



(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)



1-0025275

(51)⁷ C12N 7/01; A61P 31/04

(13) B

(21) 1-2015-03525

(22) 26/02/2014

(86) PCT/KR2014/001592 26/02/2014

(87) WO/2014/133323 04/09/2014

(30) 10-2013-0021499 27/02/2013 KR

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/02/2016 335A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

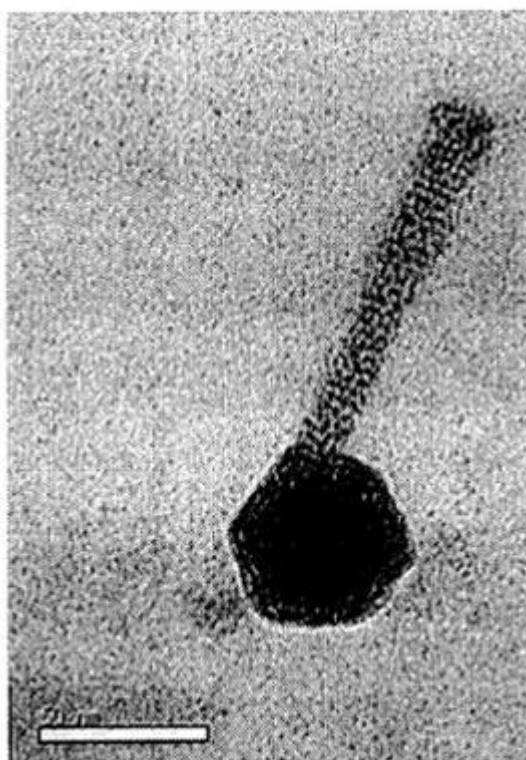
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Korea

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

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

(54) THỂ THỰC KHUẨN, CHẾ PHẨM KHÁNG KHUẨN, CHẤT KHÁNG SINH,
CHẤT PHỤ GIA, CHẤT LÀM SẠCH CHỨA THỂ THỰC KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P). Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chế phẩm kháng khuẩn chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) làm thành phần hoạt tính.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn mới có hoạt tính diệt khuẩn đối với *Clostridium perfringens* gây bệnh và chế phẩm kháng khuẩn chứa thể thực khuẩn này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm kháng khuẩn hoặc thể thực khuẩn mới để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Clostridium perfringens (CP), là một vi khuẩn *Bacillus* lớn, kỵ khí bắt buộc, gram dương, được biết là một loại vi khuẩn không có tiêm mao và tạo ra bào tử. *Clostridium perfringens* là loại vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy hoặc các bệnh tương tự, đặc biệt ở các vật nuôi như gà, lợn, v.v.. và các con vật tương tự, được coi là một trong những vi khuẩn gây bệnh chính và nguy hiểm cho ngành công nghiệp chăn nuôi, như trường hợp *Salmonella* gây ra bệnh thương hàn cho gia cầm.

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

Hoại tử ruột gây ra các triệu chứng mất nước, tiêu chảy từng đợt và các triệu chứng tương tự ở động vật bị nhiễm khuẩn tùy theo mức độ trầm trọng của bệnh, dần dần làm cho cơ thể động vật suy yếu và chậm lớn và các ảnh hưởng tiêu cực tương tự, vì vậy hoại tử trở thành một vấn đề nghiêm trọng trong ngành công nghiệp chăn nuôi. Ngoài ra, do *Clostridium perfringens* rất dễ lây truyền qua phân động vật, nên việc lây nhiễm giữa các động vật trong không gian gây giống chung có thể dễ dàng xuất hiện thông qua việc lây nhiễm qua miệng thông qua đất hoặc thức ăn đã nhiễm, hoặc các vật truyền tương tự. Đặc biệt, tỷ lệ nhiễm bệnh của con non rất cao nên *Clostridium perfringens* thực sự là một vấn đề cần giải quyết.

Trong khi đó, thể thực khuẩn là một loại virus đặc biệt, chúng chỉ gây nhiễm và phá hủy vi khuẩn và chỉ có thể tự sao chép trong vi khuẩn chủ. Thể thực khuẩn có tính đặc hiệu

vật chủ cao so với các chất kháng sinh, và gần đây, vấn đề xuất hiện chủng vi khuẩn kháng kháng sinh đã trở nên nghiêm trọng, vì vậy việc sử dụng thể thực khuẩn trong thực tế ngày càng thu hút sự chú ý (Tài liệu không phải tài liệu sáng chế 1 và 2).

Do đó, các nghiên cứu về thể thực khuẩn đã được thực hiện một cách 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.

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

Tuy nhiên, mặc dù đã có các giải pháp kỹ thuật như nêu trong các tài liệu dưới đây, nhưng công nghệ sử dụng thể thực khuẩn để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, cụ thể là bệnh hoại tử ruột do *Clostridium perfringens* gây ra vẫn là một vấn đề quan trọng trong ngành công nghiệp chăn nuôi, bao gồm ngành chăn nuôi gia cầm và lợn, vẫn chưa đầy đủ, do đó thể thực khuẩn và kỹ thuật sử dụng thể thực khuẩn cần được phát triển.

Tài liệu thể hiện tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

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

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

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

Tài liệu không phải tài liệu sáng chế

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

Tài liệu không phải tài liệu sáng chế 2: Sung Hoon Kim et al, Bacteriophage, Novel Alternative Antibiotics, BioWave Vol.7 No. 15, 2005, BRIC.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế thực hiện các nghiên cứu để giải quyết các vấn đề như việc xuất hiện vi khuẩn kháng thuốc khi sử dụng kháng sinh, việc kháng sinh tồn dư trong thịt và các vấn đề tương tự, ngăn ngừa và điều trị hiệu quả các bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra, và kết quả là, các tác giả sáng chế đã phân lập một loại thể thực khuẩn mới từ thiên ΦCJ21 (KCCM11363P) có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*.

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

Sáng chế đề xuất thể thực khuẩn mới ΦCJ21 (KCCM11363P) có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*, trong đó trình tự axit nucleic của thể thực khuẩn ΦCJ21 này là SEQ ID NO:1.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) làm thành phần hoạt tính.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia pha vào nước uống, chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) làm thành phần hoạt tính.

Hơn thế nữa, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm theo sáng chế hoặc thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo sáng chế dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra cho động vật ngoại trừ người.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một phương án ví dụ, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*, trong đó

trình tự axit nucleic của thể thực khuẩn ΦCJ21 này là SEQ ID NO:1.

Theo một phương án ví dụ khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) như đã mô tả ở trên làm thành phần hoạt tính.

Theo một phương án ví dụ khác, sáng chế đề xuất chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia cho vào nước uống, chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) như đã mô tả ở trên làm thành phần hoạt tính.

Theo một phương án ví dụ khác, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm theo sáng chế hoặc thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra.

Hiệu quả

Thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo sáng chế có tác dụng diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*.

Ngoài ra, thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo sáng chế có khả năng chịu axit, chịu nhiệt, và chịu hạn, vì vậy, thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) có thể được sử dụng làm vật liệu để ngăn ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra trong khoảng nhiệt độ hoặc pH, các điều kiện ẩm khác nhau và các yếu tố tương tự và được sử dụng làm chất kháng sinh, chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia cho vào nước uống, chất tẩy rửa, chất làm sạch hoặc các dạng chế phẩm tương tự.

Hơn nữa, theo sáng chế, thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này (KCCM11363P) làm thành phần hoạt tính có thể được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử của thể thực khuẩn mới ΦCJ21 mới (KCCM11363P, sau đây gọi là 'ΦCJ21').

Fig.2 là kết quả điện di gel trong trường xung điện (pulsed field gel electrophoresis - PFGE) của thể thực khuẩn mới ΦCJ21.

Fig.3 thể hiện kết quả điện di gel natri dodecylsulfat-polyacrylamit (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE) của thể thực khuẩn mới ΦCJ21.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm về khả năng chịu axit của thể thực khuẩn mới ΦCJ21.

Fig.5 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm về khả năng chịu nhiệt của thể thực khuẩn mới ΦCJ21.

Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm về khả năng chịu hạn của thể thực khuẩn mới ΦCJ21.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Các nội dung không được mô tả trong sáng chế nhưng có thể được hiểu và suy ra bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này hoặc lĩnh vực tương tự nên phần mô tả các nội dung này cũng sẽ được loại bỏ khỏi sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens* (CP), trong đó trình tự axit nucleic của thể thực khuẩn ΦCJ21 này là SEQ ID NO:1.

Clostridium perfringens (CP) được biết là một vi khuẩn *Bacillus* lớn, kỵ khí bắt buộc, gram dương, không có tiêm mao và tạo ra bào tử. *Clostridium perfringens* là loại vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy hoặc các bệnh tương tự ở động vật, đặc biệt ở các vật nuôi như gia cầm, lợn và các con vật tương tự, được coi là một trong những vi khuẩn gây bệnh chính và nguy hiểm cho ngành công nghiệp chăn nuôi, như trường hợp *Salmonella* gây ra bệnh thương hàn cho gia cầm.

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

Thể thực khuẩn ΦCJ21 theo sáng chế là thể thực khuẩn có tính đặc hiệu loài, gây nhiễm chọn lọc đối với *Clostridium perfringens*, có vỏ cùng kích thước và đuôi không co lại được, và về mặt hình thái thuộc Siphoviridae (Fig.1). Số liệu về trình tự axit nucleic để phân tích độ tương đồng của thể thực khuẩn ΦCJ21 với các thể thực khuẩn khác dùng được nêu ở bảng 1. Hoạt tính của thể thực khuẩn ΦCJ21 ổn định trong khoảng pH từ pH=4 đến pH=9,8 (chịu axit, xem Fig.4). ΦCJ21 giữ được hoạt tính của nó trong 2 giờ khi tiếp xúc với nhiệt độ 60°C (chịu nhiệt, xem Fig.5) và độ chuẩn của nó giảm khoảng 1/10 sau khi làm khô (xem Fig.6). Trình tự axit nucleic của thể thực khuẩn ΦCJ21 giống với SEQ ID NO: 1.

Thể thực khuẩn ΦCJ21, một thể thực khuẩn mới được phân lập bởi các tác giả sáng

chế, được lưu giữ ở trung tâm Giống vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Hongjedong, Seodamun-gu, Seoul, Korea) với số lưu giữ là KCCM11363P ngày 30/1/2013.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 làm thành phần hoạt tính. Dưới dạng một ví dụ về chế phẩm này, sáng chế đề xuất chất kháng sinh.

Do thể thực khuẩn ΦCJ21 có hoạt tính kháng khuẩn, có khả năng tiêu diệt đặc hiệu *Clostridium perfringens*, nên thể thực khuẩn ΦCJ21 này có thể được sử dụng để ngăn ngừa và điều trị các bệnh do nhiễm *Clostridium perfringens* gây ra. Một ví dụ thích hợp về bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra có thể được điều trị bằng cách sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ21 này là bệnh hoại tử ruột, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở bệnh này.

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

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

Thuật ngữ "ngăn ngừa" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ tất cả các hành động để cung cấp thể thực khuẩn ΦCJ21 và/hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là thể thực khuẩn này cho động vật trừ người để ức chế bệnh tương ứng hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh.

Thuật ngữ "điều trị" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ tất cả các hành động cung cấp thể thực khuẩn ΦCJ21 và/hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là thể thực khuẩn này cho động vật trừ người, nhờ đó triệu chứng của bệnh tương ứng do nhiễm khuẩn gây ra có tiến triển tốt hơn hoặc được giảm bớt.

Một ví dụ về bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra trong đó thể thực khuẩn ΦCJ21 và/hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là thể thực khuẩn này có thể được sử dụng là bệnh hoại tử ruột, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 với hàm lượng tốt hơn là từ 5×10^6 đến 5×10^{12} pfu/ml, tốt hơn nữa là từ 1×10^6 đến 1×10^{10} pfu/ml.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa thêm chất mang dược dụng và được phối chế cùng với chất mang này, theo đó được cung cấp dưới dạng thực phẩm, thuốc, chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia pha vào nước uống và các dạng tương tự. Thuật ngữ "chất mang dược dụng" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây kích ứng cho cơ thể sống cũng không ức chế hoạt tính sinh học và các đặc tính của hợp chất được sử dụng.

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

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

Phương pháp sử dụng chế phẩm nêu trên không bị hạn chế ở một phương pháp cụ thể, mà phương pháp bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ không mang tính giới hạn về phương pháp sử dụng là chế phẩm này có thể được sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa.

Ví dụ không mang tính giới hạn về chế phẩm để sử dụng qua đường miệng là dạng viên thuốc ngậm, viên thuốc hình thoi, viên nén, hỗn dịch chứa nước, hỗn dịch chứa dầu, bột pha sẵn, dạng cốm, 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 chế phẩm như dạng viên nén, viên nang hoặc các dạng tương tự, chế phẩm có thể chứa chất liên kết như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza, gelatin; tá dược như dicanxi phosphat hoặc các chất tương tự; chất gây rã như tinh bột ngô, tinh bột khoai lang hoặc các chất tương tự; chất làm trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, sáp polyetylen glycol hoặc các chất tương tự. Trong trường hợp ở dạng viên nang, chế phẩm có thể chứa thêm chất mang lỏng như dầu béo ngoài những chất nêu trên.

Khi sử dụng ngoài đường tiêu hóa, cũng có thể sử dụng phương pháp dùng trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, dưới da hoặc tại chỗ, v.v.. Ngoài ra, có thể bôi hoặc xịt chế phẩm vào vị trí bị bệnh, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương pháp sử dụng này.

Một ví dụ về dạng bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm các chế phẩm tiêm để tiêm dưới da, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc các dạng tương tự; chế phẩm ở dạng thuốc đạn, các chế phẩm dạng phun xịt như chế phẩm dạng khí dung có thể hít vào qua hệ hô hấp hoặc các dạng tương tự, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các dạng này. Để bào chế chế phẩm thành dạng chế phẩm tiêm, chế phẩm theo sáng chế có thể được trộn với chất làm ổn định hoặc đệm trong nước, theo đó tạo ra dung dịch hoặc hỗn dịch, và sau đó, dung dịch hoặc hỗn dịch thu được có thể được bào chế thành dạng liều đơn vị cho vào ống tiêm hoặc lọ. Để bào chế chế phẩm thành dạng phun xịt như chế phẩm dạng khí dung hoặc các dạng tương tự, chất đẩy, hoặc các chất tương tự, có thể được trộn cùng với chất phụ gia sao cho dịch cô đặc phân tán được trong nước hoặc bột ẩm được phân tán.

Cách sử dụng thích hợp, phun hoặc liều sử dụng chế phẩm nêu trên có thể được xác định theo nhiều cách khác nhau phụ thuộc vào các yếu tố như tuổi tác, cân nặng, giới tính, mức độ trầm trọng của triệu chứng bệnh, loại thực phẩm, tốc độ bài tiết của động vật sử dụng chế phẩm hoặc các yếu tố tương tự khác, cũng như phương pháp bào chế chế phẩm, phương pháp sử dụng chế phẩm, thời gian và/hoặc đường dùng. Nói chung, bác sĩ thú y có kỹ năng thông thường trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định và kê liều hiệu quả cho việc điều trị mong muốn.

Sáng chế có thể đề xuất chất kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 làm thành phần hoạt tính.

Thuật ngữ "chất kháng sinh" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chất có khả năng

sử dụng cho động vật bao gồm cả người ở dạng thuốc, theo đó tiêu diệt vi khuẩn và là khái niệm chung chỉ chất bảo quản, chất tẩy rửa, và chất kháng khuẩn.

Chất kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 theo sáng chế làm thành phần hoạt tính có tính đặc hiệu cao với *Clostridium perfringens* so với chất kháng sinh đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, do đó không tiêu diệt vi khuẩn có lợi mà chỉ tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh cụ thể và không gây kháng thuốc, do đó chất kháng sinh theo sáng chế có thể được cung cấp dưới dạng chất kháng sinh mới có vòng đời dài hơn so với kháng sinh đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi và chất phụ gia pha vào nước uống chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 làm thành phần hoạt tính.

Chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi và chất phụ gia pha vào nước uống theo sáng chế có thể được sử dụng theo cách trong đó thể thực khuẩn ΦCJ21 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này được tạo ra riêng biệt ở dạng chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia pha vào nước uống và sau đó trộn vào thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống, hoặc theo cách trong đó thể thực khuẩn ΦCJ21 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này được cho trực tiếp vào khi chuẩn bị thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống.

