



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111117940 B

(45) 授权公告日 2022.06.28

(21) 申请号 201911230411.9	CN 102586384 A,2012.07.18
(22) 申请日 2019.12.04	CN 102392003 A,2012.03.28
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111117940 A	CA 2790919 A1,2011.09.01
(43) 申请公布日 2020.05.08	CN 106148373 A,2016.11.23
(83) 生物保藏信息 CGMCC No . 17454 2019.03.28	CN 102586312 A,2012.07.18
(73) 专利权人 天津大学 地址 300350 天津市津南区海河教育园雅 观路135号天津大学北洋园校区	CN 106414713 A,2017.02.15
(72) 发明人 齐崑 尤生萍 张伟 芮金秋 吕佳佳 苏荣欣	CA 2207271 A1,1996.06.13
(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代 理事务所 12201 专利代理师 曹玉平	CN 101831474 A,2010.09.15
(51) Int. Cl . C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01) C12P 13/00 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)	CN 107630011 A,2018.01.26
(56) 对比文件 CN 105316270 A,2016.02.10 CN 105316270 A,2016.02.10 CN 103789292 A,2014.05.14 CA 2670074 A1,2008.08.07 GB 600787 A,1948.04.19 JP 2013146269 A,2013.08.01	CN 109652356 A,2019.04.19
	CN 105238807 A,2016.01.13
	CN 101240258 A,2008.08.13
	GB 0311395 D0,2003.06.25
	CN 105441497 A,2016.03.30
	CN 109704978 A,2019.05.03
	CN 103757086 A,2014.04.30
	CN 109880859 A,2019.06.14
	JP W02007123186 A1,2009.09.03
	CN 105368766 A,2016.03.02
	CN 101285085 A,2008.10.15
	CN 102424811 A,2012.04.25
	CN 107446874 A,2017.12.08
	KR 20160085602 A,2016.07.18
	CN 1884501 A,2006.12.27
	CN 103923954 A,2014.07.16 (续)
	审查员 李捷
	权利要求书1页 说明书5页 序列表8页

(54) 发明名称
一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌与方法

(57) 摘要
本发明涉及一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌与方法,该工程菌是保藏编号为CGMCC NO.17454的大肠杆菌;该方法为:(1)构建外源表达L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1,L-赖氨酸脱羧酶的酶活是空载菌株的100倍左

右;(2)将富含L-赖氨酸脱羧酶全细胞透性处理,透性细胞的L-赖氨酸脱羧酶的酶活是全细胞的3~4.5倍;(3)利用透性细胞催化L-赖氨酸盐酸盐生产戊二胺,戊二胺产率在90%~100%,浓度可达220g/L以上。本发明利用L-赖氨酸盐酸盐高效生产戊二胺,与现有工艺相比,无需诸如昂贵的IPTG诱导剂,传质效率高,产率高,生产成本低,更具经济可行性和实用性。

CN 111117940 B

[接上页]

(56) 对比文件

齐雁斌 等. 利用大肠杆菌全细胞催化赖氨酸发酵液生产1,5-戊二胺.《化工进展》.2017,

牛涛等. 一步法生产1,5-戊二胺谷氨酸棒杆菌基因工程菌的构建.《中国生物工程杂志》.2010, (第08期),

邓杰. 用于生物合成戊二胺的新的L-赖氨酸脱羧酶基因的功能鉴定和突变研究.《中国优秀博士学位论文全文数据库(电子期刊)基础科学辑》.2020, (第06期),

SHI-YUAN MENG 等. Nucleotide Sequence of the Escherichia coli cad Operon: a System for Neutralization of Low Extracellular pH.《JOURNAL OF BACTERIOLOGY》.1992, 第174卷(第8期),

李乃强. 赖氨酸脱羧酶高效表达、分子定向进化及其催化合成戊二胺的反应过程特性.《中国优秀博士学位论文全文数据库(电子期刊)基础科学辑》.2017, (第02期),

1. 一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1,其特征是所述大肠杆菌TJU-cadA-1保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,分类命名为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),保藏编号为CGMCC No.17454,大肠杆菌TJU-cadA-1高产戊二胺的大肠杆菌工程菌的制备方法,包含如下步骤:

1) 以序列Seq id no.1和Seq id no.2为引物,以pET-22b空载质粒作为模板,通过PCR扩增获得pET-22b载体DNA序列,序列为Seq id no.3;

2) 以序列Seq id no.4和Seq id no.5为引物,以大肠杆菌基因组为模板,通过菌落PCR扩增获得Pcad启动子序列,序列为Seq id no.6;

3) 以序列Seq id no.7和Seq id no.8为引物,以大肠杆菌基因组为模板,通过菌落PCR扩增获得L-赖氨酸脱羧酶DNA序列,序列为Seq id no.9;

4) 通过pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Ki技术手段将序列Seq id no.3,Seq id no.6和Seq id no.9连接成环形成重组质粒pET-22b-cadA,序列为Seq id no.10;通过CaCl₂转化法将重组质粒pET-22b-cadA转入大肠杆菌BL21 (DE3) 获得大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1。

2. 如权利要求1所述的大肠杆菌TJU-cadA-1高产戊二胺的方法,其特征是包含以下步骤:

1) 大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1发酵:将大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1接种至每升含有1~50g酵母粉、1~50g蛋白胨、1~30g NaCl、1~1000mg氨苄的液体培养基中,在16~45℃,50~350rpm条件下,外源表达L-赖氨酸脱羧酶,培养1~24h后,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的全细胞;

2) 对发酵所得的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1全细胞进行透性处理,离心后获得透性细胞;

3) 以L-赖氨酸盐酸盐为底物,采用步骤2)所述的透性细胞催化制备戊二胺。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征是所述步骤2)的透性处理是采用有机溶剂与水体积比为15%~50%的有机溶液,透性处理富含L-赖氨酸脱羧酶的全细胞,处理条件为0~40℃,50~300rpm,处理时间为1min~2h,透性处理结束后,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的透性细胞。

4. 如权利要求3述的方法,其特征是所述的有机溶剂包括甲醇、乙醇、甲苯或氯仿。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征是所述步骤3)是在反应釜中加入浓度为100~500g/L的底物L-赖氨酸盐酸盐、浓度为0.1mmol~100mmol的pH 5.6的Na₂HPO₄柠檬酸缓冲液、浓度为1~20g/L的透性细胞和浓度为0.0001~0.1mM的磷酸吡哆醛,在温度为30~45℃,转速为50~400rpm条件下催化制备戊二胺,催化时间为6~24h,戊二胺产率达到90%~100%。

一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌与方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物催化技术领域,具体地,涉及一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌与方法。

