[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03809122.4

[51] Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C12N 15/61 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 2 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100366730C

[22] 申请日 2003.4.22 [21] 申请号 03809122.4

[30] 优先权

[32] 2002. 4.22 [33] US [31] 60/374,931

[86] 国际申请 PCT/US2003/012566 2003.4.22

[87] 国际公布 WO2003/089621 英 2003.10.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.22

[73] 专利权人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州威尔明顿

共同专利权人 詹伦卡国际有限公司

[72] 发明人 M·S·佩恩 S·K·皮卡塔吉奥

D·E·特林布尔

A·K·-H·苏 F·瓦勒

R·奈尔 P·索凯勒

[56] 参考文献

CN1186856A 1998.7.8

WO0112833A2 2001.2.22

WO9635796A1 1996.11.14

审查员 刘玉玲

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李 波 徐雁漪

权利要求书 1 页 说明书 140 页

[54] 发明名称

用于遗传工程的启动子和质粒系统

[57] 摘要

本发明提供了一系列低拷贝数质粒，该质粒包含用于克隆至少 3 种不同基因或操纵子的限制性内切酶识别位点，且每一位点均侧翼于一个终止子序列，该质粒还含有可改变蛋白质表达水平的葡萄糖异构酶启动子变体。 本发明的物质和方法适用于微生物遗传工程，尤其是在探寻多重遗传插入方面。

1. 一种分离或重组的多核苷酸，包含编码浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶启动子变体的核酸序列，该核酸序列由核酸序列 SEQ ID NO: 9 所示或是通过在 SEQ ID NO: 9 中导入选自下组的一个突变而得到的核酸序列:

(a) 123 位的碱基被 T 取代;

(b) 123 位的碱基被 G 取代;

(c) 123 位的碱基被 C 取代;

(d) 121 位的碱基被 C 取代;

(e) 118 位的碱基被 A 取代; 和

(f) 118 位的碱基被 C 取代。

2. 一种表达盒，其包含权利要求 1 的包含编码浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶启动子变体的核酸序列的多核苷酸。

3. 一种试剂盒，其包含权利要求 1 的包含编码浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶启动子变体的核酸序列的多核苷酸。

4. 一种转化的宿主细胞，包含权利要求 1 的编码浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶启动子变体的多核苷酸。

5. 权利要求 4 的转化的宿主细胞，其中宿主细胞为 RJ8n。

用于遗传工程的启动子和质粒系统

本申请要求 2002 年 4 月 22 日所提交的美国临时申请 No.60/374931 的权益。

发明领域

本发明属于分子生物学领域。更具体而言，本发明涉及一系列低拷贝数质粒，该质粒包含用于克隆至少 3 种不同基因或操纵子的限制性内切酶识别位点，且每一位点均侧翼于一个终止子序列，本发明还涉及一组可改变蛋白质表达水平的启动子。本发明适用于微生物遗传工程，尤其是在探寻多重遗传插入方面。

发明背景

分子生物技术是一门以研究者将特定单位的遗传信息从某一生物体转移至另一生物体的能力为基础的学科。该过程被称为克隆，依赖于重组 DNA 技术以获得有用的产物或商业化生产方法（Glick, B. R.; Pasternak, J.J., Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. (1998)）。

商业化生产方法通常要求高表达率地生产由克隆基因编码的蛋白质。实现每一克隆基因的最大表达所适用的单一方案是不存在的。大部分克隆基因具有独特的分子特性，在找到实现可接受表达水平的一组特定条件之前，需要相当长时间的投资和努力。

仅仅将基因插入克隆载体并不能确保所要求水平的成功表达。为满足高表达率的需要，通过操纵若干不同遗传元件构建出许多专用表达载体，这些遗传元件控制着转录、翻译、蛋白质稳定性、氧限制以及宿主细胞的分泌等方面。更具体而言，受到操纵从而可以控制基因表达的分子特征包括：（1）相关转录启动子和终止子序列的特性，（2）核糖体结合位点的强度，（3）克隆基因的拷贝数以及该基因是否质粒本身所携带或被整合进入宿主细胞基因组的，（4）合成的外源蛋白质的最终细胞定位，（5）宿主生物体内的翻译效率，和（6）宿主细胞内克隆基因蛋白质的固有稳定性。

另外，宿主生物体内外源 DNA 的导入与表达可能削弱正常细胞机

能，因此往往改变该生物体的代谢。该现象是外源 DNA 强加于宿主的代谢负荷或负担造成的。代谢负荷可能是多种情况产生的，包括 1）质粒拷贝数的增加，2）蛋白质的过量产生，3）输出位点的饱和，和/或 4）外源蛋白质本身对细胞功能的干扰。

解决上述若干障碍的技术是已知的。某些研究小组将不同 DNA 聚合酶来源或不同噬菌体物种中出现的多个启动子串联，用于在细胞生长的不同时期表达基因（CN 1186856）（US 5547862; J. Biotechnol. 2(5):303-316(1985)；Biotechniques, 18(1):152-154, 156-157(1995)）。另一个研究小组采用串联重复的多克隆位点(MCS)(Gene, 139(1):83-86(1994)）以便于将 DNA 移进和移出质粒载体。一个研究小组报道采用了具有三个多克隆位点的高拷贝数载体，用于在哺乳动物细胞中表达不同基因，其中每一位点均位于不同启动子之后（Biotech. Bioeng., 57(1):1-10(1998)）。

除上述技术外，待解决的难题还有如何在使代谢负荷的影响最小、控制重组蛋白质的产率以符合生产需要和增强所转化宿主细胞稳定性的同时，方便且迅速地克隆多个基因或操纵子。

发明概述

申请人构建了可改变生产性生物体中基因表达水平的新型葡萄糖异构酶启动子序列。申请人将含有该变异 GI 启动子的表达盒整合进 pCL 1920 来源的低拷贝数质粒中，从而构建出一系列用于遗传工程的质粒。转录终止子通过转录将相关启动子与位于构建体外部的其它启动子分离。

申请人也构建了含有多个稀有限制酶的克隆位点的独特核苷酸序列，进一步有利于构建体内的克隆，或者用于将构建体转移至其它质粒或载体的主链。该独特克隆位点可导入特定基因或操纵子，并可使其在不同强度的合适启动子控制下实现表达。

本发明包括:

1. 编码浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶变体的分离或重组核酸分子，该核酸分子选自 SEQ ID NOs: 9-28;

2. 编码浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶变体的分离或重组核酸分子，该核酸分子包含 SEQ ID NOs: 9-28 中的任一核苷酸序列;

3. 编码浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶变体的分离或重组核酸分子文

库，该文库包含 SEQ ID NOs: 9-28 的核苷酸序列；

4. 包含上述多种 GI 变体的核酸分子的表达盒；以及，

5. 包含上述编码多种浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶变体的核酸分子的试剂盒。

本发明的一个进一步实施方案是包含至少三个转录终止子和至少一个位于任意两个转录终止子之间的克隆位点的 DNA 构建体。该 DNA 构建体的一个优选实施方案包含转录终止子 tonB、thrA 或 aspA，且克隆位点选自 AvrII、NheI、BfaI、Cac8I、BsaJI 和 StyI。优选克隆位点为 NheI 或 AvrII。本发明也包括上述构建体的文库。

本发明包括下列 DNA 构建体:

由 SEQ ID NO: 30 组成的 pSYC0109mcs 质粒，

由 SEQ ID NO: 31 组成的短 1.5GI 启动子，

由 SEQ ID NO: 32 组成的短 1.20GI 启动子，

由 SEQ ID NO: 70 组成的 pAH105 质粒，

由 SEQ ID NO: 71 组成的 pSYC0101 质粒，

由 SEQ ID NO: 72 组成的 pSYC0103 质粒，

由 SEQ ID NO: 73 组成的 pSYC0106 质粒，

由 SEQ ID NO: 74 组成的 pSYC0109 质粒，

由 SEQ ID NO: 78 组成的 pSYC0106mcs 质粒，

和

由 SEQ ID NO: 79 组成的 pRJ50 质粒。

本发明的一个进一步实施方案是具有多克隆位点的载体，该多克隆位点包含特异于限制性内切酶 AscI、NheI、PacI、RsrII、NsiI、SacII、MluI、AgeI、SapI 和 SnaBI 的限制性识别位点序列。该载体的特定实施方案是 SEQ ID NO: 77 的核苷酸序列。

本发明的遗传物质包括含有上述核酸分子和特定多核苷酸所编码特定多肽的转化宿主细胞。

序列表和生物保藏物简述

申请人提供了 83 个序列，符合专利申请中核苷酸和氨基酸序列的标准表示规则（Decision of the President of the EPO 的附录 I 和 II，公开于 OJEPO 的附近 2 ）、37 C.F.R. 1.821-1.825 和附录 A 和 B（Requirements for Application Disclosures Containing

Nucleotides and/or Amino Acid Sequences）、世界知识产权组织（WIPO）标准ST.25(1998)以及EPO和PCT的序列表要求(Rules 5.2和49.5(a-bis)，和Administrative Instructions的208节和附录C）。如根据此处引用作为参考的Nucleic Acids Research 13:3021-3030(1985)和Biochemical Journal 219(No.2):345-373(1984)中描述的IUPAC-IYUB标准所定义的，在对序列的描述中，一个字母码表示核苷酸序列符号，三个字母码则表示氨基酸。

SEQ ID NO: 1为野生型浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶（GI）启动子的核苷酸序列。

SEQ ID NOs: 2-8为饱和诱变GI启动子所用的寡核苷酸引物。在SEQ ID NOs: 3-8中，“N”表示A、T、C或G。

SEQ ID NOs: 9-28为GI启动子变体的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 29为大肠杆菌来源yqhD基因的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 30为pSYCO109mcs质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 31为短1.5GI启动子的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 32为短1.20GI启动子的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 33为短野生型GI启动子的核苷酸序列。

SEQ ID NOs: 34-37为扩增整合有短GI启动子的yqhD所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NOs: 38-39为构建yqhD破坏所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NOs: 40-43为证实yqhD破坏所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NOs: 44-46为以短野生型GI启动子取代染色体ppc启动子所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NO: 47为多克隆位点和终止子的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 48为pHK28-26质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NOs: 49-50为扩增dhaB3所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NOs: 51-52为扩增dhaB1所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NOs: 53-54为构建dhaT缺失所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NOs: 55-56为构建接头所用的寡核苷酸。

SEQ ID NO: 57为编码由限制位点分隔开的三个转录终止子的核苷酸序列。

SEQ ID NOs: 58-59为构建SEQ ID NO: 60所用的寡核苷酸。

SEQ ID NO: 60 为编码两侧存在 EcoRI 和 KpnI 位点的三个转录终止子的核苷酸序列。

SEQ ID NOs: 61-62 为扩增 SEQ ID NO: 60 所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NOs: 63-66 为扩增表达盒所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NO: 67 为生成 pCR-pCL1920 所用的双链接头的核苷酸序列。

SEQ ID NOs: 68-69 为扩增 pTrc99A 来源的 rrnBT1T2 终止子所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NO: 70 为 pAH105 质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 71 为 pSYCO101 质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 72 为 pSYCO103 质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 73 为 pSYCO106 质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 74 为 pSYCO109 质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NOs: 75-76 为形成 SEQ ID NO: 77 所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NO: 77 为含有下列酶的限制性识别位点的多克隆片段的核苷酸序列: NheI、RsrII、SacI、AgeI、SnaBI、AscI、PacI、NsiI、MluI 和 SapI。

SEQ ID NO: 78 为 pSCYO106mcs 质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 79 为 pRJ50 质粒的核苷酸序列。

SEQ ID NOs: 80-81 为扩增 orf 操纵子所用的寡核苷酸引物。

SEQ ID NOs: 82-83 为检验实施例 4 中转化体所用的寡核苷酸引物。

申请人在布达佩斯条约有关微生物保藏的国际认可方面的框架下确定了下列生物保藏物，用于专利程序用途:

保藏者鉴定名称	国际保藏命名	保藏日
大肠杆菌 RJ8n	ATCC PTA-4216	2002 年 4 月 9 日

此处所用“ATCC”指位于 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-1109, U.S.A 的美国典型培养物保藏中心。“ATCC No.”为 ATCC 所保藏的培养物的编号。

上述保藏物将保存于指定国际保藏机构至少 30 年，并可在公开其的专利授权后提供给公众。可以获得保藏物，并不是许可在破坏政府行为授予的专利权的条件下实施本发明。

发明详述

申请人通过构建一系列含有至少三个独特克隆位点的构建体解决了上述难题，其中转录终止子和不同强度的启动子可操作性地将各克隆位点彼此分隔。不同强度的启动子均为浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶（GI）启动子（SEQ ID NO: 1）的变体。将变异GI启动子与SYCO质粒整合进表达盒中作为生产平台，可提供一个对广泛多种生物加工项目中生物催化剂的发展有用的系统。

本发明可方便并稳定地将内源或外源的基因或操纵子整合进可控制基因表达水平的载体中。利用表达多个基因或操纵子的单个质粒可减少以前用于生成基因产物的方法中维持大肠杆菌宿主中多个质粒所需的抗生素标记数量。利用本发明可最小化代谢负荷的影响、最优化重组蛋白质的产率，并提高转化的宿主细胞的稳定性。本发明尤其适用的是下述生物过程中的遗传工程，即形成产物可能必须表达两个或以上基因或操纵子的生物过程。

申请人构建了可改变基因表达水平的新型GI启动子序列。申请人将含有变异GI启动子的表达盒整合进pCL1920来源的低拷贝数质粒中，从而构建了一系列用于遗传工程的质粒。转录终止子通过转录将相关启动子与位于构建体外部的其它启动子分隔开。

申请人也构建了含至少10个稀有限制酶的克隆位点的独特核苷酸序列，进一步有利于构建体内的克隆，或者用于将构建体转移至其它质粒或载体的主链。独特克隆位点可导入特定基因或操纵子，并可使其在不同强度的合适启动子控制下实现表达。此外，特定构建体的可以侧翼于独特克隆位点，用于实现整合进入任意数量的质粒主链中，包括pUC、pBR322、pACYC、pSC101，或本领域技术人员已知和设想的其它质粒。

申请人证明了本发明在大肠杆菌内从葡萄糖生物合成1,3-丙二醇（3G）方面的特定效用，其中该大肠杆菌经由被要求保护的物质转化过。将表达盒构建到上述低拷贝数质粒中，生成1,3-丙二醇所用的基因便被克隆进载体中。本发明可用于改变其它表达系统中的基因表达。

定义

下述定义和缩写被用于阐释权利要求和说明书。

“开放读码框架”缩写为 ORF。

“聚合酶链反应”缩写为 PCR。

术语“宿主细胞”或“宿主生物体”指可接受外源或异源基因或多重拷贝的内源基因，并可表达这些基因，生成活性基因产物的微生物。

术语“DNA 构建体”或“构建体”指 DNA 的人工构建片段。

“基因”指表达特定蛋白质的核酸片段，包括在前的调节序列（5’非编码序列）和在后的编码序列（3’非编码序列）。“天然基因”指发现于自然中，具有其自身调节序列的基因。“嵌合基因”指非天然基因，且包含未同时发现于自然中的调节和编码序列的任何基因。相应的，嵌合基因可能包含不同来源的调节序列和编码序列，或者相同来源，但以不同于自然中所存在方式排列的调节序列和编码序列。“内源基因”指位于生物体基因组中其固有位置上的天然基因。“外来”、“外源”或“异源”基因指通常未发现于宿主生物体内，但可通过基因转移被导入宿主生物体的基因。外源基因可包含被插入非天然生物体内的天然基因，或嵌合基因。“转基因”指通过转化操作被导入基因组的基因。“基因构建体”指编码用于表达一种或多种特定蛋白质的核酸片段。基因构建体中的基因在性质上可能是天然、嵌合或外源的。

术语“分离的核酸”指基本上与自然伴随天然序列的其它组分（如原始种来源的核糖体、聚合酶和/或侧翼基因组序列）分离开的核酸（如 RNA、DNA 或混合的聚合物）。该术语包括重组或克隆的 DNA 分离物，化学合成的类似物或由异源系统生物合成的类似物。

术语“编码（encoding）”和“编码（coding）”指基因通过转录和翻译机制生成氨基酸序列的过程。编码特定氨基酸序列的过程包括可能涉及不引起所编码氨基酸发生改变的碱基改变，或者涉及可能改变一个或多个氨基酸，但不影响该 DNA 序列所编码蛋白质功能特性的碱基改变。因此，应当理解本发明包括比特定实施例序列更多的序列。可产生沉默改变，即基本上不影响所生成蛋白质分子的功能特性的序列修饰，如序列的缺失、插入或取代也是被预想到的。例如，预想到了反映遗传密码兼并，或导致在特定位点生成化学等价氨基酸的基因序列改变。因此，疏水氨基酸丙氨酸的密码子可能被编码另一种疏水性较差的残基（如甘氨酸），或疏水性较强的残基（如缬氨酸、

亮氨酸或异亮氨酸）的密码子取代。类似的导致一种阴性电荷残基取代另一种阴性电荷残基（如天冬氨酸取代谷氨酸），或一种阳性电荷残基取代另一种阳性电荷残基（如赖氨酸取代精氨酸）的改变也被预期可以生成生物学等价产物。导致蛋白质分子的 N 末端和 C 末端部分改变的核苷酸改变也被预期不会改变该蛋白质的活性。某些情况中，为研究改变对蛋白质生物学活性的影响，实际可能需要获得序列的突变体。与确定编码产物生物学活性保留的方法一样，上述每种被提到的修饰均属于本领域的常规技术。此外，熟练的技术人员应认同的是本发明所包括的序列也受限于其在严格条件（0.1×SSC、0.1%SDS、65℃）下与此处例证的序列杂交的能力。

术语“表达”指从编码基因产物序列的基因转录和翻译为基因产物。

术语“启动子”指可与 RNA 聚合酶结合并启动基因转录的 DNA 区域。

术语“转录终止子”或“终止子”指终止蛋白质合成的遗传元件。

术语“操纵子”指一簇相互配合进行调节的基因。

术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用，指基因产物。

术语“质粒”、“载体”和“盒”指常常携带并非细胞中枢代谢一部分的基因，通常为环状双链 DNA 分子形式的其它染色体元件。该元件可能是任意来源的单或双链 DNA 或 RNA 的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列（线性或环状）。该元件含有若干已被连接或重组进入某种独特结构的核苷酸序列，该独特结构能够将选定基因产物的启动子片段和 DNA 序列连同合适的 3'未翻译序列一起导入细胞。“转化盒”指含有外源基因，且除该外源基因外还含有促进特定宿主细胞转化的元件的特定载体。“表达盒”指含有外源基因，且除该外源基因外还含有可增强该基因在其宿主内表达的元件的特定载体。

术语“限制性内切酶”指一类于特定且独特的内部位点切下指定长度 DNA 的酶。通过在 DNA 中制造出切口，限制性内切酶可使随后的剪接，或者将 DNA 片段插入内部位点得以实现。术语“限制位点”或“限制性识别位点”指由特定限制酶“识别”并切断的 DNA 分子中（碱基对的）核苷酸序列。

用于形容限制酶位点的术语“稀有”指基因中特定序列出现的频率

低。本说明书所应用优选的稀有限制酶位点是 AscI、NheI、PacI、RsrII、NsiI、SacII、MluI、AgeI、SapI 和 SnaBI。

术语“克隆位点”指载体中可插入 DNA 的位点。术语“多克隆位点”或“mcs”指含有任意一个或多个不同限制酶位点，并可在载体上的指定位点（限制位点）实现插入的合成 DNA 序列。术语“独特克隆位点”指在特定 DNA 序列情况下仅出现一次的克隆位点。

在对载体元件相对位置的描述中，我们感兴趣的特定位点或基因座如果位于将另两个位点分隔开的 DNA 长度中间，则将其描述为在另外两个位点“之间”。在环状载体的情况中，我们感兴趣的特定位点或基因座如果位于将该载体上另外两个位点分隔开的 DNA 最短长度内，则将其描述为在另外两个位点“之间”。该特定位点或基因座被描述为“侧翼于”另一个位于我们感兴趣的位点或基因座之前或之后的位点。

术语“遗传改变的”指通过转化或突变从而改变遗传物质的过程。术语“转化”和“转染”指细胞整合核酸后新基因的获得。该获得基因可能被整合进入染色体 DNA 或作为染色体外复制序列导入。术语“转化体”指转化产物。

术语“甘油脱水酶”或“脱水酶”指负责辅酶 B_{12}-依赖性酶活性，即可使甘油分子异构或转化生成产物 3-羟基丙醛的多肽。对本发明的应用而言，脱水酶包括优选底物分别为甘油和 1,2-丙二醇的甘油脱水酶（GenBank U09771, U30903）和二醇脱水酶（GenBank D45071）。肺炎克氏杆菌 ATCC 25955 的甘油脱水酶是由基因 dhaB1、dhaB2 和 dhaB3（GenBank U30903）编码的。dhaB1、dhaB2 和 dhaB3 基因分别编码甘油脱水酶的 α、β 和 γ 亚基。甘油脱水酶和二醇脱水酶均为利用辅酶 B_{12} 的复合体（具有 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 亚基组成）。

甘油和二醇脱水酶容易因甘油和某些其它底物出现机制基础的自杀灭活（Daneil et al., FEMS Microbiol. Rev. 22:553(1999)）。术语“脱水酶再活化因子”指负责再活化脱水酶活性的蛋白质。术语“脱水酶再活化活性”、“使脱水酶活性再活化”或“使脱水酶活性再生”指将不具有催化底物能力的脱水酶转化为具有催化底物能力的脱水酶的现象、抑制脱水酶灭活的现象或延长体内脱水酶的有用半衰期的现象。有两种蛋白质已被认定属于脱水酶再活化因子（见 WO

9821341(US 6013494 在此引入作为参考）及其所引参考文献; Daniel et al., 同上; Toraya 和 Mori, J. Biol. Chem. 274:3372(1999); 和 Tobimatsu et al., J. Bacteriol. 181:4110(1999))。

术语“氧化还原酶”或“1,3-丙二醇氧化还原酶”指负责将 3-羟基丙醛催化还原为 1,3-丙二醇的酶活性的多肽。1,3-丙二醇氧化还原酶包括，例如，由 dhaT 基因（GeneBank U09771, U30903）编码的多肽。可选的，与梭状芽孢杆菌中的 adhB 基因（一种可能的 NADH 依赖型丁醇脱水酶 2）存在 40%一致性的大肠杆菌开放读码框架，yqhD 则编码了可发挥 1,3-丙二醇氧化还原酶功能的多肽（WO 0112833）。

由 pSYCO 质粒（pSYCO101、pSYCO103、pSYCO106、pSYCO109、pSYCO106mcs 和 pSYCO109mcs）表达的酶均可被描述为包含了表达甘油脱水酶、脱水酶再活化因子、甘油-3-磷酸脱氢酶和甘油-3-磷酸酶所必需的基因。

术语“可发酵碳底物”和“可发酵碳源”指可被本发明的宿主生物体代谢的碳源，尤其是选自下组的碳源，即单糖、寡糖、多糖、甘油、二羟基丙酮和一碳底物或上述物质的混合物。

具有不同强度 GI 启动子变体的基因表达系统

一种有效的基因表达系统的最低要求是存在位于克隆基因上游的启动子（在 DNA 上，可结合 RNA 聚合酶和开始转录的位点）。通常，采用一个对 RNA 聚合酶具有高亲和性的强启动子的结果是相邻下游区域被高度或频繁转录。

在启动子中，启动子强度（下游基因的转录水平）的主要序列决定子是最保守的碱基对。与该保守序列存在偏差的启动子则减少了转录起始频率（Hawley, D.K.; McClure, W. R., Nucleic Acids Res., 11:2237-2255(1983)）。

已证实大肠杆菌 RNA 聚合酶的启动子含有保守 DNA 序列的两个区域，位于转录起始位点上游的大约 10 和 35 个碱基对。已确定 12 个碱基对是启动子当中最保守的。这些碱基是通常所说的-35 区，即上游 35 个碱基对附近的 TTGACA，和通常所说的-10 区，即上游 10 个碱基对附近的 TATAAT。-10 和-35 区之间的最佳间距为 17 个碱基对。如该间距接近 17 个碱基对，则该启动子较强，而间距为 15 和 20 个碱基对的启动子则只保留了部分功能。

申请人构建了一系列整合有浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶(GI)启动子变体的构建体。这些构建体构成了具有一系列不同强度启动子变体的文库或试剂盒，从而具有了根据需要调整改变基因表达水平的能力。链霉菌葡萄糖异构酶(EC 5.3.1.9)可将葡萄糖-6-磷酸催化转化为果糖-6-磷酸。编码磷酸葡糖异构酶(pgi)的基因的转录受控于含有一个特征性的-10标记序列(AATAAT)和一个特征性的-35标记序列(TTGACA)的启动子。尽管饱和诱变是在启动子的-35区内进行，-35区上游大约122bp长的SpeI限制位点的改变仍将影响所表达基因的活性。此外，在-10区与该启动子末端之间存在25bp长的缺失，即使SpeI限制位点发生改变，仍可保留86%的酶活性。这些具体结果以前均无报导。

RNA合成的转录终止发生在DNA的特定碱基序列上，调节着转录的终止。DNA上的通用终止序列是一个含有反向重复和一个中央非重复片段的序列。该DNA序列被转录时，RNA可通过链内碱基配对形成茎-环结构。RNA中的该茎-环结构后连接尿苷时，便形成了有效的转录终止子。其它终止位点是富GC序列后连接富AT序列的区域。这种结构无需添加任何其它因子便可终止转录，在某些时候被称为内在终止子或不依赖rho的终止子。

除需要RNA聚合酶的功能之外，还需要类似大肠杆菌来源Rho的蛋白质因子发挥作用的其它类型终止子序列已被发现。Rho不与RNA聚合酶或DNA结合，但可与RNA紧密结合并可沿着链从上游移向RNA聚合酶-DNA复合体。一旦RNA聚合酶暂停于Rho依赖性终止位点，Rho可接着使RNA和聚合酶离开DNA，从而终止转录。转录终止涉及的其它蛋白质是类似Rho的RNA结合蛋白质。在所有情况中，终止涉及的序列均于RNA水平发挥作用。不过，RNA是由DNA转录而来，因此，转录终止最终由DNA上的特定核苷酸序列决定。(Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; Parker, J.; Brock Biology of Microorganisms, 8th ed., Prentice Hall; Upper Saddle River, NJ(1997))。

申请人构建了内含三个串联排列的不同终止子序列的终止区域。这三个终止子均侧翼于用于克隆基因或操纵子的独特限制酶位点。tonB终止子是在大肠杆菌tonB基因与相对基因之间被发现的不依赖rho的双向转录终止子(Postle, K.; Good, R.F., Cell, 41,577-

585(1985))。结构上与其它不依赖 rho 的终止子相似的 thr 弱化子用于大肠杆菌苏氨酸操纵子的转录终止(Yanget et al., J. Biol. Chem., 270:23330-23336(1995))。具有不依赖 rho 的终止子的结构特征的 aspA 终止子则用于大肠杆菌天冬氨酸酶操纵子的转录终止(Takagi et al., Nucleic Acid Res., 13:2063-2074(1985))。

质粒作为自主、自复制遗传元件，具有可使其本身成为携带克隆 DNA 的潜在载体的基本特质。天然存在的质粒通常缺乏高质量克隆载体所必需的若干重要特征。这些特征包括（1）小尺寸（将外源 DNA 有效地转移进入宿主所必需的），（2）可克隆插入 DNA 的独特限制性内切酶识别位点，和（3）识别携带有克隆载体-插入 DNA 构建体的受体细胞所用的一种或多种选择性遗传标记。因此，质粒克隆载体必须是经基因工程设计的（Glick, B. R., Pasternak, J.J., Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, DC(1998))。

pCL 1920/21 载体是一对低拷贝数质粒，含有一个携带了 lac 启动子/操纵子的 580bp 长的 BstUI 片段、一个多克隆位点、被克隆进入 pGB2 中代替多接头区域的 pUC19 的 lacZ 片段，以及可赋予大肠杆菌以奇霉素和链霉素抗性的 pSC101 衍生质粒。pCL1920/21 载体（每个细胞 5 个拷贝）与 pUC 载体（每个细胞 200 个拷贝）在质粒拷贝数上存在 40 倍的差异。这样，pCL1920/21 载体被转化进菌株时，可调节被插入启动子-操纵子下游的基因的低水平表达。因此它对高拷贝数时可能有害的克隆基因而言是有用的。由于 pCL1920/21 载体可与 ColE1 衍生质粒相容，因而可利用二者与 pBR322 或 pUC 衍生质粒一起形成稳定的共转化体（Lerner et al., Nucleic Acids Res., 18:4631(1990))。

本发明的质粒可应用在多种宿主内以控制物质的生物产量。

取代任意内源基因或操纵子的染色体定位天然启动子以改变转录水平

要求保护的启动子变体（包含 SEQ ID NOs:31 和 32 的构建体）可应用特定方法中，即取代任意内源基因或操纵子相关的染色体定位天然启动子以改变该基因或操纵子转录水平的方法。结果改变了蛋白质的生产水平。待取代的启动子可以是特定任意微生物中的任何基因，

即对该微生物可操作Datsenko和Wanner[(2000)PNAS 97:6640-6645]的Liambda red方法或等效方法。

该方法中，包含一个选择标记的嵌合DNA分子是通过聚合酶链反应（PCR）合成的，该选择标记被可操作地连接在分散排列的非天然启动子上，而非天然启动子则被可操作地连接在靶基因的5'编码区中。该合成是采用下列物质实现的：（1）一对化学合成的引物，(a)第一个引物包含：(i)远离待取代的目标天然启动子的DNA区，(ii)一个非天然启动子，和(iii)来自选择标记的3'或5'末端的DNA区；以及(b)第二个引物包含：(i)最接近目标插入位点的DNA区，和(ii)与第一个引物所用选择标记的末端相对的末端来源的DNA区；和（2）编码选择标记的DNA模板。采用Datsenko和Wanner（同上）的方法将上述合成的DNA产物整合进任意宿主细胞的染色体目标位点。该操作的结果是目标天然启动子被PCR合成的携带了非天然启动子的嵌合分子所取代。

该方法的延伸可用于评估基因表达水平的改变对生物催化剂性能的影响。

大肠杆菌中从葡萄糖到1,3-丙二醇（3G）的生物合成

本发明的质粒可应用在大肠杆菌中，用于从葡萄糖生物合成1,3-丙二醇（3G）。此处的实例包括生产用生物体的构建，即整合了本发明和将可发酵碳底物转化为1,3-丙二醇所必需的遗传机制。

1,3-丙二醇的生成所涉及的基因包括脱水酶基因(典型的是甘油或二醇脱水酶）和氧化还原酶，以及其它被预期将用于脱水酶的装配或维持其稳定性的蛋白质。这些基因可能是被导入宿主细胞内的转基因，或者可能是内源基因。这些基因中的至少一种应为转基因并被导入生产用细胞中。利用本领域所熟知的技术可构建出含有编码了特定酶促途径的必需基因的重组生物体，该酶促途径可将碳底物转化为1,3-丙二醇。然后，转化的生产用细胞在合适条件下生长，从而生成1,3-丙二醇。

大肠杆菌中1,3-丙二醇的生成在以前的报导中已有描述（US5,633,362; US5,821,092; US5,686,276; US6,025,184; US6,013,494; US5,599,689; US6,136,576）。许多不同基因的表达均参与了重组大肠杆菌内从葡萄糖到1,3-丙二醇的生成。编码了甘油

脱水酶（dhaB）和1,3-丙二醇氧化还原酶（dhaT）的基因从诸如克雷伯氏杆菌的天然宿主中被分离出来，被用于转化诸如大肠杆菌菌株DH5α或FM5、肺炎克氏杆菌菌株ATCC25955、产酸克氏杆菌菌株ATCC8724或M5a1、酿酒酵母菌株YPH499、巴斯德毕赤酵母菌株GTS115和黑曲霉菌菌株FS1的宿主菌株。

在肺炎克氏杆菌、弗氏柠檬酸杆菌和巴氏固氮梭状芽孢杆菌中，编码了甘油脱水酶的三个结构亚基的基因（dhaB1-3或dhaB、C和E）被定位邻接于编码了特定1,3-丙二醇氧化还原酶的基因（dhaT）。尽管这些微生物在某些遗传组成上存在某些差异，但这些基因是成簇集中在一个还包括orfX和orfZ（编码了甘油脱水酶的脱水酶再活化因子的基因）以及orfY和orfW（未知功能的基因）的群体中。已知上述微生物均含有的特定1,3-丙二醇氧化还原酶（dhaT）属于III型醇脱氢酶家族；均表现为具有一个保守的铁结合基序，并倾向于1,3-丙二醇与3-HPA之间的NAD^+/NADH连接的互变。不过，1,3-丙二醇与3-HPA之间的NAD^+/NADH连接的互变也是由醇脱氢酶催化的，虽然该酶的动力学参数效力较低，其仍未特异地连接脱水酶上（例如，马肝脏和面包酵母醇脱氢酶（E.C.1.1.1.1））。甘油脱水酶（E.C.4.2.1.30）和二醇[1,2-丙二醇]脱水酶（E.C.4.2.1.28）是相关的，但不同酶由不同基因所编码。来源自产酸克氏杆菌和鼠伤寒沙门氏杆菌的二醇脱水酶基因与甘油脱水酶基因相似，均成簇集中在一个包含类似orfX和orfZ的基因的群体中（Daniel et al., FEMS Microbiol. Rev. 22:553(1999); Toraya和Mori, J. Biol. Chem. 274:3372(1999); GenBank AF026270）。

从淀粉美链霉菌中克隆获得编码甘油-3-磷酸脱氢酶的基因（DAR1、GPD1），并对其进行测序（Wang et al., J. Bact. 176:7091-7095(1994)）。将DAR1基因克隆进穿梭载体，用于转化表达可生成活性酶的大肠杆菌。Wang等人（同上）认为DAR1受细胞渗透性环境的调节，但未说明该基因有多大可能性被用于提高重组微生物内1,3-丙二醇的产量。

其它甘油-3-磷酸脱氢酶也已被分离获得。例如，从酿酒酵母中克隆获得sn-甘油-3-磷酸脱氢酶，并对其进行测序(Larason et al., Mol. Microbiol. 10:1101(1993)）。Albertyn等人（Mol. Cell. Biol.

