



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107532140 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680018347.6

罗兰德·佛罗伊德尔

(22)申请日 2016.03.23

(74)专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

(30)优先权数据

代理人 董科

15160897.3 2015.03.25 EP

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G12N 1/21(2006.01)

2017.09.25

G12N 15/77(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

G12N 15/63(2006.01)

PCT/EP2016/056464 2016.03.23

G12Q 1/68(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/151054 EN 2016.09.29

(71)申请人 赛斯爱普有限公司

地址 德国于利希

(72)发明人 莎拉-克里斯汀·于利奇卡

格奥尔格·绍曼 斯蒂芬·宾得

布利塔·克莱恩

权利要求书3页 说明书56页

序列表41页 附图4页

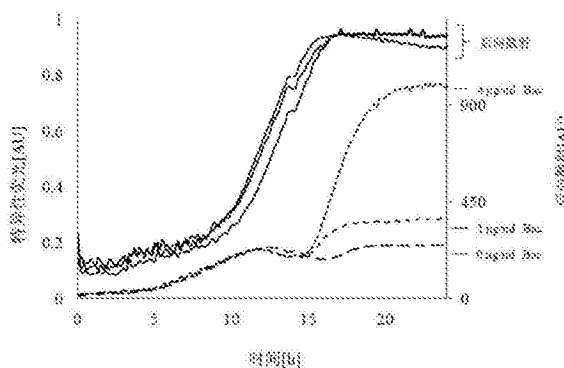
(54)发明名称

用于微生物蛋白质分泌检测和定量的传感器

间的优化的蛋白分泌,由此方法得到细胞,一种生产蛋白质的方法和一种制备混合物的方法。

(57)摘要

本发明涉及一种相对于其野生型的基因修饰的细胞,包含编码荧光蛋白的基因序列,其特征在于,所述荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白的量。本发明还涉及一种鉴定细胞的方法,所述细胞的特征在于,其具有通过细胞质膜进入细胞悬浮液中的胞外空间的增加的蛋白分泌,一种用于鉴定被优化用于蛋白质的重组生产的培养基组分的方法,一种用于鉴定被优化用于蛋白质的重组生产的培养条件的方法,一种用于鉴定化合物的方法,所述化合物的特征在于其具有抗菌活性,该抗菌活性是由于其具有破坏细菌细胞膜的性质,或者具有分析这种化合物对于在不同生理状态的或不同生长阶段的基因不同的细菌细胞种群、或基因相同的细胞种群的影响的性质,一种用于生产一种细胞的方法,其中所述细胞是相对于其野生型,经基因修饰的细胞,其具有通过细胞质膜进入胞外空



1. 一种相对于其野生型经基因修饰的细胞, 包含编码荧光蛋白的基因序列, 其特征在于, 所述荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白的量。

2. 根据权利要求1所述的细胞, 其特征在于, 编码荧光蛋白的所述基因序列由至少一种异源启动子控制, 在野生型细胞中, 所述异源启动子控制基因的表达, 而野生型细胞中的基因表达则取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白的量。

3. 根据权利要求1或2所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞为棒状杆菌属, 埃希氏杆菌属, 芽孢杆菌属或分枝杆菌属的细胞。

4. 根据前面任一项权利要求所述的细胞, 其特征在于, 所述启动子选自由以下组成的组别: cg0706-启动子、cg0996-启动子、cg0998-启动子、cg1325-启动子、htrA-启动子、mprA-启动子或pepD-启动子。

5. 根据权利要求4所述的细胞, 其特征在于, 编码荧光蛋白的所述基因序列由cg0996启动子和cg0998启动子的组合控制, 其中cg0996启动子位于cg0998启动子的上游。

6. 一种用于鉴定细胞的方法, 所述细胞的特征在于, 其具有通过细胞质膜进入细胞悬浮液中的胞外空间的增加的蛋白分泌, 其中所述方法包括以下方法步骤:

α1) 提供一种细胞悬浮液, 其中所述细胞悬浮液包括权利要求1至5中任一项所述的细胞;

α2) 将所述细胞进行基因修饰, 以获得一种细胞悬浮液, 其中所述细胞就通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白的量而言会有所不同;

α3) 鉴定所述细胞悬浮液中的个体细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白分泌。

7. 根据权利要求6所述的方法, 还包括以下方法步骤:

α4) 将已鉴定的细胞从所述细胞悬浮液中分离出来。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其特征在于, 所述分离是通过流式细胞术来实现的。

9. 一种用于鉴定细胞的方法, 所述细胞的特征在于具有通过细胞质膜进入所述细胞悬浮液中的胞外空间的高蛋白分泌, 或者一种用于鉴定细胞悬浮液的方法, 其中该细胞悬浮液包括细胞, 所述细胞的特征在于具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白分泌, 其中上述两种方法包括以下方法步骤:

β1) 提供

-一种细胞悬浮液, 所述细胞悬浮液包括权利要求1至5中任一项所述的多个细胞, 其中就通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量而言, 细胞悬浮液中的所述细胞各有不同, 或者

-多种细胞悬浮液, 其中每一种细胞悬浮液包括权利要求1至5中任一项所述的细胞, 其中就由细胞分泌的通过细胞质膜进入胞外空间的蛋白质的量而言, 所述细胞悬浮液各有不同;

β2) 在所述一种细胞悬浮液中培养不同的细胞, 或者在不同的细胞悬浮液中培养不同的细胞;

β3) 鉴定细胞悬浮液中的各个细胞, 其中所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白分泌, 或者鉴定每一种细胞悬浮液, 其中所述细胞悬浮液包括包含具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白分泌的细胞。

10. 一种用于鉴定培养基组分的方法, 所述培养基组分被优化用于蛋白的重组生产, 其中所述方法包括以下方法步骤:

γ 1) 提供多种彼此不同的培养基, 其中相对于培养基组分, 所述培养基彼此不同的;

γ 2) 在不同的培养基中培养权利要求1至5中任一项所述的细胞, 从而获得多种细胞悬浮液, 其中由于培养基的组分差异, 相对于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白的量, 所述细胞悬浮液中的细胞彼此不同;

γ 3) 鉴定那些细胞悬浮液, 其中所述细胞悬浮液包括多个细胞, 所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白分泌。

11. 一种用于鉴定培养条件的方法, 其中所述培养条件被优化以用于蛋白质的重组生产, 其中所述方法包括以下方法步骤:

δ 1) 提供多种细胞悬浮液, 其中所述悬浮液包括权利要求1至5中任一项所述的细胞;

δ 2) 在不同培养条件下培养这些细胞悬浮液中的细胞, 使得由于培养条件的差异, 相对于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白的量, 不同细胞悬浮液中的细胞彼此不同;

δ 3) 鉴定那些细胞悬浮液, 其中所述细胞悬浮液包括多个细胞, 所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白分泌。

12. 一种用于鉴定化合物的方法, 所述化合物的特征在于其具有抗菌活性, 该抗菌活性是由于其具有破坏细菌细胞膜的性质, 或者具有分析这种化合物对于在不同生理状态的或不同生长阶段的基因不同的细菌细胞种群、或基因相同的细胞种群的影响的性质, 所述方法包括以下方法步骤:

ε 1) 提供一种细胞悬浮液, 其中所述细胞悬浮液包括权利要求1至5中任一项所述的细胞;

ε 2) 在所述化合物存在的情况下培养悬浮液中的细胞;

ε 3) 通过检测细胞内荧光活性来判断所述化合物的抗菌活性和与浓度相关的抗菌活性。

13. 一种用于生产一种细胞的方法, 其中所述细胞是相对于其野生型, 经基因修饰的细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌, 其中所述方法包括以下方法步骤:

I) 提供一种细胞悬浮液, 其中所述悬浮液包括权利要求1至5中任一项所述的细胞;

II) 将所述细胞进行基因修饰, 以获得一种细胞悬浮液, 其中所述细胞就通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白的量而言会有所不同;

III) 鉴定所述细胞悬浮液中的各个细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白分泌;

IV) 将已鉴定的细胞从所述细胞悬浮液中分离出来;

V) 鉴定已被鉴定及分离出来的细胞中那些经基因修饰的 G_1 至 G_n 基因或那些经突变的 M_1 至 M_m 基因, 其中上述基因导致通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白分泌;

VI) 生产相对于其野生型经基因修饰的细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌, 其中基因组包含至少一个 G_1 至 G_n 基因和/或至少一个突变 M_1 至 M_m 基因。

14. 一种根据权利要求13所述的方法获得的细胞。

15. 一种用于生产一种蛋白质的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

(a) 由权利要求13所述的方法生产一种细胞,其中所述细胞是相对于其野生型,经基因修饰的细胞,其具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌;

(b) 在一种细胞能从所述营养物质产生蛋白质的条件下的包含营养物质的培养基中培养所述细胞。

用于微生物蛋白质分泌检测和定量的传感器

[0001] 本发明涉及一种相对于其野生型基因修饰的细胞,和一种细胞鉴定的方法,所述细胞的特征在于,具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白分泌,以及一种鉴定培养基成分的方法,所述培养基成分被优化以用于蛋白质的重组生产,以及一种鉴定培养条件的方法,所述培养条件被优化以用于蛋白质的重组生产,以及一种鉴定化合物的方法,所述化合物特征在于它的抗菌活性,因它拥有破坏细菌细胞膜的性质或具有分析这种化合物对基因不同的细菌细胞种群的影响的性质,以及一种细胞生产方法,所述细胞相对于其野生型已经被基因修饰且具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌,一种通过这种方法所得的细胞,以及一种蛋白质的生产方法和一种混合物的制备方法。

[0002] 蛋白质具有巨大的经济效益。例如,在化学合成的各类化合物中,尤其是在对映选择合成、清洁剂,或人或动物的食物中,酶常被用作生物催化剂。在药物成分中可发现其他蛋白质,如抗体、激素和免疫调节剂。

[0003] 一种制备此类蛋白质的优选方法即是利用重组微生物的生物生产技术。在发酵的过程中,培养这些微生物,使它们通过细胞内蛋白合成产生所需的蛋白质。通过这种生物合成生产途径,可以直接得到天然蛋白质,并且所使用的原材料简单、廉价。例如枯草芽孢杆菌、巴斯德毕赤酵母、大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌或相关菌类,作为微生物常被用于生产蛋白质。

[0004] 在生物技术过程中,生物和过程参数对生产蛋白质的效率和成本效益至关重要。这些参数例如包括,宿主微生物、菌株/载体组合、蛋白质编码基因的密码子使用、细胞壁传输蛋白质所必需的信号肽(分泌信号肽)、表达水平、诱导时间、温度、培养基成分和生产速度等。

[0005] 为了用于蛋白质生产的有效生物技术过程的发展,这些参数必须是多样化和优化的。然而,问题在于,不仅上述的每一个参数在很大范围内是可变的,而且不同的参数之间也相互影响,其结果是,必须评估数量巨大的、可能的参数组合。根据现有的技术,仅对优化参数或参数组合的理论预测是不可能的,并且,对于每种特定的蛋白质而言,不同的参数和参数组合被认为是理想化的,因此,每个生产过程必须测试许多不同的参数组合。

[0006] 为了在一定的菌株中生成不同的性质,所述菌株旨在用于所需蛋白质的重组生产,需运用常规化学或物理诱变步骤(例如MNNG或UV),这样,随机突变被诱导至菌株(无向诱变)的基因组中。为了生产蛋白分泌改变的突变体,例如,生成蛋白质编码基因的文库,在所述文库中,蛋白质编码基因序列与不同的分泌信号肽编码序列相融合。为了分析不同培养条件或不同培养基成分的影响,需在这些不同的培养条件和/或这些不同的培养基中培养分泌特定蛋白质的蛋白质分泌菌株。

[0007] 对基因修饰和优化的培养参数和培养基的搜索通常被称为“筛选”,这带来生产所需蛋白质的生物技术过程的高生产率、高效率和高经济效益。然而,这种筛选过程中的问题表现在:在一个包含多个基因不同的细胞的细胞悬浮液中或在一个各种参数已经被调整的实验装置中(或仅有一种参数发生变化,但也会影响其他参数),几乎不可能清晰地鉴定哪一种基因修饰或哪一个参数才是最终观察到的所需蛋白质生产上升的原因。评估此类所必

需的筛选方法,不仅耗时,而且昂贵,并且对每种单独的蛋白质而言,这些方法也是高度特异性的且通常不具有适用性。此外,这些筛选方法取决于所需蛋白质实用筛选测定的可用性,因为只有通过检测培养基中或细胞内蛋白质的催化活性,才能确定特定实验装置中的所需蛋白质的生产量或分泌量。

[0008] 本发明是基于克服有关基因修饰细胞检测而产生的缺陷这一目的,所述细胞分泌一种特殊的蛋白质。

[0009] 本发明尤其基于提供一种基因修饰细胞这一目的,在所述基因修饰细胞中,在基因修饰后,或有关培养条件的参数发生变化后,或培养基的成分发生变化后,用一种简单的方式可以鉴定这些变体,这种方式的特征在于特定蛋白质分泌增加,其中也可能简单地将这些细胞从多个不同的细胞中分离出来。此外,鉴定这些不应该依赖于所需蛋白质的性质,所述细胞的特征在于具有增加的特定蛋白质分泌,因此应该适用于所有可在发酵过程中重组产生的蛋白质。

[0010] 本发明还基于提供一种简单、快速、成本有效地鉴定一种细胞的方法这一目的,所述细胞的特征在于多种基因不同的细胞具有增加的特定蛋白质的分泌,并且特别是将这些细胞从多个基因不同的细胞中分离出来。

[0011] 本发明还基于提供一种鉴定细胞的方法的目的,即所述细胞培养在特定培养条件或特定培养基中,其特征在于,与培养在不同培养条件下或不同培养基中的相同细胞相比,所述细胞具有增加的特定蛋白质分泌,从而允许以简单、快速、成本有效的方式确定优化的培养条件和/或优化的培养基。

[0012] 本发明还基于提供一种具有优化的特定蛋白质分泌的基因修饰的细胞的目的,所述细胞中的基因或突变,尤其是这些基因中分泌信号肽的基因或突变的基因被有选择性地引入,通过上述增加细胞质膜的跨膜侧的特定蛋白质的分泌或特定蛋白质的浓度的筛选过程,所述细胞已经被鉴定为合适。

[0013] 通过构成本发明权利要求书的范畴的主题,对实现上述的至少一个目的做出了贡献。进一步的贡献是由代表本发明具体实施方式的附属权利要求书的主题做出的。

[0014] 实施方式:

[0015] (1) 一种相对于其野生型基因修饰的细胞,其中所述细胞包含编码荧光蛋白的基因序列,其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间中的蛋白质的量。

[0016] (2) 根据实施方式(1)所述的细胞,其中所述编码荧光蛋白的基因序列受至少一种异源启动子的控制,所述异源启动子控制野生型细胞中的基因表达,该基因的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间中的蛋白质的量。

[0017] (3) 根据实施方式(1)或(2)所述的细胞,其中所述细胞是棒状杆菌属、埃希氏杆菌属,芽孢杆菌属或分枝杆菌属中的一种细胞。

[0018] (4) 根据以上任一项实施方式,其中所述启动子是选自于由cg0706启动子、cg0996启动子、cg0998启动子、cg1325启动子、htrA启动子、liI启动子、mprA启动子或pepD启动子构成的组别。

[0019] (5) 根据实施方式(1)至(4)中任一项所述的细胞,其中所述细胞是棒状杆菌属的一种细胞,且其中启动子是cg0706启动子、cg0996启动子、cg0998启动子或cg1325启动子。

[0020] (6) 根据实施方式(5)所述的细胞,其中所述编码荧光蛋白的基因序列是受cg0996

启动子和cg0998启动子组合的控制,该所述组合中,cg0996启动子位于cg0998启动子的上游。

[0021] (7) 根据实施方式(1)至(4)中任一项所述的细胞,其中所述细胞是芽孢杆菌属中的一种细胞,且其中所述启动子是htrA启动子或liaI启动子。

[0022] (8) 根据实施方式(1)至(4)中任一项所述的细胞,其中所述细胞是分枝杆菌属中的一种细胞,且其中所述启动子是mprA启动子或pepD启动子。

[0023] (9) 根据实施方式(1)至(4)中任一项所述的细胞,其中所述细胞是埃希氏杆菌属中的一种细胞,且其中所述启动子是htrA启动子。

[0024] (10) 根据以上所述任一项实施方式所述的细胞,其中所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白(GFP)或该蛋白的变体。

[0025] (11) 一种用于鉴定细胞悬浮液中细胞的方法,所述细胞特征在于具有通过细胞质膜进入胞外空间中的增加的蛋白质分泌,包括以下方法步骤:

[0026] α1) 提供包含实施方式(1)至(10)中任一项所述的细胞的细胞悬浮液;

[0027] α2) 对细胞基因修饰获得细胞悬浮液,其中相对于通过细胞质膜至胞外空间的蛋白质分泌的量,各细胞均不同。

[0028] α3) 细胞悬浮液中单个细胞的鉴定,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质的分泌。

[0029] (12) 根据实施方式(11)所述的方法,其中所述方法步骤α2)中的基因修饰是由非靶向诱变或代谢工程进行。

[0030] (13) 根据执行方式(11)或(12)所述的方法,还包括方法步骤:

[0031] α4) 从细胞悬浮液中分离鉴定的细胞。

[0032] (14) 根据实施方式(13)所述的方法,其中所述分离是通过流式细胞术进行。

[0033] (15) 一种用于鉴定细胞悬浮液中细胞的方法,所述细胞的特征在于具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质的分泌,或鉴定包含细胞的细胞悬浮液方法,该细胞特征在于具有通过细胞质膜进入胞外空间的高的蛋白质的分泌,包括以下方法步骤:

[0034] β1) 提供

[0035] -包含实施方式(1)至(10)中任一项所述的多个细胞的细胞悬浮液,其中相对于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量,所述细胞悬浮液中的细胞彼此不同,

[0036] 或

[0037] -多种细胞悬浮液,每种细胞悬浮液包含实施方式(1)至(10)中任一项所述的细胞,其中相对于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量,所述细胞悬浮液彼此不同;

[0038] β2) 在细胞悬浮液或不同的细胞悬浮液中培养不同的细胞;

[0039] β3) 在细胞悬浮液中鉴定单个细胞,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌,或鉴定包含细胞的单个细胞悬浮液,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌。

[0040] (16) 一种用于鉴定培养基成分的方法,该培养基成分被优化以用于蛋白质的重组生产,包括以下方法步骤:

[0041] γ1) 提供多种培养基,所述培养基在成分上相互不同;

[0042] γ2) 在不同培养基中培养实施方式(1)至(10)中任一项所述的细胞,从而获得多

种细胞悬浮液,在所述细胞悬浮液中,由于培养基的成分不同,细胞悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量方面彼此不同。

[0043] γ 3) 鉴定包括细胞的这些细胞悬浮液,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌。

[0044] (17) 一种鉴定培养条件的方法,所述培养条件被优化以用于蛋白质的重组生产,包括以下方法步骤:

[0045] δ 1) 提供包括根据实施方式(1)至(10)中任一项所述的细胞的多种细胞悬浮液;

[0046] δ 2) 在不同培养条件下,在这些细胞悬浮液中培养这些细胞,这样,由于培养条件的不同,不同悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量方面是彼此不同的;

[0047] δ 3) 鉴定包括细胞的这些细胞悬浮液,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌。

[0048] (18) 一种鉴定化合物的方法,所述化合物特征在于其具有抗菌活性,因其具有破坏细菌胞膜的性质或具有分析此类化合物对在不同的生理状态或不同的生长阶段的基因不同的细菌细胞种群、或基因相同的细胞的影响的性质,包括以下方法步骤:

[0049] ϵ 1) 提供包含根据实施方法(1)至(10)中任一项所述的细胞的细胞悬浮液;

[0050] ϵ 2) 在化合物存在的前提下,在悬浮液中培养所述细胞;

[0051] ϵ 3) 通过检测细胞内荧光活性,确定化合物的抗菌活性和浓度相关的抗菌活性。

[0052] (19) 一种生产细胞的方法,所述细胞相对于其野生型已被基因修饰,其具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白质分泌,包括以下方法步骤:

[0053] I) 提供包含根据实施方法(1)至(10)任一项所述的细胞的细胞悬浮液;

[0054] II) 对细胞进行基因修饰获得细胞悬浮液,所述细胞悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量上是彼此不同的,

[0055] III) 在细胞悬浮液中鉴定单个细胞,该细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌;

[0056] IV) 从细胞悬浮液中分离鉴定的细胞;

[0057] V) 在已鉴定和分离的细胞中鉴定那些基因修饰的基因 G_1 至 G_n ,或哪些基因修饰的突变 M_1 至 M_n ,所述基因修饰的基因或突变导致通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌;

[0058] VI) 生产相关于其野生型基因修饰的细胞,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白质分泌,所述细胞的基因组合包含至少一种 G_1 至 G_n 的基因和/或至少一种 G_1 至 G_n 的突变。

[0059] (20) 根据实施方式(19)所述的方法,其中方法步骤II)中的基因修饰由非靶向诱变或代谢工程进行。

[0060] (21) 根据实施方式(19)或(20)所述的方法获得的细胞;

[0061] (22) 一种蛋白质生产的方法,包括以下方法步骤:

[0062] (a) 根据实施方式(19)至(20)所述的方法生产一种相对于其野生型基因修饰的细胞,,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白质分泌;

[0063] (b) 在细胞从营养素中产生蛋白质的条件下,在含有营养素的培养基中培养所述

细胞。

[0064] (23) 根据实施方式 (22) 所述的方法,其中所述的蛋白质是一种激素、毒素、抗体、结构蛋白、酶、转运蛋白、储藏蛋白、通道蛋白、调节蛋白、荧光蛋白或具有选择性结合、聚合、涂层、稳定、修复、同位素容量的蛋白质。

[0065] (24) 一种混合物的制备方法,包括以下方法步骤:

[0066] (A) 通过实施方式 (22) 或 (23) 任一项中的方法生产蛋白质;

[0067] (B) 将蛋白质与所述蛋白质相异的混合物成分相混合。

[0068] (25) 根据实施方式 (24) 所述方法,其中所述混合物是一种食物、动物饲料、药物组合物、用于食物生产的组合物、胶合组合物、纺织整理组合物或木质纤维分解组合物。

[0069] 本发明涉及一种相对于其野生型基因修饰的细胞,所述细胞包含编码荧光蛋白的基因序列,其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量。

[0070] 所述胞外空间通过细胞质膜与细胞质空间(细胞质)分离。本文所用的短语“胞外空间”通常包括细胞质膜上或细胞质膜之外的任何体积元素(当从细胞质空间观察时),包括肽聚糖层及周质和细菌外膜(在革兰氏阴性菌和二层(diderm)革兰氏阳性菌,或具有外膜的革兰氏阳性菌的情况下)。短语“胞外空间”还包含距细胞质膜的直接周边更远的区域,包括培养上清液的总体积。

[0071] 细胞的“野生型”优选地理解为,基因组以例如通过进化自然形成的状态而存在的细胞。所述术语用于整个细胞及个体基因。因此,特别是那些基因序列已经至少部分通过重组的方法为人类所修饰的细胞或基因,不能被归入术语“野生型”。

[0072] 根据本发明,所述被修饰的细胞优选地是一种通过细胞质膜将特定蛋白质分泌进入胞外空间的细胞。本文所用的术语“蛋白质”,最广义地理解为,包含两个或以上通过肽键连接的氨基酸的化合物,所述化合物是细胞蛋白质生物合成的产物。因此,短语“蛋白质”不仅包括更高分子量的蛋白质(例如,具有大于10,000Da分子量的蛋白质),而且还包括二肽、三肽、四肽、五肽,以及包含多达10个氨基酸的寡肽、包含10至100个氨基酸的多肽和包含100个以上氨基酸的大分子肽。此外,根据蛋白质的性质,除聚合氨基酸之外,所述蛋白质可能还包括,例如由共转译或转译后的糖基化产生的残糖基等另外的成分。

[0073] 所述蛋白质,例如,可以是一种激素、毒素、抗体、结构蛋白(例如胶原)、酶、转运蛋白或调节蛋白等。合适的蛋白质可以选自以下组别:人生长激素、去N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;生长因素释放因子;甲状旁腺激素;甲状腺素;脂蛋白; α 1抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子如因子VIII C、因子IX,组织因子和假性血友病因子;抗凝血因子如蛋白C;心房利钠因子;肺表面活性剂;纤溶酶原激活物,如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);蛙皮素;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β ,脑啡肽;血清白蛋白,如人血清白蛋白;抑菌物质;松弛素A链;松弛素B链;松弛素原;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,如 β -内酰胺酶;DNA酶;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;激素或生长因子受体;整合素;血小板生成素;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子,如骨源神经营养因子(BDNF),神经营养因子-3,-4,-5或-6(NT-3,NT-4,NT-5或NT-6)或神经生长因子如NGF- β ;血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子如aFGF和bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF)如TGF- β 和TGF- β ,包括TGF- β 1,TGF- β 2,TGF- β 3,TGF- β 4或TGF- β 5;胰岛素生长因子-I和-II

(IGF-I和IGF-II);胰岛素生长因子结合蛋白;CD蛋白如CD-3,CD-4,CD-8和CD-19;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);生长激素;诸如干扰素- α , β -和 γ -的干扰素;集落刺激因子(CSF),例如M-CSF,GM-CSF和G-CSF;白细胞介素(IL),例如IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原,例如艾滋病包膜的一部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;抗体;以及上述列出任何一项多肽片段。合适的酶包括转谷氨酰胺酶,脱氢酶(例如醇脱氢酶),单加氧酶,脂肪酶,蛋白酶,纤维素酶,糖苷酶(例如淀粉酶,木聚糖酶,蔗糖酶,麦芽糖酶,阿拉伯糖酶,异麦芽糖酶或果糖酶),核酸酶(例如核糖核酸酶,脱氧核糖核酸酶,外切核酸酶,内切核酸酶,拓扑异构酶或连接酶),磷酸酶(例如植酸酶或碱性磷酸酶),聚合酶(例如DNA-聚合酶或RNA-聚合酶)以及裂解酶。

[0074] 根据本发明,特别优选的细胞指的是下列菌属中这些细胞:棒状杆菌属,短杆菌属,芽孢杆菌属,乳杆菌属,乳球菌属,假丝酵母属,毕赤酵母属,克鲁维酵母属,酵母属,埃希氏杆菌属,发酵单胞菌属,耶氏酵母属,分枝杆菌属,甲基杆菌属,罗尔斯通菌属和假单胞菌属,其中特别优选的是黄色短杆菌,乳糖发酵短杆菌,大肠杆菌,酿酒酵母,乳酸克鲁维酵母,布朗克假丝酵母,皱落假丝酵母,谷氨酸棒杆菌,有效棒杆菌,运动发酵单胞菌,解脂耶氏酵母,扭脱甲基杆菌,罗尔斯通氏菌和巴斯德毕赤酵母。根据本发明,最优选的细胞是棒状杆菌属,芽孢杆菌属,分枝杆菌属,埃希氏杆菌属,酵母属和毕赤酵母属的细胞,其中谷氨酸棒杆菌,枯草芽孢杆菌和大肠杆菌是非常特别优选的菌株。

[0075] 特别适合的细胞是选自由以下杆菌构成的组别:谷氨酸棒状杆菌ATCC13032,乙酰谷氨酸棒杆菌ATCC15806,嗜醋酸棒杆菌ATCC13870,栖糖蜜棒杆菌ATCC17965,嗜热氨基棒状杆菌FERM BP-1539,黄色短杆菌ATCC14067,乳发酵短杆菌ATCC13869和短枝短杆菌ATCC14020,以及突变体和由其产生的分泌蛋白质的菌株。

[0076] 根据本发明,相对于其野生型基因修饰的细胞特征在于,它们包含编码荧光蛋白的基因序列,其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌到胞外空间的蛋白质的量。

[0077] 本领域技术人员已知的所有编码荧光蛋白的基因序列可能是一种编码荧光蛋白的基因序列。编码自发荧光蛋白的Aequora基因属的基因序列特别合适,例如在不同波长范围内荧光的绿色荧光蛋白(GFP)及其变体(例如黄色荧光蛋白,YFP;蓝色荧光蛋白,BFP;青色荧光蛋白,CFP),或者荧光增强的绿色荧光蛋白(GFP)及其变体(例如增强的GFP或EGFP,或EYFP,EBFP或ECFP)。然而,编码其他荧光蛋白的基因序列可用的还有,例如出自美国Franklin Lakes,BD Biosciences的DsRed,HcRed,AsRed,AmCyan,ZsGreen,AcGFP,ZsYellow。合适的编码荧光蛋白的基因序列还有,例如基于荧光蛋白(FbFP)的黄素单核苷酸,所述黄素单核苷酸可从德国蒙海姆的evocatal GmbH公司获得。

[0078] 根据该特征,荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌到胞外空间的蛋白质的量,并且根据本发明的转译水平,因该蛋白可以实现分泌功能,因此荧光蛋白的表达受细胞的控制。根据通过细胞质膜分泌到胞外空间的蛋白质的量,所以,可以形成能在该糖体中被翻译形成荧光蛋白的或多或少的mRNA。

[0079] 在这方面,表达的控制翻译水平上会受到至少一种异源启动子控制的编码荧光蛋白的基因序列的影响,在野生型细胞中,该异源启动子控制基因表达,而野生型细胞中该基因的表达则取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量。随后,编码荧光蛋白且

受所述启动子控制的DNA序列被称为“传感器”。

[0080] 术语“受至少一种异源启动子控制”表示自然方式的启动子不会调节编码荧光蛋白的基因序列的表达,特别是在源细胞中有至少一种启动子被分离和选择性地被基因修饰以进一步提高启动子效率。在这方面,术语“源于此启动子”指的是,至少一种根据本发明包含在被基因修饰的细胞(如包含传感器的细胞)中的启动子以及调节编码荧光蛋白的基因序列的表达的启动子,不必是源细胞中拥有相同核酸序列的启动子。相反,为了提高启动子效率,所述启动子序列可以通过插入、删除或交换单个碱基的方式被修饰,例如单个核酸序列的回文。至少一种调节编码荧光蛋白的基因序列的表达的启动子也不一定是一种被包含在已经被基因修饰的细胞本身的基因组(例如,根据本发明包含传感器的细胞基因组)中的启动子或源于该启动子的启动子。然而,如果至少一种启动子是包含在已经被基因修饰的细胞本身的基因组中的启动子或源于该启动子的启动子,且在该已经被基因修饰的细胞中,启动子控制基因表达,而基因表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量,那么它可能被证明完全是有利的。

[0081] 根据本发明,细胞中编码荧光蛋白的基因序列受至少一种启动子的控制。本文中所述术语“受至少一种启动子的控制”优选地理解为,编码荧光蛋白的基因序列与至少一种启动子功能性地连接。如果这两种序列以及任选的进一步调节元素(例如终止子)被依次排列,使每个调节元素能在核酸序列的转基因表达中实现其功能,那么所述至少一种启动子和编码荧光蛋白的基因序列会被功能性地连接起来。为此,化学意义上的直接连接并非绝对必要的。基因控制序列,例如强化因子序列,也可以在从进一步移除的位置的靶序列上或甚至从其它DNA分子上发挥其功能。优选编码荧光蛋白的基因序列的排列位于启动子序列(如3'末端)之后,以使两个序列彼此共价连接。编码荧光蛋白的基因序列和启动子也可能被功能性地彼此连接起来,这样,在这两个基因序列之间,仍然有同源基因的部分序列(也就是说,野生型细胞的基因表达受启动子的调节)。在这样的DNA构建体的表达中,可获得源自于荧光蛋白和氨基酸序列的融合蛋白质,所述氨基酸序列由相应的同源基因的部分序列编码。同源基因的部分序列的长度并非关键,只要用特定波长的光激发其荧光属性时,其荧光蛋白的功能能力没有明显受损。

[0082] 除了至少一种启动子和编码荧光蛋白的基因序列外,根据特定实施方式,依据本发明,细胞也可以包含编码调节子的基因序列,其中所述调节子优选地是一种以任何方式直接或间接地与通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质相互作用的蛋白质,或与此类蛋白质的变体相互作用的蛋白质,尤其是与错误折叠的蛋白质相互作用的蛋白质。调节子和蛋白质之间这种直接或间接的相互作用会对DNA聚合酶的启动子序列的亲配基产生影响,并依赖于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量。在这方面,调节子原则上可以是一种活化剂或抑制剂。

[0083] 根据本发明,可能的启动子在原则上是通常通过功能性连接控制基因序列的所有启动子,所述基因的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量。此类基因编码的蛋白质优选地属于包含以下物质的组别:蛋白酶,肽酶,热休克蛋白,噬菌体休克蛋白, σ 因子,抗 σ 因子,双组份信号转导系统,三组分信号转导系统,ABC转运蛋白,膜结合蛋白,周质蛋白,假定分泌蛋白,调节蛋白(通过其自身进一步调节的蛋白),涉及细胞壁生物发生的蛋白质,参与磷壁酸生物起源的蛋白,青霉素结合蛋白,涉及外膜生物发生的蛋白,膜相关

分子伴侣,周质分子伴侣,对细胞壁抗生素(如杆菌肽,万古霉素)有反应的蛋白,对碱性休克有反应的蛋白,对洗涤剂有反应的蛋白,对苯酚有反应的蛋白,对有机溶剂有反应的蛋白,涉及渗透保护的蛋白,或对Sec依赖性蛋白分泌、细胞壁抗生素。碱性休克、洗涤剂、苯酚或有机溶剂等有反应的功能未知的蛋白等。

[0084] 所述启动子进一步还可以是在具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌的情况下,与特定活化剂相互作用并用这种方式引起编码荧光蛋白的基因序列表达的启动子,或是受抑制子抑制的启动子,在蛋白质通过细胞质膜被分泌至胞外空间的情况下,所述抑制子从启动子扩散开,结果抑制子对启动子的抑制被消除,编码荧光蛋白的基因序列表达受到影响。

[0085] 根据本发明,下面将对细胞合适的例子作更详细的描述。然而,在这一点上应强调的是,本发明不局限于以下实施例。

[0086] 所述基因修饰的细胞可能是一种基因修饰的棒状杆菌细胞,其包含受以下启动子控制的编码荧光蛋白的序列:cg0706启动子(Pcg0706)或其变体,cg0996启动子(Pcg0996)或其变体,cg0998启动子(Pcg0998)或其变体,cg1325启动子(Pcg1325)或其变体或这些启动子或变体的组合,特别是cg0996启动子(Pcg0996)或其变体和cg0998启动子(Pcg0998)或其变体的组合,在该组合中,cg0996启动子(Pcg0996)或其变体位于cg0998启动子(Pcg0998)或其变体的上游,其本身被融合至编码荧光蛋白基因序列的序列。如果编码荧光蛋白的序列受cg0996启动子(Pcg0996)或其变体和cg0998启动子(Pcg0998)或其变体的组合的控制,且在这个组合中,通过多达2500个碱基对,优选地多达1000个碱基对,更优选地多达200个碱基对,cg0996启动子(Pcg0996)或其变体位于cg0998启动子(Pcg0998)或其变体的上游,cg0998启动子或其变体的序列可以直接被连接到cg0996启动子或其变体,或可以与cg0996启动子,或其变体分离。

[0087] 在这种情况下,通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质的分泌导致荧光蛋白的表达。在cg0706启动子、cg0998启动子、cg1325启动子或这些启动子的变体的情况下,除所述启动子和受所述启动子控制的荧光蛋白序列外,细胞进一步包含编码cg0706-cg1325-调节子的基因序列或该序列变体、或编码cg0996-cg0998-调节子的基因序列或该序列变体。cg0706启动子的DNA序列与SEQ ID NO.01相对应,cg0996启动子的DNA序列与SEQ ID NO.02相对应,cg0998启动子的DNA序列与SEQ ID NO.03相对应,cg1325启动子的DNA序列与SEQ ID NO.04相对应。cg0706-cg1325-调节子的DNA序列编码与SEQ ID NO.05相对应,cg0996-cg0998-调节子的DNA序列编码与SEQ ID NO.06相对应。

[0088] 所述基因修饰的细胞可能是一种基因修饰的芽孢杆菌细胞,其包含受htrA-启动子(PhtrA)或其变体控制的编码荧光蛋白的序列。在这种情况下,通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌也会导致荧光蛋白的表达。在htrA启动子的情况下,除所述启动子和受所述启动子控制的荧光蛋白序列外,细胞进一步包含一种编码Css-调节子的基因序列或所述序列变体。受Css-调节子调节的htrA-启动子的DNA序列与SEQ ID NO.07相对应,Css-调节子的DNA序列编码与SEQ ID NO.08相对应。

[0089] 所述基因修饰的细胞可能是一种基因修饰的芽孢杆菌细胞,其包含受liaL-启动子(PliaL)或其变体控制的、编码荧光蛋白的序列。在这种情况下,通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌也会导致荧光蛋白的表达。在liaL-启动子的情况下,除所述启动

子和受所述启动子控制的荧光蛋白序列外,细胞进一步包含编码LiaR-蛋白的基因序列或所述序列变体,编码LiaF-蛋白的基因序列或所述序列变体,编码LiaS-蛋白的基因序列或所述序列变体,或这些序列中两者或多者的组合。受LiaR-调节子调节的LiaL-启动子的DNA序列与SEQ ID NO.09相对应,编码LiaR-调节子的DNA序列与SEQ ID NO.10相对应,编码LiaF-调节子的DNA序列与SEQ ID NO.11相对应,编码LiaS-调节子的DNA序列与SEQ ID NO.12相对应。

[0090] 所述基因修饰的细胞可能是一种基因修饰的分枝杆菌属细胞,其包含受mprA-启动子(PmprA)或其变体控制的、编码荧光蛋白的序列。在这种情况下,通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌也会导致荧光蛋白的表达。在PmprA-启动子的情况下,除所述启动子和受所述启动子控制的荧光蛋白序列外,细胞进一步包含编码MprB-调节子的基因序列或所述序列变体,编码 σ 因子 σ E (SigE)的基因序列或所述序列变体,或这两种序列的组合。以 σ 因子 σ E (SigE)的方式受MprB-调节子调节的MprA-启动子的DNA序列与SEQ ID NO.13相对应,编码MprB-调节子的DNA序列与SEQ ID NO.14相对应,编码 σ 因子 σ E (SigE)的DNA序列与SEQ ID NO.15相对应。

[0091] 所述基因修饰的细胞可能是一种基因修饰的埃希氏菌属细胞,其包含受htrA-启动子或其变体控制的编码荧光蛋白的序列。在这种情况下,通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌也会导致荧光蛋白的表达。在htrA-启动子的情况下,除所述启动子和受所述启动子控制的荧光蛋白序列外,细胞进一步包含编码CpxR-调节子的基因序列或其序列变体。受CpxR-调节子调节的htrA-启动子的DNA序列与SEQ ID NO.16相对应,编码CpxR-调节子的DNA序列与SEQ ID NO.17相对应。

[0092] 以上在描述特定启动子X或特定编码调节子的基因序列Y时所用的术语“变体”,包括:

[0093] (1)所有的核酸,所述核酸至少70%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.5%,至少99.6%,至少99.7%,至少99.8%或至少99.9%,最优选100%分别与基因序列X和Y相同,所述同一性为对应核酸的总长度的同一性;

[0094] (2)在编码一种特定调节子的基因序列Y的情况下,所有的核酸编码氨基酸序列,所述氨基酸序列至少70%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.5%,至少99.6%,至少99.7%,至少99.8%或至少99.9%,最优选100%与对应的调节子的氨基酸序列相同;

[0095] (3)在一种编码特定调节子的基因序列Y的情况下,所有核酸编码同一种调节子,但由于基因编码的退化,与基因序列Y相异;

[0096] (4)在严格的条件下,所有核酸分别与序列X和Y的互补序列杂交。

[0097] 本文所用的术语“杂交”包括“核酸分子链通过碱基配对与互补链相结合的任何过程”(J.Coombs (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York)。杂交和杂交的强度(即核酸分子之间的关联强度)受以下因素的影响:如核酸和分子之间的互补程度,所涉及条件的严格性,所形成的杂交体 T_m ,以及核酸分子内G:C比例。

[0098] 如本文所用,术语“ T_m ”用于指“熔融温度”。熔融温度是指一个双链核酸分子半解离为单链时的温度。用于计算核酸分子 T_m 的反应式是本领域中已知的。如标准参考文献所

示,当核酸分子在1M NaCl(参见例如Anderson and Young,Quantitative Filter Hybridization,in Nucleic Acid Hybridization(1985))的水溶液中时,T_m值的简单估算可以通过以下等式计算:T_m=81.5±0.41(%G+C)。其他参考文献包括更复杂的计算,所述计算考虑了结构和序列特征。严格条件是本领域技术人员所熟知的,并且能在Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,N.Y.(1989),6.3.1-6.3.6.中查询到。

[0099] 特别地,术语“严格条件”指的是这种条件:其中作为互补核酸分子(DNA、RNA、ssDNA或ssRNA)的片段或与互补核酸分子相同的100个连续核苷酸或更多、150个连续核苷酸或更多、200个连续核苷酸或更多或者250个连续核苷酸或更多在下述条件下与特定核酸分子(DNA、RNA、ssDNA或ssRNA)杂交,所述条件等价于在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中于50℃杂交,用2X SSC、0.1%SDS于50℃条件下洗涤,优选为65℃条件下洗涤。优选地,杂交条件等价于在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中于50℃条件下杂交,用1X SSC、0.1%SDS于50℃或65℃、优选于65℃条件下洗涤;更优选地,杂交条件等价于在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中于50℃杂交,用0.1X SSC、0.1%SDS于50℃或65℃、优选于65℃条件下洗涤。优选地,互补核苷酸与整个fruA核酸或其片段杂交。可选地,优选的杂交条件涵盖于1x SSC中在65℃或于1x SSC和50%甲酰胺中在42℃条件下杂交,并随后于0.3x SSC中在65℃条件下洗涤,或于4x SSC中在50℃条件下或于6x SSC和50%甲酰胺中在40℃条件下杂交,并随后于2x SSC中在50℃条件下洗涤。其它优选的杂交条件为0.1%SDS、0.1SSD和65℃。

[0100] 因此,原则上,根据本发明,生产包含上述启动子和核酸的细胞的各种可能性是存在的,所述核酸编码荧光蛋白并受该启动子的控制。

[0101] 第一种可能性包括,例如开始于一种细胞,所述细胞基因组已经包含上述的一种启动子,优选地为编码相应调节子的基因序列,然后引入到编码荧光蛋白的基因序列的基因组中,如此一来,所述基因序列受到启动子的控制。在适当的情况下,在编码荧光蛋白的基因序列整合前或整合后,启动子本身的核酸序列可被修饰,方法是通过一个或更多核苷酸交换、核苷酸缺失或核苷酸插入,目的是为了提升启动子效率。

[0102] 第二种可能性包括,例如向细胞引入一个或更多个包含启动子序列和基因序列的核酸构建体,所述基因序列编码蛋白质并受所述启动子的控制,此处为了提升启动子效率,也可能通过一个或多个核苷酸交换、核苷酸缺失或核苷酸插入来修饰启动子本身的核酸序列。核酸构建体插入可以在染色体上或染色体外进行,例如在染色体外复制载体上。合适的载体是指在特定菌株中复制的载体。许多已知的质粒载体,如pZ1(Menkel et al.,Applied and Environmental Microbiology(1989)64:549-554),pEKEx1(Eikmanns et al.,Gene 102:93-98(1991)),或pHS2-1(Sonnen et al.,Gene 107:69-74(1991)),其是基于隐蔽性质粒pHM1519,pBL1or pGA1。其他质粒载体,如基于pCG4(US 4,489,160)或pNG2(Serwold-Davis et al.,FEMS Microbiology Letters 66,119-124(1990)),或pAG1(US 5,158,891)的质粒载体,则可以同样的方式使用。然而,所述列表并不限制本发明。

