

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)

专利号 ZL 200410089167.6

[45] 授权公告日 2006 年 9 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1273585C

[22] 申请日 2004.11.29

[21] 申请号 200410089167.6

[71] 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

[72] 发明人 梅乐和 李红梅 姚善涇

审查员 曹克浩

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 张法高

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称

细胞色素 P450BM-3 单加氧酶变体基因及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种细胞色素 P450BM-3 单加氧酶变体基因及其用途。它通过易错 PCR 技术介导的随机突变, 筛选获得的 P450BM-3 变体基因, 该 P450BM-3 基因中的第 168 位的天冬氨酸的密码子 GAT 突变为天冬酰胺的密码子 AAT, 第 225 位的丙氨酸的密码子 GCA 突变为缬氨酸的密码子 GTA, 将第 440 位赖氨酸的密码子 AAA 突变为天冬酰胺密码子 AAT 所得到的 P450BM-3 变体基因 (Asp¹⁶⁸ → Asn, Ala²²⁵ → Val, Lys⁴⁴⁰ → Asn) P450BM-3。该变体基因序列为 SEQ ID No.1 核苷酸序列, 并且编码细胞色素 P450BM-3 的单加氧酶。本发明创造了一种对吡啶具有更高催化活力的 P450BM-3 变体基因, 该变体基因表达的突变酶能催化吡啶生成染料靛蓝, 与 R. D. Schmid 领导的科研小组获得的具

有三个突变位点的 P450BM-3 (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) 变体酶相比较, 在测定的一例中活性提高了 1.9-2.4 倍, 为生物转化生产染料靛蓝提供了广阔的应用前景。

1. 一种细胞色素 P450BM-3 单加氧酶变体基因，其特征在于：通过易错 PCR 技术介导的随机突变，筛选获得的 P450BM-3 变体基因，该 P450BM-3 基因中的第 168 位的天冬氨酸的密码子 GAT 突变为天冬酰胺的密码子 AAT，第 225 位的丙氨酸的密码子 GCA 突变为缬氨酸的密码子 GTA，将第 440 位赖氨酸 Lys 的密码子 AAA 突变为天冬酰胺 Asn 的密码子 AAT 所得到的 P450BM-3 变体基因，该变体基因的核苷酸序列为 SEQ ID No. 1，并且编码细胞色素 P450BM-3 的单加氧酶。

2. 一种如权利要求 1 所述细胞色素 P450BM-3 单加氧酶变体基因的用途，其特征在于，将 P450BM-3 单加氧酶变体基因通过基因工程技术重组表达 P450BM-3 变体蛋白酶，以用于催化吲哚生成染料靛蓝。

细胞色素 P450BM-3 单加氧酶变体基因及其用途

技术领域

本发明涉及生物化工中的基因工程菌生产靛蓝染料的技术领域，尤其涉及一种细胞色素 P450BM-3 单加氧酶变体基因及其用途。

背景技术

酶分子的定向进化技术就是人为的创造特殊的进化条件，模拟天然进化机制，在体外对基因进行随机突变，从一个或多个个人工突变酶库通过一定筛选或选择方法最终获得预先期望的具有某些特性的进化酶。与自然进化相比。酶分子的定向进化过程完全是在人为控制下进化的，使酶分子朝向人们期望的特定目标进行。近年来随着诸如易错 PCR，DNA 改组等技术的应用，在对目的基因表达有高效检测筛选体统的条件下，尽管尚不清楚酶分子的结构等特性，采用酶分子的定向策略能获得具有预期特性的新酶，实现酶分子的人为的快速进化。诸多的研究表明，在目前对酶分子认识还不成熟的情况下通过 DNA 水平上适当修饰来改变酶的氨基酸顺序，进而改变酶的性能是可能在重组生物中产生新的酶类，并获得比天然酶活力更高，稳定性和催化性能更好的进化酶，以满足研究和应用的需要。

