



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110564662 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910940008.9

(22)申请日 2019.09.30

(71)申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗1号

申请人 南京福斯弗瑞生物科技有限公司

(72)发明人 陆兆新 卢静 李金良 吕凤霞

别小妹 赵海珍

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

公司 32200

代理人 程斯佳

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/75(2006.01)

C12N 15/53(2006.01)

C12R 1/125(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

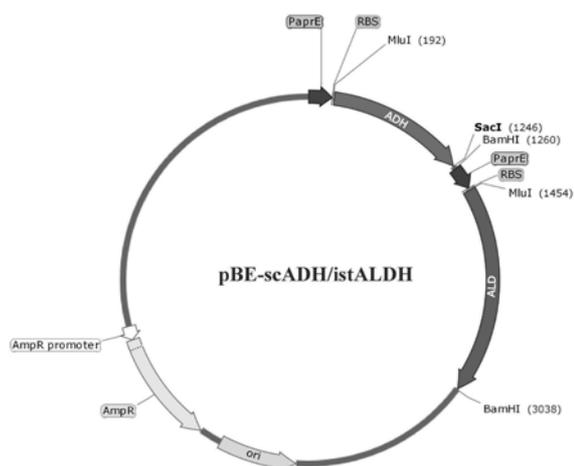
序列表3页 附图5页

(54)发明名称

一种整合型高效表达乙醛脱氢酶枯草杆菌的构建方法

(57)摘要

本发明涉及一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建方法,属于生物技术领域。本发明通过整合型质粒实现乙醛脱氢酶在枯草杆菌中的分泌表达,重组菌株在乙醛脱毒领域具有广阔的应用前景。本发明通过共表达分子伴侣PrsA和CsaA,大大提高重组枯草杆菌中乙醛脱氢酶的产量。



1. 一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建方法,其特征在于包含以下构建步骤:

1) 整合型乙醛脱氢酶分泌表达载体的构建:采用酶切连接的方法将乙醛脱氢酶基因片段与整合质粒连接,转化大肠杆菌感受态细胞,氨苄青霉素抗性平板筛选得到乙醛脱氢酶整合型分泌表达载体;

2) 整合型分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建:包括重组质粒的转化和重组菌株的筛选:

(1) 重组质粒的转化:将测序验证正确的乙醛脱氢酶整合型分泌表达载体转化枯草杆菌BS000感受态细胞,涂布抗性平板,过夜培养,PCR检测验证转化子;

(2) 重组菌株的筛选:培养含有整合型质粒的枯草杆菌转化子,在42℃,180rpm培养24小时后涂布LB平板,42℃培养得到单菌落,诱导第一次重组;将单菌落转接到新鲜的LB中37℃,180rpm培养24小时后诱导发生第二次重组,整个质粒从基因组上掉下来,涂布LB平板并在42℃培养,筛选在红霉素抗性的LB平板上不长,但在无抗性的LB平板能够生长的克隆,得到的菌株则为目的基因插入的重组菌株,通过PCR的方法检测istALDH基因,验证正确的菌株即为整合型表达乙醛脱氢酶的重组枯草杆菌,将其命名为BS001,验证片段为istALDH,1578bp。

2. 根据权利要求1所述的一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建方法,其特征在于,所述的整合型质粒是含有启动子、信号肽和整合位点淀粉酶amyE同源序列的整合型质粒。

3. 根据权利要求2所述的一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建方法,其特征在于,所述的整合型质粒包括任何能够在枯草杆菌和大肠杆菌中复制的并且能够通过同源重组的方法整合到染色体上的质粒,所述整合型质粒可以是pDG364, pMLK83, pDG1661, pDG1662, pDG1728, pDG1730, pDG1664, pAX01, pSG1170, pSG1729, pMAD, pCBS或pCBS595中的任意一种,整合质粒中包含的启动子可以是P_{amyQ}、P_{amyE}、P_{amyL}、P_{aprE}、P_{xy1A}或P_{glv}中的任意一种或其他启动子,信号肽可以是SP_{aprE}、SP_{chiA}、SP_{wapA}、SP_{pbpA}或SP_{yzqG}中的任意一种或其他信号肽。

4. 权利要求1-3之一所述的一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的分子伴侣过表达载体的构建方法,包括扩增分子伴侣PrsA或CsaA,回收扩增产物,连接到T载体,转化大肠杆菌感受态细胞,氨苄青霉素抗性平板筛选后利用限制性内切酶酶切T载体和自主复制型表达质粒,转化大肠杆菌感受态细胞,氨苄青霉素抗性平板筛选得到分子伴侣过表达载体,所述自主复制型表达质粒包括pWB980、pHP13、pHP13-43、pHT01、pHT43、pHT304、pMK3、pMK4、pHCMC04、pHCMC05、pMA5或pBE中的任意一种。

5. 权利要求1所述的一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的分子伴侣过表达菌株的构建方法,首先制备权利要求1-3之一所述的一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌化学感受态细胞,将权利要求4所述的分子伴侣过表达载体转化感受态细胞,涂布卡那霉素抗性平板,过夜培养,PCR检测验证转化子。

