HU 0002245500 B1

(19) HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: 224 550 (13) B1

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 96 02404
(22) A bejelentés napja: 1995. 03. 01.

(40) A közzététel napja: 1997. 05. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: 2005. 10. 28.

(51) Int. Cl.[7]: C 12 N 15/89
A 01 K 67/027
C 07 K 14/47
C 07 K 14/75
C 12 N 15/90
C 12 N 15/62
C 12 N 15/63
C 12 N 15/85

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/US 95/02648
(87) A nemzetközi közzétételi szám: WO 9523868

(30) Elsőbbségi adatok:
08/206,176 1994. 03. 03. US

(72) Feltalálók:
Foster, Donald C., Seattle, Washington (US);
Garner, Ian, Edinburgh, Skócia (GB);
Dalrymple, Michael A., Edinburgh, Skócia (GB);
Prunkard, Donna E., Seattle, Washington (US)

(73) Jogosult:
Pharming Intellectual Property BV, Leiden (NL)

(74) Képviselő:
ifj. Szentpéteri Ádám, S. B. G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest

(54) **Fibrinogén előállítása transzgén állatokban**

(57) Kivonat

A találmány tárgya eljárások és anyagok fibrinogén előállítására nem humán transzgenikus emlősökben. A fibrinogén Aα-, Bβ- és γ-láncait kódoló DNS-szegmenseket egy nem humán emlős szaporítóanyagába viszik be, és az emlős vagy nőstény utódai a bejuttatott DNS-szegmensekről expresszálódó fibrinogént tartalmazó tejet termelnek. A heterológ fibrinogén polipeptid láncokat kódoló DNS-szegmenseket hordozó nem humán emlősembriók és transzgenikus nem humán emlősök is a találmány tárgyát képezik.

HU 224 550 B1

A véralvadási kaszkád utolsó lépése az oldható fibrinogén plazmafehérje trombinnal katalizált átalakulása oldhatatlan fibrinné. A trombin a fibrinogén háromkomponensű lánca egyikéről (az Aα-lánc) egy kis peptidet hasít le. A fibrinmonomerek ezt követően polimerizálódnak, és az aktivált XIII-as faktorral létrejött keresztkötések tartják össze őket, így jön létre egy stabil vérrög.

A fibrinogén a biológiai szöveti ragasztók egy kulcskomponense [4,377,572 és 4,442,655 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés], amely utánozza a természetes vérrögök képződését, ezzel elősegíti a hemosztázist és a roncsolódott szövetek helyreállítását. A szöveti ragasztók egy kiegészítést vagy egy másik alternatívát szolgáltatnak a varrás, kapcsolás és a sebzárás egyéb mechanikai módszerei mellé. Azonban ezeknek a termékeknek (fibrinogén, XIII-as faktor) a fő adalék anyagait egyesített humán plazmából állítják elő krioprecipitációval [azaz például 4,377,572, 4,362,467 és 4,909,251 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés], vagy etanolos kicsapással [azaz például 4,442,655 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés] vagy egyetlen donornak a plazmájából [azaz például 4,627,879 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; Spotnitz és munkatársai: Am. Surg. *55,* 1661–168 (1989)]. A kapott fibrinogén/XIII-as faktor készítményt szarvasmarhatrombinnal keverjük össze közvetlenül felhasználás előtt, hogy a fibrinogént fibrinné alakítsuk, és aktiváljuk a XIII-as faktort, ezzel iniciálva a ragasztóanyag koagulációját.

A kereskedelmi forgalomban levő ragasztók egyesített plazmából származnak. Mivel a véreredetű termékeket a közvélemény úgy tekinti, mint amelyek a humán immundeficiencia vírusok, a hepatitisvírus és egyéb etiológiai ágensek átviteléért felelősek, ezért ezeknek a ragasztóknak az elfogadása és hozzáférhetősége korlátozott. Az Amerikai Egyesült Államokban jelenleg nincs jóváhagyva az alkalmazásuk.

Míg az autológ plazma alkalmazása csökkenti a betegség átvitelét, az autológ ragasztóanyagok csak olyan sebészeti beavatkozások esetében használhatók, amelyekben a beteg képes előre a saját vérét adni erre a célra.

Amint az előzőkben megjegyeztük, a fibrinogén három polipeptidláncból áll, és ezek mind két példányban fordulnak elő az összeállt molekulában. Ezek a láncok, jelük Aα-, Bβ- és γ-lánc, egymással koordináltan expresszálódnak, összeállnak, és a máj szekretálja őket. Jóllehet az várható, hogy a rekombináns DNS technológia alternatívát képes nyújtani a fibrinogén plazmából való előállításával szemben, ez a cél elég bizonytalannak tűnik az utóbbi időben. A három fibrinogén láncot egyenként expresszálták *Escherichia coli*-ban [Lord: DNA *4,* 33–38 (1985); Bolyard és Lord: Gene *66* 183–192 (1988); Bolyard és Lord: Blood *73,* 1202–1206], de prokarióta rendszerben még nem sikerült működőképes fibrinogént előállítani. Biológiailag aktív fibrinogén élesztőben való expresszióját sem írták még le. Tenyésztett transzfektált emlőssejteket használtak biológiailag aktív fibrinogén előállítására [Farrell és munkatársai: Blood *74* 55a (1989); Hartwig és Danishefsky: Journal of Biological Chemistry *266,* 6578–6585 (1991); Farrell és munkatársai: Biochemistry *30,* 9414–9420 (1991)], de az expressziós szint olyan alacsony volt, hogy a rekombináns fibrinogén ipari méretekben való előállítására ez a módszer nem alkalmas. A kísérleti bizonyítékok arra utalnak, hogy a tenyésztett sejtekben a májhoz viszonyítva alacsonyabb transzkripciós sebesség lehet az oka az idáig elért alacsony expressziónak, de ha növeljük a fibrinogén lánc mRNS-mennyiségét a transzfektált BHK sejtekben, akkor ez nem eredményez arányos növekedést a fibrinogén fehérje szekréciójában [Prunkard és Foster: XIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (1993)]. Ezek a friss eredmények azt sugallják, hogy a fibrinogén megfelelő összeállásához és processzálásához olyan szövetspecifikus mechanizmusokra van szükség, amelyek nincsenek jelen a szokványos laboratóriumi sejtvonalakban.

A szakterületen továbbra is megmarad az igény olyan eljárásokra, amelyekkel nagy mennyiségben elő lehet állítani nagyon jó minőségű fibrinogént, szövetragasztók és egyéb alkalmazások céljaira. Megvan továbbá az igény arra is, hogy olyan fibrinogént állítsunk elő, amely mentes a vér által hordozott patogénektől. A jelen találmány eleget tesz ezeknek az igényeknek, és további, rokon előnyökkel is szolgál.

A jelen találmány tárgya rekombináns fibrinogén, főleg rekombináns humán fibrinogén előállítása ipari mennyiségben. A találmány tárgyát képezik továbbá anyagok és módszerek a fibrinogén expresszálására transzgenikus állatok emlőszövetében, az állatok főleg haszonállatok, azaz például szarvasmarha, birka, sertés és kecske.

A jelen találmány tárgya eljárás fibrinogén előállítására, amelynek során (a) előállítunk egy első DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén Aα-lánchoz működés szempontjából hozzákapcsolt szekréciós szignált kódol, majd egy második DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén Bβ-lánchoz működés szempontjából hozzákapcsolt szekréciós szignált kódol, majd egy harmadik DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén γ-lánchoz működés szempontjából hozzákapcsolt szekréciós szignált kódol, és mind az első, mind a második, mind a harmadik szegmenst működés szempontjából további olyan DNS-szegmensekhez kapcsoljuk, amelyek ahhoz szükségesek, hogy egy nőstény gazdaszervezet emlőmirigyében expresszálódjanak; (b) a DNS-szegmenseket egy nem humán emlősfaj megtermékenyített petesejtjébe juttatjuk be; (c) a faj egy nőstényе méhébe vagy petevezetékébe juttatjuk a petesejtet, hogy a DNS-konstrukciót hordozó utódokat kapjunk; (d) az utódokat tenyésztjük, így olyan nőstény utódokat kapunk, amelyek expresszálják az első, a második és harmadik DNS-szegmenst, és olyan tejet termelnek, amely a szegmensek által kódolt biológiailag aktív fibrinogént tartalmazza; (e) a nőstény utódok által termelt tejet összegyűjtjük; és (f) kinyerjük a fibrinogént a tejből. Az egyik megvalósítási mód szerint a bejuttatott szegmenseket tartalmazó petesejtet bizonyos ideig *in*

vitro körülmények között tartjuk, mielőtt bejuttatjuk a szervezetbe.

A találmány tárgya továbbá eljárás fibrinogén előállítására, ami abban áll, hogy (a) egy első, szekréciós szignált kódoló DNS-szegmenst, amely működés szempontjából a fibrinogén Aα-láncához van kapcsolva, egy β-laktoglobulin génbe viszünk be, ezzel előállítva egy első génfúziót; (b) egy második, szekréciós szignált kódoló DNS-szegmenst, amely működés szempontjából a fibrinogén Bβ-láncához van kapcsolva, egy β-laktoglobulin génbe viszünk be, ezzel előállítva egy második génfúziót; (c) egy harmadik, szekréciós szignált kódoló DNS-szegmenst, amely működés szempontjából a fibrinogén γ-láncához van kapcsolva, egy β-laktoglobulin génbe viszünk be, ezzel előállítva egy harmadik génfúziót; (d) az első, második és harmadik génfúziós konstrukciót egy nem humán emlős szaporító sejtvonalába juttatjuk be, és így a DNS-szegmensek expresszálódnak az emlős vagy nőstény utóda emlőmirigyében, és biológiailag aktív fibrinogén szekretálódik az emlős vagy nőstény utóda tejébe; (e) tejet termelünk az emlőssel vagy nőstény utódával; és (f) kinyerjük a fibrinogént a tejből. Az előnyös megvalósítási mód szerint az emlős birka, sertés, kecske vagy szarvasmarha.

A találmány tárgya továbbá eljárás fibrinogén előállítására, amely a következő lépéseket tartalmazza: (a) létrehozunk egy nem humán emlős transzgenikus nőstényt, amely a genetikai anyagában Aα, Bβ és γ fibrinogén láncot kódoló heterológ DNS-szegmenseket hordoz, és a DNS-szegmensek az emlős egy emlőmirigyében expresszálódnak, majd a DNS-szegmensek által kódolt fibrinogén az emlős tejébe expresszálódik; (b) összegyűjtjük az emlős által termelt tejet; és (c) kinyerjük a fibrinogént a tejből.

A találmány tárgya továbbá egy nem humán emlősembrió, amely a sejtmagjában a fibrinogén Aα-, Bβ- és γ-láncait kódoló heterológ DNS-szegmenseket tartalmazza. A találmány tárgya továbbá egy transzgenikus nem humán nőstény emlős, amely a tejében kinyerhető mennyiségű humán fibrinogént termel.

A találmány tárgya továbbá eljárás egy emlős transzgenikus utódainak előállítására, amely a következő lépésekből áll: (a) előállítunk egy első, a fibrinogén Aα-láncát kódoló DNS-szegmenst, egy második, a fibrinogén Bβ-láncát kódoló szegmenst és egy harmadik, a fibrinogén γ-láncát kódoló DNS-szegmenst, és az említett első, második és harmadik szegmenst működés szempontjából további DNS-szegmensekhez kapcsoljuk, amelyek ahhoz szükségesek, hogy egy emlős nőstény gazdaszervezet emlőmirigyében expresszálódjanak, és az emlős nőstény gazdaszervezet tejébe szekretálódjon a fibrinogén; (b) a DNS-szegmenseket egy nem humán emlősfaj megtermékenyített petesejtjébe juttatjuk; (c) a petesejtet egy nem humán emlős nőstény petevezetékébe vagy méhébe juttatjuk, hogy olyan utódokat kapjunk, amelyek az első, második és harmadik DNS-szegmenseket hordozzák. A találmány tárgyát képezik továbbá az említett eljárással létrehozott nem humán emlősök.

A találmány tárgya továbbá egy nem humán emlős, amely a genetikai anyagában a fibrinogén heterológ Aα-, Bβ- és γ-láncait kódoló DNS-szegmenst hordozza, és az emlős nőstény utódai a DNS-szegmenseket egy emlőmirigyben expresszálják, ezzel biológiailag aktív fibrinogént állítva elő.

A találmány említett és egyéb tárgyai nyilvánvalóak lesznek a gyakorló szakember számára az alábbi részletes leírásból és a mellékelt ábrákból.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrák rövid leírását.

Az 1. ábrán egy humán fibrinogén Aα-lánc DNS-szekvenciájának szubklónozása látható.

A 2. ábrán a Zem228 vektor részleges restrikciós emésztési térképe látható. A használt szimbólumok: MT–1p – egér metallotionein promoter; SV40t – SV40 terminátor; és SV40p – SV40 promoter.

A 3. ábrán egy humán fibrinogén Bβ-lánc DNS-szekvenciájának szubklónozása látható.

A 4. ábrán egy humán fibrinogén γ-lánc DNS-szekvenciájának szubklónozása látható.

Az 5. ábrán a Zem219b vektor részleges restrikciós emésztési térképe látható. A használt szimbólumok: MT–1p – egér metallotionein promoter; hGHt – humán növekedési hormon terminátor; SV40t – SV40 terminátor; DHFR – dihidrofolát-reduktáz-gén; és SV40p – SV40 promoter.

A találmány jobb megértése céljából az alábbiakban meghatározzuk bizonyos szakkifejezések jelentését.

A továbbiakban a „biológiailag aktív fibrinogén" szakkifejezés jelentése olyan fibrinogén, amely trombinnal való kezelés hatására polimerizálódik, és oldhatatlan fibrint képez.

A „petesejt" jelentése a továbbiakban egy megtermékenyítetlen petesejt, egy megtermékenyített petesejt a pronukleuszok fúziója előtt vagy egy korai állapotú embrió (megtermékenyített petesejt fuzionált pronukleuszokkal).

A „biológiailag aktív fibrinogént tartalmazó tejet termelő emlős nőstény" szakkifejezés jelentése egy olyan állat, amely a vemhesség és a szülés után, a laktációs periódusban kinyerhető mennyiségű biológiailag aktív fibrinogént tartalmazó tejet termel. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy az ilyen állatok megszakításokkal termelnek tejet, és ennek következtében fibrinogént is.

Az „utód" szakkifejezést a szokásos értelmében használjuk, és értjük alatta a gyerekeket és leszármazottakat.

A „heterológ" szakkifejezés jelentése egy olyan genetikai anyag, amely nem abból a fajból származik, mint amelyikbe bejuttatjuk, illetve az ilyen genetikai anyagról termelődő fehérje.

A jelen találmányban transzgenikus állat technológiát alkalmazunk fibrinogén előállítására egy nőstény emlős gazdaszervezet emlőmirigyeiben. Az emlőmirigyben való expresszió, majd a számunkra lényeges fehérje ezt követő szekréciója a tejbe számos olyan nehézségre ad megoldást, amelyekkel a fehérjék egyéb forrásokból való izolálása során találkozhatunk. A tej könnyen összegyűjthető, nagy mennyiségben hozzáférhető, és biokémiailag jól jellemzett. Emellett a fő tejfehérjék nagy koncentrációban találhatók a tejben (1–15 g/l).

Kereskedelmi szempontból nyilvánvalóan az az előnyös, ha gazdaszervezetként egy olyan fajt használunk, amelyik sok tejet termel. Jóllehet kisebb állatok is használhatók, azaz például egerek és patkányok is (és ezek az előnyösek a koncepció bizonyítási fázisában), a jelen találmányban azt részesítjük előnyben, ha haszonállatokat használunk, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a sertéseket, kecskéket, birkákat és a szarvasmarhákat. Különösen a birkákat részesítjük előnyben az olyan tényezők következtében, mint például az ezzel a fajjal korábban szerzett transzgenezistapasztalatok, a tejhozam, az ár és a birkatej összegyűjtésére szolgáló berendezés könnyű beszerezhetősége. Lásd a WO 88/00239 számú szabadalmi bejelentést, amelyben a gazdafajok megválasztását befolyásoló faktorok összehasonlítása található meg. Általában az a kívánatos, ha gazdaállatként olyan vonalat választunk, amelyet tejtermelésre tenyésztettek. Ilyen például az East Friesland birka. Az is megoldás, ha a tejtermelő törzsállományt későbbi időpontban hozzuk létre, a transzgenikus vonal tenyésztésével. Mindegyik esetben ismert, jó egészségi állapotú állatokat kell használni.

A jelen találmány szerint előállított fibrinogén lehet humán fibrinogén, vagy lehet egy nem humán állat fibrinogénje. Gyógyászati célokra előnyös a betegnek természetes fehérjék alkalmazása. A jelen találmány tárgya tehát fibrinogén előállítása mind emberekben, mind állatgyógyászatban való felhasználás céljára. A humán fibrinogén komponens láncait kódoló klónozott DNS-molekulákat a szakirodalomban ismertették [Rixon és munkatársai: Biochem. *22,* 3237 (1983); Chung és munkatársai: Biochem. *22,* 3244 (1983); Chung és munkatársai: Biochem. *22,* 3250 (1983); Chung és munkatársai: Adv. Exp. Med. Biol. *281,* 39–48 (1990); Chung és munkatársai: Ann. NY Acad. Sci. *408,* 449–456 (1983)]. A szarvasmarha fibrinogén klónokat Brown és munkatársai [Brown és munkatársai: Nucleic Acids Research *17,* 6397 (1989)], valamint Chung és munkatársai írták le [Chung és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *78,* 1466–1470 (1981)]. Egyéb emlős fibrinogén klónokat Murakawa és munkatársai közöltek [Murakawa és munkatársai: Thromb. Haemost. *69,* 351–360 (1993)]. A humán Aα-, Bβ- és γ-lánc gének jellemző szekvenciáit az 1., 3. és 5. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy ezeknek a szekvenciáknak léteznek az allélvariánsai; további variánsok előállíthatók aminosavhelyettesítéssel, delécióval vagy inszercióval; és ezek a variánsok jól használhatók a jelen találmányban. Általában az az előnyös, ha egy megváltoztatott variáns csak korlátozott számban tartalmaz szubsztitúciókat, delékiókat vagy inszerciókat, és ha a szubsztitúciók konzervatívok. Tehát az az előnyös, ha olyan fibrinogén lánc polipeptideket állítunk elő, amelyek legalább 90 százalékban, előnyösen legalább 95 százalékban, és még előnyösebben 99 százalékban vagy még nagyobb százalékban azonosak a megfelelő természetes láncok szekvenciáival. A „γ-lánc" szakkifejezés vonatkozik az alternatív módon illesztett γ' fibrinogén láncra is [Chung és munkatársai: Biochem. *23,* 4232–4236 (1984)]. Egy humán γ'-lánc aminosavszekvenciáját a 6. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be. A rövidebb γ-láncot az 5. számú szekvencia 9511-es és 10 054-es nukleotidjai között való alternatív illesztés hozza létre, aminek az az eredménye, hogy a transzláció az 5. számú szekvencia 10 056 számú nukleotidja után leáll.

Ahhoz, hogy az emlőmirigyben expressziót kapjunk, egy tejfehérje gén transzkripciós promoterét használjuk. A tejfehérje gének közé tartoznak a kazeineket, a β-laktoglobulint (BLG), az α-laktalbumint és a tejsavó savas fehérjéjét kódoló gének. A β-laktoglobulin promoterét részesítjük előnyben. A juh β-laktoglobulin gén esetében általában azt a régiót használjuk, amely a juh BLG gén 5' határolószekvenciájának legalább a proximális 406 bázispárját tartalmazza (a 7. számú szekvencia 3844–4257-es nukleotidjaiban található). Az 5' határolószekvenciának nagyobb részeit részesítjük előnyben, egészen 5 kilobázis méretig. Különösen előnyben részesítünk egy nagyobb DNS-szegmenst, amely tartalmazza az 5' határoló promoterrégiót és a β-laktoglobulin gén 5' nem kódoló régióját (a 7. számú szekvencia 1–4257-es nukleotidjaiban találhatók) [Whitelaw és munkatársai: Biochem. J. *286,* 31–39 (1992)]. Egyéb fajok promoter DNS-ének hasonló fragmensei is alkalmasak.

A konstrukciókba beépíthetjük a β-laktoglobulin egyéb régióit is, ahogy a gén genomiális régióit is expresszálhatjuk. A szakterületen általánosan elfogadott vélemény, hogy az intronokat nem tartalmazó konstrukciók például gyengébben expresszálódnak, mint azok, amelyek tartalmazzák az említett DNS-szekvenciákat [Brinster és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *85,* 836–840 (1988); Palmiter és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *88,* 478–482 (1991); Whitelaw és munkatársai: Transgenic Res. *1,* 3–13 (1991); WO 89/01343; WO 91/02318]. Ezért általában ahol lehetséges, azt részesítik előnyben, ha a kiválasztott fehérjét vagy polipeptidet kódoló gén összes, vagy legalább néhány természetes intronját tartalmazó genomiális szekvenciát lehet használni. A találmány bizonyos megvalósítási módjai szerint az az előnyös, ha a β-laktoglobulin gén legalább néhány intronját beépítjük a konstrukcióba. Az egyik ilyen régió egy olyan, a juh β-laktoglobulin 3' nem kódoló régiójából származó DNS-szegmens, amely biztosítja az intronilleszkedést

és az RNS-poliadenilezést. Ha egy génnek a természetes 3' nem kódoló régióját helyettesítjük ezzel a juh β-laktoglobulin szegmenssel, akkor ez képes fokozni és stabilizálni a számunkra lényeges fehérjének vagy polipeptidnek az expressziós szintjét. Más megvalósítási módok szerint egy fibrinogén szekvencia iniciációs ATG-je körül található szekvenciákat egy tejspecifikus fehérje génjének megfelelő szekvenciáival helyettesítjük. Az ilyen helyettesítés egy feltételezett szövetspecifikus iniciációs környezetet biztosít az expresszió fokozására. Az egyszerű, ha a teljes fibrinogén lánc pre-pro és 5' nem kódoló szekvenciáit például a β-laktoglobulin gén szekvenciáival helyettesítjük, de kisebb régiók is helyettesíthetők.

A fibrinogén expresszálásához a fibrinogén polipeptid lánc három komponensét működés szempontjából további olyan DNS-szekvenciákhoz kapcsoljuk, amelyek az expressziójukhoz szükségesek, expressziós egységek kialakításához. Ilyen további szegmens lehet például az előzőkben említett tejfehérje gén promotere, valamint az olyan szekvenciák, amelyek az mRNS transzkripciójának terminációjához és poliadenilezéséhez szükségesek. Az expressziós egységek emellett tartalmaznak még egy szekréciós szignált kódoló DNS-szegmenst is, működés szempontjából a fibrinogén polipeptid láncot kódoló szegmenshez kapcsolva. A szekréciós szignál lehet egy természetes fibrinogén szekréciós szignál, vagy lehet egy másik, például egy tejfehérje szekréciós szignálja. A „szekréciós szignál" szakkifejezést a továbbiakban egy fehérje azon részének a megjelölésére használjuk, amely a fehérjét egy sejt szekréciós útvonalán keresztül a külvilágba vezeti. A szekréciós szignálok leggyakrabban a fehérjék N-terminálisán találhatók meg [von Heinje: Nucleic Acids Research *14,* 4683–4690 (1986); Meade és munkatársai: 4,873,316 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk.

Az expressziós egységek készítését egyszerűen úgy végezhetjük el, hogy egy fibrinogén lánc szekvenciát viszünk be egy, a további DNS-szegmenseket tartalmazó plazmid- vagy fágvektorba, jóllehet az expressziós egységet tulajdonképpen a ligálások bármilyen sorrendjével előállíthatjuk. Az különösen leegyszerűsíti a dolgokat, ha egy olyan vektort állítunk elő, amely egy tejfehérjét kódoló DNS-szegmenst tartalmaz, majd a tejfehérjét kódoló szekvenciát egy fibrinogén láncot kódoló szekvenciával helyettesítjük (beleértve egy szekréciós szignált is), ezzel egy olyan génfúziót állítva elő, amely tartalmazza a tejfehérje gén expressziós kontrollszekvenciáit is. Mindegyik esetben megkönnyíti a fibrinogén szekvenciák amplifikálását, ha az expressziós egységet plazmidokban vagy egyéb vektorokban klónozzuk. Az amplifikálást egyszerűen baktériumsejtekben, például *Escherichia coli* gazdasejtekben végezhetjük el, ezért a vektorok általában tartalmaznak egy replikációs origót és egy szelekciós markert, amely bakteriális gazdasejtekben működik.

A fibrinogén lánc génjei méretének ismeretében az a leggyakorlatiasabb lépés, ha három külön expressziós egységet állítunk elő, összekeverjük őket, majd a keveréket bejuttatjuk a gazdaszervezetbe. A szakterületen jártas szakember számára azonban nyilvánvaló, hogy más eljárások is elképzelhetők. Például a három lánc expressziós egységét egyenként bejuttathatjuk különböző embriókba, amelyeket azután később tenyésztéssel kombinálunk. Egy harmadik megközelítés szerint a három expressziós egységet egyetlen alkalmas vektorban kombinálhatjuk, azaz például egy élesztő mesterséges kromoszómában vagy P1 fág klónban. Két vagy három lánc kódolószekvenciáit policisztronos expressziós egységekben kombinálhatjuk [Levinson és munkatársai: 4,713,339 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés].

Az expressziós egysége(ke)t azután a kiválasztott faj megtermékenyített petesejtjeibe juttatjuk be (beleértve korai fejlődési fázisban levő embriókat is). A heterológ DNS bejuttatását a sok különböző módszer egyikével végezhetjük el, beleértve a mikroinjekciózást [4,873,191 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés], retrovirális fertőzéssel [Jaenisch: Science *240,* 1468–1474 (1988)] vagy helyspecifikus integrációval, embrionális őssejteket alkalmazva [Bradley és munkatársai: Bio/Technology *10,* 534–539 (1992)]. A petesejteket azután álterhes nőstények petevezetékébe vagy méhébe juttatjuk, majd hagyjuk, hogy a megfelelő ideig kihordják. A genetikai anyagukban a bejuttatott DNS-t hordozó utódok át tudják adni a DNS-t utódaiknak a normális, Mendel-féle öröklődési menet szerint, ezzel lehetővé téve transzgenikus nyájak kialakulását. A transzgenikus állatok létrehozásához szükséges általános eljárások ismertek a szakterületen [Hogan és munkatársai: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1986); Simons és munkatársai: Biotechnology *6,* 179–183 (1988); Wall és munkatársai: Biol. Reprod. *32,* 645–651 (1985); Buhler és munkatársai: Biotechnology *8,* 140–143 (1990); Ebert és munkatársai: Biotechnology *9,* 835–838 (1991); Krimpenfort és munkatársai: Biotechnology *9,* 844–947 (1991); Wall és munkatársai: J. Cell. Biochem. *49,* 113–120 (1992); és a WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757 számú WIPO publikációk; valamint a GB 87/00458 számú szabadalmi bejelentés], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. Az idegen DNS-szekvenciák emlősökbe és genetikai anyagukba való bejuttatásának technikáit eredetileg egereken fejlesztették ki [Gordon és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *77,* 7380–7384 (1980); Gordon és Ruddle: Science *214,* 1244–1246 (1981); Palmiter és Brinster: Cell. *41,* 343–345 (1985); Brinster és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *82,* 4438–4442 (1985); Hogan és munkatársai: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1986)]. Ezeket a technikákat azután nagyobb állatokban való alkalmazáshoz adaptálták, beleértve a haszonállatfajtákat is [WO 88/00239, WO 90/05188 és WO 92/11757 számú WIPO publikációk; Simons és munkatársai: Biotechnology *6,* 179–183 (1988)]. Összefogla-

lóan elmondhatjuk, hogy a transzgenikus egerek, illetve haszonállatok előállításának leghatékonyabb útja jelenleg az, ha a számunkra érdekes DNS-ből több száz lineáris molekulát injekciózunk egy megtermékenyített petesejt pronukleuszába. Egy zigóta citoplazmájába való DNS-injekciózás is alkalmazható.

