



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109370969 B

(45)授权公告日 2020.09.04

(21)申请号 201811336101.0

C12N 15/74(2006.01)

(22)申请日 2018.11.12

C12N 15/31(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12P 7/18(2006.01)

申请公布号 CN 109370969 A

C12R 1/22(2006.01)

(43)申请公布日 2019.02.22

(56)对比文件

(73)专利权人 江南大学

CN 104611244 A,2015.05.13

地址 214000 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

CN 1763175 A,2006.04.26

审查员 樊艳爽

(72)发明人 诸葛斌 李玉石 滕宇 陆信曜 宗红 宋健

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 张勇

(51)Int.Cl.

权利要求书1页 说明书5页

C12N 1/21(2006.01)

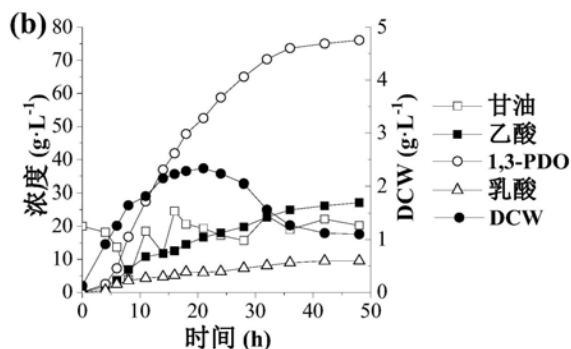
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

一种重组克雷伯氏杆菌在制备1,3-丙二醇中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种重组克雷伯氏杆菌在制备1,3-丙二醇中的应用,具体涉及一种过表达发酵乳杆菌甘油通道蛋白基因glpF的重组克雷伯氏杆菌在生产1,3-丙二醇的应用,属于基因工程领域。本发明应用基因工程方法,将带有发酵乳杆菌中glpF基因的过表达载体转入到克雷伯氏杆菌中,从而提高其对甘油的转运能力,提高克雷伯氏杆菌中1,3-丙二醇的产量。重组菌经5L发酵罐补料分批发酵,1,3-丙二醇产量高达76g/L。此发明成功改变了克雷伯氏杆菌中对甘油的转运能力,为选育1,3-丙二醇高产菌株提供了崭新的思路。



1. 一种重组克雷伯氏杆菌,其特征在于,是将来源于发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 的甘油通道蛋白基因g1pF连接到过表达载体pEtac-28a上,将连接产物转入克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 中得到的,所述甘油通道蛋白基因g1pF的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的重组克雷伯氏杆菌,其特征在于,所述过表达载体pEtac-28a是在pET-28a载体中引入了序列如SEQ ID NO.3所示的tac启动子。

3. 根据权利要求2所述的重组克雷伯氏杆菌,其特征在于,所述过表达载体pEtac-28a的构建方法为:用EcoRI和BamHI双酶切pET28a和序列如SEQ ID NO.3所示的tac启动子,酶切后,PCR连接得到过表达载体pEtac-28a(+)

4. 权利要求1-3任一所述的重组克雷伯氏杆菌的构建方法,其特征在于,所述方法包括:

(1) 从发酵乳杆菌基因组中克隆甘油通道蛋白基因g1pF,其核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.1所示;

(2) 将g1pF基因与权利要求3中的过表达载体pEtac-28a相连,并将连接产物转化到克雷伯氏杆菌中。

5. 根据权利要求4所述的构建方法,其特征在于,所述转化采用的是电击转化法。

6. 权利要求1-3任一所述的重组克雷伯氏杆菌在生产1,3-丙二醇中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述应用是以甘油为底物,以重组克雷伯氏杆菌为生物催化剂,采用分批补料的方式进行全细胞转化。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述应用包括将菌液以4%接种量接种到5L发酵罐中,厌氧,补料分批发酵重组克雷伯氏杆菌,流加甘油,使其保持在15-30g/L,37℃,150rpm,发酵48h。

9. 权利要求1-3任一所述的重组克雷伯氏杆菌在纺织、塑料及食品包装领域的应用。

一种重组克雷伯氏杆菌在制备1,3-丙二醇中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种重组克雷伯氏杆菌在制备1,3-丙二醇中的应用,具体涉及在克雷伯氏杆菌中异源表达发酵乳杆菌甘油通道蛋白基因glpF以提高1,3-丙二醇产量的方法和应用,属于基因工程技术领域。

