



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104630229 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201510074949. 0

C12R 1/07(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 02. 11

(71) 申请人 华南理工大学

地址 510006 广东省广州市番禺区广州大学
城华南理工大学

(72) 发明人 潘力 廖瑜玲 王斌 刘欣

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 宫爱鹏

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010. 01)

C12N 15/75(2006. 01)

C12N 15/56(2006. 01)

C12N 15/54(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

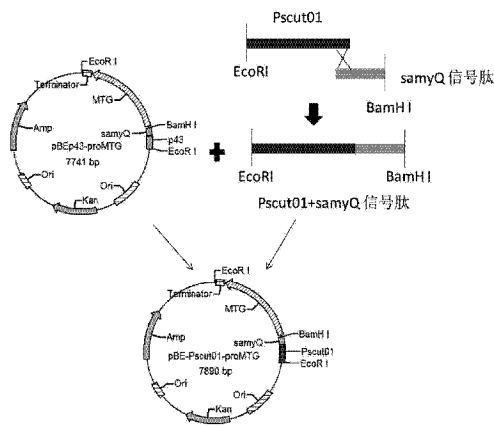
序列表8页 附图5页

(54) 发明名称

一种具有启动子功能的 DNA 片段与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种具有启动子功能的 DNA 片段与应用,所述 DNA 片段为如下任一序列:(a) 如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列或者其互补序列;(b) 对 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列进行一个或多个核苷酸取代、缺失或添加所获得的,具有与 SEQ ID NO:1 相同的作为启动子功能的核苷酸序列或者其互补序列;(c) 对 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列添加一个或多个核糖体结合位点的序列。该 DNA 具有启动子功能,具有很强的表达活性,在不需要添加诱导物的条件下即能实现外源基因的高表达,将其运用于耐热 β -半乳糖苷酶和转谷氨酰胺酶的表达。特别为解淀粉芽孢杆菌外源基因的表达提供了有效的工具。



1. 一种具有启动子功能的 DNA 片段,其特征在于,所述 DNA 片段为如下任一序列:
 - (a) 如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列或者其互补序列;
 - (b) 对 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列进行一个或多个核苷酸取代、缺失或添加所获得的,具有与 SEQ ID NO:1 相同的作为启动子功能的核苷酸序列或者其互补序列;
 - (c) 对 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列添加一个或多个核糖体结合位点的序列。
2. 根据权利要求 1 所述的 DNA 片段,其特征在于,所述核糖体结合位点的序列为 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列。
3. 一种载体,其特征在于,所述载体包含权利要求 1 所述的 DNA 序列和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列。
4. 根据权利要求 3 所述载体,其特征在于,其序列 SEQ ID NO:15 所示。
5. 一种表达质粒,其特征在于,所述质粒包含权利要求 3 所述载体以及与该载体可操作连接的位于所述 DNA 序列下游编码异源蛋白质核苷酸序列。
6. 根据权利要求 5 所述的质粒,其特征在于,所述异源蛋白质核苷酸序列为好热地芽孢杆菌 (*Geobacillus kaustophilus*) 编码的耐热 β -半乳糖苷酶的核苷酸序列,或为茂原链霉菌 (*Streptomyces mobaraensia*) 编码的转谷氨酰胺酶的核苷酸序列。
7. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为权利要求 3 或 4 所述的载体或者权利要求 4 或 5 所述的质粒转化或转导的宿主细胞。
8. 根据权利要求 7 所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为芽孢杆菌。
9. 根据权利要求 8 所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为解淀粉芽孢杆菌。

一种具有启动子功能的 DNA 片段与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 DNA 片段,具体涉及一种具有启动子功能的 DNA 片段以及它的用途。

背景技术

[0002] 解淀粉芽孢杆菌是一种在农业、医药和食品工业都有广泛用途的重要的工业微生物生产菌株之一。目前在解淀粉芽孢杆菌中高效生产高附加值的重组酶仍有许多限制,其中缺乏高效转录的启动子、可以控制的启动子,具有特征的启动子是限制基因高效表达的主要限制因素。启动子是基因表达的重要组成元件,是 RNA 聚合酶结合开始转录合成 mRNA 的地方,启动子与 RNA 聚合酶的结合效率是影响酶基因表达的关键。不同于大肠杆菌,研究表明枯草菌属含有丰富的 σ 因子(12种),RNA 聚合酶与启动子的特异性结合取决于 σ 因子,给在枯草菌属中搜寻高效的启动子带来了难度。

[0003] 目前报道用于枯草菌属表达重组蛋白的有三类启动子,首先是诱导型启动子。Pspac(杂合启动子,来源于枯草芽孢杆菌噬菌体 SP0-1 与大肠杆菌 lac 操纵子的融合)需要添加 IPTG 诱导,其弱点是启动效率不强需要改进。Pxy1 启动子需要木糖作为诱导物,最初运用于枯草芽孢杆菌中,现在也运用于巨大芽孢杆菌的蛋白表达系统,通过加添 0.1-2% 的木糖,启动子效率上调 200 倍。PcitM 来源于枯草芽孢杆菌,只需要添加 2mM 柠檬酸盐作为诱导物就可以合成大量蛋白;PspacB 用于生产一系列降解酶包括胞内水解酶,胞外分泌酶果聚糖蔗糖酶,碱性蛋白水解酶等。Ptet 用四环素作为诱导,Geissendorfer 和 Hillen 将其成功用于生产葡糖脱氢酶和人单链尿激酶。基于 glycine riboswitch 特点构建利用甘氨酸作为诱导物的启动子体系。其次是与生长阶段相关的启动子类型。比如 rpsF 基因启动子,编码 S6 和 S18 核糖体蛋白,单链 DNA 锚定蛋白,在对数生长阶段被激活。Nijland 等利用 rpsF 基因启动子在产气荚膜杆菌中大量生产 β -类毒素。aprE 编码枯草杆菌蛋白酶,其基因启动子在生长稳定期被激活,属于 sigA 因子类型的启动子,启动强度高。Jan 等利用该启动子的单拷贝重组蛋白整合枯草芽孢杆菌基因组中可以获得 10% 的总蛋白量。最后是自诱导启动子。Ppst 启动子可以在磷酸盐饥饿状态的情况下表达上调 5000 倍。Kerovuori 利用 Ppst 启动子获得 2.9g/L 植酸酶占胞外总蛋白的 65%。PgsiB 属于 sigB 因子类型的启动子,其特点是其 mRNA 有很长的半衰期达到 20min,是应对压力时被诱导,比如温度压力,盐浓度压力, pH 压力或者乙醇压力。基于 lysine riboswitch 特点的启动子(与 glycine riboswitch 相反)在细胞质中存在大量的赖氨酸时转录终止。