Az az előnyös, ha az egyes fibrinogén láncok kiegyensúlyozott expresszióját kapjuk, ami lehetővé teszi az érett fehérje hatékony képződését. Ideális esetben a három expressziós egység ugyanazon a DNS-molekulán található a petesejtbe való bejuttatás céljából. Ez a megközelítés azonban technikai problémákat okozhat, például az injekciózási és manipulációs fázisokban. A fibrinogén expressziós egységek mérete például szükségessé teheti mesterséges élesztőkromoszómák (YAC-ok) vagy P1 fág alkalmazását, hogy a DNS-t az injekciózás előtt amplifikáljuk és manipuláljuk. Ha ezt a megközelítést választjuk, akkor az injekciózandó DNS-szegmensek, amelyek mind a három expressziós egységet tartalmazzák, nagyon nagyok lehetnek, ezért az injekciós eljárás módosítására lehet szükség, azaz például nagyobb lyukú tűt kell használni. Egy sokkal egyszerűbb megközelítés szerint az egyes expressziós egységek keverékét használjuk. Azt részesítjük előnyben, ha ekvimoláris mennyiséget kombinálunk a három expressziós egységből, jóllehet a szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy ez az arány változhat, hogy kompenzáljuk egy adott expressziós egység jellemzőit. Valamennyi expressziót, általában redukált szinten, akkor is kapunk, ha egy vagy két láncból kisebb moláris mennyiséget alkalmazunk, és általában az várható, hogy az expresszió hatékonysága az előnyös ekvimoláris aránytól való eltéréssel arányosan csökken. Általában az az előnyös, ha az Aα:Bβ:γ expressziós egységeket 0,5–1:0,5–1:0,5–1 arányban alkalmazzuk. Ha eltérünk az ekvimoláris aránytól, akkor az az előnyös, ha viszonylag többet használunk a Bβ expressziós egységből. Egy másik módszer szerint az expressziós egységekből egyet vagy kettőnek a keverékét juttatjuk be az egyes petesejtekbe. Azonban az ezzel a megközelítéssel létrehozott állatokban csak egy vagy két fibrinogén lánc expresszálódik. Ha ezzel a megközelítéssel teljes fibrinogén molekulát akarunk expresszálni, akkor ehhez egy következő lépésben egy tenyésztési programra van szükség, hogy a három expressziós egységet egy állatcsoport egyedeiben hozzuk össze.

A nőstény állatokat általában szuperovuláltatják folliculusstimuláló hormonnal, majd pároztatják őket. A megtermékenyített sejteket összegyűjtik, majd a heterológ DNS-t ismert módszerekkel injekciózzák a petesejtekbe [4,873,191 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés; Gordon és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *77,* 7380–7384 (1980); Palmiter és Brinster: Cell. *41,* 343–345 (1985); Brinster és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *82,* 4438–4442 (1985); Hogan és munkatársai: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1986); Simons és munkatársai: Biotechnology *6,* 179–183 (1988); Wall és munkatársai: Biol. Reprod. *32,* 645–651 (1985); Buhler és munkatársai: Biotechnology *8,* 140–143 (1990); Ebert és munkatársai: Biotechnology *9,* 835–838 (1991); Krimpenfort és munkatársai: Biotechnology *9,* 844–947 (1991); Wall és munkatársai: J. Cell. Biochem. *49,* 113–120 (1992); és a WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757 számú WIPO publikációk; valamint a GB 87/00458 számú szabadalmi bejelentés], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk.

A megtermékenyített petesejtekbe való injekciózáshoz az expressziós egységeket eltávolítjuk a megfelelő vektorokból, a megfelelő restrikciós enzimekkel való emésztést alkalmazva. Egyszerűség kedvéért a vektorokat célszerű úgy tervezni, hogy az expressziós egységeket olyan enzimekkel való hasítással lehessen eltávolítani, amelyek nem vágnak bele sem az expressziós egységekbe, sem máshova a vektorokban. Az expressziós egységeket szokványos módszerekkel nyerjük ki, azaz például elektroelúcióval, amit fenolos extrakció, etanolos kicsapás, szacharóz-sűrűséggradiens-centrifugálás követ, vagy ezeknek a megközelítéseknek a kombinációi.

A DNS-t lényegében a Hogan és munkatársai által ismertetett módszerrel injekciózzuk a petesejtekbe [Hogan és munkatársai: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1986)]. Egy tipikus injekciózási folyamatban egy embriótenyésztő táptalajban levő korongban sztereomikroszkóppal (×50 vagy×63 nagyítással) lokalizálunk petesejteket. Az előnyben részesített táptalaj tartalmaz HEPES-t (N-2-hidroxi-etil-piperazin-N'-etánszulfonsav) vagy hidrogén-karbonáttal pufferelt táptalajt, azaz például M2-t vagy M16-ot (beszerezhető a Sigma Chemical Co.-től, St. Louis USA) vagy szintetikus petevezeték táptalajt (leírását lásd az alábbiakban). A petesejteket biztosítjuk, majd egy injekciós tutajon levő üveglemez közepére visszük, például dobpipettával (drummond pipette), amit egy kapilláriscső tesz teljessé. Ebben a fázisban alacsonyabb (például×4) nagyítást használunk. Az injekciós tutaj tartópipettáját használva a petesejteket a lemez közepére visszük. Az egyes petesejteket egymás után biztosítjuk a tartópipettába az injekciózáshoz. Az egyes injekciózási folyamatokhoz a tartópipettát/petesejtet a látómező közepére pozicionáljuk. Az injekciós tűt azután közvetlenül a petesejt alá juttatjuk. Előnyösen×40 Nomarski objektívek használatával mindkét manipulátor magasságát úgy állítjuk be, hogy mind a petesejt, mind a tű fókuszban legyen. A pronukleuszokat azután úgy lokalizáljuk, hogy elforgatjuk a petesejtet, és a tartópipettát szükség szerint beállítjuk. Ha egyszer a pronukleuszt sikerült lokalizálni, akkor a manipulátor magasságát úgy állítjuk be, hogy a pronukleáris membrán legyen a fókuszban. Az injekciós tűt a petesejt alá helyezzük el úgy, hogy a tű hegye a pronukleusz középpontja alatt legyen. A tű pozícióját megváltoztathatjuk az injekciós manipulátor alkalmazásával úgy, hogy a tűt és a pronukleuszt ugyan-

abba a fókuszsíkba hozzuk. A tűt az injekciós manipulátoron levő joystick segítségével elmozdítjuk, hogy a petesejt jobb oldalára kerüljön. Egy rövid, folyamatos döfő mozdulattal a pronukleáris membránt átszúrjuk, hogy a tű hegye a pronukleuszba kerüljön. Az injekciós tűre nyomást gyakorolunk az üvegfecskendőn keresztül, ameddig a pronukleusz az eredeti térfogatának körülbelül a kétszeresére duzzad. Ennél a pontnál a tűt lassan eltávolítjuk. Visszatérve a kisebb (például×4) nagyításhoz, az injekciózott petesejtet a lemez másik területére juttatjuk, majd az eljárást egy másik petesejttel megismételjük.

Miután a DNS-t beinjekcióztuk, a petesejteket hagyhatjuk növekedni, ezzel lehetővé tesszük, hogy a pronukleuszok fuzionáljanak, ezzel egysejtes vagy későbbi állapotú embriókat hozva létre. A petesejteket általában körülbelül a használt faj testhőmérsékletén hagyjuk növekedni, kiegyensúlyozott sókat és szérumot tartalmazó pufferelt közegben. A túlélő embriókat azután álterhes befogadó nőstényekbe visszük be, tipikusan úgy, hogy a petevezetékbe vagy a méhbe juttatjuk be őket, majd hagyjuk normálisan fejlődni. Az embriogenezis során az injekciózott DNS véletlenszerűen integrálódik kisszámú fejlődő embrió genomjába.

A potenciális transzgenikus utódokat vérminták és/vagy szövetbiopsziák alapján vizsgáljuk át. Ezekből a mintákból DNS-t készítünk, majd különböző technikákkal, azaz például polimeráz-láncreakcióval [Mullis: 4,683,202 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés]; és Southern-blottal [Southern: J. Mol. Biol. *98,* 503 (1975); Sambrook és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)] megvizsgáljuk az injekciózott konstrukciók jelenlétét. Az első transzgenikus állatok vagy a G0-k lehetnek teljesen transzgenikusak, amelyek összes sejtjükben tartalmazzák a transzgéneket, vagy lehetnek mozaikok, amelyek csak a sejtek egy alcsoportjában tartalmaznak transzgéneket [lásd például Wilkie és munkatársai: Develop. Biol. *118,* 9–18 (1986)]. Az utóbbi esetben a csírasejtek csoportjai részben vagy teljesen transzgenikusak lehetnek. Az utóbbi esetben az első transzgenikus állatból származó transzgenikus utódok száma kevesebb lesz, mint a mendeli törvények alapján várható 50%. Az első, G0 állatokat ivarérettségig tartjuk, majd szaporítjuk őket, hogy az utódokat, azaz a G1 generációt megkapjuk. A G1 állatokban is megvizsgáljuk a transzgén jelenlétét, hogy igazoljuk a G0 állatokból való átjutást. A hím G0 állatok számos nem transzgenikus nősténnyel keresztezhetők, ezzel számos utódot hozhatunk létre. Ez növeli annak az esélyét, hogy transzgenikus átvitelt figyelhetünk meg. A nőstény G0 állatokat természetesen szaporíthatjuk, vagy mesterségesen megtermékenyíthetjük, vagy szuperovuláltathatjuk, hogy számos petesejtet kapjunk, amelyeket pótanyákba juttathatunk be. Ez utóbbi eljárás adja a legnagyobb valószínűségét annak, hogy átvitelt figyeljünk meg korlátozott számú utódot nevelő állatoknál. Az előzőkben ismertetett tenyésztési eljárást alkalmazzuk olyan állatok létrehozására, amelyek normális, mendeli öröklésmenetet követő módon adják át a DNS-t az utódok következő generációjának, ezzel lehetővé téve, hogy transzgenikus állatokból telepek (egereknél), nyájak (birkáknál) vagy csordák (sertés, kecske, szarvasmarha) fejlődjenek ki.

A tejelő G0 és G1 nőstények tejében megvizsgáljuk, hogy expresszálódik-e a heterológ fehérje, immunológiai technikák alkalmazásával, azaz például ELISA-val [Harlow és Lane: Antibodies, A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] és Western-blottal [Towbin és munkatársai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA *76,* 4350–4354 (1979)]. Számos különböző ok miatt az várható, hogy a heterológ fehérje expressziós szintje változik az egyes állatokban.

Egy alkalmas állatcsaládnak három kritériumnak kell megfelelnie: ugyanabból az első, G0 állatból kell származniuk; a transzgént stabilan kell továbbadniuk; generációról generációra stabil expressziós szintet kell mutatniuk, valamint ugyanez igaz az egyes állatok egyes laktációs periódusaira is. Ezeket az elveket igazolták és megtárgyalták [Carver és munkatársai: Biotechnology *11,* 1263–1270 (1993)]. Egy ilyen alkalmas családból származó állatokat neveznek „vonalnak". Először G0 vagy G1 nőstény állatokat használnak a termelő állatok nyájának vagy csordájának létrehozására, természetes vagy mesterséges megtermékenyítést alkalmazva, ily módon számos, ugyanazt a transzgenikus eseményt tartalmazó nőstény állatot lehet gyorsan előállítani, amelyektől a tejet ki lehet nyerni.

A fibrinogént tejből nyerjük ki, standard, gyakorlatban bevált eljárásokat alkalmazva, például fölözést, kicsapást, szűrést és fehérjekromatográfiai eljárásokat.

A jelen találmány szerinti módszerrel előállított fibrinogén jól használható a humán- és állatgyógyászatban, azaz például sebészeti ragasztóanyagok készítésében. Az ilyen típusú ragasztók jól ismertek a szakterületen [4,377,572, 4,442,655, 4,462,567 és 4,627,879 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés], amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk. Általában a fibrinogént és a XIII-as faktort kombinálják az első komponens készítésére, amit közvetlenül a felhasználás előtt kevernek össze a trombint tartalmazó második komponenssel. A trombin a fibrinogént fibrinné alakítja, ezzel a keverék gélesedését okozza, és aktiválja a XIII-as faktort. Az aktivált XIII-as faktor keresztkötéseket hoz létre a fibrinben, ezzel erősíti és stabilizálja a tapadóhordozót. Az ilyen ragasztók általában 30 mg/ml–100 mg/ml fibrinogént és 50 μg/ml–500 μg/ml XIII-as faktort tartalmaznak. Ezek tartalmazhatnak emellett további adalék anyagokat is, azaz például aprotinint, albumint, fibronektint, kitöltőanyagokat és oldatba vivő anyagokat. A XIII-as faktor előállítására szolgáló módszerek jól ismertek a szakterületen [5,204,447 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés]. A fibrinogén emellett jól használható polimer részecskék, azaz például vaszkuláris graftok felszínének beborítására [5,272,074 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés], amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk.

A találmányt tovább illusztrálják a mellékelt, nem korlátozó jellegű példák.

I. példa

A pUC18 vektor [Yanisch-Perron és munkatársai: Gene *33,* 103–119] többszörös klónozóhelyét eltávolítjuk, majd egy szintetikus kétszálú oligonukleotiddal helyettesítjük (amelynek a szálait a 8. és 27. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be), és amely a PvuI/MluI/EcoRV/XbaI/PvuI/MluI restrikciós hasítási helyeket tartalmazza, valamint az EcoRI és HindIII restrikciós hasítási helyekkel kompatibilis 5' túlnyúló végek határolják. A pUC18 vektort mind EcoRI, mind HindIII restrikciós enzimmel hasítjuk, majd az 5'-terminális foszfátcsoportokat borjúbélfoszfatázzal eltávolítjuk, és az oligonukleotidot a vektorba ligáljuk. A kapcsolódási pont DNS-szekvenciáját szekvenálással igazoljuk, majd az új plazmidnak a pUCPM jelzést adjuk.

A pSS1tgXS plazmidból származó β-laktoglobulin (BLG) génszekvenciákat (ezek leírása megtalálható a WO 88/00239 számú WIPO publikációban) egy SalI-XbaI fragmens formájában kihasítjuk, majd a pUCPM plazmidban újra klónozzuk, amelyet SalI és XbaI restrikciós enzimmel hasítottunk, a pUCXS vektor előállítása céljából. A pUCXS tehát egy pUC18-származék, amely tartalmazza a teljes β-laktoglobulin gént az SS1 fág SalI hasítási helyétől az XbaI hasítási helyig [Ali és Clark: J. Mol. Biol. *199,* 415–426 (1988)].

A pSS1tgSE plazmid (leírása megtalálható a WO 88/00239 számú WIPO publikációban) tartalmaz egy 1290 bázispár méretű β-laktoglobulin fragmenst, amit egy SphI és egy EcoRI restrikciós hasítási hely, egy egyedi NotI hasítási helyet és egyetlen PvuII hasítási helyet tartalmazó régió határol, amely a β-laktoglobulin mRNS 5' nem transzlálódó vektorszekvenciájában található. Ebbe a PvuII hasítási helybe ligálunk egy kétszálú, 8 bázispár hosszúságú DNS-linkert (5'-GGATATCC-3'), amely az EcoRV enzim felismerési helyét kódolja. Ez a plazmid a pSS1tgSE/RV jelzést kapta. A pSS1tgSE/RV plazmidban SphI és NotI restrikciós hasítási helyekkel határolt DNS-szekvenciákat enzimes emésztéssel kivágjuk, majd a pUCXS-ben levő ekvivalens fragmens helyettesítésére használjuk. Ennek a plazmidnak a jelzése pUCXSRV. A pUCXSRV-ben levő β-laktoglobulin inszert szekvenciáját a 7. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be, a β-laktoglobulin gén 5' nem transzlálódó vektorszekvenciájában a 4245-ös nukleotidnál levő egyedi EcoRV hellyel együtt. Ez a hely lehetővé teszi bármely további DNS-szekvencia beépítését a β-laktoglobulin promoter kontrolljával, a transzkripciós iniciációs pont után 3'-irányban.

A BLGAMP3 (5'-TGG ATC CCC TGC CGG TGC CTC TGG-3'; 9. számú szekvencia) és a BLGAMP4 (5'-AAC GCG TCA TCC TCT GTG AGC CAG-3'; 10. számú szekvencia) primereket alkalmazva egy körülbelül 650 bázispár méretű PCR-fragmenst állítunk elő a pUCXSRV-ben levő β-laktoglobulin gén stopkodonja után 3'-irányban közvetlenül elhelyezkedő szekvenciákról. A PCR-fragmenst úgy változtatjuk meg, hogy az 5'-végén tartalmazzon egy BamHI hasítási helyet, és a 3'-végén tartalmazzon egy MluI hasítási helyet, majd a BamHI és MluI restrikciós enzimekkel hasított pGEMzf(+) (Promega) plazmidba klónozzuk, így kapjuk a pDAM200(+) plazmidot.

A pUCXSRV plazmidot KpnI restrikciós enzimmel emésztjük, majd a legnagyobb, a vektort tartalmazó gélcsíkot megtisztítjuk. Ez a csík tartalmazza a teljes pUC plazmidszekvenciákat, valamint a β-laktoglobulin génből valamennyi 3' nem kódoló szekvenciát. Ebbe a gerincbe ligáljuk a pDAM200(+) plazmidból származó kis KpnI fragmenst, amely a helyes orientációban hatékonyan létrehoz egy BamHI hasítási helyet a 2,6 kilobázis méretű β-laktoglobulin 3' határolórégió legvégén, az 5'-irányban. Ennek a plazmidnak a jelzése pBLAC200. A pBLAC200-ból egy 2,6 kilobázis méretű ClaI-XbaI fragmenst ligálunk a ClaI-XbaI restrikciós enzimekkel hasított pSP72 vektorba (Promega), ezzel egy EcoRV hasítási helyet teszünk közvetlenül a β-laktoglobulin szekvenciák elé. Ennek a plazmidnak a jelzése PBLAC210.

A pBLAC210 plazmidból származó 2,6 kilobázis méretű EcoRV-XbaI fragmenst EcoRV-XbaI restrikciós enzimekkel hasított pUCXSRV plazmidba ligáljuk, így kapjuk a pMAD6 plazmidot. Ezzel lényegében kivágjuk az összes kódoló- és intronszekvenciát a pUCXSRV-ből, ezzel egy β-laktoglobulin minigént hozunk létre, ami tartalmaz egy 4,3 kilobázis méretű 5' promotert és 2,6 kilobázis méretű 3' downstream szekvenciákat, egyetlen EcoRV hasítási hellyel határolva. A pMAD6 EcoRV hasítási helyébe egy oligonukleotidlinkert (ZC6839: ACTACGTAGT; 11. számú szekvencia) építünk be. Ez a módosítás elrontja az EcoRV hasítási helyet, és egy SnaBI hasítási helyet hoz létre, amit klónozási célokra lehet használni. A vektor jelzése pMAD6-Sna. A hírvivő RNS az SnaBI hasítási hely előtt iniciálódik, és az SnaBI hasítási hely után terminálódik. A prekurzorátirat egyetlen β-laktoglobulin-eredetű intront, a 6-os intront kódolja, amely teljes egészében a gén 3' nem transzlálódó régiójában található.

II. példa

Az egyedi fibrinogén láncokat kódoló klónokat dr. Earl W. Dawie (University of Washington, Seattle) laboratóriumából kaptuk. Egy genomiális Aα-lánc klónt [Chung és munkatársai: Adv. Exp. Med. Biol. *281,* 39–48 (1990)] a BS4 plazmidból állítunk elő. Ez a plazmid tartalmazza az Aα klónt a pUC18 SalI és BamHI hasítási helyei közé beépítve, de hiányzik belőle az Aα-lánc első négy aminosavát kódoló szekvencia. Egy genomiális Bβ-lánc DNS-t [Chung és munkatársai: Adv. Exp. Med. Biol. *281,* 39–48 (1990)] egy λ Charon 4A fág klónból (jelzése βλ4) izolálunk, két, körülbelül 5,6-5,6 bázispár méretű EcoRI fragmens formájában. A két fragmenst külön-külön klónozzuk pUC19-be, amelyet EcoRI restrikciós enzimmel emésztettünk, majd borjúbélfoszfatázzal kezeltünk. A kapott klónokat PvuII restrikciós enzimmel végzett emésztéssel vizsgáljuk át, hogy meg tudjuk különböztetni az 5' és 3' Bβ inszerteket tartalmazó plazmidokat (ezek jelzése Beta5'RI/puc, illetve Beta3'RI/puc). A genomiális γ-lánc

klónokat Rixon és munkatársai leírása szerint izoláljuk [Rixon és munkatársai: Biochemistry *24*, 2077–2086 (1985)]. A pγ12A9 klón tartalmaz 5' nem kódoló szekvenciákat, valamint körülbelül 4535 bázispárt a γ-lánc kódolószekvenciájából. A pγ12F3 klón tartalmazza a megmaradt kódolószekvenciát és a 3' nem kódoló nukleotidokat. Mindkettő pBR322-alapú plazmid, amelyekben a fibrinogén szekvenciák az EcoRI hasítási helyre vannak beépítve. Ezeket a plazmidokat templátként használjuk a megfelelő polimeráz-láncreakciókban.

A fibrinogén láncot kódoló szekvenciákat átalakítjuk, hogy az expressziós vektorokba be lehessen építeni őket, a polimeráz-láncreakciót (PCR) használva erre a célra, Mullis általános leírása szerint [4,683,202 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés]. Ezzel az eljárással eltávolítjuk a természetes 5' és 3' nem transzlálódó szekvenciákat, hozzáadunk egy 9 bázispárból álló szekvenciát az egyes kódolószekvenciák első ATG kodonja elé, ezzel az Aα-lánc szekvenciájának első négy kodonját szolgáltatjuk, valamint eltávolítunk egy belső MluI hasítási helyet az Aα szekvenciából, és restrikciós hasítási helyeket adunk hozzá, hogy megkönnyítsük az ezután következő klónozási lépéseket.

Amint az az 1. ábrán látható, az Aα kódolószekvencia 5'-végét egy PCR reakcióban változtatjuk meg, amely a ZC6632 (12. számú szekvencia) és a ZC6627 (13. számú szekvencia) primerekből 20-20 pmol-t tartalmaz, valamint körülbelül 10 ng-ot tartalmaz a BS4 plazmid templát DNS-éből, 10 μl-t egy keverékből, amely 2,5 mmol/l koncentrációban tartalmazza az egyes dNTP-ket, 7,5 μl 10×*Pyrococcus furiosus* (Pfu) DNS-polimeráz #1 puffert (200 mmol/l TRIS-HCl, pH=8,2, 100 mmol/l KCl, 60 mmol/l $(NH_4)_2SO_4$, 20 mmol/l $MgCl_2$, 1% Triton X–100, 100 μg/ml nukleázmentes szarvasmarha-szérumalbumin) (Stratagene, La Jolla, CA), valamint 75 μl vizet. Az elegyet 94 °C-ra melegítjük egy PCR-berendezésben (Perkin–Elmer Corp., Norwalk, CT). A felmelegített elegyhez 25 μl elegyet adunk, amelynek összetétele: 2,5 μl 10×#1 Pfu puffer, 22 μl víz és 1 μl 2,5 egység/μl Pfu DNS-polimeráz (Stratagene). A reakciókat PCR-berendezésben (Perkin–Elmer) futtatjuk öt ciklusban: 94 °C, 45 másodperc; 40 °C, 90 másodperc; 72 °C, 120 másodperc; 20 ciklusban 94 °C, 45 másodperc; 45 °C, 90 másodperc; 72 °C, 120 másodperc; majd 7 percig 72 °C-on inkubáljuk. A PCR-rel előállított 5' fragmenst azután BamHI és HindIII restrikciós enzimekkel emésztjük, majd a BamHI-HindIII fragmenst azután egy belső 2,91 kilobázis méretű HindIII-XbaI fragmenshez ligáljuk, valamint BamHI-XbaI restrikciós enzimekkel hasított pUC18-hoz. A PCR-rel előállított exonszekvenciákat szekvenáljuk.

Ismét az 1. ábrára hivatkozunk, ahol azt mutatjuk be, hogy az Aα kódolószekvencia 3'-végét egy reakciósorozatban átalakítjuk, amelynek során az Aα szekvencia stopkodonja előtt 563 bázispárral található MluI hasítási helyet mutáltatjuk, egy átfedő hosszabbításos PCR-t alkalmazva [Ho és munkatársai: Gene *77*, 51–59 (1989)]. Az első reakcióban a ZC6521 (14. számú szekvencia) és a ZC6520 (15. számú szekvencia) primerekből 40-40 pmol-t kombinálunk körülbelül 10 ng BS4 plazmid templát DNS-sel, egy, az előzőkben ismertetett reakcióelegyben. A reakciót 5 ciklusban futtatjuk: 94 °C, 45 másodperc; 40 °C, 60 másodperc; 72 °C, 120 másodperc; majd újabb 15 ciklust futtatunk: 94 °C, 45 másodperc, 45 °C, 60 másodperc; 72 °C, 120 másodperc, majd 7 percig 72 °C-on inkubáljuk a reakcióelegyet. Egy második reakciót is végrehajtunk, az előzőkben ismertetett módon, a ZC6519 (16. számú szekvencia) és a ZC6518 (17. számú szekvencia) primerekből 40-40 pmol-t, valamint BS4-et mint templátot alkalmazva. Az első és a második reakciókból származó, PCR-rel generált DNS-fragmenseket gélelektroforézissel izoláljuk, majd eluáljuk a gélből. A kinyert termékeknek körülbelül egytizedét kombináljuk a ZC6521 (15. számú szekvencia) és a ZC6518 (17. számú szekvencia) primerekből 40-40 pmol-lal egy PCR reakcióban, ahol is az egyes fragmensek komplementer 3'-végeit (amelyek az egyetlen bázisváltozást tartalmazzák) egymáshoz illesztjük, és ez szolgál primerként a komplementer szál 3' extenziójához. A PCR-t ugyanolyan reakciókörülmények között hajtjuk végre, mint az első, illetve a második PCR-lépésben. A reakcióterméket azután XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd az XbaI-BamHI fragmenst XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztett pUC18 plazmidba klónozzuk. A PCR-rel generált exonokat szekvenáljuk.

Amint az az 1. ábrán látható, az 5' BamHI-XbaI fragmenst (3,9 kilobázis) és a 3' XbaI-BamHI fragmenst (1,3 kilobázis) a Zem228 vektor BamHI hasítási helyére illesztjük be. A Zem228 egy pUC18-származék, amely legalább egy BamHI klónozási helyet tartalmaz egy egér MT–1 promoter és SV40 terminátor között, és egy neomicinrezisztencia-markert is tartalmaz, amelyet SV40 promoter és terminátor szekvenciák határolnak [EP 319,944 számú publikáció és 2. ábra]. A teljes Aα kódolószekvenciát egy SnaBI fragmens formájában izoláljuk a Zem228 vektorokból, amit azután a pMAD6-Sna plazmid SnaBI hasítási helyére építünk be.

