



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106479928 B

(45)授权公告日 2019.10.11

(21)申请号 201610951864.0

(22)申请日 2016.11.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106479928 A

(43)申请公布日 2017.03.08

(83)生物保藏信息
CGMCC NO.13032 2016.09.22
CGMCC NO.13135 2016.10.21

(73)专利权人 中国科学院微生物研究所
地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院
3号

(72)发明人 赵大贺 周坚 向华

(74)专利代理机构 北京律和信知识产权代理事
务所(普通合伙) 11446
代理人 刘国伟 武玉琴

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(56)对比文件

CN 1432644 A,2003.07.30,

CN 103865857 A,2014.06.18,

CN 105368838 A,2016.03.02,

审查员 张锦广

权利要求书1页 说明书7页
序列表12页 附图2页

(54)发明名称

一株耐高盐耐高COD盐水球菌菌株和来源该菌株的内源质粒

(57)摘要

本发明公开了一株盐水球菌菌株及其来源的该菌株的两个内源性质粒,并在此基础上构建了衍生质粒。本发明所提供的盐水球菌(Salinicoccus sp.)菌株408,保藏编号为CGMCC No.13032,具有耐高盐高COD的特性,使得盐水球菌不仅在微生物制造领域有广阔的应用前景,而且在高盐高COD废水处理领域具有潜在的应用价值。本发明所提供的盐水球菌质粒pS408-1和pS408-2及其衍生质粒,能够在盐水球菌中自主复制;借助此质粒工具,能够在盐水球菌中成功表达外源基因。本发明同时提供了一株质粒消除的盐水球菌菌株作为宿主,成功表达了金黄色葡萄球菌来源的乳酸脱氢酶。



1. 一株耐高盐耐高COD盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株408, 该菌株保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称为:CGMCC), 保藏编号为CGMCC No.13032。
2. 一株质粒消除的盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE, 该菌株保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称为:CGMCC), 保藏编号为CGMCC No.13135。

一株耐高盐耐高COD盐水球菌菌株和来源该菌株的内源质粒

技术领域

[0001] 本发明涉及废水处理技术领域,尤其涉及一种耐高盐耐高COD盐水球菌处理废水技术领域。

背景技术

[0002] 盐水球菌属*Salinicoccus*的分类地位隶属于细菌域真细菌界硬壁菌门芽孢杆菌纲芽孢杆菌目葡萄球菌科,是一类能够耐受或嗜好轻度或中度盐环境的微生物。根据LPSN (List of prokaryotic names with standing in nomenclature)数据库的统计结果,目前*Salinicoccus*属有15个种,分别是*S. albus*,*S. alkaliphilus*,*S. amylolyticus*,*S. carniancri*,*S. halitifaciens*,*S. halodurans*,*S. hispanicus*,*S. iranensis*,*S. jeotgali*,*S. kekensis*,*S. kunmingensis*,*S. luteus*,*S. qingdaonensis*,*S. roseus*,*S. salitudinis*,*S. salsiraiae*,*S. sesuvii*,*S. siamensis*。盐水球菌分布广泛,目前已报道的样品来源包括盐场,盐碱湖,盐矿,沿海海水,海洋沉积物,荒漠土,盐渍土,盐岩层,柴达木盆地,海马齿根际,发酵的海鲜,盐冰场等。

[0003] 盐水球菌能产生多种耐高盐的胞外水解酶,如蛋白酶,脂肪酶等,这些耐盐的蛋白资源具有重要的应用前景。*Salinicoccus* sp. strain QW6(后命名为*S. iranensis*),具有亚硝酸盐耐受和降解能力,经过优化亚硝酸盐(0.005-0.5mM)降解率达99%;从这株菌中分离到由三个亚基组成的亚硝酸盐还原相关的酶系。亚硝酸盐降解菌及其还原酶系的分离鉴定,不仅为微生物消除毒性无机物提供了新的见解,而且在废水治理方面具有潜在的应用价值。除此之外,*Salinicoccus halodurans* H3B36能够在胞内富集N(α)-acetyl- α -lysine,用以抵抗高盐 and 高温,这也是一种具有潜在应用价值的相容性溶质。

[0004] 除提供重要的代谢产物、基因和蛋白资源外,盐水球菌本身作为生产菌株,也具有广阔的应用前景。盐水球菌能够耐受高盐环境,其作为生产菌株,不需经过严格的灭菌消毒过程。*Salinicoccus roseus* W12能够耐受高达20%的乳酸盐,研究表明,交叉保护和能量代谢相关蛋白发挥重要功能;耐盐耐有机酸的特性,使得盐水球菌不仅在乳酸生产等微生物制造领域有广阔的应用前景,而且在高盐高COD废水处理领域也具有潜在的应用价值。目前尚无盐水球菌具有致病性的报道,而且其革兰氏染色呈阳性,细胞破裂后不会释放出脂多糖等免疫抗原,不会引起人类免疫反应。盐水球菌的细胞是球形,具有更大的表面积体积比,也更利于物质的跨膜转运。

[0005] 目前应用于工业化生产的微生物,如不同大肠杆菌菌株的基因组大小为4.64M到5.5M之间,枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str.168的基因组大小为4.22M,*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032的基因组大小为3.31M;具有良好产业化生产PHB前景的耐盐细菌*Halomonas* sp. TD01的基因组的大小是4.09M。基因组中存在着大量的假基因和在工业生产中非必需的基因,这些基因的扩增需要大量的物质和能量,而且有些基因的产物可能对菌体生长带来负面影响,所以有很多科学家尝试通过基因工程将基因组上非必需的基因缺失,或通过理性设计构建最小基因组的菌株。目前有7株盐水球菌菌

株完成了基因组测序(来源NCBI数据库),基因组大小2.55M-2.78M不等,而本发明提供的盐水球菌菌株,基因组只有2.24M(数据尚未发表)。相比于其他常用的生产菌株,盐水球菌的基因组普遍偏小,如果将天然具有较小基因组的盐水球菌发展成为工业生产的底盘细胞,可能具有不可替代的优势。

[0006] 但是,目前尚无盐水球菌的遗传工具和操作方法,极大地限制了其应用潜力的开发。挖掘利用盐水球菌的遗传资源,并进一步开发盐水球菌的应用潜力,具有重要的实际意义。

发明内容

[0007] 盐水球菌具有良好的耐高盐高COD的特性,尤其是耐高盐高浓度有机酸,使其在高盐高COD废水处理等领域具有潜在的产业价值。化工、制药等生产过程会产生大量的高盐高COD废水,这类废水的处理一直是水处理的重点和难点。纤维素醚的生产过程会排放大量的高盐高有机酸废水,而且纤维素醚应用范围很广,在我国产能很大。物理化学等处理方法可以实现部分高盐废水的脱盐和降COD,但是处理成本高,而且会产生较严重的二次污染。

[0008] 为了解决上述问题,本发明人经过大量实验和文献研究:生物处理认为是生态环保的处理方法。用耐高盐高COD的微生物将COD降低、去除或转化为有价值的产品,处理后的普通盐水经脱盐可获得无机盐或无机盐水直接循环利用。盐水球菌系统的构建就是为实现高盐高COD废水的廉价、环保处理。

[0009] 本发明的目的之一是提供一株耐高盐高COD的盐水球菌菌株。一株耐高盐高COD的盐水球菌(*Salinicoccus* sp.)菌株408,保藏编号为CGMCC No.13032。

[0010] 本发明提供的细菌分离自天津大港油田采油井附近储油罐下方的土壤样品,分离方法是经额外添加5%乙酸钠盐度10%的液体完全培养基富集培养两次后,在相同培养基固体平板上划线获得单克隆,其实验室内部编号为408。

[0011] 经测定,该细菌16S rDNA(序列1)与*Salinicoccus salsiraiiae* RH-1,*Salinicoccus jeotgali* S2R53-5和*Salinicoccus siamensis* PN1-2的同源性都高达99%以上,由此确定其隶属于盐水球菌属(*Salinicoccus*)。盐水球菌(*Salinicoccus* sp.)菌株408已于2016年9月22日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center,CGMCC)(地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏编号为CGMCC No.13032。

[0012] 本发明提供盐水球菌(*Salinicoccus* sp.)菌株408可以耐受中度盐度和高浓度乙酸盐,在完全培养基中耐受NaCl浓度的范围2-15%(培养基成分为:酸水解酪素7.5克/升,酵母提取物10克/升,谷氨酸钠1克/升,柠檬酸三钠3克/升,氯化钠20-150克/升,七水合硫酸镁20克/升,氯化钾2克/升,柠檬酸铁铵0.008克/升,pH调节到7.0-7.2),能够耐受高达5%的乙酸。

[0013] 本发明的另一目的是提供一株盐水球菌(*Salinicoccus* sp.)菌株PE及其来源的两个内源性质粒。

[0014] 盐水球菌(*Salinicoccus* sp.)菌株PE已于2016年10月21日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center,CGMCC)(地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏编号为CGMCC