[0004] 而解淀粉芽孢杆菌的启动子的挖掘和应用和其它芽孢杆菌属相比就非常少了。非专利文献 Marcus Schallme et al. (Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology [J]. 2004, 50:1-17.) 报道利用解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶启动子用于表达胞外 α -淀粉酶具有明显的热稳定性并用于糖化作用中,其缺点在于 α -淀粉酶启动子的活性还需要进一步提高。专利文献王正祥(王正祥.一种 β -葡聚糖酶的高效制备方法. CN201110001750 [P]. 2006.) 报道将源于地

衣芽孢杆菌高温 α -淀粉酶启动子和来源于解淀粉芽孢杆菌的中温 α -淀粉酶启动子组合成杂合启动子成功产业化生产 β -葡聚糖酶,该杂合启动子具有一定的偏好性。因此,需要挖掘更多优良性状的不同启动子运用于工业化生产中。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于在解淀粉芽孢杆菌中寻找高表达的启动子,并能运用于异源蛋白的表达和生产。本发明提供了一种 DNA 片段,该 DNA 片段具有启动子的功能;本发明还提供了所述 DNA 片段的用途。

[0006] 该方法涉及运用 RNA-seq 技术测定解淀粉芽孢杆菌在对数生长后期的全基因转录组,筛选高表达的基因,在解淀粉芽孢杆菌中找到一个转录活性高的基因。克隆所筛选的高表达基因对应的启动子序列,并应用于耐热 β -半乳糖苷酶基因 (bgaB) 的表达,通过测定 bgaB 的活性,证明筛选的启动子在解淀粉芽孢杆菌中具有高活性。应用于转谷氨酰胺酶 (MTG) 的表达,通过 SDS-PAGE 电泳图验证其蛋白表达。

[0007] 本发明提供了一种 DNA 片段,所述 DNA 片段为如下任一序列:

[0008] (a) 如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列或者其互补序列;

[0009] (b) 对 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列进行一个或多个核苷酸取代、缺失或添加所获得的,具有与 SEQ ID NO:1 相同的作为启动子功能的核苷酸序列或者其互补序列;

[0010] (c) 对 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列添加一个或多个核糖体结合位点的序列。

[0011] 所述核糖体结合位点的序列为 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列。

[0012] 一种载体,所述载体包含权利要求 1 所述的 DNA 序列和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列,优选地,所述载体为质粒载体,如序列 SEQ ID NO:15 所示。

[0013] 一种表达质粒,所述质粒包含上述载体以及与该载体可操作连接的位于所述 DNA 序列下游编码异源蛋白质核苷酸序列。

[0014] 所述异源蛋白质核苷酸序列为好热地芽孢杆菌 (*Geobacillus kaustophilus*) 编码的耐热 β -半乳糖苷酶的核苷酸序列,或为茂原链霉菌 (*Streptomyces mobaraensia*) 编码的转谷氨酰胺酶的核苷酸序列。

[0015] 一种宿主细胞,所述宿主细胞为上述载体或者上述质粒转化或转导的宿主细胞。

[0016] 所述宿主细胞为芽孢杆菌。

[0017] 所述宿主细胞为解淀粉芽孢杆菌。

[0018] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0019] 本发明提供了一种 DNA 片段,该 DNA 是一启动子,具有很强的特异表达活性,在不需要添加诱导物的条件下即能实现外源基因的高表达,特别是为解淀粉芽孢杆菌表达外源基因提供了有效的工具。

附图说明

[0020] 图 1 是实施例 2 中生长对数后期的解淀粉芽孢杆菌提取总 RNA 电泳图 (1,2: 生长对数后期的解淀粉芽孢杆菌提取总 RNA)。

[0021] 图 2 是实施例 3 中扩增 P_{scut01} 的 PCR 产物电泳图 (M:marker DNA;1,2: P_{scut01} 的 PCR 扩增产物)。

[0022] 图 3 是实施例 4 中扩增 bgaB 基因 PCR 产物电泳图 (M:marker DNA ;1,2:bgaB 基因 PCR 扩增产物)。

[0023] 图 4 是实施例 4 中扩增 biobrick 的 PCR 片段电泳图 (M:marker DNA ;1,2:biobrick 的 PCR 扩增产物)。

[0024] 图 5 是实施例 5 中融合 PCR 扩增 $P_{scut01}+samyQ$ 信号肽片段电泳图 (M:marker DNA ;1: $P_{scut01}+samyQ$ 信号肽 PCR 扩增产物)。