Thể thực khuẩn ΦCJ21 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này được sử dụng làm chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia pha vào nước uống theo sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc dạng khô, và tốt hơn là ở dạng bột khô.

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

Vi sinh vật không gây bệnh khác có thể được bổ sung thêm vào chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia pha vào nước uống. Một ví dụ không mang tính giới hạn về vi sinh vật có thể được bổ sung có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus subtilis* có khả năng tạo ra enzym proteaza, lipaza, và/hoặc enzym chuyển hóa đường như *Bacillus subtilis* hoặc các vi khuẩn tương tự; *Lactobacillus* sp. có hoạt tính sinh lý học và hoạt tính

phân hủy chất hữu cơ trong các điều kiện kỵ khí như trong dạ dày bò; nấm mốc có tác dụng làm tăng cân vật nuôi và sản lượng sữa, làm tăng khả năng tiêu hóa thức ăn chăn nuôi như *Aspergillus oryzae* hoặc các vi khuẩn tương tự; và nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* hoặc các nấm men tương tự. Có thể sử dụng một mình hoặc hỗn hợp của ít nhất hai vi sinh vật trong số các vi sinh vật này.

Chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia pha vào nước uống chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 theo sáng chế làm thành phần hoạt tính có thể chứa thêm các chất phụ gia khác, nếu cần. Một ví dụ không mang tính giới hạn 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 thêm vào giúp cho chất lượng của thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống không bị giảm sút; các axit amin, các vitamin, enzym, lợi khuẩn, chất tạo hương vị, các hợp chất chứa nitơ không phải protein, các silicat, các chất đệm, chất tạo màu, các sản phẩm chiết, các oligosacarit và các chất tương tự, được thêm vào để làm tăng độ hữu dụng của thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống. Ngoài ra, chất phụ gia này có thể bao gồm chất trộn vào thức ăn chăn nuôi hoặc các chất tương tự. Có thể sử dụng một mình hoặc hỗn hợp của ít nhất hai trong số các chất phụ gia này.

Chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi có thể có mặt với hàm lượng từ 0,05 đến 10, tốt hơn là từ 0,1 đến 2 phần trọng lượng tính trên 100 phần trọng lượng của thức ăn chăn nuôi. Chất phụ gia pha vào nước uống có thể có mặt với hàm lượng từ 0,0001 đến 0,01, tốt hơn là từ 0,001 đến 0,005 phần trọng lượng tính trên 100 phần trọng lượng của nước uống. Hoạt động của thể thực khuẩn ΦCJ21 đối với *Clostridium perfringens* có thể bộc lộ đầy đủ trong khoảng hàm lượng nêu trên.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống được tạo ra bằng cách bổ sung chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia bổ sung vào nước uống chứa thể thực khuẩn nêu trên làm thành phần hoạt tính hoặc bổ sung trực tiếp thể thực khuẩn ΦCJ21.

Thức ăn chăn nuôi được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể mà bất kỳ loại thức ăn chăn nuôi nào thường được sử dụng trong lĩnh vực này đều có thể được sử dụng. Một ví dụ không mang tính giới hạn về thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc thực vật như hạt, rễ và quả, phụ phẩm trong quá trình chế biến thực phẩm, các loại tảo, chất xơ, phụ phẩm của ngành dược, các loại chất béo, các loại tinh bột,

các loại bầu bí, các sản phẩm phụ từ hạt; và các loại thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc động vật như protein, các nguyên liệu vô cơ, các loại chất béo, chất khoáng, các loại protein đơn bào, động vật phù du hoặc các loại thực phẩm. Có thể sử dụng một mình hoặc hỗn hợp của ít nhất hai trong số các thức ăn chăn nuôi nêu trên.

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

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 làm thành phần hoạt tính. Dạng chế phẩm của chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch không bị giới hạn cụ thể mà chất tẩy rửa hoặc chất làm sạch có thể được phối chế thành dạng bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

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

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

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm theo sáng chế hoặc thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo sáng chế để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra. Các bệnh nhiễm khuẩn này tốt hơn nếu có thể là bệnh viêm ruột hoại tử, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở bệnh này. Đích ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Clostridium perfringens* gây ra có thể là gia cầm hoặc lợn, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các đối tượng đích này.

Cụ thể, chế phẩm theo sáng chế hoặc thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo sáng chế để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn theo sáng chế có thể được dùng cho các đích bị nhiễm *Clostridium perfringens* hoặc có nguy cơ bị nhiễm *Clostridium perfringens* trừ người với liều cho hiệu quả dược lý. Hiển nhiên là người có kỹ năng trong lĩnh vực này sẽ biết rõ khi nào được phẩm này có thể sử dụng cho đối tượng bị bệnh, tổng liều thích hợp trong ngày có thể được quyết định bởi bác sĩ điều trị hoặc bác sĩ thú y tham gia điều trị dựa trên chẩn đoán y tế.

Liều cho hiệu quả dược lý cụ thể của thể thực khuẩn ΦCJ21 hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là thể thực khuẩn này cho một động vật cụ thể có thể được xác định

bằng cách xem xét thời điểm sử dụng và đường sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ21 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này, tốc độ bài tiết chế phẩm, khoảng thời gian điều trị hoặc các yếu tố tương tự, bên cạnh loại và mức độ đáp ứng mong muốn, độ tuổi, cân nặng, tình trạng khỏe tổng thể, giới tính hoặc chế độ ăn của từng cá thể tương ứng. Ngoài ra, liệu cho hiệu quả được lý có thể thay đổi nhiều phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như các thành phần của thuốc hoặc các chế phẩm khác được sử dụng đồng thời hoặc riêng biệt và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y học.

Thể thực khuẩn ΦCJ21 theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là thể thực khuẩn này có thể được sử dụng ở dạng dược phẩm (xịt mũi) cho động vật hoặc được bổ sung trực tiếp vào thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống của động vật và sau đó cho động vật ăn thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống này. Ngoài ra, thể thực khuẩn ΦCJ21 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này có thể được trộn vào thức ăn chăn nuôi hoặc nước uống ở dạng chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia pha vào nước uống và sau đó sử dụng.

Đường sử dụng và phương pháp sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ21 theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là thể thực khuẩn này không bị giới hạn mà đường sử dụng hoặc phương pháp sử dụng bất kỳ đều có thể được sử dụng miễn là thể thực khuẩn ΦCJ21 hoặc chế phẩm chứa thể thực khuẩn này có thể đi vào mô đích tương ứng. Nghĩa là, thể thực khuẩn ΦCJ21 hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là thể thực khuẩn này có thể được sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa khác nhau. Ví dụ không mang tính giới hạn về đường sử dụng là sử dụng qua đường miệng, đường trực tràng, tại chỗ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, trong động mạch, dưới da và sử dụng qua đường mũi, hoặc xông hít, v.v..có thể được thực hiện.

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Phân lập thể thực khuẩn gây nhiễm *Clostridium perfringens*

<Ví dụ 1-1> Sàng lọc thể thực khuẩn và phân lập thể thực khuẩn đơn

Sau khi 50ml mẫu phân lập từ phân động vật thu được từ Samwhaw Gps. Breeding

Agri. Inc., một trang trại nuôi gà và lợn ở tỉnh nam Chungchong, 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 0,45 μ m để tạo ra dung dịch mẫu và sau đó, thực hiện phương pháp phủ thạch mềm sử dụng dung dịch mẫu đã chuẩn bị này. Phương pháp phủ thạch mềm là phương pháp quan sát hoạt động ly giải của thể thực khuẩn bằng cách sử dụng các tế bào chủ sinh trưởng trên bề mặt thạch (gắn vào môi trường rắn sử dụng thạch 0,7%).

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

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

Sau khi dung dịch lọc nuôi cấy mẫu trong đó xảy ra hoạt động ly giải được pha loãng thích hợp và được trộn với 150 μ l dung dịch nuôi cấy lắc ($OD_{600}=2$) chứa *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1), thực hiện phương pháp phủ thạch mềm thu được các vết tan đơn. Do vết tan đơn được coi là được hình thành từ thể thực khuẩn đơn nên để tinh chế và phân lập được thể thực khuẩn đơn này, phải chọn vết tan đơn, cho vào 400 μ l dung dịch SM (NaCl (5,8g/l); MgSO₄7H₂O (2g/l); Tris-Cl 1M (pH 7,5), 50ml; H₂O, được pha chế sao cho thể tích cuối cùng là 1 lít) và để yên ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, sau đó tinh chế và phân lập thể thực khuẩn đơn này.

Để có một lượng lớn thể thực khuẩn đã phân lập, 100 μ l dịch nổi chứa thể thực khuẩn đơn được lấy và trộn với 12ml thạch 0,7% và 500 μ l dung dịch nuôi cấy lắc chứa *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1), sau đó thực hiện phương pháp phủ thạch mềm trong môi trường LB có đường kính 150mm. Sau khi rót 15ml dung dịch SM vào đĩa trong đó quá trình ly giải đã hoàn thành, đĩa này được lắc nhẹ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ, sau đó đưa thể thực khuẩn lên phần thạch bên trên. Dung dịch SM trong đó thể thực

khuẩn đã được loại bỏ được thu lấy và cho cloroform vào đó với lượng 1% thể tích cuối cùng và được trộn thích hợp trong 10 phút, sau đó ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch nổi thu được được mô tả ở trên được lọc qua bộ lọc 0,45µm và bảo quản ở nhiệt độ lạnh.

<Ví dụ 1-2> Nuôi cấy và tinh chế thể thực khuẩn trên quy mô lớn

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

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

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

Tiếp theo, sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút thì dịch nổi được loại bỏ và thu lấy các kết tủa.

Các kết tủa thu được được tái tạo huyền phù bằng cách sử dụng 5ml dung dịch SM và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Sau đó, dịch nổi được lọc bằng bộ lọc 0,45µm và thực hiện siêu ly tâm (35000 vòng/phút trong 1 giờ ở 4°C) bằng cách sử dụng phương pháp gradient mật độ glyxerol (nồng độ glyxerol: 40%, 5%), sau đó tinh chế thể thực khuẩn ΦCJ21. Sau khi ΦCJ21 tinh khiết được tái tạo huyền phù bằng cách sử dụng 500µl dung dịch SM, xác định độ chuẩn.

Các tác giả sáng chế gọi thể thực khuẩn thu được bằng cách chiết mẫu từ phân động vật có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens* là "Thể thực khuẩn ΦCJ21" 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 KCCM11363P ngày 30/1/2013.

<Ví dụ 2> Quan sát hình thái của ΦCJ21

Thể thực khuẩn ΦCJ21 đã tinh chế được pha loãng trong dung dịch gelatin 0,01% và

sau đó được cố định bằng dung dịch glutaraldehyt 2,5%. Thể thực khuẩn sau khi cố định được nhỏ giọt trên đĩa mica phủ cacbon (khoảng 2,5x2,5 mm), để thích ứng trong 10 phút và rửa bằng nước cất vô trùng. Màng cacbon được đặt lên lưới bằng đồng, nhuộm bằng uranyl axetat 4% trong thời gian từ 30 đến 60 giây, làm khô và thử nghiệm bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (JEM-1011, 80 kV, độ phóng đại từ 120000 đến 200000) (Fig.1).

Fig.1 thể hiện hình ảnh được chụp bằng kính hiển vi điện tử của thể thực khuẩn ΦCJ21 và có thể thấy rằng do thể thực khuẩn này không có vỏ có kích thước đồng đều và đuôi co được, nên về mặt hình thái thể thực khuẩn này thuộc về *Siphoviridae*.

<Ví dụ 3> Phân tích kích thước ADN hệ gen của ΦCJ21

ADN hệ gen được chiết từ thể thực khuẩn ΦCJ21 được tinh chế bằng cách siêu ly tâm. Cụ thể, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA, pH=8,0), proteinaza K, và natri dodecyl sulfat (SDS) được cho vào dung dịch nuôi cấy chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 đã tinh chế sao cho có nồng độ cuối cùng lần lượt là 20mM, 50µg/ml và 0,5% (trọng lượng/thể tích), và sau đó để ở trạng thái tĩnh ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ. Sau đó, một thể tích phenol (pH=8,0) tương đương được cho vào và khuấy, sau đó ly tâm ở nhiệt độ trong phòng với tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó thu lấy dịch nổi.

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

Tiếp đó, 1µg ADN được nạp lên gel agarosa 1% để điện di trong trường xung điện (pulse-field gel electrophoresis - PFGE), và việc điện di được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ bằng cách sử dụng hệ thống BIORAD PFGE chương trình 7 (phạm vi kích thước: 25-100 kb; mức thay đổi thời gian chuyển đổi: 0,4 đến 2,0 giây, hình thẳng; điện áp

xuôi: 180 V; điện áp ngược: 120 V) (Fig.2).

Fig.2 là hình ảnh điện di gel trong trường xung điện (pulsed field gel electrophoresis: PFGE) của ADN hệ gen của thể thực khuẩn ΦCJ21, và có thể xác nhận được rằng ADN hệ gen của thể thực khuẩn ΦCJ21 có kích thước khoảng 56kb.

<Ví dụ 4> Phân tích mẫu protein của ΦCJ21

15μl dung dịch chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 tinh khiết (độ chuẩn 10^{10} pfu/ml) được trộn với 3μl dung dịch mẫu 5xSDS và gia nhiệt trong 5 phút. Protein tổng số của thể thực khuẩn ΦCJ21 được trải lên gel SDS-PAGE 15% và sau đó gel này được nhuộm màu ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ bằng dung dịch nhuộm coomassie xanh (Fig.3).

Fig.3 là hình ảnh điện di thể hiện kết quả của phép SDS-PAGE thực hiện cho thể thực khuẩn ΦCJ21 và quan sát thấy các protein chính có kích thước khoảng 40kDa, 51kDa, 53kDa, và 70kDa. Trên Fig.3, M là protein mà trở thành chất chuẩn để tính trọng lượng phân tử.

<Ví dụ 5> Phân tích trình tự gen của ΦCJ21

Để khẳng định các đặc tính di truyền của thể thực khuẩn ΦCJ21 tinh khiết, ADN của thể thực khuẩn ΦCJ21 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 lắp ráp ở MacroGen INC. bằng cách sử dụng phần mềm ghép gen GS và de novo (Roche). Việc phân tích trình tự khung đọc mở được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GeneMArk.hmm, Glimmer v3.02 và FGENESB. Việc định danh khung đọc mở được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTP và InterProScan.

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

Các số liệu về trình tự axit nucleic dùng để phân tích độ tương đồng giữa thể thực khuẩn ΦCJ21 so với các thể thực khuẩn nêu trong bảng 1.

