

최 종
연구보고서

632.8
L293a

GOVP 12009257

**Aujeszky 바이러스에 대한
재조합 DNA 백신의 개발**
Development of Recombinant DNA Vaccine
for Aujeszky's Virus

연구기관
경북대학교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Aujeszky 바이러스에 대한 재조합 DNA 백신의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 23

주관연구기관명 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 송 재 찬

연 구 원 : 여 상 건

연 구 원 : 이 근 우

연 구 원 : 유 민

연 구 원 : 백 필 수

연 구 원 : 박 상 희

연 구 원 : 이 경 현

연 구 원 : 배 진 수

연 구 원 : 김 홍 태

연 구 원 : 진 태 원

연 구 원 : 장 우 석

요 약 문

I. 제 목

Aujeszky 바이러스에 대한 재조합 DNA 백신의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가. 연구개발의 목적

Aujeszky병을 효과적으로 예방할 수 있는 재조합 DNA 백신을 개발하기 위하여, 우리나라에서 분리된 바이러스(NYJ strain)를 사용하여 기존에 밝혀진 유전자와 바이러스의 염기서열의 분석을 통하여 분리되는 유전자를 항원으로 적용하여 재조합 DNA을 제작하는 기술을 확립하고 일차적으로 실험동물을 사용한 연구를 통해 효용성에 대하여 검정하고자 하였다.

나. 연구개발의 중요성

미생물의 감염에 의한 질병의 대책은 정확한 진단과 예방할 수 있는 방법을 모색하는 일이며 더 나아가서 경제적인 손실을 최소화하기 위하여 치료제를 개발하는 일이다.

현재 Aujeszky병의 진단은 PRV의 표면항원에 대한 항원-항체특이반응을 이용한 면역학적방법⁽¹⁾과, Aujeszky바이러스의 유전자 중 thymidine kinase등, 염기서열이 이미 알려진 유전자의 DNA염기서열에 의거하여 polymerase chain reaction (PCR)반응으로 Aujeszky바이러스의 유전자배열을 증폭시켜 피검체의 조직내에 바이러스의 존재를 확인하므로써 효과적인 진단이 이루어지고 있다⁽²⁾. 그러나 아직까지 이 병에 대한 효과적인 치료방법⁽³⁾아직 개발되어 있지 않아 양돈농가의 경제적인 손실과 병의 전파에 의한 확산을 방지하기 위하여는 예

방이 최선의 방법이다. Aujeszky병의 예방은 Aujeszky병 바이러스의 독성을 약화시킨 약독균주나 사멸시킨 사독화 백신을 이용하여 이루어지고 있으나⁽³⁾ 이러한 백신들은 외국에서 개발되어 국내에서 발병하는 Aujeszky병에 대하여는 효과가 떨어지는 경우도 있으며, 백신의 반복사용으로 말미암아 돌연변이체가 발생하여⁽⁴⁾ 백신으로써의 효능을 잃어버리는 등의 문제점이 있어 예방에 대한 효과적인 백신의 개발이 시급한 실정이다.

본 과제에서는 Aujeszky병의 예방을 위한 백신개발에 있어서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Aujeszky바이러스 유전자의 DNA를 항원으로 한 재조합 DNA백신을 개발하기 위한 기반 기술을 확립하고 실험동물을 대상으로 효과를 검정하고자 한다.

1) 기술적측면

재조합 DNA백신과 약독화 또는 사독화 백신의 차이점⁽⁵⁾은 현재 사용되고 있는 약독화 또는 사독화 백신의 경우, 바이러스를 화학적으로 처리하는 등의 방법으로 세포에 대한 독성을 약화시키거나 제거시킨 바이러스를 건강체에 주사하면 개체의 면역작용으로 바이러스의 표면항원에 대하여 항체가 생성되도록 유도하여 이 항원이 새로이 침입하는 바이러스의 독성을 중화시켜 백신으로써의 효능을 나타낸다. 그러나 중화항체의 문제점은 구조가 변하지 않는 표면항원에 한해서만 그 효용을 나타내기 때문에 앞서 언급한 바와 같은 동일한 백신의 반복사용이나 지역적인 차이에 의하여 발생한 돌연변이체가 침입하였을 경우에는 백신으로써의 효능을 잃게되고, 또한 체내에서 생성되는 항원 이외의 독성성분에 의하여 발열, 구토, 식욕 감소 등의 부작용이 나타나는 문제점이 있다.

반면, 재조합 DNA기술을 이용한 DNA백신의 경우, 체내에 부작용을 나타낼 수 있는 단백질을 제외한 항원으로 작용하는 DNA배열만을 체내에 도입하여 발현시키기 때문에 이러한 부작용에 대한 문제점을 해결하면서 백신으로써의 효

능을 얻을 수 있는 장점이 있다. 일반적으로 면역반응은 항원의 종류에 따라 두 가지의 면역반응이 일어날 수 있다. 첫째, 항원유전자가 바이러스의 표면항원으로 혈관을 따라 이동할 경우에는 주로 B- cell이 관여하는 체액성 면역인 중화항체가 형성되고, 둘째, 표면항원이 아닌 바이러스 내부의 항원의 경우에는 세포성 면역을 담당하고 있는 cytotoxic T cell에 의하여 면역기능을 나타낸다⁽⁶⁾. 즉 침입한 항원이 숙주세포내에 위치할 경우 Class I 주요조직적합항원 (major histocompatibility Class I)에 의하여 인식되어, Cytotoxic T cell의 분화가 유도되고, Cytotoxic T cell은 새로이 바이러스가 침입한 세포를 사멸시키므로써 체내에서 바이러스가 증식되는 것을 막아 백신으로써의 효능을 나타낸다. 재조합 DNA백신의 장점은 항원으로 사용할 수 있는 유전자가 표면항원뿐만 아니라 바이러스의 생활사에 필수적인 단백질도 항원으로 사용할 수 있다는 점이다. 병원성을 가지는 바이러스에서는 이들 유전자가 변이를 일으키지 않기 때문에 중화항체에서 볼 수 있는 변이체의 발생에 의한 백신효능의 감소를 방지할 수 있다. 또한, DNA 백신은 면역반응에 필요한 최소한의 유전자만을 발현시킬 수 있기 때문에 약독 또는 사독화 백신에서 나타날 수 있는 부작용을 줄일 수 있는 장점이 있다.

외국의 경우에는 재조합 DNA 백신은 실험실 수준에서 백신으로써 확실한 효능을 나타내고 있어 그 효용성이 인정되고 있으나^(7,8,9) 아직까지 상용화되어 있지 않다. 이러한 이유는 재조합 DNA가 백신으로 작용하는 기전에 대해서 확실하게 밝혀져 있지 않고, 또한 DNA백신에 대한 안전성을 확인하기 위한 과정이 남아 있기 때문이다^(10,11). 그러나 DNA백신이 동물실험에서 확실한 효능을 가지고 있기 때문에 안전성이 확보될 경우 값싸고 안전하며 또한 효능이 뛰어난 백신을 공급할 수 있어⁽²⁹⁾ 그 파급효과가 대단히 클 것으로 예상된다. 현재 국내의 기술로는 일부의 기술 - 항원의 선별, 상용화를 시키기 위한 운반체의 제조 등을 제외하고 재조합 DNA백신을 제조 할 수 있는 기본적인 기술이 보급되어있

어 재조합 DNA백신을 개발할 수 있는 가능성이 높기 때문에 이와 관련된 기술의 확립이 시급한 실정이다.

2) 경제산업적인 측면

양돈에 있어서 Aujeszky병의 발생하면 다른 지역으로의 전염을 방지하기 위하여 항체반응에서 양성을 나타내는 양돈은 모두 소각 처분하여야 한다. 따라서 DNA백신에 의하여 효과적인 예방이 이루어지면 1) 저렴한 비용으로 효과적인 백신의 공급이 가능하여 양돈가의 경제적인 부담을 줄일 수 있으며, 2) 병돈의 소각처분에서 오는 경제적인 손실과, 3) 임신돈의 유산을 방지하므로써 양돈가의 수익성을 높일 수 있으며, 4) 감염성 바이러스의 생산이 억제되어 다른 지역으로의 전염을 막을 수 있는 예방효과를 얻을 수 있다.

3) 사회 문화적인 측면

양돈에 있어서 돈군의 건강증진에 따르는 경영의 합리화를 도모할 수 있으며 양돈가에서 안전한 돈육을 생산하여 공급하므로써 소비자에게 신뢰감을 주어 돈육의 소비를 증가 시킬수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 Aujeszky 병에 대한 재조합 DNA 백신의 제조 기술확립 및 실험동물을 이용하여 백신의 효능을 검정하기 위하여 Aujeszky 바이러스의 염기서열을 결정하여 항원으로 유용한 유전자를 분리하고, 재 조합 DNA를 작성하여 실험동물을 대상으로 그 효능을 검증하기 위하여 다음과 같은 내용으로 연구를 수행하였다.

가. 연구 개발의 내용

1) DNA 백신용 재조합 유전자의 제조

분리한 유전자 DNA는 항원성이 가장 잘 나타나는 부위를 선별하여 PCR 방법으로 재분리하여 동물세포에서 재조합 DNA를 발현시키기 위한 vector 인 pcDNA3 vector에 삽입하여 숙주내에서 단백질의 발현을 확인하였다.

2) 실험동물을 이용한 DNA 백신의 유용성 검정

NYJ strain을 비강 감염시킨 백신 비투여 Rat의 대조군과 DNA 백신을 투여한 실험

3) Aujeszky 바이러스 염기서열 결정 및 분석

체내에서 숙주의 면역반응을 유도하여 항원으로 작용할 수 있는 유전자를 분리하기 위하여 먼저 기존에 구조가 알려져 있는 glycoprotein의 유전자 DNA를 PCR 방법으로 분리하여 항원으로 사용하였고, 그 이외에 효과적인 항원으로 사용할 수 있는 유전자를 검출하기 위하여 Aujeszky 바이러스의 국내분리주인 NYJ strain의 염기서열을 결정 분석하였다.

나. 연구 개발 범위

- 1) 백신용 유전자의 분리
- 2) 숙주세포에서의 발현을 위한 Plasmid 재조합 DNA의 작성
- 3) 숙주세포에서 유전자 발현여부의 확인
- 4) 실험 동물 군에서 재조합 DNA백신의 효용성 검정
- 5) cosmid vector를 이용한 library 의 제작
- 6) finger printing - Cosmid contig map의 작성
- 7) cosmid clone의 염기서열 결정
- 8) computer program을 이용한 염기서열의 연결

9) database 검색에 의한 염기서열의 해석

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구결과

1) DNA 백신용 재조합 유전자의 제조

재조합 DNA 백신의 항원으로 사용할 유전자는 항원성의 유무가 검토되고 있는 glycoprotein <표 1>중에서 cytotoxic effect를 나타내지 않는 glycoprotein E, protection 기능을 보이지 않는 glycoprotein G를 제외한 8 종류의 glycoprotein 유전자를 PCR 방법으로 각각의 DNA 배열을 시도하였다. PCR 증폭을 위한 primer는 각 항원 protein의 아미노산 서열 중에서 가장 항원성을 강하게 나타내는 부분에 대하여 세포내에서 발현시에 단백질의 아미노산의 배열이 일치하도록 작성하였고, PCR에 의하여 증폭이 되지 않는 유전자에 대하여는 항원성의 여부를 무시하고 PCR에 가장 증폭이 잘되도록 primer를 작성하여 분리한 다음, PCR 증폭 산물에 대하여 아미노산과 일치하도록 internal primer를 작성하여 재증폭 시켜 8 종류의 glycoprotein 중 5종류(glycoprotein 50, C, D, H, X)의 glycoprotein에 대한 DNA를 분리하였다<그림 1>.

분리한 각 PCR 단편은 발현용 vector인 pcDNA3에 cloning한 후 염기서열을 결정하여 DNA database에 등록된 염기서열과 클로닝된 부위에 있어서 아미노산의 순서와 일치하는지의 여부를 확인하여 5종의 재조합 DNA를 제조하였다. 작성된 재조합 DNA가 숙주내에서 발현되는가의 여부를 확인하기 위하여 항원 유전자 DNA를 포함하는 transformant로부터 단백질을 추출하여 Aujeszky 바이러스의 항체와 반응시켜 재조합 DNA체가 세포내에서 정상적으로 발현하는 것을 확인하였다<그림 3>.

<표 1> Aujeszky 바이러스 항원성 단백질의 면역유도 기능

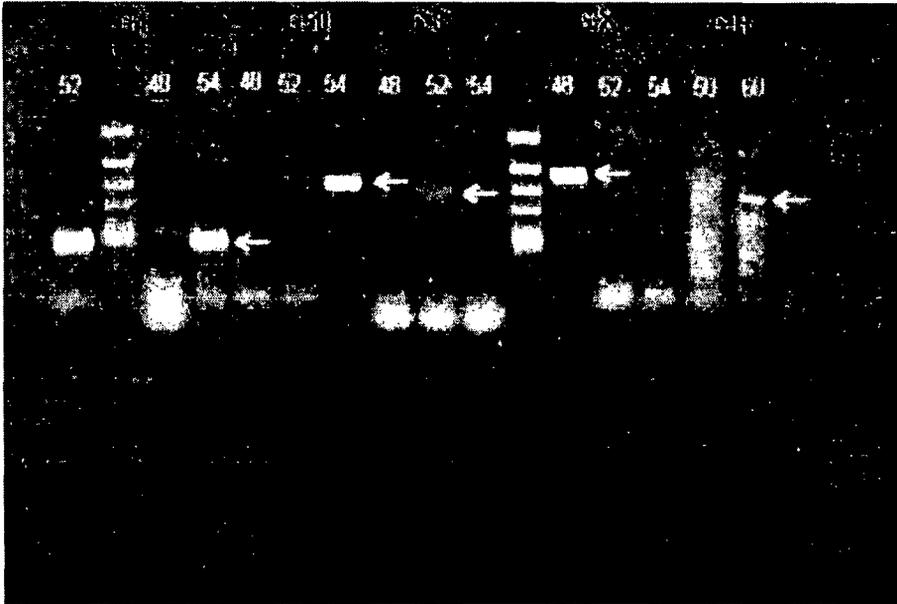
Protein	Protection		NT-C ^a	NT+C ^b	CTL(MHC-I) ^c	CTL(LAK) ^d
	Mice	Pigs				
glycoprotein 50	+	+	+	+	?	+
C	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	?	-
E	+	?	-	+	-	?
G	-	-	-	-	-	?
H	?	?	?	?	?	?
I	?	?	-	?	-	?
K	?	?	?	?	?	?
L	?	?	?	?	?	?
M	?	?	?	?	?	?

a: 보체를 투여하지 않을 경우에 있어서 단일클론항체에 의한 중화반응

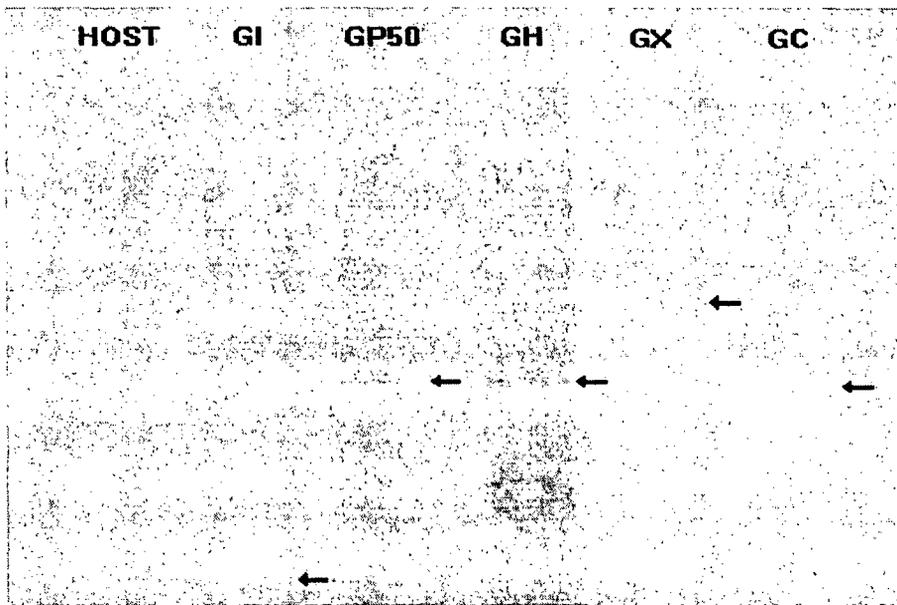
b: 보체를 투여할 경우에 있어서 단일클론항체에 의한 중화반응

c: 조직 주요적합항원에 의한 세포독성반응

d: 조직 주요적합항원에 의하지 아니한 세포독성반응



<그림 1> 항원 유전자의 PCR 증폭



<그림 3> 재조합 항원 DNA의 발현

2) 실험동물을 이용한 DNA 백신의 유용성 검정

이상의 과정에서 작성된 재조합 DNA가 백신으로써의 효능을 가지는가에 대하여 rat 사용하였다. 항체형성의 확인 결과 체액성 면역에 의한 항체의 생성은 인정되지 않았다. 따라서 백신으로써의 유용성은 바이러스와 백신의 투여 후에 세포성 면역에 의한 생존 여부로 판단하였다.

① 5종류의 glycoprotein을 항원으로 한 재조합 DNA 백신을 제조하여 면역작용을 유도한 결과 항체의 생성을 인정할 수 없었다.

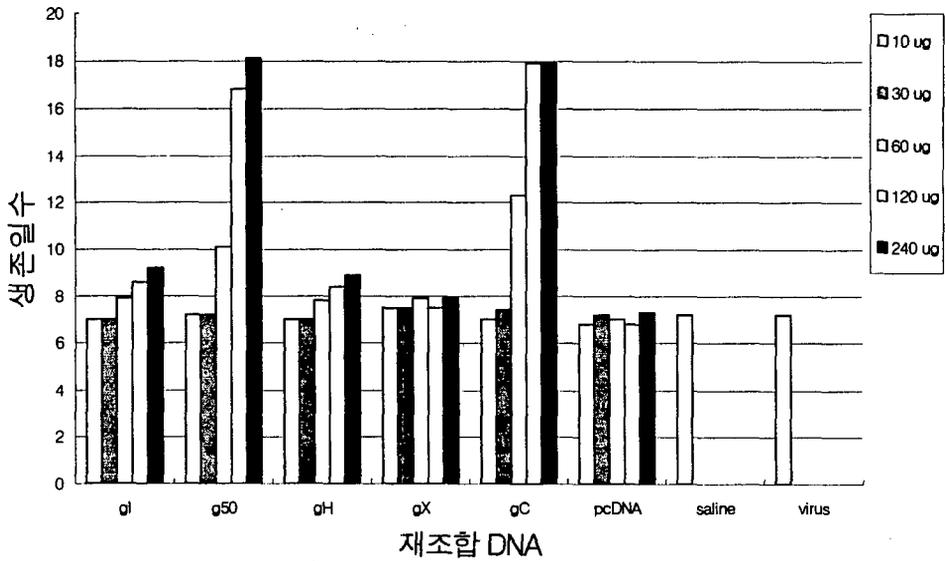
② 재조합 DNA 백신을 접종한 rat의 생존기간의 측정된 결과 항원의 종류에 따라 생존기간이 다르게 나타났으며 glycoprotein 50과 glycoprotein C의 재조합 DNA가 유의성있는 생존기간 연장을 보이므로써 백신의 효과를 나타내었다<그림 4>.

③ glycoprotein 50과 glycoprotein C의 백신효과는 백신 접종 후 바이러스를 감염시켰을 경우가 바이러스 감염 후에 백신을 투여하는 것보다 백신의 효과 증가하는 점으로 미루어 치료효과보다 예방효과가 큰 것으로 판단된다<그림 5>.

④ glycoprotein 50과 glycoprotein C의 동시 투여에 의한 백신효과의 상승작용은 미약한 증가를 나타내었다<그림 6>.

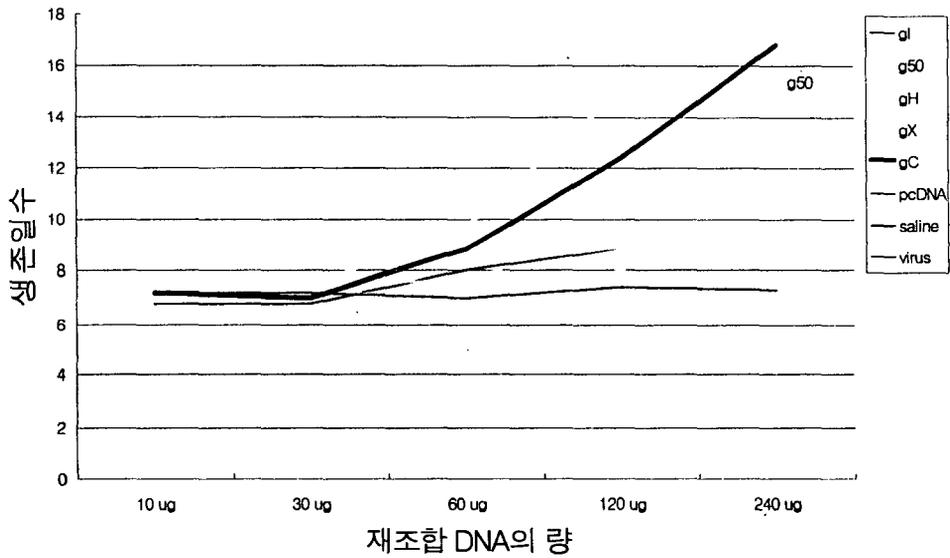
⑤ glycoprotein 50과 glycoprotein C의 백신작용을 비교하면 glycoprotein 50의 재조합 DNA 백신은 100 μg 이상의 접종시에는 백신의 효과가 거의 증가하지 않는 것으로 미루어 재조합 DNA의 백신효과는 glycoprotein C의 재조합 DNA가 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 보다 효과적인 백신의 효능을 얻기 위하여는 항원의 발현을 증가시키는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

백신접종 후 바이러스감염에 의한 효과



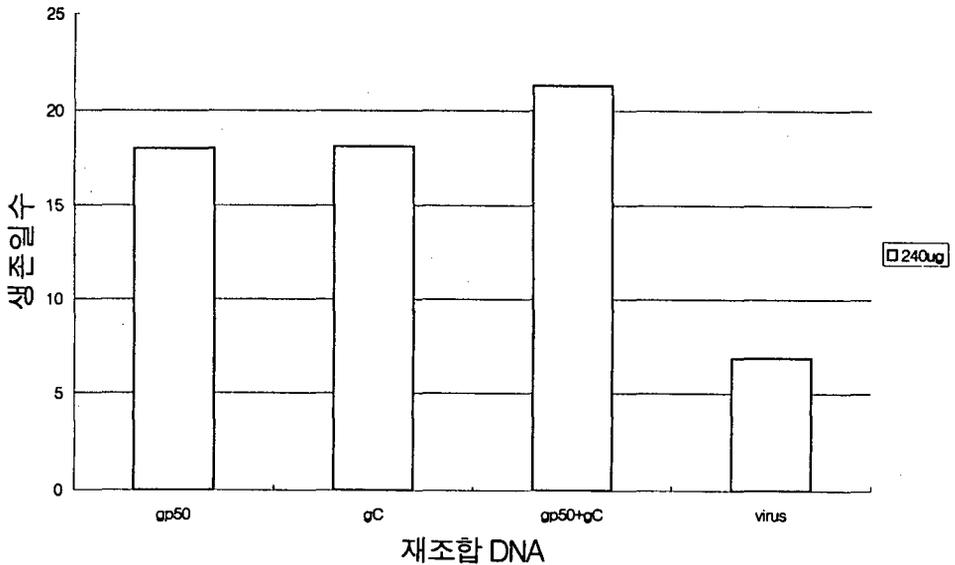
<그림 4> 각 항원별 접종량에 따르는 백신의 효과

백신의 접종량에 따른 생존기간



<그림 5> 재조합 DNA 백신의 항원에 따르는 백신효과의 차이

gp50과 gC의 동시접종에 의한 백신효과



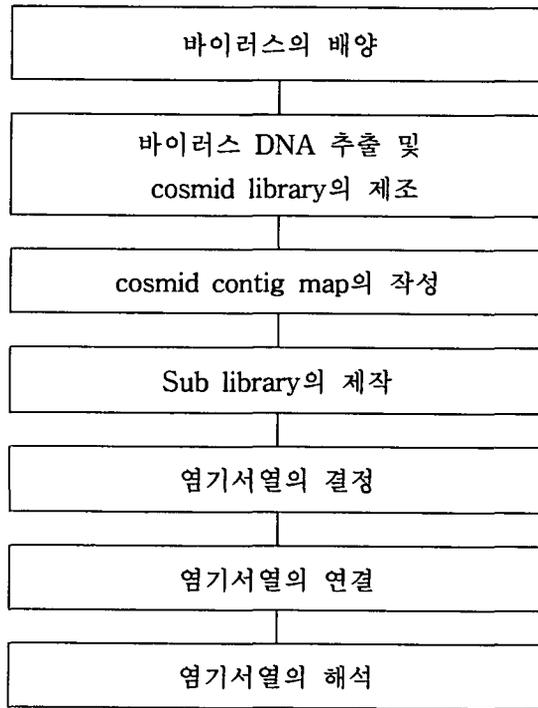
<그림 6> glycoprotein 50과 glycoprotein C의 동시접종에 의한 백신의 효과

3) Aujeszky 바이러스의 재조합 DNA 백신항원분리를 위한 염기서열 결정 및 분석

Aujeszky 바이러스의 염기서열 결정은 <그림 7>과 같은 전략으로 수행되었다. 본 과제에서는 Aujeszky 바이러스의 항원 검색과 더불어 전체 염기서열을 결정하기 위하여 aujeszky 바이러스 전체 genome의 길이가 다른 생물체에 비하여 짧은 점(약 150kb)에 착안하여 random sequencing에 의하여 짧은 염기서열을 결정하고, 각 염기서열을 computer program으로 연결하는 bottom-up 방식으로 수행하였다. 염기서열은 dideoxy-chain termination방법으로 수행하여 총 2,000여개의 클론에 대하여 염기서열을 결정하였으며 검색 조건은 유전자를 정확히 동정하기 위하여 E value를 e^{-06} 이하의 값을 가지는 유전자만을 선별하였다. 그 결과 100여개의 상동성 유전자를 검색하였으며 이러한 유전자 중에 재조합 DNA 백신의 항원으로 활용의 가능성이 높은 2개의 유전자를 선별하였다.

① 염기서열중 10B01 의 염기서열은 아직까지 Aujeszky 바이러스에서는 분리되지 않았으나 Equine herpesvirus의 glycoprotein 13의 염기서열과 유사한 구조를 가지고 있어(상동성 96%) 본 과제를 통하여 처음으로 분리되는 Aujeszky 바이러스의 glycoprotein으로 추정된다. glycoprotein은 주로 바이러스의 표면구조를 이루는 당단백질로 항원성을 나타내는 경우가 많기 때문에 전염기서열의 결정과 함께 재조합 DNA 백신의 항원으로써의 가능성을 검토되어야 할 것으로 판단된다.

② 클론 3D12은 A.pleuropneumoniae omlA gene과 95%의 상동성을 보이고 있어 본과제에서 처음 분리되는 Aujeszky 바이러스의 유전자 일 것으로 판단되며, oml 단백질은 세균의 outer membrane를 구성하는 단백질 중의 하나로 세균에 있어서 항원성을 결정하는 단백질도 작용하기 때문에 재조합 DNA 백신의 항원으로도 사용될 수 있는 가능성이 매우 높은 단백질로 더 연구를 진행시켜 전체구조를 결정하여 재조합 DNA 백신으로써의 가능성이 검토되어야 할 것이다.



<그림 7> Aujeszky 바이러스 genome의 염기서열을 결정하기 위한 전략

random sequencing의 결과 얻어진 각각의 염기서열들은 contig assembly program (<http://genome.kribb.re.kr>) 를 사용하여 연결을 시도하였다. cosmid 클론중 4G01, 4A08, 3F08 의 세 cosmid 클론에 대하여 염기서열을 결정하여 4G01 cosmid clone에 대하여는 총 780,572의 염기를 해석하여 vector에 클로닝되어 있는 전 염기서열의 결정을 완료하였다. 4A01 cosmid 클론은 총 202,950 염기를 결정하여 10개의 contig 를 작성하였고 3F08 cosmid 클론은 총 202,950 염기를 결정하여 124개의 contig를 작성하였다. 각 cosmid 클론의 연결은 Appendix 에 별도로 첨부하였다

4G01 클론에 비해 4A01과 3F08클론이 연결되지 않고 다수의 contig가 만들어지는 원인으로서는 1) 결정된 총 염기의 수가 절대적으로 부족하기 때문 2) 각 clone의 DNA에 대하여 한번의 염기서열 결정을 수행하였기 때문에 염기서열의

정확성이 결여되어 다양한 contig 가 만들어졌을 가능성, 3) 본 과제에서 사용된 바이러스는 국내에서 분리된 strain으로 염기서열이 이미 결정되어 있는 기존의 바이러스와 염기서열이 다를 수 있는 가능성이 있으나, 염기서열을 결정하는 방법을 고려할 때(misincorporation, misreading, mistyping등) 본 과제에서 수행된 결과를 확실히 하기 위하여는 반복된 염기서열의 결정이 필요할 것으로 판단되며 염기서열이 축적됨에 따라 완전한 염기서열을 결정할 수 있으리라 기대된다..

나. 활용에 대한 건의

본 과제의 수행으로 재조합 DNA 백신을 제조하기 위한 기술이 확립되었으며 실험동물을 통한 유용성이 검증되었다. 이러한 결과는 앞으로 감염성 질병의 예방에 많은 도움을 줄 것으로 기대된다. 현재 DNA 백신의 개발은 초기단계이며 재조합 DNA 백신은 기존의 백신의 문제점인 부작용을 줄이며, 지역적으로 적합한 백신을 개발할 수 있는 등의 기존백신의 단점을 보완할 수 있는 많은 장점이 있으나 아직까지 상용화되어 있지 않다. 이러한 이유는 백신의 주체가 되는 항원 유전자의 선별과정에 많은 시간과 경비가 소요되며 안전성이 확인되어 있지 않기 때문이며 또한 사회적으로는 재조합 DNA를 이용한 농산물에 대한 소비자들의 관심이 부정적으로 치우치는 것은 재조합 DNA 백신이 상용화되는 수준까지 개발되더라도 임상에 적용할 것인가의 여부는 신중하게 판단되어야 할 점이다. 그러나 이러한 문제는 사회적으로는 재조합 DNA 기술에 대한 일반 소비자들의 인식과 학문적으로는 재조합 DNA의 도입으로 일어날 수 있는 세포 내에서의 변화, 그리고 기술적으로는 핵내의 재조합 DNA가 염색체와 별도로 핵내에서 안정되게 유지될 수 있는 운반체의 개발등의 연구가 진행됨에 따라 재조합 DNA 백신의 상용화가 가능할 것으로 판단된다. 또한 재조합 DNA 백신의 개발은 병원체를 감염시켜 그 효과를 검정하는 과정을 필수적으로 거쳐야

하기 때문에 병원미생물을 통제할 수 있는 시설의 확보가 중요한 점이다. 실험 동물의 경우 비교적 간단한 시설에 의해 병원균의 외부 유출을 통제할 수 있으나 산업적인 가치가 있는 대동물의 경우 백신의 개발과정에서 발생할 수 있는 병원균의 외부 유출의 요인(배설물, 사체처리, 연구원의 출입)을 차단하기 위하여는 많은 설치 및 유지비용이 요구되기 때문에 재조합 DNA 백신개발의 가장 중요한 장애요인이 되고 있다.

본 과제 의 연구 결과의 활용은 단기적으로는 세포를 구성하는 요소가 적어 항원의 분리가 비교적 용이한 바이러스를 대상으로한 백신의 제조에 활용될 수 있으며 항원 분리의 기술이 축적됨에 따라 장기적으로는 세균에 의한 질병의 백신 개발에 활용될 수 있다. 현재 genome project가 수행되면서 전체 genome 이 결정된 바이러스가 급속히 증가하여 460여종류의 바이러스에 대한 전체염기 서열이 결정되었다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/vis.html>). 이러한 경향은 비교적 genome 크기가 작은 생물체를 대상으로 지속적으로 진행될 예정이다. 따라서 비슷한 구조의 바이러스의 경우 유사한 DNA구조를 가지고 있기 때문에 hybridization 또는 본 과제에서 수행한 PCR에 의한 항원의 분리등의 방법으로 재조합 DNA 백신의 항원을 선별하는 노력도 이러한 경향에 주목할 필요가 있을 것으로 판단된다.

Summary

DNA vaccine is a novel approach for generation protective immunity against infectious diseases. Unlike protein or peptide-based subunit vaccines, DNA vaccination provides protective immunity following endogenous expression of foreign proteins by host cells, thus allowing the presentation of antigen to the immune system in a manner that may be more analogous to that which occurs during natural infection with viruses or other intracellular pathogens. Although considerable interest has been generated by this technique, successful immunity has been most consistently induced by DNA immunization for viral diseases. Results have been more variable with nonviral pathogens, which may reflect differences in the complexity of the pathogens, the immunizing antigens chosen, and the routes of immunization. Further development of DNA vaccination will depend on elucidation its underlying immunologic mechanisms and broadening its application to nonviral infectious diseases for which existion strategies of vaccine development have failed.

Pseudorabies virus (PRV), more called suid herpes virus type 1, is a swine neurotropic alpha herpesvirus that is the causative agent for Aujeszky's disease. The appellation "pseudorabies" is both unusual and unfortunately misleading, but presumably arose from classical descriptions of the disease in dogs where the symptoms resembled those of rabies virus infection. Although the virus has a wide host range and is capable of invading the peripheral and central nervous systems of a variety of animals, the higher primates and humans are resistant to infection. The virus causes a disease

in domestic swine of considerable economic importance and is controlled in part by vaccine. It can display both a productive infection of the CNS that is almost always lethal, as well as a nonproductive latent infection in peripheral sensory ganglia. The pathogenic events that may ensue when a susceptible animal is infected vary and depend on the route of virus uptake, the infection dose, the virus strain and virulence, the age and physiological status of the animal, and the environmental conditions. Rodent models are usually predictive of results in the natural host, with the exception that adult rodents usually die from acute infection, whereas adult pigs have the capacity to recover and manifest a latent infection.

PRV genome consists of about 130,000 base pairs. Most strains of PRV have a class 2 herpesvirus genome structure typified by a unique long (UL) region joined to a unique short (US) segment that is bracketed by inverted repeat sequences. About 40 genes have been identified. These genes encode transcription factors, regulatory proteins, enzymes and proteins involved in DNA replication, virion assembly, and viral expression. DNA sequence analysis of many alpha herpesvirus genomes clearly shows that these viral DNA molecules are colinear in gene arrangement and that, with the exception of occasional inversions most (but not all) genes are found in a 1:1 correspondence.

