

## 纖維酶生產菌株的篩選與菌種鑑定

篩菌策略：

要篩特定活性的菌株只要從對應的環境中即可篩選到想要的菌株，本實驗主要目的是篩選具有耐高溫纖維酶活性的菌株。首先要決定採樣地點，採樣地點的選擇則先思考什麼環境含有豐富的纖維素，而且這個環境本身長年或某段時期的溫度較 40°C 高，這樣的環境下可能比較容易篩選到耐高溫纖維酶菌株。

採樣地點：一般篩選耐高溫纖維酶菌株最常見的環境-堆肥；另一採樣環境則選擇了牛的瘤胃。目前從堆肥中篩選到三株菌株，其在活性培養基 45°C 培養一天即可清楚觀察到明顯的澄清環，另外從牛之第四個瘤胃中篩選到一株可長於 55°C 的細菌株，由菌落的外觀與顯微鏡的觀察判讀堆肥的菌株應是屬於桿菌屬，而牛瘤胃所篩選到的菌株應屬於放線菌科，細菌菌種的鑑定則主要利用 16S rDNA 的方法，使用一對保留性引子使用聚合酵素連鎖反應增幅其 16S rDNA，所得 1.5 kb DNA 序列經由定序後，以 NCBI 的 BLAST 分析，堆肥中桿菌屬的菌株主要與枯草桿菌類相似度最高，而牛瘤胃所篩選到的菌株則與一些嗜熱鏈黴菌具有高達 99% 的序列相同性，可知此菌株應為鏈黴菌屬 (*Streptomyces*) 中的嗜熱菌。

材料方法與步驟：

一、實驗藥品：

Tryptone、Yeast extract、Nutrient broth 購自 Difco 公司、Agar、Tris 購自 Zymeset 公司、Agarose LE 購自 Mdbio 公司、Carboxymethylcellulose 購自詮智實業有限公司、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  購自 Merck 公司。

二、培養基之配製

1. 纖維水解酵素活性培養基組成份(每公升)：

Carboxymethylcellulose 10 g、Nutrient broth 1~8 g 不等、agar 15 g、痕量元素(pH 7.0)。

2. 痕量元素組成份(每公升)：

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.07g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.28g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22mg、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.8mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.05mg、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  4.5mg。

3. pH 緩衝液(100 mM)：

Sodium acetate-acetic acid：pH 3.7-5.6、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ：pH 5.8-8.0、Tris-HCL：pH 7.0-9.0、Glycine-NaOH：pH 8.6-10.6、混合 LB 培養基。

4. Luria-Bertain 培養基組成份(每公升)：

Tryptone 10 g、yeast extract 5 g、NaCl 10 g、agar 15 g、將其溶於 RO 水中

5. Nutrient Agar 培養基組成份(每公升)：

Nutrient broth 8 g、agar 15 g

### 三、菌株之篩選：

所採取的樣品放於冰桶中送回實驗室置於本實 4°C 冰箱備用。樣品經由無菌生理食鹽水連續稀釋後，不同的稀釋度樣品取 0.1 ml 塗抹於不同營養成分的培養基（不含養分的 water agar、1/10 NA、1/5 NA、NA），將培養基直接培養於 50°C 或是培養於 37°C，隔天挑選單一菌落之菌株轉點於活性分析培養基，將培養基培養於不同的溫度（55°C、50°C、45°C、40°C），觀察菌株於高溫中是否具有纖維酶之活性的表現。菌株培養 1~2 兩天後，先轉點於新的培養基中，再加入剛果紅染劑(3 mg/ml) 5 ml 染色 30 分鐘，然後以 1 M NaCl 沖洗數次，若菌株具有分解 Carboxymethylcellulose (CMC) 的酵素活性，則在菌落周圍會出現形成澄清環。

### 四、菌種鑑定

菌種的鑑定主要採用 16S rDNA 的 DNA 序列分析比對。利用 16S rDNA 兩端較保留的 DNA 序列所設計的一對引子，5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (forward primer 27f) 及 5'-TACGGCTTACCTTGTAGGACTT-3' (reverse primer 1492r) (Lane et al.,1991)，再利用聚合酶鏈鎖反應(PCR)的方法將其 DNA 增幅，聚合酶鏈鎖反應(PCR)的反應條件如下：50  $\mu$ l 的反應液中含有 100 ng 的染色體 DNA 當做模版、0.32  $\mu$ M 的一對引子、0.2mM dNTP 及 *Taq* 聚合酵素 2.5 units，反應時的條件為第一個循環為 94°C 3 分鐘，接著 30 個循環為 94°C 1 分鐘、48°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘，最後一個循環為 72°C 5 分鐘。

實驗中利用聚合酵素鏈鎖反應方法增幅出來未知菌株一段大約 1500 bp 的 16s rDNA，先利用割膠回收此片段後，將 DNA 送往源資國際生物科技股份有限公司定序其 DNA 序列。將所定序的 16S rDNA

組裝後，經由 NCBI BLAST 進行比對分析來確定菌株之屬。

### 1. 染色體 DNA 的萃取方法

利用染色體 DNA 抽取套組(Viogene)，先將菌株接種於 50 ml LB 培養液中，於 50°C 培養 24 小時，經離心(12000 rpm、5min)取得菌體，以 200  $\mu$ l 溶菌酵素(lysozyme 10mg/ml)於 37°C 水浴 60 分鐘，再加入 20  $\mu$ l 蛋白質水解酵素(proteinase K)及 200  $\mu$ l Binding buffer 後 60°C 水浴 10 分鐘，接著再加入 100  $\mu$ l 異丙醇(Isopropanol)混合，取菌液到管柱，經離心(10000 rpm、2min)，再以 0.5ml 的 Washing buffer 1 和 Washing buffer 2 離心(8000 rpm、1min)洗管柱，最後以離心(12000 rpm、1min)以完全去除酒精，經離心取得沉澱物加入 100  $\mu$ l 50°C 二次水回溶並在室溫靜置 10 分鐘，再次經由離心(8000 rpm、1min)以取得 DNA，最後置放 4°C 保存。