背景技术

[0002] 1,5-戊二胺,又名1,5-二氨基戊烷、五亚甲基二胺、尸胺和尸毒素,是具有多种生物活性的天然多胺,其可通过赖氨酸脱羧酶(E.C.4.1.1.18)催化L-赖氨酸直接脱羧形成,并且广泛分布在原核生物和真核生物中。1,5-戊二胺在农业,医药和工业中具有广泛应用,特别是作为生物基聚酰胺的重要单体。戊二胺与不可再生化石燃料六亚甲基二胺相似的结构,可替代其合成常规聚酰胺,尤其是与可再生资源的二羧酸聚合生成生物基聚酰胺。因此,戊二胺是一种重要的工业化学品。

[0003] 目前,戊二胺的生产方法主要包括微生物发酵法或全细胞生物转化法,菌种来源都是通过菌种改造来提高赖氨酸脱羧酶的表达量,往往都需采用昂贵诱导剂来诱导表达,从而大大提高了生产成本。关于微生物发酵法,其菌株通常由具有生产赖氨酸能力的谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌改造而来,存在的主要问题是发酵周期长,转化率低等;此外,发酵体系复杂,杂质多,戊二胺分离纯化困难,进而增加了生产成本。关于全细胞生物转化法,与微生物发酵法区别是先通过发酵富集菌株,再分离获得全细胞菌株,用于生物催化底物L-赖氨酸转化生成戊二胺,优点在于体系杂质少,易于纯化。但是,该方法存在的问题是传质效率低:细胞壁和细胞膜的天然屏障功能限制了底物L-赖氨酸向细胞胞内转运,以及细胞中积累的戊二胺产物的释放,从而降低了转化效率,限制了工业规模化生产。针对于现有方法的诸多问题,本发明开发了一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌和方法,包括外源表达L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌制备方法,也包括大肠杆菌工程菌发酵制备和富含L-赖氨酸脱羧酶的全细胞透性处理,还包括高产率的戊二胺催化制备。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于开发一种能够利用L-赖氨酸盐酸盐高效生产戊二胺的方法以及用于该方法的外源表达赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌。该方法无需诸如昂贵的ITPG诱导剂,传质效率高,转化率高,生产成本低。

[0005] 为了实现了上述目的,本发明的技术方案如下:

[0006] 一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌,所述大肠杆菌TJU-cadA-1保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,分类命名为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),保藏编号为CGMCC No.17454。保藏日期为2019年3月28日。

[0007] 本发明的高产戊二胺的大肠杆菌工程菌的制备方法,包含如下步骤:

[0008] 1) 以序列Seq.1和Seq.2为引物,以pET-22b空载质粒作为模板,通过PCR扩增获得pET-22b载体DNA 序列,序列为Seq.3;

[0009] 2) 以序列Seq.4和Seq.5为引物,以大肠杆菌基因组为模板,通过菌落PCR扩增获得

Pcad启动子序列,序列为Seq.6;

[0010] 3) 以序列Seq.7和Seq.8为引物,以大肠杆菌基因组为模板,通过菌落PCR扩增获得L-赖氨酸脱羧酶 DNA序列,序列为Seq.9;

[0011] 4) 通过pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Ki技术手段将序列Seq.3, Seq.6和seq.9连接成环形成重组质粒pET-22b-cadA,序列为Seq.10;通过CaCl₂转化法将重组质粒pET-22b-cadA转入大肠杆菌 BL21 (DE) 获得大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1。

[0012] 利用本发明的大肠杆菌工程菌高产戊二胺的方法,包含以下步骤:

[0013] 1) 大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1发酵;

[0014] 2) 对发酵所得的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1进行透性处理,离心后获得透性细胞;

[0015] 3) 以L-赖氨酸盐酸盐为底物,采用步骤2)所述的透性细胞催化制备高产率的戊二胺。

[0016] 所述步骤1)的发酵方法是:将大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1接种至每升含有1~50g 酵母粉、1~50g 蛋白胨、1~30g NaCl、1~1000mg氨苄的液体培养基中,在16~45℃,50~350rpm条件下,外源表达 L-赖氨酸脱羧酶,培养1~24h后,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的全细胞。

[0017] 所述步骤2)的透性处理是采用有机溶剂与水体积比为15%~50%的有机溶液,透性处理富含L-赖氨酸脱羧酶的全细胞,处理条件为0~40℃,50~300rpm,处理时间为1min~2h,透性处理结束后,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的透性细胞。

[0018] 所述的有机溶剂包括甲醇、乙醇、甲苯或氯仿。

[0019] 所述步骤3)是在反应釜中加入浓度为100~500g/L的底物L-赖氨酸盐酸盐、浓度为0.1mmol~100 mmol的pH 5.6的Na₂HPO₄柠檬酸缓冲液、浓度为1~20g/L的透性细胞和浓度为0.0001~0.1mM的磷酸吡哆醛,在温度为30~45℃,转速为50~400rpm条件下催化制备戊二胺,催化时间为6~24h,戊二胺产率达到90%~100%。

[0020] 本发明提供一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌与方法,与现有戊二胺生产技术相比具有以下优点:

[0021] (1) 本发明所述的发酵制备赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌,在发酵过程中,无需添加诱导剂即可实现赖氨酸脱羧酶的外源表达。此方法节省发酵过程中昂贵的诱导剂费用,大大降低了生产成本。

[0022] (2) 本发明所述的方法中,将富含L-赖氨酸脱羧酶的全细胞透性处理后,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的透性细胞,此方法有效的提高了细胞膜的通透性,解决了传质效率低的问题。有效的促进了底物L-赖氨酸向细胞胞内转运,以及细胞内累积产物戊二胺的释放,解除了底物以及产物对赖氨酸脱羧酶的抑制作用,提高了戊二胺的产率,而且还大幅缩短了生产周期,有效提高了生产效率。

[0023] (3) 本发明所述的方法中,戊二胺产率高达98%以上,而且生产时间短,具有很高的产率以及生产效率,并且通过无需诱导剂大肠杆菌工程菌的构建和提高传质效率的透性处理方法的建立降低了戊二胺的生产成本,故该法适用于工业化生产,且具有广阔的市场前景。

[0024] (4) 构建外源表达L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1,L-赖氨酸脱羧

酶的酶活是空载菌株的100倍左右;将富含L-赖氨酸脱羧酶全细胞透性处理,透性细胞的L-赖氨酸脱羧酶的酶活是全细胞的3~4.5倍;利用透性细胞催化L-赖氨酸盐酸盐生产戊二胺,戊二胺产率在90%~100%,浓度可达220g/L以上。