P450 酶系是广泛分布于动物、植物和微生物等不同的生物体内的一类代谢酶系。因其主要成分中 P450 蛋白与 CO 结合后，在 450nm 处有特征光吸收峰而得名。研究表明。它可以催化成千上万的化学反应，参与的主要反应有烷基的羟基化，烷基的环氧化，羟基的氧化。氮，氧，硫部位上脱烷基化，氮部位上羟基化和氧化，硫部位上的氧化，氧化性脱氨，脱氢和脱卤素，氧化性的 C-C 键断裂以及其它一些还原催化反应。有专著甚至指出它可能是自然界中最具有催化多样性的生物催化剂。由于该酶系的性质和功能以及在生命活动过程中的作用。P450 酶系受到广大研究者的极度重视。P450 酶系的作用的重要性已经成为当代生物化学研究中一个值得注意的领域。国外的研究工作主要分布在该酶系在生物体系中的作用以及利用该酶系的催化作用大规模生产手性药物等方面。而在国内。虽然有大量关于该酶系的综述性和研究性的报道。但研究工作却只限于该酶系在生物机体中的作用。目前尚未见有该酶系的催化作用制备手性药物的报道。有学者指出，主要原因是国内目前尚未能获得适量的酶。

在 P450 酶系中，P450 BM-3 是从巨大芽孢杆菌中发现的具有脂肪酸羟基化活

性的酶, 现在已作为哺乳动物微粒体 p450 单加氧酶重要的模型。P450BM-3 是一种可溶解的单加氧酶, 分子量 117, 641Da, 不像其它 P450 酶催化需要额外的蛋白, P450BM-3 在 NADPH 和 O₂ 的存在下, 它具有快速催化链长为 C12-C18 的饱和脂肪酸的加单氧酶活性。在国外, 德国的斯图加特大学技术生化研究所 R. D. Schmid 领导的科研小组在 1999 年利用定点突变定向进化技术获得具有三个突变位点的 P450BM-3 (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly), 他们意外的发现这一突变酶竟然能够催化吡啶生成靛蓝。因此, 本发明就在 R. D. Schmid 领导的科研小组用易错 PCR 技术进一步定向进化获得的具有三个突变位点的

P450BM-3 (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) 变体基因的基础上, 通过易错 PCR 技术进一步定向进化 P450BM-3 (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) 变体基因, 获得了一个高于 P450BM-3 (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) 催化吡啶活性的 P450BM-3 变体酶 P450BM-3 (Asp¹⁶⁸→Asn, Ala²²⁵→Val, Lys⁴⁴⁰→Asn), 从而提高靛蓝的产量, 使生物转化合成靛蓝更加接近实用化。

靛蓝 (indigo) 是一种颜色鲜艳而又耐久的蓝色染料, 是最早发现的天然染料之一, 全球对染料的总体需求是 800, 000t, 靛蓝就占据了 80, 000t。远古时代主要是从含有靛蓝的植物中提取。1897 年西德 BASF 生产的合成靛蓝问世, 它以生产简便、原料充足、纯度高、易贮运、使用方便等优点后来居上, 迅速普及, 从而使得具有几千年历史的植物靛蓝黯然失色。本世纪 60 年代之后, 天然靛蓝终于销声匿迹, 退出了历史舞台。进入 80 年代之后, 随着社会现代化程度的日益提高, 环境保护和劳动保护意识逐渐普及, 人们开始认识到了合成化学工业的一系列有损健康、污染环境的弊病。如合成靛蓝中使用的苯胺和邻苯二甲酸酐能导致人体急性和慢性中毒, 对呼吸道和中枢神经及肝脏均有一定损害。而生物转化合成天然靛蓝产生的有害废物比化学方法少, 既节能又廉价, 保护自然环境, 维持生态平衡等方面, 无疑都是具有重要意义的。因此很多研究者认为发展生物法生产生物靛蓝染料是极具有前途的。

发明内容

本发明的目的是提供一种细胞色素 P450BM-3 单加氧酶变体基因及其用途。

它通过易错 PCR 技术介导的随机突变, 筛选获得的 P450BM-3 变体基因, 该 P450BM-3 基因中的第 168 位的天冬氨酸 (Asp) 的密码子 GAT 突变为天冬酰胺 (Asn) 的密码子 AAT, 第 225 位的丙氨酸 (Ala) 的密码子 GCA 突变为缬氨酸 (Val) 的密码子 GTA, 将第 440 位赖氨酸 Lys 的密码子 AAA 突变为天冬酰胺 Asn 的密码子 AAT 所得到的 P450BM-3 变体基因 (Asp¹⁶⁸→Asn, Ala²²⁵→Val, Lys⁴⁴⁰→Asn)

