

发酵条件对天冬氨酸转氨酶重组菌高效表达与质粒稳定性的影响

宫长斌, 何冰芳, 曾 杨, 张 霞, 谢宁昌

南京工业大学生物化学工程实验教学示范中心, 江苏 南京

收稿日期: 2022年8月11日; 录用日期: 2022年9月15日; 发布日期: 2022年9月26日

摘 要

通过对以 pET-22b 质粒为载体, 大肠杆菌 BL21 为宿主构建的产天冬氨酸转氨酶的重组菌 BL21/pET-aspC, 质粒稳定性与重组菌产酶活性的发酵条件优化, 对比了不同发酵条件对基因工程菌菌体生长、质粒稳定性和转氨酶活性的影响, 得到较工程菌常用 LB 培养基更利于工程菌生长的培养基 CSN。考察了该培养基主要成份玉米浆、酵母粉和柠檬酸钠对重组菌生长及质粒稳定性的影响。优化后, 该发酵体系的发酵成本为 LB 培养基的 10%, 外源基因的质粒稳定性得到明显改善, 重组菌生物量与天冬氨酸转氨酶活性显著提高。优化后培养体系成本低廉, 发酵稳定, 适于基因工程菌的大规模工业化生产发酵使用。

关键词

质粒稳定性, 天冬氨酸转氨酶, 条件优化, 工程菌发酵

Effects of Fermentation Conditions on High Expression and Plasmid Stability in Recombinant Bacteria Producing Aspartate Transaminase

Changbin Gong, Bingfang He, Yang Zeng, Xia Zhang, Ningchang Xie

Biochemical Engineering Experimental Teaching Center, Nanjing Tech University, Nanjing Jiangsu

Received: Aug. 11th, 2022; accepted: Sep. 15th, 2022; published: Sep. 26th, 2022

Abstract

Using the recombinant strain BL21/pet-AspC producing aspartate aminotransferase which was

constructed with pET-22b as the vector and *E. coli* BL21 as the host, the stability of plasmid and the most suitable fermentation conditions for the production of enzyme were studied. By comparing the relationship between cell growth, plasmid stability, transaminase activity and medium composition of genetically engineered bacteria, the CSN medium, which is more favorable for the growth of engineering bacteria than the LB medium commonly used for engineering bacteria, was obtained. The effects of corn syrup, yeast powder and sodium citrate on the growth of recombinant bacteria and the stability of plasmid were investigated. The fermentation cost of the new medium was 10% of that of LB medium. The stability of plasmid of foreign gene, the biomass of recombinant bacteria and the activity of aspartate aminotransferase were significantly improved. The optimized culture system has low cost and stable fermentation, which is suitable for large-scale industrial production and fermentation of genetic engineering bacteria.

Keywords

Plasmid Stability, Aspartate Aminotransferase, Condition Optimization, Engineering Bacteria Fermentation

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

由天冬氨酸转氨酶转化苯丙酮酸(PPA)是制备 L-苯丙氨酸(L-Phe)的一条重要工艺路线[1] [2], 稳定高产天冬氨酸转氨酶的菌株是该工艺的基础[3]。本实验室利用分子生物学手段构建了一株组成型表达天冬氨酸转氨酶的工程菌 BL21/pET-aspC, 具有较高活力。但该菌株因工业化需求构建为组成型表达体系, 导致菌体生长与外源基因高效表达相互干扰, 发酵过程中质粒不稳定易于丢失, 为该重组菌的工业化生产带来很大困扰[4]。基因工程菌在生长过程中由于外源基因的表达带来的压力会导致的生长缓慢, 以及遗传不稳定性。实验室通常采用诱导型表达体系将重组菌生长与表达分离, 降低外源基因在重组菌生长阶段的表达量, 减轻宿主生长的压力[5] [6]。但诱导表达体系往往需要添加 IPTG 或乳糖等昂贵的诱导剂, 难以适应工业化的需求[7] [8]。组成型表达体系无需诱导, 免去了诱导剂, 也排除了诱导剂对菌体生长的抑制作用, 在工业生产方面具有较强的优势, 但外源基因伴随菌体生长时外源蛋白的表达会带来质粒丢失、包涵体过多是该体系的缺点[9] [10]。质粒的稳定性遗传受到宿主和质粒的基因型、比生长速率、基因的表达程度、培养温度、营养限制和反应器操作方式等多种遗传和环境因素的影响。培养基组成, 细菌比生长速率等对外源基因的稳定性、表达及菌体生长尤为重要[9]。因此确立基因工程菌高效稳定的培养体系是相关高效工程菌产业化的关键[11]。

本研究采用自行构建的天冬氨酸转氨酶基因工程菌, 通过对发酵条件与工程菌质粒稳定性、高效表达的相关因素的研究, 得到以淀粉、玉米浆、柠檬酸铵为主要营养物的发酵体系, 完全突破了常规基因工程菌 LB 培养基的框架, 其发酵成本约为 LB 培养基的 1/10, 而且工程菌的质粒稳定性及目的蛋白的表达同时有显著提高, 为该工程菌的产业化奠定了基础。