No.13135。

[0015] 本发明提供的两个内源性质粒分离提取自盐水球菌(*Salinicoccus* sp.)菌株408中。两个质粒均为环形质粒。

[0016] 其中较小质粒的大小为2191bp,命名为pS408-1(核苷酸序列见序列2);较大质粒大小为3007bp,命名为pS408-2(核苷酸序列见序列3)。

[0017] 序列表中序列2由2191个核苷酸组成。其中,序列2中的自5'端第715-1641位碱基为一个开放阅读框架,其编码具有序列表中序列4(由308个氨基酸残基组成)的氨基酸残基序列的质粒复制所需的反式作用因子Rep1。

[0018] 序列表中序列3由3007个核苷酸组成。其中,序列3中的自5'端第1067-2080位碱基为一个开放阅读框架,其编码具有序列表中序列5(由337个氨基酸残基组成)的氨基酸残基序列的质粒复制所需的反式作用因子Rep2。

[0019] 质粒pS408-1的物理图谱如图1所示,其包括的常见限制性内切酶位点有BamHI, ClaI, PvuII酶切位点各一个。其中,序列2中的自5'端第1500-1505位碱基为BamHI酶切位点;序列2中的自5'端第323-328位碱基为ClaI酶切位点;序列2的自5'端第1019-1024位碱基为PvuII酶切位点。质粒pS408-1不含ApaI, BglII, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, NcoI, NdeI, SacII, SalI, SmaI, SphI, XbaI等常见内切酶位点,因此这些内切酶位点可作为pS408-1的衍生载体的多克隆位点。

[0020] 质粒pS408-2的物理图谱如图2所示,其包括的常见限制性内切酶位点有BamHI, ClaI, EcoRI, EcoRV酶切位点各一个。其中,序列3中的自5'端第1936-1941位碱基为BamHI酶切位点;序列3中的自5'端第2689-2694位碱基为ClaI酶切位点;序列3的自5'端第698-703位碱基为EcoRI酶切位点;序列3的自5'端第2821-2826位碱基为EcoRV酶切位点。质粒pS408-2不含ApaI, BglII, HindIII, KpnI, NcoI, NdeI, PvuII, SacII, SalI, SmaI, SphI, XbaI等常见内切酶位点,因此这些内切酶位点可作为pS408-2的衍生载体的多克隆位点。

[0021] 为了进一步探讨质粒的应用范围,对其拷贝数进行了测定。质粒pS408-1在对数期的拷贝数是 0.90 ± 0.13 个,在稳定期的拷贝数是 1.12 ± 0.07 个;质粒pS408-2在对数期的拷贝数是 0.97 ± 0.07 个,在稳定期的拷贝数是 1.21 ± 0.12 个。质粒pS408-1和pS408-2的拷贝数都在1-2个范围内,均属于低拷贝数的质粒。

[0022] 本发明的又一目的是提供pS408-1和pS408-2的衍生质粒载体pTCS101和pTCS201。

[0023] 由于质粒pS408-1和pS408-2能够在盐水球菌中自主复制,在保证其提供的复制所需的元件完整的前提下,向其中引入性质明确的其它功能DNA片段,或反过来将复制所需的元件完整的引入性质明确的其他功能DNA序列,即可构成可转化盐水球菌的衍生质粒。

[0024] 本发明提供的衍生质粒是在pUCm-T的基础上,首先连接入氯霉素抗性基因(方向为EcoRI到HindIII,质粒命名为pTC),然后分别连接入质粒pS408-1的自5'端第1至2191位碱基或pS408-2的自5'端第1至3007位碱基至XbaI和HindIII位置,分别命名为pTCS101和pTCS201,物理图谱如图3和4所示。

[0025] 这两个衍生质粒pTCS101和pTCS201分别含有来自pS408-1和pS408-2完整的在盐水球菌中复制所需的复制原点,都含有在大肠杆菌中复制所需的复制原点,和在大肠杆菌及在盐水球菌中筛选转化子的抗性选择标记基因AmpR和CmR,是大肠杆菌-盐水球菌穿梭质粒。

[0026] 也对穿梭质粒在盐水球菌中的拷贝数分别进行了测定。质粒pTCS101在对数期的拷贝数是 3.52 ± 0.61 个,在稳定期的拷贝数是 8.57 ± 0.88 个;质粒pTCS201在对数期的拷贝数是 2.23 ± 0.20 个,在稳定期的拷贝数是 5.34 ± 0.35 个。

[0027] 以穿梭质粒pTCS101和pTCS201为基础,引入适当的蛋白表达元件和目的基因,转化盐水球菌,以合适的条件培养即可得到足够量的目的蛋白。如在pTCS101中克隆金黄色葡萄球菌来源的乳酸脱氢酶编码基因(Gene ID:3921373)和上下游功能序列,获得的质粒命名为pTCS101-LDH;经电穿孔转化至质粒消除株*Salinicoccus* sp. PE获得乳酸脱氢酶成功表达的菌株*Salinicoccus* sp. PE (pTCS101-LDH)。因此,基于质粒pS408-1和pS408-2构建而成各种表达载体均在本专利保护之列。

[0028] 由本发明的盐水球菌质粒及其衍生质粒载体转化所得到的微生物也属于本发明的保护范围。

[0029] 本发明的盐水球菌质粒载体为盐水球菌的研究和开发提供了遗传工具系统,将在盐水球菌的研究和开发中发挥重要作用。

[0030] 下面结合具体实施例对本发明做进一步说明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

附图说明

[0031] 图1质粒pS408-1的物理图谱。

[0032] 图2质粒pS408-2的物理图谱。

[0033] 图3质粒pTCS101的物理图谱。

[0034] 图4质粒pTCS201的物理图谱。

具体实施方式

[0035] 下述实施例中,如无特殊说明,均为常规方法。

[0036] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0037] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0038] 实施例1

[0039] 盐水球菌菌株的分离、制备、培养

[0040] 本发明提供的细菌分离自天津大港油田采油井附近储油罐下方的土壤样品,分离方法是经额外添加5%乙酸钠盐度10%的液体完全培养基富集培养两次后,在相同培养基固体平板上划线获得单克隆,其编号为408。

[0041] 经测定,该细菌16S rDNA(序列1)与*Salinicoccus salsiraiiae* RH-1,*Salinicoccus jeotgali* S2R53-5和*Salinicoccus siamensis* PN1-2的同源性都高达99%以上,由此确定其隶属于盐水球菌属(*Salinicoccus*)。菌株已于2016年9月22日保藏中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)(地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏编号为CGMCC No.13032。

[0042] 本发明提供盐水球菌(*Salinicoccus* sp.)菌株408可以耐受中度盐度和高浓度乙酸盐,在完全培养基中耐受NaCl浓度的范围2-15%(培养基成分为:酸水解酪素7.5克/升,

酵母提取物10克/升,谷氨酸钠1克/升,柠檬酸三钠3克/升,氯化钠20-150克/升,七水合硫酸镁20克/升,氯化钾2克/升,柠檬酸铁铵0.008克/升,pH调节到7.0-7.2),能够耐受高达5%的乙酸。

[0043] 实施例2

[0044] 盐水球菌质粒pS408-1和pS408-2的提取、测序和特点

[0045] 将盐水球菌(*Salinicoccus* sp.)菌株408培养至稳定期,离心收集菌体,采用提取低拷贝数质粒的方法提取盐水球菌质粒。质粒经限制性内切酶Sau3AI不完全酶切的DNA片段,连接入经BamHI (Sau3AI和BamHI是同尾酶)完全酶切的自连的pUCm-T载体,挑选有质粒片段连接入的质粒,测序;将获得的序列拼接。以部分拼接的片段为模板,设计向外方向的测序引物,以提取的盐水球菌质粒为模板测序,并进一步拼接质粒;最终获得两个环形质粒的DNA序列。

[0046] 其中较小质粒的大小为2191bp,命名为pS408-1(核苷酸序列见序列2);自5'端第715-1641位碱基为一个开放阅读框架,其编码具有序列表中序列4的氨基酸残基序列的质粒复制所需的反式作用因子Rep1,由308个氨基酸残基组成。

[0047] 质粒pS408-1的物理图谱如图1所示,其包括的常见限制性内切酶位点有BamHI, ClaI, PvuII酶切位点各一个。其中,序列2中的自5'端第1500-1505位碱基为BamHI酶切位点;序列2中的自5'端第323-328位碱基为ClaI酶切位点;序列2的自5'端第1019-1024位碱基为PvuII酶切位点。质粒pS408-1不含ApaI, BglII, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, NcoI, NdeI, SacII, SalI, SmaI, SphI, XbaI等常见内切酶位点,因此这些内切酶位点可作为pS408-1的衍生载体的多克隆位点。

[0048] 较大质粒大小为3007bp,命名为pS408-2(核苷酸序列见序列3);自5'端第1067-2080位碱基为一个开放阅读框架,其编码具有序列表中序列5的氨基酸残基序列的质粒复制所需的反式作用因子Rep2,由337个氨基酸残基组成。

