



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102575239 B

(45)授权公告日 2017.06.16

(21)申请号 201080042420.6

专利权人 丹尼斯科美国公司

(22)申请日 2010.08.18

(72)发明人 P·E·狄格恩 R·波特

(65)同一申请的已公布的文献号

C·W·弗洛曼 M·S·谢弗斯

申请公布号 CN 102575239 A

W·埃勒

(43)申请公布日 2012.07.11

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

(30)优先权数据

代理人 罗菊华

PA201070337 2010.07.15 DK

61/235,140 2009.08.19 US

61/360,891 2010.07.01 US

(51)Int.Cl.

C12N 9/34(2006.01)

C13K 1/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.03.23

(56)对比文件

WO 2009/067218 A2, 2009.05.28, 说明书第

10-12, 138-145, 149段.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/062035 2010.08.18

审查员 潘浩

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2011/020852 EN 2011.02.24

(73)专利权人 杜邦营养生物科学有限公司

权利要求书2页 说明书128页

地址 丹麦哥本哈根

序列表210页 附图16页

(54)发明名称

葡糖淀粉酶的变体

(57)摘要

本发明涉及具有改变的特性的、亲本葡糖淀粉酶的组合物变体,其用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成。因此,亲本葡糖淀粉酶的变体适合,例如在酿造和葡萄糖糖浆生产中使用。还公开了编码所述变体的DNA构建体以及在宿主细胞中产生葡糖淀粉酶变体的方法。

1. 葡糖淀粉酶变体用于相对于亲本葡糖淀粉酶减少淀粉水解过程中异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比 (IS/SH比率) 的用途, 其中所述葡糖淀粉酶变体与SEQ ID NO:2所示的亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列的区别在于位置44、61、539处的下列氨基酸取代:

a. D44R和A539R; 或

b. D44R、N61I和A539R。

2. 葡糖淀粉酶变体, 其与SEQ ID NO:2所示的亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列的区别在于位置44、61、539处的下列氨基酸取代:

a. D44R和A539R; 或

b. D44R、N61I和A539R,

其中所述葡糖淀粉酶变体相对于亲本葡糖淀粉酶在淀粉水解过程中具有减小的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比 (IS/SH比率)。

3. 根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体, 与亲本葡糖淀粉酶相比, 所述葡糖淀粉酶变体显示出可发酵糖的生产提高。

4. 根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体, 与亲本葡糖淀粉酶相比, 所述葡糖淀粉酶变体显示出酿造过程的淀粉糖化步骤中可发酵糖的生产提高。

5. 根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体, 其中与亲本葡糖淀粉酶相比, 所述葡糖淀粉酶变体显示出提高的实际发酵度。

6. 根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体, 所述葡糖淀粉酶变体是经纯化的。

7. 多核苷酸, 其编码根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体。

8. 载体, 其包含根据权利要求7的多核苷酸, 或者能够表达根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体。

9. 宿主细胞, 其包含根据权利要求8的载体。

10. 宿主细胞, 其中在染色体中稳定整合了编码根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体的核酸。

11. 能够表达根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体的细胞。

12. 根据权利要求9-10中任一项的宿主细胞或根据权利要求11的细胞, 其为细菌或真菌细胞。

13. 根据权利要求12的宿主细胞, 其为酵母细胞。

14. 根据权利要求12的宿主细胞, 其为木霉属的种。

15. 根据权利要求12的宿主细胞, 其为瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*)。

16. 根据权利要求12的宿主细胞, 其为蛋白酶缺陷性和/或木聚糖酶缺陷性和/或天然葡聚糖酶缺陷性宿主细胞。

17. 根据权利要求13-15任一项的宿主细胞, 其为蛋白酶缺陷性和/或木聚糖酶缺陷性和/或天然葡聚糖酶缺陷性宿主细胞。

18. 表达根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体的方法, 所述方法包括获得根据权利要求9-17中任一项的宿主细胞或细胞和从所述细胞或宿主细胞表达葡糖淀粉酶变体。

19. 根据权利要求18的方法, 包括纯化所述葡糖淀粉酶变体。

20. 根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体用于制备酶促组合物的用途。

21. 酶促组合物, 其包含至少一种根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体。

22. 根据权利要求21的酶促组合物,其包含至少一种根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体,其中所述组合物选自:淀粉水解组合物、糖化组合物、去污剂、醇发酵酶促组合物和动物饲料。

23. 根据权利要求21-22中任一项的酶促组合物,其包含选自下列的至少一种其它的酶:淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、葡聚糖酶、木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖酶、阿魏酸酯酶和木聚糖乙酰基酯酶。

24. 根据权利要求23的酶促组合物,其中所述至少一种其它的酶选自支链淀粉酶和其它葡糖淀粉酶。

25. 用于产生用于酿造的麦芽汁的方法,所述方法包括由谷形成醪液,以及使所述醪液与根据权利要求2的葡糖淀粉酶变体或根据权利要求21-24中任一项的酶促组合物接触。

26. 用于生产啤酒的方法,其包括:

- a. 制备醪液,
- b. 过滤醪液以获得麦芽汁,和
- c. 发酵麦芽汁以获得啤酒,

其中将根据权利要求2-6中任一项的葡糖淀粉酶变体或根据权利要求21-24任一项的酶促组合物加入:步骤a和/或步骤b和/或步骤c。

27. 根据权利要求26的方法,还包括使啤酒经受巴氏灭菌。

28. 啤酒,其中所述啤酒是通过下列步骤产生的:

- a. 制备醪液,
- b. 过滤所述醪液以获得麦芽汁,和
- c. 发酵所述麦芽汁以获得啤酒,

其中将根据权利要求2-6中任一项的葡糖淀粉酶变体或根据权利要求21-24任一项的酶促组合物加入:步骤a和/或步骤b和/或步骤c。

29. 根据权利要求28的啤酒,其中产生所述啤酒的步骤还包括巴氏灭菌所述啤酒。

葡糖淀粉酶的变体

[0001] 序列表

[0002] 所附的还有包含SEQ ID NOs:1-1099的序列表,其在此以其全部通过引用而并入。

发明领域

[0003] 所公开的是亲本葡糖淀粉酶的组合变体,其具有改变的特性并适合例如用于酿造和葡萄糖糖浆生产中。还公开了编码所述变体的DNA构建体以及在宿主细胞中生产所述葡糖淀粉酶变体的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 葡糖淀粉酶(葡聚糖1,4- α -葡萄糖水解酶,EC 3.2.1.3)是淀粉水解性外切作用碳水化合物酶,其催化从淀粉或相关寡糖和多糖分子的非还原末端去除连续的葡萄糖单元。葡糖淀粉酶可水解淀粉(例如,直链淀粉和支链淀粉)的直链和支链的糖苷连接。

[0006] 葡糖淀粉酶是由细菌、真菌、酵母和植物的许多株系产生的。特别有趣且商业上重要的葡糖淀粉酶是在细胞外产生的真菌的酶,例如来自下列的菌株:曲霉属(*Aspergillus*) (Svensson et al., *Carlsberg Res. Commun.* 48:529-544 (1983); Boel et al., *EMBO J.* 3:1097-1102 (1984); Hayashida et al., *Agric. Biol. Chem.* 53:923-929 (1989); 美国专利号5,024,941; 美国专利号4,794,175和W0 88/09795); 篮状菌属(*Talaromyces*) (美国专利号4,247,637; 美国专利号6,255,084; 和美国专利号6,620,924); 根霉属(*Rhizopus*) (Ashikari et al., *Agric. Biol. Chem.* 50:957-964 (1986); Ashikari et al., *App. Microbio. Biotech.* 32:129-133 (1989) 和美国专利号4,863,864); 腐质霉属(*Humicola*) (W0 05/052148和美国专利号4,618,579); 以及毛霉属(*Mucor*) (Houghton-Larsen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62:210-217 (2003))。已在酵母、真菌和/或细菌细胞中克隆和表达了许多编码这些酶的基因。

[0007] 商业上,葡糖淀粉酶是非常重要的酶并且被用于需要水解淀粉的广泛的应用中(例如,用于由淀粉生产葡萄糖和其它单糖)。葡糖淀粉酶被用于生产高果糖玉米甜味剂,这构成美国超过50%的甜味剂市场。

[0008] 一般而言,葡糖淀粉酶可以、且通常与 α -淀粉酶一起用于淀粉水解过程中以将淀粉水解为糊精,然后水解为葡萄糖。然后葡萄糖可被其它的酶(例如,葡萄糖异构酶)转化为果糖;被结晶;或用于发酵以产生众多的终产物(例如乙醇、柠檬酸、乳酸、琥珀酸、抗坏血酸中间体、谷氨酸、甘油和1,3-丙二醇)。在含有淀粉和/或纤维素的材料的发酵中通过使用葡糖淀粉酶而产生的乙醇可被用作燃料或含酒精消费品的来源。

[0009] 在商业上用于生产高葡萄糖玉米糖浆(HGCS)和高果糖玉米糖浆(HFCS)的高固体浓度时,葡糖淀粉酶通过缩合反应由葡萄糖合成二糖、三糖和四糖。这是由于淀粉中 α -(1-6)-D-糖苷键的缓慢水解和由D-葡萄糖形成各种累积的缩合产物(主要是异麦芽糖)而发生的。因此,许多常规方法中的葡萄糖产量不超过理论产量的95%。通过这种方法在全世界生产的糖浆的量非常大,且甚至每吨淀粉的葡萄糖产量上很小的增加也是商业上重要的。

[0010] 酿造中使用的葡糖淀粉酶主要是为了生产低碳水化合物啤酒。与其它淀粉酶(例

如来自麦芽的)相组合,葡糖淀粉酶提供对淀粉非常充分的水解,直至水解为葡萄糖单元。葡萄糖被酵母容易地转化为醇,使得酿酒厂有可能由发酵获得非常高的醇产量并同时获得残余碳水化合物量很低的啤酒。用水将发酵物稀释至所需的醇%,且最终的啤酒作为“低碳水化合物”出售。

[0011] 虽然葡糖淀粉酶多年被成功地用于商业应用中,仍存在对于具有改变的特性(例如改善的比活性,减少形成缩合产物(例如异麦芽糖)和增加的热稳定性)的新葡糖淀粉酶的需求。

[0012] 发明概述

[0013] 本申请涉及了葡糖淀粉酶变体用于减少淀粉水解过程中缩合产物的合成的用途。这些葡糖淀粉酶变体在催化结构域和/或淀粉结合结构域中含有氨基酸取代。所述变体展现出改变的特性,例如改变的比活性、减少形成缩合产物(例如异麦芽糖)和/或改变的热稳定性。

[0014] 在一个方面,本申请描述了具有淀粉结合结构域和催化结构域的葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途,相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列或等价的亲本葡糖淀粉酶,所述变体在互连环2'、和/或环1、和/或螺旋2、和/或环11、和/或螺旋12中包含两个或更多个氨基酸取代。

[0015] 在另一个方面,描述了相对于下述包含两个或更多个氨基酸取代的葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列的互连环2',和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列的环1,和/或具有SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列的螺旋2,和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列的环11,和/或具有SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列的螺旋12。

[0016] 在另一个方面,描述了相对于下述包含两个或更多个氨基酸取代的葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途:SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等价的残基序列。

[0017] 在另一个方面,描述了葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是相对于下列的:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列的互连环2',和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列的环1,和/或具有SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列的螺旋2,和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列的环11,和/或具有SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列的螺旋12。

[0018] 在另一个方面,描述了葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体的晶体形式具有这样的晶体结构:在将等价的主链原子进行比对后,其主链原子的原子坐标与TrGA的等价主链原子的原子坐标(如W02009/

067218的表20中所定义的)的均方根偏差小于0.13nm;并且所述变体具有连接子区域、淀粉结合结构域以及催化结构域,所述变体相对于亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列在淀粉结合结构域的互联环2'中,和/或催化结构域的螺旋12中、和/或环1中、和/或螺旋2中、和/或环11中包含两个或更多个氨基酸取代。

[0019] 在一个方面,葡糖淀粉酶变体包含两个或更多个氨基酸取代,其中一个氨基酸取代在539位且一个氨基酸取代在44位,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置,并且所述序列与亲本葡糖淀粉酶具有至少80%的序列同一性,并且其中44位的氨基酸取代不是44C。

[0020] 本公开还涉及编码如本文所述的葡糖淀粉酶变体的多核苷酸。一方面,涉及包含核酸的质粒。另一方面,涉及包含所述多核苷酸或能够表达所述葡糖淀粉酶变体的载体。另一方面,涉及包含(例如转化了)所述质粒或载体的宿主细胞。另一方面,涉及宿主细胞,其具有稳定整合到染色体中的编码所述变体葡糖淀粉酶的核酸序列。另一方面,涉及能够表达所述葡糖淀粉酶变体的细胞。另一方面,涉及表达葡糖淀粉酶变体的方法,所述方法包括获得宿主细胞或细胞和从所述细胞或宿主细胞表达所述葡糖淀粉酶变体,以及任选地纯化所述葡糖淀粉酶变体。

[0021] 本公开的另一方面是包含至少一种本文所述的葡糖淀粉酶变体的酶促组合物,及其用途。

[0022] 本公开的另一方面是将淀粉或部分水解的淀粉转化为含有葡萄糖的糖浆的方法,所述方法包括在至少一种本文所述的葡糖淀粉酶变体或酶促组合物的存在下糖化液体淀粉溶液。

[0023] 本公开的另一方面是本文所述的葡糖淀粉酶变体在淀粉转化过程(例如连续淀粉转化过程)、在生产寡糖、麦芽糊精或葡萄糖糖浆的过程中以及在生产高果糖玉米糖浆的过程中的用途。

[0024] 另一方面,提供了本文所述的葡糖淀粉酶变体在醇发酵过程中的用途。

[0025] 本公开的另一方面是生产用于酿造的麦芽汁的方法,所述方法包括由谷形成醪液,并使所述醪液与所述葡糖淀粉酶变体或所述酶促组合物相接触。

[0026] 而本公开的另一方面是用于生产啤酒的方法,所述方法包括:a)制备醪液,b)过滤所述醪液以获得麦芽汁,并发酵所述麦芽汁以获得啤酒,其中将所述葡糖淀粉酶变体加入:步骤(a)和/或步骤(b)和/或步骤(c)。

[0027] 而本公开的另一方面是所述葡糖淀粉酶变体用于增强酿造过程的发酵步骤或淀粉糖化步骤中可发酵糖的产生的用途。

[0028] 而本公开的另一方面是啤酒,其中所述啤酒是通过下述步骤产生的:a)制备醪液,b)过滤所述醪液以获得麦芽汁,c)发酵所述麦芽汁以获得啤酒,以及d)巴氏灭菌所述啤酒,其中将所述葡糖淀粉酶变体加入:步骤(a)和/或步骤(b)和/或步骤(c)。

附图说明

[0029] 附图并入本说明书中并构成本说明书的一部分,以阐释实施方案实施方案。在附图中:

[0030] 图1A描绘了具有632个氨基酸(SEQ ID NO:1)的瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)

葡糖淀粉酶(TrGA)。信号肽加了下划线,始于氨基酸残基SVDDFI (SEQ ID NO:12)且具有453个氨基酸残基的催化区域(SEQ ID NO:3)是粗体的;连接子区域为斜体而淀粉结合结构域(SBD)既是斜体的也加了下划线。TrGA的成熟蛋白(SEQ ID NO:2)包括催化结构域(SEQ ID NO:3)、连接子区域(SEQ ID NO:10)和淀粉结合结构域(SEQ ID NO:11)。关于TrGA葡糖淀粉酶分子的SBD编号,在本公开中参照a)成熟TrGA的SEQ ID NO:2中的491至599位,和/或b)SEQ ID NO:11中的1至109位,其代表成熟TrGA的分离的SBD序列。关于TrGA分子的催化结构域编号,参照SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3。图1B描绘了编码TrGA的cDNA (SEQ ID NO:4)。图1C描绘了前体和成熟蛋白TrGA结构域。

[0031] 图2描绘了目标质粒pDONR-TrGA,其包括TrGA的cDNA (SEQ ID NO:4)。

[0032] 图3描绘了质粒pTTT-Dest。

[0033] 图4描绘了最终的表达载体pTTT-TrGA。

[0034] 图5A和5B描绘了来自下列的亲本葡糖淀粉酶的催化结构域的比对比较:泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*) (AaGA) (SEQ ID NO:5);黑曲霉(*Aspergillus niger*) (AnGA) (SEQ ID NO:6);米曲霉(*Aspergillus oryzae*) (AoGA) (SEQ ID NO:7);瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*) (TrGA) (SEQ ID NO:3);灰腐质霉(*Humicola grisea*) (HgGA) (SEQ ID NO:8);和酒色肉座菌(*Hypocrea vinosa*) (HvGA) (SEQ ID NO:9)。同一的氨基酸以星号(*)表示。图5C描绘了篮状菌属(*Talaromyces*) 葡糖淀粉酶(TeGA)的成熟蛋白序列(SEQ ID NO:384)。图5D和5E描绘了比较来自下列的亲本葡糖淀粉酶的淀粉结合结构域(SBD)的比对:瑞氏木霉(SEQ ID NO:11);灰腐质霉(HgGA) (SEQ ID NO:385);疏棉状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*) (ThGA) (SEQ ID NO:386);埃默森篮状菌(*Talaromyces emersonii*) (TeGA) (SEQ ID NO:387);黑曲霉(AnGA) (SEQ ID NO:388);泡盛曲霉(AaGA) (SEQ ID NO:389);和太瑞斯梭孢壳霉(*Thielavia terrestris*) (TtGA) (SEQ ID NO:390)。

[0035] 图6描绘了瑞氏木霉葡糖淀粉酶(黑色) (SEQ ID NO:2)和泡盛曲霉葡糖淀粉酶(灰色) (SEQ ID NO:5)的三维结构侧面视图的比较。参照活性位点测量了所述侧面且活性位点入口位于分子的“顶部”。

[0036] 图7描绘了瑞氏木霉葡糖淀粉酶(黑色) (SEQ ID NO:2)和泡盛曲霉葡糖淀粉酶(灰色) (SEQ ID NO:5)的三维结构俯视图的比较。

[0037] 图8描绘了TrGA (SEQ ID NO:2)和AnGA (SEQ ID NO:6)的三维结构侧面视图的比对,其显示出结合位点1和2。

[0038] 图9描绘了阿卡波糖结合至TrGA晶体结构的模型。

[0039] 图10描绘了TLC板,其具有含有不同浓度的葡萄糖、麦芽糖和异麦芽糖的标准以及含有来自用TrGA和AnGA孵育的葡萄糖的反应产物的样品。

[0040] 发明详述

[0041] 葡糖淀粉酶在要求淀粉水解的广泛应用中是商业上重要的酶。申请人发现了,通过在亲本葡糖淀粉酶氨基酸序列的特定区域中的位置处引入某些改变,降低了形成 α -(1-6)键的比率,和/或减少了缩合产物(例如异麦芽糖)的形成。葡糖淀粉酶形成 α -(1-6)键的比率相对于其剪切 α -(1-4)键的比率的降低具有实际的意义。

[0042] 当前的发明人提供了若干亲本葡糖淀粉酶的变体,与亲本葡糖淀粉酶相比,所述变体在某些实施方案中显示出减少的缩合和/或减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比

(IS/SH比率)。在一些实施方案中,在糖化过程中使用本文所述的葡糖淀粉酶变体产生了具有高葡萄糖百分比的糖浆。在一些实施方案中,使用本文所述的葡糖淀粉酶变体在酿造步骤的发酵步骤和/或淀粉糖化步骤中引起了可发酵糖的生产提高。在一些实施方案中,使用本文所述的葡糖淀粉酶变体产生了提高的实际发酵度。这些改变的特性是通过突变(例如取代)亲本葡糖淀粉酶中选定的位置而获得的。这将在下文中更详细地描述。

[0043] 因此,在另一个方面中,描述了相对于下述包含两个或更多个氨基酸取代的葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的互联环2',和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的环1,和/或具有SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的螺旋2,和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的环11,和/或具有SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的螺旋12。

[0044] 在另一个方面中,描述了相对于下述包含两个或更多个氨基酸取代的葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途:SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的,和/或SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列。

[0045] 因此,在另一个方面中,描述了葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体的晶体形式具有这样的晶体结构:在将等同的主链原子进行比对后,其主链原子的原子坐标与TrGA的等同主链原子的原子坐标(如W02009/067218的表20中所定义的)的均方根偏差小于0.13nm;并且所述变体具有连接子区域、淀粉结合结构域以及催化结构域,所述变体相对于亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列在淀粉结合结构域的互联环2'中,和/或催化结构域的螺旋12中、和/或环1中、和/或螺旋2中、和/或环11中包含两个或更多个氨基酸取代。在另一个方面中,与TrGA的等同主链原子的原子坐标(如W02009/067218的表20中所定义的)的均方根偏差小于0.12nm,例如小于0.11或例如小于0.10。

[0046] 在一个方面,描述了具有淀粉结合结构域和催化结构域的葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途,相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列或平等的亲本葡糖淀粉酶,所述变体在互联环2'、和/或环1、和/或螺旋2、和/或环11、和/或螺旋12中包含两个或更多个氨基酸取代。

[0047] 在另一个方面中,描述了葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是相对于下列的:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的互联环2',和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的环1,和/或具有SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的螺旋2,和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中平等的残基序列的环11,和/或具有SEQ ID NO:2的421位

至434位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的螺旋12。

[0048] 在另一个方面中,描述了葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是相对于下列的:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列的互联环2',和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列的环1,和/或具有SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列的螺旋2,和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列的环11,和/或具有SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列的螺旋12。

[0049] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代为互联环2' 中的至少一个(例如一个、两个或三个)氨基酸取代和环1和/或螺旋2和/或环11和/或螺旋12中的至少一个(例如一个、两个、三个、四个、五个或六个)氨基酸取代。

[0050] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2' 中的一个、两个、三个或四个氨基酸取代以及环1和/或螺旋2和/或环11和/或螺旋12中的一个、两个、三个或四个氨基酸取代。在另一个方面中,在互联环2' 中有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。在另一个方面中,在环1中有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。在另一个方面中,在螺旋2中有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。在另一个方面中,在环11中有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。在另一个方面中,在螺旋12中有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。

[0051] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代为互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和环1中的至少一个氨基酸取代。

[0052] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代为互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和螺旋2中的至少一个氨基酸取代。

[0053] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代为互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和环11中的至少一个氨基酸取代。

[0054] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代为互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和螺旋12中的至少一个氨基酸取代。

[0055] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代为互联环2' 中的至少一个氨基酸取代、环1中的至少一个氨基酸取代和螺旋2中的至少一个氨基酸取代。

[0056] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在互联环2' 的位置520-543、530-543或534-543中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0057] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在环1的位置30-50、35-48或40-46的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0058] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在螺旋2的位置50-66、55-64或58-63的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0059] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在环11的位置405-420、410-420或415-420的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0060] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在螺旋12的位置421-434、425-434或428-434的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本

葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0061] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体与亲本葡糖淀粉酶具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性,例如与SEQ ID NO:1、2、3、5、6、7、8或9的至少80%、85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性。在一个方面中,葡糖淀粉酶变体与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性。

[0062] 在另一个方面中,亲本葡糖淀粉酶或葡糖淀粉酶变体具有淀粉结合结构域,其与SEQ ID NO:1、2、11、385、386、387、388、389或390的淀粉结合结构域有至少96%、97%、98%、99%或99.5%的序列同一性。在另一个方面中,亲本葡糖淀粉酶或葡糖淀粉酶变体具有催化结构域,其与SEQ ID NO:1、2、3、5、6、7、8或9的催化结构域有至少80%、85%、90%、95%或99.5%的序列同一性。

[0063] 在一个方面中,葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代且在选自44、61、417和431位的位置中具有一个或多个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代且在a)在44位具有氨基酸取代和/或b)在417和431两个位置均具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代且在44位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代且在417和431位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代且在44和61位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,葡糖淀粉酶变体在43位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,葡糖淀粉酶变体在61位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,539位的氨基酸取代是539R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,44位的氨基酸取代是44R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,417位的氨基酸取代是417R/V,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,417位的氨基酸取代是417R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,417位的氨基酸取代是417V,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,431位的氨基酸取代是431L,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,43位的氨基酸取代是43R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在一个方面中,61位的氨基酸取代是61I,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0064] 在一个方面中,缩合产物为异麦芽糖。在一个方面中,淀粉的水解是在酿造过程中。在例如酿造中,异麦芽糖的形成是不希望的,因为其在发酵中不能被转化为醇。

[0065] 啤酒传统地是指源自麦芽(例如源自大麦的麦芽)和任选地附加物(例如谷粒)的含酒精饮料,并用啤酒花调味。

[0066] 啤酒可通过基本上相同的过程从各种谷物中制造。所有的谷物淀粉均为葡萄糖均

聚物,其中葡萄糖残基通过 α -1,4键或 α -1,6键连接,其中前者是主要的。

[0067] 制造经发酵的麦芽饮料的过程通常被称作酿造。制造这些饮料所使用的主要原材料为水、啤酒花和麦芽。此外,例如下列附加物可被用作淀粉的来源:普通玉米磨粒、精细玉米磨粒、酿酒者研磨酵母、稻、蜀黍、精细玉米淀粉、大麦、大麦淀粉、去壳大麦、小麦、小麦淀粉、烘培的谷物、谷物片、黑麦、燕麦、马铃薯、木薯淀粉和糖浆(例如玉米糖浆、甘蔗糖浆、转化糖糖浆、大麦和/或小麦糖浆)等。淀粉将最终被转化为糊精和可发酵的糖。

[0068] 出于数种原因,相信麦芽(其主要由所选择的大麦品种产生)对于啤酒的总体特征和质量具有最大的影响。第一,麦芽是啤酒中主要的调味剂。第二,麦芽提供可发酵糖的主要部分。第三,麦芽提供蛋白质,其将促成啤酒的主体(body)和泡沫特征。第四,麦芽提供淀粉糖化过程中必需的酶促活性。

[0069] 啤酒花也对啤酒的质量(包括风味)有显著贡献。特别地,啤酒花(或啤酒花组成物)向啤酒中加入所希望的苦味化物质。此外,啤酒花作为蛋白质沉淀剂起作用,建立防腐剂和帮助泡沫形成和稳定化。

[0070] 制造啤酒的过程是本领域中熟知的,但是简要地,其涉及五个步骤:(a)淀粉糖化和/或附加物的蒸煮(b)麦芽汁分离和提取(c)煮沸麦芽汁并加入啤酒花(d)冷却、发酵和储存,以及(e)成熟、加工和包装。

[0071] 通常,在第一步中,将研磨或压碎的麦芽与水相混合并在受控的温度下保持一段时间以允许麦芽中存在的酶将麦芽中存在的淀粉转化为可发酵的糖。

[0072] 在第二步中,将醪液转移至“过滤槽”或醪液过滤器,在那里液体与谷物残余物分离。这种甜的液体被称为“麦芽汁”而剩下的谷物残余物被称作“麦糟”。通常使醪液经受提取,这包括向醪液中加水以从谷糟中回收残留的可溶性提取物。

[0073] 在第三步中,将麦芽汁剧烈煮沸。这使麦芽汁灭菌并帮助产生颜色、风味和气味且灭活酶活性。在煮沸过程中的某个时刻加入啤酒花。

[0074] 在第四步中,将麦芽汁冷却并转移至发酵罐,所述发酵罐含有酵母或向其中加入酵母。酵母通过发酵将糖转化为醇和二氧化碳气体;在发酵的最后,使发酵罐变冷或可使发酵罐变冷以停止发酵。酵母絮凝并被去除。

[0075] 在最后一步中,将啤酒冷却并储存一段时间,在所述时间段中,啤酒澄清且其风味产生,并且任何可能损害啤酒的外观、风味和货架期的物质都沉淀掉。在包装之前,使啤酒碳酸化并任选地将其过滤和巴氏灭菌。

[0076] 发酵之后,获得了这样的饮料,其通常含有大约2%至大约10%的醇(按重量)。不可发酵的碳水化合物在发酵过程中不被转化并且形成最终的啤酒中所溶解的固体的大多数。

[0077] 这种残余物的存留是因为麦芽淀粉酶不能够水解淀粉的 α -1,6-连接。不可发酵的碳水化合物贡献大约50卡路里/12盎司啤酒。

[0078] 关于常规酿造过程的其它信息、以及将应用于本发明的酿造技术领域中所使用的术语的定义,可在下列中找到:“Technology Brewing and Malting”by Wolfgang Kunze of the Research and Teaching Institute of Brewing,Berlin(VLB),2nd revised Edition 1999,ISBN3-921690-39-0或3rd edition(2004):ISBN 3-921690-49-8。

[0079] 最近,称为轻啤酒、卡路里减少的啤酒或低卡路里啤酒的酿造饮料被广泛普及,特

别是在美国市场中。如在美国所定义的,这些啤酒与制造商的“普通”啤酒相比,具有大约30%更少的卡路里。

[0080] 如本文中所使用的,术语“轻啤酒、卡路里减少的啤酒或低卡路里啤酒”是指最近、广泛普及的酿造饮料,特别是在美国市场中。如在美国所定义的,这些高度减弱的啤酒与制造商的“普通”啤酒相比,具有大约30%更少的卡路里。关于常规酿造过程的其它信息可在下列中找到:“Technology Brewing and Malting”by Wolfgang Kunze of the Research and Teaching Institute of Brewing,Berlin(VLB),3rd completely updated edition, 2004,ISBN 3-921690-49-8。

[0081] 本文所公开的是如本文所描述的葡糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,可发酵糖的生产提高了。本文中还公开了如本文所描述的葡糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,在酿造过程的淀粉糖化步骤中可发酵糖的生产提高了。本文所公开的是如本文所描述的葡糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,在酿造过程的发酵步骤中可发酵糖的生产提高了。本文所公开的是如本文所描述的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述的可发酵糖是葡萄糖。

[0082] 能够以显著减少的副产物的量产生葡萄糖的葡糖淀粉酶将有很大的商业意义,例如在葡萄糖糖浆的生产中或在酿造中。本文中还公开了如本文所描述的葡糖淀粉酶变体的用途,其中淀粉的水解是在用于生产葡萄糖糖浆的过程中。在一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡糖淀粉酶显示出减少的异麦芽糖合成(IS)与淀粉水解活性(SH)之比。在一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡糖淀粉酶显示出降低的淀粉水解活性,所述淀粉水解活性降低不超过5%、不超过10%或不超过15%。在一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡糖淀粉酶显示出提高的实际发酵度。在一个方面中,与由黑曲霉的葡糖淀粉酶(AnGA)(SEQ ID NO:6)形成的缩合产物的量相比,所述葡糖淀粉酶在相当的条件下形成的缩合产物的量更低。在一个方面中,所述葡糖淀粉酶形成的缩合产物的量与相当条件下由黑曲霉的葡糖淀粉酶(AnGA)(SEQ ID NO:6)形成的缩合产物的量相比基本上相同、为不超过5%更高、为不超过8%更高或为不超过10%更高。在一个方面中,基于蛋白质浓度的葡糖淀粉酶剂量是相同的。在一个方面中,基于在活性测定中的活性测量,葡糖淀粉酶的剂量是相同的。

[0083] 本文中所描述的葡糖淀粉酶变体在催化结构域和/或淀粉结合结构域中含有氨基酸取代。所述变体可显示出改变的特性,例如改善的热稳定性、缩合产物(例如异麦芽糖)的改变的形成和/或提高的实际发酵度和/或降低的异麦芽糖合成(IS)与淀粉水解活性(SH)之比和/或比活性。伴有减少的缩合产物(例如异麦芽糖)形成的变体可显著提高在例如酿造工业中制造所需产品的能力。

[0084] 1.定义和缩写

[0085] 1.1.定义

[0086] 除非另行定义,本文中所使用的所有科技术语都具有与本公开所属领域中的普通技术人员所通常理解的相同的涵义。Singleton et al.,Dictionary Of Microbiology And Molecular Biology,2nd ed.,John Wiley and Sons,New York(1994),和Hale & Markham,The Harper Collins Dictionary Of Biology,Harper Perennial,N.Y.(1991)为本领域技术人员提供了本文中所使用的许多术语的一般涵义。为了清楚和引用方便,在

下文中定义了某些术语。

[0087] 如本文中所使用的,术语“葡糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)”是指催化从淀粉和相关寡糖及多糖的非还原末端释放D-葡萄糖的酶。

[0088] 术语“亲本”或“亲本序列”是指宿主细胞中天然的或自然存在的序列。亲本葡糖淀粉酶包括但不限于,SEQ ID NOs:1、2、3、5、6、7、8和9中所示的葡糖淀粉酶序列,以及与SEQ ID NO:2具有至少80%氨基酸序列同一性的葡糖淀粉酶。

[0089] 如本文中所使用的,“等同位置”是指基于所涉及的亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列及所涉及的亲本葡糖淀粉酶的三维结构与TrGA参考葡糖淀粉酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 及三维结构的比对而为两个亲本序列所共有的位置。因此,可使用序列比对或者结构比对来确定等同物。

[0090] 术语“TrGA”是指具有SEQ ID NO:2中所示的成熟蛋白序列的亲本瑞氏木霉葡糖淀粉酶序列,其包括具有SEQ ID NO:3中所示序列的催化结构域。TrGA的分离、克隆和表达描述于W02006/060062和美国专利号7,413,887中,二者均在此通过引用而并入。在一些实施方案中,亲本序列是指这样的葡糖淀粉酶序列,其为用于蛋白质工程化的起始点。本文中的葡糖淀粉酶氨基酸编号是基于葡糖淀粉酶与TrGA (SEQ ID NO:2和/或3) 的序列比对。

[0091] 用语“蛋白质或多肽的成熟形式”是指蛋白质或多肽的最终有功能的形式。葡糖淀粉酶的成熟形式可例如缺少信号肽。作为示例,TrGA的成熟形式包括催化结构域、连接子区域和淀粉结合结构域,其具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0092] 如本文中所使用的,术语“葡糖淀粉酶变体”和“变体”用于指这样的葡糖淀粉酶,其与亲本葡糖淀粉酶序列具有一定程度的氨基酸序列同一性。变体与亲本序列相似,但是在其氨基酸序列中具有至少一个使得它们在序列上不同于亲本葡糖淀粉酶取代、缺失或插入。在某些情况中,变体被操纵和/或工程化以在其氨基酸序列中包括至少一个使得它们在序列上不同于亲本的取代、缺失或插入。此外,葡糖淀粉酶变体可保留亲本葡糖淀粉酶的功能特征,例如维持亲本葡糖淀粉酶的葡糖淀粉酶活性的至少约50%,约60%,约70%,约80%,或约90%。如果是所要选择的,其也可具有高于100%的活性。

[0093] 当用于比较而进行最佳比对时,“变体”与亲本多肽序列可具有至少约45%,约50%,约55%,约60%,约65%,约70%,约75%,约80%,约85%,约88%,约90%,约91%,约92%,约93%,约94%,约95%,约96%,约97%,约98%,约99%或约99.5%的序列同一性。在一些实施方案中,葡糖淀粉酶变体与亲本葡糖淀粉酶的催化结构域可具有至少约45%,约50%,约55%,约60%,约65%,约70%,约75%,约80%,约85%,约88%,约90%,约91%,约92%,约93%,约94%,约95%,约96%,约97%,约98%,约99%或约99.5%的序列同一性。在一些实施方案中,葡糖淀粉酶变体与亲本葡糖淀粉酶的淀粉结合结构域可具有至少约45%,约50%,约55%,约60%,约65%,约70%,约75%,约80%,约85%,约88%,约90%,约91%,约92%,约93%,约94%,约95%,约96%,约97%,约98%,约99%或约99.5%的序列同一性。可在亲本或变体序列的全长上测量序列同一性。

[0094] 使用本领域中已知的标准技术(见例如,Smith and Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981);Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970);Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444(1988);Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group,Madison,WI)中的程序例如GAP,BESTHT,FASTA和TFASTA;以及

Devereux et al., *Nucleic Acid Res.*, 12:387-395 (1984)) 来确定序列同一性。

[0095] “百分比(%)核酸序列同一性”或“百分比(%)氨基酸序列同一性”被定义为候选序列中的核苷酸残基或氨基酸残基与起始序列(例如, SEQ ID NO 2)的核苷酸残基或氨基酸残基所相同的百分比。可在起始序列的全长中测量序列同一性。

[0096] 在本申请中通过序列比对的方法确定“序列同一性”。为了本公开的目的, 比对方法为BLAST, 其由Altschul等人所描述(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); 和Karlin et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993))。特别有用的BLAST程序是WU-BLAST-2程序(见Altschul等人, *Meth. Enzymol.* 266:460-480 (1996))。WU-BLAST-2使用数个搜索参数, 其中大多数被设置为默认值。可调节的参数以下列值设置: 重叠跨越=1, 重叠部分=0.125, 词阈值(T)=11。HSP S和HSP S2参数是动态的值, 并且取决于具体序列的组成和针对其对目的序列进行检索的具体数据库的组成而由程序本身确立。然而, 可调节所述值以增加灵敏度。A%氨基酸序列同一性值是由匹配的相同残基的数目除以比对区域中“更长”序列的残基总数而确定的。“更长”序列是在比对区域中具有最多实际残基的序列(忽略通过WU-Blast-2引入以使比对得分最大化的间隙)。

[0097] 术语“最佳比对”是指给出最高百分比同一性评分的比对。

[0098] 如本文中所使用的, 术语“催化结构域”是指多肽的结构区域, 其含有用于底物水解的活性位点。

[0099] 术语“连接子”是指通常具有3至40个氨基酸残基的短氨基酸序列, 其将包含淀粉结合结构域的氨基酸序列与包含催化结构域的氨基酸序列共价结合。

[0100] 术语“淀粉结合结构域”是指优先结合淀粉底物的氨基酸序列。

[0101] 如本文中所使用的, 术语“突变体序列”和“突变体基因”可互换地使用并且是指存在于宿主细胞的亲本序列中的至少一个密码子中具有改变的多核苷酸序列。突变体序列的表达产物是相对于亲本具有改变的氨基酸序列的变体蛋白。表达产物可具有改变的功能性能力(例如, 提高的酶促活性)。

[0102] 如本文中所使用的, 在多肽的语境中, 术语“特性”或其语法上的等同物是指可被选择或检测的多肽的任何特征或属性。这些特性包括但不限于氧化稳定性、底物特异性、催化活性、热稳定性、pH活性特征谱、对蛋白分解降解的抗性、 K_M 、 K_{CAT} 、 K_{CAT}/K_M 比率、蛋白质折叠、结合底物的能力和被分泌的能力。

[0103] 如本文中所使用的, 在核酸的语境中, 术语“特性”或其语法上的等同物是指可被选择或检测的核酸的任何特征或属性。这些特性包括但不限于, 影响基因转录(例如, 启动子强度或启动子识别)的特性、影响RNA加工(例如, RNA剪接和RNA稳定性)的特性、影响翻译(例如, 调节mRNA与核糖体蛋白的结合)的特性。

[0104] 术语“热稳定的”和“耐热的”是指下述本公开的葡糖淀粉酶变体: 其在淀粉底物水解中普遍的条件下(例如暴露于改变的温度时)、在暴露于温度给定的时间段后, 保留特定量的酶促活性。

[0105] 在特性(例如热稳定性)的语境中, 术语“提高的稳定性”是指与另一个参考(即亲本)葡糖淀粉酶相比, 随时间所保留的更高的淀粉水解活性。

[0106] 在特性(例如热稳定性)的语境中, 术语“减少的稳定性”是指与另一个参照葡糖淀粉酶相比, 随时间所保留的更低的淀粉水解活性。

[0107] 术语“比活性”被定义为每mg葡糖淀粉酶蛋白的活性。在一些实施方案中，葡糖淀粉酶的活性是通过本文所描述的乙醇测定而确定的并被表示为从淀粉底物产生的葡萄糖的量。在一些实施方案中，可使用本文所描述的Caliper测定来确定蛋白质浓度。

[0108] 术语“有活性的”和“有生物学活性的”是指与特定蛋白相关的生物学活性。因此，给定蛋白的生物学活性是指本领域技术人员通常归于那种蛋白的任何生物学活性。例如，与葡糖淀粉酶相关的酶促活性是水解性的，因此有活性的葡糖淀粉酶具有水解活性。

[0109] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可互换地使用，是指任何长度的多聚形式的核苷酸，其为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。这些术语包括但不限于，单链、双链或三链DNA，基因组DNA，cDNA，RNA，DNA-RNA杂合体，或者包含嘌呤和嘧啶碱基、或其它天然的、经化学修饰、经生物化学修饰、非天然或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0110] 如本文中所使用的，术语“DNA构建体”、“转化性DNA”和“表达载体”可互换地使用，是指用于将序列引入宿主细胞或生物体中的DNA。可通过PCR或本领域技术人员已知的任何其它合适的技术而在体外产生所述DNA。DNA构建体、转化性DNA或重组表达盒可被整合到质粒、染色体、线粒体DNA、质体DNA、病毒或核酸片段中。通常，表达载体、DNA构建体或转化性DNA的重组表达盒部分包括(在其它序列中)待转录的核酸序列和启动子。在一些实施方案中，表达载体具有整合和在宿主细胞中表达异源DNA片段的能力。

[0111] 如本文中所使用的，术语“载体”是指多核苷酸构建体，其被设计用于将核酸引入一个或多个细胞类型中。载体包括克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、盒等。

[0112] 如本文中所使用的，在将核酸序列引入细胞中的语境中，术语“引入”是指任何适于将核酸序列转移到细胞中的方法。此类用于引入的方法包括但不限于原生质体融合、转染、转化、缀合和转导。

[0113] 如本文中所使用的，术语“经转化的”和“经稳定转化的”是指具有非天然(异源)多核苷酸序列的细胞，所述序列被整合到其基因组中或作为被保持至少两代的游离质粒。

[0114] 如本文中所使用的，术语“可选择的标记物”和“选择性标记物”是指能够在宿主细胞中表达的核酸(例如基因)，其允许容易地选择含有载体的那些宿主。通常，可选择的标记物是赋予宿主细胞抗微生物抗性或代谢优势以允许将含有外源DNA的细胞与在转化过程中未接受任何外源序列的细胞区分开。

[0115] 如本文中所使用的，术语“启动子”是指起作用以指导下游基因的转录的核酸序列。启动子以及其它转录和翻译调控核酸序列(也成为“控制序列”)是表达指定基因所必需的。一般地，转录和翻译调控序列包括但不限于启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、以及增强子或活化子序列。

[0116] 当将核酸置于与另一种核酸序列的功能性关系中时，其为“可操作地连接”的。例如，编码分泌性前导序列(即信号肽)的DNA与多肽的DNA可操作地连接，如果其作为参与多肽的分泌的前蛋白被表达的话。通常，“可操作地连接”是指被连接的DNA序列是连续的，并且在分泌性前导序列的情形中，其为连续的且在阅读相中。

[0117] 如本文中所使用的，术语“基因”是指多核苷酸(例如DNA区段)，其编码多肽且包括编码区之前和之后的区域，以及单个编码区段(外显子)之间的居间序列(内含子)。

[0118] 如本文中所使用的，“直向同源物”和“直向同源基因”是指通过物种形成而从共同的先祖基因进化而来的不同物种中的基因(即同源性基因)。通常，直向同源物在进化的过

程中保留了相同的功能。对直向同源物的鉴别可用于可靠地预测新测序的基因组中的基因功能。

[0119] 如本文中所使用的,“旁系同源物”和“旁系同源基因”是指通过基因组内的复制而相关联的基因。直向同源物在进化的过程中保留相同的功能,而旁系同源物进化出新的功能,虽然一些功能通常与原始的功能相关。旁系同源基因的实例包括但不限于编码胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶的基因,它们都是丝氨酸蛋白酶并一起存在于相同的物种中。

[0120] 如本文中所使用的,术语“杂交”是指核酸的链与互补链通过碱基配对而结合的过程,如本领域中所知的。

[0121] 核酸序列被认为是与参考核酸序列“选择性可杂交的”,如果所述两个序列在中等至高严紧杂交和洗涤条件下彼此特异性杂交。杂交条件是基于核酸结合复合物或探针的熔解温度(T_m)。例如,“最大严紧性”通常发生在大约 $T_m-5^{\circ}\text{C}$ 时(探针的 T_m 以下 5°C);“高严紧性”在 T_m 以下约 $5-10^{\circ}\text{C}$;“中度严紧性”在探针的 T_m 以下约 $10-20^{\circ}\text{C}$;而“低严紧性”在 T_m 以下约 $20-25^{\circ}\text{C}$ 。功能上,最大严紧性条件可被用于鉴别与杂交探针有严格同一性或接近严格同一性的序列;而中度或低严紧性杂交可被用于鉴别或检测多核苷酸序列同源物。

[0122] 中等和高严紧杂交条件是本领域中熟知的。高严紧性条件的实例包括在下列条件下杂交:约 42°C 、50%甲酰胺、 $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times\text{Denhardt's}$ 溶液、0.5%SDS和 $100\mu\text{g/ml}$ 变性的载体DNA,随后在室温下用 $2\times\text{SSC}$ 和0.5%SDS清洗两次并于 42°C 在 $0.1\times\text{SSC}$ 和0.5%SDS中再清洗两次。中等严紧条件的实例包括在 37°C 下、在包含20%甲酰胺、 $5\times\text{SSC}$ (150mM NaCl, 15mM柠檬酸钠)、50mM磷酸钠(pH 7.6)、 $5\times\text{Denhardt's}$ 溶液、10%硫酸葡聚糖和20mg/ml变性的剪断的鲑精DNA的溶液中孵育过夜,随后在约 $37-50^{\circ}\text{C}$ 下在 $1\times\text{SSC}$ 中清洗滤器。本领域技术人员知道如何按需要调节温度、离子强度等以适应例如探针长度等因素。

[0123] 如本文中所使用的,“重组的”包括指通过引入异源或同源核酸序列而被修饰的细胞或载体,或是指所述细胞源自经如此修饰的细胞。因此,例如,重组的细胞表达未在细胞的天然(非重组)形式中以相同的形式发现的基因或者表达天然的基因,然而所述天然基因作为人故意干预的结果而异常表达、表达不足或根本不表达。

[0124] 在本公开的实施方案中,在至少一个密码子中用位点饱和诱变产生了经突变的DNA序列。在另一个实施方案中,对于两个或更多个密码子进行了位点饱和诱变。在另外的实施方案中,突变体DNA序列与亲本序列具有多于约50%,约55%,约60%,约65%,约70%,约75%,约80%,约85%,约90%,约95%或约98%的同一性。在备选的实施方案中,使用任何已知的诱变程序(例如辐射、亚硝基胍等)在体内产生了突变体DNA。然后分离所需的DNA序列并将其用于本文所提供的方法中。

[0125] 如本文中所使用的,“异源蛋白”是指在宿主细胞中不天然存在的蛋白或多肽。

[0126] 如果酶以比其在相应野生型细胞中的表达水平更高的水平在宿主细胞中表达,则酶在所述细胞中“过表达”。

[0127] 术语“蛋白”和“多肽”在本文中可互换地使用。在当前的公开和权利要求中,使用了用于氨基酸残基的常规一个字母和三个字母密码。氨基酸的三字母密码如遵照生物化学命名IUPAC-IUB联合委员会(JCBN)而定义的。还理解的是,由于遗传密码的简并性,多肽可由多于一个核苷酸序列编码。

[0128] 本公开的变体通过下列命名法被描述：[原始氨基酸残基/位置/取代的氨基酸残基]。例如，用亮氨酸取代76位的精氨酸被表示为R76L。当在指定的位置有多于一个氨基酸取代时，取代表示为1) Q172C, Q172D或Q172R; 2) Q172C, D或R, 或者3) Q172C/D/R。当在本文中鉴别了适于取代的位置而没表明具体的氨基酸时，应理解为存在于所述位置的氨基酸残基可被任何氨基酸残基取代。当与其它葡糖淀粉酶相比，变体葡糖淀粉酶含有缺失时，所述缺失被表示为“*”。例如，位置R76处的缺失被表示为R76*。两个或更多个连续氨基酸的缺失被表示为例如(76-78)*。

[0129] “原序列(prosequence)”是信号序列与成熟蛋白之间、蛋白分泌所必需的氨基酸序列。原序列的剪切将产生成熟的有活性的蛋白。

[0130] 术语“信号序列”或“信号肽”是指可参与蛋白的成熟或前体形式的分泌的任何核苷酸和/或氨基酸序列。信号序列的此定义是功能性的定义，意在包括由蛋白基因的N末端部分编码的所有那些参与蛋白分泌的实行的氨基酸序列。它们通常但不是全体地结合于蛋白的N末端部分或前体蛋白的N末端部分。信号序列可以是内源性的或外源性的。信号序列可以是通常与蛋白(例如葡糖淀粉酶)相关联的序列，或者可以是来自编码另一个被分泌的蛋白的基因。

[0131] 术语蛋白或肽的“前体”形式是指具有与蛋白的氨基或羧基末端可操作地连接的原序列的、蛋白的成熟形式。前体也可具有与原序列的氨基末端可操作地连接的“信号”序列。前体还可具有涉及翻译后活性的额外的多核苷酸(例如，从其上被剪切以留下蛋白或肽的成熟形式的多核苷酸)。

[0132] “宿主株系”或“宿主细胞”是指用于包含根据本公开的DNA的表达载体的适合的宿主。

[0133] 术语“源自”和“获得自”不仅是指由所涉及的生物体的株系产生或可由其产生的葡糖淀粉酶，还指由分离自此类株系的DNA序列编码及在含有所述DNA序列的宿主生物体中产生的葡糖淀粉酶。此外，所述术语指由合成和/或cDNA来源的DNA序列编码且具有所涉及的葡糖淀粉酶的鉴别特征的葡糖淀粉酶。

[0134] 在此定义范围内的“衍生物”通常以一定程度保留了在野生型、天然或亲本形式中所观察到的特征性水解活性，从而所述衍生物可用于与所述野生型、天然或亲本形式相似的目的。葡糖淀粉酶的功能性衍生物包括天然存在的、合成或重组产生的肽或肽片段，其具有本公开的葡糖淀粉酶一般特征。

[0135] 术语“分离的”是指从自然环境中被去除的物质(如果其天然存在的话)。“纯化的”蛋白是指被至少部分地纯化至同质的蛋白。在一些实施方案中，经纯化的蛋白是超过约10%纯、约20%纯或约30%纯，如通过SDS-PAGE所确定的。本公开的其它方面包括高度纯化形式的蛋白(即超过约40%纯、约60%纯、约80%纯、约90%纯、约95%纯、约97%纯或约99%纯)，如通过SDS-PAGE所确定的。

[0136] 如本文中所使用的，术语“组合诱变”是指其中产生了起始序列的变体文库的方法。在这些文库中，变体含有一个或数个选自预先确定的突变组的突变。此外，所述方法为引入不是预先确定的突变组成员的随机突变提供了工具。在一些实施方案中，所述方法包括美国专利号6,582,914中所示的那些，在此通过引用而并入。在备选的实施方案中，组合诱变方法包括商业上可得的试剂盒(例如，**QuikChange®**Multisite, Stratagene, San

Diego, CA)。

[0137] 如本文中所使用的,术语“突变体的文库”是指在其基因组的大部分中同一但是包括一个或多个基因的不同同源物的细胞群。可使用此类文库来例如鉴别具有改善的特点的基因或操纵子。

[0138] 如本文中所使用的,术语“干燥固体含量(DS或ds)”是指在干重的基础上以%表示的浆料的总固体。

[0139] 如本文中所使用的,术语“初始命中”是指通过筛选组合共有诱变文库而鉴别出的变体。在一些实施方案中,与起始基因相比初始命中具有改善的性能特征。

[0140] 如本文中所使用的,术语“改善的命中”是指通过筛选增强的组合共有诱变文库而鉴别出的变体。

[0141] 如本文中所使用的,术语“靶特性”是指待改变的起始基因的特性。不意欲将本公开限制为任何特定的靶特性。然而,在一些实施方案中,靶特性是基因产物的稳定性(例如对变性、蛋白分解或其它变质性因素的抗性),而在其它实施方案中,改变了生产宿主中的生产水平。的确,所料想的是起始基因的任何特性都将可用于本公开中。其它的术语定义可贯穿本说明书而出现。

[0142] 如本文中所使用的,“用于制造啤酒的过程”还可被应用于任何谷(grist)的淀粉糖化中。

[0143] 如本文中所使用的,术语“谷”是指可源自任何植物和植物部分的任何含有淀粉和/或糖的植物材料,所述植物和植物部分包括根茎(例如马铃薯)、根(例如木薯[*Manihot esculenta*]根)、茎、叶和种子。所述谷可包括谷物,例如来自大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉米/玉蜀黍、稻、高粱、粟和蜀黍的谷物,例如至少10%、或至少15%、或至少25%、或至少35%,例如至少50%,至少75%,至少90%或甚至100%(w/w)的麦芽汁的谷源自谷物。在一些实施方案中,所述谷可包含从木薯[*Manihot esculenta*]根获得的、含有淀粉和/或糖的植物材料。所述谷可包括含麦芽的谷物,例如大麦麦芽。通常,至少10%,或至少15%,或至少25%,或至少35%,例如至少50%,至少75%,至少90%或甚至100%(w/w)的麦芽汁的谷来自含麦芽的谷物。所述谷可包含附加物,例如至多10%、或至少10%,或至少15%,或至少25%,或至少35%,或至少50%,至少75%,至少90%,或甚至100%(w/w)的麦芽汁的谷是附加物。

[0144] 术语“附加物”被理解为不是大麦麦芽的谷的部分。附加物可以是任何富含碳水化合物的物质。在术语“附加物”中,包括含有淀粉和/或糖的植物材料,例如在“谷”中所定义的。

[0145] 在酿造的情境中,术语“发酵”是指麦芽汁中的糖被酿造酵母中的酶转化为乙醇和二氧化碳,伴随其它发酵副产物的形成。

[0146] 如本文中所使用的,术语“麦芽”被理解为任何含麦芽的谷物,例如大麦。

[0147] 如本文中所使用的,术语“麦芽饮料”包括例如下列形成泡沫的经发酵的麦芽饮料:全麦啤酒、淡色啤酒、干啤、淡啤酒、轻啤酒、低醇啤酒、低卡路里啤酒、porter、巴克啤酒、烈啤酒、麦芽酒、非含醇的麦芽酒等。术语“麦芽饮料”还包括不形成泡沫的啤酒和备选的麦芽饮料,例如水果调味的麦芽饮料,例如柑橘调味的(例如柠檬调味的、橙子调味的、莱姆调味的或浆果调味的)麦芽饮料、酒调味的麦芽饮料(例如伏特加酒调味的、朗姆酒调味的或龙舌兰酒调味的麦芽酒),或咖啡调味的麦芽饮料(例如咖啡因风味的麦芽酒等)。

[0148] 术语“醪液”被理解为水性的淀粉浆料,例如包含压碎的大麦麦芽、压碎的大麦和/或其它附加物或其组合,稍后将其与水相混合以被分离成为麦芽汁+谷糟。

[0149] 如本文中所使用的,术语“麦芽汁”是指在淀粉糖化过程中对谷进行提取后未发酵的酒流出(run-off)。

[0150] 如本文中所使用的,术语“谷糟”是指当对谷进行了提取且将麦芽汁从醪液中分离时余留的排去了液体的固体。

[0151] 术语“啤酒”中所包括的是任何经发酵的麦芽汁,其通过对含有淀粉的材料进行酿造和发酵而产生,主要源自谷粒,例如含麦芽的大麦。也可使用小麦、玉米和稻。

[0152] 如本文中所使用的,术语麦芽汁中的“提取回收物”被定义为从谷(麦芽和附加物)中提取的可溶性物质的总和,被表达为基于干物质的百分比。

[0153] 如本文中所使用的,术语“巴氏杀菌”是指通过加热而杀死水性溶液中的微生物。在酿造过程中实施巴氏杀菌通常是通过使用闪蒸巴氏灭菌器或隧道式巴氏灭菌器。如本文中所使用的,术语“巴氏灭菌单位或PU”是指对巴氏灭菌的定量测量。对于啤酒而言的一个巴氏灭菌单位(1PU)被定义为在60摄氏度下保热一分钟。所计算的是:

[0154] $PU = t \times 1.393^{(T-60)}$, 其中:

[0155] t = 时间(分钟),于巴氏灭菌器中在巴氏灭菌温度下

[0156] T = 温度(摄氏度),在巴氏灭菌器中

[0157] $^{(T-60)}$ 代表 $(T-60)$ 的指数]

[0158] 取决于啤酒类型、原材料和微生物污染、发酵者和所感知的对于啤酒风味的影响,可使用不同的最小PU。通常,对于啤酒巴氏灭菌,需要14-15PU。取决于巴氏灭菌的设备,巴氏灭菌温度通常在64-72摄氏度的范围内,相应地计算巴氏灭菌时间。可在下述中找到其它的信息“Technology Brewing and Malting”by Wolfgang Kunze of the Research and Teaching Institute of Brewing,Berlin(VLB),3rd completely updated edition, 2004,ISBN 3-921690-49-8。

[0159] 如本文中所使用的,术语“非含醇啤酒”或“低醇啤酒”是指含有最多0.1%至3.5%或0.1%至2.5%,例如0.1%至0.5%的醇(按体积)的啤酒。非含醇啤酒是通过传统方法酿造的,但是在酿造过程的最后阶段中通过真空蒸发而去除醇,这是通过利用水和醇的不同沸点。

[0160] 如本文中所使用的,术语“低卡路里啤酒”或“具有低碳水化合物含量的啤酒”被定义为这样的啤酒:其具有的碳水化合物含量为1.5g/100g或更少且具有的实际发酵度为至少80%。

[0161] 当提供了值的范围时,所理解的是也具体公开了那个范围的上限和下限之间每个居间的值,直至下限的单位的十分之一,除非语境中清楚地另有所指。所述范围中任何所述值或居间值之间的每个更小的范围以及所述范围中的任何其它所述值或居间值都被涵盖在本公开中。这些更小范围的上限和下限可独立地被包括或排除在所述范围中,且本公开中还涵盖了所述更小范围中的每个范围(其包括两个极值中的任一个,两个极值都不包括或两个极值均包括),除了所述范围内任何具体排除的极值。当所述范围包括一个或两个极值时,排除了那些所包括的极值中的一个或两个的范围也包括在本公开中。

[0162] 在更详细地描述示例性实施方案之前,要理解本公开不局限于所描述的特定实施

方案,因为其当然可以变化。虽然与本文中所描述的那些相似或等同的任何方法和材料均可被用于实施或测试本公开,现在描述了示例性的方法和材料。

[0163] 如本文及所附权利要求中所使用的,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数的指代,除非语境中清楚地另有所指。因此,例如指代“基因”时包括多个此类候选试剂,且指代“细胞”包括指代一个或多个细胞及本领域技术人员已知的其等同物,等等。

[0164] 提供本文中所讨论的出版物仅仅是为了其中在本申请的递交日之前所公开的内容。本文没有任何部分应被解释为承认本公开不因为在先发明而有权先于此类出版物。

[0165] 1.2.缩写

GA **葡糖淀粉酶**

GAU **葡糖淀粉酶单位**

[0166] **wt %** **重量百分比**

°C **摄氏度**

rpm **转数/分钟**

H ₂ O	水
dH ₂ O	去离子水
dIH ₂ O	去离子水, Milli-Q 过滤
aa 或 AA	氨基酸
bp	碱基对
kb	千碱基
kD	千道尔顿
g 或 gm	克
μg	微克
mg	毫克
μl 和 μL	微升
ml 和 mL	毫升
mm	毫米
μm	微米
[0167] M	摩尔
mM	毫摩尔
μM	微摩尔
U	单位
V	伏
MW	分子量
MWCO	分子量阈值
sec(s) 或 s(s)	秒
min(s) 或 m(s)	分钟
hr(s) 或 h(s)	小时
DO	溶解的氧
ABS	吸光度
EtOH	乙醇
PSS	生理盐溶液
m/v	质量/体积

MTP	微量滴定板
N	正常
DP1	单糖
DP2	二糖
DP>3	寡糖、具有大于 3 的聚合度的糖
[0168] ppm	百万分率
SBD	淀粉结合结构域
CD	催化结构域
PCR	聚合酶链式反应
WT	野生型

[0169] 2. 亲本葡糖淀粉酶

[0170] 在一些实施方案中,本公开提供了葡糖淀粉酶变体。所述葡糖淀粉酶变体是亲本葡糖淀粉酶的变体,其可包含催化结构域和淀粉结合结构域。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶包含催化结构域,其具有如SEQ ID NO:1,2,3,5,6,7,8或9中所示的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:1,2,3,5,6,7,8,或9中所示的氨基酸序列的一个或多个显示至少约80%,约85%,约90%,约95%,约97%,约99%或约99.5%序列同一性的氨基酸序列。在其它的实施方案中,亲本葡糖淀粉酶包含由下列DNA序列编码的催化结构域:其在中、高或严紧条件下与编码具有SEQ ID NO:1、2或3的氨基酸序列之一的葡糖淀粉酶的催化结构域的DNA杂交。

[0171] 在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶包含的淀粉结合结构域具有如SEQ ID NO:1,2,11,385,386,387,388,389或390中所示的氨基酸序列,或具有与SEQ ID NO:1,2,11,385,386,387,388,389或390中所示的氨基酸序列的一个或多个显示至少约80%,约85%,约90%,约95%,约97%,约99%或约99.5%序列同一性的氨基酸序列。在其它实施方案中,亲本葡糖淀粉酶包含由下列DNA序列编码的淀粉结合结构域:其在中、高或严紧条件下与编码具有SEQ ID NO:1、2或11的氨基酸序列之一的葡糖淀粉酶的淀粉结合结构域的DNA杂交。

[0172] 葡糖淀粉酶的所预测的结构和已知的序列在真菌物种中是保守的 (Coutinho et al., 1994, Protein Eng., 7:393-400 和 Coutinho et al., 1994, Protein Eng., 7:749-760)。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶为丝状真菌葡糖淀粉酶。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶是从下列获得的:木霉属 (*Trichoderma*) 菌株 (例如瑞氏木霉、长枝木霉 (*T. longibrachiatum*)、*T. strictipilis*、棘孢木霉 (*T. asperellum*)、康宁木霉 (*T. konilangbra*) 和哈茨木霉 (*T. hazianum*)), 曲霉属 (*Aspergillus*) 菌株 (例如黑曲霉、构巢曲霉 (*A. nidulans*)、白曲霉 (*A. kawachi*)、泡盛曲霉 (*A. awamori*) 和米曲霉 (*A. oryzae*)), 篮状菌属 (*Talaromyces*) 菌株 (例如埃默森篮状菌 (*T. emersonii*)、嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*) 和 *T. duponti*), 肉座菌属 (*Hypocrea*) 菌株 (例如胶质肉座菌 (*H. gelatinosa*)、东方肉座菌 (*H. orientalis*)、酒色肉座菌 (*H. vinosa*) 和 *H. citrina*), 镰刀菌属 (*Fusarium*) 菌株 (例如尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)、粉红镰刀菌 (*F. roseum*) 和镰孢霉

(*F.venenatum*)), 链孢霉属(*Neurospora*) 菌株(例如粗糙链孢霉(*N.crassa*)) 和腐质霉属(*Humicola*) 菌株(例如, 灰腐质霉(*H.grisea*)、特异腐质霉(*H.insolens*) 和疏绵状腐质霉(*H.lanuginose*)), 青霉属(*Penicillium*) 菌株(例如点青霉(*P.notatum*) 或产黄青霉(*P.chrysogenum*)) 或者酵母样菌(*Saccharomycopsis*) 菌株(例如扣囊复膜孢酵母(*S.fibuligera*))。

[0173] 在一些实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶可以是细菌葡糖淀粉酶。例如, 多肽可从革兰氏阳性细菌菌株中获得, 例如芽孢杆菌属(*Bacillus*) (例如嗜碱芽孢杆菌(*B.alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*B.amyloliquefaciens*)、迟缓芽孢杆菌(*B.lentus*)、地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*B.stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*) 和苏云金芽孢杆菌(*B.thuringiensis*)) 或链霉菌属(*Streptomyces*) 菌株(例如变铅青链霉菌(*S.lividans*))。

[0174] 在一些实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含催化结构域, 其与SEQ ID NO:3的TrGA氨基酸序列的催化结构域具有至少约80%, 约85%, 约90%, 约93%, 约95%, 约97%, 约98%或约99%的序列同一性。

[0175] 在其它实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含催化结构域, 其与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的曲霉属亲本葡糖淀粉酶的催化结构域具有至少约90%, 约93%, 约95%, 约96%, 约97%, 约98%或约99%的序列同一性。

[0176] 在其它实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含催化结构域, 其与SEQ ID NO:8的灰腐质霉(HgGA) 亲本葡糖淀粉酶的催化结构域具有至少约90%, 约95%, 约97%或约99%的序列同一性。

[0177] 在一些实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含淀粉结合结构域, 其与SEQ ID NO:1、2或11的TrGA氨基酸序列的淀粉结合结构域具有至少约80%, 约85%, 约90%, 约95%, 约97%或约98%的序列同一性。

[0178] 在其它实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含淀粉结合结构域, 其与SEQ ID NO:385的灰腐质霉(HgGA) 葡糖淀粉酶的催化结构域具有至少约90%, 约95%, 约97%或约99%的序列同一性。

[0179] 在其它实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含淀粉结合结构域, 其与SEQ ID NO:390的太瑞斯梭孢壳霉(TtGA) 葡糖淀粉酶的催化结构域具有至少约90%, 约95%, 约97%或约99%的序列同一性。

[0180] 在其它实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含淀粉结合结构域, 其与SEQ ID NO:386的疏棉状嗜热丝孢菌(ThGA) 葡糖淀粉酶的催化结构域具有至少约90%, 约95%, 约97%或约99%的序列同一性。

[0181] 在其它实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含淀粉结合结构域, 其与SEQ ID NO:387的埃默森篮状菌(TeGA) 葡糖淀粉酶的催化结构域具有至少约90%, 约95%, 约97%或约99%的序列同一性。

[0182] 在其它实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将包含淀粉结合结构域, 其与SEQ ID NO:388或389的曲霉属亲本葡糖淀粉酶的淀粉结合结构域具有至少约90%, 约93%, 约95%, 约96%, 约97%, 约98%或约99%的序列同一性。

[0183] 在一些实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶将与SEQ ID NO:1或2的TrGA氨基酸序列将具

有至少约80%，约85%，约88%，约90%，约93%，约95%，约96%，约97%，约98%或约99%的序列同一性。

[0184] 在其它实施方案中，将从木霉属或肉座菌属菌株中获得木霉属葡糖淀粉酶同源物。一些典型的木霉属葡糖淀粉酶同源物被描述于美国专利号7,413,887中，特别涉及所述参考文献中SEQ ID NOs:17-22和43-47中所示的氨基酸序列。

[0185] 在一些实施方案中，亲本葡糖淀粉酶是包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的TrGA或与TrGA序列(SEQ ID NO:2)具有至少约80%，约85%，约88%，约90%，约93%，约95%，约96%，约97%，约98%或约99%序列同一性的木霉属葡糖淀粉酶同源物。

[0186] 可使用标准重组DNA技术分离和/或鉴别出亲本葡糖淀粉酶。可使用本领域技术人员所知晓的任何标准技术。例如，可使用特异于葡糖淀粉酶的保守区域的探针和/或引物来鉴别细菌或真菌细胞中的同源物(催化结构域，活性位点等)。备选地，可使用退化性PCR来鉴别细菌或真菌细胞中的同源物。在一些情形中，可就与已知葡糖淀粉酶(包括SEQ ID NO:2)之一或已知淀粉结合结构域(包括SEQ ID NO:11)的序列和/或结构同一性分析已知的序列(例如数据库中的序列)。也可使用功能性测定来鉴别细菌或真菌细胞中的葡糖淀粉酶活性。可分离具有葡糖淀粉酶活性的蛋白并逆向测序以分离相应的DNA序列。此类方法是本领域技术人员已知的。

[0187] 3. 葡糖淀粉酶结构同源性

[0188] 分子生物学的中心法则是编码特定酶的基因的DNA序列决定蛋白的氨基酸序列，此序列转而决定酶的三维折叠。这种折叠使不同的残基到一起而产生催化中心和底物结合表面，并且这产生了所涉及的酶的高特异性和活性。

[0189] 葡糖淀粉酶由多如三个的不同结构域组成，即约450个残基的催化结构域(其在所有的葡糖淀粉酶中是结构上保守的)，一般继以由30至80个残基组成的连接子区域，其与约100个残基的淀粉结合结构域相连。本文中以1.8埃的分辨率确定了所有三个区域均完整的瑞氏木霉葡糖淀粉酶的结构(见W02009/067218(Danisco US Inc., Genencor Division)中第94-216页的表20，在此通过引用将其并入；以及W02009/067218(Danisco US Inc., Genencor Division)中第89-93页的实施例11，在此通过引用将其并入)。使用坐标(见W02009/067218(Danisco US Inc., Genencor Division)中第94-216页的表20，在此通过引用将其并入)，将此结构与来自泡盛曲霉菌株X100的葡糖淀粉酶的催化结构域的坐标(之前测定的，Aleshin, A.E., Hoffman, C., Firsov, L.M., and Honzatko, R.B. Refined crystal structures of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100. J. Mol. Biol. 238: 575-591 (1994))进行比对。泡盛曲霉晶体结构仅包括催化结构域。如在图6-7中所见的，催化结构域的结构很近地重叠，并且有可能基于此结构重迭而鉴别出等同的残基。相信所有的葡糖淀粉酶均享有图6-7中所示的基本结构。

[0190] TrGA的催化结构域因此具有大约450个残基(例如TrGA SEQ ID NO:2的残基1-453)并且是12个螺旋的双桶结构域。可关于具有SEQ ID NO:2的TrGA的、形成螺旋和环的残基来定义催化结构域的所述螺旋和环：