[0025] (5) 本发明利用L-赖氨酸盐酸盐高效生产戊二胺,与现有工艺相比,无需诸如昂贵的IPTG诱导剂,传质效率高,产率高,生产成本低,更具经济可行性和实用性。

具体实施方式

[0026] 下面结合实施例对本发明的技术方案做进一步阐述,但本发明所保护范围不限于此。此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本公开,并不用于限制本公开。对本发明内容所做的等同替换,或相应的改进,仍属于本发明的保护范围之内。

[0027] 实施例1. 高产戊二胺的大肠杆菌工程菌的制备方法

[0028] 以序列Seq.1和Seq.2为引物,以pET-22b空载质粒作为模板,通过PCR扩增获得pET-22b载体DNA序列,序列为Seq.3。以序列Seq.4和Seq.5为引物,以大肠杆菌基因组为模板,通过菌落PCR扩增获得P_{cad}启动子序列,序列为Seq.6。以序列Seq.7和Seq.8为引物,,以大肠杆菌基因组为模板,通过菌落PCR扩增获得L-赖氨酸脱羧酶DNA序列,序列为Seq.9。通过pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Ki技术手段将序列Seq.3,Seq.6和seq.9连接成环形成重组质粒pET-22b-cadA,序列为Seq.10。通过CaCl₂转化法将重组质粒pET-22b-cadA转入大肠杆菌BL21 (DE3) 获得大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1。大肠杆菌 TJU-cadA-1保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,分类命名为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),保藏编号为CGMCC No.17454。

[0029] 实施例2. 发酵制备大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1

[0030] 将空载大肠杆菌BL21 (DE3) 和大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1分别接种至2瓶100mL含1g/L酵母粉、1g/L蛋白胨、1g/L NaCl、1mg/L氨苄的液体培养基中,在16℃,50rpm条件下,外源表达L-赖氨酸脱羧酶,培养1h后,取样1ml发酵液,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1,进行酶活测定。发酵1h的实验结果如下:空载菌体的细胞密度OD₆₀₀为0.483,酶活为0.032U/mg;大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1的细胞密度OD₆₀₀为0.417,酶活为5.108U/mg;

[0031] 将空载大肠杆菌BL21 (DE3) 和大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1分别接种至2瓶100mL含25g/L酵母粉、25g/L蛋白胨、15g/L NaCl、500mg/L氨苄的液体培养基中,在30℃,200rpm条件下,外源表达L-赖氨酸脱羧酶,培养12h后,取样1ml发酵液,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌 TJU-cadA-1,进行酶活测定。发酵12h的实验结果如下:空载菌体的细胞密度OD₆₀₀为7.256,酶活为0.063 U/mg;大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1的细胞密度OD₆₀₀为7.159,酶活为6.259U/mg;

[0032] 将空载大肠杆菌BL21 (DE3) 和大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1分别接种至2瓶100mL含50g/L酵母粉、50g/L蛋白胨、30g/L NaCl、1000mg/L氨苄的液体培养基中,在45℃,350rpm条件下,外源表达L-赖氨酸脱羧酶,培养24h后,取样1ml发酵液,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌 TJU-cadA-1,进行酶活测定。发酵24h的实验结果如下:空载菌体的细胞密度OD₆₀₀为8.257,酶活为0.056 U/mg;大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1的细胞密度OD₆₀₀为8.149,酶活为6.986U/mg;

[0033] 由此可见,大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1无需诱导剂外源表达赖氨酸脱羧酶的酶活大约是空载大肠杆菌的100倍,明显高于空载大肠杆菌,更适于用来催化制备戊二胺。

[0034] 酶活定义:1U/mg等于每分钟每毫克细胞催化生成1 μ mol戊二胺。

[0035] 酶活测定方法:取1ml发酵液8000rpm离心5min,去上清液,加入1ml浓度为30%的乙醇溶液重悬菌体2min,8000rpm离心5min,去上清液,再加入1ml L-赖氨酸盐酸盐浓度为150g/L的PBS缓冲液(100mM,pH 5.6)和终浓度为0.01mM的磷酸吡哆醛,在37 $^{\circ}$ C,150rpm条件下反应30min后,加入300 μ l pH 9.5的过饱和NaHCO₃-NaOH缓冲液,1ml浓度为5g/L的丹磺酰氯溶液,水浴45min,加入200 μ l 氨水和2.7ml甲醇,液相检测戊二胺浓度。

[0036] HPLC高效液相色谱条件:流动相是甲醇和水体积比为8:2的混合液;流速为1ml/min;柱温为40 $^{\circ}$ C;波长为254nm,进样量为10 μ l。

[0037] 实施例3.透性处理大肠杆菌TJU-cadA-1

[0038] 分别取2瓶实例2所得的发酵液80ml,离心获得富含L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1。其一用于透性处理,另一不作处理。透性处理组加入体积比为15%的甲醇溶液重悬菌体,在0 $^{\circ}$ C,50rpm的条件下处理1min后,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的透性细胞。将上述的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1和透性细胞分别利用Na₂HPO₄-柠檬酸溶液(100mM,pH 5.6)重悬至菌体浓度为1g/L,用于实施例4的催化反应,并进行酶活测定。酶活测定结果如下:未透性处理的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1中L-赖氨酸脱羧酶的酶活为1.569U/mg,透性细胞的酶活为4.956U/mg。

[0039] 分别取2瓶实例2所得的发酵液80ml,离心获得富含L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1。其一用于透性处理,另一不作处理。透性处理组加入体积比为40%的乙醇溶液重悬菌体,在20 $^{\circ}$ C,180rpm的条件下处理1h后,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的透性细胞。将上述的未透性处理的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1和透性细胞分别利用Na₂HPO₄-柠檬酸溶液(100mM,pH 5.6)重悬至菌体浓度为10g/L,用于实施例4的催化反应,并进行酶活测定。酶活测定结果如下:未透性处理的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1中L-赖氨酸脱羧酶的酶活为1.885U/mg,透性细胞的酶活为6.935U/mg。

[0040] 分别取2瓶实例2所得的发酵液80ml,离心获得富含L-赖氨酸脱羧酶的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1。其一用于透性处理,另一不作处理。透性处理组加入体积比为50%的甲苯溶液重悬菌体,在40 $^{\circ}$ C,300rpm的条件下处理2h后,离心收集富含L-赖氨酸脱羧酶的透性细胞。将上述的未透性处理的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1和透性细胞分别利用Na₂HPO₄-柠檬酸溶液(100mM,pH 5.6)重悬至菌体浓度为20g/L,用于实施例4的催化反应,并进行酶活测定。酶活测定结果如下:未透性处理的大肠杆菌工程菌TJU-cadA-1中L-赖氨酸脱羧酶的酶活为1.489U/mg,透性细胞的酶活为6.524U/mg。

