



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104220587 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201380017560. 1

C12N 15/63 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 01. 29

C12N 15/70 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12P 7/40 (2006. 01)

61/632, 777 2012. 01. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/023690 2013. 01. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/116244 EN 2013. 08. 08

(71) 申请人 麦兰特公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 R·R·约卡姆 龚巍 S·多勒

R·西勒斯 M·甘地 J·G·佩罗

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书37页

序列表98页 附图10页

(54) 发明名称

从经基因改造的微生物生产黏康酸

(57) 摘要

本发明处于使用生物催化剂生产可再生化学原料的领域, 该生物催化剂已经经基因改造增加了其将可再生碳源转化成有用化合物的能力。更具体而言, 本发明提供利用基因修饰的生物体生产黏康酸形式的可再生碳源的方法。

1. 从非芳族碳源开始生产顺,顺-黏康酸的经基因改造的微生物,其中将所有编码在黏康酸通路中起作用的蛋白质的基因整合到所述微生物的染色体 DNA 中。

2. 权利要求 1 的经基因改造的微生物,其中所述编码在黏康酸通路中起作用的蛋白质的基因选自自由 aroZ、qa-4、asbF、quiC、aroY、和 catAX 组成的组。

3. 权利要求 1 的经基因改造的微生物生物体,其包含编码不动杆菌属(Acinetobacter) 细菌的 QuiC 酶或所述 QuiC 酶的同源物的基因。

4. 权利要求 1 的经基因改造的微生物,其包含一种或多种编码在莽草酸通路中起作用的蛋白质的外源基因。

5. 权利要求 4 的经基因改造的微生物,其中将所述编码在莽草酸通路中起作用的蛋白质的外源基因中的一种或多种整合到所述生物体的染色体 DNA 中。

6. 权利要求 4 的经基因改造的微生物,其中所述编码在莽草酸通路中起作用的蛋白质的外源基因选自自由 aroB、aroD、aroF、aroG、aroH、tktA、talB、rpe 和 rpi 组成的组。

7. 权利要求 4 的经基因改造的生物体,其中所述编码在黏康酸通路或莽草酸通路中起作用的蛋白质的基因无一从需要补料化学品用于诱导的启动子表达。

8. 权利要求 1 的经基因改造的宿主细菌,其中芳族氨基酸生物合成的负调节蛋白的活性实质上降低或消除。

9. 权利要求 8 的经基因改造的微生物,其中芳族氨基酸生物合成的负调节蛋白是 TyrR 蛋白或 TyrR 蛋白的同源物。

10. 权利要求 8 的经基因改造的微生物,其中编码芳族氨基酸生物合成的负调节蛋白的基因已被突变。

11. 权利要求 1 的经基因改造的生物体,其包含编码渗漏 AroE 酶的 aroE 基因。

12. 权利要求 1 的经基因改造的微生物生物体,其中至少一种在莽草酸通路中有活性的酶实质上抵抗所述微生物的代谢物的抑制。

13. 权利要求 12 的经基因改造的生物体,其包含 aroG* 基因,所述 aroG* 基因编码实质上抵抗苯丙氨酸抑制的 DAHP 合酶。

14. 权利要求 12 的经基因改造的生物体,其包含编码 DAHP 合酶的 aroG* 基因,所述 aroG* 基因选自自由 aroG*20-893、aroG*20-897、aroG*20-899、aroG*20-901、aroG*111、aroG*211、aroG*212、aroG*311、aroG*312、aroG*411、aroG*412 和 aroG*511 组成的组。

15. 权利要求 1 的经基因改造的微生物,其中所述微生物是细菌。

16. 权利要求 1 的经基因改造的微生物,其中所述微生物衍生自大肠杆菌(Escherichia coli)C。

17. 经基因改造的细菌,其在 PEP 依赖性磷酸转移酶体系中有缺陷、在用于葡萄糖输入的基于 GalP 蛋白的体系中有缺陷,且包含编码功能性的葡萄糖易化扩散蛋白的外源基因。

18. 如权利要求 17 中的经基因改造的细菌,其中功能性的葡萄糖易化扩散蛋白是由 glf 基因编码的 Glf 蛋白。

19. 如权利要求 17 中的经基因改造的细菌,还包含编码葡糖激酶的外源基因。

20. 如权利要求 17 中的经基因改造的细菌,还包含一种或多种外源基因,所述外源基因编码在从非芳族碳源开始生产顺,顺-黏康酸的黏康酸通路中起作用的蛋白质。

21. 权利要求 20 的经基因改造的细菌,其中所述编码在黏康酸通路中起作用的蛋白质

的基因选自自由 aroZ、qa-4、asbF、quiC、aroY 和 catAX 组成的组。

22. 如权利要求 17 中的经基因改造的细菌,还包含一种或多种在染色体上整合的外源基因,所述外源基因编码在莽草酸通路中起作用的蛋白质。

23. 如权利要求 22 中的经基因改造的细菌,其中所述编码在莽草酸通路中起作用的蛋白质的外源基因选自自由 aroB、aroD、aroF、aroG、aroH、tktA、talB、rpe 和 rpi 组成的组。

24. 权利要求 17 的经基因改造的细菌,其中芳族氨基酸生物合成的负调节蛋白的活性被实质上降低或消除。

25. 权利要求 17 的经基因改造的细菌,其中芳族氨基酸生物合成的负调节蛋白是 TyrR 蛋白或 TyrR 蛋白的同源物。

26. 权利要求 17 的经基因改造的细菌,其中编码芳族氨基酸生物合成的负调节蛋白的基因已被缺失或突变。

27. 权利要求 17 的经基因改造的细菌,其中至少一种在莽草酸通路中有活性的酶实质上抵抗所述微生物的代谢物的抑制。

28. 权利要求 17 的经基因改造的细菌,其中所述微生物衍生自大肠杆菌 C。

29. 从非芳族碳源开始生产顺,顺-黏康酸的经基因改造的微生物,其中编码在黏康酸通路和莽草酸通路中起作用的蛋白质的外源基因不从需要补料化学品用于诱导的启动子表达。

30. 如权利要求 29 中的经基因改造的微生物,其中所述微生物是细菌。

31. 如权利要求 29 中的经基因改造的微生物,其中所述微生物是大肠杆菌。

32. 从非芳族碳源开始产生顺,顺-黏康酸的经基因改造的微生物,所述微生物包含编码渗漏 AroE 酶的 aroE 基因。

33. 如权利要求 32 中的经基因改造的微生物,其中所述微生物是细菌。

34. 如权利要求 32 中的经基因改造的微生物,其中所述微生物是大肠杆菌。

从经基因改造的微生物生产黏康酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2012 年 1 月 30 日提交的美国临时申请系列号 61/632,777 的优先权益。

发明领域

[0003] 本发明处于使用生物催化剂生产可再生化学原料的领域,该生物催化剂已经经基因改造增加了其将可再生碳源转化成有用化合物的能力。更具体而言,本发明提供利用基因改造的生物催化剂从可再生碳源生产黏康酸异构体的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 己二酸是在尼龙 66 的制造中使用的大量化学品。己二酸目前是由石化产品制备,但合成并不是环境友好的(Niu 等人,2002)。备选地,己二酸可以由黏康酸的三种异构体(顺,顺;顺,反;反,反)中的任一者经化学氢化作用制得。通过用微生物进行发酵从可再生资源生产黏康酸、接着氢化成己二酸将会是令人合意的,因为这样的至己二酸的途径将比传统的石化途径更加环境友好。

[0006] 目前针对微生物生产黏康酸的努力可以分组到三个类别,即:(1)用于黏康酸生产的芳族降解通路,其中供给多种芳族化合物,且芳族化合物的苯环部分氧化切割而打开;(2)黏康酸盐积累(buildup)通路,其中黏康酸骨架从多种 C₂、C₃、C₄ 化合物或赖氨酸形成;和(3)芳族氨基酸生物合成黏康酸通路,其中黏康酸从 3-脱氢莽草酸盐(3-dehydroshikimate)形成,所述 3-脱氢莽草酸盐是许多生物体中芳族氨基酸生物合成通路中的中间体。

[0007] 许多微生物能够利用这样的通路来降解含有苯环的芳族化合物例如苯酚、儿茶酚和苯甲酸,该通路切割芳环得到非芳族化合物的终末化合物或中间体化合物,例如顺,顺-黏康酸、或 3-羧基-顺,顺-黏康酸(Niu 等人,2002;Perez-Pantoja 等人,2008)。过去,许多小组已经尝试开发微生物以工业水平生产顺,顺-黏康酸的能力(Mizuno 等人,1988;Yoshikawa 等人,1990;Choi 等人,1997)。在 1980 年代末,美国的 Celgene Corporation 和日本的 Mitsubishi Chemical Industries 分别积极研发从甲苯和苯甲酸制造黏康酸的方法,这由该领域中多项已授权的美国专利和日本专利所证实。

[0008] 多种微生物已经被报道为利用甲苯、苯甲酸、苯或儿茶酚生产顺,顺-黏康酸。例如,以儿茶酚作为碳源,利用表达 catA 基因的重组大肠杆菌(E. coli)细胞可以以近乎 100%的摩尔转化产率实现顺,顺-黏康酸生产,所述 catA 基因编码作为生物催化剂负责催化儿茶酚的邻位切割的恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)mt-2 儿茶酚 1,2-双加氧酶(Kaneko 等人,2011)。利用该体系用于连续生产黏康酸的生物反应器已有过记载。

[0009] 利用环状 C₆ 碳化合物进行顺,顺-黏康酸的微生物生产的此方法从未在商业上实现;然而,在理解用于微生物中的黏康酸生产的降解通路中的酶的功能作用方面有着持续的学术兴趣。

[0010] 近来公开的国际专利申请(WO 2011/017560)要求保护具有黏康酸盐通路的生物

催化剂和利用这些生物催化剂来生产黏康酸的方法。简而言之,这件公开的专利申请公布了四种不同的生产黏康酸的通路。第一种用于黏康酸生产的通路以琥珀酰-CoA 和乙酰-CoA 起始。第二种用于黏康酸生产的通路以丙酮酸和丙二酸半醛起始。第三种用于黏康酸生产的通路以丙酮酸和琥珀酸半醛起始。第四种用于黏康酸生产的通路以赖氨酸起始。在此专利申请中提出的所有这些用于黏康酸生产的通路都是基于计算机建模,而这些生物催化剂究竟能否产生为具备商业上可接受的黏康酸生产力和产率还有待观察。

[0011] 利用基因改造的大肠杆菌体系的得到顺,顺-黏康酸的发酵途径已经记载于科学文献 (Niu 等人,2002) 和专利文献 (US 5,616,496 ;US 5,487,987 ;WO 2011/085311 A1) 中,但现有技术方法在用于大规模商业生产从而有经济吸引力的滴度、产率和适用性方面需要实质改进。已有两例经基因改造以从葡萄糖生产顺,顺-黏康酸的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 酵母菌的报道,但公开的滴度仅为 1.5mg/l 和 140mg/l (Weber 等人,2012 ;Curran 等人,2012)。在这些滴度下,这些酵母方法对于商业生产无一有吸引力。本发明描述了通过在用于大规模商业生产的适用性方面与领域内已知的公开方法相比有实质改进的发酵来生产顺,顺-黏康酸或顺,反-黏康酸的方法。

[0012] 本文公开的本发明的目的之一是利用适用于大规模商业生产的基因改造的生物体,通过微生物发酵来生产顺,顺-黏康酸,该发酵起始于可再生的非芳族碳源例如糖或其它可源自光合作用植物的简单的碳水化合物。

[0013] 在 2002 年,Niu 等人公开了这样的生产己二酸的“无苯”途径,其利用发酵方法生产顺,顺-黏康酸,然后是催化化学方法将顺,顺-黏康酸转化成己二酸。该方法获得专利权,但据本发明人所知,该方法尚未商业化 (US 5,487,987 ;US 5,616,496)。此公开方法的发酵部分利用基因改造的大肠杆菌菌株,其最佳者命名为 WN1/pWN2.248。该通路利用天然的芳族氨基酸生物合成通路(也称为“莽草酸通路”、“莽草酸盐通路”、“分支酸酯通路”、“共同芳族通路”、“中心芳族通路”,或简单地称为“芳族通路”,部分示于图 1 中)的一部分。在此说明书中,在供给至生物体的碳源(如葡萄糖)下游的、和直接或间接通向分支酸的任何生化步骤被视为莽草酸通路的一部分,包括,例如由 Glf、Glk、Zwf、TktA、TalB 和 Pps 催化的步骤。此外,该公开的方法利用三种异源的酶,所述异源的酶经由中间体原儿茶酸和儿茶酚将 3-脱氢莽草酸盐(芳族通路中的中间体)转化成顺,顺-黏康酸。改造的宿主菌株是大肠杆菌 K-12 的衍生物,其具有 *aroE353*, *serA::(aroB, aroZ)*, *lacZ::(tktA, aroZ)* 基因型,其中 *aroB* 编码 3-脱氢奎尼酸合酶(以下称为 AroB), *tktA* 编码转酮醇酶,且 *aroZ* 是来自肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的编码 3-脱氢莽草酸脱水酶(以下称为“AroZ”)的异源的基因。该改造的菌株含有多拷贝质粒 pWN2.248,其衍生自 pBR322 且含有用于表达 *catA*、*catX*、*aroY*、*aroF*(反馈抗性的)、*serA*、*lacIq* 和氨苄青霉素抗性的基因盒。异源的基因 *catA* 和 *catX* 来自乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 且编码儿茶酚 1,2-双加氧酶(以下称为“CatA”)和功能未知的可能增强 CatA 活性的蛋白(“CatX”)。在文献中,*catX* 基因也称为“*orf1*”(Neidle 和 Ornston,1986)。在本专利说明书中,我们要将来自不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 的 *catA* 加 *catX* 基因对称为“*catAX*。”。异源基因 *aroY* 来自肺炎克雷伯杆菌且编码原儿茶酸脱羧酶(以下称为“AroY”)。

[0014] 与上述授权专利相关的较新的专利申请已经公开 (WO 2011/085311 A1)。在此申请中,利用同样的上述菌株 WN1/pWN2.248 来生产顺,顺-黏康酸,其随后被异构化成顺,

反-黏康酸。

[0015] 然而,菌株 WN1/pWN2.248 并不能良好地适用于大规模商业生产,因此对于更加改进的方法有需求。本发明提供用于顺,顺-黏康酸的发酵生产的改进的生物催化剂。

[0016] WO 2011/085311 A1 中记载的方法具有数个其它特征,这些特征使得不能实现商业大规模实施。顺,顺-黏康酸的发酵生产中使用的生物催化剂 WN1/pWN2.248 中所包含的 aroE353 突变的发挥作用以阻断碳流入莽草酸盐通路的较下部分,从而使进入得到顺,顺-黏康酸的期望通路的碳流最大化。但 aroE 突变是“无效”突变(使基因对于所有实际目的都失活的突变),其具有将菌株变成芳族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸)和芳族维生素或莽草酸盐通路产生的维生素样中间体(对羟基苯甲酸、对氨基苯甲酸和 2,3-二羟基苯甲酸)的营养缺陷型的作用。芳族氨基酸相对昂贵,并且其需求将会对生产顺,顺-黏康酸的成本增加大量负担。因此,对于不需要向生产介质中添加这些昂贵的营养素的方法也存在需求。

[0017] 与目前可行的用于生产顺,顺-黏康酸的生物催化剂相关的再一问题涉及到维持多拷贝质粒以表达一些必需基因的需求(Niu 等人,2002)。多拷贝质粒经常太不稳定而不能用于大规模工业方法。而且,质粒上基因中的至少一个从启动子 P_{tac} 表达,其需要异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)或乳糖来诱导,而这两种化学品对于允许在经济上有吸引力的方法而言太过昂贵。因此,对于具有稳定整合到生产菌的染色体中的表达盒的更稳定菌株存在需求,并且对于从组成型启动子高水平表达从而减轻对用于启动子的化学诱导物的需求也存在需求。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明提供从非芳族碳源开始生产顺,顺-黏康酸的基因改造的微生物。该基因改造微生物不需要包含任何外源质粒以生产黏康酸,尽管它们具有某些实现期望的表型所必需的外源或异源基因。引入到微生物中的外源基因稳定地整合到染色体 DNA 中。作为外源基因的此染色体 DNA 整合的结果,使用抗生素或其它选择性方法以维持携带外源 DNA 的质粒的需求全部消除。此外,使用不需要化学诱导物的强启动子来表达从碳源如葡萄糖至顺,顺-黏康酸的通路所必需的基因。

[0020] 在本发明的一个实施方案中,芳族氨基酸生物合成的负调节物的活性受基因操纵。在本发明的一个方面,负调节物 TyrR 的活性通过控制编码 TyrR 蛋白的 tyrR 基因的表达而实质降低。在本发明的另一方面,负调节物 TyrR 的活性通过将来自微生物的染色体 DNA 的 tyrR 基因缺失或失活而完全消除。

[0021] 在本发明的另一实施方案中,因某些代谢物引起的芳族氨基酸通路中某些酶的反馈抑制通过基因操纵而克服。在大多数野生型大肠杆菌菌株中,脱氧阿拉伯-庚酮糖酸 7-磷酸(DAHP)合酶作为已知由三种不同基因即 aroG、aroF 和 aroH 编码的三种不同的异构酶出现。由该三种基因中的每种编码的蛋白受到负责芳族氨基酸生物合成的莽草酸通路的一种或多种代谢物的反馈抑制。在本发明的一个方面,野生型 aroG 基因被修饰的 aroG 基因取代,所述修饰的 aroG 基因编码抵抗微生物细胞中芳族氨基酸通路的一种或多种代谢物的反馈抑制的 AroG 蛋白。在本发明的另一方面,野生型 aroF 基因被这样的 aroF 基因取代,所述 aroF 基因编码抵抗微生物细胞中芳族氨基酸通路的一种或多种代谢物的反馈抑制的 AroF 蛋白。在本发明的另一方面,野生型 aroH 基因被这样的 aroH 基因取代,所述

aroH 基因编码抵抗微生物细胞中芳族氨基酸通路的一种或多种代谢物的反馈抑制的 AroH 蛋白。在本发明的另一实施方案中,选择用于顺,顺-黏康酸的商业生产的生物催化剂可以具有多于一种的抵抗脱氧阿拉伯-庚酮糖酸 7-磷酸 (DAHP) 合酶的反馈的异构酶。

[0022] 在本发明的另一实施方案中,通过在微生物细胞中的芳族氨基酸通路参与到碳流中的一种或多种酶的活性被增强。在本发明的一个方面,参与到芳族氨基酸通路和/或黏康酸通路的运转中的一种或多种酶的活性的增强通过基因操纵而实现。在本发明的优选实施方案中,一种或多种编码酶或蛋白 AroF、AroG、AroH、AroB、TktA、TalB、AroZ、QutC、qa-4、asbF、QuiC、AroY、Rpe、Rpi、Pps、CatA 和 CatX 或其同源物或类似物的基因的表达被增强,导致增强的所述酶的活性。Rpe 是核酮糖 -5-磷酸差向异构酶,Rpi 是核酮糖 -5-磷酸异构酶,且 Pps 是磷酸烯醇丙酮酸合成酶 (Neidhardt 和 Curtiss,1996)。如果宿主菌株是酵母 (如酿酒酵母),或丝状真菌 (如粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)),数种催化莽草酸盐通路中的反应的酶可以组合成一个大蛋白或多肽,称为 Aro1p,在酿酒酵母情形中由 ARO1 基因编码。Aro1p 组合了 AroB、AroD、AroE、AroK (或 AroL) 和 AroA 的功能。这样,出于本发明的目的,Aro1p 和 ARO1 或其部分可以作为 AroB、AroD、AroE、AroK 和/或 AroA 的替代物使用、或者在 AroB、AroD、AroE、AroK 和/或 AroA 之外使用。

[0023] 在本发明的另一实施方案中,细菌细胞中经由赤藓糖 -4-磷酸的通量通过过表达戊糖磷酸通路的运转中的酶而增强。在本发明的一个方面,由 talB 或 talA 基因编码的转醛醇酶的超量产生被工程化。在本发明的另一方面,编码转醛醇酶和转酮醇酶的基因的表达均通过基因操纵而增强。在本发明的另一方面,编码核酮糖 -5-磷酸差向异构酶和核酮糖 -5-磷酸异构酶之一或二者的基因的表达通过基因操纵而增强。

[0024] 在本发明的另一实施方案中,可用于芳族氨基酸通路的运作的 PEP (磷酸烯醇丙酮酸) 通过基因操纵而增加。在本发明的一个方面,对 PEP 池的竞争通过以用于葡萄糖摄取的 PEP 独立性体系消除和/或补偿用于葡萄糖摄取的 PEP 依赖性磷酸转移酶体系 (PTS) 而降低。在本发明的另一实施方案中,PEP 的可得性通过增加编码 PEP 合成酶的基因如 pps 的表达而增加。

附图简介

[0025] 图 1. 大肠杆菌中用于芳族氨基酸生物合成的通路。

[0026] 图 2. 大肠杆菌中用于黏康酸生产的通路。

[0027] 图 3. 显示用于全部黏康酸和生化中间体的 HPLC 分析的标准物的色谱。

[0028] 图 4. 显示用于黏康酸异构体的 HPLC 分析的标准物的色谱。

[0029] 图 5. 在用质粒 pCP32AMP、pCP14 和 pCP54 转化的大肠杆菌菌株 MYR34 中生产 DHS 的滴度。大肠杆菌的 MYR34 菌株具有 aroE 基因缺失。质粒 pCP32AMP 表达编码 DAHP 合酶的 aroG 基因。质粒 pCP14 表达编码 DHQ 合酶的 aroB 基因。质粒 pCP54 表达 aroB 和 aroG 基因二者。

[0030] 图 6. 在用质粒 pCP32AMP 和 pCP54 转化的大肠杆菌菌株 MYR34 和 MYR170 中生产 DHS 的滴度。大肠杆菌的 MYR34 菌株具有 aroE 基因缺失。MYR170 菌株具有 aroE 基因缺失和在宿主染色体 DNA 的 ack 基因座处整合的处于 P₁₅ 启动子控制下的 aroB 基因的第二拷贝。质粒 pCP32AMP 表达编码 DAHP 合酶的 aroG 基因。质粒 pCP54 表达 aroB 和 aroG 基因

二者。

[0031] 图 7. 在仅用质粒 pMG37 或用 pMG37 和 pCP32AMP 质粒二者转化的大肠杆菌菌株 MYR34 和 MYR170 中生产顺,顺-黏康酸的滴度。大肠杆菌 MYR34 菌株具有 *aroE* 基因缺失。MYR170 菌株具有 *aroE* 基因缺失和在宿主染色体 DNA 的 *ack* 基因座处整合的处于 P_{15} 启动子控制下的 *aroB* 基因的第二拷贝。质粒 pCP32AMP 表达编码 DAHP 合酶的 *aroG* 基因。质粒 pMG37 表达编码在黏康酸通路中起作用的蛋白的 *aroZ*、*aroY* 和 *catAX* 基因。

[0032] 图 8. 在仅用表达 *aroG* 基因的质粒 (pCP32AMP) 或同时表达 *aroG* 和 *tktA* 基因的质粒 (pCP50) 转化的大肠杆菌 MYR170 菌株中生产 DHS 的滴度。MYR170 菌株具有 *aroE* 基因缺失和在宿主染色体 DNA 的 *ack* 基因座处整合的处于 P_{15} 启动子控制下的 *aroB* 基因的第二拷贝。

[0033] 图 9. 来自用质粒 pCP32AMP 和 pCP50 转化的大肠杆菌 MYR34 和 MYR170 菌株的 DHS 产率。DHS 产率计算为每克消耗的葡萄糖所产生的 DHS 克数。质粒 pCP32AMP 表达 *aroG* 基因,而 pCP50 表达 *aroG* 和 *tktA*。细菌菌株 MYR34 具有 *aroE* 基因缺失。大肠杆菌 MYR170 菌株衍生自 MYR34 且具有在染色体 DNA 上的 *ack* 基因座处整合的额外的 *aroB* 基因。

[0034] 图 10. 来自用质粒 pCP32AMP 和 pCP50 转化的大肠杆菌 MYR170 和 MYR261 菌株的 DHS 滴度。质粒 pCP32AMP 表达 *aroG* 基因,而 pCP50 表达 *aroB* 和 *tktA* 基因。MYR170 菌株具有 *aroE* 基因缺失和在宿主染色体 DNA 的 *ack* 基因座处整合的处于 P_{15} 启动子控制下的 *aroB* 基因的第二拷贝。大肠杆菌 MYR261 菌株衍生自大肠杆菌 MYR170 菌株。大肠杆菌 MYR261 菌株具有在染色体 DNA 的 *poxB* 基因座处整合的 *tktA* 基因的第二拷贝及其天然启动子。

[0035] 图 11. 大肠杆菌菌株 MYR170、MYR261 和 MYR305 中的黏康酸和乙酸生产,这些菌株转化有表达编码莽草酸生物合成通路中的 DAHP 合酶的 *aroG* 的质粒 pCP32AMP 和表达编码在黏康酸通路中起作用的蛋白的 *aroZ*、*aroY* 和 *catAX* 基因的质粒 pMG37。MYR170 菌株具有 *aroE* 基因缺失和在宿主染色体 DNA 中 *ack* 基因座处插入的处于 P_{15} 启动子控制下的 *aroB* 基因的额外拷贝。MYR261 和 MYR305 是 MYR170 菌株的衍生物。MYR261 具有在宿主染色体 DNA 上的 *poxB* 基因座处整合的 *tktA* 基因的额外拷贝,而 MYR305 在宿主染色体 DNA 上的 *poxB* 基因座处具有缺失

[0036] 图 12. 由大肠杆菌菌株 MYR34 产生的内源性 DHS 向黏康酸的转化。大肠杆菌 MYR34 菌株在编码莽草酸脱氢酶的 *aroE* 基因中具有缺失。因此,存在 DHS 的积累。当 MYR34 菌株用表达在黏康酸通路中起作用的蛋白的编码基因 *aroZ*、*aroY* 和 *catAX* 的质粒转化时,DHS 转化成黏康酸。然而,当用无任何外源基因的空质粒载体 (pCL1921) 转化 MYR34 菌株时,没有出现 DHS 转化成黏康酸。

[0037] 图 13. *aroZ* 同源物将 DHS 转入黏康酸通路中的能力的比较。将三种不同的 *aroZ* 同源物,即来自不动杆菌属物种 ADP1 的 *quiC*、来自苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的 *asbF* 和来自粗糙脉孢菌的 *qa-4* 克隆到还分别自 P_{15} 和 λP_R 启动子表达 *catAX* 和 *aroY* 基因的低拷贝质粒中 P_{26} 启动子下。通过转化使这三种不同的质粒构建体在 MYR34 中表达,并测量所产生的黏康酸的量。

[0038] 图 14. 将单拷贝的 *catAX*、*aroY* 和 *quiC* 染色体整合到大肠杆菌 MYR170 菌株 ($\Delta aroE$, $\Delta ack::P_{15}-aroB$) 中,产生 MYR352 (SEQ ID No. 41)。还用携带黏康酸通路运作所需的所有基因的低拷贝质粒 pMG37 转化 MYR170,得到 MYR219 菌株。用 YEp24 (中拷贝的空

载体)或 pCP32AMP(中拷贝的 aroG 表达质粒)或 pCP50(中拷贝 aroG 和 tktA 表达质粒)转化 MYR352 和 MYR219,并使用 HPLC 方法对产生的 PCA、儿茶酚和黏康酸的量进行定量。

[0039] 图 15. 通过增加 catAX 的表达来去除 MYR352 中的儿茶酚积累。对 MYR352 转化仅表达 aroY 的质粒(pMG27)或仅表达 quiC 的质粒(pMG39)或表达所有三种黏康酸通路基因即 catAX、aroY 和 quiC 的质粒(pMG37)或仅表达黏康酸通路中的两种基因即 catAX 和 aroY 的质粒(pMG33)。仅 catAX 的过表达足以防止儿茶酚积累。

[0040] 图 16. 利用不同体系输入葡萄糖的菌株的生长。ptsHI 和 galP(MYR31)的缺失导致在基本葡萄糖培养基中生长不足,而安置 glf 和 glk 基因(MYR217)挽回生长。对照菌株 MYR34 是 Δ aroE,否则则是野生型。向培养基中添加三种芳族氨基酸和三种芳族维生素以允许营养缺陷型菌株的生长。

[0041] 图 17. 大肠杆菌 MYR34 和 MYR217 菌株中的 DHS 生产。当用导致 DHS 生产的质粒转化时,利用 glf-gl k 用于葡萄糖输入的 MYR217 较之利用磷酸转移酶体系(PTS)的 MYR34 的转化子产生更高滴度的 DHS。

[0042] 图 18. 在 7 升发酵罐中以大肠杆菌 MYR428 菌株进行的黏康酸生产。对用质粒 pCP32AMP 和 pMG37 转化具有 Δ aroE Δ ackA::P₁₅-aroB Δ poxB::tktA 基因型的大肠杆菌 MYR261 菌株以产生大肠杆菌 MYR428 菌株。

[0043] 优选实施方式详述

[0044] 如本专利申请中所用,短语“例如”或“如”意指对于当下主题存在多于一种的方法、途径、方案或物质组成,且给出的实例并不意在局限于该实例。

[0045] 术语“异源的”是指并非在生物体中天然或原生发现、但可以通过基因改造如通过转化、交配或转导而引入到生物体中的基因或蛋白。异源基因可以整合(插入)到染色体中或包含于质粒上。术语“外源的”是指出于提高、降低或消除活性的目的通过基因改造如通过转化、交配、转导或突变已经引入到生物体中或在生物体中改变的基因或蛋白。外源基因或蛋白可以是异源的,或者其可以是对于宿主生物体为原生但通过一种或多种方法例如突变、缺失、改变启动子、改变终止子、重复或者在染色体或质粒中插入一个或多个额外拷贝而改变的基因或蛋白。因此,例如,如果在染色体中在与原生位点不同的位点处插入 aroB 基因的第二拷贝,第二拷贝将是外源性的。

[0046] 如本发明中所用的术语“微生物”包括可通过发酵方法用于顺,顺-黏康酸的商业生产的细菌、古细菌、酵母、藻类和丝状真菌。

[0047] 对于命名法,基因或编码区通常以斜体的小写字母命名,例如“aroZ”,而由基因所编码的酶或蛋白可以以相同的字母命名但第一个字母大写且不斜体,例如“AroZ”或“Aro1p”,后者为在酵母中使用的用于指示酶或蛋白的惯例的实例。“p”是由所指示的基因编码的蛋白的缩写。酶或蛋白也可以用更加描述性的名称指代,例如,AroZ 也可以指代 3-脱氢莽草酸脱水酶。编码具有特定催化活性的酶的实例之一的基因或编码区可以因历史不同起源或因为基因来源于不同种类而具有数种不同的名称。例如,编码苏云金芽孢杆菌或炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)的 3-脱氢莽草酸脱水酶的基因可命名为 asbF 而非 aroZ,来自构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的相关基因可命名为 qutC,来自粗糙链孢杆菌的相关基因可命名为 qa-4,而来自贝氏不动杆菌(*Acinetobacter baylyi*)(也称为乙酸钙不动杆菌和不动杆菌属物种 ADP1)的相关基因可命名为 quiC。

[0048] “质粒”意指实质地小于染色体、与微生物的一个或多个染色体分开且独立于一个或多个染色体进行复制的环状或线性 DNA 分子。“质粒”可以以每细胞约一拷贝或以每细胞多于一个的拷贝存在。将质粒维持在微生物细胞中通常需要抗生素选择,但也可使用营养缺陷型互补。

[0049] 如本发明中所用的术语“染色体”或“染色体 DNA”在细菌细胞的环境下是实质地大于质粒且不需要任何抗生素选择的环状 DNA 分子。

[0050] “表达盒”意指这样的 DNA 序列,其可以是染色体或质粒的一部分,并且其含有至少启动子和编码酶或其它蛋白的基因或区域,从而使编码区由启动子表达,且含有该 DNA 序列的宿主细胞产生该酶或蛋白。“表达盒”可以是至少部分合成的或通过基因工程方法构建,从而使编码区从并非与编码区天然关联的启动子表达。任选地,“表达盒”可含有转录终止子,其可以是或者可以不是与编码区天然关联的终止子。“表达盒”可以具有针对多于一个蛋白的编码区,在这种情况下其可称为操纵子或合成操纵子。

[0051] 基因或编码区的“过表达”意指致使在相同或相似的生长条件下由该基因或编码区编码的酶或蛋白以高于宿主微生物野生型形式中所见水平的水平在宿主微生物中产生。这可以通过例如一种或多种以下方法而实现:1) 安置更强的启动子,2) 安置更强的核糖体结合位点,如 5'-AGGAGG 的 DNA 序列,使其位于翻译起始密码子上游约四至十个碱基的位置,3) 安置终止子或更强的终止子,4) 改善对编码区中一个或多个位点处的密码子的选择,5) 改善 mRNA 稳定性,和 6) 提高基因的拷贝数,通过在染色体中引入多个拷贝或是在多拷贝质粒上放置盒。由过表达的基因产生的酶或蛋白被称为“超量产生的”。“过表达的”基因或“超量产生的”蛋白可以是对于宿主微生物原生的基因或蛋白,或者其可以是已通过基因工程方法从不同的生物体移植到宿主微生物中的基因或蛋白,在这种情况下酶或蛋白以及编码该酶或蛋白的基因或编码区被称为“外来的”或“异源的”。外来的或异源的基因和蛋白按定义是过表达和超量产生的,因为它们未经改造的宿主生物体中不存在。

[0052] 第一基因、DNA 序列或蛋白的“同源物”是执行与所述第一基因、DNA 序列或蛋白相似的生物学功能,且经用于序列比较的 BLAST 计算机程序所测定 (Altschul 等人,1990;Altschul 等人,1997) 与所述第一基因或蛋白具有至少 25% 的序列同一性(当比较蛋白序列或比较从基因序列得到的蛋白序列时),并允许缺失和插入的第二基因、DNA 序列或蛋白。大肠杆菌 *aroG* 基因的同源物实例会是来自鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的 *aroG* 基因。

[0053] 第一基因、DNA 序列或蛋白的“类似物”是执行与所述第一基因、DNA 序列或蛋白相似的生物学功能,且经用于序列比较的 BLAST 计算机程序所测定 (Altschul 等人,1990;Altschul 等人,1997) 与所述第一基因、DNA 序列或蛋白具有少于 25% 的序列同一性(当比较蛋白序列或比较从基因序列得到的蛋白序列时),并允许缺失和插入的第二基因、DNA 序列或蛋白。肺炎克雷伯杆菌 AroZ 蛋白的类似物的实例会是来自构巢曲霉的 QutC 蛋白,因为两种蛋白都是催化 3-脱氢莽草酸脱水酶反应的酶,但在两种酶或其各自的基因之间没有显著的序列同源性。本领域中有见解的科学家将会知晓,在许多不同的生物体中可以找到许多具有特定生物学功能的酶和蛋白,如 DAHP 合酶或 3-脱氢莽草酸脱水酶,它们或是作为同源物或是作为类似物,并且因为这些酶或蛋白家族的成员共有相同的功能,故尽管它们可能在结构上稍有不同或实质不同,但在许多情况下,使用现有的基因改造方法,相同家

族的不同成员可以用于执行相同的生物学功能。因此,例如,AroZ 酶和 QutC 酶催化相同的反应,DHS 脱水酶,这样任一者在合适的环境下都会导致顺,顺-黏康酸产生,并且选哪一个来使用最终可通过选择在相似的发酵条件下产生更高滴度的顺,顺-黏康酸的一个来作出选择。

[0054] “非芳族碳源”或“非芳族化合物”是可作为碳源和/或能量用于供养本发明的微生物的含碳化合物,其中该化合物不含有与苯相关的六元环。非芳族碳源的实例包括葡萄糖、木糖、乳糖、甘油、醋酸、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、麦芽糖或蔗糖。“芳族化合物”是含有一个或多个与苯相关的六元环的化合物。芳族化合物的实例是儿茶酚或 1,2-二羟基苯。

[0055] “强组成型启动子”是这样的 DNA 序列,其通常位于由 RNA 聚合酶转录的 DNA 序列或基因的上游(当以习惯的 5' 至 3' 方向描述时在基因的 5' 侧),并且其导致所述 DNA 序列或基因通过 RNA 聚合酶转录以容易经由任何适当的测定法步骤直接或间接检测到的水平表达。适当的测定法步骤的实例包括 1) 定量逆转录酶+PCR,2) 对于所编码酶的酶测定法,3) 考马斯蓝染色的蛋白凝胶,或 4) 可测量的作为所述转录的结果间接产生的代谢物的产生,且这样的可测量的转录的发生不论特定调节转录水平的蛋白、代谢物或诱导物化学品的存在与否。不是“强组成型启动子”的启动子的实例是大肠杆菌的 P_{lac} 启动子,因为其在没有乳糖或诱导物 IPTG 的情况下受阻遏物的阻遏。通过使用领域内熟知的方法,可以使用“强组成型启动子”取代原生的启动子(否则天然存在于 DNA 序列或基因上游的启动子),得到如下的表达盒,所述表达盒可以置于质粒中或染色体中,且以高于原生启动子水平的水平提供期望 DNA 序列或基因的表达水平。强组成型启动子可以是种或属特异性的,但来自细菌的强组成型启动子常常可以在远缘相关的细菌中良好发挥功能。例如,来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或来自通常在枯草芽孢杆菌上生长的噬菌体的启动子可以在大肠杆菌中良好发挥功能。“强组成型启动子”与诱导型启动子如 P_{tac} 实质地不相同,诱导型启动子已在现有技术中用于生产顺,顺-黏康酸且对于期望的功能水平通常需要昂贵的化学品或其它环境变化(Niu 等人,2002)。强组成型启动子的实例是来自枯草芽孢杆菌噬菌体 SP01 的 P_{15} 、 P_{26} ,和大肠杆菌噬菌体 λP_R (SEQ ID No. 1、2 和 3)。

[0056] “黏康酸通路”是指从 DHS 到 PCA 到儿茶酚到顺,顺-黏康酸的生化通路,且“黏康酸通路基因”是这样的基因,其编码催化黏康酸通路中的步骤的酶,或编码用来增强所述酶例如 aroZ、aroY、catA、catX 和 qutC 中之一者的活性的辅助功能。DHS 是 3-脱氢莽草酸盐的缩写,且 PCA 是原儿茶酸的缩写。“黏康酸质粒”是含有一种或多种黏康酸通路基因的质粒。

[0057] 本发明中所用的一些基因操纵的中心围绕着如图 1 所示的存在于细菌细胞中的芳族氨基酸生物合成共同通路。图 1 所示的从 DAHP 合酶到分支酸合酶的芳族氨基酸生物合成共同通路也称为“莽草酸通路”。

[0058] 关于微生物基因改造以生产芳族氨基酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸有着大量的已公开工作(US 4,681,852、US 4,753,883、US 6,180,373、欧洲专利申请 86300748.0)。方法包括利用反馈抗性酶(AroF、AroG、PheA、TyrA)、转录阻遏(*tyrR*)的去调控、增加启动子强度(P_{tac} 、 P_{lac})和增加一个或多个基因(*tktA*)的拷贝数的多种组合。然而,上述方法的许多具体组合并未尝试过,或是因为存在太多的组合而难以无过度实验地进行尝试,或是因为不能洞察哪一种将是最佳组合。更重要的是,这些基因操纵组合的任一种在开发用于使

用可再生的非芳族碳源来商业生产黏康酸的生物催化剂中的适用性尚不知晓。

[0059] 对于许多微生物特别是大肠杆菌,芳族氨基酸生物合成通路是熟知的(Neidhardt 和 Curtiss, 1996)。在野生型细胞中,该通路受反馈抑制和转录阻遏的紧密调控。第一个关键步骤由脱氧-阿拉伯-庚酮糖酸 7-磷酸(DAHP)合酶催化,对其而言存在由 aroF、aroG 和 aroH 编码的三种同工酶。三种同工酶 AroF、AroG 和 AroH 分别受芳族氨基酸生物合成通路的产物即酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的反馈抑制。对所有三者具有反馈抗性的突变体是已知的(Draths 等人,1992;Lutke-Eversloh 和 Stephanopoulos, 2007;Hu 等人,2003;Shumilin 等人,1999)。本发明的一个方面涉及利用 aroF、aroG 和 aroH 基因的反馈抗性等位基因以表达抵抗芳族氨基酸生物合成通路的产物的反馈抑制的 AroF、AroG 和 AroH 酶蛋白。芳族通路中涉及的数种操纵子的转录受 tyrR 基因所编码的阻遏物或 trpR 基因所编码的阻遏物或二者的调控(Neidhardt 等人,1996)。特别重要的是当 TyrR 蛋白与一种或多种芳族氨基酸结合时其对 aroG 和 aroF 转录的负调节。本发明的一个方面涉及通过从宿主细菌菌株的染色体中消除 tyrR 或 trpR 基因而去除这些基因的负调节。

[0060] 本发明的主题是创造具有新的基因改造元件的基因改造盒的新组合,以提高用于大规模商业生产顺,顺-黏康酸产生菌株的发酵参数和适用性。特别地,生产顺,顺-黏康酸的现有技术并未教导遗传元件的某些组合,例如但不限于,超量产生的反馈抗性的 AroG、超量产生的反馈抗性的 AroF、过表达的 tktA、过表达的 talA、染色体上整合的用于从强组成型启动子表达 aroZ、aroY 和 catAX(或其类似物或同源物)的表达盒,以及渗漏 aroE 等位基因(我们将其定义为编码 AroE 酶的基因,该 AroE 酶对于芳族氨基酸和维生素的原养型,但不导致芳族化合物的显著分泌)的多种组合。

[0061] 本文公开的菌株构建体的所有具体实例衍生自野生型大肠杆菌 C 菌株(ATCC8739)或大肠杆菌 K-12 菌株(YMC9 或 MM294),但本文公开的遗传元件可以组装到任何其它合适的大肠杆菌菌株中,且本文公开的表达盒或遗传元件的适当类似物和同源物可以组装到任何其它的合适微生物中,如可通过发酵方法用于商业生产顺,顺-黏康酸的其它种类的细菌、古生菌、酵母、藻类和丝状真菌。

[0062] 在大肠杆菌中,自葡萄糖的芳族氨基酸生物合成通路起始于戊糖磷酸通路(PPP)的非氧化分支。非氧化戊糖磷酸通路中的四种关键酶是转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸差向异构酶和核酮糖-5-磷酸异构酶。这些酶催化导致从己糖或戊糖类形成赤藓糖-4-磷酸(E4P)的反应。为提高大肠杆菌中 E4P 的可得性,可以过表达编码转酮醇酶的 tktA 基因(Niu 等人,2002)。类似地,还预期过表达转醛醇酶基因在一些情况中提高 E4P 的可得性(Bongaerts 等人,2001)。在本发明的另一方面,通过导致转酮醇酶和转醛醇酶的酶活性增加的基因操纵来增强转酮醇酶和转醛醇酶基因的表达。在本发明的另一方面,通过超量产生核酮糖-5-磷酸差向异构酶和核酮糖-5-磷酸异构酶来提高经由 PPP 的非氧化分支的通量。

[0063] 共同芳族氨基酸通路中的第一关键步骤和最紧密调节的反应是经 DAHP 合酶(由 aroG、aroF 和 aroH 编码)的磷酸烯醇丙酮酸(PEP)和 E4P 的缩合以产生脱氧阿拉伯-庚酮糖酸 7-磷酸(DAHP)。大肠杆菌消耗的 D-葡萄糖部分通过 PPP 且部分通过糖酵解被带入芳族生物合成。当通过用提高拷贝数而使表达增强的质粒转化来扩增转酮醇酶(tktA)和 DAHP 合酶(arog)的同工酶时,进入芳族通路的葡萄糖流大大提高(Niu 等人,2002)。在本

发明的优选方面,出于扩大转酮醇酶和 DAHP 合酶的酶活性的目的,将外源 *aroG* 和 *tktA* 基因整合到染色体 DNA 中。

[0064] 在本发明的另一实施方案中,通过增加 DAHP 合成可用的 PEP 来提高微生物细胞中经由 PEP 的通量。许多菌属细胞在利用磷酸转移酶体系 (PTS) 的跨细胞膜葡萄糖转运中消耗 PEP,其中对于每分子跨细菌外膜转运的葡萄糖消耗一个 PEP 分子。通过用非 PEP 依赖性的 (PEP 独立的) 葡萄糖摄取机制取代或补偿 PEP 依赖性的 PTS,可以增加微生物细胞内芳族氨基酸生物合成通路可用的 PEP 池的大小。例如,用于糖摄取的 PTS 体系可以由基于 GalP 的糖摄取体系或基于 Glf/Glk 蛋白的糖转运体系进行取代或补偿 (Chandran 等人,2003; Yi 等人,2003)。在本发明的优选方面,除了出于保存微生物细胞内的 PEP 池的目的将用于糖摄取的 PTS 体系缺失外,还出于保存微生物细胞内的 ATP 的目的将基于 GalP 的糖摄取体系失活。在 PTS 体系和基于 Gal-P 的糖摄取体系 (Δ PTS/ Δ galP) 的运作都有缺陷的微生物细胞中,可通过引入编码 Glf 的外源基因,或编码 Glf (葡萄糖易化扩散蛋白) 和 Glk (葡萄糖激酶) 蛋白二者的外源基因来实现糖摄取。如本发明所用,术语功能性的葡萄糖易化扩散蛋白是指任何 Glf 蛋白以及在功能上等同于 Glf 且作用于通过易化扩散将糖转运到微生物细胞中的任何其它蛋白。在本发明的一个方面,将编码葡萄糖易化蛋白 Glf 的基因引入 Δ PTS/ Δ galP 微生物细胞中,且转运到微生物细胞中的葡萄糖通过内源葡萄糖激酶而磷酸化。在本发明的另一方面,将编码 Glf 和 Glk 蛋白二者的基因引入到 Δ PTS/ Δ galP 微生物细胞中。在本发明的优选方面,引入到微生物细胞中的外源 *glf* 和 *glk* 基因被整合到宿主染色体 DNA 中。

[0065] 在本发明的另一实施方案中,当生长用的碳源和能量需要糖异生 (例如如果碳源是醋酸盐或琥珀酸盐) 时,可通过提高细胞内已存在的羧化酶 (例如 PEP 羧化激酶,其由大肠杆菌中的 *pck* 编码) 的活性或通过引入外源的羧化酶而增加 PEP 池。在优选的实施方案中,引入的编码羧化酶的外源基因稳定整合到宿主染色体中。编码羧化酶的基因可以源自多种多样的微生物种类。编码羧化酶的基因还可经历基因操纵,从而使得用于顺,顺-黏康酸生产的生物催化剂内的羧化酶表达显著增加。

[0066] 在本发明的另一实施方案中,通过降低或消除利用 PEP 作为底物的丙酮酸激酶如 *PykA* 和 *PykF* 的活性而增加微生物细胞内的 PEP 池。

[0067] 从 DAHP,芳族氨基酸通路经由多个中间体至分支酸 (CHA),其是三种芳族氨基酸即 L-酪氨酸 (L-Tyr)、L-苯丙氨酸 (L-Phe) 和 L-色氨酸 (L-Trp) 的生物合成的分支点。

[0068] 在共同芳族氨基酸通路的初始阶段,3-脱氢奎尼酸 (DHQ) 合酶 (*AroB*) 从 DAHP 移除磷酸基,导致 DHQ 的形成。酶 DHQ 脱水酶 (*AroD*) 从 DHQ 中移除水分子,导致 3-脱氢莽草酸盐 (DHS) 的形成,其随后被莽草酸脱氢酶 (*AroE*) 还原成莽草酸盐 (SHK)。莽草酸激酶 I/II (*AroK*,*AroL*) 将莽草酸盐磷酸化成莽草酸 3-磷酸 (S3P)。S3P 与 PEP 进行缩合,导致 5 烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸 (EPSP) 的形成。EPSP 的形成由 EPSP 合酶 (*AroA*) 介导。EPSP 的磷酸基由分支酸合酶 (*AroC*) 移除,导致分支酸 (CHA) 的形成。

[0069] 如图 2 中所示,芳族氨基酸通路可以因 *aroE* 基因突变在 3-脱氢莽草酸盐 (DHS) 转化成莽草酸盐 (SHK) 的水平被阻断,导致 DHS 的积累 (Niu 等人,2002)。引入外源 *aroZ* 基因起到将 DHS 转化成原儿茶酸 (PCA) 的作用。PCA 随后通过由 *AroY* 酶介导的脱羧反应转化成儿茶酚。儿茶酚通过 *catA* 基因产物的作用最终转化成顺-顺黏康酸 (ccMuA)。ccMuA 可以

受马来酰乙酰乙酸异构酶的作用而产生反-反黏康酸 (ttMuA)。从 DHS 到 ccMuA 和 ttMuA 的生物合成通路被称为黏康酸通路。负责将 DHS 转化成 ccMuA 的三种不同基因可以从多种微生物种类获得并引入到选择用于黏康酸生产的微生物如大肠杆菌中。在本发明的优选实施方案中,编码黏康酸通路所涉及蛋白的外源基因被整合到宿主染色体 DNA 中。

[0070] 在将芳族氨基酸通路重定向到顺,顺-黏康酸生产的过程中,aroE 基因突变是关键性的。aroE 基因可以完全失活,导致芳族氨基酸生物合成的完全阻断,如使用描述用于黏康酸生产的大肠杆菌 WN1/pWN2.248 菌株所进行的 (Niu 等人,2002)。采用 WN1/pWN2.248 大肠杆菌菌株和相关菌株的重大缺点在于,由于 aroE 基因完全失活,该菌株成为上述的芳族酸如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸以及芳族维生素或维生素类化合物的营养缺陷型。结果,在其生长以生产顺,顺-黏康酸的过程中,该菌株需要外源添加这六种化合物 (或共同中间体,如莽草酸盐),由此使得利用该菌株进行的顺,顺-黏康酸商业生产的成本实质增加。克服对芳族氨基酸的外部来源的这种依赖性的新方法是使用具有 aroE 渗漏突变的菌株。渗漏 aroE 突变体将允许有限的碳流向莽草酸,同时积累显著量的 DHS,其随后可用于经由 AroZ 酶的作用转化成 PCA。由此,使用 aroE 的渗漏突变体形式将消除对外源芳族氨基酸的依赖性,同时仍然将碳流转向顺,顺-黏康酸。

[0071] 用于合成 DHS 转化成顺,顺-黏康酸所必需的 AroZ、AroY 和 CatA 蛋白的编码基因可以源自许多微生物种类。在一个实施方案中,这些外源基因整合到正在开发的生物催化剂的宿主染色体中。在优选的实施方案中,这些外源基因在生物催化剂内的表达由组成型启动子驱动而不需要任何诱导物。

[0072] 中间体原儿茶酸的生物合成需要 3-脱氢莽草酸脱水酶 (AroZ ;EC4.2.1.118) 这种酶。在本说明书中,“AroZ”应指任何催化 3-脱氢莽草酸脱水酶反应的酶。在现有技术中,该酶从肺炎克雷伯杆菌菌株 A170-40 (ATCC25597) 的 aroZ 基因表达 (Niu 等人,2002 ;Draths 和 Frost,1995)。然而,AroZ 的比活在生物体之间广泛变化,从 0.1 至 261 微摩尔 /min/mg (Wheeler 等人,1996 ;Fox 等人,2008 ;Pfleger 等人,2008),因此,通过从比肺炎克雷伯杆菌具有更高的比活的生物体,例如贝氏不动杆菌、构巢曲霉 (Wheeler 等人,1996) (现在也称为构巢裸胞壳 (*Emmericella nidulans*))、或粗糙脉孢菌 (Rutledge,1984 ;Stroman 等人,1978)、或鹅柄孢壳菌 (*Podospora anserina*,也称为 *Podospora pauciseta*) (Hansen 等人,2009) 表达 aroZ 基因,其也称为 asbF (Fox 等人,2008 ;Pfleger 等人,2008)、qutC (Wheeler 等人,1996)、qa-4 (Rutledge,1984) 和 quiC,可以具有显著的改进。

[0073] 作为一个特别的实例,来自粗糙脉孢菌的编码 3-脱氢莽草酸脱水酶的 qa-4 基因的编码序列可以通过数种已知方法中的任一者获得,例如全基因 DNA 合成、cDNA 克隆或通过基因组 DNA 克隆与 PCR 或合成 DNA 接头合成的组合。由于 qa-4 基因中没有内含子,可以通过 PCR 从基因组 DNA 获得编码区 (Rutledge,1984)。qa-4 酶的蛋白序列 (SEQ ID No. 4) 和原生基因的 DNA 序列 (SEQ ID No. 5) 是已知的。

[0074] 备选地,可以从构巢曲霉针对 3-脱氢莽草酸脱水酶构建表达盒。来自构巢曲霉的 QutC 酶的编码序列可以通过数种已知方法中的任一者获得,例如全基因 DNA 合成、cDNA 克隆或通过基因组 DNA 克隆与 PCR 或合成 DNA 接头合成的组合。QutC 的蛋白序列 (SEQ ID No. 6) 和不含内含子的原生基因的 DNA 序列是已知的 (SEQ ID No. 7 ;GenBank 检索号 M77665.1)。表达盒可以通过 DNA 合成,或通过基因组克隆与 PCR 的组合得到,从而使 QutC

酶能在大肠杆菌中准确产生。通过在大肠杆菌中从强组成型启动子表达 QutC 的编码序列, 可以从整合到染色体中的一个或两个拷贝的基因获得充分表达, 省去了可能导致不稳定性的并且如现有技术中所公开的在多拷贝质粒上维持多于两个拷贝的表达盒的需求 (Niu 等人, 2002)。上述方法通常可以用于获得编码期望的酶的 DNA 序列, 并且该编码序列随后可用于构建设计为在大肠杆菌中或另一合适的微生物宿主生物体中发挥功能的表达盒。

[0075] AroZ 的比活也可以通过利用现有技术的蛋白序列 (Niu 等人, 2002) 但构建改进的表达盒来加以改进, 例如, 其中在编码区之前已安置更强的启动子和 / 或核糖体结合位点 (RBS), 如实施例 4 中所描述的。

[0076] 来自肺炎克雷伯杆菌菌株 A170-40 的编码 AroZ (3- 脱氢莽草酸脱水酶) 的 aroZ 基因可以按现有技术中所描述的来获得。该基因的 DNA 序列和周围的 DNA 可以通过领域内熟知的方法确定。可利用原生的 DNA 序列将本发明的异源基因例如 aroZ 建立到表达盒中, 或者其可用针对预定宿主生物体密码子优化的序列合成。可以按记载的 (Draths 和 Frost, 1995) 从任何其它含有活性 aroZ 基因的微生物克隆 aroZ 基因, 其中所述微生物例如肺炎克雷伯杆菌菌株 342、不动杆菌属物种 ADP1 (贝氏不动杆菌 ADP1)、苏云金芽孢杆菌、构巢裸胞壳、解淀粉欧文氏菌 (*Erwinia amylovora*)、恶臭假单胞菌 W619 和许多其它菌。

[0077] 中间体儿茶酚的生物合成需要原儿茶酸脱羧酶 (AroY ;EC4. 1. 1. 63) 这种酶。在本说明书中, “AroY” 应指任何催化原儿茶酸脱羧酶反应的酶。在现有技术中, 该酶从在多拷贝质粒上的肺炎克雷伯杆菌菌株 A170-40 (ATCC25597) 的 aroY 基因表达 (Niu 等人, 2002)。然而, 再一次地, 可以通过从整合到宿主生物体的染色体中的一个或两个拷贝的表达盒产生充足的酶来获得方法改进。这可以通过从以下的生物体获得 aroY 基因来实现, 所述生物体天然产生较之现有技术的肺炎克雷伯杆菌 AroY 酶具有更高比活的 AroY 酶, 或通过提高肺炎克雷伯杆菌 AroY 的表达水平而实现, 所述提高表达水平是通过构建例如利用强组成型启动子和 / 或强 RBS 的表达盒而进行, 如以上对实施例 4 描述的。来自肺炎克雷伯杆菌菌株 A170-40 的 AroY 的蛋白序列在 SEQ ID No. 8 中给出。对应的基因 aroY 可以如上所述进行克隆 (Draths 和 Frost, 1995), 或者基于蛋白序列, 其可以用针对预定宿主生物体优化的密码子合成。

[0078] aroY 基因可以从含有同源物或类似物的任何其它微生物获得, 例如肺炎克雷伯杆菌菌株 NCTC418 (ATCC15380)、肺炎克雷伯杆菌 342 和 *Arxula adeninivorans* (Sietmann 等人, 2010)。来自肺炎克雷伯杆菌 342 的 aroY 基因的 DNA 序列和周围的 DNA 在 SEQ ID No. 9 中给出。

[0079] 顺, 顺 - 黏康酸生物合成的最后步骤需要儿茶酚 1, 2- 双加氧酶 (CatA ; EC1. 13. 11. 1) 这种酶。在本说明书中, “CatA” 应指任何催化儿茶酚 1, 2- 双加氧酶反应的酶。在现有技术中, 该酶从多拷贝质粒上的乙酸钙不动杆菌菌株 ADP1 的 catA 基因表达 (Niu 等人, 2002)。来源菌株, 乙酸钙不动杆菌菌株 ADP1 显然已重命名为不动杆菌属物种 ADP1 和贝氏不动杆菌 ADP1 (Neidle 和 Ornston, 1986 ; Barbe 等人, 2004 ; de Berardinis 等人, 2008)。在该现有技术实例中, catA 基因从 P_{tac} 启动子表达, 该启动子需要乳糖或 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷) 作为诱导物。这些化合物对于用于商业发酵而言太过昂贵, 因此再一次地, 需要通过将表达盒整合到染色体中对方法进行显著改进, 既为了消除对昂贵诱导物的需求, 也为了产生更稳定的菌株。这可以通过构建利用强组成型启动子、强 RBS、和

/ 或更稳定的 mRNA 的 catA 基因的表达盒而实现,如以上其他实施例中所述。

[0080] 来自贝氏不动杆菌 ADP1 的 catA 基因的 DNA 序列和周围序列在 SEQ ID No. 10 中给出。来自相同菌株的 CatA 的蛋白序列在 SEQ ID No. 11 中给出。在优选的实施方案中,catA 的表达盒含有一个或两个额外的天然存在于 catA 下游的开放阅读框,以提高 catA 基因的表达水平 (Schirmer 和 Hillen, 1998)。许多其它生物体可以是 catA 基因的来源,例如小田假单胞菌 (*Pseudomonas arvilla*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) (Nakazawa 等人, 1967 ;Kojima 等人, 1967)、链霉菌属物种菌株 2065 (*Streptomyces* Sp. Strain2065) (Iwagami 等人, 2000)、钩虫贪铜菌 335T (*Cupriavidus necator* 335T) 和许多其它菌 (Perez-Pantoja 等人, 2008)。

[0081] 为了提高朝向顺,顺-黏康酸的碳流,除了通过利用渗漏 aroE 突变体减小从 DHS 到莽草酸盐 (SHK) 的碳流,还有必要阻断从芳族氨基酸通路分支出的某些其它通路。一些细菌,例如不动杆菌属和假单胞杆菌属中的一些细菌,含有名为 pobA 的基因,其编码将 DHS 转化成没食子酸的对羟基苯甲酸水解酶这种酶。尽管大肠杆菌中未曾发现 PobA 同源物或类似物,但经改造以生产 DHS 的大肠杆菌菌株分泌可测量量的没食子酸 (Li 和 Frost, 1999),因此有可能这种酶确实存在于大肠杆菌中。此外,源自 DHS 的 PCA 可以通过由 pobA 基因所编码的对羟基苯甲酸水解酶 (PobA) 酶的作用转化成没食子酸。由此产生的没食子酸可以在随后被转化成焦性没食子酸。阻断所选的生物催化剂中通向没食子酸和焦性没食子酸的碳流以提高顺,顺-黏康酸的一种方式是通过基因操纵而阻断或减小对羟基苯甲酸水解酶 (PobA) 蛋白的活性。相似地,DHS 的前体——DHQ 也可以受 aroE 所编码的莽草酸脱氢酶的作用,导致奎宁酸的产生。在本发明的实施方案中,对渗漏 AroE 突变体酶额外选择或筛选其在将 DHQ 转化成奎宁酸方面的失能或降低的能力。