### 2. 聚合鏈鎖反應(PCR)產物回收方法

利用 UV 燈照射膠片後，用刀片切下 DNA 特定位置，將含有 DNA 的膠 0.2 g 置入滅菌微量管中，加 500  $\mu$ l 的 DF buffer，於 60°C 水浴 10 分鐘 (隔 1-2 分鐘需上下搖晃一下)，之後置於室溫中冷卻，管柱與收集館裝好待膠溶解，離心(13000 rpm、30 秒)，收集館內液體倒掉，加入 600  $\mu$ l Wash buffer，離心(13000 rpm、30 秒)，收集館內液體倒掉，再次離心(13000 rpm、1 分鐘)，將管柱移至新的滅菌微量管中，加入 50°C 二次水 50  $\mu$ l 回溶，靜置 2 分鐘，最後離心(13000 rpm、1 分鐘)，保存於-20°C 備用。

### 3. 瓊膠(agarose gel)電泳

以 1x TAE (121g Tris-base、28.5 ml glacial acetate、50 ml 0.5M

EDTA、pH 8.0)，配置 1% 瓊膠(agarose gel)。先量取 100 ml 1x TAE buffer 倒於血清瓶中，秤取 1 g 瓊膠倒於血清瓶中，以微波爐煮溶瓊膠加熱 20 秒後就取出搖晃均勻，待完全溶解時改加熱 10 秒就取出搖勻，直到瓊膠完全溶解。待稍為冷卻之後加入染劑 ethidium bromide (10 mg/ml) 2  $\mu$ l，混合均勻。將裝置好膠盤，放好齒梳，將溶液倒於製膠盤上，大約 20-30 分鐘膠體會凝固，拔出齒梳，將膠片放於 NDA 電泳槽中，加入 1x TAE buffer 於 DNA 電泳槽中，直至淹過瓊膠片。並剪一段石蠟膜，取 6x loading buffer 1  $\mu$ l 點於石蠟膜上，取 5  $\mu$ l 樣品於石蠟膜上與 loading buffer 混勻，將染色體 DNA 放置到瓊膠片孔洞中，連接電泳槽的正負極，開電源供應器電源，設定 100 伏特大約跑 30 分鐘左右，關閉電源，取出瓊膠片，置於 DNA 照相系統照相，觀察結果。

## 五、菌株之生化特性分析

### 1. 最適 pH 的測量

菌株先接種至平板培養基上，於 55°C 下培養 24 小時後，在接種至 50 ml 不同 pH 值的培養液之三角瓶中，分別在不同時間 12、24、36 及 48 小時觀察菌株生長之情形並紀錄之。測試的 pH 值為 4、5、6、7、8、9 及 10 的緩衝溶液，pH 4.0-5.0 使用 Sodium acetate-acetic acid；pH 6.0-7.0 使用  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ；pH 8.0-9.0 使用 Tris-HCL；pH 10.0 使用 Glycine-NaOH。

### 2. 菌株最適生長溫度之測量

菌株接種至 LB 及 NA 平板培養基上，分別於 25、30、37、40、45、50 及 55°C 下進行培養 24 小時，之後取出觀察菌株枝生長情形後紀錄之。

## 六、菌株之酵素活性的測定

菌株先接種至平板培養基上，於 55°C 下培養 24 小時後，在接種至 50 ml 培養液之三角瓶中，在 30°C、37°C、45°C、50°C 及 55°C 下震盪培養 4、10、23、30、37、50 及 57 小時，各別取三次的培養液，以 13000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液冰於 -20°C。酵素活性測定方法如下所述。

## 七、還原糖含量測定

利用 DNS (dinitrosalicylic acid) 作為水解產物的還原糖分析試劑，並以不同葡萄糖濃度做出標準曲線為依據，定量還原糖的量。

### 1. DNS 試劑的配製

取 30 g potassium sodium tartrate 溶於 80 ml 熱水，加入 1.6 g NaOH，溶解後定量至 100 ml，利用微波爐加熱，加入 1 g DNS，溶解後裝入不透光瓶中。

### 2. 還原糖標準曲線的製作

分別加入 50、75、100、150、200、250、300  $\mu$ l 不同濃度的葡萄糖溶液，再加入 950、925、900、850、800、750、700  $\mu$ l 的磷酸鉀緩衝液(50 mM、pH 7.0)，然後加入 333  $\mu$ l DNS 試劑，混合均勻後，於 96°C 下加熱 5 分鐘，進行呈色反應，以分光光度計測定在波長 510 nm 下之吸光值。進行三重複後製作標準曲線。

## 八、酵素活性測定

取 250  $\mu$ l 磷酸鉀緩衝液(50 mM、pH 7.0)，加入 200  $\mu$ l 於 30°C、37°C、45°C、50°C 及 55°C 培養的酵素液，再加入水溶性受質羧基二甲基纖維素(CMC) 25  $\mu$ l (10 mg/ml)，置於 45°C 反應 30 分鐘。再加入 167  $\mu$ l DNS 試劑中止反應，於 96°C 加熱 5 分鐘呈色，偵測 O.D.<sub>540</sub> 的變化量。DNS 在高溫下會與還原糖進行氧化還原反應，使 DNS 由原本的黃色變成紅棕色，之後再檢測 540 nm 之吸光值變化，代入由葡萄糖所測得的標準曲線，求得酵素反應的產物生成量。酵素活性每 Unit 定義為：單位時間內可產生消耗受質量的產物量，每分鐘可生成 1  $\mu$  mole 葡萄糖。

## 結果

### 一、篩選具有水解酵素活性的菌株

本實驗從高雄屠宰場牛胃檢體樣品中，篩選到一株具有具有纖維水解酵素活性的菌株，代號為 C27。菌落的型態如圖一所示，其菌落表面乾燥，培養更久時間後表面會出現粉末狀，且整個菌落會深陷於洋菜膠之下，是典型的放線菌科型態。在顯微鏡下的外觀如圖二，為桿狀的革蘭氏陽性菌，細菌個體如真菌菌絲纏繞在一起，液態培養時也類似真菌呈現菌絲球的型態。此菌株在平板活性培養基培養一天後，經剛果紅染色後菌落周圍有明顯的澄清環出現（圖三），此菌株在 55°C 下培養，還保留其纖維酶的活性。

從堆肥樣品中所篩選到的菌株暫時的代號為 C4、C24、C37。C4 菌落呈現黏糊狀，可形成較小的單一菌落，但菌落很容易連在一起而糊成一片（圖四），顯微鏡下為典型的短桿菌（圖五）。C24 菌落表面乾燥，中間會呈現出人字形，周圍呈不規則型態（圖六），顯微鏡下也為典型的短桿菌（圖七）。而 C27 的菌落表面乾燥，周圍呈不規則型態（圖八），顯微鏡下為長桿菌（圖九）。這三株篩自堆肥的菌株在 45°C 培養於平板活性培養基培養一天後，經剛果紅染色後菌落周圍皆有明顯的澄清環出現（圖十、十一、十二）

