



(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)



1-0030513

(51)⁷ C12N 7/01; A61P 31/04; A23K 1/17; (13) B
A61K 35/76

(21) 1-2016-04325

(22) 14/04/2015

(86) PCT/KR2015/003705 14/04/2015

(87) WO/2015/160165 22/10/2015

(30) 10-2014-0044997 15/04/2014 KR

(45) 25/12/2021 405

(43) 27/03/2017 348A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

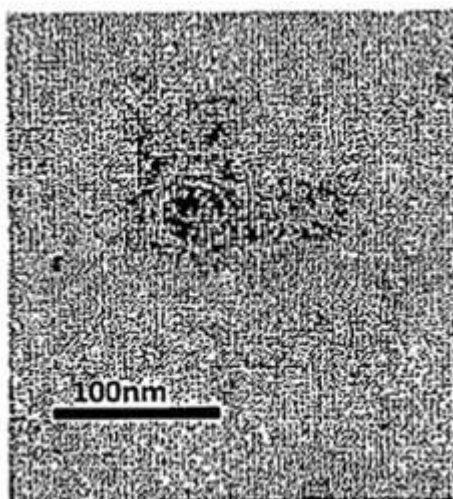
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Korea

(72) SHIN, Eun Mi (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 ΦCJ25 CÓ HOẠT TÍNH DIỆT KHUẨN KHÁNG
ESCHERICHIA COLI GÂY BỆNH CHO CHIM VÀ CHẾ PHẨM CHỨA THỂ
THỰC KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) và chế phẩm chứa thể thực khuẩn này làm thành phần hoạt tính. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chế phẩm diệt khuẩn chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) làm hoạt chất.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn kháng lại *Escherichia coli* gây bệnh cho chim (APEC) và chế phẩm chứa thể thực khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Escherichia coli (sau đây gọi là '*E. coli*') là vi khuẩn gram âm, dạng que ngắn thuộc giống *Escherichia* và thuộc họ *Enterobacteriaceae*, và là một trong số các vi khuẩn ngụ cư thông thường tồn tại trong ruột của các loài động vật khác nhau bao gồm cả động vật có vú. Đã biết là hầu hết các chủng *E. coli* không gây bệnh và có thể các bệnh nhiễm trùng cơ hội, nhưng các chủng có khả năng gây bệnh cao lại gây ra các bệnh đường ruột và nhiễm độc ở động vật bao gồm cả người.

Đã biết là trong số các chủng *Escherichia coli*, *E.coli* gây bệnh cho chim gây nhiễm qua đường hô hấp của chim, như gà, vịt, gà tây hoặc các loại tương tự, xâm nhiễm vào cơ thể qua màng nhày của đường hô hấp. *E.coli* gây bệnh cho chim gây ra các bệnh khác nhau chủ yếu là ở gia cầm liên quan đến các bệnh đường hô hấp của chim, dẫn đến các tổn thất kinh tế nặng nề cho ngành chăn nuôi gia cầm.

Thể thực khuẩn là một loại virus đặc biệt ngăn chặn và ức chế sự phát triển của vi khuẩn bị nhiễm thể thực khuẩn đặc hiệu. Do thể thực khuẩn có tính đặc hiệu vật chủ cao so với các chất kháng sinh, và do gần đây, việc vi khuẩn kháng kháng sinh nổi lên trở thành vấn đề rất nghiêm trọng, nên nhu cầu sử dụng thể thực khuẩn tăng lên rất cao.

Các nghiên cứu về thể thực khuẩn được thực hiện chủ động ở các nước khác nhau trên thế giới, và ngoài những đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền cho thể thực khuẩn thì ngày càng có nhiều đơn yêu cầu Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm (Food and Drug Administration -FDA) phê duyệt các chế phẩm chứa thể thực khuẩn.

Tuy nhiên, lĩnh vực kỹ thuật liên quan đến thể thực khuẩn để phòng tránh và/hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim, là một vấn đề quan trọng trong ngành công nghiệp chăn nuôi chim, vẫn chưa được giải quyết, do đó thể thực khuẩn và kỹ thuật liên quan đến thể thực khuẩn cần được phát triển.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo kết quả của các nghiên cứu gần đây với mục đích giải quyết các vấn đề như việc kháng khuẩn khi sử dụng kháng sinh, việc kháng sinh tồn dư ở động vật và phòng phòng ngừa hiệu quả và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh gây ra ở chim, các tác giả sáng chế phân lập một loại thể thực khuẩn mới ΦCJ25 (KCCM11463P) từ tự nhiên có hoạt tính diệt khuẩn kháng lại *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra bệnh đường hô hấp cho gia cầm.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng đã xác định các đặc tính hình thái học, sinh hóa và di truyền của thể thực khuẩn mới và khẳng định là thể thực khuẩn này có khả năng kháng axit vô cùng tốt, kháng nhiệt và chịu sấy khô và các tác giả sáng chế đã phát triển chế phẩm kháng sinh, chế phẩm phụ gia cho thức ăn gia súc, chế phẩm tẩy rửa và các chế phẩm khác sử dụng thể thực khuẩn mới này. Ngoài ra, sáng chế cũng phát triển một chế phẩm ngăn ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở chim, và phương pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh sử dụng được phẩm này.

Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) mới có hoạt tính diệt khuẩn kháng lại *Escherichia coli* gây bệnh ở chim.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh ở chim gây ra chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) làm hoạt chất.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến chất kháng sinh, chất phụ gia thức ăn cho động vật, chất phụ gia cho vào nước uống của động vật hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) làm hoạt chất.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh ở chim gây ra bằng cách sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) làm hoạt chất cho chim.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một phương án, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) mới có hoạt tính diệt khuẩn kháng lại *Escherichia coli* gây bệnh ở chim.

Theo một phương án ví dụ khác, sáng chế đề xuất chế phẩm ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh ở chim gây ra, chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) nêu trên làm hoạt chất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất kháng sinh, chất phụ gia thức ăn cho động vật, chất phụ gia cho vào nước uống cho động vật, chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) mô tả ở trên làm hoạt chất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương án ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh ở chim gây ra, bao gồm cho chim sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) như mô tả ở trên làm hoạt chất.

Hiệu quả của sáng chế

Thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) theo sáng chế có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu diệt *Escherichia coli* gây bệnh cho chim.

Ngoài ra, do thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) theo sáng chế có khả năng kháng axit rất tốt, kháng nhiệt và chịu sấy khô nên thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) không chỉ được sử dụng làm nguyên liệu tạo ra chế phẩm ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra trong phạm vi pH và nhiệt độ rộng và điều kiện sấy khô cao mà còn được đưa vào chất kháng sinh, chất phụ gia thức ăn cho động vật, chất phụ gia cho vào nước uống, chế phẩm tẩy rửa, chế phẩm làm sạch hoặc các chế phẩm tương tự để làm hoạt chất.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn các bệnh nhiễm khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) hoặc kháng sinh chứa thể thực khuẩn này làm hoạt chất, và kháng sinh này có tác dụng đặc hiệu đối với *Escherichia coli* gây bệnh cho chim so với các kháng sinh đã biết và do đó diệt chọn lọc đặc hiệu vi khuẩn gây bệnh mà không diệt vi khuẩn có lợi; và kháng sinh này không gây ra việc kháng kháng sinh, dẫn đến làm kéo dài thời gian tác dụng của sản phẩm so với các kháng sinh đã biết.

Ngoài ra, sáng chế có tác dụng ngăn ngừa và điều trị bệnh do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra bằng cách sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn chứa hoạt chất ΦCJ25 (KCCM11463P) cho

chim.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là hình ảnh dưới kính hiển vi điện tử của thể thực khuẩn ΦCJ25 mới (KCCM11463P, sau đây gọi là 'ΦCJ25').

FIG. 2 là kết quả điện di trong trường xung điện (pulsed field gel electrophoresis - PFGE) của thể thực khuẩn ΦCJ25.

FIG. 3 thể hiện kết quả điện di gel natridodecylsulfat-polyacrylamit (sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE) của thể thực khuẩn ΦCJ25.

FIG. 4 là hình thể hiện kết quả của thử nghiệm kháng axit của thể thực khuẩn ΦCJ25.

FIG. 5 là hình thể hiện kết quả của thử nghiệm kháng nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ25.

FIG. 6 là hình thể hiện kết quả của thử nghiệm chịu sấy khô của thể thực khuẩn ΦCJ25.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Những phần nội dung trong sáng chế có thể được hiểu và đề cập đầy đủ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hoặc lĩnh vực tương tự thì sẽ được loại bỏ không mô tả trong sáng chế.

Theo một phương án tổng quát, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) mới (sau đây gọi là “ΦCJ25”) có hoạt tính diệt khuẩn kháng lại *Escherichia coli* gây bệnh cho chim (APEC).

Escherichia coli gây bệnh cho chim dùng để chỉ *Escherichia coli* được truyền qua đường hô hấp của các loại chim như gà, ngỗng, gà tây và các loại tương tự, và có thể gây nhiễm khuẩn cho các loại chim này, đặc biệt là các bệnh do *E.coli* gây ra ở chim. Cụ thể là, *Escherichia coli* gây bệnh cho chim thâm nhập vào cơ thể chim qua màng nhày của đường tiêu hóa và gây ra các bệnh khác nhau như nhiễm trùng, u hạt, bệnh viêm túi khí, viêm vôi trứng, viêm khớp và các bệnh tương tự. *Escherichia coli* gây bệnh cho chim là vi khuẩn gam âm giống như *Escherichia coli* thông thường, có

roi để chuyển động và là vi khuẩn ưa khí hoặc kỵ khí không bắt buộc phân giải lactoza và fructoza để tạo thành axit và khí.

Escherichia coli gây bệnh cho chim sinh trưởng tốt trên môi trường thông thường và có thể phát triển ở nhiệt độ từ 7 đến 48°C và có nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là từ 35 đến 37°C. Cụ thể là, các yếu tố gây độc gây độc cao nhất ở khoảng 42°C, gần với nhiệt độ cơ thể của chim. Ngoài ra, *Escherichia coli* có thể sinh trưởng ở độ pH từ 4,5 đến 9,0.

Thể thực khuẩn là 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).

Cụ thể là, thể thực khuẩn ΦCJ25 theo một phương án của sáng chế là thể thực khuẩn có tính đặc hiệu gây nhiễm chọn lọc đối với *Escherichia coli* gây bệnh cho chim và về mặt hình thái là thuộc loại B1 *Siphoviridae*, là thể thực khuẩn có vỏ đa diện 20 mặt và đuôi không co lại được (FIG. 1). Mức độ tương đồng của trình tự hệ gen trình tự nucleotit của thể thực khuẩn ΦCJ25 và các trình tự nucleotit đã được giải mã của các thể thực khuẩn khác được so sánh và kết quả được thể hiện trong Bảng 1. Thể thực khuẩn ΦCJ25 thể hiện là ổn định trong khoảng pH từ 3,5 đến pH=11,0 mà không bị mất hoạt tính (FIG.4) và khi xét đến khả năng kháng nhiệt, thể thực khuẩn ΦCJ25 thể hiện là hoạt tính bị giảm khoảng 1 log hoặc ít hơn khi đưa đến nhiệt độ 50°C hoặc cao hơn trong hai giờ (FIG 5). Khi xét về khả năng chịu sấy khô, thể thực khuẩn ΦCJ25 thể hiện là giảm hoạt tính khoảng 1 log khi làm khô ở 60°C trong hai giờ (Fig.6). Một phần trình tự nucleotit ADN của thể thực khuẩn ΦCJ25 được nêu trong SEQ ID NO: 1 và 2 của Danh mục trình tự.

Thể thực khuẩn ΦCJ25, là thể thực khuẩn mới được phân lập bởi các tác giả sáng chế, lưu giữ ở trung tâm Giống vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Hongjedong, Seodamun-gu, Seoul, Korea) với số lưu giữ là KCCM11463P ngày 25/10/2013.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 làm hoạt chất.

Do thể thực khuẩn ΦCJ25 có hoạt tính diệt khuẩn diệt đặc hiệu *Escherichia*

coli gây bệnh cho chim nên thể thực khuẩn ΦCJ25 có thể được sử dụng để ngăn ngừa và điều trị bệnh do lây nhiễm *Escherichia coli* gây bệnh cho chim. Một ví dụ về bệnh lây nhiễm do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra là bệnh nhiễm khuẩn do *E.coli*, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nhiễm khuẩn do *E.coli* ở chim” dùng để chỉ các bệnh xảy ra ở đường hô hấp của chim do nhiễm *Escherichia coli* gây bệnh cho chim, và các triệu chứng bao gồm viêm túi khí, viêm quanh gan, viêm màng bụng, viêm màng bao tim, viêm vôi trứng, viêm túi noãn hoàng, viêm tủy xương hoặc nhiễm trùng máu, do đó làm cho chim bị nhiễm chậm phát triển và gây tử vong.

Thuật ngữ "ngăn ngừa" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ tất cả các hành động để ức chế hoặc làm chậm các bệnh tương ứng hoặc làm chậm diễn tiến của bệnh bằng cách sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ25 và/hoặc chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ25 cho động vật.

Thuật ngữ "điều trị" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ tất cả các hành động để bệnh có tiến triển tốt hơn hoặc các triệu chứng của bệnh được giảm nhẹ bằng cách cung cấp thể thực khuẩn ΦCJ25 và/hoặc chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ25 cho động vật.

Chế phẩm để ngăn ngừa và điều trị bệnh lây nhiễm do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim theo phương án này có thể chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 với hàm lượng từ 5×10^2 pfu/ml đến 5×10^{12} pfu/ml, cụ thể là, từ 1×10^6 đến 1×10^{10} pfu/ml.

Chế phẩm ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra theo phương án này có thể chứa thêm chất mang được dụng và được bào chế cùng với chất mang để thành phẩm ở dạng thức ăn, thuốc, chất phụ gia thức ăn cho động vật, chất phụ gia cho vào nước uống cho động vật và các chế phẩm tương tự. Như được sử dụng ở đây, 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 cho cơ thể sống và không ức chế hoạt tính sinh học và các đặc tính của chế phẩm được sử dụng.

Chất mang hữu dụng theo phương án này không bị hạn chế cụ thể và chất mang bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó được sử dụng thông thường trong lĩnh vực này và được chấp nhận trong lĩnh vực dược phẩm. Các ví dụ không làm hạn chế

về chất mang là muối thông thường, nước cất, muối được đệm, dung dịch Ringer, muối được đệm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol và không giới hạn ở các chất này. Có thể sử dụng riêng biệt hoặc hỗn hợp của các chất mang này.

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

Phương pháp sử dụng chế phẩm ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra theo sáng chế không bị hạn chế mà là phương pháp bất kỳ được sử dụng trong lĩnh vực này. Ví dụ về phương pháp này nhưng không làm giới hạn là sử dụng 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, si rô, cốm ngọt hoặc các dạng tương tự.

Để bào chế chế phẩm theo sáng chế thành các dạng liều như dạng viên nén hoặc viên nang, chế phẩm có thể chứa chất liên kết như lactoza, sacaroza, sorbitol, mannitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza, gelatin; tá dược như dicanxi phosphat; chất làm phân rã như tinh bột ngô, tinh bột khoai tây; chất làm trơn như mage stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, sáp polyetylen glycol và trong trường hợp là viên nang, chế phẩm có thể chứa chất mang lỏng như dầu béo ngoài những chất nêu trên.