背景技术

[0002] 1,3-丙二醇(1,3-PDO)是国际上公认的六大石化新产品之一,在纺织、塑料及食品包装等方面具有广阔的应用前景,其主要功能是作为合成聚酯、聚醚和聚亚氨酯的单体,它和对苯二甲酸聚合而成的聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)是合成新型优质聚酯材料的前体物质。

[0003] 1,3-丙二醇的生产方法有化学合成法和生物转化法。生物转化法生产1,3-丙二醇具有合成工艺相对简单,反应条件较温和,不产生有毒中间物,生产过程更为环保的优点,已成为当前的研究热点。用于生产1,3-丙二醇的菌株均为细菌,主要有克雷伯氏杆菌、弗氏柠檬菌、成团肠杆菌、短乳杆菌、布氏乳杆菌、丁酸梭状芽孢杆菌和巴斯德梭菌等,它们只能利用甘油而不能由糖类廉价碳源直接产生1,3-丙二醇。其中克雷伯氏杆菌具有相对较高的底物转化率和生产强度,因而得到了较多关注。

[0004] 然而,用微生物生产大宗化学品如生物燃料的一个主要挑战是生产目的产物通常对细胞有毒。已知许多短链醇通过损伤细胞膜来降低细胞活力和干扰必要的生理过程。因此,细胞必须权衡生产和生存,降低目的产物潜在产量。

[0005] 1,3-丙二醇在克雷伯氏杆菌中合成,是生长偶联的代谢产物,当克雷伯氏杆菌利用甘油作为碳源生产1,3-丙二醇时,存在产量较低,转化率较低等缺点,且在克雷伯氏杆菌发酵生产时随着1,3-丙二醇的积累会抑制底物的转运。而目前,对克雷伯氏杆菌的改造提高1,3-丙二醇的生产研究,主要集中在代谢途径和还原力的再生这两个方面,但是已有的改造方式并不能改善底物的转运效率。因此,提供一种产量和转化率较高、能够改善底物转运效率的生产1,3-丙二醇的方法,对于1,3-丙二醇的生产应用具有重要的意义。

发明内容

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种重组克雷伯氏杆菌,其特征在于,是将来源于发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)的甘油通道蛋白基因glpF连接到过表达载体上,将连接产物转入克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)中得到的。

[0007] 在本发明的一种实施方式中,所述甘油通道蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述甘油通道蛋白基因glpF的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 在本发明的一种实施方式中,所述过表达载体是在pET-28a载体中引入了序列如SEQ ID NO.3所示的tac启动子。

[0009] 在本发明的一种实施方式中,所述过表达载体的构建方法为:用EcoRI和BamHI双酶切pET28a和序列如SEQ ID NO.3所示的tac启动子,酶切后,PCR连接得到过表达载体

pEtac-28a(+)

[0010] 本发明的第二个目的是提供一种上述的重组克雷伯氏杆菌的构建方法,所述方法包括:

[0011] (1) 从发酵乳杆菌基因组中克隆甘油通道蛋白基因g1pF,其核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.1所示;

[0012] (2) 将g1pF基因与上述的过表达载体pEtac-28a相连,并将连接产物转化到克雷伯氏杆菌中。

[0013] 在本发明的一种实施方式中,所述转化采用的是电击转化法。

[0014] 本发明的第三个目的是提供上述的重组克雷伯氏杆菌在制备1,3-丙二醇中的应用。

[0015] 在本发明的一种实施方式中,所述应用是以甘油为底物,以重组克雷伯氏杆菌为生物催化剂,采用分批补料的方式进行全细胞转化。

[0016] 在本发明的一种实施方式中,所述应用包括将菌液以4%接种量接种到5L发酵罐中,厌氧,补料分批发酵重组克雷伯氏杆菌,流加甘油,使其保持在15-30g/L,37°C,150rpm,发酵48h。

[0017] 本发明应用基因工程方法,将带有发酵乳杆菌中g1pF基因的过表达载体转入到克雷伯氏杆菌中,从而提高其对甘油的转运能力,提高克雷伯氏杆菌中1,3-丙二醇的产量。重组菌经5L发酵罐补料分批发酵,1,3-丙二醇产量高达76g/L。此发明成功改变了克雷伯氏杆菌中对甘油的转运能力,为选育1,3-丙二醇高产菌株提供了崭新的思路。