The typical alpha herpesvirus virion contains 30-40 distinct proteins encoded by the virus. Approximately six proteins form the capsid and the remaining viral proteins are found in the tegument and envelope. There is little evidence for host proteins in the virus particle. The viral envelope contains a collection of integral membrane proteins that are usually modified

by glycosylation as well as phosphorylation and sulfation. The precise number of viral envelop proteins for any alpha herpesvirus is not firmly established, but 11 have been identified in HSV-1 and there are at least 9 in PRV. All PRV membrane proteins have distinct homologs in HAV-1.

This report describes a analysis of PRV genome and development of effective recombinant DNA vaccine.

The 8 kind of antigens for recombinant vaccine was chosen and amplified by PCR among pseudorabies virus glycoproteins that was shown humoral and cytotoxic antigenicity. Each antigens were analyzed their fragment antigenicity based on hemophilic region. Among 8 antigen, 5 kind of antigen- glycoprotein 50, I, X, H, C was isolated pseudorabies virus NYZ strain. The amplified DNA fragments were cloned in pcDNA 3 vector which is able to express protein in eukaryotic cell. Then the 5 kind of recombinant DNA was tested their effectiveness of vaccine by injection to muscle. The result was as follows:

1. The humoral antigenicity were not identified because the antibody were not detected.
2. The effectiveness as vaccine of recombinant DNA show that the different cytotoxic effect.

Glycoprotein 50 and glycoprotein C were dominant

3. The effectiveness as vaccine glycoprotein50 and glycoprotein C is better prevention than therapeutic effects.
4. The injection of glycoprotein 50 and glycoprotein C simultaneously showed little prolongation of life than injection separately.

5. According to increase the amount of recombinant DNA, glycoprotein C showed that effect as vaccine increased but glycoprotein 50 did not.

Content

chapter	page number
1. General Introduction.....	22
2. Construction of recombinant DNA vaccine	
1) Introduction.....	27
2) Materials and Methods.....	29
3) Results and Discussion.....	30
4) Summary.....	32
5) Figures and Tables	34
3. The Effectiveness as Vaccine of Recombinant DNA	
1) Introduction.....	40
2) Materials and Methods.....	42
3) Results and Discussion.....	43
4) Summary.....	47
5) Figures and Tables.....	48
4. Analysis of Pseudorabies virus Genome	
1) Introduction.....	50
2) Materials and Methods.....	52
3) Results and Discussion.....	54
4) Summary.....	58
5) Figures and Tables.....	60
5. References.....	63

목 차

제 1 장 서론	22
제 2 장 재조합 DNA 백신의 제조	
제 1 절 서 설.....	27
제 2 절 재료 및 방법.....	29
제 3 절 결과 및 고찰.....	30
제 4 절 적 요.....	32
제 5 절 그림 및 표.....	34
제 3 장 재조합 DNA 백신의 효과 검증	
제 1 절 서 설.....	40
제 2 절 재료 및 방법.....	42
제 3 절 결과 및 고찰.....	43
제 4 절 적 요.....	47
제 5 절 그림 및 표.....	48
제 4 장 항원 분리를 위한 PRV genome의 해석	
제 1 절 서 설.....	50
제 2 절 재료 및 방법.....	52
제 3 절 결과 및 고찰.....	54
제 4 절 적 요.....	58
제 5 절 그림 및 표.....	60
제 5 장 참고 문헌.....	63

제 1 장 서론

미생물의 감염에 의한 질병의 대책은 과학적인 영농에 의한 최적의 사육환경의 확립으로 질병에 의한 감염을 초기에 차단시키는 것이며 또한 질병의 발생을 예방하고 질병이 발생하였을 경우에는 정확한 진단으로 조기에 치료하여 경제적인 손실을 최소화하여야 한다. 돼지에서 발생하는 질병중 Aujeszky 병은 1987년 7월에 처음으로 발생이 보고된 이후 법정전염병으로 지정되어 근절을 위한 예방이 지속적으로 수행되어 전국적인 발생에 대한 공식보고는 없으나 아직까지 지역적으로 산발적인 발생을 보이고 있다. 특히 용인군과 남양주군 일대는 아직까지 Aujeszky 병의 상재 지역으로 남아있다. Aujeszky 병원체는 사람에게 감염되지 않으며 항체가 검출되는 항체 양성돼지는 이 병으로부터 회복된 개체는 예방접종을 받은 상태이며, 극히 소양의 병원체가 신경조직 또는 입과조직 등의 제한된 부위에 한정되어 나타날 수 있으나 체내에 잔존하는 바이러스는 조직의 자가용해에 의하여 파괴되며, 또한 열에 약하여 조리과정에서 쉽게 파괴되기 때문에 해체하더라도 병원체의 전파 또는 확산은 문제가 되지 않는다. 이 병의 전파는 호흡기를 통한 감염이 이루어지며, 최초의 발생은 주로 항체 양성인 돼지의 입식에 기인하는 경우가 가장 많다. 그 외에 가까운 이병의 발생 양돈장으로부터 오염된 기구, 자재, 사람, 차량 등에 바이러스가 감염되어 전파되거나 바람에 의하여 침입하고, 쥐 등의 야생동물에 의하여 전파되는 가능성도 있다. 양돈장내에서는 주로 감염된 돼지의 분비물에 의하여 전파된다.

이 병이 처음 발생하는 농장은 어미돼지가 사산, 유산 또는 허약자를 분만하는 등 심한 번식장애가 나타난다. 아울러 어린자돈은 구토와 설사를 하며, 또한 보행장애등의 신경증상이 나타난 자, 특히 생후 2 주미만의 자돈은 폐사율이 높다. 비육돈이나 성돈의 경우에는 발열과 식욕부진과 함께 기침 등의 호흡기 증상이 나타나지만 대부분 자연회복된다 이와 같이 처음 감염된 농장은 어미돼지

의 번식장애와 어린 자돈의 폐사로 가시적인 피해가 대단하며, 모든 1두당 연간 10만원 이상의 손실을 초래한다.

Aujeszky 병은 현재까지 치료제는 없으며 항생제 등으로도 효과가 없다. 따라서 이 병의 방역대책은 감염개체를 색출하여 살처분하는 것을 원칙으로 한다. 현재 이 병에 대한 방역실시령이 시행되어 양성돈의 경우 전 두수를 살처분하고 그에 따르는 보상을 실시하고 있으나 발생농가에서는 경제적, 또는 사회적인 요인에 의해 농장에 손실이 우려될 경우에는 전염원의 제거라는 방역효과를 거두지 못하는 경우도 있어 보다 적극적인 방역대책이 마련되어야 하며 관 주도의 방역대책과 함께 각 양돈농가와 관련 업계에도 이 병을 근절할 수 있도록 더욱 홍보하여 양돈가들의 자발적인 방역활동을 유도할 수 있도록 노력하여야 할 것이다. 현재 Aujeszky병의 진단은 PRV의 표면항원에 대한 항원-항체특이 반응을 이용한 면역학적방법⁽¹⁾과, Aujeszky바이러스의 유전자중 thymidine kinase등, 염기서열이 이미 알려진 유전자의 DNA염기서열에 의거하여 polymerase chain reaction (PCR)반응으로 Aujeszky바이러스의 유전자배열을 증폭시켜 피검체의 조직내에 바이러스의 존재를 확인하므로써 효과적인 진단이 이루어지고 있다⁽²⁾. 그러나 아직까지 이 병에 대한 효과적인 치료방법⁽³⁹⁾아직 개발되어 있지 않아 양돈농가의 경제적인 손실과 병의 전파에 의한 확산을 방지하기 위해서는 예방이 최선의 방법이다.

Aujeszky병의 예방은 Aujeszky병 바이러스의 독성을 약화시킨 약독균주를 이용하여 이뤄지고 있으나⁽³⁾ 백신이 외국에서 개발되어 국내에서 발병하는 Aujeszky병에 대하여는 효과가 떨어지는 경우도 있으며, 백신의 반복사용으로 말미암아 돌연변이체가 발생하여⁽⁴⁾ 백신으로써의 효능을 잃어버리는 등의 문제점이 있어 예방에 대한 효과적인 백신의 개발이 시급한 실정이다. 본 보고서에서는 Aujeszky병의 예방을 위한 백신개발에 있어서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 재조합한 Aujeszky바이러스 유전자의 DNA를 항원으로한 재조합 DNA

백신을 제조할 수 있는 기술을 확립하고 실험동물을 사용하여 백신으로써의 효능을 검정하였다. 재조합 DNA백신의 개발역사는 1990년 San Diego biotechnology company의 Vical이 동물세포내에서 유전자를 발현시킬 수 있는 구조를 가진 vector에 클로닝된 유전자를 DNA 상태만으로 실험용 쥐의 근육에 주사한 결과 근육에서 클로닝된 유전자로부터 단백질이 만들어진다는 사실이 확인되면서 본격적으로 재조합 DNA를 이용한 백신의 개발이 시도되어 현재 HIV를 비롯한 influenza, Chlamydia trachomatis, Herpes Simplex virus type 1 등에 대한 재조합 DNA 백신의 개발이 진행되고 있다. 재조합 DNA 백신과 약독화백신의 기술적인 차이점⁽⁵⁾은 현재 사용되고 있는 약독화 백신의 경우 바이러스를 화학적으로 처리하는 등의 방법으로 세포에 대한 독성을 약화시키거나 제거시킨 바이러스를 건강체에 주사하면 개체의 면역작용으로 바이러스의 표면항원에 대하여 새로이 침입하는 바이러스의 독성을 중화시킬 수 있는 항체가 생성되도록 유도하므로써 백신으로써의 효능을 나타낸다. 그러나 중화항체의 문제점은 구조가 변하지 않는 표면항원에 한해서만 그 효능을 나타내기 때문에 앞서 언급한 바와 같은 변이체가 침입하였을 경우에는 백신으로써의 효능을 잃게 되고, 또한 균체가 가지는 독성이외의 다른 세포성분 때문에 부작용이 나타나는 등의 문제점이 있다.

반면, 재조합DNA기술을 이용한 DNA백신의 경우, 숙주에 독성을 나타내지 않으면서 항원으로 작용할 수 있는 1-2개의 유전자를 사용하기 때문에 종래의 백신이 나타내는 문제점을 해결하면서 백신으로써의 효능을 얻을 수 있다. 재조합 DNA가 백신으로써 효능을 나타내는 이론적인 배경은 일반적으로 면역반응은 항원의 종류에 따라 두 가지의 면역반응이 일어날 수 있다. 첫째, 항원유전자가 바이러스의 표면항원일 경우 앞서 언급한 중화항체를 형성하고, 둘째, 표면항원이 아닌 바이러스 내부의 항원의 경우에는 세포성 면역을 담당하고 있는 cytotoxic T cell에 의하여 면역기능을 나타낸다⁽⁶⁾. 즉 침입한 항원이 숙주

세포내에 위치할 경우 Class I 주요조직적합항원(major histocompatibility Class I)에 의하여 인식되어, Cytotoxic T cell의 분화가 유도되고, Cytotoxic T cell은 새로이 바이러스가 침입한 세포를 사멸시키므로써 체내에서 바이러스가 증식되는 것을 막아 백신으로써의 효능을 나타낸다. 재조합 DNA백신의 장점은 항원으로 사용할 수 있는 유전자가 표면항원 뿐만 아니라 바이러스의 생활사에 필수적인 단백질도 항원으로 사용할 수 있다는 점이다. 병원성을 가지는 바이러스에서는 이들 유전자가 변이를 일으키지 않기 때문에 중화항체에서 볼 수 있는 변이체의 발생에 의한 백신효능의 감소를 방지 할 수 있다. 또한, DNA 백신은 면역반응에 필요한 최소한의 유전자만을 발현시킬 수 있기 때문에 약독 또는 사독화 백신에서 나타날 수 있는 부작용을 줄일 수 있는 장점이 있다.

외국의 경우에는 재조합 DNA 백신은 실험실 수준에서 백신으로써 확실한 효능을 나타내고 있어 그 효용성이 인정되고 있으나^(7,8,9) 아직까지 상용화되어 있지 않다. 이러한 이유는 재조합 DNA가 백신으로 작용하는 기전에 대해서 확실하게 밝혀져 있지 않고, 또한 DNA백신에 대한 안전성을 확인하기 위한 과정이 남아 있기 때문이다^(10,11). 그러나 DNA백신이 동물실험에서 확실한 효능을 가지고 있기 때문에 안전성이 확보될 경우 값싸고 안전하며 또한 효능이 뛰어난 백신을 공급할 수 있어⁽²⁹⁾ 그 파급효과가 대단히 클 것으로 예상된다. 이러한 장점 이외에 재조합 DNA 백신은 미생물에서 배양한 백신체를 DNA상태로 추출하기 때문에 제조 원가가 저렴하며, 장기간의 보존에도 역가를 보존할 수 있으며, 또한 비역가의 변이주에 대해서도 지역에서 분리한 항원유전자를 대상으로 백신을 제조 할 수 있기 때문에 항상 일정한 효능을 유지할 수 있는 장점이 있다. 재조합 DNA 백신의 개발에 대한 국내의 기술수준은 일부의 기술 - 항원의 선별, 상용화를 시키기 위한 운반체의 제조 등 -을 제외하고 재조합 DNA백신을 제조 할 수 있는 기본적인 기술이 보급되어 있어 재조합 DNA백신을 개발할 수 있는 여건이 충분히 마련되어 있다고 판단되어 재조합 DNA 백신의 개발이 축

산농가에 경제적인 이익뿐만 아니라 질병의 발생을 사전에 예방하므로 소비자들에게 축산물에 대한 신뢰도를 높여 돈육의 소비 뿐만 아니라 그 이외의 축산물을 안전하게 공급함으로써 소비를 촉진시킬수 있는 효과도 기대할 수 있다.

본 보고서에서는 재조합 DNA 백신의 개발을 위하여 항원 유전자의 분리와 항원성을 검색하고 재조합 DNA 백신체를 제조하는 기술을 확립과 효능을 검증하고자 하였다.

제 2 장 재조합 DNA 백신의 제조

제 1 절 서 설

재조합 DNA 백신의 제조에 있어서 가장 중요하게 고려되어야 할 점이 항원의 선별이다. 항원은 숙주의 면역반응을 일으켜 생성된 항체가 침입하는 바이러스의 독성을 중화시켜 백신으로써의 효능을 나타나게 한다. 종래의 사독 또는 약독화 백신의 경우에는 항원체의 선별이 없이 숙주에 나타내는 독성만을 제거하였기 때문에 항원에 대한 선별이 고려하지 않아도 백신으로써의 효능을 나타낼 수 있다. 그러나 재조합 DNA 백신의 경우에는 항원 운반체인 vector에 클로닝할 수 있는 크기가 제한되어 있어, 바이러스 세포가 가지는 다수의 항원 중에서 가장 효과적인 항원으로 작용하는 항원을 선별할 필요가 있다.

Aujeszký 바이러스의 유전자중 항원성을 가진 단백질은 <표 2-1>과 같이 바이러스 전체 유전자중 주로 표면항원에 대하여 연구되고 있다.

Aujeszký 바이러스는 호흡기를 통해 감염하며 감염한 직후 신경세포에 침입하여 분열 증식하여 혈액중에 노출되는 경우는 없는 것으로 알려져 있다. 이러한 바이러스의 특징은 항원 선별의 기준이 된다. 침입하는 바이러스가 혈액중에 노출되지 않으면 백신의 작용중 B-cell에 의한 체액성 면역에 의한 백신은 효과가 없을 경우가 있다. 따라서 Aujeszký 바이러스의 백신은 T-cell에 의한 세포성 면역기능이 주로 작용하도록 항원이 선별되어야 한다. 또한 항원성을 가지는 glycoprotein들의 기능은 바이러스 생활사에 필수적인 유전자인가의 여부에 따라 essential protein 또는 nonessential protein으로 구분된다. envelop protein중 glycoprotein gC, gE, gI와 gG는 바이러스의 증식에는 영향을 주지않는 nonessential protein으로 분류되며, glycoprotein gB, gD, gH, gI는 바이러스

의 증식에 필수적인 essential protein으로 분류된다. 이러한 점은 glycoprotein 이 바이러스의 생활사에 비필수적인 유전자일 경우에는 유전자의 변이가 일어나면 항원의 구조가 바뀌어 종래의 백신은 효능을 가지지 못하나, 필수적인 유전자일 경우에는 이 유전자의 변형은 바이러스의 증식에 치명적인 영향을 주어 바이러스가 증식하지 못하게 되기 자연소멸된다. 따라서 백신의 제조에 이러한 essential protein을 대상으로 항원성이 검토되어야 하나 본 연구에서는 대부분의 glycoprotein의 항원성이 아직 알려져 있지 않아 항원성이 알려진 glycoprotein중에서 현재 유전자의 DNA 구조가 알려져 있지 않은 glycoprotein B, protection 기능이 없는 glycoprotein G 제외한 8 종류의 glycoprotein이 대상으로 PCR증폭에 의하여 항원 유전자의 DNA를 분리하여 발현용 vector인 pcDNA 3에 클로닝하여 재조합 DNA 백신체를 제조하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 항원 유전자 DNA 단편의 분리

Aujeszky 바이러스의 유전자중 Glycoprotein C, D, E, I, H K, L, M 유전자의 DNA 염기 서열 및 아미노산 배열은 GenBank database에 등록된 Aujeszky 바이러스의 유전자 염기서열을 이용하였다. 각 glycoprotein의 아미노산의 배열에 대한 항원성에 대하여 조사한 다음, 전체 유전자 서열 중에서 항원성을 가장 강하게 가지는 부분에 대하여 primer를 제작하고, Polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭시켜 분리하였다. PCR에 의하여 증폭이 되지 않는 DNA 배열은 primer를 다시 제작하여 사용하였고, 일부 유전자에 대하여는 증폭되는 길이를 확인하여 gel로 부터 DNA를 추출하여 재증폭시켜 분리하였다.

2. 재조합 DNA의 작성

PCR 방법으로 증폭된 DNA 단편을 fill in 반응, gel purification의 과정을 거쳐 정제한 다음 pcDNA3 발현용 벡터에 직접 클로닝하였다. 각 항원 유전자 DNA의 염기서열을 결정하여 각각의 DNA가 발현용 벡터에 정확한 방향으로 삽입되었는지의 여부와, Genebank의 염기서열과 일치하는가의 여부를 확인하여 항원으로 사용될 유전자의 분리와 클로닝을 확인하였다.

3. 재조합 DNA의 발현

PCR과 pcDNA3에 의하여 제작된 재조합 DNA가 클로닝된 항원 유전자에 의한 단백질을 생산하는가의 여부를 세포를 초음파로 파쇄한 후, SDS-PAGE 전기영동으로 전개시키고 Aujeszky 바이러스의 항체로 염색하여 확인하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. PCR에 의한 항원 유전자 DNA의 분리 및 클로닝

각가의 항원 유전자 DNA를 분리하기 위하여 PCR에 사용된 primer는 다음과 같다<표 2-2>. Primer의 제작은 각 항원 단백질의 아미노산 배열이 나타내는 항원성을 예측<그림 2-1>하여 항원성이 가장 잘 나타나는 부분에 대하여 작성하였다. PCR에 의한 증폭의 결과, glycoprotein C, 50, I, X, H의 유전자에 대한 DNA가 분리되었다<그림 2-2>. 각 재조합 DNA 백신의 항원에 대한 PCR 산물을 pcDNA 3 vector<그림 2-3>에 직접 클로닝하여 각 클론의 유전자에 대한 염기서열의 확인과 발현방향과 DNA의 삽입방향이 일치하는지의 여부를 염기서열을 결정하여 확인하였다. 염기서열을 확인한 결과 glycoprotein 50의 염기서열 중에서 Genebank에 수록된 염기서열과 한 염기가 다른 것으로 나타났다<그림 2-4>. 변화된 염기서열의 번역은 Ala이 Glu으로 바뀐 것으로 그 이외의 염기서열과 아미노산 서열에는 변화가 없었다.

PCR에 의하여 증폭된 항원 유전자 DNA의 염기서열과, 클로닝된 방향의 확인을 위해 각 클론당 8~16개의 클론에 대하여 염기서열을 결정하였다. PCR에 의하여 증폭할 때 polymerase에 의하여 염기가 잘못 인식되는 경우가 있기 때문에 염기서열을 확인하지 않을 경우 잘못 인식된 항원의 DNA를 사용하는 오류를 범할 수 있다. 따라서 각 클론에 대해 다수의 염기서열을 분석하여 genebank의 염기서열과 비교하였다. 염기서열 분석 결과 glycoprotein H, I, X, C에서는 염기의 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 glycoprotein 50의 경우에는 하나의 염기가 다른 것이 12개의 클론에서 확인되었으며 이 염기의 변화는 아미노산으로 번역시에 Ala이 Glu로 변화한다. 이 염기의 변화는 클로닝된 PCR 산물의 12개의 클론에서 나타나는 것으로 미루어 pseudorabies 바이러스 NYJ strain의 고유 염기서열로 인정된다. 그러나 이러한 아미노산의 변화에 따른 항

원성의 예측 결과 항원성에는 변화를 주지 않는 것으로 나타나 새로운 염기서열을 포함하는 DNA를 항원으로 사용하였다. glycoprotein K, L, M에 대한 유전자 DNA는 각각 3종류의 primer와 각 primer를 혼합한 nested PCR을 시도하였으나 분리할 수 없었다. 이러한 과정을 통해 8 종류의 glycoprotein 중 glycoprotein I, 50, C, X, H의 5 종에 대한 재조합 DNA를 제조하였다.

2. 항원 유전자의 발현

항원 유전자가 클로닝되어 있는 pcDNA 3 vector에는cloning site의 전후로 클로닝된 유전자의 DNA를 발현시키기 위한 구조로 CMV바이러스의 promotor와 bovine growth hormone의 poly(A) signal을 가지고 있으며, 또한 세포에서 항원으로 인식을 용이하게 하기 위한 poly-Histidine tag를 가지고 있어 DNA 백신용으로 적합한 구조를 가지고 있다. pcDNA 3vector를 이용하여 제조한 재조합 DNA가 세포내에서 발현하는지의 여부를 확인하기 위해 재조합 DNA의 클론을 배양, 회수하여 전기영동으로 단백질을 전개한 다음 PRV의 항체를 이용하여 western blotting 방법에 의하여 발현여부를 확인하였다<그림 2-5>.

항체는 초음파 분쇄한 pseudorabies 바이러스를 토끼에 주사하여 분리하여 사용하였다.

western blotting의 결과 각 재조합 DNA는 예상되는 길이의 단백질을 생산하는 것으로 확인되었다.

제 4 절 적 요

재조합 DNA 백신을 제조하기 위하여는 1)적합한 항원을 선택하였는가, 2)정확한 구조의 항원 유전자를 발현시킬 수 있는가, 3)재조합 DNA가 정확하게 발현하고 있는가의 문제가 검토되어야한다.

단백질의 항원성에 대한 예측은 생물체마다 다른 경향을 나타내고 있어 정확하게 예측할 수 있는 방법이 아직 개발되어 있지 않으나 단백질의 고차구조중 단백질의 표면에 위치할 수 있는 구조를 가지는 부분이 강한 항원성을 나타내는 경향이 있어 친수성 아미노산으로 구성된 부분을 항원인식부위로 선택한다. 따라서 이러한 이론적인 배경에 의하여 재조합 DNA 백신을 제조하기 위한 유전자의 항원성 computer program을 사용하여 예측하였다. 정확한 구조의 항원 유전자의 확인은 일반적으로 항원으로 사용될 수 있는 단백질은 단백질 전체 구조 중에서 일부에 지나지 않으므로 전체 유전자의 구조보다 항원성이 강한 부위의 DNA 배열을 PCR로 증폭시켜 사용한다. 이 경우 PCR 증폭을 위한 primer 작성시 vector의 발현구조와 클로닝한 후 발현될 단백질의 구조가 정확한가의 여부는 이단계에서 확인되어야 한다. PCR 증폭은 적은 양의 template DNA를 사용하여 실험자가 원하는 크기의 DNA를 증폭시킬 수 있는 장점이 있으나 polymerase의 특성상 염기를 잘못 인식하는 경우가 있으며, 또한 클로닝되는 DNA에 일정한 방향으로 삽입되는 구조가 없을 경우가 있어 이러한 문제점은 다량의 클론의 염기서열을 결정하여 항원유전자의 염기서열의 적합성과 방향성이 확인되어야 한다.

이러한 문제점은 다수의 클론을 대상으로 하여 염기서열을 결정하고 각각의 염기서열의 정확성을 비교함으로써 해결될 수 있다. 항원 유전자의 발현은 유전자의 발현을 위한 vector를 개발하는 것은 많은 노력과 시간이 필요하므로 클로닝된 항원 유전자의 분석이 정확히 이루어졌을 경우에는 시판되는 vector중에

서 목적에 맞는 vector를 선택하여 사용할 수 있다.

제 5 절 그림 및 표

<표 2-1> Aujeszky 바이러스 항원성 단백질의 면역유도 기능

Protein	Protection		NT-C ^a	NT+C ^b	CTL(MHC-I) ^c	CTL(LAK) ^d
	Mice	Pigs				
glycoprotein B	+	+	+	+	?	+
C	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	?	-
E	+	?	-	+	-	?
G	-	-	-	-	-	?
H	?	?	?	?	?	?
I	?	?	-	?	-	?
K	?	?	?	?	?	?
L	?	?	?	?	?	?
M	?	?	?	?	?	?

a: 보체를 투여하지 않을 경우에 있어서 단일클론항체에 의한 중화반응

b: 보체를 투여할 경우에 있어서 단일클론항체에 의한 중화반응

c: 조직 주요적합항원에 의한 세포독성반응

d: 조직 주요적합항원에 의하지 아니한 세포독성반응

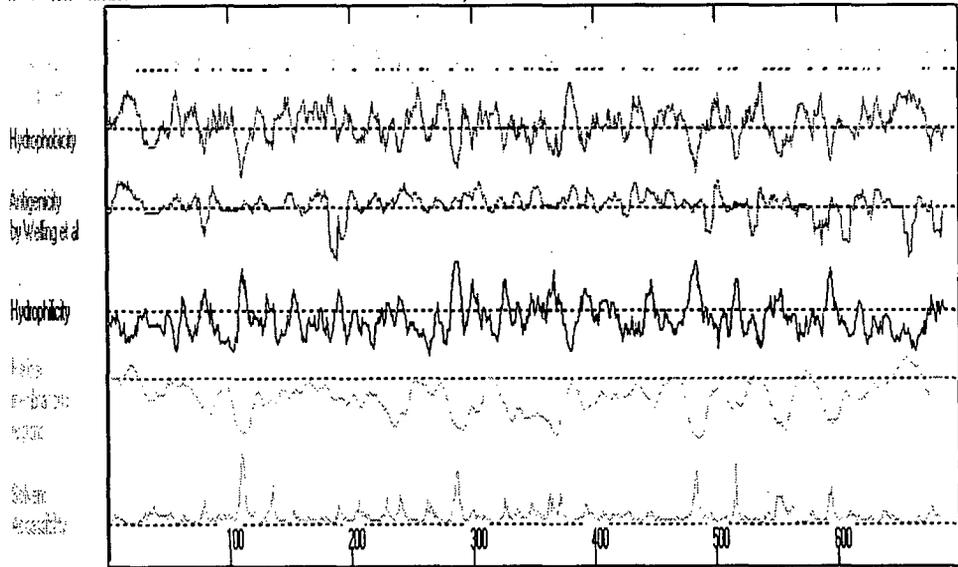
<표 2-2> 항원 유전자 분리를 위한 primer의 염기서열

Gene	primer	nt length(bp)
Glycoprotein H	for: ANNATGGAGGAGGAGGAGGAGGACC	602
	rev: AATAGCCCTCGGAGGAGAAG	
Glycoprotein 50	for: ANNATGGAGGGCCAGTACCGGCGCCT	654
	rev: GAAGAAGATGTAGACGCACACG	
Glycoprotein X	for: ANNATGGAGGCCAACCTGGACTACCCC	759
	rev: GATGTGGCGGCTCTTCTG	
Glycoprotein C	for: ANNATGGAGGGAGA AACTCTCGCCCTC	581
	rev: TACAGGAGGAGCGAGACGTT	
Glycoprotein I	for: ANNATGGCGGGACGAGCATGCTCTCT	300
	rev: CACCGAATAGTTGGGTCCAT	
Glycoprotein K	for: ANNATGGCTCGAGTCCACCCGCTGCATCA	552
	rev: TTCTCCACGCTGTAGCCGCG	
Glycoprotein L	for: ANNATGGGGATCTTTGCGCTATT	480
	rev: CCGGCTGCTGC	
Glycoprotein M	for: ANNATGGATGCAGCTAGCTGCCA	520
	rev: GGCGTATCATATGAACGC	

NQ1 AA: MPASSV

349

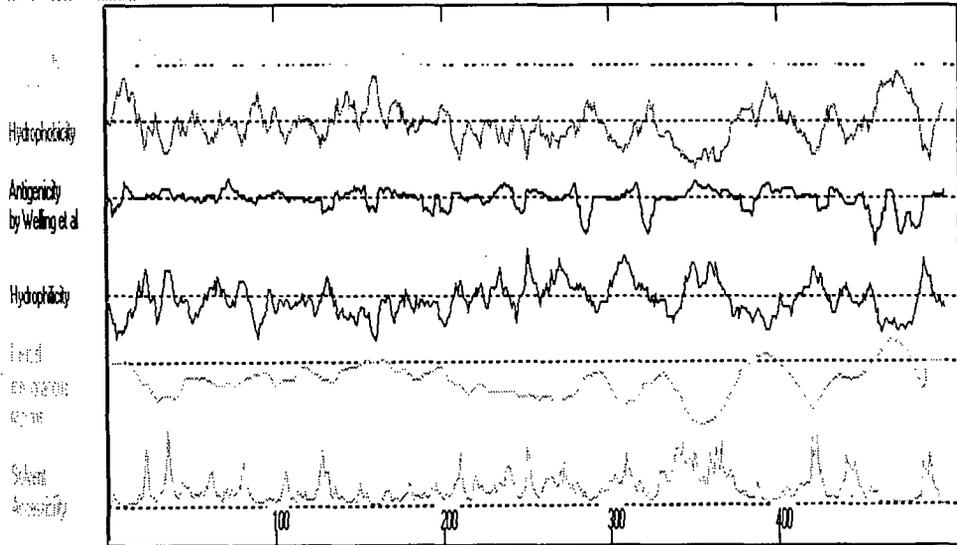
3



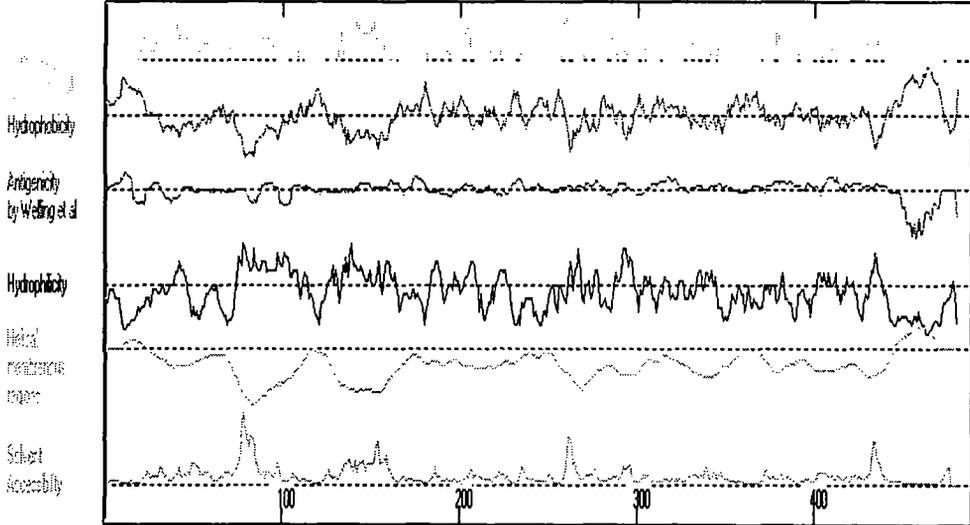
NQ1 AA: MKWATW

178

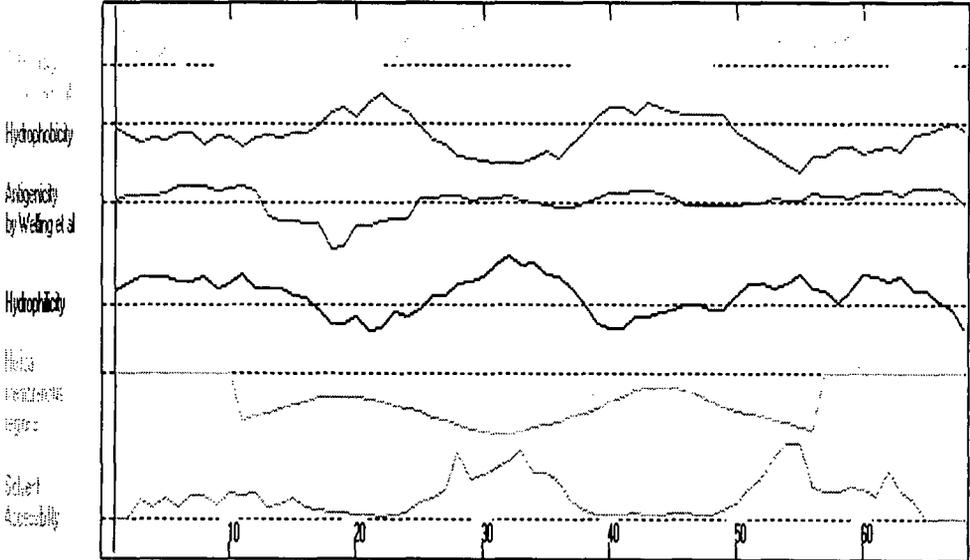
2

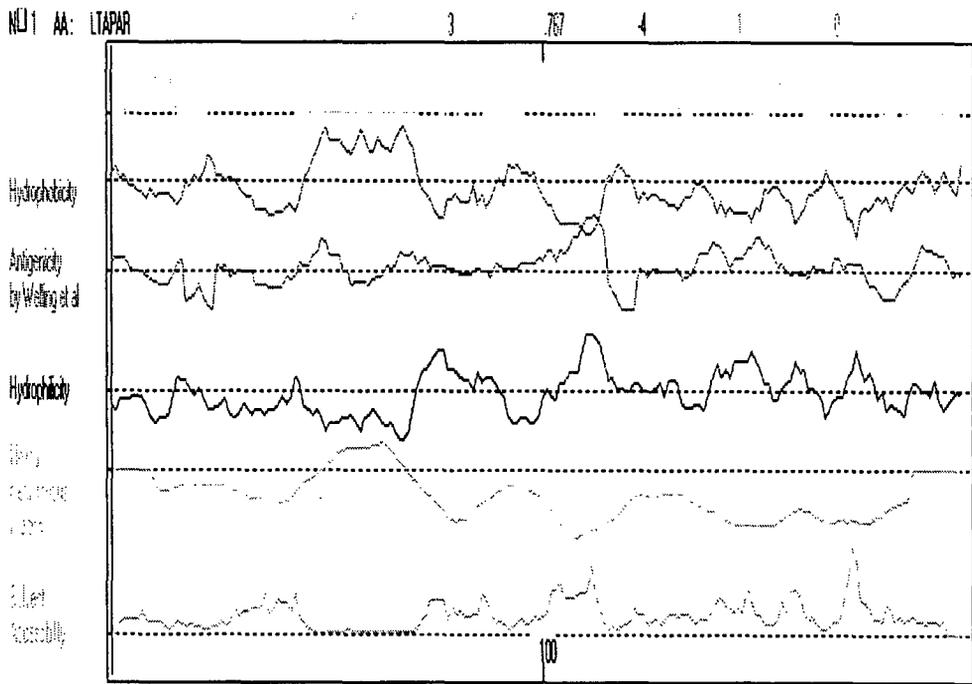


NI01 AA: HASLAR



NI01 AA: EGDVDE

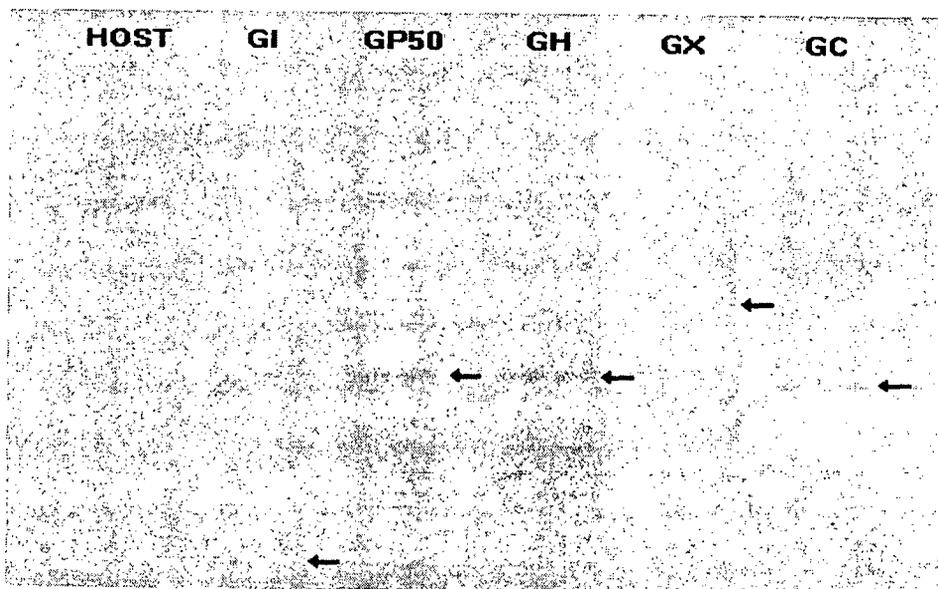




<그림 2-3> 항원 유전자의 항원성 분석

genebank	GGCCAGTACCGGCGCCTGGTGTCCGTCGACGGCGTGAACGTCCTCACC GACTTC
	Gly Gln Try Met Glu Gly Gln Try
cloned gp50	AGTATGGAGGGCCAGTACCGGCGCCTGGTGTCCGTCGACGGCGTGAAC GTCCTCACCGACTTC
genebank	ATGGTGGCGCTCCCCGAGGGGCAAGAGTGCCCGTTCGCCCGCGTGGACC AACACCGCACGT
	Met Val <u>Ala</u> Leu Pro Glu Met Val <u>Glu</u> Leu Pro Glu
cloned gp50	ATGGTGGT <u>G</u> GCTCCCCGAGGGGCAAGAGTGCCCGTTCGCCCGCGTGGAC CAACACCGCACGT