14:4135 (1994)) 描述了从酿酒酵母中克隆获得编码甘油-3-磷酸脱氢酶的 GPD1 的过程。与 Wang 等人（同上）一样，Albertyn 等人和 Larason 等人均认同该基因的调节具有渗透敏感性，但未说明该基因有多大可能性被应用在重组微生物内 1,3-丙二醇的生成中。

与 G3PDH 一样，甘油-3-磷酸酶也可从酿酒酵母被分离出来，且该蛋白质被确定是由GPP1和GPP2基因编码的(Norbeck et al., J. Biol. Chem. 271:13875(1996))。与编码G3PDH的基因相似，GPP2似乎也具有渗透敏感性。

实施例

在下述说明本发明优选实施方案的实施例中进一步具体描述了本说明。根据上述讨论和下述实施例，本领域的技术人员均可在不偏离本发明的精神和范畴的同时确定本发明的基本特征，并且可对其进行多种改动和改进以适应不同的应用和条件。

通用方法

实施例中所采用的标准重组 DNA 和分子克隆技术是本领域所熟知的，Sambrook, J., Fritsch, E. F.和 Maniatis, T.的 Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, (1989) (Maniatis)及 T. J. Silhavy, M. L. Bennan, 和 L. W. Enquist,的 Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1984),以及 Ausubel, F. M. et al.由 Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience 出版的 Current Protocols in Molecular Biology（1987）中均对该技术有所描述。

细菌培养物的维持和生长所适用的材料和方法是本领域所熟知的。对适用于下述实施例的技术的阐述可见于 Manual of Methods for Genral Bacteriology (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg 和 G. Briggs Phillips, eds), American Society for Microbiology, Washington, DC(1994)) 或 Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology,第 2 版，Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989)中 Thomas D. Brock 的文章中。如无另外指出，细菌细胞的生长和维持所适用的所有试剂、限制酶和材料均获得

自 Aldrich Chemicals（Milwaukee, WI）、DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD), New England Biolabs (Beverly, MA)或 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)。

缩写含义如下："h"指小时，"min"指分钟，"sec"指秒，"d"指天，"mL"指毫升，"L"指升，"mm"指毫米，"nm"指纳米，"mM"指毫摩尔，"M"指摩尔，"mmol"指毫摩尔，"μmole"指微摩尔，"g"指克，"μg"指微克。

实施例 1

葡萄糖异构酶启动子变体的构建

浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶（GI）启动子（SEQ ID NO: 1）含有一个特征性的-10 标记序列（AATAAT）和一个特征性的-35 标记序列（-35T、-34T、-33G、-32A、-31C、-30A）。采用混合的碱基寡核苷酸，通过标准 PCR 饱和诱变 pMP38 中 GI 启动子的-35 区（如下述实施例 6 所描述）。在 6 个独立的 PCR 反应中，一个上游引物（SEQ ID NO: 2）与 6 个下游引物（SEQ ID NOs: 3-8）中的任意一个配对，这 6 个下游引物均在-35 区中的单一位置上含有了等量混合的全部四种可能碱基，被指定为 N。上游引物也整合了两个单一的碱基对改变，即紧随 EcoRI 位点之后的 SpeI 限制位点（ACTAGT）改变为 AvrII 限制位点（CCTAGG）。采用 EcoRI 和 HindIII 消化 6 个 PCR 产物，并将其分别连接在 EcoRI/HindIII 消化的 pMP38 上。将连接产物转化进大肠杆菌，并通过从 SpeI 到 AvrII 的转化进行限制性分析，从而识别出重组体质粒，并对其核苷酸测序。预期是只有重组体质粒存在可能的-35 区改变。在 24 种可能的重组体结果（4 个碱基在 6 个位置中）中获得了 18 个重组体，其中 13 个在-35 区中存在代表性改变（表 1）。

表 1. 通过饱和诱变 PCR 获得的 GI 启动子变体

位置	碱基	名称	备注	SEQ ID NO.
-30A	A	P1.6	-35区无变化	9
	T	P1.5		10
	G	P1.20		11
	C	P1.10		12
-31C	C	P2.8	-35区无变化	9
	A	P2.39		13
-32A	A	P3.4	-35区无变化 -10与-HindIII位点之间存在25bp长的缺失	14
	C	P3.5		15
-33G	G	P4.49	-35区无变化	9
	A	P4.15		16
	C	P4.1		17
-34T	T	P5.10	-35区无变化	9
	C	P5.12		18
	A	P5.17		19
	G	P5.19		20
-35T	T	NA	-35区无变化	9
	G	P6.5		21
	A	P6.14		22
	C	P6.20		23

*NA = 不可应用

尽管在-35 区中可能的 18 种改变中有 5 种改变未被分离，仍然可将其用于改变克隆或染色体上所编码的天然和非天然基因或操纵子的表达水平。这 5 种补充 GI 启动子变体的描述见表 2。

表 2. 其它潜在 GI 启动子变体

位置	碱基	SEQ ID NO.
-31C	G	24
	T	25
-32A	G	26
	T	27
-33G	T	28

实施例 2

通过测定甘油脱水酶活性对葡萄糖异构酶启动子变体的分析

以甘油脱水酶（GDH; 由 dhaB1-3 编码）活性被用作确定 GI 启动子突变的效果的报道分子（表 3）。观察结果为，即使-35 区中无改变，GDH 活性仍然因两个碱基对的改变，即 SpeI 转化为 AvrII 而显著减弱（例如 P1.6）。也确定了 P3.4 不具有-35 突变，但在紧随-10 区存在 25 个碱基对的缺失，并具有与野生型（86%）相差不大的启动子强度。

在无细胞提取物中，脱水酶活性是以甘油或 1,2-丙二醇为底物确定的。无细胞提取物是通过下述步骤制备的，即采用弗氏压碎器破坏细胞，继而离心分离出细胞碎片。Forage 和 Foster 描述了基于乙醛与甲基苯-2-噻唑酮腙反应的实验（Biochim. Biophys. Acta 569:249(1979)）。

表 3. GI 启动子变体中相对 GDH 活性的测定

质粒	相对GDH活性
pMP38	100
pMP38/1.6	13
pMP38/1.5	3
pMP38/1.20	1
pMP38/1.10	1
pMP38/2.39	0
pMP38/3.4	86
pMP38/3.5	1
pMP38/4.1	0
pMP38/4.15	0
pMP38/5.12	0
pMP38/5.17	0
pMP38/5.19	0
pMP38/6.5	0
pMP38/6.14	1
pMP38/6.20	2

实施例 3

采用 LUX 实验对 GI 启动子变体的分析

两类报道分子被用于测定 GI 启动子变体带来的表达水平。细菌的生物发光是 5 种结构基因（luxA、luxB、luxC、luxD 和 luxE）的产物协同作用产生光的现象。luxD 产物从前体生成 C14 脂肪酸。该 C14 脂肪酸在 luxE 产物的作用下，在 ATP 依赖反应中被活化到酰基酶偶联物，将细菌的生物发光结合到细胞的能量状态。酰基酶（luxE 产物）充当了转移介质，将酰基基团转移给 luxC 产物。酰基-LuxC 二元复合体继而在特定反应中被还原，该反应中的 NADPH 充当了电子对，质子供体则将酰基偶联物还原为 C14 醛。该反应将细胞的还原能力与细菌的光发射联系起来。该光生成反应经荧光素酶（luxA 和 luxB 的产物）催化后产生了光。光发射所需的能量由从醛到脂肪酸的转化和 FMNH2 的氧化提供，从而使光的生成与细胞能量状态产生了另一种关联。

发光光杆状菌 luxAB 基因被用作 GI 启动子变体强度的报道分子（Van Dyk et al., Appl. Environ. Microbiol., 180:785-792(1995)）。将携带发光光杆状菌 luxAB 基因、3'和 5'末端含有 SpeI 位点，且 NcoI 位点被工程设计在 luxA 的起始密码子上的 PCR 片段亚克隆进 pMCS5（MobiTec, Göttingen, Germany）的 SpeI 位点，从而获得 pJT13。接着，将具有 SwaI/NcoI 末端的、以基因 SOEing PCR 为基础的卡那霉素盒克隆进 SwaI/NcoI 消化的 pJT13 中，从而获得高拷贝 luxAB 启动子探针 pJT14.HIGHCOPY。继而采用 SpeI 消化 pJT14.HIGHCOPY，获得 luxAB::卡那霉素盒，将其亚克隆进 pRJ50(SEQ ID NO: 79）中的独特 NheI 位点（与 SpeI 相容），从而获得低拷贝 luxAB 启动子探针 pJT14.LOWCOPY.1。将 GI 启动子 1.6、1.5、1.20 和天然 GI 启动子作为 NotI/NcoI 片段克隆进 pJT14.HIGHCOPY 和 pJT14.LOWCOPY 中，分别获得高拷贝构建体 pJT18、pJT19、pJT20 和 pJT25，以及低拷贝构建体 pJT21.1、pJT22.1、pJT23.1 和 pJT26.1。继而将这些质粒转化进选择的大肠杆菌菌株中，测定体内生物发光。

如 Van Dyk 和 Rosson 所描述的，启动子强度是通过采用大肠杆菌报道菌株的肉汤培养物，以 n-癸醛为醛底物，并利用发光计检测发光度而得以确定（Methods in Molecular Biology, Vol. 102:Bioluminescence Methods and Protocols, 85(1998)）。将新鲜琼脂培养皿中的大肠杆菌菌落接种进含有标准 Luria-Bertani 液体生长培养基，并添加了适当抗菌素的试管中，于 37℃需氧生长（震荡）

大约 16 小时。继而将细胞传代培养进含有 25 毫升新鲜培养基的 100 毫升摇瓶中，于相同条件下生长大约 8-10 小时。接着从每一瓶培养物中取出等量培养物（200μL），置入 96 孔透明白色培养板中，分别测定 600nm 处的光学密度（SpectraMax 190 Plater Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA）并利用发光计测定发光度（Luminoscan Ascent TAype 392, LabSystems, Helsinki, Finland）。为获得发光计读数，将 2μL 外源醛（n-癸醛）添加进各孔内，再进行测定。测定结果如表 4 所列。这些发光度数值显示的启动子强度水平近似于甘油脱水酶实验所显示的启动子强度水平。

表 4: 生物发光测定

GI启动子	质粒构建体	相对生物发光
GI野生型	pJT26.1	100%
GI 1.6	pJT21.1	12.9%
GI 1.5	pJT22.1	3.0%
GI 1.20	pJT23.1	1.3%

实施例 4

缩短的 GI 启动子序列在实现不同水平基因表达方面的应用

将实施例 1-3 中描述和应用的一个亚型的 GI 启动子序列用于改变 RJ8n 菌株中 pSYCO109mcs 质粒（如实施例 8 所描述，SEQ ID NO: 30）来源的大肠杆菌 yqhD（SEQ ID NO: 29）的表达水平，其中 RJ8n 菌株中，染色体上的 yqhD 基因被破坏，从而获得菌株 RJ8n(yqhD-)。

构建三种用于表达 yqhD 的表达盒。这些盒含有(i)一种缩短的 GI 启动子，即短 1.5GI（SEQ ID NO: 31）、短 1.20GI（SEQ ID NO: 32）或短野生型 GI（SEQ ID NO: 33）；(ii)大肠杆菌 KLP23（WO9928480）来源的 yqhD; 和(iii)苏氨酸终止子（Lynn et al., J. Mol. Biol., 183:529-541(1985)）。yqhD 基因是通过 PCR 扩增从基因组 KLP23 DNA 分离获得的，该 PCR 扩增采用了含有一种缩短的 GI 启动子，也整合有 RsrII 限制位点，且短 1.5GI（SEQ ID NO: 34）、短 1.20GI（SEQ ID NO: 35）或短野生型 GI（SEQ ID NO: 36）的正向合成引物，和含有苏氨酸终止子，并包括 SacI 位点，且对应于 yqhD（SEQ ID NO: 37）的反向引物。采用 RsrII/SacI 消化质粒 pSYCO109mcs，并将

RsrII/SacI 消化的 PCR 产物连接进该质粒中。通过电穿孔将连接混合物转化进 RJ8n(yqhD-)菌株内，并比较各菌株中的酶活性水平(表 5)。

yqhD 表达的酶活性将还原醛 3-羟基丙醛（3-HPA）和丁醛，还原速率近似于以 NADPH 为还原等价物源时的还原速率。由于 3-HPA 是非商业可提供的，通常采用的是丁醛。总体积为 1 毫升的实验混合物含有：200mM 磷酸钾缓冲液（pH7.5）、10mM 丁醛、0.2mM NADPH 和大约 0.01mg 来自待检验无细胞提取物的蛋白质。添加蛋白质样品后，测定 NADPH 的最初氧化速率，继而测定 340nm 处吸光度的改变（$\Delta\varepsilon$=6.22mM-1）。一个活性单位的定义是在 35℃，存在 10mM 丁醛的条件下，一分钟内氧化 1 毫摩尔 NADPH 所需的酶量。下表 5 列出了多种菌株的活性，均与较长 GI 启动子变体可实现的表达水平一致。

表 5. YqhD 活性

菌株和构建体	活性 (U/mg)	%活性
RJ8n(*yqhD-*)	0.015	0.8
RJ8n(*yqhD-*)/pSYCO109mcs	0.010	0.5
RJ8n(*yqhD-*)/pSYCO109mcs-短1.20 GI *yqhD*	0.14	7.3
RJ8n(*yqhD-*)/pSYCO109mcs-短1.5 GI *yqhD*	0.29	15
RJ8n(*yqhD-*)/pSYCO109mcs-短野生型 GI *yqhD*	1.92	100

为获得 RJ8n（yqhD-），采用 Wanner 和 Datsenko 所描述的操作方法破坏大肠杆菌 MG1655 中的 yqhD 基因（PNAS, 97(12):6640-6645(2000)），以进行 Red 介导的同源重组。制备正向 PCR 引物 H1::6574（SEQ ID NO: 38）（含有与 yqhD 同源的 42bp 长的序列，和将 P1 结合到 pKD13 的引物结合位点），和反向 PCR 引物 H2::6706（SEQ ID NO: 39）（含有 47bp 长的同源 yqhD 序列，和将 P4 结合到 pKD13 的引物结合位点）。以 pKD13 为模板进行 PCR 扩增，获得的 PCR 产物在每一末端均具有 yqhD 序列，其后接有 FRT（FLP 识别目标），其中 FRT 位点位于卡那霉素抗性（kanR）标记的侧翼。将 PCR 产物电转化进大肠杆菌 MG1655 细胞中，筛选出具有卡那霉素抗性的转化体。转化体中的正确插入是通过采用位于 yqhD 基因侧翼的引物 yqhDUP（SEQ ID NO: 82）和 yqhDDN（SEQ ID NO: 83）进行 PCR 证实的。含有 Lambda Red 系统的温度敏感的质粒是通过菌株于 42℃的生长得

以清除。

通过P1转导将yqhD::kan破坏转移进RJ8n中，并采用与kanR基因内的引物配对的yqhDUP2（SEQ ID NO: 40）和yqhDDN2（SEQ ID NO: 41）引物（Vec 61; SEQ ID NO:42和Vec 60; SEQ ID NO:43）进行PCR验证。为移除卡那霉素标记，整合体是由温度敏感的复制子，pCP20转化的，该复制子含有对应于FLP重组酶的基因。FLP重组酶切除了位于FRT（FLP识别目标）位点侧翼的卡那霉素标记。继而使卡那霉素敏感细胞于42℃生长，以清除pCP20。获得的菌株为RJ8n（yqhD-）。

实施例5

GI启动子对大肠杆菌磷酸烯醇丙酮酸羧化酶染色体启动子的取代

实施例5描述了短野生型GI启动子（SEQ ID NO: 33）对大肠杆菌基因组中天然ppc（编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶或PEP羧化酶）启动子的取代。

取代ppc启动子适用的寡核苷酸设计

设计两种寡核苷酸（ppcF，SEQ ID NO: 44和ppcR，SEQ ID NO; 45），使其可通过PCR扩增特定盒，该盒含有一个同源于天然ppc启动子上游区域的80bp长的序列、一个侧翼于面包酵母FRT位点的氯霉素抗性编码基因（cat）、短野生型GI启动子序列（SEQ ID NO: 33）和一个同源于天然ppc启动子的+1转录起始位点下游区域的40bp长的序列。

ppcR引物（SEQ ID NO: 45）有100个核苷酸长，包括：从P1（天然ppc启动子）转录起点的+1到ppc的ATG上游41bp的完整序列，从-35上游4bp到-10下游9bp的短野生型GI启动子序列(SEQ ID NO: 33），和用于pKD3的引发位点（Wanner和Datsenko，同上），以及含有cat基因的R6K质粒，其中该cat基因侧翼于两个FRT位点。ppcF引物（SEQ ID NO: 44）有100个核苷酸长，包括天然ppc启动子上游80bp长的序列和对应于pKD3的引发位点。

采用引物ppcF和ppcR（SEQ ID NOs:44和45），并以质粒pKD3为模板，扩增启动子取代盒。1.15-kb长的PCR产物是通过琼脂糖凝胶电泳，继而利用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen, Inc., Valencia, CA）得以纯化。

采用线性DNA进行同源重组将天然ppc启动子取代进入大肠杆菌基因

组

采用 0.5μg 上述的 1.15-kb 线性 DNA 电转化感受态大肠杆菌 MG1655 细胞，该细胞含有 pKD46（Datsenko 和 Wanner，同上），该质粒是在阿拉伯糖启动子控制下表达γ、β和 exo 的 Red-重组酶质粒，接着对获得的转化体进行筛选，获得具有氯霉素抗性的转化体（15μg/mL）。采用引物 ppcF 和 seqppcR（SEQ ID NO: 46）进行 PCR，检验重组体菌株。非特异性整合的盒未生成 PCR 产物，正确的重组体则生成了 1.25-kb 长的 PCR 产物。短野生型 GI 启动子的序列是通过采用 seqppcR 引物（SEQ ID NO: 46）对 1.25-kb 长的 PCR 产物进行测序而得以证实的。

酶活性的测定

采用下述实验方法，以超离心获得的无细胞提取物为对象，测定 MG1655 和 MG1655（短野生型 GI-ppc）中的 PEP 羧化酶活性，结果如表 6 所示。PPC 在短野生型 GI 启动子的控制下表现的活性是在天然启动子控制下所表现活性的 3 倍多。

在含有：0.11M Tris 缓冲液（pH8.5）、NADH（0.22mM）、硫酸镁（11.1mM）、碳酸氢钠（11.1mM）、酰基-CoA（0.25mM）、MalateDH（Sigma）、50μL 的 6U 细胞提取物和 0.03 磷酸烯醇丙酮酸（1.11mM）的混合物中测定 340nm 处的减量（由于 NADH 的消耗）。采用下列公式确定活性：

$$\text{单位/毫克蛋白质} = \frac{\Delta A340/\text{分钟（试样）} - \Delta A340/\text{分钟（空白）}}{6.22 \times \text{毫克蛋白质/毫升反应混合物}}$$

表 6.

天然和 GI1.6 启动子来源的 PPC 活性

菌株	活性 (U/mg)
MG1655	0.05
MG1655 (1.6GI *ppc*)	0.164

实施例 6

采用肺炎克氏杆菌 dha 调节子来源的基因转化大肠杆菌所用表达质粒的构建

表达载体 pTac1Q 的构建：

通过将 $lacI^{Q}$ 基因（Farabaugh, Nature, 274(5673):765-769(1978)）和 tac 启动子（Amann et al., Gene 25:167-178(1983)）插入 pBR322 的 EcoRI 位点，制备出大肠杆菌表达载体 pTac1Q（Sutcliffe, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43:77-90(1979)）。多克隆位点和终止子序列（SEQ ID NO: 47）取代了从 EcoRI 到 SphI 的 pBR322 序列。

甘油脱水酶基因（dhaB1, 2, 3, X）的亚克隆:

通过采用 5'末端整合有 EcoRI 位点，3'末端整合有 XbaI 位点的引物（SEQ ID NOs: 49-50）进行 PCR，从 pHK28-26（SEQ ID NO: 48）扩增了 dhaB3 基因的开放读码框架。将产物亚克隆进 pLitmus29（New England Biolabs），获得含有 dhaB3 的质粒 pDHAB3。

采用限制酶 KpnI 和 EcoRI，将特定区域（含有 pHK28-26 来源 dhaB 操纵子的 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaBX 的完整编码区域）克隆进 pBluescriptIIKS^{+}（Stratagene, La Jolla, CA），获得质粒 pM7。

通过采用 ApaI 和 XbaI 消化质粒 pM7，以移除 dhaBX 基因，纯化 5.9-kb 长的片段，并将其与质粒 pDHAB3 来源 325-bp 长的 ApaI-XbaI 片段连接，获得 pM11（含有 dhaB1、dhaB2 和 dhaB3）。

通过采用 5'末端整合有 HindIII 位点和一个共有核糖体结合位点（RBS），3'末端整合有 XbaI 位点的引物（SEQ ID NOs: 51-52）进行 PCR，从 pHK28-26 扩增 dhaB1 基因的开放读码框架。将产物亚克隆进 pLitmus28（New England Biolabs），获得含有 dhaB1 的质粒 pDT1。

将 pM11 来源的 NotI-XbaI 片段（含部分 dhaB1 基因、dhaB2 基因和 dhaB3 基因）插入 pDT1，获得 dhaB 表达质粒，pDT2。将 HindIII-XbaI 片段（含 pDT2 来源的 dhaB(1, 2, 3)基因）插入 pTac1Q，获得 pDT3。

1, 3-丙二醇脱氢酶基因（dhaT）的亚克隆:

将 pHK28-26 的 KpnI-SacI 片段（含 1, 3-丙二醇脱氢酶（dhaT）基因）亚克隆进 pBluescriptII KS+中，获得质粒 pAH1。通过以 pAH1 为模板 DNA，并采用 5'末端整合有 XbaI 位点，3'末端整合有 BamHI 位点的合成引物（SEQ ID NOs: 53-54）进行 PCR，扩增 dhaT 基因。将产物亚克隆进 pCR-Script(Stratagene)的 SrfI 位点，获得含有 dhaT 的质粒 pAH4 和 pAH5。质粒 pAH4 所含的 dhaT 基因的表达方向是从 pCR-Script 中的 lac 启动子开始的正确表达方向，而质粒 pAH5 所含

的 dhaT 基因的表达方向则与 pAH4 所含 dhaT 基因的表达方向相反。将 pAH4 来源的 XbaI-BamHI 片段（含 dhaT 基因）插入 pTac1Q，获得质粒 pAH8。将 pAH8 来源的 HindII-BamHI 片段（含有 RBS 和 dhaT 基因）插入 pBluescriptIIKS+，获得 pAH11。

用于表达 dhaT 和 dhaB(1,2,3)的表达盒的构建:

利用标准分子生物学方法从上述单个 dhaB(1,2,3)和 dhaT 亚克隆组装用于表达 dhaT 和 dhaB(1,2,3)的表达盒。将 SpeI-SacI 片段（含 pDT3 来源的 dhaB(1,2,3)基因）插入 pAH11 的 SpeI-SacI 位点，获得 pAH24。将构建自 SEQ ID NOs: 55-56 的 SalI-XbaI 接头插入经由限制酶 SalI-XbaI 消化的 pAH5 中，获得 pDT16。该接头破坏了 XbaI 位点。继而将 pDT16 来源 1-kb 长的 SalI-MluI 片段插入 pAH24 中，取代其已存在的 SalI-MluI 片段，获得 pDT18。pDT21 是通过将 pDT18 来源的 SalI-NotI 片段和 pM7 来源的 NotI-XbaI 片段插入 pCL1920（GenBank AX085428）中而构建的。通过 PCR 克隆浅青紫链霉菌来源的葡萄糖异构酶启动子序列（SEQ ID NO: 1），将其插入 pLitmus28 的 EcoRI-HindIII 位点，获得 pDT5。PCL1925 是通过将 pDT5 的 EcoRI-PvuII 片段（含 GI 启动子）插入 pCL1920（GenBank AX085428）的 EcoRI-PvuII 位点而获得的。

在链霉菌葡萄糖异构酶启动子控制下表达甘油脱水酶所用的表达载体的构建:

从 pDT24 中缺失掉 HindIII 限制片段（含 dhaT），获得 pRN105。pDT24 质粒是通过将 pDT21 的 HindIII-MluI 片段和 pDT21 的 MluI-XbaI 片段克隆进 pCL1925 的 HindIII-XbaI 位点而构建的。由 pRN105 模板获得 PCR 产物(包含 dhaX 的 3'区，即从独特 HpaI 限制位点到 dhaX 末端，且 5'末端整合有 HpaI 限制位点，3'末端整合有 XbaI 限制位点)，将其用于取代 pRN105 中已存在的 HpaI/XbaI 限制片段，获得 pMP37。由 pDT29 模板获得 PCR 产物（包含 dhaB1 的 5'区，即从恰好位于起始密码子上游的独特 HindIII 限制位点到 dhaB1 内的独特 NotI 限制位点，且 5'末端整合有 HindIII 限制位点，3'末端整合有 NotI 限制位点），将其用于取代 pRN105 中的小 HindIII/NotI 限制片段，获得 pRJ25。PDT29 是通过将 pHK28-26 的 SacI-EcoRI 片段插入 pCL1925 的 SacI-EcoRI 位点而构建的。将小 HpaI/XbaI 限制片段（含 pMP37

来源 dhaX 的 5'区）连接至 pRJ25 来源的大 XbaI/HpaI 限制片段，获得 pMP38，其中浅青紫链霉菌葡萄糖异构酶启动子（SEQ ID NO: 1）利用天然核糖体结合位点驱动了肺炎克氏杆菌 dhaB1-3,X 操纵子的表达。

实施例 7

生成 1,3-丙二醇所用 SYCO 质粒的构建

为了在大肠杆菌宿主内从葡萄糖生成 1,3-丙二醇，可表达不同来源的若干操纵子。这些操纵子包括负责甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸磷酸酶和甘油脱水酶活性的基因编码。这些基因可能来自诸如肺炎克氏杆菌来源的 dha 操纵子（含 dhaR、dhaT、dhaX 和 dhaB1-3）和也来自肺炎克氏杆菌的 orf 操纵子（含 orfYXW），以及含酵母菌来源 DAR1 和 GPP2 的操纵子。为了在发酵过程中保持菌株稳定性，优选地是在大肠杆菌宿主内保留尽可能少的质粒。为达到该目的，构建了一系列质粒，使其能够在单个质粒上克隆至少三个不同操纵子。为防止 RNA 聚合酶的连读，采用三种转录终止子位于独特克隆位点侧翼。这些转录终止子包括 tonB 终止子、thr 弱化子和 aspA 终止子。tonB 终止子是位于大肠杆菌 tonB 基因和相对基因之间的不依赖 rho 的双向终止子（Postle, K.和 Good, R. F., Cell, 41:577-585(1985)）。thr 弱化子用于大肠杆菌苏氨酸操纵子的转录终止（Lynn et al., J. Mol. Biol., 183:529-541(1985)）。aspA 终止子则用于大肠杆菌天冬氨酸酶操纵子的转录终止（Takagi et al., Nucleic Acid Research. 13(6):2063-2072(1985)）。

包含三个两侧具有独特克隆位点的转录终止子的 pRJ50 的构建:

采用 PCR 介导的重叠延伸组装合成 DNA 片段（包含 tonB、thr 和 aspA 转录终止子（SEQ ID NO: 57）和若干限制位点）（Horton et al., Bio Techniques, 8:528-535, (1990)）。将两个有 100 个碱基的寡核苷酸（SEQ ID NOs: 58-59）退火，生成一个有 175 个碱基的 DNA 片段（SEQ ID NO: 60），其中上述两个寡核苷酸在 3'末端 25 个碱基对长的跨距上彼此互补。采用两个另外的寡核苷酸引物（SEQ ID NOs: 61-62）进一步扩增上述 175-碱基片段，其两侧为 EcoRI 和 KpnI 限制位点。采用 EcoRI 和 KpnI 消化该 175-碱基对的 PCR 产物，将其亚克隆进 EcoRI/KpnI 消化的质粒 pCL1925 中，获得 pRJ50（SEQ ID NO:

79）。

表达 dhaR、orfY、orfX、orfW 和 dhaB(1,2,3,X)所用表达盒的构建:

构建质粒 pDT29 的衍生物，其中利用了被称为 PCR 介导的重叠延伸的技术，将基因 dhaT 中除了最初 5 个和最后 5 个密码子（外加终止密码子）外的全部密码子缺失。以 pDT29 为模板，采用下列引物生成两个初级 PCR 产物:

SEQ ID NO:63 = 5'GAC GCA ACA GTA TTC CGT CGC3';

SEQ ID NO:64 = 5'ATG AGC TAT CGT ATG TTC CGC CAG GCA TTC TGA GTG TTA ACG3';

SEQ ID NO:65 = 5'GCC TGG CGG AAC ATA CGA TAG CTC ATA ATA TAC3';

SEQ ID NO:66 = 5'CGG GGC GCT GGG CCA GTA CTG3'.