Amint az a 3. ábrán látható, a Bβ-lánc 5'-végét PCR-rel alakítjuk át, a ZC6629 (18. számú szekvencia), a ZC6630 (19. számú szekvencia) és a ZC6625 (20. számú szekvencia) oligonukleotidok felhasználásával. Ezeket a primereket párosával kombinálva használjuk (ZC6629+ZC6625 vagy ZC6630+ZC6625) a Bβ kódolószekvencia kialakítására, az első ATG kodonnál kezdődően (470-es pozíció a 3. számú szekvenciában) (jelzése N1-béta) vagy a 3. ATG kodonnál kezdődően (512-es pozíció a 3. számú szekvenciában) (jelzése N3-béta). A béta5'RI/puc templát DNS-ből körülbelül 5 ng-ot kombinálunk, és 20-20 pmol-t az egyes primerekből (N1-béta: ZC6629, 18. számú szekvencia + ZC6625, 20. számú szekvencia; vagy N3-béta: ZC6630, 19. számú szekvencia + ZC6625, 20. számú szekvencia), egy, az előzőkben ismertetett reakcióelegyben. Az elegyeket 5 ciklusba visszük: 94 °C, 45 másodperc; 40 °C, 120 másodperc; (N1-béta) vagy 90 másodperc (N3-béta); 72 °C, 120 másodperc; majd 20 ciklusba visszük: 94 °C, 45 másodperc; 45 °C,

120 másodperc (N1-béta) vagy 90 másodperc (N3-béta); 72 °C, 120 másodperc; majd 7 percig 72 °C-on inkubáljuk. A két reakcióterméket (N1: 555 bázispár vagy N3: 510 bázispár) EcoRI és BglII restrikciós enzimmel emésztjük, majd a fragmenseket a belső BglII-XbaI fragmenshez és EcoRI+XbaI restrikciós enzimmel emésztett pUC19 plazmidba ligáljuk. A Bβ szekvencia 3'-végét az előzőkben ismertetett módon változtatjuk meg, a ZC6625 (21. számú szekvencia) és a ZC6624 (22. számú szekvencia) oligonukleotidprimerek, valamint körülbelül 5 ng béta3'RI/puc templát használatával. A reakcióelegyet 5 ciklusba visszük: 94 °C, 45 másodperc; 40 °C, 90 másodperc; 72 °C, 120 másodperc; utána újabb 15 ciklusba visszük: 94 °C, 45 másodperc; 45 °C, 90 másodperc; 72 °C, 120 másodperc; majd 7 percig 72 °C-on inkubáljuk. Egy 990 bázispár méretű BglII-EcoRI fragmenst izolálunk. Ezt a 3' fragmenst ligáljuk a szomszédos kódolófragmenshez (340 bázispár, SphI-BglII) és SphI+EcoRI restrikciós enzimekkel emésztett pUC19 plazmidba. A 3' és 5' PCR-rel generált exonokat szekvenáljuk. Egy harmadik intermedier vektort állítunk elő, kombinálva két belső fragmenst (4285 bázispár méretű XbaI-EcoRI és 383 bázispár méretű EcoRI-SphI) egy XbaI+SphI restrikciós enzimekkel emésztett pUC19-ben. Azután összeállítjuk a teljes Bβ kódolószekvenciát (két forma), az egyik 5' EcoRI-XbaI fragmenst, a belső XbaI-SphI fragmenst, a 3' SphI-EcoRI fragmenst és az EcoRI restrikciós enzimmel emésztett pUC19 vektort összeligálva. A Bβ szekvenciát azután egy 7,6 kilobázis méretű SnaBI fragmens formájában izoláljuk, és a pMAD6-Sna SnaBI hasítási helyére építjük be.

A 4. ábrán látható, hogy a γ-lánc 5'-végét PCR-rel változtatjuk meg, a ZC6514 (23. számú szekvencia) és a ZC6517 (24. számú szekvencia) oligonukleotidprimereket, valamint 50 ng pγ12A9 templátot használva. A PCR reakciót az előzőkben ismertetett módon hajtjuk végre, az egyes primerekből 40-40 pmol-t használva. A reakciót először öt ciklusban futtatjuk: 94 °C, 45 másodperc; 40 °C, 60 másodperc; 72 °C, 120 másodperc; ezután újabb 15 ciklusban futtatjuk: 94 °C, 45 másodperc; 45 °C, 60 másodperc; 72 °C, 120 másodperc. A kapott 213 bázispár méretű fragmenst BamHI és SpeI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd a kapott restrikciós fragmenst ligáljuk a szomszédos, downstream 4,4 kilobázis méretű SpeI-EcoRI fragmenshez és a BamHI+EcoRI restrikciós enzimekkel emésztett pUC19-hez. A γ-lánc szekvenciájának 3'-végét is megváltoztatjuk, a ZC6516 (25. számú szekvencia) és a ZC6515 (26. számú szekvencia) oligonukleotidprimerek felhasználásával, körülbelül 50 ng pγ12F3 templátot, valamint ugyanazt a PCR-ciklusstruktúrát alkalmazva, mint amit az 5' fragmensnél alkalmaztunk. A kapott 500 bázispár méretű fragmenst SpeI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd a kapott restrikciós fragmenst az upstream 2,77 bázispár méretű EcoRI-SpeI fragmenshez és az EcoRI+BamHI restrikciós enzimekkel emésztett pUC19-hez ligáljuk. Mindegyik PCR-rel generált exont szekvenáljuk. Azután összeállítjuk a teljes γ'-lánc kódolószekvenciát, egy 4,5 kilobázis méretű BamHI-EcoRI 5' fragmenst, egy 1,1 kilobázis méretű EcoRI-PstI belső fragmenst és egy 2,14 kilobázis méretű PstI-XbaI 3' fragmenst ligálva BamHI+XbaI restrikciós enzimekkel emésztett Zem219b vektorba. A Zem219b vektor egy pUC18-eredetű vektor, amely egér metallotionein promotert és egy szelektálható DHFR markert tartalmaz, működés szempontjából egy SV40 promoterhez kapcsolva (5. ábra). A Zem219b plazmidot az American Type Culture Collectionnél helyeztük letétbe, egy *Escherichia coli* XL1-blue transzformáns formájában, 68 979 letéti számon. A γ'-lánc teljes kódolószekvenciáját azután egy 7,8 kilobázis méretű SnaBI fragmens formájában izoláljuk, majd a pMAD6-Sna SnaBI hasítási helyére illesztjük.

III. példa

Az induló törzsállomány egereit (C57BL6J, CBA-CA) a Harlan Olac Ltd.-től (Bicester, UK) szerezzük be. Ezeket párosával keresztezzük F1 hibrid tenyészet (B6CBAF1) kialakítására, befogadó nőstények, szuperovuláló nőstények és vazektomizált hímek előállítására. Minden állatot 14 óra fény/10 óra sötét ciklusban tartunk, kívánt mennyiségű vízzel és táppal etetjük (Special Diet Services RM3, Edinburgh, Skócia).

A transzgenikus egereket lényegében Hogan és munkatársai leírása alapján hozzuk létre [Hogan és munkatársai: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1986)], amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk. Nőstény B6CBAF1 állatokat szuperovuláltatunk 4-5 hetes korukban, vemhes kanca szérum gonadotropinnal (FOLLIGON, Vet-Drug, Falkirk, Skócia) (5 NE), majd ezt követi egy ip. humán gonadotropin injekció (CHORULN, Vet-Drug, Falkirk, Skócia) (5 NE), 45 órával később. Ezeket azután éjszakán át tenyészhímekkel pároztatjuk. Azokat, amelyek pároztak, leöljük, majd petesejtjeiket a mikroinjekciózáshoz kinyerjük.

A megtermékenyített petesejtekbe a DNS-t Hogan és munkatársai leírása szerint injekciózzuk [Hogan és munkatársai: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1986)]. Röviden, az Aα, Bβ és γ expressziós egységeket tartalmazó vektorokat MluI restrikciós enzimmel emésztjük, majd az expressziós egységeket szacharózgradiens-centrifugálással izoláljuk. Minden használt vegyszer reagens minőségű (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), minden oldat steril és nukleázmentes. A 20 és 40%-os szacharózoldatokat 1 mol/l nátrium-klorid, 20 mmol/l TRIS (pH=8,0), 5 mmol/l EDTA összetételű oldatban állítjuk elő, UHP vizet használva, majd szűréssel sterilezzük. 30%-os szacharózoldatot úgy állítunk elő, hogy azonos térfogatú 20%-os és 40%-os oldatot keverünk össze. Gradienst úgy állítunk elő, hogy a 40%-os, 30%-os és 20%-os szacharózoldatokat 0,5 ml-es lépésekben rétegezzük egy 2 ml-es poliallomer csőbe, majd egy óra hosszat hagyjuk állni. 100 µl DNS-oldatot (max. 8 µg DNS) töltünk a gradiens tetejére, majd a gradienst 17–20 óra hosszat 26 000/perc fordulatszámmal, 15 °C-on centrifugáljuk egy Beckman TL100 ultracentrifugában, TLS–55 rotort

használva (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). A gradienseket úgy frakcionáljuk, hogy a cső alját egy 20-as tűvel kilyukasztjuk, majd a cseppeket egy 96 lyukas mikrotiterlemezre gyűjtjük. 3 µl-es aliquot részeket elemzünk 1%-os agarózminigélen. A kívánt DNS-fragmenst tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, majd éjszakán át –20 °C-on etanollal kicsapjuk 0,3 mol/l nátrium-acetátban. A DNS-üledékeket újraszuszpendáljuk 50–100 µl UHP vízben, majd fluorimetriával meghatározzuk. Az expressziós egységeket Dulbecco-féle foszfáttal pufferelt sóoldatban hígítjuk, amely nem tartalmaz kalciumot és magnéziumot (literenként 0,2 g KCl-ot, 0,2 g KH_2PO_4-ot, 8,0 g NaCl-ot, 1,15 g Na_2HPO_4-ot tartalmaz), 1:1:1 mólarányban összekeverjük (vagy az N1-béta vagy az N3-béta expressziós egységet használva), a koncentrációt körülbelül 6 µg/ml-re állítjuk, és a petesejtekbe injekciózzuk (körülbelül 2 pl össz-DNS-oldat petesejtenként).

A 6-8 hetes befogadó nőstényeket úgy hozzuk létre, hogy B6CBAF1 nőstényeket keresztezünk természetes ösztruszban, vazektomizált hímekkel. A kopulációs dugókat hordozó nőstényeket azután megtartjuk a mikroinjekciózott petesejtek transzferéhez.

A potenciálisan transzgenikus állatok megszületése után, négyhetes korukban érzéstelenítés mellett farokbiopsziát veszünk belőlük. A szövetmintákat 2 ml farokpufferbe tesszük (0,3 mol/l nátrium-acetát, 50 mmol/l HCl, 1,5 mmol/l $MgCl_2$, 10 mmol/l TRIS-HCl, pH=8,5, 0,5% NP40, 0,5% Tween 20), amely 200 µg/ml proteináz K-t tartalmaz (Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország), majd vortexeljük. A mintákat 3 órán át vagy éjszakán át 55–60 °C-on rázatjuk 250/perc fordulatszámmal. A biopsziamintákból készített DNS-ben PCR-rel és Southern-blottal megvizsgáljuk, hogy megtalálhatók-e bennük az injekciózott konstrukciók. Az emésztett szövetet alaposan vortexeljük, majd 5 µl-es aliquot részeket 0,5 ml-es mikrocentrifugacsövekbe teszünk. Pozitív és negatív farokmintákat is alkalmazunk kontrollként. Az egyes csövekhez negyven µl szilikonolajat adunk (BDH, Poole, UK), majd a csöveket röviden centrifugáljuk. A csöveket 10 percig egy PCR-berendezés (például Omnigene, Hybaid, Teddington, UK) fűtőblokkjában 95 °C-on tartjuk. Ezt követően az egyes csövekben 45 µl-es aliquot rész van a PCR-keverékekből úgy, hogy az egyes reakciókeverékek végkoncentrációja az alábbi: 50 mmol/l KCl, 2 mmol/l $MgCl_2$, 10 mmol/l TRIS-HCl (pH=8,3); 0,01% zselatin; 0,1% NP40, 10% DMSO; 500 nmol/l az egyes primerekből, 200 µmol/l a dNTP-kből; 0,02 U/µl Taq polimeráz (Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország). A csöveket azután 30 ciklusba visszük, amelynek a paramétereit az éppen alkalmazott primerek határozzák meg. A primerek változhatnak, de mindegyik esetben a β-laktoglobulin promoterrégióra kell irányulniuk. Ez az injekciózott DNS-fragmensekre specifikus, mivel az egérben nincs β-laktoglobutin gén. Ezután minden egyes csőhöz 20 µl 5×felvivőpuffert adunk, amely Orange G markerfestéket tartalmaz [0,25% Orange G (Sigma), 15% 400-as típusú Ficoll (Pharmacia Biosystems Ltd., Milton Keynes, UK)], majd a reakcióelegyeket egy 1,6%-os agarózgélen elektroforetizáljuk, amely etídium-bromidot (Sigma) tartalmaz, addig, amíg a markerfesték a gél hosszának 2/3-áig vándorol. A gélt 254 nm-es hullámhosszúságú UV fényben tesszük láthatóvá. Ezzel a módszerrel azokat a transzgenikus egereket lehet azonosítani, amelyek az injekciózott DNS-fragmensekből egyet vagy többet tartalmaznak.

A pozitív farokmintákat feldolgozzuk tiszta DNS előállítása céljából. A DNS-mintákat Southern-blottal vizsgáljuk át, egy β-laktoglobulin promoterpróbát használva (a 7. számú szekvencia 2523–4253-as nukleotidjai). A megfelelő enzimekkel (azaz például EcoRI) végzett specifikus hasítások lehetővé teszik, hogy megkülönböztessük a három, Aα, Bβ és γ szekvenciákat tartalmazó konstrukciót.

A lényegében az előzőkben ismertetett módon előállított transzgenikus egerek Southern-blot-elemzése azt mutatja, hogy az utódoknak több mint 50%-a tartalmazza mind a három fibrinogén szekvenciát. A pozitív állatokból származó tej redukáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel való vizsgálata igazolja, hogy mind a három fehérjelánc jelen van, maximum 1 mg/ml koncentrációban. A teljesen elkészült fibrinogén mennyisége arányos a tejben jelen levő egyes alegységek arányával. Nyilvánvaló fenotipikus változás nem volt megfigyelhető az egerekben attól, hogy a tejükben nagy mennyiségű humán fibrinogén volt jelen.

IV. példa

Donor anyajuhokat kezelünk intravaginálisan progeszteronnal impregnált szivaccsal (CHRONOGEST Goat Sponge, Intervet, Cambridge, UK) a 0. napon. A szivacsokat 10-12 napig hagyjuk ezen a helyen.

A szuperovulációt a donor anyajuhokban összesen egy egység szarvasmarha tüszőserkentő hormonnal (OFSH) (OVAGEN, Horizon Animal Reproduction Technology, Pty. Ltd., New Zealand) indukáljuk, amit nyolc intramuszkuláris injekcióval adunk be, injekciónként 0,125 egységet alkalmazva, a –4. napon délután 5 órakor adva be az elsőt, és a 0. napon reggel 8 órakor adva be az utolsót. A donorokat intramuszkulárisan injekciózzuk 0,5 ml luteolitikus ágenssel (ESTRUMATE, Vet-Drug) a –4. napon, ezzel a corpus luteum regresszióját hozva létre, hogy visszajöjjön az ösztrusz és az ovuláció. Az ovuláció szinkronizálásához a donorállatokat intramuszkulárisan injekciózzuk 2 ml szintetikus release hormon analóggal (RECEPTAL, Vet-Drug), a 0. napon délután 5 órakor.

A donoroknak a mesterséges megtermékenyítés előtt legalább 12 órával már nem adunk vizet és élelmet. Az állatokat az 1. napon méhűri laparoszkópiával termékenyítjük meg mesterségesen, nyugtató és helyi érzéstelenítés alkalmazásával. A nyugtatás eléréséhez a mesterséges megtermékenyítés előtt körülbelül 15 perccel vagy xylazint (ROMPUN, Vet-Drug) injekciózunk az állatokba 0,05–0,1 ml/10 testsúlykilogramm dózisban, vagy 10 mg/ml ACP-t (Vet-Drug) injekciózunk az állatokba 0,1 ml/10 testsúlykilogramm dózisban. A mesterséges megtermékenyítést egy Poll Dorset kostól frissen vett ondóval végezzük. Az ondót azo-

nos térfogatú szűrt foszfáttal pufferelt sóoldattal hígítjuk, majd a hígított ondóból 0,2 ml-t injekciózunk méhszarvanként. Közvetlenül a mesterséges megtermékenyítés előtt vagy után a donoroknak intramuszkuláris AMOXYPEN injekciót adunk (Vet-Drug).

A megtermékenyített petesejteket a 2. napon nyerjük ki, a donort az 1. napon délután öt órától kezdve éheztetve és szomjaztatva. A kinyerést általános érzéstelenítés mellett végezzük, amit 5% thiopenton-nátrium (INTRAVAL-SODIUM, Vet-Drug) intravénás injekciózásával érünk el, 3 ml/10 testsúlykilogramm dózis mellett. Az anesztéziát 1–2% Halotán/O_2/N_2O belégzésével biztosítjuk, intubálás után. A megtermékenyített petesejtek kinyerése céljából laparotomiás bevágást teszünk, és a méhet exteriorizáljuk. A petesejteket a petevezetékek új-zélandi eredetű szarvasmarha-szérumalbuminnal kiegészített Ovum Culture Mediummal (Advanced Protein Products, Brierly Hill, West Midlands, UK) végzett retrográd öblítéssel nyerjük ki. Az öblítés után a méhet visszatesszük a hasüregbe, és a vágást lezárjuk. A donorokat vagy hagyjuk felgyógyulni az operáció után, vagy elaltatjuk őket. Azoknak a donoroknak, amelyeket hagyunk felgyógyulni, intramuszkuláris Amoxypen L. A. injekciót adunk a gyártó által javasolt dózisban, közvetlenül az operáció előtt vagy után.

A három fibrinogén lánc expressziós egységet tartalmazó plazmidokat MluI restrikciós enzimmel emésztjük, majd az expressziós egység fragmenseket kinyerjük, és szacharóz-sűrűséggradiensen tisztítjuk. A fragmensek koncentrációját fluorimetriával határozzuk meg, majd Dulbecco-féle foszfáttal pufferelt sóoldatban hígítjuk (kalcium és magnézium nélkül, az előzőkben ismertetett módon). A koncentrációt 6 μg/ml-re állítjuk, és az elegyből körülbelül 2 pl-t mikroinjekciózunk az egyes, látható pronukleusszal rendelkező megtermékenyített petesejtek pronukleuszába.

Mindegyik, a pronukleáris mikroinjekciózást túlélő megtermékenyített petesejtet *in vitro* 38,5 °C-on tartjuk 5% CO_2:5%O_2:90%N_2 összetételű atmoszférában, körülbelül 100% nedvességtartalom mellett, egy nátrium-hidrogén-karbonáttal pufferelt szintetikus petevezeték közegben (lásd a táblázatot), amit 20 térfogat/térfogat vazektomizált kosszérummal egészítünk ki. A szérumot hővel inaktiválhatjuk, 30 percig 56 °C-on tartva, majd –20 °C-on lefagyasztva tárolhatjuk a felhasználásig. A megtermékenyített petesejteket megfelelő időtartamig tenyésztjük, hogy a korai embriómortalitás (amit a manipulációs technikák okoznak) megtörténhessen. Ezeket az elpusztult vagy megállt embriókat eldobjuk. Azokat az embriókat, amelyek 5 vagy 6 sejtosztódáson túl vannak, szinkronizált befogadó anyajuhokba juttatjuk be.

Táblázat

Szintetikus petevezeték táptalaj

A törzsoldat (3 hónapig tárolható)	
NaCl	6,29 g
KCl	0,534 g
KH_2PO_4	0,162 g
$MgSO_4$×7 H_2O	0,182 g
Penicillin	0,06 g
60%-os nátrium-laktát-szirup	0,6 ml
Szuper H_2O	99,4 ml
B törzsoldat (2 hétig tárolható)	
$NaHCO_3$	0,21 g
Fenolvörös	0,001 g
Szuper H_2O	10 ml
C törzsoldat (2 hétig tárolható)	
Nátrium-piruvát	0,051 g
Szuper H_2O	10 ml
D törzsoldat (3 hónapig tárolható)	
$CaCl_2$×2 H_2O	0,262 g
Szuper H_2O	10 ml
E törzsoldat (3 hónapig tárolható)	
HEPES	0,651 g
Fenolvörös	0,001 g
Szuper H_2O	10 ml
10 ml nátrium-hidrogén-karbonáttal pufferelt közeg készítéséhez	
A törzsoldat	1 ml
B törzsoldat	1 ml
C törzsoldat	0,07 ml
D törzsoldat	0,1 ml
Szuper H_2O	7,83 ml
10 ml HEPES-sel pufferelt oldat előállításához	
A törzsoldat	1 ml
B törzsoldat	0,2 ml
C törzsoldat	0,07 ml
D törzsoldat	0,1 ml
E törzsoldat	0,8 ml
Szuper H_2O	7,83 ml

Az ozmolaritás értékének 265–285 mOsm között kell lennie. 2,5 ml hővel inaktivált birkaszérumot adunk hozzá és hővel sterilezzük.

A befogadó anyajuhokat intravaginális progeszteronnal impregnált szivaccsal kezeljük (Chronogest Ewe Sponge vagy Chronogest Ewe-Lamb Sponge, Intervet), amit 10-12 napig a helyén hagyunk. Az anyajuhokat intramuszkulárisan injekciózzuk 1,5 ml (300 NE) tüszőserkentő hormon helyettesítővel (P.M.S.G., Intervet), majd 0,5 ml luteolizáló ágenssel (Estrumate, Coopers Pitman-Moore), a szivacs eltávolítása előtti napon. Az anyajuhok nemi ciklusát teszteljük egy vazektomizált kossal, a 0. és 1. napon reggel 8 óra és délután 5 óra között.

Az *in vitro* tenyészetben túlélő embriókat a 6. vagy 7. napon visszavisszük a befogadókba (az 5. vagy 6. napon délután 5 órától éheztetve vannak). Az embriótranszfert általános érzéstelenítés mellett végezzük, az

előzőkben ismertetett módon. A méhet egy laparotomiás vágással exteriorizáljuk, laparoszkópiával vagy anélkül. Az embriókat visszatesszük az egyik vagy mindkét méhszarvba, de csak olyan anyajuhoknak, amelyeknek legalább egy megfelelő corpora luteájuk van. A méh visszahelyezése után a hasüreget lezárjuk, majd hagyjuk, hogy a befogadó felépüljön. Az állatoknak intramuszkuláris Amoxypen L. A. injekciót adunk a gyártó által javasolt dózisban, közvetlenül az operáció előtt vagy után.

A bárányokat a füljelzések alapján azonosítjuk, és az anyaállattal hagyjuk felnevelkedni. Az anyajuhokat és a bárányokat vagy istállóban tartjuk, és komplett tápkoncentrátumokkal, valamint egyéb kiegészítőkkel és/vagy tetszés szerint fogyasztott szénával etetjük, vagy hagyjuk legelni őket.

Életük első hetében (vagy ezután a lehető legkorábban, anélkül, hogy károsan befolyásolnánk az egészségüket), a bárányokban megvizsgáljuk a heterológ DNS jelenlétét, két mintavételi eljárást alkalmazva. Egy 10 ml-es vérmintát veszünk a nyaki vénából egy EDTA vacutainerbe. Ha lehetséges, akkor a juhokból az első vérvételtől számított egy héten belül egy második 10 ml-es mintát is veszünk. Szövetmintákat farokbiopsziával veszünk, amilyen gyorsan csak lehet, azután, hogy a farok érzéketlenné vált egy gumielasztrátor gyűrűnek a közelebbi egyharmadban való alkalmazásával (általában 20 perccel a „farkazás" után). A szövetet azonnal farokpufferoldatba tesszük. A farokmintákat szobahőmérsékleten tartjuk, majd a mintavétel napján elemezzük. Közvetlenül a biopszia után mindegyik báránynak intramuszkuláris Amoxypen L. A. injekciót adunk, majd a farok vágott végét egy antibiotikumpermettel szórjuk be.

A birkavérből extraháljuk a DNS-t, először a fehérvérsejteket szeparálva. Egy 10 ml-es vérmintát 20 ml Hank-féle pufferelt sóoldatban (HBS; beszerezhető a Sigma Co.-től) hígítunk. A hígított vérből 10 ml-t 5 ml Histopaque-ra (Sigma) rétegzünk, két, egyenként 15 ml-es csavaros tetejű csőben. A csöveket szobahőmérsékleten 15 percig centrifugáljuk 3000/perc fordulatszámmal (max 2000×g), lassú fékezéssel. A fehérvérsejt-határréteget egy tiszta 15 ml-es csőbe tesszük át, majd HBS-sel 15 ml-re hígítjuk. A hígított sejteket szobahőmérsékleten 10 percig 3000/perc fordulatszámmal centrifugáljuk, majd a sejtüledéket kinyerjük, és 2–5 ml farokpufferben szuszpendáljuk.

Ahhoz, hogy a DNS-t extraháljuk a fehérvérsejtekből, 10% SDS-t adunk a szuszpendált sejtekhez, 1% végkoncentrációban, majd a csövet fejre állítva összekeverjük az oldatot. Egy mg friss proteináz K oldatot adunk hozzá, majd az elegyet éjszakán át 45 °C-on inkubáljuk. A DNS-t azonos térfogatú fenol/kloroform (×3) és kloroform/izoamil-alkohollal (×1) extraháljuk. A DNS-t azután kicsapjuk, 0,1 térfogat 3 mol/l nátrium-acetátot és 2 térfogat etanolt adva hozzá, majd a csövet keverés céljából többször fejre fordítjuk. A kicsapott DNS-t egy tiszta üvegbottal feltekerjük. A tekercset 70%-os etanollal mossuk, majd hagyjuk, hogy a DNS részlegesen megszáradjon, majd újra oldjuk TE-ben (10 mmol/l TRIS-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH=7,4).

A vérből és a farokból származó DNS-t Southern-blottal elemezzük, a β-laktoglobulin promoterrégióra és a fibrinogén láncot kódoló régióra specifikus próbákat alkalmazva.

Az előzőekből nyilvánvaló, hogy jóllehet a találmány specifikus megvalósítási módjait illusztráció céljából ismertettük az előzőkben, különböző módosítások tehetők anélkül, hogy eltérnénk a találmány szellemétől és oltalmi körétől. Tehát a találmányt csak a mellékelt igénypontok korlátozzák.