[0191] 螺旋1 残基2-20，

[0192] 环1 残基21-51，

[0193] 螺旋2 残基52-68，

- [0194] 环2 残基69-71，
[0195] 螺旋3 残基72-90，
[0196] 环3 残基91-125，
[0197] 螺旋4 残基126-145，
[0198] 环4 残基146，
[0199] 螺旋5 残基147-169，
[0200] 螺旋6 残基186-206，
[0201] 环6 残基207-210，
[0202] 螺旋7 残基211-227，
[0203] 环7 残基211-227，
[0204] 螺旋8 残基250-275，
[0205] 环8 残基260-275，
[0206] 螺旋9 残基276-292，
[0207] 环9 残基293-321，
[0208] 螺旋10 残基322-342，
[0209] 环10 残基343-371，
[0210] 螺旋11 残基372-395，
[0211] 环11 残基396-420，
[0212] 螺旋12 残基421-434，
[0213] 环12 残基435-443，
[0214] 螺旋13 残基444-447，
[0215] 环13 残基448-453
[0216] 连接子结构域具有30至80个残基(例如具有SEQ ID NO 2的TrGA的残基454-490)。
[0217] TrGA的淀粉结合结构域具有大约100个残基(例如具有SEQ ID NO:2的TrGA的残基496-596)，其由 β 夹心(由两个扭曲的三链片构成)组成。可关于具有SEQ ID NO:2的TrGA的、形成片、螺旋和环的残基来定义淀粉结合结构域的所述片、螺旋和环：
[0218] 片1' 残基496-504，
[0219] 环1' 残基505-511，
[0220] 片2' 残基512-517，
[0221] 互联环2' 残基518-543，
[0222] 片3' 残基544-552，
[0223] 环3' 残基553，
[0224] 片4' 残基554-565，
[0225] 环4' 残基566-567，
[0226] 片5' 残基568-572，
[0227] 片间区段 残基573-577，
[0228] 片5a' 残基578-582，
[0229] 环5' 残基583-589，
[0230] 片6' 残基590-596，

[0231] 有可能基于结构重迭而鉴别出其它葡糖淀粉酶中的等同残基,如下文中所进一步详述的。

[0232] 图6是SEQ ID NO:2瑞氏木霉葡糖淀粉酶(黑色)与泡盛曲霉葡糖淀粉酶(灰色)的三维结构比较的侧面视图。在此视图中,可看到催化结构域、连接子区域以及淀粉结合结构域之间的关系。

[0233] 图7是SEQ ID NO:2的瑞氏木霉葡糖淀粉酶(黑色)与泡盛曲霉葡糖淀粉酶(灰色)的三维结构比较的俯视图。本文所示的葡糖淀粉酶(以及迄今所有已知的葡糖淀粉酶)享有这种结构同源性。对于所有的葡糖淀粉酶而言,结构的保守性与活性的保守性以及保守的作用机制相关。鉴于此高同源性,由木霉属葡糖淀粉酶的位点特异性变体(其引起改变的功能)产生的改变在其它葡糖淀粉酶中也将具有相似的结构性以及功能性影响。因此,关于什么变体产生所需的益处的教导可被应用于其它葡糖淀粉酶。

[0234] 对于淀粉结合结构域(SBD),使用W02009/067218(Danisco US Inc.,Genencor Division)中第94-216页的表20(在此通过引用而并入)的坐标来产生进一步的晶体结构。将TrGA的SBD与黑曲霉的SBD进行比对。如图8中所示的,黑曲霉和TrGA的SBD的结构非常近地重叠。相信所有的淀粉结合结构域至少共享图8中所示的某些基本结构,但一些SBD在结构上比其它的更相似。例如,TrGA SBD可被归类为在CAZY数据库(cazy.org)内的碳水化合物结合模块20家族中。CAZY数据库描述了结构上相关的、降解、修饰或产生糖苷键的酶的催化性和碳水化合物结合模块(或功能性结构域)家族。鉴于高的结构同源性,引起功能改变的TrGA SBD的位点特异性变体对于具有与所述TrGA SBD的结构有相似结构的SBD的其它葡糖淀粉酶(特别是被归类在碳水化合物结合模块20家族中的那些)也将有相似的结构以及功能性影响。因此,关于什么变体产生所需的益处的教导可被应用于具有结构相似性的其它SBD。

[0235] 因此,本文中所讨论的氨基酸位置编号是指对于图1中所示的成熟瑞氏木霉葡糖淀粉酶序列(SEQ ID NO:2)所指定的那些。然而,本公开不限于木霉属葡糖淀粉酶的变体,而是延伸至在“等同于”在瑞氏木霉葡糖淀粉酶(SEQ ID NO:2)中所特别鉴定的残基的位置处含有氨基酸残基的葡糖淀粉酶。在本公开的一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶是篮状菌属GA并且在篮状菌属葡糖淀粉酶(见例如SEQ ID NO:12)中等同的氨基酸残基位置处进行取代,如本文中所描述的那些。在其它的实施方案中,亲本葡糖淀粉酶包含SEQ ID NOs:5-9(见图5A和5B)。在其它的实施方案中,亲本葡糖淀粉酶是青霉属葡糖淀粉酶,例如产黄青霉(见例如SEQ ID NO:13)。

[0236] “结构同一性”决定氨基酸残基是否是等同的。结构同一性是指当将两个结构(三维和氨基酸结构)进行比对时,一对一的拓扑等同。葡糖淀粉酶的残基(氨基酸)位置“等同”于瑞氏木霉葡糖淀粉酶的残基,如果其与瑞氏木霉葡糖淀粉酶中的特定残基或那个残基的部分同源(即在一级或三级结构中在位置上相对应)或类似(具有相同或相似的功能性能力以结合、反应或在化学上相互作用)。

[0237] 为了确立与一级结构的同一性,可将葡糖淀粉酶的氨基酸序列与瑞氏木霉葡糖淀粉酶的一级序列直接进行比较,特别是与在序列已知的葡糖淀粉酶中已知不变的残基组进行比较。例如,本文中的图5A和5B显示了葡糖淀粉酶之间的保守残基。图5D和5E显示了来自各种葡糖淀粉酶的淀粉结合结构域的比对。在比对了保守残基之后,允许必要的插入和缺

失以维持比对(即避免通过恣意的缺失和插入而去除保守的残基),确定与瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶一级序列中的特定氨基酸等同的残基。保守残基的比对通常应当保存100%的此类残基。然而,超过约75%或少至约50%的保守残基的比对也足以确定等同的残基。此外,可将结构同一性与序列同一性相结合而用于鉴别等同的残基。

[0238] 例如,在图5A和5B中,将来自六种生物体的葡萄糖淀粉酶的催化结构域进行比对以提供氨基酸序列间最大量的同源性。这些序列的比较显示出每个序列中都含有许多保守的残基,如用星号所表示的。因此,这些保守的残基可被用于在其它葡萄糖淀粉酶(例如来自黑曲霉的葡萄糖淀粉酶)中确定瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶的相应的等同氨基酸残基。类似地,图5D和5E显示了来自七种生物体的葡萄糖淀粉酶的淀粉结合结构域,将其进行比对以鉴别出等同的残基。

[0239] 结构同一性涉及鉴别两个结构之间等同的残基。对于通过X射线晶体学确定了三级结构的酶,可通过确定三级结构水平上的同源性(结构同一性)来定义“等同的残基”。等同的残基被定义如下:其中比对之后,对其而言,瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶特定氨基酸残基的两个或更多个主链原子(N对N、CA对CA、C对C以及O对O)的原子坐标在0.13nm和任选地0.1nm之内。在一个方面中,比对之后,四个可能的主链原子中的至少2个或3个在0.1nm之内。比对是在最佳的模型被定向和定位以提供所涉及的葡萄糖淀粉酶的非氢蛋白质原子与瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶的原子坐标的最大重叠之后完成的。最佳模型是对于可获得的最高分辨率下的实验衍射数据给出最低R因子的晶体模型。

$$[0240] \quad R \text{ 因子} = \frac{\sum_h |Fo(h)| - |Fc(h)|}{\sum_h |Fo(h)|}$$

[0241] 功能上类似于瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶特定残基的等同残基被定义为酶的这些氨基酸:其可采取某种构象,从而使得它们以确定且归因于瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶特定残基的方式改变、修饰或促成蛋白质的结构、底物结合或催化作用。此外,它们是酶(已通过X射线晶体学获得了其三级结构)的下述这些残基,其以如下程度占据类似的位置:即虽然给定残基的主链原子可能不满足基于占据同源位置的等同标准,所述残基的至少两个侧链原子的原子坐标位于瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶相应侧链原子的0.13nm处。瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶三维结构的坐标如W02009/067218 (Danisco US Inc., Genencor Division) 中第94-216页的表20所示(在此通过引用而并入),并可如上文所述被用于在三级结构水平上确定等同的残基。

[0242] 一些被鉴别用于取代的残基是保守的残基,而其它的不是。在残基不保守的情形中,对于一个或多个氨基酸的取代被限于产生下述变体的取代:所述变体具有的氨基酸序列不相应于在自然中所找到的氨基酸序列。在保守残基的情形中,此类取代不应产生天然存在的序列。

[0243] 4. 葡萄糖淀粉酶变体

[0244] 根据本公开的变体在亲本葡萄糖淀粉酶的氨基酸序列中包括至少一个取代、缺失或插入而使得所述变体在序列上不同于所述亲本葡萄糖淀粉酶。在一些实施方案中,本公开的变体将具有至少约20%,约40%,约50%,约60%,约70%,约80%,约85%,约90%,约95%,约97%或约100%的、TrGA (SEQ ID NO:2) 的葡萄糖淀粉酶活性,亲本葡萄糖淀粉酶与TrGA (SEQ ID NO:2) 具有至少80%的序列同一性。在一些实施方案中,根据本公开的变体将在亲本TrGA (SEQ ID NO:2) 的至少一个氨基酸位置中或另一个亲本葡萄糖淀粉酶序列的等同位置中

包含取代、缺失或插入,所述另一个亲本葡糖淀粉酶序列与TrGA序列(SEQ ID NO:2)具有至少约80%,约85%,约90%,约95%,约97%,约98%或约99%的序列同一性。

[0245] 在其它实施方案中,根据本公开的变体将在亲本TrGA片段的至少一个氨基酸位置中、或包含亲本葡糖淀粉酶催化结构域的片段的等同位置中包含取代、缺失或插入,其中所述亲本TrGA片段包含TrGA序列的催化结构域(SEQ ID NO:3),所述包含亲本葡糖淀粉酶催化结构域的片段与SEQ ID NO:3、5、6、7、8或9的含有催化结构域的片段具有至少约80%,约85%,约90%,约95%,约97%,约98%或约99%的序列同一性。在一些实施方案中,所述片段将包含TrGA催化结构域(SEQ ID NO:3)的至少约400,约425,约450或约500个氨基酸残基。

[0246] 在其它实施方案中,根据本公开的变体将在亲本TrGA片段的至少一个氨基酸位置中、或包含亲本葡糖淀粉酶淀粉结合结构域的片段的等同位置中包含取代、缺失或插入,其中所述亲本TrGA片段包含TrGA序列的淀粉结合结构域(SEQ ID NO:11),所述包含亲本葡糖淀粉酶淀粉结合结构域的片段与SEQ ID NO:11、385、386、387、388、389和390的包含淀粉结合结构域的片段具有至少约80%,约85%,约90%,约95%,约97%,约98%或约99%的序列同一性。在一些实施方案中,所述片段将包含TrGA淀粉结合结构域(SEQ ID NO:11)的至少约40,约50,约60,约70,约80,约90,约100或约109个氨基酸残基。

[0247] 在一些实施方案中,当亲本葡糖淀粉酶包括催化结构域、连接子区域和淀粉结合结构域时,变体将在包含部分连接子区域的片段的至少一个氨基酸位置中包含取代、缺失或插入。在一些实施方案中,变体将在TrGA序列(SEQ ID NO:2)的片段的氨基酸序列中包含取代、缺失或插入。

[0248] 关于氨基酸取代的结构同一性是指取代发生在同源葡糖淀粉酶或亲本葡糖淀粉酶的等同氨基酸位置处。术语等同位置是指基于所涉及的亲本葡糖淀粉酶氨基酸序列以及所涉及的亲本葡糖淀粉酶的三维结构与TrGA参考葡糖淀粉酶氨基酸序列和三维序列的比对,而在两个亲本序列中共有的位置。例如,参考图5A,TrGA(SEQ ID NO:2或3)中的位置24是D24,对于黑曲霉(SEQ ID NO:6)的等同位置是位置D25,而对于米曲霉(SEQ ID NO:7)的等同位置是位置D26。对于三维序列的示例性比对,见图6和7。

[0249] 因此,在一个方面中,描述了葡糖淀粉酶变体,所述葡糖淀粉酶变体的晶体形式具有这样的晶体结构:在将等同的主链原子进行比对后,其主链原子的原子坐标与TrGA的等同主链原子的原子坐标(如W02009/067218的表20中所定义的)的均方根偏差小于0.13nm;并且所述变体具有连接子区域、淀粉结合结构域以及催化结构域,所述变体相对于亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列在淀粉结合结构域的互联环2'中,和/或催化结构域的螺旋12中、和/或环1中、和/或螺旋2中、和/或环11中包含两个或更多个氨基酸取代。在另一个方面中,与TrGA的等同主链原子的原子坐标(如W02009/067218的表20中所定义的)的均方根偏差小于0.12nm,例如小于0.11或例如小于0.10。

[0250] 在一个方面中,描述了葡糖淀粉酶变体,所述葡糖淀粉酶变体包含淀粉结合结构域和催化结构域,所述变体相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列或等同的亲本葡糖淀粉酶在互联环2',和/或环1,和/或螺旋2,和/或环11,和/或螺旋12中包含两个或更多个氨基酸取代,用于在淀粉水解过程中减少缩合产物的合成。

[0251] 在另一个方面中,描述了葡糖淀粉酶变体,所述葡糖淀粉酶变体包含相对于下列

的两个或更多个氨基酸取代:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的互联环2',和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的环1,和/或具有SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的螺旋2,和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的环11,和/或具有SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的螺旋12。

[0252] 在另一个方面中,描述了葡糖淀粉酶变体,所述葡糖淀粉酶变体包含相对于下列的两个或更多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列,和/或SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列。

[0253] 在一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是相对于下列的:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列的互联环2' (例如在位置518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542和/或543中的一个或多个中),和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列的环1 (例如在位置21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50和/或51的一个或多个中),和/或具有SEQ ID NO:2的52至68位的氨基酸序列的螺旋2 (例如在位置52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67和/或68的一个或多个中),和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列的环11 (例如在位置396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419和/或420的一个或多个中),和/或具有SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列的螺旋12 (例如在位置421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433和/或534的一个或多个中)。

[0254] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和环1和/或螺旋2和/或环11和/或螺旋12中的至少一个氨基酸取代。在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2' 中的1、2、3或4个氨基酸取代和环1和/或螺旋2和/或环11和/或螺旋12中的1、2、3或4个氨基酸取代。

[0255] 在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和环1中的至少一个氨基酸取代。在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和螺旋2中的至少一个氨基酸取代。在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和环11中的至少一个氨基酸取代。在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和螺旋12中的至少一个氨基酸取代。在另一个方面中,所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2' 中的至少一个氨基酸取代和环1中的至少一个氨基酸取代,以及螺旋2中的至少一个氨基酸取代。在另一个方面中,所述葡糖淀粉酶变体在互联环2' 的位置520-543、530-543或534-543中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在另一个方面中,所述葡糖淀粉酶变体在环1的位置30-50、

35-48或40-46的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在另一个方面中,所述葡糖淀粉酶变体在螺旋2的位置50-66、55-64或58-63的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在另一个方面中,所述葡糖淀粉酶变体在环11的位置405-420、410-420或415-420的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在另一个方面中,所述葡糖淀粉酶变体在螺旋12的位置421-434、425-434或428-434的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0256] 在一个方面中,葡糖淀粉酶变体包含两个或更多个氨基酸取代,其中一个氨基酸取代在539位且一个氨基酸取代在44位,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置,且所述序列与亲本葡糖淀粉酶具有至少80%的序列同一性,其中44位的氨基酸取代不是44C。

[0257] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体包含两个或更多个氨基酸取代,其中一个氨基酸取代在539位且一个氨基酸取代是44R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在61位包含氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在另一个方面中,539位的氨基酸取代是539R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在另一个方面中,44位的氨基酸取代是44R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。在另一个方面中,61位的氨基酸取代是61I,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0258] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体包含下列氨基酸取代:a) D44R和A539R;或b) D44R、N61I和A539R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0259] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体由SEQ ID NO:2组成且具有下列氨基酸取代:a) D44R和A539R;或b) D44R、N61I和A539R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置。

[0260] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体具有淀粉结合结构域,其与SEQ ID NO:1、2、11、385、386、387、388、389或390的淀粉结合结构域具有至少96%、97%、98%、99%或99.5%的序列同一性。在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体具有催化结构域,其与SEQ ID NO:1、2、3、5、6、7、8或9的催化结构域具有至少80%、85%、90%、95%或99.5%的序列同一性。

[0261] 在另一个方面中,亲本葡糖淀粉酶为真菌葡糖淀粉酶。

[0262] 在另一个方面中,亲本葡糖淀粉酶选自从下述获得的葡糖淀粉酶:木霉属的种、曲霉属的种、腐质霉属的种、青霉属的种、篮状菌属的种或裂殖酵母属(Schizosaccharmyces)的种。

[0263] 在另一个方面中,亲本葡糖淀粉酶是从木霉属的种或曲霉属的种获得的。

[0264] 在另一个方面中,葡糖淀粉酶经过了纯化。可通过本领域中已知的各种程序从培养基中回收或纯化本公开的葡糖淀粉酶,所述程序包括离心、过滤、提取、沉淀等。

[0265] 在一些实施方案中,葡糖淀粉酶变体将在亲本的氨基酸序列中包括至少两个取代。在其它实施方案中,所述变体可具有多于两个取代。例如,与相应的亲本葡糖淀粉酶相

比,变体可具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25个氨基酸取代,缺失或插入。

[0266] 在一些实施方案中,葡糖淀粉酶变体在相应于图5A、5B、5D和5E中所示的非保守氨基酸区域的位置的至少一个氨基酸位置中包含取代、缺失或插入(通常为取代)(例如,相应于图5A、5B、5D和5E中未标记为“*”的那些位置的氨基酸位置)。

[0267] 虽然变体可在成熟蛋白序列(SEQ ID NO:2)的任何位置具有取代,在一些实施方案中,葡糖淀粉酶变体在SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包含两个或更多个取代:23、42、43、44、59、60、61、65、67、68、410、417、418、430、431、433、518、519、520、527、531、535、536、537或539。在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包含一个或多个其它的取代:10、14、15、72、73、97、98、99、102、110、113、114、133、140、144、145、147、152、153、164、182、204、205、214、216、219、228、229、230、231、236、239、241、242、263、264、265、268、269、276、284、291、294、300、301、303、311、338、342、344、346、349、359、361、364、375、379、382、390、391、393、394、436、442、444、448、451、493、494、495、502、503、508、511、563或577。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶将与SEQ ID NO:2具有至少约50%,约60%,约70%,约80%,约90%,约95%,约96%,约97%,约98%或约99%的序列同一性。在其它实施方案中,亲本葡糖淀粉酶将是木霉属葡糖淀粉酶同源物。在一些实施方案中,变体将具有改变的特性。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶与SEQ ID NO:2的葡糖淀粉酶将具有结构同一性。

[0268] 在一些实施方案中,葡糖淀粉酶变体在SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶(例如木霉属葡糖淀粉酶同源物)的等同位置中包含两个或更多个取代:P23、T42、I43、D44、P45、D46、F59、K60、N61、T67、E68、R408、S410、S415、L417、H418、T430、A431、R433、N518、A519、A520、T527、V531、A535、V536、N537和A539。在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包含一个或多个取代:T10、L14、N15、A72、G73、S97、L98、A99、S102、K108、E110、L113、K114、R122、Q124、R125、I133、K140、N144、N145、Y147、S152、N153、N164、F175、N182、A204、T205、S214、V216、Q219、W228、V229、S230、S231、D236、I239、N240、T241、N242、G244、N263、L264、G265、A268、G269、D276、V284、S291、G294、P300、A301、A303、Y310、A311、D313、Y316、V338、T342、S344、T346、A349、V359、G361、A364、T375、N379、S382、S390、E391、A393、K394、I436、A442、N443、S444、T448、S451、T493、P494、T495、H502、E503、Q508、Q511、N563和N577。在一些实施方案中,与亲本葡糖淀粉酶相比,变体将具有改变的特性。

[0269] 在一些实施方案中,葡糖淀粉酶变体可仅在特定的位置区别于亲本葡糖淀粉酶。

[0270] 在其它实施方案中,葡糖淀粉酶亲本的变体在SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的下列位置中包含至少两个下列取代:T42V、I43Q/R、D44R/C、N61I、T67M、E68C/M、L417K/R/V、T430A/K、A431I/L/Q、R433C/E/G/L/N/S/V/Y、A519I/K/R/Y、A520C/L/P、V531L、A535K/N/P/R、V536M或A539E/R/S或包含亲本葡糖淀粉酶等同位置中的取代。在另一个方面中,葡糖淀粉酶变体在SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包含一个或多个取代:T10S、A72Y、G73F/W、S97N、S102A/M/R、K114M/Q、I133T/V、N145I、N153A/D/E/M/S/V、T205Q、Q219S、W228A/F/H/M/V、V229I/L、S230C/F/G/L/N/Q/R、S231L/V、D236R、I239V/Y、N263P、L264D/K、A268C/D/G/K、S291A/F/H/M/T、g294c、A301P/R、V338I/N/Q、

T342V、S344M/P/Q/R/V、G361D/E/F/I/L/M/P/S/W/Y、A364D/E/F/G/K/L/M/R/S/T/V/W、T375N、K394S、I436H、T451K、T495K/M/S、E503A/C/V、Q508R、Q511H、N563C/E/I/K/K/Q/T/V或N577K/P/R。

[0271] 在其它实施方案中,葡糖淀粉酶变体在SEQ ID NO:2的相关位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包含下列取代组之一:

[0272] N61I/L417V/A431L/A539R;

[0273] I43Q/N61I/L417V/A431L/A539R;

[0274] N61I/L417V/A431L/A535R/A539R

[0275] I43Q/L417V/A431L/A535R/A539R;

[0276] I43Q/N61I/L417V/A431L/A535R/A539R;

[0277] I43Q/N61I/L417V/T430A/A431L/A535R/A539R;

[0278] I43Q/L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I;

[0279] N61I/L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I;

[0280] I43Q/N61I/L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I;

[0281] I43R/N61I/L417V/A431L/A539R;

[0282] I43R/N61I/L417V/T430A/A431L/A535R/A539R;

[0283] G73F/L417R/E503V/A539R/N563K;

[0284] I43R/G73F/L417R/E503V/A539R/N563K;和

[0285] I43R/G73F/E503V/Q511H/N563K。

[0286] 在其它实施方案中,葡糖淀粉酶变体在SEQ ID NO:2的位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包含下列取代组之一:

[0287] L417V/A431L/A539R;

[0288] I43Q/L417V/A431L/A539R;

[0289] L417V/A431L/A535R/A539R

[0290] I43R/L417V/A431L/A539R;

[0291] L417R/A431L/A539R;或

[0292] L417G/A431L/A539R;

[0293] 其中葡糖淀粉酶变体相对于亲本葡糖淀粉酶不具有任何其它的取代,并且其中亲本葡糖淀粉酶具有催化结构域,其与SEQ ID NO:1、2、3、5、6、7、8或9具有至少80%的序列同一性。因此,亲本葡糖淀粉酶可以是别处所描述的那些中的任何葡糖淀粉酶。

[0294] 亲本葡糖淀粉酶可包含淀粉结合结构域,其与SEQ ID NO:1、2、11、385、386、387、388、389或390具有至少95%的序列同一性。亲本葡糖淀粉酶可与SEQ ID NO:1或2具有至少80%的序列同一性;例如其可包含SEQ ID NO:1或2。任选地,亲本葡糖淀粉酶可由SEQ ID NO:1或2组成。

[0295] 本公开的葡糖淀粉酶变体也可包括嵌合或杂合的葡糖淀粉酶,其具有例如来自一种葡糖淀粉酶的淀粉结合结构域(SBD)和来自另一种的催化结构域和连接子。例如,杂合葡糖淀粉酶可通过将来自AnGA (SEQ ID NO:6)的SBD与来自TrGA (SEQ ID NO:2)的SBD进行交换而制备,从而产生具有AnGA SBD和TrGA催化结构域及连接子的杂合体。备选地,可将AnGA的SBD和连接子与TrGA的SBD和连接子进行交换。

[0296] 在某些方面,与亲本葡糖淀粉酶相比,变体葡糖淀粉酶显示出改变的热稳定性。在一些方面,所述改变的热稳定性可以是与亲本葡糖淀粉酶相比增加的热稳定性。在一些实施方案中,所述改变的特性是与亲本葡糖淀粉酶相比改变的比活性。在一些实施方案中,所述改变的比活性可以是与亲本葡糖淀粉酶相比增加的比活性。在一些实施方案中,改变的特性是与亲本葡糖淀粉酶相比,在更低的温度下增加的热稳定性。在一些实施方案中,改变的特性是与亲本葡糖淀粉酶相比增加的比活性和增加的热稳定性。

[0297] 在一个实施方案中,一些变体可包括SEQ ID NO:2的下列位置或亲本葡糖淀粉酶(特别是木霉属葡糖淀粉酶同源物)的等同位置中的取代:

[0298] D44R/N61I/A539R;

[0299] D44R/A539R;

[0300] I43Q/D44C/L417V/E503A/Q511H/A539R;

[0301] I43Q/L417V/E503A/Q511H/A539R;

[0302] I43Q/D44C/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;

[0303] I43Q/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;

[0304] I43R/L417V/E503A/Q511H/A539R;

[0305] I43R/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;

[0306] I43R/L417R/E503A/A539R;

[0307] I43R/N61I/L417R/E503A/Q511H/A539R;

[0308] G73F/T430A/Q511H;

[0309] I43R/G73F/T430A;

[0310] G73F/T430A/E503V/Q511H;

[0311] D44C/G73F/N563K;

[0312] D44C/G73F/E503V/Q511H;

[0313] D44C/G73F/N563K;

[0314] D44C/G73F/L417R/N563K;

[0315] D44C/G73F/N563K;

[0316] I43R/T430A;

[0317] I43Q/T430A;

[0318] I43Q/T430A/Q511H;

[0319] D44C/L417R/N563K;

[0320] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I;

[0321] L417V/T430A/A431Q/Q511H/A535R/A539R/N563I;

[0322] L417V/T430A/Q511H/A535R/N563I;

[0323] L417V/T430A/Q511H/A539R/N563I;

[0324] G294C/L417R/A431L;

[0325] G294C/L417V/A431Q;

[0326] G294C/L417V/A431L/Q511H;

[0327] G294C/L417R/A431Q/Q511H;

[0328] L417R/A431L/Q511H;

- [0329] L417V/A431Q/Q511H;
- [0330] I43Q/T430A/Q511H/N61I;
- [0331] I43Q/T430A/Q511H/L417V;
- [0332] I43Q/T430A/Q511H/A431L;
- [0333] I43Q/T430A/Q511H/E503A;
- [0334] I43Q/T430A/Q511H/A539R;
- [0335] I43Q/T430A/Q511H/N61I/A539R;
- [0336] I43Q/T430A/Q511H/L417V/A539R;
- [0337] I43Q/T430A/Q511H/A431L/A539R;
- [0338] I43Q/T430A/Q511H/A431L/E503A;
- [0339] I43Q/T430A/Q511H/N61I/A539R/A431L;
- [0340] I43Q/T430A/Q511H/L417V/A539R/A431L;
- [0341] I43Q/Q511H/N61I;
- [0342] I43Q/Q511H/L417V;
- [0343] I43Q/Q511H/A431L;
- [0344] I43Q/Q511H/A539R;
- [0345] I43Q/Q511H/A539R/N61I;
- [0346] I43Q/Q511H/A539R/E503A;
- [0347] I43Q/Q511H/A539R/T430M;
- [0348] I43Q/Q511H/A539R/T430M/N61I;
- [0349] I43Q/Q511H/A539R/T430M/N61I/L417V;
- [0350] I43R/T430A/E503V/A535R/N563K;
- [0351] D44R/E503A/Q511H/N563I;
- [0352] E503A/N563I;
- [0353] I43R/T430A/E503A/Q511H/N563K;
- [0354] D44R/T430A/Q511H/A535R;
- [0355] L417V/A431L/A539R;
- [0356] L417V/A431L/A539R/I43Q;
- [0357] L417V/A431L/A539R/N61I;
- [0358] L417V/A431L/A539R/A535R;
- [0359] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I;
- [0360] L417V/A431L/A539R/N61I/A535R;
- [0361] L417V/A431L/A539R/A535R/I43Q;
- [0362] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I/A535R;
- [0363] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I/A535R/T430A;
- [0364] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/I43Q;
- [0365] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/N61I;
- [0366] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/I43Q/N61I;
- [0367] L417V/A431L/A539R/I43R;

- [0368] L417V/A431L/A539R/I43R/N61I;
- [0369] L417V/A431L/A539R/I43R/N61I/A535R/T430A;
- [0370] L417R/A431L/A539R;
- [0371] L417G/A431L/A539R;
- [0372] G73F/E503V/N563K/L417R/A539R;
- [0373] G73F/E503V/N563K/I43R/L417R/A539R; 和
- [0374] G73F/E503V/N563K/I43R/Q511H。
- [0375] 在其它实施方案中,一些变体可包括SEQ ID NO:2的下列位置或亲本葡糖淀粉酶(特别是木霉属葡糖淀粉酶同源物)的等同位置中的取代:
- [0376] D44R/N61I/A539R;
- [0377] D44R/A539R;
- [0378] I43Q/D44C/L417V/E503A/Q511H/A539R;
- [0379] I43Q/L417V/E503A/Q511H/A539R;
- [0380] I43Q/D44C/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;
- [0381] I43Q/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;
- [0382] I43R/L417V/E503A/Q511H/A539R;
- [0383] I43R/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;
- [0384] I43R/L417R/E503A/A539R;
- [0385] I43R/N61I/L417R/E503A/Q511H/A539R;
- [0386] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I;
- [0387] L417V/T430A/A431Q/Q511H/A535R/A539R/N563I;
- [0388] L417V/T430A/Q511H/A539R/N563I;
- [0389] I43Q/T430A/Q511H/A539R;
- [0390] I43Q/T430A/Q511H/N61I/A539R;
- [0391] I43Q/T430A/Q511H/L417V/A539R;
- [0392] I43Q/T430A/Q511H/A431L/A539R;
- [0393] I43Q/T430A/Q511H/N61I/A539R/A431L;
- [0394] I43Q/T430A/Q511H/L417V/A539R/A431L;
- [0395] I43Q/Q511H/A539R;
- [0396] I43Q/Q511H/A539R/N61I;
- [0397] I43Q/Q511H/A539R/E503A;
- [0398] I43Q/Q511H/A539R/T430M;
- [0399] I43Q/Q511H/A539R/T430M/N61I;
- [0400] I43Q/Q511H/A539R/T430M/N61I/L417V;
- [0401] L417V/A431L/A539R;
- [0402] L417V/A431L/A539R/I43Q;
- [0403] L417V/A431L/A539R/N61I;
- [0404] L417V/A431L/A539R/A535R;
- [0405] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I;

- [0406] L417V/A431L/A539R/N61I/A535R;
[0407] L417V/A431L/A539R/A535R/I43Q;
[0408] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I/A535R;
[0409] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I/A535R/T430A;
[0410] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/I43Q;
[0411] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/N61I;
[0412] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/I43Q/N61I;
[0413] L417V/A431L/A539R/I43R;
[0414] L417V/A431L/A539R/I43R/N61I;
[0415] L417V/A431L/A539R/I43R/N61I/A535R/T430A;
[0416] L417R/A431L/A539R;
[0417] L417G/A431L/A539R;
[0418] G73F/E503V/N563K/L417R/A539R; 和
[0419] G73F/E503V/N563K/I43R/L417R/A539R。
[0420] 在其它实施方案中,一些变体可包括SEQ ID NO:2的下列位置或亲本葡糖淀粉酶(特别是木霉属葡糖淀粉酶同源物)的等同位置中的取代:
[0421] D44R/N61I/A539R;
[0422] D44R/A539R;
[0423] I43Q/D44C/L417V/E503A/Q511H/A539R;
[0424] I43Q/L417V/E503A/Q511H/A539R;
[0425] I43Q/D44C/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;
[0426] I43Q/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;
[0427] I43R/L417V/E503A/Q511H/A539R;
[0428] I43R/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R;
[0429] I43R/L417R/E503A/A539R;
[0430] I43R/N61I/L417R/E503A/Q511H/A539R;
[0431] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I;
[0432] L417V/T430A/A431Q/Q511H/A535R/A539R/N563I;
[0433] L417V/T430A/Q511H/A539R/N563I;
[0434] I43Q/T430A/Q511H/A539R;
[0435] I43Q/T430A/Q511H/N61I/A539R;
[0436] I43Q/T430A/Q511H/L417V/A539R;
[0437] I43Q/T430A/Q511H/A431L/A539R;
[0438] I43Q/T430A/Q511H/N61I/A539R/A431L;
[0439] I43Q/T430A/Q511H/L417V/A539R/A431L;
[0440] I43Q/Q511H/A539R;
[0441] I43Q/Q511H/A539R/N61I;
[0442] I43Q/Q511H/A539R/E503A;
[0443] I43Q/Q511H/A539R/T430M;

- [0444] I43Q/Q511H/A539R/T430M/N61I;
[0445] I43Q/Q511H/A539R/T430M/N61I/L417V;
[0446] L417V/A431L/A539R;
[0447] L417V/A431L/A539R/I43Q;
[0448] L417V/A431L/A539R/N61I;
[0449] L417V/A431L/A539R/A535R;
[0450] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I;
[0451] L417V/A431L/A539R/N61I/A535R;
[0452] L417V/A431L/A539R/A535R/I43Q;
[0453] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I/A535R;
[0454] L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I/A535R/T430A;
[0455] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/I43Q;
[0456] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/N61I;
[0457] L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/I43Q/N61I;
[0458] L417V/A431L/A539R/I43R;
[0459] L417V/A431L/A539R/I43R/N61I;
[0460] L417V/A431L/A539R/I43R/N61I/A535R/T430A;
[0461] L417R/A431L/A539R;
[0462] L417G/A431L/A539R;
[0463] G73F/E503V/N563K/L417R/A539R;和
[0464] G73F/E503V/N563K/I43R/L417R/A539R。

[0465] 在其它实施方案中,一些变体可包括SEQ ID NO:2的下列位置或亲本葡糖淀粉酶(特别是木霉属葡糖淀粉酶同源物)的等同位置中的取代:

- [0466] D44R/N61I/A539R;
[0467] D44R/A539R;
[0468] L417V/A431L/A539R;
[0469] L417V/A431L/A539R/I43Q;
[0470] L417V/A431L/A539R/N61I。

[0471] 在其它实施方案中,一些变体可包括SEQ ID NO:2的下列位置或亲本葡糖淀粉酶(特别是木霉属葡糖淀粉酶同源物)的等同位置中的取代:

- [0472] D44R/N61I/A539R;
[0473] D44R/A539R。

[0474] 在其它实施方案中,一些变体具有SEQ ID NO:2的下列取代:D44R/N61I/A539R或D44R/A539R。

[0475] 在其它实施方案中,变体包含SEQ ID NO:1098。在其它实施方案中,变体由SEQ ID NO:1098组成。在其它实施方案中,变体包含SEQ ID NO:1099。在其它实施方案中,变体由SEQ ID NO:1099组成。

[0476] 将若干亲本葡糖淀粉酶与TrGA的氨基酸序列进行了比对。图5包括下列亲本葡糖淀粉酶的催化结构域:泡盛曲霉(AaGA)(SEQ ID NO:5);黑曲霉(AnGA)(SEQ ID NO:6);米曲

霉 (AoGA) (SEQ IDNO:7); 灰腐质霉 (HgGA) (SEQ ID NO:8) 和酒色肉座菌属 (HvGA) (SEQ ID NO:9)。下面的表1中呈现了催化结构域的%同一性。

[0477] 表1: 各种真菌葡糖淀粉酶之间的序列同源性

[0478]

	AaGA	AnGA	AoGA	HgGA	HvGA	TrGA
AaGA	100	95	58	53	57	56
AnGA		100	59	53	57	56
AoGA			100	55	56	56
HgGA				100	61	63
HvGA					100	91
TrGA						100

[0479] 在一些实施方案中,例如,变体葡糖淀粉酶将源自下列的亲本葡糖淀粉酶:曲霉属葡糖淀粉酶、腐质霉属葡糖淀粉酶或肉座菌属葡糖淀粉酶。

[0480] 5. 对变体葡糖淀粉酶的特征

[0481] 本公开还提供与亲本葡糖淀粉酶 (特别是TrGA) 相比具有至少一个改变的特性 (例如改善的特性) 的葡糖淀粉酶变体。在一些实施方案中,所述至少一个改变的特性 (例如改善的特性) 选自: IS/SH-比率、淀粉水解活性、实际发酵度、减少形成缩合产物、酸稳定性、热稳定性以及比活性。通常,改变的特性是减少的 IS/SH-比率、提高的实际发酵度、减少形成缩合产物、增加的热稳定性和/或增加的比活性。增加的热稳定性通常是在更高的温度下。在一个实施方案中,增加的 pH 稳定性是在高 pH 下。在其它实施方案中,增加的 pH 稳定性是在低 pH 下。

[0482] 与亲本葡糖淀粉酶相比,本公开的葡糖淀粉酶变体也可提供在低底物浓度下更高的淀粉水解速度。当在相同的条件下测试时,变体可具有比亲本葡糖淀粉酶更高的 $V_{\max}$ 或更低的 K_m 。例如,在约 25℃ 至约 70℃ (例如,约 25℃ 至约 35℃; 约 30℃ 至约 35℃; 约 40℃ 至约 50℃; 约 50℃ 至约 55℃ 或约 55℃ 至约 62℃) 的温度范围中,变体葡糖淀粉酶可具有更高的 $V_{\max}$ 。使用标准的已知过程可容易地测定米氏常数、 K_m 和 $V_{\max}$ 值。另一方面,葡糖淀粉酶也可显示出降低的淀粉水解活性,其与亲本葡糖淀粉酶 (例如 TrGA) 相比降低不超过 5%, 不超过 10% 或不超过 15%。

[0483] 5.1. 具有改变的热稳定性的变体葡糖淀粉酶

[0484] 在某些方面,本公开涉及与亲本 (野生型) 相比具有改变的热稳定性的变体葡糖淀粉酶。改变的热稳定性可以是在增加的温度下或在降低的温度下。以在 NaAc 缓冲液 (pH 4.5) 中、在 64℃ 下孵育 1 小时后的 % 残余活性来测量热稳定性。在这些条件下,与孵育前的起始活性相比,TrGA 具有约 15% 至 44% 的残余活性 (由于逐日的变化)。因此,在一些实施方案中,与孵育前的起始活性相比,具有增加的热稳定性的变体具有的残余活性相较于亲本多至少约 1% 到至少约 50% (在 NaAc 缓冲液 (pH 4.5) 中在 64℃ 下孵育一小时之后), 这包括约 2%, 约 3%, 约 4%, 约 5%, 约 6%, 约 7%, 约 8%, 约 9%, 约 10%, 约 11%, 约 12%, 约 13%, 约 14%, 约 15%, 约 16%, 约 17%, 约 18%, 约 19%, 约 20%, 约 21%, 约 22%, 约 23%, 约 24%, 约 25%, 约 26%, 约 27%, 约 28%, 约 29%, 约 30%, 约 31%, 约 32%, 约 33%, 约 34%, 约 35%, 约 36%, 约 37%, 约 38%, 约 39%, 约 40%, 约 41%, 约 42%, 约 43%, 约 44%, 约 45%, 约 46%, 约

47%，约48%，约49%和约50%。例如，当亲本的残余活性为15%时，具有增加的热稳定性的变体可具有的残余活性为约16%至约75%。在一些实施方案中，葡糖淀粉酶变体将具有改善的热稳定性，例如在给定的时间段（例如至少约60分钟、约120分钟、约180分钟、约240分钟或约300分钟）中暴露于改变的温度后，保留至少约50%，约60%，约70%，约75%，约80%，约85%，约90%，约92%，约95%，约96%，约97%，约98%或约99%的酶促活性。在一些实施方案中，在约40℃至约80℃的范围内、约50℃至约75℃的范围内，和约60℃至约70℃范围内的选定的温度下，和在约4.0至约6.0的pH范围中，变体与亲本葡糖淀粉酶相比具有增加的热稳定性。在一些实施方案中，如在测定和方法中所描述的，测定热稳定性。可调整所述方法而使其适合在其它的温度下用于测量热稳定性。备选地，可如所述方法中所描述的，在64℃下测定热稳定性。在一些实施方案中，在约20℃至约50℃、包括约35℃至约45℃和约30℃至约40℃的范围中选定的温度下，变体在更低的温度下具有相较于亲本葡糖淀粉酶增加的热稳定性。

[0485] 在一些实施方案中，具有热稳定性改善的变体在SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包括一个或多个缺失、取代或插入（特别是取代）：10、42、43、44、59、61、68、72、73、97、98、99、102、114、133、140、144、152、153、182、204、205、214、216、228、229、230、231、236、241、242、263、264、265、268、269、276、284、291、294、300、301、303、311、338、342、344、346、349、359、361、364、375、379、382、390、391、393、394、410、417、430、431、433、436、442、444、448、451、493、495、503、508、511、518、519、520、527、531、535、536、537、539、563或577。在一些实施方案中，亲本葡糖淀粉酶将是木霉属葡糖淀粉酶同源物，而在其它实施方案中，亲本葡糖淀粉酶与SEQ ID NO:2将具有至少约50%，约60%，约70%，约80%，约90%，约95%或约98%的序列同一性。在一些实施方案中，亲本葡糖淀粉酶与SEQ ID NO:2还将具有结构同一性。在一些实施方案中，具有增加的热稳定性的变体在SEQ ID NO:2的至少一个下列位置中具有取代：T10S、T42V、I43Q、I43R、D44C、D44R、E68C、E68M、G73F、G73W、K114M、K114Q、I133V、N153A、N153E、N153M、N153S、N153V、W228V、V229I、V229L、S230Q、S231V、D236R、L264D、L264K、A268D、S291A、S291F、S291H、S291M、S291T、G294C、A301P、A301R、V338I、V338N、V338Q、S344M、S344P、S344Q、S344R、S344V、G361D、G361E、G361F、G361I、G361L、G361M、G361P、G361S、G361W、G361Y、A364D、A364E、A364F、A364G、A364K、A364L、A364M、A364R、A364S、A364T、A364V、A364W、T375N、L417K、L417R、R433C、R433E、R433G、R433L、R433N、R433S、R433V、I436H、T495K、T495S、E503A、E503C、E503V、Q508R、Q511H、A519K、A519R、A519Y、V531L、A535K、A535N、A535P、A535R、A539E、A539R、A539S、N563C、N563E、N563I、N563K、N563L、N563Q、N563T、N563V、N577K、N577P或N577R。

[0486] 5.2. 具有改变的比活性的变体葡糖淀粉酶

[0487] 如本文中所使用的，比活性是每毫克蛋白的葡糖淀粉酶活性。活性是使用乙醇测定来确定的。筛选鉴别出与亲本TrGA PI相比具有性能指标(PI) > 1.0的变体。PI是由野生型(WT)和变体酶的比活性(活性/mg酶)计算的。其为“变体-比活性/WT-比活性”之商且可以是变体比活性增加的度量。约2的PI应为WT的约2倍更好。在一些方面，本公开涉及与亲本或野生型葡糖淀粉酶相比具有改变的比活性的变体葡糖淀粉酶。在一些实施方案中，所述改变的比活性为增加的比活性。增加的比活性可被定义为大于或等于约1的增加了的性能指标，

包括大于或等于约1.1,约1.2,约1.3,约1.4,约1.5,约1.6,约1.7,约1.8,约1.9以及约2。在一些实施方案中,增加的比活性为约1.0至约5.0,包括约1.1,约1.2,约1.3,约1.4,约1.5,约1.6,约1.7,约1.8,约1.9,约2.0,约2.1,约2.2,约2.3,约2.4,约2.5,约2.6,约2.7,约2.8,约2.9,约3.0,约3.1,约3.2,约3.3,约3.4,约3.5,约3.6,约3.7,约3.8,约3.9,约4.0,约4.1,约4.2,约4.3,约4.4,约4.5,约4.6,约4.7,约4.8和约4.9。在一些实施方案中,与亲本葡糖淀粉酶相比,变体具有至少约1.0倍更高的比活性,这包括至少约1.1倍,约1.2倍,约1.3倍,约1.4倍,约1.5倍,约1.6倍,约1.7倍,约1.8倍,约1.9倍,约2.0倍,约2.2倍,约2.5倍,约2.7倍,约2.9倍,约3.0倍,约4.0倍和约5.0倍。

[0488] 在一些实施方案中,具有比活性改善的变体在SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包括一个或多个缺失、取代或插入:10、14、15、23、59、60、61、65、67、68、72、73、97、98、99、102、110、113、133、140、144、145、147、152、153、164、182、204、205、214、216、219、228、229、230、231、236、239、241、242、263、264、265、268、269、276、284、291、300、301、303、311、338、342、344、346、349、359、361、364、375、379、382、390、391、393、394、410、417、418、430、431、433、442、444、448、451、493、494、495、502、503、508、511、518、519、520、531、535、536、539或563。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶将包含与SEQ IDNO:2的序列具有至少约50%,约60%,约70%,约80%,约90%或约95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶与SEQ ID NO:2还将具有结构同一性。在一些实施方案中,具有改善的比活性的本公开的变体在SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包括取代:I43Q、I43R、D44C、D44R、N061I、T067M、A072Y、S097N、S102A、S102M、S102R、I133T、N145I、N153D、T205Q、Q219S、W228A、W228F、W228H、W228M、S230C、S230F、S230G、S230L、S230N、S230Q、S230R、S231L、I239V、I239Y、N263P、A268C、A268G、A268K、S291A、G294C、T342V、K394S、L417R、L417V、T430K、A431I、A431L、A431Q、R433Y、T451K、T495M、A519I、A520C、A520L、A520P、A535R、V536M、A539R、N563K或N563I。在一些实施方案中,如在测定和方法中所描述地测定与变体相比的亲本的比活性。

[0489] 5.3.具有改变的热稳定性和改变的比活性的变体葡糖淀粉酶

[0490] 在一些方面,本公开涉及与亲本(例如野生型)相比具有改变的热稳定性和改变的比活性的变体葡糖淀粉酶。在一些实施方案中,改变的比活性为增加的比活性。在一些实施方案中,改变的热稳定性为在高温下(例如,在超过80℃的温度下)与亲本葡糖淀粉酶相比增加的热稳定性。

[0491] 在一些实施方案中,具有增加的热稳定性和增加的比活性的变体在SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的下列位置或亲本葡糖淀粉酶的等同位置中包括一个或多个缺失、取代或插入和取代:10、15、43、44、59、61、68、72、73、97、99、102、140、153、182、204、205、214、228、229、230、231、236、241、242、264、265、268、276、284、291、294、300、301、303、311、338、344、346、349、359、361、364、375、379、382、391、393、394、410、430、433、444、448、451、495、503、511、520、531、535、536、539或563。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶将是木霉属葡糖淀粉酶同源物而在其它的实施方案中,亲本葡糖淀粉酶将与SEQ ID NO:2具有至少约50%,约60%,约70%,约80%,约90%,约95%或约98%的序列同一性。在一些实施方案中,亲本葡糖淀粉酶与SEQ IDNO:2还将具有结构同一性。在一些实施方案中,具有增加的热稳定性和比活性的变体在SEQ ID NO:2的至少一个下列位置中具有取代:I43Q/R、D44C/R、W228F/H/

M、S230C/F/G/N/Q/R、S231L、A268C/D/G/K、S291A、G294C、R433Y、S451K、E503C、Q511H、A520C/L/P或A535N/P/R。

[0492] 5.4.产生可发酵糖的变体葡糖淀粉酶

[0493] 在另一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡糖淀粉酶显示出可发酵糖产生的提高。在另一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡糖淀粉酶显示出在酿造过程的淀粉糖化步骤中可发酵糖产生的提高。在另一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡糖淀粉酶显示出在酿造过程的发酵步骤中可发酵糖产生的提高。在另一个方面中,所述可发酵糖为葡萄糖。本领域技术人员可通过例如HPLC技术来确定可发酵糖的产生。

[0494] 5.5具有改变的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比(IS/SH比率)的变体葡糖淀粉酶

[0495] 在另一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡糖淀粉酶显示出减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比(IS/SH比率)。在另一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡糖淀粉酶显示出的淀粉水解活性降低不超过5%、不超过10%或不超过15%。

[0496] 在一个方面中,提供了用于鉴别在淀粉水解过程中具有减少的缩合产物合成的葡糖淀粉酶变体的筛选方法以及通过所述方法获得的葡糖淀粉酶变体,所述方法包括下列步骤:测量异麦芽糖合成和葡糖淀粉酶变体的淀粉水解活性,以及选择与亲本葡糖淀粉酶相比淀粉水解活性降低不超过5%,不超过10%或不超过15%且与亲本葡糖淀粉酶相比具有减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比(IS/SH比率)的变体。

[0497] 在一些实施方案中,就与亲本葡糖淀粉酶相比具有减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比(IS/SH比率)而选择葡糖淀粉酶变体。

[0498] 在一些实施方案中,就下述而选择葡糖淀粉酶变体:与亲本葡糖淀粉酶相比具有相同或增加的淀粉水解活性和减少的异麦芽糖合成(与亲本葡糖淀粉酶相比减少不超过5%、不超过10%或不超过15%)并从而具有减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比(IS/SH比率)。

[0499] 在另一个方面中,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡糖淀粉酶显示出提高的实际发酵度。

[0500] 5.5具有改变的缩合产物形成的变体葡糖淀粉酶

[0501] 在一个方面中,与由黑曲霉(AnGA)(SEQ ID NO:6)形成的缩合产物的量相比,葡糖淀粉酶在相同的条件下形成的缩合产物的量更低。在另一个方面中,所述葡糖淀粉酶在相同的条件下形成的缩合产物的量与由黑曲霉(AnGA)(SEQ ID NO:6)形成的缩合产物的量基本上相同、为不超过5%更高、不超过8%更高或不超过10%更高。在另一个方面中,基于蛋白质浓度的葡糖淀粉酶的剂量相同。在另一个方面中,基于在活性测定中(例如本文中所描述的GAU活性测定或如本文中所描述的淀粉水解活性测定)对活性的测量,葡糖淀粉酶的剂量相同。

[0502] 6.编码葡糖淀粉酶的多核苷酸

[0503] 本公开还涉及编码变体葡糖淀粉酶的分离的多核苷酸。所述多核苷酸可通过本领域中已知的确立的技术而制备。可合成地制备所述多核苷酸,例如通过自动化DNA合成仪。

DNA序列可以是通过将片段连接在一起而制备的、混合的基因组(或cDNA)和合成来源的。还可使用特定的引物,通过聚合酶链式反应(PCR)来制备多核苷酸。一般地,参考Minshull J. et al., Methods 32(4):416-427(2004)。还可由许多商业公司(例如Genearth AG, Regensburg, 德国)来合成DNA。

[0504] 本公开还提供包含下列核苷酸序列的分离的多核苷酸(i)与SEQ ID NO:4具有至少约50%的同一性,这包括至少约60%,约70%,约80%,约90%,约95%和约99%,或(ii)在中等至高严谨性的条件下能够与源自SEQ ID NO:4所示核苷酸序列的探针杂交,或(iii)与和SEQ ID NO:4所示序列具有至少90%的序列同一性的核苷酸序列互补。根据本公开可使用的探针可包括SEQ ID NO:4的至少约50,约100,约150,约200,约250,约300或更多的连续核苷酸。在一些实施方案中,所编码的多肽还与SEQ ID NO:2具有结构同一性。

[0505] 本公开还提供了编码变体葡糖淀粉酶的分离的多核苷酸,所述变体葡糖淀粉酶包含的氨基酸序列含有与SEQ ID NO:2至少约50%,约60%,约70%,约80%,约90%,约93%,约95%,约97%,约98%或约99%的氨基酸序列同一性。此外,本公开提供了包含任何上文所提供的多核苷酸的表达载体。本公开还提供了编码本文所提供的变体葡糖淀粉酶的DNA的片段(即部分)。这些片段可用于获得部分长度的DNA片段,其能够被用于从丝状真菌细胞(例如,木霉属、曲霉属、镰孢菌属、青霉属和腐质霉属)中分离或鉴别编码本文所述的成熟葡糖淀粉酶的多核苷酸或具有葡糖淀粉酶活性的其片段。在一些实施方案中,DNA片段可包含至少约50,约100,约150,约200,约250,约300或更多的连续核苷酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:4中所提供的DNA的部分可被用于从其它物种(例如编码葡糖淀粉酶的丝状真菌)中获得亲本葡糖淀粉酶(特别是木霉属葡糖淀粉酶同源物)。

[0506] 7. 葡糖淀粉酶的产生

[0507] 7.1. DNA构建体和载体

[0508] 根据本公开的一个实施方案,组装包含上文所述的、编码本公开所涵盖的变体葡糖淀粉酶且与启动子序列可操作连接的多核苷酸的DNA构建体以将其转移到宿主细胞中。在一个方面中,提供了编码如本文中所公开的葡糖淀粉酶变体的多核苷酸。

[0509] 可使用载体而将DNA构建体引入宿主细胞中。在一个方面,提供了包含根据权利要求75的多核苷酸或能够表达如本文所公开的葡糖淀粉酶变体的载体。所述载体可以是当引入宿主细胞时被稳定引入的任何载体。在一些实施方案中,载体被整合到宿主细胞基因组中并被复制。载体包括克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、噬菌体颗粒、盒等。在一些实施方案中,载体为包含与葡糖淀粉酶编码序列可操作地连接的调控序列的表达载体。

[0510] 合适的表达和/或整合载体的实例在下列中提供:Sambrook et al. (1989) (见上),和Ausubel (1987) (见上),和van den Hondel等人(1991)在Bennett and Lasure (Eds.) More Gene Manipulations In Fungi, Academic Press pp.396-428中和美国专利号5,874,276。还参考真菌遗传学库存中心菌种目录(FGSC, <http://www.fgsc.net>)的载体列表。特别有用的载体包括从例如Invitrogen和Promega获得的载体。

[0511] 用于细菌细胞的合适的质粒包括允许在大肠杆菌中复制的pBR322和pUC19和例如允许在芽孢杆菌中复制的pE194。其它适用于大肠杆菌宿主细胞的具体载体包括例如下列载体:pFB6、pBR322、pUC18、pUC100、pDONRTM201、10pDONRTM221、pENTRTM、**pGEM[®]3Z**和**pGEM[®]4Z**。

[0512] 适用于真菌细胞的具体载体包括pRAX(可用于曲霉属的通用表达载体),含有glaA启动子的pRAX,以及在肉座菌属/木霉属中包括含有cbh1启动子的pTrex3g。

[0513] 在一些实施方案中,在细菌或真菌宿主细胞中显示出转录活性的启动子可以源自编码与宿主细胞同源或异源的蛋白的基因。启动子可以是突变体、截短的和/或杂合启动子。上文提及的启动子是本领域中已知的。可用于真菌细胞(特别是丝状真菌细胞,例如木霉属或曲霉属细胞)中的合适的启动子的实例包括,例如下列示例性的启动子:瑞氏木霉启动子cbh1、cbh2、egl1、egl2、eg5、xln1和xln2。有用的启动子的其它实例包括来自泡盛曲霉和黑曲霉葡糖淀粉酶基因(glaA)的启动子(见Nunberg et al.,Mol.Cell Biol.4:2306-2315(1984)和Boel et al.,EMBO J.3:1581-1585(1984)),米曲霉TAKA淀粉酶启动子,来自酵母(*S.cerevisiae*)的TPI(磷酸丙糖异构酶)启动子,来自构巢曲霉乙酰胺酶基因和米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂肪酶基因的启动子。可用于细菌细胞的合适启动子的实例包括从下列获得的那些:大肠杆菌乳糖操纵子;地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyL),嗜热芽孢杆菌淀粉酶基因(amyS);枯草芽孢杆菌xylA和xylB基因, β -内酰胺酶基因,以及tac启动子。在一些实施方案中,启动子是宿主细胞的天然启动子。例如,当瑞氏木霉是宿主时,启动子是天然的瑞氏木霉启动子。在其它实施方案中,启动子是对于真菌宿主细胞为异源性的启动子。在一些实施方案中,启动子将是亲本葡糖淀粉酶的启动子(例如,TrGA启动子)。

[0514] 在一些实施方案中,DNA构建体包括编码信号序列的核酸,即与多肽的氨基末端相连接的氨基酸序列,其指导经编码的多肽进入细胞的分泌通路。核酸序列编码序列的5'末端可天然地包括信号肽编码区域,其天然地在翻译阅读框中与编码分泌的葡糖淀粉酶的葡糖淀粉酶编码序列的区段相连,或者核酸序列编码序列的5'末端可包括外源于编码序列的信号肽。在一些实施方案中,DNA构建体包括与从中获得了变体葡糖淀粉酶的亲本葡糖淀粉酶基因天然地连接的信号序列。在一些实施方案中,信号序列将是SEQ ID NO:1中所示的序列或者与其具有至少约90%,约94或约98%的序列同一性的序列。有效的信号序列可包括从其它丝状真菌酶获得的信号序列:例如来自木霉属(瑞氏木霉葡糖淀粉酶,纤维二糖水解酶I,纤维二糖水解酶II,内切葡聚糖酶I,内切葡聚糖酶II,内切葡聚糖酶II或分泌的蛋白酶,例如天冬氨酸蛋白酶),腐质霉属(特异腐质酶纤维二糖水解酶或内切葡聚糖酶或灰腐质霉葡糖淀粉酶)或曲霉属(黑曲霉葡糖淀粉酶和米曲霉TAKA淀粉酶)。

[0515] 在其它实施方案中,包含信号序列的DNA构建体或载体和待被引入宿主细胞中的启动子序列源自相同的来源。在一些实施方案中,可使用木霉属葡糖淀粉酶同源物的天然葡糖淀粉酶信号序列,例如来自肉座菌属菌株的信号序列。

[0516] 在一些实施方案中,表达载体还包括终止序列。在本公开中可使用在宿主细胞中有功能的任何终止序列。在一些实施方案中,终止序列和启动子序列源自相同的来源。在另一个实施方案中,终止序列是与宿主细胞同源的。有用的终止序列包括从下列获得的终止序列:瑞氏木霉cbh1的基因;黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶(Nunberg et al.(1984)(见上),和Boel et al.,(1984)(见上)),构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶,米曲霉TAKA淀粉酶或构巢曲霉trpC(Punt et al.,Gene 56:117-124(1987))。

[0517] 在一些实施方案中,表达载体包括可选择的标记物。可选择标记物的实例包括赋予抗微生物抗性的那些(例如,潮霉素和腐草霉素)。营养性选择性标记物也可用于本公开,这包括本领域中已知的那些标记物,例如amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰转移酶)和

pyrG(乳清苷-5'磷酸脱羧酶)。可用于转化木霉属的载体系统中的标记物是本领域中已知的(见例如,Finkelstein,Biotechnology Of Filamentous Fungi,Finkelstein et al.(1992)Eds.Butterworth-Heinemann,Boston,MA,第6章;Kinghorn et al.(1992)Applied Molecular Genetics Of Filamentous Fungi,Blackie Academic and Professional,Chapman and Hall,London;Berges and Barreau,Curr.Genet.19:359-365(1991);以及 van Hartingsveldt et al.,Mol.Gen.Genet.206:71-75(1987))。在一些实施方案中,选择性标记物是amdS基因,其编码乙酰胺酶,这允许经转化的细胞以乙酰胺作为氮源而生长。使用构巢曲霉amdS基因作为选择性标记物被描述于Kelley et al.,EMBO J.4:475-479(1985)和Penttila et al.,Gene 61:155-164(1987)中。

[0518] 用于连接包含编码变体葡糖淀粉酶的核酸序列、启动子、终止序列和其它序列的DNA构建体的方法,以及将它们插入合适的载体中的方法是本领域中熟知的。连接通常是通过在方便的限制性位点连接而实现的。如果不存在此类位点,则根据常规的操作使用合成的寡核苷酸连接子(见Sambrook et al.(1989)(见上)和Bennett and Lasure,More Gene Manipulations In Fungi,Academic Press,San Diego(1991)pp 70-76.)。此外,可使用已知的重组技术(例如Invitrogen Life Technologies,Gateway Technology)来构建载体。

[0519] 7.2. 宿主细胞和宿主细胞的转化

[0520] 1. 本公开还涉及包含编码本公开的变体葡糖淀粉酶的多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞选自细菌、真菌、植物和酵母细胞。术语宿主细胞包括用于产生根据本公开的变体葡糖淀粉酶的细胞、细胞的后代和由细胞产生的原生质体。在一个方面中,公开了包括(优选被转化以)载体的宿主细胞。在另一个方面中,提供了能够表达葡糖淀粉酶变体的细胞。在另一个方面中,所述宿主细胞为蛋白酶缺陷性和/或木聚糖酶缺陷性和/或葡聚糖酶缺陷性的宿主细胞。蛋白酶缺陷性和/或木聚糖酶缺陷性和/或天然葡聚糖酶缺陷性的宿主细胞可以通过删除或沉默编码所提及的酶的基因而获得。因此,含有所述GA变体的宿主细胞不表达所提及的酶。

[0521] 在一些实施方案中,宿主细胞是真菌细胞且任选地为丝状真菌宿主细胞。术语“丝状真菌”是指真菌亚门(subdivision Eumycotina)的所有丝状形式(见Alexopoulos,C.J.(1962),Introductory Mycology,Wiley,New York)。这些真菌的特征在于含有细胞壁的营养菌丝体,所述细胞壁由几丁质、纤维素和其它复合多糖构成。本公开的丝状真菌在形态学上、生理学上和遗传学上与酵母相区别。丝状真菌的营养生长是通过菌丝伸长,且碳分解代谢是严格好氧的。在本公开中,丝状真菌亲本细胞可以是但不限于下列物种的细胞:木霉属(例如,瑞氏木霉,红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)的无性变形,之前被归类为长枝木霉、绿色木霉(*Trichoderma viride*)、康宁木霉、哈茨木霉)(Sheir-Neirs et al.,Appl.Microbiol.Biotechnol.20:46-53(1984);ATCC No.56765和ATCC No.26921),青霉属的种,腐质霉属的种(例如特异腐质霉、疏松状腐质霉和灰腐质霉),金孢属(*Chrysosporium*)的种(例如,C.lucknowense),粘帚霉(*Gliocladium*)的种,曲霉属的种(例如,米曲霉、黑曲霉、酱油曲霉(*Asojae*)、日本曲霉(*A.japonicus*)、构巢曲霉和泡盛曲霉)(Ward et al.,Appl.Microbiol.Biotechnol.39:738-743(1993)和Goedegebuur et al.,Curr.Genet.41:89-98(2002)),镰孢菌属的种(例如,粉红镰孢菌、禾赤镰孢菌(*F.graminum*)、禾谷镰孢菌(*F.cerealis*)、尖孢镰刀菌(*F.oxysporum*)和镰孢霉

(*F. venenatum*)), 链孢霉属的种(粗糙链孢霉), 肉座菌属的种、毛霉菌属(*Mucor*)的种(米黑毛霉(*M. miehei*)), 根霉属(*Rhizopus*)的种, 和四脊裸胞壳(*Emericella*)的种(还见Innis et al., *Science* 228:21-26 (1985))。术语“木霉属”或“木霉属的种”或“木霉属种”是指之前或目前被归类为木霉属的任何真菌属。

[0522] 在一些实施方案中, 宿主细胞将是革兰氏阳性的细菌细胞。非限制性的实例包括链霉菌属的菌株(例如变铅青链霉菌, 天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)和灰色链霉菌(*S. griseus*))和芽孢杆菌属的菌株。如本文中所使用的, “芽孢杆菌属”包括“芽孢杆菌”属中的所有种, 如本领域技术人员所知的, 这包括但不限于枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌(*B. lentus*)、短芽孢杆菌(*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌(*B. clausii*)、碱芽孢杆菌(*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)、灿烂芽孢杆菌(*B. lautus*)和苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)。所认可的是, 芽孢杆菌属继续经历着分类学上的重构。因此, 意欲的是所述属包括被重新归类的种, 这包括但不限于例如嗜热脂肪芽孢杆菌的生物体, 其现在被命名为嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus tearothermophilus*)。

[0523] 在一些实施方案中, 所述宿主细胞为革兰氏阴性细菌菌株, 例如大肠杆菌或假单胞菌属(*Pseudomonas*)的种。在其它实施方案中, 宿主细胞可以是酵母细胞, 例如酵母菌属(*Saccharomyces*)的种、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)的种、毕赤酵母(*Pichia*)的种或假丝酵母菌属(*Candida*)种。在其它实施方案中, 宿主细胞将是经遗传学工程化的宿主细胞, 其中天然的基因被灭活了(例如通过在细菌或真菌细胞中的缺失)。当希望获得含有一个或多个灭活基因的真菌宿主细胞时, 可使用已知的方法(例如, 美国专利号5,246,853、美国专利号5,475,101和WO 92/06209中所公开的方法)。可通过完全或部分缺失、插入灭活或使得基因对于其所欲的目的而言无功能(从而防止基因表达有功能的蛋白)的任何其它方式而实现基因灭活。在一些实施方案中, 当宿主细胞为木霉属细胞(特别是瑞氏木霉宿主细胞)时, *cbh1*、*cbh2*、*egl1*和*egl2*基因将被灭活和/或缺失。具有四重缺失的蛋白的示例性瑞氏木霉宿主细胞如在美国专利号5,847,276和WO 05/001036中所示和所描述的。在其它实施方案中, 宿主细胞为蛋白酶缺陷性或无蛋白酶的株系。

[0524] 将DNA构建体或载体引入宿主细胞中包括例如下列技术: 转化、电穿孔、核显微注射、转导、转染(例如, 脂转染介导的和DEAE-糊精介导的转染)、用磷酸钙DNA沉淀物孵育、用涂覆了DNA的微粒高速轰击、以及原生质体融合。一般性的转化技术是本领域中已知的(见例如, Ausubel et al. (1987) (见上), 第九章; 和 Sambrook et al. (1989) (见上), 以及 Campbell et al., *Curr. Genet.* 16:53-56 (1989))。

[0525] 用于芽孢杆菌的转化方法在许多参考文献中被公开了, 这包括 Anagnostopoulos C. and J. Spizizen, *J. Bacteriol.* 81:741-746 (1961) 以及 WO 02/14490。

[0526] 用于曲霉属的转化方法被描述于 Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474 (1984); Berka et al., (1991) 的 *Applications of Enzyme Biotechnology*, Eds. Kelly and Baldwin, Plenum Press (NY); Cao et al., *Protein Sci.* 9:991-1001 (2000); Campbell et al., *Curr. Genet.* 16:53-56 (1989) 和 EP 238 023 中。在木霉属中表达异源蛋白被描述于美国专利号6,022,725、美国专利号6,268,328、Harkki et al. *Enzyme*

Microb. Technol. 13:227-233 (1991)、Harkki et al., BioTechnol. 7:596-603 (1989)、EP 244,234、EP 215,594、和Nevalainen et al., “The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes”, Molecular Industrial Mycology, Eds. Leong and Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992) pp. 129-148)。对于转化镰孢菌属的菌株,还参考W096/00787和Bajar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8202-8212 (1991)。

[0527] 在一个具体的实施方案中,用于转化而制备木霉属的种涉及由真菌菌丝体制备原生质体(见Campbell et al., Curr. Genet. 16:53-56 (1989); Pentilla et al., Gene 61:155-164 (1987))。根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的对丝状真菌的转化是已知的(见de Groot et al., Nat. Biotechnol. 16:839-842 (1998))。对于以丝状真菌宿主进行的转化程序,还参考美国专利号6,022,725和美国专利号6,268,328。

[0528] 在一些实施方案中,通常用下述载体系统构建遗传学上稳定的转化体,在所述载体系统中编码变体葡糖淀粉酶的核酸被稳定地整合到宿主菌株的染色体中。然后通过已知的技术纯化转化体。

[0529] 在一些其它实施方案中,宿主细胞为植物细胞,例如来自单子叶植物(例如玉米、小麦和蜀黍)的细胞或来自双子叶植物(例如大豆)的细胞。用于制造可用来转化植物的DNA构建体的方法以及用于植物转化的方法是已知的。这种方法中的一些包括根癌土壤杆菌介导的基因转移、微粒轰击、PEG介导的原生质体的转化、电穿孔等。参考美国专利号6,803,499,美国专利号6,777,589; Fromm et al., BioTechnol. 8:833-839 (1990); Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199:169-177 (1985)。

[0530] 7.3. 葡糖淀粉酶的产生

[0531] 本公开还涉及用于产生变体葡糖淀粉酶的方法,其包括用包含编码根据本公开的变体葡糖淀粉酶的多核苷酸的表达载体转化宿主细胞,在适于表达和产生变体葡糖淀粉酶的条件下培养所述宿主细胞,以及任选地回收所述变体葡糖淀粉酶。在一个方面中,提供了表达根据本公开的变体葡糖淀粉酶的方法、所述方法包括获得如本文中所公开的宿主细胞或细胞、从所述细胞或宿主细胞表达葡糖淀粉酶变体以及任选地纯化所述葡糖淀粉酶变体。在一个方面中,纯化了所述葡糖淀粉酶变体。

[0532] 在本公开的表达和生产方法中,在合适的条件下、在下述中培养宿主细胞:摇瓶培养、小规模或大规模发酵(包括连续、批量和批量给料发酵)、在实验室或工业发酵罐中,用含有生理学的盐和营养物的合适的培养基进行(见例如Pourquie, J. et al., Biochemistry And Genetics Of Cellulose Degradation, eds. Aubert, J. P. et al., Academic Press, pp. 71-86, 1988和Ilmen, M. et al., Appl. Environ. Microbiol. 63:1298-1306 (1997))。常见的商业上制备的培养基(例如,酵母麦芽提取物(YM)培养液、Luria Bertani (LB)培养液和沙氏葡萄糖(SD)培养液)可用于本公开中。用于细菌和丝状真菌细胞的培养条件是本领域中已知的并且可在科学文献中找到和/或可从真菌来源(例如美国典型培养物和真菌遗传学菌种保藏中心)获得。在葡糖淀粉酶编码序列在可诱导启动子的控制下的情形中,以有效诱导葡糖淀粉酶表达的浓度将诱导剂(例如糖、金属盐或抗微生物剂)加入培养基中。

[0533] 在一些实施方案中,本公开涉及在植物宿主中产生变体葡糖淀粉酶的方法,所述方法包括用包含编码根据本公开的葡糖淀粉酶变体的多核苷酸的载体转化植物细胞和在

适于所述变体的表达和生产的条件下生长所述植物细胞。

[0534] 在一些实施方案中,进行测定以评估以编码本公开所涵盖的变体葡糖淀粉酶的多核苷酸转化的细胞系对变体葡糖淀粉酶的表达。可在蛋白水平、RNA水平和/或通过使用特定于葡糖淀粉酶活性和/或产生的功能性生物测定来进行所述测定。这种测定中的一些包括RNA印迹法、点印迹法(DNA或RNA分析)、RT-PCR(逆转录酶聚合酶链式反应)、使用经恰当标记的探针(基于核酸编码序列)进行的原位杂交和常规的Southern印迹法以及放射自显影术。