SEQ ID NO: 65 与 SEQ ID NO: 66 配对生成一个 931bp 长的产物，其包含的核酸包括 5'dhaB1(到独特 ScaI 位点)、所有的 orfY，和 dhaT 的最初 5 个密码子。SEQ ID NO: 63 与 SEQ ID NO: 64 配对生成一个 1348bp 长的产物，其包含的核酸包括 dhaT 的最后 5 个密码子（外加终止密码子）、所有 orfX、所有 orfW 和 5'dhaR（到独特 SapI 位点）。SEQ ID NO: 64 的 5'末端上的 15 个碱基构成一个尾部，即 SEQ ID NO: 65 的 15-碱基部分的反向互补体。类似的，SEQ ID NO: 65 的 5'末端上的 11 个碱基构成一个尾部，即 SEQ ID NO: 64 的 11-碱基部分的反向互补体。因此，通过 PCR 退火（经过 26-bp 长的尾部重叠）和延伸后，将两个初级 PCR 产物连接在一起，生成了 2253bp 长的第三个核酸产物。采用 SapI 和 SacI 消化该第三个 PCR 产物，将其连接进也由 SapI 和 SacI 消化过的 pDT29 中，获得质粒 pKP32，该质粒除了 dhaT 内有大的符合读框的缺失以外，其它均与 pDT29 一致。

表达 orfWXY 和 dhaB1-3 并含有不同 GI 启动子变体的质粒的构建:

PCR 扩增 pKP32 来源的 orf 操纵子（SEQ ID NOs: 80-81），其 5'末端含 HindIII，3'末端含 AvrII，并将其亚克隆进 pLitmus28（New England Biolabs）中的 HindIII 和 AvrII 之间，获得 pKP38。将 EcoRI/HindIII 限制片段（含 pMP38/1.6 来源的 GI 突变启动子 P1.6（SEQ ID NO: 9））亚克隆进 pKP38 中的 EcoRI 和 HindIII 之间，获得 pKP39。将 AvrII/XbaI 限制片段（含 pMP38/1.6 来源的 dhaB 表达

盒）亚克隆进 pLitmus28（New England Biolabs）中的 AvrII 和 XbaI 之间，获得 pMP39。将 AvrII/XbaI 限制片段（含 pMP39 来源的 dhaB 表达盒）亚克隆进 pRJ50 的 AvrII 位点，获得 pSYCO11。将 AvrII 限制片段(含 pKP39 来源的 orf 表达盒)亚克隆进 pSYCO11 的 NheI 位点，获得 pSYCO12。质粒 pSYCO11 和 pSYCO12 相比，除了 pSYCO11 不含 orf 操纵子以外，其它均一致。

将 EcoRI/HindIII 限制片段(含 pMP38/1.5 来源的 GI 突变启动子 P1.5（SEQ ID NO: 10））亚克隆进 pKP38 中的 EcoRI 和 HindIII 之间，获得 pKP40。将 AvrII 限制片段（含 pKP40 来源，由 P1.5 驱动的 orf 操纵子）亚克隆进 pSYCO11 的 NheI 位点，获得 pSYCO13。将 pMP38/1.5 来源相应的 AvrII/NotI 限制片段取代 AvrII/NotI 限制片段（含 P1.6 和 pSYCO13 中 dhaB1 的 5'末端），获得 pSYCO19。

具有三个由转录终止子分隔开的操纵子的 pSYCO101、pSYCO103、pSYCO106 和 pSYCO109 载体的构建

将双链核酸接头（SEQ ID NO: 67）亚克隆进 pCL1920（GenBank AX085428）中的 XbaI 和 SmlI 限制位点之间，获得 pCR-pCL1920。PCR 扩增 pAH48 中的甘油途径表达盒（SEQ ID NO: 68-69），该盒包含 pTrc99A（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）来源的 trc 启动子、酿酒酵母的 DAR1 和 GPP2 的编码序列，和终止子 rrnBT1T2（来源自 pTrc99A），并将其亚克隆进 pCR-pCL1920 的 SrfI 限制位点，获得 pAH105（SEQ ID NO: 70）。

将 PvuII(2)/PvuII(4)限制片段(含 pAH105 来源的 DAR1/GPP2 表达盒)亚克隆进 pSYCO12 的 Bst11071 位点，获得 pSYCO101(SEQ ID NO: 71）。DAR1/GPP2 操纵子的方向与 orf 操纵子和 dhaB 操纵子的方向相反。将 NheI 限制片段（含 pAH105 来源的 DAR1/GPP2 表达盒）亚克隆进 pSYCO19 的 XbaI 位点，获得 pSYCO103（SEQ ID NO: 72）。

质粒 pSYCO103 包含(a)一组两个获得自酿酒酵母的外源基因(DAR1（编码甘油-3-磷酸脱氢酶的基因）和 GPP2（编码甘油-3-磷酸酶的基因））；(b)一组三个获得自肺炎克氏杆菌的外源基因（dhaB1（编码甘油脱水酶的“α”亚基的基因）、dhaB2（编码甘油脱水酶的“β”亚基的基因）和 dhaB3（编码甘油脱水酶的“γ”亚基的基因））；和(c)一组两个获得自肺炎克氏杆菌的外源基因（dhaBX（编码脱水酶再活化

因子的“α”亚基的基因）和orfX（编码脱水酶再活化因子的“β”亚基的基因））。在pSYCO103中，DAR1/GPP2操纵子的方向与orf操纵子和dhaB操纵子的方向相同。

将NheI限制片段（含pAH105来源的DAR1/GPP2表达盒）亚克隆进pSYCO12的XbaI位点，获得pSYCO106(SEQ IN NO: 73)。DAR1/GPP2操纵子的方向与orf操纵子和dhaB操纵子的方向相同。将pSYCO106中的PmlI/NotI限制片段移除，取代以pSYCO106来源的重叠StuI/NotI限制片段，导致orfW的3'末端附近缺失141个碱基对，获得pSYCO109（SEQ ID NO: 74）。

实施例8

具有10个用于克隆的稀有限制酶位点的新型核苷酸序列

设计新型核苷酸序列，编码10个用于克隆其它基因、操纵子或盒的稀有限制性内切酶位点，这些位点还用作将盒从某一质粒转移至另一质粒的位点。质粒pSYCO106ΔS是通过下述步骤构建的，即采用SpeI限制pSYCO106，将Klenow填充在末端，进行再连接。采用EcoRI消化pSYCO106ΔS，分离该载体主链，继而通过连接再次环化，形成pSpREPds。60℃退火寡核苷酸(SEQ ID NOs: 75-76)，并采用KpnI/StuI消化。多克隆片段（SEQ ID NO: 77）含有下列酶的识别位点：NheI、RsrII、SacI、AgeI、SnaBI、AscI、PacI、NsiI、MluI和SapI。凝胶纯化该片段，将其克隆进pSpREPds，形成pSpREPmcs。采用EcoRI线性化pSpREPmcs，并将EcoRI片段（含pSYCO106ΔS和pSYCO109来源的途径基因）与pSpREPmcs连接，分别形成pSYCO106mcs(SEQ ID NO: 78）和pSYCO109mcs（SEQ ID NO: 30）。

实施例9

利用大肠杆菌菌株RJ8n/pSYCO101生成1,3-丙二醇

采用质粒pSYCO101（SEQ ID NO: 71）转化电感受态大肠杆菌RJ8n细胞，获得大肠杆菌菌株RJ8n/pSYCO101。

在含有50mg/L奇霉素的2YT培养基（10g/L酵母提取物、16g/L蛋白胨和10g/L NaCl）中预培养接种发酵罐所需的RJ8n/pSYCO101。培养开始于将冷冻保存菌株（10%甘油作为冷冻保护剂）接种于2L锥瓶中的500mL培养基内，在摇床中250rpm，35℃条件下生长，直至OD_{550}达到大约1.0，将其用于接种发酵罐。

下列组分是在发酵罐内同时灭菌：45g KH_2PO_4、12g 柠檬酸一水化物、12g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、30g 酵母提取物、1.8g 柠檬酸铁铵、5mL Mazu DF204 作为消泡剂、1.2g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、7.2mL 硫酸和 60mL 微量元素溶液。灭菌后，采用 20－28%NH_4OH 将 pH 提高至 6.8，并添加下列组分：0.30g 奇霉素和葡萄糖（获得自 67%（重量百分比）的补料）。微量元素溶液含有（g/L）：柠檬酸·H_2O（4.0）、$MnSO_4 \cdot H_2O$（3.0）、NaCl（1.0）、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$（0.10）、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$（0.10）、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$（0.10）、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$（0.010）、H_3BO_3（0.010）和 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$（0.010）。接种后，体积为 6.0L，葡萄糖浓度为 10g/L。

采用上述培养基准备 15 升搅拌发酵罐。温度控制在 34℃，并采用氨水（20-28 重量百分比（w/w））控制 pH 为 6.8。溶氧（DO）控制设定为 10%，并将反压控制在 0.5bar。除了较小的偏移外，通过 67%（wt）补料将葡萄糖维持在 10g/L 与 25g/L 之间。发酵的第 10 小时添加 10 毫克维他命 B_{12}，并于 1 小时后开始协同补料（0.0167mg/mL 溶液以 2.64mg/h 的流速补料）。64 小时后获得滴定浓度为 99g/L 的 1,3-丙二醇。

<110> 纳幕尔杜邦公司

<120> 用于遗传工程的启动子和质粒系统

<130> CL1998 PCT

<150> 60/374931

<151> 2002-04-22

<160> 83

<170> Microsoft Office 97

<210> 1

<211> 199

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 1

gaattcacta gtcgatctgt gctgtttgcc acggtatgca gcaccagcgc gagattatgg 60

gctcgcacgc tcgactgtcg gacgggggca ctggaacgag aagtcaggcg agccgtcacg 120

cccttgacaa tgccacatcc tgagcaaata attcaaccac taaacaaatc aaccgcgttt 180

cccggaggta accaagctt 199

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2
cgggaattcc ctaggcgatc tgtgctgttt gccacg 36

<210> 3

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> misc_特征

<222> (74)..(74)

<223> N = A, T, C, 或 G

<400> 3
cttaagcttg gttacctccg ggaaacgcgg ttgatttgtt tagtggttga attatttgct 60

caggatgtgg catngtcaag ggcg 84

<210> 4

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> misc_特征

<222> (75)..(75)

<223> N = A, T, C, 或 G

<400> 4
cttaagcttg gttacctccg ggaaacgcgg ttgatttgtt tagtggttga attatttgct 60

caggatgtgg cattntcaag ggcg 84

<210> 5

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> misc_特征

<222> (76)..(76)

<223> N = A, T, C, 或 G

<400> 5
cttaagcttg gttacctccg ggaaacgcgg ttgatttgtt tagtggttga attatttgct 60

caggatgtgg cattgncaag ggcg 84

<210> 6

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> misc_特征

<222> (77)..(77)

<223> N = A, T, C, 或 G

<400> 6
cttaagcttg gttacctccg ggaaacgcgg ttgatttgtt tagtggttga attatttgct 60

caggatgtgg cattgtnaag ggcg 84

<210> 7

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> misc_特征

<222> (78)..(78)

<223> N = A, T, C, 或 G

<400> 7
cttaagcttg gttacctccg ggaaacgcgg ttgatttgtt tagtggttga attatttgct 60

caggatgtgg cattgtcnag ggcg 84

<210> 8

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> misc_特征

<222> (79)..(79)

<223> N = A, T, C, 或 G

<400> 8
cttaagcttg gttacctccg ggaaacgcgg ttgatttgtt tagtggttga attatttgct 60

caggatgtgg cattgtcang ggcg 84

<210> 9

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 9
cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 10

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 10

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

actatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 11

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 11

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

acgatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 12

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 12

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

accatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 13

<211> 186

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 13

ctaggcgatc tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag cgcgagatta tgggctcgca 60

cgctcgactg tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag gcgagccgtc acgcccttga 120

aaatgccaca tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa atcaaccgcg tttcccggag 180

gtaacc 186

<210> 14

<211> 162

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 14

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

acaatgccac atcctgagca aataatttc ccggaggtaa cc 162

<210> 15

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 15

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

ccaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 16

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 16

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttа 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 17

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 17

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttc 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 18

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 18

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgccctcg 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 19

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 19

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgccctag 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 20

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 20

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgccctgg 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 21

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 21

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccgtg 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 22

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 22

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccatg 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 23

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 23

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgccctg 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 24

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 24

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

agaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 25

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 25

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

ataatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 26

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 26

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

gcaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 27

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 27

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttg 120

tcaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 28

<211> 187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 28

cctaggcgat ctgtgctgtt tgccacggta tgcagcacca gcgcgagatt atgggctcgc 60

acgctcgact gtcggacggg ggcactggaa cgagaagtca ggcgagccgt cacgcccttt 120

acaatgccac atcctgagca aataattcaa ccactaaaca aatcaaccgc gtttcccgga 180

ggtaacc 187

<210> 29

<211> 1164

<212> DNA

<213> Escherichia coli K-12

<400> 29

atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct 60

ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc 120

gtgaaaaaaa ccggcgttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg 180

gaatttggcg gtattgagcc aaacccggct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg 240

gttcgcgaac agaaagtgac tttcctgctg gcggttggcg gcggttctgt actggacggc 300

accaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccggaaaata tcgatccgtg gcacattctg 360

caaacgggcg gtaaagagat taaaagcgcc atcccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca 420

gcaaccggtt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag 480

caggcgttcc attctgccca tgttcagccg gtatttgccg tgctcgatcc ggtttatacc 540

tacaccctgc cgccgcgtca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg 600

gaacagtatg ttaccaaacc ggttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt 660

ttgctgacgc taatcgaaga tggtccgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg 720

cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta 780

ccgcaggact gggcaacgca tatgctgggc cacgaactga ctgcgatgca cggtctggat 840

cacgcgcaaa cactggctat cgtcctgcct gcactgtgga atgaaaaacg cgataccaag 900

cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcactgaagg ttccgatgat 960

gagcgtattg acgccgcgat tgccgcaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccg 1020

acccacctct ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggctttgct gaaaaaactg 1080

gaagagcacg gcatgaccca actgggcgaa aatcatgaca ttacgttgga tgtcagccgc 1140

cgtatatacg aagccgcccg ctaa 1164

<210> 30

<211> 13470

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 30

ccttaagtga gtcgtattac ggactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc 60

ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc tttcgccagc tggcgtaata 120

gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc 180

gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 240

ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 300

ccgctgacga gcttagtaaa gccctcgcta gattttaatg cggatgttgc gattacttcg 360

ccaactattg cgataacaag aaaaagccag cctttcatga tatatctccc aatttgtgta 420

gggcttatta tgcacgctta aaaataataa aagcagactt gacctgatag tttggctgtg 480

agcaattatg tgcttagtgc atctaacgct tgagttaagc cgcgccgcga agcggcgtcg 540

gcttgaacga attgttagac attatttgcc gactaccttg gtgatctcgc ctttcacgta 600

gtggacaaat tcttccaact gatctgcgcg cgaggccaag cgatcttctt cttgtccaag 660

ataagcctgt ctagcttcaa gtatgacggg ctgatactgg gccggcaggc gctccattgc 720

ccagtcggca gcgacatcct tcggcgcgat tttgccggtt actgcgctgt accaaatgcg 780

ggacaacgta agcactacat ttcgctcatc gccagcccag tcgggcggcg agttccatag 840

cgttaaggtt tcatttagcg cctcaaatag atcctgttca ggaaccggat caaagagttc 900

ctccgccgct ggacctacca aggcaacgct atgttctctt gcttttgtca gcaagatagc 960

cagatcaatg tcgatcgtgg ctggctcgaa gatacctgca agaatgtcat tgcgctgcca 1020

ttctccaaat tgcagttcgc gcttagctgg ataacgccac ggaatgatgt cgtcgtgcac 1080

aacaatggtg acttctacag cgcggagaat ctcgctctct ccaggggaag ccgaagtttc 1140

caaaaggtcg ttgatcaaag ctcgccgcgt tgtttcatca agccttacgg tcaccgtaac 1200

cagcaaatca atatcactgt gtggcttcag gccgccatcc actgcggagc cgtacaaatg 1260

tacggccagc aacgtcggtt cgagatggcg ctcgatgacg ccaactacct ctgatagttg 1320

agtcgatact tcggcgatca ccgcttcccc catgatgttt aactttgttt tagggcgact 1380

gccctgctgc gtaacatcgt tgctgctcca taacatcaaa catcgaccca cggcgtaacg 1440

cgcttgctgc ttggatgccc gaggcataga ctgtacccca aaaaaacagt cataacaagc 1500

catgaaaacc gccactgcgc cgttaccacc gctgcgttcg gtcaaggttc tggaccagtt 1560

gcgtgagcgc atacgctact tgcattacag cttacgaacc gaacaggctt atgtccactg 1620

ggttcgtgcc ttcatccgtt tccacggtgt gcgtcacccg gcaaccttgg gcagcagcga 1680

agtcgaggca tttctgtcct ggctggcgaa cgagcgcaag gtttcggtct ccacgcatcg 1740

tcaggcattg gcggccttgc tgttcttcta cggcaaggtg ctgtgcacgg atctgccctg 1800

gcttcaggag atcggaagac ctcggccgtc gcggcgcttg ccggtggtgc tgaccccgga 1860

tgaagtggtt cgcatcctcg gttttctgga aggcgagcat cgtttgttcg cccagcttct 1920

gtatggaacg ggcatgcgga tcagtgaggg tttgcaactg cgggtcaagg atctggattt 1980

cgatcacggc acgatcatcg tgcgggaggg caagggctcc aaggatcggg ccttgatgtt 2040

acccgagagc ttggcaccca gcctgcgcga gcaggggaat taattcccac gggttttgct 2100

gcccgcaaac gggctgttct ggtgttgcta gtttgttatc agaatcgcag atccggcttc 2160

agccggtttg ccggctgaaa gcgctatttc ttccagaatt gccatgattt tttccccacg 2220

ggaggcgtca ctggctcccg tgttgtcggc agctttgatt cgataagcag catcgcctgt 2280

ttcaggctgt ctatgtgtga ctgttgagct gtaacaagtt gtctcaggtg ttcaatttca 2340

tgttctagtt gctttgtttt actggtttca cctgttctat taggtgttac atgctgttca 2400

tctgttacat tgtcgatctg ttcatggtga acagctttga atgcaccaaa aactcgtaaa 2460

agctctgatg tatctatctt ttttacaccg ttttcatctg tgcatatgga cagttttccc 2520

tttgatatgt aacggtgaac agttgttcta cttttgtttg ttagtcttga tgcttcactg 2580

atagatacaa gagccataag aacctcagat ccttccgtat ttagccagta tgttctctag 2640

tgtggttcgt tgtttttgcg tgagccatga gaacgaacca ttgagatcat acttactttg 2700

catgtcactc aaaaattttg cctcaaaact ggtgagctga atttttgcag ttaaagcatc 2760

gtgtagtgtt tttcttagtc cgttatgtag gtaggaatct gatgtaatgg ttgttggtat 2820

tttgtcacca ttcatttta tctggttgtt ctcaagttcg gttacgagat ccatttgtct 2880

atctagttca acttggaaaa tcaacgtatc agtcgggcgg cctcgcttat caaccaccaa 2940

tttcatattg ctgtaagtgt ttaaatcttt acttattggt ttcaaaaccc attggttaag 3000

ccttttaaac tcatggtagt tattttcaag cattaacatg aacttaaatt catcaaggct 3060

aatctctata tttgccttgt gagttttctt ttgtgttagt tcttttaata accactcata 3120

aatcctcata gagtatttgt tttcaaaaga cttaacatgt tccagattat attttatgaa 3180

ttttttaac tggaaaagat aaggcaatat ctcttcacta aaaactaatt ctaatttttc 3240

gcttgagaac ttggcatagt ttgtccactg gaaaatctca aagcctttaa ccaaaggatt 3300

cctgatttcc acagttctcg tcatcagctc tctggttgct ttagctaata caccataagc 3360

attttcccta ctgatgttca tcatctgagc gtattggtta taagtgaacg ataccgtccg 3420

ttctttcctt gtagggtttt caatcgtggg gttgagtagt gccacacagc ataaaattag 3480

cttggtttca tgctccgtta agtcatagcg actaatcgct agttcatttg ctttgaaaac 3540

aactaattca gacatacatc tcaattggtc taggtgattt taatcactat accaattgag 3600

atgggctagt caatgataat tactagctag tccttttcct ttgagttgtg ggtatctgta 3660

aattctgcta gacctttgct ggaaaacttg taaattctgc tagaccctct gtaaattccg 3720

ctagaccttt gtgtgttttt tttgtttata ttcaagtggt tataatttat agaataaaga 3780

aagaataaaa aaagataaaa agaatagatc ccagccctgt gtataactca ctactttagt 3840

cagttccgca gtattacaaa aggatgtcgc aaacgctgtt tgctcctcta caaaacagac 3900

cttaaaaccc taaaggctta agtagcaccc tcgcaagctc gggcaaatcg ctgaatattc 3960

cttttgtctc cgaccatcag gcacctgagt cgctgtcttt ttcgtgacat tcagttcgct 4020

gcgctcacgg ctctggcagt gaatgggggt aaatggcact acaggcgcct tttatggatt 4080

catgcaagga aactacccat aatacaagaa aagcccgtca cgggcttctc agggcgtttt 4140

atggcgggtc tgctatgtgg tgctatctga ctttttgctg ttcagcagtt cctgccctct 4200

gattttccag tctgaccact tcggattatc ccgtgacagg tcattcagac tggctaatgc 4260

acccagtaag gcagcggtat catcaacagg cttacccgtc ttactgtcgg gaattcattt 4320

aaatagtcaa aagcctccga ccggaggctt ttgactgcta ggcgatctgt gctgtttgcc 4380

acggtatgca gcaccagcgc gagattatgg gctcgcacgc tcgactgtcg gacgggggca 4440

ctggaacgag aagtcaggcg agccgtcacg cccttgacaa tgccacatcc tgagcaaata 4500

attcaaccac taaacaaatc aaccgcgttt cccggaggta accaagcttg cgggagagaa 4560

tgatgaacaa gagccaacaa gttcagacaa tcaccctggc cgccgcccag caaatggcgg 4620

cggcggtgga aaaaaaagcc actgagatca acgtggcggt ggtgttttcc gtagttgacc 4680

gcggaggcaa cacgctgctt atccagcgga tggacgaggc cttcgtctcc agctgcgata 4740

tttccctgaa taaagcctgg agcgcctgca gcctgaagca aggtacccat gaaattacgt 4800

cagcggtcca gccaggacaa tctctgtacg gtctgcagct aaccaaccaa cagcgaatta 4860

ttatttttgg cggcggcctg ccagttattt ttaatgagca ggtaattggc gccgtcggcg 4920

ttagcggcgg tacggtcgag caggatcaat tattagccca gtgcgccctg gattgttttt 4980

ccgcattata acctgaagcg agaaggtata ttatgagcta tcgtatgttc cgccaggcat 5040

tctgagtgtt aacgagggga ccgtcatgtc gctttcaccg ccaggcgtac gcctgtttta 5100

cgatccgcgc gggcaccatg ccggcgccat caatgagctg tgctgggggc tggaggagca 5160

gggggtcccc tgccagacca taacctatga cggaggcggt gacgccgctg cgctgggcgc 5220

cctggcggcc agaagctcgc ccctgcgggt gggtatcggg ctcagcgcgt ccggcgagat 5280

agccctcact catgcccagc tgccggcgga cgcgccgctg gctaccggac acgtcaccga 5340

tagcgacgat caactgcgta cgctcggcgc caacgccggg cagctggtta aagtcctgcc 5400

gttaagtgag agaaactgaa tgtatcgtat ctatacccgc accggggata aaggcaccac 5460

cgccctgtac ggcggcagcc gcatcgagaa agaccatatt cgcgtcgagg cctacggcac 5520

cgtcgatgaa ctgatatccc agctgggcgt ctgctacgcc acgacccgcg acgccgggct 5580

gcgggaaagc ctgcaccata ttcagcagac gctgttcgtg ctgggggctg aactggccag 5640

cgatgcgcgg ggcctgaccc gcctgagcca gacgatcggc gaagaggaga tcaccgccct 5700

ggagcggctt atcgaccgca atatggccga gagcggcccg ttaaaacagt tcgtgatccc 5760

ggggaggaat ctcgcctctg cccagctgca ccctgatgct tgcgcttgaa ctggcctagc 5820

aaacacagaa aaaagcccgc acctgacagt gcgggctttt tttttcctag gcgatctgtg 5880

ctgtttgcca cggtatgcag caccagcgcg agattatggg ctcgcacgct cgactgtcgg 5940

acgggggcac tggaacgaga agtcaggcga gccgtcacgc ccttgacaat gccacatcct 6000

gagcaaataa ttcaaccact aaacaaatca accgcgtttc ccggaggtaa ccaagcttca 6060

ccttttgagc cgatgaacaa tgaaaagatc aaaacgattt gcagtactgg cccagcgccc 6120

cgtcaatcag gacgggctga ttggcgagtg gcctgaagag gggctgatcg ccatggacag 6180

ccccttttgac ccggtctctt cagtaaaagt ggacaacggt ctgatcgtcg aactggacgg 6240

caaacgccgg gaccagtttg acatgatcga ccgatttatc gccgattacg cgatcaacgt 6300

tgagcgcaca gagcaggcaa tgcgcctgga ggcggtggaa atagcccgta tgctggtgga 6360

tattcacgtc agccgggagg agatcattgc catcactacc gccatcacgc cggccaaagc 6420

ggtcgaggtg atggcgcaga tgaacgtggt ggagatgatg atggcgctgc agaagatgcg 6480

tgcccgccgg acccccctcca accagtgcca cgtcaccaat ctcaaagata atccggtgca 6540

gattgccgct gacgccgccg aggccgggat ccgcggcttc tcagaacagg agaccacggt 6600

cggtatcgcg cgctacgcgc cgtttaacgc cctggcgctg ttggtcggtt cgcagtgcgg 6660

ccgccccggc gtgttgacgc agtgctcggt ggaagaggcc accgagctgg agctgggcat 6720

gcgtggctta accagctacg ccgagacggt gtcggtctac ggcaccgaag cggtatttac 6780

cgacggcgat gatacgccgt ggtcaaaggc gttcctcgcc tcggcctacg cctcccgcgg 6840

gttgaaaatg cgctacacct ccggcaccgg atccgaagcg ctgatgggct attcggagag 6900

caagtcgatg ctctacctcg aatcgcgctg catcttcatt actaaaggcg ccggggttca 6960

gggactgcaa aacggcgcgg tgagctgtat cggcatgacc ggcgctgtgc cgtcgggcat 7020

tcgggcggtg ctggcggaaa acctgatcgc ctctatgctc gacctcgaag tggcgtccgc 7080

caacgaccag actttctccc actcggatat tcgccgcacc gcgcgcaccc tgatgcagat 7140

gctgccgggc accgacttta ttttctccgg ctacagcgcg gtgccgaact acgacaacat 7200

gttcgccggc tcgaacttcg atgcggaaga ttttgatgat tacaacatcc tgcagcgtga 7260

cctgatggtt gacggcggcc tgcgtccggt gaccgaggcg gaaaccattg ccattcgcca 7320

gaaagcggcg cgggcgatcc aggcggtttt ccgcgagctg gggctgccgc caatcgccga 7380

cgaggaggtg gaggccgcca cctacgcgca cggcagcaac gagatgccgc cgcgtaacgt 7440

ggtggaggat ctgagtgcgg tggaagagat gatgaagcgc aacatcaccg gcctcgatat 7500

tgtcggcgcg ctgagccgca gcggctttga ggatatcgcc agcaatattc tcaatatgct 7560

gcgccagcgg gtcaccggcg attacctgca gacctcggcc attctcgatc ggcagttcga 7620

ggtggtgagt gcggtcaacg acatcaatga ctatcagggg ccgggcaccg gctatcgcat 7680

ctctgccgaa cgctgggcgg agatcaaaaa tattccgggc gtggttcagc ccgacaccat 7740

tgaataaggc ggtattcctg tgcaacagac aacccaaatt cagccctctt ttaccctgaa 7800

aacccgcgag ggcggggtag cttctgccga tgaacgcgcc gatgaagtgg tgatcggcgt 7860

cggccctgcc ttcgataaac accagcatca cactctgatc gatatgcccc atggcgcgat 7920

cctcaaagag ctgattgccg gggtggaaga agaggggctt cacgcccggg tggtgcgcat 7980

tctgcgcacg tccgacgtct cctttatggc ctgggatgcg gccaacctga gcggctcggg 8040

gatcggcatc ggtatccagt cgaaggggac cacggtcatc catcagcgcg atctgctgcc 8100

gctcagcaac ctggagctgt tctcccaggc gccgctgctg acgctggaga cctaccggca 8160

gattggcaaa aacgctgcgc gctatgcgcg caaagagtca ccttcgccgg tgccggtggt 8220

gaacgatcag atggtgcggc cgaaatttat ggccaaagcc gcgctatttc atatcaaaga 8280

gaccaaacat gtggtgcagg acgccgagcc cgtcaccctg cacatcgact tagtaaggga 8340

gtgaccatga gcgagaaaac catgcgcgtg caggattatc cgttagccac ccgctgcccg 8400

gagcatatcc tgacgcctac cggcaaacca ttgaccgata ttaccctcga gaaggtgctc 8460

tctggcgagg tgggcccgca ggatgtgcgg atctcccgcc agacccttga gtaccaggcg 8520

cagattgccg agcagatgca gcgccatgcg gtggcgcgca atttccgccg cgcggcggag 8580

cttatcgcca ttcctgacga gcgcattctg gctatctata acgcgctgcg cccgttccgc 8640

tcctcgcagg cggagctgct ggcgatcgcc gacgagctgg agcacacctg gcatgcgaca 8700

gtgaatgccg cctttgtccg ggagtcggcg gaagtgtatc agcagcggca taagctgcgt 8760

aaaggaagct aagcggaggt cagcatgccg ttaatagccg ggattgatat cggcaacgcc 8820

accaccgagg tggcgctggc gtccgactac ccgcaggcga gggcgtttgt tgccagcggg 8880

atcgtcgcga cgacgggcat gaaagggacg cgggacaata tcgccgggac cctcgccgcg 8940

ctggagcagg ccctggcgaa aacaccgtgg tcgatgagcg atgtctctcg catctatctt 9000

aacgaagccg cgccggtgat tggcgatgtg gcgatggaga ccatcaccga gaccattatc 9060

accgaatcga ccatgatcgg tcataacccg cagacgccgg gcggggtggg cgttggcgtg 9120

gggacgacta tcgccctcgg gcggctggcg acgctgccgg cggcgcagta tgccgagggg 9180

tggatcgtac tgattgacga cgccgtcgat ttccttgacg ccgtgtggtg gctcaatgag 9240

gcgctcgacc gggggatcaa cgtggtggcg gcgatcctca aaaaggacga cggcgtgctg 9300

gtgaacaacc gcctgcgtaa aaccctgccg gtggtggatg aagtgacgct gctggagcag 9360

gtccccgagg gggtaatggc ggcggtggaa gtggccgcgc cgggccaggt ggtgcggatc 9420

ctgtcgaatc cctacgggat cgccaccttc ttcgggctaa gcccggaaga gacccaggcc 9480

atcgtcccca tcgcccgcgc cctgattggc aaccgttccg cggtggtgct caagaccccg 9540

caggggggatg tgcagtcgcg ggtgatcccg gcgggcaacc tctacattag cggcgaaaag 9600

cgccgcggag aggccgatgt cgccgagggc gcggaagcca tcatgcaggc gatgagcgcc 9660

tgcgctccgg tacgcgacat ccgcggcgaa ccgggcaccc acgccggcgg catgcttgag 9720

cgggtgcgca aggtaatggc gtccctgacc ggccatgaga tgagcgcgat atacatccag 9780

gatctgctgg cggtggatac gtttattccg cgcaaggtgc agggcgggat ggccggcgag 9840

tgcgccatgg agaatgccgt cgggatggcg gcgatggtga aagcggatcg tctgcaaatg 9900

caggttatcg cccgcgaact gagcgcccga ctgcagaccg aggtggtggt gggcggcgtg 9960

gaggccaaca tggccatcgc cggggcgtta accactcccg gctgtgcggc gccgctggcg 10020

atcctcgacc tcggcgccgg ctcgacggat gcggcgatcg tcaacgcgga ggggcagata 10080

acggcggtcc atctcgccgg ggcggggaat atggtcagcc tgttgattaa aaccgagctg 10140

ggcctcgagg atctttcgct ggcggaagcg ataaaaaaaat acccgctggc caaagtggaa 10200

agcctgttca gtattcgtca cgagaatggc gcggtggagt tctttcggga agccctcagc 10260

ccggcggtgt tcgccaaagt ggtgtacatc aaggagggcg aactggtgcc gatcgataac 10320

gccagcccgc tggaaaaaat tcgtctcgtg cgccggcagg cgaaagagaa agtgtttgtc 10380

accaactgcc tgcgcgcgct gcgccaggtc tcacccggcg gttccattcg cgatatcgcc 10440

tttgtggtgc tggtgggcgg ctcatcgctg gactttgaga tcccgcagct tatcacggaa 10500

gccttgtcgc actatggcgt ggtcgccggg cagggcaata ttcggggaac agaagggccg 10560

cgcaatgcgg tcgccaccgg gctgctactg gccggtcagg cgaattaaac gggcgctcgc 10620

gccagcctct aggtacaaat aaaaaaggca cgtcagatga cgtgcctttt ttcttgtcta 10680

gcgtgcacca atgcttctgg cgtcaggcag ccatcggaag ctgtggtatg gctgtgcagg 10740

tcgtaaatca ctgcataatt cgtgtcgctc aaggcgcact cccgttctgg ataatgtttt 10800

ttgcgccgac atcataacgg ttctggcaaa tattctgaaa tgagctgttg acaattaatc 10860

atccggctcg tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaaacagac 10920

catgactagt aaggaggaca attccatggc tgctgctgct gatagattaa acttaacttc 10980

cggccacttg aatgctggta gaaagagaag ttcctcttct gtttctttga aggctgccga 11040

aaagcctttc aaggttactg tgattggatc tggtaactgg ggtactacta ttgccaaggt 11100

ggttgccgaa aattgtaagg gatacccaga agttttcgct ccaatagtac aaatgtgggt 11160

gttcgaagaa gagatcaatg gtgaaaaatt gactgaaatc ataaatacta gacatcaaaa 11220

cgtgaaatac ttgcctggca tcactctacc cgacaatttg gttgctaatc cagacttgat 11280

tgattcagtc aaggatgtcg acatcatcgt tttcaacatt ccacatcaat ttttgccccg 11340

tatctgtagc caattgaaag gtcatgttga ttcacacgtc agagctatct cctgtctaaa 11400

gggttttgaa gttggtgcta aaggtgtcca attgctatcc tcttacatca ctgaggaact 11460

aggtattcaa tgtggtgctc tatctggtgc taacattgcc accgaagtcg ctcaagaaca 11520

ctggtctgaa acaacagttg cttaccacat tccaaaggat ttcagaggcg agggcaagga 11580

cgtcgaccat aaggttctaa aggccttgtt ccacagacct tacttccacg ttagtgtcat 11640

cgaagatgtt gctggtatct ccatctgtgg tgctttgaag aacgttgttg ccttaggttg 11700

tggtttcgtc gaaggtctag gctggggtaa caacgcttct gctgccatcc aaagagtcgg 11760

tttgggtgag atcatcagat tcggtcaaat gtttttccca gaatctagag aagaaacata 11820

ctaccaagag tctgctggtg ttgctgattt gatcaccacc tgcgctggtg gtagaaacgt 11880

caaggttgct aggctaatgg ctacttctgg taaggacgcc tgggaatgtg aaaaggagtt 11940

gttgaatggc caatccgctc aaggtttaat tacctgcaaa gaagttcacg aatggttgga 12000

aacatgtggc tctgtcgaag acttcccatt atttgaagcc gtataccaaa tcgtttacaa 12060

caactaccca atgaagaacc tgccggacat gattgaagaa ttagatctac atgaagatta 12120

gatttattgg atccaggaaa cagactagaa ttatgggatt gactactaaa cctctatctt 12180

tgaaagttaa cgccgctttg ttcgacgtcg acggtaccat tatcatctct caaccagcca 12240

ttgctgcatt ctggagggat ttcggtaagg acaaaacctta tttcgatgct gaacacgtta 12300

tccaagtctc gcatggttgg agaacgtttg atgccattgc taagttcgct ccagactttg 12360

ccaatgaaga gtatgttaac aaattagaag ctgaaattcc ggtcaagtac ggtgaaaaat 12420

ccattgaagt cccaggtgca gttaagctgt gcaacgcttt gaacgctcta ccaaaagaga 12480

aatgggctgt ggcaacttcc ggtacccgtg atatggcaca aaaatggttc gagcatctgg 12540

gaatcaggag accaaagtac ttcattaccg ctaatgatgt caaacagggt aagcctcatc 12600

cagaaccata tctgaagggc aggaatggct taggatatcc gatcaatgag caagaccctt 12660

ccaaatctaa ggtagtagta tttgaagacg ctccagcagg tattgccgcc ggaaaagccg 12720

ccggttgtaa gatcattggt attgccacta ctttcgactt ggacttccta aaggaaaaag 12780

gctgtgacat cattgtcaaa aaccacgaat ccatcagagt tggcggctac aatgccgaaa 12840

cagacgaagt tgaattcatt tttgacgact acttatatgc taaggacgat ctgttgaaat 12900

ggtaacccgg gctgcaggca tgcaagcttg gctgttttgg cggatgagag aagattttca 12960

gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg 13020

gcagtagcgc ggtggtccca cctgacccca tgccgaactc agaagtgaaa cgccgtagcg 13080

ccgatggtag tgtggggtct ccccatgcga gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa 13140

cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct 13200

ctcctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca acggcccgga 13260

gggtggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc 13320

ctgacggatg gccttttttgc gtttctacaa actccagctg gatcgggcgc tagagtatac 13380

atttaaatgg taccggcgcg ccgctagctt aattaacgga ccgatgcatg agctcacgcg 13440

taccggtgct cttcgatcta cgtaagaagg 13470

<210> 31

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 31
gcccttgact atgccacatc ctgagcaaat aattcaacca ct 42