SZEKVENCIALISTA

(1) Általános információk:

(i) Bejelentők: ZymoGenetics, Inc.
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102
Amerikai Egyesült Államok
Pharmaceutical Proteins Ltd.
Roslin
Edinburgh,
Midlothian, Scotland EH25 9PP

(ii) A találmány címe: Fibrinogén előállítása transzgén állatokban

(iii) Szekvenciák száma: 27

(iv) Levelezési cím:
(A) Címzett: ZymoGenetics, Inc.
(B) Utca: 1201 Eastlake Avenue East
(C) Város: Seattle
(D) Állam: WA
(E) Ország: USA
(F) Kód: 98102

(v) Komputerforma:
(A) Közegtípus: floppy lemez
(B) Komputer: IBM PC kompatibilis
(C) Működtetőrendszer: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn Release #1,0, #1,25

(vi) Jelen benyújtás adatai:
(A) Bejelentés száma:
(B) Benyújtás napja:
(C) Besorolás:
(viii) Ügyvéd/ügyvivő adatai:
(A) Név: Parker, Gary E
(B) Regisztrálási szám: 31-648
(C) Referencia/dokumentum szám: 93-15PC
(ix) Telekommunikációs információk:
(A) Telefon: 206-442-6673
(B) Telefax: 206-442-6678
(2) SEQ. ID No: 1 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 5943 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: kétszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: DNS (genomiális)
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: Humán fibrinogén A-alfa-lánc
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: kapcsolódik (31...84, 1154...1279, 1739...1922, 3055...3200, 3786...5210)
(xi) A szekvencia leírása: 1. számú szekvencia

```
GTCTAGGAGC CAGCCCCACC CTTAGAAAAG ATG TTT TCC ATG AGG ATC GTC TGC          54
                                 Met Phe Ser Met Arg Ile Val Cys
                                   1               5

CTA GTT CTA AGT GTG GTG GGC ACA GCA TGG GTATGGCCCT TTTCATTTTT          104
Leu Val Leu Ser Val Val Gly Thr Ala Trp
     10                  15

TCTTCTTGCT TTCTCTCTGG TGTTTATTCC ACAAAGAGCC TGGAGGTCAG AGTCTACCTG      164
CTCTATGTCC TGACACACTC TTAGCTTTAT GACCCCAGGC CTGGGAGGAA ATTTCCTGGG      224
TGGGCTTGAC ACCTCAAGAA TACAGGGTAA TATGACACCA AGAGGAAGAT CTTAGATGGA      284
TGAGAGTGTA CAACTACAAG GGAAACTTTA GCATCTGTCA TTCAGTCTTA CCACATTTTG      344
TTTTGTTTTG TTTTAAAAAG GGCAAGAATT ATTTGCCATC CTTGTACCTA TAAAGCCTTG      404
GTGCATTATA ATGCTAGTTA ATGGAATAAA ACATTTTATG GTAAGATTTG TTTTCTTTAG      464
TTATTAATTT CTTGCTACTT GTCCATAATA AGCAGAACTT TTAGTGTTAG TACAGTTTTG      524
CTGAAAGGTT ATTGTTGTGT TTGTCAAGAC AGAAGAAAAA GCAAACGAAT TATCTTTGGA      584
AATATCTTTG CAGTATCAGA AGAGATTAGT TAGTAAGGCA ATACGCTTTT CCGCAGTAAT      644
GGTATTCTTT TAAATTATGA ATCCATCTCT AAAGGTTACA TAGAAACTTG AAGGAGAGAG      704
GAACATTCAG TTAAGATAGT CTAGGTTTTT CTACTGAAGC AGCAATTACA GGAGAAAGAG      764
CTCTACAGTA GTTTTCAACT TTCTGTCTGC AGTCATTAGT AAAAATGAAA AGGTAAAATT      824
TAACTGATTT TATAGATTCA AATAATTTTC CTTTTAGGAT GGATTCTTTA AAACTCCTAA      884
TATTTATCAA ATGCTTATTT AAGTGTCACA CACAGTTAAG AAATTTGTAC ACCTTGTCTC      944
CTTTAATTCT CATAACAACT CCATAAAATG GGTCCTAGGA TTTCCATTTG AAGATAAGAA     1004
ACCTGAAGCT TGCCGAAGCC CTGTGTCTGC TCTCCTTAAT CTCTGTGAGA GTGCCATCTC     1064
TTCCTGGGGA CTTGTAGGCA TGCCACTGTC TCCTCTTCTG GCTAACATTG CTGTTGCTCT     1124
CTTTTGTGTA TGTGAATGAA TCTTTAAAG ACT GCA GAT AGT GGT GAA GGT GAC        1177
                                  Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp
                                      20                  25

TTT CTA GCT GAA GGA GGA GGC GTG CGT GGC CCA AGG GTT GTG GAA AGA        1225
Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Gly Pro Arg Val Val Glu Arg
            30                  35                  40

CAT CAA TCT GCC TGC AAA GAT TCA GAC TGG CCC TTC TGC TCT GAT GAA        1273
His Gln Ser Ala Cys Lys Asp Ser Asp Trp Pro Phe Cys Ser Asp Glu
        45                  50                  55
```

```
GAC TGG GTAAGCAGTC AGCGGGGGAA GCAGGAGATT CCTTCCCTCT GATGCTAGAG          1329
Asp Trp
     60

GGGCTCACAG GCTGACCTGA TTGGTCCCAG AAACTTTTTT AAATAGAAAA TAATTGAATA      1389
GTTACCTACA TAGCAAATAA AGAAAAGGAA CCTACTCCCA AGAGCACTGT TTATTTACCT      1449
CCCCAACTCT GGATCATTAG TGGGTGAACA GACAGGATTT CAGTTGCATG CTCAGGCAAA      1509
ACCAGGCTCC TGAGTATTGT GGCCTCAATT TCCTGGCACC TATTTATGGC TAAGTGGACC      1569
CTCATTCCAG AGTTTCTCTG CGACCTCTAA CTAGTCCTCT TACCTACTTT TAAGCCAACT      1629
TATCTGGAAG AGAAAGGGTA GGAAGAAATG GGGGCTGCAT GGAAACATGC AAAATTATTC      1689
TGAATCTGAG AGATAGATCC TTACTGTAAT TTTCTCCCTT CACTTTCAG AAC TAC          1744
                                                        Asn Tyr

AAA TGC CCT TCT GGC TGC AGG ATG AAA GGG TTG ATT GAT GAA GTC AAT        1792
Lys Cys Pro Ser Gly Cys Arg Met Lys Gly Leu Ile Asp Glu Val Asn
         65                  70                  75

CAA GAT TTT ACA AAC AGA ATA AAT AAG CTC AAA AAT TCA CTA TTT GAA        1840
Gln Asp Phe Thr Asn Arg Ile Asn Lys Leu Lys Asn Ser Leu Phe Glu
     80                  85                  90

TAT CAG AAG AAC AAT AAG GAT TCT CAT TCG TTG ACC ACT AAT ATA ATG        1888
Tyr Gln Lys Asn Asn Lys Asp Ser His Ser Leu Thr Thr Asn Ile Met
 95                 100                 105                 110

GAA ATT TTG AGA GGC GAT TTT TCC TCA GCC AAT A GTAAGTATTA                1932
Glu Ile Leu Arg Gly Asp Phe Ser Ser Ala Asn
               115                 120

CATATTTACT TCTTTGACTT TATAACAGAA ACAACAAAAA TCCTAAATAA ATATGATATC      1992
CGCTTATATC TATGACAATT TCATCCCAAA GTACTTAGTG TAGAAACACA TACCTTCATA      2052
ATATCCCTGA AAATTTTAAG AGGGAGCTTT TGTTTTCGTT ATTTTTTCAA AGTAAAAGAT      2112
GTTAACTGAG ATTGTTTAAG GTCACAAAAT AAGTCAGAAT TTTGGATTAA AACAAGAATT      2172
TAAATGTGTT CTTTTCAACA GTATATACTG AAAGTAGGAT GGGTCAGACT CTTTGAGTTG      2232
ATATTTTTGT TTCTGCTTTG TAAAGGTGAA AACTGAGAGG TCAAGGAACT TGTTCAAAGA      2292
CACAGAGCTG GGAATTCAAC TCCCAGACTC CACTGAGCTG ATTAGGTAGA TTTTTAAATT      2352
TAAAATATAG GGTCAAGCTA CGTCATTCTC ACAGTCTACT CATTAGGGTT AGGAAACATT      2412
GCATTCACTC TGGGCATGGA CAGCGAGTCT AGGGAGTCCT CAGTTTCTCA AGTTTTGCTT      2472
TGCCTTTTTA CACCTTCACA AACACTTGAC ATTTAAAATC AGTGATGCCA ACACTAGCTG      2532
GCAAGTGAGT GATCCTGTTG ACCCAAAACA GCTTAGGAAC CATTTCAAAT CTATAGAGTT      2592
AAAAAGAAAA GCTCATCAGT AAGAAAATCC AATATGTTCA AGTCCCTTGA TTAAGGATGT      2652
TATAAAATAA TTGAAATGCA ATCAAACCAA CTATTTTAAC TCCAAATTAC ACCTTTAAAA      2712
TTCCAAAGAA AGTTCTTCTT CTATATTTCT TTGGGATTAC TAATTGCTAT TAGGACATCT      2772
TAACTGGCAT TCATGGAAGG CTGCAGGGCA TAACATTATC CAAAAGTCAA ATGCCCCATA      2832
GGTTTTGAAC TCACAGATTA AACTGTAACC AAAATAAAAT TAGGCATATT TACAAGCTAG      2892
TTTCTTTCTT TCTTTTTTCT CTTTCTTTCT TTCTTTCTTT CTTTCTTTCT TTCTTTCTTT      2952
CTTTCTTTCT TTCTCCTTCC TTCCTTTCTT CCTTTCTTTT TTGCTGGCAA TTACAGACAA      3012
ATCACTCAGC AGCTACTTCA ATAACCATAT TTTCGATTTC AG AC CGT GAT AAT           3065
                                              Asn Arg Asp Asn
                                                          125

ACC TAC AAC CGA GTG TCA GAG GAT CTG AGA AGC AGA ATT GAA GTC CTG        3113
Thr Tyr Asn Arg Val Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile Glu Val Leu
               130                 135                 140

AAG CGC AAA GTC ATA GAA AAA GTA CAG CAT ATC CAG CTT CTG CAG AAA        3161
Lys Arg Lys Val Ile Glu Lys Val Gln His Ile Gln Leu Leu Gln Lys
           145                 150                 155
```

```
AAT GTT AGA GCT CAG TTG GTT GAT ATG AAA CGA CTG GAG GTAAGTATGT          3210
Asn Val Arg Ala Gln Leu Val Asp Met Lys Arg Leu Glu
        160                 165                 170

GGCTGTGGTC CCGAGTGTCC TTGTTTTTGA GTAGAGGGAA AAGGAAGGCG ATAGTTATGC      3270
ACTGAGTGTC TACTATATGC AGAGAAAAGT GTTATATCCA TCATCTACCT AAAAGTAGGT      3330
ATTATTTTCC TCACTCCACA GTTGAAGAAA AAAAAATTCA GAGATATTAA GTAAATTTTC      3390
CAACGTACAT AGATAGTAAT TCAAAGCAAT GTTCAGTCCC TGTCTATTCC AAGCCATTAC      3450
ATCACCACAC CTCTGAGCCC TCAGCCTGAG TTCACCAAGG ATCATTTAAT TAGCGTTTCC      3510
TTTGAGAGGG AATAGCACCT TACTCTTGAT CCATTCTGAG GCTAAGATGA ATTAAACAGC      3570
ATCCATTGCT TATCCTGGCT AGCCCTGCAA TACCCAACAT CTCTTCCACT GAGGGTGCTC      3630
GATAGGCAGA AAACAGAGAA TATTAAGTGG TAGGTCTCCG AGTCAAAAAA AATGAAACCA      3690
GTTTCCAGAA GGAAAATTAA CTACCAGGAA CTCAATAGAC GTAGTTTATG TATTTGTATC      3750
TACATTTTCT CTTTATTTTT CTCCCCTCTC TCTAG GTG GAC ATT GAT ATT AAG          3803
                                      Val Asp Ile Asp Ile Lys
                                                      175

ATC CGA TCT TGT CGA GGG TCA TGC AGT AGG GCT TTA GCT CGT GAA GTA        3851
Ile Arg Ser Cys Arg Gly Ser Cys Ser Arg Ala Leu Ala Arg Glu Val
            180                 185                 190

GAT CTG AAG GAC TAT GAA GAT CAG CAG AAG CAA CTT GAA CAG GTC ATT        3899
Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Asp Gln Gln Lys Gln Leu Glu Gln Val Ile
        195                 200                 205

GCC AAA GAC TTA CTT CCC TCT AGA GAT AGG CAA CAC TTA CCA CTG ATA        3947
Ala Lys Asp Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu Ile
    210                 215                 220

AAA ATG AAA CCA GTT CCA GAC TTG GTT CCC GGA AAT TTT AAG AGC CAG        3995
Lys Met Lys Pro Val Pro Asp Leu Val Pro Gly Asn Phe Lys Ser Gln
225                 230                 235                 240

CTT CAG AAG GTA CCC CCA GAG TGG AAG GCA TTA ACA GAC ATG CCG CAG        4043
Leu Gln Lys Val Pro Pro Glu Trp Lys Ala Leu Thr Asp Met Pro Gln
                245                 250                 255

ATG AGA ATG GAG TTA GAG AGA CCT GGT GGA AAT GAG ATT ACT CGA GGA        4091
Met Arg Met Glu Leu Glu Arg Pro Gly Gly Asn Glu Ile Thr Arg Gly
            260                 265                 270

GGC TCC ACC TCT TAT GGA ACC GGA TCA GAG ACG GAA AGC CCC AGG AAC        4139
Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Thr Gly Ser Glu Thr Glu Ser Pro Arg Asn
        275                 280                 285

CCT AGC AGT GCT GGA AGC TGG AAC TCT GGG AGC TCT GGA CCT GGA AGT        4187
Pro Ser Ser Ala Gly Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser
    290                 295                 300

ACT GGA AAC CGA AAC CCT GGG AGC TCT GGG ACT GGA GGG ACT GCA ACC        4235
Thr Gly Asn Arg Asn Pro Gly Ser Ser Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr
305                 310                 315                 320

TGG AAA CCT GGG AGC TCT GGA CCT GGA AGT GCT GGA AGC TGG AAC TCT        4283
Trp Lys Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser Ala Gly Ser Trp Asn Ser
                325                 330                 335

GGG AGC TCT GGA ACT GGA AGT ACT GGA AAC CAA AAC CCT GGG AGC CCT        4331
Gly Ser Ser Gly Thr Gly Ser Thr Gly Asn Gln Asn Pro Gly Ser Pro
            340                 345                 350
```

```
AGA CCT GGT AGT ACC GGA ACC TGG AAT CCT GGC AGC TCT GAA CGC GGA        4379
Arg Pro Gly Ser Thr Gly Thr Trp Asn Pro Gly Ser Ser Glu Arg Gly
        355                 360                 365

AGT GCT GGG CAC TGG ACC TCT GAG AGC TCT GTA TCT GGT AGT ACT GGA        4427
Ser Ala Gly His Trp Thr Ser Glu Ser Ser Val Ser Gly Ser Thr Gly
    370                 375                 380

CAA TGG CAC TCT GAA TCT GGA AGT TTT AGG CCA GAT AGC CCA GGC TCT        4475
Gln Trp His Ser Glu Ser Gly Ser Phe Arg Pro Asp Ser Pro Gly Ser
385                 390                 395                 400

GGG AAC GCG AGG CCT AAC AAC CCA GAC TGG GGC ACA TTT GAA GAG GTG        4523
Gly Asn Ala Arg Pro Asn Asn Pro Asp Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val
                405                 410                 415

TCA GGA AAT GTA AGT CCA GGG ACA AGG AGA GAG TAC CAC ACA GAA AAA        4571
Ser Gly Asn Val Ser Pro Gly Thr Arg Arg Glu Tyr His Thr Glu Lys
            420                 425                 430

CTG GTC ACT TCT AAA GGA GAT AAA GAG CTC AGG ACT GGT AAA GAG AAG        4619
Leu Val Thr Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Arg Thr Gly Lys Glu Lys
        435                 440                 445

GTC ACC TCT GGT AGC ACA ACC ACC ACG CGT CGT TCA TGC TCT AAA ACC        4667
Val Thr Ser Gly Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Ser Cys Ser Lys Thr
    450                 455                 460

GTT ACT AAG ACT GTT ATT GGT CCT GAT GGT CAC AAA GAA GTT ACC AAA        4715
Val Thr Lys Thr Val Ile Gly Pro Asp Gly His Lys Glu Val Thr Lys
465                 470                 475                 480

GAA GTG GTG ACC TCC GAA GAT GGT TCT GAC TGT CCC GAG GCA ATG GAT        4763
Glu Val Val Thr Ser Glu Asp Gly Ser Asp Cys Pro Glu Ala Met Asp
                485                 490                 495

TTA GGC ACA TTG TCT GGC ATA GGT ACT CTG GAT GGG TTC CGC CAT AGG        4811
Leu Gly Thr Leu Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Arg His Arg
            500                 505                 510

CAC CCT GAT GAA GCT GCC TTC TTC GAC ACT GCC TCA ACT GGA AAA ACA        4859
His Pro Asp Glu Ala Ala Phe Phe Asp Thr Ala Ser Thr Gly Lys Thr
        515                 520                 525

TTC CCA GGT TTC TTC TCA CCT ATG TTA GGA GAG TTT GTC AGT GAG ACT        4907
Phe Pro Gly Phe Phe Ser Pro Met Leu Gly Glu Phe Val Ser Glu Thr
    530                 535                 540

GAG TCT AGG GGC TCA GAA TCT GGC ATC TTC ACA AAT ACA AAG GAA TCC        4955
Glu Ser Arg Gly Ser Glu Ser Gly Ile Phe Thr Asn Thr Lys Glu Ser
545                 550                 555                 560

AGT TCT CAT CAC CCT GGG ATA GCT GAA TTC CCT TCC CGT GGT AAA TCT        5003
Ser Ser His His Pro Gly Ile Ala Glu Phe Pro Ser Arg Gly Lys Ser
                565                 570                 575

TCA AGT TAC AGC AAA CAA TTT ACT AGT AGC ACG AGT TAC AAC AGA GGA        5051
Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg Gly
            580                 585                 590
```

```
GAC TCC ACA TTT GAA AGC AAG AGC TAT AAA ATG GCA GAT GAG GCC GGA        5099
Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala Gly
        595                 600                 605

AGT GAA GCC GAT CAT GAA GGA ACA CAT AGC ACC AAG AGA GGC CAT GCT        5147
Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala
    610                 615                 620

AAA TCT CGC CCT GTC AGA GGT ATC CAC ACT TCT CCT TTG GGG AAG CCT        5195
Lys Ser Arg Pro Val Arg Gly Ile His Thr Ser Pro Leu Gly Lys Pro
625                 630                 635                 640

TCC CTG TCC CCC TAGACTAAGT TAAATATTTC TGCACAGTGT TCCCATGGCC             5247
Ser Leu Ser Pro
                645

CCTTGCATTT CCTTCTTAAC TCTCTGTTAC ACGTCATTGA AACTACACTT TTTTGGTCTG       5307
TTTTTGTGCT AGACTGTAAG TTCCTTGGGG GCAGGGCCTT TGTCTGTCTC ATCTCTGTAT       5367
TCCCAAATGC CTAACAGTAC AGAGCCATGA CTCAATAAAT ACATGTTAAA TGGATGAATG       5427
AATTCCTCTG AAACTCTATT TGAGCTTATT TAGTCAAATT CTTTCACTAT TCAAAGTGTG       5487
TGCTATTAGA ATTGTCACCC AACTGATTAA TCACATTTTT AGTATGTGTC TCAGTTGACA       5547
TTTAGGTCAG GCTAAATACA AGTTGTGTTA GTATTAAGTG AGCTTAGCTA CCTGTACTGG       5607
TTACTTGCTA TTAGTTTGTG CAAGTAAAAT TCCAAATACA TTTGAGGAAA ATCCCCTTTG       5667
CAATTTGTAG GTATAAATAA CCGCTTATTT GCATAAGTTC TATCCCACTG TAAGTGCATC       5727
CTTTCCCTAT GGAGGGAAGG AAAGGAGGAA GAAAGAAAGG AAGGGAAAGA AACAGTATTT       5787
GCCTTATTTA ATCTGAGCCG TGCCTATCTT TGTAAAGTTA AATGAGAATA ACTTCTTCCA       5847
ACCAGCTTAA TTTTTTTTTT AGACTGTGAT GATGTCCTCC AAACACATCC TTCAGGTACC       5907
CAAAGTGGCA TTTTCAATAT CAAGCTATCC GGATCC                                 5943
```

(2) SEQ. ID No: 2 információi:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 644 aminosav

(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 2. számú szekvencia

```
Met Phe Ser Met Arg Ile Val Cys Leu Val Leu Ser Val Val Gly Thr
  1               5                  10                  15

Ala Trp Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly
            20                  25                  30

Gly Val Arg Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His Gln Ser Ala Cys Lys
        35                  40                  45

Asp Ser Asp Trp Pro Phe Cys Ser Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Lys Cys
    50                  55                  60

Pro Ser Gly Cys Arg Met Lys Gly Leu Ile Asp Glu Val Asn Gln Asp
65                  70                  75                  80

Phe Thr Asn Arg Ile Asn Lys Leu Lys Asn Ser Leu Phe Glu Tyr Gln
                85                  90                  95

Lys Asn Asn Lys Asp Ser His Ser Leu Thr Thr Asn Ile Met Glu Ile
            100                 105                 110

Leu Arg Gly Asp Phe Ser Ser Ala Asn Asn Arg Asp Asn Thr Tyr Asn
        115                 120                 125
```

```
Arg Val Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile Glu Val Leu Lys Arg Lys
    130                 135                 140

Val Ile Glu Lys Val Gln His Ile Gln Leu Leu Gln Lys Asn Val Arg
145                 150                 155                 160

Ala Gln Leu Val Asp Met Lys Arg Leu Glu Val Asp Ile Asp Ile Lys
                165                 170                 175

Ile Arg Ser Cys Arg Gly Ser Cys Ser Arg Ala Leu Ala Arg Glu Val
            180                 185                 190

Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Asp Gln Gln Lys Gln Leu Glu Gln Val Ile
        195                 200                 205

Ala Lys Asp Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu Ile
    210                 215                 220

Lys Met Lys Pro Val Pro Asp Leu Val Pro Gly Asn Phe Lys Ser Gln
225                 230                 235                 240

Leu Gln Lys Val Pro Pro Glu Trp Lys Ala Leu Thr Asp Met Pro Gln
                245                 250                 255

Met Arg Met Glu Leu Glu Arg Pro Gly Gly Asn Glu Ile Thr Arg Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Thr Gly Ser Glu Thr Glu Ser Pro Arg Asn
        275                 280                 285

Pro Ser Ser Ala Gly Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser
    290                 295                 300

Thr Gly Asn Arg Asn Pro Gly Ser Ser Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr
305                 310                 315                 320

Trp Lys Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser Ala Gly Ser Trp Asn Ser
                325                 330                 335

Gly Ser Ser Gly Thr Gly Ser Thr Gly Asn Gln Asn Pro Gly Ser Pro
            340                 345                 350

Arg Pro Gly Ser Thr Gly Thr Trp Asn Pro Gly Ser Ser Glu Arg Gly
        355                 360                 365

Ser Ala Gly His Trp Thr Ser Glu Ser Ser Val Ser Gly Ser Thr Gly
    370                 375                 380

Gln Trp His Ser Glu Ser Gly Ser Phe Arg Pro Asp Ser Pro Gly Ser
385                 390                 395                 400

Gly Asn Ala Arg Pro Asn Asn Pro Asp Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val
                405                 410                 415

Ser Gly Asn Val Ser Pro Gly Thr Arg Arg Glu Tyr His Thr Glu Lys
            420                 425                 430

Leu Val Thr Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Arg Thr Gly Lys Glu Lys
        435                 440                 445
```

```
Val Thr Ser Gly Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Ser Cys Ser Lys Thr
    450                 455                 460

Val Thr Lys Thr Val Ile Gly Pro Asp Gly His Lys Glu Val Thr Lys
465                 470                 475                 480

Glu Val Val Thr Ser Glu Asp Gly Ser Asp Cys Pro Glu Ala Met Asp
                485                 490                 495

Leu Gly Thr Leu Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Arg His Arg
            500                 505                 510

His Pro Asp Glu Ala Ala Phe Phe Asp Thr Ala Ser Thr Gly Lys Thr
        515                 520                 525

Phe Pro Gly Phe Phe Ser Pro Met Leu Gly Glu Phe Val Ser Glu Thr
    530                 535                 540

Glu Ser Arg Gly Ser Glu Ser Gly Ile Phe Thr Asn Thr Lys Glu Ser
545                 550                 555                 560

Ser Ser His His Pro Gly Ile Ala Glu Phe Pro Ser Arg Gly Lys Ser
                565                 570                 575

Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg Gly
            580                 585                 590

Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala Gly
        595                 600                 605

Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala
    610                 615                 620

Lys Ser Arg Pro Val Arg Gly Ile His Thr Ser Pro Leu Gly Lys Pro
625                 630                 635                 640

Ser Leu Ser Pro
```

(2) SEQ. ID No: 3 információi:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 8878 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: kétszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS (genomiális)

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: Humán fibrinogén B-béta-lánc

(ix) Tulajdonság:

(A) Név/kulcs: vegyes RNS

(B) Lokalizáció: 1...469

(ix) Tulajdonság:

(A) Név/kulcs: exon

(B) Lokalizáció: 470...583

(ix) Tulajdonság:

(A) Név/kulcs: intron

(B) Lokalizáció: 584...3257

(ix) Tulajdonság:

(A) Név/kulcs: exon

(B) Lokalizáció: 3258...3449

(ix) Tulajdonság:

(A) Név/kulcs: intron
(B) Lokalizáció: 3450...3938
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: exon
(B) Lokalizáció: 3939...4122
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: intron
(B) Lokalizáció: 4123...5042
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: exon
(B) Lokalizáció: 5043...5270
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: intron
(B) Lokalizáció: 5271...5830
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: exon
(B) Lokalizáció: 5831...5944
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: intron
(B) Lokalizáció: 5945...6632
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: exon
(B) Lokalizáció: 6633...6758
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: intron
(B) Lokalizáció: 6759...6966
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: exon
(B) Lokalizáció: 6967...7252
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: intron
(B) Lokalizáció: 7253...7870
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: exon
(B) Lokalizáció: 7871...8102
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: 3'UTR
(B) Lokalizáció: 8103...8537
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: vegyes RNS
(B) Lokalizáció: 8538...8878
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: kapcsolódás (470...583, 3258...3449, 3939...4122, 5043...5270, 5831...5944, 6633...6758, 6967...7252, 7871...8102)

