



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102120971 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 201010576835. 3

(22) 申请日 2010. 12. 02

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 4320 2010. 11. 10

(71) 申请人 天津工业生物技术研究所

地址 300308 天津市空港经济区西七道 32 号

(72) 发明人 徐健勇 宋诒 谭明 郑雯 李丽

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12N 9/44(2006. 01)

C12N 15/56(2006. 01)

C12R 1/07(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

序列表 2 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种普鲁兰酶产生菌及其所产生的耐热普鲁兰酶及编码基因

(57) 摘要

本发明描述了一个新分离的普鲁兰酶产生菌, 16S rRNA(SEQ IDNo. 1) 结果分析表明该菌为厌氧芽孢杆菌属(Anoxybacillus sp.), 由该菌所分泌的一种蛋白质, 其序列特征为序列表所示的氨基酸序列, 编码该蛋白的核酸序列为序列表SEQ ID No. 3所示的核苷酸序列, 该蛋白质特异水解普鲁兰糖分子内的 α -1, 6-糖苷键, 生成麦芽三糖, 是一个 I 型普鲁兰酶(Pullulanase), 该酶的最适反应温度为 60°C, 最适 pH 6. 5, 在 60°C、pH 6. 5 条件下 80 小时, 仍具有 50% 以上的活性。

1. 本发明提供了一个普鲁兰酶产生菌,在分类上属于厌氧芽孢杆菌属的一个种,其16S rRNA 的序列特征为序列表 SEQ ID No. 1 所示的核苷酸序列。

2. 本发明提供了一个上述权利要求中提到的产生菌所产生的蛋白质,其序列特征为具有序列表 SEQ IDNo. 2 所示的氨基酸序列,或者将该序列经一个或几个氨基酸残基插入和 / 或缺失和 / 或取代等方式所产生的氨基酸序列。

3. 本发明提供了一个可编码上述权利要求中所述蛋白质的核酸序列。

4. 在上述权利要求中提到的核酸序列,其序列特征具有下述核苷酸序列之一

1) 具有序列表 SEQ ID No. 3 所示的 DNA 序列

2) 编码序列表中 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列的 DNA 序列

3) 在高严谨条件下,可与序列表 SEQ ID No. 3 所限定的 DNA 序列杂交,且编码上述权利要求中所限定的氨基酸序列的核苷酸序列。

5. 权利要求 2 中所述的蛋白质可以特异水解普鲁兰糖、枝链淀粉等的 α -1,6-糖苷键,是一种 I 型普鲁兰酶 (Pullulanase)。

一种普鲁兰酶产生菌及其所产生的耐热普鲁兰酶及编码基因

技术领域

[0001] 本发明公开了一种普鲁兰酶产生菌及其所产生的耐热普鲁兰酶。

[0002] 发明背景

[0003] 自上世纪 70 年代起,酶制剂工业逐渐成为一个重要的产业,目前世界酶制剂总产值达 100 亿美元,我国的产值约为 100 亿人民币。随着应用领域的不断扩大和新酶种的开发,酶制剂市场迅速发展。淀粉水解酶作为第二大类酶制剂,在我国乃至世界上都拥有巨大的应用价值,尤其是近年来随着生物质能源开发的兴起,淀粉已成为生产乙醇的重要原料,淀粉水解相关的酶类显示出更加巨大的市场前景 (Aranoff SL, Pearson DR, Okun DT, Lane CR, Williamson IA and Pinkert DA. Industrial biotechnology :Development and adoption by the U.S. Chemical and biofuel industries. U.S. International Trade Commission. Washington, DC.)

