



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027285

(51)⁷ C12N 15/861; A61K 39/205; A61P
31/14

(13) B

(21) 1-2016-00880

(22) 16/08/2014

(86) PCT/CN2014/084578 16/08/2014

(87) WO2015/024484 26/02/2015

(30) 201310362921.8 19/08/2013 CN

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/05/2016 338A

(73) 1. Chengdu Farwits Biotechnology Co., Ltd. (CN)

No. 846, Southern Section, Tianfu Avenue, Huayang Street, Tianfu Xinqu, Chengdu, Sichuan 610213, China

2. Institute Pasteur of Shanghai Chinese Academy of Sciences (CN)

Life Science Building, No. 320, Yueyang Road, Xuhui District, Shanghai 200031, China

(72) ZHOU, Dongming (CN); CHI, Yudan (CN); DENG, Fei (CN); LAN, Ke (CN).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) VECTƠ VACXIN VÀ VACXIN PHÒNG BỆNH ĐẠI, BỘ KIT CHỨA VACXIN, PHƯƠNG PHÁP VÀ BỘ KIT DÙNG ĐỂ ĐIỀU CHẾ VACXIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến việc phát triển vacxin phòng bệnh đại và phương pháp điều chế. Sáng chế đã bộc lộ được loại vectơ vacxin phòng bệnh đại mới trên cơ sở vectơ vacxin có hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh. Sáng chế cũng đề xuất vacxin virut mới được điều chế dựa trên vectơ vacxin, và có thể có hiệu quả cao với khả năng gây miễn dịch tốt. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kit chứa vacxin phòng bệnh đại nêu trên, phương pháp và kit dùng để điều chế vacxin này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và virus học; và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến vectơ vaccine và vaccine phòng bệnh dại, bộ kit chứa vaccine, phương pháp và bộ kit dùng để điều chế vaccine này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh dại là bệnh lây chéo giữa người và động vật dẫn đến tử vong gây ra bởi các loại virus dại và đặc trưng bởi sự tác động đến hệ thần kinh trung ương. Bệnh dại làm chết hơn 50.000 người mỗi năm trên toàn thế giới, tạo nên tác động rất lớn đến cuộc sống, sức khỏe và kinh tế xã hội. Virus dại là loại virus ARN âm sợi đơn, thuộc chi Rhabdoviridae họ Rhabdoviridae, có hình viên đạn, và nucleocapsit xoắn ốc đối xứng và có lớp vỏ bao trên bề mặt. Kháng nguyên glycoprotein (Gp) ở trên màng ngoài của virus dại, là thành phần của các gai bề mặt của virus, và nó có khả năng kết dính các tế bào, và có thể liên kết với các thụ thể axetylcholin để virus có tính hướng thần kinh; glycoprotein có thể kích thích cơ thể tạo ra kháng thể trung hòa và kích thích miễn dịch tế bào. Kháng thể trung hòa có chức năng bảo vệ hoàn toàn chống lại sự lây nhiễm virus. Theo yêu cầu của Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization: WHO), khi hiệu giá của các kháng thể trung hòa virus dại ở huyết thanh người hoặc động vật cao hơn 0,5 IU/ml thì được coi là đã đạt được mức độ bảo vệ hiệu quả (Nishizono A et. al., Đánh giá thử nghiệm phát hiện kháng thể trung hòa nhanh cải tiến (RAPINA) để phát hiện định tính và bán định lượng của kháng thể trung hòa bệnh dại ở người và chó. Tạp chí Vaccine. 2012; 30(26): 3891-6).

Chó bệnh là nguồn lây nhiễm bệnh dại chủ yếu, tiếp theo là các loại động vật hoang dã hoặc nuôi nhốt chẳng hạn như mèo, lợn và cáo. Virus dại chủ yếu lây truyền qua các vết cắn hoặc nước bọt của chó bệnh xâm nhập vào qua vùng niêm mạc hoặc da bị tổn thương. Đã có báo cáo xác nhận rằng virus dại có thể lây truyền qua sol khí, sau khi được động vật hít vào virus dại sẽ đi vào đầu mút dây thần kinh khứu giác để nhanh chóng tiếp cận vào hệ thần kinh trung ương. Do đó, sự tiếp xúc gần gũi giữa người và các động vật mắc bệnh dại là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến tỷ lệ mắc bệnh dại ở người luôn ở mức cao. Tiêm vaccine phòng bệnh dại là một biện pháp hiệu quả để ngăn ngừa

và kiểm soát bệnh dại. Hiện nay, vacxin thu được bằng cách nuôi cấy tế bào sơ cấp và vacxin thu được bằng cách lọc và tinh chế tế bào chuyển tiếp không thuận tiện cho việc chủng ngừa cho vật chủ của virus dại, do nhiều yếu tố hạn chế như chi phí sản xuất cao, cần chủng ngừa quá nhiều lần, và cần sử dụng kết hợp với tá dược. Do đó, tại Trung Quốc, việc điều chế vacxin phòng bệnh dại có chất lượng cao, chi phí thấp, tiện lợi, để chủng ngừa là rất quan trọng để phòng và kiểm soát bệnh dại ở động vật. Việc kiểm soát hiệu quả các nguồn lây nhiễm virus dại và cắt đứt con đường lây truyền virus dại phụ thuộc vào sự phát triển thể hệ vacxin phòng bệnh dại mới dựa trên kỹ thuật di truyền.

Sự ứng dụng vector adenovirus đã thu được thành tựu nhất định trong nghiên cứu vacxin và liệu pháp gen, ví dụ, adenovirus tái tổ hợp typ huyết thanh số 5 ở người AdHu5 (human serotype 5 adenovirus) biểu hiện p53 (“Gendicine”) đã phát huy vai trò quan trọng trong liệu pháp gen đối với khối u. Trong các nghiên cứu về kiểm soát virus, đã có công bố rộng rãi về việc sử dụng vector adenovirus, một loại vacxin tái tổ hợp gen được điều chế thông qua việc biểu hiện các gen ngoại lai và thông qua việc kết hợp với kỹ thuật can thiệp ARN để ngăn chặn virus phụ thuộc vào chu kỳ sống của vật chủ. Adenovirus, với vai trò là vector được ứng dụng để phát triển vacxin có các ưu điểm sau: (1) phạm vi vật chủ bị truyền nhiễm rộng, trong đó có thể truyền nhiễm cho các tế bào phân chia và không phân chia với hiệu quả xâm nhập vào tế bào tương đối cao; (2) nền tảng di truyền rõ ràng, và khả năng gây bệnh thấp, không tích hợp vào nhiễm sắc thể hoặc thể đột biến thêm đoạn; (3) gen ngoại lai có biểu hiện ở mức cao, và có khả năng nhận các gen ngoại lai kích thước khoảng 8-10 kb, có thể biểu hiện đồng thời nhiều gen; (4) tốc độ nhân giống cao, và nuôi cấy dễ dàng, do đó có khả năng tạo ra hiệu giá của virus cao hơn, có thể áp dụng để chủng ngừa theo nhiều con đường; (5) khả năng tạo miễn dịch mạnh, có khả năng kết hợp với các protein ngoại lai để tạo ra sự miễn dịch tế bào đặc hiệu mạnh và miễn dịch thể dịch mạnh. Dựa trên các ưu điểm trên, đáng để thử nghiệm và phổ biến adenovirus dưới dạng vector vacxin, và nghiên cứu trên vacxin với kỹ thuật di truyền mới cho thấy triển vọng ứng dụng tốt hơn.

Vì adenovirus trong huyết thanh thông thường ở người, chẳng hạn như AdHu5 và AdHu2 thường lây nhiễm cho người, nên 60%-80% người dân có kháng thể trung hòa tương ứng sẽ làm yếu hiệu quả miễn dịch của vacxin sử dụng vector là AdHu5, AdHu2 và tương tự. Để khắc phục vấn đề này, cần tìm ra các loại adenovirus từ các typ huyết thanh hiếm ở người hoặc có nguồn gốc từ các động vật khác làm vector của vacxin hoặc

liệu pháp gen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vaccin phòng bệnh dại và phương pháp điều chế vaccin này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất vector vaccin phòng bệnh dại, trong đó vector vaccin phòng bệnh dại bao gồm: vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép, và trình tự mã hóa của kháng nguyên glycoprotein (Gp) của virut dại được liên kết giữa các vị trí phân giải bằng enzym I-Ceu I và PI-Sce I của vector này.

Trong đó, vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép bao gồm: trình tự hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh đã cải biến, trong đó phần lớn trình tự mã hóa của E1 được thay thế bằng đoạn nối; các vị trí phân giải bằng enzym I-Ceu I và PI-Sce I được cung cấp trong đoạn nối.

Theo một ví dụ được ưu tiên, trình tự mã hóa của kháng nguyên glycoprotein (Gp) ở virut dại được thể hiện bằng trình tự số 1 (SEQ ID NO: 1).

Theo ví dụ được ưu tiên khác, trình tự đoạn nối được thể hiện bằng SEQ ID NO: 3.

Theo ví dụ được ưu tiên khác, trình tự axit nucleic của vector biểu hiện adenovirut được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2.

Theo ví dụ được ưu tiên khác, vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép được điều chế thông qua phương pháp bao gồm:

chia hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh thành bốn đoạn, đặt lần lượt các đoạn vào vector khung (bộ khung vector), và thay thế phần lớn trình tự mã hóa của E1 trong hệ gen AdC68 bằng đoạn nối,

trong đó bốn đoạn lần lượt như sau:

các vị trí từ thứ nhất đến thứ 6025 của hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh;

các vị trí từ thứ 6026 đến thứ 17279 của hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh;

các vị trí từ thứ 17280 đến thứ 34196 của hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh; và

các vị trí từ thứ 34197 đến thứ 36519 của hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh.

Theo ví dụ được ưu tiên khác, các vị trí axit amin của các đoạn tương ứng được tính toán trên cơ sở các trình tự axit nucleic với số đăng ký tại Ngân hàng gen (GenBank) là AC_000011.

Theo ví dụ được ưu tiên khác, phần lớn trình tự mã hóa của E1 của adenovirut được cắt nhờ sự phân giải bằng hai enzym giới hạn (Nde I và SnaB I), với kích thước khoảng 3,5 kb, và được thay thế bằng các đoạn nối chứa các enzym endonucleaza I-Ceu I và PI-Sce I.

Theo ví dụ được ưu tiên khác, vector khung là vector pNEB193.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế vaccin phòng bệnh dại, trong đó phương pháp này bao gồm:

(1) chuẩn bị vector vaccin phòng bệnh dại;

(2) chuyển nhiễm tế bào tạo virus với vector vaccin phòng bệnh dại ở bước (1), trong đó virus được bọc trong tế bào để thu được vaccin phòng bệnh dại có khả năng tạo miễn dịch.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vaccin phòng bệnh dại, trong đó vaccin được điều chế theo phương pháp nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit, trong đó bộ kit chứa vaccin phòng bệnh dại.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit dùng để điều chế vaccin, trong đó bộ kit chứa vector vaccin phòng bệnh dại được mô tả ở trên.

Theo một ví dụ được ưu tiên, bộ kit còn chứa tế bào tạo virus.

Theo ví dụ được ưu tiên khác, tế bào tạo virus là tế bào HEK293.

Đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng thông qua nội dung được mô tả của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện chiến lược xây dựng vector vaccin phòng bệnh dại mới theo sáng chế;

Fig.2 thể hiện kết quả định dạng phân giải bằng enzym đối với vector pUC57-0/Gp và vector con thoi adenovirut pAdshuttle-CMV/Gp;

A: định dạng nhờ phân giải bằng enzym. 1. Chỉ thị ADN 1 Kb; 2. Định dạng vector pUC57-0/Gp nhờ phân giải bằng enzym với hai enzym là Nhe I và Xba I; 3. Định dạng vector pshuttle-CMV nhờ phân giải bằng enzym với hai enzym là Nhe I và Xba I.

B: định dạng vector pAdshuttle-CMV/Gp nhờ phân giải bằng enzym với hai enzym là Nhe I và Xba I; 1: thang chuẩn ADN 1 Kb; 2 và 3: tách dòng ngược; 4. tách dòng đúng (thuận).

C: định dạng vector pAdshuttle-CMV/Gp nhờ phân giải bằng enzym với hai enzym là Nhe I và EcoR I.

Fig.3 thể hiện kết quả định dạng vector adenovirut tái tổ hợp pAdC68-Gp và hệ gen virut tái tổ hợp nhờ phân giải bằng enzym;

1: thang chuẩn ADN 1 Kb;

2, 3, và 4: sự phân giải bằng enzym đối với hệ gen adenovirut tái tổ hợp pAdC68-Gp với Bgl II, BamH I, và Xho I.

5: thang chuẩn ADN 1 Kb;

6, 7, và 8: sự phân giải bằng enzym đối với ADN plasmit adenovirut tái tổ hợp pAdC68-Gp với Bgl II, BamH I, và Xho I.

Fig.4 thể hiện phép đo độ lây nhiễm của adenovirut tái tổ hợp;

A: gây nhiễm tế bào HEK293 (tức là 293A) với adenovirut tái tổ hợp pAdC68-Gp có kích thước 10^8 tiểu đơn vị protein (viral protein - vp) và 10^{10} vp (24 giờ).

B: gây nhiễm tế bào Huh7 với adenovirut tái tổ hợp pAdC68-Gp có kích thước 10^8 vp và 10^{10} vp (24 giờ).

Fig.5 thể hiện sự phát hiện độ ổn định di truyền của adenovirut tái tổ hợp;

A: định dạng nhờ phân giải bằng enzym đối với thể hệ thứ 5 và thể hệ thứ 15 của hệ gen adenovirut tái tổ hợp AdC68-Gp.

1: thang chuẩn ADN 1 Kb.

2, 3, và 4: sự phân giải bằng enzym đối với thể hệ thứ 5 của hệ gen adenovirut tái tổ hợp với Bgl II, BamH I, và Xho I.

5: thang chuẩn ADN 1 Kb.

6, 7, và 8: sự phân giải bằng enzym đối với thể hệ thứ 15 của hệ gen adenovirut tái tổ hợp với Bgl II, BamH I, và Xho I.

B: Lần lượt gây nhiễm các tế bào HEK293 và tế bào Huh7 bằng thể hệ adenovirut tái tổ hợp pAdC68-Gp thứ 15 với 10^{10} vp (24 giờ).

Fig.6 thể hiện đánh giá hiệu giá của kháng thể trung hòa virus dại trong huyết thanh. Ở bên trái là hiệu giá của các kháng thể trung hòa ở nhóm chuột được chủng ngừa bởi adenovirut tái tổ hợp AdC68-Gp; và bên phải là hiệu giá của các kháng thể trung hòa của chuột được chủng ngừa với vector adenovirut trống AdC68-ept.

Mô tả chi tiết sáng chế

Qua nghiên cứu chuyên sâu, nhóm tác giả của sáng chế đã xây dựng vector vaccin phòng bệnh dại mới, trên cơ sở vector vaccin của hệ gen adenovirut AdC68 ở tinh tinh, bằng cách cải tiến phương pháp xây dựng. Vector vaccin có thể được sử dụng để điều chế vaccin virus có hiệu quả biểu hiện cao và khả năng tạo miễn dịch tốt.

Để giải quyết các vấn đề còn tồn tại trong các giải pháp kỹ thuật hiện có, nhóm tác giả của sáng chế lựa chọn adenovirut từ typ huyết thanh hiếm hoặc có nguồn gốc từ các loài khác để làm vector vaccin. Vì phần lớn con người thường không có kháng thể trung hòa với adenovirut ở tinh tinh, nên có thể thu được hiệu quả miễn dịch tốt hơn nếu lấy adenovirut ở tinh tinh làm vector vaccin. Do đó, nhóm tác giả đã xây dựng adenovirut ở tinh tinh AdC68 làm vector biểu hiện tái tổ hợp khuyết sao chép. Qua kiểm nghiệm, nhận thấy vector này có khả năng tạo miễn dịch tốt và độ ổn định di truyền tốt. Dựa trên vector AdC68 này, nhóm tác giả sáng chế đã điều chế được vaccin phòng bệnh dại mới. Sau khi chuột được chủng ngừa bằng vaccin mới này, kháng thể trung hòa chống lại virus dại có thể được kích thích sản sinh một cách hiệu quả, và tạo ra khả năng đề kháng cao chống lại sự lây nhiễm virus.