P450BM-3。该变体基因序列为 SEQ ID No.1 核苷酸序列，并且编码细胞色素 P450BM-3 的单加氧酶。

细胞色素 P450BM-3 单加氧酶变体基因，表达所得到 P450BM-3 变体蛋白酶能催化吡啶生成染料靛蓝。

本发明创造了一种对吡啶具有更高催化活力的 P450BM-3 变体基因，其突变位点为 Asp¹⁶⁸→Asn, Ala²²⁵→Val, Lys⁴⁴⁰→Asn，该变体基因表达的突变酶能催化吡啶生成染料靛蓝，与 R. D. Schmid 领导的科研小组获得的具有三个突变位点的 P450BM-3 (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) 变体酶相比较，在测定的一例中活性提高了 1.9-2.4 倍，为生物转化生产染料靛蓝提供了广阔的应用前景。

附图说明

图 1 质粒 pET28 α (+) P450BM-3 的基因图谱；

图 2 靛蓝的 TLC 定性鉴定，图中：1—标准靛蓝 2—催化产生靛蓝 3—催化产生靛玉红；

图 3 突变位点 Asp¹⁶⁸→Asn, Ala²²⁵→Val, Lys⁴⁴⁰→Asn 在蛋白质三级结构中的位置；

图 4 定点突变原理示意图。

具体实施例

通过改变传统 PCR 反应体系中某些组分的浓度，或使用低保真度 *Taq*DNA 聚合酶等，使碱基在一定程度上随机错误引入获得 P450BM-3 突变基因文库，并通过一定的筛选方法获得 P450BM-3 变体基因，即：Asp¹⁶⁸→Asn, Ala²²⁵→Val, Lys⁴⁴⁰→Asn，并实现在大肠杆菌中的高效表达，经分离纯化，创造出对吡啶有较高催化的 P450BM-3 变体酶，该 P450BM-3 变体酶能催化吡啶生成靛蓝染料。本发明得到的突变酶生产出靛蓝染料可能成为一种替代化学染料的环保型技术。

本发明的技术内容包括：

通过改变传统 PCR 反应体系中某些组分的浓度，或使用低保真度 *Taq*DNA 聚合酶等，使碱基在一定程度上随机错误引入获得突变基因文库，并通过一定的筛选方法获得一种变体基因，即，本发明按照上述的设计思想，通过降低传统 PCR 中一种或者两种 dATP dGTP dCTP dTTP 的浓度并且加入一定量的 MnCl₂，同时采用低保真度的 *Taq*DNA 聚合酶，使基因在扩增时能随机的创造突变，然后将易错 PCR 扩增产物经 *Nhe*I - *Bam*HI 双酶切后插入到用同样的酶双酶切后的线性质粒 pET28 α (+)，然后转化到转化到 *E. Coli*BL21 中，涂布到含有 30μg/ml 卡那霉素 LB 琼脂平板上，37℃ 过夜培养。从平板上挑取蓝色的克隆，并接种

到 200 μ l 含有 30 μ g/ml 卡那霉素 LB 液体培养基的 96 微孔板中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 取 20 μ l 该过夜培养液加入到一个新的 200 μ l 含有 30 μ g/ml 卡那霉素 LB 液体培养基的 96 微孔板中, 在 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 0.5-0.7 时加入 IPTG (终浓度 0.5 μ M) 诱导并在 30 $^{\circ}$ C 继续培养 48 小时, 得到蓝色的细胞, 用 THF 提取该蓝色物质, 在 630nm 处测定其吸收值, 将吸收值高于亲本的菌株挑选出来并进行 100ml 规模的培养, 离心收集菌体, 超声破菌, 保留上清液, 该上清液含有 P450BM-3 变体酶, 通过测定测定其酶反应动力学曲线, 筛选出活力高于原酶的菌株挑选出来并提取质粒进行全自动 DNA 测序, 发现突变位点为 Asp¹⁶⁸→Asn, Ala²²⁵→Val, Lys⁴⁴⁰→Asn。

下面是本发明的实施例:

1. 定点突变突变在基因序列第 1460-1475 位点获得 BamHI 酶切位点

a) 定点突变引物的设计和 PCR 扩增产物的获得

上游引物 B1 5'- TGTGCTATACGGATCCGAATATGGGAACAGC -3'