附图说明

[0018] 图1:野生型克雷伯氏杆菌补料分批发酵代谢产物分析。

[0019] 图2:过表达发酵乳杆菌来源的g1pF基因的重组克雷伯氏杆菌在5L发酵罐中补料分批发酵代谢产物分析。

[0020] 图3:过表达大肠杆菌来源的g1pF基因的重组克雷伯氏杆菌在5L发酵罐中补料分批发酵代谢产物分析。

[0021] 图4:过表达内源的g1pF基因的重组克雷伯氏杆菌在5L发酵罐中补料分批发酵代谢产物分析。

具体实施方式

[0022] (一) 培养基

[0023] 5L发酵罐($g \cdot L^{-1}$):甘油20,酵母膏8,葡萄糖6, $MgSO_4 \cdot 2$, $(NH_4)_2SO_4 \cdot 2$, $KH_2PO_4 \cdot 7.5$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O \cdot 0.005$, $VB_{12} \cdot 0.015$,微量元素溶液 $0.1mL \cdot L^{-1}$,使用 $10mol \cdot L^{-1}KOH$ 调pH值至8.5。

[0024] 微量元素溶液($g \cdot L^{-1}$): $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O \cdot 0.35$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O \cdot 2$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O \cdot 0.25$, $H_3BO_3 \cdot 0.6$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O \cdot 1$, $CuCl_2 \cdot 0.2$, $ZnCl_2 \cdot 0.7$ 。

[0025] (二) 发酵产物检测方法

[0026] 生物量测定:细胞干重(DCW)根据分光光度计测量 OD_{600} 值与干重对应关系公式 $10D_{600}=0.36g \cdot L^{-1}$ 。

[0027] 产物测定:利用HPLC法检测发酵产物中1,3-PDO、2,3-BDO、乙酸、甘油、琥珀酸及乳酸的浓度,紫外与示差折光检测器检测,所用交换柱类型为有机酸离子交换柱,工作柱温:60℃;配制流动相浓度:5mmol·L⁻¹H₂SO₄;设定检测流速:0.6mL·min⁻¹。

[0028] 实施例1重组克雷伯氏杆菌的制备

[0029] 根据发酵乳杆菌基因组序列使用引物P1-XhoI(序列信息如SEQ ID NO.4所示)和P2-SalI(序列信息如SEQ ID NO.5所示)PCR扩增获得发酵乳杆菌glpF基因序列片段。

[0030] PCR反应体系如下(50μL):25μL Prime STAR Max Premix(2×),15pmol引物,150ng模板,加双蒸水至50μL(引物为上海生工生物工程有限公司合成,其余购自TaKaRa公司),扩增反应条件如下:98℃,10s;55℃,15s,72℃,1kb/min,30个循环。

[0031] 将得到的PCR扩增产物进行电泳验证,验证成功后采用UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司)进行切胶回收。

[0032] 回收程序按照试剂盒说明:用刀片切出目标片段放入1.5mL的离心管,加结合缓冲液,置于55℃水浴加热10min,每2min混匀一次;胶完全融化后转移至套在收集管内的UNIQ-10柱中,室温放置2min;8000rpm下,离心1min;倒掉收集管中的废液,加入500μL冲洗液,8000rpm下,室温离心1min,将该步骤重复一次;倒掉收集管中的废液,将UNIQ-10柱放入同一个收集管中,12000rpm离心15s;将UNIQ-10柱放入一根新的1.5mL的离心管中,在柱子膜中央滴加50μL的双蒸水,室温放置3min;12000rpm离心1min,离心管中的液体即为回收的DNA片段。

[0033] 购买商业化pET-28a,人工合成序列信息如SEQ ID NO.3所示的tac启动子。用EcoRI和BamHI双酶切pET-28a质粒和PCR的tac启动子片段,通过酶切连接进行pEtac-28a(+)表达载体的构建,将构建好的过表达载体用XhoI和Sal I双酶切,反应体系如下(50μL):5μL QucikCut Buffer(10×),1μL XhoI,1μL Sal I,30μL pEtac-28a(+)质粒片段,加双蒸水至50μL(酶购自TaKaRa公司)。反应条件如下:37℃,3h。酶切完后采用Cycle-Pure Kit(200)柱回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司)进行回收。回收程序按照试剂盒说明:酶切产物放入1.5mL的离心管,加250μL LCP buffer,轻轻离心1min;转移到收集管中的吸附柱中,室温放置2min;10000rpm,离心2min;产物重新收集到吸附柱,10000rpm,离心2min;倒掉收集管中的废液,加入700μL DNA Wash Buffer,10000rpm室温离心1min,将该步骤重复一次;倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入同一个收集管中,10000rpm离心15s;将吸附柱放入新的1.5mL的离心管中,打开盖子,65℃,静置10min;在柱子膜中央滴加50μL的双蒸水,室温放置3min;8000rpm离心1min,离心管中的液体即为酶切回收的pEtac-28a(+)片段。