2. 实验

2.1. 菌株

重组菌 BL21-pET/aspC 由本研究室构建;

2.2. 培养方法

由平板接种重组菌至液体培养基(加 Amp 100 $\mu\text{g/ml}$)中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 rpm 培养至菌种对数生长期末期, 再以 3%接种量接种至发酵培养基(加 Amp 100 $\mu\text{g/ml}$)中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 rpm 培养。

2.3. 发酵条件优化方法

2.3.1. 不同碳氮源、金属离子与生长因子对重组菌比酶活的影响

以淀粉为碳源, 10 g/L NaCl 为无机盐, 添加 2 g/L 酵母膏为氮源及生长因子。培养基中添加各种碳源、氮源、无机盐与辅因子, (实验中添加玉米浆固型物含量为 20%左右, 添加量参照以固形物质量计算), 分别测定发酵不同时间段发酵液天冬氨酸转氨酶比酶活, 选取最高点比较。

2.3.2. 正交实验

根据 1.2.6~1.2.7 实验选择对重组菌生长及产酶有影响的三个因素并确定添加量, 根据正交实验表设计实验方案, 进行正交实验。数据分析采用通过 $L_9(3^3)$ 及 3 水平 3 因素正交表进行, 做 9 组实验提取数据

2.4. 分析方法

2.4.1. PPA 和 L-Phe 的检测

采用高压液相色谱(HPLC)检测, C18 的反相柱, 流动相: 0.01 M 的醋酸钠(pH 4.5), 0.4 mM 的醋酸铜, 22%的甲醇。流速: 0.3 mL/min, 检测波长: 230 nm。

2.4.2. 天冬氨酸转氨酶比酶活测定方法

取 1 ml 发酵液。加入 1 ml 底物(PPA 0.1 mol/L, L-Asp 0.11 mol/L, 氨水调 pH 8.5), 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 采用三价铁离子法检测 PPA 含量, 以 PPA 的减少量折算成转氨酶比活力。

2.4.3. 质粒稳定性检测

取发酵液, 稀释至一定倍数, 分别取稀释后菌液 100 μL 涂布于添加 Amp 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 LB 固体培养基和不添加 Amp 的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 小时后计单菌落数量, 以添加 Amp 的培养基菌落数(具有 Amp 抗性)和总菌落数计算质粒稳定性。

质粒稳定性 = 具有 Amp 抗性菌落数/总菌落数(%)

3. 结果与讨论

3.1. 重组菌发酵条件优化

表 1 和图 1、图 2 分别考察了碳氮源和金属离子等生长因子对重组菌比酶活的影响。实验中添加玉米浆固型物含量为 20%左右, 添加量以固形物质量计算。其中淀粉作为碳源, 玉米浆和柠檬酸氨为氮源添加后重组菌转氨酶比酶活有显著提高。金属离子和生长因子中 Fe^{2+} 的添加虽然促进菌体生长, 但不利于天冬氨酸转氨酶的表达, 其他物质对菌体生长及天冬氨酸转氨酶比酶活无显著影响。

Table 1. Effect of assistant factors on the AspAT enzyme activity and biomass of recombinant *E. coli*

表 1. 金属离子和生长因子对重组菌产转氨酶和生长的影响

添加生长因子	OD ₆₄₀	酶活
对照	5.1	140.3
0.5 g/L Mg ²⁺	5.5	139.5
0.5 g/L Na ⁺	5.9	148.2

Continued

0.5 g/L Ca ²⁺	5.9	140.1
0.5 g/L Fe ²⁺	6.3	128.6
1.0 g/L VB6	4.91	141.9
1.0 g/L VC	4.6	129.6
1.0 g/L VB2	5.2	132.8
1.0 g/L PLP	5.36	137

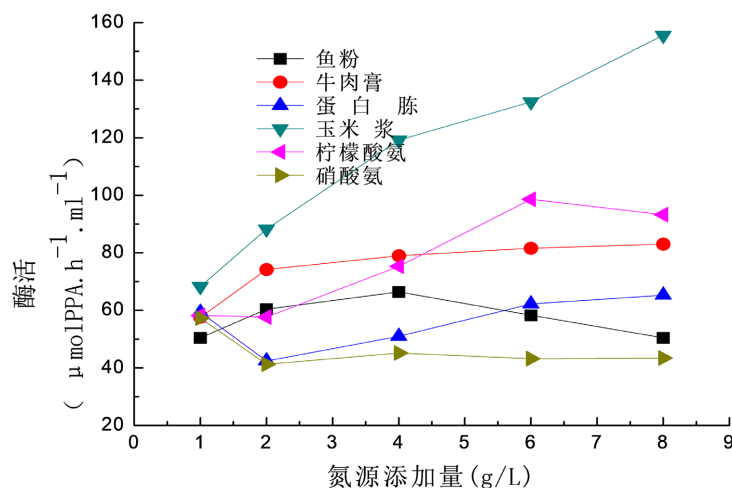


Figure 1. Effect of nitrogen source on the AspAT enzyme activity of recombinant *E. coli*