↑
BamHI 酶切位点

下游引物 B2 5'- TGTTCCATATTGGATCCGTATAGCACCAAGC-3'

选择 P450BM3 基因第 1469 位的 A 替换为 C 和 1472 位的 T 替换为 A, 这一替换属于沉默突变, 设计一对突变引物 B1 和 B2, 以 pET28 α (+)P450BM-3 为模板, 用 QuikChang™ 定点突变扩增的方法向 P450BM-3 基因引入点突变, 如附图 4 所示。

向 500 μ l 的 eppendorf 管中加入 25 pmol 的 dNTPs, 上游引物, 下游引物各 10 pmol, 大约 1ng 质粒 pET28 α (+)BM3 作为模板 DNA, 2.5u *pfu* DNA 聚合酶, 5 μ l 的含有 MgCl₂(25mM) 的 PCR 缓冲液, 然后加无菌的蒸馏水至总体积 50 μ l。PCR 反应参数是通过 95 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟后, 在 95 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 每一循环温度上升 0.7 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 16 min, 总共 14 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s。

b) 具有 BamHI 酶切位点的变体基因的获得

上述 PCR 扩增产物用 1 μ l *Dpn*I (10u/ μ l) 消化 2 小时后转化到 *E. coli* DH5 α 中并涂布到含有 30 μ g/ml 卡那霉素 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。大约挑选 12 个克隆接种到 5ml 的含有 30 μ g/ml 卡那霉素 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养以扩增质粒。提取质粒并用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 在 37 $^{\circ}$ C 酶解后, 利用 DNA 电泳和全自动 DNA 测序检测期望的突变位点是否引入。

2. 易错 PCR 引物的设计和 PCR 扩增产物的获得:

根据P450BM-3的cDNA的单加氧酶的编码区设计的, 为了方便以后的操作, 在引物的5'端分别引入*Bam*HI和*Nhe*I位点。

上游引物 5' - CTAGCTAGCATGACAATTAAG - 3'



*Nhe*I 酶切位点

*Bam*HI 酶切位点



下游引物 5' - CATATTGGATCCGTATAGCACAAC - 3'

向 500 μ l 的 eppendorf 管中加入 100pmol 的 dNTPs, 上游引物, 下游引物各 20pmol, 大约 1ng pET28 α (+) P450BM-3(由定点突变突变在基因序列第 1460 - 1475 位点具有 *Bam*HI 酶切位点的 pET28 α (+) P450BM-3) 作为模板 DNA, 以及最终浓度范围为 0 到 0.20mM $MnCl_2$, 2.5u *Taq*DNA 聚合酶, 5 μ l 的 PCR 缓冲液, 12.5 μ l 25mM 的 $MgCl_2$, 然后加无菌的蒸馏水至总体积 50 μ l。反应参数是通过 95 $^{\circ}C$ 变性 3 分钟后, 在 95 $^{\circ}C$ 1min, 47 $^{\circ}C$ 2min, 72 $^{\circ}C$ 2min, 经过 25 个循环, 然后 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min。

3. 突变文库的构建:

易错PCR 扩增产物经 *Nhe*I - *Bam*HI 双酶切后插入到用同样的酶双酶切后的线性质粒 pET28 α (+), 然后转化 *E. Coli* BL21 中, 涂布到含有 30 μ g/ml 卡那霉素 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}C$ 过夜培养。

酶切时质粒 pET28 α (+) P450BM-3 以及限制酶的用量比:

质粒 pET28 α (+) P450BM-3	5 μ l
<i>Nhe</i> I (10u/ μ l)	1 μ l
<i>Bam</i> HI (10u/ μ l)	1 μ l
Buffer (10 X)	5 μ l
无菌水	8 μ l
总体积	20 μ l

质粒 pET28 α (+) - P450BM-3 连接时连接酶和质粒的配比:

质粒 DNA pET28 α (+) 片断	2 μ l
基因 P450BM-3 片断	4 μ l
T4DNA 连接酶	1 μ l
T4DNA 连接酶 Buffer (10 X)	2 μ l
无菌水	11 μ l
总体积	20 μ l

