HU 0002170 25 B

(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 025 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 03146
(22) A bejelentés napja: 1991. 03. 29.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/504,352 1990. 04. 04. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 91/02225
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/15771

(40) A közzététel napja: 1993. 05. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1999. 11. 29.

(51) Int. Cl.[6]

G 01 N 33/576
C 07 K 14/02

(72) Feltalálók:
Choo, Qui-Lim, El Cerrito, Kalifornia (US)
Houghton, Michael, Danville, Kalifornia (US)
Kuo, George, San Francisco, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:
Chiron Corp., Emeryville, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:
S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Hepatitis C vírus- (HCV) antigénkészítmények az anti-HCV-antitestek kimutatására immunoassay-kben**

KIVONAT

A találmány tárgya szilárd mátrix felületén immobilizált hepatitis C vírus- (HCV) antigénkészítmény, amely egy vagy több kémiai szintézissel vagy rekombináns kifejezés útján nyert peptidet tartalmaz, HCV elleni antitestek immunoassay-vel történő meghatározására, amely az alábbi antigéneket tartalmazza:

a) egy első HCV-antigént, mely a HCV-poliprotein C doménjéből származó epitóppal rendelkezik, és

b) legalább egy további HCV-antigént, melyet az alábbi csoportból választanak ki:

i) egy, a HCV-poliprotein NS3 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

ii) egy, a HCV-poliprotein NS4 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

iii) egy, a HCV-poliprotein S doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

iv) egy, a HCV-poliprotein NS5 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén.

HU 217 025 B

A jelen találmány hatáskörébe a HCV (korábban nem A, nem B [Non-A, Non-B] néven ismert) meghatározására alkalmas immunoassay-k tartoznak. Részletesebben olyan HCV-antigénkészítmények, melyek az anti-HCV-antitestek meghatározására alkalmas immunoassay-k széles skáláját teszik lehetővé.

A régebben nem A, nem B (Non-A, Non-B; NANBH) hepatitis néven ismert betegségről, melyet vírus által okozott betegségnek hittek, kiderült, hogy örökölhető betegség vagy betegségcsoport, és így megkülönböztethető volt a vírusokhoz kapcsolódó májbetegségek más formáitól, beleértve az ismert hepatitisvírusok által okozott betegségektől, azaz a hepatitis A vírustól (HAV), a hepatitis B vírustól (HBV) és a delta-hepatitisvírustól (HDV) éppúgy, mint a citomegalovírus (CMV), vagy az Epstein–Barr-vírus (EBV) által indukált hepatitistől. A NANBH-t először transzfúzióval kezelt egyéneknél azonosították. Az emberről csimpánzra való átvitel és a csimpánzok közötti sorozatos átvitel azt tette nyilvánvalóvá, hogy a NANBH az átvihető fertőző anyag, illetve anyagok hatására jelentkezik. Epidemiológiailag egyértelmű, hogy a NANBH-nak három típusa fordul elő: a víz által átvitt járványos típus; a vér által átvitt, vagy a parenterálisan átvitt típus; és a szórványosan előforduló (társadalmi igények) típus. Ugyanakkor eddig nem sikerült a NANBH-ért felelős átvihető anyagot azonosítani, és a NANBH klinikai diagnosztizálása és azonosítása elsődlegesen más vírusmarkerek fertőzésének kizárásával történt. Az igazinak vélt NANBH-antigének és antitestek detektálására alkalmas eljárások közé tartozik az agargél-diffúzió, a számlálásos immunoelektroforézis (counterimmunoelectrophoresis), az immunofluoreszcencia-mikroszkópia, az immun-elektronmikroszkópia, a radioimmunoassay, és az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Ugyanakkor ezek közül a mérések közül egy sem bizonyult eléggé érzékenynek, specifikusnak és reprodukálhatónak a NANBH diagnosztikai tesztje céljára.

1987-ben a Chiron Corporation kutatói (a jelen találmány tulajdonosa) azonosították az első nukleinsavat, mely definiálhatóan a vér által átvitt NANB-hez kapcsolódik. Lásd EPO Pub. No. 318.216; Houghton és társai, Science 244: 359 (1989). Az említett publikációk egy izolátumnak az új vírusosztályból, a hepatitis C-ből (HCV) való klónozását ismertetik, az itt bemutatott izolátumprototípust „HCV1"-nek nevezték el. A HCV egy RNS-genommal rendelkező, Flavi-szerű vírus.

A 456.637 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Houghton és társai), melyet itt referenciaként említünk, számos rekombináns HCV-polipeptidnek a HCV cDNS expressziója által történő előállítását, és az említett polipeptidek immunológiai reaktivitásának HCV-vel fertőzött betegek szérumával való ellenőrzését ismerteti. Ez a limitált ellenőrzés azt mutatta, hogy a vizsgált polipeptidek közül legalább öt erősen immunogén volt; ezeket mint 5-1-1, C100, C33c, CA279a és CA290a polipeptideket azonosították. Ebből az öt polipeptidből az 5-1-1 az igazinak vélt NS4 doménen helyezkedik el; a C100 az igazinak vélt NS3 és NS4 domén között ível át; a C33c az igazinak vélt NS3 doménben helyezkedik el, míg a CA279a és a CA290a az igazinak vélt C doménban helyezkedik el. Az ellenőrzés eredménye azt mutatta, hogy az összes szérummal nemcsak az egyedülálló polipeptid volt immunológiailag reaktív. Így tökéletesített tesztek szükségesek, melyek minden, vagy több, a HCV-pozitív egyénekből származó mintával reagálnak.

A feltalálók további szerológiai vizsgálatokat végeztek a HCV-antigénen, melyek megerősítették, hogy az összes szérummal nemcsak az egyedülálló polipeptid volt immunológiailag reaktív. Ennek az univerzálisan minden HCV-fertőzött szérummal reaktív egyedülálló polipeptidnek a hiánya inter alia a HCV-epitópok törzsről törzsre történő megváltozásának, az egyénről egyénre történő humorális válasz megváltozásának és/vagy a betegség szerológiai állapota megváltozásának tulajdonítható.

Ezek a további tanulmányok az egyedülálló HCV-polipeptidnél jóval hatékonyabban detektálható HCV-antitestek detektálására alkalmas HCV-antigénkészítmények azonosítását tették lehetővé a feltalálók számára.

Ennek megfelelően a találmány tárgya szilárd mátrix felületén immobilizált hepatitis C vírus (HCV) antigénkészítmény egy vagy több kémiai szintézissel vagy rekombináns kifejezés útján nyert peptidben, HCV-nek immunassay-vel történő meghatározására. A készítmény az alábbi antigéneket tartalmazza:

a) egy első HVC antigént, mely a HVC poliprotein C doméjéből származó epitóppal rendelkezik, és

b) legalább egy további HCV-antigént, melyet az alábbi csoportból választhatunk ki:

i) egy, a HCV-poliprotein NS3 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

ii) egy, a HCV-poliprotein NS4 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

iii) egy, a HCV-poliprotein S doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

iv) egy, a HCV polipropotein NS5 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén.

Olyan körülmények között dolgozunk, melyek lehetővé teszik az antitest-antigén reakciót és a detektálást az említett antitesteknek, illetve az említett antigének immunkomplexe jelenlétében.

A találmány kivitelezése során a találmány egy HCV-antigénkészítményt nyújt, mely az antigénekből álló fúziós fehérje formájában van jelen. Egy másik kivitelezés során az antigének készítménye egyéni antigének formájában van jelen, melyek általánosan egy szilárd mátrixhoz kapcsolódnak. Egy további kivitelezés során az antigének készítménye egyéni antigének elegye formájában van jelen.

A továbbiakban a találmány eljárást nyújt HCV-antitesteknek az említett antitesteket feltehetően tartalmazó emlőstestrészekben való detektálására, ahol az említett testrészeket a fent említett HCV-antigénkészítménnyel hozzuk kapcsolatba, olyan körülmények között, melyek lehetővé teszik az antitest-antigén reakciót és a detektálást az említett antitestek, illetve az említett antigének immunkomplexe jelenlétében.

A továbbiakban a találmány in vitro eljárást nyújt a HCV-antitesteknek az említett antitesteket feltehetően

tartalmazó emlőstestkomponensekben való detektálására, ahol az említett testkomponenseket a fenti készítménnyel hozzuk kapcsolatba egyidejűleg, illetve sorozatban, ahol olyan körülmények között dolgozunk, melyek lehetővé teszik az antitest-antigén reakciót és a detektálást az említett antitestek, illetve az említett antigének immunkomplexe jelenlétében.

A továbbiakban a találmány a HCV-antitesteknek az említett antitesteket feltehetően tartalmazó emlőstestrészekben való detektálására alkalmas mérés kivitelezésére nyújt egy kitet, ahol az említett antitestek kiszerelt készítménye az alábbiakat tartalmazza:

a) a HVC antigének említett készítményét,
b) standard kontrollreagenseket, és
c) utasításokat a mérés kivitelezéséhez.

Az 1. ábra a C-DNS-nek a HCV-poliproteinre nézve érzékeny és nem érzékeny (sense, anti-sense) szálának nukleotidszekvenciáját mutatja be, és az érzékeny szál által kódolt aminosavszekvenciát.

A 2. ábra az 1. ábra aminosavszekvenciájának vázlata, mely a HCV-polipeptid igazinak vélt doménjeit mutatja be.

Definíciók

A „HCV-antigén" a legalább öt aminosavból álló polipeptidekre vonatkozik, általánosabban a legalább 8–10 aminosavból álló polipeptidekre, melyek egy, a HCV izolátumon található epitópot definiálnak. Előnyös esetben az epitóp egyenértékű a HCV-vel. Amennyiben az antigént alfanumerikus kóddal jelöljük, a C domén epitópját is alfanumerikusan adjuk meg.

A „szintetikus" kifejezés egy HCV-antigén jellemzése esetében arra vonatkozik, hogy a HCV-antigén vagy mesterségesen, például kémiai úton, vagy rekombináns szintézissel lett előállítva.

A „domének" azokra a 2. ábrán látható HCV-poliprotein-szegmensekre vonatkoznak, melyek általánosan a HCV igazinak vélt strukturális és nemstrukturális fehérjéinek felelnek meg. A domén jelölései általában a flavivirális fehérjéknél megnevezett konvencióknak felelnek meg. A doméneknek a 2. ábrán látható elhelyezkedése csak megközelítés. Az „NS" jelzés „nemstrukturális" doménekre vonatkozik, míg az „S" a burokdoméneket jelöli, és a „C" a nukleokapszid vagy a magdoméneket jelöli.

A „fúziós polipeptid" olyan polipeptidre vonatkozik, melyben a HCV-antigén(ek) a természetben elő nem forduló, egyedülálló, folyamatos aminosavlánc része(i). A HCV-antigének peptidkötéseken keresztül közvetlenül kapcsolódhatnak egymáshoz, vagy közbenső szekvenciák által szeparáltak lehetnek. A fúziós polipeptidek a HCV-vel exogén aminosavszekvenciákat is tartalmazhatnak.

Az „általános szilárd mátrix" szilárd test, melyhez az egyéni HCV-antigének, vagy a HCV-antigéneket tartalmazó fúziós polipeptidek kovalensen, vagy – például hidrofób adszorpcióval – nemkovalensen kapcsolódhatnak.