### 二、菌種鑑定

利用 16S rDNA 的方法來鑑定所篩選到的菌株，使用聚合酶連鎖反應(PCR)方法來增幅可得到一段大約 1.5 kb 的產物（圖十三），割膠回收此 DNA 片段，此 DNA 片段經由生技公司定序之後，將序列拼接組裝後，利用 NCBI 的 BLAST 比對分析。C27 的比對結果如圖十四所示，此菌株與 *Streptomyces* 這一屬菌株有高達 98~99% 的相同



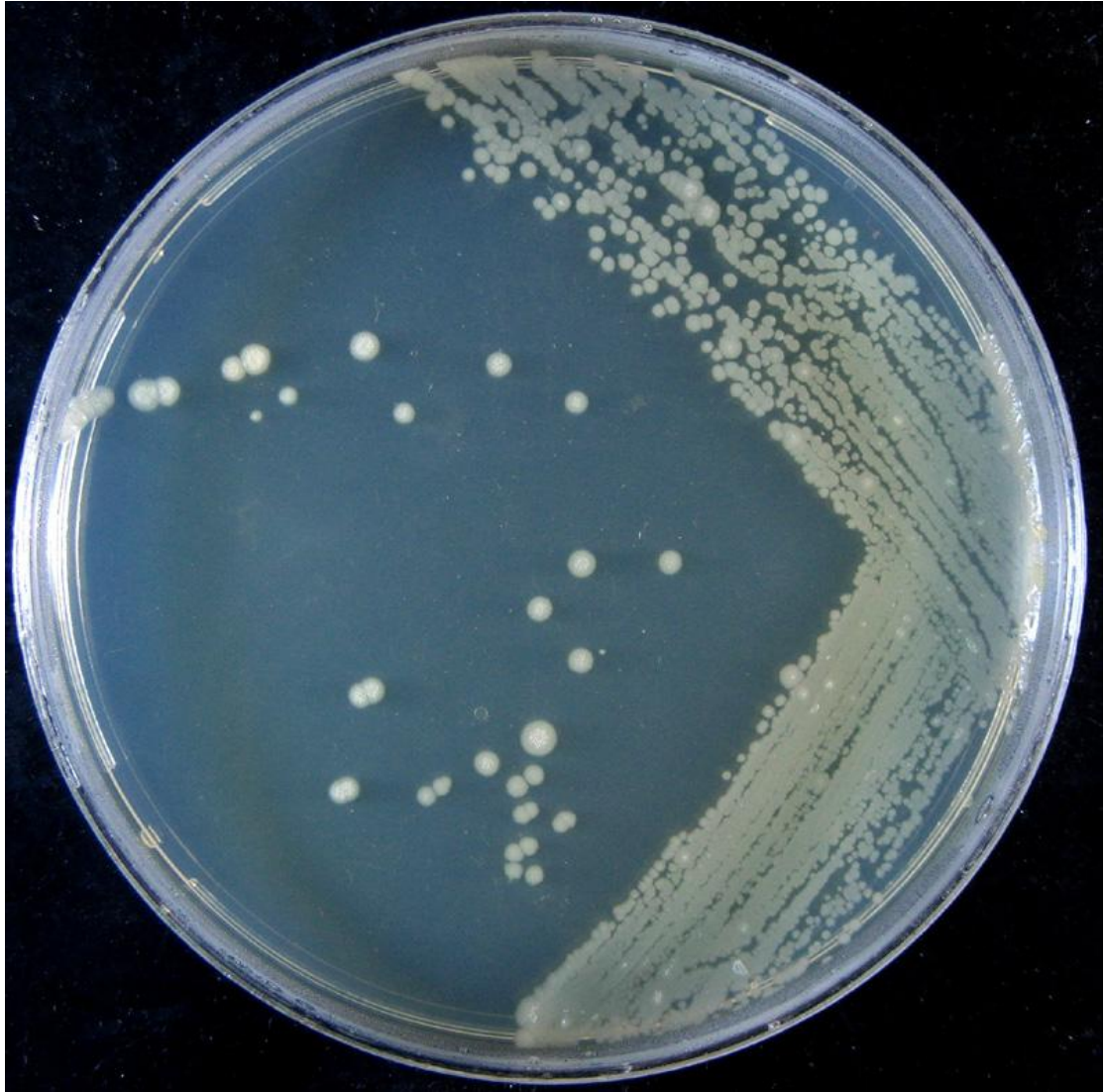
性，其中與嗜熱性鏈黴菌的相同性最高，目前暫時命名為 *Streptomyces* sp. PTC27。C4 的比對結果如圖十五所示，此菌株與 *Bacillus* 這一屬菌株有高達 98~99% 的相同性，目前暫時命名為 *Bacillus* sp. PTC4，C24 的比對結果如圖十六所示，此菌株與 *Bacillus* 這一屬菌株有高達 98~99% 的相同性，目前暫時命名為 *Bacillus* sp. PTC24，而 C37 菌株目前的 16S rDNA 的定序工作則尚未完成。