Các phương pháp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa theo phương án này bao gồm, ví dụ, sử dụng đường trong tĩnh mạch, trong màng bụng, tiêm bắp hoặc dưới da, phương pháp sử dụng tại chỗ và có thể bôi hoặc xịt chế phẩm ở vị trí bị bệnh, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các cách sử dụng này.

Để bào chế dạng sử dụng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ chế phẩm theo phương án này được bào chế ở dạng để tiêm dưới da, truyền tĩnh mạch, tiêm bắp; thuốc đạn,

thuốc dạng xịt như chế phẩm phun mù có thể hít vào qua đường hô hấp, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các dạng thuốc này. Để bào chế chế phẩm thành dạng thuốc tiêm, chế phẩm theo sáng chế có thể được trộn với chất làm ổn định hoặc được đem trong nước để điều chế dung dịch hoặc huyền phù, và sau đó, dung dịch hoặc huyền phù đã được 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 thuốc xịt như thuốc phun mù, có thể bổ sung chất đẩy, hoặc các chất tương tự, trộn cùng với chất phụ gia sao cho chất đặc phân tán được trong nước bột ẩm được phân tán.

Cách sử dụng thích hợp, xịt hoặc liều sử dụng chế phẩm ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim 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, cũng như phương pháp bào chế chế phẩm, phương pháp sử dụng chế phẩm, thời gian và/hoặc đường dùng và bác sĩ thú y có kỹ năng thông thường trong lĩnh vực này có thể dễ dàng quyết định và kê đơn liều hiệu quả để đạt hiệu quả mong muốn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 làm hoạt chất.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng sinh" dùng để chỉ chất có khả năng sử dụng cho động vật bao gồm cả người ở dạng thuốc có hiệu quả diệt vi khuẩn được sử dụng với các mục đích để làm chất khử trùng, chất sát trùng và chất kháng khuẩn.

Kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 theo sáng chế làm hoạt chất có tính đặc hiệu cao với *Escherichia coli* gây bệnh cho chim so với chất kháng sinh thông thường, do đó không diệt vi khuẩn có lợi mà chỉ diệt vi khuẩn gây bệnh và không gây kháng thuốc, do đó kháng sinh theo sáng chế có thể là chất kháng sinh mới có vòng đời dài hơn so với kháng sinh thông thường.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất phụ gia thức ăn cho động vật và chất phụ gia cho vào nước uống cho chim, cụ thể là gia cầm chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 làm hoạt chất.

Chim là đối tượng để sử dụng chất phụ gia cho đồ ăn hoặc nước uống, đối tượng này không bị giới hạn nhng trong phương án cụ thể này thì là gia cầm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gia cầm” là tên chung để chỉ các động vật thuộc loài chim trong số các động vật nuôi. Gia cầm bao gồm, nhưng không chỉ hạn chế ở, ít nhất một động vật được chọn từ nhóm bao gồm gà, vịt, gà tây.

Chất phụ gia cho thức ăn và chất phụ gia cho vào nước uống theo sáng chế có thể được sử dụng theo cách mà thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 được tạo ra riêng biệt ở dạng chất phụ gia thức ăn cho động vật hoặc chất phụ gia cho vào nước uống và sau đó trộn vào thức ăn hoặc nước uống cho động vật, hoặc thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 được cho trực tiếp vào khi chuẩn bị thức ăn hoặc nước uống cho động vật.

Thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 được sử dụng làm chất phụ gia cho thức ăn 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.

Ví dụ, thể thực khuẩn ΦCJ25 theo sáng chế có thể được trộn ở dạng bột với lượng nằm trong khoảng từ 0,05% theo trọng lượng đến 10 theo trọng lượng, cụ thể là từ 0,1 theo trọng lượng đến 2 theo trọng lượng, dựa trên trọng lượng của chất phụ gia cho thức ăn.

Phương pháp làm khô chất phụ gia cho thức ăn và chất phụ gia cho vào nước uống theo sáng chế thành dạng bột khô không bị hạn chế, mà là phương pháp bất kỳ được sử dụng thông thường trong lĩnh vực này. Một ví dụ không làm hạn chế về phương pháp làm khô là phương pháp làm khô tự nhiên trong không khí, phương pháp phun khô, phương pháp đông khô và các phương pháp tương tự. Các phương pháp này có thể được sử dụng riêng biệt hoặc kết hợp với nhau.

Chất phụ gia cho thức ăn hoặc chất phụ gia cho vào nước uống có thể chứa thêm vi sinh vật không gây bệnh khác. Các vi sinh vật như vậy có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus* sp. như *Bacillus subtilis* có thể tạo ra proteaza, lipaza, và/hoặc glycosyltransferaza; vi khuẩn axit lactic như *Lactobacillus* sp. có hoạt tính sinh lý học và hoạt tính làm thoái biến chất hữu cơ ở các điều kiện kỵ khí như dạ dày bò; vi khuẩn dạng sợi như *Aspergillus oryzae* có tác dụng làm tăng trọng lượng vật nuôi, tăng sản lượng sữa, làm tăng khả năng tiêu hóa thức ăn cho động vật; và nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* hoặc các loại tương tự. Các sinh vật này có thể được sử dụng riêng biệt hoặc kết hợp với nhau.

Chất phụ gia cho thức ăn hoặc chất phụ gia cho vào nước uống chứa thể thực khuẩn (ΦCJ25 theo sáng chế làm hoạt chất có thể chứa thêm các chất phụ gia khác, nếu cần. Một ví dụ không làm hạn chế phạm vi của sáng chế về chất phụ gia có thể sử dụng được 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 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 loại dịch chiết, các oligosacarit và các chất tương tự, được cho vào để làm tăng độ hữu dụng của thức ăn hoặc đồ uống. Ngoài ra, chất phụ gia có thể có thêm chất trộn vào thức ăn hoặc các chất tương tự. Các chất phụ gia này có thể được sử dụng riêng biệt hoặc kết hợp với nhau.

Chất phụ gia cho thức ăn chiếm hàm lượng từ 0,05 đến 10, tốt hơn là từ 0,1 đến 2 phần trọng lượng của thức ăn cho động vật. Chất phụ gia cho vào nước uống có thể có hàm lượng từ 0,0001 đến 0,01, tốt hơn là từ 0,001 đến 0,005 phần trọng lượng so với 100 phần trọng lượng của nước uống cho động vật. Hoạt tính của thể thực khuẩn ΦCJ25 kháng lại *Escherichia coli* gây bệnh cho chim có thể có đủ tác dụng với lượng nêu trên.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thức ăn hoặc nước uống cho động vật được chế biến bằng cách bổ sung chất phụ gia chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 làm hoạt chất vào thức ăn cho động vật hoặc chất phụ gia cho vào nước uống cho động vật hoặc bổ sung trực tiếp thể thực khuẩn ΦCJ25.

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

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 làm hoạt chất. Chế phẩm tẩy rửa hoặc chất làm sạch không bị giới hạn cụ thể mà có thể được tạo ra theo dạng chế phẩm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chất tẩy rửa có thể được phun để loại bỏ *Escherichia coli* gây bệnh cho chim 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, phơi nhiễm hoặc sắp phơi nhiễm với *Escherichia coli* gây bệnh cho chim, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các động vật này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra bằng cách sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ25.

Cụ thể là, phương pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh lây nhiễm theo sáng chế bao gồm việc sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ25 cho chim bị nhiễm *Escherichia coli* gây bệnh cho chim hoặc có nguy cơ nhiễm *Escherichia coli* gây bệnh cho chim với liều có hiệu quả điều trị. Tổng liều thích hợp trong ngày của thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này có thể được quyết định bởi bác sĩ điều trị hoặc bác sĩ thú y, là rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Liều chính xác hiệu quả đặc hiệu của thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ25 cho chim có thể được xác định bằng cách xem xét mức độ phản ứng thu được, độ tuổi, thể trọng, tình trạng khỏe tổng quát, giới tính hoặc chế độ ăn của từng cá thể, thời gian sử dụng và đường sử dụng của thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ25, tốc độ bài tiết chế phẩm, khoảng thời gian điều trị hoặc các yếu tố khác và có thể thay đổi nhiều phụ thuộc vào nhiều yếu tố 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 ΦCJ25 theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ25 có thể được sử dụng ở dạng được phẩm cho chim bằng cách xịt

vào mũi hoặc sử dụng theo cách cho trực tiếp vào thức ăn hoặc nước uống của chim và sau đó cho động vật ăn thức ăn hoặc nước uống này hoặc có thể trộn vào thức ăn hoặc nước uống cho chim ở dạng chất phụ gia thức ăn cho động vật hoặc chất phụ gia cho vào nước uống và cho chim sử dụng.

Đường sử dụng và phương pháp sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ25 theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ25 không bị giới hạn mà có thể sử dụng bất kỳ đường sử dụng hoặc phương pháp sử dụng nào miễn là thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này có thể đi vào mô đích. Có nghĩa là, thể thực khuẩn ΦCJ25 hoặc chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ25 có thể được sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Các ví dụ về đường sử dụng nhưng không làm hạn chế phạm vi của sáng chế là sử dụng qua đường miệng, đường trực tràng, tại chỗ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, dưới da và sử dụng qua đường mũi, xông hít hoặc các đường khác.

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 làm hạn chế phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phân lập thể thực khuẩn gây nhiễm cho *Escherichia coli* gây bệnh cho chim

Ví dụ 1-1

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

Sau khi 50ml mẫu thu được từ phân gà thu được từ các điểm trong trang trại nuôi gia cầm ở Chengwon-gun, tỉnh Chungcheong 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 0,45ml 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 phản ứng ly giải của thể thực khuẩn bằng cách sử dụng các tế bào chủ sinh trưởng trên bề mặt thạch (gắn vào giá thể rắn sử dụng 0,7% thạch).

Cụ thể là, 150ml dung dịch nuôi cấy lactic ($OD_{600} = 2$) chứa *Escherichia coli* gây bệnh cho chim, (E10-4) thu được từ khoa Thú y Trường đại học Kunkuk và 2ml

10xmôi trường LB (10 g/l of tryptophan; 5 g/l of dịch chiết nấm men; 10 g/l NaCl) được trộn với 18ml dịch mẫu đã được lọc và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 18 giờ và 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 0,45µm. Sau đó, sau khi dung dịch chứa 3 Ml thạch 0,7% (trọng lượng/thể tích) và 150ml dung dịch nuôi cấy lắc ($OD_{600} = 2$) chứa *Escherichia coli* gây bệnh cho chim (E10-4) được rót vào và để cho đặc lại trên đĩa LB, 10ml dung dịch lọc của môi trường mẫu được cho từng giọt vào, sau đó nuôi cấy ở 37°C trong 18 giờ và xác nhận sự hình thành các vết tan.

Đã biết rằng, mỗi loại thể thực khuẩn sẽ tạo ra một vết tan đơn nên các tác giả sáng chế dự định tách thể thực khuẩn đơn từ vết tan tạo thành. Cụ thể là, vết tan được cho vào 400µl dung dịch SM (NaCl (5,8g/l); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2g/l); 50ml Tris-Cl 1M (pH 7,5,); H_2O , và để ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, sau đó thu được dung dịch thể thực khuẩn.

Sau đó, 100ml dung dịch chứa thể thực khuẩn được trộn với 12ml thạch 0,7% (trọng lượng/thể tích) và 50ml dung dịch nuôi cấy lắc ($OD_{600} = 2$) chứa *Escherichia coli* gây bệnh cho chim (E10-4) được sử dụng để thực hiện phương pháp phủ thạch mềm sử dụng đĩa môi trường LB có đường kính 150mm, trong đó việc nuôi cấy được thực hiện đến khi thể thực khuẩn được ly giải hoàn toàn. Sau khi kết thúc nuôi cấy, 15ml dung dịch SM được cho vào đĩa LB và để ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ, sau đó thu lấy dung dịch chứa thể thực khuẩn.

Cloroform với lượng 1% (thể tích) được cho vào dung dịch thu được và hỗn hợp được trộn trong 10 phút, sau đó ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút rồi thu lấy dịch nổi. Dịch nổi thu được được lọc qua bộ lọc 0,45 µm, sau đó thu được mẫu cuối cùng.

Ví dụ 1-2

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

Thể thực khuẩn thu được từ ví dụ 1-1 được nuôi cấy trên quy mô lớn bằng cách sử dụng *Escherichia coli* gây bệnh cho chim (E10-4), và sau đó thể thực khuẩn được tinh chế từ đó.

Cụ thể là, sau khi *Escherichia coli* gây bệnh cho chim (E10-4) được nuôi cấy lắc và khi đến nồng độ $1,0 \times 10^{10}$ cfu được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng trong 10 phút và

sau đó tái tạo huyền phù trong 4ml dung dịch SM. Thể thực khuẩn $1,0 \times 10^6$ pfu được đưa vào dung dịch này (hệ số nhiễm: multiplicity of infection-MOI) là 0,0001 và để ở nhiệt độ phòng trong 20 phút.

Sau đó, 150 ml dung dịch LB được này được cho vào và nuôi cấy ở 30°C trong 6 giờ. Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, chloroform được cho vào với lượng 1% (thể tích) của dung dịch cuối và khuấy trong 20 phút. Sau đó, các enzyme cắt giới hạn ANDaza I và ARNaza A được lần lượt cho vào đến nồng độ cuối cùng là 1 µg/ml và dung dịch được để ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, NaCl và polyetylen glycol được cho vào đến nồng độ cuối cùng lần lượt là 1M và 10% (trọng lượng/thể tích) và được để ở 4°C trong 3 giờ, sau đó ly tâm ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút rồi thu lấy chất lắng.

Chất lắng thu được được tái tạo huyền phù trong 5ml dung dịch SM và để ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút, sau đó, 4ml chloroform được cho vào và khuấy, sau đó ly tâm ở nhiệt độ 4°C với vận tốc 4000 vòng/phút trong 20 phút, sau đó thu lấy dịch nổi. Dịch nổi được lọc bằng bộ lọc 0,45 µm và thực hiện siêu ly tâm (35000 vòng/phút trong 1 giờ ở 4°C) bằng cách sử dụng phương pháp gradient nồng độ glyxerol (nồng độ glyxerol: 40%, 5%), sau đó tinh chế thể thực khuẩn này.

Các tác giả sáng chế đặt tên cho thể thực khuẩn thu được bằng cách chiết mẫu từ phân gà trong trang trại có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng lại *Escherichia coli* gây bệnh cho chim là "Thể thực khuẩn ΦCJ25" 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 KCCM11463P ngày 30/1/2013.

Ví dụ 2

Quan sát hình thái của ΦCJ25

Thể thực khuẩn ΦCJ25 được tinh chế trong Ví dụ 1 được pha loãng trong dung dịch gelatin 0,01% và sau đó được cố định bằng dung dịch 2,5% glutaraldehyt. Thể thực khuẩn thu được được cho từng giọt vào đĩa mica phủ cacbon (xấp xỉ 2,5x2,5 mm), giữ nguyên trong 10 phút và rửa bằng nước cất vô trùng.

Sau đó, màng cacbon được đặt lên lưới bằng đồng, nhuộm bằng uranyl axetat

4% trong thời gian 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 200,000) (FIG. 1).

FIG. 1 thể hiện hình ảnh kính hiển vi điện tử chuyển đổi của thể thực khuẩn ΦCJ25 và do thể thực khuẩn ΦCJ25 này có hình dạng đa diện 20 mặt và có đuôi không co rút được, cho thấy hình thái thể thực khuẩn thuộc loại B1 *Siphoviridae*.