[0025] 图 6 是实施例 4bgaB 基因表达质粒 pBE-P43-bgaB 构建示意图。

[0026] 图 7 是实施例 4 表达质粒 pBE- P_{scut01} -bgaB 构建示意图。

[0027] 图 8 是实施例 5 中 MTG 表达质粒 pBE- P_{scut01} -MTG 构建示意图。

[0028] 图 9 是实施例 7 带有 P_{scut01} 启动子的 bgaB 基因表达质粒的解淀粉芽孢杆菌转化子的 bgaB 酶活曲线。

[0029] 图 10 是实施例 7 带有 P_{scut01} 启动子的 MTG 表达的 SDS-PAGE 电泳胶图。

具体实施方式

[0030] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0031] 以下实施例中所采用的分子生物学实验技术包括 PCR 扩增、质粒提取、DNA 片段酶切、连接、凝胶电泳等具体参见《分子克隆实验指南》(第三版)(Sambrook J, Russell DW, Janssen K, Argentine J. 黄培堂等译,2002,北京:科学出版社)。

[0032] 从一株解淀粉芽孢杆菌培养的生产对数后期阶段提取细菌 RNA。对细菌 RNA 进行转录组测序建库,去掉核糖体 RNA,对 mRNA 进行反转录建立 cDNA 文库。对细菌全转录组进行分析,根据代表基因转录水平的标准化数据 RPKM 值判断其表达量水平较高的基因,然后分析其启动子区。将所选的启动子接入载体,测定启动子在解淀粉芽孢杆菌中的活性。

[0033] 实施例 1

[0034] 细菌的培养

[0035] 将解淀粉芽孢杆菌 (-80°C) 甘油管取出划线于 LB 固体平板上 37°C 培养 20-24h,挑取单菌落于 10mL 的 1% 终浓度葡萄糖的 LB 培养基, 37°C , 200rpm 培养至 $\text{OD}_{600} 8.5 \sim 10$ (U2000 型全波长分光光度计,日本 Hitachi 公司)。

[0036] 实施例 2

[0037] 细菌总 RNA 的提取、转录组文库的建立及测序

[0038] 收集实施例 1 中 1mL 细胞于 10000g 快速离心 1min 用于提取细菌总 RNA,如图 1。具体的提取方法参考天根生化科技有限公司的细胞细菌总 RNA 提取试剂盒。用于 RNA-Seq 测序文库制备的样品经 Agilent Technologies 2100Bioanalyzer 检测合格,经过 DNaseI (RNase Free) 处理混入的 DNA 分子,用 Ribo-Zero (Gram-Positive Bacteria) kit (USA) 去掉占总 RNA 绝大多数的 rRNA,纯化得到的 mRNA。将 mRNA 先打断为合适大小的片段,以片段化的 mRNA 为模板,加入反转录酶和随机引物,合成双链 cDNA,然后用试剂盒 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) 纯化合成的 cDNA。补平 cDNA 的粘性末端,然后在一条链上加一个腺嘌呤核苷酸,以这个突出的 A 配对含有突出的 T 的一级接头序列。在分别能配对一级接头两端的引物存在的条件下进行 PCR 扩增,经过多次循环,将 PCR 结果进行凝胶电泳并切胶回收预定大小的胶带,这时得到的加上二级接头的序列组成的文库进行

上机测序。RNA-Seq 文库的测序由广州基迪奥生物科技有限公司提供测序服务。测序时分别将两端向中心的 100bp 的序列信息读出 (PE100), 称为 reads, 将这些 reads 比对到细菌基因组上就可以进行注释及表达量计算等后续生物信息学分析。

[0039] 实施例 3

[0040] 筛选并克隆启动子片段

[0041] 通过 RNA-Seq 测序数据分析解淀粉芽孢杆菌转录本结构及全基因组分析含有转录起始位置的基因, 通过 RPKM 量化, 筛选一株表达量高的基因, 其序列如 SEQ ID NO 1 所示。以解淀粉芽孢杆菌 XH7 菌株的基因组 DNA 为模板, 以人工合成引物 SEQ ID NO 3、SEQ ID NO 4 进行扩增 300bp 大小的 DNA 片段, 即 Pscut01 启动子片段, 如图 2, 与目的产物大小相符。引入酶切位点 EcoRI, KpnI。

[0042] 实施例 4

[0043] 构建 bgaB 表达质粒

[0044] bgaB 基因以 *Geobacillus kaustophilus* (CGMCC 1.3655) 为模板, 人工合成片段 SEQ ID NO5、SEQ ID NO6 为引物扩增约 2000bp 大小的 PCR 产物 (如图 3), 用限制性内切酶 KpnI 和 SalI 消化并纯化 PCR 产物, 插入质粒 pBE-p43 质粒用同样酶切位点 KpnI 和 SalI 切开的缺口, 得到 pBE-P43-bgaB 质粒 (如图 6)。质粒用 Sanger 法确认克隆的 bgaB 基因的碱基序列。

[0045] 以两段人工合成片段 SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8 退火延伸得到的 biobrick 的 PCR 片段带有酶切位点 AfI II 和 Sal I, 用限制性内切酶消化并纯化的约 100bp 大小的 PCR 产物 (如图 4) 插入质粒 pBE-P43-bgaB 相同内切酶位置, 得到 pBE-rbs-biobrick-bgaB 质粒, 设计的 biobrick 的 PCR 片段如 SEQ ID NO 9 所示, 含有 SEQ ID NO 2 序列。扩增的 PCR 片段碱基序列由 Sanger 测序确认。实施例 3 中得到带 EcoRI, KpnI 酶切位点的 Pscut01 启动子片段经过酶切、纯化后插入 pBE-rbs-biobrick-bgaB 质粒构建得到目的启动子的 bgaB 基因表达质粒 pBE-P_{scut01}-bgaB (如图 7)。