[0034] 回收的glpF序列片段用XhoI和SalI进行双酶切,反应体系如下(50μL):5μL QucikCut Buffer(10×),1μL XhoI,1μL SalI,30μL glpF序列片段,加双蒸水至50μL(酶购自TaKaRa公司)。反应条件如下:37℃,3h。酶切完后采用Cycle-Pure Kit(200)柱回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司)进行回收。回收程序按照试剂盒说明:酶切产物放入1.5mL的离心管,加250μL CP buffer,6000rpm离心1min;转移到收集管中的吸附柱中,室温放置2min;10000rpm,离心2min;产物重新收集到吸附柱,10000rpm,离心2min;倒掉收集管中的废液,加入700μL DNA Wash Buffer,10000rpm室温离心1min,将该步骤重复一次;倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入同一个收集管中,10000rpm离心15s;将吸附柱放入新的1.5mL的离心管中,打开盖子,65℃,静置10min;在柱子膜中央滴加50μL的双蒸水,室温放置3min;

8000rpm离心1min,离心管中的液体即为酶切回收的DNA片段。

[0035] 酶切的g1pF序列片段和pEtac-28a(+)片段使用T4连接酶(购自TaKaRa公司)按照说明书指示完成连接工作,连接体系如下:1 μ L T4连接酶,1 μ L T4连接缓冲液,1 μ L pEtac-28a(+)片段,7 μ L g1pF序列片段,加双蒸水至10 μ L。反应条件如下:16 $^{\circ}$ C,12h。并将连接产物转化大肠杆菌JM109,涂布卡那平板上,37 $^{\circ}$ C下培养8h。挑取单菌落进行PCR验证,引物为P1和P2,选择条带大小正确的单菌落接LB摇瓶培养基。37 $^{\circ}$ C,8h,150rpm,提取质粒(质粒抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司),进行XhoI和SalI双酶切双酶切验证。

[0036] 验证成功后转化克雷伯氏杆菌,转化方法采用电击转化法。步骤如下:挑取单菌落接种于LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,150rpm培养10-16h活化,活化后的种子液按2%的接种量转接到50mL的LB培养基中,培养至OD₆₀₀值约为0.4-0.6左右。将菌液放入冰中放置15-20min,然后4 $^{\circ}$ C,8000rpm离心收集菌体,弃去上清液。用预冷的10%甘油洗涤菌体2-3次(每次离心后放冰上静置5min)。弃尽上清,加入2-3mL的10%预冷甘油重悬菌体,并转入已灭菌的1.5mL的离心管中,每管100 μ L用于电转化。加入待转化的质粒5 μ L,冰上放置10-15min。1mm的电转杯在超净工作台中烘干,并放入冰中冷却20min。将混有质粒的感受态细胞加入电转杯中,2500V电压下,电击5ms左右,电击完成后加入1mL的LB培养基混匀后吸出全部菌液,37 $^{\circ}$ C后培养1h,然后涂布于相应的卡那霉素抗性平板上,获得表达g1pF基因的重组克雷伯氏杆菌,37 $^{\circ}$ C,150rpm培养8h。

[0037] 实施例2发酵过表达来源于发酵乳杆菌的g1pF基因的重组克雷伯氏杆菌

[0038] 将实施例1中得到的菌液以4%接种量接种到5L发酵罐中,厌氧,补料分批发酵,流加甘油使其保持在15-30g/L,37 $^{\circ}$ C,150rpm,发酵48h。不定时取样通过分光光度计测OD₆₀₀及通过HPLC测发酵产物。如图1和图2所示,与野生型相比,过表达发酵乳杆菌g1pF基因的克雷伯氏杆菌的1,3-丙二醇浓度由55g/L提高到76g/L,甘油转化率由56%提高到60%。