Do đó, sáng chế đề xuất vector biểu hiện adenovirut, trong đó vector biểu hiện bao gồm: vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép, và trình tự mã hóa của kháng nguyên glycoprotein (Gp) của virus dại được liên kết giữa các vị trí phân giải bằng enzym I-Ceu I và PI-Sce I của vector, trong đó vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép bao gồm: trình tự hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh đã cải biến, trong đó phần lớn trình tự mã hóa của E1 được thay thế bằng đoạn nối; với các vị trí phân giải bằng enzym I-Ceu I và PI-Sce I được cung cấp trong đoạn nối này.

Đối với hệ gen AdC68 adenovirut, nhóm tác giả sáng chế, sau khi so sánh cẩn thận trình tự, cuối cùng đã xác định dùng các vị trí phân giải bằng enzym I-Ceu I và PI-Sce I làm các vị trí chèn các gen ngoại lai, sao cho vector biểu hiện adenovirut sẽ không bị cắt ở các vị trí khác.

Vì hệ gen adenovirut tương đối lớn, khoảng 36 kb, khiến cho việc trực tiếp tách dòng vector adenovirut tái tổ hợp trở thành nút thắt cổ chai của kỹ thuật. Do đó, nhóm tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp liên kết nhanh nhờ sự phân giải bằng enzym, để trực tiếp xây dựng nên vector vacxin trên cơ sở AdC68 adenovirut ở tinh tinh, tức là sử dụng đầy đủ các vị trí phân giải bằng enzym tồn tại trong hệ gen adenovirut. Theo sự phân tích trên toàn bộ trình tự hệ gen AdC68 adenovirut, trình tự được chia thành bốn đoạn, cụ thể là KE, AK, XA, và PX, và sau đó các đoạn được từ từ tách dòng vào trong vector pNEB193 theo phương pháp liên kết nhờ phân giải bằng enzym, cuối cùng thu được dòng adenovirut khiếm khuyết sao chép. Ở đây, trong phần PX của AdC68 adenovirut, phần E1 là phần liên quan đến khả năng sao chép adenovirut được loại bỏ bởi hai vị trí phân giải enzym Nde I và SnaB I có kích thước khoảng 3,5 kb, và được thay thế bằng đoạn liên kết chứa các endonucleaza điều khiển I-Ceu I và PI-Sce I. Sau khi tuyến tính hóa, AdC68 adenovirut khiếm khuyết sao chép được dựng lên bằng phương pháp này có thể được bọc trong tế bào HEK293 và được khuếch đại để thu được adenovirut tái tổ hợp ổn định di truyền. Các vị trí giới hạn phân giải bằng enzym có thể có trong bốn đoạn KE, AK, XA, và PX, tạo thuận lợi cho việc liên kết hữu cơ của các thành phần.

Vector biểu hiện thường còn bao gồm điểm bắt đầu sao chép và/hoặc gen đánh dấu, v.v. Các phương pháp đã biết mà người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể sử dụng để xây dựng vector biểu hiện mong muốn theo sáng chế. Các phương pháp này bao gồm kỹ thuật tái tổ hợp ADN in-vitro (trong ống nghiệm), kỹ thuật tổng hợp ADN, kỹ thuật tái tổ hợp in-vivo (trong cơ thể sống), v.v. Các trình tự ADN có thể được liên kết hiệu quả trên các vùng gen khởi động thích hợp (ví dụ, CMV) trong vector biểu hiện để định hướng tổng hợp mRNA. Vector biểu hiện còn bao gồm vị trí gắn dính ribosom được sử dụng cho điểm khởi đầu dịch mã và điểm kết thúc phiên mã. Bên cạnh đó, vector biểu hiện tốt nhất là bao gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu có chọn lọc để cung cấp các tính trạng kiểu hình của tế bào vật chủ dùng để chuyển hóa chọn lọc.

Sáng chế còn đề xuất trình tự mã hóa của kháng nguyên glycoprotein (Gp) ở virut

dại được tối ưu cụm mã như được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1. Trình tự mã hóa này có thể biểu hiện hiệu quả cao.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế vector biểu hiện adenovirut. Phương pháp bao gồm: chia hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh thành bốn đoạn, lần lượt đưa các đoạn này vào vector khung, và thay thế trình tự mã hóa của E1 trong hệ gen AdC68 bằng đoạn nối, trong đó các vị trí phân giải bằng enzym I-Ceu I và PI-Sce I được cung cấp trong đoạn nối.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế vaccin phòng bệnh dại. Phương pháp bao gồm: chuẩn bị vector vaccin phòng bệnh dại; chuyển nhiễm tế bào tạo virus với vector biểu hiện đó, trong đó virus được bọc trong tế bào để thu được vaccin phòng bệnh dại có khả năng tạo miễn dịch.

Sau khi thu được vector biểu hiện adenovirut, tế bào tạo virus được gây nhiễm với vector biểu hiện adenovirut, để thực hiện tăng sinh virus. Có thể thu được virus sau một khoảng thời gian từ khi chuyển nhiễm. Theo phương án ưu tiên của sáng chế, virus thu được có thể truyền nhiễm lặp đi lặp lại vào tế bào tạo virus, để phát triển liên tục. Hiệu giá của virus ($TCID_{50}$) có thể được đo bằng phương pháp thông thường trong lĩnh vực này. Do đó, sáng chế còn đề xuất vaccin phòng bệnh dại được điều chế theo phương pháp của sáng chế.

Dựa vào các cải tiến mới của sáng chế, sáng chế còn đề xuất bộ kit dùng để điều chế vaccin, trong đó bộ kit chứa vector vaccin phòng bệnh dại.

Bộ kit có thể còn chứa tế bào tạo virus, ví dụ tế bào HEK293. Bên cạnh đó, bộ kit có thể còn chứa tài liệu hướng dẫn mô tả phương pháp điều chế vaccin.

Sau đây, sáng chế được mô tả kết hợp với các ví dụ cụ thể. Cần hiểu rằng, các ví dụ này chỉ được sử dụng để giải thích sáng chế mà không dùng để giới hạn phạm vi của sáng chế. Trong các ví dụ dưới đây, khi không chỉ ra điều kiện cụ thể như trong phương pháp thực hiện các phương án, sáng chế sẽ được thực hiện ở điều kiện thông thường, ví dụ, điều kiện nêu trong Tài liệu hướng dẫn thí nghiệm tách dòng phân tử (Tái bản lần thứ ba, biên soạn: Joseph Sambrook, và đồng sự, Nhà Xuất bản Khoa học, 2002) (A Laboratory manual (Third Edition, edited by Joseph Sambrook, et al., Science Press, 2002)), hoặc trong điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Trừ khi có chỉ định khác, phần trăm và số phần được tính theo trọng lượng.

1. Vật liệu và phương pháp

1.1 Plasmid và dòng chủng

Vector con thoi pShuttle-CMV được mua từ Clontech Laboratories, Inc.

AdC68 adenovirus kiểu đại (số đăng ký tại ngân hàng gen AC_000011) được mua từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC).

Plasmid pNEB193 được mua từ New England Biolabs.

Plasmid tái tổ hợp PUC57-0/Gp mang gen đích Gp (dòng ERA) đã tối ưu cụm mã được tổng hợp bởi GenScript (Nanjing) Co. Ltd.

Chủng khả biến Stb12 được mua từ Invitrogen.

Tế bào HEK293 (293A) của dòng tế bào mang adenovirus được mua từ ATCC.

Phương pháp xây dựng vector adenovirus khiếm khuyết sao chép đã mất đoạn E1 pAdC68 (pAdC68 mất đoạn E1) bao gồm:

(1) xây dựng plasmid pNEB193-KE,

trong đó theo các vị trí tách dòng đã điểm trên vector pNEB193 và trình tự của hệ gen AdC68 adenovirus, cặp mồi dùng để khuếch đại đoạn KE được thiết kế (Bảng 1), và sản phẩm đích là đoạn KE được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase Chain Reaction: PCR); tổng thể tích của hệ khuếch đại PCR là 50 μ L, và các tham số chu kỳ phản ứng là: biến tính sơ bộ ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút; biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút; ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 57°C trong thời gian 30 giây; kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 2,2 phút; các đoạn KE đã được khuếch đại PCR được phân giải bằng hai enzym EcoR I và Kpn I; các đoạn KE được tinh sạch sử dụng gel agarosa, được liên kết với các vector pNEB193 đã được phân giải bằng các enzym tương tự, và được biến nạp vào các tế bào khả biến DH5 α ; chọn ra các dòng dương tính, và thu được pNEB193-KE sau khi phân giải bằng enzym và nhận dạng trình tự,

Bảng 1: Các trình tự mồi cho phản ứng PCR

Đoạn khuếch đại	Các trình tự môi
KE	F: CGGAATTCCCTTAATTAACCATCATCAATAATAT (SEQ ID NO: 5) R: CACCACCTCCCGGTACCACA (SEQ ID NO: 6)
PX	F: GGGTTTAAACCCTTAATTAACCATCTTCAATAATATACCTCAAAC (SEQ ID NO: 7) R: CCGGAATTCCTTCTAGAACTGACAACC (SEQ ID NO: 8)
Đoạn nối	F: AGCTACGTAGTTCCGCGCACATTTCCTCCGAA (SEQ ID NO: 9) R: CGACATATGCGCGCGTTGGCCGATTCATT (SEQ ID NO: 10)

trong đó các vị trí endonucleaza giới hạn được gạch chân,

(2) xây dựng plasmid pNEB193-KE-AK,

trong đó hệ gen AdC68 được phân giải bằng hai enzym Asc I và Kpn I, các đoạn AK được thu hồi bằng cách điện di với gel agarosa có điểm nóng chảy thấp, được liên kết với các vector pNEB193-KE đã được phân giải bằng cùng các enzym, và được biến nạp vào các tế bào khả biến Stb12; chọn ra các dòng dương tính, và thu được pNEB193-KE-AK sau khi định dạng nhờ phân giải bằng enzym,

(3) xây dựng plasmid pNEB193-KE-AK-XA,

hệ gen AdC68 được phân giải bằng hai enzym Xba I và Asc I; vì Asc I có ba vị trí phân giải enzym trong AdC68 adenovirut, hệ gen AdC68 được phân giải một phần bằng Asc I ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 giây; sau khi phân giải bằng enzym, các đoạn XA lớn nhất được thu hồi với gel có điểm nóng chảy thấp, và được liên kết với các vector pNEB193-KE-AK đã được phân giải bằng cùng các enzym, và thu được pNEB193-KE-AK-XA sau khi phân giải bằng enzym,

(4) xây dựng plasmid pNEB193-PX,

trong đó theo các vị trí tách dòng đa điểm trên vector pNEB193 và trình tự của hệ gen adenovirut, các đoạn môi dùng để khuếch đại đoạn PX được thiết kế (Bảng 1), và sản phẩm đoạn PX đích được khuếch đại bằng PCR; tổng thể tích của hệ khuếch đại PCR là 50 uL, và các tham số chu kỳ phản ứng là: biến tính sơ bộ ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút; biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút; ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 1 phút; kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 6 phút; các đoạn PX đã được khuếch đại bằng phản ứng PCR và được thu hồi sẽ được phân giải bằng hai

enzym Pme I và Xba I; các sản phẩm đoạn PX đích được thu hồi với gel agarosa, được liên kết với các vectơ pNEB193 đã được phân giải bằng cùng các enzym, và được biến nạp vào trong tế bào khả biến Stb12; chọn ra dòng dương tính, trong đó vùng gần với đầu trái ITR của AdC68 adenovirut được nhận biết nhờ định dạng trình tự, hệ gen AdC68 adenovirut được phân giải bằng các phần Xba I, Xba I-Xba I trong AdC68 được thu hồi nhờ sử dụng gel agarosa có điểm nóng chảy thấp, đồng thời thay thế liên kết vào trong vectơ pNEB193-PX đã được phân giải bằng enzym Xba I, được biến nạp vào trong tế bào khả biến Stb12, chọn ra dòng dương tính, và thu được pNEB193-PX sau khi định dạng nhờ phân giải bằng enzym,

(5) loại bỏ phần E1 trong hệ gen AdC68 của plasmit pNEB193-PX

các plasmit pShuttle-CMV được phân giải bằng hai enzym EcoR I và Mfe I, các vectơ trống được liên kết theo bản chất của cặp enzym phân giải tương hỗ (isocaudamer), và chúng được biến nạp vào các tế bào khả biến DH5 α để thu được plasmit pShuttle-EM; cặp môi dùng để khuếch đại đoạn nối được thiết kế theo trình tự của plasmit pShuttle-EM (Bảng 1), và sản phẩm đoạn nối được khuếch đại nhờ phản ứng PCR; tổng thể tích của hệ khuếch đại PCR là 50 μ L, và các tham số chu kỳ phản ứng là: biến tính sơ bộ ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút; biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút; ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 1 phút; kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút; các đoạn đoạn nối đã được khuếch đại bằng phản ứng PCR được phân giải bằng hai enzym SnaB I và Nde I; các sản phẩm đoạn nối được thu hồi với gel agarosa, được liên kết với các vectơ pNEB193-PX đã được phân giải bằng cùng các enzym (thông qua sự phân tích trên trình tự của hệ gen AdC68, có thể loại bỏ trình tự phần E1 sử dụng hai vị trí phân giải nhờ enzym là SnaB I và Nde I), và được biến nạp vào trong tế bào khả biến DH5 α ; chọn ra dòng dương tính, và thu được pNEB193-PX-đoạn nối sau khi định dạng nhờ phân giải bằng enzym,

trong đó trình tự đoạn nối được chèn vào giữa các vị trí thứ 459 và 3011 của hệ gen AdC68 để thay thế phần lớn trình tự của E1, và trình tự đoạn nối được thể hiện bằng, ví dụ, SEQ ID NO: 3,

(6) xây dựng plasmit pAdC68 adenovirut khiếm khuyết sao chép,

trong đó các plasmit pNEB193-PX-đoạn nối ADN đã được phân giải bằng hai enzym Xba I và Pme I, và các đoạn PX-đoạn nối được thu hồi với gel agarosa, được liên

kết với vector pNEB193-KE-AK-XA đã được phân giải bằng cùng các enzym và được thu hồi với gel agarosa có điểm nóng chảy thấp, và được biến nạp vào các tế bào khả biến Stb12; chọn ra dòng dương tính, và thu được pAdC68 mất đoạn E1 sau khi định dạng nhờ phân giải bằng enzym.

Trình tự axit nucleic của vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép pAdC68 mất đoạn E1 được thể hiện bởi, ví dụ, SEQ ID NO: 2.

1.2 Các động vật thí nghiệm

Chuột cái ICR, từ 6 đến 9 tuần tuổi, được mua từ Shanghai SLAC Laboratory Animals Co., Ltd.

1.3 Chất thử chính

Toàn bộ Enzym lagaza T4ADN, polymeraza Taq ADN, bộ kit thu hồi ADN trên gel, và bộ kit tách chiết plasmit, v.v. được mua từ Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd. Tất cả các endonucleaza giới hạn như Bgl II, BamH I, Nhe I, và Pac I, v.v. được mua từ công ty NEB.

Chất thử chuyển nhiễm Lipofectamine2000ADN được mua từ Invitrogen.

1.4 Thu gen đích

Theo trình tự axit nucleic của vùng mã hóa Gp trong dòng virus đại ERA trong ngân hàng gen GenBank, tổng hợp gen GP đã tối ưu cụm mã (SEQ ID NO: 1), đầu 5' của gen đích đã tối ưu cụm mã lần lượt được nối với vị trí phân giải enzym EcoR I và Nhe I, và đầu 3' được nối với vị trí phân giải bằng enzym của Xba I (như thể hiện trên Fig.1); sau khi phân giải bằng hai enzym EcoR I và Xba I, gen Gp tối ưu được tạo dòng với vector thương phẩm PUC57 để thu được plasmit tái tổ hợp PUC57-0/Gp.