[0046] 实施例 5

[0047] 构建 MTG 表达质粒

[0048] 以 pBE-P_{scut01}-bgaB 质粒为模板, 人工合成片段 SEQ ID NO 10、SEQ ID NO11 为引物扩增 5' 端带有 EcoR I 酶切位点的 P_{scut01} 片段, 设计的扩增片段含有 SEQ ID NO 2 序列。以质粒 pBEp43-proMTG (专利文献: 潘力等. 一株重组的枯草芽孢杆菌及其生产转谷氨酰胺酶的方法. CN201210052578. 2[P]. 2012.) 为模板, 人工合成片段 SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 13 为引物扩增 3' 端带有 BamH I 酶切位点的 samyQ 信号肽片段。分别将 PCR 扩增的 P_{scut01} 片段和 samyQ 信号肽片段胶回收, 然后取等摩尔比例的胶回收产物作为模板, 用人工合成片段 SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 13 扩增得到大小约 450bp 融合片段 P_{scut01}+samyQ 信号肽 (如图 5)。融合 DNA 片段的核苷酸序列见序列表 SEQ ID NO 14, 融合 DNA 片段的 5' 端和 3' 端分别带有 EcoR I 和 BamH I 的酶切位点。用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 消化 P_{scut01}+samyQ 融合片段, 回收, 纯化后插入 pBEp43-proMTG 质粒用相同内切酶酶切的位置, 构建得到 MTG 表达质粒 pBEp_{scut01}-proMTG (如图 8)。

[0049] 实施例 6

[0050] 筛选解淀粉芽孢杆菌转化体

[0051] 将构建好的目的启动子的 bgaB 表达质粒 pBE-P_{scut01}-bgaB 和 MTG 表达质粒 pBEp_{scut01}-proMTG 先用化学转化法（氯化钙法）转化至大肠杆菌 (*E. coli* JM110)，然后从重组 *E. coli* JM110 提取质粒 pBE-P_{scut01}-bgaB 和 pBEp_{scut01}-proMTG，用电转化的方法转化至解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* XH7，具体方法参考非专利文献记录 Natalia P, Zakataeva, Oksana V et al. A simple method to introduce marker-free genetic modification into chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains[J]. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010, 85:1201-1209)，得转化菌株 *B. amyloliquefaciens* XH7 (pBE-P_{scut01}-bgaB) 和 *B. amyloliquefaciens* XH7 (pBE_{p_{scut01}}-proMTG)。

[0052] 实施例 7

[0053] 评估启动子的表达水平

[0054] 菌液预处理：将得到的转化子 *B. amyloliquefaciens* XH7 (pBE-P_{scut01}-bgaB) 培养于 LB 培养基中 (20ug/mL 卡那霉素)，37℃ 200rpm 培养 20h，收集 250uL 菌体，10000g 离心 1min，弃上清液用，pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗两次，37℃ 用 2mg/mL 溶菌酶处理 10min。溶菌酶处理后冻于液氮中 5min，最后置于 40℃ 500W 超声波 5min。10000g 离心 1min 上清用来测定 β-葡萄糖半乳糖苷酶酶活。

[0055] β-葡萄糖半乳糖苷酶酶活的测定：将 32uL 一定稀释度的预处理菌液与 288uL 0.25% ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside, 邻硝基苯 β-D-半乳糖苷) 混合，55℃ 下温育 15min，反应终止加入 320uL 的 10% Na₂CO₃。反应呈显色反应，在 405nm 波长下测定吸光值。对照菌株 *B. amyloliquefaciens* XH7 (pBE-rbs-biobrick-bgaB) 无显色反应，在 405nm 波长下测定吸光值 (0.025) 与空白对照 (PBS, 0.02) 差不多，无 β-葡萄糖半乳糖苷酶活性 (如图 9)。结果表明启动子 Pscut01 启动 β-葡萄糖半乳糖苷酶表达，酶活在 18h-26h 的表达最高，其中 24h 达到最高酶活 5300mU/mL。

[0056] 挑取解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* XH7 (pBE-p_{scut01}-proMTG) 的单菌落于 10mL LB 培养基中 (卡那霉素 20ug/mL)，37℃，200rpm 活化 14-16h，将活化的种子接种于 50mL LB 培养基中 (卡那霉素 20ug/mL) 接种量为 1% (体积比)，37℃，200rpm 发酵 24h 离心取上清，上清液跑 SDS-PAGE 电泳，与野生型解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* XH7 作为对照，蛋白胶图显示在 44-46KDa 有条带和 MTG 蛋白大小一致，而野生型对照在此大小范围内无条带，实验结果说明 MTG 蛋白酶原得到表达 (如图 10)。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 华南理工大学

<120> 一种具有启动子功能的 DNA 片段与应用

<130> 1

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 301

<212> DNA

<213> 解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)

<400> 1

tgggctata gccaaagcgg aaggcaacgg actitgactc cgtcatcgt tggtcgaat 60

ccagctagcc cagtcaga cacctttac ataaggtgtc ttttttacg gtatttacc 120

tcgatttcg attgtcacc agatatacta ttttaagct gctgtaagg cagtatttc 180

tgtattttcc atctacacc tgctgaaat ttggtaaaat aaatgtaata aaaaaaatga 240

aaccttttaa aacaatcaac gtatagatac agaccggtga agggcagagg taagataaaa 300

c 301

[0002]

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 2

ggfacctgat caattatagg taagagagga atgtcgac

38

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 3

ccggaattct tgggctatag ccaagcggta aggcaacgga c

41

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0003]

<220>

<223> 1

<400> 4

cggggtaccg tttatctta cctctgcct tcac

34

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 5

gcacgggga ccagatctat gaatgtgta tectc

35

<210> 6

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 6

acgctgac aacctgaag aatagcttc tcaagggtt tgctaaacct tccggctt

59

[0004]

<210> 7

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 7

cttaaggttt ctfcgaatc gcggccgctf ctagagtact agtagcggcc gctgcagga 59

<210> 8

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 8

gtcgacatc ctctctacc talaaltgat cagglaccgl ttcttctgc ageggccgc 59

<210> 9

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0005]