### 三、菌株最適生長溫度與 pH 值

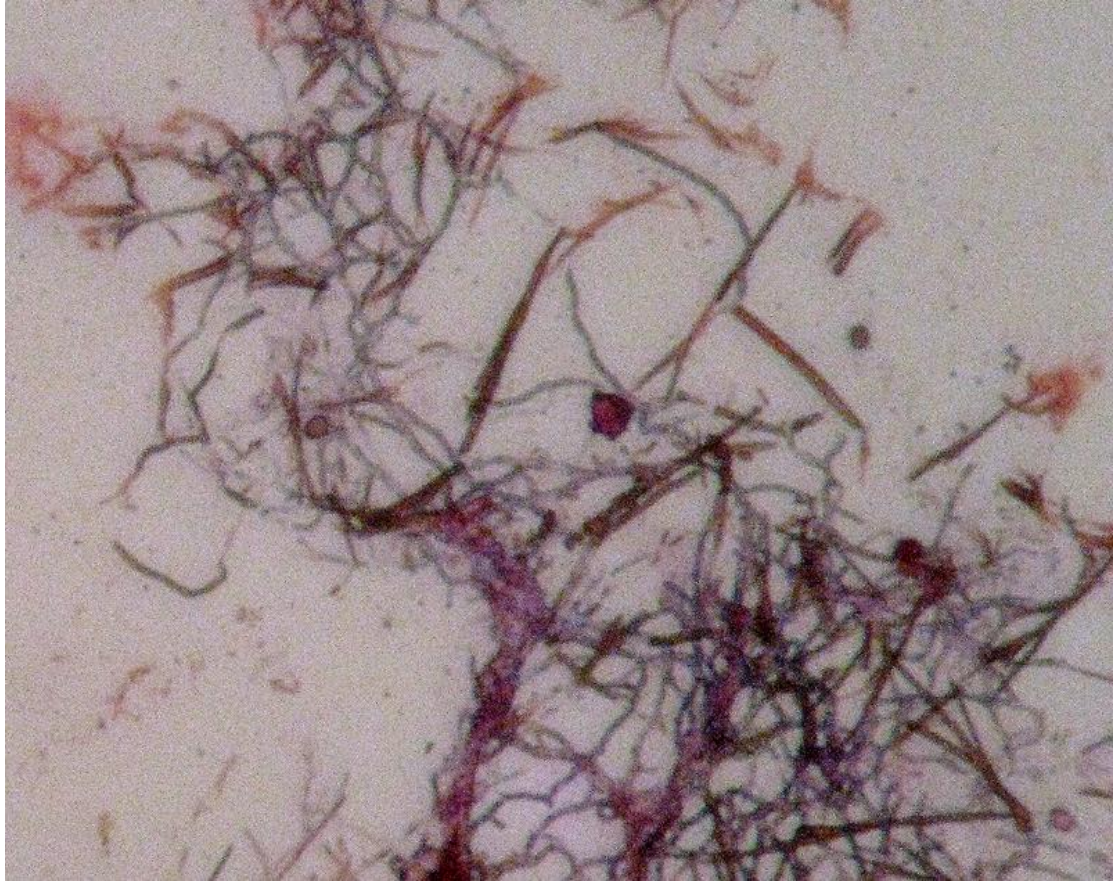
目前僅大致完成 *Streptomyces* sp. PTC27 的最適生長溫度與 pH 值試驗，其他菌株的相關工作則是尚在進行中。*Streptomyces* sp. PTC27 最高生長溫度介於 60~55°C 之間，低於 20°C 與高於 60°C 皆不會生長，最適生長的 pH 值大約在 7.0 左右，分解 carboxymethyl cellulose (CMC) 的活性在 50~45°C 之間會有較高的酵素活性。

## 未來主要工作項目

1. C27 與 C4 和 C24 菌株 carboxymethyl cellulase (CMCase) 酵素生產條件之探討。利用不同的培養基組成，不同的誘導物的添加，完成其酵素生產條件的探討。
2. CMCase 的純化。先利用蛋白質濃縮器濃縮培養菌體後的上清液，然後使用陽離子、陰離子或是斥水性交互作用層析管柱純化酵素。
3. CMCase 基因的選殖。基因選殖的策略如圖十七所示，期待透過此策略可於半年內選殖到完整的 CMCase 基因。
4. CMCase 基因的大量表現與純化。利用不同的表現載體如 pET 系列、pQE 系列或 pGEX 系列來構築表現質體。