一种整合型高效表达乙醛脱氢酶枯草杆菌的构建方法

一、技术领域

[0001] 本发明涉及一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建方法,属于生物技术领域。

二、背景技术

[0002] 乙醛脱氢酶超家族包含一系列不同的酶,它们在自然界中广泛分布,在所有三个分类域(古细菌,真细菌和真核生物)中都有代表,在整个进化史中有至关重要的作用。乙醛脱氢酶家族的成员能够代谢生理学和病理生理学相关的醛,可防止内源性和/或外源性的有毒醛的积累,以免对细胞稳态和生物功能产生不利的影

[0003] 醛类在自然界中广泛存在,乙醛存在于食品,烟草烟雾和饮料中。大多数醛类有毒性,如乙醛能够致突变、致癌。可以利用乙醛脱氢酶降解乙醛和其他醛类的特性,开发可用于乙醛脱毒、治理石油和工业污染物的新型酶制剂和菌制剂。例如,一些乙醛脱氢酶底物范围较广,能以不同碳链长度的脂肪醛和芳香为底物,可用于石油降解。乙醛脱氢酶还可以去除水产养殖业(虾池)和工业废水中的醛类污染。此外,乙醛脱氢酶还可以用于乙醛的检测,将乙醛脱氢酶和乙醇氧化酶固定在碳电极上制成生物传感器,可用于检测酒后呼出的气体中及环境中的乙醛及其他醛类。

[0004] 大多数乙醛脱氢酶是从动物肝脏,胰腺或微生物中提取的,成本较高,难以实现大规模生产。因此,通过基因克隆、异源表达和微生物发酵是获得乙醛脱氢酶的理想途径。枯草杆菌是一种重要的高效分泌异源蛋白的“细胞工厂”,具有很高的应用价值。其培养简单快速,分泌蛋白能力强且有良好的发酵基础和生产技术,是目前原核表达系统中表达和分泌外源蛋白的理想宿主。此外,枯草杆菌没有致病性,是安全微生物(Generally Recognized as Safe,GRAS),具有开发为食品级宿主的潜力。

[0005] 本发明采用同源重组的方法将乙醛脱氢酶的表达盒整合到枯草杆菌的基因组中,实现乙醛脱氢酶的分泌表达。并通过过表达分子伴侣PrsA和CsaA大大提高乙醛脱氢酶的生产量,得到的重组菌株在乙醛脱毒等领域具有广阔的应用前景。

三、发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的在于运用基因工程技术手段,提供一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建方法。

[0008] 技术方案

[0009] 一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建方法,其特征在于包含以下构建步骤:

[0010] 1) 整合型乙醛脱氢酶分泌表达载体的构建,采用酶切连接的方法将乙醛脱氢酶基因片段与整合质粒连接,转化大肠杆菌感受态细胞,氨苄青霉素抗性平板筛选得到乙醛脱氢酶整合型分泌表达载体;

[0011] 2) 整合型分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建,包括重组质粒的转化和重组菌株的筛选:

[0012] (1) 重组质粒的转化:将测序验证正确的乙醛脱氢酶整合型分泌表达载体转化枯草杆菌BS000感受态细胞,涂布抗性平板,过夜培养,PCR检测验证转化子;

[0013] (2) 重组菌株的筛选:培养含有整合型质粒的枯草杆菌转化子,在42℃,180rpm培养24小时后涂布LB平板,42℃培养得到单菌落,诱导第一次重组,此时整个质粒的序列全部将插入到枯草杆菌基因组中;将单菌落转接到新鲜的LB中37℃,180rpm培养24小时后诱导发生第二次重组,整个质粒从基因组上掉下来,涂布LB平板并在42℃培养,消除掉下来的质粒,筛选在红霉素抗性的LB平板上不长,但在无抗性的LB平板能够生长的克隆,得到的菌株则为目的基因插入的重组菌株,通过PCR的方法检测istALDH基因,验证正确的菌株即为整合型表达乙醛脱氢酶的重组枯草杆菌,将其命名为BS001,验证片段为istALDH,1578bp。

[0014] 所述的整合型质粒是含有启动子、信号肽和整合位点淀粉酶amyE同源序列的整合型质粒。

[0015] 所述的整合型质粒包括任何能够在枯草杆菌和大肠杆菌中复制的并且能够通过同源重组的方法整合到染色体上的质粒,所述整合型质粒可以是pDG364,pMLK83,pDG1661,pDG1662,pDG1728,pDG1730,pDG1664,pAX01,pSG1170,pSG1729,pMAD,pCBS或pCBS595中的任意一种。整合质粒中包含的启动子可以是P_{amyQ}、P_{amyE}、P_{amyL}、P_{aprE}、P_{xy1A}或P_{glv}的任意一种或其他启动子,信号肽可以是SP_{aprE}、SP_{chiA}、SP_{wapA}、SP_{pbpA}或SP_{yzqG}的任意一种或其他信号肽。

[0016] 所述的一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的分子伴侣过表达载体的构建方法,包括扩增分子伴侣PrsA或CsaA,回收扩增产物,连接到T载体,转化大肠杆菌感受态细胞,氨苄青霉素抗性平板筛选后利用限制性内切酶酶切T载体和自主复制型表达质粒,转化大肠杆菌感受态细胞,氨苄青霉素抗性平板筛选得到分子伴侣过表达载体,所述自主复制型表达质粒包括pWB980、pHP13、pHP13-43、pHT01、pHT43、pHT304、pMK3、pMK4、pHCMC04、pHCMC05、pMA5或pBE中的任意一种。