<220>

<223> 1

<400> 9

cttaaggttt cttegaattc gggccgctt ctagagtact agtagcggcc getgcaggaa 60

gaaacggtac ctgatcaatt ataggtaaga gaggaatgtc gac 103

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 10

ccggaattct tgggctatag ccaagcgg 29

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 11

[0006]

tttgaatcat attctctctct tacctataat tg

32

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 12

agagaggaat atgattcaaa aacgaaagcg

30

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 13

cgcggaacccg gctgatgttt ttgtaatcg

29

<210> 14

<211> 444

<212> DNA

[0007]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

<400> 14

ccggaattct tgggctatag ccaagcggta aggcaacgga cttgactcc gtcatgcgft 60

ggfegaate cagctagccc agtctcagac acctttaca taaggtgtct tttttaagg 120

tatttaacct cgattccga ttgtcatca gatatactat tftaagctg ctgtaaggc 180

agtataftct gtattttcca tctacacct gcctgaaatt tggtaaata aatgtaataa 240

aaaaaatgaa acctttaaa acaatcaacg tatagataca gaccggtgaa gggecagaggt 300

aagataaac ggtacctgat caattatagg taagagagga atatgattca aaaacgaaag 360

eggacagttt cgttcagact tgtgctatg tgcacgctgt tattgtcag tftgccgatt 420

acaaaaacat cagccggatc cgcg 444

<210> 15

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1

[0008]

<400> 15	
ttgggctata gccaaagcgg aaggcaacgg actttgactc cgtcacgcgt tggftcgaat	60
ccagctagcc cagctcaga cacctttac ataagggtc ttttttacg gtatfffacc	120
tcgallccg atgttcac agatatac ttttaagct gctgtaagg cagtatafc	180
tgtatftcc atctacacc tgcctgaaat ttgtaaaat aaatgtaata aaaaaatga	240
aacctftaa aacaatcaac gtatagatac agaccggtga agggcagagg taagataaaa	300
cggtaactga tcaattatag gtaagagagg aatgtcgac	339