[0004] 淀粉酶的研究已经有很长的历史,开发相对也比较完善,在淀粉加工中扮演了重要的角色,但是常用的淀粉酶难作用于淀粉中的 α -1,6 分支,限制了淀粉的水解效率 [3]。普鲁兰酶 (Pullulanase, EC. 3. 2. 1. 41), 又称去分枝酶,可以特异地水解普鲁兰糖、枝链淀粉等各种分枝多糖分子内的 α -1,6-糖苷键,生成相应的麦芽三糖和直链多糖,与糖化酶协同使用,能够显著提高淀粉的水解程度和利用率。在淀粉加工中,普鲁兰酶与糖化酶合用,不仅降低糖化酶的用量一半以上,而且可提高淀粉的转化率,大大降低了生产成本 (Deweer, Philippe, Amory, Antoine. Pullulanase producing microorganisms. (Oct. 6, 1998) US Patent, 5817498)。与淀粉酶相比,国际上有关普鲁兰酶的研究较少,从 1961 年 Bender 和 Wallenfels 率先从 *Klebsiella pneumoniae* 发现普鲁兰酶 (Hustedt, H., K. H. Kroner, W. Stach & M. R. Kula, (1978) Procedure for the simultaneous large-scale isolation of pullulanase and 1,4- α -glucan phosphorylase from *Klebsiella pneumoniae* involving liquid-liquid separations. *Biotechnol Bioeng* 20 :1989-2005), 一直到 1979 年,普鲁兰酶的研究一直停留在产酶微生物的发现和酶学鉴定上 (Mercier, C., B. M. Frantz & W. J. Whelan, (1972) An improved purification of cell-bound pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Eur J Biochem* 26 :1-9; Nakamura, N., K. Watanabe & K. Horikoshi, (1975) Purification and some properties of alkaline pullulanase from a strain of *Bacillus* no. 202-1, an alkalophilic microorganism. *Biochim Biophys Acta* 397 :188-193)。上世纪八十年代初,丹麦 Novo 公司分离到可分解普鲁兰多糖的嗜酸性芽孢杆菌 (*Bacillus acidopullulyticus*), 其产生的普鲁兰酶具有耐热耐酸 (60 °C, pH 4.5) 的性质,比较适合淀粉工业生产的需要 (Stefanova, M. E., R. Schwerdtfeger, G. Antranikian & R. Scandurra, (1999) Heat-stable pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*: characterization and refolding after guanidinium chloride-induced unfolding. *Extremophiles* 3 :147-152)。经过投入巨资开发研究,1983 年在日本和欧洲市场同时商业化销售,商品名为

Promozyme,是如今产量最大、应用最广的普鲁兰酶。1995年杰能科公司利用地衣芽孢杆菌异源表达 *Bacillus deramificans* 的普鲁兰酶,并申请了相关专利 (Modderman, J.P.&H. H.Foley, (1995) Safety evaluation of pullulanase enzyme preparation derived from *Bacilluslicheniformis* containing the pullulanase gene from *Bacillus deramificans*. Regul Toxicol Pharmacol 21 :375-381),其酶学特性与Novo公司相似,从而成为普鲁兰酶第二大生产商。由于淀粉工业需要更高的温度来降低底物粘度、提高反应速率和减少污染,相应地需要具有更高的热稳定性和在高温条件下的高活力的普鲁兰酶,因此近年来的研究几乎全部集中在耐热普鲁兰酶的和高效表达。2008年Gomes等人报道的来自 *Geobacillus thermoleovorans* 的普鲁兰酶由于在85℃半衰期达到3小时,成为淀粉工业关注的一个新热点 (Zouari Ayadi, D., M. Ben Ali, S. Jemli, S. Ben Mabrouk, M. Mezghani, E. Ben Messaoud & S. Bejar, (2008) Heterologous expression, secretion and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* US105 type I pullulanase. Appl Microbiol Biotechnol 78 :473-481)。同时近年来也涌现了一些相关专利 (Philippe D and Antoine A. Pullulanase. (Jun. 1, 1995). US patent 5721127; Brian S.M. and Jayarama K.S. Truncated forms of pullulanase. (Nov. 11, 2008). US Patent 7449320),但是总体上由于研究相对较少,研究菌种单一,获得的普鲁兰酶在热稳定性和酶活力上仍然不能满足淀粉糖化工艺的各项要求。

[0005] 目前,我国在普鲁兰酶的研究上距离欧美国家有很大的差距,工业用普鲁兰酶完全依赖进口,定价权掌握在少数外国公司手中,近乎垄断的市场供应导致了国内普鲁兰酶高昂的销售价格,极大的限制了国内相关产业的发展。因此,开发并大量生产具有自主知识产权的耐热普鲁兰酶对我国淀粉工业以及相关产业的发展,摆脱普鲁兰酶对进口的依赖,具有重要的经济和战略意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种普鲁兰酶产生菌及其所产生的普鲁兰酶及其编码基因。

[0007] 本发明所提供的普鲁兰酶产生菌是分离自云南腾冲地区的栖热菌,为厌氧芽孢杆菌属的一个新菌株 (*Anoxybacillus* sp. LM 18-11)。

[0008] 本发明所提供的普鲁兰酶是具有下述氨基酸序列特征之一的蛋白质:

[0009] 1) 具有列表中的 SEQ ID No. 2 所标示的氨基酸序列。

[0010] 2) 将上述氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基插入和/或缺失和/或取代等方式所产生的新序列。

[0011] 列表 SEQ ID No. 2 所述的蛋白质由 707 氨基酸残基组成,位于 96 ~ 688 位的氨基酸残基序列为典型的 I 型普鲁兰酶结构域,其中 108 ~ 204 位的氨基酸序列为普鲁兰酶 N-terminus 结构域,263 ~ 572 位的氨基酸序列为 α -淀粉酶的催化结构域。