[0017] 所述的一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的分子伴侣过表达菌株的构建方法,首先制备所述的一种整合型高效分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌化学感受态细胞,将所述的分子伴侣过表达载体转化感受态细胞,涂布卡那霉素抗性平板,过夜培养,PCR检测验证转化子。

[0018] 有益效果

[0019] 本发明将乙醛脱氢酶基因整合到枯草杆菌的基因组中,实现了其在枯草杆菌中的分泌表达,并通过过表达分子伴侣PrsA和CsaA大大提高乙醛脱氢酶的产量。

[0020] 1. 构建了整合型乙醛脱氢酶的枯草杆菌,实现了乙醛脱氢酶的高效分泌表达。对重组菌株BS001进行发酵验证,在发酵上清液中能够检测到乙醛脱氢酶活力;37℃,180rpm发酵36小时,乙醛脱氢酶产量最高,为38U/mL。

[0021] 2. 过表达分子伴侣PrsA和CsaA显著提高了重组枯草杆菌中乙醛脱氢酶的产量。对重组菌株进行发酵验证,在发酵上清液中能够检测到乙醛脱氢酶活力;37℃,180rpm发酵36小时,乙醛脱氢酶产量最高,产量分别提高81.36%和370%。

附图说明

[0022] 图1 pBE-scADHistALDH质粒图谱

[0023] 图2 pCBS/istALDH质粒图谱

[0024] 图3 pCBS/istALDH质粒构建及转化枯草杆菌验证电泳图

[0025] M:DNA Marker:1kb; (a) pCBS/istALDH构建连接产物转化大肠杆菌转化子PCR验证电泳图; (b) pCBS/istALDH转化枯草杆菌转化子PCR验证电泳图; (c) 双交换重组菌株PCR验证电泳图

[0026] 图4 pBE/csaA质粒图谱

[0027] 图5 pBE/prsA质粒图谱

[0028] 图6 pBE/csaA, pBE/csaA构建PCR验证电泳图

[0029] M:DNA Marker:1kb; (a) pBE/csaA构建连接产物转化大肠杆菌转化子PCR验证电泳图; (b) pBE/prsA构建连接产物转化大肠杆菌转化子PCR验证电泳图; (c) pBE/csaA和pBE/prsA质粒双酶切(Spe I和Sal I)验证电泳图;

[0030] 图7 pBE/csaA, pBE/csaA转化枯草杆菌PCR验证电泳图

[0031] M:DNA Marker:DS2000;

[0032] (a) pBE/csaA转化整合型分泌表达IstALDH枯草杆菌转化子PCR验证电泳图; (b) pBE/prsA转化合型分泌表达IstALDH枯草杆菌转化子PCR验证电泳图

四、具体实施方式

[0033] 实施例1:整合型乙醛脱氢酶分泌表达载体的构建

[0034] 整合型质粒可以是任何能够在枯草杆菌和大肠杆菌中复制的并且能够通过同源重组的方法整合到染色体上的任何质粒。整合位点可以是枯草杆菌中的淀粉酶(amyE)、木聚糖酶(xylA)以及其他任何的枯草杆菌生长非必须基因的位置。整合质粒中包含的启动子可以是P_{amyQ}、P_{amyE}、P_{amyL}、P_{aprE}、P_{xy1A}或P_{glv}的任意一种或其他启动子,信号肽可以是SP_{aprE}、SP_{chiA}、SP_{wapA}、SP_{pbpA}或SP_{yzG}的任意一种或其他信号肽。该实施例中以整合质粒pCBS,整合位点为amyE基因,启动子P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}和信号肽SP_{chiA}为例描述整合型质粒的构建过程,其他的质粒构建原理和过程与此相同。

[0035] (1) 根据NCBI数据库上的基因序列设计引物,以枯草杆菌168(购自上海古朵生物科技有限公司)基因组为模板,用引物1和2进行PCR扩增并回收得到amyE-up片段(GenBank:CP019662.1,327416到327936,525bp),用引物3和4进行PCR扩增并回收得到amyE-down片段(GenBank:CP019662.1,328748到329395,648bp)。

[0036] 根据NCBI数据库上的乙醛脱氢酶istALDH基因序列(GI:257782115)设计引物(下划线为酶切位点),以质粒pBE-scADH/istALDH为模板(图1,pBE-scADH/istALDH质粒来源Jing Lu,et al.,2018.Alleviating acute alcoholic liver injury in mice with Bacillus subtilis co-expressing alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase.Journal of Functional Foods.49,342-350.),用引物5和6进行PCR扩增并回收得到istALDH片段(1578bp)。

[0037] 根据NCBI数据库上的基因序列,设计串联启动子和信号肽——P_{amyL}(Sequence ID:CP032538.1,4394156到4394757,601bp),P_{amyQ}-P_{cry3A}(Sequence ID:

KT350984.1,23到641,619bp)和SPchiA (Sequence ID:CP032538.1,316361到316455,96bp),将基因序列送往南京金斯瑞生物公司进行合成。以合成的基因序列为模板,用引物7和8进行PCR扩增并回收得到P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA片段(1316bp)。