[0039] 结果表明,在克雷伯氏杆菌中过表达发酵乳杆菌甘油通道蛋白基因g1pF,可以提高克雷伯氏杆菌生产1,3-丙二醇能力和甘油转运效率。

[0040] 对比例1

[0041] 在克雷伯氏杆菌中过表达大肠杆菌来源的甘油通道蛋白基因g1pF,将其与过表达载体pEtac-28a(+)连接,转入克雷伯氏杆菌中,得到重组克雷伯氏杆菌。发酵得到的重组克雷伯氏杆菌生产1,3-丙二醇。

[0042] 以大肠杆菌基因组DNA为模板,使用引物P3-XhoI(序列信息如SEQ ID NO.6所示)和P4-SalI(序列信息如SEQ ID NO.7所示)PCR扩增获得大肠杆菌g1pF基因序列片段(NCBI-GeneID:948422)。

[0043] 其余步骤与实施例1和实施例2中一致,所得到的过表达大肠杆菌g1pF基因的重组克雷伯氏杆菌在5L发酵罐中发酵时,其产量相较于野生型没有明显的变化,如图3所示。结果表明,异源表达大肠杆菌来源的甘油通道蛋白基因g1pF,并将得到的重组菌应用于制备1,3-丙二醇,不能取得良好的效果。

[0044] 对比例2

[0045] 在克雷伯氏杆菌中过表达内源的甘油通道蛋白基因g1pF,将其与过表达载体pEtac-28a(+)连接,转入克雷伯氏杆菌中,得到重组克雷伯氏杆菌。发酵得到的重组克雷伯氏杆菌生产1,3-丙二醇。

[0046] 以克雷伯氏杆菌基因组DNA为模板,使用引物P5-XhoI(序列信息如SEQ ID NO.8所示)和P6-SalI(序列信息如SEQ ID NO.9所示)进行PCR扩增获得内源g1pF基因序列片段(序列信息如SEQ ID NO.10所示)。

[0047] 其余步骤与实施例1和实施例2中一致,所得到的过表达内源g1pF基因的重组克雷伯氏杆菌在5L发酵罐中发酵时,其1,3-PDO产量为65g/L,比本发明提供的重组菌的发酵产量低17%。

