

(12) PATENT

(19) NO

(11) 337901

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

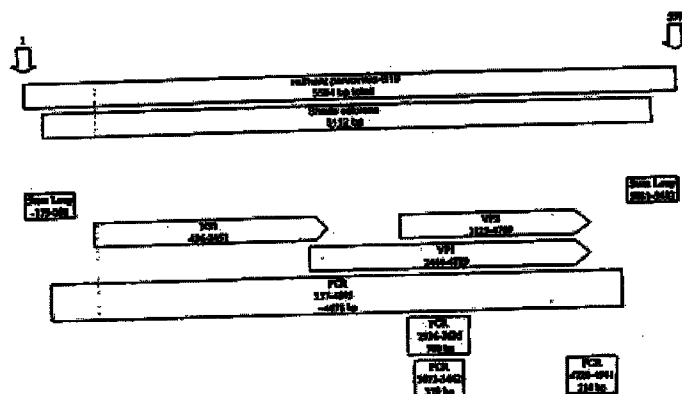
C12N 15/35 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20035732	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.06.28 PCT/US2002/20684
(22)	Inng.dag	2003.12.19	(85)	Videreføringsdag	2003.12.19
(24)	Løpedag	2002.06.28	(30)	Prioritet	2001.06.28, US, 302077 2002.03.19, US, 365956 2002.03.29, US, 369224
(41)	Alm.tilgj	2004.02.27			
(45)	Meddelt	2016.07.04			
(73)	Innehaver	Novartis Vaccines and Diagnostics Inc, 4560 Horton Street, US-CA94608 EMERYVILLE, USA			
(72)	Oppfinner	Sergio Pichuantes, 1505 Arlington Boulevard, El Cerrito, CA 94530, US-, USA Venkatakishna Shyamala, 11430 Sun Valley Drive, US-CA94605 OAKLAND, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Diagnostiske analyser for parvovirus B19			
(56)	Anførte publikasjoner	SHADE RO. et al. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. J Virol, 1986, vol. 58, no. 3, side 921-936. LEE DONG-HUN et al. Automation of nucleic acid extraction for NAT screening of individual blood units. Transfusion (Bethesda), 2001, vol. 41, no. 4, side 483-487. DURIGON EL. et al. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. J Virol Methods, 1993, vol. 44, no. 2-3, side 155-165. AUBIN JT. et al. Large-scale screening for human parvovirus B19 DNA by PCR: application to the quality control of plasma for fractionation. Vox Sang, 2000, vol. 78, no. 1, side 7-12. US 5399491 A BASSAM et al. Nucleic acid sequence detection system: revolutionary automation for monitoring and reporting PCR products. Australasian biotechnology, 1996, vol. 6, no. 5, side 285-294.			
(57)	Sammendrag				

Humant parvovirus-B 19-primere og prober utledet fra konserverte regioner i parvovirus-B 19-genomet beskrives. Også nukleinsyrebaserende analyser som anvender primerne og probene beskrives.

Humant parvovirus-B19



Teknisk fagområde

Foreliggende oppfinnelse vedrører generelt viral diagnostikk. Særlig vedrører oppfinnelsen nukleinsyrebaserte analyser for nøyaktig diagnostisering av parvovirus-B19 infeksjon, og til primere og prober for anvendelse i disse analyser.

5

Bakgrunn for oppfinnelsen

Humant parvovirus-B19 er et medlem av familien Parvoviridae, slekten Erythrovirus og er et lite 22-nm tjuflatet, ikke-innkapslet virus med et lineært, enkeltrådet DNA-molekyl på ca. 5600 nukleotider. Det virale genom koder for tre hovedproteiner, VP1, VP2 og NS1. Se Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936 og figur 1 heri. VP1 (83 kDa) og VP2 (58 kDa) er de strukturelle proteiner i proteinskallet som omgir viruset. De to proteinene kodes for i overlappende leserammer fra henholdsvis ca. nukleotid 2444 til 4789 og ca. 3125 til 4789. VP2 utgjør 95 % av proteinskallet og det større VP1 proteinet utgjør bare 5 % av proteinskallet. VP1 er nødvendig for virusets modne tilpasning. NS1 (77 kDa) er et ikkestrukturelt protein og er til stede bare i den nukleære fraksjonen av infiserte celler, og er fraværende i cytoplasmaet og i intakte virion i serum.