[0049] 质粒pS408-2的物理图谱如图2所示,其包括的常见限制性内切酶位点有BamHI, ClaI, EcoRI, EcoRV酶切位点各一个。其中,序列3中的自5'端第1936-1941位碱基为BamHI酶切位点;序列3中的自5'端第2689-2694位碱基为ClaI酶切位点;序列3的自5'端第698-703位碱基为EcoRI酶切位点;序列3的自5'端第2821-2826位碱基为EcoRV酶切位点。质粒pS408-2不含ApaI, BglIII, HindIII, KpnI, NcoI, NdeI, PvuII, SacII, SalI, SmaI, SphI, XbaI等常见内切酶位点,因此这些内切酶位点可作为pS408-2的衍生载体的多克隆位点。

[0050] 为了进一步探讨质粒的应用范围,对其拷贝数进行了测定。测定方法是采用Real-time PCR测定质粒相对于染色体的拷贝数。在质粒pS408-1上设计的一对引物为CPN-P1-F: AAAAGAGGAGCAGAAGG和CPN-P1-R: TTGCGTGATAAGTGGAT,在质粒pS408-2上设计的一对引物为CPN-P2-F: TTCGTCAGTCTCGGTGGT和CPN-P2-R: TTCGTTACTCTCCTCAAT,在染色体上单拷贝基因RNA聚合酶beta亚基编码基因设计的一对引物为CPN-C-F: GAGACGGCGAGGTTA和CPN-C-R: TTTCGACAGTTGGTGGT。质粒pS408-1在对数期的拷贝数是 0.90 ± 0.13 个,在稳定期的拷贝数是 1.12 ± 0.07 个;质粒pS408-2在对数期的拷贝数是 0.97 ± 0.07 个,在稳定期的拷贝数是 1.21 ± 0.12 个。质粒pS408-1和pS408-2的拷贝数在1-2个范围内,均属于低拷贝数的质粒。

[0051] 实施例3

[0052] 大肠杆菌-盐水球菌衍生质粒pTCS101和pTCS201的构建

[0053] 用引物CmR-F:CAACTAAAGCACCCAT和CmR-R:TCGGCATTATCTCATA扩增氯霉素抗性基因(J Bacteriol.1984,158(2):543-50),直接接入pUCm-T载体,经蓝白斑筛选和测序,获得的质粒插入T载体的方向为EcoRI到HindIII,将其命名为pTC。

[0054] 以盐水球菌Salinicoccus sp.CGMCC No.13032的基因组为模板,用引物P1-F:GATCCATTTATGCCGAG和P1-R:TCCGATGATTATATGGC扩增即可获得pS408-1复制所需的完整的DNA序列;以盐水球菌Salinicoccus sp.CGMCC No.13135的基因组为模板,用引物P2-F:GATCTGTTTATGCCGAG和P2-R:ACTACCGTTTTATTTTC扩增即可获得pS408-2复制所需的完整的DNA序列。

[0055] 上述两个盐水球菌质粒复制所需的完整的DNA序列通过分别在上下游引物的5'端添加酶切位点,经酶切接入pTC质粒;所选限制性内切酶分别为XbaI和HindIII。由pS408-1复制所需的完整的DNA序列接入pTC质粒获得衍生质粒pTCS101(物理图谱如图3所示),由pS408-2复制所需的完整的DNA序列接入pTC质粒获得衍生质粒pTCS201(物理图谱如图4所示)。

[0056] 这两个衍生质粒pTCS101和pTCS201分别含有来自pS408-1和pS408-2完整的在盐水球菌中复制所需的复制原点,都含有在大肠杆菌中复制所需的复制原点,和在大肠杆菌及盐水球菌中筛选转化子的抗性选择标记基因AmpR和CmR,是大肠杆菌-盐水球菌穿梭质粒。

[0057] 实施例4

[0058] 质粒消除菌株的获得和穿梭质粒pTCS101和pTCS201的拷贝数

[0059] 野生型盐水球菌(Salinicoccus sp.)菌株408含有内源性质粒pS408-1和pS408-2,需将其消除掉。

[0060] 首先将质粒pTCS101电穿孔法(参考FEMS Microbiol Lett.1992,73(1-2):133-138中金黄色葡萄球菌转化方法)转化到盐水球菌(Salinicoccus sp.)菌株408中,在含有10 μ g/ml氯霉素的完全培养基中传代培养两次,基于质粒不相容性原理将pS408-1消除掉;然后在无氯霉素的完全培养基中传代培养两次,通过影印平板法筛选获得无氯霉素抗性的菌株,即获得质粒pS408-1被消除的菌株。同理,在此基础上再次消除掉质粒pS408-2,获得质粒都被消除掉的菌株,即盐水球菌(Salinicoccus sp.)菌株PE。

[0061] 将穿梭质粒pTCS101和pTCS201分别转化到质粒消除的菌株Salinicoccus sp.PE中,测定穿梭质粒在盐水球菌中的拷贝数。质粒pTCS101在对数期的拷贝数是 3.52 ± 0.61 个,在稳定期的拷贝数是 8.57 ± 0.88 个;质粒pTCS201在对数期的拷贝数是 2.23 ± 0.20 个,在稳定期的拷贝数是 5.34 ± 0.35 个。

[0062] 实施例5

[0063] 金黄色葡萄球菌来源的乳酸脱氢酶基因在盐水球菌中的表达

[0064] 以金黄色葡萄球菌的基因组为模板,用引物LDH-SA-F:TGATTGGCTAGTTTGTA和LDH-SA-R:AGTTATTCCTCGTTGTC扩增即可获得乳酸脱氢酶编码基因和上下游功能序列。

[0065] 上述乳酸脱氢酶编码基因和上下游功能序列通过在上下游引物的5'端添加酶切位点,经酶切接入pTCS101质粒;所选限制性内切酶分别为PstI和EcoRI。由乳酸脱氢酶编码基因和上下游功能序列接入pTCS101质粒获得表达质粒pTCS101-LDH。

[0066] 分别将空质粒pTCS101和乳酸脱氢酶表达质粒pTCS101-LDH分别转入质粒消除盐

水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE, 得到盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE (pTCS101) 和盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE (pTCS101-LDH)。

[0067] 在相同条件下培养菌体并制作蛋白粗提液。在有10 μ g/ml氯霉素盐度5%的完全培养基中传代培养至稳定期, 收集10ml培养液的菌体, 用缓冲液 (50mM Tris Cl, 150mM NaCl, pH7.5) 洗涤两次, 最终重悬于1ml的缓冲液中。添加终浓度约为12U/ml溶葡球菌酶 (购自生工生物工程上海(股份)有限公司) 在37 $^{\circ}$ C 孵育1h, 然后在低温以200W功率按工作3s间隔6s的方式超声破碎细胞, 总超声时间为10min, 最后在低温条件下12000rpm离心2min, 上清转移至新EP管, 作为蛋白粗提液。

[0068] 测定并比较盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE (pTCS101) 和盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE (pTCS101-LDH) 的细胞粗提液中乳酸脱氢酶的比活力。

[0069] 总蛋白质浓度采用北京普利莱基因技术有限公司生产的BCA蛋白定量试剂盒测定, 测定结果为盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE (pTCS101) 的蛋白粗提液的总蛋白质浓度为 3.65 ± 0.01 mg/ml, 盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE (pTCS101-LDH) 的蛋白粗提液的总蛋白质浓度为 3.71 ± 0.01 mg/ml, 二者蛋白浓度相当。

[0070] 测定乳酸脱氢酶的方法为: 首先配制底物混合液 (1mM丙酮酸, 0.75mM NADH, pH7.0~7.5); 上述重悬菌体的缓冲液350 μ l, 底物混合液130 μ l, 蛋白粗提液或其稀释液20 μ l。