<그림 2-4> PCR에 의하여 분리된 항원 유전자의 염기서열의 분석



<그림 2-5> 재조합 DNA의 발현

제 3 장 재조합 DNA 백신의 효과 검증

제 1 절 서 설

항원 유전자의 발현과 재조합 DNA 백신의 항원성은 1) 항원 운반체, 특히 항원유전자를 발현시킬 수 있는 promoter의 종류에 따르는 vector의 선택, 2) 접종방법, 3) 항원이 발현되는 조직, 4) 항원이 발현된 후의 위치 즉 분비되는나, 세포막과 결합된 상태 또는 세포질내에 머무르고 있는나의 요인에 의하여 영향을 받을 수 있다. 항원의 운반체로는 금 입자(gold particle, 직경 1 μ m)가 주로 사용되었다. DNA를 coat한 금 입자를 표면에 강하게 분사하여 세포내에 유입시키는 방법으로 백신운반체를 위한 구조- promoter-와 안정성에 대한 연구에 사용되어 졌으나 현재에는 Vical 등에 의하여 개발된 근육주사의 방법이 사용되고 있다. 즉 접종된 재조합 DNA는 아직 확실히 밝혀지지 않은 원리에 의해 세포내로 유입되고 세포내의 재조합 DNA는 핵으로 이행하여 재조합 유전자를 발현하게된다. 항원의 발현은 promoter의 종류에 의해 많은 영향을 받는다. Chen등은 다양한 promotor을 luciferae와 연결하여 재조합 DNA 유전자의 발현양상에 대하여 검토하였다. pNASSluc(no promoter), pADluc(adenovirus type 2 major promoter), pCMVluc(Raus Sarcoma virus long terminal repeat), pSVluc(Simian 40 early enhancer promoter), pMLVluc(Murine leukemia virus longterminal repeat), pmMTVluc(murine metallothionein gene promoter), pPEPluc(mouse phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter), pBLGluc(bovine beta lactoglobulin gene promoter), pPLluc(bovine prolactin promoter), pPGKluc(mouse phosphoglycerate kinase gene promoter)의 각각 유래가 서로 다른 promoter를 사용하여 rat, 토끼, 쥐 등의 실험동물과 또한 각 실험동물의 조직별로 재조합 유전자의 발현과 안정성에 대하여 조사하였다. 조직별로는 상피세포, 표피세포, 근육세포, 간, 췌장에서 가장 잘 발현되는 것으로

나타났으며, promoter의 종류별로는 각각의 조직에 대한 특이성을 나타내고 있으나, 쥐에서 cytomegalovirus immediate early promote가 각각의 조직에서 제일 높은 활성을 나타내었다. EH한 pPEPluc gene promoter와 pmMTluc gene promote는 간에서 luciferase의 활성이 5일동안 관찰되었다.

재조합 백신에 의한 면역반응에 영향을 주는 요인은 재조합 DNA백신이 발현되는 위치이다. 세포내에서 분비단백질인 influenza virus NP gene 또는 HIV gp120 유전자를 DNA백신으로 사용하였을 경우에 DNA 백신은 항체를 형성하는 반면 비분비 항원의 경우에는 항체를 검출할 수 없었다. 이러한 결과는 재조합 DNA 백신의 유전자가 세포내에서 발현하여 세포외로 분비된 다음 임파절로 이행하여 체액성면역을 유발하는 것으로 추론된다. 재조합 DNA 백신의 체액성 면역에 대한 연구가 활발한 것은 항체의 확인이 가능하기 때문으로 세포성 면역에 대한 연구는 복잡한 기전 때문에 아직 영구가 되고 있지 않다.

재조합 DNA 백신에 대하여 고려되어야 할 점은 안전성의 문제이다. 현재까지의 연구에 의하면 plasmid DNA는 핵내에서 염색체와 별도로 존재하며 숙주의 염색체에 삽입되는 가능성은 없는 것으로 알려져 있다. plasmid가 숙주의 염색체 내로 삽입될 가능성은 세포분열이 진행중일 때 가능하며 근육세포와 같이 세포분열이 종료된 조직에서는 염색체내로의 삽입은 일어나지 않고, 또한 재조합 DNA 백신을 투여한지 19개월 지난 조직에서 plasmid를 분리하여 PCR 방법으로 확인된 점등으로 미루어 plasmid가 염색체내로의 삽입되는 경우는 없을 것으로 판단된다. 또다른 안전성에 관한 문제로 자가 면역질환(auto immune disease)처럼 재조합 DNA백신체에 대한 anti DNA 항체가 생성될 가능성이다. 그러나 현재까지 이중나선구조의 DNA는 항원성을 가지지 않는 것으로 알려져 있으며 영장류를 대상으로한 이중나선 DNA의 항원성 검사에서는 항체가 생성되지 않는 것이 확인되어 있으나 재조합 DNA 백신의 auto immune disease 가능성에 대하여는 지속적인 연구가 필요하다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 재조합 DNA 백신의 추출과 접종

재조합 DNA의 추출은 4 liter 배양액으로부터 추출하여 qiagen columne을 사용하여 분리하여 사용하였다. 재조합 DNA의 백신의 효능을 검증하기 위하여 pseudorabies virus에 감수성이 높은 rat를 사용하였으며 유전자형이 일정한 순계가 아닌 잡종 실험용 rat를 사용하였다. 재조합 DNA의 접종은 근육주사로 하였으며 DNA는 200 μ l의 일정한 saline 용액에 농도별로 희석하여 사용하였다.

2. 항체의 검출

항체의 검출은 재조합 DNA 백신을 1 주간격으로 3회 접종한 후에 미혈관으로부터 혈액을 채취하여 SDS-PAGE로 전개한 클론의 단백질에 대해 western blottin 방법을 사용하였다.

3. 항체의 효과 검증

바이러스를 감염시킨 쥐에 10 μ g ~ 240 μ g의 DNA를 근육 주사한 뒤 생존기간을 확인하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 항체의 검출

항체의 검출은 각가의 재조합 DNA 클론을 파쇄하여 SDS-PAGE전기영동으로 전개한 다음 western blot로 수행하였으나 항체의 생성은 확인되지 않았다. 본 연구에서 제작한 재조합 DNA의 항원이 막을 구성하는 단백질로 세포내에서 발현되는 것은 확인되었으나 Vogel등에 의한 보고에도 확인된 바와 같이 세포 밖으로 분비되지 않아 임파절에서의 체액성 면역반응이 일어나지 않았거나 혹은 면역반응이 일어났다 하더라도 검출할 수 없을 만큼 미약한 상태일 것으로 판단된다. 이러한 결과는 pseudorabies virus가 감염된 후 신경세포에서 증식하여 다음 세포로 이행할 때 혈액에 노출되지 않고 신경절을 따라 전체 신경세포에 감염되는 것을 고려하면 바이러스의 감염에 의하여서도 체액성 면역반응은 일어나지 않을 것으로 판단된다. 따라서 pseudorabies virus에 대한 면역작용은 세포성 면역반응에 의한 것으로 판단된다.

2. 생존 검사

pseudorabies virus에 대한 면역작용이 세포성 면역반응에 의한 현상으로 가정하여 1)재조합 DNA백신의 예방효과를 검증하기 위하여 백신의 접종 후에 바이러스를 감염시키는 경우와 2) 치료효과를 검증하기 위하여 백신의 바이러스의 감염 후에 백신을 접종하여 rat의 생존기간을 조사하므로써 세포성 면역에 의한 백신의 효과를 검증하고자 하였다.

각 재조합 DNA 백신에 대하여 각각 5 마리씩의 rat 실험군에 재조합 백신만을 투여하였을 경우에 모든 실험군이 4주 이상 생존하였으며 2.3×10^7 pfu/200 μ l 바이러스를 접종한 군에서는 평균 7.2 일의 생존기간을 나타내어 사용한 바이러스가 독성을 가지고 있으며 재조합 DNA 백신은 실험동물에 독성작용

을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

가) 백신을 접종 후에 바이러스의 감염

백신으로써의 예방 효과를 검증하기 위해 백신을 접종한 2일 후에 바이러스를 감염 시켜 면역반응을 유도시킨 다음 생존기간을 측정하였다<그림 3-1>.

위의 실험에서 바이러스를 감염시킨 후에 재조합 DNA의 vector인 pcDNA와 백신 DNA의 용매인 saline을 접종한군과 rat에 바이러스만을 투여한 군에서는 생존기간이 평균 6.8일 에서 7.5일로 나타나 감염시킨 바이러스가 독성을 나타내고 있는 것이 확인되었으며 pcDNA의 양을 재조합 DNA과 동일한 양을 투여하여도 saline과 바이러스만을 투여한 대조군과 거의 동일한 생존기간을 나타내어 pcDNA 단독으로는 바이러스에 대하여 면역작용을 유도하지 않는 것이 확인되었다. 각 재조합 DNA 백신은 항원의 종류와 접종량에 따라 rat의 생존기간이 차이를 나타내었다. 항원의 종류별 생존기간은 접종한 백신의 양에 따라 다소의 차이를 보이고 있으나 glycoprotein I 접종군은 평균 생존기간이 7.0일에서 9.2일, glycoprotein H접종군은 7.0일에서 8.9일, glycoprotein X는 7.5일에서 9.9일로 대조군에비해 생존기간이 약 28%정도 증가하는 경향을 보이는데 그쳤으나 glycoprotein 50 는 7.2일에서 18.1일 155%, glycoprotein C는 생존기간이 7일에서 17.9일로 155%의 증가비율을 보이고 있어 대조군에 비하여는 유의할 정도의 생존기간 연장을 보이고 있는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 <그림 3-2>에서 나타났듯이 glycoprotein I, H, X의 경우에는 투여량에 미약한 증가를 보이고 있으나, glycoprotein 50과 C의 경우에는 대조군과는 생존기간의 증가에 있어서 현저한 차이를 보이고 있다. 또한 glycoprotein 50과 glycoprotein C의 항원성에 있어서 glycoprotein 50은 120 ug 이상의 접종량에서는 변화를 보이고 있지 않으나, glycoprotein C의 경우에는 증가하는 경향을 보이고 있다. 이러한 경향은 어느정도 항원의 백신으로서의 효능을 짐작할 수 있으나 더 많은 양의 재조합

DNA를 접종한 결과와 장기간의 검사기간이 필요할 것으로 판단된다.

나) 바이러스의 감염 후에 백신을 접종

재조합 DNA백신의 치료효과를 검증하기 위해 바이러스의 감염 전에 백신을 접종하여 면역반응을 유도시킨 다음 바이러스를 감염시켰다<그림 3-3>.

이 실험에서도 백신을 접종한 후 바이러스를 감염시킨 경우와 유사한 경향을 나타내고 있었다. 바이러스의 독성을 확인하는 실험에서 재조합 DNA의 vector인 pcDNA와 백신 DNA의 용매인 saline 그리고 바이러스만을 투여한 군에서는 생존기간이 평균 6.8일 에서 7.5일로 감염시킨 바이러스가 독성을 나타내고 있는 것이 확인되었으며 pcDNA의 양을 재조합 DNA과 동일한 양을 접종한 군에서 평균생존기간이 6.8일~7.3일로 saline과 바이러스만을 투여한 대조군의 생존기간 7.2일과 동일한 생존기간을 나타내어 전장의 실험과 동일하게 pcDNA 단독으로는 바이러스에 대하여 면역작용을 유도하지 않는 것으로 확인되었다. 이 실험의 결과에서도 선백신 후접종의 결과와 유사하게 각 재조합 DNA 백신은 항원의 종류와 접종량에 따라 다소의 차이를 보이고 있는데 전체적으로 선접종 후감염의 결과보다 생존일 수가 짧게 나타났다. glycoprotein I 접종군은 평균 생존기간이 6.8일에서 8.8일, glycoprotein H접종군은 7.0일에서 8.9일, glycoprotein X는 6.9일에서 8.8일로 대조군에비해 생존기간이 약 27%정도 증가하는 경향을 보이는데 그쳤으나 glycoprotein 50 는 7.5일에서 15.3일로 104%, glycoprotein C는 생존기간이 7.2일에서 16.8일로 133%의 증가비율을 보이고 있어 대조군에 비하여는 유의할 정도의 생존기간 연장을 보이고 있는 것으로 나타났다. 선접종 후감염의 평균 생존기간보다 단축되는 경향이 있어(240 ug을 접종하였을 경우 glycoprotein 50을 투여한 군의 평균생존기간은 평균 18.1일에서 15.3일로, glycoprotein C를 투여한 군의 평균생존기간은 17.9일에서 16.8일) 본 과제에서 제작된 재조합 DNA 백신은 예방효과가 큰 것으로 나타났다.

다) glycoprotein 50과 glycoprotein C의 동시 투여에 의한 백신의 예방효과
일려의 실험을 통하여 재조합 DNA 백신중에 glycoprotein 50과 glycoprotein C
를 항원으로한 재조합 DNA 백신이 pseudorabies 바이러스에 대한 예방효과가
있는 것으로 나타나 두가지 재조합 DAN 백신을 동시에 접종할 경우 백신의 상
승작용이 기대되어 선접종 후 감염의 방식으로 백신효과를 검증하였다. 이 실험
에서는 백신으로써의 효과가 가장 잘 나타내는 $240\mu\text{g}/200\mu\text{l}$ 의 범위에서 검증하
였다<그림 3-4>. 또한 앞서의 실험에서 pcDNA vector와 saline를 접종한 군에
서 rat에 독성을 나타내지 않을 뿐아니라 재조합 DNA의 백신작용에도 영향을
주지 않는 것으로 나타나 바이러스의 독성확인을 위한 대조군만을 사용하였다.
glycoprotein 50과 glycoprotein C의 동시접종에 의한 백신의 효과는 <그림
3-4>에서 보이는 바와 같이 각각의 glycoprotein 항원을 단독으로 접종하였을
경우보다 약 18%(3일)가 증가하였다.

제 4 절 적 요

재조합 DNA의 백신 효능을 검증한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 연구의결과 5종류의 glycoprotein을 항원으로 사용하여 면역작용을 유도한 결과 항체의 생성을 인정할 수 없어 본 연구에서 제작된 재조합 DNA 백신의 면역작용은 세포성 면역이 주로 작용하며 세포성 면역은 작용을 하지 않거나 미약할 것으로 예측된다.

2. 5 종류의 glycoprotein에 대한 재조합 백신을 접종한 rat의 생존기간의 측정된 결과 항원의 종류에 따라 면역효과가 다르며 glycoprotein 50과 glycoprotein C의 재조합 DNA가 유의성있는 생존기간 연장을 보이므로써 백신의 효과를 나타내었다.

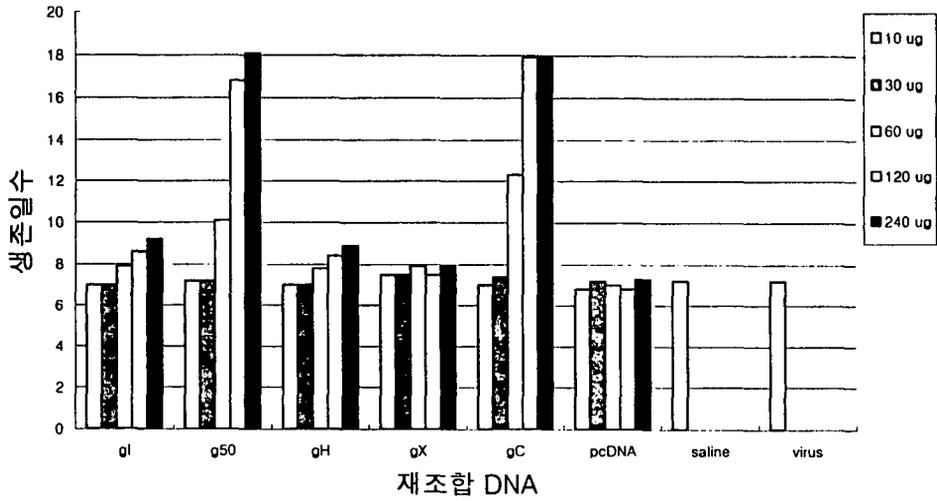
3. glycoprotein 50과 glycoprotein C의 백신효과는 백신 접종 후 바이러스를 감염시켰을 경우가 바이러스 감염 후에 백신을 투여하는 것보다 백신의 효과 증가하는 점으로 미루어 치료효과보다 예방효과가 큰 것으로 판단된다.

4. glycoprotein 50과 glycoprotein C의 동시 투여에 의한 백신효과의 상승작용은 미약한 증가를 나타내었다.

5. glycoprotein 50과 glycoprotein C의 백신작용을 비교하면 glycoprotein 50의 재조합 DNA 백신은 100 μ g이상의 접종시에는 백신의 효과가 거의 증가하지 않는 것으로 미루어 재조합 DNA의 백신효과는 glycoprotein C의 재조합 DNA가 효과적인 것으로 나타났다.

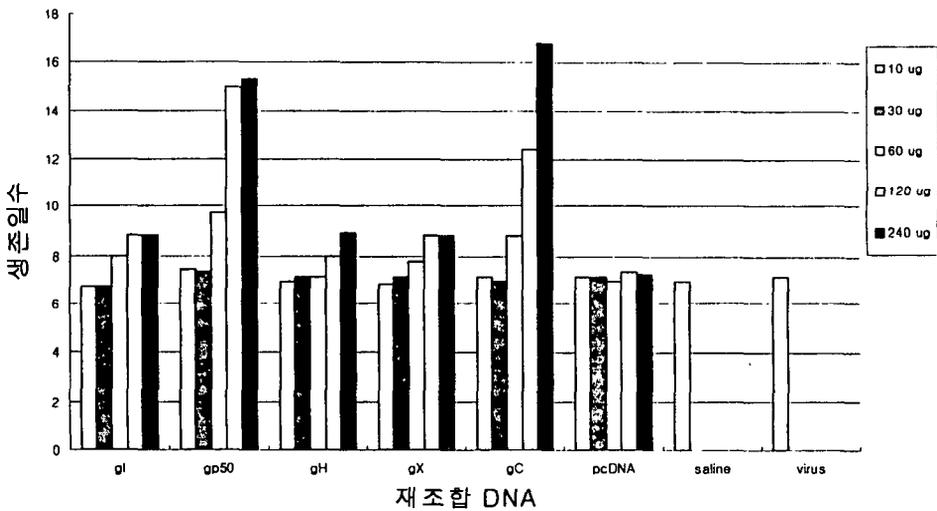
제 5 절 그림 및 표

백신접종 후 바이러스감염에 의한 효과



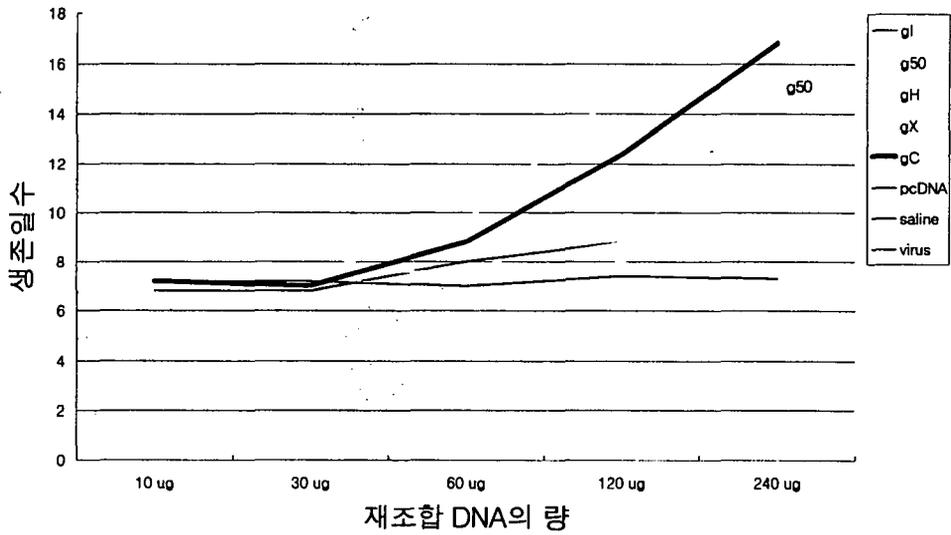
<그림 3-1> 백신 접종 후 바이러스를 감염시켰을 경우의 재조합 DNA 농도별 생존일수

바이러스 감염 후 백신접종



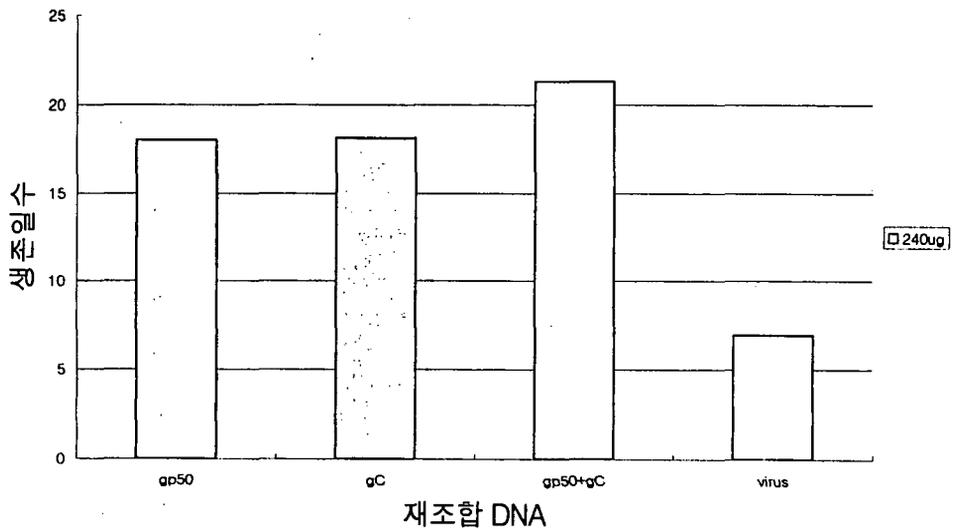
<그림 3-3> 바이러스를 감염 후 백신 접종을 하였을 경우의 재조합 DNA 농도별 생존일수

백신의 접종량에 따른 생존기간



<그림 3-2> 접종한 재조합 DNA 양에 따른 생존일수의 변화

gp50과 gC의 동시접종에 의한 백신효과



<그림 3-4> glycoprotein 50과 glycoprotein C의 동시 접종에 의한 면역효과

제 4 장 항원 분리를 위한 PRV genome의 해석

제 1 절 서 설

Pseudorabies 바이러스(PRV)의 genome는 이중쇄(double strand)로 약 130kb의 길이로 추정된다. 대부분의 PRV는 unique long region(U_L)과 역으로 반복되는 배열을 가진 unique short region(U_S)의 두부분으로 구성된 herpesvirus의 type 2의 구조를 가지고 있으며 약 70여개의 유전자가 있을 것으로 추정되고 있다. 현재까지 분리된 유전자는 40여개로 trascro[topm factors, regulatory proteins, enzymes 와 DNA의 복제에 관여하는 효소들, 그리고 바이러스의 조합에 관계되는 단백질들이다. 각 단백질의 기능은 바이러스 표면의 glycoprotein을 이용하여 바이러스가 신경세포에 대한 특이적인 인식과 침입의 기전에 대하여 연구되고 있다. 바이러스의 독성에 대한 연구는 가축중에서 특히 돼지에게 감수성이 강한 것으로 알려져 있으나 성돈에게는 거의 영향을 나타내지 않고 자돈이나 임신돈의 유산 또는 사산을 일으키는 정도로 가볍게 인식되고 있으며 또한 PRV가 사람에게 감염되더라도 독성을 나타내지 않기 때문에 사회적으로도 관심을 가질만한 임상적인 비중이 낮은 관계로 항원성에 대한 연구는 활발하게 이루어지지 않고 있는 실정이다. 대신 PRV가 신경친화성을 가지고 있어 유전공학적으로 독성을 제거한 PRV의 genome를 사용하여 신경해부학적 용도로 사용되고 있다. 현재까지 항원성에 대한 연구는 바이러스 표면의 glycoprotein을 중심으로 이루어져 glycoprotein II, III, 50, I, X, H, 63, K, L, M등의 단백질에 대한 항원성 특히 신경세포에의 감염을 중심으로 연구되어졌다. 그러나 각 glycoprotein의 체액성 또는 세포성 면역에 대하여는 glycoprotein B, C, D, G에 대하여 알려져 있을 뿐이다. 항원성은 각 glycoprotein에 따라 다양하게 나타나고 있다, glycoprotein G의 경우는 항원성을 전혀 나타내지 않는 것으로 알려져

있으며, glycoprotein C의 경우는 보체에 의한 반응이나 세포독성에 의한 면역작용을 가지는 것으로 나타났다. glycoprotein B의 경우는 체액성면역이나 일부 세포성면역을 유도하는 것으로 알려져 있으나 아직까지 MHC-I에 의한 현상인지의 여부는 알려져 있지 않다. glycoprotein E의 경우는 실험용 쥐에서는 방어작용을 나타내나 돼지에서는 아직까지 확인되지 않았으나 실험용 쥐에서는 MHC-I에 의존하지 않는 면역반응이 없다는 것은 알려져 있으나 MHC-I 의존성에 대하여는 알려져 있지 않다. 이상 연구 결과에서 보는 바와 같이 현재 분리된 항원성 단백질에 대한 숙주의 반응이 다양하게 나타나기 때문에 PRV에 대한 재조합 DNA 백신의 제조에 있어서 효과 있는 백신의 제조를 위해서는 다양한 항원의 분리가 필요하다. 항원의 분리는 바이러스를 배양하여 추출한 단백질을 사용할 수 있으나, 주의의 환경이 PRV의 유출로부터 보호되어야 하며 바이러스의 입자는 동물세포에 감염시켜 얻기 때문에 많은 경비와 시간을 필요로 하기 때문에 실용성이 적다. 현재 여러 연구자에 의하여 개발단계에 있는 재조합 DNA 백신은 단백질이 아닌 항원성이 있는 유전자의 DNA 배열을 이용하여 숙주내에서 항원 단백질을 생산하기 때문에 단백질을 직접 사용하는 방법보다 안전하며 백신생산에 있어서 효율이 좋은 장점이 있다. 또한 최근에 분자생물학의 기술과 연구내용이 비약적으로 발전함에 따라 유전자의 염기서열로부터 유전자의 구조를 파악할 수 있으며 또한 발현되는 단백질의 구조도 예상할 수 있어 항원의 염기서열을 확보하여 분석함으로써 효과 있는 재조합 DNA 백신을 제조하기 위한 항원 유전자를 분리할 수 있는 길이 열렸다. 본 장에서는 이러한 배경으로 PRV의 genome의 염기서열을 분석하여 재조합 DNA 백신을 제작하기 위한 항원의 분리를 시도하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. PRV바이러스의 cosmid library 제작

바이러스는 국내에서 분리한 NYJ strain을 사용하였다. PRV를 배양한 후 DNA를 추출하여 제한효소 Sau 3AI으로 부분분해하였다. DNA를 클로닝하기 위한 vector로는 pWEDN1 cosmid vector<그림 4-1>를 사용하였다. Library에 포함된 cosmid clone을 genome의 배열과 동일한 순서로 연결하기 위하여 cosmid DNA를 제한효소 Ban I-Msp I으로 처리하여 finger printing의 pattern을 비교하여 aujeszky바이러스의 전체 genome을 포함하는 cosmid contig map의 작성하였다.

2. 염기서열 결정

염기서열을 결정하기 위한 sub library의 제작은, 작성한 contig map의 결과에 의하여 aujeszky바이러스의 전체의 길이를 포함하는 4개의 cosmid 클론중 2개의 cosmid 클론에 대하여 DNA를 분리하고, 초음파로 절단하여 pBluescript plasmid 벡터에 클로닝하여 제작하였다. 클로닝된 DNA단편의 평균 길이는 1.2kb로 각각의 cosmid 클론에 대하여 500개의 클론을 분리하여 염기서열을 결정하였다. 작성된 cosmid DNA의 sublibrary에서 분리한 plasmid에 대하여 Dideoxy chain termination의 방법으로 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 결정하기 위한 primer로 M13의 forward primer와 reverse primer를 사용하였다.

3. 염기서열의 분석과 연결

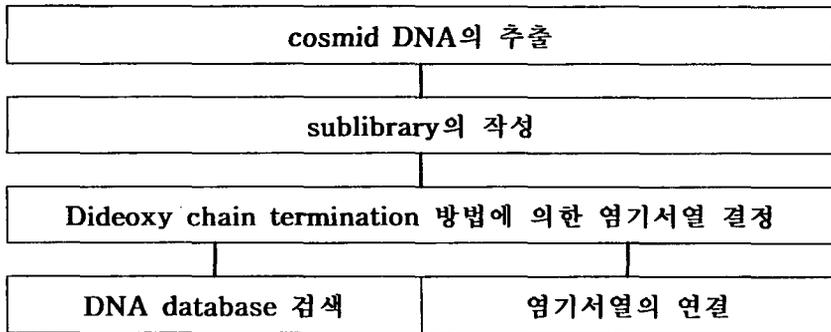
확인된 염기서열의 분석은 생명과학연구소 genepool의 blast 검색 program (<http://genome.kribb.re.kr/>)을 사용하였고 연결은 contig program을 사용하였고

검색 조건은 유전자의 규명을 보다 정확히 하기 위하여 E-value가 e^{-06} 이하의 값을 가지는 유전자에 대하여 선별하였다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 염기서열 결정

cosmid contig map에 의하여 순서가 결정된 cosmid 클론<그림 4-2, 4-3, 4-4> 중 4A01, 3F08, 4G01의 cosmid 클론을 선택하여 DNA의 염기서열을 결정하였다. 염기서열과 분석은 다음과 같은 순서로 수행하였다.



2. 염기서열 분석에 의한 항원 유전자의 분리

염기서열 분석에 의해 PRV의 염기서열 중 재조합 DNA백신의 항원으로 활용될 가능성이 있는 다음과 같은 유전자가 분리되었다.

가. 3D12 : *A.pleuropneumoniae* omlA gene 상동성 94%

oml 단백질은 세균의 outer membrane를 구성하는 단백질 중의 하나로 세균에 있어서 항원성을 결정하는 단백질도 작용하기 때문에 재조합 DNA 백신의

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
emb Y12810 APOMLAS11 <i>A.pleuropneumoniae</i> omlA gene, partial, str...	155	2e-36
> emb Y12810 APOMLAS11 <i>A.pleuropneumoniae</i> omlA gene, partial, strain	Length = 660	
Score = 155 bits (78), Expect = 2e-36		
Identities = 106/112 (94%), Positives = 106/112 (94%), Gaps = 5/112 (4%)		
Query: 1 agtaacgaatgcaattccaaccaagatattaaacctt-aaagattctcagglaa--- 5		
Sbjct: 121 agtaacgaatgcaattccaaccaagatattaaacctt-aaagattctcaggtaaatt 180		
Query: 57 attaggttattatgg-tatatgcaacttagtcaagtaagacaagatgagtct 107		
Sbjct: 181 attaggttattatggatattatgcaacttagtcaagtaagacaagatgagtct 232		

항원으로도 사용될 수 있는 가능성이 매우 높은 단백질이다.