[0535] 此外,可在样品中直接测量变体葡糖淀粉酶的产生和/或表达,例如通过直接测量培养基中的还原糖(例如葡萄糖)的测定以及通过用于测量葡糖淀粉酶活性、表达和/或产生的测定。特别地,可通过3,5-二硝基水杨酸(DNS)法(见Goto et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.58:49-54(1994))来测定葡糖淀粉酶活性。在其它的实施方案中,通过免疫学方法(例如细胞、组织切片的免疫组织化学染色或组织培养基的免疫测定(例如通过蛋白质印迹或ELISA)来评价蛋白表达。此类免疫测定可用于定性和定量地评价葡糖淀粉酶的表达。此类方法的细节是本领域技术人员已知的并且用于实施此类方法的许多试剂都是商业上可获得的。

[0536] 可通过本领域中已知的各种程序(包括离心、过滤、提取、沉淀等)从培养基中回收或纯化本公开的葡糖淀粉酶。

[0537] 8. 组合物和用途

[0538] 在一个方面中,提供了本文所述的葡糖淀粉酶变体用于制备酶促组合物的用途。

[0539] 本公开的变体葡糖淀粉酶可用于酶组合物中,这包括但不限于淀粉水解性和糖化组合物,清洁和去污剂组合物(例如衣物清洁剂、碗碟清洗剂和硬表面清洁组合物),醇发酵组合物,和动物饲料组合物。此外,变体葡糖淀粉酶可用于,例如酿造、保健、织物、环境废物转化过程、生物纸浆加工和生物质转化应用。本公开的变体葡糖淀粉酶可用于酶组合物中,这包括淀粉水解组合物、糖化组合物、去污剂、醇发酵酶促组合物和动物饲料。在一个方面中,所述组合物是淀粉水解组合物。

[0540] 在一些实施方案中,包含本公开所涵盖的变体葡糖淀粉酶的酶组合物将任选地与下列酶中的任一种或其组合相结合而使用: α -淀粉酶、蛋白酶、支链淀粉酶、异淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、环糊精葡糖转移酶、脂肪酶、植酸酶、漆酶、氧化酶、酯酶、角质酶、木聚糖酶、颗粒淀粉水解酶和其它葡糖淀粉酶。

[0541] 在一些实施方案中,包含本公开所涵盖的变体葡糖淀粉酶的酶组合物将任选地与下列酶中的任一种或其组合相结合而使用:淀粉酶、蛋白酶、支链淀粉酶、纤维素酶、葡聚糖酶、木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖酶、阿魏酸酯酶、木聚糖乙酰酯酶和其它葡糖淀粉酶。在一些实施方案中,包含本公开所涵盖的变体葡糖淀粉酶的酶组合物将任选地与下列酶中的任一种或其组合相结合而使用:淀粉酶、支链淀粉酶和其它葡糖淀粉酶。在一些实施方案中,包含本公开所涵盖的变体葡糖淀粉酶的酶组合物将任选地与下列酶中的任一种或其组合相结合而使用:淀粉酶和支链淀粉酶。在另一个方面中,所述淀粉酶为 α -淀粉酶和/或异淀粉酶。在另一个方面中,葡聚糖酶是外切葡聚糖酶和/或内切葡聚糖酶。

[0542] 在一些实施方案中,酶组合物将包括 α -淀粉酶,例如真菌 α -淀粉酶(例如曲霉属的种)或细菌 α -淀粉酶(例如芽孢杆菌属的种,例如嗜热脂肪芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和地

衣芽孢杆菌)及其变体和杂合体。在一些实施方案中, α -淀粉酶是酸稳定的 α -淀粉酶。在一些实施方案中, α -淀粉酶白曲霉 α -淀粉酶(AkAA),见美国专利号7,037,704。构想用于本公开的组合物商业上可获得的 α -淀粉酶是已知的并且包括GZYME G997、**SPEZYME®FRED**、**SPEZYME®XTRA**(Danisco US, Inc, Genencor Division)、**TERMAMYL®120-L**和**SUPRA®**(Novozymes, A/S)。

[0543] 在一些实施方案中,酶组合物将包括酸性真菌蛋白酶。在其它实施方案中,所述酸性真菌蛋白酶源自木霉属的种并且可以是美国专利号7,563,607(公开为US 2006/0154353, 2006年7月13日)中所公开的蛋白酶中的任何一种,所述美国专利在此通过引用而并入。在其它实施方案中,酶组合物将包括来自Buttiauxiella属的种的植酸酶(例如, BP-17, 也见PCT专利公开WO 2006/043178中公开的变体)。

[0544] 在其它实施方案中,本公开的变体葡糖淀粉酶可与其它葡糖淀粉酶相组合。在一些实施方案中,本公开的葡糖淀粉酶将与下列相组合:源自曲霉属菌株的一种或多种葡糖淀粉酶或其变体,所述曲霉属菌株例如米曲霉、黑曲霉、白曲霉和泡盛曲霉;源自腐质霉属菌株(特别是源自灰腐质霉)的葡糖淀粉酶或其变体,例如与WO 05/052148中所公开的SEQ ID NO:3具有至少约90%,约93%,约95%,约96%,约97%,约98%或约99%序列同一性的葡糖淀粉酶;源自篮状菌属菌株(特别是埃默森蓝状菌)的葡糖淀粉酶或其变体;源自阿太菌(Athelia)菌株(特别是罗耳阿太菌(A. rolfsii))的葡糖淀粉酶;源自青霉属菌株(特别是产黄青霉)的葡糖淀粉酶。

[0545] 特别地,变体葡糖淀粉酶可被用于淀粉转化过程,特别是在用于果糖糖浆、特性糖的葡萄糖的生产中,以及用于由发酵含淀粉的底物而生产醇和其它终产物(例如有机酸、抗坏血酸和氨基酸)(G.M.A. van Beynum et al., Eds. (1985) Starch Conversion Technology, Marcel Dekker Inc. NY)。使用本公开的变体葡糖淀粉酶组合物生产的糊精可产生至少80%,至少85%,至少90%和至少95%的葡萄糖产量。使用本公开所涵盖的葡糖淀粉酶而由淀粉底物的发酵来产生乙醇可包括产生燃料醇或可饮用的醇。在一些实施方案中,当在与亲本葡糖淀粉酶相同的条件下使用变体葡糖淀粉酶时,醇的生产将更多。在一些实施方案中,醇的生产将为约0.5%至2.5%更好,这包括但不限于与亲本葡糖淀粉酶相比,约0.6%,约0.7%,约0.8%,约0.9%,约1.0%,约1.1%,约1.2%,约1.3%,约1.4%,约1.5%,约1.6%,约1.7%,约1.8%,约1.9%,约2.0%,约2.1%,约2.2%,约2.3%和约2.4%更多的醇。

[0546] 在一些实施方案中,本公开的变体葡糖淀粉酶将可用于淀粉的水解,所述淀粉来自用于醇生产的各种基于植物的底物。在一些实施方案中,所述基于植物的底物将包括玉米、小麦、大麦、黑麦、蜀黍、稻、甘蔗、马铃薯及其组合。在一些实施方案中,所述基于植物的底物将为经分级的植物材料,例如谷物(如玉米),其被分级为例如下述组分:纤维、胚、蛋白质和淀粉(胚乳)(美国专利号6,254,914和美国专利号6,899,910)。醇发酵的方法被描述于The Alcohol Textbook, K.A. Jacques et al., Eds. 2003, Nottingham University Press, UK中。

[0547] 在某些实施方案中,所述醇将为乙醇。特别地,醇发酵生产过程被表征为湿磨或干磨过程。在一些实施方案中,变体葡糖淀粉酶将被用于湿磨发酵过程中而在其它实施方案中,变体葡糖淀粉酶将可用于干磨过程中。

[0548] 干谷研磨涉及若干基本步骤,这通常包括:碾磨、蒸煮、液化、糖化、发酵和将液体与固体分离以产生醇和其它副产物。碾磨植物材料,特别是全谷物,例如玉米、小麦或黑麦。在一些情形中,可将谷物首先分级为组成部分。可研磨经碾磨的植物材料以获得粗颗粒或细颗粒。在浆料槽中将经碾磨的植物材料与液体(例如,水和/或酒糟水)相混合。使浆料在喷射式蒸煮锅中与液化酶(例如, α -淀粉酶)一起经受高温(例如,约90℃至约105℃或更高)以将谷物中的淀粉溶解并水解为糊精。使混合物冷却并用糖化酶(例如本公开所涵盖的葡糖淀粉酶)进一步处理,以产生葡萄糖。然后,在发酵微生物(例如产生乙醇的微生物、特别是酵母(酵母属的种))的存在下,可发酵含有葡萄糖的醪液大约24至120小时。将醪液中的固体与液相分离,并获得醇(例如乙醇)和有用的副产物(例如酒糟)。

[0549] 在一些实施方案中,将糖化步骤与发酵步骤相结合且所述过程被称为同时糖化和发酵或同时糖化、酵母增殖和发酵。

[0550] 在其它实施方案中,变体葡糖淀粉酶用于淀粉水解的过程中,其中所述过程的温度为约30℃至约75℃,在一些实施方案中,为约40℃至约65℃。在一些实施方案中,变体葡糖淀粉酶用于淀粉水解的过程中,其中pH为约3.0至约6.5。一些实施方案中的发酵过程包括研磨谷物或分级谷物,以及将经碾磨的谷物与液体相结合以形成浆料,然后在单一的容器中将所述浆料与根据本公开的变体葡糖淀粉酶和任选地其它的酶以及酵母相混合以生产乙醇和其它副产物(见例如,美国专利号4,514,496、WO 04/081193和WO 04/080923),所述其它的酶为例如但不限于 α -淀粉酶、其它葡糖淀粉酶、植酸酶、蛋白酶、支链淀粉酶、异淀粉酶或具有粒状淀粉水解活性的其它酶。

[0551] 在一些实施方案中,本公开涉及糖化液体淀粉溶液的方法,所述方法包括使用本公开的变体葡糖淀粉酶的酶促糖化步骤。可通过将淀粉溶解在水或水性缓冲液中、和任选地加热以胶凝所述淀粉而产生液体淀粉溶液。可应用通过淀粉酶来进一步部分地降解淀粉。

[0552] 本发明提供了使用本发明的葡糖淀粉酶变体来从淀粉产生葡萄糖等的方法。通常,所述方法包括下列步骤:在 α -淀粉酶的存在下部分水解前体淀粉,然后在葡糖淀粉酶的存在下通过剪切 α -(1-4)和 α -(1-6)糖苷键而进一步水解,从淀粉或相关寡糖和多糖分子的非还原末端释放D-葡萄糖。利用 α -淀粉酶对前体淀粉的部分水解通过水解内部 α -(1-4)-连接而提供了淀粉分子的初始降解。在商业应用中,使用 α -淀粉酶的初始水解在约105℃的温度下进行。非常高的淀粉浓度被加工,这通常为30%至40%的固体。在此升高的温度下,初始水解通常进行五分钟。然后将经部分水解的淀粉转移到第二个槽中并在85℃至90℃的温度下孵育大约一小时以获得10至15的糖化率(D.E.)。在葡糖淀粉酶的存在下进一步水解,从淀粉或相关寡糖和多糖分子的非还原末端释放D-葡萄糖的步骤通常是在30℃至60℃的降低的温度下、在单独的槽中进行的。通常,底物液体的温度降至55℃至60℃。溶液的pH从6至6.5降到3至5.5的范围。通常,溶液的pH为4至4.5。将葡糖淀粉酶加入溶液中并使反应进行24-72小时,例如36-48小时。

[0553] 其中可使用本发明的葡糖淀粉酶变体的糖化过程的实例包括JP3-224493、JP 1-191693、JP 62-272987和EP 452,238中所描述的过程。本文所描述的葡糖淀粉酶变体可与仅水解含有至少四个葡萄糖基残基的分子中的 α -(1-6)-糖苷键的酶组合使用。优选地,葡糖淀粉酶变体可与支链淀粉酶或 α -淀粉酶组合使用。 α -淀粉酶和支链淀粉酶用于脱支的用

途、酶的分子特性和所述酶与葡糖淀粉酶的潜在应用如G.M.A.van Beynum et al., Starch Conversion Technology, Marcel Dekker, New York, 1985, 101-142中所示。

[0554] 在一个实施方案中,提供了本文所描述的葡糖淀粉酶变体用于淀粉转化过程(例如在连续糖化步骤中)的用途。本文中所述的葡糖淀粉酶变体还可以固定的形式使用。这适于并通常用于产生麦芽糊精或葡萄糖糖浆或特性糖浆(例如麦芽糖糖浆)并且还用于与果糖糖浆的生产相关联的寡糖残液流。

[0555] 当所需的最终糖产物为例如高果糖糖浆时,葡萄糖糖浆可被转化为果糖。糖化过程之后,pH被增加至6-8范围中的值,例如pH 7.5,并通过离子交换来去除钙。然后,使用例如经固定的葡萄糖异构酶(例如Sweetzyme™IT)将葡萄糖糖浆转化为高果糖糖浆。

[0556] 在其它实施方案中,变体葡糖淀粉酶用于啤酒酿造的过程中。酿造过程是本领域中熟知的,并且通常涉及下列步骤:麦芽制造、淀粉糖化和发酵。淀粉糖化是将来自经研磨的大麦麦芽和固体附加物的淀粉转化为可发酵的和不可发酵的糖以产生麦芽汁的过程。传统的淀粉糖化涉及在设定的温度和体积下,将经研磨的大麦麦芽和附加物与水相混合以继续在麦芽制造过程中起始的生物化学变化。在各种温度下,在一段时间中进行淀粉糖化过程,以活化促成蛋白和碳水化合物的降解的内源性酶。淀粉糖化之后,将麦芽汁与固体(谷糟)分离。在麦芽汁分离之后,可用酿酒酵母发酵麦芽汁以产生啤酒。可通过加入外源性酶(例如特别是葡糖淀粉酶和/或 α -淀粉酶, β -淀粉酶和支链淀粉酶)而进一步水解在淀粉糖化过程中形成的短分支葡萄糖寡聚物。可就这样使用麦芽汁或这可将其浓缩和/或干燥。经浓缩和/或干燥的麦芽汁可作为酿造提取物,作为麦芽提取物调味剂而用于非含醇麦芽饮料、麦芽醋、早餐谷物,用于糖果等。将麦芽汁发酵以产生含醇的饮料,通常是啤酒,例如,淡色啤酒、强的淡色啤酒、苦啤酒、烈啤酒、porter、淡啤酒、出口啤酒、麦芽酒、大麦葡萄酒、发泡酒(happoushu)、高醇啤酒、低醇啤酒、低卡路里啤酒或轻啤酒。在另一个典型实施方案中,将麦芽汁发酵以生产可饮用的乙醇。

[0557] 在一些实施方案中,本公开涉及水解和糖化在酿造中使用的、经胶凝化和液化(通常地)的谷淀粉的方法,其中使用了包含一种或多种如本文中所涉及的葡糖淀粉酶的酶促组合物,以增加从淀粉获得的酿酒酵母可发酵糖的量。使用酿造过程来产生可饮用的产品啤酒,其中通过用酿酒酵母发酵而使可发酵糖转化为乙醇和CO₂。可发酵糖传统地源自谷物中的淀粉,任选地被补充以例如下列的可发酵糖源:葡萄糖和麦芽糖糖浆,以及蔗糖。简要地,本领域中熟知的啤酒生产通常包括下列步骤:麦芽制造、淀粉糖化和发酵。

[0558] 历史上,啤酒生产的第一步是麦芽制造-浸渍、萌发和谷物(例如大麦)的干燥。在麦芽制造的过程中,在谷物(例如大麦)核的萌发中产生酶并且其化学组成中有某些改变(已知为修饰),这包括淀粉、蛋白质和 β -葡聚糖的一些降解。

[0559] 研磨含麦芽的谷物以提供谷,可将其与经研磨的附加物(例如非萌发的谷物)混合以提供混合的谷。将所述谷与水混合并使其经受淀粉糖化;可向醪液中加入之前经蒸煮(胶凝化和液化)的附加物。在各种温度下,在一段时间中进行淀粉糖化过程,以水解谷物蛋白、降解 β -葡聚糖并溶解和水解淀粉。在传统的淀粉糖化中,对麦芽和附加物中谷淀粉的水解是由内源于含麦芽的大麦的两种主要的酶催化的。 α -淀粉酶随机剪切淀粉分子内部的 α -1,4键而将其片段化为更小的糊精。 β -淀粉酶从这些糊精的非还原末端顺次剪切 α -1,4键,从而主要产生麦芽糖。 α -和 β -淀粉酶都不能水解 α -1,6键(其形成淀粉分子中淀粉链的分支

点),这引起醪液中有限糊精的累积。麦芽确实含有酶(有限糊精酶),其催化 α -1,6键的水解但是由于其不耐热性,其在淀粉糖化温度下仅显示出弱的活性。在淀粉糖化之后,将液体提取物(麦芽汁)与谷糟固体(即形成谷的部分的不可溶谷物和壳材料)分离。麦芽汁分离的目的包括:●获得良好的提取物回收,●获得良好的过滤性,以及●产生澄清的麦芽汁。麦芽汁的提取物回收和过滤性在酿造过程的经济性方面是重要的。

[0560] 麦芽汁的组成取决于原材料、淀粉糖化过程和特征以及其它变量。典型的麦芽汁包含65-80%的可发酵糖(葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖),以及20-35%的非可发酵有限糊精(具有比麦芽三糖更高的聚合度的糖)。当以高水平的、附加的不含麦芽的谷物酿造时,可产生淀粉糖化过程中淀粉水解酶的不足。因此需要外源性酶的来源,所述外源性酶能够在淀粉糖化的过程中产生可发酵的糖。此外,也需要此类外源性酶以降低麦芽汁中非可发酵糖的水平,并伴有可发酵糖的相应增加,以酿造具有低碳水化合物含量的高度稀释的啤酒。本文中公开的是用于淀粉水解的酶组合物,其包含至少一种本文中所涉及的葡糖淀粉酶,其可被加入醪液中或用于酿造过程的淀粉糖化步骤中,从而剪切淀粉谷中的 α -1,4键和/或 α -1,6键并从而增加麦芽汁中的可发酵糖含量和减少完成的啤酒中的非可发酵糖残余。此外,可干燥(通过例如喷雾干燥)或浓缩(例如煮沸和蒸发)如此产生的麦芽汁以提供糖浆或粉末。

[0561] 如本文中所涉及的谷可包含任何含有淀粉和/或糖的植物材料,其可源自任何植物和植物部分,这包括根茎、根、茎、叶和种子。通常谷包含谷物,例如来自大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉米、稻、高粱、粟和蜀黍的谷物,并且更优选地至少10%或更优选地至少15%,甚至更优选地至少25%或最优选地至少35%,例如至少50%,至少75%,至少90%或甚至100%(w/w)的麦芽汁的谷源自谷物。最优选地,所述谷包含含麦芽的谷物,例如大麦麦芽。优选地,至少10%或更优选至少15%、甚至更优选至少25%或最优选至少35%(例如至少50%、至少75%、至少90%或甚至100%(w/w))的麦芽汁的谷源自含麦芽的谷物。优选地,所述谷包含附加物,例如来自大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉米、稻、高粱、粟和蜀黍的不含麦芽的谷物,且更优选地,至少10%或更优选至少15%,甚至更优选至少25%或最优选至少35%(例如至少50%,至少75%,至少90%或甚至100%(w/w))的所述麦芽汁的谷源自不含麦芽的谷物或其它附加物。可在本发明的淀粉糖化过程之前、之中或之后将包含易于发酵的碳水化合物(例如糖或糖浆)的附加物加入麦芽醪液,但是优选在淀粉糖化过程之后加入。在加入到醪液中之前,可用 α -淀粉酶,和/或内切性肽酶(蛋白酶)和/或内切葡聚糖酶处理附加物的一部分,和/或对其进行热处理。如本文中所涉及的酶组合物可包括其它的酶,优选选自下列的酶: α -淀粉酶、蛋白酶、支链淀粉酶、异淀粉酶、纤维素酶、葡聚糖酶(例如外切葡聚糖酶或内切葡聚糖酶)、木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖酶、阿魏酸酯酶、木聚糖乙酰酯酶和葡糖淀粉酶。在淀粉糖化的过程中,将从谷中提取的淀粉逐渐水解为可发酵糖和更小的糊精。优选地,在麦芽汁分离之前,醪液对于碘测试是淀粉阴性的。

[0562] 在酿造过程的第三步(发酵)之前,通常将麦芽汁转移到酿造罐中并剧烈煮沸50-60分钟。在麦芽汁沸腾的过程中发生若干重要的过程(可在下述中找到进一步的信息:“Technology Brewing and Malting”by Wolfgang Kunze of the Research and Teaching Institute of Brewing,Berlin(VLB),3rd completely updated edition,2004,ISBN3-921690-49-8),这包括灭活内源性麦芽酶和加入到醪液或附加物中的任何外

源性酶。然后冷却经煮沸的麦芽汁,投入酿酒酵母并在通常为8-16℃范围内的温度下发酵以将可发酵糖转化为乙醇。可通过选择性去除醇的真空蒸发过程而从最终的啤酒产生低醇啤酒。

[0563] 在备选的实施方案中,本公开涉及使用包含如本文中所涉及的一种或多种葡糖淀粉酶(例如不耐热的葡糖淀粉酶)的酶促组合物来提高麦芽汁中可发酵糖的量的方法,其中在麦芽汁被煮沸后将所述酶促组合物加入麦芽汁中,从而所述一种或多种葡糖淀粉酶在发酵步骤中是有活性的。可在将酿酒酵母投入麦芽汁之前、与其同时地或在之后将酶促组合物加入经煮沸的麦芽汁中。在发酵和成熟步骤的最后,将啤酒(其可任选地经受真空蒸发以产生低醇啤酒)巴氏灭菌。此方法的内在优势在于发酵过程的持续时间为约6-15天(取决于投放比率,发酵,温度等),与短的淀粉糖化步骤(2-4h的持续时间)相比,这允许有更多的时间来酶促剪切非可发酵糖。此方法的其它优势在于实现所希望的非可发酵糖的减少(和可发酵糖的增加)所需的酶促组合物的量,与实现非可发酵糖的类似减少而将需要向醪液中加入的相比,其相应于显著更低数目的酶促活性单位(例如葡糖淀粉酶活性的单位)。此外,其去除了当在醪液中加入高剂量比率的葡糖淀粉酶时,在麦芽汁分离(特别是通过过滤)过程中通常所见的困难。

[0564] 本公开还提供包含至少一种本公开所涵盖的变体葡糖淀粉酶的动物饲料组合物或制剂。W003/049550(在此以其全部通过引用而并入)中提供了使用葡糖淀粉酶来生产包含淀粉的饲料的方法。简要地,将葡糖淀粉酶变体与包含淀粉的饲料相混合。葡糖淀粉酶能够降解抗性淀粉而供动物利用。在一些实施方案中,本文所描述的葡糖淀粉酶变体被用于基于淀粉原料而产生燃料的过程中。本公开的其它目的和优势从本说明书来看是显然的。

[0565] 根据本发明的其它实施方案:

[0566] 1. 相对于下述包含两个或更多个氨基酸取代的葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的互联环2',和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的环1,和/或具有SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的螺旋2,和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的环11,和/或具有SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列或亲本葡糖淀粉酶中等同的残基序列的螺旋12。

[0567] 2. 葡糖淀粉酶变体用于在淀粉水解的过程中减少缩合产物的合成的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体的晶体形式具有这样的晶体结构:在将等同的主链原子进行比对后,其主链原子的原子坐标与TrGA的等同主链原子的原子坐标(如W02009/067218的表20中所定义的)的均方根偏差小于0.13nm;并且所述变体具有连接子区域、淀粉结合结构域以及催化结构域,所述变体相对于亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列在淀粉结合结构域的互联环2'中,和/或催化结构域的螺旋12中、和/或环1中、和/或螺旋2中、和/或环11中包含两个或更多个氨基酸取代。

[0568] 3. 根据实施方案1-2中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是相对于下述的:具有SEQ ID NO:2的518位至543位的氨基酸序列的互联环2',和/或具有SEQ ID NO:2的21位至51位的氨基酸序列的环1,和/或具有SEQ ID NO:2的52位至68位的氨基酸序列的螺旋2,和/或具有SEQ ID NO:2的396位至420位的氨基酸序列的环

11,和/或具有SEQ ID NO:2的421位至434位的氨基酸序列的螺旋12。

[0569] 4.根据实施方案1-3中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2'中的至少一个氨基酸取代和环1和/或螺旋2和/或环11和/或螺旋12中的至少一个氨基酸取代。

[0570] 5.根据实施方案1-4中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2'中的1、2、3或4个氨基酸取代和环1和/或螺旋2和/或环11和/或螺旋12中的1、2、3或4个氨基酸取代。

[0571] 6.根据实施方案1-5中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2'中的至少一个氨基酸取代和环1中的至少一个氨基酸取代。

[0572] 7.根据实施方案1-6中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2'中的至少一个氨基酸取代和螺旋2中的至少一个氨基酸取代。

[0573] 8.根据实施方案1-7中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2'中的至少一个氨基酸取代和环11中的至少一个氨基酸取代。

[0574] 9.根据实施方案1-8中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2'中的至少一个氨基酸取代和螺旋12中的至少一个氨基酸取代。

[0575] 10.根据实施方案1-9中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述两个或更多个氨基酸取代是互联环2'中的至少一个氨基酸取代和环1中的至少一个氨基酸取代以及螺旋2中的至少一个氨基酸取代。

[0576] 11.根据实施方案1-10中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体在互联环2'的520-543、530-543或534-543位中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0577] 12.根据实施方案1-11中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体在环1的30-50、35-48或40-46位的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0578] 13.根据实施方案1-12中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体在螺旋2的50-66、55-64或58-63位的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0579] 14.根据实施方案1-13中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体在环11的405-420、410-420或415-420位的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0580] 15.根据实施方案1-14中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体在螺旋12的421-434、425-434或428-434位的氨基酸序列中具有至少一个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0581] 16.根据实施方案1-15中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体与亲本葡糖淀粉酶具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性。

[0582] 17.根据实施方案1-16中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡糖淀粉酶变体与SEQ ID NO:1、2、3、5、6、7、8或9具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性。

[0583] 18.根据实施方案1-17中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡糖淀粉酶

变体具有淀粉结合结构域,其与SEQ ID NO:1、2、11、385、386、387、388、389或390的淀粉结合结构域具有至少96%、97%、98%、99%或99.5%的序列同一性。

[0584] 19.根据实施方案1-18中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡萄糖淀粉酶变体具有催化结构域,其与SEQ ID NO:1、2、3、5、6、7、8或9的催化结构域具有至少80%、85%、90%、95%或99.5%的序列同一性。

[0585] 20.根据实施方案1-19中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡萄糖淀粉酶变体与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性。

[0586] 21.根据实施方案1-20中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中所述缩合产物为异麦芽糖。

[0587] 22.根据实施方案1-21中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中淀粉的水解是在酿造过程中。

[0588] 23.根据实施方案1-22中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡萄糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡萄糖淀粉酶显示出可发酵糖的产生提高。

[0589] 24.根据实施方案1-23中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡萄糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡萄糖淀粉酶显示出酿造过程的淀粉糖化步骤中可发酵糖的产生提高。

[0590] 25.根据实施方案1-24中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡萄糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡萄糖淀粉酶显示出酿造过程的发酵步骤中可发酵糖的产生提高。

[0591] 26.根据实施方案1-25中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中所述可发酵糖为葡萄糖。

[0592] 27.根据实施方案1-26中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中淀粉的水解是在用于生产葡萄糖糖浆的过程中。

[0593] 28.根据实施方案1-27中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡萄糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡萄糖淀粉酶显示出减少的异麦芽糖合成(IS)与淀粉水解活性(SH)之比。

[0594] 29.根据实施方案1-28中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡萄糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡萄糖淀粉酶显示出降低的淀粉水解活性,其降低不超过5%、不超过10%或不超过15%。

[0595] 30.根据实施方案1-29中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中与亲本葡萄糖淀粉酶(例如TrGA)相比,葡萄糖淀粉酶显示出提高的实际发酵度。

[0596] 31.根据实施方案1-30中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中与由黑曲霉(AnGA)(SEQ ID NO:6)形成的缩合产物的量相比,所述葡萄糖淀粉酶在相当条件下形成的缩合产物的量更低。

[0597] 32.根据实施方案1-31中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中所述葡萄糖淀粉酶在相当的条件下形成的缩合产物的量与由黑曲霉(AnGA)(SEQ ID NO:6)形成的缩合产物的量基本上相同、为不超过5%更高、不超过8%更高或不超过10%更高。

[0598] 33.根据实施方案31-32中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中基于蛋白浓度的葡萄糖淀粉酶剂量是相同的。

[0599] 34.根据实施方案31-33中任一项的葡萄糖淀粉酶变体的用途,其中基于活性测定中

的活性测量,葡糖淀粉酶的剂量是相同的。

[0600] 35.根据实施方案1-34中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,所述葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代,在选自位置44、61、417和431的位置中具有一个或多个氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0601] 36.根据实施方案1-35中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,所述葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代,且a)在44位具有氨基酸取代和/或b)在417和431位均具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0602] 37.根据实施方案1-36中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,所述葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代且在44位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0603] 38.根据实施方案1-37中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,所述葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代,且在417和431位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0604] 39.根据实施方案1-38中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,所述葡糖淀粉酶变体在539位具有氨基酸取代且在44和61位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0605] 40.根据实施方案1-39中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,所述葡糖淀粉酶变体在43位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0606] 41.根据实施方案1-40中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,所述葡糖淀粉酶变体在61位具有氨基酸取代,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0607] 42.根据实施方案1-41中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中539位的氨基酸取代是539R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0608] 43.根据实施方案1-42中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中44位的氨基酸取代是44R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0609] 44.根据实施方案1-43中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中417位的氨基酸取代是417R/V,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0610] 45.根据实施方案1-44中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中417位的氨基酸取代是417R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0611] 46.根据实施方案1-45中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中417位的氨基酸取代是417V,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0612] 47.根据实施方案1-46中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中431位的氨基酸取代是431L,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0613] 48.根据实施方案1-47中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中43位的氨基酸取代是43R,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0614] 49.根据实施方案1-48中任一项的葡糖淀粉酶变体的用途,其中61位的氨基酸取代是61I,所述位置相应于SEQ ID NO:2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0615] 50.如实施方案1-49中的任一项中所定义的葡糖淀粉酶变体。

[0616] 51. 包含两个或更多个氨基酸取代的葡糖淀粉酶变体, 其中一个氨基酸取代在539位且一个氨基酸取代在44位, 所述位置相应于SEQ ID NO: 2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置, 且所述序列与亲本葡糖淀粉酶序列具有至少80%的序列同一性, 其中44位的氨基酸取代不是44C。

[0617] 52. 根据实施方案51的包含两个或更多个氨基酸取代的葡糖淀粉酶变体, 其中一个氨基酸取代在539位且一个氨基酸取代为44R, 所述位置相应于SEQ ID NO: 2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0618] 53. 根据实施方案51-52中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其在61位包含氨基酸取代, 所述位置相应于SEQ ID NO: 2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0619] 54. 根据实施方案51-53中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中所述葡糖淀粉酶变体与亲本葡糖淀粉酶具有至少85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性。

[0620] 55. 根据实施方案51-54中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中所述葡糖淀粉酶变体与SEQ ID NO: 1、2、3、5、6、7、8或9具有至少85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性。

[0621] 56. 根据实施方案51-55中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中所述葡糖淀粉酶变体与SEQ ID NO: 2具有至少85%、90%、95%、98%或99.5%的序列同一性。

[0622] 57. 根据实施方案51-56中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中539位的氨基酸取代是539R, 所述位置相应于SEQ ID NO: 2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0623] 58. 根据实施方案51-57中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中44位的氨基酸取代是44R, 所述位置相应于SEQ ID NO: 2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0624] 59. 根据实施方案51-58中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中61位的氨基酸取代是61I, 所述位置相应于SEQ ID NO: 2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0625] 60. 根据实施方案51-59中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其包含下列氨基酸取代:

[0626] a. D44R和A539R; 或

[0627] b. D44R、N61I和A539R,

[0628] 所述位置相应于SEQ ID NO: 2中的各位置或亲本葡糖淀粉酶中的等同位置。

[0629] 61. 根据实施方案51-60中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其由SEQ ID NO: 2组成且具有下列氨基酸取代:

[0630] a. D44R和A539R; 或

[0631] b. D44R、N61I和A539R,

[0632] 所述位置相应于SEQ ID NO: 2中的各位置。

[0633] 62. 根据实施方案51-61中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中所述葡糖淀粉酶变体具有淀粉结合结构域, 其与SEQ ID NO: 1、2、11、385、386、387、388、389或390的淀粉结合结构域具有至少96%、97%、98%、99%或99.5%的序列同一性。

[0634] 63. 根据实施方案51-62中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中所述葡糖淀粉酶变体具有催化结构域, 其与SEQ ID NO: 1、2、3、5、6、7、8或9的催化结构域具有至少80%、85%、90%、95%或99.5%的序列同一性。

[0635] 64. 根据实施方案50-63中任一项的葡糖淀粉酶变体, 其中所述亲本葡糖淀粉酶选自获得自下列的葡糖淀粉酶: 木霉属的种、曲霉属的种、腐质霉属的种、青霉属的种、篮状菌属的种或裂殖酵母属的种。

[0636] 65. 根据实施方案50-64中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中所述亲本葡糖淀粉酶获得自木霉属的种或曲霉属的种。

[0637] 66. 根据实施方案50-65中任一项的葡糖淀粉酶变体,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡糖淀粉酶显示出可发酵糖的生产提高。

[0638] 67. 根据实施方案50-66中任一项的葡糖淀粉酶变体,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比所述葡糖淀粉酶显示出酿造过程的淀粉糖化步骤中可发酵糖的生产提高。

[0639] 68. 根据实施方案50-67中任一项的葡糖淀粉酶变体,与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比所述葡糖淀粉酶显示出酿造过程的发酵步骤中可发酵糖的生产提高。

[0640] 69. 根据实施方案68的葡糖淀粉酶变体,其中所述可发酵糖为葡萄糖。

[0641] 70. 根据实施方案50-69中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡糖淀粉酶显示出减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比(IS/SH比率)。

[0642] 71. 根据实施方案50-70中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡糖淀粉酶显示出降低的淀粉水解活性,其降低不超过5%、不超过10%或不超过15%。

[0643] 72. 根据实施方案50-71中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中与亲本葡糖淀粉酶(例如TrGA)相比,所述葡糖淀粉酶显示出提高的实际发酵度。

[0644] 73. 根据实施方案50-72中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中与由黑曲霉(AnGA)的葡糖淀粉酶(SEQ ID NO:6)形成的缩合产物的量相比,所述葡糖淀粉酶在相同条件下形成的缩合产物的量更低。

[0645] 74. 根据实施方案50-73中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中所述葡糖淀粉酶形成的缩合产物的量与相同条件下由黑曲霉(AnGA)(SEQ ID NO:6)形成的缩合产物的量基本上相同、为不超过5%更高、不超过8%更高或不超过10%更高。

[0646] 75. 根据实施方案73-74中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中基于蛋白浓度的葡糖淀粉酶剂量相同。

[0647] 76. 根据实施方案73-74中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中基于在活性测定中的活性测量,葡糖淀粉酶的剂量相同。

[0648] 77. 根据实施方案50-76中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中所述葡糖淀粉酶是经纯化的。

[0649] 78. 多核苷酸,其编码根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体。

[0650] 79. 载体,其包含根据实施方案78的多核苷酸,或者能够表达根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体。

[0651] 80. 宿主细胞,其包含根据实施方案79的载体。

[0652] 81. 宿主细胞,其中在其染色体中稳定整合了编码根据实施方案50-80中任一项的变体葡糖淀粉酶的核酸。

[0653] 82. 能够表达根据实施方案50-76中任一项的葡糖淀粉酶变体的细胞。

[0654] 83. 根据实施方案78-81中任一项的宿主细胞或根据实施方案81的细胞,其为细菌、真菌、或酵母细胞。

[0655] 84. 根据实施方案83的宿主细胞,其为木霉属的种,例如瑞氏木霉。

[0656] 85. 根据实施方案83-84中任一项的宿主细胞,其为蛋白酶缺陷性和/或木聚糖酶缺陷性和/或天然葡聚糖酶缺陷性宿主细胞。

[0657] 86. 表达葡糖淀粉酶变体的方法,所述方法包括获得根据实施方案80-85中任一项的宿主细胞或细胞和从所述细胞或宿主细胞表达葡糖淀粉酶变体,以及任选地纯化葡糖淀粉酶变体。

[0658] 87. 根据实施方案86的方法,包括纯化所述葡糖淀粉酶变体。

[0659] 88. 根据实施方案50-76中任一项的葡糖淀粉酶变体用于制备酶促组合物的用途。

[0660] 89. 酶促组合物,其包含至少一种根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体。

[0661] 90. 根据实施方案89的酶促组合物,其包含至少一种根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体,其中所述组合物选自:淀粉水解组合物、糖化组合物、去污剂、醇发酵酶促组合物和动物饲料。

[0662] 91. 根据实施方案90的酶促组合物,其为淀粉水解组合物。

[0663] 92. 根据实施方案89-91中任一项的酶促组合物,其包含至少一种选自下列的其它的酶:淀粉酶、蛋白酶、支链淀粉酶、纤维素酶、葡聚糖酶、木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖酶、阿魏酸酯酶、木聚糖乙酰酯酶和其它葡糖淀粉酶。

[0664] 93. 根据实施方案89-92中任一项的酶促组合物,其中所述至少一中其它的酶选自淀粉酶、支链淀粉酶和其它葡糖淀粉酶。

[0665] 94. 根据实施方案89-93中任一项的酶促组合物,其中所述至少一种其它的酶选自淀粉酶和支链淀粉酶。

[0666] 95. 根据实施方案89-94中任一项的酶促组合物,其中所述淀粉酶选自 α -淀粉酶和异淀粉酶。

[0667] 96. 将淀粉或经部分水解的淀粉转化为含有葡萄糖的糖浆的方法,所述方法包括在至少一种根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体或根据实施方案89-95中任一项的酶促组合物的存在下糖化液体淀粉溶液。

[0668] 97. 根据实施方案96的糖化液体淀粉溶液的方法,其包括利用根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体或根据实施方案89-95中任一项的酶促组合物的酶促糖化步骤。

[0669] 98. 根据实施方案96-97中任一项的方法,还包括使所述液体淀粉溶液与至少一种其它的酶相接触。

[0670] 99. 根据实施方案98的方法,其中所述其它的酶选自淀粉酶、蛋白酶、支链淀粉酶、纤维素酶、葡聚糖酶、木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖酶、阿魏酸酯酶、木聚糖乙酰酯酶和葡糖淀粉酶。

[0671] 100. 根据实施方案96-99的方法,其中所述其它的酶为淀粉酶和支链淀粉酶。

[0672] 101. 根据实施方案96-100中任一实施方案的方法,其中所述淀粉酶选自 α -淀粉酶和异淀粉酶。

[0673] 102. 根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体在淀粉转化过程、例如连续淀粉转化过程中的用途。

[0674] 103. 根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体在用于生产寡糖、麦芽糊精

或葡萄糖糖浆的过程中的用途。

[0675] 104. 根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体在用于生产高果糖玉米糖浆的过程中的用途。

[0676] 105. 产生用于酿造的麦芽汁的方法, 包括从谷形成醪液、和使所述醪液与根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体或根据实施方案89-95中任一项的酶促组合物接触。

[0677] 106. 实施方案105的方法, 还包括使醪液与一种或多种其它的酶相接触。

[0678] 107. 根据实施方案106的方法, 其中所述一种或多种酶选自淀粉酶、蛋白酶、支链淀粉酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖酶、阿魏酸酯酶、木聚糖乙酰酯酶和葡糖淀粉酶。

[0679] 108. 根据实施方案107的方法, 其中所述一种或多种酶是淀粉酶和/或支链淀粉酶。

[0680] 109. 根据实施方案107-108中的任一实施方案的方法, 其中所述淀粉酶是 α -淀粉酶和/或异淀粉酶。

[0681] 110. 根据实施方案105-109中任一项的方法, 其中所述谷包含一种或多种含麦芽的谷物、不含麦芽的谷物、附加物及其任意组合。

[0682] 111. 根据实施方案105-110中任一项的方法, 还包括发酵麦芽汁以获得经发酵的饮料。

[0683] 112. 根据实施方案105-111中任一项的方法, 还包括发酵麦芽汁以获得啤酒。

[0684] 113. 用于生产啤酒的方法, 其包括:

[0685] a. 制备醪液,

[0686] b. 过滤醪液以获得麦芽汁, 和

[0687] c. 发酵麦芽汁以获得啤酒,

[0688] 其中将根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体加入: 步骤(a) 和/或步骤(b) 和/或步骤(c)。

[0689] 114. 实施方案113的方法, 其中使啤酒经受巴氏灭菌步骤。

[0690] 115. 根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体用于提高酿造过程的发酵步骤或淀粉糖化步骤中的可发酵糖生产的用途。

[0691] 116. 啤酒, 其中所述啤酒是通过下列步骤产生的:

[0692] a. 制备醪液,

[0693] b. 过滤所述醪液以获得麦芽汁,

[0694] c. 发酵所述麦芽汁以获得啤酒, 和

[0695] d. 巴氏灭菌所述啤酒,

[0696] 其中将根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体加入: 步骤(a) 和/或步骤(b) 和/或步骤(c)。

[0697] 117. 实施方案116的啤酒, 其中经巴氏灭菌的啤酒被进一步表征为:

[0698] a. 基本上没有葡糖淀粉酶活性; 和/或

[0699] b. 低卡路里啤酒和/或低醇啤酒。

[0700] 118. 根据实施方案50-77中任一项的葡糖淀粉酶变体在醇发酵过程中的用途。

[0701] 119. 用于鉴别与亲本葡糖淀粉酶相比具有减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比 (IS/SH比率) 的葡糖淀粉酶变体的筛选方法。

[0702] 120. 用于鉴别下列葡糖淀粉酶变体的筛选方法, 所述葡糖淀粉酶变体与亲本葡糖淀粉酶相比, 具有相同或增加的淀粉水解活性和减少的异麦芽糖合成, 并具有减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比 (IS/SH比率), 其中所述异麦芽糖合成与亲本葡糖淀粉酶相比减少不超过5%、不超过10%或不超过15%。

[0703] 121. 用于鉴别淀粉水解过程中具有减少的缩合产物合成的葡糖淀粉酶变体的筛选方法, 所述方法包括下列步骤: 测量异麦芽糖合成和葡糖淀粉酶变体的淀粉水解活性, 以及选择与亲本葡糖淀粉酶相比具有降低的淀粉水解活性且与亲本葡糖淀粉酶相比具有减少的异麦芽糖合成与淀粉水解活性之比 (IS/SH比率) 的变体, 所述淀粉水解活性与亲本葡糖淀粉酶相比降低不超过5%、不超过10%或不超过15%。

[0704] 122. 根据实施方案119-121中任一项的方法获得的葡糖淀粉酶变体。

实施例

[0705] 测定和方法

[0706] 下列测定和方法用于下文中所提供的实施例中。下面描述了用于提供变体的方法。然而, 应注意的是可使用不同的方法来提供亲本酶的变体且本发明不限于实施例中所使用的方法。所意欲的是可使用任何适合的手段来制造变体和选择变体。

[0707] 用于96孔微量滴定板的pNPG葡糖淀粉酶活性测定

[0708] 试剂溶液是: NaAc缓冲液: 200mM乙酸钠缓冲液pH 4.5; 底物: NaAc缓冲液 (0.3g/20ml) 中的50mM p-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (Sigma N-1377) 以及终止溶液: 800mM甘氨酸-NaOH缓冲液pH 10。将30 μ l经过滤的上清液置于新鲜的96孔平底微量滴定板 (MTP) 中。向每个孔中加入50 μ l NaAc缓冲液和120 μ l底物并在50 $^{\circ}$ C下孵育30分钟 (Thermolab systems iEMS Incubator/shaker HT)。通过加入100 μ l终止溶液而使反应终止。在MTP-读数仪 (Molecular Devices Spectramax 384plus) 中、在405nm处测量吸光度并使用0.011 μ M/cm的摩尔消光系数来计算活性。

[0709] 热稳定性测定1

[0710] 以150ppm纯化的酶的储存稀释液 (在50mM NaAc pH 4.0中), 通过将6 μ l加入294 μ l 50mM NaAc缓冲液 (pH 4.5) 中而制成3ppm的稀释液。将经稀释的样品平等地分到2个MTP中。将一个MTP (初始板) 在4 $^{\circ}$ C下孵育1hr而将另一个MTP (余留板) 在64 $^{\circ}$ C下 (Thermolabsystems iEMS Incubator/Shaker HT) 孵育1hr。使所述余留板在冰上冷却10min。将60 μ l的初始板和余留板二者加入120 μ l 4%的可溶性玉米淀粉 (pH 3.7) 并在2个单独的MTP中于32 $^{\circ}$ C、900rpm下孵育2hrs (Thermolabsystems iEMS Incubator/Shaker HT)。使用下文中描述的乙醇应用测定, 在己糖激酶活性测定中测量两个板的活性。

[0711] 将热稳定性如下计算为%残余活性:

$$[0712] \quad \frac{ABS_{340} \text{ 余留} - \text{空白}}{ABS_{340} \text{ 初始} - \text{空白}} \times 100\%$$

[0713] 己糖激酶活性测定

[0714] 己糖激酶混合物: 在使用前10-15分钟, 将90ml水加入BoatIL容器葡萄糖HK R1中

(IL测试葡萄糖(HK)试剂盒,Instrument Laboratory#182507-40)并轻柔混合。将100 μ l己糖激酶混合物加入85 μ l dH₂O中。将15 μ l的样品加入混合物中并在室温下、在黑暗中孵育10分钟。10分钟后,在MTP读数仪中、在340nm处读取吸光度。根据葡萄糖(0-1.6mg/ml)标准曲线计算葡萄糖浓度。

[0715] 乙醇应用—从玉米淀粉释放葡萄糖

[0716] 8%储液:在室温下,将8g可溶性玉米淀粉(Sigma#S4180)悬浮于40ml dH₂O中。在250ml摇瓶中,将浆料以部分加入50ml沸腾的dH₂O中并蒸煮5分钟。在搅拌中使淀粉溶液冷却至25℃并用剩余的10ml dH₂O调节体积。

[0717] 终止溶液:800mM甘氨酸-NaOH缓冲液,pH 10。

[0718] 4% (m/v) 可溶性淀粉工作溶液:用100mM乙酸钠缓冲液(pH 4.0)稀释(1:1)储液。

[0719] 在平底96孔MTP中用294 μ l 50mM NaAc缓冲液(pH 4.0)稀释6 μ l的150ppm纯化的酶。将60 μ l的此稀释液加入120 μ l 4%的可溶性玉米淀粉(pH 4.0)中,并在32℃、900rpm (Thermolabsystems iEMS Incubator/Shaker HT)下孵育2hrs。通过加入90 μ l 4℃-冷的终止溶液而使反应停止。将样品置于冰上20分钟。在10℃下、以1118 $\times$ g将淀粉离心(SIGMA 6K15)5分钟,并将15 μ l上清液用于上文所描述的己糖激酶活性的测定中以确定葡萄糖含量。

[0720] 数据分析和计算乙醇筛选测定的性能指标

[0721] 使用微流电泳设备(Caliper Life Sciences,Hopkinton,MA,USA)来测量蛋白水平。根据生产商的指导(LabChip®HT Protein Express,P/N 760301)而制备微流芯片和蛋白质样品。制备培养物上清液并在-20℃下存储于96-孔微量滴定板中直至使用,使用时通过在37℃温箱中温热30分钟而使其融化。简短摇动后,将2 μ l的每种培养物样品转移到96孔PCR板(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)中(其中含有7 μ l样品缓冲液(Caliper)),随后在恒温控制的平板加热器上将平板加热至90℃5分钟。允许平板冷却,然后向每个样品中加入40 μ l水。然后将所述平板与由生产商提供并校准的蛋白标准一起置于设备中。当蛋白移动通过芯片中的焦点时,记录荧光信号并通过相对于由经校准的蛋白标准组产生的信号对信号进行定量而测定蛋白浓度。

[0722] 在Caliper蛋白测定之后,以下述方式处理数据。

[0723] 就峰模式的正确性检查校准阶梯。如果与运行(run)相关的校准阶梯不足的话,用邻近运行的校准阶梯替代它。对于峰的检测,使用caliper软件的整体峰寻找选择的默认设置。在75kDa $\pm$ 10%下选择目标峰。将结果输出到电子数据表程序中并使峰区域与乙醇筛选测定中的相应活性(ABS340-空白测量)相关联。

[0724] 以12个野生型样品的面积和活性数字、使用程序Grafit Version 5(Erithacus Software,Horley,UK)的“酶动力学”方程与非线性匹配函数相结合而制成校准线。使用默认的设置来计算Km和Vmax参数。基于这两个参数,制成米氏参考线并计算每种变体的比活性。

[0725] 基于所述比活性来计算性能指标(PI)。变体的PI是“变体-比活性/WT-比活性”的商。WT的PI是1.0而PI>1.0的变体所具有的比活性大于WT的比活性。

[0726] TrGA变体的纯化

[0727] 在一个步骤中,使用AKTA explorer 100 FPLC系统(Amersham Biosciences,

Piscataway, NJ) 通过亲和层析来纯化经表达的TrGA变体的培养物上清液。将 β -环糊精 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands; 85.608-8) 与经环氧活化的琼脂糖珠 (GE Healthcare, Diegem, Belgium; 17-0480-01) 偶联并将其用于纯化。用25mM乙酸钠缓冲液 (pH 4.3) 平衡柱子, 随后应用经浓缩的酶样品。用含有10mM α -环糊精 (Sigma, 28705) 的25mM乙酸钠缓冲液 (pH 4.3) 从柱子上洗脱所结合的变体。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 来分析经纯化的样品。

[0728] 纯化的TrGA变体的蛋白定量

[0729] 使用AKTA explorer 100FPLC系统、通过阴离子交换色谱测定纯化的TrGA变体的蛋白浓度。将经纯化的样品注射到ResourceQ_1ml柱 (GE Healthcare) 上并施以0至500mM NaCl (在25mM乙酸钠缓冲液pH4.3中) 的线性梯度以洗脱所结合的蛋白。确定了峰区域并相对于浓度已知的TrGA标准来计算蛋白浓度。

[0730] 液化物测定

[0731] 在来自于当地乙醇生产者的玉米醪液液化物上、在6孔板中确定变体的葡萄糖释放。用6g 26%DS液化物 (pH 4.3) 填充板的每个孔。随后, 加入300ppm酶和400ppm尿素, 并在于32℃孵育2、4和6hr后收集250 μ l样品。在14,000 $\times$ g下将样品离心5分钟, 并将50 μ l上清液转移到含有50 μ l杀伤溶液 (1.1N硫酸) 的eppendorf管中, 允许其保持5分钟。向所述管中加入250 μ l水, 然后用0.22 μ m的过滤板过滤, 并如下文所述注射到HPX-87H柱上。

[0732] 评价TrGA变体在乙醇发酵中的性能

[0733] 从当地乙醇生产者获得了玉米醪液液化物样品并在一些情形中使用酒糟水将其稀释至26%DS。使用4N硫酸将浆料的pH调节至pH 4.3。将100g或50g等份的醪液放入125ml摇瓶中并将其置于32℃温箱中, 且允许其平衡。加入100 μ l 400ppm尿素后, 向摇瓶中加入1ml所欲浓度的纯化的变体或2种不同浓度的纯化的TrGA。最后, 向每个样品中加入333 μ l的Red Star Red酵母 (15g, 在45ml DI水中水合了30分钟; Lesaffre yeast Corp. Milwaukee, WI) 溶液。在5、21、28、48和52小时时收集样品并使用Aminex HPX-87H柱 (Bio-Rad) 通过HPLC (Agilent 1200系列) 进行分析。

[0734] 乙醇和碳水化合物确定

[0735] 用发酵罐啤酒填充2ml的eppendorf离心管并在冰上冷却10分钟。将样品在14,000 $\times$ g下离心3分钟, 并将500 μ l上清液转移至含有50 μ l杀伤溶液 (1.1N硫酸) 的测试管中, 且允许其保持5分钟。向测试管中加入5.0ml水然后过滤到0.22 μ m过滤板 (multiscreen, Millipore, Amsterdam, 荷兰) 中, 且在HPLC上运行。柱温度: 60℃; 运动相: 0.01N硫酸; 流速 0.6ml/min; 检测器: RI; 注射体积: 20 μ l。柱子基于电荷和分子量而将分子分离; DP1 (单糖); DP2 (二糖); DP3 (三糖); DP>3 (具有大于3的聚合度的寡糖); 琥珀酸; 乳酸; 甘油; 甲醇; 乙醇。

[0736] 确定GAU活性

[0737] 底物: 新鲜制备了p-硝基苯基- β -麦芽糖苷 (4mM), 以及热稳定的 β -葡萄糖苷酶 (5U/ml) (来自测定R-AMGR 305/04; Megazyme International Wicklow, 爱尔兰)。

[0738] 缓冲液: 200mM乙酸钠缓冲液 (pH 4.5)。

[0739] 在96孔板中、用乙酸钠缓冲液将酶样品稀释至少10倍: 将20 μ L底物与20 μ L酶溶液相混合并在40℃下伴随搅拌孵育10分钟。加入300 μ L 2%的氨基丁三醇碱以终止反应并显

色。相对于试剂空白而测量400nm处的吸光度。

[0740] 通过向20μL底物中加入300μL氨基丁三醇碱溶液(2%) (伴随剧烈搅拌), 随后加入酶溶液(20μL) 而制备空白。如下计算活性:

$$[0741] \quad \text{活性 (U/mL)} = \frac{\Delta A_{400}}{10} \cdot \frac{340}{20} \cdot \frac{1}{18.1} \cdot \frac{1}{0.88} \cdot \text{稀释液}$$

[0742] 其中:U=酶活性的国际单位。一个单位是在确定的pH和温度下每分钟从底物上释放1μmole对硝基酚的酶的量。 ΔA_{400} =吸光度(反应)-吸光度(空白)。10=孵育时间(min)。340=最终反应体积(μL)。20=被测定的酶的体积(μL) 18.1=在400nm处、2%氨基丁三醇碱(pH约8.5)中的EmM对硝基酚(单位:μM⁻¹*cm⁻¹)。0.88=光路径(cm)

[0743] 淀粉水解活性(SH活性):

[0744] 缓冲液:0.1M柠檬酸缓冲液pH 5.4 (由0.1M柠檬酸和0.1M柠檬酸三钠制成)

[0745] 底物:缓冲液中的30%可溶性淀粉(Merck, v.nr 1.01257.1000) (稍稍加热直至所有的淀粉都在溶液中)

[0746] 酶:葡糖淀粉酶,基于上述测定标准化至3GAU/ml。

[0747] 将60μL 30%的淀粉转移至96孔PCR板中。加入60μL的酶样品或标准并通过用移液器抽吸数次而混合。尽可能快地进行随后的步骤直至孵育。

[0748] 用密封带覆盖PCR板,然后运行下列PCR程序:63℃下6min、99℃下6min以及4℃下10min。不加热盖子。在温度循环之后离心PCR板(300rpm下约1min)以在孔底收集所有的液体。在4℃下储存板直至进一步分析。根据下面的方法测量葡萄糖浓度并且如下计算水解活性:

$$[0749] \quad \text{淀粉水解活性 (M/min)} = \frac{\left[\text{葡萄糖} \right] \frac{g}{l}}{180 \frac{g}{mol} \times 6 \text{ min}}$$

[0750] 异麦芽糖水解活性

[0751] 与淀粉水解活性一样,除了底物是2%的异麦芽糖(Sigma I7253)且PCR程序的第一步为63℃下10min而非6min之外。

[0752] 确定葡萄糖浓度

[0753] 从Megazyme©D-葡萄糖测定(KGLUC 04/06)进行修饰并用于测定从淀粉和异麦芽糖水解反应释放的葡萄糖的量。

[0754] 用蒸馏水将瓶1的内容物[试剂缓冲液:磷酸钾缓冲液(1.0M, pH7.4), 对羟基苯甲酸(0.22M)和叠氮化钠(0.4%w/v)]稀释至1L。在约20mL溶液1中稀释瓶2的内容物[试剂酶:葡萄糖氧化酶(>12,000U)和过氧化物酶(>650U)以及4-氨基安替比林(80mg)。冻干的粉末]并定量地转移至含有剩余溶液1的瓶中。这是葡萄糖确定试剂(GOPD试剂)。其新鲜地使用或在黑暗中冷冻保存。在使用之前检查此溶液的吸光度(A₅₁₀) 在相对于蒸馏水读取时小于0.05。

[0755] 在96孔板中,向10μL样品溶液中加入250μL的GOPD试剂。用密封带覆盖平板并在Eppendorf热混合器中于40℃、700rpm下孵育20min。在510nm处读取吸光度。由milli-q水中的1.4、1.2、0.8、0.4、0.2和0mg/ml葡萄糖制成葡萄糖标准曲线并用于计算样品葡萄糖浓

度。

[0756] 通过TLC确定麦芽糖和异麦芽糖合成

[0757] 底物:30%葡萄糖,在0.1M柠檬酸缓冲液(pH 5.4)中(稍稍加热以使所有的葡萄糖进入溶液中)。

[0758] 酶:将葡糖淀粉酶标准化至3GAU/ml,总是运行黑曲霉葡糖淀粉酶产品(AnGA; **Diazyme®**X4, Danisco, 丹麦)和瑞氏木霉葡糖淀粉酶产品(TrGA **Diazyme** TR8 Danisco, 丹麦)作为参考。

[0759] 参考:热灭活的酶样品和/或缓冲溶液(不是在所有的情形中使用)。

[0760] 标准:1)0.3%麦芽糖和0.1%异麦芽糖在去矿物质水中。2)0.2%麦芽糖和0.05%异麦芽糖,在去矿物质水中。3)0.3%麦芽糖和0.1%异麦芽糖在去矿物质水中。

[0761] 反应条件:将60μl底物与60μL酶溶液在PCR板的孔中混合。用密封带覆盖所述板,并运行下列温度:63℃下120min、99℃下6min、4℃下10min。将盖子加热至70℃。孵育后,对平板进行中等的离心(1min,在300rpm下),并将其储存在4℃直至进一步分析。一式两份运行所有的样品。

[0762] 对麦芽糖和异麦芽糖的定量:在样品应用之前,于167℃下预加热TLC板10min。在去矿物质水中将所有的样品和标准稀释20倍。使用自动化的TLC取样器(ATS4, CAMAG, Muttentz, 瑞士)来准确地转移4μL样品至TLC板。每个板可含有20个样品,所述样品被置于4mm宽的带中。在40℃下将板加热10min以使带干燥。用AcN, EtAc, 1-丙醇, H₂O (85:20:50:40)洗脱TLC板,之后于167℃将板加热5min以去除过量的溶剂。将板反转(即通过在接近样品施用处的边缘握住板)浸入5% H₂SO₄:EtOH (95:5)中。每日制作浸渍溶液。在167℃下将板加热3min以使点显现。通过在TLC扫描仪(CAMAG扫描仪3, Muttentz, 瑞士)中扫描而确定点强度并通过基于所有的麦芽糖和异麦芽糖浓度vs.点强度画出标准曲线而进行定量。利用点强度vs.浓度对于两种化合物相等的事实,由这一曲线计算出麦芽糖和异麦芽糖二者的浓度。

[0763] 图10描绘了TLC板的实例,所述板具有含不同浓度的葡萄糖、麦芽糖和异麦芽糖的标准和含有反应产物的样品,所述反应产物来自用黑曲霉葡糖淀粉酶产品(AnGA; **Diazyme®**X4, Danisco, 丹麦)和瑞氏木霉葡糖淀粉酶产品(TrGA **Diazyme** TR8 Danisco, 丹麦)孵育的葡萄糖。盲道是没有酶而进行孵育的葡萄糖。

[0764] 根据下式,基于由TLC确定的异麦芽糖浓度来计算异麦芽糖合成活性(IS活性):

$$[0765] \quad \text{异麦芽糖合成活性 (M/min)} = \frac{[\text{异麦芽糖}] \% \times 10 \frac{\text{g}}{\text{l}}}{342 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 120 \text{min}}$$

[0766] 热稳定性测定2

[0767] 作为在本实验中所用的条件下酶的热稳定性的度量,在15%葡萄糖、0.1M柠檬酸缓冲液(pH 5.4)中于63℃用酶孵育120min之前和之后,根据上述测定确定GAU活性。数据被呈现为%活性丧失。

[0768] 通过发酵生产GA

[0769] 400x痕量元素溶液:在1000ml去矿物质水中稀释:无水柠檬酸(175g)、FeSO₄*7 H₂O (200g)、ZnSO₄*7H₂O (16g)、CuSO₄*5H₂O (3.2g)、MnSO₄*H₂O (1.4g)、H₃BO₃ (0.8g)。对其进行酸化

而使所有的组分进入溶液中可能是有帮助的。将溶液过滤并灭菌。

[0770] LD-培养基:加入至约800ml去矿物质水中:酪蛋白氨基酸(9g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5g), KH_2PO_4 (4.5g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1g),哌嗪-1,4-双(丙磺酸)(PIPPS)缓冲液(33g),400x瑞氏木霉痕量元素(2.5ml),用NaOH 4N将pH调节至5.5。将终体积调节至920ml。

[0771] 2xAmd S碱琼脂(1升): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6ml),20% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6ml),瑞氏木霉孢子元素400x(2ml),50%葡萄糖 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ (80ml)。用4N NaOH将pH调节至4.5,制成1L并过滤灭菌。在4℃储存。

[0772] 初始培养物:在AmdS-碱琼脂平板上培养菌株。为了产生琼脂平板,将基础培养基琼脂煮沸,冷却到大约50℃后,用2xAmdS碱1:1稀释并倾倒在培养皿上。在孢子形成之后(大约6-7天),用2ml盐水0.015%Tween80刮抹平板。将大约1ml加入含有500-600 μl 35%甘油的甘油管中并储存在-80℃。由此孢子悬浮物直接开始进行预培养物发酵。

[0773] 预培养物:通过向LD培养基中加入2.5%葡萄糖,随后使其达到1L而制成培养基。为了产生生物物质,将50 μl 孢子悬浮物加入100ml培养基中(在500ml摇瓶中灭菌)。于30℃、180rpm下将摇瓶在旋转摇床上孵育2天,然后使用10ml悬浮物来接种新的摇瓶,将其在类似的条件下孵育1天。将此摇瓶的内容物用于接种发酵罐。

[0774] 主要培养物:为了制成1L的培养基,将40ml葡萄糖/槐糖混合物(Danisco, Jamsa, 芬兰)加入LD-培养基中并使其达到1L。用预培养物接种含有4L培养基的6L发酵罐,并于34℃下、在pH 3.5下培养大约16小时,直到CER/OUR(二氧化碳排出率/氧气摄入率)开始下降。然后使温度降至28℃,pH升至4.0并使发酵继续进行大约80小时。

[0775] 确定实际发酵度(RDF)的酿造分析

[0776] 使用下列程序进行分析:以266ml水捣碎70g经研磨的皮尔森麦芽(Weyermann, Bamberg, 德国)。在(混合麦芽和水)中淀粉糖化之后的温度循环为:63.9℃下140分钟、在10分钟中增加至73.9℃、73.9℃下5分钟。在淀粉糖化的最后,使醪液冷却,使其达到350g并过滤。在30分钟后测量滤出物的体积。对经过滤的麦芽汁进行取样用于确定比重,然后在水浴中加热至99℃10分钟,以破坏任何剩余的葡糖淀粉酶活性。热处理产生丧失1.5g/200ml麦芽汁。加入酵母后,在500ml锥形瓶中,以18℃和100rpm使麦芽汁发酵至少88小时且不超过120小时。确定发酵物的比重。根据下面的等式计算实际发酵度(RDF)值:

$$[0777] \quad RDF(\%) = \left(1 - \frac{RE}{P_{\text{初始}}} \right) \times 100$$

[0778] 其中:RE=实际提取物=(0.1808× $^{\circ}\text{P}_{\text{初始}}$)+(0.8192× $^{\circ}\text{P}_{\text{最终}}$), $^{\circ}\text{P}_{\text{初始}}$ 是发酵前经标准化的麦芽汁的比重而 $^{\circ}\text{P}_{\text{最终}}$ 是经发酵的麦芽汁的比重,以柏拉图度表示。

[0779] 实施例1:在pTTT载体中构建TrGA位点评价文库(SELs)用于在瑞氏木霉中表达

[0780] 通过Gateway®BP重组反应(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)将瑞氏木霉cDNA序列(SEQ ID NO:4)克隆到pDONR™201中,产生进入载体pDONR-TrGA(图2)。所述cDNA序列(SEQ ID NO:4)编码TrGA信号肽、原序列和成熟蛋白,这包括催化结构域、连接子区域和淀粉结合结构域(SEQ ID NO:1)。SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:1显示在图1B和1B中。图1C阐释了前体和成熟蛋白TrGA结构域。

[0781] 为了在瑞氏木霉中表达TrGA蛋白,通过GATEWAY®LR重组反应将TrGA编码序列(SEQ ID NO:4)克隆到Gateway相容目标载体pTTT-Dest(图3)中。表达载体含有源自瑞氏木

霉cbhI的启动子和终止子区域,这允许目的基因的强的可诱导表达。所述载体还含有构巢曲霉amdS选择性标记物,其允许转化体在作为唯一氮源的乙酰胺上生长。所述表达载体还含有瑞氏木霉端粒区域,其允许真菌细胞中非染色体质粒的保持。在目标pTTT-Dest质粒上,cbhI启动子与终止子区域被氯霉素抗性基因CmR和致死性大肠杆菌基因ccdB分隔开,其侧翼有基于噬菌体 λ 的特异性重组位点attR1、attR2。此配置允许直接选择通过**GATEWAY**®LR重组反应而以正确的方向含有在cbhI调控元件控制下的TrGA基因的重组体。最终的表达载体pTTT-TrGA显示在图4中。

[0782] 使用pDONR-TrGA进入载体(图2)作为模板和表2中列出的引物来构建SELs。用于诱变实验中的所有引物都在与设计待突变的TrGA序列(SEQ ID NO:1)的密码子对齐的位置处含有三联体NNS(N=A,C,T,G,且S=C或G),这允许在预先选择的位置随机掺入核苷酸。每个SEL文库的构建均以pDONR-TrGA进入载体上两个独立的PCR扩增反应开始:一个使用Gateway F(pDONR201-FW)并使用特异性的诱变引物R(表2),而另一个使用Gateway引物R(pDONR201-RV)和特异性的诱变引物F(表2)。高保真PHUSION DNA聚合酶(Finnzymes OY, Espoo, 芬兰)被用于包括0.2 μ M的引物的PCR扩增反应中。根据Finnzymes提供的方案使反应进行25个循环。将1 μ l等份的所获得的PCR片段作为模板、与Gateway FW和Gateway RV引物(Invitrogen)一起用于随后的融合PCR反应。在22个循环后,此PCR扩增产生了在特定密码子位置被随机突变的全长线性TrGA DNA片段的群体。所述片段的侧翼在两端都是Gateway-特异性attL1、attL2重组位点。用**CHARGESWITCH**®PCR净化试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, USA)将DNA片段纯化,然后根据Invitrogen提供的方案,使用LR CLONASE™II酶混合物将其与100ng的pTTT-目标载体(图3)重组。将所产生的重组产物转化到大肠杆菌最大效率DH5中,如供应商(Invitrogen)所描述的。通过将细菌涂布在含有100 μ g/ml氨苄西林的2 $\times$ YT琼脂板(16g/L Bacto胰蛋白胨(Difco)、10g/L Bacto酵母提取物(Difco)、5g/L NaCl、16g/L Bacto琼脂(Difco))上而选择在所需位置含有突变的最终的表达构建体pTTT-TrGA。

[0783] 使来自每个文库的96个单克隆在37 $^{\circ}$ C下、在含有200 μ L包含100 μ g/ml氨苄西林的2 $\times$ YT培养基的MTP中生长24hrs。将培养物直接用于扩增包括在其中引入了特定突变的区域的PCR片段。使用ABI3100序列分析仪(Applied Biosystems)对所获得的特定PCR产物进行测序。每个文库含有15至19个不同的、最终表达载体中的TrGA变体。如下文中所述的,这些变体被单独转化到瑞氏木霉中。参照被随机突变的TrGA序列中的特定氨基酸残基而将文库编号为1至182。

[0784] 表2:用于产生TrGA SELs的引物

[0785]