[0071] 通过测定340nm吸光值的降低速率, 代表底物NADH的消耗速率, 计算比活力。测定结果为盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE (pTCS101) 的蛋白粗提液中乳酸脱氢酶的比活力为 0.42 ± 0.10 U/mg, 盐水球菌 (*Salinicoccus* sp.) 菌株PE (pTCS101-LDH) 的蛋白粗提液中乳酸脱氢酶的比活力为 34.34 ± 3.71 U/mg, 后者样品中乳酸脱氢酶的比活力提高了近80倍, 表明乳酸脱氢酶得到成功表达。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国科学院微生物研究所
- [0003] <120> 一株耐高盐耐高COD盐水球菌菌株和来源该菌株的内源质粒
- [0004] <160> 7
- [0005] <210> 1
- [0006] <211> 1436
- [0007] <212> DNA
- [0008] <213> 盐水球菌菌株Salinicoccus sp.
- [0009] <400> 1
- [0010] cagtcgaacg cgcagccccg gagcttgctc cgggttctgc gagtggcggg cgggtgagta 60
- [0011] acacgtaggc aacctacca tcagactggg ataaccgagg gaaaccgtgg ctaataccgg 120
- [0012] atgatcctga tccccgcagg gggatgagtt gaaaggcggg ctttgactgc cactgatgga 180
- [0013] tgggcctgcg ggcgattagc tagttggtgg ggtaagggcc caccaaggcg acgatgcgta 240
- [0014] gccgacctga gagggatgat gccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg 300
- [0015] aggcagcagt agggaatctt ccgcaatgga cgcaagtctg acggagcaac gccgcgtgag 360
- [0016] tgaagaaggg tttcggctcg taaaactctg ttgtcaggga agaacgccgg tgggagtaac 420
- [0017] tgtccatcgg gtgacggtag ctgaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc 480
- [0018] ggtaatacgt aggtggcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagcgc gcgtaggcgg 540
- [0019] ttcgttaagt ctgatgtgaa agccccggc tcaaccgggg agggctcattg gaaactggcg 600
- [0020] aacttgagtg cagaagagga gagtggatt ccatgtgtag cggtgaaatg cgcagagata 660
- [0021] tggaggaaca ccagtggcga aggcggctct ctggtctgca actgacgctg atgtgcgaaa 720
- [0022] gcgtggggat caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgagtgcta 780
- [0023] agtgtagggg ggtttccgcc ccttagtgct gcagcaaacg cattaagcac tccgcctggg 840
- [0024] gagtacggcc gcaaggctga aactcaaagg aattgacggg gacccgcaca agcgggtggag 900
- [0025] catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga accttaccac atcttgacat cctctgaccg 960
- [0026] ccatggagac atggcttccc ttcggggcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc 1020
- [0027] tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttata attagttgcc 1080
- [0028] agcattcagt tgggcaactc agtgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg 1140
- [0029] acgtcaaate atcatgcccc ttatgatttg ggctacacac gtgctacaat ggacagggta 1200
- [0030] caaagggcag ctacgccgag aggccaaagg aatcccataa aactgttctc agttcggatt 1260
- [0031] ggagtctgca actcgactcc atgaagctgg aatcgctagt aatcggtgat cagaatgcca 1320
- [0032] cggatgaatac gttcccgggt cttgtacaca ccgccgctca caccacggaa gtcggttaaca 1380
- [0033] cctgaagccg gtgggccaac ctttatggag gcagccgctg aaggtgggac cgatga 1436
- [0034] <210> 2
- [0035] <211> 2191
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213> 盐水球菌菌株Salinicoccus sp.
- [0038] <400> 2

[0039]	gatccattta tgccgagaaa acttttgggtg ggaaaagcaa ccctgaataa actaaaaagc	60
[0040]	cggtaggcag ataccgtgag gtatcaaaaa tgcctaccga cagcttttgg gtttttaggg	120
[0041]	ttgccgttgg ttcacaccaa aaggaaattg gaataaatat taatttactg tatcttctta	180
[0042]	attaaaagga ggagattaca ttaataatag tttaaattta tttcttattg tttctttttt	240
[0043]	ctttttgctt tacttaatat tttctgaagg aaattttgcc ttttttatat tattagcgtt	300
[0044]	tgttcttttt gtatttttct taatcgataa tggtgaaaag gaaaatgttg atgataaaaag	360
[0045]	gtattatgta ttacgtttat atattactgg tattgtaata ttctttttca ttactgattt	420
[0046]	tatatatggg tggagtaatt cttttgttta tataatggct atgataccaa ttatgtatgt	480
[0047]	aacagtaaaa aacaataaaa cgggttttctt cttatcttga tactatacgt cataatttct	540
[0048]	atcgggggca atatgccttg agccgttggg atgactgctt taaacacaaa aaaacttgca	600
[0049]	tgtttccgtc tactagttta gtgttttagg tgacgaagcc aaaaacataa aacctagggg	660
[0050]	aaagtgcaag tttttttgta tgcaccttct ttggtagaaa ggatttattc acttatggag	720
[0051]	aagtataccc agaaaaagcg aaaaaatcaa ctgttacaga cactcatcag taagcatgtc	780
[0052]	agcaaaaaga cactggaacg ggtaaaggac tgtaatacat tcttatttat ggtggctgat	840
[0053]	attacgatgg aaaaaaccaa actacaccgt tccaataact gcgagcatcg gttctgtcca	900
[0054]	gtctgtgcat ggaagaaagc ccgtaagaac gccatgaaga ttagtattct gatggaatac	960
[0055]	ctcaaaaaag aggagcagaa ggagtttctc tttctgactt tgacggcacc aatgtgcca	1020
[0056]	gctggggaac taaacgatga aattaagcat tataataact cgttcaaacg tatgatgcag	1080
[0057]	cgaaggaag taaagacggc tgtaaaaggc tatgtgcgga aattggaagt cacctacaac	1140
[0058]	aaagatcgag acgactatca tccgcatttt cacgtaatct tagccgctga taaacactat	1200
[0059]	tttaataata aaagacaata tattaacgc gatagatggc tcgaactctg gcaacaatca	1260
[0060]	acaaaaaatc cacttatcac gcaagtggac atcagacgcg taaaacacac cgacaacaaa	1320
[0061]	aaagaagtct ccgaaattgc caaatacagc gccaaagaca gcgactatct ccaagacgaa	1380
[0062]	accgtatttg acacattcta taaaacactt tccggtaagc gccttattgt atattccgga	1440
[0063]	ctctttaaag acgccagcac actctatgaa accaaagcac tcgaccacta taaagacatg	1500
[0064]	gatccaacct actacatcta ccaaattttt tctactggg gtaaaactga ctacatcgaa	1560
[0065]	accgaacgca aactcatgaa tcaagacatg ctaaaagaaa tcaatcgac cctattagac	1620
[0066]	gaaacagaca tcgaagaata accgttacac ctgcacccat tgttacactt tccattcccc	1680
[0067]	ctttaacctt gaccctgta tcacgacacg cagtgatgca ggggtcaagg tttgagatta	1740
[0068]	gtaacttggt gcttatcgaa tgggggaaga tgccaggtat atcaatgggt gcgggtgat	1800
[0069]	acgaccattc caaataaaaa aatgggtcat accccccatt tcccccca tttaccctac	1860
[0070]	catttggaa agtcatggaa tctttatgga aagtgtattt agtatgttat ttagaatcat	1920
[0071]	attgggattt atttaattgt tttttgttc tctcttga agcgaatcat cccagtctaa	1980
[0072]	cgctcgggaa ttttggtaaa aatggacgtg cgtgtaactg ggcagtacct gcgtactgat	2040
[0073]	tttaaactta actttgattt agacaccatt tcagagtcca aataagagta tatgagcgtc	2100
[0074]	caaattgttt ttaggtact tttctatgac ttaagtcctt agaaacgctt tgagggtctc	2160
[0075]	ttctgacgtt ttgagccata taatcatcgg a	2191
[0076]	<210> 3	
[0077]	<211> 3007	

[0078] <212> DNA

[0079] <213> 盐水球菌菌株Salinicoccus sp.