[0082] 生产反,反-黏康酸代替顺,顺-黏康酸有数个优点。在使用乙烯用于生产对苯二甲酸的狄尔斯-阿尔德反应 (Diels Alder reaction) 中对反,反-黏康酸的偏好高于顺,顺-黏康酸。具有经基因操纵的芳族通路的生物催化剂产生顺,顺-黏康酸,所述顺,顺-黏康酸可以在细胞外利用化学转化方法转化成反,反-黏康酸。另一方面,通过将马来酰乙酐乙酸异构酶或相似的异构酶引入到生物催化剂中,可以在细菌生物催化剂中将顺,顺-黏康酸转化成反,反-黏康酸。

[0083] 本专利申请的说明书提供了与构建足以生产黏康酸的微生物菌株相关的本发明的数个不同方面。本领域技术人员能够汇编本发明的数个不同方面以构建具有极高效率的用于生产黏康酸的生物催化剂。

[0084] 实验部分

[0085] 总论

[0086] 菌株和接种体制备:本发明中所用的细菌菌株和质粒的清单提供于表 1 中。本文公开的菌株构建体的所有具体实例衍生自野生型大肠杆菌 C 菌株 (ATCC8739) 或大肠杆菌 K-12 菌株 (YMC9 或 MM294),但本文公开的遗传元件可以组装到任何其它合适的大肠杆菌菌株中,且本文公开的表达盒或遗传元件的适当类似物和同源物可以组装到任何其它的合适微生物中,如可通过发酵方法用于商业生产顺,顺-黏康酸的其它种类的细菌、古生菌、酵母、藻类和丝状真菌。

[0087] 大肠杆菌 C 能在 AM1 矿物培养基中发酵 10% 葡萄糖。AM1 培养基含有 2.63g/

L(NH₄)₂HP0₄、0.87g/L NH₄H₂PO₄、1.5mM MgSO₄、1.0mM 甜菜碱、和 1.5ml/L 痕量元素。痕量元素制备成 1000X 储液并且含有以下组分:1.6g/L FeCl₃、0.2g/L CoCl₂·6H₂O、0.1g/L CuCl₂、0.2g/L ZnCl₂·4H₂O、0.2g/L NaMoO₄、0.05g/L H₃BO₃、和 0.33g/L MnCl₂·4H₂O。用 1.0 ~ 10.0M KOH 或 1.0 ~ 9.0M 氢氧化铵使发酵液的 pH 维持在 7.0。

[0088] 发酵:通过从经基因改造的并存储于 -80℃ 冰箱中的大肠杆菌菌株的 40% 甘油储液在新鲜的 NBS-2% 葡萄糖 (Jantama 等人, 2008a) 平板上划线接种而开始发酵。通过在琼脂板和液体培养基中包含合适的(一种或多种)抗生素而保留质粒(如果存在的话)。氨苄青霉素(钠盐)以 150mg/L 使用,壮观霉素 HCL 以 100mg/L 使用,四环素 HCL 以 15mg/L 使用,且硫酸卡那霉素以 50mg/L 使用。在 24 至 48 小时(37℃)后,将单克隆挑选到摇瓶中 25ml 的相同培养基中。在 37℃ 200rpm 震荡直至细胞生长至约 1.0 的 OD₆₀₀ 后,在冰上冷却培养物并添加等体积的无菌 80% 甘油。然后将 2ml 的等分物在 -80℃ 冻存以用作发酵用的接种物。

[0089] 细胞生长:通过使用 Thermo Electronic Spectronic20 分光光度计测量 550nm(OD₅₅₀) 或 600nm(OD₆₀₀) 下的光密度来估算细胞质量。

[0090] 对莽草酸通路和黏康酸通路中的中间体的分析:利用购自 Sigma-Aldrich 的标准物,通过 HPLC 和 Waters Alliance 仪器并监测 210nm 下的吸光度或 45℃ 下的折射率来测定发酵液中所产生的全部黏康酸(包括顺,顺-黏康酸和顺,反-黏康酸以及其它生化中间体)。柱子是 BioRad Aminex HPX-87H,以 8mM 硫酸作为流动相在 0.6ml/min 的流速下在 50℃ 运行 40 分钟。购买的标准物(Sigma-Aldrich)的色谱图示于图 3。为准备用于 HPLC,将发酵样品在 0.05M 磷酸钾缓冲液(pH7.0)中稀释 10 或 100 倍,以防止顺,顺-形式的黏康酸异构化为顺,反-形式。

[0091] 为分离黏康酸的异构体,将如上制备的样品在第二 HPLC 体系中运行。仪器是 Agilent1200HPLC,柱子是 Agilent Eclipse XDB-C18, 4.6x150mm,以用磷酸调节至 pH3.0 的 50mM KH₂PO₄ 于 30% 甲醇中的流动相在 30 摄氏度运行。流速为 1ml/min,持续 4 分钟,进行 278nm 下的吸光度检测。通过将顺,顺-黏康酸溶解于水中并允许其在室温下经历约 2 小时的自发的酸催化的异构化来产生顺,反-黏康酸标准物,直至 HPLC 峰已经完全移动至新位置。其它标准物购自 Sigma-Aldrich。显示标准物的色谱图示于图 4 中。

[0092] 用于发酵方法的黏康酸生产培养基的组成:每升的发酵培养基含有 50ml/L 的 1M KH₂PO₄、10ml 的 200g/L 柠檬酸+25g/L 柠檬酸铁、1.2ml 的 98% 硫酸和一滴 Antifoam204。将这些组分与足量的水混合以允许有添加以下其它组分的空间。在高压灭菌后,添加以下组分:10、20、30 或 40ml 的 50% 葡萄糖(以得到 5、10、15 或 20g/L 终浓度)、2ml 的 1M MgSO₄、1ml 的 0.1M CaCl₂、10ml 的 1000X 痕量元素(Jantama 等人, 2008a)、1、2、4 或 8ml 的 50g/L 苯丙氨酸+50g/L 酪氨酸+50g/L 色氨酸(以得到 0.5、0.1、0.2 或 0.4g/L 终浓度)、10ml 的 1g/L 对羟基苯甲酸+1g/L 对氨基苯甲酸+1g/L 2,3-二羟基苯甲酸和必要时的 1ml 的 150mg/ml 氨苄青霉素(钠盐)和/或 1ml 的 100mg/ml 壮观霉素 HCL。

[0093] 对于补料分批发酵,给料瓶含有 600g/L 的无水葡萄糖和 32ml/L 的 50g/L 苯丙氨酸+50g/L 酪氨酸+50g/L 色氨酸。9M NH₄OH 用作碱以维持发酵培养基的 pH。

[0094] 对于摇瓶,用 NBS 盐(Jantama 等人 2008a)加 0.2M MOPS 缓冲液(pH7.4)替代如上所述的高压灭菌前的混合物,但葡萄糖和其它添加物相同。

[0095] 补料分批发酵在 7L New Brunswick Scientific 发酵罐中进行, pH、DO、温度、葡萄糖和进料速度通过 DCU 控制器或 Biocommand 软件来加以控制。温度维持在 37°C, pH 通过 9N 氨水维持在 7.0, 溶解氧 (DO) 维持在 30% 空气饱和同时将叶轮速度从 750rpm 升高至 1200rpm。期望的培养基中的初始葡萄糖浓度为约 5 至 25g/L。当葡萄糖浓度降至低于 5g/L 时, 将葡萄糖溶液添加至发酵罐中, 并通过溶解氧水平来控制葡萄糖的进料速度。总发酵时间为 48 小时, 最终滴度为 16g/L 的黏康酸。

[0096] 表达黏康酸通路基因的质粒的构建: 将 DHS 转化成黏康酸所需的三种异源基因单独或组合克隆到低拷贝质粒 pCL1921 中 (Lerner 和 Inouye, 1990)。pCL1921 的 DNA 序列在表 3SEQ ID No. 20 中给出。简言之, catAX、aroY 和 aroZ 类似物或同源物的编码序列经密码子优化用于在大肠杆菌中表达并商业合成 (GeneArt, Invitrogen)。然后利用携带独特的核糖体结合位点的正向引物和携带各基因独特的终止子序列的反向引物将这些序列经 PCR 扩增。将所得的 PCR 片段经限制性酶消化并通过标准分子克隆方法克隆到独特的组成型启动子序列的下游。通过从之前描述过的来源 DNA 序列进行 PCR 扩增 (美国专利申请 20090191610 ; 美国专利 7244593), 之后是限制性消化和标准分子克隆, 来克隆启动子序列。启动子 -RBS- 编码序列 - 终止子序列在一起组成表达盒。接着将单独的表达盒组合以产生表达一个、两个或所有三个黏康酸通路基因的质粒。

[0097] 实施例 1

[0098] 增加 aroG 和 aroF 的表达

[0099] 大肠杆菌的 tyrR 基因可通过数种熟知方法中的任一种来突变, 例如化学或辐射诱变和筛选 (例如通过 PCR 和 DNA 测序) 或选择类似物抗性 (例如, 对 4- 氟酪氨酸的抗性)、转座子诱变、细菌噬菌体 Mu 诱变或转化。在优选的实施方案中, tyrR 基因中的突变是无效突变 (导致没有可检测的活性的突变), 而在更优选的实施方案中, 至少部分 tyrR 基因缺失。这可以通过例如利用使用线性 DNA 分子的两步转化法 (Jantama 等人, 2008a ; Jantama 等人, 2008b) 来实现。在第一步中, 通过双重组和选择氯霉素抗性将 cam^R、sacB 盒在 tyrR 基因座处整合以取代大部分的或所有的 tyrR 开放阅读框。在第二步中, 通过双重组、在丰富培养基如 LB 中选择对 5% 蔗糖的抗性将包括缺失型的 tyrR 基因的线性 DNA 整合。通过诊断性聚合酶链式反应 (PCR) 来鉴定和确定正确的缺失。将 tyrR 缺失的目的是增加 aroG 和 aroF 的表达。实现相似结果的可选方法是用强组成型启动子取代 aroG 和 / 或 aroF 之前的原生启动子和 (如果必要的话), 添加转录终止子。关于总体如何实现的更多细节在以下实施例 4 中给出。

[0100] 以上描述的用于克服 TyrR 蛋白对 AroG 和 AroF 活性的抑制的两种途径中后者是优选的, 因为 tyrR 缺失会引起不希望的基因如 aroLM 的过表达 (Neidhardt 和 Curtiss, 1996)。关于总体如何实现的更多细节在以下实施例 4 中给出。

[0101] 实施例 2

[0102] 反馈抗性的 AroG 和 AroF

[0103] 导致反馈抗性的 AroG 酶 (3- 脱氧 -D- 阿拉伯庚酮糖酸 -7- 磷酸合酶或 DAHPS) 的 aroG 基因中的突变是领域内已知的 (Shumilin 等人, 1999 ; Kikuchi 等人, 1997 ; Shumilin 等人, 2002)。还已知的是产生、鉴定和表征这些突变的方法 (Ger 等人, 1994, Hu 等人, 2003)。优选的突变是引起对苯丙氨酸抑制完全抗性的突变。可以通过数种已知方法中

的任一种将任何已知的已公开的反馈抗性突变引入到染色体中或质粒上所包含的 *aroG* 基因中,其中一个方法实例是诱变 PCR,其中期望的突变作为 PCR 引发寡核苷酸的部分被合成 (Hu 等人,2003)。通过 DNA 测序来证实突变的正确置入。来自大肠杆菌 C 的野生型 *aroG* 基因的序列在 SEQ ID No. 18 中给出。优选的突变是将 *AroG* 的氨基酸 150 从脯氨酸变成亮氨酸的点突变,例如通过将密码子 150 从 CCA 变成 CTA (Hu 等人,2003)。在更优选的实施方案中,密码子 150 从 CCA 变成 CTG,其是大肠杆菌中的优选密码子。该特别的 *aroG* 等位基因是优选的,因为所编码的 DAHP 合酶对高达 3mM 的苯丙氨酸抑制完全抵抗,并且其具有与野生型酶相似的比活 (Hu 等人,2003)。

[0104] 可以通过诱变和选择对一种或多种苯丙氨酸类似物 (如 β -2-噻吩丙氨酸、*p*-氟代苯丙氨酸、*p*-氯代苯丙氨酸、*o*-氟代苯丙氨酸和 *o*-氯代苯丙氨酸) 的抗性、接着证明导致抗性的突变与 *aroG* 基因关联,来得到另外的反馈抗性 *aroG* 等位基因 (Ger 等人,1994;US 专利 4,681,852)。与 *aroG* 的关联可以通过 DNA 测序或苯丙氨酸存在和不存在情况下的酶测定来直接证明 (Ger 等人,1994),或通过噬菌体介导的转导和对 *aroG* 基因座处或其附近的可供阳性或阴性选择的遗传标记物的选择而间接证明 (US 专利 4,681,852)。这样的遗传标记物可以是 *aroG* 基因自身中的缺失或点突变,或者是任何合适的紧密关联的基因 (如大肠杆菌情况下的 *nadA*) 中的突变。例如,在大肠杆菌中,在诱变和选择苯丙氨酸类似物抗性后,单个突变体或突变体集合可被用作供体用于经 P1 介导转导至缺失所有三种 DAHP 合酶基因 *aroG*、*aroF* 和 *aroH* 的原生受体中,并选择在合适的基本培养基上的生长。然后转导子将富集 (一个或多个) 期望的基因中的突变。备选地,在诱变和选择类似物抗性后,单个突变体或突变体集合可被用作供体用于经 P1 介导转导至包含 *nadA* 基因中的无效突变的原生受体菌株中,再次选择在缺乏烟酰胺的基本培养基上的生长。另一方法是在这样的菌株背景中选择抗性突变体,所述菌株背景在 *aroG* 基因附近 (如在 *nadA* 基因中) 含有转座子 (如 Tn10) 插入。从类似物抗性突变体 P1 转导到不包含所述转座子的菌株背景中和选择四环素或其它合适的抗生素抗性将富集期望的 *aroG* 突变。在所有这些方法中,反馈抗性最终通过酶测定和对基因的 DNA 测序而得以证实。我们将对反馈抑制具有抗性的 *aroG* 的等位基因称为 *aroG**。

[0105] 菌株 WM191 (Δ *tyrR*, Δ *aroF*) 衍生自 YMC9 (ATCC33927)。利用两步基因取代法 (Jantama 等人,2008a) 置入 *tyrR* 和 *aroF* 的完全缺失 (clean deletion),以得到菌株 WM191。接着,从 CAG12147 (CGSC7351, Coli Genetic Stock Center, Yale University) 转导入 *nadA::Tn10* 等位基因,以得到菌株 WM189 (Δ *tyrR*, Δ *aroF*, *nadA::Tn10*)。在 LB+ 四环素 HCl (15mg/1) 上进行选择。菌株 RY890 (Δ *tyrR::kan*, *aroF*363) 通过 P1 转导以三步从 MM294 (ATCC33625) 得到。供体菌依次为 JW1316-1 (CGSC9179, Coli Genetic Stock Center, Yale University)、NK6024 (CGSC6178, Coli Genetic Stock Center, Yale University) 和 AB3257 (CGSC3257, Coli Genetic Stock Center, Yale University),并且三次选择依次为 LB+ 硫酸卡那霉素 (50mg/1)、LB+ 盐酸四环素 (15mg/1) 和 NBS 最低限葡萄糖 (Jantama 等人,2008a) 及硫胺素 HCl (5mg/1)。

[0106] 用 UV 光对 WM189 诱变至约 20% 存活,并铺板于含有 *o*-氟代苯丙氨酸 (1mM)、硫胺素 (5mg/1) 和烟酰胺 (1mM) 的 NBS 最低限葡萄糖培养基中 (Jantama 等人,2008a)。将从数个板各自得到的菌落收集到单独的池中,并在各个池上制备 Plvir 溶菌物。使用这些溶菌

物在 LB 培养基上将 WM191 转导成四环素抗性 (15mg/l), 并将得到的菌落复制铺板到含有 1mM o- 氟代苯丙氨酸、硫胺素 (5mg/l) 和烟酰胺 (1mM) 的 NBS 最低限葡萄糖培养基上。假定在四环素和类似物上均存活的菌落复制物在 *aroG* 中含有反馈抗性突变。从 5 个独立的池中选择八个单独的菌落用于 DNA 测序。通过聚合酶链式反应将 *aroG* 编码区扩增并测序。示于图 4 的结果显示, 八个菌株各自在其 *aroG* 基因中包含点突变。一些等位基因与已公开的等位基因相同, 但一些是新的。

[0107] 使用来自以上描述的池之一的 P1vir 溶菌物将 RY890 (其具有 *aroG* 野生型等位基因) 转导成四环素抗性并通过如上所述的复制铺板转导成对 o- 氟代苯丙氨酸 (0.3mM) 抗性。挑取四个克隆, 命名为 RY893、RY897、RY899 和 RY901, 用于 DNA 测序 (表 4), 再次地, 两个等位基因与已公开的等位基因相同, 但两个是新的。与后四个菌株同基因但却含有野生型 *aroG* 基因的菌株 RY890 通过从 CAG12147 转导被构建为对照。这五株菌在摇瓶瓶中在 25ml NBS 最低限葡萄糖 (15g/l) + 硫胺素 HCl (5mg/l) 和烟酰胺 (1mM) 中过夜生长。所得的细胞通过离心收集, 重悬以用 10ml 水漂洗, 再离心, 并重悬于 0.5ml 的 50mM 磷酸钾 (pH7.0) 中。重悬的细胞通过与三滴氯仿一起涡旋而裂解, 并使用与文献中所描述的方法类似的方法测定粗溶菌物的 DAHP 合酶活性 (Hu 等人, 2003), 有以下改动。磷酸盐缓冲液是 50mM (终浓度), pH7.0, 最终的赤藓糖 -4- 磷酸浓度为 2mM, 最终的磷酸烯醇丙酮酸浓度为 5mM, 孵育温度为 30°C, 反应在 10 分钟时终止。我们将 1mU 定义为每分钟每毫克蛋白产生 1nM DAHP 的活性。为测试反馈抗性, 在有或没有终浓度 18mM 的苯丙氨酸的存在下对各个粗溶菌物进行测试。测定结果示于表 5。酶显示出不同的比活和对苯丙氨酸的抗性, 但所有选择的进行测试的突变体形式显著比野生型对照具有更高抗性。

[0108] 将来自如上所述的 RY893、RY899、RY901 和 RY902 的 *aroG* 等位基因按如下引入黏康酸生产菌株背景中。将来自 *aroG** 和 *aroGwt* 供体菌株的 P1vir 溶菌物用于将 MYR219 (大肠杆菌 C, Δ *aroE*, Δ *ack::P₁₅-aroB*, pMG37) 转导成四环素 HCl 抗性 (15mg/l), 以分别得到新菌株 RY903、RY909、RY911 和 RY912。然后使用 JW1316-1 的 P1vir 溶菌物以引入 Δ *tyrR::kan* 等位基因, 将这些菌各自转导成硫酸卡那霉素抗性 (50mg/l), 分别得到菌株 RY913、RY919、RY921 和 RY922。始终维持壮观霉素选择以维持黏康酸质粒。所得的四株菌在 37°C 在摇瓶瓶中在含有 20g/l 葡萄糖、0.2M MOPS 缓冲液 (pH7.4)、烟酰胺 (1mM)、苯丙氨酸 (100mg/l)、酪氨酸 (100mg/l)、色氨酸 (100mg/l)、对羟基苯甲酸 (1mg/l)、对氨基苯甲酸 (1mg/l)、2,3- 二羟基苯甲酸 (1mg/l)、酚红 (10mg/l) 和硫酸铵 (1g/l) 的补充物的 NBS 基本培养基 (Jantama 等人, 2008a) 中生长 48 小时。通过针对 pH7.0 标准物目视酚红颜色估计, 通过按要求对摇瓶人工添加 1ml 的 1.0M KOH 等分物, 将 pH 保持在接近 7。产生的黏康酸如上所述通过 HPLC 进行检测, 结果显示在表 6 中。所有三株含有反馈抗性的 *aroG** 等位基因的菌株较之含有野生型 *aroG* 等位基因的同基因菌株产生更多的黏康酸。在本文公开的单独实验中, 在多拷贝质粒 pCP32AMP 上含有 *aroG* 的菌株 MYR205 在摇瓶中产生 1.5g/l 黏康酸。因此, 发明人已经显示, 较之含有同基因的 *aroG* 质粒的菌株, Δ *tyrR* 和单拷贝染色体 *aroG** 的组合可以表现良好地在摇瓶中产生黏康酸。染色体等位基因相较于质粒等位基因的固有的优异遗传稳定性, 加之减弱了对于为了维持质粒的选择性培养基的需求, 使得本文描述的新菌株更加适合于大规模商业发酵。而且, 不需要化学诱导物用于黏康酸通路基因的表达。因此, 上述的本发明菌株较之全部在不理想的多拷贝质粒上包含用于过表

达 DAHP 合酶的基因的现有技术 (Niu 等人, 2002) 而言有改进。

[0109] 按与以上针对 AroG 描述内容相似的方式, 可以在质粒上或在染色体中置入产生抵抗由酪氨酸的反馈抑制的 AroF 或 AroH 同工酶的突变。优选的突变是将 AroF 的氨基酸 148 从脯氨酸变为亮氨酸的点突变, 例如通过将密码子 148 从 CCG 变为 CTG (Weaver 等人, 1990), 得到命名为 aroF* 的基因。可以按与以上针对 aroG* 等位基因描述内容类似的方式通过对酪氨酸类似物 (例如 o- 氟代酪氨酸、m- 氟代酪氨酸、p- 氟代苯丙氨酸等) 的抗性来分离其它 aroF* 等位基因。可以通过与转座子或卡那霉素抗性插入物关联而选择、富集以及转导 aroF* 等位基因, 例如, 在诸如 JW2584 (CGSC10051, Coli Genetic Stock Center, Yale University) 的菌株中在紧密连接的 $\Delta yfiR::kan$ 中。

[0110] 实施例 3

[0111] 从染色体 DNA 缺失 aroE 和黏康酸生产

[0112] 在该实施例中研究了过表达多拷贝质粒上的 aroB 和 aroG 以及表达在黏康酸通路中有功能的蛋白的编码基因的作用。在编码莽草酸脱氢酶的 aroE 基因中含有缺失的菌株 MYR34 被用作这些研究中的亲本菌株。以与上述实施例 1 中所描述内容相似的方式完成 aroE 的染色体拷贝的缺失。当用过表达编码在莽草酸通路中有功能的 DAHP 合酶蛋白的 aroG 基因的质粒 pCP32AMP 转化 MYR34 时, DHS 的积累有显著提高。当用从组成型启动子表达 aroB 基因的质粒转化 MYR34 时, 没有注意到 DHS 积累的显著提高。然而, 当用表达 aroB 和 aroG 基因二者的质粒转化大肠杆菌菌株 MYR34 时, 相比使用仅转化有 aroG 的 MYR34 时所观察的情况, DHS 的积累有增加, 因此表明 aroB 是 DHS 生产中的第二瓶颈 (图 5)。

[0113] 在图 6 呈现的实验中, 检视了整合到宿主染色体 DNA 中的 aroB 基因的额外的拷贝的效果。在衍生自 MYR34 的大肠杆菌菌株 MYR170 中, 将处于 P15 启动子控制下的 aroB 基因的额外拷贝在 ack 基因座处整合到宿主染色体中。当用 pCP32AMP 质粒转化 MYR170 菌株时, 与用相同质粒转化 MYR34 菌株时所检测到的 DHS 积累相比, DHS 积累有轻微的增加。MYR170 中 DHS 积累的轻微增加可以归因于整合到宿主染色体 DNA 中的 aroB 基因的额外拷贝。当用表达 aroB 和 aroG 基因二者的 pCP54 转化 MYR170 菌株时, DHS 积累有进一步的增加, 意味着 aroB 是 DHS 生产中的第二瓶颈。

[0114] 图 7 提供了使用大肠杆菌菌株 MYR34 和 MYR170 的黏康酸生产结果。在建立了在 aroE 缺失菌株 MYR34 和 MYR170 中在 aroB 和 aroG 基因的过表达下有 DHS 积累后, 工作致力于观察编码在黏康酸生产通路中有功能的蛋白的“黏康酸通路”基因的表达是否会导致 DHS 转变成顺, 顺 - 黏康酸。在这些实验中, 单独用质粒 pMG37 或用质粒 pMG37 和 pCP32AMP 二者转化大肠杆菌菌株 MYR34 和 MYR170。质粒 pMG37 表达编码在黏康酸通路中有功能的蛋白的 aroZ、aroY 和 catAX 基因。当用质粒 pMG37 和 pCP32AMP 二者转化这些细菌菌株时, 与仅用 pMG37 质粒转化的这两种菌株中的黏康酸产量相比, MYR34 和 MYR170 二者中的黏康酸产量增加, 这提示在这些菌株中, aroB 表达是顺, 顺 - 黏康酸生产的瓶颈。

[0115] 实施例 4

[0116] tktA 的过表达

[0117] 由 tktA 编码的转酮醇酶是戊糖磷酸通路中的关键酶, 并被认为是对于黏康酸生产中的关键中间体之一——赤藓糖 -4- 磷酸的生产是限制性的。已知通过将基因及其原生启动子置于多拷贝质粒上来过表达编码转酮醇酶的 tktA (Sprenger 等人, 1995, 1995a) 能提

高进入芳族通路中的流量 (Draths 等人, 1992)。然而, 这样的质粒不稳定, 并且往往需要抗生素选择以维持。现有技术中的另一方法是向宿主菌株的染色体中添加 *tktA* 基因的一个额外拷贝 (Niu 等人, 1992)。然而, *tktA* 的一个额外拷贝及其原生启动子并不足以用赤藓糖-4-磷酸饱和芳族通路, 因为其原生启动子并非完全接近于理想。这样, 该方法需要实质的改进。

[0118] 可以例如, 通过用强组成型启动子例如来自枯草芽孢杆菌噬菌体 SP01 的 P_{15} 或 P_{26} 启动子 (分别为 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2), 或来自细菌噬菌体 λ 的 P_R 启动子 (SEQ ID No. 3) 来替代染色体中的原生 *tktA* 启动子, 来获得改进的 *tktA* 过表达。这通过如实施例 1 中描述的两步而实现, 不同在于在第一步骤中使用 cam^R , *sacB* 盒来取代原生染色体 *tktA* 启动子。在第二步中, 通过转化线性 DNA 并进行蔗糖抗性选择而置入强组成型启动子, 所述线性 DNA 包含强组成型启动子, 其侧翼是在强组成型启动子下游侧的 *tktA* 编码区 5' 端的至少 50 个碱基和在强组成型启动子上游侧的就在原生 *tktA* 启动子上游的同源的至少 50 个碱基对。自这样的表达盒的改进的表达还通过增加从表达盒转录的 mRNA 的稳定性而实现。mRNA 稳定性的提高通过在 mRNA 的 5' 端、mRNA 的 3' 端或两端增加茎环结构而实现。茎-环结构往往存在于 mRNA 的末端, 其由 rho- 非依赖性的转录终止子自然终止, 但如果不是这样, 则可以通过遗传工程的公知方法 (连接、PCR 等) 向 DNA 序列中添加 rho- 非依赖性的转录终止子。这样的终止子可以由在各重复序列中的 4 至 20 个碱基的反向重复序列组成, 所述反向重复序列由 3 个或更多个碱基的“环”隔开, 后接富含 T (脱氧胸苷) 的一个或多个碱基的区域。反向重复序列富含 G 和 C (脱氧鸟苷和脱氧胞苷)。类似地, 可以通过就在转录起始点的下游但在核糖体结合位点之前插入含有如上所述的茎-环但没有 T- 富集的区的 DNA 序列, 将茎-环构建到 mRNA 的 5' 端中。对于此的实例结合 P_{15} 启动子 (SEQ ID No. 1) 给出。

[0119] 在过表达 *tktA* 基因对经由莽草酸通路的碳流的作用的分析中, 大肠杆菌菌株 MYR170 被用作亲本菌株。MYR170 在编码莽草酸脱氢酶的 *aroE* 基因中有缺失并在 *ack* 基因座处具有 *aroB* 基因的额外拷贝。

[0120] 在图 8、9 和 10 所描绘的实验中, 使用两种不同质粒, 即 pCP32AMP 和 pCP50。质粒 pCP32AMP 仅从其原生启动子表达 DAHP 合酶 *aroG* 基因, 质粒 pCP50 从其原生启动子表达转酮醇酶基因 *tktA* 连同 *aroG* 基因。用 pCP32AMP 和 pCP50 质粒单独转化具有 *aroE* 缺失和在染色体 DNA 的 *ack* 基因座处整合的在 P_{15} 启动子控制下的 *aroB* 基因的额外拷贝的 MYR170。如图 8 所示, 与仅表达 *aroG* 基因的大肠杆菌细胞相比, *aroG* 基因连同 *tktA* 基因的表达使 DHS 积累进一步增加。

[0121] 图 9 提供了用质粒 pCP32AMP 或 pCP50 转化的两种不同菌株即 MYR34、MYR170 中的 DHS 产率的数据。具有 *aroE* 基因缺失的 MYR34 菌株每消耗 1 克葡萄糖产生 0.1 克 DHS。当用具有 *aroG* 基因过表达的 pCP32AMP 质粒转化 MYR34 菌株时, 该菌株中的 DHS 产率增至每消耗 1 克葡萄糖产生 0.15 克 DHS。MYR170 具有在 *ack* 基因座处插入的 *aroB* 基因的额外拷贝。由于存在 *aroB* 基因的该额外拷贝, 用 pCP32AMP 转化的 MYR170 菌株中的 DHS 生产的产率稍高于用 pCP32AMP 转化的 MYR34 菌株中所观察到的 DHS 产率。因此, MYR170 中 *aroB* 的额外拷贝的存在引起增加的经由莽草酸通路的碳流。当用表达 *aroG* 和 *tktA* 基因二者的质粒 pCP50 转化 MYR170 菌株时, 观察到 DHS 产率的进一步提高。因此, *tktA* 的额外拷贝的存

在导致经由莽草酸通路的碳流的增加。更具体而言,存在额外的 *aroB* 和 *tktA* 基因的作用引起对 DHS 产率的累加效应。

[0122] 图 10 中描绘的实验中所使用的 MYR261 被改造为在 *poxB* 基因座处将 *tktA* 基因的额外拷贝整合到 MYR170 的染色体 DNA 中。MYR261 菌株中期望的基因取代 (*poxB::tktA*) 通过 PCR 验证。用 pCP32AMP (*aroG* 过表达) 质粒或 pCP50 (*aroG* 和 *tktA* 过表达) 质粒转化 MYR261。作为对照,用 pCP32AMP 质粒转化 MYR170。如图 10 所示的结果所显示的,与在用相同质粒转化的 MYR170 菌株中所观察到的 DHS 生产的滴度相比,MYR261 的染色体 DNA 中 *tktA* 基因的额外拷贝的存在增加了 pCP32AMP 质粒的 DHS 生产滴度。当用过表达转酮醇酶的质粒 pCP50 转化菌株时,MYR261 中转酮醇酶水平的进一步增加导致 DHS 生产滴度的进一步提高。由 *poxB* 编码的酶 PoxB,或丙酮酸氧化酶,产生乙酸盐作为反应产物。这样,如本文描述的因 *tktA* 插入引起的 *poxB* 缺失去除了乙酸盐生产的潜在活性通路。类似地,同时插入 P15*aroB* 并删除编码 *AckA* 或乙酸激酶的 *ackA*,如在以下实施例 12 中所描述的,去除了通向乙酸盐的另一潜在活性通路。乙酸盐产生在发酵中通常是不合人意的 (Jantama 等人, 2008b)。这样,这些缺失可以用于减少乙酸盐生产。

[0123] 图 11 提供了在用质粒 pCP32AMP 和 pMG37 转化后大肠杆菌 MYR170、MYR261 和 MYR305 菌株中的黏康酸和乙酸生产的滴度。通过从染色体 DNA 中缺失 *poxB* 基因从 MYR170 得到 MYR305,而 MYR261 是 MYR170 衍生菌,其中 *poxB* 基因已经通过插入 *tktA* 基因的额外拷贝而失活。如上所述,质粒 pCP32AMP 表达编码在莽草酸生物合成通路中起作用的 DAHP 合酶蛋白的 *aroG* 基因,导致由于大肠杆菌菌株 MYR170、MYR261 和 MYR305 中 *aroE* 基因的缺失的 DHS 的积累。由于质粒 pMG37 上黏康酸通路基因即 *aroZ*、*aroY* 和 *catAX* 的表达, DHS 被转化成顺,顺-黏康酸,如图 2 所示。在 MYR261 菌株中 *aroB* 基因和 *tktA* 基因的额外拷贝的存在下,黏康酸生产稍有增加,伴随着乙酸积累的降低。

[0124] 实施例 5

[0125] *talA* 或 *talB* 的过表达

[0126] *talB* 基因编码大肠杆菌中主要的转醛醇酶,但 *talA* 基因也编码小部分的转醛醇酶。已知转醛醇酶的过表达提高进入芳族通路的流量 (Lu 和 Liao, 1997; Sprenger, 1995; Sprenger 等人, 1995b)。在现有技术中,这是通过在多拷贝质粒上从原生启动子过表达 *tal* 基因 (现在称为 *talB* 基因) 而实现的 (Lu 等人, 1997, Sprenger 等人, 1995b)。然而,这样的质粒并不稳定,并且需要抗生素筛选以维持。因此,需要有改进的方法。可以例如通过用强组成型启动子例如来自枯草芽孢杆菌噬菌体 SP01 的 P15 或 P26 启动子 (分别为 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2),或来自细菌噬菌体 λ 的 PR 启动子 (SEQ ID No. 3) 来替代染色体中的原生 *talB* 启动子来获得改进的 *talB* 表达。这通过如实施例 1 中描述的两步而实现,不同在于在第一步骤中使用 *cam^R*, *sacB* 盒来取代原生染色体 *talB* 启动子。在第二步中,通过用线性 DNA 转化并进行蔗糖抗性选择而置入强组成型启动子,所述线性 DNA 包含强组成型启动子,其侧翼是在强组成型启动子下游侧的 *talB* 编码区 5' 端的至少 50 个碱基和在强组成型启动子上游侧的就在原生 *talB* 启动子上游的同源的至少 50 个碱基对。也可以通过相似方法来过表达 *talA* 基因,但优选过表达 *talB* 基因,因为其编码主要活性 (Sprenger, 1995; Sprenger 等人, 1995b)。对于有关设计为用于过表达的表达盒的构建的更多细节,参见实施例 4。

[0127] 实施例 6**[0128] aroZ、aroY 和 catAX 基因的表达**

[0129] 为证实大肠杆菌所产生的内源性 DHS 转化成黏康酸,将来自不动杆菌属物种 ADP1 的异源基因 catAX、来自肺炎克雷伯杆菌的 aroY、和来自不动杆菌属物种 ADP1 的 quiC 克隆到低拷贝质粒 pCL1921 中强组成型启动子(分别为 P_{15} 、 P_R 和 P_{26})下(Lerner 和 Inouye, 1990),以生成“黏康酸质粒”pMG37。携带空载体(pCL1921)或 pMG37 的 MYR34 衍生菌在含有 2% 葡萄糖的摇瓶培养基(补充有芳族氨基酸和维生素的 NBS 基本培养基)中在 37°C 生长 17 小时。收集上清液并通过 HPLC 分析。与显示 DHS 积累的 MYR34/pCL1921 成对比,MYR34/pMG37 显示黏康酸的产生(图 12)。从后一菌株中没有检测到显著量的 DHS 或中间体产物如 PCA 和儿茶酚,提示从 pMG37 表达的异源基因是有功能并且足够的。

[0130] 实施例 7**[0131] aroZ 同源物的比较**

[0132] 比较三种不同的 aroZ 同源物和类似物(图 13)将 DHS 转入黏康酸生产通路的能力。来自不动杆菌属物种 ADP1 的 quiC、来自苏云金芽孢杆菌的 asbF 和来自粗糙链孢菌的 qa-4 被报告为编码具有 AroZ 样活性的蛋白(Elsemore 和 Ornston, 1995; Fox 等人, 1995; Rutledge, 1984)。这些基因各自经密码子优化以用于在大肠杆菌中表达且通过 GeneArt (Invitrogen) 合成,并克隆到还分别从 P_{15} 和 P_R 启动子表达 catAX 和 aroY 基因的低拷贝“黏康酸质粒”中强组成型 P_{26} 启动子下。MYR34/pCL1921、MYR34/pMG37(以 quiC 作为 aroZ 的黏康酸质粒)、MYR34/pMG47(以 asbF 作为 aroZ 的黏康酸质粒)和 MYR34/pMG70(以 asbF 作为 aroZ 的黏康酸质粒)在具有含 2% 葡萄糖、芳族氨基酸和芳族维生素的基本培养基的摇瓶中在 37°C 生长 48 小时。收集上清液并通过 HPLC 分析。如所预期的,转化空载体的 MYR34 积累 DHS 且不产生黏康酸。检查的两种 aroZ 同源物和一种类似物在将 DHS 转向黏康酸生产中是有功能的,但程度不同。表达 quiC 基因的 MYR34 衍生菌最为强烈,显示近乎 100% 的 DHS 向黏康酸的转化和微乎其微的 DHS 存留量。表达真菌 aroZ 同源物 qa-4 的 MYR34 衍生菌以约 80% 的 DHS 向黏康酸的转化和 20% 的 DHS 存留紧接其后。最后,表达 asbF 基因的 MYR34 衍生菌显示仅 50% 的 DHS 向黏康酸的转化和 50% 的 DHS 存留。汇总而言,在我们的摇瓶测定条件下,与其它 aroZ 同源物相比,quiC 基因的表达和/或活性看起来是最高的。

[0133] 实施例 8**[0134] catAX、aroY 和 quiC 的染色体整合**

[0135] 可以通过含有仅在 adhE 基因座处染色体整合的从组成型启动子表达的 catA-X、aroY 和 quiC 的单拷贝的菌株来生产黏康酸。

[0136] 高 DHS 生产菌——MYR170($\Delta aroE$, $\Delta ack::P_{15}$ -aroB),是用于在染色体中 adhE 基因座处整合黏康酸通路基因的宿主菌(SEQ ID No. 41)。对所得的菌株 MYR352 转化质粒 YEp24(中拷贝,空载体)、pCP32AMP(中拷贝,aroG 从原生启动子表达)或 pCP50(中拷贝,aroG 和 tktA 从其各自的原生启动子表达),以生成衍生菌株。后两种质粒用于增加 DHS 产量。菌株在 37°C 在如上所述的含 2% 葡萄糖的摇瓶培养基中生长 72 小时。在 72 小时收集上清液并通过 HPLC 分析。如所预期的,与空载体对照相比,转化有 aroG 和 aroG/tktA 的 MYR352 衍生菌显示出总产物形成的整体提高(图 14)。所有的 MYR352 转化子生产可测量

滴度的黏康酸,首次证明黏康酸可以由仅含有整合的“黏康酸通路”基因的菌株生产且不需要补料基因表达的化学诱导物。

[0137] 任何这些 MYR352 衍生菌中产生的 DHS 并非全被转化成终产物黏康酸。相反,有显著量的儿茶酚积累(图 14),提示当 catAX 在染色体上从单拷贝表达时,其表达或活性是限制性的。由于主要的积累中间体是儿茶酚,可能在用于黏康酸合成的 MYR352 菌株背景中 quiC 和 aroY 基因表达和 / 或活性是充足的。

[0138] 将 MYR352 衍生菌与类似的 MYR219 衍生菌平行比较。MYR219 菌株与 MYR170 菌株相同,但含有表达黏康酸通路基因的低拷贝质粒 pMG37。因此,MYR352 与 MYR219 菌株的主要区别涉及到黏康酸通路基因的剂量(分别为 1 个拷贝 vs. 约 5 个拷贝)。与 MYR352 衍生菌相反,MYR219 衍生菌显示出极少的儿茶酚或其它中间体的积累,并成功地生产终产物黏康酸。总的来说,这些结果表明需要提高菌株例如 MYR352 中的 catAX 活性。

[0139] 实施例 9

[0140] catAX 的表达

[0141] MYR352 菌株中儿茶酚的积累和不足的黏康酸生产是由于 catAX 基因产物的有限剂量和 / 或活性。如上所述,MYR352 含有 $\Delta aroE$, $\Delta ack: :P_{15}$ -aroB 和强组成型启动子下的染色体整合的 catAX、aroY 和 quiC 基因的单拷贝。用中拷贝的空载体对照 (YE_p24) 或 aroG/tktA 表达质粒 (pCP50) 转化该菌株以增加进入芳族氨基酸合成通路的碳流并生产大量的 DHS。转化的菌株在如上所述的补充有 2% 葡萄糖的摇瓶培养基中在 37°C 生长 72 小时,导致儿茶酚中间体的积累。该结果提示 catAX 活性在 MYR352 中可能不足。为验证该假设,测试一种或多种从低拷贝质粒表达的黏康酸通路基因减弱 MYR352/pCP50 中儿茶酚积累的能力(图 15)。具体而言,还用低拷贝的空载体对照 (pCL1921) 或表达黏康酸生产通路的所有三种基因、两种基因或一种基因的质粒转化 MYR352/pCP50。在如上所述的摇瓶实验中测定衍生菌。尽管单独增加 aroY(来自 pMG27) 或单独增加 quiC(来自 pMG39) 的剂量并未减少儿茶酚积累,但所有的黏康酸通路基因(来自 pMG37) 的表达或 catAX 和 aroY(来自 pMG33) 共同的表达导致成功地将儿茶酚转化成黏康酸。此外,单独表达 catAX(来自 pMG31) 足以生产黏康酸和防止儿茶酚积累。

[0142] 实施例 10

[0143] 构建渗漏 aroE 突变

[0144] 在用于生产顺,顺-黏康酸的现有技术方法中,宿主菌株含有名为 aroE353 的 aroE 基因突变,其是无效突变。结果,该菌株需要补料从莽草酸通路制备的芳族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸)和芳族维生素(对羟基苯甲酸、对氨基苯甲酸,和 2,3-二羟基苯甲酸)。在商业上有吸引力的方法中补料芳族氨基酸太过昂贵。这样,现有技术方法需要实质的改进。这可以通过置入渗漏 aroE 基因(我们会将其称为 aroE*) 而实现。渗漏突变通过首先产生使 aroE 编码序列中的一个氨基酸改变引起无效表型的错义突变而获得。这可以通过任何形式的诱变和筛选对于以上列出的六种芳族化合物的同时营养缺陷型而实现。优选方法是利用 Taq DNA 聚合酶,使用野生型大肠杆菌 C 基因组 DNA 作为模板,并使用与 aroE 编码区上游的约 1000 个碱基对和下游的 1000 个碱基对杂交的 PCR 寡核苷酸引物,通过易错 PCR 诱变来产生突变体 aroE 基因池。所得的线性 DNA 分子池用于转化产生顺,顺-黏康酸并且含有已经取代 aroE 编码区的整合的 camR, sacB 盒(对于相关实例参见实施例 4)

的大肠杆菌 C 衍生菌, 并进行蔗糖抗性选择。然后对转化子筛选已经失去氯霉素抗性并且需要以上列出的六种芳族化合物的营养缺陷型。挑取数个独立的营养缺陷型并通过在含有六种芳族化合物的基本葡萄糖板上铺板约 10^7 、 10^8 、或 10^9 细胞 (在基本葡萄糖培养基中漂洗) 来测试可复原力 (revertability)。挑取在板上产生菌落的复原体并进行顺, 顺-黏康酸产生但没有实质性水平的芳族氨基酸产生的测试。在这些复原体中将有这样的菌株, 所述菌株携带 *aroE* 基因中的一个或多个突变, 从而使 AroE 酶提供充足的芳族氨基酸和维生素用于生长, 但又没有这些芳族化合物的剩余。获得渗漏 *aroE* 突变体的另一方法是向顺, 顺-黏康酸生产菌中置入经典的不可回复的 *aroE* 突变体如 *aroE353* 和 *aroE24* (均可从 Yale University 的 Coli Genetic Stock Center, New Haven, CT, USA 得到) 之一, 并如上所述选择复原体。

[0145] 实施例 11

[0146] 通过易化扩散的葡萄糖输入

[0147] 芳族通路的第一个关键步骤中的底物之一是磷酸烯醇丙酮酸 (PEP)。PEP 也是用于通过细菌磷酸转移酶体系 (PTS) 输入葡萄糖和一些其它糖类的磷酸盐和能量的来源。因此, 当细菌在 PTS- 依赖性的糖上生长时, 在 PTS 和芳族通路之间存在对 PEP 的竞争。这样, 可以通过删除 PTS 并提供可选的糖摄取通路来实现增加芳族通路流量的显著改进。该问题的一个解决方案是用大肠杆菌 GalP 通透酶, 对于葡萄糖摄取起相当好作用的质子同向转运蛋白 (US 专利 6, 692, 794) 取代 PTS。然而, 质子同向转运蛋白仍然耗用能量以维持驱动通透酶所必需的质子梯度。这样, 对于方法的进一步改进存在需求。

[0148] 一些糖, 例如木糖, 可以由从 ATP (三磷酸腺苷) 的水解获得能量的转运蛋白运输。再一次地, 如果可以用需要较少能量的转运蛋白来取代能量依赖性的转运蛋白, 那么可以获得改进, 因为 ATP 中固有的能量得以保存用于其它有益用途。

[0149] 可以通过利用在糖输入中不耗用能量的易化扩散转运蛋白来获得显著改进 (Parker 等人, 1995; Snoep 等人, 1994)。例如, 由 *glf* 基因编码的来自运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 的葡萄糖易化蛋白可以用于代替或额外加至 3-脱氢莽草酸盐 (DHS) 生产菌株中的 PTS (Yi 等人, 2003)。然而, 这些菌株仍然至少部分依赖于 GalP 进行葡萄糖输入。由于 GalP 需要质子梯度形式的能量用于葡萄糖输入, 有需求提高黏康酸生产菌株的葡萄糖输入效率。

[0150] 用于 *glf* 加上葡萄糖激酶基因 *glk* (也来自运动发酵单胞菌) 的表达的盒可以与强组成型启动子如 P_{26} 组装。然后可以将该盒在不妨碍期望的化合物 (在这种情况下为顺, 顺-黏康酸) 的生产的位置处整合到宿主菌株的基因组中。大肠杆菌染色体中这样的位置的实例是苏氨酸降解操纵子, *tdcABCDEFG*。如果生长培养基不含苏氨酸, 则不需要操纵子或该操纵子不表达, 由此在该操纵子中插入表达盒不会妨碍代谢。

[0151] 为实现上述的改进, 利用与实施例 1 中所公开内容相似的方法将一个或多个编码 PTS 功能的基因缺失。例如可以缺失 *ptsH*、*ptsI*、*csr* 或 *ptsG* 中的一个或多个。接着缺失 *galP*。然后可以在两步步骤中置入 P_{26} -*glf*, *glk* 盒, 与实施例 1 中所描述内容相似。在第一步中, 利用源自 pAC21 (SEQ ID No. 15) 的线性 DNA 在 *tdc* 操纵子处整合 *cam^R*, *sacB* 盒, 并进行氯霉素 (30mg/l) 抗性选择。在第二步中, 利用源自 pAC19 (SEQ ID No. 15) 的线性 DNA 在 *tdc* 操纵子处整合 P_{26} -*glf*, *glk* 盒, 进行蔗糖抗性选择并进行氯霉素敏感度筛选, 在这种

情况下是在基本葡萄糖培养基上的改进生长。

[0152] 为测试葡萄糖的易化扩散是否能替代大肠杆菌中常规的葡萄糖输入体系,从 MYR34(Δ aroE) 中缺失 ptsHI 基因和 galP 基因,然后利用源自 pAC19(SEQ ID No. 14) 的线性 DNA 在 tdc 操纵子处整合 P_{26} -glf, glk 盒,得到菌株 MYR217。MYR217 在补充有所需的三种芳族氨基酸和三种芳族维生素样化合物的基本葡萄糖培养基上生长相当好(图 16)。然而,含有 ptsHI 和 galP 缺失但不含有 glf, glk 盒的菌株 MYR31 并未显示出任何可测量的生长(图 16)。因此,易化扩散足以取代我们的菌株背景中的两种常规葡萄糖输入体系。

[0153] 为测试易化扩散是否可用于生产源自芳族通路的化合物,用 pCP54(aroG, aroB) 和 pCP55(aroG, aroB, tktA) 转化 MYR34 和 MYR217。对这两种菌株比较摇瓶中芳族中间体 3-脱氢莽草酸盐(DHS)的生产(图 17)。在 pCP54 或 pCP55 的情况下,利用易化扩散的菌株产生与利用常规葡萄糖输入体系的菌株相比同样多或更多的 DHS。DHS 生产是经改造的大肠杆菌菌株中黏康酸生产的良好代表,因此我们可以得出结论,葡萄糖的易化扩散对于黏康酸生产是有用的改进。

[0154] 实施例 12

[0155] aroB 基因的过表达

[0156] 据报道 aroB 基因的表达对于顺,顺-黏康酸生产是限速性的(Niu 等人,2002)。在现有技术中,据称这是通过整合 aroB 基因的第二拷贝与其原生启动子而解决的。然而,这并不足以缓解 aroB 限制,因为 aroB 基因的原生启动子和核糖体结合位点还远不够理想。这样,该方法需要实质的改进。

[0157] 可以例如通过用强组成型启动子例如来自枯草芽孢杆菌噬菌体 SP01 的 P_{15} 或 P_{26} 启动子(分别为 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2),或来自细菌噬菌体 λ 的 P_R 启动子(SEQ ID No. 3)来替代染色体中的原生 aroB 启动子来获得改进的 aroB 过表达。这通过如实施例 4 中描述的两步而实现,不同在于在第一步骤中使用 cam^R , sacB 盒来取代原生染色体 aroB 启动子和/或核糖体结合位点。在第二步中,通过用线性 DNA 转化并进行蔗糖抗性选择而置入强组成型启动子,所述线性 DNA 包含强组成型启动子,后接核糖体结合位点和在强组成型启动子的下游侧的自 aroB 编码序列 5' 端的至少 50 个碱基(包括 ATG 起始密码子),以及在强组成型启动子上游侧的就在原生 aroB 启动子上游的同源的至少 50 个碱基对。除了置入更强启动子外或代替置入更强启动子,利用相似方法,可以在 aroB 的 ATG 翻译起始密码子上游的约 4 至 10 个碱基对处置入更强的核糖体结合位点例如 AGGAGG。这样的合成盒例如 P_{15} -aroB 盒的拷贝可以在不同于原生 aroB 基因座的基因座处例如在 ack 基因座处整合到染色体中。如实施例 4 中同时缺失 ack 基因并缺失 poxB 基因可帮助减少发酵过程中不希望的乙酸盐形成。

[0158] 实施例 13

[0159] 降低经由戊糖磷酸通路的氧化分支的流量

[0160] 芳族通路中第一关键步骤所需的赤藓糖-4-磷酸来源于戊糖磷酸通路(PPP)的非氧化部分。存在两种不同的通路可让碳进入 PPP。第一种是从葡萄糖-6-磷酸通过酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(由 zwf 基因编码)、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(由 pg1 基因编码)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(由 gnd 基因编码),得到核酮糖-5-磷酸。在这三个步骤的最后,一个碳作为 CO_2 损失。这种进入 PPP 的通路称为 PPP 的氧化分支。核酮糖-5-磷酸然后通过异构

酶、差向异构酶、转酮醇酶和转醛醇酶的作用被转化成多种其它糖磷酸盐。这组起始于核酮糖-5-磷酸的可逆反应被称为 PPP 的非氧化分支。第二种碳进入 PPP 的通路是通过果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸（二者都来自 Embden-Myerhoff 通路，也称为糖酵解），它们可经转醛醇酶和转酮醇酶组合和重排而得到多种其它糖磷酸盐，其中之一是赤藓糖-4-磷酸。如果碳是通过该第二途径进入 PPP，则没有 CO₂ 损失。为了提高自葡萄糖的顺，顺-黏康酸产率，通过阻断 PPP 的氧化分支从而使所有进入 PPP 的碳必须经历自果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸的非氧化途径，可以防止 CO₂ 损失。利用与实施例 1 所公开的用于缺失 tyrR 基因的内容相似的两步法，通过缺失 zwf 基因来完成 PPP 氧化分支的阻断。

[0161] 实施例 14

[0162] 增加通向芳族通路和经由 PEP 通向芳族通路的流量

[0163] 理想的是确保 PEP 不是顺，顺-黏康酸通路上的限速中间体。这是例如，通过增加丙酮酸通过酶 PEP 合成酶向 PEP 的再循环而实现的，这是通过如以上在其它实施例中所描述的整合 pps 基因的过表达盒而实现的。另一方法是限制丙酮酸激酶的 PEP 消耗，丙酮酸激酶在大肠杆菌中由 pykA 和 pykF 基因编码。在这种情况下，方法是降低（一种或多种）酶的活性。这是通过缺失一种或多种编码丙酮酸激酶的基因（如实施例 1 中对于 tyrR 所描述的），或降低这些基因中的一种或多种的表达强度，如通过突变启动子、核糖体结合位点或编码序列从而使丙酮酸激酶活性的水平降低而实现的。例如，大肠杆菌 pykA 基因之前的 RBS 是 5' CGGAGTATTACATG。ATG 翻译起始密码子加下划线。该序列可以突变成 CaGAGTATTACATG、CaaAGTATTACATG、CaatGTATTACATG、CaataTATTACATG 等等，从而通过一次一个碱基变化使 RBS 序列变得与 AGGAGG 的共有 RBS 更加不同。然后将各个突变的形式引入到染色体中 pykA 基因座处，取代野生型，并测量黏康酸生产水平的改进。

[0164] 实施例 15

[0165] 赋予蔗糖上的生长

[0166] 源自大肠杆菌 C 的菌株不能以蔗糖作为唯一碳源生长。然而，如 PCT 专利申请 PCT/US11/064598 中（在此整体地并入本文以作参考）所公开的，它们可经基因改造而如此生长。这样，可以改造顺，顺-黏康酸生产菌株使其在蔗糖上生长，如以上提及的申请中所公开的那样。

[0167] 实施例 16

[0168] 改进的顺，顺-黏康酸生产者

[0169] 可以通过一个接一个地安置特征将实施例 1-15 中所描述的所有特征组合到一株大肠杆菌菌株中。所得的菌株包含改进的顺，顺-黏康酸生产者。随后可通过在与第一拷贝的位置隔开的位置，一次一个地整合各个上述过表达盒的第二拷贝，对所得菌株进行再进一步的改进。方便且安全的位置的实例是在就在 rrff（其编码核糖体 RNA）的终止子下游的 BsrB1 限制性位点。期望的盒作为平端线性 DNA 连接到质粒 pMH17F（SEQ ID No. 17）中唯一的 BsrB1 位点。实例是 catAX 表达盒连接以得到名为 pcatAX 的质粒。平行地，cam^R，sacB 盒作为平端片段连接到 pMH17F 中以得到 pMH28F（SEQ ID No. 19）。使用通过 PCR 或通过限制性酶切从 pMH28 得到的线性 DNA 在 rrff 位点处保存 cam^R，sacB 盒。接着，利用在蔗糖上选择，使用通过 PCR 或通过限制性酶切从 pcatAX 得到的线性 DNA 在 rrff 基因座处安置 catAX 盒的第二拷贝。然后将所得的菌株与祖代亲本菌株比较顺，顺-黏康酸生产，以确定

catAX 是限制性步骤。通过相似的方法,对来自实施例 2-15 的各个盒测试限速步骤。如果发现步骤是限速性的,则在染色体的另外其它合适位置处整合相关盒的一个或多个额外的拷贝,引起顺,顺-黏康酸生产的更进一步改善,而不需要质粒或可诱导的启动子。

[0170] 实施例 17

[0171] 通过发酵生产顺,顺-黏康酸

[0172] 可以通过以上实施例 1-15 中所公开的经基因改造的微生物来生产顺,顺-黏康酸。生长培养基可以广泛地不同,并且可以是任何支持微生物充分生长的培养基。优选的培养基是含有矿物盐和非芳族碳源例如葡萄糖、木糖、乳糖、甘油、乙酸、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、麦芽糖或蔗糖的基本培养基(关于优选基本生长培养基的实例参见上文)。对于经改造的微生物和生长培养基的各个组合,通过常规实验来确定生产顺,顺-黏康酸的合适条件,在所述常规实验中,发酵参数系统性地变化,例如温度、pH、通气速率和用于维持 pH 的化合物。随着顺,顺-黏康酸产生,必须向发酵罐中补料一种或多种化合物以防止 pH 变得太低。用来中和酸的优选化合物包括碱性盐,如铵、钠、钾、钙、镁的氧化物、氢氧化物、碳酸盐和碳酸氢盐,或者两种或更多种的这类碱盐的组合。

[0173] 大肠杆菌 MYR428 菌株在 7 升发酵罐中的黏康酸生产示于图 18。对具有基因型 $\Delta aroE \Delta ackA::P_{15}-aroB \Delta poxB::tktA$ 的大肠杆菌 MYR261 菌株转化质粒 pCP32AMP 和 pMG37 以产生 MYR428。MYR428 在如上所述的 7 升发酵罐中以葡萄糖补料生长 48 小时。最终黏康酸滴度为 16g/l(参见图 18)。

[0174] 在发酵完成后,通过絮凝、离心和/或过滤来移除细胞,然后通过一个或多个后续步骤例如沉淀、结晶、电渗析、层析(离子交换型、疏水亲和性、和/或基于尺寸的)、微滤、纳滤、反渗透和蒸发的组合从澄清发酵液中纯化顺,顺-黏康酸。

[0175]

表 1. 本发明中使用的细菌菌株和质粒	
细菌菌株/质粒	特征
细菌菌株	
ATCC8739	大肠杆菌“C”野生型
MYR34	ATCC8739 Δ aroE
MYR170	ATCC8739 Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB
MYR261	ATCC8739 Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, Δ poxB::tktA
MYR305	ATCC8739 Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, Δ poxB
MYR31	ATCC8739 Δ ptsHI, Δ galP
MYR217	ATCC8739 Δ ptsHI, Δ galP, Δ tdc::glf-glk, Δ aroE
MYR352	ATCC8739 Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, Δ adhE::P ₁₅ -catAX, P _R -aroY, P ₂₆ -quiC
RY903	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-893
RY909	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-899
RY911	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-901
RY912	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroGwt
RY913	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-893, Δ tyrR::kan
RY919	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-899, Δ tyrR::kan
RY921	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-901, Δ tyrR::kan
RY922	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroGwt, Δ tyrR::kan
质粒	
YE24	2 μ 酵母来源, URA3, Tc ^R , pMB1 复制子, Ap ^R
pCP32AMP	2 μ 酵母来源, URA3, Tc ^R , pMB1 复制子, Ap ^R , aroG
pCP14	2 μ 酵母来源, URA3, Tc ^R , pMB1 复制子, Ap ^R , P ₁₅ aroB
pCP54	2 μ 酵母来源, URA3, Tc ^R , pMB1 复制子, Ap ^R , P ₁₅ aroB, aroG
pCP50	2 μ 酵母来源, URA3, Tc ^R , pMB1 复制子, Ap ^R , aroG, tktA
pCP55	2 μ 酵母来源, URA3, Tc ^R , pMB1 复制子, Ap ^R , aroG, aroB, tktA
pCL1921	pSC101 复制子, Spc ^R
pMG27	pSC101 复制子, Spc ^R , P _R -aroY
pMG31	pSC101 复制子, Spc ^R , P ₁₅ -catAX
pMG33	pSC101 复制子, Spc ^R , P ₁₅ -catAX, P _R -aroY
pMG37	pSC101 复制子, Spc ^R , P ₁₅ -catA-CatX, P _R -aroY, P ₂₆ -quiC
pMG39	pSC101 复制子, Spc ^R , P ₂₆ -quiC
pMG47	pSC101 复制子, Spc ^R , P ₁₅ -catAX, P _R -aroY, P ₂₆ -asbF
pMG70	pSC101 复制子, Spc ^R , P ₁₅ -catAX, P _R -aroY, P ₂₆ -qa-4

[0176]

表 2 序列信息

编号	名称	描述
1	SEQ ID No. 1	来自枯草芽孢杆菌噬菌体 SP01 的 P ₁₅ 启动子, 具有就在转录起始位点下游添加的茎和环
2	SEQ ID No. 2	来自枯草芽孢杆菌噬菌体 SP01 的 P ₂₆ 启动子
3	SEQ ID No. 3	来自大肠杆菌噬菌体的 P _R 启动子
4	SEQ ID No. 4	由 <i>qa-4</i> 基因编码的来自粗糙脉孢菌的 3-脱氢莽草酸脱水酶的蛋白序列
5	SEQ ID No. 5	来自粗糙脉孢菌的 <i>qa-4</i> 基因的基因组 DNA 序列加周围序列
6	SEQ ID No. 6	由 <i>qutC</i> 基因编码的来自构巢曲霉的 3-脱氢莽草酸脱水酶的蛋白序列
7	SEQ ID No. 7	来自构巢曲霉的 <i>qutC</i> 基因的基因组 DNA 序列加周围序列
8	SEQ ID No. 8	来自肺炎克雷伯杆菌 ATCC25597 的原儿茶酚脱羧酶 (AroY) 的蛋白序列
9	SEQ ID No. 9	肺炎克雷伯杆菌 342 的 <i>aroY</i> 基因的 DNA 序列加两千碱基的周围 DNA 序列
10	SEQ ID No. 10	来自贝氏不动杆菌 ADP1 的 <i>catA</i> 基因的 DNA 序列, 包括 410 碱基的上游序列和两个下游开放阅读框
11	SEQ ID No. 11	来自贝氏不动杆菌 ADP1 的 CatA (儿茶酚 1,2-双加氧酶) 的蛋白序列
12	SEQ ID No. 12	来自不动杆菌属物种 ADP1 的 <i>quiC</i> (3-脱氢莽草酸脱水酶) 基因的 DNA 序列
13	SEQ ID No. 13	来自不动杆菌属物种 ADP1 的 <i>quiC</i> (3-脱氢莽草酸脱水酶) 基因的经密码子优化的 DNA 序列
14	SEQ ID No. 14	来自不动杆菌属物种 ADP1 的 QuiC (3-脱氢莽草酸脱水酶) 的蛋白序列
15	SEQ ID No. 15	质粒 pAC21 的 DNA 序列
16	SEQ ID No. 16	质粒 pAC19 的 DNA 序列
17	SEQ ID No. 17	质粒 pMH17F 的 DNA 序列
18	SEQ ID No. 18	野生型 <i>aroG</i> 基因的编码区的 DNA 序列
19	SEQ ID No. 19	质粒 pMH28F 的 DNA 序列

[0177]

表 3. 序列信息 – 续

编号	名称	描述
20	SEQ ID No. 20	质粒 pCL1921 的 DNA 序列
21	SEQ ID No. 21	质粒 pMG27 的 DNA 序列
22	SEQ ID No. 22	质粒 pMG31 的 DNA 序列
23	SEQ ID No. 23	质粒 pMG33 的 DNA 序列
24	SEQ ID No. 24	质粒 pMG37 的 DNA 序列
25	SEQ ID No. 25	质粒 pMG39 的 DNA 序列
26	SEQ ID No. 26	质粒 pMG47 的 DNA 序列
27	SEQ ID No. 27	质粒 pMG70 的 DNA 序列
28	SEQ ID No. 28	质粒 pCP32AMP 的 DNA 序列
29	SEQ ID No. 29	质粒 pCP14 的 DNA 序列
30	SEQ ID No. 30	质粒 pCP50 的 DNA 序列
31	SEQ ID No. 31	质粒 pCP54 的 DNA 序列
32	SEQ ID No. 32	质粒 pCP55 的 DNA 序列
33	SEQ ID No. 33	质粒 YEP24 的 DNA 序列
34	SEQ ID No. 34	缺失的 <i>aroE</i> 区的 DNA 序列
35	SEQ ID No. 35	整合的盒 $\Delta ack::P_{15}aroB$ 的 DNA 序列
36	SEQ ID No. 36	$\Delta poxB$ 区的 DNA 序列
37	SEQ ID No. 37	整合的盒 $\Delta poxB::tklA$ 的 DNA 序列
38	SEQ ID No. 38	$\Delta ptsHI$ 区的 DNA 序列
39	SEQ ID No. 9	整合的盒 $\Delta tdc::glf-glK$ 的 DNA 序列
40	SEQ ID No. 40	$\Delta galP$ 区的 DNA 序列
41	SEQ ID No. 41	MYR352 $\Delta adhE::P_{15-catAX}$, P_R-aroY , $P_{26-quiC}$

[0178]

表 4. 导致对苯丙氨酸反馈抑制抗性的 *aroG**突变体等位基因

菌株	等位基因号	核苷酸突变	氨基酸突变
RY893	<i>aroG</i> *20-893	C449T	Pro150Leu
RY897	<i>aroG</i> *20-897	C449T	Pro150Leu
RY899	<i>aroG</i> *20-899	T538C	Ser180Pro
RY901	<i>aroG</i> *20-901	C438T	Pro150Ser
MYR450	<i>aroG</i> *111	C55T	Pro19Ser
MYR451	<i>aroG</i> *211	G533A	Gly178Glu
MYR452	<i>aroG</i> *212	C540T	Ser180Phe
MYR453	<i>aroG</i> *311	从碱基对 36 至 44bp 缺失	Glu-Ile-Lys 缺失
MYR454	<i>aroG</i> *312	C632T	Ser211Phe
MYR455	<i>aroG</i> *411	T29A	Ile10Asn
MYR456	<i>aroG</i> *412	G533A	Gly178Glu
MYR457	<i>aroG</i> *511	C448T	Pro150Ser

[0179]

表 5. 来自多种重组大肠杆菌菌株的粗制提取物中的 AroG 活性测量

菌株	<i>aroG</i> *等位基因	比活 mU (1mU = 每分钟每毫克 蛋白制造 1nM 产物)	抗苯丙氨酸 活性百分比%
RY893	<i>aroG</i> *20-893	62	34
RY897	<i>aroG</i> *20-897	55	77
RY899	<i>aroG</i> *20-899	92	113
RY901	<i>aroG</i> *20-901	78	76
RY902	<i>aroG</i> 野生型	38	6
RY890	<i>aroG</i> 野生型	54	7

[0180]

表 6. 含有反馈抗性 *aroG**等位基因的菌株在摇瓶中的黏康酸生产

菌株	黏康酸滴度 g/l
RY913	3.04
RY919	3.11
RY921	2.99
RY922	1.45

[0181] 参考文献

[0182] 美国专利号 4, 480, 034

[0183] 美国专利号 4, 535, 059

[0184] 美国专利号 4, 588, 688

[0185] 美国专利号 4, 608, 338

[0186] 美国专利号 4, 681, 852

- [0187] 美国专利号 4, 753, 883
- [0188] 美国专利号 4, 833, 078
- [0189] 美国专利号 4, 968, 612
- [0190] 美国专利号 5, 168, 056
- [0191] 美国专利号 5, 272, 073
- [0192] 美国专利号 5, 487, 987
- [0193] 美国专利号 5, 616, 496
- [0194] 美国专利号 6, 600, 077
- [0195] 美国专利号 6, 180, 373
- [0196] 美国专利号 6, 210, 937
- [0197] 美国专利号 6, 472, 169
- [0198] 美国专利号 6, 613, 552
- [0199] 美国专利号 6, 962, 794
- [0200] 美国专利号 7, 244, 593
- [0201] 美国专利号 7, 638, 312
- [0202] 美国专利号 7, 790, 431
- [0203] 美国专利申请公开号 US 2009/0191610
- [0204] 美国专利申请公开号 US 2010/0314243 A1
- [0205] 欧洲专利申请号 86300748. 0
- [0206] 国际专利申请公开号 WO 2011/017560
- [0207] 国际专利申请公开号 WO 2011/085311
- [0208] 国际专利申请公开号 WO 2011/123154
- [0209] Altschul, S. F. , Gish, W. , Miller, W. , Myers, E. W. , and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, J Mol Biol 215, 403-410.
- [0210] Altschul, S. F. , Madden, T. L. , Schaffer, A. A. , Zhang, J. , Zhang, Z. , Miller, W. , and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res 25, 3389-3402.
- [0211] Barbe, V. , Vallenet, D. , Fonknechten, N. , Kreimeyer, A. , Oztas, S. , Labarre, L. , Cruveiller, S. , Robert, C. , Duprat, S. , Wincker, P. , Ornston, L. N. , Weissenbach, J. , Marliere, P. , Cohen, G. N. , and Medigue, C. (2004) Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium, Nucleic Acids Res 32, 5766-5779.
- [0212] Bird, J. A. and Cain, R. B. (1968) *cis-cis*-muconate, the product inducer of catechol 1, 2-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. J. 109, 479-481.
- [0213] Bongaerts, J. , Kramer, M. , Muller, U. , Raven, L. and Wubbolts, M. (2001) Metabolic engineering for microbial production of aromatic acids and derived compounds. Met. Eng. 3, 289-300.
- [0214] Chandran, S. S. , Yi, J. , Draths, K. M. , von Daeniken, R. , Weber, W. and Frost, J. W. (2003) Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic

acid. *Biotechnol. Prog.* 19, 808–814.

