



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

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

(11)



1-0027978

(51)⁷ C12N 7/01; A61P 31/04

(13) B

(21) 1-2015-03522

(22) 26/02/2014

(86) PCT/KR2014/001591 26/02/2014

(87) WO/2014/133322 04/09/2014

(30) 10-2013-0021500 27/02/2013 KR

(45) 25/04/2021 397

(43) 25/02/2016 335A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

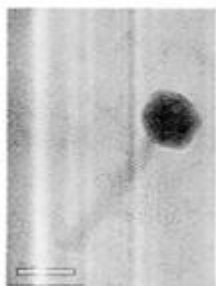
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Korea

(72) SON, Bo Kyung (KR); BAE, Gi Duk (KR); KIM, Jae Won (KR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) THỂ THỰC KHUẨN, CHẾ PHẨM, CHẤT KHÁNG SINH, CHẤT TẨY RỬA, CHẤT LÀM SẠCH, CHẤT PHỤ GIA THỨC ĂN CHĂN NUÔI VÀ CHẤT PHỤ GIA BỔ SUNG VÀO NƯỚC UỐNG CHỨA THỂ THỰC KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra, chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo sáng chế làm thành phần hoạt tính.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens* gây bệnh và chế phẩm kháng khuẩn chứa thể thực khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Clostridium perfringens (CP), là *bacillus* kị khí bắt buộc gram dương lớn, được biết là loại vi khuẩn không có roi và tạo bào tử. *Clostridium perfringens* là vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy hoặc các bệnh tương tự, Cụ thể, ở các động vật nuôi như gà, lợn và các con vật tương tự, được coi là một trong những vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm gắn liền với ngành công nghiệp chăn nuôi, như trường hợp *Salmonella* gây ra bệnh thương hàn gà.

Gần đây, một trong các bệnh thường gặp phải trong ngành công nghiệp chăn nuôi gia súc và gia cầm là viêm ruột hoại tử do *Clostridium perfringens* gây ra. Đã được biết là bệnh viêm ruột hoại tử thường do nhiễm đồng thời *Clostridium perfringens* và *coccidium*, và triệu chứng chính của bệnh viêm ruột hoại tử là tiêu chảy ra máu do có các tổn thương nghiêm trọng ở phần dưới của ruột non của gà, lợn và các động vật khác tương tự.

Bệnh viêm ruột hoại tử gây ra các triệu chứng mất nước, tiêu chảy chu kỳ và các triệu chứng tương tự ở động vật bị nhiễm khuẩn, dẫn đến các bệnh nghiêm trọng, làm cho cơ thể động vật suy yếu dần và chậm lớn và các triệu chứng tương tự, vì vậy bệnh viêm ruột hoại tử đã trở thành vấn đề nghiêm trọng trong ngành công nghiệp chăn nuôi. Ngoài ra, do *Clostridium perfringens* rất dễ lây truyền qua phân động vật nên việc lây truyền giữa các động vật trong môi trường chăn nuôi có thể dễ dàng qua đường miệng qua đất hoặc thức ăn nhiễm khuẩn, hoặc các vật truyền tương tự. Đặc biệt, việc lây truyền qua con non rất cao nên *Clostridium perfringens* thực sự là vấn đề cần giải quyết.

Trong khi đó, thể thực khuẩn là một loại virus đặc biệt mà gây nhiễm và chỉ phá hủy vi khuẩn và chỉ có thể tự sao chép trong vi khuẩn chủ. Thể thực khuẩn có tính đặc hiệu vật chủ cao so với các chất kháng sinh, và gần đây, việc kháng kháng sinh nổi lên trở thành vấn đề rất nghiêm trọng, do đó nhu cầu sử dụng thể thực khuẩn ngày càng tăng lên

(tài liệu phi sáng chế 1 và 2).

Do đó, nghiên cứu về thể thực khuẩn đã được thực hiện chủ động ở nhiều nước trên thế giới, và ngoài những đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế cho thể thực khuẩn thì ngày càng có nhiều đơn yêu cầu Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug Administration - FDA) cấp phép cho các chế phẩm chứa thể thực khuẩn.

Như nêu trong các tài liệu kỹ thuật đã biết về thể thực khuẩn, thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens* đã được bộc lộ trong tài liệu sáng chế 1 và thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Staphylococcus aureus* đã được bộc lộ trong tài liệu sáng chế 2. Hơn nữa, protein phân giải từ thể thực khuẩn phá hủy đặc hiệu cấu trúc peptidoglycan của màng tế bào vi khuẩn và dịch ly giải vi khuẩn đã được mô tả trong tài liệu sáng chế 3.

Tuy nhiên, mặc dù đã được đề cập đến trong nhiều tài liệu liên quan nêu dưới đây nhưng kỹ thuật liên quan đến thể thực khuẩn để phòng tránh và/hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm, cụ thể là bệnh viêm ruột hoại tử do *Clostridium perfringens* gây ra là vẫn một vấn đề quan trọng trong ngành công nghiệp chăn nuôi bao gồm cả chăn gia cầm và chăn nuôi lợn vẫn chưa được giải quyết thích đáng, do đó thể thực khuẩn và kỹ thuật liên quan đến thể thực khuẩn cần được phát triển.

Tài liệu thể hiện lĩnh vực liên quan

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Hàn Quốc số 10-2012-0076710 A

Tài liệu sáng chế 2: Công bố bằng sáng chế Hàn Quốc số 10-0910961 B1

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Hàn Quốc số 10-2009-0021475 A

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Cislo M, et al, Arch. Immunol. Ther. Exp. 2:175-183, 1987

Tài liệu phi sáng chế 2: Sung Hun Kim et al, Bacteriophage, Novel Alternative Antibiotics, BioWave Vol.7 No. 15, 2005, BRIC

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu để giải quyết các vấn đề như vi

khuẩn kháng thuốc khi sử dụng kháng sinh, việc kháng sinh tồn dư trong thịt và các vấn đề tương tự, phòng ngừa hiệu quả và điều trị các bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra, và kết quả là, các tác giả sáng chế đã phân lập một loại thể thực khuẩn mới ΦCJ22 (KCCM11364P) có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens* từ tự nhiên.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng đã xác định các đặc tính về hình thái học, sinh hóa và di truyền của thể thực khuẩn mới này và khẳng định là thể thực khuẩn này có khả năng chịu axit, khả năng chịu nhiệt, khả năng chịu hạn rất tốt và các đặc tính khác tương tự, do đó, các tác giả sáng chế đã phát triển chất kháng sinh, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi gia súc, chất tẩy rửa và các chế phẩm khác sử dụng thể thực khuẩn mới này. Ngoài ra, sáng chế cũng phát triển chế phẩm ngăn ngừa và điều trị các bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra và phương pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh sử dụng được phẩm này.

Sáng chế đề xuất thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chế phẩm để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) làm thành phần có hoạt tính.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến chất kháng sinh, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia cho vào nước uống của động vật hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) làm thành phần có hoạt tính.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một phương án, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*.

Theo một phương án ví dụ khác, sáng chế đề xuất chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra, chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) nêu trên làm thành phần có hoạt tính.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất kháng sinh, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia cho vào nước uống cho động vật, chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) mô tả ở trên làm thành phần có hoạt tính.

Hiệu quả

Thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo sáng chế có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*.

Ngoài ra, thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo sáng chế có khả năng chịu axit, khả năng chịu nhiệt, khả năng chịu hạn rất tốt và do đó thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) này có thể được sử dụng làm nguyên liệu tạo ra chế phẩm dùng để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra trong phạm vi pH và nhiệt độ rộng, trong các điều kiện ẩm và các điều kiện tương tự và được sử dụng làm chất kháng sinh, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia cho vào nước uống cho động vật, chất tẩy rửa, chất làm sạch hoặc các chế phẩm tương tự.

Hơn nữa, theo sáng chế, các bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra có thể được ngăn ngừa hoặc điều trị bằng cách sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) làm thành phần hoạt tính dùng cho động vật trừ người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh soi dưới kính hiển vi điện tử của thể thực khuẩn ΦCJ22 mới (KCCM11364P, sau đây gọi là “ΦCJ22”).

Fig.2 là kết quả điện di trong trường xung điện (pulsed field gel electrophoresis - PFGE) của thể thực khuẩn ΦCJ22.

Fig.3 thể hiện kết quả điện di trên gel natri dodecylsulfat-polyacrylamit (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE) của thể thực khuẩn ΦCJ22.

Fig.4 là hình thể hiện kết quả của thử nghiệm khả năng chịu axit của thể thực khuẩn ΦCJ22.

Fig.5 là hình thể hiện kết quả của thử nghiệm khả năng chịu nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ22.

Fig.6 là hình thể hiện kết quả của thử nghiệm khả năng chịu hạn của thể thực khuẩn ΦCJ22.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Những phần nội dung không được mô tả trong bản mô tả sáng chế này có thể được hiểu và suy luận đầy đủ bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này hoặc lĩnh vực tương tự, vì thế không được mô tả trong bản mô tả sáng chế này.

Theo một khía cạnh tổng quát, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens* (CP).

Đã biết rằng *Clostridium perfringens*, là loại vi khuẩn *bacillus* kỵ khí bắt buộc gram dương lớn, không có roi và tạo bào tử. *Clostridium perfringens*, là loại vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy hoặc các bệnh tương tự, cụ thể là ở vật nuôi như gà, lợn và các con vật tương tự, được coi là một trong những vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm gắn liền với ngành công nghiệp chăn nuôi, như trường hợp *Salmonella* gây ra bệnh thương hàn gà.

Thể thực khuẩn là một virus đặc hiệu vi khuẩn gây nhiễm cho một loại vi khuẩn cụ thể để ức chế và ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn và là dạng virus có vật liệu di truyền là axit deoxyribonucleic (ADN) sợi đơn hoặc sợi kép hoặc axit ribonucleic (ARN).

Thể thực khuẩn ΦCJ22 theo sáng chế là thể thực khuẩn có tính đặc hiệu theo loài gây nhiễm chọn lọc *Clostridium perfringens*, là thể thực khuẩn có vỏ cùng kích thước và đuôi không thu lại được, và về mặt hình thái thì thuộc loài Siphoviridae (Fig.1). Số liệu phân tích độ đồng nhất về mặt trình tự axit nucleic của thể thực khuẩn ΦCJ22 và các thể thực khuẩn được nêu ở bảng 1. Hoạt tính của thể thực khuẩn ΦCJ22 ổn định trong 2 giờ ở môi trường pH nằm trong khoảng từ pH=4 đến pH=9,8 (bền axit, xem Fig.4). ΦCJ22 duy trì hoạt tính của nó trong 2 giờ khi phơi nhiễm ở nhiệt độ 60°C (khả năng chịu nhiệt, xem Fig.5) và độ chuẩn của nó giảm khoảng 2 log sau khi làm khô (xem Fig.6). Trình tự axit nucleic của thể thực khuẩn ΦCJ22 giống với SEQ ID NO: 1.

Thể thực khuẩn ΦCJ22 là thể thực khuẩn mới được phân lập bởi các tác giả sáng chế, được lưu giữ ở Trung tâm Giống vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Hongjedong, Seodamun-gu, Seoul, Korea) với số lưu giữ là KCCM11364P ngày 30/1/2013.

Theo một khía cạnh tổng quát khác, sáng chế đề xuất chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 làm thành phần có hoạt tính. Theo một khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề xuất chất kháng sinh.

Do thể thực khuẩn ΦCJ22 có hoạt tính kháng khuẩn có khả năng tiêu diệt các đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens* nên thể thực khuẩn ΦCJ22 có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh do lây nhiễm *Clostridium perfringens* gây ra. Một ví dụ thích hợp về bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra có thể được điều trị bằng

cách sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ22, là viêm ruột hoại tử, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Bệnh hoại tử ruột là một trong số các bệnh viêm nhiễm chủ yếu do *Clostridium perfringens* gây ra, là một bệnh nhiễm khuẩn hay gặp nhất ở vật nuôi, cụ thể là gia cầm, gây ra các tổn thương đáng kể. Bệnh có thể gây ra ở gia cầm, đặc biệt là gà ở hầu hết các độ tuổi, nhưng chủ yếu là gây ra cho gà từ 2 đến 5 tuần tuổi ăn thức ăn trên sàn nuôi và cũng thường thấy ở gà từ 12 đến 16 tuần tuổi nuôi trong lồng.

Do *Clostridium perfringens* tăng sinh rất nhanh trong ruột non nên gây ra các triệu chứng của viêm ruột hoại tử và gây hoại tử màng nhày dạ dày ruột, bệnh tiêu chảy đột ngột và các triệu chứng tương tự. Ví dụ, ở lợn, trong trường hợp viêm ruột hoại tử rất cấp tính, sau 1 đến 2 ngày mắc bệnh đã gây tử vong và trong trường hợp bệnh viêm ruột hoại tử cấp, sau từ 2 đến 3 ngày mắc bệnh tiêu chảy ra máu có thể gây ra tử vong cho lợn. Hơn nữa, trong trường hợp bệnh viêm ruột hoại tử bán cấp, bệnh tiêu chảy (phân không có máu) diễn tiến trong từ 5 đến 7 ngày và gây ra ốm yếu, mất nước và trong trường hợp bệnh viêm ruột hoại tử mạn tính, gây ra bệnh tiêu chảy không liên tục và gây ra rối loạn tăng trưởng.

Thuật ngữ "ngăn ngừa" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ tất cả các hành động để cung cấp thể thực khuẩn ΦCJ22 và/hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22 cho động vật trừ người để ức chế bệnh hoặc làm chậm diễn tiến của bệnh tương ứng xuất hiện.

Thuật ngữ "điều trị" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ tất cả các hành động cung cấp thể thực khuẩn ΦCJ22 và/hoặc chế phẩm chứa thành phần có hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22 cho động vật trừ người, nhờ đó cho phép triệu chứng của bệnh gây ra bởi việc nhiễm khuẩn tương ứng tiến triển tốt hơn hoặc được giảm nhẹ.

Một ví dụ về bệnh viêm nhiễm gây ra do *Clostridium perfringens* trong đó thể thực khuẩn ΦCJ22 và/hoặc chế phẩm chứa thành phần có hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22 có thể được sử dụng là viêm ruột hoại tử, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Tốt hơn, nếu chế phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra theo sáng chế có thể chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 với hàm lượng từ 5×10^2 đến 5×10^{12} pfu/ml, tốt hơn nữa là từ 1×10^6 đến 1×10^{10} pfu/ml.

Chế phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens*

gây ra theo sáng chế có thể chứa thêm chất mang được dụng và được bào chế với chất mang để theo đó thành phẩm ở dạng thức ăn, thuốc, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia cho vào nước uống và các chế phẩm tương tự.

Thuật ngữ "chất mang được dụng" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây kích thích cơ thể sống hoặc ức chế hoạt chất sinh học và các đặc tính của chế phẩm được sử dụng.

Loại chất mang hữu dụng theo sáng chế không bị hạn chế cụ thể và chất mang bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó thường được sử dụng trong lĩnh vực này và được chấp nhận trong lĩnh vực dược phẩm. Một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về chất mang là muối thông thường, nước vô trùng, muối được đệm, dung dịch Ringer, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol và các dung dịch tương tự. Có thể sử dụng một hoặc nhiều hỗn hợp gồm ít nhất hai trong số các chất mang đã nêu.

Ngoài ra, nếu cần, chất phụ gia thông thường khác như chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm hãm vi khuẩn và/hoặc các chất tương tự có thể được bổ sung thêm vào và sử dụng, và chế phẩm có thể được bào chế ở dạng chế phẩm để tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch, nhũ tương và dạng khác tương tự, viên thuốc dẹt và tròn, viên nang, thuốc dạng hạt, viên nén hoặc các dạng bào chế tương tự bằng cách bổ sung chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất liên kết, chất làm trơn và các chất tương tự, và sau đó được sử dụng.

Phương pháp sử dụng chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra không bị hạn chế mà phương pháp bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn về phương pháp dùng này là sử dụng chế phẩm qua đường miệng hoặc sử dụng ngoài đường tiêu hóa.

Ví dụ không làm giới hạn về chế phẩm sử dụng qua đường miệng là viên ngậm, viên thuốc hình thoi, viên nén, hỗn dịch trong nước, hỗn dịch trong dầu, dạng bột, dạng hạt, nhũ tương, viên nang cứng, viên nang mềm, sirô, cốm ngọt hoặc các dạng tương tự.

Để bào chế chế phẩm theo sáng chế thành dạng viên nén, viên nang hoặc các dạng tương tự, chế phẩm có thể còn chứa chất liên kết như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza, gelatin; tá dược như dicanxi phosphat hoặc các chất tương tự; chất làm phân rã như tinh bột ngô, tinh bột khoai lang hoặc các chất tương tự; chất làm trơn như mage stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, sáp polyetylen glycol

hoặc các chất tương tự. Trong trường hợp bào chế viên nang, chế phẩm có thể chứa chất mang lỏng như dầu béo ngoài những chất nêu trên.

Đối với phương pháp dùng ngoài đường tiêu hóa, phương pháp dùng trong tĩnh mạch, phương pháp dùng trong màng bụng, phương pháp dùng trong cơ, phương pháp dùng dưới da, phương pháp dùng cục bộ hoặc các phương pháp dùng khác tương tự, có thể được sử dụng. Ngoài ra, phương pháp bôi hoặc xịt chế phẩm lên vị trí bị bệnh cũng có thể được sử dụng nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương pháp sử dụng nêu trên.

Một ví dụ về dạng bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm các chế phẩm tiêm để tiêm dưới da, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc các dạng tương tự; các chế phẩm ở dạng thuốc đạn, các chế phẩm dạng phun xịt như các chế phẩm phun mù có thể hít vào qua đường hô hấp hoặc các dạng thuốc tương tự, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các dạng thuốc này.

Để bào chế chế phẩm thành dạng chế phẩm tiêm, chế phẩm theo sáng chế có thể được trộn với chất làm ổn định hoặc đệm trong nước, theo đó điều chế ra dung dịch hoặc hỗn dịch, và sau đó, dung dịch hoặc hỗn dịch đã điều chế có thể được bào chế thành dạng liều đơn vị cho vào ống tiêm hoặc lọ.

Để bào chế chế phẩm thành dạng chế phẩm phun xịt như chế phẩm phun mù hoặc các dạng tương tự, có thể bổ sung chất đẩy, hoặc các chất tương tự, trộn cùng với chất phụ gia sao cho sản phẩm ngưng kết hoặc bột ẩm được phân tán trong nước có thể được sử dụng.