[0041] 由此可见,富含L-赖氨酸脱羧酶的透性细胞酶活大约是未透性处理的3~4.5倍,明显高于全细胞,更适于用来催化制备戊二胺。

[0042] 酶活的定义、测定方法及HPLC高效液相色谱条件如实施例2所述。

[0043] 实施例4.催化制备高产率的戊二胺

[0044] 向实施例4中含透性细胞浓度为1g/L的Na₂HPO₄-柠檬酸溶液(0.1mM,pH 5.6)中,加入浓度为0.0001 mmol/L的磷酸吡哆醛和浓度为100g/L的底物L-赖氨酸盐酸盐,在30 $^{\circ}$ C,50rpm水浴摇床中转化反应6小时后进行戊二胺浓度检测。检测结果如下:戊二胺浓度为

50.38g/L,产率为90.19%。

[0045] 向实施例4中含透性细胞浓度为10g/L的 Na_2HPO_4 -柠檬酸溶液(100mM,pH 5.6)中,加入浓度为0.1mmol/L的磷酸吡哆醛和浓度为400g/L的底物L-赖氨酸盐酸盐,在40℃,250rpm水浴摇床中转化反应18小时后进行戊二胺浓度检测。检测结果如下:戊二胺浓度为221g/L,产率为99.10%。

[0046] 向实施例4中透性细胞浓度为20g/L的 Na_2HPO_4 -柠檬酸溶液(50mM,pH 5.6)中,加入浓度为0.01 mmol/L的磷酸吡哆醛和浓度为500g/L的底物L-赖氨酸盐酸盐,在45℃,400rpm水浴摇床中转化反应24小时后进行戊二胺浓度检测。检测结果如下:戊二胺浓度为227.21g/L,产率为81.35%。

[0047] 戊二胺检测方法:样品离心去除菌体,取上清稀释1000倍,取1ml稀释后的样品,加入300ul pH 9.5 的过饱和 NaHCO_3 - NaOH 缓冲液,1ml浓度为5g/L的丹磺酰氯溶液,水浴45min,加入200ul氨水和2.7 ml甲醇,液相检测戊二胺浓度。

[0048] HPLC高效液相色谱检测条件如实施例2所述。

[0049] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 天津大学
- [0003] <120> 一种高产戊二胺的大肠杆菌工程菌与方法
- [0004] <160> 10
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 49
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] caaaaaataa tgagatccgg ctgctaaca agccccgaaag gaagctgag 49
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 38
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] gtattaatth catgtatata tccttcttaa agttaaac 38
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 5343
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] tgagatccgg ctgctaaca agccccgaaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag 60
- [0024] caataactag cataaccctc tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa 120
- [0025] ggaggaacta tatccggatt ggcaatggg acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg 180
- [0026] cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcctta gcgcccctc 240
- [0027] ctttcgcttt cttcccttc tttctcgcca cgttcgccg ctttccccgt caagctctaa 300
- [0028] atcgggggct cccttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctgac cccaaaaaac 360
- [0029] ttgattaggg tgatggttca cgtagtggc catgcctctg atagacggtt tttcgccctt 420
- [0030] tgacgttga gtccacgtt tttaatagtg gactcttgtt ccaactgga acaactca 480
- [0031] accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggtttt gccgatttcg gcctattggt 540
- [0032] taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta 600
- [0033] caatttcagg tggcactttt cggggaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 660
- [0034] aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 720
- [0035] attgaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt ccttttttg 780
- [0036] cggcattttg ctttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 840
- [0037] aagatcagtt ggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 900
- [0038] ttgagagttt tcgccccgaa gaacgtttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 960
- [0039] gtggcgcggt attatcccgt attgacgcc ggcaagagca actcggctgc gcatacaact 1020
- [0040] attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 1080
- [0041] tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taacatgag tgatacaact gcggccaact 1140

[0042]	tacttctgac aacgatcggg	ggaccgaagg agctaaccgc	ttttttgac aacatggggg	1200
[0043]	atcatgtaac tcgccttgat	cgttgggaac cggagctgaa	tgaagccata ccaaacgacg	1260
[0044]	agcgtgacac cacgatgcct	gcagcaatgg caacaacgtt	gcgcaacta ttaactggcg	1320
[0045]	aactacttac tctagcttcc	cggcaacaat taatagactg	gatggaggcg gataaagttg	1380
[0046]	caggaccact tctgcgctcg	gcccttccgg ctggctggtt	tattgctgat aaatctggag	1440
[0047]	ccggtgagcg tgggtctcgc	ggtatcattg cagcactggg	gccagatggt aagccctccc	1500
[0048]	gtatcgtagt tatctacacg	acggggagtc aggcaactat	ggatgaacga aatagacaga	1560
[0049]	tcgctgagat aggtgcctca	ctgattaagc attggtaact	gtcagaccaa gtttactcat	1620
[0050]	atatacttta gattgattta	aaacttcatt ttttaattta	aaggatctag gtgaagatcc	1680
[0051]	ttttgataa tctcatgacc	aaaatccctt aacgtgagtt	ttcgttccac tgagcgtcag	1740
[0052]	accccgtaga aaagatcaaa	ggatcttctt gagatccttt	ttttctgcgc gtaatctgct	1800
[0053]	gcttgcaaac aaaaaacca	ccgctaccag cggtggtttg	tttgccggat caagagctac	1860
[0054]	caactctttt tccgaaggta	actggcttca gcagagcgca	gataccaaat actgtccttc	1920
[0055]	tagttagacc gtagttaggc	caccacttca agaactctgt	agcaccgcct acatacctcg	1980
[0056]	ctctgctaata cctgttacca	gtggctgctg ccagtgccga	taagtcgtgt cttaccgggt	2040
[0057]	tggactcaag acgatagtta	ccgataaagg cgcagcggtc	gggctgaacg gggggttcgt	2100
[0058]	gcacacagcc cagcttgag	cgaacgacct acaccgaact	gagataccta cagcgtgagc	2160
[0059]	tatgagaaag cgccacgctt	cccgaaggga gaaaggcggg	caggtatccg gtaagcggca	2220
[0060]	gggtcggaac aggagagcgc	acgagggagc ttccaggggg	aaacgcctgg tatctttata	2280
[0061]	gtcctgtcgg gtttcgccac	ctctgacttg agcgtcgatt	tttgtgatgc tcgtcagggg	2340
[0062]	ggcggagcct atggaaaaac	gccagcaacg cggccttttt	acggttccctg gcccttttgc	2400
[0063]	ggccttttgc tcacatgttc	tttctgcgt tatcccctga	ttctgtggat aaccgtatta	2460
[0064]	ccgcctttga gtgagctgat	accgctgcc gcagccgaac	gaccgagcgc agcgagtcag	2520
[0065]	tgagcgagga agcgggaagag	cgctgatgc ggtatcttct	ccttacgcat ctgtgcggta	2580
[0066]	ttcacaccg catatatggt	gcactctcag tacaactctg	tctgatgccg catagttaag	2640
[0067]	ccagtataca ctccgctatc	gctacgtgac tgggtcatgg	ctgcgccccg acaccgccca	2700
[0068]	acaccgcctg acgcgccctg	acgggcttgt ctgctcccgg	catccgctta cagacaagct	2760
[0069]	gtgaccgtct ccgggagctg	catgtgtcag aggttttcac	cgatcacc gaaacgcgcg	2820
[0070]	aggcagctgc ggtaaagctc	atcagcgtgg tcgtgaagcg	attcacagat gtctgcctgt	2880
[0071]	tcatccgctt ccagctcgtt	gagtttctcc agaagcgtta	atgtctggct tctgataaag	2940
[0072]	cgggccatgt taagggcgg	tttttctgt ttggctactg	atgcctccgt gtaaggggga	3000
[0073]	tttctgttca tgggggtaat	gataccgatg aaacgagaga	ggatgctcac gatacgggtt	3060
[0074]	actgatgatg aacatgcccc	gttactggaa cgttgtgagg	gtaaacaact ggcggtatgg	3120
[0075]	atgcggcggg accagagaaa	aatactcag ggtcaatgcc	agcgttctgt taatacagat	3180
[0076]	gtaggtgttc cacaggtag	ccagcagcat cctgcgatgc	agatccggaa cataatggtg	3240
[0077]	cagggcctg acttccgctt	ttccagactt tacgaaacac	ggaaaccgaa gaccattcat	3300
[0078]	gttgtgtctc aggtcgcaga	cgttttgcag cagcagtcgc	ttcacgttcg ctcgcgtatc	3360
[0079]	ggtgattcat tctgctaacc	agtaaggcaa ccccgccagc	ctagccgggt cctcaacgac	3420
[0080]	aggagcacga tcatgcgcac	ccgtggggcc gccatgccgg	cgataatggc ctgcttctcg	3480
[0081]	ccgaaacgtt tgggtgcggg	accagtgacg aaggcttgag	cgaggcgtg caagattccg	3540
[0082]	aataccgcaa gcgacaggcc	gatcatcgtc gcgctccagc	gaaagcggtc ctcgccgaaa	3600
[0083]	atgaccgaga gcgctgccgg	cacctgtcct acgagttgca	tgataaagaa gacagtcata	3660