[0215] Chen, R., Hatzimanikatis, V., Yap, W. M. G. J., Potma, P. W. and Bailey, J. E. (1997) Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 13, 768–775.

[0216] Chen, K., Dou, J., Tang, S., Yang, Y., Wang, H., Fang, H. and Zhou, C. (2012) Deletion of the *aroK* gene is essential for high shikimic acid accumulation through the shikimate in *E. coli*. *Bioresource Technol.* 119, 141–147.

[0217] Choi, W. J., Lee, E. Y., Cho, M. H., and Choi, C. Y. (1997) Enhanced production of *cis,cis*-muconate in a cell-recycle bioreactor. *J. Fermentation and Bioengineering.* 84, 70–76.

[0218] Curran, K. A., Leavitt, J. M., Karim, A. S. and Alper, H. S. (2012) Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabol. Engineer.* 15, 55–66.

[0219] de Berardinis, V., Vallenet, D., Castelli, V., Besnard, M., Pinet, A., Cruaud, C., Samair, S., Lechaplais, C., Gyapay, G., Richez, C., Durot, M., Kreimeyer, A., Le Fevre, F., Schachter, V., Pezo, V., Doring, V., Scarpelli, C., Medigue, C., Cohen, G. N., Marliere, P., Salanoubat, M., and Weissenbach, J. (2008) A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Syst Biol* 4, 174.

[0220] Draths, K. M., Pompliano, D. L., Conley, D. L., Frost, J. W., Berry, A., Disbrow, G. L., Staversky, R. J., and Lievens, J. C. (1992) Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose—the Role of Transketolase, *Journal of the American Chemical Society* 114, 3956–3962.

[0221] Draths, K. M., and Frost, J. W. (1995) Environmentally Compatible Synthesis of Catechol from D-Glucose, *Journal of the American Chemical Society* 117, 2395–2400.

[0222] Elsemore, D. A., and Ornston, L. N. (1995) Unusual ancestry of dehydratases associated with quinate catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus*, *J Bacteriol* 177, 5971–5978.

[0223] Escalante, A., Calderon, R., Valdivia, A., de Anda, R., Hernandez, G., Ramirez, O. T., Gosset, G. and Boliver, F. (2010) Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 9, 21–33.

[0224] Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F. and Valle, F. (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 14, 620 – 623.

[0225] Fox, D. T., Hotta, K., Kim, C. Y., and Koppisch, A. T. (2008) The missing link in petrobactin biosynthesis: *asbF* encodes a(–)-3-dehydroshikimate dehydratase, *Bioc*

hemistry47, 12251-12253.

[0226] Ger, Y., Chen, S., Chiang, H., and Shiuan, D. (1994) A Single Ser-180 Mutation Desensitizes Feedback Inhibition of the Phenylalanine-Sensitive 3-Deoxy-D-Arabinose-7-Phosphate (DAHP) Synthetase in *Escherichia coli*, *J Biochem* 116, 986-990.

[0227] Grant, D. J., and Patel, J. C. (1969) The non-oxidative decarboxylation of p-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid and gallic acid by *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*), *Antonie Van Leeuwenhoek* 35, 325-343.

[0228] Hansen, E. H., Moller, B. L., Kock, G. R., Bunner, C. M., Kristensen, C., Jensen, O. R., Okkels, F. T., Olsen, C. E., Motawia, M. S., and Hansen, J. (2009) De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *Appl Environ Microbiol* 75, 2765-2774.

[0229] Hu, C., Jiang, P., Xu, J., Wu, Y., and Huang, W. (2003) Mutation analysis of the feedback inhibition site of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*, *J Basic Microbiol* 143, 399-406.

[0230] Iwagami, S. G., Yang, K., and Davies, J. (2000) Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. strain 2065, *Appl Environ Microbiol* 66, 1499-1508.

[0231] Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. (2008a) Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate, *Biotechnol Bioeng* 99, 1140-1153.

[0232] Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., and Ingram, L. O. (2008b) Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C, *Biotechnol Bioeng* 101, 881-893.

[0233] Kaneko, A., Ishii, Y., and Kirimura, K. (2011) High-yield production of cis,cis-muconic acid from catechol in aqueous solution by biocatalyst. *Chem. Lett.* 40, 381-383.

[0234] Kikuchi, Y., Tsujimoto, K., and Kurahashi, O. (1997) Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol* 63, 761-762.

[0235] Kojima, Y., Fujisawa, H., Nakazawa, A., Nakazawa, T., Kanetsuna, F., Taniuchi, H., Nozaki, M., and Hayaishi, O. (1967) Studies on pyrocatechase. I. Purification and spectral properties, *J Biol Chem* 242, 3270-3278.

[0236] Kramer, M., Bongaerts, J., Bovenberg, R., Kremer, S., Muller, U., Orf, S., Wubbolts, M. and Raevens, L. (2003) Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabol. Eng.* 5, 277-283.

[0237] Lerner, C. G., and Inouye, M. (1990) Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert

screening capability, *Nucleic Acids Res* 18, 4631.

[0238] Li, K. and Frost, J. W. (1999) Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: A comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources. *Biotechnol. Prog.* 15, 876-883.

[0239] Lu, J. L., and Liao, J. C. (1997) Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase, *Biotechnol Bioeng* 53, 132-138.

[0240] Lu, J., Tang, J., Liu, Y., Zhu, X. (2012) Combinatorial modulation of galP and glk gene expression for improves alternative glucose utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2455-2462

[0241] Lutke-Eversloh, T., and Stephanopoulos, G. (2007) L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 103-110.

[0242] Mizuno, S., Yoshikawa, N., Seki, M., Mikawa, T., and Imada, Y. (1988) Microbial production of cis, cis-muconic acid from benzoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol.* 28, 20-25.

[0243] Nakazawa, A., Kojima, Y., and Taniuchi, H. (1967) Purification and properties of pyrocatechase from *Pseudomonas fluorescens*, *Biochim Biophys Acta* 147, 189-199.

[0244] Neidhardt, F. C., and Curtiss, R. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, D. C.

[0245] Neidle, E. L., and Ornston, L. N. (1986) Cloning and expression of *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2-dioxygenase structural gene *catA* in *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 168, 815-820.

[0246] Niu, W., Draths, K. M., and Frost, J. W. (2002) Benzene-free synthesis of adipic acid, *Biotechnol Prog* 18, 201-211.

[0247] Parker, C., Barnell, W. O., Snoep, J. L., Ingram, L. O., and Conway, T. (1995) Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport, *Mol Microbiol* 15, 795-802.

[0248] Parsek, M. R., Shinabarger, D. L., Rithmel, R. K. and Chakrabarty, A. M. (1992) Roles of CatR and cis, cis-Muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 174, 7798-7806.

[0249] Patnaik, R. and Liao, J. C. (1994) Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite with near theoretical yield. *App. Env. Microbiol.* 60, 3903-3908.

[0250] Pfleger, B. F., Kim, Y., Nusca, T. D., Maltseva, N., Lee, J. Y., Rath, C. M., Scaglione, J. B., Janes, B. K., Anderson, E. C., Bergman, N. H., Hanna, P. C., Joachimiak, A., and Sherman, D. H. (2008) Structural and functional analysis of AsbF: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin

biosynthesis, Proc Natl Acad Sci U S A 105, 17133-17138.

[0251] Perez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D. H., and Gonzalez, B. (2008) Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134, FEMS Microbiol Rev 32, 736-794.

[0252] Perez-Pantoja, D., Donoso, R., Agullo, L., Cordova, M., Seeger, M., Pieper, D. H., and Gonzalez, B. (2011) Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales, Environ Microbiol.

[0253] Pittard, J. and Wallace, B. J. (1966) Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 91, 1494-1508.

[0254] Polen, T., Spelberg, M. and Bott, M. (2012) toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables, J. Biotechnol, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotech.2012-07.008>.

[0255] Rutledge, B. J. (1984) Molecular characterization of the qa-4 gene of *Neurospora crassa*, Gene 32, 275-287.

[0256] Schirmer, F., and Hillen, W. (1998) The *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 mop operon mRNA is differentially degraded, resulting in a higher level of the 3' CatA-encoding segment than of the 5' phenolhydroxylase-encoding portion, Mol Gen Genet 257, 330-337.

[0257] Shumilin, I. A., Kretsinger, R. H., and Bauerle, R. H. (1999) Crystal structure of phenylalanine-regulated 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*, Structure 7, 865-875.

[0258] Shumilin, I. A., Zhao, C., Bauerle, R., and Kretsinger, R. H. (2002) Allosteric inhibition of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase alters the coordination of both substrates, J Mol Biol 320, 1147-1156.

[0259] Shumilin, I. A., Bauerle, R., Wu, J., Woodard, R. W., and Kretsinger, R. H. (2004) Crystal structure of the reaction complex of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Thermotoga maritima* refines the catalytic mechanism and indicates a new mechanism of allosteric regulation, J Mol Biol 341, 455-466.

[0260] Shumkova, E. S., Solyanikova, I. P., Plotnikova, E. G. and Golovleva, L. A. (2009) Phenol degradation by *Rhodococcus opacus* Strain 1G. App. Biochem. Microbiol. 45, 43-49.

[0261] Sietmann, R., Uebe, R., Boer, E., Bode, R., Kunze, G., and Schauer, F. (2010) Novel metabolic routes during the oxidation of hydroxylated aromatic acids by the yeast *Arxula adeninivorans*, J Appl Microbiol 108, 789-799.

[0262] Smith, M. R. and Ratledge, C. (1989) Quantitative biotransformation of catechol to cis, cis-muconate. Biotech. Lett. 11, 105-110.

[0263] Snoep, J. L., Arfman, N., Yomano, L. P., Fliege, R. K., Conway, T., and

Ingram, L. O. (1994) Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase, *J Bacteriol* 176, 2133–2135.

[0264] Sprenger, G. A. (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12, *Arch Microbiol* 164, 324–330.

[0265] Sprenger, G. A., Schorken, U., Sprenger, G., and Sahm, H. (1995a) Transketolase A of *Escherichia coli* K12. Purification and properties of the enzyme from recombinant strains, *Eur J Biochem* 230, 525–532.

[0266] Sprenger, G. A., Schorken, U., Sprenger, G., and Sahm, H. (1995b) Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, *talB*, and characterization of the enzyme from recombinant strains, *J Bacteriol* 177, 5930–5936.

[0267] Stroman, P., Reinert, W. R., and Giles, N. H. (1978) Purification and characterization of 3-dehydroshikimate dehydratase, an enzyme in the inducible quinic acid catabolic pathway of *Neurospora crassa*, *J Biol Chem* 253, 4593–4598.

[0268] Tang, J., Zhu, X., Lu, J. and Liu, P. (2012) Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production. *App Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s00253-012-434.1

[0269] Tateoka, T., and Yasuda, I. (1995) 3-Dehydroshikimate dehydratase in mung bean cultured cells, *Plant Cell Reports* 15, 212–217.

[0270] Weaver, L. M., and Herrmann, K. M. (1990) Cloning of an *aroF* allele encoding a tyrosine-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase, *J Bacteriol* 172, 6581–6584.

[0271] Weber, C., Bruckner, C., Weinreb, S., Lehr, C., Essl, C. and Bole, E. (2012) Biosynthesis of *cis,cis*-muconic acid and its aromatic precursors catechol and proteocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*, *App Environ Microbiol.* 78, 8421–8430.

[0272] Wheeler, K. A., Lamb, H. K., and Hawkins, A. R. (1996) Control of metabolic flux through the quinate pathway in *Aspergillus nidulans*, *Biochem J* 315(Pt1), 195–205.

[0273] Wu, C-M., Wu, C-C., Su, C-C., Lee, S-N., Lee, Y-A. and Wu, J-Y. (2006) Microbial synthesis of *cis,cis*-muconic acid from benzoate by *Sphingobacterium* sp. Mutants. *Biochem. Eng. J.* 29, 35–40.

[0274] Xie, N., Tang, H., Feng, J., Tao, F., Ma, C. and Xu, P. (2009) Characterization of benzoate degradation by newly isolated bacterium *Pseudomonas* sp. XP-M2. *Biochem. Eng. J.* 46, 79–82.

[0275] Yi, J., Draths, K. M., Li, K. and Frost, J. W. (2003) Altered Glucose Transport and Shikimate Pathway Product Yields in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 1450–1459

[0276] Yoshikawa, N., Mizuno, S., Ohta, K., and Suzuki, M. (1990) Microbial production

of cis,cis-muconic acid. J. Biotechnol. 14, 203-210

[0001]

序列表.txt

序列表

<110> 麦兰特公司
Yocum, R. Rogers
Gong, Wei
Dole, Sudhanshu
Sillers, Ryan
Gandhi, Meghal
Pero, Janice G.

<120> 从经基因改造的微生物生产黏康酸

<130> MC2013-01PCT

<150> US 61/632,777

<151> 2012-01-30

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 195
<212> DNA
<213> P15 启动子;

<400> 1
getattgaag acagctatgg ttcaactgtcc accaaacaaa actgtgtctca gtaccgccaa 60
tattttctccc ttgaggggta caaagaggtg tccctagaag agatecacgc tgtgtaaaaa 120
ttttacaaaa aggtattgac tticcctaca ggggtgtgtaa taatttaatt acaggcgggg 180
gcaaccccgcc ctggtt 195

<210> 2
<211> 164
<212> DNA
<213> P26 启动子;

<400> 2
gectacctag cttccaagaa agatattccta acagcacaaag agcggaaaga tgtttttgttc 60
tacatccaga acaaccfctg ctaaaattcc tgaaaaattt tgcaaaaagt tgitgacttt 120
atctacaagg tgtggtataa taattttaac aacagcagga cgct 164

<210> 3
<211> 91
<212> DNA
<213> PR 启动子;

<400> 3
acgttaaate tatcaccgca aggataaat atctaacacc gtgcgtgttg actattttac 60
ctctggcggt gataatggtt gcatgtacaa g 91

<210> 4
<211> 359
<212> PRT
<213> 由qa-4基因编码的3-脱氢莽草酸脱水酶;

<400> 4
Met Pro Ser Lys Leu Ala Ile Ser Ser Met Ser Leu Gly Arg Cys Phe
1 5 10 15
Ala Gly His Ser Leu Asp Ser Lys Leu Asp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly
20 25 30

[0002]

Tyr Leu Gly Ile Glu Leu Phe Tyr Glu Asp Leu Val Asp Val Ala Glu
 35 40 45
 His Leu Ser Asn Glu Arg Pro Ser Pro Glu Gly Pro Phe Val Glu Ala
 50 55 60
 Gln Ile Ala Ala Ala Arg His Ile Leu Gln Met Cys Gln Ala Arg Gly
 65 70 75 80
 Leu Glu Val Val Cys Leu Gln Pro Phe Met His Tyr Asp Gly Leu Asn
 85 90 95
 Asp Arg Ala Glu His Glu Arg Arg Leu Glu Lys Leu Ala Leu Trp Ile
 100 105 110
 Glu Leu Ala His Glu Leu His Thr Asp Ile Ile Gln Ile Pro Ala Asn
 115 120 125
 Phe Leu Pro Ala Asn Gln Val Ser Asp Asn Leu Asp Leu Ile Val Ser
 130 135 140
 Asp Leu Cys Lys Val Ala Asp Ile Gly Ala Gln Ala Leu Pro Pro Ile
 145 150 155 160
 Arg Phe Ala Tyr Glu Ser Leu Cys Trp Ser Thr Arg Val Asp Leu Trp
 165 170 175
 Glu Arg Cys Trp Asp Ile Val Gln Arg Val Asp Arg Pro Asn Phe Gly
 180 185 190
 Ile Cys Leu Asp Thr Phe Asn Ile Leu Gly Arg Ile Tyr Ala Asp Pro
 195 200 205
 Thr Ser Pro Ser Gly Arg Thr Pro Asn Ala Lys Glu Ala Val Arg Lys
 210 215 220
 Ser Ile Ala Asn Leu Val Ser Arg Val Asp Val Ser Lys Val Phe Tyr
 225 230 235 240
 Val Gln Val Val Asp Ala Glu Arg Leu Ser Lys Pro Leu Leu Pro Gly
 245 250 255
 His Pro Tyr Tyr Asn Pro Glu Gln Pro Ala Arg Met Ser Trp Ser Arg
 260 265 270
 Asn Cys Arg Leu Phe Tyr Gly Glu Thr Glu Tyr Gly Ala Tyr Leu Pro
 275 280 285
 Val Lys Glu Val Ala Arg Ala Leu Phe His Gly Ile Gly Phe Glu Gly
 290 295 300
 Trp Val Ser Leu Glu Leu Phe Asn Arg Arg Met Ser Glu Glu Gly Pro
 305 310 315 320
 Glu Val Pro Glu Glu Leu Ala Met Arg Gly Ala Ile Ser Trp Ala Lys
 325 330 335

[0003]

Leu Val Gln Asp Leu Arg Ile Pro Val Glu Gly Pro Leu Val Thr Met
340 345 350

Pro Arg Val Ser Ala Ser Leu
355

<210> 5
<211> 2160
<212> DNA
<213> 来自粗糙脉孢菌的qa-4基因加周围序列;

<400> 5
gaattcggga aatggaatct facctgggaa ccgaaatcac agtcogggta ggttatagag 60
catatagtga actgtcaaag ttctagacct ggaccagcca ctiggagtcg ttgttttagt 120
tatacciaca ttcaactcact gttagctttc aatcatactt acttagacgg agcaacgcgc 180
cagaatccaa attgttgcat agttgcggta tcaccaagtg gcttcccata atagtgtgcc 240
attcgatgag acagctiaact ggaagaccgg tactcgcagg ttgcaagatt acacggaagg 300
attcggatatt ccgtgtttca tcgtcacaag tccctttcca tatgaatccg aggtactatg 360
actggatctc gatacaagct ggccagcgag gtgcctgcct tgacaggctg tcaactgcgg 420
gacggccggc taagtgttta acaacgaagg gtggaagatg tctcgtcccg tcatccaaga 480
ccgtcaacat tcgaggccat ctgactgttg aagagatgct aaatcttgig aaacgctcat 540
aggctcgtta ccttcggccc acccgtaat gctttattcc gctgagcaaa cttcggttc 600
catcccgcgg ttcaaccgtt acatcactta tcgttgccgt tattggccga ttcttcgcaa 660
accgaaacga tgacatcccg aatactcgca atacaccgcc acggccggcg tcttatcac 720
acctctatg ggagacgaaa gtgcctigat acccctagtc attgaagat tcaggatggg 780
agacggctgg ccgcttgccg agttacgttc gactcttggt cgcaggaacg ctgcccgtat 840
tgaatgagac cccgagaagg fcaaatcaaa tcttggaaga ccccaactgc ttcctcattg 900
cttcaactcc ccataatcaat ggggcacatc ctgtgactac cttggtgctt tatttctca 960
ccatttggeg atacaagctc aaggacaccg aggtgatata cagtcttca aggacactat 1020
ctcaactcaa tatcaagaac cagtctcacc atctcttatt tctccaggat cccccacca 1080
acaacatcgg cttttttttt tcccctattc tcaagaccea tcaagaagct cacttcgctg 1140
agcctttcgc catgcccgtc aagctagcca ttagttccat gtccctaggg cgtgctttg 1200
ccggccaactc tctggacagc aagcttgatg ccgctcaacg atacggctat cttggtatcg 1260
agctttttta tgaggatctg gtcgacgttg cagagcattt gtcgaacgag cgtccctctc 1320
ccgaaggccc ttttgtegaa gctcagatag ccgccgctcg tcatattctc cagatgtgtc 1380
aagccagggg gcttgaggtc gtctgctcc agcctttcat gcactacgac ggccttaacg 1440
acagggcaga acatgagcgt cgtctggaga agctagcact atggattgag ctgctcatg 1500
agcttcacac cgacatcatt cagatcccag ccaacttctt cctgccaac caagtcagtg 1560
acaacctega cctgattgtc tcagatcttt gcaaggtggc cgatattgga gctcaagctt 1620
tgccccctat ccgctttgcc tacgagagtc ttgtctggag caccgctgtc gacctctggg 1680
agcgtgctg ggacatcgta caacgcgttg accgcccaca ctttggcatt tgccttgaca 1740
ccttcaacat cctcgccgc atctatgccg acctacatc tcctagcggg aggacacca 1800

[0004]

```

acgcaaaaga ggcagtcagg aagtcctcgc ecaacttggt ctgcgcgctg gatgtcteca      1860
aagtctttcta cgtccaggtg gttgacgcgc agaggtctgag caagccacta ctgcccggtc      1920
accctgatta caatccagag cagccggcga ggatgagctg gtcgcgcaat tgtagactgt      1980
tctacggcga aacagaatat ggtagctatc ttcccgtgaa ggaggttgct cgagcccttt      2040
tccacggcat tggtttcgag ggcctgggtc gtttgagctt ttccaaccgc agaatgtctg      2100
aggagggacc tgaagtgcgc gaggaacttg ccatgagagg cgtatctctg tgggcccaagt      2160

```

<210> 6
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> 由qutC基因编码的来自构巢曲霉的QutC;

<400> 6

Met Pro Ala Asn Leu Lys Ile Gly Ile Pro Thr Val Ser Leu Ser Lys
1 5 10 15

Pro Gly Leu His Ser Leu Asp His Lys Leu Arg Ser Ala Ala His Gly
20 25 30

Phe Ala Gly Ile Glu Leu Phe Ile Asp Asp Leu Ser His Phe Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Phe Asn Gly Ser Leu Thr Gln Ala Ala Lys Tyr Ile Ser Ser
50 55 60

Leu Ala Lys Gln Leu Asn Leu Thr Phe Ile Cys Leu Gln Pro Phe Gly
65 70 75 80

Phe Tyr Glu Gly Leu Val Asp Thr Asn Gln Ser Thr Tyr Leu Leu Thr
85 90 95

Glu Lys Leu Pro Leu Trp Phe Ala Ile Ala Arg Ile Ile Gly Thr Asp
100 105 110

Leu Ile Gln Ile Pro Ala Asn Phe Leu Gln Asn Asp Pro Val Thr Gly
115 120 125

Ala Ala Arg Thr Ser Gly Asp Ile Arg Leu Ile Val Ser Asp Leu Gln
130 135 140

Thr Ile Ala Asp Ile Gly Val Lys Gln Gly Phe Arg Phe Val Tyr Glu
145 150 155 160

Ala Leu Cys Trp Ser Thr His Val Asp Thr Trp Glu Ala Ala Trp Asn
165 170 175

Val Val Lys Leu Val Asp Arg Glu Asn Phe Gly Ile Cys Leu Asp Ser
180 185 190

Phe Asn Thr Arg Thr Pro Leu Pro Ser Leu Gly Arg Arg Arg Met Leu
195 200 205

Ser Lys Pro Trp Pro Ser Pro Trp Arg Arg Ser Val Leu Ser Ser Pro
210 215 220

[0005]

Val Glu Asn Trp Thr Ser Gly Lys Ser Ser Thr Ser Ser Leu Ser Met
225 230 235 240

Ala Ser Gly Cys Arg Arg Arg Trp Thr Arg Ser Thr Pro Phe Met Trp
245 250 255

Arg Ala Asn Pro Arg Arg Met Ser Trp Ser Arg Asn Ala Arg Leu Phe
260 265 270

Pro Cys Glu Glu Glu Arg Gly Gly Tyr Leu Pro Val Leu Glu Ile Ala
275 280 285

Arg Ala Phe Phe Glu Ile Gly Phe Glu Gly Trp Val Ser Leu Glu Leu
290 295 300

Phe Ser Arg Thr Cys Asn Asp Pro Asp Val Asn Thr Val Gly Glu His
305 310 315 320

Ala Arg Arg Gly Met Asp Arg Arg Arg Arg Val Val Ala Ala Leu Gly
325 330 335

Leu Asp Val Glu Val Pro Ala Arg Asn Cys Glu Cys
340 345

<210> 7
 <211> 3298
 <212> DNA
 <213> 来自构巢曲霉的qutC基因的加周围序列;

<400> 7
 aagcttggtt tcaagtgatg atatatagtt atgaggatat aafatgaacc gaaagacgat 60
 gtttcttggtg aafatattacg tgatagtgtg ctgtcttaata tggtagacga gtagaacaac 120
 tacatacggg cactacttac agccctagtc attccctccc tegttagcct accatttata 180
 cactttgaac atccacagge ttgcctccct ccatactctc cetaacagct tgaacaactc 240
 tgagcgccct caccocatot tcaacgccac agccaactcc tegtctgcca tctcaccct 300
 ttccaactaac aacatcaaca aaatateccc actgcgcac aaacggcctc acatcagcat 360
 ccttcaactga aatctgctgc atcgccaact ccgtattcca gcctttctct ttccctgtc 420
 cacaagaaac atggcatag ctccagcgcg tcatatcagg cacactgaga ctgcctctgg 480
 ttccaagaat tggataacag tegttagcac tcttgaagg agcggcgga atcgtaggat 540
 tctgcgccgt tctgtttca aagttaacg gcgaaggcgt cgcgtgcag atgagaaatg 600
 tgcctactat ccagacga aagegcagcg tcacagcaca gccttcteg gcggtatgtt 660
 ccgggttctg gcgcatgcg tgcaggagtg taccctccg gtagacccta ctgacgggac 720
 caaacagaaa ctgcagcacg tcgatatcgt ggataagatt aatccccagc acgcgcct 780
 tcttttatac tgcgcgcaa gaaccgagcg gcggcgcaa gtaagaggcc ggcttcagaa 840
 gtgtccagag gccgttact gcaacgacgg tgcgagtga gtcgtctct aacaaagact 900
 ttgtggtttg gatgtacgga ttgaagcgcc ggtgtggcc gatctggatg ttgatcttcg 960
 catctttgcc tctcttctca tctttacatt tctgttctt gacggtagcg aggaggtgct 1020
 cggecgactc cagatcgta ctgacgggtt tctcaaggag gatattgcgg attccgttct 1080

[0006]

ccagcagctg gaggctgacg tccacgtgcg tgtgattggg cgtgctcacg atcgccgcgt	1140
ctggtttccc ggttgcttta ccgacaacgt ctaacataga cgtaatagaa tcatagcaag	1200
gaacgccaaa tgattctgcg accgggattg cagagggta agggtaaca aaagcgatca	1260
gctgggttcg tgggtgtcgt tgcacggatt gtgcgtgacg gggcccaata agtcgggcac	1320
cgacgatgac aatgaggata ttcttgctct ttcccttgcg gcagggcacc attgtgcatg	1380
tcggtggctg gaaataaaca gaacagggat atggtcaagt cggagaatcg gtgcaggata	1440
gaccggctac ttgatgtagg acgacagtcg cgatctaccg agagcgtgag attcactgtg	1500
ggactgatit atgtaatttg aggcgcagca gacttaggga cttgaaatgt ggctgtctgt	1560
ggatgcattt gcggggtaig gagtacagag tgcatacagc tgtgtatag gagttcctta	1620
cggagagggt gacciggtat ggggagaacg ggcaaaatgc tcacccggca acctctcaaa	1680
gcgtttaccc ggtatactcc tcigatatca atatttccaa tcagcaccta tatcateacg	1740
acgtctectt gaggattccg tagctaaccg ccttgatcc tacattaata aataagccat	1800
ttgcttttct tgcctgcagt gtgattctca atacgattac gtatcacatg cagattgcct	1860
ttacttcage tgcatttgat cagccacagc tctaagagca aacataccct acctacctac	1920
ctacttcgce tagggtacat aatcacgcgc atctctctct cgatcagttt tcaactcaat	1980
cagctcattc attctattct taatataata tataccttta gatctccagc agagaccgca	2040
agagtcggca attcaaaatg cccgcaaacc tcaaaatcgg tatcccaacc gtgtccctgt	2100
caaaaccggg cctgcactct ctigaccata agctccgctc ggccgctcat ggcttcgagg	2160
ggatcgagct gtttattgat gacctctccc atttcgctc atcgtcatte aatggctccc	2220
tcactcaagc ggcaaagtat atctctctgc tcgccaagca acttaacctc acatttatct	2280
gcctgcaacc attcggtttc tacgagggtc tgggtggcac aaatcagtcg acgtacctgc	2340
tcactgagaa actcccgcgc tggtttgcga tcgcccgcct tataggcaca gatctcatcc	2400
aaatccccgc aaatttctc cagaatgacc ctgtcacccg ggctgcacga acaagcggcg	2460
acataagget tatcgtctca gactcgcaga cgatcgcaga tatcggtgta aagcagggtc	2520
tccgctttgt gtacgaggcg ctctgctggt cgacgcattg cgatacatgg gaagcagcgt	2580
ggaatgtcgt caagctggtt gatagagaga atttcgggat ctgcctggat agcttcaaca	2640
cgcggacccc gcttcctgca ctgggaagac gccggatgct gageaagccg tggccaagtc	2700
catggagacg ctccgttctc tcgtctccag tggagaactg gacatcagga aaatcttcta	2760
catccagctt gtcgatggcg agcgtttgtc ggcgcgcctg gacgagaagc acctcttca	2820
tgtggagggc caacccccga agaattgagct ggagtcgcaa tgcgcggtta ttccctgtg	2880
aagaggagag ggggtgggtat ctctctgtgt tggagatcgc gagggcgttc ttgaaatcg	2940
ggttcgaggg gtgggtgagt ctagagctgt ttcaaggac gtgtaatgat cccgatgtga	3000
acacgggtgg ggagcatgcg agacgtggga tggatagaag gaggagggtt gttgcggcgc	3060
taggactcga tgttgaggtg ccagcacgta actgtgaatg ttagcatgaa cggcaaggag	3120
agggtggagg tgcaggtgca ggaggagctg gctgttcagc atcggctgta ggtagtggtg	3180
tcttgaaagg acgatagggt ttgatctaga gatttttatt ttgtctaatt actggtaatg	3240
atggcctcat gcacgctgtt gaacacgctg tacaacatca ctgttgaaga tgatacct	3298

[0007]

<210> 8
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> 来自肺炎克雷伯杆菌 ATCC25597的AroY;
 <400> 8
 Met Thr Ala Pro Ile Gln Asp Leu Arg Asp Ala Ile Ala Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 Gln His Asp Asn Gln Tyr Leu Glu Thr Asp His Pro Val Asp Pro Asn
 20 25 30
 Ala Glu Leu Ala Gly Val Tyr Arg His Ile Gly Ala Gly Gly Thr Val
 35 40 45
 Lys Arg Pro Thr Arg Ile Gly Pro Ala Met Met Phe Asn Asn Ile Lys
 50 55 60
 Gly Tyr Pro His Ser Arg Ile Leu Val Gly Met His Ala Ser Arg Gln
 65 70 75 80
 Arg Ala Ala Leu Leu Leu Gly Cys Glu Ala Ser Gln Leu Ala Leu Glu
 85 90 95
 Val Gly Lys Ala Val Lys Lys Pro Val Ala Pro Val Val Val Pro Ala
 100 105 110
 Ser Ser Ala Pro Cys Gln Glu Gln Ile Phe Leu Ala Asp Asp Pro Asp
 115 120 125
 Phe Asp Leu Arg Thr Leu Leu Pro Ala His Thr Asn Thr Pro Ile Asp
 130 135 140
 Ala Gly Pro Phe Phe Cys Leu Gly Leu Ala Leu Ala Ser Asp Pro Val
 145 150 155 160
 Asp Ala Ser Leu Thr Asp Val Thr Ile His Arg Leu Cys Val Gln Gly
 165 170 175
 Arg Asp Glu Leu Ser Met Phe Leu Ala Ala Gly Arg His Ile Glu Val
 180 185 190
 Phe Arg Gln Lys Ala Glu Ala Ala Gly Lys Pro Leu Pro Ile Thr Ile
 195 200 205
 Asn Met Gly Leu Asp Pro Ala Ile Tyr Ile Gly Ala Cys Phe Glu Ala
 210 215 220
 Pro Thr Thr Pro Phe Gly Tyr Asn Glu Leu Gly Val Ala Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 Arg Gln Arg Pro Val Glu Leu Val Gln Gly Val Ser Val Pro Glu Lys
 245 250 255
 Ala Ile Ala Arg Ala Glu Ile Val Ile Glu Gly Glu Leu Leu Pro Gly
 260 265 270

[0008]

Val Arg Val Arg Glu Asp Gln His Thr Asn Ser Gly His Ala Met Pro
 275 280 285

Glu Phe Pro Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Asn Pro Ser Leu Pro Val Ile
 290 295 300

Lys Val Lys Ala Val Thr Met Arg Asn Asn Ala Ile Leu Gln Thr Leu
 305 310 315 320

Val Gly Pro Gly Glu Glu His Thr Thr Leu Ala Gly Leu Pro Thr Glu
 325 330 335

Ala Ser Ile Trp Asn Ala Val Glu Ala Ala Ile Pro Gly Phe Leu Gln
 340 345 350

Asn Val Tyr Ala His Thr Ala Gly Gly Gly Lys Phe Leu Gly Ile Leu
 355 360 365

Gln Val Lys Lys Arg Gln Pro Ala Asp Glu Gly Arg Gln Gly Gln Ala
 370 375 380

Ala Leu Leu Ala Leu Ala Thr Tyr Ser Glu Leu Lys Asn Ile Ile Leu
 385 390 395 400

Val Asp Glu Asp Val Asp Ile Phe Asp Ser Asp Asp Ile Leu Trp Ala
 405 410 415

Met Thr Thr Arg Met Gln Gly Asp Val Ser Ile Thr Thr Ile Pro Gly
 420 425 430

Ile Arg Gly His Gln Leu Asp Pro Ser Gln Thr Pro Glu Tyr Ser Pro
 435 440 445

Ser Ile Arg Gly Asn Gly Ile Ser Cys Lys Thr Ile Phe Asp Cys Thr
 450 455 460

Val Pro Trp Ala Leu Lys Ser His Phe Glu Arg Ala Pro Phe Ala Asp
 465 470 475 480

Val Asp Pro Arg Pro Phe Ala Pro Glu Tyr Phe Ala Arg Leu Glu Lys
 485 490 495

Asn Glu Gly Ser Ala Lys
 500

<210> 9

<211> 5502

<212> DNA

<213> 肺炎克雷伯杆菌342的aroY基因加两千碱基的周围DNA序列;

<400> 9

```

gcgacgccga ctggcgatc cgtgaactgc tggcgcgat gaccacgct ctgcagggt      60
gtgaaacct agaggatgtg attaaggtg cggagctgtt cgcgccgaac atcgccccga      120
cgatccccgg taaactgtat attctggata ccatccatg gcagatgcgc tgcgtggcgc      180
agtggctgtc gcccgccggg gagacgacgt cctttgcicc cgacgactgc tgggcgatac      240
ggcggggact cagccatccg ccggtgcagg gtgagccga taccacatgc taccatctgc      300

```

[0009]

cggaggcgca cgccggccag tcgctctgcg taccgctcat cgcccagggc gaagcgatcg	360
gtctgctgag ctttcagaac gtcaccgcca gtgacgcccc ttcccgggct tacctggagc	420
tgaatggcga agcgctgggg ctggcgctcg ccaatcagcg tttaacgcagc gccctgctgg	480
aaaaagcggt gttcgattcg ctgaccgggc tgcgtaaccg ccacatcttt gatgaagcgc	540
tgcactcgca gatggcgctg gcgggccata cccacacccc gctgagctgc ctgatgatcg	600
acatcgatca cttcaagcc atcaatgacc gctacggcca tgaagccggg gatctggtag	660
ttaagagcgt cgcgaccatt gtgcagcgcg cgggtgcgca tateggeatg gctttccgct	720
acggcgcgca ggagttttta gtgctgctcc ccgggattga cgaagccggg gcgcaccagt	780
gcgccagcga gatctacacc cagggtcaca atatgacgct gcgctgatggc ctgacggaga	840
taggccaggt ggatgtgtcg attggcatcg ccagctaccc gcagcacacc caaagcgaca	900
gcctgctgcg cgcagcggac gccgcgctgt accggcgcaa agagctgggc cgttcaagga	960
ttgtcagctt tggccgcctg aagaaccgct aagcgggatt attgctcagc ggcattaagc	1020
agcgagataa ctttccgcac caccgccgaa cggaaatggc ggtggtaaac catgctcagc	1080
teactctccg ccagccgac ctgaagatcg atatacacea cgttatcaag gcgtaaggcc	1140
ctcgccgaga ccggcaccag cgccaccccc accccggggg agaccagget aatcagcgag	1200
gtgacatcgt taattcgtg caccacctgc ggcgtaaaac ccgcgacgcg acaggcgta	1260
ataaatacct gctccagtc ggtgccctgc ggatcgtcaa gcgagatcca gttgtcagtg	1320
cgcaacgagg ccagattgag cgccccacg cctgccagcg gatgctgttg ataaagcgcc	1380
aggcaaaagt tttccgcac aaatggcctg accaccagcg cgtccggcgg tgacgccagc	1440
ggcgcgcgga tgatggcgat atccagacgc agatccagca gccttcgta gagcatttgc	1500
acatccccc ctgaccagcga cagctcaatc ccggccagct cagcgcgcag ctgcgcagg	1560
agccccggca gtttgcctgc atacatcgca ctggagacat agccagatg caatcgcccc	1620
tgtcgccctc gtgcggtgcg ctggcgctcc aggaccgct gatcggccat ctccagcgcc	1680
agcccgctct tctgcaagaa ggccctgccc gcggcggtga gggtcaggcg ccggttagcg	1740
cgggagaaga gcaccacgcc caggcgctgc tcgagttgtt taatctgctg gctgaggcg	1800
ggctggcgca tatgtaaccg ctctgccgcc cgatgcataa gtagttcttc agcaacgacc	1860
acaaaatggc gtaacgctcg caaggacatg gccggactcc gggagtaaa ttagataataa	1920
aaatgttata aataaagcat gaatgatgca attgataacc attagcctgc gacatactg	1980
tgcgcatcga cagcctaagg agaacatcat gaccgcaccg attcaggatc tgcgcgacgc	2040
tategcgctg ctgcaacagc atgacaatca gtacctcgaa accgacatc cggttgaccc	2100
taacgctgag ctggccggcg tctatcgcca catcggcgcg ggccgcaccg tgaagcgccc	2160
cacgcgcacg gccccggcga tgatgtttaa caatattaag ggctatccgc actcgcgcat	2220
tctggtgggc atgcacgcca gccgccagcg ggccgcgctg ctgctgggct gcgaagcctc	2280
acagctggcg ctggaggtag gcaaagcggt gaaaaaacg gtcgcgcggg tggctcgttc	2340
ggccagcagc gcccctgtc aggaacaggt ctttctggcc gacgatccgg attttgattt	2400
gcgcacctg ctcccggcgc ccaccaacac cccgatcgac gccggtccct tcttctgct	2460
ggcgctggcg ctggccagcg atcccagcga cgcctcgctc accgacgtca ccatecacgc	2520

[0010]

cttgtgcgtc cagggccggg atgagctgtc gatgtttctc gccgtggcc gccatatcga	2580
agtgtttcgt cagaaagccg aggcccttg caaaccgtg ccgataacca tcaatatggg	2640
actegatccg gctatctata tcggcgctg ctttgaagcg ccgaccacac gtttggctat	2700
aacgaactgg gcgtcgccg tgcgttggc cagcgtccg tagagctggt acagggcgte	2760
agcgtcccg agaaagccat cgtctcgcc gagatcgita tcgaaggga actgctgccg	2820
ggggtacgcg tcagagaaga tcagcacaca acagcgcca tcgatgccg gaatttctg	2880
gttactgcgg cggcgccaat ccgtcgctgc cggtcattaa agtcaaagcg gtgacctgc	2940
gaaacaatgc gattctgcag acgctggtag gccggggcga agagcatacc accctcgccg	3000
gattgccaac ggaagccagt atctggaatg ctgtcgagcg tcctatcccg gccittttac	3060
aaaatgtcfa cggccacacc gccggcgccg gtaaatccct cgggactctg caggtgaaaa	3120
aacgccagcc cggcgacgaa gggcgtcagg gccagggcg gttgctggcg ctggcgacct	3180
attccgagct gaaaaatate attctggtcg atgaagatgt cgatacttti gacagcgacg	3240
atatcctgtg ggccatgacc acccgcatgc agggggatgt cagcatcacg acgatcccag	3300
gcattcgtgg tcaccagctg gatccitccc agaccccgcc ctacagccc tcgatcccg	3360
gagagggtat cagttgcaag acgattttcg attgcacggt gccgtggcg ctaaaatcac	3420
acttcgagcg cgcaccgttt gccgatgtcg atccgcgtcc gtttgcgcg gattattttg	3480
cccggcttga aaaaaaccac ggtcagtaaa atcaggtgat agccgccgga gcacggcggc	3540
atcttccggg ccagcatcac ctgcagcggg tggtgacgc agggttagtt gatcgcgcg	3600
gagaggtctt ttttcacctg ctacacgtgc tcgggggtca caacctggct cagtcgaag	3660
tagtatttca cagataata ccgcacctgc tggtcagct gcccaaggc ggccagctgc	3720
tgtttgaact tagcgicafc ccatttccg gattgaataa cgtctgccag ggcacatcc	3780
tgatagccgc tgatttaate tggcttacat tgttttcgaa tccttgacgc agcgcttga	3840
ttttggcgac ctgctcttca ctcagcttca ggtgtggac gaccggatcc tcgagacag	3900
acggtatate gccggaggtc gacgcctggc tggttccgt aaagcagggt gtcagcgcaa	3960
tggcgagcag ggtgttacgc aagcgagtat tcacagtga tgatccttca aaaaagaaaa	4020
tgagaggcga ttatcactgc gctaataaag actatctgta acaaagggtt aatttaaac	4080
tggataaaaa aaggatggta agaaacagaa atcagatccc gggtcagcag cacagaaga	4140
tatatcacc ctctcagtaa cggccctgtc caatgatate ccggcgcgcg ctgattaact	4200
gtttttgctt ttggtttcaa tcccccaac gatcacatgg ctggtcaggg tatgaataga	4260
ttgcaacagc ccgggaaaag cggggcgtt ttctttatcc cagaagtaat ctttatecac	4320
tttgacgcaa tcgaagcgga agcgtccag cagcgggaag gacgtcgcc gcggccaaaa	4380
tcattccagc agaccgggca aagcgccgc agcgtgttca gcccgctcag ctacgtccg	4440
gcgataaact cgtgaaagtt ctcatittat tccagagcaa tgtgtttaca ggagcgcagg	4500
aaatcacaga gatagcgat cgtcagaata aagtggctta ataatcacc aatattcagc	4560
gatatcggtt tattatcgac ccggcgaaaa tcaaatacag aaagtaacte gatttgccga	4620
ataaafagag caagcttate gcgttcggt agcgtggaga aagaaaaagt cgacgcagag	4680
gtggtatitt gtgcgggtgc tataatatct ttagtaagca actcccacga gtggtagctg	4740
ccgtcatcgc taatagcggg ctccagaacg aagcgataag aggtattttt cagcttttct	4800

[0011]

```

tcaaccattt aaaaaatacc aaaaataaga aagggttaag catgtcatat attttccgcc 4860
aacaanaata gtttaagtg atcgataata atcattcgat agttaanaac tatcaagata 4920
taatttatfg atcggtaaat tgaatttaata taaatttagcc actgccgtaa ctccctctga 4980
aaagteaatt aaaaatttgt ttcaaacag ccagttacca gagtattctg cgtaaagcct 5040
ggctgtctca cgttttgtgc tgcaggtaa aaaaagagag gggtaataaa aatgaaaaat 5100
acaagccgcc agttttagtc atatcattat gccgaatag aataacgtg cgtgaggcg 5160
ccgttcgcc ttgcatgcc tgcgtctca aaaaaaagt gtgactcagt cgacaaaacg 5220
tcatattttt ccgtatcct gcagcaaga agagtgaagt ggatgacagg cagtgaanaa 5280
aataaacgtg attccgtgg gctgatget attcatgctc atgccagcg catggctggg 5340
ccctgcgcc cggcacaccg gcagcatgca gtgcgtttgg ttgacgggg caatggtgag 5400
ctgctgcgc aagcaacgac tggcggaagg ctgccgcac catttactgg tcagacgata 5460
aacggtaact cgcgggtgg tgtgaacag attatcgtg gc 5502

```

<210> 10

<211> 4629

<212> DNA

<213> 来自贝氏不动杆菌ADPI的catA基因的DNA序列，包括410碱基的上游序列和两个下游开放阅读框；

<400> 10

```

atctgctega ccatagtaat gatcacatta tgagctaaat ttacttttta aaatttaaat 60
atattatata tatitgaatt ttattgtttt attttaattt ttagcttaga agtttttatt 120
aagattttatt tttaaatag atgtgaaaa aattagtata caaaaaagc atgaaaacat 180
actctcttag gaattggagt cccatgagt ttcagataca gttgatcagt atggaaggta 240
tagaaacgac tategaata aataagtttg tgggtgtgta agcaaggtaa agctcaaggc 300
tgaggcaaac caagcaagg ttaattgaac cgatatgcac aacacattca acgatagcgt 360
cgacagataa gtttatcaaa tgatgttttg gcgatttcaa ggagaaaacc atggaagtta 420
aaalatlcaa tactcaggat gtgcaagatt tttaactgtg tgcaggcgga cttagcaag 480
aagggtggca tccgcgtgta aagcagatca tccatcgtgt gctttcagat ttatataaag 540
ccattgaaga ttgaatato acttcagatg aatactgggc aggtgtggca tatttaaatc 600
agctagggtc caatcaagaa gctggtttac tctgccagg cttgggtttt gaccattacc 660
tcgatatgag tatggatgcc gaagatgcc cactaggtat tgaaaatgcg acaccaagta 720
ccattgaagg ccgctatac gtggcagggt cgcctgaate ggtaggttat gcgcgatgg 780
atgacggaag tgatccaaat ggtcataccc tgattctaca tggaacgate ttgatgcag 840
atggaanaac ttacccaat gccaaagtig aaatctggca tgccaatacc aaaggctttt 900
attcacactt cgacccaaca ggcgagcagc aggcgttcaa tatgcgcgt agtattatta 960
ccgatgaaaa cggtcagtat cgcgttcgta ccattttgcc tgcgggttat ggttgeccac 1020
cagaagggtc aacgcaacag ttgtgaaic agttgggccc tcatggtaac cgcctgcgc 1080
acattcaeta tttgtttct gccgatggac accgaaact aactacgcaa attaatgtgg 1140
ctggcgatcc gtacacctat gaagactttg cttatgcaac ccgtgaagcg ttgtgtgtg 1200
atgcagtgga acacacgat cctgaagcca ttaaggccaa tgatgttgaa ggeccattcg 1260
ctgaaatggt ttctgatcta aaattgacgc gtttgggtga tgggttagat aaccaagttg 1320

```

[0012]

ttgatcgtec acgtctagcg gtgtaataca ccaaaatggt tcaaaattat caggcgagtg	1380
atcatgatca ctggcctgtt ttattttcag ggaagggtgg agacaattac gtggacaatc	1440
aaatcattca ggaaacccga gataaaattt taagcgtatt gccgaatcag gctgggcaat	1500
tggcacgett ggctcgtctg atgcagtttg cttgtgacce caccattacc gtcattggta	1560
aatataatca tggtaaaagc cgactactca atgagctgat cgggacagat atttttcttg	1620
ttgccgataa acgagagacg attcaactgg ccgaacataa acaagatcag gtgcgttggt	1680
tggatgcacc cggactcgat gcagatgttg cggcagtgga tgatcgteat gcttttgaag	1740
cagtcctggac acaggcagat attcgccctt ttgtgcattc agtcgagaa ggccaactcg	1800
atgcaactga gcatcatctt ttacaacaac ttattgaaga tgcagaccat agecggcgcc	1860
aaaccatact ggtcttgacc cagatagatc agataccgga tcagacaatt ttaaccaga	1920
ttaaaacctc aattgcacag caggiaacca aactcgatat ttggcgtgtt tcggccactc	1980
gccaccgtca gggatttgaa aatggaaaaa ccttctgat cgaaaaaagt ggaatcggcg	2040
cgttacgaca tacacttgag caggcacttg ctcaggcttc atctgcacga acgtatgaaa	2100
agaatagatt gctgtctgac ttgcatcctc aacttaagca gttattactc gatcaaaaac	2160
atgtacttca gcaactacaa cagacacagc agcagcaatt gcatgacttt gatacaggac	2220
tcataacatc actcgataag aticgagtag atcttgagcc cattgtaaat atagatggtc	2280
aagaccaagc actcaatcca gattcatttg ccacgatgtt taaaaataca gcagccaagc	2340
agcaacgtgc caaagtgcag attgcttact cactgccttg tatcgagatc aatagccatc	2400
tcatacgtca cgggtgtgtg gggtttaccg cagagcaaca aaccacgata aaaagtattg	2460
atacggteat tgttgcgtt ttgtgaattt cagtgaattt tcgogateag ctacgtgcat	2520
tgttttatac cgataccgaa cgacaacgct tgcgaagaga gtttcgattt tattttgaaa	2580
agtcagcagg ccgaatgatt itagctgcca agattgagca gacaatgcgg cagcaagggt	2640
gtattcaaaa tgcaatgatg gcgttgcaac agatggagag tgcagcatga ccagcggcgg	2700
acacattcaa tigtattatc aacacacccg gcagattgag actgcccaag gggatataca	2760
gttggcattg caatcgatgc agcaatggcg cgaagcattt gctacagcat taaaacaaaa	2820
tacctttgat ttaacgggct ggtcaccgca gacaaagatc gccaatcaac tcaagcaatt	2880
taaccataag cttacaacgc atgtatcgaa ttgggatacc gaatggcata cttttagtg	2940
tgtcfaatcg gttgcagaag tatttcatac tcgggtgatg ttgcttgat tcggtaagtt	3000
taatgcgga aagagttcat tgtgtaacct actggccgaa tgccttcgtt ctacgaaca	3060
aaccgtgcaa tattttcatg ttcaaaaatg acagatatct tataccgaat ctcaacttae	3120
cgaagggtga accgagacga cagcgcaact acaggcgcta tgcctgggtg aaaaacttat	3180
tttgctagat acaccaggtt tgcattcttg tactcagaaa aatgcagcgc tcacacaaaa	3240
atttatcgac agtgacgatg gtgtgctgtg gctcagtagc gcaacttcac cgggtcaggt	3300
gcaagagcta gatgcactgg ggccgcagtt aaagcgtcat aaacctttat ttcctgttat	3360
taccgaagc gattttgtcg aagaagatga aattgatggt gagctatgta cagtgtttg	3420
caataaaaat tcagaacaac gtgcgttgca agagtctgat gtattgatgc gtgcgaaaga	3480
aaaactgcac atatgcaagt ggatgtgagt ttattaaagc cggccgtgtc cgtttcaact	3540

[0013]

```

caaatggcgc gtgaagcaga taigaaccca caagccatga acgaggtcgg ttttgagcga      3600
ttatttgcag cacitttggc tcttattgag cctgctttgc gctataagca gcgtaaacct      3660
gccgaagtat tgttgcatit ttgcaagaa catatcattg aaggtttaag gttttacctg      3720
caacccgatc tagagcaaat acaacaggac ctcaaacagg ctcaagaiga tttacgacag      3780
ctacacaccg atttagccga ggcagtctgg cgtagegtat tgcctgagct accacaaett      3840
cttgagcaac atgcaagtac acaaaatatt gatgccgtag tgaacagttt gaacgagtgg      3900
ataaacgtcg cattgaaca acagcttgca attcagcttg atgcttaagg tttaaatttg      3960
gattcgctta gcaagatega aaaaaccgaa aaaatgcagt atgaacgcat tgcgggaatg      4020
gtgggtcatg atggcttgfa caccacitc acgcagcaga ttcaacaagc tgicaaagct      4080
tctacgagtg aattgattga tcagtgtcag gctcaacttg agcagtcaat caaacatgtt      4140
caaacactcg atgaaacett catcgattac agcgcagcac tcgatcaact cagccaagcg      4200
ctacgcattg aataaagagc agtaaatitt tcagacatat tttattcgat gattggcctg      4260
atatgggtgc ttgcaaacac ctctgtaca caggcgagaa ttttaggaat gtaattactg      4320
tggtccatat ttgcaccgc gagtgaattt gggctatagg catcatcacc taaaattgga      4380
atataaagta gattcttcac cccaatatcc atggcagacg ccggtacgat gcagacgect      4440
tcacctgctg ccaccaagcc gattgccagt tgaatttctc gaatttcggt gattttggat      4500
ggtactaggc ctagttcggt aaagagigac tgaataaagg tcgcaaaatt gggcttttga      4560
gagactgggt acagcagcat cggttcatca ataatttgag agagatgaac cctgttgtct      4620
gcaaacctga                                     4629