(xi) A szekvencia leírása: 3. számú szekvencia

```
GAATTCATGC CCCTTTTGAA ATAGACTTAT GTCATTGTCA GAAAACATAA GCATTTATGG        60
TATATCATTA ATGAGTCACG ATTTTAGTGG TTGCCTTGTG AGTAGGTCAA ATTTACTAAG       120
CTTAGATTTG TTTTCTCACA TATTCTTTCG GAGCTTGTGT AGTTTCCACA TTAATTTACC       180
AGAAACAAGA TACACACTCT CTTTGAGGAG TGCCCTAACT TCCCATCATT TTGTCCAATT       240
AAATGAATTG AAGAAATTTA ATGTTTCTAA ACTAGACCAA CAAAGAATAA TAGTTGTATG       300
ACAAGTAAAT AAGCTTTGCT GGGAAGATGT TGCTTAAATG ATAAAATGGT TCAGCCAACA       360
AGTGAACCAA AAATTAAATA TTAACTAAGG AAAGGTAACC ATTTCTGAAG TCATTCCTAG       420
CAGAGGACTC AGATATATAT AGGATTGAAG ATCTCTCAGT TAAGTCTAC ATG AAA           475
                                                      Met Lys
                                                        1

AGG ATG GTT TCT TGG AGC TTC CAC AAA CTT AAA ACC ATG AAA CAT CTA         523
Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys His Leu
          5                  10                  15
```

```
TTA TTG CTA CTA TTG TGT GTT TTT CTA GTT AAG TCC CAA GGT GTC AAC          571
Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly Val Asn
     20                  25                  30

GAC AAT GAG GAG GTGAATTTTT TAAAGCATTA TTATATTATT AGTAGTATTA              623
Asp Asn Glu Glu
 35

TTAATATAAG ATGTAACATA ATCATATTAT GTGCTTATTT TAATGAAATT AGCATTGCTT        683
ATAGTTATGA AATGGAATTG TTAACCTCTG ACTTATTGTA TTTAAAGAAT GTTTCATAGT        743
ATTTCTTATA TAAAAACAAA GTAATTTCTT GTTTTCTAGT TTATCACCTT TGTTTTCTTA        803
AGATGAGGAT GGCTTAGCTA ATGTAAGATG TGTTTTTCTC ACTTGCTATT CTGAGTACTG        863
TGATTTTCAT TTACTTCTAG CAATACAGGA TTACAATTAA GAGGACAAGA TCTGAAAATC        923
TCACAAACTA TAAAATAATA AAAGAGCAGA ATTTTAAGAT AAAAGAAACT GGTGGTAGGT        983
AGATTGTTCT TTGGTGAAGG AAGGTAATAT ATATTGTTAC TGAGATTACT ATTTATAAAA       1043
ATTATAACTA AGCCTAAAAG CAAAATACAT CAAGTGTAAT GATAGAAAAT GAAATATTGC       1103
TTTTTTCAGA TGAAAAGTTC AAATTAGAGT TAGTGTGTAT TGTTATTATT AATAGTTATG       1163
AAACACGGTT CAGTCTAATT TATTTATTTG TAGAACAGTT TGTCCTCAAC TATTATTTTT       1223
GCTGACTTAT TGCTGTTAAT TTGCAGTTAC TAAAAATACA GAAATGCATT TAGGACAATG       1283
GATATTTAAG AAATTTAAAT TTTATCATCA AACGTATCAT GGCCAAATTT CTTACATATA       1343
GCATAGTATC ATTAAACTAG AAATAAGAAT ACACAATAAT ATTTAAATGA AGTGATTCAT       1403
TTCGGATCAT TATTGAGTTT CAAGGGAACT TGAGTGTTGT ACTTATCAGA CTCTACATGT       1463
AAGAACATAT AGTTAATCTG GTTGTGTGTG TAAAAACATA TGGTTAATCT GGTTAAGTCT       1523
GGTTAATCAT ATTAGGTAAG AAAAATGTAA AGAATGTGTA AGACGAAATT TTTGTAAAGT       1583
ACTCTGCAAA GCACTTTCAC ATTTCTGCTT ATCAACTAAA CCTCACAGAG ATAGTTTAAT       1643
AGTTTAGGCT TTAAAATGGA TTTTGATTAT TCAACAAGTG GCCTTCATAA TTTCTTTAAG       1703
TGTTTTTCTT TAAGTATATA CTTTCTTTAA ATATTTTTTA AAATTTCCTT TTCTCTAGTA       1763
AAGCCAGACC ATCCATGCTA CCTCTCTAGT GGCACTCTGA AATAAAAAGA AAATAGTTTT       1823
CTCTGTTATA ATTGTATTTG TAATAAGCAG ATGAATCACA TTTCTTAAAA TTTGTTTTAG       1883
AGAGGGTAAG CTCTGACTAG GACCATGACT TCAATGTGAA ATATGTATAT ATCCTCCGAA       1943
TCTTTACATA TTAAGAATGT ATATAGTCAA CTGGTTAAAC AGGAAAATCT GGAACAGCCT       2003
GGCTGGGTTT TAATCTTAGC ACCATCCTAC TAAATGTTAA ATAATATTAT AATCTAATGA       2063
ATAAATGACA ATGCAATTCC AAATAGAGTT CATCTGATGA CTTCTAGACT CACAAAATTG       2123
CAAGAGAGCT CAGTTGTTGC TCAGTTGTTC CAAATCATGT CGTTTGTTAA TTTGTAATTA       2183
AGCTCCAAAG GATGTATAGC TACTGACAAA AAAAAAAATG AGAATGTAGT TAATCCAAAT       2243
CAAAACTTTC CTATTGCAAT GCGTATTTTC TGCTTCATTA TCCTTTAATA TAATATTTTA       2303
AGTTAGCAAG TAATTTTAAT TACAATGCAC AAGCCTTGAG AATTATTTTA AATATAAGAA       2363
AATCATAATG TTTGATAAAG AAATCATGTA AGAAATTTCA AGATAATGGT TTAACAAATA       2423
ATTTTGTTGA TAGAAGATAA GACTAAAAGT GAAATTCGAA GTGGAGAGGA CACTTAAACT       2483
GTAGTACTTG TTATGTGTGA TTCCAGTAAA AATAGTAATG AGCACTTATT ATTGCCAAGT       2543
ACTGTTCTGA GGGTACCATA TGCAATAAGT TATTTAATCC TTACAATAAT CTTGTAAGGC       2603
AGATTCAAAC TATCATTACA CTTATTTTAC AGATGAGAAA ACTGGGGCAC AGATAAAGCA       2663
ACTTGCCCAA GGTCTCATAG CTGTAAGTCA ACCCTACGGT CAAGACCTAC AAGTAGCCGA       2723
GCTCCAGAGT ACATTATGAG GGTCAAAGAT TGTCTTATTA CAAATAAATT CCAAGTAGAA       2783
TCAACCTTTA ATAAGTCTTT AATGTCTCTT AAATATGTTT ATATAGGAGT CTAATCACCA       2843
ATTCACAAAA ATGAAAGTAG GGAAATGATT AACAATAATC ATAGGAATCT AACAATCCAA       2903
GTGGCTTGAG AATATTCATT CTTCTTGACA GTATAGATTC TTTACAATTT CGTAAGTTCC       2963
AATGTATGTT TTAGGAATAT GAGGTCATTA CTATTCATAA TCTGATACAG CTTTATCCTA       3023
AGGCCTCTCT TTAAAAACTA CACTGCATCA TAGCTTTTTT GTGCAGTTGG TCTTTCTACT       3083
GTTACTGAAC AGTAAGCAAC CTACAGATTC ACTATCACCA ACCAGCCAGT TGATGGATCT       3143
TAAGCAAATT ATCAAGCTTG TGATAACCTA AATTATAAAA TGAGGGTGTT GGAATAGTTA       3203
CATTCCAAAT CTTCTATAAC ACTCTGTATT ATATTTCTGC CTCATTCCTT GTAG GGT         3260
                                                              Gly

TTC TTC AGT GCC CGT GGT CAT CGA CCC CTT GAC AAG AAG AGA GAA GAG          3308
Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu
 40                  45                  50                  55
```

```
GCT CCC AGC CTG AGG CCT GCC CCA CCG CCC ATC AGT GGA GGT GGC TAT      3356
Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr
                60                  65                  70

CGG GCT CGT CCA GCC AAA GCA GCT GCC ACT CAA AAG AAA GTA GAA AGA      3404
Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg
            75                  80                  85

AAA GCC CCT GAT GCT GGA GGC TGT CTT CAC GCT GAC CCA GAC CTG          3449
Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu His Ala Asp Pro Asp Leu
        90                  95                  100

GTGGGTGCAC TGATGTTTCT TGCAGTGGTG GCTCTCTCAT GCAGAGAAAG CCTGTAGTCA   3509
TGGCAGTCTG CTAATGTTTC ACTGACCCAC ATTACCATCA CTGTTATTTT GTTTGTTTAT   3569
TTTGGAAATA AAATTCAAAA CATAAACATA TTGGGCCTTT GGTTTAGGCT TTCTTTCTTG   3629
TTTTCTTTGG TCTGGGCCCA AAATTTCAAA TTAGGATATG TGGGTGCCAC CTTTCCATTT   3689
GTATTTTGCC ACTGCCTTTG TTTAGTTGGT AAAATTTTCA TAGCCCAATT ATATTTTTTC   3749
TGGGGTAAGT AATATTTTAA ATCTCTATGA GAGTATGATG ATGACTTTCG AATTTCTGGT   3809
CTTACAGAAA ACCAAATAAT AAATTTTTAT GTTGGCTAAT CGTATCGCTG AATTTTCCTA   3869
TGTGCTATTT TAACAAATGT CCATGACCCA AATCCTTCAT CTAATGCCTG CTATTTTCTT   3929
TGTTTTTAG GGG GTG TTG TGT CCT ACA GGA TGT CAG TTG CAA GAG GCT        3977
          Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Gln Leu Gln Glu Ala
                105                 110                 115

TTG CTA CAA CAG GAA AGG CCA ATC AGA AAT AGT GTT GAT GAG TTA AAT      4025
Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro Ile Arg Asn Ser Val Asp Glu Leu Asn
            120                 125                 130

AAC AAT GTG GAA GCT GTT TCC CAG ACC TCC TCT TCT TCC TTT CAG TAC      4073
Asn Asn Val Glu Ala Val Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser Phe Gln Tyr
        135                 140                 145

ATG TAT TTG CTG AAA GAC CTG TGG CAA AAG AGG CAG AAG CAA GTA AAA G    4122
Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Lys
    150                 155                 160

GTAGATATCC TTGTGCTTTC CATTCGATTT TCAGCTATAA AATTGGAACC GTTAGACTGC   4182
CACGAGAATG CATGGTTGTG AGAAGATTAA CATTTCTGGG TTAGTGAATA GCATTCATAC   4242
GCTTTTGGGC ACCTTCCCCT GCAACTTGCC AGATAAGCAC TATTCAGCTC TTATTCCCAG   4302
TCTGACATCA GCAAGTGTGA TTTTCTATGA AAAATTCTAC TATGACTCCT TATTTTAAGT   4362
ATACAAGAAA CTTGTGACTC AGAAGATAAT ATTTACAGAG TGGAAAAAAA CCCCTAGCAT   4422
TTATAGTTTT AACATTTGAG GTTTTGAATG AGAGAGTTAT CCATAATATA TTCAATTGTG   4482
TTGTGGATAA TGACACCTAA CCTGTGAATC TTGAGGTCAG AATGTTGAGT GCTGTTGACT   4542
TGGTGGTCAG GAAACAGCTA GTGCGTGAGC CTGGCACAGG CATCTCAGTG AGTAGCATAC   4602
CCACAGTTGG AAATTTTTCA AAGAAATCAA AGGAATCATG ACATCTTATA AATTTCAAGG   4662
TTCTGCTATA CTTATGTGAA ATGGATAAAT AAATCAAGCA TATCCACTCT GTAAGATTGA   4722
ACTTCTCAGA TGGAAGACCC CAATACTGCT TTCTCCTCTT TTCCCTCACC AAAGAAATAA   4782
ACAACCTATT TCATTTATTA CTGGACACAA TCTTTAGCGT ATACCTATGG TAAATTACTA   4842
GTATGGTGGT TAGGATTTAT GTTAATTTGT ATATGTCATG CGCCAAATCA TTTCCACTAA   4902
ATATGACTAT ATATCATAAC TGCTTGGTGA TAGCTCAGTG TTTAATAGTT TATTCTCAGA   4962
AAATCAAAAT TGTATAGTTA AATACATTAG TTTTATGAGG CAAAAATGCT AACTATTTCT   5022
ACATAATTTC ATTTTTCCAG AT AAT GAA AAT GTA GTC AAT GAG TAC TCC         5071
                    Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser
                        165                 170

TCA GAA CTG GAA AAG CAC CAA TTA TAT ATA GAT GAG ACT GTG AAT AGC     5119
Ser Glu Leu Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser
    175                 180                 185
```

```
AAT ATC CCA ACT AAC CTT CGT GTG CTT CGT TCA ATC CTG GAA AAC CTG          5167
Asn Ile Pro Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu
190                 195                 200                 205

AGA AGC AAA ATA CAA AAG TTA GAA TCT GAT GTC TCA GCT CAA ATG GAA          5215
Arg Ser Lys Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu
                210                 215                 220

TAT TGT CGC ACC CCA TGC ACT GTC AGT TGC AAT ATT CCT GTG GTG TCT          5263
Tyr Cys Arg Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser
            225                 230                 235

GGC AAA G GTAACTGATT CATAAACATA TTTTTAGAGA GTTCCAGAAG AACTCACACA         5320
Gly Lys

CCAAAAATAA GAGAACAACA ACAACAACAA AAATGCTAAG TGGATTTTCC CAACAGATCA        5380
TAATGACATT ACAGTACATC ATAAAAATAT CCTTAGCCAG TTGTGTTTTG GACTGGCCTG        5440
GTGCATTTGC TGGTTTTGAT GAGCAGGATG GGGCACAGGT AGTCCCAGGG GTGGCTGATG        5500
TGTGCATCTG CGTACTGGCT TGAACAGATG GCAGAACCAC AGATAGATGT AGAAGTTTCT        5560
CCATTTTGTG TGTTCTGGGA GCTCATGGAT ATTCCAGGAC ACAAAAGGTG GAGAAGAGCT        5620
TTGTTCATCC TCTTAGCAGA TAAACGTCCT CAAAACTGGG TTGGACTTAC TAAAGTAAAA        5680
TGAAAATCTA ATATTTGTTA TATTATTTTC AAAGGTCTAT AATAACACAC TCCTTAGTAA        5740
CTTATGTAAT GTTATTTTAA AGAATTGGTG ACTAAATACA AAGTAATTAT GTCATAAACC        5800
CCTGAACATA ATGTTGTCTT ACATTTGCAG AA TGT GAG GAA ATT ATC AGG AAA           5853
                                Glu Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys
                                240                 245

GGA GGT GAA ACA TCT GAA ATG TAT CTC ATT CAA CCT GAC AGT TCT GTC          5901
Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val
        250                 255                 260

AAA CCG TAT AGA GTA TAC TGT GAC ATG AAT ACA GAA AAT GGA G                5944
Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met Asn Thr Glu Asn Gly
    265                 270                 275

GTAAGCTTTC GACAGTTGTT GACCTGTTGA TCTGTAATTA TTTGGATACC GTAAAATGCC        6004
AGGAAACAAG GCCAGGTGTG GTGGCTCATA CCTGTAATTC CAGCACCTTG GGAGGCCAAA        6064
GTGGGCTGAT AGCTTGAGCC TAGGAGTTTG AAACTAGCCT GGGCAACATA ATGAGACCCT        6124
AACTCTACAA AAAAAAAAAA AATACCAAAA AAAAAAAAAA AATCAGCTGT GTTGGTAGTA        6184
TGTGCCTGTA GTCCCAGCTA TCCAGGAGGC TGAGATGGGA GATCACCTGA GCCCACAACC        6244
TGGAGTCTTG ATCATGCTAC TGAACTGTAG CCTGGGCAAC AGAGGATAGT GAGATCCTGT        6304
CTCAAAAAAA AAAATTAATT AAAAAGCCAG GAAACAAGAC TTAGCTCTAA CATCTAACAT        6364
AGCTGACAAA GGAGTAATTT GATGTGGAAT TCAACCTGAT ATTTAAAAGT TATAAAATAT        6424
CTATAATTCA CAATTTGGGG TAAGATAAAG CACTTGCAGT TTCCAAAGAT TTTACAAGTT        6484
TACCTCTCAT ATTTATTTCC TTATTGTGTC TATTTTAGAG CACCAAATAT ATACTAAATG        6544
GAATGGACAG GGGATTCAGA TATTATTTTC AAAGTGACAT TATTTGCTGT TGGTTAATAT        6604
ATGCTCTTTT TGTTTCTGTC AACCAAAG GA TGG ACA GTG ATT CAG AAC CGT             6655
                            Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg
                                    280                 285

CAA GAC GGT AGT GTT GAC TTT GGC AGG AAA TGG GAT CCA TAT AAA CAG          6703
Gln Asp Gly Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln
                290                 295                 300

GGA TTT GGA AAT GTT GCA ACC AAC ACA GAT GGG AAG AAT TAC TGT GGC          6751
Gly Phe Gly Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly
            305                 310                 315

CTA CCA G GTAACGAACA GGCATGCAAA ATAAAATCAT TCTATTTGAA ATGGGATTTT         6808
Leu Pro
```

```
TTTTAATTAA AAAACATTCA TTGTTGGAAG CCTGTTTTAG GCAGTTAAGA GGAGTTTCCT      6868
GACAAAAATG TGGAAGCTAA AGATAAGGGA AGAAAGGCAG TTTTTAGTTT CCCAAAATTT      6928
TATTTTTGGT GAGAGATTTT ATTTTGTTTT TCTTTTAG GT GAA TAT TGG CTT            6980
                                          Gly Glu Tyr Trp Leu
                                          320

GGA AAT GAT AAA ATT AGC CAG CTT ACC AGG ATG GGA CCC ACA GAA CTT        7028
Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly Pro Thr Glu Leu
325                 330                 335                 340

TTG ATA GAA ATG GAG GAC TGG AAA GGA GAC AAA GTA AAG GCT CAC TAT        7076
Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val Lys Ala His Tyr
                345                 350                 355

GGA GGA TTC ACT GTA CAG AAT GAA GCC AAC AAA TAC CAG ATC TCA GTG        7124
Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr Gln Ile Ser Val
            360                 365                 370

AAC AAA TAC AGA GGA ACA GCC GGT AAT GCC CTC ATG GAT GGA GCA TCT        7172
Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met Asp Gly Ala Ser
        375                 380                 385

CAG CTG ATG GGA GAA AAC AGG ACC ATG ACC ATT CAC AAC GGC ATG TTC        7220
Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His Asn Gly Met Phe
    390                 395                 400

TTC AGC ACG TAT GAC AGA GAC AAT GAC GGC TG GTATGTGTGG                  7262
Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp
405                 410                 415

CACTCTTTGC TCCTGCTTTA AAAATCACAC TAATATCATT ACTCAGAATC ATTAACAATA      7322
TTTTTAATAG CTACCACTTC CTGGGCACTT ACTGTCAGCC ACTGTCCTAA GCTCTTTATG      7382
CATCACTCGA AAGCATTTCA ACTATAAGGT AGACATTCTT ATTCTCATTT TACAGATGAG      7442
ATTTAGAGAG ATTACGTGAT TTGTCCAATG TCACACAACT ACCCAGAGAT AAAACTAGAA      7502
TTTGAGCACA GTTACTTTCT GAATAATGAG CATTTAGATA AATACCTATA TCTCTATATT      7562
CTAAAGTGTG TGTGAAAACT TTCATTTTCA TTTCCAGGGT TCTCTGATAC TAAGGGTTGT      7622
AAAAGCTATT ATTCCAGTAT AAAGTAACAA ACACAGTCCC TAGATGGATT GCCACAAAGG      7682
CCCAGTTATC TCTCTTTCTT GCTATAGGGC ACAGGAGGTC TTTGGTGTAT TAGTGTGACT      7742
CTATGTATAG CACCCAAAGG AAAGACTACT GTGCACACGA GTGTAGCAGT CTTTTATGGG      7802
TAATCTGCAA AACGTAACTT GACCACCGTA GTTCTGTTTC TAATAACGCC AAACACATTT      7862
TCTTTCAG G TTA ACA TCA GAT CCC AGA AAA CAG TGT TCT AAA GAA GAC          7910
          Leu Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp
                      420                 425

GGT GGT GGA TGG TGG TAT AAT AGA TGT CAT GCA GCC AAT CCA AAC GGC        7958
Gly Gly Gly Trp Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly
    430                 435                 440

AGA TAC TAC TGG GGT GGA CAG TAC ACC TGG GAC ATG GCA AAG CAT GGC        8006
Arg Tyr Tyr Trp Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly
445                 450                 455                 460

ACA GAT GAT GGT GTA GTA TGG ATG AAT TGG AAG GGG TCA TGG TAC TCA        8054
Thr Asp Asp Gly Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser
                465                 470                 475

ATG AGG AAG ATG AGT ATG AAG ATC AGG CCC TTC TTC CCA CAG CAA TAGTCCCCAA 8109
Met Arg Lys Met Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln
            480                 485                 490
```

```
TACGTAGATT TTTGCTCTTC TGTATGTGAC AACATTTTTG TACATTATGT TATTGGAATT      8169
TTCTTTCATA CATTATATTC CTCTAAAACT CTCAAGCAGA CGTGAGTGTG ACTTTTTGAA      8229
AAAAGTATAG GATAAATTAC ATTAAAATAG CACATGATTT TCTTTTGTTT TCTTCATTTC      8289
TCTTGCTCAC CCAAGAAGTA ACAAAAGTAT AGTTTTGACA GAGTTGGTGT TCATAATTTC      8349
AGTTCTAGTT GATTGCGAGA ATTTTCAAAT AAGGAAGAGG GGTCTTTTAT CCTTGTCGTA      8409
GGAAAACCAT GACGGAAAGG AAAAACTGAT GTTTAAAAGT CCACTTTTAA AACTATATTT      8469
ATTTATGTAG GATCTGTCAA AGAAAACTTC CAAAAAGATT TATTAATTAA ACCAGACTCT      8529
GTTGCAATAA GTTAATGTTT TCTTGTTTTG TAATCCACAC ATTCAATGAG TTAGGCTTTG      8589
CACTTGTAAG GAAGGAGAAG CGTTCACAAC CTCAAATAGC TAATAAACCG GTCTTGAATA      8649
TTTGAAGATT TAAAATCTGA CTCTAGGACG GGCACGGTGG CTCACGACTA TAATCCCAAC      8709
ACTTTGGGAG GCTGAGGCGG GCGGTCACAA GGTCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGACCAAT      8769
ATGGTGAAAC CCCATCTCTA CTAAAAATAC AAAAATTAGC CAGGCGTGGT GGCAGGTGCC      8829
TGTAGGTCCC AGCTAGCCTG TGAGGTGGAG ATTGCATTGA GCCAAGATC                  8878
```

(2) SEQ. ID No: 4 információi:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 491 aminosav

(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

```
Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys
 1               5                  10                  15

His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly
            20                  25                  30

Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro
        35                  40                  45

Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro
    50                  55                  60

Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala
65                  70                  75                  80

Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu
                85                  90                  95

His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Gln Leu
            100                 105                 110

Gln Glu Ala Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro Ile Arg Asn Ser Val Asp
        115                 120                 125

Glu Leu Asn Asn Asn Val Glu Ala Val Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser
    130                 135                 140

Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg Gln Lys
145                 150                 155                 160

Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser Glu Leu
                165                 170                 175

Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn Ile Pro
            180                 185                 190

Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys
        195                 200                 205
```

```
Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Arg
    210                 215                 220

Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu
225                 230                 235                 240

Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu
                245                 250                 255

Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met
            260                 265                 270

Asn Thr Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly
        275                 280                 285

Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly
    290                 295                 300

Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu Pro Gly
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly
                325                 330                 335

Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val
            340                 345                 350

Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr
        355                 360                 365

Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met
    370                 375                 380

Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His
385                 390                 395                 400

Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Leu
                405                 410                 415

Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp
            420                 425                 430

Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp
        435                 440                 445

Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly
    450                 455                 460

Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg Lys Met
465                 470                 475                 480

Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln
                485                 490
```