Az „emlőstestkomponensek" (mammalian body component) emlős eredetű (például humán) testfolyadékra vagy -szövetre vonatkozik, mely általában az egyén által termelt antitesteket tartalmazza. Ezek a testkomponensek a szakmában általánosan ismertek, ilyenek például korlátozások nélkül a vér, a plazma, a szérum, a gerincfolyadék, a nyirokfolyadék, a légzőrendszer szekréciós termékei, a bél- vagy a húgy- és ivarszervi traktus, a könnyek, a nyálka, a tej, a fehérvértestek és a mielómák.

Az „immunológiailag reaktív" kifejezés azt jelenti, hogy a szóban forgó antigén a HCV-vel fertőzött egyén szérumában általában szignifikáns mennyiségben jelen levő anti-HCV-antitesttel specifikusan reagál.

Az „immunkomplex" kifejezés azokra az elegyekre, illetve aggregátumokra vonatkozik, melyek az antitestnek az antigén epitópjával való kapcsolódásakor keletkeznek.

A 2. ábra a HCV-polipeptid igazinak vélt doménjeit mutatja be. A készítményben alkalmazott antigének doménjei az alábbiak: C, S (vagy E), NS3, NS4 és NS5. A C domén feltehetőleg a HCV-fehérje nukleokapszidját definiálja. Ez az 1. ábrán a polipeptid N-terminusától megközelítőleg 120 aminosav távolságig terjeszkedik. Az S domén feltehetőleg a virion burokfehérjét és a mátrix- (M) fehérjét határozza meg, és az 1. ábrán megközelítőleg a 120. aminosavtól a 400. aminosavig tart. Az NS3 domén megközelítőleg az 1050. aminosavtól az 1640. aminosavig tart, és feltehetőleg a virális proteázt alkotja. Az NS4 domén az NS3 terminusától a 2000. aminosavig tart. Az NS4 fehérje funkciója eddig ismeretlen. Végül az NS5 domén megközelítőleg a 2000. aminosavtól a poliprotein végéig tart, és feltehetőleg a virális polimerázt határozza meg.

Az 1. ábrán látható szekvencia a HCV1 izolátum szekvenciája. A vér által átvitt HCV-től eltérő törzsek szekvenciája várhatóan eltér az 1. ábrán látható szekvenciától, főleg a burok (S) és a nukleokapszid (C) doméneknél. Az ilyen eltérő szekvenciával rendelkező HCV-antigének alkalmazása szintén a jelen találmány tárgykörébe tartozik, de a változás nem gyengíti szignifikánsan az antigén immunológiai reaktivitását a HCV-vel fertőzött egyén szérumával szemben.

A teljes vagy megcsonkított doméneket tartalmazó HCV-antigének, a doménfragmentumok antigenicitása a szakmai gyakorlattal rendelkezők számára könnyen ellenőrizhető. A készítményben alkalmazott HCV-antigének előnyös esetben a meghatározott domén immundomináns részét is tartalmazzák (azaz azt a részt, mely a polipeptid immunológiai reaktivitásáért elsődlegesen felelős). A C domén esetén előnyös esetben a C domén-antigén a domén teljes szekvenciájának nagy részét tartalmazza. A C22-ként jelölt antigén (lásd 4. példa, lent) különösképpen előnyös. Az S domén-antigénje előnyös esetben tartalmazza a domén N-terminális végén levő hidrofób szubdomént. Ez a hidrofób szubdomén megközelítőleg a 199. aminosav és a 328. aminosav között helyezkedik el az 1. ábrán. Az S2-vel jelölt HCV-antigén (lásd 3. példa, lent) különösképpen előnyös. A hidrofób szubdomén azonos irányú szekvenciája igény esetén szintén az S domén-antigénjébe tartozik.

Egy előnyben részesített NS3 domén-antigén a C33c jelzéssel ellátott antigén. Ez az antigén az 1. ábrán az

1192–1457. aminosavakat tartalmazza. Egy előnyben részesített NS4 antigén a C100 jelzéssel ellátott antigén, ami az 1. ábrán a 1569–1931. aminosavakat tartalmazza. Egy előnyben részesített NS5 antigén, ami az 1. ábrán a 2054–2464. aminosavakat tartalmazza.

A HCV-antigén polipeptid formájában fordulhat elő, mely teljes mértékben a HCV-aminosav-szekvenciából áll, vagy a HCV-vel exogén szekvenciát tartalmazhat (azaz exogén szekvenciát tartalmazó fúziós fehérje formájában fordulhat elő). Rekombinánsan előállított HCV-antigén esetén az antigén fúziós fehérjeként történő előállítása, mint például SOD, α-faktor, vagy ubiquitin (lásd a 4.751.180, a 4.870.008 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat, melyek ismertetik a SOD, az α-faktor és az ubiquitin fúziós fehérjék expresszióját) fokozhatja az antigén expressziójának mértékét és/vagy fokozhatja az antigén vízoldhatóságát. A fúziós fehérjék, például az α-faktor vagy az ubiquitin fúziója a gazda expressziója által történik, melynek során az eltávolítja a heterológ szekvenciát. Az α-faktor egy szekréciós rendszer, míg az ubiquitin a citoplazmában marad.

Az antigénkészítmények előállítása továbbá fúziós fehérjeként is történhet. Így például a C22-t és a C33c-t kódoló folyamatos DNS-fragmentum megszerkesztése egy expressziós vektorba klónozással történhet, és a C22 és C33c fúziós fehérje expresszálására alkalmazható. Hasonló módon hozhatjuk létre a C100-ból származó C22 fúziós fehérjét; az S2-ből származó C22-t; a C22 és egy NS5 antigént; a C22-t, a C33c-t és az S2-t; a C22-t, a C100-at és az S2-t; a C22-t, a C33c-t, a C100-at és az S2-t. A bemutatott domének alternatív fragmentumait is alkalmazhatjuk.

A találmány szerinti HCV-antigének előállítása előnyös esetben rekombináns úton, vagy jól ismert szilárd fázisú kémiai eljárással történhet. Ugyanakkor az antigének a disszociált HCV-ből vagy HCV-részecskékből affinitáskromatográfiával izolált antitestekkel szemben termeltek is lehetnek.

Amennyiben az előállítás rekombináns technikával történik, a standard eljárások során az antigént kódoló cDNS megszerkesztése, a DNS expressziós vektorba klónozása, a gazdasejt – például a baktérium – transzformálása és az ilyen, az antigént termelő DNS expresszálása alkalmazható. Amint fent említettük, kívánatos lehet az antigén fúziós fehérjeként történő expresszálása, így az expresszió fokozható, a tisztítás megkönnyíthető és az oldhatóság fokozható. A HCV-antigének előállítására alkalmas eljárásokat az alábbi példákban és a 456.637 sorozatszámú szabadalmi sorozatban ismertetjük.

A HCV-antigéneket két vagy több antigénből álló fúziós fehérje formájában történő elegyítéssel, általános szilárd mátrixon egyéni immobilizálással vagy fizikai keveréssel elegyíthetjük. Az antigén fúziós fehérjéit szintén a szilárd mátrixon (hozzákötéssel) immobilizálhatjuk. A fehérjéknek a szilárd mátrixhoz kovalensen, illetve nem kovalensen való hozzákapcsolása céljából alkalmazható eljárások és módszerek a szakmában jól ismert eljárások. A szilárd felület természete a mérés formátuma szerint változik. A mikrotiterlyukakban végzett mérés során a szilárd felület a lyuk fala vagy teteje lehet. A gyöngyöket alkalmazó mérés során a szilárd felület a gyöngyök felszíne lesz. A „dipstick"-et alkalmazó mérések során (azaz amikor a szilárd testet pórusos vagy szálas anyagból, például szövetből vagy papírból állítjuk elő) a felszín annak az anyagnak a felülete lesz, melyből a „dipstick"-et készítettük. Az agglutinációs mérések során a szilárd felület a latex- vagy a zselatinrészecskék felszíne lesz. Amennyiben a mátrixhoz egyéni antigéneket kötünk, azok a felületen homogénen szétoszolhatnak, illetve valamilyen minta szerint, így például sávokban, ami megkönnyíti az antigénkötések észrevételét.

Az egyszerű antigénelegyek az antigént megfelelő oldószerben vagy diszpergálóközegben tartalmazzák.

A HCV-antigéneket gyakorlatilag olyan mérésekben alkalmazhatjuk, melyek egy ismert antigént alkalmaznak az antitestek detektálására. Ezeknek a méréseknek általános jellemzője az, hogy az antigént a HCV-antitesteket feltehetően tartalmazó emlőstestkomponensekkel hozzuk kapcsolatba, olyan körülmények között, melyek lehetővé teszik, hogy az antigén valamely ilyen, a testkomponensben jelen levő antitesthez kapcsolódjon. Ezek a körülmények a fiziológiai hőmérséklet, a pH és az antigénfelesleget alkalmazó ionerősség. Az antigénnek a mintával történő inkubálását az antigént tartalmazó immunkomplex detektálása követi.

Az immunoassay-k tervezése során számos változtatás léphet fel, és a szakmában számos változat ismert. Így például szilárd támasztékot alkalmazó, illetve immunocsapadék-képzéses eljárást alkalmazhatunk. A legtöbb mérés jelzett antitestet vagy polipeptidet alkalmaz; a jelzés enzimes, fluoreszcens, kemilumineszcens, radioaktív vagy festékmolekula lehet. Olyan mérések is ismeretesek, melyek biotint, avidint alkalmaznak, vagy enzimmel jelzett és közvetített immunoassay-k, mint például az ELISA.

Az immunoassay kivitelezése, korlátozások nélkül, homogén vagy heterogén formában történhet, standard vagy kompetitív módon. A heterogén formánál a polipeptidet szilárd mátrixhoz vagy támasztékhoz kapcsoljuk, ami megkönnyíti az inkubálás után a mintának a polipeptidtől történő elválasztását. A szilárd támasztékok nitro-cellulóz (azaz membrán- vagy mikrotiterlyukforma), poli(vinil-klorid) (azaz ívek vagy mikrotiterlyukak), polisztirén-latex (azaz gyöngyök vagy mikrotiterlemezek), poli(vinil-fluorid) („Immulon" néven ismert), diazotált papír, nejlonmembránok, aktivált gyöngyök és Protein A gyöngyök lehetnek. Így például a heterogén formáknál Dynatech Immulon™ 1 vagy Immulon™ 2 mikrotiterlemezeket, vagy 0,25 inch átmérőjű polisztirolgyöngyöket (Precision Plastic Ball) alkalmazhatunk. Az antigenikus polipeptideket tartalmazó szilárd támaszték mosása általában a vizsgálandó minta eltávolítása és a kötött antitestek eltávolítása után történik. A szakmában mind a standard, mind a kompetitív forma általánosan ismert.

Homogén forma esetén a vizsgálandó mintát az antigénkészítmény oldatával inkubáljuk. Például olyan körülményeket alkalmazhatunk, melyek mellett a képződő

antigén-antitest komplex kicsapódik. Ezeknél a méréseknél a szakmában mind a standard, mind a kompetitív forma általánosan ismert.

A standard forma esetén az antigén-antitest komplexet képző HCV-antitestek mennyiségét közvetlenül ellenőrizzük. Ezt az anti-HCV-antitestek epitópját felismerő, jelzett antixenogenikus (például antihumán) antitestek meghatározásával végezhetjük, melyek felismerik az anti-HCV-antitesteknek a komplexképződés következtében kapcsolódott epitópját. A kompetitív forma esetén a mintában levő HCV-antitestek mennyiségére a komplexben levő, ismert mennyiségű, jelzett antitest (vagy egyéb kompetitív ligandum) kötésének kompetitív hatásából következtetünk.