Cách sử dụng thích hợp, xịt hoặc liều sử dụng của chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như tuổi tác, thể trọng, giới tính, mức độ triệu chứng bệnh, loại thực phẩm, tốc độ bài tiết của động vật sử dụng chế phẩm hoặc các yếu tố khác tương tự, cũng như phương pháp bào chế chế phẩm, phương pháp sử dụng chế phẩm, thời gian và/hoặc đường dùng. Nói chung, bác sĩ thú y có kỹ năng thông thường trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định và kê đơn liều hiệu quả cho việc điều trị mong muốn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chất kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 làm thành phần có hoạt tính.

Thuật ngữ "kháng sinh" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chất có khả năng được cung cấp cho động vật bao gồm cả người ở dạng thuốc để tiêu diệt vi khuẩn và tương ứng với khái niệm chung chỉ chất bảo quản, chất tẩy rửa, và chất kháng khuẩn.

Kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 theo sáng chế làm thành phần có hoạt tính có tính đặc hiệu cao với *Clostridium perfringens* so với chất kháng sinh đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, do đó không diệt vi khuẩn có lợi mà chỉ tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh và không gây kháng thuốc, theo đó kháng sinh theo sáng chế có thể được cung cấp dưới dạng chất kháng sinh mới có vòng đời dài hơn so với kháng sinh đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chất phụ gia thức ăn chăn nuôi và chất phụ gia cho vào nước uống chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 làm thành phần có hoạt tính.

Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi và chất phụ gia cho vào nước uống theo sáng chế có thể được sử dụng theo cách mà thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 được tạo ra riêng biệt ở dạng chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia cho vào nước uống và sau đó trộn vào thức ăn thức uống hoặc nước uống, hoặc theo cách thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 được cho trực tiếp vào khi chuẩn bị thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống.

Thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 được sử dụng làm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia cho vào nước uống theo sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc dạng khô, và tốt hơn là ở dạng bột khô.

Phương pháp làm khô để tạo ra chất phụ gia thức ăn chăn nuôi và chất phụ gia cho vào nước uống theo sáng chế ở dạng bột khô không bị hạn chế, mà có thể sử dụng phương pháp bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về phương pháp làm khô là phương pháp làm khô tự nhiên trong không khí, phương pháp làm khô tự nhiên, phương pháp sấy phun, phương pháp đông khô và các phương pháp khác tương tự. Một trong số các phương pháp này có thể được sử dụng riêng biệt hoặc ít nhất hai phương pháp được sử dụng đồng thời với nhau.

Vi sinh vật không gây bệnh khác có thể được bổ sung thêm vào chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia cho vào nước uống. Một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về vi sinh vật có thể được bổ sung như vậy có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus* sp. có thể tạo ra proteaza, lipaza, và/hoặc các enzym chuyển hóa đường như *Bacillus subtilis* hoặc các vi khuẩn tương tự; *Lactobacillus* sp. có hoạt tính sinh lý và hoạt tính phân hủy chất hữu cơ ở các điều kiện kỵ khí như dạ dày bò; nấm mốc có tác dụng làm tăng trọng lượng vật nuôi và sản lượng sữa, làm tăng khả năng tiêu hóa thức ăn chăn nuôi như *Aspergillus oryzae* hoặc các loại tương tự; và các nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* hoặc các loại tương tự. Có thể sử dụng một hoặc một hỗn hợp gồm ít nhất hai vi

sinh vật trong số các vi sinh vật này.

Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia cho vào nước uống chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 theo sáng chế làm thành phần có hoạt tính có thể chứa thêm các chất phụ gia khác, nếu cần. Một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về chất phụ gia có thể được sử dụng là chất liên kết, chất nhũ hóa, chất bảo quản và các chất tương tự, được cho vào để tránh chất lượng của thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống bị giảm; các axit amin, các vitamin, enzym, probiotic, chất tạo mùi vị, các hợp chất nitơ không protein, các silicat, các chất đệm, chất tạo màu, các chất chiết, các oligosacarit và các chất tương tự, được bổ sung vào để làm tăng tính hữu dụng của thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống. Ngoài ra, chất phụ gia có thể chứa thêm chất trộn vào thức ăn chăn nuôi hoặc các chất tương tự. Có thể sử dụng một mình hoặc hỗn hợp của ít nhất hai trong số các chất phụ gia nêu trên.

Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể có mặt với hàm lượng từ 0,05 đến 10, tốt hơn là từ 0,1 đến 2 phần trọng lượng tính trên 100 phần trọng lượng của thức ăn chăn nuôi. Chất phụ gia cho vào nước uống có thể có mặt với hàm lượng từ 0,0001 đến 0,01, tốt hơn là từ 0,001 đến 0,005 phần trọng lượng tính trên 100 phần trọng lượng của nước uống. Hoạt tính của thể thực khuẩn ΦCJ22 kháng lại *Clostridium perfringens* có thể bộc lộ vừa đủ ở khoảng hàm lượng nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống được chế biến bằng cách bổ sung chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia bổ sung vào nước uống chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 làm thành phần có hoạt tính hoặc bổ sung trực tiếp thể thực khuẩn ΦCJ22.

Thức ăn chăn nuôi được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể mà có thể sử dụng loại thức ăn chăn nuôi bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc thực vật như hạt, rễ và quả, phụ phẩm của quá trình chế biến thực phẩm, các loại tảo, các chất xơ, các phụ phẩm của ngành dược, các loại chất béo, các loại tinh bột, các loại bầu bí, các sản phẩm phụ từ hạt và các loại thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc động vật như protein, các nguyên liệu vô cơ, các loại chất béo, các chất khoáng, các loại protein đơn bào, các động vật phù du hoặc các loại thực phẩm. Có thể sử dụng một hoặc hỗn hợp của ít nhất hai trong số các thức ăn chăn nuôi này.

Nước uống cho động vật được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể mà có thể sử dụng nước uống bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh tổng quát khác, sáng chế đề xuất chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 làm thành phần có hoạt tính. Dạng phối chế của chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch không bị giới hạn cụ thể mà chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch có thể được phối chế thành dạng chế phẩm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chất tẩy rửa có thể được phun xịt để loại bỏ *Clostridium perfringens* ra khỏi vùng mà động vật sinh sống, lò mổ, vùng dịch bệnh, thiết bị nấu nướng hoặc nơi nấu nướng hoặc các địa điểm tương tự, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các địa điểm này.

Chất làm sạch có thể được sử dụng để làm sạch bề mặt da hoặc các vị trí trên cơ thể động vật, Cụ thể, ở gia cầm hoặc lợn, đã bị phơi nhiễm hoặc sắp phơi nhiễm với *Clostridium perfringens*, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các động vật này.

Theo một khía cạnh tổng quát khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra bằng cách sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thành phần có hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22. Tốt hơn, nếu bệnh viêm nhiễm là bệnh viêm ruột hoại tử, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở bệnh này. Động vật đích để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh do *Clostridium perfringens* gây ra là gia cầm hoặc lợn, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Cụ thể, phương pháp ngăn ngừa và điều trị các bệnh viêm nhiễm theo sáng chế bao gồm việc sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thành phần có hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22 cho các động vật đích bị nhiễm *Clostridium perfringens* hoặc có nguy cơ nhiễm *Clostridium perfringens* từ người với liều cho hiệu quả về mặt dược lý. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ biết rõ khi nào được phẩm có thể sử dụng cho đối tượng mắc bệnh, tổng liều thích hợp trong ngày có thể được quyết định bởi bác sĩ điều trị hoặc bác sĩ thú trong nhận định có cơ sở về mặt y tế.

Liều cho hiệu quả về mặt dược lý của thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thành phần có hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22 cho động vật cụ thể có thể được xác định bằng cách xem xét thời gian sử dụng và đường sử dụng của thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ22, tốc độ bài tiết chế phẩm, khoảng thời gian điều trị hoặc các yếu tố khác, ngoài loại và mức độ đáp ứng mong muốn, độ tuổi, thể trọng, tình trạng khỏe tổng quát, giới tính hoặc chế độ ăn của cá thể tương ứng. Ngoài ra, liều cho hiệu quả về mặt dược lý có thể thay đổi nhiều phụ thuộc vào các nhiều yếu tố khác nhau như các thành phần của thuốc hoặc các chế phẩm khác sử dụng đồng thời hoặc riêng biệt và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y học.

Thể thực khuẩn ΦCJ22 theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa thành phần có hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22 có thể được sử dụng ở dạng dược phẩm (xịt mũi) cho động vật hoặc sử dụng theo cách cho trực tiếp vào thức ăn hoặc nước uống của động vật và sau đó cho động vật ăn thức ăn hoặc nước uống này. Ngoài ra, thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này có thể trộn vào thức ăn hoặc nước uống cho động vật ở dạng chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia cho vào nước uống và cho động vật sử dụng.

Đường sử dụng và phương pháp sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ22 theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa thành phần có hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22 không bị giới hạn mà có thể sử dụng đường sử dụng hoặc phương pháp sử dụng bất kỳ miễn là thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này có thể đi vào mô đích tương ứng. Nghĩa là, thể thực khuẩn ΦCJ22 hoặc chế phẩm chứa thành phần có hoạt tính là thể thực khuẩn ΦCJ22 có thể được sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa khác nhau. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về đường sử dụng là có thể sử dụng qua đường miệng, đường trực tràng, tại chỗ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, trong tĩnh mạch, dưới da và sử dụng qua đường mũi, xông hít hoặc các đường dùng khác tương tự.

Sau đây, sáng chế sẽ mô tả chi tiết thông qua phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, các ví dụ chỉ mang tính minh họa sáng chế mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phân lập thể thực khuẩn gây nhiễm *Clostridium perfringens*

Ví dụ 1-1

Sàng lọc thể thực khuẩn và phân lập thể thực khuẩn đơn

Sau khi 50ml mẫu phân lập từ mẫu phân động vật thu được từ trang trại Samwhaw Gps. Breeding Agri. Inc., là trang trại nuôi gà và lợn ở tỉnh nam Chungchong, mẫu này được cho vào ống ly tâm và được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi được lọc bằng bộ lọc 0,45μm để tạo ra dung dịch mẫu và sau đó thực hiện phương pháp phủ thạch mềm sử dụng dung dịch mẫu đã được chuẩn bị. Phương pháp phủ thạch mềm là phương pháp quan sát hoạt động ly giải của thể thực khuẩn bằng cách sử dụng các tế bào chủ sinh trưởng trên bề mặt thạch (được gắn vào môi trường rắn sử dụng thạch 0,7%).

Cụ thể, 18ml dịch lọc mẫu được trộn với 150 μ l dung dịch nuôi cấy lắc ($OD_{600}=2$) chứa *Clostridium perfringens*, (CP, BCCP 17-1) được phân lập ở Trung tâm kiểm dịch động-thực vật (Animal and Plant Quarantine Agency) và 2ml dịch chiết tim-não 10x (sau đây được gọi là môi trường 'BHI' (được chuẩn bị sao cho có thể tích cuối cùng là 1 lít) và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ. Sau đó, dung dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút và dịch nổi được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc cỡ 0,45 μ m.

Sau đó, sau khi dung dịch chứa 5ml thạch 0,7% (trọng lượng/thể tích) và 150 μ l dung dịch nuôi cấy lắc ($OD_{600}=2$) chứa *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1) được rót vào và để cho đặc lại trên đĩa BHI (BHI + 0,2% máu cừu), 10 μ l dung dịch lọc của môi trường mẫu được nhỏ giọt vào, sau đó nuôi cấy ở 30°C trong 18 giờ. Sau đó, xác nhận là có vết tan đã hình thành.

Sau khi dung dịch lọc của môi trường mẫu trong đó có xảy ra sự ly giải được pha loãng thích hợp và được trộn với 150 μ l dung dịch nuôi cấy lắc ($OD_{600}=2$) chứa *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1), thực hiện phương pháp phủ thạch mềm thu được các vết tan đơn. Do vết tan đơn được hình thành từ thể thực khuẩn đơn nên để tinh chế và phân lập riêng một thể thực khuẩn đơn, phải chọn vết tan đơn và cho vào 400 μ l dung dịch SM (NaCl (5,8g/l); MgSCVBhO (2g/l); Tris-Cl 1M (pH=7,5, 50ml); H₂O, pha chế sao cho thể tích cuối cùng là 1 lít) và để ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, sau đó tinh chế và phân lập thể thực khuẩn đơn.

Để có một lượng lớn thể thực khuẩn đã phân lập, 100 μ l dịch nổi của dung dịch chứa thể thực khuẩn đơn được lấy và trộn với 12ml thạch 0,7% và 500 μ l dung dịch nuôi cấy lắc chứa *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1), sau đó thực hiện phương pháp phủ thạch mềm trong môi trường LB có đường kính 150mm. Sau khi rót 15ml dung dịch SM vào đĩa trong đó quá trình ly giải đã hoàn thành, đĩa được lắc nhẹ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ, sau đó đưa thể thực khuẩn lên phần thạch bên trên. Dung dịch SM trong đó thể thực khuẩn đã được loại bỏ được thu lấy và cho cloroform vào đó với lượng 1% thể tích cuối cùng và được trộn thích hợp trong 10 phút, sau đó ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch nổi thu được được mô tả ở trên được lọc qua bộ lọc 0,45 μ m và bảo quản ở nhiệt độ lạnh.

Ví dụ 1-2

Nuôi cấy và tinh chế thể thực khuẩn trên quy mô lớn

Thể thực khuẩn đã chọn được nuôi cấy trên quy mô lớn bằng cách sử dụng *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1), và sau đó thể thực khuẩn này được tinh chế từ đó.

Cụ thể, dung dịch nuôi cấy lắc chứa *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1) 1% được chủng vào môi trường nuôi cấy lỏng để sản xuất lượng lớn và đồng thời, thể thực khuẩn được cho vào với hệ số bội nhiễm (multiplicity of infection-MOI) là 0,1, đồng thời với việc chủng *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1) theo đó thực hiện việc đồng lây nhiễm. Sau đó, thực hiện nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 30°C ở điều kiện kỵ khí.

Sau đó, ly tâm ở 4°C với tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút và sau đó dịch nổi được lọc bằng bộ lọc 0,45µl. Sau khi NaCl và polyetylen glycol (PEG) được bổ sung vào dịch nổi đã lọc để có nồng độ cuối cùng lần lượt là 1M và 10% (trọng lượng/thể tích) tương ứng và trộn với nhau, hỗn hợp này được để tiếp ở 4°C trong 8 giờ hoặc lâu hơn. Tiếp theo, sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút thì dịch nổi được loại bỏ và thu lấy kết tủa.

Kết tủa thu được được tái tạo huyền phù bằng cách sử dụng 5ml dung dịch SM và để ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Sau đó, dịch nổi được lọc bằng bộ lọc 0,45µm và thực hiện siêu ly tâm (35000 vòng/phút trong 1 giờ ở 4°C) bằng cách sử dụng phương pháp gradien nồng độ glyxerol (nồng độ glyxerol: 40%, 5%), sau đó tinh chế thể thực khuẩn ΦCJ22. Sau khi ΦCJ22 tinh khiết được tái tạo huyền phù bằng cách sử dụng 500µl dung dịch SM, thực hiện phép chuẩn độ.

Các tác giả sáng chế gọi thể thực khuẩn thu được bằng cách chiết mẫu từ phân có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens* là "thể thực khuẩn ΦCJ22" và lưu giữ thể thực khuẩn này tại Trung tâm giống vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms (361-221, Hongjedong, Seodamun-gu, Seoul, Korea) với số lưu trữ là KCCM11364P ngày 30/1/2013.

Ví dụ 2

Quan sát hình thái học của ΦCJ22

Thể thực khuẩn ΦCJ22 được pha loãng trong dung dịch gelatin 0,01% và sau đó được cố định bằng dung dịch glutaraldehyt 2,5%. Thể thực khuẩn đã được cố định được nhỏ giọt trên đĩa mica phủ cacbon (xấp xỉ 2,5x2,5 mm), giữ nguyên trong 10 phút và rửa bằng nước cất vô trùng. Màng cacbon được đặt lên lưới bằng đồng, nhuộm bằng uranyl axetat 4% trong thời gian từ 30 đến 60 giây, làm khô và kiểm tra bằng cách sử dụng kính

hiển vi điện tử chuyển đổi (JEM-1011, 80 kv, độ phóng đại từ 120000 đến 200000) (Fig.1).

Fig.1 thể hiện hình ảnh thu được bằng kính hiển vi điện tử của thể thực khuẩn ΦCJ22 và có thể thấy rằng do thể thực khuẩn này không có vỏ đẳng cự và đuôi co được nên về mặt hình thái học, thể thực khuẩn thuộc về loài *Siphoviridae*.

Ví dụ 3

Phân tích kích thước ADN hệ gen của ΦCJ22

ADN hệ gen được chiết từ thể thực khuẩn ΦCJ22 đã tinh chế bằng cách siêu ly tâm.

Cụ thể, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA, pH=8,0), proteinaza K, và natri dodecyl sulfat (SDS) được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 tinh khiết sao cho có nồng độ cuối cùng lần lượt là 20mM, 50μg/ml và 0,5% (trọng lượng/thể tích), và sau đó để ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ. Sau đó, một thể tích phenol (pH=8,0) tương đương được cho vào và khuấy, sau đó ly tâm ở nhiệt độ phòng với tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó thu lấy dịch nổi.

Dịch nổi được trộn với một thể tích PC (phenol: cloroform =1:1) tương đương và ly tâm ở nhiệt độ phòng và tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó thu lấy dịch nổi. Dịch nổi được trộn với một thể tích tương đương cloroform và ly tâm ở nhiệt độ phòng với tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó thu lấy dịch nổi. Sau đó dịch nổi thu được được trộn với 10% (thể tích) dung dịch natri axetat 3M và thể tích gấp đôi dung dịch etanol lạnh 95%, dựa trên tổng thể tích và để ở nhiệt độ -20°C trong 1 giờ. Sau đó, ly tâm ở nhiệt độ 0°C ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút và thu lấy kết tủa bằng cách loại bỏ dịch nổi. Sau đó, 50μl dung dịch đệm Tris-EDTA (TE) (pH=8,0) được cho vào để hòa tan kết tủa thu được. ADN đã chiết được pha loãng 10 lần và nồng độ được tính bằng phương pháp đo độ hấp phụ ở OD260.

