



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104087523 B

(45)授权公告日 2016.09.14

(21)申请号 201410025924.7

(22)申请日 2014.01.20

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104087523 A

(43)申请公布日 2014.10.08

(83)生物保藏信息  
CGMCC No.7865 2013.07.02

(73)专利权人 中国科学院南海海洋研究所  
地址 510301 广东省广州市新港西路164号

(72)发明人 张偲 田新朋 鞠建华 罗明和  
尹浩

(74)专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 刘明星

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12P 17/16(2006.01)

A23L 3/3544(2006.01)

A23L 3/3571(2006.01)

C12R 1/465(2006.01)

审查员 陈彦闯

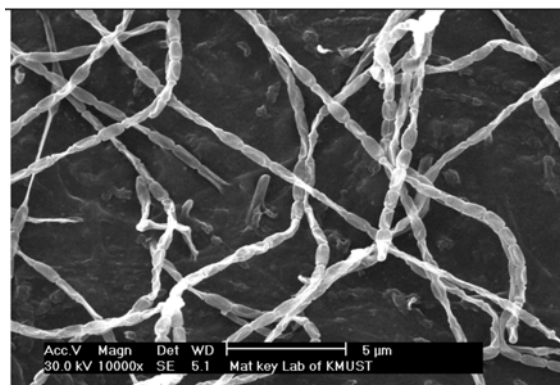
权利要求书1页 说明书5页  
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种海洋链霉菌及利用其制备Enterocin的方法以及该菌的应用

(57)摘要

本发明公开了一种海洋链霉菌及利用其制备Enterocin的方法以及该菌的应用。链霉菌(*Streptomyces qinglanensis*)SCS10 05256,其保藏编号为CGMCC No.7865。本发明提供了一种新的海洋链霉菌SCS10 05256,该菌能够发酵高效大量产生肠道菌素化合物Enterocin,有望将该菌株改造为化合物Enterocin的工程菌株,或将该菌作为食品添加剂等应用为轻工食品、饲料等防腐保鲜,实现应用。



1. 链霉菌 *Streptomyces qinglanensis* SCSIO 05256, 其保藏编号为 CGMCC No.7865。
2. 一种化合物 Enterocin 的制备方法, 其特征在于, 化合物 Enterocin 是从权利要求 1 所述的链霉菌 *Streptomyces qinglanensis* SCSIO 05256 的发酵培养物中制备分离得到的。
3. 根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于, 具体步骤如下:
  - a. 制备链霉菌 *Streptomyces qinglanensis* SCSIO 05256 的发酵培养物;
  - b. 将发酵培养物进行固液分离, 得到发酵液和菌丝体, 发酵液用丁酮萃取, 丁酮萃取液浓缩后得浸膏 A, 菌丝体用丙酮浸提, 浸提液浓缩后得浸膏 B;
  - c. 将浸膏 A 和浸膏 B 合并得到粗提物, 粗提物经硅胶柱层析, 以乙酸乙酯/石油醚为洗脱剂, 从体积比 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4 进行梯度洗脱, 收集乙酸乙酯/石油醚 5:5 洗脱的馏分, 再用中压反相柱层析, 用甲醇/水梯度洗脱, 0~60min, 5%~60% 体积分数, 流速 18mL/min, 收集保留时间为 30min 的馏分, 再经正相硅胶柱层析, 以二氯甲烷/甲醇为洗脱剂, 从体积比 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6 梯度洗脱, 收集二氯甲烷/甲醇 96:4 洗脱的馏分, 即为化合物 Enterocin。
4. 权利要求 1 所述的链霉菌 *Streptomyces qinglanensis* SCSIO 05256 在制备化合物 Enterocin 中的应用。
5. 权利要求 1 所述的链霉菌 *Streptomyces qinglanensis* SCSIO 05256 及其发酵产物在制备防腐保鲜剂中的应用。
6. 权利要求 1 所述的链霉菌 *Streptomyces qinglanensis* SCSIO 05256 及其发酵产物在制备微生态制剂及环保制品中的应用。