[0038] 1:5' AGATCTCGCCCGATCAGACCAGTTTTTAATTTG3' (Bgl II)

[0039] 2:5' GCTTCCAAGCACAAAGAAGGACGCAATGTTTGCAAAACGATTC3'

[0040] 3:5' CATTACGATGGCCCAATAATCAATGGGGAAGAGAACCGC3'

[0041] 4:5' ACGCGTCAAGTGAACGATGGTAAACTGACAGGCACG3' (Mlu I)

[0042] 5:5' GAATGGGGAAGTTGCAAAAGCCATGCTTAGAACTGCAACTAGAAC3'

[0043] 6:5' CGGTTCTCTTCCCATTTGATAATTGTGGGCCATCGTTAATGGC3'

[0044] 7:5' GTTTTGAATCGTTTTGCAAACATTGCGTCCTTCTTTGTGCTTGAAG3'

[0045] 8:5' GTTCTAGTTGCAGTTCTAAGCATGGCTTTTGCAACTTCCCATTCAC3'

[0046] (2) 以amyE-up片段和P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA片段为模板,用引物1和8进行PCR扩增得到(amyE-up)-(P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA)片段(809bp)。

[0047] 然后以(amyE-up)-(P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA)片段和istALDH片段为模板,用引物1和6进行PCR扩增得到(amyE-up)-(P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA)-(istALDH)片段(2387bp)。

[0048] 最后以(amyE-up)-(P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA)-(istALDH)片段和amyE-down片段为模板,用引物1和4(下划线为酶切位点)进行PCR扩增得到(amyE-up)-(P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA)-(istALDH)-(amyE-down)片段(3035bp)。

[0049] (3) 对(amyE-up)-(P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA)-(istALDH)-(amyE-down)片段进行加A反应,用T4连接酶将其与pMD19T载体连接,转化到大肠杆菌感受态细胞,得到重组质粒pMD19T/istALDH(Bgl II-Kpn I)。用限制性内切酶Bgl II和Mlu I双酶切pMD19T/istALDH(Bgl II-Kpn I)和整合质粒pCBS(pCBS质粒来源Meng,Fanqiang,et al.Enhanced expression of pullulanase in Bacillus subtilis by new strong promoters mined from transcriptome data,both alone and in combination.Frontiers in Microbiology 2018(9):2635.),对酶切产物进行纯化,用T4连接酶将线性化的温度敏感型整合载体pCBS片段与(amyE-up)-(P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA)-(istALDH)-(amyE-down)片段连接,转化大肠杆菌感受态细胞,将测序正确的质粒命名为pCBS/istALDH(图2)。

[0050] 实施例2:整合型分泌表达乙醛脱氢酶的枯草杆菌的构建

[0051] 重组质粒的转化:将重组质粒pCBS/istALDH转化枯草杆菌168化学感受态细胞,涂布LB抗性平板(含有5μg/mL红霉素),37℃过夜培养,PCR检测验证转化子。

[0052] 重组菌株的筛选:pCBS质粒是大肠杆菌和枯草杆菌的温敏型穿梭质粒,含有革兰氏阳性菌的温度敏感型复制起始位点。在37℃条件下,可在宿主菌中进行自主复制,当温度升高至42℃时,则无法进行自主复制。

[0053] 将含有重组质粒的枯草杆菌在42℃,180rpm培养24小时后涂布LB平板,42℃培养得到单菌落,诱导第一次重组。第一次重组在amyE-up和amyE-down位置均可以发生,在本实施例中以在amyE-up位置发生重组为例。

[0054] 由于枯草杆菌基因组和重组质粒pCBS/istALDH都含有amyE-up片段,菌株会在培养过程中在基因组的amyE-up位置发生重组,得到的单菌落的基因组出现amyE up-P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SPchiA-istALDH-amyEdown-质粒上的序列和amyEup-基因组序列-amyE down的

序列。

[0055] 将单菌落转接到新鲜的LB中37℃,180rpm培养24小时后诱导发生第二次重组。涂布LB平板并在42℃培养,筛选出在红霉素抗性的LB平板上不生长,但在无抗性的LB平板能够生长的克隆。第二次重组在wprA-down位置发生,得到的菌株则为目的基因插入的重组菌株,通过PCR的方法可以检测istALDH基因(基因组出现amyE up-P_{amyL}-P_{amyQ}-P_{cry3A}-SP_{chiA}-istALDH-amyE down的序列)。

[0056] 验证正确的菌株即为整合型表达乙醛脱氢酶的重组枯草杆菌,将其命名为BS001(图3,验证片段为istALDH,1578bp)。

[0057] 对重组菌株BS001进行发酵验证,在发酵上清液中能够检测到乙醛脱氢酶活力;37℃,180rpm发酵36小时,乙醛脱氢酶产量最高,为38U/mL。

[0058] 实施例3:枯草杆菌过表达CsaA菌株的构建(CsaA基因GenBank:CP041757 REGION:2078810—2079142,333bp)