[0103] 用于生产基因构建体的方法说明是本领域中技术人员所熟知的,如Martin等人(Bio/Technology 5,137-146(1987)),Guerrero等人(Gene 138,35-41(1994)),Tsuchiya和Morinaga(Bio/Technology 6,428-430(1988)),Eikmanns等人(Gene 102,93-98

(1991)), 美国专利申请US 4,601,893中的EP-A-0 472 869, Schwarzer和Pühler (Bio/Technology 9,84-87 (1991), Remscheid等人 (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)), LaBarre等人 (Journal of Bacteriology 175,1001-1007 (1993)), WO-A-96/15246, Malumbres等人 (Gene 134,15-24 (1993)), JP-A-10-229891, Jensen和Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58,191-195 (1998)) 以及已知的基因学和分子生物学教科书。所述方法说明包括一种启动子和一种受该启动子控制的基因序列, 和将这种构建体整合到细胞的染色体中, 或将包含所述基因构建体的染色体外复制载体转移到细胞中。

[0104] 本发明还涉及鉴定细胞的方法, 所述细胞特征在于具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌, 包括以下方法步骤:

[0105] $\alpha 1$) 提供一种包含所述细胞的细胞悬浮液, 根据本发明该细胞相对于其野生型已经被基因修饰且包括一种编码荧光蛋白的基因序列, 其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量;

[0106] $\alpha 2$) 通过细胞的基因修饰可获取细胞悬浮液, 该细胞悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量上是不同的;

[0107] $\alpha 3$) 在细胞悬浮液中鉴定个体细胞, 该细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质的分泌;

[0108] $\alpha 4$) 将所述鉴定的细胞从细胞悬浮液中有选择地分离开。

[0109] 根据本发明, 在方法的步骤 $\alpha 1$) 中, 首先提供一种包含营养素培养基和大量上述已经基因修饰细胞的细胞悬浮液。

[0110] 根据本发明, 在方法的步骤 $\alpha 2$) 中, 为了获取一种细胞悬浮液, 所述细胞悬浮液中一种或多种细胞然后被基因修饰, 在该细胞悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量上不同;

[0111] 细胞悬浮液的基因修饰可以通过靶向或非靶向诱变、或通过代谢工程尤其为非靶向诱变而进行。

[0112] 在靶向诱变中, 尤其是细胞基因的突变是以受控的方式而生成。可能的突变为转变、颠换、插入和缺失。根据氨基酸交换对酶活性的影响, 可以参考“错义突变”或“无义突变”。基因中至少一个碱基对的插入或缺失会导致“框架疑为突变”, 其结果是错误的氨基酸被包含在内或翻译过早中断。几个密码子的缺失通常导致酶活性完全丧失。产生这种突变的方法说明是一种先进技术且可以在已知的基因学和分子生物教科书中找到, 例如Knapp (“Molekulare Genetik”, 6th edition, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, Germany, 1995)、Winnacker (“Gene und Klone”, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990) 或Hagemann (“Allgemeine Genetik”, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, 1986) 主编的教科书。涉及靶向诱变方法的细节, 尤其是有用的文献参考, 可以在例如DE-A-10224 088中找到。

[0113] 然而, 如果方法步骤 $\alpha 2$) 中的基因修饰由非靶向诱变进行, 那么根据本发明, 这种情况是优选的。所述非靶向诱变的实施例是用化学物质处理细胞, 如N-甲基-N-硝基-N亚硝基胍或紫外线照射细胞。诱导突变的这种方法通常是已知的, 并且可以特别在Miller (“A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for

Escherichia coli and Related Bacteria” (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) 或美国细菌学协会手册 “Manual of Methods for General Bacteriology” (Washington D.C., USA, 1981)。

[0114] 根据本发明中另一个过程的实施例,如果在方法步骤 $\alpha 2$)中的基因修饰是通过代谢工程实现的,那么它也是可能的。本文所述的术语“代谢工程”指的是基因细胞信息的靶向基因修饰。这种修饰包括将基因引入到不属于该物种的物种中(如异源基因),天然基因(如同源基因)的复制,基因缺失,同源或异源基因的重排,或调节序列,例如信号序列、衰减子、启动子或终止子的引入。进行代谢工程的方法是本领域中已知的,且可以从已知的基因学和分子生物学教科书中获得,例如Mülhardt的“The experimenter:molecular biology/genomics”, 6th edition, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, 2009, 及 Wink的“Molecular Biotechnology: Concepts, Methods and Applications”, 2nd Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2011。

[0115] 代谢工程的一个实施例是调节序列的引入,该调节序列编码Sec-信号肽,以及当与编码蛋白序列的基因直接或间接融合时,会导致从细胞中分泌融合蛋白(Rusch and Kendall, 2007, “Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport”, Biochemistry 46, 9665-9673; Bendtsen et al., 2004: “Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0”, J. Mol. Biol. 340, 783-795; Nielsen et al., 1997: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites”, Protein Eng. 10, 1-6; von Heijne and Abrahmsen, 1989: “The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins”, Protein Eng. 2, 531-534; von Heijne, 1989: “Species-specific variation in signal peptide design: Implications for protein secretion in foreign hosts”, FEBS Lett. 244, 439-446; Dalbey et al., 2012: “Membrane proteases in the bacterial protein secretion and quality control pathway”, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76, 311-350)。代谢工程的其他实施例是蛋白编码基因的密码子使用的变化,受蛋白编码基因控制的启动子的变化,或蛋白编码基因上游区域中核糖体结合点位的变化。

[0116] 通过方法步骤 $\alpha 2$)中的细胞基因修饰,根据细胞中发生的突变的性质,尤其在特定细胞中,例如作为酶活性增加或下降、特定酶表达增加或下降、特定转运蛋白活性上升或下降、特定转运蛋白表达上升或下降的结果,以及作为调节蛋白中的突变、调节序列的突变、结构蛋白的突变、RNA调控因子的突变、新的(异源的)酶活性的引入、新的(异源的)调节蛋白的引入、新的(异源或合成)调节序列的引入、新的(异源的)结构蛋白引入、或新的(异源的)RNA调控因子的引入的结果,通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质可能会增加,通过启动子与相应调节蛋白相互作用,这会影响荧光蛋白的表达。因此,作为突变的结果,通过细胞质膜至胞外空间的蛋白质分泌增加的细胞的区别在于,所述细胞中形成了荧光蛋白。因此,对通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌而言,荧光蛋白基因扮演着报告基因的角色。

[0117] 根据本发明,在方法步骤 $\alpha 3$)中,细胞悬浮液中的细胞因此可以通过检测细胞内荧光活性而被鉴定,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质分泌。为此,细

胞悬浮液暴露在高频电磁辐射中可以激发荧光蛋白发光。

[0118] 根据本发明所述方法的独特结构,优选地直接在方法步骤 $\alpha 3$)中的细胞鉴定之后,进一步执行方法步骤 $\alpha 4$),在该方法步骤中,所述鉴定的细胞从细胞悬浮液中被分离,此分离过程优选地以流式细胞术(FACS=荧光激活细胞分选术)的方式进行,特别优选地以高效流式细胞术(HT-FACS=高通量荧光激活细胞分选术)的方式进行。流式细胞术方法分析细胞悬浮液的细节可以在以下文献中找到,例如,在Sack U,Tarnok A,Rothe G(eds.): *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Basel, Karger, 2007, pages 27-70。

[0119] 通过本发明所述的方法,在细胞已经产生靶向或非靶向突变或者代谢工程已经改变基因信息的细胞悬浮液中,因此以靶向、不会影响所述细胞活力的方式来分离这些细胞是可能的,在所述细胞中,突变导致了通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质的分泌。

[0120] 根据本发明,传感器不仅可以用来鉴定基因修饰,所述基因修饰导致通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白质的分泌,而且还可以用来:

[0121] -在包含多个基因不同的细胞悬浮液中鉴定细胞,所述细胞的特征在于具有通过细胞质膜进入胞外空间的很高的蛋白质的分泌;

[0122] -为通过细胞质膜进入胞外空间的蛋白质分泌优化细胞培养条件;

[0123] -为通过细胞质膜进入胞外空间的蛋白质分泌优化细胞培养基;

[0124] -鉴定化合物,该化合物特征在于其具有抗菌活性,原因是其能破坏细菌细胞膜的性质或其能分析此类化合物对基因不同的细菌细胞的影响的性质。

[0125] 所述方法包括方法步骤 $\beta 1$)至 $\beta 3$), $\gamma 1$)至 $\gamma 3$), $(\delta 1)$ 至 $(\delta 3)$ 或 $\epsilon 1$)至 $\epsilon 3$),如下所述:

[0126] 本发明还涉一种及细胞悬浮液中细胞鉴定的方法,所述细胞特征在于具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌,或鉴定包含细胞的细胞悬浮液的方法,所述细胞的特征在于具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌,包括以下方法步骤:

[0127] $\beta 1$) 提供

[0128] -包含多个细胞的细胞悬浮液,根据本发明,所述细胞相对于其野生型已经被基因修饰且包含一种编码荧光蛋白的基因,其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量,其中细胞悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量上彼此不同,

[0129] 或

[0130] -多种细胞悬浮液,每种细胞悬浮液包括根据本发明所述的相关于其野生型方面已经被基因修饰且包含一种编码荧光蛋白的基因的细胞,其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量,其中细胞悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量上彼此不同;

[0131] $\beta 2$) 在细胞悬浮液中或不同细胞悬浮液中培养不同的细胞;

[0132] $\beta 3$) 在细胞悬浮液中鉴定个体细胞,所述细胞具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌,或鉴定包含具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌的细胞的单个细胞悬浮液。

[0133] 与所述特定过程一起使用的术语“具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌的细胞”指的是,与其他细胞悬浮液中的细胞相比,与其他细胞悬浮液相比,所述细胞

或细胞悬浮液特征在于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质量特别高。

[0134] 本发明还涉及一种鉴定培养基成分的方法,该培养基成分在蛋白质重组生产方面得到优化,包括以下方法步骤:

[0135] γ 1) 提供多种在成分上彼此不同的培养基;

[0136] γ 2) 根据本发明,培养相关于其野生型已经被基因修饰且包含一种编码荧光蛋白的基因的细胞,其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量,从而获得多种细胞悬浮液。由于培养基的成分不同,所述细胞悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量均不同。

[0137] γ 3) 鉴定这些包含具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌的细胞的细胞悬浮液。

[0138] 与所述特定过程一起使用的术语“具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌的细胞”指的是,与其他细胞悬浮液相比,所述细胞悬浮液特征在于,通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质分泌特别高。因此,所述细胞中通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌意味着,用于该特定的细胞悬浮液中的培养基尤其有利于细胞的培养,所述细胞旨在通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白质分泌。

[0139] 方法步骤 γ 1) 过程中提供的培养基在碳源的种类和数量、氮源的种类和数量、磷源的种类和数量、微量元素的种类和数量、盐的种类和用量、洗涤剂的种类和数量、维生素的种类和数量、缓冲液的种类和数量等方面是彼此不同的。

[0140] 本发明还涉及一种鉴定培养条件的方法,所述培养条件被优化以用于蛋白质的重组生产,包括以下方法步骤:

[0141] δ 1) 提供多种根据本发明包含细胞的细胞悬浮液,所述细胞相对于其野生型已经被基因修饰且包含一种编码荧光蛋白的基因,其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质的量;

[0142] δ 2) 在这些细胞悬浮液中以不同的条件培养这些细胞,这样,由于培养条件的不同,所述在不同细胞悬浮液中的细胞在通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质分泌量方面也是不同的;

[0143] δ 3) 鉴定这些包含具有通过细胞质膜进入胞外空间的高的蛋白质的分泌的细胞的细胞悬浮液。

[0144] 与该特定过程相关的这一表述“具有通过细胞质膜进入胞外空间的高蛋白分泌的细胞”指的是那些细胞悬浮液,与其它细胞悬浮液相比,其特征在于其通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白质分泌特别高。因此,通过细胞质膜分泌至该细胞悬浮液中的胞外空间的高蛋白分泌表明本实验装置中所选择的培养条件对于旨在通过细胞质膜分泌大量蛋白至胞外空间的细胞的培养特别有利。

[0145] 处理步骤 δ 2) 中培养条件的变化可以涉及,例如温度,搅拌速率,供氧量,进料速率,添加诱发物的时间点,培养时间和进行细胞培养方式的变化(分批处理,连续发酵等)。

[0146] 本发明还涉及一种鉴定化合物的方法,由于该种化合物具有抗菌活性,其是由于具有破坏细菌细胞膜的性质,或分析这种化合物对处于不同生理状态或不同生长阶段的基因不同的细菌细胞群体或基因相同的细胞群体产生影响的性质,所述方法包括以下方法步骤:

[0147] ε1) 根据本发明, 提供一种细胞悬浮液, 该细胞悬浮液包括许多细胞, 其是相对于其野生型经基因修饰的细胞, 并且其包含一种编码一种荧光蛋白的基因序列, 其中荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌到胞外空间中的蛋白的量;

[0148] ε2) 在所述化合物存在的情况下, 对这些细胞悬浮液中的细胞进行培养;

[0149] ε3) 通过鉴定细胞内荧光活性来判断所述化合物的抗菌活性。

[0150] 惊奇地发现本发明中的传感器也可以用于鉴定一种化合物, 该种化合物由于其破坏细菌细胞膜的性质而具有抗菌活性的特征。如果这种化合物破坏了一种含有本发明中的传感器的细胞的膜, 则可以观察到细胞内荧光蛋白的表达有所增加。

[0151] 包含本发明中的传感器的细胞因此也可以用于, 例如用于判断给定的化合物是否具有破坏细菌细胞膜的能力, 或者在何种浓度下, 给定化合物具有破坏细菌细胞膜的能力。为此, 根据本发明, 将化合物以一种或不同浓度加入到包含传感器的细胞悬浮液中, 并且在该化合物存在的情况下培养该细胞, 通过鉴定细胞内荧光活性来判断该化合物是否破坏细胞膜, 且在何种浓度下该化合物会破坏细胞膜。

[0152] 包含本发明中的传感器的细胞因此也可以用于, 例如用于判断细胞悬浮液中的哪种细胞易受一种特定化合物的影响, 该种化合物会破坏细菌细胞膜, 其中该细胞悬浮液包括多个处于不同生理状态或不同生长阶段的基因不同或基因相同的细胞。为此, 将该化合物添加到处于不同生理状态或不同生长阶段的一种基因不同的细胞悬浮液中或基因相同的细胞中, 其中根据本发明, 每个细胞都包括该传感器, 并且在该种化合物存在的情况下, 对细胞进行培养, 以通过鉴定细胞内荧光活性来判断哪种细胞易受该化合物的影响。

[0153] 本发明还涉及一种生产相对于其野生型经基因修饰的细胞的方法, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间中的优化的蛋白分泌, 所述方法包括以下方法步骤:

[0154] I) 提供一种包含本发明中细胞的细胞悬浮液, 其中所述细胞是相对于其野生型经基因修饰的细胞, 包含编码荧光蛋白的基因序列, 其中所述荧光蛋白的表达取决于通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白的量。

[0155] II) 对细胞进行基因修饰以获得一种细胞悬浮液, 其中细胞悬浮液中的细胞就通过细胞质膜分泌到胞外空间的蛋白量而言会有所不同;

[0156] III) 鉴定细胞悬浮液中的个体细胞, 这些细胞具有通过细胞质膜进入至胞外空间的增加的蛋白分泌;

[0157] IV) 从细胞悬浮液中分离出已鉴定的细胞;

[0158] V) 鉴定已被鉴定及分离出来的细胞中那些经基因修饰的 G_1 至 G_n 基因或那些经突变的 M_1 至 M_m 基因, 其中上述基因导致通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白分泌;

[0159] VI) 生产相对于其野生型经基因修饰的细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌, 其中基因组包含至少一个 G_1 至 G_n 基因和/或至少一个突变 M_1 至 M_m 基因。

[0160] 根据方法步骤I) 至IV), 通过突变或通过代谢工程首先产生细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的增加的蛋白分泌, 并从细胞悬浮液中将细胞分离出来。关于这些处理步骤的细节, 参考如上所述的处理步骤i) 至iv)。

[0161] 在方法步骤V) 中, 在被鉴定和分离出来的细胞中, 那些经基因修饰的基因 G_1 至 G_n 或那些经突变的基因 M_1 至 M_m 然后通过本领域技术人员已知的遗传方得以鉴定, 其中上述经基因修饰的基因 G_1 至 G_n 或那些经突变的基因 M_1 至 M_m 导致通过细胞质膜进入胞外空间的增加的

蛋白分泌, n 和 m 的数值取决于观察到的修饰基因的数目, 以及在鉴定和分离出的细胞中分别观察到的突变基因的数量。优选地, 在本上下文中的步骤是这样的, 首先分析那些基因的序列或那些已知能够促进蛋白质通过细胞质膜进入胞外空间的细胞中的启动子序列。如果没有在这些基因中的任何一个中识别突变, 则按照顺序分析已被鉴定和分离的细胞的整个基因组, 以便在适当的情况下鉴定进一步修饰的基因 G_i 或进一步的突变 M_i 。可以以这种方式鉴定有利的修饰基因序列 G_i 或有利的突变 M_i , 其中有利的修饰基因序列 G_i 或有利的突变 M_i 使得通过细胞质膜分泌至胞外空间的蛋白有所增加。

[0162] 在另一种方法步骤VI) 中, 相对于其野生型经基因修饰的细胞, 具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌, 其中基因组包含至少一个基因 G_1 至 G_n 和/或可以产生的至少一个突变 M_1 至 M_m 。为此, 有针对性地将方法步骤V) 中观察到的一个或多个有利的修饰基因 G 和/或修饰突变 M 引入细胞中。特定突变的这种针对性引入可以, 例如通过“基因替换”的方式得以实现。在该方法中, 一种突变, 例如删除, 插入或碱基交换, 在目的基因的体外产生。产生的等位基因又被克隆到载体上, 其对目标主体来说是不可复制的, 然后通过转化或缀合将其转移到目标主体内。在通过影响整合的第一“交叉”事件和影响靶基因或靶序列中的切除的一个合适的第二“交叉”事件进行同源重组之后, 实现突变或等位基因的合并。

[0163] 本发明还涉及一种细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌, 这也已经通过上述方法获得。

[0164] 本发明也涉及到一种生产蛋白的过程, 该过程包括以下方法步骤:

[0165] (a) 通过上述方法生产相对于其野生型经基因修饰的细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌;

[0166] (b) 在一种能从所述营养物质产生蛋白质的条件下的包含营养物质的培养基中培养所述细胞。

[0167] 可以通过该方法制备的合适的蛋白质包含激素, 毒素, 抗体, 结构蛋白, 酶, 转运蛋白或调节蛋白。特别合适的是那些已经提及的, 与本发明中的细胞有关联的蛋白质。

[0168] 根据本发明, 按照方法步骤(a) 的生产的经基因修饰的细胞, 其具有通过细胞质膜进入胞外空间的优化的蛋白分泌, 可在方法步骤(b) 的营养培养基中以分批处理的方法(分批培养) 或以补料分批的方法(进料方法) 或重复补料分批的方法(重复进料方法) 连续不断或间断地培养, 以产生蛋白质。还可以想到如GB-A-1009370中所述的半连续方法。Chmiel的教科书(“Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik”, Gustav Fischer Verlag, , Stuttgart, 1991), 或在Storhas的教科书(“Bioreaktoren und periphere Einrichtungen”, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994) 中都有描述已知的培养方法的概述。

[0169] 使用的营养培养基必须以合适的方式满足特定菌株的要求。各种微生物培养基的描述包含在美国细菌学协会的手册“普通细菌学方法手册”中(美国, 华盛顿, 1981) 中。

[0170] 营养培养基可以包含碳水化合物, 例如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉和纤维素, 油和脂肪, 例如大豆油、葵花油、花生油和椰子脂, 脂肪酸, 例如棕榈酸、硬脂酸和亚油酸, 醇, 例如甘油和甲醇, 烃, 例如甲烷, 氨基酸, 例如L-谷氨酸或L-缬氨酸, 或有机酸, 例如乙酸, 作为碳源。这些物质可单独使用或以混合物形式使用。

[0171] 营养培养基可以包含有机含氮化合物, 例如蛋白胨、酵母提取物、肉膏、麦芽提取

物、玉米液、大豆粉和尿素,或无机化合物,例如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸盐和硝酸铵,作为氮源。所述氮源可以单独使用或以混合物形式使用。

[0172] 营养培养基可以包含磷酸,磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或相应的含钠盐作为磷源。所述营养培养基必须另外含有生长所必须的金属盐,例如硫酸镁或硫酸铁。最后,除了上述物质以外,还可使用生长必须物质,例如氨基酸和维生素。另外,可向营养培养基中添加合适的前体。可在培养期间将提及的起始物质以单批次形式添加到培养物中或以合适方式给料。

[0173] 为了控制培养物的pH值,可以以合适的方式使用碱性化合物,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氨或氨水,或酸性化合物,例如磷酸或硫酸。为了控制泡沫继续产生,可使用消泡剂,例如脂肪酸聚乙二醇酯。为了维持质粒的稳定,可向培养基中添加合适的选择性作用的物质,例如抗生素。为了维持有氧条件,向培养物中引入氧气或含氧气体混合物,例如空气,培养物的温度通常为15℃到45℃,优选为25℃到40℃。

[0174] 本发明还涉及一种制备混合物的方法,包括以下方法步骤:

[0175] (A) 通过上述方法制备蛋白质;

[0176] (B) 将蛋白质及与蛋白质不同的混合物组分混合。

[0177] 所述混合物可以是食品、动物饲料、药物组合物、用于食品生产的组合物,例如包含淀粉水解酶和脂肪水解酶的混合物,其用作酶促单甘油酯的替代物,使得酵母发酵的烘焙食品、胶合组合物、纺织整理组合物或木质纤维分解组合物具有碎屑结构轮廓。

[0178] 现借助附图和非限制性实施例对本发明做进一步说明。

[0179] 图1示出根据菌株ATCC13032pSen0706 (见实施例1c) 中杆菌肽 (Bac) 浓度来鉴定荧光。

[0180] 图2示出根据菌株ATCC13032pSen0706 (见实施例1c) 中万古霉素 (Van) 浓度来鉴定荧光。

[0181] 图3示出根据菌株ATCC 13032 pSen0706 pCLTON2-AmyE (见实施例1e) 中AmyE的分泌水平或细胞质膜跨膜侧的AmyE的浓度来鉴定荧光。

[0182] 图4示出根据菌株ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2 (见实施例3d) 中角质酶的分泌水平或细胞质膜跨膜侧的角质酶的浓度来鉴定荧光。

[0183] 图5根据AmyA的分泌水平示出菌株C. 谷氨酸棒杆菌ATCC 13032 pSen0706S pEKEx2-AmyA的细胞的体内荧光,其中所述细胞已经在具有或不具有山梨醇的营养培养基中培养(实施例1g))。

[0184] 图6示出了根据角质酶的分泌水平或细胞质膜跨膜侧的角质酶浓度的体内荧光,其中已经使用了具有不同遗传背景的菌株 (ATCC 13032 gSen0996_8和MB001 gSen0996_8) (实施例3f))。

[0185] 图7示出了根据角质酶的分泌水平或细胞质膜跨膜侧的角质酶浓度的体内荧光,其中已经使用了不同的分泌信号肽(实施例3i))。

[0186] 图8示出了通过荧光激活细胞分选术 (FACS) 对谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032 pSen0996_8pCLTON2-FsCut (NprE) (图8A), 谷氨酸棒杆菌ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2_FsCut (Ywmc) (图8B) 和含有比例为1:1的两种菌株的混合培养物(图8C) 体内荧光发射进行检测。(实施例3k))。

[0187] 实施例1

[0188] 根据本发明中的第一实施例,通过一个细胞的例子来生产细胞,其中编码荧光蛋白的基因序列受cg0706启动子的控制,并且其中荧光蛋白的表达取决于是否有化合物存在,及该化合物的浓度,这种化合物的特征在于:其具有抗菌活性,这归因于破坏细菌细胞膜的性质,或取决于细胞质膜的跨膜侧的 α -淀粉酶(AmyE)的浓度。

[0189] a) 构建载体pSen0706 and pSen0706S

[0190] 通过PCR扩增启动子序列并随后克隆到载体pSenLys(Binder等人,“A high-throughput approach to identify genes variants of bacterial metabolite producer in the single-cell level”;基因组生物学13(5),R40,2002),来实现启动子P(cg0706)与报告基因eyfp(SEQ ID No.18;eYFP的蛋白质序列:SEQ ID No.19)的融合的构建。将谷氨酸棒杆菌ATCC13032的基因组DNA用作模板,寡核苷酸0706-Sal-fII(SEQ ID No.20)和0706-RBSNde-r(SEQ ID No.21)则用作引物。pSenLys已经包含了编码eyfp的序列。

[0191] 0706-RBSNde_r:

[0192] GCGCATATGATATCTCCTTCTTCTAGCGGGTCTGCCACATTTGCTG

[0193] 0706-Sal-fII:

[0194] GCGGTCGACGGGTAAACGTGGGATATAAA

[0195] 在从0.8%琼脂糖凝胶上纯化扩增的片段后,用限制酶SalI和NdeI消化片段,纯化所述反应混合物后,将片段连接到已经用SalI and NdeI打开并去磷酸化的载体pSenLys中。连接混合物直接用于转化大肠杆菌XL1-blue,并且在含有50 μ g/ml卡那霉素的LB平板上进行转化体的选择。在这些平板上生长,对卡那霉素具有抗性的32个菌落从而可用于菌落PCR。使用引物SenCas-fw(SEQ ID No.24)和TKP-seq-rv(SEQ ID No.25)处理菌落PCR,以检查启动子片段是否插入到载体pSenLys中。对琼脂糖凝胶中的菌落PCR的分析显示了已经分析的样品中具有大小为343bp的PCR产物,于是培养4个菌落,用于更大规模的质粒制备。培养16个小时后,通过离心分离收集这些培养物,制备质粒DNA。这些质粒制备物中的两种用菌落PCR中使用的引物进行测序,插入的序列与预期序列显示100%同一性。所得质粒命名为pSen0706(SEQ ID No.35)。

[0196] 通过PCR扩增壮观霉素抗性介导序列,及随后将PCR产物克隆到载体pSen0706中,得到质粒pSen0706S,其是pSen0706的变体,其表达了壮观霉素抗性而不是卡那霉素抗性。质粒pEKEx3用作PCR的模板,寡核苷酸Spc SacII-f(SEQ ID No.22)和Spc Bgl-r(SEQ ID No.23)用作引物。

[0197] Spc SacII-f:

[0198] GCGCCGCGGACTAATAACGTAACGTGACTGGCAAGAG

[0199] Spc Bgl-r:

[0200] GCGAGATCTTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGAC

[0201] 从0.8%琼脂糖凝胶中纯化扩增的片段后,用限制酶SacII和BglII消化片段,纯化反应混合物后,将该片段连接到已经用SacII和BglII消化且去磷酸化的载体pSen0706中。将连接混合物直接用于转化大肠杆菌XL1-blue,并在含有100 μ g/ml壮观霉素的LB平板上进行转化体的选择。在这些平板上生长并因此具有壮观霉素抗性的4个菌落被用于接种液体

培养物(5ml含有100 μ g/ml壮观霉素的LB培养基)。培养16小时后,将这些培养物离心,制备质粒DNA。使用引物SenCas-fw (SEQ ID No.24)和TKP-seq-rv (SEQ ID No.25)对这些质粒制备物中的2个进行测序,并且插入片段的序列与预期序列显示100%同一性。所得质粒命名为pSen0706S。

[0202] SenCas-fw:

[0203] GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATG

[0204] TKP-seq-rv:

[0205] CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCG

[0206] b) 用pSen0706转化谷氨酸棒杆菌

[0207] 按照Tauch等人,在2002 (Curr Microbiol.45 (5) (2002),第362-7页)所述制备谷氨酸棒状杆菌菌株ATCC 13032的感受态细胞,如Tauch等人所述用pSen0706通过电穿孔转化这些细胞。用含有25 μ g/ml的卡那霉素在BHIS平板上进行转化体的选择,由此获得的克隆命名为ATCC 13032 pSen0706。

[0208] c) 根据一种化合物的浓度检测荧光,其中该化合物的特征在于抗菌性,这种特性源于其具有破坏细菌细胞膜的性质。

[0209] 通过在微型生物反应器系统中,用微量滴定仪 (Flowerplate®MTP-48-B) 中的0.8ml CGXII培养基 (Keilhauer等人,1993,J.Bacteriol.175:5595-603) 培养菌株ATCC 13032 pSen0706的细胞的方式来鉴定 (Mplate-48-B) (m2p-labs GmbH,52499 Baesweiler,德国) 体内荧光发射。该系统允许平行培养48种培养物,及定期对培养物的生长情况和荧光进行自动光学测量。将10株具有菌株ATCC 13032 pSen0706细胞的培养物接种至0.1的光密度 (OD) 并培养24小时。4小时后,将抗菌物质万古霉素或杆菌肽添加到培养物中。将万古霉素浓度调整至0;1.25;2.5;5;10;15;20 μ g/ml,将杆菌肽浓度调节至0;1;4 μ g/ml。每10分钟测量培养物的细胞密度和荧光。用波长485nm的光激发荧光,EYFP的荧光发射测量在520/10nm进行。通过BioLecton V.2.4.1.0软件对培养物的荧光进行数字记录。观察到具有不同的万古霉素或杆菌肽浓度的培养物的荧光发射也不同 (图1和图2)。

[0210] d) 用pCLTON-AmyE转化ATCC 13032 pSen0706。

[0211] 如上所述,用载体pCLTON2-AmyE通过电穿孔转化上述谷氨酸棒杆菌ATCC 13032 pSen0706的感受态细胞。该载体包含核酸序列,用于编码来自枯草芽孢杆菌的淀粉水解酶 α -淀粉酶 (AmyE) 和Sec特异性天然信号肽,以便能够在谷氨酸棒杆菌的Sec途径上输出蛋白质。通过用引物AmyE-HpaI-f (SEQ ID No.33) 和AmyE-SacI-r (SEQ ID No.34) 扩增来自枯草芽孢杆菌的染色体DNA的AmyE编码序列,用HpaI和SacI限制并连接在SmaI/SacI切割的pCLTON2载体中,该载体是pCLTON1的壮观霉素抗性赋予衍生物 (谷氨酸棒杆菌的四环素诱导型表达载体,其允许紧密调节的基因表达。Lausberg F,Chattopadhyay AR,Heyer A, Eggeling L,Freudl R.Plasmid.2012 68 (2):142-7)。由此获得的克隆命名为ATCC 13032 pSen0706 pCLTON2-AmyE。

[0212] AmyE-Hpa-f:

[0213] GCGCGTTAACCGAAGGAGATATAGATATGTTTGC

[0214] AmyE-Sac-r:

[0215] CAGTGAATTCGAGCTCCTAGTG

[0216] e) 根据AmyE分泌水平或细胞质膜的跨膜侧的AmyE的浓度来检测荧光(参数变化)

[0217] 通过在BioLector系统(m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, 德国)中,用微量滴定仪中(Flowplate® plate.MTP-48-B)的0.8ml CGXII培养基(Keilhauer等人, 1993, J.Bacteriol. 175:5595-603)培养菌株ATCC 13032 pSen0706 pCLTON2-AmyE的细胞,来检测体内荧光。将3株具有菌株ATCC 13032 pSen0706 pCLTON2-AmyE细胞的培养物接种至0.1的光密度(OD)并培养24小时。4小时后,通过加入脱水四环素(ATc)诱导AmyE的表达。将脱水四环素(ATc)浓度调节至0, 100, 250ng/ml以引起不同的表达强度。每10分钟测量培养物的细胞密度和荧光。用波长485nm的光激发荧光, EYFP的荧光发射测量在520/10nm进行。通过BioLector V.2.4.1.0软件对培养物的荧光进行了数字记录。观察到不同诱导的培养物的荧光发射也不同(图3)。24小时后,将Flowplate中的培养物离心,以沉淀细胞并获得无细胞的培养物上清液。通过淀粉酶测定法(Phadebas Amylase Test, Magle AB, 瑞典, 隆德),每种培养物上清液的中20μl用于定量分泌的AmyE的酶活性。观察到在这些选择的培养条件下由ATc浓度诱导的培养物上清液中淀粉酶的活性较高,这不得不认为其与更高的荧光发射相关。

[0218] f) 用pEKEx2-AmyA转化谷氨酸棒杆菌ATCC 13032 pSen0706S。

[0219] 如上所述,用载体pEKEx2-AmyA通过电穿孔转化上述谷氨酸棒杆菌ATCC 13032 pSen0706S的感受态细胞。该载体包含核酸序列,用于编码来自枯草芽孢杆菌的淀粉水解酶 α -淀粉酶(AmyA)和Sec特异性天然信号肽,以便能够在谷氨酸棒杆菌的Sec途径上输出蛋白质。通过用引物AmyA-BamHI-f (SEQ ID No. 40)和AmyA-SacI-r (SEQ ID No. 41)扩增来自枯草芽孢杆菌的染色体DNA的AmyA编码序列,用BamHI和SacI进行限制SacI和连接在BamHI/SacI切割的pE-KEx2-载体中(Eikmanns等人, 基因102:93-98 (1991)),以制备pEKEx2-AmyA。由此获得的克隆命名为ATCC 13032 pSen0706S pEKEx2-AmyA。

[0220] AmyA-BamHI-f:

[0221] CGCGGATCCAAGGAGAATGACGATGAGAAAACGTAAAAATGGATTAATC

[0222] AmyA-SacI-r:

[0223] GCGGAGCTCTAATTATTTACCCATATAGATACAGACCCAC

[0224] g) 根据AmyA的分泌水平或细胞质膜跨膜侧的AmyA的浓度来检测荧光,其作为营养培养基中山梨醇含量变化的实施例。

[0225] 通过在BioLector系统(m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, 德国)中,在微量滴定仪中添加或不添加91g/l的山梨醇,用0.8ml “Difco脑心浸液”培养基(Difco, Becton Dickinson BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, 美国, 纽约)培养谷氨酸棒杆菌ATCC 13032 pSen0706S pEKEx2-AmyA的细胞,来鉴定体内荧光。将4株具有菌株ATCC 13032 pSen0706S pEKEx2-AmyA的细胞的培养物接种至0.1的光密度(OD)并培养24小时。4小时后,通过加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导AmyE的表达。将IPTG-浓度调节至10或50μM以引起不同的表达强度。每10分钟测量培养物的细胞密度和荧光。用波长485nm的光激发荧光, EYFP的荧光发射测量在520/10nm进行。通过BioLector V.2.4.1.0软件对培养物的荧光进行了数字记录。观察到不同诱导的培养物的荧光发射也不同,且生长于含有或不含有山梨醇的营养培养基中的培养物的荧光发射不同(图5)。24小时后,将Flowplate中的培养物离心,以沉淀细胞并获得无细胞的培养物上清液。通过淀粉酶测定法(Phadebas

Amylase Test, Magle AB, 瑞典, 隆德), 每种培养物上清液的中20μl用于定量分泌的AmyE的酶活性。观察到在这些选择的培养条件下由ATc浓度诱导的培养物上清液中淀粉酶的活性较高, 这不得不认为其与更高的荧光发射有关。

[0226] 实施例2

[0227] 根据本发明中的第一实施例, 通过一个细胞的例子来制备细胞, 其中用于编码荧光蛋白的基因序列受cg1325启动子的控制, 并且其中荧光蛋白的表达取决于是否存在一种化合物, 及该化合物的浓度, 这种化合物的特征在于: 其具有抗菌活性, 这归因于破坏细菌细胞膜的性质, 或取决于细胞质膜的跨膜侧的某一蛋白质的浓度。

[0228] a) 构建载体pSen1325

[0229] 通过PCR扩增启动子序列并随后克隆到载体pSenLys (Binder等人, “A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producer at the single-cell level”; 基因组生物学13(5), R40, 2012), 实现启动子P (cg1325) 与报告基因eyfp (SEQ ID No.18; eYFP的蛋白质序列: SEQ ID No.19) 的融合的构建; 将谷氨酸棒杆菌ATCC13032的基因组DNA用作模板, 寡核苷酸1325-Sal-f (SEQ ID No.26) and 1325-RBSNde-r (SEQ ID No.27) 则用作引物。pSenLys已经包含了编码eyfp的序列。

[0230] 1325-Sal-f:

[0231] GCGGTCGACGAGCTGTAAGGGTTTACTTG

[0232] 1325-RBSNde-r:

[0233] GCGCATATGATATCTCCTTCTTCTAACCAGCGACGCCGCCGATCC

[0234] 在从1%琼脂糖凝胶上纯化扩增的片段后, 用限制酶SalI and NdeI和消化片段, 纯化所述反应混合物后, 将片段连接到已经经SalI and NdeI消化且去磷酸化的载体pSenLys中。连接混合物直接用于转化大肠杆菌XL1-blue, 并且在含有50μg/ml卡那霉素的LB平板上进行转化体的选择。在这些平板上生长, 对卡那霉素具有抗性的48个菌落从而可用于菌落PCR。使用引物SenCas-fw (SEQ ID No.24) 和TKP-seq-rv (SEQ ID No.25) 处理菌落PCR, 以检查启动子片段是否插入到载体pSenLys中。对琼脂糖凝胶中的菌落PCR的分析显示了已经分析的样品中具有大小为250bp的PCR产物, 于是培养4个菌落, 用于更大规模的质粒制备。经过16个小时的培养, 通过离心分离法收集这些培养物, 制备质粒DNA。这些质粒制备物中的2种用菌落PCR中使用的引物进行测序, 插入的序列与预期序列显示100%同一性。所得质粒命名为pSen1325 (SEQ ID No.36)。

[0235] b) 用pSen1325转化谷氨酸棒杆菌。

[0236] 按照Tauch等人, 2002 (Curr Microbiol.45(5) (2002), 第362-7页) 所述制备谷氨酸棒状杆菌菌株ATCC 13032的感受态细胞, 如Tauch等人所述用pSen1325通过电穿孔转化这些细胞。用含有50μg/ml的卡那霉素在BHIS平板上选择转化体, 由此获得的克隆命名为ATCC 13032 pSen1325。

[0237] c) 根据一种化合物的浓度检测荧光, 其中该化合物的特征在于抗菌活性, 这种特性源于其具有破坏细菌细胞膜的性质。

[0238] 通过在BioLector系统 (Mplate-48-B) (m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, 德国) 中, 用微量滴定仪中 (Flowerplate®MTP-48-B) 的0.8ml CGXII培养基 (Keilhauer等人, 1993,

J.Bacteriol.175:5595-603) 培养菌株ATCC 13032 pSen1325的细胞的方式来鉴定体内荧光发射。将13株具有菌株ATCC 13032 pSen1325细胞的培养物接种至0.1的光密度(OD)并培养24小时。4小时后,将抗菌物质万古霉素或杆菌肽添加到培养物中。将万古霉素浓度调整至0;1.25;2.5;5;10;15;20 μ g/ml,将杆菌肽浓度调节至0;0.25;0.5;1;2;4 μ g/ml。每10分钟测量培养物的细胞密度和荧光。用波长485nm的光激发荧光,EYFP的荧光发射测量在520/10nm进行。通过BioLector V.2.4.1.0软件对培养物的荧光进行数字记录。观察到具有不同的万古霉素或杆菌肽浓度的培养物的荧光发射也不同。

[0239] 实施例3

[0240] 根据本发明中的第一实施例,通过一个细胞的例子来制备细胞,其中编码荧光蛋白的基因序列受cg0996启动子和cg0998启动子的控制,并且其中荧光蛋白的表达取决于细胞质膜的跨膜侧的某一蛋白质的浓度。

[0241] a) 构建载体pSen0996_8,pSen0996_8c and pSen0996_8e。

[0242] 通过化学合成的合成DNA-片段(SEQ ID No.28for pSen0996_8,SEQ ID No.29for pSen0996_8c and SEQ ID No.30for pSen0996_8e)且将它们连接到载体pSenLys (Binder等人,“A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producer at the single-cell level”;基因组生物学13(5),R40,2012),实现启动子P(cg0996)和P(cg0998)与报告基因eyfp(SEQ ID No.18;eYFP的蛋白质序列:SEQ ID No.19)的融合的构建。pSenLys已经包含了编码eyfp的序列。

[0243] 用限制酶SalI和NdeI裂解合成的DNA片段后,随后纯化反应混合物,将已经切出的DNA片段与已用SalI/NdeI消化并去磷酸化的载体pSenLys进行单独连接反应。连接混合物可直接用于大肠杆菌XL1-blue的转化,并在含有50 μ g/ml卡那霉素的LB平板上进行转化体的选择。在这些平板上生长的8个菌落,因此具有卡那霉素抗性,可用于菌落PCR。使用引物SenCas-fw(SEQ ID No.24)和TKP-seq-rv(SEQ ID No.25)进行菌落PCR,以验证合成的DNA片段已经插入pSenLys。

[0244] 在琼脂糖凝胶中的菌落PCR的分析显示在已经分析过的样品中,在pSen0996_8的情况下,预期有大小为872bp的PCR产物,在pSen0996_8c的情况下,预期有413bp的PCR产物,在pSen0996_8e的情况下,预期有大小为2774bp的PCR产物,于是培养8个菌落用于大规模的质粒制备。培养16个小时后,离心收集培养物,制备质粒DNA。使用引物JPS0003(SEQ ID No.31)和JPS0004(SEQ ID No.32)对这些质粒制备物中的每一个进行测序,并且插入序列与预期序列显示100%同一性。所得质粒命名为pSen0996_8(SEQ ID No.37),pSen0996_8c(SEQ ID No.38)和pSen0996_8e(SEQ ID No.39)。

[0245] JPS0003:

[0246] CTGAACTTGTGGCCGTTTAC

[0247] JPS0004:

[0248] TTGTTGCCGGAAGCTAGAG

[0249] b) 用pSen0996_8、pSen0996_8c和pSen0996_8e转化谷氨酸棒杆菌。

[0250] 如Tauch等人,2002(Curr Microbiol.45(5)(2002),第362-7页中所述制备谷氨酸棒状杆菌菌株ATCC 13032的感受态细胞。正如Tauch等人所述,用pSen0996_8或pSen0996_8c或pSen0996_8e通过电穿孔转化这些细胞。

[0251] c) 用pCLTON2-FsCut转化ATCC 13032 pSen0996_8或ATCC 13032, pSen0996_8c或ATCC 13032 pSen0996_8e

[0252] 如上所述, 用载体pCLTON2-FsCut通过电穿孔转化上述谷氨酸棒杆菌ATCC 13032 pSen0996_8或ATCC 13032 pSen0996_8c或ATCC 13032 pSen0996_8e的感受态细胞。该载体包含核酸序列, 用于编码来自茄病镰刀菌的脂肪酶角质酶 (FsCut) 和Sec特异性天然信号肽, 以便能够在谷氨酸棒杆菌的Sec途径上输出蛋白质。通过化学合成合成的DNA片段 (SEQ ID No. 33), 用PstI/SacI限制合成的DNA片段, 并将限制性片段连接到等位消化的载体pCLTON2, 该载体是pCLTON2的壮观霉素抗性赋予的衍生物 (谷氨酸棒状杆菌的四环素诱导型表达载体, 允许密切调节基因表达。Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. Plasmid. 2012 68 (2): 142-7)。如此获得的克隆命名为ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut, ATCC 13032 pSen0996_8c pCLTON2-FsCut或ATCC 13032 pSen0996_8e pCLTON2-FsCut。