Parvovirus-B19 ble først oppdaget i serum fra normale bloddonorer, og er det eneste medlem av familien Parvoviridae som er kjent å være patogen for mennesker. Viruset er assosiert med et utstrakt område med hensyn til sykdomsmanifestasjoner. Humant parvovirus-B19 forårsaker normalt en asymptomatisk og/eller en mild, selvbegrensende infeksjon hos barn. Hos voksne kan parvovirus-B19 forårsake en overilt, transient symmetrisk polyartralgi og artritt. Parvovirus-B19 assosieres med transient aplastisk krise (TAC) i pasienter som har underliggende hemolytiske forstyrrelser. Kronisk B19-infeksjon og vedvarende anemi er rapportert i immunkompromitterte pasienter med akutt leukemi, medfødte immunmangler, AIDS og etter benmargstransplantasjon. Parvovirus-B19 er også assosiert med fosterdød i gravide kvinner.

I de fleste land opptrer B19-virusinfeksjon generelt i løpet av barndommen, og ca. 50 % av barn har B19-antistoffer ved 15 års alderen. Alminnelig forekomst av B19-antistoff kan øke ytterligere gjennom livet og nå verdier høyere enn 90 % i eldre individer.

I parvovirus-B19-infeksjon hos menneske er det antatt at begynnende viral replikasjon finner sted i luftveiene. Viruset målretter så cellene i benmargen. Dette fører til viral replikasjon i stor målestokk, med rapportert viremi på mellom 10^2 til 10^{14} partikler/ml, som opptrer 7-10 dager etter infeksjon, men før symptomene starter.

Opphør av viremi finner sted samtidig med påvisning av spesifikke IgM-antistoffer som forblir forhøyet i to til tre måneder. Anti-B19-IgG-antistoffer påvises få dager etter IgM-antistoffene opptrer, og vedvarer resten av livet.

Fravær av lipidinnkapsling og begrenset DNA-innhold gjør parvovirus-B19
 5 ekstremt resistent mot fysisk-kjemisk inaktivering. Spesielt i høy konsentrasjon kan parvovirus-B19 motstå konvensjonell varmebehandling av blodprodukter og overføring av B19 gjennom administrering av oppløsning-detergentbehandlet faktor VIII og damp- eller tørkebehandlet faktor VIII- og IX-preparater er dokumentert.

Humant parvovirus-B19 kan ikke dyrkes i konvensjonelle cellekulturer, som
 10 gjør laboratoriepåvisning og isolering av viruset ekstremt vanskelig. I mange år var derfor den eneste antigene kilde serum fra viremipasienter. Rekombinante antigener er produsert for anvendelse i serologisk analyse i et forsøk på å omgå disse problemene. Se for eksempel Sisk og Berman, *Biotechnology* (1987) 5:1077-1080; U.S. patent nr. 6 204 044. Immunenzymatisk IgM-innsamlingsanalyse er blitt anvendt
 15 for påvisning av anti-B19-IgM, så vel som diagnostisering av nylig B19-infeksjon. Den diagnostiske utførelse av en rekke kommersielt tilgjengelige tester er imidlertid ikke homogen. I tillegg kan IgM-baserte diagnostiske tester ikke påvise viruset det viremiske trinn av infeksjon, og når IgM-antistoffer er syntetisert, kan de forbli i sirkulasjon i flere måneder etter opphøret av viremi.

20 Den høye forekomst av B19-antistoffer i den normale populasjonen, sammen med det faktum at høy viremi vanligvis vedvarer i bare en uke, gjør anvendelse av serologisk baserte tester upraktisk. I tillegg kan serologisk diagnose være lite å stole på i immunkompromitterte pasienter.