Tiếp đó, 1 μg ADN được nạp lên gel agarosa 1% điện di trong trường xung điện (pulse-field gel electrophoresis-PFGE), và việc điện di được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ bằng cách sử dụng hệ BIORAD PFGE chương trình 7 (khoảng kích thước: 25-100 kb; khoảng thời gian thay đổi: 0,4 đến 2,0 giây, hình tuyến tính; điện áp xuôi: 180 V; điện áp ngược: 120 V) (Fig.2).

Fig.2 thể hiện hình ảnh điện di trong trường xung điện (pulsed field gel electrophoresis: PFGE) của ADN hệ gen của thể thực khuẩn ΦCJ22, và có thể xác nhận là

ADN hệ gen của thể thực khuẩn ΦCJ22 có kích thước khoảng 56kb.

Ví dụ 4

Phân tích mẫu protein của ΦCJ22

15μl dung dịch thể thực khuẩn ΦCJ22 tinh khiết (độ chuẩn 10^{10} pfu/ml) được trộn với 3μl dung dịch mẫu 5xSDS và gia nhiệt trong 5 phút. Protein tổng số của thể thực khuẩn ΦCJ22 được trải lên gel SDS-PAGE 15% và sau đó gel được nhuộm ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ bằng dung dịch nhuộm coomassie xanh (Fig.3).

Fig.3 là hình ảnh điện di thể hiện kết quả của phép SDS-PAGE được thực hiện cho thể thực khuẩn ΦCJ22 và đã quan sát thấy các protein chính có kích thước khoảng 40kDa, 51kDa, 53kDa, và 70kDa. Trên Fig.3, M là chất chuẩn để tính trọng lượng phân tử.

Ví dụ 5

Phân tích trình tự gen của QCJ22

Để xác nhận các đặc tính di truyền của thể thực khuẩn ΦCJ22 tinh khiết, AND của thể thực khuẩn ΦCJ22 được phân tích bằng cách sử dụng máy phân tích trình tự FLX titan (Roche), là một thiết bị phân tích gen. Các gen được ghép lại trên máy MacroGen INC, bằng cách sử dụng phần mềm ghép gen GS de novo (Roche). Phân tích trình tự khung đọc mở được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GeneMark.hmm, Glimmer v3.02 và FGENESB. Việc xác định khung đọc mở được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTP và InterProScan.

Trình tự hệ gen của thể thực khuẩn có rất nhiều điểm giống với trình tự hệ gen đã biết của thể thực khuẩn nhưng không có thể thực khuẩn nào giống hoàn toàn (100%) tất cả các phần với thể thực khuẩn theo sáng chế. Do đó, có thể khẳng định rằng thể thực khuẩn theo sáng chế là thể thực khuẩn mới phân lập.

Các số liệu phân tích về độ tương đồng của trình tự axit nucleic của thể thực khuẩn ΦCJ22 so với các thể thực khuẩn nêu trong bảng 1.

Bảng 1

Mã truy vấn				Đối tượng	Mức độ tương đồng		
Tên lệnh	Chiều dài	Bắt đầu	Kết thúc	Mô tả	Giá trị E	Bắt cặp/tổng số	Pct. (%)
contig00001_orf00003	441	31	384	Protein giả định (Aquifex aeolicus VF5)	2E-10	53/152	34
contig00001_orf00001	930	1	915	Protein miễn, họ SNF2 (Bryantella formatexigen DSM14469)	1E-31	101/315	32

contig00001_orf00011	324	37	306	Protein giả định ANACOL_03384 [Anaerotruncus colihominis DSM 17241]	7E-07	38/91	41
contig00001_orf00016	2868	2410	2859	Protein giả định AC3-2545 [Clostridium perfringens E str. JGS1987]	7E-55	103/150	68
contig00001_orf00013	213	1	207	Bacteriocin uviB homolog [Clostridium perfringens C str. JGS1495]	3E-22	47/69	68
contig00001_orf00012	1257	28	1254	Protein miễn N-axetylmuramoyl-L-analin amidaza [Clostridium perfringens C str. JGS1721]	1E-97	200/421	47
contig00001_orf00017	588	28	573	Protein giả định HMPREF9630_00205 [Eubacteriaceae bacterium CM2]	6E-16	54/184	29
contig00001_orf00010	1347	583	753	Protein giả định PCC7424_5514 [Cyanotheca sp. PCC 7424]	1E-05	31/57	54
contig00001_orf00014	150	1	135	Protein giả định CD_B2512 [Clostridium botulinum Ba4 str.657]	9E-12	33/45	73
contig00001_orf00021	987	1	960	Protein giả định 2016scaffold57_00038 [thực khuẩn không xác định được]	5E-41	109/328	33
contig00001_orf00022	702	7	417	ZkdP [Bacillus sp. JS]	8E-19	53/139	38
contig00001_orf00015	594	1	585	Protein giả định bảo toàn [Clostridium perfringens E str. JGS1987]	4E-25	72/198	36
contig00001_orf00018	1059	28	1047	Protein được lắp ghép trên bazo giả định; protein kỳ đầu PBXS giả định [Bacillus subtilis subsp.subtilis str.168]	4E-52	119/341	34
contig00001_orf00019	408	1	384	Yếu tố PBSX của protein giống thực khuẩn [Clostridium thermocellum ATCC 27405]	1E-14	48/128	37
contig00001_orf00033	405	16	402	Protein giả định RUMOB_E10156 [Ruminococcus obeum ATCC 29174]	5E-10	44/130	33
contig00001_orf00023	2562	25	1239	Protein do đuôi thực khuẩn, họ TP901 [Hepertosisphon aurantiacus DSM 785]	2E-88	193/410	47
contig00001_orf00031	534	43	522	Protein giả định B1NLA3EDRFT3746 [Bacillus sp. 1NLA3E]	1E-45	89/170	52
contig00001_orf00037	885	19	879	Protein thuộc họ tương tự protein F của thực khuẩn Mu [Geobacillus thermoglucosidans TIMO-09.020]	2E-50	114/304	37
contig00001_orf00026	432	10	420	Protein giả định RUMOB_E01063 [Ruminococcus obeum ATCC 29174]	8E-16	47/139	33
contig00001_orf00030	435	1	339	Protein giả định; PBSX giả định [Bacillus amyloliquefaciens XH7]	1E-07	37/116	31
contig00001_orf00035	921	10	882	Protein giả định bảo toàn [Bacillus cereus 03BB108]	4E-84	161/291	55
contig00001_orf00036	1260	1	1080	Protein giả định BSSC830350 [Bacillus subtilis subsp.subtilis str.SC_8]	9E-63	154/395	38
contig00001_orf00025	420	88	417	Protein giả định BSSC830350 [Bacillus subtilis subsp. Subtilis str. SC-8]	3E-13	40/111	36
contig00001_orf00032	363	13	336	Protein giả định B1NLA3EDRAFT_3747	8E-13	45/108	41
contig00001_orf00027	1332	1	1329	Protein vỏ đuôi thể thực khuẩn [Desulfosporosinus youngiae DSM 17734]	1E-63	169/449	37
contig00001_orf00039	1455	100	1452	Protein giả định bthr0004_54930 [Bacillus thuringiensis serovar sotto str. T04001]	5E-86	194/467	41
contig00001_orf00044	378	1	366	dCMP deaminase, dự đoán [Archeaoglobus fulgidus DSM 4304]	5E-23	61/134	45
contig00001_orf00038	1476	7	1458	Protein giả định RUMOB_E01050 [Ruminococcus obeum ATCC 29174]	1E-108	221/499	44
contig00001_orf00041	837	259	678	Terminaza thực khuẩn, dưới đơn vị nhỏ, họ PBSX [Clostridium botulinum Ba4str. 657]	2E-26	66/164	40
contig00001_orf00050	564	91	558	Protein giả định bảo toàn [Clostridium botulinum BKT015925]	3E-05	42/161	26

contig00001_orf00058	207	1	204	Protein giả định phi340_gp33 [thực khuẩn Clostridium phiCP340]	1E-12	32/68	47
contig00001_orf00057	363	34	294	Protein liên quan đến thực khuẩn dự đoán [Selenomonas ruminantium subsp. Lactilytica TAM6421]	4E-09	34/87	39
contig00001_orf00062	588	7	570	Thymidin kinaza [Clostridium butyricum E4 str. BoNT E BL5262]	2E-55	109/190	57
contig00001_orf00059	594	37	537	Protein giả định CbC4_4068 [Clostridium botulinum BKT015925]	5E-17	66/191	34
contig00001_orf00065	1974	133	1566	Primaza [Gordonia thực khuẩn GTE2]	3E-36	137/494	27
contig00001_orf00066	528	247	360	Protein giả định [Pelotomaculum thermopropionicum SI]	0,0003	17/38	44
contig00001_orf00073	762	358	756	Thymidylat synthaza [Clostridium acetobutylicum DSM1731]	8E-16	45/134	33
contig00001_orf00074	183	16	180	Protein giả định AC5_1713 [Clostridium perfringens CPE str. F4969]	6E-08	30/70	42
contig00001_orf00080	864	46	702	Gp089 [thực khuẩn Lactococcus KSV1]	2E-06	57/220	25
contig00001_orf00078	2442	226	2388	ADN polymeraza I [thực khuẩn Gordonia GTE2]	2E-97	265/756	35
contig00001_orf00079	930	7	888	Protein giả định [thực khuẩn Gordonia GTE2]	2E-12	77/324	23
contig00002_orf00001	366	40	321	Protein giả định BSSC8_16350 [Bacillus subtilis subsp. subtilis Str. SC_8]	2E-08	40/100	40
contig00001_orf00082	345	22	282	Protein giả định FAEPRAM212_01595 [Faecalibacterium prausnitzii M21/2]	3E-11	37/87	42

Trình tự hệ gen một phần của thể thực khuẩn ΦCJ22 giống với trình tự SEQ ID No: 1. Trình tự hệ gen được xác định bằng máy phân tích di truyền.

Ví dụ 6

Thử nghiệm độ ổn định của ΦCJ22 phụ thuộc vào độ pH

Để xác định độ ổn định của thể thực khuẩn ΦCJ22 trong môi trường có độ pH thấp, thử nghiệm về độ ổn định được thực hiện trong một khoảng pH rộng (pH= 4,0; 5,5; 6,4; 6,9; 7,4; 8,2; 9,0 và 9,8).

Để thử nghiệm, các dung dịch có độ pH khác nhau (đệm natri axetat (độ pH=4,0, pH=5,5 và 6,4), đệm natri phosphat (pH=6,9 và pH=7,4) và dung dịch Tris-HCl (độ pH=8,2; pH=9,0 và pH 9,8)) được pha chế ở nồng độ tương ứng là 0,2M.

Sau đó, 9μl dung dịch ở từng độ pH được trộn với 10μl thể thực khuẩn có độ chuẩn $1,0 \times 10^9$ pfu/ml sao cho nồng độ cuối cùng của từng dung dịch pH là 1M, mỗi dung dịch pH này được để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trong 1 giờ và 2 giờ. Sau đó, dung dịch phản ứng được pha loãng từng bước, 10μl dung dịch pha loãng ở mỗi bước được nhỏ từng giọt và nuôi cấy ở 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch mềm và chuẩn độ được đo dựa trên việc có hoặc không có dịch phân giải (Fig.4).

Fig.4 thể hiện kết quả của thử nghiệm khả năng chịu axit của thể thực khuẩn ΦCJ22. Như thể hiện trên Fig.4, có thể thấy là thể thực khuẩn ΦCJ22 không bị mất hoạt tính và ổn định đáng kể trong phạm vi độ pH từ 4,0 đến 9,8 trong thời gian 2 giờ.

Ví dụ 7

Thử nghiệm về độ ổn định của ΦCJ22 phụ thuộc vào nhiệt độ

Thử nghiệm để khẳng định độ ổn định với nhiệt trong quá trình bào chế thể thực khuẩn trong trường hợp sử dụng thể thực khuẩn làm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi trong số chế phẩm chứa thể thực khuẩn được tiến hành.

Cụ thể, 200μl dung dịch chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 có độ chuẩn $1,0 \times 10^8$ pfu/ml được để ở 60°C trong các khoảng thời gian là 0, 10, 30, 60 và 120 phút. Sau đó, dung dịch nêu trên được pha loãng theo bậc, 10μl mỗi dung dịch pha loãng được nhỏ giọt và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch mềm và độ chuẩn được đo dựa trên sự có mặt hoặc không có mặt của dịch ly giải (Fig.5).

Fig.5 thể hiện kết quả về khả năng chịu nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ22. Như nêu trên Fig.5, có thể thấy rõ là hoạt tính không bị giảm đáng kể khi thể thực khuẩn ΦCJ22 được phơi nhiễm ở 60°C trong 2 giờ.

Ví dụ 8

Thử nghiệm về độ ổn định của ΦCJ22 khi làm khô

Thử nghiệm để khẳng định độ ổn định trong điều kiện làm khô trong quá trình bào chế thể thực khuẩn khi sử dụng thể thực khuẩn làm chất phụ gia thức ăn chăn nuôi trong số các chế phẩm chứa thể thực khuẩn được tiến hành.

Cụ thể, 100μL dung dịch chứa thể thực khuẩn có độ chuẩn $1,0 \times 10^8$ pfu/ml được làm khô ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 120 phút bằng cách sử dụng máy cô chân không 5301(Eppendorf). Viên lắg thu được sau khi làm khô được cho vào và tái tạo huyền phù trong dung dịch SM với lượng bằng lượng dung dịch ban đầu ở nhiệt độ 4°C trong một ngày.

Sau đó, dung dịch nêu trên được pha loãng theo bậc, 10μl dung dịch pha loãng của mỗi bậc được nhỏ giọt và nuôi cấy ở 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch mềm và chuẩn độ được tính dựa trên sự có mặt hoặc không có mặt

của dịch ly giải (Fig.6).

Fig.6 thể hiện kết quả của phép thử khả năng chịu hạn của thể thực khuẩn ΦCJ22. Như nêu trên Fig.6, có thể thấy rằng thể thực khuẩn ΦCJ22 bị phân hủy khoảng 2 log sau khi làm khô.

Ví dụ 9

Sử dụng quang phổ để kiểm tra mức độ gây nhiễm của ΦCJ22 so với các chủng *Clostridium perfringens* kiểu đại

Thể thực khuẩn ΦCJ22 có hoặc không có hoạt tính ly giải đều được thử nghiệm trên 45 chủng kiểu đại *Clostridium perfringens* được phân lập từ Trung tâm kiểm định động thực vật (Animal and Plant Quarantine Agency) và trường đại học Kunkuk ngoài chủng *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1) được sử dụng trong thử nghiệm.

Cụ thể, 10μl dung dịch chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 có độ chuẩn 1,0 x 10¹⁰ pfu/μl và được trộn với 150μl dung dịch môi trường lắc (OD₆₀₀ = 2) chứa từng chủng trong số các chủng được cho vào và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch mềm. Sau đó, quan sát xem có hoặc không có vết tan được tạo thành. Kết quả của thử nghiệm này là, trong số 45 chủng *Clostridium perfringens* kiểu đại thì có 42 chủng bị nhiễm, như vậy tỷ lệ nhiễm vào khoảng 93,3% và tỉ lệ ly giải là khoảng 75,6%. Kết quả được nêu trong các bảng 2 và 3.

Bảng 2

Nguồn gốc <i>Clostridium perfringens</i>	Chủng <i>Clostridium perfringens</i>	Nhiễm
Trường đại học Kunkuk	HLYS-1	-
	HLYS-3	++
	JSH-1	+
	KCCCM 409471	+++
	KJW-2	+++
	OYS-2	-
	KCCM 12098	++

Bảng 3

Nguồn gốc <i>Clostridium perfringens</i>	Chủng <i>Clostridium perfringens</i>	Nhiễm	Chủng <i>Clostridium perfringens</i>	Nhiễm
Trung tâm kiểm định động thực vật	CP-KJW-1	+++	BCCP43-1	+/-
	CP-JSH-1	+++	BCCP44-3	+

(Animal and Plant Quarantine Agency)	CP-OYS-2	+++	BCCP47-2	+++
	CP-BC-1	+++	BCCP48-3	+++
	CP-BSW-4	+++	BCCP50-1-3	+/-
	CP-HBM-2	+++	BCCP50-1-8	+/-
	CP-HL	+++	BCCP51-1-1	+++
	CP-KW-1	+++	BCCP51-1-5	+++
	CP-BS-1	-	BCCP52-2-8	+++
	CP-HL-1	+++	BCCP53-2-3	+++
	CP-LJN-1	+++	BCCP54-3-8	+++
	BCCP17-1	+++	BCCP55-3-1	+++
	BCCP23-4	+++	SBCCP429-2	+++
	BCCP37-2	+++	SBCCP321	+++
	BCCP38-1	+++	SBCCP343	+++
	BCCP39-1	+++	SBCCP361	+++
	BCCP40-1	+/-	ELCCP Suksan Kim	++
	BCCP41-3	+++	ELCCP6-1 ruột	+/-
	BCCP42-2	+++	ELCCP6-1 phụ lục	+

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) có hoạt tính diệt vi khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*, trong đó trình tự axit nucleic của thể thực khuẩn ΦCJ22 này là SEQ ID NO: 1.
2. Chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh viêm nhiễm do *Clostridium perfringens* gây ra, trong đó chế phẩm này chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó bệnh viêm nhiễm nêu trên là bệnh viêm ruột hoại tử.
4. Chất kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
5. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
6. Chất tẩy rửa chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
7. Chất phụ gia bổ sung vào nước uống chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
8. Chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ22 (KCCM11364P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Thể thực khuẩn, chế phẩm, chất kháng sinh, chất tẩy rửa, chất làm sạch, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi và chất phụ gia bổ sung vào nước uống chứa thể thực khuẩn này