[0059] 以枯草杆菌168的基因组DNA为模板,用引物9和10(下划线为酶切位点)进行PCR扩增,回收PCR产物(CsaA,333bp)。对回收产物进行加A反应,用T4连接酶将其与pMD19T载体(Takara公司)连接,转化大肠杆菌感受态细胞,得到重组质粒pMD19T/csaA(Mlu I-Sal I)。用限制性内切酶Mlu I和Sal I双酶切pMD19T/csaA(Mlu I-Sal I)和表达质粒pBE(购自Takara公司,Cat#3380),对酶切产物进行纯化,用T4连接酶将线性化的pBE载体与csaA片段连接,转化大肠杆菌感受态细胞,将测序正确的质粒命名为pBE/csaA(图4,图6a&c,验证片段为csaA,333bp)。

[0060] 将验证正确的重组质粒pBE/csaA转重组菌株BS001感受态细胞,涂布LB抗性平板(含有10μg/mL卡那霉素),37℃培养过夜,通过PCR检测验证转化子(图7a,验证片段为casA,333bp),将验证正确的菌株命名为BS002。对重组菌株BS002进行发酵验证,在发酵上清液中能够检测到乙醛脱氢酶活力;37℃,180rpm发酵36小时,乙醛脱氢酶产量最高,为69U/mL,产量提高81.36%。

[0061] 9:5' ACGCGTATGGCAGTTATTGATGACTTTGAGA3' (Mlu I)

[0062] 10:5' GTCGACTTATCCGATTTTTGTGCCGTT3' (Sal I)

[0063] 实施例4:枯草杆菌过表达PrsA菌株的构建(PrsA基因GenBank:CP041757 REGION:1069955—1070833,879bp)

[0064] 以枯草杆菌168基因组DNA为模板,用引物11和12(下划线为酶切位点)进行PCR扩增,回收PCR产物(PrsA,879bp)。对回收产物进行加A反应并对出产物进行回收,用T4连接酶将其与pMD19T载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞,得到重组质粒pMD19T/prsA(Mlu I-Sal I)。用限制性内切酶Mlu I和Sal I双酶切pMD19T/prsA(Mlu I-Sal I)和表达质粒pBE(购自Takara公司,Cat#3380),对酶切产物进行纯化,用T4连接酶将线性化的pBE载体与prsA片段连接,转化大肠杆菌感受态细胞,将测序正确的质粒命名为pBE/prsA(图5,图6b&c,验证片段为prsA,879bp)。

[0065] 将重组质粒pBE/prsA转化重组菌株BS001感受态细胞,涂布LB抗性平板(含有10μg/mL卡那霉素),37℃培养过夜,通过PCR检测验证转化子(图7b,验证片段为prsA,879bp),将验证正确的菌株命名为BS003。对重组菌株BS003进行发酵验证,在发酵上清液中能够检测到乙醛脱氢酶活力;37℃,180rpm发酵36小时,乙醛脱氢酶产量最高,为180U/mL,产量提

高370%。

[0066] 11:5' ACGCGTATGAAGAAAATCGCAATAGCAGC3' (Mlu I)

[0067] 12:5' GTCGACTTATTTAGAATTGCTTGAAGATGAAGAA3' (Sal I)。

序列表

- <110> 南京农业大学,南京福斯弗瑞生物科技有限公司
 <120> 一种整合型高效表达乙醛脱氢酶枯草杆菌的构建方法
 <141> 2019-09-30
 <160> 12
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)
 <400> 1
 agatctcgcc cgatcagacc agtttttaat ttg 33
 <210> 2
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)
 <400> 2
 gcttccaagc acaaagaagg acgcaatggt tgcaaaacga ttc 43
 <210> 3
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)
 <400> 3
 cattaacgat ggcccacaat aatcaatggg gaagagaacc gc 42
 <210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)
 <400> 4
 acgctcaag tgaacgatgg taaactgaca ggcacg 36
 <210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)
 <400> 5
 gaatggggaa gttgcaaaag ccatgcttag aactgcaact agaac 45
 <210> 6
 <211> 43

<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
<400> 6	
cggttctctt cccattgat aattgtgggc catcgtaat ggc	43
<210> 7	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
<400> 7	
gttttgaatc gttttgcaaa cattgcgtcc ttctttgtgc ttggaag	47
<210> 8	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
<400> 8	
gttctagttg cagttctaag catggctttt gcaactccc cattcac	47
<210> 9	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
<400> 9	
acgcgtatgg cagttattga tgactttgag a	31
<210> 10	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
<400> 10	
gtcgacttat ccgatttttg tgccgtt	27
<210> 11	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
<400> 11	
acgcgtatga agaaaatcgc aatagcag	28
<210> 12	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
<400> 12	