Ví dụ 3

Phân tích kích thước ADN hệ gen của ΦCJ25

ADN hệ gen được chiết từ thể thực khuẩn ΦCJ25 được tinh chế như trong Ví dụ 1.

Cụ thể là, axit etylenđiaminetetraaxetic 20mM (EDTA), proteinaza K 50µg/ml, và natri dodecyl sulfat 0,5% (SDS) được cho vào dung dịch nuôi cấy chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 tinh khiết và để ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ, tiếp đó bổ sung một thể tích phenol (pH=8,0) tương đương vào và khuấy, sau đó ly tâm ở nhiệt độ trong 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, sau đó 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 dung dịch natri axetat 3M với thể tích bằng 10% tổng thể tích và bổ sung dung dịch etanol lạnh 95% với thể tích gấp đôi, trộn và để ở nhiệt độ -20°C trong 1 giờ.

Sau đó, dịch thu được được ly tâm ở nhiệt độ 0°C ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút và thu lấy chất lắng bằng cách loại bỏ dịch nổi. Sau đó, hòa tan chất lắng thu được bằng 50µl dung dịch đệm TE (Tris-EDTA; pH=8,0). ADN được chiết được pha loãng 10 lần và nồng độ ADN được tính bằng phương pháp đo hấp phụ ở bước sóng OD₂₆₀.

Tiếp đó, 1µg ADN được nạp lên gel agaro 1% điện di trong trường xung điện (pulse-field gel electrophoresis-PFGE) và phát triển bằng cách sử dụng hệ BIORAD PFGE chương trình 7 (mức độ kích thước: 25-100 kb; mức độ thời gian thay đổi: 0,4 đến 2,0 giây, hình tuyến tính; điện áp hướng tới: 180 V; điện áp ngược: 120 V) ở nhiệt

độ phòng trong 20 giờ (FIG. 2).

FIG. 2 hình điện di trong trường xung điện (pulsed field gel electrophoresis: PFGE) của ADN hệ gen của thể thực khuẩn ΦCJ25, và có thể xác nhận là ADN hệ gen của thể thực khuẩn ΦCJ25 có kích thước khoảng 53kb.

Ví dụ 4

Phân tích mẫu protein của ΦCJ25

15ml dung dịch thể thực khuẩn ΦCJ25 tinh khiết (chuẩn độ 10^{11} pfu/ml) được trộn với 3ml dung dịch mẫu 5xSDS và đun sôi trong 5 phút để thực hiện phép điện di SDS-PAGE 12% (FIG. 3).

FIG. 3 là hình điện di thể hiện kết quả của phép SDS-PAGE thực hiện cho thể thực khuẩn ΦCJ25 và có thể thấy rằng các protein chủ yếu có kích thước khoảng 10,3kDa, khoảng 12,5kDa, khoảng 15,1kDa, khoảng 43kDa, khoảng 49,3kDa, khoảng 60,4kDa và khoảng 94,9kDa.

Ví dụ 5

Phân tích đặc tính di truyền của ΦCJ25

Để xác định các đặc tính di truyền của thể thực khuẩn ΦCJ25 được tính chế trong Ví dụ 1, ADN của thể thực khuẩn ΦCJ25 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 bằng cách sử dụng phần mềm lắp ráp GS trên máy Macrogen INC. Trình tự khung đọc mở được xác định bằng cách sử dụng phần mềm GeneMark.hmm, Glimmer v3.02 và FGENESB. Việc phân tích khung đọc mở được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTP và InterProScan.

Trình tự nucleotit của thể thực khuẩn ΦCJ25 có rất nhiều điểm giống với trình tự nucleotit của các thể thực khuẩn đã biết (thể thực khuẩn *Escherichia* phiEB49, thể thực khuẩn *Escherichia* KBN21) 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.

Bảng 1 dưới đây thể hiện kết quả thu được khi so sánh các trình tự nucleotit của thể thực khuẩn ΦCJ25 và trình tự nucleotit đã được giải mã đã biết.

Bảng 1

Câu lệnh				Đối tượng		Mức độ tương đồng	
Tên	Chiều dài	Bắt đầu	Kết thúc	Mô tả	Giá trị E	Tương đồng/ Tổng số	Pct.(%)
SEQ ID NO: 1	39618	1	9030	Thể thực khuẩn <i>Escherichia</i> EcoDS1, hệ gen đầy đủ	0	8653/9041	95

ADN của thể thực khuẩn ΦCJ25 đã được chuẩn bị được phân tích bằng cách sử dụng máy đọc trình tự ADN và kết quả từng phần của trình tự nucleotit được phân tích được nêu trong SEQIDNO: 1.

Ví dụ 6

Độ ổn định pH của ΦCJ25

Để xác định xem thể thực khuẩn ΦCJ25 có ổn định trong môi trường pH thấp của dạ dày hay không, thử nghiệm về độ ổn định được thực hiện trong một khoảng pH rộng (pH- 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,5; 6,5; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 và 11,0).

Để thử nghiệm, các dung dịch có độ pH khác nhau (dung dịch đệm natri axetat (pH=4,0; pH=4,5; pH=5,0 và pH=5,5) và các dung dịch đệm natri xitrat (pH=2,5; pH=3 và pH=3,5) được điều chế ở nồng độ 0,2M.

180μl mỗi dung dịch pH được trộn với 20μl dung dịch thể thực khuẩn được chuẩn độ $2,0 \times 10^{11}$ PFU/ml để mỗi dung dịch pH có nồng độ 1M, và sau đó dung dịch thu được được để ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Đối với nhóm đối chứng, 20μl dung dịch thể thực khuẩn được chuẩn độ $2,0 \times 10^{11}$ PFU/ml được trộn với 180μl dung dịch SM theo phương pháp tương tự và dung dịch thu được được để ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó, các dung dịch được pha loãng hàng loạt, và 10μl mỗi dung dịch của từng bước pha loãng được nuôi cấy bằng phương pháp dùng lớp thạch mềm ở 30°C trong 18 giờ để xác định chuẩn độ thể thực khuẩn dựa trên việc thể thực khuẩn có bị ly giải hay không (Fig. 4).

Fig. 4 thể hiện kết quả thử nghiệm về khả năng kháng axit của thể thực khuẩn ΦCJ25. Trong Fig. 4, có thể thấy rằng thể thực khuẩn ΦCJ25 không bị mất hoạt tính

và độ ổn định được duy trì trong khoảng pH từ pH=3,5 đến pH=11, so với nhóm đối chứng.

Ví dụ 7

Độ ổn định với nhiệt độ của ΦCJ25

Nếu thể thực khuẩn được đưa vào chất phụ gia cho thức ăn cho gia súc ở các dạng liều khác nhau của thể thực khuẩn, nhiệt có thể được tạo ra trong quá trình bào chế và do đó, các thử nghiệm dưới đây được thực hiện để xác định độ ổn nhiệt của các thể thực khuẩn này.

Cụ thể là, 100μl dung dịch chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 có nồng độ $1,25 \times 10^{10}$ pfu/ml được để ở các nhiệt độ 37°C, 45°C, 53°C và 60°C lần lượt trong 10 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút. Sau đó, dung dịch nêu trên được pha loãng hàng loạt, 10μl mỗi dung dịch pha loãng được nhỏ giọt và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 18 giờ để xác định chuẩn độ thể thực khuẩn dựa trên thể thực khuẩn bị ly giải (FIG. 5).

FIG. 5 thể hiện kết quả thử nghiệm về khả năng kháng nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ25. Như nêu trong FIG. 5, có thể thấy là thể thực khuẩn ΦCJ25 không bị giảm hoạt tính ở 53°C trong 120 phút, và hoạt tính giảm 1 log hoặc ít hơn khi đưa đến nhiệt độ 60°C trong 120 phút.

Ví dụ 8

Độ ổn định trong điều kiện sấy khô của thể thực khuẩn ΦCJ25

Nếu thể thực khuẩn được đưa vào chất phụ gia cho thức ăn cho gia súc ở các dạng liều khác nhau của thể thực khuẩn, thể thực khuẩn có thể bị làm khô trong quá trình bào chế và do đó, các thử nghiệm dưới đây được thực hiện để xác định độ ổn định của các thể thực khuẩn này chịu được các điều kiện sấy khô.

Dựa trên các thử nghiệm về khả năng kháng nhiệt, thử nghiệm sấy khi được thực hiện bằng cách sử dụng máy cô SpeedVac. 200μl dung dịch thể thực khuẩn ΦCJ25 với nồng độ $1,2 \times 10^{10}$ PFU/ml được làm khô ở 60°C trong chân không trong 2 giờ, và các viên tròn thu được được đưa vào 200μl dung dịch SM, sau đó tái tạo huyền phù hoàn toàn ở 4°C trong một ngày, từ đó đo các mức chuẩn độ (Fig. 6).

Fig. 6 thể hiện kết quả thử nghiệm về khả năng chịu được sấy khô của thể thực khuẩn ΦCJ25. Như thể hiện trên Fig.6, có thể thấy là sau khi sấy khô, khi so sánh với các mức chuẩn độ đầu tiên và các mức độ ổn định liên quan, thể thực khuẩn ΦCJ25 bị mất hoạt tính khoảng 1 log khi thể thực khuẩn ΦCJ25 được sấy khô ở 60°C trong 2 giờ.

Ví dụ 9

Thử nghiệm mức độ nhiễm của thể thực khuẩn ΦCJ25 so với các chủng *Escherichia coli* gây bệnh cho chim kiểu đại

Ngoài *Escherichia coli* sinh độc tố ruột (E09-19) được sử dụng trong thử nghiệm này, hoạt tính phân giải của thể thực khuẩn ΦCJ25 được thử nghiệm trên 46 chủng *Escherichia coli* gây bệnh cho chim kiểu đại được phân lập bởi khoa thuốc thú y trường Đại học Konkuk (KU), 10 chủng *Escherichia coli* gây bệnh cho chim được phân lập bởi Trung tâm kiểm dịch động thực vật Hàn Quốc (KAPQA), 7 chủng *Escherichia coli* gây bệnh cho chim được phân lập bởi khoa thuốc thú y, Đại học quốc gia Chonbuk (CNU), và 26 chủng *Escherichia coli* gây bệnh cho chim đã được chẩn đoán bệnh được phân lập bởi nông trại Komipharm đều được thử nghiệm.

Cụ thể là, 150μl dung dịch nuôi cấy lắc chứa mỗi chủng ($OD_{600} = 2$) được trộn, và 10μl dung dịch chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 có mức chuẩn độ 10^9 pfu/ml được cho vào từng giọt và nuôi cấy bằng phương pháp dùng lớp thạch mềm ở 30°C trong 18 giờ, và sau đó việc hình thành vết tan được xác định (bảng 2).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Số	Các chủng KU	Kiểu huyết thanh	ΦCJ25	Số	Các chủng KAPQA	Kiểu huyết thanh	ΦCJ25
1	E09-1			48	06Q-035	O-78	0
2	E09-2			49	06D-044	O-78	0
3	E09-3		0	50	06Q-140	O-78	0
4	E09-4			51	07D-001	O-78	0
5	E09-5			52	07D-022	O-78	0
6	E09-6	O-78	0	53	07Q-039	O-78	0
7	E09-7			54	KWU-02	O-78	0
8	E09-8	O-78	0	55	KWU-32	O-78	0
9	E09-9	O-78	0	56	KWU-33	O-78	0
10	E09-10			57	KWU-43	O-78	0
11	E09-11	O-78	0	Số	Các chủng CNU	Kiểu	ΦCJ25

12	E09-12	O-125				huyết thanh	
13	E09-13			58	A12-MRA-076-①		
14	E09-14			59	A10-LSf-005		
15	E09-15		0	60	AI 1-LSF-043		
16	E09-16			61	A12-MRA-076-②		
17	E09-17			62	D12-JW-058		
18	E09-18			63	A12-LSF-083	O-78	0
19	E09-19			64	A12-MRA-076-③		
20	E09-20			Số	Các chủng KF	Kiểu huyết thanh	ΦCJ25
21	E09-21						
22	E09-22			65	12-001-3		
23	E09-23		0	66	12-053		
24	E09-24			67	12-055		
25	E09-25			68	12-086-1	O-78	0
26	E09-26			69	12-086-2	O-78	0
27	E09-27		0	70	12-096-3		
28	E09-28			71	12-175		
29	E09-29			72	12-187	O-78	0
30	E09-30		0	73	12-211-5		
31	E09-31			74	12-220-4		
32	E09-32		0	75	12-220-6		
33	E09-33			76	12-248		
34	E09-34		0	77	12-261-1		
35	E09-35(297	O-78	0	78	12-266		
36	E09-36C34			79	12-274-1		
37	E09-37(343			80	12-275-2	O-78	0
38	E09-38(343			81	12-286-2		
39	E09-39(353			82	12-300	O-78	0
40	E09-40(353			83	12-303-2	O-78	0
41	E09-41(376			84	12-304-3		
42	E09-42(376			85	12-299-1	O-78	0
43	E102	O-1	0	86	12-299-2	O-78	0
44	E103	O-78	0	87	12-299-3	O-78	0
45	E104	O-78	0	88	12-324	O-78	0
46	E105	O-78	0	89	12-338-1	O-78	0
47	E106			90	12-338-4	O-78	0

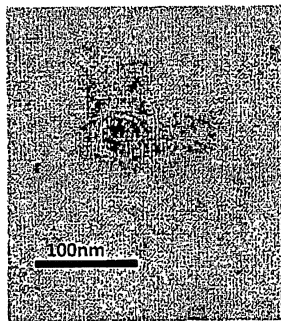
Như thể hiện trong bảng 2, thể thực khuẩn ΦCJ25 thể hiện khả năng gây nhiễm đối với *Escherichia coli* gây bệnh cho chim (bao gồm các kiểu huyết thanh 0-1, 0-78, 0-125) là nguyên nhân chính gây bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây ra cho chim ở các nông trại gia cầm.

Đã biết là thông thường kiểu huyết thanh 0-78 là chủng nổi trội nhất trong số các chủng *Escherichia coli* gây bệnh cho chim được phân lập từ các nông trại gia cầm.

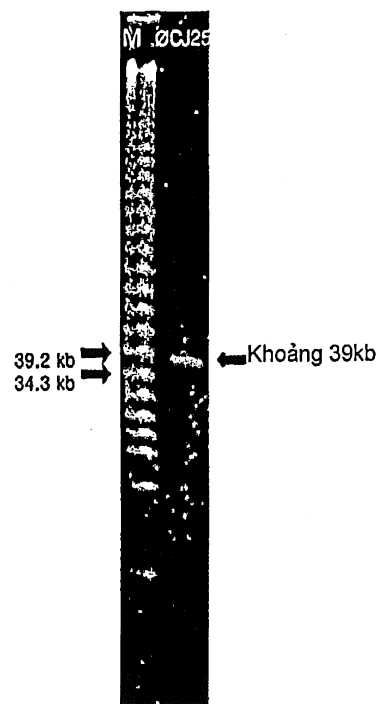
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) có khả năng tiêu diệt đặc hiệu đối với *Escherichia coli* gây bệnh cho chim.
2. Chế phẩm ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra, chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) theo điểm 1 làm hoạt chất.
3. Chế phẩm ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Escherichia coli* gây bệnh cho chim gây ra theo điểm 2, trong đó bệnh nhiễm khuẩn là bệnh tiêu chảy do E.coli gây ra ở chim.
4. Kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) theo điểm 1 làm hoạt chất.
5. Chất phụ gia cho thức ăn dành cho chim chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) theo điểm 1 làm hoạt chất.
6. Thức ăn dành cho chim chứa chất phụ gia cho thức ăn dành cho chim theo điểm 5.
7. Chất phụ gia cho vào nước uống cho chim chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) theo điểm 1 làm hoạt chất.
8. Nước uống cho chim chứa chất phụ gia cho vào nước uống cho chim theo điểm 7.
9. Chất khử trùng chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) theo điểm 1 làm hoạt chất.
10. Chất tẩy rửa chứa thể thực khuẩn ΦCJ25 (KCCM11463P) theo điểm 1 làm hoạt chất.