[0253] d) 根据AmyE分泌水平或细胞质膜的跨膜侧的AmyE的浓度来检测荧光 (参数变化)

[0254] 通过在BioLector系统 (m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, 德国) 中, 用微量滴定仪中 (Flowerplate® plate.MTP-48-B) 的0.8ml CGXII培养基 (Keilhauer等人, 1993, J. Bacteriol. 175: 5595-603) 培养菌株ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut的细胞, 来检测体内荧光。将3株具有菌株ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut的细胞的培养物接种至0.1的光密度 (OD) 并培养24小时。4小时后, 通过加入脱水四环素 (ATc) 诱导角质酶的表达。将脱水四环素 (ATc) 浓度调节至0、100、250mM以引起不同的表达强度。每10分钟测量培养物的细胞密度和荧光。用波长485nm的光激发荧光, EYFP的荧光发射测量在520/10nm进行。通过BioLector V. 2.4.1.0软件对培养物的荧光进行了数字记录。观察到不同诱导的培养物的荧光发射也不同 (图4)。24小时后, 将Flowerplate中的培养物离心, 以沉淀细胞并获得无细胞的培养物上清液。通过对硝基苯基棕榈酸酯 (pNPP) 法, 每种培养物上清液的中20μl用于定量分泌的角质酶的酶活性。观察到在这些选择的培养条件下由ATc浓度诱导的培养物上清液中角质酶的活性较高, 这必须被认为与更高的荧光发射相关。

[0255] e) 构建载体pK19-pSen0996_8e

[0256] 通过将谷氨酸棒状杆菌ATCC13032的基因组DNA作为模板和用引物0998up-f (SEQ ID No. 42) 和0998up-r (SEQ ID No. 43) 扩增cg0998-上游区, 扩增pK19-pSen0996_8e, 将谷氨酸棒状杆菌ATCC13032的基因组DNA作为模板和用引物0998dw-f (SEQ ID No. 44) 和0998dw-r (SEQ ID No. 45) 扩增cg0998-下游区, 将pSen0996_8e作为模板和用引物eyfp-ol-f (SEQ ID No. 46) 和eyfp-ol-r (SEQ ID No. 47) 扩增eyfp编码序列, 随后将上述PCR反应的PCR产物作为模板和用引物0998up-f和0998dw-r重叠延伸PCR。最后, 重叠延伸PCR的产物用T4多核苷酸激酶磷酸化并连接到SmaI切割质粒pK19 (SEQ ID No. 48) 中。

[0257] 0998up-f: GAAGAAACCGCCGAAACGTCAAGC

[0258] 0998up-r: CGATGCACGGTCCGGTTCTC

[0259] 0998dw-f: GTTTAAAGAGTTAATCTGCATCTAATCAAGTAGCC

[0260] 0998dw-r: GCCATCACGAATTGCCGAACGAG

[0261] eyfp-ol-f:

[0262] GAGAACCCGGACCGTGCATCGTAGAAGAAGGAGATATCATATGG

[0263] eyfp-ol-r:

[0264] GCAGATTAACCTCTTTTAACTTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

[0265] 连接混合物直接用于转化大肠杆菌XL1-blue,并且通过蓝/白筛选,在含有50µg/ml卡那霉素和100µg/ml Xgal (5-溴-4-氯-3-吲哚酚-β-D-吡喃半乳糖苷)的LB平板上进行转化体的选择。培养4个菌落,分别用于大规模的质粒制备。培养16小时后,通过离心分离收集培养物,质粒DNA制备完成,并使用引物M13uni (-43) (SEQ ID No.49)和M13rev (-49) (SEQ ID No.50)将质粒DNA用于测序。插入序列与预期序列显示100%的同一性。所得质粒命名为pK19-pSen0996_8e (SEQ ID No.51)

[0266] M13uni (-43):AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT

[0267] M13rev (-49):GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG

[0268] f) 构建菌株谷氨酸棒杆菌ATCC 13032 gSen0996_8和谷氨酸棒杆菌MB001 gSen0996_8。

[0269] 按照Tauch等人,在2002 (Curr Microbiol.45 (5) (2002),第362-7页)中所述制备谷氨酸棒状杆菌菌株ATCC 13032和谷氨酸棒状杆菌MB001 gSen0996_8的感受态细胞,如Tauch等人所述用pSen0706通过电穿孔转化这些细胞。因为该载体不能在谷氨酸棒状杆菌中复制,所以含有卡那霉素的琼脂平板上的菌落只能从那些细胞处生长,其通过同源重组将含有pSen0996_8e序列的载体整合到其染色体中。在第二次同源重组中,所述载体可以再次从染色体中去除,仅在基因组中留下引入的pSen0996_8e序列。为了选择那些细胞,选择了在含有卡那霉素的琼脂平板上生长的菌落,这些菌落在复杂的培养基中培养并被铺在含有10%蔗糖的琼脂平板上。载体pK19含有来自枯草芽孢杆菌的sacB基因的修饰变体,用于编码蔗糖果聚糖酶,该蔗糖果聚糖酶催化蔗糖到果聚糖的反应,后者对谷氨酸棒状杆菌具有毒性。因此,含有琼脂的蔗糖上的菌落只能从那些细胞生长,其中第二次同源重组中去除整合的载体序列,仅在基因组中留下引入的pSen0996_8e序列。由此获得的克隆命名为ATCC 13032 gSen0996_8和MB001gSen0996_8。(Schäfer,A.,Tauch,A.,Jäger,W.,Kalinowski,J.,Thierbach,G.,Pühler,A. (1994),来自大肠杆菌质粒pK18和pK19的小型可移动化多功能克隆载体:选择在谷氨酸棒状杆菌染色体中定义的缺失,Gene 145:69-73)。

[0270] g) 用pCLTON2-FsCut转化谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032 gSen0996_8和MB001 gSen0996_8,这一转化作为细菌菌株遗传背景变异的一个实施例。

[0271] 按照Tauch等人,2002 (Curr Microbiol.45 (5) (2002),第362-7页)所述制备谷氨酸棒状杆菌菌株ATCC 13032 gSen0996_8 and MB001 gSen0996_8的感受态细胞。如上所述,用载体pCLTON2-FsCut通过电穿孔转化这些细胞。由此获得的克隆命名为ATCC 13032 gSen0996_8 pCLTON2-FsCut and MB001 gSen0996_8 pCLTON2-FsCut。

[0272] h) 根据角质酶分泌水平或细胞质膜的跨膜侧的角质酶浓度来鉴定荧光。

[0273] 通过在BioLector系统(m2p-labs GmbH,52499 Baesweiler,德国)中,用微量滴定仪中(Flowerplate®plate.MTP-48-B)的0.8ml CGXII培养基(Keilhauer等人,1993,J.Bacteriol.175:5595-603)培养谷氨酸棒状杆菌菌株ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut and MB001 gSen0996_8 pCLTON2-FsCut细胞,来检测体内荧光。将3株具有菌株MB001 gSen0996_8 pCLTON2-FsCut的细胞的培养物接种至0.1的光密度(OD)并培养24小时。4小时后,通过加入脱水四环素(ATc)诱导角质酶的表达。将脱水四环素(ATc)浓度调节

至0到250mM以引起不同的表达强度。每10分钟测量培养物的细胞密度和荧光。用波长485nm的光激发荧光,EYFP的荧光发射测量在520/10nm进行。通过BioLector V.2.4.1.0软件对培养物的荧光进行了数字记录。观察到不同诱导的培养物的荧光发射也不同,且不同菌株的荧光发射不用(图6))。24小时后,将Flowerplate中的培养物离心,以沉淀细胞并获得无细胞的培养物上清液。通过对硝基苯基棕榈酸酯(pNPP)法,每种培养物上清液的中20μl用于定量分泌的角质酶的酶活性。观察到培养物上清液中角质酶的较高活性与较高的荧光发射有关,能够通过传感器信号的光学分析来区分具有不同角质酶分泌水平的菌株,或区分细胞质膜跨膜侧的角质酶浓度不同的菌株。

[0274] i) 用pCLTON2-FsCut (NprE) 和pCLTON2-FsCut (Ywmc) 转化谷氨酸棒状杆菌ATCC13032gSen0996_8,这一转化作为分泌信号肽的一个实施例。

[0275] 如Tauch等人,2002(Curr Microbiol.45 (5) (2002),第362-7页)所述制备了谷氨酸棒状杆菌菌株ATCC 13032gSen0996_8的感受态细胞。如上所述,用载体pCLTON2-FsCut (NprE) 和pCLTON2-FsCut (Ywmc) 通过电穿孔转化这些细胞。这些载体是上述的pCLTON2-FsCut的变体,用NprE-或Ywmc信号序列(SEQ ID No.52,SEQ ID No.53)替代角质酶的天然分泌信号序列。由此获得的克隆命名为ATCC 13032 gSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE) 和ATCC 13032 gSen0996_8 pCLTON2-FsCut (Ywmc)。

[0276] j) 根据角质酶分泌水平或细胞质膜的跨膜侧的角质酶浓度来鉴定荧光。

[0277] 通过在BioLector系统(m2p-labs GmbH,52499 Baesweiler,德国)中,用微量滴定仪中(Flowerplate®plate.MTP-48-B)的0.8ml CGXII培养基(Keilhauer等人,1993,J.Bacteriol.175:5595-603)培养菌株ATCC 13032 pSen0996_8pCLTON2-FsCut (NprE) 和ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (Ywmc)的细胞,来鉴定体内荧光。将3株具有菌株ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE) 和3株具有菌株ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (Ywmc)的细胞的培养物接种至0.1的光密度(OD)并培养24小时。4小时后,通过加入脱水四环素(ATc)诱导角质酶的表达。将脱水四环素(ATc)浓度调节至0、100、250mM以引起不同的表达强度。每10分钟测量培养物的细胞密度和荧光。用波长485nm的光激发荧光,EYFP的荧光发射测量在520/10nm进行。通过BioLector V.2.4.1.0软件对培养物的荧光进行了数字记录。观察到不同诱导的培养物的荧光发射也不同(图4)。24小时后,将Flowerplate中的培养物离心,以沉淀细胞并获得无细胞的培养物上清液。通过对硝基苯基棕榈酸酯(pNPP)法,每种培养物上清液的中20μl用于定量分泌的角质酶的酶活性。观察到培养物上清液中角质酶的较高活性与更高的荧光发射有关。

[0278] 另外,通过荧光激活细胞分选术(FACS)进行体内荧光发射鉴定。将谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE) 和谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (Ywmc)的培养物,及含有比例为1:1和1:100的两种菌株(NprE:Ywmc)的混合培养物接种在0.8ml CGXII培养基(Keilhauer等人,1993,J.Bacteriol.175:5595-603)中,并在BioLector系统(m2p-labs GmbH,52499 Baesweiler,德国)中,用微量滴定仪(Flowerplate MTP-48-B)培养。4小时后,通过加入250mM脱水四环素(ATc)来诱导角质酶的表达。进一步培养10小时后,分析所有培养物的光学性质。观察到表达与不同分泌信号肽融合的角质酶的菌株的荧光发射也不同(图8A和8B)。通过使用出自美国BD公司(美国BD公司,美国,新泽西州,富兰克林湖,)的FACS Aria细胞分选仪III,含有两株菌株ATCC

13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE) 和 ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (Ywmc) (图8C) 的细胞的混合培养物细胞被用来分类细胞。针对“前向散射”和“侧向散射”，200是FACS设置的阈值，“前向散射”(ND过滤器1.0)的电子增益为16mV，“侧向散射”为269mV。在488nm的波长下激发增强型黄色荧光蛋白(EYFP)，并且利用上游连接的发射带路径滤波器530/30nm，通过400mV的“参数增益”PMT进行鉴定。将每个混合培养物的44个细胞相对于EYFP荧光进行分选，并使用FACS Aria细胞分选仪III将其储存在96孔微量滴定板中(每孔含有200 μ l CGXII培养基)中(图8C)。培养16个小时后，通过离心分离收集培养物，制备质粒DNA。质粒制备物用引物pEKEx2-fw (SEQ ID No.54)和pEKEx2-rv (SEQ ID No.55)进行测序。在1:1混合培养的情况下，观察到46个分选细胞中有44个细胞是ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE)，46个细胞中有2个细胞是ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (Ywmc)。在1:100混合培养的情况下，观察到46个分选细胞中有16个细胞是ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE)，46个细胞中有30个细胞是ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (Ywmc)。

[0279] pEKEx2-fw:CTCGTATAATGTGTGGAATTG

[0280] pEKEx2-rv:CAGACCGCTTCTGCGTTC

[0281] 1) 谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE) 的突变

[0282] 将谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE) 在30℃的“Difco Brain Heart Infusion”培养基(Difco, Becton Dickinson BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA)中过夜生长，并将5ml该培养物与溶解在1ml二甲基亚砷中的0.5mg N-甲基-N-亚硝基-N'-硝基胍的0.1ml溶液合并。将该培养物在30℃下振荡15分钟。随后，将细胞在4℃和2500 $\times$ g下离心，并重新悬浮于5ml的0.9%氯化钠中。重复离心步骤和再悬浮步骤。将7.5ml 80%甘油添加到由此获得的细胞悬浮液中，并将该突变细胞悬浮液的等分试样储存在-20℃。将200 μ l的细胞悬浮液用于接种0.8ml CGXII培养基(Keilhauer等人, 1993, J. Bacteriol. 175:5595-603)。在30℃和1000rpm下，在微量滴定仪中((Flowerplate[®] MTP-48-B)进行培养。4小时后，通过加入250mM脱水四环素(ATc)诱导角质酶的表达。在进一步培养10小时后，如上所述通过FACS分析所有培养物的光学性质。通过使用FACS Aria细胞分选仪III，以每秒10,000个颗粒的分析速度分析了8,000,000个细胞，并挑选出了384个相对于EYFP荧光的细胞，并储存在96孔微量滴定板(每个孔含有200 μ l CGXII培养基)中。将平板在1000rpm和30℃下培养16小时。已经储存起来的384个细胞中的336个细胞生长成了培养物。他们被用来接种新鲜的CGXII培养基，并在1,000rpm和30℃下培养24小时。4小时后，通过加入250mM脱水四环素(ATc)诱导角质酶的表达。24小时后，将培养物离心以沉淀细胞并获得无细胞的培养物上清液。通过对硝基苯基棕榈酸酯(pNPP)法，每种培养上清液中的20 μ l被用来定量分泌的角质酶的酶活性。观察到，与作为起始和对照菌株的ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut (NprE)相比，在分离的菌株的培养物上清液中测量了分泌的角质酶的增强的酶活性。

[0283] 序列表

SEQ ID No. 01

```

gcgggtctgc cacatttgct gaaaagtacc agttgcaagg tgtggtgttg gagcttcata    60
accaggttgg gcaaaaggga tgaatccctg gttgtggtgg ggctcctgaa aagtaactcat    120
agactctatt gtggagtgtt gaggcctgata agtgaatggg ggaaagccct gaaaagggtgg    180
cgttcagggt ctccctgat g                                     201

```

SEQ ID No. 02

```

accttaaaatt catgcctac aaccttttgt aggtagaat ttaacaagag ccagttatct    60
totcttaaaa tgaggaggtg actggcttct ttatgcttaa gaggtgttag cataagtga    120
atatgttcca acgcgtggac gtcttaattg ggaggaagtc tgtaacggac tggaagacga    180
aaagggtatc gatg                                     194

```

SEQ ID No. 03

```

[0284] gggaaacctat tcgcagcggg ttcgaaaatg tcgatgatta aaccactaaa gagctcacag    60
gaagtgttca gactacttag agtgacgccc cagccacagg gttcataatc aaatcatg    118

```

SEQ ID No. 04

```

accagcgacg ccgcgatcc atttgtcggg ggtgcttcgg gegagtcgtc gagattgtgc    60
tgaggaaagtc atcgggatca agctccttta tggtgattg agtttttctt tcttcttcaa    120
tcatecgcaa taagaacctg gagcacatcg gggatttccc ctctcctaac ccctaaaaac    180
ccctgagaaa acgctccaag taaaccttta cagctc                                     216

```

SEQ ID No. 05

```

atggttgatg tgtttttggg cgatgaccac tccgtgttcc gctccggcgt caaagcagaa    60
ctaggcaacg ccgtcacagt agtcggcgaa gcagggacgg tgcccgacgc cgtagccggc    120
atcaaggcaa gcaaacacga ggtagtgttt ctgcacgtcc acatgcccgga cggcggcggc    180
ctcgcagtgc tccagcagat caacgaactcc gatgtggaca ccattttctt ggcactcagt    240
gtctctgatg ctgcggaaga tgctacgccc atcatccgtg gcggtgccag gggatacgtg    300

```

```

accaaatcaa tctccggtga agaactcatt gaagccatca accgcgtgaa atccggcgac 360
gcattctttct caccacgcct ggcaggcttc gtctctgacg ccttcgccgc ccccgattcc 420
gcagctggcg caggcattgt cgacgcaccc gaaaaagacg ccgcctaga atccggaaaa 480
atctcgcagc acccagttgt cgacgcctc acccgccgcg aactcgaagt cctccgcta 540
ctagcccgcg gctacaccta caaagaaatc ggcaagaac tgttcatttc cgtcaaaacc 600
gtggaaccc acgcctcaaa cattctgcgg aaaacccaac aatccaaccg ccacgcgttg 660
acccggtggg ctactcgag ggatcttgac taa 693

```

SEQ ID No. 06

```

atgttccaac gcgtggacgt cttaattggg aggaagtctg tcaaggactg gaagacgaaa 60
agggatatga tgaaaatttt agttgttgat gacgagcaag ctgtacgtga ctcttgcca 120
cgttcccttt cgttcaacgg atacaacggt gtctctgcag aagacggcat ccaagcacta 180
gagatgattg acaaggaaca gctgcttfg gtgactctcg atgtcatgat gcttggtatg 240
gacggacttg aggtctgtcg ccaccttcgc agcgaaggcg atgateggcc aattcttatt 300
cttactgcc gcgataatgt ttctgatcgt gttggtggcc tcgatgcagg cgcagatgac 360
tatttgcta aaccatttgc tcttgaaag ctgttgccgc gcgtccgttc actggtgcgt 420
cgctctgcag tggaatcaaa tcagagtcc agcattgaac aggcctctatt atcttggtgc 480
gatttgacgc ttgacccaga aagtcgagat gtctaccgca acggacgcgc catcagcctt 540
actgaacag agttgcgct cctgcaattg ctctcaaaa accaaaggaa agtgcact 600
cgcccccaga ttttggaaga ggtatggggc tgcgatttcc ccacttcagg caatgccctc 660
gaggtctaca ttggatacct tcgacgcaag actgaattgg aaggagaaga ccgcctgac 720
catacagtac gaggagtcgg atacgtcctg cgagagaccg ctccgtga 768

```

[0285]

SEQ ID No. 07

```

atggataact atcgtgatga aaacagaacg aaaggtaatg agaatgaggt ctttttaacg 60
aaagagaac atcagagcgc ctctactcgc gcccgcaatg tcattcatga tcaggagaa 120
aaaaaacgag gattcggatg gttcagaccg ttgcttggcg gagtgatcgg cggcagctct 180
gctcttggca ttacacggt tacacgcctt ggtgaccatg attctcagga cactgcaaaa 240
caatcatcca gccagcagca aacgcaatct gttacagcaa caagcacctc ctctgaatct 300
aaaaaaagct caagcagctc atctgcattc aagagcgagg actcttctaa aatctcagat 360
atggtagaag acctttcacc agcagattgtc ggtattacaa atcttcaggc acaatcaaac 420
agctctttgt tcggctctag ttctctgat tcacgcgaag atacagaaag cggttcaggg 480
tcagggtgca ttttcaaaaa agagaatggt aaggcttata tcattacaaa taaccaagtc 540
gtagaagggg catcatcact gaaggtatct ttatatgacg gcactgaggt tactgcaaa 600
ctggtaggca gtgactcgtt aactgattta gccgtcctcc aaatcagtga tgaccacgctc 660
acaaaagtgg caaaactcgg tgattcatct gatcttagaa caggcgagac cgttattgcg 720
attggggatc cgcttgaaa agacctgtcc cgcacagtaa cacaaggaat tgaagcggc 780
gtggacagaa cggtttcaat gtctacatca gccggcgaaa cgagcattaa cgtcattcag 840
acagacgcag caattaatcc aggtaacagc gccggtcctt tgttaataac agacggcaaa 900
attgtcggca ttaacagtat gaaaatcagt gaggatgatg ttgagggat cggattcgcc 960
attccaagca atgacgtaaa accgattgct gaagaattgc tgtctaaagg acaaattgaa 1020
cgtccatata tcggtgtcag catgcttgat ctgagcaag tgccgcaaaa ttaccaagaa 1080

```

```

ggcacactcg gectgttcgg cagccagctg aataaaggcg tttacatcog tgaggteogt 1140
tcaggtctct ctgctgaaaa ggcgggatta aaagcggagg atattatcat cggcctaaaa 1200
ggtaaaagaaa ttgatacagg cagtgaattg cgcaatatct tatataaaga cgcaaagatc 1260
ggtgataccg ttgaagtga aattctccga aacggcaag aaatgacgaa aaaaattaaa 1320
ctggatcaaa aagaagagaa aacttcgtaa 1350

```

SEQ ID No. 08

```

ttgtcataca ccatttatct agttgaagat gaggataacc tgaatgaact gctgacgaag 60
tatttagaga atgagggctg gaacattaca tcttttacga aaggtgaaga cgcagaaaag 120
aaaaagacac cgtctcccca cctatggatt ctogatatca tgctgcggga taccgacggc 180
tatacattaa taaaagaaat caaggcgaaa gatectgacg tgccggtcct ttttatttcc 240
gcccagatg cggatattga cagagtgcct ggcttagagc ttggcagcaa tgactacatt 300
tcaaagccgt ttttgcggcg ggagctgatt atccgtgtgc aaaagctgt gcagctcgta 360
tataaggaag ctctctctgt ccaaaaaaat gaaattgccg tctcctcgta tcgggtcgct 420
gaagacgccc gcgaggtcta tgacgaaaac gggaatatca tcaatttgac gtcaaaggaa 480
tttgatctgc tgetattatt tatccatcat aaagggcctc catactctcg tgaggatata 540
ctcctaaaag tgtggggaca tgactacttc ggaacagacc gggtcgttga tgatctcgtc 600
cggagactgc gcagaaagat gcctgaattg aaggtggaga cgatttacgg tttcggctac 660
aggatgatgt catcatga 678

```

[0286]

SEQ ID No. 09

```

tccggtgcga gatacgactc cggctctata taaaaatcaa tctctgattc gttttgcata 60
tcttccaaact tgtataagat gaagacaagg aaaaacgaag gaggatctgc atg 113

```

SEQ ID No. 10

```

gtgattcgag tattattgat tgatgatcat gaaatgggtc gaatggggct cgcggctttt 60
ttggaggcgc agcccgatat tgaagtcctc ggcgaagcat cggacggcag cgaaggtgtt 120
cggcttgctg tggaactgtc gectgatgtc attttaatgg accttgctat ggagggcctg 180
gatggcattg aagctacaaa gcaaatttgc cgggagcttt ccgacccgaa aattattgtg 240
ctcaetaget tcattgatga tgacaaagtg taccgggtta ttgaagetgg cgcgctcage 300
tatctgttga aaacctcaaa agcggcagaa atcgcgcgat ccattccggc cgcagcaag 360
ygagagccga agctggagtc aaaagtggcg gaaaaagtat tatccaggt gcgccactca 420
ggtgaaaacg cgtctccgca tgaatcgctt acaaaaacgg agctcgaaat actotgcctg 480
atcgacagaag gaaagacaaa caaagaaata ggcgaggcac tgtttattac gattaaaaca 540
gtcaaaacac atattacgaa tttttatca aagctggatg tcagtgcog gacgcaggcg 600
gcgggtgacg cacaccgaaa tcctctctgt aattag 636

```

SEQ ID No. 11

```

atgacaaaaa aacagcttct cggattgato attgctttat tcggcatcag tatgtttttg 60
caaattatcg gaataggcga tctgtgtttt tggcgcctct tttttctgat tgccgctat 120

```

tteecttaaaaa	aatattcccg	tgaattggcctt	ggetccgtca	tgtatatott	tgcccgogttt	180
ctatttttga	aaaacctctt	cagcatcaac	tttaatttat	tcggctatgc	gtttgccgca	240
ttttctgattt	acgccggcta	caggcttata	aaagggaagc	cgatatttga	acogaatgag	300
aaacagggtca	atctcaataa	aaaagaacat	catgagccgc	caaaagatgt	aaaacatcc	360
gacatgcgca	gcttttttat	cggtgagctg	caaatgatga	agcagccgtt	tgacctgaac	420
gatttaaatg	tctctggttt	tatcgggtgat	atcaaaatcg	atttatctaa	agcgatgatt	480
cccgagggag	aaagtacaat	cgtcatttag	ggagtcattg	gtaacgttga	tatttatgta	540
ccatcggaac	ttgaagtggc	tgtcagctcg	gctgttttta	taggagacat	taatctgac	600
ggctogaaga	aaagcggatt	aagcacgaag	gtatatgcgc	cgtaactga	ttttagcgag	660
tcaaagcgcc	gggtaaaagt	gtccgtttcc	ttatttatcg	gtgatgtgga	tgtgaagtac	720
gtatga						726

SEQ ID No. 12

atgagaaaaa	aatgcttgc	cagcctccaa	tcggcgccca	tcgcgatgac	aacgggaatc	60
agcctgctcc	tttttgttg	cctgatttcc	tttatgatgt	tttactatcg	gctcgatccg	120
cttgttttgc	tgtcatcaag	ctggttcgga	attccgttta	tcctgatttt	gcttctgac	180
agcgtgacog	tcggtttcgc	ctcagggtat	atgtacggca	accggttgaa	gacaaggatt	240
gatacattaa	ttgaatecat	tttaaccttt	gaaaaacggca	atttcgctta	tcggataccg	300
cgcctcggtg	atgatgaaat	cgccctggct	gctgatcagc	tgaacgaaat	ggcgaagcgc	360
gtggagcttc	aagtgcctc	cctccagaaa	ctttccaatg	aacgtgcgga	atggcaggct	420
caaatgaaga	agtcggttat	ctcagaagaa	cgccagcgat	tggccagaga	tcttcatgat	480
gcggtcagcc	agcagctctt	tgccatatcg	atgatgacat	cagccgtgct	ggaacatgtc	540
aaggatgctg	atgacaaaac	agtcaagcgg	atcaggatgg	tcgagcatat	ggcaggcgaa	600
gccccaaaatg	agatgagggc	gctgctgctc	catttacggc	ctgttaccct	tgaaggaaaa	660
gggctgaagg	agggccttac	ggagcttttg	gaacgatttc	gaaaaaagca	gcgatttgat	720
attgagtggg	atatacagga	cacagcgata	cccagggtg	ttgaagacca	cttgttcaga	780
atcgtgcagg	agcccttttc	aaacgtattt	agacattcaa	aagcgtcaaa	agtaaccgtg	840
attctgggca	taaaagaacg	ccagctccgt	ctgaagggtga	ttgataatgg	aaaaggcttt	900
aaaatggacc	aggtgaaagc	ctcctcctac	ggettgattt	ctatgaaaga	acgtgcaagt	960
gaaatcgggc	gtgtcgccga	agtgatttca	gtagaaggaa	aaggcactca	aatcgaagtg	1020
aaggtcccca	tttttcggga	agaaaaagga	gagaacgaac	gtgattcgag	tattattgat	1080
tga						1083

SEQ ID No. 13

ggacatcgag	aaotctcggg	gttcggcgaa	cgttatctca	gtggaatctc	agtcacgcgc	60
cgcaacctag	ttgtgcagtt	actgttgaaa	gccacacca	tgccagtcca	cgcatg	116

SEQ ID No. 14

atgtggtggt	tcgcgcgcgc	agaccggggc	ccgtgcgcgc	ccaccagctc	attatccctg	60
cgggtggcgg	tcattgctgt	ggcgatgtcc	atggctgcga	tgggtggtgt	gctgatgtcg	120
ttcgccgtct	atgcggtgat	ctcgccgcgc	ctctacagcg	acatcgacaa	ccaactgcag	180

	agccggggcgc aactgctcat cggcagtggc tcgctggcag ctgatccggg taaggcaatc	240
	gaggggtaccg cctattcggg tgcacacgcg atgctgggtc accccggcca gtccatctac	300
	accgctcaac agccgggcca gacgctgcgc gtcgggtgctg ccgagaaggc gg-gatccgt	360
	ggcgagttgt tcatgtcgcg ggcacccacc gccgaccaac ggggtgcttg caiccgctctg	420
	accaacggta gttcgctgct gatctccaaa agtctcaagc ccaccgaagc agtcatgaac	480
	aagetgcgtt ggggtgctatt gatcgtaggt gggatcgggg tggcggtcgc ccggtggcc	540
	gggggatgg tcacccgggc cgggtgagg ccggtgggc gccacccga agcgccgag	600
	cggtgggcgc gaaccgacga cctgcggccc atccccgtct tcggcagcga cgaattggcc	660
	aggtgacag aggcattcaa tttaatgctg cggcgctgg ccgagtcacg ggaacggcag	720
	gcaaggctgg ttaccgacgc cggacatgaa ttgcgtacc ccgtaacgtc gc-gcgcacc	780
	aatgtcgaa ccttgatggc ctcgatggc ccgggggctc cgcggctacc caagcaggag	840
	atggtcgacc tgcgtgcgc tggctggct caaatcgagg aattgtccac ac-ggtaggc	900
	gatttggtgg acctgtcccg aggcgacgc ggagaagtgg tgcacgagcc ggtcgacatg	960
	gtgacgtcg tcgaccgacg cctggagcgg gtcaggcggc ggcgcaacga taiccttttc	1020
	gacgtcgagg tgattgggtg gcaggtttat ggcgataccg ctggattgtc gcggtggcg	1080
	cttaacctga tggacaacgc cgcgaagtgg agccgcgcg gcggccacgt ggggtgcagg	1140
	ctgagccagc tcgacgcgtc gcacgctgag ctgggtggtt ccgaccgcgg ccggggcatt	1200
	ccgtgcagg agcgccgtct ggtgtttgaa cggttttacc ggtcggcatc ggcaocggcg	1260
	ttgcggggt cgggcctcgg gttggcgatc gtcaaacagg tgggtgctca ccacggcgga	1320
	ttgtcgcgca tcgaagacac cgaccagggc ggccagcccc ctggaaegtc gatttaectg	1380
	ctgtccccg gccgtcggt gccgatccg cagcttcccg gtgcgacggc tggcgctcgg	1440
[0288]	agcaocggaca tcgagaactc tcgggggttc gegaacgtta tctcagtga atctcagtc	1500
	acgcgcgcaa cctag	1515

SEQ ID No. 15

atggaactcc	tggcggaac	ccgggttggg	aatacggat	cgcaactttg	cgttgcgac	60
ggtgacgact	tgcacactta	ttgcagtgc	aattcggagg	atctcaatat	cacgaccatc	120
acgacottga	gtcagaccag	catgtctcat	ccccaacagg	tcgcgatga	ccagtgggtg	180
gagccgtctg	accaattgca	gggcacccgc	gtattcgacg	ccaccgggga	caaggccacc	240
atgcgcctct	gggatgagct	ggtccgtcag	cacgcgcgtc	gggtgtaccg	gctggettatt	300
cggctctccg	gcaaccagca	cgatgcggaa	gacctgaccc	aggagacctt	tatcagggtg	360
ttccggtcgg	tcagaatta	ccagccgggc	accttcgaag	gctggctaca	ccgcatacc	420
accaacttgt	tcctggacat	ggtccgcgc	egggtcgc	tcgggatgga	ggcgttaccc	480
gaggaactacg	acgggtgcc	cgcgatgag	ccccaccgc	agcagatcta	ccacgaagca	540
cggctgggac	ctgacctgca	ggtgccttg	gcctcgctgc	cgcggagtt	tgtgcgcgc	600
gtgggtgctgt	gtgacatcga	gggtctgtcg	taocaggaga	tcggcgccac	actgggcgtg	660
aagctcggga	cggtagctag	ccggatacac	cgcggacgc	aggcaetg	ggactacctg	720
gcagcgcacc	ccgaacatgg	cagtgccga	gttcacgtca	accagttcg	ctga	774

SEQ ID No. 16

gtaaattacc	gtcagattct	cctgagtttc	cgetatggga	atattattac	cgtgcgcgc	60
tgtgcaggga	ttatatcagc	ggatgacgc	acctctatgc	gtgggatgaa	taccgacgtc	120

tgatggcgt	agaacaataa	ccaggctttt	gtaaagaaga	acaataaatt	tttacctttt	180
gcagaaactt	tagttcggaa	cttcaggcta	taaaacgaat	ctgaagaaca	cagcaatttt	240
gogttatctg	ttaatcgaga	ctgaaatata	tg			272

SEQ ID No. 17

atgaataaaa	tcctgttagt	tgatgatgac	cgagagctga	cttccctatt	aaaggagctg	60
ctcgagatgg	aaggottcaa	cgtgattggt	gcccacgatg	gggaacaggc	gcttgatctt	120
ctggacgaca	gcattgattt	acttttgott	gaogtaatga	tgccgaagaa	aaatgggtatc	180
gacacattaa	aagcacttgc	ccagacacac	cagaagcctg	tcattatggt	gacggcgcg	240
ggcagtgaac	ttgatcgcgt	tctcggcctt	gagctggcgc	cagatgacta	tctcccgaaa	300
ccgtttaatg	atcgtgagct	ggtggcagct	atcgcgcga	tcctgcgcgc	ttcgcactgg	360
agcgagcaac	agcaaaacaa	cgacaacggt	tcaccgacac	tggaagtga	tgcccttagtg	420
ctgaatccag	gcgcgcagga	agccagcttc	gacgggcaaa	cgctggaggt	aaccggtaact	480
gagtttacc	tgctctattt	gctggcacag	catctgggtc	aggtgggttc	ccgtgaacat	540
ttaagccagg	aagtgttggg	caaacgcctg	acgcctttcg	accgcgcgat	tgatatgcac	600
atttccaacc	tgcgtcgtaa	actgcgggat	cgtaaagatg	gtcacccgtg	gtttaaaacc	660
ttgcgtgggtc	gcggctatct	gatggtttct	gcttcatga			699

SEQ ID No. 18

[0289]

gtgagcaagg	gcgaggagct	gttcaccggg	gtggtgccc	tcctgggtga	gctggacggc	60
gacgtaaacg	gccacaagtt	cagcgtgtcc	ggcgagggcg	agggcgatgc	cacctacggc	120
aagctgaccc	tgaagtccat	ctgcaccacc	ggcaagctgc	ccgtgcctcg	gcccaccctc	180
gtgacccact	tcggctacgg	cctgcagtcg	ttgcgcgcgt	accccgacca	catgaagcag	240
ccgactttct	tcaagtccgc	catgcccgaa	ggctacgtcc	aggagcgcac	catcttcttc	300
aaggacgacg	gcaactacaa	gaccgcgcgc	gaggtgaagt	togagggcga	cacctgtgtg	360
aaccgcacgc	agctgaaggg	catcaacttc	aaggaggacg	gcaacatcct	ggggcacaag	420
ctggagtaca	actacaacag	ccacaaogtc	tatatcatgg	ccgacaagca	gaagaacggc	480
atcaagggtga	acttcaagat	ccgccacaac	atcgagggcg	gcagcgtgca	gctcgcgcgc	540
caataccagc	agaacacccc	catcggcgac	ggccccgtgc	tgctgcccga	caaccactac	600
ctgagctacc	agtcgcctct	gagcaaagac	cccaacgaga	agcgcgatca	catggtcctg	660
ctggagttcg	tgaccgcgcg	cgggatcact	ctcggcatgg	acgagctgta	caagtaataa	720

SEQ ID No. 19

VSKGEELFTG	VVPILVELDG	DVNGHKFSVS	GELEGDATYG	KLTLKFICTT	GKLPVPWPTL	60
VTFYCYQLQC	FARYPDHMKQ	HDFFKSAMPE	CYVQERTIFF	KDDCNKTRA	EVKFEGDTLV	120
NRIELKGINF	KEDGNILGHK	LEYNYNSHNV	YIMADKQKNG	IKVNFKIRHN	IEGGSVQLAD	180
HYQQNTPIGD	GPVLLPDNHY	LSYQSALSKD	PNEKRDMVL	LEFVTAAGIT	LGMDELYK	238

SEQ ID No. 20

gcggtcgacg	ggtaaactg	ggatataaa	29
------------	-----------	-----------	----

SEQ ID No. 21

gcgcatatga tatctccttc ttctagcggg tctgccacat ttgctg 46

SEQ ID No. 22

gcgcgcggga ctaataacgt aacgtgactg gcaagag 37

SEQ ID No. 23

gcgagatctt ctgcctcgtg aagaagggtg tgctgac 37

SEQ ID No. 24

gtcgccgtcc agctcgacca ggatg 25

SEQ ID No. 25

cgggaagcta gagtaagtag ttcg 24

[0290]

SEQ ID No. 26

gcggctgacg agctgtaagg gtttaettg 29

SEQ ID No. 27

gcgcataatga tatctccttc ttctaaccag cgacgccgac gatcc 45

SEQ ID No. 28

gaatttaaca agagccagtt atcttctctt aaaatgagga ggtaactggc ttctttatgc 60
ttaagagggtg ttagcataag tgaaatatgt tccaacgcgt ggacgtotta attgggagga 120
agtctgtcac ggactggaag acgaaaaggg tatcgatgaa aattttagtt gttgatgaag 180
agcaagctgt acgttaatct atcgcgccgt cagctccgt tccatgcgg gatcgggatt 240
aggctttgcc atcgtgaatc aggttggtgaa tcggcatggt ggccaactcg ttgtgggtga 300
atcagatgat ggcggaacga gaatcactat tgatttgcca ggggaaccca ttgcagcgg 360
gttcgaaaat gtcgatgatt aaggtaaccac cactaaagag ctacacaggaa gtgttcagac 420
taetttagagt gacgccccag ccacagggtt cataatcaaa tcatgacaaa tcaattcccc 480
acaaacaacg gtgagaaccc ggaccggtga tcggaaactc catcagaaac caactccggt 540
acctgaactt taagaaggag atatcatatg 570

SEQ ID No. 29

caatttaaca agagccagtt atcttctctt aaaatgagga ggtaactggo ttctttatgc	60
ttaagagggtg ttagcataag tgaaatatgt tccaacgggt ggacgtctta attgggagga	120
agtctgtcac ggactggaag acgaaaaggg tatcgatgtg aaccatttcg cagcgggttc	180
gaaaatgtcg atgattaagg taccaccact aaagagctca caggaagtgt tcagaactact	240
tagagtgaag cccagccac agggttcata atcaaatcat g	281

SEQ ID No. 30

aatttaacaa gagccagtta tcttctctta aaatgaggag gtaactgggt tctttatgct	60
taagagggtg tagcataagt gaaatatgtt ccaacgggtg gacgtcttaa ttgggaggaa	120
gtctgtcacg gactggaaga cgaaaaggg atcgatgaaa attttagttg ttgatgacga	180
gcaagctgta cgtgactcct tgcgacgttc cctttcgttc aacggataca acgttgttct	240
cgcagaagac ggcattccaag cactagagat gattgacaag gaacagcctg ctttggtgat	300
cctcgatgtc atgatgcctg gtatggacgg acttgaggtc tgcgccacc ttgcgacga	360
aggcgatgat cggccaattc ttattcttac tgcgcgat aatgtttctg atcgtgttg	420
tggcctcgat gcaggcgcag atgactatct ggctaaacca tttgctcttg aagagctgtt	480
ggcgcgcgtc cgttcaactg tgcgtcgtc tgcagtggaa tcaaatcaga gttccagcat	540
tgaacaggct ctattatctt gtggcgattt gacgtttgac ccagaaagtc gagatgtcta	600
cgcacaacga cgcgccatca gccttactcg aacagagttc gcgtcctgc aattgcctc	660
caaaaaocaa aggaaagtgc tcaactgcgc ccagattttg gaagaggat ggggctgcga	720
tttcccaact tcaggcaatg cctcgaggt ctacattgga taccttcgac gcaagactga	780
attggaagga gaagaccgc tgatccatac agtacgagga gtcggatacg tectgcgaga	840
gaccgctccg tgacattaag gcgaatcggc gcaggggaaa atgggcctgc cctaccgaa	900
agtgatgact ccgacggttc aatgtcgttg cgttggcgtc tggctttgct gacgcgaact	960
ttggtagctt tcgccgttg gtattact gttgtgcac attggtctgt ctccagctat	1020
gtcaccaact caatcgatcg tgatctggaa aaacaagcgg atgcaatgct tggacgagcc	1080
agtgaagcgg gattctatgc aaccgcagaa accgaaattg ctctgttagg tgaatatgcc	1140
agtgaactc gaatcgctt aatccacct ggggtgggaat acgtcatcg tgaatccata	1200
tcaactgcctg attcagattt ccttaagagt aaagaagcgg ggaacagat cctcgtaaca	1260
agtgtgagc gcattctcat gaaacgagat agctcgggca cagtgggtgt tttgtctaaa	1320
gatatgggtg ataccgatcg gcagctcac gtgcttggtg tcattctctt gatcattggc	1380
ggcagtgggtg ttttggcgtc gattctgctt ggtttcatca ttgcgaagga ggggctgaaa	1440
ccactgtcaa agctgcagcg tgccgtcgaa gagatcgaa gaactgatga gcttcgtgcg	1500
attcccgtgg tgggaaatga tgagtctgct aagttgactc gtagtttcaa tgacatgctc	1560
aaggcactgc gggagtctcg taccggcaa tctcagttgg tggcagatgc aggacacgag	1620
ctgaaaactc cactgacctc aatgcggaca aatattgaat tgctgttgat ggcaaccaac	1680
agtggaggat cgggaatccc caaggaaaga ttggatggcc ttcagcgtga tgtattggcg	1740
cagatgaccg aaatgtctga tttgattggg gatcttgttg atcttgcgcg tgaagaaacc	1800
gccgaaacgt caagcattgt agatctcaac caagtgttg aaattgcgct tgaccgaatg	1860
gaaagccgtc gcatgacggg gcggatagat gttccgaga ctgtggattg gaaactgctg	1920
ggcgatgatt tttccttaac cagggcatta gtaaatgtt tggataatgc cattaatgg	1980

[0291]

tgcgcctgaga atggcattgt tcgagtgtcg atgtcacaga tcgacaaagc aacggtcgcg	2040
attgttattg atgaatcagg gcctggaatt gctgaaaaag aacgaggatt agttttggaa	2100
cggttctatc gcgcgcgcag ccccggttcc atgcgcggat cgggattagg tcttgccatc	2160
gtgaatcagg ttgtgaatcg gcatgggtgc caactcgttg tgggtgaate agatgatgga	2220
ggaacgagaa tcactattga tttgccaggg gaaccctatc gcagcgggtt cgaaaatgtc	2280
gatgattaaa ccactaaaga gctcacagga agtggttcaga ctacttagag tgacgcccc	2340
gccacagggt tcataatcaa atcatgacaa atcaattccc cacaacaac ggtgagaacc	2400
cggacgcgtc atcggaaact ccacagaaa ccaactcgg tacctgaact ttaagaagga	2460
gatacatat g	2471