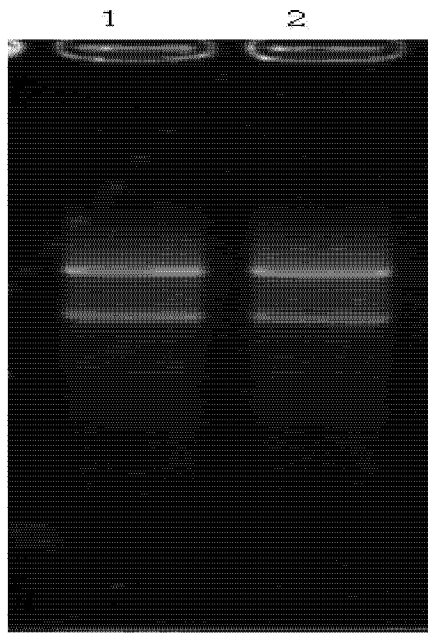


图 1

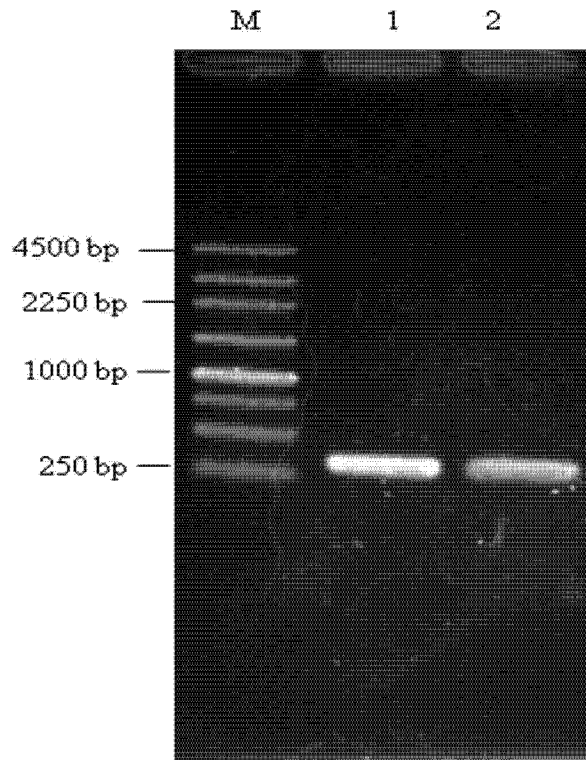


图 2

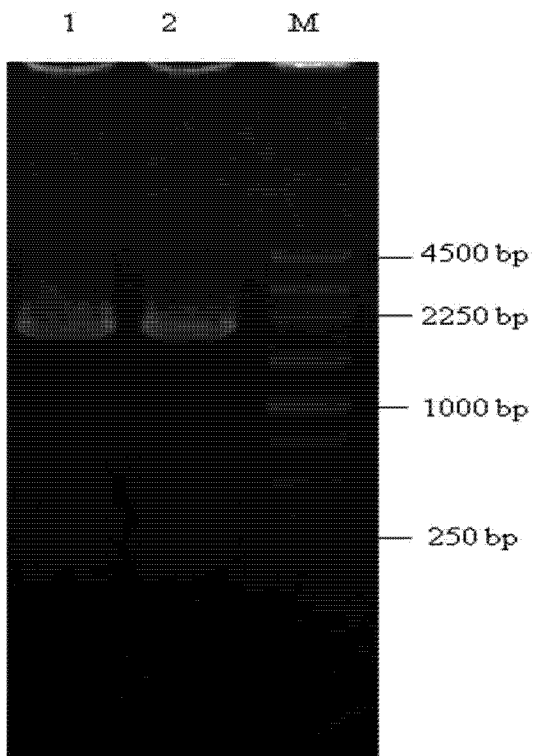


图 3