[0080] <400> 3

[0081] gatctgttta tgccgagaaa acttttggtg ggaataggga aacggaaaga tactaaaaag 60

[0082] ccgaatggct ggataccggt aggtatcaat tttgccattc gacagctttt ttattttttg 120

[0083] tttccctggt ggttcacacc aaaaggaaat tggaaataaaa atataaagag agttggtaca 180

[0084] tttttgatta atatttttag gataattatg tttatagggt cagggatttt attatttaat 240

[0085] gtgattgcaa gaccagataa tgcattttta tttatgacat taggtgttct gctagttatg 300

[0086] ggcggaggag ttatgatact aagacagaat aaaggaaaag aataaaaagga gaaaaactat 360

[0087] atagaactca ttattaaaaa tgctattaaa ggtattagta atttagtttt catcggtaga 420

[0088] ctcttcgta agatgtttta taaataagta tggagcgatt ataaacattc ccatttgtat 480

[0089] gaaagtgtta ggtaaaaatt taagtttttc catcatttca ttttcagtga atgctataaa 540

[0090] aggaaataga attatgcaga aagcaaaata aattgttaat aatagatatg gaaattcaaa 600

[0091] tatgtttcca gtagtaaaat tgtttatgac atagatatag aatgcaaaaa tagctacacc 660

[0092] aattatgaat gctaagaatc tgaaaaaaat gttgctagaa ttcattaaac taatactcct 720

[0093] ttgttattat gatataaacg aatggaacac agactatatg agtaggataa aaaagcaagt 780

[0094] ttctaaaaag acaataagca gatacttatt gtcttttttag aacttgcttt tgaacttaga 840

[0095] aatgagcgtt tttgagcgag tttcttttat cttgatacta agggtcatat tttcgatttg 900

[0096] ggtaaataatg accctatccc ttgatacagt tgacttaaac acaaaaaaac ttgcattttc 960

[0097] cagggtagta gtttaatggt ctaggtgact aagccaacaa cataaattac taggggaaag 1020

[0098] tgcaagtttt tttgtacctt tcgcagatga aaggattatt caattcatgg agaagtatac 1080

[0099] agagaaaaag ttgaaaaatc aactgttaca gacactcata ggcaaacatg ttactgattc 1140

[0100] cacactatta agaataaagg agtgcaacac atttatgtta tttcttgctg ataagacgct 1200

[0101] tgaagagacg aagttgcatg gtgcgaatag ttgcaagcat agattttgtc cagtgtgttc 1260

[0102] atggcggaaa tctcggaga atgcattgaa gatcagcatt ctcatgcagt atttgagaga 1320

[0103] agaagaaaat aaagaatttg ttttctaac gcttactgca ccaaacgtga ctgctgatga 1380

[0104] attgaatgat gagattcaac attataacaa atcttttaaa cggttgatgg aacgtaaaga 1440

[0105] agtgaaagca gcagtcaaag gttatggttag aaaattagaa gtgacctatg acggtaaaga 1500

[0106] atctattacg aaaagtatgt ataaacatcg aacgaattat tataaaaaac gtggcttaaa 1560

[0107] tatcggcgat aaaaatccaa actatgatac ttatcatcca cattttcatg tgggtctggc 1620

[0108] agttaataaa acctatttta ataaaccgaa tgtttatatt cgtcagtctc ggtggttga 1680

[0109] attgtggcaa caatctacaa aaaatccaat gattacgcag gtcgatgtca gacgagtga 1740

[0110] acatacagat acaaaaaag aagtttcaga gattgcgaaa tacagtgcga aggattctga 1800

[0111] ttatctacaa aatgaaaaag tttttgatac attttttaat tcattgtcag gcaaacgatt 1860

[0112] gattgtgtat tcaggattgt ttaaagaagc cagcaagatg tatgacaata aagaattaga 1920

[0113] aaagtataaa gaaatggatc cgactcaata tataatttta ttgttttatc attggggaca 1980

[0114] aacagaatat attcaaacgg acaaaaaatt aatgtcggaa gatatgcaaa aagaagttaa 2040

[0115] taatcaaatg ctagatgatg aaaatattga ggaagagtaa ccgaaagggt gctctttttt 2100

[0116] tgatttcacc cttgaggcgg atttccccag gggaatgctc gttttttcgt tagaaaaata 2160

[0117]	cgtgcgtgta actgggcagt atttaaata ctgaaatctg attctgttat tttgctat	2220
[0118]	aacataaatg ttaatatgtt atttaaataa aatgttatca agataatgaa tcatttaatt	2280
[0119]	aatatTTTTat ttaattaaat tgTTaacatc gttcaaTgc caaataagcg attctgagcg	2340
[0120]	tttctatTTta atTTtaggta gttcagTTca tTTttgatta ttgaatgtcc tcagaactga	2400
[0121]	tttatggctt atatatgcgg attcaaaata atTTatggga ctgTTTTata tattTTcata	2460
[0122]	ttcccgtaag ggtgcactta tacgTTattc tgacggggTg cacaaaatct ttctcgctg	2520
[0123]	cgctcgaaaa aacggtaaag aataggagtt gatagTTatc aaaaatattt tttatTTtct	2580
[0124]	tttattaatt atcatatTTg aagTTatTTt ttatatatTTt tttgatacta gacctagtga	2640
[0125]	attaatTTta ttgattggag gattatgtat tatttattta gcagTTcaat cgattaaaaa	2700
[0126]	aattgttaat aattcaagTg aaagaaaata aagaaagggg aatcaaaagT agaattTTtt	2760
[0127]	taaaaaaagT gagaatgagT gaaaatcaaa aataaattat aaagagcata aggggTTtat	2820
[0128]	gatatcaaac gcttatcgct tacgctctaa acgTTgatat ggtcggcagT gccgacctta	2880
[0129]	accttatgcc atcacaataa ttatataaaa cacactaaaa acacaaagat gagtcgtgtg	2940
[0130]	TTTTtagTgt gTTatTTTtc ggtattgaga aaacagTTgc aaaggtatta gaaaataaaa	3000
[0131]	cggtagT	3007
[0132]	<210> 4	
[0133]	<211> 308	
[0134]	<212> PRT	
[0135]	<213> 盐水球菌菌株Salinicoccus sp.	
[0136]	<400> 4	
[0137]	Met Glu Lys Tyr Thr Gln Lys Lys Arg Lys Asn Gln Leu Leu Gln	
[0138]	1 5 10 15	
[0139]	Thr Leu Ile Ser Lys His Val Ser Lys Lys Thr Leu Glu Arg Val	
[0140]	20 25 30	
[0141]	Lys Asp Cys Asn Thr Phe Leu Phe Met Val Ala Asp Ile Thr Met	
[0142]	35 40 45	
[0143]	Glu Lys Thr Lys Leu His Arg Ser Asn Asn Cys Glu His Arg Phe	
[0144]	50 55 60	
[0145]	Cys Pro Val Cys Ala Trp Lys Lys Ala Arg Lys Asn Ala Met Lys	
[0146]	65 70 75	
[0147]	Ile Ser Ile Leu Met Glu Tyr Leu Lys Lys Glu Glu Gln Lys Glu	
[0148]	80 85 90	
[0149]	Phe Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ala Pro Asn Val Pro Ala Gly Glu	
[0150]	95 100 105	
[0151]	Leu Asn Asp Glu Ile Lys His Tyr Asn Asn Ser Phe Lys Arg Met	
[0152]	110 115 120	
[0153]	Met Gln Arg Lys Glu Val Lys Thr Ala Val Lys Gly Tyr Val Arg	
[0154]	125 130 135	
[0155]	Lys Leu Glu Val Thr Tyr Asn Lys Asp Arg Asp Asp Tyr His Pro	

[0156]		140		145		150
[0157]	His Phe His Val	Ile Leu Ala Ala	Asp Lys His Tyr	Phe Asn Asn		
[0158]		155		160		165
[0159]	Lys Arg Gln Tyr	Ile Lys Arg Asp	Arg Trp Leu Glu	Leu Trp Gln		
[0160]		170		175		180
[0161]	Gln Ser Thr Lys	Asn Pro Leu Ile	Thr Gln Val Asp	Ile Arg Arg		
[0162]		185		190		195
[0163]	Val Lys His Thr	Asp Asn Lys Lys	Glu Val Ser Glu	Ile Ala Lys		
[0164]		200		205		210
[0165]	Tyr Ser Ala Lys	Asp Ser Asp Tyr	Leu Gln Asp Glu	Thr Val Phe		
[0166]		215		220		225
[0167]	Asp Thr Phe Tyr	Lys Thr Leu Ser	Gly Lys Arg Leu	Ile Val Tyr		
[0168]		230		235		240
[0169]	Ser Gly Leu Phe	Lys Asp Ala Ser	Thr Leu Tyr Glu	Thr Lys Ala		
[0170]		245		250		255
[0171]	Leu Asp His Tyr	Lys Asp Met Asp	Pro Thr Tyr Tyr	Ile Tyr Gln		
[0172]		260		265		270
[0173]	Ile Phe Tyr His	Trp Gly Lys Thr	Asp Tyr Ile Glu	Thr Glu Arg		
[0174]		275		280		285
[0175]	Lys Leu Met Asn	Gln Asp Met Leu	Lys Glu Ile Asn	Gln Thr Leu		
[0176]		290		295		300
[0177]	Leu Asp Glu Thr	Asp Ile Glu Glu				
[0178]		305				
[0179]	<210>	5				
[0180]	<211>	337				
[0181]	<212>	PRT				
[0182]	<213>	盐水球菌菌株	Salinicoccus sp.			
[0183]	<400>	5				
[0184]	Met Glu Lys Tyr	Thr Glu Lys Lys	Leu Lys Asn Gln	Leu Leu Gln		
[0185]	5	10		15		
[0186]	Thr Leu Ile Gly	Lys His Val Thr	Asp Ser Thr Leu	Leu Arg Ile		
[0187]		20		25		30
[0188]	Lys Glu Cys Asn	Thr Phe Met Leu	Phe Leu Ala Asp	Lys Thr Leu		
[0189]		35		40		45
[0190]	Glu Lys Thr Lys	Leu His Gly Ala	Asn Ser Cys Lys	His Arg Phe		
[0191]		50		55		60
[0192]	Cys Pro Val Cys	Ser Trp Arg Lys	Ser Arg Lys Asn	Ala Leu Lys		
[0193]		65		70		75
[0194]	Ile Ser Ile Leu	Met Gln Tyr Leu	Arg Glu Glu Glu	Asn Lys Glu		