图 1. 氮源对重组菌产转氨酶的影响

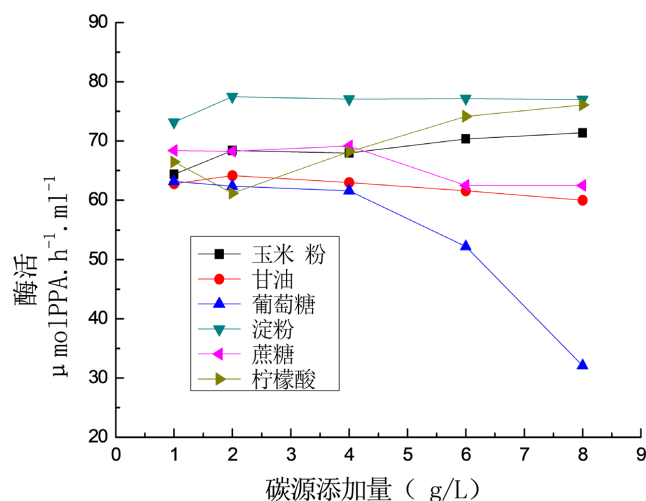


Figure 2. Effect of carbon source on the AspAT enzyme activity of recombinant *E. coli*

图 2. 碳源对重组菌产转氨酶的影响

选择对重组菌生长及产酶有影响的三个因素：A：玉米浆；B：淀粉；C：柠檬酸氨进行正交实验，并对测定的数据进行分析，数据见表 2。

正交实验数据分析：通过对比实验数据和极差分析，在这三种因素中，对转氨酶酶活性影响为：玉米浆(56.5) > 淀粉(13.0) > 柠檬酸氨(5.1)。因子 A 去 3 水平最佳，B 取 2 水平最佳，C 取 2 水平最佳，各因素

的最优水平为 A3B2C2。由于正交实验所确定的最佳条件并未被包含在正交表的九个实验中，因此按最佳条件进行了验证。同时，做一个 A3B2C3 为对照，比酶活分别为：A2B2C3：165；A3B2C2：184。验证实验的产酶量处于正交实验的最高水平，实验结果与理论推导一致。优化最终培养基为：玉米浆 45 ml/L；淀粉 2 g/L；柠檬酸氨 1 g/L。该培养基本研究简称为 CSN 培养基。

Table 2. Selecting the best medium using three level orthogonal
表 2. 三水平正交实验表优化最适培养基

序号	玉米浆(ml/L)	酵母粉(g/L)	柠檬酸氨(g/L)	转氨酶活性($\mu\text{molPPA}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$)
1	30	3	1	155.1
2	35	1	0.5	157.1
3	40	2	1.5	172.9
4	35	2	0.5	164.2
5	40	3	1.5	170.1
6	45	1	1	180.0
7	35	1	1.5	157.1
8	40	2	1	170.1
9	45	3	0.5	180
M1	476.4	494.2	501.3	
M2	497.3	507.2	505.2	
M3	532.9	505.2	500.1	
Ri	56.5	13.0	5.1	

3.2. CSN 培养基对菌体生长和外源基因表达及稳定性的影响

对比原培养体系，重组菌 BL21/pET-aspC 菌体生长及天冬氨酸转氨酶比酶活均有显著提高(数据见图 3)。

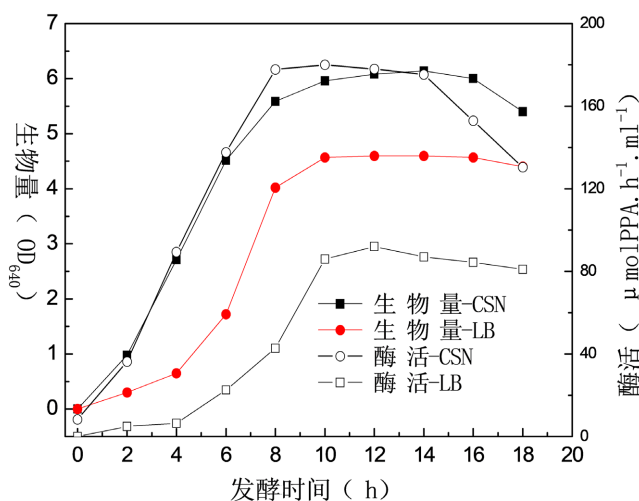


Figure 3. Effect of CSN on the Growth and the expression of AspAT enzyme of recombinant *E. coli*
图 3. CSN 培养基对重组菌生长和外源基因表达的影响