gtcgacttat ttagaattgc ttgaagatga agaa

34

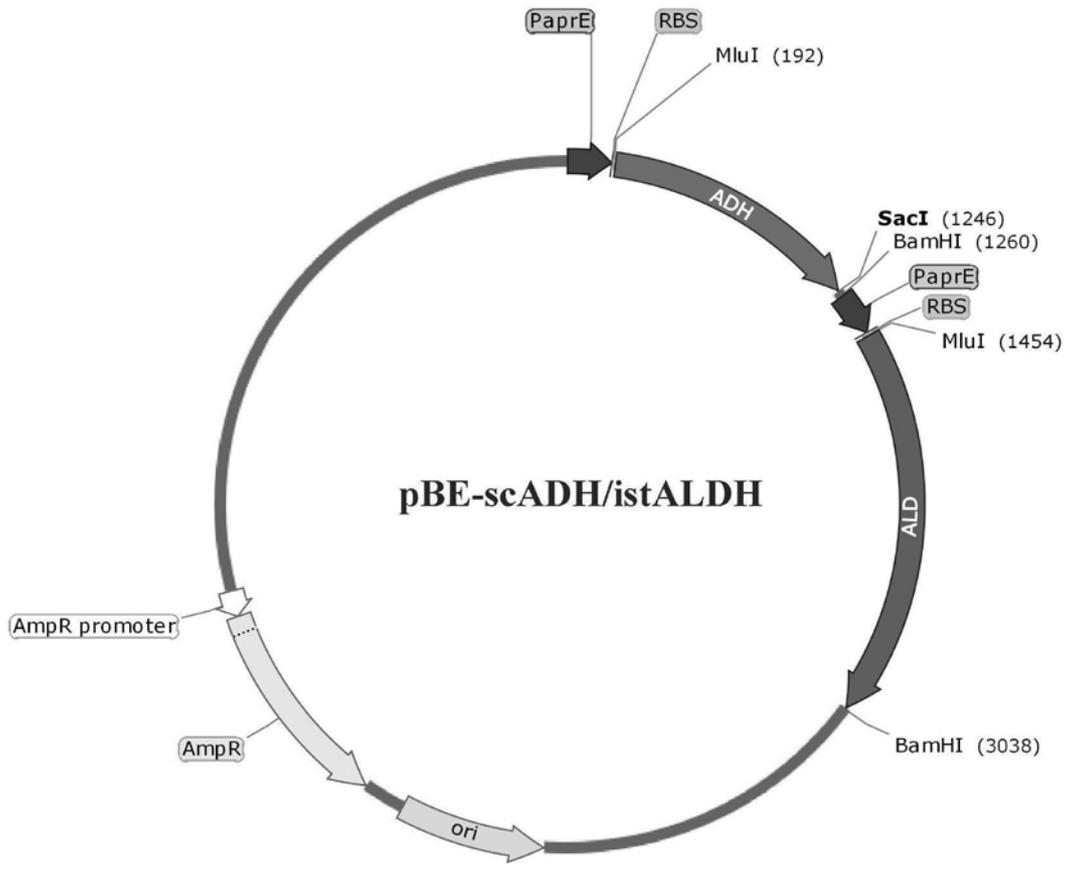


图1

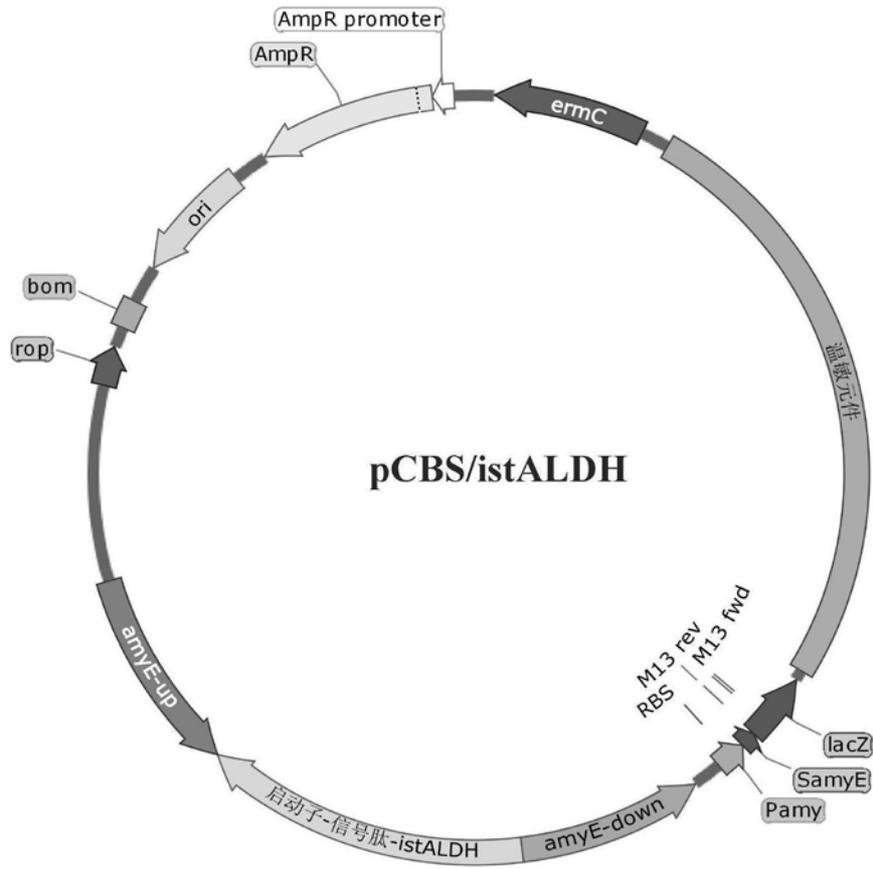