<130> P13-5112

<150> KR 13/021500

<151> 2013-02-27

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 52133

<212> ADN

<213> một phần của ADN của thể thực khuẩn CJ22

<400> 1

ataaaattat gaactcaaat attctaggag ttaattggaa acagtttgaa gatgacttta	60
taatcaaagg aggttatatg aactatgaaa ttgtggggta taagaatgag gaaatattaa	120
agaaccttat gcaccagaat tgctatatag taagaataga agattgtatt gatttaccag	180
aacaacttcc tgatctgtat ttaacctgtg aattaaatag taaagccaga aaggcctata	240
atgaccttag aaaggaaatg atagcacaac tagatatagt acaggaaaac attcctagga	300
agcaattaa ggccttatta aggtctaag gtatacccta tgagagtaat gagccctatg	360
aggatttatt ctaagggtc aatatgttta tcaaccaatt aacagctgat ctactatta	420
cccaatattt gaggctacag cagatctcag gaggatttat tacaacaat gtaggaaata	480
gtattaatat tgataaaggc aaattaggct tgttacagga ctatctagaa ggatataaaa	540
agcctgttgt tgtaatatgt aattttcttg aggaataaaa acttatacat gatactttta	600
aaaagacca cagagtagaa tgcttaacag gatctactaa gaatagagct gagatcaata	660
aggattttca ggagggcaag attgacatat taactacta aataagttca ggtagtgttg	720
gtctaaacct cttcagggcc tcaagggtta tattctatag ttggaactat aaatatgatg	780

attatgtgca agctattgcc agaatacaaaa ggaatgggtca aaaggagcct tggcaaataa	840
tacacttaat aactgagaat actattgatg agaaaatatt aaaatcaata cagcttaaaa	900
gggatagagc agaaaaactg ttgactattg ataagtaatg tggtaatata gaattgaggt	960
gataagtaat gagaaaagaa caacctagaa taagtaatca tactgaaata gctaaagctt	1020
taattgaggc tggtaaaact attaaagccc taaccaagat taaagtcaag gaggaaaaga	1080
aaaaacaaaaa gggacttgaa aggtaagac tcctaaatga ggaaaagaag aaggagagag	1140
aattaatgaa agaatttaat cctaagagc ccaagaagcc aagaaagaaa aaggacaaaac	1200
ctataaagaa ggttgatctg aataaagttg aggccaaagg agattaccct actactccgg	1260
gaagtaatgc acccatggga acagttgatt taaaatcttt atgtgagtca ttaggattag	1320
atccaagtaa agccagagcc aagctaagaa agcaaggggt aaacaaacc tataaatggt	1380
caggatctga actgaggat attaagaaaa tgtaaaaata aggggaggtt taaaaacctc	1440
ttcttttcg ttgacaatat ccacagtata tggtaatata aatattgtaa tcaaacaaaa	1500
aggagagaac tgaatatgaa agatcttgaa aaacttaca gggaagaatt gattgaactt	1560
gtaaaggagt tatctattga ttggacagga gcctataata gaaactataa gattgacctt	1620
gatgagtatg agattgtata tattgatctt aatgatctaa aagagttcaa tgataaatta	1680
ggatcatctag aaggagatgt gtatatataa tacactgtaa atcttattaa ggccattta	1740
catcctgaga aggatatatt gattagatgg ggtgggtgatg agtttgtagt tatcagtgat	1800
atagcttata atctgtgcaa taccttgaac atataccctg agttatcatg tggctatggt	1860
aaaggtaaaa ctattgaaga agctatagta caggccgact caatgatgta taagaataaa	1920
aaatctaaga agttaagata ctcaaaggag gattagttat tatgaggta ttatggtaa	1980
aagagtattt ggatatatgc aatatcttgg gtattgagcc cacaatggaa gcttgtgcta	2040
ggtggggaaa gaataaaaaa ttatcagggt ttcatthaac ccccgtagga gcaactaaat	2100
agttgcttct tttaaagcg atccgatacc tagcaacttt catgccaaaa agaaattcgg	2160
gattttctt gacatagact ccagagtctg gtataataat cttgtaaaca aaattaattc	2220
aaaggagttg ttaattatga ataacaaaaa atttcaagaa actttagaac aattaaagga	2280

ggaactagaa atacaagggg tagaatttaa tgatgagaat gacttaatag ctgctgttga	2340
atacatcata gaatatgatt accaccaga acaatatgtg gaagatactt tatgtaacta	2400
ccctgaaatg ttcaaggatc tataaaacta aggaggtgta aaaacctcct tttttattt	2460
ttcgaaaaaa tctggattta atcgttgaca ggatcgggac tatctagtat aataatattg	2520
taatcaaaat taattgaagg agatgttaac tatggaacta acaagatcag aaaaacttaa	2580
tgtaataaag ggaattgctc aaaaggctat ggataataaa atctatccac aatttagaaa	2640
agaactagat aaacaggtaa aatcctttgg actaagcaac aaagttaggg aaagtgaatt	2700
aggagactac ctttctgtc gcatggttg ctagaggag gttatcctaa aaatgaaaaa	2760
agcccattaa taggggtggc caaaaggcca tctattttt tcgaaaaaaa tctccagaat	2820
ctcgttgaca tagtctgggc cctctggtat aataatattg taatcaatat taattaattc	2880
ttaggaggaa tgaaaaatga ctaaattaga aatgttaaat gagatagaaa aaataaataa	2940
ggtggtttt gaaaagaact tcaaaaaaca attcttggat aaggatagat aactactaca	3000
acaaatggga gtaactaaat attatgtatg taaatatcat aaaaaagctg agattgaaaa	3060
atatcttgat gcttgcattc gtgcaatata tgatatagga agaagggatg atctaggagg	3120
gtaaaacccc atccttttt ttcttgaag ttttcgttg acagatccag agttctctat	3180
tataattaaa tcataaatta actattggag gtaaacaaaa tgagagatat gatagaaaat	3240
caattagctg aatatgaagt aaaggagtta tacaatgagg ccacaatgat cttaggaaaa	3300
gcatttggtg taagtgtgtg tgatctttat atagaatctg atgtggatgc taactactat	3360
ggtctatgcc atagatcagg taataaattt actgggatta caattaatct tttcccttc	3420
aggtttgac aggaaggaga aaaagcttat gataagatca aaaaatttgg ctgggatatt	3480
aaggactgtg ttcttgaaac tatatgcat gaattggctc acttaactta ttggtcacat	3540
agtcctttac ataaaaaatt aactagtctt tattacaaca aagtacaaca ggctagaaag	3600
ggtgagaact cagctgtagc tcaaactaga agtgatatat acactttaa agatctatgt	3660
gaattgatag aactagatcc aaggaaagcc agaagtatat taagaaagaa caatattgag	3720
aaaccaggta aacaatggga atgggagcaa ggtatgccta aagatatata tgatctatta	3780

ataaacctaa aagttagggg aagaaaataa tttcttctcc ctctttttc gttgacatat	3840
ctcgagagtg ctggtataat tatattaaca aataacttag gaggtaaatc acatgataga	3900
tatatattac agtattcaag tagaagctga aaatttcttt ggttgtcaaa aggaagatgg	3960
aagctgggta gcaacggggg catttagtat accagttaac agcataacct ttgaagaggc	4020
tgacaaatta tctaagagg ctatagatgg atggctaaag gaatatgagg ttactagggt	4080
aattagtaga agatcacatt cacagggttaa gctagattgg tataacagtt atatcaagga	4140
tgaccatta aagggtgata taattaatat ggtatatact gatctttctg ataaggctaa	4200
aattaaatat ggttttgta agatatgggc tagcactatg tcaaagggtg ctaagaaagg	4260
tttacttaa acttgcccta gatgtggagg cactggccat tactcaagaa cctcagatgg	4320
taacactact tgctttaa atgtaacggctt taaatatgtg ataccaacta agatctcaa	4380
gaaattttat aaatctgtgg agaaaacctt tgacatctct ggcaataact cttataataa	4440
actgttaa acaaaacaaag aggagatgtt aaatatgaac ttaactgcaa tggaaataaa	4500
gatattaaat gctatgagaa agaataaatt tgatgacgga ctatagttg actgtgtatg	4560
ggtattctca gtaatagaaa actcaggtat agaaggaact aaggctagag gtgtgatctc	4620
atcactgtt aaaaagggtt tagtatttgc tgatggagag gtaatagggt acacagaaga	4680
aggaagaagg gtctttgata atgctgatgg agaagaatgt aactggggag gtccaaaatt	4740
attaaaagaa atccctgaca aaccagagga aatctcttat aatgaaaatg tagataaaac	4800
aaataagaaa gaagaggtaa atgatatgaa agatttaa actatgaaag ctgttgaaat	4860
taaagaatta gcaaaggagt taaaagttaa aaactggtgg actatgaaaa aggctgatct	4920
aatagctgct atccaacaaa tccaacaacc acaagaagaa aaagttgaag aggtacaaca	4980
accagctgaa cctgaagaaa aggctgaaca aactaaaatt actcttgatc taacagatgt	5040
taaggaacca gagaaaaaag ctgaaccaa aactaaggaa ggtaagtca cattaaaaat	5100
gatactgaa gaattaaata tgaatggtaa aaaggcaaga agaactctaa gaaacaaaga	5160
agttgtaaaa ccaggaaagc aatgggaatg ggataatgaa gaagaattta aaaagggtta	5220
ggacctaact tctaaataaa gtaggcccaa cctctatccc ctattgattt acaggaggat	5280

ctgattttct cttatccatt aactgcttcc atacttgatt accaaaggaa gctacagctg	5340
cacatattaa accctgtata aagccattca aaaaggctct ggctgtaaaa cctaattcta	5400
attgaattgc catatataag attgataatg atatactgaa tatcaaaagt attaattgta	5460
tagaccaatc tggatatataa ggcttagcct tgataaacag acctaacag taacatgata	5520
caatgattat taaaagctgt ggatcaatgt aattgaatat taagtttact aaattttctt	5580
ccatgataaa taccacctaa attatctcta catattttga acttacataa ccttgcttct	5640
taccgtggct agtattatat tctatatgat accaaccatt cttactccc aatatagtaa	5700
ctctctcatt actaaatact gagcctatta tattaccatt cacatcatct cttacattaa	5760
gagaagtgtt aactttaact attccttgtt taacatctc atagaatttc tggctttgct	5820
cacctcgtg gcgaacgtat ccatcagatg gaggaccatc cttctataa aatgttattc	5880
ttaaccagcc attagttcta tacattgggc tagcctttg accaggctgt agttctcat	5940
tatgatcttt gatgttaacg tcttcagggt tccaccacac ataagttact ccattgtcat	6000
ttgatattt catgtggtag tcaaaactta atctactata atgtttata tctatatagg	6060
catgataatt gctgttctt ccagggtata taacttcaat atattttcta gaaggatata	6120
tccaaggac aaataaatta tctagactat caatatatct acctggaatt ggtttgcaat	6180
cctcatctag gacttctatt gaaccttcc ccaccaaagt ggcattagtt cttgtttctg	6240
aacttcata aaatccctta ggggcctcag gtaagcttg ggtattatca taatccctg	6300
agccagatcc ttctgacca gttagtcctt tacatatagc agcagctata gcactaggat	6360
ttaataaatt acaatcctc tgacttgata caaagccaca ttcaactaat atagccggtg	6420
cattagtata ttaagtacc gctaggtcat aacctaaata ttctctagca actcttatac	6480
ctctgttata atatccaagc ttagcaagtt caactaatac tctcttagcc attgttcag	6540
cttctccacc tctagcatga attagacct caacaccatg agctgatga tcttactag	6600
aatttaaag taatgataca aaaccatcca ctccagcatt attagcagta ttatatctat	6660
gtgctaaact agcatctaga gaaggggcag aatcagtagt acaattaacc acctatcac	6720
caacagactc taaatcgctg attagagctt tacctattt tctatctca atttgctcag	6780

ttactatacc tgaagcccca gtatctgctc cggataatgt gtgccccata tcaattcccc	6840
ataatttact cataaaaata catctccttt aaatattata gtgttttatt aggctgaga	6900
ggctcgctac agcattttaa ccacctcctt aatatatttt cttatataaa acctaacagg	6960
tcttaaatga cctgctaggc ttataattta accttggtta ctaaataagg gatctttat	7020
agtatctaca tcttccttta tctctcaac tacgttgaat ttatcaacta gcttatctat	7080
cacttgattt aatttattct ctcttctct agcctctttt ctagtgtcat ataatagcca	7140
tacaaataga ctacaaaaga taccttggtt aagaactga gttagtagtt cttttccat	7200
agattacacc ctttcattaa agtcttcacc acatattctt tttagtcct ctggtgtaat	7260
ttctcctct ggattagaag agcattttac tgcctgatgt aattgtcct tacctattgc	7320
tccaattcta taagccattt ccagaaatt cataatctct acctccttat ttattcatca	7380
atttaatttt tatatcagct agttctgtg tttagtactt cattatggct ttggtttgca	7440
ttagctctaa tttagtatta gcaagagcct gagcttgata actaactaat ttattaatat	7500
ctaggggatt aggatctata gcctcatagg aagtaaatag gtccttatcc ttatgctat	7560
ataagtctga tctttctta ttatatcaa acttggtagg ttctccttt atgtgggtcaa	7620
ataaacttac agtcatttgt ataaccggaa ggatatctag gtcaataacc tcagtgttat	7680
ccacaaaggc taaatgcctt tgtgaattat gaggtatatg gagacatata atatcttcga	7740
tattatttaa tatctacta cctctctgt agtatagtg ctctggctta ttaattagg	7800
ctaataattt agtaacttct tcatggtctt tatctataaa tggttttaca tctctgagt	7860
cttctgcctg atttatcagc atttctttt catcatcata gaataaagg tctataacct	7920
tattagtttc cacagaataa ttaaactcta ctattctcat gttttatcaa ctctttact	7980
cagtagctaa gtaggttagt attatttgag ttggtttacc agctaccatt tgataacatc	8040
caccatttag gtatgagtta gtccaatggt caatagtaca ataaccagag gtattattgg	8100
aagcgtcatt atagttatgt gatactagag atattggtaa tacccaactc caagccttag	8160
ggaaatgtat agtatagctt acacctccac ctgagttagc atagcctgtc ttaactattt	8220
gacgaactaa ccttacacct ccaccaagt ggaataacct agtactgtct ccattatccc	8280

aatagtctcc ttagctaca gatttattag ctacctggag gtcttgaaca ttctcagtgg	8340
ctagtattct accctcctgt ttataccaaa atcttccgtc ttctggacca ccataccagt	8400
catttattct catatatattt ctagccccta ggttttcagc tgatagagcc ttatccacat	8460
ctagggatcc ctctccagcg gttatcctca tatcaaaatc ttattactg ccttttaggt	8520
ggaagtctat aatatgccct acttcataa ccccatcatt accaatatta ggtaccctt	8580
gagttccttt actagagtca tatataccca tattagctag ctgttactg ttggcagctg	8640
tagcagtttt acctaagtaa gcattatcat ggttatgggt agaagaggct gctcctatct	8700
cagagggagt gggtttatta tttgatgat aaattaaact cccactataa gctaatacac	8760
catcatccct taactgtaaa aatttattag actttttatt ttggaaatat acatctgttc	8820
cccctactcc acataataaa gctctcatat tatcatccct aagactagct aaggtagcta	8880
ctacatttac atttactaat tgatccactg taagtttgcc ttcaataacc ccgtcacctt	8940
ccttagctat agcccctatt tottgagggtg taggcttatt atcttcatga tagatcttct	9000
tattgttctt attaacaata tctaaagagt ctatctttac aggccttcca gcatacccta	9060
tatggacttt attatctgca tctatataga tcacatagtc atcactgcct tctttagttc	9120
tacagctaaa tccatagttg tgcgccccta taaatttctg acctggcctc ataattagat	9180
gacctgataa ttctccaccc gtagtaggta gggcccctat ttctggggga gttggtttgt	9240
ttgtttact atatatttca gcccaattcg tccatccagt accctccatg tttgtagctg	9300
ttctagtaaa aactcctcca ccatctgcaa agaacattg agaagcccag tgcctgtat	9360
tccaggataa aacaatcaat ctcccactcg ctagagttgg ggcatttttt tcaatagaat	9420
ttctaactgt agaataaata cccccctcg taatggtgtt tagatctaca ccctctagtc	9480
tttggtctgt ttatcccag gccctatat cagcgggagt aggtctgtta ttctcatcat	9540
aaacctttac ccaatcagac caggtgttcc cattataaaa ccctctagta taggtaatac	9600
ccttaccatt tggagggtatt gttttaaacc tctgtactac ccaatcgggg ctatacctaa	9660
taactccat aattgatata ccctgagaag gagcatttgc catgttttta taccactat	9720
atattccagg tattttaata ttatttaagt cagtatcatt catgtctaaa tatgcagaat	9780

aagcaccaat ttcttcagga gtaggcttat tggcactatc ataggcctta tgccactttc	9840
cccatgtgtt actctcatat acatagttcc taatatatcg agtgatagta tcgctaggat	9900
atagattaat aaactcctgt tgaacacctat tcttaccatc acctaaacct gtatttctaa	9960
gaataaatac cctagcactc ccctgggcca gtgttcctc ggggtgtattt ttaaaatcac	10020
cattccccgt atcaaaggag cagaaggagt ttctgtctt aaaggaatta caatccctat	10080
ccacaggtac atcgacctt tggatcacat ccacttggc agcttttgg ttacttgg	10140
ttgtaaaact agtgtcttc tcaaataata gatctaact ttttagcaca tctcagggg	10200
ctaggttata gtcaggtact acattacctc tagctaataa ggtatttaac accttaatg	10260
atgtgctga ggtgcaccc tgtaccacaa attgtattt agtatccgta gctccagagg	10320
gaatactaaa cttatgagtt ttaatttgt acccattact ctgtgggtga ctacctgct	10380
ttacaatact cttatattgt tgacctccac tagtagtgta agccagttta atctcatagc	10440
tggtaaaact accctcaata tcttctaaga aggctaatac gtaatcacta ttgggttcta	10500
taggcagagt ttaatctca agagtttgg gacctgtga cataccagac catttaaac	10560
ctcgtctctt agttggagta tctgtaatag gtgtgatatt accaggacca gtataagact	10620
cagagttgta ccactcaagc ctattaatag taccaaccct taaagcatct agcctatcct	10680
cattagactt agacttctt tctacctcag tcattttctg ttatgttctg gcagcgaagt	10740
tctcaatgtt ttattgtcc ttgtaaaat cattcattt tggcttatct gtaactccc	10800
acttatftaa acctagagta ggagttttac cagtacttg cattttgcat acctcctta	10860
ttcagttata gcatattctt cccattttc ccaggtaagg tctagactgt cccactgct	10920
ccacatataa tcatacctat cgaacatctc ccaagtaata taaagtaata taatttgata	10980
tattaaatga gcaggcattc ttctctgaa tactcttct agagccttta ggtaggtgg	11040
taccctgggt aggtcagtaa agctaattt gatcttact tctcagcta tgaactctac	11100
ctttacctt ccacctgat aggccttagt aagattttg atagatgtac tattaaactt	11160
ttccaagca gatagaacta ctgtaataat agctctttc tcttggtcag ttggtgggta	11220
atcaaagtat ttatataatt caagatcagt gaaaaatctt tctagacctt ccttaggagt	11280