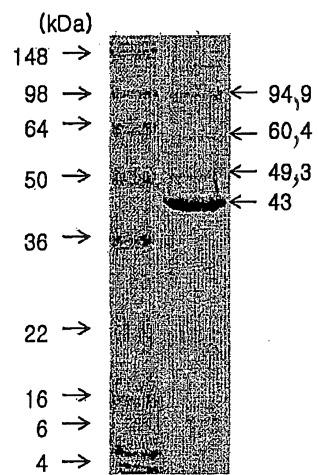
【Fig.1】



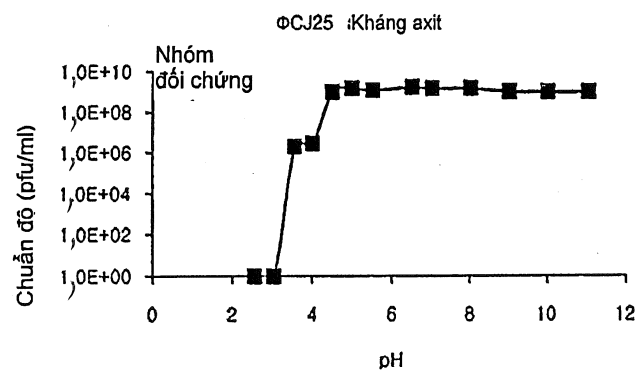
【Fig.2】



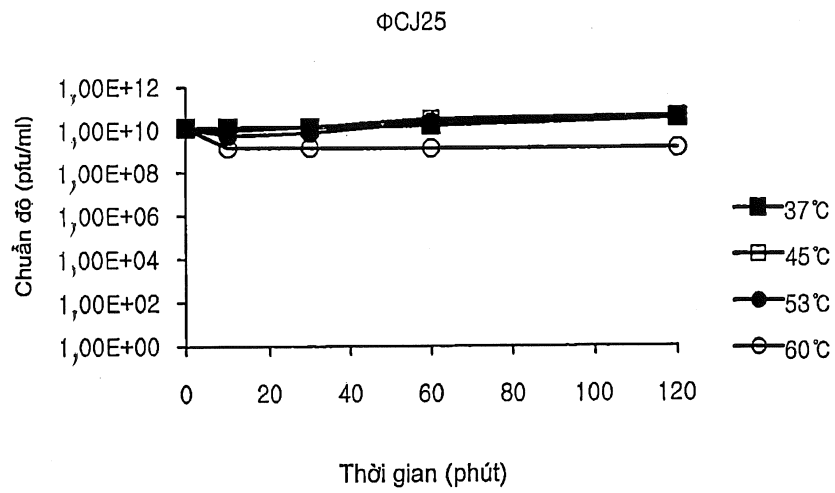
【Fig.3】



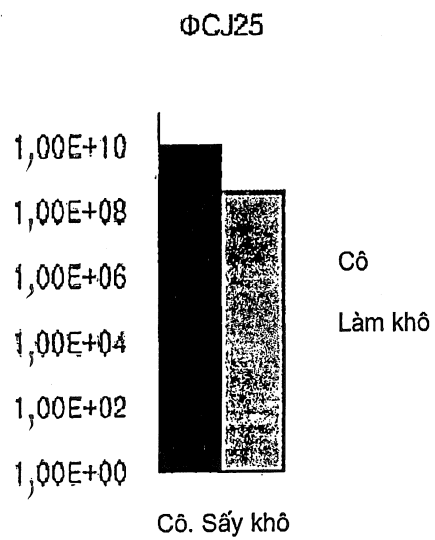
【Fig.4】



【Fig.5】



【Fig.6】



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION
 <120> THỂ THỰC KHUẨN ΦCJ25 CÓ HOẠT TÍNH ĐẶC HIỆU DIỆT ESCHERICHIA COLI GÂY BỆNH CHO CHIM VÀ CHẾ PHẨM CHỨA THỂ THỰC KHUẨN NÀY
 <130> P14-5114
 <150> KR 10-2014-0044997
 <151> 2014-04-15
 <160> 1
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 39618
 <212> ADN
 <213> Thể thực khuẩn CJ25
 <400> 1
 tcttcaatct taatcaggaa ccgtgagaac ttgtaggaca tcagataaga ccttccgatg
 60
 aacactgtac gtcctgacca atctccattg agtgtaacca cagttgagat ttcggtcaat
 120
 tcaccaaggt ccacgtaagc accctgactg tcaataagat agtagcgacc gggagacgga
 180
 gtgtttccac cataagcaga accaatgtca accgtagtct tatagggtgc agcggtgtat
 240
 gagtcaattg gtattatcat agacaccttg gagtcaacgt ggagtctata cggctctaata
 300
 ggaaagtcag ttgcctcctt gatgaactta aggtgctcaa ggtccacgcc gacttggtgc
 360
 tgacgaacaa tgaacatggt agagccaatc gacgcagacg ccagaatctt atcagcttta
 420
 gggaactccc agtgcgacca agaggcttga agctgtacgc cgtccttaaa caagaacttg
 480
 tagatgtaga ttcggttgta tgcacctgta gagttgacgc agatgtagtt ctcggtccct
 540
 gtaccttgaa tgtcaaacac cccgttaggg atataagaca gtacgtggcc agtggtatca
 600
 tcggcatcct tcacgtcaga cacatctgct acagcgaagt atcgcttaat gctggtgaat
 660