[Bảng 1]

Lệnh hỏi				Đối tượng		Mức độ tương đồng	
Tên	Chiều dài	Bắt đầu	Kết thúc	Mô tả	Giá trị E	Số lượng tương đồng/Tổng số	PCT (%)
contig00001_orf00003	543	70	537	protein giả định bảo toàn [Clostridium botulinum BKT015925]	3E-05	42/161	26
contig00001_orf00010	207	1	204	protein giả định phi340_gp33 [Thể thực khuẩn Clostridium phiCP340]	2E-12	32/68	47
contig00001_orf00011	543	19	486	protein giả định CbC4_4068 [Clostridium botulinum BKT015975]	5E-17	63/180	35
contig00001_orf00013	588	7	570	thymidin kinaza [Clostridium butyricum E4 str. BoNT E BL5282]	2E-55	109/190	57
contig000131_orf00009	363	34	294	protein liên quan đến thực khuẩn dự đoán [Selenomonas ruminantium subsp. lactilytica TAM6421]	6E-09	34/87	39
contig00001_orf00017	528	247	360	protein giả định [Pelotomaculum thermopropionicum SI]	0.0003	17/38	44
contig00001_orf00016	1974	133	1566	primaza [Thể thực khuẩn Gordonia GTE2]	3E-36	137/494	27
contig00001_orf00031	930	7	888	protein giả định [Thể thực khuẩn Gordonia GTE2]	5E-13	80/324	24
contig00001_orf00030	2442	226	2388	ADN polymeraza 1 [Thể thực khuẩn Gordonia GTE2]	2E-97	265/756	35
contig00001_orf00024	762	358	756	thymidylat synthaza [Clostridium acetobutylicum DSM 1731]	8E-16	45/134	33
contig00001_orf00035	513	1	273	protein giả định CbC4_7040 [Clostridium botulinum BK1015925]	9E-18	48/91	52
contig00001_orf00032	884	46	702	gp089 [Thể thực khuẩn Lactococcus KSY1]	2E-06	57/220	25
contig00001_orf00038	1452	64	1437	protein vùng. Họ SNF2 [Bryantella formatexigens DSM 14469]	4E-56	150/475	31
contig00001_orf00026	183	16	180	protein giả định AC5_1713 [Clostridium perfringens CPE str F4969]	6E-08	30/70	42
contig00001_orf00038	441	31	384	protein dự đoán [Aqulfex aeolicus VF5]	1E-10	54/152	35
contig00001_orf00044	1359	583	753	protein giả định PCC7424_5514 [Cyanotheca sp. PCC 7424]	1E-05	31/57	54
contig00001_orf00046	1246	7	1239	endolysin [Clostridium perfringens E str. JGS1987]	3E-168	295/415	71

contig00001_orf00050	2913	2455	2904	protein giả định AC3_2545 [Clostridium perfringens E str_JGS1987]	6E-58	107/150	71
contig00001_orf00052	1059	2B	1047	Protein lắp ráp đệm đáy giả định: protein tiền thể thực khuẩn PBSX giả định [Bacillus subtilis subsp_ subtilis str 168]	4E-52	119/341	34
contig00001_orf00051	588	28	573	protein giả định HMPREF9630_00205 [Eubacteriaceae bacterium CM2]	3E-16	55/184	29
contig00001_orf00048	150	1	135	giả định protein CLJ_62512 [Clostridium botulinum Ba4 str. 657]	9E-12	33/45	73
contig00001_orf00047	213	1	207	Đoạn tương đồng bacteriocin UvlB [Clostridium perfringensC str_JGS1495]	3E-22	47/69	68
contig00001_orf00049	594	1	585	protein giả định bảo toàn [Clostridium perfringens E.strJCS 1987]	1E-25	73/198	36
contig00001_orf00056	714	19	429	ZkdP [Bacillus sp.JS]	9E-19	53/139	38
contig00001_orf00055	987	1	960	protein 2016_scaffold57_00038 [Thể thực khuẩn không xác định]	1E-41	110/328	33
contig00001_orf00053	408	1	381	protein giả định Plar1B_05095 [Paenibacillus subsp larvae B-3650]	3E-14	47/131	35
contig00001_orf00057	2562	25	1239	protein đo dài đuôi thể thực khuẩn, họ TP901 [Herpetosiphonaurantiacus DSM 785]	1E-88	194/410	47
contig00001_orf00059	420	88	417	protein giả định BSSC8_30350 [Bacillus subtilis subsp. Subtilis str. SC-08]	3E-13	40/111	36
contig00001_orf00063	435	1	339	protein giả định: PESX dự đoán [Bacillus amyloliquefaciens XH7]	1E-07	37/116	31
contig00001_orf00064	534	43	522	protein giả định B1NLA3MEDRAFT_3746 [Bacillus sp.1NLA3E]	1E-45	89/170	52
contig00001_orf00065	363	13	336	protein giả định B1NLA3MEDRAFT_3747 [Bacillus sp.1NLA3E]	8E-13	45/108	41
contig00001_orf00060	432	10	420	protein giả định RUMOB_01063 [Ruminococcus obeum ATCC 29174]	8E-16	47/139	33
contig00001_orf00069	1260	1	1089	protein giả định RUMOB_01052, (Ruminococcus obeum ATCC 29174]	2E-62	153/390	39
contig00001_orf00068	921	10	882	protein giả định bảo toàn [Bacillus cereus 03BB108]	4E-86	165/291	56

contig00901_orf00066	405	16	402	protein giả định RUMOB_E_01056 [Ruminococcus obeum ATCC 29174]	5E-10	44/130	33
centig00001_orf00070	885	19	879	Protein tạo hình thái đầu SPP1 gp7 [Bacillus sp 1NLA3E]	7E-50	118/300	39
contig00001_orf00061	1332	1	1329	protein vỏ đuôi thể thực khuẩn [Desulfosporosinus younoiae DSM 17734]	1E-63	169/449	37
contig00901_orf00072	396	1	372	protein giả định 2016_scaffold57_00101 [thể thực khuẩn không xác định]	4E-11	59/135	43
contig00001_orf00071	1467	46	1449	protein giả định RUMOB_E_01050 [Ruminococcus obeum ATCC 29174]	5E-108	215/479	44
contig00002_orf00002	837	259	678	Đơn vị nhỏ terminaza của thể thực khuẩn họ PBSX [Clostridium botulinum Ba4 str 657]	2E-26	66/164	40
coraig00004_orf00001	408	1	357	CMP/dCMP deaminaza protein liên kết với kẽm [Methanohalobium evestigatum Z-7303]	2E-23	56/131	42
contig00003_orf00004	420	1	417	qp317 [thể thực khuẩn Bacillus G]	5E-24	67/154	43

Trình tự hệ gen từng phần của thể thực khuẩn ΦCJ21 được tạo ra trong các phần nêu trên giống với trình tự SEQ ID No: 1. Trình tự hệ gen này được xác định bằng máy phân tích gen.

<Ví dụ 6> Thử nghiệm độ ổn định của ΦCJ21 phụ thuộc vào độ pH

Để khẳng định độ ổn định của thể thực khuẩn ΦCJ21 trong môi trường pH thấp, thử nghiệm độ ổn định được thực hiện trong một khoảng pH rộng (pH= 4,0; 5,5; 6,4; 6,9; 7,4; 8,2; 9,0 và 9,8).

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

Sau đó, 90μl mỗi dung dịch pH nêu trên được trộn với 10μl dung dịch chứa thể thực khuẩn có độ chuẩn $1,0 \times 10^9$ pfu/μl sao cho nồng độ cuối cùng của từng dung dịch pH là 1M, mỗi dung dịch pH này được để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, trong 1 giờ và 2 giờ.

Sau đó, dung dịch phản ứng được pha loãng từng bậc, 10μl dung dịch pha loãng ở mỗi bậc

được nhỏ từng giọt và nuôi cấy ở 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch mềm và độ chuẩn được xác định dựa trên việc có hoặc không có hoạt động ly giải (Fig.4).

Fig.4 thể hiện kết quả của thử nghiệm độ chịu axit của thể thực khuẩn ΦCJ21. Như thể hiện trong Fig.4, có thể khẳng định được rằng thể thực khuẩn ΦCJ21 không bị mất hoạt tính và rất ổn định trong khoảng pH từ 4,0 đến 9,8 trong thời gian lên tới 2 giờ.

<Ví dụ 7> Thử nghiệm độ ổn định của ΦCJ21 phụ thuộc vào nhiệt độ

Thực hiện một thử nghiệm để khẳng định độ ổn định đối với nhiệt trong quá trình phối chế thể thực khuẩn trong trường hợp sử dụng thể thực khuẩn này làm chế phẩm phụ gia cho thức ăn chăn nuôi trong số các chế phẩm chứa thể thực khuẩn khác.

Cụ thể, 200μl dung dịch chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 có độ chuẩn $1,0 \times 10^8$ pfu/ml được để yên ở 60°C trong các khoảng thời gian là 0, 10, 30, 60 và 120 phút. Sau đó, dung dịch nêu trên được pha loãng từng bậc, 10μl mỗi dung dịch pha loãng được nhỏ giọt và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch mềm và độ chuẩn được xác định dựa trên sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt động ly giải (Fig.5).

Fig.5 thể hiện kết quả của thử nghiệm khả năng chịu nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ21. Như nêu trên Fig.5, có thể thấy rõ rằng hoạt tính không giảm nhiều khi thể thực khuẩn ΦCJ21 tiếp xúc với nhiệt độ 60°C trong 2 giờ.

<Ví dụ 8> Thử nghiệm độ ổn định của ΦCJ21 khi làm khô

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

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

Sau đó, dung dịch nêu trên được pha loãng từng bậc, 10μl dung dịch đã pha loãng của mỗi bậc được nhỏ giọt và nuôi cấy ở 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch mềm và độ chuẩn được xác định dựa trên sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt động ly giải (Fig.6).

Fig.6 thể hiện kết quả của thử nghiệm khả năng chịu hạn của thể thực khuẩn ΦCJ21.

Như nêu trên Fig.6, có thể thấy rằng độ chuẩn của thể thực khuẩn ΦCJ21 sau khi làm khô bị giảm xuống khoảng 1/10 so với độ chuẩn trước khi làm khô.

<Ví dụ 9> Sử dụng quang phổ để thử nghiệm mức độ gây nhiễm của ΦCJ21 đối với các chủng *Clostridium perfringens* kiểu dại

Việc thể thực khuẩn ΦCJ21 có hoặc không có hoạt động ly giải được kiểm tra trên 45 chủng *Clostridium perfringens* kiểu dại được phân lập bởi Trung tâm kiểm định động thực vật (Animal and Plant Quarantine Agency) và trường đại học Kunkuk University không phải chủng *Clostridium perfringens* (BCCP 17-1) được sử dụng trong thử nghiệm.

Cụ thể, 10μl dung dịch chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 có độ chuẩn $1,0 \times 10^{10}$ pfu/ml và được trộn với 150μl dung dịch môi trường lactic (OD₆₀₀=2) chứa từng chủng trong số các chủng được nhỏ giọt và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch mềm. Sau đó, quan sát xem có hoặc không có vết tan được tạo thành.

Kết quả của thử nghiệm này là, trong số 45 chủng *Clostridium perfringens* kiểu dại thì có 42 chủng bị nhiễm, như vậy tỉ lệ nhiễm vào khoảng 97,7% và tỷ lệ bị ly giải là khoảng 97,7%. Kết quả được nêu trong Bảng 2 và 3.

[Bảng 2]

Nguồn gốc CP	Chủng CP	Khả năng nhiễm
Trường đại học Kunkuk	HLYS-1	+
Trường đại học Kunkuk	HLYS-3	+++
	JSH-1	+++
	KCCM 40947 ^T	+++
	KJW-2	++
	OYS-2	+++
	KCCM 12098	+++

[Bảng 3]

Nguồn gốc CP	Chủng CP	Khả năng gây nhiễm	Chủng CP	Khả năng gây nhiễm
Trung tâm kiểm định động thực vật	CP-KJW-1	+++	BCCP43-1	+/-
Trung tâm kiểm định động thực vật	CP-JSH-1	+++	BCCP44-3	+/-
	CP-OYS-2	+++	BCCP47-2	+++
	CP-BC-1	+++	BCCP48-3	+++
	CP-BSW-4	+++	BCCP50-1-3	+
	CP-HBM-2	+++	BCCP50-1-8	++
	CP-HL	+++	BCCP51-1-1	+++
	CP-KW-1	+++	BCCP51-1-5	+++
	CP-BS-1	-	BCCP52-2-8	+++

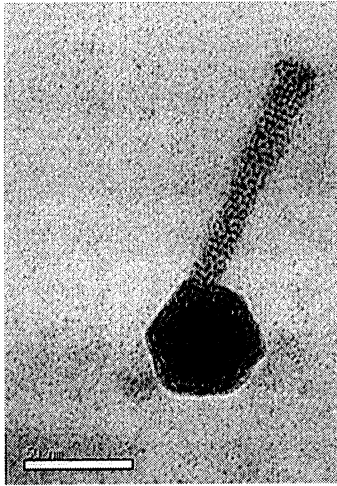
	CP-HL-1	+++	BCCP53-2-3	+++
	CP-LJN-1	+++	BCCP54-3-8	+++
	BCCP17-1	+++	BCCP55-3-1	+++
	BCCP23-4	+++	SBCCP429-2	+++
	BCCP37-2	+++ (T)	SBCCP321	+++
	BCCP38-1	+++	SBCCP343	+
	BCCP39-1	+++	SBCCP361	+++
	BCCP40-1	+	ELCCP Suksan Kim	+++
	BCCP41-3	+++	ELCCP6-1 ruột	+++
	BCCP42-2	+++	Ruột thừa	++

YÊU CẦU BẢO HỘ

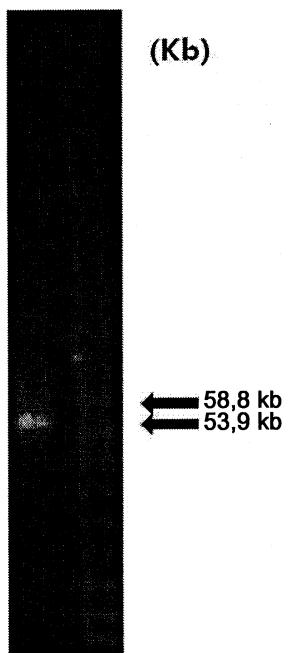
1. Thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Clostridium perfringens*, trong đó thể thực khuẩn này có trình tự axit nucleic là SEQ ID No.1.
2. Chế phẩm chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
3. Chất kháng sinh chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
4. Chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
5. Chất tẩy rửa chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
6. Chất phụ gia pha vào nước uống chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
7. Chất làm sạch chứa thể thực khuẩn ΦCJ21 (KCCM11363P) theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.

CÁC HÌNH VẼ

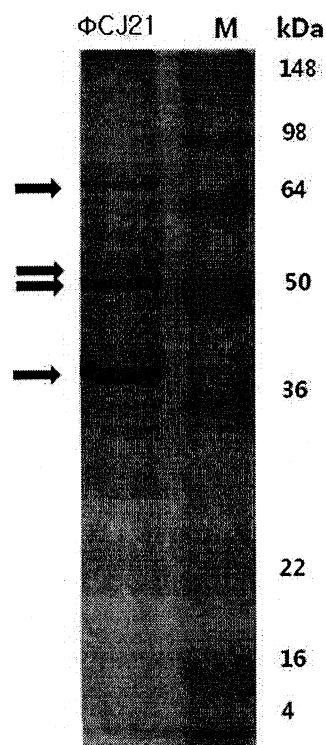
【Fig.1】



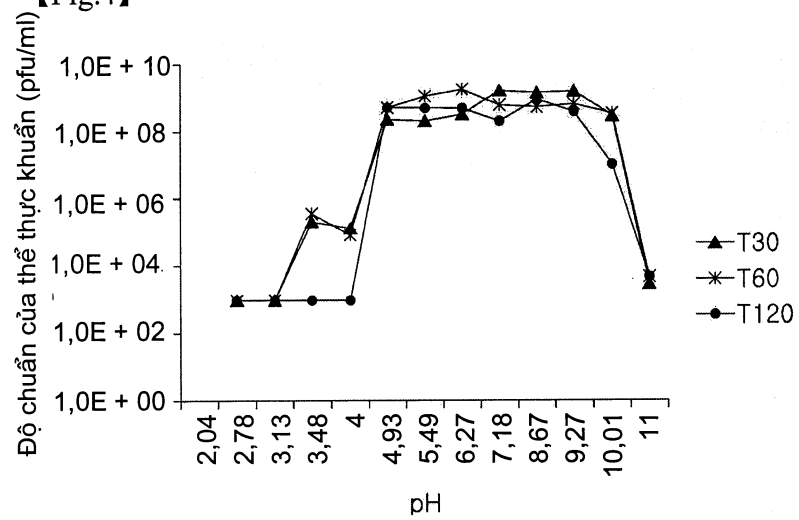
【Fig.2】



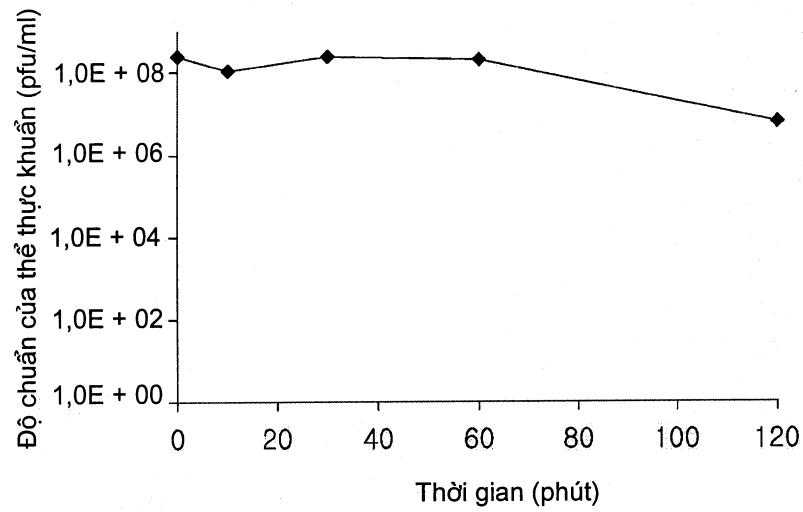
【Fig.3】



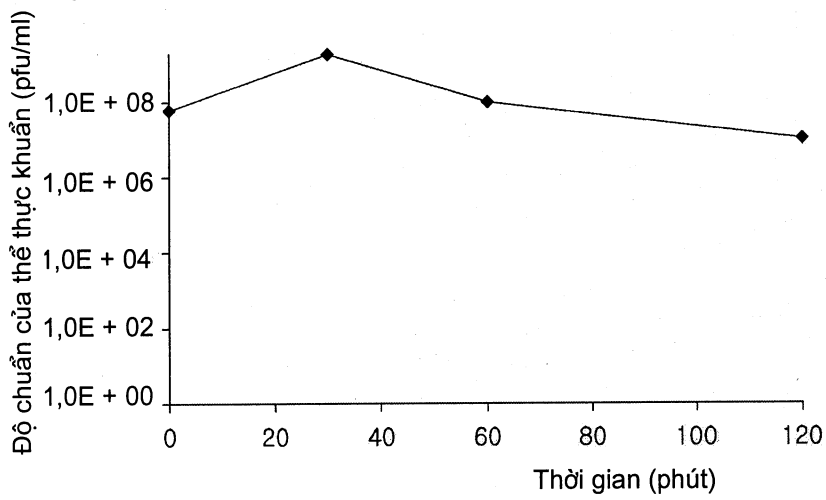
【Fig.4】



【Fig.5】



【Fig.6】



25275

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> CJ CheilJedang Corporation
- <120> Thể thực khuẩn và chế phẩm kháng khuẩn chứa thể thực khuẩn này
- <130> P13-5114
- <150> KR 13/021499
- <151> 2013-02-27
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 47438
- <212> ADN
- <213> một phần của ADN của thể thực khuẩn CJ21