Nukleinsyrebasert hybridiseringsanalyse, slik som dot blot og *in situ*
 25 hybridisering er anvendt for B19-påvisning. Disse analysene har generelt påvisningsbegrensninger på 1 til 0,1 pg viralt DNA ($\sim 10^4$ - 10^5 virale partikler). PCR har større sensitivitet (~ 100 genomkopier). DNA hybridiseringsteknikker er imidlertid tidskrevende og har begrenset anvendelse, og PCR er upraktisk for å screene store prøveantall.

30 Det forblir derfor behov for å utvikle pålitelige diagnostiske tester for å påvise parvovirus-B19 i viremiske prøver for å forebygge virusoverføring gjennom blod- og plasmaderivater eller ved tett personkontakt.

Oppsummering av oppfinnelsen

35 Foreliggende oppfinnelse er basert på oppdagelsen av unike primere og prober for anvendelse i nukleinsyrebasert analyse, så vel som utvikling av en sensitiv og

pålitelig nukleinsyrebasert diagnostisk test for å påvise parvovirus-B19-DNA i biologiske prøver fra potensielt infiserte individer. Teknikken beskrevet heri anvender ekstraherte DNA-prøver som templat for oppformering av konserverte genomiske regioner i B19-sekvensen ved anvendelse av transkripsjonsstyrt oppformering (TMA), så vel som i en 5' nukleaseanalyse, slik som "TaqMan"-teknikken. Ved påvisning av B19-DNA i viremiske prøver tillater fremgangsmåtene så lave virale titere som 10^3 viruspartikler/ml. Infiserte prøver kan følgelig identifiseres og ekskluderes fra transfusjon, så vel som fra tillagingen av blodderivater.

I en utførelsesform er følgende foreliggende oppfinnelse rettet mot en fremgangsmåte for påvisning av human parvovirus-B19-infeksjon i en biologisk prøve, kjennetegnet ved at nevnte fremgangsmåte omfatter:

- (a) å isolere nukleinsyre fra en biologisk prøve mistenkt for å inneholde humant parvovirus-B19-DNA, hvori nevnte nukleinsyre omfatter en målsekvens;
- (b) å oppformere målsekvensen ved å benytte en nukleinsyrepolymerase med 5'- til 3'- nukleaseaktivitet, et primerpar som er i stand til å hybridisere til målsekvensen, og en oligonukleotidprobe designet for å hybridisere 3' til den ene av primerne i den oppformerte sekvensen,

hvori

- (i) nevnte primerpar består av en sensprimer av SEKV ID nr. 88 og en antisensprimer av SEKV ID nr. 89;
- (ii) probens 5' ende inneholder en fluorescerende rapportørfarge, og probens 3' ende er blokkert for å hindre probeutvidelse og inneholder en farge som bremser fluorescensen av den 5' fluorofor;
- (iii) under oppformering fordøyer polymerasen oligonukleotidproben når den hybridiserer til målsekvensen, for dermed å separere rapportørmolekylet fra bremsermolekylet; og
- (iv) ettersom oppformeringen er utført, blir fluorescensen på rapportørmolekylet målt, med fluorescens som korresponderer til nukleinsyreoppformeringsbegivenheten.

I en annen utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot en fremgangsmåte for påvisning av human parvovirus-B19-infeksjon i en biologisk prøve, kjennetegnet ved at nevnte fremgangsmåte omfatter:

- (a) å isolere nukleinsyre fra en biologisk prøve mistenkt for å inneholde humant parvovirus-B19-DNA, hvori nevnte nukleinsyre omfatter en målsekvens;