gaccacgag gcgctgagaa gaagactgag cgtcctacag cgaacggtct ggcattatcg
720

cctacggcaa actctgagcc tacatcaagc tggatagact tcgaggtaag gaccctgag
780

cttgtcatca cgaactgcac ctcatctgac caaagtagta gctgctcact aaacggaacg
840

gcataacttaa ggattgagat tctaggggtga cttacagcta cgtcaatagg atcgtcatca
900

ctcagtgtcg ccacactctt aggaagaac gcaaagtagc tggctgaacg gctcatgatt
960

acgttctcgc ctgacaagaa cccagccta ttctgtaga agaacacatc gttaatcgta
1020

gcatccacga agctaggcat agggtttgtg tcatcattac cagcaccacg cttagaccag
1080

tccagagtct tgaactcaaa ggagccgtca gattgtctca ccagagcatg tggcattgtg
1140

gtgttgtcga acccagtgac cactcccggc tctactgtct ccttccacgt cttagtgttg
1200

gagtcataca tcacgtaata ttcatcggcg ctactgttgg tctcaccttg aatcttaatg
1260

atgtacccat ttggagcagc aagaggcaac ttagagattg tctgcaccgt gtcgaggact
1320

gggctgatta gctggttagc gtagccatcc tccgtctcca ctgagttaat gtcagtcctt
1380

gaaggggcag tgattaacag gaatccaggc ccaaggctga acgtgaaggt agggtaagca
1440

gcaacaagaa ggtctctcag agcttcaccg atgacctgag catccacctt atgagggtcc
1500

ttctcggcat cagtacctgc tggcaactta tgccaaacct taactcctcc gttgattcct
1560

accctaaggc cgcgaccata ctgtccgcc cgcagggttaa ttaaagcacg agctttacaa
1620

ttataaccag agtgtgcctt ctgcctcccc cctttaacga caaccttacg gttcacgatg
1680

aacgtatagt ctgcaacggt aacgacacgg atatcatctc gcgggttgga cgacttaacg
1740

tagtctacct caccggaac tgagtactga ttaccactca agtcaactac ctgaatgttg
1800

gacccgttga acacgatgta atactgctcc tgctcatcac ggtaaatcag gtggaactta
1860

gggttgctcc caacgtcgat gttaagacgt cgcttgaaga ctgtaggtgg acgcttctgg
1920

agtccatcac tttcggatga ccagcagtta acttgctcct cgccttggtc cgagaacctc
1980

aggatgtcgg gctgctggct aatgccacct ttaaggttct tgattgattg agtaattagt
2040

ggcataggcc ctccttaaact catactcatt aggacgtatc cctcagcgat gtcaccaacg
2100

tcagcaatgt ggacaacctt acgtgctacc tgttgtccag tatacccggt gtccactca
2160

ttcaggataa gccagtcgcc aaccttaaag tcccggtcgt taagtctaag ctctgctgtc
2220

tttagacctt gctgtaccgg accaaagtgc tggcggtgaa tcttcagggt gtgactagcc
2280

attagtccct cccgatgtcg gacatcatgt tgtagcgacc agtgtccatc tcgtattcca
2340

tgacctgctg atagagctct gcttctgct cacgaaggta cagttcagac tctgggctac
2400

cgaagaactt agcgttgaac tcacggctag ctttagtgac gatgtagtcc ctgaagacca
2460

caggcatctc ggagaatggc ttcattctca caagctctac cgtgataggg tcggtgaaag
2520

tggttgactg agtggacagg tcgtacaggt atccacccat gttgctgtag tagctgggtg
2580

ccccagtggc cattacacga aggtatgacg gcaagaatcg aatcctattg tcttgacat
2640

caggtgtcag gacagcagct tcgttgatgt taaagttcca gcctttagct tggacctgac
2700

gattgacacg atgcagtata cggtgagcgt tcgagacgtc agcgttcccc tcgtcaagct
2760

gtaggactgc tggttcaccg atagcagcta acatatcgtt gatggcgtct aagtcacgt
2820

tagtattcag tggaatgtat tgagccataa gtctcctctc gctttaagca aaaaaaaccc
2880

ctcaagcacc cgaaggcacc caaggggttt caattagttg ttggactcag ccagtttagc
2940

ggccctgttc gcagcacgag tacgcgcagc tttctgttga ggagttaggg tctcctcttc
3000

aggtgcagcc gctactgtag cgacgttagg ttggctaaag gtgcttacgc cgctgcgctg
3060

aaaaccagtg cgccagccgc ttcagggcgc agaccaccgt gacccatagc gtacttacca
3120

acaatcaggt cgccctgagc atcgacgtca cggtcacgtt ccagcgccaa gtcacgcagc
3180

ttaacggtac ccacagcaga acggtgagag aacagacca caacgttgtc catagcaact
3240

ttaacgtcgc cagtagcagt tgccgggaat gcgtgtttct gaccggaagt gatagagata
3300

ccatcgtcac cacgggtctc accagcgcca ccctgtacaa gatgcggaac ttcaacaaca
3360

acgaagccca tcacgttacg gatgttacca gtctctgggt caatcagcgc agcatagtta
3420

gcagcgttag gcatcagagc ggcgaggatt gcagagtagt tgtccggcgt ggtgtagaag
3480

taacggtcgc cagcaggaac gtagttggag gtcagcttcg cacgagcaat ggtcagttga
3540

ccaatgattg cttcacccag tttagccggg gtgtcgaggt cagctttctt accaacttcc
3600

agtacggacg cagtaccag accagcgatg ttctcggttg atgcagctgg gaggttacac
3660

aggatagcca tttcagccag aacagcacca tcggcagcga tagccagagc ctcacccaac
3720

tggttggaat actcgccagc cacgtcatag tggttcatag cgtcttcaat gtcgaaaatc
3780

atcacatcgg cagtcagcag accatcaatg gtaatcactt tctcggtatg tttgatacct
3840

ttacgcttat ctgacagtcg ctcacctgga gccagataca caccagaggt gcggcccatg
3900

accgggaact gagcagactt accgttctga atggtacgga caatatgctt gtcagccgtt
3960

acagagcggc gagtgaatgc ggtcaggact tcaccagcaa agaccttcag gaacaacgcc
4020

agagcgtcgg aactggatgt acctttacct tggctctgtac caattttctg acccgtaacc
4080

tttgccatat gataattctc ctattcaatt gaaagataaa gtttattact tactgtatgc
4140

ccaatccgta tggactgaag taatagggaa accttgagtc tgtctcttgg tctccctata
4200

gtgatagttt agtcctacag gcttgaggcg gctaccttag cgcgaacttc catcgtgtac
4260

ttagcgtcac gcaggatcgc cgggtcactc atagccttaa tcatgtcagc cttggagctg
4320

aatgcttcgg tctgaggagc cttaggtgcg accacaggtt tagcctgagt ggtgatggta
4380

cgctgagggt taacacctac agctttaccc agagtcttgc cagccagatt cagaagagct
4440

ttggtagtag caatgtcctt acgaacgata gcagcttcca gtgcttcacg agttgatggg
4500

tcgttggatt caaggtgtga caggattcga ttaaaatggt cagcaccacc agcgtatcga
4560

accacaccag cagcgtactg ttcagccaga gcttcctgac cacgtacaaa cgaatctacg
4620

aaacgcttgg tgtaacctgc ttcttgaac ttagcgtagg atgcgtcaga cagcttacgg
4680

tccttggcgt attcagcctt gatagcggta atctcatcag cagtgcctt gccagcttct
4740

acagcagaag acaccatgtc gtcgaatgca gcttcgtttt catccagagc ggtgacactt
4800

tcggtcagct ctttaggtgc atcaccaagt tcgacgaact caggttgctc accatcgttc
4860

tcagactctt cgtcatctga ctcgtggtct tcttcacctt cagtctcttc gacgttctcg
4920

tcttcttcgg tcgcctcttc gttttcgact tccagttgct tgaaggtaat agcgtcgtcg
4980

ccatcacgaa cagctacgtc ctgttcaagc atagacttct ggtattcgtt caggctcctca
5040

acggaaccag tgattgcatt agagctaacg ccaaactcgg cataaactga ttgagacatt
5100

gagtcattct cctttaagtc gttaataggt aaacacctac ttgcagtgtg ggactaacgg
5160

ctaccatatg gtcgacttag tagctcttac tttcgggtgtt cctatagtga tagtttaggc
5220

ttgagccatg tcctcaccag ctccctgacc tacagcagca cccatgttag caccagcagc
5280

agacgcaccg ttgaccacag ctccttgagc ggattgttca gcaatacgtt gcatcttctc
5340

gtcctgagtc agaagcagac cagcgggtgtc aattcctaag gcattcagta gtcgcagctt
5400

cagggtcggc aagttaatgt ccgggtcctg ttgcagaggc ttagagcccg tcatcatggt
5460

aaccgcctga gtcagcttct ccaagtcctg accacgacct aacgcttcca gaccagtgga
5520

gaccgtaggc tctaccgctt ctttcggaag gtcaggaatc atgccagcag actgaagttg
5580

gttcatcagc acacggacga taggtaactg aagctcttgt gactgtaccg agtacacgcc
5640

ccctaaggtc gcctccagtt cgccagcaac ataacgaatc tcttcagcag tcactcgctc
5700

agcattacgc tgaacagcac tattaagaag gaaggcccag cctaaacgtt gctcgatagc
5760

gtcagccacc gacttggcaa tcgtaaagtc ctgacctttc gtcagttgca ggaagttgat
5820

gtcctcgacg cgaccagcca cgaactcacc tgtagccgcc ttgttcagac gacgaggttg
5880

cgtgataccg ttcgggttaa cgaggccac caccttggag gctaccttag ccattttggt
5940

gatagcttct gtaatcgtct ccagcgagtt caggtctcca agatactcct cgcagtaaga
6000

acgaccatag tcttcaccat ccagtcgaac cattcgtacc gggatgtatg gacatgcagt
6060

cagtgggtag gaaccctcgg tccctgctac ctcaatgcct tccacttctt catagcgcaa
6120

atactcgtcg tcctgacggt agatgtgagt atatacttcc agctctgtgt caggctcata
6180

gtcgtctgcg ttgagttgtg acttcacgtc ttccggtaga gcactaaacg ctaccttgtc
6240

gagagtcaca atctgcaaga tattaccgaa agcatcacgt tgaacaacgt aggacactaa
6300

gcggtacatt cgcataggac tgtaagtacc ttgttcaggc tctggaatgt agagcagaca
6360

gttaccggag acgataagct gcttcagagc ttcgaacaat gggacacgga aactgttagt
6420

ctccatgtag gccatcaaca cacgctcgac catagccagc ccttcgtcaa cagcagccgc
6480

agcctctgag tcctgactca aggtcttggc ctcatattcg gagactgtaa gtcgcatcca
6540

cggtgactga ggggaataatg ccaacatcag ctttgagcc aagttgttca agcagcgagc
6600

acctacagct tgccacggag ttgtgtactc agtagacgag ttgtcggact ccttaggaaa
6660

tagtgacggg atagtgacag cagcacagtt ctgagcgcgt gtctcatatg gctgtctacc
6720

gttcttttagt ctgtcataga ccgcttttagc tccttcagca gcgaaccctt caggttcagc
6780

cattcgtcac ctctttaa ataaataaccg ccaccagagg tgcgagagac ctgaaggcta
6840

cgcttaccgg aacgcttcac tttcttctcg tcagatgtgg ttgtttcagt atccacatcc
6900

tccactttgg cgttcggtac ttccactggt gctgctgggg cctgagcctc aacaacctta
6960

ggtgcatctt cagctccaag accaacggtc cctagcgtac ttttcaccac tttcttgaaa
7020

gccttactga ttgatttacc cacggttaat ctcttagtt gttacgatgt ctaccgaccc
7080

agaaacatgc ttgacacgag aataccagcc aagaccccaa cgcttgcaact cttcgtttac
7140

gatgtgcctg acagtctcaa gaaccttgcg ggaggactgc gagtcacgac gaatagcgac
7200

gattgaaagg tcaagaccgg gagtcggctg gtgccaagat gcggtagcta gcatgtagag
7260

atacgctact ggttgacctg agacatcgta gattgtgtac tcttcacat cgaactcgtc
7320

agcaatacgg taagtatgag ccttgaagtc ctcgaatgac ttgaagttag actgcccgtc
7380

ttcccagagg cgacaagcgc acatgtggcg accttcgctg gagttgagat atggtagcat
7440

tgtcttacct catgttgacg ccagaggctc gcatagcgcg acttactgac gatttatctt
7500

taggtgcaga ctccttcttg accttcaggt ctttgatacc tttggtctcg ttggtgtcca
7560

catccgattc agccccgatg tcaactgacg caacttcctc actcagagggt gctgggtcag
7620

gtgcttgac cgaaggcttc ggagtgctaa tctttggact gaaacacata gtccctccta
7680

cagttaatca aactgaacgg tatctttcag ctcacgacgc atagcaatcg cagagtcgag
7740

agtgtcagag caatactgga gacccttgat aaaccctgca atgaacgcat cgctgtagcc
7800

ctgctgcttt aggagactga tagctcccat cttctcagcg tagcttgctg tgaacagtac
7860

gtgcagaaac tggatggcag actgggagat gttcgggaca tcaagtcttt cttcctgtaa
7920

ctgcttaaca acgttttcaa tagcattaat tgccatcttg aatctcctct ttaagttaag
7980

actaaagtct atcttatagt catatcctag gtcctaaagt ccctatagtg atagtttagt
8040

gtttcaccta tggatgactg ttggattgat aggatatgac tatcggttag actcagtgtt
8100

tagggcggtt gttcgaccgg aaccacttgt acatgcagta aagggccaga agtccggccc
8160

agtagattac atggatggtg tccacaggat gacctccttg gacttagggt catagtcgga
8220

ggctcgacaa atacgagcga cctgagcttg gaccagaagc tcctcctcgg tcatcccagc
8280

tttagcagcc agtgtaacca tgcagtccca cagcgtcatg tcttcacgct tcggatactt
8340

cttccactca gtcttaatat ggcctttgtt cttaccagtc ttaagctcac ggctctcctg
8400

cacgaagtag tacggctcgt caaggaacgc acgagtgggtg tcctcaccca ttcccgaat
8460

gccaccgtag ccatctgtag tatcaccctt gatgggtctgc tccatgtgcc agtagtctgc
8520

ctcggcagtc gtatgactca ggatttcacc agtgggtaac cagaagaact cacagttcgg
8580

gatgggtcttg aagtccttat cgcaggacac cagcaccgca tggtcacatc caacaatctg
8640

aggtcgggtc ccgatgatac ccatacagtc atcaccctca agcgtaggac gcaggaagct
8700

gttgaaccgt gggtcagcca tcaattctgc tacgaacttc ttgtaaccta caggcttgcg
8760

agaaccttta cgattggact tataggtagg cagaacctcc ttacgccagt tgttatcgtc
8820

agtaaagcac atcacaatct tagcgtcttt ccacgccttg cgcttcttga cgatttcaga
8880

gatgggtgttc tcaaggatac gacgagcctt ctcatgggtcg cagataatgg tccagatgtc
8940

atcacccag tctgtctcgt cctcggcagc agccatagaa gagaagacca gatagtcacc
9000

atccagaacc agagctatct tcttctcaga acccatcgtc cagacctcca gtagccatag
9060

cgaccatagc tggcatcaaa gaaactttcg gtccttaat acgttcgaga gtcacctcag
9120

gctgaagcca tttgttggtg aactcgtggg ccatgtcgtt gtcctctgag ttaggtggg
9180

acatcaggtt ccagaagttt gaagacatct cagtctcatt ctcaaccggg cgatatactc
9240

cccagtcatt tacctctgaa ccatagctgt cactccacat accactggct acgatgggtca
9300

gcccgatgaa cgggcgccac tcataggcct cagcgggaga ctctgtatat gactcaacgt
9360

ccttctcggg caaggtgtat gaccaagatg cgtagaactc agcgtacttg cggtgctcct
9420

tctcgcactc acccatttca aggaccagct ctttaagact ttcaggtatc ttcatagaca
9480

gcctccatgt tggttcagga acttaacgcc ttcagcggta atctcccacg caccattggt
9540

acgcccaccc gtagacaggc agctcagatg tccacgactc gcagcctcag ccacaagtgc
9600

agcgttggtg cgcacatagt tggactggaa ggtcttcggg caggacttaa gggccgctag
9660

gaccgtaag tattcactca ttgcttgacc tcgaatcgca ggttgacac accgaactgg
9720

ccagcaccaa aggcgtctac cagctctttc ttgatgttct tcttggcgac aatttcaagg
9780

gcagactcag ggcctaactc gattgctgct ttgaccagag ccaactgaaa cccatccagc
9840

ttcttaccct cagcgtaggc tttagtcgtc tcagccagtt ggcgacacac ggtctcttct
9900

tcctttgagt tgataaccat cttcaggctg aaacttacac gaatacgttt agtaatagcc
9960

attggttaaca ctcccttccg ttaatgacat tctttccacg tgggtccaat cttaccctca
10020

gtatcaagaa cacatttaaa gttatagaac tcacccacct tacgcatagc aagctgagca
10080

atcttgacga cttcttcggc aatctcctga gtacgacaag ctacttgaat ctcatccttt
10140

ctgtattctc ctattgctag gagtgtcgga ctatatcatc agcctttgag ttgactgtct
10200

ggcgcttcgg gtaacgaggg aatctcacc cggccctac tcctttcgga tagtctctac
10260

gccttcact ctctaateca cttacacgcg gcagagaacg taacaccaaa cttctcacct
10320

aagtgtgttc ctgtacatcc agtctccagc cagtattcct tcgctgactc tttatggtca
10380

gcgtagcggt cctgtttgt cttgactgta tgctcagacc cttctagtaa ctggagatgc
10440

tctgcgttac agcatgccct gttcctacac ttgtggtcta cttcataccc ttctggtata
10500