<400> 1	
ttttaagag actgcaatag gttttctaaa aataagggag ggattaaccc tcctttttat	60
aattttttga gtcttgaaa aatccttaat tagttcaagt ttctgaagt tctctgac	120
ttctccattc tcttctaac ttgtagct tcttcttcg aatgagcatg gccatccagg	180
aattggtgcc atcttcttc aagtctctg tttcagatt gaagtctat aacctcaagt	240
gaatggtgt ccatagatc acctcctaa cactattata agtgatactg tcatattctg	300
tcaaataaaa aagagaggta atatatacct cccacattat cttattgagt atacacagat	360
atattctct tcaagagttt ggtaataag tgattgagca tattgtata gatcttagg	420
ttgtgtatct cttatatct gtattactt tcatgttct ctcttaata atttatatcc	480
aaagcataat gggttctcct caagttcaaa taatattcc cagttagtca tttattata	540
attcatattt aacatctcct tcagttgtt tatgctttaa ttataagaga gattccagag	600
agtgtaata gaaatcccg aagaaaagag agaattgtat tctcccatc ttaattttt	660
tattgtgct ccatcaact ccttgccatc cacatcatg acatactat caagtctat	720
tgtagagcc gtataact tttgtctt tctatcaaaa acctaatga catcagggt	780
acctctgtca atgatgtaag caatctctg agttccatc gcatatgta ctgaagtaa	840
tgagtgtaga ggtataaagt ctggagctgc ccagtcacca accttaagat ctctctat	900

actattcttg gtctcatatc ctgccacatc tgtaggttca tctgatgaat aataagtaac	960
ttcaactttg aactccattc ctttaaatga atttatcatc tcaattagat ttgtttatc	1020
agttctcagt ttatcattct gatactttaa tccttctaca ttatccatca gtatttcagt	1080
ctgctcagtt aattgtttat ttgactcaat gtattcttgg acagcattcc cccaatgatt	1140
gtttaggctc tgtatggta acagtagccc tcctatcaca attattgta ataatgacat	1200
aattcttta atcattctct ttaactcct ttatttttaa ttgaatttc tcaattccag	1260
atttatattt acccacagta ttaaaagtat cagttagat tgcataggtt tcctcatcag	1320
aattaaatct gaagcttct ctcttgatat cacctagctt attaaaggtc ttaccctct	1380
tgtccagata tcctttatag tccatatagc acagacaagc agtaataaat tcctgtttag	1440
ttctgaagtg atgagatata ccatacctt ctacccattt acttaataca aataggctct	1500
cattatcctt tggctttatc aattcaatcc atacaaactc attagcttgc tttagattag	1560
taaacttttt agccttgaac ttcttactac tctggatctt atccttatag tcatggaata	1620
cttcaggcca aaattcctgt aaatacatat ataaagagaa ctcatctacc ttagctttag	1680
gatctttaa gtaattaat gggatatccag acactgctct tatctggttc tttagcatat	1740
tattctcatt ttttagttga gaaacaatga aagagagatg agtaacagct ctggttaagct	1800
catgctcatt taaagatcta ccttctctat tctggattag ctctctta tctccccagt	1860
tatctatcat ttatagcacc tcctatgctt acattataca tatataagat aaatatgtca	1920
aagtcacat aggcataatca gtatcattt ttctgatatg ggtagcatat cagcatagtt	1980
acacctgata tcacatatag agtttacaat ttttgaatc aaatttggtg gtatcactag	2040
cgtagagga tatcagaaat acccatatt attacaatat atactatata taaataatta	2100
tatattatta tatatagat atagccaagg gctatatata actatgttt attgattaca	2160
taattggcag gctattgcct tgccttcgtt tacactacgg caggcatatc catgcaggac	2220
ttctctccg agctttgcc ctatatagaa aaaccagac ggtcagcgat cgagctcttg	2280
atttgtttg gttggaaga aagagagagt tagggggaaa gagagtaaga gagaacagta	2340
gttgagagag agttctccg aacgttgaca gttgtactta ctctcttat aatgacagta	2400

aaggagggat aaccattatg aaagttatat tatctaataaaaagaaatt atcattgaaa	2460
acaaggactt cttcataata atggaagagg acagatttat tctatctaga gcaatagata	2520
agaattgcgg agaattagta tctcaagtac ctaagtactg tattcttata tatgaggata	2580
aatccatacc aagatactta tataaggata atactcattt atatgaggtt attggcaata	2640
gagctatcat aagatacagt atataagagc ccacaatcaa ttctaaggcc ttttagatat	2700
gtggaatgt gattttactt ataatgtgt agagacacct tacaggagct gctagaggcc	2760
tttaaaggag gtatatcatg tatttatgta atggtaaaat agtcaagaat aaaaatgact	2820
taaaagataa gtttggtgt aaatcagtag tattcatcga tggggatgta gccacagtaa	2880
tggactttag tgacagaaag ccaaagataa caaaatatct tattaggagg gtatcacatg	2940
ataaacacat cattattgaa gagactggaa gggatagagg aaaagcataa gcaaaatact	3000
gatgagataa gaaagaacct aaactatgcc agatatttga ttgagaaaca gtattgtcat	3060
ttaacaaagg agcagaagat aaaattggga cagttcttag gattgactga gaagaagtta	3120
aaagaaatac aagagataaa taatcagtta ataaatttga gagtggggct aagttatgaa	3180
gtcgtatgta ataaccagaa aaaatagtgg ggtatcttta gcagatacag acatgggaca	3240
agtattagct aagatactat gtaagcatgg gggaacactt accattgagg aaattgaacc	3300
agaacatatt ggtcaaactt ttctattgt agaaggtaaa agaatatggt ataatagaaa	3360
aggaggtgat aatattgggg agaagaagt ctatgttaat tctcaagtat gactgcgaag	3420
aaactccaga aagaattgaa ttacgaaaga agtggttaca ggttgtctt cattcaataa	3480
tatattatag atatgacaac aatatctgga cagaccaaca atgggatgag actgccagag	3540
aggtagttaa acttaagaat gagaatccag gcttagtaaa cagtatgcca ttaggaatg	3600
acctaaaat cttgatgga tccactggct ttaatcttc atgtatgcaa gatattaaga	3660
tgctaagggt ggctcaaaat ttactcgact ttcatgttaa acgaggactt gatggaaaga	3720
gtaagaaaaa gaagaaaagg aggagaaagg aatgaaccta ctgagcact atataaaaaa	3780
ggtagacagt gtaagagagt accatgaatt cgataatgaa ccttgggcta aaggtaaaca	3840
atatgtagaa gtagaccttg attatcttg ttactctaac ataccacaaa gaactaaatt	3900

agtatttact gttgatgagt gggagaaaat aaaatataga ggctactaca tgggatagg	3960
ggaatagtta tgataagaga aatgggcatg agaatgctaa taccagaaat acatgatata	4020
aaagataggg atatacaaaa ttttgaaga aaggccctaa atgagctagt tgatgaaaag	4080
ttctttataa tacctgcaag tagtactggg aaatatcatc caacttatag tgcaggggta	4140
ggaggtttgc taagacatac taaagctgct tgttatatag gtaaagcatt atgcgaagct	4200
gagatgatat gtcaagaaga taaggatctg atacaggctg ctctgatatt acatgatatt	4260
aataaacctg ctaaggagca tccatatatg gttagagaga cactatcccc attaaaggaa	4320
gagtttccat caacctatga aaaggtaata gaactaattg agtctcatca tggatcaatg	4380
ggagagtacc caattaatac ttatcaaaag aggatagtag acttagctga ttatatcagt	4440
tcacaaaaag gattaatatt ctcatatgac caaggaactg attattctga ctgttatgg	4500
gaggagaagt aaatggtgct aggggtaata accctagtag caatattttt actaggagtg	4560
tttatagggt ttgaggtgaa gaaatggagc taggttttgc aatattagct atagtagtat	4620
caatattttt agaaactaaa tatataaagg agtagattat tatgtcaaga gcaagagctg	4680
caagaagaag agctgaaagg gagaacaaaa atcttaatgt tcttaaagct gtggacatca	4740
tgttagcctt atcatgctat acattaaaga aggaaggta tggtaagact agaatgacta	4800
ggtttgtgga agagatgagt aaacacacag aggaaattga aaaggaaca ctaactatg	4860
aaaccataat gggagagatt aaggatttag taccaccagg tatatttgat ttagaggagg	4920
agtcaaagga gtgataatct tggaataatt attatgggca tttagaatat taggcatact	4980
tgtaatagta tgggttatat tggaggcgat cagttgtgag caataaatta tattttaggt	5040
atagtgcctat gaactctgga aagactactc agttaatcca ggtagcacat aactatgaag	5100
aaaggggaat gaagccctta gtagttaagc caggaattga cactaaaggt ggaccatgta	5160
taatcagtag aataggggta gcaagaaagg tggatgttct tctacctcct aggggttaat	5220
tatcaaaaaat actttctgac tttagggcta attactgggc agtagatgtt atattaattg	5280
atgaggtaga attcttatcc agagaacagg ttgatgatct gttaaattta tcattacatt	5340
atcctatcat atgttatgga ttgagaactg attttaaaag agaaggattt gaaggaagta	5400

cccgattatt acaagtggcc cataacattg aagaattgaa gaacatttgt caatgcggt	5460
aaaaagccac atttcaata ttgaaatatt aaggtaaata tactgaccag ggtaaccaga	5520
tacaaattga taaccagcca gaaagtgtg aatatgaagc cgtttgaat gaatgtata	5580
ataaattaat ttttctaaa taactcgtg acaggctata taggatatga tattatagta	5640
ttgtaatcaa attacaaaca ccaacaaaaa cttataatt agttaatttc aaactatact	5700
aaatttgta tttaaaaatt aaaaatatgg aggaatgatt attatggcaa aaggaaaagc	5760
aaaatggta gaggaagcaa ataataagga gtaattgta atagtacaat ctgctttaa	5820
ttctggagat gagaaagaag ttaaaaaggc ttaaaaagct attgtggaat tagatgaaag	5880
aactcgtgac acagatggac aaataactgt agaggaagca ttagaatcat tagaaatggc	5940
tgtaggaact gtaaaggctg cataccaagc agaaatagat gctgtggaag atgaagatgc	6000
agtagatgct gacttgaag aagttgatga agacgaagca gaagaagatg aaaatgattt	6060
agaatcatta tctaaaaaag aattagctgc tatggctaaa gacttaggta tcaaaggagc	6120
taagaaaaaa gataaagatg agttaatcgc ttaatacaa gaagctcaag gtgaagaaga	6180
agacgaagag gaagaagaag aggatgaaac tctgactac tctgaaatga ctaagaaaga	6240
cttaattgct ctgctaaag aaagaggaat aaaagttaat aagaaaatga aaccagctga	6300
gataattgaa ttattagaag ctgatgatga agaataattc tcatcaaatt ataaggggag	6360
caaacttgct cctcaaattt ttacttatt ttgaaacag atgttagagg gggatgtata	6420
aatggcaaga ggtggaaatt caacttatac taaagcagta tattgttaca acaataatag	6480
ggagtataga tccttcagat atgcagctaa acaattagga gtatcggctg ttagtataat	6540
gagagtagtt aacgggacta aaccacatat aggggggatta gtattcgctg agatagagga	6600
aggcactaga aaattaaagc caagaggaga agtagttcca tacttgaaag aattaggttg	6660
ggataatata gacttataat aggggggtata atatatggac ataaagtct tgaaggatat	6720
atttctaaa caatgtgaaa atggagatta cattatccta gcagctagaa aaggtaaaga	6780
atggaaagat ttaccaatta aatataataa gaataacatt gacaaaaaac taaaggactt	6840
tgaacaacag tataagggtt atgatttata ttggagccca atgccttata gtaatcctca	6900

aagaaggata gttaacttca tagagactaa atacttaata caagatatag atgagcatac	6960
tgaccattg gggattaaac ctaaaccaag ttatctgtgg gaaagttctc ctggaaaata	7020
tcaggggcta tgggaaatgg ataggtatat agaggctaata caatatgacg aaataaatcc	7080
agcattagct aaacatatag gctgtgactc ctgcttgat gttactcatg tatatagaat	7140
accaggaact attaactaca aatacaagaa taaacaaaa gtaaaaagac ctatacacac	7200
taaggagata tataagccta aggtgatcgc taaggctgtt aaggctgtaa gtaaatctaa	7260
tgatagtgtt aaggtaata taggaggatc tgaggcctca caatctgaaa gaaagatata	7320
tgctaaatat aatataccaa agaaggtag agacttactg gctttagatg atattactc	7380
tttagataga agttctacta tatggtatat tgagaataag ttacatgaaa taggactaga	7440
gcctaagtag attatattat tagttaaggg ctcagctttt aataaatata agggaagaaa	7500
agatgaagaa acaagattaa gaaaagaatt ggataaaatc ataggaggag aaatagaggc	7560
tgatattgaa aaggctgaaa gtactaaact gagaatagat agttatcagg atgttatggg	7620
taataatgga gcctcccgg gttggtagt acaaggtttc tgggtagaa gatctcatgg	7680
aattgtggct ggacaaccaa aggtatttaa atccacattt acacaggact tagctatctc	7740
agtgctagt ggaagaccat tcctaggta atactctgtt ctagaaccag gccagtaat	7800
tgtagttcaa aatgagaatg ctgactggat tatgagggat agaactgaaa agataattag	7860
ccacagagga gtagttgga atgtggatat aaaaggtaag agaagactta aagttaggtt	7920
tgctccagat ctctctatca cttttattaa tcaacagga ttatgttag atgaagaatc	7980
ccatagaaaa cagatagaag aattaattga tgagataaaa cctgtactag taatattcga	8040
cccattatat cttatgttta gtggagatct taataatgca gctgatctta atcctgtact	8100
acaatgggtg cttaaactta agaatgagaa gcatacagga gttatgttaa tacaccacta	8160
taataaaggt ggaaatgcc acaaacaccag aggtgggtcaa aagatggctg gttcattcat	8220
attacatggt tgggtagaat cagcactata tttaaaaaga cctgatgact tagaagggtga	8280
cgatgaggag atcgaggtag atatagataa cctgataaa caaagccatt taccaagtaa	8340
aatcattatg gatagagagt tccgtctgc aggacaattc cctcaaattg aattaaattt	8400