Az anti-HCV-antitestet (vagy kompetitív mérés esetén a kompetitív antitestet) tartalmazó komplexek képződését a formától függően számos jól ismert eljárással detektálhatjuk. Így például a komplexben lévő, nem jelzett HCV-antitesteket antixenogenikus Ig-konjugátum alkalmazásával detektálhatjuk, mely egy jelzéssel (azaz egy enzimjelzéssel) képzett komplex.

Immunocsapadék-képzéses vagy agglutinációs mérés esetén a HCV-antigének és -antitestek közötti reakció során háló keletkezik, ami az elegyből vagy a szuszpenzióból kicsapódik, és így látható csapadékréteg vagy -film képződik. Amennyiben anti-HCV-antitest nincs jelen a vizsgálandó mintában, nem képződik látható csapadék.

Az említett immunoassay-k céljára a HCV-antigének kiszerelése kitekben történik. A kit általában különálló edényekben tartalmazza az antigének készítményét (vagy mindegyiket szilárd mátrixhoz kötve, vagy szeparálva azokkal a reagensekkel, melyek azoknak a mátrixhoz kötődését segítik), a kontroll antitestkészítmény (pozitív és/vagy negatív), amennyiben a méréshez azonos és jelképző reagensek szükségesek, és a jelzés közvetlen jelt nem hoz létre, jelzett antitesteket (azaz enzimszubsztrátot). A mérés kivitelezéséhez szükséges utasítások (azaz leírások, magnetofonszalag, VCR, CD-ROM stb.) szintén a kithez tartoznak.

Az alábbi példák a találmányt szemléltetik minden korlátozás nélkül. A p1, p35 és p99 peptideket az EP 90125342 számú leírás, a CA 290a peptidet a WO 90/11089 számú irat ismerteti.

1. példa: A C33c HCV-antigén szintézise

A C33c HCV-antigén az NS3 domén szekvenciáját tartalmazza. Ez speciálisan az 1. ábrán látható 1192–1457. aminosavakat tartalmazza. Az antigént baktériumban állítottuk elő, fúziós fehérje formájában, humán szuperoxid-diszmutáz (SOD) alkalmazásával, az alábbiak szerint. A pSODcf1 vektort [Steiner és társai (1986), J. Virol. 58:9] EcoRI és BamHI alkalmazásával tártuk fel, és a keletkezett EcoRI, BamHI fragmentumot az alábbi linkerhez ligáltuk, melynek eredményeképpen pcf1EF keletkezett:

GATC CTG GAA TTC TGA TAA
GAC CTT AAG ACT ATT TTA A

A 1192–1457. aminosavakat kódoló és EcoRI végeket tartalmazó cDNS-klónt pcf1EF-be illesztettük, így pcf1EF/C33c-t kaptunk. Az expressziós szerkezetet D1210 E. coli sejtekbe transzformáltuk.

A transzformátumokat egy fúziós fehérje expresszálására használtuk, ami keretben (in frame) az N-terminusán SOD-ot, és a C-terminusán C33c antigént tartalmazott. Az expresszálás ampicillint (100 μg/ml) tartalmazó, 1500 ml mennyiségű Luria táptalajon (Luria broth) történt, a transzformáns 15 ml mennyiségű, egyéjszakás tenyészetével. A sejtek 0,3 O. D.-ig növekedtek, 2 mM végső koncentráció eléréséig IPTG-t adtunk hozzá, és a tenyésztést addig folytattuk, míg a sejtek az 1 O. D.-t elérték, ezután 3000×g mellett, 4 °C-on, 20 perces centrifugálással összegyűjtöttük a sejteket. A kiszerelt sejteket –80 °C-on több hónapig tároltuk.

A SOD-C33c polipeptid megtisztítása céljából a baktériumsejteket, melyekben a polipeptidet expresszáltuk, ozmotikus hatásnak vagy mechanikai feltárásnak vetettük alá, a SOD-C33c-t tartalmazó oldhatatlan frakciót izoláltuk, alkalikus foszfatázzal differenciáló-extrakciónak vetettük alá, és az extraktumban levő fúziós fehérjét S-Sepharose és Q-Sepharose oszlopokon kromatográfiásan tisztítottuk.

Az ozmotikus hatásnak vagy mechanikai feltárásnak eredményeképpen kapott nyersextraktumot az alábbi eljárással dolgoztuk fel. A kiszerelt sejtek egy grammját 10 ml mennyiségű, 0,02 M Tris-HCl-t, pH 7,5, 10 mM EDTA-t és 20% szukrózt tartalmazó oldatban felszuszpendáltuk, és 10 percig jégen inkubáltuk. Ezután a sejteket 4000×g mellett, 4 °C-on, 15 perces centrifugálással pelletizáltuk. A felülúszó eltávolítása után a sejtpelletet 10 ml A1 pufferben (0,01 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 14 mM β-merkapto-etanol [BME]) felszuszpendáltuk, és 10 percig jégen inkubáltuk. A sejteket 4000×g mellett, 4 °C-on, 15 perces centrifugálással ismét pelletizáltuk. A tiszta felülúszó (I. periplazmikus frakció) eltávolítása után a sejtpelletet A1 pufferben felszuszpendáltuk, 10 percig jégen inkubáltuk, majd 4000×g mellett, 4 °C-on, 15 perces centrifugálással ismét pelletizáltuk. A tiszta felülúszó (II. periplazmikus frakció) eltávolítása után a sejtpelletet A2 pufferben (0,02 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 14 mM BME, 1 mM PMSF) felszuszpendáltuk. A sejtek feltárása céljából a szuszpenziót (5 ml) 7,5 ml Dyno-mill ólommentes savval mosott üveggyöngyökre (átmérő 0,10–0,15 mm) (beszerezve a Glen–Mills, Inc. cégtől) vittük Falcon-csőben, és két percig a legnagyobb sebességgel kevertük, majd legalább két percig jégen hűtöttük; a keveréses-hűtéses eljárást további négyszer megismételtük. A keverés után kapott szuszpenziót kis erősséggel üvegtölcséren szűrtük át; az üveggyöngyöket A2 pufferrel kétszer átmostuk, majd a szűrletet és a mosófolyadékot elegyítettük.

A nyersextraktum oldhatatlan frakcióját 4000×g mellett, 4 °C-on, 15 perces centrifugálással összegyűjtöttük, 10 ml mennyiségű A2 pufferrel kétszer mostuk, és 5 ml mennyiségű MILLI-Q vízzel felszuszpendáltuk.

A SOD-C33c-t tartalmazó frakciót NaOH-nak (2 M) és NaCl-nek (2 M) a szuszpenzióhoz történő hozzáadásával, úgy, hogy mindegyiknek 20 mM volt a végső koncentrációja, elválasztottuk az oldhatatlan

anyagtól, az elegyet 1 percig kevertük, 20 000 × g mellett, 4 °C-on, 20 percig centrifugáltuk, és a felülúszót visszatartottuk.

A SOD-C33c S-Sepharose oszlopon történő megtisztítása céljából a felülúszó frakciót 6 M urea, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 14 mM BME és 1 mM EDTA végső koncentrációra állítottuk be. Ezt a frakciót vittük fel a S-Sepharose Fast Flow (1,5 × 10 cm) oszlopra, melyet B pufferrel (0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 14 mM BME és 1 mM EDTA) ekvilibráltunk. A minta felvitele után az oszlopot két oszloptérfogatnyi B pufferrel mostuk. Az átfolyó és a mosófrakciókat összegyűjtöttük. A felvitel és a mosás során 1 ml/perc folyadékrátát alkalmaztunk; az összegyűjtött frakciók térfogata 1 ml volt. A SOD-C33c-t tartalmazó frakciók azonosítása céljából aliquot frakciókat analizáltunk gélelektroforézissel, SDS-t tartalmazó 10%-os poliakrilamid gélen, majd Coomassie kékkel festettük azt. A frakciók Western blot eljárással is analizálhatók, közvetlenül a SOD ellen termelt antitestek alkalmazásával. A SOD-C33c-t tartalmazó frakciókat pooloztuk.

A SOD-C33c további tisztítása Q-Sepharose oszlopon (1,5 × 5 cm) történt, melyet B pufferrel ekvilibráltunk. A poolozott, SOD-C33c-t tartalmazó frakciókat, melyeket az S-Sepharose oszlopon végzett kromatográfia eredményeként kaptunk, felvittük az oszlopra. Az oszlopot ezután B pufferrel mostuk, és 60 ml mennyiségű 0,0–0,4 M NaCl B pufferben levő oldatával eluáltuk. A felvitel, a mosás és az elúció során 1 ml/perc folyadékrátát alkalmaztunk; az összegyűjtött frakciók térfogata 1 ml volt. Minden, a Q-Sepharose oszlopon kapott frakciót az S-Sepharose oszlopnál ismertetett eljárás szerint analizáltunk. Az oszlopon eluált SOD-C33c csúcsot 0,2 M NaCl-nél kaptuk.

A Q-Sepharose oszlopon kapott SOD-C33c tisztasága 90% felett volt, amit a poliakrilamid gélek és a humán SOD ellen termelt monoklonális antitesteket alkalmazó immunoblot eljárások is alátámasztottak.

2. példa: A HCV C100 antigén szintézise

A HCV C100 antigén az NS3 és az NS4 doménekből származó szekvenciákat tartalmazza. Az 1. ábrán a 1569–1931. aminosavakat tartalmazza. Ezt az antigént élesztőben termeltük. A fenti aminosavakat kódoló 1270 bp-ból álló, EcoRI terminussal rendelkező cDNS-fragmentumot előállítottuk.

Az élesztő expressziós vektor megszerkesztése, melynek során ezt a fragmentumot közvetlenül a S. cerevisiae ADH2/GAP promoterbe fuzionáltuk, egy olyan eljárás során történt, ami a C100 szekvencia PCR-eljárással történő amplifikációjából áll. A klónozás után a C100 szekvenciát kivágtuk, és egy, az ADH2/GAP promotert tartalmazó szekvenciával ligáltuk az élesztővektor nagyobb fragmentumához.

A C100 PCR-amplifikációja során vektorként $^{pS3-56}$C100m vektort alkalmaztunk, melyet SalI-es feltárással linearizáltunk. A pS3-56 egy pBR322--származék, ami a humán szuperoxid-diszmutáz-gén ADH2/GAPDH hibrid élesztőpromoter ellentétesen haladó ágát tartalmazó expressziós kazettát, valamint egy azonos irányban haladó a-faktor transzkripciós terminátort tartalmaz.

Az amplifikáció céljából alkalmazott oligonukleotid primereket az expressziós vektorba való klónozás megkönnyítésére és egy transzlációs terminátorkodon beviteléhez terveztük. Az új 5'-HindIII és 3'-SalI helyek előállítása a PCR-oligonukleotidokkal történt. A SalI helyeket tartalmazó oligonukleotidok tehát a kettős terminátorkodont kódolják, ami a következő: TAA és TGA. A HindIII helyeket tartalmazó oligonukleotidok tehát egy, a pgap63 génből származó, le nem fordított szekvenciát tartalmaznak, ami az AUG kodonnal közvetlenül ellentétes irányban helyezkedik el. A pEco63GAPDH gént Holland és Holland (1980), valmint Kniskern és társai (1986) ismertetik. A C100 közvetlen expressziója céljából az alábbi PCR-primereket alkalmaztuk:

'5 GAG TGC TCA AGC TTC AAA ACA AAA TGC CTC
ACT TTC TAT CCC AGA CAA AGC AGA GT 3'

és

'5 GAG TGC TCG TCG ACT CAT TAG GGG GAA
ACA TGG TTC CCC CGG GAG GCG AA 3'.