```

<210> 11

<211> 311

<212> PRT

<213> 来自贝氏不动杆菌ADP1的CatA;

<400> 11

```

Met Glu Val Lys Ile Phe Asn Thr Gln Asp Val Gln Asp Phe Leu Arg
1           5           10           15

```

```

Val Ala Ser Gly Leu Glu Gln Glu Gly Gly Asn Pro Arg Val Lys Gln
20           25           30

```

```

Ile Ile His Arg Val Leu Ser Asp Leu Tyr Lys Ala Ile Glu Asp Leu
35           40           45

```

```

Asn Ile Thr Ser Asp Glu Tyr Trp Ala Gly Val Ala Tyr Leu Asn Gln
50           55           60

```

```

Leu Gly Ala Asn Gln Glu Ala Gly Leu Leu Ser Pro Gly Leu Gly Phe
65           70           75           80

```

```

Asp His Tyr Leu Asp Met Arg Met Asp Ala Glu Asp Ala Ala Leu Gly
85           90           95

```

```

Ile Glu Asn Ala Thr Pro Arg Thr Ile Glu Gly Pro Leu Tyr Val Ala
100          105          110

```

```

Gly Ala Pro Glu Ser Val Gly Tyr Ala Arg Met Asp Asp Gly Ser Asp

```

[0014]

115	120	125
Pro Asn Gly His Thr Leu Ile Leu His Gly Thr Ile Phe Asp Ala Asp 130	135	140
Gly Lys Pro Leu Pro Asn Ala Lys Val Glu Ile Trp His Ala Asn Thr 145	150	155 160
Lys Gly Phe Tyr Ser His Phe Asp Pro Thr Gly Glu Gln Gln Ala Phe 165	170	175
Asn Met Arg Arg Ser Ile Ile Thr Asp Glu Asn Gly Gln Tyr Arg Val 180	185	190
Arg Thr Ile Leu Pro Ala Gly Tyr Gly Cys Pro Pro Glu Gly Pro Thr 195	200	205
Gln Gln Leu Leu Asn Gln Leu Gly Arg His Gly Asn Arg Pro Ala His 210	215	220
Ile His Tyr Phe Val Ser Ala Asp Gly His Arg Lys Leu Thr Thr Gln 225	230	235 240
Ile Asn Val Ala Gly Asp Pro Tyr Thr Tyr Asp Asp Phe Ala Tyr Ala 245	250	255
Thr Arg Glu Gly Leu Val Val Asp Ala Val Glu His Thr Asp Pro Glu 260	265	270
Ala Ile Lys Ala Asn Asp Val Glu Gly Pro Phe Ala Glu Met Val Phe 275	280	285
Asp Leu Lys Leu Thr Arg Leu Val Asp Gly Val Asp Asn Gln Val Val 290	295	300
Asp Arg Pro Arg Leu Ala Val 305	310	
<210> 12		
<211> 1461		
<212> DNA		
<213> 来自不动杆菌属物种ADP1的quiC;		
<400> 12		
atgaaattaa cttctttacg cgtatcttta ttggegetgg gcttggtaac atcaggtttt	60	
gctgeggcag aaacttatac tgtagatcgt tatcaggatg atagtgaana aggetctttg	120	
cgttgggcaa ttgaacaatc taatgcaaat agcgacaaag agaatacagat tctgattcag	180	
gctgttggtg aggcacctta tgtgatcaag gtggataaac cgttaccacc gattaaatca	240	
tctgtaaaaa ttattggtac agaatgggat aaaacgggag aatttattgc gattgatggt	300	
tcaactata tcaaggcgga aggcgaanaa gcatgtccag gtgcaaatcc aggacaatat	360	
ggtaccaatg ttctgaccat gactttacca ggtttggttc tacaagatgt caatgggtgtg	420	
accctgaag gtcttgatgt tcatcgcttc tgtattggtg tactggtaaa tcgttcaagc	480	
aataatttga ttacgcataa ccgtatttca aataattacg gtggcgetgg tgcacatgac	540	

[0015]

```

aegggtgatg atggtaaagg taaccaaacg tetaccacca ccaataacaa caaagtattg      600
gataatgtgt ttattgacaa tggcgatggt ctfgaactga cgcgtggagc agcattcaac      660
ctgattgcta acaatctgtt tacatcgacc aaagccaate cagagcgcgc tcaaggcatt      720
gaaatfcttt gggggaatga caatgcagtg gtgggtaaca aatttgaana ctattcagat      780
ggtctacaaa tcaactgggg taaacgtaat tacatcgctt ataacgaatt gaccaataac      840
tctttgggtt tcaatcttac aggtgatgga aacatcttcg atagtaacaa agtgcattgc      900
aatcgfattg gtatcgcaat tcgttctgaa aaagatgcaa atgcacgtat cacacttacc      960
aaaaatcaga tttgggataa tggtaaagat atcaaacgct gtgaggctgg tggttcatgt     1020
gttccaaacc aacgttttag tgcaattgta ttgggtgttc ctgcgcctga gcatgaaggt     1080
ttttagtgct ctctgtgtgg cgggttagtc atfgaacctg caaaattaca aaaaacatgt     1140
acacagccaa atcaacaaaa ctgtaatgcc attccgaacc aagggtattca ggcacctaaa     1200
ctgactgtca gtaaaaaaca acttacagtt gaagttaaag gaacacacaa ccagcgttac     1260
aacgtagaat tttttgaaa tctaatgca tcttcttccg aagctgagca atatttaggt     1320
tcaattgttg tagtgacaga tcatcaaggt ctgcaaaag caaactgggc accaaaagtc     1380
agcatgccat ctgttactgc gaatgtaact gatcattgg gcgccacitc agagttaagt     1440
tctgcagtga aaatgagata a                                     1461

```

<210> 13

<211> 1461

<212> DNA

<213> 来自不动杆菌属物种ADP1的经密码子优化的quiC基因;

<400> 13

```

atgaaactga ccagcctgcg tgttagcctg ctggcactgg gtctggttac cagcggtttt      60
gcagcagcag aaacctatac cgttgatcgt tatcaggatg atagcgaaaa aggtagcctg     120
cgttgggcaa tfgaacagag caatgcaaat agcgcacaag aaaaccagat tctgattcag     180
gcagttggta aagcaccgta tgttatcaaa gttgataaac cgtgcctcc gattaaaagc     240
agcgttaaaa tcattggcac cgagtgggat aaaaccggtg aatttatatgc aattgatggc     300
agcaactata tcaaaggcga aggtgaaaaa gcatgtccgg gtgcaaatcc gggtcagtat     360
ggcaccaatg ttctgacct gacctgcct ggtctggttc tgcaagatgt taatggtgtt     420
acctgaaaag gtcfggatgt tcatcgtttt tgtattggtg tctggttaa tcgcagcagc     480
aataacctga ttcagcataa tcgtatcagc aacaattatg gtggtgccgg tgttatgatt     540
accggtgatg atggtaaagg taatccgacc agcaaccacca ccaataataa caaagttctg     600
gataacgtgt tcatcgataa tggatgatgt ctggaactga cccgtgggtc agcattiaat     660
ctgattgcaa ataacctgtt taccagcaca aaagccaatc cggaaccgag ccagggtatt     720
gaaattctgt ggggtaatga taatgccgtg gtgggtaaca aattcgaaaa ctattcagat     780
ggcctgcaaa tcaattgggg taaacgtaac tatatcgect ataacgaact gaccaataac     840
agcctgggtt tcaatctgac aggtgatggt aacattttcg acagcaataa agtgcattgt     900
aaccgfattg gtattgccat tcgtagttaa aaagatgcaa atgcacgtat taccctgacc     960
aaaaatcaga tttgggataa cggcaagat atcaaacgtt gtgaagccgg tggtagctgt     1020
gttccgaatc agcgtctggg tgcaattgtt ttgggtgttc cggcactgga acatgaaggt     1080

```

[0016]

```

ttgttggtta gccgtggcgg tggigtgttt attgaaccgg caaaactgca aaaaacctge      1140
accagccga accagcagaa ttgtaatgca attcctaattc agggatttca ggcaccgaaa      1200
ctgacagtta gcaaaaaaca gctgaccggt gaagttaaag gcacccttaa teagcgttat      1260
aatgtggaat tttttggcaa tegttaatgcc agcagcagcg aagcagaaca gtatctgggt      1320
agcaattgttg ttgttaccga teatcagggt ctggcaaaag caaattgggc tccgaaagtt      1380
agcatgccga gcgttaccgc aaatgtgaca gatcatctgg gtgcgaccag cgaactgagc      1440
agcgcagtta aaatgcgtta a                                         1461

```

<210> 14
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> 来自不动杆菌属物种ADPI的QuiC;

<400> 14

```

Met Lys Leu Thr Ser Leu Arg Val Ser Leu Leu Ala Leu Gly Leu Val
1           5           10           15

```

```

Thr Ser Gly Phe Ala Ala Ala Glu Thr Tyr Thr Val Asp Arg Tyr Gln
20           25           30

```

```

Asp Asp Ser Glu Lys Gly Ser Leu Arg Trp Ala Ile Glu Gln Ser Asn
35           40           45

```

```

Ala Asn Ser Ala Gln Glu Asn Gln Ile Leu Ile Gln Ala Val Gly Lys
50           55           60

```

```

Ala Pro Tyr Val Ile Lys Val Asp Lys Pro Leu Pro Pro Ile Lys Ser
65           70           75           80

```

```

Ser Val Lys Ile Ile Gly Thr Glu Trp Asp Lys Thr Gly Glu Phe Ile
85           90           95

```

```

Ala Ile Asp Gly Ser Asn Tyr Ile Lys Gly Glu Gly Glu Lys Ala Cys
100          105          110

```

```

Pro Gly Ala Asn Pro Gly Gln Tyr Gly Thr Asn Val Arg Thr Met Thr
115          120          125

```

```

Leu Pro Gly Leu Val Leu Gln Asp Val Asn Gly Val Thr Leu Lys Gly
130          135          140

```

```

Leu Asp Val His Arg Phe Cys Ile Gly Val Leu Val Asn Arg Ser Ser
145          150          155          160

```

```

Asn Asn Leu Ile Gln His Asn Arg Ile Ser Asn Asn Tyr Gly Gly Ala
165          170          175

```

```

Gly Val Met Ile Thr Gly Asp Asp Gly Lys Gly Asn Pro Thr Ser Thr
180          185          190

```

```

Thr Thr Asn Asn Asn Lys Val Leu Asp Asn Val Phe Ile Asp Asn Gly
195          200          205

```

```

Asp Gly Leu Glu Leu Thr Arg Gly Ala Ala Phe Asn Leu Ile Ala Asn

```

[0017]

210	215	220
Asn Leu Phe Thr Ser Thr Lys Ala Asn Pro Glu Pro Ser Gln Gly Ile 225 230 235 240		
Glu Ile Leu Trp Gly Asn Asp Asn Ala Val Val Gly Asn Lys Phe Glu 245 250 255		
Asn Tyr Ser Asp Gly Leu Gln Ile Asn Trp Gly Lys Arg Asn Tyr Ile 260 265 270		
Ala Tyr Asn Glu Leu Thr Asn Asn Ser Leu Gly Phe Asn Leu Thr Gly 275 280 285		
Asp Gly Asn Ile Phe Asp Ser Asn Lys Val His Gly Asn Arg Ile Gly 290 295 300		
Ile Ala Ile Arg Ser Glu Lys Asp Ala Asn Ala Arg Ile Thr Leu Thr 305 310 315 320		
Lys Asn Gln Ile Trp Asp Asn Gly Lys Asp Ile Lys Arg Cys Glu Ala 325 330 335		
Gly Gly Ser Cys Val Pro Asn Gln Arg Leu Gly Ala Ile Val Phe Gly 340 345 350		
Val Pro Ala Leu Glu His Glu Gly Phe Val Gly Ser Arg Gly Gly Gly 355 360 365		
Val Val Ile Glu Pro Ala Lys Leu Gln Lys Thr Cys Thr Gln Pro Asn 370 375 380		
Gln Gln Asn Cys Asn Ala Ile Pro Asn Gln Gly Ile Gln Ala Pro Lys 385 390 395 400		
Leu Thr Val Ser Lys Lys Gln Leu Thr Val Glu Val Lys Gly Thr Pro 405 410 415		
Asn Gln Arg Tyr Asn Val Glu Phe Phe Gly Asn Arg Asn Ala Ser Ser 420 425 430		
Ser Glu Ala Glu Gln Tyr Leu Gly Ser Ile Val Val Val Thr Asp His 435 440 445		
Gln Gly Leu Ala Lys Ala Asn Trp Ala Pro Lys Val Ser Met Pro Ser 450 455 460		
Val Thr Ala Asn Val Thr Asp His Leu Gly Ala Thr Ser Glu Leu Ser 465 470 475 480		
Ser Ala Val Lys Met Arg 485		

<210> 15
 <211> 9462
 <212> DNA
 <213> 质粒pAC21;

[0018]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5924)..(5924)
 <223> n是a、c、g或t

 <400> 15
 gttgacagta agacgggiaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
 gaactgtctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcca taaaacgecc 180
 tgagaagccc gtgacgggct ttctttgtat tatgggtagt ttctttgcat gaatecataa 240
 aaggcgcttg tagtgccatt tacceccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatggtc ggagacaaaa ggaatatcca 360
 gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggctctgttt 420
 gtagaggage aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgttaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtgagttata cacagggctg ggatctatcc tttttatctt tttttattct ttctttatcc 540
 tataaattat aaccacttga atataaacaa aaaaaacaca caaaggctct gcggaattta 600
 cagagggctc agcagaattt acaagtttcc cagcaaaagt ctacgagaat ttacagatac 660
 ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aatttggtata 720
 gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtctg tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
 gtgtggcaact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat 960
 tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta 1020
 aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagecaa aaattagaat 1080
 tagtttttag tgaagagata ttgccttata ttttccagtt aaaaaaatc ataaaatata 1140
 atctggaaca tgttaagtct ttigaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat 1200
 taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca agcacaatat agagattagc cttgatgaat 1260
 ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggett aaccaatggg 1320
 ttttgaacc aataagtaaa gatftaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata 1380
 agcagggccg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc 1440
 tctgaacega acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaaa ccaacaacca 1500
 ttacatcaga ttectacctc cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg 1560
 caaaaattca gctcaccagt tttagggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg 1620
 atctcaatgg ttctgtctca tggttcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac 1680
 tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca 1740
 agactaacia acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc 1800
 atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt 1860
 ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta 1920
 acaccttaata gaacagggtg aaccagttaa acaaagcaac tagaacaatg aattgaacac 1980
 ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaca ggcgatgctg 2040

[0019]

```

cttategaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgctcctcgt ggggaaaaaa 2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga 2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgittgc gggcagcaaa acccgttatg 2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggtcceca 2280
atfaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gateaatccc 2340
cctgctcgcg caggetgggt gccaaactct cgggtaacat caaggcccgga tccttggagc 2400
ccttgccttc ccgcacgatg atcgigccgt gategaaatc cagatccttg acccgagtt 2460
gcaaaccctc actgatccgc atgcccgctc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct 2520
cgccttccag aaaaccgagg atgcgaacca ctcatccgg ggtcagcacc accggcaagc 2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct 2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc 2700
gtctgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttgcct gctgcccagg gttgccgggt 2760
gacgcacace gtggaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc 2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct caccgaaactg gtccagaacc ttgaccgaac 2880
gcagcggtgg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttggg 2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgta cgcctgggt cgatgtttga 3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca 3060
tcatgagga agcggtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gtiggcgtca 3120
tcgagcgcca tctgaaccg acgttgcctg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg 3180
gcggcctgaa gccacacagt gataatgatt tgcctgttac ggtgaccgta aggcctgatg 3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttggaaac ttccgcttcc cctggagaga 3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attccgtggc 3360
gttatecagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca ggcgaatgac attcttgacg 3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atciggtat cttgctgaca aaagcaagag 3480
aacatagcgt tgccttggta ggtecagcg cggaggaaact ctttgatccg gttcctgaac 3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg 3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tctcccgaat ttggtacagc gcagtaaccg 3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgtgcgc actgggcaat ggagcgccgt ccggcccagt 3720
atcagcccgat catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg 3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg 3840
tagtcggcaa ataattgtct acaattcggt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcgctta 3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaactatc aggtcaagtc 3960
tgtttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg 4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gtggcggaag taatcgcaac atccgcatta 4080
aaatctagcg agggccttac taagctgatc cgggtgatga ctttttgaat gacctttaat 4140
agattatatt actaattaat tggggacct agaggteccc ttttttattt taaaaatttt 4200
ttcacaacac gggttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 4260

```

[0020]

tttcccgaact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggctttaca cttaatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttacacacgg aaacagctat gacctgatl acgccaaget tgcattgctg	4440
caggtcgact ctagaggatc cccccgccg ccgacagagt aataggtttt acttaatage	4500
tcttccgtgc ccttccagge agtgatccgc attccgttct catggcgagg caacatttcg	4560
ggaiggaaga taatgttctt tgcacagga aaatcaacaa tatgcgcacc agatgccact	4620
ggcagccgcc cgtgcgcgt tactaactct ataaatgcag ggatctcacc aatgacaaca	4680
tcctgcggac tgtttcctgc cagtcccatg atgatggcga catccgtggc atggcctttg	4740
cccgicagtg acaacgaccc gtacagatcg accacaatat ggctcgtcgc ggtaataag	4800
ccgctacttt ccagccgafc aataaaactt tttccggcat tcattggccc caccggtatgc	4860
gaactggagg gaccaatccc aattttgaaa atatcgaatg cactaatcat gtgacggaag	4920
atcacttcgc agaataaata aatcctgggtg tccctgttga taccgggaag cctggggcca	4980
acttttggcg aaaatgagac gtigatcggc acgtaagagg ttccaacttt caccataatg	5040
aaataagatc actaccgggc gtattttttg agttatcgag attttcagga gctaagggaag	5100
ctaaaatgga gaaaaaaac aciggatata ccaccgtga tatatcccaa tggcatcgta	5160
aagaacattt tgaggcattt cagtcagtig ctcaatgtac ctataaccag accgttcagc	5220
tggatattac ggctttttta aagaccgtaa agaaaaataa gcacaagttt tatccggcct	5280
ttattcacat tcttgcgcgc ctgatgaatg ctcatccgga attccgtatg gcaatgaaag	5340
acggtgagct ggtgatatgg gatagtgttc acccttgta caccgttttc catgagcaaa	5400
ctgaacggtt ttcacgcgc tggagtgaat accacgacga tttccggcag ttctacaca	5460
tatatcgcga agatgtggcg tgitacgggtg aaaacctgge ctatttccct aaagggttta	5520
ttgagaatat gtttttcgtc tcagccaatc cctgggtgag ttccaccagt ttgatattaa	5580
acgtggccaa tatggacaac ttcttcgcgc ccgttttcac catgggcaaa tattatacgc	5640
aaggcgacaa ggtgctgatg ccgctggcga ttcaggttca tcatgcggtt tgitatggct	5700
tccatgtcgg cagaatgctt aatgaattac aacagtactg ccatgagtgg caggcggggg	5760
cgtaattttt ttaaggcagt tattgtgccc cttaaaccgc tggctgtacg cctgaataag	5820
tgataataag cggatgaatg gcagaaatc gaaagcaaat tcgacccggt cgtcgttca	5880
gggcagggtc gttaaatagc cgttatgtc tattgtggt ttantcggta cccggggatc	5940
gcggccgcgg accggatccc atcacatata cctgccgttc actattattt agtgaatga	6000
gatattatga tattttttga attgtgatia aaaaggcaac ttatgccc tgcaacagaa	6060
actataaaaa atacagagaa tgaaaagaaa cagatagatt ttttagttct ttaggcccgt	6120
agtctgcaaa tccttttatg attttctatc aaacaaaaga ggaatagaa ccagttgcaa	6180
tcacaacgag agtctaatag aatgaggtcg aaaagtaaat cgcgcgggtt tgitactgat	6240
aaagcaggca agacctaaaa tgtgtaaagg gcaaagtgtat tactttggcg tcacccttta	6300
catatttttag gtcttttttt attgtgcgtat actaacttgc catcttcaaa caggagggtc	6360
ggaagaagca gaccgctaac acagtacata aaaaaggaga catgaacgat gaacatcaaa	6420
aagtttgcaa aacaagcaac agtattaacc ttactaccg cactgctggc aggaggcgca	6480
actcaagcgt ttgcgaaaga aacgaaccaa aagccatata aggaacata cggcatttcc	6540

[0021]

catattacac gccatgatat gctgcaaatc cctgaacagc aaaaaaatga aaaatatcaa	6600
gttcctgaat tcgattcgic cacaattaaa aatatctctt ctgcaaaagg cctggacgtt	6660
tgggacagct ggccattaca aaacgctgac ggcacigtcg caaactatca cggctaccac	6720
atcgctctttg cattagccgg agatcctaaa aatgcggatg acacatcgat ttacatgttc	6780
tatcaaaaag tcggcgaaac ttctattgac agctggaaaa acgtggecg cgtctttaaa	6840
gacagcgaca aattcgaigc aaatgattct atcctaaaag accaaacaca agaattggtca	6900
ggttcagcca catttacatc tgacggaaaa atccgtttat tctacactga tttctcgggt	6960
aaacattacg gcaaacaaac acigacaact gcacaagtta acgtatcagc atcagacagc	7020
tctttgaaca tcaacgggtg agaggattat aaatcaatct ttgacgggtg cggaaaaacg	7080
tatcaaaatg tacagcagtt catcgatgaa ggcaactaca gtcaggcgca caaccatacg	7140
ctgagagatc ctactacgt agaagataaa ggccacaaat acttagtatt tgaagcaaac	7200
actggaactg aagatggcta ccaaggcgaa gaatctttat ttaacaaagc atactatggc	7260
aaaagcaca catctcttcg tcaagaaagt caaaaacttc tgcaaaagca taaaaaacgc	7320
acggtgagtt tagcaaacgg cgtctcgggt atgattgagc taaacgatga ttacacactg	7380
aaaaaagtga tgaaccgct gattgcattc aacacagtaa cagatgaaat tgaacgcgcg	7440
aacgtcttta aaatgaacgg caaatggtac ctgttcactg actcccgcgg atcaaaaatg	7500
acgattgacg gcattacgtc taacgatatt tacatgcttg gttatgttte taattcttta	7560
actggcccat acaagccgct gaacaaaact ggcccttggt taaaaatgga tcttgatcct	7620
aacgatgtaa cctttactta ctcacacttc gctgtacctc aagcgaaagg aaacaatgtc	7680
gtgattacaa getatatgae aaacagagga ttctacgcag acaacaate aacgtttgag	7740
ccgagcttcc tgcftgaacat caaaggcaag aaaacatctg ttgtcaaaga cagcatcctt	7800
gaacaaggac aattaacagt taacaaataa aaacgcaaaa gaaaatgcc aataccatt	7860
ggcattttct tttatttctt ccatttaaat ggaigcatgc gctagcggag tgtatacttg	7920
cttactatgt tggcactgat gaggtgtgca gtgaagtgtc tcagcctcgt gacggggacg	7980
gtcgtaaagt cgttcgcic cacttcactg aacggcaatc cgagggtgtg gatccaatta	8040
aggccacgct gtcatttaaa ttccgttttt ccagttcaaa tgcaattgcc ttcaatgcac	8100
cttcgtagct gtggtgagcc agcgggtgct gctctcccc atttaeggat aagaatgcat	8160
tttcagagtt aataccgtcg gcaatacctg acattaatac ttcacagtcg ctggcctcga	8220
gtacggaaaa cttaatcgaa gacgaaccac agttaataac caaaacaacc ggaaattcat	8280
tcattctctt tctcactctg agttacggat taaaacagtt tgtatacgat gttcaggatg	8340
gtcagcagac caatcacggt aacaaacacg ttatecagac gaccacggta tttcgcaga	8400
gacggcgctt tacggatggc atacatcggc aacaggcaca gcagggatgc gataatcgg	8460
gcgcccattg cttcaatcag gtcgaggatg ttccgggttg cgtaggcaac aaccaggtg	8520
gagcccatga tgaagatcat gctgagagta ttcagtttac ccagcgacac ttiggttttg	8580
tcaccittat aaccgaactt cagaatcaga ccattcaage ctccagcgt cccagatag	8640
tgaccgaaga aagatttgaa gatagccacg agtgcgatga tggaaagcgc atattccagt	8700
gtaatcgcca acgttgtttt ggtaccggtc atggacgcaa agtgggttagc cagataagaa	8760

[0022]

```

agcactggaa tattctgcgc ttiggettcc gccatgttgg ceggagacag agtaaacagg      8820
cagctaaagg cnaagaacat caccactgca accatcagca tgetggcacg agaaatgatt      8880
tgggaacatt tacgtteggc gaagtcgca cegaagctct tctcatactc ttcacgttta      8940
gaaaccacga aggaagagac gattggcgag aagttaaagg agaaaaccaa gatggaaatc      9000
cccagccaga cagtgatcag gataccgtca tgaccggta aegacagcga accgaggta      9060
acctggctga taactgcaga gtccagtaa gggatcagcg acaaagaaat cagcaccagg      9120
ctggcgataa acggccatac caggtagctc agggatccga gtcgaattc actgcccgc      9180
gttttacaac gtctgactg ggaaaacctt ggcgttacc aacttaatcg ccttcagca      9240
cateccccct tccccagctg gcgtaatagc gaaggagccc gcaccgatc ccctcccaa      9300
cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcg ctagtcgggt atttctctc tacgcactg      9360
tgcggtattt cacaccgat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgcgcgatg      9420
ttaagccage cccgacaccc gccaacaccc gctgacgaat tc      9462

```

<210> 16
 <211> 9430
 <212> DNA
 <213> 质粒pAC19;

```

<400> 16
gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc      60
agtctgaatg acctgtcagc ggataatccg aagtgtcag actggaaaat cagagggcag      120
gaactgtctg acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgccca taaaacgecc      180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttcttgcac gaatccataa      240
aaggcgccctg tagtgcatt tacccccatt cactgcaga gccgtgagcg cagcgaactg      300
aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatggc ggagacaaaa ggaataatca      360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt agggttttaa ggtctgtttt      420
gtagaggagc aaacagcggt tgcgacatcc ttttgtaata ctgcggaact gactaaagta      480
gtgagttata cacaggctg gcatctatc tttttatctt tttttattct ttctttatc      540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta      600
cagagggtct agcagaattt acaagttttc cagcaaaagg ctagcagaat ttacagatac      660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata      720
gtgatataaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagtgtt ttcaaagcaa      780
atgaactagc gattagtgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta atttatgct      840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt      900
tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat      960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat ccttggta      1020
aaggcittga gattttccag tggacaaact atgccaagti cfaagcgaa aaattagaat      1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttatc tttccagtt aaaaaaatc ataaaatata      1140
atctggaaca tgttaagtct ttigaaaaca aatactctat gaggatttat gagtgttat      1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcataat agagattagc cttgatgaat      1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg      1320

```

[0023]

ttttgaaacc aataagtaaa gatitaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgaetgat acgttgattt tccaagtiga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttctaceta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gccttaactg	1560
caaaaaitca gctcaccagt tttagggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttcgttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacaa acaaaagtag aacaactggt caccgttaga tatcaaaggg aaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
gggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctataa gaacaggtga aaccagtaaa acaaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctcccg tgggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggteccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggte attcaaaagg tcatecaccg gatcaattcc	2340
ctgtctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caagcccca tecttggagc	2400
ccttgcccto ccgcacgat atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg accgcagtt	2460
gcanaacctc actgatccgc atgcccgttc catacagang ctggcgcaac aaacgatgct	2520
cgccttcag aaaaacgagg atgcgaacca ctteatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgcgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgaacttcgt gctgcccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaaccacgtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgaagtag cgtatgcgt caccgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg taacggcgca gtggcggtt tcatggcttg ttatgactgt ttttttggg	2940
tacagtctat gctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgcctgggt cgaatgttga	3000
tggtatggag cagcaacgat gttaacgacg agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaca	3060
tcatgaggga agcgtgatc gccgaagtat cgaactcaact atcagaggta gttggcgta	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttcttgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtgatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tcttggttac ggtgaccgta agccttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagcttgg atcaacgacc ttliggaaac ttccgcttcc ccggagaga	3300
gcgagattct ccgcgtgta gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gaganitgca gcgcaatgac attcttgacg	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atciggtat cttgtgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgetatg gaactcgcg cccgactggg	3600

[0024]

ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcgt ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtcta acaattcggt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggetta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaacatc aggtaaacgt	3960
tgtttttatt atttttaage gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcat	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgate cgggtgatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc tttttatit taaaaatit	4200
ttcacaaaae gggttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgaact ggaaageggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggtctgta tgttgtgtgg aaatgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gacctgatt acgccaagct tgcattgcctg	4440
caggtcgaact ctagaggatc ccccccgcgc ccgacagagt aataggtttt acttaatagc	4500
tcttctgtc ccttccaggc agtgatccgc attccgttct catggcgagg caacatttgc	4560
ggatggaaga taatgttctt tgcctacagga aaatcaacaa tatgcgcacc agatgccact	4620
ggcagccgcc cgctgcgcgt tactaactct ataaatgcag ggatctcacc aatgacaaca	4680
tcttgcggac tgttctctgc cagtcccatg atgatggcga catccgttgc atggcctttg	4740
ccgctcagtg acaacgaccc gtacagatcg accacaatat ggcctgtcgc ggtaataag	4800
ccgctacttt ccagccgacg aataaaaact tttccggcat tcatgtggcc caeggtatgc	4860
gaactggagg gaccaatccc aattttgaaa atatcgaaat caetaatcat atccacaccc	4920
tcggattgcc gttcagtgaa gtggagcgga acgacettac gaccgtcccg ctacagagc	4980
tttacgcaact acgtactgcg atggcttcaa ttccagcgg gagggcggat ccactaatac	5040
aaaatataac aaaagttaat aataatatta ttcttactta agactttttt gtcttcaatt	5100
tttagtaaaa aatataaaaa agccaccctc ccgattttat cggaaggcag cctcttaaat	5160
tcagttcata atattaaaaa atattatica acttcagaat attgtttgga ataggcagct	5220
gcgcaccca acagtccagg ctgcggataa gtaatcaact taaccggaat cttggacatg	5280
acgcgttcaa agcgtccttt tgaacaaaag cgtgacgga aaccagatc tggcaaatgg	5340
gaagcgatac gaagaccgac accaccgcca ataaacacac tggttgcacc ctgtgccaaa	5400
gcaagatcac cagcgatagc gccaggctc aagcagaagc gatccaaagc ggcttcagca	5460
aggttgtctt taccttccaa agccatctgc cataatttaa tatcatccag caagctgaac	5520
ggaacgcctt caatggcagc cagtgtctcg tagatattac caagaccgg gccagaaata	5580
atcggttcca tagaaacgcg gcggaacgt tcacgtaaac gtgccagaat ttgtcttca	5640
agctctgcaa gcggagcaaa gtcgataiga ccgcctcag ttctgatgac gaaataacgg	5700
ccttcagtc gcaacagatg ggcaacaccc aagcccgttc ccggaccaag aatagtata	5760
acaccatcgc taggaagcgc ttcatcagga ccacaaatat gatccagata agaagaatcc	5820

[0025]

ataatgcgcaa cgcgtgggc aaccgcgcc aagtcattga tcagaacatg cgtatcgatg	5880
tccagctttt cattcagagt agctggcttt aatacccaag ggttatttgt aagttttaaa	5940
acttcaccat gaaccgggcc agcccatgca atagctgcgg cacgtggcag aggacgaccc	6000
agtttttcae cgaaacgttc ccaagctaac tgcangctag catgtttctg cgtttttaaa	6060
gttgtttctt ctccaagaga aagaaccga ecattgttta cttecgcaat agagaaacgc	6120
gcatgcgttc caccgatgtc aatcgcaaca atttcataa taattccttt ctgaaatcag	6180
aaggctaccc aacaggtaaa ataagtccgc ccgttttata ccacgttgt aaacaaaaag	6240
tataatttgt taagacttat ctaaaaaga caaaaggatt cagccaaagc aagtttaact	6300
acttctggga gcgcacatc tcctcgattt catccaggct ccgacctttg gttccggca	6360
cgaagcgagc aacaatcaag ccacctaaga tacttaatgc tgcgaaaacg agataggaga	6420
aaccgtggtt gaaagtctga ttcaatctg gagaaccatc ggcaacctta aacagggaagt	6480
taaccaagat attagctaac cattgtccgg taacacgat aggcatact gcgcccttga	6540
tggaaactcg gaacatttct gacagaacaa eccagcagac agggcccccac gacataccaa	6600
agactgcaat ataaagaagc acagaagcca aaggcaaac accaccgact ttgaaccaga	6660
aacagcagcc taaaacagcc atcattgcag ccataccgag agcaccctaa ataagcagag	6720
gtttacggcc gaagcgttca acaacacggg aagcaatcat ggtgaagatg aagttcaca	6780
cacegataga gatggtctgc aataatgcc tatcagctcc aaacctaata ttctggaaca	6840
ctcgcgtgtc ataatacagc acggcgtaa taccgactaa ctgctggaag gcagcaacgg	6900
atacaccgga aaaaacacgc gtgataccaa aagcaacaa acctgcctg cttttgtcca	6960
tggctttatc aaagccagct ttaatctttt gaatcgtcag attaggatcg gcttgcggtt	7020
ccagacgagc aaggattttg ctacgctcgg aatgacgtcc cttcatcaac aaccaatgag	7080
gcgtatccgg tgcggttaac agcagcaata agaaggcaat accgatcagg ccttctgaag	7140
ccggagacca gcaccaacca ctggcattaa cccaatcgat agaaccgaaa tgagccagta	7200
accaggtaaa gatataaccg gttaaagcac ccgtcacat ggccatctgc tgaccagaaa	7260
ccatctgacc acgtttgtct ggcggagcaa tticagcaat ataggttggg gtcaaggttg	7320
aaacgacacc gatacctaaa ccggcaagaa accggaaaaa gcaaaaaatt tgtaaagccg	7380
aaccaccggt tccaaataat ttctcggtta acgcagcacc aaaaccggcg gcgacgaac	7440
aatgggaact catcaacaat ccgcgcgac gaccgaagcg aataccaatc cagccagaca	7500
gcaaagaacc ggtaacacaa ccgaccaaaa cagcaacaac gaccatccca gaaagggaag	7560
ccgcagccgt agcagacagg tgacgagggg caataaaatg gatatcaacc ggtgtaccga	7620
ttgcagcgat aaccgctgaa tcgtaaccga aaagcaagcc gcctatagca gcgattaggg	7680
ctagtcgcgt gactagaccg tgactacttt cagaactcat ggcgattcct ctccctctag	7740
agcgtcctgc tgttggttaag attatfatac cacaccttgt agataaagtc aacaactttt	7800
tgcanaattt ttcaggaatt ttagcagagg ttgttctgga tgtagaacaa aacatctttc	7860
cgctcttgtg ctgttaggat atctttcttg gaagctaggt aggcctcgag ttatggcagt	7920
tggttaaaag gaaacaaaaa gaccgttttc acacaaaacg gtcctttctg atttctttt	7980
acagtcacag ccacttttgc aecaattaag gecacgctgt catttaaact ccgtttttcc	8040
agttcaaatg caattgcctt caatgcacct tcgtagctgt ggtgagccag cgttgcctggc	8100

[0026]

```

tctccccat ttacggataa gaatgcattt tccgagttaa taccgtcggc aatacctgac      8160
attaatactt cacagtcgct ggcatcagat acggaaaact taatcgaaga cgaaccacag      8220
ttaataacca aaacaaccgg aaatcattc atctcttttc tcatcctgag ttacggattt      8280
aaacagtttg tatacagatg tcaggatggt cagcagacca atcacggtaa caaacacgtt      8340
atccagacga ccacgggtatt tcgccagaga cggcgettta cggatggcat acatcggcaa      8400
caggcacagc agggatgcga taatcgggtc gcccatggct tcaatcaggt cgaggatggt      8460
cgggttggcg taggcaacaa ccagggtgga gcccatgatg aagatcatgc tgagagtatt      8520
cagtttaccg agcgacactt tggttttgtc accittataa ccgaacttca gaatcagacc      8580
attcaagcct tccagcgtcc ccagatagtg accgaagaaa gatttgaaga tagccacgag      8640
tgcgatgatg gaagccgcat attccagtg atcgcgaac gttgttttgg taccggtcat      8700
ggacgcaaag tggttagcca gataagaaag cactggaata ttctgcgctt tggcttccgc      8760
catgttggcc ggagacagag taaacaggca gctaaaggca aagaacatca ccaactgcaac      8820
catcagcatg ctggcagcag aaatgatatt ggaacattta cgttcggtga agtcgcgacc      8880
gaagtccttc tcatactctt cactgttaga aaccacgaag gaagagacga ttggcgagaa      8940
gttaaaggag aaaaccatga tggaaatccc cagccagaca gtgateagga taccgtcatg      9000
accggttaac gacagcgaac cgaggtaaac ctggtcgata actgcagagt tccagtaagg      9060
gatcagcgac aaagaatca gcaccaggct ggcgataaac ggccatacca ggtagctcag      9120
ggtaaccgagc tcgaattcac tggccgtcgt tttaaacgtt cgtgactggg aaaaccctgg      9180
cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga      9240
agaggcccgcc accgatcgcc ctcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgccct      9300
gatgcggtat ttctccttfa cgcactctgt cggatatitca caccgcatat ggtgcactct      9360
cagtiacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc      9420
tgacgaattc                                     9430

```

<210> 17
 <211> 5768
 <212> DNA
 <213> 质粒pMH17F;

```

<400> 17
gittgacagta agacgggtaa gccgtgtgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc      60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatecg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag      120
gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaaccgcca taaaacgccc      180
tgagaagccc gtgacgggct ttctttgtat tatgggtagt ttcccttgcatt gaatccataa      240
aaggcgccctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg      300
aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca      360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt      420
gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgttaata ctgcggaaact gactaaagta      480
gtgagttata cacagggtcg ggtatctatc tttttatctt tttttattct ttctttatct      540
tataaattat aaccacitga atataacaa aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta      600
cagagggctct agcagaattt acaagtttcc cagcaaaggc ctagcagaat ttacagatac      660

```

[0027]

ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattgggtata	720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa	780
atgaactiagc gattagtgcg fatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggfctcgt	900
tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaaigct tatgggtgat	960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttgggta	1020
aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagttttttag tgaagagata ttgccttctc tttccagtt aaaaaattc ataaaaata	1140
atctggaaca tgttaagtct ttigaaaaca aatactctat gaggatttat gattgggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaatig gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagtga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttcttacctc cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt ttigaggcaa aatttttgag tgacaigcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttctgtctca tggtctacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacafac	1680
tggtctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggtctctg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacia acaaaagtag aacaactggt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acaccttaata gaacagggtga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gectgaaaca ggcgatgctg	2040
citatcgaat caaagetgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctcccgt ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgtttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgoga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggteccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaecg gatcaattcc	2340
cctgtctcgc caggctgggt gccaaactct cgggtaacat caaggcccga tccctggagc	2400
ccitgeccct ccgcacgatg atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgagtt	2460
gcaaacctct actgatccgc atgcccgctc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgcttccag aaaaccgagg atgcgaacca ctcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctctc gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccttagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gtctgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gtgcccgaag gttgcccgggt	2760
gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcgggtc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cagcgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880

[0028]

gcagcgggtg taacggcgca gtggcgggtt tcatggcttg ttatgaactgt ttttttggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cggcgtgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgaggga agcggtgatc gcgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta	3120
tcgagcgcca tctcgaaacc acgttgctgg cgtacattt gtaaggctec gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgcctgttac ggtgaccgta aggcctgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaac ttcggttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgtgtga gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attcctggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttcgag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgetatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgccccgat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgtgccg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagcccgat catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcg agatcagttg gaagaatttg tccaactagt gaaaggcgag atcaceaagg	3840
tagtcggcaa ataalgcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcctttatt atttttaage gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc ttttcttgt taicgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgac cgggtggaatg ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggetttaca ctttatgctt ccggtcgtga tgttgtgtgg aattgtgagt	4380
tacctagaga gggtagaat tgcgaacat gcgcataagt ttcccgaca gatttcaggt	4440
ggtcagcagc aacgcgttgc catfgcgctg tctgtgtgta tgaagccgaa aattatgttg	4500
tttgaigagc caacgtcggc gctcgatcct gagatggatg aagaggtgct ggatacagtg	4560
attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca	4620
cgaaccgtcg ctgaccgggt aatttttatg gatcgtaggg aaatagtga gcaagctgca	4680
cctgaatgaat tttttgcgca tcttaaatca gagcgtacga gggtattttt atcgcaggta	4740
atccattaat tgaalgttag ttcgaaaagc aaaaaggcca tcccttcgga tggccttctg	4800
cttgatttga tgtctggcag ttatgtggcg gcgtcctgce gccaccctc cgggccgttg	4860
cttcgcaacg ttcaaatccg ctccggcggt atttgtctta ctggggagag tgttcaccga	4920
caaacacag ataaaacaaa agggccagtc ttccgactga gccttttgtt ttatttgatg	4980
tctggcagtt cctactctc gcatggggag accccacact accatcgcg ctacggcggt	5040
ttcaattctg agttcggeat ggggicaggt gggaccaccg cgetactgcc gccagacaaa	5100
ttcttttcta atctgccgaa cttaaaccta aaaagtgggt ctgataccca gattcgaact	5160

[0029]

```

ggggacctca cccttaccaa gggcgcgctc taccaactga gccatatcag cacgctaaat 5220
ttgatgctcg gcagttccct acctcgcgat ggggagacce cacactacca tcggcgctac 5280
ggcgtttcac ttctgagttc ggcattgggt cagggtggag caccgcgcta cgccgccag 5340
gcaaatctcg ttttatcaga ccgcttctgc gttctgattt aatctgtatc aggetgaaaa 5400
tcttctctca tccgataaac aatttcacac aggaacacgc tatgaccatg attacgccaa 5460
gctcgagctc gaattcaactg gccgtcgitt tacaacgctc tgaetgggaa aaccttgccg 5520
ttaccaact taategcctt gcagcacatc ccccttcgc cagctggcgt aatagcgaag 5580
aggcccgca ccatgcctt tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgctga 5640
tgcggtattt tctcttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca 5700
giacaatcig ctctgatgcc gcatagttaa gccagcccg acacccgcca acacccgctg 5760
acgaattc 5768

```

<210> 18
 <211> 1053
 <212> DNA
 <213> 野生型aroG基因的编码区;

```

<400> 18
atgaattatc agaacgacga ttacgcac aaagaaatca aagagttact tctctctgtc 60
gcattgctgg aaaaattccc cgtactgaa aatgccgga atacggttc ccatgccga 120
aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatgcc tgttggtgt gattggccca 180
tgctcaattc atgatcctgt cgcggcaaaa gagtatgcca ctctgctgt ggcgtcgt 240
gaagagctga aagatgagct ggaaatcgta atgcgcgtct atttgaaaa gccgcgtacc 300
acggtgggct ggaaaggcct gattaacgat ccgcatatgg ataatagett ccagatcaac 360
gacggctcgc gtatagcccg taaattgctg ctgatalta acgacagcgg tctgccagcg 420
gcaggtgagt ttctcgatat gatcacccca caatatctcg ctgacctgat gagctggggc 480
gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg aactggcatc agggctttct 540
tgtccgctcg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat ccatgccatt 600
aatgccgcgc gtgcgccga ctgcttcctg tccgtaacga aatgggggca ttcggcgatt 660
gtgaatacca geggtaacgg cgattgccat atcattctgc gcggcggtaa agagcctaac 720
tacagcgcca agcacgttgc tgaagtgaan gaagggtga acaaagcagg cctgccagca 780
caggatgata tcgatttcag ccatgciaac tcgtccaaac aattcaaaaa gcagatggat 840
gtttgtctcg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa aggccattat tggcgtgatg 900
gtggaaagcc atctgggtga aggcaatcag agcctcgaga gcggggagcc gctggcctac 960
ggtaagagca tcaccgatgc ctgcacggc tgggaagata ccgatgetct gttacgteaa 1020
ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggt taa 1053

```

<210> 19
 <211> 8820
 <212> DNA
 <213> 质粒pMH28F;

<220>
 <221> misc_feature

[0030]

<222> (5894).. (5894)

<223> n是a、c、g或t

<400> 19

```

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgetg ccttactggg tgcattagcc      60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag      120
gaactgtctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcca taaaacgccc      180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgatg tatgggtagt ttctttgcac gaatccataa      240
aaggcgcccg tagtgccatt taccccattt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg      300
aatgtcacga aaaagacagc gacacaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatatcca      360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagecttt aggggtttta ggctctgttt      420
gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgtaata ctgcggaact gactaaagta      480
gtgagttata cacagggtg ggatctatcc tttttatctt tttttatctt ttctttatcc      540
tataaattat aaccacttga atataaacaa aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta      600
cagagggtct agcagaattt acaagtttcc cagcaaaagg ctagcagaat ttacagatac      660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgaet agcccatctc aatiggtata      720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtaigtctga attagttgtt ticaaagcaa      780
atgaactage gattagtgcg tatgacttaa eggagcatga aaccaagcta attttatgct      840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt      900
tcacttataa ccaatacgtt cagatgatga acatcagtag ggaaatgctt tatgggtgat      960
tagcfaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgigga aatcaggaat cctttggtta      1020
aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat      1080
tagtttttag tgaagagata ttgccctatc ttttccagtt aaaaaaatc ataaaatata      1140
atctggaaca tgttaagtct ttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat      1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca agcacaatat agagattagc cttgatgaat      1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg      1320
ttttgaaacc aataagtaaa gattttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata      1380
agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagtiga actagataga caaatggatc      1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca      1500
ttacatcaga ttctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg      1560
caaaaattca gctcaccagt tttagggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg      1620
atctcaatgg ttctttctca tggtctacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac      1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca      1740
agactaacaa acaaaagtag aacaactggt caccgttaga tatcaaaggg aaaaactgtc      1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt      1860
ggctgcatffa aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta      1920
acaccttaata gaacaggtga aaccagtaaa acaaagcaac taguacatga aattgaacac      1980
ctgagacaaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcatgctg      2040
cttategaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgctcccggt ggggaaaaaa      2100
tcatggcaat tetggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctcgca      2160

```

[0031]

ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaaccc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggggtcccca	2280
atlaanttagt aatataatct attaaaggte attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
ccgtctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggcccga tccttgagac	2400
ccctgcccctc ccgcacgatg atcgigccgt gatcgaaate cagatccctg acccgagatt	2460
gcaaacccctc actgatecgc atgcccggtc catacagaag ctggggaac aaacgatgct	2520
cgcctttccag aaaaccgagg atgcgaacca ctcatccgg ggtcagcacc accggaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctctt gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccttagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gtcgtttcgc cagccaggac agaaatgect cgacttctgt gctgccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgfa atgcaagtag cgtatgcgtc caccgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt tttttgggg	2940
tacagtctat gcttcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgcctgggtt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc aggcagtcg cctaaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgaggga agcgggtgac gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta	3120
tegagcgcca tctgaaccg acgttgcttg cgttacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgcgtgttac ggtgaccgta aggettgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaaac ttcggttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgacg	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctgctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgettactg tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtgctgcgc actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagcccggt cactattgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgccg agatcagttg gaagaaattg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtct acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcaat aagcacataa ttgctcacag ccaaaactatc aggtcaagtc	3960
tgtttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggetggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggcctttac taagctgac cgggtgatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggittacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgaact ggaaagcggg cagtgcgcg aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttafgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagt	4380

[0032]

tacctagaga gggtagaagt tgccgaacat gcgcataagt ttcccggaca gatttcaggt	4440
ggtcagcagc aacgcgttgc cattgcgcgt tcgctgtgta tgaagccgaa aattatgttg	4500
tttgatgagc caacgtcggc gctcgatctc gagatgggta aagaggtgct ggatacgatg	4560
attgggctgg cgcagtcggg taigacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca	4620
cgaaccgteg ctgacccggg aatttttatg gatcgtaggg aaatagtgga gcaagctgca	4680
ccatgatgaat tttttgcga tectaaatca gagcgtagca gggcattttt atcgacagga	4740
atccattaat tgaatgttag ttcgaaaagc aaaaaggcca tcttttcgga tggcctttcg	4800
cttgatttga tgtctggcag ttatggcgg gcgtcctgcc cggccacctc cgggccgttg	4860
cttcgcaacg ttcaaatccg gtgacggaag atcacttcgc agaataaata aatcctgggtg	4920
tccctgttga facegggaag ccctgggcca acttttggcg aaaatgagac gttgatcggc	4980
acgtaagagg ttccaacttt caccataatg aaataagatc actaccgggc gtattttttg	5040
agttatcgag attttcagga gctaaggaag ctaaaatgga gaaaaaaatc actggatata	5100
ccaccgttga tatatcccaa tggcatcgta aagaacattt tgaggeattt cagtcagttg	5160
ctcaatgtac ctataaccag accgttcagc tggatattac ggctttttta aagaccgtaa	5220
agaaaaataa gcacaagttt taiccgccct ttattcacat tcttgcccgc ctgatgaatg	5280
ctcatccgga attccgtatg gcaatgaaag acggtgagct ggtgatattg gatagtgttc	5340
acccttgita caccgttttc catgagcaaa ctgaaacgtt ttcatcgctc tggagtgaat	5400
accacgacga tttecggcag ttctacaca tatattcgca agatgtggcg tgttacggtg	5460
aaaacctgge ctatttccct aaagggttta ttgagaatat gtttttcgtc tcagccaatc	5520
cctgggtgag tttaaccagt tttagattaa acgtggccaa tatggacaac ttcttcgccc	5580
ccgttttcac catgggcaaa taftatacgc aaggcgacaa ggtgctgatg ccgctggcga	5640
ttcaggttca tcatgccgtt tgtgatggct tccatgtcgg cagaatgctt aatgaattac	5700
aacagtactg ccatgagttg caggcggggg cgtaattttt ttaaggcagt tattgggtgcc	5760
cttaaacgcc tgggtctacg cctgaataag tgataataag cggatgaatg gcagaaatc	5820
gaaagcaaat tcgaccgggt cgtcggttca gggcagggtc gttaaatagc cgttatgtc	5880
tattgctggt ttantcggta cccggggatc gcggccggcg accggatccc atcacatata	5940
cctgccttgc actattattt agtgaatga gatattatga tattttctga attgtgatta	6000
aaaaggcaac ttatgcccc tgcacacagaa actataaaaa atacagagaa tgaaaagaaa	6060
cagatagatt ttttagttct ttaggcccgt agtetgcaaa tccttttatg attttctatc	6120
aaacaaaaga ggaaaataga ccagttgcaa tccaaacgag agtctaatag aatgaggteg	6180
aaaagtaaat cgcgcgggtt tgitactgat aaagcaggca agaccataaa tggtaaaagg	6240
gcaaagtgtg tactttggcg tcacccctta catattttag gtcttttttt attgtgcgta	6300
actaacttgc catcttcaaa caggagggct ggaagaagca gaccgtaac acagtacata	6360
aaaaaggaga catgaacgat gaacatcaaa aagtttgcaa aacaagcaac agfattaacc	6420
tttactaccg cactgctggc aggagcgca actcaagcgt ttgcgaaaga aacgaaccaa	6480
aagccatata aggaacata cggcatttcc catattacac gccatgatat gctgcaaatc	6540
cctgaacagc aaaaaaatga aaaatataca gttectgaat tcgattcgtc cacaattaaa	6600
aatatctctt ctgcaaaagg cctggacgtt tgggacagct ggccattaca aaacgctgac	6660

[0033]

ggcaetgtcg caaactatca cggetaccac atcgtctttg cattagccgg agatcctaaa	6720
aatgcggatg acacatcgat ttacaigtgc tatcaaaaag tcggcgaaac tictattgac	6780
agetggaaaa acgttgccg cgtcttfaaa gacagcgaca aattcgatgc aaatgattct	6840
atcctaaaag accaaacaca agaattggtca ggttcagcca catttacatc tgacggaaaa	6900
atccgtttat tctacactga tttctccggt aaacattacg gcaaacaaaac actgacaaact	6960
gcacaagtta acgtatcagc atcagacagc tctttgaaca tcaacggtgt agaggattat	7020
aaatcaatct ttgacggtga cggaaaaacg tatcaaaatg tacagcagtt catcgatgaa	7080
ggcaactaca gctcaggcga caaccatacg ctgagagatc ctactacgt agaagataaa	7140
ggccacaaat acttagtatt tgaagcaaac actggaactg aagatggcta ccaaggcgaa	7200
gaatctttat ttaacaaagc atactatggc aaaagcacat cattcttcg tcaagaaagt	7260
caaaaacttc tgcaaacgga taaaaaacgc acggctgagt tagcaaacgg cgtctcgggt	7320
atgattgagc taaacgatga ttacacactg aaaaaagtga tgaaccgct gattgcatct	7380
aacacagtaa cagatgaaat tgaacgcgcg aacgtcttta aaatgaacgg caaatggtac	7440
cigtacacig actccgcgg atcaaaaatg acgattgacg gcattacgtc taacgatatt	7500
tacatgcttg gttatgttct taattcttia actggcccat acaagccgct gaacaaaact	7560
ggccttgtgt taaaaatgga tcttgatcct aacgaigtaa cctttacita ctacacattc	7620
gctgtacctc aagcgaaagg aaacaatgtc gtgattacaa gctatatgac aaacagagga	7680
ttctacgcag acaaacatc aacgtttgcg ccgagcttc tgctgaacat caaaggcaag	7740
aaaacatctg ttgtcaaaag cagcatcctt gaacaaggac aattaacagt taacaaataa	7800
aaacgcacaa gaaaatgcca atatcctatt ggcattttct tttatttctt ccatttaaat	7860
ggatgcatgc gctagcggag tgtatfactg ettactatgt tggcactgat gaggggtgca	7920
gtgaagtgtc tctcccgccg ggaattgtcc tactcgggag agtgttcacc gacaaacaa	7980
agataaaaca aaaggcccg tctccgact gagcctttg tttatttga tgtctggcag	8040
ttccctacac tcgcatgggg agaaccacac ctaccatcgg cgtacggcg gtttcactc	8100
tgagtccgce atggggtcag gtgggaccac cgcgtactg ccgccagaca aattcttttc	8160
taatctgccg aactttaacc taaaaagtgg tgetgatacc cagagtcgaa ctggggacct	8220
caaccctaac aagggtgcgc tctaccaact gagceatate agcacgctaa attgatgcc	8280
tggcagttcc ctactctcgc atggggagac cccacactac categgcgct acggcgttc	8340
actttctagt tcggcatggg gtcagggtgg accaccgcgc tacggccgcc aggcacaaatc	8400
tgttttatea gaccgcttct gcgtttctgt ttaattctga tcaggctgaa aatcttctct	8460
catccggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctcgagc	8520
tcgaattcac tggccgtcgt tttaaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa	8580
cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggccgc	8640
accgatcgcc ctcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgctt gatcggtat	8700
tttctctta cgcactctgt cggatttca caccgcataat ggctcactct cagtacaatc	8760
tgetctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc tgacgaattc	8820

<210> 20

[0034]

<211> 4774
 <212> DNA
 <213> 质粒pCL1921;

<400> 20
 gttgacagta agacgggtaa gcctgttga gataccgctg ctttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaa cagagggcag 120
 gaactgtcga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcc aaaaacgccc 180
 tgagaagccc gtgacgggct ttcttctgtat tatgggtagt ttcttgcac gaatccataa 240
 aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgnaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatggc ggagacaaaa ggaatattca 360
 gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt agggttttaa ggtctgtttt 420
 gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttgtgtaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtagattata cacaggcgct ggatctattc tttttatctt ttttattcti tttttattc 540
 tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta 600
 cagagggtct agcagaattt acaagtttc cagcaaaagt ctacgagaat ttacagatac 660
 ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata 720
 gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtgc taigacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
 gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcacttataa ccaatagct cagatgatga acatcagtag ggaaatgct tatggtgtat 960
 tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta 1020
 aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagegaa aaattagaat 1080
 tagtttttag tgaagagata ttgccttate ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata 1140
 atciggaaca tgttaagtct ttigaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat 1200
 taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat 1260
 ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320
 ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaatg gtggttgata 1380
 agcaggcccg cccgactgat acgttgattt tccaagtta actagataga caaatggatc 1440
 tctgaaccga acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca 1500
 ttacatcaga ttcttaccta cgtaacggac taagaaaaac actacaagat gctttaactg 1560
 caaaaattca gctcaccagt tttagaggca aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg 1620
 atctcaatgg ttctgtctca tggtcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac 1680
 tggttaataa cggaaggatc tgaggttctt atggtctttg tatctatcag tgaagcatca 1740
 agactaaca acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc 1800
 atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt 1860
 ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta 1920
 acacctaata gaacaggta aaccagtaaa acaaaagcaac tagaacatga aattgaacac 1980
 ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgtcg 2040
 cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagfga cgctcccggt ggggaaaaaa 2100

[0035]

tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacg gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggctccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgcctcgc caggctgggt gccaaactct egggtaacat caagcccca tccctggage	2400
ccttgccctc ccgcacgat atcgtgccgt gatcgaaac cagatcctg acccgagtt	2460
gcaaaccctc actgatccgc atgccgttc catacagaag ctggcgcaac aaacgatgct	2520
cgccttcag aaaaccgagg atgcgaacca ctcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcagcg ccgaggtctt ccgatctct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgt gctgccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaacagg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgt caccgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg taacggcgca gtggcggttt tcatggctt ttatgactgt tttttgggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgcctgggt cgaigtgtga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgaggga agcggtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta	3120
tcgagcgcca tctgaaccg acgttgctgg ccgtacatt gtacgctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgcgtgttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagcttfg atcaacgacc ttttgaaac ttcggttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcctgfa gaagtcacca ttgttgtgca cgaagacate attccgtgga	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttcgag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctgctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgttatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgtgcgc actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagcccgat catacttgaa gctagacagg ctatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgteta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggetta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactate aggtcaagtc	3960
tgcctttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaagcttggc tttttcttgt tctgcgaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgac cggtggatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag cctacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttccgact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggccttaca cttaatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc	4380

[0036]

ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgcattgctg 4440
 caggctgact etagaggate cccgggtacc gagctcgaat tcaactggccg tcgttttaca 4500
 acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc 4560
 tttcgccagc tggcgtaata gcgaagagcg ccgcaaccgat cgccttcccc aacagttgcg 4620
 cagcctgaat ggcgaaagcg gccgatgcg gtaatttctc cttaacgale tglcggtat 4680
 ttcacaaccg atatgggtga ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca 4740
 gccccgacac ccgccaacac ccgtgacga attc 4774

<210> 21
 <211> 6432
 <212> DNA
 <213> 质粒pMG27;

<400> 21
 gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
 gaactgtga acagcaaaaa gtcagatagc accaatagc agaccccca taaaagccc 180
 tgagaagccc gtgacgggtt ttcttgiat tatgggtagt ttcttgcgt gaatccataa 240
 aaggcgctg tagtgccatt taccctcatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaataattca 360
 gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt agggttttaa ggtctgtttt 420
 gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttgtgtaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtgagttata cacagggctg ggatctatc tttttatctt tttttattct ttctttatc 540
 tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta 600
 cagaggggtct agcagaattt acaagtttct cagcaagggt ctacagaat ttacagatac 660
 ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agccatctc aattggtata 720
 gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtcgc taigacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
 gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcacttataa ccaatacgtt cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatgggtgat 960
 tagctaaaag aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta 1020
 aaggctttga gatittccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat 1080
 tagtttttag tgaagagata ttgecttate ttttccagtt aaaaaaatc ataaaatata 1140
 atctggaaca tgttaagctt ttigaaaaca aatactctat gaggatttat gattggttat 1200
 taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcataat agagattage cttgatgaat 1260
 ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320
 ttttgaaacc aataagtaaa gatftaaaca ctacagcaa tatgaaattg gtggttgata 1380
 agegagggcg cccgactgat acgttgattt tccaagtga actagataga caaatggatc 1440
 tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca 1500
 ttacatcaga ttcttacctc cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg 1560
 caaaaattca gctcaccagt tttagggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg 1620