[0048] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 江南大学

[0003] <120> 一种重组克雷伯氏杆菌在制备1,3-丙二醇中的应用

[0004] <160> 10

[0005] <170> PatentIn version 3.3

[0006] <210> 1

[0007] <211> 711

[0008] <212> DNA

[0009] <213> Lactobacillus fermentum

[0010] <400> 1

[0011] atgcatcaat tatttgcgga attaatgggg actgccctca tgatcgtcctt tggggtcggg 60

[0012] gttcacgccc acaccgtcctt aaatgacacg aagtaccacg gttcaggaca tttatcttgc 120

[0013] atcacaacat gggcatttgg catctcaatc gttttattca tttttccaac catctgcctg 180

[0014] aaccagcca tggcatttgc gcaattctta ctggggaaca tgagctttag ccggttcatt 240

[0015] gaagtctcga tttttgaaact ggctgggtggg gtcattggcg ccgtcattgt gtacatcatg 300

[0016] tacgccgacc aatttaagca ctctacgac aatatcgacc cagtgcgat ccgaaacatt 360

[0017] ttctcaacgg gtcttggtgt ccggaacctg ccacggaact tcttcgtcga attctttgac 420

[0018] accttcattt tctgacggc gatcatggtc atcgtgacca tcaagacacc cggcatcatg 480

[0019] ccaattggca tcggactgct ggtctgggcc attgggatgg gacttggggg cccaactggg 540

[0020] ttcgcatga accaagcgcg ggacctcggc ccacgaattg cttttgccat cctgccattg 600

[0021] aagaacaagg cggcagccga ttggcaatac gggttgcttg tgccctggtat cgcaccgttc 660

[0022] tttggtgccg cggcagccgt catttttgca aaattttatc ttggacttta a 711

[0023] <210> 2

[0024] <211> 236

[0025] <212> PRT

[0026] <213> Lactobacillus fermentum

[0027] <400> 2

[0028] Met His Gln Leu Phe Ala Glu Leu Met Gly Thr Ala Leu Met Ile Val

[0029] 1 5 10 15

[0030] Phe Gly Val Gly Val His Ala Asp Thr Val Leu Asn Asp Thr Lys Tyr

[0031] 20 25 30

[0032] His Gly Ser Gly His Leu Phe Ala Ile Thr Thr Trp Ala Phe Gly Ile

[0033] 35 40 45

[0034] Ser Ile Val Leu Phe Ile Phe Pro Thr Ile Cys Leu Asn Pro Ala Met

[0035] 50 55 60

[0036] Ala Phe Ala Gln Phe Leu Leu Gly Asn Met Ser Phe Ser Arg Phe Ile

[0037] 65 70 75 80

[0038] Glu Val Ser Ile Phe Glu Leu Ala Gly Gly Val Ile Gly Ala Val Ile

[0039]		85		90		95
[0040]	Val Tyr Ile Met Tyr Ala Asp Gln Phe Lys His Ser Tyr Asp Asn Ile					
[0041]		100		105		110
[0042]	Asp Pro Val Thr Ile Arg Asn Ile Phe Ser Thr Gly Pro Gly Val Arg					
[0043]		115		120		125
[0044]	Asn Leu Pro Arg Asn Phe Phe Val Glu Phe Phe Asp Thr Phe Ile Phe					
[0045]		130		135		140
[0046]	Leu Thr Ala Ile Met Val Ile Val Thr Ile Lys Thr Pro Gly Ile Met					
[0047]		145		150		155
[0048]	Pro Ile Gly Ile Gly Leu Leu Val Trp Ala Ile Gly Met Gly Leu Gly					
[0049]		165		170		175
[0050]	Gly Pro Thr Gly Phe Ala Met Asn Gln Ala Arg Asp Leu Gly Pro Arg					
[0051]		180		185		190
[0052]	Ile Ala Phe Ala Ile Leu Pro Leu Lys Asn Lys Ala Ala Ala Asp Trp					
[0053]		195		200		205
[0054]	Gln Tyr Gly Leu Leu Val Pro Gly Ile Ala Pro Phe Phe Gly Ala Ala					
[0055]		210		215		220
[0056]	Ala Ala Val Ile Phe Ala Lys Phe Tyr Leu Gly Leu					
[0057]		225		230		235
[0058]	<210> 3					
[0059]	<211> 29					
[0060]	<212> DNA					
[0061]	<213> 人工合成					
[0062]	<400> 3					
[0063]	ttgacaatta atcatcggct cgtataatg 29					
[0064]	<210> 4					
[0065]	<211> 32					
[0066]	<212> DNA					
[0067]	<213> 人工合成					
[0068]	<400> 4					
[0069]	ccgctcgaga tgcataatt atttgcggaa tt 32					
[0070]	<210> 5					
[0071]	<211> 38					
[0072]	<212> DNA					
[0073]	<213> 人工合成					
[0074]	<400> 5					
[0075]	acgcgtcgac ttaaagtcca agataaaatt ttgcaaaa 38					
[0076]	<210> 6					
[0077]	<211> 39					

[0078]	<212> DNA	
[0079]	<213> 人工合成	
[0080]	<400> 6	
[0081]	gcgtcgacgg gtttcatatg agtcaaacat caaccttga	39
[0082]	<210> 7	
[0083]	<211> 29	
[0084]	<212> DNA	
[0085]	<213> 人工合成	
[0086]	<400> 7	
[0087]	ccctcgagtt acagcgaagc tttttgttc	29
[0088]	<210> 8	
[0089]	<211> 35	
[0090]	<212> DNA	
[0091]	<213> 人工合成	
[0092]	<400> 8	
[0093]	acgcgtcgac atgagccaaa catcaacctt aaaag	35
[0094]	<210> 9	
[0095]	<211> 40	
[0096]	<212> DNA	
[0097]	<213> 人工合成	
[0098]	<400> 9	
[0099]	ccctcgaggc gtcgacttac agcgaagctt tatgttgagt	40
[0100]	<210> 10	
[0101]	<211> 852	
[0102]	<212> DNA	
[0103]	<213> Klebsiella Peneumoniae	
[0104]	<400> 10	
[0105]	atgagccaaa catcaacctt aaaaggccag tgcatecgag agttcctcgg taccgggttg	60
[0106]	ttgatctttt tcggcgttgg gtgcgtggct gcgctcaagg tcgcgggagc cagcttcggg	120
[0107]	caatgggaaa tcagcatcat ctggggctctg ggcgtcgcca tggcgatcta cctgaccgct	180
[0108]	ggggctctccg gtgcgcacct taacctgcg gtaactatcg cactctggct gttcgcctgc	240
[0109]	ttcgatggcc gcaaagtggc cccttttatac atttcgcaat tcgctggcgc cttttgcgct	300
[0110]	gcggcattag tttacgggct ttactacaat cttttcctcg attatgaaac cacccacat	360
[0111]	atggctccgcg gcagcgtaga aagcctcgat ctggccggca tcttctccac ctatccgaac	420
[0112]	ccgcataatca attttgtgca ggccttcgcg gtagagatgg tgattaccgc tatcctgatg	480
[0113]	ggcgtcatcc tggcgtgac cgacgatggc aacggcgtgc cgcgcggccc gcttgcctccg	540
[0114]	ctgctgatcg gcctgctgat tgcggtgatt ggcgcctcca tgggaccgct gaccggcttc	600
[0115]	gccatgaacc cggcgcgtga tateggccc aaagctttcg cctggctggc cggctggggc	660
[0116]	gacgtgcct tcaccggcgg caaagatatt ccttatttcc tggtgccgct gtgcgcaccg	720