培养基优化后,重组菌迟滞期明显减少,较快进入对数生长期,并在10 h进入稳定期,天冬氨酸转氨酶比酶活随菌体的生长表达量迅速增加,在8 h,先于菌体生长达到稳定期。在菌体稳定期的后期,新的培养体系菌体生物量和比酶活均有明显下降,原培养体系则稳定期较长,可能是由于菌体前期生长过于旺盛,菌体更易于进入消亡期所致。两个体系发酵过程中高比酶活区间均较宽,对于下一步利用转氨酶转化制备L-Phe过程中菌体的收集非常有利。

本研究为两级发酵,因此培养基对外源基因稳定性,尤其是种液中外源基因稳定性的影响至关重要,实验优化后培养基CSN与原出发菌使用培养基LB成份改变较大,所以本研究考察了两种培养基对外源基因稳定性的影响,见图4。菌体生长初期,因培养基中含有100 $\mu\text{g/ml}$ Amp两种培养基中重组菌质粒丢失率均较低,随培养时间的增长,培养基中Amp的消耗,施加的选择性压力降低,LB培养基中重组菌质粒丢失率迅速增加,而CSN培养基质粒丢失率相对较低,表明重组菌外源基因的稳定性在CSN培养基中有了显著提高。

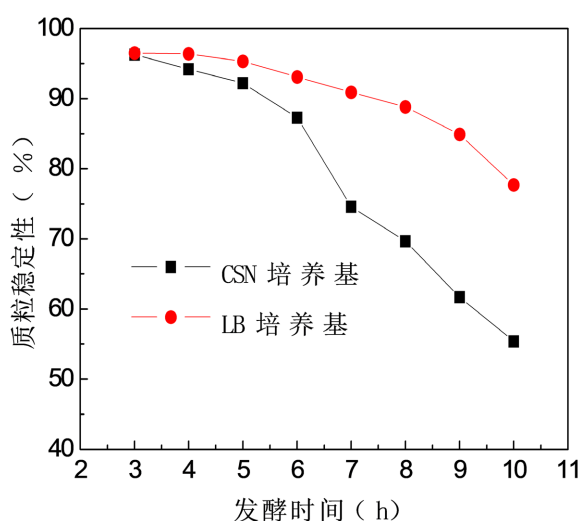


Figure 4. Effect of various medium on the plasmid of recombinant *E. coli*

图4. 培养基对外源基因稳定性的影响

3.3. CSN 培养基中各组份对重组菌的影响分析

玉米浆的添加(图5)对重组菌影响较大,随着培养基中玉米浆含量的增加菌体生物量快速增加,对比淀粉(图6)的添加对重组菌的生长无明显影响,柠檬酸氨(图7)单组份对菌体生长的影响表现为在生长前期菌体生长较快,后期生物量则有所下降。表明该培养基主要营养物质为玉米浆。而且玉米浆可明显改善质粒稳定性,可能是玉米浆中含有大量的有机质,同时含有丰富的无机盐,金属离子,氨基酸等,不仅可作为碳氮源供菌体生长所需,更能提供大量的菌体生长所需生长因子,利于重组菌的质粒稳定性。淀粉的添加同样可改善质粒的稳定性,有报道培养基中少量添加葡萄糖可改善质粒稳定性[10],但本研究中碳源添加葡萄糖时,并不利于重组菌生长和产天冬氨酸转氨酶活性也较低,可能是葡萄糖代谢产生大量乙酸不利于菌体生长[11],而淀粉需经水解为单糖后才能被菌体利用,缓和了菌体的代谢产生大量的乙酸从而利于重组菌的生长与质粒稳定性。柠檬酸氨的添加对质粒稳定性基本没有影响,对菌体前期生长则有明显促进作用,但前期实验中在LB培养基中柠檬酸铵的添加会导致菌体生长过早进入衰亡期,在添加过量玉米浆的CSN培养基中并未见到该现象,应该是菌体生长过程中优先利用了玉米浆中的营养物质,缓和了柠檬酸氨的作用。

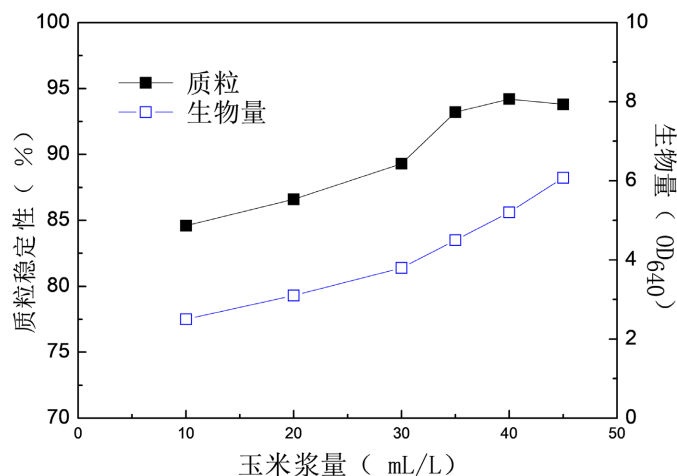


Figure 5. Effect of corn steep liquor on the stability of plasmid and biomass of recombinant *E. coli*
图 5. 玉米浆对重组菌质粒稳定性和生物量的影响