图2

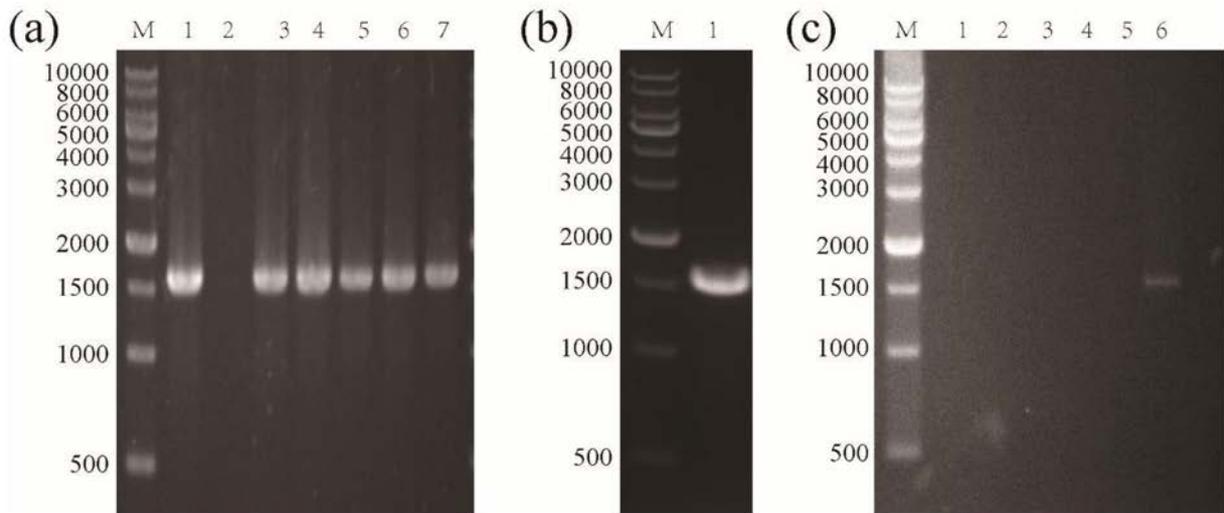


图3

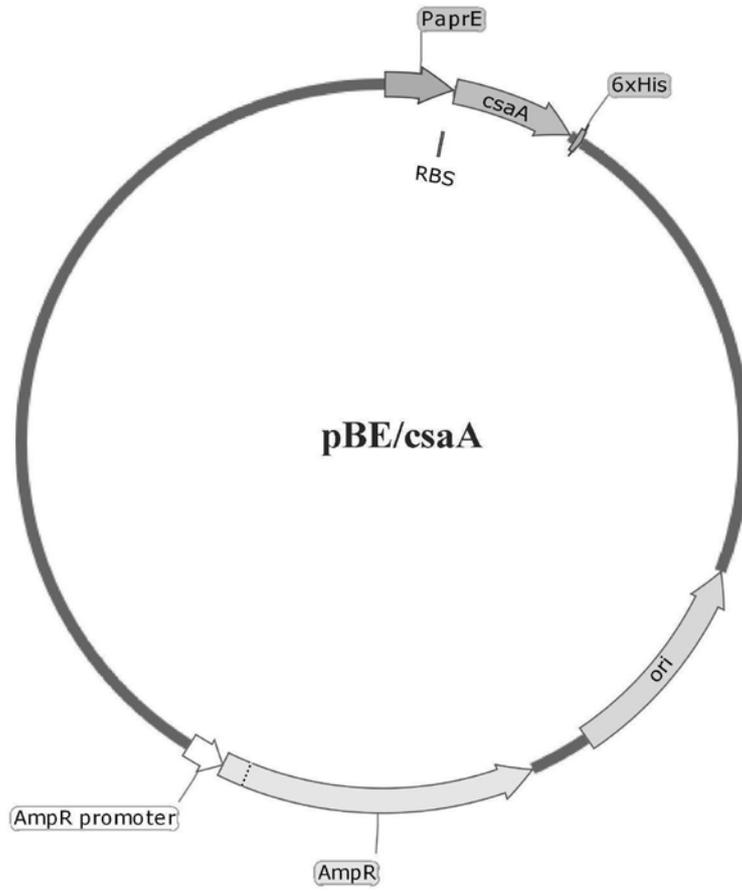


图4