atcaatggga gaattggag atccctatta tcatgtagaa gtagcaatac ccggaaaaga	8460
agtaattgtg aaacctgagg acaaagccaa agttatagag gctgtaaaat caggagctca	8520
taccaaggag gagatagtat caatatcagg attaaattca cagaaggta atctagttct	8580
agatacttta aaagatacta ttgtatatc tccggataaa ggttataata taagtaagaa	8640
actaaatatt gggaggaaaa aggcattgata ataaagtga agaggccagc aggtcataat	8700
catataaagg cctttgtagt agtaattatt gctaggggta agaagaataa aatcacttat	8760
cattcaggat tgaaatattt ctatacctat aaatcagcta aattatttat agacaaagtt	8820
atggaagaat gtccctgggc tgaattttat tgggtggatg tccatgaagc tcataagatc	8880
cctgaaggcg aagaaatacc caaaaagaag atgtggtgc catattgtca aactattcaa	8940
gaatttaaga gaagccaagg aggttacaag aattgcccta tctgtggtat aagtaccaa	9000
gactttatg taaaatgtat gaatataaag tataggagg ctaaggctaa tgcaagaag	9060
aaactgaag gaagtagtac taattctagg gatattctg tcaatgggga taatgctaac	9120
tcagggggca aaactaatag aaagtcatca ccaagaaaa agtcaagaaa agttagtaga	9180
aaagcttcat aatgctttag actataatgt tattgagact tctccatctg gactagatgg	9240
ggaggatctt accatcaaac taaatcttaa tagtctaag gaccttacc ctaacaactt	9300
atctaagta gctaagagg ttatggtaaa taacttagga gtcagaatt atactatact	9360
tgtttatgat agtaatagac cagaaaatct tctggctgtt atagatatac ctaaaaattc	9420
taaaataacc ttgacataa taaattaatt atggaatat aaaaatgtag aaggaggaga	9480
atttaatggt caataaaaag tattacatct tgaaagacct taatgatgac aaacccaac	9540
tatggaaggg aagttaacc actgctacta agatagcagg agcattagga gttagtgtga	9600
taaaactaaa taggtattta gtaagaaagg gatttgccag aaggtaaat gagcatacac	9660
ttgaaataat agaccaatc ctgctaaag aacttggtta ttatgtaact ccaagtaagt	9720
ccctataaa tcctttattt gaatataatg ataaaggagt acaatatata ctaacttaa	9780
tagtagaaga tctaaagaat ggaggagagc ttaatgatt atcattttag gaatggataa	9840
ctcaggtaag accacaacag ctaagaacct aactaaacac agaggaggag aatatatcca	9900

atcaatggga cctggttctt atgaagaaca aagagaatgg gtattaactc aaattgtgag	9960
aaaaggtgaa agggaagcta tacatgatag atttacttgc ttgaagaaa tgggtgatgg	10020
acctatcatc agagataata gtaatttcaa ccttgacagt aaggagctaa agatcttaaa	10080
acatctatgt aagccaacta ttgtatatgc tagaccacct agggaagtga tcttcaattt	10140
tgggtataga gaacagatgc caggagtaat tgaaagagct gaacatctac tagctagata	10200
tgatgaactg atatggaaat tattctgtga tggatggaat gtactgggtat atgattatac	10260
tacttccaat gtggagaagc tatccaatt aatagatgac tcaagtgcta aagaagctat	10320
aaaccaattt ataaatatat caagataaga ggagagattg ttatgaatat aaacctgca	10380
gtagaagaaa aaatagaagg agatagatta caagctatct ttaatagaca aaaggaattg	10440
atggagaaat atcatcatat agaggctaga tcaggattat gccaaactga agactgtcca	10500
gttaacttaa atgataaaaag gggcaagct agacttaaag attttgcttg gagaatgact	10560
gaagaagtag gagaagcatt agatgcttat aacctgaag accattacca agaagaattg	10620
attgatggat tacacttctt aactgaattt acaatcctag ctggaagga ttataatact	10680
atagatgata atgctatact agttgatagc ctagagaact tatatcataa ggctactaca	10740
tcaccagaat ttctgaaat gttagtagaa gaagctgtaa ctgacctggg aagagaaatg	10800
ggatgtgct gtaattgcct taagaataaa ccttggaac aaacttcaat gctaacagat	10860
gtaaatgctt ttaaccaaag actatttaat gtatgggtat gttatattaa attattagct	10920
gtatctggct tagaggtaga tgacatagta aatataacc ttaagaaatc acaggtaa	10980
aaattccgcc aaagatctaa ttactaaaat aaatacttag gagaaggtaa tatgctaata	11040
agagactata atgatttga tgacttattc ttaaacttta atagggaat gattaccaat	11100
ccagaagaaa ctatgatga tactcagaat atacagggct ttcaggagga cttagttctc	11160
tctgtaatg ccataaatg tactttaaat ctaggggact ttggatataa agaaggtaag	11220
tggggacacc tattaagatc atacattgat tatccacaat taattgaatt tagagaaaag	11280
cttaccaaga taagtgggtat gagctatact tattatttca acaggaaaaa agctactaat	11340
ggttcttgct tgatagctgc agtagtaact agacaaaaa gaaaaggacc ttggaacac	11400

ttaaaaatta tgtatagagt atgtgaatta caaaagaaat tcgcagctga cctagtatta	11460
ataaacaggt tcattgaaga actacctcaa gaagtatgtg agatagataa tattactttt	11520
catatgtctc aagcttattt gtcaggaatg ttataaatg gataactcaa ttattttaag	11580
gtaccaagaa agagtattgc taatagcaaa catccttggc ataaatcctt gaatagtaac	11640
tataacaggt totttaaate agaggaccag atacactctt acaaagctct ccagaagatg	11700
cagtattac atttgggtct ggagaaattt ccaaagatag atatcaataa attatctatt	11760
gacaagtact ttaataagta gtataattaa cttacaaaaa ttaaataaat ggaggaatta	11820
aactatgaga atttatatta atgtcaaga agcatttgaa gaagtaaaaa gagatttatg	11880
tgaaatgggg attgaggtaa gacccaaaac tatgcaagat aaagttatag aaggtaatcc	11940
agattatttc acaaaggagt tacaaaacta tagttacaca attctagaaa gtaaacctga	12000
agaagttcca ggtgtatctc aaccttgggc agatgctgaa tttagagaaa ggatctacga	12060
tccacaaggt gtcatcaatc aatactctct tgaagaaaga gaagaattat ttggtataca	12120
tccacatcat actagggggg ctttcataaa tcccggtaaa gcttatcaat taagacctga	12180
ggtatggaat gaatatctaa gagatggaaa atttgatatt ttctacaatg aaagaatttg	12240
gcaatacaga caaattgagg atatcatcaa tagaattaaa gaagatccag gctcaagaca	12300
attatgggta tctctgtgga atccagctat tgatccattc aatataggag gagtaactag	12360
agtaccatgt tcattaggat ataactcca agtaaggga ggtaaattaa atattcatta	12420
tggtatgaga agctctgact ttgctactca ctttgctaag gatgtttatc ttgctatgaa	12480
actattacat tgggtagctg aacaaactgg ctatgaacca ggaagtttct ctcatacaat	12540
tttctctct catgtttaca acaaagatat taagggggta ttctaataaa tgagttacat	12600
gagaaaagaa agatataagc attctgatct taataataaa gttacaaga aagaaaccct	12660
aaagcaattt attaggaata ctgaaaagga atttgattta gaaccagcta acctggggga	12720
tatgactaga aatgaactta ataactatat aaattatatg gatgaactgt ggagtaagta	12780
atatgtataa ttatagtgat gataacagac ctaagaataa taacaatggc tgtcttggtt	12840
gtttaattat aatcttagca gctataggat tatgggtaat aattttgat attgccaata	12900

taatatatca tatgatattc taatttaaag ggggctatcc taatgaaaaa tataatttgt	12960
cctatgtgta aaaactcagt aacattaaaa agaaaatag gagctatgtt ttggatcatg	13020
attttcttaa ctggaggcct atgggtagta accataccct tcaaaaaaca taaggctgt	13080
ccagtatgta attcaatcat aaaataaaga taagggcctt taggggtcct ttctatttag	13140
gaggaatat tttaaatgag atgtaacaac tgtaacctat ataccactc agctccctca	13200
tgtatagaag gaacttgtgt aggaaagaaa aagaagccaa gaataatggt cataaatagt	13260
ttagctaag atagggatga ggccaataga atagctactc ctgataaatc attacttgat	13320
aaaatggaag gtctagactt ttattatacc aatgctatta agttagaac tcctaagggt	13380
actaaatca aagtatcaga gattaagaaa tgccaagaac atttacttaa ggaaattgaa	13440
aagtataaac ctgagtatgt tatgatctta ggaatcgaag cactaaagat gctaagtaat	13500
gaaggataaa cctcaatatg ttgagtagct aaaaaacatg agaaatatgg ctttaagttt	13560
attgccagct attcaccagg ttagttgca tatgacccaa cttaaagcaca attgtagat	13620
caggccttta ataacttta agccatggta aaaggtaaag agcatgaatt accagagctt	13680
aacataaaac ttattaccag tatgaaagag ttaaccagg cttcaaata tttaagagag	13740
gaagggtata atagagtatc atatgatata gaaactagag gcttagatag gttaataat	13800
gacattactc tatttggttt tggaataact caagtacaat atatactgcc tttagaagtc	13860
aaatatagcc cattaagggg taagcccata gcacaaagaa gattagctaa atccttgatt	13920
aaaagactta attcggagat gaaggaaaga atagccaga atggtaagtt tgatgataat	13980
ttctaaagg agaaatatgg tattaagcca atcataacct ttgatacttt actagcctca	14040
cattgttttag atgagaatac tcctaattgg cttaaggaga atgctttatt acattgtaat	14100
gctaaagact gggatataaa taagaaatta aagaccggaa atgtggagac taaatcagac	14160
tttgaggatt atgttaggta tctggggat gatataact atacatttgc tctatataaa	14220
atatttaata aaagacttaa aagggatgag agcttatata aactattcca ccacttatac	14280
atcccagcta gtaaagctta tgaggatgtt cagtcaagg gtatatatgt aaatcaggag	14340
aaattcaaag aggttgaaaa atacttaaga tctgaactag ataagattga gactggactt	14400

aagaagtata ctaatggcca ggatattaac tggagctcac ctaaacaggt tggggaattt	14460
ttatatgata cccttggctc tcctgtgatt gaggttactg actctggagc accagctact	14520
ggagaaagtg tattattaag actaagagat aaacatccag cagtagaact actattacag	14580
cataggggag ttcatataca aatttctcac ttatagatg gttggctaaa taggatgcac	14640
aatcatagat tatatccaaa ctftaaactt catggaactg taacaggaag aacctcaagt	14700
aataatccta atctacagca agttcctaga gataagaaaa tcaggagttt attaggacca	14760
tctcctggaa gagtattcat tgaagccgat ctatcccagg ccgaacttag aatagctgct	14820
atgatggccg atgaggataa tatgaaattt atttaccaga ctggtggaga tatacatgac	14880
tccacatata atattatatac tggggaagat atcaatgatg agaaagatcc agcagttaag	14940
aaggagaaaa ggaaaaaggc taaggctgta aactttggtt tcttatatgg tatgcaatgg	15000
aaaaaattca aggattatgg aagagacaac tatggtctta aattaacaga tgaggaagcc	15060
aaaacatata gaaggaactt ctftaataaa tctcctaaac tattaacatg gcatgataaa	15120
caaagaaaga ttgttaaagc caatggtgaa gtaagatctc caataggaag aattagaaga	15180
ttaccagata tatattcatc tgatagatct aaagctgctg aagccgaaag acaatgtatt	15240
aactcaccag ttcaagggtt tgggtcagat atcactttat taggcctatg tgagattaca	15300
ggctatgcta aatatgttaa tctgaatat gtattagata agtctaagtt tgatgtatta	15360
ggctcagtac atgactcaat attatttgaa gtagataaag actatgtgga agaattagct	15420
tggaaagtaa aatcaatagt tgaaaataat aaagtattaa agaaagtatt taaatttacc	15480
ccaacagtcc caataatcat ggatatatca gttggttatt ctgggggagg atgtgttgaa	15540
ctggatttta aagggtgattg gaaaagccag ataagaaaag tgttgacaga tgaataatta	15600
tctgataata taaatattgt aatgaaaagg aggtataagg atgttaaaaa taagtaattc	15660
cagaattaac aaattcttgt ctgtcctta tgcccattat gttaaatact atgaaggtct	15720
ggtacctaaa agaagtggag ctgccttaca aaggggctct gctatccacc aggctataga	15780
agactacat aatgggaaga gttggaaaaa atctgttgat aaattttcca aagagtttta	15840
caaaaatata tttaaagaag agatccttga atttgagat attccaaaaa tggtttattc	15900

tttatgtgat aactatttcc actattatga tgaaaaagaa gataatgtaa cctatgtgga	15960
aatgaacat cacttogaat taaaactatg taagggtgta actctagaag gctatattga	16020
tagtgtctta gatgtggatg gaaagatag ggctaaggaa actaaaacct ataaaaagat	16080
gcctgataga aatttctga tttcaatag acaatctgct atatatacct gggctcttct	16140
acatgaatac caaaaagtaa gtggtactat atgggatata atattagctc agcaaccagg	16200
tagaccagaa ttaactcaaa aaggggtatt atctcaaaag aggattaaat ccacaccttt	16260
agagttagaa agaggaataa gagaattagg attagatcct aaagattatg agtcttatat	16320
taattctgct agatgggaag acttctttgt aagacacca ataattattat caaagagtat	16380
acttaacagt gtaatggatg atactattga gatagctaaa ctattagag atgagggta	16440
caaaagaaag gaaaagaacc ttggaaaagg ttgctcttc tgtgaatata agtctttatg	16500
tcaagctgaa cttttaaatc ttgataaaga atttattatt aaggctgact acaaaaaag	16560
ggaggaaagt gacaatggca aaaaagcaaa aatcaaaatc aaatagtttt gaggacagat	16620
tagtggatct atatgatata gatgagccca caatattaac actttatgga agatctggtt	16680
caggtaaaac tactatctca ggaacactac ccaaaccaat attctttatt gatgtaaagg	16740
acaaaggtagc tctatcagct agaaacaagc ttagagttaa aagaggagat atacaagtat	16800
ttagtctaaa gagttttgat gacatatagc aggcttatga ttacctatca gaaaacactg	16860
ataaatttaa aacagtagtt atagaccatt taactgcttt acaagaatta ggtaatgaaa	16920
aggtaaagc tgaagaagggt aaggaccaga tgagccaaag aatgtttgga aatgtggcta	16980
attatatgaa agaggttata aacctttata aagaattaaa tgaggaagggt atactaccat	17040
gctttatagt acaagatagg ttagaatctg gtgatggta aggagaagac caattaatgc	17100
ctgaggtagg accaggatta atgccatctg tatctaaata tttatgtgct gtatcaagag	17160
taataggta tacttattta tatgaacact cagaaaaaga gggatgaag gttaggaaag	17220
aatccagta tagactaaga ctaggacct acccttatta tattactaaa ttactagac	17280
ctcaaggatc tgaatgtcca gcttatctgg tacatgattt aaaatcacca acaactatct	17340
gggaggatat tgaaactatt ctggctggtg aatggaataa taagccagct aaatctggt	17400

aaaaaaccag taagaaatct ggtaaaaaga aaaaataaaa attttctaaa aataccttg	17460
acaaccaatt aaaaatctga taatataaac ttgtaaacaa agaggtacaa tatcttgaca	17520
aatatttatt tcataatgat attttaaaat ttaaggagga caataacatg gctaaaaaga	17580
ctactaagag aggttaacaaa aacaaaggag gattaaagat tgatctttca aacgttgaaa	17640
cttcagttac tatcccagaa ggaaattaca ttgtggaagt agaagatgta gaggttaagg	17700
tttctgaaaa tagtggaaagc aattatttat catttacttt tgtaatagca gaaggaaaga	17760
tgaaaggaca aaagttatc cacatttgct cactcaacc acaagcttta ttaacttaa	17820
aaggtgtgtt agttgcttta ggatttgata tccctgatga ggagttcgaa ttagatacag	17880
aagctctagt tggtttaca tggtgggtag aagtatcaca tgaaatatat gaaggtaaga	17940
agaaatcaag aataactgat ttataaacc ttgacgaagc tgactctgat gatgacgaag	18000
atgaggatga tgactcagat gacgaagaag atgatgaaga cgatgagtct gaagttgatc	18060
ttgaagaatt agacaaggat gagctaaaag aattagctaa ggctttaaaa atcccagcta	18120
agaaaatcaa gaaggctaaa actgaagaag atctaattga tctaattgaa gaagaagctg	18180
acgaagaaga aatagctgaa caatataatg acctattcgg agactctgat gaagatgacg	18240
aagaagatga ggatgaagaa gaggaagatg aagaagaaaa tgactatgag tcaatgactt	18300
taaaagaact taaagctgaa gctaaggaca gaggcttaaa ggtaaaaaa ggaatgtcta	18360
aggatgacat catagaaatg ctagaagaag atgatgaaga ataaaattta attattaana	18420
tatgagggcc ttaaggctc tcctttattt acccttgag gctactatta tgcttgaaag	18480
agatgtggtt aaatccataa tgaatatgct taaaaaagaa taccaggtt ttggtttta	18540
aactcatggg ggaccatttc aaatagctgg ctactctgat atactagggt gccacaaagg	18600
taagtttatt ggtattgaag ttaaacttcc tggaaaagaa aagaacctaa ctcaaaaaca	18660
aaaagacatt ataaataaaa taaatctagc aggaggaata gcttttatgg ctacctcagc	18720
tgaatataca aggaggagat tacatgaaaa atttagaaag acaccaacaa ttctaggag	18780
aactaggaga tctgtatgaa ttaaagaata atctatatgg ggataatttc cacaagacct	18840
atcttgaata tggaaccct gtcctatgta taagacttga agataagcta ggaagagcta	18900