[0012] 上述的蛋白质特异水解 α -1,6-糖苷键,是一种 I 型普鲁兰酶。

[0013] 本发明提供了编码上述普鲁兰酶的基因,是具下列特征之一的核苷酸序列:

[0014] 1) 具有列表 SEQ ID No. 3 所示的 DNA 序列

[0015] 2) 可编码列表中 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列的 DNA 序列

[0016] 3) 在高严谨条件下,可与列表 SEQ ID No. 3 所限定的 DNA 序列杂交,且编码上述

氨基酸序列的核苷酸序列。

[0017] 上述的高严谨条件可为在 $5\times\text{SSC}$, $5\times\text{Denhardt}'\text{S}$ 溶液, 0.05mg/ml 鲑鱼精 DNA, 50% 去离子甲酰胺溶液中, 65°C 下杂交, 然后在室温 $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS, 在 60°C 下 $0.5\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 的溶液中, 洗膜 15 分钟, 各两次。

[0018] 本发明提供的普鲁兰酶可有效水解普鲁兰糖、枝链淀粉等分子内的 $\alpha-1,6$ -糖苷键, 在食品、医药、造纸、洗涤等领域有广阔的应用前景。

附图说明:

[0019] 图 1: 质粒 pET28a::apu1A 物理图谱

[0020] 图 2: 普鲁兰糖水解产物液相色谱图

[0021] A: 葡萄糖标准品液相色谱图, 保留时间约为 4.2 分钟

[0022] B: 麦芽糖标准品液相色谱图, 保留时间约为 5.8 分钟

[0023] C: 麦芽三糖标准品液相色谱图, 保留时间约为 8.1 分钟

[0024] D: 普鲁兰糖经 Apu1A 水解 30 分钟后, 水解产物的液相色谱图

[0025] 图 3: Apu1A 的最适反应温度

[0026] 图 4: Apu1A 的最适 pH

[0027] 具体实施办法

[0028] 除非有特殊说明, 本发明中的实验方法均为常规方法, 具体可参见“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Sambrook and Russell, ed. 2001)。DNA 片段回收采用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司), 按说明书方法操作; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 按说明书方法操作; 限制性内切酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 寡核苷酸引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; DNA 序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

[0029] $25\ \mu\text{l}$ 常规 PCR 反应体系为: $0.1\ \mu\text{g}$ 模板 DNA、 1.5mM MgCl_2 、 20mM Tris-HCl (pH 8.4)、 50mM KCl、 0.2mM dNTP 混合物、 $0.2\ \mu\text{M}$ 正向引物和 $0.2\ \mu\text{M}$ 反向引物, 以及 1U pfu 高保真 DNA 聚合酶 (北京全式金生物技术有限公司)。在 PCR-热循环仪 (Eppendorf, 德国) 中进行 PCR 循环反应。

[0030] 1. 普鲁兰酶产生菌的分离及鉴定:

[0031] 样品采自中国云南腾冲地区轮马温泉下游的淤泥, 采样点位于北纬 $25^\circ 25.357'$ 、东经 $98^\circ 16.442'$ 。实验中, 称取 1g 土样加入 100ml 无菌水, 经充分混匀静置 30 分钟后, 取上清液 1ml , 做适当的梯度稀释, 涂布于 Thermus 固体平板, 置于恒温培养箱 60°C 培养 48 ~ 72 小时。待长出 1mm 左右大小的菌落后, 再分别接种至普鲁兰酶筛选培养基, 60°C 培养 48 小时后, 在平板表面滴加鲁格式碘液, 挑选出其中一株有明显普鲁兰水解圈的菌株进行进一步的分析、鉴定。

[0032] 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取该水解普鲁兰糖菌株的基因组 DNA。合成 16S rRNA 扩增引物: $5' -\text{AGRGTTCGATCMTGGCTCAG}-3'$ 和 $5' -\text{GGCGGWTGTACAAGGC}-3'$, 以上述菌株基因组 DNA 为模板, 按照下列方案进行 PCR 反应, 94°C 预变性 4 分钟后, 再 94°C 变性 30 秒、 55°C 复性 45 秒、 72°C 延伸 1 分钟, 反应 30 个循环, 最后 72°C 10 分钟。扩增得到一个约 1.4kb 的 DNA 片段, 对该 DNA 片段进行序列测定 (SEQ IDNo. 1), 序列分析的结果表明该序列

为 16S rRNA 片段,经 16S rRNA 比对分析,结果显示该菌株为厌氧芽孢杆菌属菌株,将其命名为 *Anoxybacillus* sp. LM 18-11,该菌株现保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(登记号:CGMCC No. 4320,保藏日期:2010 年 11 月 10 日),保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所。

[0033] 上述实验中所用的培养基及试剂组成:

[0034] 1) *Thermus* 培养基 (1000ml): 1g tryptone, 1g yeast extract, 100mg Nitritotriacetic acid, 60mg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100mg $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8mg NaCl, 103mg KNO_3 , 689mg NaNO_3 , 140mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.47mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.2mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5mg H_3BO_3 , 25 μg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 25 μg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 46 μg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.5% agar, pH 7.8。

[0035] 2) 普鲁兰酶筛选培养基 (1000ml): 5g tryptone, 1g yeast extract, 0.7g NaNO_3 , 0.1g Na_2HPO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g CaCl_2 , 5g pullulan, 1.5% agar。

[0036] 3) 鲁格式碘液 (300ml): 1g I_2 , 2g KI

[0037] 2. 厌氧芽孢杆菌普鲁兰酶基因的克隆

[0038] 通过在 Genbank 数据库中检索,获知在厌氧芽孢杆菌属中,菌株 *Anoxybacillus flavithermus* WK1 已完成了全基因组的测序 (Genbank Accession No. CP000922),基因组序列预测分析显示,其中编码一个 I 型的普鲁兰酶,该基因座位被命名为 " Af1v_0438 "。根据 I 型普鲁兰酶保守区进行分析,同时参照该序列,合成普鲁兰酶的保守序列引物: 5' -AGAAGCGGTGGATCCTTAT-3' 和 5' -CATTTCCAACCTCCTGTTC-3', 以 *Anoxybacillus* sp. LM 18-11 基因组 DNA 为模板,按照下列方案进行 PCR 反应,94°C 预变性 4 分钟后,再 94°C 变性 30 秒、50°C 复性 45 秒、72°C 延伸 1 分钟,反应 30 个循环;最后 72°C 10 分钟,扩增得到 0.6kb 的 DNA 片段,并对插入片段进行了测序分析 (SEQ ID No. 3 的 673 ~ 1274bp)。以该片段为基础,采用基因组步移技术 (Genome Walking Kit, 宝生物工程 (大连) 有限公司),最终扩增得到包含一个完整阅读框序列的 DNA 片段,并测序 (SEQ ID No. 3),其中的 140 ~ 2263bp 为编码区,被命名为 *apu1A*。*apu1A* 编码一个由 707 个氨基酸残基组成的蛋白质 (SEQ ID No. 2),被命名为 *Apu1A*。功能分析的结果预测 *Apu1A* 为一个可能的 I 型普鲁兰酶,位于 96 ~ 677 位的氨基酸残基序列为典型的 I 型普鲁兰酶结构域,其中 108 ~ 204 位的氨基酸序列为普鲁兰酶 N-terminus 结构域,261 ~ 571 位的氨基酸序列为 α -淀粉酶的催化结构域。

[0039] 3. *Apu1A* 的酶学功能及活性分析

[0040] 3.1 普鲁兰酶 *Apu1A* 表达载体的构建

[0041] 以 *Anoxybacillus* sp. LM 18-11 基因组 DNA 为模板,合成如下引物: 5' -CCCCAAAACAACAGTCGT 和 5' caactcgagACATTGAATTAATACCCACG,按照下列方案进行 PCR 反应,94°C 预变性 4 分钟后,再 94°C 变性 30 秒、60°C 复性 45 秒、72°C 延伸 2 分钟,反应 30 个循环;最后 72°C 10 分钟,扩增得到 2.1kb 的 DNA 片段,将该片段经 *Xho* I () 酶切回收后,插入到经过 *Nco* I-*Xho* I (*Nco* I 酶切端经 *Klenow* 平滑化处理) 的大肠杆菌表达载体 pET-28a (Novagen 公司) 上,该重组质粒被命名为 pET-28a::*apu1A* (图 1), *apu1A* 的 3' 端融合了 6×His 编码序列,表达产物 *Apu1A* 的 3' 端会带有一个由 6 个组氨酸残基组成的 His-Tag,可方便用于 *Apu1A* 的纯化。

[0042] 3.2 *Apu1A* 的表达及酶活分析

[0043] 将质粒 pET-28a::apu1A 转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) (Novagen 公司), 获得 Apu1A 表达菌株 BL21/apu1A。挑取 BL21/apu1A 单克隆至 LB 液体培养基 (卡那霉素 50mg/L), 经 37°C, 220rpm 过夜培养, 按 1% 的接菌量加入到新鲜的 LB 培养基中, 37°C, 220rpm 培养 2 ~ 3 小时至 OD₆₀₀ 达到 0.6 后, 加入 IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 至终浓度为 0.8mmol/L, 18°C, 160rpm 继续培养 20 小时后, 4°C, 4000rpm 离心 10 分钟收集菌体, 菌体用等体积的 0.02mol/L Tris 缓冲液 (三羟甲基氨基甲烷, pH8.0) 悬浮后, 4°C, 4000rpm 离心 10 分钟收集, 用 0.05 体积的 0.02mol/L Tris 缓冲液 (pH8.0) 悬浮, 超声破碎后, 12000g 离心 5 分钟, 上清液经 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 于 4°C 保存, 即获得含有 Apu1A 的粗酶液。