(2) SEQ. ID No: 5 információi:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 10 564 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: kétszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS (genomiális)
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: Humán fibrinogén gamma-lánc
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: kapcsolódik (1799...1876, 1973...2017, 2207...2390, 2510...2603, 4211...4341, 4645...4778, 5758...5942, 7426...7703, 9342...9571)
(xi) A szekvencia leírása: 5. számú szekvencia

```
CTACACACTT CTTGAAGGCA AAGGCAATGC TGAAGTCACC TTTCATGTTC AAATCATATT      60
AAAAAGTTAG CAAGATGTAA TTATCAGTGT ACTATGTAAA TCTTTGTGAA TGATCAATAA     120
TTACATATTT TCATTATATA TATTTTAGTA GATAATATTT ATATACATTC AACATTCTAA     180
ATATAGAAAG TTTACAGAGA AAAATAAAGC CTTTTTTTCC AATCCTGTCC TCCACCTCTG     240
CATCCCATTC TTCTTCACAG AGGCAACTGA TTCAAGTCAT TACATAGTTA TTGAGTGTTA     300
ACTACAACTA TGTTAAGTAC AGCTATATAT GTTAGATGCC GTAGCCACAG AAATCAGTTT     360
ACAATCTAAT GCAGTGGATA CAGCATGTAT ACATATAATA TAAGGTTGCT ACAAATGCTA     420
TCTGAGGTAG AGCTGTTTGA AAGAATACTA ATACTTAAAT GTTTAATTCA ACTGACTTGA     480
TTGACAACTG ATTAGCTGAG TGGAAAAGAT GGATGAGAAA GATTGTGAGA CTTAATTGGC     540
TGGTGGTATG GTGATATGAT TGACAATAAC TGCTAAGTCA GAGAGGGATA TATTAAGGAG     600
GAGAAGAAAA GCAACAAATC TGGTTTTGAT GTGTTCACTT TGTTATAATT ATTGATTATT     660
TACTGAATAT GAATATTTAT CTTTGTTTTT GAGTCAATAA ATATACCTTT GTAAAGACAG     720
AATTAAAGTA TTAGTATTTC TTTCAAACTG GAGGCATTTC TCCCACTAAC ATATTTCATC     780
AAAACTTATA ATAAGCTTGG TTCCAGAGGA AGAAATGAGG GATAACCAAA AATAGAGACA     840
TTAATAATAG TGTAACGCCC AGTGATAAAT CTCAATAGGC AGTGATGACA GACATGTTTT     900
CCCAAACACA AGGATGCTGT AAGGGCCAAA CAGAAATGAT GGCCCCTCCC CAGCACCTCA     960
TTTTGCCCCT TCCTTCAGCT ATGCCTCTAC TCTCCTTTAG ATACAAGGGA GGTGGATTTT    1020
TCTCTTCTCT GAGATAGCTT GATGGAACCA CAGGAACAAT GAAGTGGGCT CCTGGCTCTT    1080
TTCTCTGTGG CAGATGGGGT GCCATGCCCA CCTTCAGACA AAGGGAAGAT TGAGCTCAAA    1140
AGCTCCCTGA GAAGTGAGAG CCTATGAACA TGGTTGACAC AGAGGGACAG GAATGTATTT    1200
CCAGGGTCAT TCATTCCTGG GAATAGTGAA CTGGGACATG GGGGAAGTCA GTCTCCTCCT    1260
GCCACAGCCA CAGATTAAAA ATAATAATGT TAACTGATCC CTAGGCTAAA ATAATAGTGT    1320
TAACTGATCC CTAAGCTAAG AAAGTTCTTT TGGTAATTCA GGTGATGGCA GCAGGACCCA    1380
TCTTAAGGAT AGACTAGGTT TGCTTAGTTC GAGGTCATAT CTGTTTGCTC TCAGCCATGT    1440
ACTGGAAGAA GTTGCATCAC ACAGCCTCCA GGACTGCCCT CCTCCTCACA GCAATGGATA    1500
ATGCTTCACT AGCCTTTGCA GATAATTTTG GATCAGAGAA AAAACCTTGA GCTGGGCCAA    1560
AAAGGAGGAG CTTCAACCTG TGTGCAAAAT CTGGGAACCT GACAGTATAG GTTGGGGGCC    1620
AGGATGAGGA AAAAGGAACG GGAAAGACCT GCCCACCCTT CTGGTAAGGA GGCCCCGTGA    1680
TCAGCTCCAG CCATTTGCAG TCCTGGCTAT CCCAGGAGCT TACATAAAGG GACAATTGGA    1740
GCCTGAGAGG TGACAGTGCT GACACTACAA GGCTCGGAGC TCCGGGCACT CAGACATC      1798
ATG AGT TGG TCC TTG CAC CCC CGG AAT TTA ATT CTC TAC TTC TAT GCT       1846
Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala
  1               5                  10                  15

CTT TTA TTT CTC TCT TCA ACA TGT GTA GCA GTAAGTGTGC TCTTCACAAA        1896
Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala
            20                  25

ACGTTGTTTA AAATGGAAAG CTGGAAAATA AAACAGATAA TAAACTAGTG AAATTTTCGT    1956
ATTTTTTCTC TTTTAG TAT GTT GCT ACC AGA GAC AAC TGC TGC ATC TTA         2005
                Tyr Val Ala Thr Arg Asp Asn Cys Cys Ile Leu
                            30                  35

GAT GAA AGA TTC GTAAGTAGTT TTTATGTTTC TCCCTTTGTG TGTGAACTGG          2057
Asp Glu Arg Phe
        40

AGAGGGGCAG AGGAATAGAA ATAATTCCCT CATAAATATC ATCTGGCACT TGTAACTTTT    2117
TAAAAACATA GTCTAGGTTT TACCTATTTT TCTTAATAGA TTTTAAGAGT AGCATCTGTC    2177
TACATTTTTA ATCACTGTTA TATTTTCAG GGT AGT TAT TGT CCA ACT ACC TGT       2230
                            Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr Cys
                                        45
```

```
GGC ATT GCA GAT TTC CTG TCT ACT TAT CAA ACC AAA GTA GAC AAG GAT        2278
Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr Gln Thr Lys Val Asp Lys Asp
 50                  55                  60                  65

CTA CAG TCT TTG GAA GAC ATC TTA CAT CAA GTT GAA AAC AAA ACA TCA        2326
Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr Ser
                 70                  75                  80

GAA GTC AAA CAG CTG ATA AAA GCA ATC CAA CTC ACT TAT AAT CCT GAT        2374
Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro Asp
             85                  90                  95

GAA TCA TCA AAA CCA A GTGAGAAAAT AAAGACTACT GACCAAAAAA                  2420
Glu Ser Ser Lys Pro
        100

TAATAATAAT AATCTGTGAA GTTCTTTTGC TGTTGTTTTA GTTGTTCTAT TTGCTTAAGG      2480
ATTTTTATGT CTCTGATCCT ATATTACAG AT ATG ATA GAC GCT GCT ACT TTG          2532
                               Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu
                                       105                 110

AAG TCC AGG ATA ATG TTA GAA GAA ATT ATG AAA TAT GAA GCA TCG ATT        2580
Lys Ser Arg Ile Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile
                 115                 120                 125

TTA ACA CAT GAC TCA AGT ATT CG GTAAGGATTT TTGTTTTAAT TTGCTCTGCA        2633
Leu Thr His Asp Ser Ser Ile Arg
            130

AGACTGATTT AGTTTTTATT TAATATTCTA TACTTGAGTG AAAGTAATTT TTAATGTGTT      2693
TTCCCCATTT ATAATATCCC AGTGACATTA TGCCTGATTA TGTTGAGCAT AGTAGAGATA      2753
GAAGTTTTTA GTGCAATATA AATTATACTG GGTTATAATT GCTTATTAAT AATCACATTG      2813
AAGAAAGATG TTCTAGATGT CTTCAAATGC TAGTTTGACC ATATTTATCA AAAATTTTTT      2873
CCCCATCCCC CATTTATCTT ACAACATAAA ATCAATCTCA TAGGAATTTG GGTGTTGAAA      2933
ATAAAATCCT CTTTATAAAA ATGCTGACAA ATTGGTGGTT AAAAAAATTA GCAAGCAGAG      2993
GCATAGTAAG GATTTTGGCT CCTAAAGTAA ATTATATTGA ATGTGGAGCA GGAAGAAACA      3053
TGTCTTGAGA GACTAAGTGT GGCAAATATT GCAAAGCTCA TATTGATCAT TGCAGAATGA      3113
ACCTGCATAG TCTCTTCCCT TCATTTGGAA GTGAATGTCT CTGTTAAAGC TTCTCAGGGA      3173
CTCATAAACT TTCTGAACAT AAGGTCTCAG ATACAGTTTT AATATTTTTC CCCAATTTTT      3233
TTTTCTGAAT TTTTCTCAAA GCAGCTTGAG AAATTGAGAT AAATAGTAGC TAGGGAGAAG      3293
TGGCCCAGGA AAGATTTCTC CTCTTTTTGC TATCAGAGGG CCCTTGTTAT TATTGTTATT      3353
ATTATTACTT GCATTATTAT TGTCCATCAT TGAAGTTGAA GGAGGTTATT GTACAGAAAT      3413
TGCCTAAGAC AAGGTAGAGG GAAAACGTGG ACAAATAGTT TGTCTACCCT TTTTTACTTC      3473
AAAGAAAGAA CGGTTTATGC ATTGTAGACA GTTTTCTATC ATTTTTGGAT ATTTGCAAGC      3533
CACCCTGTAA GTAACTACAA AAGGAGGGTT TTTACTTCCC CCAGTCCATT CCCAAAGCTA      3593
TGTAACCAGA AGCATTAAAG AAGAAAGGGG AAGTATCTGT TGTTTTATTT TACATACAAT      3653
AACGTTCCAG ATCATGTCCC TGTGTAAGTT ATATTTTAGA TTGAAGCTTA TATGTATAGC      3713
CTCAGTAGAT CCACAAGTGA AAGGTATACT CCTTCAGCAC ATGTGAATTA CTGAACTGAG      3773
CTTTTCCTGC TTCTAAAGCA TCAGGGGGTG TTCCTATTAA CCAGTCTCGC CACTCTTGCA      3833
GGTTGCTATC TGCTGTCCCT TATGCATAAA GTAAAAAGCA AAATGTCAAT GACATTTGCT      3893
TATTGACAAG GACTTTGTTA TTTGTGTTGG GAGTTGAGAC AATATGCCCC ATTCTAAGTA      3953
AAAAGATTCA GGTCCACATT GTATTCCTGT TTTAATTGAT TTTTTGATTT GTTTTTCTTT      4013
TTCAAAAAGT TTATAATTTT AATTCATGTT AATTTAGTAA TATAATTTTA CATTTTCCTC      4073
AAGAATGGAA TAATTTATCA GAAAGCACTT CTTAAGAAAA TACTTAGCAG TTTCCAAAGA      4133
AAATATAAAA TTACTCTTCT GAAAGGAATA CTTATTTTTG TCTTCTTATT TTTGTTATCT      4193
TATGTTTCTG TTTGTAG A TAT TTG CAG GAA ATA TAT AAT TCA AAT AAT CAA        4244
                    Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn Gln
                    135                 140                 145
```

```
AAG ATT GTT AAC CTG AAA GAG AAG GTA GCC CAG CTT GAA GCA CAG TGC        4292
Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln Cys
                150                 155                 160

CAG GAA CCT TGC AAA GAC ACG GTG CAA ATC CAT GAT ATC ACT GGG AAA G      4341
Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly Lys
            165                 170                 175

GTAACTGATG AAGGTTATAT TGGGATTAGG TTCATCAAAG TAAGTAATGT AAAGGAGAAA      4401
GTATGTACTG GAAAGTATAG GAATAGTTTA GAAAGTGGCT ACCCATTAAG TCTAAGAATT      4461
TCAGTTGTCT AGACCTTTCT TGAATAGCTA AAAAAAACAG TTTAAAAGGA ATGCTGATGT      4521
GAAAAGTAAG AAAATTATTC TTGGAAAATG AATAGTTTAC TACATGTTAA AAGCTATTTT      4581
TCAAGGCTGG CACAGTCTTA CCTGCATTTC AAACCACAGT AAAAGTCGAT TCTCCTTCTC      4641
TAG AT TGT CAA GAC ATT GCC AAT AAG GGA GCT AAA CAG AGC GGG CTT          4688
   Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu
          180                 185                 190

TAC TTT ATT AAA CCT CTG AAA GCT AAC CAG CAA TTC TTA GTC TAC TGT        4736
Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys
        195                 200                 205

GAA ATC GAT GGG TCT GGA AAT GGA TGG ACT GTG TTT CAG AAG                 4778
Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys
    210                 215                 220

GTAATTTTTT CCCCACCATG TGTATTTAAT AAATTCCTAC ATTGTTTCTG CCATATGGCA      4838
GATACTTTTC TAAGCACCTT GTGAACCGTA GCTCATTTAA TCCTTGCAAT AGCCCTAAGA      4898
GGAAGGTACT TCTGTTACTC CTATTTACAG AAAAGGAAAC TGAGGCACAC AAGGTTAAAT      4958
AACTTGCCCA AGACCACATA ACTAATAAGC AACAGAGTCA GCATTTGAAC CTAGGCAGTA      5018
TAGTTTCAGA GTTTGTGACT TGACTCTATA TTGTACTGGC ACTGACTTTG TAGATTCATG      5078
GTGGCACATA ATCATAGTAC CACAGTGACA AATAAAAAGA AGGAAACTCT TTTGTCAGGT      5138
AGGTCAAGAC CTGAGGTTTC CCATCACAAG ATGAGGAAGC CCAACACCAC CCCCCACCAC      5198
CCCACCACCA TCACCACCCT TTCACACACC AGAGGATACA CTTGGGCTGC TCCAAGACAA      5258
GGAACCTGTG TTGCATCTGC CACTTGCTGA TACCCACTAG GAATCTTGGC TCCTTTACTT      5318
TCTGTTTACC TCCCACCACT GTTATAACTG TTTCTACAGG GGGCGCTCAG AGGGAATGAA      5378
TGGTGGAAGC ATTAGTTGCC AGACACCGAT TGAGCAATGG GTTCCATCAT AAGTGTAAGA      5438
ATCAGTAATA TCCAGCTAGA GTTCTGAAGT CGTCTAGGTG TCTTTTTAAT ATTACCACTC      5498
ATTTAGAATT TATGATGTGC CAGAAACCCT CTTAAGTATT TCTCTTATAT TCTCTCTCAT      5558
GATCCTTGCA GCAACCCTAA GAAGTAACCA TCATTTTTCC TATTTGATAC ATGAGGAAAC      5618
TGAGGTAGCT TGGCCAAGAT CACTTAGTTG GGAGTTGATA GAACCAGTGC TCTGTATTTT      5678
TGACAAAATG TTGACAGCAT TCTCTTTACA TGCATTGATA GTCTATTTTC TCCTTTTGCT      5738
CTTGCAAATG TGTAATTAG AGA CTT GAT GGC AGT GTA GAT TTC AAG AAA AAC        5790
                  Arg Leu Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn
                          225                 230

TGG ATT CAA TAT AAA GAA GGA TTT GGA CAT CTG TCT CCT ACT GGC ACA        5838
Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr
    235                 240                 245

ACA GAA TTT TGG CTG GGA AAT GAG AAG ATT CAT TTG ATA AGC ACA CAG        5886
Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln
250                 255                 260                 265

TCT GCC ATC CCA TAT GCA TTA AGA GTG GAA CTG GAA GAC TGG AAT GGC        5934
Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly
                270                 275                 280

AGA ACC AG GTACTGTTTT GAAATGACTT CCAACTTTTT ATTGTAAAGA                  5982
Arg Thr Ser
```

```
TTGCCTGGAA TGTGCACTTT CCAACTATCA ATAGACAATG GCAAATGCAG CCTGACAAAT      6042
GCAAACAGCA CATCCAGCCA CCATTTTCTC CAGGAGTCTG TTTGGTTCTT GGGCAATCCA      6102
AAAAGGTAAA TTCTATTCAG GATGAATCTA AGTGTATTGG TACAATCTAA TTACCCTGGA      6162
ACCATTCAGA GTAATAGCTA ATTACTGAAC TTTTAATCAG TCCCAGGAAT TGAGCATAAA      6222
ATTATAATTT TATCTAGTCT AAATTACTAT TTCATGAAGC AGGTATTATT ATTAATCCCA      6282
TTTTATAGAT TAACTTGCTC AAAGTCACAT TGCTGATAAG TGGTAGAGGT AGAATTCAGA      6342
CTCAAGTAGT TTAACTTTAG AGCCTGTCCT CTTAACAACT ATCCTGGTTG AAAAGCAAAT      6402
ACAGCCTCTT CAGACTTCTC AGTGCCTTGA TGGCCATTTA TTCTGTCAAA TCATGAGCTA      6462
CCCTAAAAGT AAACCAGCTA GCTCTTTTGA TGATCTAGAG GCTTCTTTTT GCTTGAGATA      6522
TTTGAAGGTT TTAAGCATTG TTACCTAATT AAAATGCAGA AAAATATCCA ACCCTCTTGT      6582
TATGTTTAAG GAATAGTGAA ATATATTGTC TTCAAACACA TGGACTTTTT TTTATTGCTT      6642
GGTTGGTTTT TAATCCAGAA AGTGCTATAG TCAGTAGACC TTCTTCTAGG AAAGGACCTT      6702
CCATTTCCCA GCCACTGGAG ATTAGAAAAT AAGCTAAATA TTTTCTGGAA ATTTCTGTTC      6762
ATTCATTAAG GCCCATCCTT TCCCCCACTC TATAGAAGTG TTGTCCACTT GCACAATTTT      6822
TTCCAGGAAA GAATCTCTCT AACTCCTTCA GCTCACATGC TTTGGACCAC ACAGGGAAGA      6882
CTTTGATTGT GTAATGCCCT CAGAAGCTCT CCTTCTTGCC ACTACCACAC TGATTTGAGG      6942
AAGAAAATCC CTTTAGCACC TAACCCTTCA GGTGCTATGA GTGGCTAATG GAACTGTACC      7002
TCCTTCAAGT TTTGTGCAAT AATTAAGGGT CACTCACTGT CAGATACTTT CTGTGATCTA      7062
TGATAATGTG TGTGCAACAC ATAACATTTC AATAAAAGTA GAAAATATGA AATTAGAGTC      7122
ATCTACACAT CTGGATTTGA TCTTAGAATG AAACAAGCAA AAAAGCATCC AAGTGAGTGC      7182
AATTATTAGT TTTCAGAGAT GCTTCAAAGG CTTCTAGGCC CATCCCGGGA AGTGTTAATG      7242
AGCTGTGGAC TGGTTCACAT ATCTATTGCC TCTTGCCAGA TTTGCAAAAA ACTTCACTCA      7302
ATGAGCAAAT TTCAGCCTTA AGAAACAAAG TCAAAAATTC CAAGGAAGCA TCCTACGAAA      7362
GAGGGAACTT CTGAGATCCC TGAGGAGGGT CAGCATGTGA TGGTTGTATT TCCTTCTTCT      7422
CAG T ACT GCA GAC TAT GCC ATG TTC AAG GTG GGA CCT GAA GCT GAC           7468
      Thr Ala Asp Tyr Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp
      285                 290                 295

AAG TAC CGC CTA ACA TAT GCC TAC TTC GCT GGT GGG GAT GCT GGA GAT      7516
Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp
    300                 305                 310

GCC TTT GAT GGC TTT GAT TTT GGC GAT GAT CCT AGT GAC AAG TTT TTC      7564
Ala Phe Asp Gly Phe Asp Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe
315                 320                 325                 330

ACA TCC CAT AAT GGC ATG CAG TTC AGT ACC TGG GAC AAT GAC AAT GAT      7612
Thr Ser His Asn Gly Met Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp
                335                 340                 345

AAG TTT GAA GGC AAC TGT GCT GAA CAG GAT GGA TCT GGT TGG TGG ATG      7660
Lys Phe Glu Gly Asn Cys Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met
            350                 355                 360

AAC AAG TGT CAC GCT GGC CAT CTC AAT GGA GTT TAT TAC CAA G            7703
Asn Lys Cys His Ala Gly His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln
        365                 370                 375

GTATGTTTTC CTTTCTTAGA TTCCAAGTTA ATGTATAGTG TATACTATTT TCATAAAAAA      7763
TAATAAATAG ATATGAAGAA ATGAAGAATA ATTTATAAAG ATAGTAGGGA TTTTATCATG      7823
TTCTTTATTT CAACTAAGTT CTTTGAAACT GGAAGTGGAT AATACCAAGT TCATGCCTAA      7883
AATTAGCCCT TCTAAAGAAA TCCACCTGCT GCAAAATATC CAGTAGTTTG GCATTATATG      7943
TGAAACTATC ACCATCATAG CTGGCACTGT GGGTTGTGGG ATCTCCTTTA GACATACAAC      8003
ATAAATGATC TGGATGGATT AACATTACTA CATGGATGCT TGTTGACACA TTAACCTGGC      8063
TTCCCATGAG CTTTGTGTCA GATACACGCA GTGAACAGGT GTTTGGAGGA ACAGAATAAA      8123
GAGAAGGCAA GCACTGGTAA GGGCAGGGGT TTGTGAAAGC TTGAGAGAAG AGACCAGTCT      8183
GAGGACAGTA GACACTTATT TTAGGATGGG GGTTGGATGA GGAGGCTATA GTTTGCTATA      8243
AGCTTGGAAT GGTTTGGAAC ACTGGTTTCA CTCACCTACC CAGCAGTTAT GTGTGGGGAA      8303
GCCTTACCGA TGCTAAAGGA TCCATGTTAC AATAATGGCA TTATTTGGAA ATCCCAGTGG      8363
TATTCCATGA ATAAAACCAC TATGAAGATA ATCCCACTCA ACAGACTCTC CGTTGGAGAA      8423
```

```
GGACAGCAAC ACCACCCTGG GAAAGCCAAA CAGTCAGACC AGACCTGTTT AGCATCAGTA      8483
GGACTTCCCT ACCATATCTG CTGGGTAGAT GAGTGAAACC AGTGTTCCAA ACCACTCCGG      8543
GCTTGTAGCA AACCATAGTC TCCTCATCTA CCAAGATGAG CAACCTTACC TCCTGATGTC      8603
CTAGCCAATC ACCAACTAGG AAACTTTGCA CAGTTTATTT AAAGTAACAG TTTGATTTTC      8663
ACAATATTTT TAAATTGGAG AAACATAACT TATCTTTGCA CTCACAAACC ACATAATGAG      8723
AAGAAACTCT AAGGGAAAAT GCTTGATCTG TGTGACCCGG GGCGCCATGC CAGAGCTGTA      8783
GTTCATGCCA GTGTTGTGCT CTGACAAGCC TTTTACAGAA TTACATGAGA TCTGCTTCCC      8843
TAGGACAAGG AGAAGGCAAA TCAACAGAGG CTGCACTTTA AAATGGAGAC ATAAAATAAC      8903
ATGCCAGAAC CATTTCCTAA AGCTCCTCAA TCAACCAACA AAATTGTGCT TTCAAATAAC      8963
CTGAGTTGAC CTCATCAGGA ATTTTGTGGC TCCTTCTCTT CTAACCTGCC TGAAGAAAGA      9023
TGGTCCACAG CAGCTGAGTC CGGGATGGAT AAGCTTAGGG ACAGAGGCCA ATTAGGGAAC      9083
TTTGGGTTTC TAGCCCTACT AGTAGTGAAT AAATTTAAAG TGTGGATGTG ACTATGAGTC      9143
ACAGCACAGA TGTTGTTTAA TAATATGTTT ATTTTATAAA TTGATATTTT AGGAATCTTT      9203
GGAGATATTT TCAGTTAGCA GATAATACTA TAAATTTTAT GTAACTGGCA ATGCACTTCG      9263
TAATAGACAG CTCTTCATAG ACTTGCAGAG GTAAAAAGAT TCCAGAATAA TGATATGTAC      9323
ATCTACGACT TGTTTTAG GT GGC ACT TAC TCA AAA GCA TCT ACT CCT AAT          9373
                  Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser Thr Pro Asn
                                  380                 385

GGT TAT GAT AAT GGC ATT ATT TGG GCC ACT TGG AAA ACC CGG TGG TAT        9421
Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr Arg Trp Tyr
        390                 395                 400

TCC ATG AAG AAA ACC ACT ATG AAG ATA ATC CCA TTC AAC AGA CTC ACA        9469
Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn Arg Leu Thr
    405                 410                 415

ATT GGA GAA GGA CAG CAA CAC CAC CTG GGG GGA GCC AAA CAG GTC AGA        9517
Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly Ala Lys Gln Val Arg
420                 425                 430                 435

CCA GAG CAC CCT GCG GAA ACA GAA TAT GAC TCA CTT TAC CCT GAG GAT        9565
Pro Glu His Pro Ala Glu Thr Glu Tyr Asp Ser Leu Tyr Pro Glu Asp
                440                 445                 450

GAT TTG TAGAAAATTA ACTGCTAACT TCTATTGACC CACAAAGTTT CAGAAATTCT         9621
Asp Leu

CTGAAAGTTT CTTCCTTTTT TCTCTTACTA TATTTATTGA TTTCAAGTCT TCTATTAAGG      9681
ACATTTAGCC TTCAATGGAA ATTAAAACTC ATTTAGGACT GTATTTCCAA ATTACTGATA      9741
TCAGAGTTAT TTAAAAATTG TTTATTTGAG GAGATAACAT TTCAACTTTG TTCCTAAATA      9801
TATAATAATA AAATGATTGA CTTTATTTGC ATTTTTATGA CCACTTGTCA TTTATTTTGT      9861
CTTCGTAAAT TATTTTCATT ATATCAAATA TTTTAGTATG TACTTAATAA AATAGGAGAA      9921
CATTTTAGAG TTTCAAATTC CCAGGTATTT TCCTTGTTTA TTACCCCTAA ATCATTCCTA      9981
TTTAATTCTT CTTTTTAAAT GGAGAAAATT ATGTCTTTTT AATATGGTTT TTGTTTTGTT     10 041
ATATATTCAC AGGCTGGAGA CGTTTAAAAG ACCGTTTCAA AAGAGATTTA CTTTTTTAAA     10 101
GGACTTTATC TGAACAGAGA GATATAATAT TTTTCCTATT GGACAATGGA CTTGCAAAGC     10 161
TTCACTTCAT TTTAAGAGCA AAAGACCCCA TGTTGAAAAC TCCATAACAG TTTTATGCTG     10 221
ATGATAATTT ATCTACATGC ATTTCAATAA ACCTTTTGTT TCCTAAGACT AGATACATGG     10 281
TACCTTTATT GACCATTAAA AAACCACCAC TTTTTGCCAA TTTACCAATT ACAATTGGGC     10 341
AACCATCAGT AGTAATTGAG TCCTCATTTT ATGCTAAATG TTATGCCTAA CTCTTTGGGA     10 401
GTTACAAAGG AAATAGCAAT TATGGCTTTT GCCCTCTAGG AGATACAGGA CAAATACAGG     10 461
AAAATACAGC AACCCAAACT GACAATACTC TATACAAGAA CATAATCACT AAGCAGGAGT     10 521
CACAGCCACA CAACCAAGAT GCATAGTATC CAAAGTGCAG CTG                       10 564
```

(2) SEQ. ID No: 6 információi:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 453 aminosav

(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 6. számú szekvencia

```
Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala
 1               5                  10                  15

Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp
            20                  25                  30

Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr
        35                  40                  45

Cys Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr Gln Thr Lys Val Asp Lys
    50                  55                  60

Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr
65                  70                  75                  80

Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro
                85                  90                  95

Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu Lys Ser
            100                 105                 110

Arg Ile Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile Leu Thr
        115                 120                 125

His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn
    130                 135                 140

Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln
145                 150                 155                 160

Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly
                165                 170                 175

Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu
            180                 185                 190

Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys
        195                 200                 205

Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu
    210                 215                 220

Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly
225                 230                 235                 240

Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn
                245                 250                 255

Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu
            260                 265                 270

Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg Thr Ser Thr Ala Asp Tyr
        275                 280                 285

Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr
    290                 295                 300

Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp Ala Phe Asp Gly Phe Asp
305                 310                 315                 320
```

```
Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe Thr Ser His Asn Gly Met
                325                 330                 335

Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp Lys Phe Glu Gly Asn Cys
            340                 345                 350

Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met Asn Lys Cys His Ala Gly
        355                 360                 365

His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
    370                 375                 380

Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr
385                 390                 395                 400

Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn
                405                 410                 415

Arg Leu Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly Ala Lys
            420                 425                 430

Gln Val Arg Pro Glu His Pro Ala Glu Thr Glu Tyr Asp Ser Leu Tyr
        435                 440                 445

Pro Glu Asp Asp Leu
    450
```

(2) SEQ. ID No: 7 információi:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 10 807 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: kétszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS (genomiális)