- (b) å reagere den isolerte parvovirus-B19-nukleinsyren med et første oligonukleotid omfattende en første primer som omfatter en kompleksdannende sekvens tilstrekkelig komplementær til den 3'-terminale delen av målsekvensen som den skal danne kompleks med, hvori nevnte første primer videre omfatter en promoter for en DNA-avhengig RNA-polymerase 5'og operativt koblet til den kompleksdannende sekvensen, hvori nevnte reaksjon er gjort under betingelser som tilveiebringer dannelse av et oligonukleotid/målsekvenskompleks og initiering av DNA-syntese;
- (c) å utvide den første primeren i en utvidelsesreaksjon ved å anvende målsekvensen som et templat for å gi et første DNA-primerutvidelsesprodukt som er komplementært til målsekvensen;
- (d) å behandle DNA-primerutvidelsesproduktet med et andre oligonukleotid omfattende en andre primer som omfatter en kompleksdannende sekvens tilstrekkelig komplementær til den 3'-terminale delen av DNA-primerutvidelsesproduktet til å danne kompleks dermed, under betingelser som tilveiebringer dannelse av et oligonukleotid/målsekvenskompleks og initiering av DNA syntese;
- (e) å utvide den 3'-terminale del av den andre primeren i en DNA-utvidelsesreaksjon for å gi et andre DNA-primerutvidelsesprodukt, og dermed produsere et templat for den DNA-avhengige RNA-polymerase;
- (f) å anvende templatene for produksjon av flere RNA-kopier av målsekvensen ved anvendelse av en DNA-avhengig RNA-polymerase som gjenkjenner promotersekvensen; og
- (g) autokatalytisk repetere trinnene (b) til (f) ved anvendelse av RNA-kopiene fra trinn (f) for oppformering av målsekvensen, hvori nevnte første og andre primer har polynukleotidsekvensen til SEKV ID nr. 88 og 89.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåten videre trinnene:

- (h) å tilsette en merket oligonukleotidprobe til produktet fra trinn (g), hvor oligonukleotidproben er komplementær til en del av målsekvensen, under betingelser som tilveiebringer for hybridiseringen av proben med målsekvensen slik at det dannes et probe:mål-kompleks; og

(i) å påvise nærvær eller fravær av merking som indikasjon på nærvær eller fravær av målsekvensen.

I andre utførelsesformer er merkingen en acridiniumester.

I visse utførelsesformer av de forskjellige fremgangsmåtene beskrevet ovenfor tilveiebringes en internkontroll. Den interne kontrollen kan utledes fra sekvensen i figur 12 (SEKV. ID nr. 92). I ytterligere utførelsesformer omfatter den interne kontroll SEKV. ID nr. 90.

- 5 Et diagnostisk testsett omfattende oligonukleotidprimerne, og instruksjoner for gjennomføring av den diagnostiske testen kan tilveiebringes. Testsettet kan videre omfatte en oligonukleotidprobe omfattende en parvovirus-B19-spesifikk hybridiseringssekvens fra ca. 10 til ca. 50 nukleotider koblet til en acridinestermerking.

Disse og andre aspekter ifølge foreliggende oppfinnelse vil bli tydelige ved referanse til den påfølgende detaljerte beskrivelse og de vedlagte tegninger.

Kort beskrivelse av figurene

- Figur 1 er en skjematisk fremstilling av det humane parvovirus-B19-genom, som viser de forskjellige kodende regioner hos viruset. Tre PCR-fragmenter er vist, ett med
15 ca. 700 basepar (bp), korresponderende til nukleotidposisjonene 2936-3635 av parvovirus-B19-genomet, beskrevet i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936; ett med omtrentlig 370 bp innen 700 bp-fragmentet, korresponderende til nukleotidposisjonene 3073-3442 i parvovirus-B19-genomet, beskrevet i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936; og ett med omtrentlig 214 bp korresponderende til nukleotidposisjonene 4728-
20 4941 i parvovirus-B19-genomet, beskrevet i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936.

Figurene 2A til 2U (SEKV. ID nr. 1-21) viser DNA-sekvenser fra forskjellige parvovirus-B19-isolater inkluderende korresponderende sekvenser til nukleotidposisjonene 2936-3635 i parvovirus-B19-genomet, beskrevet i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936; (700 bp-fragmentet fra figur 1).