1.5 Thu vector con thoi adenovirut tái tổ hợp

Sau khi plasmit PUC57-0/Gp được phân giải bằng hai enzym Nhe I và Xba I, gen đích có các đầu dính được tạo ra, đồng thời, vector con thoi adenovirut pshuttle-CMV được phân giải bằng hai enzym Nhe I và Xba I để thu được vector đuôi thẳng, sử dụng ligaza T4ADN để liên kết các đầu dính của các sản phẩm trên. Sản phẩm đã liên kết được biến nạp bằng phương pháp thông thường, được sàng lọc trên đĩa thạch có khả năng kháng Kanamycin, và được nuôi qua đêm trong môi trường dịch dinh dưỡng LB ở nhiệt độ 37°C, để chiết tách plasmit ADN. Plasmit tái tổ hợp dương tính thu được sau

khi định dạng bằng phương pháp như phân giải bằng enzym và PCR, v.v., và plasmit này được đặt tên là pAdshuttle-CMV/Gp.

1.6 Thu plasmit adenovirut tái tổ hợp

Sau khi plasmit pshuttle-CMV/Gp được phân giải bằng hai enzym PI-Sce I và I-Ceu I, gen đích có các đầu dính được tạo ra, đồng thời, vectơ adenovirut pAdC68 mất đoạn E1 được phân giải bằng hai enzym PI-Sce I và I-Ceu I để thu được vectơ đuôi thẳng. Các đoạn gen đích được tách ra sử dụng gel agarosa có điểm nóng chảy thấp, gel chứa trong các đoạn gen đích và các vectơ được ủ ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 5 phút, và sau khi tan hoàn toàn, các đầu dính của các sản phẩm nêu trên được liên kết sử dụng ligaza T4ADN. Các sản phẩm đã liên kết được biến nạp vào tế bào khả biến Stb12 của vi khuẩn theo phương pháp thông thường, lấy một lượng sản phẩm biến nạp thích hợp phủ lên đĩa thạch có khả năng kháng ampicilin, và được nuôi ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ. Chọn dòng có khả năng kháng ampicilin. Một lượng nhỏ plasmit ADN được chiết tách. Phân tích linh động điện di được thực hiện sử dụng gel agarosa 0,8%, đồng thời lần lượt tiến hành phân tích bản đồ phân giải bằng enzym đối với các enzym Bgl II, BamH I, và Xho I. Một lượng lớn plasmit ADN chất lượng cao thu được sau khi mở rộng quy mô nuôi cấy (1:1000) dịch vi khuẩn chứa plasmit adenovirut tái tổ hợp thu được. Vectơ adenovirut tái tổ hợp thu được chứa gen Gp của virut đại được đặt tên là pAdC68-Gp.

1.7 Điều chế adenovirut tái tổ hợp

Plasmit pAdC68-Gp adenovirut tái tổ hợp được đuôi thẳng sử dụng endonucleaza giới hạn Pac I. Các plasmit được biến nạp vào các tế bào HEK293 (đĩa nuôi cấy 6 giếng) bằng phương pháp chuyển nhiễm liposom, và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 6 đến 8 ngày, và các mảng rõ ràng xuất hiện. Các tế bào được gom lại sau khi khoanh vùng và tạo huyền phù. Sau khi lặp lại việc đóng băng và làm tan ba lần, huyền phù virut được thu để gây nhiễm vào các tế bào HEK293 (lọ nuôi cấy tế bào dung tích 75 ml). Các bước ở trên được lặp lại đến khi thu được lượng virut thích hợp (khoảng từ 20 đến 40 lọ nuôi cấy tế bào dung tích 150 ml), các virut được tinh sạch bằng phương pháp ly tâm theo gradien tỉ trọng sử dụng xeri clorua, giá trị mật độ quang (optical density – OD) được đo lại, và glyxerol có nồng độ 10% được thêm vào để bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Các ADN hệ gen virut được tách chiết (lượng virut là 10^{12} vp), và các phân tích bản đồ

phân giải bằng các enzym Bgl II, BamH I, và Nhe I được thực hiện. Trình tự axit nucleic của đoạn gen đích được phát hiện sử dụng vùng gen khởi động CMV đoạn môi phổ biến. Các virus đã tinh sạch lần lượt được truyền liên tục 15 thế hệ trong tế bào HEK293, đánh giá sự ổn định di truyền của các vector tái tổ hợp.

1.8 Phân tích khả năng tạo miễn dịch

Các adenovirus tái tổ hợp có hiệu giá nhất định được tiêm vào bắp để chủng ngừa cho chuột ICR. Sau ba tuần, tiến hành đo nồng độ kháng thể trung hòa trong huyết thanh. Hiệu giá của kháng thể trung hòa được đo bởi Viện nghiên cứu sản phẩm sinh học Vũ Hán (Wuhan Institute of Biological Products).

Nhóm thí nghiệm: 10 cá thể chuột ICR được tiêm adenovirus tái tổ hợp AdC68-Gp với lượng 10^{10} vp; nhóm đối chứng: 10 cá thể chuột ICR được tiêm vector adenovirus trống AdC68-ept có lượng 10^{10} vp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tách dòng vùng mã hóa Gp của virus đại

Điện di trên gel agarosa đã thể hiện rằng PUC57-0/Gp, đã được phân giải bằng enzym, có kích thước phù hợp như mong đợi (bp), như được thể hiện trên Fig.2; vì Nhe I và Xba I là cặp enzym phân giải tương hỗ, sự tách dòng ngược có thể xảy ra trong khi sàng lọc plasmit con thoi tái tổ hợp pAdshuttle-CMV/gp. Trước hết, dòng dương tính được xác định nhờ sự phân giải bằng enzym với hai enzym Nhe I và Xba I, và sau đó vị trí phân giải bằng enzym đơn EcoR I trong vùng ngoài đoạn gen đích của pAdshuttle-CMV/gp được sử dụng để tái định dạng, và kết quả của sự phân giải bằng enzym của vector con thoi adenovirus tái tổ hợp pAdshuttle-CMV/Gp là phù hợp như mong đợi. Kết quả giải trình tự đã cho thấy rằng các trình tự axit nucleic thu được là giống với trình tự axit nucleic của đoạn gen đích đã tối ưu cụm mã.

Ví dụ 2: Định dạng adenovirus tái tổ hợp

pAdshuttle-CMV/gp và pAdC68 được phân giải bằng hai enzym PI-Sce I và I-Ceu I, và sản phẩm thu được từ đó được liên kết với nhau sử dụng ligaza T4ADN. Sau khi dòng có khả năng kháng ampicillin được chọn ra, plasmit pAdC68-Gp được định dạng nhờ sự phân giải bằng enzym, như được thể hiện trên Fig.3, và có kích thước như kỳ vọng. Kết quả giải trình tự cho thấy rằng trình tự axit nucleic thu được là giống như trình

tự axit nucleic cả đoạn gen đích được tối ưu cụm mã.

Một lượng lớn ADN plasmid adenovirut tái tổ hợp được tạo ra, và các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm với các plasmid tái tổ hợp sau khi được phân giải bằng Pac I. Sau từ 6 đến 8 ngày, sự biến đổi bệnh lý tế bào rõ rệt đã xuất hiện. Các vết tan xuất hiện trong các tế bào ở giai đoạn ban đầu của thương tổn, và chúng dần trở nên lớn hơn và sau đó là ở trạng thái đan lưới, và cuối cùng tất cả các tế bào hoàn toàn bị nổi lên. Các tế bào trong 20 lọ (150 ml) đã lây nhiễm virus được thu gom. Các virus được tinh sạch từ hỗn hợp đã trải qua việc lặp lại đông lạnh và rã đông, bằng phương pháp ly tâm theo gradien tỷ trọng sử dụng xesi clorua. Giá trị OD của adenovirut tái tổ hợp đo được là $8,9 \times 10^{12}$ vp/ml. Hệ gen virus được tách chiết, và sau khi định dạng nhờ phân giải bằng enzym, kích thước các đoạn như kỳ vọng.

Ví dụ 3: Đo lường hiệu quả của adenovirut tái tổ hợp và phân tích độ ổn định di truyền của adenovirut tái tổ hợp

Các tế bào HEK293 và dòng tế bào ung thư gan Huh7 được gây nhiễm với các virus với số lượng khác nhau, như được thể hiện trên Fig.4. Tại thời điểm 24 giờ sau khi gây nhiễm, các vết tan xuất hiện trong các tế bào HEK293 (lượng virus là 10^8 vp); tuy nhiên, các tế bào Huh7 đã lây nhiễm (lượng virus là 10^8 vp) không khác biệt đáng kể với nhóm đối chứng. Khi lượng virus đạt đến 10^{10} vp, các vết tan cũng xuất hiện trong các tế bào Huh7. Các virus đã tinh sạch được lần lượt truyền liên tục 15 thế hệ trong tế bào HEK293. Một lượng nhỏ virus được thu gom và tinh sạch. Các hệ gen của các virus ở thế hệ thứ 5 và thế hệ thứ 15 lần lượt được định dạng nhờ sự phân giải bằng enzym. Các kết quả cho thấy các virus tái tổ hợp không bị đột biến, và vẫn đảm bảo khả năng lây nhiễm như ở virus ban đầu, như được thể hiện trên Fig.5.

Ví dụ 4: Đo hiệu giá của kháng thể trung hòa trong huyết thanh

Vectơ adenovirut tái tổ hợp AdC68-Gp được sử dụng để chủng ngừa cho chuột ICR. Sau ba tuần, đo hiệu giá của kháng thể trung hòa trong huyết thanh, như được thể hiện trên Fig.6. Hiệu giá (giá trị trung bình là 38,3 IU/ml) của kháng thể trung hòa trong huyết thanh của chuột của nhóm chủng ngừa cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng, và adenovirut tái tổ hợp ở tinh tinh AdC68-Gp có thể kích thích sản sinh kháng thể trung hòa hiệu quả với hiệu giá cao hơn.

Tóm lại, nhóm tác giả sáng chế đã hoàn thành việc xây dựng nên vectơ vacxin

phòng bệnh đại tái tổ hợp mới, kiểm tra tính ổn định di truyền và kiểm tra khả năng tạo miễn dịch. Các kết quả cho thấy vacxin phòng bệnh đại mới dựa trên vectơ adenovirut AdC68 có thể kích thích chuột sinh ra kháng thể trung hòa đặc hiệu với hiệu giá cao hơn, và hiệu giá này cao hơn nhiều so với tiêu chuẩn hiệu quả bảo vệ được WHO đưa ra.

Tất cả các tài liệu được đề cập trong sáng chế được sử dụng để tham khảo đối với đơn cũng giống như mỗi tài liệu được trích dẫn để làm tài liệu tham khảo độc lập. Ngoài ra, cũng cần hiểu rằng, sau khi đọc phần mô tả nêu trên của sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể thực hiện các thay đổi hoặc cải biến khác nhau đối với sáng chế, và những hình thức tương đương này cũng thuộc phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vector vacxin phòng bệnh dại, khác biệt ở chỗ, vector vacxin phòng bệnh dại này bao gồm: vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép, và trình tự mã hóa của kháng nguyên glycoprotein của virus dại được liên kết giữa các vị trí phân giải enzym, I-Ceu I và PI-Sce I của vector này; trong đó

vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép bao gồm: trình tự hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh đã cải biến, trong đó phần lớn trình tự mã hóa của E1 được thay thế bởi đoạn nối; các vị trí phân giải enzym I-Ceu I và PI-Sce I được cung cấp trong đoạn nối;

vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép được điều chế bằng phương pháp bao gồm:

chia hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh thành bốn đoạn, đặt lần lượt các đoạn này vào vector khung, và thay thế phần lớn trình tự mã hóa của E1 trong hệ gen AdC68 bằng đoạn nối, trong đó trình tự axit nucleic của vector adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2,

trong đó bốn đoạn lần lượt như sau:

các vị trí từ 1 đến 6025 của hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh;

các vị trí từ 6026 đến 17279 của hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh;

các vị trí từ 17280 đến 34196 của hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh; và

các vị trí từ 34197 đến 36519 của hệ gen AdC68 adenovirut ở tinh tinh,

vector khung là vector pNEB193;

trình tự mã hóa của kháng nguyên glycoprotein của virus dại được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, trình tự đoạn nối được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

2. Phương pháp điều chế vacxin phòng bệnh dại, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

(1) chuẩn bị vector vacxin phòng bệnh dại theo điểm 1;

(2) chuyển nhiễm tế bào tạo virus với vector vacxin phòng bệnh dại ở bước (1), trong đó virus này được bọc trong tế bào để thu được vacxin phòng bệnh dại có khả năng tạo miễn dịch.

3. Vacxin phòng bệnh dại, khác biệt ở chỗ, vacxin này được điều chế bằng phương pháp theo điểm 2.
4. Bộ kit, khác biệt ở chỗ, bộ kit này chứa vacxin phòng bệnh dại theo điểm 3.
5. Bộ kit dùng để điều chế vacxin, khác biệt ở chỗ, bộ kit này chứa vector vacxin phòng bệnh dại theo điểm 1.
6. Bộ kit theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, bộ kit này còn bao gồm tế bào tạo virus.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CHENGDU FARWITS BIOTECHNOLOGY CO. LTD, INSTITUTE PASTEUR OF SHANGHAI
CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

<120> VECTO VACXIN VÀ VACXIN PHÒNG BỆNH ĐẠI, BỘ KIT CHỨA VACXIN, PHƯƠNG
PHÁP VÀ BỘ KIT DÙNG ĐỂ ĐIỀU CHẾ VACXIN NÀY

<130> 134682

<150> CN201310362921.8

<151> 19-08-2013

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1575

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<221> đặc điểm đa dạng

<223> Gen gp đã tối ưu hóa cụm mã

<400> 1

atgggtccctc aggtctctgct gtttgtccct ctgctgggtgt tccctctgtg tttcggcaag	60
tttcttatct ataccatccc agacaagctg ggcccttgga gccctatcga tattcaccat	120
ctgtcctgcc ccaacaatct ggtggctgag gatgaagggt gtaccaacct gagcggcttc	180
tcctacatgg agctgaaagt gggatatatc ctggctatta agatgaacgg gttcacatgc	240
actggcgtgg tcaccgaggc agaaacctac acaaattttg tgggctatgt caccacaact	300
ttcaagagga aacacttttag accaacacccc gacgcctgtc gcgcgcgtta caactggaaa	360
atggctggcg atcctcgata tgaggaaagc ctgcacaatc cttaccaga ctatagatgg	420
ctgcggactg tgaagaccac aaaagagtcc ctggctcatca tttccccttc tgtcgcagac	480
ctggatccat acgatagatc tctgcacagt cgggtgtttc catcoggaaa gtgctctggg	540
gtggccgtca gctccactta ctgttctacc aaccatgatt atacaatctg gatgccagag	600
aatcccaggc tggggatgag ttgcgacatt ttcacaaatt cacgcggcaa gcgagcctca	660
aaaggaagcg agacttgtgg gtttgtggac gaaaggggac tgtataagag cctgaaaggg	720
gcctgcaagc tgaaactgtg tggcgtgctg ggactgagac tgatggatgg cacctgggtc	780
gctatgcaga catctaacga gactaagtgg tgccctcccg accagctggg gaatctgcac	840
gacttcagaa gcgatgagat cgaacatctg gtggctgagg aactggtgcg aaaaagggag	900
gaatgtctgg atgctctgga atcaatcatg actaccaaga gcgtgagctt caggagactg	960
agccacctgc ggaagctggg ccctgggttc ggcaaagcat acaccatctt taacaagaca	1020
ctgatggagg cagacgcca ttataaatct gtgcgcacct ggaatgaaat tctgcctagt	1080
aagggatgcc tgcgagtcgg cggacgatgt caccacatg tgaacggcgt cttctttaat	1140
ggaatcattc tggggcccga cggcaacgtg ctgatccctg agatgcagtc tagtctgctg	1200

cagcagcaca tggagctgct ggaatcaagc gtgattcctc tgggtccatcc actggcagat 1260
cccagcacag tgttcaaaga cggagatgag gccgaagact ttgtggaggt ccacctgcct 1320
gatgtgcata accaggtgag tggcgtcgac ctgggactgc caaattgggg caagtacgtg 1380
ctgctgtccg ctggagcact gactgctctg atgctgatca ttttcctgat gacctgctgt 1440
cgacgagtga accgatccga gccaaactcag cacaatctgc gaggaaccgg gagagaagtg 1500
tctgtcacac ctgagagtgg aaaaatcatt agcagttggg agtcacacaa atctggcggc 1560
gaaacaaggc tgtaa 1575