SEQ ID No. 31

ctgaactcgt ggcggtttac	20
-----------------------	----

SEQ ID No. 32

ttgttgccgg gaagctagag	20
-----------------------	----

SEQ ID No. 33

gcgcgttaac cgaaggagat atagatatgt ttgc	34
---------------------------------------	----

[0292]

SEQ ID No. 34

cagtgaattc gagctcctag tg	22
--------------------------	----

SEQ ID No. 35

ggatccctat taactgtaca gctcgccat gccgagagt atcccgccg cggtcacgaa	60
ctccagcagg accatgtgat cgcgcttctc gttggggtct ttgctcagg cggactggta	120
gctcaggtag ttgttgcgcg gcagcagcac ggggcgcgc ccgatgggg ttgtctgctg	180
gtagtggctg gcgagctgca cgtgcgcgc ctccgatgtt tggcggatct tgaagttcac	240
cttgatgccg ttcttctgct tgtcggccat gatatagac ttgtggctgt tgtagttgta	300
ctccagcctg tgcccagga tgttgccgtc ctccctgaag ttgatgccct tcagctcgat	360
ggcggtcacc aggggtgcgc cctcgaaact caccctcgcg cgggtcttgt agttgcgcgc	420
gtccttgaag aagatgggtg gctcctggac gtagecctcg ggcctggcgg acttgaagaa	480
gtcgtgcctc ttcatgttgt cggggtagcg ggcgaagcac tqcagccgt agccgaagg	540
ggtcacgagg gtgggcccag gcacgggcag cttgcgggtg gtgcagatga acttcagggt	600
cagcttgccg taggtggcat cgcctcgcc ctccgcggac acgctgaact tgtggccgtc	660
tacgtgcgcg tcagctcga ccaggatggg caccaccccg gtgaacagct cctcgccctt	720
gctcaccata tgatatctcc tcttctagc ggggtctgca catttgcctg aaagtaccag	780
ttgcaagggt ttgtgttgga gcttcataac cagggtgggc aaaagggatg aatccctgg	840
tgtggtgggg ctccgaaaa gtaactcatg actctattgt ggagtgttga ggctgataag	900
tgaatggggg aaagccctga aaagggtggc ttcagggtct tccctgatgg tttgggtgcg	960

	caggggcatg	acatgatcga	agatatgagt	aacacacctg	cgccttatac	ccgcagcct	1020
	gcggggcaag	cgggtgcctt	atatccacg	tttaccogtc	gacotgcagc	aatggcaaca	1080
	acgttgcgca	aactataaac	tggcgaaacta	cttactctag	cttcccgcca	acaattaata	1140
	gactgggatgg	aggcggatea	agttgcagga	ccactttctgc	gctcggccct	tcoggetggc	1200
	tggtttattg	ctgataaaac	tggagccggg	gagcgtgggt	ctcgggfat	cattgcagca	1260
	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgatc	gtagttatct	acacgacggg	gagtcaggca	1320
	actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagataggtg	octcacigat	taagcattgg	1380
	taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	ctttagattg	atttaaaact	tcatttttaa	1440
	tttaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	tgacaaaaat	cccttaacgt	1500
	gagttttcgt	tccaccgagc	gtcagacccc	ttaataagat	gatcttcttg	agatcgtttt	1560
	ggctctgcgcg	taatccttg	ctctgaaaac	gaaaaaaccg	ccttgacagg	cggtttttcg	1620
	aaggttctct	gagctaccca	ctctttgaac	cgaggtaact	ggcttgagg	agcgcagtca	1680
	ccaaaacttg	tccttcagct	ttagccttaa	cggcgcatg	acttcaagac	taactcctct	1740
	aaatcaatta	ccagtggctg	ctgcagctgg	tgtttttgca	tgtctttccg	ggttggaactc	1800
	aagacgatag	ttaccggata	aggcgacgcg	gtcggactga	acggggggtt	cgtgcataca	1860
	gtccagcttg	gagcgaaactg	cttacccgga	actgagtgct	aggcgtggaa	tgagacaaac	1920
	gcggccataa	cagcggaatg	acacuggtaa	acgaaaggc	aggaacagga	gagcgcacga	1980
	gggagccgc	agggggaaac	gcctggatc	tttatagtc	tgtcgggttt	cgcacccact	2040
	gatttgagcg	tcaqatttcg	tgatgcttgt	cagggggcg	gagcctatgg	aaaaacggct	2100
	ttgcgcgggc	cctctcactt	ccctgttaag	tatcttctg	gcctctcca	ggaaatctcc	2160
	gccccttctg	taagccattt	ccgctgcgcg	cagtcgaacg	accgagcgta	gcgagtcagt	2220
[0293]	gagcgaggaa	gcggaatata	tcctgtatca	catattctgc	tgacgcaccg	gtgcagcctt	2280
	ttttctcctg	ccacatgaag	cacttcaactg	acaccctcat	cagtgcacac	atagtaagcc	2340
	agtatacact	cgcctagcgc	tgaggtctgc	ctcgtgaaga	aggtgttgct	gactcatacc	2400
	aggcctgaat	cgcgccatca	tccagccaga	aagtgaggga	gccacggttg	atgagagctt	2460
	tgttgtaggt	ggaccagttg	gtgattttga	acttttgcct	tgccaaggaa	cggctctgcg	2520
	tgtcgggaag	atgcgtgac	tgatccttca	actcagcaaa	agttcgattt	attcaacaaa	2580
	gccacgttgt	gtctcaaaa	ctctgatgtt	acattgcaca	agataaaaat	atatcatcat	2640
	gaacaataaa	actgtctgct	tacataaaca	gtaatacaag	gggtgttatg	agccatattc	2700
	aacgggaaac	gtcttgctcg	aggcccgcat	taaattccaa	catggaatgt	gatttatatg	2760
	ggtataaatg	ggctcgcgat	aatgtcgggc	aacaggtgc	gacaatctat	cgattgtatg	2820
	ggaagcccca	tgccgcagag	ttgtttctga	aacatggcaa	aggtagcgtt	gccaatgatg	2880
	ttacagatga	gatggcaga	ctaaaactggc	tgacggaatt	tatgcctctt	cgcacatca	2940
	agcattttat	cgtactcct	gatgatgcct	ggttaactcac	cactgcgac	ccgggaaaa	3000
	cagcattcca	ggtattagaa	gaatatcctg	attcaggtga	aaatatcgtt	gatgcgctgg	3060
	cagtgttctc	gcgcgggttg	cattcgatct	ctgtttgtaa	ttgtcccttt	aacagcgatc	3120
	gcgtattctg	tctcgtcag	gcgcaatcac	gaatgaataa	cggtttggtt	gatgcgagtg	3180
	attttgatga	cagcgtaat	ggctggcctg	ttgaacaagt	ctggaaagaa	atgcataagc	3240
	ttttgccatt	ctcaccgat	tcagtcgtca	ctcatggtga	tttctcactt	gataacctta	3300
	tttttgacga	ggggaaatta	ataggttgta	ttgatgttgg	acgagtcgga	atgcagacc	3360
	gataccagga	tcttgccatc	ctatggaaact	gcctcgggtga	gttttctcct	tcattacaga	3420
	aaaggctttt	tcaaaaatat	ggtattgata	atcctgatat	gaataaattg	cagtttcatt	3480
	tgatgctcga	tgagtctttc	taatcagaat	tggtaatttg	gttgtaaacac	tggcagagca	3540
	ttacgctgac	ttgacgggac	ggcggtttg	ttgaataaat	cgaacttttg	ctgagttgaa	3600

	ggatcagatc	aogcatcttc	ccgacaaagc	agaccgttcc	gtggcaaagc	aaaagttcaa	3660
	aatcaccac	tgggtccact	acaacaaagc	tctcatcaac	cgtggctccc	tcaattttctg	3720
	gctggatgat	ggggcgattc	aggcctggta	tgagtcagca	acaccttctt	caagaggcag	3780
	acctcagcgc	tcaaagatgc	aggggtaaaa	gctaaccgca	tctttaccga	caaggaatcc	3840
	ggcagttcaa	cagatcggga	agggctggat	ttgctgagga	tgaaggaggga	ggaaggtgat	3900
	gtcatttctg	tgaagaagct	cgaccgtctt	ggccgcgaca	ccgccgacat	gatccaaactg	3960
	ataaaagagt	ttgatgtcca	gggtgtagcg	gttcggttta	ttgacgacgg	gatcagttacc	4020
	gacggtgata	tggggcaaat	ggtggtcacc	atcctgttcg	ctgtggtaca	ggctgaacgc	4080
	cggaggatca	agtccgtcaa	gccaaagcga	accagcggca	ccgccgcgag	caacgtcgca	4140
	agggcgatca	ggggacgatt	tttgogaaga	atttccacgg	taagaatcca	atctctcgaa	4200
	tttaggggtga	aagaagcttg	gcataggggt	gtgcacgaac	tcgggtggagg	aaattttccgc	4260
	ggggcaaggc	ttcgcgaagc	ggagtccggg	cagtggcttt	gaagatcttt	gggagcagtc	4320
	cttctgcgct	tacgaggtga	gccggtgggg	aaccgtttat	tgcctatggg	gtgagccccc	4380
	ctagagagct	tcaagagcaa	tcagcccgac	ctagaaagga	ggccaagaga	gagaccctta	4440
	cggggggaac	cgtttttctg	ctacgagatg	gcacattttac	tgggaagctt	tacggcgtcc	4500
	tctgtgaagt	tcaatgcccg	cagaatttaag	tgtctatttc	acggctcgac	gtgacacgct	4560
	aaatttcagac	atagcttcat	tgattgtcgg	ccacgagcca	gtctctccct	caacagtcac	4620
	aaaccaacct	gcaatggtoa	agcgatttcc	tttagctttc	ctagcttgtc	gttgactgga	4680
	cttagctagt	ttttctcgct	gtgctcgggc	gtactcactg	tttgggtctt	tcagcgcttc	4740
	tgcggccttt	ttaccgcaac	gtcttcccat	agtggccaga	gotttttcgc	ctcggtctgt	4800
	ctgcgtctct	gtctgacgag	cagggaacgac	tggctggcct	ttagcgacgt	agccgcgcac	4860
[0294]	acgtcgcgcc	atcgtctggc	ggtcaagcat	cggcggcaga	tcaggctcac	ggcgtctctg	4920
	tcggaccgcc	tgagcgacgg	tgtaggcacg	ctcgtaggcg	tcgatgatct	tgggtgtcttt	4980
	tagcgctcca	ccagccgctt	ttaactggta	ccccacagtc	aaagcgtggc	gaaaagccgt	5040
	ctcatcacgg	ggggcacgcc	ctggagcagt	ccagaggaca	cggacgcctg	cgatcagctc	5100
	tcagacgctc	tcagcggcgc	tcggcaggct	tgcctcaagc	gtggcaagtg	ctttttgcttc	5160
	cgcagtggct	tttcttgccg	cttcgatacg	tgcccgctcg	ctagaaaaat	cctgtctcata	5220
	gcgtttttta	gggtttttctg	tgcctgagat	catgcgagca	acctccataa	gatcagctag	5280
	gcgatccacg	cgattgtgct	gggcacgcca	gcggtaacgc	gtgggacgtg	cggagacgtg	5340
	cagtggccac	cggctcagcc	tatgtgaaaa	agcctggta	gcgccgaaaa	cgcgggtcat	5400
	ttctcgggtc	gttgcagcca	gcaggcgcac	attcgggctg	ctcatgcctg	ctcgggcata	5460
	caccggatca	atgagccaga	tgagctggca	tttcccgctc	agtggattca	cgcgcgatcca	5520
	agctggcgct	ttttccaggc	gtgccacggc	ctccaaaatc	gcgtagacct	cggggtttac	5580
	gtgctcgatt	ttcccgccgg	cctgggtggct	cggcacatca	atgtccagga	caagcacggc	5640
	tgcgtgctgc	gcgtgcgtca	gagcaacata	ctggcacccg	gcaagcgatt	ttgaaccaac	5700
	tcgggtataac	ttcggctgtg	tttctcccg	gtccgggtct	ttgatccaag	cgttgccgaa	5760
	gtcgcgggtc	ttgctgccct	ggaaattttc	tctgcccgag	tgagcgagga	attcgcggcg	5820
	gtcttcgctc	gtccagccac	gtgatccgag	cgcgagctcg	ggatgggtgt	cgaacagatc	5880
	agcggaaaaat	ttccaggccg	gtgtgtcaat	gtctcgtgaa	tcgcctagag	tcatttttga	5940
	gcgtttttct	ccagggttg	actgggggtt	agccgacgcc	ctgtgagtta	ccgtccacgg	6000
	ggcgttcaac	atttttcagg	tattcgtgca	gcttatcgct	tcttgccgcc	tgtgcgcttt	6060
	ttcagcgcgc	gacgcgtctg	ccgattcggg	gcagggtggtg	gcggcgctga	cacgtcctgg	6120
	ggggccacgg	ccacacgaaa	cgcggcattt	acgatgtttg	tcatgcctgc	gggcaccgcg	6180
	ccacgatcgc	ggataattct	cgtgcgcgt	ccagctctg	tgacgacct	ggccaaaatt	6240

tcgctcgggg	gacgcacttc	cagcgccatt	tgcgacctag	ccgcctccag	ctcctcgccg	6300
tggcgtttgt	tggcggeetc	gcgctgggt	gcggcacgac	acgcattctga	gcaaatat	6360
gcgcgcgcgc	ctcgcgggtc	aggccgggga	ggaatcaggc	caccgcagta	ggcgcaactg	6420
attcgatcct	ccactactgt	gcgtccctct	ggcgctgccg	agcacgcagc	tcgtcagcca	6480
gcctctcaag	atccggccacg	agagtttcta	ggctcgctcg	ggcactggcc	cagtctcgtg	6540
atgctgggcg	gtccgtcgta	tcgagagctc	ggaaaaatcc	gatcacctgt	tttaaatcga	6600
cggcgacatc	gagcgcgctc	gactccagcg	cgacatcaga	gagatccata	gctgatgatt	6660
cgggcccaatt	ttggtacttc	gtcgtgaagg	tcatgacacc	attataacga	acgttcgtta	6720
aagtttttgg	cggaaaaatca	cgcggcacga	aaattttcac	gaagcgggac	tttgcgcagc	6780
tcaggggtgc	taaaaat	gtatcgcaact	tgatttttcc	gaaagacaga	ttatctgcaa	6840
acggtgtgtc	gtattttctgg	cttggttttt	aaaaaatctg	gaatcgaaaa	tttgcggggc	6900
gaecgagaag	ttttttacaa	aaggcaaaaa	ctttttcggg	atcgacagaa	ataaaacgat	6960
cgacggtaac	caacaaaaaa	gcgtcaggat	cgccgtagag	cgattgaaga	ccgtcaacca	7020
aaggggagc	ctccaatcga	cgcgacgcgc	gtcttacggc	gatcctgacg	cagattttta	7080
gctatctgtc	gcagcgccct	cagggacaag	ccacccgcac	aacgtcgcca	ggcgcatcag	7140
cgacgcgcga	ggg					7153

SEQ ID No. 36

[0295]

ggatccttat	tacttgtaca	gctcgtccat	gcgagagtg	atcccggcgg	cggtcacgaa	60
ctcagcagg	accatgtgat	cgcgtctctc	gttgggtctc	ttgctcaggg	cggactggta	120
gctcaggtag	tggttgtcgg	gcagcagcac	ggggccgtcg	ccgatggggg	tgttctgctg	180
gtagtggteg	gcgagctgca	cgcgtccgcc	ctcgatgttg	tggcggatct	tgaagtccac	240
cttgatgccg	ttcttctgct	tgtcgcccat	gatatagacg	ttgtggtgtg	tgtagtgtga	300
ctccagcttg	tgcgccagga	tgttgccgtc	ctccttgaag	ttgatgccct	tcagctcgat	360
gcggttcacc	aggggtgtgc	cctcgaaact	cacotcggcg	cggtctctgt	agttgccgtc	420
gtccttgaag	aagatgggtc	gctcctggac	gtagccttcg	ggcatggcgg	acttgaagaa	480
gtcgtgctgc	ttcatgttgt	cggggtagcg	ggcgaagcac	tgcaggccgt	agccgaaggt	540
ggtcacgagg	gtgggcccagg	gcacgggcag	cttgccgggtg	gtgcagatga	acttcagggt	600
cagcttgccg	taggtggcat	cgcctcgcgc	ctcgccggac	acgctgaact	tgtggccgtt	660
tacgtcgccg	tccagctcga	ccaggatggg	caaccacccg	gtgaacagct	cctcgccctt	720
gctcaccata	tgatattctc	ttcttctaac	cagcgacgcc	gccgatccat	ttgtcgggtg	780
tgettcgggc	gagtcgtcga	gattgtgctg	ggaaagtcat	cgggatcaag	ctcctttctg	840
gctgattgag	tttttcttct	ttcttcaatc	atcgccaata	agaacctaga	gcacatcggg	900
gatttccctc	ctcctaacc	ctaaaaacc	ctgagaaaac	gtccaagta	aacctttaca	960
gctcgtcgac	ctgcagcaat	ggcaaccacg	ttgcgcaaac	tattaaactg	cgaactactt	1020
actctagctt	cccggaaca	attaatagac	tggatggagg	cggataaagt	tgcaggacca	1080
cttctgocct	cggcccttcc	ggctggctgg	tttattgctg	ataaatctgg	agccgggtgag	1140
cgtgggtctc	gcggtatcat	tgcagcactg	gggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgtta	1200
gttatctaca	cgaaggggag	tcaggcaact	atggatgaac	gaaatagaca	gatcgctgag	1260
ataggtgect	cactgattaa	gcattggtaa	ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	1320
tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	1380
aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcgttcc	actgagcgtc	agacccctta	1440
ataagatgat	cttcttgaga	tcgttttggt	ctgcgcgtaa	tctcttgcct	tgaaacgaa	1500

[0296]

```

aaaacgcgcct tgcagggcggg tttttcgaag gttctctgag ctaccaactc tttgaacoga 1560
ggtaactggc ttggaggagc gcagtcacca aaacttgtcc tttoagtta gacttaaccg 1620
gcgcgatgact tcaagactaa ctccctctaaa tcaattacca gtggctgctg ccagtgggtc 1680
ttttgcattgt cttttcgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg ccgacgggtc 1740
ggactgaacg ggggggttcgt gcatacagtc cagcttggag cgaactgcct acccggaact 1800
gagtgtcagg cgtggaatga gacaaacggc gccataacag cggaaatgaca ccggtaaaac 1860
gaagggcagg aacaggagag cgcacgaggg agccgcacag gggaaaacgc tggtatcttt 1920
atagtctgtg cgggtttcgc caccactgat ttgagcgtca gatttctgtg tgcctgtcag 1980
ggggcgggag cctatggaaa aacggctttg ccgcggccct ctacttccc tgttaagtat 2040
cttcctggca tcttcacgga aatctccgcc ccgttcgtaa gccatttccg ctgcgcgag 2100
tcgaacgacc gagcgtagcg agtcagttag caggaagcgg gaatatatcc tgtatcacat 2160
attctgctga cgcaccggtg cagccttttt tctcctgcca catgaagcac ttcactgaca 2220
ccctcatcag tgccaacata gtaagccagt atacactccg ctagcgtgga ggtctgcctc 2280
gtgaagaagg tgttgcgtgc tcataccagg cctgaatcgc cccatcatcc agccagaaag 2340
tgagggagcc acggttgatg agagctttgt tgtaggtgga ccagttgggt attttgaact 2400
tttgctttgc caccggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg cgtgatctga tcttcaact 2460
cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc acgttgtgtc tcaaaatctc tgaattaca 2520
ttgcacaaga taaaaatata tcatcatgaa caataaaact gtctgcttac ataaacagta 2580
atacaagggg tgttatcgac catattcaac gggaaaacgc ttgctcgagg ccgcgattaa 2640
attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc tcgcgataat gtcgggcaat 2700
caggtgcgac aatctatcga ttgtatggga agcccgatgc gccagagttg tttctgaaac 2760
atggcaaagg tagcgttgc aatgatgtta cagatgagat ggtcagacta aactggctga 2820
cggaaatttat gcctcttccg accatcaagc attttatccg tactcctgat gatgcattgt 2880
tactcaccac tgcgaccccc gggaaaacag cattccaggt attagaagaa tatcctgatt 2940
caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttctcgcg ccggttgcat tcgattcctg 3000
tttgtaattg tctttttaac agcgatcgcg tatttctgtc cgtcaggcg caatcacgaa 3060
tgataaacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga gcgtaatggc tggcctgttg 3120
aacaagtctg gaaagaaatg cataagcttt tgccattctc accggactca gtcgtcactc 3180
atggtgattt ctcaactgat aaccttattt ttgacgaggg gaaattaata ggttgtattg 3240
atgttggacg agtcggaatc gcagacggat accaggatct tgccactcta tggaaactgc 3300
tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac ggttttttca aaaataagggt attgataatc 3360
ctgatatgaa taaatcgacg tttcatttga tgcctgatga gtttttctaa tcagaattgg 3420
ttaattggtt gtaacactgg cagagcatta cgtgacttg acgggacggc ggtttgttg 3480
aataaatcga acttttgcgt agttgaagga tcagatcacg catcttcccg acaacgcaga 3540
ccgttcctg gcaaaagcaa agttcaaaat caccaactgg tccacctaca acaaaagctc 3600
catcaaacgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg gcgattcagg cctgggtatga 3660
gtcagcaaca ccttcttccg gaggcagacc tcagcgtcca aagatgcagg ggtaaaagct 3720
aacgcgatct ttaccgacaa ggcacccggc agttcaacag atcgggaagg gctggatttg 3780
ctgaggatga aggtggagga aggtgatgtc attctggtga aqaagctcga ccgtcttggc 3840
cgcgacaccc ccgacatgat ccaactgata aaagagtttg atgctcaggg tgtagcgggt 3900
cggtttattg acgacgggat cagtaccgac ggtgatattg ggcaaaagggt ggtcaccatc 3960
ctgtcggctg tggcacaggc tgaacgccgg aggatcaagt cggtaaacgc aagcgcaccc 4020
agcggcaccc ccgcgagcaa cgtcgcaagg gcgatcaggg gacgattttt gcgaagaatt 4080
tccacggtaa gaatccaatc tctogaattt aggggtgaaag aagcttggca taggggtgtg 4140

```

[0297]

caogaaactcg gtggaggaaa ttcccgcggt gcaaggcttc gcaagcgga gtcgcggaag 4200
tggctttgaa gatctttggg agcagtcctt gtgcgcttac gaggtgagcc ggtggggaac 4260
cgttatctgc ctatggtgtg agccccccta gagagcttca agagcaatca gcccgaccta 4320
gaaaggaggg caagagagag acccctacgg ggggaaccgt tttctgecta cgagatggca 4380
catttaetgg gaagctttac ggcgtctcgg tggagttca atgcccgcag acttaagtgc 4440
tctattcacg gtctgacgtg acacgctaaa ttcagacata gcttcactga ttgtcgcca 4500
cgagccagtc tctccctcaa cagtcataaa ccaacctgca atgggtcaagc gatttccctt 4560
agctttccta gcttgctgtt gactggaett agctagtttt tctgcctgtg ctcgggcgta 4620
ctcactgttt gggctcttcc agcgttctgc ggccttttta ccgccaagtc tcccatagt 4680
ggccagagct tttcgccctc ggcgtctctg cgtctctgtc tgacgagcag ggacgactgg 4740
ctggccttta gcgacgtagc cgcgcacacg tccgcgcctc gtctggcggt cagcgcctgg 4800
cgccagatca ggcctcaggg cgtctctctc gaccgcctga ggcaggtgt aggcagctc 4860
gtaggcgctg atgatcttgg tgtcttttag gcgctcaca gccgcttta actggatatc 4920
cacagtcaaa gcgtggcgaa aagcgtctc atcacggcg gcacgcctg gacnagtc 4980
gaggaacagg accgcgtcga tcagctctcc agacgcttca gggcgctcg gcaggttgc 5040
ttcaagcgtg gcaagtcctt ttgcttcgc agtggtttt cttgcgcctt cgatacgtgc 5100
ccgtccgcta gaaaactcct gctcatagcg ttttttaggt tttctgtgc ctgagatcat 5160
gcgagcaacc tcataagat cagctaggcg atccacgga ttgtgtggg catgcccagc 5220
gtacgcggtg gcatcgtcgg agacgtcag tggccacgg ctcagcctat gtgaaaaagc 5280
ctggtcagcg ccgaaaacgc gggctcattc ctcggtcgtt gcagccagca ggcgcataat 5340
cgggctgctc atgcccgtg cggcatacac cggatcaatg agccagatga gctggcattt 5400
ccgctcagt ggattcacgc cgtcccaagc tggcgtttt tccaggcgtg cccagcctc 5460
caaatcgcg tagacctcg ggtttacgtg ctcgattttc ccgcccgcct ggtggctcgg 5520
cacatcaatg tccaggacaa gcacggctgc gtgtgtcgcg tgcgtcagag caacatactg 5580
gcacccggga agcgaatttg aaccacacg gtataactc ggcgtgtgtt ctcccggtc 5640
cgggtctttg atccaaagc tggcgaagtc gcgggtcttg ctgcccggg aattttctct 5700
gccaggtga gcgaggaatt cgcggcggtc ttcgctcgtc cagccacgtg atgcagcgc 5760
gagctcggga tgggtgtcga acagatcagc ggaaaattc caggccggtg tgtcaatgtc 5820
tcgtgaatcc gctagagtc tttttgagcg ctttctccca ggtttggact gggggttagc 5880
cgacgccctg tgagttaccg ctccaggggc gttcaacatt tttcaggtat tcgtgcagct 5940
tctcgtctct tgcgcctgt gcgtttttc gaacgcgcag gctgctgcg attcggtgca 6000
ggtggtggcg gcgtgacac gtcctggcg gccacggcca cccgaaaagc ggcatttacg 6060
atgtttgtca tgcctgcggg caccgcgcca cgtcgcgga taattctcgc tgcgcttcc 6120
agctctgtga cgaacctggc caaaatttcg ctgggggac gcacttccag cgcatttgc 6180
gacctagcgg cctccagctc ctcggcggtg cgtttgttgg ccgctcgcg gctggctgcg 6240
gcacgacacg catctgagca atattttgcg cgcgctcctc ggggtcagg ccggggagga 6300
atcaggccac cgcagtaggc gcaactgatt cgtacttcca ctactgtgog tctcctggc 6360
gctgcgcagc acgcagctcg tcagccagct cctcaagatc cgcacgaga gtttctaggt 6420
cgtcgcggc actggccag tctcgtgatg ctggcgcgtc cgtcgtatcg agagctcga 6480
aaaatccgat caccgtttt aaatcgacgg cagcctcag ccgctcggac tccagcgcga 6540
catcagagag atccatagct gatgattcgg gccaatttt gtaactcgtc gtgaaggtca 6600
tgacaaccatt ataacgaacg ttcgttaaag tttttggcg aaaatcacgc ggcacgaaaa 6660
ttttcacgaa ggggaattt ggcagctca ggggtgctaa aaattttgta tgcacttga 6720
ttttccgaa agacagatta tctgcaaaag gtgtgtcgt tttctggctt ggtttttaaa 6780

aaatctggaa	tcgaaaattt	gcgggcgac	cgagaagttt	ttacaaaag	gcaaaaactt	6840
tttcgggato	gacagaaata	aaacgataca	cggtacgcaa	caaaaaagcg	tcaggatcgc	6900
cgtagagcga	ttgaagacgc	tcaaccaaag	gggaagcctc	caatcgacgc	gacgcgcgct	6960
ctacggcgat	cctgacgcag	atttttagct	atctgtcgca	gcgccctcag	ggacaagcca	7020
cccgacacaac	gtcgcgaggg	cgatcagcga	cgcgcgaggg			7060

SEQ ID No. 37

[0298]

ccctcgggcg	tcgctgatcg	cccgcgcgac	gttgtcgggg	tggtttgtcc	ctgagggcgc	60
tgcgacagat	agctaaaaat	ctgcgtcagg	atcgccgtag	agcgcgcgtc	gcgtcgattg	120
gaggcttccc	cttttggttg	cggctctcaa	tcgctctacg	gcgatccetga	cgtttttttg	180
ttcggtaccg	tcgatcgttt	tatttctgtc	gaccccgaaa	aagttttttg	cttttgtaaa	240
aaacttctcg	gtcgcccgcg	aaacttttga	ttccagattt	tttaaaaacc	aagccagaaa	300
tacgacacac	cgtttgcaga	taactctgtc	thcgaaaaaa	tcaagtgcga	tacaaaattt	360
ttagcaccgc	tgagctgcgc	aaagtcgcgc	ctcgtgaaaa	ttttcgtgcc	gcgtgatttt	420
ccgcacaaaa	ctttaacgaa	cgttcgttat	aatggtgtca	tgaccttcac	gacgaagtac	480
caaatctggc	ccgaatcctc	agctatggat	ctctctgatg	tcgcgctgga	gtcgcgcgcg	540
ctcgatgctg	ccgtcgattt	aaaaacggtg	atcggtattt	tcgagctctc	cgatacgacg	600
gacgcgcgcg	catcacgaga	ctgggcccag	gccgcgcgcg	acctagaaac	tctcgtggcg	660
gatcttgagg	agctggctga	cgagctgcgt	gctcggcagc	gccaggagga	cgcacagtag	720
tggaggatcg	aatcagttgc	gccactgcgc	gtggcctgat	tcctccccgc	cctgaccgcg	780
gaggacggcg	cgcaaatat	tgcctcagatg	cgtgtcgtgc	cgcagccagc	cgcgagcgcg	840
ccacacaaacg	ccacgcgcgag	gagctggagg	cggctaggtc	gcaaatggcg	ctggaagtgc	900
gtcccccgag	cgaaattttg	gccatggctg	tcacagagct	ggaagcggca	gcgagaatta	960
tcgcgcgatcg	tggcgcggtg	cccgcaggca	tgacaaaacat	cgtaaatgcc	gcgtttcgtg	1020
tggccgtggc	cgcgcaggac	gtgtcagcgc	cgcaccacc	tgcaccgaat	cggcagcagc	1080
gtcgcgcgtc	gaaaaagcgc	acaggcggca	agaagcgata	agctgcacga	atacctgaaa	1140
aatgttgaaac	gccccgtgag	cggtaactca	cagggcgtcg	gctaaccccc	agtcacaaac	1200
tgggagaaaag	cgtcaaaaaa	tgactctagc	ggattcaoga	gacattgaca	cacggccttg	1260
gaaattttcc	gctgatctgt	tcgacaccca	tcgcgagctc	gcgctgcgat	cacgtggctg	1320
gacgagcgaa	gacgcgcgcg	aattcctcgc	tcacctgggc	agagaaaatt	tcacgggcag	1380
caagacccgc	gaattcgcca	gcgcttggtg	caaagaccgc	gacacgggag	aaacacgcgc	1440
gaagttatac	cgagttgggt	caaaatcgct	tgcccggtgc	cagtatgttg	ctctgacgca	1500
cgcgcgcgac	gcagccgtgc	ttgtcctgga	cattgatgtg	ccgagccacc	aggcgcgcgc	1560
gaaaatcgag	cacgtaaaac	ccgaggtcta	cgcgattttg	gagcgcctgg	cacgcctgga	1620
aaaagcgcca	gcttggtatg	gctggaatcc	actgagcggg	aaatgcacgc	tcctctggct	1680
cattgatccg	gtgtatgccg	cagcaggcat	gagcagcccg	aatatgcgcg	tgctggctgc	1740
aaagacgcgag	gaaatgaccc	gcgttttggg	cgtgaccag	gctttttcac	ataggetgag	1800
ccggtggcca	ctgcacgtct	ccgacgatcc	caccgcgtac	cgttgccatg	cccagcacia	1860
tcgcgtggat	cgcctagctg	atccttatgga	ggttgctcgc	atgatctcag	gcacagaaaa	1920
acctaaaaaa	cgtatgagc	aggagttttc	tagcggacgg	gcacgtatcg	aagcggcaag	1980
aaaagccact	gcggaagcaa	aagcacttgc	cacgcttgaa	gcaagcctgc	cgcgcgcgcg	2040
tgaagcgtct	ggagagctga	tcgacggcgt	ccgtgtcctc	tggactgctc	cagggcgtgc	2100
cgcgcgtgat	gagacggctt	ttcgccacgc	tttgactgtg	ggataccagt	taaaagcggc	2160

[0299]	tgggtgagcgc	ctaaaagaca	ccaagatcat	cgacgcctac	gagcgtgcot	acaccgtgcg	2220
	tcaggcggtc	ggagcagaag	gccgtgagcc	tgatctgcgg	ccgatgcgtg	acggccagac	2280
	gatggcgcg	cgtgtgcgcg	gctacgtcgc	taaaggccag	ccagtcgtcc	ctgctcgtca	2340
	gacagagacg	cagagcagcc	gagggcgaaa	agctctggcc	actatgggaa	gacgtggcgg	2400
	taaaaaggcc	gcagaaecgt	ggaaaagacc	aaacagttag	tacgcccgag	cacagcgaga	2460
	aaaactagct	aagtcacgtc	aacgacaagc	taggaaagct	aaaggaaatc	gcttgaccat	2520
	tgcaggtttg	tttatgactg	ttgagggaga	gactggctcg	tggccgacaa	tcaatgaagc	2580
	tatgtctgaa	tttagcgtgt	cacgtcagac	cgtgaataga	gcacttaagt	ctgggggcat	2640
	tgaacttcca	cgaggacgcc	gtaaaagcttc	ccagtaaatg	tgccatctcg	taggcagaaa	2700
	acggttcccc	ccgtaggggt	ctctctcttg	gcctcctttc	taggtcgggc	tgattgctct	2760
	tgaagctctc	tagggggggt	cacaccatag	gcagataaag	gttccccacc	ggctccacct	2820
	gtaagcgcac	aaggactget	cccaaagatc	ttcaaagcca	ctgccgcgac	tcgcttcgcg	2880
	gaagccttgc	ccgcgggaaa	tttctccacc	cgagttcgtg	cacaccctta	tgccaaagctt	2940
	ctttccacct	aaattcgaga	gattggattc	ttaccgtgga	aattcttcgc	aaaaatcgtc	3000
	ccctgatcgc	ccttgcgacg	ttgctcgcgg	cggtagcgct	ggttgcgctt	ggcttgaccg	3060
	acttgatcct	ccggcgttca	gcctgtgcc	cagccgacag	gatggtgacc	accatttgcc	3120
	ccatatcaac	gtcggtactg	atccugtcgt	caataaacgg	aaccgctaca	ccctgagcat	3180
	caaaactctt	tatcagttgg	atcatgtcgg	cgtgttcggg	gccaaagcgg	togagcttct	3240
	tcaccagaat	gacatcacct	tcctccacct	tcctcctcag	caaatccagc	ccttcccgat	3300
	ctgttgaact	gcgggatgcc	ttgtcggtaa	agatgcgggt	agcttttacc	cctgeatctt	3360
	tgagcgttga	ggtctgcctc	gtgaagaagg	tgttgetgac	tcataccagg	cctgaatcgc	3420
	cccatcatcc	agccagaaag	tgagggagcc	acggttgatg	agagctttgt	tgtagggtga	3480
	ccagttgggtg	atttttgaact	tttgcctttg	cacggaacgg	tctgcgttgt	cgggaagatg	3540
	cgtgatctga	tccttcaact	cagcaaaagt	tcgattttat	caacaaagcc	gccgtcccgt	3600
	caagtcagcg	taatgtctctg	ccagtgttac	aaccaattta	ccaattctga	ttagaaaaac	3660
	tcctcgagca	tcaaatgaaa	ctgcaattta	ttcatatcag	gattatcaat	accatatttt	3720
	tgaaaaagcc	gtttctgtta	tgaaggagaa	aactcaccca	ggcagttcca	taggatggca	3780
	agatcctggg	atcgggtctgc	gattccgact	cgtccaacat	caatacaacc	tattaatttc	3840
	ccctcgtcaa	aaataagggt	atcaagttag	aaatcaccat	gagtgcagac	tgaatccggg	3900
	gagaatggca	aaagcctatg	catttctttc	cagacttggt	caacaggcca	gccattacgc	3960
	tgcgcaccaa	aatcactcgc	atcaaccaaa	cgtttattca	ttcgtgattg	cgcctgagcg	4020
	agcgaataa	cgcgacgcgt	gttaaaagga	caattacaaa	caggaaatga	atgcaaccgg	4080
	cgcaggaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata	ttctttataat	4140
	acctggaatg	ctgttttccc	ggggatcgca	gtgggtgagta	acctatgcac	atcaggagta	4200
	cggataaaat	gcttgatggg	cggaaagagg	ataaattccg	tcagccagtt	tagtctgacc	4260
	atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcta	cctttgccat	gtttcagaaa	caactctggc	4320
	gcctcgggct	tcoccataca	tcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccgac	attatcggga	4380
	gcccatttat	accatataa	atcagcatcc	atgttggaat	ttaatcgogg	cctcgagcaa	4440
	gacgtttccc	gttgaatatg	gctcataaca	ccccttgat	tactgtttat	gtaagcagac	4500
	agttttattg	ttcatgatga	tatattttta	cttgttgcaa	tgtaacatca	gagattttga	4560
	gacacaaagt	ggcttctgtg	aataaatcga	acttttgctg	agttgaagga	tcagatcacg	4620
	catcttcccg	acaacgcaga	ccgttcogtg	gcaaagcaaa	agttcaaaat	caccaactgg	4680
	tcacacctaca	acaaagctct	catcaacogt	ggctccctca	ctttctggct	ggatgatggg	4740
	gogattcagg	cctggataga	gtcagcaaaa	ccttcttcac	gaggcagacc	tcagcgctag	4800

	cggagtggtat	actggccttac	tatgtttggca	ctgatgaggg	tgtcagtgaa	gtgcttcattg	4860
	tggcaggaga	aaaaaggtcg	caccggtgcg	tcagcagaat	atgtgataca	ggatatattc	4920
	cgttcctctg	ctcacagact	cgtacagctc	ggtcgttcga	ctgcggcgag	cggaaatggc	4980
	ttacgaacgg	ggcggagatt	tcctggaaga	tgccagggaag	atacttaaca	gggaagttag	5040
	agggccgcgg	caaagccgtt	tttcctatagg	ctccgccccc	ctgacaagca	tcacgaaatc	5100
	tgcgcgtcaa	atcagtggtg	gcgaaccgcg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	5160
	cctggcggct	ccctcgtgcg	ctctcctggt	cctgcctttc	ggttttacgg	tgtcattccg	5220
	ctgttatggc	cgcgtttgtc	tcattccacg	cctgacactc	agttccgggt	aggcagttcg	5280
	ctccaagctg	gactgtatgc	acgaaccccc	cgttcagtcc	gaccgcgcg	ccttatccgg	5340
	taactatcgt	cttgagtcca	acccggaaaag	acatgcacaa	gcaccactgg	cagcagccac	5400
	tggtaattga	tttagaggcg	ttagtcttga	agtcattgoc	cggttaaggc	taaactgaaa	5460
	ggacaagttt	tgggtgactgc	gtcctctecaa	gccagttacc	tcggttcaca	gagttggtag	5520
	ctcagagaa	cttcgaaaaa	cgcacctgca	aggcggtttt	ttcgttttca	gagcaagaga	5580
	ttacgcgcag	acaaaaacga	tctcaagaag	atcatcttat	taagggtctt	gacgcctcag	5640
	ggacagaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	tcattgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	5700
	agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaaact	5760
	ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcagtc	tgtctatttc	5820
	gttcattccat	agttgcctga	ctcccgcctg	tgtagataac	taagatacgg	gagggettac	5880
	catctggccc	cagtgtctga	atgataccgc	gagaccacag	ctcaccggct	ccagatttat	5940
	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaaggggcc	agcgcagaag	tggctccgca	actttatccg	6000
	cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	aagctagagt	aagtagctcg	ccagtttaata	6060
[0300]	gtttgcgcaa	cgttggtgoc	attgctgcag	gtcgaccatg	cgcctttccc	agtggaaagg	6120
	cgcacatgtc	gcccctcagg	aggtaaatat	cgcaggctcag	accgttcgca	tcocacgcgc	6180
	tctggttaag	gcagcacagc	tcggctctct	ggacgttagag	cagttctaaa	ccttaaaattc	6240
	atgccttaca	acctttttgt	ggtaagaatt	taacaagagc	cagttatctt	ctcttaaaat	6300
	gaggaggtaa	ctggcctctt	tatgcttaag	agggtgttag	ataagtgaag	tatgttccaa	6360
	cgcgtggacg	tcttaatttg	gagggaagtct	gtcacggact	ggaagacgaa	aagggtatcg	6420
	atgaaaattt	tagttgttga	tgacgagcaa	gctgtacgtt	aatctatcgc	gcctgcagct	6480
	cccgttccat	gcccggatcg	ggattaggct	ttgccatcgt	gaatcaggtt	gtgaatccgc	6540
	atggtggcca	actcgttgtg	ggtgaatcag	atgatggcgg	aacgagaatc	actattgatt	6600
	tgcacgggga	acccattcgc	agcgggttcg	aaaatgtoga	tgattaaggt	accaccacta	6660
	aagagctcac	aggaagtgtt	cagactactt	agagtgcgc	cccagccaca	gggttcataa	6720
	tcaaatcatg	acaaatcaat	tccccacaaa	caacggtgag	aacccggacc	gtgcategga	6780
	aaactccatc	gaaaccaact	ccggtacctg	aaactttaaga	aggagatata	atatggtgag	6840
	caagggcgag	gagctgttca	ccgggggtgt	gcccattcct	gtcgagctgg	acggcgacgt	6900
	aaacggccac	aagttcagcg	tgtccggcga	ggcgaggggc	gatgccacct	acggcaagct	6960
	gaccctgaag	ttcatctgca	ccaccggcaa	gctgcccggt	ccctggccca	ccctcgtgac	7020
	caccttcggc	taaggcctgc	agtgccttgc	ccgtacccc	gaccacatga	agcagcacga	7080
	cttcttcaag	tccgccatgc	ccgaaggcta	cgtccaggag	cgcaccatct	tcttcaagga	7140
	cgcgggcaac	tacaagaacc	gcgcggaggt	gaagttcgag	ggcgacaccc	tgggtgaaccg	7200
	catcgagctg	aagggcacac	acttcaagga	ggacggcaac	atcctggggc	acaagctgga	7260
	gtacaactac	aacagccaca	acgtctatat	catggccgac	aagcagaaga	acggcatcaa	7320
	ggtgaacttc	aagatccgcc	acaacatoga	ggcgggcagc	gtgcagctcg	ccgaccacta	7380
	ccagcagaac	acccccatcg	gcgacggccc	cgtgctgctg	cccagacaac	actacctgag	7440

ctaccagtgcc	gccctgagca	aagaccccaa	cgagaagcgc	gacacatgg	tcctgctgga	7500
gttcgtgacc	gccgcggga	tcactctcgg	catggacgag	ctgtacaagt	aataaggatc	7560
c						7561