[0044] Apu1A 的活性分析是以 0.5% 普鲁兰糖为底物, 加入适量的经适当稀释的粗酶液, 在不同的温度和 pH 条件下酶解 20 分钟, 水解产物经安捷伦高效液相色谱系统鉴定, 水解产物为麦芽三糖 (图 2), 证明 Apu1A 为 I 型普鲁兰酶; 同时水解产生的还原糖经 DNS 法测定, 测定 OD₅₄₀ 光吸收; 经计算分析确定 Apu1A 的最适反应 pH 和最适反应温度, 结果显示: Apu1A 的最适反应温度在 55 ~ 60°C 之间 (表 1, 图 3), 最适反应 pH 为 6.5 (表 2, 图 4), 热稳定性分析的结果显示, 在 pH 6.5、60°C 的条件下处理 80 小时, Apu1A 仍具有 50% 以上的活性 (表 3)。

[0045] 表 1Apu1A 的最适反应温度

[0046]

温度 (°C)	30	35	40	45	50	55	60	65	70
相对活性 (%)	36.6	45.2	61.2	77.7	89.1	97.2	100	48.2	4.3

[0047] 表 2Apu1A 的最适反应 pH

[0048]

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
相对活性 (%)	5.4	26.7	77.7	100	68.3	11.5	4.1

[0049] 表 3Apu1A 的热稳定性

[0050]

时间 (hr)	0	12	24	36	48	60	70	80	84
相对活性 (%)	100	93.1	89.9	78.7	76.5	70.9	68.8	55.4	47.7

[0051] 上述高效液相色谱分析条件; 色谱柱: 4.6mm ID×150mm Zorbax Carbohydrate Analysis column; 流动相: 乙腈: 水 = 70 : 30 (V/V); 流速: 2ml/min; 上样量: 20 μl; 柱温: 30°C; 检测器: 示差检测器。标准品分别为 10mg/ml 的葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖。

[0052] 在上述酶促反应中, 最适反应温度的测定选在 0.04mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.2) 中进行, 最适反应 pH 的测定在不同 pH 的 0.04mol/L 磷酸钠缓冲液、60°C 的条件下进行。

[0053] DNS 试剂的配制: 称取酒石酸钾钠 182.0g, 溶于 500mL 蒸馏水中, 加热 (不超过 50°C), 于热溶液中依次加入 3,5-二硝基水杨酸 6.3g, NaOH 21.0g, 苯酚 5.0g, 无水亚硫酸钠 5.0g, 搅拌至溶解完全, 冷却后用蒸馏水定容至 1000mL, 贮存于棕色瓶中, 室温保存。

[0001]

序列表

SEQ ID No. 1

1 gttagcggcg gacgggtgag taacacgtgg gcaacctgcc ctgtagacgg ggataacacc
61 gagaaatcgg tgctaatacc ggataacacg aaagaccgca tggtttttcg ttgaaaggcg
121 gcgcaagctg tcgctacagg atgggcccg cggcgattag ctagtgggtg aggtaacggc
181 tcaccaaggc gacgatgcgt agccgacctg agaggggat cgccacact gggactgaga
241 cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct
301 gacggagcaa cgccgcgtga gcgaagaagg ccttcgggtc gtaaagctct gttgttaggg
361 aagaacaagt accgcagtca ctggcggtac cttgacggta cctaacgaga aagccacggc
421 taactacgtg ccagcagccg cgtaatacg taggtggcaa gcgttgccg gaattattgg
481 gcgtaaaagc cgccgagggc gttccttaag tctgatgtga aagcccacgg ctcaaccgtg
541 gagggtcatt ggaaactggg ggacttgagt gcagaagagg agagcggaat tccacgtgta
601 gcggtgaaat gcgtagagat gtggaggaa accagtgccg aagcgggctc tctggtctgt
661 aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca
721 cgccgtaaac gatgagtgt aagtgttaga gggtatccac cctttagtgc ttagactaac
781 gcattaagca ctccgcctgg ggagtacgct cgcaagagt aactcaaag gaattgacgg
841 gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca
901 ggtcttgaca tcccctgaca acccgagaga tcgggcgttc ccccttcggg gggacagggt
961 gacagtggtg gcatggtgt cgtcagctcg tgcctgaga tgttgggta agtcccgcaa
1021 cgagcgaac cctcgacctt agttgccagc attcagttgg gactcctaag gtgactgccg
1081 gctaaaagtc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcacc atgcccctta tgacctgggc
1141 tacacacgtg ctacaatggg cgtacaaaag gtcgcgaac ccgcgaggg gagccaatcc
1201 caaaaagccg ctctcagttc ggattgcagg ctgcaactcg cctgcatgaa gccggaatcg
1261 c