<210> 2

<211> 36955

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<221> đặc điểm đa dạng

<223> Adenovirut tái tổ hợp khuyết sao chép pAdC68 mất đoạn E1

<400> 2

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccc gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggcttg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cccttaatta accatcatca 420
ataatataacc taaaactttt tgtgcgcgtt aatatgcaaa tgaggtgttt gaatttgggg 480
atgcggggcg ctgattggct gagagacggg cgaccgttag gggcggggcg ggtgacgttt 540
ttaacggtcg acggaatttg aaagtcgtgt tttgatgacg tagcgtggga acccggaat 600
gacggcagtt ttgggcgttt gaggaagtgc gcgtatTTTT ttgagtgtgt caccggtttc 660
tgggcgtgtg ctgggcgtgt gtgattatTTT ggcggttatt tttagacttt ggcctttacg 720
tcagtgtaga tctgggctat atattgagca gagagcgggt ggacagggtta gagctcagcc 780
tttctctgac tcttgcgcct gttgtgtgct gctgctcggg aagctatgga cgctgaggct 840
ttgtatgtgt acctggaggg atcgggggct ttgctgcctg tgcaggaggg gagtaattac 900
atTTTgtacg cacctgagaa ttttgtgctt catccgcatg gcatcgcttt gctggacttg 960
agactgagca ttgtagtgcc ttattgcttc ctcgggcgct ttttttact cgcgagcgcc 1020
aatgttccgg ggggtgattc atcttgtcga atcattcacg ccggccaccg ggaacgtctc 1080
tctgtgatgg ttttcaatca tagcgacaat ttttacgagg gtcgcgccgg agaccccggtg 1140
gcctgcctgg tgctggagag aacgatttac ccacctgttc gccaggctag catggtttta 1200

tggttcatttt	tgtttttttct	acagatcagc	taactaacca	tgctggaacg	caccgcttgc	1260
atttacttca	tcgttggtcc	cgaggctcta	aacgtccacc	tgaggagattt	ttcttttggt	1320
gattttctta	aaaattgcct	gggcgatttt	ctgtccagtt	atctggaaga	tatcacggg	1380
tctagccagc	atgcttatag	cagtcttgca	tttggaatg	ctcactgggg	aggacttcgg	1440
tttatctgta	ctgtggcttg	ccctaatttt	attcctgggtg	gtcctatggc	taaaaatttc	1500
ggagaggata	tgaaagagta	cttacagtta	ttgctgaggg	aggagctcag	ggatcgcggc	1560
agagattttg	atattccgct	tgtcaatctg	ctgcaggtga	accaggagca	gaatatcttg	1620
gaattatgag	ggtgtgctta	agaatgccgg	tgaggggcgc	tctgcgcgag	ctctttatca	1680
tggtctggctt	ggattttacct	cacgaactag	ttcgaatcat	tcaaggctgg	aaaaatgaaa	1740
attatctggg	gatggtgcag	gagtgttaaca	tgatgattga	ggaattagag	aacctctccg	1800
ctttcgctat	tgtcttggtt	ctggatgtgc	gcgtggaggc	tttgctggaa	gccaccgtgg	1860
aacatctcga	gaaccgtatc	acctttgacc	tggtctgttat	tttccaccaa	cacagcgggg	1920
gcgagagggtg	ccatctccgc	gatcttcatt	ttgaagtact	ccgagacogt	ttggattaaa	1980
agttaatcat	ggttcttctt	gttcttccct	ccccgcgct	caccgaaacc	caacaaaatt	2040
gcatcatctg	gctgggtctg	gccattcca	cggtggtcga	tgtgatcaga	gccatcaggc	2100
atgatgggat	cttcatcact	cctgaggccc	tagatctgct	gcacggtctg	agagagtggc	2160
tgttttacaa	tttcaacacc	gagcgttcca	agegcgcgaga	ccgcgcgcgg	cgatcgggtg	2220
gcagcgcccc	gaccaggttc	tgctacagca	agtacgaaaa	tgtccgaaag	caactgcac	2280
atgacacggt	cgcgaacacg	atcagccgcg	tcccgccatc	acctgtatcg	gccggccccc	2340
ttaccacgct	gtgaggagac	cgagaccgc	gcttctctgg	tgaggatca	cccgggtctg	2400
cctgattgcg	ataccctgtc	catgcacaat	gtaagtctctg	tgcgaggatt	gccctgttct	2460
gcgggggttcg	ctgtcctgca	agagttcccc	gtgccctggg	atatggtttt	gacccccgag	2520
gagttgagag	tgctgaagag	atgcatgagc	atatgcctgt	gctgtgccaa	catagacttg	2580
ttcagctccc	agatgatcca	cgggtacgag	cggtgggtcc	tccattgcca	ttgcggggac	2640
ccgggggtctc	ttcgctgcat	ggcggggcggg	gcggtgctgg	ccctgtgggt	ccgcaggatc	2700
atccgggggt	gcatgttcaa	ccagaggggtg	atgtggtacc	gggagggtgg	gaaccgccac	2760
atgccaagg	agatcatgta	cgtgggcagc	gtgttctgga	gggggcacca	cttgatttac	2820
ctgaggatct	ggtacgacgg	ccacgtgggt	agcatccttc	ccgcgatgag	tttcggctgg	2880
agcgtgttga	actatggact	gttgaacaac	ctggtgggtc	tgtgttgca	gtaactgcagc	2940
gacctgagcg	agatccgcat	gcgctgctgc	gcccgcgcga	ccagacgact	gatgctgagg	3000
gccgtgggca	tcatgctgag	ggagtccctg	gaccgggacc	ccctgagcag	cagcttgacg	3060
gagcggcggc	ggcagcgact	gctgcggggc	ctgatgcgac	accaccggcc	gatcccggtc	3120

gcggactatg attcccaccg ccgctcttct gcttcttcca gataaccgtg atcccagacca 3180
 ccgaggacaa tcctcagctg ttgagctgtg aggtgcagat gcgggagtg cccgaggggtt 3240
 tcatctccct gaccgaccog agactggctc gctctgaaac tgtgtggaac gtggagacca 3300
 aaagcatgtc catcaccaat ggcattcaga tgttcaaggc tgtgcggggg gagaggggtg 3360
 tgtattccat gtcttgggag ggtggaggaa aaataactgc tcgaatcctg taaaactggt 3420
 gaatcaataa aacacttgaa ctttatttta ttttgtgttt cagagtgtgtg tccacagagt 3480
 ggggtgggaa ggggtggcat gcagggtggg atacagtgtt cattcttggg cgatgtatga 3540
 gaaggataaa gagttagccc caaatgttgc tccaacatag cttccattag tccaggtgta 3600
 tgaaaatgac attgaatatg tactgttgtc gtcatcagta ccattgaggg ttatagttag 3660
 aagcataggt tttgaaacat ctccattcat gtatacttgc cctactatat tatttttagt 3720
 agtagaactt tgtgactttg gataagcttt taaattgggc atgaatccta cagcattggt 3780
 atatggagtg ccatctatgc tatctccctg cctatacccc cagtattttt ttagtgtaga 3840
 atgttctgtt aaaagaacac cgtttgcac aaaacgtaga aacacctgag cactgcttac 3900
 ggtgccagta atggggttta ggtttccact tcctacaact aagactgaca cagtggccag 3960
 tatttgacta ccacatttag tcaagcaaag tgttagtttt gcatcatttt ctgcgagtat 4020
 ttgacagttt ggtgatggat cagggtgtgt ccacaaagtg agtttatcgt cttctttgtt 4080
 accagccatt atggctcctg tactgtcaaa gctaaggcca gatccaagtt taacttggat 4140
 tgggtaagca tcatcaacac ctgtttctgt actactgctt ccaaactcta acccatttcc 4200
 aatgttggtt gctatggctc catcttcaaa ttttaaacct ttagcccagc ttatgttgct 4260
 ttcaattgca tctcctgttg taacatgcaa acctctgtct aaggtaagct ttatgtttcc 4320
 atcagtatca aatgtaagtg gagagactaa ctgtactgcc aaggcagagc cacggagtcc 4380
 taaacctgat ccaaaacct aagctagtgt gtttagaatg cttgttctca gtatatttaa 4440
 tgggtggagaa acttgtaagg ataattttcc atcttttagtg taaaaggggt gatccatgtt 4500
 aagggaaatg gtgttggttg aaaaactgag aggggcggcg gccttggtgg ccgtgttgga 4560
 gatgagtttt cccgaggaat cgagggtccac cccctctccc agcttgaggg tgatttcccc 4620
 gttcttggtg gtgacggggg cggccagtcg cagggacaac acccccaggg gcttctcttg 4680
 gaatccatct gaagagacga aggggggggt gatgaagggc acggtcgggt cgttgtctgc 4740
 atcgtagggg tagacggggg cgaagtcac atccaccgg acgcgctttt tggacatctg 4800
 atagaagata aaatgaagat tgagggacag gaggaatttg acatcccctt cagcgtgtgg 4860
 aggaagtttg cagcccgcg gggcctgcag taccagagct gggaagaggg gagtgaagtg 4920
 gtgttggcag aaaacatgga cagagacctg gtatcagatt tcaagtaagt gattctttat 4980
 ttttttgta aactcaaac atcaatatga ttgtatcttt atttcaaac aaatgattat 5040

tttttatttc	tgtaaaatca	tcatcaatat	gatcttttatt	tcactggata	agggggtgat	5100
tagttcatgg	ggaggaggtc	gcggaggccg	cagaggggtct	tgatcagagt	gtggacgcag	5160
tcgggggagt	cgcaggagca	gtggatgcac	cccttggtat	cgccagactg	ctgggtgatg	5220
acgatgggg	tgactccgac	caggcaggtg	aaattctggc	gotgctgcag	gagctcgtag	5280
gagaggcgat	ggtcgtttgg	agtgacctcg	taggagatct	tggcctgttt	caccaggcag	5340
aagatgcctc	tcttgccactg	gtggatggcc	accgcatacct	gcagctcctt	gacggctctc	5400
tcctgctgct	ggcgaatgcg	aagttggggc	agtcgctgct	ccgaggcgcg	gocgtccatg	5460
tccaggagaa	ggtcgttgac	gttggttggtg	gccagtgggg	cagtcatctc	cgccgggttag	5520
attgaagtaa	ctaatagcgg	ggagcatggg	tcgctgtggc	tcggcctcat	agtctaatat	5580
gggcatgtat	tgtggcctag	gctgtagtgg	tggtagtgcg	tgtgcctgag	gttgctgtgg	5640
tggtgtgtca	ggttcaggcg	ggagatagag	cgcctctggc	gagttccaac	caaagtcaaa	5700
gcaggggtaa	atcacaaagg	agatgagggg	gcaggccaga	atgttcacga	tcccaatgat	5760
catgatccag	ctgggatgca	tgtctgattt	ttggcggtag	catttgagga	atttccaggg	5820
ttcttggaat	ttgcatttgc	ggacctcctc	gggggactgg	gtgggggacc	gggggtcgac	5880
gggacggggg	agcactaaca	gcagaagcgc	gagaagtagc	agagcccgca	tgcttatcag	5940
aggagcctga	gcagccgcgc	cactcgctgg	tcgcggtact	gggggtgggtg	gcgcaggtag	6000
gcgatgcgca	caaagatcca	gtcaatgaac	tggagaagg	tgataagcag	gcagactatg	6060
ctacagcagc	agatgcaggt	ggtgaaggca	aagagcacgt	aggaggcgaa	gggccaata	6120
cagtctggac	tggcgttggc	caccagagcg	aggggtggc	agacttggag	gaggcagata	6180
agaatagtga	tcaagaattg	tctaggaatc	atagttcaat	caccatactg	taaaagagaa	6240
gagaagattc	cttagacccc	cttccacctg	aagcggtccc	ggctgcccga	caatgatggg	6300
cttgtagacc	ggcttgcggt	gcgcgttggg	aatgcggcgg	cagaagatgt	agtagagcaa	6360
cacggccagg	atgaccaacc	cgatcacaat	gagcaggggtg	atctgccatt	gcattgccgc	6420
gtctgtttgc	ttcaggggag	tgggaagagg	agcggggcta	ggagtagtag	cgggactgat	6480
tggtgtagag	gaaagcgagg	agagattggc	ggtgctagag	aaggcactgg	aggtagctgt	6540
ggtgtggctc	tcgacagtgg	acaaaaattc	agtagtctgc	tcattgggtac	tagcagtggg	6600
actgctagat	ggggccca	tcaaaaatgc	cactcggacc	ccagacgagc	tggcaacctc	6660
tgctgctgta	gtggtggtag	gctgatttaa	tgtactgtat	gtggttgtct	gtgtagtgtg	6720
ggttgtctgt	gtggtagtgc	taggtgggct	aggcgtaggc	agtggtatga	ctttaacgtc	6780
atagataaaa	gtatgttggg	taaaataccc	attagataca	ctgacacttt	gtccttgaat	6840
tctaccattt	tgagctgagg	tggcattgac	aatggtaaga	ttaactccct	cacatgtata	6900
aactaataca	ctccaattgc	aaatatcttt	ccaccatttg	aggtgggtatt	ttgtccagg	6960

ggtgttttca gcaccctcta cacctaccag tgtcacattg ccccccctcag taacattcac 7020
 atctttaata aagctaactt taggaatagg attgcaaaaa acaatgccaa tcaaagaaca 7080
 aaaaactaga gcgctaactg ccttcatgac tctggaaaaa attaaacata gaggttcagc 7140
 agtgggtctg atttttgtcg gtaaagcctt ctatagcagc aagcaaaaat gaacatgcag 7200
 atgattatga ctgctaatacc cgaaagcaca ccgacaatgc cgctgactag cagccccgga 7260
 caccgctgat caggtgtagg ggtaatgcc acaaatgaac tgtcttggac ctgcaaggct 7320
 aactttgctg cctcctctgc tgcggtttga tctgtgtgtg tgggtgtgagt agttgtggtg 7380
 ggtggagggtg gagtagtggg atcaacaaca gttactttgt aaaaaatcat actgtcagca 7440
 tcatctccag ggcagggtga actgccagca tatgatttcg tgatattgag gagtatcaga 7500
 tcagtaccat tgcataatata attgttaatt ttagaatttt gaattttgcc attcttaaga 7560
 ttgcataatt cagtttctgt agtgtcagat ccaaaatagc aataccacga aagcataccc 7620
 ttgcgtggac ctttcagtgt ataatttgat ccgacaacga cagtaacgct ctcattgtca 7680
 gaattgcata gagcagaggt aatgatagaa aaaattaaaa ggcctaggat cttcatgggt 7740
 ctaaaaaatt aaaattcaac acttagtaag tgttccagct tgcgttcag tctgtgcttt 7800
 ctgtagcaga aggcatagta caccatgcac aaggcgatga tcaacatgca caccactaca 7860
 gcaacaataa tgccaatcat ggatttggga atttcctcac tgggtggggg gggttgagt 7920
 ctattgttga ccatttgacg catggcaaaa atgttatttg tagtgagctg catagtggta 7980
 acaggtgtag tttttgtggt tgtggtcatt ctaggcgtgg tgggttcaga cacagaaaact 8040
 tgataaaaatt ccattgtcga aatgcctgct gtagttccat aatacatacc tacatagtct 8100
 ctagtgatgt taattagggg taagtcagat ccacattgaa acttgatgag agtaatgctc 8160
 tcattttttt tgttattgtt tccacagagt tcagtagata catctgattc attaaaataa 8220
 caataccatg aaacttctgt ggctttttct ggacctttca atgtgtgatt agtgccagt 8280
 taaatagtaa ttttctcatt actcattcca tgaatgacgg caatgagact ggcaaataaa 8340
 agcaaaaatt taacagaggc catggtctga aaaagggtgtg aaaaaaacg ttatggctgt 8400
 ttttcttttt cggcattatt tctggggcga atagcgatga gcatgtgaat gctcaggcac 8460
 acgatagcgg tgattagcgc cgtgcacagg ctgtaagcga tggagaagac cacgatgttc 8520
 tccttcgtgg ggggccacat atcgtactgc ttgctcatcc acatgaccgt gtcgcacatg 8580
 tgcgcaaaaa tgaaagtatt attcacggtg cgcggggagc cgtcagcacc ggggacagag 8640
 acggtgtacc actcggggtc cccgggctgc cacacggacg cgagagtatt gttccgagtc 8700
 ttgttattgt actcgattct caggttctcg cattcccatc cgcacttgat cagtaccgag 8760
 caccgattgc catcgggctg aaaactcagc tggcatttgt tgggattgaa atgcaagcag 8820
 ggatcggcct tctccttcac tacagccgca ccgccagtc ccacaatcga aagcaacacc 8880