[0037]

atctcaatgg ttcgttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacca acaaaagtag aacaactggt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtagcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acaccttaata gaacaggtag aaccagtaaa acaaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgccctccgt ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggctccca	2280
atfaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggctgggt gccaaagtct cgggtaacat caaggccccg tccittggagc	2400
ccttgccttc ccgcacgatg atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgcagtt	2460
gcaaaccttc actgatccgc atgeccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccittccag aaaaccgagg atgcgaacca ctctatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctctt gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgcgctagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gtctgttcgc cagccaggac agaaatgctt cgaacttcgt gtgcccag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcgggtc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgtc cagcgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgaactgt tttttgggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgcgctgggt cgaigtgtga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgagga ageggtgac gccgaagtat cgaactcaact atcagaggta gttggcgctc	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgcttg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgcctgttac ggtgaccgta aggccttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttggaac ttccgcttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcctgta gaagtcacca ttgttggtca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccage taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatgga gcgcaatgae attcttgcag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat ctgtctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggta ggtecagcgg cggaggaaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgtgcgg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg ctatctttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840

[0038]

tagtcggcaa ataattgteta acaatttcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggotta	3900
actcaagcgt tagatgcaet aagcacataa ttgtctacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcittttatt atttttaage gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggetgge tttttcttgi fatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac afecgcatta	4080
aaaictageg agggcctttac taagctgate cgggtggaiga ecttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgaagcg aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt cgggtcgtga tgttgtgtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gacctatgatt acgccaagct tgcattgctg	4440
caggctgacc gttaaateta tcaccgcaag ggataaatat etaacaccgt gcgtgttgac	4500
tattttacct ctggcgttga taatggttgc atgtactaat ctagataagg aatatagcca	4560
tgaccgcacc gattcaggat ctgcgtgatg caattgceet gctgcaacag catgataatc	4620
agtatctgga aaccgateat ccggttgatc cgaatgcaga actggcaggc gtttatcgtc	4680
atattggtgc cgggtgcacc gttaaacgtc cgaccctgat tggctccgca atgatgttta	4740
ataacattaa aggtttatecg cacagccgta ttctggttgg tatgcatgca agccgtcagc	4800
gtgcagcact gctgctgggt tgtgaagcaa gtcagctggc actgggaagt ggtaaacgag	4860
ttaaaaaac ggltgcaccg gltgttgttc cggcaagcag cgcaccgtgt caagagcaga	4920
tttttctggc agatgatecg gattttgatc tgcgtaccct gctgcctgca cataccaata	4980
ccccgattga tgcaggctcg ttttttgtc tgggtctggc cctggcaage gatccggtgg	5040
atgcaagcct gaccgatgtt accattcacc gtctgtgtgt tcagggtcgt gatgaactga	5100
gcattgtect ggcagcaggc cgccatattg aagtttttcg tcagaaagca gaagcagcag	5160
gtaaaccgct gccgattacc attaataagg gtctggaccc agcaatctat attggcgcatt	5220
gttttgaage accgaaccacc ccgtttggtt ataataaact ggggtgttgc ggtgcactgc	5280
gtcagcgtcc ggttgaaact gttcagggtg ttagcgttcc ggaaaaagca attgcacgtg	5340
ccgaatttgt tattgaaggt gaactgcctc ctggtgttcg tgttcgtgaa gatcagcata	5400
ccaattcagg tcatgcaatg ccggaatttc cgggttattg tgggtgtgca aatccgagcc	5460
tgccggttat taaagttaaa gccgttacca tgcgcaataa cgcaattctg caaaccttgg	5520
ttggctcggg tgaagaacat accaccctgg caggtctgcc gaccgaagca agcatttgga	5580
atgcagtiga agcagcaatt ccgggttttc tgcaaaaatgt ttatgccccat accgcaggcg	5640
gtggtaaaatt tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgtca gctgcccgat gaaggctgct	5700
agggtcaggc agccctgctg gcgctggcaa cctatagcga actgaaaaat atcattctgg	5760
tggatgagga tgtggacatt ttgtatagtg atgatatctt gtgggcaatg accaccgcta	5820
tgcagggtga tgttagcatt accaccattc egggtattcg cggtcatcag ctggaccgga	5880
gccagacacc ggaatattca ccgagcattc gtggtaatgg tattagctgc aaaaccatct	5940
ttgattgtac cgttccgtgg gcactgaaaa gccattttga acgtgcaccg ttgcagatg	6000
ttgatecgcg tccgtttgca cctgaatatt ttgcacgtct ggaaaaaat cagggcagcg	6060
caaaataagc taataacagg cctgctggta atcgcaggaa tttttatttg gatggatccc	6120

[0039]

cgggtaccga gctcgaattc actggccgctc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 6180
 ggcgttaccc aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 6240
 gaagaggccc gcaccgatcg ccttcccaa cagttgcgca gccggaatgg cgaatggcgc 6300
 ctgatgcggt attttctcct taecgatctg tgcggtaatt cacaccgat atggtgcaat 6360
 ctcatgacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc 6420
 gctgacgaat tc 6432

<210> 22
 <211> 7294
 <212> DNA
 <213> 质粒pMG31;

<400> 22
 gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtgttcag actggaaaat cagagggcag 120
 gaactgciga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgccta laaacgccc 180
 tgagaagccc gtgacgggct tttcttgat tatgggtagt ttcttgcac gaatccataa 240
 aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatggc ggagacaaaa ggaatattca 360
 gcgatttccc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt aggggtttta ggtctgtttt 420
 gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtgagttata cacagggctg ggaatctatc tttttatctt tttttattct ttctttatcc 540
 tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta 600
 cagagggctc agcagaattt acaagtttc cagcaaaagt ctacgagaat ttacagatac 660
 ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgaat agcccatctc aattggtata 720
 gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatget 840
 gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcacttataa ccaatcagct cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatgggtgat 960
 tagctaaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta 1020
 aaggetttga gattttccag tggacaaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat 1080
 tagtttttag tgaagagata ttgcctatc ttttccagtt aaaaaaatc ataaaaatata 1140
 atctggaaca tgttaagtct ttigaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat 1200
 taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat 1260
 ttaagttcat gtaaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320
 ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca ctacagcaa tatgaaatg gtggttgata 1380
 agcaggcccg cccgactgat acgttgattt tccaagtiga actagataga caaatggatc 1440
 tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca 1500
 ttacatcaga ttctacctc cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg 1560
 caaaaattca gctcaccagt tttagggcaa aatttttagg tgacatgcaa agtaagcatg 1620
 atctcaatgg ttgtttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac 1680

[0040]

tggetaaata cggaaggatc fgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatea	1740
agactaacia acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaagg aaaactgtcc	1800
ataigcacag atgaaaacgg fgiaaaaaag afagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggigcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctaaata gaacaggatga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacaatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gccatgaaaca ggcatgtctg	2040
cttategaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgctctccgt ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggggtccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggic attcaaaagg tateccaccg gatcaattcc	2340
ccctgctcgc caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggcccg tctttggagc	2400
ccctgcccct ccgcacgatg atcgtgcctg gatcgaaatc cagatccttg acccgagtt	2460
gcaaacctct actgatccgc atgcccgctc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgctctccag aaaaccgagg atcggaacca ctctatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccttagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
getcgttgc cagccaggac agaaatgcct cgacttgcct gctgcccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcct cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg taaccggcga gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgggg	2940
tacagtctat gctcgggca tccaagcagc aagcgcgta cgcctgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cageaacgat gttacgcagc agggcagtcg cctaaaaa aagttaaaca	3060
tcatgagga agcggigatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtca	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgcctg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
cgggcctgaa gccacacagt gatattgatt tctgtgttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttgtgaaac ttcggttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgtgta gaagtcacca ttgttgtgca cgaagacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatgca gcgcaatgac attcttgacg	3420
gtatcttga gccagccacg atcgacaatt atctggetat ctgtctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaaact ctgtgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagccctg catacttgaa gctagacagg ctatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaceaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggctta	3900

[0041]

actcaagegt tagatgcaact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcctttatc atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggetggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagcigatc cgggtggaiga ccttttgaat gaactttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggteccc ttttttatii taaaaatfff	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacggttg ccgattcatt aatgcagctg gcacgcaggg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgcatttgac	4440
gacagctatg gttcactgtc caccaaccaa aactgtgtct agtaccgcca atattttctc	4500
cttgagggggt acaaaagaggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttacaaa	4560
aaggtatiga ctttccctac aggggtgta ataatttaat tacaggcggg ggcaaccccc	4620
cctgttctgc agaggaggaa tatagccatg gaagtgaana tcttcaaac ccaggatgtt	4680
caggatttct tgcgtgttgc aagcgtctg gaacaagagg gtggtatcc gcgtgttaaa	4740
caaattatc atcgtgttct gagcgacctg tataaagcaa ttgaagatct gaatatcacc	4800
agcgacgaat attgggcagg cgttgcatat ctgaatcagc tgggtgcaaa tcaagaagca	4860
ggctctgctg gtccgggtct gggttttgat cattatctgg atatgcgtat ggatgcagaa	4920
gatgcagcac tgggtattga aaatgcaaca ccgcgtacca ttgaaggicc gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac cggaaagcgt tggttatgca cgcattgatg atggtagcga tccgaatggt	5040
cataccctga ttctgcatgg caccattttt gatgcagatg gtaaacgcct gccgaatgca	5100
aaagttagaaa ttggcatgc aaacaccaaa ggcttttata gccattttga tccgaccggt	5160
gaacagcagg cctttaatat gcgtcgtagc attattaccg atgagaatgg tcagtatcgt	5220
gttctgacca ttctgccgc cggttatggt tgcctccgg aaggtccgac ccagcaactg	5280
ctgaaccaac tgggtcgtca tggtaatcgt ccggcacata ttcattatct tgttagcgca	5340
gatgtgcacc gtaaacgtac caccagatt aatgttgccg gtgatccgta tacctatgat	5400
gattttgcat atgccaccg tgaaggtctg gttgttgatg cagttgaaca taccgatccg	5460
gaagcaatta aagccaatga tgtggaaggt ccttttgccg aaatggtgtt tgatctgaaa	5520
ctgacccgct tgggtgatgg tgtigataat caggttgtgg atcgtccgcg tetggcagtt	5580
taatacacca aaatggttca aaattatcag gcgagtatc atgatcactg gccgtgtttt	5640
atttcaggga aggggtggaga caattacgtg gataatcaga tcatccaaga aaccgtggat	5700
aaaattctga gcgttctgcc gaatcaggca ggtcagctgg cagctctggt gcgtctgatg	5760
caatttgeat gcgaccgac cattaccgtt attggcaaat ataaccatgg taaaagccgt	5820
ctgctgaatg aacigattgg caccgatatc tttagcgttg cagataaacg tgaaccatt	5880
cagctggccc aacataaaca ggatcaggtt cgttgcttgg atgcacctg tetggatgcc	5940
gatgttgca cagttgatga tcgtcatgca ttgaagcag ttgggacca ggcagatatt	6000
cgtctgtttg ttcatagegt tcgtgaaggt gaactggatg caaccgaaca ccatctgctg	6060
caacagctga ttgaagatgc cgatcatage cgtcgtcaga ccattctggt tetgacccag	6120
attgatcaga ttccggatca gaccatcctg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag	6180

[0042]

```

gttcgaaac tggatatttg ggcagttagc gcaaccgcte atcgtcaggc cattgaaac 6240
ggtaaaaccc tgcctgacga aaaaagcggc atgggtgcac tgcgccatac cctggaacag 6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaaa atcgctctgt gtcagatctg 6360
caecatcagc tgaacaact gctgctggat cagaaacatg ttcigcaaca actgcaacag 6420
acacagcaac agcagctgca tgattttgat accggctcga ttaacattct ggacaaaatt 6480
cgtgttgatc tggaaaccgt tctgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccggat 6540
agctttgcaa ccatgtttaa aaacaccgca gcaaaacagc agcgtgccaa agttcagatt 6600
gcataatgcc gtgcattgat tgaaatcaac agccatctga ttcccatggg tttgtttgtt 6660
ctgcctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgattgt tgccgtgttt 6720
ggatcagcgg ttaaatctcg tgatcagctg cgtgccctgt ttataaccga taccgaacgt 6780
cagcgtctgc aacgtgaatt tcttttctat ttgaaaaaa gtcccggtcg catgattctg 6840
gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggctgta ttcagaatgc catgatggca 6900
ctgcaaaaaa tggaaagcgc agcataaaaa caccgaagcc gcaaacggcg tccgaatttc 6960
ttggtcgact ctagaggatc cccgggtacc gagctcgaat tcactggccg tctttttaca 7020
acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggtac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc 7080
tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgccttccc aacagttgcg 7140
cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcacg tgtcgggtat 7200
ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca 7260
gccccgacac ccgccaacac ccgtgacga attc 7294

```

<210> 23
 <211> 8952
 <212> DNA
 <213> 质粒pMG33;

```

<400> 23
gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
agttctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcca taaaacgccc 180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgat tatgggtagt ttcttgcac gaatccataa 240
aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgaiggtc ggagacaaaa ggaatattca 360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt agggttttta ggctctgttt 420
gtagaggagc aaacagcggt tgcgacatcc ttttgtaata ctgcggaact gactaaagta 480
gtgagttata cacagggctg ggaatctatt tttttatctt tttttattct tcttttatte 540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta 600
cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaagg ctagcagaat ttacagatac 660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata 720
gtgatfataa tcacctagac caattgagat gtatgtciga attagttgtt tcaaaagcaa 780
atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900

```

[0043]

tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaatgct tatggtgtat	960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaaat ccttttggtta	1020
aaggttttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttacc ttttccagtt aaaaaaatc ataaaatata	1140
atctggaaca tgttaagtct ttgaaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaagctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagtga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttcttacctt cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttagggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttctgttctt tggctcagc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cgggaaggatc tgaggttctt atggtctttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacia acaaaagtag aacaactggt caccgttaga tatcaaaagg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acaccttaata gaacagggtg aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaa cttgttacag tcaacagtca cacatagaca gectgaaaca ggcatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctcccg ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgtttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggggtccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
ectgtctgag caggttgggt gccaaactct cgggtaaact caaggcccg tcttgggagc	2400
ccttgccttc cgcacgatg atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgagtt	2460
gcaaaccttc actgatecgc atgccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgctttccag gaaaccgagg atgcgaacca ctctatccgg ggtcagcacc accggaagc	2580
gcccgcagcg ccgaggtctt ccgatctctt gaagccaggc cagatccgtg cacagcaect	2640
tgccttagaa gaacagcaag gccccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttctgt gctgccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gggaaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgtt cagcaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggttg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttggg	2940
tacagtctat gcttcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgcctgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc aggcagtcg ccttaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgaggga agcggtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtca	3120

[0044]

tctgagcgcca tctcgaaccg acgtttcttg cctacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tcttggttac ggtgaaccga aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagcttfg atcaacgacc ttttgaaaac ttcggtctcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcctgta gaagtcacca ttgtttgtca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccnag taagcgcga ctgcaatttg gagaatggca gcgaatgac attcttgcag	3420
gtatcttcca gccagccacg atcgacattg atctggctat ctgtctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggta ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgia gtgcttacgt tctcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgccctg ccggcccagt	3720
atcagcccgat catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
ctctcgctgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaagcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtct acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgag gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcagc ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaagcctgga tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgacg cgggtggatga ccttttgaat gaccttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac gggttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagita gctcactcat	4320
taggcacccc aggttttaca ctttatgctt ccggtctgta tgttgtgttg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gacctgatt acgccaagct tgcatttgac	4440
gacagctatg gttcactgct caccacccaa aactgtgctc agtaccgcca atatttctcc	4500
cttgaggggat acaaaagggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttacaaa	4560
aaggtattga ctttccctac aggggtgtga ataatttaatt tacaggcggg ggcaaccccc	4620
cctgttctgc agaggaggaa tatagccatg gaagtgaana tcttcaacac ccaggatgtt	4680
caggatttct tgcgtgttgc aagcggctct gaacaagagg gtggtaatec gcgtgtttaa	4740
caaatatttc atcgtgttct gagcgacctg tataaagcaa ttgaagatct gaafatcacc	4800
agcgacgaat attgggcagg cgttgcatat ctgaatcage tgggtgcaaa tcaagaagca	4860
ggtctgctga gtccgggtct gggttttgat cattacttgg atatgcgtat ggatgcagaa	4920
gatgcagcac tgggtattga aatgcaaca ccgcgtacca ttgaaggfcc gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac cggaaagcgt tggttatgca cgcattgatg atggtagcga tccgaatggt	5040
cataccctga ttctgcatgg caccattttt gatgcagatg gtaaacccgt gccgaatgca	5100
aaagtigaaa ttggtcatgc aaacacccaa ggtttttata gccattttga tccgaccggt	5160
gaacagcagg cctttaatat gcgtcgtagc attattaccg atgagaatgg tcagtatcgt	5220
gttctacca ttctgcctgc cggttatggt tctctcccg aaggctccag ccagcaactg	5280
ctgaaccaac tgggtcgtca tggtaatcgt ccggcacata ttcattattt tgttagcgca	5340
gatggtcacc gtaaaactgac caccagatt aatgttgcg gtgatccgta tacctatgat	5400

[0045]

```

gattttgcat atgccaaccg tgaaggctcg gttgttgatg cagttgaaca taccgatecg 5460
gaagcaatta aagccaatga tgtggaaggt ccttttgccg aaatgggtgt tgatctgaaa 5520
ctgacccegtc tgggttgatgg tgggtgataat caggttggtg atcgcccgcg tctggcagtt 5580
taatacaacca aaatggttca aaattatcag gcgagtgatc atgatcactg gccgtgtttt 5640
atttcaggga aggggtggaga caattacgtg gataatcaga tcatccaaga aaccgtggat 5700
aaaattctga gegtctgcc gaatcaggca ggtcagctgg cacgtctggt gcgtctgatg 5760
caatttgcac gcgatccgac cattaccgtt attgcaaat ataacctgg taaaagccgt 5820
ctgctgaatg aactgattgg caccgataac tttagcgttg cagataaacg tgaaccatt 5880
cagctggccg aacataaaca ggatcagggt cgttggtctg atgcacctg tctggatgcc 5940
gaigtgcag cagttgaiga tgcgtatgca ttgaagcag ttggacca ggcagatatt 6000
cgctgtttg ttcatacgct tgcgtgaagg gaactggatg caaccgaaca ccatctgctg 6060
caacagctga ttgaagatgc cgtatcatgc cgtcgtcaga ccattctggt tctgaccag 6120
attgatcaga ttcggatca gaccatccg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag 6180
gttccgaaac tggatatttg ggcagttagc gcaaccctgc atcgtcaggg cattgaaaac 6240
ggtaaaacc tgcgtatcga aaaaagcgtt attggtgcac tgcgccatac cctggaacag 6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaa atcgctctgt gtcagatctg 6360
caccatcagc tgaacaact gctgtggat cagaaacatg ttctgcaaca actgcaacag 6420
acacagcaac agcagctgca tgatttgat accggtctga ttaacattct ggacaaaatt 6480
cgtgttgatc tggaaaccgt tgtgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccggt 6540
agctttgcaa ccaigttaa aaacaccgca gcaaacacgc agcgtgcaa agttcagatt 6600
gcatafatgc gtgcattcat tgaatcaac agccatctga ttccgcatgg tgtgtgtgt 6660
ctgcctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgattgt tgcctgttt 6720
ggatcagcgc ttaaatctg tgcagctg cgtgccctgt ttataaccg taccgaacgt 6780
cagcgtctgc aacgtgaatt tcgtttctat ttgaaaaa gtgccggtcg catgattctg 6840
gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggtctga ttcagaatgc catgatgga 6900
ctgcaacaaa tggaaagcgc agcataaaaa caccgacgcc gcaaacggcg tccgaatttc 6960
ttggctgacc gttaaattca tcaccgcaag ggataaatat ctaacaccgt gcgtgttgac 7020
tattttacct ctggcgggtg taatgggtgc atgtactaat ctgataagg aatatagcca 7080
tgaccgcacc gattcaggat ctgcgtgat caattgccct gctcaacag catgataatc 7140
agtatctgga aaccgatcat ccggttgatc cgaatgcaga actggcagcg gttatctgc 7200
atatgtgtgc cgggtgcacc gttaaacgtc cagccgttat tggtcggca atgatgttta 7260
ataacattaa aggtatccg cacagccgta ttctggttgg tatgcatgca agccgtcagc 7320
gtgcagcact gctgctgggt tgtgaagcaa gtcagctggc actggaagtt ggtaaagcag 7380
ttaaaaaacc ggttgcaacc gtggtgtgtc cggcaagcag cgcaccgtgt caagagcaga 7440
ttttctggc agatgacccg gatttgatc tgcgtacct gctccctgca cataccaata 7500
ccccgattga tgcaggtccg ttttttgtc tgggtctggc cctggcaagc gatccggtgg 7560
atgcaagcct gaccgatgtt accattcacc gtcgtgtgt tccaggtcgt gatgaactga 7620

```

[0046]

gcattgttcc tggcagcaggt cgccatattg aagtttttcg tcagaaagca gaagcagcag 7680
 gtaaaccgct gccgattacc attaatatgg gtcigggacc agcaatctat attggcgcat 7740
 gttttgaagc accgaccacc cggtttggtt ataatgaact ggggtgttgc ggtgcactgc 7800
 gtcagcgfco gggtgaactg gttcagggtg ttagcggtcc ggaaaaagca attgcacgtg 7860
 ccgaaattgt tattgaaggt gaactgcfcg ctgggtgttc tggtcgtgaa gatcagcata 7920
 ccaattcagg tcatgcaatg ccggaatttc cgggttattg tgggtgtgca aatccgagcc 7980
 tgcgggttat taaagtiaaa gccgttacca tgcgcaataa cgcaattctg caaaccttgg 8040
 ttggtccggg tgaagaacat accaccctgg caggctctgc gaccgaagca agcatttggg 8100
 atgcagttga agcagcaatt cgggttttc tgcaaatgt ttatgccc atccgaggcg 8160
 gtggtaaatt tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgtca gccgtccgat gaaggtcgtc 8220
 agggtcagcc agccctgctg gcgttgga cctatagcga actgaaaa atcattctgg 8280
 tggatgagga tgggacatt ttgatagtg atgataattc gtgggcaatg accaccgta 8340
 tgcagggtga tggtagcatt accaccattc cgggtattcg cggctatcag ctggaccga 8400
 gccagacacc ggaatattca ccgagcatte gtgtaattg tattagctgc aaaaccatct 8460
 ttgattgtac cgttccgtgg gcactgaaaa gccatttga acgtgcaccg ttgacagatg 8520
 ttgatccgcg tccgtttgca cctgaatatt ttgcacgtct ggaaaaaat cagggcagcg 8580
 caaaaataagc taataacagg ctgctggta atcgaggaa ttttatttg gatggatccc 8640
 cgggtaccga gcctgaattc actggcgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaacctt 8700
 gggttaccc aacttaatcg ccttgacga catccccctt tgcacagctg gegttaatagc 8760
 gaagaggccc gcaccgatcg ccttcccaa cagtgcgca gccgaatgg cgaatggcgc 8820
 ctgatcggtt atttctctt tacgcatctg tgcggtattt cacaccgat atgggtcact 8880
 ctcatgacaa tctgtctga tgcgcatag ttaagccagc cccgacccc gccaacccc 8940
 gctgacgaat tc 8952

<210> 24
 <211> 10630
 <212> DNA
 <213> 质粒pMG37;

<400> 24
 gttgacagta agacgggtaa gccgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcag ggataatccg aagtggtagc actggaaaat cagagggcag 120
 gaactgtgta acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgccca taaaacgccc 180
 tgagaagccc gtgacgggtt ttctttgtat tatgggtagt ttcttgcgt gaatccataa 240
 aaggcgcttg tagtgccatt taccctcatt caetgcccga gccgtgagcg cagcgaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca 360
 gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt agggttttaa ggtctgtttt 420
 gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtgagttata cacagggtcg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc 540
 tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta 600
 cagagggtct agcagaattt acaagtttcc cagcaaaagg ctagcagaat ttacagatac 660

[0047]

ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aatttggtata	720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagtgttt ttcaaagcaa	780
atgaacttagc gattagtgcg tatgaactta cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt	900
tcacttataa ccaatacgcg cagatgaiga acatcagtag ggaaatget tatgggttat	960
tagctaaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactglgga aatcaggaal cctlllggta	1020
aaggctttga gattttccag tggacaaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttate tttccagtt aaaaaaattc ataaaatata	1140
atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagtctat gttaatgett gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttltgaaacc aataagtaaa galitaaaca ctacagcaa tatgaaatlg gllgttgata	1380
agcgagcgcg ccgactgat acgttgattt tccaagtga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttagggcaa aatttttag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttctgtctca tggtcacgc aaaaacaacg aaccacata gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggccttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaaca acaadagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atctgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acaccttaata gaacaggtag aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagecagtag cgctcccggt ggggaaaaaa	2100
tcattgcaat tctggaagaa atagcgttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgega	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgittgc ggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgaataac gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggttcccc	2280
attaattagt aatataatct attaaaggte attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgtcgcg caggctgggt gccaaagctt cgggtaacat caaggcccg tccctggagc	2400
ccttgccctc ccgcacgat atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgagtt	2460
gcaaaccttc actgatccgc atgcccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgcttccag aaaaccgagg atgcgaacca ctcatccgg ggtcagcacc accggcaage	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctctt gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgcctagtaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgctt cgacttcgct gctgccccag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaacagg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cagcgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttggg	2940

[0048]

tacagtctat	gcctcgggca	tccaagcagc	aagcgcgtta	cgccgtgggt	cgatgtttga	3000
tgttatggag	cagcaacgat	gttacgcagc	agggcagtcg	ccctaaaaca	aagttaaaca	3060
tcatgagggg	agcgggtgac	gccgaagtat	cgactcaact	atcagaggta	gttggcgtca	3120
tcgagcgcca	tctcgaaccg	acgttgcctg	ccgtacattt	gtacggctcc	gcagtggatg	3180
gcggccctgaa	gccacacagt	gatattgatt	tgcctgttac	ggtagccgta	aggettgtatg	3240
aaacaacgcg	gegagctttg	atcaacgacc	ttttggaaac	ttcggttcc	cctggagaga	3300
gcgagattct	ccgcgctgta	gaagtcacca	ttgttgtgca	cgacgacatc	attccgtggc	3360
gttatccagc	taagcgcgaa	ctgcaatttg	gagaatggca	gcgcaatgac	attcttgcag	3420
gtatcttcga	gccagccacg	atcgacattg	atctggctat	cttgcctgaca	aaagcaagag	3480
aacatagcgt	tgccittgta	ggccagcgg	cggaggaaact	ctttgatccg	gttcctgaac	3540
aggatctatt	tgaggcgcta	aatgaaacct	taacgctatg	gaactcgcg	cccgactggg	3600
ctggcgatga	gcgaaatgta	gtgcttacgt	tgtcccgcat	ttgttacage	gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc	gccgaaggat	gtcgcgcgcg	actgggcaat	ggagcgcctg	ccggcccagt	3720
atcagccctg	catacttgaa	gctagacagg	cttatcttgg	acaagaagaa	gatcgccttg	3780
ccfcgcgcgc	agatcagttg	gaagaatttg	tccactacgt	gaaaggcgag	atcaccaagg	3840
tagtcggcaa	ataatgtcta	acaaticgtt	caagccgacg	ccgcttcgcg	gcgcggctta	3900
actcaagcgt	tagatgcact	aagcacataa	ttgctcacag	ccaaactatc	aggtaagtc	3960
tgcttttatt	atttttaagc	gtgcataata	agccctacac	aaattgggag	atatatcatg	4020
aaaggctggc	tttttcttgt	tatcgcaata	gttggcgaag	taatcgcaac	atccgcatta	4080
aaatctagcg	agggctttac	taagctgac	cggctggatga	ccctttgaat	gacctttaat	4140
agattatatt	actaattaat	tggggacctt	agaggcccc	ttttttattt	taaaaatttt	4200
ttcacaaaac	ggtttacaag	catacgttgg	ccgattcatt	aatgcagctg	gcacgacagg	4260
tttccgact	ggaaagcggg	cagtgcgcgc	aacgcaatta	atgtgagtta	gtcactcat	4320
taggcacccc	aggctttaca	ctttatgctt	ccggctcgta	tgttgtgtgg	aattgtgagc	4380
ggataacaat	ttcacacagg	aaacagctat	gacctgatt	acgccaagct	tgtatttgac	4440
gacagctatg	gttactgtc	caccaaccaa	aactgtgctc	agtaccgcca	atatttctcc	4500
cttgaggggt	acaaagaggt	gtccctagaa	gagatccacg	ctgtgtaaaa	attttacaaa	4560
aaggatttga	ctttccctac	agggtgtgta	ataatttaat	tacaggcggg	ggcaaccctg	4620
cctgttctgc	agaggaggaa	tatagccatg	gaagtgaana	ttttcaacac	ccaggatgtt	4680
caggattttc	tgcgtgttgc	aagcggctct	gaacaagagg	gttgtaatcc	gcgtgttaaa	4740
caaattattc	atcgtgttct	gagcgacctg	tataaagcaa	ttgaagatct	gaatatcacc	4800
agcgacgaat	attgggcagg	cgttgcatat	ctgaatcagc	tgggtgcaaa	tcaagaagca	4860
ggtctgctga	gtccgggtct	gggttttgat	cattatcttg	atatgcgtat	ggatgcagaa	4920
gatgcagcac	tgggtattga	aatgcaaca	ccgcgtacca	ttgaaggtcc	gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac	cggaaagcgt	tgtttatgca	cgcattggatg	atggtagcga	tccgaatggt	5040
cataccctga	ttctgcatgg	cacctttttt	gatgcagatg	gtaaaccgct	gccgaatgca	5100
aaagttgaaa	tttggcatgc	aaacacaaaa	ggcttttata	gccattttga	tccgaccggt	5160

[0049]

gaacagcagg cctttaatat gcgtcgtage attattaccg atgagaatgg tcagtatcgt	5220
gttcgtacca ttctgcctgc cggttatggt tgctctccgg aaggtccgac ccagcaactg	5280
ctgaaccaac tgggtcgtea tggtaatcgt ccggcacata ttcatatttt tgttagcgca	5340
gatggtcacc gtaaaactgac caccacagatt aatgttgcgg gtgatccgta tacctatgat	5400
gattttgcat atgccacccg tgaaggctg gttgttgatg cagtigaaca taccgatccg	5460
gaagcaatta aagccaatga tgtggaaggt ccttttgcgg aaatggtgtt tgatctgaaa	5520
ctgacccgtc tggttgatgg tgttgataat cagggttggtg atcgtccggc tctggcagtt	5580
taatacacca aaatgggtca aaattatcag gcgagtgc atgatcactg gcctgttttt	5640
atttcaggga aggggtggaga caattacgtg gataatcaga tcatccaaga aaccgtggat	5700
aaaattctga gcgttctgcc gaatcaggca ggtcagctgg cacgtctggt gcgtctgatg	5760
caatttgcac gcgatccgac cattaccgtt attggtcaat ataaccatgg taaaagccgt	5820
ctgctgaatg aactgattgg caccgatate tttagcgttg cagataaacg tgaaccattt	5880
cagctggccg aacataaaca ggaicagggt cgttgctgg atgcaccitg tctggatgcc	5940
gatgttgcag cagttgatga tcgtcatgca ttigaagcag tttggaacca ggcagatatt	6000
cgtctgtttg ttcatagcgt tcgtgaaggt gaactggatg caaccgaaca ccatctgctg	6060
caacagctga ttgaagatgc ccatcatagc cgtcgtcaga ccattctggt tctgaccag	6120
attgatcaga ttccggatca gaccatcctg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag	6180
gttccgaaac tggatatttg ggcagttagc gcaaccgcgc atcgtcaggc cattgaaaac	6240
ggtaaaaccc tgcctgatga aaaaageggt attggtgcac tgcgccatac cctggaacag	6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaaa atcgtctgct gtcagatctg	6360
caccatcagc tgaacaacct gcctcaggat cagaaacatg ttctgcaaca actgcaacag	6420
acacagcaac agcagctgca tgattttgat accggctcga ttaacattct ggacaaaatt	6480
cgtgttgatc tggaaaccga tgtgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccggat	6540
agctttgcaa ccatgtttaa aaacaccgca gcaaaacagc agcgtgccaa agttcagatt	6600
gcatatagcc gtgcattgat tgaatcaac agccatctga ttccgcatgg tgtgttggt	6660
ctgectgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgatgtt tgccgtgttt	6720
ggatcagcgg ttaaatttct gatcagctg cgtgccctgt ttataaccga taccgaacgt	6780
cagcgtctgc aacgtgaatt tcgtttctat ttigaaaaaa gtgccggctg catgattctg	6840
gcagcaaaaa tgaacagac catgcgtcag cagggtctga ttcagaaatg catgatggca	6900
ctgcaacaaa tggaaagcgc agcataaaaa caeggagcgc gcaaacggcg tccgaatttc	6960
ttggctgacc gttaaatcta tcaccgcaag ggataaatat ctaaacaccg gcgtgttgac	7020
tattttacct ctggcgggtg taatggttgc atgtactaat ctagataagg aatataacca	7080
tgaccgcacc gattcaggat ctgcgtgatg caattgccct gctgcaacag catgataatc	7140
agtatctgga nacgatcat ccggttgatc cgaatgcaga actggcaggc gtttatcgtc	7200
atatttggtg ccgttggaac gttaaacgic cgaccctgat tggtecgga atgaigtta	7260
ataacattaa aggttatccg cacagcgtg ttctggttgg tatgcatgca agccgtcage	7320
gtgcagcact gctgctgggt tgtgaagcaa gtcagctggc actggaagtt ggtaaagcag	7380
ttaaaaaacc ggttgacccg gtggttggtc cggaagcag cgcaccgtgt caagagcaga	7440

[0050]

```

ttttctggc agatgatecg gatittgate tgcgtaccct gctgcctgca cataccaata 7500
ccccgattga tgcaggtcgg tttttttgtc tgggtctggc cctggcaagc gatccggtgg 7560
atgcaagcct gaccgatgtt accatcatic gctctgtgtg tcagggtcgt gatgaactga 7620
gcatgttctt ggcagcaggt cgccatattg aagtttttcg tcagaaaagc gaagcagcag 7680
gtaaaccgct gccgattacc attaatatgg gctctggacc agcaatctat attggcgcgt 7740
gttttgaagc accgaccacc ccgttttggt ataataaact ggggtgttgc ggtgcactgc 7800
gtcagcgtcc ggttgaactg gttcagggtg ttagecgttc ggaaaaagc attgcacgtg 7860
ccgaaattgt tattgaaggt gaactgctgc ctggtgttcg gtctcgtgaa gatcagcata 7920
ccaattcagg tcatgcaatg ccggaatttc cgggttattg tgggtgtgca aatccgagcc 7980
tgccggttat faaagttaaa gccgttacca tgcgcaataa cgeaatctcg caaacctcgg 8040
ttggtccggg tgaagaacat accaccctgg caggctctgc gaccgaagc agcatttggg 8100
atgcagttga agcagcaatt ccgggttttc tgcataatgt ttatgcccat accgcagcgg 8160
gtggtaaat tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgta gctgcgat gaaggtcgtc 8220
agggtcaggc agccctcgtg gcgtcggcaa cctatagcga actgaaaaat atcattctgg 8280
tggatgagga tgtggacatt ttgatagtg atgatatctt gtggcaatg accaccgtg 8340
tgcagggtga tgttagcatt accaccattc cgggtattcg cggtcacag ctggaccgca 8400
gccagacacc ggaatattca ccgagcattc gtggtaatgg tattagctgc aaaaccatct 8460
ttgattgtac cgttcctgg gcactgaaaa gccattttga acgtgcaccg ttgacagatg 8520
ttgatccgcg tccgtttgca ctgcaatatt ttgcacgtct ggaaaaaaat cagggcagcg 8580
caaaataagc taataacagg cctgcctgta atcgcaggaa tttttatttg gatggatccg 8640
cctacctage ttccaagaaa gatatactaa cagcacaaga geggaagat gttttgttct 8700
acatccagaa caacctctgc taaaattcct gaaaaatitt gcaaaaagti gttgacitta 8760
tctacaaggt gtgttataat aatcttaaca acagcaggac gtcccggtg tgaggaaaac 8820
ctaataaagc tgaccagcct gcgtgttagc ctgctggcac tgggtctggt taccagcggt 8880
tttgacgagc cagaaacctt taccgtgat cgttatcagg atgatagcga aaaaggtagc 8940
ctgcgttggg caattgaaca gagcaatgca aatagcgac aagaaaacca gattctgatt 9000
caggcagttg gtaaaagcacc gatgttatc aaagttgata aaccgctgcc tccgattaaa 9060
agcagcgtta aatcatttgg caccgagttg gataaaaccg gtgaatttat tgcaattgat 9120
ggcagcaact atatcaaagg cgaaggtgaa aaagcatgtc cgggtgcaaa tccgggtcag 9180
tatggcacca atgttcgtac catgacctg cctggtctgg ttctgcaaga tgtaaatggt 9240
gttacctga aaggtctgga tgttcacgtt tttgtattg gtgtctggt taatcgcagc 9300
agcaataacc tgattcagca taatcgtatc agcaacaatt atgggtggtc cgggtgttatg 9360
attaccggtg atgatggtaa aggtaatccg accagcaca ccaccaataa taacaaagtt 9420
ctggataacg tgttcacgca taatggtgat ggtctggaac tgaccctggg tgcagcattt 9480
aatctgattg caaataacct gtttaccagc acaaaagcca atccggaacc gagccaggtt 9540
attgaaatte tgtggggtaa tgataatgcc gtggtgggtg acaaatctga aaactattca 9600
gatggcctgc aatcaattg gggtaaacgt aactatatcg cctataacga actgaccaat 9660

```

[0051]

```

aacagcctgg gtttcaatct gacaggtagt ggtaacattt tcgacagcaa taaagtgcatt 9720
ggtaaccgta ttggtattgc cattcgtagt gaaaaagatg ccaatgcacg tattaccctg 9780
accaaaaatc agatttggga taacggcaaa gatatacaac gttgtgaage cgggtggtage 9840
tgtgttccga atcagcgtct ggggtgcaatt gtttttgggt ttccggcact ggaacatgaa 9900
ggttttgttg gtagecgtgg cgggtggtgtt gttattgaac cggcaaaact gcaaaaaacc 9960
tgcaccagc cgaaccagca gaattgtaat gcaattceta atcagggtat tcaggcaccg 10020
aaactgacag ttagcaaaaa acagctgacc gttgaagtta aaggcacecc taatcagcgt 10080
tataatgtgg aatttttttg caatcgtaat gccagcagca gegaagcaga acagtatctg 10140
ggtagcattg ttgttgttac cgatcatcag ggtctggcaa aagcaaatg ggctccgaaa 10200
gttagcatgc cgagcgttac cgcaaatgtg acagatcacc tgggtgcgac cagcgaactg 10260
agcagcgcag ttaaaatgcg ttaaatgcat gcgcgcgcgc ttgcgcgcgc gctttttttt 10320
ggtagcgagc tcgaattcac tggccgtcgt ttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 10380
cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga 10440
agaggccgc accgatcgcc ctteccaaca gtgcgcgcgc ctgaatggcg aatggcgccct 10500
gatgcggtat ttctcctta cgcactctgt cggattttca caccgcatat ggtgcactct 10560
cagtacaate tgctcigatg ccgatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc 10620
tgacgaattc 10630

```

<210> 25
 <211> 6452
 <212> DNA
 <213> 质粒pMG39;

```

<400> 25
gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcaattagcc 60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcc aaaaacgccc 180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttcccttgcatt gaatccataa 240
aaggcgctg tagtgccatt tacccccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggc ggagacaaaa ggaatatcca 360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt aggggttttaa ggctcgtttt 420
gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttctaata ctgcggaact gactaaaagta 480
gtgagttata cacagggtg ggatctatc tttttatctt tttttattct ttctttatcc 540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta 600
cagagggtct agcagaattt acaagttttc cagcaaaagg ctagcagaat ttacagatac 660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgaet agcccatctc aattgggtata 720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagtgtt ttcaaagcaa 780
atgaactage gattagtgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
gtgtggcaet actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
tcacttataa ccaatagct cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat 960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta 1020

```

[0052]

aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttata ttttccagtt aaaaaaatc ataaaatata	1140
atctggaaca tgttaagtct ttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcataat agagattage cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat acgittgatt tccaagtiga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatggaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttcttaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaecagt tttagaggca aatttttag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttctttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggtctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaaca acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgicc	1800
afatgcacag atgaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctaata gaacagggtg aaccagtaaa acaaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgctcccgt ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gccggtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gtittgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggggtcccca	2280
attaatagat aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatecaccc gateaatccc	2340
cctgctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggcccca tccttgagc	2400
ccttgccttc ccgcacgatg atcgtgccgt gategaaatc cagatccttg accgcagtt	2460
gcaaaccttc actgatccgc atgccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccttcag aaaaccgagg atgcgaacca ctcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaacgg atgaaggcac gaaeccatg gacataagcc tglcgggtc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatcgct caccgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtag taaeggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt tttttgggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgta cgcctgggt ccatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gtacgcagc aggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgaggga agcgggtgat gccgaagtat cgaetcaact atcagaggta gttggcgtea	3120
tcgagcgcca tctgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggccigaa gccacacagt gatattgatt tgcgtgttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaac ttcggttcc cctggagaga	3300

[0053]

gcgagattct cgcgctgta gaagtcacca ttgttggtga cgaagacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgcag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat ctigtgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgcgc cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgcctccgat ttgttacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtgcgtgccg actgggcaat ggagcgcctg ccggcccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg ctatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
ccctgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtct acaattcggt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggccta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgtttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatateatg	4020
aaagcctgge tttttcttgt tatcgcaata gttagcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggccttac taagctgac cgggtgatga cttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgaact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggetttaca ctttatgctt ccggtcgtga tgttggtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttacacacagg aaacagctat gacctgatt acgccaagct tgcattgctg	4440
caggctgact cttagaggat cgcctacctg gcttccaaga aagatatcct aacagcacia	4500
gagcggaaag atgttttgtt ctacatccag aacaacctct gctaaaattc ctgaaaaatt	4560
ttgcaaaaag ttgttgactt tatctacaag gtgtggtata ataattctaa caacagcagg	4620
acgtccccgg gttgaggaaa acctaatgaa actgaccagc ctgcgtgtta gctgctggc	4680
actgggtctg gttaccagcg gttttcagc agcagaaacc tataccgttg atcggtatca	4740
ggatgatagc gaaaaaggta gccctgcgtt ggcaattgaa cagagcaatg caaatagcgc	4800
acaagaaaac cagattctga ttcaggcagt tggtaaagca ccgtatgtta tcaaagttga	4860
taaaaccctg cctccgatta aaagcagcgt taaaatcatt ggcaccgagt gggataaaac	4920
cgtgtaattt attgcaattg atgcagcaa ctatatcaaa ggcaagggtg aaaaagcatg	4980
tccgggtgca aatccgggtc agtatggcac caatgttcgt acctgaccc tgcctggtct	5040
ggtttctgca gatgttaatg gtgttacct gaaaggcttg gatgttcat gttttgtat	5100
tgtgtttctg gttaatcgca gcagcaataa ctgattcag cataatcgta tcagcaacaa	5160
ttatggtggt gccggtgtta tgattaccgg tgatgatggt aaaggtaatc cgaccagcac	5220
caccaccaat aataacaaag ttctggataa cgtgttcac gataatggtg atggtctgga	5280
actgaccctg ggtgcagcat ttaatctgat tgcaataaac ctgtttacca gcacaaaage	5340
caatccggaa ccgagccagg gtattgaaat tctgtgggtt aatgataatg ccgtgggtgg	5400
taacaaattc gaaaactatt cagatggcct gcaaatcaat tggggtaaac gtaactatat	5460
cgcctataac gaactgacca ataacagcct gggtttcaat ctgacagggt atggtaacat	5520

[0054]

```

tttcgacagc aataaagtgc atggtaaccg tattggtatt gccattcgta gtgaaaaaga 5580
tgecaatgca cgtattaccc tgaccaaaaa tcagatttgg gataacggca aagatatcaa 5640
acgttgtgaa gccggtggta gctgtgttcc gaatcagegt ctgggtgcaa ttgtttttgg 5700
tgttccggca ctggaacatg aaggttttgt tggtagccgt ggcggtggtg ttgttattga 5760
accggcaaaa ctgcaaaaaa cctgcaccca gccgaaccag cagaattgta atgcaattcc 5820
taatcagggt attcaggcac cgaaactgac agttagcaaa aaacagctga ccgttgaagt 5880
taaaggcacc cctaatacgc gtatataatgt ggaatttttt ggcaatcgta atgccagcag 5940
cagcgaagca gaacagtatc tgggtagcat tgttgttgtt accgatcatc agggctctggc 6000
aaaagcaaat tgggtctccg aagtttagcat gccgagcgtt accgcaaatg tgacagatca 6060
tctgggtgcg accagcgaac tgagcagcgc agttaaatac cgttaaatac atgcgcgcgcg 6120
cgttcgcgcg gcgttttttt ttggtaccga gctcgaaatc actggccgctc gttttacaac 6180
gtcgtgactg ggaaaaccct ggcggttacc aacttaatac ccttgcagca catccccctt 6240
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cctttcccaa cagtgcgcga 6300
gccgaatggc cgaatggcgc ctgatgcggt attttctcct taagcatctg tgcggtattt 6360
cacaccgat atggtgacct ctcatgacaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc 6420
cccgacaccc gccaacaccc gtgacgaat tc 6452

```

<210> 26
 <211> 10012
 <212> DNA
 <213> 质粒pMG47F;

```

<400> 26
gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatecg aagtggtagc actggaaaaa cagagggcag 120
gaactgtcga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcga taaaacgccc 180
tgagaagccc gtgacgggct ttctttgtat tatgggtagt ttctttgcat gaatccataa 240
aaggcgccctg tagtgccatt tacccccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
aatgtcacga aaaagacagc gactcaggfg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca 360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtctac ttaagccttt agggttttaa ggtctgtttt 420
gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc itttgtaata ctgcggaact gactaaagta 480
gtgagttata cacagggetg ggatctatcc tttttatctt tttttattct ttctttatcc 540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta 600
cagagggtct agcagaattt acaagttttc cagcaaaggt ctagcagaat ttacagatac 660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgaci agcccatctc aattggtata 720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa 780
atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
tcacttataa ccaatacget cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat 960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat ccttttggtta 1020
aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat 1080

```

[0055]

tagtttttag tgaagagata ttgcccttate ttttccagtt aaaaaaatc ataaaatata	1140
atctggaaca tgttaagtct ttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgett gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gatitaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagtga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttcttacctt cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttagggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttctgttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacea acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atacgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acaccttaata gaacagggtga aaccagttaa acaangcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgctcccggt ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gccggtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gtttttgtaa aaaattttta aaataaaaaa ggggaccict aggggtcccca	2280
atttaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaceg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggttggtt gccaaagctct egggtaacat caaggcccca tecttggagc	2400
ccttgccctc ccgcacgat atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgcagtt	2460
gcaaaccctc actgatccgc atgccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccttcag aaaaaccgagg atcggaacca ctctatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgaagg ccgaggtctt ccgatctctt gaagccaggg cagatccgtg cacagacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaacagg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct caccgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtag taacggcgca gtggcgggtt tcatggcttg ttatgactgt tttttgggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgccgtgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgaggga agcggtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtea	3120
tcgagcgcca tctcgaaecg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgcgtgttac ggtgaccgta agcettgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttggaac ttggcttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgtgta gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attccgtggc	3360

[0056]

gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgcag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggta ggccagcgg cgagggaact ctttgatccg gtccctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgetatg gaactcgcgc cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgia gtgcttacgt tgcctccgat ttggtacage gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgtgcgc acigggcaat ggagcgctg ceggeccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtcta acaattcgtt caagecgacg ccgcttcgcg gcgcggetta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgtttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atafateatg	4020
aaaggctgge tttttcttgt tategcaata gtggcggaag taatcgcaac atccgeatta	4080
aaatctagcg agggccttac taagctgac cggtggatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggacct agaggcccc tttttatit taaaaatit	4200
ttcacaaaac gggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgaact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggccttaca ctttatgctt ccggtctgta tgttgtgtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gacctgatt acgccaagct tgctattgac	4440
gacagctatg gttcactgtc caccacaaca aactgtgtc agtaccgcca atatttctcc	4500
cttgaggggt acaaaagggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttacaaa	4560
aaggatatga ctttccctac aggggtgtga ataatttaac tacaggcggg ggcaaccccg	4620
cctgttctgc agaggaggaa tatagccatg gaagtgtaaa tcttcaacac ccaggatgtt	4680
caggattttc tgcgtgttgc aagcggctg gaacaagagg gtggtaatcc gcgtgtttaa	4740
caaattatc atcgtgttct gagegacctg tataaagcaa ttgaagatct gaatatcacc	4800
agcgacgaat attgggcagg cgttgcatac ctgaatcagc tgggtgcaaa tcaagaagca	4860
ggctctctga gtccgggtct ggggtttgat catlactctg atatgcgtat ggatgcagaa	4920
gatgcagcac tgggtattga aaatgcaaca ccgcgtacca ttgaaggctc gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac cggaaagcgt tggttatgca cgcattggat atggtagcga tccgaatggt	5040
cataccctga ttctgcatgg caccattttt gatgcagatg gtaaaccgct gccgaatgca	5100
aaagttgaaa tttggcatgc aaacaccaaa ggcttttata gccattttga tccgaccggt	5160
gaacagcagg cctttaatat gcgtcgtagc attattaccg atgagaatgg tcagtatcgt	5220
gttcgtacca ttctgcctgc cggttatggt tgcctccgg aaggccgac ccagcaactg	5280
ctgaaccaac tgggtcgtca tggtaatcgt ccggcacata ttcattatit tgttagcgca	5340
gatggtcacc gtaaaactgac caccagatt aatgttgccg gtgatecgtg tacctatgat	5400
gattttgcat atgccaccg tgaaggctc gtgtgtgatg cagtigaaca taccgatccg	5460
gaagcaatta aagccaatga tgtggaaggt ccttttgccg aaatgggtgt tcatctgaaa	5520
ctgaccgcgc tgggtgatgg tgitgataat caggttgtgg atcgtccgcg tctggcagtt	5580

[0057]

taatacacca aaatggttca aaallatcag gcgagtgatc atgatacacg gccgtgtttt	5640
atttcaggga aggggtggaga caattacgtg gataatcaga tcatccaaga aaccgtggat	5700
aaaattctga gcgttctgce gaatcaggca ggtcagctgg caegtctggt gcgtctgatg	5760
caatttgcac gcgacccgac cattaccgtt attggcaaat ataaccatgg taaaagccgt	5820
ctgtctgaatg aactgattgg caccgatata tttagcgttg cagataaacg tgaaccatt	5880
cagctggccg aacataaaca ggatcagggt cgttggctgg atgcacctgg tctggatgcc	5940
gafgttgcag cagttgatga tctgtatgca tttgaagcag tttaggacca ggcagatatt	6000
cgtctgtttg ttcatacgtt tctgtgaagg gaactggatg caaccgaaca ccatctgctg	6060
caacagctga ttgaagatgc cgtatcatgc cgtcgtcaga ccattctggt tctgaccag	6120
attgatcaga ttccggatca gaccatcctg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag	6180
gttccgaaac tggatatttg ggcagttagc gcaaccctgc atcgtcaggg cattgaaaae	6240
ggtaaaaccc tctgtatgca aaaaagcgtt attggtgcac tgcgccatac cctggaacag	6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaaa atcgtctgct gtcagatctg	6360
caccatcagc tgaacaact gctgtggat cagaaacatg ttctgcaaca actgcaacag	6420
acacagcaac agcagctgca tgattttgat accggtctga ttaacattct ggacaaaatt	6480
cgtgttgatc tggaaaccga tggtaattat gattgtcagg atcaagcacl gaatccgcat	6540
agctttgcaa ccatgtttta aaacaccgca gcaaacacgc agcgtgccaa agttcagatt	6600
gcataatagc gtgcatgcat tgaaatcaac agccatctga ttccgcatgg tgtgtgtggt	6660
ctgcctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgattgt tgccgtgttt	6720
ggatcagcgc ttaaatctcg tgatcagctg cgtgccctgt ttataaccga taccgaacgt	6780
cagcgtctgc aacgtgaatt tcttttctat ttigaaaaaa gtgcgggtcg catgattctg	6840
gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggtctga ttccagaatgc catgatggca	6900
ctgcaacaaa tggaaagcgc agcataaaaa caccgacgcc gcaaacggcg tccgaatttc	6960
tiggctgacc gttaaateta tcaccgcaag ggataaatai ctaaacaccgt gcgtgttgac	7020
tattttacct ctggcgttga taatggttgc atgtactaat ctagataagg aatatagcca	7080
tgaccgcacc gatfcaggat ctgcgtgatg caattgccct gctgcaacag catgataatc	7140
agtatctgga aaccgatcat cgggttgatc cgaatgcaga actggcagge gtttatcgtc	7200
atattggtgc cgggtgcacc gttaaacgtc cgaaccgtat tggteggca atgaigtta	7260
ataacattaa aggttatecg cacagccgta ttctggttgg tatgcatgca agecgtcagc	7320
gtgcagcact gctgtgggt tgtgaagcaa gtcagctggc actggaagtt ggtaaagcag	7380
ttaaaaaacc ggttcaccg gtggttgttc cggcaagcag cgcaccgtgt caagagcaga	7440
tttttctggc agatgatecg gattttgatc tgcgtaccct gctgcctgca cataccaata	7500
ccccgattga tgcaggctccg tttttttgtc tgggtctggc cctggcaagc gatccggtgg	7560
atgcaagcct gaccgatgtt accattcacc gctgtgtgtg tcagggtcgt gatgaactga	7620
gcatgttccet ggcagcaggt cgcctatatt aagtttttgc tcagaaaagca gaagcagcag	7680
glaaaacegt gccgattacc attaatatgg gctcggaccc agcaatctat attggcgcac	7740
gttttgaagc accgaccacc ccgtttggtt ataatagaat ggggtgtgcc ggtgcactgc	7800
gtcagcgtcc ggttgaactg gttcagggtg ttagcgttcc ggaaaaagca attgcacgtg	7860

[0058]

cggaaattgt tattgaaggt gaactgctgc ctgggtgttcg tgttcgtgaa gatcagcata	7920
ccaattcagg tcatgcaatg ccggaatttc cgggttattg tgggtgtgca aatccgagcc	7980
tgccggttat taaagttaaa gccgttacca tgcgcaataa cgcaattctg caaaccttgg	8040
ttgttcgggg tgaagaacat accaccctgg caggtctgcc gaccgaagca agcatttggga	8100
atgcagttga agcagcaatt ccgggttttc tgcaaaatgt ttatgcccac accgcaggcg	8160
gtggtaaaatt tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgtca gctgcccgat gaaggtcgtc	8220
agggctcaggc agccctgcctg gcgctggcaa cctatagcga actgaaaaat alcatctcgg	8280
tggatgagga tgtggacatt ttigatagtg atgataitct gtgggcaatg accaccctga	8340
tgcagggtga tgttagcatt accaccattc cgggtatttc eggctcatcag ctggaccoga	8400
gccagacacc ggaataitca ccgagcattc gtggtaatgg tatiagctgc aaaaccatct	8460
ttgattgtac cgttcctggg gcaactgaaa gccattttga acgtgcaccg ttgcagatg	8520
ttgatccgcg tccgtttgca cctgaatatt ttgcacgtct ggaaaaaaat cagggcagcg	8580
caaaaataagc taataacagg cctgctggta atcgcaggaa tttttatttg gatggatccg	8640
cctacctagc ttccaagaaa gatatactaa cagcacaga gcggaaagat gtittgttct	8700
acatccagaa caacctctgc taaaattcct gaaaaatctt gaaaaagtt gttagcttta	8760
tctacaaggt gtgtgataat aatcttaaca acagcaggac gctcccggtg tgaggaaaac	8820
ctaataaagt atagcctgtg caccattagc ttctgtcacc agctgattag ctttaccgat	8880
attgttcagt ttgcctatga aaacggcttt gaaggtattg aactgtgggg caccatgca	8940
cagaatctgt atatgcaaga atatgaaacc accgaacgtg aactgaattg cctgaaagat	9000
aaaaccctgg aaattaccat gatcagcgat tatctggata ttagcctgag cgcagatttt	9060
gaaaaaacca tcgaaaaatg tgaacagctg gcaattctgg ceaattgggt taaaacgaac	9120
aaaattcgta cctttgccgg tcagaaaggt agtgcagatt ttageccagca agaactgcaa	9180
gagtatgtga atcgtattcg catgatttgi gaactgtttg ccagcataa tatgtatgtt	9240
ctgctggaaa cccatccgaa taccctgacc gataacctgc cgagcaccct ggaactgctg	9300
ggtgaagtig atcatccgaa tctgaaaatc aacctggatt ttctgcatat ctgggaaage	9360
ggtgcagatc cggttgatag ctttcagcag ctgcgtccgt ggattcagca ttatcacttt	9420
aaaaacatta gcagcgcaga ctatctgcat gtgtttgaac cgaataatgt ttatgcagca	9480
gcaggtaate gtaccggtat ggttcctctg ttgaaggca ttgttaacta tgatgaaate	9540
atccaagaag tgcgcgatac cgaatctttt gcaagcctgg aatggtttgg tcafaacgca	9600
aaagatatte tgaaagccga aatgaaagtg ctgaccaate gtaatctgga agttgttace	9660
agctaaatgc atgcgcgccg cgttcgcgcg gccttttttt ttggtaccga gctcgaattc	9720
actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaacct ggcgtttacce aacttaatcg	9780
ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg	9840
cccttcccaa cagttgcgca gccgtaatgg cgaatggcgc ctgatgcggt attttctcct	9900
taegcatctg tgcggtattt caccacgcac atgggtgcact ctcagtacaa tctgctctga	9960
tgccgcatag ttaagccagc ccgacaccc gccaacaccc gctgacgaat tc	10012

<210> 27

[0059]

<211> 10249
 <212> DNA
 <213> 质粒pMG70;

<400> 27
 gttgacagta agacgggtaa gcctgttga gataccgctg ctttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaa cagagggcag 120
 gaactgtcga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcca taaaacgccc 180
 tgagaagccc gtgacgggct ttctttgtat tatgggtagt ttctttgcat gaatccataa 240
 aaggcgcttg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgnaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca 360
 gcgattttgc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggctgttttt 420
 gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttgtgtaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtagattata cacagggctg ggaatctatc tttttatctt tttttattct tttttttatc 540
 tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta 600
 cagagggctc agcagaattt acaagtttcc cagcaaaagt ctacgagaat ttacagatac 660
 ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aatttggtata 720
 gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtgcg taigacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
 gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcacttataa ccaatcacgt cagatgatga acatcagtag ggaaatgct tatggtgtat 960
 tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat ccttttggtta 1020
 aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagegaa aaattagaat 1080
 tagtttttag tgaagagata ttgccttate ttttccagtt aaaaaattc ataaaaata 1140
 atciggaaca tgttaagtct ttigaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat 1200
 taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat 1260
 ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320
 ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaaca cttacagcaa tatgaaatg gtggttgata 1380
 agcagggcgg cccgactgat acgttgattt tccaagtta actagataga caaatggatc 1440
 tctgaaccga acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca 1500
 ttacatcaga ttcttaccta cgtaacggac taagaaaaac actacaagat gctttaactg 1560
 caaaaaattca gctcaccagt tttagaggca aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg 1620
 atctcaatgg ttctgtctca tggtcacgc aaaaaaacg aaccacacta gagaacatac 1680
 tggtctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggtctttg tatctatcag tgaagcatca 1740
 agactaaca acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc 1800
 atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt 1860
 ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta 1920
 acacctaata gaacaggta aaccagtaaa acaaaagcaac tagaacatga aattgaacac 1980
 ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcatgctg 2040
 cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagfga cgcttccgt ggggaaaaaa 2100