## 一种海洋链霉菌及利用其制备Enterocin的方法以及该菌的应用

### 技术领域：

[0001] 本发明属于工业微生物领域，具体涉及一种海洋链霉菌及利用其制备Enterocin的方法以及该菌的应用。

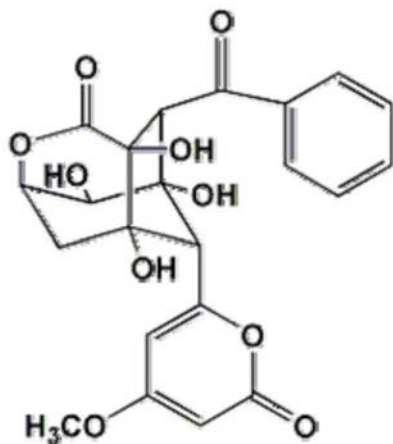
### 背景技术：

[0002] 肠道菌素是重要的细菌素之一，能同时抑制G<sup>+</sup>和G<sup>-</sup>细菌，具有广谱抑菌作用，特别是对食品腐败和保鲜相关的微生物等具有良好的抑制作用，如单核细胞增生李斯特菌等多种李斯特菌及一些乳酸菌等；另外，肠道菌素具有良好的热稳定性、以及对多种蛋白酶、还原剂等有良好的稳定性，是食品生产中优良的保鲜和防腐添加剂。因此，肠道菌素广谱抑菌作用和良好的稳定性特性有望作为新型生物防腐剂用于食品的防腐保鲜及环保制剂。部分肠道菌素产生菌株则可以作为益生菌和发酵剂应用于保健食品和发酵食品的生产。

[0003] 近年来，国外学者对肠道菌素及其产生菌株进行了大量研究，发现天然细菌素产生量少且获得过程比较复杂，限制了对它的广泛应用。另外，有些肠球菌是条件致病菌，含有毒力因子且具有抗生素抗性，引起了人们对其在食品应用中的安全性考虑。

[0004] Enterocin，其结构式如式1所示，公开于文献Seto H, Tsutomu S, Urano S, et al. Utilization of <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C coupling in structural and biosynthetic studies. VII<sup>1)</sup> the structure and biosynthesis of vulgamycin[J]. Tetrahedron Lett, 1976, 17(48): 4367-4370和文献Kang H, Jensen P R, Fenical W. Isolation of microbial antibiotics from a marine ascidian of the genus didemnum[J]. J Org Chem, 1996, 61(4): 1543-1546. 中。

[0005]



式(1)

### 发明内容：

[0006] 本发明的第一个目的是提供链霉菌(*Streptomyces qinglanensis*)SCSI0 05256，该菌于2013年07月02日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)，地址：北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所，其保藏编号为CGMCC

No.7865。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种化合物Enterocin的制备方法,其特征在于,化合物Enterocin是从链霉菌SCSIO 05256的发酵培养物中制备分离得到的。

[0008] 具体步骤如下:

[0009] a、制备链霉菌SCSIO 05256的发酵培养物;

[0010] b、将发酵培养物进行固液分离,得到发酵液和菌丝体,发酵液用丁酮萃取,丁酮萃取液浓缩后得浸膏A,菌丝体用丙酮浸提,浸提液浓缩后得浸膏B;

[0011] c、将浸膏A和浸膏B合并得到粗提物,粗提物经硅胶柱层析,以乙酸乙酯/石油醚为洗脱剂,从体积比1:9,2:8,3:7,4:6,5:5,6:4进行梯度洗脱,收集乙酸乙酯/石油醚5:5洗脱的馏分,再用中压反相柱层析,用甲醇/水梯度洗脱,0~60min,5%~60%体积分数,流速18mL/min,收集保留时间为30min的馏分,再经正相硅胶柱层析,以二氯甲烷/甲醇为洗脱剂,从体积比99:1,98:2,97:3,96:4,95:5,94:6梯度洗脱,收集二氯甲烷/甲醇96:4洗脱的馏分,即为化合物Enterocin。

[0012] 本发明的第三个目的是提供链霉菌SCSIO 05256在制备化合物Enterocin中的应用;

[0013] 本发明的第四个目的是提供链霉菌SCSIO 05256及其发酵产物等在制备防腐保鲜剂中的应用。

[0014] 本发明的第五个目的是提供链霉菌SCSIO 05256及其发酵产物等在制备微生态制剂及环保制品中的应用;

[0015] 本发明的第六个目的是提供化合物Enterocin在制备抗菌药物中的应用。

[0016] 所述的抗菌药物优选为抗藤黄微球菌、苏云金芽孢杆菌或嗜水气单胞菌等该类微生物的药物。

[0017] 本发明提供了一种新的海洋链霉菌SCSIO 05256,该菌能够发酵高效大量产生肠道菌素化合物Enterocin,有望将该菌株改造为化合物Enterocin的工程菌株,或将该菌作为食品添加剂等应用为轻工食品、饲料等防腐保鲜,实现应用。

[0018] 本发明的链霉菌(*Streptomyces qinglanensis*)SCSIO 05256于2013年07月02日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,其保藏编号为CGMCC No.7865。