aaagtttatt actaggagat caagatgact tcccttcata tgctgctcaa aaagaatctg	18960
tggttgatac ttactagac ttagctaact atgctattat ggctgctatg gaattaacta	19020
gtgatgataa ctacagaaata catgatctta gtaaagaaga atatgatgaa gaagacatag	19080
atgataatga cgatgaggac ttagatgatg atgatgacaa tgtttacgac gaagaagaat	19140
tagatttga tagtatgaat aaagaatcct taaagcaata tctaaaagat aatggggtta	19200
aattccatag taaggcctca agagatgaac ttgtaaaact ggctaaggag gtataaggag	19260
gaggctttaa tgctcttct ttttagtat gaagagaaaa ttatttaaac atcagaaaga	19320
agcattacaa ctatttttaa gtaaagaaaa gtttgccta ttatggaca tgggtacggg	19380
taagaccta gttcctattg tggccctga gaaactgaa ggtttagata ctgtactaat	19440
attctcacct aaatctattg tatttaactg ggagtctgag atccataaat ttactaaact	19500
taaggaatat aaaatattta aattacaagg tagtaaaacc aaggttatgg aaacctatag	19560
ggctataaaa tcatactcag gattaaagat tattattgcc aattttgaga aggctaggtt	19620
gatggataaa tacctatga acttaaagcc acagtttatt gttgtgatg aatcccataa	19680
ggtaaagaat agaaatgccc agatatctaa ggctctatat aaaattgcta ctaaattgaa	19740
atatagattg ataatgacag ggactcctac tcctaattgt tatgaagatt tatttatgca	19800
gtataaaatt atgaactcaa atattctagg agttaactgg aaacagtttg aggatgactt	19860
tataatcaag ggaggttata tgaactatga aattgtgggg tataagaatg aggaaatatt	19920
aaagaacctt atgcaccaga attgctatat agtaagaata gaagattgta ttgattacc	19980
agaacaactt cctgatctgt atttaacctg tgaactaaat agtaaagcta gaaaggccta	20040
caatgacctt agaaaggaaa tgatagcaca actagatata gtacaggaaa acattcctag	20100
gaagcaatta aaggccttat taaggctcaa tggatatact tatgagggtat atgagccata	20160
tgaggattta ttcttaagag ctaatatgtt tatcaatcaa ttaacagctg atcttaccat	20220
taccaatat ttaaggctac agcagatctc aggaggattt attacaaaca atgtaggaaa	20280
tagtattaat attgataaag gcaaattagg ctattacag gactatctag aaggatataa	20340
aaagcctgtt gttgtaatat gtaattttct tgaggaaata aaacttatac atgatacttt	20400

taaaaagacc cacagagtag aatgcttaac aggatctact aagaatagag ctgagatcaa	20460
taaggatttt caggagggtta agattgatat attaatacta caaataagtt caggtagtgt	20520
tggcttaaac ctcttcaggg cctcaagggt aatattctat agttggaact ataaatatga	20580
tgattatgtg caagctattg ccagaattaa aagaaatggt caaaaggagc cttggcaaata	20640
aatacactta ataactgaga atactattga tgagaaaata ttaaaatcaa tacagcttaa	20700
aagagataga gcagaaaaac tgttgactac tgataagtaa tgttgtaata tagaattgag	20760
gtgataaata atgagaaaag aacaacctag aataagtaat catactgaaa tagctaaagc	20820
tttgattgaa gctgggaaaa ctattaaggc cctaaccaag attaaagtca aggaggaaaa	20880
gaaaaaacia aaaggccttg aaaggctaag acttctaaat gaggaaaaga agaaggagag	20940
agaattaatg aaagaattta atcctaata gctaagaag tcaagaaaga aaaaggacaa	21000
acctataaag agggttgac tgaataaagt tgaggctaag ggaacttacc ctacacctc	21060
tggaggtaat gcacctactg gaacagttga cttaaaaact ttatgtgagt cattaggatt	21120
agatccaagt aaagccaggg ccaagctaag aaagcaaggt gtaaacaaac catataaatg	21180
gtcaggatct gaacttgagg atattaagaa aatgttaaaa taaggggagg tttaaaaacc	21240
tcttctttt cgttgacaat atccacagta tatgtaata taaatattgt aatcaaacia	21300
aaaggagaga actgaatatg aaagatcttg aaaaacttac aagggaagaa ttgattgagc	21360
ttgtaaagga gttatctatt gattggacag gagcctataa tagaaactat aagattgacc	21420
ttgaggagta tgagattgta tatattgat ttaatgatct gaaagagttc aatgataagt	21480
taggtcatct agaaggagat gtgtatatac aatacactgt aaatcttacc aaggccatt	21540
tacatcctga gaaggatata ttgattaggt ggggtggtga tgagtttga gttatcagt	21600
atatagctta taatctatgc aataccttga atatataccc tgagttatca tgtggctatg	21660
gtaaaggtaa acctattgaa gaagctatag tacaggccga ctcaatgatg tataagaata	21720
aaaaatctaa gaagttaaga tactcaaagg aggattaatt actatgaggt tattatggtt	21780
aaaagaatat ttgatatat gcaatatctt gggatttgag ccacaaatgg aagcttgtgc	21840
taggtgggga aagaataaaa aactatcagg gtttctatta acccccgtag gagcaactaa	21900

atagttgctt ctttttaaag cgatccgata cctagcaact ttcatgccaa aaagaaattc	21960
ggggttttct ttgacataga ctccagactc tggataata atcttgtaaa caaaattaat	22020
tcaaaggagt tgtaattat gaataacaaa aaatttcaag aaactttaga acaattagag	22080
gaggaactag aaatacaagg ggtagaattt aatgatgaga atgacttaat agctgctgtt	22140
gaatacatca tagaatatga ttaccaccca gaacaatatg tggaagatac ttatgtaac	22200
taccctgaaa tgttcaagga tctataaaac taaggagggtg taaaaacctc ctttttattt	22260
ttcgaaaaaa tctggatttt tccattgaca tattctggag tatctagtat aataaaaatg	22320
taatcaatat taattaaata aaggagatgt taaacatggg ttataacatg aatgaaagta	22380
ttgctaaaaa tgtaattgaa ggaacactaa aaagaaaagg attaagatta aaaactgaat	22440
acttagaaat ggtggttaat caaattaagg atcttaaagg aactgctaaa agggataagg	22500
tacttgaact attaaagcaa aatcctgaaa tagcaaaacc tttaataaaa cctgtaccag	22560
gtggttatat aatggactaa gaattagggtg ggatctccca cctttttta tttttctaaa	22620
aatctggatt taatcgttga catagtctgg gccctctggt ataataatat tgtaatcaaa	22680
attaattaat tcttaggagg aatgaagaat gactaaatta gaaatgttaa atgagataga	22740
aaaaataaat aagggtggtt ttgaaaagaa ctccaaaaa caattcttag ataagaagat	22800
agaactatta caacaaatgg gagtaactaa atattatata tgtaaacatc ataaaaaagc	22860
tgagattgaa aaatatcttg aggcttgcat ctgtgcaata tatgatatag gaagaagaga	22920
tgatctagga tggtaaacc cctcctttt ttcttgaag ttttctgtg acagatccag	22980
agttctctct tataattaaa tcataaatta actattggag gtaaacaaaa tgagagatat	23040
gatagaaaat caattagctg aatatgaagt aaaggaatta tacaatgagg ccacaatgat	23100
cttaggaaaa gcatttgggtg taagtgtgtg tgatctttat atagaatctg atgtggatgc	23160
caattattat ggtctatgcc atagatcagg taataaattt actgggatta caattaacct	23220
tttccctttc aggtttgcac aggaaggaga aaaagcttat gacaaaatca aaaaatttgg	23280
ttgggatac aaggactgtg ttcttgaaac tatatgccaat gaattagctc acttaactta	23340
ttggtcacat agtcctttac ataaaaaatt aactagcctt tattacaaca aagtgaaca	23400

ggctagaaaa ggtgaaaact cagctgtagc acaaactaga agtgatatat acactttaa	23460
agatttatgt gaattgatag aactagatcc aagaaaggca agaagcatat taagaaagaa	23520
taacattgag aaaccaggta aacaatggga gtgggagcaa ggtatgccta aagatatata	23580
tgatctatta atcaacttaa aggttagggg gagaaggtaa aacttcttct ctttttcgt	23640
tgacatatct cgagagtgt ggtataatta tattaacaaa taacttagga ggtaaatac	23700
atgatagata tatattatag tattcaagta gaagctgaaa acttcttgg ttgcaaaaa	23760
gaagatggaa gctgggtagc aacaggagca ttagtatat ctgttaatag cataacttt	23820
gaagaggctg ataaattatc caatgaggcc atagatggat ggttaaagga gtatgaggt	23880
actaaggtaa taagtaggag atcacatata caagttaaat tggattgga taatagttat	23940
atcaaggatg atccattaaa gggatgata attaatagg tgtaccctga tcttcagat	24000
aaagctaaaa tcaaatatgg ctttggaag atatgggcta gcactatgtc aaagggtgt	24060
aagaaagggt tacttaaaac ttgccctaga tgtgggggca ctggccatta ctcaagaacc	24120
tcagatggta acactacttg ctttaaatgt aacggcttta aatatgtgat accaactaag	24180
atctcaaaga aattttataa atctgtggag aaaaccttg acatctctgg caataactct	24240
tataataaac ttgtaaaca aaacaaagag gagatgttaa atatgaactt aactgcaatg	24300
gaaataaaga tattaaatgc tatgagaaag aatgaattg atgatggact agatgtgac	24360
tgtgtatggg tattctcagt aatagaaaac tcaggtatag aaggaactaa ggctagaggt	24420
gtgatctcat cactgttaa aaaagggtta gtattgtctg atggagaggt aataggttac	24480
acagaagaag gaagaaagg ctttgataat gctgatggag aagaatgtaa ctggggaggt	24540
ccaaaattat taaaagaaat ccctgacaaa ccagaggaaa tctctataa tgaaaatga	24600
gataaaaca ataagaaaga agagataaat gatatgaaag atttaaatac tatgaaagct	24660
gttgaaatta aagaattagc aaaggaatta aaagttaaaa actggtggac tatgaaaaag	24720
gctgacctaa tagctgctat ccaacaaatc caacaaccac aagaagaaaa ggttgaagag	24780
gtacaacaac cagctgaacc tgaagaaaag gctgaacaaa ctaaaattac tcttgatcta	24840
acagatgtta aggaaccaga gaaaaaggat gaaccaaag ctgaaccaa aactaaggaa	24900

ggtaagtca ccttaaagat gatacttgaa gaattaaata tgaatggtaa aaaggcaaga 24960
 agaatcttaa gaaacaaaga agttgtaaaa ccaggaaagc aatgggaatg ggataatgaa 25020
 gaagaattta aaaagggttaa ggacctactt tctaaataaa gtaggcccaa cctctatccc 25080
 ctattgattt acaggaggat ctgattttct ctacccatt aactgcttc atacttgatt 25140
 accaaaggaa gctacagctg cacatattaa acctgtata aagccattca aaaaggctct 25200
 agctgtaaaa cctagttcca attgaattgc catatataag attgacaatg atatactgaa 25260
 taccaaaagt attaatgga tagaccaatc cggtatataa ggcttagcct tgataaacag 25320
 acctaaacag taacatgata ctatgattat taaaagctgt ggatcaatgt aattgaatat 25380
 taaatttact aaattttctt ccatgataaa taccocctaa attatctcta catattttga 25440
 acttacataa ccttgcttct taccatggct agtattatat tctatatgat accaaccatt 25500
 ctacttcct aatatagtaa ctctctcatt attaaatact gagcctatta tattaccatt 25560
 cacatcatct ctcacattaa gggaagtgtt aaccttaact attccttgtt taatctctc 25620
 atagaacttc tggctttgtt caccctcgta acgaacgtat ccatcagatg gaggaccatc 25680
 cttctataa aatgttattc ttaaccagcc attagttcta tacattggac tagccttttg 25740
 accgggtgtt aaagtctcat cacagtcagt tacattcaca ttctttggat cccaccacac 25800
 ataagttact ccattgtcat ttgatactt catgtggtag tcaaaactta atctgctgta 25860
 atgtttatg tcaatataag catggtactt ctattcttt ccaggatata caactctat 25920
 gaaatttcta gaaggatata ttccaaggac aaataaatta tctaggctat caataaatct 25980
 accagggact ggcttacaat cctcatctag aacttctatt gaaccttccc ccactaaagt 26040
 agcattagtt ctgtctcat tagactcata gaatccttta ggattattat ctgctggaat 26100
 gcttgagta ctacctcac tgatctcctt attacaaata ccccagcta ttaattcacc 26160
 aataagttta gggccttag ccttatagat acttacatca gtggttgctt cacagaagca 26220
 tactccact atgacagctg gcatagtagt ctttcttagc tcatataatt tagcattaca 26280
 ttaactcct ctattcttta atcctgtacc ttggcaaca gcattaacta ttctgtggc 26340
 atatacttct gcttctctc cagtgcata tatccaagtt cctgtaccta aagcaccttc 26400

atacatatcg taagccttgt caaaatgaat actaataaat aagtcagctc cccaggcctc	26460
agccttatta accccatatg ctaagtcagt gttaacatca caatttccag gagtgacatc	26520
tagaacacta tggccttcat ttcttaaagc cagtatcaca gagtctttta cttttctatc	26580
ctcagtagtt tcatcaatta aaccataagc acccttagct tgaaagttat gtccacctct	26640
tactgctatc ttcataataa acatctcctt taaatattat agtgttttat tgggcctgag	26700
aggctcgcta cagcatttta accacctcct taatatattt tcttatataa aacctaacag	26760
gccttaaag acctgctagg cttataagtt aacctttggt actaaatagg tgatctttta	26820
tagtatctac atcctctttg atatcctcaa ctacattgaa ttatcaact agcttatcta	26880
tcacttgatt taatttattc tctctttctc tagcctcttt tctagtgta tataatagcc	26940
atacaaatag actacaaaag ataccttggc taagaacttg agttagtagt tcttttcca	27000
tagattacac cctttcatta aagtcttcac cacatattct ttatagtc cctgggtgta	27060
ttctccttc tggattagaa gagcatttta ctgcctgatg taatttgcc ttacctattg	27120
ctccaattct ataagccatt tcccagaaat tcataatctc tacctcctta ttattcatc	27180
aatttaattt ttatcagc tagttctgt gttaaactt tcattatggc cttagttgc	27240
attagctcta atttggatc agcaagagcc tgagcttgat agccaactac ttattaata	27300
tctagaggat taggatctat agcctcatat gaagtaaata ggtccttctc ttgatactg	27360
tatagatctg atctcttttt actaatatca aatttagttg ggccactctt tatgtgtgca	27420
aatagactta cagtcatttg tataacagga agattgtcta gatcaataac ctacgtgta	27480
tccacaaagg ctaaagccc ttgtgaatta tgaggatat ggagacatat aatatcttct	27540
atattattta atatttcaat atcttccta tagtatagag gttcaggcct attaattagg	27600
tctaataatcc tagtaacttc ttcatggtct ttatctataa atgattttac atcctctgag	27660
tctctgcct gatttatcag cctttctttt tcatcatcat agaataaag gtctataacc	27720
ttattagttt ccacagaata attaaatcct actattctca tgttttatca actcccttac	27780
tcagtagcta aatagggttag tattatttga gttggcttac cagctacat ttgataacat	27840
ccaccattta aatatgagtt agtccaatgg tcaatagtac aataaccaga ggtattatta	27900