[0195]		80		85		90
[0196]	Phe Val Phe Leu Thr Leu Thr Ala Pro Asn Val Thr Ala Asp Glu					
[0197]		95		100		105
[0198]	Leu Asn Asp Glu Ile Gln His Tyr Asn Lys Ser Phe Lys Arg Leu					
[0199]		110		115		120
[0200]	Met Glu Arg Lys Glu Val Lys Ala Ala Val Lys Gly Tyr Val Arg					
[0201]		125		130		135
[0202]	Lys Leu Glu Val Thr Tyr Asp Gly Lys Glu Ser Ile Thr Lys Ser					
[0203]		140		145		150
[0204]	Met Tyr Lys His Arg Thr Asn Tyr Tyr Lys Lys Arg Gly Leu Asn					
[0205]		155		160		165
[0206]	Ile Gly Asp Lys Asn Pro Asn Tyr Asp Thr Tyr His Pro His Phe					
[0207]		170		175		180
[0208]	His Val Val Leu Ala Val Asn Lys Thr Tyr Phe Asn Lys Pro Asn					
[0209]		185		190		195
[0210]	Val Tyr Ile Arg Gln Ser Arg Trp Leu Glu Leu Trp Gln Gln Ser					
[0211]		200		205		210
[0212]	Thr Lys Asn Pro Met Ile Thr Gln Val Asp Val Arg Arg Val Lys					
[0213]		215		220		225
[0214]	His Thr Asp Asn Lys Lys Glu Val Ser Glu Ile Ala Lys Tyr Ser					
[0215]		230		235		240
[0216]	Ala Lys Asp Ser Asp Tyr Leu Gln Asn Glu Lys Val Phe Asp Thr					
[0217]		245		250		255
[0218]	Phe Phe Asn Ser Leu Ser Gly Lys Arg Leu Ile Val Tyr Ser Gly					
[0219]		260		265		270
[0220]	Leu Phe Lys Glu Ala Ser Lys Met Tyr Asp Asn Lys Glu Leu Glu					
[0221]		275		280		285
[0222]	Lys Tyr Lys Glu Met Asp Pro Thr Gln Tyr Ile Phe Leu Leu Phe					
[0223]		290		295		300
[0224]	Tyr His Trp Gly Gln Thr Glu Tyr Ile Gln Thr Glu Gln Lys Leu					
[0225]		305		310		315
[0226]	Met Ser Glu Asp Met Gln Lys Glu Val Asn Asn Gln Met Leu Asp					
[0227]		320		325		330
[0228]	Asp Glu Asn Ile Glu Glu Glu					
[0229]		335				
[0230]	<210> 6					
[0231]	<211> 5779					
[0232]	<212> DNA					
[0233]	<213> 盐水球菌菌株Salinicoccus sp.					

[0234]	<400> 6						
[0235]	ctgcaggcgg	cgcgccatgg	gatatcatcg	atcatatgtc	gccctatagt	gagtcgtatt	60
[0236]	acggtagcga	gctcgaattc	actggccgtc	gttttacaac	gtcgtgactg	ggaaaaccct	120
[0237]	ggcgttacc	aacttaatcg	ccttgacgca	catccccctt	tcgccagctg	gcgtaatagc	180
[0238]	gaagaggccc	gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgca	gcctgaatgg	cgaatggcgc	240
[0239]	ctgatgcggt	atcttctcct	tacgcatctg	tgcggtatct	cacaccgcat	atggtgcaact	300
[0240]	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgcacacc	gccaacaccc	360
[0241]	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	agctgtgacc	420
[0242]	gtctccggga	gctgcatgtg	tcagagggtt	tcaccgtcat	caccgaaacg	cgcgagacga	480
[0243]	aagggcctcg	tgatacgcct	atctttatag	gttaatgtca	tgataataat	ggtttcttag	540
[0244]	acgtcagggtg	gcacttttctg	gggaaatgtg	cgcggaacc	ctatctgttt	atctttctaa	600
[0245]	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	tcaataatat	660
[0246]	tgaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	cttttttgcg	720
[0247]	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	agatgctgaa	780
[0248]	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	840
[0249]	gagagtttcc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	900
[0250]	ggcgcggtat	tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	catacactat	960
[0251]	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	1020
[0252]	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataaacctgc	ggccaactta	1080
[0253]	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggat	1140
[0254]	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgacgag	1200
[0255]	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaacctatt	aactggcga	1260
[0256]	ctacttactc	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcggg	taaagttgca	1320
[0257]	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	atctggagcc	1380
[0258]	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	gccctcccgt	1440
[0259]	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	1500
[0260]	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	1560
[0261]	atactttaga	ttgatattaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	1620
[0262]	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cggtccactg	agcgtcagac	1680
[0263]	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgctg	aatctgctgc	1740
[0264]	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	agagctacca	1800
[0265]	actctttttc	cgaaggtaac	tggttccagc	agagcgcaga	taccaataac	tgttcttcta	1860
[0266]	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgtc	1920
[0267]	ctgctaatec	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	1980
[0268]	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	2040
[0269]	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gataacctaca	gcgtgagcta	2100
[0270]	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	2160
[0271]	gtcggaaacg	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	2220
[0272]	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgctgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	2280

[0273]	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	2340
[0274]	ccttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	tcccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	2400
[0275]	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtcagtg	2460
[0276]	agcgaggaag	cggaagagcg	cccaatacgc	aaaccgcctc	tccccgcgcg	ttggccgatt	2520
[0277]	cattaatgca	gctggcacga	caggtttccc	gactggaaag	cgggcagtga	gcgcaacgca	2580
[0278]	attaatgtga	gtttagctcac	tcattaggca	ccccaggctt	tacactttat	gcttccggct	2640
[0279]	cgatgtttgt	gtggaattgt	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgacat	2700
[0280]	gattacgcca	agctttccga	tgattatatg	gctcaaaacg	tcagaaagag	ccctcaaagc	2760
[0281]	gtttctaagg	acttaagtca	tagaaaagta	ccctaaaaac	aatttggacg	ctcatatact	2820
[0282]	cttatttgga	ctctgaaatg	gtgtctaaat	caaagttaag	tttaaaatca	gtacgcaggt	2880
[0283]	actgccagct	tacacgcacg	tccattttta	ccaaaattcc	cgagcgttag	actgggatga	2940
[0284]	ttcgcttcaa	gagtgagaac	aaaaaaacaa	ttaaataaat	cccaatatga	ttctaaataa	3000
[0285]	catactaaat	acactttcca	taaagattcc	atgactattc	caaattgtag	ggtaaatggg	3060
[0286]	ggggtaaatg	gggggtatga	cccatttttt	tatttggaat	ggtcgtatac	accgcacccc	3120
[0287]	attgatatac	ctggcatctt	ccccattcg	ataagcaaca	agttactaat	ctcaaacctt	3180
[0288]	gaccctgca	tcactgcgtg	tcgtgataca	ggggtcaagg	ttaaaggggg	aatggaaagt	3240
[0289]	gtaacaatgg	gtgcaggtgt	aacggttatt	cttcgatgtc	tgtttcgtct	aatagggtct	3300
[0290]	gattgatttc	ttttagcatg	tcttgattca	tgagtttgcg	ttcggtttcg	atgtagtcag	3360
[0291]	ttttacccca	gtgataaaaa	atlttgtaga	tgtagtaggt	tggatccatg	tctttatagt	3420
[0292]	ggtcgagtgc	tttggtttca	tagagtgtgc	tggcgtcttt	aaagagtccg	gaatatacaa	3480
[0293]	taaggcgctt	accggaaagt	gttttataga	atgtgtcaaa	tacggtttcg	tcttgagat	3540
[0294]	agtcgctgtc	tttggcgctg	tatttggcaa	tttcggagac	ttcttttttg	ttgtcgggtg	3600
[0295]	gttttacgcg	tctgatgtcc	acttgcgtga	taagtggatt	ttttgttgat	tgttgccaga	3660
[0296]	gttcgagcca	tctatcgcgt	ttaatataat	gtcttttatt	attaaaatag	tgtttatcag	3720
[0297]	cggctaagat	tacgtgaaaa	tgcggatgat	agtcgtctcg	atctttgttg	taggtgactt	3780
[0298]	ccaatttccg	cacatagcct	tttacagccg	tctttacttc	ctttcgtgc	atcatacgtt	3840
[0299]	tgaacgagtt	attataatgc	ttaatttcat	cgtttagttc	cccagctggc	acatttgggtg	3900
[0300]	ccgtcaaagt	cagaaagaga	aactccttct	gctcctcttt	tttgaggat	tccatcagaa	3960
[0301]	tactaatctt	catggcgctt	ttacgggctt	tcttccatgc	acagactgga	cagaaccgat	4020
[0302]	gctcgcagtt	attggaacgg	tgtagtttgg	ttttttccat	cgtaatatca	gccaccataa	4080
[0303]	ataagaatgt	attacagtcc	tttaccgctt	ccagtgtctt	tttgcgaca	tgcttactga	4140
[0304]	tgagtgtctg	taacagttga	ttttttcgtc	ttttctgggt	atacttctcc	ataagtgaat	4200
[0305]	aaatcctttc	taccaagaaa	ggtgcataca	aaaaaacttg	cactttcccc	taggttttat	4260
[0306]	gtttttggct	tcgtcaccta	aaacactaaa	ctagtagacg	gaaacatgca	agtttttttg	4320
[0307]	tgtttaaagc	agtcatacca	acggctcaag	gcataattgcc	cccgatagaa	attatgacgt	4380
[0308]	atagtatcaa	gataagaaga	aaccggtttt	attgtttttt	actgttacat	acataattgg	4440
[0309]	tatcatagcc	attatataaa	caaagaatt	actccacca	tatataaaat	cagtaatgaa	4500
[0310]	aaagaatatt	acaataccag	taatataata	acgtaataca	taataccttt	tatcatcaac	4560
[0311]	attttccttt	tcaccattat	cgattaagaa	aaatacaaaa	agaacaaacg	ctaataatat	4620