- 25 Figur 2A (SEKV. ID nr. 1) er den korresponderende sekvens fra isolat CH47-26; Figur 2B (SEKV. ID nr. 2) er den korresponderende sekvens fra isolat CH48-29; Figur 2C (SEKV. ID nr. 3) er den korresponderende sekvens fra isolat CH33-2; Figur 2D (SEKV. ID nr. 4) er den korresponderende sekvens fra isolat CH33-3; Figur 2E (SEKV. ID nr. 5) er den korresponderende sekvens fra isolat CH33-4;
30 Figur 2F (SEKV. ID nr. 6) er den korresponderende sekvens fra isolat CH42-7; Figur 2G (SEKV. ID nr. 7) er den korresponderende sekvens fra isolat CH42-18; Figur 2H (SEKV. ID nr. 8) er den korresponderende sekvens fra isolat CH42-19; Figur 2I (SEKV. ID nr. 9) er den korresponderende sekvens fra isolat CH46-23; Figur 2J (SEKV. ID nr. 10) er den korresponderende sekvens fra isolat CH1-1;
35 Figur 2K (SEKV. ID nr. 11) er den korresponderende sekvens fra isolat CH1-6; Figur 2L (SEKV. ID nr. 12) er den korresponderende sekvens fra isolat CH2-8;

Figur 2M (SEKV. ID nr. 13) er den korresponderende sekvens fra isolat CH2-10;
 Figur 2N (SEKV. ID nr. 14) er den korresponderende sekvens fra isolat CH2-11C;
 Figur 2O (SEKV. ID nr. 15) er den korresponderende sekvens fra isolat CH5-13;
 Figur 2P (SEKV. ID nr. 16) er den korresponderende sekvens fra isolat CH7-22;
 5 Figur 2Q (SEKV. ID nr. 17) er den korresponderende sekvens fra isolat CH13-27;
 Figur 2R (SEKV. ID nr. 18) er den korresponderende sekvens fra isolat CH14-33;
 Figur 2S (SEKV. ID nr. 19) er den korresponderende sekvens fra isolat CH62-2;
 Figur 2T (SEKV. ID nr. 20) er den korresponderende sekvens fra isolat CH64-2; og
 Figur 2U (SEKV. ID nr. 21) er den korresponderende sekvens fra isolat CH67-2.

10 Figur 3A-3C (SEKV. ID nr. 22) viser en sekvens for PCR-fragmentet på ca. 4.7
 kbp vist i figur 1 fra parvovirus-B19 klon 2-B1. Sekvensen er et 4677-
 nukleotidfragment som korresponderer til nukleotidposisjon 217-4893 fra Shade et al.,
J. Virol. (1986) 58:921-936. Sekvensen som er vist inneholder den fullengde åpne
 leseramme fra parvovirus-B19 som koder for NS1, VP1 og VP2, og ytterligere 5' og 3'
 15 ikketranslaterte sekvenser.

Figurene 4A-4C (SEKV. ID nr. 23) viser en sekvens for PCR-fragmentet på ca.
 4.7 kbp vist i figur 1 fra parvovirus-B19 klon 2-B6. Sekvensen er et 4677
 nukleotidfragment korresponderende til nukleotidposisjonene 217-4893 fra Shade et al.,
J. Virol. (1986) 58:921-936. Sekvensen som er vist inneholder den fullengde åpne
 20 leseramme hos parvovirus-B19 som koder for NS1, VP1 og VP2, og ytterligere 5' og 3'
 ikketranslaterte sekvenser.

Figurene 5A (SEKV. ID nr. 24) og 5B (SEKV. ID nr. 25) viser henholdsvis
 NS1-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B1.

Figurene 6A (SEKV. ID nr. 26) og 6B (SEKV. ID nr. 27) viser henholdsvis
 25 VP1-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B1.

Figurene 7A (SEKV. ID nr. 28) og 7B (SEKV. ID nr. 29) viser henholdsvis
 VP2-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B1.

Figurene 8A (SEKV. ID nr. 30) og 8B (SEKV. ID nr. 31) viser henholdsvis
 NS1-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B6.

30 Figurene 9A (SEKV. ID nr. 32) og 9B (SEKV. ID nr. 33) viser henholdsvis
 VP1-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B6.