gaagcgtcat tatagttatg tgatactaga gatataggta ataccaatt ccaatcctta	27960
ggaaaatgta tagtataact tacacctccc cctgagttag cataacctgt cttactatt	28020
tgacggacta atcttagtcc tctcccaga ctaactactc tggattatc ccctacatcc	28080
caatagtctc ctttagccac aggactatct ttacataga ggtttccac atttcagta	28140
tataatcctt ttcatcttg ttatagtag aatctgcat cttcagatcc accataccag	28200
tcattattc tcatatattt tctggccat aagtttcag ctgagaaatc ttgccagcat	28260
tttagagctc cactaataga ctctaacta gtattaaagt cttatttgt cccagggtca	28320
tggaagtcaa tcattctacc tacttcata acaccgtcat gaggtatgaa agaatgcca	28380
ataaagttag tattgccttc agctaactcc caattctaa atttattact attagcagct	28440
gtaccatttt tacctaggta agcactatca tgggtgtggt tcgaatctgc agctctatc	28500
tcagagggtc taggtttgtt gatactacca tataatttat tccactcagt ccaatatccc	28560
tgattattgt agaacctagc atatactaag ccagcactat taataaataa ttggttatat	28620
tctccaccct ccttactcat tgatagaaga gtccatata tactccagt gtgaggggcg	28680
ttgggtatat catttcccc tactataaag gttcctggag atttaatatc attaaaatct	28740
aaaaccttc ccttaact ttgtagatat ctatcatcat gggtatggtt agttggggat	28800
gccccacat ctgctgctgt tggttatta tctcatgat agatcttctt attgttcta	28860
ttaacaatat ctaaagagtc tatctttaca ggccttcag cataccctat atggactttg	28920
ttatctgcat ctatatacat cacatagtca tcactaccct ctttagtctt acagctaaat	28980
ccataattgt gggccccgat aaatttctga cctggtctca taattaagtg gcctgataat	29040
tctccaccag tagtaggtaa ggcaccaatg tcttggggag taggtttgtt ttgtttacta	29100
tatatttcag cccaagtcgt ccatccagta ccctccatgt ttgtagctgt tctagtaaaa	29160
actcttcac catctgcaa gaacattga gaagcccagt gtcctgtatt ccaggataag	29220
acaatcaatc tccatctgc taggattggg gcattttat cgacagaatt tctaactgta	29280
gaataaatac cccctccgt aatggtgttt agatctacac cctctagtct ttggctgtt	29340
ttatcccagg caccaatgct ttggggagta ggttagccc cagagttata atcctttctc	29400

caagggaacc aatccgtatt atttacttta tatctccaat acttattacc attggtatca	29460
taatactctt gccatatcca gttattagta ttattatgct tagtctctgt actaacatat	29520
actatcagta taccatattt tgtaccogtt agtggggcat taggtaactc acctgagatc	29580
agatattgcc cctcagttaa agctgtatta aaatcagtta tggcgtcctt aggaatggga	29640
taagccccta ttcttgagg ttagggcta ttagcctcat cataaacctt ataccactta	29700
ctccaagaat tatttctga tgtgtagttt ctaacatata tagttattt attggttga	29760
tataggttaa taaactctg ttggaatccc ctctacccg tatttctaac tataaaaacc	29820
ctattactca tatgggctaa ggttcctcg ggggtattt taaagtcacc tgttctgta	29880
tcaaagtaga agaaggcatt cgctgttta aaggaattac aatctctatc taaggagca	29940
ctaaccttaa taagtcttg atcttgatta gccttcggt ctattgatt ttgtaaacta	30000
gtgtcttct caaatagtag gtctaactt ttagcacat cctcaggggc tagattatag	30060
tcaggtagta cattacctt agctagtaat aggttagta ccttaatga tgtgctgaa	30120
gttgacact gtaccacaaa ctgtatttg gtatcagtag ctccggaagg aatactaaac	30180
ttatgagttt ttgatttga cccattactc tgtggtgtac taccttgctt tataatactc	30240
ttatattgt gacctccact agtgaagcc agtttaatt catagctagt aaaactacct	30300
tcaatatctt ctaagaaggc taatacataa tcactatttg gttctatagg cagagtttta	30360
atctcaagag ttgtggacc tgttgacata ccagaccatt taaaacctcg tctcttggt	30420
ggagcatctg ttatgggtgt gatattacca ggaccagtat aagactcaga gttgtaccac	30480
tcaagcctat taatagtacc aacctcaaa gcattccagtc taccctcatt agatttagac	30540
ttcttttcta cctcagtcatt ttctgttta tgttcggtag caaagtctc aatgtttca	30600
ttatccttat taaaatcagc catTTTTGGC ttatctgtta actccactt atttaaact	30660
aaagtaggag ttaccagct acttgacatt ttgcatact cctttattca gttatagcat	30720
attcttccca ttttccag gtaaggctta gactgtccca ctgctccac atataatcat	30780
atctatogaa catctcccaa gtaataataa gtaataat ttgatattt aaatgagcag	30840
gcattcttc cctgaatact ctcttagag ccttaggtt aggtgtacc cccggtaggt	30900

cagtaaagct aatttgatc ttactctct cagctatgaa ctctacctt acccttccac	30960
ctgtgtaggc ctagtaaga ttttgatag atgtactatt aaacttttc caagcagata	31020
gaactactgt aataatagct ctttctctt ggtcagaggg tgggtaatca aagtattat	31080
ataactcaag atcagtgaag aatctttcta gaccttctt aggagtggc ttgggatcca	31140
catagtcttg taattcctgt cccttagtat atagttctg aagttcagta gccataatag	31200
tgttactaa gttatcagcc tctttatat tatcataaaa ttcaggaaca tacaatagta	31260
attcttttg aacctgttct agactataca taagttacca ccacctcagt aatgggtggt	31320
atttgattag caggaatagt taaagattga ctacttccat taagtgaat ggtgtataa	31380
tcttctact cctcaatatt taaaagcata gcccctattc ttttataga taggctagta	31440
attttaata ctgactgct tagaaactct tctagttct tctgaagtt taattttat	31500
tgttctctg taactgaact caattctta acctgagctc ttacagtgat attaaagggt	31560
tgggctgact caacagtaaa aacacatcct ataggagctt taccctcacc taaaccttc	31620
ttgcctggat ccattgtatc ttgaacttta ttaactagtt caggattggc aggcttattc	31680
tcaactgtgg ttataatacc ctagcagta tttatccat tccaacaggg aagaaccaca	31740
gctttacct ctcagctac acttttacac caatctgta actgttgac atttccatct	31800
ccagatgggt gtatagtggc ttagtagct ctctcttta actcatcatc tgtctctga	31860
tctctaccaa taacaaggat atctccata gtagcactct taagtctgc tatagcattg	31920
atgggaatta gatgtgacc tgtgatact ttattaggct ctgaacctaa agtctcacat	31980
tcaataatat tgggctctat cacttgccag aaataatctc ctcttgga tctgaacca	32040
acatcgggt catagccaac aaacttagct gaccttctac acttagttgg aattattctg	32100
gatatcccta cattggcagc tctctcatct aagaacttac ctgtagcagt acttagaaat	32160
actgagtcta atattgatt aacattaaca gcataaaact cagctagctt aacagcaaaa	32220
accatagcca tatcataggt gaaacttcca gttctagtgt caatatcatc ggggatagg	32280
cctatcatct ctctaaataa ttcttatgt gttcgggaga ataaatcttc agaaaatccc	32340
attatcac ccctccagt ttgtatctc catatatggt atttatccat acttcaatat	32400

atacattctt gccttgacaca ttatacttta gatcagttac ttagtcact ctatcgtctt 32460
 ctaagagaca ttcaggata gccctattaa tctccattc aagaagtca ggagttacta 32520
 gagagtcatt aatcaaagct ctaatatcac aaccataaga agtatcttga taaatcatat 32580
 aggcattttt aggagtatt aatctttat ataaagattg ttttaaggcc tcaagacat 32640
 ccacattatc ataaattcta ttaagattta gatctagttt ataggtcttg gtatttcca 32700
 ttgtttctc atcaactata aggtatctt taaagccatt aggtagcatt atatcaacct 32760
 cctaagatcc ctaacataaa atatcttgt ccatcatcat agggcataag atatacagta 32820
 tcgccctcac taatagactc aatatgtttt ggaacatcta taatattcc agatagtact 32880
 aattttctat tggaagaca ctacatttt aaagggttag tactaagtac ctagctcta 32940
 taaatattta gagggtgga catattacta tatacttgtt ttacacagtc taataaatta 33000
 ttagccatta aatatcacc tcctcagtc atttaagttt taaattcatg gtatagtcag 33060
 tatcaaattt atgggtatca gactcaatat agaaagcctt attaatTTTT aaatggggta 33120
 tactaaccac aatggcttgg ccactaatac agtcaggtag acctataaca gttatagaga 33180
 tatcagtttt aggtctotta cctgtttcta gcttattct agccttctca ttttaattggg 33240
 ctgggttag ttcatcactg atagtatcgt ataattgaaa tacaccatat ttctttggc 33300
 tgctatcatc ttagcagag gcaaataaag taatctcggg atcatcttta ccctaccct 33360
 gtttatattt acatactagc ttacctggt tgacaatact atcaaagttt ctacttctg 33420
 aaaaagtcc aatattttta ccatattoga attccacaa ttcgtattg gttctcgg 33480
 ttataaaatc aaacttacct gtaatagaat tatagtaa ataaaactgt tctccagttt 33540
 gttcataaac ctctttatt accttctca taatatcata gggagtttgt ttctcacata 33600
 ctaaactaga gaaagtatat ccagttttag ctactactcc aggggtaacc ccaaaggctt 33660
 tacataatga ctcaaata gcttcgcccag ttgggtttc gaatacaaag ctatctttat 33720
 tattagcca ataaatcata gggtcataag cttaacctt aagtaaagc ttttctcat 33780
 tatctgagat attcataata ataccattaa agatattctt acctcatgg actagtacta 33840
 cctgatctcc atcataaatt ggatgtatat cttagcatt atattggaat gatagggtac 33900

gaggggcaga tgaagaagac cctgccaac tcttaccact ggaggtattt gtaatatcaa	33960
aggatttata tcttgtacc acaattaatt gcatattata acctcctat ataataacca	34020
gaactccaac cttctttata tcttgaacca ttatctaatt tatactttac ataatgcat	34080
ccattttgag actttaatac tgtaaagtgt tcattaggcc atatcttacc ctggtagga	34140
ttattgatac cagggtccagt tcttaccat agccatgagt aaacattagt agtagtagct	34200
gccaaggtt gactacctcc agaagaacta ccacctgtat taccactata ggctagtta	34260
ggttttggaa ttgtgaaact aactgattta acctcaggct tcttatactc agttagttt	34320
atttttactt gaagagtacc aatatctcca cctttctcag tatatgagat attatcaata	34380
gtaactaata aattaatata agtactagta atagtaaacc ttactggatc ttaccatt	34440
tcaataagtt tagcataact tactcggggg tctgcaatat cagtatactc acatccatcg	34500
tagtatgagc ttggtaaact aaaattaaaa gaaaaagatt ttagcttagg gtctcctatg	34560
aaagagagtt cccctaagcc ttcaatggaa actgtactat tatctctact atcagagata	34620
tttatatcag tgggatttac tggtaaccta aacctagtat ctccctgtat taaccagaat	34680
tgatatttac tatgcaaggt ccagttcacc tccctcgaac atttctgtat ttaacattc	34740
cacaataaat ctgtatactc tcattaattc actttctgag attgttccat ctcagcctg	34800
tactgtgaaa ttaaatgagt tgtaaatgtt cataacttta gatccatcat cacttctgc	34860
tccagattgt cttagtaaat cctgagtttt atctgcaggt aatacttgag agcctctagg	34920
catttttgag aatgtaggac ccataactaa ttcggggcca gcttcaccaa ccatggcagc	34980
tttatcagtg aagaaatcag taccttcagc aagcattggt atctgtggaa tattgatacc	35040
tttacctct atgattggaa cccagtctgg tatcttaata gtattaagag caccaattaa	35100
tccattgatt aaactgatta ttccatttat aggtccttta gcaagagcta gcataccatt	35160
gaatactcca ccaaataat tcttaactcc ctccaagct ttagaccagt tacctgtaaa	35220
tacccagct ataaatgcaa ttataccact tagagttgc attaaagctt gaagaatatt	35280
tgagatattt tctacggctc catttacagc cgcagcaatc attggccaaa cagcattaa	35340
tactgctcct aaagcataaa gtataggagt taacatatcc acaagtcctt ggaatatcat	35400

acaaaaactt tctatagcag attgtatatg gggaactaca ctctcagcaa agcttaagaa	35460
cattggtaat agtgtattat tccaccaatc agctaactct tgtaagattg gcattaagat	35520
gttacctatt acttccacaa ctgagaaat tgcaggagct atataagtag caaaggcctc	35580
agctaaagaa gtagcaattg gcatgaaaac attagttatc aattctccaa gagctgtaaa	35640
agtagcagag aacatagaac ctaatacttc taatatagga cctaacactt ccaatacagt	35700
ttgccatact tgagtaaact ctggaacata aagaactact aagtctatgg ctggaattag	35760
gttattcata aatatagaag ctaaagtcc aaacatatca agaagtactt gacctatagg	35820
agctaatact cccatgatag gctcagctaa accactaaag gcttcttgta tattattgtt	35880
agcctctgat aaataatctg gtagacctac taagatctct ccaaaattat tatatatgtc	35940
tttccaaga ctccatatct tctcattaat ttgatctgcc acatcatcag gtaagaactt	36000
atataatata tcattggta gatctataaa gggttgcata gcatcccaa actcccaacc	36060
attcatgatg taatatatag tctctctaa accttgaaa gcagaaacaa ccattgagaa	36120
tatgggtcct agctttcaa agccctcttg tataaatgtg ataccattta gaacagcatt	36180
agctataacc tcaacggcag gggctagggc atctcccaca tctaacataa ctacagcagc	36240
tttgattttt attctctcca tggttctatt aaagccctta tccattttt cataggcagc	36300
ttcagtggcc ccagcactat tottcatctc attagagca ttagtaaagg cctcagtacc	36360
ttcaccagtc aaggctagtg cagctgaacc agcttctaca gaaccaaaga ggtcattgat	36420
accagatta ctttctggg cgtgttttc taacatctga agggcctctt gtatattacc	36480
tccaccttta atgaagtctt tgaaccctt accagctatt tcccgaaga ccttatcagt	36540
cttggttccc gattagata gctcatctat agcagctctt atcttagtag tagctacaga	36600
tgttgaacc cctgagctg ttaatgcagc tatagaggca gatacttctt caaaagatac	36660
cccagcagct gaggctgaag gtagcacatt gaatagggat tgtgatagtt gctcaaagtt	36720
agtcttacca agtcttactg tagtaaacad aaggctcag gcccttgaa catccatatt	36780
cttagctcca tatgagttaa taacagtagt tagtcatca accgcagttt ctattgaggt	36840
gatacctct atagaagctt taccagctgt ttctaagaaa ctaaaaacgt tctcctctgg	36900

aactgatgag gatatggctt gataaagagc aggtactact ttatcaggca atatccctat 36960
atcagaactt aacttttta cctggccgga catcttatca aaggctctt gagtagagt 37020
gggtaataga gtcataacct catttaaacc ttgctcaaaa tcccaaagg cttaacact 37080
gtccttagta aaatcccaga cagccttagc tgagaatact ccagcagcta ctccaccaat 37140
tttgcaaga gtacccatga aggaattacc actatcagcc atctggtaa atgcaccaga 37200
gatcttatct tgggcagaga atatggcagt aaatgcagct tgacttgcca ttatatccct 37260
cctttatgat taagagcctt tctttaactt atccctagct ttttatctt ctctaaagc 37320
cagttcacat gaagctataa gaaaggctt cctattggga gatagttat caaattcca 37380
gggtagtata ttatgcttct ggaataacac atgagcccaa aatgcactag tgcggcctt 37440
tattagttt ttgctcttt gattagatca tcctattat cgcctaacc atttatgtcc 37500
ataacctcac tagttatcct agtgaaatct cctggaagc ttagtacatc cataagtaaa 37560
tctactggat ccacaaactt agtagactct aaccatttg gatcttaaa gtcagggaat 37620
actatggttt ctagtatcat ttccctagta gctctctt ggtctgttat tgagtagtt 37680
ataccttgt ttctagtaat tactgtattt ctctttgga tatcttccat ttgcttagta 37740
gtgattggct ttaatacca aggtataggt tggcccgcta attcatgacc ctgaggaaa 37800
ctaaatctag ctacccttc aactcaatt tcgggtgatt gttaccctt atcatttcc 37860
atgaaaaatt ccatactaaa tttagacata ataactacc tccacaatat tctaatctt 37920
ttataaatat ctactctg aagctgagaa tgatattct tctgaattt ctctccctc 37980
agcatctagt ccaattagtg gtaaatctcc ttctaattgt actcctagta attgtactct 38040
gtcctcacca taattctta catagtcaga atctggatca tcacatacag ctgtatatc 38100
catcttaggg aatataccag ttttaagta ttcttaata gcttctta tcattggagt 38160
agcttgaat tgagttag ttccagttat atcataacct ataaccttg aggttaatcc 38220
ttctgacct ataactctt tcttagtcac ctgaggagta aatagagctt ctagtttat 38280
taagctagtt acttgcttac ctgatacaaa agctctacct tcttagcag acattctatt 38340
aactcactc atgggctata cctcctaat tattctaac agttacaaag tatttctga 38400