4. 一种对吡啶具有高催化活性的变体基因的筛选

从平板上挑取蓝色的克隆，并接种到 200 μ l 含有 30 μ g/ml 卡那霉素 LB 液体培养基的 96 微孔板中，37 $^{\circ}$ C 过夜培养，取 20 μ l 该过夜培养液加入到一个新的 200 μ l 含有 30 μ g/ml 卡那霉素 LB 液体培养基的 96 微孔板中，在 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 0.5–0.7 时加入 IPTG (终浓度 0.5 μ M) 诱导并在 30 $^{\circ}$ C 继续培养 48 小时，得到蓝色的细胞，用 THF 提取该蓝色物质，在 630nm 处测定其吸收值，将吸收值高于亲本的菌株挑选出来并接种到 100 毫升 LB 液体培养基中：种子液为试管培养液，接种量 1%–3%，培养基的体积为 100 毫升，pH7.0–7.5，摇床转速为 150–200 转/分钟，在 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD 0.5–0.7 时加入 IPTG (0.5–1.0 μ M) 诱导，然后将温度转为 30 $^{\circ}$ C 继续培养 5–8 小时，培养液以 80000 转/分钟离心 10–20 分钟，去除上清液，收获离心后的细胞，悬浮于 5 毫升的 pH7.5 50mM 含有 0.5M NaCl 和微量 PMSF 的磷酸盐缓冲液中，在冰浴的条件下超声破菌 10 分钟 (超声 60 秒，间隙 60 秒)，再 8000rpm 离心 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟，得到含有 P450BM-3 变体酶的上清液，并用以下方法测定其酶活：

在 1ml 缓冲液为 pH8.2 的磷酸缓冲液反应液中加入 10mM–100mM 吡啶为底物，加入 1.2nmol–2.4nmol P450BM-3 变体酶，室温下培育 9 分钟，加入 20 μ l NADPH 5 mg/ml 启动反应 ($\epsilon=6.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，测定其酶反应动力学曲线，筛选出活力高于原酶的菌株挑选出来并提取质粒进行全自动 DNA 测序，发现突变位点为 Asp¹⁶⁸ \rightarrow Asn, Ala²²⁵ \rightarrow Val, Lys⁴⁴⁰ \rightarrow Asn。用蛋白质模拟技术确定该突变位点 168 位是由 Asn 替代了原来的 Asp，该突变位点位于底物结合部位，接近于该隧道的底部的左侧一方的。在突变位点 440 位中是由 Asn 替代 Lys，该突变位于底物结合部位，在隧道的右侧。我们从 Asn 和 Lys 的结构中发现，Asn 具有远远短于 Lys 的侧链，这一突变大大减少的底物进入该隧道的阻力，隧道的形状更适合于底物。突变位点 225 位 Ala 替代 Val 远离的底物结合部位的，这种远离活性中心的突变是在整体上轻微的改变酶的结构。

通过酶动力学曲线的测定，与 R. D. Schmid 领导的科研小组获得的具有三个突变位点的 P450BM-3 (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) 变体酶相比较，在测定的一例中活性提高了 1.9–2.4 倍。

5. 全细胞生产染料靛蓝

a) 挑取含有该 P450BM-3 变体基因 Asp¹⁶⁸ \rightarrow Asn, Ala²²⁵ \rightarrow Val, Lys⁴⁴⁰ \rightarrow Asn 的阳性克隆接种到 LB 液体培养基中：种子液为试管培养液，接种量 1%–2%，培养基的体积为 100 毫升，pH7.0–7.5，摇床转速为 150–200 转/分钟，在 37 $^{\circ}$ C 培养至

OD0.5-0.7 时加入 IPTG (0.5-1.0 μ m) 诱导, 然后将温度转为 30 $^{\circ}$ C 继续培养 48 小时.

b) 将培养液以 4000-80000 转\分钟离心 10-20 分钟, 放弃上清液, 收获离心后的细胞。离心后的细胞用适量的水冲洗 2-3 次,, 加入适量的四氢呋喃 (THF) 提取蓝色物质, 1000-2000 转\分钟离心保留上清液, 用旋转蒸发器干燥, 然后在干燥好的蓝色沉淀中加入无水乙醇提取数次, 直到最后一次提取液没有红色为止, 将剩下的蓝色物质再用 THF 溶解。

c) TLC 薄层色谱定性分析产生的靛蓝

色谱条件: 预涂硅胶: TLC 板 西德 E. MERCK 公司生产的硅胶 60F25

TLC 板: 10cm \times 10cm \times 2cm, 使用前在 120 $^{\circ}$ C 活化 1 小时

溶剂系统 四氢呋喃: 汽油醚=1: 2 , 无水乙醇均为分析纯

展开方法: 上行法 展开前饱和 5 分钟

展距: 7.5 cm

温度: 室温

试验方法:

用毛细管吸取适量的提取液距 TLC 板底边 1.5 cm 处点样, 待溶剂挥发后立即放入存有展开剂的层析缸中分别进行展开, 待至前沿 7.5 cm 时取出凉干, 并立即扫描, 如附图 2 所示。

扫描条件扫描条件: 228 nm 单波长反射矩齿扫描, 狭缝 0.4 mm \times 0.4

从图 2 中看出从发酵液中提取的蓝色物质和商业出售的标准靛蓝有相同的 R_f 值都为 0.78, 因此我们获得的这一变体基因产生的蓝色物质是靛蓝。

序列表

(1) SEQ ID NO. 1. 信息

(b) 序列特征:

长度: 3150 个碱基

类型: 核酸

链型: 单链

拓扑结构: 线性

(b) 分子类型: cDNA

(c) 最初来源: 巨大芽孢杆菌

(d) 序列描述: SEQ ID NO. 1:

```
ATGACAATTAAGAAATGCCTCAGCCAAAAACGTTTGGAGAGCTTAAAAATTTACCGTTA
TTAAACACAGATAAACCGGTTCAAGCTTTGATGAAAATTGCGGATGAATTAGGAGAAATC
TTTAAATTCGAGGCGCCTGGTCGTGTAACGCGCTACTTATCAAGTCAGCGTCTAATTA
GAAGCATGCGATGAATCACGCTTTGATAAAAACTTAAGTCAAGCGCTTAAATTTGTACGT
GATTTTGCAGGAGACGGGTATTTACAAGCTGGACGCATGAAAAAAATTGGAAAAAGCG
CATAATATCTTACTTCCAAGCTTCAGTCAGCAGGCAATGAAAGGCTATCATGCGATGATG
GTCGATATCGCCGTGCAGCTTGTTCAAAGTGGGAGCGTCTAAATGCAGATGAGCATATT
GAAGTACCGGAAGACATGACACGTTTAAACGCTTGATAACAATTGGTCTTTGCGGCTTTAAC
TATCGCTTTAACAGCTTTTACCGAATCAGCCTCATCCATTTATTACAAGTATGGTCCGTG
GCACTGGATGAAGCAATGAACAAGCTGCAGCGAGCAAATCCAGACGACCCAGCTTATGAT
GAAAAACAAGCGCCAGTTTCAAGAAGATATCAAGGTGATGAACGACCTAGTAGATAAAATT
ATTGCAGATCGCAAAGTAAGCGGTGAACAAAGCGATGATTTATTAACGCATATGCTAAAC
GGAAAAGATCCAGAAACGGGTGAGCCGCTTGATGACGAGAACATTCGCTATCAAATTATT
ACATTTCTTAATTGCGGGACACGAAACAACAAGTGGTCTTTTATCATTGCGCTGTATTTT
TTAGTAAAAATCCACATGTATTACAAAAAGCAGCAGAAGAAGCAGCACGAGTTCTAGTA
GATCCTGTTCCAAGCTACAAACAAGTCAAACAGCTTAAATATGTCGGCATGGTCTTAAAC
GAAGCGCTGCGCTTATGGCCAACTGCTCCTGCGTTTTCCCTATATGCAAAGAAGATACG
GTGCTTGGAGGAGAATATCCTTTAGAAAAAGGCGACGAACTAATGGTTCTGATTCCTCAG
CTTCACCGTGATAAAACAATTTGGGGAGACGATGTGGAAGAGTTCCGTCCAGAGCGTTTT
GAAAATCCAAGTGCATTCGCGAGCATGCGTTTAAACCGTTTGGAAACGGTCAGCGTGCG
TGTATCGGTCAGCAGTTCGCTCTTCATGAAGCAACGCTGGTACTTGGTATGATGCTAAAA
CACTTTGACTTTGAAGATCATACAACTACGAGCTGGATATTAAGAACTTTAACGTTA
```