AA 位置	F/R	DNA 序列 5' 至 3'
pDONR201-	F	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC (SEQ ID NO:13)
pDONR201-	R	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC (SEQ ID NO:14)
4	F	CGTCACCAAGAGGTCTGTTGACNNSTTCATCAGCAC CGAGACGCC (SEQ ID NO:15)
4	R	GTCAACAGACCTCTTGGTGACGTCG (SEQ ID NO:16)
5	F	CACCAAGAGGTCTGTTGACGACNNSATCAGCACCG AGACGCCTATTGC (SEQ ID NO:17)
5	R	GTCGTCAACAGACCTCTTGGTGAC (SEQ ID NO:18)
10	F	TGACGACTTCATCAGCACCGAGNNSCCTATTGCA CTG (SEQ ID NO:19)
10	R	CTCGGTGCTGATGAAGTCGTC (SEQ ID NO:20)
12	F	TCATCAGCACCGAGACGCCTNNSGCACTGAACAATC TTCTTTGCA (SEQ ID NO:21)
12	R	AGGCGTCTCGGTGCTGATGAAGTCG (SEQ ID NO:22)
14	F	CAGCACCGAGACGCCTATTGCANNSAACAATCTT CTT (SEQ ID NO:23)
14	R	TGCAATAGGCGTCTCGGTGCT (SEQ ID NO:24)
15	F	CACCGAGACGCCTATTGCACTGNNSAATCTTCTT TGC (SEQ ID NO:25)
15	R	CAGTGCAATAGGCGTCTCGGT (SEQ ID NO:26)
23	F	CAATCTTCTTTGCAATGTTGGTNNSGATGGATGC CGT (SEQ ID NO:27)
23	R	ACCAACATTGCAAAGAAGATTG (SEQ ID NO:28)
24	F	TTCTTTGCAATGTTGGTCTNNSGGATGCCGTGCATT CGGCACAT (SEQ ID NO:29)
24	R	AGGACCAACATTGCAAAGAAGATTG (SEQ ID NO:30)
29	F	GTCCTGATGGATGCCGTGCANNSGGCACATCAGCTGG TGCGGTGA (SEQ ID NO:31)
29	R	TGCACGGCATCCATCAGGACCAACA (SEQ ID NO:32)
42	F	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCNNNSATTGACCC GGAC (SEQ ID NO:33)
42	R	GCTGGGAGATGCAATCACCGCA (SEQ ID NO:34)
43	F	TGATTGCATCTCCAGCACANNSGACCCGGACTACTA TTACATGT (SEQ ID NO:35)
43	R	TGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA (SEQ ID NO:36)
44	F	TTGCATCTCCAGCACAAATTNNSCCGGACTACTATTA CATGTGGA (SEQ ID NO:37)
44	R	AATTGTGCTGGGAGATGCAATCACC (SEQ ID NO:38)
45	F	CATCTCCAGCACAAATTGACNNSGACTACTATTACA TGTGGACGC (SEQ ID NO:39)
45	R	GTCAATTGTGCTGGGAGATGCAATC (SEQ ID NO:40)
46	F	CTCCAGCACAAATTGACCCGNNSTACTATTACATGT GGACGCGAGA (SEQ ID NO:41)
46	R	CGGGTCAATTGTGCTGGGAGATGCA (SEQ ID NO:42)
47	F	CCAGCACAAATTGACCCGGACNNSTATTACATGTGGA CGCGAGATA (SEQ ID NO:43)
47	R	GTCCGGGTCAATTGTGCTGGGAGAT (SEQ ID NO:44)
49	F	CAATTGACCCGGACTACTATNNSATGTGGACGCGAG ATAGCGCTC (SEQ ID NO:45)
49	R	ATAGTAGTCCGGGTCAATTGTGCTG (SEQ ID NO:46)

[0786]

51	F	ACCCGGACTACTATTACATGNNNSACGCGAGATAGC GCTCTTGTCT (SEQ ID NO:47)
51	R	CATGTAATAGTAGTCCGGGTCAATT (SEQ ID NO:48)
59	F	GACGCGAGATAGCGCTCTTGTCTNNSAAGAACCTC ATC (SEQ ID NO:49)
59	R	GACAAGAGCGCTATCTCGCGT (SEQ ID NO:50)
60	F	GCGAGATAGCGCTCTTGTCTTNNNSAACCTCATC GAC (SEQ ID NO:51)
60	R	GAAGACAAGAGCGCTATCTCG (SEQ ID NO:52)
61	F	AGATAGCGCTCTTGTCTTCAAGNNSCTCATCGAC CGC (SEQ ID NO:53)
61	R	CTTGAAGACAAGAGCGCTATC (SEQ ID NO:54)
65	F	TGTCTTCAAGAACCTCATCGACNNSTTACCGAA ACG (SEQ ID NO:55)
65	R	GTCGATGAGGTTCTTGAAGAC (SEQ ID NO:56)
67	F	CAAGAACCTCATCGACCGCTTNNNSGAAACGTA CGAT (SEQ ID NO:57)
67	R	GAAGCGGTCGATGAGGTTCTT (SEQ ID NO:58)
68	F	GAACCTCATCGACCGCTTCAACNNSACGTACGA TGCG (SEQ ID NO:59)
68	R	GGTGAAGCGGTCGATGAGGTT (SEQ ID NO:60)
70	F	TCGACCGCTTCAACGAAACGNNNGATGCGGGCCT GCAGCGCCGCA (SEQ ID NO:61)
70	R	CGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGG (SEQ ID NO:62)
72	F	CCGCTTCAACGAAACGTACGATNNSGGCCTGCA GCGC (SEQ ID NO:63)
72	R	ATCGTACGTTTCGGTGAAGCGG (SEQ ID NO:64)
73	F	CTTCAACGAAACGTACGATGCGNNSCTGCAGCG CCGC (SEQ ID NO:65)
73	R	CGCATCGTACGTTTCGGTGAA (SEQ ID NO:66)
75	F	AAACGTACGATGCGGGCCTGNNSCGCCGCATCGAG CAGTACATTA (SEQ ID NO:67)
75	R	CAGGCCCGCATCGTACGTTTCGGTG (SEQ ID NO:68)
76	F	CGTACGATGCGGGCCTGCAGNNSCGCATCGAGCAGT ACATTACTG (SEQ ID NO:69)
76	R	CTGCAGGCCCGCATCGTACGTTTCG (SEQ ID NO:70)
94	F	CTCTCCAGGCCTCTCTAACNNSCTGGGCTCCCTCGC GGACGGCT (SEQ ID NO:71)
94	R	GTTAGAGAGGCCCTGGAGAGTGACC (SEQ ID NO:72)
97	F	GGGCCTCTCTAACCCCTCGGGCNNNSCTCGCGGAC GGC (SEQ ID NO:73)
97	R	GCCCGAGGGGTTAGAGAGGCC (SEQ ID NO:74)
98	F	CCTCTCTAACCCCTCGGGCTCCNNSGCGGACGG CTCT (SEQ ID NO:75)
98	R	GGAGCCCGAGGGGTTAGAGAG (SEQ ID NO:76)
99	F	CTCTAACCCCTCGGGCTCCCTCNNSGACGGCTCT GGT (SEQ ID NO:77)
99	R	GAGGGAGCCCGAGGGGTTAGA (SEQ ID NO:78)
100	F	ACCCCTCGGGCTCCCTCGCGNNSGGCTCTGGTCTC GGCGAGCCCA (SEQ ID NO:79)
100	R	CGCGAGGGAGCCCGAGGGGTTAGAG (SEQ ID NO:80)
102	F	CTCGGGCTCCCTCGCGGACGGCNNSGGTCTCGGC GAG (SEQ ID NO:81)
102	R	GCCGTCCGCGAGGGAGCCCGA (SEQ ID NO:82)
110	F	TGGTCTCGGCGAGCCCAAGTTTNNSTTGACCCTG AAG (SEQ ID NO:83)
110	R	AAACTTGGGCTCGCCGAGACCA (SEQ ID NO:84)

[0787]

111	F	TCTCGGCGAGCCCAAGTTTGAGNNSACCCTGAA GCCT (SEQ ID NO:85)
111	R	CTCAAACCTGGGCTCGCCGAG (SEQ ID NO:86)
113	F	CGAGCCCAAGTTTGAGTTGACCNNSAAGCCTTTC ACC (SEQ ID NO:87)
113	R	GGTCAACTCAAACCTGGGCTC (SEQ ID NO:88)
114	F	CCAAGTTTGAGTTGACCCTGNNSCCTTTCACCGGC AACTGGGGTC (SEQ ID NO:89)
114	R	CAGGGTCAACTCAAACCTGGGCTCG (SEQ ID NO:90)
116	F	TTGAGTTGACCCTGAAGCCTNNSACCGGCAACTGG GGTCGACCGCA (SEQ ID NO:91)
116	R	AGGCTTCAGGGTCAACTCAAACCTTG (SEQ ID NO:92)
119	F	CCCTGAAGCCTTTCACCGGCNNSTGGGGTCGACCG CAGCGGGATG (SEQ ID NO:93)
119	R	GCCGGTGAAAGGCTTCAGGGTCAAC (SEQ ID NO:94)
122	F	CTTTCACCGGCAACTGGGGTNNSCCGCAGCGGGAT GGCCAGCTC (SEQ ID NO:95)
122	R	ACCCAGTTGCCGGTGAAAGGCTTC (SEQ ID NO:96)
125	F	GCAACTGGGGTCGACCGCAGNNSGATGGCCAGCT CTGCGAGCCA (SEQ ID NO:97)
125	R	CTGCGGTCGACCCAGTTGCCGGTG (SEQ ID NO:98)
133	F	GGATGGCCAGCTCTGCGAGCCNNSGCCTTGATT GGA (SEQ ID NO:99)
133	R	GGCTCGCAGAGCTGGGCCATCC (SEQ ID NO:100)
137	F	TGCGAGCCATTGCCTTGATTNNSTACTCAAAGTGGC TCATCAACA (SEQ ID NO:101)
137	R	AATCAAGGCAATGGCTCGCAGAGCT (SEQ ID NO:102)
140	F	CATTGCCTTGATTGGATACTCANNSTGGCTCAT CAAC (SEQ ID NO:103)
140	R	TGAGTATCCAATCAAGGCAATG (SEQ ID NO:104)
144	F	TGGATACTCAAAGTGGCTCATCNNSAACAATAT CAG (SEQ ID NO:105)
144	R	GATGAGCCACTTTGAGTATCC (SEQ ID NO:106)
145	F	ATACTCAAAGTGGCTCATCAACNNSAATATCAG TCG (SEQ ID NO:107)
145	R	GTTGATGAGCCACTTTGAGTA (SEQ ID NO:108)
146	F	CAAAGTGGCTCATCAACAACNNSTATCAGTCGACT GTGTCCAACG (SEQ ID NO:109)
146	R	GTTGTTGATGAGCCACTTTGAGTAT (SEQ ID NO:110)
147	F	AAAGTGGCTCATCAACAACAACNNSCAGTCGACT GTG (SEQ ID NO:111)
147	R	GTTGTTGTTGATGAGCCACTT (SEQ ID NO:112)
148	F	GGCTCATCAACAACAATATNNSTCGACTGTGTCCA ACGTCATCT (SEQ ID NO:113)
148	R	ATAGTTGTTGTTGATGAGCCACTTT (SEQ ID NO:114)
152	F	CAACAATATCAGTCGACTGTGNNSAACGTCATC TGG (SEQ ID NO:115)
152	R	CACAGTCGACTGATAGTTGTT (SEQ ID NO:116)
153	F	CAACTATCAGTCGACTGTGTCCNNSGTCATCTGG CCT (SEQ ID NO:117)
153	R	GGACACAGTCGACTGATAGTT (SEQ ID NO:118)
164	F	GCCTATTGTGCGCAACGACCTCNNSATGTTGCC CAGT (SEQ ID NO:119)
164	R	GAGGTCGTTGCGCACAAATAGG (SEQ ID NO:120)
169	F	ACCTCAACTATGTTGCCAGNNSTGGAACCAAACC GGCTTTGACC (SEQ ID NO:121)
169	R	CTGGGCAACATAGTTGAGGTCGTTG (SEQ ID NO:122)

[0788]

172	F	ATGTTGCCCACTACTGGAACNNSACCGGCTTTGACC TCTGGGAAG (SEQ ID NO:123)
172	R	GTTCCAGTACTGGGCAACATAGTTG (SEQ ID NO:124)
175	F	AGTACTGGAACCAACCGGCNNSGACCTCTGGGAA GAAGTCAATG (SEQ ID NO:125)
175	R	GCCGGTTTGGTTCCAGTACTGGGCA (SEQ ID NO:126)
178	F	ACCAAACCGGCTTTGACCTCNSGAAGAAGTCAATG GGAGCTCAT (SEQ ID NO:127)
178	R	GAGGTCAAAGCCGGTTTGGTTCCAG (SEQ ID NO:128)
180	F	CCGGCTTTGACCTCTGGGAANNSTCAATGGGAGCT CATTCTTTA (SEQ ID NO:129)
180	R	TTCCCAGAGGTCAAAGCCGGTTTGG (SEQ ID NO:130)
181	F	GCTTTGACCTCTGGGAAGAANNSTCAATGGGAGCTCAT TCTTTACTG (SEQ ID NO:131)
181	R	TTCTCCCAGAGGTCAAAGCCGGTT (SEQ ID NO:132)
182	F	CTTTGACCTCTGGGAAGAAGTCNNSGGGAGCTCATT C (SEQ ID NO:133)
182	R	GACTTCTTCCCAGAGGTCAAAG (SEQ ID NO:134)
204	F	TGTCGAGGGCGCCACTCTTGCTNNSACTCTTGGCCA G (SEQ ID NO:135)
204	R	AGCAAGAGTGGCGCCCTCGAC (SEQ ID NO:136)
205	F	CGAGGGCGCCACTCTTGCTGCCNNSCTTGCCAGTC G (SEQ ID NO:137)
205	R	GGCAGCAAGAGTGGCGCCCTC (SEQ ID NO:138)
208	F	CTCTTGCTGCCACTCTTGCCNNSCTGGGAAGCGCTTA TTCATCTG (SEQ ID NO:139)
208	R	GCCAAGAGTGGCAGCAAGAGTGGCG (SEQ ID NO:140)
211	F	CCACTCTTGCCAGTCGGGANNSTGCTTATTCATCTGT TGCTCCCC (SEQ ID NO:141)
211	R	TCCCAGTGGCCAAGAGTGGCAGCA (SEQ ID NO:142)
214	F	TGGCCAGTCGGGAAGCGCTTATNNSCTGTGCTCC C (SEQ ID NO:143)
214	R	ATAAGCGCTTCCCAGTGGCC (SEQ ID NO:144)
216	F	GTCGGGAAGCGCTTATTCATCTNNSGCTCCCCAGGT T (SEQ ID NO:145)
216	R	AGATGAATAAGCGCTTCCCGA (SEQ ID NO:146)
219	F	CGCTTATTCATCTGTTGCTCCNNSGTTTTGTGCTT T (SEQ ID NO:147)
219	R	GGGAGCAACAGATGAATAAGC (SEQ ID NO:148)
228	F	TGTGCTTTCTCCAACGATTCNNSGTGTCGTCTGGTG GATACGTCG (SEQ ID NO:149)
228	R	GAATCGTTGGAGAAAGCACAAAAC CT (SEQ ID NO:150)
229	F	GTGCTTTCTCCAACGATTCTGGNNSTCGTCTGGTG GA (SEQ ID NO:151)
229	R	CCAGAATCGTTGGAGAAAGCA (SEQ ID NO:152)
230	F	CTTTCTCCAACGATTCTGGGTGNNSTCTGGTGGAT ACG (SEQ ID NO:153)
230	R	CACCCAGAATCGTTGGAGAAA (SEQ ID NO:154)
231	F	TCTCCAACGATTCTGGGTGTCGNNSGGTGGATAC GTC (SEQ ID NO:155)
231	R	CGACACCCAGAATCGTTGGAGA (SEQ ID NO:156)
236	F	GGTGTCGTCTGGTGGATACGTCNNSTCCAACATC AACAC (SEQ ID NO:157)
236	R	GACGTATCCACCAGACGACAC (SEQ ID NO:158)
239	F	TGGTGGATACGTCGACTCCAACNNSAACACCAAC GAG (SEQ ID NO:159)

[0789]

239	R	GTTGGAGTCGACGTATCCACC (SEQ ID NO:160)
240	F	TGGATACGTCGACTCCAACATCNNSACCAACGAG GGCA (SEQ ID NO:161)
240	R	GATGTTGGAGTCGACGTATCCA (SEQ ID NO:162)
241	F	ATACGTCGACTCCAACATCAACNNSAACGAGGGCAG GAC (SEQ ID NO:163)
241	R	GTTGATGTTGGAGTCGACGTA (SEQ ID NO:164)
242	F	TCGACTCCAACATCAACACCNNSGAGGGCAGGACTG GCAAGGATG (SEQ ID NO:165)
242	R	GGTGTGATGTTGGAGTCGACGTAT (SEQ ID NO:166)
243	F	ACTCCAACATCAACACCAACNNSGGCAGGACTGGCA AGGATGTCA (SEQ ID NO:167)
243	R	GTTGGTGTGATGTTGGAGTCGACG (SEQ ID NO:168)
244	F	CTCCAACATCAACACCAACGAGNNSAGGACTGGCA AG (SEQ ID NO:169)
244	R	CTCGTTGGTGTGATGTTGGAGT (SEQ ID NO:170)
245	F	ACATCAACACCAACGAGGGCNNSACTGGCAAGGAT GTCAACTCCG (SEQ ID NO:171)
245	R	GCCCTCGTTGGTGTGATGTTGGAGT (SEQ ID NO:172)
263	F	TTCCATCCACACCTTCGATCCCNNSCTTGGCTGTG AC (SEQ ID NO:173)
263	R	GGGATCGAAGGTGTGGATGGA (SEQ ID NO:174)
264	F	CATCCACACCTTCGATCCCAACNNSGGCTGTGACG CA (SEQ ID NO:175)
264	R	GTTGGGATCGAAGGTGTGGAT (SEQ ID NO:176)
265	F	CCACACCTTCGATCCCAACCTTNNSTGTGACGCAG GC (SEQ ID NO:177)
265	R	AAGGTTGGGATCGAAGGTGTG (SEQ ID NO:178)
268	F	CGATCCCAACCTTGGCTGTGACNNSGGCACCTTCC AGC (SEQ ID NO:179)
268	R	GTCACAGCCAAGGTTGGGATC (SEQ ID NO:180)
269	F	TCCCAACCTTGGCTGTGACGCANNSACCTTCCAG CCA (SEQ ID NO:181)
269	R	TGCGTCACAGCCAAGGTTGGG (SEQ ID NO:182)
276	F	AGGCACCTTCCAGCCATGCAGTNNSAAAGCGCTC TCC (SEQ ID NO:183)
276	R	ACTGCATGGCTGGAAGGTGCC (SEQ ID NO:184)
284	F	CAAAGCGCTCTCAACCTCAAGNNSGTTGTCGAC TCCT (SEQ ID NO:185)
284	R	CTTGAGGTTGGAGAGCGCTTT (SEQ ID NO:186)
291	F	GGTTGTTGTCGACTCCTTCCGCNNSATCTACGGC GTG (SEQ ID NO:187)
291	R	GCGGAAGGAGTCGACAACAAC (SEQ ID NO:188)
292	F	TTGTCGACTCCTCCGCTCCNNSTACGGCGTGAAC AAGGGCATTG (SEQ ID NO:189)
292	R	GGAGCGGAAGGAGTCGACAACAACC (SEQ ID NO:190)
294	F	ACTCCTCCGCTCCATCTACNNSGTGAACAAGGGCA TTCCTGCCG (SEQ ID NO:191)
294	R	GTAGATGGAGCGGAAGGAGTCGACA (SEQ ID NO:192)
297	F	GCTCCATCTACGGCGTGAACNNSGGCATTCTGCCGG TGCTGCCG (SEQ ID NO:193)
297	R	GTTACGCCGTAGATGGAGCGGAAG (SEQ ID NO:194)
300	F	CTACGGCGTGAACAAGGGCATTNNSGCCGGTGCTGC CG (SEQ ID NO:195)
300	R	AATGCCCTTGTTCACGCCGTA (SEQ ID NO:196)
301	F	CGGCGTGAACAAGGGCATTCTNNSGGTGCTGCCG TC (SEQ ID NO:197)

[0790]

301	R	AGGAATGCCCTTGTTACGCC (SEQ ID NO:198)
303	F	GAACAAGGGCATTCTGCGGTTNNSGCCGTCGCCA TT (SEQ ID NO:199)
303	R	ACCGGCAGGAATGCCCTTGTT (SEQ ID NO:200)
309	F	GTGCTGCCGTCGCCATTGGCENNSTATGCAGAGGAT GTGTACTACA (SEQ ID NO:201)
309	R	GCCAATGGCGACGGCAGCACCGCA (SEQ ID NO:202)
310	F	CTGCCGTCGCCATTGGCCGNNSGCAGAGGATGTGT ACTACAACG (SEQ ID NO:203)
310	R	CCGGCCAATGGCGACGGCAGCACCG (SEQ ID NO:204)
311	F	TGCCGTCGCCATTGGCCGTATNNSGAGGATGTG TAC (SEQ ID NO:205)
311	R	ATACCGGCCAATGGCGACGGC (SEQ ID NO:206)
313	F	CCATTGGCCGGTATGCAGAGNNSGTGTACTACAA CGGCAACCCTT (SEQ ID NO:207)
313	F	CCATTGGCCGGTATGCAGAGNNSGTGTACTAAC GGCAACCCTT (SEQ ID NO:208)
313	R	CTCTGCATACCGGCCAATGGCGACG (SEQ ID NO:209)
313	R	CTCTGCATACCGGCCAATGGCGACG (SEQ ID NO:210)
314	F	TTGGCCGGTATGCAGAGGATNNSACTACAACGGCAA CCCTTGGT (SEQ ID NO:211)
314	R	ATCCTCTGCATACCGGCCAATGGCG (SEQ ID NO:212)
315	F	GCCGGTATGCAGAGGATGTGNNSTACAACGGCAACC CTTGGTATC (SEQ ID NO:213)
315	R	CACATCCTCTGCATACCGGCCAATG (SEQ ID NO:214)
316	F	GGTATGCAGAGGATGTGTACNNSAACGGCAACCCTT GGTATCTTG (SEQ ID NO:215)
316	R	GTACACATCCTCTGCATACCGGCCAAT (SEQ ID NO:216)
317	F	ATGCAGAGGATGTGTACTACNNSGGCAACCCTTGGTA TCTTGCTA (SEQ ID NO:217)
317	F	ATGCAGAGGATGTGTACTACNNSGGCAACCCTTGGTA TCTTGCTA (SEQ ID NO:218)
317	R	GTAGTACACATCCTCTGCATACCGGC (SEQ ID NO:219)
317	R	GTAGTACACATCCTCTGCATACCGGC (SEQ ID NO:220)
321	F	TGTAACAACGGCAACCCTNNSATCTTGCTACATT TGCTGCTG (SEQ ID NO:221)
321	F	TGTAACAACGGCAACCCTNNSATCTTGCTACATT TGCTGCTG (SEQ ID NO:222)
321	R	AGGGTTGCCGTTGTAGTACACATCC (SEQ ID NO:223)
321	R	AGGGTTGCCGTTGTAGTACACATCC (SEQ ID NO:224)
338	F	GCAGCTGTACGATGCCATCTACNNSGGAAGAAGA CG (SEQ ID NO:225)
338	R	GTAGATGGCATCGTACAGCTG (SEQ ID NO:226)
340	F	ACGATGCCATCTACGTCTGGNNSAAGACGGGCTCC ATCACGGTGA (SEQ ID NO:227)
340	R	CCAGACGTAGATGGCATCGTACAGC (SEQ ID NO:228)
341	F	ATGCCATCTACGTCTGGAAGNNSACGGGCTCCATCA CGGTGACCG (SEQ ID NO:229)
341	R	CTTCCAGACGTAGATGGCATCGTAC AGC (SEQ ID NO:230)
342	F	ATGCCATCTACGTCTGGAAGAAGNNSGGCTCCA TCACG (SEQ ID NO:231)
342	R	CTTCTTCCAGACGTAGATGGC (SEQ ID NO:232)
344	F	CTACGTCTGGAAGAAGACGGGCNNSATCACGG TGACC (SEQ ID NO:233)
344	R	GCCCGTCTTCTTCCAGACGTAG (SEQ ID NO:234)

[0791]

346	F	CTGGAAGAAGACGGGCTCCATCNSGTGACCGCC ACCTC (SEQ ID NO:235)
346	R	GATGGAGCCCGTCTTCTTCCA (SEQ ID NO:236)
349	F	GACGGGCTCCATCACGGTGACCNNSACCTCCCTG GCC (SEQ ID NO:237)
349	R	GGTCACCGTGATGGAGCCCGT (SEQ ID NO:238)
350	F	GCTCCATCACGGTGACCGCCNNSTCCCTGGCCTTC TTCCAGGAGC (SEQ ID NO:239)
350	R	GGCGGTCACCGTGATGGAGCCCGTC (SEQ ID NO:240)
356	F	CCACCTCCCTGGCCTTCTTCNNSGAGCTTGTTCTTG CGTGACGG (SEQ ID NO:241)
356	R	GAAGAAGGCCAGGGAGGTGGCGGTC (SEQ ID NO:242)
359	F	CCTGGCCTTCTTCCAGGAGCTTNNSCCTGGCGTGA CG (SEQ ID NO:243)
359	R	AAGCTCCTGGAAGAAGGCCAG (SEQ ID NO:244)
361	F	CTTCTTCCAGGAGCTTGTTCTNNSGTGACGGCC GGG (SEQ ID NO:245)
361	R	AGGAACAAGCTCCTGGAAGAA (SEQ ID NO:246)
363	F	AGGAGCTTGTTCTTGGCGTGNNSGCCGGGACCTA CTCCAGCAGCT (SEQ ID NO:247)
363	R	CACGCCAGGAACAAGCTCCTGGAAG (SEQ ID NO:248)
364	F	GGAGCTTGTTCTTGGCGTGACGNNSGGGACCTACT CC (SEQ ID NO:249)
364	R	CGTCACGCCAGGAACAAGCTC (SEQ ID NO:250)
368	F	GCGTGACGGCCGGGACCTACNNSAGCAGCTCTTCG ACCTTTACCA (SEQ ID NO:251)
368	R	GTAGGTCCCGGCCGTCACGCCAGGA (SEQ ID NO:252)
369	F	TGACGGCCGGGACCTACTCCNNSAGCTCTTCGACC TTTACCAACA (SEQ ID NO:253)
369	R	GGAGTAGGTCCCGGCCGTCACGCCA (SEQ ID NO:254)
375	F	CTCCAGCAGCTCTTCGACCTTTNNSAACATCATC AACG (SEQ ID NO:255)
375	R	AAAGGTCGAAGAGCTGCTGGA (SEQ ID NO:256)
376	F	GCAGCTCTTCGACCTTTACCNNSATCATCAACGCC GTCTCGACAT (SEQ ID NO:257)
376	R	GGTAAAGGTCGAAGAGCTGCTGGAG (SEQ ID NO:258)
379	F	TTCGACCTTTACCAACATCATCNNSGCCGTCTCG ACA (SEQ ID NO:259)
379	R	GATGATGTTGGTAAAGGTCGA (SEQ ID NO:260)
382	F	TACCAACATCATCAACGCCGTCNNSACATACGC CGAT (SEQ ID NO:261)
382	R	GACGGCGTTGATGATGTTGGT (SEQ ID NO:262)
390	F	GACATACGCCGATGGCTTCTCNNSGAGGCTGCC AAG (SEQ ID NO:263)
390	R	GAGGAAGCCATCGGCGTATGT (SEQ ID NO:264)
391	F	ATACGCCGATGGCTTCTCAGCNNSGCTGCCAAG TAC (SEQ ID NO:265)
391	R	GCTGAGGAAGCCATCGGCGTA (SEQ ID NO:266)
393	F	CGATGGCTTCTCAGCGAGGCTNNSAAGTACGTC CCC (SEQ ID NO:267)
393	R	AGCCTCGCTGAGGAAGCCATC (SEQ ID NO:268)
394	F	TGGCTTCTCAGCGAGGCTGCCNNSTACGTCCCC GCC (SEQ ID NO:269)
394	R	GGCAGCCTCGCTGAGGAAGCC (SEQ ID NO:270)
395	F	TCCTCAGCGAGGCTGCCAAGNNSGTCCCCGCCGACG GTTCTGCTGG (SEQ ID NO:271)
395	R	CTTGGCAGCCTCGCTGAGGAAGCCA (SEQ ID NO:272)

[0792]

398	F	AGGCTGCCAAGTACGTCCCCNNSGACGGTTCGCTGGC CGAGCAGTT (SEQ ID NO:273)
398	R	GGGGACGTACTTGGCAGCCTCGCTG (SEQ ID NO:274)
401	F	AGTACGTCCCCGCCGACGGTNNSTGGCCGAGCAG TTTGACCGCA (SEQ ID NO:275)
401	R	ACCGTCGGCGGGGACGTACTTGGCAG (SEQ ID NO:276)
408	F	CGCTGGCCGAGCAGTTTGACNNSAACAGCGGCACTCC GCTGTCTG (SEQ ID NO:277)
408	R	GTCAAAGTCTCGGCCAGCGAACCG (SEQ ID NO:278)
409	F	TGGCCGAGCAGTTTGACCGCNSAGCGGCACTCCGCT GTCTGCGC (SEQ ID NO:279)
409	R	GCGGTCAAAGTCTCGGCCAGCGAA (SEQ ID NO:280)
410	F	GGCCGAGCAGTTTGACCGCAACNNSGGCACTCCG CTG (SEQ ID NO:281)
410	R	GTTGCGGTCAAAGTCTCGGC (SEQ ID NO:282)
412	F	AGTTTGACCGCAACAGCGGCNNSCCGCTGTCTGCGC TTCACCTGA (SEQ ID NO:283)
412	R	GCCGCTGTTGCGGTCAAAGTCTCG (SEQ ID NO:284)
415	F	GCAACAGCGGCACTCCGCTGNNSGCGCTTCACCTGA CGTGGTCGT (SEQ ID NO:285)
415	R	CAGCGGAGTGCCGCTGTTGCGGTCA (SEQ ID NO:286)
417	F	CAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGNNSCACTGACGT GGT (SEQ ID NO:287)
417	R	CGCAGACAGCGGAGTGCCGCT (SEQ ID NO:288)
418	F	GCACTCCGCTGTCTGCGCTTNNSTGACGTGGTCGT ACGCCTCGT (SEQ ID NO:289)
418	R	AAGCGCAGACAGCGGAGTGCCGCTG (SEQ ID NO:290)
421	F	TGTCTGCGCTTCACCTGACGNNSTCGTACGCCTCGTT CTTGACAG (SEQ ID NO:291)
421	R	CGTCAGGTGAAGCGCAGACAGCGGA (SEQ ID NO:292)
430	F	GTACGCCTCGTTCTTGACAGCCNNSGCCGTCGG GCT (SEQ ID NO:293)
430	R	GGCTGTCAAGAACGAGGCGTA (SEQ ID NO:294)
431	F	CGCCTCGTTCTTGACAGCCACGNNSCGTGCGGC TGGC (SEQ ID NO:295)
431	R	CGTGGCTGTCAAGAACGAGGC (SEQ ID NO:296)
433	F	TCTTGACAGCCACGGCCGTTNNSGCTGGCATCGTG CCCCCTCGT (SEQ ID NO:297)
433	R	ACGGGCCGTGGCTGTCAAGAACGAG (SEQ ID NO:298)
436	F	CCACGGCCCGTCGGGCTGGCNNSGTGCCCCCTCGT GGGCCAACA (SEQ ID NO:299)
436	R	GCCAGCCCGACGGGCGTGGCTGTC (SEQ ID NO:300)
442	F	TGGCATCGTGCCCCCTCGTGNNNSAACAGCAG CGCT (SEQ ID NO:301)
442	R	CCACGAGGGGGGACGATGCC (SEQ ID NO:302)
443	F	CATCGTGCCCCCTCGTGGGCCNNSAGCAGCGCT AGC (SEQ ID NO:303)
443	R	GGCCACGAGGGGGGACGAT (SEQ ID NO:304)
444	F	CGTGCCCCCTCGTGGGCCAACNNSAGCGCTAGC ACG (SEQ ID NO:305)
444	R	GTTGGCCACGAGGGGGGAC (SEQ ID NO:306)
448	F	GTGGGCCAACAGCAGCGCTAGCNNSATCCCT CGACG (SEQ ID NO:307)
451	F	GCAGCGCTAGCAGATCCCNNSACGTGCTC CGGCGCTCCGTGG (SEQ ID NO:308)
451	R	GGGGATCGTGCTAGCGCTGCTGTTG (SEQ ID NO:309)

[0793]

493	F	CTACACGCCCTGCCCTGCGCGNNSCCAACCTCC GTG (SEQ ID NO:310)
493	R	CGCGCAGGGCAGGGGCGTGTA (SEQ ID NO:311)
494	F	CACGCCCCTGCCCTGCGCGACCNNACCTCCGTG GCC (SEQ ID NO:312)
494	R	GGTCGCGCAGGGCAGGGGCGT (SEQ ID NO:313)
495	F	GCCCCTGCCCTGCGCGACCCANNSTCCGTGGCC GTC (SEQ ID NO:314)
495	R	TGGGGTCGCGCAGGGCAGGGG (SEQ ID NO:315)
501	F	CCCAACCTCCGTGGCCGTACCNNSACGAGCTC GTGT (SEQ ID NO:316)
501	R	GGTGACGGCCACGAGGTTGG (SEQ ID NO:317)
502	F	AACCTCCGTGGCCGTACCTTCNNSGAGCTCGTG TCG (SEQ ID NO:318)
502	R	GAAGGTGACGGCCACGGAGGT (SEQ ID NO:319)
503	F	CTCCGTGGCCGTACCTTCACNNSCTCGTGTCGA CACA (SEQ ID NO:320)
503	R	GTGGAAGGTGACGGCCACGGA (SEQ ID NO:321)
508	F	CTTCACGAGCTCGTGTGACANNSTTTGGCCAG ACG (SEQ ID NO:322)
508	R	TGTCGACACGAGCTCGTGGA (SEQ ID NO:323)
511	F	GCTCGTGTGACACAGTTTGGCNNSACGGTCAAGGTG (SEQ ID NO:324)
511	R	GCCAACTGTGTGACACGAG (SEQ ID NO:325)
514	F	CACAGTTTGGCCAGACGGTCNNSGTGGCGGGCAACG CCGCGGCC (SEQ ID NO:326)
514	R	GACCGTCTGGCCAACTGTGTGAC (SEQ ID NO:327)
517	F	TGGCCAGACGGTCAAGGTGGCGNNSAACGCCGCGGC CCTGGG (SEQ ID NO:328)
517	R	CGCCACCTTGACCGTCTGGCCAACTG (SEQ ID NO:329)
518	F	CCAGACGGTCAAGGTGGCGGGCNNSGCCGCGGCCCT GGGCAACT (SEQ ID NO:330)
518	R	GCCCCGCCACCTTGACCGTCTGGCCAAA (SEQ ID NO:331)
519	F	GACGGTCAAGGTGGCGGGCAACNNSGCCGCCCTGGG CAACT (SEQ ID NO:332)
519	R	GTTGCCCGCCACCTTGACCGTCTGGCC (SEQ ID NO:333)
520	F	GGTCAAGGTGGCGGGCAACGCCNNSGCCCTGGGCAA CTGGA (SEQ ID NO:334)
520	R	GGCGTTGCCCGCCACCTTGACCGTCTG (SEQ ID NO:335)
525	F	CAACGCCGCGGCCCTGGGCAACNNSAGCACGAGCGCC GCCG (SEQ ID NO:336)
525	R	GTTGCCAGGGCCGCGCGCTTGCCCGC (SEQ ID NO:337)
527	F	CGCGGCCCTGGGCAACTGGAGCNNSAGCGCCGCCGT GGCTC (SEQ ID NO:338)
527	R	GCTCCAGTTGCCAGGGCCGCGCGTT (SEQ ID NO:339)
531	F	CAACTGGAGCACGAGCGCCGCCNNSGCTCTGGACGC CGTCA (SEQ ID NO:340)
531	R	GGCGGCGCTCGTGCTCCAGTTGCCAG (SEQ ID NO:341)
533	F	GAGCACGAGCGCCGCCGTGGCTNNSGACGCCGTCAAC TATGC (SEQ ID NO:342)
533	R	AGCCACGGCGGCGCTCGTGCTCCAGTT (SEQ ID NO:343)
535	F	GAGCGCCGCCGTGGCTCTGGACNNSGTCAACTATGCC GATA (SEQ ID NO:344)
535	R	GTCCAGAGCCACGGCGGCGCTCGTGCT (SEQ ID NO:345)
536	F	CGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCNNSAATATGCCGAT AACC (SEQ ID NO:346)
536	R	GGCGTCCAGAGCCACGGCGGCGCTCGT (SEQ ID NO:347)

[0794]

537	F	CGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCNNSTATGCCGAT AAC (SEQ ID NO:348)
537	F	CGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCNNSTATGCCGATAAC CACCCC (SEQ ID NO:349)
537	R	GACGGCGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT (SEQ ID NO:350)
537	R	GACGGCGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT (SEQ ID NO:351)
538	F	CGTGGCTCTGGACGCCGTC AACNNSGCCGATAACCACCCCC (SEQ ID NO:352)
538	R	GTTGACGGCGTCCAGAGCCACGGCGGCG (SEQ ID NO:353)
539	F	GGCTCTGGACGCCGTC AACTATNNSGATAACCACCCC CTGT (SEQ ID NO:354)
539	R	ATAGTTGACGGCGTCCAGAGCCACGGC (SEQ ID NO:355)
540	F	TCTGGACGCCGTC AACTATGCCNNSAACCACCCCTG TGGATT (SEQ ID NO:356)
540	R	GGCATAGTTGACGGCGTCCAGAGCCAC (SEQ ID NO:357)
541	F	GGACGCCGTC AACTATGCCGATNNSACCCCTGTGGA TTGGG (SEQ ID NO:358)
541	R	ATCGGCATAGTTGACGGCGTCCAGAGC (SEQ ID NO:359)
545	F	CTATGCCGATAACCACCCCTGNNSATTGGGACGGTC AACCTC (SEQ ID NO:360)
545	R	CAGGGGGTGGTTATCGGCATAGTTGAC (SEQ ID NO:361)
546	F	TGCCGATAACCACCCCTGTGNNNSGGGACGGTCAA CCTCGAG (SEQ ID NO:362)
546	R	CCACAGGGGGTGGTTATCGGCATAGTT (SEQ ID NO:363)
547	F	CGATAACCACCCCTGTGGATTNNSACGGTCAACCTC GAGGCT (SEQ ID NO:364)
547	R	AATCCACAGGGGGTGGTTATCGGCATA (SEQ ID NO:365)
549	F	CCACCCCTGTGGATTGGGACGNNSAACCTCGAGGC TGGAGAC (SEQ ID NO:366)
549	R	CGTCCCAATCCACAGGGGGTGGTTATC (SEQ ID NO:367)
551	F	CCTGTGGATTGGGACGGTCAACNNSGAGGCTGGAGA CGTCGTG (SEQ ID NO:368)
551	R	GTTGACCGTCCCAATCCACAGGGGGTG (SEQ ID NO:369)
561	F	TGGAGACGTCGTGGAGTACAAGNNSATCAATGTGGG CCAAGAT (SEQ ID NO:370)
561	R	CTTGACTCCACGACGTCTCCAGCCTC (SEQ ID NO:371)
563	F	CGTCGTGGAGTACAAGTACATCNNSGTGGGCCAAG ATGGCTCC (SEQ ID NO:372)
563	R	GATGTACTTGTACTCCACGACGTCTCC (SEQ ID NO:373)
567	F	CAAGTACATCAATGTGGGCCAANNNSGGCTCCGTGAC CTGGGAG (SEQ ID NO:374)
567	R	TTGGCCACATTGATGTACTTGTACTC (SEQ ID NO:375)
569	F	CATCAATGTGGGCCAAGATGGCNNSGTGACCTGGGA GAGTGAT (SEQ ID NO:376)
569	R	GCCATCTTGGCCACATTGATGTACTTG (SEQ ID NO:377)
577	F	CGTGACCTGGGAGAGTGATCCCNNSCACATTACAC GGTTCCT (SEQ ID NO:378)
577	R	GGGATCACTCTCCAGGTCACGGAGCC (SEQ ID NO:379)
579	F	CTGGGAGAGTGATCCCAACCACNNSTACCGTTCC TGCGGTG (SEQ ID NO:380)
579	R	GTGGTTGGGATCACTCTCCAGGTCAC (SEQ ID NO:381)
583	F	TCCCAACCACATTACACGGTTNNSGCGGTGGCTTG TGTGACG (SEQ ID NO:382)
583	R	AACCGTGTAAGTGTGGTTGGGATCACT (SEQ ID NO:383)

[0795] 实施例2:将TrGA SELs转化到瑞氏木霉中

[0796] 使用PEG原生质体方法将SELs转化到瑞氏木霉中。使经序列分析证实的SELs的大肠杆菌克隆在深孔微量滴定板(Greiner Art.No.780271)中、于37℃生长过夜,所述深孔微

量滴定板含有1200 μ l含有氨苄西林(100 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)的2 $\times$ YT培养基。使用**CHEMAGIC®**质粒Mini试剂盒(Chemagen-Biopolymer Technologie AG, Baesweiler, 德国)从培养物中分离质粒DNA,并使用有下述修改的PEG-原生质体方法(Penttilä et al. (1987) Gene 61:155-164)将所述质粒DNA单独转化到源自携带四个基因缺失(Δ cbh1、 Δ cbh2、 Δ egl1、 Δ egl2,即“四重缺失的”;见美国专利号5,847,276,WO 92/06184和WO 05/001036)的RL-P37的瑞氏木霉宿主菌株中。

[0797] 对于原生质体制备物,在木霉属基本培养基(MM)(20g/L葡萄糖、15g/L KH_2PO_4 (pH 4.5)、5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.6g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.6g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1ml的1000 $\times$ 瑞氏木霉痕量元素溶液{5g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.4g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.6g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、3.7g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ })中,伴随150rpm的振荡,使孢子在24 $^\circ\text{C}$ 下生长16-24小时。通过离心收获萌发的孢子并用15mg/ml的 β -D-葡聚糖酶-G(Interspex Art.No.0439-1)溶液进行处理以裂解真菌细胞壁。通过标准方法对原生质体进行进一步制备,如Penttilä等人(1987,见上)所述。

[0798] 将转化方法按比例缩小10倍。通常,用200ml的25%PEG溶液处理在25 μ l总体积中含有至多600ng的DNA和 $1-5 \times 10^5$ 原生质体的转化混合物,用2体积的1.2M山梨醇溶液稀释,与含有乙酰胺的3%选择性顶端琼脂糖MM(与上文所述相同的基本培养基,但是用20mM乙酰胺替代了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)相混合,并倾倒在含有乙酰胺的2%选择性琼脂糖上(其在24孔微量滴定板或分为48孔的20 $\times$ 20cm的Q-托盘中)。将板在28 $^\circ\text{C}$ 孵育5至8天。使用0.85%NaCl、0.015%Tween 80的溶液从板上收获来自在每个单独的孔上再生的转化体总群体的孢子。使用孢子悬浮物在96孔MTP中接种发酵。在24孔MTP的情形中,引入在含有选择性乙酰胺MM的新鲜24孔MTP上进行的额外涂布步骤以富集孢子数目。

[0799] 实施例3:以MTP形式发酵表达TrGA变体的瑞氏木霉转化体

[0800] 使转化体发酵并就各种特性测试含有经表达的变体TrGA蛋白的上清液。简要地,一式四份、用表达TrGA变体的瑞氏木霉转化体的孢子悬浮物接种96孔过滤板(Corning Art.No.3505)(多于 10^4 个孢子/孔),所述96孔过滤板在每个孔中含有200 μ l的LD-GSM培养基(5.0g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、33g/L 1,4-哌嗪二(丙磺酸)(pH 5.5)、9.0g/L酪蛋白氨基酸、1.0g/L KH_2PO_4 、1.0g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.0g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5ml/L的1000 $\times$ 瑞氏木霉痕量元素、20g/L葡萄糖、10g/L槐糖)。在28 $^\circ\text{C}$ 下孵育所述板6天,伴有230rpm的摇动和80%的湿度。通过真空过滤收获培养物上清液。在不同的测定中使用所述上清液,用于筛选具有改进的特性的变体。

[0801] 实施例4:由产生GA的转化体制备完全培养液样品

[0802] 起初在含有30ml ProFlo培养基的250ml摇瓶中预培养产生TrGA的转化体。Proflo培养基含有:30g/L的 α -乳糖、6.5g/L的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2g/L KH_2PO_4 、0.3g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、上文所述的1ml/L 1000 $\times$ 痕量元素盐溶液、2ml/L 10%Tween 80、22.5g/L ProFlo棉籽粉(Traders protein,Memphis,TN)、0.72g/L CaCO_3 。在28 $^\circ\text{C}$ 和140rpm下生长两天后,将10%的Proflo培养物转移到含有30ml乳糖确定培养基的250ml摇瓶中。所述乳糖确定培养基的组成如下:5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、33g/L 1,4-哌嗪二(丙磺酸)缓冲液(pH 5.5)、9g/L酪蛋白氨基酸、4.5g/L KH_2PO_4 、1.0g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5ml/L Mazu DF60-P止泡剂(Mazur Chemicals,IL)、1ml/L的1000 $\times$ 痕量元素溶液。在灭菌之后,将40ml/L的40%(w/v)乳糖溶液加入培养基中。将含有乳糖确定培养基的摇瓶在28 $^\circ\text{C}$ 、140rpm下孵育4-5天。

[0803] 通过离心从培养物样品中去除菌丝体并就总蛋白含量 (BCA蛋白测定试剂盒, Pierce Cat.No.23225) 分析上清液和GA活性,如上文中在测定和方法部分中所描述的。

[0804] 通过SDS-PAGE电泳确定完全培养液样品的蛋白特征谱。将培养物上清液的样品与含有还原剂的等体积2×样品加载缓冲液相混合并在含有MES SDS电泳缓冲液 (Invitrogen,Carlsbad,CA,USA) 的NUPAGE®Novex 10%双(2-羟乙基) 亚氨基-3羟甲基甲烷凝胶上分离。在含有SIMPLYBLUE SafeStain (Invitrogen,Carlsbad,CA,USA) 的SDS凝胶中可见多肽带。

[0805] 实施例5:变体的热稳定性

[0806] 根据上文的测定“热稳定性测定2”来测量热稳定性。

[0807] 亲本分子在所描述的条件中具有87.2%的残余活性,表3显示了变体的残余活性,所述变体是为了大规模发酵和进一步分析而从初步的筛选中选择的。所使用的材料是来自摇瓶的粗制发酵培养液。在于含有15%葡萄糖的0.1M柠檬酸缓冲液 (pH 5.4) 中、在63℃下孵育120min之前和之后,基于GAU活性计算了残余活性。

[0808] 表3:所选择的TrGA变体的热稳定性,显示为在于含有15%葡萄糖的0.1M柠檬酸缓冲液 (pH 5.4) 中、在63℃下孵育120min之前和之后的残余活性。

	变体	残余活性
[0809]	D44R/ N61I/ A539R (BRW 11)	84.2
	L417R/ A431L/ A539R (VAR16)	88.5
	D44R/ A539R (BRW 1)	99.0
	N61I/ L417V/ A431L/ A539R (VAR3)	86.2
	I43R/ L417V/ A431L/ A539R (VAR13)	89.8
	BRW 2	92.4
	I43Q/ D44C/ N61I/ L417V/ E503A/ Q511H/ A539R (ALL3)	86.6
	I43Q/ D44C/ L417V/ E503A/ Q511H (ALL1)	90.1
	I43R/ N61I/ L417R/ E503A/ Q511H/ A539R (ALL8)	84.6
	I43Q/ N61I/ T430M/ Q511H/ A539R (RB19)	83.0
	I43Q/ N61I/ T430A/ A431L/ Q511H/ A539R (RB10)	82.3
	Diazyme X4 (AnGA 参考产品)	72.3
	Diazyme TR8 (TrGA 参考产品)	87.2
[0810]	I43R/ G73F/ T430A (C2 阴性对照 I)	88.3
	I43Q/ L417V/ Q511H (RB13 阴性对照)	74.1

[0811] 实施例6:测定异麦芽糖合成和淀粉水解及其比率

[0812] 根据上文所述的测定“淀粉水解活性”和“通过TLC确定麦芽糖和异麦芽糖合成”来测试变体。如所描述的,由这些分析的结果计算IS/SH比率。表4总结了选择用于大规模发酵和进一步分析的变体的数据。所使用的材料是来自摇瓶的粗制发酵培养液。

[0813] 表4:所选择的TrGA变体的异麦芽糖合成活性(IS)、淀粉水解活性(SH)和IS/SH比率

变体 (亲本葡糖淀粉酶 TrGA, SEQ ID No:2)	异麦芽糖合成 M/min *10E-05	淀粉水解 M/min	异麦芽糖合成 相对于 DiazymeX4	(IS/SH) *10E-04
D44R/ N61I/ A539R (BRW 11)	2.7	0.078	1.1	3.4
L417R/ A431L/ A539R (VAR16)	3.4	0.078	1.4	4.4
D44R/ A539R (BRW 1)	3.2	0.071	1.4	4.5
N61I/ L417V/ A431L/ A539R (VAR3)	4.3	0.089	1.5	4.8
I43R/ L417V/ A431L/ A539R (VAR13)	4.1	0.082	1.6	5.0
BRW 2	3.9	0.079	1.6	5.0
I43Q/ D44C/ N61I/ L417V/ E503A/ Q511H/ A539R (ALL3)	3.8	0.074	1.6	5.1
I43Q/ D44C/ L417V/ E503A/ Q511H (ALL1)	3.7	0.072	1.6	5.2
I43R/ N61I/ L417R/ E503A/ Q511H/ A539R (ALL8)	4.3	0.079	1.7	5.4
I43Q/ N61I/ T430M/ Q511H/ A539R (RB19)	4.7	0.085	1.8	5.6
I43Q/ N61I/ T430A/ A431L/ Q511H/ A539R (RB10)	5.3	0.089	1.8	5.9
Diazyme X4 (AnGA 参考产品)			1.0	3.2
Diazyme TR8 (TrGA 参考产品)			2.5	7.9
I43R/ G73F/ T430A (C2 阴性对照)	8.7	0.0789	5.0	16
I43Q/ L417V/ Q511H (RB13 阴性对照)	8.1	0.0508	3.4	11

[0815] 实施例7:确定实际发酵度(RDF)的酿造分析

[0816] 使表3和表4中所示的所有变体生长在发酵罐中并收集和纯化GA酶(如上文在“TrGA变体的纯化”中所述的)。如上文的实施例6中所述就IS/SH比率再分析经纯化的酶并如实施例5中所述测量热稳定性。如上文中在“确定实际发酵度(RDF)的酿造分析”中所述,对于显示出最佳IS/SH比率和热稳定性组合的四种变体(Brew11、Brew1、Var16和Var13)进行确定实际发酵度(RDF)的酿造分析。RDF值列在表5中。表5.所选择的纯化的TrGA-变体、纯化的野生型TrGA和纯化的AnGA的RDF值

(亲本葡糖淀粉酶 TrGA, SEQ ID No:2)	纯化的	纯化的
	RDF	STDEV
AnGA (纯化自Diazyme X4)	82.5	0.064
TrGA (纯化自DiazymeTR8)	82.0	0.028
D44R/ N61I/ A539R (BRW 11)	82.50	0.005
D44R/ A539R (BRW 1)	82.33	0.050
L417R/ A431L/ A539R (VAR16)	81.93	0.113
I43R/ L417V/ A431L/ A539R (VAR13)	81.86	0.085

[0818] 实施例8:组合变体的构建和表征

[0819] 基于数据,对含有单个取代的所选择变体组进行进一步表征。这些变体在下列位置具有单个取代:43、44、61、73、294、417、430、431、503、511、535、539和563。在这些位点中,43、44和294在之前于裂殖酵母菌丝中进行的筛选实验中被鉴定出。见W0 08/045489,其在此通过引用而并入。从大规模发酵中纯化变体,并测定热稳定性和比活性的PI。具体地,使

用各种底物(包括DP7、玉米淀粉和液化物)来测定比活性。结果显示在表6中。

[0820] 表6:所选择的单位点变体组的PI,其中的每一种都是从500ml发酵获得的。

[0821]	变体	P.I. DP7-FPLC	P.I. 玉米淀粉-FPLC	P.I. 热稳定性	P.I. 液化物-FPLC
	N61I	1.16	1.35	1.00	1.66
	A431L	1.15	1.38	1.18	1.51
	L417V	1.18	1.32	1.02	1.40
	A431Q	1.06	1.20	0.92	1.24
	G294C	1.01	0.84	0.94	1.23
	N563K	1.07	1.12	1.97	1.15
	Q511H	1.05	1.09	1.52	1.13
	T430M	1.05	1.15	0.89	1.09
	E503A	1.08	1.16	1.40	1.09
[0822]	变体	P.I. DP7-FPLC	P.I. 玉米淀粉-FPLC	P.I. 热稳定性	P.I. 液化物-FPLC
	I43Q	1.11	1.24	0.94	1.08
	A539R	1.15	1.37	1.43	1.08
	I43R	1.03	1.07	1.41	1.07
	L417R	1.23	1.27	1.51	1.04
	T430A	1.13	1.35	1.23	1.04
	G73F	1.06	1.06	1.45	1.03
	D44R	0.97	1.06	1.46	0.98
	N563I	1.09	1.22	2.06	0.92
	D44C	0.80	0.82	0.96	0.91
	E503V	1.17	1.07	1.66	0.88
	A535R	1.09	1.44	1.47	0.85

[0823] 此外,使用PCR方法构建了组合变体,其具有下列中的取代:43、44、61、73、294、417、430、431、503、511、535、539和563。简要地,使用质粒pDONR-TrGA(图2)作为骨架来构建组合变体。构建组合变体的方法是基于Gateway技术(Invitrogen,Carlsbad,CA)。用于产生组合变体的引物显示在表2和表7中。选择了下列合成的构建体方式用于构建所有的组合变体。

[0824] CTCTCT [XbaI位点] [MF] GAGAGGGG [attB1] [GAP组合变体] [attB2位点] CCCCAGAG [MR] [HindIII] AGAGAG

[0825] 用限制性酶Xba-I和HindIII处理此构建体。将经消化的片段连接到经Xba-I/HindIII处理的pBC(源自pUC19的载体)中。将连接混合物转化到大肠杆菌DH10B(Invitrogen,Carlsbad,CA)中并涂布在补充了100μg/ml氨苄西林的选择性琼脂上。在37℃下将平板孵育16h。从所述选择性平板分离菌落并将其接种到选择性液体培养基中。在37℃和250rpm下孵育16h之后,使用标准质粒分离试剂盒分离质粒并与pDONR2.21(Invitrogen,Carlsbad,CA)相组合以产生含有特定组合变体的Gateway进入载体。将反应混合物转化到大肠杆菌最大效率DH5α(Invitrogen,Carlsbad,CA)中并涂布在选择性琼脂(2×TY,补充了

50μg卡那霉素/ml)上。于37℃过夜孵育之后,挑取单菌落用于序列分析(BaseClear B.V., Leiden, 荷兰)。将组合变体亚克隆到pTrexTrTel中并在瑞氏木霉宿主菌株中表达,如W0 06/060062中所描述的。

[0826] 表7:用于构建组合变体的引物

[0827]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
Var1 基础-1	GAGAGAGTGC GGGCCTCTTCGCTATTTCTAGA	391
Var1 基础-2	CAAAATAAAATCATTATTTGTCTAGAAATAGCGAAGAGGC	392
Var1 基础-3	CAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTCTGT	393
Var1 基础-4	TTGCTCATCAATGTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGT	394
Var1 基础-5	TGCAACACATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAAC	395
Var1 基础-6	AGCCTGCTTTTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCA	396
Var1 基础-7	TTTGTACAAAAAGCAGGCTATGCACGTCCTGTCTGACTGC	397
Var1 基础-8	CAACGGAGCCGAGCAGCACCGCAGTCGACAGGACGTGCAT	398
Var1 基础-9	GGTGCTGCTCGGCTCCGTTGCCGTTCAAAGGTCCTGGGA	399
Var1 基础-10	AGACCGCTTGATCCTGGTCTTCCCAGGACCTTTGAACGG	400
Var1 基础-11	AGACCAGGATCAAGCGGTCTGTCCGACGTCACCAAGAGGT	401
Var1 基础-12	GCTGATGAAGTCGTCAACAGACCTTTGGTGACGTCGGAC	402
Var1 基础-13	CTGTTGACGACTTCATCAGCACCGAGACGCCTATTGCACT	403
Var1 基础-14	CATTGCAAAGAAGATTGTTCACTGCAATAGGCGTCTCGGT	404
Var1 基础-15	GAACAATCTTCTTTGCAATGTTGGTCTGATGGATGCCGT	405
Var1 基础-16	CCAGCTGATGTGCCGAATGCACGGCATCCATCAGGACCAA	406
Var1 基础-17	GCATTCGGCACATCAGTGGTGCGGTGATTGCATCTCCCA	407
Var1 基础-18	GTAGTCCGGGTCAATTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	408
Var1 基础-19	GCACAATTGACCCGGA TACTATTACATGTGGACGCGAGA	409
Var1 基础-20	TCTTGAAGACAAGAGCGCTATCTCGCGTCCACATGTAATA	410
Var1 基础-21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGAACCTCATCGACCGCTTCACC	411
Var1 基础-22	AGGCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTGATGAGGT	412
Var1 基础-23	GAAACGTACGATGCGGGCCTGCAGCGCCGCATCGAGCAGT	413
Var1 基础-24	AGTGACCTGGGCAGTAATGTACTGCTCGATGCGGCGCTGC	414
Var1 基础-25	ACATTACTGCCAGGTCACTCTCCAGGGCCTCTCTAACCC	415
Var1 基础-26	CGTCCGCGAGGGAGCCCGAGGGGTTAGAGAGGCCCTGGAG	416
Var1 基础-27	CTCGGGCTCCCTCGCGGACGGCTCTGGTCTCGGCGAGCCC	417
Var1 基础-28	TTCAGGGTCAACTCAAAC TTTGGGCTCGCCGAGACCAGAGC	418

[0828]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
Var1 基础-29	AAGTTTGAGTTGACCCTGAAGCCTTTCACCGGCAACTGGG	419
Var1 基础-30	GCCATCCCGCTGCGGTCGACCCAGTTGCCGGTGAAAGGC	420
Var1 基础-31	GTCGACCGCAGCGGGATGGCCCAGCTCTGCGAGCCATTGC	421
Var1 基础-32	ACTTTGAGTATCCAATCAAGGCAATGGCTCGCAGAGCTGG	422
Var1 基础-33	CTTGATTGGATACTCAAAGTGGCTCATCAACAACAACTAT	423
Var1 基础-34	ACGTTGGACACAGTCGACTGATAGTTGTTGTTGATGAGCC	424
Var1 基础-35	CAGTCGACTGTGTCCAACGTCATCTGGCCTATTGTGCGCA	425
Var1 基础-36	GGCAACATAGTTGAGGTCGTTGCGCACAATAGGCCAGATG	426
Var1 基础-37	ACGACCTCAACTATGTTGCCAGTACTGGAACCAAACCGG	427
Var1 基础-38	CTTCTTCCCAGAGGTCAAAGCCGTTTGGTTCCAGTACTG	428
Var1 基础-39	CTTTGACCTCTGGGAAGAAGTCAATGGGAGCTCATTCTTT	429
Var1 基础-40	CGGTGCTGGTTGGCAACAGTAAAGAATGAGCTCCCATTGA	430
Var1 基础-41	ACTGTTGCCAACCAGCACCGAGCACTTGTCGAGGGCGCCA	431
Var1 基础-42	GCCAAGAGTGGCAGCAAGAGTGGCGCCCTCGACAAGTGCT	432
Var1 基础-43	CTCTTGCTGCCACTCTTGGCCAGTCGGAAGCGCTTATTC	433
Var1 基础-44	AAACCTGGGGAGCAACAGATGAATAAGCGCTTCCCGACTG	434
Var1 基础-45	ATCTGTTGCTCCCCAGGTTTTGTGCTTTCTCCAACGATTC	435
Var1 基础-46	TATCCACCAGACGACACCCAGAATCGTTGGAGAAAGCACA	436
Var1 基础-47	TGGGTGTCGTCTGGTGGATACGTCGACTCCAACATCAACA	437
Var1 基础-48	GCCAGTCCTGCCCTCGTTGGTGTGATGTTGGAGTCGACG	438
Var1 基础-49	CCAACGAGGGCAGGACTGGCAAGGATGTCAACTCCGTCCT	439
Var1 基础-50	CGAAGGTGTGGATGGAAGTCAGGACGGAGTTGACATCCTT	440
Var1 基础-51	GACTTCCATCCACACCTTCGATCCCAACCTTGGCTGTGAC	441
Var1 基础-52	CATGGCTGGAAGGTGCCTGCGTCACAGCCAAGGTTGGGAT	442
Var1 基础-53	GCAGGCACCTTCAGCCATGCAGTGACAAAGCGCTCTCCA	443
Var1 基础-54	GTCGACAACAACCTTGAGGTTGGAGAGCGCTTTGTCACTG	444
Var1 基础-55	ACCTCAAGGTTGTTGTCGACTCCTTCCGCTCCATCTACGG	445
Var1 基础-56	CAGGAATGCCCTTGTTACGCCGTAGATGGAGCGGAAGGA	446
Var1 基础-57	CGTGAACAAGGGCATTCTGCCGGTGCTGCCGTGCCATT	447
Var1 基础-58	ACATCCTCTGCATACCGGCCAATGGCGACGGCAGCACCGG	448
Var1 基础-59	GGCCGGTATGCAGAGGATGTGTACTACAACGGCAACCCTT	449

[0829]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
Var1 基础-60	AGCAAATGTAGCAAGATACCAAGGTTGCCGTTGTAGTAC	450
Var1 基础-61	GGTATCTTGCTACATTTGCTGCTGCCGAGCAGCTGTACGA	451
Var1 基础-62	TCTTCCAGACGTAGATGGCATCGTACAGCTGCTCGGCAGC	452
Var1 基础-63	TGCCATCTACGTCTGGAAGAAGACGGGCTCCATCACGGTG	453
Var1 基础-64	AAGGCCAGGGAGGTGGCGGTACCGTGATGGAGCCCCTCT	454
Var1 基础-65	ACCGCCACCTCCCTGGCCTTCTCCAGGAGCTTGTTCTCTG	455
Var1 基础-66	GTAGGTCCCGCCGTCACGCCAGGAACAAGCTCCTGGAAG	456
Var1 基础-67	GCGTGACGGCCGGGACCTACTCCAGCAGCTCTTCGACCTT	457
Var1 基础-68	CGGCGTTGATGATGTTGGTAAAGGTCAAGAGCTGCTGGA	458
Var1 基础-69	TACCAACATCATCAACGCCGTCTCGACATACGCCGATGGC	459
Var1 基础-70	TTGGCAGCCTCGCTGAGGAAGCCATCGGCGTATGTCGAGA	460
Var1 基础-71	TTCCTCAGCGAGGCTGCCAAGTACGTCCCCGCCGACGGTT	461
Var1 基础-72	GTCAAACCTGCTCGGCCAGCGAACCCTCGGCGGGGACGTAC	462
Var1 基础-73	CGCTGGCCGAGCAGTTTGACCGCAACAGCGGCACTCCGCT	463
Var1 基础-74	ACGTCAGGTGAACCGCAGACAGCGGAGTGCCGCTGTTGCG	464
Var1 基础-75	GTCTGCGGTTACCTGACGTGGTCGTACGCCTCGTTCTTG	465
Var1 基础-76	GCCCGACGAAGCGTGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	466
Var1 基础-77	ACAGCCACGCTTCGTGCGGGCTGGCATCGTGCCCCCTCGT	467
Var1 基础-78	GCTAGCGCTGCTGTTGGCCACGAGGGGGGCACGATGCCA	468
Var1 基础-79	GGGCCAACAGCAGCGCTAGCACGATCCCCTCGACGTGCTC	469
Var1 基础-80	ATCCGACCACGGACGCGCCGAGCACGTGAGGGGATCGT	470
Var1 基础-81	CGGCGCGTCCGTGGTCGGATCCTACTCGCGTCCCACCGCC	471
Var1 基础-82	TGCGACGGAGGGAATGACGTGGCGGTGGGACGCGAGTAGG	472
Var1 基础-83	ACGTCATTCCCTCCGTCGCAGACGCCAAGCCTGGCGTGC	473
Var1 基础-84	CGTGTAGGGAGTACCGGAAGGCACGCCAGGCTTGGGCGTC	474
Var1 基础-85	CTTCCGGTACTCCCTACACGCCCTGCCCTGCGCGACCCC	475
Var1 基础-86	AGGTGACGGCCACGGAGGTTGGGGTCGCGCAGGGCAGGGG	476
Var1 基础-87	AACCTCCGTGGCCGTACCTTCCACGAGCTCGTGTCGACA	477
Var1 基础-88	TTGACCGTCTGGCCAACTGTGTCGACACGAGCTCGTGGA	478
Var1 基础-89	CAGTTTGGCCAGACGGTCAAGGTGGCGGGCAACGCCGCGG	479
Var1 基础-90	CGTGCTCCAGTTGCCAGGGCCGCGGCGTTGCCCGCCACC	480

[0830]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
Var1 基础-91	CCCTGGGCAACTGGAGCACGAGCGCCGCTGGCTCTGGA	481
Var1 基础-92	TATCACGATAGTTGACGGCGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	482
Var1 基础-93	CGCCGTCAACTATCGTGATAACCAACCCCTGTGGATTGGG	483
Var1 基础-94	CCAGCCTCGAGGTTGACCGTCCCAATCCACAGGGGGTGGT	484
Var1 基础-95	ACGGTCAACCTCGAGGCTGGAGACGTCGTGGAGTACAAGT	485
Var1 基础-96	ATCTTGGCCACATTGATGTACTTGTACTCCACGACGTCT	486
Var1 基础-97	ACATCAATGTGGGCCAAGATGGCTCCGTGACCTGGGAGAG	487
Var1 基础-98	TGTAAGTGTGGTTGGGATCACTCTCCAGGTCACGGAGCC	488
Var1 基础-99	TGATCCCAACCACACTTACACGGTTCCTGCGGTGGCTTGT	489
Var1 基础-100	TCCTTGACAACCTGCGTCACACAAGCCACCGCAGGAACCG	490
Var1 基础-101	GTGACGCAGGTTGTCAAGGAGGACACCTGGCAGTCGTAAA	491
Var1 基础-102	CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACGACTGCCAGGTGTCC	492
Var1 基础-103	CCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCAT	493
Var1 基础-104	TTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTCTTATAATGCCAA	494
Var1 基础-105	TGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTC	495
Var1 基础-106	TCAAATAATGATTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTCG	496
Var1 基础-107	AAAATAAAATCATTATTTGAAGCTTAAGCCTGGGGTGCCT	497
Var1 基础-108	AGAGAGTCATTAGGCACCCAGGCTTAAGCT	498
Var2 -18	GTAGTCCGGGTCTTGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	499
Var2 -19	GCACACAAGACCCGGACTACTATTACATGTGGACGCGAGA	500
Var3 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	501
Var3 -22	AGGCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	502
Var4 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	503
Var4 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAACCAACCCCTGTGGATTGGG	504
Var5 -18	GTAGTCCGGGTCTTGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	505
Var5 -19	GCACACAAGACCCGGACTACTATTACATGTGGACGCGAGA	506
Var5 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	507
Var5 -22	AGGCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	508
Var6 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	509
Var6 -22	AGGCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	510
Var6 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	511

[0831]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
Var6 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAAACCACCCCCTGTGGATTGGG	512
Var7 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	513
Var7 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAAACCACCCCCTGTGGATTGGG	514
Var7 -18	GTAGTCCGGGTCTTGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	515
Var7 -19	GCACACAAGACCCGGACTACTATTACATGTGGACGCGAGA	516
Var8 -18	GTAGTCCGGGTCTTGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	517
Var8 -19	GCACACAAGACCCGGACTACTATTACATGTGGACGCGAGA	518
Var8 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	519
Var8 -22	AGGCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	520
Var8 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	521
Var8 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAAACCACCCCCTGTGGATTGGG	522
Var9 -18	GTAGTCCGGGTCTTGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	523
Var9 -19	GCACACAAGACCCGGACTACTATTACATGTGGACGCGAGA	524
Var9 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	525
Var9 -22	AGGCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	526
Var9 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	527
Var9 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAAACCACCCCCTGTGGATTGGG	528
Var9 -76	GCCCGACGAAGAGCGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	529
Var9 -77	ACAGCCGCTCTTCGTCGGGCTGGCATCGTGCCCCCTCGT	530
Var10 -76	GCCCGACGAAGAGCGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	531
Var10 -77	ACAGCCGCTCTTCGTCGGGCTGGCATCGTGCCCCCTCGT	532
Var10 -88	TTGACCGTATGGCCAACTGTGTGCACACGAGCTCGTGGA	533
Var10 -89	CAGTTTGCCATACGGTCAAGGTGGCGGGCAACGCCGCGG	534
Var10 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	535
Var10 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAAACCACCCCCTGTGGATTGGG	536
Var10 -96	ATCTTGCCCCACAATGATGTACTTGTACTCCACGACGTCT	537
Var10 -97	ACATCATTGTGGGCCAAGATGGCTCCGTGACCTGGGAGAG	538
Var10 -18	GTAGTCCGGGTCTTGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	539
Var10 -19	GCACACAAGACCCGGACTACTATTACATGTGGACGCGAGA	540
Var11 -76	GCCCGACGAAGAGCGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	541
Var11 -77	ACAGCCGCTCTTCGTCGGGCTGGCATCGTGCCCCCTCGT	542

[0832]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
Var11 -88	TTGACCGTATGGCCAACTGTGTCGACACGAGCTCGTGGA	543
Var11 -89	CAGTTTGCCATACGGTCAAGGTGGCGGGCAACGCCGCGG	544
Var11 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	545
Var11 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAACCACCCCCTGTGGATTGGG	546
Var11 -96	ATCTTGCCCCACAATGATGTACTTGTACTCCACGACGTCT	547
Var11 -97	ACATCATTGTGGGCCAAGATGGCTCCGTGACCTGGGAGAG	548
Var11 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	549
Var11 -22	AGGCCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	550
Var12 -76	GCCCGACGAAGAGCGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	551
Var12 -77	ACAGCCGCTCTTCGTGCGGGCTGGCATCGTGCCCCCTCGT	552
Var12 -88	TTGACCGTATGGCCAACTGTGTCGACACGAGCTCGTGGA	553
Var12 -89	CAGTTTGCCATACGGTCAAGGTGGCGGGCAACGCCGCGG	554
Var12 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	555
Var12 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAACCACCCCCTGTGGATTGGG	556
Var12 -96	ATCTTGCCCCACAATGATGTACTTGTACTCCACGACGTCT	557
Var12 -97	ACATCATTGTGGGCCAAGATGGCTCCGTGACCTGGGAGAG	558
Var12 -18	GTAGTCCGGGCTTGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	559
Var12 -19	GCACACAAGACCCGGACTIONATTACATGTGGACGCGAGA	560
Var12 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	561
Var12 -22	AGGCCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	562
Var13 -18	GTAGTCCGGGTCACGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	563
Var13 -19	GCACACGTGACCCGGACTIONATTACATGTGGACGCGAGA	564
Var14 -18	GTAGTCCGGGTCACGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	565
Var14 -19	GCACACGTGACCCGGACTIONATTACATGTGGACGCGAGA	566
Var14 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	567
Var14 -22	AGGCCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	568
Var15 -18	GTAGTCCGGGTCACGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	569
Var15 -19	GCACACGTGACCCGGACTIONATTACATGTGGACGCGAGA	570
Var15 -21	TAGCGCTCTTGTCTTCAAGATTCTCATCGACCGCTTCACC	571
Var15 -22	AGGCCCCGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGAA	572
Var15 -92	TATCACGATAGTTGACACGGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	573