tctccgtgct gttccttcca gactgtcctg tgatacatct ctaggacacc gttagtcctc
10560

tttcggaaat aaccatcagc attaatgttg tgtgacgtag ggatgatata accactctct
10620

gtggtcgcaa ggattaactt cttgcctctc atatatcctc cctatggctt ggctcggtat
10680

tgccctagaa gggtttcacc gagttcacca gatttaatgt gcacaatgag atagtttatg
10740

cacccatgcc atatatgcaa agtctccttc ccagccgtga acatacccg cctcttctag
10800

catacgttca gtctcgacaa tccagtgtt acagactacc gcaccatcgc cttgaagtag
10860

ggcgtaaagt gctgagtgtg gagaccggat gtgaatgcgg cgaccatcaa gtccacgcaa
10920

ccaacggcgt ttccacttga cgatgttctc accatctacc cacttagagt ctgagattaa
10980

cgtattactc acagcttccc tgaggctcct gatggctggt gtgccctcaa tgaatttctt
11040

catgagagct gaaccttctt tcttaccacc gccgactatc agtccaatct tcgctgcgcc
11100

tgcaccatac aggaacgcat agatgaacgt cttggcggtt ttgcggaaag cctcatggtc
11160

gtggctcgac ttatcgctg ggacgttagg tgctaacca gcgtttactg cgttggccca
11220

gtggatgtca ctttcgacca cagtcttcgc ataggcacca ccatcaaacg gagccgctcg
11280

gttccccaga caacgaagct caagacctga ggcataca cccacttgaa tccaagggtc
11340

tggttaccg tccttcttat tccacgtgc accgaaggca ccacggcaag tctcaccata
11400

cggagcaccg ttagcaggga cctgagccat gtttggtgaa ctatgggtcg cacgtccggt
11460

tactgccccg catgggttga ttgaaccgtg catacgtccg tctggaccta caagtttcaa
11520

ccatgcgttc ttaccttcag ccacctgacc tatgcgttc tggactacaa gatactcacg
11580

gaccagctct acgcaagcct gagcctctgc gtctggtaac ttaacgtgtt ctaacgtctc
11640

gtcatcaact acaggtttcc cgggtgtcagt gaagtccaca ggttcccatc cacgtccat
11700

caagactttc gctaagtggc ctccgctccc cggattaaac tcaacgtaag tgataggtgt
11760

gaatgggtgt cctccatcg tgtctcgtga gtcgaactcg caaggctcca gtcctaggcg
11820

ttgagctttg ttcttcggct tcttgaatac tgacccgacc ttaggataca cgactcgagg
11880

atacttcgga aggtccttgc ctgtacgtgg gtgcttgaag aactccttgc ctcccttcgg
11940

tgcataccag ctaccgaaag tcgaacgcag cttgtccagt agctctgcac gtttgacagt
12000

gagttcacga tataagcctt cgaccatctc ggtgttcacg ggatagccgt tacgttccat
12060

cttcgcacag gtccacgcag catcatgttc cagacgcaac gcataaatct ggtcgaaagc
12120

gaactgttca gactggaagt aatacttgtc agtcagaaac ttcttgaaca acgccagcgt
12180

gaccacaacg tcttgaacgt tatagtcag catctcctga gacgggaaca accattcgtc
12240

cccagcctta tattcgatac cttcagcctt gcacttggca acgtaatcgt gtttgtactc
12300

acctttcatc tcaccgagac gatagcccca agcctcaaga gactgacgtc ccatcatctg
12360

aggtggcaga cgacctgctt tcaccgcgcc catgtctgag aacttaatgt ttggatacat
12420

caagcgagct agcaccaagg tatcaacaat tcgaccctta ttcacattta ggttcttacc
12480

gaagtatttc ttcttcagta ttttcaaggc tggatatatca tagttcacac cattgtgcag
12540

aaccagcata ccgtcagtgg atgccataat agattctatg cggctctatat attctttgaa
12600

cccacctgtc agcccagtca taggggcaac accatatttc tcagtagctt gagttccagc
12660

gttaatgata acaccacagt ggaactgtga cacagtgtct agtagaccgt cagtctctat
12720

atctgtacca tagaatgagt tgagattaaa catcatattt ctccaagtac gttatagcag
12780

ccctaagcac ggctaccttg tcaccgaact taccaagtgc gctattacat gtgccacata
12840

gcaatcccct aacactacct gagtcgtggc aatgggtcaac gtgggctata ttattcttac
12900

tctcaataga cccatgcttg aagataatgt ctgagcatat agcgcatctg ccattttgac
12960

tatcgaacat agtgtcatat tcctcaagtg tgagaccata ggctttctta agccaagact
13020

tacgggcaga tagacgatgc acctcaccgg cctctgtacc tttgtttcgg tgatatcgcg
13080

acctattatc ctcacgaaca caggatatac accacccatt tatcttcctg aactcagtgg
13140

actcctttgt ggagccacat ctactgcaag tcctcatatt gcttctcctt tagttataag
13200

tctaatacata aaggccactc gatgtgaatg gccttgagtc tagacctaga agtctgtacg
13260

caagaagtga tacataaaact tccggttagc tttcttccat gccttagagt cgaacctttg
13320

gtctcccaga atgttggaaca ggcaggtcgc ttcgtcactc caccatttgt acatgaaccg
13380

atggtagcga gctttaagtt ttcttagcaa tgtactcctc cttagaagtc ttggtcttcc
13440

cacgagccgc tatcctcttc tccgctgcta ccagtgtagc taatcggttc gagccaccgg
13500

gtcgtcttgt tgtattcgag gtgtcctgcc actccagtgt cacccgtaaa acgacactta
13560

agcagacgaa gttgaacaat attaggagta tcaccttgct ggtttcgctc aagggcgatg
13620

atagtatcag acagttggcg gagagcacca gaaccacgta ggtcagtgat tgaaacaggt
13680

cgtccttctt catgcgattt acctttctct gggttcttca ggtgacatat gaccacgaca
13740

accacaccct tcgtcttcgc aaacttcttg agacgagtca tgatacggtc aatggcttta
13800

cgttcatctg agttatcttc catgcccgc acaacgattg agatgtggtc aagcagtatg
13860

acgtcacagt cgagaccgtc caccatgtag gccaaacttag cgaacaaggt gtcttcctct
13920

gactcggcga atgaatcgta caggtggaac ttatcgtctc cgaacagctt gtcataccat
13980

tcgtcgaacc gtccatcctc taagatggct tgcttcagtt ccttgctctg gcgtagacgg
14040

acgttattgt ccagacccat aaggctctga actgtttcct ctactgcctc ctccagcata
14100

gccataccta cacgcttgcc tcctctgccc cactctaaga ggagctgacg gacgaaggta
14160

gacttaccba tgcctgaccc tgaagtcacc atgataagct caccagctcg cgcaccaagg
14220

gtcatcgctg tgagtgttgt gcaggacgag aacatgagac cttcagtctc tgccttaagc
14280

atagcctccc gtgtgcggtc cttaaactt gctgctgata ccacaccagc cgggacgaaa
14340

ggtttagcgt tccagatagc atcggatgat gccttgaagt ccttggcctg aagtgcagcg
14400

ttggcgtctt tgtaccggt gatgaacgcg accttaacct gacctgctgg taagactgga
14460

gctgcacct caatggcctg acgaccggt tcacccatgt cgaacatcaa gattatctct
14520

tcgaactggc cgagatactc aaggttcgca gccatagctt tcttcgcaga cttagcgcct
14580

aacggaagcg agaccacagg atactttccg tcctgcacct gagctacaga cagagcgtct
14640

atctcaccct cagttatgac tatcttcttg ccaccgttcc agagctgaga gccgaacagc
14700

atgtcagact tgacgctacc gatagcagtg aagttcttct cagcgtctcg gactttctgc
14760

cctaccttgg tcccggacct gtcgtaataa tcagcgacct gaaccatctt cccacccatg
14820

ttacctacc agtagctgta cttcttacat atctccatgc tcagactacg ggctggtagt
14880

gggacatatc gtccagcggt ctcaccgaac gttaacagat tgctcacttg ctttctacct
14940

cctgaggggtg tgtatccctc ggtcaactcc atgtctcctt tcttccatgc gactgaaggg
15000

tcacaggcga agcagtacat gtgtccatct gagtaaacac cattggcatc cgaggaccca
15060

cagtctggac actgggtgtg atacagaaag aactctcgt cgtctcggtc atcgtatgac
15120

attggtcact ccttaatcac aagtgcgaac agagggacag gactctcggc cccatcccta
15180

aggtgatagt ttaggctttg aagaactgag acaactggtc agctttgggtg tcagcctgac
15240

gtgccttcat gccagcttcc agtgacgcta ttgtcagctt gtcagccaga gcagaagcat
15300

cagccgcgcc gtcagcagtc ttctttgcta cttttcgttc cagaaccgca gcacgacgat
15360

agccacgcac caccagacga ccaagaaatt ctataagttt aatcattggg ttgttctcct
15420

ttagagttta ttaaccgcgg tctgaagtga ccagttcgtt ggtagacatc cagcgttgta
15480

agtcgaaact tgggcacgcc tttggcgcta cgtcatgggtg agctttgatt tctgcctgag
15540

gatacaggac cttcaggtca tccagcttgt tgcgcaggga gttcatctgg gctggcgtga
15600

agttagcttc aaactgacct ttagcggtga ttccacctac aaggcagacg cctactgacc
15660

gggagttcca gtccttaaca tgtgacccta cgacattgac cgggcgacct tcttccacag
15720

tgccatcacg cttgatgata aagtggtagc ctacatccag ccagccttgc tgcttgtgcc
15780

acatacggat ggtctctacc ccgatgtcca tatctggctt ggtagccgaa cagtgaacga
15840

agatagcgtc agtccgggac cgtgggttga actgaacctt actcaccatc gtacaccacc
15900

agctctacag ctacgaggtt aagatgactt tggaagcggc tagcatccgt ggtgtgcatc
15960

tggagcaatt tatggttgaa gacgtgagag ttactaatct tcacgtacac ttcacccggc
16020

ttaccgtgga tgataaacga atagcctacc gggattttat caatggtcag acgcttacga
16080

acgaccttaa cttcttgagt catcacttaa ctcctttctt cttggggatg aggatacctg
16140

aaggcagacg tacagtcgcc tcccgaagcc actcaaccgg gatgaactta tcggcaaact
16200

taaagccgtt cttttcgcac catgcgccat acgtggtcgg agaccctttg tataacttgg
16260

agcgggaact tgagaacacg aaccggatgt ctaactctgg gtgctgttct cgtaccagaa
16320

ggtgcttctt acggatcatca ctatcgaaga tacctttggt ctccacgatg ataccgtttg
16380

gaaggataaa gtctggtgtg tacttgtggt cggaagccgg aatcacatag ttgatataat
16440

ggctttcgta ctccgctttg acgccgttct gttccagcca ctgctgggtc ttggcttcaa
16500

gtccagagcg gtaggcaccc acagagtgcc cccgttttgc agaccattgg gccattagaa
16560

gtcgtaatca ccaccagagc cagagtcgtc accaccttcg gaaccatcgt caccgaagtc
16620

gtcagacccg aagtcaccgt cagtcgacgc tttgtagcca ccagagccga tgtcttcac
16680

gtcactccag ccaccatcgc caccactgcc ctcgccggac cactctttca gttcgaccag
16740

aaggcaggac tcaagctgga gcttaacgct tgcaccagtc gcagcgttcc acttgaacgg
16800

tagtacttta aactttacct tcagctttga gccagcgcca atattcggga cgtcacggat
16860

taacttagca tcggtgtcgt agaaccgtaa tacgataggc tctgacttac catccttcag
16920

gtaagacgca aagcatttga acttcatggt aacagtgcc a tcaccgttct caatccacgg
16980

catgtgcct tcacgcggtt caataggctt cttgccacgc tgaacctgag gtgggttctt
17040

ctcgttgtct gcgagtgtt ttgcatgcgc atcgtcgtga atcttctgta agacatcaat
17100

catcttacgg accttcgggt tgctcaggtc gaatgtcagg ttgactttgt gttcaccacg
17160

ctcgttgtac ttggtgtctg ctttggttcag ccatgcgtaa ggctcaacga tgccagctac
17220

cggagtgggt aaagtcttca gttgctcttt agccattggt gttaaactcc taattaaaag
17280

ttacgaactg gacgtctgtc ctacagtgat agtttaggtc tcaggacgaa tccgtccgac
17340

cacaaacca gcgtcctcat actcttctga cttcagggtg gcctcttcaa gagactttgc
17400

gtacaccgga acctcgaagg attgaatgcg gccctcaagc tccacgatgt atttcttctc
17460

aacctcagtc ataaaccgcg ctcccttccat tggttgtata acgtaatgta gtccggggtg
17520

agagtcttct cgtacatctc ccggcaccac tcaactcgga gcatagcact tacctttatg
17580

caggtcgaac agctcctgat agaaggctgc tttgttcagg tccttctcca tagtcgccag
17640

ctctgacttc ttaccagctc ggagtcgata cttcaggacg ttaccaagc agaatccacg
17700

gaactcgctc acagtcatgg accgggcat aatctcaatg gactctacgc cgtcaaagac
17760

ctgatagtgg gacggcttgc gaacgccatc aatttcttgg agtttggttac ctacaagttt
17820

accaacgtga gggaagcggc cgtcaccatt acacgcttca cagtatgtgg tgctatcaca
17880

gtatgtcatc agagcgctc cttaattacc agaagtgcc gcttaatgcg aggccatttt
17940

gtaacgacca caggcacatc aacttgttct ttatccatag ccttcagcat agacttgcg
18000

gtgactagcg catgaactgc tggagacaga gccactgtct taccaaagcg gggtaatggt
18060

tgattagctt tatggaagct gaatgggcta tgcgacaggt ggaagcttcg agtaaactcg
18120

ttgaacatta agtttttaga cataagggtt ctcctttggt cggttatggt tgtcctatag
18180

tgatagctta gggtcaggct ggggccaaga cgatagcttg ctagcacaaa gcaaagaaac
18240

ccagcagtcg gaagaccact gggttgacgt tataaggaat ctcttaaggc taccgcctcg
18300

gctatggtat cgaacgtacc gtatgactta ctctttatcc gcagttgccg gcgaccagtt
18360

gatttctgat attgaacgta tttctctcca gattggcagt gactacgggt tggaacgtta
18420

gttaggttca cgcctgagt cacacacctg aggttctcaa tcctgttata tgaagggtc
18480

ctgttgatat ggtcaatcac catcccttct ggtataggac cgtggggttag ttcccagact
18540

actcgggtgg ccagcagttg gccctttgtc gtacttagaa tccagtaccc atcctttcgt
18600

ctataaccaa gatgtctacc gtttaggttg gagactccag agggagccgc cctgtctgct
18660

ttaaactctg accgtagggt cgtcctcagt tccacgccac tggtcgaacg agggatgccg
18720

tagtaagcca cttggtgtct cctccatgta ggtaatctgg caggcccagc ctttataata
18780

atcagggtcg gacttaacgt tttcggtgaa ctcggacatt agggcgcgac taatgttagt
18840

tgcgagacc tccatcccgt tctcaagcat aacgtcaaag ccgatgacca taccttcggt
18900

ggctagacct tctgttcccc atataggccg tacaacgtga ccgtctgcct cttcgcttg
18960

tttcatcttg aacataacctg acttcttgcc acgttccag cgtcccagtg gatctttaac
19020

caccagaccc tcattggccct cttctctctt cttctcatac aagtcagtaa gtcgtctaa
19080

gctaaacact gtatgactct cagatagcac ccagtcgatt tccgggaagt atttctggag
19140

gagagggacg acagcttcgg ctttcaggcg tgtgacgcta tggataggac cttcggcttt
19200

cgggttagca atggttgta tgttgatgac accgtagacc acaaccttaa gtcgtgaccg
19260

ggctaccag aacgggacct tcttgccacg gcccgatag cattcagcga actcctcgtt
19320

gttaggcttc agccacttcg ttcggatgag acctgaggat gtgttgaagt ccacaccttt
19380

gacctgacc tcgccatcaa tcattcaggcc aacaccttcg tagccagctt gacgcaggaa
19440

ccatcgccag tcagcttggg tccacgcgtt acctaaactca gatttcattc actccaaggc
19500

tggcagaggt ttagactcac ggctcagcca gtaggtctca ctttcacgca ggaccaggag
19560

attcaggcgc acaccatcgt acttcacctc agcttccaga gaccggctg cttccagtgc
19620

cttcttaatt ctagactcag agtagtctac agcgcgggtgc gggttagttt taatagtcgt
19680

agtcattata ttttctccat gtgtcgagtt ggtagcgag accgttaagg aagcctgttg
19740

cagtgttata cagtgcgtct tcagagtaat gtccgaaggt ctttaagcgc aagatgttac
19800

ccgtctatc ctgacttga agtctcatgc actccatcct aagaggcgcg tcgtaccagt
19860

catgctgtat cagcagaag tctaactgat agagcctgtt acacgctgct ctgaaagcgt
19920

tgaggttgcc aatataaagt cgggtccatag cgttacactc ctacgaaata cttctcctgg
19980

ttgaccagag agtctttacc ttcagcatta cggaagcac ctttgacacc ccctccacgc
20040

ttggtcttat tcagcttgcg tcccttcgga atgtaacctt cagtctgctg acgttcacgg
20100

atgcgctcga agttgatagt attctgatac atacggttaa atctccagta gtgtttatTT
20160

agggTTaatc atgaaggcca cgactTTgag tcatgacCTt gagtCTaatc ctatagtgat