[0002]

SEQ ID No. 2

1 mppkqsfea yldeltmiti lfpchvdqkr apifflrddk ktayrltirs sekhsfiky
61 eclvpfivel gkryvvytee gwqvplqvg vmrtkafddl yaydgnldga tydpekttk
121 vwaptatdvl lklihtttke ettyvmtrek kglwtytvyd dverflytym tyvnfiwrea
181 vdpysksvsv ngtygvvdl aktnipkpsm slfismtdai iyemhirdft ihhesgvrqk
241 gkyvglterg ttgpnngltg lsyikqlgvt hvqlmpvqdf egvdelqplk mynwgynvth
301 ynapegsyat dpddpyarii elkrairafq qegirvildv vnhvvyvret ssfehlvpgy
361 yfryerngyp sngtgvgnl aserkmvkkf iidsvtywlk eygvdgfrfd lmgildidtm
421 ndvrraidei dptviilgeg wlatplpse kktianakh tpriayfndr frdyvkgstf
481 dihergfalg dcsykeavig airgsihlff sprqsvnyve chdnhtlwdk mavanahese
541 yirrkrqkla taivllsqgi pflhsgqefy rtkkgvensy nspdevnqv d wneksrweed
601 vreimkliel rkkhgaf rfl tadqvrhmk fydhpsvia yqlvdvgyg pwkqivvvyh
661 neekkampl adgkwkvmfs sekewlgnvc eqfieingig awvliqc

[0003]

SEQ ID No. 3

1 gcataataag taagtaacca gatggtaaaa gtggaaacgg aacggtacat gatatacata
61 atgtattatt tccccctccc tgttttttat tataattcat aaaatagcgg attaaaaaat
121 cggaagttgg tgaccggtca tgcccccaaa acaacagtcg tttgaagctt atttagatga
181 attgacaatg attactatth ttttccgtg ccatgttgac caaaaacgtg caccgatatt
241 ttttttacgc gatgataaaa aaacagcata tcgcttaacg attcgttcaa gtgagaagca
301 tcattcattt ataaaatag agtgtctcgt tccttttatc gttgaattag gaaagcgata
361 tgtcgtttac acggaagaag ggtggcaagt tccattgcaa gtaggagctg tgatgcgcac
421 gaaagcgttt gatgatttgt atgcatatga cggaaatgat ctgggtgcaa cgtacgatcc
481 ggaaaaaaca acatttaaaag tatgggcacc aacggcgaca gacgtactat taaagcttat
541 tcatccaacg acgaaagaag aaacgactta tgtcatgacg cgagaaaaaa aaggattatg
601 gacatatacc gtttatgatg atgttgaacg ctttttgac acgtatatga cgtatgtgaa
661 ctttatgttg cgtgaagctg ttgatcctta tgcgaagtcc gtttccgtga acggaacata
721 tggcgttggt gtagatcttg caaagacaaa cataccgaaa ccgtcaatgt ctctgtttat
781 ttcgatgacg gatgcaatca tttatgaaat gcatatacgc gatttcacia ttcacatga
841 aagcggagtg agacaaaaag gaaaatatgt tggcttaacg gagcgcggaa caacaggccc
901 aaacggaaca ttaacgggac tttcatatat taagcagctt ggtgtgacgc acgttcaact
961 tatgcctgtg caagattht aaggagtga tgaacttcag ccgcttaaga tgtacaattg
1021 gggatataat acagtgcatt acaatgctcc agaaggaagc tatgcgactg atccggatga
1081 tccgatgceg cgtatcatcg agttaaaccg agccattcgt gctttccaac aggaaggcat
1141 tcgctcatt ttagatgtg tatataacca cgtatacgtt cgcgaaacat catcgtttga
1201 acatcttgtt cccgatatt attttcgcta tgaacgaaat ggctatccat caaacggaac
1261 gggagtagga aacgatttag cttccgaaag gaaaatggtc aaaaagttca ttattgactc
1321 ggtaacatat tggttaaaag aatacggcgt cgacggattt cgthttgatc tcatgggcat
1381 tttagatata gatacgatga atgatgtgcg gcgagccatt gatgagatcg atccaactgt
1441 tatcatttta ggggaagggt gggatttagc aacaccgta ccatccgaaa aaaagacgac
1501 aatcgctaac gcaaaacata caccgcgcat cgcatacttc aacgatcgtt ttcgcgacta
1561 cgtcaagggg agcacgttcg acattcatga gcgaggcttc gctttaggag attgttcata
1621 taaagaagcc gtgatcggag cgattcgtgg aagcatccac ctctttttct ccccgaggca
1681 aagtgtgaat tatgtcgaat gtcatgataa ccatacgtta tgggacaaaa tggccgttgc
1741 aaacgctcat gaaagtgaat atattcgacg gaagcgtcaa aagctagcga cagctatcgt
1801 tttattatcc caaggtattc cgtttttgca tagcgggtcaa gagttttatc ggacgaaaaa
1861 aggggtggaa aatagctaca actcccctga tgaagtgaac caagtcgatt ggaatgagaa
1921 gagcagatgg gaagaagatg tgcgagaaat aatgaaactc attgagcttc ggaaaaagca
1981 tgggtcgttc cggtttttaa ctgctgatca agttcggcgt cacatgaaat tttatgacac
2041 gcatccatcc gtcattgctt atcagcttgt tgatgttggc gtgtatggcc catggaagca
2101 aattgttgtc gtttatcata acgaagagaa aaaggcgatg ttaccgctag cagatggaaa
2161 atggaaagtg atgtttagct cagaaaagga atggttaggg aatgthttgtg aacagthttat
2221 tgaataaat ggaattgtg cgtgggtatt aattcaatgt tgacggagga acgatagggg
2281 agataaaatc tagtaagatg acaatcgtta tttttattht gactaagtcg aaaggtgagc
2341 tcacttggaag cagttactag gtaaggagtg ggaaatctcc ccccgagttg