ggctctggga tccacatagt cttgtaattc ctgtccctta gtatatagct tctgaagttc	11340
agtagccata atagtgttta ctaagttatc agcctctttt atattatcat aaaattcagg	11400
aacgtacaat agtaattctt ttgaacctg ttctagacta tacataagtt accaccacct	11460
cagtaatggt tggatttga ttagcaggaa tagttaaaga ttgactactc ccattaagtg	11520
taatggttgt ataattctt actccctcaa tatttaaaag catagcccct attctattta	11580
tagataggct agtaatttta aatacttgac tatttagaaa ttcttctagt tctttctga	11640
agtttaattt tattgttct tctgtaactg aactcaattt ctttaactga gctcttacag	11700
tgatattaaa gggttgagct gactcaacag taaaaacaca tcttatagga gctttacctt	11760
cacctaaacc ttcttgccct ggatccatgt attcttgaac ttattaact aattcaggat	11820
tggcaggctt atttcaact gtggttataa tacctttagc agtatttata ccattccaac	11880
aggaagaac cacagcttta cctactccag ctacactttt acaccaatca gtttaactgtt	11940
gaacatttcc atctcccgat gggtgtatag tggctttggt agctctttct ctttaactcat	12000
catctgtctc ttgatctcta ccaataacaa gtatatctcc catagtagca ctcttaagtt	12060
ctgctatagc attgataggg attagatgtg tacctgttga taccttattg ggtcctgaac	12120
ctaaggcttc acattcaata atattaggct ctatcacttg ccagaaataa tctctcctt	12180
ggaatcttga accaaccatcg gggtcatagc caacaaattt agctgacctt ctacacttag	12240
ttggaattat tctggatctc cctacattgg cagctctctc atctaagaac ttacctgtag	12300
cagtacttag aaatactgag tctaataatt gattaacatt aacagcataa aactcagcta	12360
gcttaacagc aaaaaccata gccatatcat aggtgaaact tccagttcta gtgtcaatat	12420
catcagggga taggcctatc atttcttcta ataattcttt atgtgttcgg gagaataaat	12480
cttcagaaaa tcccattata tcacccttc cagttttgta tctccatata tggattttat	12540
ccatacttca atatatacat tcttaccttg cacattatac tttagatcag ttactttagt	12600
cactctatca tcttctaaga gacattcagg gatagcccta ttaatctcca ttcaagaag	12660
ttcaggagtt actagagagt cattaatcaa agctctaata tcacaacct aagaagtatc	12720
ttgataaatc atataggcat ttttaggagt tattaatctt ttatataaag attgttttaa	12780

ggcctcaaga ccatccacat tatcataaat cctattaaga tctagatcca gttttaggt	12840
cttgggtattc tccattgttt tctcatcaac tataagggta tctttaagc cattaggtag	12900
cattatatca acctcctaag atccctaaca taaaatatct ttgtccatca tcatagggca	12960
taaggtaaac agtatcacc tcactaatag actcaatatg ttttgaaca tctataatat	13020
ttccagatag tactaatttc ctattgtgaa gacactcaca ttttataggg ctggtactaa	13080
gtactttagc tctataaata tttagagggg tagacatatt actatatact tgttttacac	13140
aatctaataa attattagcc attaaatatc accctcctca gtacatttaa gttttaagtt	13200
catggtgtag tcagtatcga atttatgagt atcagactca atgtagaaag ccttattaat	13260
ttttaaagt ggtatactaa ctacaatggc ttaccacta atacagtcag gtacacctat	13320
aacagttata gaaatatccg ttttaggtct ctacctgtt tctagcttta ttctagcctt	13380
ctcatttaat tgggcttggg ttagttcatc actgatagta tcgtataatt gaaatacacc	13440
atatttcttt tggctgctat catctttagc agaggcaaat aaagtaatct cgggatcatc	13500
ttaccctta ccctgtttat attacatac tagctttacc tgggtgacaa tactatcaaa	13560
gtttctactt ctgaaaaag ttccaatatt ttaccatat tcgaatttc acaattcttt	13620
agtgggtctt cgggttataa aatcaaactt acctgtaata gaattataat aaatataaaa	13680
ctgttctcca gttgttcat aaacctcttt tattaccttc ttcataatat cataggggagt	13740
ttgtttctca cactactaac tagagaaagt atatccagtt ttagctacta ctccaggggc	13800
aaccccaaag gctttacata atgactcaaa tatagcttcg ccagtttgat tttcgaatac	13860
aaaactatct ttattattag cccaataaat catagggtca taagctttaa cttaagtaa	13920
atgcttttc tcattatctg agatattcat aataatacca ttaaagatat tcttaccctc	13980
atggactagt actacctgat ctccatcata aattggatgt atatcttgag cattatattg	14040
gaatgatagg gtacgagggg cagatgaaga agacctgcc caactcttac cactggaggt	14100
atttgaata tcaaaggatt tatctccttg taccacaatt aattgcatat tataacctcc	14160
ttatataatc accagaactc caaccttcct tataatctga accattatct aatttatact	14220
ttacataatg ccatccattt tgagacctta atactgtaaa gtgttcatta ggccatatct	14280

tacccttagt aggattattg ataccaggtc cagttcttac ccatagccat gagtaaaca	14340
tagtagtagt agctgcccac gggtgagtag ctccagaaga actaccacct gtattaccac	14400
tataggctag ttaggtttt ggaattgtga aactaactga ttaacctca ggcttctat	14460
actcagttag tttattttt actgaagag taccaatc tccaccttc tcagtatatg	14520
agatattatc aatagtaact aatagggtta tatcagtact agtaatagta aatcttactg	14580
gatctttacc catttcaata agtttagcat aacttactcg ggggtctgca atatcagtat	14640
actcacatcc atcgtagtag gagcttggtg actcaaaatt aaaagaaaaa gattttagct	14700
tagggtctcc tatgaaagag agttccccta agccttcaat ggaaactgta ctattatctc	14760
tactatcaga gatatttata tcagtgggat ttactggtta cctaaacctg gtatctccct	14820
gtattaacca gaattgatat ttactatgca aggtccagat cacctccctc gaacatttcc	14880
tgatttaaca ttccacaat aaatctgtat actctcatta attcacttcc tgagattgtt	14940
ccatcttcag cctgtactgt gaaattaaat gagttgttaa tgttcataac tttagatcca	15000
tcatcacttc ctgctccaga ttgtcttagt aaatcctgag tttatctgc aggtatatac	15060
tgagagcctc taggcatttt tgagaatgta ggaccataa ctaattcggg accagcttca	15120
ccaacctagg cagctttatc agtgaagaaa tcagtacctt cagcaagcat tggtagctgt	15180
ggaatattga tacctttacc tcctatgatt ggaacctcag ctggtatctt aatagtatta	15240
agagcaccaa ttaatccatt gattaaactg attattccgt ttatagggtc tttagcaaga	15300
gctagcatac cattgaatac tccaccgaat atattcttaa ctccctcca agctttagac	15360
cagttacctg taaatactcc ggctataaat gcaattatac cacttagggg ttgcattaaa	15420
gcttgaagaa tatttgagat atttgtacg gctccattta cagccgcagc aatcattggc	15480
caaacagcat taaatactgc tcctaaagca taaagtatag gagttagcat atccacaagt	15540
ccttggaata tcataccaaa actttctata gcagattgta tatatggaac tacacttca	15600
gcaaagctta agaacattgg taatagtgtg ttattccacc aatcagctaa tccttgaag	15660
attggcatta agatgttacc tattacttcc acaacttgag aaattgcagg agctatataa	15720
gtagcaaagg cctcagctaa agaagtagca attggcatga aaacattagt tatcaattcc	15780

ccaagagctg taaaagtagc agagaacata gaacctaata cttctaatat aggacctaac	15840
acttccaata cagtttgcca tacttgagta aatccctgaa cataaaggac tactaagtct	15900
atggctggaa ttaggttatt cataaatata gaagctaaag ttccaaacat atcaagaagt	15960
acttgaccta taggagctaa tactcccatg ataggctcag ctaaaccact aaaggcttct	16020
tgtatattat tgtagcctc tgataaataa tctggtagac ctactaagat ctccccaaaa	16080
ttattatata tgtcttctcc aagactccat atcttctcat taatttgatc tgccacatca	16140
gcaggtaaga acttatatag tatatcgttg gttagatcta taaaagggtg catagcatcc	16200
ccaaactccc aaccattcat gatgtaatat atagtctctc ctaaaccttg gaaagcagaa	16260
acaaccattg agaatatagg tcctagtttt tcaaagcctt cttgtataaa tgtgatacca	16320
ttaggacag cattagctat aacctcaacg gcaggggcta gggcatctcc cacatctaac	16380
ataactacag cagcttggga ttttattctc tccatgggtc tattaaagcc cttatccatt	16440
tttcatatg cagcttcagt ggccccagca ctattcttca tctcattaag agcattagta	16500
aaggcctcag taccttcacc agtcaaggct agtgcagctg aaccagcttc tacagaacca	16560
aagaggtcat tgatacccag attacttttc tgagcgtggt tttctaacat ctgaagggcc	16620
tcttgatat tacctccacc tttaatgaag tctttgaaac ccttaccagc tatttccggg	16680
aagaccttat cagtcttgggt tcccgattta gatagctcat ctatagcagc tcttatctta	16740
gtggtagcta cagatgttgg aacccccctga gctgttaatg cagctataga ggcagatact	16800
tcttcaaagg ataccccagc agctgaggct gaaggtagca cattgaatag ggattgtgat	16860
agttgctcaa agttagtctt accaagtctt actgtagtaa acataaggtc tgaggccctt	16920
tgaacatcca tattcttagc tccatatgag ttaataacag tagttagtcc atcaaccgca	16980
gtttctattg atgtgatacc acctatagaa gctttaccag ctgtttctaa gaaactaaaa	17040
acgttatcct ctggaactga tgaggatatg gcttgataga gagcaggtag tactttatca	17100
ggcaatatcc ctatatcaga acttaacttt ttacctggc cggacatctt atcaaaggtc	17160
tcttgagtag agttaggtaa tagggtcata acctcattta acccttgctc aaaatcccca	17220
aaggctttaa tactgtcctt agtaaaatcc cagacagcct tagctgagaa tactccagca	17280

gccactccac caatfttggc aagagtaccc atgaaggaat taccactatc agccatctgg	17340
ttaaagtcac cagagatctt atcttgggca gagaatatgg cagtaaagc agcttgactt	17400
gccattatat cctctcttta tgattaagag ccttcttta acttatccct agcttctta	17460
tcttcttcta aagccagttc acatgaagct ataagaaagg ctttctatt gggagatagt	17520
ttatcaaatt cccagggtag tatattatgc ttctggaata acacatgagc ccaaaatgca	17580
ctagtgtcgg cctttattag tttttgctt ctttgattag atcatcctta ttatgccta	17640
atccatttat gtccataacc tactagtta ttctagttaa atctcctggt aagcttagta	17700
catccataag taaatctact ggtaccacaa acttagtaga ctctaaccat ttggatctt	17760
taaagtcagg gaatactatt gtttctagta tcatttcct agtagctctt ctttggctg	17820
ttattgagtt agttatacct ttgttctgg taattactgt atttctctt tggatacct	17880
ccatttgctt agtagtgatt ggctttaata tccaaggat aggttggccc gctaattcat	17940
gacctcagg gaaactaaat ctactaccc cctcaacttc aatttcgggt gattgtttac	18000
ccttatcatt ttccatgaaa aattccatac taaatttga cataataatc tacctccaca	18060
atattcttaa tctttataa atatcttact tctgaagctg agaatgatat ttcttctga	18120
atttctctc cctcagcatc tagtccaatt agtggtaaat ctcttctaa ttgtactcct	18180
agtaattgta ctctgtctc accataattc ttaacatagt cagaatctgg atcatcacat	18240
acagcttgta tatcatctt agggaaatata ccagtcttta agtattctt aatagcttct	18300
cttatcattg gagtagctt gaattgagtt atagtccag ttatatcata acctataact	18360
ttgagggtta atccttctg acccataacc ctttcttag tcacctcagg agtaaataga	18420
gcttctaatt ttattaagct agttactgc ttacctgata caaaagctct accctctcta	18480
gcagacattc tattaacttc actcatgggc tatacctcct taattattct taacagttac	18540
aaagtattc ttgaaagttc ttacaggttg tgtaagtata gtagcataca tagtcttcc	18600
tttactagct tcttcatcta ccactacatc agagtcaggg tccacattct ttaatgctcc	18660
ttgagcttg agtgtagtta atagacttat tagtctatcc tgagctagtt ttataccatc	18720
ttgtgggtta gggaaaacat taggaactaa tatttgagat cctagatcta taacagcatc	18780

taatacagcc acaactttat tatctgtaaa gcttcatcc cattctctg taaaagtatg	18840
ggtgtattt atatcttct caactactac cttactctt tcagaatttg agtcagtttg	18900
agtgagaat ataaattgac ctgttttaa tccatcaact attgagagt gtttagtct	18960
tggattagca tctactgcc caggatatgc ttataagta aggtcctcag tatatccagc	19020
tgcagctcta gcccagcta cccatgcagt tgcttgagaa gcggttaact tagtgcctcc	19080
atctaataca accccatttt taacattgat gatatatggg taatcacaag tagcaaagtc	19140
agaagtaact gccacaatgt tctaccaac ttcatctctg aagtatttaa gtttgataa	19200
tagagcagtg tgtaattcac tctcagtaaa tgggaaggcc atagtttaa agttgtataa	19260
ctcacagtta tctaagaagt tgataacatc agagttattc atctgagtag aagtaccagt	19320
actaaactca gtcttagcag tctcatctat agaaccactt ccacttactg taaaccattg	19380
agacttaact gttgatattt cagttactcc ttagcctca aatattttag accctcaag	19440
atataataat atatccttc ctccaagagg attagtctta atagttagag ataatttatt	19500
acctctttct ccagctttag tagctgtaaa tggtagagac cctactacag ctttgcttt	19560
agttccacct gttaggttat atactaaaac agttgcagct tctttaaag cctcttaac	19620
tagtaacaca gtagggtag ttatgtcata cccaagttga tataatgctt ctaggccacc	19680
ttcattggtt accttgataa catctccagc attacccac ttaagttgta atggttaagat	19740
cataactcct agattattaa gcttaggctc attaagtcca ccacttaca atctagtata	19800
cataccaggt ctactttat ttgtcctgg aataaaagt cctcctgcca tctattttac	19860
ctcctcttt agccagctct ttataatctg actagttgt ttattgtta actcttcac	19920
aggtggaaga gattgaactg cagcgttgaa gacaaactcc tcaacctgga aaagttgtg	19980
acaatgggct ctaattgag gtatggaaaa ttttgtact ttactattt tacccttt	20040
gttatctcaa aattttcgaa gtaagttgga tctttataaa gactaaccac aatatcatag	20100
tttatctcta catgagaatc ttctcagtt tcacctcaa atactccac attctttatt	20160
ttgagatttt tgttggtctt actaccatcc ctattaagta taggaatttt tctatttctc	20220
aagtatatgg cattagctat attctgagca attcaagag agtcttagg tcaaataacc	20280

ttaactctta gggattctc agtcctataa ctacaaagag tatcattctg aggattaaat	20340
acctcttga aatataatga gggatacttg aattttcag gtattcgctc aaaatagagg	20400
gtagtaattc cagttagatc agatatgaat ttagcaatac tccctatata tgctgtcatt	20460
aataactacc ccctaaaact tcggctaacc aatcttctaa ttttcttgg aaagcctgtt	20520
caaataatctt tcatataatc ttactgcat tgtcccaata aggtttacct ggtactttct	20580
tttgtcttag taccatacca gtcttagctc ctggttgata aataaactta tcccctgacc	20640
atatgccagg aacgaatcta aatgattgtc ctgttgatt agttagtga ccatcgttta	20700
cccacttagc atattttagg ttagtaccac ctctaaagt tagtcctcca tcactactta	20760
cccatatacc attcttacct ccctttgaa aggagttaag taataatcta gtatctacta	20820
ctgtagtct aattatttca tctgaacca catcaaggaa gtctatccct gcagcttcaa	20880
accatactgc taattgcttt ttgaaatcac tattagcggc atctcttagc ttctttataa	20940
accttctat ttgttagca tctatttcta tgccccaga attgaagcc ataactacct	21000
aaaatcctta gcctctatac caaccttaat ttttagacc cttatatccc taggagcttt	21060
agctatata gtgataaccag tctcaaggtc cacaatttta tcattttgtc taacatcagt	21120
tccaatagca aaatctactg agtactcctg ggtaacttta aacctagggt cttgtactc	21180
aagttttct agagttcctg atttaaaatg acagggtagc tcagtcattg ctggctcatc	21240
aggataacta aagctagggg tatgggctag gccatatccg gtagcttcag gatcttctaa	21300
taggtggtat atattacatc tatgatttaa gagcttgta tatgaatttc taatcatact	21360
acagtaccct taatctcata gtattgttc ttagatagtg actatcatct tctaagaaag	21420
gtttaatcag aggcataata tcaggctcta taacagcctt atcagttctt ctgtatatg	21480
agtagtcac atagggtctg gattgaatat cagccttgct aatgaccaag gatttagtc	21540
cataatactc agcatagct atattgggcta accttaattc ttactatta ggattttct	21600
ccacaatagt atcatagtct ttatttgaat ttttaaaaat tctgagatc ttggcttag	21660
ctcttagtat atccatctca atatttttg ggtctctttt cttaatctca ggattactg	21720
aaaagtcaat tatttcatcc ggagtaatat tcatatgagc caccctatc tgtttcttt	21780