SEQ ID No. 38

[0301]	ccctgcggcg	tcgctgatcg	ccctgcggac	gttgtgcggg	tggtttgtcc	ctgagggcgc	60
	tgagacagat	agctaaaaat	ctgcgtcagg	atgcgcgtag	agcgcgcgtc	gcgtcgattg	120
	gaggcttccc	ctttggttga	cggtcttcaa	tcgctctacg	gcgatcctga	cgcttttttg	180
	ttgcgtaccg	tcgatcgttt	tatttctgtc	gatcccgaaa	aagttttttg	cttttgtaaa	240
	aaacttctcg	gtgcgcccg	aaattttcga	ttccagattt	tttaaaaaac	aagccagaaa	300
	taagacacac	cgtttgacga	taatctgtct	ttcggaaaaa	tcaagtgcga	tacaaaattt	360
	ttagaccccc	tgagctgcgc	aaagtcccg	ttcgtgaaaa	ttttcgtgcc	gcgtgatttt	420
	ccgcacaaaa	cttttaacga	cgttcgttat	aatggtgtca	tgaccttcac	gacgaagtac	480
	caaaattggc	ccgaatcctc	agctatggat	ctctctgatg	tcgcgcgtga	gtccgacgcg	540
	ctcgatgetg	ccgtcgattt	aaaaacggtg	atcggatttt	tcgagctctc	cgatacgacg	600
	gaecgcgccg	catcacgaga	ctgggcccag	gccgcgagcg	acctagaaac	tctcgtggcg	660
	gatcttgagg	agctggctga	cgagctgcgt	gtcggccagc	gccaggagga	cgcacagtac	720
	tggaqgagcg	aatcagttgc	gcctactcgc	gtggcctgat	tcctcccccg	cccgaccgcg	780
	gaggacggcg	cgcaaaatat	tgctcagatg	cgtgtcgtgc	cgcagccagc	cgcgagcgcg	840
	ccaacaaaag	ccacgcggag	gagctggagg	cgctaggttc	gcaaatggcg	ctggaagtgc	900
	gtcccccgag	cgaaattttg	gccaatggtc	tcacagagct	ggaagcggca	gcgagaatta	960
	tcgcgcgateg	tggcgcgggtg	ccgcgaggca	tgacaaacat	cgtaaatgcc	gcgtttcgtg	1020
	tggcgcgtgc	cgcccaggac	gtgtcagcgc	cgcaccacc	tgacccgaat	cggcagcagc	1080
	gtcgcgcgtc	gaaaaagcgc	acaggcggca	agaagcgata	agctgcacga	atacctgaaa	1140
	aatgttgaac	gccccgtgag	cggtaaactc	cagggcgctg	gctaaccccc	agtccaaaac	1200
	tggaagaaaag	cgctcaaaaa	tgactctagc	ggattcagca	gacattgaca	cacggccttg	1260
	gaaattttcc	gtgatctgt	tcgacaccca	tcgcgagctc	gcgctgcgat	cacgtggctg	1320
	gaagagcgaa	gaccgcgcgc	aattcctcgc	tcacctgggc	agagaaaatt	tcaggggcag	1380
	caagaccgcg	gacttcgcca	gcgcttggat	caaagaccgc	gacacgggag	aaacacagcc	1440
	gaagttatac	cgagttggtt	caaaatcgct	tgcccgggtc	cagtatgttg	ctctgacgca	1500
	cgcgcagcac	gcagccgtgc	ttgtcctgga	cattgatgtg	cgcagccacc	agcccggcgc	1560
	gaaaatcgag	cacgtaaaac	ccgaggtcta	cgcgattttg	ggcgcgtggg	cacgcctgga	1620
	aaaagcgcca	gcttggtatg	gcgtgaatcc	aetgagcggg	aaatgccagc	tcctctggct	1680
	cattgatccg	gtgtatgccg	cagcagggat	gagcagcccg	aattatgcgc	tgtgtggctgc	1740
	aaagaccgag	gaaatgaacc	gcgttttcgg	cgttgaccag	gotttttcac	ataggctgag	1800
	ccgttggeca	ctgcacgtct	ccgacgatcc	caccgcgtac	cgcgtggcatg	cccagcacaa	1860
	tcgcgtggat	cgctagctg	atcttatgga	ggttgctcgc	atgatctcag	gcacagaaaa	1920
acctaaaaaa	cgtatgagc	aggaattttc	tagcggacgg	gcacgtatcg	aaagcggcaag	1980	
aaaagccact	gcggaagcaa	aagcacttgc	cagccttgaa	gcaagcctgc	cgcgcgcgcg	2040	
tgaagcgtct	ggagagctga	tcgacggcgt	ccgtgtcctc	tggaactgtc	caggggcgtgc	2100	
cgcgcgtgat	gagacggctt	ttgcgcacgc	tttgactgtg	ggataccagt	taaaagcggc	2160	
tggtgagcgc	ctaaaagaca	ccaagatcat	cgcgcctac	gagcgtgcct	acacgcctgc	2220	
tcaggcggtc	ggagcagacg	gcgcgtgagc	tgatctgcgc	ccgatgcgtg	accgcagacg	2280	

gatggcgcgga cgtgtgogcg gctacgtcgc taaaggccag ccagtcgtcc ctgctcgtca 2340
gacagagacg cagagcagcc gagggcgaaa agctctggcc actatgggaa gacgtggcgg 2400
taaaaaaggcc gcagaacgct ggaaagaccc aaacagttag tacgcccgag cacagcgaga 2460
aaaactagct aagtcacgtc aacgacaagc taggaaagct aaaggaaatc gcttgaccat 2520
tgcagggttg tttatgactg ttgagggaga gaetggctcg tggccgacaa tcaatgaagc 2580
tatgtctgaa tttagcgtgt cagtcagac cgtgaataga gcacttaagt ctgcgggcat 2640
tgaacttcca cgaggacgcc gtaaaagctc ccagtaaatg tgccatctcg taggcagaaa 2700
acggttcccc ccgtaggggt ctctctcttg gctccttcc taggtcgggc tgattgctct 2760
tgaagctctc taggggggct cacaccatag gcagataacg gttccccacc ggctcacctc 2820
gtaagcgac aaggactgct cccaaagatc tcaaaagcca ctgcccgac tccgcttcgc 2880
gaagccttgc ccgcgggaaa tttcctccac cgagtctcg cacacccta tgccaaagctt 2940
ctttcacctt aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgte 3000
ccctgatcgc ccttgcgacg ttgctcgcg cggtgcgctt ggttgcgctt ggcttgaccg 3060
actgatcct cggcggttca gctgtgcca cagccagacg gatggtgacc accatttgcc 3120
ccatataccc gtcggtaactg atcccgctgt caataaacgg aaccgctaca cctgagcat 3180
caactcttt tatcagttgg atcatgtcgg cggtgtcgcg gccaaagcgg tcgagcttct 3240
tcaccagaat gacatcacct tcttcacct tcatctcag caaatcagc cttcccgat 3300
ctgttgaact gcgggatgcc ttgtcggtaa agatgoggtt agcttttacc cctgcactct 3360
tgagcgctga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttqctgac tcataccagg cctgaatcgc 3420
cccatactcc agccagaaag tgagggagcc acggttgatg agagcttctg tgtagggtga 3480
ccagttgggtg attttgaaat tttgctttgc cagggaaagg tctgcgtgt cggaagatg 3540
[0302] cgtgatctga tccctcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc gccgtcccgt 3600
caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac 3660
tcctcgagca tcaaaagaa ctgcaattta tcatatcag gattatcaat accatatttt 3720
tgaaaaagcc gtttcgtaa tgaaggagaa aactcacga ggcagttcca taggatggca 3780
agatcctggg atcggctctg gattccgact cgtccaaat caatacaacc tattaatttc 3840
ccctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcaccat gagtgaagac tgaatccgg 3900
gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 3960
tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttctgtattg ccctgagcg 4020
agacgaaata cgcgacgct gttaaaagga caattacaaa caggaaatga atgcaaccgg 4080
cgcaggaaac ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata ttcttctaat 4140
acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta 4200
cggataaaat gcttgatggg cggaagaggg ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 4260
atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 4320
gcctcgggct tcccatacca tcgatagatt gtgcacctg attgcccgac attatcgca 4380
gccattttat acccatata atcagcatcc atgttggaat ttaatcgagg cctcgagcaa 4440
gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgat tactgttat gtaagcagac 4500
agttttattg ttcgatgaga tatattttta tctgtgcaa tgtaacatca gagatttga 4560
gacacaacgt ggccttggtg aataaatcga acttttctg agttgaagga tcagatcacg 4620
catcttcccg acaaagcaga ccgttcctg gcaaagcaaa agttcaaaat caccactgg 4680
tccacctaca acaaagctct catcaaccgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg 4740
gogattcagg cctggatga gtcagcaaca ccttcttcac gaggcagacc tcagcgctag 4800
cggagtgtat actggcttac tatgttggca ctgatgaggg tgcagtgaa gtgcttcag 4860
tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgag tcagcagaat atgtgataca ggatatattc 4920

	cgcttctctcg ctcactgact cgcacgcctc ggtcgttcga ctgcggcgag cggaaatggc	4980
	ttacgaacgg ggccgagatt tccggaaga tgcacggaag atacttaaca gggaagtga	5040
	agggcccgcg caaagccggt tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc	5100
	tgacgcctcaa atcagtgtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc	5160
	cctggcggtt cctcgtgct ctcctcgtt cctgcctttt ggtttacgg tgctattccg	5220
	ctgttatggc cgcgtttgt tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg	5280
	ctccaagctg gactgtatgc acgaacccc cgttcagtcc gaccgctgcg ccttatccg	5340
	taactatcgt cttgagtcca acccggaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac	5400
	tggttaattga tttagaggag ttagtcttga agtcatgcgc cggttaaggc taaactgaaa	5460
	ggacaagttt tggtgactgc gctcctccaa gccagttacc tcggttcaaa gaggttgtag	5520
	ctcagagaac cttcgaaaaa ccgcctgca aggcggtttt ttcgttttca gageaagaga	5580
	ttacgcgcag accaaaacga tctcaagaag atcatcttat taaggggtct gacgctcagt	5640
	ggaccgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	5700
	agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gaggtaactt	5760
	ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc	5820
	gttcattccat agttgcctga ctcccctcg ttagataac tacgatacgg gagggttac	5880
	catctggccc cagtgtgca atgataccgc gacacccacg ctacccggtt ccagatttat	5940
	cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg	6000
	cctccatcca gtctattaat tgttcgcggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	6060
	gtttgcgcaa cgttggtgct attgctgcag gtgcacaatt taacaagagc cagtatatct	6120
	ctcttaaaat gaggaggtaa ctggcttctt tatgcttaag aggtgttagc ataagtga	6180
[0303]	tatgttccaa cgcgtggacg tcttaattgg gaggaagtct gtcacggact ggaagacgaa	6240
	aagggtatcg atgtgaacc attccgacgc ggttcgaaaa tgcgatgat taaggtaacca	6300
	ccactaaaga gctcacagga agtgctcaga ctacttagag tgacgcccc gccacagggt	6360
	tcataatcaa atcatggtga gcaagggcga ggagctgttc accgggggtg tgccatcct	6420
	ggctcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgagg	6480
	cgatgccacc tacggcaagc tgacctgaa gttcatctgc accaccgca agctgccct	6540
	gccctggccc accctcgtga ccacctcgg ctacggcctg cagtgcctcg ccgctatccc	6600
	cgaaccatg aagcagcacg acttcttcaa gtccgcctg ccgaaggct acgtccagga	6660
	gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgcgagg tgaagttcga	6720
	ggcgacacac ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcac aacttcaagg aggaaggcaa	6780
	catcctgggg cacaagctg agtacaaact caacagccac aacgtctata tcatggcga	6840
	caagcagaag aacggcatca aggtgaact caagatccgc cacaacatcg agggcgag	6900
	cgtgcagctc gcgacccact accagcagaa ccccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct	6960
	gcccgacaac cactacatga gctaccagtc cgcctgagc aaagaccca acgagaagcg	7020
	cgateacatg gtctcgtg agttcgtgac cgcgcgggg atcactctcg gcatggacga	7080
	gctgtacaag taataaggat cc	7102

SEQ ID NO. 39

ccctcgggcg tcgtgatec ccctcgagc gttgtgcggg tggcttgtcc ctgaggccgc	60
tgcacagat agctaaaaat ctgcgtcagg atcgcctag agcgcgcgtc gcgtcagttg	120
gaggcttccc ctttggttga cggcttcaa tcgctctacg gcgacatga cgttttttg	180
ttgcgtaccg tcgatcgttt tatctctgtc gatcccgaaa aagtttttgc cttttgtaaa	240

	aaactttctcg	gtcgccccgc	aaatttttoga	ttccagatttt	tttaaaaaacc	aagccagaaa	300
	taagacacac	cgtttgcaga	taatctgtct	ttcggaaaaa	tcaagtgcga	tacaaaattt	360
	ttagcaccce	tgagc-gcgc	aaagtcccg	ttcgtagaaa	ttttcgtgcc	gcgtgatttt	420
	ccgccaaaaa	ctttaacgaa	cgttcgttat	aatggtgtca	tgacctccac	gacgaagtac	480
	cagaatttgc	ccgaatcacc	agctatggat	ctctctgatg	tcgcgcctga	gtccgacgcg	540
	ctcgatgctg	cgttcgattt	aaaaacgggt	atcggatttt	tcgagctct	cgatacgcg	600
	gaacgcgcag	catcacgaga	ctgggcccagt	gcgcgagcgc	acctagaaac	ctcgttggcg	660
	gatcttgagg	agctggttga	cgagctcggt	gtcgggcagc	gccagggaga	cgcacagttag	720
	tggaggatcg	aatcagttgc	gcctactgcg	gtggcctgat	tcctccccgg	cctgaccgcg	780
	gaggacggcg	cgcataatat	tgctcagatg	cgtgtcgtgc	cgcagccagc	cgcgagcgcg	840
	ccacacaaac	ccacgcgcag	gagctggagg	cggctagggt	gcaaatggcg	ctggaagtgc	900
	gtcccccgag	cgaatttttg	gccatggtcg	tcacagagct	ggaagcggca	gcgagaatta	960
	tcgcgcgctg	tggcgcgggt	cccgccaggc	tgacaaacat	cgtaaatgcc	gcgtttcgtg	1020
	tggccgttgc	cgcaccaggc	gtgtcagcgc	cgcaccacc	tgaccgaat	cggcagcagc	1080
	gtcgcgctc	gaaaaagcgc	acaggcggca	agaagcgata	agctgcacga	atacctgaaa	1140
	aatgttgaa	gccccgtgag	cggtaactca	caggcgcgtc	gctaaccccc	agtccaaacc	1200
	tgggagaaa	cgtccaaaa	tgactctago	ggattcacga	gacattgaca	caccggcctg	1260
	gaaattttcc	gctgatctgt	tcgacaccca	tcgcgagctc	gcgctgcgat	cacgtggctg	1320
	gacgagcgaa	gaccgcgcgc	aattcctcgc	tcacctgggc	agagaaaatt	tcaggggcag	1380
	caagacccgc	gacttcgcca	gcgcttggat	caaagaccgc	gacacgggag	aaacacagcc	1440
	gaagttatac	caggttgggt	caaaaatcgt	tgcccgggtc	cagtatgttg	ctctgacgca	1500
[0304]	cgcgacgcac	gcagccgtgc	ttgtcctgga	cattgatgtg	cgcagccacc	aggccggcgg	1560
	gaaatcgag	cacgtaaaac	cgcaggtcta	cgcgattttg	gagcgcctgg	cacgcctgga	1620
	aaaagcgcga	gcttggatcg	gcgtgaatcc	actgagcggg	aaatgcacgc	tcactctggc	1680
	cattgatccg	gtgtatgcgc	cagcagggat	gagcagccgc	aatatgcgcc	tgctggctgc	1740
	aacgaacgag	gaaatgaccc	gcgttttcgg	cgttgaccag	gctttttcac	ataggttgag	1800
	ccgttggcca	ctgcacgtct	cgcacgatac	caccgcgtac	cgttggcatg	cccagcacaa	1860
	tcgcgtggat	cgcctagctg	atcttatgga	ggttgcctgc	atgactccag	gcacagaaaa	1920
	acctaaaaaa	cgtatcgagc	aggagttttc	tagcggacgc	gcacgtatcg	aagcggcaag	1980
	aaaagccact	gcggaagcaa	aagcacttgc	cacgcttgaa	gcaagcctgc	cgcgcgcgcg	2040
	tgaagcgtct	ggagagctga	tcgacggcgt	cgtgtcctc	tggactgctc	cagggcgtgc	2100
	cgcgcgtgat	gagacggctt	ttcgccacgc	tttgactgtg	ggataccagt	taaaagcggc	2160
	tggtgagcgc	ctaaaagaca	ccaagatcat	cgcgccttac	gagcgtgcct	acaccgtcgc	2220
	tcagggcgtc	ggagcagacg	gccgtgagcc	tgatctgcgc	cgcgtgcgtg	accgcacagc	2280
	gatggcgcga	cgtgtgcgcg	gctacgtcgc	taaaaggccag	ccagtcgtcc	ctgctcgtca	2340
	gacagagacg	cagagcagcc	gagggcgaaa	agctctggcc	actatgggaa	gacgtggcgg	2400
	tazaaaggcc	gcagaacgct	ggaaagaccc	aaacagttag	tacgcccgag	cacagcgaga	2460
	aaaactagct	aagtccagtc	aacgacaagc	taggaaagct	aaaggaaatc	gcttgaccat	2520
	tgcaggttgg	tttatgactg	ttgagggaga	gactggctcg	tggccgacaa	tcaatgaagc	2580
	tatgtctgaa	tttagcgtgt	cacgtcagac	cgtgaataga	gcacttaagt	ctgcgggcct	2640
	tgaacttcca	cagggacgcc	gtaaaagctc	ccagtaaatg	tgccatctcg	taggcagaaa	2700
	acggttcccc	cgcgtagggg	ctctctcttg	gcctcctttc	taggtcgggc	tgattgctct	2760
	tgaagctctc	taggggggct	cacacccatg	gcagataaac	gttccccacc	ggctcaccct	2820
	gtaagcgcac	aaggactgct	cccaaagatc	ttcaaagcca	ctgcgcgcgc	tcgccttcgc	2880

	gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac caggttcgtg cacaccccta tgccaagctt	2940
	ctttcacccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc	3000
	ccctgatcgc ccttgcgacg ttgctcgogg cggtgccgct ggttgcgctt ggcttgaccg	3060
	acttgatcct cggcggttca gctgtgcca cagccgacag gatggtgacc accatttgcc	3120
	ccatataacc gtoggtaactg atcccgctgt caataaacgg aaccgctaca cctgagcat	3180
	cagaactcttt tatcagttgg atcatgtcgg cgtgtctcgg gccaaagcgg tcgagcttct	3240
	tcaccagaat gacatcacct tccctcaact tcatcctcag caaatccagc ccttcccgat	3300
	ctgttgaact gccggatgcc ttgtcggtaa agatgcggtt agcttttacc cctgcatctt	3360
	tgagcgctga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg cctgaatcgc	3420
	cccatcatcc agccagaaag tgagggagcc acggttgatg agagctttgt tgtagggtga	3480
	ccagttgggtg attttgaact tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg	3540
	cgtgatctga tccctcaact cagcaaaagt tcgattttatt caacaaagcc gccgtcccgt	3600
	caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac	3660
	tcacgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt	3720
	tgaaaaagcc gtttctgtta tgaaggagaa aactcaccca ggcagttcca taggatggca	3780
	agatcctgggt atcggctcgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc	3840
	ccctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcaccat gagtgcagac tgaatccggt	3900
	gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc	3960
	tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg ccctgagcg	4020
	agacgaaata cgogacgct gttaaaagga caattacaaa caggaaatga atgcaaccgg	4080
	cgcaggaaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata ttcttctaat	4140
[0305]	acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcato atcaggagta	4200
	cggataaaat gcttgatggt cggaaagagg ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc	4260
	atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc	4320
	gcctcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtgcacctg attgcacgac attatcgcca	4380
	gcccatctat acccatatca atcagcatcc atgttggaat ttaatcgogg cctcgagcaa	4440
	gaogtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgat tactgttat gtaagcagac	4500
	agttttattg ttcgatgaga tatattttta tcttggtcaa tqtacatca gagattttga	4560
	gacacaaagt ggctttgttg aataaatcga acttttctg agttgaagga tcagatcaag	4620
	catcttcccg acaacgcaga ccgttcctg gcaaagcaaa agttcaaaat caccaactgg	4680
	tcacactaca acaaagctct catcaacagt ggtccctca ctttctggct ggatgatggg	4740
	gcgattcagg cctggatga gtcagcaaca ccttcttcac gaggcagacc tcagcgctag	4800
	cggagtgtat actggcttac tatgttggca ctgatgaggg tgtcagtgaa gtgcttcatg	4860
	tggcaggaga aaaaaggctg caccgggtcg tcagcagaat atgtgataca ggatatatto	4920
	cgttcctcgc ctcaatgact cgtacgctc ggtcgttcga ctgcgycgag cggaaatggc	4980
	ttacgaacgg ggccgagatt tccgtgaaga tgcagggaag ataacttaaca gggaagtga	5040
	agggccgggg caaagccgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc	5100
	tgacgctcaa atcagtgtg gcgaacccg acaggactat aaagatacca ggogtttccc	5160
	cctggcgggt cctcgtcgc ctctcctggt cctgccttcc ggtttaccgg tgcattccg	5220
	ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg	5280
	ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtcc gacgcctcgc ccttatccgg	5340
	taactatcgt cttgagteca acccggaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac	5400
	tggtaattga ttttagaggag ttagtcttga agtcatgcgc cgggttaaggc taaactgaaa	5460
	ggacaagttt tgggtgaetgc gctcctccaa gccagttacc tcggttcaaa gagttggtag	5520

	ctcagagaac	cttcgaaaaa	ccgccctgca	aggcggtttt	ttcgttttoa	gagcaagaga	5580
	ttacgcgcag	accaaaacga	tctcaagaag	atcatcttat	taaggggtct	gacgctcagt	5640
	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	5700
	agatcccttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	5760
	ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	5820
	gttcatccat	agttgcctga	ctcccccgtg	tgtagataac	taagatacgg	gagggcttac	5880
	catctggccc	cagtgcctga	atgataccgc	gagacccacg	ctcacccgct	ccagatttat	5940
	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaaggggcg	agcgcagaag	tggctccgca	actttatccg	6000
	ccctccatcca	gtctactaat	tgttgccggg	aaagtagagt	aagtagctcg	ccagttaata	6060
	gtttgcgcaa	cgttgctgcc	attgctgcag	gtcgaccatg	cgccttccc	agtggagggc	6120
	cgaacaatgtc	gcccttcagg	aggccaagat	cgacggtcag	accgttcgca	tcccacgcgc	6180
	tctggttaag	gcagcacagc	tccgtctcgt	ggacgtagag	cagttctaaa	cttaaatte	6240
	atcgccataca	accttttgta	ggtaagaatt	taacaagagc	cagttatctt	ctcttaaaat	6300
	gaggaggtaa	ctggcttctt	tatgcttaag	agggtttagc	ataagtgaag	tatgttccaa	6360
	cgcgtggacg	tcttaattgg	gaggaaagtct	gtcacggact	ggaagacgaa	aagggctatcg	6420
	atgaaaatct	tagttgttga	tgaagagcaa	gctgtacgtg	actccttgcg	acgttccctt	6480
	tcgttcaacg	gatacaacgt	tgttctcgca	gaagacggca	tccaagcaact	agagatgatt	6540
	gacaagggaac	agcctgcttt	ggtgatccct	gatgtcatga	tgcctggtat	ggacggactt	6600
	gaggtctgtc	gccaccttcg	cagcgaaggc	gatgatcggc	caattcttat	tcttactgoc	6660
	cgcgataatg	ttctctgatcg	tgttggtggc	ctcgatgcag	gcgcagatga	ctatttggtc	6720
	aaaccatttg	ctcttgaaag	gctgttggtg	cgcgtccgtt	caactggctcg	tgcctctgca	6780
[0306]	gtggaatcaa	atcagagttc	cagcattgaa	caggctctat	tatcttggtg	cgatttgacg	6840
	cttgaccacg	aaagtcgaga	tgtctaacgc	aacggacggc	ccatcagcct	tactcgaaca	6900
	gagttcgccg	tcctgcaatt	gtcctcctaa	aaccaaagga	aagtgcctcac	tgcgcgccag	6960
	atcttggaag	aggtaagggg	ctgcgatttc	cccacttcag	gcaatgccct	cgaggtctac	7020
	attggatacc	ttcgacgcaa	gactgaattg	gaaggagaa	accgcctgat	ccatacagta	7080
	cgcggagtcg	gatacgtcct	gcgagagacc	gtcccgtagc	attaaggcga	atcggcgcag	7140
	gggaaaatgg	gcctgcccct	accgaaagtg	atgactccga	cggttcaatg	tgcctgcgtt	7200
	ggcgtctggc	tttgctgagc	gccactttgg	tagctttcgc	cgttggtgtt	attaactgtt	7260
	ctgcataattg	gtctgtctcc	agctatgtca	ccaactcaat	cgatcgtgat	ctggaaaaac	7320
	aagcgggatgc	aatgccttga	cgagccagtg	aagcgggatt	ctatgcaacc	gcagaaaccg	7380
	aaattgctct	gttaggtgaa	tatgccagtg	acactcgaat	cgccttaatc	ccacctgggt	7440
	gggaatacgt	catcggtgaa	tccatatacc	tgcctgattc	agatttccct	aagagtaaa	7500
	aagcggggaa	acagatccct	gtaacaagtg	ctgagcgcat	tctcatgaaa	cgagataget	7560
	cgggcacagc	ggtggatttt	gctaaagata	tgttgataac	cgatcggcag	ctcauggtgc	7620
	ttggcgtcat	tctctgatac	attggcggca	gtggtgtttt	ggcgtcgatt	ctgcttggtt	7680
	tcatcattgc	gaaggagggg	ctgaaaccac	tgtcaaaagt	gcagcgtgoc	gtcgaagaga	7740
	tcaaacgaac	tgatgagctt	cgtgcgattc	cgttggtggg	aaatgaagag	ttcgctaagt	7800
	tgaotcgtag	tttcaatgac	atgctcaagg	cactgcggga	gtctcgtacc	cggcaatctc	7860
	agttggtggc	agatgcagga	cacgagctga	aaaotccact	gacctcaatg	cggacaaata	7920
	ttgaattgct	gttgaagggc	accaacagtg	gaggatcggg	aatccccaag	gaagaattgg	7980
	atggccttca	gcgtgatgta	ttggcgcaga	tgaccgaaat	gtctgatttg	attgggtgatc	8040
	ttgttgatct	tgcgcgtgaa	gaaaccgcgc	aaacgtcaag	cattgtagat	ctcaaccaag	8100
	tgttggaat	tgcgcctgac	cgaatggaaa	gccgtcgcat	gacggtgcgg	atagatgttt	8160

cccgagactgt ggattggaaa ctgctgggog atgatttttc cttaccagc gcattagtaa 8220
 atgttttfga taatgccatt aaatggtcgc ctgagaatgg catgtttcga gtgtcgatgt 8280
 cacagatcga caaagcaacg gtcgcgattg ttattgatga ttcagggcct ggaattgctg 8340
 aaaaagaacg aggattagtt ttggaacggc tctatogcgc cgtcagctcc cgttccatgc 8400
 cgggatcggg attaggtctt gccatcgtga atcaggttgt gaatcggcat ggtggccaac 8460
 tcttctgtgg tgaatcagat gatggcgga cagaaatcac tattyatttg ccaggggaac 8520
 ccattcccg cgggttcgaa aatgtcgatg attaacaccac taaagagctc acaggaagtg 8580
 ttcagactac ttagagtgc gccccagcca cagggttcat aatcaaatca tgacaaatca 8640
 attccccaca aacaacggtg agaaccggga cgtgcgcatg gaaactocat cagaaaccaa 8700
 ctccggtacc tgaactttta gaaggagata tcatatggtg agcaagggcg aggagctggt 8760
 caccgggggt gtgccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag 8820
 cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg 8880
 caccaccggc aagctgcgcg tgccttggcc caccctcgtg accaccttcg gctacggcct 8940
 gcagtgcctt gcccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gactttctca agtcgcgcat 9000
 gcccgaaagg tacgtccagg agcgcacccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac 9060
 ccgcgcgcg gtgaagttcg agggcgacac cctgtgtgaa cgcctcgagc tgaagggtat 9120
 caacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca 9180
 caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg 9240
 ccacaacatc gagggcggca gcgtgcagct cgcgcgaccac taccagcaga acaccccat 9300
 cggcgacggc ccggtgctgc tgcgcgacaa cactacctg agctaccagt ccgcctgag 9360
 caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagtctgtga ccgcgcgcg 9420
 gatcactctc ggcgtggag agctgtacaa gtaataagga tcc 9463

[0307]

SEQ ID No. 40

ccgcgatcca aggagaaatga cgatgagaaa acgtaaaaat ggattaatc 49

SEQ ID No. 41

gaggagctct aattatttac ccatatagat acagaccac 40

SEQ ID No. 42

gaagaaacgc ccgaaacgtc aagc 24

SEQ ID No. 43

cgatgcacgg tccgggttct c 21

SEQ ID No. 44

gtttaaaaga gttaatctgc atctaataaa gtaged 36

SEQ ID No. 45

gccatcacga attgccgaac gag 23

SEQ ID No. 46

gagaacccgg accgtgcacg gtagaagaag gagatatcat atgg 44

SEQ ID No. 47

gcagattaac tcttttaaac ttactaottg cacagctcgt ccatgcog 48

SEQ ID No. 48

[0308]

attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgtttgtg ggaattgtga 60
 ggggataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatga ttacgccaaag cttgcattgcc 120
 tgcaggctga ctctagagga tcccgggta ccgagctcga attcaactggc cgtcgtttta 180
 caacgtcgtg actgggaaaa cccggcggtt acccaactta atcgccctgc agcacatccc 240
 cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcacog atcgcccttc ccaacagttg 300
 cgcagcctga atggcgaaatg gcgcgataag ctacgtttcac gctgcgcgaa gcactcaggg 360
 cgcaagggct gctaaaggaa gcggaacacg tagaaagcca gtccgcagaa acggtgctga 420
 ccccgatga atgtcagcta ctgggctatc tggacaaggg aaaacgcaag cgcaagaga 480
 aagcaggtag cttgcagtgg gcttacctgg cgtatagctag actggcggtt tttatggaca 540
 gcaagcgaac cggaattgcc agctggggcg cctcttggtt aggttgggaa gccctgcaaa 600
 gtaaacctga tggctttctt gccgccaaag atctgatggc gcaggggacg aagatctgat 660
 caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct 720
 ccggccgctt ggggtggagag gctattcgcc tatgaactgg cacaacagac aatcggtcgc 780
 tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcg cggttctttt tgtcaagacc 840
 gacctgtccg gtgcctgaa tgaactocaa gacgaggcag cgcggctatc gtggtcggcc 900
 acgacggggc ttccttgccg acctgtgctc gacqttgtca ctgaagcggg aagggaactgg 960
 ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtctat ctacacctgc tctgcgcag 1020
 aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cgcctgcata cgttgatcc ggctacctgc 1080
 ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccgg 1140
 cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgcacgc cgaactgttc 1200
 gccaggtcca aggcggggat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc 1260
 tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgtttttctg gattcatcga ctgtggccgg 1320
 ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat tgcagaagag 1380
 cttggcggcg aatgggtgta ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg 1440
 cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac gagtctctct gagcgggact ctggggttcg 1500
 ctagaggatc gatccttttt aaccatcac atatacctgc cgttcaetat tatttagtga 1560
 aatgagatat tatgatattt tctgaattgt gattaaaaag gcaactttat gcccatgcaa 1620
 cagaactat aaaaaatata gagaatgaaa agaaacagat agatttttta gttcttttag 1680
 cccgtagtct gcaaactcct ttaagatttt ctatcaaaac aaagaggaaa atagaccagt 1740
 tgcaatccaa acgagagtct aatagaatga ggtcgaaaag taaatcgccg gggtttggt 1800
 ctgataaagc aggcgaagac taaaatgtgt aaagggcaaa gtgtatactt tggcgctacc 1860
 ccttacctat tttaggtctt ttttatttgt gcgtaactaa cttgccatct tcaaacagga 1920

	gggctggaag aagcagaccg ctaacacagt acataaaaaa ggagacatga acgatgaaca	1980
	tcaaaaagtt tgcaaaaceaa gcaacagtat taacctttac taccgcactg ctggcaggag	2040
	gcgcaactca agcgtttgcg aaagaaacga accaaaagcc atataaggaa acatacggca	2100
	tttcccatat tacacgccat gatatgctgc aaatccctga acagcaaaaa aatgaaaaat	2160
	atcaagtttc tgaatttgat tcgtccacaa ttaaaaatat ctcttcgca aaaggcctgg	2220
	acgtttggga cagctggcca ttacaaaacg ctgacggcac tgtcgcaaac tatcacggct	2280
	accacatcgt ctttgcatta gccggagatc ctaaaaatgc ggatgacaca tcgatttaca	2340
	tgttttatca aaaagtcggc gaaacttota ttgacagctg gaaaaacgct ggccgcgtct	2400
	ttaaagacag cgacaaattc gatgcaaatg attctatcct aaaagacca acacaagaat	2460
	ggtcaggttc agccacattt acatctgacg gaaaaatccg tttattctac actgatttct	2520
	ccggtaaaca ttacggcaaa caaacactga caactgcaca agttaacgta tcagcatcag	2580
	acagctcttt gaacatcaac ggtgtagagg attataaatc aatctttgac ggtgacggaa	2640
	aaacgtatca aaatgtacag cagttcatcg atgaaggcaa ctacagctca ggcgacaacc	2700
	atacgtgag agatctcac tacgtagaag ataaaggcca caaatactta gtatttgaag	2760
	caacacactg aactgaagat ggtaccgaag gcgaagaatc tttatttaac aaagcatact	2820
	atggcaaaag cacatcattc ttccgtcaag aaagtcaaaa acttctgcaa agcgataaaa	2880
	aacgcacggc tgagttagca aacggcgtc tcggtatgat tgagctaaac gatgattaca	2940
	cactgaaaaa agtgatgaaa ccgctgattg catctaacac agtaacagat gaaattgaac	3000
	gcgcgaacgt ctttaaaatg aacggcaaat ggtacctgtt cactgactcc ccgggatcaa	3060
	aatgacgat tgacggcatt acgtctaacg atatttacct gcttggttat gtttctaatt	3120
	ctttaactgg ccatacaag ccgctgaaca aaactggcct tgtgttaaaa atggatcttg	3180
[0309]	atcctaacga tgtaaccttt acttactcac acttcgctgt acctcaagcg aaaggaaaca	3240
	atgtcgtgat tacaagctat atgacaaaca gaggattcta ccgagacaaa caatcaacgt	3300
	ttgcgccgag cttccctgctg aacatcaaag gaagaaaaac atctgttctc aaagacagca	3360
	tccttgaaca aggacaatta acagttaaca aataaaaacg caaaagaaaa tgccgatggg	3420
	taccgagcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgac atcacgagat ttcgattcca	3480
	ccgcgcctct ctatgaaaag ttgggtctcg gaatcgtttt ccgggaacgc ctgcggacg	3540
	tgctcatagt ccacgacgac cgtgattttg tagccctggc ccacggccag caggtaggcc	3600
	gacaggctca tgcgggcgc ccgcgccttt cctcaatcg ctcttcgttc gtctggaagg	3660
	cagtacacct tgataggtgg gctgcccttc ctggttggct tggtttcatc agccatccgc	3720
	ttgcctcat ctgttacgac ggcggtagcc gccacgctc gcagagcagg attcccgctg	3780
	agcaccgcca ggtgcgaata agggacagtg aagaaggaa acccgctcgc ggggtggcct	3840
	acttcaceta tcctgcctcg ctgacgcgt tggatacacc aaggaaagtc tacacgaacc	3900
	ctttggcaaa atcctgtata tcgtgcgaaa aaggatggat ataccgaaaa aatcgctata	3960
	atgacccgca agcagyggtta tgacgggaa aagcgtgct tccctgctgt tttgtggaat	4020
	atctaccgac tggaaacagg caaatgcagg aaattactga actgagggga caggcgagag	4080
	acgatgccaa agagctcctg aaaatctcga taactcaaaa aatacgcctg gtagtgatct	4140
	tatttcatta tggtgaaaagt tggaaacctc tacgtgcga tcaacgtctc attttcgcca	4200
	aaagttaggc cagggcttcc cggtatcaac agggacacca ggatttatit attctgcgaa	4260
	gtgatcttcc gtcacaggta tttattcggc gaaaagtgc tcgggtgatg ctgccaactt	4320
	actgatttag tgtatgatgg tgtttttgag gtgctccagt ggcttcctgt tctatcagct	4380
	cctgaaaaac tcgataaetc aaaaaatacg ccgggtagt atcttatitc attatggtga	4440
	aagttggaac ctcttaacgt ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt ggcccagggc	4500
	ttccgggtat caacagggac accaggattt atttattctg cgaagtgatc ttccgtcaca	4560

```

ggtattttatt cggcgcaaaag tgcgtcgggt gatgctgcca acttactgat ttagtgtatg 4620
atggtgtttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc agggctggat gatcctccag 4680
cgcggggata tcatgctgga gttcttgcgc cccccaaaaa ggatctaggt gaagatcctt 4740
tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgccagac 4800
cccgtagaaa agatcaaaag atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatc-gctgc 4860
ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca 4920
actctttttc ogaaggtaac tggcttcagc agagcgccaga taccaaatac tgtccttcta 4980
gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag ccccgctac atacctcgct 5040
ctgctaatec tgttaaccagt ggctgctgcc agtgggcgata agtcgtgtct tacggggtt 5100
gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg gggctcgtgc 5160
acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gctgagcat 5220
tgagaaagcg ccacgcttc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 5280
gtcggaaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 5340
cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg 5400
cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttccctggc cttttgctgg 5460
ccttttgcct acatgtttct tctgcgtta tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc 5520
gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgccg ccagtcagtg 5580
agcgagggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tcccgcgcg ttggccgatt 5640
cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca 5700
attaatgtga gttagctcac tc 5722

```

[0310]

SEQ ID No. 49

```

agggttttcc cagtcacgac gtt 23

```

SEQ ID No. 50

```

gagcggataa caatttcaca cagg 24

```

SEQ ID No. 51

```

cgataagcta gcttcacgt gccgcaagca ctacgggggc aagggtgct aaaggaagcg 60
gaacacgtag aaagccagtc ccgagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg 120
ggctatctgg acaagggaac acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcag-gggct 180
tacctggcga tagctagact gggcggtttt atgyacagca agcgaaacgg aattgccagc 240
tggggcgcgc tctggttaag ttgggaagcc ctgcaaaagta aactggatgg ctttcttgcc 300
gccaaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt 360
togcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctcgc gcgccttggg tggagaggct 420
attcggctat gactgggcac aacagacaat cggtgctct gatgccgcg tgttcggct 480
gtcagcgccg gggcgcccg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg cctgaatga 540
actccaagac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc 600
tgtgctcgac gttgtcaetg aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgcggg 660
gcaggatctc ctgtcatctc accttgetcc tgcgagaaa gtatccatca tggc-gatgc 720
aatcgggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc aagcgaaaca 780

```

[0311]

```

tcgcacatcgag cgagcacgta ctccgatgga agccgggtctt gtcgatcagg atgatctgga 840
cgaagagcat caggggctcg cgcagccga actgttcgcc aggcacaagg ccgggatgcc 900
cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgtatccctgc ttgccgaata tcattggtgga 960
aaatggccgc ttttctggat tcacgcactg tggccggctg ggtgtggcgg accgtatca 1020
ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggccggcaat gggtgaccg 1080
cttcctcgtg ctttacggta tcgcgcctcc cgattcgcag cgcacgcct tctatcgct 1140
tcttgacgag ttcttctgag cgggaactctg ggttctcgta gaggatcgat cttttttaac 1200
ccatcacata tacctgcctt tcaactattat ttagtgaat gagataattat gatatcttct 1260
gaattgtgat taaaaaggca actttatgcc catgcaacag aaactataaa aaatacagag 1320
aatgaaaaga aacagataga ttttttagtt ctttaggcc gtatctcgca aatcctttta 1380
tgattttcta tcaaacaaaa gaggaaaata gaccagttgc aatccaaacg agagtctaatt 1440
agaatgaggt cgaagaagtaa atccgcgggg tttgttactg ataaagcagg caagacctaa 1500
aatgtgtaaa gggcaaatgt tatacttttg cgtcacccct tacataattt aggtcttttt 1560
ttattgtcgc taactaactt gccatcttca aacaggaggg ctggaagaag cagaccgcta 1620
acacagtaca taaaaaagga gacatgaacg atgaacatca aaaagtctgc aaacaagca 1680
acagtattaa ctttactac cgcactgtcg gcaggaggcg caactcaagc gtttgcgaaa 1740
gaaacgaacc aaaagccata taaggaaaca taaggcattt cccatattac acgccatgat 1800
atgctgcaaa tccctgaaca gcaaaaaaat gaaaaatata aagttctga atttgattcg 1860
tccacaatta aaaatatctc ttctgcaaaa ggccctggacg tttgggacag ctggccatta 1920
cacaacgctg acggcactgt cgcacaactat caggctacc acatcgtctt tgcattagcc 1980
ggagatccta aaaatgcgga tgacacatcg atttacatgt tctatcaaaa agtcggcgaa 2040
acttctattg acagctggaa aaacgctggc cgcgtcttta aagacagcga caaattcgat 2100
gcaaatgatt ctatcctaaa agaccacaaa caagaatggt cagggttcagc cacatttaca 2160
tctgacggaa aaatccgttt attctacact gatttctcgg gtaaacattt cggcaacaaa 2220
acactgacaa ctgcacaagt taacgtatca gcacagaca gctctttgaa catcaacggt 2280
gtagaggatt ataaatcaat ctttgacggg gacggaaaaa cgtatcaaaa tgtacagcag 2340
ttcatcgatg aaggcaacta cagctcaggc gacaaccata cgttgagaga tctcactac 2400
gtagaagata aaggccacca atacttagta tttgaagcaa acactggaac tgaagatggc 2460
taaccaaggc aagaatcttt atttaacaaa gcatactatg gcaaaagcac atcattcttc 2520
cgtaagaaa gtcaaaaact tctgcaaagc gataaaaaac gcacggtga gttagcaaac 2580
ggcgtctcgc gtatgattga gctaaaagat gattacacac tgaaaaaagt gatgaaaccg 2640
ctgattgcat ctaaacacagt aacagatgaa attgaacgcg cgaacgtctt taaaatgaac 2700
ggcaaatggt aactgttcac tgactcccg ggatcaaaaa tgacgattga cggcattacg 2760
tctaacgata tttacatgct tggttatggt tctaattctt taactggccc atacaagccg 2820
ctgaacaaaa ctggccttgt gttaaaaatg gatcttgatc ctaacgatgt aacctttact 2880
tactcacact tcgctgtacc tcaagcgaaa ggaacaaatg tcgtgattac aagctatatg 2940
acaaacagag gattctacgc agacaaacaa tcaacgtttg ccgcgagctt cctgctgaac 3000
atcaaaaggc agaaaacatc tgttgcaaaa gacagcatcc ttgaacaagg acaattaaca 3060
gttaacaaat aaaaacgcaa aagaaaatgc cgatgggtac cgagcgaaat gaccgaccaa 3120
gcagcgccca acctgccatc acgagatttc gattccacgc ccgccttcta tgaaagggtt 3180
ggcttcggaa tcgtttctcg ggacgccttc gcggacgtgc tcatagacca cgacgccgt 3240
gattttgtag ccttgccga cggccagcag gtaggccgac aggcctcatg cggccgcgcg 3300
cgctttttcc tcaatcgctc ttctgtcgtc tggaaaggcag taacacctga taggtgggct 3360
gcccctctcg gttggcttg tttcactcgc catccgcttg cctcactctg ttacgcgcgc 3420