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: juh β-laktoglobulin

(xi) A szekvencia leírása: 7. számú szekvencia

```
ACGCGTGTCG ACCTGCAGGT CAACGGATCT CTGTGTCTGT TTTCATGTTA GTACCACACT      60
GTTTTGGTGG CTGTAGCTTT CAGCTACAGT CTGAAGTCAT AAAGCCTGGT ACCTCCAGCT     120
CTGTTCTCTC TCAAGATTGT GTTCTGCTGT TTGGGTCTTT AGTGTCTCCA CACAATTTTT     180
AGAATTGTTT GTTCTAGTTC TGTGAAAAAT GATGCTGGTA TTTTGATAAG GATTGCATTG     240
AATCTGTAAA GCTACAGATA TAGTCATTGG GTAGTACAGT CACTTTAACA ATATTAACTC     300
TTCACATCTG TGAGCATGAT ATATTTTCCC CCTCTATATC ATCTTCAATT CCTCCTATCA     360
GTTTCTTTCA TTGCAGTTTT CTGAGTACAG GTCTTACACC TCCTTGGTTA GAGTCATTCC     420
TCAGTATTTT ATTCCTTTGA TACAATTGTG AATGAGGTAA TTTTCTTAGT TTCTCTTTCT     480
GATAGCTCAT TGTTAGTGTA TATATAGAAA AGCAACAGAT TTCTATGTAT TAATTTTGTA     540
TCCTGCAACA GATTTCTATG TATTAATTTT GTATCCTGCT ACTTTACGGA ATTCACTTAT     600
TAGCTTTTTG GTGACATCTT GAGGATTTTC TGAAGAAAAT GGCATGGTAT GGTAGGACAA     660
GGTGTCATGT CATCTGCAAA CAGTGGCAGT TTTCCTTCTT CCCTTCCAAC CTGGATTTCT     720
TTGATTTCTT TCTGTCTGAG TACGACTAGG ATTCCCAATA CTATACCGAA TAAAAGTGGC     780
AAGAGTGGAC ATCCTTGTCT TATTTTTCTG ACCTTAGAGG AAATGCTTTC AGTTTTTCAC     840
CATTAATTAT AATGTTTACT GTGGGCTTGT CATATGTGGC CTTCATTATA TGGAGGTCTA     900
TTCCCTCTAT ACCCACCTTG TTGAGAGTTT TTATCATAAA AGTATGTTGA ATTTTGTCAA     960
AAGTTTTTCC TGCATCTATT GAGATGATTT TTACTCTTCA ATTCATTAAT GATTTTTATT    1020
CTTCATTTTG TTAATGATTT CCATTCTTCA ATTTGTTAAC GTGGTATATC ACATTGATTG    1080
ATTTGTGGAT ACCTTTGTAT CCCTGGGATA AACCTCACTT GATCATGAGC TTTCAATGTA    1140
TTTTTGAATT CACTTTGCTA ATATTCTGTT GGGTATTTTT GCATCTCTAT TCATCAATGA    1200
TATTGGCCTA AGAAAGGTTT TGTCTGGTTT TAGTATCAGG GTGATGCTGG CCTCATAGAG    1260
AGAGTTTAGA AGCATTTCCT CCTCTTTGAT TTTTCGGAAT AGTTTGAGTA GGATAGGTAT    1320
TAACTCTTCT TTAAATGTTT GGGGACTTCC CTGGTGAGCC GGTGGTTGAG AATCCGCCTC    1380
```

```
AGGGATGTGG GTTTGATCCC TGGTCAGGGA ACCATTAATA AGATCCCACA TGCTGCAGGC      1440
AACAAGCCCC CAAGCTGCAA CCACTGAGCT GCAACCGCTG CAGTGCCCAC AGGCCACGAC      1500
CAGAGAAAGC CCACATACAG CAGGGAAGAC CCAGCACAAC CGGAAAAAGG AGTTTGGTGG      1560
AATACAGCTG TGAAGCCGTC TGGTCCTGGA CTCCTGCTTG AGGGAATTTT TTAAAAATTA      1620
TTGATTCAAT TTCATTACTG GTAACTGGTC TGTTCATATT TTCTATTTCT TCCGGGTTCA      1680
GTCTTGGGAG ATTGTACATG CCTAGGAATG TGTCCGTTTC TTCTAGGTTG TCCATTTTAT      1740
TGGACATGCA TGGGAGCACA CAGCACCGAC CAGCGAGACT CATGCTGGCT TCCTGGGGCC      1800
AGGCTGGGGC CCCAAGCAGC ATGGCATCCT AGAGTGTGTG AAAGCCCACT GACCCTGCCC      1860
AGCCCCACAA TTTCATTCTG AGAAGTGATT CCTTGCTTCT GCACTTACAG GCCCAGGATC      1920
TGACCTGCTT CTGAGGAGCA GGGGTTTTGG CAGGACGGGG AGATGCTGAG AGCCGACGGG      1980
GGTCCAGGTC CCCTCCCAGG CCCCCCTGTC TGGGGCAGCC CTTGGGAAAG ATTGCCCCAG      2040
TCTCCCTCCT ACAGTGGTCA GTCCCAGCTG CCCCAGGCCA GAGCTGCTTT ATTTCCGTCT      2100
CTCTCTCTGG ATGGTATTCT CTGGAAGCTG AAGGTTCCTG AAGTTATGAA TAGCTTTGCC      2160
CTGAAGGGCA TGGTTTGTGG TCACGGTTCA CAGGAACTTG GGAGACCCTG CAGCTCAGAC      2220
GTCCCGAGAT TGGTGGCACC CAGATTTCCT AAGCTCGCTG GGGAACAGGG CGCTTGTTTC      2280
TCCCTGGCTG ACCTCCCTCC TCCCTGCATC ACCCAGTTCT GAAAGCAGAG CGGTGCTGGG      2340
GTCACAGCCT CTCGCATCTA ACGCCGGTGT CCAAACCACC CGTGCTGGTG TTCGGGGGGC      2400
TACCTATGGG GAAGGGCTTC TCACTGCAGT GGTGCCCCCC GTCCCCTCTG AGATCAGAAG      2460
TCCCAGTCCG GACGTCAAAC AGGCCGAGCT CCCTCCAGAG GCTCCAGGGA GGGATCCTTG      2520
CCCCCCCGCT GCTGCCTCCA GCTCCTGGTG CCGCACCCTT GAGCCTGATC TTGTAGACGC      2580
CTCAGTCTAG TCTCTGCCTC CGTGTTCACA CGCCTTCTCC CCATGTCCCC TCCGTGTCCC      2640
CGTTTTCTCT CACAAGGACA CCGGACATTA GATTAGCCCC TGTTCCAGCC TCACCTGAAC      2700
AGCTCACATC TGTAAAGACC TAGATTCCAA ACAAGATTCC AACCTGAAGT TCCCGGTGGA      2760
TGTGAGTTCT GGGGCGACAT CCTTCAACCC CATCACAGCT TGCAGTTCAT CGCAAAACAT      2820
GGAACCTGGG GTTTATCGTA AAACCCAGGT TCTTCATGAA ACACTGAGCT TCGAGGCTTG      2880
TTGCAAGAAT TAAAGGTGCT AATACAGATC AGGGCAAGGA CTGAAGCTGG CTAAGCCTCC      2940
TCTTTCCATC ACAGGAAAGG GGGGCCTGGG GGCGGCTGGA GGTCTGCTCC CGTGAGTGAG      3000
CTCTTTCCTG CTACAGTCAC CAACAGTCTC TCTGGGAAGG AAACCAGAGG CCAGAGAGCA      3060
AGCCGGAGCT AGTTTAGGAG ACCCCTGAAC CTCCACCCAA GATGCTGACC AGCCAGCGGG      3120
CCCCCTGGAA AGACCCTACA GTTCAGGGGG GAAGAGGGGC TGACCCGCCA GGTCCCTGCT      3180
ATCAGGAGAC ATCCCCGCTA TCAGGAGATT CCCCCACCTT GCTCCCGTTC CCCTATCCCA      3240
ATACGCCCAC CCCACCCCTG TGATGAGCAG TTTAGTCACT TAGAATGTCA ACTGAAGGCT      3300
TTTGCATCCC CTTTGCCAGA GGCACAAGGC ACCCACAGCC TGCTGGGTAC CGACGCCCAT      3360
GTGGATTCAG CCAGGAGGCC TGTCCTGCAC CCTCCCTGCT CGGGCCCCCT CTGTGCTCAG      3420
CAACACACCC AGCACCAGCA TTCCCGCTGC TCCTGAGGTC TGCAGGCAGC TCGCTGTAGC      3480
CTGAGCGGTG TGGAGGGAAG TGTCCTGGGA GATTTAAAAT GTGAGAGGCG GGAGGTGGGA      3540
GGTTGGGCCC TGTGGGCCTG CCCATCCCAC GTGCCTGCAT TAGCCCCAGT GCTGCTCAGC      3600
CGTGCCCCCG CCGCAGGGGT CAGGTCACTT TCCCGTCCTG GGGTTATTAT GACTCTTGTC      3660
ATTGCCATTG CCATTTTTGC TACCCTAACT GGGCAGCAGG TGCTTGCAGA GCCCTCGATA      3720
CCGACCAGGT CCTCCCTCGG AGCTCGACCT GAACCCCATG TCACCCTTGC CCCAGCCTGC      3780
AGAGGGTGGG TGACTGCAGA GATCCCTTCA CCCAAGGCCA CGGTCACATG GTTTGGAGGA      3840
GCTGGTGCCC AAGGCAGAGG CCACCCTCCA GGACACACCT GTCCCCAGTG CTGGCTCTGA      3900
CCTGTCCTTG TCTAAGAGGC TGACCCCGGA AGTGTTCCTG GCACTGGCAG CCAGCCTGGA      3960
CCCAGAGTCC AGACACCCAC CTGTGCCCCC GCTTCTGGGG TCTACCAGGA ACCGTCTAGG      4020
CCCAGAGGGG ACTTCCTGCT TGGCCTTGGA TGGAAGAAGG CCTCCTATTG TCCTCGTAGA      4080
GGAAGCCACC CCGGGGCCTG AGGATGAGCC AAGTGGGATT CCGGGAACCG CGTGGCTGGG      4140
GGCCCAGCCC GGGCTGGCTG GCCTGCATGC CTCCTGTATA AGGCCCCAAG CCTGCTGTCT      4200
CAGCCCTCCA CTCCCTGCAG AGCTCAGAAG CACGACCCCA GGGATATCCC TGCAGCCATG      4260
AAGTGCCTCC TGCTTGCCCT GGGCCTGGCC CTCGCCTGTG GCGTCCAGGC CATCATCGTC      4320
ACCCAGACCA TGAAAGGCCT GGACATCCAG AAGGTTCGAG GGTTGGCCGG GTGGGTGAGT      4380
TGCAGGGCGG GCAGGGGAGC TGGGCCTCAG AGAGCCAAGA GAGGCTGTGA CGTTGGGTTC      4440
CCATCAGTCA GCTAGGGCCA CCTGACAAAT CCCCGCTGGG GCAGCTTCAA CCAGGCGTTC      4500
ACTGTCTTGC ATTCTGGAGG CTGGAAGCCC AAGATCCAGG TGTTGGCAGG GCTGGCTTCT      4560
CCTGCGGCCG CTCTCTGGGG AGCAGACGGC CGTCTTCTCC AGTCCTCTGC GCGCCCTGAT      4620
TTCCTCTTCC TGTGAGGCCA CCAGGCCTGC TGGAAACACG CCTGCCTGCG CAGCTTCACA      4680
CGACCTTTGT CATCTCTTTA AAGGCCATGT CTCCAGAGTC ATGTGTTGAA GTTCTGGGGG      4740
TTAGTGGGAC ACAGTTCAGC CCCTAAAAGA GTCTCTCTGC CCCTCAAATT TTCCCCACCT      4800
CCAGCCATGT CTCCCCAAGA TCCAAATGTT GCTACATGTG GGGGGGCTCA TCTGGGTCCC      4860
TCTTTGGGTT CAGTGTGAGT CTGGGGAGAG CATTCCCCAG GGTGCAGAGT TGGGGGGAGT      4920
ATCTCAGGGC TGCCCAGGCC GGGGTGGGAC AGAGAGCCCA CTGTGGGGCT GGGGGCCCCT      4980
```

```
TCCCACCCCC AGAGTGCAAC TCAAGGTCCC TCTCCAGGTG GCGGGGACTT GGCACTCCTT    5040
GGCTATGGCG GCCAGCGACA TCTCCCTGCT GGATGCCCAG AGTGCCCCCC TGAGAGTGTA    5100
CGTGGAGGAG CTGAAGCCCA CCCCCGAGGG CAACCTGGAG ATCCTGCTGC AGAAATGGTG    5160
GGCGTCTCTC CCCAACATGG AACCCCCACT CCCCAGGGCT GTGGACCCCC CGGGGGGTGG    5220
GGTGCAGGAG GGACCAGGGC CCCAGGGCTG GGGAAGAGGG CTCAGAGTTT ACTGGTACCC    5280
GGCGCTCCAC CCAAGGCTGC CCACCCAGGG CTTTTTTTTT TTTTAAACTT TTATTAATTT    5340
GATGCTTCAG AACATCATCA AACAAATGAA CATAAAACAT TCATTTTTGT TTACTTGGAA    5400
GGGGAGATAA AATCCTCTGA AGTGGAAATG CATAGCAAAG ATACATACAA TGAGGCAGGT    5460
ATTCTGAATT CCCTGTTAGT CTGAGGATTA CAAGTGTATT TGAGCAACAG AGAGACATTT    5520
TCATCATTTC TAGTCTGAAC ACCTCAGTAT CTAAAATGAA CAAGAAGTCC TGGAAACGAA    5580
GCAGTGTGGG GATAGGCCCG TGTGAAGGCT GCTGGGAGGC AGCAGACCTG GGTCTTCGGG    5640
CTCAAGCAGT TCCCGCTACC AGCCCTGTCC ACCTCAGACG GGGGTCAGGG TGCAGGAGAG    5700
AGCTGGATGG GTGTGGGGGC AGAGATGGGG ACCTGAACCC CAGGGCTGCC TTTTGGGGGT    5760
GCCTGTGGTC AAGGCTCTCC CTGACCTTTT CTCTCTGGCT TCATCTGACT TCTCCTGGCC    5820
CATCCACCCG GTCCCCTGTG GCCTGAGGTG ACAGTGAGTG CGCCGAGGCT AGTTGGCCAG    5880
CTGGCTCCTA TGCCCATGCC ACCCCCCTCC AGCCCTCCTG GGCCAGCTTC TGCCCCTGGC    5940
CCTCAGTTCA TCCTGATGAA AATGGTCCAT GCCAATGGCT CAGAAAGCAG CTGTCTTTCA    6000
GGGAGAACGG CGAGTGTGCT CAGAAGAAGA TTATTGCAGA AAAAACCAAG ATCCCTGCGG    6060
TGTTCAAGAT CGATGGTGAG TCCGGGTCCC TGGGGGACAC CCACCACCCC CGCCCCCGGG    6120
GACTGTGGAC AGGTTCAGGG GGCTGGCGTC GGGCCCTGGG ATGCTAAGGG ACTGGTGGTG    6180
ATGAAGACAC TGCCTTGACA CCTGCTTCAC TTGCCTCCCC TGCCACCTGC CCGGGGCCTT    6240
GGGGCGGTGG CCATGGGCAG GTCCCGGCTG GCGGGCTAAC CCACCAGGGT GACACCCGAG    6300
CTCTCTTTGC TGGGGGGCGG GCGGTGCTCT GGGCCCTCAG GCTGAGCTCA GGAGGTACCT    6360
GTGCCCTCCC AGGGGTAACC GAGAGCCGTT GCCCACTCCA GGGGCCCAGG TGCCCCACGA    6420
CCCCAGCCCG CTCCACAGCT CCTTCATCTC CTGGAGACAA ACTCTGTCCG CCCTCGCTCA    6480
TTCACTTGTT CGTCCTAAAT CCGAGATGAT AAAGCTTCGA GGGGGGGTTG GGGTTCCATC    6540
AGGGCTGCCC TTCCGCCGGG CAGCCTGGGC CACATCTGCC CTTGGCCCCC TCAGGACTCA    6600
CTCTGACTGG AGGCCCTGCA CTGACTGACG CCAGGGTGCC CAGCCCAGGG TCTCTGGCGC    6660
CATCCAGCTG CACTGGGTTT GGGTGCTGGT CCTGCCCCCA AGCTGCCCGG ACACCACAGG    6720
CAGCCGGGGC TGCCCACTGG CCTCGGTCAG GGTGAGCCCC AGCTGCCCCC GCTCAGGGCT    6780
TGCCCCGACA ATGACCCCAT CCTCAGGACG CACCCCCCTT CCCTTGCTGG GCAGTGTCCA    6840
GCCCCACCCG AGATCGGGGG AAGCCCTATT TCTTGACAAC TCCAGTCCCT GGGGGAGGGG    6900
GCCTCAGACT GAGTGGTGAG TGTTCCCAAG TCCAGGAGGT GGTGGAGGGT CCTGGCGGAT    6960
CCAGAGTTGA CAGTGAGGGC TTCCTGGGCC CCATGCGCCT GGCAGTGGCA GCAGGGAAGA    7020
GGAAGCACCA TTTCAGGGGT GGGGGATGCC AGAGGCGCTC CCCACCCCGT CTTCGCCGGG    7080
TGGTGACCCC GGGGGAGCCC CGCTGGTCGT GGAGGGTGCT GGGGGCTGAC TAGCAACCCC    7140
TCCCCCCCCG TTGGAACTCA CTTTTCTCCC GTCTTGACCG CGTCCAGCCT TGAATGAGAA    7200
CAAAGTCCTT GTGCTGGACA CCGACTACAA AAAGTACCTG CTCTTCTGCA TGGAAAACAG    7260
TGCTGAGCCC GAGCAAAGCC TGGCCTGCCA GTGCCTGGGT GGGTGCCAAC CCTGGCTGCC    7320
CAGGGAGACC AGCTGCGTGG TCCTTGCTGC AACAGGGGGT GGGGGGTGGG AGCTTGATCC    7380
CCAGGAGGAG GAGGGGTGGG GGGTCCCTGA GTCCCGCCAG GAGAGAGTGG TCGCATACCG    7440
GGAGCCAGTC TGCTGTGGGC CTGTGGGTGG CTGGGGACGG GGGCCAGACA CACAGGCCGG    7500
GAGACGGGTG GGCTGCAGAA CTGTGACTGG TGTGACCGTC GCGATGGGGC CGGTGGTCAC    7560
TGAATCTAAC AGCCTTTGTT ACCGGGGAGT TTCAATTATT TCCCAAAATA AGAACTCAGG    7620
TACAAAGCCA TCTTTCAACT ATCACATCCT GAAAACAAAT GGCAGGTGAC ATTTTCTGTG    7680
CCGTAGCAGT CCCACTGGGC ATTTTCAGGG CCCCTGTGCC AGGGGGGCGC GGGCATCGGC    7740
GAGTGGAGGC TCCTGGCTGT GTCAGCCGGC CCAGGGGGAG GAAGGGACCC GGACAGCCAG    7800
AGGTGGGGGG CAGGCTTTCC CCCTGTGACC TGCAGACCCA CTGCACTGCC CTGGGAGGAA    7860
GGGAGGGGAA CTAGGCCAAG GGGGAAGGGC AGGTGCTCTG GAGGGCAAGG GCAGACCTGC    7920
AGACCACCCT GGGGAGCAGG GACTGACCCC CGTCCCTGCC CCATAGTCAG GACCCCGGAG    7980
GTGGACAACG AGGCCCTGGA GAAATTCGAC AAAGCCCTCA AGGCCCTGCC CATGCACATC    8040
CGGCTTGCCT TCAACCCGAC CCAGCTGGAG GGTGAGCACC CAGGCCCCGC CCTTCCCCAG    8100
GGCAGGAGCC ACCCGGCCCC GGGACGACCT CCTCCCATGG TGACCCCCAG CTCCCCAGGC    8160
CTCCCAGGAG GAAGGGGTGG GGTGCAGCAC CCCGTGGGGG CCCCCTCCCC ACCCCCTGCC    8220
AGGCCTCTCT TCCCGAGGTG TCCAGTCCCA TCCTGACCCC CCCATGACTC TCCCTCCCCC    8280
ACAGGGCAGT GCCACGTCTA GGTGAGCCCC TGCCGGTGCC TCTGGGGTAA GCTGCCTGCC    8340
CTGCCCCACG TCCTGGGCAC ACACATGGGG TAGGGGGTCT TGGTGGGGCC TGGGACCCCA    8400
CATCAGGCCC TGGGGTCCCC CCTGTGAGAA TGGCTGGAAG CTGGGGTCCC TCCTGGCGAC    8460
TGCAGAGCTG GCTGGCCGCG TGCCACTCTT GTGGGTGACC TGTGTCCTGG CCTCACACAC    8520
TGACCTCCTC CAGCTCCTTC CAGCAGAGCT AAGGCTAAGT GAGCCAGAAT GGTACCTAAG    8580
```

```
GGGAGGCTAG CGGTCCTTCT CCCGAGGAGG GGCTGTCCTG GAACCACCAG CCATGGAGAG      8640
GCTGGCAAGG GTCTGGCAGG TGCCCCAGGA ATCACAGGGG GGCCCCATGT CCATTTCAGG      8700
GCCCGGGAGC CTTGGACTCC TCTGGGGACA GACGACGTCA CCACCGCCCC CCCCCCATCA      8760
GGGGGACTAG AAGGGACCAG GACTGCAGTC ACCCTTCCTG GGACCCAGGC CCCTCCAGGC      8820
CCCTCCTGGG GCTCCTGCTC TGGGCAGCTT CTCCTTCACC AATAAAGGCA TAAACCTGTG      8880
CTCTCCCTTC TGAGTCTTTG CTGGACGACG GGCAGGGGGT GGAGAAGTGG TGGGGAGGGA      8940
GTCTGGCTCA GAGGATGACA GCGGGGCTGG GATCCAGGGC GTCTGCATCA CAGTCTTGTG      9000
ACAACTGGGG GCCCACACAC ATCACTGCGG CTCTTTGAAA CTTTCAGGAA CCAGGGAGGG      9060
ACTCGGCAGA GACATCTGCC AGTTCACTTG GAGTGTTCAG TCAACACCCA AACTCGACAA      9120
AGGACAGAAA GTGGAAAATG GCTGTCTCTT AGTCTAATAA ATATTGATAT GAAACTCAAG      9180
TTGCTCATGG ATCAATATGC CTTTATGATC CAGCCAGCCA CTACTGTCGT ATCAACTCAT      9240
GTACCCAAAC GCACTGATCT GTCTGGCTAA TGATGAGAGA TTCCCAGTAG AGAGCTGGCA      9300
AGAGGTCACA GTGAGAACTG TCTGCACACA CAGCAGAGTC CACCAGTCAT CCTAAGGAGA      9360
TCAGTCCTGG TGTTCATTGG AGGACTGATG TTGAAGCTGA AACTCCAATG CTTTGGCCAC      9420
CTGATGTGAA GAGCTGACTC ATTTGAAAAG ACCCTGATGC TGGGAAAGAT TGAGGGCAGG      9480
AGGAGAAGGG GACGACAGAG GATGAGATGG TTGGATGGCA TCACCAACAC AATGGACATG      9540
GGTTTGGGTG GACTCCAGGA GTTGGTGATG GACAGGGAGG CCTGGCGTGC TACGGAAGCG      9600
GTTTATGGGG TCACAAAGAC TGAGTGACTG AACTGAGCTG AACTGAATGG AAATGAGGTA      9660
TACAGCAAAG TGGGGATTTT TTAGATAATA AGAATATACA CATAACATAG TGTATACTCA      9720
TATTTTTATG CATACCTGAA TGCTCAGTCA CTCAGTCGTA TCTGACTCTG TGACCTATGG      9780
ACCGTAGCCT TCCAGGTTTC TTCTGTCCAC AGAATTCTCC AAGGCAAGAA TACTGGAGTG      9840
GGTAGCCATT TCCTCCTCCA GGGGATCCTC CCGACCCAGG GATTGAACCG GCATCTCCTG      9900
TATTGGCAGG TGGATTCTTT ACCACTGTGC CACCAGGGAA GCCCGTGTTA CTCTCTATGT      9960
CCCACTTAAT TACCAAAGCT GCTCCAAGAA AAAGCCCCTG TGCCCTCTGA GCTTCCCGGC    10 020
CTGCAGAGGG TGGTGGGGGT AGACTGTGAC CTGGGAACAC CCTCCCGCTT CAGGACTCCC    10 080
GGGCCACGTG ACCCACAGTC CTGCAGACAG CCGGGTAGCT CTGCTCTTCA AGGCTCATTA    10 140
TCTTTAAAAA AAACTGAGGT CTATTTTGTG ACTTCGCTGC CGTAACTTCT GAACATCCAG    10 200
TGCGATGGAC AGGACCTCCT CCCCAGGCCT CAGGGGCTTC AGGGAGCCAG CCTTCACCTA    10 260
TGAGTCACCA GACACTCGGG GGTGGCCCCG CCTTCAGGGT GCTCACAGTC TTCCCATCGT    10 320
CCTGATCAAA GAGCAAGACC AATGACTTCT TAGGAGCAAG CAGACACCCA CAGGACACTG    10 380
AGGTTCACCA GAGCTGAGCT GTCCTTTTGA ACCTAAAGAC ACACAGCTCT CGAAGGTTTT    10 440
CTCTTTAATC TGGATTTAAG GCCTACTTGC CCCTCAAGAG GGAAGACAGT CCTGCATGTC    10 500
CCCAGGACAG CCACTCGGTG GCATCCGAGG CCACTTAGTA TTATCTGACC GCACCCTGGA    10 560
ATTAATCGGT CCAAACTGGA CAAAAACCTT GGTGGGAAGT TTCATCCCAG AGGCCTCAAC    10 620
CATCCTGCTT TGACCACCCT GCATCTTTTT TTCTTTTATG TGTATGCATG TATATATATA    10 680
TATATATTTT TTTTTTTTTC ATTTTTTGGC TGTGCTGGCT GTTCGTTGCA GTTCGGTGCG    10 740
CAGGCTTCTC TCTAGTTTCT CTCTAGTCTT CTCTTATCAC AGAGCAGTCT CTAGACGATC    10 800
GACGCGT                                                              10 807
```

(2) SEQ. ID No: 8 információi:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 47 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(xi) A szekvencia leírása: 8. számú szekvencia

```
AATTCCGATC GACGCGTCGA CGATATACTC TAGACGATCG ACGCGTA                    47
```

(2) SEQ. ID No: 9 információi:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: BLGAMP3

(xi) A szekvencia leírása: 9. számú szekvencia

```
TGGATCCCCT GCCGGTGCCT CTGG                                            24
```

(2) SEQ. ID No: 10 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 24 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: BLGAMP4
(xi) A szekvencia leírása: 10. számú szekvencia

AACGCGTCAT CCTCTGTGAG CCAG 24

(2) SEQ. ID No: 11 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 10 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6839
(xi) A szekvencia leírása: 11. számú szekvencia

ACTACGTAGT 10

(2) SEQ. ID No: 12 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 42 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6632
(xi) A szekvencia leírása: 12. számú szekvencia

CGACGCGGAT CCTACGTACC TGCAGCCATG TTTTCCATGA GG 42

(2) SEQ. ID No: 13 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 21 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6627
(xi) A szekvencia leírása: 13. számú szekvencia

AGGGCTTCGG CAAGCTTCAG G 21

(2) SEQ. ID No: 14 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 24 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6521
(xi) A szekvencia leírása: 14. számú szekvencia

GCCAAAGACT TACTTCCCTC TAGA 24

(2) SEQ. ID No: 15 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 30 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6520
(xi) A szekvencia leírása: 15. számú szekvencia
GCATGAACGT CGCGTGGTGG TTGTGCTACC 30

(2) SEQ. ID No: 16 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 30 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6519
(xi) A szekvencia leírása: 16. számú szekvencia
ACCACGCGAC GTTCATGCTC TAAAACCGTT 30

(2) SEQ. ID No: 17 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 36 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6518
(xi) A szekvencia leírása: 17. számú szekvencia
GCTGCGGGAT CCTACGTACT AGGGGGACAG GGAAGG 36

(2) SEQ. ID No: 18 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 45 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6629
(xi) A szekvencia leírása: 18. számú szekvencia
CGACGCGAAT TCTACGTACC TGCAGCCATG AAAAGGATGG TTTCT 45

(2) SEQ. ID No: 19 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 45 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6630
(xi) A szekvencia leírása: 19. számú szekvencia
CGACGCGAAT TCTACGTACC TGCAGCCATG AAACATCTAT TATTG 45

(2) SEQ. ID No: 20 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 21 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6625
(xi) A szekvencia leírása: 20. számú szekvencia
GTGAGATTTT CAGTCTTGT C 21

(2) SEQ. ID No: 21 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 21 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6626
(xi) A szekvencia leírása: 21. számú szekvencia

AAGAATTACT GTGGCCTACC A 21

(2) SEQ. ID No: 22 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 33 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6624
(xi) A szekvencia leírása: 22. számú szekvencia

GCTGCGGAAT TCTACGTACT ATTGCTGTGG GAA 33

(2) SEQ. ID No: 23 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 45 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6514
(xi) A szekvencia leírása: 23. számú szekvencia

CGACGCGGAT CCTACGTACC TGCAGCCATG AGTTGGTCCT TGCAC 45

(2) SEQ. ID No: 24 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 21 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6517
(xi) A szekvencia leírása: 24. számú szekvencia

GTCTCTGGTA GCAACATACT A 21

(2) SEQ. ID No: 25 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 22 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6516
(xi) A szekvencia leírása: 25. számú szekvencia

GGGTTTCTAG CCCTACTAGT AG 22

(2) SEQ. ID No: 26 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 22 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris
(vii) Közvetlen forrás:
(B) Klón: ZC6515
(xi) A szekvencia leírása: 26. számú szekvencia
GGGTTTCTAG CCCTACTAGT AG 22

(2) SEQ. ID No: 27 információi:
(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 47 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(xi) A szekvencia leírása: 27. számú szekvencia
AAGCTACGCG TCGATCGTCT AGAGTATATC GTCGACGCGT CGATCGG 47

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás fibrinogén előállítására, *azzal jellemezve,* hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

előállítunk egy első DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén Aα-lánchoz működés szempontjából hozzákapcsolt szekréciós szignált kódol, majd egy második DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén Bβ-lánchoz működés szempontjából hozzákapcsolt szekréciós szignált kódol, majd egy harmadik DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén γ-lánchoz működés szempontjából hozzákapcsolt szekréciós szignált kódol, és mind az első, mind a második, mind a harmadik szegmenst működés szempontjából további olyan DNS-szegmensekhez kapcsoljuk, amelyek ahhoz szükségesek, hogy egy nőstény gazdaszervezet emlőmirigyében expresszálódjanak;

a DNS-szegmenseket egy nem humán emlősfaj megtermékenyített petesejtjébe juttatjuk be;

a faj egy nőstényе méhébe vagy petevezetékébe juttatjuk a petesejtet, hogy a DNS-konstrukciót hordozó utódokat kapjunk;

az utódokat tenyésztjük, így olyan nőstény utódokat kapunk, amelyek expresszálják az első, a második és harmadik DNS-szegmenst, és olyan tejet termelnek, amely a szegmensek által kódolt biológiailag aktív fibrinogént tartalmazza;

a nőstény utódok által termelt tejet összegyűjtjük; és kinyerjük a fibrinogént a tejből.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett fajt a birka, sertés, kecske és szarvasmarha állatcsoportból választjuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy mind az első, mind a második, mind a harmadik DNS-szegmens egy intront tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett első, második és harmadik DNS-szegmensek mólaránya a 0,5–1:0,5–1:0,5–1 tartományban van.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy mind az első, mind a második, mind a harmadik DNS-szegmenst működés szempontjából egy, az alábbi csoportba tartozó transzkripciós promoterhez kapcsoljuk: kazein, β-laktoglobulin, α-laktalbumin és tejsavó savas gén promoter.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett első, második és harmadik DNS-szegmenst a β-laktoglobulin promoter vezérlésével expresszáljuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett bejuttatási lépés során az említett első, második és harmadik DNS-szegmenst az említett megtermékenyített petesejt pronukleuszába injekciózzuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett fibrinogén humán fibrinogén.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett második DNS-szegmens a 3. számú szekvenciavázlaton látható nukleotidok közül a 470–8100 nukleotidok közötti nukleotidokat tartalmazza.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett második DNS-szegmens a 3. számú szekvenciavázlaton látható nukleotidok közül az 512–8100 nukleotidok közötti nukleotidokat tartalmazza.