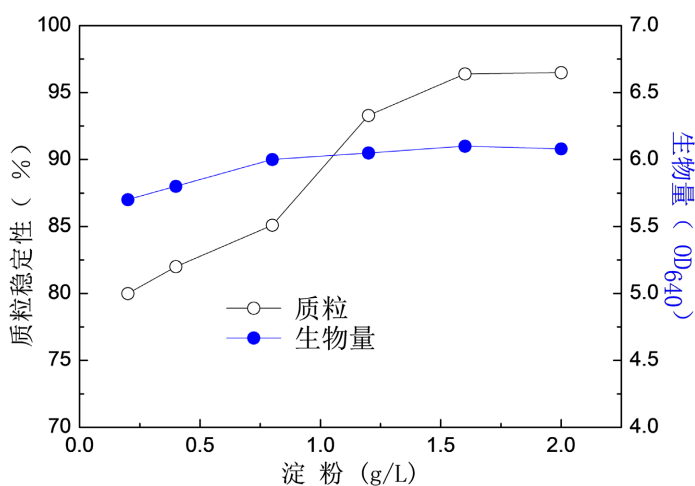


Figure 6. Effect of starch on the stability of plasmid and biomass of recombinant *E. coli*
图 6. 淀粉对重组菌质粒稳定性和生物量的影响

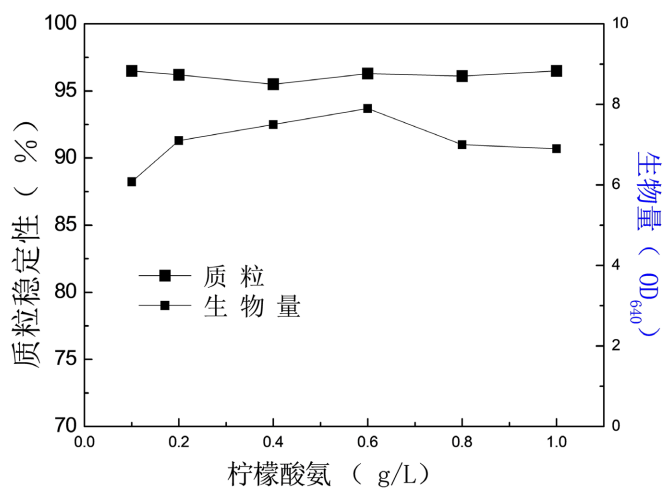
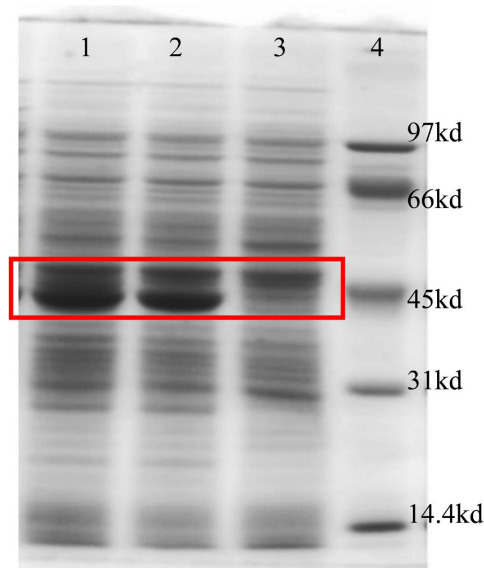


Figure 7. Effect of NaCl on the stability of plasmid and biomass of recombinant *E. coli*
图 7. 柠檬酸氨对重组菌质粒稳定性和生物量的影响

3.4. 培养基对外源基因表达的影响

分别取培养 12 小时的重组菌的发酵液，离心收集菌泥，以生理盐水稀释，640 nm 处测定其生长 OD，稀释 OD 值至 1，取 100 μ l 破壁后做 SDS-PAGE 电泳，结果见图 8。该菌株构建的表达体系启动子较弱，外源基因表达量偏低，但可以明显看到重组菌在 LB 培养基和 CSN 培养基中均有高于宿主菌加强的一条天冬氨酸转氨酶的电泳条带(蛋白分子量 43 kd)。图 8 结果表明，在相同菌体生物量的情况下，同一菌株在 LB 培养基的外源基因表达量要略高于 CSN 培养基。相同生物量 OD₆₀₀ 条件下，CSN 培养基发酵获得的菌体比酶活较 LB 培养基提高 110%，说明 CSN 培养基在外源基因表达数量上低于 LB 培养基，但酶活性反而更高，可能是 CSN 培养基菌体生长快，菌体内生物资源利用偏向于菌体生长，导致外源基因表达量偏低。但表达量低反而有利于新合成蛋白的折叠，形成的包涵体较少，LB 培养基表达蛋白包涵体较多导致[6] [12]。