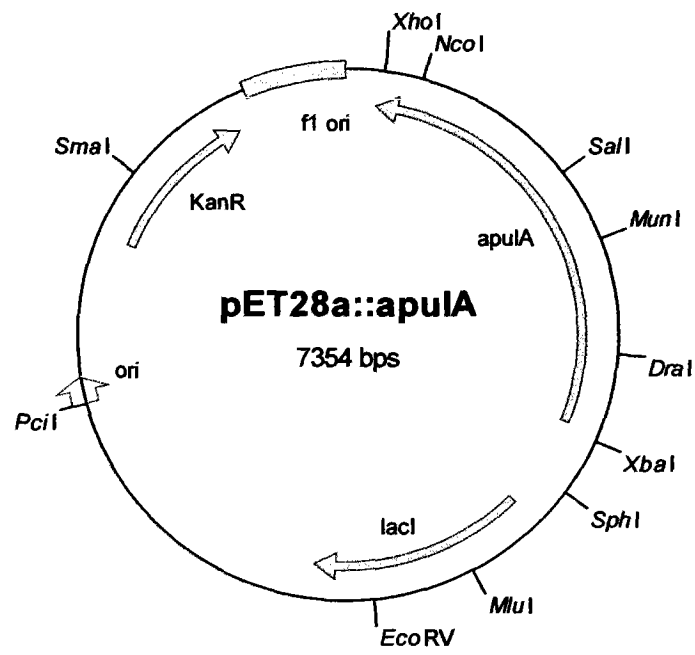


图 1

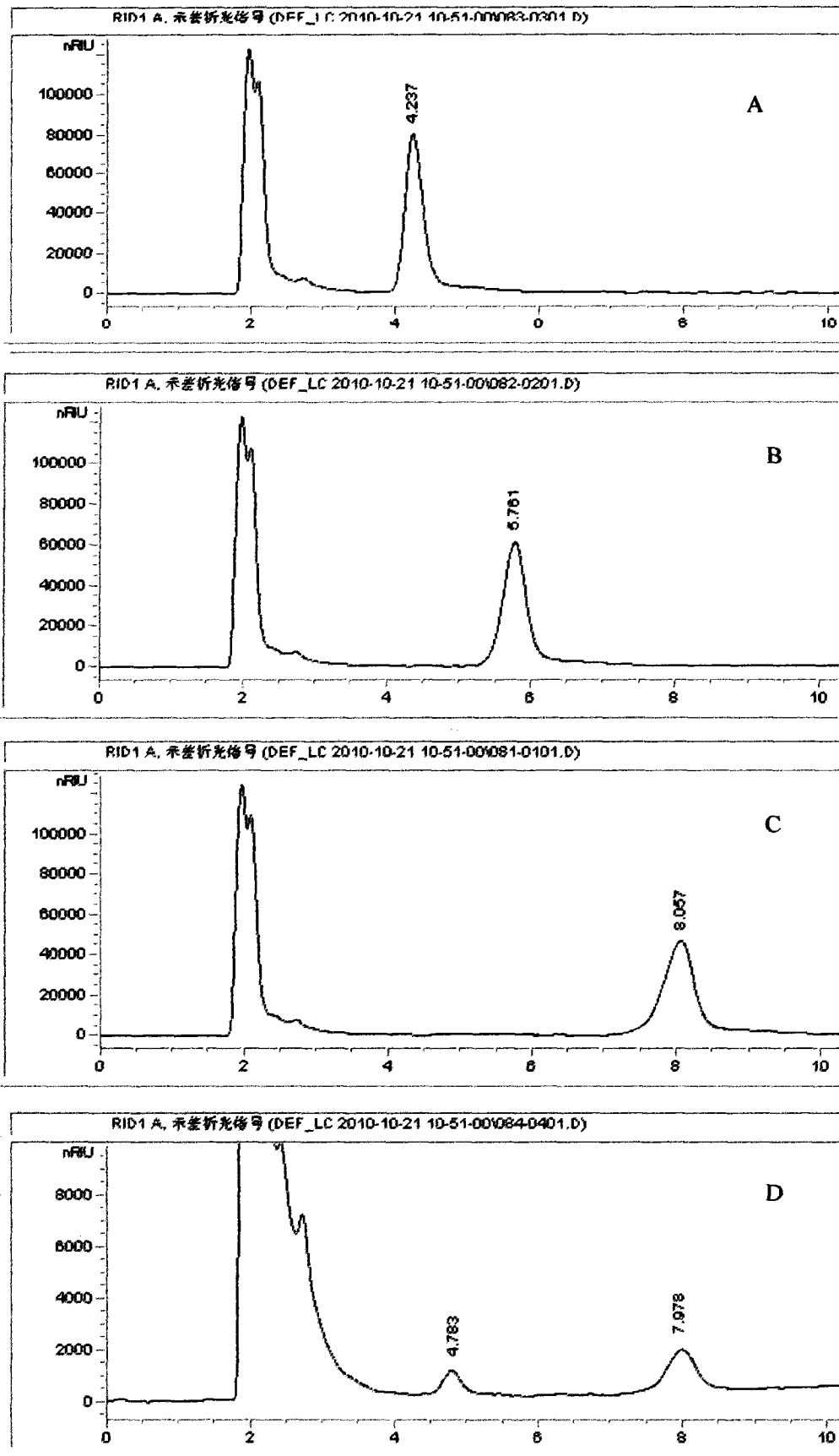


图 2