#### 附图说明:

[0019] 图1是链霉菌SCSIO 05256的系统发育树。

[0020] 图2是扫描电镜显示的菌株SCSIO 05256的显微结构图。

[0021] 图3是粗提物总浸膏的高效液相色谱图,HPLC条件:色谱柱为phenomex150×4.6mm (SphereClone SAX),流动相包括流动A相和流动B相,流动相A相:15%(体积分数)的乙腈+0.1%(体积分数)的冰醋酸,溶剂为水,流动B相:85%(体积分数)的乙腈,溶剂为水;进样程序:0-20min,流动相比比例为A相/B相(体积比):100:0-20:80,20-25min,流动相比比例为A相/B相(体积比):0:100,25.1-30min,流动相比比例为A相/B相(体积比):100:0,检测波长254nm,流速1ml/min。其中上面是一维图谱,下面是对应的二维图谱,标出来的峰是enterocin。

[0022] 图4是化合物Enterocin的<sup>1</sup>H NMR500MHz和<sup>13</sup>C NMR125MHz图谱CD<sub>3</sub>OD。

**具体实施方式：**

[0023] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0024] 实施例1:海洋链霉菌(*Streptomyces qinglanensis*)SCSIO 05256的分离和鉴定

[0025] 海洋链霉菌SCSIO 05256鉴定中涉及的基因组DNA的提取,16S rDNA的PCR扩增,序列比对和系统进化树的建立方法以及生理学、化学和形态学鉴定等,均参考文献[Tian, X.P., Zhi, X.Y., Qiu, Y.Q., Zhang, Y.Q., Tang, S.K., Xu, L.H., Zhang, S., Li, W.J. *Sciscionella marinagen.nov., sp.nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea. Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, 59 (Pt2):222-228]。

[0026] 本发明的海洋链霉菌SCSIO 05256是从我国南海北部珠江口附近(E113° 49.22', N22° 15.17')水深28米的海底沉积物中分离获得的。分离培养基为改良的ISP2培养基,每升含有酵母粉2g,麦芽提取粉2.0g,牛肉膏1g,琼脂15.0g,蒸馏水500ml,天然海水500ml, pH7.2。分离培养条件为:28℃,14天。挑取白色菌落,分离纯化得到菌株编号SCSIO 05256。

[0027] 按照参考文献中的方法或者常规方法提取该菌株SCSIO 05256的基因组DNA,应用常规PCR扩增该菌株的16S rDNA并测序,其序列如SEQ ID NO.1所示。对16S rDNA核苷酸序列进行BLAST分析,结果显示,该菌株与*Streptomyces qinglanensis* 172205<sup>T</sup>显示出最大相似性,相似度为99.78%,说明该菌株SCSIO 05256为链霉菌属。通过邻接法构建的系统发育树清晰地显示出该菌株与链霉菌*Streptomyces qinglanensis*聚在同一个亚支,显示出较近的系统进化关系,如图1所示,该菌应归属于链霉菌*Streptomyces qinglanensis*物种的一个菌株。

[0028] 形态学特征和生理生化分析:

[0029] 菌株SCSIO 05256属于革兰氏阳性,好氧放线菌,气丝白色分支并分化成卷曲的孢子链;孢子杆状(如图2所示),孢子表面光滑。Czapek's agar有可溶性色素产生。能水解淀粉、纤维素、吐温20,40,60;明胶液化阴性,H<sub>2</sub>S产生,吐温80水解,氧化酶和硝酸盐还原反应阴性。接触酶反应和脲酶反应阳性,不产生黑色素。可以利用D-阿拉伯糖,D-纤维二糖,L-鼠李糖,果糖,D-半乳糖,D-葡萄糖,肌醇,D-麦芽糖,D-甘露醇,D-甘露糖,木糖醇,D-棉子糖,和D-木糖为唯一碳源和能源生长,而不能利用草酸盐,卫矛醇,D-乳糖,D-海藻糖。pH、盐浓度和温度的耐受范围分别为pH6.0-8.0,0-8%和4-40℃。细胞壁含有L-DAP。优势醌为MK-9(H6)。根据以上形态学、生理学、化学等分析,菌株SCSIO 05256具有典型的链霉菌属特征,且其16S rRNA基因序列与链霉菌菌种的相似性达到了99.8%,因此其为链霉菌的一个物种。通过16S rRNA基因序列分析,其最相似菌种为*Streptomyces qinglanensis*,但其分离自海洋,其耐盐性,吐温80水解,生长pH以及对唯一碳氮源的生长实验等均显示出其与已知菌种*Streptomyces qinglanensis*特征不同,重新构建的系统发育树(图1)显示出与已知菌种*Streptomyces qinglanensis*不同,因此,应为该种的一个新的海洋菌株。