11. Eljárás fibrinogén előállítására, *azzal jellemezve,* hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

egy első, szekréciós szignált kódoló DNS-szegmenst, amely működés szempontjából a fibrinogén Aα-láncához van kapcsolva, egy β-laktoglobulin génbe viszünk be, ezzel előállítva egy első génfúziót;

egy második, szekréciós szignált kódoló DNS-szegmenst, amely működés szempontjából a fibrinogén Bβ-láncához van kapcsolva, egy β-laktoglobulin génbe viszünk be, ezzel előállítva egy második génfúziót;

egy harmadik, szekréciós szignált kódoló DNS-szegmenst, amely működés szempontjából a fibrinogén γ-láncához van kapcsolva, egy β-laktoglobulin génbe viszünk be, ezzel előállítva egy harmadik génfúziót;

az első, második és harmadik génfúziós konstrukciót nem humán emlős szaporító sejtvonalába juttatjuk be, és így a DNS-szegmensek expresszálódnak az emlős vagy nőstény utóda emlőmirigyében, és bioló-

giailag aktív fibrinogén szekretálódik az emlős vagy nőstény utóda tejébe;

tejet termelünk az emlőssel vagy nőstény utódával; és

kinyerjük a fibrinogént a tejből.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett emlős birka, sertés, kecske vagy szarvasmarha.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy mind az első, mind a második, mind a harmadik génfúzió tartalmaz intront.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy mind az első, mind a második, mind a harmadik bejuttatott génfúzió mólaránya a 0,5–1:0,5–1:0,5–1 tartományban van.

15. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett bejuttatási lépés során az említett első, második és harmadik génfúziót egy megtermékenyített petesejt pronukleuszába juttatjuk be, majd az említett petesejtet egy álterhes nőstény petevezetékébe juttatjuk be, ezzel olyan nőstény utódokat állítva elő, amelyek szaporítóanyagukban hordozzák az említett génfúziókat.

16. Eljárás fibrinogén előállítására, *azzal jellemezve,* hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

létrehozunk egy nem humán emlős transzgenikus nőstényt, amely a genetikai anyagában Aα, Bβ és γ fibrinogén láncot kódoló heterológ DNS-szegmenseket hordoz, és a DNS-szegmensek az emlős emlőmirigyében expresszálódnak, majd a DNS-szegmensek által kódolt fibrinogén az emlős tejében expresszálódik;

összegyűjtjük az emlős által termelt tejet; és

kinyerjük a fibrinogént a tejből.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett emlős birka, sertés, kecske vagy szarvasmarha.

18. Nem humán emlősembrió, amely a sejtmagjában fibrinogén Aα-, Bβ- és γ-láncokat kódoló heterológ DNS-szegmenseket tartalmaz.

19. Transzgenikus nem humán nőstény, amely a tejében kinyerhető mennyiségben termel humán fibrinogént.

20. Eljárás egy nem humán emlős transzgenikus utódainak előállítására, *azzal jellemezve,* hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

előállítunk egy első DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén Aα-láncot kódol, majd egy második DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén Bβ-láncot kódol, majd egy harmadik DNS-szegmenst, amely egy fibrinogén γ-láncot kódol, és mind az első, mind a második, mind a harmadik szegmenst működés szempontjából további olyan DNS-szegmensekhez kapcsoljuk, amelyek ahhoz szükségesek, hogy egy nőstény gazdaszervezet emlőmirigyében expresszálódjanak, és az említett nőstény gazdaszervezet tejébe szekretálódjanak;

a DNS-szegmenseket egy nem humán emlősfaj megtermékenyített petesejtjébe juttatjuk be;

a faj egy nősténye méhébe vagy petevezetékébe juttatjuk a petesejtet, hogy az említett első, második és harmadik DNS-konstrukciót hordozó utódokat kapjunk.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett utód nőstény.

22. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett utód hím.

23. A 20. igénypont szerint előállított nem humán emlős.

24. A 23. igénypont szerinti nem humán emlős, amely említett emlős nőstény.

25. A 24. igénypont szerinti nőstény emlős, amely az említett DNS-szegmensek által kódolt, biológiailag aktív fibrinogént tartalmazó tejet termel.

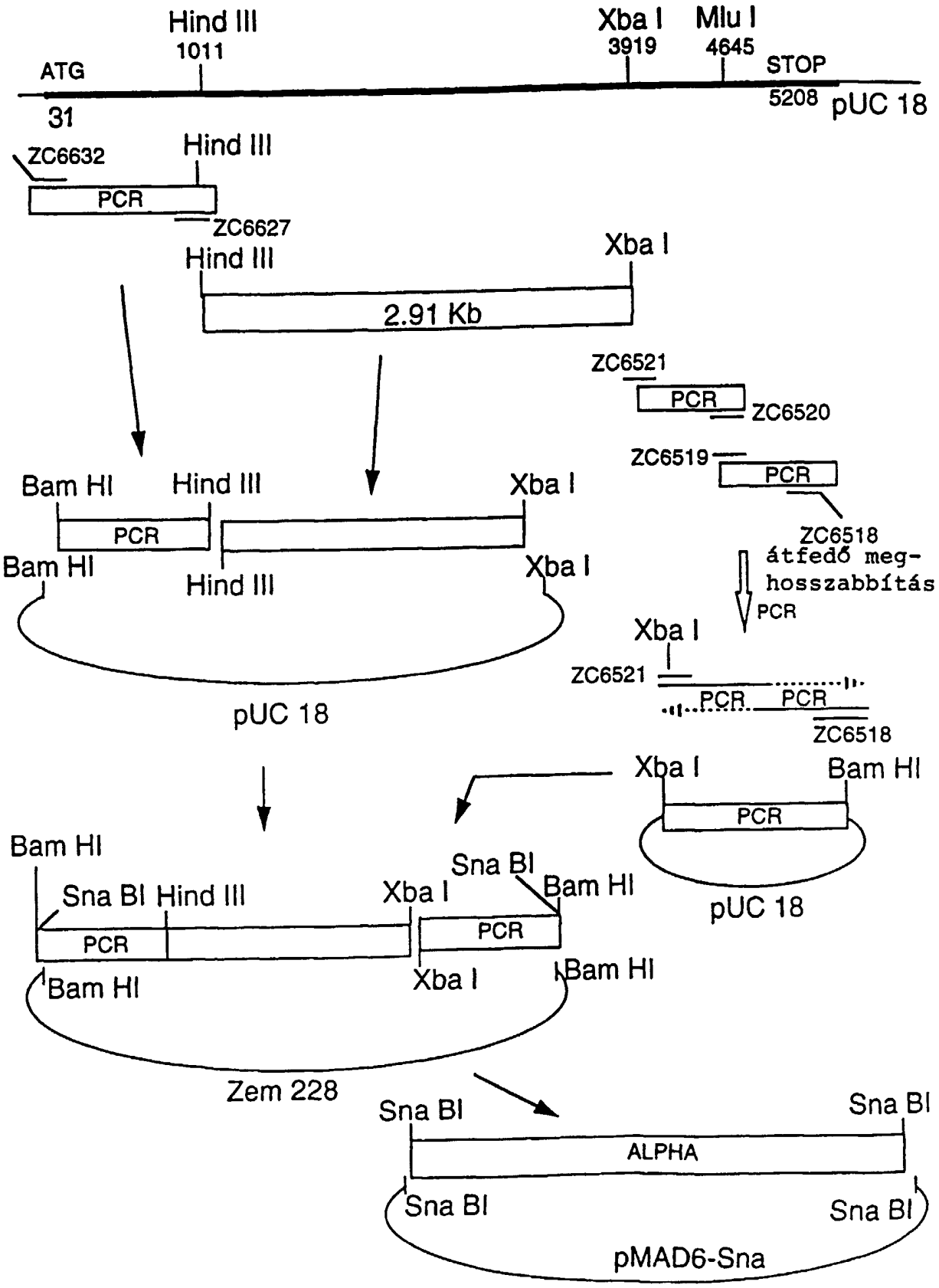
26. A 23. igénypont szerinti nem humán emlős, amely említett emlős hím.

27. A szaporítóanyagában heterológ fibrinogén Aα-, Bβ- és γ-láncokat kódoló DNS-szegmenseket hordozó nem humán emlős, amely említett emlős nőstény utódai az említett DNS-szegmenseket egy emlőmirigyben expresszálják, biológiailag aktív fibrinogént termelve.

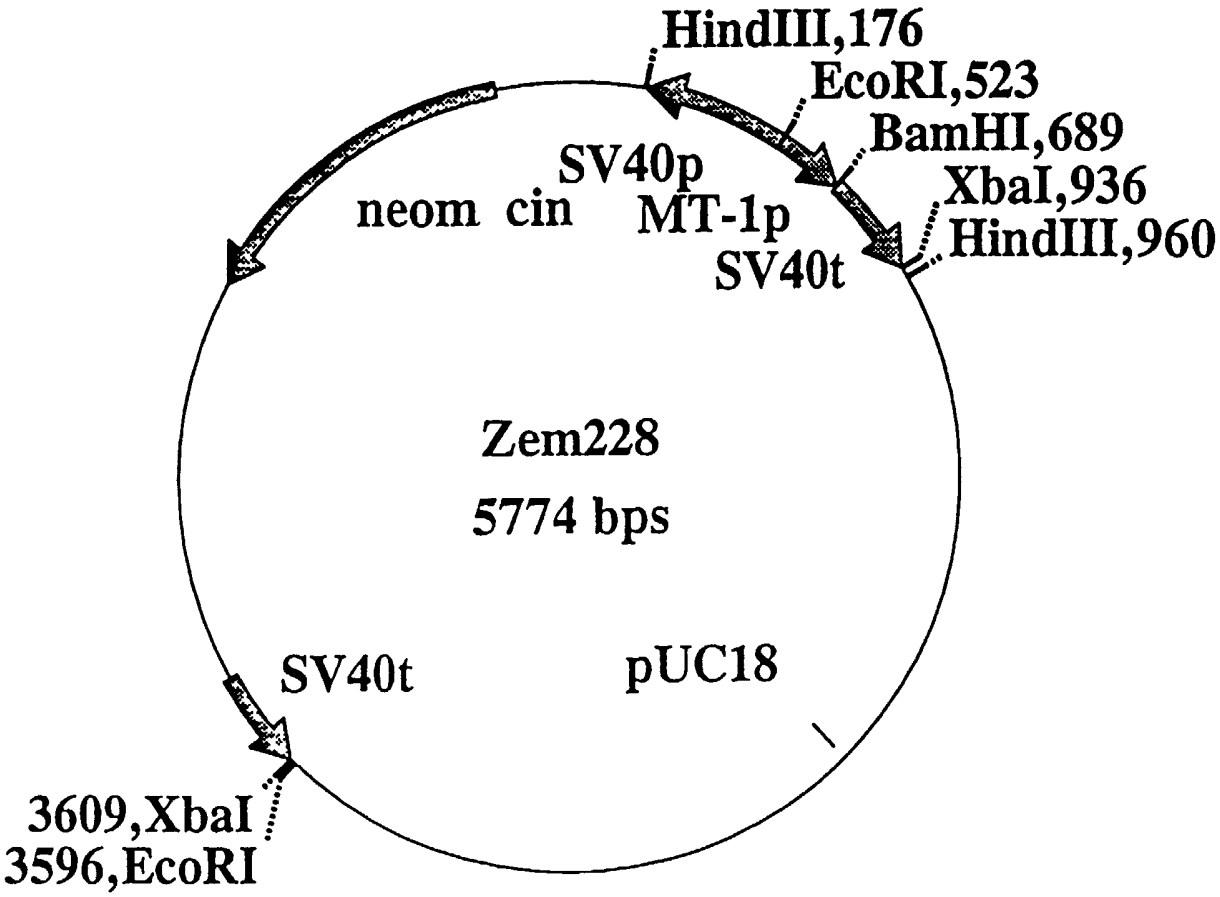
28. A 27. igénypont szerinti emlős, amely emlős nőstény.

29. A 27. igénypont szerinti emlős, amely emlős hím.

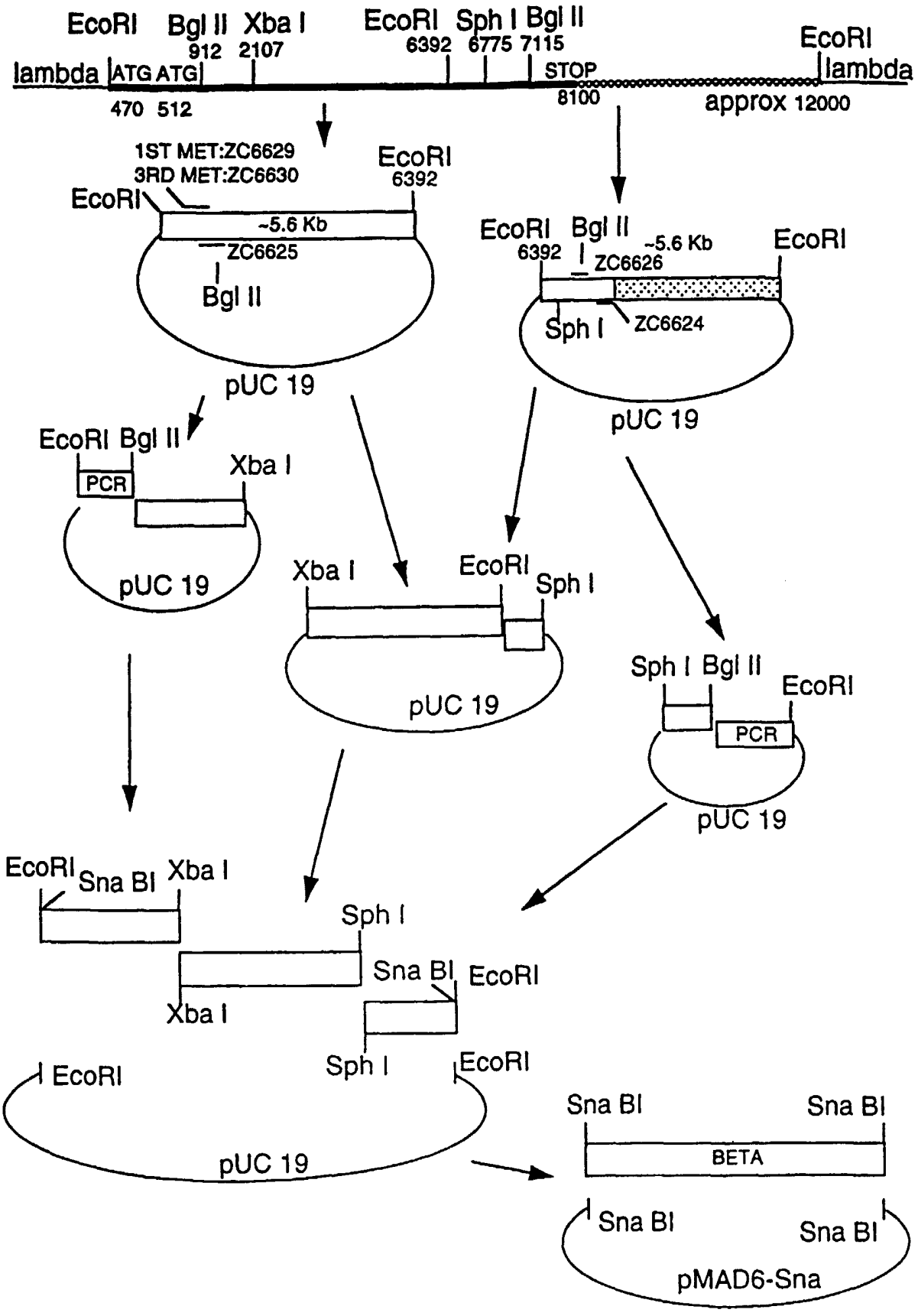
1. ábra


Hind III
1011
Xba I
3919
Mlu I
4645
ATG
STOP
5208
pUC 18
31
ZC6632
Hind III
PCR
ZC6627
Hind III
Xba I
2.91 Kb
ZC6521
PCR
ZC6520
ZC6519
PCR
ZC6518
átfedő meg-
hosszabbítás
PCR
Bam HI
Hind III
Xba I
PCR
Bam HI
Hind III
Xba I
pUC 18
Xba I
ZC6521
PCR
PCR
ZC6518
Xba I
Bam HI
PCR
pUC 18
Bam HI
Sna BI
Hind III
Xba I
Sna BI
Bam HI
PCR
PCR
Bam HI
Xba I
Bam HI
Zem 228
Sna BI
Sna BI
ALPHA
Sna BI
Sna BI
pMAD6-Sna

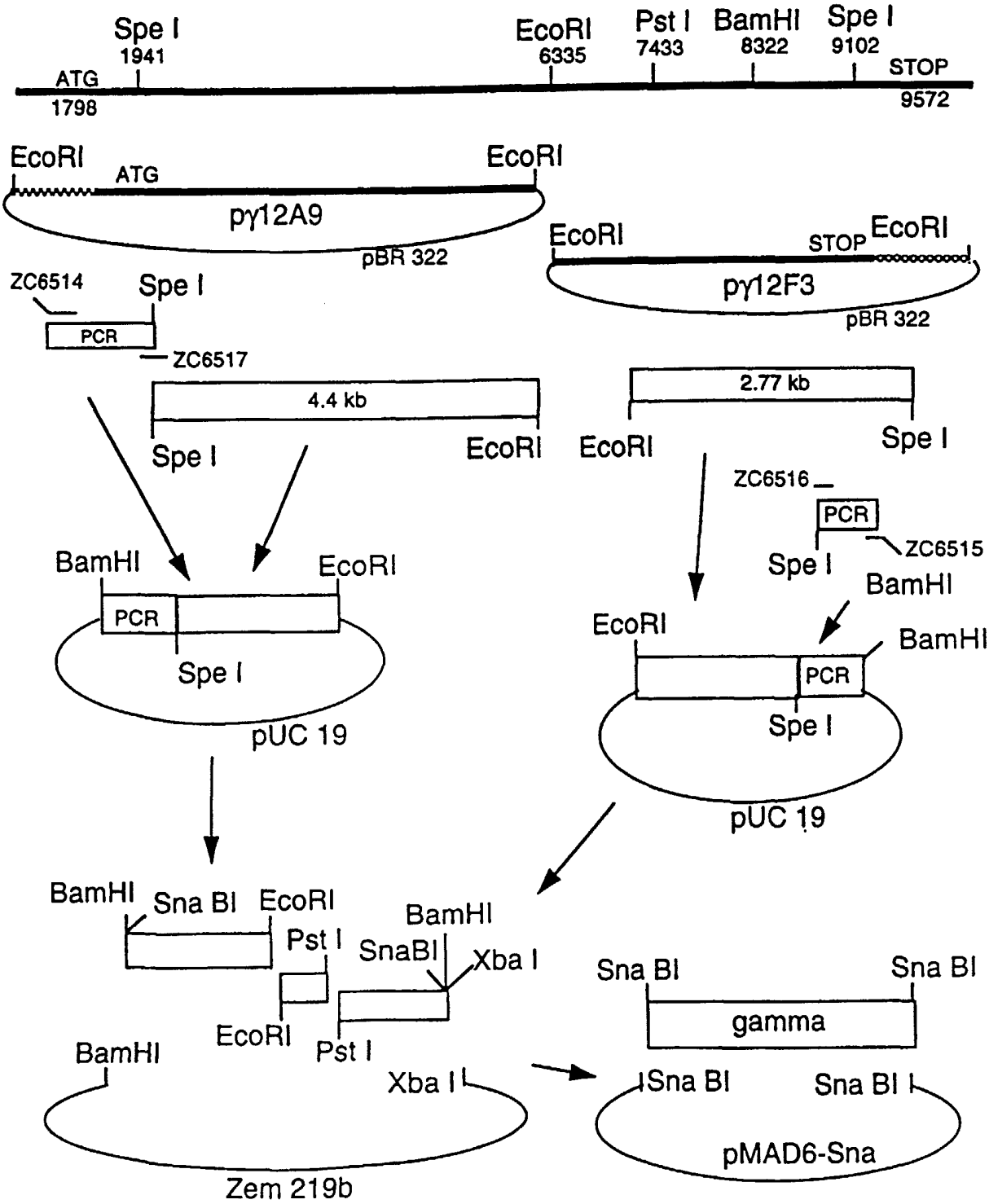
2. ábra


HindIII,176
EcoRI,523
BamHI,689
XbaI,936
HindIII,960
SV40p
neom cin
MT-1p
SV40t
Zem228
5774 bps
SV40t
pUC18
3609,XbaI
3596,EcoRI

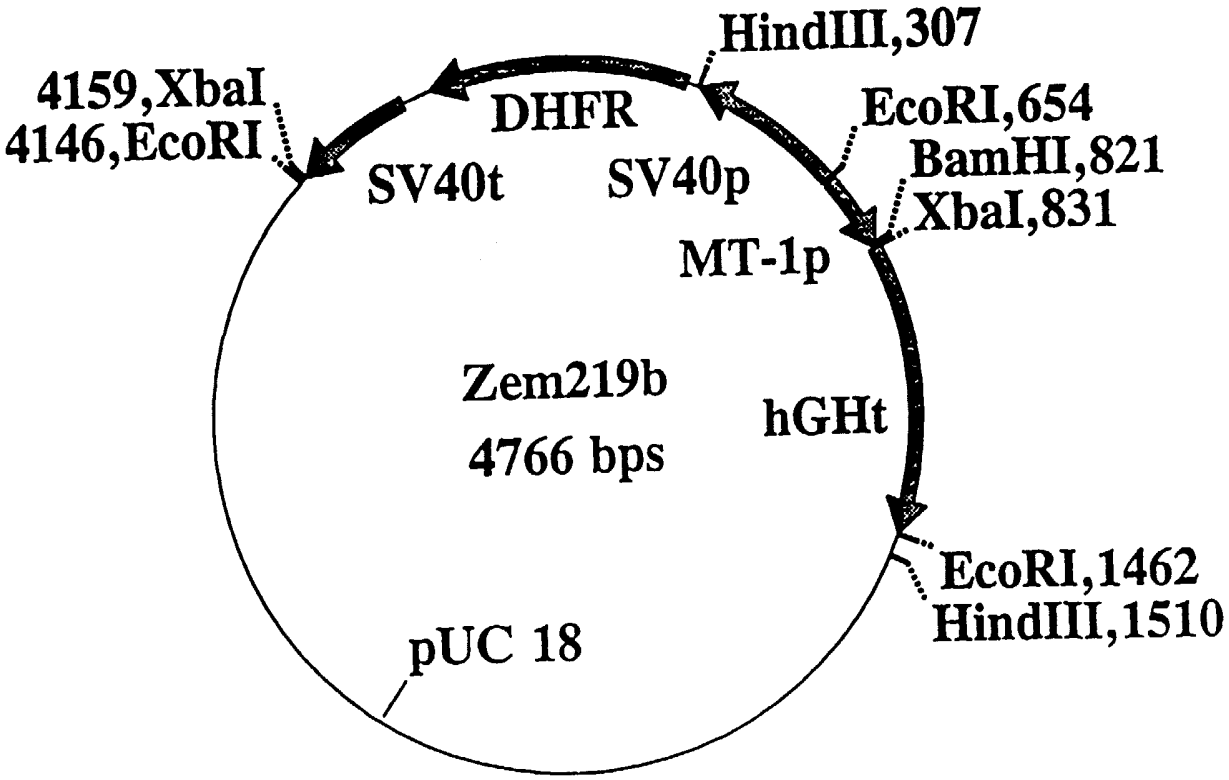
3. ábra


EcoRI
Bgl II
Xba I
912
2107
EcoRI
Sph I
Bgl II
6392
6775
7115
EcoRI
lambda
ATG ATG
STOP
8100
lambda
470
512
approx 12000
1ST MET:ZC6629
3RD MET:ZC6630
EcoRI
6392
EcoRI
~5.6 Kb
ZC6625
Bgl II
pUC 19
EcoRI
Bgl II
6392
ZC6626
~5.6 Kb
EcoRI
Sph I
ZC6624
pUC 19
EcoRI
Bgl II
PCR
Xba I
pUC 19
Xba I
EcoRI
Sph I
pUC 19
Sph I
Bgl II
EcoRI
PCR
pUC 19
EcoRI
Sna BI
Xba I
Sph I
Sna BI
EcoRI
Xba I
Sph I
EcoRI
EcoRI
pUC 19
Sna BI
Sna BI
BETA
Sna BI
Sna BI
pMAD6-Sna

4. ábra


Spe I
1941
ATG
1798
EcoRI
6335
Pst I
7433
BamHI
8322
Spe I
9102
STOP
9572
EcoRI
ATG
EcoRI
pγ12A9
pBR 322
EcoRI
STOP
EcoRI
pγ12F3
pBR 322
ZC6514
Spe I
PCR
ZC6517
4.4 kb
Spe I
EcoRI
2.77 kb
EcoRI
Spe I
ZC6516
PCR
ZC6515
Spe I
BamHI
BamHI
EcoRI
PCR
Spe I
pUC 19
EcoRI
BamHI
PCR
Spe I
pUC 19
BamHI
Sna BI
EcoRI
Pst I
BamHI
SnaBI
Xba I
EcoRI
Pst I
BamHI
Xba I
Zem 219b
Sna BI
Sna BI
gamma
Sna BI
Sna BI
pMAD6-Sna

5. ábra


HindIII,307
4159,XbaI
4146,EcoRI
DHFR
EcoRI,654
BamHI,821
XbaI,831
SV40t
SV40p
MT-1p
Zem219b
4766 bps
hGHt
EcoRI,1462
HindIII,1510
pUC 18