[0833]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
Var15 -93	CCGTGTCAACTATCGTGATAACCAACCCCTGTGGATTGGG	574
Var15 -76	GCCCGACGAAGAGCGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	575
Var15 -77	ACAGCCGCTCTTCGTCGGGCTGGCATCGTCCCCCCTCGT	576
Var16 -74	ACGTCAGGTGACGCGCAGACAGCGGAGTGCCGCTGTTGCG	577
Var16 -75	GTCTGCGCGTCACCTGACGTGGTCGTACGCCTCGTTCTTG	578
Var17 -74	ACGTCAGGTGACCCGCAGACAGCGGAGTGCCGCTGTTGCG	579
Var17 -75	GTCTGCGGGTCACCTGACGTGGTCGTACGCCTCGTTCTTG	580
Var18 -22	AGAAACGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGGT	581
Var18 -23	GAAACGTACGATGCGTTTCTGCAGCGCCGCATCGAGCAGT	582
Var18 -74	ACGTCAGGTGACGCGCAGACAGCGGAGTGCCGCTGTTGCG	583
Var18 -75	GTCTGCGCGTCACCTGACGTGGTCGTACGCCTCGTTCTTG	584
Var18 -76	GCCCGACGGGCCGTGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	585
Var18 -77	ACAGCCACGGCCCGTCGGGCTGGCATCGTCCCCCCTCGT	586
Var18 -87	AACCTCCGTGGCCGTACCTTCCACGTTCTCGTGTCGACA	587
Var18 -88	TTGACCGTCTGGCCAACTGTGTCGACACGAGAACGTGGA	588
Var18 -96	ATCTTGCCCCACTTTGATGTACTTGTACTCCACGACGTCT	589
Var18 -97	ACATCAAAGTGGGCCAAGATGGCTCCGTGACCTGGGAGAG	590
Var19 -18	GTAGTCCGGGTCACGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	591
Var19 -19	GCACACGTGACCCGGACTACTATTACATGTGGACGCGAGA	592
Var19 -22	AGAAACGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGGT	593
Var19 -23	GAAACGTACGATGCGTTTCTGCAGCGCCGCATCGAGCAGT	594
Var19 -74	ACGTCAGGTGACGCGCAGACAGCGGAGTGCCGCTGTTGCG	595
Var19 -75	GTCTGCGCGTCACCTGACGTGGTCGTACGCCTCGTTCTTG	596
Var19 -76	GCCCGACGGGCCGTGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	597
Var19 -77	ACAGCCACGGCCCGTCGGGCTGGCATCGTCCCCCCTCGT	598
Var19 -87	AACCTCCGTGGCCGTACCTTCCACGTTCTCGTGTCGACA	599
Var19 -88	TTGACCGTCTGGCCAACTGTGTCGACACGAGAACGTGGA	600
Var19 -96	ATCTTGCCCCACTTTGATGTACTTGTACTCCACGACGTCT	601
Var19 -97	ACATCAAAGTGGGCCAAGATGGCTCCGTGACCTGGGAGAG	602
Var20 -18	GTAGTCCGGGTCACGTGTGCTGGGAGATGCAATCACCGCA	603
Var20 -19	GCACACGTGACCCGGACTACTATTACATGTGGACGCGAGA	604

[0834]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
Var20 -22	AGAAACGCATCGTACGTTTCGGTGAAGCGGTCGATGAGGT	605
Var20 -23	GAAACGTACGATGCGTTTCTGCAGCGCCGCATCGAGCAGT	606
Var20 -74	ACGTCAGGTGAAGCGCAGACAGCGGAGTGCCGCTGTTGCG	607
Var20 -75	GTCTGCGCTTCACCTGACGTGGTCGTACGCCTCGTTCTTG	608
Var20 -76	GCCCGACGGGCGTGGCTGTCAAGAACGAGGCGTACGACC	609
Var20 -77	ACAGCCACGGCCGTCGGGCTGGCATCGTCCCCCCTCGT	610
Var20 -87	AACCTCCGTGGCCGTACCTTCCACGTTCTCGTGTGACA	611
Var20 -88	TTGACCGTATGGCCAACTGTGTGCACACGAGAACGTGGA	612
Var20 -89	CAGTTTGGCCATACGGTCAAGGTGGCGGGAACGCCGCGG	613
Var20 -93	TATCGGCATAGTTGACGGCGTCCAGAGCCACGGCGGCGCT	614
Var20 -94	CGCCGTCAACTATGCCGATAACCACCCCCTGTGGATTGGG	615
Var20 -96	ATCTTGGCCACTTTGATGTACTTGTACTCCACGACGTCT	616
Var20 -97	ACATCAAAGTGGGCCAAGATGGCTCCGTGACCTGGGAGAG	617
GAV 基础-1	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	618
GAV 基础-2	GCAGTCGACAGGACGTGCATAGCCTGCTTTTTGTACAAA	619
GAV 基础-3	ATGCACGTCCTGTGCACTGCGGTGCTGCTCGGCTCCGTTG	620
GAV 基础-4	TCCCAGGACCTTTTGAACGGCAACGGAGCCGAGCAGCACC	621
GAV 基础-5	CCGTTCAAAGGTCCTGGGAAGACCAGGATCAAGCGGTCT	622
GAV 基础-6	ACCTCTTGGTGACGTGCGACAGACCGCTTGATCCTGGTCT	623
GAV 基础-7	GTCCGACGTCACCAAGAGGTCTGTTGACGACTTCATCAGC	624
GAV 基础-8	AGTGCAATAGGCGTCTCGGTGCTGATGAAGTCGTCAACAG	625
GAV 基础-9	ACCGAGACGCCTATTGCACTGAACAATCTCTTTGCAATG	626
GAV 基础-10	ACGGCATCCATCAGGACCAACATTGCAAAGAAGATTGTTC	627
GAV 基础-11	TTGGTCTGATGGATGCCGTGCATTGCGCACATCAGCTGG	628
GAV 基础-12	TGGGAGATGCAATCACCGCACCAGCTGATGTGCCGAATGC	629
GAV 基础-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAATTGACCCGGACTAC	630
GAV 基础-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCAATTGTGC	631
GAV 基础-15	TATTACATGTGGACGCGAGATAGCGCTCTTGCTTTCAAGA	632
GAV 基础-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGTTCTTGAAGACAAGAGCGCTA	633
GAV 基础-17	ACCTCATCGACCGCTTCACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	634
GAV 基础-18	ACTGCTCGATGCGGCGCTGCAGGCCCGCATCGTACGTTTC	635

[0835]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
GAV 基础-19	GCAGCGCCGCATCGAGCAGTACATTACTGCCCAGGTCCT	636
GAV 基础-20	GGGTTAGAGAGGCCCTGGAGAGTGACCTGGGCAGTAATGT	637
GAV 基础-21	CTCCAGGGCCTCTCTAACCCTCGGGCTCCCTCGCGGACG	638
GAV 基础-22	GGGCTCGCCGAGACCAGAGCCGTCCGCGAGGGAGCCCGAG	639
GAV 基础-23	GCTCTGGTCTCGGCGAGCCCAAGTTTGAGTTGACCCTGAA	640
GAV 基础-24	CCCAGTTGCCGTGAAAGGCTTCAGGGTCAACTCAAACCT	641
GAV 基础-25	GCCTTTCACCGGCAACTGGGGTCGACCGCAGCGGGATGGC	642
GAV 基础-26	GCAATGGCTCGCAGAGCTGGGCCATCCCGCTGCGGTCGAC	643
GAV 基础-27	CCAGCTCTGCGAGCCATTGCCTTGATTGGATACTCAAAGT	644
GAV 基础-28	ATAGTTGTTGTTGATGAGCCACTTTGAGTATCCAATCAAG	645
GAV 基础-29	GGCTCATCAACAACAACCTATCAGTCGACTGTGTCCAACGT	646
GAV 基础-30	TGCGCACAAATAGGCCAGATGACGTTGGACACAGTCGACTG	647
GAV 基础-31	CATCTGGCCTATTGTGCGCAACGACCTCAACTATGTTGCC	648
GAV 基础-32	CCGGTTTGGTTCAGTACTGGGCAACATAGTTGAGGTCGT	649
GAV 基础-33	CAGTACTGGAACCAACCGGCTTTGACCTCTGGAAGAAG	650
GAV 基础-34	AAAGAATGAGCTCCCATTTGACTTCTTCCAGAGGTCAAAG	651
GAV 基础-35	TCAATGGGAGCTCATTCTTTACTGTTGCCAACCAGCACCG	652
GAV 基础-36	TGGCGCCCTCGACAAGTGCTCGGTGCTGTTGGCAACAGT	653
GAV 基础-37	AGCACTTGTCGAGGGCGCCACTCTTGCTGCCACTCTTGGC	654
GAV 基础-38	GAATAAGCGCTTCCCGACTGGCCAAGAGTGGCAGCAAGAG	655
GAV 基础-39	CAGTCGGGAAGCGCTTATTCATCTGTTGCTCCCAGGTTT	656
GAV 基础-40	GAATCGTTGGAGAAAGCACAAACCTGGGGAGCAACAGAT	657
GAV 基础-41	TGTGCTTCTCCAACGATTCTGGGTGTCGTCTGGTGGATA	658
GAV 基础-42	TGTTGATGTTGGAGTCGACGTATCCACCAGACGACCCCA	659
GAV 基础-43	CGTCGACTCCAACATCAACACCAACGAGGGCAGGACTGGC	660
GAV 基础-44	AGGACGGAGTTGACATCCTTGCCAGTCCTGCCCTCGTTGG	661
GAV 基础-45	AAGGATGTCAACTCCGTCCTGACTTCCATCCACACCTTCG	662
GAV 基础-46	GTCACAGCCAAGGTTGGGATCGAAGGTGTGGATGGAAGTC	663
GAV 基础-47	ATCCCAACCTTGGCTGTGACGCAGGCACCTTCCAGCCATG	664
GAV 基础-48	TGGAGAGCGCTTTGTCACTGCATGGCTGGAAGGTGCCTGC	665
GAV 基础-49	CAGTGACAAAGCGCTCTCCAACCTCAAGGTTGTTGTCGAC	666

[0836]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
GAV 基础-50	CCGTAGATGGAGCGGAAGGAGTCGACAACAACCTTGAGGT	667
GAV 基础-51	TCCTTCCGCTCCATCTACGGCGTGAACAAGGGCATTCTG	668
GAV 基础-52	AATGGCGACGGCAGCACCGGCAGGAATGCCCTTGTTACG	669
GAV 基础-53	CCGGTGCTGCCGTCGCCATTGGCCGGTATGCAGAGGATGT	670
GAV 基础-54	AAGGGTTGCCGTTGTAGTACACATCCTCTGCATACCGGCC	671
GAV 基础-55	GTACTACAACGGCAACCCTTGGTATCTTGCTACATTGCT	672
GAV 基础-56	TCGTACAGCTGCTCGGCAGCAGCAAATGTAGCAAGATACC	673
GAV 基础-57	GCTGCCGAGCAGCTGTACGATGCCATCTACGTCTGGAAGA	674
GAV 基础-58	CACCGTGATGGAGCCCGTCTTCTCCAGACGTAGATGGCA	675
GAV 基础-59	AGACGGGCTCCATCACGGTGACCGCCACCTCCCTGGCCTT	676
GAV 基础-60	CAGGAACAAGCTCCTGGAAGAAGGCCAGGGAGGTGGCGGT	677
GAV 基础-61	CTTCCAGGAGCTTGTTCTTGGCGTGACGGCCGGGACCTAC	678
GAV 基础-62	AAGGTCGAAGAGCTGCTGGAGTAGGTCCCGGCCGTACGC	679
GAV 基础-63	TCCAGCAGCTCTTCGACCTTTACCAACATCATCAACGCCG	680
GAV 基础-64	GCCATCGGCGTATGTCGAGACGGCGTTGATGATGTTGGTA	681
GAV 基础-65	TCTCGACATACGCCGATGGCTTCTCAGCGAGGCTGCCAA	682
GAV 基础-66	AACCGTCGGCGGGGACGTACTTGGCAGCCTCGCTGAGGAA	683
GAV 基础-67	GTACGTCCCCGCCGACGGTTCGCTGGCCGAGCAGTTTGAC	684
GAV 基础-68	AGCGGAGTGCCGCTGTTGCGGTCAAACCTGCTCGGCCAGCG	685
GAV 基础-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGCTTCACCTGACGT	686
GAV 基础-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTGAGGTGAAGCGCAGAC	687
GAV 基础-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCACGGCCCGTCGGGC	688
GAV 基础-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGGGCCGTGGCTGT	689
GAV 基础-73	TGGCATCGTGCCCCCTCGTGGGCCAACAGCAGCGCTAGC	690
GAV 基础-74	GAGCACGTCGAGGGGATCGTGCTAGCGCTGCTGTTGGCCC	691
GAV 基础-75	ACGATCCCCTCGACGTGCTCCGGCGCGTCCGTGGTCGGAT	692
GAV 基础-76	GGCGGTGGGACGCGAGTAGGATCCGACCACGGACGCGCCG	693
GAV 基础-77	CCTACTCGCGTCCCACCGCCACGTATTCCCTCCGTCGCA	694
GAV 基础-78	GCACGCCAGGCTTGGGCGTCTGCGACGGAGGAATGACGT	695
GAV 基础-79	GACGCCAAGCCTGGCGTGCCTTCCGGTACTCCCTACACG	696
GAV 基础-80	GGGGTCGCGCAGGGCAGGGGCGTGTAGGGAGTACCGGAAG	697

[0837]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
GAV 基础-81	CCCCTGCCCTGCGGACCCCAACCTCCGTGGCCGTACCT	698
GAV 基础-82	TGTCGACACGAGCTCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	699
GAV 基础-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCAGACGGTCAA	700
GAV 基础-84	CCGCGGCGTTGCCCGCCACCTTGACCGTCTGGCCAAACTG	701
GAV 基础-85	GGTGGCGGGCAACGCCGCGGCCCTGGGCAACTGGAGCACG	702
GAV 基础-86	TCCAGAGCCACGGCGGCGCTCGTGCTCCAGTTGCCAGGG	703
GAV 基础-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATGCCGATA	704
GAV 基础-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGGCATAGTTGACGGCG	705
GAV 基础-89	ACCACCCCTGTGGATTGGGACGGTCAACCTCGAGGCTGG	706
GAV 基础-90	ACTTGTACTCCACGACGTCTCCAGCCTCGAGGTTGACCGT	707
GAV 基础-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCAATGTGGGCCAAGAT	708
GAV 基础-92	CTCTCCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCACATTGATGT	709
GAV 基础-93	GGCTCCGTGACCTGGGAGAGTGATCCCAACCACACTTACA	710
GAV 基础-94	ACAAGCCACCGCAGGAACCGTGTAAGTGTGGTTGGGATCA	711
GAV 基础-95	CGGTTCTGCGGTGGCTTGTGTGACGCGAGTTGTCAAGGA	712
GAV 基础-96	TTTACGACTGCCAGGTGTCCTCCTTGACAACCTGCGTCAC	713
GAV 基础-97	GGACACCTGGCAGTCGTAAACCCAGCTTTCTTGTACAAAG	714
GAV 基础-98	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG	715
AI1-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACACTTTGCCCGGACTAC	716
AI1-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGCAAAGTGTGC	717
AI1-69	CGCAACAGCGGCACTCCGTGTCTGCGGTTACCTGACGT	718
AI1-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	719
AI1-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	720
AI1-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	721
AI1-84	CCGCGGCGTTGCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	722
AI1-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATAGAGATA	723
AI1-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCTCTATAGTTGACGGCG	724
AI2-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACACTTGACCCGGACTAC	725
AI2-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCAAGTGTGC	726
AI2-69	CGCAACAGCGGCACTCCGTGTCTGCGGTTACCTGACGT	727
AI2-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	728

[0838]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
AII2-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	729
AII2-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	730
AII2-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	731
AII2-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATAGAGATA	732
AII2-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCTCTATAGTTGACGGCG	733
AII3-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACACTTTGCCCGGACTAC	734
AII3-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGCAAAGTGTGC	735
AII3-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	736
AII3-17	TCCTCATCGACCGCTTACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	737
AII3-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	738
AII3-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGAACCGCAGAC	739
AII3-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	740
AII3-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	741
AII3-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	742
AII3-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATAGAGATA	743
AII3-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCTCTATAGTTGACGGCG	744
AII4-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACACTTGACCCGGACTAC	745
AII4-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCAAGTGTGC	746
AII4-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	747
AII4-17	TCCTCATCGACCGCTTACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	748
AII4-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	749
AII4-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGAACCGCAGAC	750
AII4-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	751
AII4-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	752
AII4-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	753
AII4-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATAGAGATA	754
AII4-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCTCTATAGTTGACGGCG	755
AII5-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAAAGAGACCCGGACTAC	756
AII5-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCTCTTGTGC	757
AII5-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	758
AII5-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGAACCGCAGAC	759

[0839]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
AII5-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	760
AII5-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	761
AII5-84	CCGCGGCGTTGCCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAACTG	762
AII5-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATAGAGATA	763
AII5-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCTCTATAGTTGACGGCG	764
AII6-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAAGAGACCCGGACTAC	765
AII6-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCTCTTGTGC	766
AII6-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	767
AII6-17	TCCTCATCGACCGCTTCACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	768
AII6-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	769
AII6-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGAACCGCAGAC	770
AII6-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	771
AII6-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	772
AII6-84	CCGCGGCGTTGCCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAACTG	773
AII6-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATAGAGATA	774
AII6-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCTCTATAGTTGACGGCG	775
AII7-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAAGAGACCCGGACTAC	776
AII7-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCTCTTGTGC	777
AII7-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGAGACACCTGACGT	778
AII7-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGTCTCGCAGAC	779
AII7-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	780
AII7-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	781
AII7-84	CCGCGGCGTTGCCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAACTG	782
AII7-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATAGAGATA	783
AII7-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCTCTATAGTTGACGGCG	784
AII8-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAAGAGACCCGGACTAC	785
AII8-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCTCTTGTGC	786
AII8-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	787
AII8-17	TCCTCATCGACCGCTTCACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	788
AII8-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGAGACACCTGACGT	789
AII8-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGTCTCGCAGAC	790

[0840]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
AI18-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	791
AI18-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	792
AI18-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	793
AI18-87	AGCGCCGCGCTGGCTCTGGACGCGCTCAACTATAGAGATA	794
AI18-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCTCTATAGTTGACGGCG	795
CS1-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	796
CS1-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	797
CS1-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGCTCCGTCGGGC	798
CS1-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGGAGCGCGGCTGT	799
CS1-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	800
CS1-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	801
CS1-87	AGCGCCGCGTGGCTCTGGACCGCGTCAACTATCGCGATA	802
CS1-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGCGG	803
CS1-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCATTGTGGGCCAAGAT	804
CS1-92	CTCTCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCACAATGATGT	805
CS2-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	806
CS2-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	807
CS2-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGCAACGTCGGGC	808
CS2-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGTTGCGCGGCTGT	809
CS2-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	810
CS2-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	811
CS2-87	AGCGCCGCGTGGCTCTGGACCGCGTCAACTATCGCGATA	812
CS2-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGCGG	813
CS2-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCATTGTGGGCCAAGAT	814
CS2-92	CTCTCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCACAATGATGT	815
CS3-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	816
CS3-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	817
CS3-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	818
CS3-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGGGCCGCGGCTGT	819
CS3-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	820
CS3-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	821

[0841]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
CS3-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACCGCGTCAACTATGCCGATA	822
CS3-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGGCATAGTTGACGCGG	823
CS3-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCATTGTGGGCCAAGAT	824
CS3-92	CTCTCCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCCACAATGATGT	825
CS4-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	826
CS4-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	827
CS4-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCGCGGGCCGTCGGGC	828
CS4-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGGGCCGCGGCTGT	829
CS4-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	830
CS4-84	CCGCGGCGTTGCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAACTG	831
CS4-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACCGCGTCAACTATCGCGATA	832
CS4-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGGCATAGTTGACGCGG	833
CS4-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCATTGTGGGCCAAGAT	834
CS4-92	CTCTCCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCCACAATGATGT	835
LQ1-50	CAGTAGATGGAGCGGAAGGAGTCGACAACAACCTTGAGGT	836
LQ1-51	TCCTTCCGCTCCATCTACTGCGTGAACAAGGGCATTCTG	837
LQ1-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGAGACACCTGACGT	838
LQ1-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGTCTCGCAGAC	839
LQ1-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCACGCTCCGTCGGGC	840
LQ1-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGGAGCGTGGCTGT	841
LQ2-50	CAGTAGATGGAGCGGAAGGAGTCGACAACAACCTTGAGGT	842
LQ2-51	TCCTTCCGCTCCATCTACTGCGTGAACAAGGGCATTCTG	843
LQ2-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTACACCTGACGT	844
LQ2-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGTACCGCAGAC	845
LQ2-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCACGACGTCGGGC	846
LQ2-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGCTGCGTGGCTGT	847
LQ3-50	CAGTAGATGGAGCGGAAGGAGTCGACAACAACCTTGAGGT	848
LQ3-51	TCCTTCCGCTCCATCTACTGCGTGAACAAGGGCATTCTG	849
LQ3-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTACACCTGACGT	850
LQ3-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGTACCGCAGAC	851
LQ3-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCACGTTACGTCGGGC	852

[0842]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
LQ3-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGTAACGTGGCTGT	853
LQ3-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	854
LQ3-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	855
LQ4-50	CAGTAGATGGAGCGGAAGGAGTCGACAACAACCTTGAGGT	856
LQ4-51	TCCTTCGCTCCATCTACTGCGTGAACAAGGGCATTCTCTG	857
LQ4-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGAGACACCTGACGT	858
LQ4-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGTCTCGCAGAC	859
LQ4-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCACGCAGCGTCGGGC	860
LQ4-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGCTGCGTGGCTGT	861
LQ4-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	862
LQ4-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	863
LQ5-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGCGTCACCTGACGT	864
LQ5-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGACGCGCAGAC	865
LQ5-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCACGCTCCGTCGGGC	866
LQ5-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGAGCGTGGCTGT	867
LQ5-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	868
LQ5-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	869
LQ6-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	870
LQ6-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAGGTGAACCGCAGAC	871
LQ6-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCACGCTTCGTCGGGC	872
LQ6-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGAAGCGTGGCTGT	873
LQ6-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCATACGGTCAA	874
LQ6-84	CCGCGGCGTTGCCC GCCACCTTGACCGTATGGCCAAACTG	875
TS1-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAAGAGACCCGGACTAC	876
TS1-14	TCTCGCTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCTCTTGTC	877
TS1-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCGACGCCGTCGGGC	878
TS1-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCTGCGGCTGT	879
TS1-82	TGTCGACACGAGCACGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	880
TS1-83	TCCACGTGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCAGACGGTCAA	881
TS1-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACCGGTCAACTATGCCGATA	882
TS1-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGGCATAGTTGACGCGG	883

[0843]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
TS1-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCAAAGTGGGCCAAGAT	884
TS1-92	CTCTCCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCCACTTTGATGT	885
TS2-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAAATTAGACCGGACTAC	886
TS2-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGTCTAATTGTGC	887
TS2-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	888
TS2-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	889
TS2-84	CCGCGGCGTTGCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAACTG	890
TS2-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCATTGTGGGCCAAGAT	891
TS2-92	CTCTCCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCACAATGATGT	892
TS3-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	893
TS3-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCAGACGGTCAA	894
TS3-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCATTGTGGGCCAAGAT	895
TS3-92	CTCTCCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCACAATGATGT	896
TS4-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAAAGACCCGGACTAC	897
TS4-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGTCTCTTGTGC	898
TS4-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	899
TS4-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGGGCCGCGGCTGT	900
TS4-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	901
TS4-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	902
TS4-84	CCGCGGCGTTGCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAACTG	903
TS4-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCATTGTGGGCCAAGAT	904
TS4-92	CTCTCCCAGGTCACGGAGCCATCTTGGCCACAATGATGT	905
TS5-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACAAATCGCCCGGACTAC	906
TS5-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGCGAATTGTGC	907
TS5-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	908
TS5-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGGGCCGCGGCTGT	909
TS5-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	910
TS5-84	CCGCGGCGTTGCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAACTG	911
TS5-87	AGCGCCGCGTGGCTCTGGACGCGGTCAACTATGCCGATA	912
TS5-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGGCATAGTTGACCGCG	913
GAV st-1	GAGAGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	914

[0844]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
GAV st-2	GCAGTCGACAGGACGTGCATAGCCTGCTTTTTGTACAAA	915
GAV st-3	ATGCACGTCCTGTCGACTGCGGTGCTGCTCGGCTCCGTTG	916
GAV st-4	TCCCAGGACCTTTTGAACGGCAACGGAGCCGAGCAGCACC	917
GAV st-5	CCGTTCAAAAGGTCCTGCGGAAGACCAGGATCAAGCGGTCT	918
GAV st-6	ACCTCTTGGTGACGTCGGACAGACCGCTTGATCCTGGTCT	919
GAV st-7	GTCCGACGTCACCAAGAGGTCTGTTGACGACTTCATCAGC	920
GAV st-8	AGTGCAATAGGCGTCTCGGTGCTGATGAAGTCGTCAACAG	921
GAV st-9	ACCGAGACGCCTATTGCACTGAACAATCTCTTTGCAATG	922
GAV st-10	ACGGCATCCATCAGGACCAACATTGCAAAGAAGATTGTTC	923
GAV st-11	TTGGTCCTGATGGATGCCGTGCATTCCGGCACATCAGCTGG	924
GAV st-12	TGGGAGATGCAATCACCGCACCAGCTGATGTGCCGAATGC	925
GAV st-13	TGCGGTGATTGCATCTCCAGCACACAAGACCCGGACTAC	926
GAV st-14	TCTCGCGTCCACATGTAATAGTAGTCCGGGTCTTGTGTGC	927
GAV st-15	TATTACATGTGGACGCGAGATAGCGCTCTTGTCTTCAAGA	928
GAV st-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGTTCTTGAAGACAAGAGCGCTA	929
GAV st-17	ACCTCATCGACCGCTTCACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	930
GAV st-18	ACTGCTCGATGCGGCGCTGCAGGCCCGCATCGTACGTTTC	931
GAV st-19	GCAGCGCCGCATCGAGCAGTACATTACTGCCCAGGTCACT	932
GAV st-20	GGGTTAGAGAGGCCCTGGAGAGTGACCTGGGCAGTAATGT	933
GAV st-21	CTCCAGGGCCTCTCTAACCCTCGGGCTCCCTCGCGGACG	934
GAV st-22	GGGCTCGCCGAGACCAGAGCCGTCCGCGAGGGAGCCCGAG	935
GAV st-23	GCTCTGGTCTCGGCGAGCCCAAGTTTGAGTTGACCCTGAA	936
GAV st-24	CCCAGTTGCCGGTGAAAGGCTTCAGGGTCAACTCAAATT	937
GAV st-25	GCCTTTCACCGGCAACTGGGGTCGACCGCAGCGGGATGGC	938
GAV st-26	GCAATGGCTCGCAGAGCTGGGCCATCCCGCTGCGGTGAC	939
GAV st-27	CCAGCTCTGCGAGCCATTGCCTTGATTGGATACTCAAAGT	940
GAV st-28	ATAGTTGTTGTTGATGAGCCACTTTGAGTATCCAATCAAG	941
GAV st-29	GGCTCATCAACAACAACTATCAGTCGACTGTGTCCAACGT	942
GAV st-30	TGCGCACAAATAGGCCAGATGACGTTGGACACAGTCGACTG	943
GAV st-31	CATCTGGCCTATTGTGCGCAACGACCTCAACTATGTTGCC	944
GAV st-32	CCGTTTTGGTTCCAGTACTGGGCAACATAGTTGAGGTCGT	945

[0845]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
GAV st-33	CAGTACTGGAACCAAACCGGCTTTGACCTCTGGGAAGAAG	946
GAV st-34	AAAGAATGAGCTCCCATTTGACTTCTTCCAGAGGTCAAAG	947
GAV st-35	TCAATGGGAGCTCATTCTTTACTGTTGCCAACCAGCACCG	948
GAV st-36	TGGCGCCCTCGACAAGTGCTCGGTGCTGGTTGGCAACAGT	949
GAV st-37	AGCACTTGTGAGGGCGCCACTCTTGCTGCCACTCTTGGC	950
GAV st-38	GAATAAGCGCTTCCCGACTGGCCAAGAGTGGCAGCAAGAG	951
GAV st-39	CAGTCGGGAAGCGCTTATTCATCTGTTGCTCCCAGGTTT	952
GAV st-40	GAATCGTTGGAGAAAGCACAAAACCTGGGGAGCAACAGAT	953
GAV st-41	TGTGCTTTCTCCAACGATTCTGGGTGTCGTCTGGTGGATA	954
GAV st-42	TGTTGATGTTGGAGTCGACGTATCCACCAGACGACACCCA	955
GAV st-43	CGTCGACTCCAACATCAACACCAACGAGGGCAGGACTGGC	956
GAV st-44	AGGACGGAGTTGACATCCTTGCCAGTCCTGCCCTCGTTGG	957
GAV st-45	AAGGATGTCAACTCCGTCCTGACTTCCATCCACACCTTCG	958
GAV st-46	GTCACAGCCAAGGTTGGGATCGAAGGTGTGGATGGAAGTC	959
GAV st-47	ATCCCAACCTTGGCTGTGACGCAGGCACCTTCCAGCCATG	960
GAV st-48	TGGAGAGCGCTTTGTCACTGCATGGCTGGAAGGTGCCTGC	961
GAV st-49	CAGTGACAAAGCGCTCTCCAACCTCAAGGTTGTTGTCGAC	962
GAV st-50	CCGTAGATGGAGCGGAAGGAGTCGACAACAACCTTGAGGT	963
GAV st-51	TCCTTCCGCTCCATCTACGGCGTGAACAAGGGCATTCTG	964
GAV st-52	AATGGCGACGGCAGCACCGGCAGGAATGCCCTTGTTACG	965
GAV st-53	CCGGTGCTGCCGTCGCCATTGGCCGGTATGCAGAGGATGT	966
GAV st-54	AAGGGTTGCCGTTGTAGTACACATCCTCTGCATACCGGCC	967
GAV st-55	GTAACAACGGCAACCCTTGGTATCTTGCTACATTTGCT	968
GAV st-56	TCGTACAGCTGCTCGGCAGCAGCAAATGTAGCAAGATACC	969
GAV st-57	GCTGCCGAGCAGCTGTACGATGCCATCTACGTCTGGAAGA	970
GAV st-58	CACCGTGATGGAGCCCGTCTTCTTCCAGACGTAGATGGCA	971
GAV st-59	AGACGGGCTCCATCACGGTGACCGCCACCTCCCTGGCCTT	972
GAV st-60	CAGGAACAAGCTCCTGGAAGAAGGCCAGGGAGGTGGCGGT	973
GAV st-61	CTTCCAGGAGCTTGTCTGGCGTGACGGCCGGGACCTAC	974
GAV st-62	AAGGTCGAAGAGCTGCTGGAGTAGGTCCCGCCGTCACGC	975
GAV st-63	TCCAGCAGCTCTTCGACCTTTACCAACATCATCAACGCCG	976

[0846]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
GAV st-64	GCCATCGGCGTATGTCGAGACGGCGTTGATGATGTTGGTA	977
GAV st-65	TCTCGACATACGCCGATGGCTTCCTCAGCGAGGCTGCCAA	978
GAV st-66	AACCGTCGGCGGGGACGTACTTGGCAGCCTCGCTGAGGAA	979
GAV st-67	GTACGTCCCCGCCGACGGTTCGCTGGCCGAGCAGTTTGAC	980
GAV st-68	AGCGGAGTGCCGCTGTTGCGGTCAAAGTCTCGGCCAGCG	981
GAV st-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGCTTACCTGACGT	982
GAV st-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTGAGGTGAAGCGCAGAC	983
GAV st-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCACGGCCCGTCGGGC	984
GAV st-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCGACGGGCCGTGGCTGT	985
GAV st-73	TGGCATCGTGCCCCCTCGTGGGCCAACAGCAGCGCTAGC	986
GAV st-74	GAGCACGTCGAGGGGATCGTGCTAGCGCTGCTGTTGGCCC	987
GAV st-75	ACGATCCCCTCGACGTGCTCCGGCGCGTCCGTGGTCGGAT	988
GAV st-76	GGCGGTGGGACGCGAGTAGGATCCGACCACGGACGCGCCG	989
GAV st-77	CCTACTCGCGTCCCACCGCCACGTCAATCCCTCCGTCGCA	990
GAV st-78	GCACGCCAGGCTTGGGCGTCTGCGACGGAGGGAATGACGT	991
GAV st-79	GACGCCCAAGCCTGGCGTGCCTTCCGGTACTCCCTACACG	992
GAV st-80	GGGGTCGCGCAGGGCAGGGGCGTGTAGGGAGTACCGGAAG	993
GAV st-81	CCCCTGCCCTGCGCGACCCCAACCTCCGTGGCCGTCACCT	994
GAV st-82	TGTCGACACGAGCTCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	995
GAV st-83	TCCACGAGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	996
GAV st-84	CCGCGGCGTTGCCCGCCACCTTGACCGTGTGGCCAAACTG	997
GAV st-85	GGTGGCGGGCAACGCCGCGGCCCTGGGCAACTGGAGCACG	998
GAV st-86	TCCAGAGCCACGGCGGCGCTCGTGCTCCAGTTGCCAGGG	999
GAV st-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATGCCGATA	1000
GAV st-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGGCATAGTTGACGGCG	1001
GAV st-89	ACCACCCCTGTGGATTGGGACGGTCAACCTCGAGGCTGG	1002
GAV st-90	ACTTGTACTCCACGACGTCTCCAGCCTCGAGGTTGACCGT	1003
GAV st-91	AGACGTCGTGGAGTACAAGTACATCAATGTGGGCCAAGAT	1004
GAV st-92	CTCTCCCAGGTACGGAGCCATCTTGGCCACATTGATGT	1005
GAV st-93	GGCTCCGTGACCTGGGAGAGTGATCCCAACCACACTTACA	1006
GAV st-94	ACAAGCCACCGCAGGAACCGTGTAAGTGTGGTTGGGATCA	1007

[0847]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
GAV st-95	CGGTTCTGCGGTGGCTTGTGTGACGCAGGTTGTCAAGGA	1008
GAV st-96	TTTACGACTGCCAGGTGTCCTCCTTGACAACCTGCGTCAC	1009
GAV st-97	GGACACCTGGCAGTCGTAACCCAGCTTTCTGTACAAAG	1010
GAV st-98	CTCTGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG	1011
RB1-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	1012
RB1-17	TCCTCATCGACCGCTTACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	1013
RB1-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	1014
RB1-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCGCGGCTGT	1015
RB2-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	1016
RB2-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTACAGTGAACCGCAGAC	1017
RB2-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	1018
RB2-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCGCGGCTGT	1019
RB3-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGCTCCGTCGGGC	1020
RB3-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGAGCGCGGCTGT	1021
RB1-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	1022
RB1-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCGCGGCTGT	1023
RB4-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	1024
RB4-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	1025
RB4-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	1026
RB4-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCGCGGCTGT	1027
RB5-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	1028
RB5-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCGCGGCTGT	1029
RB5-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1030
RB5-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1031
RB6-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	1032
RB6-17	TCCTCATCGACCGCTTACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	1033
RB6-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	1034
RB6-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCGCGGCTGT	1035
RB6-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1036
RB6-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1037
RB7-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	1038

[0848]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
RB7-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	1039
RB7-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGGCCCGTCGGGC	1040
RB7-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCGCGGCTGT	1041
RB7-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1042
RB7-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1043
RB8-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGCTCCGTCGGGC	1044
RB8-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGAGCGCGGCTGT	1045
RB8-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1046
RB8-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1047
RB9-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGCTCCGTCGGGC	1048
RB9-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGAGCGCGGCTGT	1049
RB9-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGGAGGTT	1050
RB9-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	1051
RB10-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	1052
RB10-17	TCCTCATCGACCGCTTCACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	1053
RB10-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGCTCCGTCGGGC	1054
RB10-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGAGCGCGGCTGT	1055
RB10-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1056
RB10-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1057
RB11-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	1058
RB11-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	1059
RB11-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCGCGCTCCGTCGGGC	1060
RB11-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGAGCGCGGCTGT	1061
RB11-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1062
RB11-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1063
RB12-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	1064
RB12-17	TCCTCATCGACCGCTTCACCGAAACGTACGATGCGGGCCT	1065
RB13-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	1066
RB13-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTCAAGTGAACCGCAGAC	1067
RB14-71	GGTCGTACGCCTCGTTCCTTGACAGCCACGCTCCGTCGGGC	1068
RB14-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGAGCGTGGCTGT	1069

[0849]

引物	DNA 序列	SEQ ID NO:
RB15-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1070
RB15-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1071
RB16-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	1072
RB16-17	TCCTCATCGACCGCTTACCAGAAACGTACGATGCGGGCCT	1073
RB16-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1074
RB16-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1075
RB17-82	TGTCGACACGAGCGCGTGGAAGGTGACGGCCACGAGGTT	1076
RB17-83	TCCACGCGCTCGTGTGACACAGTTTGGCCACACGGTCAA	1077
RB17-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1078
RB17-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1079
RB18-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCATGGCCCGTCGGGC	1080
RB18-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCATGGCTGT	1081
RB18-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1082
RB18-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1083
RB19-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	1084
RB19-17	TCCTCATCGACCGCTTACCAGAAACGTACGATGCGGGCCT	1085
RB19-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCATGGCCCGTCGGGC	1086
RB19-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCATGGCTGT	1087
RB19-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1088
RB19-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1089
RB20-16	GGTGAAGCGGTCGATGAGGATCTTGAAGACAAGAGCGCTA	1090
RB20-17	TCCTCATCGACCGCTTACCAGAAACGTACGATGCGGGCCT	1091
RB20-69	CGCAACAGCGGCACTCCGCTGTCTGCGGTTACCTGACGT	1092
RB20-70	CAAGAACGAGGCGTACGACCACGTACGGTGAACCGCAGAC	1093
RB20-71	GGTCGTACGCCTCGTTCTTGACAGCCATGGCCCGTCGGGC	1094
RB20-72	ACGAGGGGGGCACGATGCCAGCCCGACGGGCCATGGCTGT	1095
RB20-87	AGCGCCGCCGTGGCTCTGGACGCCGTCAACTATCGCGATA	1096
RB20-88	CCCAATCCACAGGGGGTGGTTATCGCGATAGTTGACGGCG	1097

[0850] 从大规模发酵(即100ml或500ml发酵)中纯化变体,并确定热稳定性(T_s)和比活性的PI。具体地,使用不同的底物测定比活性,所述底物包括DP2、DP3、DP4、DP5、DP6、DP7、玉米淀粉(CS)和液化物(Liq)。PIs呈递在表8中。表8中的“N/D”代表“没有进行”。

[0851]

表 8: 代表性组合变体的 PI

变体	突变	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	CS	Ts	Liq.
ALL1	I43Q/D44C/L417V/E503A/Q511H/A539R	0.89	1.22	1.08	1.10	1.17	1.02	1.27	1.95	1.59
ALL2	I43Q/L417V/E503A/Q511H/A539R	1.13	1.50	1.24	1.19	1.32	1.24	1.52	1.84	1.96
ALL3	I43Q/D44C/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R	0.69	1.09	0.91	0.89	0.96	0.99	1.30	1.43	1.64
ALL4	I43Q/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R	0.89	1.40	1.15	1.15	1.25	1.12	1.52	1.79	1.73
ALL5	I43R/L417V/E503A/Q511H/A539R	1.10	1.50	N/D	N/D	N/D	1.04	1.17	2.37	1.87
ALL6	I43R/N61I/L417V/E503A/Q511H/A539R	0.93	1.52	N/D	N/D	N/D	1.37	1.53	1.84	2.24
ALL7	I43R/L417R/E503A/A539R	1.19	1.38	1.29	1.23	1.33	1.20	1.54	1.67	1.62
ALL8	I43R/N61I/L417R/E503A/Q511H/A539R	1.07	1.56	N/D	N/D	N/D	1.08	1.14	1.84	2.11
C1	G73F/T430A/Q511H	0.82	0.80	0.95	0.95	1.06	0.94	1.07	1.84	0.96
C2	I43R/G73F/T430A	0.96	0.97	1.14	1.17	1.28	1.07	1.25	1.91	1.18
C4	G73F/T430A/E503V/Q511H	0.97	0.80	1.10	1.08	1.17	1.04	1.06	2.57	1.01
C5	D44C/G73F/N563K	0.77	0.77	0.86	0.87	0.95	0.77	0.71	2.16	0.97
C7	D44C/G73F/E503V/Q511H	0.74	0.71	0.82	0.84	0.93	0.78	0.79	2.10	0.89
C8	D44C/G73F/N563K	0.78	0.76	0.81	0.91	0.94	0.79	1.05	2.28	N/D
C9	D44C/G73F/L417R/N563K	0.82	0.86	0.96	1.07	1.08	0.96	1.00	2.57	1.22
C11	D44C/G73F/N563K	0.74	0.68	0.81	0.92	0.90	0.76	1.04	2.42	N/D
C12	I43R/T430A	1.02	1.06	1.21	1.21	1.32	1.03	1.35	1.60	1.26
C13	I43Q/T430A	0.96	0.94	1.13	1.14	1.24	1.04	1.29	1.10	1.45
C14	I43Q/T430A/Q511H	1.08	1.11	1.13	1.14	1.23	1.13	1.34	1.33	1.46
C15	D44C/L417R/N563K	0.84	0.88	0.95	1.07	1.08	0.85	1.09	2.30	0.99
CS1	L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I	0.78	1.19	1.35	1.29	1.42	1.28	1.44	1.56	2.35
CS2	L417V/T430A/A431Q/Q511H/A535R/A539R/N563I	0.96	1.39	1.46	1.42	1.52	1.60	1.77	1.56	2.32

[0852]

变体	突变	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	CS	Ts	Liq.
CS3	L417V/T430A/Q511H/A535R/N563I	1.00	1.17	N/D	N/D	N/D	0.98	1.40	1.69	1.78
CS4	L417V/T430A/Q511H/A539R/N563I	1.11	1.36	N/D	N/D	N/D	1.21	1.53	1.95	1.73
LQ1	G294C/L417R/A431L	1.10	1.47	1.18	1.18	1.35	1.10	0.98	1.04	1.77
LQ2	G294C/L417V/A431Q	1.15	1.56	1.32	1.30	1.46	1.22	1.08	1.02	2.08
LQ3	G294C/L417V/A431L/Q511H	0.99	1.41	N/D	N/D	N/D	N/D	1.21	1.29	2.07
LQ4	G294C/L417R/A431Q/Q511H	1.20	1.49	1.11	1.13	1.27	1.08	1.19	1.43	1.65
LQ5	L417R/A431L/Q511H	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	1.02	1.21	1.56	1.88
LQ6	L417V/A431Q/Q511H	0.94	1.30	1.20	1.18	1.28	1.25	1.33	1.35	2.05
RB1	I43Q/T430A/Q511H/N61I	0.90	1.13	1.00	1.03	1.13	1.08	1.15	1.27	1.47
RB2	I43Q/T430A/Q511H/L417V	1.12	1.34	N/D	N/D	N/D	1.09	1.38	1.42	1.87
RB3	I43Q/T430A/Q511H/A431L	0.87	1.05	1.03	1.05	1.15	1.10	1.25	1.29	1.70
RB4	I43Q/T430A/Q511H/E503A	0.99	1.00	1.05	1.04	1.13	1.09	1.29	1.47	1.50
RB5	I43Q/T430A/Q511H/A539R	0.98	1.22	1.06	1.02	1.11	1.10	1.45	1.47	1.59
RB6	I43Q/T430A/Q511H/N61I/A539R	0.75	1.09	1.09	1.05	1.14	1.23	N/D	0.94	N/D
RB7	I43Q/T430A/Q511H/L417V/A539R	1.20	1.62	N/D	N/D	N/D	1.29	1.44	1.85	2.17
RB8	I43Q/T430A/Q511H/A431L/A539R	0.90	1.38	N/D	N/D	N/D	1.25	1.38	1.59	2.18
RB9	I43Q/T430A/Q511H/A431L/E503A	0.79	0.82	0.95	0.92	1.02	1.03	1.39	1.69	1.55
RB10	I43Q/T430A/Q511H/N61I/A539R/A431L	0.68	1.27	N/D	N/D	N/D	0.87	1.47	1.29	1.73
RB11	I43Q/T430A/Q511H/L417V/A539R/A431L	0.89	1.50	N/D	N/D	N/D	1.05	1.36	1.58	2.03
RB12	I43Q/Q511H/N61I	0.75	0.80	0.91	0.91	1.00	0.82	1.25	1.37	1.56
RB13	I43Q/Q511H/L417V	0.97	0.94	0.96	0.93	1.05	0.94	1.38	1.50	1.50
RB14	I43Q/Q511H/A431L	0.73	0.75	0.89	0.88	0.94	0.89	1.31	1.37	1.55
RB15	I43Q/Q511H/A539R	0.90	0.88	1.03	0.99	1.07	1.05	1.42	1.52	1.69
RB16	I43Q/Q511H/A539R/N61I	0.78	0.96	1.22	1.18	1.26	0.94	1.43	1.60	1.34

[0853]

变体	突变	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	CS	Ts	Liq.
RB17	I43Q/Q511H/A539R/E503A	1.02	1.15	1.16	1.12	1.21	1.20	1.38	1.68	1.40
RB18	I43Q/Q511H/A539R/T430M	0.81	0.84	1.03	0.99	1.08	0.54	1.44	1.64	1.40
RB19	I43Q/Q511H/A539R/T430M/N61I	0.77	1.21	N/D	N/D	N/D	1.07	1.50	1.47	1.88
RB20	I43Q/Q511H/A539R/T430M/N61I/L417V	0.73	1.35	N/D	N/D	N/D	0.96	1.55	1.79	1.95
TS1	I43R/T430A/E503V/A535R/N563K	1.09	0.95	1.13	1.09	1.17	1.19	N/D	2.13	N/D
TS2	D44R/E503A/Q511H/N563I	0.80	0.70	0.88	0.89	0.96	0.85	1.14	1.53	1.23
TS3	E503A/N563I	0.93	0.73	0.91	0.88	0.96	0.92	1.17	1.39	1.04
TS4	I43R/T430A/E503A/Q511H/N563K	0.92	0.77	0.95	0.89	1.02	1.06	1.33	1.66	1.33
TS5	D44R/T430A/Q511H/A535R	0.74	0.68	0.83	0.83	0.91	0.91	0.95	1.59	1.21
Var1	L417V/A431L/A539R	0.69	1.06	N/D	1.12	N/D	1.16	1.26	1.18	1.40
Var2	L417V/A431L/A539R/I43Q	0.69	1.13	N/D	1.15	N/D	1.18	1.40	1.12	1.53
Var3	L417V/A431L/A539R/N61I	0.43	0.91	N/D	0.99	N/D	1.06	1.29	1.14	1.38
Var4	L417V/A431L/A539R/A535R	0.64	0.97	N/D	1.03	N/D	1.07	1.22	1.49	1.22
Var5	L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I	0.38	0.86	N/D	0.94	N/D	1.04	1.25	1.07	1.24
Var6	L417V/A431L/A539R/N61I/A535R	0.32	0.72	N/D	0.82	N/D	0.90	1.16	1.86	1.15
Var7	L417V/A431L/A539R/A535R/I43Q	0.65	0.99	N/D	1.03	N/D	1.10	1.22	1.29	1.26
Var8	L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I/A535R	0.32	0.73	N/D	0.80	N/D	0.94	1.11	1.08	1.12
Var9	L417V/A431L/A539R/I43Q/N61I/A535R/T430A	0.25	0.70	N/D	0.71	N/D	0.84	0.99	1.13	1.14
Var10	L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/I43Q	0.53	0.98	N/D	0.97	N/D	1.06	1.08	1.86	1.63
Var11	L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/N61I	0.38	0.80	N/D	0.86	N/D	0.95	1.16	1.51	1.15
Var12	L417V/T430A/A431L/Q511H/A535R/A539R/N563I/I43Q/N61I	0.31	0.78	N/D	0.84	N/D	0.94	1.17	1.81	1.30
Var13	L417V/A431L/A539R/I43R	0.67	1.08	N/D	1.12	N/D	1.18	1.32	1.83	1.55
Var14	L417V/A431L/A539R/I43R/N61I	0.43	0.99	N/D	1.01	N/D	1.09	1.24	1.70	1.48
Var15	L417V/A431L/A539R/I43R/N61I/A535R/T430A	0.39	0.94	N/D	0.96	N/D	1.09	1.34	1.96	1.59

[0854]

变体	突变	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	CS	Ts	Liq.
Var16	L417R/A431L/A539R	0.70	1.01	N/D	1.03	N/D	1.11	1.23	1.33	1.31
Var17	L417G/A431L/A539R	0.70	1.15	N/D	1.14	N/D	1.19	1.20	1.23	1.42
Var18	G73F/E503V/N563K/L417R/A539R	0.93	1.14	N/D	1.12	N/D	1.11	1.08	2.71	0.98
Var19	G73F/E503V/N563K/I43R/L417R/A539R	1.24	1.47	N/D	1.43	N/D	1.33	1.38	2.58	1.21
Var20	G73F/E503V/N563K/I43R/Q511H	0.94	0.95	N/D	0.95	N/D	0.97	1.02	2.47	0.84

[0855] 实施例9:TrGA和AaGA之间的同源性

[0856] 将W02009/067218 (Danisco US Inc., Genencor Division) 第89-93页的实施例11

(在此通过引用而并入)中所鉴别的TrGA的晶体结构重迭在之前所鉴定的泡盛曲霉GA(AaGA)的晶体结构上。AaGA晶体结构是从蛋白质数据库(PDB)中获得的并且结晶的AaGA的形式是仅含有催化结构域的形式(PDB输入号:1GLM)。含有所有三个完整区域的TrGA的结构在此被测定至1.8埃的分辨率(见W02009/067218(Danisco US Inc., Genencor Division)中94-216页的表20(在此通过引用而并入)和W02009/067218(Danisco US Inc., Genencor Division)第89-93页的实施例11(在此通过引用而并入))。使用坐标(见W02009/067218(Danisco US Inc., Genencor Division)中94-216页的表20(在此通过引用而并入)),将所述结构与之前所确定(Aleshin et al., J. Mol. Biol. 238:575-591 (1994))的泡盛曲霉菌株X100的催化结构域的坐标进行比对。如图6-7中所见,所述催化结构域的结构非常紧密地重合并允许基于结构重迭而鉴别出等同的残基。

[0857] 基于这种分析,鉴别出了TrGA中可被突变并产生增加的热稳定性和/或比活性的位点。这些位点包括活性位点处的108、124、175和316。还鉴别出了特定的成对变体Y47W/Y315F和Y47F/Y315W。所鉴别出的其它位点是I43、D44、P45、D46、R122、R125、V181、E242、Y310、D313、V314、N317、R408和N409。因为高的结构同源性,所期待的是在TrGA的位点处发现的有益变体在泡盛曲霉和其它同源性葡糖淀粉酶中将具有相似的影响。

[0858] TrGA连接子(残基454-490)被定义为跨越两个二硫桥之间的区域的区段,一个在残基222和453之间,一个在残基491和587之间。所述连接子的残基中的九个是脯氨酸。从晶体结构来看,所述连接子以宽的弧形从分子后方延伸,在接近底物结合表面的表面上的赖氨酸477残基之后继以突然的转动。连接子作为随机卷曲延伸,其通过Tyr452、Pro465、Phe470、Gln474、Pro475、Lys477、Val480以及Tyr486侧链之间的相互作用而被锚定至催化结构域表面上的区域。

[0859] 淀粉结合结构域由两个扭曲的 β 折叠的 β -夹心构成,所述 β 折叠在一端由Cys 491和Cys 587之间的二硫桥系连,而在另一端具有一系列通过长环连接的、包含淀粉结合位点的环。TrGA SBD的结构与通过NMR确定的AnGA SBD的平均化结构(Sorimachi et al., Structure 5:647-661 (1997))以及蜡状芽孢杆菌 β 淀粉酶的SBD结构(Mikami, B. et al., Biochemistry 38:7050-61 (1999))十分相似。图9显示了AnGA与包括SBD的TrGA晶体结构的比对。当以这些SBD中的一个或两个进行比对时,一个环突出为高度可变的,相应于残基537-543(在黑曲霉中所述环是554-560,而在蜡状芽孢杆菌中所述环是462-465)。在 β -环糊精的NMR结构中,淀粉类似物与AnGA的SBD相复合(Sorimachi et al. (1997) 见上),在与环糊精结合后,所述环在实质上移动。因此,此环被称为“柔性环”。此柔性环形成了“结合位点2”的一部分(关于TrGA中的此结合位点,见图9)。在AnGA中还鉴别了第二个结合位点(结合位点1),其是与其它碳水化合物结合蛋白享有相似性的主要位点。总体而言,这些SBD的结合位点1中残基甚至侧构象的保守性非常高。附图显示了SBD与催化结构域之间在用于结合淀粉的这些结合位点中的相互作用。

[0860] 总之,对于连接子和SBD与催化结构域之间的相互作用,似乎存在共有的模式。所述相互作用是以下列形式:锚定与相邻结构域的表面区域相互作用的侧链。一般地,锚定残基被发现在连接子区段上。在CD和SBD间相互作用的情形中,锚定残基可由任一结构域贡献,如下列中的情形:来自CD的残基Ile 43和Phe 29或来自SBD的残基592。

[0861] 实施例10:阿卡波糖与TrGA结合的模式

[0862] 确定了与抑制剂阿卡波糖相复合的TrGA的晶体结构。通过使预生长的天然TrGA晶体在阿卡波糖中浸泡而获得了所述复合物的晶体。浸泡3天之后,将晶体装在密封的玻璃毛细管中并用Rigaku Raxis IV++图像平板检测仪以**2.0 Å**的分辨率收集x射线衍射。将坐标拟合为不同的电子密度图。将此模型精细化至R因子为0.154,对于总共41276个反射(代表在27至**2.0 Å**分辨率之间所收集的所有数据)具有0.201的R-自由。所产生的精细化结构的模型显示在图9中。

[0863] 基于SBD的存在对于不可溶淀粉的水解有影响的知识,由此SBD与更大的淀粉分子之间应当有相互作用。因此,将TrGA的结构与下列的已知结构进行比较:(1)结合了阿卡波糖的AaGA的CD和(2)与β-环糊精复合的来自黑曲霉的SBD。这显示出,在结合位点2结合的β-环糊精接近底物的位置,如结合至泡盛曲霉CD的阿卡波糖的位置所显示的。因此,将来自AaGA结构模型的阿卡波糖的坐标(pdb输入1GAI,Aleshin,等人1994见上)比对到TrGA活性位点中。此外,比对了与环糊精结合的AnGA SBD结构(pdb输入1AC0:Sorimachi等人1997,见上)。由此,制成了结合TrGA的阿卡波糖的模型(见图9)。此模型显示出,SBD将使TrGA CD定位在接近被破坏的淀粉处,并防止水解后将产物从活性位点释放时酶从底物散开。TrGA的SBD将沿着位点1结合淀粉,并且其优选如下定位:其中被破坏的片段将结合松散末端中的位点2,所述松散末端指向催化位点(催化结构域的活性侧)内。此模型显示出SBD和连接子的结构如何促成所提出的酶功能。参与CD、连接子和SBD之间的特异性相互作用的氨基酸侧链对于瑞氏木霉GA是特定的,然而,在其它葡糖淀粉酶中,互补的序列变化将使得能够产生类似的总体相互作用和结构域并列。

[0864] 基于此模型,鉴别了TrGA SBD中可进行取代以产生增加的稳定性和/或比活性的位点。因此,为结合位点1的一部分的两个环很可能是用于改变以增加或减少与更大的淀粉分子的结合的候选者。这些是环1(aa560-570)和环2(aa 523-527)。因为氨基酸525和572处的两个Trp(色氨酸)残基有可能直接参与淀粉结合,改变它们将不是有益的。然而,位于下面的残基(包括516-518),以及位于下面的残基558-562将是有益的。残基570-578的环也是用于改变的良好候选者。残基534-541是结合位点2中与CD上的催化位点相互作用的一部分。因此,这些可能是用于可增加或减少比活性的改变的良好候选者。

[0865] 由于TrGA SBD的高的结构同源性,预期的是在瑞氏木霉GA的位点处发现的有益变体将在泡盛曲霉和其它同源性葡糖淀粉酶中有相似的影响。因此,TrGA SBD的结构为工程化这种酶和相关的酶而用于与亲本葡糖淀粉酶相比的改变的特性提供了基础。这些改变的特性对于基于淀粉原料的燃料产生中的过程可能是有利的。

[0866] 序列

[0867] SEQ ID NO:1:瑞氏木霉葡糖淀粉酶,全长;含有信号肽

[0868] <210>1

[0869] <211>632

[0870] <212>PRT

[0871] <213>瑞氏木霉

[0872] <400>1

[0873] Met His Val Leu Ser Thr Ala Val Leu Leu Gly Ser Val Ala Val Gln

[0874] 1 5 10 15

[0875]	Lys	Val	Leu	Gly	Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Asp	Val	Thr	Lys
[0876]				20					25					30		
[0877]	Arg	Ser	Val	Asp	Asp	Phe	Ile	Ser	Thr	Glu	Thr	Pro	Ile	Ala	Leu	Asn
[0878]			35					40					45			
[0879]	Asn	Leu	Leu	Cys	Asn	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Cys	Arg	Ala	Phe	Gly	Thr
[0880]		50					55					60				
[0881]	Ser	Ala	Gly	Ala	Val	Ile	Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Ile	Asp	Pro	Asp	Tyr
[0882]	65					70					75				80	
[0883]	Tyr	Tyr	Met	Trp	Thr	Arg	Asp	Ser	Ala	Leu	Val	Phe	Lys	Asn	Leu	Ile
[0884]					85					90					95	
[0885]	Asp	Arg	Phe	Thr	Glu	Thr	Tyr	Asp	Ala	Gly	Leu	Gln	Arg	Arg	Ile	Glu
[0886]				100					105					110		
[0887]	Gln	Tyr	Ile	Thr	Ala	Gln	Val	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser
[0888]			115					120						125		
[0889]	Gly	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Phe	Glu	Leu
[0890]		130					135					140				
[0891]	Thr	Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Gly	Asn	Trp	Gly	Arg	Pro	Gln	Arg	Asp	Gly
[0892]	145					150					155				160	
[0893]	Pro	Ala	Leu	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Ile	Gly	Tyr	Ser	Lys	Trp	Leu	Ile
[0894]				165						170					175	
[0895]	Asn	Asn	Asn	Tyr	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asn	Val	Ile	Trp	Pro	Ile	Val
[0896]				180						185					190	
[0897]	Arg	Asn	Asp	Leu	Asn	Tyr	Val	Ala	Gln	Tyr	Trp	Asn	Gln	Thr	Gly	Phe
[0898]			195						200					205		
[0899]	Asp	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Val	Ala	Asn
[0900]		210						215					220			
[0901]	Gln	His	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly
[0902]	225					230					235				240	
[0903]	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Val	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Cys	Phe
[0904]				245						250					255	
[0905]	Leu	Gln	Arg	Phe	Trp	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Asn	Ile
[0906]				260					265					270		
[0907]	Asn	Thr	Asn	Glu	Gly	Arg	Thr	Gly	Lys	Asp	Val	Asn	Ser	Val	Leu	Thr
[0908]			275						280					285		
[0909]	Ser	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Cys	Asp	Ala	Gly	Thr	Phe
[0910]		290						295					300			
[0911]	Gln	Pro	Cys	Ser	Asp	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Val	Val	Asp
[0912]	305					310					315				320	
[0913]	Ser	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Lys	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Ala

[0914]		325		330		335
[0915]	Ala Val Ala Ile Gly Arg Tyr Ala Glu Asp Val Tyr Tyr Asn Gly Asn					
[0916]		340		345		350
[0917]	Pro Trp Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala					
[0918]		355		360		365
[0919]	Ile Tyr Val Trp Lys Lys Thr Gly Ser Ile Thr Val Thr Ala Thr Ser					
[0920]		370		375		380
[0921]	Leu Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Pro Gly Val Thr Ala Gly Thr Tyr					
[0922]	385		390		395	400
[0923]	Ser Ser Ser Ser Ser Thr Phe Thr Asn Ile Ile Asn Ala Val Ser Thr					
[0924]		405		410		415
[0925]	Tyr Ala Asp Gly Phe Leu Ser Glu Ala Ala Lys Tyr Val Pro Ala Asp					
[0926]		420		425		430
[0927]	Gly Ser Leu Ala Glu Gln Phe Asp Arg Asn Ser Gly Thr Pro Leu Ser					
[0928]		435		440		445
[0929]	Ala Leu His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Ala					
[0930]		450		455		460
[0931]	Arg Arg Ala Gly Ile Val Pro Pro Ser Trp Ala Asn Ser Ser Ala Ser					
[0932]	465		470		475	480
[0933]	Thr Ile Pro Ser Thr Cys Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser					
[0934]		485		490		495
[0935]	Arg Pro Thr Ala Thr Ser Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly					
[0936]		500		505		510
[0937]	Val Pro Ser Gly Thr Pro Tyr Thr Pro Leu Pro Cys Ala Thr Pro Thr					
[0938]		515		520		525
[0939]	Ser Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser Thr Gln Phe Gly Gln					
[0940]		530		535		540
[0941]	Thr Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu Gly Asn Trp Ser Thr					
[0942]	545		550		555	560
[0943]	Ser Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr Ala Asp Asn His Pro					
[0944]		565		570		575
[0945]	Leu Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly Asp Val Val Glu Tyr					
[0946]		580		585		590
[0947]	Lys Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp					
[0948]		595		600		605
[0949]	Pro Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala Cys Val Thr Gln Val					
[0950]		610		615		620
[0951]	Val Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser					
[0952]	625		630			

[0953] SEQ ID NO:2:瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶,成熟蛋白;没有信号肽
 [0954] <210>2
 [0955] <211>599
 [0956] <212>PRT
 [0957] <213>瑞氏木霉
 [0958] <400>2
 [0959] Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn
 [0960] 1 5 10 15
 [0961] Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser
 [0962] 20 25 30
 [0963] Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Asp Pro Asp Tyr Tyr
 [0964] 35 40 45
 [0965] Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Leu Ile Asp
 [0966] 50 55 60
 [0967] Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln
 [0968] 65 70 75 80
 [0969] Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser Gly
 [0970] 85 90 95
 [0971] Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr
 [0972] 100 105 110
 [0973] Leu Lys Pro Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro
 [0974] 115 120 125
 [0975] Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn
 [0976] 130 135 140
 [0977] Asn Asn Tyr Gln Ser Thr Val Ser Asn Val Ile Trp Pro Ile Val Arg
 [0978] 145 150 155 160
 [0979] Asn Asp Leu Asn Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe Asp
 [0980] 165 170 175
 [0981] Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Asn Gln
 [0982] 180 185 190
 [0983] His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ala Thr Leu Ala Ala Thr Leu Gly Gln
 [0984] 195 200 205
 [0985] Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Ser Val Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu
 [0986] 210 215 220
 [0987] Gln Arg Phe Trp Val Ser Ser Gly Gly Tyr Val Asp Ser Asn Ile Asn
 [0988] 225 230 235 240
 [0989] Thr Asn Glu Gly Arg Thr Gly Lys Asp Val Asn Ser Val Leu Thr Ser
 [0990] 245 250 255
 [0991] Ile His Thr Phe Asp Pro Asn Leu Gly Cys Asp Ala Gly Thr Phe Gln

[0992]	260	265	270
[0993]	Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Val Val Asp Ser		
[0994]	275	280	285
[0995]	Phe Arg Ser Ile Tyr Gly Val Asn Lys Gly Ile Pro Ala Gly Ala Ala		
[0996]	290	295	300
[0997]	Val Ala Ile Gly Arg Tyr Ala Glu Asp Val Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro		
[0998]	305	310	315
[0999]	Trp Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Ile		
[1000]	325	330	335
[1001]	Tyr Val Trp Lys Lys Thr Gly Ser Ile Thr Val Thr Ala Thr Ser Leu		
[1002]	340	345	350
[1003]	Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Pro Gly Val Thr Ala Gly Thr Tyr Ser		
[1004]	355	360	365
[1005]	Ser Ser Ser Ser Thr Phe Thr Asn Ile Ile Asn Ala Val Ser Thr Tyr		
[1006]	370	375	380
[1007]	Ala Asp Gly Phe Leu Ser Glu Ala Ala Lys Tyr Val Pro Ala Asp Gly		
[1008]	385	390	395
[1009]	Ser Leu Ala Glu Gln Phe Asp Arg Asn Ser Gly Thr Pro Leu Ser Ala		
[1010]	405	410	415
[1011]	Leu His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Ala Arg		
[1012]	420	425	430
[1013]	Arg Ala Gly Ile Val Pro Pro Ser Trp Ala Asn Ser Ser Ala Ser Thr		
[1014]	435	440	445
[1015]	Ile Pro Ser Thr Cys Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser Arg		
[1016]	450	455	460
[1017]	Pro Thr Ala Thr Ser Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly Val		
[1018]	465	470	475
[1019]	Pro Ser Gly Thr Pro Tyr Thr Pro Leu Pro Cys Ala Thr Pro Thr Ser		
[1020]	485	490	495
[1021]	Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser Thr Gln Phe Gly Gln Thr		
[1022]	500	505	510
[1023]	Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu Gly Asn Trp Ser Thr Ser		
[1024]	515	520	525
[1025]	Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr Ala Asp Asn His Pro Leu		
[1026]	530	535	540
[1027]	Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly Asp Val Val Glu Tyr Lys		
[1028]	545	550	555
[1029]	Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro		
[1030]	565	570	575

[1031] Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala Cys Val Thr Gln Val Val
 [1032] 580 585 590
 [1033] Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser
 [1034] 595
 [1035] SEQ ID NO:3:瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶催化结构域,成熟TrGA的1-453,CD
 [1036] <210>3
 [1037] <211>453
 [1038] <212>PRT
 [1039] <213>瑞氏木霉
 [1040] <400>3
 [1041] Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn
 [1042] 1 5 10 15
 [1043] Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser
 [1044] 20 25 30
 [1045] Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Asp Pro Asp Tyr Tyr
 [1046] 35 40 45
 [1047] Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Leu Ile Asp
 [1048] 50 55 60
 [1049] Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln
 [1050] 65 70 75 80
 [1051] Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser Gly
 [1052] 85 90 95
 [1053] Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr
 [1054] 100 105 110
 [1055] Leu Lys Pro Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro
 [1056] 115 120 125
 [1057] Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn
 [1058] 130 135 140
 [1059] Asn Asn Tyr Gln Ser Thr Val Ser Asn Val Ile Trp Pro Ile Val Arg
 [1060] 145 150 155 160
 [1061] Asn Asp Leu Asn Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe Asp
 [1062] 165 170 175
 [1063] Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Asn Gln
 [1064] 180 185 190
 [1065] His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ala Thr Leu Ala Ala Thr Leu Gly Gln
 [1066] 195 200 205
 [1067] Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Ser Val Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu
 [1068] 210 215 220
 [1069] Gln Arg Phe Trp Val Ser Ser Gly Gly Tyr Val Asp Ser Asn Ile Asn

[1070]	225	230	235	240
[1071]	Thr Asn Glu Gly Arg Thr Gly Lys Asp Val Asn Ser Val Leu Thr Ser			
[1072]	245	250	255	
[1073]	Ile His Thr Phe Asp Pro Asn Leu Gly Cys Asp Ala Gly Thr Phe Gln			
[1074]	260	265	270	
[1075]	Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Val Val Asp Ser			
[1076]	275	280	285	
[1077]	Phe Arg Ser Ile Tyr Gly Val Asn Lys Gly Ile Pro Ala Gly Ala Ala			
[1078]	290	295	300	
[1079]	Val Ala Ile Gly Arg Tyr Ala Glu Asp Val Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro			
[1080]	305	310	315	320
[1081]	Trp Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Ile			
[1082]	325	330	335	
[1083]	Tyr Val Trp Lys Lys Thr Gly Ser Ile Thr Val Thr Ala Thr Ser Leu			
[1084]	340	345	350	
[1085]	Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Pro Gly Val Thr Ala Gly Thr Tyr Ser			
[1086]	355	360	365	
[1087]	Ser Ser Ser Ser Thr Phe Thr Asn Ile Ile Asn Ala Val Ser Thr Tyr			
[1088]	370	375	380	
[1089]	Ala Asp Gly Phe Leu Ser Glu Ala Ala Lys Tyr Val Pro Ala Asp Gly			
[1090]	385	390	395	400
[1091]	Ser Leu Ala Glu Gln Phe Asp Arg Asn Ser Gly Thr Pro Leu Ser Ala			
[1092]	405	410	415	
[1093]	Leu His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Ala Arg			
[1094]	420	425	430	
[1095]	Arg Ala Gly Ile Val Pro Pro Ser Trp Ala Asn Ser Ser Ala Ser Thr			
[1096]	435	440	445	
[1097]	Ile Pro Ser Thr Cys			
[1098]	450			
[1099]	SEQ ID NO:4:瑞氏木霉葡萄糖淀粉酶cDNA			
[1100]	<210>4			
[1101]	<211>1899			
[1102]	<212>DNA			
[1103]	<213>瑞氏木霉			
[1104]	<400>4			
[1105]	atgcacgtcc tgtcgactgc ggtgctgctc ggtccggttg ccgttcaaaa ggtcctggga	60		
[1106]	agaccaggat caagcgggtct gtccgacgtc accaagaggt ctgttgacga cttcatcagc	120		
[1107]	accgagacgc ctattgcact gaacaatctt ctttgcaatg ttggtcctga tggatgcctt	180		
[1108]	gcattcggca catcagctgg tgcggtgatt gcatctccca gcacaattga cccggactac	240		