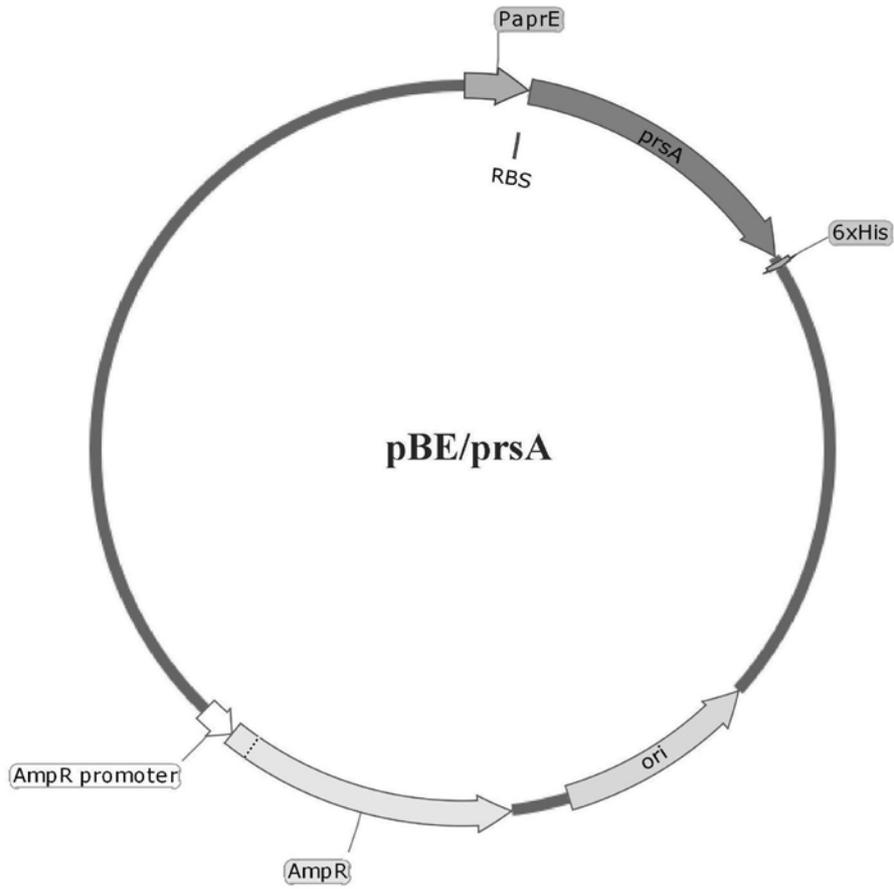


图5

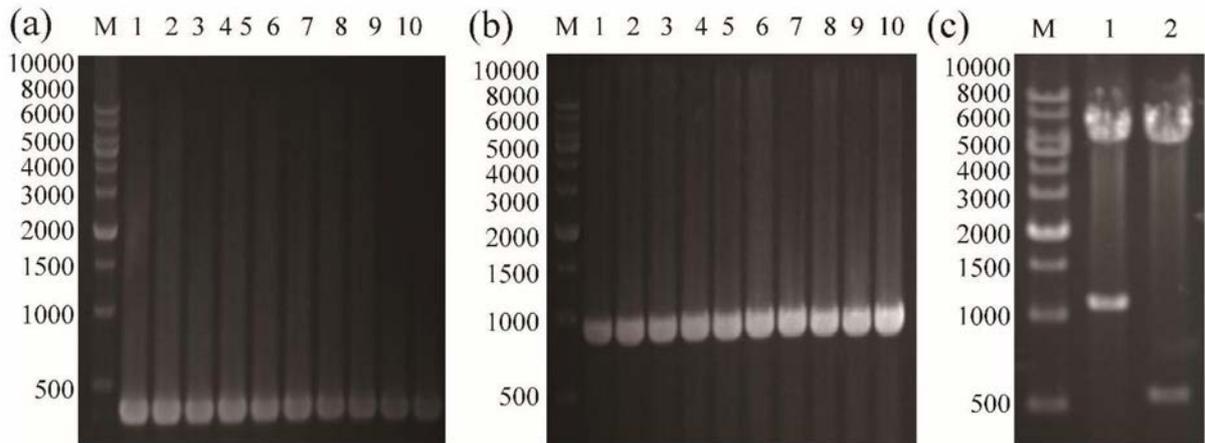


图6

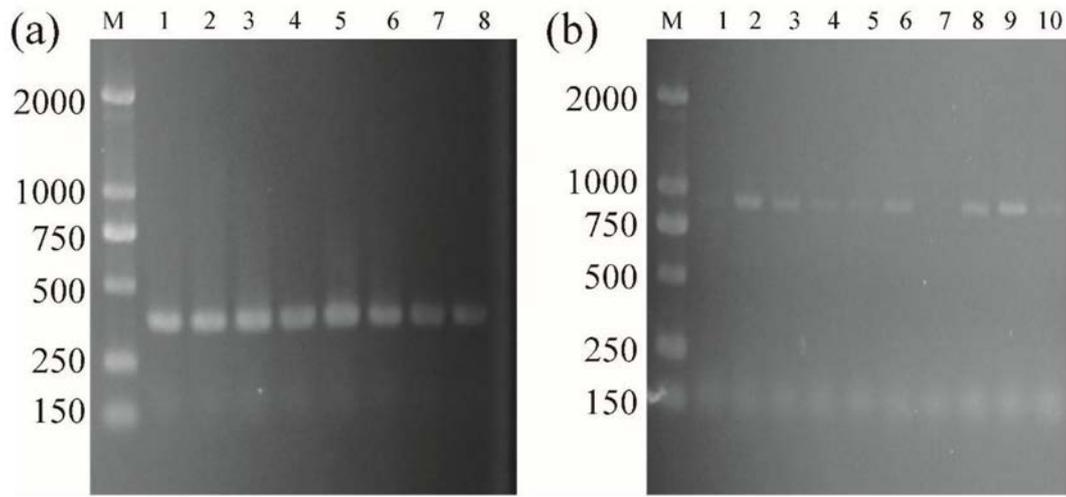


图7