圖一：C27 培養於營養瓊脂培養基時的菌落型態。



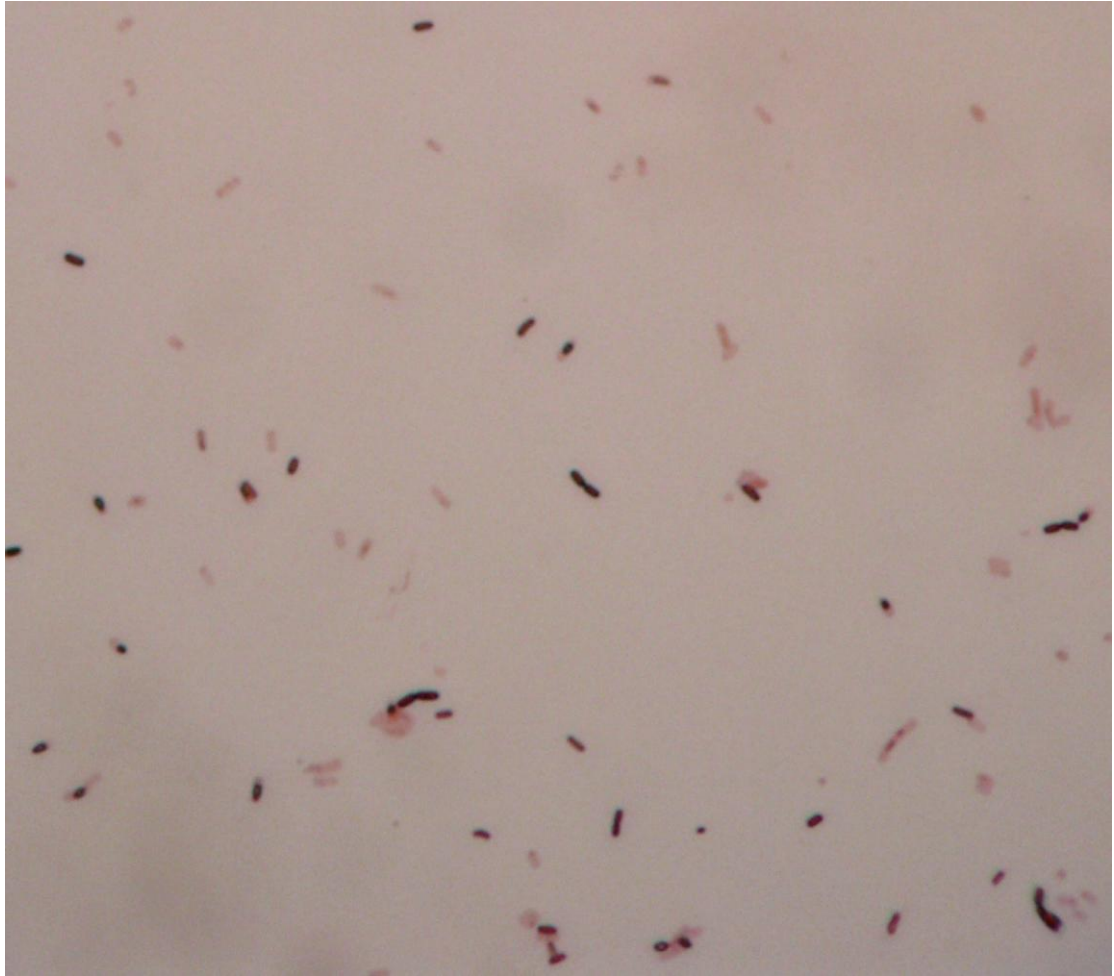
圖二：C27 菌株於顯微鏡下所觀察到的菌體外觀（1000 倍）。



圖三：C27 菌株於 55°C 培養在含 CMC 的活性培養基中，經由剛果紅染色後於菌落周圍出現明顯的澄清環。



圖四：C4 培養於營養瓊脂培養基時的菌落型態。

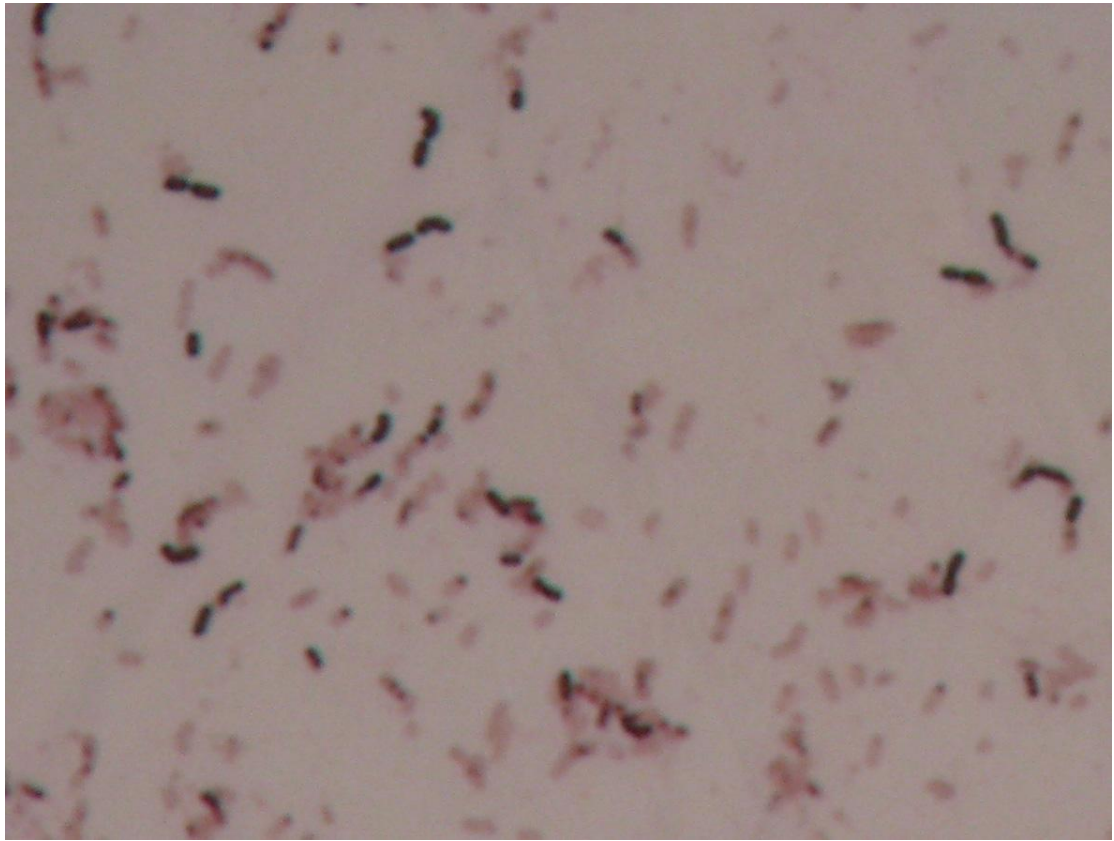


圖五：C4 菌株於顯微鏡下所觀察到的菌體外觀（1000 倍）。



圖六：C24 培養於營養瓊脂培養基時的菌落型態。

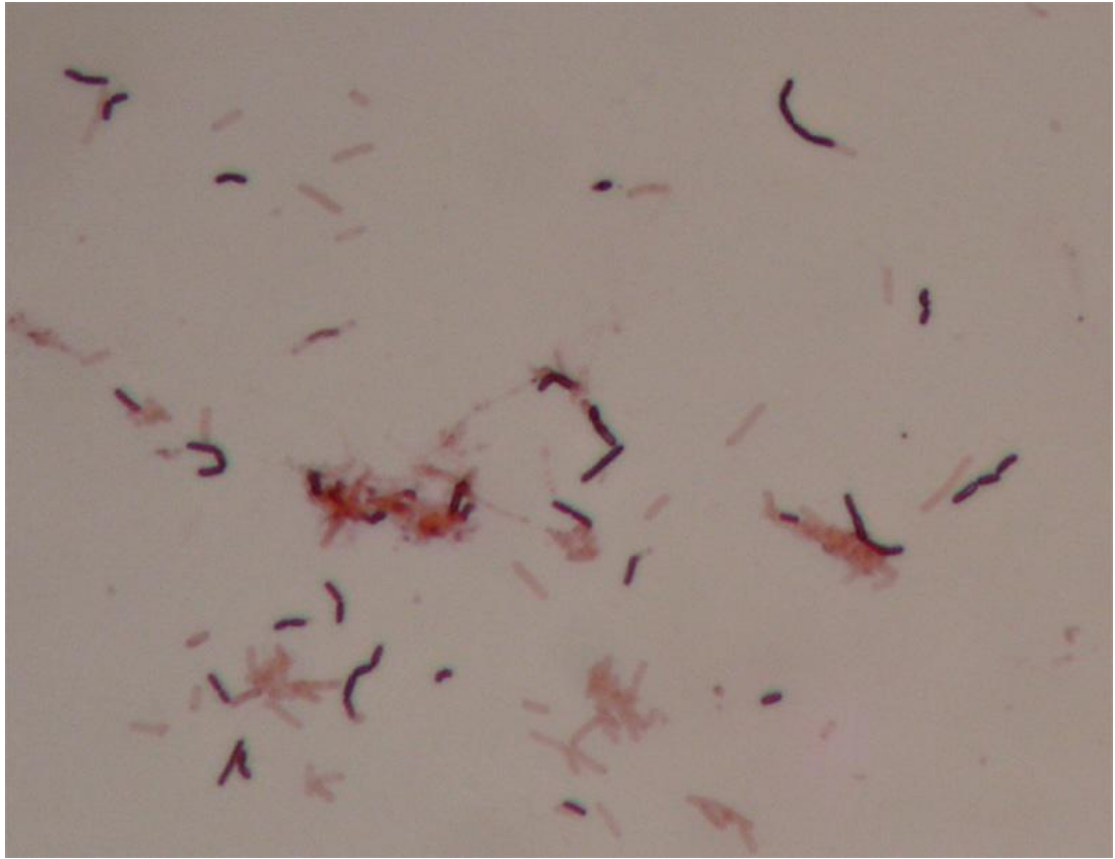




圖七：C24 菌株於顯微鏡下所觀察到的菌體外觀（1000 倍）。



圖八：C37 培養於營養瓊脂培養基時的菌落型態。



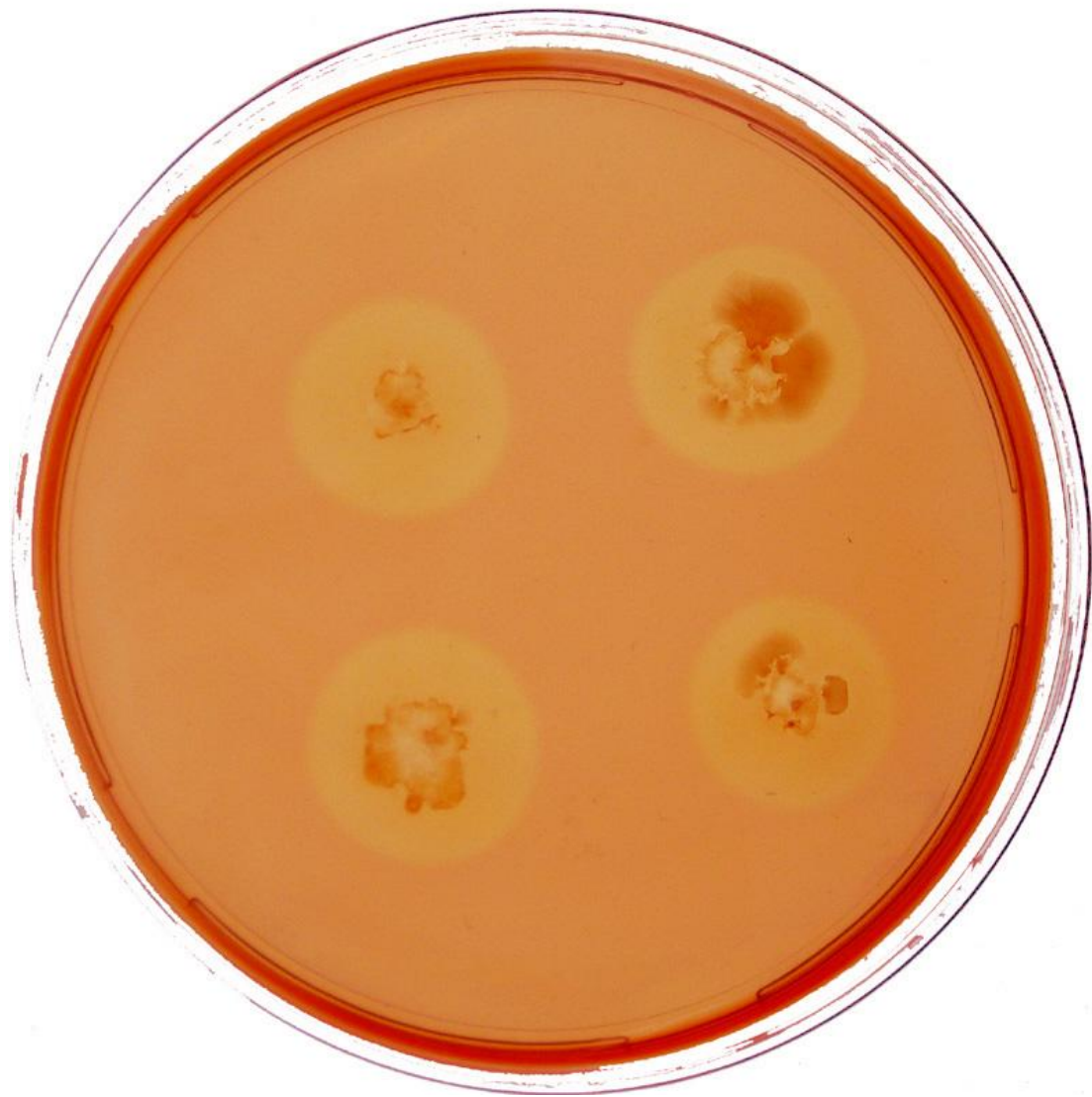