<210> 32

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 32
gcccttgacg atgccacatc ctgagcaaat aattcaacca ct 42

<210> 33

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 33

gcccttgaca atgccacatc ctgagcaaat aattcaacca ct 42

<210> 34

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 34
cattcggacc ggcccttgac tatgccacat cctgagcaaa taattcaacc actacagcaa 60

agggagcaag taatgaacaa c 81

<210> 35

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 35
cattcggacc ggcccttgac gatgccacat cctgagcaaa taattcaacc actacagcaa 60

agggagcaag taatgaacaa c 81

<210> 36

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 36
cattcggacc ggcccttgac aatgccacat cctgagcaaa taattcaacc actacagcaa 60

agggagcaag taatgaacaa c 81

<210> 37

<211> 82

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 37
cattgagctc aaaaaaaaag cccgcactgt caggtgcggg ctttttttctg tgtttaagct 60

tagcgggcgg cttcgtatat ac 82

<210> 38

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 38
atgtgcgcgc caacgtcatg tgggcggcga ctcaggcgct gagtgtaggc tggagctgct 60

tc 62

<210> 39

<211> 67

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 39
cagacgcgtt cagcatattg cagcagctta gcgcgcttgg tatcgcgatt ccggggatcc 60

gtcgacc 67

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 40
gccagcaagc ggcaaatctc ttcac 25

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 41
gaggcgtaaa aagcttagcg ggcgg 25

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 42
gcttcctcgt gctttacggt atcg 24

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 43

cctgcgtgca atccatcttg ttc 23

<210> 44

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 44
cgatttttta acatttccat aagttacgct tatttaaagc gtcgtgaatt taatgacgta 60

aattcctgct atttattcgt gtgtaggctg gagctgcttc 100

<210> 45

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 45
tcgcattggc gcgaatatgc tcgggctttg cttttcgtca gtggttgaat tatttgctca 60

ggatgtggca ttgtcaaggg catatgaata tcctccttag 100

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 46
gcggaatatt gttcgttcat attaccccag 30

<210> 47

<211> 94

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 终止子

<400> 47
agcttaggag tctagaatat tgagctcgaa ttcccgggca tgcggtaccg gatccagaaa 60

aaagcccgca cctgacagtg cgggcttttt tttt 94

<210> 48

<211> 12145

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 48

gtcgaccacc acggtggtga ctttaatgcc gctctcatgc agcagctcgg tggcggtctc 60

aaaattcagg atgtcgccgg tatagttttt gataatcagc aagacgcctt cgccgccgtc 120

aatttgcatc gcgcattcaa acattttgtc cggcgtcggc gaggtgaata tttccccgg 180

acaggcgccg gagagcatgc cctggccgat atagccgcag tgcatcggtt catgtccgct 240

gccgccgccg gagagcaggg ccaccttgcc agccaccggc gcgtcggtgc gggtcacata 300

cagcgggtcc tgatgcaggg tcagctgcgg atgggcttta gccagcccct gtaattgttc 360

attcagtaca tcttcaacac ggttaatcag ctttttcatt attcagtgct ccgttggaga 420

aggttcgatg ccgcctctct gctggcggag gcggtcatcg cgtaggggta tcgtctgacg 480

gtggagcgtg cctggcgata tgatgattct ggctgagcgg acgaaaaaaa gaatgccccg 540

acgatcgggt ttcattacga aacattgctt cctgattttg tttctttatg gaacgttttt 600

gctgaggata tggtgaaaat gcgagctggc gcgctttttt tcttctgcca taagcggcgg 660

tcaggatagc cggcgaagcg ggtgggaaaa aatttttttgc tgattttctg ccgactgcgg 720

gagaaaaggc ggtcaaacac ggaggattgt aagggcatta tgcggcaaag gagcggatcg 780

ggatcgcaat cctgacagag actagggttt tttgttccaa tatggaacgt aaaaaattaa 840

cctgtgtttc atatcagaac aaaaaggcga aagatttttt tgttccctgc cggccctaca 900

gtgatcgcac tgctccggta cgctccgttc aggccgcgct tcactggccg gcgcggataa 960

cgccagggct catcatgtct acatgcgcac ttatttgagg gtgaaaggaa tgctaaaagt 1020

tattcaatct ccagccaaat atcttcaggg tcctgatgct gctgttctgt tcggtcaata 1080

tgccaaaaac ctggcggaga gcttcttcgt catcgctgac gatttcgtaa tgaagctggc 1140

gggagagaaa gtggtgaatg gcctgcagag ccacgatatt cgctgccatg cggaacggtt 1200

taacggcgaa tgcagccatg cggaaatcaa ccgtctgatg gcgattttgc aaaaacaggg 1260

ctgccgcggc gtggtcggga tcggcggtgg taaaaccctc gataccgcga aggcgatcgg 1320

ttactaccag aagctgccgg tggtggtgat cccgaccatc gcctcgaccg atgcgccaac 1380

cagcgcgctg tcggtgatct acaccgaagc gggcgagttt gaagagtatc tgatctatcc 1440

gaaaaacccg gatatggtgg tgatggacac ggcgattatc gccaaagcgc cggtacgcct 1500

gctggtctcc ggcatgggcg atgcgctctc cacctggttc gaggccaaag cttgctacga 1560

tgcgcgcgcc accagcatgg ccggaggaca gtccaccgag gcggcgctga gcctcgcccg 1620

cctgtgctat gatacgctgc tggcggaggg cgaaaaggcc cgtctggcgg cgcaggccgg 1680

ggtagtgacc gaagcgctgg agcgcatcat cgaggcgaac acttacctca gcggcattgg 1740

ctttgaaagc agtggcctgg ccgctgccca tgcaatccac aacggtttca ccattcttga 1800

agagtgccat cacctgtatc acggtgagaa agtggccttc ggtaccctgg cgcagctggt 1860

gctgcagaac agcccgatgg acgagattga aacggtgcag ggcttctgcc agcgcgtcgg 1920

cctgccggtg acgctcgcgc agatgggcgt caaagagggg atcgacgaga aaatcgccgc 1980

ggtggcgaaa gctacctgcg cggaagggga aaccatccat aatatgccgt ttgcggtgac 2040

cccggagagc gtccatgccg ctatcctcac cgccgatctg ttaggccagc agtggctggc 2100

gcgttaattc gcggtggcta aaccgctggc ccaggtcagc ggtttttctt tctcccctcc 2160

ggcagtcgct gccggagggg ttctctatgg tacaacgcgg aaaaggatat gactgttcag 2220

actcaggata ccgggaaggc ggtctcttcc gtcattgccc agtcatggca ccgctgcagc 2280

aagtttatgc agcgcgaaac ctggcaaacg ccgcaccagg cccagggcct gaccttcgac 2340

tccatctgtc ggcgtaaaac cgcgctgctc accatcggcc aggcggcgct ggaagacgcc 2400

tgggagttta tggacggccg cccctgcgcg ctgtttattc ttgatgagtc cgcctgcatc 2460

ctgagccgtt gcggcgagcc gcaaaccctg gcccagctgg ctgccctggg atttcgcgac 2520

ggcagctatt gtgcggagag cattatcggc acctgcgcgc tgtcgctggc cgcgatgcag 2580

ggccagccga tcaacaccgc cggcgatcgg cattttaagc aggcgctaca gccatggagt 2640

ttttgctcga cgccggtgtt tgataaccac gggcggctgt tcggctctat ctcgctttgc 2700

tgtctggtcg agcaccagtc cagcgccgac ctctccctga cgctggccat cgcccgcgag 2760

gtgggtaact ccctgcttac cgacagcctg ctggcggaat ccaaccgtca cctcaatcag 2820

atgtacggcc tgctggagag catggacgat ggggtgatgg cgtggaacga acagggcgtg 2880

ctgcagtttc tcaatgttca ggcggcgaga ctgctgcatc ttgatgctca ggccagccag 2940

gggaaaaata tcgccgatct ggtgaccctc ccggcgctgc tgcgccgcgc catcaaacac 3000

gcccgcggcc tgaatcacgt cgaagtcacc tttgaaagtc agcatcagtt tgtcgatgcg 3060

gtgatcacct taaaaccgat tgtcgaggcg caaggcaaca gttttattct gctgctgcat 3120

ccggtggagc agatgcggca gctgatgacc agccagctcg gtaaagtcag ccacaccttt 3180

gagcagatgt ctgccgacga tccggaaacc cgacgcctga tccactttgg ccgccaggcg 3240

gcgcgcggcg gcttcccggt gctactgtgc ggcgaagagg gggtcgggaa agagctgctg 3300

agccaggcta ttcacaatga aagcgaacgg gcgggcggcc cctacatctc cgtcaactgc 3360

cagctatatg ccgacagcgt gctgggccag gactttatgg gcagcgcccc taccgacgat 3420

gaaaatggtc gcctgagccg ccttgagctg gccaacggcg gcaccctgtt tctggaaaag 3480

atcgagtatc tggcgccgga gctgcagtcg gctctgctgc aggtgattaa gcagggcgtg 3540

ctcacccgcc tcgacgcccg gcgcctgatc ccggtggatg tgaaggtgat tgccaccacc 3600

accgtcgatc tggccaatct ggtggaacag aaccgcttta gccgccagct gtactatgcg 3660

ctgcactcct ttgagatcgt catcccgccg ctgcgcgccc gacgcaacag tattccgtcg 3720

ctggtgcata accggttgaa gagcctggag aagcgtttct cttcgcgact gaaagtggac 3780

gatgacgcgc tggcacagct ggtggcctac tcgtggccgg ggaatgattt tgagctcaac 3840

agcgtcattg agaatatcgc catcagcagc gacaacggcc acattcgcct gagtaatctg 3900

ccggaatatc tcttttccga gcggccgggc ggggatagcg cgtcatcgct gctgccggcc 3960

agcctgactt ttagcgccat cgaaaaggaa gctattattc acgccgcccg ggtgaccagc 4020

gggcgggtgc aggagatgtc gcagctgctc aatatcggcc gcaccaccct gtggcgcaaa 4080

atgaagcagt acgatattga cgccagccag ttcaagcgca agcatcaggc ctagtctctt 4140

cgattcgcgc catggagaac agggcatccg acaggcgatt gctgtagcgt ttgagcgcgt 4200

cgcgcagcgg atgcgcgcgg tccatggccg tcagcaggcg ttcgagccga cgggactggg 4260

tgcgcgccac gtgcagctgg gcagaggcga gattcctccc cgggatcacg aactgtttta 4320

acgggccgct ctcggccata ttgcggtcga taagccgctc cagggcggtg atctcctctt 4380

cgccgatcgt ctggctcagg cgggtcaggc cccgcgcatc gctggccagt tcagccccca 4440

gcacgaacag cgtctgctga atatggtgca ggctttcccg cagcccggcg tcgcgggtcg 4500

tggcgtagca gacgcccagc tgggatatca gttcatcgac ggtgccgtag gcctcgacgc 4560

gaatatggtc tttctcgatg cggctgccgc cgtacagggc ggtggtgcct ttatccccgg 4620

tgcgggtata gatacgatac attcagtttc tctcacttaa cggcaggact ttaaccagct 4680

gcccggcgtt ggcgccgagc gtacgcagtt gatcgtcgct atcggtgacg tgtccggtag 4740

ccagcggcgc gtccgccggc agctgggcat gagtgagggc tatctcgccg gacgcgctga 4800

gcccgatacc cacccgcagg ggcgagcttc tggccgccag ggcgcccagc gcagcggcgt 4860

caccgcctcc gtcataggtt atggtctggc aggggacccc ctgctcctcc agccccccagc 4920

acagctcatt gatggcgccg gcatggtgcc cgcgcggatc gtaaaacagg cgtacgcctg 4980

gcggtgaaag cgacatgacg gtcccctcgt taacactcag aatgcctggc ggaaaatcgc 5040

ggcaatctcc tgctcgttgc ctttacgcgg gttcgagaac gcattgccgt cttttagagc 5100

catctccgcc atgtagggga agtcggcctc ttttaccccc agatcgcgca gatgctgcgg 5160

aataccgata tccatcgaca gacgcgtgat agcggcgatg gctttttccg ccgcgtcgag 5220

agtggacagt ccggtgatat tttcgcccat cagttcagcg atatcggcga atttctccgg 5280

gttggcgatc aggttgtagc gcgccacatg cggcagcagg acagcgttgg ccacgccgtg 5340

cggcatgtcg tacaggccgc ccagctggtg cgccatggcg tgcacgtagc cgaggttggc 5400

gttattgaaa gccatcccgg ccagcagaga agcataggcc atgttttccc gcgcctgcag 5460

attgctgccg agggccacgg cctggcgcag gttgcgggcg atgaggcgga tcgcctgcat 5520

ggcggcggcg tccgtcaccg ggttagcgtc tttggagata taggcctcta cggcgtgggt 5580

cagggcatcc atcccggtcg ccgcggtcag ggcggccggt ttaccgatca tcagcagtgg 5640

atcgttgata gagaccgacg gcagtttgcg ccagctgacg atcacaaact tcactttggt 5700

ttcggtgttg gtcaggacgc agtggcgggt gacctcgctg gcggtgccgg cggtggtatt 5760

gaccgcgacg ataggcggca gcgggttggt cagggtctcg attccggcat actggtacag 5820

atcgccctca tgggtggcgg cgatgccgat gcctttgccg caatcgtgcg ggctgccgcc 5880

gcccacggtg acgatgatgt cgcactgttc gcggcgaaac acggcgaggc cgtcgcgcac 5940

gttggtgtct ttcgggttcg gctcgacgcc gtcaaagatc gccacctcga tcccggcctc 6000

ccgcagataa tgcagggttt tgtccaccgc gccatcttta attgcccgca ggcctttgtc 6060

ggtgaccagc agggcttttt tccccccccag cagctggcag cgttcgccga ctacggaaat 6120

ggcgttgggg ccaaaaaagt taacgtttgg caccagataa tcaaacatac gatagctcat 6180

aatatacctt ctcgcttcag gttataatgc ggaaaaacaa tccagggcgc actgggctaa 6240

taattgatcc tgctcgaccg taccgccgct aacgccgacg gcgccaatta cctgctcatt 6300

aaaaataact ggcaggccgc cgccaaaaat aataattcgc tgttggttgg ttagctgcag 6360

accgtacaga gattgtcctg gctggaccgc tgacgtaatt tcatgggtac cttgcttcag 6420

gctgcaggcg ctccaggctt tattcaggga aatatcgcag ctggagacga aggcctcgtc 6480

catccgctgg ataagcagcg tgttgcctcc gcggtcaact acggaaaaca ccaccgccac 6540

gttgatctca gtggcttttt tttccaccgc cgccgccatt tgctgggcgg cggccagggt 6600

gattgtctga acttgttggc tcttgttcat cattctctcc cgcaccagga taacgctggc 6660

gcgaatagtc agtaggggggc gatagtaaaa aactattacc attcggttgg cttgctttat 6720

ttttgtcagc gttattttgt cgcccgccat gatttagtca atagggttaa aatagcgtcg 6780

gaaaaacgta attaagggcg ttttttatta attgatttat atcattgcgg gcgatcacat 6840

tttttatttt tgccgccgga gtaaagtttc atagtgaaac tgtcggtaga tttcgtgtgc 6900

caaattgaaa cgaaattaaa tttatttttt tcaccactgg ctcatttaaa gttccgctat 6960

tgccggtaat ggccgggcgg caacgacgct ggcccggcgt attcgctacc gtctgcggat 7020

ttcacctttt gagccgatga acaatgaaaa gatcaaaacg atttgcagta ctggcccagc 7080

gccccgtcaa tcaggacggg ctgattggcg agtggcctga agaggggctg atcgccatgg 7140

acagcccctt tgacccggtc tcttcagtaa aagtggacaa cggtctgatc gtcgaactgg 7200

acggcaaacg ccgggaccag tttgacatga tcgaccgatt tatcgccgat tacgcgatca 7260

acgttgagcg cacagagcag gcaatgcgcc tggaggcggt ggaaatagcc cgtatgctgg 7320

tggatattca cgtcagccgg gaggagatca ttgccatcac taccgccatc acgccggcca 7380

aagcggtcga ggtgatggcg cagatgaacg tggtggagat gatgatggcg ctgcagaaga 7440

tgcgtgcccg ccggaccccc tccaaccagt gccacgtcac caatctcaaa gataatccgg 7500

tgcagattgc cgctgacgcc gccgaggccg ggatccgcgg cttctcagaa caggagacca 7560

cggtcggtat cgcgcgctac gcgccgttta acgccctggc gctgttggtc ggttcgcagt 7620

gcggccgccc cggcgtgttg acgcagtgct cggtggaaga ggccaccgag ctggagctgg 7680

gcatgcgtgg cttaaccagc tacgccgaga cggtgtcggt ctacggcacc gaagcggtat 7740

ttaccgacgg cgatgatacg ccgtggtcaa aggcgttcct cgcctcggcc tacgcctccc 7800

gcgggttgaa aatgcgctac acctccggca ccggatccga agcgctgatg ggctattcgg 7860

agagcaagtc gatgctctac ctcgaatcgc gctgcatctt cattactaaa ggcgccgggg 7920

ttcagggact gcaaaacggc gcggtgagct gtatcggcat gaccggcgct gtgccgtcgg 7980

gcattcgggc ggtgctggcg gaaaacctga tcgcctctat gctcgacctc gaagtggcgt 8040

ccgccaacga ccagactttc tcccactcgg atattcgccg caccgcgcgc accctgatgc 8100

agatgctgcc gggcaccgac tttatttttct ccggctacag cgcggtgccg aactacgaca 8160

acatgttcgc cggctcgaac ttcgatgcgg aagattttga tgattacaac atcctgcagc 8220

gtgacctgat ggttgacggc ggcctgcgtc cggtgaccga ggcggaaacc attgccattc 8280

gccagaaagc ggcgcgggcg atccaggcgg ttttccgcga gctggggctg ccgccaatcg 8340

ccgacgagga ggtggaggcc gccacctacg cgcacggcag caacgagatg ccgccgcgta 8400

acgtggtgga ggatctgagt gcggtggaag agatgatgaa gcgcaacatc accggcctcg 8460

atattgtcgg cgcgctgagc cgcagcggct ttgaggatat cgccagcaat attctcaata 8520

tgctgcgcca gcgggtcacc ggcgattacc tgcagacctc ggccattctc gatcggcagt 8580

tcgaggtggt gagtgcggtc aacgacatca atgactatca ggggccgggc accggctatc 8640

gcatctctgc cgaacgctgg gcggagatca aaaatattcc gggcgtggtt cagcccgaca 8700

ccattgaata aggcggtatt cctgtgcaac agacaaccca aattcagccc tcttttaccc 8760

tgaaaacccg cgagggcggg gtagcttctg ccgatgaacg cgccgatgaa gtggtgatcg 8820

gcgtcggccc tgccttcgat aaacaccagc atcacactct gatcgatatg ccccatggcg 8880

cgatcctcaa agagctgatt gccggggtgg aagaagaggg gcttcacgcc cgggtggtgc 8940

gcattctgcg cacgtccgac gtctccttta tggcctggga tgcggccaac ctgagcggct 9000

cggggatcgg catcggtatc cagtcgaagg ggaccacggt catccatcag cgcgatctgc 9060

tgccgctcag caacctggag ctgttctccc aggcgccgct gctgacgctg gagacctacc 9120

ggcagattgg caaaaacgct gcgcgctatg cgcgcaaaga gtcaccttcg ccggtgccgg 9180

tggtgaacga tcagatggtg cggccgaaat ttatggccaa agccgcgcta tttcatatca 9240

aagagaccaa acatgtggtg caggacgccg agcccgtcac cctgcacatc gacttagtaa 9300

gggagtgacc atgagcgaga aaaccatgcg cgtgcaggat tatccgttag ccacccgctg 9360

cccggagcat atcctgacgc ctaccggcaa accattgacc gatattaccc tcgagaaggt 9420

gctctctggc gaggtgggcc cgcaggatgt gcggatctcc cgccagaccc ttgagtacca 9480

ggcgcagatt gccgagcaga tgcagcgcca tgcggtggcg cgcaatttcc gccgcgcggc 9540

ggagcttatc gccattcctg acgagcgcat tctggctatc tataacgcgc tgcgcccgtt 9600

ccgctcctcg caggcggagc tgctggcgat cgccgacgag ctggagcaca cctggcatgc 9660

gacagtgaat gccgcctttg tccgggagtc ggcggaagtg tatcagcagc ggcataagct 9720

gcgtaaagga agctaagcgg aggtcagcat gccgttaata gccgggattg atatcggcaa 9780

cgccaccacc gaggtggcgc tggcgtccga ctacccgcag gcgagggcgt ttgttgccag 9840

cgggatcgtc gcgacgacgg gcatgaaagg gacgcgggac aatatcgccg ggaccctcgc 9900

cgcgctggag caggccctgg cgaaaacacc gtggtcgatg agcgatgtct ctcgcatcta 9960

tcttaacgaa gccgcgccgg tgattggcga tgtggcgatg gagaccatca ccgagaccat 10020

tatcaccgaa tcgaccatga tcggtcataa cccgcagacg ccgggcgggg tgggcgtigg 10080

cgtggggacg actatcgccc tcgggcggct ggcgacgctg ccggcggcgc agtatgccga 10140

ggggtggatc gtactgattg acgacgccgt cgatttcctt gacgccgtgt ggtggctcaa 10200

tgaggcgctc gaccggggga tcaacgtggt ggcggcgatc ctcaaaaagg acgacggcgt 10260

gctggtgaac aaccgcctgc gtaaaaccct gccggtggtg gatgaagtga cgctgctgga 10320

gcaggtcccc gagggggtaa tggcggcggt ggaagtggcc gcgccgggcc aggtggtgcg 10380

gatcctgtcg aatccctacg ggatcgccac cttcttcggg ctaagcccgg aagagaccca 10440

ggccatcgtc cccatcgccc gcgccctgat tggcaaccgt tccgcggtgg tgctcaagac 10500

cccgcagggg gatgtgcagt cgcgggtgat cccggcgggc aacctctaca ttagcggcga 10560

aaagcgccgc ggagaggccg atgtcgccga gggcgcggaa gccatcatgc aggcgatgag 10620

cgcctgcgct ccggtacgcg acatccgcgg cgaaccgggc acccacgccg gcggcatgct 10680

tgagcgggtg cgcaaggtaa tggcgtccct gaccggccat gagatgagcg cgatatacat 10740

ccaggatctg ctggcggtgg atacgtttat tccgcgcaag gtgcagggcg ggatggccgg 10800

cgagtgcgcc atggagaatg ccgtcgggat ggcggcgatg gtgaaagcgg atcgtctgca 10860

aatgcaggtt atcgcccgcg aactgagcgc ccgactgcag accgaggtgg tggtgggcgg 10920

cgtggaggcc aacatggcca tcgccggggc gttaaccact cccggctgtg cggcgccgct 10980

ggcgatcctc gacctcggcg ccggctcgac ggatgcggcg atcgtcaacg cggaggggca 11040

gataacggcg gtccatctcg ccggggcggg gaatatggtc agcctgttga ttaaaaccga 11100

gctgggcctc gaggatcttt cgctggcgga agcgataaaa aaatacccgc tggccaaagt 11160

ggaaagcctg ttcagtattc gtcacgagaa tggcgcggtg gagttctttc gggaagccct 11220

cagcccggcg gtgttcgcca aagtggtgta catcaaggag ggcgaactgg tgccgatcga 11280

taacgccagc ccgctggaaa aaattcgtct cgtgcgccgg caggcgaaag agaaagtgtt 11340

tgtcaccaac tgcctgcgcg cgctgcgcca ggtctcaccc ggcggttcca ttcgcgatat 11400

cgcctttgtg gtgctggtgg gcggctcatc gctggacttt gagatcccgc agcttatcac 11460

ggaagccttg tcgcactatg gcgtggtcgc cgggcagggc aatattcggg gaacagaagg 11520

gccgcgcaat gcggtcgcca ccgggctgct actggccggt caggcgaatt aaacgggcgc 11580

tcgcgccagc ctctctcttt aacgtgctat ttcaggatgc cgataatgaa ccagacttct 11640

accttaaccg ggcagtgcgt ggccgagttt cttggcaccg gattgctcat tttcttcggc 11700

gcgggctgcg tcgctgcgct gcgggtcgcc ggggccagct ttggtcagtg ggagatcagt 11760

attatctggg gccttggcgt cgccatggcc atctacctga cggccggtgt ctccggcgcg 11820

cacctaaatc cggcggtgac cattgccctg tggctgttcg cctgttttga acgccgcaag 11880

gtgctgccgt ttattgttgc ccagacggcc ggggccttct gcgccgccgc gctggtgtat 11940

gggctctatc gccagctgtt tctcgatctt gaacagagtc agcatatcgt gcgcggcact 12000

gccgccagtc ttaacctggc cggggtcttt tccacgtacc cgcatccaca tatcactttt 12060

atacaagcgt ttgccgtgga gaccaccatc acggcaatcc tgatggcgat gatcatggcc 12120

ctgaccgacg acggcaacgg aattc 12145

<210> 49

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 49

ggaattcaga tctcagcaat gagcgagaaa accatgc 37

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 50
gctctagatt agcttccttt acgcagc 27

<210> 51

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 51
ggccaagctt aaggaggtta attaaatgaa aag 33

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 52
gctctagatt attcaatggt gtcggg 26

<210> 53

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 53
gctctagatt attcaatggt gtcggg 26

<210> 54

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 54
gcgccgtcta gaattatgag ctatcgtatg tttgattatc tg 42

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 55
tcgacgaatt caggagga 18

<210> 56

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 56
ctagtcctcc tgaattcg 18

<210> 57

<211> 133

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 片段

<400> 57
agtcaaaagc ctccgaccgg aggcttttga ctgctagcaa acacagaaaa aagcccgcac 60

ctgacagtgc gggctttttt tttcctaggt acaaataaaa aaggcacgtc agatgacgtg 120

cctttttttct tgt 133

<210> 58

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 58
ggaattcatt taaatagtca aaagcctccg accggaggct tttgactgct agcaaacaca 60

gaaaaaagcc cgcacctgac agtgcgggct ttttttttcc 100

<210> 59

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 59
ggggtaccat ttaaatgtat actctagaca agaaaaaagg cacgtcatct gacgtgcctt 60

ttttatttgt acctaggaaa aaaaaagccc gcactgtcag 100

<210> 60

<211> 175

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 片段

<400> 60
ggaattcatt taaatagtca aaagcctccg accggaggct tttgactgct agcaaacaca 60

gaaaaaagcc cgcacctgac agtgcgggct ttttttttcc taggtacaaa taaaaaaggc 120

acgtcagatg acgtgccttt tttcttgtct agagtataca tttaaatggt acccc 175

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 61
ggaattcatt taaatagtca 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 62
ggggtaccat ttaaatgtat 20

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 63
gacgcaacag tattccgtcg c 21

<210> 64

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 64
atgagctatc gtatgttccg ccaggcattc tgagtgttaa cg 42

<210> 65

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 65
gcctggcgga acatacgata gctcataata tac 33

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 66
cggggcgctg ggccagtact g 21

<210> 67

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 67
tctagaggat ccgctagcac tagtagcccg ggcgctagcg cggccgcccc ggg 53

<210> 68

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 68
tattcagctg gctagcgtgc accaatgctt ctggcgt 37

<210> 69

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 69
gatccagctg gagtttgtag aaacgcaaaa aggcc 35