[0084]	agtgcggcga cgatagtcac gccccgcgcc caccggaagg agctgactgg gttgaaggct	3720
[0085]	ctcaagggca tcggtcgaga tcccggtgcc taatgagtga gctaacttac attaattgcg	3780
[0086]	ttgcgtcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc	3840
[0087]	ggccaacgcg cggggagagg cggtttgct attgggcgcc aggggtggtt ttcttttcac	3900
[0088]	cagtgagacg ggcaacagct gattgccctt caccgcctgg ccctgagaga gttgcagcaa	3960
[0089]	gcggtccacg ctggtttgcc ccagcaggcg aaaatcctgt ttgatggtg ttaacggcgg	4020
[0090]	gatataacat gagctgtctt cggtatcgtc gtatcccact accgagatat ccgcaccaac	4080
[0091]	gcgcagcccg gactcggtaa tggcgcgcat tgcgccagc gccatctgat cgttggcaac	4140
[0092]	cagcatcgca gtgggaacga tgccctcatt cagcatttgc atggtttgtt gaaaaccgga	4200
[0093]	catggcactc cagtcgcctt cccgttccgc tatcggctga atttgattgc gactgagata	4260
[0094]	tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag	4320
[0095]	cgcgatttgc tggtagacca atgcgaccag atgctccacg cccagtcgcg taccgtcttc	4380
[0096]	atgggagaaa ataatactgt tgatgggtgt ctggtcagag acatcaagaa ataacgccg	4440
[0097]	aacattagtg caggcagctt ccacagcaat ggcacctctg tcatccagcg gatagttaat	4500
[0098]	gatcagccca ctgacgcgtt gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac aggcttcgac	4560
[0099]	gccgttctgt tctaccatcg acaccaccac gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt	4620
[0100]	aatcgcgcg acaatttgcg acggcgcgtg cagggccaga ctggaggtgg caacgccaat	4680
[0101]	cagcaacgac tgtttgcccg ccagttgttg tgccacgcgg ttgggaatgt aattcagctc	4740
[0102]	cgccatcgcc gcttccactt tttcccgcgt tttcgcagaa acgtggctgg cctggttcac	4800
[0103]	cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac	4860
[0104]	tggtttcaca ttaccaccc tgaattgact ctcttccggg cgctatcatg ccataccgcg	4920
[0105]	aaaggttttg cgccattcga tgggtgccgg gatctcgacg ctctccctta tgcgactcct	4980
[0106]	gcattaggaa gcagcccagt agtaggttga ggccgttgag caccgccgcc gcaaggaatg	5040
[0107]	gtgcatgcaa ggagatggcg cccaacagtc ccccggccac ggggcctgcc accataccca	5100
[0108]	cgccgaaaca agcgtcatg agcccgaagt ggcgagccc atcttcccga tcggtgatgt	5160
[0109]	cggcgatata ggcgccagca accgcacctg tggcgcgggt gatgccggcc acgatgcgtc	5220
[0110]	cggcgtagag gatcgagatc tcgatcccgc gaaattaata cgactcacta taggggaatt	5280
[0111]	gtgagcggat aacaattccc ctctagaat aattttgtt aactttaaga aggagatata	5340
[0112]	cat	5343
[0113]	<210>	4
[0114]	<211>	50
[0115]	<212>	DNA
[0116]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0117]	<400>	4
[0118]	gagatataca tgaattaat acgcttatct cgacaaattt cttgcttcag	50
[0119]	<210>	5
[0120]	<211>	40
[0121]	<212>	DNA
[0122]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0123]	<400>	5
[0124]	gtcatagtca tagtcatgcc cgatcttctt ggcagaactc	40
[0125]	<210>	6