gccaccagcg caccgcagct cactaggggtg atcttcccca tttcttaaac cagcaacaca 8940
 gcaccactaa gtacgaacag caagggaggt ataggtagca gagaacccaa agcccacccg 9000
 caactaggcc tagcgctatt aaccacaacca cctcccaggg gccgtagtaa atcccagagg 9060
 ttggttgacc tcggagctca cctccgggtg ggggtgtagt attagattca gaaaggctgc 9120
 gacggtggcg ttggtggagg ttagtttggg tgtagtagc ggggagcgac gctgtggtat 9180
 tcgggatcag gtggaagggtg tgatggcagg gtcccagagc gcactgatag gtcccgggga 9240
 ggaaggggtg gaagagctgg agcttgcttc tgcgggtgga aaaagtaagg ttggcagggc 9300
 cgctcagcag gactccgtcg ttgtgcagc ggttgacaac ggcgatcggg gagccctgga 9360
 acagccaggt gaggtacttc ttgtggggct tacactggag ctggagctcg gtctcgttcc 9420
 cggatgaagaa caaagactgg ttgatggatt caggaacaca cggaagtccg gagtagtgc 9480
 tgatctcagc ttttattata ctcagtacac agcagacaac aaagactttc atgcaggccg 9540
 ggggtggttc agatgcagta cagagtcaga aggtctgtc cttgctcgcg ctgcaccagg 9600
 atcggacgct ggctgaagat ccgaagcagg tgggagtcga ggcaccttc gacgacgatc 9660
 cgcactccgt gggccgggccc ctgaggggtc tcctcgggca gctcaaagta ggcaaactcg 9720
 gcgagatccc gagcgaagca gcggaagcgg cggcagtggt ccaggtgtcg aagccgagct 9780
 aggtcagctg cgccaccatg ggacattcaa tcgtagccgt ccaccgactc gctgatggcg 9840
 tcgaagttcg ggatgaactc gtccgggtag tggccggggg agccggagaa ggggttgaag 9900
 tagaccgagg gagtgaactc ctccacgaac tggagagtgc cgatgccacc cgagcggggc 9960
 tgcgaggacg aactctccaa agtcaggacg gcctgacgag gcgtgaagga agatctcccc 10020
 gatccggcga gttggaagac tccgtcaggt cgcagacca gcgaagagct caccacctcg 10080
 tcgttgagct gtgtgcctct gcccgggac accagccgct ttataacctg agcggggcgg 10140
 tgacgacaca ggggtggcgcc gcccgccagc tggacacctg agttagtcag ctggacttcg 10200
 gcctgggctg ctgcggaag tagtacggtc gtgggctggg gaatttcctg gtacaccagg 10260
 gcggcgggccc aattacgagg attgaggtga ttgcggggcg tggcgggtgag cgctgactgt 10320
 tctaggagta tctggtttcg gtgggcgagg atgtcattca cccgtgagat catcgcgggc 10380
 ccggcgctga gccaatcat gcgggtggag tagtctcggg cggcacccggc ggccaggccc 10440
 atctggggct ggtagctcca catgtaaggc gtgggaatct ctttgctcat gatgatgggt 10500
 ggaggcggct agggcgaagg gcacaggtga cgtaattccc gcctttttct gcgactgggc 10560
 gggcgcgggc tactctttaa gagtgagcgc gcagtacttg ttgaagagag cctcggcgtc 10620
 ctcgagagtg cgctgaagtt ggtcttcgct cttgtgatac agacaactgc gggtagcgca 10680
 gcgcagagaa cggttcttga ctttcagttc ctgctcctgc ccccgactct gctggaagat 10740
 ggcatagagg gtgggaaaga tccggttctt cagctcccgg gtttgcgccg gctcgttcgc 10800

cgcgatcctc agtccacctg ctgcgcgcgc tgtggatttt ctagctgctg gttttctgct 10860
 ggtctttttc tgetgctgct gcctcttctt ggaagtagta ggggctgtgg aggtgacggt 10920
 agtaatgcaa gatgttgccg ggaaagtcca cccgcggtg gaagagcagg tagcgccggg 10980
 tgaaggagat gttgcccccg caggcctgca agcaggagac gatggcgttt ttgtgcccc 11040
 gccaggactt gtatccctgc cgctccttct taccggtctg ggtggtgggg ttcggaatc 11100
 gtccggtctc gtcccatcta ctgtgtggtc gagcgggacc ccgaccgga gcggagatgg 11160
 tatcgtgct gcttgctttc tccccgcgc aggacgacgg tctggcggcg gctgcttctt 11220
 ccacctctc ctctgcctcc tctcgtctt cctccagact gtcttgacgg ctgtcctcct 11280
 ctgcctgagt gctgtccag tcttctcca tctcctctc ctctgcctga ctgctgttct 11340
 ccagttctc ctccaaatcc tccacgggcg gcagctccac tttcagcttc ttgtttctc 11400
 ggggcatcct gggggaagcc ggggttgagc tctcaccgg tctgggggtc gaggtagacc 11460
 ccgcggccct ttttcagcaa gaattcttgg cgggatttct ggatggcttg caattgggcc 11520
 aggatcgccc cctgggtgat gacgcaggcc gacagctcgg ccttgggcgg atgggattgg 11580
 tctcgtaga acctgatctc gaagggatgg tagtctcgg gcacgaactt gcgcaagtag 11640
 gccgaggtcc acagccccgg ggtgagtttc agacccccct tggcggtga accctcgct 11700
 tcgctgggccc cttgcaactc gaaggtgccg atgatctggg tctcgctcag cagctggggg 11760
 ttgcaggcca gggagcggtg cggcgtgcag aggttgacg ggcagtggca ctcgagcagg 11820
 ccctcgccgc tgacgtctc gatcacgtcc gagtggtagg ccaggtagtt ggccaggcgc 11880
 agcaggtagc agtggctcca cagcggcggg gggcactcgc ggaaggtcag cggcacgaag 11940
 tccgagggca gcgcggagca ggtggcgggc aggttccgg agcgttcgag gatgaaagag 12000
 cgaaagtttt gcaacatgct ttggctcata aagtcgggca ggccgttgcg cagcgtcagc 12060
 ctgaggcgct cggggaaaat gaggtcggcc aggtccgagg cgggtggtgcg ctcgtcgaac 12120
 ccggtccaca gacccttgag gttcttctgc aggtgcttgc agagctcttt caggttctgc 12180
 tctccagac actgctgcca cagcccatg cccgtctgcc aggtgtggca gaggtagagg 12240
 tagacgcagt cgcggatgta gtgcgcgcgg gcctccccgc gcagggtggt gtgcagcacg 12300
 ttctgcccc ggcggttctc gtgcaagatg cccatgtagg agaccagggt ggtcagctcc 12360
 acgttgagga tcttgacagg ctggcgcaag aaccgtgcc tgaagaggta gtgcaggttc 12420
 tctcgacct tgcgcagggt ctccgcgtcg gogaagaagc ggcgaggca ctccagctcc 12480
 acggtcacca ggaccacggc catcatgagt ttgcgcgct cttccaaact ctggggacta 12540
 gcattaggac ccagccaccg ggccagctgc tcgtcgctga ccacgggctt gccctcctcg 12600
 gagtcttgca tgccctcgtc ctggagatg ggcgacgcgc gcttgatgag cacctggctc 12660
 atgaccgcgc tcatgacttt ggggggcagg ttcagagccg ggtaggcgaa atgggtcagc 12720

tegaccgtgc gtttgagcac cgccagccgc gcgttgctgc cttccaactc gaccagggcg 12780
 ctgtggtgct catgctctcc tccttctcct tgcagagcgt tcgcggcccc agtctcgtcg 12840
 ctgcccagac cctcgaagat cttgggaacc tcttccaagg aggcgatatc aggtaggcg 12900
 gcgcggggac ccaggttgaa aagggcgctc gcgcgggtgc ggttggcgcg gcaggagacg 12960
 gggatctttt ggttcttgaa aaagatgtgg taggtggcca gggcctcggg caccgcgaag 13020
 accgggtaga agttgaggcg cgggttgggc tcgcaggtgc cattgggctg gcgcttgggg 13080
 ggcacgcgcg gcgagaagag gttcaactcg taggcgcggc tgagctcctc cacgctgagg 13140
 ggcacctcgg tcgggtcgag cagcgcaccc ttgacgatgg tggcctgccg ggccagatgc 13200
 ttgatgagcg cgtcctcccc cccgctcagg tggaggtagt cgccgtcatg ctcgagccca 13260
 gcctgactct gctcattctc tgcttctcgc tctggctggt cttggtgtat ctcttcttgt 13320
 gaaaagcgca ctgccagctc ctccctcgtc tccgcggggc tcacatagcc cagggtcaatc 13380
 tcgatggatt cctccatctc ttgcatgtct gggacggccg cgtcggagggt ggcggggctg 13440
 ggcggggggg cggttaagct ttcattctgc tgctgctgct tctcgtcggc ggtgggggca 13500
 gatggcgagg ttggcgatgg ctgagtctcc atgcttggtt ttccctcccta ggagaacaca 13560
 atggccggcc gcggaggaag tcagtcagag cgccgcggg agcgcacccc cgaacgcgga 13620
 aggggctctg ccagccatcc gccaaagtgc ggcggcgaga gcccgtcgcc tccgcctctg 13680
 cccccgaaga gacataccta ccgcgcgctg gcctcggacc aagaagagga agagatagta 13740
 gtggtgagcg agaactcgcg ctccccctcg ccatctccaa catctccgcc gccgctgccg 13800
 cccaagaaga aaccccgcaa gaccaagcat gtggtcctgc aggacgtcag ccaggacagc 13860
 gaggacgaaa gacaggccga ggaggagctg gcggccgtgg gcttcagcta cccccgggtg 13920
 cggatcaccg agaaggacgg caagcggagc tttgagacct tggacgagag cgacccccctg 13980
 gccgcggctg ctagcgctaa gatgatggtg aagaacccta tgagcctgcc catcgtctcg 14040
 gcctgggaga agggtatgga aatcatgact atgctgatgg accgctaccg cgtggagacc 14100
 gacctgaaag ccaacttcca gctgatgcc gagcagggcg aggtgtaccg ccgcatctgc 14160
 cacctgtaca tcaacgagga gcaccgggc attcogctga ccttcactag caacaagacc 14220
 ctgaccacca tgatggggcg cttcctgcag ggcttcgtgc acgcgcattc ccagatcgcc 14280
 cacaagaact gggagtgcac cgggtgcgcg ctgtggctgc acgggtgcac cgaggccgag 14340
 ggcaagctgc ggtgcctgca cgggaccacc atgatccaga aggagcacat gatcgagatg 14400
 gatgtggcga gcgagaacgg gcagcgcgcg ctgaaggaga accccgaccg ggccaagatc 14460
 acccagaacc gctggggggc cagcgtggtg cagctggcca acaacgacgc gcgctgctgc 14520
 gtgcacgacg ccgggtgcgc caccaaccag ttctctagca agtcctgcgg ggtcttcttc 14580
 accgagggag ccaaggccca gcaggcgttc aggcaattgg aggctttcat gaaggccatg 14640

taccggggga tgaacgccga ccaggcccag atgatgctga tccccctgca ctgcgattgc 14700
aaccacaagc ccgggtgcgt gccaccatg ggaaggcaga cctgcaagat gaccccccttc 14760
gggatggcca acgccgagga cctcgacgtg gagagcatca ccgacgcgac ggtgctggcg 14820
agcgtgaagc acccggccct gatggtgttc cagtgtgca acccctgta ccgcaactcc 14880
cgcgcgcaga acgcggtcc caactgcgat ttcaagatct ccgcgcccga cctgctgggc 14940
gccctgcaac tgacgcgga gctgtggacc gactccttcc ccgacacccc gctgccccaa 15000
ctgctgatcc ccgagttcaa gtggctggcc aagtaccagt tccgcaacgt gtccctgccc 15060
gcgggccatg ccgagacccg gcagaacctt ttcgatttct aaataaatca tctcagatgc 15120
atgtgtaaca tgaaagtgtt gtttattaaa gacatttaac atacacacac ggtttacatg 15180
tcttgattca tgcggtcgaa ggcggtggcc ttctcgatgc gcgcgcggtg ggagcgaaag 15240
taggcggagt gggagttgag gaagcggtag agcgccctct ggttgcggcg cagggtgggt 15300
tccacctggg gcgaactggag catgccgttg ggcacccccg tcagcaagtt catggtgggg 15360
ttcttgctca tggggcggtc gggccagtgc acgaaggcgt gcaggaacat gcagcagaag 15420
agcccgagcgc cgcccgagcg cggacctgc acggtctggg tggacttttc cagggtgacg 15480
cagcggctct cgggtggccag ggcgctgcg gcgagcaggc cctcgtaact gaactggtag 15540
atctgcttga ggcgctcgtc cgagaacctg aaggggtcga agaggtagca ggtgttcgag 15600
cgcggggttc aggcgaaggc cagccagtgc tcgcccccg tctcgcggcc ggccgtgttg 15660
acgatggcgc aggccagctt gtgcggggcc atgaatcccg ggaagcgctt atcgaaggtg 15720
cccaggaagt agggcccgca gccaggctc cggatgatgg cctgagctc ctgctcgccg 15780
gagcccgcg ccattggcttg caagaagcaa gagcttaggt ggtggcggtta ccggccgaga 15840
agggggtgcg caggtagacg gcctcgatga cgcgcggtg gggctggtgc actcggacga 15900
cgtcgaagac ttcgaagaca acatagagaa ggggtgactc atccatgggg tcgacttcga 15960
aattcatgtc tagcgcgtgg gcggagttgg catagagcat gttctggccg aggtcggtga 16020
gcgcgcccatt ggacatgaag ttgctggaga aggggatgcg ccacatgacc ctgtcgcaga 16080
ggaacttttt ctgggtgacg ctgggtgacg cgtctcttgc gatgagcggg taggggtagt 16140
tggcggggta gggctggccc tggcgcatgg tggcgcgag gtagccgacg aagcccgagt 16200
tgttgctgct gtaggccagg gtgacggcct ggtagtcctt gtagttgacc tcgtccacca 16260
cctggcggtc catgggctgg aagttgcgga agaaggagta catgcgggtc ttgtagccct 16320
cgggcacgta gaagccctgg tagccgatgt tgtagtgggc cagcatctgg accaggaacc 16380
agtccttggc catgttgac tgggccacgt tgtagccctc gccgtcgacg gtgcgcttga 16440
tttcgaactc gttgggcgtc aggagccggt cgttgccggg ccagctgacg gaggagtcca 16500
aggtgatgga gaccttcttg aagggtgtgt tgaggtagaa ggtgccgtcg aggtagggga 16560