[0060]

tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa accigaagcc ggatctgcga	2160
tctcgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggtcceca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggte attcaaaagg tcatccaccg gateaatfca	2340
cctgcctcgc caggctgggt gccaaacctt cgggtaacat caaggcccg tccitggagc	2400
ccttgccctc ccgcacgat atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg accgcagtt	2460
gcaaaccttc actgatccgc atgcccgctc catacagaag ctggcgcaac aaacgatgct	2520
cgctttccag aaaaccgagg atgcgaacca cttcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccttagaa gaacagcaag gccgcaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttgcg cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaacagg atgaaggcac gaaccacgtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatcgctt cagcaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggttg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttggg	2940
tacagcttat gccctgggca tccaagcagc aagcgcgta cgcctgggt cgaatgttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgaggga agcggctgac gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta	3120
tgcagcgcca tctcgaacgg acgttctgtg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgcctgttac ggtgaccgta aggccttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagcttfg atcaacgacc ttttggaaac ttcggcttcc cctggagaga	3300
gagagattct ccgcctgtga gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgaatgac attcttgcag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggetat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggta ggtccagcgg eggaggaaat ctltgatccg gtlccatgac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaatgta gtgcttacgt tgteccgeat ttggfacagc geagtaaccg	3660
gcaaatctgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgcttg ccggcccagt	3720
atcagcccgat catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgcta acaattcggt caagccgacg ccgcttcgag gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcaet aagcacataa ttgctcacag ccaaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcctttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaagcttggc tttttcttgt tategcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgac cgggtgatga ccttttgaat gaccttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggacctc agaggteccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggccttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc	4380

[0061]

ggataacaat ttacacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgctattgac	4440
gacagctatg gttcactgtc caccaaccaa aactgtgctc agtaccgcca atatttctcc	4500
cttgagggggt acaaagaggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttacaaa	4560
aaggtattga ctttccctac aggggtgtga ataatttaat tacaggcggg ggcaaccccg	4620
ccgtttctgc agaggaggaa tatagccaig gaagtgaaaa tcttcaacac ccaggatgtt	4680
caggattttc tgcgtgttgc aagcggctcg gaacaagagg gtggtaatcc gcgtgttaaa	4740
caaattatc atcgtgttct gagcgacctg tataaagcaa ttgaagatct gaatatcacc	4800
agcgacgaat attgggcagg cgttgcatat ctgaatcagc tgggtgcaaa tcaagaagca	4860
ggctctctga gtccgggtct gggttttgat cattatctgg atatgcgtat ggatgcagaa	4920
gaigcagcac tgggtattga aaatgcaaca ccgcgtacca ttgaaggctc gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac cggaaagcgt tggttatgca cgcattgatg atggtagcga tccgaatggt	5040
cataccctga ttctgcatgg caccattttt gatgcagatg gtaaacgcct gccgaatgca	5100
aaagttgaaa ttggcatgc aaacaccaaa ggcttttata gccattttga tccgaccggt	5160
gaacagcagg cctttaatat gcgtcgtagc attattaccg atgagaatgg tcagtatcgt	5220
gttcgtacca ttctgcctgc cggttatggt tgcctccgg aaggtecgac ccagcaactg	5280
ctgaaccaac tgggtcgtca tggtaatcgt ccggcacata ttcatatttt tgttagcgca	5340
gatggtcacc gtaaaactgac caccagatt aatgttccg gtgacccgta tacctatgat	5400
gattttgcat atgccaccgg tgaaggctcg gttgttgatg cagtgaaca taccgatccg	5460
gaagcaatta aagccaatga tgtggaaggt ccttttccg aaatggtgtt tgatctgaaa	5520
ctgaaccgtc tgggtgatgg tgttgataat caggttgtgg atcgtccggc tctggcagtt	5580
taatacacca aaatggttca aaattatcag gcgagtatc atgatcacig gcctgttttt	5640
atttcagga aggggtggaga caattacgtg gataatcaga tcatccaaga aaccgtggat	5700
aaaattctga gcgttctgcc gaatcaggca ggteagctgg cagctctggt gcgtctgatg	5760
caatttgcat gcgatccgac cattaccgtt attggcaaat ataaccatgg taaaagccgt	5820
ctgctgaatg aactgattgg caccgatatc tttagcgttg cagataaacg tgaaacatt	5880
cagctggccg aacataaaca ggatcagggt cgttgctgg atgcacctgg tctggatgcc	5940
gatgttcag cagttgatga tgcgtatgca ttgaagcag ttiggacca ggcagataat	6000
cgtctgtttg tteatagegt tegtgaaggt gaaetggatg caacegaaca ccatctgtctg	6060
caacagctga ttgaagatgc cgatcatagc cgtcgtcaga ceattctggt tctgaccag	6120
attgatcaga ttccggatca gaccatcctg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag	6180
gttccgaaac tggatatttg ggcagttagc gcaaccgctc atcgtcaggg cattgaaaac	6240
ggtaaaaccc tgcgtatcga aaaaagcggc attggtgcac tgcgccatac cctggaacag	6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaaa atcgtctgct gtcagatctg	6360
caccatcagc tgaacaact gctgctggat cagaaacatg ttctgcaaca actgcaacag	6420
acacagcaac agcagctgca tgattttgat accggtctga ttaacattct ggacaaaatt	6480
cgtgttgatc tggaaaccgat tgtgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccggat	6540
agctttgcaa ccatgtttta aaacaccgca gcaaaacagc agcgtgccaa agttcagatt	6600

[0062]

gcataatagcc gtgcatgcat tgaatacaac agccatctga ttogccatgg tgttgttgg	6660
ctgccctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgatgtg tgccgtgttt	6720
ggatcagcgc ttaaatctcg tgatcagctg cgtgccctgt tttataccga taccgaacgt	6780
cagcgtctgc aacgtgaatt tctgttctat ttgaaaaaa gtgccggtcg catgattctg	6840
gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggtctga ttcagaatgc catgatggca	6900
ctgcaacaaa tggaaagcgc agcataaaaa caccgacgcc gcaaacggcg tcgaatttc	6960
tgggtcgacc gttaaatcta tcaccgaag ggataaataa ctaacacgtg gcgtgttgac	7020
tattttacct ctggcgggtga taatggttgc atgtactaat ctagataagg aatatagcca	7080
tgaccgcacc gattcaggat ctgcgtgatg caattgccct gctgcaacag catgataatc	7140
agtaictgga aaccgatcat ccggttgatc cgaatgcaga actggcaggc gtttatcgtc	7200
atattggtgc cgggtgcacc gttaaacgtc cgaccgtat tggtcggca atgatgttta	7260
ataacattaa aggttatccg cacagccgta tctgtgttgg tatgcatgca agccgtcagc	7320
gtgcagcaet gctgctgggt tgtgaagcaa gtcagctggc actggaagtt ggtaaagcag	7380
ttaaaaaacc ggttgacacc gtggtgttc cggcaagcag cgcaccgtgt caagagcaga	7440
tttttctggc agatgatecg gattttgate tgcgtaccct gctgctgca cataccaata	7500
ccccgattga tgcaggtecg ttttttctg tgggtctggc cctggcaagc gatccggtgg	7560
atgcaagcct gaccgatgtt accattcate gtctgtgtgt tcagggtcgt gatgaactga	7620
gcatgttctt ggcagcaggt cgccatattg aagtttttcg tcagaaagca gaagcagcag	7680
glaaacccgt gccgattacc attaatatgg gtctggaccg agcaatctat attggcgcat	7740
gttttgaagc accgaaccac ccgtttgttt ataatagaact ggggtgtgccc ggtgcaatgc	7800
gtcagcgtcc ggttgaaact gticagggtg ttagcgttcc ggaaaaagca attgcacgtg	7860
ccgaaattgt tattgaaggt gaactgctgc ctggtgttcg tgttcgtgaa galcagcata	7920
ccaattcagg tcatgcaatg ccggaatttc cgggttattg tgggtgtgca aatccgagcc	7980
tgccggttat taaagttaaa gccgttacca tgcgcaataa cgcaattctg caaacccctg	8040
tgggtccggg tgaagaacat accaccctgg caggctctgc gaccgaagca agcatttga	8100
atgcagttag agcagcaatt ccgggttttc tgcaaaatgt ttatgcccat accgcaggcg	8160
gtggtaaatt tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgtca gectgccgat gaaggctcgtc	8220
agggtcagcc agccctgctg gcgctggcaa cctatagcga actgaaaaat atcattctg	8280
tggatgagga tgtggacatt ttigatagtg atgatattct gtgggcaatg accaccgta	8340
tgcagggtga tgttagcatt accaccatc cgggtattcg cggtcacag ctggaccgca	8400
gccagacacc ggaatattca ccgagcattc gtggtaatgg tattagctgc aaaaccatct	8460
ttgattgtac cgttcctggg gcactgaaaa gccattttga acgtgcaccg ttgcagatg	8520
ttgatccgcg tccgtttgca cctgaalatt ttgcacgtct ggaaaaaaat cagggcagcg	8580
caaaataagc taataacagg cctgctggta atcgcaggaa tttttatttg gatggatccg	8640
cctacctagc ttccaagaaa gatatactaa cagcacaaga gcggaagat gttttgttct	8700
acatccagaa caacctctgc taaaattcct gaaaaatctt gcaaaaagtt gttgacttta	8760
tctacaaggt gtggtataat aatcttaaca acagcaggac gctcccgggt tgaggaaaac	8820
ctaattccga gcaactggc aattagcagc atgagcctgg gtcgtttgtt tgcaggctcat	8880

[0063]

```

agcctggata gtaaacctgga tgcagcacag cgttatgggt atctgggtat tgaactgttt 8940
tatfaggatc tgggtgatgt tgcagaacat ctgagcaatg aacgtccgag tccggaaggt 9000
ccgtttgttg aagcacagat tgcagcagca cgtcatattc tgcaaatgtg tcaggcacgt 9060
ggtctggaag ttgtttgtct gcaaccgttt atgcattatg atggtctgaa tgategtgcc 9120
gaacatgaac gtcgtctgga aaaactggca ctgtggattg aactggcaca tgaactgcat 9180
accgatatta ttcagattcc ggcaaatatt ctgccigcaa atcaggttag cgataatctg 9240
gaicctgatt ttagcgatct gtgtaaagt gcagatatlg gtgcacaggc actgcctccg 9300
atcctgtttg catatgaaag ccigtgttgg agcaccctgt ttgatctgtg ggaacgttgt 9360
tgggatattg ttcagcgtgt ggatcgtccg aatttttgta ttgtctgga tacctttaac 9420
atcctgggtc gcatttatgc agatccgacc agcccagcgc gtctgacccc gaatgcaaaa 9480
gaagcagttc gtaaaagcat tgccaatctg gttagccgtg tggatgttag caaagttttt 9540
tatgttcagg ttgtggatgc cgaacgtctg agtaaacccg tgetgcctgg tcatccgtat 9600
tataacecgg aacagcctgc acgtatgagc tggtaacgta attgtctctt gtctatgtgt 9660
gaaaccgaat atggtgcaat tctgcegttt aaagaagttg cagcgcactt gtctcatgtt 9720
attgtttttg aaggttgggt tagcctggaa ctgtttaate gtctgtatgag cgaagaaggt 9780
ccggaagttc ctgaagaact ggccatgcgt ggtgcaatta gctgggcaaa actggttcag 9840
gatctgcgta ttccggttga aggtccgtct gttaccatgc ctctgttag cgcaagcctg 9900
taaatgcatt cgcgcgcgtt tgcgcggcgc cttttttttg gtaccgagct cgaattcact 9960
ggcgcgtctt ttacaacgtc gtgactggga aaacctgggc gttacccaac ttaatcgcct 10020
tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc 10080
ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgcttg atcggttatt ttctcttae 10140
gcattctgtc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gtctgatgc 10200
cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgaattc 10249

```

<210> 28
 <211> 7623
 <212> DNA
 <213> 质粒pCP32AMP;

```

<400> 28
acatgaatgg tcttcggttt ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc 60
tgcaccatta tgttcggat ctgcatcgca ggatctctgt ggtaccctg tggaacacct 120
acatctgtat taacgaagcg ctggcatlga ccctgagtga tttttctctg gtcccgcgcg 180
atccataccg ccagtgttt accctcaca cgttccagta accgggcatg ttcatcatca 240
gtaacecgta tegtgageat cctctctctg ttcatcggtg tcattacccc cafgaacaga 300
aattccccct tacacggagg catcaagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg 360
cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg 420
atgaacagcg agacatctgt gaatcgttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct 480
gcctcgcgcg ttctgggtat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 540
tcacagcttg tctgtaagcg gatgcggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 600
gtgttgccgg gtgtcggggc gcagccatga ccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 660

```

[0064]

ctgacctaac tatcgccgat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcgggtgtga	720
aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttcgg ctctctcgct	780
cactgactcg ctgcgctcgg tctgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc	840
ggtaatacgg ttaaccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	900
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggetcgg	960
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg	1020
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagetccctc gtgcgctctc ctgttccgac	1080
cttgcgcgtt accggatacc fgtccgcctt tctccctcgg ggaagcgtgg cgctttctca	1140
tagctcacgc ttaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt	1200
gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgtg cgccttatcc ggtaaciate gtcttgagtc	1260
caaccggta agacacgact tatcccaact gccagcagcc aciggtaaca ggattagcag	1320
agcgaggatg gtaggcgggt ctacagagtt ctggaagtgg tggcctaact acggetacac	1380
tagaaggaca gtatttggt tctgcgctct gcgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	1440
tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgtcggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa	1500
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct ttctacggg	1560
gtctgacgct cagtggaaacg aaaacacacg ttaagggtt ttggatcatg gattatcaaa	1620
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatg aaaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	1680
atatgagtaa acttgggtctg acagttaaca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc	1740
gatctgtcta ttctgttcac ccatagttgc ctgactcccc gtctgttaga taactacgat	1800
acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata ccgcgagacc cagctcacc	1860
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc	1920
tgcaacttta tccgcttcca tccagtcctt taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag	1980
ttcgcaggtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg tgggtgcacg	2040
ctcgtcgttt ggtatggctt caitcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gatttacatg	2100
atcccccatg ttgtgcaaaa aageggttag ctctctcggg cctccgacg ttgtcagaag	2160
taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt	2220
catgccatcc gtaagatgct ttctgtgac fggtagtagc tcaaccaagt cttctgaga	2280
atagtgatag cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtea acacgggata ataccggcc	2340
acatagcaga actttaaaag tgcctcatat tggaaaacgt ttctcgggga gaaaactctc	2400
aaggatctta ccgctgttga gatccagtc gatgtaacce actcgtgcac ccaactgac	2460
ttcagcatct ttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc	2520
cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tctttttca	2580
atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat	2640
ttagaaaaat aaacaaatag gggttcgcg cacatttccc cgaaaagtgc cactgacgt	2700
ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt	2760
tcgtcttcaa gaattctgaa ccagtcctaa aacgagtaaa taggaccggc aattcttcaa	2820
gcaataaaca ggaataccaa ttattaaaag ataacttagt cagatcgtac aataaagctt	2880

[0065]

tgaagaaaaa tgcgccttat tcaatctttg ctataaaaaa tggcccaaaa tctcacattg	2940
gaagacattt gatgacctca ttcttttcaa tgaaggcct aacggagtgg actaatgttg	3000
tgggaaattg gagcgataag cgtgcttctg cctgggccag gacaacgtat actcaccaga	3060
taacagcaat acctgatcac tacttcgcac tagttttctg gtactatgca tatgatccaa	3120
tatcaanagga aatgatagca ttgaaggatg agactaatcc aattgaggag tggcagcata	3180
tagaacagct aaagggtagt gcigaaggaa gcatacgata ccccgcatgg aatgggataa	3240
tatcacagga ggtactagac tacttttcat cctacataaa tagacgcata taagtacgca	3300
tttaagcata aacacgcact atgccgttct tctcatgtat atatatatac aggcaacacg	3360
cagatatagg tgcgacgtga acagtgagct gtatgtgcgc agctcgcgtt gcattttcgg	3420
aagcgctcgt ttctggaaaac gccttgaagt tcttatccg aagtctctat tctctagaaa	3480
gtataggaac ttcagagcgc ttctgaaaac caaaagcgt ctgaagacgc actttcaaaa	3540
aaccaaaaac gcaccggact gtaacgagct actaaaatat tgcgaatacc gcttcacaaa	3600
acattgetca aaagtatctc ttgctatat atctctgtgc tatatcccta tataacctac	3660
ccatccacct ttgcctcctt gaacttgcct ctaaacctga cctctacatt tttatgttt	3720
atctctagta ttactcttta gacaaaaaaa ttgtagtaag aactattcat agagtgaatc	3780
gaaaacaata cgaaaatgta aacatttctt atacgtagta tatagagaca aaatagaaga	3840
aaccgttcat aattttctga ccaatgaaga atcatcaacg ctatcacitt cfttcacaaa	3900
agtatgcgca atccacatcg gtatagaata taatcgggga tgcctttatc ttgaaaaaat	3960
gcaccgcgag ctctgctagt aatcagtaaa cgcgggaagt ggagtcaggc tttttttatg	4020
gaagagaaaa tagacaccaa agtagccttc ttctaacctt aacggacctn cagtcgaaaa	4080
agttatcaag agactgcatt atagagcgca caaaggagaa aaaaagtaat ctaagatgct	4140
ttgttagaaa aatagcgtc tcgggaigca tttttgtaga acaaaaaaga agtatagatt	4200
ctttgttggt aaaatagcgc tctcgcgttg catttctgtt ctgtaaaaat gcagctcaga	4260
ttctttgttt gaaaaattag cgcctcgcg ttgcattttt gtittacaaa aatgaagcac	4320
agattcttgc ttggtaaaaat agcgccttcg cgttgcatth ctgttctgta aaaaatgcgc	4380
tcagattctt tgtttgaaaa attagcgtc tcgcgttgca tttttgttct acaaaatgaa	4440
gcacagatgc ttctttaaca aagataigct attgaagtgc aagatggaaa cgcagaaaaat	4500
gaaccgggga tgcgaactgc aagattacct atgcaataga tgcaatagtt tctccaggaa	4560
ccgaataaca tacattgtct tccgtaaage gctagactat atattattat acaggttcaa	4620
atatactatc tgtttcaggg aaaactccca ggttcggatg ttcaaaaatc aatgatgggt	4680
aacaagtacg atcgtaaaat tgtaaacag ttgtcggat attagctgt atctctcaa	4740
agcgtattcg aatatcattg agaagctgca gcgtcacatc ggataataat gatggcagcc	4800
attgtagaag tgccttttgc atttctagtc tctttctcgg tctagctagt ttactacat	4860
cgcgaagata gaattctaga tcacactgcc ttgtcigagc tggatcaata gagtaacaaa	4920
agagtgttaa ggctctgtta aaggacaagg acctgagcgg aagtgtatcg tacagtagac	4980
ggagtatact agtatagtct atagtcctg gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga	5040
taagcttttc aattcaatc atcatttttt ttttattctt tttttgtatt tgggtttctt	5100
tgaaattttt ttgattcgggt aatctccgaa cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga	5160

[0066]

cttagattgg	tatatatacg	catatgtagt	gttgaagaaa	catgaaattg	cccagttatc	5220
ttaacccaac	tgcacagaac	aaaaacctgc	aggaaacgaa	gataaatcat	gtcgaaagct	5280
acatataagg	aacgtgtcgc	tactcaicct	agtcctgttg	ctgccaaagct	atttaataatc	5340
atgcacgaaa	agcaaacaaa	cttgtgtgct	tcattggatg	ttcgtaccac	caaggaatta	5400
ctggagttag	ttgaagcatt	aggteccaaa	atttgtttac	taaaaacaca	tgtggataatc	5460
ttgactgatt	tttccatgga	gggcacagtt	aagccgctaa	aggcattatc	cgccaagtiac	5520
aattttttac	tcttcaaga	cagaaaattt	gctgacattg	gtaatacagt	caaattgcag	5580
tactctgcgg	gtgtatatacag	aatagcagaa	tgggcagaca	ttacgaatgc	acacgggtgtg	5640
gtgggccccag	gtattgttag	cggtttgaag	caggcggcag	aagaagtaac	aaaggaacct	5700
agaggccttt	tgatgttagc	agaattgtca	tgcagggget	ccctatctac	tggagaatat	5760
actaagggtta	ctgttgacat	tgcgaagagc	gacaaagatt	ttgttatcgg	ctttattgtct	5820
caaagagaca	tgggtggaag	agatgaaggt	tacgattgggt	tgattatgac	accgggtgtg	5880
ggtttagatg	acaagggaga	cgcattgggt	caacagtata	gaaccgtgga	tgatgtggtc	5940
tctacaggat	ctgacattat	tattgttggga	agaggactat	ttgcaaaggg	aagggatgct	6000
aaggtagagg	gtgaacgtta	cagaaaagca	ggctgggaag	catatttgag	aagatgcggc	6060
cagcaaaact	aaaaaactgt	attataagta	aatgcatgta	tactaaactc	acaaattaga	6120
gcttcaattt	aattatatca	gttattaccg	gggaatctcg	gtcgtaatga	cttgaaaataa	6180
ttaacaaaca	aaggagtta	agttagaagt	tgtaggagag	atctcgtttt	tcgcgacaat	6240
ciggcggttt	tcttgcta	atccaggata	atccgttcat	agtgtaaaa	cccgtttaca	6300
cattctgacg	gaagatatag	attggaagta	ttgcattcac	taagataagt	atggcaacac	6360
tggaaacagac	atgaattatc	agaacgacga	tttacgcate	aaagaaatca	aagagttact	6420
tcttctgtgc	gcattgtgtg	aaaaattccc	cgtactgaa	aatgccgcga	atacggttgc	6480
ccatgccccg	aaagcgatcc	ataagatcct	gaaaggta	gatgatcgcc	tgttggttgt	6540
gatitggccc	tgtcaatttc	atgatcctgt	cgcggcaaaa	gagtaigcca	ctcgcttgc	6600
ggcgtgtcgt	gaagagctga	aagatgagct	ggaaatcgta	atgcgcgtct	attttgaaaa	6660
gccgcgtacc	acggtgggct	ggaaagggtc	gattaacgat	ccgcataatg	ataatagctt	6720
ccagatcaac	gacggtctgc	gtatagcccg	taaatgtctg	cttgatatata	acgacagcgg	6780
tctgcccagc	gcagggtgagt	ttctcgatat	gatcaccoca	caatatctcg	ctgacctgat	6840
gagctggggc	gcaattggcg	cacgtaccac	cgaatcgag	gtgcaccgcg	aactggcacc	6900
agggttttct	tgtccggctg	gcttcaaaaa	tggcaccgac	ggtacgatta	aagtggctat	6960
cgatgccatt	aatgccgcg	gtgcgccgca	ctgcttctctg	tcgtaacga	aatgggggca	7020
ttcggegatt	gigaatacca	gcggtaacgg	cgattgccat	atcattctgc	gcggcggtaa	7080
agagcctaac	tacagcgcca	agcacgttgc	tgaagtga	gaagggtga	acaaagcagg	7140
cctgccagca	cagggtgatga	tcgatttcag	ccatgctaac	tcgtccaaac	aattcaaaaa	7200
gcagatggat	gtttgtgtgc	acgtttgcc	gcagattgcc	ggtggcgaaa	aggccattat	7260
tggcgtgatg	gtgaaagcc	atctgggtga	aggcaatcag	agcctcgaga	gcggggagcc	7320
gctggcctac	ggtaagagca	tcaccgatgc	ctgcacggc	tgggaagata	ccgatgctct	7380

[0067]

gttacgtcaa ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg taaggtttaa ttgtcggatg	7440
cgcgcgcaga gtggcgatc cgaatgaatc ecacaggcct gataagtcgc gcagcgcgc	7500
atcaggcaat gtgtccatt gttagcaaca aaaaagccga ctcacttgcg gtcggcttgc	7560
tcattttaaa cgaatgacgt ttacttcgct ttacctgggt ttgcaaccgc cgtcgtcttc	7620
gct	7623
<210> 29	
<211> 7630	
<212> DNA	
<213> 质粒pCP14;	
<400> 29	
cicgaggcta ttgaagacag ctaiggttca ctgtccacca accaaaacig tgctcagtac	60
cgccaatatt tctcccttga ggggtacaaa gaggtgtccc tagaagagat ccacgtgtg	120
taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc cctacagggt gtgtaataat ttaattacag	180
gcgggggcaa ccccgctgt tctagaggag gaggaatgc catggagagg attgtcgtta	240
cctcgggga acgtagtac ccaattacca tcgcactcgg ttgttttaat gaaccagctt	300
cattcttacc gctgaatcg gcgcgcagc tcatgttggt caccacgaa accctgctc	360
ctctgtatct cgataaggtc gcgcgcgtac ttgaacaggc ggggtgttaac gtcgatacgc	420
ttaacctccc tgacggcgag cagtataaaa gcctggctgt actcgatacc gctttacgg	480
cgttggtaca aaagcgcgt ggtcgcgata ctacgtgggt ggcgcttggc ggcggcgtag	540
tggcgatct gaccggcttc gcgcggcgga gttatcagcg cgtgttctgt ttcatccaag	600
tcccgcgcac gttactgtcg caggctgatt cctccgttgg cgcaaaact gcggtcaacc	660
atccctcgg taaaaacatg attggcgcgt tctaccagcc tgcctcagtg gtgtggatc	720
tcgaactgtc gaaaaagctt ccccgcgctg agttagcgtc ggggctggca gaagtcac	780
aatacggcat tattcttgac gggtcggttt tcaacaggct ggaagagaat ctggatgcgt	840
tgttgcgtct ggacggctcg gcaatggcgt actgtattcg ccgttgttgt gaactgaagg	900
cagaagttgt cgcgcggcgc gagcgcgaaa ccgggttacg tgccttactg aatcgggac	960
acacctttgg tcatgccatt gaagctgaaa tggggtatgg caattggtta catggtgaag	1020
cggtcgcgc gggatgtgt atggcgcgc gcacgcgga acgtctcggg cagtttagtt	1080
ctgcgaaac gcagcgtatt ataacctgc tcacgcgggc tgggttacgc gtcaatgggc	1140
cgcgcgaaat gtccgcgcag gegtatttac cgcatacgt gcgtgacaag aaagtcctg	1200
cgggagagat gcgcttaatt ctccgttgg caattggtaa gactgaagti cgcgcgcgc	1260
tttcgcacga gcttcttctt aacgccattg ccgattgtca atcagcgtaa tcatcgttca	1320
tgccgatgc cgctatgtag gccgataag gcgttcacgc cgcacgcgc aaccgatgc	1380
tgatgcgacg cggtcgcgtc ttatcaggcc tacaggctga tgccgatatg tacatcgtat	1440
tccgcaatta atacatagca acatgaatgg tcttcggttt ccgtgttctg taaagctcgg	1500
aaacgcggaa gtcagcgcgc tgcaccatta tgttcggat ctgcacgcga ggatgtcgt	1560
ggctaccctg tggaaacac acatctgtat taacgaagcg ctggcattga ccctgagtga	1620
ttttctctg gtcgcgcgc atccataccg ccagttgttt accctcaca cgttcacgta	1680
accgggcacg ttcatcatca gtaaccgcta tcgtgagcat cctctctcgt ttcatcggta	1740

[0068]

tcattacecc catgaacaga aattceccct tacacggagg catcaagtga ccaaacagga	1800
aaaaaccgcc cttaacatgg cccgcittat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa	1860
actcaacgag ctggacgagg atgaacagge agacatcigt gaatcgcttc acgaccacgc	1920
tgatgagctt taccgcagct gcctcgcgcg ttccggtgat gacggtgaaa acctctgaca	1980
catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc	2040
ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc gcagccatga ccagtcacg	2100
tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga	2160
gtgcaccaata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg	2220
cgtctctccg ctctctcgt cactgactcg ctgcgcgcg tcgttcggct gcggcagcgc	2280
gtatcagctc actcaaagcg ggtaatcgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga	2340
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaagcg cgcgttgctg	2400
gcgtttttcc ataggetccg ccccccagc gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag	2460
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc	2520
gtgcctctc ctgttccgac cctgcgcgtt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg	2580
ggaagcgtgg cgtttctca tagctcagc tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt	2640
cgtctcaage tgggtgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccctg cgccttatec	2700
ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc	2760
actggtaaca ggattagcag agcgaggatg ttaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg	2820
tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcctctt gctgaagcca	2880
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgtcgttagc	2940
ggtaggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat	3000
cctttgatct ttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcagc ttaagggatt	3060
ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc tttaaatta aaaatgaagt	3120
tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgettaatc	3180
agttaggcac ctatctcagc gatctgtctt ttctgttcac ccatagttgc ctgactcccc	3240
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata	3300
ccgcgagacc cacgctcacc ggtccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg	3360
gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc	3420
cgggaagcta gagtaagtag ttccgaggtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct	3480
gcagcctatc tgggtgcacg ctctctgttt ggtatggctt catcagctc cggttcccaa	3540
cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctcttccggt	3600
cctccgatcg ttgtcagaag taagtggcc gcagtggtat cactcatggt tatggcagca	3660
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct ttctgtgac tggtagtac	3720
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgacoga gttgctcttg cccggcgta	3780
acacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt	3840
tcttcgggga gaaaactctc aaggatctta ccgtctgtga gatccagttc gatgtaacct	3900
actcgtgeac ccaactgac ttcagcatct ttactttca ccagegttct tgggtgagca	3960
aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaag ggaataaggc gcacacggaa atgttgaata	4020

[0069]

ctcatactet	tcctttttca	atattattga	agcattttatc	agggttattg	tetcatgagc	4080
ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	4140
cgaaaagtgc	cacctgacgt	ctaagaaacc	attattiatca	tgacattaac	ctataaaaaat	4200
aggcgtatca	cgaggccctt	tcgtcttcaa	gaattctgaa	ccagtcctaa	aacgagtaaa	4260
taggaccggc	aattcttcaa	gcaataaaca	ggaataccaa	ttattaaaag	ataacttagt	4320
cagatcgtac	aataaagett	tgaagaaaaa	tgcgccttat	tcaatcttig	ctataaaaaa	4380
tggcccaaaa	tctcacattg	gaagacattt	gatgacctca	tttcttcaa	tgaagggcct	4440
aacggagttg	actaatgttg	tgggaaattg	gagcgataag	cgtgcttcg	ccgtggccag	4500
gacaacgtat	actcatcaga	taacagcaat	acctgatcac	tacttcgcac	tagtttctcg	4560
gtactatgca	tatgatccaa	tatcaagga	aatgatagca	ttgaaggatg	agactaatcc	4620
aattgaggag	tggcagcata	tagaacagct	aaagggtagt	gcigaaggaa	gcatacgata	4680
ccccgcatgg	aatgggataa	tatcacagga	ggtactagac	tacctttcat	ectacataaa	4740
tagacgcata	taagtacgca	tttaagcata	aacacgcaet	atgccgttct	tctcatgtat	4800
atatatatac	aggcaacacg	cagatatagg	tgcgacgtga	acagtgagct	gtatgtgcgc	4860
agctcgcgtt	gcattttcgg	aagcgtctgt	tttcggaaac	gcttgaaggt	tcctattccg	4920
aagttcctat	tctctagaaa	gtataggaac	ttcagagcgc	ttttgaaaaa	caaaagcgt	4980
ctgaagacgc	actttcaaaa	aaccaaaaac	gcaccggact	gtaacgagct	actaaaatat	5040
tgcgaatacc	gcttccacaa	acattgtctc	aaagtatctc	tttgcataat	atctctgtgc	5100
tatatecccta	tataacctac	ccatccacct	ttcgtctcct	gaacttgcat	ctaaactcga	5160
cctctacatt	ttttatgttt	atctctagta	ttactcttta	gacaaaaaaa	ttgtagtaag	5220
aactattcat	agagtgaate	gaaaacaata	cgaaaatgta	aacatttccct	atacgtagta	5280
tatagagaca	aatagaaga	aaccgttcat	aattttctga	ccaatgaaga	atcatcaacg	5340
ctatcacitt	ctgttcacaa	agtatgcgca	atccacateg	gtatagaata	taatcgggga	5400
tgcctttatc	tigaaaaaat	gcacccgcag	cttcgctagt	aatcagtaaa	cgcgggaagt	5460
ggagtcaggc	tttttttatg	gaagagaaaa	tagacaccaa	agtagecttc	ttctaacctt	5520
aacggaccta	cagtgcaaaa	agttatcaag	agactgcatt	atagagcgca	caaaggagaa	5580
aaaaagtaat	ctaagatgct	tigttagaaa	aatagcgctc	tgggatgca	ttttgtaga	5640
acaaaaaaga	agtatagatt	ctttgttggt	aaaatagcgc	tctcgcgttg	catttctgtt	5700
ctgtaaaaat	gcagctcaga	ttctttgttt	gaaaaattag	cgtctctcgc	ttgcattttt	5760
gttttaca	aatgaagcac	agattcttcg	ttggtaaaat	agcgttttcg	cgttgcattt	5820
ctgttctgta	aaaatgcagc	tcagattctt	tgtttgaaaa	attagcgctc	tcgcgttgca	5880
tttttgttct	acaaaatgaa	gcacagatgc	ttcgtaaca	aagatatgct	attgaagtgc	5940
aagatggaaa	cgcagaaaaat	gaaccgggga	tgcgacgtgc	aagattacct	atgcaataga	6000
tgcaatagtt	tctccaggaa	cgaataaca	tacattgtct	tccgtaaagc	gctagactat	6060
atattattat	acaggttcaa	atatactatc	tgtttcaggg	aaaactccca	ggttcggatg	6120
ttcaaaatc	aatgatgggt	aacaagtacg	atcgtaaatc	tgtaaaacag	tttgteggat	6180
attaggctgt	atctcctcaa	agcgtattcg	aatatcattg	agaagctgca	gcgtcacatc	6240

[0070]

```

ggataataat gatggcagcc attgtagaag tgccitttgc atttctagtc tctttctcgg 6300
tctagctagt tttaactacat cgcgaagata gaatcttaga tcacactgcc ttgtctgagc 6360
tggatcaata gagtaacaaa agagtggtaa ggccctcgta aaggacaagg acctgagcgg 6420
aagtgtatcg tacagtagac ggagtatact agtatagtc atagtcctgt gaattctcat 6480
gittgacagc ttatcatega taagcitttc aattcaatc atcatttttt tttattctt 6540
ttttttgatt tcggtttctt tgaaattttt ttgattcggg aatctccgaa cagaaggaa 6600
aacgaaggaa ggagcacaga cttagattgg tatatatacg catatgtagt gttgaagaaa 6660
catgaaattg cccagtattc ttaacccaac tgcacagaa aaaaacctgc aggaaacgaa 6720
gataaatcat gtcgaaaget acatataagg aacgtctctc tactcatcct agtctctgtg 6780
ctgccaaagc atttaatatc atgcacgaaa agcaaacaaa ctgtgtgtct tcatggatg 6840
ttcgtaccac caaggaatta ctggagttag ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac 6900
taaaaacaca tgttgataac ttgactgatt ttccatgga gggcacagtt aagccgcata 6960
aggcattatc cgcgaagta aattttttac tcttcgaaga cagaaaaatt gctgacattg 7020
gtaatacagt caaattgcag tactctcggg gtgtatcac aatagcagaa tgggcagaca 7080
ttacgaatgc acacgggtgt gttggcccg gttttgttgg cggtttgaag caggcggcag 7140
aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt tgatgttagc agaattgtca tgcaagggt 7200
ccctatctac tggagaatat actaagggtc ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt 7260
ttgttatcgg cttttattgt caaagagaca tgggtggaag agatgaaggt tacgattggt 7320
tgattatgac acccgggtgt gtttttagat acaagggaga cgcattgggt caacagtata 7380
gaaccgtgga tgatgtggtc tctacaggat ctgacattat tattgttgga agaggactat 7440
ttgcaaaggg aagggtgctt aaggtagagg gtgaacgta cagaaaagca ggctgggaag 7500
catatttgag aagatgcggc cagcaaaact aaaaaactgt attataagta aatgcatgta 7560
tactaaactc acaaattaga gcttcaattt aattatatca gttattacce gggaatctcg 7620
gtcgtaatga 7630

```

<210> 30
 <211> 10015
 <212> DNA
 <213> 质粒pCP50;

```

<400> 30
cttgaaataa ttaacaaaca aaggatttac agttagaat ttaggagag atctcgtttt 60
tcgcgacaat ctggcggttt tcttgctaatt tccaggatta atccgttcat agtgtaaaac 120
cccgtttaca cattctgacg gaagatatag attggaagta ttgcattcac taagataagt 180
atggcaacac tggaaacagc atgaattatc agaacgacga ttacgcate aaagaaatca 240
aagagttact tcctcctgtc gcattgctgg aaaaattccc cgtactgaa aatgccgcga 300
atacggttgc ccatgccgca aaagcgatec ataagatctt gaaaggtaat gatgatcgcc 360
tgttggttgt gattgcecca tgcataatc atgafctgt cgcggcaaaa gattatgcca 420
ctcgttctgt ggcgtctcgt gaagagctga aagatgagct ggaantcgt atgcgcgtct 480
attttgaaaa gccgcgtacc acggtgggct ggaaagggtc gattaacgat ccgcataatg 540
ataatagctt ccagatcaac gacggctctc gtatagcccc taaattgctg cttgatatta 600

```

[0071]

acgacagcgg tctgccagcg gcaggtgagt ttctcgatat gatcacccca caatatctcg	660
ctgacctgat gagctggggc gcaattggcg cactgaccac cgaatcgag gtgcaccgcg	720
aactggcctc agggctttct tgtccggtcg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta	780
aagtggctat cgatgccatt aatgccgcgc gtgcgcgcga ctgcttctg tccgtaacga	840
aatgggggca itcggegati gtgaatacca gcggtaacgg cgattgccat atcattctgc	900
gcggcggtaa agagcctaac tacagcgga agcacgttgc tgaagtgaag gaagggtga	960
acaaagcagg cctgccagca caggtgatga tctgattcag ccatgctaac tcttccaaac	1020
aattcaaaaa gcagatggat gtttgigtg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa	1080
aggccattat tggcgtgatg gtggaagcc atctgttgga aggcaatcag agcctcgaga	1140
gcggggagcc gctggcctac ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tgggaagata	1200
ccgatgctct gttacgtcaa ctggcgcaatg cagtataaagc gcgtcgcggg taaggtttaa	1260
ttgtcgatg cgcgcgcaga gtggcgatc cgatgaatca ccacaggcct gataagtgcg	1320
gcagcgtcgc atcaggcaat gtgtccatt gttagcaaca aaaaagccga ctacattgca	1380
gtcgcttctc tcatttttaa cgaatgaagt ttacttctgt ttacctggt ttgcaaccgc	1440
cgctgcttct gctacatgaa tggctctcgg ttccctgttt tctgaaagtc tggaaacgcg	1500
gaagtcagcg cctgcaeca ttaagtctcg gatctgcatc gcaggatgct gtggtctacc	1560
ctgtggaaca cctacatctg tattaacgaa gcgtggcatc tgacctgag tgatttttct	1620
ctggtccccc cgcctccata ccgccagttg ttaccctca caacgttcca gtaaccgggc	1680
atgttcatca tcagtaaccc gtatcgtgag catcctctct cgtttcatcg gtatcattac	1740
ccccatgaac agaaattccc cttacacgg aggcataag tgaccaaaca ggaanaaac	1800
gcccttaaca tggcccgctt tatcagaagc cagacatata cgattctgga gaaactcaac	1860
gagctggacg cggatgaaca ggcagacatc tgtgaatgc ttcacgacca cgtgatgag	1920
ctttacgcga gctgcctcgc gcgtttcggt gatgacggtg aaaaacctctg acacatgcag	1980
ctcccgagga cggtaacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtag	2040
ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgaccagtc acgtagcgat	2100
agcggagtgt ataactggctt aactatgcgg cctcagagca gattgtactg agagtgcacc	2160
atatcggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc aggcgtctct	2220
ccgttctctc gctcactgac tgcgtcgcgt cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag	2280
ctcaatcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaangaaca	2340
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt	2400
tccataggct ccgccccct gacgagcctc acaaaaaatc agctcaagt cagaggtggc	2460
gaaacccgac aggaactataa agataccagg cgtttccccc tggaaagctc ctcgtgcgt	2520
ctcctgttcc gacctgcgc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tccggaagcg	2580
tggcgttctc tcatagctca cgtgtagggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgttcca	2640
agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccagccg ctgcgcctta tccggttaact	2700
atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta	2760
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgtacaga gttcttgaag tgggtggccta	2820
actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tetgtgaag ccagttacct	2880

[0072]

tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaaac caccgctggt agcgggtggtt	2940
tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga	3000
tcctttctac ggggtctgac gctcagigga acgaaaaactc acgttaaggg attttggtea	3060
tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaaa ttaaaaatga agtttttaaa	3120
caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg	3180
cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcctgactc cccgtctgtt	3240
agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgcctgcaatg atacgcgag	3300
accacgctc accggtcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc	3360
gcagaagtgg tcttgcaact ttatccgctt ccatccagtc tattaattgt tgcggggaag	3420
ctagagtaag tagttcgcca gttaaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctgcaggca	3480
tcgtgggtgc acgctcgtcg ttgggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa	3540
ggcgagttac atgatccccc atgttgigca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga	3600
tcgttgicag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata	3660
attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtagg tactcaacca	3720
agtcattctg agaatagtgt atcgcgagc cgagtgtctc ttgcccgcg tcaacacggg	3780
ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattgaaaa cgttcttcgg	3840
ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcatgtaa cccactctg	3900
cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag	3960
gaaggcaaaa tgcgcacaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactatcac	4020
tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca	4080
tatttgaatg tatttagaaa aataaacaac taggggttcc ggcacattt ccccgaagg	4140
tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta	4200
tcacgaggcc ctttcgtctt caagaattct gaaccagtc taaaacgagt aataggacc	4260
ggcaattctt caagcaataa acaggaatac caattattaa aagataactt agtcagatcg	4320
tacaataaag ctttgaagaa aaatgcgctt tatccaatct ttgtataaaa aaatgcecca	4380
aaatctcaca ttggaagaca ttgatgacc tcatttcttt caatgaaggg cctaacggag	4440
ttgactaatg ttgtgggaaa ttggagcgat aagcgtgctt ctgccgtggc caggacaacg	4500
tatactcatc agataacagc aatacctgat cactacttcg cactagtctc tcggtactat	4560
geatatgac caatatcaaa ggaaatgata gcattgaagg atgagactaa tccaattgag	4620
gagtggcagc atatagaaca gctaaagggt agtgcgaag gaagcatacg ataccccgca	4680
tggaaatgga taatatcaca ggaggtacta gactaccttt catctacat aaatagacgc	4740
atataagtac gcatttaage ataaacacgc actatgccgt tcttctcatg tatafatata	4800
tacaggcaac acgcagatat aggtgcgacg tgaacagtga gtgtatgtg cgcagctcgc	4860
gttgcaattt cggaagcgt cgtttccgga aacgctttga agttcctatt ccgaagttcc	4920
tattctctag aaagtatagg aacttcagag cgttttgaa aaccaaagc gctctgaaga	4980
cgcactttca aaaaaccaaa aacgcaccgg actgtaacga gctactaaaa tattgcgaat	5040
accgcttcca caaacattgc tcaaaagtat ctctttgcta tatatctctg tgctatatcc	5100

[0073]

ctatataacc tacccatcca cttttcgctc ctigaacttg catctaaact cgacctctac	5160
atTTTTtatg ttatctctta gtattactct ttagacaaaa aaattgtagt aagaactatt	5220
catagagtga atcgaaaaca atacgaaaat gtaaacattt cctatagcta gtatatagag	5280
acanaataga agaaaccgtt cataattttc tgaccaatga agaateatca acgetateac	5340
tttctgttca caaagtatgc gcaatccaca tcggtataga atataatcgg ggatgccttt	5400
atcttgaaaa aatgcacccg cagcttcgct agtaatcagt aaacgcggga agtggagtca	5460
ggcttttttt atggaagaga aaatagacac caaagtagcc ttcttctaac cttaacggac	5520
ctacagtgc aaaaagttatc aagagactgc attatagagc gcacaaagga gaaaaaaagt	5580
aatctaagat gctttgttag aaaaatagcg ctctcgggat gcatttttgt agaacaaaaa	5640
agaagiatag attctttgtt ggtaaaatag cgctctcgcg ttgcatttct gtctgtaaa	5700
aatgcagctc agattctttg ttgaaaaat tagcgetctc gegtgtcatt ttgtttttac	5760
aaaaatgaag cacagattct tcgtttgtaa aatagcgctt tcgcgttgca ttctgttct	5820
gtaaaaatgc agctcagatt ctitgtttga aaaattagcg ctctcgcgtt gcatttttgt	5880
tctacaaaat gaagcacaga tgettctgta acaaagatat gctattgaag tgcaagatgg	5940
aaacgcagaa aatgaaccgg ggatgcgacg tgcaagatta cctatgcaat agatgcaata	6000
gtttctccag gaaccgaaat acatacattg tcttccgtaa agcgetagac tataattat	6060
tatacaggtt caaatatact atctgtttca gggaaaactc ccaggttcgg atgttcaaaa	6120
ttcaatgatg ggtaacaagt acgatcgtaa atctgtaaaa cagttttgctg gatattaggc	6180
tgtatctect caaagcgtat tcgaatatca ttgagaagct gcagegtcac atcggataat	6240
aatgatggca gccattgtag aagfgccttt tgcatttcta gtctctttct cggctctagct	6300
agttttacta catcgcgaag atagaatctt agatcacact gcctttgctg agctggatca	6360
atagagtaac aaaagagtgg taaggcctcg ttaaaggaca aggacctgag cggaagtgt	6420
tcgtacagta gacggagtat actagtatag tctatagtcc gtggaattct catgtttgac	6480
agcttatcat cgataagctt ttcaattcaa ttcatcattt tttttttatt ctttttttg	6540
atttcggttt ctttgaaatt tttttgattc ggtaatctcc gaacagaagg aagaacgaag	6600
gaaggagcac agacttagat tggatatat acgcataatgt agtgttgaag aaacatgaaa	6660
ttgccagta ttcttaaccc aactgcacag aacaaaaacc tgcaggaaac gaagataaat	6720
catgtcgaaa gctacatata aggaacgtgc tgetactcat cctagtcctg ttgctgccaa	6780
gctatttaat atcatgcacg aaaagcaaac aaacttgtgt gcttcattgg atgttcgtac	6840
caccaaggaa ttactggagt tagttgaagc attaggtccc aaaatttgtt tactaaaaac	6900
acatgtggat atcttgactg atttttccat ggagggcaca gtttagccgc taaaggcatt	6960
atccgccaa g tacaattttt tactcttcga agacagaaaa ttgctgaca ttggtaatac	7020
agteaaattg cagtactctg cgggtgtata cagaatagca gaatggcgag acattacgaa	7080
tgcacacggt gtggtgggcc caggtattgt tngcggtttg aagcaggcgg cagaagaagt	7140
aacaaaggaa cctagaggcc ttttgatgtt agcagaattg tcatgcaagg gctccctatc	7200
tactggagaa tatactaagg gtactgttga cattgcgaag agcgacaaag attttgttat	7260
cggctttatt gctcaaagag acatgggtgg aagagatgaa ggttacgatt ggttgattat	7320
gacacccggt gtgggtttag atgacaaggg agacgcattg ggtcaacagt atagaaccgt	7380

[0074]

ggatgatgtg gtcctacag gatctgacat tattattgtt ggaagaggac tatttgcaaa	7440
gggaagggat gctaaggtag aggggtgaacg ttacagaaaa gcaggctggg aagcatattt	7500
gagaagatgc ggccagcaaa actaaaaaac tgiattataa gtaaatgcat giatactaaa	7560
ctcacaatt agagcttcaa tttaattata tcagttatta cccgggaatc teggtegtaa	7620
tgaagggaaa agcgcaacgg acgggcgagt agattgcga acatgcgagc atgatccaga	7680
gatttctgaa gcagcaaaag gatgttccat giacatgacg cgcggcttgc ggtaaatgtt	7740
tggcaaatit tccggcgtag cccaaaacgc gctgtcgtca agtcgttaag ggctgcacct	7800
tcacatccg atctggagtc aaaatgtcct cactaaaga gcttgccaat gctattcgtg	7860
cgtgagcat ggacgcagta cagaaagcca aatccggtca cccgggtgcc cctatgggta	7920
tggctgacat tgccgaagtc ctgtggcgtg atttctgaa acacaaccgc cagaatccgt	7980
ccgtggctga ccgtgaccgc ttctgtctgt ccaacggcca cggctccatg ctgatctaca	8040
gcctgtctga cctcaccggt tacgatctgc cgatggaaga actgaaaaac ttccgtcagc	8100
tgcactctaa aactccgggc cacccggaag taggttatac cgttggtgtg gaaaccacca	8160
ccggtccgct gggtcagggt atigccaacg cagtcgggat ggcgattgca gaaaaaacgc	8220
tggcggcgca gtttaaccgt ccaggtcacg acattgtcga cactacacc tacgccttca	8280
tgggcgacgg ctgcatgatg gaaggcatct cccacgaagt ttgtctctg gcgggtacgc	8340
tgaagctggg taaactgatt gcgttctacg atgacaacgg tatctcaate gatgtctacg	8400
ttgaagctg gttcactgac gacaccgcaa tgcgtttcga agcttacggc tggcacgtta	8460
ttcgcgacat cgacggtcat gacgcggcat ccatcaaac gcgagtagaa gaagcgcgcg	8520
cagtgaactga caaacctcc ctgtgatgt gcaaaacat catcggttcc gggtcccccga	8580
acaaagccgg taccacgac tcccacgggt cgcgcctggg cgacgtgaa attgcctga	8640
cccgcgaaca gctgggtgg aaatacgcgc cgttcgaaat cccgtctgaa atctatgctc	8700
agtgggatgc gaaagaagca ggccaggcga aagaatctgc atggaatgag aagtttgcgg	8760
cttacgcgaa agcttatccg caggaagcgg ctgaatttac ccgccgtatg aaaggcgaaa	8820
tgcgtctga cttcgacgcc aaagcgaaag agtttatcgc taaactgcag gctaattccg	8880
cgaatctgc cagccgtaaa gcgtcgaga atgctatcga agcgttcggc ccgtgttgc	8940
ctgaattctt cggcggtctt ctgacctgg caccgtctaa ctgacctg tggctctggtt	9000
ctaaagcaat caacgaagat gctgcaggta actacatcca ctacggtgtt cgcgagttcg	9060
gtatgaccgc gattgctaac ggtatctccc tgcacggtg ttctctgccg tacacctcca	9120
ccttctgat gttcgtggaa tacgcacgta acgccgtacg tatggctgcg ctgafgaaac	9180
agcgtcagggt gatggtttac accacgact ccatcggtct ggccgaagat ggcccgaact	9240
accagccggt tgagcaggtc gcttctctgc gcgtgacccc gaacatgtct acatggcgtc	9300
cgtgtgacca ggttgaatcc gcggtcgcgt ggaaatacgg cgttgagcgt caggacggcc	9360
cgactgcgct tatcctctcc cgtcagaacc tggcgcagca ggaacgaact gaagagcaac	9420
tggcaaacat cgcgcgcggt ggtaatgtgc tgaagactg cgcgggtcag ccggaactga	9480
ttttcctgc taccggttca gaagtgaac tggctgttgc tgcctacgaa aaactgactg	9540
ccgaaggcgt gaaagcgcgc gtgggtctca tgcctctac cgacgcattt gacaagcagg	9600

[0075]

atgctgctta ccgtagaatcc gtagtgccga aagcggttac tgcacgcgtt gctgtagaag 9660
 cgggtattgc tgactactgg tacaagtatg ttggcctgaa cggtagctatc gtcggtaiga 9720
 ccaccttcgg tgaatctgct cgggcagagc tgcgttttga agagtteggc ttactgttg 9780
 ataacgttgt tgcgaaagca aaagaactgc tgtaattagc atttcgggta aaaaggctgc 9840
 ttgggcgacc ttttttatta ccttgataig tccgttttgc gacaagcaat agataaagcg 9900
 tgtttagat cacaataatt tatatgcaat aaatatcaat tatgtaatat gcatcacgat 9960
 atgcgtatig acatttgttg ttataactat aactcaatgt tatataagaa attaa 10015

<210> 31
 <211> 9065
 <212> DNA
 <213> 质粒pCP54;

<400> 31
 acatgaatgg tcttcggttt ccggttttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc 60
 tgcaccatta tggtccggat ctgcatcgca gtagctgct ggtaccctg tggaacacct 120
 acatctgtat taacgaagcg ctggcattga cctgagtgta tttttctctg gtcgccgcgc 180
 atccatacgg ccagttgttt accctcaca cgttccagta accgggcattg ttcatcatca 240
 gtaacccgta tctgagcat cctctctctg ttcatcggtta tcattacccc catgaacaga 300
 aattccccct tacacggagg catcaagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg 360
 cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacagag ctggacgcgg 420
 atgaacagcg agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct 480
 gcctcgcgcg ttccggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 540
 tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcaggge gcgtcagcgg 600
 gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatage ggagtgtata 660
 ctgcttaaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga 720
 aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgtctttccg cttcctcgt 780
 cactgactcg ctgcgctcgg tcttccggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 840
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 900
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggtccg 960
 ccccccgtac gageateaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 1020
 actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 1080
 cctgcgcct acccgatacc tctccgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgtttttctc 1140
 tagctcagc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgtctcaage tgggctgtgt 1200
 gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatec ggtaactate gtcttgagtc 1260
 caacccggta agacacgact tategccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 1320
 agcagggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggtacac 1380
 tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 1440
 tggtagctct tgatccggca aacaanccac cgttggttagc ggtgggtttt ttgtttgcaa 1500
 gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 1560
 gtcagcgtc cagtgaacg aaaaactcac ttaagggaatt ttggtcatga gattatcaaa 1620

[0076]

aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	1680
ataigagtaa acttgggtctg agtggcggtt ttcattggctt gttatgactg tttttttggg	1740
gtacagtcta tgcttcgggc atccaagcag caagcggtt acgcctggg tcatgtttg	1800
atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagggcagtc gccctaaaac aaagttaaac	1860
atcatgaggg aagcgggat cgcgaagta tcgactcaac tatcagaggt agttggcgtc	1920
atcgagcgcc atctcgaacc gacgttgctg gccgtacatt tgtacggctc cgcagtggat	1980
ggcggcctga agccacacag tgatatgat ttgctggta cggtagccgt aaggcttgat	2040
gaaacaacgc ggcgagcttt gatcaacgac cttttgaaa cttcgcttc cctggagag	2100
agcgagattc tccgcctgt agaagtcacc attgttgtc acgacgacat cattccgtg	2160
cgttatccag ctaagcgga actgcaattt ggagaatgga agcgcaatga catctttgca	2220
ggtatcttcg agccagccac gatcgacatt gatctggcta tcttgctgac aaaagcaaga	2280
gaacatagcg ttgcttgggt aggtccagcg gcggaggaac tctttgatcc ggttcttgaa	2340
caggatctat ttgagcgct aaatgaaacc ttaacgctat ggaactcgcc gcccgactgg	2400
gctggcgatg agcgaaatgt agtgcctacg ttgtcccgca ttgggtacag cgcagtaacc	2460
ggcaaaatcg cgcgaagga tgcctgtgc gactgggcaa tggagcgct gccggccag	2520
tatcagcccg tcafacttga agctagacag gcttatcttg gacaagaaga agatcgcttg	2580
gcctcgcgcg cagatcagtt ggaagaattt gtccactacg tgaaaggcga gatcaccaag	2640
gtagtcggca aataatgtct aacaattcgt tcaagccgac gccgcttcgc ggcgcgctt	2700
aactcaagcg ttagatgcac taagcacata attgctcaca gccaaactat cagaattctg	2760
aaccagtcct aaaacgagta aataggaccg gcaattcttc aagcaataaa caggaatacc	2820
aattatataa agataactta gtcagatcgt acaataaagc ttigaagaaa atgcgccctt	2880
attcaatctt tgctataaaa aatggcccaa aatctcacat tggaagacat ttgatgacct	2940
catttctttc aatgaagggc ctaacggagt tgactaatgt tgtgggaaat tggagcgata	3000
agcgtgcttc tgccgtggcc aggacaacgt atactcatca gataacagca atacctgac	3060
actacttcgc actagtcttc cgttactatg catatgatcc aatatcaaag gaaatgatag	3120
cattgaagga tgagactaat ccaattgagg agtggcagca tatagaacag ctaaagggt	3180
gtgctgaagg aagcatacga taecccgcct ggaatgggat aatatcacag gaggtactag	3240
actaccttc atctacata aatagacgca tataagtacg catttaagca taacacgca	3300
ctatgccgtt ctctcatgt atatatatat acaggcaaca cgcagatata ggtgcgacgt	3360
gaacagttag ctgtatgtgc gcagctcgcg ttgcatcttc ggaagcgctc gttttcgaa	3420
acgctttgaa gttcttattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttcagagc	3480
gcttttgaaa accaaaagcg ctctgaagac gcaatttcaa aaaaccaaaa acgcaccgga	3540
ctgtaacgag ctactaaaaat attgccaata ccgcttcac aaacattget caaaagtatc	3600
tctttgctat atatctctgt gctatatecc tatataacct accatccac cttegtccc	3660
ttgaacttgc atctaaactc gacctctaca ttttttatgt ttatctctag tattactctt	3720
tagacaaaaa aattgtagta agaactattc atagagttaa tcgaaaacaa tacgaaaatg	3780
taaacatttc ctatacgtag tatatagaga caaaatagaa gaaaccgttc ataattttct	3840
gaccaatgaa gaatcatcaa cgctatcact ttctgttcac aaagtatgcg caatccacat	3900

[0077]

cggatagaaa tataatcggg gatgccttta tcttgaaaa atgcacccgc agcttcgcta	3960
gtaatcagta aacgcgggaa gtggagtcag gcttttttta tggaagagaa aatagacacc	4020
aaagtagcct tcctctaacc ttaacggacc tacagtgcga aaagttatca agagactgca	4080
ttatagagcg cacaaaggag aaaaaagta atctaagatg ctttggttaga aaaatagcgc	4140
tctcgggatg catttttgta gaacaaaaaa gaagtataga ttctttgttg gtaaaatagc	4200
gcctctcgct tgcattttctg ttctgtaaaa atgcagctca gattctttgt ttgaaaaatt	4260
agcgctctcg cgttgcattt ttgttttaca aaaatgaagc acagattctt cgttggtaaa	4320
atagcgcttt cgcgttgcatt ttctgttctg taaaaatgca gctcagattc tttgtttgaa	4380
aaattagcgc tctcgcgttg catttttggt ctacaaaatg aagcacagat gcttcgttaa	4440
caaagatatg ctattgaagt gcaagatgga aacgcagaaa atgaaccggg gatgcgacgt	4500
gcaagattac ctaigcaata gatgcaatag ttctctcagg aaccgaaata catacattgt	4560
cttccgtaaa gcgctagact atatatattt atacaggttc aaatatacta tctgtttcag	4620
ggaaaactcc caggttcgga tgttcaaaat tcaatgatgg gtaacaagta cgatcgtaaa	4680
tctgtaaaae agttigtctg atattaggtt gtatctctc aaagcgtatt cgaatatcat	4740
tgagaagctg cagcgtcaca tcggataata atgatggcag ccattgtaga agtgcctttt	4800
gcattttctag tctctttctc ggctagctga gttttactac atcgcaaga tagaatctta	4860
gacacactg cctttgctga gctggatcaa tagagtaaca aaagagtgtt aaggcctctg	4920
taaaggacaa ggacctgagc ggaagtgtat cgtacagtag acggagtata ctagtatagt	4980
ctatagtcgg tggaattctc atgtttgaca gcttatcctc gataagcttt tcaattcaat	5040
tcacattttt ttttttatc ttttttttga ttctcggttc ttgaaattt ttttgattcg	5100
gtaatctccg aacagaagga agaacgaagg aaggagcaca gacttagatt ggtaatatata	5160
cgcataatgta gtgttgaaga aacatgaaat tgcccagtat tcttaaccca acfgcacaga	5220
acaaaaacct gcaggaaacg aagataaatc atgtcgaaag ctacatatata ggaacgtgct	5280
gctactcctc ctagtctgtg tctgtccaag ctatttaata tcatgcacga aaagcaaaca	5340
aacttgtgtg cttcattgga tgttcgtacc accaaggaat tactggagtt agttgaagca	5400
ttaggtccca aaatttggtt actaaaaaca catgtggata tcttgactga tttttccatg	5460
gagggcacag ttaagcgcct aaaggcatta tcgccaagt acaatttttt actcttcgaa	5520
gncagaaaaa ttgttgacat tggtaataca gtcaaatgtc agtactctgc gggtgtatac	5580
agaatagcag aatgggcaga cattacgaat gcacacggtg tgggtggccc aggtattgtt	5640
agcggtttga agcagggcgc agaagaagta acaaaggaa ctagaggcct ttgatgtta	5700
gcagaattgt catgcaaggg ctccctatct actggagaat ataactaagg tactgttgac	5760
attgcgaaga gcgacaaaga ttitgttact ggetttattg ctcaaagaga catgggtgga	5820
agagatgaag gttacgattg gttgattatg acaccgggtg tgggttttaga tgacaaggga	5880
gacgcaitgg gtcaacagta tagaaccgtg gatgatgtgg tctctacagg atctgacatt	5940
attattgttg gaagaggact atttgcaaag ggaagggatg ctaaggtaga gggatgaacgt	6000
tacagaaaaa caggttgga agcatatttg agaagatgcg gccagcaaaa ctaaaaaact	6060
gtattataag taaatgcatg tatactaaac tcacaaatta gagcttcaat ttaattatat	6120