[1109] tattacatgt ggacgcgaga tagcgctctt gtcttcaaga acctcatcga ccgcttcacc 300
 [1110] gaaacgtacg atgcgggcct gcagcgccgc atcgagcagt acattactgc ccaggtcact 360
 [1111] ctccaggggcc tctctaacc ctcgggctcc ctgcgggacg gctctggtct cggcgagccc 420
 [1112] aagtttgagt tgaccctgaa gcctttcacc ggcaactggg gtcgaccgca gcgggatggc 480
 [1113] ccagctctgc gagccattgc cttgattgga tactcaaagt ggctcatcaa caacaactat 540
 [1114] cagtcgactg tgtccaacgt catctggcct attgtgcgca acgacctcaa ctatgttgcc 600
 [1115] cagtactgga accaaaccgg ctttgacctc tgggaagaag tcaatgggag ctctattctt 660
 [1116] actgttgcca accagcaccg agcacttgtc gagggcgcca ctcttgctgc cactcttggc 720
 [1117] cagtcgggaa gcgcttattc atctgttgct cccaggttt tgtgctttct ccaacgattc 780
 [1118] tgggtgtcgt ctgggtgata cgtcgactcc aacatcaaca ccaacgaggg caggactggc 840
 [1119] aaggatgtca actccgtcct gacttccatc cacaccttcg atcccaacct tggtgtgac 900
 [1120] gcaggcacct tccagccatg cagtgcacaa gcgctctcca acctcaaggt tgttgctgac 960
 [1121] tcttccgct ccatctacgg cgtgaacaag ggcatcctg ccggtgctgc cgtcgccatt 1020
 [1122] ggccggtatg cagaggatgt gtactacaac ggcaacctt ggtatcttgc tacatttgct 1080
 [1123] gctgccgagc agctgtacga tgccatctac gtctggaaga agacgggctc catcacggtg 1140
 [1124] accgccacct ccttgccctt ctccaggag cttgttctg gcgtgacggc cgggacctac 1200
 [1125] tccagcagct ctccgacctt taccaacatc atcaacgccg tctcgacata cgccgatggc 1260
 [1126] ttctcagcg aggtcgccaa gtacgtcccc gccgacggtt cgctggccga gcagtttgac 1320
 [1127] cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgctt cactgacgt ggctgtaacg ctcttcttg 1380
 [1128] acagccacgg cccgtcgggc tggcatcgtg cccctcgt ggcccaacag cagcgctagc 1440
 [1129] acgateccct cgacgtgctc cggecgctc gtggtcggat cctactcgcg tcccaccg 1500
 [1130] acgtcattcc ctccgtgca gacgccaag cctggcgtgc ctccgggtac tccctacag 1560
 [1131] cccctgcct gcgcgacccc aacctccgtg gccgtcacct tccacgagct cgtgtcgaca 1620
 [1132] cagtttgcc agacgggtcaa ggtggcgggc aacgccgagg cctgggcaa ctggagcacg 1680
 [1133] agcgccgccc tggctctgga cgccgtcaac tatgccgata accacccct gtggattggg 1740
 [1134] acggtcaacc tcgaggctgg agacgtcgtg gactacaagt acatcaatgt gggccaagat 1800
 [1135] ggctccgtga cctgggagag tgateccaac cacacttaca cggttcctgc ggtggcttgt 1860
 [1136] gtgacgcagg ttgtcaagga ggacacctgg cagtcgtaa 1899
 [1137] SEQ ID NO:5:泡盛曲霉GA (AaGA) ;CD
 [1138] <210>5
 [1139] <211>448
 [1140] <212>PRT
 [1141] <213>泡盛曲霉
 [1142] <400>5
 [1143] Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr
 [1144] 1 5 10 15
 [1145] Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala
 [1146] 20 25 30
 [1147] Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr
 [1148] 35 40 45

[1149]	Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Gly Leu Val Ile Lys Thr Leu Val
[1150]	50 55 60
[1151]	Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr Asp Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn
[1152]	65 70 75 80
[1153]	Tyr Ile Ser Ser Gln Ala Ile Val Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly
[1154]	85 90 95
[1155]	Asp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu
[1156]	100 105 110
[1157]	Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala
[1158]	115 120 125
[1159]	Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Gly Phe Arg Gln Trp Leu Leu Asp Asn
[1160]	130 135 140
[1161]	Gly Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Glu Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn
[1162]	145 150 155 160
[1163]	Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu
[1164]	165 170 175
[1165]	Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His
[1166]	180 185 190
[1167]	Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser
[1168]	195 200 205
[1169]	Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln Ala Pro Gln Ile Leu Cys Tyr Leu Gln
[1170]	210 215 220
[1171]	Ser Phe Trp Thr Gly Glu Tyr Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg
[1172]	225 230 235 240
[1173]	Ser Gly Lys Asp Thr Asn Thr Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp
[1174]	245 250 255
[1175]	Pro Glu Ala Gly Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg
[1176]	260 265 270
[1177]	Ala Leu Ala Asn His Lys Glu Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr
[1178]	275 280 285
[1179]	Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg
[1180]	290 295 300
[1181]	Tyr Pro Lys Asp Ser Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr
[1182]	305 310 315 320
[1183]	Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys
[1184]	325 330 335
[1185]	Gln Gly Ser Leu Glu Ile Thr Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Gln Ala
[1186]	340 345 350
[1187]	Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr

[1188]	355	360	365
[1189]	Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val		
[1190]	370	375	380
[1191]	Ser Ile Val Glu Thr His Ala Ala Ser Asn Gly Ser Leu Ser Glu Gln		
[1192]	385	390	395
[1193]	Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp		
[1194]	405	410	415
[1195]	Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Met		
[1196]	420	425	430
[1197]	Pro Pro Ser Trp Gly Glu Thr Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys		
[1198]	435	440	445
[1199]	SEQ ID NO:6:黑曲霉(AnGA),CD		
[1200]	<210>6		
[1201]	<211>449		
[1202]	<212>PRT		
[1203]	<213>黑曲霉		
[1204]	<400>6		
[1205]	Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr		
[1206]	1	5	10
[1207]	Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala		
[1208]	20	25	30
[1209]	Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr		
[1210]	35	40	45
[1211]	Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val		
[1212]	50	55	60
[1213]	Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn		
[1214]	65	70	75
[1215]	Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly		
[1216]	85	90	95
[1217]	Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp		
[1218]	100	105	110
[1219]	Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro		
[1220]	115	120	125
[1221]	Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp		
[1222]	130	135	140
[1223]	Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg		
[1224]	145	150	155
[1225]	Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp		
[1226]	165	170	175

[1227]	Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln
[1228]	180 185 190
[1229]	His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser
[1230]	195 200 205
[1231]	Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu
[1232]	210 215 220
[1233]	Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser
[1234]	225 230 235 240
[1235]	Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe
[1236]	245 250 255
[1237]	Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro
[1238]	260 265 270
[1239]	Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile
[1240]	275 280 285
[1241]	Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly
[1242]	290 295 300
[1243]	Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys
[1244]	305 310 315 320
[1245]	Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp
[1246]	325 330 335
[1247]	Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys
[1248]	340 345 350
[1249]	Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser
[1250]	355 360 365
[1251]	Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe
[1252]	370 375 380
[1253]	Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu
[1254]	385 390 395 400
[1255]	Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr
[1256]	405 410 415
[1257]	Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val
[1258]	420 425 430
[1259]	Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr
[1260]	435 440 445
[1261]	Cys
[1262]	SEQ ID NO:7:米曲霉(AoGA),CD
[1263]	<210>7
[1264]	<211>450
[1265]	<212>PRT

[1266] <213>米曲霉
 [1267] <400>7
 [1268] Gln Ser Asp Leu Asn Ala Phe Ile Glu Ala Gln Thr Pro Ile Ala Lys
 [1269] 1 5 10 15
 [1270] Gln Gly Tyr Leu Asn Asn Ile Gly Ala Asp Gly Lys Leu Val Glu Gly
 [1271] 20 25 30
 [1272] Ala Ala Ala Gly Ile Val Tyr Ala Ser Pro Ser Lys Ser Asn Pro Asp
 [1273] 35 40 45
 [1274] Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ala Gly Leu Thr Met Glu Glu Tyr
 [1275] 50 55 60
 [1276] Ile Glu Gln Phe Ile Gly Gly Asp Ala Thr Leu Glu Ser Thr Ile Gln
 [1277] 65 70 75 80
 [1278] Asn Tyr Val Asp Ser Gln Ala Asn Glu Gln Ala Val Ser Asn Pro Ser
 [1279] 85 90 95
 [1280] Gly Gly Leu Ser Asp Gly Ser Gly Leu Ala Glu Pro Lys Phe Tyr Tyr
 [1281] 100 105 110
 [1282] Asn Ile Ser Gln Phe Thr Asp Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly
 [1283] 115 120 125
 [1284] Pro Ala Leu Arg Ala Ser Ala Leu Ile Ala Tyr Gly Asn Ser Leu Ile
 [1285] 130 135 140
 [1286] Ser Ser Asp Lys Gln Ser Val Val Lys Ala Asn Ile Trp Pro Ile Tyr
 [1287] 145 150 155 160
 [1288] Gln Asn Asp Leu Ser Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe
 [1289] 165 170 175
 [1290] Asp Leu Trp Glu Glu Val Gln Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Val
 [1291] 180 185 190
 [1292] Gln His Lys Ala Leu Val Glu Gly Asp Ala Phe Ala Lys Ala Leu Gly
 [1293] 195 200 205
 [1294] Glu Glu Cys Gln Ala Cys Ser Val Ala Pro Gln Ile Leu Cys His Leu
 [1295] 210 215 220
 [1296] Gln Asp Phe Trp Asn Gly Ser Ala Val Leu Ser Asn Leu Pro Thr Asn
 [1297] 225 230 235 240
 [1298] Gly Arg Ser Gly Leu Asp Thr Asn Ser Leu Leu Gly Ser Ile His Thr
 [1299] 245 250 255
 [1300] Phe Asp Pro Ala Ala Ala Cys Asp Asp Thr Thr Phe Gln Pro Cys Ser
 [1301] 260 265 270
 [1302] Ser Arg Ala Leu Ser Asn His Lys Leu Val Val Asp Ser Phe Arg Ser
 [1303] 275 280 285
 [1304] Val Tyr Gly Ile Asn Asn Gly Arg Gly Ala Gly Lys Ala Ala Ala Val

[1305]	290	295	300
[1306]	Gly Pro Tyr Ala Glu Asp Thr Tyr Gln Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu		
[1307]	305	310	315
[1308]	Thr Thr Leu Val Ala Ala Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp		
[1309]	325	330	335
[1310]	Asp Lys Gln Gly Gln Val Asn Val Thr Glu Thr Ser Leu Pro Phe Phe		
[1311]	340	345	350
[1312]	Lys Asp Leu Ser Ser Asn Val Thr Thr Gly Ser Tyr Ala Lys Ser Ser		
[1313]	355	360	365
[1314]	Ser Ala Tyr Glu Ser Leu Thr Ser Ala Val Lys Thr Tyr Ala Asp Gly		
[1315]	370	375	380
[1316]	Phe Ile Ser Val Val Gln Glu Tyr Thr Pro Asp Gly Gly Ala Leu Ala		
[1317]	385	390	395
[1318]	Glu Gln Tyr Ser Arg Asp Gln Gly Thr Pro Val Ser Ala Ser Asp Leu		
[1319]	405	410	415
[1320]	Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Phe Leu Ser Ala Val Gly Arg Arg Asn Gly		
[1321]	420	425	430
[1322]	Thr Val Pro Ala Ser Trp Gly Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val Pro Ser		
[1323]	435	440	445
[1324]	Gln Cys		
[1325]	450		
[1326]	SEQ ID NO:8:灰腐质霉葡萄糖淀粉酶(HgGA);CD		
[1327]	<210>8		
[1328]	<211>441		
[1329]	<212>PRT		
[1330]	<213>灰腐质霉		
[1331]	<400>8		
[1332]	Ala Ala Val Asp Thr Phe Ile Asn Thr Glu Lys Pro Ile Ala Trp Asn		
[1333]	1	5	10
[1334]	Lys Leu Leu Ala Asn Ile Gly Pro Asn Gly Lys Ala Ala Pro Gly Ala		
[1335]	20	25	30
[1336]	Ala Ala Gly Val Val Ile Ala Ser Pro Ser Arg Thr Asp Pro Pro Tyr		
[1337]	35	40	45
[1338]	Phe Phe Thr Trp Thr Pro Asp Ala Ala Leu Val Leu Thr Gly Ile Ile		
[1339]	50	55	60
[1340]	Glu Ser Leu Gly His Asn Tyr Asn Thr Thr Leu Gln Gln Val Ser Asn		
[1341]	65	70	75
[1342]	Pro Ser Gly Thr Phe Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Ala Lys Phe		
[1343]	85	90	95

[1344]	Asn Val Asp Leu Thr Ala Phe Thr Gly Glu Trp Gly Arg Pro Gln Arg
[1345]	100 105 110
[1346]	Asp Gly Pro Pro Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gln Tyr Ala Lys Trp
[1347]	115 120 125
[1348]	Leu Ile Ala Asn Gly Tyr Lys Ser Thr Ala Lys Ser Val Val Trp Pro
[1349]	130 135 140
[1350]	Val Val Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Thr Ala Gln Tyr Trp Asn Glu Thr
[1351]	145 150 155 160
[1352]	Gly Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Pro Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile
[1353]	165 170 175
[1354]	Ala Ser Ser His Arg Ala Leu Thr Glu Gly Ala Tyr Leu Ala Ala Gln
[1355]	180 185 190
[1356]	Leu Asp Thr Glu Cys Pro Pro Cys Thr Thr Val Ala Pro Gln Val Leu
[1357]	195 200 205
[1358]	Cys Phe Gln Gln Ala Phe Trp Asn Ser Lys Gly Asn Tyr Val Val Ser
[1359]	210 215 220
[1360]	Thr Ser Thr Ala Gly Glu Tyr Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Ser Ile
[1361]	225 230 235 240
[1362]	Leu Ala Ser Ile His Asn Phe Asp Pro Glu Ala Gly Cys Asp Asn Leu
[1363]	245 250 255
[1364]	Thr Phe Gln Pro Cys Ser Glu Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Ala Tyr
[1365]	260 265 270
[1366]	Val Asp Ser Phe Arg Asn Leu Tyr Ala Ile Asn Lys Gly Ile Ala Gln
[1367]	275 280 285
[1368]	Gly Lys Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Ser Glu Asp Val Tyr Tyr Asn
[1369]	290 295 300
[1370]	Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Ala Asn Phe Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr
[1371]	305 310 315 320
[1372]	Asp Ala Ile Tyr Val Trp Asn Lys Gln Gly Ser Ile Thr Val Thr Ser
[1373]	325 330 335
[1374]	Val Ser Leu Pro Phe Phe Arg Asp Leu Val Ser Ser Val Ser Thr Gly
[1375]	340 345 350
[1376]	Thr Tyr Ser Lys Ser Ser Ser Thr Phe Thr Asn Ile Val Asn Ala Val
[1377]	355 360 365
[1378]	Lys Ala Tyr Ala Asp Gly Phe Ile Glu Val Ala Ala Lys Tyr Thr Pro
[1379]	370 375 380
[1380]	Ser Asn Gly Ala Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Gly Lys Pro
[1381]	385 390 395 400
[1382]	Asp Ser Ala Ala Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ser Ala Phe Leu Ser Ala

[1383]	405	410	415
[1384]	Ile Asp Arg Arg Ala Gly Leu Val Pro Pro Ser Trp Arg Ala Ser Val		
[1385]	420	425	430
[1386]	Ala Lys Ser Gln Leu Pro Ser Thr Cys		
[1387]	435	440	
[1388]	SEQ ID NO:9:酒色肉座菌葡萄糖淀粉酶 (HvGA) ;CD		
[1389]	<210>9		
[1390]	<211>452		
[1391]	<212>PRT		
[1392]	<213>酒色肉座菌		
[1393]	<400>9		
[1394]	Ser Val Asp Asp Phe Ile Asn Thr Gln Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn		
[1395]	1	5	10
[1396]	Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser		
[1397]	20	25	30
[1398]	Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Thr Asp Pro Asp Tyr Tyr		
[1399]	35	40	45
[1400]	Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Ile Val Asp		
[1401]	50	55	60
[1402]	Arg Phe Thr Gln Gln Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln		
[1403]	65	70	75
[1404]	Tyr Ile Ser Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly		
[1405]	85	90	95
[1406]	Ser Leu Ser Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr		
[1407]	100	105	110
[1408]	Leu Ser Gln Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro		
[1409]	115	120	125
[1410]	Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn		
[1411]	130	135	140
[1412]	Asn Asn Tyr Gln Ser Thr Val Ser Asn Ile Ile Trp Pro Ile Val Arg		
[1413]	145	150	155
[1414]	Asn Asp Leu Asn Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe Asp		
[1415]	165	170	175
[1416]	Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Asn Gln		
[1417]	180	185	190
[1418]	His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ala Thr Leu Ala Ala Thr Leu Gly Gln		
[1419]	195	200	205
[1420]	Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Ser Val Ala Pro Gln Ile Leu Cys Phe Leu		
[1421]	210	215	220

[1422] Gln Arg Phe Trp Val Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Ser Asn Ile Asn Thr
 [1423] 225 230 235 240
 [1424] Asn Glu Gly Arg Thr Gly Lys Asp Ala Asn Ser Leu Leu Ala Ser Ile
 [1425] 245 250 255
 [1426] His Thr Phe Asp Pro Ser Leu Gly Cys Asp Ala Ser Thr Phe Gln Pro
 [1427] 260 265 270
 [1428] Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Val Val Asp Ser Phe
 [1429] 275 280 285
 [1430] Arg Ser Ile Tyr Gly Val Asn Lys Gly Ile Pro Ala Gly Ser Ala Val
 [1431] 290 295 300
 [1432] Ala Ile Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Phe Asn Gly Asn Pro Trp
 [1433] 305 310 315 320
 [1434] Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ser Val Tyr
 [1435] 325 330 335
 [1436] Val Trp Lys Lys Thr Gly Ser Ile Thr Val Thr Ser Thr Ser Ser Ala
 [1437] 340 345 350
 [1438] Phe Phe Gln Glu Leu Val Pro Gly Val Ala Ala Gly Thr Tyr Ser Ser
 [1439] 355 360 365
 [1440] Ser Gln Ser Thr Phe Thr Ser Ile Ile Asn Ala Ile Ser Thr Tyr Ala
 [1441] 370 375 380
 [1442] Asp Gly Phe Leu Ser Glu Ala Ala Lys Tyr Val Pro Ala Asp Gly Ser
 [1443] 385 390 395 400
 [1444] Leu Ala Glu Gln Phe Asp Arg Asn Thr Gly Thr Pro Leu Ser Ala Val
 [1445] 405 410 415
 [1446] His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Ala Ala Arg Arg
 [1447] 420 425 430
 [1448] Ala Gly Val Val Pro Pro Ser Trp Ala Ser Ser Gly Ala Asn Thr Val
 [1449] 435 440 445
 [1450] Pro Ser Ser Cys
 [1451] 450
 [1452] SEQ ID NO:10:TrGA,连接子区域
 [1453] <210>10
 [1454] <211>37
 [1455] <212>PRT
 [1456] <213>瑞氏木霉
 [1457] <400>10
 [1458] Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser Arg Pro Thr Ala Thr Ser
 [1459] 1 5 10 15
 [1460] Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly Val Pro Ser Gly Thr Pro

[1461]	20	25	30
[1462]	Tyr Thr Pro Leu Pro		
[1463]	35		
[1464]	SEQ ID NO:11:TrGA,SBD		
[1465]	<210>11		
[1466]	<211>109		
[1467]	<212>PRT		
[1468]	<213>瑞氏木霉		
[1469]	<400>11		
[1470]	Cys Ala Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser		
[1471]	1	5	10
[1472]	Thr Gln Phe Gly Gln Thr Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu		
[1473]	20	25	30
[1474]	Gly Asn Trp Ser Thr Ser Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr		
[1475]	35	40	45
[1476]	Ala Asp Asn His Pro Leu Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly		
[1477]	50	55	60
[1478]	Asp Val Val Glu Tyr Lys Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val		
[1479]	65	70	75
[1480]	Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala		
[1481]	85	90	95
[1482]	Cys Val Thr Gln Val Val Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser		
[1483]	100	105	
[1484]	SEQ ID NO:12 SVDDFI:TrGA成熟蛋白的起始		
[1485]	<210>12		
[1486]	<211>6		
[1487]	<212>PRT		
[1488]	<213>瑞氏木霉		
[1489]	<400>12		
[1490]	Ser Val Asp Asp Phe Ile		
[1491]	1	5	
[1492]	SEQ ID NO:384篮状菌属GA成熟蛋白		
[1493]	<210>384		
[1494]	<211>588		
[1495]	<212>PRT		
[1496]	<213>篮状菌属的种		
[1497]	<400>384		
[1498]	Gly Ser Leu Asp Ser Phe Leu Ala Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Gln		
[1499]	1	5	10

[1500]	Gly Val Leu Asn Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ala Asp Val Ala Gly Ala
[1501]	20 25 30
[1502]	Ser Ala Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Arg Ser Asp Pro Asp Tyr
[1503]	35 40 45
[1504]	Phe Tyr Ser Trp Thr Arg Asp Ala Ala Leu Thr Ala Lys Tyr Leu Val
[1505]	50 55 60
[1506]	Asp Ala Phe Ile Ala Gly Asn Lys Asp Leu Glu Gln Thr Ile Gln Glu
[1507]	65 70 75 80
[1508]	Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Gln Val Gln Thr Ile Ser Asn Pro Ser Gly
[1509]	85 90 95
[1510]	Asp Leu Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asn Glu
[1511]	100 105 110
[1512]	Thr Ala Phe Thr Gly Pro Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala
[1513]	115 120 125
[1514]	Leu Arg Ala Thr Ala Leu Ile Ala Tyr Ala Asn Tyr Leu Ile Asp Asn
[1515]	130 135 140
[1516]	Gly Gln Ala Ser Thr Ala Asp Glu Ile Ile Trp Pro Ile Val Gln Asn
[1517]	145 150 155 160
[1518]	Asp Leu Ser Tyr Val Thr Gln Tyr Trp Asn Ser Ser Thr Phe Asp Leu
[1519]	165 170 175
[1520]	Trp Glu Glu Val Glu Gly Ser Ser Phe Phe Thr Thr Ala Val Gln His
[1521]	180 185 190
[1522]	Arg Ala Leu Val Glu Gly Asn Ala Leu Ala Thr Arg Leu Asn His Thr
[1523]	195 200 205
[1524]	Cys Pro Asn Cys Val Ser Gln Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu Gln
[1525]	210 215 220
[1526]	Ser Tyr Trp Thr Gly Ser Tyr Val Leu Ala Asn Phe Gly Gly Ser Gly
[1527]	225 230 235 240
[1528]	Arg Ser Gly Lys Asp Val Asn Ser Ile Leu Gly Ser Ile His Thr Phe
[1529]	245 250 255
[1530]	Asp Pro Ala Gly Gly Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Ala
[1531]	260 265 270
[1532]	Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Val Thr Asp Ser Phe Arg Ser Val
[1533]	275 280 285
[1534]	Tyr Ala Val Asn Ser Gly Ile Ala Glu Gly Ser Ala Val Ala Val Gly
[1535]	290 295 300
[1536]	Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Ala
[1537]	305 310 315 320
[1538]	Thr Ala Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Ile Tyr Gln Trp Asn

[1539]		325		330		335
[1540]	Lys Ile Gly Ser Ile Ser Ile Thr Asp Val Ser Leu Ala Phe Phe Gln					
[1541]		340		345		350
[1542]	Asp Ile Tyr Pro Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Asn Ser Gly Ser Ser					
[1543]		355		360		365
[1544]	Thr Phe Asn Asp Ile Ile Ser Ala Val Gln Thr Tyr Ala Asp Gly Tyr					
[1545]		370		375		380
[1546]	Leu Ser Ile Ile Glu Lys Tyr Thr Pro Ser Asp Gly Ser Leu Thr Glu					
[1547]		385		390		395
[1548]	Gln Phe Ser Arg Ser Asp Gly Thr Pro Leu Ser Ala Ser Gly Leu Thr					
[1549]		405		410		415
[1550]	Trp Ser Tyr Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ala Ala Arg Arg Gln Ser Ile					
[1551]		420		425		430
[1552]	Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Ser Ser Ala Ser Ser Val Pro Ala Val					
[1553]		435		440		445
[1554]	Cys Ser Ala Thr Ser Ala Thr Gly Pro Tyr Ser Thr Ala Thr Asn Thr					
[1555]		450		455		460
[1556]	Ala Trp Pro Ser Ser Gly Ser Gly Pro Ser Thr Thr Thr Ser Val Pro					
[1557]		465		470		475
[1558]	Cys Thr Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe Asp Glu Ile Val Ser					
[1559]		485		490		495
[1560]	Thr Thr Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Pro Glu Leu					
[1561]		500		505		510
[1562]	Gly Asn Trp Ser Pro Ser Ser Ala Ile Pro Leu Arg Ala Asp Ala Tyr					
[1563]		515		520		525
[1564]	Thr Ser Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Leu Asn Leu Pro Ala Gly					
[1565]		530		535		540
[1566]	Thr Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Phe Lys Lys Glu Thr Asp Gly Thr Ile					
[1567]		545		550		555
[1568]	Val Trp Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Ala Tyr Cys					
[1569]		565		570		575
[1570]	Gly Gln Thr Thr Ala Ile Leu Asp Asp Ser Trp Gln					
[1571]		580		585		
[1572]	SEQ ID NO:385灰腐质霉GA SBD					
[1573]	<210>385					
[1574]	<211>112					
[1575]	<212>PRT					
[1576]	<213>灰腐质霉					
[1577]	<400>385					

[1578] Cys Ala Asp Ala Ser Glu Val Tyr Val Thr Phe Asn Glu Arg Val Ser
 [1579] 1 5 10 15
 [1580] Thr Ala Trp Gly Glu Thr Ile Lys Val Val Gly Asn Val Pro Ala Leu
 [1581] 20 25 30
 [1582] Gly Asn Trp Asp Thr Ser Lys Ala Val Thr Leu Ser Ala Ser Gly Tyr
 [1583] 35 40 45
 [1584] Lys Ser Asn Asp Pro Leu Trp Ser Ile Thr Val Pro Ile Lys Ala Thr
 [1585] 50 55 60
 [1586] Gly Ser Ala Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Lys Val Gly Thr Asn Gly Lys
 [1587] 65 70 75 80
 [1588] Ile Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Ile Thr Leu Gln Thr Ala
 [1589] 85 90 95
 [1590] Ser Ser Ala Gly Lys Cys Ala Ala Gln Thr Val Asn Asp Ser Trp Arg
 [1591] 100 105 110
 [1592] SEQ ID NO:386疏棉状嗜热丝孢菌GA SBD
 [1593] <210>386
 [1594] <211>109
 [1595] <212>PRT
 [1596] <213>疏棉状嗜热丝孢菌
 [1597] <400>386
 [1598] Cys Thr Pro Pro Ser Glu Val Thr Leu Thr Phe Asn Ala Leu Val Asp
 [1599] 1 5 10 15
 [1600] Thr Ala Phe Gly Gln Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Pro Glu Leu
 [1601] 20 25 30
 [1602] Gly Ser Trp Asp Pro Ala Asn Ala Leu Leu Met Ser Ala Lys Ser Trp
 [1603] 35 40 45
 [1604] Thr Ser Gly Asn Pro Val Trp Thr Leu Ser Ile Ser Leu Pro Ala Gly
 [1605] 50 55 60
 [1606] Thr Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Lys Asp Asp Gly Ser Ser Asp
 [1607] 65 70 75 80
 [1608] Val Val Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Asn Val Pro Lys Asp
 [1609] 85 90 95
 [1610] Cys Gly Ala Asn Thr Ala Thr Val Asn Ser Trp Trp Arg
 [1611] 100 105
 [1612] SEQ ID NO:387埃默森篮状菌GA SBD
 [1613] <210>387
 [1614] <211>108
 [1615] <212>PRT
 [1616] <213>埃默森篮状菌

[1617] <400>387
 [1618] Cys Thr Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe Asp Glu Ile Val Ser
 [1619] 1 5 10 15
 [1620] Thr Ser Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Pro Glu Leu
 [1621] 20 25 30
 [1622] Gly Asn Trp Ser Thr Ala Ser Ala Ile Pro Leu Arg Ala Asp Ala Tyr
 [1623] 35 40 45
 [1624] Thr Asn Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Asn Leu Pro Pro Gly
 [1625] 50 55 60
 [1626] Thr Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Phe Lys Asn Gln Thr Asp Gly Thr Ile
 [1627] 65 70 75 80
 [1628] Val Trp Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Ala Tyr Cys
 [1629] 85 90 95
 [1630] Gly Gln Thr Thr Ala Ile Leu Asp Asp Ser Trp Gln
 [1631] 100 105
 [1632] SEQ ID NO:388黑曲霉GA SBD
 [1633] <210>388
 [1634] <211>108
 [1635] <212>PRT
 [1636] <213>黑曲霉
 [1637] <400>388
 [1638] Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr
 [1639] 1 5 10 15
 [1640] Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu
 [1641] 20 25 30
 [1642] Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr
 [1643] 35 40 45
 [1644] Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly
 [1645] 50 55 60
 [1646] Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val
 [1647] 65 70 75 80
 [1648] Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys
 [1649] 85 90 95
 [1650] Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
 [1651] 100 105
 [1652] SEQID NO:389泡盛曲霉GA SBD
 [1653] <210>389
 [1654] <211>108
 [1655] <212>PRT

[1656] <213>泡盛曲霉
 [1657] <400>389
 [1658] Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr
 [1659] 1 5 10 15
 [1660] Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu
 [1661] 20 25 30
 [1662] Gly Asp Trp Asp Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr
 [1663] 35 40 45
 [1664] Thr Ser Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly
 [1665] 50 55 60
 [1666] Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val
 [1667] 65 70 75 80
 [1668] Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys
 [1669] 85 90 95
 [1670] Gly Glu Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
 [1671] 100 105
 [1672] SEQ ID NO:390太瑞斯梭孢壳霉GA SBD
 [1673] <210>390
 [1674] <211>108
 [1675] <212>PRT
 [1676] <213>太瑞斯梭孢壳霉
 [1677] <400>390
 [1678] Cys Ser Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asn Glu Arg Val Thr
 [1679] 1 5 10 15
 [1680] Thr Gln Trp Gly Gln Thr Ile Lys Val Val Gly Asp Ala Ala Ala Leu
 [1681] 20 25 30
 [1682] Gly Gly Trp Asp Thr Ser Lys Ala Val Pro Leu Ser Ala Ala Gly Tyr
 [1683] 35 40 45
 [1684] Thr Ala Ser Asp Pro Leu Trp Ser Gly Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly
 [1685] 50 55 60
 [1686] Leu Ala Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Asn Val Ala Ala Asp Gly Gly Val
 [1687] 65 70 75 80
 [1688] Thr Trp Glu Ala Asp Pro Asn His Ser Phe Thr Val Pro Ala Ala Cys
 [1689] 85 90 95
 [1690] Gly Thr Thr Ala Val Thr Arg Asp Asp Thr Trp Gln
 [1691] 100 105
 [1692] SEQ ID NO:1098瑞氏木霉葡糖淀粉酶变体
 [1693] SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDCRAFGTSAGAVIASPSTIRPDYYYMWTRDSALVFKNLIDRFTET
 YDAGLQRRIEQYI

[1694] TAQVTLQGLSNPSGSLADGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTV
SNVIWPIVRNDLN

[1695] YVAQYWNQTGFDLWEEVNGSSFFTANQHRALVEGATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGG
YVDSNINTNEGRT

[1696] GKDVNSVLTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDKALS NLKVVD SFRSIYGVNKGIPAGA AVAIGRYAEDVY
YNGNPWYLATFAA

[1697] AEQLYDAIYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSSTFTNI INAVSTYADGFLSEAAKYVP
ADGSLAEQFDRNS

[1698] GTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSASTIPSTCSGASVVGSRPTATSFPPSQTPKPG
VPSGTPYTPLPCA

[1699] TPTSAVTFHELVSTQFGQTVKVAGNAAALGNWSTSAVALDAVNRYDNHPLWIGTVNLEAGDVVEYKY
INVGDGSVTWES

[1700] DPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

[1701] SEQ ID NO:1099瑞氏木霉葡糖淀粉酶变体

[1702] SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTIRPDYYYMWTRDSALVFKILIDRFTET
YDAGLQRRIEQYI

[1703] TAQVTLQGLSNPSGSLADGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTV
SNVIWPIVRNDLN

[1704] YVAQYWNQTGFDLWEEVNGSSFFTANQHRALVEGATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGG
YVDSNINTNEGRT

[1705] GKDVNSVLTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDKALS NLKVVD SFRSIYGVNKGIPAGA AVAIGRYAEDVY
YNGNPWYLATFAA

[1706] AEQLYDAIYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSSTFTNI INAVSTYADGFLSEAAKYVP
ADGSLAEQFDRNS

[1707] GTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSASTIPSTCSGASVVGSRPTATSFPPSQTPKPG
VPSGTPYTPLPCA

[1708] TPTSAVTFHELVSTQFGQTVKVAGNAAALGNWSTSAVALDAVNRYDNHPLWIGTVNLEAGDVVEYKY
INVGDGSVTWES

[1709] DPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

[1710] 对于本公开所描述的方法和系统的各种修饰和变化对于本领域技术人员而言将是显然的,而不背离本公开的范围和精神。虽然与具体的代表性实施方案相关联而描述了本公开,应理解,要求保护的主体不应被不适当地限制为此类具体实施方案。的确,对于本领域技术人员而言显而易见的、用于实施本公开的所述模式的各种修饰意在下文的权利要求的范围内。

序列表

<110> Danisco A/S

<120> 葡糖淀粉酶的变体

<130> 18262PCT00

<160> 1099

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 632

<212> PRT

<213> 瑞氏木霉

<400> 1

Met His Val Leu Ser Thr Ala Val Leu Leu Gly Ser Val Ala Val Gln
1 5 10 15

Lys Val Leu Gly Arg Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Asp Val Thr Lys
20 25 30

Arg Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn
35 40 45

Asn Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr
50 55 60

Ser Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Asp Pro Asp Tyr
65 70 75 80

[0001]

Tyr Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Leu Ile
85 90 95

Asp Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu
100 105 110

Gln Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser
115 120 125

Gly Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu
130 135 140

Thr Leu Lys Pro Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly
145 150 155 160

Pro Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile
165 170 175

Asn Asn Asn Tyr Gln Ser Thr Val Ser Asn Val Ile Trp Pro Ile Val
180 185 190

Arg Asn Asp Leu Asn Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe
195 200 205

Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Asn
210 215 220

Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ala Thr Leu Ala Ala Thr Leu Gly

225	230	235	240
Gln Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Ser Val Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe	245	250	255
Leu Gln Arg Phe Trp Val Ser Ser Gly Gly Tyr Val Asp Ser Asn Ile	260	265	270
Asn Thr Asn Glu Gly Arg Thr Gly Lys Asp Val Asn Ser Val Leu Thr	275	280	285
Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Asn Leu Gly Cys Asp Ala Gly Thr Phe	290	295	300
Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Val Val Asp	305	310	315
Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Gly Val Asn Lys Gly Ile Pro Ala Gly Ala	325	330	335
Ala Val Ala Ile Gly Arg Tyr Ala Glu Asp Val Tyr Tyr Asn Gly Asn	340	345	350
Pro Trp Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala	355	360	365
Ile Tyr Val Trp Lys Lys Thr Gly Ser Ile Thr Val Thr Ala Thr Ser	370	375	380
Leu Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Pro Gly Val Thr Ala Gly Thr Tyr	385	390	395
Ser Ser Ser Ser Ser Thr Phe Thr Asn Ile Ile Asn Ala Val Ser Thr	405	410	415
Tyr Ala Asp Gly Phe Leu Ser Glu Ala Ala Lys Tyr Val Pro Ala Asp	420	425	430
Gly Ser Leu Ala Glu Gln Phe Asp Arg Asn Ser Gly Thr Pro Leu Ser	435	440	445
Ala Leu His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Ala	450	455	460
Arg Arg Ala Gly Ile Val Pro Pro Ser Trp Ala Asn Ser Ser Ala Ser	465	470	475
Thr Ile Pro Ser Thr Cys Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser	485	490	495
Arg Pro Thr Ala Thr Ser Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly	500	505	510
Val Pro Ser Gly Thr Pro Tyr Thr Pro Leu Pro Cys Ala Thr Pro Thr	515	520	525
Ser Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser Thr Gln Phe Gly Gln			

[0002]

530	535	540
Thr Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu Gly Asn Trp Ser Thr 545 550 555 560		
Ser Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr Ala Asp Asn His Pro 565 570 575		
Leu Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly Asp Val Val Glu Tyr 580 585 590		
Lys Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp 595 600 605		
Pro Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala Cys Val Thr Gln Val 610 615 620		
Val Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser 625 630		
<210> 2 <211> 599 <212> PRT <213> 瑞氏木霉		
<400> 2		
Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn 1 5 10 15		
[0003] Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser 20 25 30		
Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Asp Pro Asp Tyr Tyr 35 40 45		
Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Leu Ile Asp 50 55 60		
Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln 65 70 75 80		
Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser Gly 85 90 95		
Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr 100 105 110		
Leu Lys Pro Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro 115 120 125		
Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn 130 135 140		
Asn Asn Tyr Gln Ser Thr Val Ser Asn Val Ile Trp Pro Ile Val Arg 145 150 155 160		
Asn Asp Leu Asn Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe Asp 165 170 175		

	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Val	Ala	Asn	Gln
				180					185						190	
	His	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Gln
			195					200					205			
	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Val	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Cys	Phe	Leu
		210					215					220				
	Gln	Arg	Phe	Trp	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Asn	Ile	Asn
	225					230					235					240
	Thr	Asn	Glu	Gly	Arg	Thr	Gly	Lys	Asp	Val	Asn	Ser	Val	Leu	Thr	Ser
					245					250					255	
	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Cys	Asp	Ala	Gly	Thr	Phe	Gln
				260					265					270		
	Pro	Cys	Ser	Asp	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Val	Val	Asp	Ser
			275					280					285			
	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Lys	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Ala	Ala
		290					295					300				
	Val	Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ala	Glu	Asp	Val	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Asn	Pro
	305					310					315					320
[0004]	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile
					325					330					335	
	Tyr	Val	Trp	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu
				340					345					350		
	Ala	Phe	Phe	Gln	Glu	Leu	Val	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser
			355					360					365			
	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Asn	Ile	Ile	Asn	Ala	Val	Ser	Thr	Tyr
			370				375					380				
	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Val	Pro	Ala	Asp	Gly
	385					390					395					400
	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	Phe	Asp	Arg	Asn	Ser	Gly	Thr	Pro	Leu	Ser	Ala
				405					410						415	
	Leu	His	Leu	Thr	Trp	Ser	Tyr	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Arg
				420					425					430		
	Arg	Ala	Gly	Ile	Val	Pro	Pro	Ser	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
		435						440					445			
	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Ser	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Gly	Ser	Tyr	Ser	Arg
		450					455					460				
	Pro	Thr	Ala	Thr	Ser	Phe	Pro	Pro	Ser	Gln	Thr	Pro	Lys	Pro	Gly	Val
	465					470					475					480

Pro Ser Gly Thr Pro Tyr Thr Pro Leu Pro Cys Ala Thr Pro Thr Ser
 485 490 495
 Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser Thr Gln Phe Gly Gln Thr
 500 505 510
 Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu Gly Asn Trp Ser Thr Ser
 515 520 525
 Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr Ala Asp Asn His Pro Leu
 530 535 540
 Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly Asp Val Val Glu Tyr Lys
 545 550 555 560
 Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro
 565 570 575
 Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala Cys Val Thr Gln Val Val
 580 585 590
 Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser
 595
 <210> 3
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 瑞氏木霉
 <400> 3
 Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn
 1 5 10 15
 Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser
 20 25 30
 Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Asp Pro Asp Tyr Tyr
 35 40 45
 Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Leu Ile Asp
 50 55 60
 Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser Gly
 85 90 95
 Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr
 100 105 110
 Leu Lys Pro Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro
 115 120 125
 Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn
 130 135 140

[0005]

	Asn	Asn	Tyr	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asn	Val	Ile	Trp	Pro	Ile	Val	Arg
	145					150					155					160
	Asn	Asp	Leu	Asn	Tyr	Val	Ala	Gln	Tyr	Trp	Asn	Gln	Thr	Gly	Phe	Asp
				165						170					175	
	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Val	Ala	Asn	Gln
			180						185					190		
	His	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Gln
		195						200					205			
	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Val	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Cys	Phe	Leu
	210						215					220				
	Gln	Arg	Phe	Trp	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Asn	Ile	Asn
	225					230					235					240
	Thr	Asn	Glu	Gly	Arg	Thr	Gly	Lys	Asp	Val	Asn	Ser	Val	Leu	Thr	Ser
				245						250					255	
	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Cys	Asp	Ala	Gly	Thr	Phe	Gln
			260					265						270		
	Pro	Cys	Ser	Asp	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Val	Val	Asp	Ser
			275					280					285			
[0006]	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Lys	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Ala	Ala
	290						295					300				
	Val	Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ala	Glu	Asp	Val	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Asn	Pro
	305					310					315					320
	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile
				325						330					335	
	Tyr	Val	Trp	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu
			340						345					350		
	Ala	Phe	Phe	Gln	Glu	Leu	Val	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser
		355						360					365			
	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Asn	Ile	Ile	Asn	Ala	Val	Ser	Thr	Tyr
		370					375					380				
	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Val	Pro	Ala	Asp	Gly
	385					390					395					400
	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	Phe	Asp	Arg	Asn	Ser	Gly	Thr	Pro	Leu	Ser	Ala
				405						410					415	
	Leu	His	Leu	Thr	Trp	Ser	Tyr	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Arg
			420						425					430		
	Arg	Ala	Gly	Ile	Val	Pro	Pro	Ser	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
		435						440					445			

Ile Pro Ser Thr Cys
450

<210> 4

<211> 1899

<212> DNA

<213> 瑞氏木霉

<400> 4

atgcacgtcc tgctgactgc ggtgctgctc ggctccgttg ccgttcaaaa ggtcctggga	60
agaccaggat caagcggctc gtccgacgtc accaagaggt ctgttgacga cttcatcage	120
accgagacgc ctattgcaat gaacaatctt ctttgcaatg ttggtcctga tggatgccgt	180
gcattcggca catcagctgg tgcggtgatt gcattcctca gcacaattga cccggactac	240
tattacatgt ggacgcgaga tagcgtctct gtcttcaaga acctcatcga ccgttccacc	300
gaaacgtacg atgcgggctc gcagcgcgcg atcgagcagt acattactgc ccaggtcact	360
ctccaggggc tctetaaccc ctccggctcc ctccgggacg gctctggtct cggcgagccc	420
aagtttgagt tgacctgaa gcctttcacc ggcaactggg gtccgacgca gcgggatggc	480
ccagctctgc gagccattgc cttgattgga tactcaaagt ggtcatcaa caacaactat	540
cagtcgactg tgctcaacgt catctggcct attgtgcgca acgacctcaa ctatgttgcc	600
cagtaactga accaaaccgg ctttgacctc tgggaagaag tcaatgggag ctcatcttt	660
actgttgcca accagcaccg agcacttgct gagggcgcca ctcttctgct cactcttggc	720
cagtcgggaa gcgtttatc atctgttctt cccaggttt tgtgctttct ccaacgatc	780
[0007] tgggtgtcgt ctggtggata cgtcgactcc aacatcaaca ccaacgaggg caggactggc	840
aaggatgtca actccgtcct gacttccatc cacaccttcg atcccaacct tggtgtgtgac	900
gcaggcaact tccagccatg cagtgaacaa gcgtctctca acctcaaggt tgtgtctgac	960
tccttccgct ccatctacgg cgtgaacaag ggcattcctg ccggtgctgc cgtcgccatt	1020
ggccggtatg cagaggatgt gtactacaac ggcaaccctt ggtatcttgc tacatttct	1080
gctgccgagc agctgtacga tgccatctac gtctggaaga agacgggctc catcacggtg	1140
accgccacct ccttggcctt cttccaggag cttgttctct gcgtgacggc cgggacctac	1200
tccagcagct cttcgacctt taccaacatc atcaacgcg tctcgacata cgcgatggc	1260
ttcttcagc aggttgccaa gtacgtcccc gccgacgggt cgttgccga gcagtttgac	1320
cgaacacagc gcaactccgt gtctgcgtt cacctgacgt ggtcgtacgc ctcttcttg	1380
acagccacgg cccgtcgggc tggcatcgtg cccctcctgt gggccaacag cagcgctagc	1440
acgatccctt cgacgtgctc cggcgcgctc gtggtcggat cctactcgcg tcccaccgcc	1500
acgtcatctc ctccgtcga gacgccaaag cctggcgtgc cttccggtac tccctacag	1560
cccttgcctt gcgcgacccc aacctccgtg gccgtcacct tccacgagct cgtgtcgaca	1620
cagttttggc agacggtcaa ggtggcgggc aacgcgcgg ccttgggcaa ctggagcacg	1680
agcgccgcg tggctctgga cgcgctcaac tatgcgata accacccct gtggattggg	1740
acggtcaacc tcgaggtcgg agacgtcgtg gagtacaagt acatcaatgt gggccaagat	1800
ggctccgtga cctgggagag tgatcccaac cacacttaca cggttcctgc ggtggcttgt	1860
gtgacgcagg ttgtcaagga ggacacctgg cagtcgtaa	1899

<210> 5
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 泡盛曲霉
 <400> 5
 Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr
 1 5 10 15
 Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala
 20 25 30
 Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr
 35 40 45
 Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Gly Leu Val Ile Lys Thr Leu Val
 50 55 60
 Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr Asp Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn
 65 70 75 80
 Tyr Ile Ser Ser Gln Ala Ile Val Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly
 85 90 95
 Asp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu
 100 105 110
 Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala
 115 120 125
 Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Gly Phe Arg Gln Trp Leu Leu Asp Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Glu Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn
 145 150 155 160
 Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu
 165 170 175
 Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His
 180 185 190
 Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser
 195 200 205
 Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln Ala Pro Gln Ile Leu Cys Tyr Leu Gln
 210 215 220
 Ser Phe Trp Thr Gly Glu Tyr Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg
 225 230 235 240
 Ser Gly Lys Asp Thr Asn Thr Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp
 245 250 255
 Pro Glu Ala Gly Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg
 260 265 270
 Ala Leu Ala Asn His Lys Glu Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr

[0008]

275	280	285
Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg 290	295	300
Tyr Pro Lys Asp Ser Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr 305	310	315
Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys 325	330	335
Gln Gly Ser Leu Glu Ile Thr Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Gln Ala 340	345	350
Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr 355	360	365
Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val 370	375	380
Ser Ile Val Glu Thr His Ala Ala Ser Asn Gly Ser Leu Ser Glu Gln 385	390	395
Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp 405	410	415
Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Met 420	425	430
[0009]		
Pro Pro Ser Trp Gly Glu Thr Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys 435	440	445
<210> 6		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 黑曲霉		
<400> 6		
Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr 1	5	10
Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala 20	25	30
Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr 35	40	45
Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val 50	55	60
Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn 65	70	75
Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly 85	90	95
Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp 100	105	110

	Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro 115 120 125
	Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp 130 135 140
	Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg 145 150 155 160
	Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp 165 170 175
	Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln 180 185 190
	His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser 195 200 205
	Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu 210 215 220
	Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser 225 230 235 240
	Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe 245 250 255
[0010]	Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro 260 265 270
	Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile 275 280 285
	Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly 290 295 300
	Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys 305 310 315 320
	Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp 325 330 335
	Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys 340 345 350
	Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser 355 360 365
	Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe 370 375 380
	Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu 385 390 395 400
	Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr 405 410 415

Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val
420 425 430

Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr
435 440 445

Cys

<210> 7
<211> 450
<212> PRT
<213> 米曲霉

<400> 7

Gln Ser Asp Leu Asn Ala Phe Ile Glu Ala Gln Thr Pro Ile Ala Lys
1 5 10 15

Gln Gly Tyr Leu Asn Asn Ile Gly Ala Asp Gly Lys Leu Val Glu Gly
20 25 30

Ala Ala Ala Gly Ile Val Tyr Ala Ser Pro Ser Lys Ser Asn Pro Asp
35 40 45

Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ala Gly Leu Thr Met Glu Glu Tyr
50 55 60

[0011]

Ile Glu Gln Phe Ile Gly Gly Asp Ala Thr Leu Glu Ser Thr Ile Gln
65 70 75 80

Asn Tyr Val Asp Ser Gln Ala Asn Glu Gln Ala Val Ser Asn Pro Ser
85 90 95

Gly Gly Leu Ser Asp Gly Ser Gly Leu Ala Glu Pro Lys Phe Tyr Tyr
100 105 110

Asn Ile Ser Gln Phe Thr Asp Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly
115 120 125

Pro Ala Leu Arg Ala Ser Ala Leu Ile Ala Tyr Gly Asn Ser Leu Ile
130 135 140

Ser Ser Asp Lys Gln Ser Val Val Lys Ala Asn Ile Trp Pro Ile Tyr
145 150 155 160

Gln Asn Asp Leu Ser Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe
165 170 175

Asp Leu Trp Glu Glu Val Gln Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Val
180 185 190

Gln His Lys Ala Leu Val Glu Gly Asp Ala Phe Ala Lys Ala Leu Gly
195 200 205

Glu Glu Cys Gln Ala Cys Ser Val Ala Pro Gln Ile Leu Cys His Leu
210 215 220

Gln Asp Phe Trp Asn Gly Ser Ala Val Leu Ser Asn Leu Pro Thr Asn
 225 230 235 240
 Gly Arg Ser Gly Leu Asp Thr Asn Ser Leu Leu Gly Ser Ile His Thr
 245 250 255
 Phe Asp Pro Ala Ala Ala Cys Asp Asp Thr Thr Phe Gln Pro Cys Ser
 260 265 270
 Ser Arg Ala Leu Ser Asn His Lys Leu Val Val Asp Ser Phe Arg Ser
 275 280 285
 Val Tyr Gly Ile Asn Asn Gly Arg Gly Ala Gly Lys Ala Ala Ala Val
 290 295 300
 Gly Pro Tyr Ala Glu Asp Thr Tyr Gln Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu
 305 310 315 320
 Thr Thr Leu Val Ala Ala Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp
 325 330 335
 Asp Lys Gln Gly Gln Val Asn Val Thr Glu Thr Ser Leu Pro Phe Phe
 340 345 350
 Lys Asp Leu Ser Ser Asn Val Thr Thr Gly Ser Tyr Ala Lys Ser Ser
 355 360 365
 [0012] Ser Ala Tyr Glu Ser Leu Thr Ser Ala Val Lys Thr Tyr Ala Asp Gly
 370 375 380
 Phe Ile Ser Val Val Gln Glu Tyr Thr Pro Asp Gly Gly Ala Leu Ala
 385 390 395 400
 Glu Gln Tyr Ser Arg Asp Gln Gly Thr Pro Val Ser Ala Ser Asp Leu
 405 410 415
 Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Phe Leu Ser Ala Val Gly Arg Arg Asn Gly
 420 425 430
 Thr Val Pro Ala Ser Trp Gly Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val Pro Ser
 435 440 445
 Gln Cys
 450
 <210> 8
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> 灰腐质霉
 <400> 8
 Ala Ala Val Asp Thr Phe Ile Asn Thr Glu Lys Pro Ile Ala Trp Asn
 1 5 10 15
 Lys Leu Leu Ala Asn Ile Gly Pro Asn Gly Lys Ala Ala Pro Gly Ala
 20 25 30

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

Val Ser Leu Pro Phe Phe Arg Asp Leu Val Ser Ser Val Ser Thr Gly
 340 345 350
 Thr Tyr Ser Lys Ser Ser Ser Thr Phe Thr Asn Ile Val Asn Ala Val
 355 360 365
 Lys Ala Tyr Ala Asp Gly Phe Ile Glu Val Ala Ala Lys Tyr Thr Pro
 370 375 380
 Ser Asn Gly Ala Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Gly Lys Pro
 385 390 395 400
 Asp Ser Ala Ala Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ser Ala Phe Leu Ser Ala
 405 410 415
 Ile Asp Arg Arg Ala Gly Leu Val Pro Pro Ser Trp Arg Ala Ser Val
 420 425 430
 Ala Lys Ser Gln Leu Pro Ser Thr Cys
 435 440
 <210> 9
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 酒色肉座菌
 <400> 9
 Ser Val Asp Asp Phe Ile Asn Thr Gln Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn
 1 5 10 15
 Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser
 20 25 30
 Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Thr Asp Pro Asp Tyr Tyr
 35 40 45
 Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Ile Val Asp
 50 55 60
 Arg Phe Thr Gln Gln Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Ile Ser Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly
 85 90 95
 Ser Leu Ser Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr
 100 105 110
 Leu Ser Gln Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro
 115 120 125
 Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn
 130 135 140
 Asn Asn Tyr Gln Ser Thr Val Ser Asn Ile Ile Trp Pro Ile Val Arg
 145 150 155 160
 Asn Asp Leu Asn Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe Asp

[0014]

	165	170	175
	Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Asn Gln 180 185 190		
	His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ala Thr Leu Ala Ala Thr Leu Gly Gln 195 200 205		
	Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Ser Val Ala Pro Gln Ile Leu Cys Phe Leu 210 215 220		
	Gln Arg Phe Trp Val Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Ser Asn Ile Asn Thr 225 230 235 240		
	Asn Glu Gly Arg Thr Gly Lys Asp Ala Asn Ser Leu Leu Ala Ser Ile 245 250 255		
	His Thr Phe Asp Pro Ser Leu Gly Cys Asp Ala Ser Thr Phe Gln Pro 260 265 270		
	Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Val Val Asp Ser Phe 275 280 285		
	Arg Ser Ile Tyr Gly Val Asn Lys Gly Ile Pro Ala Gly Ser Ala Val 290 295 300		
	Ala Ile Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Phe Asn Gly Asn Pro Trp 305 310 315 320		
[0015]	Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ser Val Tyr 325 330 335		
	Val Trp Lys Lys Thr Gly Ser Ile Thr Val Thr Ser Thr Ser Ser Ala 340 345 350		
	Phe Phe Gln Glu Leu Val Pro Gly Val Ala Ala Gly Thr Tyr Ser Ser 355 360 365		
	Ser Gln Ser Thr Phe Thr Ser Ile Ile Asn Ala Ile Ser Thr Tyr Ala 370 375 380		
	Asp Gly Phe Leu Ser Glu Ala Ala Lys Tyr Val Pro Ala Asp Gly Ser 385 390 395 400		
	Leu Ala Glu Gln Phe Asp Arg Asn Thr Gly Thr Pro Leu Ser Ala Val 405 410 415		
	His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Ala Ala Arg Arg 420 425 430		
	Ala Gly Val Val Pro Pro Ser Trp Ala Ser Ser Gly Ala Asn Thr Val 435 440 445		
	Pro Ser Ser Cys 450		
	<210> 10		

<211> 37
<212> PRT
<213> 瑞氏木霉

<400> 10

Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser Arg Pro Thr Ala Thr Ser
1 5 10 15

Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly Val Pro Ser Gly Thr Pro
20 25 30

Tyr Thr Pro Leu Pro
35

<210> 11
<211> 109
<212> PRT
<213> 瑞氏木霉

<400> 11

Cys Ala Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser
1 5 10 15

Thr Gln Phe Gly Gln Thr Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu
20 25 30

Gly Asn Trp Ser Thr Ser Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr
35 40 45

[0016]

Ala Asp Asn His Pro Leu Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly
50 55 60

Asp Val Val Glu Tyr Lys Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val
65 70 75 80

Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala
85 90 95

Cys Val Thr Gln Val Val Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser
100 105

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> 瑞氏木霉

<400> 12

Ser Val Asp Asp Phe Ile
1 5

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 13
tcgcgttaac gctagcatgg atctc

25

	<210> 14 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 14 tcgcgttaac gctagcatgg atctc	25
	<210> 15 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 15 cgtcaccaag aggtctgttg acnnsttcat cagcaccgag acgcc	45
	<210> 16 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 [0017] <400> 16 gtcaacagac ctcttgggtga cgtcg	25
	<210> 17 <211> 48 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 17 caccaagagg tctgttgacg acnnsatcag caccgagacg cctattgc	48
	<210> 18 <211> 24 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 18 gtcgtcaaca gacctcttgg tgac	24
	<210> 19 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	

[0018]	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	19	
		tgacgacttc atcagcacccg agnnsccctat tgcactg	37
	<210>	20	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	20	
		ctcgggtgctg atgaagtcgt c	21
[0018]	<210>	21	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	21	
		tcatacagcac cgagacgcct nnsgcactga acaatcttct ttgca	45
	<210>	22	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
[0018]	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	22	
		aggcgtctcgt gtgctgatga agtcg	25
	<210>	23	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	23	
		cagcacccgag acgcctattg cannsaaca tcttctt	37
[0018]	<210>	24	
	<211>	21	
	<212>	DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 24	
	tgcaataggc gtctcggtgc t	21
	<210> 25	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 25	
	caccgagacg cctattgcac tgnnsaatct tctttgc	37
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 26	
	cagtgcata ggcgtctcgg t	21
[0019]	<210> 27	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 27	
	caatcttctt tgcaatgttg gtnnsgatgg atgccgt	37
	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 28	
	accaacattg caaagaagat tg	22
	<210> 29	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	

	<220>				
	<221>	misc_特征			
	<222>	(21).. (22)			
	<223>	n为a, c, g或t			
	<400>	29			
		ttctttgcaa tgttggtcct nnsggatgcc gtgcattcgg cacat		45	
	<210>	30			
	<211>	25			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			
	<400>	30			
		aggaccaaca ttgcaaagaa gattg		25	
	<210>	31			
	<211>	45			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			
	<220>				
	<221>	misc_特征			
	<222>	(21).. (22)			
	<223>	n为a, c, g或t			
[0020]	<400>	31			
		gtcctgatgg atgccgtgca nnsggcacat cagctggtgc ggtga		45	
	<210>	32			
	<211>	25			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			
	<400>	32			
		tgcacggcat ccatcaggac caaca		25	
	<210>	33			
	<211>	37			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			
	<220>				
	<221>	misc_特征			
	<222>	(23).. (24)			
	<223>	n为a, c, g或t			
	<400>	33			
		tgcggtgatt gcattctcca gcnnsttga cccggac		37	
	<210>	34			
	<211>	22			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			

	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	34	
		gctgggagat gcaatcaccg ca	22
	<210>	35	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc 特征	
	<222>	(21)..(22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	35	
		tgattgcatc tcccagcaca nnsgcccg actactatta catgt	45
	<210>	36	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	36	
		tgtgctggga gatgcaatca ccga	25
[0021]	<210>	37	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc 特征	
	<222>	(21)..(22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	37	
		ttgcatctcc cagcacaatt nnsccggact actattacat gtgga	45
	<210>	38	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	38	
		aattgtgctg ggagatgcaa tcacc	25
	<210>	39	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	

[0022]	<220>				
	<221>	misc_特征			
	<222>	(21).. (22)			
	<223>	n为a, c, g或t			
	<400>	39			
		catctcccag cacaattgac nmsgactact attacatgtg gacgc		45	
	<210>	40			
	<211>	25			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			
	<400>	40			
		gtcaattgtg ctgggagatg caatc		25	
	<210>	41			
	<211>	46			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			
	<220>				
	<221>	misc_特征			
	<222>	(21).. (22)			
	<223>	n为a, c, g或t			
	<400>	41			
		ctcccagcac aattgaccgc nntactatt acatgtggac gcgaga		46	
	<210>	42			
	<211>	25			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			
	<400>	42			
		cgggtcaatt gtgctgggag atgca		25	
	<210>	43			
	<211>	45			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			
	<220>				
	<221>	misc_特征			
	<222>	(21).. (22)			
	<223>	n为a, c, g或t			
	<400>	43			
		ccagcacaat tgaccggac nntattaca tgtggacgcg agata		45	
	<210>	44			
	<211>	25			
	<212>	DNA			
	<213>	人工的			
	<220>				
	<223>	DNA引物			

	<400> 44 gtccgggtca attgtgctgg gagat	25
	<210> 45 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 45 caattgacct ggactactat nnsatgtgga cgcgagatag cgctc	45
	<210> 46 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 46 atagtagtcc ggggtcaattg tgctg	25
[0023]	<210> 47 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 47 accgggacta ctattacatg nnsacgcgag atagcgtct tgtct	45
	<210> 48 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 48 catgtaatag tagtccgggt caatt	25
	<210> 49 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征	

	<222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 49 gacgcgagat agcgcctcttg tcnnsaagaa cctcattc	37
	<210> 50 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 50 gacaagagcg ctattctcgcg t	21
	<210> 51 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 51 gcgagatagc gctcttctgtc tcnnsaacct catcgac	37
[0024]	<210> 52 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 52 gaagacaaga gcgctattctc g <210> 53 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 53 agatagcgct cttgtcttca agnnsctcat cgaccgc <210> 54 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 54	21
		37

	cttgaagaca agagcgctat c	21
	<210> 55 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 55 tgtcttcaag aacctcatcg acnnsttcac cgaaacg	37
	<210> 56 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 56 gtcgaatgagg ttcttgaaga c	21
[0025]	<210> 57 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 57 caagaacctc atcgaccgct tcnnsgaaac gtacgat	37
	<210> 58 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 58 gaagcggtcg atgaggttct t	21
	<210> 59 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	

[0026]	<400> 59 gaacctcatt gaccgcttca ccnnsacgta cgatgcg	37
	<210> 60 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 60 ggtgaagcgg tcgatgaggt t	21
	<210> 61 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 61 tcgaccgctt caccgaaacg nnsgatgcgg gcctgcagcg ccgca	45
	<210> 62 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 62 cgtttcgggtg aagcggtcga tgagg	25
	<210> 63 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 63 ccgcttcacc gaaacgtacg atnnsaggcct gcagcgc	37
	<210> 64 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 64 atcgtacgtt tcggtgaagc gg	22

	<210> 65 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 65 cttcaccgaa acgtacgatg cgnnsetgca gcgcgcg	37
	<210> 66 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 66 cgcatcgtac gtttcggtga a	21
[0027]	<210> 67 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 67 aaacgtacga tgcgggcctg nnsccgcgca tcgagcagta catta	45
	<210> 68 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 68 caggcccgca tcgtacgttt cggtg	25
	<210> 69 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 69	

	cgtaacgatgc gggcctgcag nnsccgcatcg agcagtacat tactg	45
	<210> 70 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 70 ctgcaggccc gcatcgtaacg ttctcg	25
	<210> 71 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 71 cctctccagg cctctctaac nnsctgggct cctctcgga cggt	45
	<210> 72 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
[0028]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 72 gttagagagg ccttgagag tgacc	25
	<210> 73 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 73 gggcctctct aaccctcgg gcnnctcgc ggaaggc	37
	<210> 74 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 74 gccccagggg ttagagagc c	21
	<210> 75	

	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 75	
	cctctctaac ccctcgggct ccnmsgcgga cggctct	37
	<210> 76	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 76	
	ggagcccag gggttagaga g	21
	<210> 77	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0029]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 77	
	ctctaaccctc tcgggtctcc tcnmsgcgg ctctggt	37
	<210> 78	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 78	
	gaggagccc gaggggttag a	21
	<210> 79	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 79	
	acccctcggg ctccctcgcg nmsggtctg gtctcggcga gccca	45

[0030]	<210>	80	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	80	
		cgcgagggag cccgaggggt tagag	25
	<210>	81	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	81	
		ctcgggctcc ctcgeggacg gcnnsggtct cggcgag	37
[0030]	<210>	82	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	82	
		gccgtccgcg agggagcccg a	21
	<210>	83	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	83	
		tggctctggc gagcccaagt ttnnsttgac cctgaag	37
[0030]	<210>	84	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	84	
		aaacttgggc tcgccgagac ca	22
	<210>	85	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	85	
		aaacttgggc tcgccgagac ca	22

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 85	
	tctcggcgag cccaagtttg agnnsaccct gaagcct	37
	<210> 86	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 86	
	ctcaaacttg ggctcgccga g	21
	<210> 87	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0031]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 87	
	cgagcccaag tttagattga ccnnsaagcc ttccacc	37
	<210> 88	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 88	
	ggtcaactca aacttgggct c	21
	<210> 89	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 89	
	ccaagtttga gttgacctg nnsectttca cggcaactg gggtc	45
	<210> 90	

	<211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 90 cagggtcaac tcaaacttgg gctcg	25
	<210> 91 <211> 46 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t <400> 91 ttgagttgac cctgaagcct nnsaccggca actggggteg accgca	46
	<210> 92 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 [0032] <400> 92 aggcttcagg gtcaactcaa acttg	25
	<210> 93 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t <400> 93 ccctgaagcc ttccaccggc nnstggggtc gaccgcagcg ggatg	45
	<210> 94 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 94 gccggtgaaa ggcttcaggg tcaac	25
	<210> 95 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	

[0033]	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	95	
		ctttcaccgg caactggggt nnsccgcagc gggatggccc agctc	45
	<210>	96	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	96	
		accccagttg ccggtgaaag gcttc	25
[0033]	<210>	97	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	97	
		gcaactgggg tcgaccgcag nmsgatggcc cagctctgcg agcca	45
	<210>	98	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
[0033]	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	98	
		ctgcggtcga cccagttgc cggtg	25
	<210>	99	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	99	
		ggatggccca gctctgcgag ccnsgcctt gattgga	37
[0033]	<210>	100	
	<211>	22	
	<212>	DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 100	
	ggtctgcaga gctgggcat cc	22
	<210> 101	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 101	
	tgcgagccat tgccttgatt nnstactcaa agtggctcat caaca	45
	<210> 102	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 102	
	aatcaaggca atggctcgca gagct	25
[0034]	<210> 103	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 103	
	cattgccttg attggataact cannstggct catcaac	37
	<210> 104	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 104	
	tgagtatcca atcaaggcaa tg	22
	<210> 105	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	

	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 105 tggataactca aagtggctca tcnnsaacaa ctatcag	37
	<210> 106 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 106 gatgagccac tttgagtatc c	21
	<210> 107 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 107 atactcaaag tggetcatca acnnsaacta tcagtcg	37
[0035]	<210> 108 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 108 gttgatgagc cactttgagt a	21
	<210> 109 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 109 caaagtggct catcaacaac nnstatcagt cgactgtgtc caacg	45
	<210> 110 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	

	<220> <223> DNA引物	
	<400> 110 gttggtgatg agccacttg agtat	25
	<210> 111 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc 特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 111 aaagtggctc atcaacaaca acnnsagtc gactgtg	37
	<210> 112 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 112 gttggtgttg atgagccact t	21
[0036]	<210> 113 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc 特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 113 ggctcatcaa caacaactat nnstcgactg tgtccaacgt catct	45
	<210> 114 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 114 atagttgttg ttgatgagcc acttt	25
	<210> 115 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	

	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	115	
		caacaactat cagtcgactg tgnnsaacgt catctgg	37
	<210>	116	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	116	
		cacagtcgac tgatagttgt t	21
	<210>	117	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	117	
		caactatcag tcgactgtgt ccnnsgteat ctggcct	37
[0037]	<210>	118	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	118	
		ggacacagtc gactgatagt t	21
	<210>	119	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	119	
		gcctattgtg cgcaacgacc tennstatgt tgcccagt	38
	<210>	120	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	

[0038]	<400> 120 gaggtcgttg cgcacaatag g	21
	<210> 121 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 121 acctcaacta tgttgcccag nntggaacc aaaccggett tgacc	45
	<210> 122 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 122 ctgggcaaca tagttgaggt cgttg	25
	<210> 123 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 123 atgttgccca gtactggaac nnsaccgget ttgacctctg ggaag	45
	<210> 124 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 124 gttccagtac tgggcaacat agttg	25
	<210> 125 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征	

	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 125	
	agtactggaa ccaaaccggc nmsgacctct gggaagaagt caatg	45
	<210> 126	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 126	
	gccggtttgg ttccagtact gggca	25
	<210> 127	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 127	
	accaaaccgg ctttgacctc nnsagaagaag tcaatgggag ctcat	45
[0039]	<210> 128	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 128	
	gaggteaag ccggttttgt tccag	25
	<210> 129	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 129	
	ccggctttga cctctgggaa nnsagtcaatg ggagctcatt ctta	45
	<210> 130	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 130	

	ttcccagagg tcaaagcggg ttgtg	25
	<210> 131 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 131 gctttgacct ctgggaagaa nnsaatggga gctcattctt tactg	45
	<210> 132 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 132 tttctccag aggtcaaagc cgggtt	25
[0040]	<210> 133 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 133 ctttgacctc tgggaagaag tcnnsgggag ctcattc	37
	<210> 134 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 134 gacttcttcc cagaggtcaa ag	22
	<210> 135 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	

[0041]	<400> 135 tgtcgagggc gccactcttg cttnsactct tggccag	37
	<210> 136 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 136 agcaagagtg gcgccctcga c	21
	<210> 137 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 137 cgagggcgcc actcttgctg ccnnsccttg ccagtcg	37
	<210> 138 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 138 ggcagcaaga gtggcgcct c	21
	<210> 139 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 139 ctcttgctgc cactcttggc nnstcgggaa gcgcttatc atctg	45
	<210> 140 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 140 gccaagagtg gcagcaagag tggcg	25

[0042]	<210>	141	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21)..(22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	141	
		ccactcttgg ccagtcggga nnsgettatt catctgttgc tcccc	45
	<210>	142	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	142	
		tcccgactgg ccaagagtgg cagca	25
	<210>	143	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23)..(24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	143	
		tggccagtcg ggaagcgctt atnnstctgt tgctccc	37
	<210>	144	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	144	
		ataagcgctt cccgactggc c	21
	<210>	145	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23)..(24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	145	

	gtcgggaagc gcttattcat ctnnsgctcc ccaggtt	37
	<210> 146 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 146 agatgaataa gcgcttcccg a	21
	<210> 147 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 147 cgcttattca tctgttgctc ccnnsgtttt gtgcttt	37
[0043]	<210> 148 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 148 gggagcaaca gatgaataag c	21
	<210> 149 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 149 tgtgtttct ccaacgattc nnsrgtgctg ctggtggata cgteg	45
	<210> 150 <211> 26 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 150 gaatcgttg agaaagcaca aaacct	26
	<210> 151	

	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 151	
	gtgctttctc caacgattct ggnnstcgtc tggtgga	37
	<210> 152	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 152	
	ccagaatcgt tggagaaagc a	21
	<210> 153	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0044]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 153	
	ctttctccaa cgattctggg tgnnstctgg tggatacg	38
	<210> 154	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 154	
	caccagaat cgttgagaa a	21
	<210> 155	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 155	
	tctccaacga ttctgggtgt cgnnsggtgg atacgtc	37

	<210> 156 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 156 cgacaccag aatcgttga ga 22
	<210> 157 <211> 39 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t <400> 157 ggtgtcgtct ggtggatacg tcnnstccaa catcaacac 39
[0045]	<210> 158 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 158 gacgtatcca ccagacgaca c 21 <210> 159 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t <400> 159 tgggtgatac gtcgactcca acnnsaacac caacgag 37 <210> 160 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 160 gttggagtcg acgtatccac c 21 <210> 161 <211> 38 <212> DNA