A PCR-amplifikáció céljából alkalmazott primerek és templátok a Cetus–Perkin–Elmer PCR-kitből származtak, az eljárást a gyártó utasításai szerint hajtottuk végre. A PCR-t 29 ciklusban, 94 °C-on egy perc alatt, 37 °C-on két perc alatt, és 72 °C-on tíz perc alatt hajtottuk végre; a végső inkubálás 72 °C-on tíz percig tartott. A DNS-t –4 °C-on vagy –20 °C-on egy éjszakán keresztül tároltuk.

Az amplifikáció után a PCR-terméket HindIII és SalI alkalmzásával tártuk fel. Az 1,1 kb méretű főtermékét gélelektroforézissel tisztítottuk meg, és az eluált tisztított terméket egy, a pBR322-ből származó nagy SalI-HindIII fragmentummal ligáltuk. A megfelelő rekombinánsok izolálása céljából kompetens HB101 sejteket transzformáltunk a rekombináns vektorokkal, és a klónozás után a klónból kivágott SalI-HindIII fragmentumok előre várt mérete alapján azonosítottuk a kívánt rekombinánsokat. A klónok egyikét, mely a megfelelő mérettel rendelkező SalI-HindIII fragmentumot tartalmazta, pBR322/C100-d-nek neveztük el. Azt, hogy ez a klón az amplifikált C100-at tartalmazta, a SalI-HindIII fragmentum közvetlen szekvenciaanalízisével erősítettük meg.

A C100-at tartalmazó expressziós vektort a pBR322/C100-d-ből származó SalI-HindIII fragmentumot egy 13,1 kb méretű, a pBS24.1 BamHI-SalI fragentumhoz, és egy, az ADH2/GAP promotert tartalmazó 1369 bm BamHI-HindIII fragmentumhoz ligáltuk.

(Az utóbbi fragmentumot az EPO 164.566 ismerteti.) A pBS24.1 vektort az U. S. S. N. 382.805 számú leírás ismerteti (1989. július 19.) Az ADH2/GAP promotert a vektor pPGAP/AG/HindIII HindIII és BamHI alkalmazásával történő feltárásával és a 1369 bp méretű fragmentum gélen történő tisztításával kaptuk.

A kompetens HB101 sejteket transzformáltuk a rekombináns vektorokkal; a megfelelő rekombinánst egy 2464 bp méretű fragmentum és egy 13,1 bp méretű fragmentum létrehozásával azonosítottuk, melyeket a klónozott vektor BamHI és SalI alkalmazásával történő feltárásával kaptunk. A megfelelő klónozott rekombináns vektorok egyikét pC100-d#3-nak neveztük el.

A C100 expresszálása céljából a Saccharomyces cerevisiae AB122 (MATa leu2 ura3-53 prb 1-1122 pep4-3 prcl-407[cir-0]) kompetens sejtjeit a pC100-#3 expressziós vektorral transzformáltuk. A transzformált sejteket URA-szorbitolra vittük, és az egyes transzformánsokat csíkok formájában Leu$^-$ lemezekre vittük fel.

Az egyes klónokat Leu$^-$, ura$^-$ közegben tenyésztettük, 2% glükóz jelenlétében, 30 °C-on, 24–36 óráig. 2% glükózt tartalmazó, egy liter mennyiségű Yeast Extract Peptone Mediumot (élesztőextraktumos pepton tápközeg) 10 ml egyéjszakás tenyészettel inokuláltunk, és a kapott tenyészetet 30 °C-on, 400 rpm keverési ráta és 1 l levegő/1 l közeg/perc (azaz lvvm) levegőráta mellett 48 órán keresztül hagytuk növekedni. A fermentor pH-ját nem ellenőriztük. A tenyészetet a New Brunswick Science Corp. által gyártott BioFlo II fermentorban tenyésztettük. A fermentáció után a sejteket izoláltuk, és C100 expressziójukat meghatároztuk.

Az expresszált C100 polipeptid analízisét a transzformált sejtekkel végeztük, teljes sejtlizátumon, és a nyersextraktumokat különálló élesztőtelepekről nyertük, melyeket a Leu$^-$ lemezekről kaptunk. A sejtlizátumot és a nyersextraktumot SDS poliakrilamid gélen gélelektroforézissel és Western blot eljárással vizsgáltuk meg. A Western blot eljárást élesztőben expresszált SOD-C100 polipeptiddel szemben termelt nyúl-poliklonális-antitestekkel hajtottuk végre. A C100 polipeptid előre várt mérete 364 aminosav volt. Az expresszált polipeptidek a gélelektroforézis alapján MW_r 39,9 K értékkel rendelkeztek.

Minden bemutatott analitikai eljárás azt bizonyítja, hogy az expresszált C100 polipeptid a teljes sejtlizátumban jelen volt, míg a nyersextraktumból hiányzott. Az eredmények szerint az expresszált C100 polipeptid feltehetőleg oldhatatlan.

3. példa: A HCV S2 antigén expressziója

A HCV S2 antigén az S domén hidrofób N-terminusa szekvenciáját tartalmazza. Ez az 1. ábrán a 199–328. aminosav.

Az S2 polipeptidet kódoló expressziós vektor létrehozásának eljárása és élesztőben való expressziója hasonló volt a C100 polipeptid expressziójának 2. példában ismertetett eljárásával.

A PCR-reakció templátja a pBR322/Pi14a vektor volt, amit HindIII-al végzett feltárással linearizáltunk. A Pi14a a 199–328. aminosavakat kódoló cDNS-klón.

Az S2-t kódoló szekvencia PCR-amplifikációja során primerként alkalmazott oligonukleotidok szekvenciája az alábbi volt.

Az S2 szekvencia 5'-régiójára:

5' GAG TGC TCA AGC TTC AAA ACA AAA TGG GGC TCT
ACC ACG TCA CCA ATG ATT GCC CTA AC 3'

és

az S2 szekvencia 3'-régiójára:

'5 GAG TGC TCG TCG ACT CAT TAA GGG GAC CAG TTC
ATC ATC ATA TCC CAT GCC AT 3'.

Az 5'-terület primerje egy HindIII helyet és egy ATG startkodont visz be az amplifikált termékbe. A 3'-terület primerje egy transzlációs stopkodont és egy SalI helyet visz be az amplifikált termékbe.

A PCR-t 29 ciklusban, 94 °C-on egy perc alatt, 37 °C-on két perc alatt, és 72 °C-on tíz perc alatt hajtottuk végre; a végső inkubálás 72 °C-on tíz percig tartott.

A PCR-reakció fő terméke egy 413 bp-ból álló fragmentum volt, melyet gélen tisztítottunk meg. A tisztított fragmentumot egy, a HindIII és a SalI fragmentummal feltárt, a pBR322-ből származó nagyobb fragmentumhoz ligáltuk, így kaptuk a pBR322/S2d plazmidot.

A 413 bp méretű HindIII-SalI S2 fragmentumnak az ADH2/GAP promotert tartalmazó 1,36 bp méretű BamHI-HindIII fragmentummal és a pBS24,1 élesztővektor nagyméretű BamHI-SalI fragmentumával történő ligálása eredményeképpen rekombináns vektorokat kaptunk, melyeket klónoztunk. A megfelelő rekombináns vektorokat a BamHI-el és a SalI-el történő feltárás után egy 1,7 kb fragmentum jelenlétével azonosítottuk. Egy, az amplifikált szekvenciából létrehozott expressziós vektort, és egy, közvetlenül az ADH2/GAP promoterbe fuzionált S2-t kódoló szekvenciát azonosítottunk mint pS2d#9.

4. példa: A HCV C antigén szintézise

A HCV C22 antigén a C doménről származik. Ez az 1. ábrán az 1–122. aminosav.

A C polipeptidet kódoló expressziós vektor létrehozásának eljárása és élesztőben való expressziója az alábbi eltéréseken kívül hasonló volt a C100 polipeptid expressziójának a 2. példában ismertetett eljárásával.

A PCR-reakció templátja a pBR322/Ag30a vektor volt, amit HindIII-mal végzett feltárással linearizáltunk. Az Ag30a az 1–122. aminosavakat kódoló cDNS-klón.

A C szekvencia 5'-régiójára:

5' GAG TGC AGC TTC AAA ACA AAA TGA GCA CGA
ATC CTA AAC CTC AAA AAA AAA AC 3'

és

A C szekvencia 3'-régiójára:

'5 GAG TGC TCG TCG ACT CAT TAA CCC AAA TTG CGC
GAC CTA CGC CGG GGG TCT GT 3'.

Az 5'-terület primerje egy HindIII helyet visz be az amplifikált termékbe, míg a 3'-terület primerje egy transzlációs stopkodont és egy SalI helyet visz be az amplifikált termékbe. A PCR-t 29 ciklusban, 94 °C-on egy perc alatt, 37 °C-on két perc alatt, és 72 °C-on tízperc alatt hajtottuk végre; a végső inkubálás 72 °C-on tíz percig tartott.

A PCR-reakció fő terméke egy 381 bp-ból álló fragmentum volt. Ennek a fragmentumnak a pBR322 nagy SalI-HindIII fragmentummal történő ligálása a pBR322/C2 plazmidot eredményezte.

A 381 bp méretű HindIII-SalI C-nek, mely a pBR322/C2-ből kivágott fragmentumot kódolja, az ADH2/GAP promotert tartalmazó, 1,36 bp méretű BamHI-HindIII fragmentummal és a pBS24.1 élesztővektor nagyméretű BamHI-SalI fragmentumával történő ligálása eredményeképpen rekombináns vektorokat kaptunk, melyeket klónoztunk. A megfelelő rekombináns vektorokat a BamHI-gyel és a SalI-gyel való feltárás után egy 1,74 kb fragmentum jelenlétével azonosítottuk. Egy, az amplifikált szekvenciából létrehozott expressziós vektort és egy, közvetlenül az ADH2/GAP promoterbe fuzionált C-t kódoló szekvenciát azonosítottunk mint pC22.

Az expresszált C polipeptid analízisét a transzformált sejtekkel végeztük, teljes sejtlizátumon, és a nyersextraktumokat különálló élesztőtelepekről nyertük, melyeket a Leu⁻ lemezekről kaptunk. A sejtlizátumot és a nyersextraktumot SDS poliakrilamid gélen gélelektroforézissel vizsgáltuk meg. A C polipeptid előre várt mérete 122 aminosav volt. Az expresszált polipeptidek a gélelektroforézis alapján MW_r 13,6 Kd értékkel rendelkeztek.

5. példa: Az NS5 polipeptid szintézise

Ez a polipeptid az NS5 domén N-terminusának szekvenciáját tartalmazza. Az NS5 polipeptidet kódoló expressziós vektor létrehozásának eljárása és expressziója az alábbi eltéréseken kívül hasonló volt a C33c polipeptid expressziójának az 1. példában ismertetett eljárásával.