```

[0312]

ggtagccggc cagccctcgca gagcaggatt cccgttgagc accgccaggt gogaataagg 3480
gacagtgaag aaggaacac cgtcgcggg tgggectact tcacctatcc tgcccgcgtg 3540
acgcggttg atacaccaag gaaagtctac acgaaccctt tggcaaatc ctgtatatcg 3600
tgcaaaaaag gatggatata ccgaaaaaat cgtataatg accccaagc agggttatgc 3660
agcggaaaa cgtcgtctcc ctgctgtttt gtggaatata taccgactgg aaacaggcaa 3720
atgcaggaaa ttactgaact gaggggacag gcgagagacg atgccaaga gctcctgaaa 3780
atctcgataa ctcaaaaaat acgcccggtg gtgatcttat ttcattatgg tgaaagtgg 3840
aacctcttac gtgcgatac acgtctcatt ttgcacaaa gttggcccag ggcttcccgg 3900
tatcaacagg gacaccagga tttattttatt ctgcgaagtg atcttcogtc acagggtattt 3960
attcggcgca aagtgcgtcg ggtgatgctg ccaacttaet gatttagtgt atgatgggtg 4020
ttttgaggtg ctccagtggc ttctgtttct atcagctcct gaaaatctcg ataactcaaa 4080
aaatacggcc ggtagtgatc ttatttcatt atgggtgaaag ttggaacctc ttaagtgcg 4140
atcaacgtct catcttcgcc aaaagttggc ccagggttc ccggtatcaa cagggacacc 4200
aggatttatt tattctcgca agtgatcttc cgtcacaggt atttattcgg cgcgaagtgc 4260
gtcgggtgat gctgcacact tactgattta gtgtatgatg gtgttttga ggtgctccag 4320
tggtctctgt ttctacagg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgcctggagt 4380
cttcgcccac cccaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaaat 4440
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 4500
ttcttgagat ccttttttcc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 4560
accagcggtg gtttggttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttcoga aggtaactgg 4620
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca 4680
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc 4740
tgctgccagt ggcgataaag cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 4800
taaggcgag cggctcggct gaacggggg tctgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 4860
gaactacacc gaactgagat acctacagc tgagcattga gaaagcgcca cgttcccg 4920
agggagaaa gcygacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgacag 4980
ggagcttcca gggggaagc cctggtatct ctatagtcct gtcgggttc gccacctctg 5040
acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg aqccatagg aaaaacgca 5100
caacggggcc tttttacggt tcttgccctt ttgctggcct tttgctcaca tgttcttcc 5160
tgcttatcc cctgattctg tggataaacc tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 5220
tcgcgcgagc cgaacgacgc agcgacgcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgccc 5280
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gcgattcat taatgcagct ggcaagacag 5340
gtttcccgac tggaaagcgg gcagttagcg caacgcatt aatgtgagtt agctcaetca 5400
ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggtcgt atgttggtg gaattgtgag 5460
cgataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat taugccaaagc ttgatgctt 5520
gcaggctgac tetagaggat cccgaagaa accgcgaaa cgtcaagcat tgtagatctc 5580
aaccaagtgt tggaaattgc gcttgaccga atggaaagcc gtcgcattgac ggtgcggata 5640
gatgtttccg agaactgtga ttgaaaactg ctgggcgatg atttttccct aaccagggca 5700
ttagttaatg ttttgataa tgccattaaa tggtcgcctg agaatggcat tgttcgagt 5760
tcgatgtcac agatogacaa agcaacggtc cgcattgtta ttgatgattc agggcctgga 5820
attgctgaaa aagaacgagg attagttttg gaacggttct atcgcgcctg cagctcccgt 5880
tccatgccgg gatcgggatt aggtcttgcc atcgtgaatc aggttggtgaa tcggcatgg 5940
ggccaactcg ttgtgggtga atcagatgat ggcggaacga gaatcaetat tgatttgcca 6000
ggggaaccca ttgcgagcg gttcgaaaat gtcgatgatt aaaccactaa agagctcaca 6060

	ggaagtgttc agactactta gagtgaagcc ccagccacag ggttcataat caaatcatga	6120
	caaatcaatt cccacaaaac aacggtgaga acccggaccc tgcacgtag aagaaggaga	6180
	tatcatatgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtegag	6240
	ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc	6300
	acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg	6360
	cccaccctcg tgaccacctt cggctacggc ctgcagtgtc tggcccgcta ccccgaccac	6420
	atgaagcagc acgacttctt caagtcggcc atgccgaag gctacgtcca ggagcgcacc	6480
	atcttcttca aggaagcagg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgaggcgac	6540
	accctgggtga accgcacgca gctgaagggc atcaacttca aggaggacgg caacatcctg	6600
	gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag	6660
	aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cggcacaaca tggggggcg cagcgtgcag	6720
	ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcgcgacg gccccgtgct gctgcccagc	6780
	aaccactacc tgagctacca gtccgccttg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgacacc	6840
	atggtcctgc tggagtctgt gacggccggc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac	6900
	aagtaataag tttaaaagag ttaattctga tctaataaag tagccaagta tgagttagga	6960
	acaatgagca aggatccatt gggaagtctt accgatgttg tagacacacg agttccgctt	7020
	cgggatgttg aaccggatcc ggagtctctg aaggctacgg aaaaagaatt ccacatggca	7080
	tcccagaagc gcgtcttctg tgtctgtgtg ggcgacatg tcgctgaggc agatgggact	7140
	ggcgttctgg ttaacggagc gctcttagag tctggcttca acgtggacgc tgtgtgcagc	7200
	gtgaagctca agaagtctca gattaggcaa gctattgaaa ccgcagttgt tggcggcgct	7260
	gaccttgtgc tgaccatcgg cggagtgggc gttggtcctc gggataaaac tcttgaggca	7320
[0313]	accagcgctg tgttggaaca ggacgtccca ggaatcgccg aggcgcttcg ttcctccggt	7380
	ttggccctgt gcgcggtgga tgcaagtgtt tcccgaggcg tagcggcgct atccggetca	7440
	accgtgggtg tcaacctcgc tgagtctcgt tcggcaattc gtgatggcgg gtaccgagct	7500
	cgaattcact ggcgtctgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttacccaac	7560
	ttaatgcctc tgcagcacat cccctttctg ccagctggcg taatagcgaa gaggcgcgca	7620
	ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcg	7666

SEQ ID No. 52

MGLGKKLSVA VAASFMSLSI SLPGVQA 27

SEQ ID No. 53

MKKRFSLIMM TGLLFGLTSP AFA 23

SEQ ID No. 54

ctcgtataat gtgtggaatt g 21

SEQ ID No. 55

cagaccgctt ctgcgttc 18

SEQUENCE LISTING

<110> 于利希研究中心有限公司

<120> 用于微生物蛋白质分泌检测和定量的传感器

<130> F13156PC

<150> EP 15160897.3

<151> 2015-03-25

<160> 55

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 201

<212> DNA

<213> Corynebacterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the cg0706-promoter

<400> 1

gcgggtctgc cacatttgct gaaaagtacc agttgcaagg tgtggtgttg gagcttcata 60
accaggttgg gcaaaaggga tgaatccctg gttgtggtgg ggctcctgaa aagtactcat 120
agactctatt gtggagtgtt gaggctgata agtgaatggg ggaaagccct gaaaaggtgg 180
cgttcagggt cttccctgat g 201

<210> 2

<211> 194

<212> DNA

<213> Corynebacterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of thecg0996-promoter

<400> 2

accttaaatt catcgcctac aaccttttgt aggtaagaat ttaacaagag ccagttatct 60
tctcttaaaa tgaggaggta actggcttct ttatgettaa gaggtgttag cataagtga 120
atatgttcca acgcgtggac gtcttaattg ggaggaagtc tgtcacggac tggaagacga 180
aaagggtatc gatg 194

<210> 3

<211> 118

<212> DNA

<213> Corynebacterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the g0998-promoter

<400> 3

gggaacccat tcgcagcggg ttcgaaaatg tcgatgatta aaccactaaa gagctcacag 60
gaagtgttca gactacttag agtgacgccc cagccacagg gttcataatc aaatcatg 118

<210> 4

<211> 216

<212> DNA

<213> Corynebacterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the cgl325-promoter

<400> 4

accagcgacg ccgccgatcc atttgtcggt ggtgcttcgg gcgagtcgtc gagattgtgc 60
tgggaaagtc atcgggatca agtccttta tggetgattg agtttttctt tcttcttcaa 120
tcatcgccaa taagaaccta gagcacatcg gggatttccc ctctcctaac ccctaaaaac 180
ccctgagaaa acgctccaag taaaccetta cagctc 216

<210> 5

<211> 693

<212> DNA

<213> Corynebacterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the cg0706-cgl325-regulator

<400> 5

atggttgatg tgtttttggg cgatgaccac tccgtgtttc gctccggcgt caaagcagaa 60
ctaggcaacg ccgtcacagt agtcggcgaa gcagggacgg tggccgacgc cgtagccggc 120
atcaaggcaa gcaaaccaga ggtagtgctt ctgcacgtcc acatgcccga cggcggcggc 180
ctcgcagtgc tccagcagat caacgactcc gatgtggaca ccattttctt ggcaactcagt 240
gtctctgatg ctgcggaaga tgtcatcgcc atcatccgtg gcggtgccag gggatacgtg 300
accaaataca tctccggtga agaactcatc gaagccatca accgcgtgaa atccggcgac 360
gcattcttct caccacgcct ggcaggttc gtctcgcacg ccttcgccgc ccccgattcc 420
gcagctggcg caggcattgt cgacgcaccc gaaaaagacg ccgccgtaga atccggaaaa 480
atcctcgacg acccagttgt cgacgcctc acccgccgcg aactcgaagt cctccgccta 540
ctagcccgcg gctacaccta caaagaaatc ggcaaagaac tgttcatttc cgtcaaaaacc 600
gtggaaaccc acgcctcaaa cattctgcgg aaaacccaac aatccaaccg ccacgcgttg 660
acccggtggg ctactcgag ggatcttgac taa 693

<210> 6

<211> 768

<212> DNA

<213> Corynebacterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the cg0996-cg0998-regulator

<400> 6

```
atgttccaac gcgtggacgt cttaatggg aggaagtctg tcacggactg gaagacgaaa 60
agggtatcga tgaaaatttt agttgttgat gacgagcaag ctgtacgtga ctccttgcca 120
cgttcccttt cgttcaacgg atacaacgtt gttctcgcag aagacggcat ccaagcacta 180
gagatgattg acaaggaaca gcctgctttg gtgatcctcg atgtcatgat gcctgggatg 240
gacggacttg aggtctgtcg ccaccttcgc agcgaaggcg atgatcggcc aattcttatt 300
cttactgccc gcgataatgt ttctgatcgt gttggtggcc tcgatgcagg cgcagatgac 360
tatttggtta aaccatttgc tcttgaagag ctggtggcgc gcgtccgttc actggtgcgt 420
cgctctgcag tggaatcaaa tcagagtcc agcattgaac aggtcttatt atcttgtggc 480
gatttgacgc ttgaccaga aagtcgagat gtctaccgca acggacgcgc catcagcctt 540
actgaacag agttcgcgct cctgcaattg ctctcaaaa accaaaggaa agtgetcact 600
cgcgccaga ttttgaaga ggtatggggc tgcgatttcc ccacttcagg caatgccttc 660
gaggtctaca ttggatacct tcgacgcaag actgaattgg aaggagaaga ccgcctgac 720
catacagtac gaggagtcgg atacgtcctg cgagagaccg ctccgtga 768
```

<210> 7

<211> 1350

<212> DNA

<213> Bacillus

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the htrA-promoter

<400> 7

```
atggataact atcgtgatga aaacagaacg aaaggtaatg agaatgaggt ctttttaacg 60
aaagagaacg atcagagcgc ctctactcgc gcccgcaatg tcattcatga tcaggagaag 120
aaaaaacgag gattcggatg gttcagaccg ttgcttggcg gagtgatcgg cggcagtctt 180
gctcttggca ttacacggtt tacaccgctt ggtgaccatg attctcagga cactgcaaaa 240
caatcatcca gccagcagca aacgcaatct gttacagcaa caagcacctc ctctgaatct 300
aaaaaaagct caagcagctc atctgcattc aagagcgagg actcttctaa aatctcagat 360
atggtagaag acctttcacc agcgattgtc ggtattacaa atcttcaggc acaatcaaac 420
agctctttgt tcggtcttag ttcttctgat tcagcgaag atacagaaag cggttcaggg 480
tcaggtgtca ttttcaaaaa agagaatggc aaggettata tcattacaaa taaccacgtc 540
gtagaagggg catcatcact gaaggtatct ttatatgacg gcactgaggt tactgcaaa 600
ctggtaggca gtgactcgtt aactgattta gccgtcctcc aatcagtgat tgaccacgtc 660
acaaaagtgg caaacttcgg tgattcatct gatcttagaa caggcgagac cgttattgcg 720
attgggggatc cgcttggaag agacctgtcc cgcacagtaa cacaaggaat tgtaagcggc 780
```

gtggacagaa cggtttcaat gtctacatca gccggcgaaa cgagcattaa cgtcattcag 840
 acagacgcag caattaatcc aggtaacagc ggcggtcctt tgtaaatac agacggcaaa 900
 attgtcggca ttaacagtat gaaaatcagt gaggatgatg ttgagggtat cggattcgcc 960
 attccaagca atgacgtaaa accgattgct gaagaattgc tgtctaaagg acaaattgaa 1020
 cgtccatata tcggtgtcag catgcttgat ctagagcaag tgccgcaaaa ttaccaagaa 1080
 ggcacactcg gcctgttcgg cagccagctg aataaaggcg ttacatccg tgaggtcgct 1140
 tcaggctctc ctgctgaaaa ggccggatta aaagcggagg atattatcat cggcctaaaa 1200
 ggtaaagaaa ttgatacagg cagtgaattg cgcaatatct tatataaaga cgcaaagatc 1260
 ggtgataccg ttgaagtga aattctccga aacggcaaag aatgacgaa aaaaattaaa 1320
 ctggatcaaa aagaagagaa aacttcgtaa 1350

<210> 8

<211> 678

<212> DNA

<213> Bacillus

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the Csx-regulator

<400> 8

ttgtcataca ccatttatct agttgaagat gaggataacc tgaatgaact gctgacgaag 60
 tatntagaga atgagggtcg gaacattaca tcttttacga aaggtgaaga cgccagaaag 120
 aaaatgacac cgtctcccca cctatggatt ctgatataca tgctgccgga taccgacggc 180
 tatacattaa taaaagaaat caaggcgaaa gatcctgacg tgccgggtcat ttttatttcc 240
 gcccgagatg cggatattga cagagtgcct ggcttagagc ttggcagcaa tgactacatt 300
 tcaaagccgt ttttgccgcg ggagctgatt atccgtgtgc aaaagctgct gcagctcgta 360
 tataaggaag ctctcctgt ccaaaaaaat gaaattgccg tctctctgta tcgggtcgct 420
 gaagacgccc gcgaggtcta tgacgaaaac gggaatatca tcaatttgac gtcaaaggaa 480
 tttgatctgc tgctattatt tatccatcat aaagggcatc catactctcg tgaggatatt 540
 ctctataaag tgtggggaca tgactacttc ggaacagacc gggtcgttga tgatctcgct 600
 cggagactgc gcagaaagat gcctgaattg aaggtggaga cgatttacgg tttcggctac 660
 aggatgatgt catcatga 678

<210> 9

<211> 113

<212> DNA

<213> Bacillus

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the liaL-promoter

<400> 9

tccggtgcga gatacgactc cggctttata taaaaatcaa tctctgattc gttttgcata 60

tcttccaact tgtataagat gaagacaagg aaaacgaaag gaggatctgc atg 113

<210> 10

<211> 636

<212> DNA

<213> Bacillus

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence coding for the LiaR-regulator

<400> 10

gtgattcgag tattattgat tgatgatcat gaaatggtea gaatggggct cgcggccttt 60
 ttggaggcgc agcccgatat tgaagtcate ggcaagcat cggacggcag cgaagggtgtt 120
 cggcttgctg tggaactgtc gctgatgtc attttaatgg accttgteat ggagggcatg 180
 gatggcattg aagctacaaa gcaaatttgc cgggagcttt ccgacccgaa aattattgtg 240
 ctactagct tcattgatga tgacaaaagtg taccgggta ttgaagctgg cgcgctcagc 300
 tatctgttga aaacctcaaa agcggcagaa atcgccgatg ccatccgcgc cgcaagcaag 360
 ggagagccga agctggagtc aaaagtggcg ggaaaagtat tatccaggct gcgccactca 420
 ggtgaaaacg cgctcccga tgaatcgctt acaaaacggg agctcgaaat actctgcctg 480
 atcgcagaag gaaagacaaa caaagaaata ggcgaggaac tgttttattac gattaaaaca 540
 gtcaaaacac atattacgaa tattttatca aagctggatg tcagtgaccg gacgcaggcg 600
 gcggtgtacg cacaccgaaa tcatctcgtg aattag 636

<210> 11

<211> 726

<212> DNA

<213> Bacillus

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence coding for the LiaF-protein

<400> 11

atgacaaaaa aacagcttct cggattgate attgetttat tcggcatcag tatgtttttg 60
 caaattatcg gaataggcga tctgctgttt tggecgetct tttttctgat tgccggctat 120
 ttccttaaaa aatattcccg tgattggctt ggctccgtca tgtatatctt tgccgcgttt 180
 ctatttttga aaaacctctt cagcatcacc ttttaattat tcggctatgc gtttgccgca 240
 tttctgatgtt acgccggcta caggettate aaaggggaagc cgatatttga accgaatgag 300
 aaacaggtca atctcaataa aaaagaacat catgagccgc caaaagatgt aaaacatccc 360
 gacatgcgca gcttttttat cggtgagctg caaatgatga agcagccgtt tgacctgaac 420
 gatttaaatg tctctggttt tatcggatgat atcaaaatcg atttatctaa agcgatgatt 480
 cccgagggag aaagtacaat cgtcattagc ggagtcattg gtaacgttga tatttatgta 540
 ccatcggaac ttgaagtggc tgtcagctcg gctgttttta taggagacat taatctgac 600
 ggctcgaaga aaagcggatt aagcacgaag gtatatgccg cgtcaactga ttttagcgag 660

tcaaagcgcc gggtaaaagt gtccgtttcc ttatttatcg gtgatgtgga tgtgaagtac 720
gtatga 726

<210> 12

<211> 1083

<212> DNA

<213> Bacillus

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence coding for the LiaS-protein

<400> 12

atgagaaaaa aaatgcttgc cagcctccaa tggcgcgcca tccgcatgac aacgggaatc 60
agcctgctcc tttttgtttg cctgatttcc tttatgatgt tttactatcg gctcgatccg 120
cttgttttgc tgtcatcaag ctggttcgga attccgttta tcttgatttt gcttctgac 180
agcgtgaccg tcggtttcgc ctcagggtat atgtacggca accggttgaa gacaaggatt 240
gatacattaa ttgaatccat ttttaaccttt gaaaacggca atttcgctta tcggataccg 300
ccgctcgggtg atgatgaaat cggcctggct gctgatcagc tgaacgaaat ggcaagcgc 360
gtggagcttc aagtcgcac cctccagaaa ctttccaatg aacgtgcgga atggcaggct 420
caaatgaaga agtcggttat ctcagaagaa cgccagcgat tggccagaga tcttcatgat 480
gcggtcagcc agcagctctt tgccatatcg atgatgacat cagccgtgct ggaacatgtc 540
aaggatgctg atgacaaaac agtcaagcgg atcaggatgg tcgagcatat ggcaggcgaa 600
gcccaaaatg agatgagggc gctgctgctc catttacggc ctgttaccct tgaaggaaaa 660
gggctgaagg agggccttac ggagcttttg gacgagttcc gaaaaagca gccgattgat 720
attgagtggg atatacagga cacagcgata tccaagggtg ttgaagacca cttgttcaga 780
atcgtgcagg agggcccttc aaacgtatct agacattcaa aagcgtcaaa agtaaccgtg 840
attctgggca taaagaacag ccagctccgt ctgaagggtg ttgataatgg aaaaggcttt 900
aaaatggacc aggtgaaagc ctcctcatal ggcttgaatt ctatgaaaga acgtgcaagt 960
gaaatcggcg gtgtcgccga agtgatttca gtagaaggaa aaggcactca aatcgaagt 1020
aagggtcccga tttttccgga agaaaaagga gagaacgaac gtgattcgag tattattgat 1080
tga 1083

<210> 13

<211> 116

<212> DNA

<213> Mycobakterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the mprA-promoter

<400> 13

ggacatcgag aactctcggg gttcggcgaa cgttatctca gtggaatctc agtccacgcg 60
cgcaacctag ttgtgcagtt actgttgaag gccacacca tgccagtcca cgcattg 116

<210> 14

<211> 1515

<212> DNA

<213> Mycobakterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the MprB-regulator

<400> 14

```
atgtggtggt tccgccgccg agaccgggcg ccgctgcgcg ccaccagctc attatccctg 60
cggtggcggg tcatgctgct ggcgatgtcc atggtcgcga tggtggttgt gctgatgtcg 120
ttcgccgtct atgcggtgat ctcgcccgcg ctctacagcg acatcgacaa ccaactgcag 180
agccggggcg aactgctcat cgccagtggc tcgctggcag ctgatccggg taaggcaatc 240
gagggtagcg cctattcgga tgtcaacgcg atgctggtca accccggcca gtccatctac 300
accgctcaac agccggggcca gacgtgccc gtcggtgctg ccgagaaggc ggtgatccgt 360
ggcgagtgtg tcatgtcgcg gcgcaccacc gccgaccaac ggggtgcttg catccgtctg 420
accaacggta gttcgtgct gatctccaaa agtctcaagc ccaccgaagc agtcatgaac 480
aagctgcgtt ggggtgctatt gatcgtgggt gggatcgggg tggcggtcgc cgcggtggcc 540
gggggggatg tcacccgggc cgggctgagg ccggtgggcc gcctcaccga agcggccgag 600
cgggtggcgc gaaccgacga cctgcggccc atccccgtct tcggcagcga cgaattggcc 660
aggctgacag aggcattcaa tttaatgctg cgggcgctgg ccgagtcacg ggaacggcag 720
gcaaggctgg ttaccgacgc cggacatgaa ttgcgtaccc cgctaacgtc gctgcgcacc 780
aatgtcgaa tcttgatggc ctgatggcc ccgggggctc cgcggtacc caagcaggag 840
atggtcgacc tgcgtgccga tgtgctggct caaatcgagg aattgtccac actggtaggc 900
gatttggtgg acctgtccc aggcgacgcc ggagaagtgg tgcacgagcc ggtcgacatg 960
gctgacgtcg tcgaccgag cctggagcgg gtcaggcggc gcgcgaacga tacccttttc 1020
gacgtcgagg tgattgggtg gcaggtttat ggcgataccg ctggattgtc gcggatggcg 1080
cttaacctga tggacaacgc cgcgaagtgg agcccgcgg gcggccacgt ggggtgtcagg 1140
ctgagccagc tcgacgcgtc gcacgtgag ctggtggttt ccgaccgagg cccgggcatt 1200
cccgtgcagg agcgcctct ggtgtttgaa cggttttacc ggtcggcatc ggcacgggag 1260
ttgccgggtt cgggcctcgg gttggcgatc gtcaaacagg tgggtgctca ccacggcgga 1320
ttgctgcgca tcgaagacac cgaccaggc ggccagcccc ctggaacgtc gatttacgtg 1380
ctgctccccg gccgtcgat gccgattccg cagcttcccc gtgcgacggc tggcgctcgg 1440
agcacggaca tcgagaactc tcggggttcg gcgaacgtta tctcagtgga atctcagtec 1500
acgcgcgcaa cctag 1515
```

<210> 15

<211> 774

<212> DNA

<213> Mycobakterium

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the sigma factor (SigE)

<400> 15

```
atggaactcc tcggcggacc ccgggttggg aatacggaat cgcaactttg cgttgccgac 60
ggtgacgact tgccaactta ttgcagtgca aattcggagg atctcaatat cagaccatc 120
acgaccttga gtccgaccag catgtctcat cccaacagg tccgcgatga ccagtgggtg 180
gagccgtctg accaattgca gggcaccgcc gtattcgacg ccaccgggga caaggccacc 240
atgccgtcct gggatgagct ggtccgtcag cacgccgacg ggggtgtaccg gctggcttat 300
cggtctctccg gcaaccagca cgatgccgaa gacctgaccc aggagacctt tatcagggtg 360
ttccggtcgg tccagaatta ccagccgggc accttcgaag gctggctaca ccgcatcacc 420
accaacttgt tcctggacat ggtccgccgc cgggctcgca tccggatgga ggcgttacc 480
gaggactacg accgggtgcc cgccgatgag cccaaccccg agcagatcta ccacgacgca 540
cggctgggac ctgacctgca ggetgcettg gcctcgctgc cgccggagtt tcgtgccgcg 600
gtggtgctgt gtgacatcga gggctctgtc tacgaggaga tcggcgccac actgggcgtg 660
aagctcggga cggtagctag ccggatacac cgccgacgcc aggcactgcg ggactacctg 720
gcagcgcacc ccgaacatgg cgagtgcgca gttcacgtca acccagttcg ctga 774
```

<210> 16

<211> 272

<212> DNA

<213> Escherichia

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the htrA-promoter

<400> 16

```
gtaaattacc gtcagattct cctgagtttc cgctatggga atattattac cgttgccgcc 60
tgctgcagga ttatatcagc ggtatgaccg acctctatgc gtgggatgaa taccgacgtc 120
tgatggccgt agaacaataa ccaggctttt gtaaagacga acaataaatt ttacctttt 180
gcagaaactt tagttcggaa cttcaggcta taaaacgaat ctgaagaaca cagcaatttt 240
gcgttatctg ttaatcgaga ctgaaataca tg 272
```

<210> 17

<211> 699

<212> DNA

<213> Escherichia

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA-sequence of the CpxR-regulator

<400> 17

```
atgaataaaa tcctgttagt tgatgatgac cgagagctga cttccctatt aaaggagctg 60
ctcgagatgg aaggcttcaa cgtgattgtt gccacgatg gggaacaggc gcttgatctt 120
```

ctggacgaca gcattgattt acttttgctt gacgtaatga tgccgaagaa aaatgggtatc 180
 gacacattaa aagcacttcg ccagacacac cagacgcctg tcattatggt gacggcgcg 240
 ggcagtgaac ttgatcgctt tctcgccctt gagctgggcg cagatgacta tctcccgaaa 300
 ccgtttaatg atcgtgagct ggtggcacgt attcgcgcg tcttgcgccg ttcgcactgg 360
 agcgagcaac agcaaaacaa cgacaacggt tcaccgacac tggaagtga tgccttagtg 420
 ctgaatccag gccgtcagga agccagcttc gacgggcaaa cgctggagtt aaccggtact 480
 gagtttacc tgccttattt gctggcacag catctgggtc aggtgggttc ccgtgaacat 540
 ttaagccagg aagtgttggg caaacgcctg acgcctttcg accgcgctat tgatatgcac 600
 atttccaacc tgcgtcgtaa actgccgat cgtaaagatg gtcacccgtg gtttaaaacc 660
 ttgcgtggtc gcggtatct gatggtttct gttcatga 699

<210> 18

<211> 720

<212> DNA

<213> enhanced yellow fluorescens protein (eyfp)

<400> 18

gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccc tcttggtcga gctggacggc 60
 gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgaggcg agggcgatgc cacctacggc 120
 aagctgaccc tgaagtcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gcccaccctc 180
 gtgaccacct tcggctacgg cctgcagtgc ttgcccgt accccgacca catgaagcag 240
 cagcacttct tcaagtccgc catgcccga ggctacgtcc aggagcgac catcttcttc 300
 aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcc gagtggaagt tcgaggcgca caccctgggtg 360
 aaccgcatcg agctgaagg catcaacttc aaggaggac gcaacatcct ggggcacaag 420
 ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc 480
 atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggcg gcagcgtgca gctcgccgac 540
 cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac 600
 ctgagctacc agtccgccct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg 660
 ctggagtctg tgaccgccgc cggtatcact ctcggcatgg acgagctgta caagtaataa 720

<210> 19

<211> 238

<212> PRT

<213> protein sequence of the eYFP

<400> 19

Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val
1				5					10					15	
Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu
				20					25					30	
Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys
				35					40					45	
Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe

50	55	60
Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln		
65	70	75
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg		
85	90	95
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val		
100	105	110
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile		
115	120	125
Asn Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn		
130	135	140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly		
145	150	155
Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Gly Gly Ser Val		
165	170	175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro		
180	185	190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser		
195	200	205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val		
210	215	220
Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys		
225	230	235

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer 0706-Sal-fII

<400> 20

gcggtcgacg ggtaaactgt ggatataaaa 29

<210> 21

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer 0706-RBSNde_r

<400> 21

gcgcataatga tatctccttc ttctagcggg tctgccacat ttgctg 46

<210> 22
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer Spc SacII-f
<400> 22
gcgccgcgga ctaataacgt aacgtgactg gcaagag 37
<210> 23
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer Spc Bgl-r
<400> 23
gcgagatctt ctgcctcgtg aagaaggtgt tgctgac 37
<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer SenCas-fw
<400> 24
gtcgccgtcc agctcgacca ggatg 25
<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer TKP-seq-rv
<400> 25
cgggaagcta gagtaagtag ttcg 24
<210> 26
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer 1325-Sal-f
<400> 26

gcgggtcgacg agctgtaagg gtttacttg 29

<210> 27

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer 1325-RBSNde-r

<400> 27

gcgcatatga tatctccttc ttctaaccag cgacgccgcc gatcc 45

<210> 28

<211> 570

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA-fragment for pSen0996_8

<400> 28

gaatttaaca agagccagtt atctttctctt aaaatgagga ggtaactggc ttctttatgc 60
ttaagaggtg ttagcataag tgaaatatgt tccaacgcgt ggacgtctta attgggagga 120
agtctgtcac ggactggaag acgaaaaggg tatcgatgaa aatttttagtt gttgatgacg 180
agcaagctgt acgttaatct atcgcgccgt cagctcccgt tccatgccgg gatcgggatt 240
aggctcttgcc atcgtgaatc aggttgtgaa tcggcatggg ggccaactcg ttgtgggtga 300
atcagatgat ggcggaacga gaatcactat tgatttgcca ggggaacca ttcgcagcgg 360
gttcgaaaat gtcgatgatt aaggtaccac cactaaagag ctacaggaa gtgttcagac 420
tacttagagt gacgccccag ccacagggtt cataatcaaa tcatgacaaa tcaattcccc 480
acaaacaacg gtgagaaccc ggaccgtgca tcggaaactc catcagaaac caactccggt 540
acctgaactt taagaaggag atatcatatg 570

<210> 29

<211> 281

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA-fragment for pSen0996_8c

<400> 29

caatttaaca agagccagtt atctttctctt aaaatgagga ggtaactggc ttctttatgc 60
ttaagaggtg ttagcataag tgaaatatgt tccaacgcgt ggacgtctta attgggagga 120
agtctgtcac ggactggaag acgaaaaggg tatcgatgtg aaccattcg cagcgggttc 180
gaaaatgtcg atgattaagg taccaccact aaagagctca caggaagtgt tcagactact 240
tagagtgacg cccagccac agggttcata atcaaatcat g 281

<210> 30

<211> 2471

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA-fragment for pSen0996_8e

<400> 30

```

aatttaacaa gagccagtta tcttctctta aaatgaggag gtaactggct tctttatgct 60
taagagggtgt tagcataagt gaaatatgtt ccaacgcgtg gacgtcttaa ttgggaggaa 120
gtctgtcacg gactggaaga cgaaaagggt atcgatgaaa attttagttg ttgatgacga 180
gcaagctgta cgtgactcct tgcgacgttc ctttcgttc aacggataca acgttgttct 240
cgcagaagac ggcatccaag cactagagat gattgacaag gaacagcctg ctttgggtgat 300
cctcgatgtc atgatgcctg gtatggacgg acttgaggte tgcgccacc ttcgcagcga 360
aggcgatgat cggccaatte ttattettac tgcccgcgat aatgtttctg atcgtgttgg 420
tggcctcgat gcaggcgcag atgactatct ggctaaacca tttgctcttg aagagctgtt 480
ggcgcgcgtc cgttactctg tgcgtcgtc tgcagtggaa tcaaatcaga gttccagcat 540
tgaacaggct ctattatctt gtggcgattt gacgcttgac ccagaaagtc gagatgtcta 600
ccgcaacgga cgcgccatca gccttactcg aacagagttc gcgctcctgc aattgctcct 660
caaaaaccaa aggaaagtgc tcaactcgcg ccagatcttg gaagaggtat ggggctgcga 720
tttccccact tcaggcaatg ccctcgaggt ctacattgga taccttcgac gcaagactga 780
attggaagga gaagaccgcc tgatccatac agtacgagga gtcggatacg tcctgcgaga 840
gaccgctccg tgacattaag gcgaatcggc gcaggggaaa atgggcctgc ccctaccgaa 900
agtgatgact ccgacggttc aatgtcgttg cgttggcgtt tggctttgct gagegccact 960
ttggtagctt tcgccgttgg tgttattact gttgctgcat attggtctgt ctccagctat 1020
gtcaccaact caatcgatcg tgatctggaa aaacaagcgg atgcaatgct tggacgagcc 1080
agtgaagcgg gattctatgc aaccgcagaa accgaaattg ctctgttagg tgaatatgcc 1140
agtgacactc gaatcgcctt aatcccacct ggggtgggaat acgtcatcgg tgaatccata 1200
tcaactgcctg attcagattt ccttaagagt aaagaagcgg ggaaacagat cctcgtaaca 1260
agtgtgagc gcattctcat gaaacgagat agctcgggca cagtgggtgt ttttgctaaa 1320
gatatggtgg ataccgatcg gcagtcacg gtgcttggcg tcattctctt gatcattggc 1380
ggcagtgggtg ttttggcgtc gattctgctt ggtttcatca ttgcgaagga ggggctgaaa 1440
ccactgtcaa agctgcagcg tgccgtcgaa gagatcgaac gaactgatga gcttcgtgcg 1500
attcccgtgg tgggaaatga tgagttcgtt aagttgactc gtagtttcaa tgacatgctc 1560
aaggcactgc gggagtctcg taccgggcaa tctcagttgg tggcagatgc aggacacgag 1620
ctgaaaactc cactgacctc aatgcggaca aatattgaat tgctgttgat ggcaaccaac 1680
agtggaggat cgggaatccc caaggaagaa ttggatggcc ttcagcgtga tgtattggcg 1740
cagatgaccg aaatgtctga tttgattggt gatcttgttg atcttgcgcg tgaagaaacc 1800
gccgaaacgt caagcattgt agatctcaac caagtgttgg aaattgcgct tgaccgaatg 1860
gaaagccgtc gcatgacggt gcggatagat gtttccgaga ctgtggattg gaaactgctg 1920
ggcgatgatt tttccttaac cagggcatta gtaaatgttt tggataatgc cattaaatgg 1980

```

tcgcctgaga atggcattgt tcgagtgtcg atgtcacaga tcgacaaagc aacgggtccgc 2040
attgttattg atgattcagg gcctggaatt gctgaaaaag aacgaggatt agttttggaa 2100
cggttctatc gcgccgtcag ctcccgttcc atgccgggat cgggattagg tcttgccatc 2160
gtgaatcagg ttgtgaatcg gcatggtggc caactcgttg tgggtgaatc agatgatggc 2220
ggaacgagaa tcactattga ttgcccaggg gaaccattc gcagcgggtt cgaaaatgtc 2280
gatgattaaa ccactaaaga gctcacagga agtggtcaga ctacttagag tgacgcccc 2340
gccacagggt tcataatcaa atcatgacaa atcaattccc cacaacaac ggtgagaacc 2400
cggaccgtgc atcggaact ccatcagaaa ccaactccgg tacctgaact ttaagaagga 2460
gatatcatat g 2471

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer JPS0003

<400> 31

ctgaacttgt ggccgtttac 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer JPS0004

<400> 32

ttgttgccgg gaagctagag 20

<210> 33

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer AmyE-HpaI-f

<400> 33

gcgcgttaac cgaaggagat atagatatgt ttgc 34

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer AmyE-SacI-r

<400> 34

cagtgaattc gagctcctag tg 22

<210> 35

<211> 7153

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA-sequence of plasmid pSen0706

<400> 35

```

ggatccttat tacttgtaca gctcgtccat gccgagagtg atccccggcgg cggtcacgaa 60
ctccagcagg accatgtgat cgcgcttctc gttgggggtct ttgctcaggg cggactggta 120
gctcaggtag tggttgtcgg gcagcagcac gggggccgtcg ccgatggggg tgttctgctg 180
gtagtggtcg gcgagctgca cgtgcccgc ctcgatgttg tggcggatct tgaagtccac 240
cttgatgccg ttcttctgct tgtcggccat gatatagacg ttgtggctgt ttagttgta 300
ctccagcttg tgccccagga tgttgccgtc ctcttgaag ttgatgcct tcagctcgat 360
gcggttcacc aggggtgtcg cctcgaactt cacctcggcg cgggtcttgt agttgccgtc 420
gtccttgaag aagatgggtg gctcctggac gtagccttcg ggcatggcgg acttgaagaa 480
gtcgtgctgc ttcattgtgt cggggtagcg ggcaagcac tgcaggccgt agccgaaggt 540
ggtcacgagg gtgggccagg gcacgggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggt 600
cagcttgccg taggtggcat cgccctcgcc ctgccggac acgctgaact tgtggccgtt 660
tacgtcgccg tccagctcga ccaggatggg caccacccc gtgaacagct cctcgccctt 720
gctcaccata tgatatctcc ttcttctagc gggctctgcca catttgctga aaagtaccag 780
ttgcaaggtg tgggtgttga gcttcataac caggttgggc aaaagggtg aatccctggt 840
tgtggtgggg ctctgaaaa gtactcatag actctattgt ggagtgttga ggctgataag 900
tgaatggggg aaagccctga aaaggtggcg ttcagggtct tccctgatgg tttggtgtcg 960
caggggcatg acatgatcga agatatgagt aacacacctg cgccttatac cccgcagcct 1020
gcggggcaag cgggtgcctt atatcccacg tttaccgctc gacctgcagc aatggcaaca 1080
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccggca acaattaata 1140
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc 1200
tggtttattg ctgataaate tggagccggt gagegtgggt ctgcggtat cattgcagca 1260
ctggggccag atggttaagc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca 1320
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg 1380
taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa 1440
tttaaaagga tctagtgtaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt 1500
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc ttaataagat gatcttcttg agatcgtttt 1560
ggctctgcgcg taatctcttg ctctgaaaac gaaaaaacgg ccttgacagg cggtttttcg 1620
aaggttctct gagctaccaa ctctttgaac cgaggtaact ggcttgagg agcgcagtca 1680
ccaaaacttg tcctttcagt ttagccttaa ccggcgcagt acttcaagac taactcctct 1740
aatcaatta ccagtggctg ctgccagtgg tgcttttgca tgtctttccg ggttgactc 1800

```

aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcggactga acgggggggtt cgtgcataca 1860
gtccagcttg gagcgaactg cctacccgga actgagtgtc aggcgtggaa tgagacaaac 1920
gcggccataa cagcggaaatg acaccggtaa accgaaaggc aggaacagga gagcgcacga 1980
gggagccgcc aggggggaaac gcctgggtatc tttatagtcc tgtcggggtt cgccaccact 2040
gatttgagcg tcagatttcg tgatgcttgt cagggggggcg gagcctatgg aaaaacggct 2100
ttgccgcggc cctctcactt cctgttaag tatcttctg gcattctcca ggaaatctcc 2160
gccccgttcg taagccattt ccgctcgccg cagtccaacg accgagcgta gcgagtcagt 2220
gagcgaggaa gcggaatata tctgtatca catattctgc tgacgcaccg gtgcagcctt 2280
ttttctcctg ccacatgaag cacttcactg acaccctcat cagtccaac atagtaagcc 2340
agtatacact ccgctagcgc tgaggtctgc ctctgaaga aggtgttgct gactcatacc 2400
aggcctgaat cgcctcatca tccagccaga aagtgaggga gccacggttg atgagagctt 2460
tgttgtaggt ggaccagttg gtgattttga acttttgctt tgccacggaa cggctctcgt 2520
tgtcgggaag atgcgtgatc tgatccttca actcagcaa agttcgattt attcaacaaa 2580
gccacgttgt gtctcaaaat ctctgatgtt acattgcaca agataaaaat atatcatcat 2640
gaacaataaa actgtctgct tacataaaca gtaatacaag ggggtgttatg agccatattc 2700
aacgggaaac gtcttgctcg aggcgcgat taaattccaa catggatgct gatttatatg 2760
ggataaaatg ggctcgcat aatgtcggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg 2820
ggaagcccgat tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg 2880
ttacagatga gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca 2940
agcattttat ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgatc cccgggaaaa 3000
cagcattcca ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg 3060
cagtgttcct gcgccggtt cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc 3120
gcgtatttcg tctcgtcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg 3180
attttgatga cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataagc 3240
ttttgccatt ctaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta 3300
tttttgacga ggggaaatta ataggttgta ttgatgttg acgagtcgga atcgagacc 3360
gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcggta gttttctcct tcattacaga 3420
aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt 3480
tgatgctcga tgagttttc taatcagaat tggtaattg gttgtaacac tggcagagca 3540
ttacgctgac ttgacgggac ggcggctttg ttgaataaat cgaacttttg ctgagttgaa 3600
ggatcagatc acgcattctc ccgacaacgc agaccgttc gtggcaaagc aaaagttcaa 3660
aatcaccaac tgggtccacct acaacaaagc tctcatcaac cgtggctccc tcaatttctg 3720
gctggatgat ggggcgattc aggcctggta tgagtcagca acacattctt cacgaggcag 3780
acctcagcg tcaaagatgc aggggtaaaa gtaaccgca tctttaccga caaggcatcc 3840
ggcagttcaa cagatcggga agggctggat ttgctgagga tgaaggtgga ggaaggtgat 3900
gtcattctgg tgaagaagct cgaccgtctt ggccgcgaca ccgccgacat gatccaactg 3960
ataaaagagt ttgatgctca ggggtgtagc gtccggttta ttgacgacg gatcagtacc 4020
gacggtgata tggggcaaat ggtggtcacc atcctgtcgg ctgtggcaca ggctgaacgc 4080
cggaggatca agtcggtcaa gccaaagcga accagcggca ccgccgcgag caacgtcgca 4140

```

agggcgatca ggggacgatt ttgCGaaga atttccacgg taagaatcca atctctcgaa 4200
tttagggTga aagaagcttg gcataggggt gtgcacgaac tcggtggagg aaatttccgc 4260
ggggcaaggc ttcgCGaagc ggagtcgCGg cagtggcttt gaagatcttt gggagcagtc 4320
cttgtgcgct tacgaggTga gccggtgggg aaccgttatc tgcctatggT gtgagcccc 4380
ctagagagct tcaagagcaa tcagcccgac ctagaaagga ggccaagaga gagacccta 4440
cggggggaac cgTTTTctgc ctacgagatg gcacatttac tgggaagctt tacggcgTcc 4500
tcgtggaagt tcaatgcccc cagacttaag tgctctattc acggtctgac gtgacacgct 4560
aaattcagac atagcttcat tgattgtcgg ccacgagcca gtctctccct caacagtcac 4620
aaaccaacct gcaatggTca agcgatttcc ttagctttc ctacgttgTc gttgactgga 4680
cttagctagt ttttctcgct gtgctcgggc gtactcactg tttgggtctt tccagcgTtc 4740
tgcggccttt ttaccgccac gtcttcccat agtggccaga gcttttgcg ctcggctgct 4800
ctcgctctct gtctgacgag cagggacgac tggctggcct ttagcgacgt agccgcgcac 4860
acgtcgcgcc atcgctcTgc ggtcacgeat cggcggcaga tcaggctcac ggccgtctgc 4920
tccgaccgcc tgagcgacgg ttaggcacg ctcgtaggcg tcgatgatct tggTgtcttt 4980
taggcgtca ccagccgctt ttaactggta tcccacagtc aaagcgtggc gaaaagccgt 5040
ctcatcacgg gcggcacgcc ctggagcagT ccagaggaca cggacgccgt cgatcagctc 5100
tccagacgct tcagcggcgc tcggcaggct tgcttcaagc gtggcaagtG cttttgcttc 5160
cgcagtggtc tttcttgccg cttcgatacg tgcccgtccg ctagaaaact cctgctcata 5220
gcgtttttta ggTTTTctg tgctgagat catgcgagca acctccataa gatcagctag 5280
gcgatccacg cgattgtgct gggcatGCCa gcggtacgcg gtgggatcgt cggagacgtg 5340
cagtggccac cggctcagcc tatgtgaaaa agcctggTca gcgccgaaaa cgcgggtcat 5400
ttcctcggtc gttgcagcca gcaggcgcat attcgggctg ctcatgcctg ctgcggcata 5460
caccggatca atgagccaga tgagctggca tttcccgctc agtggattca cgccgatcca 5520
agctggcgct ttttccaggc gtgcccagcg ctccaaaatc gcgtagacct cggggtttac 5580
gtgctcgatt ttcccgccgg cctggtggct cggcacatca atgtccagga caagcacggc 5640
tgcgTgtgc gcgtgcgtca gagcaacata ctggcaccgg gcaagcgatt ttgaaccaac 5700
tcggtataac ttcggctgtg tttctcccgt gtccgggtct ttgatccaag cgctggcgaa 5760
gtcgcgggtc ttgtgccct ggaaattttc tctgccagg tgagcgagga attcgcggcg 5820
gtcttcgctc gtccagccac gtgatcgcag cgcgagctcg ggatgggtgt cgaacagatc 5880
agcggaaaaat ttccaggccg gtgtgtcaat gtctcgtgaa tccgctagag tcatttttga 5940
gcgctttctc ccaggtttgg actgggggtt agccgacgcc ctgtgagtta ccgctcacgg 6000
ggcgTtcaac atttttcagg tattcgtgca gcttatcgtc tcttgccgcc tgtgcgcttt 6060
ttcgacgcgc gacgctgctg ccgattcggT gcaggtggTg gcggcgctga cacgtcctgg 6120
gcggccacgg ccacacgaaa cgcggcattt acgatgtttg tcatgcctgc gggcaccgcg 6180
ccacgatcgc ggataattct cgctgccgct tccagctctg tgacgacct ggccaaaatt 6240
tcgctcgggg gacgcacttc cagegccatt tgcgacctag ccgcctccag ctctcggcg 6300
tggcgTttgt tggcgcgctc gcggtggct gcggcacgac acgcatctga gcaatatttt 6360
gcgcgccgtc ctcgcgggtc aggccgggga ggaatcaggc caccgcagta ggcgcaactg 6420
attcgatcct ccactactgt gcgtcctcct ggcgtgccg agcacgcagc tcgtcagcca 6480