attcttggtt gtaaatttc tagcagggtc ttctttactg tcatctgtag aaggtatttc	21840
ttctccagta aaatcctcta gaggttcac ctaacacaggt tcatctatga caatcacatc	21900
atagttctgc tttaaataat ttactagact atctttaact tctctacat ggtcttgagt	21960
aattctatga cctttaataa ccagagtttg taatttacc tttgctaatt tgaccttagc	22020
cataatatct ctctttcta atgaaaaaga gccacattt attgtgggcc ttcatgatta	22080
agcttttacc ttgattatct tagcagcagc tttaggatct tcaaactta catccatctt	22140
aagagttaaa actacataag tagctcttc tctaggagct ctttctaatt caattctgat	22200
atctcttgag atacctataa ctatattctt aggggtgagtt aagattatat cagatacttg	22260
tgtagaagaa tctcataat ctgtagcat agctataccc ttaacaggta caccataagc	22320
agatttaact gtaccattta taaatgagtc atcaccatta gcagttaatc tctcccctac	22380
taaatctacc caatcagttt ctaaacatt tgagcagtag aatctccact cacctggatt	22440
tcttaagtac tttagctggaa cagctttctt agcttggtt aataggtctt tacttaaagc	22500
agctttttga gccttacta cgtgagctgt taattgttt ctaaccccat ctaattgttg	22560
taagaaagta tcaactacat gtccagtatc accattaaca attatttctt ccatatcaag	22620
agcaactctc tcagctaata attgcattac agtgtctctt attgattttc ctctatatt	22680
tgttctata gtatcatcag ttaacttaac cacagctata aattcttag ctgttaaagt	22740
aactgtcca gtagttggag ctgaatattt agactcccct ggatctttc cttcagctgc	22800
aggatttaat actctttgac caaatcctat tgactcaatc ttttagagt ctctttcat	22860
tggtacagtt ctgacctt ttaatatgtt tggctcatca attatcattt taataaaagc	22920
gtagcttgt tctgtgttta atttacctcc accatttaat actgtagagt taaatacggc	22980
tttatttact ttgacataa cttccctcc tagttattat tattcttggt ttccacaaa	23040
taatccatta aatactgact ttgaacttc ttgtcttct tctccattt tagcaatttg	23100
tttacttct acatatggag ccatggctt agctactgcc tcagctattt tttctctc	23160
agtctttct tctgtttct ggattaagcc agccttaac atagctttt ccacagcctt	23220
agcaactata tctcagtag tagctgttg acctcattc ttattaact caccctcaac	23280

aggcttagtt ccatctaagt ccttttgat agcttcgtct atcattttt gtacttgagt	23340
ttcattcatc tcttctccc cctccactga gtctaataat tcattaatag cactttgtgc	23400
tgttttaac tttccacat ttttgaaga tattttctta cctgccttat tgactggtaa	23460
ctcaaaggat ttagctactt cttctggagt tcttaataat attccctcca tagtttcaga	23520
aaattcttga agagcttctt ttatcttacc tacatcactt tcaaaagatc tagtgtaac	23580
ccaactagaa tatggatata gaatatcttc tagggacta actgcattcc agaaattatt	23640
tcttttgca gtctctttat atttttcaga gtatgcacct ttctgtatat gctttggagt	23700
taacccaag gcctttcaa ttttatcaag tatagattga cctatagact tctcaatctc	23760
atcaatatct acatcttgtag tagaatactt accagtacca cccatagacc atccagtaat	23820
ttcgcccttc tcaatcttgc tccatagatc atcatcgaca atctcagctt tagctaacca	23880
agttccagct ttaactactg taccttctat tgtagtatct tctcagttta cccatgattt	23940
tacaatcttg acaccccaa gagtggtctc attgtgtgt aaatcactac caaggccatt	24000
ttcattaaac cactcacaag ctttcttgat ctcttctca gtcataaagt tatcatggta	24060
gtcagcagtc attggctcat atactacacc aataacaaaa tgattatctc cttcagactc	24120
agactttaag attggcttat catatctaaa tctattagga gctccaagtt ctttagccac	24180
aatccattgc cattatttag ctgctttatc aactaatgaa aggtaatcaa ttttagcatc	24240
tgagatctca atagctttct taactgattt tactggcatt tactctccct cctttacaaa	24300
ttatattctg ctatcacttg atctctgata gcttctttt cttctttaga taatcctagt	24360
atatccttat caattacagg cccatgagta caatgacaat tcacagtctc agaagctggt	24420
aagtttatat ctctaggaaa tctagcttca taaattccta ctgtgaagta ttcacctta	24480
ttaataacag taccatctag atcgacatgg tgtgccttg ggtgaatacc ccttccccct	24540
gagtgttcc actgtattcc tgttactgcg gggcattgat taaaagcctc atccttagca	24600
tatgagtggg ctcttaacat ttcagtaata gcagtagctc tagctctagt tctactaaag	24660
ccataagtct cagataattt accaactaca tctctacag actctccatc ttaagagcc	24720
ttatccagaa tattctgtag ttttcatgg gaagttaatt tcatcattc cccagttta	24780

gaagaccact catctataaa ggtagtagta tatggagaaa agactttggt tagggataag	24840
tccttatcaa taccttgtaa gtaagtatct cctaaatfff ctatagcttc ttgataacaa	24900
ctcttaagag ttctgctaa agaagtatcg atatcatctg tacctatttg agactccaca	24960
tattccataa attcttcaat gggttcaaag tctccatctt ttataagatg tttaattct	25020
tctgtaagga gatcagaaat agtgtcttct aattcagaga tcttttctat tgtataatca	25080
atctctcat agccagcttc ttcaattct ttctaaggc tatcatcttc attctttaag	25140
atcttatcaa ttttagcgat caactcatca gtaccacta ttacttacct cctttaatt	25200
gatagtttaa taactgttgc ttgacctt taagtacagc tatcacctca tcaactccat	25260
tagagttttg agccttctca attatacttg ttaagttatt actcattgaa gaggcaactg	25320
agtaagtagg gatatttgcc cattcttcat caataggagt atagtcctta ttgattgatg	25380
aataatactc ctcatlaatc tgattaggag tcatagctct agaggctata gcaaacattc	25440
ctttctgata atcagagttc tcaatattag gactcttaaa ataagcttcc acatatttaa	25500
aaccatagcc agatagaata acattattta gtatccatgt taggttttct ctttcaggaa	25560
caaatacttg ctcttcagtt ttctttag tagctctggc ttagccaca ttgtaattct	25620
gagagtaccc tacatatatg tctgtagta agaaagaaga ttgtatcttt ttcttagtat	25680
tatccatgta gtcttggaaat aactcatcct tctgtaatat ctcatagagg ggcttgacct	25740
caacagtaac tggcttagag tcatcaaggg cagtgtcttt ctctgcagct tcagtttcta	25800
atactaagaa accatgctgg gaatttcac cttttacact attcatgtac tcagttaact	25860
cattccaaga ttatcatta agagtaccac ctgaattag taacattaat ggagtatgtt	25920
taccattagt aaaatatctc cagttaata attcggcctt tctgaacct tgagcggcta	25980
acataggacc ttccatctt ggtgtacat agacaccata acctgttta aaatgaagta	26040
tactgttagc tcgatcttta agaggtatct ctccctttc ataatacttt ccagtattca	26100
tatctagatc tctaggatct ccccatcct taaagaagat tgattgatta ttacagtct	26160
gcttaaatct tctgaacctt ttcttctag tgtactgttt accatatcta gttacagtgt	26220
actctgtact ctcatcatct agcttaagaa tttaattgt cttaggatct tcaatttctt	26280

ttatctcttt tacgagagct gagtcttttag gatctctac tatctctaaa aaagaatacc	26340
caagtccttc tctccaatca actatctctt caaagacatt ctgggttggt ttatcaaaag	26400
acagggtatc aattaattct tccagctggt tatattcagc ttctatttct ggagtagggt	26460
catctacctt ctcaatatac ctaataccta ttccgaatcc agcaatatta ttccggtagg	26520
ccttttgca ttgggggtatt attgtagact cccttataat cacttctaag agttgggggt	26580
catactccgg agatacttca tcaacttcaa ttccaagtac actgggttgt tgattggatt	26640
tatccactgg atccaaagac ttttggatag ggtctccaca tatacttctg gcggatatct	26700
tttcaaaagt tactttacct cctttcttac attatatac aaattataaa atccagatgg	26760
cctcatattt caggaggaggat tacatcaact ccacatatag tgtcaaatac ggccattcac	26820
atgatttaaa aataactata atttgatacg ttattataa cataattcac aaaaatttgt	26880
caacgtttta tttttacatt attttccgga agattttccg tatatatcc ccatataaaa	26940
ttatataatt attaagtgtat actatattac tatattaatt tatgaaataa attatatagt	27000
atatagtata cttatattac atatatataa aggtggtaac tctgatatgc cttctatgc	27060
acattattac taatatagag cctagtcaat ttcaaaaactg atatctcaca tadcagaata	27120
aaaattattg gctttaatgg gcataatcagt tactagattt ttcttaattt agatccaaca	27180
ggaaggcaag ctaagaatag agagtctgct aagtctggag aatgtagtcc ccttttctc	27240
atttcatcct tactctccag ctttattga cctttggagt tgaatacttt aaactttctg	27300
gtagtcaatt cccccacaag gtcagtatta ttccgtagcc ttaactcatc atcctccagt	27360
aattccttaa ctacagaggc tatatatgtg gttgtatcat aataaaaaggc ataagcctgg	27420
gacccccctt ttaatggcat accaaaactta catggtacta ccttcaacca gtccagtttt	27480
tcttcaagtt ttatctcttt taatctatca gttactcccc cacctacacc agtgtcgtct	27540
atttttaca ctacagctag tttagggaac tcaccatgca gggatttagc ctttcttagc	27600
acttccccta ctgttttcat ggtgtcctta ccttgatagt agatagggtc ttccacatat	27660
ccatcaattt tggatcatgag tgagggtctta tctgaaccaa atctagctac gtctacaccc	27720
atatctatag taactgggtc ttaggtctg gttatttcac tgttgatacc tctatatact	27780

gtggataatt gtataaatat gtcatcttct tctagtggaa agtccccctt taccagacat	27840
ctgtagacat tggactcttc cccatacttt ttcttaaca ttttatgggt ttctttatca	27900
gttctatcaa cttttagc gtcaatatga atacatttaa aatttcctt aagactgtgg	27960
tgagaatcaa agaagatacc tgtatttta acagggttac caatcaaaaat tatcttatt	28020
tcctcatctg atatagtacc aagtaatgct tctagtatct catcatctat tccaggagcc	28080
tcatcacata taattagcat gaactcacta tgaagaccaa gcatattctc tttctatta	28140
ctagttttac acatagcaaa ccaagtcata ggactacaat tcctagtcat agtggtttg	28200
tttactgtaa agtaatcttc cacaatgggt cctgtagcc attttgatat ttcaggccat	28260
aatacagatg ttaactgtga aaatgtagga gctgtggcaa ttaccttaca ttcaggccta	28320
aaggtcatat accaaattat aaggcaagca caggccatag tcttacctac cccctgtcct	28380
gaccttacag aggttctctt attgtctctt acacttatta aaatacctt ttgatgtgga	28440
tctaagtgtat ctctagtat atcttctgag aatccacaag gatcgtcata atatagatct	28500
actaattctt caaaggatat ttctccagg gcttccttgt taatgtggaa cttatcaact	28560
aaagcatcta gctctaattt ctcaatcatt ctatctaaat caaacaatta tatacacctc	28620
cttagtaaag tgctttattt agtctgttaa taccttttta cttagtagta ttagattttc	28680
ctttacctgc attcttttc ttctatcag ccattttagc tctaagaacc tcaagatctt	28740
ttccttgcc agcattattc tgattttcct gtatttgtaa aagtaattta acctttcaa	28800
gttcaacttt catcacatca gtacttaagc cgaagtatac ctcaagtctt ttagtgcct	28860
gaagtctatc ttccatctta actgataccc catctttact ttgtttaatc tcattgatta	28920
aagtaccatc tacagcctta ctagacctta atagtactag atcatccttg aattggcaca	28980
catcagttat atctgcaaag gctatcttca tgtactgcct tattacatcc ataccatgc	29040
atagtaattc ttcatctcta tcggctctga tagcctttag agcttcctgt attttctct	29100
ttttaatag tttagatcca tgtcatgag aattattcac aggatagcct gctctagcag	29160
ctgctgtagt tgcattaaag cacttcatgt aatgaaatac aaacaactct tctttctcat	29220
caagatcata ctctcagcc agggctctaa tagtcttttt tgttttgcta ctcaatgcca	29280

caatatcacc ttcttcttct aaaaatgta tgccctgttc tttaaactct cttagacact	29340
gcctaacaaa ggtctgtgat accttagcaa ggttccttaa ttgttagga tgtgtaaagg	29400
gatcagcctt cagggcatta tatatcaatt ttttggttt cctcaaatgt tcaggagtac	29460
agtactctgg ttcagtgtat gacttatagc tcataatata atatcacccc cttaaaatcc	29520
agattttact acgtgaaaaa tggttggcac actaacatta atgctagtaa taccaaccaa	29580
atggcaaaat taactatgga ttataccac tattatacca catctggatt aattatgtca	29640
acgttttata attttacttc acctgtcaat atttttcat acatatccac atctattctt	29700
ccttctgta gcaggttacc agctgcaatt tgtatttct ctggggaata tactggatta	29760
ccttagtat caagttccgt accagtatat gagtctacct tgccctgtt cataccatat	29820
ccaactgatt tatgaacttc tagttttca ttatggtctt ctgccaatg tttaattct	29880
tcctgatatt ccttattctc ttcttagtt tgtttacatt caataggctt attatcttc	29940
atcttttct ttagggctgc tgtattaggt ttacagttct tagatcctcc acctgaacct	30000
ctattcttat ctctcata agctttatta atctcaaccc caattattag atccatcttc	30060
tctatcaagt aaagacattc ttactatt ggattgttag gttgatttt agaaatgatg	30120
tctgacact cttctttaa ttgatgtgga ttattacatt ggctagggca ttttctct	30180
ggtccatagg gaattgtata tgctaagcag ttacctgtg gatccctct ataacatctt	30240
ctcttacata ttattttact cattgttgt atcctccta aatgtaataa atattgctct	30300
tgatactctg gaaatgttac atcctgaaa tgcttctct accttatcat gtactagatc	30360
taccctact aaaggttcta tcacaactat attattagtt cctagtacag gaaatacttc	30420
acattcagta tctagtccat ctataaatc tttaactct tccaatcct taactggaac	30480
tggcttaac ctggggcttt ctcccacaa taattttct ctgatatatt ttcttctga	30540
taatctatca aactcatcaa tgttacttc ataaggattt ttaatttct caatacctgc	30600
agaggccata gatcttatgg ccttaattg actatcacta aagaatttc ctttactcat	30660
attgttctac ctccacatca ttacaaatta atttagctat tctccactt aatctgtatt	30720
tctcaagata taccacttc ttaattctg cattgattat taagtagca cagctctcac	30780

atggagataa ggttacatac atagtagttc cttcagttga gatcccatgt ttagcacagt	30840
aacttattaa gccagcttct gcatggatca caatatcaca tccaggacct aaacaagttt	30900
tacaatgttc tactcctgaa ggtactccat tatatgaagt agcaactatc ctgttatctc	30960
taactaatac acaaccaact gcttttctta ggcaagtaga tcttctgtc ataagtttag	31020
caacttccat gtaaagtgtt tctctgctta ttctgttgtt attattttcc atagtttatac	31080
acctcaattt tattatatac tattccctat catatgtcaa gagaaacttt agaaagggtat	31140
atcaccataa tccagatcaa tacattgggc tggcttttagt ttacttttt taggctctgg	31200
agttttcttg actttatgat actttggagc tctggctaaa tcctttttta actttctgac	31260
tctctcata tcccactcat gtatttcatt gtctctaaaa tattcattca atactcttac	31320
tgccgatctc ttgaagggtg tctttataga gcagttatta ggagcaagac agcatcctgt	31380
ctctttatct gatatagtat aacatactgt attataaggg gctcctacgg gcctatgaat	31440
gaataaggtc ctgcccataa aatcaaactc acataatact tccacatatac tttatactg	31500
ttgtccttgg tcattcttac atagtatata agtatattct ttcattgtta ttctccttc	31560
tatgttaaaa gggagatcat ctctcccctt aatacctttt tattctctg ttgttctcat	31620
caacctcaat tacttcatac cttctaacct tatcagatat accttctcc tgaataactt	31680
taggaatata tcctatggcc tgtctttgt tatccacttc aaaatatctg gtcaagatcc	31740
ttttgatgt tacaatact aatcttactt tcatacatac tacctccatg tggcctgaac	31800
tacagctcca ggtctatgct tagcttcaat cttagcttct tcctcagtat caaaatagat	31860
tatatcttcc ttgtgttcat ccttaacaga taccagtggt actcctaaat attgttatg	31920
tgctaataca ctaacatcag ggtccaatc cacatcaact gttacttgta aaacgatata	31980
tcttctttc atatcagttc tccttctgt attatttgt tgattttatt ataagagagc	32040
ctcggaagtt tgtcaaagat ttctcgaag aaattcgtat aatatcttcc gagctgagca	32100
taatatagac tataaaaaca aaatcaagga gttgtaataa atgaaagata ataactaat	32160
accattaaga gatattgcca aagagggttg aataaatgaa aggaaagcca gaaagctatt	32220
aagatcacat gagaataaag caaatcaca ttattattgg atgtttacac caagagagaa	32280

aagacatatt gtatcagttc taaagagact gcaataggtt ttctaaaaat aaggaggagga 32340
ttaaccctcc ttttataat ttttgagtt ctggaaaaat ccttaattag ttcaagttc 32400
gtaaagttct ctgatacttt tccattctct tcttaacttg gatagcttct tcttcgcaag 32460
gagcatggcc atctaggaat tggtgccatc ttcttcaag ttctctgtat tcagattgaa 32520
gttctataat ctcaagttaa tgattgtcca tactatcacc tctcaacac tattataagt 32580
gatactgtca tattctgtca aataaaaaag agagaatgtt attctccca tottaatac 32640
tttatggttg ctccatcaac tcccttgcca tccacatcat ggacatactt atcaagtctc 32700
attgttgagt cctgtataat tctttgtct tctctgtcaa aaaccttaat gacatcaggg 32760
ttaccctgt caatgatga agcaatctct tgagttccat ctgcatatgt tactgaagt 32820
aatgaatga gaggaataaa gctggagct gccagtcac caatcttaag atctctctct 32880
atactattct tggctcata tctgccaca tctgtaggct catctgatga gtaataagta 32940
acttcaactt tgaactccat tctttaaag gagtttatca tctcaattag atttggtta 33000
tcagttctca gtttatcatt ctgatatatt aatccttcta cattgtccat cagtatctca 33060
gtctgctcag ttaattgttt attcgactca atatatctt ggacagcatt tcccaatga 33120
ttgtttaggc tctgtatggt taacagtagc cctcctatca caattattgt tagtaatgac 33180
ataactcttt taatcattct ctttfaactc ctttattttt aattgaatt tctcaattcc 33240
agatttataat ttaccacag tatcaaagg atcggttagt attgcatagg ttctctatc 33300
agaattaaat ctgaagcttc ctctcttgat gtctcctagc ttattaaagg tcttaccctc 33360
ctgttcaga tatcctttat agtccatata gcacagacaa gcagtaacaa actcttgctt 33420
attcctgaaa ttatgcttga taccataacc atctacccat ttacttaata caaataggct 33480
ttcattggtc tttttactt tattattctg gattagatcc ttccacacat aatcattagc 33540
ctctttaaag gacttaaact tcttgcttt tagtatctta ctactctgga tcttggttt 33600
ataatcctca aatatacttg gccagaagtc ttttagatat aaatacaagg aaatatcatc 33660
taatttagca ttccgatcgt taatctggat tacaggatga ccatccattg ctctgatgtt 33720
attccttaat tgggtattct ctcttttat tttagatact tcaatatata atttaacgaa 33780