tggagcccga gtagacgaag taggggtcga acccgagacc cagcgagggc gtctccttgg 16620
 tcttgagacg cgtgaaggac cagccgcgga aggcggccca gttgcgcgag gggatggaga 16680
 tgggcacgtt ggtggcggtt gccgggatgg ggtagagcat gttggccgcc gagaggtagt 16740
 cgttgaagga ctggtcgttg gtgtcgttgc gcagcatggc ctcgagcgtg gaggccgtgt 16800
 tgtgcgccat ggggaagaag gtggcgtaga ggttgatgct ggtgaaggag atggaggccc 16860
 cgtccgtgcg caggtcgttg ccgagggagc tctgcaggat catgttgacg tccttgcgga 16920
 agttccactc gtaggtgtag gaccgggca ggagcaggag gctcttgatg gcgaaaaatt 16980
 tctggggcac ctggatgttg aagggcacgt agcgcccggt gcccaggagc atggagcggg 17040
 agcgagccc cgcatcgcg tgggtggtga aggggttcac gttgtccatg ggatccagcg 17100
 accagcgcg cccgatgttg atgtaggagt ccaccagcga gggcgccacc acccgccgt 17160
 tcatgtaatc gtaggtgttg gtgttggtgg gcagggtaac attggcggc gtgtaactgt 17220
 aagagtcggg caggtaacag gccacgttgg cgtagaggaa gttcctccac aggttggtt 17280
 ggatgttgat ttccatggcg aatggattac ccttgccctat ctcatagca tcattgacac 17340
 tgtcatcttt ggtccatgtg gtttgatcag ttccattagc cttaattccc tgataagtat 17400
 ctgttctgcc aacagcatcc agagggaac aatagttggg aagttcatcc tccacaccat 17460
 gattttcaat aatgcgcaca tcaggatcat agctgtccac cgctgattc cacatactga 17520
 aataccgggt tctgtcacc agagagtcaa gcaagagctg gtaggacagc tcggtgtttc 17580
 tgtcttgcaa gtcaaccaca gcattcagct gagaagcctg accggccagc accccatat 17640
 tgccagtgt gttgtagtac atgagcccga taaagttgtc tctgaaacca atgtagttag 17700
 gtctgttggg catggcttgc tgacccaaat taatagaaga gctgctgtca tctgtgctg 17760
 ctttgtatac aatatgggta tctggagttt ccaaaccac attttcagta tacaaaacaa 17820
 tttctggagc taggccagca gcagccgcac ttctgttgtc aaagaaagcc atgtctatgt 17880
 catattcttt agtagtcct gttcctgttt tcacatttgc ctgacctct tctttattag 17940
 taggcttggc aaaagaacca taacaaggct tcattttggg atcaggctta agagctctgc 18000
 ctccatactt ttcattcagta ccagtgtgt catgccattc agcatcacc acttgagggt 18060
 caggctgata ggttttatct gcgtagattg gctgatcatc ggtgtcagtt ccaagttgaa 18120
 taccatcttt tgtgatgtta atgccctgca cgggtgcatt tccatatgta taggtttttt 18180
 ctgtggcagt ttcaccatcg gctttatatg tccactgaca agtgttgggt gctcccttgg 18240
 gggccagact gttgtaggcg gtgccggagt agggtttgaa gctagggccc cgatccagca 18300
 cgccgcggat gtcaaagtag gtgctggcca tgtccagcac gcggttgtcg cccacggcca 18360
 gcgtgtagcg cactttgtac gagtaggtgt tgtcctcgcg gtccacgggc acgaagcgca 18420
 gcgtcagccg ctggctgcgg tcggtggtca catcgtgcgt gggcgccacc gtggggttcc 18480

taaacttggtt cccagactg aagtaggtgt ctgtggcgcg ggcaaactgc accagacccg 18540
 gactcaggta ctccgaagcg tcctgtccgg cgatgtgcat gtacgcccac tggggcagca 18600
 tcgatggggg ggccatcttg caactcggcg acgcgcctct tcaactcctcc ttctgggtgga 18660
 cagcggcggc ggcgacataa tacatacaca cacagacaag caagttaagc gctacggtag 18720
 gtttaatagc agcggcggcg cttcacactc tgcactccca gacccacgat gctgttcaga 18780
 gtgctctgcc agttcgcgat agggcggggc gtgcccccg gtgcgcgcgc ggccacggcc 18840
 accggcggca ggggcttagc cactgtagag gggcgggaag gctggggagg aggcaagtcc 18900
 agggctcgcg gcttttcggg ttccagcacc ccggtggcca ggggcgcgat gggccgcgtg 18960
 gtgggcagac ccagtttcac cgcctcctcg tacggggggc gctcgtccgt gtgcgtcagc 19020
 agcgtctcct ccgcacggg gcggggtcgc ttctcgcccc gcttgccag gggaggcagc 19080
 tcctcctoca cctgcggcat ctccacggag ccggcgggcg gcaccgggtc caggcggctg 19140
 ttgatctgcc gctgcacggc ctggttgcc aggtccacca ccccgttgat gcccgaggcg 19200
 agcccatcga ccaccttctg ctggaagttc tgctctttca gcttatccct cagcgcctgc 19260
 cctgtggtgc tgttccacgc cttgctgcca taggttttaa gcgtggaccc gaaattctta 19320
 agcccgtcc agagactgct ccaattgaag gcgccccgt tcagttggct ggtgccgatg 19380
 tcgctccagg tgcccatgaa cggccgcgtg ccgtgtcgcg gagccaggga cgaaaaattg 19440
 atgtcttcca tctgtctacg aaaacacatc acaggaccag gagcgtcaga gtccatgggt 19500
 ttattacaag atgtttccaa gtgtgtctca gtggcgctga gaggcctgca ccgccacgga 19560
 agcaatgccg gggatcgcgc cgatcgccgc ggcgatgatg gggatcagcg cgggcaggaa 19620
 gcctcccccc aaccgcttgc tgatggcgcg ccgcccggg tgggtggtggc gacgcacccc 19680
 gttccccgcc agccttctac ggcgcggttt tcttcctcgg tagcccgtaa tgggaacgcg 19740
 aaggcggcat gtgagggcca ttgatctgca aagctggcga aagtttaa at ggcatgctc 19800
 ggggtggtagc gcgcgcgcgc cagggtcaga ggtgcgcgcg cgcggcggta cactctccgc 19860
 accagggcgg cagggtgggt tgcagcggcg gtgcggcgac ggcggcggcg agtgggtgctc 19920
 ttgcggcggc ggctgctggt atgaccgcgc tagaagcgcg tgccgcggta gcccggcgtg 19980
 gggatgatgg aaggatgcag cgcgtagttg ggcatcagca ggctggccgc gccgtacttg 20040
 cgccgggggtc ttcgactagg agccgatggc atccagggat ccgtctgcac ctccatgggtg 20100
 ctggtgctgg gcttgatcat gggctcggtc tgcgtttcca tgggtccgt gggaatcttg 20160
 atgtccacgg tctgcacgcc caggcccggg gccacctgct tgatgggccc caccttgacc 20220
 tcgggctgca cgtccgggtc caccttcctg gtctccagca cgtcttcag cttctggcgc 20280
 ttgggcacca tcagctgcat ggtggggtac agatcctcgc cctcgcgctt gaacccccgg 20340
 cgcggcgcgc cggctcggcag cacctgctgc aaggtcacgc gcttgaggct cggcgtgggg 20400

ttgccgtggt ccagcgggat ggacaccgcc tcttccttcg gtgcggaacg gctgcgcttg 20460
 ccgtaagcaa actcgcccag gcgctcggcc gcctgctcca gaatatcatc atccccgtac 20520
 acctcgctgt aggagcgctt ggaagcgggtg ccggagcgct cgcggggcgt gaagaccacg 20580
 gtggtgccgg gtctcagcac cggttgcacc ttccgcccgc gccactgcac gcgcgcgg 20640
 ggggcgaact cgcgcacaaa ctccaccaat ccgtccacat cactttcttc ttcttttttg 20700
 tcctttttga ccgccttgat tttgcggggc tttctttcct ccttcaccac cgcaggggcg 20760
 tagatctcag gcgcgatgac ctggagcatc tcttccttga atttgcgctt ggacatcctc 20820
 ctgcgcgctg ggacacatca acatcgcgaa gtgaacatct tcaagtgcga ggggggcggg 20880
 tgcgcacggg cacgcgcaca ccggtggcgg cgtcgcgcac ccagtacacg ttccctcgcc 20940
 gcgggcggga catgctggcg atggccgctg ccgcgcgcgt ggccgcgcgt ctccgggtcc 21000
 tgccggcgct ggcgcctgaa gccgcgcgtc tggccgccct gagcatggcc ctgcgtcccg 21060
 tgccgctggc cctgcgcage aaggctcgcg ccgcgcgcgt ggcgggggtg ctccgggtgc 21120
 gccggggcat gcgcgcgcgc cggctcttgg ccggggcgta ccggcgcgcg tccgccacca 21180
 cgctgtcgat gacggcgctc acggtggaga cgggcgcggc ggcgggggtg tagttgcgcg 21240
 cgtcggccac cacctggtcg atcacgtcgt cgacggtggt gcgcgaccgc acgcggccct 21300
 tgagggcgcc ccaggagcg cggaagtgcc cgcgcacgcg caccgggtgt tgctggagc 21360
 gttggcgagc gcctccgtac atcttgcctg gcgcgcgcag gcccacaccg gtgttattac 21420
 tgggcgagat gagaatggac atttagaagg tgcggctcga gaggacgcgc ggcgcgacta 21480
 tgcccagggc cttgtagacg taggggcagg tgcggcgtct ggcgtcagta acggtcacgc 21540
 gctggactcc ccgatactg ctgcgcagcg gcagggtccc gtgatctgtg agagcaggaa 21600
 cgttttctact gacggtggta atggtgggcg cgggcgggcg gacgaggatc tggttctcgg 21660
 ggaagcgggt gaagacgtgc gtaagcgagg tgaaggcgcg cagctgctgc gagtagacgg 21720
 cctgctcggt gaagaagctc ttggagtaga cgggcaggag ctccggcgcc accaccgggt 21780
 agttgctaac ttgacgcgtg gagcggaagg tgaccgggtc ttgcatcatg tcgggcagcg 21840
 accagtagac ttgctccacg ccgcagggtga cgtccgaggt ggtgagcagc gtccaggagc 21900
 gcacgccctt ctccgggtcg ccatagttgt aggttaggta ccagctgcgg taggcggtgt 21960
 ttatcttgtc cggtagtacg ttgtagctcc tgttcttgc atccttctcc accggtgaa 22020
 tgactatctt actttcggtt tcagccgcct cggccgctgc cactgctgcg gcgcttgcaa 22080
 aattatcgcc cctgacctcg gtagaggcg tagctacggc tgcagttgct tcagctgctg 22140
 catcctcctt gcttttctca taggcgtcga catccaggag cgcggggatg ttgccccct 22200
 ccagatcctc gtacatgac tggaagcctt cctggaagg ctgcctcttg cgaatgcca 22260
 gcaggttgct gaggcggctc tcggtgaagt ccaccccgca gccgggcagc aagacaatat 22320

cgggatggaa agcctcggtg gtgtacaccc cgggcatgac cagctcggtc acgggggtccc 22380
 agcccagcct gaagttccta gtgtcgaact tcacgccgat gtcgctctcc agcaccocgt 22440
 tctgccgccc caccgccaag taattgtcga tgatggcggt gtccatcagg tcgatgggtca 22500
 tggtcaccga gaagttgcct tcgggcagct caaatccac ccattcatac ttcagctcat 22560
 cctgactacc atcataatcc tctgtcactg tcacccatt gggggtcttg cgggagacca 22620
 tcaccgcgc cttgaacttg ttgctgtaca tgaactcgtt cacgttgggc atgttggtgt 22680
 gcatgatggt tttcagctgg ccgccccacc gcgagcgctc gtcaaagttg atggtctggg 22740
 tgctggcctc cgtgggggtg aagtcattgt tctgcaccac ggtggtcagg aagttgctgt 22800
 ggtcgttctg gtagttcagc gaggcgatgt ccgccgactt gttgtccacc aggtacaacc 22860
 ggggtggtatc gtacaagggt gccagctccg agtaacgaat gctgttccgc ccctccgtag 22920
 gcgccaggta ccgcgggggc acgtaaggag cctccagcgg gggctgcac gccgccgcgc 22980
 ccatcgctg ctgcatcacg ctctcgtagc agggaggagg accctccggg tacgcacgcc 23040
 tcatacact agatacaaca acaacagaga agaaacgaac gcacgctggt cgccatggcc 23100
 ttggtgagta tcatttattt tcggtttctc ttacatcatg cggccgatac gggggcgag 23160
 gtgagcgaac gggttaccac tcccaccaa gtccaacacg ctgctgtcgt cggcggagtc 23220
 ctcatcgctc cacatctgtc ccgctgcct gtctgcccac cggcgtttac gggcggcgct 23280
 gcccggctc gtggccccct ggcagccccg gggatcgctc ctgtgctcct ggcatacgt 23340
 cttccagcgg ctcatcttgt ccaccaggct ttctatcccg ttattgggga agttcttctc 23400
 ccgctcgggt ctcaacagcg agtcattcaa gtactcctct tcgccagca agcgcgggcg 23460
 cgtgatcctg ccagctcgc tgctgcggat actgttcagc gagaaggga agctcgggaa 23520
 aggactggcg gcctcgggca ccgcgcgggc agcaccctcg cggccggaca gcgcgagga 23580
 cgggcgtcgg tcgctgcctt ccttcttcca caaggggcgc tcgttagcac ccggtcgggg 23640
 ggagaacacg ctgctgtcca catcgctcca caggaaccgc tcattggggg cgggcatgtc 23700
 gtactcgccc gtgtagaacc ccggcggcgg gagccagtgg ggattcagga tggcgttggt 23760
 gaaatagtca gagttcatgg cggccgcccg atgcaagtag tccatcagtt tattgatgaa 23820
 cgggcggttg ctggcgta tgctgggctc catgttgccg gcggtcatgt cgagcgcggc 23880
 gctgggggtg gccccctcct gcatcaggaa caggccacg ctctgctgca cgtaacgcag 23940
 gatgcgctcc tcctcgggtg tgagcgcgta ctggggcggg atcttctgcg accggttggg 24000
 cagcaaaaag ttcagggtgg cttccagggt gcccggtcg tcctggcca gggcgcggt 24060
 cacgtgggtg atctcctggt aggtctgctc gtccacgtgc gcctggcca tggcctcgcg 24120
 gtacaggtta atcaggtagc ccaggtaaga gttgcggttg atgctgcgc tgtccgtgaa 24180
 gggggccacc agcagcagca gcaggcgga gttcggcgtc agcaggctcg acaccgtcgc 24240

gcgggtccccg accgggggcct gcacgccccca caggccctgc aagttcttga aagcctggct 24300
 caggttcacg gtctgcaagc cctggcgact ggtctggaag aagtagtccg gcccggactg 24360
 gtacacctcg ctctggggca cctcggtcac catcaggcgc agggcgctga tgaagttggt 24420
 gtagtctctc tggccccggg gcacgttggc gggctgggtg ctgaggaagg cgttcagcgc 24480
 caccatggat cccaggttgg actcgcggtg gaaccgctcg cgctgggcca cggcctcgcg 24540
 cacgtcggtc accatgcggt ccaggttgggt ctgcacgttg gtgctgttgt agcggggccac 24600
 gcgctccagc agcgcgttgt acaccaggcc ggctcgctcg ccgcggtagg ccttggtctc 24660
 caccagcgcg ttcacgatgg ccaggacctt ctcgctcggtg gggttggagc gcgagggcac 24720
 cacggcctcc aggatggccg agagccggtt ggctggggc tgctgtctaa aggccttcggg 24780
 gttgcgggtc gtcagcgcca tgatgcgttg catggcctgg gtccaatcgt ccgaggagtt 24840
 aatgccggac ggctggctct gcagcgccgc ccgcatcgcg ggatcaggag gtggctgttg 24900
 ttgttgcatc tagcaaaaat acggtcgcgc catcagtctt ccaggtaact gccctcctcg 24960
 tccacctcat cgtccacctc ttctacgtag ggtcctgccg ccgcctccaa ggcccggcgg 25020
 ctgggctgcc agtgcaggtc cgcgcccatg tcaaagtagc tctccccctc ggtcccggcc 25080
 ccggtcaggg cccgctgcag actatgcatc agctcctggg cgctcagctc gcgcgcctg 25140
 ctggcgctca ccgcacggtg catcctgtcg ttgcggtaca ccccagatc gtcgctcagg 25200
 gtcagcactt tcagggtcac gcgcagttaa aaccgcgcga tcttcacctc cttgtctatg 25260
 ggcacgtacg gggctcttgta gatcttcta gcgtagtact tgcccaaact cagcaccgag 25320
 aagttgatgg ccgccagctt ctcgacagc ggcagccgc gctcctgcac cacgatgctc 25380
 tgcagaatgt tcaccaggtc caggagccag cggccctcgg gctcgggtgat attcagcagc 25440
 gcctccctga acgcttcggt gtcccgacta tgctgcacca ccaggaacag ctgcgcgctc 25500
 agcggcttgc tgggtggggt ctgcacgatg gcctccagca ggtcccacag gtgcatcagg 25560
 cccaggttca cctcctcgcg cgcgatcagg gtgcgcacgt ggttggtgaa ggatttttgg 25620
 aagttgctct cctccttcac ggtctgctcg tacgccgtga ccaggttggc cgcggccacg 25680
 tgcgcgcgcg cggggctgat cccgcgcagc tcgtccgct cgaaatcctc gtccctcagc 25740
 accctctttc ggtccaggcc gcgcgcagc tcccgcctcg cgtggaaccg ggccgcgcgc 25800
 atctcctcgg gctcctcgcc gctcctgtct ctgaacaggt tctgcttggg cacgtaggcc 25860
 tcgcgagcgt cccttttcat ctgcacgcgc ggggtgccgt ccggcgacga cgcgccagc 25920
 cgcgccagcc cctcgccctc ttccaaggcc agctggtgat cataactctg tccagccccg 25980
 ctcacggcgg ccgcggcggt cgtggctgga agttgctgct ggggcggggg cagaagcgcc 26040
 ggctgtggag ggggctgttg ttgcggtgga ggggtggtgg ggcgcactct ccgcagtacg 26100
 ggatgcatct ggcaaaaaca aaaaaaaca aagaggggct cgctccgtaa ctggagaagt 26160