나. 10B01 : Equine herpesvirus type 4 genes 13 gene 상동성 96%

PRV는 alpha herpesvirus로 다른 속의 herpes virus와 유사한 구조를 가지고 있어 10B01은 PRV의 아직까지 밝혀지지 않은 새로운 glycoprotein으로 PRV의 다른 glycoprotein과 같이 항원으로 사용할 수 있는 가능성이 많다

Sequences producing significant alignments:		(bits)	Value
emb A21044 A21044 Equine herpesvirus type 4 g13 gene.		289	9e-77
Score = 289 bits (146), Expect = 9e-77			
Identities = 179/186 (96%), Positives = 179/186 (96%), Gaps = 3/186 (1%)			
Query: 1	atataatgcgattcataacatttgcgtatataatctgtggggggttatattaacagca 60		
Sbjct: 65	atataatgcgattcataacatttgcgtatataatctgtggggggttatattaacagca 124		
Query: 61	cgctctgggaccagtgc-agcgccagt-cagccacaccaccaccaataactggcgaaggca 118		
Sbjct: 125	cgctctgggaccagtgcagcgccagtccagccacaccaaccacaataactggcgaaggca 184		
Query: 119	ccagttctccagtcacaccaacttacacaaccagtagcgactctaataa-tcaacagcca 177		
Sbjct: 185	ccagttctccagtcacaccaacttacacaaccagtagcgactctaataattcaacagcca 244		
Query: 178	cgaaca 183		
Sbjct: 245	cgaaca 250		

그 이외의 항원성이 검토되고 있는 유전자는 다음과 같다,

Query	Sequences producing significant alignments	Score (bits)	E Value
2A03(200)	Sequence 57 from Patent WO9502701		2e-51
3C01(139)	Zea maize AGAMOUS homologue mRNA		5e-17
3C06(177)	Yersinia enterocolitica 23S ribosomal RNA		8e-26
3D05(223)	Sequence 127 from patent US5688920.		8e-05
3D07(244)	Homo sapiens RIG-like 14-1 mRNA, complete		6e-12
3D09(226)	Homo sapiens RIG-like 14-1 mRNA, complete		2e-05
3E03(136)	Human Not1 linking clone from chromosome		2e-04
3E11(151)	P.putida pfrl gene.		3e-09
3F06(219)	A. thaliana transcribed sequence: clone		1e-31
3G01(239)	Homo sapiens RIG-like 14-1 mRNA, complete		e-19

3G02(201)	Homo sapiens RIG-like 14-1 mRNA, complete	1e-09
4A01(134)	Mouse mRNA for PAP homologous protein.	3e-06
4A11(198)	P.putida histidine ammonia-lyase (hutH) gene.	8e-20
4B06(203)	Escherichia coli genomic sequence of minutes 9	1e-18
4B07(237)	OG1RF Enterococcus 20-dDa protein	5e-06
4B08(210)	HSFIH021 H.	3e-07
4B10(245)	OG1RF Enterococcus 20-dDa protein	6e-09
4C01(141)	Synthetic construct dihydrofolate reduct	5e-05
4F03(220)	Zea maize AGAMOUS homologue mRNA	9e-14
4F06(201)	MAAD0078.RAF S	4e-12
G01 (180)	Salmonella typhimurium terminal inverted repeats,	2e-23
4H12(186)	Chlamydomonas P700 chlorophyll a-apoprotein A1 (psaA) gene	3e-28
5A01(134)	Mouse mRNA for PAP homologous protein	3e-06
5A02(141)	Sequence 60 from patent US 5712143	8e-13
5A07(114)	Rice Innature 96AS0497	4e-14
5A08(123)	Zea maize AGAMOUS homologue mRNA,	5e-26
5B09(153)	Dictyostelium discoideum slug cDNA,	8e-41
5B10(146)	11-4117. TV RPC11	1e-42
6A03(158)	Sequence 55 from Patent W09502701	9e-07
6A07(141)	Sequence 60 from patent US5712143	8e-13
6B03(303)	Zebrafish AB Danio	7e-06
6B04(164)	Sequence 55 from Patent W09502701	9e-07
6B11(228)	A.pleuropneumoniae omla gene, partial, strai...	8e-59
6B12(182)	Salmonella typhimurium incompatibility determi...	3e-39
6C02(211)	Drosophila melanogaster C/EBP gene, complete...	8e-18
8B02(155)	Salmonella enteritidis virulence protein	2e-18
8B05(181)	Vibrio parahaemolyticus beta-N-hexosaminidas...	
8B11(200)	Rattus norvegicus 3beta-hydroxysteroid dehyd...	3e-15
A10(207)	Mouse mRNA for PAP homologous protein.	2e-07
C03(153)	Calonectris diomedea random amplified polym...	3e-39
C12(189)	P.mevalonii HMG-CoA reductase (mvaA) gene,	2e-40
D01(112)	P.putida histidine ammonia-lyase (hutH)	8e-14
G02(185)	P.putida histidine ammonia-lyase (hutH)	2e-15
G08(247)	K. pneumoniae genes nifH and nifD (fragment)	1e-45
G10(211)	Human uncoupling protein homolog (UCPH) .	1e-14
H09(143)	P.putida histidine ammonia-lyase (hutH)	2e-15
8B02(155)	Salmonella enteritidis virulence proteih	2e-18
8A11(149)	H.pylori nixA gene.	e-18
5B06(218)	F.rubripes 5HT1D gene.	4e-11
5B03(194)	Bacteriophage S13 circular DNA	6e-53

H09(143)	<i>P.putida</i> histidine ammonia-lyase (hutH) gene	2e-15
8A11(149)	<i>H.pylori</i> nixA gene.	8e-18
5B06(218)	<i>F.rubripes</i> 5HT1D gene.	4e-11
D01(112)	<i>P.putida</i> histidine ammonia-lyase (hutH) gene	8e-14
C12(189)	<i>P.mevalonii</i> HMG-CoA reductase (mvaA) gene,	2e-40
15E04(156)	<i>D. ananassae</i> Om(1D) gene.	2e-06

3. 염기서열의 연결 - appendix에 첨부

cosmid 클론중 4G01, 4A08, 3F08 의 세 클론에 대하여 결정된 염기서열을 contig program을 이용하여 연결하였다.

4G01 cosmid clone에 대하여는 총 780,572의 염기를 해석하여 vector에 클로닝되어 있는 전 염기서열의 결정을 완료하였다.

4A01 cosmid 클론은 총 202,950 염기를 결정하여 10개의 contig 를 작성하였고 3F08 cosmid 클론은 총 202,950 염기를 결정하여 124개의 contig를 작성하였다. 각 cosmid 클론의 연결은 Appendix 에 별도로 첨부하였다

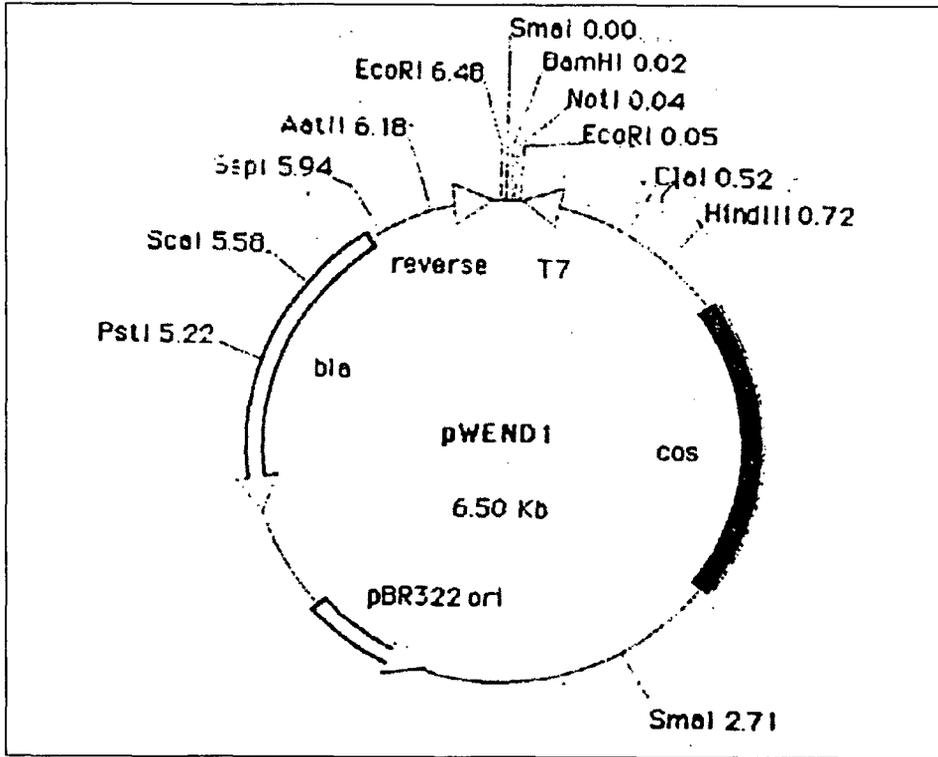
제 4 절 적 요

항원 유전자의 분리는 재조합 DNA 백신의 제조에 있어서 가장 중요한 부분으로 본 연구에서는 PRV의 염기서열을 결정하여 기존에 알려져 있는 항원성 단백질과 비교하여 항원을 분리하고자 시도하였다. 염기서열 분석 결과 얻어진 omlA gene과 g13 의 유전자는 항원으로써의 가능성이 높아 더 연구를 진행시켜 전체구조를 결정하여 재조합 DNA 백신으로써의 가능성이 검토되어야 할 것이다. 또한 항원으로써의 기능이 명확히 드러난 유전자 이외에 각 염기서열 분석이 진행 중에 있어 더 많은 종류의 항원이 분리될 것이 기대된다. 본 과제에서는 염기서열을 비교하여 항원을 검출하였다. 이러한 방법은 직접 유전자의 DNA를 분리할 수 있어 클로닝과 동시에 재조합 DNA 의 항원 유전자로 사용할 수 있는 장점이 있으나 많은 노력과 시간과 비용이 수반된다.

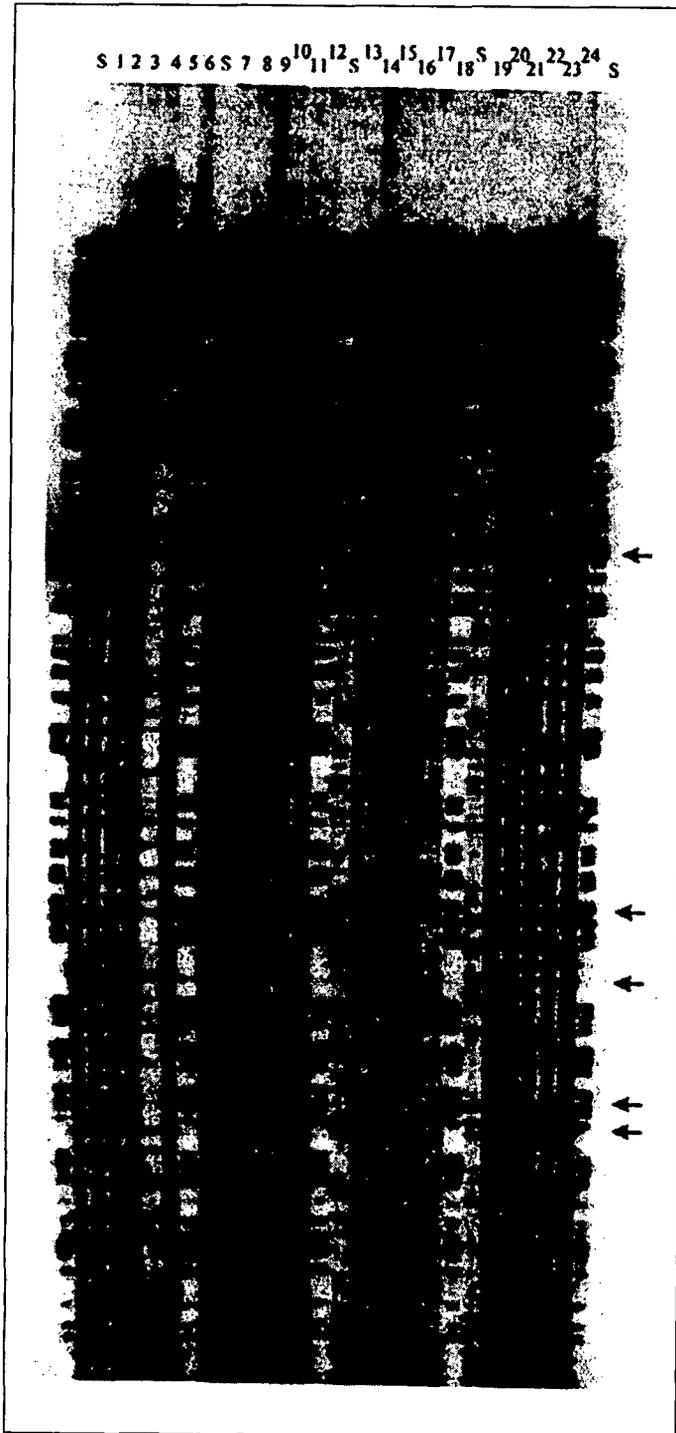
본 연구에서는 항원 유전자의 분리와 더불어 PRV genome의 전체 염기서열을 결정도 동시에 수행하였다. 그러나 현재의 연구장비 시설로는 본 연구의 수행기간 동안에 완성 할 수 없었다. PRV genome의 염기서열 결정하기 위한 일련의 과정 중에서 cosmid library 작성, contig map의 작성, cosmid clone에 대한 sublibrary의 제작등의 과정은 현재의 기술로 충분히 가능하였으나 가장 문제시되었던 점은 염기서열을 결정하는 방법으로 본 연구에서는 연구 여건상 염기서열 자동 결정장치를 구입하여 사용하지 못하고 수동에 의존한 염기서열 방법으로 수행하였다. 또한 수동에 의존한 염기 서열 과정에서 방사선 동위원소를 사용할 경우 불가피하게 많은 양의 방사선 물질을 사용 할 수밖에 없기 때문에 방사선 폐기물의 처리가 문제시 될 가능성이 있어 새로이 개발된 PCR-silver staining에 방법으로 수행하여 문제점을 해결하였다. 그러나 수동에 의존한 염기서열 결정 방법은 data의 판독과 computer 작업을 위한 file의 작성

에 많은 시간과 노력이 필요하며 또한 손으로 입력하는 방식은 정확성이 떨어지는 문제점을 가지고 있으며 이러한 단점은 염기서열의 효율을 결정하는 데 치명적인 결과를 초래하였다. 현재 genome project가 수행되면서 전체 genome 이 결정된 바이러스가 급속히 증가하여 460여종류의 바이러스에 대한 전체염기서열이 결정되었다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/vis.html>). 이러한 경향은 비교적 genome 크기가 작은 생물체를 대상으로 지속적으로 진행될 예정이다. 따라서 비슷한 구조의 바이러스의 경우 유사한 DNA 구조를 가지고 있기 때문에 hybridization 또는 본 과제에서 수행한 PCR에 의한 항원의 분리등의 방법으로 재조합 DNA 백신의 항원을 선별하는 노력도 이러한 경향에 주목할 필요가 있을 것으로 판단된다.

제 5 절 그림 및 표



<그림 4-1> 본 연구의 Aujeszky 바이러스 genome의 클로닝에 활용된 pWEDND 1 cosmid vector의 제한효소 지도



<그림 4-2> cosmid clone의 finger printing

```

tolerance in tenths of mm = 7 (main) 10 (difmap)
match probability cutoff = 1.0e-04
analytical probability cutoff = 1.0e-11

-----start-of-mapsub-output-----@
project name = mobil
number of clones = 406, number of bands = 11246
first clone in set =
last clone in set =
first clone in set =
last clone in set =

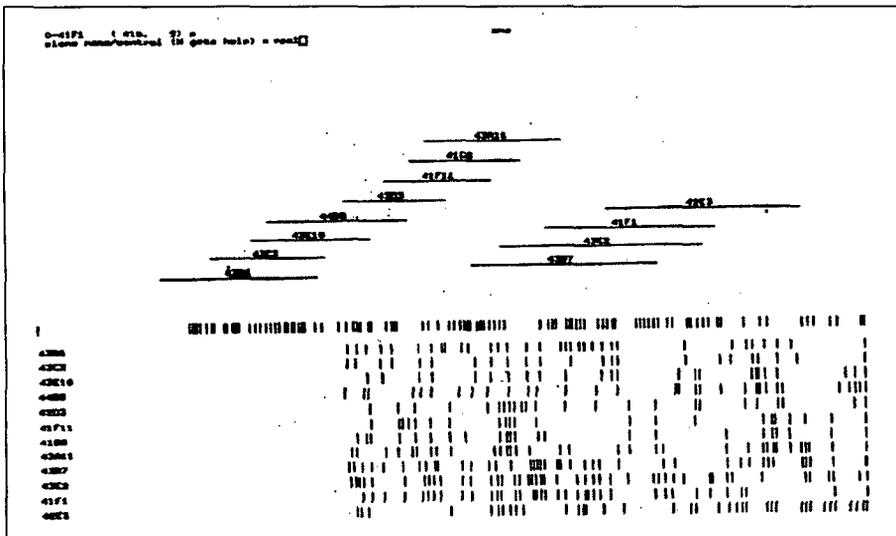
0-1D1 ( 26b, 0)
      23 matches 0-1D10 ( 28b, 0) 2.6e-19 0 3d
      20 matches 0-1F10 ( 21b, 0) 4.7e-19 0 3
      8 matches 0-3A3 ( 28b, 0) 3.0e-03 0 1
      11 matches 0-4C9 ( 28b, 0) 3.1e-03 0 3
      7 matches 0-4A8 ( 28b, 0) 5.7e-03 0 2
      difmap: 7 matches 0-2C8 ( 28b, 0) 9.9e-02 0 3
      difmap: 4 matches 0-2B2 ( 28b, 0) 2.6e-01 0 2

0-1D2 ( 38b, 0)
      17 matches 0-1D7 ( 22b, 0) 1.1e-10 0 21d
      24 matches 0-2E3 ( 47b, 0) 1.0e-09 0 14
      17 matches 0-1H2 ( 24b, 0) 1.1e-09 0 3
      19 matches 0-2E5 ( 46b, 0) 5.9e-06 0 15
      15 matches 0-4H5 ( 36b, 0) 9.7e-05 0 10
      difmap: 12 matchex 0-2A3 ( 31b, 0) 1.1e-03 0 10
      difmap: 11 matchex 0-4C9 ( 46b, 0) 6.2e-02 0 12
      difmap: 9 matches 0-3D8 ( 34b, 0) 5.7e-02 0 10

0-1D7 ( 22b, 0)
      19 matches 0-1H2 ( 24b, 0) 6.5e-17 0 3d
      17 matches 0-1D2 ( 38b, 0) 1.1e-10 0 1
      11 matches 0-4H5 ( 36b, 0) 7.2e-05 0 1
      8 matches 0-3A6 ( 23b, 0) 5.5e-04 0 2
      11 matches 0-2F1 ( 47b, 0) 6.7e-04 0 3
      difmap: 1 matches 0-2F1 ( 47b, 0) 7.3e-01 0 3
      difmap: 6 matches 0-1D11 ( 18b, 0) 3.7e-03 0 3
      difmap: 5 matches 0-2G1 ( 24b, 0) 5.6e-02 0 3
      difmap: 5 matches 0-1E7 ( 26b, 0) 7.3e-02 0 3
      difmap: 3 matches 0-4C6 ( 27b, 0) 4.3e-01 0 3

```

<그림 4-3> MSPSUB program에 의한 각 cosmid DNA간의 유사성 분석 결과



<그림 4-4> cosmid 클론의 연결

제 5 장 참고 문헌

1. Banks-M J-Viol. Methods 1985 12;41-5 Detection of antibodies to Aujeszky's disease virus in whole blood by elisasics
2. Scherba-G; Jin-L; Schnitzeln-WM; Vodkin-MH T-Vol-Methods 1992 38(1);131-43 Diffeerential polymease chain reaction for detestion of wild typw and a vaccine strain of Aujeszky's disease(Pseudorabies) virus.
3. Ben-Porat T, Hoffmann P., Brown L., Feldman T., Blakenship M., Virology 1982 122:251-267 Partial characterizatiion of temperature-sensitive mutants of pseudorabies virus.
4. Hasebe-H; Ossario-FA; Hogg-A; Liauw-H; Bartkoski-MJ; Sugiyama-M J-vet-Med-Sci 1992 54(4);693-8 Inffluence of vaccination route on the efficiency of Aujeszky's disease deletiion mutant vaccine.
5. Cohen J. Nature 1993 259:1691-1692 Naked DNA points way to vaccine
6. Smith and Wood 1992 Molecular and cell biochemistry; Cell biology 305-322
7. Wild-TF; Bernard-A; Spehner-D; Drillien-R J-Gen-Virol. 1992 73 : 359-6 Construction of vaccinia virus recombinants expressing several measles virus proteins and analysis of their efficacy in vaccination of mice.
8. Lu-S; Santoro-JC; Fuller-DH; Haynes-JR; Robinson-HL Virology. 1995 10; 209(1): 147-54 Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice.
9. Terre-J; Chappuis-G; Lombard-M; Desmettre-P J-Biotechnol. 1996 30; 46(2): 156-7 Eradication of rabies, using a rec-DNA vaccine.
10. Milne-A; Krugman-S; Waldon-JA; Hadler-SC; Lucas-CR; Moyes-CD;

Pearce-N N-Z-Med-J. 1992 26; 105(940): 336-8 Hepatitis B vaccination in children: five year booster study.

11 Robertson-JS Vaccine. 1994 12(16): 1526-8 Safety considerations for nucleic acid vaccines.

12.Yankauckas-MA; Morrow-JE;Parker-SE; Abai-A; Rhodes-GH; Dwarki-VJ; Gromkowski-SH DNA-Cell-Biol. 1993 12(9): 771-6 Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene.

13.Asakura-Y; Hamajima-K; Fukushima-J; Mohri-H; Okubo-T; Okuda-K Am-J-Hematol. 1996 53(2): 116-7 Induction of HIV-1 Nef-specific cytotoxic T lymphocytes by Nef-expressing DNA vaccine.

14.Justewicz-DM; Webster-RG Virology. 1996 224(1): 10-7

Long-term maintenance of B cell immunity to influenza virus hemagglutinin in mice following DNA-based immunization.

15.Tokushige-K; Wakita-T; Pachuk-C; Moradpour; Weiner-DB; Zurawski-VR Jr; Wands-JR Hepatology. 1996 24(1): 14-20 Expression and immune response to hepatitis C virus core DNA-based vaccine constructs.

16.Huygen-K; Content-J; Denis-O; Montgomery-DL; Yawman-AM; Deck-RR; DeWitt-CM; Orme-IM; Baldwin-S; D'Souza-C; Drowart-A; Lozes-E; Vandenbussche-P; Van-Vooren-JP; Liu-MA; Ulmer-JB Nat-Med. 1996 2(8): 893-8 Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine

17.Lowrie-DB; Tascon-RE; Colston-MJ; Silva-CL Vaccine. 1994 12(16): 1537-40 Towards a DNA vaccine against tuberculosis.

18.Doolan-DL; Sedegah-M; Hedstrom-RC; Hobart-P; Charoenvit-Y;

Hoffman-SL

J-Exp-Med. 1996 1; 183(4): 1739-46 Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity.

19.Lu-S; Arthos-J; Montefiori-DC; Yasutomi-Y; Manson-K; Mustafa-F; Johnson-E; Santoro-JC; Wissink-J; Mullins-JI; Haynes-JR; Letvin-NL; Wyand-M; Robinson-HL J-Virol. 1996 Jun; 70(6): 3978-91 Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques.

20.Lagging-LM; Meyer-K; Hoft-D; Houghton-M; Belshe-RB; Ray-R J-Virol. 1995 69(9): 5859-63 Immune responses to plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein.

21.Justewicz-DM; Morin-MJ; Robinson-HL; Webster-RG J-Virol. 1995 69(12): 7712-7 Antibody-forming cell response to virus challenge in mice immunized with DNA encoding the influenza virus hemagglutinin.

22.Robinson-HL; Lu-S; Mustafa-F; Johnson-E; Santoro-JC; Arthos-J; Winsink-J; Mullins-JI; Montefiori-D; Yasutomi-Y; et-al Ann-N-Y-Acad-Sci. 1995 27; 772: 209-11 Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques.

23.Xiang-ZQ; Spitalnik-SL; Cheng-J; Erikson-J; Wojczyk-B; Ertl-HC Virology. 1995 Jun 1; 209(2): 569-79 Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus.

24.Osterrieder-N; Wagner-R; Brandmuller-C; Schmidt-P; Wolf-H; Kaaden-OR Virology. 1995 20; 208(2): 500-10 Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB).

25. Ciernik-IF; Berzofsky-JA; Carbone-DP *J-Immunol.* 1996 156(7):2369-75
Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes.
26. Nomura-M; Nakata-Y; Inoue-T; Uzawa-A; Itamura-S; Nerome-K; Akashi-M; Suzuki-G *J-Immunol-Methods.* 1996 14; 193(1): 41-9 In vivo induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a single epitope introduced into an unrelated molecule.
27. Nichols-WW; Ledwith-BJ; Manam-SV; Troilo-PJ *Ann-N-Y-Acad-Sci.* 1995 27; 772: 30-9 Potential DNA vaccine integration into host cell genome.
28. Webster-RG; Fynan-EF; Santoro-JC; Robinson-H *Vaccine.* 1994 12(16): 1495-8 Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin.
29. Davis-HL; McCluskie-MJ; Gerin-JL; Purcell-RH *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996 9; 93(14): 7213-8 DNA vaccine for hepatitis B: evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines.
30. Sakaguchi-M; Nakamura-H; Sonoda-K; Hamada-F; Hirai-K *Vaccine.* 1996 14(8): 747-52 Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus.
31. Lee I. A., Lee Y. H., Kim J. H., Nam M. S., Song J. C., Choe I. S. *Korean J. immunology* 1996 18(2):143-149 Cloning and characterization of myb induced myeloid protein-1 gene homologue from human fetal liver
32. Kim J. H., Song J. C., Lee I. A., Lee Y., Nam M. S., Han Y., Chung J. H., Choe J. S. *J. Biochem. and Mol. Biol.* 1995 28(5):402-407 Analysis of partial cDNA sequences from human fetal liver

33. Park J.H., Song J. C., Kim M. H., Lee D. S., Kim C.H. *Microbiology* 1994 140:2247-2250 Determination of genome size and a preliminary physical map of an extreme alkaliphile, *Micrococcus* sp. Y-1, by pulsed field gel electrophoresis.
34. 이봉희, 조경제, 최완성, 강형채, 박순태, 이성준, 송현준, 백상호 *Korean J. Ana.* 1995 28(5):487-494 β -galactosidase의 유전자를 주입한 Pseudorabies 바이러스 변종의 신경추적자로의 활용연구.
35. del-Canho-R; rosheide-PM; Voogd-Schotanus-M; Huisman-WM; Heijtkink-RA; Schalm-SW *Vaccine*. 1994 12(14): 1323-6 Immunogenicity of two different dosages (10 and 5 micrograms) of recombinant DNA hepatitis B vaccine in healthy neonates.
36. Vahlsing-HL; Meek-J; Marquet-M; Hobart-P; Norman-J; Manthorpe-M *Hum-Gene-Ther.* 1996 Jun 20; 7(10): 1205-17 An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle.
37. Liang-X; Hartikka-J; Sukhu-L; Manthorpe-M; Hobart-P *Gene-Ther.* 1996 3(4): 350-6 Novel, high expressing and antibiotic-controlled plasmid vectors designed for use in gene therapy.
38. Wheeler-CJ; Felgner-PL; Tsai-YJ; Marshall-J; Sukhu-L; Doh-SG; Hartikka-J; Nietupski-J; Manthorpe-M; Nichols-M; Plewe-M; Liang-X; Norman-J; Smith-A; Cheng-SH *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1996 93(21): 11454-9 A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung.
39. Field-HJ *Antiviral-Res* 1985 5(3):157-68 Chemotherapy of Aujeszky disease in the mouse by means of nucleoside analogues; bromovimydoxyuridine acyclovir, and dihydropropoxymethylguanine

40. Frederick R. Vogel Nave Sarver *Clinical Microbiology reviews* 1995 8(3)
406-410 Nucleic Acid Vaccine
41. Jean D. Boyer, Kenneth E. Ugen, Michael Chatterfohn, Min Wang, Ami Shah, Michael Agadjanyan, Mark L. Bagarazzi, Ali Javadian, Richard Carrano, Leslie Coney, Williams V. Williams, and David B. Weiner *J. infect. disease* 1997 176 : 1501-1509 DNA vaccination as Anti-Human Immunodeficiency Virus Immunotherapy in Infected Chimpanzees
42. Dong-ji Zhang, Xi Yang, Jody Berry, Caixia Shen, Grant McClarty, and Robert C. Brunham *J. Infect. Diseases* 1997 176 : 1035-1040 DNA Vaccination with the Major Outer-Membrane Protein Gene Induces Acquired Immunity to *Chlamydia trachomatis* (Mouse Pneumonia infection)

Appendix

cosmid clone의 염기서열 연결

cosmid clone 4G01 연결 완료 : 총 35,305 염기

Pairing test Number of segment pairs = 780572; number of pairwise comparisons = 5600

'+' means given segment; '-' means reverse complement

```
Repairing...
Number of additional pairwise comparisons = 2

OVERLAPS          CONTAINMENTS
***** Contig 1 *****
28H10+
      22D04+ is in 28H10+
      21E06+ is in 28H10+
      22A03+ is in 21E06+
      23B01+ is in 21E06+

29H112+
25I104+
28B05+
      25I109+ is in 28B05+
      22D11+ is in 28B05+

22G07+
28B10+
21D11+
      25B08+ is in 21D11+

22G12+
28C09+
21C12+
      21H101+ is in 21C12+
      20B12+ is in 21H101+

25C04+
23E08+
25E10+
      20F09+ is in 25E10+

21G06+
24F12+
22C10+
      23C07+ is in 22C10+

29F03+
      29A05+ is in 29F03+
      23H05+ is in 29F03+

28G06+
27B11+
      20I101+ is in 27B11+

27D02+
20G07+
22D12+
29F09+
20I108+
23B07+
24D10+
29B03+
23D07+
26G12+
29D04+
20B11+
24C09+
      29E05+ is in 24C09+
      28A10+ is in 24C09+

21H111+
      26C11+ is in 21H111+

22B11+
21B02+
20F04+
21F02+
      25D06+ is in 21F02+

26G09+
      27G11+ is in 26G09+
      29G01+ is in 26G09+

27G12+
```

26I106+	
21B12+	26E12+ is in 21B12+
	25B01+ is in 21B12+
21I102+	
20D08+	
23E10+	
23D06+	29G06+ is in 23D06+
	25C07+ is in 23D06+
25A11+	
26B04+	28I103+ is in 26B04+
	20A09+ is in 26B04+
21I110+	
20C12+	
21E09+	25G12+ is in 21E09+
	21E05+ is in 21E09+
	26D06+ is in 21E09+
28E09+	
20E01+	
28B03+	21F11+ is in 28B03+
26A04+	
23G05+	
26A06-	
25D09+	
23F05+	23G08+ is in 23F05+
29I110+	
20B07+	
29A0-	
20E04-	
29B0-	
24B11+	
25G08+	
23I102+	28A05+ is in 23I102+
24G05+	
28C06+	
29D12+	22B10+ is in 29D12+
29E08+	
27A05+	
20H03-	
28C01+	
25E12+	21G01+ is in 25E12+
23G11+	
23D12+	
29E02+	
26B05+	21B04+ is in 26B05+
27D08+	
27I111+	24B08+ is in 27I111+
27G10+	29A11+ is in 27G10+
20E02+	
28A02+	22D07+ is in 28A02+
	22C09+ is in 22D07+
23H01+	
29G11-	
28F04+	
26A10-	
25F05+	28D06+ is in 25F05+
25B04+	23I111+ is in 25B04+
21C05+	
23F02+	
20E11-	
28D01+	21F05+ is in 28D01+
29I107+	26G06+ is in 29H07+
20G09+	
28I107+	
23A09+	
23I106+	
23G04-	
25D07+	
23B08+	
28G11-	

28F12+	
27D11-	
21A01-	
27F04-	
22H01+	
24E08-	
20E10+	
27E12+	
23C06+	
24E10-	
21B08+	
24A10+	22B07+ is in 24A10+
28H04+	
29B04+	
26C05+	26E08+ is in 26C05+
29C09+	
25B06+	
20F06+	
21A09+	
28A04-	
20F08+	
22F11-	
24H01+	
26H08+	24C07+ is in 26H08+
26E11+	
29A06+	
29B07+	
29B05-	
21E11-	
21F03-	
22E06+	
24E09+	
21G09+	
27A03+	
28H02+	
29C02+	20A04+ is in 29G02+
27C0-	22D10+ is in 27C06-
20D09+	
25G07-	
22C04+	22B06+ is in 22C04+
26H10+	
25E08+	21E01+ is in 25E08+
20C04+	
27G07+	
20D10-	
26G04+	
29A07+	25F06+ is in 29A07+
22B03+	24A04+ is in 22B03+
28D12+	
24A11+	22C08+ is in 24A11+
27D01+	
28F02+	
21A11+	
27F07+	
28G02-	
24F06+	
21B06+	
25C09-	
22G04+	
25B05-	
28A01-	
25F04+	
22H04+	
27A01-	
21C08+	
23C11+	20G02+ is in 23C11+
26C01+	
22H05+	
26A03+	28C05+ is in 26A03+
29E06+	
22F02+	
26G08+	20G01+ is in 26G08+
24G12+	

29B10+	
28B08+	
27C09-	
21D08+	
20B05-	
21G08-	
20F10-	
23A05-	
28F09+	
26E03-	
25D03+	
25D08-	
29C10+	
22B12+	
21H04-	
29G10+	
29H01+	
23F06+	
	24C08+ is in 23F06+
27E06+	
25A04+	
29E11+	
22B04+	
28G10+	
	23B12+ is in 28G10+
22G10+	
20G03+	
29F08+	
29A01+	
22B09+	
27D06+	
26C07+	
	24G07+ is in 26C07+
	24F04+ is in 26C07+
29F02+	
24B02+	
27D09+	
	20H02+ is in 27D09+
	21B03+ is in 20H02+
23B03+	
	28H09+ is in 23B03+
24E11+	
	24D04+ is in 24E11+
22G11+	
23E11+	
28G01+	
21B10+	
28G12-	
	26H04+ is in 28G12-
27C05+	
21D02+	
25H12-	
20D07+	
23E09+	
23F12+	
29B02+	
	29A10+ is in 29B02+
	27E09+ is in 29B02+
27F09+	
27B04-	
20C07+	
	24A02+ is in 20C07+
23E02+	
24G08+	
23D10+	
28C04-	
	25B09+ is in 28C0-
28B07+	
29B12+	
28F11+	
22F01-	
20E12+	
21G02-	
23C05+	
21G04+	
	26B07+ is in 21G04+
24H04+	
29C04+	
28B01+	
29F10+	
24C01+	
	28E01+ is in 24C01+
	21F01+ is in 24C01+
22E02-	
25A02+	
	21A08+ is in 25A02+