<210> 70

<211> 7283

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 70
tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60

taacaagaaa aagccagcct ttcatgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120

acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180

ttagtgcatc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt 240

gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct 300

tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360

gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct ccattgccca gtcggcagcg 420

acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc 480

actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca 540

tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga 600

cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg 660

atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc 720

agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact 780

tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttccaa aaggtcgttg 840

atcaaagctc gccgcgttgt ttcatcaagc cttacggtca ccgtaaccag caaatcaata 900

tcactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac ggccagcaac 960

gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg 1020

gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta 1080

acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgacccacgg cgtaacgcgc ttgctgcttg 1140

gatgcccgag gcatagactg taccccaaaa aaacagtcat aacaagccat gaaaaccgcc 1200

actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcg tgagcgcata 1260

cgctacttgc attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcgtgccttc 1320

atccgtttcc acggtgtgcg tcacccggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt 1380

ctgtcctggc tggcgaacga gcgcaaggtt tcggtctcca cgcatcgtca ggcattggcg 1440

gccttgctgt tcttctacgg caaggtgctg tgcacggatc tgccctggct tcaggagatc 1500

ggaagacctc ggccgtcgcg gcgcttgccg gtggtgctga ccccggatga agtggttcgc 1560

atcctcggtt ttctggaagg cgagcatcgt ttgttcgccc agcttctgta tggaacgggc 1620

atgcggatca gtgagggttt gcaactgcgg gtcaaggatc tggatttcga tcacggcacg 1680

atcatcgtgc gggagggcaa gggctccaag gatcgggcct tgatgttacc cgagagcttg 1740

gcacccagcc tgcgcgagca ggggaattaa ttcccacggg ttttgctgcc cgcaaacggg 1800

ctgttctggt gttgctagtt tgttatcaga atcgcagatc cggcttcagc cggtttgccg 1860

gctgaaagcg ctatttcttc cagaattgcc atgatttttt ccccacggga ggcgtcactg 1920

gctcccgtgt tgtcggcagc tttgattcga taagcagcat cgcctgtttc aggctgtcta 1980

tgtgtgactg ttgagctgta acaagttgtc tcaggtgttc aatttcatgt tctagttgct 2040

ttgttttact ggtttcacct gttctattag gtgttacatg ctgttcatct gttacattgt 2100

cgatctgttc atggtgaaca gctttgaatg caccaaaaac tcgtaaaagc tctgatgtat 2160

ctatcttttt tacaccgttt tcatctgtgc atatggacag ttttcccttt gatatgtaac 2220

ggtgaacagt tgttctactt ttgtttgtta gtcttgatgc ttcactgata gatacaagag 2280

ccataagaac ctcagatcct tccgtattta gccagtatgt tctctagtgt ggttcgttgt 2340

ttttgcgtga gccatgagaa cgaaccattg agatcatact tactttgcat gtcactcaaa 2400

aattttgcct caaaactggt gagctgaatt tttgcagtta aagcatcgtg tagtgttttt 2460

cttagtccgt tatgtaggta ggaatctgat gtaatggttg ttggtatttt gtcaccattc 2520

atttttatct ggttgttctc aagttcggtt acgagatcca tttgtctatc tagttcaact 2580

tggaaaaatca acgtatcagt cgggcggcct cgcttatcaa ccaccaattt catattgctg 2640

taagtgttta aatctttact tattggtttc aaaacccatt ggttaagcct tttaaactca 2700

tggtagttat tttcaagcat taacatgaac ttaaattcat caaggctaat ctctatattt 2760

gccttgtgag ttttcttttg tgttagttct tttaataacc actcataaat cctcatagag 2820

tatttgtttt caaaagactt aacatgttcc agattatatt ttatgaattt ttttaactgg 2880

aaaagataag gcaatatctc ttcactaaaa actaattcta atttttcgct tgagaacttg 2940

gcatagtttg tccactggaa aatctcaaag cctttaacca aaggattcct gatttccaca 3000

gttctcgtca tcagctctct ggttgcttta gctaatacac cataagcatt ttccctactg 3060

atgttcatca tctgagcgta ttggttataa gtgaacgata ccgtccgttc tttccttgta 3120

gggttttcaa tcgtggggtt gagtagtgcc acacagcata aaattagctt ggtttcatgc 3180

tccgttaagt catagcgact aatcgctagt tcatttgctt tgaaaacaac taattcagac 3240

atacatctca attggtctag gtgatttaa tcactatacc aattgagatg ggctagtcaa 3300

tgataattac tagtcctttt cctttgagtt gtgggtatct gtaaattctg ctagaccttt 3360

gctggaaaac ttgtaaattc tgctagaccc tctgtaaatt ccgctagacc tttgtgtgtt 3420

ttttttgttt atattcaagt ggttataatt tatagaataa agaaagaata aaaaaagata 3480

aaaagaatag atcccagccc tgtgtataac tcactacttt agtcagttcc gcagtattac 3540

aaaaggatgt cgcaaacgct gtttgctcct ctacaaaaca gaccttaaaa ccctaaaggc 3600

ttaagtagca ccctcgcaag ctcgggcaaa tcgctgaata ttccttttgt ctccgaccat 3660

caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc gctgcgctca cggctctggc 3720

agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg ccttttatgg attcatgcaa ggaaactacc 3780

cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcagggcgt tttatggcgg gtctgctatg 3840

tggtgctatc tgacttttg ctgttcagca gttcctgccc tctgattttc cagtctgacc 3900

acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa tgcacccagt aaggcagcgg 3960

tatcatcaac aggcttaccc gtcttactgt cgggaattcg cgttggccga ttcattaatg 4020

cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt 4080

gagttagctc actcattagg caccccaggc tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt 4140

gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc 4200

caagcttgca tgcctgcagg tcgactctag aggatccgct agcactagta gccctattca 4260

gctggctagc gtgcaccaat gcttctggcg tcaggcagcc atcggaagct gtggtatggc 4320

tgtgcaggtc gtaaatcact gcataattcg tgtcgctcaa ggcgcactcc cgttctggat 4380

aatgtttttt gcgccgacat cataacggtt ctggcaaata ttctgaaatg agctgttgac 4440

aattaatcat ccggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 4500

aaacagacca tgactagtaa ggaggacaat tccatggctg ctgctgctga tagattaaac 4560

ttaacttccg gccacttgaa tgctggtaga aagagaagtt cctcttctgt ttctttgaag 4620

gctgccgaaa agcctttcaa ggttactgtg attggatctg gtaactgggg tactactatt 4680

gccaaggtgg ttgccgaaaa ttgtaaggga tacccagaag ttttcgctcc aatagtacaa 4740

atgtgggtgt tcgaagaaga gatcaatggt gaaaaattga ctgaaatcat aaatactaga 4800

catcaaaacg tgaaatactt gcctggcatc actctacccg acaatttggt tgctaatcca 4860

gacttgattg attcagtcaa ggatgtcgac atcatcgttt tcaacattcc acatcaattt 4920

ttgccccgta tctgtagcca attgaaaggt catgttgatt cacacgtcag agctatctcc 4980

tgtctaaagg gttttgaagt tggtgctaaa ggtgtccaat tgctatcctc ttacatcact 5040

gaggaactag gtattcaatg tggtgctcta tctggtgcta acattgccac cgaagtcgct 5100

caagaacact ggtctgaaac aacagttgct taccacattc caaaggattt cagaggcgag 5160

ggcaaggacg tcgaccataa ggttctaaag gccttgttcc acagacctta cttccacgtt 5220

agtgtcatcg aagatgttgc tggtatctcc atctgtggtg ctttgaagaa cgttgttgcc 5280

ttaggttgtg gtttcgtcga aggtctaggc tggggtaaca acgcttctgc tgccatccaa 5340

agagtcggtt tgggtgagat catcagattc ggtcaaatgt ttttcccaga atctagagaa 5400

gaaacatact accaagagtc tgctggtgtt gctgatttga tcaccacctg cgctggtggt 5460

agaaacgtca aggttgctag gctaatggct acttctggta aggacgcctg ggaatgtgaa 5520

aaggagttgt tgaatggcca atccgctcaa ggtttaatta cctgcaaaga agttcacgaa 5580

tggttggaaa catgtggctc tgtcgaagac ttcccattat ttgaagccgt ataccaaatc 5640

gtttacaaca actacccaat gaagaacctg ccggacatga ttgaagaatt agatctacat 5700

gaagattaga tttattggat ccaggaaaca gactagaatt atgggattga ctactaaacc 5760

tctatctttg aaagttaacg ccgctttgtt cgacgtcgac ggtaccatta tcatctctca 5820

accagccatt gctgcattct ggagggattt cggtaaggac aaaccttatt tcgatgctga 5880

acacgttatc caagtctcgc atggttggag aacgtttgat gccattgcta agttcgctcc 5940

agactttgcc aatgaagagt atgttaacaa attagaagct gaaattccgg tcaagtacgg 6000

tgaaaaatcc attgaagtcc caggtgcagt taagctgtgc aacgctttga acgctctacc 6060

aaaagagaaa tgggctgtgg caacttccgg tacccgtgat atggcacaaa aatggttcga 6120

gcatctggga atcaggagac caaagtactt cattaccgct aatgatgtca aacagggtaa 6180

gcctcatcca gaaccatatc tgaagggcag gaatggctta ggatatccga tcaatgagca 6240

agacccttcc aaatctaagg tagtagtatt tgaagacgct ccagcaggta ttgccgccgg 6300

aaaagccgcc ggttgtaaga tcattggtat tgccactact ttcgacttgg acttcctaaa 6360

ggaaaaaggc tgtgacatca ttgtcaaaaa ccacgaatcc atcagagttg gcggctacaa 6420

tgccgaaaca gacgaagttg aattcatttt tgacgactac ttatatgcta aggacgatct 6480

gttgaaatgg taacccgggc tgcaggcatg caagcttggc tgttttggcg gatgagagaa 6540

gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa aacagaattt 6600

gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag aagtgaaacg 6660

ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact gccaggcatc 6720

aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcgg 6780

tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt gcgaagcaac 6840

ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa attaagcaga 6900

aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tccagctgga tcgggcgcta 6960

gcgcggccgc cccgggtacc gagctcgaat tcactggccg tcgttttaca acgtcgtgac 7020

tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc tttcgccagc 7080

tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat 7140

ggcgaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc 7200

atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac 7260

ccgccaacac ccgctgacga gct 7283

<210> 71

<211> 13669

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 71

tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60

taacaagaaa aagccagcct ttcatgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120

acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180

ttagtgcatc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt 240

gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct 300

tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360

gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct ccattgccca gtcggcagcg 420

acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc 480

actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca 540

tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga 600

cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg 660

atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc 720

agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact 780

tctacagcgc ggagaatctc gtctctcca ggggaagccg aagtttccaa aaggtcgttg 840

atcaaagctc gccgcgttgt ttcatcaagc cttacggtca ccgtaaccag caaatcaata 900

tcactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac ggccagcaac 960

gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg 1020

gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta 1080

acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgacccacgg cgtaacgcgc ttgctgcttg 1140

gatgcccgag gcatagactg taccccaaaa aaacagtcat aacaagccat gaaaaccgcc 1200

actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcg tgagcgcata 1260

cgctacttgc attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcgtgccttc 1320

atccgtttcc acggtgtgcg tcacccggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt 1380

ctgtcctggc tggcgaacga gcgcaaggtt tcggtctcca cgcatcgtca ggcattggcg 1440

gccttgctgt tcttctacgg caaggtgctg tgcacggatc tgccctggct tcaggagatc 1500

ggaagacctc ggccgtcgcg gcgcttgccg gtggtgctga ccccggatga agtggttcgc 1560

atcctcggtt ttctggaagg cgagcatcgt ttgttcgccc agcttctgta tggaacgggc 1620

atgcggatca gtgagggttt gcaactgcgg gtcaaggatc tggatttcga tcacggcacg 1680

atcatcgtgc gggagggcaa gggctccaag gatcgggcct tgatgttacc cgagagcttg 1740

gcacccagcc tgcgcgagca ggggaattaa ttcccacggg ttttgctgcc cgcaaacggg 1800

ctgttctggt gttgctagtt tgttatcaga atcgcagatc cggcttcagc cggtttgccg 1860

gctgaaagcg ctatttcttc cagaattgcc atgatttttt ccccacggga ggcgtcactg 1920

gctcccgtgt tgtcggcagc tttgattcga taagcagcat cgcctgtttc aggctgtcta 1980

tgtgtgactg ttgagctgta acaagttgtc tcaggtgttc aatttcatgt tctagttgct 2040

ttgttttact ggtttcacct gttctattag gtgttacatg ctgttcatct gttacattgt 2100

cgatctgttc atggtgaaca gctttgaatg caccaaaaac tcgtaaaagc tctgatgtat 2160

ctatcttttt tacaccgttt tcatctgtgc atatggacag ttttcccttt gatatgtaac 2220

ggtgaacagt tgttctactt ttgtttgtta gtcttgatgc ttcactgata gatacaagag 2280

ccataagaac ctcagatcct tccgtattta gccagtatgt tctctagtgt ggttcgttgt 2340

ttttgcgtga gccatgagaa cgaaccattg agatcatact tactttgcat gtcactcaaa 2400

aattttgcct caaaactggt gagctgaatt tttgcagtta aagcatcgtg tagtgttttt 2460

cttagtccgt tatgtaggta ggaatctgat gtaatggttg ttggtatttt gtcaccattc 2520

atttttatct ggttgttctc aagttcggtt acgagatcca tttgtctatc tagttcaact 2580

tggaaaatca acgtatcagt cgggcggcct cgcttatcaa ccaccaattt catattgctg 2640

taagtgttta aatctttact tattggtttc aaaacccatt ggttaagcct tttaaactca 2700

tggtagttat tttcaagcat taacatgaac ttaaattcat caaggctaat ctctatattt 2760

gccttgtgag ttttcttttg tgttagttct tttaataacc actcataaat cctcatagag 2820

tatttgtttt caaaagactt aacatgttcc agattatatt ttatgaattt ttttaactgg 2880

aaaagataag gcaatatctc ttcactaaaa actaattcta atttttcgct tgagaacttg 2940

gcatagtttg tccactggaa aatctcaaag cctttaacca aaggattcct gatttccaca 3000

gttctcgtca tcagctctct ggttgcttta gctaatacac cataagcatt ttccctactg 3060

atgttcatca tctgagcgta ttggttataa gtgaacgata ccgtccgttc tttccttgta 3120

gggttttcaa tcgtggggtt gagtagtgcc acacagcata aaattagctt ggtttcatgc 3180

tccgttaagt catagcgact aatcgctagt tcatttgctt tgaaaacaac taattcagac 3240

atacatctca attggtctag gtgattttaa tcactatacc aattgagatg ggctagtcaa 3300

tgataattac tagtcctttt cctttgagtt gtgggtatct gtaaattctg ctagaccttt 3360

gctggaaaac ttgtaaattc tgctagaccc tctgtaaatt ccgctagacc tttgtgtgtt 3420

ttttttgttt atattcaagt ggttataatt tatagaataa agaaagaata aaaaaagata 3480

aaaagaatag atcccagccc tgtgtataac tcactacttt agtcagttcc gcagtattac 3540

aaaaggatgt cgcaaacgct gtttgctcct ctacaaaaca gaccttaaaa ccctaaaggc 3600

ttaagtagca ccctcgcaag ctcgggcaaa tcgctgaata ttccttttgt ctccgaccat 3660

caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc gctgcgctca cggctctggc 3720

agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg ccttttatgg attcatgcaa ggaaactacc 3780

cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcagggcgt tttatggcgg gtctgctatg 3840

tggtgctatc tgacttttg ctgttcagca gttcctgccc tctgatttc cagtctgacc 3900

acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa tgcacccagt aaggcagcgg 3960

tatcatcaac aggcttaccc gtcttactgt cgggaattca tttaaatagt caaaagcctc 4020

cgaccggagg cttttgactg ctaggcgatc tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag 4080

cgcgagatta tgggctcgca cgctcgactg tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag 4140

gcgagccgtc acgcccttga caatgccaca tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa 4200

atcaaccgcg tttcccggag gtaaccaagc ttgcgggaga gaatgatgaa caagagccaa 4260

caagttcaga caatcaccct ggccgccgcc cagcaaatgg cggcggcggt ggaaaaaaaa 4320

gccactgaga tcaacgtggc ggtggtgttt tccgtagttg accgcggagg caacacgctg 4380

cttatccagc ggatggacga ggccttcgtc tccagctgcg atatttccct gaataaagcc 4440

tggagcgcct gcagcctgaa gcaaggtacc catgaaatta cgtcagcggt ccagccagga 4500

caatctctgt acggtctgca gctaaccaac caacagcgaa ttattatttt tggcggcggc 4560

ctgccagtta tttttaatga gcaggtaatt ggcgccgtcg gcgttagcgg cggtacggtc 4620

gagcaggatc aattattagc ccagtgcgcc ctggattgtt tttccgcatt ataacctgaa 4680

gcgagaaggt atattatgag ctatcgtatg ttccgccagg cattctgagt gttaacgagg 4740

ggaccgtcat gtcgctttca ccgccaggcg tacgcctgtt ttacgatccg cgcgggcacc 4800

atgccggcgc catcaatgag ctgtgctggg ggctggagga gcaggggtc ccctgccaga 4860

ccataaccta tgacggaggc ggtgacgccg ctgcgctggg cgccctggcg gccagaagct 4920

cgcccctgcg ggtgggtatc gggctcagcg cgtccggcga gatagccctc actcatgccc 4980

agctgccggc ggacgcgccg ctggctaccg gacacgtcac cgatagcgac gatcaactgc 5040

gtacgctcgg cgccaacgcc gggcagctgg ttaaagtcct gccgttaagt gagagaaact 5100

gaatgtatcg tatctatacc cgcaccgggg ataaaggcac caccgccctg tacggcggca 5160

gccgcatcga gaaagaccat attcgcgtcg aggcctacgg caccgtcgat gaactgatat 5220

cccagctggg cgtctgctac gccacgaccc gcgacgccgg gctgcgggaa agcctgcacc 5280

atattcagca gacgctgttc gtgctggggg ctgaactggc cagcgatgcg cggggcctga 5340

cccgcctgag ccagacgatc ggcgaagagg agatcaccgc cctggagcgg cttatcgacc 5400

gcaatatggc cgagagcggc ccgttaaaac agttcgtgat cccggggagg aatctcgcct 5460

ctgcccagct gcacgtggcg cgcacccagt cccgtcggct cgaacgcctg ctgacggcca 5520

tggaccgcgc gcatccgctg cgcgacgcgc tcaaacgcta cagcaatcgc ctgtcggatg 5580

ccctgttctc catggcgcga atcgaagaga ctaggcctga tgcttgcgct tgaactggcc 5640

tagcaaacac agaaaaaagc ccgcacctga cagtgcgggc ttttttttttc ctaggcgatc 5700

tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag cgcgagatta tgggctcgca cgctcgactg 5760

tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag gcgagccgtc acgcccttga caatgccaca 5820

tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa atcaaccgcg tttcccggag gtaaccaagc 5880

ttcacctttt gagccgatga acaatgaaaa gatcaaaaacg atttgcagta ctggcccagc 5940

gccccgtcaa tcaggacggg ctgattggcg agtggcctga agaggggctg atcgccatgg 6000

acagcccctt tgacccggtc tcttcagtaa aagtggacaa cggtctgatc gtcgaactgg 6060

acggcaaacg ccgggaccag tttgacatga tcgaccgatt tatcgccgat tacgcgatca 6120

acgttgagcg cacagagcag gcaatgcgcc tggaggcggt ggaaatagcc cgtatgctgg 6180

tggatattca cgtcagccgg gaggagatca ttgccatcac taccgccatc acgccggcca 6240

aagcggtcga ggtgatggcg cagatgaacg tggtggagat gatgatggcg ctgcagaaga 6300

tgcgtgcccg ccggaccccc tccaaccagt gccacgtcac caatctcaaa gataatccgg 6360

tgcagattgc cgctgacgcc gccgaggccg ggatccgcgg cttctcagaa caggagacca 6420

cggtcggtat cgcgcgctac gcgccgttta acgccctggc gctgttggtc ggttcgcagt 6480

gcggccgccc cggcgtgttg acgcagtgct cggtggaaga ggccaccgag ctggagctgg 6540

gcatgcgtgg cttaaccagc tacgccgaga cggtgtcggt ctacggcacc gaagcggtat 6600

ttaccgacgg cgatgatacg ccgtggtcaa aggcgttcct cgcctcggcc tacgcctccc 6660

gcgggttgaa aatgcgctac acctccggca ccggatccga agcgctgatg ggctattcgg 6720

agagcaagtc gatgctctac ctcgaatcgc gctgcatctt cattactaaa ggcgccgggg 6780

ttcagggact gcaaaacggc gcggtgagct gtatcggcat gaccggcgct gtgccgtcgg 6840

gcattcgggc ggtgctggcg gaaaacctga tcgcctctat gctcgacctc gaagtggcgt 6900

ccgccaacga ccagactttc tcccactcgg atattcgccg caccgcgcgc accctgatgc 6960

agatgctgcc gggcaccgac tttatttttct ccggctacag cgcggtgccg aactacgaca 7020

acatgttcgc cggctcgaac ttcgatgcgg aagattttga tgattacaac atcctgcagc 7080

gtgacctgat ggttgacggc ggcctgcgtc cggtgaccga ggcggaaacc attgccattc 7140

gccagaaagc ggcgcgggcg atccaggcgg ttttccgcga gctggggctg ccgccaatcg 7200

ccgacgagga ggtggaggcc gccacctacg cgcacggcag caacgagatg ccgccgcgta 7260

acgtggtgga ggatctgagt gcggtggaag agatgatgaa gcgcaacatc accggcctcg 7320

atattgtcgg cgcgctgagc cgcagcggct ttgaggatat cgccagcaat attctcaata 7380

tgctgcgcca gcgggtcacc ggcgattacc tgcagacctc ggccattctc gatcggcagt 7440

tcgaggtggt gagtgcggtc aacgacatca atgactatca ggggccgggc accggctatc 7500

gcatctctgc cgaacgctgg gcggagatca aaaatattcc gggcgtggtt cagcccgaca 7560

ccattgaata aggcggtatt cctgtgcaac agacaaccca aattcagccc tcttttaccc 7620

tgaaaacccg cgagggcggg gtagcttctg ccgatgaacg cgccgatgaa gtggtgatcg 7680

gcgtcggccc tgccttcgat aaacaccagc atcacactct gatcgatatg ccccatggcg 7740

cgatcctcaa agagctgatt gccggggtgg aagaagaggg gcttcacgcc cgggtggtgc 7800

gcattctgcg cacgtccgac gtctccttta tggcctggga tgcggccaac ctgagcggct 7860

cggggatcgg catcggtatc cagtcgaagg ggaccacggt catccatcag cgcgatctgc 7920

tgccgctcag caacctggag ctgttctccc aggcgccgct gctgacgctg gagacctacc 7980

ggcagattgg caaaaacgct gcgcgctatg cgcgcaaaga gtcaccttcg ccggtgccgg 8040

tggtgaacga tcagatggtg cggccgaaat ttatggccaa agccgcgcta tttcatatca 8100

aagagaccaa acatgtggtg caggacgccg agcccgtcac cctgcacatc gacttagtaa 8160

gggagtgacc atgagcgaga aaaccatgcg cgtgcaggat tatccgttag ccacccgctg 8220

cccggagcat atcctgacgc ctaccggcaa accattgacc gatattaccc tcgagaaggt 8280

gctctctggc gaggtgggcc cgcaggatgt gcggatctcc cgccagaccc ttgagtacca 8340

ggcgcagatt gccgagcaga tgcagcgcca tgcggtggcg cgcaatttcc gccgcgcggc 8400

ggagcttatc gccattcctg acgagcgcat tctggctatc tataacgcgc tgcgcccgtt 8460

ccgctcctcg caggcggagc tgctggcgat cgccgacgag ctggagcaca cctggcatgc 8520

gacagtgaat gccgcctttg tccgggagtc ggcggaagtg tatcagcagc ggcataagct 8580

gcgtaaagga agctaagcgg aggtcagcat gccgttaata gccgggattg atatcggcaa 8640

cgccaccacc gaggtggcgc tggcgtccga ctacccgcag gcgagggcgt ttgttgccag 8700

cgggatcgtc gcgacgacgg gcatgaaagg gacgcgggac aatatcgccg ggaccctcgc 8760

cgcgctggag caggccctgg cgaaaacacc gtggtcgatg agcgatgtct ctcgcatcta 8820

tcttaacgaa gccgcgccgg tgattggcga tgtggcgatg gagaccatca ccgagaccat 8880

tatcaccgaa tcgaccatga tcggtcataa cccgcagacg ccgggcgggg tgggcgttgg 8940

cgtggggacg actatcgccc tcgggcggct ggcgacgctg ccggcggcgc agtatgccga 9000

ggggtggatc gtactgattg acgacgccgt cgatttcctt gacgccgtgt ggtggctcaa 9060

tgaggcgctc gaccgggggа tcaacgtggt ggcggcgatc ctcaaaaagg acgacggcgt 9120

gctggtgaac aaccgcctgc gtaaaaccct gccggtggtg gatgaagtga cgctgctgga 9180

gcaggtcccc gagggggtaa tggcggcggt ggaagtggcc gcgccgggcc aggtggtgcg 9240

gatcctgtcg aatccctacg ggatcgccac cttcttcggg ctaagcccgg aagagaccca 9300

ggccatcgtc cccatcgccc gcgccctgat tggcaaccgt tccgcggtgg tgctcaagac 9360

cccgcagggg gatgtgcagt cgcgggtgat cccggcgggc aacctctaca ttagcggcga 9420

aaagcgccgc ggagaggccg atgtcgccga gggcgcggaa gccatcatgc aggcgatgag 9480

cgcctgcgct ccggtacgcg acatccgcgg cgaaccgggc acccacgccg gcggcatgct 9540

tgagcgggtg cgcaaggtaa tggcgtccct gaccggccat gagatgagcg cgatatacat 9600

ccaggatctg ctggcggtgg atacgtttat tccgcgcaag gtgcagggcg ggatggccgg 9660

cgagtgcgcc atggagaatg ccgtcgggat ggcggcgatg gtgaaagcgg atcgtctgca 9720

aatgcaggtt atcgcccgcg aactgagcgc ccgactgcag accgaggtgg tggtgggcgg 9780

cgtggaggcc aacatggcca tcgccggggc gttaaccact cccggctgtg cggcgccgct 9840

ggcgatcctc gacctcggcg ccggctcgac ggatgcggcg atcgtcaacg cggaggggca 9900

gataacggcg gtccatctcg ccggggcggg gaatatggtc agcctgttga ttaaaaccga 9960

gctgggcctc gaggatcttt cgctggcgga agcgataaaa aaatacccgc tggccaaagt 10020

ggaaagcctg ttcagtattc gtcacgagaa tggcgcggtg gagttctttc gggaagccct 10080

cagcccggcg gtgttcgcca aagtggtgta catcaaggag ggcgaactgg tgccgatcga 10140

taacgccagc ccgctggaaa aaattcgtct cgtgcgccgg caggcgaaag agaaagtgtt 10200

tgtcaccaac tgcctgcgcg cgctgcgcca ggtctcaccc ggcggttcca ttcgcgatat 10260

cgcctttgtg gtgctggtgg gcggctcatc gctggacttt gagatcccgc agcttatcac 10320

ggaagccttg tcgcactatg gcgtggtcgc cgggcagggc aatattcggg gaacagaagg 10380

gccgcgcaat gcggtcgcca ccgggctgct actggccggt caggcgaatt aaacgggcgc 10440

tcgcgccagc ctctaggtac aaataaaaaa ggcacgtcag atgacgtgcc ttttttcttg 10500

tctagagtac tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 10560

ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcgagctcgg tacccggggc 10620

ggccgcgcta gcgcccgatc cagctggagt ttgtagaaac gcaaaaaggc catccgtcag 10680

gatggccttc tgcttaattt gatgcctggc agtttatggc gggcgtcctg cccgccaccc 10740

tccgggccgt tgcttcgcaa cgttcaaatc cgctcccggc ggatttgtcc tactcaggag 10800

agcgttcacc gacaaacaac agataaaacg aaaggcccag tctttcgact gagcctttcg 10860

ttttatttga tgcctggcag ttccctactc tcgcatgggg agaccccaca ctaccatcgg 10920

cgctacggcg tttcacttct gagttcggca tggggtcagg tgggaccacc gcgctactgc 10980

cgccaggcaa attctgtttt atcagaccgc ttctgcgttc tgatttaatc tgtatcaggc 11040

tgaaaatctt ctctcatccg ccaaaacagc caagcttgca tgcctgcagc ccgggttacc 11100

atttcaacag atcgtcctta gcatataagt agtcgtcaaa aatgaattca acttcgtctg 11160

tttcggcatt gtagccgcca actctgatgg attcgtggtt tttgacaatg atgtcacagc 11220

ctttttcctt taggaagtcc aagtcgaaag tagtggcaat accaatgatc ttacaaccgg 11280

cggcttttcc ggcggcaata cctgctggag cgtcttcaaa tactactacc ttagatttgg 11340

aagggtcttg ctcattgatc ggatatccta agccattcct gcccttcaga tatggttctg 11400

gatgaggctt accctgtttg acatcattag cggtaatgaa gtactttggt ctcctgattc 11460

ccagatgctc gaaccatttt tgtgccatat cacgggtacc ggaagttgcc acagcccatt 11520

tctcttttgg tagagcgttc aaagcgttgc acagcttaac tgcacctggg acttcaatgg 11580

atttttcacc gtacttgacc ggaatttcag cttctaattt gttaacatac tcttcattgg 11640

caaagtctgg agcgaactta gcaatggcat caaacgttct ccaaccatgc gagacttgga 11700

taacgtgttc agcatcgaaa taaggtttgt ccttaccgaa atccctccag aatgcagcaa 11760

tggctggttg agagatgata atggtaccgt cgacgtcgaa caaagcggcg ttaactttca 11820

aagatagagg tttagtagtc aatcccataa ttctagtctg tttcctggat ccaataaatc 11880

taatcttcat gtagatctaa ttcttcaatc atgtccggca ggttcttcat tgggtagttg 11940

ttgtaaacga tttggtatac ggcttcaaat aatgggaagt cttcgacaga gccacatgtt 12000

tccaaccatt cgtgaacttc tttgcaggta attaaacctt gagcggattg gccattcaac 12060

aactcctttt cacattccca ggcgtcctta ccagaagtag ccattagcct agcaaccttg 12120

acgtttctac caccagcgca ggtggtgatc aaatcagcaa caccagcaga ctcttggtag 12180

tatgtttctt ctctagattc tgggaaaaac atttgaccga atctgatgat ctcacccaaa 12240

ccgactcttt ggatggcagc agaagcgttg ttaccccagc ctagaccttc gacgaaacca 12300

caacctaagg caacaacgtt cttcaaagca ccacagatgg agataccagc aacatcttcg 12360

atgacactaa cgtggaagta aggtctgtgg aacaaggcct ttagaacctt atggtcgacg 12420

tccttgccct cgcctctgaa atcctttgga atgtggtaag caactgttgt ttcagaccag 12480

tgttcttgag cgacttcggt ggcaatgtta gcaccagata gagcaccaca ttgaatacct 12540

agttcctcag tgatgtaaga ggatagcaat tggacacctt tagcaccaac ttcaaaaccc 12600

tttagacagg agatagctct gacgtgtgaa tcaacatgac ctttcaattg gctacagata 12660

cggggcaaaa attgatgtgg aatgttgaaa acgatgatgt cgacatcctt gactgaatca 12720

atcaagtctg gattagcaac caaattgtcg ggtagagtga tgccaggcaa gtatttcacg 12780

ttttgatgtc tagtatttat gatttcagtc aatttttcac cattgatctc ttcttcgaac 12840

acccacattt gtactattgg agcgaaaact tctgggtatc ccttacaatt ttcggcaacc 12900

accttggcaa tagtagtacc ccagttacca gatccaatca cagtaacctt gaaaggcttt 12960

tcggcagcct tcaaagaaac agaagaggaa cttctctttc taccagcatt caagtggccg 13020

gaagttaagt ttaatctatc agcagcagca gccatggaat tgtcctcctt actagtcatg 13080

gtctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacattata cgagccggat 13140

gattaattgt caacagctca tttcagaata tttgccagaa ccgttatgat gtcggcgcaa 13200

aaaacattat ccagaacggg agtgcgcctt gagcgacacg aattatgcag tgatttacga 13260

cctgcacagc cataccacag cttccgatgg ctgcctgacg ccagaagcat tggtgcacgc 13320

tagccagtac atttaaatgg taccctctag tcaaggcctt aagtgagtcg tattacggac 13380

tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc 13440

ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc 13500

cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcct gatgcggtat tttctcctta 13560

cgcatctgtg cggtatttca caccgcatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 13620

ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc tgacgagct 13669

<210> 72

<211> 13543

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 72

tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60

taacaagaaa aagccagcct ttcatgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120

acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180

ttagtgcatc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt 240

gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct 300

tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360

gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct ccattgccca gtcggcagcg 420

acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc 480

actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca 540

tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga 600

cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg 660

atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc 720

agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact 780

tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttccaa aaggtcgttg 840

atcaaagctc gccgcgttgt ttcatcaagc cttacggtca ccgtaaccag caaatcaata 900

tcactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac ggccagcaac 960

gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg 1020

gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta 1080

acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgacccacgg cgtaacgcgc ttgctgcttg 1140

gatgcccgag gcatagactg taccccaaaa aaacagtcat aacaagccat gaaaaccgcc 1200

actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcg tgagcgcata 1260

cgctacttgc attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcgtgccttc 1320

atccgtttcc acggtgtgcg tcacccggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt 1380

ctgtcctggc tggcgaacga gcgcaaggtt tcggtctcca cgcatcgtca ggcattggcg 1440

gccttgctgt tcttctacgg caaggtgctg tgcacggatc tgccctggct tcaggagatc 1500

ggaagacctc ggccgtcgcg gcgcttgccg gtggtgctga ccccggatga agtggttcgc 1560

atcctcggtt ttctggaagg cgagcatcgt ttgttcgccc agcttctgta tggaacgggc 1620

atgcggatca gtgagggttt gcaactgcgg gtcaaggatc tggatttcga tcacggcacg 1680

atcatcgtgc gggagggcaa gggctccaag gatcgggcct tgatgttacc cgagagcttg 1740

gcacccagcc tgcgcgagca ggggaattaa ttcccacggg ttttgctgcc cgcaaacggg 1800

ctgttctggt gttgctagtt tgttatcaga atcgcagatc cggcttcagc cggtttgccg 1860

gctgaaagcg ctatttcttc cagaattgcc atgatttttt ccccacggga ggcgtcactg 1920

gctcccgtgt tgtcggcagc tttgattcga taagcagcat cgcctgtttc aggctgtcta 1980

tgtgtgactg ttgagctgta acaagttgtc tcaggtgttc aatttcatgt tctagttgct 2040

ttgttttact ggtttcacct gttctattag gtgttacatg ctgttcatct gttacattgt 2100

cgatctgttc atggtgaaca gctttgaatg caccaaaaac tcgtaaaagc tctgatgtat 2160

ctatcttttt tacaccgttt tcatctgtgc atatggacag ttttcccttt gatatgtaac 2220

ggtgaacagt tgttctactt ttgtttgtta gtcttgatgc ttcactgata gatacaagag 2280

ccataagaac ctcagatcct tccgtattta gccagtatgt tctctagtgt ggttcgttgt 2340

ttttgcgtga gccatgagaa cgaaccattg agatcatact tactttgcat gtcactcaaa 2400

aattttgcct caaaactggt gagctgaatt tttgcagtta aagcatcgtg tagtgttttt 2460

cttagtccgt tatgtaggta ggaatctgat gtaatggttg ttggtatttt gtcaccattc 2520

atttttatct ggttgttctc aagttcggtt acgagatcca tttgtctatc tagttcaact 2580

tggaaaatca acgtatcagt cgggcggcct cgcttatcaa ccaccaattt catattgctg 2640

taagtgttta aatctttact tattggtttc aaaacccatt ggttaagcct tttaaactca 2700

tggtagttat tttcaagcat taacatgaac ttaaattcat caaggctaat ctctatattt 2760

gccttgtgag ttttcttttg tgttagttct tttaataacc actcataaat cctcatagag 2820

tatttgtttt caaaagactt aacatgttcc agattatatt ttatgaattt ttttaactgg 2880

aaaagataag gcaatatctc ttcactaaaa actaattcta atttttcgct tgagaacttg 2940

gcatagtttg tccactggaa aatctcaaag cctttaacca aaggattcct gatttccaca 3000

gttctcgtca tcagctctct ggttgcttta gctaatacac cataagcatt ttccctactg 3060

atgttcatca tctgagcgta ttggttataa gtgaacgata ccgtccgttc tttccttgta 3120

gggttttcaa tcgtggggtt gagtagtgcc acacagcata aaattagctt ggtttcatgc 3180

tccgttaagt catagcgact aatcgctagt tcatttgctt tgaaaacaac taattcagac 3240

atacatctca attggtctag gtgattttaa tcactatacc aattgagatg ggctagtcaa 3300

tgataattac tagtcctttt cctttgagtt gtgggtatct gtaaattctg ctagaccttt 3360

gctggaaaac ttgtaaattc tgctagaccc tctgtaaatt ccgctagacc tttgtgtgtt 3420

ttttttgttt atattcaagt ggttataatt tatagaataa agaaagaata aaaaaagata 3480

aaaagaatag atcccagccc tgtgtataac tcactacttt agtcagttcc gcagtattac 3540

aaaaggatgt cgcaaacgct gtttgctcct ctacaaaaca gaccttaaaa ccctaaaggc 3600

ttaagtagca ccctcgcaag ctcgggcaaa tcgctgaata ttccttttgt ctccgaccat 3660

caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc gctgcgctca cggctctggc 3720

agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg ccttttatgg attcatgcaa ggaaactacc 3780

cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcagggcgt tttatggcgg gtctgctatg 3840

tggtgctatc tgacttttg ctgttcagca gttcctgccc tctgattttc cagtctgacc 3900

acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa tgcacccagt aaggcagcgg 3960

tatcatcaac aggcttaccc gtcttactgt cgggaattca tttaaatagt caaaagcctc 4020

cgaccggagg cttttgactg ctaggcgatc tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag 4080

cgcgagatta tgggctcgca cgctcgactg tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag 4140

gcgagccgtc acgcccttga ctatgccaca tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa 4200

atcaaccgcg tttcccggag gtaaccaagc ttgcgggaga gaatgatgaa caagagccaa 4260

caagttcaga caatcaccct ggccgccgcc cagcaaatgg cggcggcggt ggaaaaaaaa 4320

gccactgaga tcaacgtggc ggtggtgttt tccgtagttg accgcggagg caacacgctg 4380

cttatccagc ggatggacga ggccttcgtc tccagctgcg atatttccct gaataaagcc 4440

tggagcgcct gcagcctgaa gcaaggtacc catgaaatta cgtcagcggt ccagccagga 4500

caatctctgt acggtctgca gctaaccaac caacagcgaa ttattatttt tggcggcggc 4560

ctgccagtta tttttaatga gcaggtaatt ggcgccgtcg gcgttagcgg cggtacggtc 4620

gagcaggatc aattattagc ccagtgcgcc ctggattgtt tttccgcatt ataacctgaa 4680

gcgagaaggt atattatgag ctatcgtatg ttccgccagg cattctgagt gttaacgagg 4740

ggaccgtcat gtcgctttca ccgccaggcg tacgcctgtt ttacgatccg cgcgggcacc 4800

atgccggcgc catcaatgag ctgtgctggg ggctggagga gcaggggtc ccctgccaga 4860

ccataaccta tgacggaggc ggtgacgccg ctgcgctggg cgccctggcg gccagaagct 4920

cgcccctgcg ggtgggtatc gggctcagcg cgtccggcga gatagccctc actcatgccc 4980

agctgccggc ggacgcgccg ctggctaccg gacacgtcac cgatagcgac gatcaactgc 5040

gtacgctcgg cgccaacgcc gggcagctgg ttaaagtcct gccgttaagt gagagaaact 5100

gaatgtatcg tatctatacc cgcaccgggg ataaaggcac caccgccctg tacggcggca 5160

gccgcatcga gaaagaccat attcgcgtcg aggcctacgg caccgtcgat gaactgatat 5220

cccagctggg cgtctgctac gccacgaccc gcgacgccgg gctgcgggaa agcctgcacc 5280

atattcagca gacgctgttc gtgctggggg ctgaactggc cagcgatgcg cggggcctga 5340

cccgcctgag ccagacgatc ggcgaagagg agatcaccgc cctggagcgg cttatcgacc 5400

gcaatatggc cgagagcggc ccgttaaaac agttcgtgat cccggggagg aatctcgcct 5460

ctgcccagct gcacgtggcg cgcacccagt cccgtcggct cgaacgcctg ctgacggcca 5520

tggaccgcgc gcatccgctg cgcgacgcgc tcaaacgcta cagcaatcgc ctgtcggatg 5580

ccctgttctc catggcgcga atcgaagaga ctaggcctga tgcttgcgct tgaactggcc 5640

tagcaaacac agaaaaaagc ccgcacctga cagtgcgggc ttttttttttc ctaggcgatc 5700

tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag cgcgagatta tgggctcgca cgctcgactg 5760

tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag gcgagccgtc acgcccttga ctatgccaca 5820

tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa atcaaccgcg tttcccggag gtaaccaagc 5880

ttcacctttt gagccgatga acaatgaaaa gatcaaaacg atttgcagta ctggcccagc 5940

gccccgtcaa tcaggacggg ctgattggcg agtggcctga agaggggctg atcgccatgg 6000

acagcccctt tgacccggtc tcttcagtaa aagtggacaa cggtctgatc gtcgaactgg 6060

acggcaaacg ccgggaccag tttgacatga tcgaccgatt tatcgccgat tacgcgatca 6120

acgttgagcg cacagagcag gcaatgcgcc tggaggcggt ggaaatagcc cgtatgctgg 6180

tggatattca cgtcagccgg gaggagatca ttgccatcac taccgccatc acgccggcca 6240

aagcggtcga ggtgatggcg cagatgaacg tggtggagat gatgatggcg ctgcagaaga 6300

tgcgtgcccg ccggaccccc tccaaccagt gccacgtcac caatctcaaa gataatccgg 6360

tgcagattgc cgctgacgcc gccgaggccg ggatccgcgg cttctcagaa caggagacca 6420

cggtcggtat cgcgcgctac gcgccgttta acgccctggc gctgttggtc ggttcgcagt 6480

gcggccgccc cggcgtgttg acgcagtgct cggtggaaga ggccaccgag ctggagctgg 6540

gcatgcgtgg cttaaccagc tacgccgaga cggtgtcggt ctacggcacc gaagcggtat 6600

ttaccgacgg cgatgatacg ccgtggtcaa aggcgttcct cgcctcggcc tacgcctccc 6660

gcgggttgaa aatgcgctac acctccggca ccggatccga agcgctgatg ggctattcgg 6720

agagcaagtc gatgctctac ctcgaatcgc gctgcatctt cattactaaa ggcgccgggg 6780

ttcagggact gcaaaacggc gcggtgagct gtatcggcat gaccggcgct gtgccgtcgg 6840

gcattcgggc ggtgctggcg gaaaacctga tcgcctctat gctcgacctc gaagtggcgt 6900

ccgccaacga ccagactttc tcccactcgg atattcgccg caccgcgcgc accctgatgc 6960

agatgctgcc gggcaccgac tttatttttct ccggctacag cgcggtgccg aactacgaca 7020

acatgttcgc cggctcgaac ttcgatgcgg aagattttga tgattacaac atcctgcagc 7080

gtgacctgat ggttgacggc ggcctgcgtc cggtgaccga ggcggaaacc attgccattc 7140

gccagaaagc ggcgcgggcg atccaggcgg ttttccgcga gctggggctg ccgccaatcg 7200

ccgacgagga ggtggaggcc gccacctacg cgcacggcag caacgagatg ccgccgcgta 7260

acgtggtgga ggatctgagt gcggtggaag agatgatgaa gcgcaacatc accggcctcg 7320

atattgtcgg cgcgctgagc cgcagcggct ttgaggatat cgccagcaat attctcaata 7380

tgctgcgcca gcgggtcacc ggcgattacc tgcagacctc ggccattctc gatcggcagt 7440

tcgaggtggt gagtgcggtc aacgacatca atgactatca ggggccgggc accggctatc 7500

gcatctctgc cgaacgctgg gcggagatca aaaatattcc gggcgtggtt cagcccgaca 7560

ccattgaata aggcggtatt cctgtgcaac agacaaccca aattcagccc tcttttaccc 7620

tgaaaacccg cgagggcggg gtagcttctg ccgatgaacg cgccgatgaa gtggtgatcg 7680

gcgtcggccc tgccttcgat aaacaccagc atcacactct gatcgatatg ccccatggcg 7740

cgatcctcaa agagctgatt gccggggtgg aagaagaggg gcttcacgcc cgggtggtgc 7800

gcattctgcg cacgtccgac gtctccttta tggcctggga tgcggccaac ctgagcggct 7860

cggggatcgg catcggtatc cagtcgaagg ggaccacggt catccatcag cgcgatctgc 7920

tgccgctcag caacctggag ctgttctccc aggcgccgct gctgacgctg gagacctacc 7980

ggcagattgg caaaaacgct gcgcgctatg cgcgcaaaga gtcaccttcg ccggtgccgg 8040

tggtgaacga tcagatggtg cggccgaaat ttatggccaa agccgcgcta tttcatatca 8100

aagagaccaa acatgtggtg caggacgccg agcccgtcac cctgcacatc gacttagtaa 8160

gggagtgacc atgagcgaga aaaccatgcg cgtgcaggat tatccgttag ccacccgctg 8220

cccggagcat atcctgacgc ctaccggcaa accattgacc gatattaccc tcgagaaggt 8280

gctctctggc gaggtgggcc cgcaggatgt gcggatctcc cgccagaccc ttgagtacca 8340

ggcgcagatt gccgagcaga tgcagcgcca tgcggtggcg cgcaatttcc gccgcgcggc 8400

ggagcttatc gccattcctg acgagcgcat tctggctatc tataacgcgc tgcgcccgtt 8460

ccgctcctcg caggcggagc tgctggcgat cgccgacgag ctggagcaca cctggcatgc 8520

gacagtgaat gccgcctttg tccgggagtc ggcggaagtg tatcagcagc ggcataagct 8580

gcgtaaagga agctaagcgg aggtcagcat gccgttaata gccgggattg atatcggcaa 8640

cgccaccacc gaggtggcgc tggcgtccga ctacccgcag gcgagggcgt ttgttgccag 8700

cgggatcgtc gcgacgacgg gcatgaaagg gacgcgggac aatatcgccg ggaccctcgc 8760

cgcgctggag caggccctgg cgaaaacacc gtggtcgatg agcgatgtct ctcgcatcta 8820

tcttaacgaa gccgcgccgg tgattggcga tgtggcgatg gagaccatca ccgagaccat 8880

tatcaccgaa tcgaccatga tcggtcataa cccgcagacg ccgggcgggg tgggcgttgg 8940

cgtggggacg actatcgccc tcgggcggct ggcgacgctg ccggcggcgc agtatgccga 9000

ggggtggatc gtactgattg acgacgccgt cgatttcctt gacgccgtgt ggtggctcaa 9060

tgaggcgctc gaccggggga tcaacgtggt ggcggcgatc ctcaaaaagg acgacggcgt 9120

gctggtgaac aaccgcctgc gtaaaaccct gccggtggtg gatgaagtga cgctgctgga 9180

gcaggtcccc gagggggtaa tggcggcggt ggaagtggcc gcgccgggcc aggtggtgcg 9240

gatcctgtcg aatccctacg ggatcgccac cttcttcggg ctaagcccgg aagagaccca 9300

ggccatcgtc cccatcgccc gcgccctgat tggcaaccgt tccgcggtgg tgctcaagac 9360

cccgcagggg gatgtgcagt cgcgggtgat cccggcgggc aacctctaca ttagcggcga 9420

aaagcgccgc ggagaggccg atgtcgccga gggcgcggaa gccatcatgc aggcgatgag 9480

cgcctgcgct ccggtacgcg acatccgcgg cgaaccgggc acccacgccg gcggcatgct 9540

tgagcgggtg cgcaaggtaa tggcgtccct gaccggccat gagatgagcg cgatatacat 9600

ccaggatctg ctggcggtgg atacgtttat tccgcgcaag gtgcagggcg ggatggccgg 9660

cgagtgcgcc atggagaatg ccgtcgggat ggcggcgatg gtgaaagcgg atcgtctgca 9720

aatgcaggtt atcgcccgcg aactgagcgc ccgactgcag accgaggtgg tggtgggcgg 9780

cgtggaggcc aacatggcca tcgccggggc gttaaccact cccggctgtg cggcgccgct 9840

ggcgatcctc gacctcggcg ccggctcgac ggatgcggcg atcgtcaacg cggaggggca 9900

gataacggcg gtccatctcg ccggggcggg gaatatggtc agcctgttga ttaaaaccga 9960

gctgggcctc gaggatcttt cgctggcgga agcgataaaa aaataccccgc tggccaaagt 10020

ggaaagcctg ttcagtattc gtcacgagaa tggcgcggtg gagttctttc gggaagccct 10080

cagcccggcg gtgttcgcca aagtggtgta catcaaggag ggcgaactgg tgccgatcga 10140

taacgccagc ccgctggaaa aaattcgtct cgtgcgccgg caggcgaaag agaaagtgtt 10200

tgtcaccaac tgcctgcgcg cgctgcgcca ggtctcaccc ggcggttcca ttcgcgatat 10260

cgcctttgtg gtgctggtgg gcggctcatc gctggacttt gagatcccgc agcttatcac 10320

ggaagccttg tcgcactatg gcgtggtcgc cgggcagggc aatattcggg gaacagaagg 10380

gccgcgcaat gcggtcgcca ccgggctgct actggccggt caggcgaatt aaacgggcgc 10440

tcgcgccagc ctctaggtac aaataaaaaa ggcacgtcag atgacgtgcc ttttttcttg 10500

tctagcgtgc accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg 10560

caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg 10620

ttttttgcgc cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt 10680

aatcatccgg ctcgtataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 10740

agaccatgac tagtaaggag gacaattcca tggctgctgc tgctgataga ttaaacttaa 10800

cttccggcca cttgaatgct ggtagaaaga gaagttcctc ttctgtttct ttgaaggctg 10860

ccgaaaagcc tttcaaggtt actgtgattg gatctggtaa ctggggtact actattgcca 10920

aggtggttgc cgaaaattgt aagggatacc cagaagtttt cgctccaata gtacaaatgt 10980

gggtgttcga agaagagatc aatggtgaaa aattgactga aatcataaat actagacatc 11040

aaaacgtgaa atacttgcct ggcatcactc tacccgacaa tttggttgct aatccagact 11100

tgattgattc agtcaaggat gtcgacatca tcgttttcaa cattccacat caatttttgc 11160

cccgtatctg tagccaattg aaaggtcatg ttgattcaca cgtcagagct atctcctgtc 11220

taaagggttt tgaagttggt gctaaaggtg tccaattgct atcctcttac atcactgagg 11280

aactaggtat tcaatgtggt gctctatctg gtgctaacat tgccaccgaa gtcgctcaag 11340

aacactggtc tgaaacaaca gttgcttacc acattccaaa ggatttcaga ggcgagggca 11400

aggacgtcga ccataaggtt ctaaaggcct tgttccacag accttacttc cacgttagtg 11460

tcatcgaaga tgttgctggt atctccatct gtggtgcttt gaagaacgtt gttgccttag 11520

gttgtggttt cgtcgaaggt ctaggctggg gtaacaacgc ttctgctgcc atccaaagag 11580

tcggtttggg tgagatcatc agattcggtc aaatgttttt cccagaatct agagaagaaa 11640

catactacca agagtctgct ggtgttgctg atttgatcac cacctgcgct ggtggtagaa 11700

acgtcaaggt tgctaggcta atggctactt ctggtaagga cgcctgggaa tgtgaaaagg 11760

agttgttgaa tggccaatcc gctcaaggtt taattacctg caaagaagtt cacgaatggt 11820

tggaaacatg tggctctgtc gaagacttcc cattatttga agccgtatac caaatcgttt 11880

acaacaacta cccaatgaag aacctgccgg acatgattga agaattagat ctacatgaag 11940

attagattta ttggatccag gaaacagact agaattatgg gattgactac taaacctcta 12000

tctttgaaag ttaacgccgc tttgttcgac gtcgacggta ccattatcat ctctcaacca 12060

gccattgctg cattctggag ggatttcggt aaggacaaac cttatttcga tgctgaacac 12120

gttatccaag tctcgcatgg ttggagaacg tttgatgcca ttgctaagtt cgctccagac 12180

tttgccaatg aagagtatgt taacaaatta gaagctgaaa ttccggtcaa gtacggtgaa 12240

aaatccattg aagtcccagg tgcagttaag ctgtgcaacg ctttgaacgc tctaccaaaa 12300

gagaaatggg ctgtggcaac ttccggtacc cgtgatatgg cacaaaaatg gttcgagcat 12360

ctgggaatca ggagaccaaa gtacttcatt accgctaatg atgtcaaaca gggtaagcct 12420

catccagaac catatctgaa gggcaggaat ggcttaggat atccgatcaa tgagcaagac 12480

ccttccaaat ctaaggtagt agtatttgaa gacgctccag caggtattgc cgccggaaaa 12540

gccgccggtt gtaagatcat tggtattgcc actactttcg acttggactt cctaaaggaa 12600

aaaggctgtg acatcattgt caaaaaccac gaatccatca gagttggcgg ctacaatgcc 12660

gaaacagacg aagttgaatt catttttgac gactacttat atgctaagga cgatctgttg 12720

aaatggtaac ccgggctgca ggcatgcaag cttggctgtt ttggcggatg agagaagatt 12780

ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct 12840

ggcggcagta gcgcggtggt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt 12900

agcgccgatg gtagtgtggg gtctccccat gcgagagtag ggaactgcca ggcatcaaat 12960

aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa 13020

cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg agcggatttg aacgttgcga agcaacggcc 13080

cggagggtgg cgggcaggac gcccgccata aactgccagg catcaaatta agcagaaggc 13140

catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaactcca gctggatcgg gcgctagagt 13200

atacatttaa atggtaccct ctagtcaagg ccttaagtga gtcgtattac ggactggccg 13260

tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag 13320

cacatccccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc 13380

aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 13440

tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat 13500

agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacga gct 13543

<210> 73

<211> 13543

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 73

tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60

taacaagaaa aagccagcct ttcatgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120

acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180

ttagtgcatc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt 240

gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct 300

tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360

gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct ccattgccca gtcggcagcg 420

acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc 480

actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca 540

tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga 600

cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg 660

atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc 720

agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact 780

tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttccaa aaggtcgttg 840

atcaaagctc gccgcgttgt ttcatcaagc cttacggtca ccgtaaccag caaatcaata 900

tcactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac ggccagcaac 960

gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg 1020

gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta 1080

acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgacccacgg cgtaacgcgc ttgctgcttg 1140

gatgcccgag gcatagactg taccccaaaa aaacagtcat aacaagccat gaaaaccgcc 1200

actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcg tgagcgcata 1260

cgctacttgc attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcgtgccttc 1320

atccgtttcc acggtgtgcg tcacccggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt 1380

ctgtcctggc tggcgaacga gcgcaaggtt tcggtctcca cgcatcgtca ggcattggcg 1440

gccttgctgt tcttctacgg caaggtgctg tgcacggatc tgccctggct tcaggagatc 1500

ggaagacctc ggccgtcgcg gcgcttgccg gtggtgctga ccccggatga agtggttcgc 1560

atcctcggtt ttctggaagg cgagcatcgt ttgttcgccc agcttctgta tggaacgggc 1620

atgcggatca gtgagggttt gcaactgcgg gtcaaggatc tggatttcga tcacggcacg 1680

atcatcgtgc gggagggcaa gggctccaag gatcgggcct tgatgttacc cgagagcttg 1740

gcacccagcc tgcgcgagca ggggaattaa ttcccacggg ttttgctgcc cgcaaacggg 1800

ctgttctggt gttgctagtt tgttatcaga atcgcagatc cggcttcagc cggtttgccg 1860

gctgaaagcg ctatttcttc cagaattgcc atgatttttt ccccacggga ggcgtcactg 1920

gctcccgtgt tgtcggcagc tttgattcga taagcagcat cgcctgtttc aggctgtcta 1980

tgtgtgactg ttgagctgta acaagttgtc tcaggtgttc aatttcatgt tctagttgct 2040

ttgttttact ggtttcacct gttctattag gtgttacatg ctgttcatct gttacattgt 2100

cgatctgttc atggtgaaca gctttgaatg caccaaaaac tcgtaaaagc tctgatgtat 2160

ctatcttttt tacaccgttt tcatctgtgc atatggacag ttttcccttt gatatgtaac 2220

ggtgaacagt tgttctactt ttgtttgtta gtcttgatgc ttcactgata gatacaagag 2280

ccataagaac ctcagatcct tccgtattta gccagtatgt tctctagtgt ggttcgttgt 2340

ttttgcgtga gccatgagaa cgaaccattg agatcatact tactttgcat gtcactcaaa 2400

aattttgcct caaaactggt gagctgaatt tttgcagtta aagcatcgtg tagtgttttt 2460

cttagtccgt tatgtaggta ggaatctgat gtaatggttg ttggtatttt gtcaccattc 2520

atttttatct ggttgttctc aagttcggtt acgagatcca tttgtctatc tagttcaact 2580

tggaaaatca acgtatcagt cgggcggcct cgcttatcaa ccaccaattt catattgctg 2640

taagtgttta aatctttact tattggtttc aaaacccatt ggttaagcct tttaaactca 2700

tggtagttat tttcaagcat taacatgaac ttaaattcat caaggctaat ctctatattt 2760

gccttgtgag ttttcttttg tgttagttct tttaataacc actcataaat cctcatagag 2820

tatttgtttt caaaagactt aacatgttcc agattatatt ttatgaattt ttttaactgg 2880

aaaagataag gcaatatctc ttcactaaaa actaattcta atttttcgct tgagaacttg 2940

gcatagtttg tccactggaa aatctcaaag cctttaacca aaggattcct gatttccaca 3000

gttctcgtca tcagctctct ggttgcttta gctaatacac cataagcatt ttccctactg 3060

atgttcatca tctgagcgta ttggttataa gtgaacgata ccgtccgttc tttccttgta 3120

gggttttcaa tcgtggggtt gagtagtgcc acacagcata aaattagctt ggtttcatgc 3180

tccgttaagt catagcgact aatcgctagt tcatttgctt tgaaaacaac taattcagac 3240

atacatctca attggtctag gtgattttaa tcactatacc aattgagatg ggctagtcaa 3300

tgataattac tagtcctttt cctttgagtt gtgggtatct gtaaattctg ctagaccttt 3360

gctggaaaac ttgtaaattc tgctagaccc tctgtaaatt ccgctagacc tttgtgtgtt 3420

ttttttgttt atattcaagt ggttataatt tatagaataa agaaagaata aaaaaagata 3480

aaaagaatag atcccagccc tgtgtataac tcactacttt agtcagttcc gcagtattac 3540

aaaaggatgt cgcaaacgct gtttgctcct ctacaaaaca gaccttaaaa ccctaaaggc 3600

ttaagtagca ccctcgcaag ctcgggcaaa tcgctgaata ttccttttgt ctccgaccat 3660

caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc gctgcgctca cggctctggc 3720

agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg ccttttatgg attcatgcaa ggaaactacc 3780

cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcagggcgt tttatggcgg gtctgctatg 3840

tggtgctatc tgactttttg ctgttcagca gttcctgccc tctgattttc cagtctgacc 3900

acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa tgcacccagt aaggcagcgg 3960

tatcatcaac aggcttaccc gtcttactgt cgggaattca tttaaatagt caaaagcctc 4020

cgaccggagg cttttgactg ctaggcgatc tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag 4080

cgcgagatta tgggctcgca cgctcgactg tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag 4140

gcgagccgtc acgcccttga caatgccaca tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa 4200

atcaaccgcg tttcccggag gtaaccaagc ttgcgggaga gaatgatgaa caagagccaa 4260

caagttcaga caatcaccct ggccgccgcc cagcaaatgg cggcggcggt ggaaaaaaaa 4320

gccactgaga tcaacgtggc ggtggtgttt tccgtagttg accgcggagg caacacgctg 4380

cttatccagc ggatggacga ggccttcgtc tccagctgcg atatttccct gaataaagcc 4440

tggagcgcct gcagcctgaa gcaaggtacc catgaaatta cgtcagcggt ccagccagga 4500

caatctctgt acggtctgca gctaaccaac caacagcgaa ttattatttt tggcggcggc 4560

ctgccagtta tttttaatga gcaggtaatt ggcgccgtcg gcgttagcgg cggtacggtc 4620

gagcaggatc aattattagc ccagtgcgcc ctggattgtt tttccgcatt ataacctgaa 4680

gcgagaaggt atattatgag ctatcgtatg ttccgccagg cattctgagt gttaacgagg 4740

ggaccgtcat gtcgctttca ccgccaggcg tacgcctgtt ttacgatccg cgcgggcacc 4800

atgccggcgc catcaatgag ctgtgctggg ggctggagga gcagggggtc ccctgccaga 4860

ccataaccta tgacggaggc ggtgacgccg ctgcgctggg cgccctggcg gccagaagct 4920

cgcccctgcg ggtgggtatc gggctcagcg cgtccggcga gatagccctc actcatgccc 4980

agctgccggc ggacgcgccg ctggctaccg gacacgtcac cgatagcgac gatcaactgc 5040

gtacgctcgg cgccaacgcc gggcagctgg ttaaagtcct gccgttaagt gagagaaact 5100

gaatgtatcg tatctatacc cgcaccgggg ataaaggcac caccgccctg tacggcggca 5160

gccgcatcga gaaagaccat attcgcgtcg aggcctacgg caccgtcgat gaactgatat 5220

cccagctggg cgtctgctac gccacgaccc gcgacgccgg gctgcgggaa agcctgcacc 5280

atattcagca gacgctgttc gtgctggggg ctgaactggc cagcgatgcg cggggcctga 5340

cccgcctgag ccagacgatc ggcgaagagg agatcaccgc cctggagcgg cttatcgacc 5400

gcaatatggc cgagagcggc ccgttaaaac agttcgtgat cccggggagg aatctcgcct 5460

ctgcccagct gcacgtggcg cgcacccagt cccgtcggct cgaacgcctg ctgacggcca 5520

tggaccgcgc gcatccgctg cgcgacgcgc tcaaacgcta cagcaatcgc ctgtcggatg 5580

ccctgttctc catggcgcga atcgaagaga ctaggcctga tgcttgcgct tgaactggcc 5640

tagcaaacac agaaaaaagc ccgcacctga cagtgcgggc ttttttttttc ctaggcgatc 5700

tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag cgcgagatta tgggctcgca cgctcgactg 5760

tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag gcgagccgtc acgcccttga caatgccaca 5820

tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa atcaaccgcg tttcccggag gtaaccaagc 5880