[0030] 因此,综合分析多项分类数据,鉴定此菌株为链霉菌属*Streptomyces qinglanensis*的一个菌株,命名为:链霉菌(*Streptomyces qinglanensis*)SCSIO 05256,该菌于2013年07月02日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,其保藏编号为CGMCC

No.7865。

[0031] 实施例2:化合物Enterocin的分离和制备

[0032] 1、培养基

[0033] A、种子培养基:每升是这样配制的:将大豆粉10g,淀粉5g,细菌学蛋白胨2g,葡萄糖20g,酵母膏2g, $K_2HPO_4$ 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g,碳酸钙2g,海盐30g,加入到1L水中,pH=7.2-7.4,121℃,灭菌30min。

[0034] B、发酵培养基:配方同种子培养基。121℃,灭菌30min。

[0035] 2、发酵

[0036] 2.1、种子培养:将培养皿上活化的链霉菌SCSIO 05256的单菌落分别接入12瓶,每瓶含有50mL种子培养基的250mL的锥形培养瓶中,28℃,200r·min<sup>-1</sup>,培养48h,制得种子液600mL。

[0037] 2.2、发酵培养:将种子培养液以10%的接种量(体积百分比)接入到6L发酵培养基(置于250mL的锥形培养瓶,每瓶含有50ml发酵培养基,共120瓶)中,28℃,200r·min<sup>-1</sup>,振荡培养168h,得到6L发酵培养物。

[0038] 3、萃取

[0039] 发酵培养物先进行离心分离(4000r·min<sup>-1</sup>,14min),得到6L体积的上清液(发酵液)和菌丝体。发酵液用1倍体积的丁酮萃取3次,合并丁酮萃取液,丁酮萃取液减压蒸馏得上清液提取物一浸膏A(5.8g);菌丝体用2L丙酮在室温下浸提3次,每次3小时,合并丙酮浸提液,丙酮浸提液减压蒸馏得菌丝体提取物一浸膏B(1.3g)。

[0040] 4、化合物1的提取分离

[0041] 经HPLC检测表明,浸膏A和浸膏B两者成分基本相似,将浸膏A和浸膏B合并得粗提物,粗提物的HPLC图如图3所示,合并后的粗提物经常压硅胶柱(100-200目)层析,采用正相柱层析,以乙酸乙酯/石油醚为洗脱剂,从体积比1:9,2:8,3:7,4:6,5:5,6:4进行梯度洗脱,收集乙酸乙酯/石油醚5:5处洗脱得到馏份fr6~7,然后用中压反相柱层析MPLC(中压反相柱220\*35mm,填料为C-18反相硅胶)(甲醇-水梯度洗脱,0~60min,5%~60%体积分数,流速18mL/min)洗脱,于30min处洗脱制备得到目标物单峰。目标物单峰最后用正相硅胶柱层析进一步纯化,以二氯甲烷/甲醇为洗脱剂,使用体积比99:1,98:2,97:3,96:4,95:5,94:6梯度洗脱,在二氯甲烷/甲醇96:4处洗脱得到化合物1纯品(133mg)。

[0042] 5、通过结构分析

[0043] 从链霉菌SCSIO 05256的发酵培养物中制备得到的化合物1的鉴定结果如下:

[0044] 化合物1为白色粉末,HR-ESI-MS给出准分子离子峰m/z:445.1130[M+H]<sup>+</sup>,467.0950[M+Na]<sup>+</sup>,911.2008[2M+Na]<sup>+</sup>,计算分子式为C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>,不饱和度为13,其核磁波谱见图4。<sup>1</sup>H NMR(CD<sub>3</sub>OD)谱给出1个单取代苯环信号[ $\delta$ H7.95(2H,d,J=7.5Hz),7.59(1H,t,J=7.5Hz),7.49(2H,t,J=7.5Hz)]和1个对间位偶合的烯氢信号[ $\delta$ H6.41(H,d,J=2Hz),5.66(H,d,J=2Hz)],4个连氧碳上的质子信号 $\delta$ H4.5-5.0,1个甲氧基信号 $\delta$ H3.89,以及2个相互偶合的亚甲基信号 $\delta$ H1.90和2.70。<sup>13</sup>C NMR(CD<sub>3</sub>OD)谱的低场区显示可能的6个烯碳信号 $\delta$ C140.8,134.2,129.6,129.6,129.5,129.5,1个羰基碳信号 $\delta$ C197.9,4个酯碳或连氧烯碳信号 $\delta$ C175.6,173.5,167.1,162.3;高场区给出9个脂肪碳信号;另外 $\delta$ C107.2和89.1显示2个碳信号。化合物1的波谱数据如下:<sup>1</sup>H NMR(CD<sub>3</sub>OD500MHz) $\delta$ :4.68(H,d,J=4.5Hz,H-3),4.81