28B11+	29H05+ is in 25A02+
28F08+	
25C03+	26B10+ is in 25C03+
28E06+	24F07+ is in 28E06+
25H05+	
23F03+	
22E07-	23H09+ is in 29H04+
29H04+	
27B07+	29D06+ is in 27B07+
28A03+	
28A12-	25F07+ is in 28A12-
22G09+	
29G04+	
23D01+	21E08+ is in 23D01+
29B01+	
22C01-	
27G08+	
22E09+	26G03+ is in 22E09+
26D05+	
27A10-	
20C05+	20E05+ is in 20C05+
25A09+	
21G10+	
22E12+	28G09+ is in 22E12+
29D07+	
20E09+	
28H06+	
22A09-	
25H08+	
22H07-	
29G03-	
25B12-	
29C0-	
21D01+	
29D02+	23D03+ is in 29D02+
21C01+	26G01+ is in 21C01+
28F05+	
27B08+	
21A03+	
21A06-	
25E06+	
23B04-	
24F09-	
29E09+	26F10+ is in 29E09+
27B01+	26G11+ is in 27B01+
29B06+	
23B02+	21B09+ is in 23B02+
21H09+	
22G05-	
22G06+	
27H07+	
29H11+	28B06+ is in 29H11+
28E08+	
28D07+	
22E05+	
20B10-	
23D11+	
22C12+	
21A05+	25D04+ is in 21A05+
	27A08+ is in 21A05+
28B02+	
27H06+	
29E01+	24C02+ is in 29E01+
27A07+	
24F02-	
20D04+	29H08+ is in 20D04+
21H07+	

27A02+	22G02+ is in 21H07+
25C08+	
24C04+	25B10+ is in 25C08+
26H12+	
22H102-	
20A08-	
23B06+	
29E10+	21D04+ is in 29E10+
26C06+	
25H110+	
29F06-	25F01+ is in 25C10+
25C10+	29D01+ is in 28F01+
28F01+	
25D11+	20A12+ is in 29A04+
29A04+	23C10+ is in 20B04+
20B04+	
20H106+	
26F07+	
24H110-	
27H10-	
24A12+	20G11+ is in 24A05+
24A05+	
22E08+	
21E07+	
29F01+	28E05+ is in 28H05+
28H105+	
27B12+	
28C03+	
22H110+	24D09+ is in 23D08+
23D08+	
22E04+	28B12+ is in 22H103+
22H103+	
29C06+	
29G07+	
29G05+	
24E01+	
27A04+	
23A10-	
22A02+	
24F10+	
20H112+	
27C03-	
27F08+	
27E01-	
21C10+	
24E12+	
23F10-	
23D04-	
25F12-	
26F06+	
28G05+	
28D03+	27H110+ is in 28D03+
	20A0- is in 28D03+
20H110+	22A08+ is in 20H110+
25G05+	
24H10-	26H109+ is in 24H107-
27C12+	
27F10+	
22D09-	
29F05+	
21D03-	
23A01+	
20D12+	
25A12-	
24B05-	
26A05+	28G03+ is in 26A05+
29C05+	
20B08+	20E03+ is in 20B08+
26C10+	20E08+ is in 26C10+

24A09+	
23A07-	
26D03+	26H07+ is in 26D03+
20E06+	
21C07-	
26F04-	
22D03+	21F08+ is in 22D03+
26D09+	
25F09+	
20D01+	
29G12+	25A07+ is in 29G12+
23H08+	21G12+ is in 23H08+
26B08+	
20C11+	
26E05+	20D06+ is in 26E05+
	28A11+ is in 26E05+
21H06+	
26F09+	25A08+ is in 26F09+
24H11+	22A06+ is in 24H11+
28D04+	
22H11+	
23H03+	
27D03+	
21D12+	
21B07-	
29F12+	
29C07-	
23H12+	
23G10-	
29F04+	
24B09-	
20D03+	
27E07+	
26H11+	
23B09-	
20F12+	
25A07+	
23H06+	
23C01-	
27G04+	
25E11+	
22F04-	
28C11-	
27A12-	
22C05+	
28G08-	
26B03+	
23F07-	
22E01+	26F03+ is in 22E01+
21A10+	21E04+ is in 21A10+
27F01+	
20B06+	25F11+ is in 20B06+
29C11+	23C08+ is in 29C11+
20A10+	
23A11+	
26E02+	
28D05+	
22F05+	
29H03+	28D09+ is in 29H03+
	22H09+ is in 28D09+
22F03+	
28C07+	
29E07+	
20G05+	22F08+ is in 20G05+
27G09+	
20G08-	
21A04+	
20G12-	24D12+ is in 20G12-
22F06+	
22D02-	28E02+ is in 22D02-
	29A08+ is in 22D02+

29G09+	27C01+ is in 22D02+
25H11+	
24H08+	
21A12+	
22H08+	26A02+ is in 21A12+
23E05+	
28F03+	
26D07+	25H01+ is in 28F03+
27A06-	28C02+ is in 28F03+
29E03-	
20G10+	
22A01+	24B06+ is in 20G10+
23C09+	
20C02-	
29E04+	
26C12+	24H02+ is in 29E04+
27E08-	25C05+ is in 29E04+
29B09+	
25A06+	
28F06+	20D11+ is in 25A06+
24D07+	
28C12+	
20H04+	23F01+ is in 28C12+
21H08-	
22G01-	
20G04-	
24G03+	
25E07+	
25C12+	
22H06+	29C02+ is in 25C12+
28H12-	
29B11+	
22A05+	
29F07+	26E04+ is in 22A05+
24B01-	
22G03+	27C08+ is in 24B01-
20C06+	28E10+ is in 22G03+
20F02-	
20E07-	
23G01+	
26A01+	27F02+ is in 23G01+
25G04+	
24A07-	
20D02-	
29D09+	
24G09-	
22B05+	
29G08+	
25A03-	
21F04+	
27H01-	
29F11+	
24D01-	
21G03+	
28B04+	
23D09-	
24B07+	
24C10+	21F10+ is in 24B07+
22C11+	
26B12+	21C04+ is in 22C11+
20F03+	
27H04-	
28B09+	
27G05+	
29A02-	
26A09+	
20D05+	
23A06-	
23E12+	
21E02+	

21F09-	
27B09+	
29I102+	
28I101+	27H08+ is in 28I101+
26I102+	
21E03+	24D06+ is in 21E03+
	20B09+ is in 21E03+
	23E04+ is in 21E03+
23A12+	
28E11+	
25E05+	25G10+ is in 25E05+
27G01+	
27E04+	
21A07+	
20A11-	
21I105+	
25D05-	
20I107-	
24C12-	
28E12+	
28A06+	
20B02-	
25E02+	
22B02+	
24I105-	
22D05-	
26I103-	
26B11+	
27E05+	
21E10-	
28F07+	
29D10+	
29C12-	
20I111+	
26A12+	20A03+ is in 26A12+
23I104+	
24E03+	
25C03+	
26G07+	20C10+ is in 26G07+
28D11+	
28G07+	
29D08-	
24I106+	
21D06-	
22A07-	
22D08+	
22F10-	
20F05-	27I112+ is in 20F05-
28E07+	25B02+ is in 28E07+
27B06+	
25B11+	27A09+ is in 25B11+
28C10+	25H06+ is in 28C10+
20A01+	
22D01-	
21I103-	
21C02+	
23D05+	
26F05-	
26E10+	
26D04-	
26F11+	
27I102-	
20I105+	
29A12-	
20A02+	
21G05+	21D10+ is in 21G05+
23G07+	
25G11+	
26I105+	
26A08+	27C10+ is in 26A08+
	28I111+ is in 26A08+
21E12+	21D05+ is in 21E12+
23A03+	23C02+ is in 23A03+

28A07+	20C01+ is in 23A03+
27B10+	
27A11+	
29E12+	
23G06+	27C02+ is in 29E12+
211112+	
22C03-	
22F12-	
24F05-	
20A07+	
26F08+	23B10+ is in 20A07+
27B03+	
20G06+	20F07+ is in 27B03+
24E05+	
20C03-	
29D11-	
22E03+	
291106+	26D08+ is in 22E03+
25A10+	
21B01+	
23G09-	
261101-	
24B10+	
271109-	
26E07+	
25D01+	
23D02-	
20C08+	
21D07-	
22G08+	
27B02+	20B01+ is in 22G08+
27F06+	
24G11+	
26A11-	
27D04+	
21C06+	
20B03-	
29A09+	
21F12+	
23F11-	
26G10+	
24C06+	281108+ is in 26G10+
271103-	
27C04-	
24E06+	
28D02+	
24B12+	20F01+ is in 28D02+
20F11+	
21A02-	
27G03-	
22A11+	
20A05-	
24G04+	
28G04-	
24D08+	
26G02+	
27C07+	
28D08-	
231107+	
26B06+	291109+ is in 231107+
22A12+	24D11+ is in 231107+
22B08+	
28E03+	
23F09+	29D05+ is in 28E03+
26C08+	
23A04-	
21C11-	26F12+ is in 23A04-
21D09+	28F10+ is in 21C11-
22A04-	
26F02+	27D12+ is in 22A04-
27F05-	221112+ is in 22A04-

24I109-
 29C03+
 27C11-
 21G11+
 24A06+
 29D03-
 25E01-
 21F06+

26C09+ is in 21F06+

29C08+
 21C03+
 28A09+

22E10+ is in 28A09+
 27G06+ is in 22E10+

21F07+
 26G05-
 21B11-
 27B05-
 22E11-
 25E03-

24D05+ is in 25E03-

27F12-
 23F04+ is in 27F12-

23G12+
 28A08+
 22D06+
 28E04+
 21G07-
 28D10+
 21C09-
 20I109+
 22B01+

27E10+ is in 22B01+

22F07+
 25I107-

23A08+ is in 25I107+

22A10+
 26F01+ is in 22A10+

25A05+
 27D10+ is in 25A05+

28C08+
 23A02+
 26D12+

21B05+ is in 26D12+

20C09+
 23E03+ is in 20C09+

27D07-
 27F03+ is in 27D07-
 22F09+ is in 27D07-
 27F11+ is in 27D07-
 27G02+ is in 27D07-

4G01 염기서열 총 35,305 염기

CATCTTTGTGCTGTGCCGGCCCTCACGGCCCGGGGTGACGGCCGTGGGGGACAAGATGGCGAGCCACATCTCGCGCGCGTGT
 TCTGTGCGAATCGACCTGCTGTTTTACGATGACGGTATTACAAGCTCATGGCCCGCCGCGCAGGTCCTCCATTCATCTACGGG
 GACACGGACTCCCCAAGAAAAGTACATCGGGTCTACCGGGGTAAGGACCGGATCCCGTACGTGATCGTGGCCAGACCCCGG
 AGTGGCCATCCCGGAGAGGGCCCGAGGACTGCAGGCGTTCCGGGCGCTCCTCGTTAAAAAGTTTATCCCGAAGTGTGGCACCC
 CCGGACGACGTGGCCGCGCGGCTCCGGACAGAGGAGACGGTCCGCGCGGCTGGCCGCCCTCCGCGAGCTAGACGCCCGCCGCC
 AGGGGACGCCAAGCCCGCCCGGGAGACGGATGGGGTCCGGGAGCGAGATCGAGTTGGCGCGGAGCAGCAGCTCGTGGGATGGC
 CGTGCCTGCCGACCCCGGGAGGCGCGTCCAAGCCCGCAAGCTGCTGGTGAAGCAGACCCCGCGCGTACACCAAGCCG
 CGTGGAGGGGGCGTGTGGCGGTCCGCCAACACGACCAAGGGCTCGAATACTGTTGATCTGCTGCACGAAGGCCAGGATTAGGG
 CCTCGCGCTGAGCCGGTAGTGCAGGTGGCGGACGCTCGTGGCGTCCGCCGTAACACCGACTATTACTCTCCACCTGTTGGG
 TTTGGTACAAATTGGGGGCGCCGACACGAGAGCGGAGTGGTCCCGGAAAGATGACGTACAGCATGGAGCCCGCCCGCCCGG
 CCCTGCCCTCGGCGAGCGCGACCTGACCCCGTGGCCCGTAAAGTGGGGTCCGGGTAACGATACCCGCTCCCGGAGCGCCCGG
 GTTAGCCGCGCGGAGGAGTGGCTGGCGCGGAGCCGTTGGACGAAAAAAGCTCGGGTTGGCCAAAGATCCCGCCAGGGATGGC
 TTAGCATGGCCCGGAGCGCTCCGCGCAGGATCGTGTGGACGAAAAAAGCTCGGGTTGGCCAAAGATCCCGCCAGGGATGGC
 CGAACGAACCCAGGGTCCGAGCTGGCCGAGGATCGACATTAAGGCCCTGTTGGGAATAACGCCAAGATCACCGAGAGTCTCTCC
 CGGTTGACAGCGGGGACAGCAACCCCGATGCCATAGTTCGTTCCCGCAGGCCAGCTGGCTAGTAGCAGGGTTCGGGGAGGCCAGGG
 CACGAGCACAAATTGCGGGGTGAGGGCGGCGAGGCTCTCCGGGACGACGAGCGCCCTGCTCTGCCACACGTGGGCGACGAACCGGTAC
 CCGCATACGCCATTGCCACAAACACAGCTCCTGTGGTACGATACAGTCAAGAGCGTCCGTCGCCGCGCGCGGGTCCGACGCCCATC
 TATGCCCTGGGACATCCAGGACTTTGCTCCTCACCGCCGAACCTGGCCACCAACAGCAGAGGCTCCTGAACCGCCGTTAGACGC
 CCATCGGCGCATACCATGTGCTTAAAGATCGGAGGAAACTCGTCAATGTTGATAGAGCTTCTCCCGCGCCGGAAGCAGGCTA
 AGGCGCGATCGGTGCACAAACCGGCCCGCTCCCGGGTCTGCTCGGGGTGAGACCCGGAGATCAGGCGAGTTCGCGCCAGGCT
 CTGGTCCAGACAGAAGGGGCGAGCACAATAATGCTGCGGGTCTTCCAGGGGACCGGAGGCAAGAGCGTTTATCAACCGCACCTCCAGGGCCCTGGCGACGCA
 CCAGCCCGGCGCAGAGTCCCGCGCGCGCAGAGGAGCGGACCGCGCGGCTCCTTGGCGTCTAAGCAGCGCGCCCGCCCTCACG
 GACAAATGTTACGTCTTGAAGGTGTAGATGAGGGCAGCGACGCTATGCGAGACACGCCCTCGAACCTTGGTCAACCTCCATCTCCGTA
 TGGCCACATGGGGTACAGAACCGCTCGAGCTGGTCCGACGAGCGAGCGCACGATGGTCCCGCGCTACCGTCAAACCTCGAAGCCCG
 CCGTCAAGCTGATGTCCTCATTTTTCCGAATCTGCCCGCGCGTGTTCAGCACGGTGGCCATCAGAGGGCCAGGTCGAGGTCC
 CGGCTCCGTTGCTGCGTTCGCGCGGAGCGATCCCGGCCCTCCTCGAGGGCGTCTGGCGAGGGCGGCCGAAAGGCCCGCA
 TAGCGCTGGCGCTCGTGTGTTTTCCGAGTAGCGGACCCAGGAGGCCCGGAGTCTGCGCAGGGCCAGCCAGTAAGCACGCACCAAGTAA

CAGGTTACACATGTACATACATAGTACACAGGGTGTGCTCCAGGGACAGGACAGGCATTCTCCGCCGGTGCGCCCGGGGCTGGGCATC
GGGTTCCGGTAACTCGCAAAGCGCGGAGCCAGCTCCGCCGCTGCTGCCCGCGATCCGCTTCCAGGACTGGCGGACAGTGGCGC
GACGGGCTCCCGGACCGCCAGCTGGGGCCGACTCCGACGCGGGGGTGCCTGGCGGAGGACACAGGACGACGACGACGACGACG
GTACGCCACGATATCCGGGACTCTCCGGCTCCGGTCCCGACGTCCGAGCTCCGGCGAGAGGACGCTCTAAGAGCCAGGAGGCT
GGGATCGAAGGCCACATCGAATCCCGCTTCCGAGCGCGGGCGGAGTACAGCAGCTGTCTCCAGGAGACGGGGCGCAATCTCCAT
CAGCGCGGTGGTGAAGCGACGCTCCGCTGCCGTGCTGTTGGGACCCCTCCGTGACAGTACGGAAGCAGCAGTGGGAGAAAAAGTCCCG
TCCGGCGCGCTGCTGGTTCGAGGGATGTGATCCCGCCGCGACCCCGCCCTCTCCGCCCGGGGCAAGCCCTACACCGGCCA
CCAGGTTGACGCTTCCGAGGCTCGTTCAGCGAATTGAGTTACAGGCCAAGGTTCTGCACCTTGGCGGCTCCCGGGGAGGGCGAG
GGTTCGGGTTCTTGGGCATCCCGCGCCGCTTTTGGTGGAGGGCAAGTTCAAGCGTCCGAAAGGAGCCAGCCAGGTTCCGCGGAC
CCGCGGAGCAGCTAATCGAGCGGCTGGCCAGCGGGAGGGCCCTACTCTCCCTCCATGACGTACACAAAATCGGCCAGGACCCCG
GGGGCGAAGTGCATGGCTGGCGGAGGGGGCGCACCGCCAGCGAACAACCGGCCACGAGATGCTAGCGTCCACAGAACAC
CGGCTGTCCGTGCTGTTCAATTAACCCGTTCTGACGGGGTTTTTTCATCGCCAGTGGGGCCGCCAGCCATTTGGCACAGAGA
AACGCCACCCACTGAGGCGAGAGCGGTAGGTTTGTTCACAGCTCGATGGTGGCGAGACGACAGGGCCGGTCCAGCGGAAG
TGTGATGGCCCGCGGAAAGGGCCGGTGTCCAAAAGCCCTCCACAGGGATCCGGGGCGGGTTCGGGGTCTCCCGCG
CCGCGAACCCTCCGTCCGCCCGCCCGCCCGGGCCCTTGGGGGGCGGTGATACGGGGCGGATGATCCGGGGCCGAGTCCCGGGT
CCATCGAGTACGAGCTGCTCCCGGGGACTGATGAGGGCCCGGTTGGCAGACTGCCAGGAAACGAGTATCCGGCGACCGCTCG
AGTACCGCACACCGGACGCTTTACGGGCTCGGCTCCGGCTCGGATGATGCCCGGCTCCGAGGATGATGGCGCAGCA
TGTGATCAGCTGCTTGTGCGCGAGCTCCGCTTCCGGTTCATGGCCCCGAAAGTCCCGGAGCGGACGAGCGGATCTGTCGCCG
CCGCGGAGCAGCTAATCGAGCGGCTGGCCCTCCCTGACGTACCGCGGCTATAAAAAGCCGACGACGCGCCCGCCCGCA
GCCCCGACACCGCTGTGTGACCGCGAGCTGCTCCGCCAAGCGGGAAAGATTCTACCCGTCCGCCGCAACCCGGCGTCC
CGGAGCGTACGGGGCGGAGACCCCTGGAGACTTGGAGACTTACAGCCGCTACGCTCGCTGCTCCCGGACCTGGACGCTTATCG
TCCATCTACGTTCCGGGGCGGGTCCAGCCTCCCTCCAGTGCCTTTTCAGTTTTCATGGCCATGACGGGCTCCAGCCATCAAG
GGGGCGTGGCCGAGCGGACGCGGATATGACCCCGCGGAGCTGGAGGTTGCTTCCCGACTACGGACGCGAAGCTGAATCAAG
CCTCGTCCGAGCTACCGAGGCGGACACCTATCAGTGACTGGCCGTCAGTGTCCGGGACCGCGTGGGACCGCTTTGGCCCGC
TCCCTTTTAAACCAGGGCCCTCCCGCCGTGGCACCAGGCCCTCGGGGTTTAAAGCACTGGGGCGCGAGATGTCCGGTTG
CGACGGGGGGGAAAGCAGATCGATAGGAGAGCGGGGAAAGCGGTTGGGCTGGGGCCCGGGGCGGCGGCTGGGATGATGGCGCAG
CGGCTGCCGTAGTGGGGCGGGGAAAGCGATTCCGCGGCGACTGGCCCGCCCGGGCGGTTGCTGACCGCGCCGCTGCTTTG
GCGCGGGAAGCTGCTATTGGTGGGTGGTGGTGGTGGAGTAATCAATAAAAAGACACACCAAGCAGCAGCCCTGCTTTAATGTCGG
ATGGCGTCCCGCAATTTACCTTTATCAAGGGAGTTCGAAATTAACAATACGGGGGGGGGGCGCAATTTGACGGCGGGGAGGG
GGGACGGAAGCGCGGACGATGGTGGCGGTTTTGCGGGCGGGGAAAGCGGCTACACGACTATGTCGCGGGCGACGCCG
GGCCGCTGGTTCGGCCCGCTTGGCCCTTGGGAGTTCATCGCGGATACCGCACTGAATGGTCCGCTCTGGGGCCCTATAA
AAAAGGACACCCCGCCCGCGGCTTACCCAGTCCGATGGGATGGTTACCAACAGCGCTGAGTGGGATGGTGGATGCTCCGGGGC
TTGGATGCGCGGGCTGCTTGGCCACCAATAACTCTCAGTTTATCATGATAACAACCCCGCACCCCGCTGGGCTGGGCTGGG
GCGCGGACAGCCACTTGTCTGGCTTGGTGGGTTACCGGGCAGCGACGCTCCATCCGACTGTGGGCTTGAAGCACTCC
ACGAAAACACAGCTTACCCCGCGGGCCACTTACCGGTTTTCGTTCCGAAACCTTCGAGCCCGGCTTGTGAGTCTGGT
GTTATGGGGAGTGTGTTCCCGAGGAGTGGGTCCGAGCGCTCGGCTCGGCTCGGAATCCGAGAGGAAACAAATGCCCCACACAGCCCTC
CGACGACACCCCTATGCTTCCGAGCTCCGCTCCCGCTCCACAGTATTCGACGAAAGCAGCCAGCCCTATGTTCCGCGGCG
GACCCCGCGCCGCTGGTTCGGGCGCGTGGTGGCTAGACAAGGAGCTCCCGCGGGGAGCGGGGGAGCGTGGATTTGTGGAAG
TTCTTCCGGGTTTTCGTTGGGGCCAAATAATCGAGCGGTAGCCCAATATGCGCAGCCTGATGCGCAGCGCTGATGAGCGCTGTG
ATGAAGCAACAGCGCGCAGGGCGGGTGGGCGTCAAGTATGGGGGGCGGGCTGACGTCGGGGGGGGGGCGACGGGAAACCG
TCCCGCTTTGGGGTGGGGAACCGGATGCTCCCGGAAATAGCTCCCGGACAGGAGGGAGGATTCGCGGATGCTCCGCGCGCGC
TCCCGCGCTCCGGCGCGGGAGCGGGGAGCGGGGAGCGGGGACCTCCAGTTGACAGGAGGGGCTGGGTTGGGTTGGGCGCTC
GGAGTCTTCGTCAGAGACTACAGGTTCTGAAGCAGCGACCGGGCGGCTGACGTTGCGCGGGTCCGAGGGGTTGGGTTGGGCT
GGGTTGGGCTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGG
CCCGGGCGGGGCTTACGACAGCGCGGACCAATGATCCTGGCTCCGACACAATCCCGACTCCGACCGAGACAGCGGGG
GTTTCCGGGCCCGGCTACATTTGGGCTGGTGGGCTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGG
GCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGTTGTTAGGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCGAAACCTCCGGGAGGATG
GGGACCGGAGCGCGAGGCGGCTGGCCGGTTCGCGCTAAAACAGGGGCGTGGTGAAGGGAGGGATTCGCGGATTCGAGCTGGG
CGACCGGACCGGGCGCTGAAGCGCCAGCCCGCGGGTCCGCTGTAAGTCTGTTAGGCGGTTAGCGGGAGCGGGGGGCG
TCCGGCCCGCTTACGGGAACCTGGGGGGGTTGGCGGGACCCGAGGTTAGCGGGGGGGGGGTTTCCGCCCGGGCAAAA
CCGCTGGCCGGCGCTGGGCGCGGAGGGGAGGGGACACACAGCACCAGGCTGGGGGCTGCTCTGGGGTTTGGGAGG
GGCGGGGGCGCGGAAATCGTAACCGGGCGACCGTGTCCGGGAGCGCGCCCGCACTGGTGGTCCGCGGAGCC
TGGTGGCGCGCGCAGGAGGCTGCCCGGCGTGTCCGGCGCGCGGACCGGACGAAAGCGGGAGAGCGCGGGAGGAG
CGGGGGGGCGGGGGTGGCATCGGGGGCGCGGGGAACTTGGGGACCGGCAAGCGCGGAGTCTGCGGGGGGCC
ACGGCGCGGGCGCTGCTTTCGGCGGGACGCGCGTGTGCTTCCGAGCCGCTGACTGCCGGCCAGGGGGCGCGGTGCAC
ACTGGGACCTGGGAGCGATGATCCGGCTGGGCGAAAGGGGTCGGGGGCAAGGAGGGCGGGGGCGCGGAGTCTGCAGA
CGGAGCTCTCCAGGCTGAATCCATGCCACTCCGAGGGGGGACGGGCTCCCGGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGG
CCAGGCTTCCGGGGCCAAACGAGCCCTCCGCCCAACAGGTTCCACAGGGCGGGGGTCCGGTTTGGGACCGAGGGGCTGTGTTG
TCCGGGGCGCGCTGATACCGGATGCCCGGAAATAGCTCCCGGACAGGAGGGAGGCGTGAAGCGCCCGCGAGGATAGCTCG
CGCGAGGAAAGGGCTCCGCTGGTGGCGTGGCGCGGAGGACGCTCTCCCGCCCGCCCAAAAGCGGAGCTCCGTTGGCTCGC
TGCAACAACCCGACCTGGGGGGGCGGGGGTCCGGTTTTTCCCAACAACCGCGACCGGGGTTCCAGAGGGCGGAAAGCTG
CCAGACAGCGCGGGCCCGGGCGAGGGGCGCTCGGCGATGAGCGCGGACAGGCGCGGGAGCTGTGCCCGCAGACAGCGTTTTT
GATCGGTTACGTTCCGGCTCAGGAGCGGACGAGCGCCACGCTCGATGTCGGACGACAGGGATGCGCAAGGGCGGCTCGGGCC
CGGAGCGCTGAGTCAAAACGCGTGAACACAGCTCCAGCTCCGACTCGCGGAAAGCCGCTGGTGTTCGGGAGCGCCACGACGA
GGCGCGCCCGAGGACTGCCCGCAGCAGGTTCCATGGCCGTAACCGCGCGCCCGGGGCTGGGTTGGTGGTGGGAGGCTG
CACGGCAGCTGTGGCCGTTGGCCGTTAGAGGGCGTTGGGGGAGCGGGGGTGCAGCCTCCGCCCGCCCGGAGGGGCTCAG
GCTCCGAGATCCAGACGCGGTCAGAAGGGGCTGCAAACTGTACTGTGTAGTCTGCGGAAACATCGAGGCTTGGGA
GACACATGCGCCGACATACCTCGTCCACTCGGACGCTCACCGCCAGCGCTGGCGGGACTCAGCTTCCAGCGCGATGAG
CTCCCGCGCGCCCGAACTCTCCAGCGCCATGGGGCCAGGTTCCCGGGCACCGGCTCGAAGCGCCCGCTCGTTCGATCCAGCT
GGGACCGGAGCGCGAGGGGCTGGTTTTCGGACAACCTTCCCGCGCGCCAGTCCGCAAGCGCGTGGCGGAACATGAGGC
CCCGGCTCGGAGGGCTCCCGCGAAACCGTGGCAGCACGCGGATCGGGGCTGTTGATCGGGGCTCAGGGCTGCACGAATAGC
ATGAATCTCGCTCGCTTCTGCTAGTCCGCTGCGGACACAGTGTGGTGGTCTGTCAGGGCGGAAAGCTGCTC
GCAAACGACCGGGGAGGTTAGATGATGACTCCTAAAAGAGCGACAGGAGCGCTCGTGTGGCGAAACAGATCCAGGCGCCAAAATGA
CTCCCGCGCCCGGAACTCTCCACCGCCATGGGCCAGTCCCGGCAACCGCGTCCGATGCTGAGGAGCTGCGGAGCTCGGAGC
CGAGCGCGCCCGGGCGCGCCGCTCACCGTGTGATGACGTTGAGGAGCTACATGGCCGTGACGCTCGAGCGGCGGAGGCTG
TCCGTCGGAAGCGGGGCGAATGATCCCGCTCGGACACATCAGCAGCGCGCCGAGCTTCCGCTCAGCGCCGGAAGCAGGA
GCGCTACTGCACTGGCTTCCATCTGGGGGCAACCGCGATCCAGCTACTGGTGGCTCCGCGACAGCAGGGGGCCAGGGCG
CGCCCTATCGCTCAGGAGGCGGCGCTCGCCGCTTACGGGTTAGCGGGTCCGCTCAAAGGGGCTCCCTCCAGACCC
GCTCGGTTGCTTCCGCGCGCTGCTTTGGCGCGCACACGGGCTCCTTGGTATCGGCGCGAATGGCCAGACCCCTCGGCTCGAG
CTGGGCCCGCGGGCGCGCCCGCGCCCGCCGCTTGGCCGCTCCAGGCGATCGCGGAATCCACCTACTCCGCTGAGGCTC
TTTGA AAAAAGCGCAGGTTCCGAGGCTCGCTCGGTCGGTGGCGCGATGACCATCAGGAGGACATGCTCTCCCTCGGTTGGTGGCGG
CCCGCGCACCTTGGCCCTGGGCGCCATCTTCTCTGAGGTCGGCGGTTGGCGGCTCAAGTTCCGCTCGGCGCTGAGGCGGAGGCG
CAATTCAGCTGGGCGCAGGACGACCCAAACCGGGCGGCGAGTCCAGCGCCACGCTCCGATCCGCGCGCGCGGACTCTCGCTGG
CAAAAAGCGAGCTGAAGCGGCTGGGGCGCTGAGGCGCGAATTTCCAGCTCCTGCAGGGCGGACCGCTTCCACGCGGCTCCAG
CACGGCTCCAGCTCGGGCGCCAGCGCTGAGGCTACTGCGGGCGCGCGCCGCTGGGGGATGGTCCCGGCGCTCCCTGGG