ttcacctttt gagccgatga acaatgaaaa gatcaaaacg atttgcagta ctggcccagc 5940

gccccgtcaa tcaggacggg ctgattggcg agtggcctga agaggggctg atcgccatgg 6000

acagcccctt tgacccggtc tcttcagtaa aagtggacaa cggtctgatc gtcgaactgg 6060

acggcaaacg ccgggaccag tttgacatga tcgaccgatt tatcgccgat tacgcgatca 6120

acgttgagcg cacagagcag gcaatgcgcc tggaggcggt ggaaatagcc cgtatgctgg 6180

tggatattca cgtcagccgg gaggagatca ttgccatcac taccgccatc acgccggcca 6240

aagcggtcga ggtgatggcg cagatgaacg tggtggagat gatgatggcg ctgcagaaga 6300

tgcgtgcccg ccggaccccc tccaaccagt gccacgtcac caatctcaaa gataatccgg 6360

tgcagattgc cgctgacgcc gccgaggccg ggatccgcgg cttctcagaa caggagacca 6420

cggtcggtat cgcgcgctac gcgccgttta acgccctggc gctgttggtc ggttcgcagt 6480

gcggccgccc cggcgtgttg acgcagtgct cggtggaaga ggccaccgag ctggagctgg 6540

gcatgcgtgg cttaaccagc tacgccgaga cggtgtcggt ctacggcacc gaagcggtat 6600

ttaccgacgg cgatgatacg ccgtggtcaa aggcgttcct cgcctcggcc tacgcctccc 6660

gcgggttgaa aatgcgctac acctccggca ccggatccga agcgctgatg ggctattcgg 6720

agagcaagtc gatgctctac ctcgaatcgc gctgcatctt cattactaaa ggcgccgggg 6780

ttcagggact gcaaaacggc gcggtgagct gtatcggcat gaccggcgct gtgccgtcgg 6840

gcattcgggc ggtgctggcg gaaaacctga tcgcctctat gctcgacctc gaagtggcgt 6900

ccgccaacga ccagactttc tcccactcgg atattcgccg caccgcgcgc accctgatgc 6960

agatgctgcc gggcaccgac tttatttttct ccggctacag cgcggtgccg aactacgaca 7020

acatgttcgc cggctcgaac ttcgatgcgg aagattttga tgattacaac atcctgcagc 7080

gtgacctgat ggttgacggc ggcctgcgtc cggtgaccga ggcggaaacc attgccattc 7140

gccagaaagc ggcgcgggcg atccaggcgg ttttccgcga gctggggctg ccgccaatcg 7200

ccgacgagga ggtggaggcc gccacctacg cgcacggcag caacgagatg ccgccgcgta 7260

acgtggtgga ggatctgagt gcggtggaag agatgatgaa gcgcaacatc accggcctcg 7320

atattgtcgg cgcgctgagc cgcagcggct ttgaggatat cgccagcaat attctcaata 7380

tgctgcgcca gcgggtcacc ggcgattacc tgcagacctc ggccattctc gatcggcagt 7440

tcgaggtggt gagtgcggtc aacgacatca atgactatca ggggccgggc accggctatc 7500

gcatctctgc cgaacgctgg gcggagatca aaaatattcc gggcgtggtt cagcccgaca 7560

ccattgaata aggcggtatt cctgtgcaac agacaaccca aattcagccc tcttttaccc 7620

tgaaaacccg cgagggcggg gtagcttctg ccgatgaacg cgccgatgaa gtggtgatcg 7680

gcgtcggccc tgccttcgat aaacaccagc atcacactct gatcgatatg ccccatggcg 7740

cgatcctcaa agagctgatt gccggggtgg aagaagaggg gcttcacgcc cgggtggtgc 7800

gcattctgcg cacgtccgac gtctccttta tggcctggga tgcggccaac ctgagcggct 7860

cggggatcgg catcggtatc cagtcgaagg ggaccacggt catccatcag cgcgatctgc 7920

tgccgctcag caacctggag ctgttctccc aggcgccgct gctgacgctg gagacctacc 7980

ggcagattgg caaaaacgct gcgcgctatg cgcgcaaaga gtcaccttcg ccggtgccgg 8040

tggtgaacga tcagatggtg cggccgaaat ttatggccaa agccgcgcta tttcatatca 8100

aagagaccaa acatgtggtg caggacgccg agcccgtcac cctgcacatc gacttagtaa 8160

gggagtgacc atgagcgaga aaaccatgcg cgtgcaggat tatccgttag ccacccgctg 8220

cccggagcat atcctgacgc ctaccggcaa accattgacc gatattaccc tcgagaaggt 8280

gctctctggc gaggtgggcc cgcaggatgt gcggatctcc cgccagaccc ttgagtacca 8340

ggcgcagatt gccgagcaga tgcagcgcca tgcggtggcg cgcaatttcc gccgcgcggc 8400

ggagcttatc gccattcctg acgagcgcat tctggctatc tataacgcgc tgcgcccgtt 8460

ccgctcctcg caggcggagc tgctggcgat cgccgacgag ctggagcaca cctggcatgc 8520

gacagtgaat gccgcctttg tccgggagtc ggcggaagtg tatcagcagc ggcataagct 8580

gcgtaaagga agctaagcgg aggtcagcat gccgttaata gccgggattg atatcggcaa 8640

cgccaccacc gaggtggcgc tggcgtccga ctacccgcag gcgagggcgt ttgttgccag 8700

cgggatcgtc gcgacgacgg gcatgaaagg gacgcgggac aatatcgccg ggaccctcgc 8760

cgcgctggag caggccctgg cgaaaacacc gtggtcgatg agcgatgtct ctcgcatcta 8820

tcttaacgaa gccgcgccgg tgattggcga tgtggcgatg gagaccatca ccgagaccat 8880

tatcaccgaa tcgaccatga tcggtcataa cccgcagacg ccgggcgggg tgggcgttgg 8940

cgtggggacg actatcgccc tcgggcggct ggcgacgctg ccggcggcgc agtatgccga 9000

ggggtggatc gtactgattg acgacgccgt cgatttcctt gacgccgtgt ggtggctcaa 9060

tgaggcgctc gaccgggggа tcaacgtggt ggcggcgatc ctcaaaaagg acgacggcgt 9120

gctggtgaac aaccgcctgc gtaaaaccct gccggtggtg gatgaagtga cgctgctgga 9180

gcaggtcccc gagggggtaa tggcggcggt ggaagtggcc gcgccgggcc aggtggtgcg 9240

gatcctgtcg aatccctacg ggatcgccac cttcttcggg ctaagcccgg aagagaccca 9300

ggccatcgtc cccatcgccc gcgccctgat tggcaaccgt tccgcggtgg tgctcaagac 9360

cccgcagggg gatgtgcagt cgcgggtgat cccggcgggc aacctctaca ttagcggcga 9420

aaagcgccgc ggagaggccg atgtcgccga gggcgcggaa gccatcatgc aggcgatgag 9480

cgcctgcgct ccggtacgcg acatccgcgg cgaaccgggc acccacgccg gcggcatgct 9540

tgagcgggtg cgcaaggtaa tggcgtccct gaccggccat gagatgagcg cgatatacat 9600

ccaggatctg ctggcggtgg atacgtttat tccgcgcaag gtgcagggcg ggatggccgg 9660

cgagtgcgcc atggagaatg ccgtcgggat ggcggcgatg gtgaaagcgg atcgtctgca 9720

aatgcaggtt atcgcccgcg aactgagcgc ccgactgcag accgaggtgg tggtgggcgg 9780

cgtggaggcc aacatggcca tcgccggggc gttaaccact cccggctgtg cggcgccgct 9840

ggcgatcctc gacctcggcg ccggctcgac ggatgcggcg atcgtcaacg cggaggggca 9900

gataacggcg gtccatctcg ccggggcggg gaatatggtc agcctgttga ttaaaaccga 9960

gctgggcctc gaggatcttt cgctggcgga agcgataaaa aaatacccgc tggccaaagt 10020

ggaaagcctg ttcagtattc gtcacgagaa tggcgcggtg gagttctttc gggaagccct 10080

cagcccggcg gtgttcgcca aagtggtgta catcaaggag ggcgaactgg tgccgatcga 10140

taacgccagc ccgctggaaa aaattcgtct cgtgcgccgg caggcgaaag agaaagtgtt 10200

tgtcaccaac tgcctgcgcg cgctgcgcca ggtctcaccc ggcggttcca ttcgcgatat 10260

cgcctttgtg gtgctggtgg gcggctcatc gctggacttt gagatcccgc agcttatcac 10320

ggaagccttg tcgcactatg gcgtggtcgc cgggcagggc aatattcggg gaacagaagg 10380

gccgcgcaat gcggtcgcca ccgggctgct actggccggt caggcgaatt aaacgggcgc 10440

tcgcgccagc ctctaggtac aaataaaaaa ggcacgtcag atgacgtgcc ttttttcttg 10500

tctagcgtgc accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg 10560

caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg 10620

ttttttgcgc cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt 10680

aatcatccgg ctcgtataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 10740

agaccatgac tagtaaggag gacaattcca tggctgctgc tgctgataga ttaaacttaa 10800

cttccggcca cttgaatgct ggtagaaaga gaagttcctc ttctgtttct ttgaaggctg 10860

ccgaaaagcc tttcaaggtt actgtgattg gatctggtaa ctggggtact actattgcca 10920

aggtggttgc cgaaaattgt aagggatacc cagaagtttt cgctccaata gtacaaatgt 10980

gggtgttcga agaagagatc aatggtgaaa aattgactga aatcataaat actagacatc 11040

aaaacgtgaa atacttgcct ggcatcactc tacccgacaa tttggttgct aatccagact 11100

tgattgattc agtcaaggat gtcgacatca tcgttttcaa cattccacat caatttttgc 11160

cccgtatctg tagccaattg aaaggtcatg ttgattcaca cgtcagagct atctcctgtc 11220

taaagggttt tgaagttggt gctaaaggtg tccaattgct atcctcttac atcactgagg 11280

aactaggtat tcaatgtggt gctctatctg gtgctaacat tgccaccgaa gtcgctcaag 11340

aacactggtc tgaaacaaca gttgcttacc acattccaaa ggatttcaga ggcgagggca 11400

aggacgtcga ccataaggtt ctaaaggcct tgttccacag accttacttc cacgttagtg 11460

tcatcgaaga tgttgctggt atctccatct gtggtgcttt gaagaacgtt gttgccttag 11520

gttgtggttt cgtcgaaggt ctaggctggg gtaacaacgc ttctgctgcc atccaaagag 11580

tcggtttggg tgagatcatc agattcggtc aaatgttttt cccagaatct agagaagaaa 11640

catactacca agagtctgct ggtgttgctg atttgatcac cacctgcgct ggtggtagaa 11700

acgtcaaggt tgctaggcta atggctactt ctggtaagga cgcctgggaa tgtgaaaagg 11760

agttgttgaa tggccaatcc gctcaaggtt taattacctg caaagaagtt cacgaatggt 11820

tggaaacatg tggctctgtc gaagacttcc cattatttga agccgtatac caaatcgttt 11880

acaacaacta cccaatgaag aacctgccgg acatgattga agaattagat ctacatgaag 11940

attagattta ttggatccag gaaacagact agaattatgg gattgactac taaacctcta 12000

tctttgaaag ttaacgccgc tttgttcgac gtcgacggta ccattatcat ctctcaacca 12060

gccattgctg cattctggag ggatttcggt aaggacaaac cttatttcga tgctgaacac 12120

gttatccaag tctcgcatgg ttggagaacg tttgatgcca ttgctaagtt cgctccagac 12180

tttgccaatg aagagtatgt taacaaatta gaagctgaaa ttccggtcaa gtacggtgaa 12240

aaatccattg aagtcccagg tgcagttaag ctgtgcaacg ctttgaacgc tctaccaaaa 12300

gagaaatggg ctgtggcaac ttccggtacc cgtgatatgg cacaaaaatg gttcgagcat 12360

ctgggaatca ggagaccaaa gtacttcatt accgctaatg atgtcaaaca gggtaagcct 12420

catccagaac catatctgaa gggcaggaat ggcttaggat atccgatcaa tgagcaagac 12480

ccttccaaat ctaaggtagt agtatttgaa gacgctccag caggtattgc cgccggaaaa 12540

gccgccggtt gtaagatcat tggtattgcc actactttcg acttggactt cctaaaggaa 12600

aaaggctgtg acatcattgt caaaaaccac gaatccatca gagttggcgg ctacaatgcc 12660

gaaacagacg aagttgaatt catttttgac gactacttat atgctaagga cgatctgttg 12720

aaatggtaac ccgggctgca ggcatgcaag cttggctgtt ttggcggatg agagaagatt 12780

ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct 12840

ggcggcagta gcgcggtggt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt 12900

agcgccgatg gtagtgtggg gtctccccat gcgagagtag ggaactgcca ggcatcaaat 12960

aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa 13020

cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg agcggatttg aacgttgcga agcaacggcc 13080

cggagggtgg cgggcaggac gcccgccata aactgccagg catcaaatta agcagaaggc 13140

catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaactcca gctggatcgg gcgctagagt 13200

atacatttaa atggtaccct ctagtcaagg ccttaagtga gtcgtattac ggactggccg 13260

tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag 13320

cacatccccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc 13380

aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 13440

tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat 13500

agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacga gct 13543

<210> 74

<211> 13402

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 74

tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60

taacaagaaa aagccagcct ttcatgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120

acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180

ttagtgcatc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt 240

gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct 300

tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360

gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct ccattgccca gtcggcagcg 420

acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc 480

actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca 540

tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga 600

cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg 660

atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc 720

agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact 780

tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttccaa aaggtcgttg 840

atcaaagctc gccgcgttgt ttcatcaagc cttacggtca ccgtaaccag caaatcaata 900

tcactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac ggccagcaac 960

gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg 1020

gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta 1080

acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgacccacgg cgtaacgcgc ttgctgcttg 1140

gatgcccgag gcatagactg taccccaaaa aaacagtcat aacaagccat gaaaaccgcc 1200

actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcg tgagcgcata 1260

cgctacttgc attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcgtgccttc 1320

atccgtttcc acggtgtgcg tcacccggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt 1380

ctgtcctggc tggcgaacga gcgcaaggtt tcggtctcca cgcatcgtca ggcattggcg 1440

gccttgctgt tcttctacgg caaggtgctg tgcacggatc tgccctggct tcaggagatc 1500

ggaagacctc ggccgtcgcg gcgcttgccg gtggtgctga ccccggatga agtggttcgc 1560

atcctcggtt ttctggaagg cgagcatcgt ttgttcgccc agcttctgta tggaacgggc 1620

atgcggatca gtgagggttt gcaactgcgg gtcaaggatc tggatttcga tcacggcacg 1680

atcatcgtgc gggagggcaa gggctccaag gatcgggcct tgatgttacc cgagagcttg 1740

gcacccagcc tgcgcgagca ggggaattaa ttcccacggg ttttgctgcc cgcaaacggg 1800

ctgttctggt gttgctagtt tgttatcaga atcgcagatc cggcttcagc cggtttgccg 1860

gctgaaagcg ctatttcttc cagaattgcc atgatttttt ccccacggga ggcgtcactg 1920

gctcccgtgt tgtcggcagc tttgattcga taagcagcat cgcctgtttc aggctgtcta 1980

tgtgtgactg ttgagctgta acaagttgtc tcaggtgttc aatttcatgt tctagttgct 2040

ttgttttact ggtttcacct gttctattag gtgttacatg ctgttcatct gttacattgt 2100

cgatctgttc atggtgaaca gctttgaatg caccaaaaac tcgtaaaagc tctgatgtat 2160

ctatcttttt tacaccgttt tcatctgtgc atatggacag ttttcccttt gatatgtaac 2220

ggtgaacagt tgttctactt ttgtttgtta gtcttgatgc ttcactgata gatacaagag 2280

ccataagaac ctcagatcct tccgtattta gccagtatgt tctctagtgt ggttcgttgt 2340

ttttgcgtga gccatgagaa cgaaccattg agatcatact tactttgcat gtcactcaaa 2400

aattttgcct caaaactggt gagctgaatt tttgcagtta aagcatcgtg tagtgttttt 2460

cttagtccgt tatgtaggta ggaatctgat gtaatggttg ttggtatttt gtcaccattc 2520

atttttatct ggttgttctc aagttcggtt acgagatcca tttgtctatc tagttcaact 2580

tggaaaatca acgtatcagt cgggcggcct cgcttatcaa ccaccaattt catattgctg 2640

taagtgttta aatctttact tattggtttc aaaacccatt ggttaagcct tttaaactca 2700

tggtagttat tttcaagcat taacatgaac ttaaattcat caaggctaat ctctatattt 2760

gccttgtgag ttttcttttg tgttagttct tttaataacc actcataaat cctcatagag 2820

tatttgtttt caaaagactt aacatgttcc agattatatt ttatgaattt ttttaactgg 2880

aaaagataag gcaatatctc ttcactaaaa actaattcta atttttcgct tgagaacttg 2940

gcatagtttg tccactggaa aatctcaaag cctttaacca aaggattcct gatttccaca 3000

gttctcgtca tcagctctct ggttgcttta gctaatacac cataagcatt ttccctactg 3060

atgttcatca tctgagcgta ttggttataa gtgaacgata ccgtccgttc tttccttgta 3120

gggttttcaa tcgtggggtt gagtagtgcc acacagcata aaattagctt ggtttcatgc 3180

tccgttaagt catagcgact aatcgctagt tcatttgctt tgaaaacaac taattcagac 3240

atacatctca attggtctag gtgattttaa tcactatacc aattgagatg ggctagtcaa 3300

tgataattac tagtcctttt cctttgagtt gtgggtatct gtaaattctg ctagaccttt 3360

gctggaaaac ttgtaaattc tgctagaccc tctgtaaatt ccgctagacc tttgtgtgtt 3420

ttttttgttt atattcaagt ggttataatt tatagaataa agaaagaata aaaaaagata 3480

aaaagaatag atcccagccc tgtgtataac tcactacttt agtcagttcc gcagtattac 3540

aaaaggatgt cgcaaacgct gtttgctcct ctacaaaaca gaccttaaaa ccctaaaggc 3600

ttaagtagca ccctcgcaag ctcgggcaaa tcgctgaata ttccttttgt ctccgaccat 3660

caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc gctgcgctca cggctctggc 3720

agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg ccttttatgg attcatgcaa ggaaactacc 3780

cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcagggcgt tttatggcgg gtctgctatg 3840

tggtgctatc tgactttttg ctgttcagca gttcctgccc tctgattttc cagtctgacc 3900

acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa tgcacccagt aaggcagcgg 3960

tatcatcaac aggcttaccc gtcttactgt cgggaattca tttaaatagt caaaagcctc 4020

cgaccggagg cttttgactg ctaggcgatc tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag 4080

cgcgagatta tgggctcgca cgctcgactg tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag 4140

gcgagccgtc acgcccttga caatgccaca tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa 4200

atcaaccgcg tttcccggag gtaaccaagc ttgcgggaga gaatgatgaa caagagccaa 4260

caagttcaga caatcaccct ggccgccgcc cagcaaatgg cggcggcggt ggaaaaaaaa 4320

gccactgaga tcaacgtggc ggtggtgttt tccgtagttg accgcggagg caacacgctg 4380

cttatccagc ggatggacga ggccttcgtc tccagctgcg atatttccct gaataaagcc 4440

tggagcgcct gcagcctgaa gcaaggtacc catgaaatta cgtcagcggt ccagccagga 4500

caatctctgt acggtctgca gctaaccaac caacagcgaa ttattatttt tggcggcggc 4560

ctgccagtta tttttaatga gcaggtaatt ggcgccgtcg gcgttagcgg cggtacggtc 4620

gagcaggatc aattattagc ccagtgcgcc ctggattgtt tttccgcatt ataacctgaa 4680

gcgagaaggt atattatgag ctatcgtatg ttccgccagg cattctgagt gttaacgagg 4740

ggaccgtcat gtcgctttca ccgccaggcg tacgcctgtt ttacgatccg cgcgggcacc 4800

atgccggcgc catcaatgag ctgtgctggg ggctggagga gcagggggtc ccctgccaga 4860

ccataaccta tgacggaggc ggtgacgccg ctgcgctggg cgccctggcg gccagaagct 4920

cgcccctgcg ggtgggtatc gggctcagcg cgtccggcga gatagccctc actcatgccc 4980

agctgccggc ggacgcgccg ctggctaccg gacacgtcac cgatagcgac gatcaactgc 5040

gtacgctcgg cgccaacgcc gggcagctgg ttaaagtcct gccgttaagt gagagaaact 5100

gaatgtatcg tatctatacc cgcaccgggg ataaaggcac caccgccctg tacggcggca 5160

gccgcatcga gaaagaccat attcgcgtcg aggcctacgg caccgtcgat gaactgatat 5220

cccagctggg cgtctgctac gccacgaccc gcgacgccgg gctgcgggaa agcctgcacc 5280

atattcagca gacgctgttc gtgctggggg ctgaactggc cagcgatgcg cggggcctga 5340

cccgcctgag ccagacgatc ggcgaagagg agatcaccgc cctggagcgg cttatcgacc 5400

gcaatatggc cgagagcggc ccgttaaaac agttcgtgat cccggggagg aatctcgcct 5460

ctgcccagct gcaccctgat gcttgcgctt gaactggcct agcaaacaca gaaaaaagcc 5520

cgcacctgac agtgcgggct ttttttttcc taggcgatct gtgctgtttg ccacggtatg 5580

cagcaccagc gcgagattat gggctcgcac gctcgactgt cggacggggg cactggaacg 5640

agaagtcagg cgagccgtca cgcccttgac aatgccacat cctgagcaaa taattcaacc 5700

actaaacaaa tcaaccgcgt ttcccggagg taaccaagct tcacctttg agccgatgaa 5760

caatgaaaag atcaaaacga tttgcagtac tggcccagcg ccccgtcaat caggacgggc 5820

tgattggcga gtggcctgaa gaggggctga tcgccatgga cagccccttt gacccggtct 5880

cttcagtaaa agtggacaac ggtctgatcg tcgaactgga cggcaaacgc cgggaccagt 5940

ttgacatgat cgaccgattt atcgccgatt acgcgatcaa cgttgagcgc acagagcagg 6000

caatgcgcct ggaggcggtg gaaatagccc gtatgctggt ggatattcac gtcagccggg 6060

aggagatcat tgccatcact accgccatca cgccggccaa agcggtcgag gtgatggcgc 6120

agatgaacgt ggtggagatg atgatggcgc tgcagaagat gcgtgcccgc cggacccccc 6180

ccaaccagtg ccacgtcacc aatctcaaag ataatccggt gcagattgcc gctgacgccg 6240

ccgaggccgg gatccgcggc ttctcagaac aggagaccac ggtcggtatc gcgcgctacg 6300

cgccgtttaa cgccctggcg ctgttggtcg gttcgcagtg cggccgcccc ggcgtgttga 6360

cgcagtgctc ggtggaagag gccaccgagc tggagctggg catgcgtggc ttaaccagct 6420

acgccgagac ggtgtcggtc tacggcaccg aagcggtatt taccgacggc gatgatacgc 6480

cgtggtcaaa ggcgttcctc gcctcggcct acgcctcccg cgggttgaaa atgcgctaca 6540

cctccggcac cggatccgaa gcgctgatgg gctattcgga gagcaagtcg atgctctacc 6600

tcgaatcgcg ctgcatcttc attactaaag gcgccggggt tcagggactg caaaacggcg 6660

cggtgagctg tatcggcatg accggcgctg tgccgtcggg cattcgggcg gtgctggcgg 6720

aaaacctgat cgcctctatg ctcgacctcg aagtggcgtc cgccaacgac cagactttct 6780

cccactcgga tattcgccgc accgcgcgca ccctgatgca gatgctgccg ggcaccgact 6840

ttatttttctc cggctacagc gcggtgccga actacgacaa catgttcgcc ggctcgaact 6900

tcgatgcgga agattttgat gattacaaca tcctgcagcg tgacctgatg gttgacggcg 6960

gcctgcgtcc ggtgaccgag gcggaaacca ttgccattcg ccagaaagcg gcgcgggcga 7020

tccaggcggt tttccgcgag ctggggctgc cgccaatcgc cgacgaggag gtggaggccg 7080

ccacctacgc gcacggcagc aacgagatgc cgccgcgtaa cgtggtggag gatctgagtg 7140

cggtggaaga gatgatgaag cgcaacatca ccggcctcga tattgtcggc gcgctgagcc 7200

gcagcggctt tgaggatatc gccagcaata ttctcaatat gctgcgccag cgggtcaccg 7260

gcgattacct gcagacctcg gccattctcg atcggcagtt cgaggtggtg agtgcggtca 7320

acgacatcaa tgactatcag gggccgggca ccggctatcg catctctgcc gaacgctggg 7380

cggagatcaa aaatattccg ggcgtggttc agcccgacac cattgaataa ggcggtattc 7440

ctgtgcaaca gacaacccaa attcagccct cttttaccct gaaaacccgc gagggcgggg 7500

tagcttctgc cgatgaacgc gccgatgaag tggtgatcgg cgtcggccct gccttcgata 7560

aacaccagca tcacactctg atcgatatgc cccatggcgc gatcctcaaa gagctgattg 7620

ccggggtgga agaagagggg cttcacgccc gggtggtgcg cattctgcgc acgtccgacg 7680

tctcctttat ggcctgggat gcggccaacc tgagcggctc ggggatcggc atcggtatcc 7740

agtcgaaggg gaccacggtc atccatcagc gcgatctgct gccgctcagc aacctggagc 7800

tgttctccca ggcgccgctg ctgacgctgg agacctaccg gcagattggc aaaaacgctg 7860

cgcgctatgc gcgcaaagag tcaccttcgc cggtgccggt ggtgaacgat cagatggtgc 7920

ggccgaaatt tatggccaaa gccgcgctat ttcatatcaa agagaccaaa catgtggtgc 7980

aggacgccga gcccgtcacc ctgcacatcg acttagtaag ggagtgacca tgagcgagaa 8040

aaccatgcgc gtgcaggatt atccgttagc cacccgctgc ccggagcata tcctgacgcc 8100

taccggcaaa ccattgaccg atattaccct cgagaaggtg ctctctggcg aggtgggccc 8160

gcaggatgtg cggatctccc gccagaccct tgagtaccag gcgcagattg ccgagcagat 8220

gcagcgccat gcggtggcgc gcaatttccg ccgcgcggcg gagcttatcg ccattcctga 8280

cgagcgcatt ctggctatct ataacgcgct gcgcccgttc cgctcctcgc aggcggagct 8340

gctggcgatc gccgacgagc tggagcacac ctggcatgcg acagtgaatg ccgcctttgt 8400

ccgggagtcg gcggaagtgt atcagcagcg gcataagctg cgtaaaggaa gctaagcgga 8460

ggtcagcatg ccgttaatag ccgggattga tatcggcaac gccaccaccg aggtggcgct 8520

ggcgtccgac tacccgcagg cgagggcgtt tgttgccagc gggatcgtcg cgacgacggg 8580

catgaaaggg acgcgggaca atatcgccgg gaccctcgcc gcgctggagc aggccctggc 8640

gaaaacaccg tggtcgatga gcgatgtctc tcgcatctat cttaacgaag ccgcgccggt 8700

gattggcgat gtggcgatgg agaccatcac cgagaccatt atcaccgaat cgaccatgat 8760

cggtcataac ccgcagacgc cgggcggggt gggcgttggc gtggggacga ctatcgccct 8820

cgggcggctg gcgacgctgc cggcggcgca gtatgccgag gggtggatcg tactgattga 8880

cgacgccgtc gatttccttg acgccgtgtg gtggctcaat gaggcgctcg accgggggat 8940

caacgtggtg gcggcgatcc tcaaaaagga cgacggcgtg ctggtgaaca accgcctgcg 9000

taaaaccctg ccggtggtgg atgaagtgac gctgctggag caggtccccg agggggtaat 9060

ggcggcggtg gaagtggccg cgccgggcca ggtggtgcgg atcctgtcga atccctacgg 9120

gatcgccacc ttcttcgggc taagcccgga agagacccag gccatcgtcc ccatcgcccg 9180

cgccctgatt ggcaaccgtt ccgcggtggt gctcaagacc ccgcaggggg atgtgcagtc 9240

gcgggtgatc ccggcgggca acctctacat tagcggcgaa aagcgccgcg gagaggccga 9300

tgtcgccgag ggcgcggaag ccatcatgca ggcgatgagc gcctgcgctc cggtacgcga 9360

catccgcggc gaaccgggca cccacgccgg cggcatgctt gagcgggtgc gcaaggtaat 9420

ggcgtccctg accggccatg agatgagcgc gatatacatc caggatctgc tggcggtgga 9480

tacgtttatt ccgcgcaagg tgcagggcgg gatggccggc gagtgcgcca tggagaatgc 9540

cgtcgggatg gcggcgatgg tgaaagcgga tcgtctgcaa atgcaggtta tcgcccgcga 9600

actgagcgcc cgactgcaga ccgaggtggt ggtgggcggc gtggaggcca acatggccat 9660

cgccggggcg ttaaccactc ccggctgtgc ggcgccgctg gcgatcctcg acctcggcgc 9720

cggctcgacg gatgcggcga tcgtcaacgc ggaggggcag ataacggcgg tccatctcgc 9780

cggggcgggg aatatggtca gcctgttgat taaaaccgag ctgggcctcg aggatctttc 9840

gctggcggaa gcgataaaaa aatacccgct ggccaaagtg gaaagcctgt tcagtattcg 9900

tcacgagaat ggcgcggtgg agttctttcg ggaagccctc agcccggcgg tgttcgccaa 9960

agtggtgtac atcaaggagg gcgaactggt gccgatcgat aacgccagcc cgctggaaaa 10020

aattcgtctc gtgcgccggc aggcgaaaga gaaagtgttt gtcaccaact gcctgcgcgc 10080

gctgcgccag gtctcacccg gcggttccat tcgcgatatc gcctttgtgg tgctggtggg 10140

cggctcatcg ctggactttg agatcccgca gcttatcacg gaagccttgt cgcactatgg 10200

cgtggtcgcc gggcagggca atattcgggg aacagaaggg ccgcgcaatg cggtcgccac 10260

cgggctgcta ctggccggtc aggcgaatta aacgggcgct cgcgccagcc tctaggtaca 10320

aataaaaaag gcacgtcaga tgacgtgcct tttttcttgt ctagcgtgca ccaatgcttc 10380

tggcgtcagg cagccatcgg aagctgtggt atggctgtgc aggtcgtaaa tcactgcata 10440

attcgtgtcg ctcaaggcgc actcccgttc tggataatgt tttttgcgcc gacatcataa 10500

cggttctggc aaatattctg aaatgagctg ttgacaatta atcatccggc tcgtataatg 10560

tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gaccatgact agtaaggagg 10620

acaattccat ggctgctgct gctgatagat taaacttaac ttccggccac ttgaatgctg 10680

gtagaaagag aagttcctct tctgtttctt tgaaggctgc cgaaaagcct ttcaaggtta 10740

ctgtgattgg atctggtaac tggggtacta ctattgccaa ggtggttgcc gaaaattgta 10800

agggataccc agaagttttc gctccaatag tacaaatgtg ggtgttcgaa gaagagatca 10860

atggtgaaaa attgactgaa atcataaata ctagacatca aaacgtgaaa tacttgcctg 10920

gcatcactct acccgacaat ttggttgcta atccagactt gattgattca gtcaaggatg 10980

tcgacatcat cgttttcaac attccacatc aatttttgcc ccgtatctgt agccaattga 11040

aaggtcatgt tgattcacac gtcagagcta tctcctgtct aaagggtttt gaagttggtg 11100

ctaaaggtgt ccaattgcta tcctcttaca tcactgagga actaggtatt caatgtggtg 11160

ctctatctgg tgctaacatt gccaccgaag tcgctcaaga acactggtct gaaacaacag 11220

ttgcttacca cattccaaag gatttcagag gcgagggcaa ggacgtcgac cataaggttc 11280

taaaggcctt gttccacaga ccttacttcc acgttagtgt catcgaagat gttgctggta 11340

tctccatctg tggtgctttg aagaacgttg ttgccttagg ttgtggtttc gtcgaaggtc 11400

taggctgggg taacaacgct tctgctgcca tccaaagagt cggtttgggt gagatcatca 11460

gattcggtca aatgtttttc ccagaatcta gagaagaaac atactaccaa gagtctgctg 11520

gtgttgctga tttgatcacc acctgcgctg gtggtagaaa cgtcaaggtt gctaggctaa 11580

tggctacttc tggtaaggac gcctgggaat gtgaaaagga gttgttgaat ggccaatccg 11640

ctcaaggttt aattacctgc aaagaagttc acgaatggtt ggaaacatgt ggctctgtcg 11700

aagacttccc attatttgaa gccgtatacc aaatcgttta caacaactac ccaatgaaga 11760

acctgccgga catgattgaa gaattagatc tacatgaaga ttagatttat tggatccagg 11820

aaacagacta gaattatggg attgactact aaacctctat ctttgaaagt taacgccgct 11880

ttgttcgacg tcgacggtac cattatcatc tctcaaccag ccattgctgc attctggagg 11940

gatttcggta aggacaaacc ttatttcgat gctgaacacg ttatccaagt ctcgcatggt 12000

tggagaacgt ttgatgccat tgctaagttc gctccagact ttgccaatga agagtatgtt 12060

aacaaattag aagctgaaat tccggtcaag tacggtgaaa aatccattga agtcccaggt 12120

gcagttaagc tgtgcaacgc tttgaacgct ctaccaaaag agaaatgggc tgtggcaact 12180

tccggtaccc gtgatatggc acaaaaatgg ttcgagcatc tgggaatcag gagaccaaag 12240

tacttcatta ccgctaatga tgtcaaacag ggtaagcctc atccagaacc atatctgaag 12300

ggcaggaatg gcttaggata tccgatcaat gagcaagacc cttccaaatc taaggtagta 12360

gtatttgaag acgctccagc aggtattgcc gccggaaaag ccgccggttg taagatcatt 12420

ggtattgcca ctactttcga cttggacttc ctaaaggaaa aaggctgtga catcattgtc 12480

aaaaaccacg aatccatcag agttggcggc tacaatgccg aaacagacga agttgaattc 12540

atttttgacg actacttata tgctaaggac gatctgttga aatggtaacc cgggctgcag 12600

gcatgcaagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt tcagcctgat acagattaaa 12660