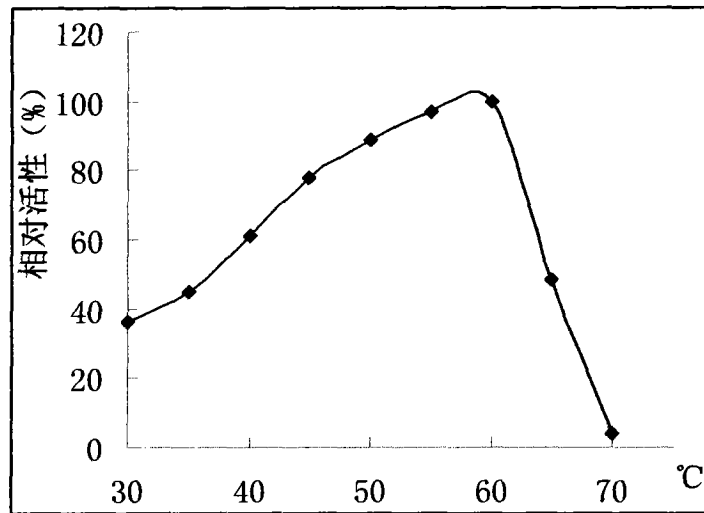


图 3

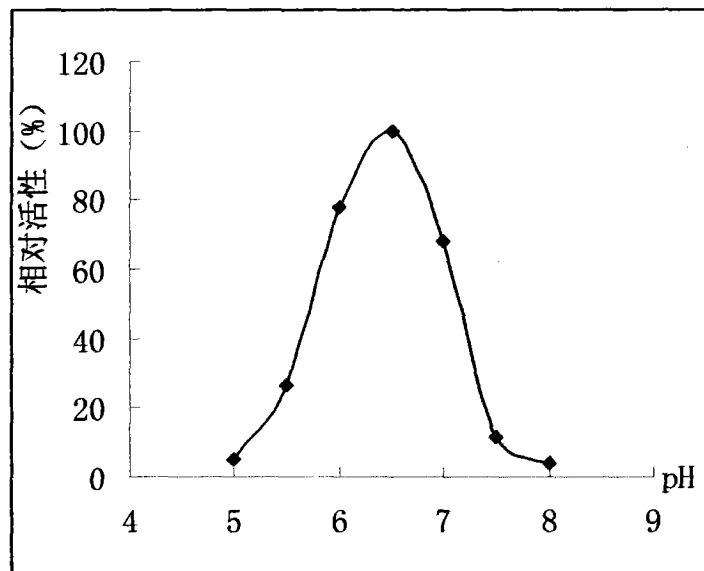


图 4