tgcgtagac aattcatgat tggtaattc ccttttagg ggcttaccat cttactttc	33840
tttagtagtt acaatattaa agtagtcttg taacctatcc cagttattct tcattagatc	33900
cacctcctat gcttacatta tacatatatt gtactgatat gtcaaagtcc aggcattaac	33960
tgatatctga tatgcctata tttttacccc atatcagtct gatatccac atatcagttg	34020
aaactacaaa atcacaaaag cattggtatc actggcgtag agggatatca gttatgcccc	34080
ctttatatat acatagtatt atatatacta tataataata tattattata tatagtatat	34140
atatattaca tgggtgata caagggcagg ctattgcctt gcctccatta tcattacggc	34200
aggcatatcc atgctccga gctttgccc tatatagaaa aaccagacg gtcagcgatc	34260
gagctctga ttttagttgg aaagagttct agttggaaga agagtaaaga gagagttctt	34320
ctccagttgg aaagagagta gagttctccc gaacgttgac agtagtaatc acttcttta	34380
taataacagt aaaggagga taacctgat gaaagtata ttatctaag aaaaagagat	34440
tatcattgaa aacaaggact tcttcataat aatggaagag gacagattta ttctatctag	34500
agcaatagat aagaatagcg gagaactagt atctcaagta cctaagtact gccttctat	34560
atatgaggat aaatctatac caagatactt atataaggat aatactcact tatatgaggt	34620
tattggtaat agagctatca taagatacag tatataagag ccacaaatca attttaaagg	34680
cctcttaaaa taagataatg tattttaatg ttctatacca ttagaattga ttacaggagc	34740
tgctagaggc ctttaaagga tatataggag gtactactaa tatgtataaa ttatacctat	34800
gttacaatac taatgaacaa aaacattatt gtggtattac taagaataat attgtggatc	34860
gcaagatatc aaaaaagcct gattgtaact tcacactaat aatattaaaa agtgataata	34920
ttaaatatct ggaaagtata cgagataggt taaaggggga ctataattat cgaaagaaaa	34980
gggtatacag aaaaagcact gaacagtatt ataatactaa acaagaagcg gctagagata	35040
atggcttaac tatgttaca cttaaaaatt tattgaagga gggagttgag tacacttga	35100
aataaataca atgtatttat gtaatggtaa aatagtcaag aataaaaaatg acttaaaaga	35160
taagtttggg ggtaaatcag tagtattcat cgaatgggat gtagccacag taatggactt	35220
tagtgacgga aagccaaaga taacaaaata tcttattagg gaggtatcac atgataaaca	35280

catcattatt gaagagactg gaagggatag agggaaaagca taagcaaaat actgatgaga	35340
taagaaagaa cctaaactat gccagatatt tgattgagaa acagtattgt catttaacaa	35400
aagaacagaa gataagattg ggacagttct taggattgac tgagaagaag ttaaaagaaa	35460
tacaagagat aaataatcag ttaataaatt tgagagtggg gctaagttat gaagtcgtat	35520
gtaataacca aaaaaaatag tggggatatct tttagcagata cagacatggg acaagtatta	35580
gctaagatac tatgtaagca tgggggaaca cttaccattg aggaaattga accagaacat	35640
attggtcaaa cttttctat tgtagaaggt aaaagaatat ggtataatag aaaaggaggt	35700
gataatattg gggagaagaa gtgctatgtt aattctcaag tatgactgcg aagaaactcc	35760
agaaagaatt gaattacgaa agaagtgggt acagatttgt cttcattcaa taatatatta	35820
tagatatgac aacaatatct ggacagacca acaatgggat gagactgcc a gagaggtagt	35880
taaacttaag aatgagaatc caggtttagt aaacagtatg ccatttagga atgacctaa	35940
agtctttgat ggatccactg gctttaatct ttcattgatg caagatatta agatgctaag	36000
gtgggctcaa aacttacttg actttcatgt taaacgagga ctgatggaa agagtaagaa	36060
aaagaagaaa aggaggagaa agaaatgaac ctacttgagc attatataaa aaaggtacac	36120
agtgaagag agtaccatga atttgataat gaacctggg ctaaaggtaa acaatatgta	36180
gaagtagaca tggactatat ttgttattct aatacaccac aaagagtga gatggtattt	36240
actgttgatg agtgggagaa aataaaatat caaggctact acatgggata ggaggaatag	36300
ttatgataag agaaatgggc atgagaatgc taataccaga aatacatgat ataaaagata	36360
gagatataca aaattttgta agaaaggccc taaatgagct agttgatgaa aagttcttta	36420
taatacctgc aagtagtact ggaaaatatt atccaactta tagtcaggg gtaggaggtt	36480
tgtaagaca tactaaagct gcttggtata taggtaaagc attatgcgaa gctgagatga	36540
tatgtcagga agataaggat ctgatacagg ctgctctgat attacatgat attaataaac	36600
ctgctaagga gcatccatac ctagttagag agacactatt accactaaag gaagagtttc	36660
catcaaccta tgaaaaggta atagaactaa ttgagtctca tcatggtcaa tggggagagt	36720
acccaatcaa tacttatcaa aagagaatag tacacttggc tgattatatt agttcacaga	36780

aaggattaat atttcatat gaccaaggaa ctgattattc tgacctgtta tgggaggaga	36840
agtaaagtgt gctaggggta ataaccctag tatcaatatt ttactagga gtgtttatag	36900
gtttgaggt gaagaaatgg aactaggatt tgcaatatta gctatagtag tatcaatatt	36960
tttagaaact aaatatataa aggagtagat tattatgtca agagcaagag ctgcaagaag	37020
aagagctgaa agagagaaca aaaatcttaa tgttcttaa gctgtggaca tcatgttagc	37080
cttatcatgc tatacactaa agaaggaagg ttatggtaag actagaatga ctaggtttgt	37140
ggaagggatg agtaaacaca cagaggagat tgagaaggga acacttaact atgaaacat	37200
aatgggagag attaaggatt tagtaccacc aggtatattt gatttagagg aggagtcaaa	37260
ggagtgatag tattgggata ttattatgg gcatttagaa tattaggcat acttgaata	37320
gtatggtgta taatggaggc gatcagttgt gagcaataag ttatattta gatatagtc	37380
tatgaactct ggaaagacta ctacagttat ccaggtagca cataactatg aagaaagagg	37440
aatgaagcca ttagtagtta agcccgaat tgatactaaa ggtggaccat gtataatcag	37500
tagaataggg gtagcaagaa aggtggatgt tcttctacct ctagagtta aattatcaaa	37560
aatactttct gactttgagt ctaattattg ggcagtagat gttatattaa ttgatgaggt	37620
acaattctta tccagagaac aggttgatga tctgttaaat ttatcattac attatcctat	37680
tatatgttat ggattgagaa ctgacttaa aagggaagga ttgaaggaa gtaccagggt	37740
attacaagt gcccataata ttgaagaatt aaagaacatt tgtcaatgtg gtaaaaaagc	37800
cacattctca atattaaaat accagggtaa atatactgac caaggtaacc agatacaaat	37860
tgataaccag cccgaaagtg ttgaatatga agccgtttgt aatgaatgtt ataataaatt	37920
aatttttct aaataactcg ttgacaggct atatgggata tgatattata gtattgtaat	37980
caaattacaa acaccaacca aaactttata attagttaat ttcaaactat actaaatttg	38040
ttatttaaaa attaaaaata tggaggaatg attattatgg caaaaggaaa agcaaaatgg	38100
ttagaggaag caaacaataa ggagctaatt gtaatcgtac aatctgctt aaattctgga	38160
gatgagaaag aagttaaaaa ggccttaaaa gctattgtgg aattagatga aagaactcct	38220
gacacagatg gacaaataac thtagaggaa gcattagaat cattagaaat ggctgtagga	38280

actgtaaagg ctgcatacca agcagaaaata gatgctgtgg aagatgaaga ttagtagat	38340
gctgacttcg aagaagttga ttaggacgaa gcagaagaag acgaaaatga tttagaatca	38400
ttatctaaaa aggaattagc tgctatggct aaagacttag gtatcaaagg agctaagaaa	38460
aaagataaag atgagttaat cgctttaatc aaagaagctc aaggtgaaga agaagacgaa	38520
gaggaagaag aagaggatga aactcctgac tactctgaaa tgactaagaa agacttaatt	38580
gctcttgcta aagaaagagg aataaaagtt aataagaaaa tgaaaccagc tgagataatt	38640
gaattattag aagctgatga tgaagaataa ttctcatcaa ataataaggg gagcaaactt	38700
gctcctcaaa tttttactt attttagaaa cagatgttag agggggatgt ataatggca	38760
agaggtggaa attcaactta tactaaagca gtatattgtt acaacaataa tagggagtat	38820
agatccttca gatatgcagc taaacagtta ggagtatcgg ctgtagtat aatgagagta	38880
gttaacggga ctaaaccaca tataggggga ttagtattcg ctgagataga ggaaggcact	38940
agaaaattaa agccaagagg agaagtagtt ccatactga aagaattagg ttgggataat	39000
atagacttat aatagggggt ataatatatg gacataaagt tctgaagga tatattctt	39060
aaacaatgtg aaaatggaga ttacattatc cttagcagcta gaaaaggtaa agaatggaaa	39120
gatgtaccaa tcaaatataa taagaataac attgacaaaa aactaaagga ctttgaacaa	39180
cagtataagg gttatgattt atattggagc ccaatgccct atagtaatcc tcaaagaagg	39240
atagttaact tcatagagac taaatactta atacaggata tagatgagca tactgacca	39300
ttagggatta aacctaaacc aagttatctg tgggaaagtt ctctggaaa atatcagggg	39360
ctatgggaaa tggataggta tatagaggct aatcaatatg acgaaataaa tccagcctta	39420
gctaaacata taggctgtga ctctgcttt gatgttactc atgtatatag aataccagga	39480
actattaact ataaatacaa gaataaacca aaagtaaaaa gacctataca cactaaggag	39540
atatataagc ctaaggtgat cgctaaggct gttaaggctg taagtaaact taatgatagt	39600
gttaaggcca atataggagg atctgaggcc tcacaatctg aaagaaagat atatgctaaa	39660
tataatatac ccaagaaggt tagagactta ctggctttag atgatattac ttcttagat	39720
agaagttcta ctatatggta tattgagaat aaattacatg aaataggact agagccta	39780

gagattatat tattagttaa gggctcagct ttaataaat ataaggaag aaaagatgaa	39840
gaaacaagat taagaaaaga attggataaa atcataggag gagaaataga ggctgatatt	39900
gaaaaggctg aaagtactaa actgagaata gatagttatc aggatgttat gggtaataat	39960
ggagccttcc ctggttggtt agtacaaggt ttctgggga gaagatctca tggaattgtg	40020
gctggacaac caaaggtatt taaatccaca ttacacagg acttagctat atcagttgct	40080
agtgaagac cattccttg tcaatcctt gttctagaac ctggcccagt aattgtagtt	40140
caaaatgaga atgctgactg gattatgaga gatagaactg aaaagataat tagccacaga	40200
gggtagttg gtaatgtga tataaaaggt aagagaagac ttaaagttag gtttctcca	40260
gatcttcta tcactttat taatcaacag ggatttatgt tagatgaaga atcccataga	40320
aaacagatag aagaattaat tgatgagata aaacctgtac tagtaatatt cgaccatta	40380
tatcttatgt ttagtggaga tcttaataat gcagctgac ttaatcctgt actacaatgg	40440
tgtcttaaac ttaagaatga gaagcataca ggagttagc taatacacca ctataataa	40500
ggtggaaatg ctactcaaac taggggtggt caaaagatgg ctggttcatt catattacat	40560
ggttgggtag aatcagcact atatttaaag agacctgatg acttagaagg tgatgatgag	40620
gaaatcgagg tagatataga taacctgat aaacaaagcc atttaccaag taaaatcatt	40680
atggatagag agttccgtct tgcaggacaa ttccctcaaa ttgaattgaa cttatcaatg	40740
ggagaatttg gagatccata ttatcatgta gaagtagcaa tacctggaaa agaagtaatt	40800
gtgaaacctg aggacaaagc caaagttata gaggctgtaa aatcaggagc tcataccaag	40860
gaggagatag tgtcaatatc aggattaaat tcacagaagg ttaatctagt tctagatact	40920
ttaaagata ctattgtata ttctcctgat aaaggttata atataagtaa gaaactaat	40980
attgggagga aaaaggcatg ataataaagt gtaagaggcc agcaggatc aatcatataa	41040
aggcctttgt agtagtaatt attgctagag gtaagaagaa taaaatcact tatcattcag	41100
gattgaaata ttctataacc tataaatcag cttaaattatt tatagacaaa gttatggaag	41160
aatgtccctg ggctgaattt tattgggtgg atgtccatga agctcataag atccctgaag	41220
gcgaagagat acctaagaag aagatgtggt gtccgtattg tcaaactatt caagaattta	41280

agagaagcca aggagggtac aagaattgcc ctatctgtgg cataagtgac caagactttt	41340
atgtaaaatg tatgaatata aagtataggg aggctaaggc taatgcgaag aagaaacttg	41400
aaggaagtaa tactaattct agggatatca ttgtcaatgg agataatgct aactcagggg	41460
gcaaaactaa tagaaagtca tcaccaaaga aaaagtcaag aaaagttagt agaaaagctt	41520
cataatgctt tagactataa tgttattgag acttctccat ctggactaga tggggaggat	41580
cttatcatca aactaaacct taatagtctt aaagacctta cccctaacaa ttatctaag	41640
ttagctaattg aggttatggt caataactta ggagctcaga attatactat acttgttat	41700
gatagtaata gaccagaaaa tcttctggct gttatagata tacctaaaaa ttctaaaata	41760
accttgaca taataaatta attatggtta tataaaaatg tagaaggagg agaattta	41820
ggtcaataaa aagtattaca tcttgaaaga ccttaatgat gacaaacccc aactatggaa	41880
gggaagtta accactgcta ctaagatagc aggagcatta ggagttagtg tgataaaact	41940
aaataggtat ttagtaagaa agggatttgc cagaaggtac aatgaacata cactcgaaat	42000
agtagacca atccttgcta aagaacttg ttattatgta actccaagta agtcccttat	42060
aaatccttta ttgaatata atgataaagg agtacaatat atactaaact taatagtaga	42120
agatctaaag aatggaggag agctttaatg attatcattt taggaatgga taactcaggt	42180
aagaccacaa cagctaagaa cctaactaaa cacagaggag gagaatatat ccaatcaatg	42240
ggacctggtt ctatgaaga acaaagagaa tgggtattaa ctcaaattgt gagaaaaagt	42300
gaaaggaag ctatacatga tagatttact tgcttgaag aaatggtgta tggacctatc	42360
atcagagata gtagtaattt caaccttgac agtaaggagc taaagatctt aaaacattta	42420
tgtaagccaa ctattgtata tgctagacca cctagagaag tgatcttcaa ttttggtgat	42480
agagaacaga tgccaggagt aattgaaaga gctgaacatc tactggctag atatgatgaa	42540
ctgatatgga agttattctg tgatggatgg aatgtactgg tatatgatta tactacttcc	42600
aatgtggaga agttatccca attaatagat gactcaagtg cttaaagaagc tataaaccaa	42660
ttataaata tatcaagata agaggagaga ttgttatgaa tataaaccat gcagtagaag	42720
aaaaagtaga aggagataga ttacaagcta tctttaatag acaaaaggaa ttgatggaga	42780

aatatcatca tatagaagct aggtcaggat tatgccaaac tgaagactgt ccagttaact	42840
taaatgataa aagagggtcaa gctagactta aagattttgc ttggagaatg actgaagaag	42900
taggagaagc attagatgct tataatcatg aagaccatta ccaagaagaa ttgattgatg	42960
gattacactt cttactgaa ttacaatcc tagctggtaa ggattataat actatagatg	43020
ataatgctat attagttgat agcctagaga acttatatca taaggctact acatcaccag	43080
aatttcctga aatgttagta gaagaagctg taactgacct ggtaagagaa atgggtatgt	43140
gctgtaattg ccttaagaat aaaccttga aacaaacttc aatgctaaca gatgtaaatg	43200
ctttaacca aagactatth aatgtatggg tatgttatat taaattatta gctgtatctg	43260
gcttagaggt agatgacata gtaaataat accttaagaa atcacaggta aataaattcc	43320
gccaaagatc taattactaa aataaatact taggagaagg taatatgcta ataagagact	43380
ataatgattt tgatgactta ttcttaaact ttaataggga aatgattacc aatccagaag	43440
aaactatgat gtatactcag aatatacagg gcttcagga ggacttagtt ctctcctgta	43500
agtcccataa atgtacttta aatctagggg actttggata taaagaaggt aagtggggac	43560
acctattaag atcatacatt gattatccac aattaattga attagagaa aagcttacca	43620
agataagtgg tatgagctat acctattatt tcaacaggaa aaaagctact aatgggtctt	43680
gcttgatagc tgcagtagta actagaccaa aaagaaaagg accttgaaa cacttaaaaa	43740
ttatgtatag agtatgtgaa ttacaaaaga aattcgcagc tgatctgga ttaataaaca	43800
ggttcattga agaactacct caagaagtat gtgagataga taatattact ttcatatgt	43860
ctcaagctta ttgtcagga atgtttataa atggatactt caattatth aaggtaccaa	43920
gaaagagtat tgctaatagc aaacatcctt ggcataaatc ctigaatagt aactataaca	43980
ggttctttaa atcagaggac cagatacact ctacaaagc tctccagaag atgcagtat	44040
tacattttgg tctggagaaa ttccaaaga tagatatcaa taaattatct attgacaagt	44100
actttaataa gtagtataat taacttaaca aaattaaata aatggaggaa ttaaactatg	44160
agaatttata ttaatgctca agaagcattt gaagaagtaa aaagagattt atgtgaaatg	44220
gggattgagg taagacccaa aactatgcaa gataaagtta tagaaggtaa tccagattat	44280