6. példa: Radioimmunoassay (RIA) a HCV-antitestekre

Az 1–5. példában említett HCV-antigéneket RIA-eljárással vizsgáltuk, így detektáltuk a klinikailag HCV-betegnek diagnosztizált (nem A, nem B [Non-A, Non-B]) egyének szérumában és fizetett vérdonorok szérumában a HCV ellen termelt antitesteket.

A C-t kódoló szekvencia PCR-amplifikációja során primerként alkalmazott oligonukleotidok szekvenciája az alábbi volt.

A RIA Tsu és Herzenberg (1980) eljárásán alapul; Selected Methods in Cellular Immunology (W. H. Freeman & Co.), pp. 373–391. Az eljárás lényege az alábbi. Mikrotiterlemezeket tisztított HCV-antigénnel vonunk be (coating). A bevont lemezeket a szérummintával vagy megfelelő kontrollal inkubáljuk. Az inkubálás alatt az antitestek, amennyiben jelen vannak a rendszerben, immunológiailag hozzákötődnek a szilárd fázisú antigénhez. A nem kötött anyag eltávolítása és a mikrotiterlemezek mosása után a humán antitest-NANBV antigénkomplexeket ^{125}I-jelzett birka-anti-humán immunoglobulinnal történő inkubálással detektáljuk. A nem kötött jelzett antitesteket leszívással távolítjuk el, és a lemezeket mossuk. Az egyes lyukakban meghatározzuk a radioaktivitást; a kötött humán anti-HCV-antitestek mennyisége arányos a lyukakban mért radioaktivitás-értékekkel.

Részletesen az eljárást az alábbi módon hajtjuk végre. 100 µl mennyiségű, 0,125 M Na-borát-pufferben, pH 8,3 és 0,075 M NaCl-ben (BBS) 0,1–0,5 µg HCV-antigént tartalmazó aliquot mennyiségeket viszünk az egyes lyukakba a mikrotiterlemezekre (Dynatech Immulon 2 Removawell Strips). A lemezt egy éjszakán keresztül 4 °C-on nedves kamrában inkubáljuk, az antigénoldatot eltávolítjuk, és a lyukakat 3-szor 0,02% Triton X–100-at tartalmazó BBS-sel mossuk. A nemspecifikus kötések megakadályozása céljából a lyukakat szarvasmarha-szérumalbuminnal (BSA) vonjuk be, 100 µl 5 mg/ml koncentrációjú BSA BBS-ben készített elegyének a bevitelével, majd a lemezeket egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk; az inkubálás után a BSA-oldatot eltávolítjuk. A bevont lyukakban levő antigének a szérummal reagálnak a 100 µl mennyiségű, 1:100 hígítású, 10 mg/ml BSA-t tartalmazó, 0,01 M Na-foszfát-pufferben, pH 7,2, 0,15 M NaCl-ben készült szérummintákkal a szérumot tartalmazó lyukak 1 órás, 37 °C-on történő inkubálása alatt. Az inkubálás után a szérummintákat leszívással eltávolítjuk, és a lyukakat BBST-vel ötször mossuk. Az antigénhez kötött antitestek mennyiségét ^{125}I-jelzett F'(ab)$_2$ birka-anti-humán IgG-nek a bevont lyukakhoz kötődése által határozzuk meg. Az egyes lyukakhoz hozzáadjuk a jelzett anyag 100 µl-es aliquot mennyiségeit (fajlagos aktivitás 5–20 µCi/µg), a lemezeket 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáljuk, és az anyagfelesleget leszívással távolítjuk el, majd a lemezt BBST-vel ötször mossuk. Az egyes lyukakban

kötött radioaktivitás mértékét τ-sugárzást detektáló számlálóval határozzuk meg.

Az 1. táblázat a HCV-fertőzöttnek diagnosztizált egyének szérumának vizsgálati eredményeit mutatja be.

1. táblázat

Beteg	Antigén				
	S2	C22	C100	C33c	NS5
CVH IVDA	P	P	P (+++)	P	P
CVH IVDA	P	P	P (+)	P	P
CVH IVDA	P	P	P (+)	P	P
CVH NOS	P	P	P	P	P
AVH NOS HS	N	N	N	N	N
AVH NOS HS	P	N	N	N	N
AVH NOS HS	P	N	N	N	N
AVH NOS HS	P/N	N	N	N	N
AVH PTVH	N	N	N	P/N	N
AVH NOS HS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	N	N	N	P
AVH PTVH	N	N	N	N	N
AVH IVDA	N	P	N	P	P
AVH PTVH	P	P/N	N	N	P
AVH NOS	N	P	N	N	N
AVH IVDA	N	P	N	P	P
AVH NOS HS	P/N	N	N	N	N
AVH PTVH	N	N	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH NOS HS	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	N	N	N
AVH PTVH	P	N	P (+)	P (+++)	N
CVH PTVH	N	P	P	P	P
CVH NOS HS	P	P	P	P	N
CVH NOS	N	P	P/N	P	P
CVH IVDA	N	N	N	P	N
AVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH IVDA	P/N	P	N	P	P
AVN IVDA	N	P	P	P	N
CVH PTVH	P	P/N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH PTVH?	N	P	P	P	P
AVH IVDA	N	P	N	P	N
AVH NOS	N	N	N	N	N

1. táblázat (folytatás)

Beteg	Antigén				
	S2	C22	C100	C33c	NS5
AVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	N	P	N	N	P
CVH NOS	P	P	N	N	N
CVH NOS HS	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	N	P	P
AVH nurse	P	P	N	N	N
AVH IVDA	P	P	P	P	N
AVH IVDA	N	P	P (+)	P (+++)	N
AVH nurse	P/N	P	N	N	N
AVH PTVH	P/N	P	P	N	P
AVH NOS	N	P/N	N	N	P
AVH NOS	N	P	N	P	N
AVH PTVH	P	P/N	N	N	N
AVH PTVH	N	P	N	P	P
AVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH PTVH	N	P	N	N	P
CVH PTVH	P/N	P	P (+)	P (+++)	N
AVH PTVH	N	P/N	P (+)	P (+++)	P
AVH PTVH	P	(?)	P	N	P
CVH PTVH	N	P	N	P	P
CVH PTVH	N	P	P	P	P
CVH PTVH	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	N	N	N	N
AVH nurse	P	P	N	N	N
CVH PTVH	N	P	N	N	P
AVH IVDA	N	P	N	P/N	N
CVH PTVH	P	P	P (+)	P (+++)	P
AVH NOS	P	P	N	N	N
AVH NOS	P/N	P	N	N	P
AVH PTVH	P/N	P	P	P	P
AVH NOS	N	P	P	P	P/N
AVH IVDA	N	P	N	N	P
AVH NOS	N	P/N	N	N	N
AVH NOS	P	P	N	N	P
AVH PTVH	N	P	P	P	P
crypto	P	P	P	P	P
CVH NOS	N	P	P	P	P
CVH NOS	N	N	N	N	N
AVH PTVH	N	P	P (+)	P (++)	N
AVH PTVH	N	P/N	P (+)	P (++)	P
AVH PTVH	N	P/N	P (+)	P (++)	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P

1. táblázat (folytatás)

Beteg	Antigén				
	S2	C22	C100	C33c	NS5
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH NOS	N	P	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P/N
AVH IVDA	P	P	P	P	N
AVH NOS	P	P	N	N	N
AVH NOS	P	P	N	N	N
CVH PTVH	P	P	N	N	P/N
AVH PTVH	N	P	N	P	P
AVH NOS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	P	N	N	N
AVH NOS	P	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	P/N	N	N	N
AVH IVDA	N	P	P	P	P
crypto	N	P	N	N	P/N
crypto	P	P	P/N	P	P
AVH IVDA	N	N	P	P	N
AVH IVDA	N	P	P	P	N
AVH NOS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	N	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH PTVH	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	P (+)	P (+++)	P
CVH PTVH	P	P	P (+)	P (+++)	P
CVH NOS	P/N	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH IVDA	N	P	P	P	P
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH NOS	P	P	N	N	P/N
AVH NOS	N	P/N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	N	N	P
CVH NOS	N	P/N	N	N	N
AVH NOS	N	P	N	N	N
AVH NOS	N	P	N	N	N
CVH PTVH	N	P	N	N	N
AVH IVDA	N	P	N	P	P
AVH NOS	P	N	N	N	N

1. táblázat (folytatás)

Beteg	Antigén				
	S2	C22	C100	C33c	NS5
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P/N	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	N	P	P	P	P
AVH NOS	N	P	N	N	N
CVH IVDA	N	P	N	N	P
CVH IVDA	N	P	N	N	P
AVH PTVH	P	P	N	P	P
AVH PTVH	P	P	N	P	P
CVH NOS	N	P/N	N	N	P/N
CVH NOS	N	P	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH IVDA	N	P	N	N	P
AVH IVDA	N	P	P (++)	P (+)	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH PTVH	N	P	P	P	P
CVH PTVH?	N	P	P	P	P
CVH PTVH?	P/N	P	P	P	P
CVH NOS HS	P	P	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	N
CVH PTVH	N	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P/N
CVH NOS	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH NOS	N	N	N	N	P/N
CVH NOS	N	P/N	N	N	P/N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH NOS	N	P	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	P	P	N	N	P/N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS HS	P	P	P	P	P
CVH NOS HS	P	P	P	P	P
CVH PTVH	N	N	N	N	N
AVH PTVH	N	P	P	P	P
AVH NOS			–	–	

1. táblázat (folytatás)

Beteg	Antigén				
	S2	C22	C100	C33c	NS5
CVH PTVH	N	P	P/N	P (+++)	N
crypto	P	P	P	P	P
crypto	P	P	P	P	P
crypto	N	P	N	N	N
crypto	N	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
crypto	N	N	N	N	N
crypto	N	P	N	N	P/N
crypto	N	P	N	N	P
crypto	P	P	P	P	P
crypto	N	P	N	P	N
crypto			–	–	
crypto			–	–	
CVH NOS			–	–	
AVH IVDA	N	P	N	P (+)	P
AVH IVDA	N	P/N	N	P (++)	N

AVH=akut virális hepatitis
CVH=krónikus virális hepatitis
PTVH=poszttranszfúziós virális hepatitis
IVDA=intravénásdrog-használó
crypto=kriptogenikus hepatitis
NOS=nem egyértelmű forrás
P=pozitív
N=negatív

Az eredmények szerint egyik egyedülálló antigén sem reagált az összes szérummal. A legreaktívabb a C22 és a C33c volt, míg az S2 az egyes valódinak vélt, akut HCV-esetek szérumaival reagált, melyekkel más antigén nem lépett reakcióba. Az eredmények alapján a két antigén elegye, mely a leginkább megfelelő detektálási sorozatot biztosította, a C22 és a C33c volt. Amennyiben az akut fertőzés maximumát kívánjuk detektálni, a készítménynek az S2-t is célszerű tartalmaznia.

A 2. táblázat a fizetett vérdonorok szérumának vizsgálati eredményeit mutatja be.