20220

agTTtaggtt aacCTcttct gcgTTggatt aaggTgaata ctgcgagTgc tccaagccac
20280

aaggccagta actgtaggtc tgtcattTgg ttgccgcacT tTTaaggact tgctcgtgcg
20340

tctgctccac ctgCTtaacc agccactTga atgTTacgtt aagccgCTtt gacagctctg
20400

tagggattac tgtggtCTtc accagaccCT tgcCGttgtg ttccgTTacg gTcacgattt
20460

gagTcccacc attaacgccc gtctgCTtgt gtgcgaattt cataactCTc tCTgtTTaag
20520

cgaatgcaaa gtctgaagac aagatgtCTc cgatattcag tttgcCTttc ttCGgaagct
20580

caggcaactt gTcgcgctga CTctcgtgaa gctggTattc gaactgCTcg tagaagtcaa
20640

gcagaacacT gTTgtcgcg taggtCTcga ccatcgtCTc acggacacca cGgaacagat
20700

actcagcacT agcagggatg gTcccgaagc tatcgtgaat cactgcgaac gacatcacgc
20760

cataCTtgcg gtgcgtgtgg actacagtCT tgcggaggTg gctgCCatCT tgtgagtTga
20820

cgaagtTCgg gCTaatgcCT gactCTgtCT tgtgCTtgTc cagCTCTttc ttCGtacCTc
20880

TgttgacggT aggctgaaga ttgaatgacc ctaagaacat caggTTcaga cgagtggTat
20940

CTtCTtgcg gTattCTgc cagaccggga aaccatcagg tGttaccCag tGtaccggaa
21000

ggcaaggCTt caggatttCT cCagtCTtCT tGtCTTcac ttcagcagcc agcagCTTgg
21060

cagcactTg aagccactTc atagcgtcaa ccgcagcaac tacggTcaca CTcaccgCTt
21120

cccaaTcat CTtagccatg aagcgagacg CTtggtTgg CTcagtgaac atagcgccag
21180

accctgagtc aatcgctggc atcactatgt cctcgtatac ttggtctgcg aatccgtact
21240

ctttcgaccc gtaggccaga gtcacgaccg aacgcttagt aaccttgcg gacataccgt
21300

aagtcaacca ctgacggggc agctctcgtg tccccagctt gagacgctcg gtaatctcac
21360

cagttttctt gtctctgtga gtcaccatct cgttatccgt accgttaacc agcaggactt
21420

tgagttcctc ctcaatgcgg tcggacacga tgcggtagat gtcttgacc ttaccggatg
21480

gcgtcaggtt tactgcatgt ccaccgatgt ggacacgaag catcgcgctg aagtgctgaa
21540

tcccagagca ggacccatcg aacgctatcg gtagcgagca ggagtaagac aggccgtgat
21600

gcattactcc agcatactcg aagcagaacg cgaggaagca gaacggggag tctaacttgc
21660

cccaccactc aatgctatcc atcgggtgcct tagcagtagc cataatgttg tcgtgggttg
21720

cttccaccca cttgatgcgc tcctcgaagg tgactttatc gacacccgca cagtttgac
21780

catggacctt cagccatttg aaaccttcag caccaataga cttaccgact gccagagtca
21840

ggagaccctt ctgcatgctg ttaccctgag gggtgaacat cgttacagcg tagacgcgac
21900

cgcgccagtc catgttgat gggaaccaga tggccttaaa ctgagaaaac ttgttcgctt
21960

ggttaacgat aaagctcagt gacaacctgc gtgactgtcg ggccttctcg cgtcgataga
22020

taccagcagc agccttcttc catgccttga gttcctctc agtctcacc gcatagtcct
22080

caggcttcag tggctccatt tgagggatgt cgtcaatagg cgtattgttc agcttctcga
22140

ccatgttcac caggtccagt accttcttgt tcactttcca aggcgatttc tggatgatgt
22200

taacagcgtc atatacttca ggcattgaca cgtcttcgta acgtgccacc gcagacttag
22260

accctaagcg aatcagtggc aatgggtctgc gacctttggc ccagtaccca ccgcctacga
22320

caccagtcca cggcttaggc ggaacgacgc aaggttggtg gactggagcg ataccgcaa
22380

gactgaagcc acgttgtgcc atcttcttga ccagaagtc tgacaggtgg accatctcaa
22440

cgtcagtcgc tgcattaccg gcaccgtaac gcttaagctc gaccagttgt gttgactgga
22500

tgacaatctc aagcatctta attccaacgt ggacagcctc ggtcggactc caagttcccc
22560

acgcatcttc cagttgacct tgctcaagca ttgaggtctc aaccgcttgc atgtaggctt
22620

tcttgtagga tatccctgct cgcttggtca ggttatcagc tatcgctttt ttgaagtgtc
22680

ccttctcctg atcacggatt ctaccgaagc gtatttcac ctaattgtg cgacctatcg
22740

cggatgccat aggtgtaatc ggtatccctt caggcttgac cagcttggaat aggatgacct
22800

ttagtatgat aaccgcagca gactcacagg agatgcgcag agagcgatcc ttgacggcct
22860

tctcttcagt gctcaacatg gtgaacgcta cgctaggacg agagattgac agcttcccg
22920

ctggaccttc atgccactcc ttgactgctt gcgcaatctt agggaccaga gtctgcatca
22980

aaggcttggc gacctgattg tctgccagtt ccccgcgctc ggtctggcgc tcaaggttct
23040

tgatgaaacg tcgctcacct tcagtgtatg cctcatgctc aagctgaagt tgtttgactg
23100

caaggctcttg cccgtagtgg tcagccagca gggttaaagc ctcaatggcg ttcgacacat
23160

cagagaagtc gtgtttgtca atagagatga cgctcatact taaagtcctt gttattagtc
23220

tttcaattaa agtctctttg gtctttcact tggagtctta gaccttgagt cctatagtga
23280

tagttaagtc agaattactt taatatcagt ggggttagcgt gaagattact gaagtcacca
23340

tgagtcgtgt gcttgatggg tgaccgttgg tctatcgcct tccagcctga gaccagaagt
23400

ttaccgtcgt cggtgattgg ttgttcacca tacgccagac acatcagctc agacttatgg
23460

ccctctgccc ggagtcgtgc ctgtagcaca cggtcacgct cctcctgttg acgtgcggag
23520

tgacttgacg ttccgtggcg ataccctgta gccagtaggc ttaacatggt catatctgcg
23580

tccatagagt gtaccagatt aatcccgtaa gacttggtca ttacagtttg ctcccaagtg
23640

ttgctatata ccagacgttc gccaaagttgc gcatgaatcg tccgttaggt tgacgtacag
23700

tccagcgacc catacgtaca tagttgaatt tgtagacttt acgcgccttg ttaatgtctc
23760

tcaccagcac gtaggcgata agtccatagc ctatgactat caatagtgcg atactcatag
23820

tgatttccgt ttaataacaat cgtatatacc ataacctata atccagataa ctggcgctag
23880

gcatacccag taaccgatgt tcatagttaa ctccatatcaa tgtaagtgat aatcttcgag
23940

gccacctata agtcgatgac ctctcgtcta tcaactcagct attgcgttca tggttacacc
24000

tccaccgcta cagtgggtcat cttgcttaca gtcagcccac cagcaagctc aaccgcatag
24060

cgtatagcct cctcttttga cttgaagtcc tttcctgcaa ggtgataaat gtcgcctggt
24120

attaccttag aaggcctgcg acttaccgca atagcgtttt tcatggtaag ctcaccccg
24180

ctatactgag taaaccagcg cttcaccgaa ctcgccccca ccccgaaactt tttggctggt
24240

tccgtcaccc tatccatagc tccctcaggc agagaggtgt agtagttaac aacgttgagt
24300

ttaaatgcta ccgagaatac attgcgagct ttagcagtca ttattctttc cttctgtagt
24360

tgtaaagtgg taatcactca ggccaccatg tagatgacct gtagtttaac actcagtacc
24420

cgccctgtcag tgttatggtc agacttttggc gattagctac gtagcaagca ccacgcttca
24480

tcattctcgta gcacccatcg tagaacgcct gttcactgct ataagttatc tggtagatgt
24540

tacttatcct catcgtgtag actatcgtga atacgtttgc ggcctcata gaccgctttc
24600

aggtgacgca tagtcgcac gtggtttaac tgcccggctc tgaccataat ccgggcgttg
24660

gtgacgtgat gctggcagag accgtaagtt aacatcactc gcagtcctcc tcagcagcct
24720

caaaccagac cacatccgag ctattagaca cgtcattata cagtgcctca tagatgcggg
24780

cttgtagtat acgcgttacg tccttggctc caggcatcag ccagagtct tcgaactcaa
24840

ggtcaatacc atcagcagcc atcacgtga aaatctcgtg gtaatagagc ggaaccatat
24900

cgtctacgac ttcatgcagc gcacgtggc aatcatcgcc ttcagctatt tcgtcatact
24960

gaatgcgctc gttaaatgct tcaacagttg cagccagcag ctcatagtat gcgttagcgt
25020

tacgttccat agttatatcc totcaaaagt tgtttggtga tgtagtgac catcagtcag
25080

ggccttcagg tgtagactca aagaccctgt agttaatcac tatcggcgca cattaagagt
25140

ttatccagat tgtaaagag cattcccttc agtcagatga cttcaggtag accatttcag
25200

tgttggctcg caccgttggt tcgatgtggc acagcttaca tcttatcggt actgcttgct
25260

aactactttc tgtcatctgc ctgttggtcg tatgacttac caggctgtct acttgaccgg
25320

gatgaccggc cgtcttcact atccggttggt tgccgtgtcg tgtagacgga agctattaag
25380

ccatagtcta gacctatagt caataggcaa tcttaaataa tattgattaa gctatcgtcg
25440

gccccatagt gactaagagg atagtctttg actaacatgt cttagacctt aagtctatag
25500

ctttgtgtct attagactgt aggtctttga ctgtaggtaa tggctttacc gatggtcggt
25560

gactgtaggt tgtaggactg taggttggtg agacctatgg ttatacagat agagactcgg
25620

agacaaccaa tagtcccaac ctatcgtcct gacctccagc catagcctca acctatcggt
25680

gacctgaagt cttgaccatc ggtccaacct tatgatagac tggggtaggg ccttttgtct
25740

ggacttaaag agggcctatg gggagacttg aggttcttga actgtgagat gtgggttcaa
25800

acttttggtc caaaactcat cgtcactact gtaggcctca gccactgtag gtcaaggacc
25860

gtaggtcagg cgacactagg atagaccaat aagtaggatg accctaagtg agcttctatt
25920

aaggtgttac ctaaagtcct tgactacagt agctaaggtc agtagagtga gtctttatcc
25980

acgtactgac cttaggtctt ccgctcatga atcgttacca tgattgcggt aattacactg
26040

agagaccaga gagcatacga gagtctcgat ccacccgacc cactgacttc cagcagtaac
26100

gccagcagca agtagaacag cagcaagaaa cctgtatgta gctcgattgg tcgccagagc
26160

tttaagtaca gcttttgtct ttgccatatg ctacatacct cctgtatcta tggtcggtga
26220

ctatatgtat tggagggatt atgattaata tcaccctcct tcaatcggtg caagccttag
26280

gtaagaactt gagtctgcct cctaaggctt tgcataaagt ctgcatatgt atattcacta
26340

cagtaatact ataagtaacc gggggtcttc cctatagtga tagttaagtc caaactcctt
26400

gtaaaacagt aggttagact ggtagtaact ataggttact aaccgcgtat tcatgcagct
26460

ttcacctata gttattcatt cagctagtgg aacgtaacgt atgaccctag tcctagctcg
26520

tcgtccgtat cgtgagttac ccggacccca ttgtcccaga actcggtgtg gatggactcg
26580

aagcctttcc gtgggttctc catctgttcc tccagccact cctcagtgac ttcacgttct
26640

cctttgttgg catccttagc catcgactca acgaagaact gtacaccgat agccagtgca
26700

tcaagtcggt catcgtgtgc caaggctcca cgttcacgag agatacgggt catctggtag
26760

aagagagagt agatagggtt acgcacacca tccttgtcag aggctgtctg gtagtcttgg
26820

acgatagcag cagcgttgac gataagtcgg tgagaccca tgataggctc tagaacgtca
26880

cagatgcgta gttctttctg acccttactc ttcacttcag ttacagccgc aggatggata
26940

cgggccgcta caggcttgaa tagctcaagg tacataccat caccgaagtt accctcaatg
27000

acgtattcgt tgaccttcca cttacggcca atcttagcca gagcttcag cgtagagcct
27060

tcataaccac cacgcatgcc acccacttcc atagcgaaga tgtagccggt gagctggtac
27120

agtaccgcat agccagtttc atccttacca cgaccactag ggtcaatgac cagaatcttc
27180

tgggtgtatg agctgaaggc agaacctaca gtctgatacg tgtggtacga gtcacccatg
27240

agtccaacgt taggaacatc ctcacgcttg ttctgagggt tcggcaacca ttggtagacc
27300

attgggctag acgtgggtc caagtctgct acgataaggt cacggagctt cagagggtag
27360

ttctctgcat cactcagggt agggttaagc atgaactgta gcgcgaagcc agctttaccg
27420

taagatagct caggttcctt aagggtccgta tcatcgaagc gtacttcacg agtcggacgc
27480

cagtagaagg actcagggtc ctcttccagc tctgcttgaa gcataggagc cagacggctg
27540

ccgtaagact gccagtcctt cttatcgcgt ggataacgag ctggccagat agtagtggtg
27600

taccacgac cttccagctc acgatacaag gtcattctcg tctgaggagt acccagataa
27660

atgattgtac ctcccggctt caggatagca tcaaactctt tcacaagctc tgacagacgg
27720

tctcgtgcag cctgagtcgc tgagttgtta ggaacctcca cgtcatcggc aatcaggatg
27780

tcagcacgac taccagtcaa ctgaccagtg ataccaacag acttaaccga aggtgagtgg
27840

tctggctttg ctggcccaac gtcgaagcta ataaccgcat ctcgctgtcc ctgcttaggt
27900

ttgagttcct gaagctgagg catgaggtcg atgattcgtc tgatgaatat ggagttagca
27960

tcggctcgtt cctttgaggc cgacacaatc atgaacttca agtctggggtt gttccatagc
28020

ttccagacca cgaaaccaca ggtcagaaac gatttgccaa taccacggaa cgctgaagg
28080

atgaagcggc gattatcccc agcagccagc ttcttacaca tatctatctg gcagcgggtt
28140

ggaacaggaa gacttagtgc tttccagaga acgaagatga agaacacgaa gtcgtccctc
28200

atcctttggg tcatttctgc ctgtctttca gctgggtgtt tcttagacat atagtccctc
28260

caatattagg tccactttgc agtaatcact taacaccttg gagcctcctt attgtgtcct
28320

gaagcgcctt ctccctaagg tctgcctcct gagttattcg gataagactt ttagaagttt
28380

ctgggtgtag ttcgactctg ccattaggga agcatcgact gacatctgac tcggtgagac
28440

ctgaggtgtt gactcggacg cgcagccgct tgttatcgcg gttaagggtca gcaataatcc
28500

tatcagtaga gccttccagc gcggacatct tgtcttgcca ctcggtgac actttgtcga
28560

gttcaccttg gacagcagcc cggtgattct ctcgtcctc aagtttcgtg atgtactcat
28620

tgtttacctt cgctccac ttattgtctg ccaccagta gcctgaacag aacaggagtc
28680

ctgcaaccag ccaaggggcg catctacgta aaagttcgag catagttgcc ctctcattt
28740

ctcagaatcc acgtagcgtc gctactcgta gtatgtatta accataaagg ccactacaca
28800

tagtaatgac cttgagtcta acacttattg aacaccatac ccggtgtcat tatcctcagt
28860

cgctgaaagc accttatcgt actctgcgtt cagggcctcc atatcagcca gcgtcttctc
28920

gtccacagac accttgctta acacaaagtt gtgacgagca agcagcttct caatggcggt
28980

gtagagctga ggtgaacgct tagagtcac cgcaggtct tgcaacatga gtcgagcacg
29040

ttcagtatca agcatcaata ggaacttctc taagtccatc tgcgtcatgt tttaccacct
29100

cctttaatcg tttttagtac tagcacacca atctggacaa cgggtgtacgc gatagctgca
29160

acgtagaacc attcggtcag tgtaagtccg aagaagaacc gactggcacc atcagccgca
29220

gcggtcccta cgataggaga ggctttaagg acctcattct tgaagtctaa ctcaatcata
29280

aaacctccag tttaaagcgg gtcgtccgtg acccaaagtt gttaccataa gttggtcagc
29340

gtgtagttag cctttacctc cacaaccttc gacgattcaa taccttctga tgatatacaa
29400

accatccgaa gcgggttttc ctttatatta cggatgttac cgttcccgat atagctgctt
29460

ttatagccga agttgggtga ggtctgattt gaacagtacc cctgtcgcta gctgccccga
29520

taaacacatc ataaccagtt gaagcattaa aatcagagaa gaggcttaca ggggcgctat
29580

tttgtgctac tggtagagct gacgatgttc cataccgctt caatatgcca ggtgtgacag
29640

cataggactt accatccctt ctgcatacaa tatccaagtc aaacgtgtaa ccatcaaacc
29700

cgaactgtgt agcatcttgg aaaaacttca ttacttcagc ggtagaacct ccagccggag
29760

caacgtaatt gaagccagag aaagtcattc gggtaaaacg gttgtctcgg tcaacagtat
29820

caaatgtctt atcaatctta aggctactaa gcccatatac cccgttcaaa attattgggt
29880

tttgggcacg agtgttcata ctaatatcca gcttaggagc attatataaa tctatgcgct