ttacaaaagg agttacaaaa ctatagttac acaattctag aaagtaaacc tgaagaagtt 44340
 ccagggtgtat ctcaaccttg ggcagatgct gaatttagag aaaggatcta cgatccacaa 44400
 ggtgtcatca atcaatactc tctgaagaa agagaagaat tatttggtat acatccacat 44460
 catactaggg gggctttcat aaatcctggt aaagcttacc aattaagacc tgaggatgg 44520
 aatgaatata taagagatgg aaaatttggg tattcttaca atgaaagaat ttggcaatac 44580
 agacaaattg aggatcatcat caatagaatt aaagaagatc caggctcaag acaattatgg 44640
 ttatctctgt ggaatccagc tattgatcca ttcaatatag gaggagtaac tagagtacca 44700
 tgttcattgg gatataactt ccaagtaaga gaaggtaagc taaatatcca ttatgttatg 44760
 agaagttctg attttgctac tcacttgct aatgatgttt atcttgctat gaaactatta 44820
 cattgggtag ctgaacaaac tggctatgaa ccaggaagtt tcttcatac aattttctct 44880
 cttcatgttt acaacaaaga tattaagggg gtattctaataaat gatgagtaaa 44940
 gaaagatata aacattctga tcttaataat aaggtaaca agaaggaaac cctaaagcaa 45000
 ttatttagga atactgaaaa ggaattgat ttgaaccag ctaacctgg ggacatgact 45060
 aggaatgaac ttaataacta tataaattat atggatgaac tgtggagtaa gtaatatgta 45120
 taattatagt gatgataaca gacctagaa caataacaat ggctgtcttg gttgttaat 45180
 tataatctta gcagctatag gattatgggt aataatttt gatattgcca atataatata 45240
 tcatatgata ttctaaattt aaagggggct atcctaataaaa aaatataat ttgtctatg 45300
 tgaaaaaact cagtaacatt aaaaagaaaa tatggagcta tgttttgat catgattttc 45360
 ttaactggag gcctatgggt agtaaccata ccctcaaaaa aacataaggt ctgtccagta 45420
 tgaactcaa tcataaaata aagataaggg ctttagggg tctttctat ttaggaggtta 45480
 atattttaa tgagatgtaa caactgtaac ctatatactc actcagctcc ctcagtata 45540
 gaaggaactt gttaggaaa gaaaaagaag ccaagaataa tggcataaa tagtttagct 45600
 aatgatagg atgaggccaa tagaatagct actctgata aatcattact tgataaaatg 45660
 gaaggcttag actttatta taccaatgct attaatgta gaactcctaa gggactaaa 45720
 atcaaagtat cagagattaa gaaatgcaa gaacatttac ttaaggaaat tgaaaaatat 45780

aaacccgaat atgttatgat cttaggatct caagcattaa agatgctaag taatgaaggt 45840
 ataacttcaa tatgtggagt acctaagaag catgagaaat atggcttaa atttattgcc 45900
 agctattcac cagggttagt tgcataatgac ccaactaaag cacaattgt agatcaggcc 45960
 ttaataact ttaaagccat ggtaaaaggt aaagagcatg aattaccaga gcttaatata 46020
 aaacttatta ctagtatgaa agagctaaac caggcttca aatatttaag ggatgaaggt 46080
 tataatagag tatcatatga tatagaaact agaggcttag ataggttta taatgacatt 46140
 acactatttg gtttggtaa tactcaagta cagtataac tgcctttaga agtcaaata 46200
 agcccactaa ggggtaagcc catagcacia agaagattag ctaaatcctt aattaaaaga 46260
 ctaattctg agatgaagga aagaatagcc cagaatgga agttgatga taatttcta 46320
 aaggagaaat atggtattaa gccaatcata accttgata cttactagc ctcacattgt 46380
 ttagatgaga atactcctaa tggcttaag gagaatgctc tattacattg taatgctaaa 46440
 gactgggata taaataagaa attaaagact ggaaatgtg agactaaatc agactttgag 46500
 gattatgta gatattctggg atatgatata tactatacat ttgctctata taaaatattt 46560
 aataagagac taaaaggga tgagagctta tataaattat tccaccactt atatatcccc 46620
 gctagtaaag ctatgagga tgttcagttc aagggtatat atgtaaatca ggagaaattc 46680
 aaagaggttg aaaaatactt aagatctgaa ctagataaga ttgagactgg acttaagaag 46740
 tatactaag gccaggatat taactggagc tcacctaaac aggttgagga attttatat 46800
 gatacattg gtcttctgt gattgaggtt actgactctg gagcaccagc tactggagaa 46860
 agtgtattat taagactaag agataaacat ccagcagtag aactactatt acagcatagg 46920
 ggagttcata tacaaatttc tactttata gatggttggc taaataggat gcacaatcat 46980
 agattatct caaactttaa actcatgga actgtaacag gaagaacctc aagtaataat 47040
 cctaattac agcaagtcc tagagataag aaaatcagga gtttattagg accatctct 47100
 ggaagagtat tcattgaagc cgatctatcc caggccgaac ttagaatagc tgctatgatg 47160
 gccgatgagg ataatatgaa atttattac cagactggtg gagatataca tgactccaca 47220
 tataatatta tatctgggga agatatcaat gatgagaaag atccagcagt taagaaggag 47280

aaaaggaaaa aggctaaggc tgtaaacttt ggttcctat atggtatgca atggaaaaag 47340
 ttcaaggatt atggaagaga caactatggc cttaaattaa cagatgagga agccaaaaca 47400
 tatagaagga acttctttaa taaatatacct aaactattaa catggcatga taaacaaaga 47460
 aagattgtta aagccaatgg tgaagtaaga tctccaatag gaagaattag aagattacca 47520
 gatataatatt catctgatag atctaaagct gctgaagccg aaagacaatg tattaactca 47580
 cctgttcaag gttttgggtc agatacact ttattaggcc tatgtgagat cacaggctat 47640
 gctaaatatg ttaatcctga atatgtatta gataagtcta agtttgatgt attaggctca 47700
 gtacatgact caattttatt tgaagtagat aaagattatg tggaagaatt agcttggaag 47760
 gtaaaatcaa tagttgaaaa taataaagta ttaaagaaag tatttaagtt taccccaaca 47820
 gtccaataa tcatggatat atcagttggt tattcttggg gaggatgtgt tgaactggat 47880
 tttaaagggt attggaaaag ccagataaga aaagtgttga cagatgaata attatctgat 47940
 aatataaata ttgtaatgaa aaggaggtat aaggatgtta aaaataagta attccagaat 48000
 taacaaattc ttgtctgtc cttatgccca ttatgttaaa tactatgaag gtctgtgacc 48060
 taaaagaagt ggagctgcct tacaaagggg ctctgctatc caccaggcta tagaagacta 48120
 ccataatggg aagagttgga aaaaatctgt tgataaatTT tcaaagagt ttacaaaaa 48180
 tacatttaaa gaagagatcc ttgaattgg agatattcca aaaatgggtt attctttatg 48240
 tgataactat ttccactatt atgatgaaaa agaagataat gtaacctatg tggaaaatga 48300
 acatcacttc gaattaaaac tatgtaaggg tgtaactcta gaaggctata ttgatagtgt 48360
 cttagatgtg gatggaaaga tatgggctaa ggaaactaaa acctacaaaa agatgcctga 48420
 tagaaatttc ctgatcttca atagacaatc tgctatatat acctgggctc ttctacatga 48480
 atacccaaaa gtaagtggta ctatatggga tataatatta gctcagcaac caggtagacc 48540
 agaattaact caaaaagggg tattatctca aaagaggatt aaatccacac cttagagtt 48600
 agaaagagga ataagagaat taggattaga tcctaaagat tatgagtctt atattaattc 48660
 tgctagatgg gaagacttct ttgtaagaca cccaataata ttatcaaaga atatacttaa 48720
 cagtgtaatg gatgatacta ttgagatagc taaacttatt agaggtgagg gccacaaaag 48780

aaaggaaaag aaccttggaa aaggttgctc ttctgtgaa tataagtctt tatgtcaagc 48840
 tgaactttta aatcttgata aagaatttat tattaaggct gactacaaac aaaggaggga 48900
 aagtgacaat ggcaaaaaag caaaaatcaa aatcaaatag tttgaggac agattagtgg 48960
 atctatatga tatagatgag cccacaatac taacacttta tggaagatct gggtcaggta 49020
 aaactactat cttaggaaca ctacccaaac caatattctt tattgatgta aaggacaaag 49080
 gtactctatc agctagaaac aagcttagag ttaaagagg agatatacaa gtatttagtc 49140
 taaagagttt tgatgacata tacgaggctt atgattacct atcagaaaac actgataaat 49200
 ttaaacagt agttatagac catttaactg cttacaaga attaggtaat gaaaaggta 49260
 aagctgaaga aggtaaggac cagatgagcc aaagaatgtt tggaatgtg gctaattata 49320
 tgaaagaggt tataaacctt tataaagaat taaatgagga aggtatacta ccatgcttta 49380
 tagtacaaga taggttagaa tctgtgatg gtgaaggaga agaccaatta atgcctgagg 49440
 taggaccagg attaatgcca tctgtatcta aatatttatg tgctgtatca agagtaatag 49500
 gtcatactta ttatatgaa cactcagaaa aagagggtat gaagggttaag aaagaaatcc 49560
 agtatagact aagactagga cctaaccctt attatattac taaatttact agacctcaag 49620
 gatctgaatg tccagcttat ctgtacatg atttaaaatc accaacaact atctgggagg 49680
 atattgaaac tattctggct ggtgaatgga ataataagcc agctaaatct ggtaaaaaaa 49740
 ccagtaagaa atctggtaaa aagaaaaaat aaaaatttcc taaaataacc ttgacaacc 49800
 aattaaaaat ctgataatat aaacttgtaa acaaagaggt acaatatctt gacaaatatt 49860
 tatctcataa tgatatatta aaatttaagg aggacaataa catggctaaa aagactacta 49920
 agagaggtaa caaaaacaaa ggaggattaa agattgatct ttcaaactgt gaaacttcag 49980
 ttactatccc agaaggaaat tacattgtgg aagtagaaga ttagagggtt aaggtttctg 50040
 aaaatagtgg aagcaattat ttatcattta ctttgtaat agcagaagga aagatgaaag 50100
 gacaaaagtt ataccacatt tgctcacttc aaccacaagc ttattttaac ttaaagggtg 50160
 tgttagttgc ttaggattt gatatccctg atgaggaggt cgaattagat acagaagctc 50220
 tagttggtt acaatgtgga gtagaagtat cacatgaaat atatgagggt aagaagaaat 50280

caagaataac tgatttata aacctgacg aagctgactc tgatgatgac gaagatgagg 50340
 atgatgactc agatgacgaa gaagatgatg atgaagacga tgagtctgaa gttgatcttg 50400
 aagaattaga caaggatgag ctaaaagaat tagctaaggc tttaaaaatc ccagctaaga 50460
 aatcaagaa ggctaaaact gaagaagatc taattgatct aattgaagaa gaagctgacg 50520
 aagaagaaat agctgaacaa tataatgacc tattcgga ctcgatgaa gatgacgaag 50580
 aagatgagga tgaagaagag gaagatgaag aagaaaatga ctatgagtca atgacttta 50640
 aagaactta agctgaagct aaggacagag gcttaaaggt taaaaaagga atgtctaagg 50700
 atgacatcat agaaatgcta gaagaagatg atgaagaata aaatttaatt attaaaatat 50760
 gagggccttt aaggctctcc ttatttacc ctggaggct actattatgc ttgaaagaga 50820
 tgttggttaa tcataatga atatgcttaa aaaagaatac ccaggtttt ggtttaaac 50880
 tcatggggga cctttcaaa tagctggctt acctgatata ctagggtgcc acaaaggtaa 50940
 gtttattggt attgaagta aacttctgg aaaagaaaag aacctactc aaaaacaaaa 51000
 agacattata aataaaataa atctagcagg aggaatagct ttatggcta cctcagctga 51060
 atatacaagg aggagattac atgaaaaatt tagaaagaca ccaacaattc ctaggagaac 51120
 taggagatct gtatgaatta aagaataatc tatatgggga taattccac aagacttacc 51180
 ttgaatatgg aaacctgtt ctatgtataa gactgaaga taagctagga agagctaaaa 51240
 gtttattact cggagatcaa gatgacttc ctcatatgc tgctcaaaaa gaatctgtgg 51300
 ttgatacttt actagactta gctaactatg ctattatggc tgctatggaa ctaactagt 51360
 atgataactc agaaatacat gatcttagta aagaagaata tgatgaagaa gacatagagg 51420
 ataatgacga tgaggactta gatgatgaca atgtttacga cgaagaagaa ttagattttg 51480
 atagtatgaa taaagaatcc ttaaaacaat atctaaaaga taatgggggt aaattccata 51540
 gtaaggcctc aagagatgaa ctgtaaaac tggctaagga ggtataagga ggaggcttta 51600
 atgcctcttc ttttttagta tgaagagaaa attatttaa catcagaaag aagcattaca 51660
 actatttta aataaagaaa agttgccct atttatggac atgggtacgg gtaagacctt 51720
 agtcctatt gtggcccttg agaaactga aggtctagat actgtactaa tattctcacc 51780

taaatctatt gtatttaact gggagtctga gatccataaa ttactaaac ttaaagagta 51840
taaaatattt aaactacagg gtaataaaac caaggttatg gaaacctata gagctataaa 51900
atcctactca ggattaaaga ttattattgc caatttgag aaggctaggt tgatggataa 51960
ataccttatg aactaaagc cacagtttat tgtgttgac gaatcccata aggtaaagaa 52020
tagaaatgcc cagatatcta aggctctata taaaattgct actaaatgta aatatagatt 52080
gataatgaca gggactccca ctctaattgg ttatgaagat ttatttatgc aat 52133

Fig.1

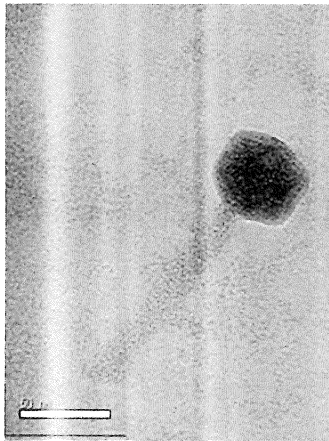


Fig.2

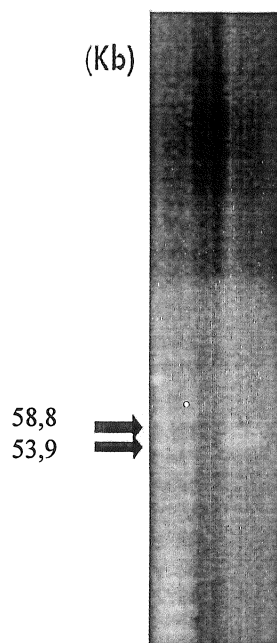


Fig.3

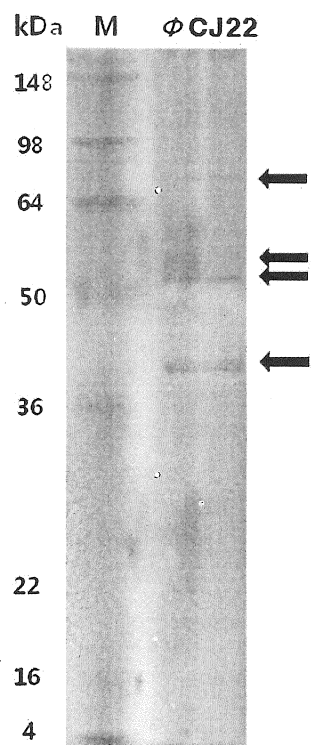


Fig.4

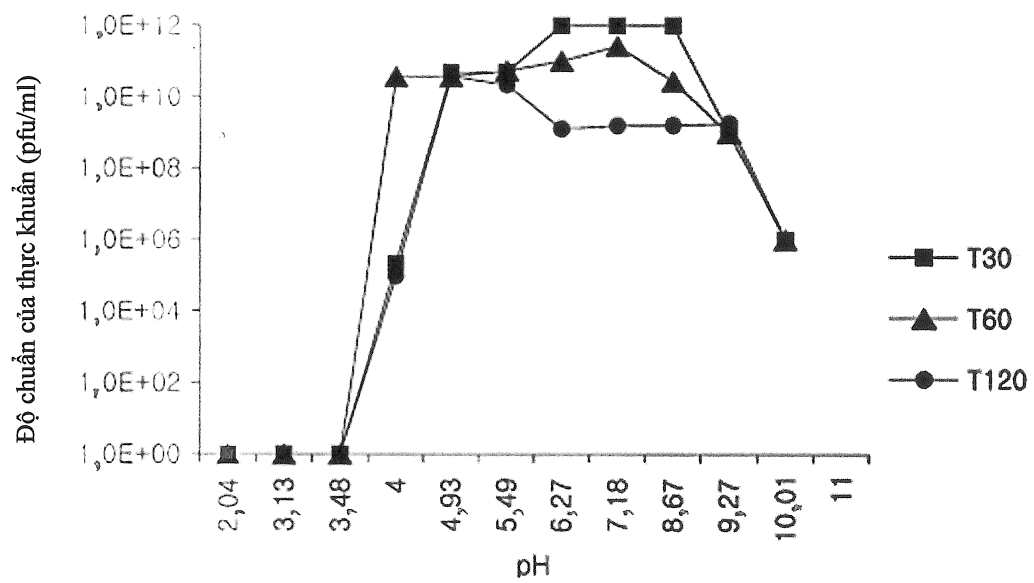


Fig.5

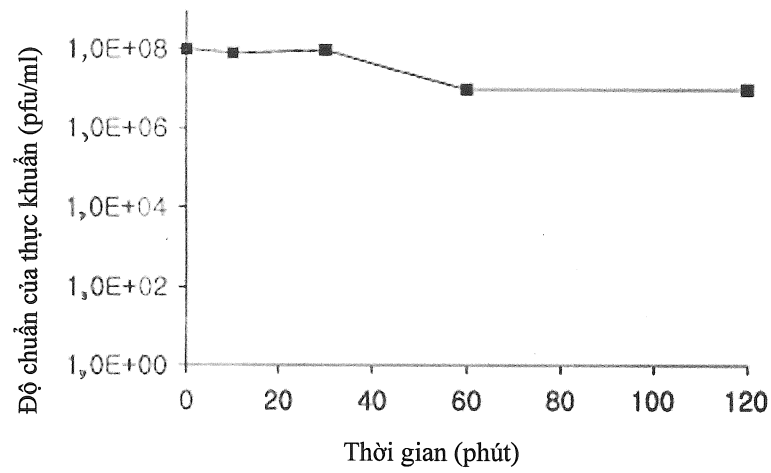


Fig.6