GTATCTGCATAGTGGGGCCGAGGCCGCCCGGGCGGCCGTTTCGAGGTCGTGCACACCCCCAGGTGCGCCGTGGTTTCGGTGATGA
CGGAACCGCAGCGCGCTGGACTGACTCAGCAAGTCCCGGGCCGTCGTGATACATGACCCGGGGGGGAAGGTAGGCCGCGCTACAC
GTGGCCCTTCGCGCATGTGCAGCCGACGACGACAGCGCGTCCCGACCCAGGTGAATGCCCTCGAGGGCCCGACGGGGGAAGC
CGCGACAGCGTCTATGCGCTGGAGGTGCGCCGACAGGGCGAATGAACACGCGCAGCTGCTGGACTCAAACTCCCCACGAGCGCCG
CCAGGCTTGAAGACTCCGCACTGCGCAGAAAGCGCGCTCGGCTCAGGAAACAGCTCCCGGGCCAGAAACCCCTCCAGGCGCGAAAGT
AGTGGTGGGATCAAAACCGGCGCACAGGCGGAGCGGGGTCGACGCGGCTGAGGGCCGTCGACACGCGCACTCTCGCGGCTC
GAACCATCTTGTGGCTCGAGCGCGGAATCATTATGGCCAAAGAGGCCCGCTGGTGTACCCTGGTGTAGGGGATGAGGGTCCG
CGTCGCTTCGCGAGTCCGTGGCCGTTGGGGCGCGCCGCCAGGAGATAGCCACGCCAAGCGTCAACCGATTACTACCGAGCCAA
GAACCGGAGGCCCTTTCGACGAACGGGGGGGGGAAGCAGGCTGTACGCGGGGTGGTAAGGTTCCGCGTGGGCTGCCCAACG
GGACCGGCGCCATCTTGAGCGACTCTCCCCAAGGGCTCGATGGAGGTCGCGGGCTCATGGCCAGCGACTCTGGTGACGGT
GCCAGCGGTCTATCCACTCCACGGCGCACTGGCGGACGCGGACCGGCCCGAGGGCCCGCGCGGTGCGCAGGCGGGCGAATCCAG
CGCATGGGACGTGTCGAGCGGATGACCGCGAGGATGGTGTCTTATGACCTCCATCTCCCGAAGCGCTGGTCCGGGGCGTCCGG
GAGAGCCACCAAGCGGTGTACGAGCAACCGGGGAGGTTCTCGGCCAAGAGCGCGTCTCCGGAAGCGCTGGGCCCGGTGGGA
GCGCGACAGGTGTCGCGCAGCGGGCCGACAGCTCCCGCGCTGCGGGGGGATGGCCGATCCGCAACAGAAACCGCCGCC
ATGGCGCGCCGACTGGCCGTGGCCAGAAACCGGGGCTCGCCCGCTTTCGCGTCTCGGCCGTGGGGTGGCGGTGGCG
AAGGCCGCTAGCTCGCAATAGCGCTCATAGGTCGTCGAGGGCGACCGGGGTTGAGTGTGACGTCGACGCGGGGCTCGG
ACGGAGACCGCGTGTGCCATGACGCCCGCTCGCTGGTGGGGACAGCGTAGACCAACGACGAGACCGGGCGGCAATGACTG
TCGTGCGCTGATGGGAGCGGAATATCGATCCCGCGCCCTCCAGGACCCCGCAGGCGTTCGAGTACCCCGCGCTTCGCG
GGGTGTTATACGGCCATTAAGCTCCGCACTCCCGTTCGCGGACCCAGGCCGGGATTGCGGATGTGACCGCGCGGGACGG
CGTGGGTTGCGGACTTTCGCGGGGGCGGCCAAATGGCCCTTAAACGTTGTATACGACGCGCGGGCGGAGTCCGCGCAACAA
CACCGGAGCGGTGACCGCTGTTGGCTGGGGTGGGTGGTTCGCGCTTTCGCTGAGTGTCTTCCAGCCCGCCCGCTCCCTCC
CGGGTCTTCTAGGTGCGGATCGGGTGCAGTGAAGCAATCCGCTACCCGCAACCCCTTCCGTGGGGCGGGAGTACCGTGG
AACTCCCCCAACACCGGATACCGCGGGACAGGGCTGCTTCGCGCGCTCTCGGCCCGCTCGCGCCGCTGACCCCGGCTGACCCCAA
CGACCGGGCGCCGAGCGACGCCAACCAGGATTTTCCGAGTGTCTGACCGAACAGGCGCTGGCAGAACGCGGGCGGAGCTCCG
GTCGAGGAGACCGCCCGCTTGGCACTCTACTGCGGGGACCAATGCGGGGATCGGCTGCGCGCATCTAACCCCTAACCCCG
AGTGTCTGACGATCTGTGCCAACCAACCGGTGCGGTCGCGCTGCTTTCGCTTGGCTTCCCTCCCGGTTCCCTTTCGCGCT
CCGCTTCCGAGCTGCTGCTGATGCTGTTGGGACGCTGCTTTCGCGCTCGGACCCAGGCGCCAGGCGCGCGCTCACCCCG
CGCACTGCTCACTCCGCTCGCGCTCGCCAGGCCACCGCGCCCGCGCACGGCCGCGGACGGCCGCGAGAGGTTGAGCGCGCGCTG
GTCACGAACCCCAAGTGGGACCGCGGACTGCGCCCGCTCGCGCGTGTATCTCCCGGATGTCGCTTGGCTCCGCTGTTGAAAT
GGCCAGCCCGCCAGCGCATCTCTCCGCTCGAAGCGCTCAGGCTCCCGCTTGTCACTTGGAAAGGCGTGGTGGCGCCCGCGA
GTGGCGGCGATGCGCGTGAAGGTAGCAACCGCCCGCCACACAGCTCCGCTTTCGCTTTCGCAACCTGACCATGATCAAC
CCCTTCCCGCTGCTACTCGTGTTCGTTGACCCGGGCTCGCGCAAAATGAAGCGGCTGGCGGAGGCTGGGGCCAGCTGAGG
CGACCGCCCTGGGTGCTGCGCCACAGGCTGGGGGGGAGGGCGCTACCGAGAGCGGGTGCACGCGCGCGGGCTAGTGTCTG
GACGCGCGGACGCGTCCGCGCCACTGGCCCGCGTGGCGCGGTTGGGGGACAGGAGGGGCCCTCTCGCCAGCGCCACCGGGGCG
GCCCTTGTACTCGCCGATGCGGTACGGGAGCGGCTTTCGAAATCCCGACGCTACGTTTCTGACCTGGTATTCACTACCGACA
GCGCCGGTCCGCGGGGCGGATACCGCGCCAGCGGGGCGGACACGCTTTCGCGGAGGACGAGCTTTCGCGGAGGAC
ACGACTCGCACAGGTCATGGGTTTTTCGCGGGGCTGGTGTGCTGGTTCACCGAGGACGAGTACGACGCTACCGCCGTGTC
CGCCGCGGCCAGGCTCCCGAGGGGTCGGGACCCCGGAGGGCGCGCACGCTGTTGGCTGGACGCGCACGAGGCGCACGAG
TGGACCGCGAGCTGGGGTGGGGGCGCGGGCTCAAGAGCCAGCTCCCGAGCGCGCGCGGAGCCCGCGCATCTCCCTCGAG
CCGCGCAACCCCGCCCGCGCGCTGAGAGCGGCTGTTGGCGCCCTCCGATCACCAACAGTATCACGCGCAACCCGAAACCC
GACTTTCCTCGTTCGCGGAGCATGACGCCCGCCCGCGCCAGGTCGCGGCTCCGACGCGCACTGTACGTACGCGAG
CTCGGATGATGCGCCGAGGATGTCGCCCTGGCCCGCTGCTGCAACCGCAGCGGCTTTGGGACGTAACCGCCACTACC
GCGGACCGCGGGCCCGCCCTCCCTTCTGTCGCGGCTGTCGCGGTGACAGGCCGAAACCGGAGTGTGTAACGCTTTCGGCGG
GAGGAGCCCAAAATGCAATGGGATACATGGAGGAATAAATCTCTGTCGCCCTCGTACACCCCGCTGACCGGACATCGGTGT
CCCGGAGGACCGGACTCGTTTTGGGACCCCGCGGCTGGCCGCAATCCCGAACCAGCGGCTGCTGCTGCGCGAGCTGTGTGT
GTGTACGTGAGTGGGGCGCGCTGGATGGATAAAAGCCAGCGCGGTGGTGTAGGGTACCAGAGTGTCTTTCGCGCGCGGGC
GCCCCAGGACCGGGCGCGCCGATTAACATCGCGGAGGACAGGACTCGAGCCGCGAGCGGCTTTCGCGGAGGCTGCGGGCA
TTCCGGGAAACCCAGTCCGCTCGCGGGGACTTTTCACTGAACTGGAATTTGTCCAATGATACGCAAGCAACAGTGGAGCCGT
GGCAACAATCTTCACTGGTCCGCTCGGATTCGCGGATTCGCGGAGGACGAGGACACGAGTACGACGACGCTTACTCGATCC
TCATCGATGACTCCCTCGAGATAGATGGCCCGTGTGTCGCCCTGGAGCAATGACACCCCGCCCTGGATGTTTCCCGCGGACCC
CCTCGCACGCTCTCGGACGTCGCGGGGGGCGCACCGGCCCGGGCGCGGACCGCGGTGTCGCCGCTTACCCGAGCGGGGGCTG
CAATCGCCCTTGAAGTATGACTGGGTCCGATGCTCTCCAGGACGCTTTTGGCTGGCGGCTCCGCGCTGTTTTCAAGCGCTGATG
GCGTGTGATGCTGCTTCTCCCTACCGGCTAGACGCGCGCGCTGGAATCTACGCGCCGAGACCGGATCTTCGCGCCGATCCCG
GGCGCATGATGTCGACAGCTACGCGGCGGCTGCGGAGGAGGCTGCTGGTGGAAATGTTCAAGCTCTACGACGCTTACGACCA
GACGTACCTGTCGACCCCGGCTGCTGAACTCGGGACCCCGCAACTACTACCTCCAGCTGCTACCTGGTCCATCGCCGCTCC
TGCAACCTGGGAAGCGTGAATCTGGCACCGCTGACGCGCTGCGTGAACACCCCGGACCCACTGCGATCCAAGGAGGACGA
CGCGGAGGGCTTTCGACCCCGCGCCAGTCCACACCGAGCTGCGGGCGGCTGCTCCGATGAAGGGGGTCTTCGCGGTGGGAC
GGCACGCTTCCCGCTCCCTCGCGGCGCTGGCGGCTTTCGAGAGTGGCTGAGGAGTGGCTGACCGCGAACCCGCTCATGCTGG
TTTTGCGGTCGCGCCCGCGCCAGGACAGATACCCATCCAGGAGCTGCGCTACCGGACGCCCTCGCTCACGCGGAGGACCT
TGGGCTCTCACTACGCGCTCGTGGAGATGCAAGTCTTACTGCTGCTGGCGCGCTTACTGCTGCTGCGCGCTTCCGCTCCG
CGAACGCATACGCTTATCTGAGGGATGTGACTCCGCTCGCTTACCGCATCTCGGGGTTCTGTTGACCTGCGGATCC
GGACCCGGGAGGCTCCTTGTATCTGGCCCTGAGGAGTGGCAGGCGCAGCGCTGCGACGACTGTGTACACACCGCCCTCGGA
TGCCAGCGGATGCGTCTCCAGGACAGCTTACTTGGCGGCTCCGCGCTGTTTTCAAGCGCTGATGAGCTCTACCGCCACA
CGCTGGTGGAAACCAAGCGTGTCCAGGAGTTTTACTAAAGCGTGTGGCGGGCACTACATGGAAGTCTTACTCGCTGGTGGCA
AGACCGGTTGAACCGCACTACTACGACACCCAGGGGGCGTGTGGTGAACCTCGCCAGCTGGACGGCGGAGAAAGCTCACAT
GACCTGTTGAAACCTCTGACCGGAGATGTCATGGTCCGGGACACAGCGCGGCTGCCACACGCGCCGACGCGCAGAGTCAACG
GGTTCAAGCCGCTGGTGAACCGGATGTCGCTCGCCGACTTACGGGAGGAGTTCGAGTGGCCCTGGATTTGGCTGACGGAAGG
CTTCGCGAGCACGAAGCCAGCTGGAGGCTTGGACATTAAGACAATGCCCGCCCGGCGACCCCTCGGGGCTCACCAGCAAGCTC
AGTGCCATCCCAACAAAGAGAGGCGCGCTCCGAGCGGCTCGCCGCAACCGGGGATCGGGTATGCGTGAAGGCTTTAACGA
CTCGCCCGCGGCTCCAAGGACTCCAGTGGCCGGGACCGCCAGCGCTCATACGCGCTGCTCCCGCCCGCTTACCAGTACCAGA
CGCCGACGCTCCCGGCGCTTGGGGCCCTTCTCCTACCGGCGCTGAGGTACTGGGTTCCGCGAGTGGCATTTGCGCGAGTGGCAT
TGGCGAGTGGCGCCACGACCGGGAGCCCTTAAACCCAGCCCGAGTGCACCCGCGGCAACGCAACCTGCGGCTCATGGGAATCGG
AGTGGGGCTGACACCGGCTGCTGAGCTGAGCTGGGCTGGATCTGGAGTCTGCGCAATTCAGGACTGAAACAAACACTCGCGGAG
TGATGCTGCTGTCGCGCATGAGACAGACGACGCGCTGTCGCTTCGCGGGCCCGTCCCTTCAACCTTTAAGCGCAGCATGTATCG
CGCCGGCCGCTTTCACGTTGGAGCGCTTCCGAGCGCCCGCGCGCTACGAGGGCGAGTGGGAGTGTACGCGAGGACTGATGAA
ACACGCTGCGCAACAGCCAGTGTTCGCGCTGATGCCACCGCGCTCGCGCGGCTCGCGGCGAGTCTCGGAGTCTAGCCAGGGGCT
CCTGTTACCAACCTGTTGAGCAAGGTGACCCGGGACGGGAGCGCTGCGCCCAACAGCGCTGCTGCTAAAGGAACTGGAACCGCAG
TTTAGCGGGAAGCGCTCTGGAGGATGGACAGTCTCGACGCCAAGGCGGACCGGACCGCTCCAGCGCTCCGCTGGCGAGGCGCC
ACCCACCCCTCCGCGGATCAAGACCGGCTTACTACGACGAGAAAGTGTGATGACGCTGTTGCGGACCGCGCCCGCTTACGCTG
ACCATAGCCAACTCATGACCGCTGTATGTCAGGGAAGGCGGACCGGACCGCTCCAGCGCTCCAGCTCGCGCTTCTGTCAGCCG
ATATAAGCGGACTAAAACAGGAGTACTACTCGAAGGTTCGCAAGGCGGACCAACAGCGGGGTCTTTGGCGGCGACCAACACTG
TCGATGAGCTGCGGCTGTGACGCAACACCCCTCCGCGCACGCCGCGCACTGCTGCTCCGCTCCACGCTTCCCGCT

GCTTCTGTGCGGCCGCCGACGACCTGGTTACGGAACCTGGGCGGCCTCTCCGGCCTGTTTGAGCAGAAGGACATTCTCCACTACTA
CGTGGAGCAGGAATGCATCGAAGTCTACTCGCGGGGGTGGGAGAGGATAAAAGCGCGCCCAAAAAGCAGTAAACCAGGTCTGTCT
GGTGTGGCGTAGGTGTTATGGGATGGAGTCTGGTGGTACAAATCATCCAGCTGGTGTCTTTTCCAAACCAACGACCCAGGCGCGCC
CGAGTACGTGTTTCTTATCATCTCATCGAGGCGCATCTTTTCCGGCCTCGTTGCGCGCATCCGCTACCTTCGCAACCAAC
TTCTGCGGGTCACTCGGCATCAACACATCTACAACAACTACCTCGCGGGCACGCAAGCCCGCGAAGAACCCGCGTCCAGG
GACTCGGGGCGTCTGGGGCGGACGGCAGCGCGCTCCGGACCCGCGCGCTGTACGGCTGTTCGGCCAGGCGGTGAGATCGAG
ATCGATTTATCCGATCCAGCGCCGACGGACAGAGCGACTCGGGGGTCCAGTGACATTCGCGCAGCACATCTCCACGGAGCCA
TATCTGAGCCCGGGCGGCCTGGCGCCATCGAAAACCTACGTGCGATTTGTACACGTACGCGACCCGTTGGTGTGATAGAGGTTGGC
GCAGGCATCGTCCGCTCCAGCTGACCCGAGTAAATCAGATGCGCCAGACGAGGCGCGCTTCCCGGTACCATCAACCCCGGGCA
ACCTGTCGGTAGCCGAGGGCCGCACTCCGCGCCAAAGTGGTGGTGAAGCGCGGGTGGCGGAAATCGCGCTCCGTCGCGCGGT
CTGACCCGCTCCCGGGTCCCGAGGCGAGAGGTTGCCCTCATAGCCGGTCCAGGGAATCTGGGGCGTCTGGGGCGGACGGC
AGCGCGGCTCCGGAACCGCCGACGATTTATCTCCGAGGGGACACGACTCCAGATTCCGGCTGTGATGATATGCGGGAAAC
ACACCAATTTTTCGAGTGTGCGAGCGCGGGTGTGATTCTTGGCGGTTGGCCACATAACCTCAGGGGGGTGGGAGAGGATAAAGA
GGCAGTGTAGCGGGACGAGCTATCCGCGCGCATCTTGGTGGTGGCGGCAAAAAGCAAGAGGGGACGCGCTGGCGGCATA
GGATCCATAAATTTATTTTCCGGGACAGCGCCTCTGCTGACGTTGGGCTACTCTCCAGAATTTGGTGGTCTTTGGCCAGGAC
GCTCTTGGGGTGGGGGACTTGGGCTCAGCTCAGCTGGGTCGCACTGCTTCCGGCGGATCATCAGATAGATCGCGCCAGGT
TTCTGTCGGATGTCTGTTAGTAGGAGCGCTTTCAGAAAGCTGCAGCGATAAGCGATAATGACCCCGGATGACGTACTTAATGT
AGCGGTCACTGAGGCTACCCAGGCGCGGAGAACCGCAATACAGAACCCAGGTGTCCACAGCTCGGTGATGTTGGATGGGATCG
GGGAATGACGTGGCGTCACTTTGGGCTCAGCGCCAGCGCGCTGCGGTCTTCCAGCAGCTCCGCGAGGACACCCATCCAGGG
GGAGTCTCTGCTCTTAAAGAATTTCCGTCACAGAGCGCGCTCGGTGCGCGCGCGCGCGCGCGGAGGAGGGGGTGGT
TCCGTGGAGTCCCGAGCGCCGCAAGAACTGGGGTAGTCTTAAAGTACTTTATCCGGAAGGCGGTGAGCCTCATGTCCACAGCT
GGCCTCCTCGTCCGCTCGGCACTGGGGCGTATATCGCGACAGTTGATCGTGGGAATGTAGCAGGCGTGAAGCGCCCGCGCTGACT
AATATCAACACAAATACAGGCCATCAACAGGAGGTCAAGTGTCCGTGGCGAGGGGGTGGAGAGGCGGTGGGGCGGGTGAAT
ACCAGGTGAGCCCGGTAACTCCCGGGTGGGCTTGGAGTGGTGTGGGGGAAGCGGTGGAGAGGGCTCCACGCGCCGCT
CTTGGGCGTGGCGGAGGACTTGGCTTGGCTCCAAACACACCGGCTCCATTCATCCCAACAAACCTGTCAACATCGGTAACGAA
GATGGGAAAAGGACTTTGGGTAACACCTTAAATAAGCGACTAATGGCTCGCGGTGTAAGTGGGTATCGCGCTGATATTTACCA
CAAAGTGTACATGACGTTCCACAGGTCACGGCAATGGGGCCAGATGGTGTGTGGGGCCCGAGGATATACCCGGGACCTGGAC
GAGCTCGGGCGGGTGTAGCTCTACGCGCGGGCGTGTCAACGATCTGTGAGTGTGCGCGCGCGCTTACCCGCTTTGGCCATAA
TAACTCTGAACCAACAACTCAGGTAAATGTAACGCGGATCGGCTAACTAAGGCGTGGTGGTGGCGCATGTGGACGGGACT
CGGCGACCGTCCGGGACCCGAGCCTGCTCTGTGTATGGTACCCAGACAAACACACCCGCAAGAGGACAATATCCGTTATGG
GACCGCTCTTTAATTTGATGGCCAACTCCACGCGGATTTGGTGCAGCACCTGCAATGCGCCGTGGGGCGCAACCTTCCCGCGCT
CAATCCCTTCAAAAGGTTGTGGCCAACTCCAGGAGTGGGGCGTATTTAATCAGGCTAGCGCGCGGCTGCGGTAGTTTCCGCTCG
GTGAGCAGCGTCCGGTGTCTGGTGGTCCCTGGCTGCCATCAAAACCCACCTCGCAGCGCATACGCGGCTCCCGCTCCGCTCC
CCGAGACCCCGCGCTGCCCTCACCAACCGAAGCCACTCTGACTGTGGGGTGTCCAGCGGCTTCCAGCTGGGATGACGGATCC
CCTGGCGGTGTGGCCCCCGCTTCCCGTGGAGGACCGCTCGGACCGCTCCCTCGGGACCGCGGAGGGGGCGCCGTCCAGG
TGCTCTGACGGCGCCGACTTAAAGTACTACAGGACTTGGCCCGCTGCGCACGAGCTTCCGCTGAGCTGCTTGGATATGGGG
GACCGGGGATCCTATCCATAACAGCATCTTTGGGAGCAGGTGTCTGTCGCCCTGGAACACTCCACTTACGTTATCGTGGCG
CGGACCCAGCGCGGCTCTGCTCTCGTGACCAAGAGCGCTCCCTCCTGAGCGTGTTCGCGCCAACAGTACCCGGACCTACG
CGGTGGAGTTGGGATCACGGCCAGGCGCGTGTCAACGATGGTTCAGCGCATATGAGCAGGACGCTCCGACCGCGAGCGGT
GAGTACCGAGCAGACGCTGATGAAGCGCAACTGACGAGCTTTGGTGTCTGGTCCCGAGGAACTCCAGCGCTCAGTTGCGCC
TACAGGCGCCGACTCAAGTCTTAAACGCGACCGGGCCGATAGTGCCACCGCCACCACTTCGAGCTCGGGTGAATCGGCA
AATTTTCCGTTTCAACCAAGTACCTCGCTCACCTTTGCTCCCGCGAGGAGGGCGTGTCTGTCAGCAGCAGCAGCAGGTTCCAGCAT
CTGTCCAAACCGCTCACCAAGGTTGGCCACCGCGCGGCGCCCAACCGCAAGCGGTGTAGCAGGGAAATACCCATCGCACCTTCTGTG
GTGCTCAGCATGTCAGCATGCGGGCGGTCTCCCGGACTGCAAGTTCGCGCGGGGCGCCCTCAAGTTTCTCAGCAGCCCGCTC
CCCAGTGTGCGCTCACGCGCCGCTGCCCTCACCAACCGGATATCGGCGGATTTCTCTGAAACCCAGAGATTTGCTTACGCTGGCTG
GTCATAGCCAGGGTCTCCTCAGCGGGAGCTCGGCGCTCCGGGCTCTGGAGCGGAGCAGCAGAGCAGGACTCCGCTCGG
ACGCGGTACGCCACCGGCTCCGAAGCGTACCGGTACTTTCCGACCTCCCGACCGGAGGAAAGCAGCCCGCGGCTTCTC
GCCTTCGGGGGGGCCCAAAACCCGATGGTTTTGGATTCCTCGTACGCGGGCGGGCTTGGGGCGCCCGGATGGTCTCGGGGG
AUCTCGGGTCCCAACTCTCGACCACTCCCGGTTAATGTAAATAAATTTGGTATTTGCCAACACTTCCCGGCTGCTCGGCTGGTCA
TGTGTGCTGCTCGCCCGCCACTCGGGTTCGTTATTTCCCTTCCGCTTATAAAAGCCGATTTGGGGCGGTGACCGAACCCAC
CCGCGTGCATACCGGCGCGCGCTACTGTTGGATCGGTGAAGGCGCGGATGCTCCGCAACGACAGCAGCAGCCCGGCTTCCCC
GGAGGACCGGAGGACGGTGCAGCAGCAGCGGCGCCACACTCGCTGCGTGGGTTCTTTCCCGCGCCAGCCCGGGAGGCGCTGG
CGCGGGGTTTATGCATATCTGCTTCAAGCGCCACGCTGGGTTTTGCGGGATCGGTCGTTATGTCCGCGCGGCGCTACGCGAATCG
CGCTCTGGGGCGTTCCCGCTCGGCGCACCGCTCGAATAAAGGAGGGCGCGCGGTGAGCGGCGCTGCGCGCGGCGGTGTGG
CGGACGTGGCCCGAGTTCTCGAAGCGCGCGGATATACGCTGCTCAACTGCGCGCGGTGGATGGCATGCCATGCGCGGTGG
CCCTGACGAGCTGTCCGACAGACTGCGGGCTCTTGGTCTCCAGGGCTTGGCTGCGGACGATCCGCGCAGCAGCAGCAGCGG
CGGACCCCGGGGACGGGCGGGTGGCGGCGACGCTTCCGGGCGCTTCTTACAGTCCAGTCCCGCTCACTCCACGAAAGCTG
GACCTGTCCCTTCAAGCGGGCGCTCGGGGCGCGGACAGGCGCGCTGGGGCCGAACTTTGGGGTGGGGTGTGCTGCTG
ATGACGTCTATCCGCTCTTCTCCTCGCCCGGGGCGGCTGTCGTCAGACGAGGAGCGCCACCTGGGGATGGTCTCGGGGG
CTGATTCGCGGGCGCAAGTGGGGCGGATGCCCTCCGGGTCAACGGGGCGGGGAGGATAGTCCGGAAGCCCGCGGCTG
GTTAAAGAAACCTAAGAGGGGTGGCCACCGCGGGAGTGGCGCTGCTGGGCTTTATGCGCGGCTAGGGGTCGTTGATGATA
TATTTTTCAGGGATGATTTGCGATAACACCGCGGGGGCGACCCAAACCCCGTGGGGCCCGGGTATAAATTCGGAACACCCCGG
ACCTTACGGACCCGCTGCTTTGTTTACGACCCAGTGCCTGGCAGTGGCGCGCCATATGCGTGGGAGGGGACACGGGACCGG
GGGGCCCGGCTACCTCACTATCGAGGGCGCTTGGTGGGGAACGCTCCGGGCTGCGGCTGTGAGGCGCTTCCGCTGGGTTG
TGTTTCGGTTTGGCGCGCGCTCTGTGACCTATTTCTGTCACCGGGCGCTGCCAGCCAGCGGCTGATCCCATCCGGTGTCCGT
CCAATCGCTCCGCTCCCGACCTAGAGGAGATCGAACCGCTACGGGAGCGCGCGGTGGAGTGTGTTTATGCGCGGCTCTCGCTT
GCCAGCCGATCCCTCGCGAGGGGGAGGCGTGGGATGGCGAACTGCTCCCGGGAGCGGTGGAGGCTCCCGCGCGGCGGTGG
GAAGACTCGATGGCGCTCCCGGGCGGAGGCGGGGCGCTTACATGCCCGCGCGGAGCGGCGCATTTGGCCGAGCAGCAGT
CCTCCGGGGGCTGGGCTTCTCAGCGCCAGCGGCTGCTGCTGCTGACCCCAACATCGACCCGATTTGCTTGGCGGAGTGGGG
CAAACCCAAACATGTACCAGCAAAAACAAACCCACCCAGGCGCGCAGCCCAACAAACCCCAAGCGACTCCGATGCCCA
CCTCCAGCACGATCCAGACACCCGGCGCCGCAAAAAGTGGAGATCCACGGGCGCGAGGTTGCTGCGCTGGCGCTCCCTCGC
GCGGGGGCGGAAACCGGGCGCTCCGAGTGTGCTGTACCCCGCTTCCCACTAAACCCGTCGGTACGCTCGCGGTCGCGGTGCA
ATCCGATGCGGTTTCGGAATTCACCCACATCGCTGCTGCGTCAAGAGGTTGGTGGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTTCCGCTCCAGATATGGCTTACTCCATGGTCCGTCGAAAGGTTGCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGGCTCGTGGCTCCGTCGCGCGCTCCAGACGCGTGGTCCGGGACGAACATACCCGCGCCAGCGGGGACTCTGGTGTACGA
CAGCGCCCAACCTAACAGGACCCCGCCCGCCCACTCCACCCCGACCCCGCGCGGATGAGTGCATAACCCAGTGGAC
AGGCCACGATCACCGGGCCCTGTGGTGCAGCGCGCGCATCTCGGTGCTGGGAGCAAGCGGAGGCTCCGACAGCGGAGCA
CCAGCGCCCTTGTCTACCGTCCGCTGCACAGGAAGTCTGACCCCGGGCGGGTCCCAAGGATGCGCGGAGCGGAGCGGGG
GTTCCGGGTGCTTGGGGCGAGGGCGCGCGCGCGCGGCGGCGGCTCCGCTGCTGCGGAGGTGACGCGCGGACAGGAA
GTAATTTGGCTGGGGCGGAGCGGACGAGTACGGGAGTGGTGGTGGCGTTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GCCACCGGCTGATGAGGGTCAAGCGTCAAGGCGAGTGCAGCGCGCGCGCTACTACCCGTAACCCCGTGGAGTTTGTCTG
GTTGAGGACGACCCAGGTGTTAAACCCGGCAGATCGACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
GTGACTCCGAGGCTGTGCGCGCGGAGGTCGCCCGGACCTTCACTGCGAGTACGTGGCATCGGACTCCGTAAGCTTCTG
CGACGATGCCACCGGGTGGCCCTGTGCTGCGCGGCAACCATCACCATGAAATTTGGGTCCGATGTGCTGTCGACGGCC
GCTGCTGCGCGGAGGCTGACGTTTCCGCTGGTCCGGGACGACCCCTCACCGGCGGCTAAGTGGCGCGCTAGCAGCGGAG

TCGTGCGACCACCCGGGCTGGCTACGGTCCGGTCCACCCTGCCATTTTCGTACGACTACAGCGAGTACATCTGTCGGTTGACCGGAT
ATCCGGCCGGGATTCCCGTTCTAGAACACACCGGCAGTACCAGCCCCACCAGGGACCCACCAGCGGCAGGTGATCGAGGGCA
TCGAGTGGGTGGGATTGGAATCGGGTTCTCGCGCGGGGCTCTGGTGTAAACGGAATCGTTACGTCGTCGGCACATCAGATC
GCGGCAGCGTATCGCGGTAAACGCAAGACCCCCCGTTACCTTTTTAATATATATAATGTTGGTCCCCCTCTATCCGCCACCCTG
GGCGCTATAAGCCGCCACCTCTCTTCCCTCAGGTATCCTTGGTGTATCCGAACGACACAGCGGTGGAGAAAAACGCTCCCC
CTGAGCCGCTTTCCACCAACACAACGGCATGCCTCTGCGGGCATCGGAACACGCCTACCGCCCTGGGCCCGGGACACCCCCCA
TGGGGCTCGGCTCCCCGCCGCGGCTGGGTTGGCTCGGGACCATATCGGGGGAGTTGTGATCATTGCCGCTGGTCTCTGTGC
CCTCGCGGGCTCGTGGGCATTTCCCATGCGACAGCGGATGGCACGAGTTCAACCTCGGGTGCATATCCTGGGATCCGACCCCAT
GGAGCACGAGAGCGGCTCGGGCTGTAGCGCCCCGGGACCCCTGATCCCCCGCGCGGCTGCCAAACAGCTGGCCCGCGTGCAC
GCGTCCAGTCCGCAAGATCCTCGGGCTACTGGTGGGTGAGCGGAGACGGCATTGCGGGCTGCCTGCGGCTCGTGCACGGCGTGGC
GGTATTGACCAGTTTTCGAGGAGCCCGCCCTTCGCATATCGCGGGCTTTGTTGAGTTGTAACCTCGACCAGCAACGCGCTGGGGCTG
CCGCGGATGCCCTCCACCGTGGATACGAGCGGTATCCACGGTCCCGTATTGGAGGACTACGTACCCCCCGTTCGCGGGCCGAG
GCGGCGTGCAGCCGTGAGGCGCGTGTACTGCGGTCTGTCTCTCTCTCCCTTCCCGGGGTCCGGCACGACCCAAAAATAA
AAACACACAATCACGTGCATAAAAAAAGACACGCGGTCCCTGTGGTGTTTTTGGTTATTTGGGAGGCGCGGCCATGTGCGTGAATGG
GCCGACGACGACGTGAAGGCTTAAATCTCGTCGACAAACAGGGGAAAGGGCGTGGTCTAGCGACGGCAGCACGGGCGGAGG
CGGGTGCGGTGTGCTGCTGGGCGCTCAGATGGCGCGCAAGCTTTTCGATGGCGGGCGAGGACGGGCGAGGGGCTAACGGCGG
GGGCGGGCCGTCCACGATCAGGCCCGGTGCGGCCCGGGGGGAAAAAGGGCGGATCCCCCAGCTGACAGGGGATTTTCCGCC
TCAATGTACGTGATATACTGGGAGGCCGCGCTGCATTGCGCGTTCACGACAGCTTTTCGTAGACCCCGATCCATGGTATTTCTCG
TAGACACGCCCCCGTCTCGCTCACCGTCTCGTATATTGACTCCCGCAACGTGGCCGGCTGTGTGCGAGCTTGGTGGGGCCGAG
CGGGGGGGTCTCCTCGTAGGGGGCGTGCCTTGCGGCGGGCGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGCCGTGATACGTTGGCTTCCATCTG
GTGCGGTTCTCCCTCCCCGGAAGCGGGGGCCCCGCGCGTCCGCGCGGGCCTCCGGAACCTCCGGGTGGACGCGGGGGTCCGAGT
GTAGGGGGGGTCCACACCCGCGCACGAGCGTGGCCGATCGAGGCTCCCAAGACGCGCGCGGACGAGGAGGGGGGCGAGTGC
CCGCGCGGTCCGCTGTGCGGTCCCGGACGTTACGGCCGGGTAGAAACGCTCTGGCTGTCCACCGTTTCCGACAGGTCCGGA
CCCCGGTACCCCGATCACACCGGTCAACGAGGGTGGCTGGCCGTGCGTCCGGGGAGGCCCCGCGGACACGCTGCTG
CGGCGAGACCCGAGGATGACTCGTAGTGGAGCGACGGCGCCCGTTCGCGAGCAGATCCGCGGCCAGGGCGGCCCCGAACCAAGC
CTTGATGCTCAACTCCATCCGGGCCAGCTGGGGCGGTATCGTGGGAAACAGGGGGCGGTGGTCCGACGATACTGTTTTCAG
GCTGTGCGTGGCCAGACCGCTACCCGGTGGGGTTCGCTTGGGGCGTGGTGTGAGGACGATCGACAGAGCCGCTCCGCTTGGCG
GTCTGCCACAGGTTGGCTAGGCGGCTCAGGTGGCCAGGACGCTCTCCCTCCGCATCCGTTGGGTACTTTACTATCCCCGAGTC
CCGCGAGTACTGCGTAGGAGCTGACCGCCCGCTGAGCGCATGCACTGCATGGAGCGTTCACCGGCTCCGGCGTCTTTCGCGTTTA
AGCTTGTGAGGTCAGTACGAGGGCGCTCAGGGCGGGCGTCTGGTTCAGGGCGTTCGGTCTGCCCCGCGGGCCCTCCGGGCTG
CCGCCGAGCGGGAGGACCGGAAGCGTAGTGCCTGGATGTACTCGTACCAGCGAGCCGGTGCATACGTTGCTTGTCCGTCCGCGCGGCT
CAACTGGCCCGCGGGCAGCTCCACCTCGCCAGCGCCTGGGTGGCGAGTGGGGTTCGTTGGGAGCAACTCTCGGGACGCTGCGTC
CACAGCATCCAGGACGCCACCGGTACAGCACGGAGAGCTAGGCCAGGAGCTGTTGAGCCGACGCGGCTGGGTCCGCGGGCTC
GTTGTGCGCGCGCCCGCTGAGGGCACCTCCATCTATAAAGAACATGTAAGTGTGAATCCGATGGAGGGCGTCCGCGAGCCCGGAA
CCGTTTGTGTTCCCGCGCGCAACCGCCACCGTGGCGGCTACTTGGCCGCCACGCCCGCGCGCGGCTCCGCGACCGGGT
CGTTCGATGGCGAGGTCCGGGGAGGGCGGGTCTTGAACGGGTGCGCGCCAGCAGCTTTGGCCCATGGGGTGCAGTCCGCCA
CGGGTCTCGGGGACGTCAGGGCCGTGGGACACCGCTGTCATGATCGG

cosmid clone 4A08 :

contig 10

'+' means given segment; '-' means reverse complement

Pairing test Number of segment pairs = 202350; number of pairwise comparisons = 5634

Assembly.....

Repairing....