[0078]

cagttattac cegggaatct cggtcgtaat gacttgaaat aattaacaaa caaaggaggt	6180
acagttagaa attgtaggag agatctcggt tttcgcgaca atctggcggt tttcttgcfa	6240
attccaggat taatccgttc atagtgtaaa acccgttta cacattctga cggaagatat	6300
agattggaag tattgcattc actaagataa gtatggcaac actggaacag acatgaatta	6360
tcagaacgac gatttacgca tcaaagaaat eaaagagtta ettectctcg tcgcattgct	6420
ggaaaaatc cccgctactg aaaatgccgc gaatacgggt gccatgcc gaaaagcgat	6480
ccataagatc ctgaaaggta atgatgatcg cctgttggtt gtgattggcc catgctcaat	6540
tcatgatcct gtcgcggcaa aagagtatgc cactcgcttg ctggcgctgc gtgaagagct	6600
gaaagatgag ctggaaatcg taatgcgcgt ctattttgaa aagccgcgta ccacggtggg	6660
ctggaaaggg ctgattaacg atccgcatac ggataatagc ttccagatca acgacggtct	6720
gcgtatagcc cgtaaattgc tgcttgatat taacgacagc ggtctgccag cggcagggtga	6780
gtttctcgat atgatcacc cacaatatct cgtcgacctg atgagctggg gcgcaattgg	6840
cgcacgtacc accgaatcgc aggtgcaccg egaactggca tcagggtttt ctgtcctgg	6900
cggcttcaaa aatggcaccg acggtacgat taaagtggct atcgatgcca ttaatgccgc	6960
cggtcgcgcg cactgcttcc tgctcgtaac gaaatggggg cattcgcgca ttgtgaatac	7020
cagcggtaac ggcgattgcc atatcattct gcgcggcggt aaagagccta actacagcgc	7080
gaagcacgtt gctgaagtga aagaagggtc gaacaaagca ggcttgccag cacaggtagt	7140
gatcgatttc agccatgcta actcgccaa acaattcaaa aagcagatgg atgtttgtgc	7200
tgacgtttgc cagcagattg ccggtggcga aaaggccatt atggcgta tggtggaaag	7260
ccatctggtg gaaggcaatc agagcctcga gagcggggag ccgctggcct acggtaaag	7320
catcacgat gcctgcatcg gctgggaaga taccgatgct ctgttaacgtc aactggcgaa	7380
tgcagtaaaa gcgcgtcgcg ggtaagggtt aattgtcgga tgcgcgta gagtggcgta	7440
tccgatgaat caccacagc ctgataagtc gcgcagcgtc gcatcaggca atgtgtcca	7500
ttgttagcaa caaaaagcc gactcacttg cagtcggctt tctcatttta aacgaatgac	7560
gtttacttcg ctttacctg gtttgaacc gccgtgctt tcgctctcga ggctattgac	7620
gacagctatg gttaactgtc caccaaccaa aactgtgctc agtaccgcca atatttctcc	7680
cttaggggtg acaaagaggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttacaaa	7740
aaggatttga ctttccctac aggtgtgtga ataatttaac tacaggcggg ggcaccccg	7800
cctgttctag aggaggagga atcgccatgg agaggattgt cgttactctc ggggaacgta	7860
gttaaccaat taccatcgca tctggtttgt ttaatgaacc agcttcattc ttaccgctga	7920
aatcgggcga gcaggtcatt ttggtcacca acgaaacctt ggctcctctg taactcgata	7980
aggtccgcgg cgtacttgaa caggcgggtg ttaacgtcga tagcgatac ctccctgacg	8040
gcgagcagta taaaagcccg gctgtactcg ataccgtctt tacggcggtg ttacaaaagc	8100
cgcattggtc cgatactacg ctggtggcgc ttggcggcgg cgtagtgggc gatctgaccg	8160
gcttcggggc ggcagattat cagcgggtg ttctgttcat tcaagtcceg acgacgttae	8220
tgctgcaggt cgattcctcc gttagcgcca aaactgcggt caaccatccc ctcggtaaaa	8280
acatgattgg cgcgttctac cagcctgctt cagtgggtgt ggatctcgac tgtctgaaaa	8340
cgttccccc gcgtgagtta gcgtcggggc tggcagaagt catcaatac ggcattattc	8400

[0079]

```

ttgacgggtgc gtttttcaac tggctggaag agaattcigga tgcgttggtg cgtctggacg 8460
gtccggcaat ggcgtactgt attcgccgtt gttgtgaact gaaggcagaa gttgtcggcg 8520
ccgacgagcg cgaaaccggg ttacgtgctt tactgaatct gggacacacc ttgggtcatg 8580
ccattgaagc tgaattgggg taaggcaatt gtttacaagg tgaagcggtc gctgcgggta 8640
tgggatggcg ggcgcggacg tgggaacgct cggggcagtt tagttctgcc gaaacgcage 8700
gtattataac cctgctcagc cgggctgggt taccggtaaa tgggcgcgcg gaaatgtccg 8760
cgcaggcgta ttaccgcat atgctgcgtg acaagaaagt ccttgcggga gagatgcgct 8820
taattcttcc gttggcaatt ggtaagagtg aagttcgagc cggcgtttcg cagcagcttg 8880
ttcttaacgc cattccgat tgtcaatcag cgtaatcacc gttcatgctt gatgcgcgta 8940
tgtaggcggc ataaggcgtt cagcccgcat ccggcaaccg atgctgatg cgacgcggtc 9000
gcgtcttacc aggcctacag gtcgatgccg atatgtacat cgtattcggc aattaatata 9060
tagca 9065

```

<210> 32
 <211> 11475
 <212> DNA
 <213> 质粒pCP55:

```

<400> 32
acatgaatgg tcttcgggtt ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagegccc 60
tgcaccatta tgttccggat ctgcatacga ggaatctgct ggtaccctg tggaaacacct 120
acatctgtat taacgaagcg ctggcatiga cctgagtgta tttttctctg gtcccgcgcg 180
atccataacc ccagttgttt accctcaca cgttccagta accgggcagc ttcatcatca 240
gtaaccgcta tctgagcat cctctctcgt ttcatcggtg tcattacccc catgaacaga 300
aattccccct tacacggagg catcaagtga ccaaacagga aaaaaccgce cttaacatgg 360
cccgttttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg 420
atgaacaggc agacatctgt gaatcgcttc acgaccaagc tgatgagctt taccgcagct 480
gcctcgcgcg ttctgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 540
tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 600
gtgttgccgg gtgtcggggc gcagccatga ccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 660
ctggtttaac tatgcggcat cagagcagat tgtacigaga gtgcaccata tgcggtgtga 720
aataaccgac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgtctttcgg ctctctcgct 780
cactgactcg ctgcgcfcgg tcttccggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaagge 840
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 900
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 960
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgac ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 1020
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 1080
cctgccgctt accggatacc tgtccgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgttttctca 1140
tagctcacgc ttaggtatc tcagttcggt gtaggtcggt cgtccaagc tgggctgtgt 1200
gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgtg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 1260
caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 1320

```

[0080]

agcgaggat	gtaggcgggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	1380
tagaaggaca	gtattttgta	tctgcgtct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	1440
tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgtcggtagc	ggtaggtttt	ttgtttgcaa	1500
gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgaict	tttctacggg	1560
gtctgacgct	cagtgggaacg	aaaactcacg	ttaagggatt	ttggctatga	gattatacaa	1620
aaggatcttc	acctagatcc	ttttaaatia	aaaatgaagt	tttaaatcaa	tctaaagtat	1680
atatgagtaa	acttggctcg	acagttacca	atgcttaate	agtgaggcac	ctatctcagc	1740
gatctgtcta	tttcgttcat	ccatagttag	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	1800
acgggagggc	ttaccatctg	gccccagtgc	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgtcacc	1860
ggctccagat	ttatcagcaa	ttaaccagcc	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtggctc	1920
tgcacttita	tccgcctcca	tccagtctat	taattgttgc	cgggaagcta	gagtaagtag	1980
ttcgccagtt	aafagtittgc	gcaacgttgt	tgcattgtct	gcaggcatcg	tggtgtcacg	2040
ctcgtcgttt	ggtaggtctt	cattcagctc	cggttcccaa	cgtatcaagg	gagttacatg	2100
atcccccatg	ttgtgcacaa	aagcggttag	ctccttcggg	cctccgatcg	ttgtcagaag	2160
taagttggcc	gcagtgttat	caetcatggt	tatggcagca	ctgcataatt	ctcttactgt	2220
catgccatcc	gtaagatgct	tttctgtgac	tggtgagtac	tcaaccaagt	cattctgaga	2280
atagtgtatg	cgccgaccga	gttgcctctg	cccggcgtea	acacgggata	atacgcgcgc	2340
acatagcaga	actttaaaag	tgctcatcat	tggaaaacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	2400
aaggatctta	ccgtgtttga	gattcagttc	gatgtaaccc	actcgtgcac	ccaactgata	2460
ttcagcatct	tttactttea	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	2520
cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaata	cicatactct	tccittttca	2580
atattattga	agcattttatc	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	2640
ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttcgcgc	cacatttccc	cgaaaaagtgc	caccctgacgt	2700
ctaagaaacc	attattatca	tgacattaac	ctataaaaaat	aggcgtatca	cgaggccctt	2760
tctgtctcaa	gaattctgaa	ccagtcctaa	aacgagtaaa	taggaccgcgc	aattcttcaa	2820
gcaataaaca	ggaataccaa	ttattaaaag	ataacttagt	cagatcgtac	aataaagctt	2880
tgaagaaaaa	tgcgccttat	tcaatctttg	ctataaaaaa	tggcccaaaa	tctcacattg	2940
gaagacattt	gatgacctca	tttctttcaa	tgaaggccct	aacggagtgt	actaatgttg	3000
tgggaaaattg	gagcgataag	cgtgtctctg	ccgtggccag	gacaacgtat	actcatcaga	3060
taacagcaat	acctgateac	taettcgcac	tagtttctcg	gtactatgca	tatgatecaa	3120
tatcaaagga	aatgatagca	ttgaaggatg	agactaatcc	aattgaggag	tggcagcata	3180
tagaacagct	aaagggtagt	gctgaaggaa	gcatacgata	cccccaifgg	aatgggataa	3240
tatcacagga	ggtagctagac	tacctttcat	cctacataaa	tagacgcata	taagtacgca	3300
tttaagcata	aacacgcact	atgccgtttc	tctcatgtat	atatatatac	aggcaacacg	3360
cagatatagg	tgcgacgtga	acagtgagct	gtatgtgcgc	agctcgcgtt	gcattttcgg	3420
aagcgtctgt	tttcggaaac	gctttgaagt	tcttatcccg	aagttcctat	tctctagaaa	3480
gtataggaac	ttcagagcgc	ttttgaaaac	caaaagcgct	ctgaagacgc	actttcaaaa	3540

[0081]

aaacaaaaac gcaccggact gtaacgagct actaaaatat tgcgaatacc gettccacaa	3600
acattgtctc aaagtatctc ttgtctatat atctctgtgc tatatcccta tataacctac	3660
ccatccacct ttgcctcctt gaaattgcat ctaaaetega cctctacatt ttttatgttt	3720
atctctagta ttactcttta gacaaaaaaa ttgtagtaag aactattcat agagtgaate	3780
gaaaacaata cgaanaatgta aacatttccct atacgtagta tatagagaca aaatagaaga	3840
aaccgttcat aattttctga ccaatgaaga atcatcaacg ctatcacctt ctgttcacaa	3900
agtatgcgca atccacatcg gfatagaata taatcgggga tgcctttatc ttgaaaaaat	3960
gcaccgcgag ctctgctagt aatcagtaaa cgcgggaagt ggagtcaggc ttttttatg	4020
gaagagaaaa tagacacaa agtagccttc ttctaacctt aacggaccta cagtgcacaa	4080
agttatcaag agactgcatt atagagcgca caaaggagaa aaaaagtaat ctaagatgct	4140
ttgttagaaa aatagcgctc tcgggatgca tttttgtaga acaaaaaaga agtatagatt	4200
ctttgttggt aaaatagcgc tcctcgcttg catctctgtt ctgtaaaaat gcagctcaga	4260
ttctttgttt gaaaaattag cgcctcgcgc ttgcattttt gttttacaaa aatgaagcac	4320
agattcttcg ttggtaaaa atgcctttcg cgttgcatct ctgttctgtt aaaaatgcgc	4380
tcagattctt tgtttgaaaa attagcgctc tcgcgttgca tttttgtctt acaaaatgaa	4440
gcacagatgc ttctttaaca aagatatgct attgaatgic aagatggaaa cgcagaaaaat	4500
gaaccgggga tgcgacgtgc aagattacct atgcaataga tgcaatagtt tctccaggaa	4560
ccgaataca tacattgtct tcctgtaaagc gctagactat atattattat acaggttcaa	4620
atatactatc tgtttcaggg aaaactccca ggttcggatg ttcaaaaatc aatgatgggt	4680
aaacaagtac atcgtaaaatc tgtaaaacag ttgttcggat attagcctgt atctcctcaa	4740
agcgtattcg aatatcattg agaagctgca gcgtcacatc ggataataat gatggcagcc	4800
attgtagaag tgccttttgc atttctagtc tctttctcgg tctagctagt tttactacat	4860
cgcgaagata gaactctaga tcacactgcc ttgtctgagc tggatcaata gagtaacaaa	4920
agagtggtaa ggccctcgta aaggacaagg acctgagcgg aagtgtatcg tacagtagac	4980
ggagtatact agtatagctt atagtcctgt gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga	5040
taagcttttc aattcaattc atcatttttt ttttattctt ttttttgatt tcggtttctt	5100
tgaatttttt ttgatctggt aatctccgaa cagaaggagc aacgaaggaa ggagcacaga	5160
cttagattgg tatatatacg catatgtagt gttgaagaaa catgaattg cccagtatc	5220
ttuacccaac tgcacagaae aaaaaectgc aggaacgaa galaaatcat gtcgaaagct	5280
acataaagg aacgtgctgc tactcactct agtccctgtg ctgccaagct atttaatac	5340
atgcacgaaa agcaaacaaa ctgtgtgtgt tcattggatg ttctgtaccac caaggaaata	5400
ctggagttag ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatata	5460
ttgactgatt ttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggcattatc cgcgaagtac	5520
aatttttttac tcttcgaaga cagaaaaatt gctgacattg gtaatacagt caaattgcag	5580
tactctcggg gtgtatfacg aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg	5640
gtgggccag gtattgttag cggtttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct	5700
agaggecttt tgatgtttag agaattgtca tgcagggtct cctatctac tggagaatat	5760
actaagggtta ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct	5820

[0082]

caaagagaca tgggtggaag agatgaaggt tacgattggt tgattatgac acccggtgtg	5880
ggttttagatg acaagggaga cgcatlgggt caacagtata gaaccgtgga tgatgtggtc	5940
tcacaggat ctagacattat tattgttggga agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct	6000
aaggtagagg gtgaacgtta cagaaaagca ggctgggaag catatttgag aagatgcggc	6060
cagcaaaact aaaaaactgt attataagta aatgcatgta tactaaactc acaaatlaga	6120
gcitcaattt aattataatca gttattaccc gggaatctcg gtcgtaatga aaggaaaagc	6180
gcaacggacg ggcgagtaga ttgcgcaaca tgcgagcatg atccagagat ttctgaagca	6240
gcaaaaggat gttccatgta catgacgcgc ggcttgcggt aaattgttgg caaatlttcc	6300
ggcgtagccc aaaaacgcgt gtcgtcaagt cgttaagggc gtgcccttca tcatccgate	6360
tggagtcaaa atgtcctcac gtaaaagact tgccaatgct attcgtgcgc tgagcatgga	6420
cgcagtagacg aaagccaaat ccggtcaccg gggtgccctt atgggtatgg ctgacattgc	6480
cgaagtctcg tggcgtgatt tectgaaaca caaccgcag aatccgtcct gggetgaccg	6540
tgaccgettc gtgctgtcca acggccacgg ctccatgctg atctacagcc tgcgtcacct	6600
caccggttac gatctgccga tggaaagaact gaaaaacttc cgtcagctgc actctaaaac	6660
tccgggccac ccggaagtag gttataccg tgggtgtgaa accaccacg gtcgctggg	6720
tcagggtatt gccaacgcag tccgtatggc gatigcagaa aaacgcgtgg cggcgcagtt	6780
taaccgtcca ggtcacgaca ttgtcgacca ctacacctac gccttcattg gcgacggetg	6840
catgatggaa ggcatctccc acgaagtttg ctctctggcg ggtacgctga agctgggtaa	6900
actgattgcg ttctacgatg acaacggtat ctcaatcgat ggtcacgttg aaggetgggt	6960
cactgacgac accgcaatgc gtltcgaagc ttacggettg cactgtattc gegacatcga	7020
cggtcagtac gcggcatcca tcaaacgcgc agtagaagaa gcgcgcgcag tgactgacaa	7080
accgtccctg ctgatgtgca aaaccatcat cggtttcggt tcccgaaca aagccggtac	7140
ccacgaetcc cacggtgcgc cgttgggcga cgtgaaatt gccctgaccc gcgaacagct	7200
gggctggaaa tacgcgccgt tcgaaatccc gtctgaaatc tatgtcagt gggatgcgaa	7260
agaagcaggc caggcgaagc aatctgcatg gaatgagaag ttltcggttt acgcgaaagc	7320
ttatccgcag gaagcggctg aatttaccgc ccgtatgaaa ggcgaaatgc cgtctgaatt	7380
cgaagccaaa gcgaaagagt ttatcgctaa actgeagget aatccggcga aaatcgccag	7440
ccgtaaagcg tgcgagaatg ctatcgaaagc gttcgccccg ctgttgcctg aattcctcgg	7500
cggctctgct gacctggcac cgtctaacct gacctgtgg tctggttcta aagcaatcaa	7560
cgaagatget gcaggtaact acatccacta cgggttgcgc gatttcggta tgaccgcgat	7620
tgetaacggt atctccctgc acggtggttt cctgcctgac acctccacct tctgatgtt	7680
cgtggaatac gcacgtaacg ccgtacgtat ggctgcgctg atgaaacagc gtcaggatgat	7740
ggtttacacc cacgaetcca tccgtctggg cgaagatggc ccgaetccac agccggttga	7800
gcaggtcgct tctctgcgcg tgaccccgaa catgtctaca tggcgtccgt gtgaccaggt	7860
tgaatccgcg gtgcgtgga aatacggcgt tgagcgtcag gacggccccg ctgccttat	7920
cctctccctg cagaacctgg cgcagcagga acgaactgaa gagcaactgg caaacatcgc	7980
gcgcgggtgt tatgtgctga aagactgcgc cggtcagccg gaactgattt tcatcgctac	8040

[0083]

cggttcagaa gtgaaactgg ctgttgctgc ctacgaaaaa ctgactgccg aaggcgtgaa	8100
agcgcgcgtg gtgtccatgc cgtctaccga cgcatttgac aagcaggatg ctgcttaccg	8160
tgaatccgta ctgccgaaag cggttactgc acgcgttgct gtagaagcgg gtattgtcga	8220
ctactggtae aagtatgttg gcctgaacgg tctatctgtc ggtatgacea ccttcggtga	8280
atctgctccg gcagagctgc tgtttgaaga gtccgcttc actgttgata acgttgttgc	8340
gaaagcaaaa gaactgctgt aattagcatt tcgggtaaaa aggtcgttc gccgaccttt	8400
tttattacct tgatatgtcc gtttcggac aagcaataga taaagcgtgt tctagatcac	8460
aaatatattat atgcaataaa tatcaattat gtaatatgca tcacgatatg cgtattgaca	8520
tttgttgta taactataac tcaatgitat ataagaaatt aactgaaat aattaacaaa	8580
caaaggagtt acagttagaa atgttaggag agatctcgtt ttccgcgaca atctggcgtt	8640
tttcttgcta attccaggat taatccgttc atagtgtaaa acccgttta cacattctga	8700
cggaaagatat agattggaag tattgcattc actaagataa gtatggcaac actggaacag	8760
acatgaatta tcagaacgac gatttacgca tcaaagaaat caaagagtta cttctctctg	8820
tcgcattiget ggaaaaattc cccgtactg aaaatgccgc gaatacgtt gcccatcccc	8880
gaaanagcat ccataagatc ctgaaaggta atgatgatcg cctgttggtt gtgattggcc	8940
catgtcaat tcatgacct gtccggcga aagagtatgc cactcgttg ctggcgtgc	9000
glgaagagct gaaagatgag ctggaaatcg taatgcgcgt ctattttgaa aagccgcgt	9060
ccacggtggg ctggaaaggg ctgattaacg atccgcataa ggataatagc ttccagatca	9120
acgacggtct gcgtatagcc cgtaaattgc tcttgatat taacgacagc ggtctgccag	9180
cggcagggtga gtttctcgat atgatcacc cacaatatct cgtgacctg atgagctggg	9240
gcgcaattgg cgcacgtacc accgaatgc aggtgcaccg cgaactggca tcaggccttt	9300
cttgctccgt cggttcaaaa aatggcaccg acggtacgat taaagtggt atcgatgcca	9360
ttaatgccgc cggctgcgcg cactgccttc tctccgtaac gaaatgggg cattcggcga	9420
ttgtgaatac cagcggtaac ggcgatggc atatcattct gcgcggcgtt aaagagccta	9480
actacagcgc gaagcaggtt gctgaagtga aagaagggt gaacaaagca ggctgccag	9540
cacaggatgat gatcgatttc agccatgcta actcgtccaa acaattcaaa aagcagatgg	9600
atgtttgtgc tgacgtttgc cagcagattg ccggtggcga aaaggccatt attggcgtga	9660
tggtggaaaag ccattctggt gaaggcaatc agagcctcga gagcggggag ccgctggcct	9720
acggtaagag caccaccgat gctgcatcg gctgggaaga taccgatgt ctgttacgtc	9780
aactggcgaa tgcagtaaaa gcgcgtcgcg ggttaaggttt aattgtcga tgcgccgta	9840
gagtgccgta tccgatgaat caccacaggc ctgataagtc gcgcagcgtc gcacaggca	9900
atgtgctcca ttgttagcaa caaaaaagcc gactcattg cagtcggctt tctcatttta	9960
aacgaatgac gtttacttcg ctttaccctg gtttgcaccc gccgtgctt tgcctctcga	10020
ggctattgac gacagctatg gttcacgtc caccaccaa aactgtgtc agtaccgcca	10080
atattttctc cttgaggggt acaaagaggt gtccctagaa gagatccaag ctgtgtaaaa	10140
attttacaaa aaggtattga ctttccctac aggtgtgtga ataatttaac tacaggcggg	10200
ggcaaccccg cctgttctag aggaggagga atcgccatgg agaggatigt cgttactctc	10260
ggggaacgta gttacccaat taccatcgca tctggtttgt ttaattgaac agcttcatc	10320

[0084]

```

ttaccgctga aatcgggcga gcaggtcacg ttggtcacca acgaaacctt ggctcctctg 10380
tatctcgata aggtccgcgg cgtacttgaa caggcgggtg ttaacgtcga tagcgttate 10440
ctccctgacg gcgagcagta taaaagcctg gctgtactcg ataccgtctt tacggcgttg 10500
ttacaaaaagc cgcattggtc cgtactacg ctggtggcgc ttggcggcgg cgtagtgggc 10560
gatctgaccg gcttcgcggc ggcgagttat cagecgggtg ttctttcat tcaagtcceg 10620
acgacgttac tgcgcagggt cgttcctcc gtggcgga aaactgcggt caaccatccc 10680
ctcgtaaaa acatgattgg cgcgttctac cagctgctt cagtgggtgt ggtctcgac 10740
tgtctgaaaa cgttcccc gcgtgagtt gctcgggc tggcagaagt catcaaatac 10800
ggcattatct ttgacggtgc gttttcaac tggctggaag agaactctga tgcgttgttg 10860
cgtctggacg gtccgcaat ggctactgt attcgcgtt gttgtgaact gaaggcagaa 10920
gttgtcgccg ccgacgagcg cgaaaccggg ttacgtgctt tactgaatct gggacacacc 10980
tttggtcatg ccattgaagc tgaatgggg tatggcaatt ggttacatgg tgaagcggtc 11040
gctcgggta tggatgagc ggcgcggacg tcggaacgtc tgggcagtt tagttctgcc 11100
gaaacgcagc gtattataac cctgctcagc cgggctgggt taccggtcaa tgggcgcgc 11160
gaaatgtccg cgcagcgta ttaccgcat atgctcgtg acaagaaagt ccttcggga 11220
gagatgcgtc taattcttcc gtggcaatt gtaagagtg aagttcgag cggcgttcg 11280
cacgagcttg ttcttaacgc cattccgat tgtcaatcag cgtaatcgc gttcatgctt 11340
gatgccgcta ttaggcggc ataaggcgtt cagccgcgtt ccggcaaccg atgcctgatg 11400
cgacgcggtc gcgtcttacc aggcctacag gtcgatccg ataigtacat cgtattcggc 11460
aattaataca tagca 11475

```

<210> 33
 <211> 7769
 <212> DNA
 <213> 质粒pYEP24;

```

<400> 33
gaattctgaa ccagtcctaa aacgagtaaa taggaccggc aattcttcaa gcaataaaca 60
ggaataccaa ttattaaaag ataacttagt cagatcgta aataaagctt tgaagaaaaa 120
tgcgccttat tcaatctttg ctataaaaaa tggcccaaaa tctcacattg gaagacattt 180
gatgaccfca tttctttcaa tgaaggcctt aacggagttg actaatgttg tgggaaattg 240
gagcgataag cgtgcitctg ccgtggccag gacaacgtat actcatcaga taacagcaat 300
acctgatcac taettcgac tagtttctcg gtaetaigca tatgatcaa tatcaaagga 360
aatgatagca ttgaaggatg agactaatcc aattgaggag tggcagcata tagaacagct 420
aaagggtagt gctgaaggaa gcatacgata ccccgcatgg aatgggataa tatcacagga 480
ggtaactagc tacctttcat cctacataaa tagacgcata taagtacgca ttttaagcata 540
aacacgcact atgccgttct tctcatgtat atatataac aggcacacg cagatatagg 600
tgcgacgtga acagtgagct gtatgtgcgc agctcgggtt gcattttcgg aagcgtctgt 660
tttcggaaac gctttgaagt tcctattccg aagttcttat tctctagaaa gtataggaac 720
ttcagagcgc ttttgaaaac caaaagcgtc ctgaagacgc actttcaaaa aaccaaaaae 780
gcaccggact gtaacgagct actaaaatat tgcgaatacc gcttcacaa acattgtcga 840

```

[0085]

```

aaagtatctc ttgctatat atctctgtgc tatatcccta tataacctac ccatccacct      900
ttcgcctcctt gaacttgcct ctaaactcga cctctacatt ttttatgttt atctctagta      960
ttactcitta gacaaaaaaa ttgtagtaag aactattcat agagtgaatc gaaaacaata     1020
cgaaaaatgta aacatttctc atacgtagta tatagagaca aaatagaaga aaccgttcat     1080
aattttciga ccaatgaaga atcatcaacg ctatcacitt ctgttcacaa agtatgcgca     1140
atccacatcg gtatagaata faatcgggga tgcctttatc ttgaaaaaat gcacccgcag     1200
cttcgctagt aatcagtaaa cgcgggaagt ggagtcaggc ttttttatg gaagagaaaa     1260
tagacaccaa agtagccttc ttctaacctt aacggaccta cagtgcacaa agttatcaag     1320
agactgcatt atagagcgca caaaggagaa aaaaagtaat ctaagatgct ttgttagaaa     1380
aatagcgcic teggatgca tttttgtaga acaaaaaaga agtatagatt cttgtttgtt     1440
aaaatagcgc tctcgcgttg cattctgtt ctgtaaaaat gcagctcaga ttctttgttt     1500
gaaaaattag cgciccgcg ttgcattttt gttttacaaa aatgaagcac agattcttcg     1560
ttggtaaaat agcgttttc cgttgcattt ctgttcgta aaaatgcagc tcagattctt     1620
tgtttgaaaa attagcgtc tcgcttgca tttttgtct acaaaatgaa gcacagatgc     1680
ttcgtaaca aagatatgct attgaatgc aagatggaaa cgcagaaaaat gaaccgggga     1740
tgcgacgtgc aagattacct atgcaataga tgcaatagtt tctccaggaa ccgaaataca     1800
tacattgtct tccgtaaagc gctagactat atattattat acaggttcaa atatactatc     1860
tgtttcaggg aaaactccca gggtcggatg ttcaaaatc aatgatgggt aacaagtaacg     1920
atcgtaaaatc tgtaaaacag ttgtcggat attagctgt atctctcaa agcgtatttcg     1980
aatatcattg agaagctgca gcgtcacatc ggataataat gatggcagcc attgtagaag     2040
tgccttttgc atttctagtc tctttctcgg tctagctagt ttactacat cgcgaagata     2100
gaatcttaga tcacactgcc ttgtctgagc tggatcaata gagtaacaaa agagtggtaa     2160
ggcctcgta aaggacaagg acctgagcgg aagtgtatcg tacagtagac ggagtatact     2220
agtatagctc atagtcctg gaattctcat gttgacagc ttatcatcga taagcttttc     2280
aattcaattc atcattttt ttttattctt ttttttgatt tgggtttctt tgaaattttt     2340
ttgattcggc aatctccgaa cagaaggaa aacgaaggaa ggagcacaga cttagattgg     2400
tatatatacg catatgtagt gtigaagaaa catgaaattg cccagtatc ttaacccaac     2460
tgcacagAAC gaaaacctgc aggaacgaa gataaatcat gtcgaaaget acatataagg     2520
aacgigtgc tactcatctc agtcctgtg ctgccaaget atttaatafc atgcacgaaa     2580
agcaaacaaa cttgtgtgct tcattggatg ttctgtaccac caaggaattc ctggagttag     2640
ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatata ttgactgatt     2700
tttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggcattatc cccaagtac aattttttac     2760
tcttcgaaga cagaaaaatt gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctcggg     2820
gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg gtgggccag     2880
gtattgttag cggtttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccitt     2940
tgatgttagc agaattgtca tgcaagggtc ccctatctac tggagaatat actaagggtg     3000
ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca     3060

```

[0086]

tgggtggaag agatgaaggt tacgattggt tgattatgac acccggtgtg ggittagatg	3120
acaaggagaga cgcattgggt caacagata gaaccgtgga lgalgtggic telacaggat	3180
ctgacattat tattgttga agaggactat ttgcaaagg aaggatgct aagtagagg	3240
gtgaacgita cagaaaagea ggcgtggaag catatttgag aagatgcgc cagcaaaact	3300
aaaaaactgt attataagtaaatgcatgta taetaaactc aaaaattaga gcttcaattt	3360
aattatataca gttattaccc gggaatctcg gtcgtaatga tttttataat gacgaaaaaa	3420
aaaaaattgg aaagaaaaag cttaaatgcg gtagtttatac acagttaaat tgctaacgca	3480
gtcaggeacc gtgtatgaaa tctaacaaatg cgtcatcggt catcctcggc accgtcaccc	3540
tggatgctgt aggcataaggc ttggttatgc cggtagtgc gggcctcttg cgggatatcg	3600
tccattccga cagcagtcgc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatatac gcgttgatgc	3660
aatttctatg cgcaccggtt ctcggagcac tgcgcgacc ctttggccgc cgcacagtc	3720
tgctcgttc gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acacccgtcc	3780
tgttgatcct ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggtg	3840
ctggcgcta tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggcgcgacc ttccgggtca	3900
tgagcgttg ttccggcgtg ggtatggtg caggccccgt ggccgggga ctgttggcg	3960
ccatctcctt gcatgcacca ttcttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac	4020
tgggtgctt cctaattcag gactgcata agggagagcg tcgaccgatg ccttgagag	4080
ccttaacccc agtcagctc ttccgggtgg cgcggggcat gactatcgtc gccgaccta	4140
tgactgtctt ctttatcatg caactcgtag gacagggtgc gcagcgctc tgggtcattt	4200
tcggcgagga ccgcttctgc tggagcgga cgaatgatcg cctgtcgtt gcggtattcg	4260
gaattctgca cgcctcgtt caagccttcg tcaactggtc cgcacacaaa cgtttcggcg	4320
agaagcagc cattatcgcc gccatggcg ccgacgcgt ggcctacgtc ttgctggcgt	4380
tcgcgacgc aggcgtgatg gccttccca ttatgattct tctcgttcc ggcggcatcg	4440
ggatgcccgc gttgcaggcc atgtgtcca gccaggtaga tgacgacct caggacagc	4500
ttcaaggatg gctcgcggtt ctaccagcc taacttcgat cactggaccg ctgatgtca	4560
cggcgattta tgcgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcattgatt gtaggcgccg	4620
ccctatacct tgtctgctc ccccggttgc gtcgcggtgc atggagccg gccacctga	4680
cctgaatgga agccggcgcc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa	4740
tcaattcttg cggagaaatg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatgc	4800
gtccgccatc tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg	4860
ggtcgcgatg atcgtgctc tgcgttgag gaccggcta ggctggcggg gtigccttac	4920
tggtagcag aatgaateac cgatacgcga gcgaacgtga agcgaactgct gctgcaaac	4980
gtctgcgacc tgagcaacaa catgaatggt ctccggttcc cgtgttctg aaagtctgga	5040
aacgcggaag tcagcgccct gcaccattat gtccggatc tgcacgcag gatgtgctg	5100
gctacctgt ggaacacct catctgtatt aacgaagcgc tggcattgac cctgagtgt	5160
ttttctctgg tccgcgcga tccaiacgc cagttgttta cctcacaac gttccagtaa	5220
ccggcgatgt tcatcatcag taaccggtat cgtgagcatc ctctctctgt tcatcggtat	5280
cattaccccc atgaacagaa attccccctt aacggaggc afcaagtgc caaacaggaa	5340

[0087]

aaaaccgccc	ttaacatggc	ccgetttatc	agaagccaga	cattaacgct	tctggagaaa	5400
ctcaacgagc	tggacgcgga	tgaacaggca	gacatctgtg	aatcgcttca	cgaccacgct	5460
gatgagcttt	accgcagctg	cctcgcgcgt	ttcggtgatg	acggtgaaaa	cctctgacac	5520
atgcagctcc	cggagacggt	cacagcttgt	ctgtaagcgg	atgccgggag	cagacaagcc	5580
cgtcagggeg	cgtcagcggg	fgttggcggg	tgtcggggcg	cagccaigac	ccagtcacgt	5640
agcgatagcg	gagtgataac	tggcttaact	atgcggcatc	agagcagatt	gtactgagag	5700
tgcaccatat	gcggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	gagaaaaatac	cgcatcaggc	5760
gccttccgcg	tccctcgcgc	actgactcgc	tgcgctcggt	cgctcggctg	cggcgagcgg	5820
tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	5880
agaacatgtg	agcaaaaaggc	cageaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	5940
cgtttttcca	taggtccgcg	ccccctgacg	agcatcacia	aaatcgacgc	tcaagtcaga	6000
ggtggcgaaa	cccgcagga	ctataaagat	accaggcggt	tecccttga	agctccctcg	6060
tgcgctctcc	tgttcggacc	ctgcgcctta	cggataacct	gtccgccttt	cctccctcgg	6120
gaagegtgge	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcggtg	taggtcgttc	6180
gtcccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	6240
gtaactatcg	tcttgagtcc	aaccgcgtaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	6300
ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtc	tacagagtte	ttgaagtggg	6360
ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	6420
ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gacccggcaa	acaaaccacc	gtcggtagcg	6480
gtggfttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	6540
cittgatctt	tctacggggg	tctgacgcgc	agtggaaacga	aaactcacgt	taagggaatt	6600
tggatcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	aaatgaagtt	6660
ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggctctga	cagttaccaaa	tgtttaatca	6720
gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcacg	catagttgcc	tgactccccg	6780
tctgttagat	aactacgata	cgggaggggc	tacctctcgg	ccccagtgct	gcaatgatac	6840
cgcgagaccc	acgtccaccg	gtctcagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaaggg	6900
ccgagcgcag	aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	ccagtctatt	aattgtttgcc	6960
gggaagctag	agtaagtagt	tgcgcagtta	atagtttgcg	caacgtttgt	gccattgtctg	7020
caggcatcgt	ggtgtcacgc	tctgtctttg	gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	7080
gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaa	agcgggttagc	tcttccggtc	7140
ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	cagtggttate	actcatgggt	atggcagcac	7200
tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	7260
caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcgctcaa	7320
cacgggataa	taccgcgcga	catagcagaa	ctttaaaagt	gtcatcatt	ggaaaacgtt	7380
cttcggggcg	aaaactctca	aggatctttac	cgtctgttag	atccagttcg	atgtaaccca	7440
ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	7500
aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataagggc	gacacggaaa	tgttgaatac	7560

[0088]

tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggtfattgt ctcatgagcg	7620
gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc	7680
gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaata	7740
ggcgtatcac gaggeccctt cgtcttcaa	7769
<210> 34	
<211> 2000	
<212> DNA	
<213> 缺失的aroE区的序列;	
<400> 34	
actacgtccg tcctctgaaa tcttcagcgg atggacatat cgtcaaagtt ctggaggggc	60
aggtttgcgc tgcatgtggc gcaaatecgg tattacgcca gggacgcttt ggtatgttta	120
tfggttgcat taactaccct gaatgcgaac ataccgaact tatcgataaa ccggacgaaa	180
cagcaattac atgcccccaa tctcggacgg gccatctggt ccagcgcgc tcccgttatg	240
gcaaaacatt tcaactctgt gatcgtacc eggagtgtca atttgcatt aacttcaaac	300
ccatagctgg agaatgccct gagtgcatt atcgcctact catcgaaaag aaaaccgcgc	360
agggtgtaaa acacttttgt gccagtaaac aatgtggaaa gccggtttcg gcggaataat	420
aacgtgaata ataacctgca aagagacgct atcgcagctg cgatagatgt tctcaatgaa	480
gaacgtgtca tcgcctatcc aacggaagcc gttttcgtg ttgggtgcga tctgatagc	540
gaaacagcag tgatgcgact gttggagtta aaacagcgtc cggttgataa ggggctgatt	600
ttaatcgcag caaattacga gcagcttaaa ccttatattg atgacaccat gttgactgac	660
gtgcagcgtg aaaccatttt tccccctcgg ccaggctcctg tcacctttgt ctttccccgcg	720
cctgcgacaa caccgcgctg gttagcgggc cgttttgatt cgttgcgtg acgagtcacc	780
gaecatccgt tgggtggtgc ttgtgccag gcttatggta aacegctggt ttctaccagt	840
gccaaattga gtggattgcc acctgtcga acagtagacg aagttcgcgc acaatttggc	900
gcggcgttcc cggttgtgcc tggtgaaacg gggggcggtt taaatccttc agaaatccgc	960
gatccctga cgggtgaact gtttcgacag gggtaacata atcaggccat ccagtttccg	1020
gacagggaag agtgggacga gaataaaaaa tgtgtatgtt tccccctct cgtgaatggt	1080
atgcaactga catgcgcgat ctctggcgag agtctggcgt atcgttttac tggagatacg	1140
ccagaacagt ggtagcgag ttttcgtcag catcgtggg acctggaaga agaagcgga	1200
aaettaatc aggaacaaag tgaagatgat caaggctggg tctggttacc ctgatccaga	1260
tattcgtcct tccatttcac gtaattatc gcggaatagc gtaacceage cttctcttca	1320
tcaettaacg ggcgatctg tttagcggg ctaccgagat acagatatcc gctctccagc	1380
cgtttatttt gtgggaccag actaccega ccaatcata catcatcttc tactattgag	1440
ccatcaagta aaattgagcc cateccaacc aaaactcgat tgccaatggt gcagccgtgg	1500
agcatcacct tgtgaccaac agtgacatct tcgccaatgg ttaatgggtt gccatctggg	1560
tigtacgagg atttatgagt gacatgcaac atactgccat cctggatatt ggtgcgtgct	1620
ccgatctgta cataatgtac atctccacga atcacacga gggccagat ccccatcata	1680
tcagccagac gaacgtcacc aatcacgaca ctgctatcgt cgatcattac gcgctgaccg	1740
atttgtggaa aaagatcgcg gtatggcggt aaaacatcag acatacttac ctacgaata	1800

[0089]

aatgattllac taatgactllt gggggcatta ttggcctltg gcaagtcclt tagtalgcaa	1860
aaaagcaccg ttttgtgtgc gattgcagca aaaagggtga aaaaacaaca aacagaaaaa	1920
aagatcaaaa aaafactttgt gcaaaaaatt gggatcccta taatgcgcct ccgttgagac	1980
gacaacgtga aacacttcac	2000
<210> 35	
<211> 2460	
<212> DNA	
<213> 在缺失的ack基因座处整合的PI5aroB盒的序列;	
<400> 35	
gatcggcggc ataaaacgga tcgcataacg cgtcatcttg ataacgcgat tttcgacaaa	60
gaccggggca aggcgttttt ccagcggcc a gctctttgag taatgctgtc cccggcgaaa	120
caagctaaaa aaattaacag aacgattatc cggcggttac atgcttcacc tcaacttcac	180
atataaagat tcaaaaaatt gtgcaaatc acaactcagc gggacaacgt tcaaaaacatt	240
ttgtcttcca taccactat caggtatct ttagcagcct gaaggcctaa gtagtacata	300
ttcattgagt cgtcaaatc atatacatta tgccattggc tgaaaattac gcaaaatggc	360
atagactcaa gataattctt ccatcatgca aaaaaaaatt tgcagtgcct gatgttaac	420
ataaatgtcg gtgtcatcat gcgtacgct ctatggtcc ctgacgtttt tttagccacg	480
tatcaattat aggtacttcc ctcgaggcta ttgacgacag ctatggttca ctgtccacca	540
acaaaaactg tgctcagtac cgccaatatt tctcccttga ggggtacaaa gaggtgtccc	600
tagaagagat ccacgctgtg taaaaatttt aaaaaaagg attgacttcc cctacagggt	660
gtgtaataat ttaattacag gcggggggcaa ccccgctgt tctagaggag gaggaatcgc	720
catggagagg attgtcgtta ctctcggga acgtagtta ccaattacca tctcatctgg	780
ttgttttaat gaaccagett cattcttacc gctgaaatcg ggcgagcagg tcatgttgg	840
caccaacgaa accctggctc ctctgtatct cgataaggte cgcggcgtae ttgaacagge	900
gggtgttaac gtcgatagcg ttatctctcc tgacggcgag cagtataaaa gectggctgt	960
actcgatacc gtctttacgg cgttgttaca aaagecgcat ggctcgata ctacgctgg	1020
ggcgcttggc ggcggcgtag tggcgatct gaecggcttc gggcgggcga gttatcagcg	1080
cgggtgtcgt ttcattcaag tcccagcagc gttactgtc caggctgatt cctccgttgg	1140
cggcaaaact gcggtcaacc atcccctcgg taaaaacatg attggcgctg tctaccagcc	1200
tgcttcagtg gtggtggatc tegactgtct gaaaacgcit ccccgcggtg agttagcgtc	1260
ggggtcgca gaagtcacat aatacggcat tattcttgac ggtgcgtttt tcaactggct	1320
ggaagagaat ctggatgcgt tgttgcgtct ggacggctcg gcaatggcgt actgtattcg	1380
ccgttgttgt gaactgaagg cagaagtgt cgcgcgcgac gagcgcgaaa ccgggttacg	1440
tgctttactg aatctgggac acacctttgg tcatgccatt gaagctgaaa tggggtatgg	1500
caattggtta catggtgaag cggctcgtgc gggatatgtg atggcgcgcc ggacgtcgga	1560
acgtctcggg cagtttagtt ctgccgaaac gcagcgtatt ataaccctgc tcaacggggc	1620
tgggttacgg gtcaatgggc cgcgcgaaat gtccgcgcag gcgtatttac cgcataatgt	1680
gcgtgacaag aaagtccttg cgggagagat gcgtttaatt cttecggttg caatttgtaa	1740
gagtgaagtt cgcagcggcg ttctgcacga gcttgttctt aacgccattg ccgattgtca	1800

[0090]

```

atcagcgtaa tcacgttca tgctgatgc cgetatgtag gccgataag gcgttcacgc 1860
cgcatccggc aaccgatgcc tgatgcgacg cggtecgctc ttatcaggec tacaggtcga 1920
tgecgatatg tacatcgtat teggcaatta atacatagca ttacacaccg ccagctcage 1980
tggcgggtgct gttttgtaac ccgcaaatc ggcggtaacg aaagaggata aaccgtgtcc 2040
cgtattatta tgctgatecc taccggaace agegtcggtc tgaccagcgt cagcettigge 2100
gtgatccgtg caatggaacg caaaggcgtt cgtctgagcg ttttcaaacc tatcgttcag 2160
ccgcgtaccg gtggcgatgc gcccgatcag actacgacta tcgtgcgtgc gaactcttcc 2220
accacgacgg ccgctgaacc gcigaaaatg agctacgttg aaggtctgct ttccagcaat 2280
cagaaagatg tgctgatgga agagatcgtc gcaaaactacc acgctaacac caaagacgct 2340
gaagtcgttc tggttgaagg tctgggtccg acacgtaagc accagtttgc ccagtctctg 2400
aactacgaaa tcgctaaaaa gctgaatgcg gaaatcgtct tcgttatgtc tcagggcact 2460

```

<210> 36
 <211> 1000
 <212> DNA
 <213> 缺失的poxB区的序列;

```

<400> 36
gcggcccgcc tccgtatatg gattgggtag agcaggaagt gaaagcgctc ggctgacgc 60
gtttctttaa agagaaattc ttaccccag tagcggaagc agcgaccagc ggtctgaaat 120
tcacaaaact gcaaccggca cgagaatttt acgcccgggt tggcaccacg ctactggagg 180
cgctggaaag caataacgtt ccggttgctc ccgcctcccg tgcgggtgtt tgcggctgct 240
gtaagacaaa agtggtticc ggtgaatata cggtagcagc cacaatgacg ctgaccgacg 300
ccgaaategc tgaaggttac gtactggcct gctectgcca tccgcagggg gatttggttc 360
tcgcataate gccttatgcc cgatgaiaft cctttcatcg ggctatttaa ccgttagtgc 420
ctcctttctc tcccattccf tcccctccg tcagatgaac taaacttggt accgittatc 480
cattcaggag atggagaacc aaagggtgga atttcccgct ataataagga catgccatga 540
ttgatattac cagtataacc gtiaccgac cgagccgcgc catgctcgaa gcaatgatgg 600
ccgccccggt tggggacgac gtttacggag acgacctac cgtaatgct ctgcaggact 660
acgccgcaga gctttccggt aaagaagccg ccatttttct gccgaccggc acicaggcca 720
acctggctgc tctgctcagt cactgcgaac gfggcgaaga gtatattgtc ggtcagcccg 780
cgcataacta tetgtttgaa gccggtggcg cagcgggtgct gggcagtatt cagccgcaac 840
ccatcgacgc ggctgccgac ggcacgtac cgttgataa agtggcgatg aaaatcaaac 900
ccgacgatat ccatttcgcc cgcaccaaai tactcagttt ggaaaacacc cacaacggca 960
aagtgcctgc gcgtgaatac ctgaaagaag catgggaatt 1000

```

<210> 37
 <211> 3392
 <212> DNA
 <213> 在缺失的poxB基因座处的tktA盒;

```

<400> 37
gcggcccgcc tccgtatatg gattgggtag agcaggaagt gaaagcgctc ggctgacgc 60
gtttctttaa agagaaattc ttaccccag tagcggaagc agcgaccagc ggtctgaaat 120
tcacaaaact gcaaccggca cgagaatttt acgcccgggt tggcaccacg ctactggagg 180

```

[0091]

```

cgctggaaag caataacgtt cccgttgtcg ccgctgccg tgcgggtgtt tgcggtgct 240
gtaagacaaa agtggtttcc ggtgaatata cggtagcag cacaatgacg ctgaccgacg 300
ccgaaatcgc tgaaggttac gtactggcct gctcctgcc tccgcagggg gatttggtc 360
tcgcataatc gccctatgcc cgatgatatt cctttcatcg ggctatttaa ccgttagtgc 420
ctcctttctc tcccatecct lccccctccg tcagatgaac taaacttggt accgttatca 480
cattcaggag atggagaacc aaggaaaagc gcaacggacg ggcgagtaga ttgcgcaaca 540
tgcgagcatg atccagagat ttctgaagca gcaaaaggat gtccatgta catgacgcgc 600
ggcttgcggt aaattgttgg caaatittcc gccgtagccc aaaacgcgct gtcgtcaagt 660
cgtaagggc gtgcccttca tcatccgacg tggagtcaaa atgtcctcac gtaaagagct 720
tgccaatgct attcgtgcgc tgagcatgga cgcagtacag aaagccaaat ccggtcaccc 780
gggtgccctt atgggtatgg ctgacattgc cgaagtctg tggcgtgatt tcttgaaaca 840
caaccgcag aatccgtctt gggtgaccg tgaccgttc gtctgttcca accgccacgg 900
ctccatgctg atctacagcc tgcctgcacct caccggttac gatctgcca tggagaact 960
gaaaaacttc cgtcagctgc actctaaaac tccgggccac ccggaagtag gttataccgc 1020
tggtgtggaa accaccaccg gtccgctggg tcagggtatt gccaacgcag tcggtatggc 1080
gattgcagaa aaaacgctgg cggcgcagtt taaccgtcca gtcacgaca ttgtcgacca 1140
ctacacctac gccctcatgg gcgacggctg catgatgaa ggcatctccc acgaagtttg 1200
ctctctggcg ggtacgctga agctgggtaa actgattgct ttctacgatg acaacggtat 1260
ctcaatcgat ggtcacgttg aaggetgggt cactgacgac accgcaatgc gtttcgaagc 1320
ttaaggctgg cacgttatte gegacatcga cggtcatgac gcggcatcca tcaaacgcgc 1380
agfagaagaa gcgcgcgcag tgaactgaaa accgtccctg ctgaigtgca aaaccatcat 1440
cggtttcggt tcccgaaca aagccgttac ccacgaetcc caccgtgcgc cgtgggcca 1500
cgtgaaatt gccctgaccc gcgaacagct gggtggaaa tacgcgccgt tcgaaatccc 1560
gtctgaaatc tatctcagc gggatgcgaa agaagcagge caggcgaaag aatctgcatg 1620
gaatgagaag tttcggtctt acgcgaaagc ttatccgcag gaagcgctg aatttaccgc 1680
ccgtatgaaa ggcaaatgc cgtctgaact cgacgccaaa gcgaagagt ttatcgctaa 1740
actgcagctt aatccggcga aaatcgccag ccgtaaagcg tgcgagaatg ctatcgagc 1800
gttcggcccc ctgttgcctg aattcctcgg cggctctgct gacctggcac cgtctaacct 1860
gacctgttgg tctggtctca aagcaatcaa cgaagatgct gcaggtaact acatccacta 1920
cgggttctgc gagttcggtg taaccgcgat tgcataacgt atctccctgc accgtgggtt 1980
cctgccgtac acctccacct tctgtatgtt cgtggaatac gcacgtaacg ccgtacgtat 2040
ggctgcgctg atgaaacagc gtcaggigat ggtttacacc caccgaetcca tcggtctggg 2100
cgaagatggc ccgactcacc agccgggtga gcaggctcgt tctctgcgcg tgaccccgaa 2160
catgtetaca tggcgctcgt gtgaccaggt tgaatccgcg gtcgcgtgga aatacggcgt 2220
tgagcgtcag gacggcccga ctgcgttat cctctccctg cagaacctgg cgcagcagga 2280
acgaactgaa gagcaactgg caaacatcgc gcgcggtggt tatgtgctga aagactgcgc 2340
cggtcagccg gaactgattt tcatcgctac cggttcagaa gttgaactgg ctgttgcctg 2400

```

[0092]

ctacgaaaaa ctgacigccg aaggcgtgaa agegcgcgig gigtccatgc cgtclaccga 2460
 cgeatttgac aagcaggatg ctgcttaccg tgaatccgta ctgccgaaag cggttactgc 2520
 acgcgttgct gtagaagcgg gtattgctga ctaetggtac aagtatgttg gectgaacgg 2580
 tgctatcgtc ggtagacca ccttcgggtga atcigtctcg gcagagetgc tgtttgaaga 2640
 gttcggcttc actgttgata acgtttgttc gaaagcaaaa gaactgtgtt aattagcatt 2700
 tcgggtaaaa aggtcgcttc ggcgaccttt tttattacct tgatatgtcc gtttcggac 2760
 aagcaataga taaagcgtgt ttagatcac aaatatattat atgcaataaa tatcaattat 2820
 gtaatatgca tcacgatatg cgtattgaca tttgttgta taactataac tcaatgttat 2880
 ataagaaatt aaaaagggtg gcatttcccg tcataataag gacatgccat gattgattta 2940
 cgcagtata ccgttaccg accgagccgc gccatgctcg aagcaatgat ggccgccccg 3000
 gttggggacg acgtttacgg agacgacct accgttaatg ctctgcagga ctacgccga 3060
 gagctttccg gtaagaage cgccattttt ctgccgaccg gcaetcagge caacctggtc 3120
 gctctgtca gtcactgcga acgtggcgaa gagtatattg tcggtcagge cgcgcataac 3180
 tatctgtttg aagccggtgg cgcagcggcg ctgggcagta ttcagccgca acccatcgac 3240
 gcggtgcgcg acggcacgct accgctggat aaagtggcga tgaanaatca acccgacgat 3300
 atccatttcg ccgcaccaa attactcagt ctggaaaaca cccacaacgg caaagtgtcg 3360
 ccgcgtgaat acctgaaaga agcatgggaa tt 3392

<210> 38
 <211> 1015
 <212> DNA
 <213> ptsHI缺失序列;

<400> 38
 gaagatgaaa gctttaccaa caagaatatt gtggttatte taccateate gggtgagcgt 60
 tatttaagca ccgcattgtt tgccgatctc ttacatgaga aagaattgca acagtaatgc 120
 cagcttgta aaaatgcgta aaaaagcacc ttttaggtg cttttttgtg gectgcttca 180
 aactttcgcc cctcctggca ttgattcagc ctgtcggaaac tggattattaa ccagactaat 240
 tattttgatg cgcgaattta atcggtacag gaaaagccaa agctgaatcg attttatgat 300
 tiggttcaat tcttctttta gcggcataat gttaaatgac gtacgaaacg tcagcggta 360
 acacccgcca gcaatggaci gtattgcgtt ctctgtcgtt cgcgtctgtt aaaaacigge 420
 gctaacaata caggctaaag tegaaccgcc aggctagact ttagttccac aacactaaac 480
 ctataagtig gggaaataca atgttccagc aagaagttac cattaccgtt ccgacaatct 540
 gctaatecac gagatgcggc ccaatttact gcttaggaga agatcatggg ttgttcgat 600
 aaactgaaat ctctggtttc cgacgacaag aaggataccg gaactatiga gatcattgct 660
 ccgtctcttg gcgagatcgt caatatcgaa gacgtgccgg atgtcgtttt tgcggaaaaa 720
 atcgttggtg atggtattgc tatcaaacca acgggtaaca aaatggtcgc gccagtagac 780
 ggccaccatg gtaaaatctt tgaaaccaac caegcattct ctatcgaaac tgatagcggc 840
 gttgaactgt tctgtaactt cggtagcgc accgttgaac tgaaaggcga aggettcaag 900
 cgtattgtcg aagaaggta gcgcgtgaaa gtggcgata ctgtcattga atttgatctg 960
 ccgcgtcgtg aagagaaagc caagtcctacc ctgactccgg ttgttatctc caacatggac 1020

[0093]

gaaatcaaag aactgatcaa actgt	1045
<210> 39	
<211> 4595	
<212> DNA	
<213> 在缺失的tdc基因座处整合的glf-gl1k盒;	
<400> 39	
ctgattttctt tgtcgtgat ccttactgg aactcgcag ttategacca ggttgacctc	60
ggttcgtgt cgttaacgg tcatgaagg atcctgatca ctgtctggt ggggatttcc	120
atcatggttt tctcctttaa ctctcgcga atcgtctctt ccttcgtggt ttctaaacgt	180
gaagagtaig agaaagactt cggtcgcga ttaccgaac gtaaatgttc ccaaatcatt	240
tctcgtgcca gcatgctgat ggttcagtg gtgatgttct ttgccttag ctgectgttt	300
actcgtctc cggccaacat ggccgaagcc aaagcgcaga atattccagt gctttcttat	360
ctggctaacc actttgctc catgaccggt accaaaaaa cgttcgcgat tacactggaa	420
tatggcggtt ccatcctgc actcgtggct atcttcaaat ctttcttcgg tcaactatctg	480
gggacgctgg aaggctttaa tggctcgtt ctgaagttc gttataaagg tgacaaaacc	540
aaagtgtcgc tgggtaaact gaatactctc agcatgatct tcatcatggg ctccacctgg	600
gtttgtgctt acgccaacce gaacatctc gacctgattg aagccatggg cgcaccgatt	660
atcgcacccc tgcgtgctt gttgccgat tatgccatcc gtaaagcgcc gtctctggcg	720
aaataccgtg gtcgtctgga taacgtgttt gttaccgtga ttggtctgct gaccatctctg	780
aacatcgtat acaaactgtt ttaatccgta atcaggatg agaaaagaga tgaatgaatt	840
tccggttggt ttggttatfa actgtgggtc gtcttcgatt aagttttccg tactcgatgc	900
cagcgactgt gaagtattaa tgtcagggtat tgccgacggt attaactcgg aaaatgcatt	960
cttatecgtt aatgggggag agccagcacc gctggctcac cacagctacg aaggtgcatt	1020
gaaggcaatt gcatttgaac tggaaaaacg gagttttaat gacagcgtgg ccttaattgg	1080
tgcaaaagtg gctgtgactg faaaaagaaa tcgaaaaaga ccgttttgtg tgaaaacggt	1140
ctttttgttt ccttttaacc aactgccata actcaggcc tacttagctt ccaagaaaga	1200
tatectaaca gcacaagagc ggaaagatgt ttgttctac atccagaaca acctctgcta	1260
aatctctga aaaattttgc aaaaagtgtg tgactttatc tacaagtggt ggtataataa	1320
tcttaacaac agcaggacgc tctagaggga gaggaatgc catgagttct gaaagtagtc	1380
agggtctagt caagcgaata gccctaateg ctgctatagg cggtttgctt ttcggttacg	1440
attcagcgtt tatcgtgca atcgtacac cggttgatat ccattttatt gccccctgc	1500
acctgtctgc tacggtcgc gcttcccttt ctgggatggt cgttgttgc gttttggtc	1560
gttgtgttac cggttctttg ctgtctggtt ggattggfat tcgcttcggt cgtcgcggcg	1620
gattgttgat gagttccatt tgttctgctc ccgcgggttt tgggtctgcg ttaaccgaaa	1680
aattattttg aaccggtggt tcggttttac aaatttttg ctttttccgg tttcttgccg	1740
gtttaggtat cgggtgtggt tcaaccttga ccccaacctt tatgtctgaa attgctccgc	1800
cagacaaaac tggtcagatg gtttctggtc agcagatggc cattgtgacg ggtgctttaa	1860
ccggttatat ctttacctgg ttactggctc atttcggttc tctcgattgg gttaatgcca	1920
gtggttgatg ctggtctccg gcttcagaag gcctgatcgg tatgtccttc ttattgtctc	1980