AATCCTGAAGGCTTTGTGGTAAAAGCAAATCGAAAAAATTCGCTTGGCGGTATTCCT
TCACCTAGCACTGAACAGTCTGCTAAAAAGTACGCAAAAAGGCAGAAAACGCTCATAAT
ACGCCGCTGCTTGTGCTATACGGTTCAAATATGGGAACAGCTGAAGGAACGGCGCGTGAT
TTAGCAGATATTGCAATGAGCAAAGGATTTGCACCGCAGGTCGCAACGCTTGATTCACAC
GCCGAAATCTTCCGCGCGAAGGAGCTGTATTAATTGTAACGGCGTCTTATAACGGTCAT
CCGCCTGATAACGCAAAGCAATTTGTGCGACTGGTTAGACCAAGCGTCTGCTGATGAAGTA
AAAGGCGTTCGCTACTCCGTATTTGGATGCGGCGATAAAAACTGGGCTACTACGTATCAA
AAAGTGCCTGCTTTTATCGATGAAACGCTTGCCGCTAAAGGGGCAGAAAACATCGCTGAC
CGCGGTGAAGCAGATGCAAGCGACGACTTTGAAGGCACATATGAAGAATGGCGTGAACAT
ATGTGGAGTGACGTAGCAGCCTACTTTAACCTCGACATTGAAAACAGTGAAGATAATAAA
TCTACTCTTTCACCTCAATTTGTGCGACAGCGCCGCGGATATGCCGCTTGCGAAAATGCAC
GGTGCCTTTTCAACGAACGTCGTAGCAAGCAAAGAAGCTTCAACAGCCAGGCAGTGCACGA
AGCACGCGACATCTTGAAATTGAACTTCCAAAAGAAGCTTCTTATCAAGAAGGAGATCAT
TTAGGTGTTATTCCTCGCAACTATGAAGGAATAGTAAACCGTGTAACAGCAAGTTCCGGC
CTAGATGCATCACAGCAAATCCGTCTGGAAGCAGAAGAAGAAAAATTAGCTCATTTGCCA
CTCGCTAAAACAGTATCCGTAGAAGAGCTTCTGCAATACGTGGAGCTTCAAGATCCTGTT
ACGCGCACGCAGCTTCGCGCAATGGCTGCTAAAACGGTCTGCCCGCCGCATAAAGTAGAG
CTTGAAGCCTTGCTTGAAAAGCAAGCCTACAAAGAACAAGTGCTGGCAAACGTTTAAACA
ATGCTTGAAGTCTTGAAAAATACCCGGCGTGTGAAATGAAATTCAGCGAATTTATCGCC
CTTCTGCCAAGCATAACGCCGCGCTATTACTCGATTTCTTCATCACCTCGTGTCGATGAA
AAACAAGCAAGCATCACGGTCAGCGTTGTCTCAGGAGAAGCGTGGAGCGGATATGGAGAA
TATAAAGGAATTGCGTCGAACTATCTTGCCGAGCTGCAAGAAGGAGATACGATTACGTGC
TTTATTTCCACACCGCAGTCAGAATTTACGCTGCCAAAAGACCCTGAAACGCCGCTTATC
ATGGTCGGACCGGGAACAGGCGTCGCGCCGTTTAGAGGCTTTGTGCAGGCGCGCAAACAG
CTAAAAGAACAAGGACAGTCACTTGGAGAAGCACATTTATACTTCGGCTGCCGTTACCT
CATGAAGACTATCTGTATCAAGAAGAGCTTGAAAACGCCCAAAGCGAAGGCATCATTACG
CTTCATACCGCTTTTTCTCGCATGCCAAATCAGCCGAAAACATACGTTACGCACGTAATG
GAACAAGACGGCAAGAAATTGATTGAACTTCTTGATCAAGGAGCGCACTTCTATATTTGC
GGAGACGGAAGCCAAATGGCACCTGCCGTTGAAGCAACGCTTATGAAAAGCTATGCTGAC
GTTACCAAGTGAGTGAAGCAGACGCTCGCTTATGGCTGCAGCAGCTAGAAGAAAAGGC
CGATACGCAAAGACGTGTGGGCTGGGTAA