[0126] <211> 292
 [0127] <212> DNA
 [0128] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0129] <400> 6
 [0130] gaaattaata cgcttatctc gacaaatttc ttgcttcaga ggaggggatg gcgctggacg 60
 [0131] atctcaacct gcgtagcaaa attcctcgac gaacgtggga tcgtagtaga gaaaaccggc 120
 [0132] ccttataacc tgctgttatt ggcatcgata aaaccaaagc aatgggatta ttgcgtgggt 180
 [0133] tagaagatcc cggacggaat tcaaacctc tttagtgtc ttgatcaaaa atatgctacc 240
 [0134] cgaccggct ctctatgcat gagttctgcc aagaagatcg ggcatgacta tg 292
 [0135] <210> 7
 [0136] <211> 42
 [0137] <212> DNA
 [0138] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0139] <400> 7
 [0140] cgggcatgac tatgactatg aacgttattg caatattgaa tc 42
 [0141] <210> 8
 [0142] <211> 37
 [0143] <212> DNA
 [0144] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0145] <400> 8
 [0146] gcttctgac cgcgcgccc tgtgagggtg ttttcat 37
 [0147] <210> 9
 [0148] <211> 2154
 [0149] <212> DNA
 [0150] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0151] <400> 9
 [0152] atgactatga acgttattgc aatattgaat cacatggggg tttattttaa agaagaacc 60
 [0153] atccgtgaac ttcatcgcgc gcttgaacgt ctgaacttcc agattgttta cccgaacgac 120
 [0154] cgtgacgact tattaact gatcgaaaac aatgcgcgc tgtgcggcgt tatttttgac 180
 [0155] tgggataaat ataatctcga gctgtgcgaa gaaattagca aatgaacga gaacctgccg 240
 [0156] ttgtacgct tcgctaatac gtattccact ctgatgtaa gcctgaatga cctgcgttta 300
 [0157] cagattagct tctttgaata tgcgctgggt gctgctgaag atattgctaa taagatcaag 360
 [0158] cagaccactg acgaatatat caacactatt ctgcctccgc tgactaaagc actgttttaa 420
 [0159] tatgtctgtg aaggtaaata tactttctgt actcctgtgc acatgggcgg tactgcattc 480
 [0160] cagaaaagcc cggtagtag cctgttctat gatttctttg gtccgaatac catgaaatct 540
 [0161] gatattcca tttcagtatc tgaactgggt tctctgctgg atcacagtgg tccacacaaa 600
 [0162] gaagcagaac agtatatcgc tcgctcttt aacgcagacc gcagctacat ggtgaccaac 660
 [0163] ggtacttcca ctgcgaacaa aattgttgg atgtactctg ctccagcagg cagcaccatt 720
 [0164] ctgattgacc gtaactgcca caaatcgtg acccactga tgatgatgag cgatgttacg 780
 [0165] ccaatctatt tccgccgac ccgtaacgt tacggtatc ttggtggtat cccacagagt 840
 [0166] gaattccagc acgctaccat tgctaagcgc gtgaaagaaa caccaaagc aacctggccg 900
 [0167] gtacatgctg taattacaa ctctacctat gatggtctgc tgtacaacac cgacttcatc 960

[0168] aagaaaacac tggatgtgaa atccatccac tttgactccg cgtgggtgcc ttacaccaac 1020
 [0169] ttctcaccga tttacgaagg taaatgcggt atgagcgggt gccgtgtaga agggaaagt 1080
 [0170] atttacgaaa cccagtccac tcacaaactg ctggcggcgt tctctcagge ttccatgatc 1140
 [0171] cacgttaaag gtgacgtaaa cgaagaaacc tttaacgaag cctacatgat gcacaccacc 1200
 [0172] acttctccgc actacggtat cgtggcgtcc actgaaaccg ctgcggcgat gatgaaaggc 1260
 [0173] aatgcaggta agcgtctgat caacggttct attgaacgtg cgatcaaatt ccgtaaagag 1320
 [0174] atcaaacgtc tgagaacgga atctgatggc tggttctttg atgtatggca gccggatcat 1380
 [0175] atcgatacga ctgaatgctg gccgctgcgt tctgacagca cctggcacgg cttcaaaaac 1440
 [0176] atcgataacg agcacatgta tcttgaccg atcaaagtca ccctgctgac tccggggatg 1500
 [0177] gaaaaagacg gcacatgag cgactttggt attccggcca gcatcgtggc gaaatacctc 1560
 [0178] gacgaacatg gcatcgttgt tgagaaaacc ggtccgtata acctgctgtt cctgttcagc 1620
 [0179] atcggtatcg ataagaccaa agcactgagc ctgctgcgtg ctctgactga ctttaaacgt 1680
 [0180] gcgttcgacc tgaacctgcg tgtgaaaaac atgctgccgt ctctgtatcg tgaagatcct 1740
 [0181] gaattctatg aaaacatgcg tattcaggaa ctggctcaga atatccacaa actgattgtt 1800
 [0182] caccacaatc tgccggatct gatgtatcgc gcatttgaag tgctgccgac gatggtaatg 1860
 [0183] actccgatag ctgcattcca gaaagagctg cacggtatga ccgaagaagt ttacctgac 1920
 [0184] gaaatggtag gtcgtattaa cgccaatatg atccttccgt acccgccggg agttcctctg 1980
 [0185] gtaatgccgg gtgaaatgat caccgaagaa agccgtccgg ttctggagtt cctgcagatg 2040
 [0186] ctgtgtgaaa tcggcgtca ctatccgggc tttgaaaccg atattcacgg tgcataccgt 2100
 [0187] caggetgatg gccgtatac cgttaaggta ttgaaagaag aaagcaaaaa ataa 2154
 [0188] <210> 10
 [0189] <211> 7786
 [0190] <212> DNA
 [0191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0192] <400> 10
 [0193] tgagatccgg ctgctaaca agcccgaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag 60
 [0194] caataactag cataaccct tgggcctct aaacgggtct tgaggggtt tttgctgaaa 120
 [0195] ggaggaacta tatccgatt ggcaatggg acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg 180
 [0196] cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagegcceta gcgcccctc 240
 [0197] ctttcgcttt ctcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa 300
 [0198] atcgggggct cccttaggg ttccgattta gtgctttac gcacctgac ccaaaaaac 360
 [0199] ttgattaggg tgatggttca cgtagtggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt 420
 [0200] tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca 480
 [0201] accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggtttt gccgatttcg gcctattggt 540
 [0202] taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta 600
 [0203] caatttcagg tggcactttt cggggaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 660
 [0204] aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 720
 [0205] attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt cccttttttg 780
 [0206] cggcattttg ctttctgtt tttgctcacc cagaaacgt ggtgaaagta aaagatgctg 840
 [0207] aagatcagtt gggcgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 900
 [0208] ttgagagttt tcgccccgaa gaacgtttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 960
 [0209] gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggctgc gcatacact 1020