(H, dd, J=4.5Hz, H-5), 4.75(H, d, J=2.5Hz, H-6), 1.90(H, dt, J=14.5, 5.5, 3Hz, H-7), 2.70(H, dd, J=14.5, 2.5Hz, H-7), 4.72(H, s, H-9), 6.41(H, d, J=2Hz, H-11), 5.66(H, d, J=2Hz, H-13), 7.95(2H, d, J=7.5Hz, H-17, 17'), 7.49(2H, t, J=7.5Hz, H-18, 18'), 7.59(H, t, J=7.5Hz, H-19), 3.90(3H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR(CD<sub>3</sub>OD, 125Hz)  $\delta$ : 175.6(C-1), 80.0(C-2), 56.6(C-3), 77.4(C-4), 80.8(C-5), 71.2(C-6), 36.7(C-7), 77.6(C-8), 54.6(C-9), 162.3(C-10), 107.2(C-11), 173.5(C-12), 89.1(C-13), 167.1(C-14), 197.9(C-15), 140.8(C-16), 129.5(C-17, 17'), 129.6(C-18, 18'), 134.2(C-19), 57.1(C-20); HR-ESI-MS  $m/z$ : 445.1130[M+H]<sup>+</sup>, 467.0950[M+Na]<sup>+</sup>, 911.2008[2M+Na]<sup>+</sup>。将该化合物1的 $^1\text{H}$  NMR与 $^{13}\text{C}$  NMR与文献[Seto H, Tsutomu S, Urano S, et al. Utilization of  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  coupling in structural and biosynthetic studies. VII<sup>1)</sup> the structure and biosynthesis of vulgamycin[J]. Tetrahedron Lett, 1976, 17(48): 4367-4370和文献Kang H, Jensen P R, Fenical W. Isolation of microbial antibiotics from a marine ascidian of the genus didemnum[J]. J Org Chem, 1996, 61(4): 1543-1546.]报道数据相比较,发现其与已知化合物Enterocin结构相同。确定该化合物1为Enterocin(其结构式如式1所示)。

[0045] 实施例3: 化合物Enterocin的抗菌活性测定

[0046] 采用枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* ATCC 6633, 苏云金芽孢杆菌*Bacillus thuringiensis*, 金黄色葡萄球菌*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 大肠杆菌*Escherichia coli* ATCC 25922, 藤黄微球菌*Micrococcus luteus*, 嗜水气单胞菌*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, 鲍曼不动杆菌*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, 肺炎克雷伯氏菌*Klebsiella pneumonia* ATCC 13883, 铜绿假单胞菌*Pseudomonas aeruginosa*, 白色念珠菌*Candida albicans*共10个敏感物种作为指示菌进行活性检测。以上10种指示菌培养接种到营养肉汤培养基(Nutrient Agar)肉汤培养基中。利用滤纸片法进行化合物1的抗菌活性测定。

[0047] 抗菌药物贮存液制备: 样品(化合物Enterocin)精密称取10mg以上, 用经过0.22 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤的DMSO作溶剂, 配置成5, 2.5, 1和0.5mg/ml的梯度稀释液。配制好的抗菌药物贮存液应于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

[0048] 接种物制备: 10种敏感菌株一次用生长法制备浓度相当于 $6 \times 10^6$ 个/ml的菌悬液, 取1ml菌悬液加入到冷却至45度的琼脂培养基中摇匀1分钟, 后以每板25ml倒平板, 自然冷却30分钟备用。分别吸取上述5, 2.5, 1和0.5mg/ml的梯度稀释液10 $\mu\text{l}$ 于直径6mm的无菌双层滤纸片上, 然后再分别覆盖于上述接种后的平板上, 每种敏感菌种做3次重复。密封后置37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 孵育20h观察结果。

[0049] 结果判断: 以用肉眼观察, 结果明确的显示化合物Enterocin对藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)以及嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966)有抑制活性, 对其余7株菌没有抑制活性。因此本发明的化合物Enterocin有望研发成为食品及饲料等轻工产品的防腐保鲜材料或填料等。

## 序列表

<110>中国科学院南海海洋研究所

<120>一种海洋链霉菌及利用其制备 Enterocin 的方法以及该菌的应用

<160>1

<210>1

<211>1396

<212>DNA

<213>链霉菌 (*Streptomyces qinglanensis*) SCSIO 05256

<400>1

[0001]