圖九：C37 菌株於顯微鏡下所觀察到的菌體外觀（1000 倍）。



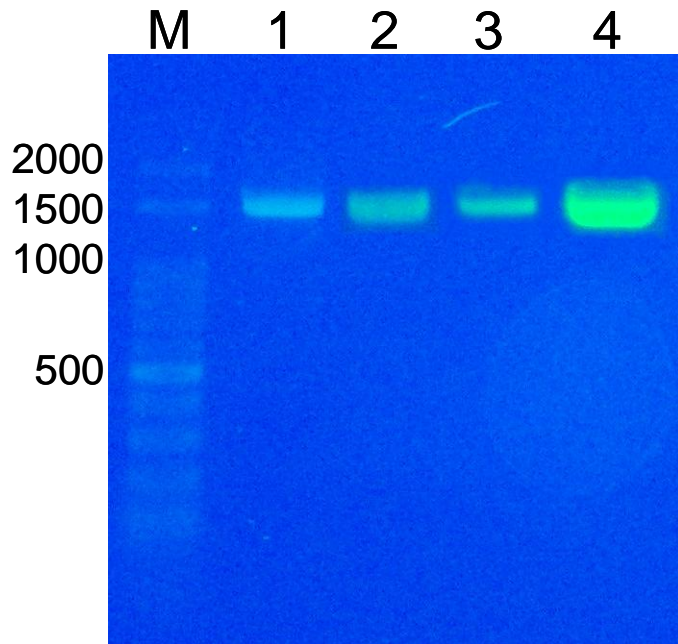
圖十：C4 菌株於 45°C 培養在含 CMC 的活性培養基中，經由剛果紅染色後於菌落周圍出現明顯的澄清環。



圖十一：C24 菌株於 45°C 培養在含 CMC 的活性培養基中，經由剛果紅染色後於菌落周圍出現明顯的澄清環。



圖十二：C37 菌株於 45°C 培養在含 CMC 的活性培養基中，經由剛果紅染色後於菌落周圍出現明顯的澄清環。



圖十三：C4、C24、C27 與 C37 菌株 16S rDNA 的 PCR 產物電泳圖。M：100 bp ladder 標準品、欄 1：C4 的 16S rDNA PCR 產物、欄 2：C24 的 16S rDNA PCR 產物、欄 3：C27 的 16S rDNA PCR 產物、欄 4：C37 的 16S rDNA PCR 產物。