[0117] gtggtcggcg cggcgctggg cgcattcagc tatcgtaage tgattggccg tcacctgcct 780
[0118] tgcgacacct gcgtggagga agagcaacag ageccctcct cttccaccac tcaacataaa 840
[0119] gcttcgctgt aa 852

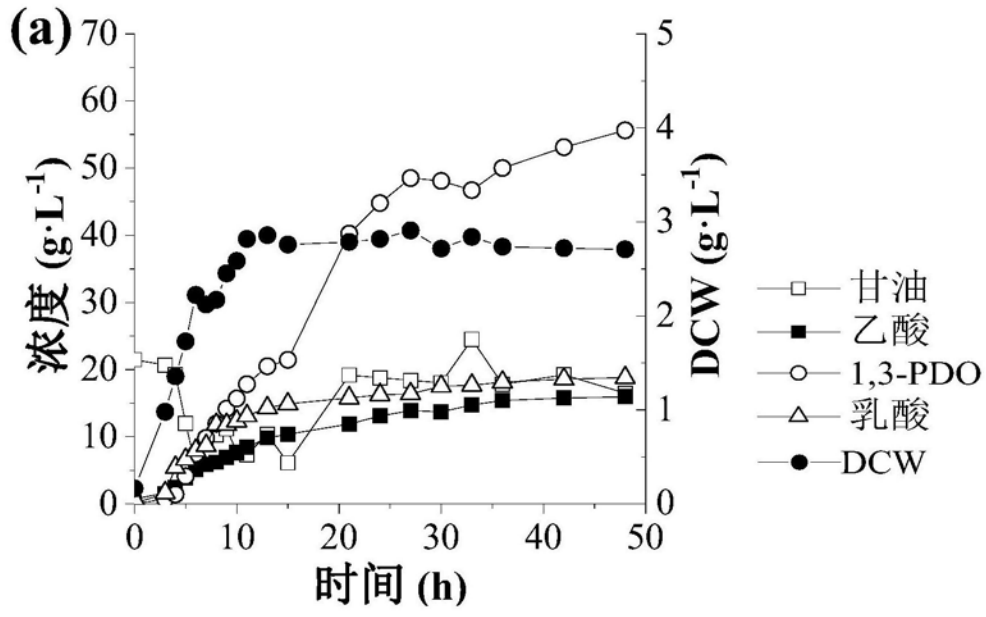


图1

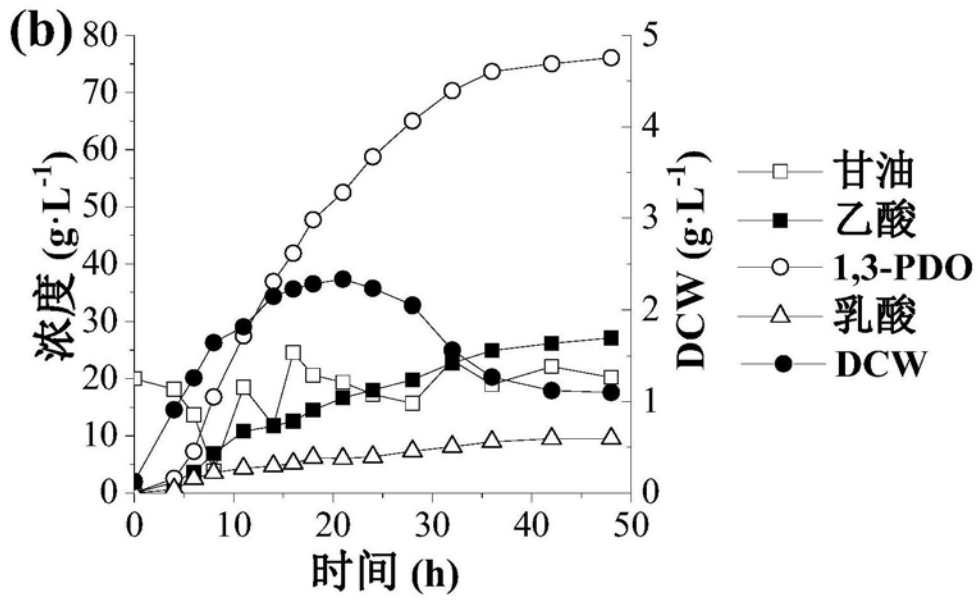


图2

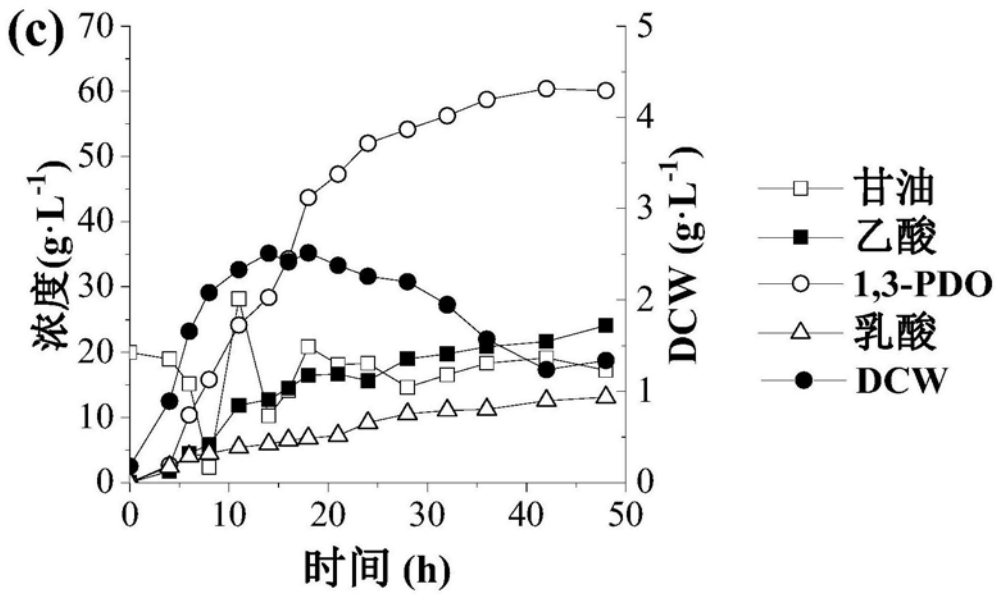


图3

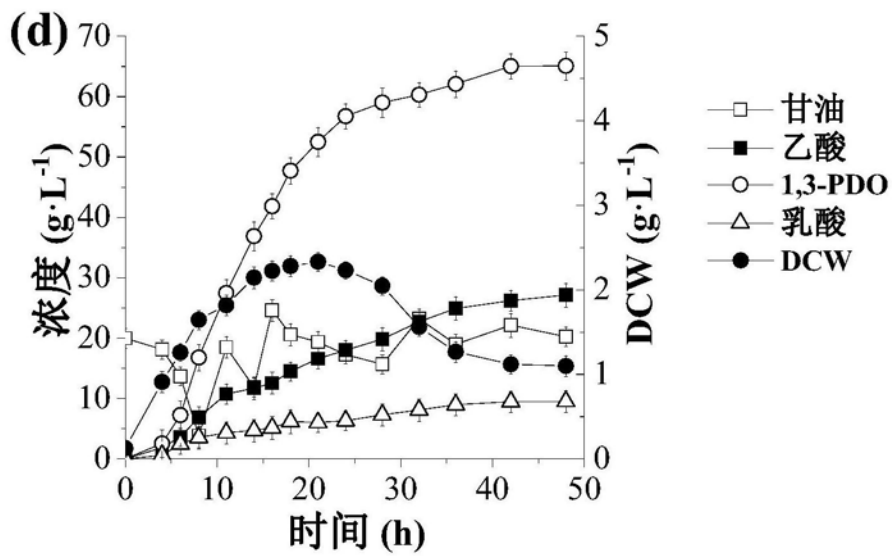


图4