泳道 1. LB 培养基；泳道 2. CNS 培养基；泳道 3. 空宿主 BL21 对照；泳道 4. Mark。

Figure 8. Effect of NaCl on the stability of plasmid and biomass of recombinant *E. coli*
图 8. 柠檬酸氨对重组菌质粒稳定性和生物量的影响

4. 结论

1) 优化后培养基所需成份均为廉价易得的工业产品，最佳配方为：玉米浆 45 ml/L，淀粉 2 g/L，柠檬酸氨 1 g/L。优化后发酵体系培养基成本仅为优化前 10%左右，菌体生物量提高 50%，外源基因表达转氨酶比酶活提高 110%，质粒的稳定性也得到明显改善。该培养基适用于工业大规模发酵。

2) 优化后培养基中从组份分析，淀粉作为碳源仅为 2 g/L，而且淀粉对菌体生长及产酶影响较小，主要起到稳定外源基因的作用。菌体生长所需营养物质大多来自玉米浆和柠檬酸氨，且玉米浆对菌体生长，产酶及外源基因质粒稳定性均有较大影响。

3) 优化后的培养基不需要添加辅酶，成本进一步降低，以优化后的发酵液为酶液，转化苯丙酮酸制备 L-苯丙氨酸，转化率比优化前的 LB 培养基发酵液为酶液提高了 18%。

本研究采用的培养基 CSN 价格不仅远低于 LB 培养基，所含营养物质和生长因子也更为丰富，更适于菌体的生长，从成本上也更利于工业化生产的需要，而且相对于 LB 培养基，也更有利于基因工程菌质粒的稳定性。对基因工程菌的大规模发酵条件的探索具有较高的指导意义。

基金项目

国家一流本科专业和江苏省品牌专业建设工程；国家重点研发计划项目(2019YFA0905200)。

参考文献

- [1] 张清华, 李莎, 廉政, 等. 利用 DNA 重组技术生产 L-苯丙氨酸的研究[J]. 天津农学院学报, 2020, 27(2): 38-43.
- [2] Chao, Y.P., Lai, Z.J., Chen, P., *et al.* (1999) Enhanced Conversion Rate of L-Phenylalanine by Coupling Reactions of Aminotransferases and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Escherichia coli* K-12. *Biotechnology Progress*, **15**, 453-458. <https://doi.org/10.1021/bp990044f>
- [3] Chao, Y.P., Lo, T.-E., Luo, N.S. (2000) Selective Production of L-Aspartic Acid and L-Phenylalanine by Coupling Reactions of Aspartase and Aminotransferase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 19-25. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00149-6)
- [4] 邵宇, 张显, 胡孟凯, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成 L-苯乳酸[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 1-8.
- [5] 喻国策, 焦瑞身, 王骥程, 王树青. 大肠杆菌 *E. coli* HB101(pBR322)高密度培养过程质粒的稳定性[J]. 过程工程学报, 2001(2): 185-188.
- [6] 张琳琳. 重组蛋白包涵体变复性过程优化及折叠机制探索[D]: [硕士学位论文]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [7] 张若兰, 刘庆国, 王敏, 等. 枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因在酿酒酵母中的表达和应用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(7): 76-81.
- [8] 张刚, 杨光, 裴海生, 等. 质粒平均分配基因 *parDE* 对甲酸脱氢酶 NADH 再生系统稳定性的影响[J]. 过程工程学报, 2008(2): 345-349.
- [9] 翟成一, 徐岩, 聂尧, 等. 产普鲁兰酶重组大肠杆菌质粒稳定性的研究[J]. 工业微生物, 2015, 45(2): 13-20.
- [10] Johan, P. (2002) Multieveled Selection on Plasmid Replication. *Genetics*, **161**, 1373-1384. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.4.1373>
- [11] 杨涛, 陈坚, 方芳, 等. 多铜氧化酶在大肠杆菌中的分泌表达[J]. 过程工程学报, 2020, 20(10): 1210-1217.
- [12] 杨晓玫, 师尚礼. 红、黄、绿三种颜色荧光质粒导入大肠杆菌中的稳定性表达[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 53(3): 193-198.

附录

pte22b+aspC 质粒图谱

```

1 agcttgcggt tgatcatcgt ctgagccgc tttcagcgg gcttcattgt ttttaagtct
61 tacagcactg ccacaatcgc ttcgcacagc ggagccatgt tatctggtgt catccggccc
121 acatttacgc gaccagaagc aaccgcatat acgccaact ctctgcgcag acgcagcact
181 tgttcttttg tcaggccact gaaggagaac atgccgttct gtttgatgat aaagctgaag
241 tcgcggtttg cgccttttc ctgcagcgtg ttgacgaaca actgacgcac acgctgaata
301 cgctggcgca tatcagtcag ctctgtgtcc caaatcgcac gtaacgcac gttgctcagg
361 atggtggcaa caacagaagc gccgtgtgct ggtgggttag agtagttagc gcgaatcgcc
421 gctttcattt ggctgaatgc gcgatcaac gtttactgt cggcagcaac cagagtacaa
481 gcgccaacac gctcgttgta caggccaaag ttttagagt aggaactggc aacaatcagc
541 tctttatgca tagccgcgaa agcgcgcagt ccttcagcat ctcttccag accacgggca
601 aaacctggtt aagcgaagtc aaacagcggg aaccagcctt tctcaacgga gagttgtgcc
661 agtgtttgcc attgtccag cgtagggtcg ataccggtg ggttatggca gcagccatgg
721 aacagcacta cgctgccagc ctgagcttca ttcaggctgt taatcagtc atcgaagtca