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 161	
	tggatacgtc gactccaaca tcnnsaccaa cgagggca	38
	<210> 162	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 162	
	gatgttgag tcgacgtatc ca	22
	<210> 163	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0046]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 163	
	atacgtcgac tccaacatca acnnsaacga gggcaggac	39
	<210> 164	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 164	
	gttgatgttg gagtcgacgt a	21
	<210> 165	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 165	
	tcgactccaa catcaacacc nnsagggca ggactggcaa ggatg	45
	<210> 166	

	<211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 166 ggtgttgatg ttggagtcga cgtat	25
	<210> 167 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t <400> 167 actccaacat caacaccaac nnsggcagga ctggcaagga tgtca	45
	<210> 168 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 [0047] <400> 168 gttgggttg atgttgagat cgacg	25
	<210> 169 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t <400> 169 ctccaacatc aacaccaacg agnnsaggac tggcaag	37
	<210> 170 <211> 23 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 170 ctcgttggtg ttgatgttg agt	23
	<210> 171 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	

	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 171 acatcaacac caacgagggc nnsactggca aggatgtcaa ctccg	45
	<210> 172 <211> 26 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 172 gccctcgttg gtgttgatgt tggagt	26
	<210> 173 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0048]	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 173 ttccatccac accttcgac ccnnscttgg ctgtgac	37
	<210> 174 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 174 gggatcgaag gtgtggatgg a	21
	<210> 175 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 175 catccacacc ttcgatccca acnnsaggctg tgacgca	37
	<210> 176 <211> 21 <212> DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 176	
	gttgggatcg aaggtgtgga t	21
	<210> 177	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 177	
	ccacaccttc gatccaacc ttnnstgtga cgcaggc	37
	<210> 178	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 178	
	aaggttggga tcgaaggtgt g	21
[0049]	<210> 179	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 179	
	cgatccaac cttggctgtg acnnsggcac cttccagc	38
	<210> 180	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 180	
	gtcacagcca aggttgggat c	21
	<210> 181	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	

	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 181 tcccaacctt ggctgtgacg cannsacctt ccagcca	37
	<210> 182 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 182 tgcgtcacag ccaaggttgg g	21
	<210> 183 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
[0050]	<400> 183 aggcaccttc cagccatgca gtnnsaaagc gctctcc	37
	<210> 184 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 184 actgcatggc tggaaggtgc c	21
	<210> 185 <211> 38 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 185 caaagcgctc tccaacctca agnnsgettgt cgactcct	38
	<210> 186 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	

	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	186	
		cttgaggttg gagagcgctt t	21
	<210>	187	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc 特征	
	<222>	(23)..(24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	187	
		ggttggtgtc gactccttcc gcnnsatcta cggcgtg	37
	<210>	188	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	188	
		gcggaaggag tcgacaaca c	21
[0051]	<210>	189	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc 特征	
	<222>	(21)..(22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	189	
		ttgtcgactc cttccgctcc nnstacggcg tgaacaaggg cattc	45
	<210>	190	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	190	
		ggagcggaag gagtgcacaa caacc	25
	<210>	191	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	

	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	191	
		actccttccg ctccatctac nnsgtgaaca agggcattcc tgccg	45
	<210>	192	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	192	
		gtagatggag cggaaggagt cgaca	25
	<210>	193	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	193	
		gtcccatcta cggcgtgaac nnsggcattc ctgccggtgc tgccg	45
[0052]	<210>	194	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	194	
		gttcacgccg tagatggagc ggaag	25
	<210>	195	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	195	
		ctacggcgtg aacaaggga ttnsgccgg tgctgccg	38
	<210>	196	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	

	<400> 196 aatgcccttg ttcacgccgt a	21
	<210> 197 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 197 cggcgtgaac aagggcattc cttnsggtgc tgccgtc	37
	<210> 198 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 198 aggaatgcc ttgttcacgc c	21
[0053]	<210> 199 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 199 gaacaagggc attcctgccg gttnsgccgt cgccatt	37
	<210> 200 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 200 accggcagga atgcccttgt t	21
	<210> 201 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征	

	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 201	
	gtgctgccgt egccattggc nnstatgcag aggatgtgta ctaca	45
	<210> 202	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 202	
	gccaatggcg acggcagcac cggca	25
	<210> 203	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 203	
	ctgccgtcgc cattggccgg nnsgcagagg atgtgtacta caacg	45
[0054]	<210> 204	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 204	
	cgggccaatg gcgacggcag caccg	25
	<210> 205	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 205	
	tgccgtcgc attggccggt atnnsagga tgtgtac	37
	<210> 206	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 206	

	ataccggcca atggcgacgg c	21
	<210> 207 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 207 ccattggcgg gtatgcagag nnsgtgtact acaacggcaa ccctt	45
	<210> 208 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc 特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 208 ccattggcgg gtatgcagag nnsgtgtact acaacggcaa ccctt	45
[0055]	<210> 209 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 209 ctctgcatac cggccaatgg cgacg	25
	<210> 210 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 210 ctctgcatac cggccaatgg cgacg	25
	<210> 211 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc 特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t	

[0056]	<400> 211 ttggccggta tgcagaggat nnstactaca acggcaaccc ttggt	45
	<210> 212	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 212 atcctctgca taccggccaa tggcg	25
	<210> 213	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
[0056]	<400> 213 gccggtatgc agaggatgtg nnstacaacg gcaacccttg gtatc	45
	<210> 214	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 214 cacatctctt gcataccggc caatg	25
	<210> 215	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
[0056]	<400> 215 ggtatgcaga ggatgtgtac nnsaacggca acccttggtg tcttg	45
	<210> 216	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 216 gtacacatcc tctgcatacc ggccaat	27

	<210> 217	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 217	
	atgcagagga tgtgtactac nnsaggcaacc cttggatatct tgeta	45
	<210> 218	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 218	
	atgcagagga tgtgtactac nnsaggcaacc cttggatatct tgeta	45
[0057]	<210> 219	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 219	
	gtagtacaca tcctctgcat accggc	26
	<210> 220	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 220	
	gtagtacaca tcctctgcat accggc	26
	<210> 221	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 221	

	tgtactacaa cggcaacct nnstatcttg ctacatttgc tgctg	45
	<210> 222	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 222	
	tgtactacaa cggcaacct nnstatcttg ctacatttgc tgctg	45
	<210> 223	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 223	
	agggttgccg ttgtagtaca catcc	25
	<210> 224	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
[0058]	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 224	
	agggttgccg ttgtagtaca catcc	25
	<210> 225	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 225	
	gcagctgtac gatgccatct acnnstggaa gaagacg	37
	<210> 226	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 226	
	gtagatggca tcgtacagct g	21
	<210> 227	

<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<220>		
<221>	misc_特征	
<222>	(21)..(22)	
<223>	n为a, c, g或t	
<400>	227	
	acgatgccat ctacgtctgg nnsaagacgg gctccatcac ggtga	45
<210>	228	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	228	
	ccagacgtag atggcatcgt acagc	25
<210>	229	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
[0059]		
<220>		
<221>	misc_特征	
<222>	(21)..(22)	
<223>	n为a, c, g或t	
<400>	229	
	atgccatcta cgtctggaag nnsacgggct ccatcacggt gaccg	45
<210>	230	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	230	
	cttcagacg tagatggcat cgtacagc	28
<210>	231	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<220>		
<221>	misc_特征	
<222>	(24)..(25)	
<223>	n为a, c, g或t	
<400>	231	
	atgccatcta cgtctggaag aagnnsggct ccatcacg	38

	<210> 232 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 232 cttcttccag acgtagatgg c	21
	<210> 233 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t <400> 233 ctacgtctgg aagaagacgg gcnnsatcac ggtgacc	37
	<210> 234 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物	
[0060]	<400> 234 gcccgtcttc ttccagacgt ag	22
	<210> 235 <211> 39 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t <400> 235 ctggaagaag acgggtcca tcnnsgtgac cgcacctc	39
	<210> 236 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 236 gatggagccc gtcttcttcc a	21
	<210> 237 <211> 37 <212> DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 237	
	gacgggctcc atcacggtga ccnsacctc cctggcc	37
	<210> 238	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 238	
	gtcaccgtg atggagcccg t	21
	<210> 239	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0061]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 239	
	gtccatcac ggtgaccgcc nnstccctgg cctttttcca ggagc	45
	<210> 240	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 240	
	ggcggtcacc gtgatggagc ccgtc	25
	<210> 241	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 241	
	ccacctccct ggcctttcttc nnsagcttg ttcttggegt gacgg	45
	<210> 242	

	<211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 242 gaagaaggcc agggaggtgg cggtc	25
	<210> 243 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 243 ectggccttc ttccaggagc tttnscctgg cgtgacg	37
	<210> 244 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 [0062] <400> 244 aagctcctgg aagaaggcca g	21
	<210> 245 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 245 cttcttccag gagcttggtc cttnsrgtgac ggccggg	37
	<210> 246 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 246 aggaacaagc tcctggaaga a	21
	<210> 247 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	

[0063]	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	247	
		aggagcttgt tcctggcgtg nmsgcggga cctactccag cagct	45
	<210>	248	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	248	
		cacgccagga acaagctcct ggaag	25
[0063]	<210>	249	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	249	
		ggagcttggt cctggcgtga cgnmsgggac ctactcc	37
	<210>	250	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
[0063]	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	250	
		cgtcacgcca ggaacaagct c	21
	<210>	251	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	251	
		gcgtgacggc cgggacctac nnsagcagct cttegacctt tacca	45
[0063]	<210>	252	
	<211>	25	
	<212>	DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 252	
	gtaggtcccg gccgtcacgc cagga	25
	<210> 253	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 253	
	tgacggccgg gacctactcc nnsagetctt cgacctttac caaca	45
	<210> 254	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 254	
	ggagtaggtc ccggccgtca cgcca	25
[0064]	<210> 255	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 255	
	ctccagcagc tcttcgacct tttnsaacat catcaacg	38
	<210> 256	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 256	
	aaaggtcgaa gagctgctgg a	21
	<210> 257	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	

	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	257	
		gcagctcttc gacctttacc nnsatcatca acgccgtctc gacat	45
	<210>	258	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	258	
		ggtaaaggtc gaagagctgc tggag	25
	<210>	259	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
[0065]	<400>	259	
		ttcgaccttt accaacaatca tcnnsgccgt ctcgaca	37
	<210>	260	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	260	
		gatgatgttg gtaaaggctcg a	21
	<210>	261	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	261	
		taccaacatc atcaacgccg tcnnsacata cgccgat	37
	<210>	262	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	

	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	262	
		gacggcgttg atgatgttgg t	21
	<210>	263	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc 特征	
	<222>	(23)..(24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	263	
		gacatacggc gatggcttcc tcnnsgaggc tgccaag	37
	<210>	264	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	264	
		gaggaagcca tcggcgtatg t	21
[0066]	<210>	265	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc 特征	
	<222>	(23)..(24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	265	
		atacgcgat ggcttctctca gcnnsgctgc caagtac	37
	<210>	266	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	266	
		gctgaggaag ccatcggcgt a	21
	<210>	267	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	

	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	267	
		cgatggettc ctcagegagg cttnsaagta cgtccccc	37
	<210>	268	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	268	
		agcctcgtg aggaagccat c	21
	<210>	269	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	269	
		tggttcttc agcgaggctg ccnnstacgt ccccgcc	37
[0067]	<210>	270	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	270	
		ggcagcctcg ctgaggaagc c	21
	<210>	271	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	271	
		tcctcagcga ggetgccaag nnsgtcccg ccgacggttc getgg	45
	<210>	272	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	

[0068]	<400> 272 cttggcagcc tcgctgagga agcca	25
	<210> 273 <211> 46 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 273 aggetgcaaa gtaagtcacc nnsagcggtt cgtggccga gcagtt	46
	<210> 274 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 274 ggggacgtac ttggcagcct cgtg	25
	<210> 275 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (21)..(22) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 275 agtaagtcac cgcgacgggt nnsctggccg agcagtttga ccgca	45
	<210> 276 <211> 26 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 276 accgtcggcg gggacgtact tggcag	26
	<210> 277 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征	

	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 277	
	cgctggcga gcagtttgac nnsaacagcg gcactccgct gtctg	45
	<210> 278	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 278	
	gtcaaaactgc tcggccagcg aaccg	25
	<210> 279	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 279	
	tggccgagca gtttgaccgc nnsagcggca ctccgctgtc tgcgc	45
[0069]	<210> 280	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 280	
	gcggtcaaac tgctcggcca gcgaa	25
	<210> 281	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 281	
	ggccgagcag tttgaccgca acnnsggcac tccgctg	37
	<210> 282	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 282	

	gttgcggtca aactgctcgg c	21
	<210> 283 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 283 agtttgaccg caacagcggc nnsccgctgt ctgcgcttca cctga	45
	<210> 284 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 284 gccgctgttg cgggtcaaact gctcg	25
[0070]	<210> 285 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (21).. (22) <223> n为a, c, g或t <400> 285 gcaacagcgg cactccgctg nnsccgcttc acctgacgtg gtcgt	45
	<210> 286 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 286 cagcggagtg ccgctgttgc ggtca	25
	<210> 287 <211> 38 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc 特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	

[0071]	<400> 287 cagcggcact ccgctgtctg cgnnscacct gacgtggt	38
	<210> 288	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 288 cgcagacagc ggagtgccgc t	21
	<210> 289	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
[0071]	<400> 289 gcactccgct gtctgcgctt nnsctgacgt ggtcgtacgc ctcgt	45
	<210> 290	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 290 aagcgcagac agcggagtgc cgctg	25
	<210> 291	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
[0071]	<400> 291 tgtctgcgct tcacctgacg nnstcgtacg cctcgttctt gacag	45
	<210> 292	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 292 cgtcaggtga agcgcagaca gcgga	25

	<210> 293	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 293	
	gtacgcctcg ttcttgacag ccnnsgcccg tcgggct	37
	<210> 294	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 294	
	ggctgtcaag aacgaggcgt a	21
	<210> 295	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0072]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 295	
	cgctcgttc ttgacagcca cgnnscgtcg ggctggc	37
	<210> 296	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 296	
	cgtggctgtc aagaacgagg c	21
	<210> 297	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 297	

	tcttgacagc cacggcccggt nnsgetggea tcgtgcccc ctcgt	45
	<210> 298	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 298	
	acgggcccgtg gctgtcaaga acgag	25
	<210> 299	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21).. (22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 299	
	ccacggcccgc tcgggctggc nnsgtgcccc cctcgtgggc caaca	45
	<210> 300	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
[0073]	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 300	
	gccagcccga cgggcccgtgg ctgtc	25
	<210> 301	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 301	
	tggcatcgtg cccccctcgt ggnsaacag cageget	37
	<210> 302	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 302	
	ccacgagggg ggcacgatgc c	21
	<210> 303	

	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 303	
	catcgtgcc ccctcgtggg ccnnsagcag cgctagc	37
	<210> 304	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 304	
	ggcccaacgag gggggcacga t	21
	<210> 305	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0074]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 305	
	cgtgcccccc tcgtgggcca acnnsagcgc tagcacg	37
	<210> 306	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 306	
	gttgccccac gaggggggca c	21
	<210> 307	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 307	
	gtgggccaac agcagcgcta gcnnsatccc ctgacg	37

	<210> 308	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 308	
	gcagcgctag cagatcccc nnsacgtgct cgggcgcgtc cgtgg	45
	<210> 309	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 309	
	ggggatcgtg ctagecgtgc tgttg	25
	<210> 310	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0075]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 310	
	ctacacgcc ctgccctgcg cgnnaccaac ctccgtg	37
	<210> 311	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 311	
	cgcgcagggc aggggcgtgt a	21
	<210> 312	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 312	

	cacgccccctg ccctgcgcga ccnnsacctc cgtggcc	37
	<210> 313 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 313 ggtcgcgcag ggcagggcg t	21
	<210> 314 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 314 gccccctgcc tgcgcgaccc cannstccgt ggccgtc	37
	<210> 315 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
[0076]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 315 tggggtcgcg cagggcaggg g	21
	<210> 316 <211> 38 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 316 cccaacctcc gtggccgtca ccnnsacga gctcgtgt	38
	<210> 317 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 317 ggtgacggcc acggaggttg g	21
	<210> 318	

	<211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 318 aacctccgtg gccgtcacct tcnnsgagct cgtgtcg	37
	<210> 319 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物	
	<400> 319 gaaggtgacg gccacggagg t	21
	<210> 320 <211> 39 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物	
[0077]	<220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 320 ctccgtggcc gtcaccttcc acnnsetcgt gtcgacaca	39
	<210> 321 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物	
	<400> 321 gtggaagtg acggccacgg a	21
	<210> 322 <211> 37 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 322 cttccacgag ctcgtgtcga cannstttgg ccagacg	37

[0078]	<210>	323	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	323	
		tgtcgacacg agctcgtgga a	21
	<210>	324	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	324	
		gctcgtgtcg acacagtttg gcnnacgggt caaggtg	37
	<210>	325	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	325	
		gccaaactgt gtcgacacga g	21
	<210>	326	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(21).. (22)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	326	
		cacagtttgg ccagacggtc nnsctggcgg gcaacgccgc ggcgc	45
	<210>	327	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	327	
		gaccgtctgg ccaaactgtg tcgac	25
	<210>	328	
	<211>	42	
	<212>	DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 328	
	tggccagacg gtcaaggtgg cgnsaacgc cgcggccctg gg	42
	<210> 329	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 329	
	cgccaccttg accgtctggc caaactg	27
	<210> 330	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
[0079]	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 330	
	ccagacggtc aaggtggcgg gcnnsgccgc ggccctgggc aact	44
	<210> 331	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 331	
	gcccggccacc ttgaccgtct ggccaaa	27
	<210> 332	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 332	
	gacggtcaag gtggcgggca acnnsgegc cctgggcaac t	41
	<210> 333	

	<211> 27 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 333 gttgcccgcc accttgaccg tctggcc	27
	<210> 334 <211> 41 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 334 ggtcaagggtg gcgggcaacg ccnsgccct gggcaactgg a	41
	<210> 335 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 [0080] <400> 335 ggcgttgccc gccaccttga ccgtctg	27
	<210> 336 <211> 41 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 336 caacgccgcg gccctgggca acnnsagcac gagcgccgcc g	41
	<210> 337 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 337 gttgcccagg gccgcggcgt tgcccgc	27
	<210> 338 <211> 41 <212> DNA <213> 人工的	

[0081]	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	338	
		cgcgccctg ggcaactgga gcnnsgcgc cgccgtggct c	41
	<210>	339	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	339	
		gctccagttg cccagggcgc cgccgtt	27
	<210>	340	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	340	
		caactggagc acgagcgccg ccnnsgctct ggacgccgc a	41
	<210>	341	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	341	
		ggcggcgctc gtgtccagt tgcccag	27
	<210>	342	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	342	
		gagcacgagc gccgcgtgg ctnnsgcgc cgtaactat gc	42
	<210>	343	
	<211>	27	
	<212>	DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 343	
	agccacggcg gcgctcgtgc tccagtt	27
	<210> 344	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 344	
	gagcgccgcc gtggctctgg acnnsqtcaa ctatgccgat a	41
	<210> 345	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 345	
	gtccagagcc acggcggcgc tcgtgct	27
[0082]	<210> 346	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 346	
	cgccgccgtg gctctggacg ccnnsaacta tgccgataac c	41
	<210> 347	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 347	
	ggcgtccaga gccacggcgg cgctcgt	27
	<210> 348	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	

	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 348 cgccgtggct ctggacgccg tcnnstatgc cgataac	37
	<210> 349 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 349 cgccgtggct ctggacgccg tcnnstatgc cgataaccac ccc	43
	<210> 350 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 350 gacggcgtcc agagccacgg cggcgct	27
[0083]	<210> 351 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 351 gacggcgtcc agagccacgg cggcgct	27
	<210> 352 <211> 41 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 352 cgtggctctg gacgccgtca acnnsgccga taaccacccc c	41
	<210> 353 <211> 28 <212> DNA <213> 人工的	

	<220> <223> DNA引物	
	<400> 353 gttgacggcg tccagagcca cggcggcg	28
	<210> 354 <211> 41 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc 特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 354 ggctctggac gccgtcaact atnmsgataa ccaccccctg t	41
	<210> 355 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 355 atagttgaag gcgtccagag ccacggc	27
[0084]	<210> 356 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc 特征 <222> (23)..(24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 356 tctggacgcc gtcaactatg ccnnsaacca cccctgtgg att	43
	<210> 357 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 357 ggcatagttg acggcgtcca gagecac	27
	<210> 358 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	

	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	358	
		ggacgccgtc aactatgccg atnnsacccc cctgtggatt ggg	43
	<210>	359	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	359	
		atcgcatag ttgacggcgt ccagagc	27
	<210>	360	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	360	
		ctatgccgat aaccaccccc tgnnsattgg gacggtaac ctc	43
[0085]	<210>	361	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<400>	361	
		caggggggtgg ttatcgcat agttgac	27
	<210>	362	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	
	<220>		
	<221>	misc_特征	
	<222>	(23).. (24)	
	<223>	n为a, c, g或t	
	<400>	362	
		tgccgataac caccacctgt ggnsaggac ggtcaacctc gag	43
	<210>	363	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	DNA引物	

[0086]	<400> 363 ccacaggggg tggttatcgg catagtt	27
	<210> 364 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 364 cgataaccac cccctgtgga tttnsaagggt caacctcgag gct	43
	<210> 365 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 365 aatccacagg gggtggttat cggcata	27
	<210> 366 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	
	<400> 366 ccaccccctg tggattggga cgtnsaacct cgaggctgga gac	43
	<210> 367 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 367 cgtcccaatc cacagggggt ggttata	27
	<210> 368 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<220> <221> misc_特征	

	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 368	
	cctgtggatt gggacgggtca acnnsaggc tggagacgtc gtc	43
	<210> 369	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 369	
	gttgaccgtc ccaatccaca ggggggtg	27
	<210> 370	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 370	
	tggagacgtc gtggagtaca agnnsatcaa tgtgggcaa gat	43
[0087]	<210> 371	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 371	
	cttgtactcc acgacgtctc cagcctc	27
	<210> 372	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23).. (24)	
	<223> n为a, c, g或t	
	<400> 372	
	cgtcgtggag tacaagtaca tcnnsgtggg ccaagatggc tcc	43
	<210> 373	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 373	

	gatgtacttg tactccaega cgtctcc	27
	<210> 374 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 374 caagtacatc aatgtgggcc aannsggctc cgtgacctgg gag	43
	<210> 375 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 375 ttggcccaca ttgatgtact tgtactc	27
	<210> 376 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc_特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t <400> 376 catcaatgtg ggccaagatg gcnnsgtgac ctgggagagt gat	43
[0088]	<210> 377 <211> 28 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 377 gccatcttgg cccacattga tgtacttg	28
	<210> 378 <211> 43 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <220> <221> misc 特征 <222> (23).. (24) <223> n为a, c, g或t	

[0089]	<400> 378 cgtgacctgg gagagtgate ccnnscacac ttacacggtt cct	43
	<210> 379	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 379 gggatcactc tcccagggtca cggagcc	27
	<210> 380	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
[0089]	<400> 380 ctgggagagt gatcccaacc acnnstacac ggttcctgcg gtg	43
	<210> 381	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 381 gtggttggga tcactctccc aggtcac	27
	<210> 382	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<220>	
	<221> misc_特征	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n为a, c, g或t	
[0089]	<400> 382 tcccaaccac acttacacgg ttnnsgcggg ggcttgtgtg acg	43
	<210> 383	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 383 aaccgtgtaa gtgtggttgg gatcact	27

<210> 384
 <211> 588
 <212> PRT
 <213> 篮状菌属的种

<400> 384

Gly Ser Leu Asp Ser Phe Leu Ala Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Val Leu Asn Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ala Asp Val Ala Gly Ala
 20 25 30

Ser Ala Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Arg Ser Asp Pro Asp Tyr
 35 40 45

Phe Tyr Ser Trp Thr Arg Asp Ala Ala Leu Thr Ala Lys Tyr Leu Val
 50 55 60

Asp Ala Phe Ile Ala Gly Asn Lys Asp Leu Glu Gln Thr Ile Gln Glu
 65 70 75 80

Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Gln Val Gln Thr Ile Ser Asn Pro Ser Gly
 85 90 95

Asp Leu Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asn Glu
 100 105 110

[0090]

Thr Ala Phe Thr Gly Pro Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala
 115 120 125

Leu Arg Ala Thr Ala Leu Ile Ala Tyr Ala Asn Tyr Leu Ile Asp Asn
 130 135 140

Gly Gln Ala Ser Thr Ala Asp Glu Ile Ile Trp Pro Ile Val Gln Asn
 145 150 155 160

Asp Leu Ser Tyr Val Thr Gln Tyr Trp Asn Ser Ser Thr Phe Asp Leu
 165 170 175

Trp Glu Glu Val Glu Gly Ser Ser Phe Phe Thr Thr Ala Val Gln His
 180 185 190

Arg Ala Leu Val Glu Gly Asn Ala Leu Ala Thr Arg Leu Asn His Thr
 195 200 205

Cys Pro Asn Cys Val Ser Gln Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu Gln
 210 215 220

Ser Tyr Trp Thr Gly Ser Tyr Val Leu Ala Asn Phe Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Ser Gly Lys Asp Val Asn Ser Ile Leu Gly Ser Ile His Thr Phe
 245 250 255

Asp Pro Ala Gly Gly Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Ala
 260 265 270

	Arg	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Val	Val	Thr	Asp	Ser	Phe	Arg	Ser	Val
	275							280					285			
	Tyr	Ala	Val	Asn	Ser	Gly	Ile	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Val	Ala	Val	Gly
	290						295					300				
	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro	Trp	Tyr	Leu	Ala
	305					310					315					320
	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Tyr	Gln	Trp	Asn
					325					330					335	
	Lys	Ile	Gly	Ser	Ile	Ser	Ile	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Ala	Phe	Phe	Gln
				340					345					350		
	Asp	Ile	Tyr	Pro	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Thr	Tyr	Asn	Ser	Gly	Ser	Ser
		355						360					365			
	Thr	Phe	Asn	Asp	Ile	Ile	Ser	Ala	Val	Gln	Thr	Tyr	Ala	Asp	Gly	Tyr
		370					375						380			
	Leu	Ser	Ile	Ile	Glu	Lys	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Thr	Glu
	385					390					395					400
	Gln	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	Gly	Thr	Pro	Leu	Ser	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr
					405					410					415	
[0091]	Trp	Ser	Tyr	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln	Ser	Ile
				420					425					430		
	Val	Pro	Ala	Ser	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Ala	Val
		435						440					445			
	Cys	Ser	Ala	Thr	Ser	Ala	Thr	Gly	Pro	Tyr	Ser	Thr	Ala	Thr	Asn	Thr
		450					455						460			
	Ala	Trp	Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Val	Pro
	465					470					475					480
	Cys	Thr	Thr	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Val	Thr	Phe	Asp	Glu	Ile	Val	Ser
					485					490					495	
	Thr	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ser	Ile	Pro	Glu	Leu
				500					505					510		
	Gly	Asn	Trp	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Ile	Pro	Leu	Arg	Ala	Asp	Ala	Tyr
		515						520					525			
	Thr	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Trp	Tyr	Val	Thr	Leu	Asn	Leu	Pro	Ala	Gly
		530					535						540			
	Thr	Ser	Phe	Glu	Tyr	Lys	Phe	Phe	Lys	Lys	Glu	Thr	Asp	Gly	Thr	Ile
	545					550					555					560
	Val	Trp	Glu	Asp	Asp	Pro	Asn	Arg	Ser	Tyr	Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Cys
					565						570					575

Gly Gln Thr Thr Ala Ile Leu Asp Asp Ser Trp Gln
580 585

<210> 385
<211> 112
<212> PRT
<213> 灰腐质霉

<400> 385

Cys Ala Asp Ala Ser Glu Val Tyr Val Thr Phe Asn Glu Arg Val Ser
1 5 10 15

Thr Ala Trp Gly Glu Thr Ile Lys Val Val Gly Asn Val Pro Ala Leu
20 25 30

Gly Asn Trp Asp Thr Ser Lys Ala Val Thr Leu Ser Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Lys Ser Asn Asp Pro Leu Trp Ser Ile Thr Val Pro Ile Lys Ala Thr
50 55 60

Gly Ser Ala Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Lys Val Gly Thr Asn Gly Lys
65 70 75 80

Ile Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Ile Thr Leu Gln Thr Ala
85 90 95

Ser Ser Ala Gly Lys Cys Ala Ala Gln Thr Val Asn Asp Ser Trp Arg
100 105 110

[0092]

<210> 386
<211> 109
<212> PRT
<213> 疏棉状嗜热丝孢菌

<400> 386

Cys Thr Pro Pro Ser Glu Val Thr Leu Thr Phe Asn Ala Leu Val Asp
1 5 10 15

Thr Ala Phe Gly Gln Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Pro Glu Leu
20 25 30

Gly Ser Trp Asp Pro Ala Asn Ala Leu Leu Met Ser Ala Lys Ser Trp
35 40 45

Thr Ser Gly Asn Pro Val Trp Thr Leu Ser Ile Ser Leu Pro Ala Gly
50 55 60

Thr Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Lys Asp Asp Gly Ser Ser Asp
65 70 75 80

Val Val Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Asn Val Pro Lys Asp
85 90 95

Cys Gly Ala Asn Thr Ala Thr Val Asn Ser Trp Trp Arg
100 105

<210> 387
<211> 108

<212> PRT
<213> 埃默森篮状菌

<400> 387

Cys Thr Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe Asp Glu Ile Val Ser
1 5 10 15

Thr Ser Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Pro Glu Leu
20 25 30

Gly Asn Trp Ser Thr Ala Ser Ala Ile Pro Leu Arg Ala Asp Ala Tyr
35 40 45

Thr Asn Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Asn Leu Pro Pro Gly
50 55 60

Thr Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Phe Lys Asn Gln Thr Asp Gly Thr Ile
65 70 75 80

Val Trp Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Ala Tyr Cys
85 90 95

Gly Gln Thr Thr Ala Ile Leu Asp Asp Ser Trp Gln
100 105

<210> 388
<211> 108
<212> PRT
<213> 黑曲霉

[0093]

<400> 388

Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr
1 5 10 15

Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu
20 25 30

Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr
35 40 45

Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly
50 55 60

Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val
65 70 75 80

Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys
85 90 95

Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
100 105

<210> 389
<211> 108
<212> PRT
<213> 泡盛曲霉

<400> 389

Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr

1	5	10	15
Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu	20	25	30
Gly Asp Trp Asp Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr	35	40	45
Thr Ser Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly	50	55	60
Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val	65	70	75
Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys	85	90	95
Gly Glu Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg	100	105	

<210> 390
<211> 108
<212> PRT
<213> 太瑞斯梭孢壳霉

<400> 390

Cys Ser Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asn Glu Arg Val Thr	1	5	10	15
---	---	---	----	----

[0094]

Thr Gln Trp Gly Gln Thr Ile Lys Val Val Gly Asp Ala Ala Ala Leu	20	25	30
Gly Gly Trp Asp Thr Ser Lys Ala Val Pro Leu Ser Ala Ala Gly Tyr	35	40	45
Thr Ala Ser Asp Pro Leu Trp Ser Gly Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly	50	55	60
Leu Ala Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Asn Val Ala Ala Asp Gly Gly Val	65	70	75
Thr Trp Glu Ala Asp Pro Asn His Ser Phe Thr Val Pro Ala Ala Cys	85	90	95
Gly Thr Thr Ala Val Thr Arg Asp Asp Thr Trp Gln	100	105	

<210> 391
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 391
gagagagtgc gggcctcttc gctatttcta ga

32

<210> 392
<211> 40

[0095]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 392
caaaataaaa tcattatttg tctagaaata gcgaagaggc 40

<210> 393
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 393
caaataatga ttttattttg actgatagtg acctgttcgt 40

<210> 394
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 394
ttgctcatca atgtgttgca acgaacaggt cactatcagt 40

<210> 395
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 395
tgcaacacat tgatgagcaa tgctttttta taatgccaac 40

<210> 396
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 396
agcctgcttt tttgtacaaa gttggcatta taaaaaagca 40

<210> 397
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 397
tttgtacaaa aaagcaggt atgcacgtcc tgtcgactgc 40

<210> 398
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 398 caacggagcc gagcagcacc gcagtcgaca ggacgtgcat	40
	<210> 399 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 399 ggtgctgctc ggctccgttg ccgttcaaaa ggtcctggga	40
	<210> 400 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 400 agaccgcttg atcctggtct tcccaggacc ttttgaacgg	40
	<210> 401 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0096]	<400> 401 agaccaggat caagcggctc gtccgacgtc accaagaggt	40
	<210> 402 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 402 gc tga tgaag tcgtcaacag acc tct tggc gacgtcggac	40
	<210> 403 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 403 ctgttgacga cttcatcagc accgagacgc ctattgcact	40
	<210> 404 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 404 cattgcaaag aagattgttc agtgcaatag gegtctcggt	40

	<210> 405	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 405	
	gaacaatctt ctttgaatg ttggtcctga tggatgccgt	40
	<210> 406	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 406	
	ccagctgatg tgccgaatgc acggcatcca tcaggaccaa	40
	<210> 407	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 407	
	gcattcggca catcagctgg tgcggtgatt gcattctccca	40
[0097]	<210> 408	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 408	
	gtagtcggg tcaattgtgc tgggagatgc aatcacgca	40
	<210> 409	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 409	
	gcacaattga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
	<210> 410	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 410	
	tcttgaagac aagagcgcta tctcgcgtcc acatgtaata	40
	<210> 411	
	<211> 40	

[0098]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 411
tagcgctctt gtcttcaaga acctcatcga ccgcttcacc 40

<210> 412
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 412
aggcccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgaggt 40

<210> 413
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 413
gaaacgtacg atgcgggcct gcagcgccgc atcgagcagt 40

<210> 414
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 414
agtgccttg gcagtaatgt actgctcgat gcggcgtgc 40

<210> 415
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 415
acattactgc ccaggtcact ctccagggcc tctctaacc 40

<210> 416
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 416
cgtccgcgag ggagcccgag gggtttagaga ggccctggag 40

<210> 417
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 417 ctcgggctcc ctcgcgacg gctctggtct cggcgagccc	40
	<210> 418 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 418 ttcagggtca actcaaactt gggtctgcgc agaccagagc	40
	<210> 419 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 419 aagtttgagt tgacctgaa gctttcacc ggcaactggg	40
	<210> 420 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0099]	<400> 420 gccatccgc tgcggtcgc ccagttgcc ggtgaaaggc	40
	<210> 421 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 421 gtcgaccgca gcgggatggc ccagctctgc gagccattgc	40
	<210> 422 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 422 actttgagta tccaatcaag gcaatggctc gcagagctgg	40
	<210> 423 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 423 cttgattgga tactcaaagt ggctcatcaa caacaactat	40

	<210> 424	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 424	
	acgttggaca cagtcgactg atagttgttg ttgatgagcc	40
	<210> 425	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 425	
	cagtcgactg tgtccaacgt catctggcct attgtgcgca	40
	<210> 426	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 426	
	ggcaacatag ttgaggtcgt tgcgcacaat aggccagatg	40
[0100]	<210> 427	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 427	
	acgacctcaa ctatgttgcc cagtactgga accaaaccgg	40
	<210> 428	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 428	
	cttcttccca gaggtcaaag ccggttttgt tccagtactg	40
	<210> 429	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 429	
	ctttgacctc tgggaagaag tcaatgggag ctcattcttt	40
	<210> 430	
	<211> 40	

[0101]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 430	
cgggtgctgggt tggcaacagt aaagaatgag ctccattga	40
<210> 431	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 431	
actgttgcca accagcacg agcacttgtc gagggcgcca	40
<210> 432	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 432	
gccaaagagtgc gcagcaagag tggcgccctc gacaagtgc	40
<210> 433	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 433	
ctcttgctgc cactcttggc cagtcgggaa gcgcttattc	40
<210> 434	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 434	
aaacctgggg agcaacagat gaataagcgc ttcccgactg	40
<210> 435	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 435	
atctgttgct cccaggttt tgtgctttct ccaacgattc	40
<210> 436	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 436 tatccaccag acgacaccca gaatcgttgg agaaagcaca	40
	<210> 437 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 437 tgggtgtcgt ctggtggata cgtcgactcc aacatcaaca	40
	<210> 438 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 438 gccagtcttg ccctcgttgg tgttgatgtt ggagtcgacg	40
	<210> 439 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0102]	<400> 439 ccaacgaggg caggactggc aaggatgtca actccgtcct	40
	<210> 440 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 440 cgaaggtgtg gatggaagtc aggacggagt tgacatcctt	40
	<210> 441 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 441 gacttcacac cacaccttcg atcccaacct tggetgtgac	40
	<210> 442 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 442 catggctgga aggtgcctgc gtcacagcca aggttgggat	40

	<210> 443	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 443	
	gcaggcacct tccagccatg cagtgacaaa gcgctctcca	40
	<210> 444	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 444	
	gtcgacaaca accttgaggt tggagagcgc ttgtcactg	40
	<210> 445	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 445	
	acctcaaggt tgttgtcgac tccttcgct ccatctacgg	40
[0103]	<210> 446	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 446	
	caggaatgcc cttgttcacg ccgtagatgg agcggaagga	40
	<210> 447	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 447	
	cgtgaacaag ggcattcctg ccgtgctgc cgtcgccatt	40
	<210> 448	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 448	
	acatctcttg cataccggcc aatggcgacg gcagcacggg	40
	<210> 449	
	<211> 40	

[0104]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 449
ggcgggtatg cagaggatgt gtactacaac ggcaaccctt 40

<210> 450
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 450
agcaaatgta gcaagatacc aagggttgcc gttgtagtac 40

<210> 451
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 451
ggatatcttgc tacatttgct gctgccgagc agctgtacga 40

<210> 452
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 452
tcttcagac gtagatggca tcgtacagct gctcggcagc 40

<210> 453
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 453
tgccatctac gtctggaaga agacgggctc catcacggtg 40

<210> 454
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 454
aagccaggg aggtggcggt caccgtgatg gagcccgtct 40

<210> 455
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 455 accgccacct ccctggcctt ctccaggag cttgttcctg	40
	<210> 456 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 456 gtaggtcccg gccgtcacgc caggacaag ctctggaag	40
	<210> 457 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 457 gcgtgacggc egggacctac tccagcagct ctccgacctt	40
	<210> 458 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0105]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 458 cggcgttgat gatgttgta aaggtcgaag agctgctgga	40
	<210> 459 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 459 taccaacatc atcaacgccg tctcgacata cgccgatggc	40
	<210> 460 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 460 ttggcagcct cgctgaggaa gccatcggcg tatgtcgaga	40
	<210> 461 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 461 ttctcagcg aggctgcaa gtacgtcccc gccgacggtt	40

	<210> 462	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 462	
	gtcaaac tgc tcggccagcg aaccgtcggc ggggacgtac	40
	<210> 463	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 463	
	cgctggccga gcagtttgac cgcaacagcg gcactccgct	40
	<210> 464	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 464	
	acgtcaggtg aaccgcagac agcggagtgc cgctgttgcg	40
[0106]	<210> 465	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 465	
	gtctgcggtt cacctgacgt ggtcgtacgc ctcgttcttg	40
	<210> 466	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 466	
	gcccgcagaa gcgtggctgt caagaacgag gcgtacgacc	40
	<210> 467	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 467	
	acagccacgc ttctgcgggc tggeatcgtg cccccctcgt	40
	<210> 468	
	<211> 40	

[0107]

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	468	
	gctagcgctg ctgttggccc acgagggggg cacgatgcca	40
<210>	469	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	469	
	gggccaacag cagcgctagc acgatccct cgacgtgctc	40
<210>	470	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	470	
	atccgaccac ggacgcgcg gagcacgtcg aggggatcgt	40
<210>	471	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	471	
	cggcgcgtcc gtggtcggat cctactcgcg tcccaccgcc	40
<210>	472	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	472	
	tgcgacggag ggaatgacgt ggcggtggga cgcgagtagg	40
<210>	473	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	473	
	acgtcattcc ctccgtcgca gacgcccaag cctggcgtgc	40
<210>	474	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

	<223> DNA引物	
	<400> 474 cgtgtaggga gtaccggaag gcacgccagg cttgggcgtc	40
	<210> 475 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 475 cttcgggtac tccctacacg cccctgccct gcgcgacccc	40
	<210> 476 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 476 aggtgacggc cacggagggt ggggtcgcgc agggcagggg	40
	<210> 477 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0108]	<400> 477 aacctccgtg gccgtcacct tccacgagct cgtgtcgaca	40
	<210> 478 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 478 ttgaccgtct ggccaaactg tgtcgacacg agctcgtgga	40
	<210> 479 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 479 cagtttggcc agacgggtcaa ggtggcgggc aacgccgcgg	40
	<210> 480 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 480 cgtgctccag ttgcccaggg ccgcggcggt gcccccacc	40

	<210> 481	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 481	
	ccctgggcaa ctggagcacg agcgccgccg tggctctgga	40
	<210> 482	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 482	
	tatcacgata gttgacggcg tccagagcca cggcggcgct	40
	<210> 483	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 483	
	cgccgtcaac tategtgata accaccccct gtggattggg	40
[0109]	<210> 484	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 484	
	ccagcctcga ggttgaccgt cccaatccac aggggggtgt	40
	<210> 485	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 485	
	acggtcaacc tcgaggtgg agacgtcgtg gagtacaagt	40
	<210> 486	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 486	
	atcttggecc acattgatgt acttgtaact cagacgtct	40
	<210> 487	
	<211> 40	

[0110]

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	487	
	acatcaatgt gggccaagat ggctccgtga cctgggagag	40
<210>	488	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	488	
	tgtaagtgtg gttgggatca ctctcccagg tcacggagcc	40
<210>	489	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	489	
	tgatcccaac cacacttaca cggttcctgc ggtggcttgt	40
<210>	490	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	490	
	tccttgacaa cctgcgtcac acaagccacc gcaggaaccg	40
<210>	491	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	491	
	gtgacgcagg ttgtcaagga ggacacctgg cagtcgtaaa	40
<210>	492	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	492	
	ctttgtacaa gaaagctggg tttagactg ccaggtgtcc	40
<210>	493	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

	<223> DNA引物	
	<400> 493 cccagctttc ttgtacaaag ttggcattat aagaaagcat	40
	<210> 494 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 494 ttgcaacaaa ttgataagca atgcttttctt ataatgccaa	40
	<210> 495 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 495 tgcttatcaa tttgttgcaa cgaacaggtc actatcagtc	40
	<210> 496 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0111]	<400> 496 tcaaataatg attttatttt gactgatagt gacctgttcg	40
	<210> 497 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 497 aaaataaaaat cattatttga agcttaagcc tggggtgcc	40
	<210> 498 <211> 31 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 498 agagagtcac taggcacccc aggettaagc t	31
	<210> 499 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 499 gtagtccggg tcttgtgtgc tgggagatgc aatcacccga	40

	<210> 500 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 500 gcacacaaga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
	<210> 501 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 501 tagcgtcttt gtcttcaaga ttctcatcga ccgtttcacc	40
	<210> 502 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 502 aggcccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa	40
[0112]	<210> 503 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 503 tatcacgata gttgacacgg tccagagcca cggcggcgct	40
	<210> 504 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 504 ccgtgtcaac tatcgtgata accaccccct gtggattggg	40
	<210> 505 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 505 gtagtccggg tcttgtgtgc tgggagatgc aatcacccga	40
	<210> 506 <211> 40	

[0113]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 506	
gcacacaaga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
<210> 507	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 507	
tagcgctett gtcttcaaga ttctcatcga ccgcttcacc	40
<210> 508	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 508	
aggcccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa	40
<210> 509	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 509	
tagcgctett gtcttcaaga ttctcatcga ccgcttcacc	40
<210> 510	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 510	
aggcccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa	40
<210> 511	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 511	
tatcacgata gttgacacgg tccagagcca cggcggcgct	40
<210> 512	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 512 ccgtgtcaac tatcgtgata accaccccct gtggattggg	40
	<210> 513 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 513 tatcacgata gttgacacgg tccagagcca cggcggcgct	40
	<210> 514 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 514 ccgtgtcaac tatcgtgata accaccccct gtggattggg	40
	<210> 515 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0114]	<400> 515 gtagtcggg tcttgtgtgc tgggagatgc aatcacgca	40
	<210> 516 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 516 gcacacaaga ccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
	<210> 517 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 517 gtagtcggg tcttgtgtgc tgggagatgc aatcacgca	40
	<210> 518 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 518 gcacacaaga ccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40

	<210> 519	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 519	
	tagcgctctt gtcttcaaga ttctcatcga ccgcttcacc	40
	<210> 520	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 520	
	aggcccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa	40
	<210> 521	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 521	
	tatcacgata gttgacacgg tccagagcca cggcggcget	40
[0115]	<210> 522	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 522	
	ccgtgtcaac tatcgtgata accacccct gtggattggg	40
	<210> 523	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 523	
	gtagtccggg tcttgtgtgc tgggagatgc aatcaccgca	40
	<210> 524	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 524	
	gcacacaaga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
	<210> 525	
	<211> 40	

[0116]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 525
tagcgctctt gtcttcaaga ttctcatcga ccgcttcacc 40

<210> 526
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 526
aggcccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa 40

<210> 527
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 527
tatcacgata gttgacacgg tccagagcca cggcggcgct 40

<210> 528
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 528
ccgtgtcaac tatcgtgata accacccctt gtggattggg 40

<210> 529
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 529
gccccagcaa gaggcgctgt caagaacgag ggcgtacgac 40

<210> 530
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 530
acagccgctc ttcttcgggc tggcatcgtg cccccctcgt 40

<210> 531
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 531 gcccgcacgaa gagcggctgt caagaacgag gcgtacgacc	40
	<210> 532 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 532 acagccgctc ttctctgggc ttgcctctgt cccccctcgt	40
	<210> 533 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 533 ttgaccgtat ggccaaactg tctgcacacg agctcttgga	40
	<210> 534 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0117]	<400> 534 cagtttgcc ataccgtcaa ggtggcgggc aacgccgcgg	40
	<210> 535 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 535 tatcacgata gttgacacgg tccagagcca cggcggcgct	40
	<210> 536 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 536 ccgtgtcaac tctctgata accacccctc gtggattggg	40
	<210> 537 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 537 atcttggccc acaatgatgt acttgactc cagcagctct	40

	<210> 538	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 538	
	acatcattgt gggccaagat ggctccgtga cctgggagag	40
	<210> 539	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 539	
	gtagtccggg tcttgtgtgc tgggagatgc aatcaccgca	40
	<210> 540	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 540	
	gcacacaaga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
[0118]	<210> 541	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 541	
	gcccgcagaa gagcggctgt caagaacgag gcgtacgacc	40
	<210> 542	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 542	
	acagccgctc ttctcgggc tggcatcgtg cccccctcgt	40
	<210> 543	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 543	
	ttgaccgtat ggccaaactg tgctgcacag agctcgtgga	40
	<210> 544	
	<211> 40	

[0119]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 544	
cagtttggcc atacggtaa ggtggcgggc aacgccgcgg	40
<210> 545	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 545	
tatcacgata gttgacacgg tccagagcca cggcggcgct	40
<210> 546	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 546	
ccgtgtcaac tatcgtgata accaccccct gtggattggg	40
<210> 547	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 547	
atcttggecc acaatgatgt acttgtaact cagcagctct	40
<210> 548	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 548	
acatcattgt ggccaagat ggctccgtga cctgggagag	40
<210> 549	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 549	
tagegtcttt gtcttcaaga ttctcatcga ccgttcacc	40
<210> 550	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 550 aggcccgcacat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa	40
	<210> 551 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 551 gcccgcacgaa gagcggctgt caagaacgag gcgtacgacc	40
	<210> 552 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 552 acagccgctc ttctctgggc tggcatcgtg cccccctcgt	40
	<210> 553 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0120]	<400> 553 ttgaccgtat ggccaaactg tgctgacacg agctcgtgga	40
	<210> 554 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 554 cagtttgccc atacgggtcaa ggtggcgggc aacgccgcgg	40
	<210> 555 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 555 tatcacgata gttgacacgg tccagagcca cggcggcgct	40
	<210> 556 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 556 ccgtgtcaac tatcgtgata accaccccct gtggattggg	40

	<210> 557	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 557	
	atcttgcccc acaatgatgt acttgctactc cagcagctct	40
	<210> 558	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 558	
	acatcattgt gggccaagat ggctccgtga cctgggagag	40
	<210> 559	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 559	
	gtagtccggg tcttgtgtgc tgggagatgc aatcacccga	40
[0121]	<210> 560	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 560	
	gcacacaaga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
	<210> 561	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 561	
	tagcgtcttt gtcttcaaga ttctcatga ccgcttcacc	40
	<210> 562	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 562	
	aggcccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa	40
	<210> 563	
	<211> 40	

[0122]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 563
gtagtccggg tcacgtgtgc tgggagatgc aatcacccga 40

<210> 564
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 564
gcacacgtga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga 40

<210> 565
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 565
gtagtccggg tcacgtgtgc tgggagatgc aatcacccga 40

<210> 566
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 566
gcacacgtga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga 40

<210> 567
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 567
tagcgtcttt gtcttcaaga ttctcatcga ccgcttcacc 40

<210> 568
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 568
aggeccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa 40

<210> 569
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 569 gtagtcggg tcacgtgtgc tgggagatgc aatcaccgca	40
	<210> 570 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 570 gcacacgtga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
	<210> 571 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 571 tagcgetett gtcttcaaga ttctcatcga ccgettcacc	40
	<210> 572 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0123]	<400> 572 aggeccgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgagaa	40
	<210> 573 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 573 tatacagata gttgacacgg tccagagcca cggcggcgct	40
	<210> 574 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 574 ccgtgtcaac tategtgata accacccct gtggattggg	40
	<210> 575 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 575 gcccgacgaa gagcggctgt caagaacgag gcgtacgacc	40

	<210> 576	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 576	
	acagccgctc ttctgcgggc tggcatcgtg cccccctcgt	40
	<210> 577	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 577	
	acgtcaggtg acgcgcagac agcggagtgc cgctgttgcg	40
	<210> 578	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 578	
	gtctgcgcgt cacctgacgt ggtcgtacgc ctctgttcttg	40
[0124]	<210> 579	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 579	
	acgtcaggtg acccgcagac agcggagtgc cgctgttgcg	40
	<210> 580	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 580	
	gtctgcgggt cacctgacgt ggtcgtacgc ctctgttcttg	40
	<210> 581	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 581	
	agaaacgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgaggt	40
	<210> 582	
	<211> 40	

[0125]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 582
gaaacgtacg atgcgtttct gcagegccgc atcgagcagt 40

<210> 583
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 583
acgtcaggtag acgcgcagac agcggagtgc cgctgttgcg 40

<210> 584
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 584
gtctgcgcgt cacctgacgt ggctgtagc ctcgtttcttg 40

<210> 585
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 585
gcccgcacggg ccgtggctgt caagaacgag gcgtacgacc 40

<210> 586
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 586
acagccacgg cccgtcgggc tggcatcgtg cccccctcgt 40

<210> 587
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 587
aacctccgtg gccgtcacct tccacgttct cgtgtcgaca 40

<210> 588
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 588 ttgaccgtct ggccaaactg tgctgacacg agaacgtgga	40
	<210> 589 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 589 atcttgcccc actttgatgt acttgtaact cagacgtct	40
	<210> 590 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 590 acatcaaagt gggccaagat ggctccgtga cctgggagag	40
	<210> 591 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0126]	<400> 591 gtagtcggg tcacgtgtgc tgggagatgc aatcacgcga	40
	<210> 592 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 592 gcacacgtga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga	40
	<210> 593 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 593 agaaacgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgaggt	40
	<210> 594 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 594 gaaacgtacg atgcgtttct gcagcgccgc atcgagcagt	40

	<210> 595	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 595	
	acgtcaggtg acgcgcagac agcggagtgc cgctgttgcg	40
	<210> 596	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 596	
	gtctgcgcgt cacctgacgt ggctgtacgc ctctgttcttg	40
	<210> 597	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 597	
	gcccgcacggg ccgtggctgt caagaacgag gcgtacgacc	40
[0127]	<210> 598	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 598	
	acagccacgg cccgtcgggc tggcatcgtg cccccctcgt	40
	<210> 599	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 599	
	aacctccgtg gccgtcacct tccacgttct cgtgtcgaca	40
	<210> 600	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 600	
	ttgaccgtct ggccaaactg tgtcgacacg agaacgtgga	40
	<210> 601	
	<211> 40	

[0128]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 601
atcttgcccc actttgatgt acttgtagct cagcagctct 40

<210> 602
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 602
acatcaaagt gggccaagat ggctccgtga cctgggagag 40

<210> 603
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 603
gtagtccggg tcacgtgtgc tgggagatgc aatcaccgca 40

<210> 604
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 604
gcacacgtga cccggactac tattacatgt ggacgcgaga 40

<210> 605
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 605
agaaacgcat cgtacgtttc ggtgaagcgg tcgatgaggt 40

<210> 606
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 606
gaaacgtacg atgcgtttct gcagcggcgc atcgagcagt 40

<210> 607
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 607 acgtcaggtg aagcgcagac agcggagtgc cgctgttgcg	40
	<210> 608 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 608 gtctgcgctt cacctgacgt ggtegtacgc ctcgttcttg	40
	<210> 609 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 609 gccccgacggg ccgtggctgt caagaacgag gcgtacgacc	40
	<210> 610 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0129]	<400> 610 acagccacgg cccgtcgggc tggcatcggt cccccctcgt	40
	<210> 611 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 611 aacctccgtg gccgtcacct tccacgttct cgtgtcgaca	40
	<210> 612 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 612 ttgaccgtat ggccaaactg tgtegcacag agaacgtgga	40
	<210> 613 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 613 cagtttgcc atacggtcaa ggtggcgggc aacgccgcgg	40

	<210> 614	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 614	
	tatcggcata gttgacggcg tccagagcca cggcggcgct	40
	<210> 615	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 615	
	cgccgtcaac tatgccgata accaccccct gtggattggg	40
	<210> 616	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 616	
	atcttgcccc actttgatgt acttgctactc cagcagctct	40
[0130]	<210> 617	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 617	
	acatcaaagt ggccaagat ggctccgtga cctgggagag	40
	<210> 618	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 618	
	acaagtttgt acaaaaaagc aggct	25
	<210> 619	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 619	
	gcagtcgaca ggacgtgcat agcctgcttt ttgtacaaa	40
	<210> 620	
	<211> 40	

[0131]

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	620	
	atgcacgtcc tgtcgactgc ggtgctgctc ggctccgttg	40
<210>	621	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	621	
	tcccaggacc ttttgaacgg caacggagcc gagcagcacc	40
<210>	622	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	622	
	ccgttcaaaa ggtcctggga agaccaggat caagcgtct	40
<210>	623	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	623	
	acctcttggg gacgtcggac agaccgcttg atcctggtct	40
<210>	624	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	624	
	gtccgacgtc accaagaggt ctgttgacga cttcatcagc	40
<210>	625	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	625	
	agtgcaatag gcgtctcggt gctgatgaag tcgtcaacag	40
<210>	626	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

	<223> DNA引物	
	<400> 626 accgagacgc ctattgcact gaacaatctt ctttgcaatg	40
	<210> 627 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 627 acggcatcca tcaggaccaa cattgcaaag aagattgttc	40
	<210> 628 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 628 ttggtcctga tggatgccgt gcattcggca catcagctgg	40
	<210> 629 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0132]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 629 tgggagatgc aatcacccga ccagctgatg tgccgaatgc	40
	<210> 630 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 630 tgcggtgatt gcattcccca gcacaattga cccggactac	40
	<210> 631 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 631 tctcgcgtcc acatgtaata gtagtcggg tcaattgtgc	40
	<210> 632 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 632 tattacatgt ggacgcgaga tagcgtctt gtcttcaaga	40

	<210> 633 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 633 ggatgaagcgg tcgatgaggt tcttgaagac aagagcgcta	40
	<210> 634 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 634 acctcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
	<210> 635 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 635 actgctcgat gcggcgctgc aggcccgcat cgtacgtttc	40
[0133]	<210> 636 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 636 gcagcgccgc atcgagcagt acattactgc ccaggtcact	40
	<210> 637 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 637 gggttagaga ggccctggag agtgacctgg gcagtaatgt	40
	<210> 638 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 638 ctccagggcc tctctaacc ctcgggctcc ctcgggacg	40
	<210> 639 <211> 40	

[0134]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 639	
gggctcgccg agaccagagc cgtccgcgag ggagcccgag	40
<210> 640	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 640	
gctctggtct cggcgagccc aagtttgagt tgacctgaa	40
<210> 641	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 641	
cccagttgcc ggtgaaagcc ttcagggtca actcaaactt	40
<210> 642	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 642	
gcctttcacc ggcaactggg gtcgaccgca gcgggatggc	40
<210> 643	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 643	
gcaatggctc gcagagctgg gccatccccg tcgggtcgac	40
<210> 644	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 644	
ccagctctgc gagccattgc cttgattgga tactcaaagt	40
<210> 645	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 645 atagttgttg ttgatgagcc actttgagta tccaatcaag	40
	<210> 646 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 646 ggctcatcaa caacaactat cagtcgactg tgtccaacgt	40
	<210> 647 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 647 tgcgacaaat aggcagatg acgttgaca cagtcgactg	40
	<210> 648 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0135]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 648 catctggcct attgtgcga acgacctcaa ctatgttgcc	40
	<210> 649 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 649 ccggtttggt tccagtactg ggcaacatag ttgaggtcgt	40
	<210> 650 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 650 cagtactgga accaaaccgg ctttgacctc tgggaagaag	40
	<210> 651 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 651 aaagaatgag ctccattga ctcttccca gaggtcaaag	40

	<210> 652	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 652	
	tcaatgggag ctcattcttt actgttgcca accagcaccg	40
	<210> 653	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 653	
	tggcgccctc gacaagtgt cggtgctggt tggcaacagt	40
	<210> 654	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 654	
	agcacttgtc gagggcgcca ctcttgctgc cactcttggc	40
[0136]	<210> 655	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 655	
	gaataagcgc ttcccgactg gccaaagagt gcagcaagag	40
	<210> 656	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 656	
	cagtcgggaa gcgcttattc atctgttgct ccccaggttt	40
	<210> 657	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 657	
	gaatcgttgg agaaagcaca aaacctgggg agcaacagat	40
	<210> 658	
	<211> 40	

[0137]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 658	
tgtgctttct ccaacgattc tgggtgtcgt ctggtggata	40
<210> 659	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 659	
tgttgatgtt ggagtcgacg tateccaccag acgacacca	40
<210> 660	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 660	
cgtegactcc aacatcaaca ccaacgaggg caggactggc	40
<210> 661	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 661	
aggacggagt tgacatcett gccagtcctg ccctcgttgg	40
<210> 662	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 662	
aaggatgtca actcgtcctt gacttcacac cacaccttcg	40
<210> 663	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 663	
gtcacagcca aggttgggat cgaaggtgtg gatggaagtc	40
<210> 664	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 664 atcccaacct tggctgtgac gcaggcacct tccagccatg	40
	<210> 665 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 665 tggagagcgc ttgtcactg catggctgga aggtgcctgc	40
	<210> 666 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 666 cagtgacaaa gcgctctcca acctcaaggt tgttgtegac	40
	<210> 667 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0138]	<400> 667 ccgtagatgg agcgggaagga gtcgacaaca accttgaggt	40
	<210> 668 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 668 tccttccgct ccactctacgg cgtgaacaag ggcattcctg	40
	<210> 669 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 669 aatggcgacg gcagcaccgg caggaatgcc cttgttcacg	40
	<210> 670 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 670 ccggtgctgc cgtcgccatt ggccggtatg cagaggatgt	40

	<210> 671	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 671	
	aagggttgcc gttgtagtac acatcctctg cataccggcc	40
	<210> 672	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 672	
	gtactacaac ggcaaccctt ggtatcttgc tacatttgct	40
	<210> 673	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 673	
	tcgtacagct gctcggcagc agcaaagtga gcaagatacc	40
[0139]	<210> 674	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 674	
	gtgcccagc agctgtacga tgccatctac gtctggaaga	40
	<210> 675	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 675	
	caccgtgatg gagcccgtct tcttcagac gtagatggca	40
	<210> 676	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 676	
	agacgggctc catcacggtg accgccacct ccctggcett	40
	<210> 677	
	<211> 40	

[0140]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 677
caggaacaag ctcttggaag aaggccaggg aggtggcggt 40

<210> 678
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 678
cttcaggag cttgttcctg gcgtgacggc cgggacctac 40

<210> 679
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 679
aaggtcgaag agctgctgga gtaggtcccg gccgtcacgc 40

<210> 680
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 680
tccagcaget cttcgacctt taccaacatc atcaacgcgc 40

<210> 681
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 681
gccatcggcg tatgtcgaga cggcgttgat gatgttggtg 40

<210> 682
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 682
tctcgacata cgccgatggc ttcctcagcg aggctgcaa 40

<210> 683
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 683 aaccgtcggc ggggacgtac ttggcagcct cgctgaggaa	40
	<210> 684 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 684 gtacgtcccc gccgacggtt cgctggccga gcagtttgac	40
	<210> 685 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 685 agcggagtgc cgctgttgcg gtcaaaactgc tcggccagcg	40
	<210> 686 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0141]	<400> 686 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgctt cacctgacgt	40
	<210> 687 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 687 caagaacgag gcgtacgacc acgtcagggtg aagcgagac	40
	<210> 688 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 688 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccacgg cccgtcgggc	40
	<210> 689 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 689 acgagggggg cacgatgcca gcccgcgggg ccgtggctgt	40

	<210> 690 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 690 tggcatcgtg cccccctcgt gggccaacag cagcgctagc 40
	<210> 691 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 691 gagcacgtcg aggggatcgt gctagcgctg ctgttgcccc 40
	<210> 692 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 692 acgatccccct cgacgtgctc cggcgcgtcc gtggtcggat 40
[0142]	<210> 693 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 693 ggcgggtggga cgcgagtagg atccgaccac ggacgcgccg 40
	<210> 694 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 694 cctactcgcg tcccaccgcc acgtcattcc ctccgtcgca 40
	<210> 695 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 695 gcacgccagg cttgggcgtc tgcgacggag ggaatgacgt 40
	<210> 696 <211> 40

[0143]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 696
gacgcccaag cctggcgtgc ctccggtagc tccctacacg 40

<210> 697
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 697
ggggtcgcgc agggcagggg cgtgtaggga gtaccggaag 40

<210> 698
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 698
cccctgcct gcgcgacccc aacctccgtg gccgtcacct 40

<210> 699
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 699
tgtcgacacg agctcgtgga aggtgacggc cacggaggtt 40

<210> 700
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 700
tccacgagct cgtgtcgaca cagtttgcc agacggtcaa 40

<210> 701
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 701
ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtct ggccaaactg 40

<210> 702
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 702 ggtagcgggc aacgccgcgg ccctgggcaa ctggagcacg	40
	<210> 703 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 703 tccagagcca cggcggcgct cgtgtccag ttgccaggg	40
	<210> 704 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 704 agcgcgcgcg tggctctgga cgccgtcaac tatgccata	40
	<210> 705 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0144]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 705 cccaatccac agggggtggt tatcggcata gttgacggc	40
	<210> 706 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 706 accacccct gtggattggg acggtcaacc tcgaggctgg	40
	<210> 707 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 707 acttgtaact cagacgtct ccagctcga ggttgaccgt	40
	<210> 708 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 708 agacgtcgtg gagtacaagt acatcaatgt gggccaagat	40

	<210> 709	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 709	
	ctctcccagg tcacggagcc atcttgccc acattgatgt	40
	<210> 710	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 710	
	ggctccgtga cctgggagag tgatccaac cacacttaca	40
	<210> 711	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 711	
	acaagccacc gcaggaaccg tgtaagtgtg gttgggatca	40
[0145]	<210> 712	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 712	
	cggttcctgc ggtggcttgt gtgacgcagg ttgtcaagga	40
	<210> 713	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 713	
	tttacgactg ccaggtgtcc tccttgacaa cctgcgtcac	40
	<210> 714	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 714	
	ggacacctgg cagtcgtaaa cccagctttc ttgtacaaag	40
	<210> 715	
	<211> 24	

[0146]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 715	
accactttgt acaagaaagc tggg	24
<210> 716	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 716	
tgcggtgatt gcattccca gcacatttg cccggactac	40
<210> 717	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 717	
tctcgcgtcc acatgtaata gtagtcggg caaagtgtgc	40
<210> 718	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 718	
cgcaacagcg gcactccget gtctgcggtt cacctgacgt	40
<210> 719	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 719	
caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
<210> 720	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 720	
tgtegcacag agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
<210> 721	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 721 tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttggcc acacggtcaa	40
	<210> 722 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 722 ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccggtt ggccaaactg	40
	<210> 723 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 723 agcgcgcgcg ttgctctgga cgccgtcaac tataagata	40
	<210> 724 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0147]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 724 cccaatccac agggggtggt tatctctata gttgacggcg	40
	<210> 725 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 725 tgcggtgatt gcatctccca gcacacttga cccggactac	40
	<210> 726 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 726 tctcgcgtcc acatgtaata gtagtcggg tcaagtgtgc	40
	<210> 727 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 727 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40

	<210> 728	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 728	
	caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 729	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 729	
	tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 730	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 730	
	tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttgccc acacgggtcaa	40
[0148]	<210> 731	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 731	
	cgcgcgcgtt gcccgcacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 732	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 732	
	agcgcgcgcg tggctctgga cgcgctaac tatagagata	40
	<210> 733	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 733	
	cccaatccac agggggtggt tatctctata gttgacggcg	40
	<210> 734	
	<211> 40	

[0149]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 734	
tgcggtgatt gcattccca gcacactttg cccggactac	40
<210> 735	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 735	
tctcgcgtcc acatgtaata gtagtcggg caaagtgtgc	40
<210> 736	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 736	
ggtgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
<210> 737	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 737	
tcctcatega ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
<210> 738	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 738	
cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
<210> 739	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 739	
caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
<210> 740	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 740 tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 741 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 741 tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttggcc acacggtcaa	40
	<210> 742 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 742 ccgcggcggtt gcccgcacac ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 743 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0150]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 743 agcgccgcgc ttgctctgga cgccgtcaac tatagagata	40
	<210> 744 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 744 cccaatccac aggggggtggt tatctctata gttgacggcg	40
	<210> 745 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 745 tgcggtgatt gcattccca gcacacttga cccggactac	40
	<210> 746 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 746 tctcgcgtcc acatgtaata gtagtccggg tcaagtgtgc	40

	<210> 747	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 747	
	ggatgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
	<210> 748	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 748	
	tcctcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
	<210> 749	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 749	
	cgcaacacgcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
[0151]	<210> 750	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 750	
	caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 751	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 751	
	tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 752	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 752	
	tccacgcgt cgtgtcgaca cagtttgcc acacggtcaa	40
	<210> 753	
	<211> 40	

[0152]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 753
ccggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg 40

<210> 754
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 754
agcgccgcg tggctctgga cgccgtcaac tatagagata 40

<210> 755
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 755
cccaatccac agggggtggt tatctctata gttgacggcg 40

<210> 756
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 756
tgcggtgatt gcattccca gcacaagaga cccggactac 40

<210> 757
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 757
tctcggtcc acatgtaata gtagtccggg tctcttgtgc 40

<210> 758
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 758
cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt 40

<210> 759
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 759 caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 760 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 760 tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 761 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 761 tccacgcgt cgtgtcgaca cagtttgcc acacgtcaa	40
	<210> 762 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0153]	<400> 762 ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 763 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 763 agcgccgcg tggctctgga cgccgtcaac tatagagata	40
	<210> 764 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 764 cccaatccac agggggtggt tatctctata gttgacggcg	40
	<210> 765 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 765 tgcggtgatt gcatctccca gcacaagaga cccggactac	40

	<210> 766	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 766	
	tctcgcgtcc acatgtaata gtagtccggg tctcttgtgc	40
	<210> 767	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 767	
	ggtgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
	<210> 768	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 768	
	tcctcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
[0154]	<210> 769	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 769	
	cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
	<210> 770	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 770	
	caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 771	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 771	
	tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 772	
	<211> 40	

[0155]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 772
tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttgccc acacgggtcaa 40

<210> 773
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 773
ccgcggcgctt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg 40

<210> 774
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 774
agcgccgcgcg tggctctgga cgccgtcaac tatagagata 40

<210> 775
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 775
cccaatccac agggggtggt tatctctata gttgacggcg 40

<210> 776
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 776
tgcggtgatt gcctctccca gcacaagaga cccggactac 40

<210> 777
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 777
tctcgctcc acatgtaata gtagtcggg tctcttgtgc 40

<210> 778
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 778 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgaga cacctgacgt	40
	<210> 779 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 779 caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg tctcgagac	40
	<210> 780 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 780 tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 781 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0156]	<400> 781 tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttgcc acacggtcaa	40
	<210> 782 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 782 ccgcggcggtt gcccgcacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 783 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 783 agcgcgcgcg ttgctctgga cgccgtcaac tatagagata	40
	<210> 784 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 784 cccaatccac agggggtggt tatctctata gttgacggcg	40

	<210> 785	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 785	
	tgcggtgatt gcatctccca gcacaagaga cccggactac	40
	<210> 786	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 786	
	tctcgcgtcc acatgtaata gtagtccggg tctcttgtgc	40
	<210> 787	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 787	
	ggatgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
[0157]	<210> 788	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 788	
	tcttcacga ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
	<210> 789	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 789	
	cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgaga cacctgacgt	40
	<210> 790	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 790	
	caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg tctcgcagac	40
	<210> 791	
	<211> 40	

[0158]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 791
tgtegacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt 40

<210> 792
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 792
tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttggcc acacgggtcaa 40

<210> 793
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 793
ccgcggcggtt gcccgcacc ttgaccgtgt ggccaaactg 40

<210> 794
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 794
agcgcgcgcg tggctctgga cgccgtcaac tatagagata 40

<210> 795
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 795
cccaatccac agggggtggt tatctctata gttgacggcg 40

<210> 796
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 796
cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt 40

<210> 797
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 797 caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 798 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 798 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgc tccgtcgggc	40
	<210> 799 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 799 acgagggggg cacgatgcca gcccgcgga gcgcggctgt	40
	<210> 800 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0159]	<400> 800 tccacgagct cgtgtcgaca cagtttgcc acacggtcaa	40
	<210> 801 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 801 ccgcggcggtt gcccgcacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 802 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 802 agcgccgcg tggctctgga ccgcgtcaac tatecgata	40
	<210> 803 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 803 cccaatccac agggggtggt tatecgata gttgacgcgg	40