[0312]	aaaaaaggca aaatttcctt cagaaaatat taagtaaagc aaaaagaaaa aagaacaat	4680
[0313]	aagaaataaa tttaaactat tattaatgta atctctctct tttaatag aagatacagt	4740
[0314]	aaattaatat ttattccaat ttccttttgg tgtgaaccaa cggcaaccct aaaaacccaa	4800
[0315]	aagctgtcgg taggcatttt tgatacctca cggtatctgc ctaccggctt tttagtttat	4860
[0316]	tcagggttgc ttttcccacc aaaagtttcc tcggcataaa tggatctcta gactcgaggg	4920
[0317]	atccagatct ccagtctttc ggcattatct catattataa aagccagtca ttaggcctat	4980
[0318]	ctgacaattc ctgaatagag ttcataaaca atcctgcatg ataaccatca caaacagaat	5040
[0319]	gatgtacctg taaagatagc ggtaaataata ttgaattacc tttattaatg aattttcctg	5100
[0320]	ctgtaataat gggtagaagg taattactat tattattgat atttaagtta aaccagtaa	5160
[0321]	atgaagtcca tggaaataata gaaagagaaa aagcattttc aggtataggt gttttgggaa	5220
[0322]	acaatttccc cgaaccatta tatttctcta catcagaaag gtataaatca taaaactctt	5280
[0323]	tgaagtcatt ctttacagga gtccaaatac cagagaatgt ttagataca ccatcaaaaa	5340
[0324]	ttgtataaag tggtctaac ttatcccaat aacctaac tcgctgcta ttgtaaccag	5400
[0325]	ttctaaaagc tgtatttgag tttatcacc ttgtcactaa gaaaataaat gcagggtaa	5460
[0326]	atztatatcc ttcttgtttt atgtttcggg ataaaacact aatatcaatt tctgtggtta	5520
[0327]	tactaaaagt cgtttgttgg ttcaaataat gattaaatat ctcttttctc ttccaattgt	5580
[0328]	ctaaatcaat tttattaag ttcatatgat atgctctcta aatttttata taaagtgtta	5640
[0329]	cttgtctgct ttcttcatta gaatcaatcc ttttttaaaa gtcaatatta ctgtaacata	5700
[0330]	aatatatata ttttaaaaat atcccacttt atccaatttt cgtttgttga actaatgggt	5760
[0331]	gctttagttg agacctggt	5779
[0332]	<210> 7	
[0333]	<211> 6595	
[0334]	<212> DNA	
[0335]	<213> 盐水球菌菌株Salinicoccus sp.	
[0336]	<400> 7	
[0337]	ctgcaggcgg ccgcccattg gatatcatcg atcatatgtc gccctatagt gagtcgtatt	60
[0338]	acggtagcga gctcgaattc actggccgct gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct	120
[0339]	ggcgttacc aacttaatcg cttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc	180
[0340]	gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc	240
[0341]	ctgatgcggt attttctct tacgcatctg tgcggtatit cacaccgcat atggtgcaact	300
[0342]	ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacacc gccaacacc	360
[0343]	gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc	420
[0344]	gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga	480
[0345]	aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag	540
[0346]	acgtcaggtg gcacttttcc gggaaatgtg cgcggaacc ctatttgttt atttttctaa	600
[0347]	atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat	660
[0348]	tgaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg	720
[0349]	gcattttgcc ttctgtttt tgctcacc caaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa	780
[0350]	gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt	840

[0351] gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt 900
[0352] ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat 960
[0353] tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg 1020
[0354] acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta 1080
[0355] cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat 1140
[0356] catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag 1200
[0357] cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa 1260
[0358] ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca 1320
[0359] ggaccacttc tgcgctcggc ctttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc 1380
[0360] ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctcccgt 1440
[0361] atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 1500
[0362] gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat 1560
[0363] atactttaga ttgatttaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt 1620
[0364] tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 1680
[0365] cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgct aatctgctgc 1740
[0366] ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca 1800
[0367] actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta 1860
[0368] gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt 1920
[0369] ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 1980
[0370] gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 2040
[0371] acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta 2100
[0372] tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg 2160
[0373] gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccaggggaa acgcctggta tctttatagt 2220
[0374] cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg 2280
[0375] cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg 2340
[0376] ctttttgctc acatgttctt tcttgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc 2400
[0377] gcctttgagt gagctgatac cgctcggcgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg 2460
[0378] agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tcccgcgcg ttggccgatt 2520
[0379] cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca 2580
[0380] attaattgta gtttagctcac tcattaggca cccagcgtt tacactttat gcttccggct 2640
[0381] cgtatgttgt gtggaattgt gagecgataa caatttcaca caggaaacag ctatgacat 2700
[0382] gattacgcca agcttactac cgttttattt tctaatacct ttgcaactgt tttctcaata 2760
[0383] ccgaaaaata acacactaaa aacacacgac tcatctttgt gtttttagtg tgttttata 2820
[0384] aattattgtg atggcataag gtttaaggctg gcaactgccg ccatatcaac gtttagagcg 2880
[0385] taagcgataa gcgtttgata tcataaacc cttatgctct ttataattta tttttgattt 2940
[0386] tcactcattc tcactttttt taaaaaatt ctacttttga ttccccttc tttattttct 3000
[0387] ttcacttgaa ttattaacia tttttttaat cgattgaact gctaaataaa taatacataa 3060
[0388] tctccaatec aataaaatta attcactagg tctagtatca aaaaatataa aaaaaataac 3120
[0389] ttcaaatatg ataattaata aaagaaaata aaaaatattt ttgataacta tcaactccta 3180

[0390]	ttctttaccg	ttttttcgag	cgcaggcgag	aaagattttg	tgccccctgt	cagaataacg	3240
[0391]	tataagtgca	cccttacggg	aatatgaaaa	tatataaaac	agtcccataa	attattttga	3300
[0392]	atccgcata	ataagccata	aatcagttct	gaggacattc	aataatcaaa	aatgaactga	3360
[0393]	actacctaaa	attaatataga	aacgctcaga	atcgcttatt	tggcatttga	acgatgttaa	3420
[0394]	caatttaatt	aaataaaata	ttaattaaat	gattcattat	cttgataaca	ttttatttaa	3480
[0395]	ataacatatt	aacatttatg	ttaaatagca	aaataacaga	atcagatttc	agtattttaa	3540
[0396]	atactgccca	gttacacgca	cgtatttttc	taacgaaaaa	acgagcattc	ccctggggaa	3600
[0397]	atccgcctca	agggtgaaat	caaaaaaaga	gcaacctttc	ggttactctt	cctcaatatt	3660
[0398]	ttcatcatct	agcatttgat	tattaacttc	tttttgcata	tcttccgaca	ttaatttttg	3720
[0399]	ttccgtttga	atatattctg	tttgtcccca	atgataaaac	aataaaaata	tatattgagt	3780
[0400]	cggatccatt	tctttatact	tttctaattc	tttattgtca	tacatcttgc	tggttctttt	3840
[0401]	aaacaatcct	gaatacaca	tcaatcgttt	gcttgacaat	gaattaaaaa	atgtatcaaa	3900
[0402]	aactttttca	ttttgtagat	aatcagaatc	cttcgcactg	tatttcgcaa	tctctgaaac	3960
[0403]	ttcttttttg	ttatctgtat	gtttcactcg	tctgacatcg	acctgcgtaa	tcattggatt	4020
[0404]	ttttgtagat	tgttgccaca	attccaacca	ccgagactga	cgaatataaa	cattcggttt	4080
[0405]	attaaaatag	gttttattaa	ctgccagcac	cacatgaaaa	tgtggatgat	aagtatcata	4140
[0406]	gtttggattt	ttatcgccga	tatttaagcc	acgtttttta	taataattcg	ttcgatgttt	4200
[0407]	atacatactt	ttcgtaatag	attctttacc	gtcataggtc	acttctaatt	ttctaacata	4260
[0408]	acctttgact	gctgctttca	cttctttacg	ttccatcaac	cgtttaaaag	atttgttata	4320
[0409]	atgttgaatc	tcatcattca	attcatcagc	agtcacgttt	ggtgcagtaa	gcgttaagaa	4380
[0410]	aacaaattct	ttattttctt	cttctctcaa	atactgcatg	agaatgctga	tcttcaatgc	4440
[0411]	attcttccga	gatttccgcc	atgaacacac	tggacaaaat	ctatgcttgc	aactattcgc	4500
[0412]	accatgcaac	ttcgtctttt	caagcgtctt	atcagcaaga	aataacataa	atgtgttgca	4560
[0413]	ctcctttatt	cttaatagtg	tggaatcagt	aacatgtttg	cctatgagtg	tctgtaacag	4620
[0414]	ttgatttttc	aactttttct	ctgtatactt	ctccatgaat	tgaataatcc	tttcatctgc	4680
[0415]	gaaaggtaca	aaaaaacttg	cactttcccc	tagtaattta	tgttgttggc	ttagtcacct	4740
[0416]	agaacattaa	actactacc	tggaaaatgc	aagttttttt	gtgtttaagt	caactgtatc	4800
[0417]	aagggatagg	gtcatattta	cccaaatcga	aaatatgacc	cttagtatca	agataaaaaga	4860
[0418]	aactcgctca	aaaacgctca	tttctaagtt	caaaagcaag	ttctaaaaag	acaataagta	4920
[0419]	tctgcttatt	gtcttttttag	aaacttgctt	ttttatccta	ctcatatagt	ctgtgttcca	4980
[0420]	ttcgtttata	tcataataac	aaaggagtat	tagtttaatg	aattctagca	acattttttt	5040
[0421]	cagattctta	gcattcataa	ttgggtgtagc	tatttttgca	ttctatatct	atgtcataaa	5100
[0422]	caattttact	actggaaaca	tatttgaatt	tccatatcta	ttattaacaa	tttattttgc	5160
[0423]	tttctgcata	attctatttc	cttttatagc	attcactgaa	aatgaaatga	tggaaaaaact	5220
[0424]	taaattttta	cctaacactt	tcatacaaat	gggaatgttt	ataatcgctc	catacttatt	5280
[0425]	tataaaacat	cttacgaagg	agtcctaccga	tgaaaactaa	attactaata	cctttaatag	5340
[0426]	catttttaat	aatgagttct	atatagtttt	tctcctttta	ttcttttctt	ttattctgtc	5400
[0427]	ttagtatcat	aactcctccg	cccataacta	gcagaacacc	taatgtcata	aataaaaatg	5460
[0428]	cattatctgg	tcttgcaatc	acattaaata	ataaaaatccc	tgcacctata	aacataatta	5520