```

781 agagtgtgat ttccgcac ataataagcg tattcacgaa ctccagacc tgcagagtta
841 aagacgctct tatggttcgg ccagcttggg ttgctacccc acacacgctt aacgctggta
901 tttttgccca gaaatcggc agccacgct agtgcgccag tccccccgg agtctgtgcc
961 gtgcgagcac gttgtcatt gatcaggcgc ctaccttac caaacagcag ttctgagtg
1021 cagegaccaa atcagggat gccgtcaatg ccgaggtaat tttggtggt ttcatttfcg
1081 agcagatact gttcagcctt tttcacgctg gtcagtaccg gggttttgcc cgtctcatct
1141 ttatagacac caatcccag gftaattttg ccgggacggt catcggcacg aacagatcg
1201 gccagccca gaatcgggtc ggcaggagcg gcgtaatgt tctcaaacat gacgaggttc
1261 cattatggtt acagaaggga agtccgctat cagggtaacg ggagatttac aaaattcaa
1321 ctattactga tgaaacgca ggctgtttt gcaagacgtg agattgcttg gaaggtaccg
1381 agctegaatt cggatccgaa ttaattccga tatccatggc catcggcgcg tgggcagcga
1441 ggagcagcag accagcagca gcggtcggca gcaggtattt catatgtata tctcttct
1501 aaagttaaac aaaattattt cttaggggga attgtatcc gtcacaatt ccctatagt
1561 gagtgcatt aatttcggg gatcagatc tcatcctct acgccggacg catcgtggcc
1621 ggcatcaccg gcgccacagg tgcggttctt ggcgcctata tcgccgacat caccgatggg
1681 gaagatcggg ctcgccactt cgggctcatg agcgttctt tcggcgtggg tatggtggca
1741 ggccccgtgg ccgggggact gttgggcgc atctccttgc atgcaccatt ccttgcggcg
1801 gcggtgctca acggcctcaa cctactactg ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag
1861 ggagagcgtc gagatcccgg acaccatcga atggcgcaa accttcgcg gtatggcatg
1921 atagcggccg gaagagagtc aattcagggg gtgtaatgtg aaaccagtaa cgtatacga
1981 tctcgcagag tatgccgggt tctcttata gaccgttcc cgcgtggtga accagccag
2041 ccacgtttct gcgaaacgc gggaaaaagt ggaagcggcg atggcggagc tgaattacat
2101 tccaaccgc gtggcacaac aactggcggg caaacagtcg ttgctgattg gcgttccac
2161 ctccagctcg gccctgcacg cggcgtcga aattgtcgcg gcgattaaat ctgcgccga
2221 tcaactgggt gccagcgtgg tgggtcgtat ggtagaacga agcggcgtc aagcctgta
2281 agcggcgggt cacaatttc tcgcaacg cgtcagtggg ctgatcatta actatccgct
2341 ggatgaccag gatgccattg ctgtggaagc tgcctgcact aatgttccgg cgttattct
2401 tgatgtctct gaccagacac ccatcaacag tattatttc tccatgaag acggtacgcg
2461 actggcgtg gagcatctgg tcgattggg tcaccagcaa atcgcgctgt tagcgggccc
2521 attaagtct gtctcggcgc gtctcgtct ggctggctgg cataaatatc tcaactgcaa
2581 tcaaatcag ccgatagcgg aacgggaagg cgactggagt gccatgtccg gtttcaaca
2641 aaccatgcaa atgtgaatg agggcatcgt tccactcgc atgctggtg ccaacgatca
2701 gatggcgtg ggcgcaatgc gcgccattac cgagtccggg ctgcgcgttg gtgcggatat
2761 ctcggtagtg ggatacagc ataccgaaga cagctcatgt tatatcccgc cgtaaccac
2821 catcaaacg gattttgcc tctggtggca aaccagcgtg gaccgcttgc tgcaactctc
2881 tcagggccg gcggtgaagg gcaatcagct gttccccgtc tcaactggtga aaagaaaaac
2941 caccctggcg cccaatcgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttgccgatt cattaatgca
3001 gctggcacga cagtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtaa
3061 gttagctcac tcattaggca ccgggatctc gaccgatgcc ctgagagcc tcaaccag
3121 tcagctcctt ccggtgggcg cggggcatga ctatcgtcgc cgcacttatg actgtctct