29940

cccctacagc cccagagcga tcggcaatgt taacagcaat agaaaaagtg gtattgtttc
30000

cttcaatttt gatggtggag cgtttatctg cattaattga aatggcaggg gatgcctcag
30060

ctgttgacat tcctgtaatc tccaatgctt gcacatactt agtgatgtat atctttgcct
30120

cttcactata gttacctgcc aaacacgttg cctggctgtc accaattctt atctcacctg
30180

tttcaattgt acttgaaatt actgacgtcc caacaatggg aacttcaacc ttagtcccta
30240

acgggaacga agatgtcatt gcacgatcaa gtgtcaacac attcccagaa attgctgtga
30300

tacggcgtgt ttctacccca ccagtagagt tggatgaatgc aatttcaaac cagatatcga
30360

accctgctgc atcagcaacc gtaacagtag tgtctccaat atttgccgct gagttaagt
30420

tcgtgctcat tccttcaata gaaaccgtac actgcctggg actcccgcg atatagccca
30480

tcagttttat tgagttattc cggacgcgaa caccgtactt tgtcgaagtt gcaccgtttt
30540

ttgttccctg cgagtgccca taccaatata tggcaagatg taaaagatcg tagttgctga
30600

tacggtggtt gattgattta ttcttaacgg tagcgtaagg cgctgtgtaa atagctctcc
30660

cggtgctga tgctcctttt tcccctactc cgccattaac agtgaaacct tcgacggttt
30720

gatgccaatg gagacggtct ctgctcctat cgcgcggatc aattccaaca tggcgcagtg
30780

aaatatcaga tgatgttgac atgattattg ttgcgtcatt tccagccccg gaaaaagtaa
30840

atcctctgcg atcaacatca aggttgattg tatttgatag atagcttccg gaagggaatg
30900

ataacttaga tattatactg ttagcccttg caactctgtt tgcttcatct actgctgcag
30960

agttttcatc tgggtcttgc cctccaaaac caaactccgc aaaacccatc ctctctctta
31020

caattaagtt ggcattaaaa ccaccagcta tggggatgga gtatgttgta ttatcttgtg
31080

ttgttgatat taaccaatct gattcagatt ttattccatg tttgttttta tatgttttta
31140

cagtcatccc ttactgaat acggcaccat cccctgatgg caggattcca gacactaaat
31200

ctgaaacact attaaatgct atagttgtat ttttagtgac ccataatcta aaagaagcat
31260

caccaacact aaccacgca ccagcccaa taccaccaga tgattcagga gttgaaccag
31320

caggaacgtt ctttgaagc gtgccatccc agcggtaata agcaccatcc tcttcccata
31380

gcaggacctc gttccatgtt gtaacgttga agcctttctc gaaggagcga cgggtaatat
31440

agccaattag accagctgcc ttgatactcg cagcgattcg tcgtgcttcg tcctcgctat
31500

ccttagcggt gccagcagag ataccagcag catcggcatg ttccttcgct aagtcaacag
31560

tttggctcgc accttcttct gcaatatgga tagcctgaag ctctgcattg gtcagggtcac
31620

tagctgtcaa cactgagcca ttctgaagt ctaccactaa gtcagttcca gtctgacgat
31680

gaatacgaac gatgtcaaaa cctgattggc caaccaacat ctcaatcatc gttggattaa
31740

ggaatcggtg atctcgacca gcttcagta cacggctcag ggcagggtta gagctgttca
31800

ccagcgtaac aacaacaaac gttctggcta ggtagtcgaa ctcaatcctg tactgagtgt
31860

ttctgaagg gaattgtgta atcgtagaca ttatgcctcc tttgtgattt aaaggagacc
31920

tatggtagcg cctcctttgt gatttaaagc tagacctatg gtagcgctc ccgtttccta
31980

tagtgatagt ttagtccttg atgtggattc cttgctcctc aaacgttcca agcaacagct
32040

tctgggtaat ggggtcggtc ggaaccagtt cacggaacgt attatacatc ccggtcatgt
32100

agtcacgctc attgacacga gtatcagcct tgaggtagcc agccaagttg taagccgaag
32160

cgccaacggt agcagcatat ccgaaagccg gaacctgctc caagaagtta ccaacgacat
32220

tcatacacagg gtcacttgta gctgcaccat acgcgatggc acgttcaggc ttctctgtag
32280

gcgaacgagg taggatagac gaacggagca tcttagtgct ctcataccca gcgatacccc
32340

caagaatggt agctacccca agtgggtccac caagatgtga actacgtgat agagctgcat
32400

atccaatcat cgtcgggtcc agagcttgct tgaggtagtc acggtctcga ccatacctgca
32460

tagcgtaagc cttgacatgc gcctgagcca tgtagtagat accagcaaga cccatagaga
32520

tcacagtggg cagagcagcg tccatcgctc ggttggttctt cgtggcggtta tagaagggtc
32580

gcatggtacg tccattgatg gacttgatga cgaagttctt aaactgaagg acagtcttag
32640

cgagaggacc ataagccttg gcgtccatgt ttgacagctt gtggggccgg agtaacgttt
32700

cgtcagcgat ggtgtcaccc atacgccaca ggtccatagc ccttgggtcc tgactaaacg
32760

ccttcttata cttgatgggtg tacttcccgt ctggaccacg agtcactgac tcccggatta
32820

gggacttaat gcctttccac tgctcgctcag atataccagc ggtcttaagc cagcgggtcat
32880

cgaacttacg cttactacca gtcaggctat gctccacgat gtcagacagg aagccttgac
32940

gtccagcatc taacaggtag ttgggtcgta cgttgaggac tttagtgaac ggagaacgta
33000

ctgcaagttc accggtgtaa tacttggcag tccccagagc tgtagctgta ccacgcccga
33060

ggtcactgta agaccgcaga cggatcaatga catcctgttt agacggacgg attgagtcac
33120

ccagttcctt accgaagatc acattatgca ggtccttaac ctccgaggct cccatcttct
33180

tgttacggaa ggctaggtca cggaacatag ggactccatg tagcattgca cgaacgttac
33240

cgcgagccag cataccacca atctccgtta agttctgaac acccatgtag gcattcttag
33300

cgaagaacga taggtctgtc attgtgcgca tcacggtagc gaaggctgca tcatcagcac
33360

catcacgtcg agcacgacca gttagaatct tcaagggtgc acgtaagggtg gatacttcac
33420

ctttcaactt accgtcatcc ccagccttgt tcatcatggt ctcaaccaag tccttcatgt
33480

ccttcgtggt tttgcctgta ccagccatga tagcaatatc gccattaact cgacggttgt
33540

agggccgggac aatcttgtcc atgtcccact cacgcagggtt gttgacactg aaggctctgac
33600

cattaggtag gacgattgac atatcgctat cgaacagggtt acgagcctca aggaagctgt
33660

tgttctccag accaaccaga ccgttgatgt tctcttccat tacggatgaa cgttcgaact
33720

gctcgggtgtg agagataccg taagccttat cgttggcgta cttatcgacc gcagcagcaa
33780

gtccctctgg agtcaacgta gggtcagcct ctaagagtgc ctcgccacg cgtttcttga
33840

cttcagggtcg agacgcatag ctggtcaacc atgacttctt gatggcctcc tgtagcgct
33900

ctggactccc aagctccttg atgtacagct ccttcatctg tttgctgtac acatgagggg
33960

cgtagggttcc cttgaagcgg ctaccgggaa agatagactg agcgtctgtc cgaccaaaca
34020

tagctggatt ctccatcatc tcacgcttgg cgtcaaactg gttcttcagt aggtcataga
34080

ctttcagttc tcccggagtc agttcagcct tcaggtttcc gctaccatct tcgatagcca
34140

tagacacacg ctggtagatg tcttgacgga atgcgccaga gtctcgccag aatgctgtct
34200

ggaagtacgg gtcttttagt gcctcagtaa tcgcatcgtc gatgtcggtg tagaaccgat
34260

ggtccacagc acgaagtctc tcgaatacgt ctgacgcagt ggtcccgatt ttacctgatg
34320

cccctgactg cataccagtc ggtgagcgca ctaagtcagc agctactcca cgaatctcag
34380

ggttctcaga ccgaagcagc ttcaggccaa tctcggtaag tccaccaagg ttcacaccag
34440

cagcggcagc ttcaggctca atcacttcat caaagacctg acgtgtctta gggttcagag
34500

ggttctcacc aatcaggatt gaaccatctt caagtcgtac actaccggc tcattcggaa
34560

cgtcagcgaa cttaactcct tgatgactaa aggtctgctc accttcctga acagggagac
34620

gagacaggtc ctgaccatca acgttacgag cggctctcacg ggcttcaga cgtgtagctg
34680

gaccagcgaa ctcathtagt ttgcgaccta aggtcttacc taagccatca gcgatagcag
34740

tcatactgc accgaataga gcaccaccaa ggatagcttc agccacatga gcatcaccac
34800

cagccactga ggtacgggca acctcagaca caccagatag tgctccagct tgggcagcca
34860

ctgtgaacat cttgttgacc agcttgccgc ctttaccac ctgtccagcg ataggaacgt
34920

aggtcagcgg gtctacacca gcaccaatca caccagcagc taactgagca ccaatcccg
34980

ccttggcctt ctcttggtcc aacttctggt tctcaagcgc caagttaata agctcggta
35040

ggttctgagg agaaccacca gtaatgactc cataatactg aggcaggacc ccagagttac
35100

gaatctggtc cagctcctcg cgagtccact tatggttggt ccatctggta gggttgaaca
35160

catcaccaat gacatcaagt gagtccctcg tctgaccagc gcggatagcc acgccgaca
35220

gagagttttt cacttcagct tctgtagcag caccgaaacc gaaccacgta gagcggctctt
35280

ctcgttcctg catggtctcg ccagtagcct tatagaacat ctcaccgaac gattcgttgg
35340

gagcttcagg ttcttgaccc tcaatgttta gaccagcagc ggtcggaagg ttctcaccca
35400

gagctacttt aggttttagcc ttgaggcctt ccgtgagtgc gtcaaatacg ttagcgctta
35460

ctgggtggagt ctttggggtg atgcccccg caccacttaa ggcgcgagag actcctagct
35520

tgtagacctc agggtcatac cgggaaccag tctcatggta gccgatagcc tcagacagag
35580

aggcgaggac atcaggatta gtcaagtcaa tgctttgggt cgctggaatg ccagtagcag
35640

ccacaaccga gtcgatgtag gactgagtgt cgttctcgct gggtggtgcc catcggttga
35700

taatcttctc gattgagtcg tagccctgtc gaccgtacga catcaggttc ttagccagag
35760

cgcgagcgcc agagtcagga gtgtcgaacg ttacgaaaga cccatcgtct cctgtagctc
35820

cttccactg gtcttttgaa acacgaatgt tcccgatggt attggtgcga ataccacgag
35880

tcgccattgt tattactcct taccgattaa ggtgtttgcg atactctcca gcgagacatc
35940

actgtacaga ccgccgcgtt tctggatggt accttcacgc tcggctcgac gtttatcacc
36000

agccgattta gtctcgacaa tgcgagagcg ggtgttggct ttacgttcag cttcagcgta
36060

ggctttatcc tcagcttggt tctgctgttc acggtacagt ttaccacca gttctttatc
36120

gtatcgaatg cgtagggttc cgttagcgct ctgcaggaag accgagccgt tctgctcaac
36180

tacagagagc tgagagttca cgaccaaggt gttagccttg acgagcagct tgcgagctgt
36240

gtcgatgatg tctcgaccaa ccttccaaga ctcagggtta tccccgacca taagttgatg
36300

gcgggacacc atgccgattg acttaccatc ctgaccatca tcggtgaaag tcacggtgtg
36360

ttcattcaac cacttctggg tattctgagt ggctccgtca gcgttacctg tcctgtagta
36420

ccatgagtcc catacttttc gtgcaatcat cttcaattca gtcggtatcc ttgagagttg
36480

agtctccttt gagtcattcg tcagctctct ccactccttg tctgcctcac ttgcatctc
36540

acgcgataaa cttgcagctt gcttatcagc ttcaatcagc gtctgagggc ccagacctat
36600

cttgtcaatc tgctcgaaag tcgtgaacaa ttgggcctgc tcagggtaga ggaccgcgaa
36660

gtcgaaggg tcctgagtgt agaccttacg cagagactcg aagcgtttca tcctgtctgg
36720

gtcgtactgt ccacggatga cagcagcttg ccactcacca gcagcgtcct gaatcagcgt
36780

ctggaaggca ttacggaacg gaccattggt agtgtcagct ctcaacaatg ccaccttctg
36840

agcgtcctta gcagcctcag ggatgtccat ctgggtcaatc tgctgtagct tggcagacgc
36900

atagttgttc atgtctgaac gcttgaactc tcctgtgggt tcagagaccg gaaggtcctc
36960

atagttgggt gacacgtttt ctccagccag acgtcgtctga tacacttggt cgatgaccag
37020

ttgcttggtc tgggtctgga ttaacttagc gttctccttt gcctgttcag cagacttacg
37080

ctttaccgct tccagtaagc tggcttcggc attaataagc atctgacgct gaggtgtgag
37140

ttcttcaccc ggttgaagca ggttggtctg ctcttgagt ttctgaatct gggccagacc
37200

gatggttggg tcatcctgaa gaatagcaga ctgaacgccg agtgctaagt cttcctgata
37260

cttagccacc agtttatact cagtaccttg ggctcaacc atagcagcat tgaagacgtc
37320

aggtcctaca atctcttcga tggtagcgtc aacaccatta agggtgatac gctcgccacg
37380

gacttgctgt aggaagtttg agcctcctga cttctggatt gcgtcacgta ccgtctgggt
37440

gattacctct cgtgctctct ggtctgaagg tatagcagca gtcgtcaggc catcccgaat
37500

gtaggccatg aaggtctttc cagactcagg cgaacgcac caggtcccat cgtaaggaa
37560

cgagttcatc tcaatacagag tgttcaacat tgcggtctct tcagactgct tgctgaaata
37620

cttattgaat gaccgtaga tagcgatgtt tcgggtccgtg atattatcgt taaatccacg
37680

ctggaagaac tcgtcggtag ggttaatacc agcctcttca gcataagact tagctgcgtc
37740

ttgaagtcgc tgggtggcgat attcttccat ttcttgacgt gtgcggaact caccgttctg
37800

aatcttaacg ttaatctcgt cgtctacagc aaaggcagca ttacgaccag tcttgactcg
37860

aagtgccttc atagcgtaag ggtcatcctg atacagcaat gtgccgttct ggatagcctc
37920

acgtctctgc tgagggtgtca acttacggat aatctcgtta gaccgctcgt cagctctggt
37980

cttctcatcg tccttgaact gcttgtaaa tcctgtccca gactcaacga agttagtcaa
38040

tgcacgagcc agcccggagt ccccgatcgg agcctgaacg ttggctgctt gatagttgac
38100

ggcgatagtt ttaccggcg ctctgccacg acccatagtc cgattagcca gagctgattc
38160

aatattacta gccattagtc ctctcttag ctatgacctg taggtgtgcc tttagcagca
38220

ctaactcgtg cagcaccacc agagcttgat gcccagaga ttgacttacc agcagcgtac
38280

ccctgcatcc cggcgcttgc aacattaagt gcatgagcca gtgggctggt cttgatgatt
38340

ttaccctgac cacggatagc agacttggtg ttctcaatgt tggcgatacg gttcccgaag
38400

atagccgcat agtcgcggtt gtaactttcg gtaatccctg ctcgctcctt gactgtatct
38460

ccttcgacct gacgttcaat cctgtccata gagttacctt ccagaccgga ctcagccacc
38520

gcagctcgga ccataccctg attgcgtata ccgttgagcg tggctctctgt cagttcagcc
38580

atctgctgct ccttcaggctc tcgctcctgc atcctcaggt tggcgtcaga atagttcatc
38640

tgcttaacca tttcctgagc ctgtcgggtc tgagcgtcaa ttgctgcacc ttcggccttg
38700

gcctgctggg atgcggacat agtggccccg gctacagcca tgatgcccat ggcgatactt
38760

acgggttcac acatacgtcc tccttagaga tagtgaataa ttgaaaacgc tcaccagtta
38820

ccgggctgat agtccaatca tcatggaact tagccccaag caacttcaag aatttaatgt
38880

gagacttatt gcctgaccac acgtagttcc agatgggtccc gtattggtct aacattaagt
38940

ccctgtactc agagatacgc tttacgaact ctcgcttctc tttaggtctc agcttataga
39000

caagaccgga agtcaagaac catacgttat ccccttggtt tccaccatag gcaaacactt
39060

cgcttacacc gttcgttaaa accacagatg acggggataa atgcttaagc agtctttcag
39120

atagaccac ggttgaccca tagtttgctt tgcattcatt aacatcatct gctgaaagat
39180

gccacagaaa gtagtggaca tctggttccg tagccttgcg aatatacata aagtctcctt
39240

ataaccttaa gggcctatag tccctatagt gatagttaag gtaaacttat aggccattca
39300

ataagttaaa cggaacgagc tttcttagcg tatgacgcct cccagccaca cccaacgatt
39360

gacactgggg taggatagtc ggactctaag gttagactcg tggttaatgc gttaccattc
39420

atagcgaagc gatactgacc atccccaatg ttggtagtcc cgatgggttg ctgaccaagg
39480

gtgtacccat taaagtggtt cacgaactcc cgctcaccgt ttctgacaat gagtctaaga
39540

30513

gcaccagtgt cctttagtgc gacccaagcc cgacgaagtt gtaggcgtcc agtgtcttca
39600

gactgagtgc cactttcg
39618