Number of additional pairwise comparisons = 462

OVERLAPS

CONTAINMENTS

***** Contig 1 *****

15A01+
15A11+
15A015+

***** Contig 2 *****

15E10-
15E07-
15E05-
15E06-

15G10- is in 15E06-

15G015-
3C09-
15A10-

15E03- is in 15A10-

3C11-
15C04-

3B015- is in 15C04-

15E01-
3A115-
15E115-
15G06-
3B08-
3C08-
>15C06-
15A09-
15A08-
15C09-
15G04-
3A07-
15C08-
3A04-

15E04- is in 3A04-

15C015-
5B01-

5B05- is in 5B01-

5C01- is in 5B01-

5B015-

3E07- is in 5B015-

5C05-
5C06-

15C07- is in 5C06-

3E08-

3E09- is in 3E08-
5B06- is in 3E09-
3E08- is in 3E09-
3E04- is in 3E09-
3E115- is in 3E09-
3E03- is in 3E09-
15I107- is in 3E09-

15C01-
5B09-

5B07- is in 5B09-
5B10- is in 5B07-
5A09- is in 5B10-
15I111- is in 5B09-
15C11- is in 15I111-
15A03- is in 15I111-

3E05-

5C015- is in 3E05-
5A08- is in 3E05-
5A115- is in 3E05-
5A10- is in 3E05-

5A04-
3E06-

5C03- is in 3E06-
5A03- is in 3E06-

5A01-
15C01+
5I106+

	5G06+ is in 5I106+
5E06+	7B03+ is in 5I106+
7E115+	
	7B01+ is in 7E115+
5E07+	
	3I107+ is in 5E07+
3I101+	
7C115+	5E08+ is in 7C115+
3G10+	
5I108+	
	5I109+ is in 5I108+
	7B11+ is in 5I109+
	7I101+ is in 5I108+
5G07+	
5G08+	
7E015+	
	5G09+ is in 7E015+
	5I110+ is in 7E015+
	***** Contig 3 *****
5D01-	
15C03-	
5I1015-	
15C07+	
15G05+	
15A06+	
15G03+	
15A05+	
3A05-	
	***** Contig 4 *****
3A015-	
7F04-	
	3B015- is in 7F04-
	7A08- is in 7F04-
	7A01- is in 7F04-
	3A01- is in 7F04-
7D115-	
	***** Contig 5 *****
3F08+	
15I109+	
	5I111+ is in 15I109+
7F11-	
	7F08- is in 7F11-
7D09-	
7A07-	
	3B09- is in 7A07-
	3B01- is in 7A07-
7F015-	
3B04-	
3B07-	
3A03-	
7A06-	
3B05-	
7D05-	
	7F06- is in 7D05-
3A11-	
7D015-	
	7A03- is in 7D015-
7C08+	
7C01+	
5C10+	
7I1015+	
5C11+	
7E03+	
	5G04+ is in 7E03+
7C015+	
	5G03+ is in 7C015+
	7I105+ is in 7C015+
5C115+	
5G10+	
	7B10+ is in 5G10+
3F09+	
	5G015+ is in 3F09+
5D015+	
	7E05+ is in 5D015+
	7B09+ is in 5D015+
5D03+	
	5G01+ is in 5D03+
5F115+	
	7E09+ is in 5F115+
5D04+	
7E01+	
7C03+	
	5F11+ is in 7C03+
7C05+	

```

7E10+ is in 7C05+
5F10+ is in 7C05+
5D05+
5D06+
5F09+ is in 5D05+
5G11+ is in 5D06+
5G115+ is in 5D06+
3H115+
5F08+ is in 3H115+
7C06+
3G07+
7E11+
7C09+ is in 7E11+
5F06+
5F05+
3F10+ is in 5F05+
3F11+
5H01+ is in 3F11+
5F04+ is in 3F11+
7B07+
5D09+ is in 7B07+
7B06+
3G05+
7C10+
3H015+ is in 7C10+
5D10+
3F04+
3H03+
3G015+
5D11+ is in 3G015+
5H03+
5D115+
5E115+ is in 5D115+
5E01+
5H04+
3F115+
7B05+ is in 3F115+
5H05+
3G01+
5E03+
5E04+
5E10+ is in 5E04+
3H06+
5E09+ is in 3H06+
5E05+ is in 3H06+
12H115-
12B01- is in 12H115-
12G115- is in 12H115-
14A01- is in 12H115-
***** Contig 6 *****
7A015+
***** Contig 7 *****
7A05-
7F07-
7F01-
7D06-
7F09-
7F05-
7D011-
***** Contig 8 *****
7A09+
7A04+
7D03+
7D01+
7F03+
7D04+
***** Contig 9 *****
7A10-
7D07-
5F03+
11A01+ is in 5F03+
11H11+ is in 11A01+
11G11+ is in 5F03+
11B01+ is in 5F03+
11C01+ is in 11B01+
11F11+ is in 11C01+
11E11+ is in 5F03+
11D01+ is in 5F03+
11D11+
11C11+
11E01+
11B11+
11F01+ is in 11B11+
11A11+
11G01+
11H10+

```

11H01+	
11G10+	
11A015+	
11F10+	
11B015+	
11E10+	
11C015+	
11D015+	
11D10+	
11E015+	11C10+ is in 11E015+
11B10+	
11F015+	
11A10+	
11G015+	
11F03+	11H09+ is in 11F03+
	11H015+ is in 11H09+
11H03+	
11G09+	
11A03+	
11E03+	
11A04+	
11B03+	11F09+ is in 11B03+
	11G03+ is in 11F09+
11B04+	11C04+ is in 11B04+
11E09+	
11C03+	
11D04+	
11D03+	11D09+ is in 11D03+
11E04+	
11C09+	
11F04+	
11B09+	
11H04+	11D05+ is in 11H04+
11A115+	
11A09+	
11E05+	11A05+ is in 11E05+
11H08+	
11B115+	
11B05+	
11F05+	11C115+ is in 11F05+
11G08+	
11G05+	
11C05+	
11F08+	
11D115+	
11E115+	
11E08+	
11D08+	
11F115+	
11G115+	
C08+	
11H115+	
11B08+	
11D06+	11C07+ is in 11D06+
	11C06+ is in 11D06+
	11G07+ is in 11D06+
	11E06+ is in 11G07+
	11G06+ is in 11D06+
	11D07+ is in 11G06+
11H05+	11B06+ is in 11H05+
	11H07+ is in 11B06+
	11A08+ is in 11H05+
	11E07+ is in 11A08+
	11F07+ is in 11A08+
	11F06+ is in 11A08+
11H06+	
11B07+	11A07+ is in 11B07+
7D08+	
115A01+	
115E05+	
115A03+	
115A05+	
115B06+	
115D115+	
115B01+	

115E08+
115B10+
115D015+
115C01+

115A07+ is in 115C01+

115A08+
115A06+
115B03+
115E9+
115D09+
115A09+
115B015+
115D06+
115C115+
115E06+
115A015+
115D08+
115C04+
115C05+
115B09+
115A04+
115C07+
115D04+
115B04+
115C03+
115B07+
115D01+
115A10+
115C015+
115C09+

115D11+ is in 115C09+

115B08+
115B05+

***** Contig 10 *****
115B11+

12A07- is in 115B11+
14D04- is in 12A07-
12G06- is in 14D04-
12H06- is in 14D04-
14D03- is in 115B11+
12B07- is in 115B11+
12D06- is in 115B11+
14D05- is in 115B11+
12C06- is in 14D05-

14D06-
12B06-
14D07-
12A06-
14D115-
12H05-
14G015-
12G05-

14G03- is in 12G05-

14D01-
14G04-
12E05-
14G05-
14G07-
12D05-
12C05-
14G08-
12B05-
12E08-
12A05-
12F08-
12H04-
12G08-
12G04-
12H08-
14G09-

14C115- is in 14G09-

14G10-
12E04-
12D04-
14G11-
14C11-
14G115-
14H01-
12B04-
12G09-

14C10- is in 12G09-
12A10- is in 12G09-
14H1015- is in 12G09-

14C09-
14H103-
12G03-

CCCCAGACGAGCGTGGCCGTCACGAGATGCTGGCGTACGCGGCCACGTTGTACCGCTGGCTGCTGTGGATGATGGACACGGTCCGAC
GCGCGCGTGGTCCGCCACCTGGGGCGCACGCGCGGGTGGCGCGGGCCGCGCGAGACGATGTCGCCGAGGCCCTTTGGGC
GGCACCGCCGCGCGGCCCGCCGTGGCCCTGGGCTCGGGCGAGGTGCTGCTGCTGACGAGCCACACGGCGACGGTGTGGTGGC
CCTGGAGATCTCGGGCCACGTGGGCGAGACGCCCTGGAAGAGCGCGGTGTCGGCCCTCACGGCCCGCGTCTGGCCCGCGTGG
ACCTCGTGAACCTTCGTGCCACACGCGCAGACCCCTCATCAACCTGACGCTGGCCGGCTACGTGTGCTGGCTCGACGACGGGATGGA
GGACCCGTAACCTGCGCGCGCGCGCTGCGCGCGCAGTGCCTCCACCACTGATCGGCGACCTGGCGCCACAGCTCTGTCGCACG
CCTGGGGCGCCATGGAGCGCGGCACGCTGCGCTGTTCAACTACGCCATCGCGCGACGCTGGCCCTGATCGCGCGGGCCACGGAG
CGCTTCGCGCGCGTGTGGCGACGACGGGCCAGCGGACATGCGCTTCTGTGCGTCCCGCGCGCAGCCCGCGTGGCCGCGT
TACCGGGCGTGCAGACGCCGTCCGCCCGCCCGCGCACGCGACGCGAGCCGCCGACGAGTACGTGACCCCTTCGCCGAG
GCTGTGAACCTGGCCGCTCCGCCCGCCCGTCCCGAGGGGCCCGGAGCTCGGACGACGAGCTGGAGGTGGACGGCGG
CGGGCGCGCCCTCCGGCGCAGCGCGACGCCGCCACGTGACGAAACCGCAAGGACCTGCGCCCGCGCGCGCGCGCGCGG
GGAGGGGAGGGCGACGACGAGGAGGAGGAGGATGACCGGTTCCCGCGCCGCGACGCGGGGACGCCGGGCGCTCCACGAGCTCG
TCGCAGGAGAGCGCCCGGACGAGGAGTTCGCCCGCGGGATCGGCGTGCGCAGCGCGAGGAGGACGAAAGACGAGGGGTGG
AGGAGGAAAGCGTGTACGTGCACCCGACCGGGGACGGGAAACGAGGCGCGCGCGGGCCACGACGACGACGCCCGCTGGGCCCC
GCTGACGCGCCACGGGAGCATGCGCACCAAGCTTCGGCGCGGGGTCCCGGGCTCGTTCGCCCGCCCGGAGCGCTTCGTGCGCGCC
GGCTTCGCGCAGGCGCCGAGGCGACCCCGCGGGCTCCCGTCACTCGGCGCGCCCGCCCGCCCGCGGGTCCCGGCCA
GGCCGAGACCCGACGCTGTACACGACCCCGCGCGGACCCCGCGGACGCGCGCTGTACGACGACCCCGCGGATCG
ACCTACCGGCCACCCGCGTCCGCGCCCAAGAGTGGCGCTGTGACGGCCCGCGGACCCCGCTGTGATGGTTCCCGCGT
CCCCGTGTGTGGAATAAAGTTTTTCTAATTCTGTACACACGCGCGTGCCTGTATCGTGGGGAGAGGGACGGGGAGAGGGG
GGAGGGGAGAGGGACGGAGGGGAGAGGGACGGAGGGGAGAGGGACGCGAGACGTTGCCAAACAGCGCATCTTTATT
GATTCGCCGGGAGGGGCTACAGGGCTCGGGTCTCGCTTCGAAAGGATATGTAGTGGACGCTCGCGGTACGACGAGCGCTC
CGATAACCGCCGACGACCGGGCTGCTGCGAGCCGCGCTGCACCTGCGGCAACGGCGCGGCTGAAAGGGGGCGGGCGCATG
GGCATGTGGCTCAGCACCGCTCAGTGGACTGCTGCCAGGGGAGCGGAAAGCAGCCGGGGCCCTGCAGATGGTGTGCGCGGGGA
CCTCCTGGGACGCCCCACCGGACTAGAGGCTGGGCTCCACCTGGCCGACGACTTGTCCCGCCACCGGGTGGCGCGGGT
GCATGGCGGGGTGCACCGGACCATGGGTAGCGCTGCCACGCGCGTGGACGACATGAAATAGCTCATGCGCGTACGCTGGGT
CCGCTAGAAACCCGCGACGGCCCGCGGTGGTGCCTACACCACTGGGGCAGGCGCTGATGTACAAGGGGTGCTCCTGCTCG
ACCCGACGAGTACCACCGGGGCCCGCAAGTTGCTCCGGTATGCGCGCGGACACGAGCTGCAGCTGCAAGGATGG
CTGAAGTACCACCGGAGGGCTCCCGTCTCACGGGCAAGCGGGCGACCTGGTGTGGCGTGCATGTTCAAGCCGCGACGACC
TCGCTGCTGCGAAGTTCGCCCGCACCTGCACTACGCTAAGGACTCGGGCAAGATGGTGTGCGGGGCGTGGCCCTCAACACTTGA
TGACCATGCGGTTCTCCGGCTCAAGGGCGCCCGATGCGCGCGGTTGCGGCATGCGGTAGCTGGGGCGCGCCGGAGCCG
CCCAGCGGCTCCGGTCCGGTCCGGGCGCGCTTCGGGCTCGGGCGGGCCGCTGCGGGCGCGGGGGCCCGGGGACGGGCT
CGGCCGCTGCGCCCTGGTGGCGGGCCCGCGGGGTGCGCGCTGGAGGCTCGGGCTCGCGCGTGGCGGGAAAGCGGGG
CGGCCGCGACGAGGTCGCCACCGCGCTCGGGCGCTCGGCAAGGGCGGGGCTGGTGGCGCGCGCCCGACGAGCGCGT
GGCGAGCCAAGTACCGTCCCGTGGCGTACCCGCGGAGGACCCCGCACACGAGATGTAGAAGAAAGGCGGACTCCCGC
GCTTCCCATAGCGGAGGACCCGCCAGGGCGCTGCGGCTGCTCGATTTTCGCGTGGGGCAGGCATCGGAGGCGTATGGCGCAG
CTACTACTACCACC

>Contig 10

GCAGCTACTACTACCACCGCCACCATCATCATCGACGCCGTTACTGCGGAGGCTACGACCGGGCTGCGCTTTAGCTCGTGGCGT
CCGCGGACCGCCAGGAGGCGATACCCCTTCGCCCCCTCAGGCGGAAGAAGATGTAGACGCACACGCCCACAGGAGCGCGCC
ATCGCGGTGCCGTTGCCGACGATACCGAGCGGTGGCGCGAGACCCCGCGCGCGGTTGGTCCGGGCGGGAACGGCTCGCGG
GCTGCGGCCACCCGCTGGCAGCAGCGCCGGCGGGCGAAGGGCGGTTGCGCGTCTCGGGCTCGGAGGTTGCGGCGTGGGGC
GGCCCCCGCGCGGTGGTCCCGCTGCGCGCTCGCGGCTCGGCGAGGCGCGGGGGCGCGGGGCTCGCCGGGGCGGGCTCGGCTTC
GCCGGGGCTGGGCTGGGCTCGCGGAGCCCGGAGGGCGCGCGGGGTGATGGCGTACGGCGTGGCGCGGGCGTATGGCC
GCGGGAACGTCGGGCTTCTGCGGTACCAAGTGTTCACAACCTCCCGGTGCGGGGCTGCTGGTAGAACCGGCTCAGGAATCGCAT
CACGTCACCGCCCGCTTGAAGCTGTGCTGCTCCAGCAGCGCCGAACTTGTACGTGCGGTTGGTCCACGCGGGCGAAGGGCA
CTCTTGCCCTCGGGGAGCGCCACCATGAAGTTCACAACCTCCCGGTGCGGGGCTGCTGGTAGAACGCGGTCAGGAATCGCATCAG
TCCACGCCCCGCTTGAAGCTGTGCTGCTCCAGCAGCGCGCAACTTGTACGTGCGGTTGGTCCACGCGGGCGAAGCGGCACTT
GCCCTCGGGGAGCGCCACCATGAAGTGGTGGGAGGACTTCAAGCGCTGACGCGACACGAGCGCGGCTACTGCCCCTCGTTGAACC
GCCCGGGGCCACCATGAGCAGCCCGAGCTGCTCCTCGTGGGAAACATGTAGTCCGCGGACGGGTTCCACCATCGGCTGGTGG
GGCGCGGACGCGCCAAAGATCTGCTGGGTGCGAGTCCGACTCGGATAAAGTACAGAGGTTGGCGCACCCGTCGCGATGC
GGTACCAGGCCAGTGGGCGCGGTACGTGGGCGCGGTTGGGCCACCGCTGTTGAGCAGCGGTTCCACTCGGGGTCGGAGATC
AGCGCCACCCCGCACGGGCTCTCCAGCGGGCGGTTGGTAGACGTCGCGGGGCGGACGAAAGGGCGAGGGGACCGTGTGCA
GCGTCAGCTGCCACGACTCGGTGTACGGGTACGCGGGCGGGGAAAGGTCGGCGCGGGCACGCGCTCCACTCCGCGCGAGCGT
CGTCCGGGCGACGCGCCCAATAGCGCTGCGAGCAG

Number of segment pairs = 30800; number of pairwise comparisons = 229

'+' means given segment; '-' means reverse complement

Assembly.....

Repairing....

Number of additional pairwise comparisons = 21462

OVERLAPS

CONTAINMENTS

```
***** Contig 1 *****
A09+
***** Contig 2 *****
A10-
I111-
      8A11- is in I111-
I108-
      I109- is in I108-
D01-
***** Contig 3 *****
C10+
***** Contig 4 *****
C12+
***** Contig 5 *****
D02+
***** Contig 6 *****
D03+
***** Contig 7 *****
D04+
***** Contig 8 *****
D05+
***** Contig 9 *****
D07+
***** Contig 10 *****
F02+
***** Contig 11 *****
F03+
***** Contig 12 *****
F04+
***** Contig 13 *****
F05+
***** Contig 14 *****
F07-
3B04-
3B09-
C03-
***** Contig 15 *****
F09+
***** Contig 16 *****
F10-
I103-
I106-
G02-
***** Contig 17 *****
F12+
***** Contig 18 *****
G01+
***** Contig 19 *****
G03+
***** Contig 20 *****
G04+
***** Contig 21 *****
G05+
***** Contig 22 *****
G06+
***** Contig 23 *****
G07-
G10-
3A02-
3D05-
3C01-
***** Contig 24 *****
G08+
***** Contig 25 *****
G09+
***** Contig 26 *****
I101+
      B04+ is in I101+
***** Contig 27 *****
I102+
***** Contig 28 *****
I104+
***** Contig 29 *****
I105+
***** Contig 30 *****
I107+
```

```

***** Contig 31 *****
III2+
***** Contig 32 *****
I01+
***** Contig 33 *****
I02+
***** Contig 34 *****
5B01+
      B01+ is in 5B01+
6A02+
***** Contig 35 *****
5B03+
      6B03+ is in 5B03+
***** Contig 36 *****
5B05-
      6B05- is in 5B05-
6A11-
***** Contig 37 *****
5B07+
***** Contig 38 *****
6A01+
***** Contig 39 *****
6A05+
***** Contig 40 *****
6A06+
***** Contig 41 *****
6A07+
***** Contig 42 *****
6A09+
      5B06+ is in 6A09+
8D06+
D06+
      8D02+ is in D06+
3C04+
***** Contig 43 *****
6A10+
***** Contig 44 *****
6B06+
***** Contig 45 *****
6B09+
***** Contig 46 *****
6B10+
***** Contig 47 *****
6B11+
      3A05+ is in 6B11+
***** Contig 48 *****
6B12+
***** Contig 49 *****
6C02+
***** Contig 50 *****
4C04+
***** Contig 51 *****
4C08+
***** Contig 52 *****
4C09+
***** Contig 53 *****
4C10+
***** Contig 54 *****
4D02+
***** Contig 55 *****
4D03+
***** Contig 56 *****
4D04+
***** Contig 57 *****
8A01+
***** Contig 58 *****
8A02+
***** Contig 59 *****
8A05+
***** Contig 60 *****
8A06+
***** Contig 61 *****
8A07+
***** Contig 62 *****
8B01+
***** Contig 63 *****
8B02+
***** Contig 64 *****
8B03+
***** Contig 65 *****
8B04+
***** Contig 66 *****
8B05-
3B08-
***** Contig 67 *****
8B06+

```

```

***** Contig 68 *****
8B07+
***** Contig 69 *****
8B08+
***** Contig 70 *****
8B09-
3A10-
3A01-
      8D04- is in 3A01-
***** Contig 71 *****
8B10+
***** Contig 72 *****
8B11-
3F11-
      3G01- is in 3F11-
      8E07- is in 3F11-
      8F08- is in 8E07-
      3I06- is in 8F08-
      3G06- is in 3I06-
      3I05- is in 3I06-
      3F09- is in 3F11-
      3F07- is in 3F09-
      8E09- is in 3F11-
      3G05- is in 3F11-
      3G03- is in 3F11-
      3F10- is in 3G03-
      3F12- is in 3F11-
      3G02- is in 3F11-
      3H07- is in 3F11-
8C09-
      8I101- is in 8C09-
***** Contig 73 *****
8B12+
***** Contig 74 *****
8C02+
***** Contig 75 *****
8E02+
***** Contig 76 *****
8E08+
***** Contig 77 *****
8E10+
***** Contig 78 *****
8E11+
***** Contig 79 *****
8F01+
8F02 - 100+
***** Contig 80 *****
8I103+
***** Contig 81 *****
8C08+
***** Contig 82 *****
8C10+
***** Contig 83 *****
8C11+
***** Contig 84 *****
8C12+
***** Contig 85 *****
8D01+
***** Contig 86 *****
8D03+
***** Contig 87 *****
8D05+
***** Contig 88 *****
8D07+
***** Contig 89 *****
3A03+
***** Contig 90 *****
3A04+
***** Contig 91 *****
3A06+
***** Contig 92 *****
3A07+
***** Contig 93 *****
3A09+
***** Contig 94 *****
3A12-
3D02-
***** Contig 95 *****
3B01+
***** Contig 96 *****
3B02-
3D08-
***** Contig 97 *****
3B03+
***** Contig 98 *****
3B05+

```

```

..... Contig 99 .....
3B07+
..... Contig 100 .....
3B10+
..... Contig 101 .....
3B11+
..... Contig 102 .....
3B12+
..... Contig 103 .....
3C02+
..... Contig 104 .....
3C03+
..... Contig 105 .....
3C05+
..... Contig 106 .....
3C06+
..... Contig 107 .....
3C08+
..... Contig 108 .....
3C09+
..... Contig 109 .....
3C10+
..... Contig 110 .....
3C11+
..... Contig 111 .....
3C12+
..... Contig 112 .....
3D01+
..... Contig 113 .....
3D03+
..... Contig 114 .....
3D04+
..... Contig 115 .....
3D07+
..... Contig 116 .....
3D09+
..... Contig 117 .....
3D10+
..... Contig 118 .....
3D11+
..... Contig 119 .....
3D12+
..... Contig 120 .....
3F05+
..... Contig 121 .....
3F06+
..... Contig 122 .....
3F08+
..... Contig 123 .....
3G07+
..... Contig 124 .....
3G08+

```

CONSENSUS SEQUENCES

```

>Contig 1
GAATCCTGGTTAGGCCGAAGCGAAAAAGCTGCTGGCCGAAGCCGTTACCCAGGTTTCAAGACCACCATCCCCTACCGAGGCCCTTA
CTACCATTGACCCTAGTGACCCTGCCAGCCTAATCATGCATCATCTACATCCAACACT

```

```

>Contig 2
GATCCTGTCCCGGGGCTAAGTTAGAGCCTTCTAACCGATCGCTATCACATGCGTCCAAGTCATGCTGCACATTTTGATCGCCGGTCACTC
GCGCGCATATGTCTGATGATATCCGCTTAACTCGAGTGCCACCACCGCCGCGAGATCTTGATCACCTAGGGGGCCCGACGCTCTTAAGCT
ACAGCTGTCGGACGGACTGAAGCCGGTTGTCCTTCTGGTGCACAGCTACCGGGCCGACNGCGTTCGCGGA

```

```

>Contig 3
CAACCCGGCCAAGGCCAAAGCCATGCGTGAAATGGTCGAGTACAGCCTGACCAAAGGCCAGACCATCGCCGATTCGATGGGCCACATC
CGCTGCCACCGTCGGTTGTCGACCAGGTGCGCAAAGCGTCGGCCAACATCAGTAATACCCAGGCGCTCCCGGTAT

```

```

>Contig 4
CCCTTGTTGGGTGGCCGCGCGGTAAAGGGTCAGACCCGAGCGAAGGCGTAGGCGTCGAGGATGCCTTCGATCACTGCCTCGCCACTAAAT
TCAAGGCCGTTTCCAGTTGCTGCAGGAGCTAATCCCGACCTAGGAGCCTGGCAGGCGGAGTCAGGCCAGGTTGGACAAGAATGCCA
GGCGTACCTCGCC

```

```

>Contig 5
CCCTGGTACGGGCAGGTAACATCATGGTCAACTCAAGCCCAAATCCCAATCGTAGGTTTATAGCGTCAGGGCAACTCTCACGCCAC
CGCGCGATCTCGCAG

```

```

>Contig 6
CTCCCTCGCAGCCCTCTCTGCAGACATCATTGCCGACTACCGGACACTCGGCTTGCTCCCTTACCAAGCGCAAACCGCCAACCGAAC
TAACACCTCAGACTGACGTGCGTCTCCTAGC
CACC

```

```

>Contig 7
CGCCAGCTGGACACGTATACATAGTCAGTGCC

```

```

>Contig 8
AGAAGAATAACAGCTTCGATTTTTCTCCTCTAAAATAAAAATTATTATTTATACAGTTTTATCGAAATGAGATTGCTGTTTGATTAAGTGC

```

CTGACAGAATCACC

>Contig 9

TCAGGTTTGTGCGAGATGGTCCGAGGTGGCGTTCCAGGTATGTAGCTCGACTGATTGATCTACCCGCCCTATTAAGTCTCGACGTTGTAA
TACC

>Contig 10

GGACTTCTACGGCTACTTCCCTCCAATGGCACCCCTGTCTCCGATTGGGCGATTCTCTCAGACCCGGTCTGGGCGTCTGGGTCTGT
CTGGACTCGATCTGCAGCCGGGATCACTAGTCTAGAGGGGCCACGGTAGCTCATGC

>Contig 11

CCCAGGCCGGTGAATCGAACTCAAGGCCACAGTGCATCCAGCTTGGCGATACCGCTTGGCAATCGATCATTAGCCAAACAAAGGTA
CATTCCACAACCTACCT

>Contig 12

TTCAGCAGSTGTTGCAGTATGCTTCCGAGAAGGCCGGGACGTTGCCAAGCGAGGCCCTTTCAGGGCAACCAGCGCTCCGAGTCCAGC
AGCTTGTTCAGCTCGGTTACTGCCAGCGGATACGGTCCCGAATCTGTGATGACTGATCGACGATGACGCAGTCCGATCGGCTGACCT
AGAGAGAACTACCGAGTACC

>Contig 13

GTTGCGCTCAATGACTCGCAGGATTCGGTGAACGATCCACCTCGACGAAAAACCGCAATGCTGAOCGCCTTCTGGCTCCAGGCTTCG
GTAATGGCAGTACGAGGTTATGACGCAGACAGACAGTTCGATTCCGGCTGGTTGGTGGCACGGGAGCAGATCCAGACTCGAGCTCA
CAGGCCAGTTGTGCACATGAGACATTGAGATGATCAGACTATACATTCAGGATAT

>Contig 14

AGGCCAGGACCGAATTAAGTAGGCAAAATGCGGTAATGTATCCGCTAGGCTTGGATATTTATTTTTATCGGCTCTATCCAACCTCACAA
AGATCAAACCTTGGTCTCAGGTAGATGAAATTCGTTGCACCTGAGGTTGCGATTTTACCCGCTTTTGGGCAGATAGTCCCGCTACCGGT
ATGCACCTGGTAGTGGGATAGTTCAAAAAACCCAGCTCCAGGCATTTCGTGATTTAGCCATGGGATTTCCCTCAGGGGGGTAATCT
CGAACTGCCCTTAGCAGGCCGCTTACACCCGCTTACCTTCCC

>Contig 15

GGCGAAATACAGTCGCGGGCCAAAGTGCTGGCGGCCAACAAACGCCTCTCGAAGAACTCGACGAGCTGGAGGCCAAGGCCCGCGCGG
CGACATTTGGCTGACGAAGAAACGCTGTACGCTTCTACGAGCGCGCTCGAGCGAAATCACAAGCCGGACTTCAGCAGCTTGACGATGC
AGCAAGGATCGACTCTAATCGATCTGGAGAGACTGCTGTAGTACGATCCGATCGATCGTCAATGATCGGGATC

>Contig 16

GGGATTGGAGGTAACGGTAATGAGGTTGAATTTAGAGGAGAAGGATAATGGTGAAGTTTCTAACCGAGTTCGTAATTAACCATTGGGTCCA
AAAGGATCAGTGTGCAACATTTTACTGACCGTCACTCGCAGCATTATGCATGAGTGGATATCCCGACTTAACTCGAGTACGGACCA
CCGCGGATCGAGATCTTATCAGCCTAGGGGGATCCCGTACGATCTTTATAGCTACAGACTCGATCGAGGACGGCATGCTAAGCCGG
ATTGGTACCTTCTGGTAGCAGACTACCGGGGCCGAACGCCGTTCCG

>Contig 17

AAGCCCGGCTGGAGCGCGTGCACGACAGTGAAGCCAGCCGTTGGCCGGCCCTTATCAGCAGCGGGCAATCGAAGGGTACTCCGAAG
GGCACCGGGGACAGACGCAAGGACAGGCCGGCAAGCCGCAC

>Contig 18

CCGGCGCTTGACCGTGGTATTGAAGTGGTTGACCTCGACTGAAGTCGAAGCCAACTTGCATCTTTCAACTTGAAGTGTGATCGCT

>Contig 19

GGCAGCTGGGCGTGTCTGCTGATCCGAGGAAGCCGGTGGCCTGGTGAAGCAGTTCACCGTGGTTAGCGACTTCTCGAACAAGGGCC
ACATCGTTCGAGGGCAACATCAAGTGTCTCAAGGCCGCTACTGACGCATCAGCGACCTCAGAGAGACTAGCCTAGCAGATCGCGAGAAGA
TTTTTTTTCTAATATCTAATAT

>Contig 20

GGCCATCGAGCACGGGTGCTTCCGGTTGCCGAAGTGCAGAGAGCTTCGACAATCGAAATGATCCTGCAGCCCGATGCCGACTAG
TTCTAGAGCGAACAACACGTGGTCA

>Contig 21

CCAGCCTTAGCCCGCAGCAATTCGGCTACTGACCATGGTCTGTGAAGGCTTGTGAACAAGCAGACGCCCTATGAGCTGAACGTTGTCG
GAAGCAACCATCAAGGCCACGTGACCGCGATCTCGCAGCTGGCGTGGCCACCAGCCAGGCTGCCGTGCTGCGAACCAGATCGGC
AGCACTACTCCGGGCTACCGAGGCCGACGCCG

>Contig 22

TAAACGTATAGATCGATGAGACAGACAAGCATGGGATTATATCGGACTACTATGATAGCCATGCCTGGGATTAGGTCTACTGTCTTGCCT
CCATACGGCATGATAGGTATGAGGATCAGGTCCGCGAGTTGCTCGGCCCGAGTTGCACCCGTTCCGCGCATTAAGTCTCACCAACTGC
TCGGGGCTGAGCGACCGGGCAGGACGCCCTGAGAC

>Contig 23

GGCGCGGATACGCAGTTCGAGTACGGTACTCAGCGGGTAGACACTCCGTACGACCGAGAGACGGAGTAAGTGTCCAGCACGTTTCCC
CTACACAGACGTTCCCGTAATTAACCCATTGCGGGTCCCAAAGGGTCAAGTGCCTGCAACATTTCTGCGGGTCACTCGCGCGCAT
TATCATGATGATATCCCGTTAACCTCAGTGCAGCCACACGCCGCGGAGATCTGATCACCTAGGGGGCCGACGATCCTTAAGCTAT
AGATCCAGAATCGGCTCCATAGTGGCGCGCTCAAGGAAAAACCCGGACTGTGCAGTGTCAAAGGGGGCCGCTACTCCTG

>Contig 24

GGAAAGAGGAAGACACCAGCATCTTGGTAAAACCGCCCGGAAGAAACGCGGCCCTGAGCACAGGACAATATGATGACCAACGCAACG
CGCAACGTAATCTGGCGCTATCCAGGAGTCTGAGGTTCCGGAACCGCGCGAAAGAGCCAGAAGACACTATTGTCTAGCGATCCGGC
ATGAGAGGCTCGCAAGTCAATCTCTACGCAGTACCACCGGCTAGTAGCCTAGGCCCTTAGCGCTCAGGG

>Contig 25

TATACCAGCAAACTGCGATTTTGCCTTACGCCAGCGACCTTGGCGACCGCTTTATCGACATCCACCATCCGGTATTCGCGTGGAAAT
GAGATACACAGACGCTGTGAAGCTGTAGTTGCACCCCTGGACGATGATTACGCTCAGTCTGCCGTCAGCTATTGTCTCGGATAGAGAG
ACTGACTGCCGTCTATCAGGTTAGACGGATGATATACAGGAGGTTCCG

>Contig 26

GGTCAATCATTATGCCAGGACGGTATCCGATGATCCCGCCAGATCCACCCCGCCACCATGATCCGACGACGAAATCCGCGCGATT
ACCGAGCAGGATTTCGAACGTTGCCCGCAAGGCGATCGCAAAATGAATCGATGCGCCGTCAGGATCTCGCAACGAATCCTGCCGGCA

ACCTGCGCAACCATAGGTCGATACCTGCTGA

>Contig 27

GGGTGGAGGTGAACAAAGCGGTGGCGCGATGAGCTTCCGTCGGCGCACAGTATGCACTGTTCTTCGAGGCCCTGGCGCTGTACTG
GAAAGCCCTGGAAGCGCAACCTGCATGGACCAGTCACCCGGTGATGAGCTACACCGATGTGCGTTGTTGGCGAGAACAACCGAAACTC
CGATGCT

>Contig 28

CCATCGACACGTTGTCTTCTAGGTTGCCGAAGTCAGGCAGGCTAGTCAGACATCGGAATTCCTACACCACGGTAGATCCACTATTCTAA
CTACCCCTACCCATTGAAGCTCCAATTC

>Contig 29

TACGTGGCCTAATGGTTACAGTATGCCATCGCAGTTCGCTACACGCAGGACGCTTTTTACGTTCTGTTGGTTGTGGCCTGTTGATG
CTAAAGGTGAGCCGCTTAAAGCTACCAGTTATATGGCTGTGGTCTATGTGCTAATACGTATCGATCTCGAGCC

>Contig 30

CCATCGACACGATGAGTCTTCTGAGATTAGACACGAAGTACGACAACGACATGTACGACATCGAAATTCCTAGCAAGCC

>Contig 31

CCATCGACACGTTGTCTTCTAGGTTAGCCGGTCAGACATCGAATTCCTGCAGCTCCAAGGGGGCAGGCCATGCCACCATAGGATTGA
GTCTCCAATTGCCCTATAGGTAGTAGCTATAGCCCGCTACCTGGACGTCGTTAACTCTGCTA

>Contig 32

GGGTTTTGACATCACCATGCACCGTATGGGGCATGATGACGGTGCAGTAACAGTCAATGCTACCTTCGGCCGAGCGGACTTACCGA
GGTAGCCGTGGCCGGCTTGGCTGGCTCTGGTAGCCGAGTAGCCGGCGGCTATACCGCTGGCTACCAAGTACG