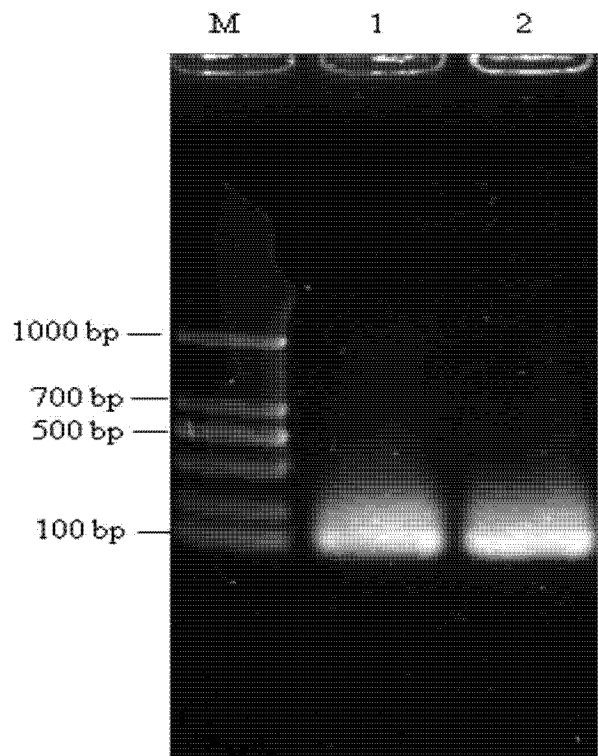


图 4

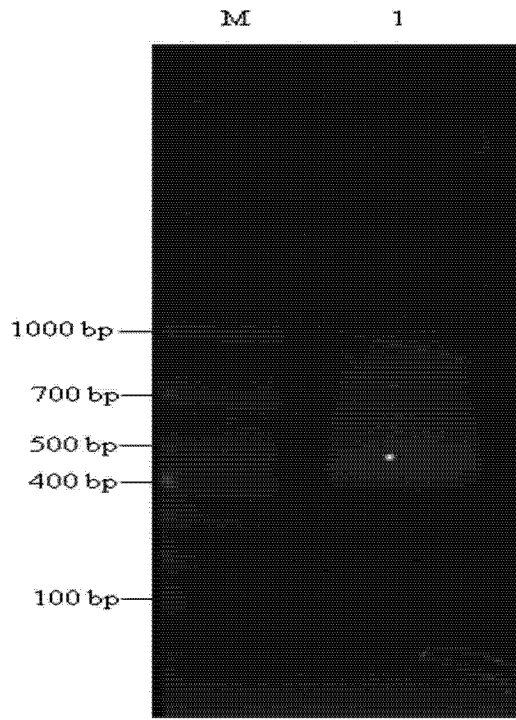


图 5

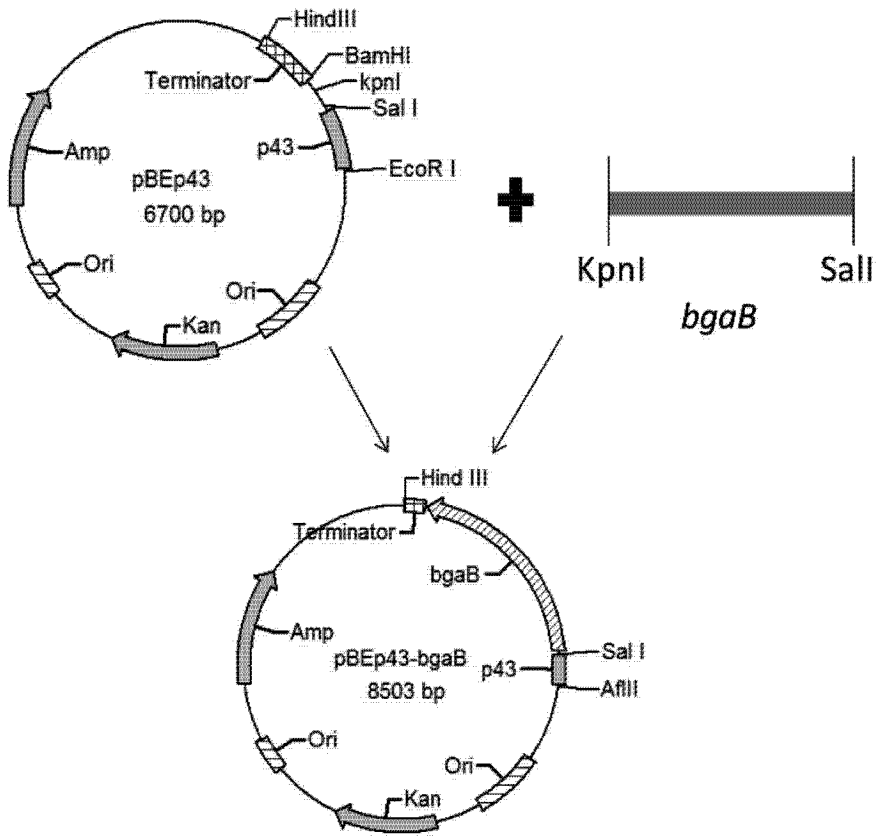


图 6

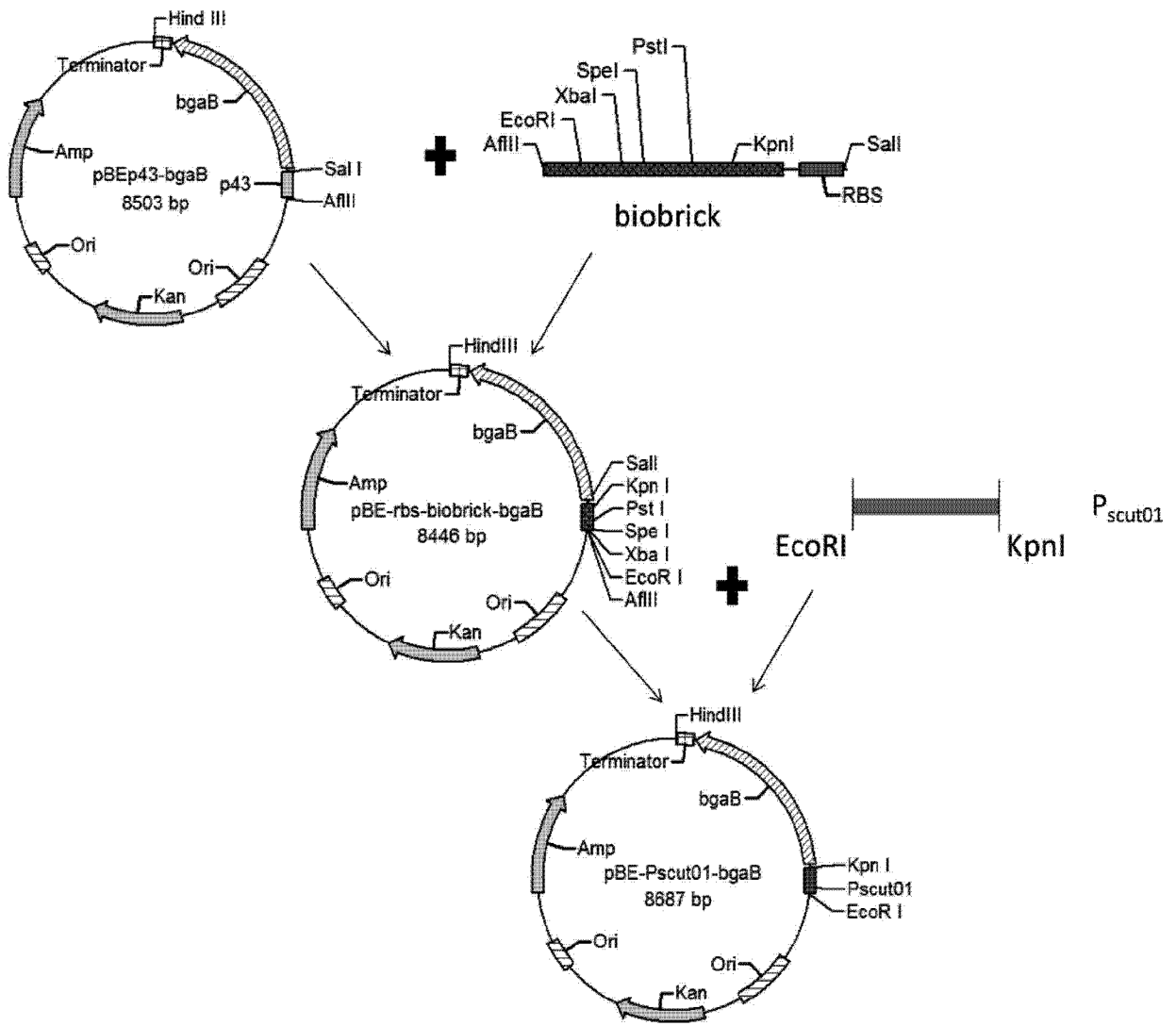