```

gctcctcaag atccgccacg agagtttcta ggtcgctcgc ggcactggcc cagtctcgtg 6540
 atgctggcgc gtccgtcgtg tcgagagctc ggaaaaatcc gatcacggtt tttaaatacga 6600
 cggcagcatc gagcgcgtcg gactccagcg cgacatcaga gagatccata gctgatgatt 6660
 cgggccaatt ttggtacttc gtcgtgaagg tcatgacacc attataacga acgttcgtta 6720
 aagtttttgg cggaaaaatca cgcggcacga aaattttcac gaagcgggac tttgcgcagc 6780
 tcagggggtgc taaaaatttt gtatcgcaact tgatttttcc gaaagacaga ttatctgcaa 6840
 acgggtgtgtc gtattttctgg cttggttttt aaaaaatctg gaatcgaaaa tttgcggggc 6900
 gaccgagaag ttttttacaa aaggcaaaaa ctttttcggg atcgacagaa ataaaacgat 6960
 cgacgggtacg caacaaaaaa gcgtcaggat cgccgtagag cgattgaaga ccgtcaacca 7020
 aaggggaagc ctccaatcga cgcgacgcgc gctctacggc gatcctgacg cagattttta 7080
 gctatctgtc gcagcgccct cagggacaag ccaccgcac aacgtcgcga gggcgatcag 7140
 cgacgccgca ggg 7153

<210> 36

<211> 7060

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA-sequence of plasmid pSen1325

<400> 36

ggatccttat tacttgtaca gctcgtccat gccgagagt atcccggcgg cggtcacgaa 60
 ctccagcagg accatgtgat cgcgcttctc gttgggggtct ttgctcaggg cggactggta 120
 gctcaggtag tggttgtcgg gcagcagcac ggggccgtcg ccgatggggg tgttctgctg 180
 gtagtggtcg gcgagctgca cgctgccgcc ctcgatgttg tggcggatct tgaagttcac 240
 cttgatgccg ttcttctgct tgtcggccat gatatagac ttgtggctgt ttagtttgta 300
 ctccagcttg tgccccagga tgttgccgtc ctcttgaag ttgatgccct tcagctcgat 360
 gcggttcacc aggggtgtcg cctcgaactt cacctcggcg cgggtcttgt agttgccgtc 420
 gtccttgaag aagatgggtc gtcctggac gtagccttc ggcatggcgg acttgaagaa 480
 gtcgtgctgc ttcatgtggt cggggtagcg ggcaagcac tgcaggccgt agccgaaggt 540
 ggtcacgagg gtgggccagg gcacgggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggt 600
 cagcttgccg taggtggcat cgccctcgcc ctgcgccgac acgtgaact tgtggccgtt 660
 tacgtcgccg tccagctcga ccaggatggg caccaccccg gtgaacagct ctcgccctt 720
 gtcaccata tgatatctcc ttcttctaac cagcgacgcc gccgatccat ttgtcgggtg 780
 tgcttcgggc gagtcgtcga gattgtgctg ggaaagtcac cgggatcaag ctcttttatg 840
 gctgattgag tttttcttcc ttcttcaatc atcgccaata agaacctaga gcacatcggg 900
 gatttcccct ctcttaaccc ctaaaaaccc ctgagaaaac gctccaagta aacccttaca 960
 gtcgtcgac ctgcagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 1020
 actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 1080
 cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag 1140
 cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 1200

gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag 1260
 ataggcgctt cactgattaa gcattggttaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt 1320
 tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat 1380
 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccctta 1440
 ataagatgat cttcttgaga tcgttttggg ctgcgcgtaa tctcttgctc tgaaaacgaa 1500
 aaaaccgcct tgcagggcgg tttttcgaag gttctctgag ctaccaactc tttgaaccga 1560
 ggtaactggc ttggaggagc gcagtcacca aaacttgtcc tttcagttta gccttaaccg 1620
 gcgcatgact tcaagactaa ctccctctaaa tcaattacca gtggctgctg ccagtgggtg 1680
 ttttgcatgt ctttccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg cgcagcggtc 1740
 ggactgaacg ggggggttcgt gcatacagtc cagcttgagg cgaactgcct acccggaact 1800
 gagtgtcagg cgtggaatga gacaaacgcg gccataacag cggaatgaca ccggtaaacc 1860
 gaaaggcagg aacaggagag cgcacgaggg agccgccagg gggaaacgcc tggatatctt 1920
 atagtccgtg cgggtttcgc caccactgat ttgagcgta gatttcgtga tgcttgctag 1980
 gggggcggag cctatggaaa aacggctttg ccgcggccct ctcaattccc tgtaagtat 2040
 cttcctggca tcttccagga aatctccgcc ccgttcgtaa gccatttcg ctccgccag 2100
 tcgaacgacc gagcgtagcg agtcagttag cgaggaagcg gaatatatcc tgtatcacat 2160
 attctgctga cgcaccgggt cagccttttt tctcctgcca catgaagcac ttcactgaca 2220
 ccctcatcag tgccaacata gtaagccagt atacactccg ctagcgtga ggtctgcctc 2280
 gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg cctgaatcgc cccatcatcc agccagaaag 2340
 tgaggagacc acggttgatg agagctttgt tgtaggtgga ccagttggtg attttgaact 2400
 tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg cgtgatctga tccttcaact 2460
 cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc acgttgtgtc tcaaaatctc tgatgttaca 2520
 ttgcacaaga taaaaatata tcatcatgaa caataaaact gtctgcttac ataaacagta 2580
 atacaagggg tgttatgagc catattcaac gggaaacgtc ttgctcgagg ccgcgattaa 2640
 attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc tcgcgataat gtcgggcaat 2700
 caggtgcgac aatctatcga ttgtatggga agcccgatgc gccagagttg tttctgaaac 2760
 atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta cagatgagat ggtcagacta aactggctga 2820
 cggaatttat gcctcttccg accatcaagc attttatccg tactcctgat gatgcatggt 2880
 tactcaccac tgcatcccc gggaaaacag cattccaggt attagaagaa taccctgatt 2940
 caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttctgctg ccggttgcat tcgattcctg 3000
 tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg tatttcgtct cgctcaggcg caatcacgaa 3060
 tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga gcgtaatggc tggcctgttg 3120
 aacaagtctg gaaagaaatg cataagcttt tgccattctc accggattca gtcgtcactc 3180
 atggtgattt ctcaattgat aaccttattt ttgacgaggg gaaattaata ggttgatttg 3240
 atgttggacg agtcggaatc gcagaccgat accaggatct tgccatccta tggaactgcc 3300
 tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac ggttttttca aaaatatggt attgataatc 3360
 ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga tgctcgatga gtttttctaa tcagaattgg 3420
 ttaattgggt gtaacactgg cagagcatta cgctgacttg acgggacggc ggctttgttg 3480
 aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg catcttcccg acaacgcaga 3540

```

ccgttccgtg gcaaagcaaa agttcaaaat caccaactgg tccacctaca acaaagctct 3600
catcaaccgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg gcgattcagg cctggtatga 3660
gtcagcaaca ctttcttcac gaggcagacc tcagcgctca aagatgcagg ggtaaaagct 3720
aaccgcatct ttaccgacaa ggcatccggc agttcaacag atcgggaagg gctggatttg 3780
ctgaggatga aggtggagga aggtgatgtc attctggatga agaagctcga ccgtcttggc 3840
cgcgacaccg ccgacatgat ccaactgata aaagagtttg atgctcaggg tgtagcgggt 3900
cggtttattg acgacgggat cagtaccgac ggtgatatgg ggcaaattgg ggtcaccatc 3960
ctgtcggctg tggcacaggc tgaacgccgg aggatcaagt cggtaagcc aagcgcaacc 4020
agcggcaccg ccgcgagcaa cgctgcaagg gcgatcaggg gacgattttt gcgaagaatt 4080
tccacggtaa gaatccaatc tctcgaattt aggggtgaaag aagcttggca taggggtgtg 4140
cacgaactcg gtggaggaaa tttccgcggg gcaaggcttc gcgaagcgga gtcgcggcag 4200
tggttttgaa gatctttggg agcagtcctt gtgcgcttac gaggtgagcc ggtggggaac 4260
cgttatctgc ctatggtgtg agcccccta gagagcttca agagcaatca gcccaccta 4320
gaaaggaggc caagagagag acccctacgg ggggaaccgt tttctgccta cgagatggca 4380
catttactgg gaagctttac ggcgctctcg tggaagtcca atgcccgcag acttaagtgc 4440
tctattcacg gtctgacgtg acacgctaaa ttcagacata gtttcattga ttgtcggcca 4500
cgagccagtc tctccctcaa cagtcataaa ccaacctgca atggtcaagc gatttccttt 4560
agctttccta gcttgtcgtt gactggactt agctagtttt tctcgtctgt ctcgggcgta 4620
ctcactgttt gggctctttc agcgttctgc ggctttttta ccgccacgtc tccccatagt 4680
ggccagagct tttcgccctc ggctgctctg cgtctctgtc tgacgagcag ggacgactgg 4740
ctggccctta gcgacgtagc cgcgcacacg tcgcgccatc gtctggcggt cacgcatcgg 4800
cggcagatca ggctcacggc cgtctgtctc gaccgcctga gcgacggtgt aggcacgctc 4860
gtaggcgtcg atgatcttgg tgtcttttag gcgctcacca gccgctttta actggtatcc 4920
cacagtcaaa gcgtggcgaa aagccgtctc atcacgggcg gcacgccctg gagcagtcca 4980
gaggacacgg acgccgtcga tcagctctcc agacgcttca gcggcgctcg gcaggcttgc 5040
ttcaagcgtg gcaagtgcct ttgcttccgc agtggctttt cttgccgctt cgatacgtgc 5100
ccgtccgcta gaaaactcct gctcatagcg ttttttaggt ttttctgtgc ctgagatcat 5160
gcgagcaacc tccataagat cagctaggcg atccacgcga ttgtgctggg catgccagcg 5220
gtacgcgggt ggatcgtcgg agacgtgcag tggccaccgg ctcagcctat gtgaaaaagc 5280
ctggctcagc ccgaaaacgc gggtcatttc ctcggtcgtt gcagccagca ggcgcatatt 5340
cgggctgctc atgcctgctg cggcatacac cggatcaatg agccagatga gctggcattt 5400
cccgtcagt ggattcacgc cgatccaagc tggcgctttt tccaggcgtg cccagcgctc 5460
caaaatcgcg tagacctcgg ggtttacgtg ctcgattttc ccgccggcct ggtggctcgg 5520
cacatcaatg tccaggacaa gcacggetgc gtgctgcgcg tgcgtcagag caacatactg 5580
gcaccgggca agcgattttg aaccaactcg gtataacttc ggctgtgttt ctcccgtgtc 5640
cgggtctttg atccaagcgc tggcgaagtc gcgggtcttg ctgccctgga aattttctct 5700
gcccagggtg gcgaggaatt cgcggcggtc ttcgctcgtc cagccacgtg atcgcagcgc 5760
gagctcggga tgggtgtcga acagatcagc ggaaaatttc caggccggtg tgtcaatgtc 5820
tcgtgaatcc gctagagtca tttttgagcg ctttctccca ggtttggact gggggttagc 5880

```

cgacgccctg tgagttaccg ctcacggggc gttcaacatt tttcaggtat tcgtgcagct 5940
 tategcttct tgccgcctgt gcgctttttc gacgcgcgac gctgctgccg attcggtgca 6000
 ggtggtggcg gcgctgacac gtcctgggcg gccacggcca cacgaaacgc ggcatTTTtacg 6060
 atgtttgtca tgccTgcggg caccgcgcca cgatcgcgga taattctcgc tgccgcttcc 6120
 agctctgtga cgacCATggc caaaatttcg ctcggggggac gcacttccag cgccatttgc 6180
 gacctagccg cctccagctc ctcggcgtgg cgtttgTttg gcgcgtcgcg gctggctgcg 6240
 gcacgacacg catctgagca atattttgcg cgccgtcctc gcgggtcagg ccggggagga 6300
 atcaggccac cgcatgaggc gcaactgatt cgatcctcca ctactgtgcg tcctcctggc 6360
 gctgccgagc acgcagctcg tcagccagct cctcaagatc cgccacgaga gtttctaggt 6420
 cgctcgcggc actggcccag tctcgtgatg ctggcgcgtc cgtcgtatcg agagctcgga 6480
 aaaatccgat caccgttttt aaatcgacgg cagcatcgag cgcgtcggac tccagcgca 6540
 catcagagag atccatagct gatgattcgg gccaatTTtg gtacttcgtc gtgaaggTca 6600
 tgacaccatt ataacgaacg ttcgttaaag tttttggcgg aaaatcacgc ggcacgaaaa 6660
 ttttcacgaa gcgggacttt gcgcagctca ggggtgctaa aaattttgta tcgcacttga 6720
 tttttccgaa agacagatta tctgcaaacg gtgtgtcgta tttctggctt ggTTTTtaaa 6780
 aaatctggaa tcgaaaattt gcggggcgac cgagaagttt tttaaaaag gcaaaaactt 6840
 tttcgggatc gacagaaata aaacgatcga cggtagcTaa caaaaaagcg tcaggatcgc 6900
 cgtagagcga ttgaagaccg tcaaccaaag gggaagcctc caatcgacgc gacgcgcgct 6960
 ctacggcgat cctgacgcag attttttagct atctgtcgca gcgccctcag ggacaagcca 7020
 cccgcacaac gtcgcgaggg cgatcagcga cgccgcaggg 7060

<210> 37

<211> 7561

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA-sequence of plasmid pSen0996_8

<400> 37

ccctgcggcg tcgtgatcgc ccctcgcgac gttgtgcggg tggtttgtcc ctgagggcgc 60
 tgcgacagat agctaaaaat ctgcgtcagg atcgccgtag agcgcgcgtc gcgtcgattg 120
 gaggttccc ctttggttga cggctttcaa tcgtctacg gcgatcctga cgctTTTTtg 180
 ttgcgtaccg tcgatcgttt tatttctgtc gateccgaaa aagTTTTtgc cttttgtaaa 240
 aaacttctcg gtcgccccgc aaattttcga ttccagattt tttaaaaacc aagccagaaa 300
 tacgacacac cgtttgcaaa taatctgtct ttcggaaaaa tcaagtgcga taaaaattt 360
 ttagcacccc tgagctgcgc aaagtccccg ttcgtgaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt 420
 ccgcaaaaaa cttaacgaa cgttcgttat aatggtgtca tgaccttcac gacgaagtac 480
 caaaattggc ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg 540
 ctcgatgctg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggatttt tccgagctct cgatacgacg 600
 gacgcgccag catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg 660
 gatcttgagg agctggctga cgagctgcgt gctcggcagc gccaggagga cgcacagtag 720

```

tggaggatcg aatcagttgc gcctactgcg gtggcctgat tcctccccgg cctgaccgcg 780
gaggacggcg cgcaaaatat tgctcagatg cgtgtcgtgc cgcagccagc cgcgagcgcg 840
ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggctaggtc gcaaatggcg ctggaagtgc 900
gtcccccgag cgaaattttg gccatggtcg tcacagagct ggaagcggca gcgagaatta 960
tccgcgatcg tggcgcgggtg cccgcaggca tgacaaacat cgtaaatagcc gcgtttcgtg 1020
tggccgtggc cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc 1080
gtcgcgcgtc gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa 1140
aatgttgaac gccccgtgag cggtaactca cagggcgtcg gctaaccccc agtccaaacc 1200
tgggagaaaag cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg 1260
gaaattttcc gctgatctgt tcgacacca tcccagctc gcgctgcgat cactgtggctg 1320
gacgagcgaa gaccgccgag aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag 1380
caagaccgcg gacttcgcca gcgcttggat caaagaccg gacacgggag aaacacagcc 1440
gaagttatac cgagttgggt caaaatcgct tgcccgtgc cagtatgttg ctctgacgca 1500
cgcgcagcac gcagccgtgc ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg 1560
gaaaatcgag cacgtaaacc ccgaggtcta cgcgattttg gagcgtggg cagcctgga 1620
aaaagcgcca gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aatgccagc tcacttggt 1680
cattgatccg gtgtatgccg cagcaggcat gagcagcccc aatatgcgc tgctggctgc 1740
aacgaccgag gaaatgacct gcgttttcgg cgctgaccag gctttttcac ataggctgag 1800
ccggtggcca ctgcacgtct ccgacgatcc caccgcgtac cgctggcatg ccagcacaa 1860
tcgcgtggat cgcttagctg atcttatgga ggttgctcgc atgatctcag gcacagaaaa 1920
acctaaaaaa cgctatgagc aggagttttc tagcggacgg gcacgtatcg aagcggcaag 1980
aaaagccact gcggaagcaa aagcacttgc cacgcttgaa gcaagcctgc cgagcgccgc 2040
tgaagcgtct ggagagctga tcgacggcgt ccgtgtcctc tggactgctc cagggcgtgc 2100
cgcccgtgat gagacggctt ttcgccacgc tttgactgtg ggataccagt taaaagcggc 2160
tggtgagcgc ctaaaagaca ccaagatcat cgacgcctac gagcgtgcct acaccgtcgc 2220
tcaggcggtc ggagcagacg gccgtgagcc tgatctgccg ccgatgcgtg accgccagac 2280
gatggcgcga cgtgtgcgcg gctacgtcgc taaaggccag ccagtgcgtc ctgctcgtca 2340
gacagagacg cagagcagcc gagggcgaaa agctctggcc actatgggaa gacgtggcgg 2400
taaaaaggcc gcagaacgct ggaaaagacc aaacagttag tacgcccag cagcgcgaga 2460
aaaactagct aagtccagtc aacgacaagc taggaaagct aaaggaaatc gcttgaccat 2520
tgcaggttgg tttatgactg ttgagggaga gactggctcg tggccgacaa tcaatgaagc 2580
tatgtctgaa tttagcgtgt cacgtcagac cgtgaataga gcacttaagt ctgcgggcat 2640
tgaacttcca cgaggacgcc gtaaagcttc ccagtaaatg tgccatctcg taggcagaaa 2700
acggttcccc ccgtaggggt ctctctcttg gcctccttc taggtcgggc tgattgctct 2760
tgaagctctc taggggggct cacaccatag gcagataacg gttccccacc ggtcacctc 2820
gtaagcgcac aaggactgct cccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac tccgttcgc 2880
gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacacccta tgccaagctt 2940
ctttcacct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 3000
ccctgatcgc ccttgcgacg ttgctcgcgg cgggtgccgt ggttgcgctt ggcttgaccg 3060

```

acttgatcct ccggcgttca gcctgtgccca cagccgacag gatggtgacc accatttgcc 3120
 ccataacacc gtcggtactg atcccgctgt caataaacgg aaccgctaca ccctgagcat 3180
 caaactcttt tatcagttgg atcatgtcgg cgggtgtcgg gccaaagacgg tcgagcttct 3240
 tcaccagaat gacatcacct tcttccacct tcattcctcag caaatccagc ctttcccgat 3300
 ctgttgaact gccggatgcc ttgtcggtaa agatgcgggtt agcttttacc cctgcatctt 3360
 tgagcgctga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg cctgaatcgc 3420
 cccatcatcc agccagaaaag tgagggagcc acggttgatg agagctttgt tgtaggtgga 3480
 ccagttgggtg attttgaact ttgtctttgc cacggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg 3540
 cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc gccgtcccggt 3600
 caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac 3660
 tcacgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatacag gattatcaat accatatttt 3720
 tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcacga ggcagttcca taggatggca 3780
 agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 3840
 ccctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcacat gagtgacgac tgaatccggt 3900
 gagaatggca aaagcttatg cttttcttcc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 3960
 tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 4020
 agacgaaata cgcgatcgtc gttaaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 4080
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat 4140
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta 4200
 cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 4260
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 4320
 gcatcgggct tccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccagc attatcgcga 4380
 gccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg cctcgagcaa 4440
 gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac 4500
 agttttattg ttcatgatga tatattttta tcttggtgca tgtaacatca gagattttga 4560
 gacacaacgt ggctttgttg aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg 4620
 catcttcccc acaacgcaga ccgttccgtg gcaaagcaaa agttcaaaat caccaactgg 4680
 tccacctaca acaaagctct catcaaccgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg 4740
 gcgattcagg cctggtatga gtcagcaaca ctttcttcac gaggcagacc tcagcgctag 4800
 cggagtgtat actggcttac tatgttgga ctgatgaggg tgtcagtga gtgcttcacg 4860
 tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgcg tcagcagaat atgtgataca ggatatattc 4920
 cgcttcctcg ctactgact cgtacgctc ggtcgttcga ctgcggcgag cggaaatggc 4980
 ttacgaacgg ggcgagatt tcctggaaga tgccaggaag atacttaaca gggaagttag 5040
 agggccgcgg caaagccgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc 5100
 tgacgctcaa atcagtgggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 5160
 cctggcggtt ccctcgtgcg ctctcctgtt cctgccttcc ggtttaccgg tgctattccg 5220
 ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg 5280
 ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtc gaccgctgcg ctttatccgg 5340
 taactatcgt cttgagtcca acccggaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac 5400

tggtaattga tttagaggag ttagtcttga agtcatgcgc cggttaaggc taaactgaaa 5460
 ggacaagtgt tggtgactgc gtcctccaa gccagttacc tcggttcaaa gagttggtag 5520
 ctcagagaac cttcgaaaaa ccgccctgca aggcgggttt ttcgttttca gagcaagaga 5580
 ttacgcgcag accaaaacga tctcaagaag atcatcttat taaggggtct gacgctcagt 5640
 ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 5700
 agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt 5760
 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggacacctat ctcagcgatc tgtctatttc 5820
 gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggttac 5880
 catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat 5940
 cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg 6000
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 6060
 gtttgcgcaa cgttgttgcc attgtgcag gtcgacctg cgccgttccc agtgaaggc 6120
 cgacaatgtc gcccttcagg aggtcaagat cgacggtcag accgttcgca tcccacgccg 6180
 tctggttaag gcagcacagc tcggtctcgt ggacgtagag cagttctaaa ccttaaattc 6240
 atgcctaca accttttgta ggtaagaatt taacaagagc cagttatctt ctcttaaaat 6300
 gaggaggtaa ctggcttctt tatgtttaag aggtgttagc ataagtgaat tatgttccaa 6360
 cgcgtggacg tcttaattgg gaggaagtct gtcacggact ggaagacgaa aagggtatcg 6420
 atgaaaattt tagttgttga tgacgagcaa gctgtacgtt aatctatcgc gccgtcagct 6480
 cccgttccat gccgggatcg ggattaggtc ttgccatcgt gaatcaggtt gtgaatcggc 6540
 atggtggcca actcgttggt ggtgaatcag atgatggcgg aacgagaatc actattgatt 6600
 tgccagggga acccattcgc agcgggttcg aaaatgtcga tgattaaggt accaccacta 6660
 aagagctcac aggaagtgtt cagactactt agagtgcgc cccagccaca gggttcataa 6720
 tcaaatcatg acaaatcaat tccccacaaa caacggtagg aaccggacc gtgcatcgga 6780
 aactccatca gaaaccaact ccggtacctg aactttaaga aggagatatc atatggtgag 6840
 caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt 6900
 aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct 6960
 gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgccctg ccctggccca ccctcgtgac 7020
 caccttcggc tacggcctgc agtgcttcgc ccgtacccc gaccacatga agcagcacga 7080
 cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga 7140
 cgacggcaac tacaagaccc gcgccgaggt gaagttecag ggcgacaccc tggatgaaccg 7200
 catcgagctg aagggcacat acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga 7260
 gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa 7320
 ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga gggcggcagc gtgcagctcg ccgaccacta 7380
 ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgtgtgtg cccgacaacc actacctgag 7440
 ctaccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tctgtctgga 7500
 gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aataaggatc 7560
 c 7561

<210> 38

<211> 7102

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA-sequence of plasmid pSen0996_8c

<400> 38

```

ccctgcggcg tcgctgatcg ccctcgcgac gttgtgcggg tggcttgtcc ctgagggcgc 60
tgcgacagat agctaaaaat ctgcgtcagg atcgccgtag agcgcgcgtc gcgtcgattg 120
gaggcttccc ctttgggtga cggtcttcaa tcgctctacg gcgatcctga cgcttttttg 180
ttgcgtaccg tcgatcggtt tatttctgtc gatcccgaaa aagtttttgc cttttgtaaa 240
aaacttctcg gtcgccccgc aaattttcga ttccagattt tttaaaaacc aagccagaaa 300
tacgacacac cgtttgcaga taatctgtct ttcggaaaaa tcaagtgcga taaaaattt 360
ttagcacccc tgagctgcgc aaagtcccgc ttcgtgaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt 420
ccgccaaaaa ctttaacgaa cgttcgttat aatggtgtca tgaccttcac gacgaagtac 480
caaaattggc ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg 540
ctcgatgctg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggatttt tccgagctct cgatacgacg 600
gacgcgccag catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg 660
gatcttgagg agctggctga cgagctgcgt gtcggcagc gccaggagga cgcacagtag 720
tggaggatcg aatcagttgc gcctactgcg gtggcctgat tcctccccgg cctgaccgcg 780
gaggacggcg cgcaaaatat tgctcagatg cgtgtcgtgc cgcagccagc cgcgagcgcg 840
ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggctaggtc gcaaattggc ctggaagtgc 900
gtcccccgag cgaaattttg gccatggtcg tcacagagct ggaagcggca gcgagaatta 960
tccgcgatcg tggcgcggtg cccgcaggca tgacaaacat cgtaaattgc gcgtttcgtg 1020
tggccgtggc cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc 1080
gtcgcgcgtc gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa 1140
aatgttgaac gccccgtgag cggtaaactc cagggcgctc gctaaccacc agtccaaacc 1200
tgggagaaaag cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg 1260
gaaattttcc gctgatctgt tcgacacca tcccagctc gcgctgcgat cacgtggctg 1320
gacgagcgaa gaccgccgcg aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag 1380
caagaccgcg gacttcgcca gcgtttggat caaagaccgc gacacgggag aaacacagcc 1440
gaagttatac cgagttggtt caaaatcgct tgcccggcgc cagtattgtt ctctgacgca 1500
cgcgacgac gcagccgtgc ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg 1560
gaaaatcgag cacgtaaaacc ccgaggtcta cgcgattttg gagcgtggg cagcctgga 1620
aaaagcgcca gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aatgccagc tcattctggct 1680
cattgatccg gtgtatgccg cagcaggeat gagcagcccc aatatgcgcc tgctggctgc 1740
aacgaccgag gaaatgaccc gcgttttcgg cgtgaccag gctttttcac ataggctgag 1800
ccggtggcca ctgcacgtct ccgacgatcc caccgcgtac cgctggcatg ccagcacaa 1860
tcgcgtggat cgcctagctg atcttatgga ggttgctcgc atgatctcag gcacagaaaa 1920
acctaaaaaa cgctatgagc aggagttttc tagcggacgg gcacgtatcg aagcggcaag 1980
aaaagccact gcggaagcaa aagcacttgc cacgcttgaa gcaagcctgc cgagcggcgc 2040

```

```

tgaagcgtct ggagagctga tcgacggcgt cegtgtcctc tggactgctc cagggcgtgc 2100
cgccccgtgat gagacggcctt ttgccacgc tttgactgtg ggataccagt taaaagcggc 2160
tggtgagcgc ctaaaagaca ccaagatcat cgacgcctac gagcgtgcct acaccgtcgc 2220
tcaggcggtc ggagcagacg gccgtgagcc tgatctgccg ccgatgcgtg accgccagac 2280
gatggcgcga cgtgtgcgcg gctacgtcgc taaaggccag ccagtcgtcc ctgctcgtca 2340
gacagagacg cagagcagcc gagggcgaaa agctctggcc actatgggaa gacgtggcgg 2400
taaaaaggcc gcagaacgct ggaaagaccc aaacagttag tacgcccagc cacagcgaga 2460
aaaactagct aagtccagtc aacgacaagc taggaaagct aaaggaaatc gcttgacat 2520
tgcaggttgg tttatgactg ttgagggaga gactggctcg tggccgacaa tcaatgaagc 2580
tatgtctgaa tttagcgtgt cacgtcagac cgtgaataga gcacttaagt ctgcgggcat 2640
tgaacttcca cgaggacgcc gtaaagcttc ccagtaaagt tgccatctcg taggcagaaa 2700
acggttcccc ccgtaggggt ctctctcttg gctctcttc taggtcgggc tgattgctct 2760
tgaagctctc tagggggggt cacaccatag gcagataacg gtteccacc ggctcacctc 2820
gtaagcgcac aaggactgct cccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac tccgcttcgc 2880
gaagccttgc cccgcggaaa tttctccac cgagttcgtg cacacccta tgccaagctt 2940
ctttcacctt aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgctc 3000
ccctgatcgc ccttgcgacg ttgctcgcgg cggtgccgtt ggttgcgctt ggcttgaccg 3060
acttgatcct ccggcgttca gcctgtgcca cagccgacag gatggtgacc accatttgcc 3120
ccatataacc gtcggtactg atcccgtcgt caataaaccg aaccgtaca ccctgagcat 3180
caaactcttt tatcagttgg atcatgtcgg cgggtgcgcg gccaagacgg tcgagcttct 3240
tcaccagaat gacatcacct tcctccacct tcattctcag caaatccage ctttcccgat 3300
ctgttgaact gccggatgcc ttgtcggtaa agatgcggtt agcttttacc cctgcatctt 3360
tgagcgtga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg cctgaatcgc 3420
cccatcatcc agccagaaag tgagggagcc acggttgatg agagctttgt tgtaggtgga 3480
ccagttgggtg attttgaact ttgtcttgc cacggaacgg tctgcgttgt cggaagatg 3540
cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc gccgtcccg 3600
caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac 3660
tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatctt 3720
tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 3780
agatcctggt atcggctcgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 3840
ccctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcacatc gagtgacgac tgaatccggt 3900
gagaatggca aaagcttatg cttttcttcc cagacttggt caacaggcca gccattacgc 3960
tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaaa ccgttatcca ttcgtgattg cgctgagcgc 4020
agacgaaata cgcgatcgtt gttaaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 4080
cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata ttcttctaat 4140
acctggaatg ctgttttccc ggggatcgea gtggtgagta accatgcate atcaggagta 4200
cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 4260
atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta ctttgccat gtttcagaaa caactctggc 4320
gcacggggt tccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccagc attatcgcga 4380

```

```

gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctcgagcaa 4440
gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac 4500
agttttattg ttcgatga taatatttta tcttggtgca tgtaacatca gagattttga 4560
gacacaacgt ggctttgttg aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg 4620
catcttcccc acaacgcaga ccgttccgtg gcaaagcaaa agttcaaaat caccaactgg 4680
tccacctaca acaaagctct catcaaccgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg 4740
gcgattcagg cctgggtatga gtcagcaaca cttcttcac gaggcagacc tcagcgctag 4800
cggagtgtat actggcttac tatgttggca ctgatgaggg tgtcagtga gtgcttcag 4860
tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgctg tcagcagaat atgtgataca ggatatattc 4920
cgcttcctcg ctcaactgact cgctacgctc ggctgttcga ctgcggcgag cggaaatggc 4980
ttacgaacgg ggcgagatt tcttgaaga tgccaggaag atacttaaca gggaagtga 5040
agggccgagg caaagccgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc 5100
tgacgtcaa atcagtgggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca gggtttccc 5160
cctggcggtt cctcgtgctg ctctcctgtt cctgccttc ggtttaccgg tgtcattccg 5220
ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg 5280
ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtc gaccgtgctg cttatccgg 5340
taactatcgt cttgagtcca acccgaaaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac 5400
tggtaatga tttagaggag ttagtcttga agtcatgcgc cggttaaggc taaactgaaa 5460
ggacaagttt tggtgactgc gtcctccaa gccagttacc tcggttcaaa gaggttgtag 5520
ctcagagaac cttcgaaaaa ccgccctgca aggcggtttt ttcgttttca gagcaagaga 5580
ttacgcgcag accaaaacga tctcaagaag atcatcttat taaggggtct gacgtcagt 5640
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 5700
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gaggtaactt 5760
ggctctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc 5820
gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggttac 5880
catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat 5940
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggcgc agcgcagaag tggctcctgca actttatccg 6000
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 6060
gtttgcgcaa cgttggtgcc attgtgcag gtcgacaatt taacaagagc cagttatctt 6120
ctcttaaaat gaggaggtaa ctggcttctt tatgtttaag aggtgttagc ataagtga 6180
tatgttccaa cgcgtggacg tcttaattgg gaggaagtct gtcacggact ggaagacga 6240
aagggtatcg atgtgaaccc attcgcagcg ggttcgaaaa tgcgatgat taaggtacca 6300
ccactaaaga gtcacagga agtggtcaga ctacttagag tgacgcccc gccacagggt 6360
tcataatcaa atcatggtga gcaagggcga ggagctgttc accggggtgg tgccatcct 6420
ggctcagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgagg 6480
cgatgccacc tacggcaagc tgacctgaa gtteatctgc accaccgga agctgcccgt 6540
gccctggccc accctcgtga ccaccttcgg ctacggcctg cagtgttcg cccgtaccc 6600
cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga 6660
gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga 6720

```

gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcac aacttcaagg aggacggcaa 6780
 catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga 6840
 caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg agggcggcag 6900
 cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa caccgccatc ggcgacggcc ccgtgctgct 6960
 gcccgacaac cactacctga gctaccagtc cgccctgagc aaagacccca acgagaagcg 7020
 cgatcacatg gtccctgctgg agttcgtgac cgccgcccggg atcactctcg gcatggacga 7080
 gctgtacaag taataaggat cc 7102

<210> 39

<211> 9463

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA-sequence of plasmid pSen0996_8e