cggctggcta tggggtcttg gaaacgacgg ggcagccacg ccctcgttag ccgcggaatc 26220
 cggccggcct cgaaccgggg cacaccgcaa cgcaaccctg gcgattcttc tocagactac 26280
 ggcagcgagc catcgcggtc ggccgctttc cgcgcttact agtctcatcc ggccctccaaa 26340
 aaaaagttgc aaaacgaccc gcctccgtat cctggagggt tgggtgcaggc ttgggtcgag 26400
 acgggagtg ccaataccacg ttagctgcgg ctccagcctg attcgagatt cgaaccgggg 26460
 tacacgcgca gcccacccg ttcgcttagc ctccaggcca cggagtcgag ccgctgaccg 26520
 ctttcgtttt tgcccgtata gagcatccac gactgcgcgc gcctcacggg ccagaccgtg 26580
 cccaccatga actacttcct gccgctgcgc aacatctgga accgcgtccg cgagttcccg 26640
 cgcgcctcca ccaccgcgc cggcatcacc tggatgtcca ggtacatcta cggctaccac 26700
 cgcaccatgc tcgaggacct cgcgcccggc gccccgcga ccgagcgatg gccgctctac 26760
 cgccagccgc cgccgcactt cctcatcggc taccagtacc tgggtgcgcac ctgcaacgac 26820
 tacatcttcg acacgcgcgc ctactgcgc ctcaagtacc acgagctcgt gcgtccgggc 26880
 caccagaccg tcaactggtc cgtcatggcc aactgctcct acaccatcaa caccggagcc 26940
 taccaccgt tcgtcgactt tgatgacttc cagaccaccc tcaccagat ccagcaagcc 27000
 atcctcgccg agcgcgtcgt cgccgacctg gcgctcgtcc agccccagcg cggcttcggg 27060
 ctcacgcgca tgcacggccg cgcgggcgag gaggagggtc ccgtggagcg gctcatgcag 27120
 gactactaca aggacctggc caggtgtcag gaccacgcct ggggcatggc cgaccgtctg 27180
 cgcattccagc aagccggggc caaagacctg gtgctcctcg ccaccatccg ccgtctcaga 27240
 accgcctatt tcaacttcat caccagcagc atcgcccgcc ccgctcccaa ccaacatgac 27300
 ccgccagaag aaaccgtgct cagcctacct tgcgactgcg actggctcga agccttcggt 27360
 cagcggtttt cagatcccgt ggatctcgag acgctcaggt ccttgcgcgg agtccctacg 27420
 gggcaattga taagatgcat cgtcagcgcc ctctccctgc ccaacgggga ccccccggc 27480
 cacctggaga tgcgcggcg cgtcttcacg ctgcggcccc gcgaggacgg gcgcgcgctc 27540
 accgagacca tgcgacgcg gcgcggcgag accatcgagc gttcatcga ccgtctgcc 27600
 gtgcgccgcc ggcgacgcg gccccctccc ccgccaccac tgccgcctga ggaggaagta 27660
 gaagagatgt tagtggagga ggaagaagag gaagtggagg aactcccggg ggccttcgag 27720
 cgcgaggtgc gcgccaccat cgccgagctc atccgtcttc tggaggagga gttgaccgtc 27780
 tcggcgcgca actcccagtt tttcaacttc gccgtggact tttacgaggc catggaacgt 27840
 ttggaggcgc tgggcgacgt cagcgagatg ccgctccgcc gctggatcat gtatttcttc 27900
 gtcaccgagc acatgccac cagctcaac tacctctacc agcgcctctg caactacgcg 27960
 gtcttcacgc gccacgtgga gctcaacctc gccagggtgg tcatgcgcgc cggcgatccc 28020
 gagggcgctg tggctctacg ccgctctgg aacgaggcgg gcatgaacgc cttctcgag 28080

ctcatggggc gcattctccaa cgacctcgcg gccaccgtgg agcgcgcccg ccgcggagac 28140
 cttcaagagg aggagatcga gcagttcatg accgagatcg cctaccagga caactcgggc 28200
 gacgtgcaag agatcctgcg gcaggccgcc gtcaacgata ccgagattga ttctgtcgaa 28260
 ctctcttttca ggttcaaaact cacgggtccc gtggccttca cccagaggcg tcagatccag 28320
 gacgtcaacc gtcgcgtcgt cgctcacgcc agtcttctcc gggcgcagta ccagaacct 28380
 cccgcgcgcg gcgcccacgt gccctgccc cccctgcctc cgggccccga gccgcccctg 28440
 ccgcccggcg cgcgtcctcg ccgcccgttc taaccttgga agaggcaccg ccccgctcgc 28500
 cccagccgcc caagaagaaa cgggggacgg tggtcacacc ccagggggcac gggaccctgc 28560
 aagccatcga cgtcgccacc aatggcgcgg tggagatcaa gtacctctg gacctccgc 28620
 gcgcccctgga aaaactcctg caagtcaacc gcgcgcgcc gctgcccact gacctgactc 28680
 cgcagcgtct caggacctg gacagctccg gcctgcgcgc cctcgtcctc gctctccgac 28740
 ccgctcgcgc cgaggtctgg acctgcctcc cgcgcgggct cgtcagcatg accaccatcg 28800
 aggcagaaga gggccaggcc gaccaccacg acgtagtaca gcacgagatg caggcgccac 28860
 gactccactt cccactgaaa ttctctgtca aaggaaactca ggtacagctc gtgcagcacg 28920
 tgcatcccg gcagcgttgc gagcactgtg gccgcttgta taaacacaag cacgagtgtt 28980
 cggcgcgcgc toggcatttc tacttccatc acatcaacag ccattcctcc aattggtggc 29040
 aggagatcca gttcttcccc atcggtcgc atcctcgcac cgaaaggctc ttctcacct 29100
 acgatgtgga aacctacacc tggatggggc ccttcggcaa gcagctcgtc cccttcatgc 29160
 tggatcatgaa actctccggg gacgaccggc tcgtcgagct cgcctcgat ctgcacctcc 29220
 agctcaaatt ggatcgctgg cacggggacc ccgcacatt ctactgcgtc acccccgaaa 29280
 aaatggccgt cgggcagcag ttccgtcagt accgggaccg tctgcaaacc gccctggccg 29340
 tggatctctg gacttccttc ctccgcgcca accccatct cgcgactgg gcgctcgagc 29400
 agcacgggct cagcgacccc gacgagctca cctacgagga gctcaagaaa ctgccccacg 29460
 tcaagggccg tccgcgattc gtggaactct acatcgtggt ccacaacatc aacggcttcg 29520
 acgagatcgt gctcgccgcc caggatcatc acaaccgggc cgaggtgccc caacctttcc 29580
 gcatcactcg caactttatg cccgcgcgcg gcaagatcct cttcaacgat gttactttcg 29640
 ctttgcccaa cccgcctac aagaagcgca cggacttcca gctctgggag caggggggct 29700
 gcgaogatat cgacttcaag caccagttcc tcaaggatcat ggtcagggac actttcgccc 29760
 tcacgcacac ctccctgcgc aaggccgccc aggcctacgc cctccccgtg gagaagggt 29820
 gctgcgccta caaggccgtc aaccagttct acatgctagg ctcttaccgt gcagatcagg 29880
 acgggttccc cctcgaagag tactggaagg accgcgaaga gttccttctc aaccgcgagc 29940
 tgtggaaaca aaagggacag ctcaagtatg acatcatcca ggagaccctc gactactgcg 30000

ctctggacgt cctagtcacc gccgagctcg tcgccaagct gcaagactcc tacgcccact 30060
 tcatccgcga ctcggtcgga ctgccccacg ccacttcaa catcttccaa aggcccacca 30120
 tctcctccaa ctcgcatgcc attttccgcc agatcgtcta ccgcgccgaa aagcccagtc 30180
 gcaccaacct gggcccgggg ctctctgccc cctcgcacga gctgtatgac tacgtgcgcg 30240
 ccagcatccg cggggggcgc tgctacccca cctacatcgg catcctcgag gagcccctct 30300
 acgtctacga catctgcggc atgtacgcct ccgcgcttac ccatcccatg ccctggggca 30360
 cgcccctcag tccctacgag cgcgcgctgg ccgtgcgcga atggcaagct gccctggacg 30420
 atctggccac ttccatcagc tactttgacc ccgacctcct gcccgcatc ttaccatcg 30480
 atgccgaccc ccccgacgag gtcattgctg accccctgcc ccccttctgc tcgcgcaagg 30540
 gcggacgcct ctgctggact aatgagcccc tgcgcgcgca ggtggccacc agtgtggacc 30600
 tcatcacctt gcataatcgg ggctggcagg tcagaatcgt gcccgacgag ctgaccaccg 30660
 tcttccccga atggaagtgc gtggcgcgcg agtacgtgca gctcaacatc gccgccaagg 30720
 agcgcgccga caaggaaaaa aaccagacca tgcgctccat cgccaagctc ctctccaacg 30780
 ccctctacgg ctctctcgcc accaagctcg acaacaaaaa gatcgtcttt tctgaccaga 30840
 tggacgaggg gctcttgaaa ggcatctccg ccggcaccgt caatatcaaa tctcctcgt 30900
 ttctagaaac tgacaacctg agtgccgagg tcatgcccgc ctctgagagg gaatacctac 30960
 cccaacagct ggcgctcctg gacagcgatc cggaagacag tgaggacgag cagggacccg 31020
 caccctttta tcccccccg gccgggaccc ccggtcacgt ggcctacact tacaagccaa 31080
 tcaccttctt ggatgtggac gagggggaca tgtgtttgca taccctggaa aaggtggacc 31140
 cgctggtgga caacgaccgc taccctgcc acgtggcctc ctctgtgctg gcctggaccc 31200
 gggctttcgt ctcgagtggt gcgggggttc tctacgagga ggaccgcggc acaccgctcg 31260
 aggaccggcc cataaagtcg gtctacgggg acacggacag cctctttgtc acccagcggg 31320
 gacacgagct catggagacc aaaggtaaga aacgcatcaa aaagaacggc gggaaactgg 31380
 tttttgaccc cgaccagccc gacctacct ggctcgtgga gtgcgagacc gtctgcgccc 31440
 actgcggcgc ggacgcctac gccccgagt ccgtcttctc cgccccaaag ctctacgccc 31500
 tcaagtccct cctctgtccc gcctgcgggc agacttccaa aggtaagctc cgcgccaag 31560
 gccacgcggc cgaggcgctc aactacgaac tcatggtcaa ttgctacctg gccgacgcgc 31620
 agggcgccga tcgggagcgg ttttcgacca gccggatgag cctgaagcgc accctcgcaa 31680
 gcgcccagcc cggcgcgcac cccttcaccg tgacggagac caccctgacg cggacgctgc 31740
 gacctggaa ggaccggacc ctggctgcgc tggacgcca tcgtctggtg ccctactccc 31800
 gcagccgtcc caaccgcga aacgaggagg tctgctggat cgagatgccg tagagcacat 31860
 caccgagctc tgggaccgcc tggaactctt gcaacaaacc ctctccaaaa tgcccatggc 31920

cgacggactc aagccgctga aaaacttcgc ctcgctccag gagctcctat ccctgggggg 31980
 agagcgccctc ctggcggaac tggcgcgga gaacatgcac gtgcgcgaga tgatgaacga 32040
 ggtggccccc ctccctccggg aggacggcag ctgtctctcc ctcaactacc acctgcagcc 32100
 ggtcatcggg gtcatctacg gccccaccgg ctgcggcaag tcccagctgc tccggaactt 32160
 gctttcggcc cagctcatct cccccgccc ggaaaccgtg ttctttatcg ccccgaggt 32220
 ggacatgata cccccctccg agctcaaagc ctgggagatg cagatctgtg aggggaacta 32280
 cgccccggg atcgagggtg cctttgtccc ccagtcggc accctccgcc ccaaattcat 32340
 taaaatggcc tatgatgacc tcaccagga ccacaactat gatgtgtccg accccgaaa 32400
 cgtctttgcc caggccgccc ccacgggcc catcgccatc atcatggatg agtgcagga 32460
 aaacctgggc gggcacaaag gcgtcgcaa attctttcac gccttcctt ccaagttgca 32520
 tgataaatc cccaagtga ccggatacac cgtgctgggt gtccctgcaca acatgaacct 32580
 caggcgggat ctggcggtg acatcgcaa tctcaagatc caggccaaga tgcacctcat 32640
 ctccccccgc atgcatccct ccagctcaa cagatttgta aacacctaca ccaaagggt 32700
 gcccgaggcc atcagtctcc tctcaaaga tattgtgcaa caccatgcc tgcgccctg 32760
 ctatgactgg gtgatttaca acaccacccc cgagcacgag gccctgcaat ggagctacct 32820
 ccacccccgg gacgggctca tgcccatgta cctcaacatc caagcccacc tctaccgggt 32880
 cctggaaaag atccaccggg tgctcaatga tcgagaccgg tgggccaggg cctaccgcgc 32940
 gcgaaaaatc aaataaagat tcagactctg tgttaaaatc aacaaccgtc tccgtttatt 33000
 tattgattca ttttttattt ggatttcacc gtggcaaccg cggcccgct ctgctcctgc 33060
 agctgagcca cctgctgggt cagctcgccc aggcgctggg tcaaggcctc gagctgggcc 33120
 atcagcagca acagcttctc ctcgctcagg ctggcgggat tattggtgga actcgagttg 33180
 gccaccagag tgccgtagta gccggcgccc atggccattc cgcgcacggc gctggcgga 33240
 gatgcagcag ctgcggcggc agctgcgtcc aacgacgaag agctcagggt tgcataggct 33300
 agggttgaag agttcgcggt ctgcacgggc cggccgtcca ccgtggatcc catcacattc 33360
 tgacgcactc ccgcccagga ggggagacgc cccgtcagat aagggtgaa taccctccc 33420
 tcaaaggagc cgcttccgct catgctgctg caacacacag aaaagcacag atttcagtta 33480
 ttctggccct catgcaggct ccccccgcc ccagaacact actcactcta gtcagattct 33540
 tccccgctgg aaccgaactc cgtcccggtg cagggaaca ccaaattgat gggtcgcagg 33600
 tctccgtca catccacaca cacgggctgg aacctggcat gcttccctcc gactcgcag 33660
 gctcggcacc tgggtcttga ttcacatat ctcaaatct tccacacctc cacattcatg 33720
 tcaaacaccc ccgtcaggct cactctggac atggcatcgg gctccagcag caccttcaca 33780
 taattcagggt tgcaactgga gggcatgaac atgcctcggc gggaccccag atgcatattg 33840