aagttcttac aggttgtgta agtatagtag catacatagt ctttcttta ctagcttctt	38460
catccaccac tacatcagag tcagggtcca cattcttta tgctcctga gctttagtg	38520
tagttaataa acttattagt ctatcctgag ctagtttat accatcttg tggtaggga	38580
aaacattagg aactaagatc tgagatccta gatctataac agcatccaat acagccacaa	38640
ctttattatc tgtaaagctt tcatcccat cttctgtaa agtatgggtg gtatttat	38700
cttctcaac tactacctt actcttcag aattgagtc agttgagtt gagaatataa	38760
attgacctgt tttaatcca tcaactatt gagagtgtt tagtctgga ttagcatcta	38820
ctgctccagg atatgcttta taagtaaggt ctctagtata tccagctgca gctctagcac	38880
cagctacca tgcagtgct tgagaagctg ttaacttagt gcctccatcc agtacaacc	38940
cattttaac attgatgata tatgggtaac cacaagtagc aaagtcagaa gtaactgcca	39000
caatgttctt accaacctca tctctgaagt atttaagttt tgataataga gcagtgtgta	39060
attcactctc agtaaatggg aaggccatag tttaaagtt gtataactca cagttatcta	39120
agaagttaat aacatcagag ttattcatct gagtagaagt accggtacta aactcagtct	39180
tagcagtctc atctatagaa ccactccac ttactgtaa ccattgagac ttaactgtg	39240
atatttcagt tactcctgta gcctcaaaga ttttagatcc ttcaagatat aataatat	39300
ccttctctcc aagaggattg gtcttaatag ttagagataa ttattacc cttctccag	39360
ctttagtagc tgtaaatgtt agagacccta ctacagctt ggctttagtt ccacctgta	39420
agttatatac taaaacagtt gcagcttctt ttaaagcctc ttaactagt aatacagtag	39480
ggtgagttat atcataccca agttgatata atgcttctag gccacctca ttggttacct	39540
tgataacatc tccagcatta cccacttaa gttgtaatgg taagatcata actcctagat	39600
tattaagctt aggctcatta agtcaccac ttacaaatct agtatacata ccaggctta	39660
ctttatttg tctggaata aaagttcctc ctgcatcta tttacctc ttcttagcc	39720
agtctttat aatctgacta gttgtttta ttgtaactc ttcatcaggt ggaagggt	39780
gaactgcagc gttgaagaca aactcctcaa cctggaaaag ttgtgacaa tgggcttta	39840
attgaggtat ggaaaattt tgactttca ctatttacc cctttgtta tctcaaagtt	39900

ttcgaagtaa gttggatctt tataaagact aaccacaata tcatagtta tctctacctg	39960
agaatcttct tcagtttcac ctcaaatac ttccacattc ttattttga gatttttgtt	40020
ggtcttacta ccatccctat taagtatagg aattttcta ttctcaagt atatagcatt	40080
agctatattc tgagcaattt caagagagtc tttaggttca aataccttaa ctcttaaggt	40140
attctcagtt ctataactac aaagagtatc attctgagga ttaaatacct tcttgaaata	40200
taatgagga tacttgaact ttccaggtat tcgctcaaaa tagagggtag taattccagt	40260
tagatcagat atgaatttag caatactccc tatatctgct gtcattaata actaccccct	40320
aaaacttcgg ctaaccaatc ttctagtttt ctttggaag cctgttcaa tatttttca	40380
tatattttta ctgcattgtc ccaataaggt ttaccaggta ctttctttg tcttagtacc	40440
ataccagtct tagctcctgg ttgataaata aatttatctc ctgaccatat gccaggaacg	40500
aatctaaatg attgtccttg tggattagta tagtgaccat cgtttacca ctagcatat	40560
tttaggttag taccaacttc taagggttag cctccatcac tacttacca tataccattc	40620
ttaccccctt ttgaaagga gtaagtaat aatctagtgt ctactactg tagtctaatt	40680
atttcatctt gaaccacatc aaggaagtct atccctgcag ctcaaacca tactgctaatt	40740
tgcttttga aatcactatt agcggcatct cttagcttct ttataaacct ttctatttgt	40800
ttagcatcta ttctatgcc tccagaattt gaagccataa ctatctaaaa tccttagcct	40860
ctataccaac ctaattttt agaccttta tatccctagg agctttagct atatatgtga	40920
taccagtctc aaggtcaca atttatcat ttgtctaac atcagttcca atagcaaat	40980
ctactgagta ctctgggta atcttaaacc taggttcttt gtactcaagt ttcttagag	41040
ttcctgactt aaaatgacag ggtacctcag ttatgtctgg ctcatcagga taactaaagc	41100
taggggtatg ggctagccca tatccgggat cttcaggatc ttctaatagg tggatatat	41160
tacatctatg atttaagagc ttgttatatg aatttctaatt catattacag tacccttaatt	41220
ctcatagtag ttgttctgat agatggacta tcatcttcta agaaaggttt aatcagaggc	41280
ataatatcag gctctataac agccttatca gttcttcttg tatatgagta gtcacatag	41340
gtctcggatt gaatatcagc cttgctaattg accaaggatt gtagtcata atactcagca	41400

tacagtatat gggctaacct taattcttta ctattgggat tttctccac aatagtatca	41460
tagtctttac ttgaattttt aaaaattcct gagatcttgg cttagctct taatatatcc	41520
atctcaatat tttgggggtc tcttttcta atctcaggat tacttgagaa gtcaattatt	41580
tcatccggag taatattcat atgagccacc cctatctgtt tctttattc ttgtttgtaa	41640
atctctagc aggttcttct ttattgtcat ctgtagaagg tacttcttct tcagtaaaat	41700
cttctagagg ttcatcctca acaggttcat ctatgacaat cacatcatag ttctgtttta	41760
aataatttac tagactatct ttaacttctt ctacatggtc ttgggtaatc ctatgaccct	41820
taataaccag agtttgtaat ttacccttg ctaatttgac cttagccata atatctctcc	41880
tttctaataaaa aaaagagccc acatttaaag tgggccttca tgattaagct ttactttaa	41940
ctatcttagc agcagcttta ggatcttcaa acttaacatc catcttaaga gttaaaacta	42000
cataagtaga tcttttcta ggagctcttt ccaactctat tctgatatct cttagagatc	42060
ctataactat attcttaggg tgagttaaga ttatgtctga tacttgagta gaagagtcgt	42120
cataatcttg tagcatagct atacctttaa caggtagctcc ataagcagat ttaacagtag	42180
catttataaa tgagtcaccc ccattagcag ttaatctttc tctactaag tctacccaat	42240
cagtttctaa accatttgag cagtagaatc tccattcacc tgggtttctt aaataacttag	42300
ctggtacagc ttcttagct tgttttaata ggtctttact taaagcagct ttgttagcat	42360
ctactacatg agcagttaat tgttttctaa ccccatctaa ttgttgtaag aaagtatcgc	42420
tactatgtcc agtatcacca ttacaatta tttcttccat gtcaagagca actctctcag	42480
ctaataattg cattacagtg gcttctattg atttctctc tatatttgtt tctatagtat	42540
catcagttaa ctaaccaca gctataaact cttagacttg taaagtaact gttccagtag	42600
ttggagctga atatttagat tgtcctggat ctgttccttc agctgcagga ttaatactc	42660
tttgacaaa tctattgac tcaatctttt tagagtctcc ttcatgttg acagttctag	42720
cctcttttaa tattgttggc tcatcaatta tcattttaat aaaagcgtta gcttgttctg	42780
gatttaattt acctccacca ttaatacgg cagcgttaaa tacagcttta ttacttttg	42840
acataacttt cctcctaata tgttattatt ctgggttcc accaaataat ccattaaata	42900

ctgatttttg aacttctgt ccttcttctc cgtttttagc aatttgttta cttctacat 42960
 atggagccat ggctttagct actgcctcag ctatttttc ttctcagtt tttcttctt 43020
 gtttctggat taagccagcc tctaacatag cttttccac agccttagca actatatctt 43080
 cagtagtagc tggttgacct tcattcttat taacttcacc ctcaacaggt ttagttccat 43140
 ctaatgcctt ttgatagct tcgtctatca tttttgtac ttgagttca ttcattctt 43200
 cttccccctc cactgagtct aataattcat taatagcact ttgtgctgtt ttaactttt 43260
 ccacattttt tgaagatatt ttcttacctg ccttattgac tggtaactca aaagatttag 43320
 ctacttcttc tggagttcct aataatattc cctccatagt ttcagaaaaat tcttgaagag 43380
 cctcctttat cttatctaca tcactttcaa aagatctagt gtaatcccaa ctagaatag 43440
 gatatagaat atcttctaag gtactaactg cattccagaa attatttctt ttgcagtct 43500
 ctttatattt ttcagagtat gcacctttct gtatatgctt tggagttaac cctagggcct 43560
 ttccaatttt atcaagtata gattgaccta tagacttctc aatctcatca atatctacat 43620
 cttgtgtaga atatttacca gtaccacca tagaccatcc agtaatttcg cttttctcaa 43680
 tttgtctcca tagatcatca tcgataatct cagctttagc taaccaagtt ccagctttaa 43740
 ctactgtacc ttctatttg gtatcttctc cagttacca tgattttaca atcttgacac 43800
 cctcaagagt gttctcattg tgttgtaa at cactaccaag gccattttca ttaaaccact 43860
 cacaagcttt ttgatctct tctcagtc taaaattatc atggtagtca gcagtcattg 43920
 gctcatatac tacaccgata acaaaatgat tatctcttc agactcagac ttaagattg 43980
 gcttatcata tctaaatcta ttaggagctc caagttctt agccacaatc cattgccatt 44040
 tattagctgc ttatcaact aatgaaaggt aatcaatttt agcatctgag atctcaatag 44100
 ctttctaac tgattttact ggcatttact ctccctcctt tacaaattat attctgctat 44160
 cacttgatct ctgatagctt cttttcttc tttagataat cctagtatat cttatcaat 44220
 tacaggccca tgagtacaat gacaattcac agtctcagaa gctggttaagt tgatatccct 44280
 aggaaatcta gttcataaa ttctacagt gaagtactca ctttattaa tgacagtacc 44340
 atccagatcg acatgggtgt gccttgggtg aataccccct cccctgagt gtttcactg 44400

tattcctgtt actgcggggc attgattaaa agcctcatcc ttagcatatg agtgggctct	44460
taacatttca gtaatagcag tagctctagc tctagttcta ctaaagccat aagtctcaga	44520
taatttacca actacatctt ctacagactc tccatcttca agagccttat ccagaatatt	44580
ctgtagtttt tcatgggaag ttaatttcat catttcccca agtttagaag accactcatc	44640
tataaaggta gtagtatatg gagaaaagac ttgggttagg gataagtcct tatcaatacc	44700
ttgtaaataa gtatctccta aattttctat agcttcttga taacaactct taagagtttc	44760
tgctaaagaa gtatcgatat tatctgtacc tatttgagac tccacatatt ctataaattc	44820
ttcaatggtt tcaaagtctc catcttttat aagatgtttt aattcttctg taaggagatc	44880
agaaatagtg tcttctaatt cagagatctt ttctatttga taatcaatct cctcatagcc	44940
agcttctttc aattctttct taaggctatt atcttcattc ttaagatct tatcaatttt	45000
agcgatcaac tcatcagtac ccactattac ttacctcctt ttaattgata gtttaataac	45060
tgtttcttag cctctttaag tacagctatc acctcatcac tccattaga gtttgagcc	45120
tttcaatta tacttgtaa gttattactc atagaagagg caactgagta agtagggata	45180
ttgcccatt ctcatcaat aggagtatag tccttattga ttgatgaata atactcctca	45240
ttaatctgat taggagtcac agctctagag gctatagcaa acattccttt ctgataatca	45300
gagtttcaa tattaggact cttaaagtaa gcttcacat atttaaaacc atagccagat	45360
agaataacat tatttagtat ccatgttagg ttttctctt caggaacaaa tacttgctct	45420
tcagtttct ttgtagcctc tctggctgta gccacattat aatctggga gtaccctaca	45480
tatatatctg gtagtaagaa agaagattgt atcttttcc tagtattatc catgtagtct	45540
tggaataact catccttctg taatatttca gataggggct tgacctcaac agtaactggc	45600
ttagagtcac caatggcagt gtctttctct gcagcttcag ttctagtac taagaaacca	45660
tgctgggaat tttcaccttt tacactattc atgtactcag ttaactcatt ccaagattta	45720
tcattaagag taccaccttg aattagtaac attaattggag tatgtttacc attagtaaaa	45780
tatctccagt ttaataattc ggctttctt gaaccttgag cggctaacat aggaccttc	45840
catcttggtg taccatagac accataacct gttttaaata gaagtatact gttagctcga	45900

tctttaagag gtatctctcc ctttcataa tactttccag tattcatatc tagatctcta	45960
ggatctcccc attccttaaa gaagattgat tgattattta cagtctgctt aaatcttctg	46020
aacctttttc ttctagtga ctgtttacca tatcggggtta cagtgtactc tgtactctca	46080
tcatctagct taagaatttt aattgtctta ggggtctcaa tttctttat ctcttttacg	46140
agagctgagt ctttaggatc ttctacgatc tctaaaaaag aatacccaag tccttctctc	46200
caatcaacta tctcttcaaa gacattcttg gttggtttat caaaagacag ggtatcaatt	46260
aattcttcca gctgtttata ttacagcttc atttctggag taggttcac taccttctca	46320
atatacctaa tacctattcc gaatccagca atattatttc ggtaggcctt ttgcattgg	46380
ggtattattg tagactccct tataatcact tctaatagtt gggggtcata ttcaggagat	46440
atctcatcaa cttcaattcc aagtacactg gtttgtgat tagatttacc cactggatcc	46500
aaagactttt ggataggggc tccacatata cttctggcgg atatctttt caaagttact	46560
ttacctcctt tcttacatta tatatcaaat tataaaatcc agatggcctc atatttcagg	46620
gaggattaca tcaactccac atatagtgc aaatacggcc attcacatga tttaaaaata	46680
actataattt gatacgttta ttataacata attcacaaaa tttgtcaac gttttatttt	46740
tacattattt tccggaagat ttccgcata tactcccat ataaaattat ataattatta	46800
atgtatacta tattactata ttaatttatg aaataaatta tatagtatat agtatactta	46860
tattacatat atataagggt ggtaactctg atatgccttc tatatcacat tattactaat	46920
atagagccta gtcaatttca aaactgatat ctacatatac agaataaaaa agtattggct	46980
ttaataggca tatcagttac tagatttttc ttaatttaga tccaacagga aggcaagcta	47040
agaatagaga gtctgctaag tctggagaat gtagtctct tttcttcatt tcatccttac	47100
totccagctt tatttgacct ttggagtga atactttaaa ctttctggta gtcaattctc	47160
ccacaagatc tgtattatcc ggtagtctta actcatcacc ctccagtaat tccttaacta	47220
cagaggctat atatgtgggt gtatcataat aaaaggcata agcctgggac cccctcttta	47280
gtggcatacc aaacttacat ggtactacct tcaaccagtc cagtttttct tcaagtttta	47340
tctcttttaa tctatcagtt actccccac ctacaccagt gtcgtctatt ttacaaacta	47400

25275

ccgctagttt aggggaactca ccatgtagag atttagcc

47438