tcagaacgca gaagcggtct gataaaacag aatttgcctg gcggcagtag cgcggtggtc 12720

ccacctgacc ccatgccgaa ctcagaagtg aaacgccgta gcgccgatgg tagtgtgggg 12780

tctccccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata aaacgaaagg ctcagtcgaa 12840

agactgggcc tttcgtttta tctgttgttt gtcggtgaac gctctcctga gtaggacaaa 12900

tccgccggga gcggatttga acgttgcgaa gcaacggccc ggagggtggc gggcaggacg 12960

cccgccataa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc atcctgacgg atggcctttt 13020

tgcgtttcta caaactccag ctggatcggg cgctagagta tacatttaaa tggtaccctc 13080

tagtcaaggc cttaagtgag tcgtattacg gactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact 13140

gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccc ttcgccagct 13200

ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 13260

gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 13320

tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag ccccgacacc 13380

cgccaacacc cgctgacgag ct 13402

<210> 75

<211> 110

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 75
gcagtacaaa tgttacgggg taccggcgcg ccgctagctt aattaacgga ccgatgcatg 60

agctcacgcg taccggtgct cttcgatcta cgtaagaagg ccttcctatc 110

<210> 76

<211> 110

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 76
gataggaagg ccttcttacg tagatcgaag agcaccggta cgcgtgagct catgcatcgg 60

tccgttaatt aagctagcgg cgcgccggta ccccgtaaca tttgtactgc 110

<210> 77

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 片段

<400> 77
cggcgcgccg ctagcttaat taacggaccg atgcatgagc tcacgcgtac cggtgctctt 60

cgatctacgt aagaagg 77

<210> 78

<211> 13611

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 78
aagtgagtcg tattacggac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 60

cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga 120

agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcct 180

gatgcggtat tttctcctta cgcatctgtg cggtatttca caccgcatat ggtgcactct 240

cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc 300

tgacgagctt agtaaagccc tcgctagatt ttaatgcgga tgttgcgatt acttcgccaa 360

ctattgcgat aacaagaaaa agccagcctt tcatgatata tctcccaatt tgtgtagggc 420

ttattatgca cgcttaaaaa taataaaagc agacttgacc tgatagtttg gctgtgagca 480

attatgtgct tagtgcatct aacgcttgag ttaagccgcg ccgcgaagcg gcgtcggctt 540

gaacgaattg ttagacatta tttgccgact accttggtga tctcgccttt cacgtagtgg 600

acaaattctt ccaactgatc tgcgcgcgag gccaagcgat cttcttcttg tccaagataa 660

gcctgtctag cttcaagtat gacgggctga tactgggccg gcaggcgctc cattgcccag 720

tcggcagcga catccttcgg cgcgattttg ccggttactg cgctgtacca aatgcgggac 780

aacgtaagca ctacatttcg ctcatcgcca gcccagtcgg gcggcgagtt ccatagcgtt 840

aaggtttcat ttagcgcctc aaatagatcc tgttcaggaa ccggatcaaa gagttcctcc 900

gccgctggac ctaccaaggc aacgctatgt tctcttgctt ttgtcagcaa gatagccaga 960

tcaatgtcga tcgtggctgg ctcgaagata cctgcaagaa tgtcattgcg ctgccattct 1020

ccaaattgca gttcgcgctt agctggataa cgccacggaa tgatgtcgtc gtgcacaaca 1080

atggtgactt ctacagcgcg gagaatctcg ctctctccag gggaagccga agtttccaaa 1140

aggtcgttga tcaaagctcg ccgcgttgtt tcatcaagcc ttacggtcac cgtaaccagc 1200

aaatcaatat cactgtgtgg cttcaggccg ccatccactg cggagccgta caaatgtacg 1260

gccagcaacg tcggttcgag atggcgctcg atgacgccaa ctacctctga tagttgagtc 1320

gatacttcgg cgatcaccgc ttccctcatg atgtttaact ttgttttagg gcgactgccc 1380

tgctgcgtaa catcgttgct gctccataac atcaaacatc gacccacggc gtaacgcgct 1440

tgctgcttgg atgcccgagg catagactgt accccaaaaa aacagtcata acaagccatg 1500

aaaaccgcca ctgcgccgtt accaccgctg cgttcggtca aggttctgga ccagttgcgt 1560

gagcgcatac gctacttgca ttacagctta cgaaccgaac aggcttatgt ccactgggtt 1620

cgtgccttca tccgtttcca cggtgtgcgt cacccggcaa ccttgggcag cagcgaagtc 1680

gaggcatttc tgtcctggct ggcgaacgag cgcaaggttt cggtctccac gcatcgtcag 1740

gcattggcgg ccttgctgtt cttctacggc aaggtgctgt gcacggatct gccctggctt 1800

caggagatcg gaagacctcg gccgtcgcgg cgcttgccgg tggtgctgac cccggatgaa 1860

gtggttcgca tcctcggttt tctggaaggc gagcatcgtt tgttcgccca gcttctgtat 1920

ggaacgggca tgcggatcag tgagggtttg caactgcggg tcaaggatct ggatttcgat 1980

cacggcacga tcatcgtgcg ggagggcaag ggctccaagg atcgggcctt gatgttaccc 2040

gagagcttgg cacccagcct gcgcgagcag gggaattaat tcccacgggt tttgctgccc 2100

gcaaacgggc tgttctggtg ttgctagttt gttatcagaa tcgcagatcc ggcttcagcc 2160

ggtttgccgg ctgaaagcgc tatttcttcc agaattgcca tgatttttc cccacgggag 2220

gcgtcactgg ctcccgtgtt gtcggcagct ttgattcgat aagcagcatc gcctgtttca 2280

ggctgtctat gtgtgactgt tgagctgtaa caagttgtct caggtgttca atttcatgtt 2340

ctagttgctt tgttttactg gtttcacctg ttctattagg tgttacatgc tgttcatctg 2400

ttacattgtc gatctgttca tggtgaacag ctttgaatgc accaaaaact cgtaaaagct 2460

ctgatgtatc tatctttttt acaccgtttt catctgtgca tatggacagt tttccctttg 2520

atatgtaacg gtgaacagtt gttctacttt tgtttgttag tcttgatgct tcactgatag 2580

atacaagagc cataagaacc tcagatcctt ccgtatttag ccagtatgtt ctctagtgtg 2640

gttcgttgtt tttgcgtgag ccatgagaac gaaccattga gatcatactt actttgcatg 2700

tcactcaaaa attttgcctc aaaactggtg agctgaattt ttgcagttaa agcatcgtgt 2760

agtgtttttc ttagtccgtt atgtaggtag gaatctgatg taatggttgt tggtattttg 2820

tcaccattca tttttatctg gttgttctca agttcggtta cgagatccat ttgtctatct 2880

agttcaactt ggaaaatcaa cgtatcagtc gggcggcctc gcttatcaac caccaatttc 2940

atattgctgt aagtgtttaa atctttactt attggtttca aaacccattg gttaagcctt 3000

ttaaactcat ggtagttatt ttcaagcatt aacatgaact taaattcatc aaggctaatc 3060

tctatatttg ccttgtgagt tttcttttgt gttagttctt ttaataacca ctcataaatc 3120

ctcatagagt atttgttttc aaaagactta acatgttcca gattatattt tatgaatttt 3180

tttaactgga aaagataagg caatatctct tcactaaaaa ctaattctaa tttttcgctt 3240

gagaacttgg catagtttgt ccactggaaa atctcaaagc ctttaaccaa aggattcctg 3300

atttccacag ttctcgtcat cagctctctg gttgctttag ctaatacacc ataagcattt 3360

tccctactga tgttcatcat ctgagcgtat tggttataag tgaacgatac cgtccgttct 3420

ttccttgtag ggttttcaat cgtggggttg agtagtgcca cacagcataa aattagcttg 3480

gtttcatgct ccgttaagtc atagcgacta atcgctagtt catttgcttt gaaaacaact 3540

aattcagaca tacatctcaa ttggtctagg tgattttaat cactatacca attgagatgg 3600

gctagtcaat gataattact agctagtcct tttcctttga gttgtgggta tctgtaaatt 3660

ctgctagacc tttgctggaa aacttgtaaa ttctgctaga ccctctgtaa attccgctag 3720

acctttgtgt gttttttttg tttatattca agtggttata atttatagaa taaagaaaga 3780

ataaaaaaag ataaaaagaa tagatcccag ccctgtgtat aactcactac tttagtcagt 3840

tccgcagtat tacaaaagga tgtcgcaaac gctgtttgct cctctacaaa acagacctta 3900

aaaccctaaa ggcttaagta gcaccctcgc aagctcgggc aaatcgctga atattccttt 3960

tgtctccgac catcaggcac ctgagtcgct gtctttttcg tgacattcag ttcgctgcgc 4020

tcacggctct ggcagtgaat gggggtaaat ggcactacag gcgcctttta tggattcatg 4080

caaggaaact acccataata caagaaaagc ccgtcacggg cttctcaggg cgttttatgg 4140

cgggtctgct atgtggtgct atctgacttt ttgctgttca gcagttcctg ccctctgatt 4200

ttccagtctg accacttcgg attatcccgt gacaggtcat tcagactggc taatgcaccc 4260

agtaaggcag cggtatcatc aacaggctta cccgtcttac tgtcgggaat tcatttaaat 4320

agtcaaaagc ctccgaccgg aggcttttga ctgctaggcg atctgtgctg tttgccacgg 4380

tatgcagcac cagcgcgaga ttatgggctc gcacgctcga ctgtcggacg ggggcactgg 4440

aacgagaagt caggcgagcc gtcacgccct tgacaatgcc acatcctgag caaataattc 4500

aaccactaaa caaatcaacc gcgtttcccg gaggtaacca agcttgcggg agagaatgat 4560

gaacaagagc caacaagttc agacaatcac cctggccgcc gcccagcaaa tggcggcggc 4620

ggtggaaaaa aaagccactg agatcaacgt ggcggtggtg ttttccgtag ttgaccgcgg 4680

aggcaacacg ctgcttatcc agcggatgga cgaggccttc gtctccagct gcgatatttc 4740

cctgaataaa gcctggagcg cctgcagcct gaagcaaggt acccatgaaa ttacgtcagc 4800

ggtccagcca ggacaatctc tgtacggtct gcagctaacc aaccaacagc gaattattat 4860

ttttggcggc ggcctgccag ttatttttaa tgagcaggta attggcgccg tcggcgttag 4920

cggcggtacg gtcgagcagg atcaattatt agcccagtgc gccctggatt gtttttccgc 4980

attataacct gaagcgagaa ggtatattat gagctatcgt atgttccgcc aggcattctg 5040

agtgttaacg aggggaccgt catgtcgctt tcaccgccag gcgtacgcct gttttacgat 5100

ccgcgcgggc accatgccgg cgccatcaat gagctgtgct gggggctgga ggagcagggg 5160

gtcccctgcc agaccataac ctatgacgga ggcggtgacg ccgctgcgct gggcgccctg 5220

gcggccagaa gctcgccccc gcgggtgggt atcgggctca gcgcgtccgg cgagatagcc 5280

ctcactcatg cccagctgcc ggcggacgcg ccgctggcta ccggacacgt caccgatagc 5340

gacgatcaac tgcgtacgct cggcgccaac gccgggcagc tggttaaagt cctgccgtta 5400

agtgagagaa actgaatgta tcgtatctat acccgcaccg gggataaagg caccaccgcc 5460

ctgtacggcg gcagccgcat cgagaaagac catattcgcg tcgaggccta cggcaccgtc 5520

gatgaactga tatcccagct gggcgtctgc tacgccacga cccgcgacgc cgggctgcgg 5580

gaaagcctgc accatattca gcagacgctg ttcgtgctgg gggctgaact ggccagcgat 5640

gcgcgggggcc tgacccgcct gagccagacg atcggcgaag aggagatcac cgccctggag 5700

cggcttatcg accgcaatat ggccgagagc ggcccgttaa aacagttcgt gatcccgggg 5760

aggaatctcg cctctgccca gctgcacgtg gcgcgcaccc agtcccgtcg gctcgaacgc 5820

ctgctgacgg ccatggaccg cgcgcatccg ctgcgcgacg cgctcaaacg ctacagcaat 5880

cgcctgtcgg atgccctgtt ctccatggcg cgaatcgaag agactaggcc tgatgcttgc 5940

gcttgaactg gcctagcaaa cacagaaaaa agcccgcacc tgacagtgcg ggctttttt 6000

ttcctaggcg atctgtgctg tttgccacgg tatgcagcac cagcgcgaga ttatgggctc 6060

gcacgctcga ctgtcggacg ggggcactgg aacgagaagt caggcgagcc gtcacgccct 6120

tgacaatgcc acatcctgag caaataattc aaccactaaa caaatcaacc gcgtttcccg 6180

gaggtaacca agcttcacct tttgagccga tgaacaatga aaagatcaaa acgatttgca 6240

gtactggccc agcgccccgt caatcaggac gggctgattg gcgagtggcc tgaagagggg 6300

ctgatcgcca tggacagccc ctttgacccg gtctcttcag taaaagtgga caacggtctg 6360

atcgtcgaac tggacggcaa acgccgggac cagtttgaca tgatcgaccg atttatcgcc 6420

gattacgcga tcaacgttga gcgcacagag caggcaatgc gcctggaggc ggtggaaata 6480

gcccgtatgc tggtggatat tcacgtcagc cgggaggaga tcattgccat cactaccgcc 6540

atcacgccgg ccaaagcggt cgaggtgatg gcgcagatga acgtggtgga gatgatgatg 6600

gcgctgcaga agatgcgtgc ccgccggacc ccctccaacc agtgccacgt caccaatctc 6660

aaagataatc cggtgcagat tgccgctgac gccgccgagg ccgggatccg cggcttctca 6720

gaacaggaga ccacggtcgg tatcgcgcgc tacgcgccgt ttaacgccct ggcgctgttg 6780

gtcggttcgc agtgcggccg ccccggcgtg ttgacgcagt gctcggtgga agaggccacc 6840

gagctggagc tgggcatgcg tggcttaacc agctacgccg agacggtgtc ggtctacggc 6900

accgaagcgg tatttaccga cggcgatgat acgccgtggt caaaggcgtt cctcgcctcg 6960

gcctacgcct cccgcgggtt gaaaatgcgc tacacctccg gcaccggatc cgaagcgctg 7020

atgggctatt cggagagcaa gtcgatgctc tacctcgaat cgcgctgcat cttcattact 7080

aaaggcgccg gggttcaggg actgcaaaac ggcgcggtga gctgtatcgg catgaccggc 7140

gctgtgccgt cgggcattcg ggcggtgctg gcggaaaacc tgatcgcctc tatgctcgac 7200

ctcgaagtgg cgtccgccaa cgaccagact ttctcccact cggatattcg ccgcaccgcg 7260

cgcaccctga tgcagatgct gccgggcacc gactttattt tctccggcta cagcgcggtg 7320

ccgaactacg acaacatgtt cgccggctcg aacttcgatg cggaagattt tgatgattac 7380

aacatcctgc agcgtgacct gatggttgac ggcggcctgc gtccggtgac cgaggcggaa 7440

accattgcca ttcgccagaa agcggcgcgg gcgatccagg cggttttccg cgagctgggg 7500

ctgccgccaa tcgccgacga ggaggtggag gccgccacct acgcgcacgg cagcaacgag 7560

atgccgccgc gtaacgtggt ggaggatctg agtgcggtgg aagagatgat gaagcgcaac 7620

atcaccggcc tcgatattgt cggcgcgctg agccgcagcg gctttgagga tatcgccagc 7680

aatattctca atatgctgcg ccagcgggtc accggcgatt acctgcagac ctcggccatt 7740

ctcgatcggc agttcgaggt ggtgagtgcg gtcaacgaca tcaatgacta tcaggggccg 7800

ggcaccggct atcgcatctc tgccgaacgc tgggcggaga tcaaaaatat tccgggcgtg 7860

gttcagcccg acaccattga ataaggcggt attcctgtgc aacagacaac ccaaattcag 7920

ccctctttta ccctgaaaac ccgcgagggc ggggtagctt ctgccgatga acgcgccgat 7980

gaagtggtga tcggcgtcgg ccctgccttc gataaacacc agcatcacac tctgatcgat 8040

atgccccatg gcgcgatcct caaagagctg attgccgggg tggaagaaga ggggcttcac 8100

gcccgggtgg tgcgcattct gcgcacgtcc gacgtctcct ttatggcctg ggatgcggcc 8160

aacctgagcg gctcggggat cggcatcggt atccagtcga aggggaccac ggtcatccat 8220

cagcgcgatc tgctgccgct cagcaacctg gagctgttct cccaggcgcc gctgctgacg 8280

ctggagacct accggcagat tggcaaaaac gctgcgcgct atgcgcgcaa agagtcacct 8340

tcgccggtgc cggtggtgaa cgatcagatg gtgcggccga aatttatggc caaagccgcg 8400

ctatttcata tcaaagagac caaacatgtg gtgcaggacg ccgagcccgt caccctgcac 8460

atcgacttag taagggagtg accatgagcg agaaaaccat gcgcgtgcag gattatccgt 8520

tagccacccg ctgcccggag catatcctga cgcctaccgg caaaccattg accgatatta 8580

ccctcgagaa ggtgctctct ggcgaggtgg gcccgcagga tgtgcggatc tcccgccaga 8640

cccttgagta ccaggcgcag attgccgagc agatgcagcg ccatgcggtg gcgcgcaatt 8700

tccgccgcgc ggcggagctt atcgccattc ctgacgagcg cattctggct atctataacg 8760

cgctgcgccc gttccgctcc tcgcaggcgg agctgctggc gatcgccgac gagctggagc 8820

acacctggca tgcgacagtg aatgccgcct ttgtccggga gtcggcggaa gtgtatcagc 8880

agcggcataa gctgcgtaaa ggaagctaag cggaggtcag catgccgtta atagccggga 8940

ttgatatcgg caacgccacc accgaggtgg cgctggcgtc cgactacccg caggcgaggg 9000

cgtttgttgc cagcgggatc gtcgcgacga cgggcatgaa agggacgcgg gacaatatcg 9060

ccgggaccct cgccgcgctg gagcaggccc tggcgaaaac accgtggtcg atgagcgatg 9120

tctctcgcat ctatcttaac gaagccgcgc cggtgattgg cgatgtggcg atggagacca 9180

tcaccgagac cattatcacc gaatcgacca tgatcggtca taacccgcag acgccgggcg 9240

gggtgggcgt tggcgtgggg acgactatcg ccctcgggcg gctggcgacg ctgccggcgg 9300

cgcagtatgc cgaggggtgg atcgtactga ttgacgacgc cgtcgatttc cttgacgccg 9360

tgtggtggct caatgaggcg ctcgaccggg ggatcaacgt ggtggcggcg atcctcaaaa 9420

aggacgacgg cgtgctggtg aacaaccgcc tgcgtaaaac cctgccggtg gtggatgaag 9480

tgacgctgct ggagcaggtc cccgaggggg taatggcggc ggtggaagtg gccgcgccgg 9540

gccaggtggt gcggatcctg tcgaatcccc acgggatcgc caccttcttc gggctaagcc 9600

cggaagagac ccaggccatc gtccccatcg cccgcgcccc gattggcaac cgttccgcgg 9660

tggtgctcaa gaccccgcag ggggatgtgc agtcgcgggt gatcccggcg ggcaacctct 9720

acattagcgg cgaaaagcgc cgcggagagg ccgatgtcgc cgagggcgcg gaagccatca 9780

tgcaggcgat gagcgcctgc gctccggtac gcgacatccg cggcgaaccg ggcacccacg 9840

ccggcggcat gcttgagcgg gtgcgcaagg taatggcgtc cctgaccggc catgagatga 9900

gcgcgatata catccaggat ctgctggcgg tggatacgtt tattccgcgc aaggtgcagg 9960

gcgggatggc cggcgagtgc gccatggaga atgccgtcgg gatggcggcg atggtgaaag 10020

cggatcgtct gcaaatgcag gttatcgccc gcgaactgag cgcccgactg cagaccgagg 10080

tggtggtggg cggcgtggag gccaacatgg ccatcgccgg ggcgttaacc actcccggct 10140

gtgcggcgcc gctggcgatc ctcgacctcg gcgccggctc gacggatgcg gcgatcgtca 10200

acgcggaggg gcagataacg gcggtccatc tcgccggggc ggggaatatg gtcagcctgt 10260

tgattaaaac cgagctgggc ctcgaggatc tttcgctggc ggaagcgata aaaaaatacc 10320

cgctggccaa agtggaaagc ctgttcagta ttcgtcacga gaatggcgcg gtggagttct 10380

ttcgggaagc cctcagcccg gcggtgttcg ccaaagtggt gtacatcaag gagggcgaac 10440

tggtgccgat cgataacgcc agcccgctgg aaaaaattcg tctcgtgcgc cggcaggcga 10500

aagagaaagt gtttgtcacc aactgcctgc gcgcgctgcg ccaggtctca cccggcggtt 10560

ccattcgcga tatcgccttt gtggtgctgg tgggcggctc atcgctggac tttgagatcc 10620

cgcagcttat cacggaagcc ttgtcgcact atggcgtggt cgccgggcag ggcaatattc 10680

ggggaacaga agggccgcgc aatgcggtcg ccaccgggct gctactggcc ggtcaggcga 10740

attaaacggg cgctcgcgcc agcctctagg tacaaataaa aaaggcacgt cagatgacgt 10800

gccttttttc ttgtctagcg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 10860

tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc 10920

gttctggata atgtttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 10980

gctgttgaca attaatcatc cggctcgtat aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt 11040

tcacacagga aacagaccat gactagtaag gaggacaatt ccatggctgc tgctgctgat 11100

agattaaact taacttccgg ccacttgaat gctggtagaa agagaagttc ctcttctgtt 11160

tctttgaagg ctgccgaaaa gcctttcaag gttactgtga ttggatctgg taactggggt 11220

actactattg ccaaggtggt tgccgaaaat tgtaagggat acccagaagt tttcgctcca 11280

atagtacaaa tgtgggtgtt cgaagaagag atcaatggtg aaaaattgac tgaaatcata 11340

aatactagac atcaaaacgt gaaatacttg cctggcatca ctctacccga caatttggtt 11400

gctaatccag acttgattga ttcagtcaag gatgtcgaca tcatcgtttt caacattcca 11460

catcaatttt tgccccgtat ctgtagccaa ttgaaaggtc atgttgattc acacgtcaga 11520

gctatctcct gtctaaaggg ttttgaagtt ggtgctaaag gtgtccaatt gctatcctct 11580

tacatcactg aggaactagg tattcaatgt ggtgctctat ctggtgctaa cattgccacc 11640

gaagtcgctc aagaacactg gtctgaaaca acagttgctt accacattcc aaaggatttc 11700

agaggcgagg gcaaggacgt cgaccataag gttctaaagg ccttgttcca cagaccttac 11760

ttccacgtta gtgtcatcga agatgttgct ggtatctcca tctgtggtgc tttgaagaac 11820

gttgttgcct taggttgtgg tttcgtcgaa ggtctaggct ggggtaacaa cgcttctgct 11880

gccatccaaa gagtcggttt gggtgagatc atcagattcg gtcaaatgtt tttcccagaa 11940

tctagagaag aaacatacta ccaagagtct gctggtgttg ctgatttgat caccacctgc 12000

gctggtggta gaaacgtcaa ggttgctagg ctaatggcta cttctggtaa ggacgcctgg 12060

gaatgtgaaa aggagttgtt gaatggccaa tccgctcaag gtttaattac ctgcaaagaa 12120

gttcacgaat ggttggaaac atgtggctct gtcgaagact tcccattatt tgaagccgta 12180

taccaaatcg tttacaacaa ctacccaatg aagaacctgc cggacatgat tgaagaatta 12240

gatctacatg aagattagat ttattggatc caggaaacag actagaatta tgggattgac 12300

tactaaacct ctatctttga aagttaacgc cgctttgttc gacgtcgacg gtaccattat 12360

catctctcaa ccagccattg ctgcattctg gagggatttc ggtaaggaca aaccttattt 12420

cgatgctgaa cacgttatcc aagtctcgca tggttggaga acgtttgatg ccattgctaa 12480

gttcgctcca gactttgcca atgaagagta tgttaacaaa ttagaagctg aaattccggt 12540

caagtacggt gaaaaatcca ttgaagtccc aggtgcagtt aagctgtgca acgctttgaa 12600

cgctctacca aaagagaaat gggctgtggc aacttccggt acccgtgata tggcacaaaa 12660

atggttcgag catctgggaa tcaggagacc aaagtacttc attaccgcta atgatgtcaa 12720

acagggtaag cctcatccag aaccatatct gaagggcagg aatggcttag gatatccgat 12780

caatgagcaa gacccttcca aatctaaggt agtagtattt gaagacgctc cagcaggtat 12840

tgccgccgga aaagccgccg gttgtaagat cattggtatt gccactactt tcgacttgga 12900

cttcctaaag gaaaaaggct gtgacatcat tgtcaaaaac cacgaatcca tcagagttgg 12960

cggctacaat gccgaaacag acgaagttga attcattttt gacgactact tatatgctaa 13020

ggacgatctg ttgaaatggt aacccgggct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg 13080

atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa 13140

acagaatttg cctggcggca gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga 13200

agtgaaacgc cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg 13260

ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt 13320

gtttgtcggt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg 13380

cgaagcaacg gcccggaggg tggcgggcag gacgcccgcc ataaactgcc aggcatcaaa 13440

ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact ccagctggat 13500

cgggcgctag agtatacatt taaatggtac cggcgcgccg ctagcttaat taacggaccg 13560

atgcatgagc tcacgcgtac cggtgctctt cgatctacgt aagaaggcct t 13611

<210> 79

<211> 4490

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 79

tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60

taacaagaaa aagccagcct ttcatgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120

acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180

ttagtgcatc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt 240

gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct 300

tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360

gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct ccattgccca gtcggcagcg 420

acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc 480

actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca 540

tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga 600

cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg 660

atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc 720

agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact 780

tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttccaa aaggtcgttg 840

atcaaagctc gccgcgttgt ttcatcaagc cttacggtca ccgtaaccag caaatcaata 900

tcactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac ggccagcaac 960

gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg 1020

gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta 1080

acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgacccacgg cgtaacgcgc ttgctgcttg 1140

gatgcccgag gcatagactg taccccaaaa aaacagtcat aacaagccat gaaaaccgcc 1200

actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcg tgagcgcata 1260

cgctacttgc attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcgtgccttc 1320

atccgtttcc acggtgtgcg tcacccggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt 1380

ctgtcctggc tggcgaacga gcgcaaggtt tcggtctcca cgcatcgtca ggcattggcg 1440

gccttgctgt tcttctacgg caaggtgctg tgcacggatc tgccctggct tcaggagatc 1500

ggaagacctc ggccgtcgcg gcgcttgccg gtggtgctga ccccggatga agtggttcgc 1560

atcctcggtt ttctggaagg cgagcatcgt ttgttcgccc agcttctgta tggaacgggc 1620

atgcggatca gtgagggttt gcaactgcgg gtcaaggatc tggatttcga tcacggcacg 1680

atcatcgtgc gggagggcaa gggctccaag gatcgggcct tgatgttacc cgagagcttg 1740

gcacccagcc tgcgcgagca ggggaattaa ttcccacggg ttttgctgcc cgcaaacggg 1800

ctgttctggt gttgctagtt tgttatcaga atcgcagatc cggcttcagc cggtttgccg 1860

gctgaaagcg ctatttcttc cagaattgcc atgatttttt ccccacggga ggcgtcactg 1920

gctcccgtgt tgtcggcagc tttgattcga taagcagcat cgcctgtttc aggctgtcta 1980

tgtgtgactg ttgagctgta acaagttgtc tcaggtgttc aatttcatgt tctagttgct 2040

ttgttttact ggtttcacct gttctattag gtgttacatg ctgttcatct gttacattgt 2100

cgatctgttc atggtgaaca gctttgaatg caccaaaaac tcgtaaaagc tctgatgtat 2160

ctatcttttt tacaccgttt tcatctgtgc atatggacag ttttcccttt gatatgtaac 2220

ggtgaacagt tgttctactt ttgtttgtta gtcttgatgc ttcactgata gatacaagag 2280

ccataagaac ctcagatcct tccgtattta gccagtatgt tctctagtgt ggttcgttgt 2340

ttttgcgtga gccatgagaa cgaaccattg agatcatact tactttgcat gtcactcaaa 2400

aattttgcct caaaactggt gagctgaatt tttgcagtta aagcatcgtg tagtgttttt 2460

cttagtccgt tatgtaggta ggaatctgat gtaatggttg ttggtatttt gtcaccattc 2520

atttttatct ggttgttctc aagttcggtt acgagatcca tttgtctatc tagttcaact 2580

tggaaaatca acgtatcagt cgggcggcct cgcttatcaa ccaccaattt catattgctg 2640

taagtgttta aatctttact tattggtttc aaaacccatt ggttaagcct tttaaactca 2700

tggtagttat tttcaagcat taacatgaac ttaaattcat caaggctaat ctctatattt 2760

gccttgtgag ttttcttttg tgttagttct tttaataacc actcataaat cctcatagag 2820

tatttgtttt caaaagactt aacatgttcc agattatatt ttatgaattt ttttaactgg 2880

aaaagataag gcaatatctc ttcactaaaa actaattcta atttttcgct tgagaacttg 2940

gcatagtttg tccactggaa aatctcaaag cctttaacca aaggattcct gatttccaca 3000

gttctcgtca tcagctctct ggttgcttta gctaatacac cataagcatt ttccctactg 3060

atgttcatca tctgagcgta ttggttataa gtgaacgata ccgtccgttc tttccttgta 3120

gggttttcaa tcgtggggtt gagtagtgcc acacagcata aaattagctt ggtttcatgc 3180

tccgttaagt catagcgact aatcgctagt tcatttgctt tgaaaacaac taattcagac 3240

atacatctca attggtctag gtgattttaa tcactatacc aattgagatg ggctagtcaa 3300

tgataattac tagtcctttt cctttgagtt gtgggtatct gtaaattctg ctagaccttt 3360

gctggaaaac ttgtaaattc tgctagaccc tctgtaaatt ccgctagacc tttgtgtgtt 3420

ttttttgttt atattcaagt ggttataatt tatagaataa agaaagaata aaaaaagata 3480

aaaagaatag atcccagccc tgtgtataac tcactacttt agtcagttcc gcagtattac 3540

aaaaggatgt cgcaaacgct gtttgctcct ctacaaaaca gaccttaaaa ccctaaaggc 3600

ttaagtagca ccctcgcaag ctcgggcaaa tcgctgaata ttccttttgt ctccgaccat 3660

caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc gctgcgctca cggctctggc 3720

agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg cctttttatgg attcatgcaa ggaaactacc 3780

cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcagggcgt tttatggcgg gtctgctatg 3840

tggtgctatc tgacttttg ctgttcagca gttcctgccc tctgattttc cagtctgacc 3900

acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa tgcacccagt aaggcagcgg 3960

tatcatcaac aggcttaccc gtcttactgt cgggaattca tttaaatagt caaaagcctc 4020

cgaccggagg cttttgactg ctagcaaaca cagaaaaaag cccgcacctg acagtgcggg 4080

ctttttttt cctaggtaca aataaaaaag gcacgtcaga tgacgtgcct tttttcttgt 4140

ctagagtata catttaaatg gtaccctcta gtcaaggcct taagtgagtc gtattacgga 4200

ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc 4260

cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc 4320

ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta ttttctcctt 4380

acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat 4440

gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgagct 4490

<210> 80

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 80

cataagcttg cgggagagaa tgatgaacaa gag 33

<210> 81

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 81
acgcctaggc cagttcaagc gcaagcatca g 31

<210> 82

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 82
ctttaatctg cacaccccaa cccgc 25

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 83
ggcggtatca atcgagcgat aaccc 25