CCTTACCATG CAGTCGAACG ATGAAGCCGC TTCGGTGGTG GATTAGTGGC GAACGGGTGA 60  
GTAACACGTG GGCAATCTGC CCTGCACTCT GGGACAAGCC CTGGAAACGG GGTCTAATAC 120  
CGGATATGAT CACCGGCCGC ATGGTCTGGT GGTGGAAAGC TCCGGCGGTG CAGGATGAGC 180  
CCGCGGCCTA TCAGCTTGTT GGTGGGGTGA TGGCCTACCA AGGCGACGAC GGGTAGCCGG 240  
CCTGAGAGGG CGACCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA 300  
GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGCGCAA GCCTGATGCA GCGACGCCGC GTGAGGGATG 360  
ACGGCCTTCG GGTTGTAAAC CTCTTTCAGC AGGGAAGAAG CGCAAGTGAC GGTACCTGCA 420  
GAAGAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGGT GCGAGCGTTG 480  
TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGAGCTCGTA GGCGGCCTGT CACGTCCGAT GTGAAAGCCC 540  
GGGGCTTAAC CCCGGGTCTG CATTGATAC GGGCAGGCTA GAGTTCGGTA GGGGAGATCG 600  
GAATTCCTGG TGTAGCGGTG AAATGCGCAG ATATCAGGAG GAACACCGGT GGCGAAGGCG 660



[0002]

GATCTCTGGG CCGATACTGA CGCTGAGGAG CGAAAGCGTG GGGAGCGAAC AGGATTAGAT 720

ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGTTGGK AACTAGGTGT GGGCGACATT CCACGTCGTC 780

CGTGCCGCAG CTAACGCATT AAGTTCCCCG CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGCTAAAACT 840

CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAAGCG GCGGAGCATG TGGCTTAATT CGACGCAACG 900

CGAAGAACCT TACCAAGGCT TGACATACAC CGGAAAGCGC TGGAGACAGT GCCCCCCTTG 960

TGGTCGGTGT ACAGGTGGTG CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTAA 1020

GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGTCCTGT GTTGCCAGCA ACTCTTCGGA GGTGTTGGGAC 1080

TCACGGGAGA CTGCCGGGGT CAACTCGGAG GAAGGTGGGG ACGACGTCAA GTCATCATGC 1140

CCCTTATGTC TTGGGCTGCA CACGTGCTAC AATGGCCGGT ACAATGAGCT GCGATGCCGT 1200

GAGGTGGAGC GAATCTCAAA AAGCCGGTCT CAGTTCGGAT TGGGGTCTGC AACTCGACCC 1260

CATGAAGTCG GAGTCGCTAG TAATCGCAGA TCAGCATTGC TGCGGTGAAT ACGTTCCCGG 1320

GCCTTG TACA CACCGCCCGT CACGTCACGA AAGTCGGTAA CACCCGAAGC CGGTGGCCCA 1380

ACCCCTTG TG GGAGGG 1396

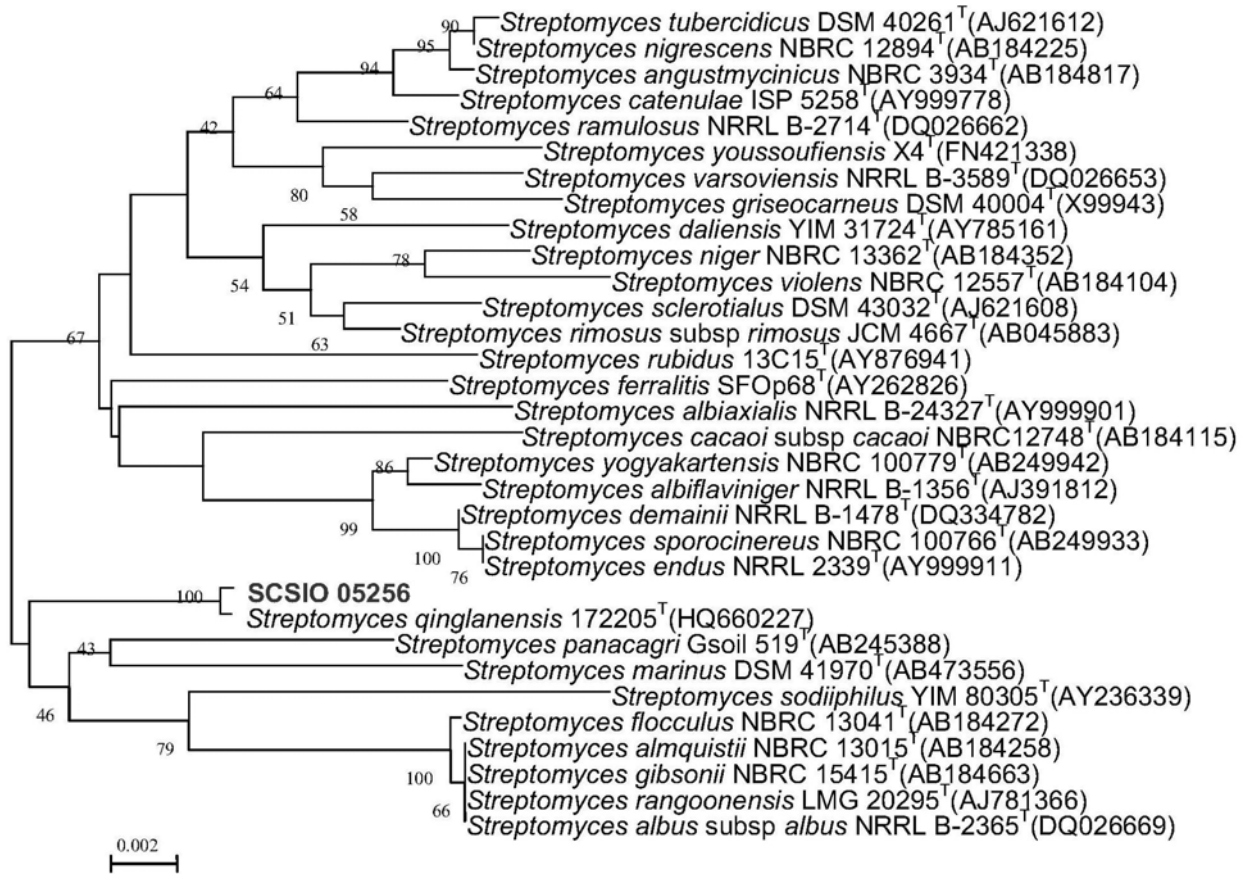


图1

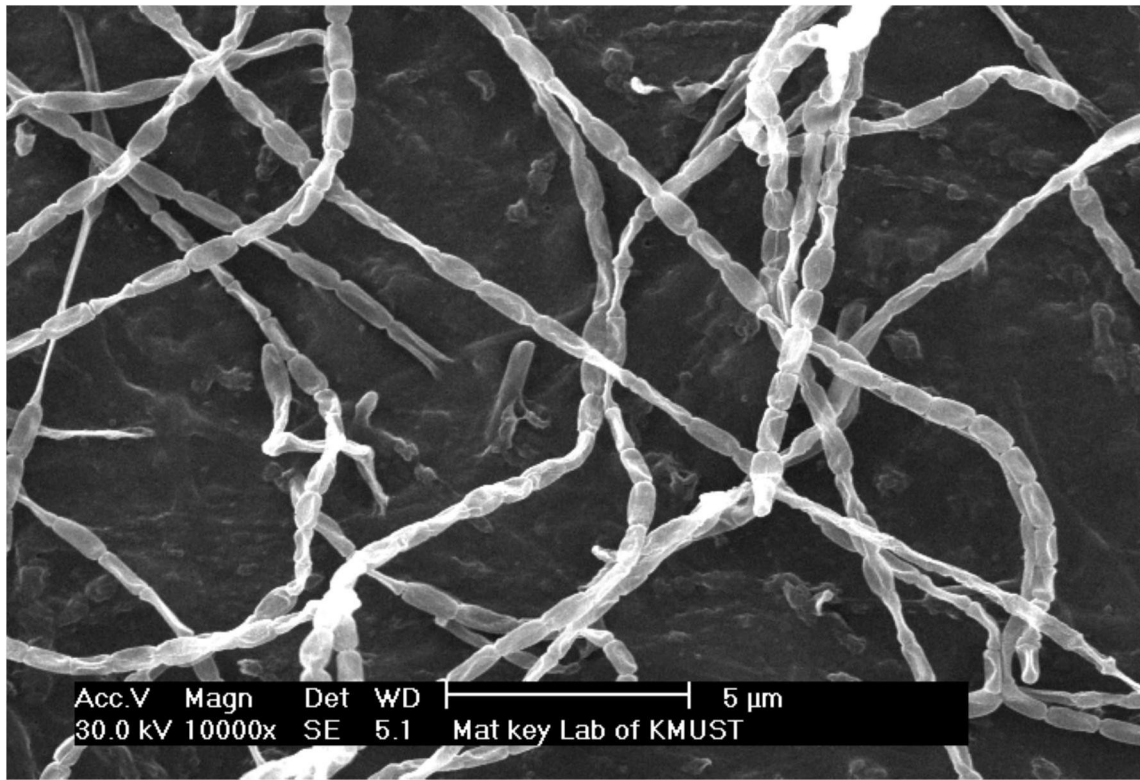


图2

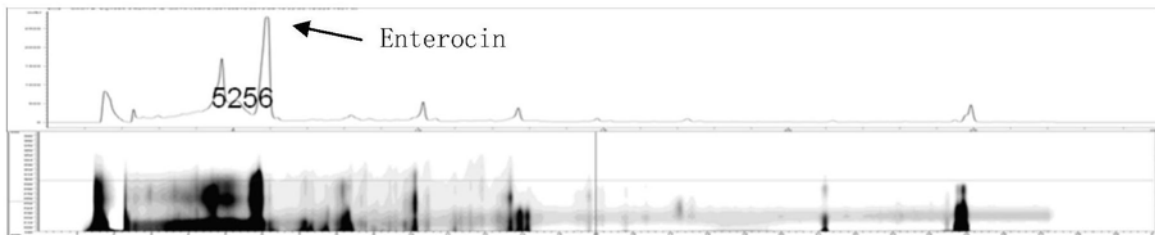


图3

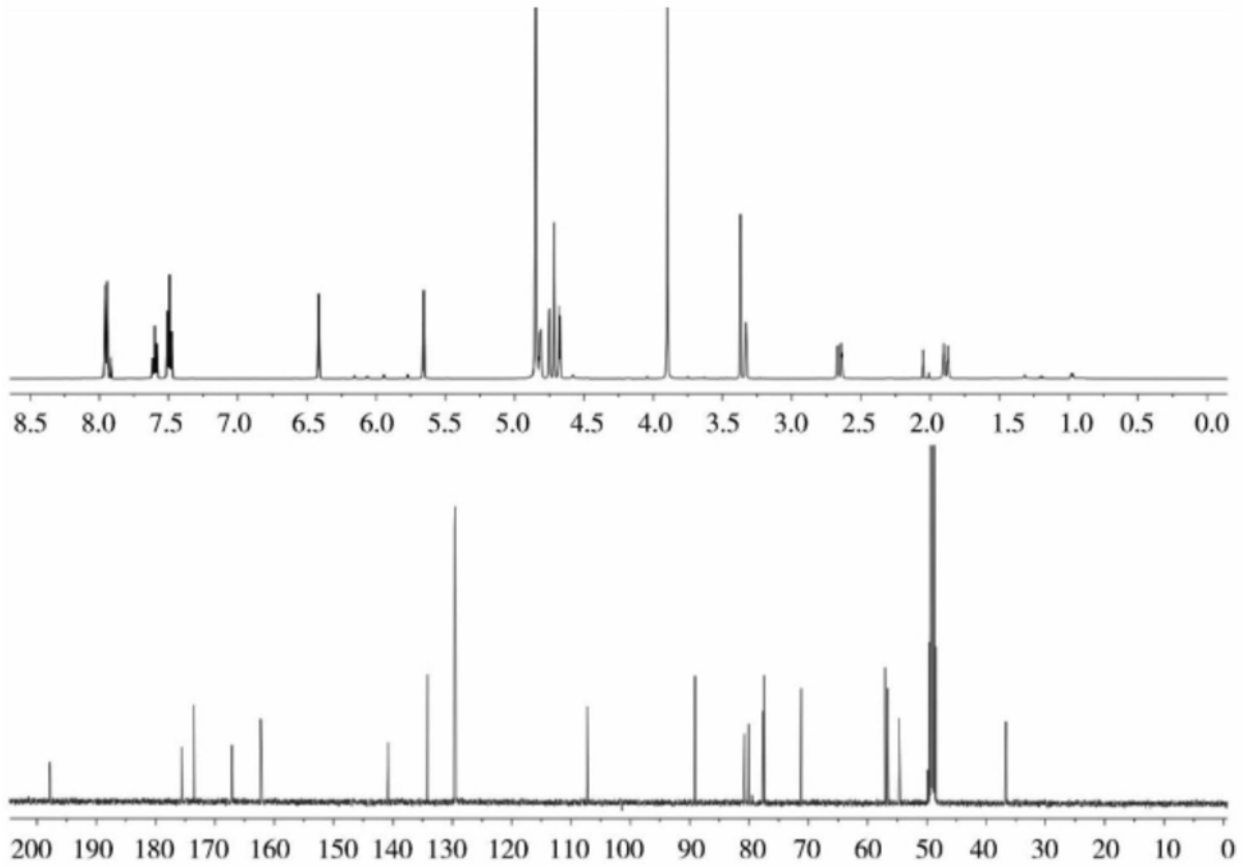


图4