cacctgggtca tgacattgtg ctggaactcg ggccagggct tgcgagcatg ggaagccaca 33900
tgtacgggtgg ccagcatatg cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagacc cataataccc 33960
ataatgccat ttcattacct ctttctccgc acccgacata gatgaattgt cgggtcaagcc 34020
ttgccttggt gtagcttaaa ttttgctcgc gcactactca gcgacctcca acacacaagc 34080
agggagcaga tactggctta actatgcggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca 34140
taggggatcg ggagatctga gctttcgcta ccttaggacc gttatagtta cgtcaggtgg 34200
cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaactac gtaaaaacac cggactttga caccgtacgc 34260
ggaaatttag gtgaaaaaca cggtaatcga aacccccacg taatcgggtca aagtctactc 34320
ggccctcggc aaatactcct ccctgccata aacgcgaaat tactcagatt ttcacttcct 34380
cattcagttt tcgcgcgaaa atggcccgtt ttcacttgca tccgccaga aacacctcat 34440
ttcctgtcag agagcgcggg aaaattgagt atttccgtgt tcaaaccaca cctcgtttga 34500
cgtcactttt cccacgagaa cttgcaaact ggctcctcct cgcaaccacg tcatcaaac 34560
gtcactcgcc ccgcccctaa cggtcgctca tccctcgacc aatcacgcc cttcctcccc 34620
aaattcaaac gcctcatttg catattaacg cgcacaaaaa gtttgaggta tattattgaa 34680
gatggttaat taagggttta aacctgcagg catgcaagct tggcgtaatc atggtcatag 34740
ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 34800
ataaagtgt aagcctgggg tgcctaata gtgagctaac tcacattaat tgcgttgctc 34860
tcaactgccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 34920
cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg 34980
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg 35040
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag 35100
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 35160
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 35220
taccaggcgt tttcccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 35280
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca aagctcacgc 35340
tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc 35400
ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 35460
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat 35520
gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca 35580
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 35640
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt 35700
acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg gtctgacgct 35760

cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttgggtcatga gattatcaaa aaggatcttc 35820
 acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa 35880
 acttgggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta 35940
 tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtctgttaga taactacgat acgggagggc 36000
 ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat 36060
 ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta 36120
 tccgcctcca tccagtctat taattggtgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt 36180
 aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgtcacg ctctgtcttt 36240
 ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg 36300
 ttgtgcaaaa aagcggtttag ctccctcggc cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc 36360
 gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc 36420
 gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg 36480
 cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga 36540
 actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta 36600
 ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct 36660
 tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaaatgc cgcaaaaaag 36720
 ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatctct tcttttttca atattattga 36780
 agcatttctc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat 36840
 aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc 36900
 attattatca tgacattaac ctataaaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtc 36955

<210> 3
 <211> 307
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> đặc điểm đa dạng
 <223> Đoạn nổi

<400> 3
 cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagacc cataataccc ataatgccat ttcattacct 60
 ctttctccgc acccgacata gatgaattgt cgggtcaagcc ttgccttggt gtagcttaaa 120
 ttttgctcgc gcactactca gcgacctcca acacacaagc agggagcaga tactggctta 180
 actatgcggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca taggggatcg ggagatctga 240
 gctttcgcga ccttaggacc gttatagtta cgtcaggttg cacttttcgg ggaaatgtgc 300
 gcggaac 307

<210> 4
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> đoạn mỗi

<400> 4
 cggaattccc ttaattaacc atcatcaata atat 34

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> đoạn mỗi

<400> 5
 caccacctcc cgtaccaca 20

<210> 6
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> đoạn mỗi

<400> 6
 gggttttaaac ccttaattaa ccatcttcaa taatatacct caaac 45

<210> 7
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> đoạn mỗi

<400> 7
 ccggaattcc cgtttctaga aactgacaac c 31

<210> 8
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> đoạn mỗi

<400> 8
 agctacgtag ttccgcgcac atttccccga a 31

<210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> đoạn mỗi

<400> 9
 cgacatatgc gcgcgttggc cgattcatta 30

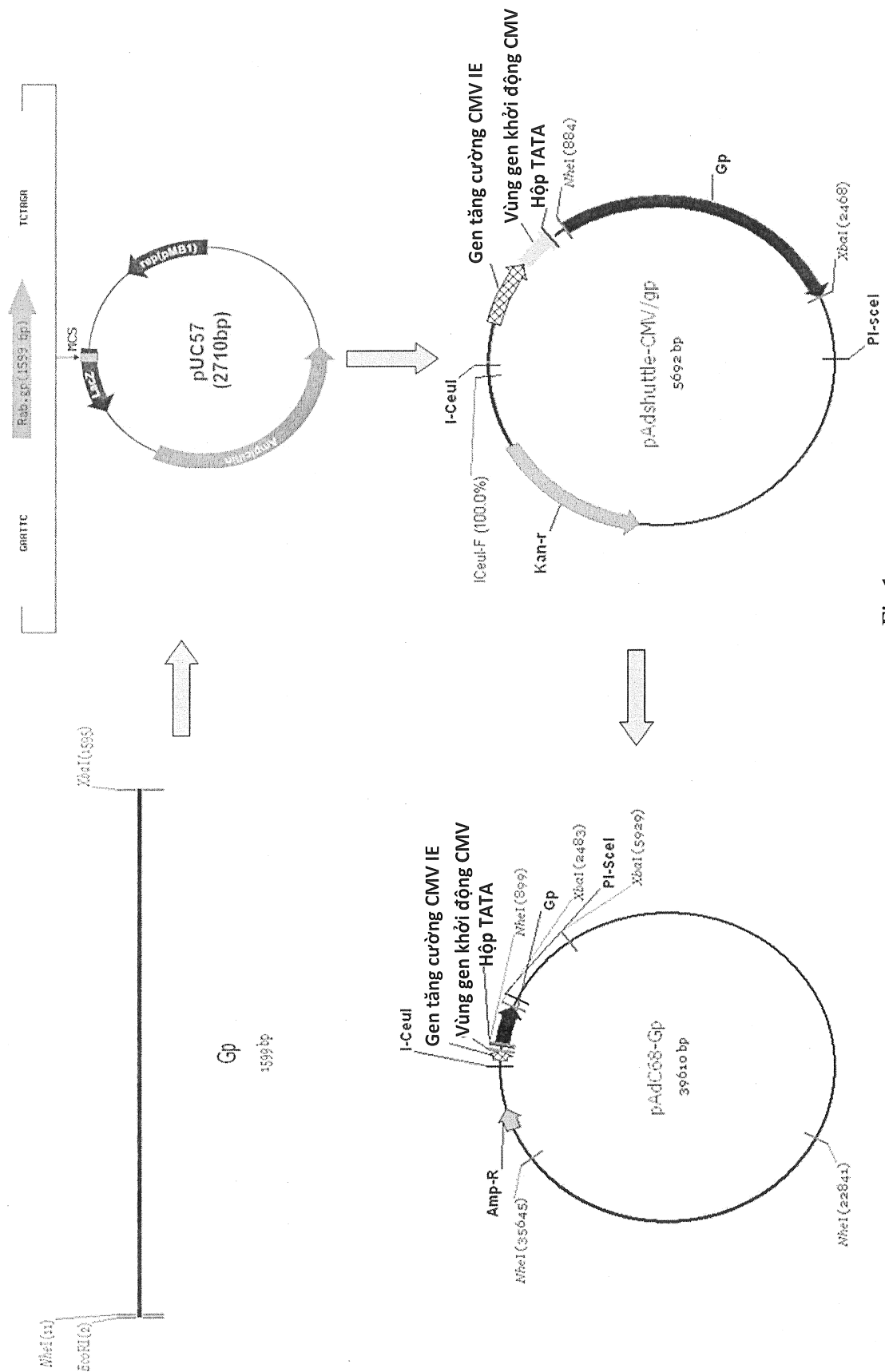


Fig.1

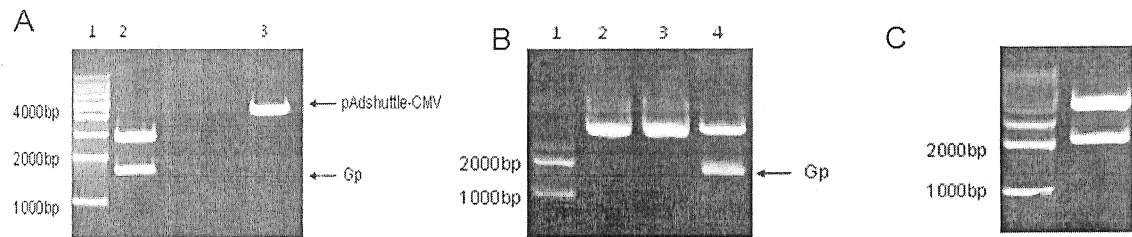


Fig.2

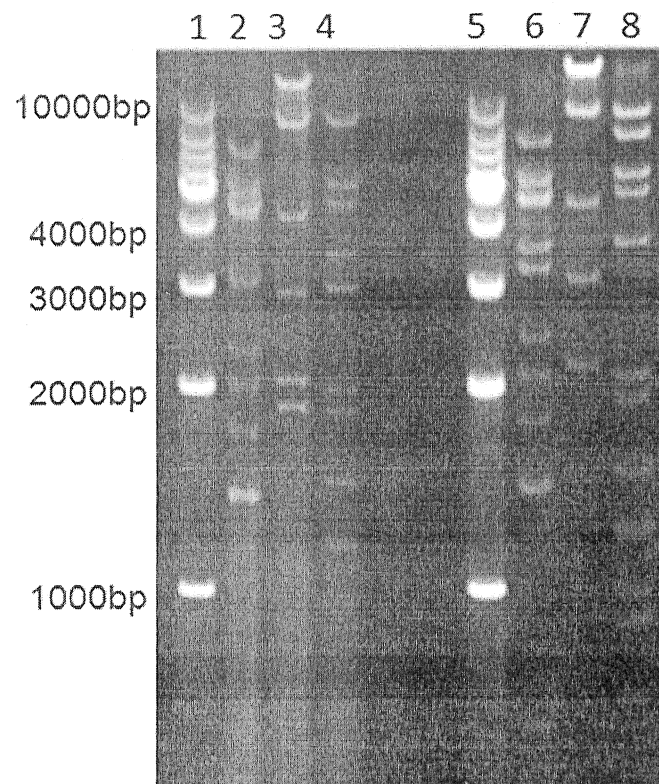


Fig.3

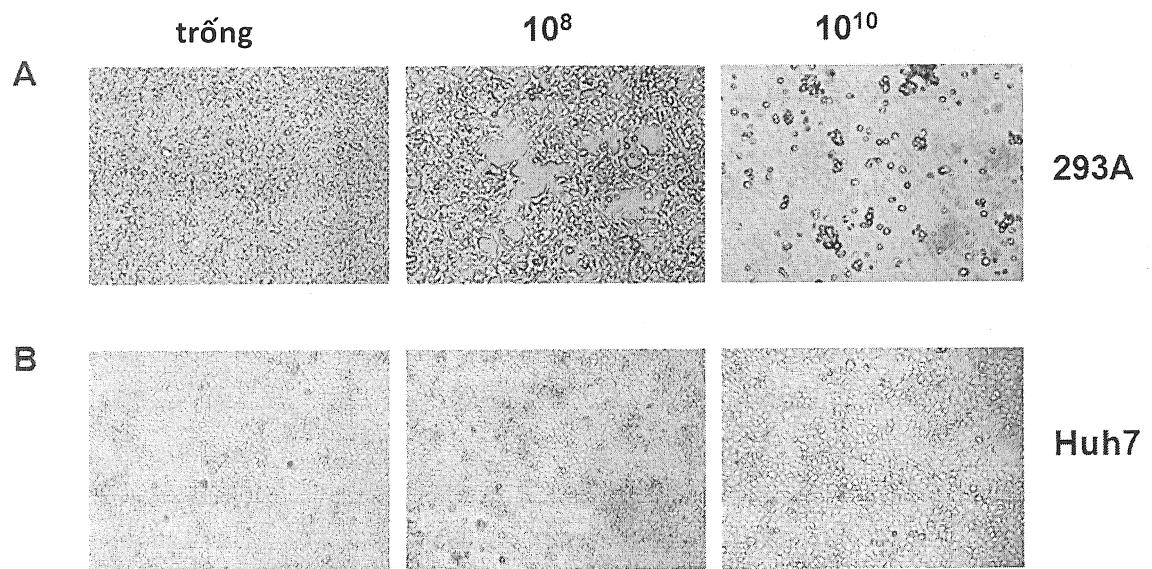


Fig.4

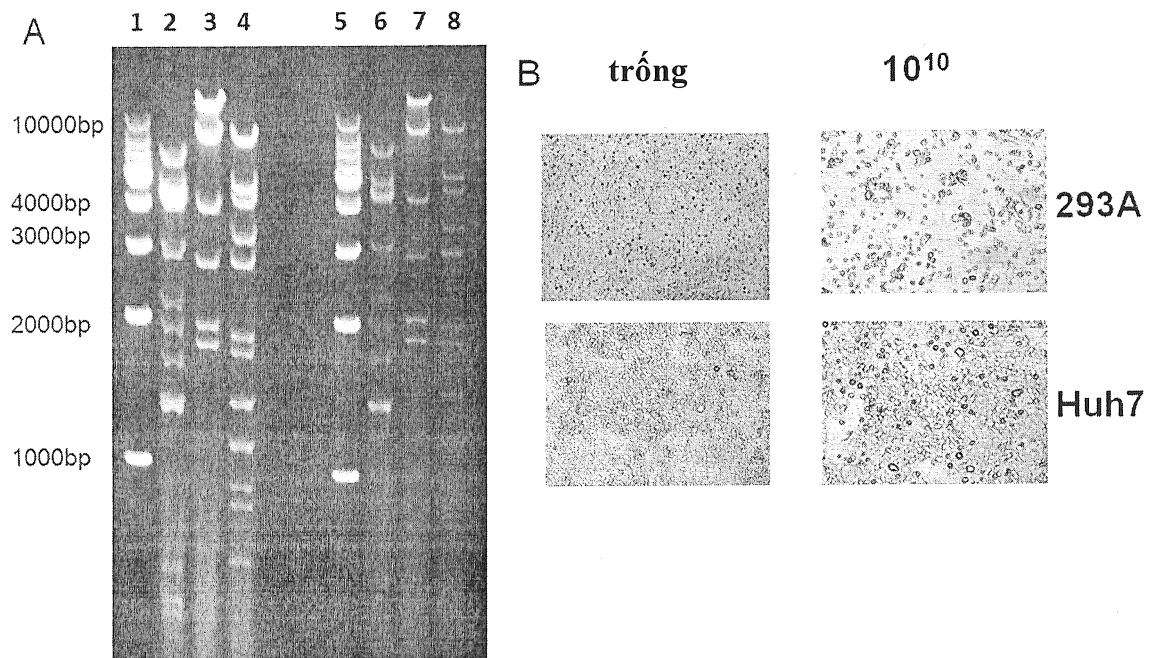


Fig.5

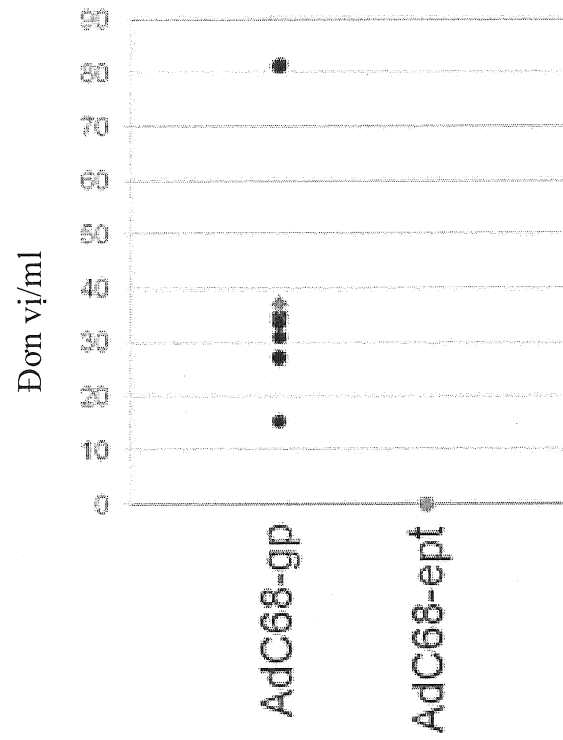


Fig.6