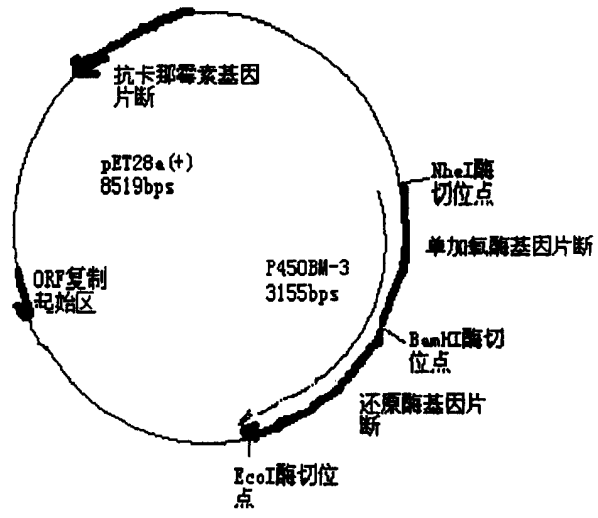


图 1

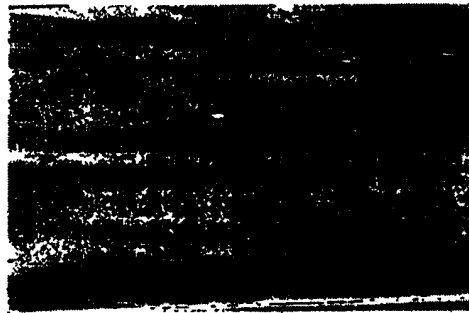


图 2.

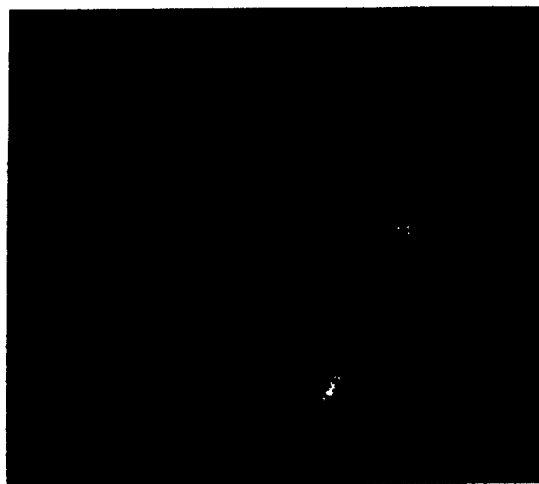


图 3

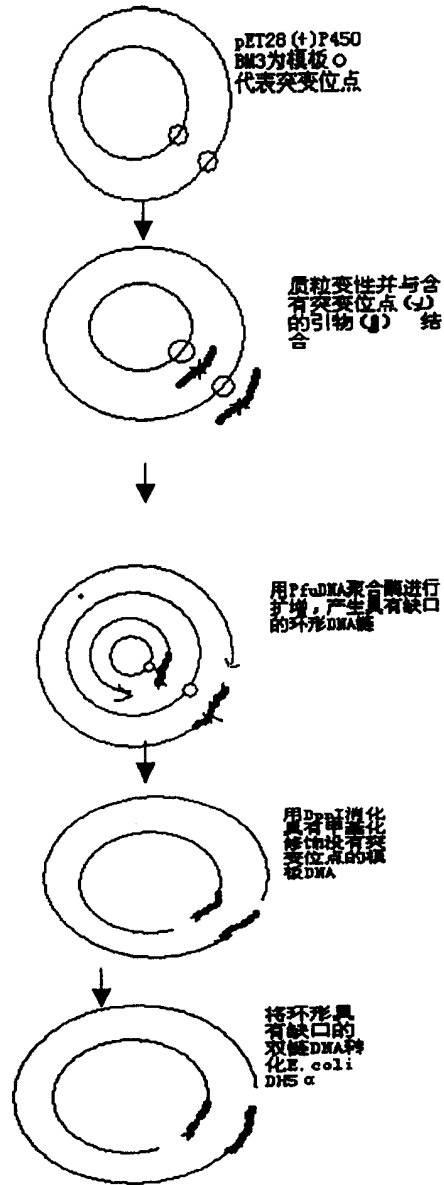


图4