**Sequences producing significant alignments:**

(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max ident
<a href="#">AB018096.1</a>	Streptomyces thermodiastaticus gene for 16S rRNA, partial sequen	99%
<a href="#">Z68095.1</a>	S.thermoviolaceus 16S rRNA gene	99%
<a href="#">AB184685.1</a>	Streptomyces thermoviolaceus subsp. apinzens gene for 16S rRNA,	99%
<a href="#">AB184583.1</a>	Streptomyces thermocyanomaculatus gene for 16S rRNA, partial s	99%
<a href="#">AB184582.1</a>	Streptomyces thermocyanoviolaceus gene for 16S rRNA, partial se	99%
<a href="#">AB184545.1</a>	Streptomyces thermoviolaceus subsp. thermoviolaceus gene for 16	99%
<a href="#">NR_027616.1</a>	Streptomyces thermoviolaceus subsp. thermoviolaceus strain DSM	99%
<a href="#">AB184371.1</a>	Streptomyces thermoviolaceus subsp. thermoviolaceus gene for 16	99%
<a href="#">AF441168.1</a>	Streptomyces sp. CH-M-1035 16S ribosomal RNA gene, partial seq	98%
<a href="#">AB249928.1</a>	Streptomyces thermodiastaticus gene for 16S rRNA, partial sequen	98%
<a href="#">AJ001434.1</a>	Streptomyces thermodiastaticus 16S ribosomal RNA, strain NAR 85	98%
<a href="#">DQ303453.1</a>	Streptomyces sp. E1125 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">AB249966.1</a>	Streptomyces mexicanus gene for 16S rRNA, partial sequence, stra	98%
<a href="#">AB184358.1</a>	Streptomyces thermophilus gene for 16S rRNA, partial sequence, st	98%
<a href="#">Z68101.1</a>	S.thermodiastaticus 16S rRNA gene	98%
<a href="#">AB184194.1</a>	Streptomyces chromofuscus gene for 16S rRNA, partial sequence, s	98%
<a href="#">AB018095.1</a>	Streptomyces thermodiastaticus gene for 16S rRNA, partial sequen	98%
<a href="#">AB184489.1</a>	Streptomyces tosaensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strair	98%
<a href="#">NR_026071.1</a>	Streptomyces thermocarboxydovorans strain AT52 16S ribosomal F	98%
<a href="#">U94487.1</a>	Streptomyces thermocarboxydovorans DSM 44294 16S ribosomal F	98%
<a href="#">EU741184.1</a>	Streptomyces sp. 13658E 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	98%
<a href="#">U94488.1</a>	Streptomyces thermocarboxydovorans DSM 44295 16S ribosomal F	98%
<a href="#">AB249917.1</a>	Streptomyces qlomeratus gene for 16S rRNA, partial sequence, str	98%
<a href="#">AJ781754.1</a>	Streptomyces qlomeratus 16S rRNA gene, type strain LMG 19903	98%
<a href="#">EF012136.1</a>	Streptomyces sp. s6-212 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	98%
<a href="#">AB249938.1</a>	Streptomyces thermocoprophilus gene for 16S rRNA, partial sequer	98%
<a href="#">FJ849837.1</a>	Streptomyces sp. CMU-PA517 16S ribosomal RNA gene, partial seq	98%
<a href="#">AB184370.1</a>	Streptomyces nobilis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: M	98%