[0094]

tgtaaaccgc accgatacgc ccgcatgggt tggatgaa gggacgtcat tccgaggcta	2040
gcaaaatcct tgcctgtctg gaaccgcaag ccgacccaa tctgacgatt caaaagatta	2100
aagcttggett tgataaagcc atggacaaaa gcagcgcagg ttgttttget ttgtgtatca	2160
ccgtttgttt tgcgggtgta tccgttctg ccttccagca gttagtcggg attaacgcgc	2220
tgcctgattt tgcaccgcag atgttccaga atttaggttt tggagctgat acggcattat	2280
tcagacccat cctctatcgt gtgtgaact tcattttcac catgattgct tccgtgttg	2340
ttgaccgctt cggccgtaaa cctctgctta ttgggggtgc tctcggtatg gctgcaatga	2400
tggctgtttt aggcctgtgt ttctgttca aagtcgggtg tgttttgcct ttggcttctg	2460
tgtttcttta tattgcagtc ttgtgtatgt catggggccc tgtctgtctg gttgttctgt	2520
cagaaatgtt cccgagttcc atcaagggtg cagctatgcc tatcgctgtt accggacaat	2580
ggttagctaa tatcttgggt aacttctgt ttaaggttgc cgatgttct ccagcattga	2640
atcagacttt caaccacggt ttctctatc tcttttgc agcattaaat atcttaggtg	2700
gcttgattgt tgcctgttgc gtgcggaaa ccaaagggtg gagctggat gaaatcgagg	2760
agatgtggcg cctccagaag tagttaaaat tgccttggct gaatcctttt gctttttta	2820
gataagtctt aaccaattat acttttgtt tacaacgatg gtataaagcg ggcggactta	2880
ttttaccgtt tgggtagcct tctgatttca gaaaggaatt attatggaaa ttgttgcgat	2940
tgacatcggg ggaacgatg cgcgtttctc tattgcggaa gtaagcaatg gtcgggttct	3000
ttctcttgga gaagaacaa cttttaaac ggcagaacat gctagcttgc agttagcttg	3060
ggaacgttgc ggtgaaaaac tgggtcgtcc tctgceacgt gccgcagcta ttgcatgggc	3120
tggcccggtt catgttgaag tttaaaaact taccataaac ctttgggtat taagaccagc	3180
tactctgaat gaaaagctgg acatcgatac geatgttctg atcaatgact tggcgcgggt	3240
tgcacacgcg gtgcgcata tggattcttc ttatctggat catatttctg gtcctgatga	3300
agcgttctct agcgtgggt ttatcaatat tcttggtccg ggaacgggct tgggtgttgc	3360
ccatctgttg cggactgaag gccgttattt cgtcatcgaa actgaaggcg gtcatacga	3420
ctttgtctcg cttagacagc ttgaagacaa aattctggca cgtttacgtg aacgtttccg	3480
ccgcgtttct atcgaacgca ttatttctgg cccgggtctt ggtaatatct acgaagcaat	3540
ggctgccatt gaaggcgttc cgttcagctt gctggatgat attaaattat ggcagatggc	3600
tttgaaggtt aaagacaacc ttgctgaagc cgttttggat cgtttctgct ttagccttgg	3660
cgtatcgtct ggtgatcttg ctttggcaca ggttcgaacc agtgttgita ttggcgttgg	3720
tgtcggctct cgtatcgtt cccatttgc agaatctgtt ttccgtcagc gctttgttcc	3780
aaaaggacgc ttgaacgcg tcatgtccaa gattccggtt aagttgatta cttatccgca	3840
gcctggactg ttgggtgcgc agctgcctat gccacaacaa attctgaagt tgaataatat	3900
tttttaatat tatgaactga atttaagagg ctgccttccg ataaaatcgg gaggtggcct	3960
tttttatatt tttaactaaa aaatgaagac aaaaaagttc taagtaagaa taatattatt	4020
attaaacttt gatataattt gtattagtgg atccgccctc ccgttggaat ttgaagccat	4080
cgcagtacgt agtgcgtaaa gcctcgtgag cgggacggtc gtaaggtcgt tccgtccac	4140
ttcacfgaac ggcaatccga ggggttggat atgattagtg cattcgatat ttcaaaatt	4200
gggatttggt cctccagttc gcataccgtg gggccaatga atgcggaaa aagttttatt	4260

[0095]

gacggctgg aaagtagcgg cttattaacc gcgacgagcc atattgtggt cgatctgtac 4320
 gggtcgttgt cactgacggg caaaggccat gccacggatg tcgccatcat catgggaactg 4380
 gcaggaaaca gtccgcagga fggtgtcatt gatgagatec ctgcatttat agagtttagta 4440
 acgcgcagcg ggcggctgcc agtggcatct ggtgcgcata ttgttgattt tctgtagca 4500
 aagaacattt tcttccatcc cgaaatgttg cctcgccatg agaacggaat gcggatcaact 4560
 gcttggaagg gacaggaaga gctattaagt aaaac 4595

<210> 40
 <211> 1069
 <212> DNA
 <213> galP缺失区;

<400> 40
 actttggtcg tgaacatttc ccgtgggaaa aaaccgacaa agcgcagctg ctgcgcgatg 60
 ctgccgtctc gaagtaatct ttcctcacct gcgttcaaaag gccagcctcg cgctggcctt 120
 tttcttttgg ataggcgttc acgccgcata cggcaaaaaa accgcccgca caataacatc 180
 attcttctcg atcaegtctc accgcagatt atcatcacia ctgaaaccga ttacaccaac 240
 cacaacagac aaagatttgt aatattttca tattattatt cggttttcac agttgttaca 300
 tttcttttca gtaaagtctt aattgcagat aacagcgttt aatctatgat gatataactc 360
 aattattttc atgcacttaa atcataacta agataaatgt tagtgtaagc gattacactg 420
 atgtgatttg cttcacatct ttttacctcg tactcaccta tcttaattca caataaaaaa 480
 taaccatatt ggagggcata atgcttgacg ctaaaaaaca ggggcggfca aacaaggcaa 540
 tgacgtttga aataggeget cactgattaat ctccccaagc ttcttcccat cgcggaggaa 600
 gccacctctt gcagtcactt tttcttgcct ctatcctctg ccgctaigaa aacatcccgt 660
 ctccctatcg ccatccaaca ggccgttatg cgtcgctgc gggaaaaact cgcccaggcc 720
 aacctgaagc tagggcgtaa ctaccggag ccaaaactct cttacacca gcgcggaacc 780
 tccgceggaa cggccttgct ggaaagctat gaaattcgcc tcaatccgt tttgctgttg 840
 gaaaacagtg aagcttttat tgaagaagt gtaccgcacg aactggcaca tttgcttgta 900
 tggaaacatt tcggccgcgt agcggccat ggcaaagagt ggaagtggat gatggaaaa 960
 gtgctgggtg ttcgcgcccg tcgtacgcct cagttcgaac tgcaatccgt gcgtcgcaac 1020
 accttccct accgtgcaa gtgccaggag catcagctta ccgtacgcc 1069

<210> 41
 <211> 6100
 <212> DNA
 <213> adhE基因座处的P15-catAX +PR-aroY+P26-quiC盒;

<400> 41
 ttgattttca taggttaagc aaatcatcac cgcactgact atactctcgt attcgagcag 60
 atgatttact aaaaaagttt aacattatca ggagagcatt agcttgctat tgacgacagc 120
 tatggttcac tgtccaccaa ccaaaactgt gctcagtacc gccaatattt ctcccttgag 180
 gggtaaaaag aggtgtccct agaagagatc cagctgtgt aaaaatttta caaaaaggta 240
 ttgactttcc ctacagggtg tgtaataatt taattacagg cgggggcaac cccgcctgtt 300
 ctgcagagga ggaatatagc catggaagt aaatcttca acaccagga tggtcaggat 360

[0096]

tttctgctg ttgcaagcgg tctggaacaa gaggttgta atccgcgtgt taaacaaatt	420
attcatcgtg ttctgagcga cctgtataaa gcaattgaag atctgaatat caccagcgac	480
gaataattggg caggcgttgc ataictgaat cagctgggtg caaatcaaga agcaggtctg	540
ctgagtcagg gtctgggttt tgaicattat ctggataige gtatggatgc agaagatgea	600
gcacitgggta ttgaaaaatgc aacacccgtt accatitgaag gtccgcgtga tgttgcgggt	660
gcaccggaaa gcgtttggta tgcacgcatt gatgatgta gcatccgaa tggcataacc	720
ctgattctgc atggcaccat ttttgatgea gatggtaaac cgttgcgaa tgcaaaagt	780
gaaatttggc atgcaaacac caaaggcttt tatagccatt ttgatccgac cgttgaacag	840
caggccttta atatgcgtcg tagcattatt accgatgaga atggtcagta tctgtttcgt	900
accattctgc ctgcccgtta tggttgtcct ccggaaggte cagccagca actgctgaac	960
caactgggtc gtcatggtta tegtccggca catattcatt attttgttag cgcagatggt	1020
caccglaaac tgaccacca gattaatglt gccgtgata cgtataacca tgaatatttt	1080
gcataatgca cccgtgaagg tctggtgtt gatgcagttg aacataccga tccggaagca	1140
attaaagcca atgatgtga aggtcctttt gccgaaatgg tgtttgatct gaaactgacc	1200
cgtctggttg atggtgttga taatcaggtt gtggatcgtc cgcgtctggc agtttaatac	1260
accaaaatgg ttcaaaatta tcaggcgagt gatcatgata actgacctgt ttttatttca	1320
gggaagggtg gagacaatta cgtggataat cagatcatce aagaaaccgt ggataaaatt	1380
ctgagcgttc tgcgaaatca ggcaggicag ctggcagctc tggigcgtct gatgcaattt	1440
gcatgcgata cgaccattac cgttattggc aaatataacc atggtaaaag ccgtctgctg	1500
aatgaactga ttggcacega tatcttttagc gttgcagata aacgtgaaac cattcagctg	1560
gccgaacata aacaggatca ggttcgttgg ctggatgcac etggtctgga tgcgatgtt	1620
gcagcagttg atgatcgtca tgcattigaa gcagtttga cccaggeaga tattegtctg	1680
tttgttcata gcgttcgtga aggtgaactg gatgcaaccg aacaccatct gctgcaacag	1740
ctgattgaag atgccgatca tagccgtctg cagaccatte tggttctgac ccagattgat	1800
cagattccgg atcagaccat cctgacacag attaaaacca gcattgcaca gcaggttccg	1860
aaactggata tttgggcagt tagcgcaacc cgtcatcgtc agggcattga aaacggtaaa	1920
accttgcgtg tcgaaaaaag cggatattgt gcactgcgcc atacctgga acaggcactg	1980
gcacaggctc cgagcgcacg tacctatgaa aaaaatcgtc tgcgtgcaga tctgcaccat	2040
cagctgaaac aactgctgct ggatcagaaa catgttctgc aacaactgca acagacacag	2100
caacagcagc tgcattgatt tgataceggc ctgattaaca ttctggacaa aattcgtgtt	2160
gatctggaac cgattgtgaa tatigtatgt caggatcaag caatgaatcc ggatagcttt	2220
gcaaccatgt ttaaaaaaac cgcagcaaaa cagcagcgtg ccaaagtcca gattgcataf	2280
agccgtgcct gcattgaaat caacagccat ctgattcgcc atggtgttgt tggctcgtct	2340
gcggaacage agaccaccat taaaagcatt gataccgiga ttgttgccgt gtttggatc	2400
agcgttaaat ttcgtgatca gctgcgtgcc ctgttttata ccgataccga acgtcagcgt	2460
ctgcaacgtg aatttctgtt ctattttgaa aaaagtgcgc gtgcgatgat tctggcagca	2520
aaaattgaac agaccatgcg tcagcagggc tgtattcaga atgcatgat ggcaactgaa	2580
caaatggaaa gcgcagcata aaaacacgga cgcgcgcaac ggcgtccgaa tttcttggtc	2640

[0097]

gaccgttaaa tctatcacg caaggataa atatctaaca ccgtgcgtgt tgactatatt	2700
acctctggcg gtgataatgg ttgcatgtac taatctagat aaggaatata gccatgaccg	2760
caccgattca ggaictgcgt gatgcaattg ccttgcctga acagcatgat aatcagtatc	2820
tggaaaccga tcaiccggtt gatccgaatg cagaactggc aggcgtttat cgtcatattg	2880
gtgccggtgg caccgttaaa cgtccgaccc gtattgggcc ggcaatgatg ttttaataaca	2940
ttaaaggtta tccgcacagc cgtattctgg ttggatgca tgcaagccgt cagcgtgcag	3000
cactgcctgt gggttgtgaa gcaagtcagc tggcactgga agttggtaaa gcagttaaaa	3060
aaccggttgc accggtggtt gtcccgcaa gcagcgacc gtgtcaagag cagatttttc	3120
tggcagatga tccggatttt gatctgcgtt ccttgcctgc tgcacatacc aataaccoga	3180
ttgatgcagg tccgtttttt tgtctgggtc tggccctggc aagcgatccg gtggatgcaa	3240
gccagaccga tgttaccatt catcgtctgt gtgttcaggg tctgatgaa ctgagcatgt	3300
tcctggcagc aggtcgccat attgaagttt ttctgcagaa agcagaagca gcaggtaaac	3360
cgtcgccgat taecattaat atgggtctgg acccagcaat ctatatggc gcatgttttg	3420
aagcaccgac caccctgtt gggtataatg aactgggtgt tgcgggtgca ctgcgtcagc	3480
gtccggttga actggttcag ggtgttagcg ttccgaaaa agcaattgca cgtgccgaaa	3540
ttgttattga aggtgaactg ctgccgggtt ttctgtttcg tgaagatcag cataccaatt	3600
caggctatgc aatgccgaa ttccgggtt attgtgtggg tgcaaatccg agcctgcogg	3660
ttattaaagt taaagccgtt accatgcgca ataacgcaat tctgcaaac ctggttggtc	3720
cgggtgaaga acataccacc ctggcaggtc tgcgaccga agcaagcatt tggaatgcag	3780
ttgaagcagc aattccgggt ttcttgcata atgtttatgc ccataccgca ggcgggtgta	3840
aatttctggg tatcttgcga gtgaaaaac gtcagcctgc cgtgaaggt cgtcagggtc	3900
aggcagccct gctggcgtg gcaacctata gcgaactgaa aaatatcatl ctggtggatg	3960
aggatgtgga cttttttgat agtgatgata ttctgtggc aatgaccacc cgtatgcagg	4020
gtgatgttag cattaccacc attccgggtt ttccgggtca tcagctggac ccgagccaga	4080
caccggaata ttaccagagc attcgtggta atggtattag ctgcaaaacc atctttgatt	4140
gtaccgttcc gtgggcactg aaaagccatt ttgaacgtgc accgtttgca gatgttgatc	4200
cgcgtccgtt tgcacctgaa tttttgcac gctctgaaaa aaatcagggc agcgcaaat	4260
aagctaataa caggctctgt ggtaatgcga ggaattttta ttggatgga tccgcttacc	4320
tagcttccaa gaaagatac ctaacagcac aagagcggaa agatgttttg ttctacatcc	4380
agaacaacct ctgctaaaaa tcttgaaaaa ttgtgcaaaa agttgttgac ttatctaca	4440
agggtgtgta taataatctt aacaacagca ggacgtccc gggttgagga aaacctaatg	4500
aaactgacca gcctgcgtgt tagcctgctg gcaactgggtc tggttaccag cggttttgca	4560
gcagcagaaa cctataccgt tgatcgttat caggatgata gcgaaaaagg tagcctgcgt	4620
tgggcaattg aacagagcaa tgcaaatagc gcacaagaaa accagattct gattcaggca	4680
gttggtaaag caccgtatgt tatcaagtt gataaacgc tgcctccgat taaaagcagc	4740
gttaaaatca ttggcaccga gtgggataaa accggtgaat ttattgcaat tgatggcagc	4800
aactatatca aaggcgaagg tgaanaagca gtccgggtg caaatccggg tcagtatggc	4860

[0098]

accaatgttc gtaccatgac cctgcctggt ctggttctgc aagatgttaa tggigtacc	4920
ctgaaaggtc tggatgttca tcgtttttgt attgggttgc tggttaatcg cagcagcaat	4980
aacctgattc agcataatcg fatcagcaac aattatgggtg gtgccggfgt tatgattacc	5040
ggtgatgatg gtaaaggtaa tccgaccagc accaccacca ataataacaa agttctggat	5100
aacgtgttca tgcataatgg tgatggctcg gaactgaccc gtggtgcage atttaatctg	5160
attgcaaata acctgtttac cagcacaaaa gccaatccgg aaccgagcca gggtaattgaa	5220
attctgtggg gtaatgataa tgccgtgggt ggtaacaaat tcgaaaacta ttcagatggc	5280
ctgcaaatec attggggtaa acgtaactat atcgctata acgaactgac caataacagc	5340
ctgggttica atctgacagg tgatggtaac attttcgaca gcaataaagt gcatggtaac	5400
cgtattggta ttgccattcg tagtgaaaaa gatgccaatg cacgtattac cctgaccaa	5460
aatcagatit gggataacgg caaagatac aaacgttgtg aagccggfgg tagctgtgt	5520
ccgaatcagc gtctgggtgc aattgtttt ggtgttccgg cactggaaca tgaaggttt	5580
gttggtagcc gtggcgtgg tgttgttatt gaaccggcaa aactgaaaa aacctgcacc	5640
cagccgaacc agcagaattg taatgcaatt cctaaccagg gtattcagge accgaaactg	5700
acagttagca aaaaacagct gaccgttgaa gttaaaggca cccctaata gcgttataat	5760
gtggaatttt ttggcaatcg taatgccagc agcagcgaag cagaacagta tctgggtagc	5820
attgttgttg ttaccgatca tcagggtctg gcaaaagcaa attgggtcc gaaagtiagc	5880
atgcgagcgc ttaccgcaa tgtgacagat catctgggtg cgaccagcga actgagcagc	5940
gcagttaaaa tgcgtfaaat gcatgcgcgc cgcgttcgc cggcgtttt ttttggtact	6000
cagtagegct gtctggcaac ataaacggcc cttctgggc aatgcegatc agttaaggat	6060
tagttgaccg atccttaaac tgaggcacta taacggttc	6100

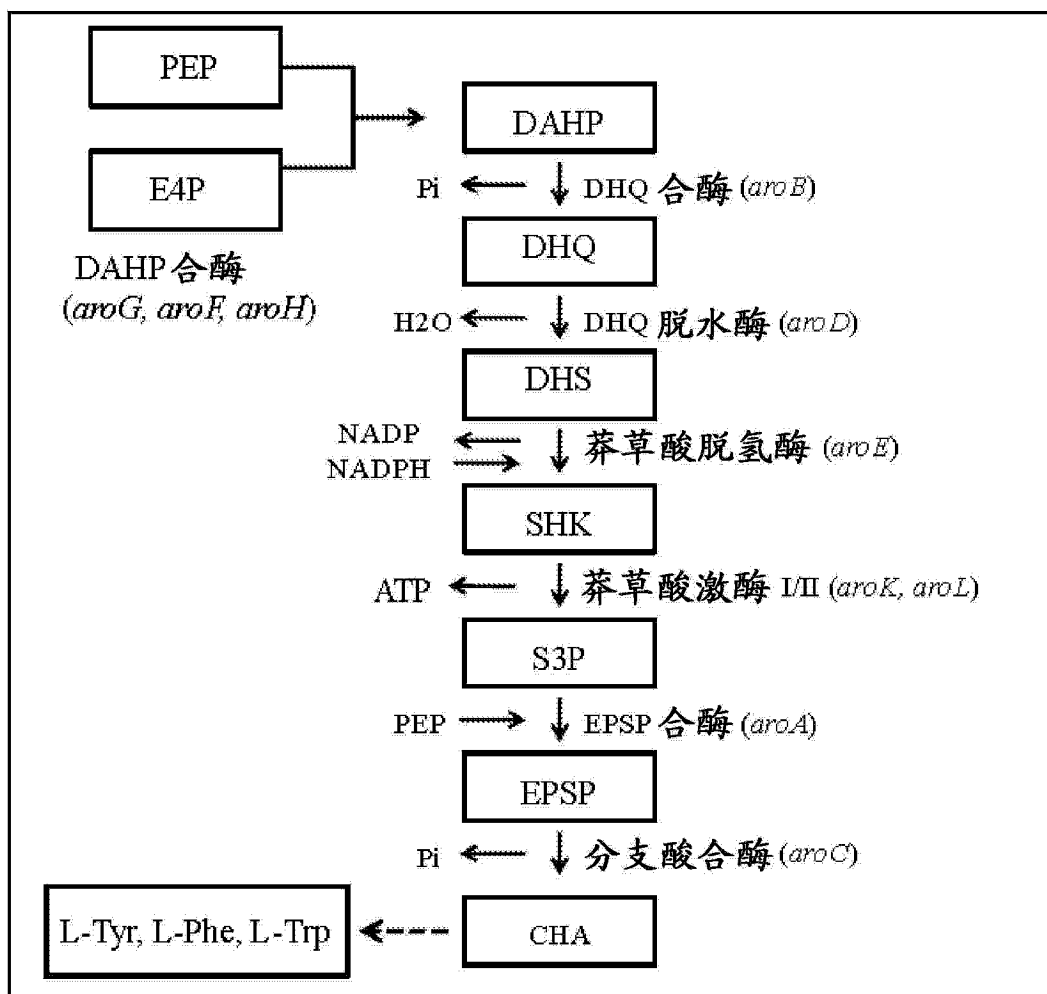


图 1

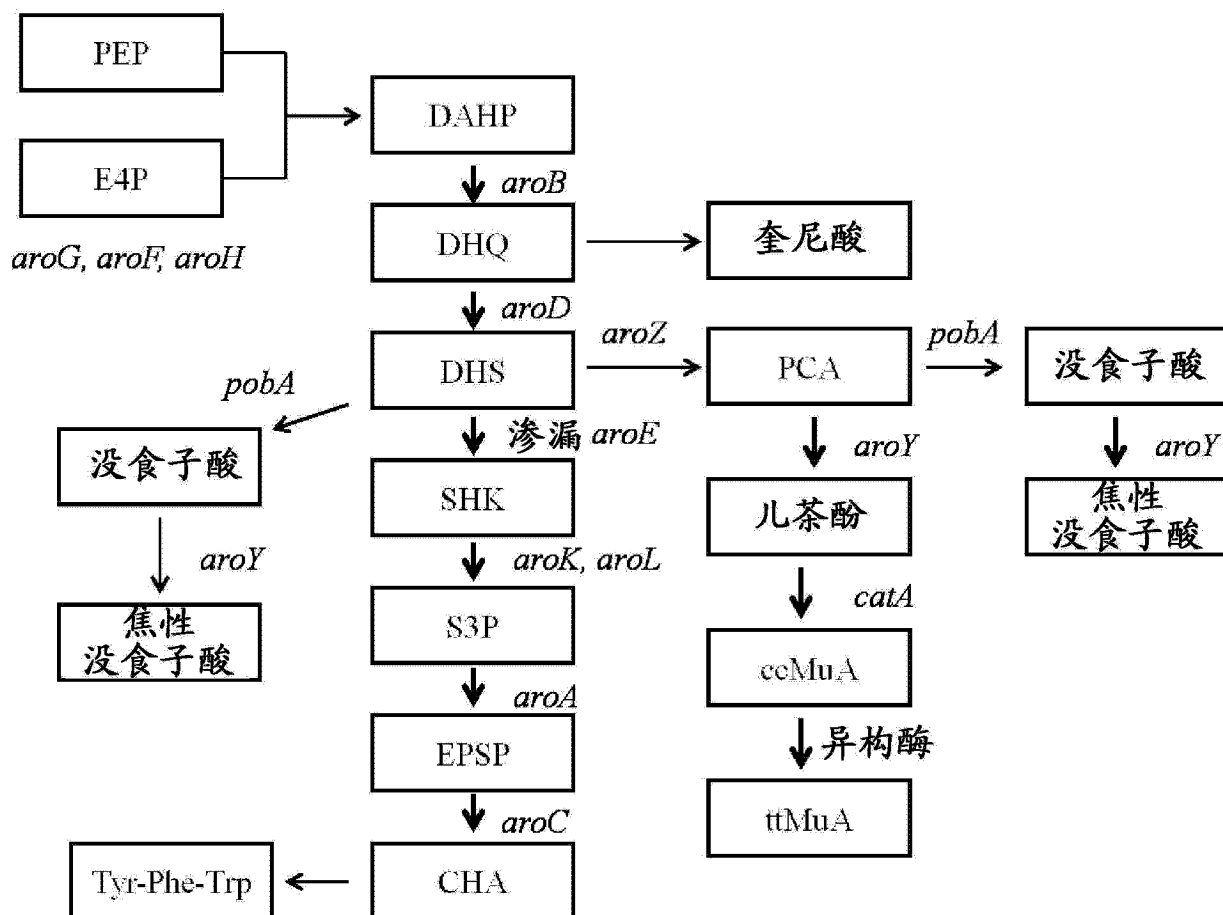


图 2

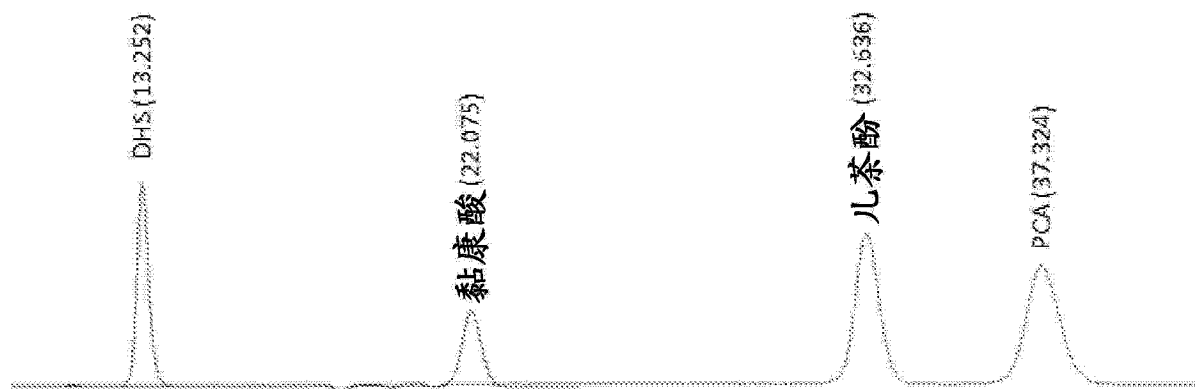


图 3

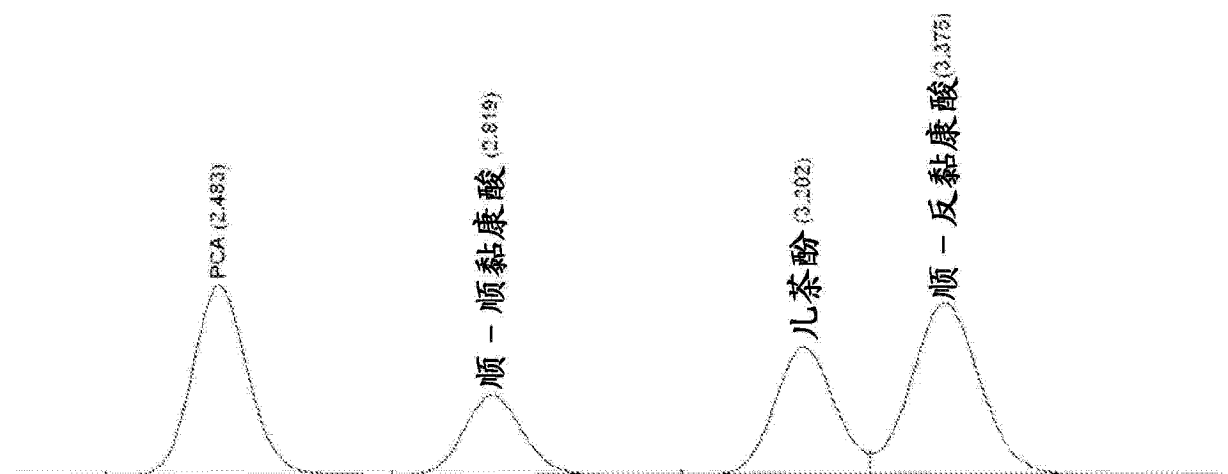


图 4

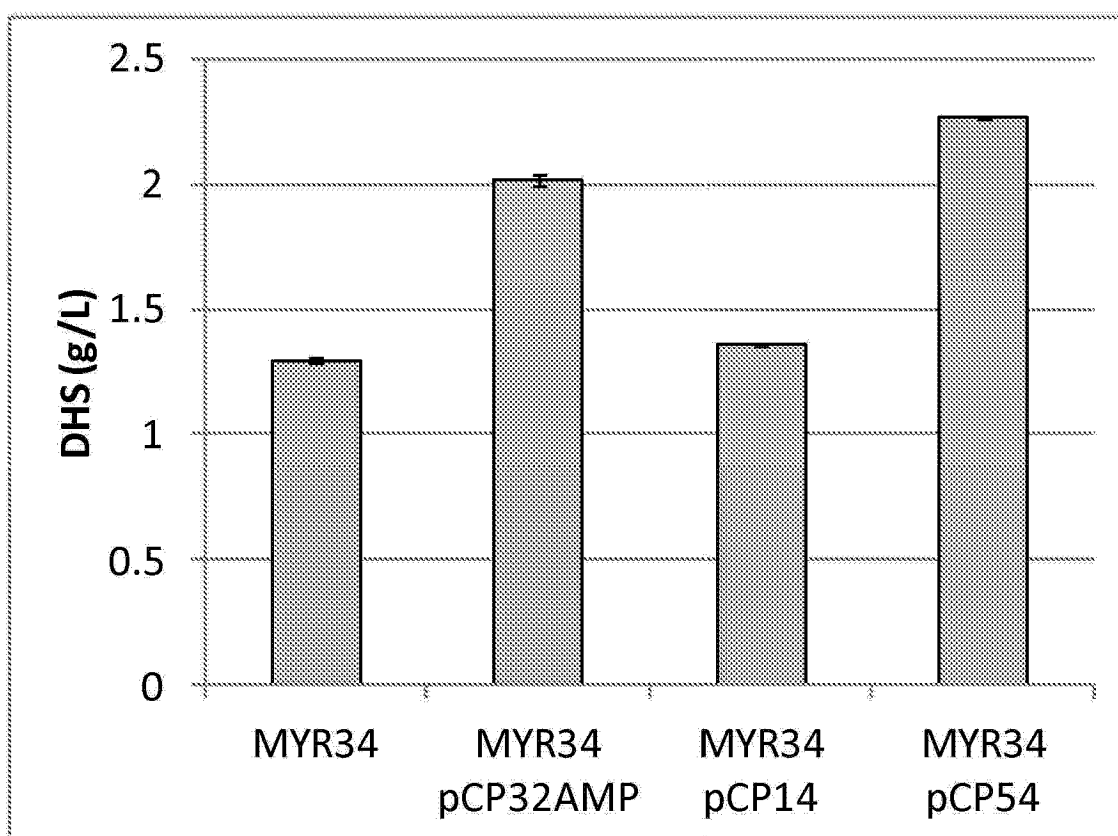


图 5

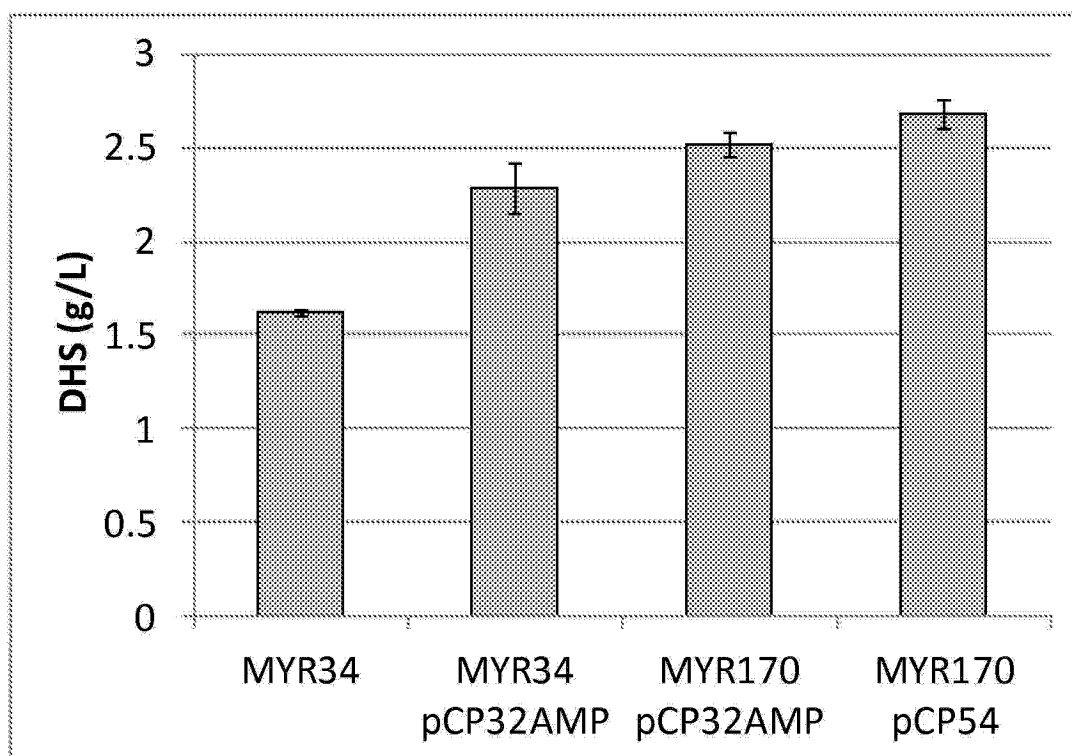


图 6

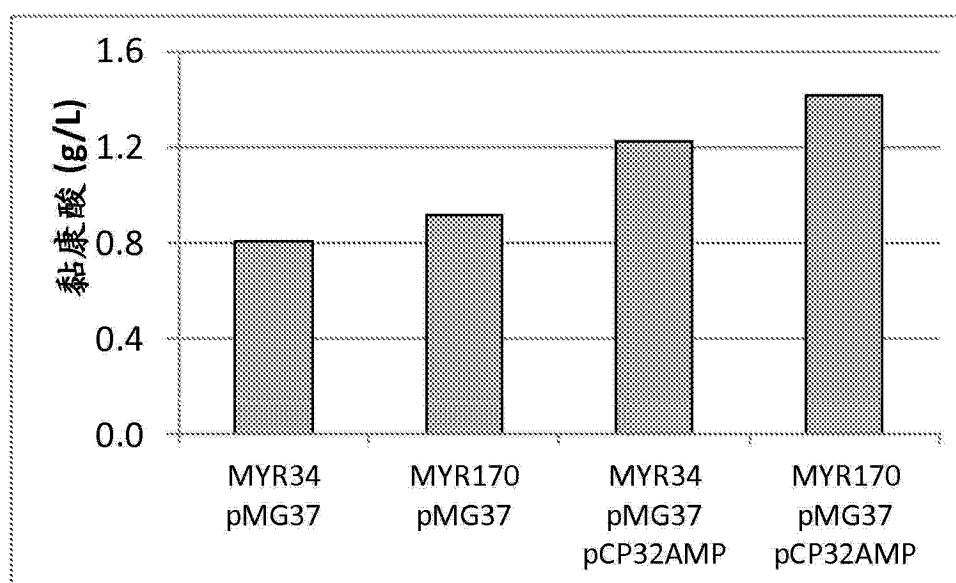


图 7

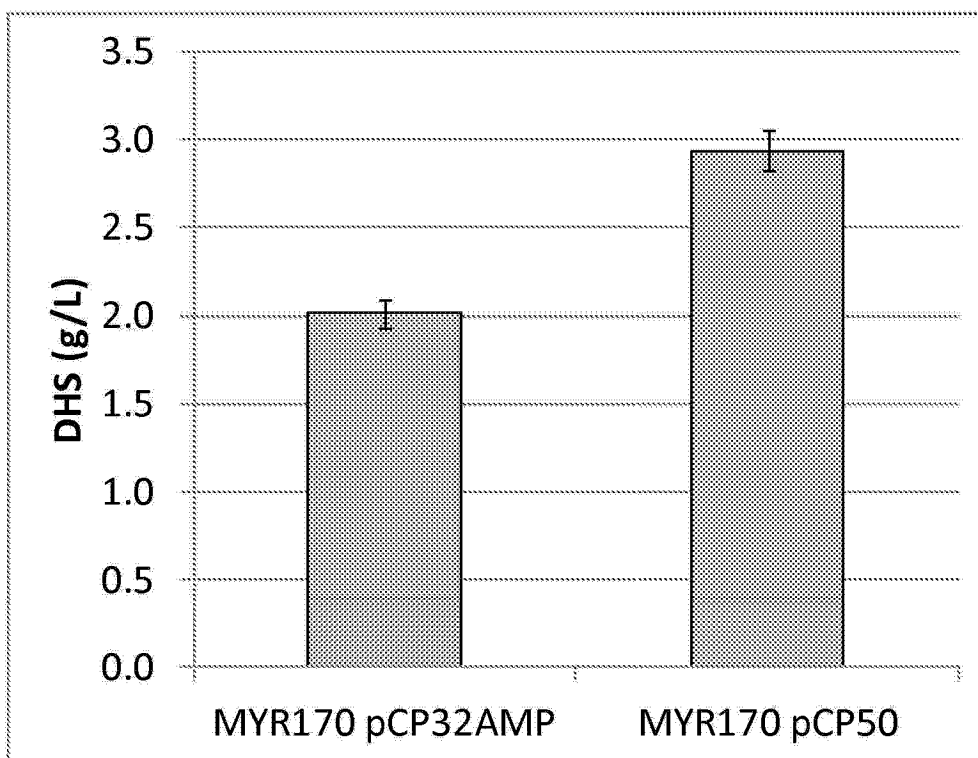


图 8

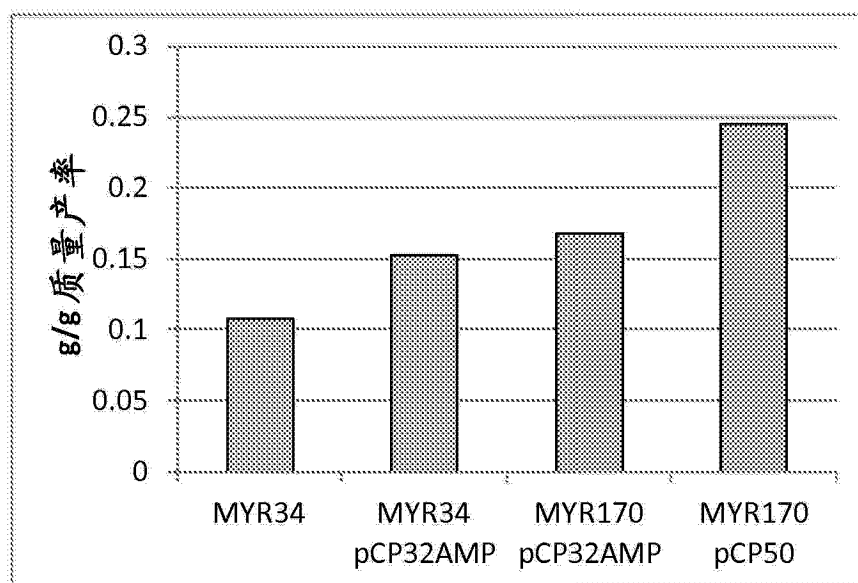


图 9

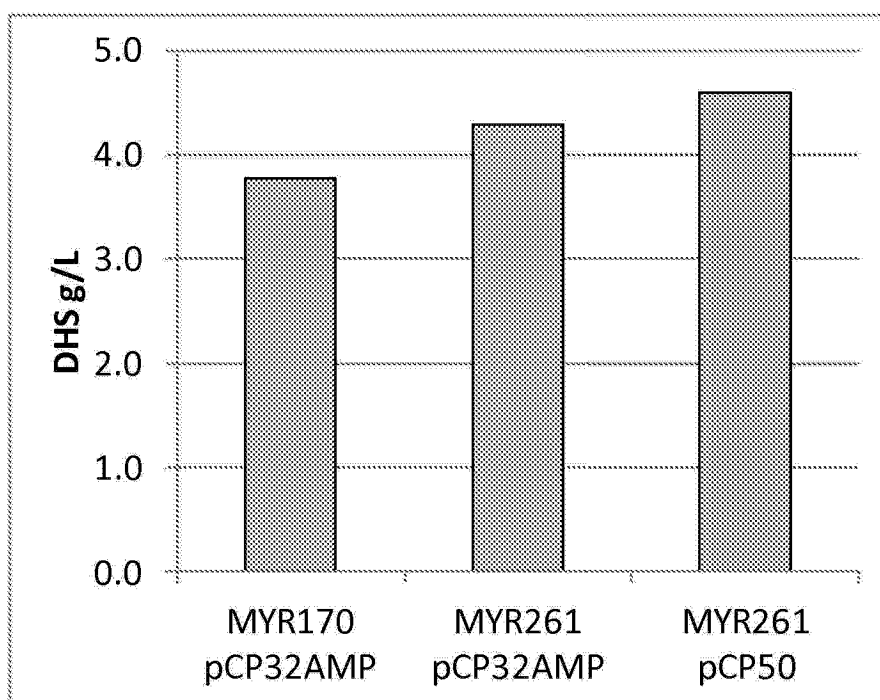


图 10

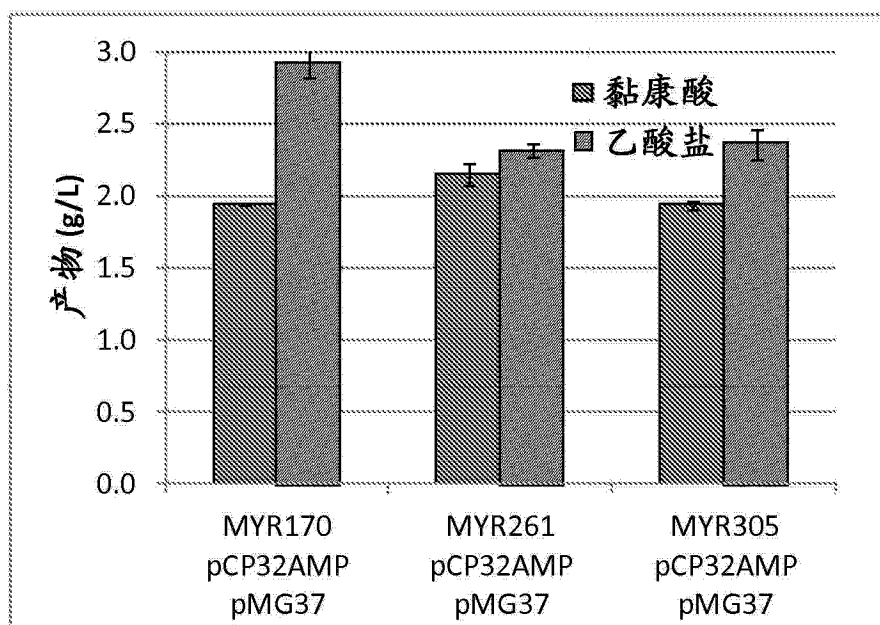


图 11

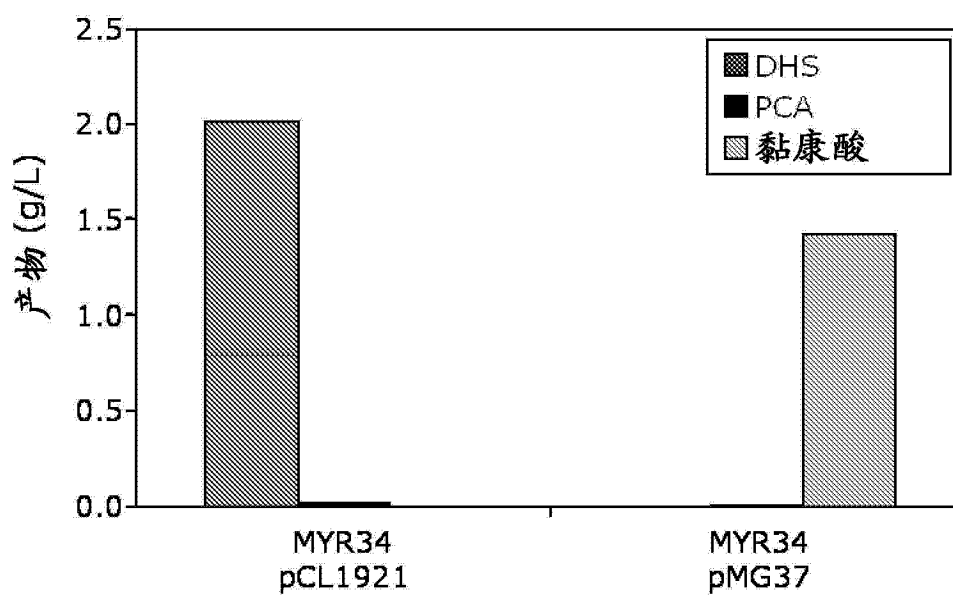


图 12

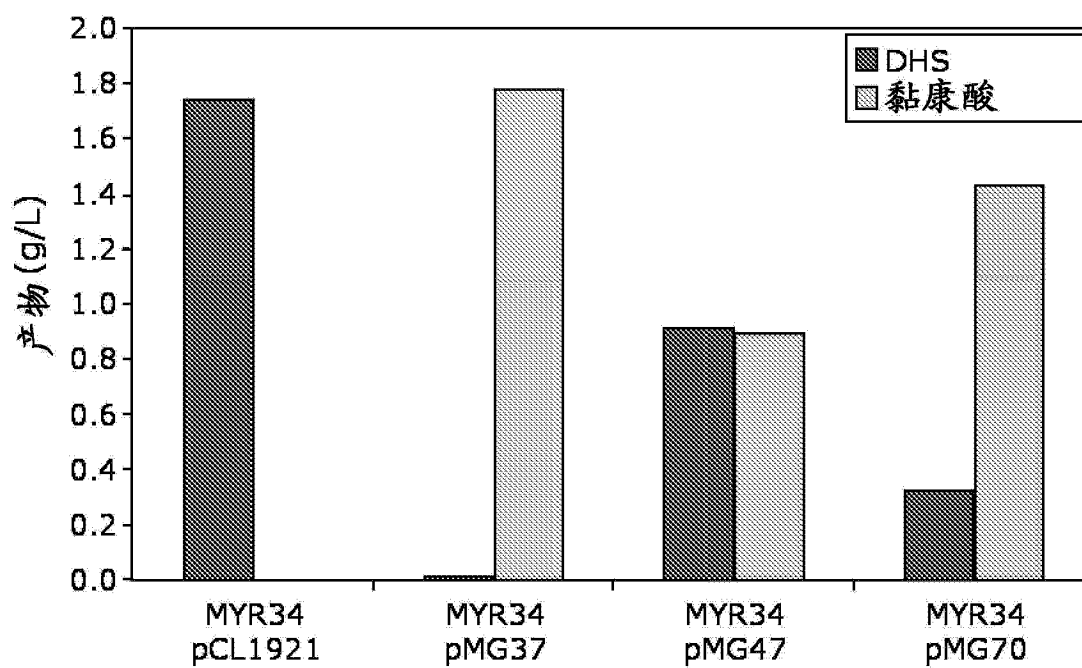


图 13

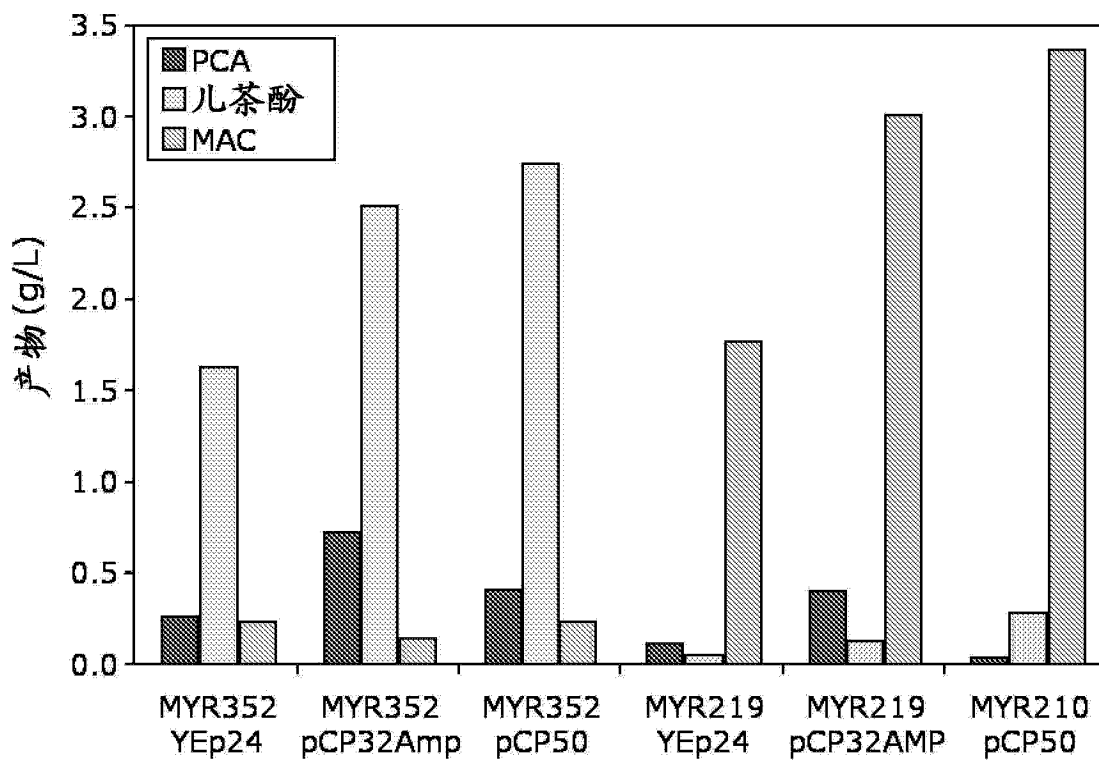


图 14

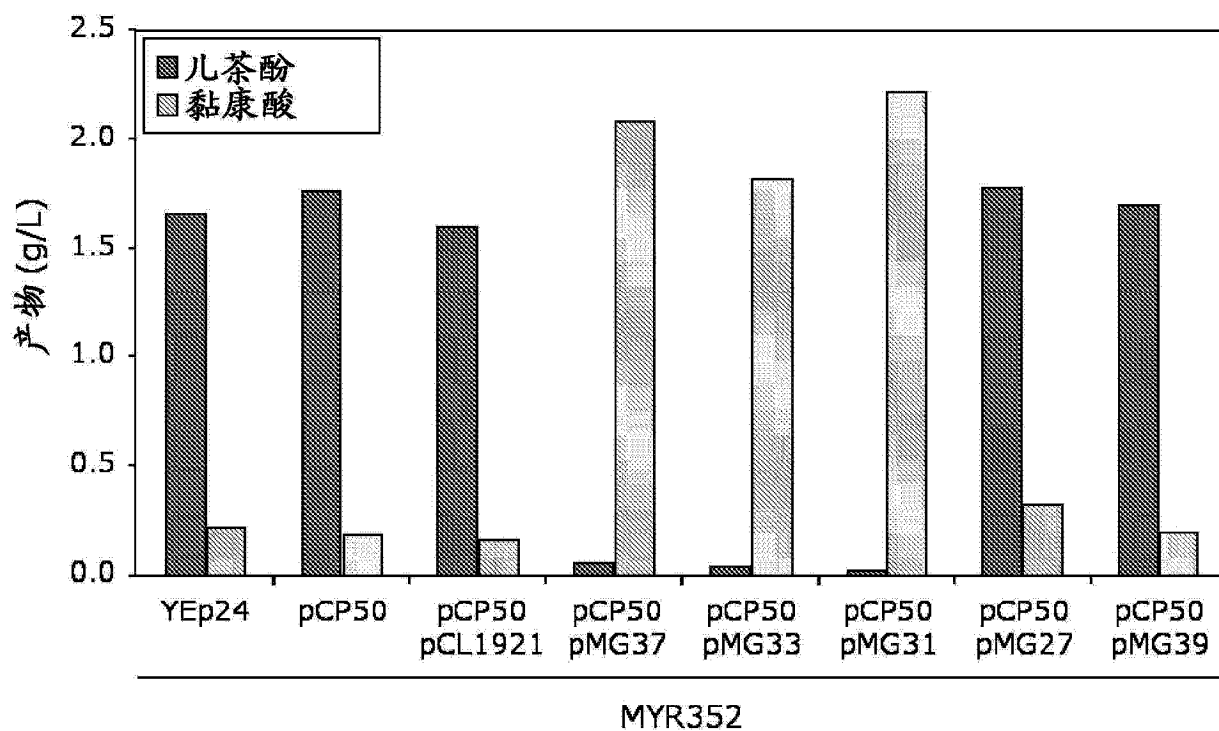


图 15

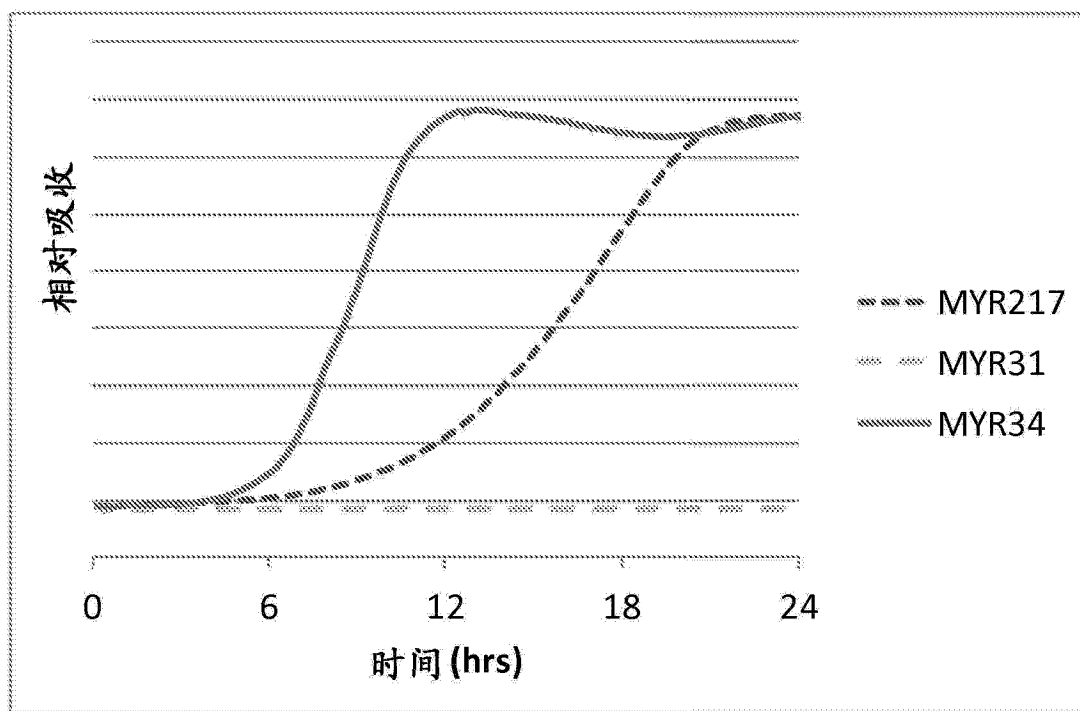


图 16

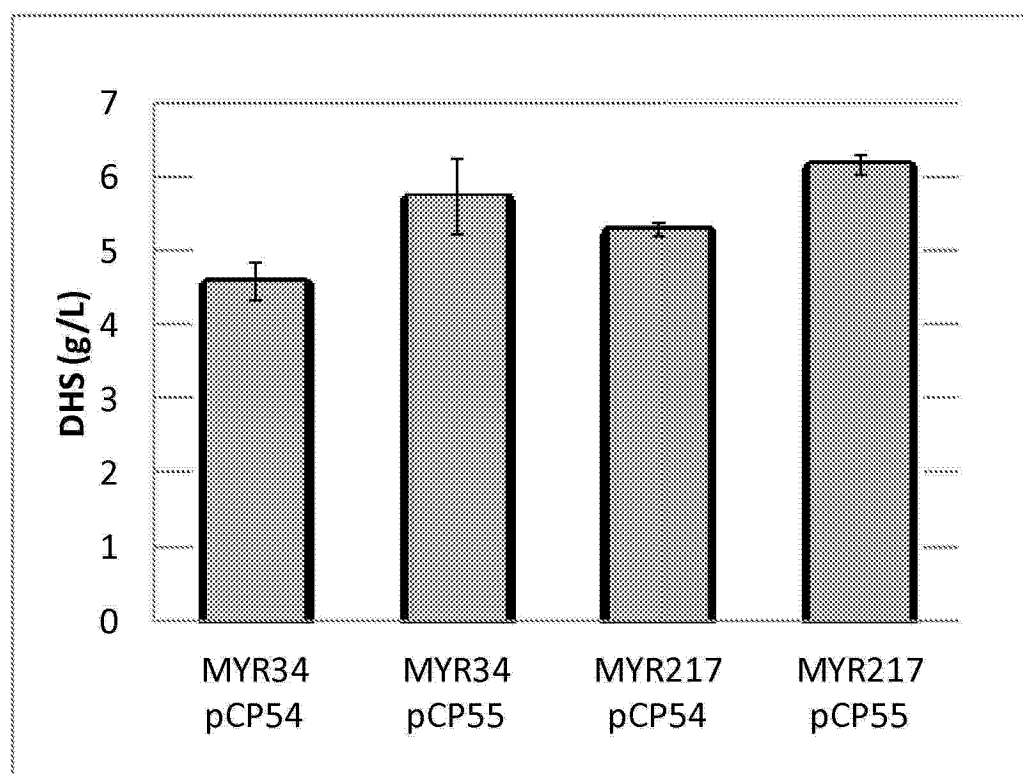


图 17

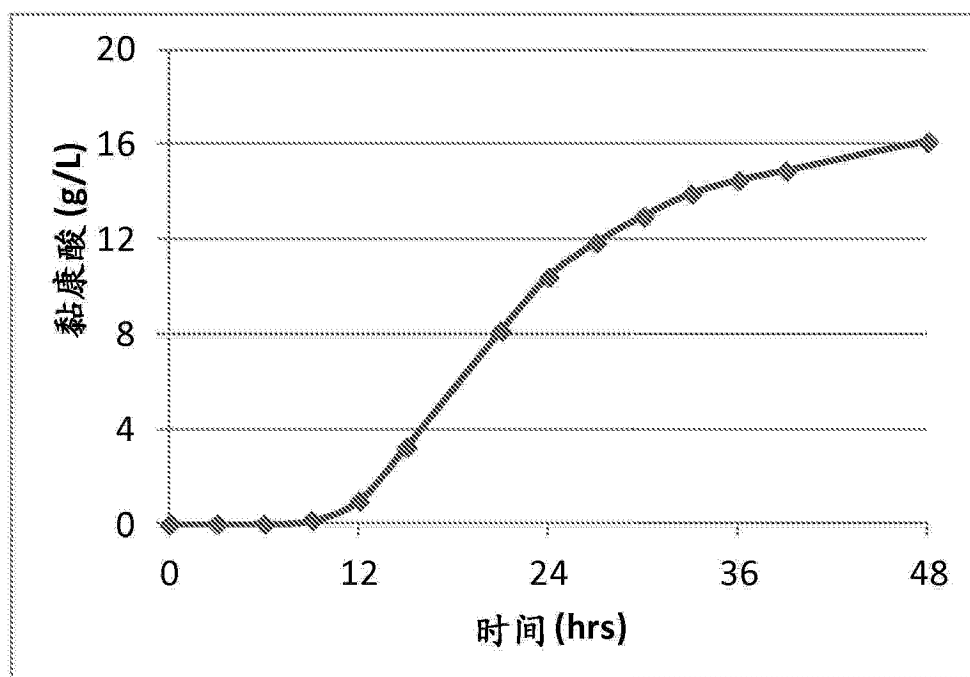


图 18