2. táblázat

Donor	Antigén				
	C100	C33c	C22	S2	NS5
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	P	P	P	P	P
4	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N
18	P	P	P	P	P
19	P	P	N	P	P
20	P	P	N	P	P
21	N	N	N	N	N

2. táblázat (folytatás)

Donor	Antigén				
	C100	C33c	C22	S2	NS5
22	N	P	P	N	P
23	P	P	P	P	P
24	N	N	N	N	N
25	N	N	N	N	N
26	N	N	N	N	N
27	N	N	N	N	N
28	N	N	N	N	N
29	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N
31	P	P	P	N	P
32	N	N	N	N	N
33	N	N	N	N	N
34	N	N	N	N	P
35	N	N	P	N	P
36	N	N	N	N	N
37	N	N	N	N	N
38	N	N	N	N	N
39	N	N	N	N	N
40	N	N	N	N	N
41	N	N	N	N	P
42	N	N	N	N	N
43	N	N	N	N	N
44	N	N	N	N	N
45	N	N	N	N	N
46	N	N	N	N	N
47	P	P	N	N	P
48	N	N	N	N	N
49	N	N	N	N	N
50	N	N	N	N	N
51	N	P	P	N	P
52	N	N	N	N	N
53	N	P	P	N	P
54	P	P	P	P	N
55	N	N	N	N	N
56	N	N	N	N	N
57	N	N	N	N	N
58	N	N	N	N	N
59	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N
61	N	N	N	N	N
62	N	N	N	N	N
63	N	N	N	N	N

Donor	Antigén				
	C100	C33c	C22	S2	NS5
64	N	N	N	N	N
65	N	N	N	N	N
66	N	N	N	N	N
67	N	N	N	N	N
68	N	N	N	N	N
69	N	N	N	N	N
70	P	P	P	P	P
71	N	N	N	N	N
72	N	N	N	N	N
73	P	P	P	P	N
74	N	N	N	N	N
75	N	N	N	N	N
76	N	N	N	N	P
77	N	N	N	N	N
78	N	N	N	N	N
79	N	N	N	N	N
80	N	N	N	N	N
81	N	N	N	N	N
82	N	N	N	N	N
83	P	P	N	N	N
84	N	N	P	N	N
85	N	N	N	N	N
86	P	P	P	P	N
87	N	N	N	N	N
88	N	N	N	N	N
89	P	P	P	P	P
90	P	P	P	P	N
91	N	N	N	N	P
92	P	P	P	N	N
93	N	N	N	N	N
94	N	N	N	N	N
95	N	N	N	N	N
96	N	N	N	N	N
97	N	N	N	N	N
98	N	P	P	P	P
99	P	P	P	P	P
100	N	N	N	N	N
101	P	P	P	P	P
102	N	N	N	N	N
103	N	N	N	N	N
104		N	N	N	N
105	P	P	P	P	N
106	N	N	N	N	N

2. táblázat (folytatás)

Donor	Antigén				
	C100	C33c	C22	S2	NS5
107	N	N	N	N	N
108	N	N	N	N	N
109	P	P	P	P	P
110	P	P	P	N	P
111	P	P	P	N	P
112	N	N	N	N	N
113	P	P	P	P	P
114	N	N	N	N	N
115	N	N	N	N	N
116	P	P	P	P	P
117	N	N	N	N	N
118	N	N	N	N	N
119	N	N	N	N	N
120	P	P	P	P	P
121	N	N	N	N	N
122	N	P	P	N	P
123	N	N	N	N	N
124	N	N	N	N	N
125	N	N	N	N	N
126	P	N	N	N	N
127	N	N	N	N	N
128	N	N	N	N	N
129	N	N	N	N	N
130	P	P	P	P	N
131	N	N	N	N	P
132	N	N	N	N	N
133	N	N	N	N	N
134	N	N	N	N	N
135	N	N	N	N	N
136	N	N	N	N	N
137	N	N	N	N	N
138	N	N	N	N	N
139	N	N	N	N	N
140	P	N	N	N	N
141	P	N	P	P	P
142	N	N	N	N	N
143	N	N	N	N	N
144	N	N	N	N	N
145	N	N	N	N	N
146	N	N	N	N	N
147	N	N	N	N	N
148	N	N	N	N	N

Donor	Antigén				
	C100	C33c	C22	S2	NS5
149	N	N	N	N	N
150	N	N	N	N	N
151	N	N	N	N	N
152	N	N	N	N	N
153	N	N	N	N	N
154	P	P	P	P	P
155	N	N	N	N	N
156	N	N	N	N	N
157	N	N	N	N	N
158	N	N	N	N	N
159	N	N	N	N	N
160	N	N	N	N	N
161	P	P	P	P	P
162	N	N	N	N	N
163	N	N	N	N	N
164	P	P	P	N	P
165	N	N	N	N	N
166	P	P	P	N	P
167	N	N	N	N	N
168	N	N	N	N	N
169	N	N	N	N	N
170	N	N	N	N	N
171	N	N	N	N	N
172	N	N	N	N	N
173	N	N	N	N	N
174	N	N	N	N	N
175	N	N	N	N	N
176	N	N	N	N	N
177	N	N	N	N	P
178	N	N	N	N	N
179	N	N	N	N	N
180	N	N	N	N	N
181	N	N	N	N	N
182	N	N	N	N	N
183	P	P	P	P	P
184	N	N	N	N	N
185	N	N	N	N	N
186	N	N	N	N	N
187	N	N	N	N	N
188	N	P	P	N	N
189	N	N	N	N	N
190	N	N	N	N	N
191	N	N	N	N	N

2. táblázat (folytatás)

Donor	Antigén				
	C100	C33c	C22	S2	NS5
192	N	N	N	N	N
193	N	N	N	N	N
194	N	N	N	N	N
195	N	N	N	N	N
196	N	N	N	N	N
197	N	N	N	N	P
198	P	P	P	N	N
199	N	N	N	N	P
200	P	P	P	P	N

A fizetett vérdonorok esetén kapott eredmények megerősítik a fertőzött egyének szérumánál kapott eredményeket.

7. példa: A HCV-antitestek HCV-antigénkészítmény alkalmazásával történő ELISA-meghatározása

A C22 és a C33c antigének készítményével bevont lemezeket az alábbiak szerint készítettük el. Közvetlenül a Removeawell Immulon I lemezekre (Dynatech. Corp.) történő felvitel előtt bevonópufferből (coating puffer; 50 mM borát, pH 9,0) 21 ml/lemez, BSA-ból (25 μg/ml) C22-ből és C33c-ből (mindegyik 2,50 μg/ml mennyiségben) oldatot készítettünk. Ötperces keverés után az oldatból 0,2 ml/lyuk mennyiségeket vittünk fel a lemezekre, befedtük, két órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd az oldatfelesleget leszívással eltávolítottuk. A lyukakat egyszer 400 μl mosópufferrel mostuk [100 mM nátrium-foszfát, pH 7,4, 140 mM NaCl, 0,1% (W/V) kazein, 1% (W/V) Triton X–100, 0,01% (W/V) Thimerosal). A mosóoldat eltávolítása után 200 μl/lyuk mennyiségű „utóbevonó oldatot" (postcoat solution) (10 mM Na-foszfát, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,1% (W/V) kazein, 3% szukróz és 2 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF)] vittünk a lyukakba, a párolgás megakadályozása céljából lazán befedtük a lemezeket, majd szobahőmérsékleten 30 percig állni hagytuk. Ezután a lyukakból leszívtuk a folyadékot, és önmelegedés (self heating) nélkül egy éjszaka alatt szárazra liofileztük. Az így kapott lemezeket 2–8 °C-on, zárt alumíniumtasakban, szárítókapszulával (3 g Sorbit™ kapszulák) tárolhatjuk.

Az ELISA eredményeinek megerősítése céljából a szérumminta, illetve a kontrollminta 20 μl mennyiségeit adtuk a 200 μl minta hígítót [100 mM nátrium-foszfát, pH 7,4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% (W/V) kazein, 1% (W/V) Triton X–100, 0,01% (W/V) Thimerosal és 100 μg/ml élesztőextraktum] tartalmazó lyukakba. A lemezeket lefedtük, és 37 °C-on két órán keresztül inkubáltuk, majd az oldatot leszívással eltávolítottuk, és a lemezeket háromszor 400 μl mosópufferrel mostuk [0,05% Tween 20-at tartalmazó, foszfátpufferes fiziológiás sóoldat (PBS)]. A mosás után a lyukakat 200 μl egér-anti-humán IgG-torma-peroxidáz- (HRPO) konjugátummal kezeltük, mely Ortho konjugátum hígítóoldatban volt [10 mM nátrium-foszfát, pH 7,2, 150 mM NaCl, 50% (V/V) fetális szarvasmarhaszérum, 1% (V/V) hőkezelt lószérum, 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,05% (W/V) Tween 20 és 0,02% (W/V) Thimerosal]. A kezelés 37 °C-on, egy órán keresztül tartott, majd az oldatot leszívással eltávolítottuk, és a lemezeket háromszor 400 μl mosópufferrel mostuk, melyet szintén leszívással távolítottunk el. A kötött enzimkonjugátum meghatározása céljából 200 μl szubsztrátoldatot (10 mg o-fenilén-diamin-dihidroklorid 5 ml „developer" oldatban) adtunk hozzá. A „developer" oldat 50 mM Na-citrátot tartalmazott, pH 5,1 foszforsavval és 0,6 μl/ml 30%-os H_2O_2-t. A szubsztrátoldatot tartalmazó lemezeket sötétben 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, a reakciót 50 μl/ml 4 N kénsav hozzáadásával állítottuk le, majd meghatároztuk az OD-értékeket.

Hasonló módon végezhetjük el a C22 és C33c, és C22, C33c, és S2, és a C22, és C100, C22, és S2, C22, és egy NS5 antigén, C22, C33c, és S2, és C22, C100, és S2 fúziós fehérjék ELISA-vizsgálatát.

A fenti eljárások kivitelezésében a molekuláris biológiai, az immunológiai és az egyéb kapcsolódó tudományok alapján történő módosításoknak az alább következő igénypontok területén belül kell esniük.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Szilárd mátrix felületén immobilizált hepatitis C vírus- (HCV) antigénkészítmény, amely egy vagy több kémiai szintézissel vagy rekombináns kifejezés útján nyert peptidet tartalmaz, HCV elleni antitestek immunoassay-vel történő meghatározására, *azzal jellemezve,* hogy az alábbi antigéneket tartalmazza:

a) egy első HCV-antigént, mely a HCV-poliprotein C doménjéből származó epitóppal rendelkezik, és

b) legalább egy további HCV-antigént, melyet az alábbi csoportból választunk ki:

i) egy, a HCV-poliprotein NS3 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

ii) egy, a HCV-poliprotein NS4 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

iii) egy, a HCV-poliprotein S doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

iv) egy, a HCV-poliprotein NS5 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az antigének kombinációja a p1 peptid és a C 100-3; a p35 peptid és a C 100-3; vagy a p99 peptid és a C 100-3 kombinációjától vagy a CA 290a fúziós peptidtől eltérő.

3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy egy harmadik HCV-antigént tartalmaz, melyet az alábbi csoportból választunk ki:

i) egy, a HCV poliprotein NS3 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

ii) egy, a HCV-poliprotein NS4 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

iii) egy, a HCV-poliprotein S doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén;

iv) egy, a HCV-poliprotein NS5 doménjéből származó epitóppal rendelkező HCV-antigén,

azzal a feltétellel, hogy a második és harmadik antigén a HCV-poliprotein különböző doménjeiből származó epitóppal rendelkezik.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a második antigén a HCV NS3 doménjéből származó epitóppal rendelkezik.

5. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a második antigén a HCV NS4 doménjéből származó epitóppal rendelkezik.

6. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a második antigén a HCV S doménjéből származó epitóppal rendelkezik.

7. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a második antigén a HCV NS5 doménjéből származó epitóppal rendelkezik.

8. A 4. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az első HCV-antigén a C22, és a második HCV-antigén a C33c.

9. A 3. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az első HCV-antigén a C22, a második HCV-antigén a C33c, és a harmadik HCV-antigén az S2.

10. A 3. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az első HCV-antigén a C22, és a második HCV-antigén a C100.

11. A 3. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az első HCV-antigén a C22, a második HCV-antigén a C100, és a harmadik HCV-antigén az S2.

12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítmény egy fúziós polipeptidet tartalmaz.

13. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az első HCV-antigén és a további antigének külön kötődnek a közös szilárd mátrixhoz.

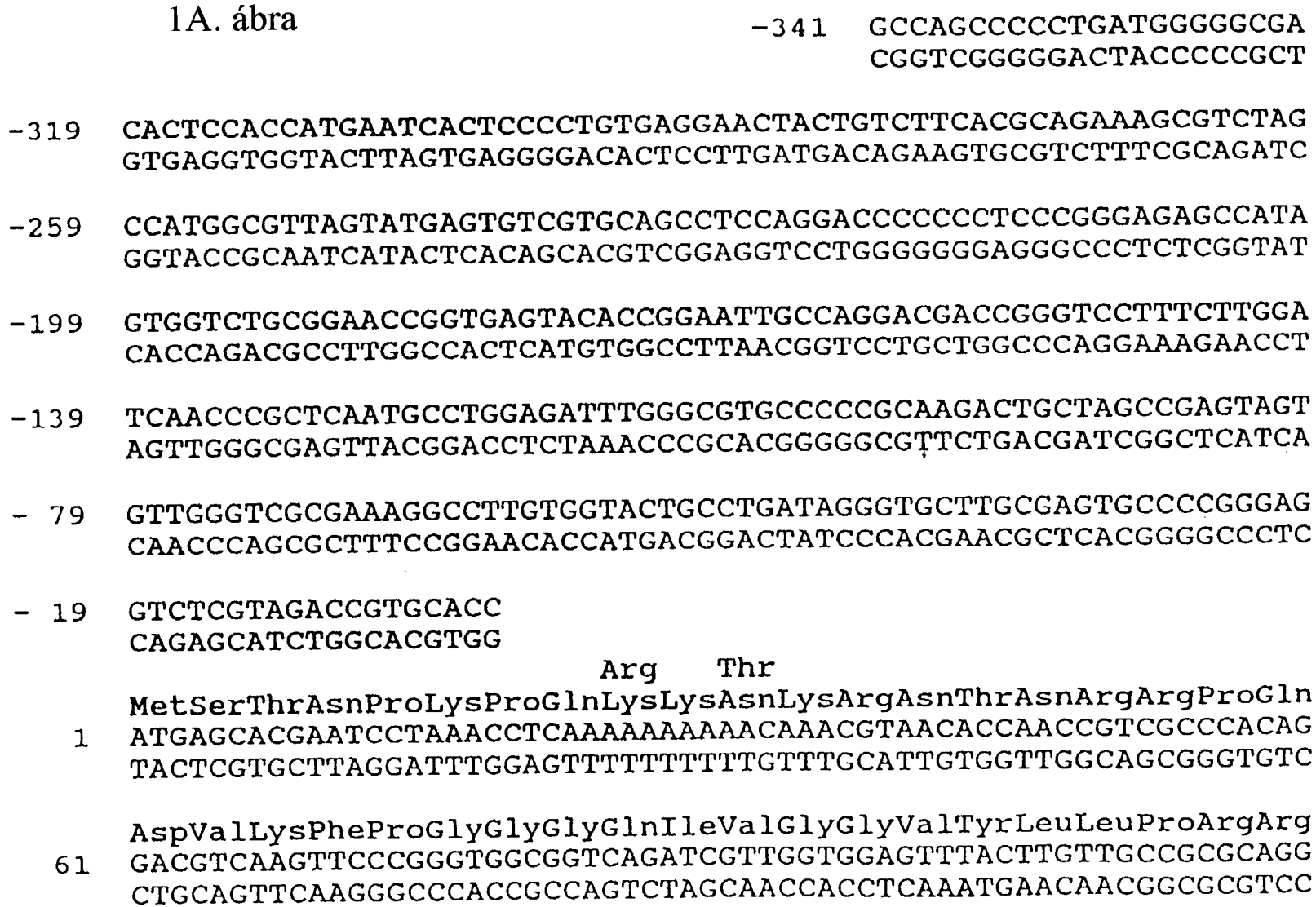
14. A 13. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a szilárd mátrix egy mikrotiterlemez felszíne, gyöngy vagy pálca.

15. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az az első HCV-antigén és a további antigének keverékét tartalmazza.

16. Az 1–15. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az egy kit része.

17. In vitro módszer HCV-antitesteknek emlőstestkomponensekben történő meghatározására, *azzal jellemezve,* hogy a testkomponenst az 1–16. igénypontok bármelyike szerinti antigénkészítménnyel hozzuk érintkezésbe, és a létrejött antitest-antigén reakció során keletkezett immunkomplex jelenlétét kimutatjuk.

1A. ábra



HU 217 025 B
Int. Cl.[6]: G 01 N 33/576

```
    GlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGly
121 GGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGAGGT
    CCGGGATCTAACCCACACGCGCGCTGCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCA

    ArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGly
181 AGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTCGTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGG
    TCTGCAGTCGGATAGGGGTTCCGAGCAGCCGGGCTCCCGTCCTGGACCCGAGTCGGGCCC

    TyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerPro
241 TACCCTTGGCCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCC
    ATGGGAACCGGGGAGATACCGTTACTCCCGACGCCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGG

    ArgGlySerArgProSerTrpGlyProThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGly
301 CGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGGGCCCCACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGT
    GCACCGAGAGCCGGATCGACCCCGGGGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCA

    LysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuVal
361 AAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTC
    TTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAG

    GlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAsp
421 GGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGAC
    CCGCGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCCGGGACCGCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTG
```

1B. ábra

1C. ábra

```
                                                                Thr
     GlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAla
481  GGCGTGAACTATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCC
     CCGCACTTGATACGTTGTCCCTTGGAAGGACCAACGAGAAAGAGATAGAAGGAAGACCGG

     LeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerThrGlyLeu
541  CTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCTACCAAGTGCGCAACTCCACGGGGCTT
     GACGAGAGAACGAACTGACACGGGCGAAGCCGGATGGTTCACGCGTTGAGGTGCCCCGAA

     TyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspAlaIle
601  TACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCCATC
     ATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATGCTCCGCCGGCTACGGTAG

     LeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSerArgCysTrpVal
661  CTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAACGCCTCGAGGTGTTGGGTG
     GACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCACTCCCGTTGCGGAGCTCCACAACCCAC

     AlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGlnLeuArgArg
721  GCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCGCGACGCAGCTTCGACGT
     CGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGGCGCTGCGTCGAAGCTGCA

     HisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeu
781  CACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTA
     GTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGGAGATGCACCCCCTGGAT

     CysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTrpThr
841  TGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTCACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACG
     ACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGGAAGAGAGGGTCCGCGGTGACCTGC
```

```
      ThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrp
901   ACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCACCGCATGGCATGG
      TGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCCAGTGGCGTACCGTACC

                                                        Val
      AspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIle
961   GATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATC
      CTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAG

      ProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAla
1021  CCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCG
      GGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGC

      TyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGly
1081  TATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGC
      ATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCACGACGACGATAAACGGCCG

      ValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHisThrValSerGlyPheVal
1141  GTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCACACTGTGTCTGGATTTGTT
      CAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCACGGCCGGTGTGACACAGACCTAAACAA

      SerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrp
1201  AGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGG
      TCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAGGTCGACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACC
```

1D. ábra

1E. ábra

```
      HisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGly
1261  CACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGG
      GTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCC

      LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg
1321  CTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGA
      GAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCT

      ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro
1381  CCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCC
      GGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGG

      AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys
1441  GACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAAG
      CTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCGCTTC

      SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValValGlyThrThrAsp
1501  AGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGAC
      TCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTG

      ArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThrAspValPheValLeuAsn
1561  AGGTCGGGCGCGCCCACCTACAGCTGGGGTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCTTAAC
      TCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCCCACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTG

      AsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPhe
1621  AATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTC
      TTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAG
```


ThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHis
1681 ACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTGTCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCAC
TGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTG
CysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGly
1741 TGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGT
ACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAGGCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCA
Ile
ProTrpLeuThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCys
1801 CCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGT
GGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGCTGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACA
ThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeu
1861 ACCATCAACTACACCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTG
TGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGAC
GluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSer
1921 GAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCC
CTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGG
GluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThr
1981 GAGCTCAGCCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCACA
CTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGT

1F. ábra

1G. ábra

```
      ThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGln
2041  ACCCTACCAGCCTTGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAG
      TGGGATGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTC

      TyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValVal
2101  TACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTT
      ATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAA

      LeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeu
2161  CTCCTGTTCCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTC
      GAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAG

      IleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAla
2221  ATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCC
      TATAGGGTTCGCCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGG

      GlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGly
2281  GGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTTCTTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGT
      CCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCCA

      LysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeu
2341  AAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTG
      TTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGAC

      LeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGly
2401  TTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGCGGT
      AACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCA
```

```
      ValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSer
2461  GTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGC
      CAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCGCGATATAGTCG

                              (Asn)
      TrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrp
2521  TGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGG
      ACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACC

      IleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaVal
2581  ATTCCCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGCGACGCCGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTA
      TAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACAT

      HisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrp
2641  CACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGG
      GTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACC

      IleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArg
2701  ATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGG
      TAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCC

      PheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLys
2761  TTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCATTAAG
      AAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTC
```

1H. ábra

11. ábra

```
      LeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAla
2821  TTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCG
      AATCCCCGCGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGC

      HisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGlu
2881  CACAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAG
      GTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTTTACCTC

      ThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeu
2941  ACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGGTGACATCATCAACGGCTTG
      TGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAAC

      ProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSer
3001  CCTGTTTCCGCCCGCAGGGGCCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCC
      GGACAAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTCGGCTACCTTACCAGAGG

      LysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeu
3061  AAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCAGCAGACAAGGGGCCTCCTA
      TTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCGTCTGTTCCCCGGAGGAT

      GlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGln
3121  GGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAG
      CCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTTCACCTCCCACTCCAGGTC

      IleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThr
3181  ATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACT
      TAACACAGTTGACGACGGGTTTGGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCCACACGACCTGA
```

```
      ValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMet
3241  GTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTCCTGTCATCCAGATG
      CAGATGGTGCCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCCCAGGACAGTAGGTCTAC

                                                    Ser       Thr
      TyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeu
3301  TATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTG
      ATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAAC

      ThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIle
3361  ACACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCATT
      TGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAA

      ProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyr
3421  CCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTCGCCCCGGCCCATTTCCTAC
      GGGCACGCGGCCGCCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGACAGCGGGGCCGGGTAAAGGATG

      LeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePhe
3481  TTGAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGCACGCCGTGGGCATATTT
      AACTTTCCGAGGAGCCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAA

      ArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsn
3541  AGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAAC
      TCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTG
```