[0210]	attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	1080
[0211]	tgacagtaag	agaattatgc	agtgctgcca	taacatgag	tgataacact	gcggccaact	1140
[0212]	tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgca	aacatggggg	1200
[0213]	atcatgtaac	tcgccttgat	cgttgggaac	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	1260
[0214]	agcgtgacac	cacgatgcct	gcagcaatgg	caacaacgtt	gcgcaaacata	ttaactggcg	1320
[0215]	aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagttg	1380
[0216]	caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	ctggctggtt	tattgctgat	aaatctggag	1440
[0217]	ccggtgagcg	tggttctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggt	aagccctccc	1500
[0218]	gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	1560
[0219]	tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	attggtaact	gtcagaccaa	gtttactcat	1620
[0220]	atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	1680
[0221]	tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	1740
[0222]	accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	1800
[0223]	gcttgcaaac	aaaaaacca	ccgctaccag	cggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	1860
[0224]	caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgtccttc	1920
[0225]	tagttagacc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgctt	acatacctcg	1980
[0226]	ctctgctaat	cctgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	cttaccgggt	2040
[0227]	tggactcaag	acgatagtta	ccgataaagg	cgcagcggtc	gggctgaacg	gggggttctg	2100
[0228]	gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	2160
[0229]	tatgagaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcggg	caggatcccg	gtaagcggca	2220
[0230]	gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	2280
[0231]	gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	2340
[0232]	ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	acggttctctg	gccttttctg	2400
[0233]	ggccttttgc	tcacatgttc	tttctcgcgt	tatccctga	ttctgtggat	aaccgtatta	2460
[0234]	ccgcctttga	gtgagctgat	accgctcgcc	gcagccgaac	gaccgagcgc	agcgagtcag	2520
[0235]	tgagcgagga	agcgggaagag	cgctgatgc	ggtatcttct	ccttacgcat	ctgtgcggta	2580
[0236]	ttcacaccg	catatatggt	gactctcag	tacaatctgc	tctgatgccg	catagttaag	2640
[0237]	ccagatataca	ctccgctatc	gctacgtgac	tggtcatggt	ctgcgccccg	acaccgccca	2700
[0238]	acaccgctg	acgcgccctg	acgggcttgt	ctgctcccgg	catccgctta	cagacaagct	2760
[0239]	gtgaccgtct	ccgggagctg	catgtgtcag	aggttttcac	cgtcatcacc	gaaacgcgcg	2820
[0240]	aggcagctgc	ggtaaagctc	atcagcgtgg	tcgtgaagcg	attcacagat	gtctgcctgt	2880
[0241]	tcatccgcgt	ccagctcggt	gagtttctcc	agaagcgta	atgtctggct	tctgataaag	2940
[0242]	cgggccatgt	taagggcggt	ttttctctgt	ttggctactg	atgcctccgt	gtaaggggga	3000
[0243]	tttctgttca	tgggggtaat	gataccgatg	aaacgagaga	ggatgctcac	gatacgggtt	3060
[0244]	actgatgatg	aacatgcccg	gttactggaa	cgttgtgagg	gtaaacact	ggcggtatgg	3120
[0245]	atgcggcggg	accagagaaa	aatcactcag	ggtcaatgcc	agcgcttctg	taatacagat	3180
[0246]	gtaggtgttc	cacagggtag	ccagcagcat	cctgcgatgc	agatccggaa	cataatgggt	3240
[0247]	cagggcgtg	acttccgcgt	ttccagactt	tacgaaacac	ggaaaccgaa	gaccattcat	3300
[0248]	gttgttctc	aggtcgcaga	cgttttgcag	cagcagtcgc	ttcacgttcg	ctcgcgtatc	3360
[0249]	ggtgattcat	tctgctaacc	agtaaggcaa	ccccgccagc	ctagccgggt	cctcaacgac	3420
[0250]	aggagcacga	tcatgcgcac	ccgtggggcc	gccatgccgg	cgataatggc	ctgcttctcg	3480
[0251]	ccgaaacgtt	tggtggcggg	accagtgacg	aaggcttgag	cgagggcgtg	caagattccg	3540