<400> 39

ccctgcggcg tcgctgatcg ccctcgcgac gttgtgcggg ttgcttgctc ctgagggcgc 60
 tgcgacagat agctaaaaat ctgcgtcagg atcgccgtag agcgcgcgtc gcgtcgattg 120
 gaggttccc ctttggttga cggcttctca tcgctctacg gcgacatcga cgcttttttg 180
 ttgcgtaccg tcgatcgttt tatttctgtc gatcccgaaa aagtttttgc cttttgtaaa 240
 aaacttctcg gtcgccccgc aaatttttga ttccagattt tttaaaaacc aagccagaaa 300
 tacgacacac cgtttgcaga taatctgtct ttcggaaaaa tcaagtgcga taaaaattt 360
 ttagcacccc tgagctgcgc aaagtcccgc ttcgtgaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt 420
 ccgccaaaaa ctttaacgaa cgttcgttat aatggtgtca tgaccttcac gacgaagtac 480
 caaaattggc ccgaatcacc agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg 540
 ctcgatgctg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggatttt tccgagctct cgatacgacg 600
 gacgcgccag catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg 660
 gatcttgagg agctggctga cgagctgcgt gctcggcagc gccaggagga cgcacagtag 720
 tggaggatcg aatcagttgc gcctactgcg gtggcctgat tcctccccgg cctgaccgcg 780
 gaggacggcg cgcaaaatat tgctcagatg cgtgtcgtgc cgcagccagc cgcgagcgcg 840
 ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggtaggtc gcaaattggc ctggaagtgc 900
 gtcccccgag cgaaattttg gccatggtcg tcacagagct ggaagcggca gcgagaatta 960
 tccgcgatcg tggcgcggtg cccgcaggca tgacaaacat cgtaaattgc gcgtttcgtg 1020
 tggccgtggc cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc 1080
 gtcgcgcgtc gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa 1140
 aatgttgaac gccccgtgag cggtaactca caggcgctcg gctaaccacc agtccaaacc 1200
 tgggagaaaag cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg 1260
 gaaattttcc gctgatctgt tcgacaccca tcccgagctc gcgctgcgat cactgtgctg 1320
 gacgagcgaa gaccgccgcg aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag 1380
 caagaccgcg gacttcgcca gcgtttggat caaagaccgc gacacgggag aaacacagcc 1440
 gaagttatac cgagttggtt caaaatcgct tgcccgtgct cagtattgtt ctctgacgca 1500

cgcgccagcac gcagccgtgc ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg 1560
 gaaaatcgag cacgtaaacc ccgaggtcta cgcgattttg gagcgctggg cacgcctgga 1620
 aaaagcgcca gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcattctggct 1680
 cattgatccg gtgtatgccg cagcaggcat gagcagcccc aatatgcgcc tgctggctgc 1740
 aacgaccgag gaaatgaccc gcgttttcgg cgctgaccag gctttttcac ataggctgag 1800
 ccggtggcca ctgcacgtct ccgacgatcc caccgcgtac cgctggcatg ccagcacaa 1860
 tcgcgtggat cgccatagctg atcttatgga ggttgctcgc atgatctcag gcacagaaaa 1920
 acctaaaaaa cgctatgagc aggagttttc tagcggacgg gcacgtatcg aagcggcaag 1980
 aaaagccact gcggaagcaa aagcacttgc cacgcttgaa gcaagcctgc cgagcgccgc 2040
 tgaagcgtct ggagagctga tcgacggcgt ccgtgtctc tggactgctc cagggcgctgc 2100
 cgcccgatgat gagacggctt ttccgacgc tttgactgtg ggataccagt taaaagcggc 2160
 tgggtgagcgc ctaaaaagaca ccaagatcat cgacgcctac gagcgtgcct acaccgtcgc 2220
 tcaggcggtc ggagcagacg gccgtgagcc tgatctgccg ccgatgcgtg accgccagac 2280
 gatggcgcca cgtgtgcgcg gctacgtcgc taaaggccag ccagtcgtcc ctgctcgtca 2340
 gacagagacg cagagcagcc gagggcgaaa agctctggcc actatgggaa gacgtggcgg 2400
 taaaaaggcc gcagaacgct ggaaagaccc aaacagttag tacgcccagc cacagcgaga 2460
 aaaactagct aagtccagtc aacgacaagc taggaaagct aaaggaaatc gcttgaccat 2520
 tgcaggttgg tttatgactg ttgagggaga gactggctcg tggccgacaa tcaatgaagc 2580
 tatgtctgaa tttagcgtgt cacgtcagac cgtgaataga gcacttaagt ctgcgggcat 2640
 tgaacttcca cgaggacgcc gtaaagcttc ccagtaaagtg tgccatctcg taggcagaaa 2700
 acggttcccc ccgtaggggt ctctctcttg gcctccttcc taggtcgggc tgattgctct 2760
 tgaagctctc tagggggggt cacaccatag gcagataacg gttccccacc ggctcacctc 2820
 gtaagcgcac aaggactgct ccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac tccgcttcgc 2880
 gaagccttgc cccgcggaaa ttctctccac cgagttcgtg cacaccctta tgccaagctt 2940
 ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgctc 3000
 ccctgatcgc ccttgcgacg ttgctcgcgg cggtgccgct ggttgcgctt ggcttgaccg 3060
 acttgatcct ccggcggttca gcctgtgcca cagccgacag gatggtgacc accatttgcc 3120
 ccataacacc gtcggtactg atcccgtcgt caataaacgc aaccgctaca ccctgagcat 3180
 caaactcttt tatcagttgg atcatgtcgg cgggtgtcgc gccaaagacg tcgagcttct 3240
 tcaccagaat gacatcacct tcttccacct tcatectcag caaatccagc ctttcccgat 3300
 ctgttgaact gccggatgcc ttgtcggtaa agatgcggtt agcttttacc cctgcatctt 3360
 tgagcgctga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttgcgtac tcataccagg cctgaatcgc 3420
 cccatcatcc agccagaaaag tgaggagacc acggttgatg agagctttgt tgtaggtgga 3480
 ccagttgggtg attttgaact tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg 3540
 cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc gccgtcccgt 3600
 caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac 3660
 tcacgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 3720
 tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca 3780
 agatcctggg atcggctcgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 3840

ccctcgtcaa aaataagggtt atcaagttag aaatcacat gagtgacgac tgaatccggt 3900
 gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc 3960
 tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 4020
 agacgaaata cgcgatcgcgt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 4080
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata 4140
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgcga gtggtgagta accatgcatc atcaggagta 4200
 cggataaaat gcttgatggg cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 4260
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cttttgcat gtttcagaaa caactctggc 4320
 gcatcgggct tcccatataa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgc attatcgca 4380
 gcccatattat accatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg cctcgagcaa 4440
 gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac 4500
 agttttattg ttcatgatga tatattttta tcttgtagca tgtaacatca gagattttga 4560
 gacacaacgt ggctttgtg aataaatcga acttttctg agttgaagga tcagatcacg 4620
 catcttcccg acaacgcaga ccgttccgtg gcaagcaaa agttcaaat caccaactgg 4680
 tccacctaca acaaagctct catcaaccgt ggtccctca ctttctggct ggatgatggg 4740
 gcgattcagg cctggatga gtcagcaaca cttcttcac gaggcagacc tcagcgctag 4800
 cggagtgtat actggcttac tatgttgga ctgatgagg tgctcagtga gtgcttcag 4860
 tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgcg tcagcagaat atgtgataca ggatatattc 4920
 cgcttctcgc ctactgact cgctacgctc ggtcgttcga ctgcggcgag cggaaatggc 4980
 ttacgaacgg ggcgagatt tcctggaaga tgccaggaag atacttaaca gggaagttag 5040
 agggccgcgg caaagccgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc 5100
 tgacgctcaa atcagtggg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 5160
 cctggcggct ccctcgtgcg ctctcctgtt cctgccttc ggtttaccgg tgtcattccg 5220
 ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg 5280
 ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtc gaccgctgcg ctttatccgg 5340
 taactatcgt cttgagtcca acccggaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac 5400
 tggtaattga tttagaggag ttagtcttga agtcatgcgc cggttaaggc taaactgaaa 5460
 ggacaagttt tggtagctgc gtcctccaa gccagttacc tcggttcaaa gagttgtag 5520
 ctacagagaa cttcgaaaaa ccgccctgca aggcggtttt ttcgttttca gagcaagaga 5580
 ttacgcgcag accaaaaacga tctcaagaag atcatcttat taaggggtct gacgctcagt 5640
 ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 5700
 agatcccttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct 5760
 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagt aggcacctat ctacgcgac tgtctatttc 5820
 gttcatccat agttgcctga ctccccgtc gtagataac tacgatacgg gagggcttac 5880
 catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctaccggct ccagatttat 5940
 cagcaataaa ccagccagcc ggaaggggcg agcgcagaag tggctctgca actttatccg 6000
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 6060
 gtttgcgcaa cgttgttgc attgtgcag gtcgacctg cgccgttccc agtgaaggc 6120
 cgacaatgtc gcccttcagg aggtcaagat cgacggtcag accgttcgca tcccacgccg 6180

```

tctggttaag gcagcacagc tcggtctcgt ggacgtagag cagttctaaa ccttaaattc 6240
atcgccctaca accttttgta ggtaagaatt taacaagagc cagttatctt ctcttaaaat 6300
gaggaggtaa ctggcttctt tatgcttaag aggtgttagc ataagtgaat tatgttccaa 6360
cgcggtggacg tcttaattgg gaggaagtct gtcacggact ggaagacgaa aagggtatcg 6420
atgaaaaattt tagttgttga tgacgagcaa gctgtacgtg actccttgcg acgttccctt 6480
tcgttcaacg gatacaacgt tgttctcgca gaagacggca tccaagcact agagatgatt 6540
gacaaggaac agcctgcttt ggtgatcctc gatgtcatga tgcctggtat ggacggactt 6600
gaggtctgtc gccaccttcg cagcgaaggc gatgatcggc caattcttat tcttactgcc 6660
cgcgataatg tttctgatcg tgttggtggc ctcgatgcag gcgcagatga ctatttggct 6720
aaaccatttg ctcttgaaga gctgttggcg cgcgctcggt cactggtgcg tcgctctgca 6780
gtggaatcaa atcagagttc cagcattgaa caggctctat tatcttgttg cgatttgacg 6840
cttgacccag aaagtcgaga tgtctaccgc aacggacgcg ccatcagcct tactcgaaca 6900
gagttcgcg tcctgcaatt gctcctcaaa aaccaaagga aagtgtcac tcgcgcccg 6960
attttggaag aggtatgggg ctgcgatttc ccaacttcag gcaatgcctt cgaggtctac 7020
attggatacc ttcgacgcaa gactgaattg gaaggagaag accgcctgat ccatacagta 7080
cgaggagtcg gatacgtcct gcgagagacc gctccgtgac attaaggcga atcggcgcag 7140
gggaaaatgg gcctgcccc accgaaagtg atgactccga cggttcaatg tcgttgcggt 7200
ggcgcttggc tttgctgagc gccactttgg tagctttcgc cgttggtgtt attactgttg 7260
ctgcatattg gtctgtctcc agctatgtca ccaactcaat cgatcgtgat ctgaaaaaac 7320
aagcggatgc aatgcttga cgagccagt aagcgggatt ctatgcaacc gcagaaaccg 7380
aaattgctct gttaggtgaa tatgccagt acactcgaat cgcttaate ccacctgggt 7440
gggaatacgt catcggtgaa tccatatcac tgctgatc agatttcctt aagagtaaag 7500
aagcggggaa acagatcctc gtaacaagt ctgagcgcat tctcatgaaa cgagatagct 7560
cgggcacagt ggtggttttt gctaaagata tgggtggata cgatcggcag ctcacggtgc 7620
ttggcgctcat tctcttgatc attggcggca gtgggtgttt ggcgctcgatt ctgcttggtt 7680
tcatcattgc gaaggagggg ctgaaaccac tgtcaaagct gcagcgtgcc gtcgaagaga 7740
tcgaacgaac tgatgagctt cgtgcgattc ccgtggtggg aatgatgag ttcgctaagt 7800
tgactcgtag tttcaatgac atgtcaagg cactgcggga gtctcgtag cggaatctc 7860
agttggtggc agatgcagga cacgagctga aaactccact gacctcaatg cggacaaata 7920
ttgaattgct gttgatggca accaacagt gaggatcggg aatccccaag gaagaattgg 7980
atggccttca gcgtgatgta ttggcgcaga tgaccgaaat gtctgatttg attggtgatc 8040
ttgttgatct tgcgcgtgaa gaaaccgccg aaacgtcaag cattgtagat ctcaaccaag 8100
tgttggaaat tgcgcttgac cgaatggaaa gccgtcgcat gacggtgcgg atagatgttt 8160
ccgagactgt ggattggaaa ctgctgggag atgatttttc cttaccagg gcattagtaa 8220
atgttttgga taatgccatt aaatggtcgc ctgagaatgg cattgttcca gtgtcgatgt 8280
cacagatcga caaagcaacg gtccgcattg ttattgatga ttcagggcct ggaattgctg 8340
aaaaagaacg aggattagtt ttggaacggt tctatcgcg cgtcagctcc cgttccatgc 8400
cgggatcggg attaggtctt gccatcgtga atcaggttgt gaatcgcat ggtggccaac 8460
tcgttggtggg tgaatcagat gatggcgga cgagaatcac tattgatttg ccagggaac 8520

```

ccattcgcag cgggttcgaa aatgtcgatg attaaaccac taaagagctc acaggaagtg 8580
 ttcagactac ttagagtac gccccagcca cagggttcat aatcaaata tgacaaatca 8640
 attccccaca aacaacggtg agaaccggga ccgtgcatcg gaaactccat cagaaaccaa 8700
 ctccggtacc tgaacttta gaaggagata tcatatgggtg agcaagggcg aggagctggt 8760
 caccgggggtg gtgcccattc tggtcgagct ggacggcgac gtaaaccggc acaagttcag 8820
 cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg 8880
 caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccttcg gctacggcct 8940
 gcagtgttc gcccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgcat 9000
 gcccgaggc tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca actacaagac 9060
 ccgcccagag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaaggcat 9120
 caacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gactacaact acaacagcca 9180
 caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg 9240
 ccacaacatc gagggcgga gcgtgcagct cgcgaccac taccagcaga acaccccat 9300
 cggcgacggc cccgtgctgc tgcccagaaa ccaactactg agtaccagt ccgccctgag 9360
 caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gatttcgtga ccgccgccg 9420
 gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtaataagga tcc 9463

<210> 40

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer AmyA-BamHI-f

<400> 40

cgcgatcca aggagaatga cgatgagaaa acgtaaaaat ggattaatc 49

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer AmyA-SacI-r

<400> 41

gcggagctct aattatttac ccatatagat acagaccac 40

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer 0998up-f

<400> 42

gaagaaaccg ccgaaacgtc aagc 24

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer 0998up-r

<400> 43

cgatgcacgg tccgggttct c 21

<210> 44

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer 0998dw-f

<400> 44

gtttaaaaga gttaatctgc atctaataca gtagcc 36

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer 0998dw-r

<400> 45

gccatcacga attgccgaac gag 23

<210> 46

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer eyfp-ol-f

<400> 46

gagaacccgg accgtgcatc gtagaagaag gagatatcat atgg 44

<210> 47

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer eyfp-ol-r

<400> 47

gcagattaac tcttttaaac ttattacttg tacagctcgt ccatgccg 48

<210> 48

<211> 5722

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmid pK19

<400> 48

attaggcacc ccaggttita cactttatgc ttccggetcg tatgttgtgt ggaattgtga 60
 gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag cttgcatgcc 120
 tgcaggctga ctctagagga tccccgggta ccgagctcga attcactggc cgtcgtttta 180
 caacgtcgtg actgggaaaa ccttggegtt acccaactta atcgcccttc agcacatccc 240
 cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg 300
 cgcagcctga atggcgaaatg gcgcgataag ctagcttcac gctgccgcaa gcaactcagg 360
 cgcaagggct gctaaaggaa gcggaacacg tagaaagcca gtccgcagaa acgggtgctga 420
 ccccgatga atgtcagcta ctgggctatc tggacaaggg aaaacgcaag cgcaaagaga 480
 aagcaggtag cttgcagtgg gcttacatgg ctagacttag actgggcggt tttatggaca 540
 gcaagcgaac cggaattgcc agctggggcg ccctctggta aggttgggaa gccctgcaa 600
 gtaactgga tggctttctt gccgccaagg atctgatggc gcaggggatc aagatctgat 660
 caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct 720
 ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggtcgc 780
 tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggccc cggttctttt tgtcaagacc 840
 gacctgtccg gtgccctgaa tgaactccaa gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc 900
 acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg 960
 ctgctatttg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcaccttgc tcctgccgag 1020
 aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc 1080
 ccattcgacc accaagcgaa acatcgcac gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt 1140
 cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc 1200
 gccaggtcga aggcgcggat gcccgcggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc 1260
 tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg 1320
 ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggtta cccgtgatat tgctgaagag 1380
 cttggcgggc aatgggctga ccgttctc gtgttttacg gtatcgccgc tcccgattcg 1440
 cagcgcacgc cttctatcg cttcttgac gagttctct gagcgggact ctgggggttcg 1500
 ctagaggatc gatccttttt aacccatcac atatacctgc cgttcactat tatttagtga 1560
 aatgagatat tatgatattt tctgaattgt gattaaaaag gcaactttat gcccatgcaa 1620
 cagaaactat aaaaaataca gagaatgaaa agaaacagat agatttttta gttctttagg 1680
 cccgtagtct gcaaatecct ttatgatttt ctatcaaaca aaagaggaaa atagaccagt 1740
 tgcaatccaa acgagagtct aatagaatga ggtcgaaaag taaatcgcgc gggtttggtta 1800

ctgataaagc aggcaagacc taaaatgtgt aaagggcaaa gtgtatactt tggcgtcacc 1860
 ccttacatat tttaggctctt tttttattgt gcgtaactaa cttgccatct tcaaacagga 1920
 gggctggaag aagcagaccg ctaacacagt acataaaaaa ggagacatga acgatgaaca 1980
 tcaaaaagtt tgcaaaacaa gcaacagtat taacctttac taccgcactg ctggcaggag 2040
 gcgcaactca agcgtttgcg aaagaaacga accaaaagcc atataaggaa acatacggca 2100
 tttcccatat tacacgccat gatatgctgc aaatccctga acagcaaaaa aatgaaaaat 2160
 atcaagtttc tgaatttgat tcgtccacaa ttaaaaatat ctcttctgca aaaggcctgg 2220
 acgtttggga cagctggcca ttacaaaacg ctgacggcac tgtcgcaaac tatcacggct 2280
 accacatcgt ctttgcatga gccggagatc ctaaaaatgc ggatgacaca tcgatttaca 2340
 tgttctatca aaaagtcggc gaaacttcta ttgacagctg gaaaaacgct ggccgcgtct 2400
 ttaaagacag cgacaaatc gatgcaaatg attctatctt aaaagacca acacaagaat 2460
 ggtcaggttc agccacattt acatctgacg gaaaaatccg tttattctac actgatttct 2520
 ccggtaaaca ttacggcaaa caaacactga caactgcaca agttaacgta tcagcatcag 2580
 acagctcttt gaacatcaac ggtgtagagg attataaatc aatctttgac ggtgacggaa 2640
 aaacgtatca aaatgtacag cagttcatcg atgaaggcaa ctacagctca ggcgacaacc 2700
 atacgtgag agatcctcac tacgtagaag ataaaggcca caaatactta gtatttgaag 2760
 caaacactgg aactgaagat ggctaccaag gcgaagaatc tttatttaac aaagcatact 2820
 atggcaaaaag cacatcattc ttccgtcaag aaagtcaaaa acttctgcaa agcgataaaa 2880
 aacgcacggc tgagttagca aacggcgctc tcggtatgat tgagctaaac gatgattaca 2940
 cactgaaaaa agtgatgaaa ccgctgattg catctaacac agtaacagat gaaattgaac 3000
 gcgcgaacgt ctttaaaatg aacggcaaat ggtacctgtt cactgactcc cgcggatcaa 3060
 aaatgacgat tgacggcatt acgtctaacg atatttacat gcttggttat gtttctaatt 3120
 ctttaactgg ccatacaag ccgctgaaca aaactggcct tgtgttaaaa atggatcttg 3180
 atcctaacga tgtaaccttt acttactcac acttcgctgt acctcaagcg aaaggaaaca 3240
 atgtcgtgat tacaagctat atgacaaaca gaggattcta cgcagacaaa caatcaacgt 3300
 ttgcgccgag cttcctgctg aacatcaaag gcaagaaaac atctgttgct aaagacagca 3360
 tccttgaaca aggacaatta acagttaaca aataaaaacg caaaagaaaa tgccgatggg 3420
 taccgagcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 3480
 ccgccgcctt ctatgaaaag ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ctgcgggacg 3540
 tgctcatagt ccacgacgcc cgtgattttg tagccctggc cgacggccag caggtaggcc 3600
 gacaggctca tgccggccgc cgccgccttt tectcaatcg ctcttcgttc gtctggaagg 3660
 cagtacacct tgataggtgg gctgcccttc ctggttggtt tggtttcate agccatccgc 3720
 ttgccctcat ctgttacgcc ggcggtagcc ggccagcctc gcagagcagg attcccgttg 3780
 agcaccgcca ggtgcgaata agggacagtg aagaaggaa acccgctcgc ggggtgggcct 3840
 acttcaccta tcctgccccg ctgacgccgt tggatacacc aaggaaagtc tacacgaacc 3900
 ctttgcaaaa atcctgtata tcgtgcgaaa aaggatggat ataccgaaaa aatcgctata 3960
 atgaccccgga agcagggtta tgcagcgga aagcgtgct tccctgctgt tttgtggaat 4020
 atctaccgac tggaaacagg caaatgcagg aaattactga actgagggga caggcgagag 4080
 acgatgcaaa agagctcctg aaaatctcga taactcaaaa aatacgcccc gtagtgatct 4140

tatttcatta tgggtgaaagt tggaacctct tacgtgccga tcaacgtctc attttcgcca 4200
 aaagttggcc cagggtctcc cggatatcaac agggacacca ggatttattt attctgcgaa 4260
 gtgatcttcc gtcacaggta tttattcggc gcaaagtgcg tcgggtgatg ctgccaaactt 4320
 actgatttag tgtatgatgg tgtttttgag gtgctccagt ggcttctgtt tctatcagct 4380
 cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatacgc cccggtagtg atcttatttc attatggtga 4440
 aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt ggcccagggc 4500
 ttcccgggtat caacagggac accaggattt atttattctg cgaagtgatc ttccgtcaca 4560
 ggtattttatt cggcgcaaaag tgcgtcgggt gatgctgccg acttactgat ttagtgtatg 4620
 atgggtgtttt tgagggtgctc cagtggcttc tgtttctatc agggctggat gatcctccag 4680
 cgcgggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cccccaaaa ggatctaggt gaagatcctt 4740
 tttgataatc tcatgacca aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 4800
 cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 4860
 ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca 4920
 actctttttc cgaaggtaac tggttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta 4980
 gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt 5040
 ctgctaatacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 5100
 gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 5160
 acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcat 5220
 tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 5280
 gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 5340
 cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg 5400
 cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcttggc cttttgctgg 5460
 ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc 5520
 gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagt 5580
 agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt 5640
 cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca 5700
 attaattgta gttagctcac tc 5722

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer M13uni (-43)

<400> 49

agggttttcc cagtcacgac gtt 23

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer M13rev (-49)

<400> 50

gagcggataa caatttcaca cagg 24

<210> 51

<211> 7666

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmid pK19-pSen0996_8e

<400> 51

cgataagcta gcttcacgct gccgcaagca ctcagggcgc aagggtgct aaaggaagcg 60
 gaacacgtag aaagccagtc cgcagaaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg 120
 ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct 180
 tacatggcga tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccage 240
 tggggcgccc tctggttaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc 300
 gccaaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcggt 360
 tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 420
 attcggtat gactgggcac aacagacaat cggtctctct gatgcccgcc tgttccggct 480
 gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga 540
 actccaagac gaggcagcgc ggctatctg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcage 600
 tgtgtctgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg 660
 gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 720
 aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc aagcgaaaca 780
 tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga 840
 cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcggatgcc 900
 cgacggcgag gatctcgtcg tgacctatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga 960
 aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca 1020
 ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg 1080
 cttcctcgtg ctttacggta tcgccgtcc cgattcgcag cgcategcct tctatgcct 1140
 tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcta gaggatcgat cttttttaac 1200
 ccatcacata tacctgccgt tcaactattat ttagtgaaat gagatattat gatattttct 1260
 gaattgtgat taaaaaggca actttatgcc catgcaacag aaactataaa aaatacagag 1320
 aatgaaaaga aacagataga ttttttagtt ctttaggccc gtagtctgca aatcctttta 1380
 tgattttcta tcaaacaaaa gaggaataa gaccagttgc aatccaaacg agagtctaat 1440
 agaatgaggt cgaaaagtaa atcgcgcggg tttgttactg ataaagcagg caagacctaa 1500
 aatgtgtaaa gggcaaagt tatactttgg cgtcaccct tacatat tttt aggtcttttt 1560
 ttattgtgcg taactaactt gccatcttca aacaggagg ctggaagaag cagaccgcta 1620
 acacagtaca taaaaaagga gacatgaac atgaacatca aaaagtttgc aaaacaagca 1680

acagtattaa cctttactac cgcactgctg gcaggaggcg caactcaagc gtttgcgaaa 1740
 gaaacgaacc aaaagccata taaggaaaca tacggcattt cccatattac acgccatgat 1800
 atgctgcaaa tccctgaaca gcaaaaaaat gaaaaatata aagtttctga atttgattcg 1860
 tccacaatta aaaatatctc ttctgcaaaa ggcctggacg tttgggacag ctggccatta 1920
 caaaacgctg acggcactgt cgcaaaactat cacggctacc acatcgtctt tgcattagcc 1980
 ggagatccta aaaatgcgga tgacacatcg atttacatgt tctatcaaaa agtcggcgaa 2040
 acttctattg acagctggaa aaacgctggc cgcgtcttta aagacagcga caaattcgat 2100
 gcaaatgatt ctatcctaaa agaccaaaaca caagaatggt caggttcagc cacatttaca 2160
 tctgacggaa aaatccgttt attctacact gatttctccg gtaaacatta cggcaaaaaa 2220
 acactgacaa ctgcacaagt taacgtatca gcatcagaca gctctttgaa catcaacggt 2280
 gtagaggatt ataaatcaat ctttgacggg gacggaaaaa cgtatcaaaa tgtacagcag 2340
 ttcatcgatg aaggcaacta cagctcaggc gacaaccata cgctgagaga tcttcactac 2400
 gtagaagata aaggccacaa ataactagta ttgaagcaa aacttggaac tgaagatggc 2460
 taccaaggcg aagaatcttt atttaacaaa gcatactatg gcaaaagcac atcattcttc 2520
 cgtcaagaaa gtcaaaaact tctgcaaagc gataaaaaac gcacggctga gttagcaaac 2580
 ggcgtctctg gtatgattga gctaaacgat gattacacac tgaaaaaagt gatgaaaccg 2640
 ctgattgcat ctaacacagt aacagatgaa attgaacgag cgaacgtctt taaaatgaac 2700
 ggcaaatggt acctgttcac tgactcccg cggatcaaaaa tgacgattga cggcattacg 2760
 tctaagata ttacatgct tggttatgtt tctaattctt taactggccc atacaagccg 2820
 ctgaacaaaa ctggccttgt gttaaaaaat gatcttgatc ctaacgatgt aacctttact 2880
 tactcacact tcgctgtacc tcaagcgaaa ggaaacaatg tcgtgattac aagctatatg 2940
 acaaacagag gattctacgc agacaaacaa tcaacgtttg cgccgagctt cctgctgaac 3000
 atcaaaggca agaaaacatc tgttgtcaaa gacagcatcc ttgaacaagg acaattaaca 3060
 gttaacaaat aaaaacgcaa aagaaaatgc cgatgggtac cgagcgaaat gaccgaccaa 3120
 gcgacgccc acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg 3180
 ggcttcggaa tcgttttccg ggacgcctc gcggacgtgc tcatagtcca cgacgcccgt 3240
 gattttgtag ccctggccga cggccagcag gtaggccgac aggctcatgc cggccgcccgc 3300
 cgcttttcc tcaatcgctc ttcgttcgtc tggaaggcag tacacctga taggtgggct 3360
 gcccttcctg gttggcttgg ttcatcagc catccgctt ccctcatctg ttacgccggc 3420
 ggtagccggc cagcctcgca gagcaggatt cccgttgagc accgccagggt gcgaataagg 3480
 gacagtgaag aaggaacacc cgctcgcggg tgggectact tcacctatcc tgccccgctg 3540
 acgccgttgg atacaccaag gaaagtctac acgaaccctt tggcaaaatc ctgtatatcg 3600
 tgcgaaaaag gatggatata ccgaaaaaat cgctataatg accccgaagc agggttatgc 3660
 agcgaaaaag cgctgcttcc ctgctgtttt gtggaatata taccgactgg aaacaggcaa 3720
 atgcaggaaa ttactgaact gaggggacag gcgagagacg atgccaaaga gctcctgaaa 3780
 atctcgataa ctcaaaaaat acgcccggta gtgatcttat ttcattatgg tgaaagttgg 3840
 aacctcttac gtgccgatca acgtctcatt ttcgcaaaa gttggcccag ggcttcccgg 3900
 tatcaacagg gacaccagga tttatttatt ctgcgaagt atcttccgtc acaggtatct 3960
 attcggcgca aagtgcgtcg ggtgatgctg ccaacttact gatttagtgt atgatggtgt 4020

```

ttttgagggtg ctccagtggc ttctgtttct atcagctcct gaaaatctcg ataactcaaa 4080
aaatacgccc ggtagtgatc ttatttcatt atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg 4140
atcaacgtct catthttcgcc aaaagttggc ccagggttc cgggtatcaa caggacacc 4200
aggatttatt tattctgcga agtgatcttc cgtcacaggt atttattcgg cgcaaagtgc 4260
gtcgggtgat gctgccaact tactgattta gtgtatgatg gtgtttttga ggtgctccag 4320
tggtttctgt ttctatcagg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt 4380
cttcgcccac cccaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacccaaat 4440
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 4500
ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 4560
accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 4620
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca 4680
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc 4740
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 4800
taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttctgtcaca cagcccagct tggagcgaac 4860
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccg 4920
aggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 4980
ggagcttcca gggggaaaac cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg 5040
acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag 5100
caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgtggcct tttgtcaca tgttttttc 5160
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 5220
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgccc 5280
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag 5340
gtttcccgac tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctactca 5400
ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag 5460
cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc ttgcatgcct 5520
gcaggtcgac tctagaggat ccccgaagaa accgccgaaa cgtcaagcat tgtagatctc 5580
aaccaagtgt tggaaattgc gcttgaccga atggaaagcc gtcgcatgac ggtgcgata 5640
gatgtttccg agactgtgga ttggaaactg ctgggcgatg atttttcctt aaccagggca 5700
ttagtaaatg ttttgataa tgccattaaa tggctgcctg agaatggcat tgttcgagtg 5760
tcgatgtcac agatcgacaa agcaacggtc cgcattgta ttgatgattc agggcctgga 5820
attgctgaaa aagaacgagg attagttttg gaacggttct atcgcgccgt cagctcccgt 5880
tccatgccgg gatcgggatt aggtcttggc atcgtgaatc aggttgtgaa tcggcatggt 5940
ggccaactcg ttgtgggtga atcagatgat ggcggaacga gaatcactat tgatttgcca 6000
ggggaacca ttcgcagcgg gttcgaaaat gtcgatgatt aaaccactaa agagctcaca 6060
ggaagtgttc agactactta gagtgacgcc ccagccacag ggttcataat caaatcatga 6120
caaatcaatt cccacaaaac aacggtgaga acccgaccg tgcacgtag aagaaggaga 6180
tatcatatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tgggtcccat cctggtcgag 6240
ctggacggcg acgtaaagcg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 6300
acctacggca agctgaccct gaagtctatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccttg 6360

```

cccaccctcg tgaccacctt cggctacggc ctgcagtget tcgcccgeta ccccgaccac 6420
 atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 6480
 atctttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 6540
 accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcaacttca aggaggacgg caacatcctg 6600
 gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 6660
 aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgagggcgg cagcgtgcag 6720
 ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgccccgac 6780
 aaccactacc tgagctacca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac 6840
 atggctcctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 6900
 aagtaataag tttaaaagag ttaatctgca tctaataag tagccaagta tgagtgagga 6960
 acaatgagca aggatccatt gggaagtctt accgatgttg tagacacacg agttccgctt 7020
 ccggatgttg aaccggatcc ggagtctctg aaggctacgg aaaaagaatt ccacatggca 7080
 tcccagaagc gcgtcttctg tgtcctggtg ggcgatcatg tcgctgaggc agatgggact 7140
 ggccgttttg ttacggagct gctcttagag tctggettca acgtggacgc tgtggtcagc 7200
 gtgaagtcta agaagtctca gattaggcaa gctattgaaa ccgcagttgt tggcggcgct 7260
 gaccttgtgc tgaccatcgg cggagtgggc gttggtcctc gggataaaac tcctgaggca 7320
 accagcgctg tgttggacca ggacgtccca ggaatcgcg aggcgcttcg ttctccggt 7380
 ttggcctgtg gcgcggtgga tgcaagtgtt tcccgaggcg tagcgggcgt atccggtca 7440
 accgtggtgg tcaacctcgc tgagtctcgt tcggcaattc gtgatggcgg gtaccgagct 7500
 cgaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttacceaac 7560
 ttaatcgctt tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gagggcccga 7620
 ccgacgcgcc ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcg 7666

<210> 52

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> NprE signal sequence

<400> 52

Met Gly Leu Gly Lys Lys Leu Ser Val Ala Val Ala Ala Ser Phe Met

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Ser Leu Pro Gly Val Gln Ala

20 25

<210> 53

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Ywmc signal sequence

<400> 53

Met Lys Lys Arg Phe Ser Leu Ile Met Met Thr Gly Leu Leu Phe Gly

1

5

10

15

Leu Thr Ser Pro Ala Phe Ala

20

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer pEKEx2-fw

<400> 54

ctcgataaat gtgtggaatt g 21

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer pEKEx2-rv

<400> 55

cagaccgctt ctgcgttc 18

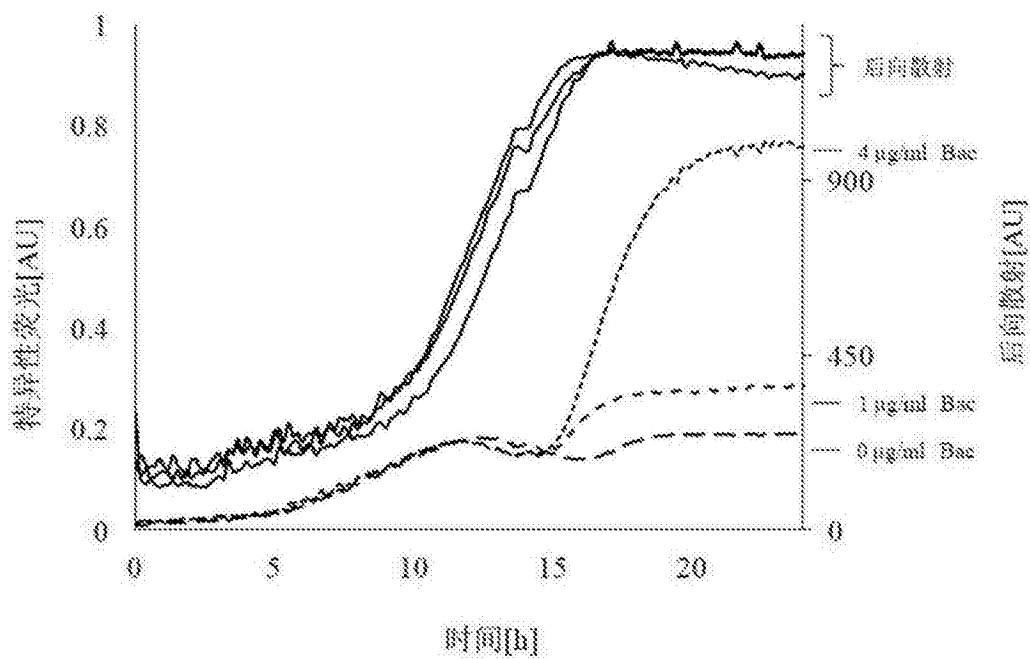


图1

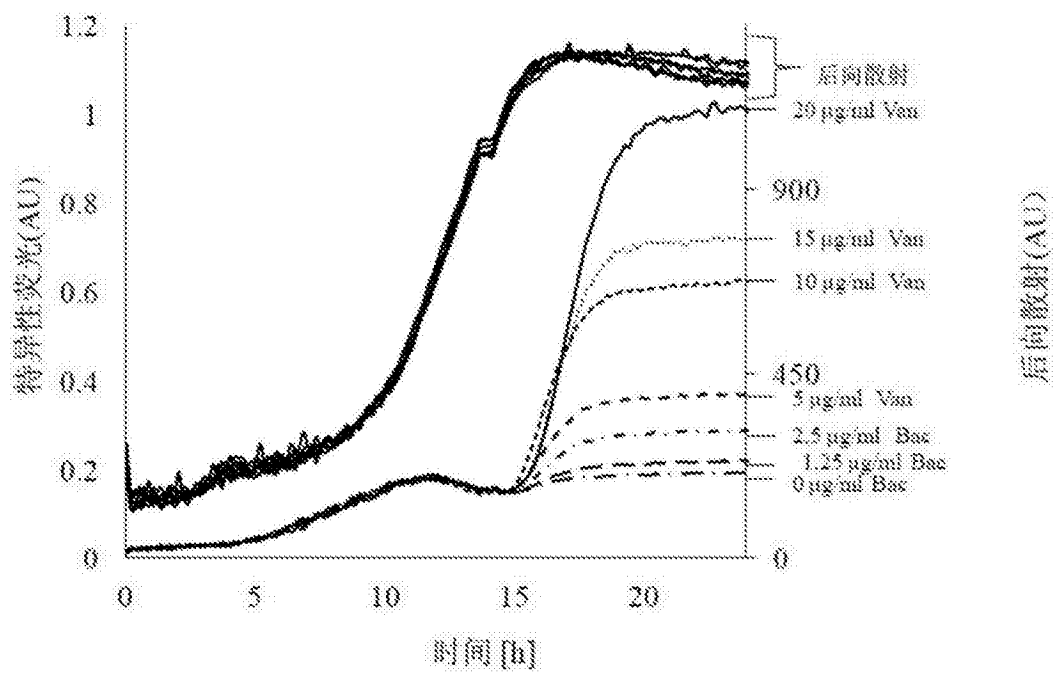


图2

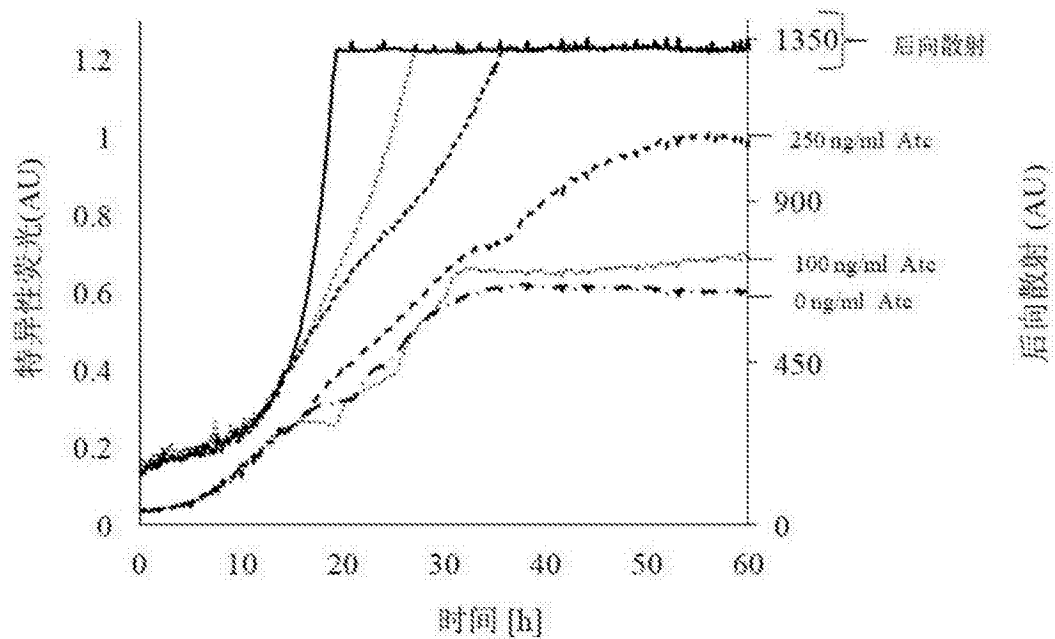


图3

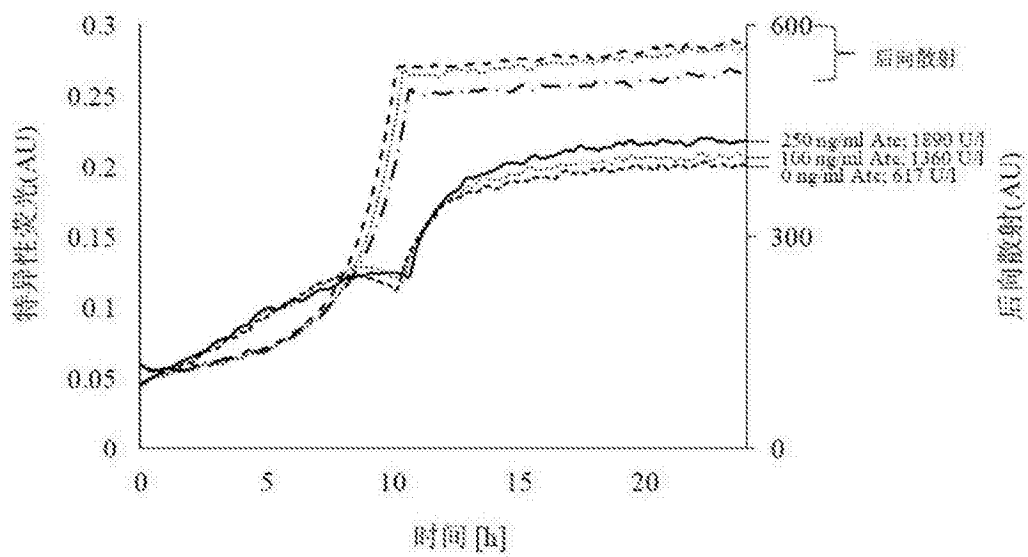


图4

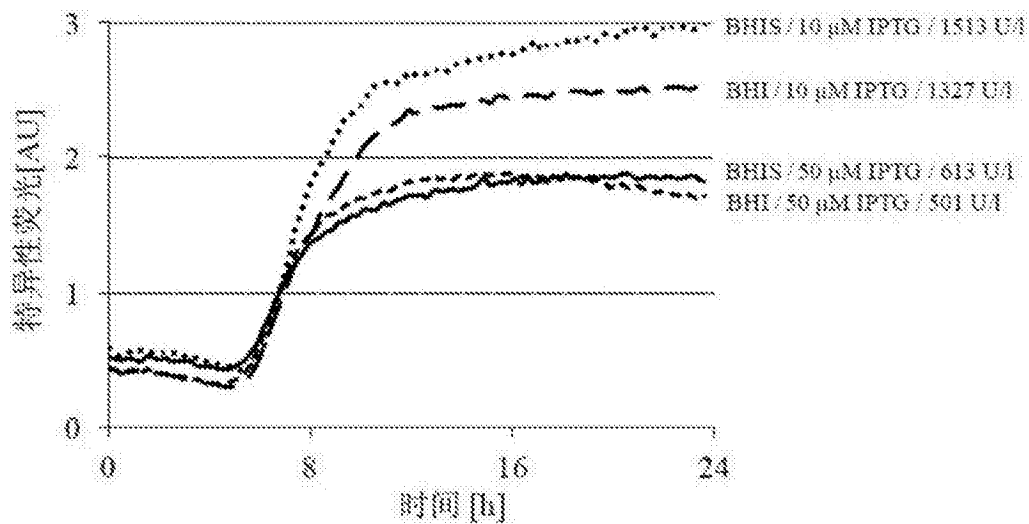


图5

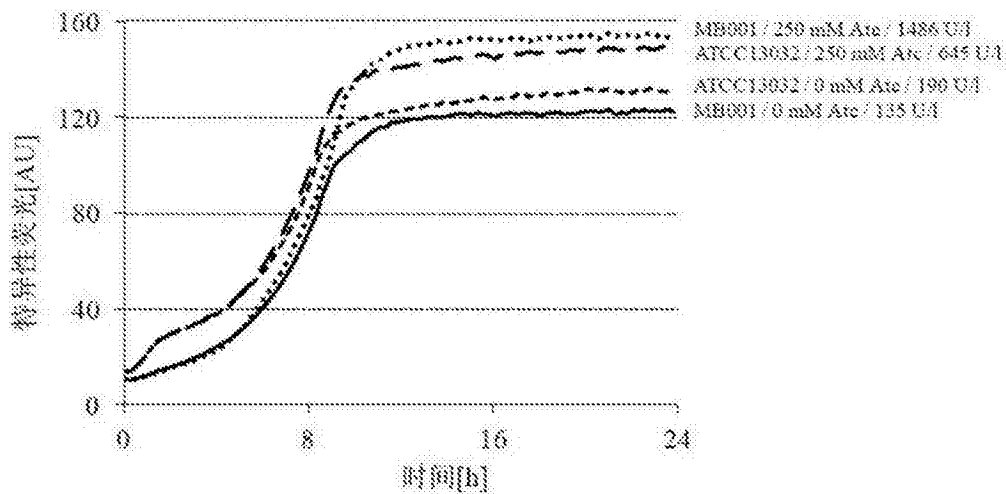


图6

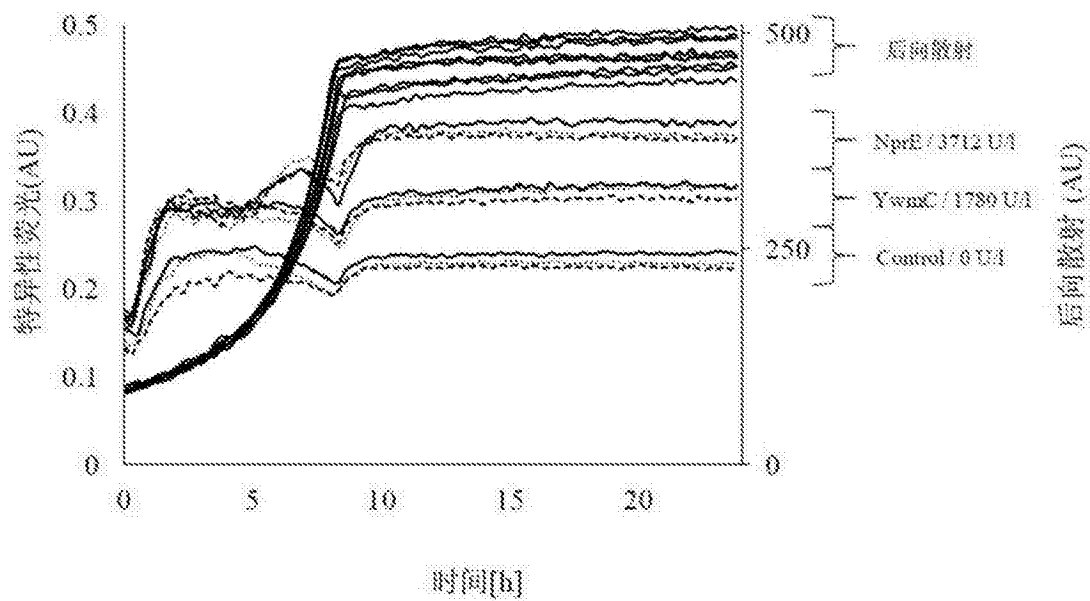


图7

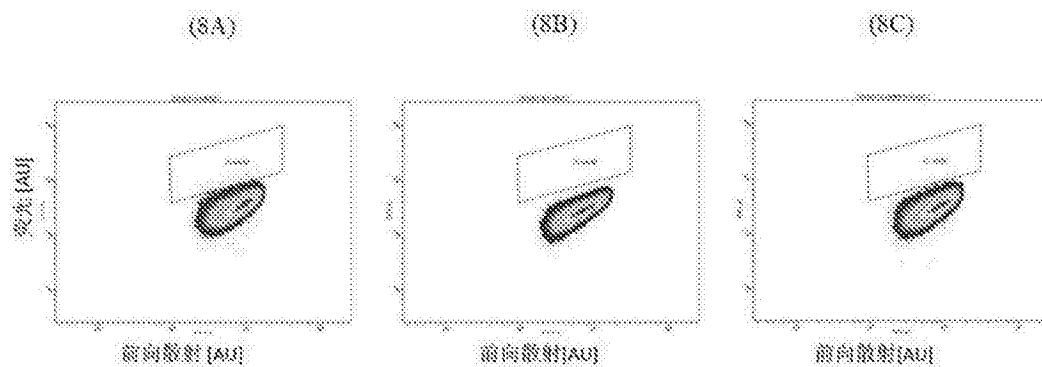


图8