>Contig 33

CCTCCTTCATCCGTTGCCGCTTGTCACTGGCCCTGGTCTGCTCCGAGGTGCGCATCGTTGCGACCCGGGAAGAGGCCGACATCCATCAT
GATCATCTCCACCG

>Contig 34

ATCAAGCCAAAAATTAATGTCTCTATATACAGCGTGTGCTTAACTTTTATTATCCCAGTTAATATCGGCTGATGCTTTTGAAAAAGTATG
GAAATAATATTACCAGATTTTTTATAAGTTCTAATGCAACTTCAATACACCGTTTTATGTTGCAATTTATTTTTAGCATTTCAAGGTGTG
ATTGCAATGCCCTTCTTGTGTTTTTTTGTGCTATCTTTTTCAGAGGGTGTCTCAACGGTCAAGGCTCAATACACAGTCTGACATAAGACAA
AATCTAAATGTAATTAATTTTTTACTAAGTACT

>Contig 35

CGAACGTGCCAAGCATATTAAGCCACTTCTCTCATCCAACGCTCAGTTTTGACAGAATCGTTAGTTGATGGCGAAAGGTGCGAAAAGTA
AGAGCTTCTCGAGCTCGCTTGGTAGGTCAAGTTTACTCATTTTTGCGAGCAGTCCACTTCGTTAATTCGAAACACGAGTAGTATTCTCTTTC
AGTATTTTTGCT

>Contig 36

TAGTCGATAGAGATTTTTTAAACGGTTTTTTCATGTGCCCTACGTCCTGAGTGATACAGTGAACACTGATACCATGGCAGTAGGATGTTCTGA
GACAGTATCTTCTATACCCACACATACCAGACGTAGGCTAGCGGCTTTTTCAGAAGTCTTACGCTACCCGGCCAAAAAGGTCCGTTGCT
GGTCAAGTCTTTTTACATTTTTAGACCATAATTTGTCAAGT

>Contig 37

TTGCCAAGGGTTCGTGGCAAGCGAACTAAGAGCCTCGGTCCGCTCGTTGCCGGCTAGGATGTGGCGTCCGGTGTGCCGAGAGTCGC
CGATCGCCTCGGGGCACATGATCAGCT

>Contig 38

ATACAATCCCTAGTTTAAAGTAGGGATTGAAACTAAGCAGTTTTACATTCATAAANAANTGTTACCCTTGTAATACTTCAATTGATATAAAG
AAAGTGTGCAATTGGTAATTATCTAATAAACGTTAATTTGAAATTAATTTGGGTTCAATTTGCGGATGCTCACAGGAGATATACTATCTAAAAT
GCAGATCTATACCTGTTTTCTGTTTTTATG

>Contig 39

AATAACACACTCTAGGTATCATTCTTACCTGCAAAAGTATGGGGAATAGCATAGGATGCACCAAGTCATTTCTTTTTCCAAATTTAATTTTATT
TGCTGTTCTTTGAGTTCTTTTTAGCCACTTGACGTTAACTCACTTGGCCATTGGATATTGGCCATGCTAATCAAAATCTTGATACAT
ATGCAAGTTTTACTGAGAAGTTAAGTAACAGTTTTGAAAATACTTTTTGACAGACACAAGAGCTTAAGTAGTCAGGA

>Contig 40

ACAAATACTATTTTTAGGTAAATAGAGGGATCTAATTGCTCATTATTAATCAATTCATGAAGAAAATATATTTCCAAAGAAATATCTATG
ATGCTTTACAAGAAAATCCTAAGATTTCTGATCGCTGAGTACAGCCGAAGTCAGACTAAATGCCGATCGAATCGACTCGCAGTATCGCT
ATAAAAAGTCAGATTTTCGAGTTTTGCGAGTAAAAATCCAGACAAGGTTTTGAGATCTATCGAAAATTAACAAGGTAATTTGAGATTGGCGC
CAGAAATTAATACGCGA

>Contig 41

GAAITTTGCTGCATCAATTGTNTTCCAGTTAAGTAAAACCCGTACGCTCTGATTTTTAGTCTGAGTGTATTTAGAGGTATTGTGGCGGATT
GTGGATAATTAGGTAACGTGATACATCTCTCAGAAGTAAACATCGCAACTCCAGTGGGACAGTACATCGTTAATAGTTTTTTTCGTTCTCC
ATTCGAAATGTAATAATCATCACTGTGCTTTTATTATTCGGAAGCCTTAACTGTTACGAGCGATTCTGTGCACTGTTATACACACACTCGTGA
T

>Contig 42

TACAGAATGAAGCATATAGCCCGACTTTAGGGTCGACACCTGCAATGATGGAGAAGGCAATTGCTTCAGGAATTGAGAGCCAAAGCAACA
ACAATACCCCGCAAGAACATCCCGCTGAAATTTGATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCCGCT
GAGCTCCAAATTCGCTATAGTGAGTCTGATTACGCCGCTCACTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCGTCGCTTACC
CAACTTAATCGCCTTGACAGCACATCCCCCTTTCGCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAACCGATCGCCTTCCCAACAGTCCGCGC
CAGATGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGCGCA

>Contig 43

TCATAACGATGGGTCAATCGAGATGCCATACGAATAGCATGACCTGCAGCACAGCCCAACTATAAACAGCCCAACTATAAACAGGCAGAC
TTACAATCTCTAAATCAACCAACTCACCTAAGTACTCGCATATTCAGAGCCGATGCTTATTCTACCATGATCTCGTGAAGGTATACCCC
ACATAGACGTGAGAGNTTCACTTCGATTTTCGAGTTTTATCACAACGCGAGGACATGATGTTGCCACACAGCTAAAGTTAATAGTATCTC
ACAGTGCATTTTT

>Contig 44

AGAAATTACTGATACTACAATCCCACCCCTACTGGCTTACATTTTCACGGCTTTCGGTCGGGGGTATTA TACTCGATAAACCATCACTTC
GCCTGATGATACCTCGTTTTGAAGTTCAGCATTACTCTACCTGCTGCTGCTACACA

>Contig 45
ACCAGACGCCCGCAGCACCCCGTCTCCGTTCCGTCGCCTCCTCGCGTGAAGAGGTCCTCGCGCACTTTGCCCTCGGGGCTCATACG
TTCGACCCAAACATAAAGCGGGCGTCGGAACCGTATTTCTGTCTGATGGCGGTTACAGAGATGGCGGCGTTGTATGAGCTCA
CT

>Contig 46
AAGTTACCGGGTCCAATCACGGTACGTCGTCGCCGACATTAAGCTGCGCGCG

>Contig 47
TCGCGTAATACTTCGCCATTTTTACCAGAAAAATACCCCCAGAGAAGTTTTCGCTCAGGAGTTAGTTTTAAAAGAAAAATTTATCTATTTT
TAGAATAAAAAGTCCATTTATAATGGTACCATCTTCGCCAATTTTCTCCAGTCACTGATTTTCTAACAAATAGTTCTACCAAATCTC
CTAATTTCCAGTAATCATTATCTCACCAAATAGCTGCAGTTGATACT

>Contig 48
TGAAGGCCAGCCATTCCTGCGCTTTATTTGATTCGATCGAACAGGATGGACACACCTGTAATCTCATCGGAATGTCGGTTTTATGTCTAA
AATCCTGAACAAGTCTGATCACAAAATTTGCCATAGTCAGGCAAAGATATTCCGGTCCGATATCGTCGACATGGTCATCCGCGTATGCTC

>Contig 49
TCAAAAAACAATGCCAAAATATCATGGATTACTGAAGAACAATAATCATATATTCGACGACATGTCAAAAAATTTAACAAGGAGGAGGAAA
AACATTACAATCGTTCTGCAGCCGGGGTCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGACCCCGTGGTCCAATTCGCCATATAGTGTGTGATTA
CGCGCGCTCACTGCGACGTTTCACACTGTG

>Contig 50
CCTGTGCTTGTCTACCAGTACTGCAAGTTGATCATGTGAGGTTAAAACGAATAAACATTGTCTCATGTTATTTGCTTCGATAATGTCTGT
CTCGATGATTTGACGGAGCATTGTTACAGGGTCAGAGCATGCCAGGTGACGCGCATTTAGCTTAGATGCTCATCTCGAGAATTTGTCGGGAC
TGATCTCTAACG

>Contig 51
CCATTATAAGCACTCGCCTCAACAATTTCTGGGTTAATGCGCACTGCAGGCTGAGATAGCGCTAAGGCCAAAAGCTACAAGTACAAAAT
ACTGACACCAACCAACTAAGGTAGCACTGCAGTATTATCATGATACCCCGTGTCTGATAGTCTGCAATTTCAAGACTACTGCTTTA
GATTGTAATACTCCGATTGGATCCCGCA

>Contig 52
CCCCAGTTGACCCCAACTGCGCGGACATCTGCGCCGAAGTCGGTCTGCTGTTGGTGCCCCAGTTGTAGCCGCTGACGTTTTCCATC
TGCAATTTGGCAAACGAGTAATTGACCGTAACACAACCCAGATGCCCGCTGAGGAGCTCGAGCTGAGACCCGAGGAGGCAAAGTGGCT
TAGGGCTGGAGAGCCGTCACGATGTTTTGATCGGATCGATCGCCAG

>Contig 53
CCTCTAAGTTATAGCTTCGCTTATATGTAATCTACCTTTGGACTCTCAAGCTGACCGGCTTTTTCTACTACAGTATTGCTGCAAAAACAGA
AAAGTGGCAGAGACTAAGCGATCAAGTGAAGCTGTTAAAAGGCTAGACTCTTACTGGCTGGCTTCCGTTTTTAAAACAAAGAGGTG
GTCCAACTGGCTCTGAACCACTAAAGGCTAGT

>Contig 54
CCAAAAAACAATACCACAGTAGGCACATCGACTATGGAGAAGTACACTTGTATGATGGTCACATCACAAGTTGGGCTTTTCATGGCAC
CACCAAGTCAAGGCGCTTTGCACTTTATGTGGGGCAGTCAATTTGACAAGGGGCTATTGGCACATCCTATTGATTGACCATAGTTTACAG
ACACTTTGAAGATTCGAT

>Contig 55
GCCAGTCCAACAGGTACGGCTTCAGTTTGTAGCTTCGGAGTCAAGTTTTGCTATAAAGCTTGGCAAGCTTTTGGCACTAGTCTTTAGC
TCTAAACTAAAGCTGACTTTTGTCTAGCCGAGTTTCCATTTACAGGAAGCTCTAAGCGTGTGTCAGTTATCAAAACAAAGCCACTGCGTA
CTGGCCTTTCGCTACTTCTGGACTCCTACAGAAAAGCTAAGTTCAAGATCGATCTTTGGGTGAGAAAGGCTCCGGTTAAGGTTATAC

>Contig 56
GATGCCATCTTTAGTTTCTCAATTCACCATCGCGATACAGCCACTACCATTAGGTTTTATCAGATTAATCCAGATCCAAATCGAAAA
TTTACGAATCCAGAGATCCGTGACCTAGCTAGCGTATGCACCTGCACCTGACTAGTTACTCAAAATCATCGAAAAAATCCCACAGGACC
TCGAAAGGAGGTATCGAAAAGTACTAGAGTACCATCCATAAGGGGATGATATATGATCGGACCTCGTATCAGAGTTAAGACCCAGTA

>Contig 57
CCTTGAAGCCACAGAAGCCACCCATATCAGACCGTAGAAGTTCATCTCCGACGTTGAAGTGGTGACACCTTCACCAACAGCAGTGACAAC
CCCAGCCATATCCGTTCCCAACAGCAGGAAGCTCTGACTAGCATATGTCGTCGAAGACGATTTATATCATAGTCAACACTAGATAATCGA
CTAGACTGCAGCTGT

>Contig 58
TGTGTTTTTACAGCGCTTCATACATCTCTGATTAATAATGTTATCCCTGATATTTTCCGTTATTAGTACAGAGGAAAGCTTAACAATCTTAAA
TCCATAATAACACAGTGATTTCTGAAGCAATTTGCTTCTCACTGTTCTCTCATCGACAGACGGAAGGCTACCGGTAC

>Contig 59
TTCCCTTACGTAAACAGCTCCAGCGCAATTCAGGGTATCCAGACTGAACCGGATCTGCTGACTGGCCGCCACATCGAGCGCAAAAATCTTC
GTGTACACTCCGTAATCTCAGACTTCTCATGTCCATCAGTCTGCAGACCTTCGGTGACATGCATACACAGAGATCGATCCGAACCTGC

>Contig 60
ATCGAACGCTATCTATTGAGCTCATCAGATATATTAAGCTTCGGAATTTACTGACAGACTGAACAATTTTGACACATAAACACTATGACC
GATCGACTT

>Contig 61
GGAGTACTGGTACTTTTGTACAGGAAAAATTCAGAAAAACAATAAAGTGTGTGAGACTATGGCCAAAGTGTGAAAAACTCAACATATAAA
GCTCCTTTAAACATGAAACCCGCGTTTAAAGCGTTTTCTTTTT

>Contig 62
ATATTATTATATCCAATAAGCCTCTTAGGAGATAAAGAAAGCCGTAATCATTATTGTTCTGAAAAGATATTTACCTTCTGTGTTCTTGCAG
GGATTTTACAAGTGTTTTTCTCCATTGGTGGCAAGTCAGTTCTAACTTATCGAGAGTCCC

>Contig 63

GGGTAGACACCTCATCAGAACAGTTCCTGCCACCTTACGGCGTGGCAGCCAATAAAATACGCTAACGATCAGTAATCTACGACCTACC
GCAGAAACTCTCAAGAACTGCAATCCTAACAGGCATTATATCGCGTAACTGCTGTTATGATC

>Contig 64
TTACAGGACGCTCATCGGCACACTCCGACCTGACCATCCCTCTCACTCTAATGAACTCAAATTGACTCTCGGAACCTCGTATCCACACAGTC
TCGAAATACTCTGCGCTATCCAACCTCACATCTCGAAAGTTCCTGGAGAAATCAGTTAAATAA

>Contig 65
TTCTCCCGTCTCCCGCCCTTACACACCCAACGCTCCAACCCGGCCCGCCGGAACCTTCAACCAAGCCAAACGCCCCGCCAACCTTGA
ACCGCTTTTCCAAAAGAACCCCTAGATGCCGATGATTATACCTGTTCCAACCTCCGATCATCCTTTTCGATTGAAATAAGTCTTA

>Contig 66
CTATGTGCCAATTGAGTCAGTCATCCGCGCATATGATGATGATCCCGATTAGACCATCGAGGTGCGCCACC GCCCGCGAGATCTTGAT
CACCTAGGGGGCCCGACGTCACATTAAGACTAATACGCAACAGTTTGTGAGGCACATGTGGACAAGCTGTGGACGCCGGGACGCTGGT
CCCGGATCAGGCGGCCCGCTGACTAGGTACGTGCCACATGTAGACCAGTGCCTGGGCTC
CGCG

>Contig 67
GTATACTAATTCGGAATGTCCTAGTGCCAGTGGATGTGATCTCTCAGATCGGAAAAGTAATATCGGCGACAACAAGATGAGATCAGAAC
GTCAAAGATCCCGAGATTCCGAAGAATATTCCTATAGTAAATAAATCTGAACCTCCGAGAACGTCAAAGATCCCGAGATTCCGAAAG
ATATTCCTATAGTAAATAAATTCGAACCTCCAGCAGCACATTAGAGTAATCCC

>Contig 68
AGTCTAACTTGAATGACCCAGTTTACTACTCAGCAGCGCAGCAGCACATGCCAGAACGACCGTGCATGGAACATCAATCCAACCTGGT
TGAAGTCTGTCTGTTGAAATCAAATCGGAGAATGAAAGTTTATCTCTGGCATGGAAGCACAATTGCTATGTGCAGTATAACTCGAGGTA

>Contig 69
TGATCCAACGCTTACGTCATCAGTTTTCTGGATGAAAAAAAACCGTTTGTCAACAGTGTGGATATCGTCATAAAATAAAAACGTTTGATGA
AGACATTTCTTGCAATCAATCAACGAAACGACGGTTTTTTTTGTTACT

>Contig 70
ATGCTACACGGAAATATGTACGATTCTCCAAGAGTCCATATACATGGTCAAGTCAAGTCCGTCACATTGTGACGCTCCACTGCCCGCATTATG
ATGAGTATATCCGCTTAACTGCAAGTGGCCAGCCCGGCGAGATCTTGATCACCTAGGGGGCCCGAGCTTAAAGTAATATCCGACAG
TTTGTGAGGCCCGCTTGAAGCAAGCCAGGGTCCAGGGTACCAGCTGGTCCGACATGGTCCGCTAGAGCCCGGCGACGGTCTAC
AGGCGATCGTACCTAGTGCAGTAGGGTT

>Contig 71
TGCTGAGCCTTACGCTGACTTATCGATCGCTGCACATCAGCGATTGATGGGCAATCCAGATTTACGAAGTCCATTTCAAGGCTGATG
GAGTTCTCAGAACATTATGATTAGAGCAATATAACAATCTCACCGATTGTTTTCTTGGTCCGATCCAATCGCTTTGCAATAGATGAGTT
CGAGCCTACTGAGGA

>Contig 72
CATGTATACTATACGCTAACCTATACTTAAACGGTGGTAACGAATACTAGAACGCATACCTCCAAACTTCTCTTTGACCCAAACCTTTA
GTGTAGTAGAGAGAAAGATCGGTAGAGGTACAGTGCATGTAATCAATTTGAGTGGGGTACACTAGACGAATGACACAACCTGGTACG
GACCCACCTCGACGGACCCTGACCTCGCTCCAAAAACCCGCTCTCTAGTAGGTCACAACACCGTTCTCTCTTCTAG

>Contig 73
GGTTTTACTGCCAGTGAACAGACGTCGGGAAACGTTTAAATACGATCTGAATGAAGAAGACAGGGCATATTATCCCAACCAATCATAACTT
TCGTTCTTCAAGTATAAAGTTTTATAGAAACCATCGTCAATCTCGCAGCAATCACGGCCATCGCCGCCATTGCGATTGAGAATACGGCAAG
ATAGGTTGATGATTGTCGTG

>Contig 74
TGAATTGATGCAGATACGTTGACGGCTCCGAATCGACAGATCCCTCCCGATCCGAATCACTCGCACT

>Contig 75
CGGGAGATGGCTGGTACCCTGCGAACACACGAGTCGATGCGCACACATCGGTACCACCTGACGACGCCGATCGCTAGCGGACGTAG
ACTGCGTTACTTTCTAGTTACCAGAAGGTGATGATGGCATTGCTCGACC

>Contig 76
GGGTGAGAGAACGCTGGCAGTCTGAACCGAATAAACAGCGCCTGCTAAACAACCTGCTGTGTTGTCACCTGTTAGAGATTCTCCTTACG
AATGAACAGGCCATTGCGATTACCGCAACATTACCGCAGACGCTTCAATCTATAGGTAACCGATTGGCAGCTT

>Contig 77
ACGTGAACACAGTTTATAGTATATGTGACGGCGAGCAGTGCCTTCCGAGTTCCTTCACTGCTCTCCCAACGAGTCCCTGTA
TCAGGTTAATGGATCAGGCGGTTGTTGTAACCAAGTATGGGATGTTGTTAGCGATAAACACGAGCTCTCCTTGAA

>Contig 78
GCATTTTCGACGATAGCCATTACATTTGTCGCAACAGTTTTCGCGTTATATAAACCTGAACCCGTTGGCATACTTTCTCCATACTATAAAA
ACATAAACATCGCATAACACGTGAAGTATAGTACCCGATTTATCGGTGGACAACAGATGAGACGTCACAGTACACTTAGAGTC

>Contig 79
AAGCAACTCAGCCGTCGACATCGACTGGCCGACGACGAAACTACCAAGTTGAACCCGTCGAGACCTTACCGGAATCCGAAGAGCATACT
TGATGTAGCCTCCGAGACCACAGCACCAGAAATCCCCAGAATAATGTTGACGACGACCCCTACATTTGATTTCCCGGCATAATCCAT
TTTCGGATGA

>Contig 80
AAAAACCCGTCCTCACCAGTACCAGCGAGCTCACCCAGCGATGGTCAACACATGAACGAGATCCAATGGGATGATGTAATTAATTGCA
TGCACATG

>Contig 81
CCCAAAAGCAGACTGTGACTCTGACTATCTAGGTAGATTGTTATTGACTTTGACTTTGACTGATACGTAATATCGCGCAG

>Contig 82
GCTCAAGGATGTCAGAAAGTTACCAGCAGCTCGTGGGACTTCCGTAACAGCTCAATATTTCCATTTCTCACCTCATGACGTT

>Contig 83

AATGGATTGGCAGTCGGTGCCAAAAAGTCTTTCTCACCAGTACCATTGTCACCTTTCAAGGCCAACC AAAATCGTGGCTGAGCTGAC
CTATCCTGTGACTGGCAAAAATGTGTCGACCGTATCTATACCGATCTATGTGATTGATGTTACTCCAGACGGTTTCCTCGAATTCCTGC
AGCCGGGGATCCACTAGTCTAGAGCG

>Contig 84
GAAAAATAACGTTAATAAAGTATCCCTACAAACTGCTGGGTGAGTTTTTTCGAGCATTGTTTCGATCTATGACGACGCTTGGCGTGTG
CAGATTGTCAGATTGTCAGATCAGAGACCATCTTGTAGTCCGATCCATTTTTCGATGACGACGCA

>Contig 85
GACTTGTGATGCTCACTTATCAATAAAGTACGAACATTAAGACTATATCAGACAGCTAGAGCATAAACATCACCAGCAGAACCTACTAT
ACAACATAACGAGGCTATTGAGATCGG

>Contig 86
AAATGCAAAAATGTTTGACGCTGTTGCTGCCTTGAGAGAAAGGGGAGACCTGACGAACAACAGAAAGGGGATAAATGGCGCTCAATTAGG
GGGATCTTATTACAAATCCAACTCCAACAAGGCTAGAGTATAACACAATATTTATTTATAGT

>Contig 87
TTTTGGGTATTTGGTCTTTTCATATCACATCTCTTATACTTTTGGCGATTTATAACGTTTTATGAAAATACAGCTACTTTACTTCTTACAT
AAG

>Contig 88
TTTGGCGAAGGACATTTGACAGGTTTTGGGTGACGGGGGAAGTACATAAGTACGGACACGACCAAGGTTTTTGCACGCGGAACAACT
GTCTGACGGGATATACTTAACACTGACACAATCACATGCTGGACCAGTACCCTA

>Contig 89
TGGAGTCATGGGTGCTTAGTGGTATGGCTGCTGGCGTTGCTATGGCATTATTTGGTTCAATCTTAGTATGTTGCTATCTCAGGCTAGC
ACTAACAGCCATAACCATGCCAGGCAATTTGCACCATACGGTTCACTTATACT

>Contig 90
CGTTCGTGTATCTGAAGGAACACATCCGCCGTATGTCGGTGGACCCAAATCACGATTATATCCGGATCCTTGCACGGCAATCCATCCT
GACAACTGTCAGCTCGTAGCCGATATGATGAGACTTCGAGTGGCGCTGAGCCCTTACAAATACGCCGTGCTCA

>Contig 91
TCTGCTGGATGGCTTTTCTGTCGGGGTGTAAAGCGAACACACCCCGCGTGGCAGTCTGATCCAGCGTTGCGGTGATCACGAAC
ATACGTCACAAACCGCGGCTTCTGCTTCTTATTACCCGGCAGCAGCACCTGGACGGGGTATCATCGGCATGGAG

>Contig 92
CCTGATCTGATTGCCGGTAATGGCGTAAATTTTCTGCTCCTGTGACGTCGAACAGCCGGTTTTTCTCGGTGGTGGCATGAATCCCGT
GATTGGCGGTTTATGACGACGCCCGCAATGTGGCGATTGCGGCAATCAACATCTAACAGTAACACCGAAGTCTTACGGCTTCTTCA
ATGGCCAATAAACG

>Contig 93
TAAATCCGCGCTGATCGGTTCTTATTGCTGATGATACGCCGAAACACGCGGATCGTTCAGATATCGATAACCTGAACGCTGAA
ATACCGAAAGCAGCGGTGATCGTCAGACACTCCTTCTGTAATCATCCACAGTTCAGGCACCTGATCCTCGACCGTTGACCAGAGC
GACCATACGAATCTTCGACATTCGAGGTTCT

>Contig 94
CACACTAGCAGCAGTAGTCGAACGAAACTGGCTTGCATCTGTGCCAAATTACTTGGCGAAAGCACTCAGACCCGACGCTCCTGACC
GTTTGAAGTCGACCTGGCGGTCATTAGCTGTCCGAAGGACTCAGTACTTCGACGCTCATGAAGCAATGAAGCTGTAGTAATGTC
GCTGAAACCTGGTTCGATCAGCCGTC

>Contig 95
AACCCCTCACCCGGAATCGACACGCATTTACGCCGCGCTGGACTGATTAACGACCGAGATCGCGCGCATCGCCGGCAGGAGACGAAAA
AATGAATTCATCCTCGACCTGTCCGGAGTCTCATGGGTACGTATCACCAGTACAACCTCGCGGCAGATTTTCCGG

>Contig 96
GTTAACGAGTGGCACGCGGAGATTTGATACCTAGGGGAAAGAGCTCTTAAGCTTATAGTATACCGAACGTTTGTGAGAGCACAGTGTG
AACAAAGCTGTGACGCGCGGACGCTGTTCCGCGGTTACGCGCGCCGCTCGCACTAGGTAGCTTGCCTGTAGACGCGCGCGCGG

>Contig 97
AACTATAGCCATGCGATATGGGGTGTACGAGAGTTAATAACTCAAGTAAGCCGTTGCGAAGACTTTGAGGCTCATGTTCAAATACATC
GACGACCCTTGACGTCGTGTTGTTAAATATCTCGTATCAATGTTGGT

>Contig 98
TGTGAGCAAACCGTCTCAAGCTAACGTTAACATACTTTCTCCAATAAACGCTTCTAGCTTCGTTACTGCTTCTGTGACGCTGACCAGTTGA
GGTTTTTGTGATGAGACTTATAGTTAGATC

>Contig 99
TTTTAAGGCCGTGCGCGAAATGCTGCCTGCTCGTCTTGTGATGACGCGACTGGCCGCTGATGCACTCCGCTTTGGTGAGACTGA
ATCAGCCTTTGATTACATGATGGCCACTCGCGAGTATCTCGACGAACACGGCAAGCCCTTGCCTTCTACAGCGATAAGCACGGCATT
CAGGGTCAATAATGGAGTTC

>Contig 100
GAAACAGCAGCGTAAAGAAATGGTCGAGGCTTTATTACGAAATTTGATGATCAGTATCAGTTCCCTTATACCCGACGGGTGATAATCAT
CCGAGTGAGCTGCAAGGTGAAGATCACCCGATTTGATGATGATTCTGAAACGGATGATGCGGATGGATTGAAC

>Contig 101
ATAATAAACTATTCCTAATGGAGTTGTTCTGCTCTTGTAGCGGTAAGTCCAGCTAGTACCGTGCATGTTAAGTATATCCCGCTCAGA
CAGTTTTTCCGTCGCAAAAACCTTGGTTCGTTACTTACTTCCCGTACCCAAAACCTGTGCAAAATCCTTCCAAAACACATTGAG
CTTATCGTACTCTGATTTGGATCAA

>Contig 102
AAAACGCTGTTTTCTGACACAGGCTCCCGACTGGGACCGCATTACCGGTTTCACTGGGGTATGGATTATTTCTTTGTTTCAATTTT
ATCTTCTCGTAAATCTGGCGGATCGAATCTCGAGCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGC

>Contig 103
TTTTACCAGGACATTTAAATCTTTTGAACAGCTCTACACCGCTTCCCTTTCAAACCTAAGCGCACCAATTTCTGAGCTGTAGAATTTCCAGA

TGGTTCCTTTACAGACTCGCTATAACTTTGTCGGTACTGTTTCAGTAACTCAAGATAGTGAATTG

>Contig 104
CCCTTACCGGTGGGTGGATGACCCGGCCGTGCAGCGCCCGTTGCGTCAGACCCGTACCCGCAAACTTTCCCTGAATCACTTCCCGG
TGAGCGAAAAAGCGCTGCTGCGCGCAGAGCCATGCTGCCCGGATCCGGTGGTGTTCGAGTACCCT

>Contig 105
AATCGCCACGGATAATCTTGATAGCTTCCGAGCCGTTGATAACTGCGTTTCATATTTCTGTCGGTGACATCTGTCGACACCGTACTGTTA
TAAACACAGTTTCGATGTAATCAAAAATATCGCTGCGGGCGTTGTTCCGACGTTCTGAGGACT

>Contig 106
GAATACCGCGGAGGATATTCACATTTCCCAAGGCGGAGTTGTGCCGATGGCCAAGATGATGATCTACGTTACCGAAGAGCAGGATTGC
TCTTTGCGCCTGAGGATAGGACTGGATCTGGGTAGCCGTGCCGGAGTCT

>Contig 107
GAATTCCTGCTAAGCTGCTGAAAAATCTACTCCAATATCGCCAAAGAGTCGGAGAGGTGAAAACTACCTGAAAAGTTAGGTGTTCCGCG
TCAAATTTCCGCTGTCTCGTTTCATAATATTGACCCATAACCAACACTCTGGAGCAAACTACTGAAAACG

>Contig 108
GACCAACCCGCCATTTACTAAAATTTAGCGCGCTGTCCCGCGACTCTGGCTATGACCCCTCCATTGCCATTCCTTGACAGCGCTGTC
CCGGCGACTCTGGCTATGACCCCTCCATTGCCATTCTTTGCAGCCTTGCAGCCATATTTACACTTGTCTCCGCTCTGTCTTGTGTG
CGAATTCGATCCACCCTTGGGACATCGATC

>Contig 109
CCCCATTAGAAAACCTATTCTTGGCTAGATGTTGGCAATTTTGTCTTTCAGTTTTGAGCGTCGAGATGCCACACAGCAGGGTCCC
ATGAGCCACTCCAAGCAGTTTACGAATGCTTGGGCATAGTCGGTTAAGATCAAATAAATCGTACTAGCTGGTGAGATC

>Contig 110
GATATAACTCACTGGTATAGGATCTGGCATATTACGCCGAAGACTACCTGTCGCTATGGTTAAGCCTACGCGTGGCCAGAGAGGTGAAAAA
CCAGCTACTTGTCTGCTACCCGCTTTCGAAAAACGAACGTTCCGGCAGCGCAAGGCTGATTTTAAACC

>Contig 111
ACCTGGTAAGCAACTCCGCTCCGGTCATCCACCACGCTGAACAGCATCACGGTGGGTTCCGCCCCGGGCGAGGTCAACCCAGTCAGGCC
GTTCAATATGTTTGAGATCGGACGGTGACATATCAAACTGCCAGCAGTCATTGCTGCTTTCTGCCTGAAATCTTA

>Contig 112
CAGTTGGTTGTTGACAGTTGGTGTTCAGGCGAGCAGTTGTCATGGTGGTGCATACGGGTTTTTTCACACACAGTTGTCATCAGTCACAGA
CTTACGTTACGGGACTAACCT

>Contig 113
GAATCACACAGGGGCTTCAAGCTTTCCACATTATATGTTGGGTTTACTTATTATCATCGCGCTGTTGATTGTCTGAGTACTAGTCGACGATCA
TCAACATGTTTTCAACAAGTCGGTCAACGAAAACCTGG

>Contig 114
GAGATTTAGATTAGTTTTCAGAGTCATTGATCGATCGATTCGCGACAGTATCTTTTCGACGCGATTCCATGATCGAGAGTTTATCAGAC
CGATCTCAGAGCGGATGATCTGCAGTATT

>Contig 115
CAACAGTCGTGACTGGGAAAACCTGCGGTTACCCAACTAATCGCCTTCGACGACATCCCCCTTCCGCGAGTGCCTGAATACGGAAG
AGGCCCGACAGATCTCCGTTCCACAAGTTCGCGGACTGCCCCGATAC

>Contig 116
ATCAAATTAAGACATTTCTGAAATTAACATAATACGCCCTTATCAGAAAGTGCCTGTGACGACGTTTTTCTATAAGTATCAATATCTTATCCG
ACACAGATGACGGGGTTACGCGCCATGTCGATGG

>Contig 117
AAAACGCGCACACTCCGATCATCGTTCCAGGAGAATTCATGGGAAACATTTCTAGAACATTAGAGACCTTGTCTTTTATTTGTTGCTC
GACCAGAACTCGCCACAGTTCCCTAAGCGTTC

>Contig 118
GGGTGATCGCCACCGGTTGTTGATCTCGACCATCGAAGCCACCACCCGAGTACTGCGGTGACCGGTTTTCAGATGATCTAGATTT
CTCTGTGATTAATTTCTCAAGGGGTATGGTT

>Contig 119
TTTTAGATGATTACGATTAATCTTATCCTTATCTAATACGACTGTAATGTGATCTTTTTTTCATCTATTTTTAAATTCAGACATCAATCAGGATTAT
AATGATCACTGACGATTAATATCCTTAACCCC

>Contig 120
AAGGCTGGCGAGCTTCAGCATGGCGACTGGACGTGGCGGAACTAGTAGCCCCAGCTAGGACCCCGATTAGCAGCCTAGGGGTCTTC
CCCTGCTCAGACAACAGTAAGCAAGGAAACACGCTGTTGCTCTAGCCAGGGTGCATCGCACCCAGTTAGTTAG

>Contig 121
CACTTATACCATTGCTTACGCATAAAAGCTTTAAGCTCAGTGTGAACTCATATTACTTTTCCGTTAGATATAAGCTTCCGCTCGTTGCTG
ACTAAGCTGTCTGCTTATAAAGGGCTAGCTCTCTAGCTTTAGACTTGACTGGCATATGCTGACTGACTGACTGACTCCCGG

>Contig 122
CCAGGAAATAATCTTTAGCATAAAAGCCACCAGTTTTTGGCATAAACACACCAGAAATAGACATGGTAAAACGTTGGCTGGATTGATCAGTA
GAGACGGCAAAATCAAGGCCAAGATCGGTGCCATGACGAATCCAAG

>Contig 123
AAAAACCTCTGTGACGTCACCAGGAGTACCAGGATGGTCAAACACGTAAGCAGATCAACGGCCGGAGTGAGTTAACTTCCGTTAGCGT
ACAGTGGAAAGTAAAGAGAGAGTAGTTGATTTCCAA

>Contig 124
CAAGCGTGGGATGATCCGCTGACCCCAAAACCCCTCCTCCAGTACCAGGCAGCTCCACCCAGGCATGGTCAACACAGTAAGCAGA
CCTCAGTGGAGTAGGGTTAAGTTAGCTACAGCTGAGATGGCTAGGAAAGAGAGATGGGATGTGATTTAAACC