3181 ttatcatgca actcgtagga cagggtgccg cagcgtctg ggtcatttc ggcgaggacc
3241 gctttcgtg gagcgcgacg atgacggcc tgcgcttc ggtattcga atcttcacg
3301 cctcgtcga agcctcgtc actggtccc ccaccaaacg ttccggcgag aagcaggcca
3361 ttatgccgg catggcggcc ccacgggtgc gcatgacgt gtcctgtcg ttgaggacc
3421 ggctaggctg gcgggggtg cttactggt agcagaatga atcaccgata cgcgagcgaa
3481 cgtgaagcga ctgctgtgc aaaacgtctg cgacctgagc aacaacatga atggtcttcg
3541 gttccgtgt ttcgtaaagt ctggaaacgc ggaagtacg gccctgcacc attatgttc
3601 ggatctgcat cgcaggatgc tgctggctac cctgtggaac acctacatct gtattaacga
3661 agcgtggca ttgacctga gtgattttc tctggtccc ccgcatccat accgccagt
3721 gttaccctc acaacgttc agtaaccggg catgttcac atcagtaacc cgtatcgtga
3781 gcatcctctc tctttcacc ggtatcatta ccccatgaa cagaaatccc ccttacacgg
3841 aggcacagt gaccaaacg gaaaaaacg cccttaacat ggcccgttt atcagaagcc
3901 agacattaac gcttctggag aactcaacg agctggacgc ggatgaacag gcagacatct
3961 gtgaatcgt tcacgaccac gctgatgagc ttaccgcag ctgcctcgcg cgttcggtg
4021 atgacggta aaactctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag
4081 cggatgccg gagcagacaa gccctcagg gcgcgtcagc ggggttggc ggggtcggg
4141 gcgagccat gaccagtca cgtagcgata gcggagtga tactggctta actatcggc
4201 atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatatcgggt gtgaaatacc gcacagatgc
4261 gtaaggagaa aataccgat caggcgtct tccgttcct cgtcactga ctgcctcgc
4321 tccgtcgttc ggctcggcg agcggatca gctcactca aggcggtaat acggttatcc
4381 acagaatcag gggataacg aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg
4441 aaccgtaaaa agcccgcgtt gctggcgttt ttccatagcg tccgcccc tgacgagcat
4501 cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata aagataccag
4561 gcgtttcccc ctggaagtc cctcgtcgc tctcctgtc cgacctgcc gcttacggga
4621 tactgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgttt cctatagtc acgctgtagg
4681 tatctcagtt cgtgttaggt cgttcgtcc aagctgggt gtgtgcacga accccccgtt
4741 cagcccagc gctgcgctt atccggtaac tctcgtctg agtccaacc gtaagacac
4801 gacttatcgc cactggcagc agccactgtt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc
4861 ggtgctacag agttctttaa gtggtgcct aactacggct aactagaag gacagtatt
4921 ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaa gagttggtag ctctgtatcc
4981 ggcaaaaaa ccaccgtgg tagcgggtgt tttttgtt gcaagcagca gattacgcgc
5041 agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atctttcta cggggtctga cgctcagtg
5101 aacgaaact caggttaagg gattttgtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag
5161 atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaactgg
5221 tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcagctg tctattcgt
5281 tcatccatag ttgctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca
5341 tctgccccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct caccggctcc agattatca
5401 gcaataaacc agccagccgg aaggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac ttatccgcc
5461 tccatccagt ctattaattg ttgccggaa gctagagtaa gtatcgcg agttaatagt
5521 ttgcgaacg ttgttccat tgctgcaggc atcgtggtgt cagcctcgc gtttggatg

5581 gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc
5641 aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg
5701 ttatcactca tggftatggc agcactgcat aattctctta ctgcatgcc atccgtaaga
5761 tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga
5821 ccgagtgct ctgccccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta
5881 aaagtgetca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg
5941 ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atctttfact
6001 ttaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggggaata
6061 agggcgacac ggaatgttg aatactcata ctctctctt tcaatatta ttgaagcatt
6121 taccaggtt attgtctcat gacgggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia
6181 ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg aaattgtaaa cgttaatatt
6241 ttgttaaaat tcgcgtaaa tttttgttaa atcagctcat ttttaacca ataggccgaa
6301 atccgcaaaa tccttataa atcaaaagaa tagaccgaga taggggtgag tgtgttcca
6361 gtttgaaca agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc
6421 gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccatcacctt aatcaagttt tttggggtcg
6481 aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct aaaggagacc cccgatttag agcttgacgg
6541 ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg
6601 gcgctggcaa gtgtagcggc cacgctgcgc gtaaccacca caccgcccgc gcttaatgag
6661 ccgctacagg gcgctgcca ttcgccaatc cggatatagt tctctcttc agcaaaaaac
6721 cctcaagac ccgttagag gcccaagggt gttatgctag ttattgctca gcggtggcag
6781 cagccaactc agcttcttt cgggctttgt tagcagccgg atctcagtg tggtggtggt
6841 ggtgctcgag tgcggccgca