	<210> 804	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 804	
	agacgtcgtg gagtacaagt acatcattgt gggccaagat	40
	<210> 805	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 805	
	ctctcccagg tcacggagcc atcttgccc acaatgatgt	40
	<210> 806	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 806	
	cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
[0160]	<210> 807	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 807	
	caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 808	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 808	
	ggtcgtacgc ctctttcttg acagccgcgc aacgtcgggc	40
	<210> 809	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 809	
	acgagggggg cacgatgcca gcccgacgtt gcgcggtgt	40
	<210> 810	
	<211> 40	

[0161]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 810	
tccacgagct cgtgtcgaca cagtttgccc acacgggtcaa	40
<210> 811	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 811	
ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
<210> 812	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 812	
agcgccgcgcg tggctctgga ccgcgtcaac tatcgcgata	40
<210> 813	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 813	
cccaatccac agggggtggt tatcgcgata gttgacgcgg	40
<210> 814	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 814	
agacgtcgtg gagtacaagt acatcattgt ggccaagat	40
<210> 815	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 815	
ctctcccagg tcacggagcc atcttgcccc acaatgatgt	40
<210> 816	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 816 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
	<210> 817 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 817 caagaacgag gcgtacgacc acgtcagggtg aaccgcagac	40
	<210> 818 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 818 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgg cccgtcgggc	40
	<210> 819 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0162]	<400> 819 acgagggggg cacgatgcca gcccgcgagg ccgcggctgt	40
	<210> 820 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 820 tccacgagct cgtgtcgaca cagtttgcc acacgggtaa	40
	<210> 821 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 821 ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 822 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 822 agcgccgccg tggctctgga ccgcgtcaac tatgccgata	40

	<210> 823 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 823 cccaatccac agggggtggt tatcggcata gttgacgcgg	40
	<210> 824 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 824 agacgtcgtg gagtacaagt acatcattgt gggccaagat	40
	<210> 825 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 825 ctctcccagg tcacggagcc atcttgccc acaatgatgt	40
[0163]	<210> 826 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 826 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
	<210> 827 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 827 caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 828 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 828 ggtcgtacgc ctcggttcttg acagccgagg cccgtcgggc	40
	<210> 829 <211> 40	

[0164]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 829	
acgagggggg cacgatgccg gcccgacggg ccgcggctgt	40
<210> 830	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 830	
tccacgagct cgtgtcgaca cagtttggcc acacgggtcaa	40
<210> 831	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 831	
ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
<210> 832	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 832	
agcgccgcgcg ttgctctgga cgccgtcaac tatcgcgata	40
<210> 833	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 833	
cccaatccac aggggtgtgt tatcgcgata gttgacggcg	40
<210> 834	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 834	
agacgtcgtg gagtacaagt acatcattgt gggccaagat	40
<210> 835	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 835 ctctcccagg tcacggagcc atcttgcccc acaatgatgt	40
	<210> 836 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 836 cagtagatgg agcggagga gtcgacaaca accttgaggt	40
	<210> 837 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 837 tccttcgct ccactactg cgtgaacaag ggcattcctg	40
	<210> 838 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0165]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 838 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgaga cacctgacgt	40
	<210> 839 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 839 caagaacgag gcgtacgacc acgtcagggt tctcgagac	40
	<210> 840 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 840 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccacgc tccgtcgggc	40
	<210> 841 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 841 acgagggggg cacgatgcca gcccagcgga gcgtggctgt	40

	<210> 842	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 842	
	cagtagatgg agcggaagga gtcgacaaca accttgaggt	40
	<210> 843	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 843	
	tccttcgct ccatctactg cgtagacaag ggcatctctg	40
	<210> 844	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 844	
	cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtg cacctgacgt	40
[0166]	<210> 845	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 845	
	caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg taccgcagac	40
	<210> 846	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 846	
	ggtcgtacgc ctggttcttg acagccacgc agcgtcgggc	40
	<210> 847	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 847	
	acgagggggg cacgatgcca gcccgacgct gcgtgctgt	40
	<210> 848	
	<211> 40	

[0167]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 848
cagtagatgg agcggaagga gtcgacaaca accttgaggt 40

<210> 849
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 849
tccttcgct ccacttactg cgtgaacaag ggcattcctg 40

<210> 850
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 850
cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggta cacctgacgt 40

<210> 851
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 851
caagaacgag gcgtacgacc acgtcagggtg taccgcagac 40

<210> 852
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 852
ggtcgtacgc ctctttcttg acagccacgt tacgtcgggc 40

<210> 853
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 853
acgagggggg cacgatgcca gcccgcagta acgtggctgt 40

<210> 854
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 854 tccacgagct cgtgtcgaca cagtttgcc acacggtcaa	40
	<210> 855 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 855 ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 856 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 856 cagtagatgg agcgggaagga gtcgacaaca accttgaggt	40
	<210> 857 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0168]	<400> 857 tccttcgct ccatctactg cgtgaacaag ggcatctctg	40
	<210> 858 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 858 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgaga cacctgacgt	40
	<210> 859 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 859 caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg tctcgcagac	40
	<210> 860 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 860 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccacgc agcgtcgggc	40

	<210> 861 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 861 acgagggggg cacgatgcca gcccgacgct gcgtggctgt	40
	<210> 862 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 862 tccacgagct cgtgtcgaca cagtttggcc acacggtaa	40
	<210> 863 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 863 ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
[0169]	<210> 864 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 864 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgct cacctgacgt	40
	<210> 865 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 865 caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg acgcgcagac	40
	<210> 866 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 866 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccacgc tccgtcgggc	40
	<210> 867 <211> 40	

[0170]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 867	
acgagggggg cacgatgcca gcccgacgga gcgtggctgt	40
<210> 868	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 868	
tccacgagct cgtgtcgaca cagtttggcc acacgggtcaa	40
<210> 869	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 869	
ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
<210> 870	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 870	
cgcaacacgg gcactccgct gtctgcgggtt cacctgacgt	40
<210> 871	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 871	
caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
<210> 872	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 872	
ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccacgc ttcgtcgggc	40
<210> 873	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 873 acgagggggg cacgatgcca gcccgcagaa gcgtggctgt	40
	<210> 874 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 874 tccacgagct cgtgtcgaca cagtttggcc atacggtcaa	40
	<210> 875 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 875 ccgcggcgtt gcccgcacac ttgaccgtat ggccaaactg	40
	<210> 876 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0171]	<400> 876 tgcggtgatt gcacatccca gcacaagaga cccggactac	40
	<210> 877 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 877 tctcgcgtcc acatgtaata gtagtcggg tctcttgtgc	40
	<210> 878 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 878 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcag cccgtcgggc	40
	<210> 879 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 879 acgagggggg cacgatgcca gcccgcaggg ctgcggctgt	40

	<210> 880	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 880	
	tgtcgacacg agcacgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 881	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 881	
	tccacgtgct cgtgtcgaca cagtttgcc agacggtcaa	40
	<210> 882	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 882	
	agcgccgccc tggtcttga ccgctcaac tatgccgata	40
[0172]	<210> 883	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 883	
	cccaatccac agggggtggt tateggcata gttgacgcgg	40
	<210> 884	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 884	
	agacgtcgtg gagtacaagt acatcaaagt gggccaagat	40
	<210> 885	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 885	
	ctctcccagg tcacggagcc atcttgccc accttgatgt	40
	<210> 886	
	<211> 40	

[0173]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 886
tgcggtgatt gcattccca gcacaattag accggactac 40

<210> 887
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 887
tctcgcgtcc acatgtaata gtagtccggt ctaattgtgc 40

<210> 888
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 888
tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt 40

<210> 889
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 889
tccacgcget cgtgtcgaca cagtttgcc acacgggtcaa 40

<210> 890
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 890
ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg 40

<210> 891
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 891
agacgtcgtg gagtacaagt acatcattgt gggccaagat 40

<210> 892
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 892 ctctcccagg tcacggagcc atcttggccc acaatgatgt	40
	<210> 893 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 893 tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 894 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 894 tccacgcgt cgtgtcgaca cagtttggcc agacggtcaa	40
	<210> 895 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0174]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 895 agacgtcgtg gagtacaagt acatcattgt gggccaagat	40
	<210> 896 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 896 ctctcccagg tcacggagcc atcttggccc acaatgatgt	40
	<210> 897 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 897 tgcggtgatt gcattccca gcacaagaga cccggactac	40
	<210> 898 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 898 tctcgcgtcc acatgtaata gtagtccggg tctcttgtgc	40

	<210> 899	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 899	
	ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgg ccgctcgggc	40
	<210> 900	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 900	
	acgagggggg cacgatgcca gcccgacggg ccgcggtgt	40
	<210> 901	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 901	
	tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
[0175]	<210> 902	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 902	
	tccacgcgt cgtgtcgaca cagtttgccc acacgtcaa	40
	<210> 903	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 903	
	ccgcggcgtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 904	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 904	
	agacgtcgtg gagtacaagt acatcattgt gggccaagat	40
	<210> 905	
	<211> 40	

[0176]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 905
ctctcccagg tcacggagcc atcttgcccc acaatgatgt 40

<210> 906
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 906
tgcggtgatt gcattccca gcacaattcg cccggactac 40

<210> 907
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 907
tctcgcgtcc acatgtaata gtagtcggg cgaattgtgc 40

<210> 908
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 908
ggtcgtacgc ctctttcttg acagccgcgg cccgtcgggc 40

<210> 909
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 909
acgagggggg cacgatgcca gcccagcggg ccgcggtgt 40

<210> 910
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 910
tccacgagct cgtgtcgaca cagtttgcc acacggtcaa 40

<210> 911
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 911 ccgcggcggtt gcccgccacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 912 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 912 agcgccgccg tggctctgga cgcggtaac tatgccgata	40
	<210> 913 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 913 cccaatccac agggggtggt tateggcata gttgaccgcg	40
	<210> 914 <211> 33 <212> DNA <213> 人工的	
[0177]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 914 gagaggggac aagtttgtac aaaaaagcag gct	33
	<210> 915 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 915 gcagtcgaca ggacgtgcat agcctgcttt ttgtacaaa	40
	<210> 916 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 916 atgcacgtcc tgctgactgc ggtgctgctc ggctccgttg	40
	<210> 917 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 917 tcccaggacc ttttgaacgg caacggagcc gagcagcacc	40

	<210> 918	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 918	
	ccgttcaaaa ggtcctggga agaccaggat caagcggctt	40
	<210> 919	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 919	
	acctcttggg gacgtcggac agaccgcttg atcctggtct	40
	<210> 920	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 920	
	gtccgacgtc accaagaggt ctgttgacga cttcatcagc	40
[0178]	<210> 921	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 921	
	agtgcaatag gcgtctcggg gctgatgaag tcgtcaacag	40
	<210> 922	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 922	
	accgagacgc ctattgcact gaacaatctt ctttgaatg	40
	<210> 923	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 923	
	acggcatcca tcaggaccaa cattgcaaag aagattgttc	40
	<210> 924	
	<211> 40	

[0179]

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	924	
	ttggtcctga tggatgccgt gcattcggca catcagctgg	40
<210>	925	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	925	
	tgggagatgc aatcaccgca ccagctgatg tgccgaatgc	40
<210>	926	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	926	
	tgcggtgatt gcattctcca gcacacaaga cccggactac	40
<210>	927	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	927	
	tctcgcgtcc acatgtaata gtagtcggg tcttgtgtgc	40
<210>	928	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	928	
	tattacatgt ggacgcgaga tagcgtcttt gtcttcaaga	40
<210>	929	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	DNA引物	
<400>	929	
	ggtgaagcgg tcgatgaggt tcttgaagac aagagcgcta	40
<210>	930	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

	<223> DNA引物	
	<400> 930 acctcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atcggggcct	40
	<210> 931 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 931 actgctcgat gcggcgctgc aggcccgcat cgtacgtttc	40
	<210> 932 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 932 gcagcgccgc atcgagcagt acattactgc ccaggtcact	40
	<210> 933 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0180]	<400> 933 gggttagaga ggccctggag agtgacctgg gcagtaatgt	40
	<210> 934 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 934 ctccagggcc tctctaacc ctcgggctcc ctcgggacg	40
	<210> 935 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 935 gggctcgccg agaccagagc cgtecgcgag ggagcccgag	40
	<210> 936 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 936 gctctgggtct cggcgagccc aagtttgagt tgacctgaa	40

	<210> 937 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 937 cccagttgcc ggtgaaaggc ttcagggtca actcaaactt	40
	<210> 938 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 938 gcctttcacc ggcaactggg gtcgaccgca gcgggatggc	40
	<210> 939 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 939 gcaatggctc gcagagctgg gccatccgc tgcggtcgac	40
[0181]	<210> 940 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 940 ccagctctgc gagccattgc cttgattgga tactcaaagt	40
	<210> 941 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 941 atagttgttg ttgatgagcc actttgagta tccaatcaag	40
	<210> 942 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 942 ggctcatcaa caacaactat cagtcgactg tgtccaacgt	40
	<210> 943 <211> 40	

[0182]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 943
tgcgcacaat aggccagatg acgttggaca cagtcgactg 40

<210> 944
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 944
catctggcct attgtgcgca acgacctcaa ctatgttgcc 40

<210> 945
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 945
ccggtttggt tccagtactg ggcaacatag ttgaggtcgt 40

<210> 946
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 946
cagtactgga accaaaccgg ctttgacctc tgggaagaag 40

<210> 947
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 947
aaagaatgag ctccattga cttcttccca gaggtcaaag 40

<210> 948
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 948
tcaatgggag ctcatctttt actgttgcca accagcaccg 40

<210> 949
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 949 tggcgccctc gacaagtgct cggtgctggg tggcaacagt	40
	<210> 950 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 950 agcacttgct gagggcgcca ctcttgctgc cactcttgge	40
	<210> 951 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 951 gaataagcgc ttcccgactg gccaaagatg gcagcaagag	40
	<210> 952 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0183]	<400> 952 cagtcgggaa gcgcttattc atctgttgct ccccaggttt	40
	<210> 953 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 953 gaatcgttgg agaaagcaca aaacctgggg agcaacagat	40
	<210> 954 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 954 tgtgttttct ccaacgattc tgggtgtcgt ctggtggata	40
	<210> 955 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 955 tgttgatgtt ggagtcgacg tateccaccg acgacacca	40

	<210> 956 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 956 cgtcgactcc aacatcaaca ccaacgaggg caggactggc	40
	<210> 957 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 957 aggacggagt tgacatcctt gccagtcctg ccctcgttgg	40
	<210> 958 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 958 aaggatgtca actcctcct gacttccatc cacacctteg	40
[0184]	<210> 959 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 959 gtcacagcca aggttgggat cgaaggtgtg gatggaagtc	40
	<210> 960 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 960 atcccaacct tggctgtgac gcaggcacct tccagccatg	40
	<210> 961 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 961 tggagagcgc ttgtcactg catggctgga aggtgcctgc	40
	<210> 962 <211> 40	

[0185]

<212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> DNA引物

 <400> 962
 cagtgacaaa gcgctctcca acctcaaggt tgttgtcgac 40

 <210> 963
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> DNA引物

 <400> 963
 ccgtagatgg agcggagga gtcgacaaca accttgaggt 40

 <210> 964
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> DNA引物

 <400> 964
 tccttcgct ccactctacgg cgtgaacaag ggcattctctg 40

 <210> 965
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> DNA引物

 <400> 965
 aatggcgacg gcagcaccgg caggaatgcc ctgtttcacg 40

 <210> 966
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> DNA引物

 <400> 966
 ccggtgctgc cgtcgccatt ggccggtatg cagaggatgt 40

 <210> 967
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> DNA引物

 <400> 967
 aagggttgcc gttgtagtac acatcctctg cataccggcc 40

 <210> 968
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>

	<223> DNA引物	
	<400> 968 gtactacaac ggcaaccctt ggtatcttgc tacatttgct	40
	<210> 969 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 969 tcgtacagct gctcggcagc agcaaatgta gcaagatacc	40
	<210> 970 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 970 gctgccgagc agctgtacga tgccatctac gtctggaaga	40
	<210> 971 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0186]	<400> 971 cacctgatg gagcccgctt tcttcagac gtagatggca	40
	<210> 972 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 972 agacgggctc catcacggtg accgccacct ccctggcctt	40
	<210> 973 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 973 caggaacaag ctccctggaag aaggccaggg aggtggcggt	40
	<210> 974 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 974 cttcaggag cttgttcctg gcgtgacggc cgggacctac	40

	<210> 975	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 975	
	aaggtcgaag agctgctgga gtaggtcccg gccgtcacgc	40
	<210> 976	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 976	
	tccagcagct cttcgacctt taccaacatc atcaacgccg	40
	<210> 977	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 977	
	gccatcggcg tatgtcgaga cggcgttgat gatgttgga	40
[0187]	<210> 978	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 978	
	tctcgacata cgccgatggc ttcttcagcg aggctgccaa	40
	<210> 979	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 979	
	aaccgtcggc ggggacgtac ttggcagcct cgctgaggaa	40
	<210> 980	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 980	
	gtacgtcccc gccgacggtt cgctggccga gcagtttgac	40
	<210> 981	
	<211> 40	

[0188]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 981	
agcggagtgc cgctgttgcg gtcaactgc tcggccagcg	40
<210> 982	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 982	
cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgctt cacctgacgt	40
<210> 983	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 983	
caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aagcgcagac	40
<210> 984	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 984	
ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccacgg cccgtcgggc	40
<210> 985	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 985	
acgagggggg cacgatgcca gcccacggg ccgtggctgt	40
<210> 986	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 986	
tggcatcgtg cccccctcgt ggccaacag cagcgctagc	40
<210> 987	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 987 gagcacgtcg aggggatcgt gctagcgctg ctgttggccc	40
	<210> 988 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 988 acgateccct cgacgtgctc cggcgcgtcc gtggtcggat	40
	<210> 989 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 989 ggcgggtggga cgcgagtagg atccgaccac ggacgcgcgg	40
	<210> 990 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0189]	<400> 990 cctactcgcg tcccaccgcc acgtcattcc ctccgtcgca	40
	<210> 991 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 991 gcacgccagg ctgggcgtc tgcgacggag ggaatgacgt	40
	<210> 992 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 992 gacgccaag cctggcgtgc cttecgttac tccetacag	40
	<210> 993 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 993 ggggtcgcgc agggcagggg cgtgtaggga gtaccggaag	40

	<210> 994 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 994 cccctgccct gcgcgacccc aacctccgtg gccgtcacct	40
	<210> 995 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 995 tgtcgacacg agctcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
	<210> 996 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 996 tccacgagct cgtgtcgaca cagtttgccc acacgggtcaa	40
[0190]	<210> 997 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 997 ccgcggcggtt gcccgcacc ttgaccgtgt ggccaaactg	40
	<210> 998 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 998 ggtggcgggc aacgccgcgg ccctgggcaa ctggagcacg	40
	<210> 999 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 999 tccagagcca cggcggcgct cgtgtctcag ttgccaggg	40
	<210> 1000 <211> 40	

[0191]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1000	
agcgccgcg tggctctgga cgccgtcaac tatgccgata	40
<210> 1001	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1001	
cccaatccac agggggtggt tateggcata gttgacggcg	40
<210> 1002	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1002	
accacccct gtggattggg acggtcaacc tcgaggttg	40
<210> 1003	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1003	
acttgtaetc cacgacgtet ccagcctcga ggttgaccgt	40
<210> 1004	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1004	
agacgtcgtg gagtacaagt acatcaatgt gggccaagat	40
<210> 1005	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1005	
ctctcccagg tcacggagcc atcttggccc acattgatgt	40
<210> 1006	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 1006 ggctccgtga cctgggagag tgatcccaac cacacttaca	40
	<210> 1007 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1007 acaagccacc gcaggaaccg tgtaagtgtg gttgggatca	40
	<210> 1008 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1008 cggttctctgc ggtggcttgt gtgacgcagg ttgtcaagga	40
	<210> 1009 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0192]	<400> 1009 tttacgactg ccaggtgtcc tccttgacaa cctgcgtcac	40
	<210> 1010 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1010 ggacacctgg cagtcgtaaa cccagctttc ttgtacaaag	40
	<210> 1011 <211> 32 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1011 ctctggggac cactttgtac aagaaagctg gg	32
	<210> 1012 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1012 ggtgaagcgg tcgatgagga tcctgaagac aagagcgcta	40

	<210> 1013	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1013	
	tectcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
	<210> 1014	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1014	
	ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgg cccgtcgggc	40
	<210> 1015	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1015	
	acgagggggg cacgatgcca gcccgacggg ccgcggctgt	40
[0193]	<210> 1016	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1016	
	cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
	<210> 1017	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1017	
	caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 1018	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1018	
	ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgg cccgtcgggc	40
	<210> 1019	
	<211> 40	

[0194]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1019	
acgagggggg cacgatgcca gcccgcggg ccgcggctgt	40
<210> 1020	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1020	
ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgc tccgtcgggc	40
<210> 1021	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1021	
acgagggggg cacgatgcca gcccgcgga gcgcggctgt	40
<210> 1022	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1022	
ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgg cccgtcgggc	40
<210> 1023	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1023	
acgagggggg cacgatgcca gcccgcggg ccgcggctgt	40
<210> 1024	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1024	
tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40
<210> 1025	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 1025 tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttggcc acacgggtcaa	40
	<210> 1026 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1026 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgg cccgtcgggc	40
	<210> 1027 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1027 acgagggggg cacgatgcca gcccgcggg ccgcggctgt	40
	<210> 1028 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0195]	<400> 1028 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgg cccgtcgggc	40
	<210> 1029 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1029 acgagggggg cacgatgcca gcccgcggg ccgcggctgt	40
	<210> 1030 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1030 agcgccgcg tggctctgga cgccgtcaac tatecgata	40
	<210> 1031 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1031 cccaatccac aggggtggt tatecgata gttgacggcg	40

	<210> 1032	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1032	
	ggatgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
	<210> 1033	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1033	
	tcctcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
	<210> 1034	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1034	
	ggtcgtacgc ctcgctcttg acagccgcgg cccgtcgggc	40
[0196]	<210> 1035	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1035	
	acgagggggg cacgatgcca gcccgacggg ccgcggctgt	40
	<210> 1036	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1036	
	agcgccgccg tggctctgga cgccgtcaac tatecgata	40
	<210> 1037	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1037	
	cccaatccac aggggtggt tatecgata gttgacggcg	40
	<210> 1038	
	<211> 40	

[0197]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1038	
cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
<210> 1039	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1039	
caagaacgag gcgtacgacc acgtcagggt aaccgcagac	40
<210> 1040	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1040	
ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgg cccgtcgggc	40
<210> 1041	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1041	
acgagggggg cacgatgcca gcccacggg ccgcggctgt	40
<210> 1042	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1042	
agcgcgcgcg ttgctctgga cgccgtcaac tategcgata	40
<210> 1043	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> DNA引物	
<400> 1043	
cccaatccac agggggtggt tatcgcgata gttgacggcg	40
<210> 1044	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

	<223> DNA引物	
	<400> 1044 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgc tccgtcgggc	40
	<210> 1045 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1045 acgagggggg cacgatgcca gcccgacgga gcgcggctgt	40
	<210> 1046 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1046 agcgcgcgcg tggctctgga cgccgtcaac tategcgata	40
	<210> 1047 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
[0198]	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1047 cccaatccac agggggtggt tategcgata gttgacggcg	40
	<210> 1048 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1048 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgc tccgtcgggc	40
	<210> 1049 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1049 acgagggggg cacgatgcca gcccgacgga gcgcggctgt	40
	<210> 1050 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1050 tgtcgacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt	40

	<210> 1051	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1051	
	tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttgcc acacggtaa	40
	<210> 1052	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1052	
	ggtgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
	<210> 1053	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1053	
	tcctcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
[0199]	<210> 1054	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1054	
	ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgc tccgtcgggc	40
	<210> 1055	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1055	
	acgagggggg cacgatgcca gcccgacgga gcgcggctgt	40
	<210> 1056	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1056	
	agcgcgcgcg tggctctgga cgccgtcaac tatcgcgata	40
	<210> 1057	
	<211> 40	

[0200]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1057
cccaatccac agggggtggt tatcgcgata gttagcggcg 40

<210> 1058
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1058
cgcaacagcg gcactccgct gtctcggtt cacctgacgt 40

<210> 1059
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1059
caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac 40

<210> 1060
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1060
ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccgcgc tccgtcgggc 40

<210> 1061
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1061
acgagggggg cacgatgcca gcccgacgga gcgcggctgt 40

<210> 1062
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1062
agcgccgccg tggctctgga cgccgtcaac tatcgcgata 40

<210> 1063
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 1063 cccaatccac agggggtggt tategcgata gttgacggcg	40
	<210> 1064 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1064 ggtgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
	<210> 1065 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1065 tcttcatega ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
	<210> 1066 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0201]	<400> 1066 cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
	<210> 1067 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1067 caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 1068 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1068 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccacgc tccgtcgggc	40
	<210> 1069 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1069 acgagggggg cacgatcca gcccgacgga gcgtggctgt	40

	<210> 1070 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 1070 agcgccgccg tggctctgga cgccgtcaac tatcgcgata	40
	<210> 1071 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 1071 cccaatccac agggggtggt tatcgcgata gttgacggcg	40
	<210> 1072 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 1072 ggatgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
[0202]	<210> 1073 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 1073 tctcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atcggggcct	40
	<210> 1074 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 1074 agcgccgccg tggctctgga cgccgtcaac tatcgcgata	40
	<210> 1075 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> DNA引物 <400> 1075 cccaatccac agggggtggt tatcgcgata gttgacggcg	40
	<210> 1076 <211> 40	

[0203]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1076
tgtegacacg agcgcgtgga aggtgacggc cacggaggtt 40

<210> 1077
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1077
tccacgcgct cgtgtcgaca cagtttggcc acacgggtcaa 40

<210> 1078
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1078
agcgccgcgcg tggctctgga cgccgtcaac tatecgata 40

<210> 1079
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1079
cccaatccac agggggtggt tatecgata gttgacggcg 40

<210> 1080
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1080
ggtegtacgc ctcgttcttg acagccatgg cccgtcgggc 40

<210> 1081
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> DNA引物

<400> 1081
acgagggggg cacgatgcca gcccgacggg ccatggctgt 40

<210> 1082
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

	<223> DNA引物	
	<400> 1082 agcgccgcccg tggctctgga cgccgtcaac tatecgata	40
	<210> 1083 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1083 cccaatccac aggggggtggt tatecgata gttgacggcg	40
	<210> 1084 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1084 ggtgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
	<210> 1085 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
[0204]	<400> 1085 tcttcatega ccgcttcacc gaaacgtacg atcggggcct	40
	<210> 1086 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1086 ggtcgtacgc ctcgttcttg acagccatgg cccgtcgggc	40
	<210> 1087 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1087 acgagggggg cacgatcca gcccgacggg ccatggctgt	40
	<210> 1088 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> DNA引物	
	<400> 1088 agcgccgccc tggctctgga cgccgtcaac tatecgata	40

	<210> 1089	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1089	
	cccaatccac agggggtggt tatcgcgata gttgacggcg	40
	<210> 1090	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1090	
	ggtgaagcgg tcgatgagga tcttgaagac aagagcgcta	40
	<210> 1091	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1091	
	tcctcatcga ccgcttcacc gaaacgtacg atgcgggcct	40
[0205]	<210> 1092	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1092	
	cgcaacagcg gcactccgct gtctgcggtt cacctgacgt	40
	<210> 1093	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1093	
	caagaacgag gcgtacgacc acgtcaggtg aaccgcagac	40
	<210> 1094	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1094	
	ggtcgtacgc ctgcttcttg acagccatgg cccgtcgggc	40
	<210> 1095	
	<211> 40	

[0206]	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1095	
	acgagggggg cacgatgcca gcccgcggg ccatggctgt	40
	<210> 1096	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1096	
	agcgccggcg tggctctgga cgccgtcaac tatcgcgata	40
	<210> 1097	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> DNA引物	
	<400> 1097	
	cccaatccac agggggtggt tatcgcgata gttgacggcg	40
	<210> 1098	
	<211> 599	
	<212> PRT	
	<213> 瑞氏木霉	
	<400> 1098	
	Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn	
	1 5 10 15	
	Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser	
	20 25 30	
	Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Arg Pro Asp Tyr Tyr	
	35 40 45	
	Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Leu Ile Asp	
	50 55 60	
	Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln	
	65 70 75 80	
	Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser Gly	
	85 90 95	
	Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr	
	100 105 110	
	Leu Lys Pro Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro	
	115 120 125	
	Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn	
	130 135 140	

	Asn	Asn	Tyr	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asn	Val	Ile	Trp	Pro	Ile	Val	Arg
	145					150					155					160
	Asn	Asp	Leu	Asn	Tyr	Val	Ala	Gln	Tyr	Trp	Asn	Gln	Thr	Gly	Phe	Asp
				165						170					175	
	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Val	Ala	Asn	Gln
				180					185					190		
	His	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Gln
		195						200					205			
	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Val	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Cys	Phe	Leu
		210					215					220				
	Gln	Arg	Phe	Trp	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Asn	Ile	Asn
	225					230					235					240
	Thr	Asn	Glu	Gly	Arg	Thr	Gly	Lys	Asp	Val	Asn	Ser	Val	Leu	Thr	Ser
					245					250					255	
	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Cys	Asp	Ala	Gly	Thr	Phe	Gln
				260					265					270		
	Pro	Cys	Ser	Asp	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Val	Val	Asp	Ser
			275					280					285			
[0207]	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Lys	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Ala	Ala
		290					295					300				
	Val	Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ala	Glu	Asp	Val	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Asn	Pro
	305					310					315					320
	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile
					325					330					335	
	Tyr	Val	Trp	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu
					340				345					350		
	Ala	Phe	Phe	Gln	Glu	Leu	Val	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser
			355					360					365			
	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Asn	Ile	Ile	Asn	Ala	Val	Ser	Thr	Tyr
					370			375				380				
	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Val	Pro	Ala	Asp	Gly
	385					390					395					400
	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	Phe	Asp	Arg	Asn	Ser	Gly	Thr	Pro	Leu	Ser	Ala
					405					410					415	
	Leu	His	Leu	Thr	Trp	Ser	Tyr	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Arg
				420					425					430		
	Arg	Ala	Gly	Ile	Val	Pro	Pro	Ser	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
			435					440					445			

Ile Pro Ser Thr Cys Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser Arg
450 455 460

Pro Thr Ala Thr Ser Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly Val
465 470 475 480

Pro Ser Gly Thr Pro Tyr Thr Pro Leu Pro Cys Ala Thr Pro Thr Ser
485 490 495

Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser Thr Gln Phe Gly Gln Thr
500 505 510

Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu Gly Asn Trp Ser Thr Ser
515 520 525

Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr Arg Asp Asn His Pro Leu
530 535 540

Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly Asp Val Val Glu Tyr Lys
545 550 555 560

Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro
565 570 575

Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala Cys Val Thr Gln Val Val
580 585 590

[0208]

Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser
595

<210> 1099
<211> 599
<212> PRT
<213> 瑞氏木霉

<400> 1099

Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn
1 5 10 15

Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser
20 25 30

Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Arg Pro Asp Tyr Tyr
35 40 45

Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Ile Leu Ile Asp
50 55 60

Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser Gly
85 90 95

Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr
100 105 110

	Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Gly	Asn	Trp	Gly	Arg	Pro	Gln	Arg	Asp	Gly	Pro	
			115					120					125				
	Ala	Leu	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Ile	Gly	Tyr	Ser	Lys	Trp	Leu	Ile	Asn	
		130					135					140					
	Asn	Asn	Tyr	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asn	Val	Ile	Trp	Pro	Ile	Val	Arg	
		145				150				155						160	
	Asn	Asp	Leu	Asn	Tyr	Val	Ala	Gln	Tyr	Trp	Asn	Gln	Thr	Gly	Phe	Asp	
				165					170						175		
	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Val	Ala	Asn	Gln	
			180						185						190		
	His	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Gln	
		195					200						205				
	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Val	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	
		210					215					220					
	Gln	Arg	Phe	Trp	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Asn	Ile	Asn	
		225				230				235						240	
	Thr	Asn	Glu	Gly	Arg	Thr	Gly	Lys	Asp	Val	Asn	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	
				245					250						255		
[0209]	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Cys	Asp	Ala	Gly	Thr	Phe	Gln	
			260					265					270				
	Pro	Cys	Ser	Asp	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Val	Val	Asp	Ser	
			275					280					285				
	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Lys	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Ala	Ala	
		290					295					300					
	Val	Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ala	Glu	Asp	Val	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Asn	Pro	
		305				310					315					320	
	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	
				325						330					335		
	Tyr	Val	Trp	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	
			340						345						350		
	Ala	Phe	Phe	Gln	Glu	Leu	Val	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	
			355					360					365				
	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Asn	Ile	Ile	Asn	Ala	Val	Ser	Thr	Tyr	
		370					375					380					
	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Val	Pro	Ala	Asp	Gly	
		385				390					395					400	
	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	Phe	Asp	Arg	Asn	Ser	Gly	Thr	Pro	Leu	Ser	Ala	
				405						410					415		

Leu His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Ala Arg
420 425 430

Arg Ala Gly Ile Val Pro Pro Ser Trp Ala Asn Ser Ser Ala Ser Thr
435 440 445

Ile Pro Ser Thr Cys Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser Arg
450 455 460

Pro Thr Ala Thr Ser Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly Val
465 470 475 480

Pro Ser Gly Thr Pro Tyr Thr Pro Leu Pro Cys Ala Thr Pro Thr Ser
485 490 495

Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser Thr Gln Phe Gly Gln Thr
500 505 510

[0210]

Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu Gly Asn Trp Ser Thr Ser
515 520 525

Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr Arg Asp Asn His Pro Leu
530 535 540

Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly Asp Val Val Glu Tyr Lys
545 550 555 560

Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro
565 570 575

Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala Cys Val Thr Gln Val Val
580 585 590

Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser
595

TrGA 亲本蛋白 (632氨基酸) (SEQ ID NO: 1)

1 MHVLSTAVLL GSVAVQKVLG RPGSSGLSDV TKRSVDDFIS TETPIALNNL
51 LCNVGPDGCR AFGTSAGAVI ASPSTIDPDY YYMWTRDSAL VFKNLIDRFT
101 ETYDAGLQRR IEQYITAQVT LQGLSNPSGS LADGSGLGEP KFELTLKPFT
151 GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY QSTVSNVIWP IVRNDLNYVA
201 QYWNQTGFDL WEEVNGSSFF TVANQHRALV EGATLAATLG QSGSAYSSVA
251 PQVLCFLQRF WVSSGGYVDS NINTNEGRTG KDVNSVLTSI HTFDPNLGCD
301 AGTFQPCSDK ALSNLKVVD SFRSIYGVNK GIPAGAAVAI GRYAEDVYYN
351 GNPWYLATFA AAEQLYDAIY VWKKTGSITV TATSLAFFQE LVPGVTAGTY
401 SSSSSTFTNI INAVSTYADG FLSEAAKYVP ADGSLAEQFD RNSGTPLSAL
451 HLTWSYASFL TATARRAGIV PPSWANSSAS TIPSTCSGAS VVGYSRPTA
501 TSFPPSQTPK PGVPSGTPYT PLPCATPTSV AVTFHELVST QFGQTVKVAG
551 NAAALGNWST SAAVALDAVN YADNHPLWIG TVNLEAGDVV EYKYINVGD
601 GSVTWESDPN HTYTVPAVAC VTQVVKEDTW QS

图1A

TrGA的DNA编码序列 (1899 bp) (SEQ ID NO: 4)

```
1 ATGCACGTCC TGTGCGACTGC GGTGCTGCTC GGCTCCGTTG CCGTTCAAAA
51 GGTCCCTGGGA AGACCAGGAT CAAGCGGTCT GTCCGACGTC ACCAAGAGGT
101 CTGTTGACGA CTTCATCAGC ACCGAGACGC CTATTGCACT GAACAATCTT
151 CTTTGCAATG TTGGTCCTGA TGGATGCCGT GCATTCCGCA CATCAGCTGG
201 TGCGGTGATT GCATCTCCCA GCACAATTGA CCCGGA CTAC TATTACATGT
251 GGACGCGAGA TAGCGCTCTT GTCTTCAAGA ACCTCATCGA CCGCTTCACC
301 GAAACGTACG ATGCGGGCCT GCAGCGCCGC ATCGAGCAGT ACATTACTGC
351 CCAGGTCAC TCCAGGGCC TCTCTAACCC CTCGGGCTCC CTCGCGGACG
401 GCTCTGGTCT CGGCGAGCCC AAGTTTGAGT TGACCCTGAA GCCTTTCACC
451 GGCAACTGGG GTCGACCGCA GCGGGATGGC CCAGCTCTGC GAGCCATTGC
501 CTTGATTGGA TACTCAAAGT GGCTCATCAA CAACA ACTAT CAGTCGACTG
551 TGTCCAACGT CATCTGGCCT ATTGTGCGCA ACGACCTCAA CTATGTTGCC
601 CAGTACTGGA ACCAAACCGG CTTTGACCTC TGGGAAGAAG TCAATGGGAG
651 CTCATTCTTT ACTGTTGCCA ACCAGCACCG AGCACTTGTG GAGGGCGCCA
701 CTCTTGCTGC CACTCTTGGC CAGTCGGGAA GCGCTTATTC ATCTGTTGCT
751 CCCCAGGTTT TGTGCTTTCT CCAACGATTG TGGGTGTCGT CTGTTGGATA
801 CGTCGACTCC AACATCAACA CCAACGAGGG CAGGACTGGC AAGGATGTCA
851 ACTCGTCCCT GACTTCCATC CACACCTTCG ATCCCAACCT TGGCTGTGAC
901 GCAGGCACCT TCCAGCCATG CAGTGACAAA GCGCTCTCCA ACCTCAAGGT
951 TGTTGTGCGAC TCCTTCCGCT CCATCTACGG CGTGAACAAG GGCATTCCCTG
1001 CCGGTGCTGC CGTCGCCATT GGCCGGTATG CAGAGGATGT GTACTACAAC
1051 GGCAACCCTT GGTATCTTGC TACATTTGCT GCTGCCGAGC AGCTGTACGA
1101 TGCCATCTAC GTCTGGAAGA AGACGGGCTC CATCACGGTG ACCGCCACCT
1151 CCCTGGCCTT CTTCCAGGAG CTTGTTCCCTG GCGTGACGGC CGGGACCTAC
1201 TCCAGCAGCT CTTGACCTT TACCAACATC ATCAACGCCG TCTCGACATA
1251 CGCCGATGGC TTCCTCAGCG AGGCTGCCAA GTACGTCCCC GCCGACGGTT
1301 CGCTGGCCGA GCAGTTTGAC CGCAACAGCG GCACTCCGCT GTCTGCGCTT
1351 CACCTGACGT GGTCGTACGC CTCGTTCTTG ACAGCCACGG CCCGTCGGGC
1401 TGGCATCGTG CCCCCCTCGT GGGCCAACAG CAGCGCTAGC ACGATCCCCCT
1451 CGACGTGCTC CGGCGCGTCC GTGGTCGGAT CCTACTCGCG TCCCACGCC
1501 ACGTCATTCC CTCCGTCGCA GACGCCCAAG CCTGGCGTGC CTTCCGGTAC
1551 TCCCTACACG CCCCTGCCCT GCGCGACCCC AACCTCCGTG GCCGTACCT
1601 TCCACGAGCT CGTGTGACGA CAGTTTGGCC AGACGGTCAA GGTGGCGGGC
1651 AACGCCGCGG CCCTGGGCAA CTGGAGCACG AGCGCCGCCG TGGCTCTGGA
1701 CGCCGTCAAC TATGCCGATA ACCACCCCT GTGGATTGGG ACGGTCAACC
1751 TCGAGGCTGG AGACGTCTGT GAGTACAAGT ACATCAATGT GGGCCAAGAT
1801 GGCTCCGTGA CCTGGGAGAG TGATCCCAAC CACACTTACA CGGTTCTGTC
1851 GGTGGCTTGT GTGACGCAGG TTGTCAAGGA GGACACCTGG CAGTCGTAA
```

图1B

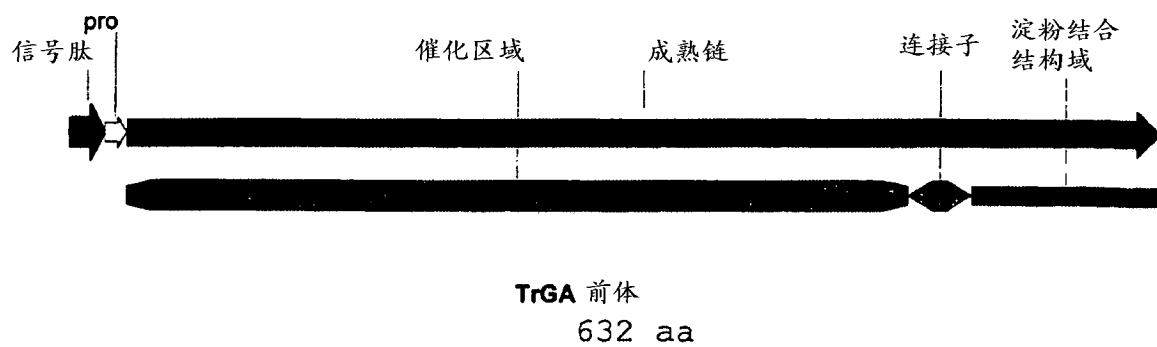


图1C

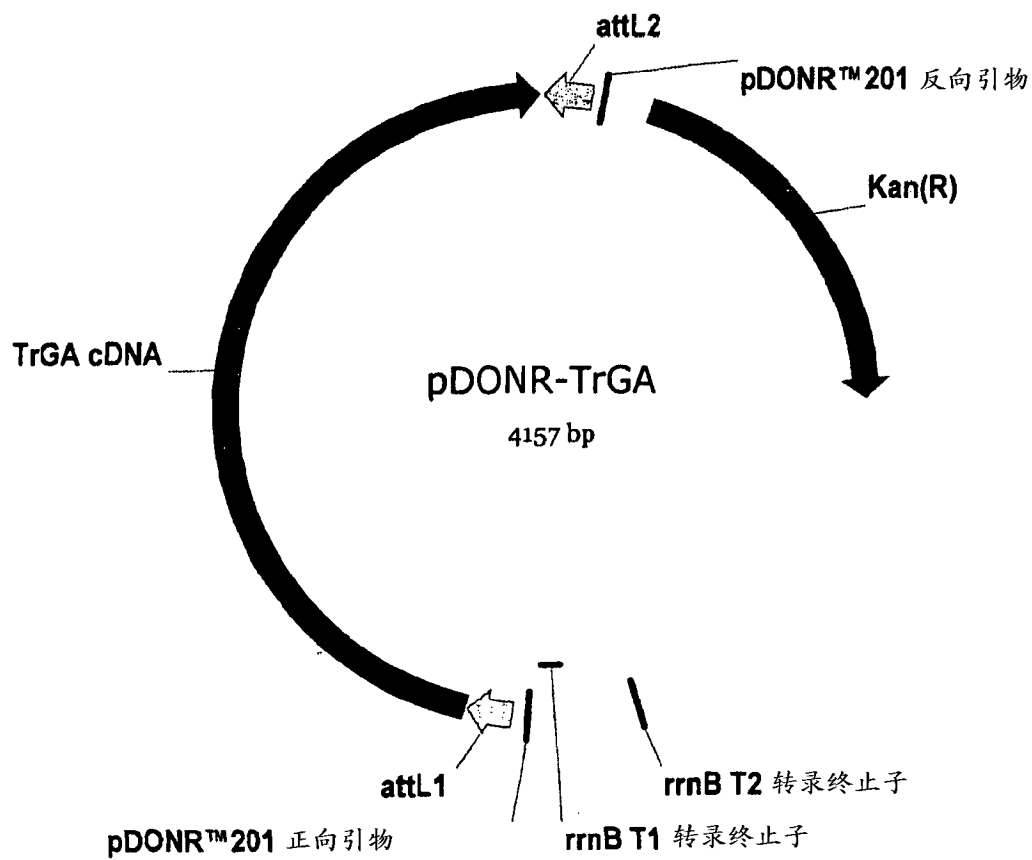


图2

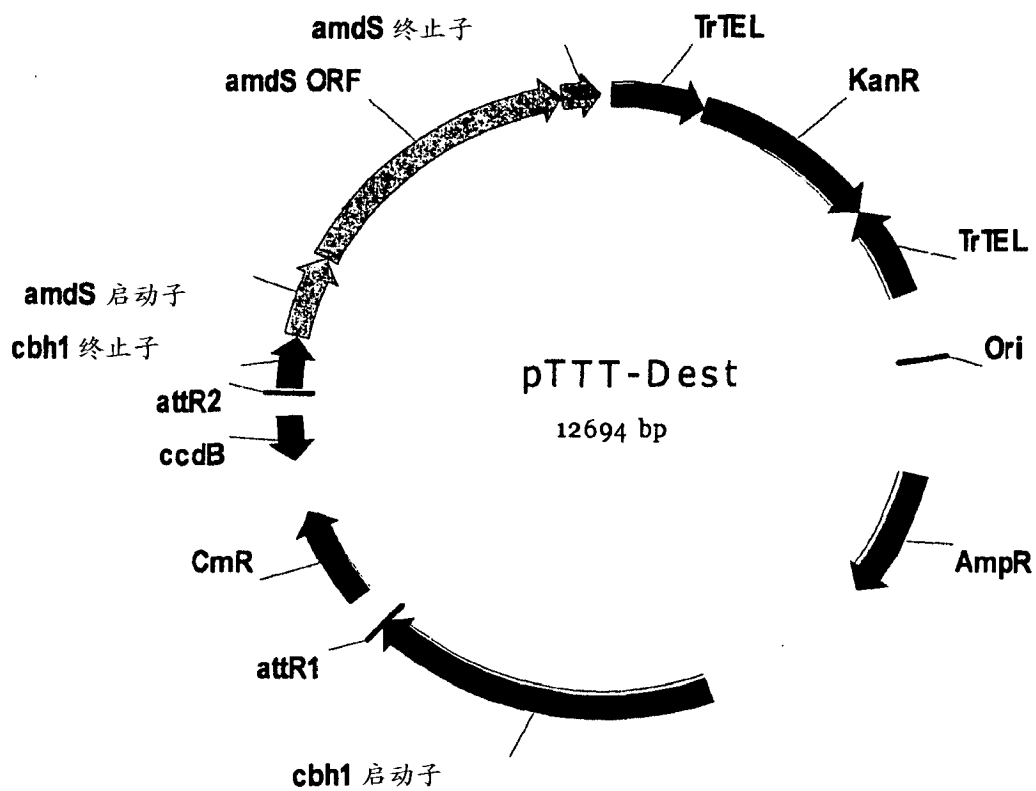


图3

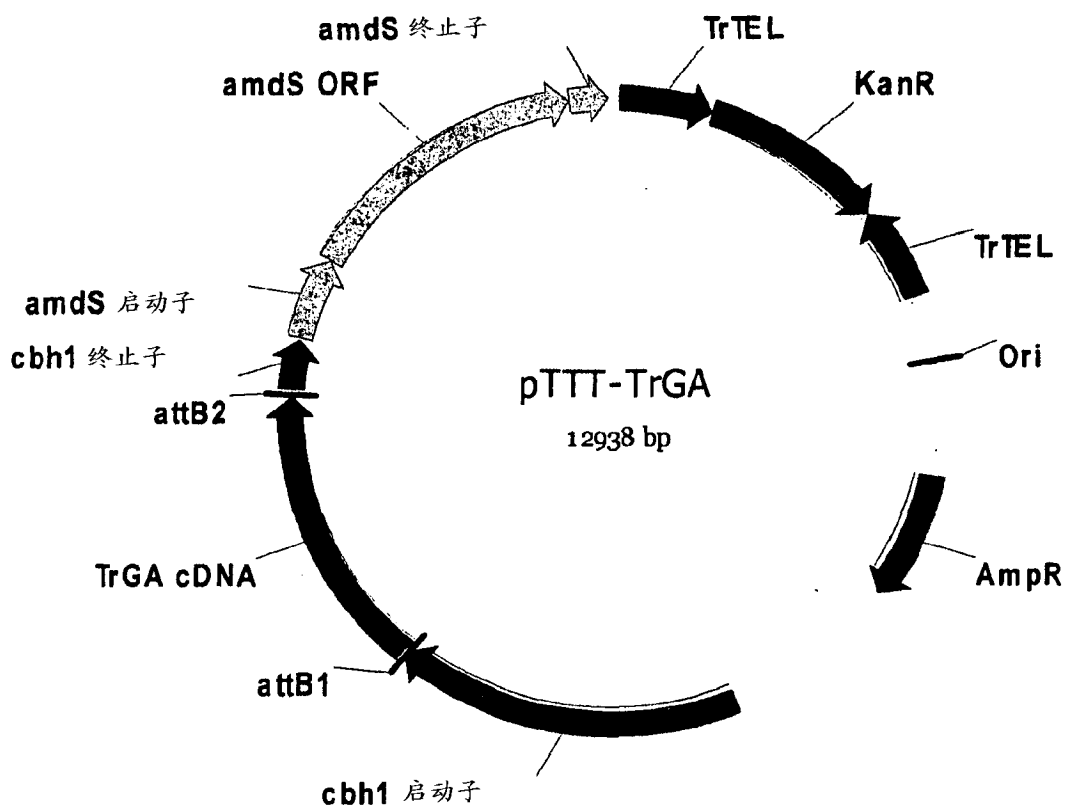


图4

AaGA (1) -ATLDSWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNDPDYF

AnGA (1) -ATLDSWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNDPDYF

AoGA (1) QSDLNAFIEAQTPIAKQGYLNNIGADGKLVEGAAAGIVYASPSKSNPDYF

HgGA (1) -AAVDTFINTEKPIAWNKL LANIGPNGKAAPGAAAGVVIASPSRTDPPYF

HvGA (1) --SVDDFINTQTPIALNNLLCNVGPDCRAFGTSAGAVIASPSTTDPDYF

TrGA (1) --SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDCRAFGTSAGAVIASPSTIDPDYF

* * * * *

AaGA (50) YTWTRDGLVIKTLVDLFRNGDTD-LLSTIENYISSQAIVQGISNPSGDL

AnGA (50) YTWTRDGLVLKTLVDLFRNGDTS-LLSTIENYISAQAIVQGISNPSGDL

AoGA (51) YTWTRDAGLTMEEYIEQFIGGDAT-LESTIQNYVDSQANEQAVSNPSGGL

HgGA (50) FTWTPDAALVLTGIIESLGHNYNT-----TLQQVSNPSGTF

HvGA (49) YMWTRDSALVFKNIVDRFTQQYDAGLQRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSL

TrGA (49) YMWTRDSALVFKNLIDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSL

* * * *

AaGA (99) SSGG-LGEPKFNVDETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIGFRQWLLDNGYT

AnGA (99) SSGAGLGEPKFNVDETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYT

AoGA (100) SDGSGLAEPKFYYNISQFTDSWGRPQRDGPALRASALIAYGNSLISSDKQ

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

AaGA (244) DTNTLLGSIHTFDPEAGCDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDG

AnGA (245) DANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDG

AoGA (246) DTNSLLGSIHTFDPAACDDTTFQPCSSRALSNHKLVD SFRSVYGINNG

HgGA (236) DANSILASIHNFDPEAGCDNLTFQPCSERALANHKAYVDSFRNLYAINKG

HvGA (248) DANSLLASIHTFDPSLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKG

TrGA (249) DVNSVLTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKG

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

图5A

AaGA (294) LSDSEAVAVGRYPKDSYYNGNPWFLCTLAAAEQLYDALYQWDKQGSLEIT

AnGA (295) LSDSEAVAVGRYPEDTYNGNPWFLCTLAAAEQLYDALYQWDKQGSLEVT

AoGA (296) RGAGKAAVGPYAEDTYQGGNPWYLTTLVAAELLYDALYQWDKQGVNVT

HgGA (286) IAQGKAVAVGRYSEDVYYNGNPWYLANFAAAEQLYDAIYVWNKQGSITVT

HvGA (298) IPAGSAVAIGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSITVT

TrGA (299) IPAGAAVAIGRYAEDVYYNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVT

* * * * * * * * * * * * * *

AaGA (344) DVSLDFFQALYSDAATGTYSSTSSSTYSIVDAVKTFADGFVSIVETHAAS

AnGA (345) DVSLDFFKALYSDAATGTYSSTSSSTYSIVDAVKTFADGFVSIVETHAAS

AoGA (346) ETSLPFFKDLSSNVTTGSYAKSSSAYESLTSVAVKTYADGFISVVQEYTPD

HgGA (336) SVSLPFFRDLVSSSVSTGTYSKSSSTFTNIVNAV KAYADGFIEVA AKYTPS

HvGA (348) STSSAFFQELVPGVAAGTYSSSQSTFTSIINAISTYADGFLSEAAKYVPA

TrGA (349) ATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSSTFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPA

* * * * * * * *

AaGA (394) NGSLSEQYDKSDGDELSARDLTWSYAALLTANNRRNSVMPPSWGETSAS-

AnGA (395) NGSMSEQYDKSDGEQLSARDLTWSYAALLTANNRRNSVVPASWGETSAS-

AoGA (396) GGALAEQYSRDQGT PVSASDLTWSYAAFLSAVGRRNGTVPASWGSSTAN-
 HgGA (386) NGALAEQYDRNTGKPDSAADLTWSYSAFLSAIDRRAGLVPPSWRASVAKS
 HvGA (398) DGS LAEQFDRNTGTPLSAVHLTWSYASFLTAAARRAGVVPSSWASSGAN-
 TrGA (399) DGS LAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSAS-
 * * * * * * * * * * *

AaGA (443) SVPGTC
 AnGA (444) SVPGTC
 AoGA (445) AVPSQC
 HgGA (436) QLPSTC
 HvGA (447) TVPSSC
 TrGA (448) TIPSTC
 * *

图5B

gslsflatetpialqgvlnnigpngadvagasagivvaspsrsdpdyfyswtrdaaltakylvdafiagnkdle
 qtiqeyisaqaqvqtisnpsgdlstgglgepkfnvnetaftgpwgrpqrdgpalrataliayanylidngqasta
 deiwpivqndlsyvtqywnsstfdlweevegssffttavqhralvegnalatrlnhtcpncvsqapqvlcflqs
 ywtgsyvlanfggsgrsgkdvnslgsihtfdpaggcdstfqpcsaralanhkvvtdsfrsvyavns giaegsa
 vavgrypedvyqggnpwylataaaaeqlydaiyqwnkigsisitdvslaffqdiypsaavgtynsgsstfndiis
 avqtyadgylsiiekytpsdgslteqfsrsdgtplsasgltwasyaslltaaarrqsivpaswgessassvpavcs
 atsatgpystatntawpssgsgpstttsvpcttptsavtfdelvsttygetiylagsipelgnwspssaipbra
 daytssnplwyvtlnlpagtsfeykffkktgdgtivweddnpnrsytpaycgqttailddswq

图5C

瑞氏木霉	位置	491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520
氨基酸	C A T P T S V A V T F H E L V S T Q F G Q T V K V A G N A A	
灰腐质霉	位置	493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522
氨基酸	C A D A S E V Y V T F N E R V S T A W G E T I K V V G N V P	
太瑞斯梭孢壳霉	位置	489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518
氨基酸	C S T P T A V A V T F N E R V T T Q W G Q T I K V V G D A A	
疏棉状嗜热丝孢菌	位置	475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504
氨基酸	C T P P S E V T L T F N A L V D T A F G Q N I Y L V G S I P	
埃默森篮状菌	位置	482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511
氨基酸	C T T P T S V A V T F D E I V S T S Y G E T I Y L A G S I P	
黑曲霉	位置	509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538
氨基酸	C T T P T A V A V T F D L T A T T T Y G E N I Y L V G S I S	
泡盛曲霉	位置	508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537
氨基酸	C T T P T A V A V T F D L T A T T T Y G E N I Y L V G S I S	

瑞氏木霉	位置	521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550
	氨基酸	A L G N W S T S A A V A L D A V N Y A D N H P L W I G T V N
灰腐质霉	位置	523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552
	氨基酸	A L G N W D T S K A V T L S A S G Y K S N D P L W S I T V P
太瑞斯梭孢克霉	位置	519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548
	氨基酸	A L G G W D T S K A V P L S A A G Y T A S D P L W S G T V D
疏棉状嗜热丝孢菌	位置	505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534
	氨基酸	E L G S W D P A N A L L M S A K S W T S G N P V W T L S I S
埃默森篮状菌	位置	512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541
	氨基酸	E L G N W S T A S A I P L R A D A Y T N S N P L W Y V T V N
黑曲霉	位置	539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568
	氨基酸	Q L G D W E T S D G I A L S A D K Y T S S D P L W Y V T V T
泡盛曲霉	位置	538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567
	氨基酸	Q L G D W D T S D G I A L S A D K Y T S S N P L W Y V T V T
		• • • • •

图5D

瑞氏木霉	位置	551 552 553	554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571	572 573 574 575 576 577 578
	氨基酸	L E A • G D V V E Y K Y I N V G Q D G S V T • W E S D P N H		
灰腐质霉	位置	553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574	575 576 577 578 579 580 581	
	氨基酸	I K A T G S A V Q Y K Y I K V G T N G K I T • W E S D P N R		
太瑞斯校孢克霉	位置	549 550 551	552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569	570 571 572 573 574 575 576
	氨基酸	L P A • G L A V Q Y K Y I N V A A D G G V T • W E A D P N H		
疏棉状嗜热丝孢菌	位置	535 536 537	538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563	
	氨基酸	L P A • G T S F E Y K F I R K D D G S S D V V W E S D P N R		
埃默森篮状菌	位置	542 543 544	545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562	563 564 565 566 567 568 569
	氨基酸	L P P • G T S F E Y K F F K N Q T D G T I V • W E D D P N R		
黑曲霉	位置	569 570 571	572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589	590 591 592 593 594 595 596
	氨基酸	L P A • G E S F E Y K F I R I E S D D S V E • W E S D P N R		
泡盛曲霉	位置	568 569 570	571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588	589 590 591 592 593 594 595
	氨基酸	L P A • G E S F E Y K F I R I E S D D S V E • W E S D P N R		
		• • • • •		

瑞氏木霉	位置 579580 581 582 583	584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594	595 596 597 598 599
	氨基酸 T Y T V P A V A C V T Q V V K E . D T W Q S		
灰腐质霉	位置 582583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600	601 602 603 604	
	氨基酸 S I T L Q T A S S A G K C A A Q T V N . . D S W R .		
太瑞斯梭孢克霉	位置 577578 579 580 581	582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596	
	氨基酸 S F T V P A A C G T T A V T R D D T W Q .		
疏棉状嗜热丝孢菌	位置 564565 566 567 568	569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583	
	氨基酸 S Y N V P K D C G A N T A T V N S W W R .		
埃默森篮状菌	位置 570571 572 573 574	575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589	
	氨基酸 S Y T V P A Y C G Q T T A I L D D S W Q .		
黑曲霉	位置 597598 599 600 601	602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616	
	氨基酸 E Y T V P Q A C G T S T A T V T D T W R .		
泡盛曲霉	位置 596597 598 599 600	601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615	
	氨基酸 E Y T V P Q A C G E S T A T V T D T W R .		

图5E

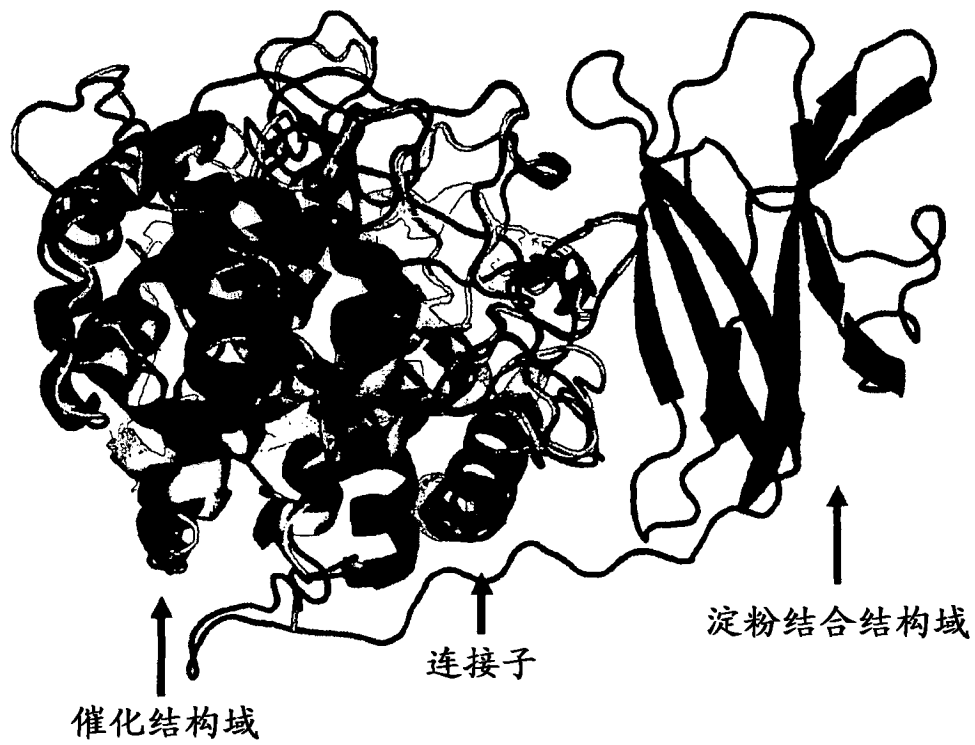


图6

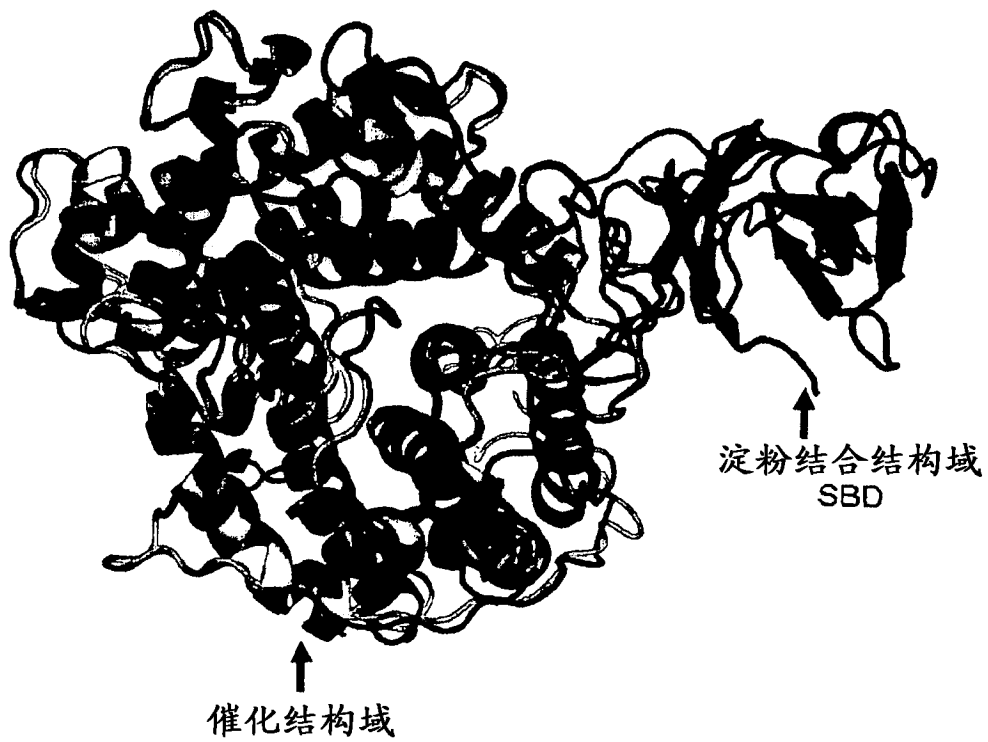


图7

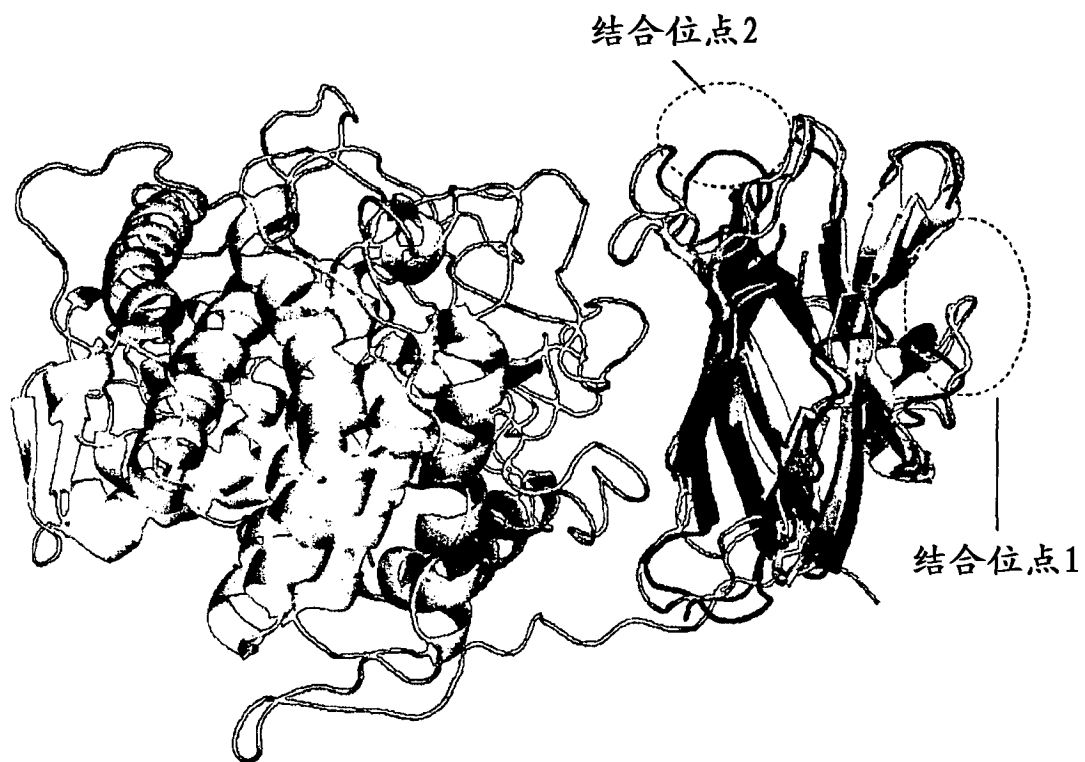


图8

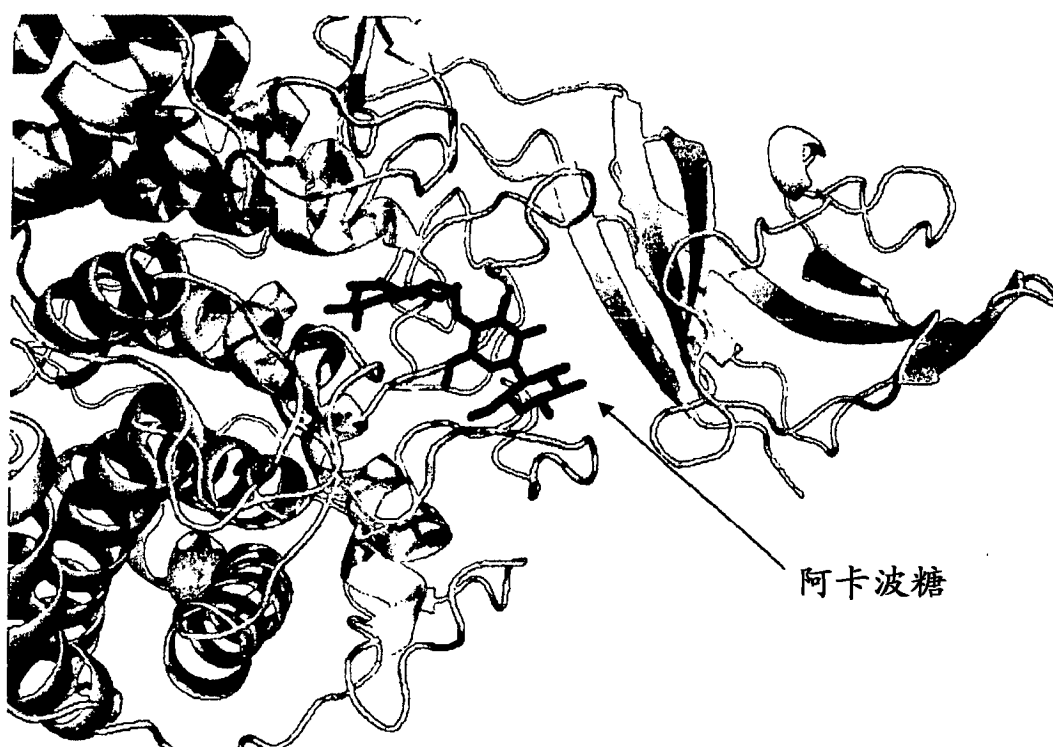


图9

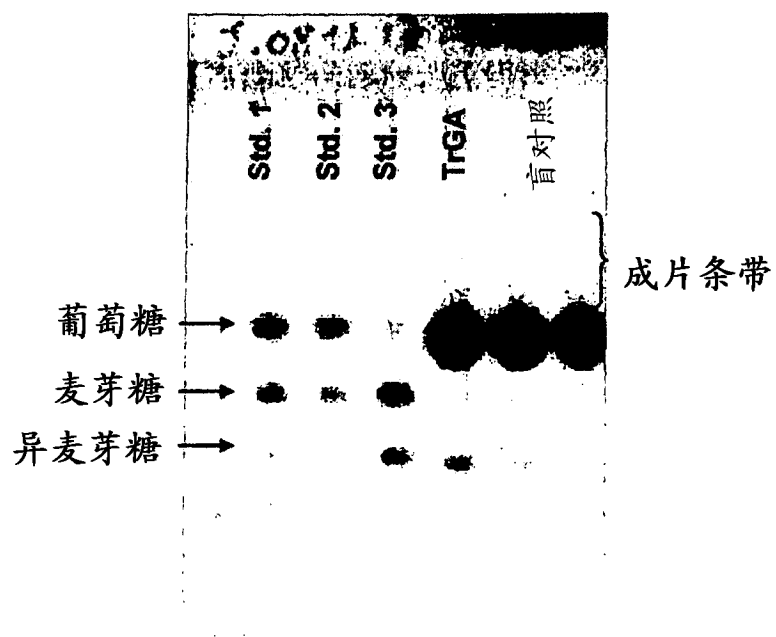


图10