图 7

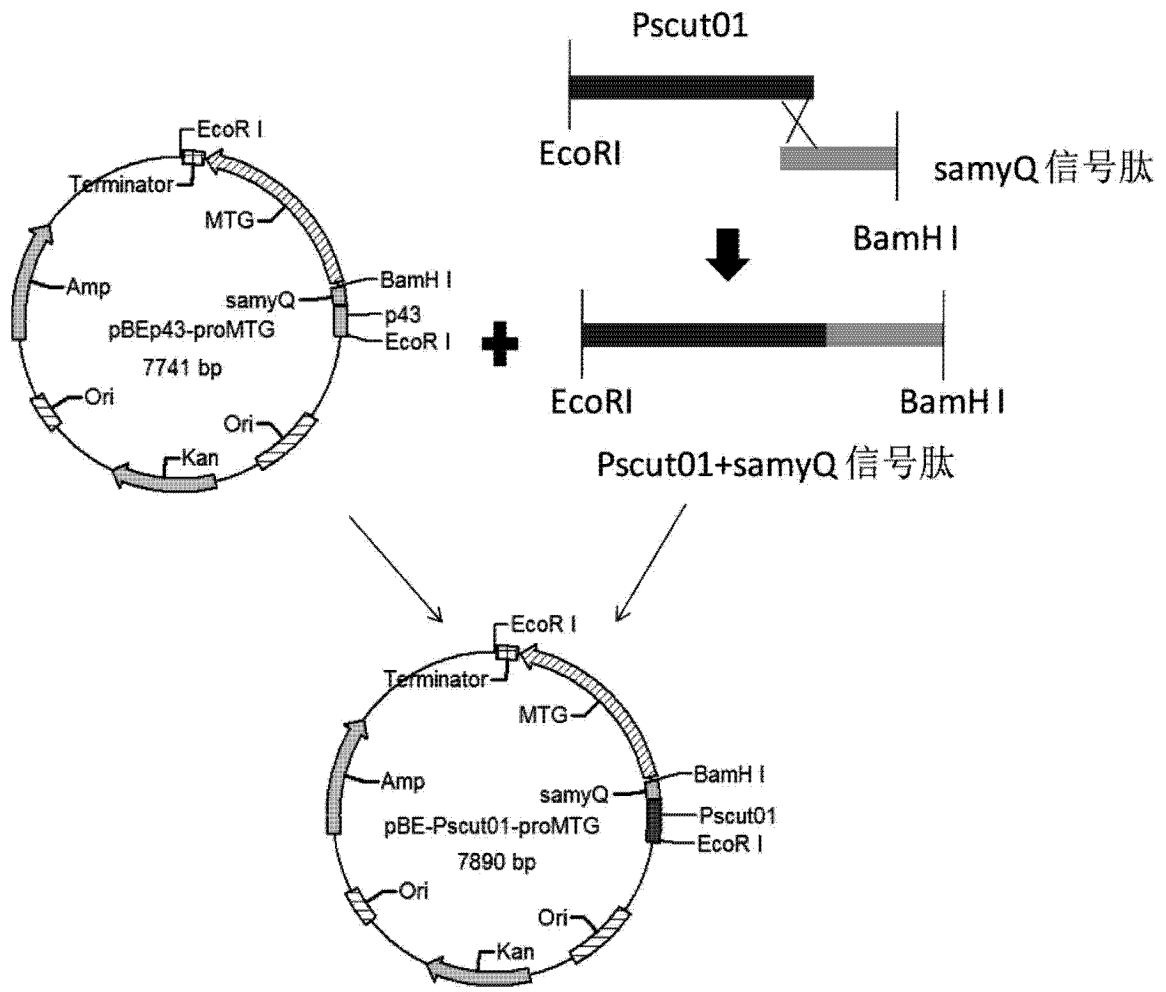


图 8

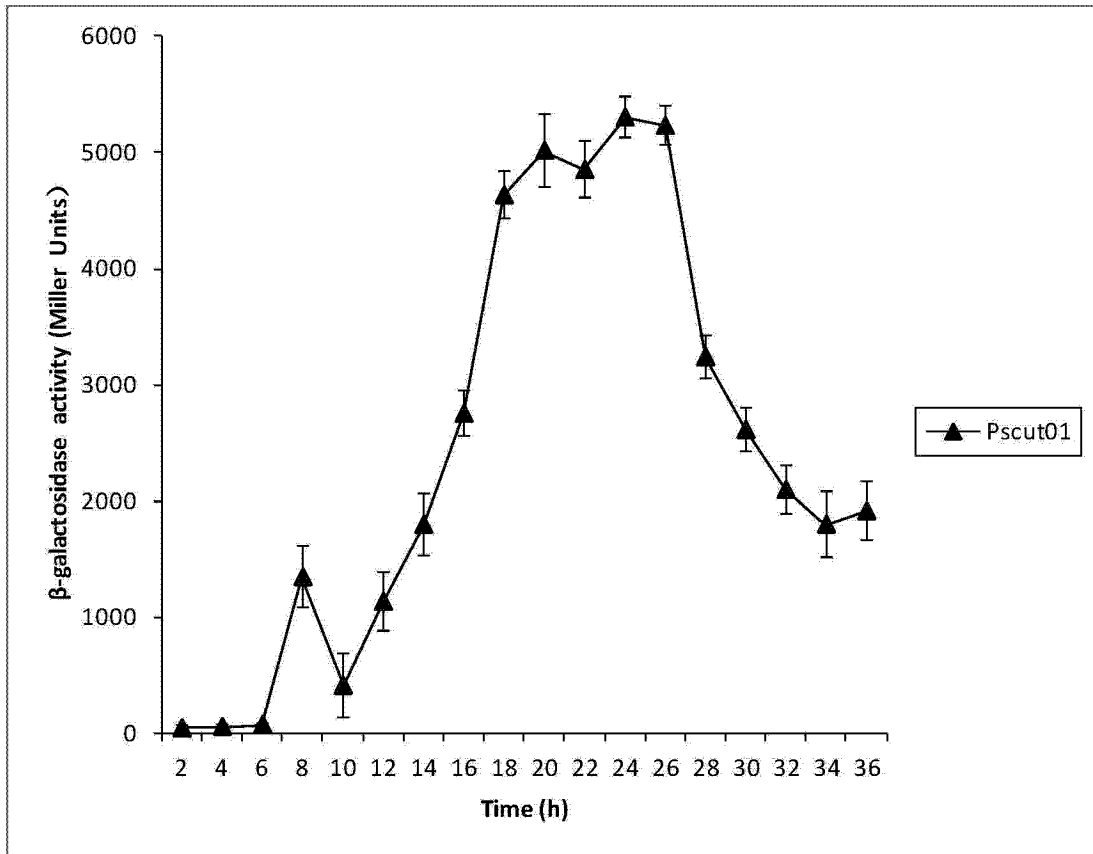


图 9

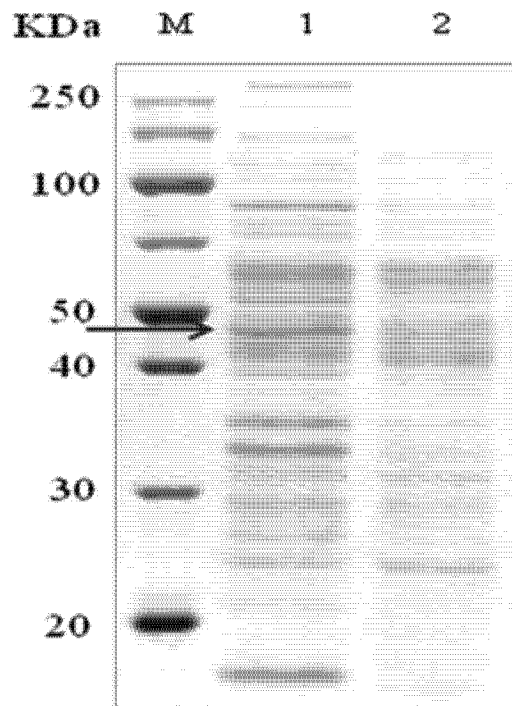


图 10