[0252]	aataccgcaa	gcgacaggcc	gatcatcgtc	gcgctccagc	gaaagcggtc	ctcgccgaaa	3600
[0253]	atgaccaga	gcgctgccg	cacctgtcct	acgagttgca	tgataaagaa	gacagtcata	3660
[0254]	agtgcggcga	cgatagtc	gccccgcgcc	caccggaagg	agctgactgg	gttgaagget	3720
[0255]	ctcaaggga	tcggtcgaga	tcccgggtgc	taatgagtga	gctaacttac	attaattg	3780
[0256]	ttgcgtcac	tgcccgttt	ccagtcggga	aacctgtcgt	gccagctgca	ttaatgaatc	3840
[0257]	ggccaacgcg	cggggagagg	cggtttgctg	attgggcgcc	agggtggttt	ttcttttcac	3900
[0258]	cagtgagacg	ggcaacagct	gattgcctt	caccgcctgg	ccctgagaga	gttgcagcaa	3960
[0259]	gcggtccacg	ctggtttgcc	ccagcaggcg	aaaatcctgt	ttgatggtgg	ttaacggcgg	4020
[0260]	gatataacat	gagctgtctt	cggtatcgtc	gtatcccact	accgagatat	ccgcaccaac	4080
[0261]	gcgcagccc	gactcggtaa	tggcgcgc	atgcgccagc	gccatctgat	cgttggcaac	4140
[0262]	cagcatcgca	gtgggaacga	tgccctcatt	cagcatttgc	atggtttgtt	gaaaaccgga	4200
[0263]	catggcactc	cagtcgctt	cccgttccgc	tatcggtga	atttgattgc	gagtgagata	4260
[0264]	tttatgccag	ccagccagac	gcagacgcgc	cgagacagaa	cttaatgggc	ccgctaacag	4320
[0265]	cgcgatttgc	tggtgacca	atgcgaccag	atgctccacg	cccagtcgcg	taccgtcttc	4380
[0266]	atgggagaaa	ataatactgt	tgatgggtgt	ctggtcagag	acatcaagaa	ataacgccgg	4440
[0267]	aacattagtg	caggcagctt	ccacagcaat	ggcatcctgg	tcatccagcg	gatagttaat	4500
[0268]	gatcagccca	ctgacgcgtt	gcgcgagaag	attgtgcacc	gccgctttac	aggcttcgac	4560
[0269]	gccgcttctg	tctaccatcg	acaccaccac	gctggcacc	agttgatcgg	cgcgagattt	4620
[0270]	aatgccgcg	acaatttgcg	acggcgcgtg	cagggccaga	ctggaggtgg	caacgccaat	4680
[0271]	cagcaacgac	tgtttcccc	ccagttgtt	tgccacgcgg	ttgggaatgt	aattcagctc	4740
[0272]	cgccatgcc	gcttccactt	tttcccgcgt	tttcgcagaa	acgtggctgg	cctggttcac	4800
[0273]	cacgcgggaa	acggtctgat	aagagacacc	ggcatactct	gcgacatcgt	ataacgttac	4860
[0274]	tggtttcaca	ttcaccacc	tgaattgact	ctcttccggg	cgctatcatg	ccataccgcg	4920
[0275]	aaaggttttg	cgccattcga	tggtgtccgg	gatctcgacg	ctctccctta	tgcgactcct	4980
[0276]	gcattaggaa	gcagcccagt	agtaggttga	ggccgtttag	caccgccgcc	gcaaggaatg	5040
[0277]	gtgcatgcaa	ggagatggcg	cccaacagtc	ccccggccac	ggggcctgcc	accataccca	5100
[0278]	cgccgaaaca	agcgtcatg	agcccgaagt	ggcgagccc	atcttcccca	tcggtgatgt	5160
[0279]	cggcgatata	ggcgccagca	accgcacctg	tggcgcgggt	gatgccggcc	acgatcgtc	5220
[0280]	cggcgtagag	gatcgagatc	tcgatccgc	gaaattaata	cgactcacta	taggggaatt	5280
[0281]	gtgagcggat	aacaattccc	ctctagaaat	aattttgttt	aactttaaga	aggagatata	5340
[0282]	catgaaatta	atacgcttat	ctcgacaaat	ttcttgcttc	agaggagggg	atggcgcgtg	5400
[0283]	acgatctcaa	cctgcgtagc	aaaattctc	gacgaacgtg	ggatcgtagt	agagaaaacc	5460
[0284]	ggcccttata	acctgtgtt	attggcatcg	ataaaacca	agcaatggga	ttattgctg	5520
[0285]	ggttagaaga	tcccggacgg	aattcaaact	ctcttttagt	ctcttgatca	aaaatatgct	5580
[0286]	accgaccgcg	gctctctatg	catgagttct	gccaagaaga	tcggcatga	ctatgactat	5640
[0287]	gaacgttatt	gcaatattga	atcacatggg	ggtttat	aaagaagaac	ccatccgtga	5700
[0288]	acttcatcgc	gcgcttgaac	gtctgaactt	ccagattgtt	taccgaacg	accgtgacga	5760
[0289]	cttattaaaa	ctgatcga	acaatgcgcg	tctgtgcggc	gttattttt	actgggataa	5820
[0290]	atataatctc	gagctgtgcg	aagaaattag	caaaatgaac	gagaacctgc	cgttgtacgc	5880
[0291]	gttcgcta	acgtattcca	ctctcgatgt	aagcctgaat	gacctgcgtt	tacagattag	5940
[0292]	cttctttgaa	tatgcgctgg	gtgctgctga	agatattgct	aataagatca	agcagaccac	6000
[0293]	tgacgaatat	atcaacacta	ttctgcctcc	gctgactaaa	gcactgttta	aatatgttcg	6060

[0294] tgaaggtaaa tatactttct gtactcctgg tcacatgggc ggtactgcat tccagaaaag 6120
[0295] cccggtaggt agcctgttct atgatttctt tgggccgaat accatgaaat ctgatatttc 6180
[0296] catttcagta tctgaactgg gttctctgct ggatcacagt ggtccacaca aagaagcaga 6240
[0297] acagtatatac gctcgcgtct ttaacgcaga ccgcagctac atggtgacca acggtacttc 6300
[0298] cactgcgaac aaaattgttg gtatgtactc tgctccagca ggcagcacca ttctgattga 6360
[0299] ccgtaactgc cacaaatcgc tgaccacact gatgatgatg agcgatgta cgccaatcta 6420
[0300] tttccgcccg acccgtaacg cttacggat tcttggtggt atcccacaga gtgaattcca 6480
[0301] gcacgtacc attgctaagc gcgtgaaaga aacaccaaac gcaacctgce cggtacatgc 6540
[0302] tgtaattacc aactctacct atgatggtct gctgtacaac accgacttca tcaagaaaac 6600
[0303] actggatgtg aatccatcc actttgactc cgcgtgggtg cttacacca acttctcacc 6660
[0304] gatttacgaa ggtaaatgcg gtatgagcgg tggccgtgta gaagggaaag tgatttacga 6720
[0305] aaccagtc actcacaac tgctggcggc gttctctcag gcttccatga tccacgttaa 6780
[0306] aggtgacgta aacgaagaaa ctttaacga agcctacatg atgcacacca ccacttctcc 6840
[0307] gcactacggt atcgtggcgt ccaactgaaac cgctgcggcg atgatgaaag gcaatgcagg 6900
[0308] taagcgtctg atcaacggtt ctattgaacg tgcgatcaaa ttccgtaaag agatcaaacg 6960
[0309] tctgagaacg gaatctgatg gctggttctt tgatgtatgg cagccggatc atatcgatac 7020
[0310] gactgaatgc tggccgctgc gttctgacag cacctggcac ggcttcaaaa acatcgataa 7080
[0311] cgagcacatg tatcttgacc cgatcaaagt caccctgctg actccgggga tggaaaaaga 7140
[0312] cggcaccatg agcgactttg gtattccggc cagcatcgtg gcgaaatacc tcgacgaaca 7200
[0313] tggcatcggt gttgagaaaa ccggtccgta taacctgctg ttctgttca gcatcggtat 7260
[0314] cgataagacc aaagcactga gcctgctgcg tgctctgact gactttaaac gtgcgttcga 7320
[0315] cctgaacctg cgtgtgaaaa acatgctgcc gtctctgtat cgtgaagatc ctgaattcta 7380
[0316] tgaaaacatg cgtattcagg aactggctca gaatatccac aaactgattg ttcaccacaa 7440
[0317] tctgccgat ctgatgtatc gcgcatttga agtgctgccg acgatggtaa tgactccgta 7500
[0318] tgctgattc cagaaagagc tgcacggtat gaccgaagaa gtttacctcg acgaaatggt 7560
[0319] aggtcgtatt aacccaata tgatcctcc gtaccgccg ggagtctctc tggtaatgcc 7620
[0320] ggtgaaatg atcaccgaag aaagccgtcc gttctggag ttctgcaga tgctgtgtga 7680
[0321] aatcgcgct cactatccgg gctttgaaac cgatattcac ggtgcatacc gtcaggctga 7740
[0322] tggccgctat accgttaagg tattgaaaga agaaagcaaa aaataa 7786