圖十四：C27 之 16S rDNA 於 NCBI 網站以 BLAST 比對分析所得的結果。



Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

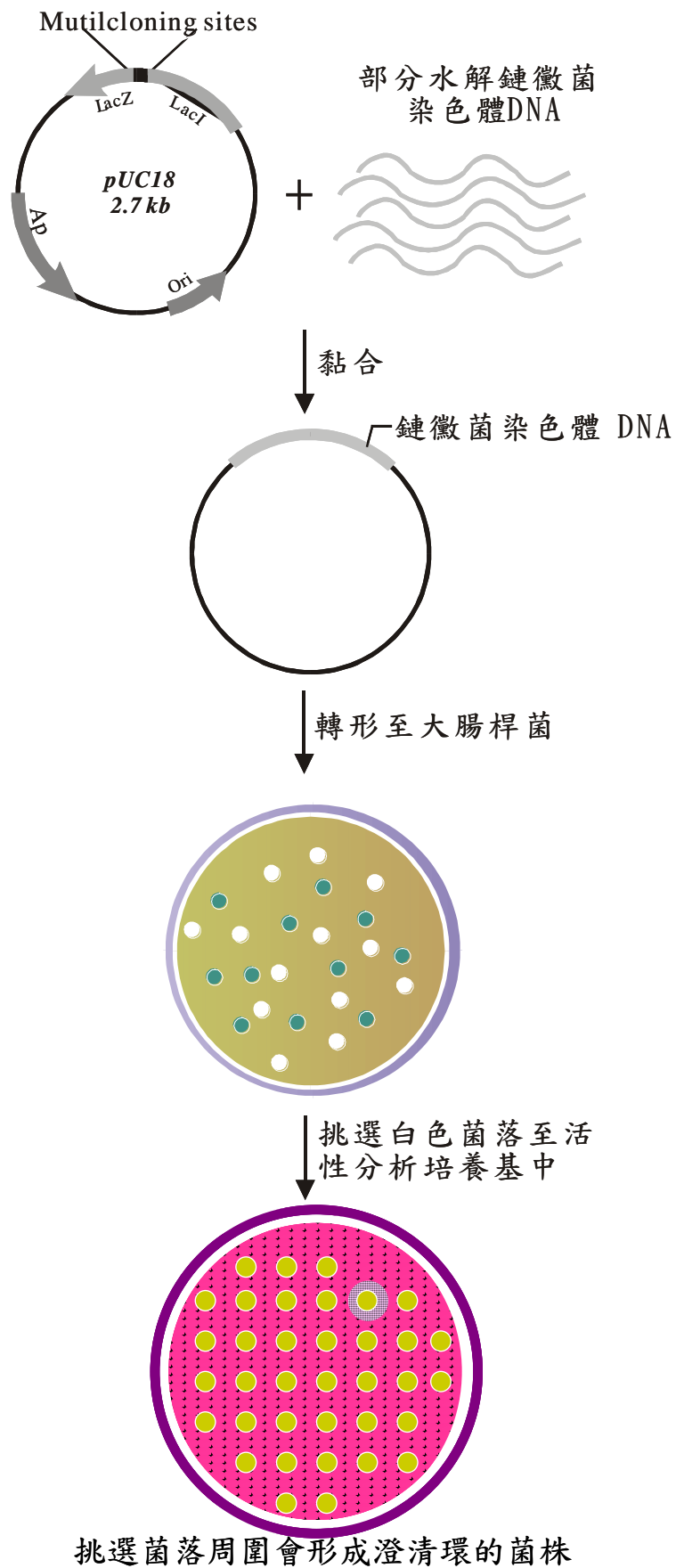
Accession	Description	Max ident
<a href="#">FJ705346.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens strain 19E2 16S ribosomal RNA gene, pai	99%
<a href="#">DQ422953.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens strain Ba-74501 16S ribosomal RNA gene	99%
<a href="#">EU531505.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens strain Ba-32732C 16S ribosomal RNA gene	99%
<a href="#">EF472261.1</a>	Bacillus subtilis strain QD517 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	99%
<a href="#">EU257695.1</a>	Bacillus sp. G1(2007) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">AY620954.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	99%
<a href="#">EU489517.1</a>	Bacillus subtilis strain TC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	99%
<a href="#">EU346662.1</a>	Bacillus subtilis strain Pab02 16S ribosomal RNA gene, partial seque	99%
<a href="#">EF472262.1</a>	Bacillus subtilis strain QD434 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	99%
<a href="#">FJ860227.1</a>	Bacillus sp. AiL3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">FJ713021.1</a>	Bacillus licheniformis strain H3 16S ribosomal RNA gene, partial seq	99%
<a href="#">FJ654441.1</a>	Bacillus sp. GJ24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">EU371583.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone CBFOS-01 16S ribosomal RNA gene, p	99%
<a href="#">EU371565.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone CBIOS-01 16S ribosomal RNA gene, p	99%
<a href="#">AB199898.1</a>	Bacillus sp. Aero1-1 gene for 16S rRNA	99%
<a href="#">EU257446.1</a>	Bacillus subtilis isolate C9-1 16S ribosomal RNA gene, partial seque	99%
<a href="#">EU257445.1</a>	Bacillus subtilis isolate C7-3 16S ribosomal RNA gene, partial seque	99%
<a href="#">EU257435.1</a>	Bacillus subtilis isolate C7-2 16S ribosomal RNA gene, partial seque	99%
<a href="#">EU257432.1</a>	Bacillus subtilis isolate B006 16S ribosomal RNA gene, partial seque	99%
<a href="#">AB244463.1</a>	Bacillus velezensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: C7-	99%
<a href="#">AB244461.1</a>	Bacillus sp. C5-1 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: C5-1	99%
<a href="#">AB244441.1</a>	Bacillus velezensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: An <sup>4</sup>	99%
<a href="#">AB244428.1</a>	Bacillus velezensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: A1 <sup>4</sup>	99%
<a href="#">AB244285.1</a>	Bacillus velezensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: A1-	99%
<a href="#">CP000560.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens FZB42, complete genome	99%
<a href="#">EF428253.2</a>	Bacillus subtilis strain HDYM-34 16S ribosomal RNA gene, partial sei	99%
<a href="#">EF428251.2</a>	Bacillus subtilis strain HDYM-28 16S ribosomal RNA gene, partial sei	99%
<a href="#">EF428240.2</a>	Bacillus subtilis strain HDYM-11 16S ribosomal RNA gene, partial sei	99%

圖十五：C4 之 16S rDNA 於 NCBI 網站以 BLAST 比對分析所得的結果。

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max ident
<a href="#">AB301023.1</a>	Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH54	98%
<a href="#">AB301020.1</a>	Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH24	98%
<a href="#">EU257695.1</a>	Bacillus sp. G1(2007) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">EF101729.1</a>	Bacillus subtilis strain GB14 16S ribosomal RNA (rrnE) gene, partial	99%
<a href="#">EF101707.1</a>	Bacillus subtilis strain HU48 16S ribosomal RNA (rrnE) gene, partial	98%
<a href="#">EF101699.1</a>	Bacillus subtilis strain HU75 16S ribosomal RNA (rrnE) gene, partial	99%
<a href="#">EF025573.1</a>	Bacillus atrophaeus strain IIL15 16S ribosomal RNA gene, partial se	98%
<a href="#">FJ853423.1</a>	Bacillus sp. NGWB3-W14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">FJ705346.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens strain 19E2 16S ribosomal RNA gene, pa	99%
<a href="#">FJ608704.1</a>	Bacillus subtilis strain SB87 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	98%
<a href="#">FJ483514.1</a>	Bacillus subtilis strain EG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	99%
<a href="#">EU236747.1</a>	Bacillus sp. Z20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">EU236744.1</a>	Bacillus sp. Z16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">EU194333.1</a>	Bacillus atrophaeus strain XJHXX-35 16S ribosomal RNA gene, parti	99%
<a href="#">EU050709.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone DQ328D 16S ribosomal RNA gene, par	98%
<a href="#">EF178446.1</a>	Bacillus subtilis strain 2Re5 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	98%
<a href="#">AY172514.1</a>	Bacillus subtilis isolate BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial seque	98%
<a href="#">AY172513.1</a>	Bacillus subtilis isolate BS-2 16S ribosomal RNA gene, partial seque	98%
<a href="#">FJ791171.1</a>	Bacillus sp. enrichment culture clone O3 16S ribosomal RNA gene, r	98%
<a href="#">FJ789808.1</a>	Bacillus subtilis strain BAB-1 16S ribosomal RNA gene, partial seque	99%
<a href="#">FJ268958.1</a>	Bacillus subtilis strain D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">EU835575.1</a>	Bacillus sp. MXH060501 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">EU835574.1</a>	Bacillus sp. KDG060503 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
<a href="#">EU835565.1</a>	Bacillus sp. GCNB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">EU835560.1</a>	Bacillus sp. GCNB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
<a href="#">EU826021.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens strain DM-54 16S ribosomal RNA gene, p	98%
<a href="#">EU834272.1</a>	Bacillus pumilus strain DS55 16S ribosomal RNA gene, partial seque	98%
<a href="#">EU686585.1</a>	Bacillus subtilis strain MZ-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	98%

圖十六：C24 之 16S rDNA 於 NCBI 網站以 BLAST 比對分析所得的結果。



圖十七：鏈黴菌(C27) CMCase基因選殖策略圖