[0429]	tcctaaaaat	attaatcaaa	aatgtaccaa	ctctctttat	atTTTTtattc	caatttcctt	5580
[0430]	ttggtgtgaa	ccaacaggga	aacaaaaaat	aaaaaagctg	tcgaatggca	aaattgatac	5640
[0431]	ctaacggtat	ccagccattc	ggctTTTTtag	tatctttccg	tttccctatt	cccacaaaa	5700
[0432]	gttttctcgg	cataaacaga	tctctagact	cgagggatcc	agatctccag	tctttcggca	5760
[0433]	ttatctcata	ttataaaagc	cagtcattag	gcctatctga	caattcctga	atagagttca	5820
[0434]	taaacaatcc	tgcatgataa	ccatcacaaa	cagaatgatg	tacctgtaa	gatagcggta	5880
[0435]	aatatattga	attaccttta	ttaatgaatt	ttcctgctgt	aataatgggt	agaaggtaat	5940
[0436]	tactattatt	attgatattt	aagttaaacc	cagtaaata	agtccatgga	ataatagaaa	6000
[0437]	gagaaaaagc	atTTTcaggt	ataggtgttt	tgggaaacaa	tttccccgaa	ccattatatt	6060
[0438]	tctctacatc	agaaaggat	aatcataaa	actctttgaa	gtcattcttt	acaggagtcc	6120
[0439]	aaataccaga	gaatgtttta	gatacaccat	caaaaattgt	ataaagtggc	tctaacttat	6180
[0440]	cccaataacc	taactctccg	tcgctattgt	aaccagttct	aaaagctgta	tttgagttta	6240
[0441]	tcacccttgt	cactaagaaa	ataaatgcag	ggtaaaattt	atatacttct	tgTTTTatgt	6300
[0442]	ttcggataaa	aacactaata	tcaatttctg	tggttatact	aaaagtcggt	tgttggttca	6360
[0443]	aataatgatt	aaatatctct	tttctcttcc	aattgtctaa	atcaatttta	ttaaagttca	6420
[0444]	tttgatatgc	ctcctaaatt	tttatctaaa	gtgttacttg	tctgctttct	tcattagaat	6480
[0445]	caatcctttt	ttaaaagtca	atattactgt	aacataaata	tatatatttt	aaaaatatcc	6540
[0446]	cactttatcc	aattttcggt	tgttgaacta	atgggtgctt	tagttgagac	ctggt	6595

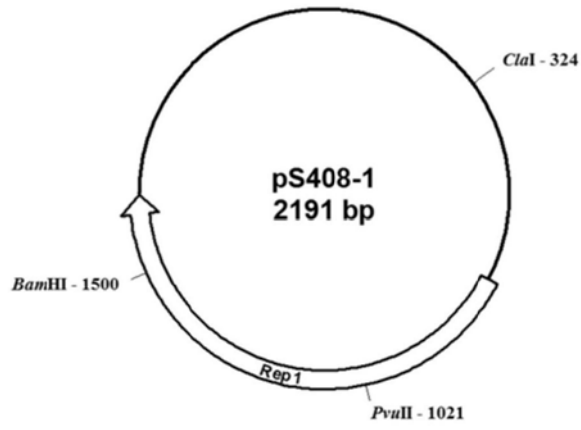


图1

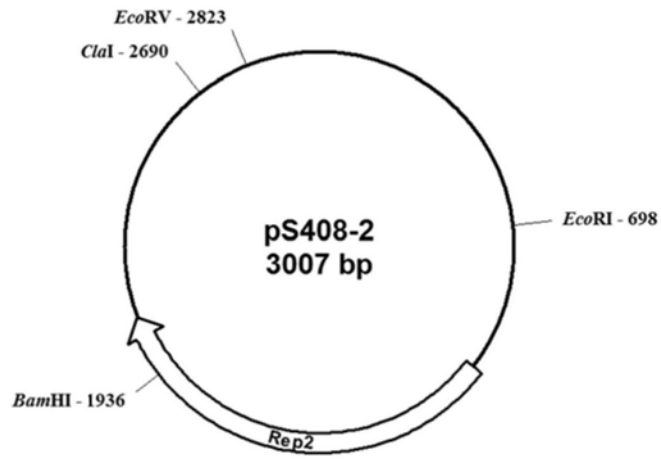


图2

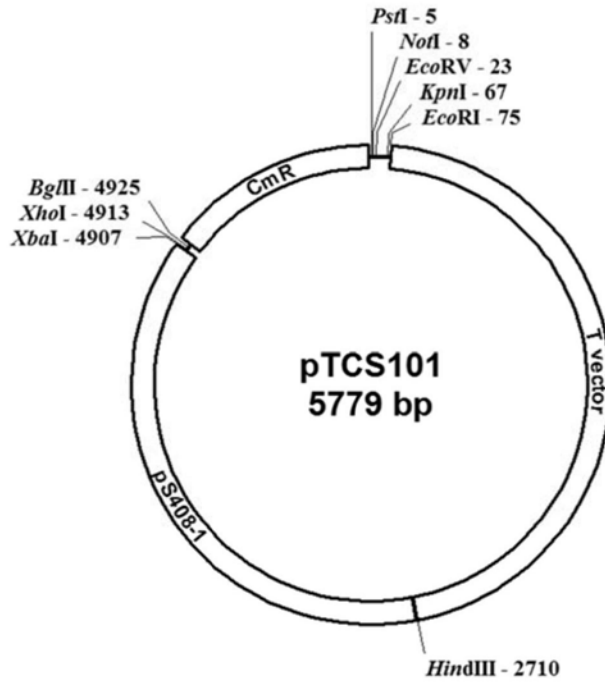


图3

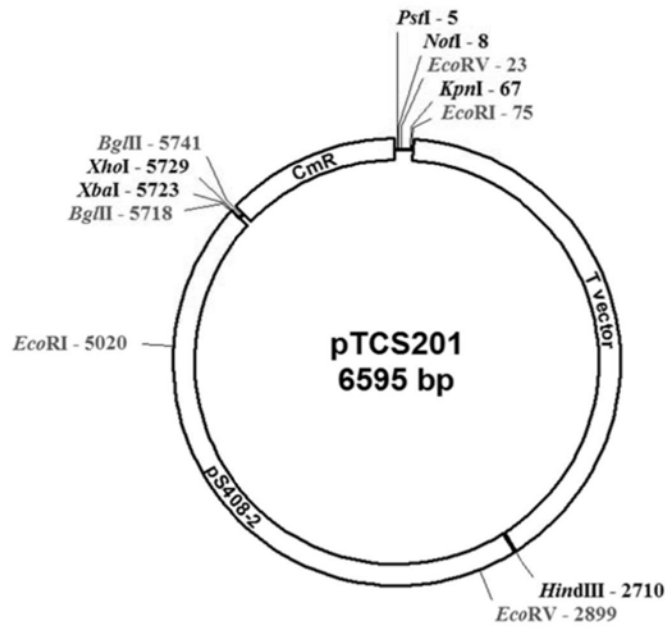


图4