1J. ábra

1K. ábra

```
      LeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValPro
3601  CTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGCCC
      GATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCACGGG

      GlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysVal
3661  CAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTC
      GTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTCGCCGTTTTCGTGGTTCCAG

      ProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAla
3721  CCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCA
      GGCCGACGTATACGTCGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGT

                                                              Leu
      ThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThr
3781  ACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACC
      TGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGG

      GlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeu
3841  GGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTT
      CCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAA

      AlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSer
3901  GCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCC
      CGGCTGCCGCCCACGAGCCCCCCGCGAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGG
```

```
                                (Val)
     ThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGly
3961 ACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACTGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGG
     TGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACTGGTTCGTCTCTGACGCCCC

     AlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisPro
4021 GCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCC
     CGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGG

     AsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIle
4081 AACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATC
     TTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAG

     ProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCys
4141 CCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCATTCAAAGAAGAAGTGC
     GGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACG

     AspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGly
4201 GACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGT
     CTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCA

     LeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAlaThrAspAlaLeu
4261 CTTGACGTGTCCGTCATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGTCGTGGCAACCGATGCCCTC
     GAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAG

                                                  Tyr
     MetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGln
4321 ATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTCACCCAG
     TACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTC
```

1L. ábra

1M. ábra



HU 217 025 B
Int. Cl.[6]: G 01 N 33/576

```
     ProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGly
4801 CCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTTTGATTCGCCTCAAGCCCACCCTCCATGGG
     GGGGGTAGCACCCTGGTCTACACCTTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCC

     ProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisPro
4861 CCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTCAGAATGAAATCACCCTGACGCACCCA
     GGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGT

     ValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrp
4921 GTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGG
     CAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACC

     ValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysVal
4981 GTGCTCGTTGGCGGCGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTGCGTG
     CACGAGCAACCGCCGCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCAC

     ValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluVal
5041 GTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTC
     CAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAG

     LeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGln
5101 CTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAA
     GAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTT
```

1N. ábra

```
      GlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSer
5161  GGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGCGTCC
      CCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGG

      ArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPhe
5221  CGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTTC
      GCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGAGCTCTGGAAG

      TrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThr
5281  TGGGCGAAGCATATGTGGAACTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACG
      ACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGC

      LeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerPro
5341  CTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCCA
      GACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGT

      LeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeu
5401  CTAACCACTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCCAGCTC
      GATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCCACCCACCGACGGGTCGAG

      AlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGly
5461  GCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGC
      CGGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAATCGACCGCGGCGGTAGCCG

      SerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAla
5521  AGTGTTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCG
      TCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGC
```

1O. ábra

```
                                                                  (Gly)
      GlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuVal
5581  GGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTC
      CCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCAG

      AsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAla
5641  AATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCA
      TTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAGCCGCACCAGACACGTCGT

      IleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIle
5701  ATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATA
      TATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTCACCTACTTGGCCGACTAT

      AlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAla
5761  GCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCA
      CGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCGTGATGCACGGCCTCTCGCTACGT

                                (HisCys)
      AlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeu
5821  GCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTG
      CGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGGGTCGAGGACTCCGCTGAC

      HisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIle
5881  CACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATC
      GTGGTCACCTATTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAG
```

1P. ábra

```
      TrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMet
5941  TGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATG
      ACCCTGACCTATACGCTCCACAACTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTTCGATTCGAGTAC

      ProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArg
6001  CCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGA
      GGTGTCGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCCATATTCCCCCAGACCGCT

      (Val)
      GlyAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLys
6061  GTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAA
      CACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTT

      AsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPhe
6121  AACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTC
      TTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCCTGGAAG

      ProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPhe
6181  CCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCCTGTACCCCCCTTCCTGCGCCGAACTACACGTTC
      GGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGGACATGGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAG

      AlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHis
6241  GCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCAC
      CGCGATACCTCCCACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCCTGAAGGTG

      TyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGlu
6301  TACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAA
      ATGCACTGCCCATACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACCGGTCCAGGGTAGCGGGCTT
```

1Q. ábra

```
        PhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeu
6361    TTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTTTGCGCCCCCCTGCAAGCCCTTG
        AAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGGATGTATCCAAACGCGGGGGGACGTTCGGGAAC

        LeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeu
6421    CTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTA
        GACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCCATCCCAGCGTTAAT

        ProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHis
6481    CCTTGCGAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCAT
        GGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACTGCAGGTACGAGTGACTAGGGAGGGTA

        IleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSer
6541    ATAACAGCAGAGGCGGCCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCCCCTCTGTGGCCAGC
        TATTGTCGTCTCCGCCGGCCCGCTTCCAACCGCTCCCCTAGTGGGGGGAGACACCGGTCG

        SerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAsp
6601    TCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGAC
        AGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTG

        SerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsn
6661    TCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAAC
        AGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCCTCTACCCGCCGTTG
```

1R. ábra

1S. ábra

```
      IleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuVal
6721  ATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTG
      TAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACAC

      AlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArg
6781  GCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGA
      CGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCCTCT

      PheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThr
6841  TTCGCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCCGGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAGACG
      AAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCGCCGGCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGC

      TrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLys
6901  TGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAG
      ACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTC

      SerProProValProProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeu
6961  TCCCCTCCTGTGCCTCCGCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCCTCACTGAATCAACCCTA
      AGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCTTCGCCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGAT

                                  (Ser)
      SerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIle
7021  TCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATT
      AGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAA

      ThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSer
7081  ACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCCTTCTGGCTGCCCCCCCGACTCC
      TGCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGG
```


(PheAla)
AspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeu
7141 GACGCTGAGTCCTATTCCTCCATGCCCCCCCTGGAGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTT
CTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAA
SerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCys
7201 AGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGC
TCGCTGCCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACG
SerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLys
7261 TCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAGAAA
AGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGGCGCCTTCTTGTCTTT
LeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThr
7321 CTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCCACC
GACGGGTAGTTACGTGATTCGTTGAGCAACGATGCAGTGGTGTTAAACCACATAAGGTGG
ThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeu
7381 ACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTG
TGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCCGTCTTCTTTCAGTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGAC
AspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAla
7441 GACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGGCGTCAAAAGTGAAGGCT
CTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTTCCTCCAATTTCGTCGCCGCAGTTTTCACTTCCGA

1T. ábra

1U. ábra



HU 217 025 B
Int. Cl.[6]: G 01 N 33/576


ThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyr
7921 ACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTAC
TGGGCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATG
GlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeu
7981 CAATGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTT
GTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCGGGCGCACCGGTAGTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAA
(Gly)
TyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArg
8041 TATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGC
ATACAACCCCCGGGAGAATGGTTAAGTTCCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCG
AlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArg
8101 GCGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGG
CGCTCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCC
AlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeu
8161 GCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTA
CGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAAT
ValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThr
8221 GTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACG
CAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGC

1V. ábra

1W. ábra

```
          GluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeu
8281      GAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCCCCTGGGGACCCCCCACAACCAGAATACGACTTG
          CTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGGGGACCCCTGGGGGGTGTTGGTCTTATGCTGAAC

          GluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArg
8341      GAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCCACGACGGCGCTGGAAAGAGG
          CTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTGCTGCCGCGACCTTTCTCC

          ValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAla
8401      GTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCA
          CAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCCTCTGTCGT

          ArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrp
8461      AGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTTTGCCCCCACACTGTGG
          TCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACC

          AlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGlu
8521      GCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGCCAGGGACCAGCTTGAA
          CGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCGAACTT

          GlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuPro
8581      CAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCT
          GTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGAACTAGATGGA

          ProIleIleGlnArgLeuHisGlyLeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGly
8641      CCAATCATTCAAAGACTCCATGGCCTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGT
          GGTTAGTAAGTTTCTGAGGTACCGGAGTCGCGTAAAAGTGAGGTGTCAATGAGAGGTCCA
```

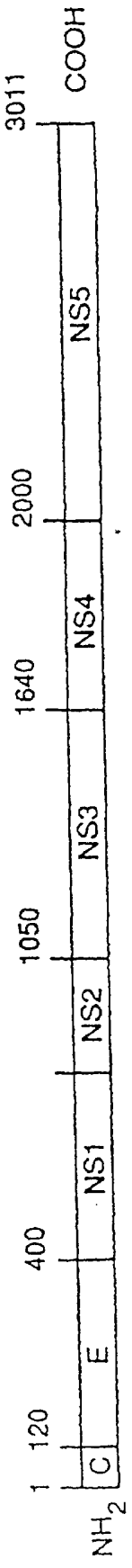
```
                GluIleAsnArgValAlaAlaCysLeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrp
8701            GAAATTAATAGGGTGGCCGCATGCCTCAGAAAACTTGGGGTACCGCCCCTTGCGAGCTTGG
                CTTTAATTATCCCACCGGCGTACGGAGTCTTTTGAACCCCATGGCGCGGGAACGCTCGAACC

                Gly
                ArgHisArgAlaArgSerValArgAlaArgLeuLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIle
8761            AGACACCGGGCCCGGAGCGTCCGCGCTAGGCTTCTGGCCAGAGGAGGCAGGGCTGCCATA
                TCTGTGGCCCGGGCCTCGCAGGCGCGATCCGAAGACCGGTCTCCTCCGTCCCGACGGTAT

                CysGlyLysTyrLeuPheAsnTrpAlaValArgThrLysLeuLysLeuThrProIleAla
8821            TGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGAACAAGCTCAAACTCACTCCAATAGCG
                ACACCGTTCATGGAGAAGTTGACCCGTCATTCTTGTTTCGAGTTTGAGTGTTATCGC

                AlaAlaGlyGlnLeuAspLeuSerGlyTrpPheThrAlaGlyTyrSerGlyGlyAspIle
8881            GCCGCTGGCCAGCTGGACTTGTCCGGCTGGTTCACGGCTGGCTACAGCGGGGGAGACATT
                CGGCGACCGGTCGACCTGAACAGGCCGACCAAGTGCCGACCGTGTCGCCCCCTCTGTAA

                                (Pro)
                TyrHisSerValSerHisAlaArgProArgTrpIleTrpPheCysLeuLeuLeuLeuAla
8941            TATCACAGCGTGTCTCATGCCCGGCCCCCGCTGGATCTCTGGTTTTGCCTACTCCTGCTTGCT
                ATAGTGTCGCACAGAGTACGGGCCGGGGGCGACCTAGACCAAAACGGATGAGGACGAACGA
```

1X. ábra

1Y. ábra

```
                AlaGlyValGlyIleTyrLeuProAsnArgOP
9001  GCAGGGGTAGGCATCTACCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAACACTCCGGCCT
      CGTCCCCATCCGTAGATGGAGGGGTTGGCTACTTCCAACCCCATTTGTGAGGCCGGA
```

( ) = az 5'- vagy 3'- terminális klónozó műtermékek
(adott esetben) tulajdonítható heterogenitás



2. ábra