Figurene 10A (SEKV. ID nr. 34) og 10B (SEKV. ID nr. 35) viser henholdsvis
 VP2-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B6.

Figurene 11A til 11Z (SEKV. ID nr. 62-87) viser DNA-sekvenser fra
 35 forskjellige parvovirus-B19-isolater som inkluderer de korresponderende sekvensene til

nukleotidposisjon 2936-3635 til parvovirus-B19-genomet, beskrevet i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936 (700 bp-fragmentet fra figur 1).

- Figur 11A (SEKV. ID nr. 62) er den korresponderende sekvens fra isolat CH80-1;
 5 Figur 11B (SEKV. ID nr. 63) er den korresponderende sekvens fra isolat CH81-3;
 Figur 11C (SEKV. ID nr. 64) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL1-4;
 Figur 11D (SEKV. ID nr. 65) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL2-1;
 Figur 11E (SEKV. ID nr. 66) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL3-1;
 Figur 11F (SEKV. ID nr. 67) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL4-3;
 10 Figur 11G (SEKV. ID nr. 68) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL5-2;
 Figur 11H (SEKV. ID nr. 69) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL6-2;
 Figur 11I (SEKV. ID nr. 70) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL7-3;
 Figur 11J (SEKV. ID nr. 71) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL8-2;
 Figur 11K (SEKV. ID nr. 72) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL9-1;
 15 Figur 11L (SEKV. ID nr. 73) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL9-9;
 Figur 11M (SEKV. ID nr. 74) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL10-2;
 Figur 11N (SEKV. ID nr. 75) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL11-1;
 Figur 11O (SEKV. ID nr. 76) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL12-1;
 Figur 11P (SEKV. ID nr. 77) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL13-3;
 20 Figur 11Q (SEKV. ID nr. 78) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL14-1;
 Figur 11R (SEKV. ID nr. 79) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL15-3;
 Figur 11S (SEKV. ID nr. 80) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL16-2;
 Figur 11T (SEKV. ID nr. 81) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL17-1;
 Figur 11U (SEKV. ID nr. 82) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL18-1;
 25 Figur 11V (SEKV. ID nr. 83) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL19-1;
 Figur 11W (SEKV. ID nr. 84) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL20-3;
 Figur 11X (SEKV. ID nr. 85) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL21-3;
 Figur 11Y (SEKV. ID nr. 86) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL22-11;
 Figur 11Z (SEKV. ID nr. 87) er den korresponderende sekvens fra isolat B19SCL2-14.
 30 Figur 12 (SEKV. ID nr. 92) viser en eksempelsekvens som en internkontroll (IC) kan utledes fra for målfanging og oppformering.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- Praktiseringen av den foreliggende oppfinnelse benytter konvensjonelle
 35 fremgangsmåter for kjemiske, biokjemiske, rekombinante DNA-teknikker og virologi innen fagfeltet med mindre annet er indikert. Slike teknikker forklares fullstendig i

litteraturen. Se for eksempel *Fundamental Virology*, 2. utgave, bind I & II (B. N. Fields og D. M. Knipe, red.); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., foreliggende utgave); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. utgave, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick og N. Kaplan, red., Academic Press, Inc.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, red., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

Det må bekjennes at som anvendt i denne spesifikasjonen og de vedtatte krav, vil de ubestemte entallsformene ”en” og ”et”, og de bestemte endingene i entallsformene ”-en” og ”-et” inkludere referanser til flertall med mindre innholdet klart sier noe annet. For eksempel inkluderer således referansen ”et antigen” til en blanding av to eller flere antigener, og liknende.

De følgende aminosyreforkortelsene anvendes gjennom hele teksten:

	Alanin:	Ala (A)
15	Arginin:	Arg (R)
	Asparagin:	Asn (N)
	Asparginsyre:	Asp (D)
	Cystein:	Cys (C)
	Glutaminsyre:	Gln (Q)
20	Glutamat:	Glu (E)
	Glysin:	Gly (G)
	Histidin:	His (H)
	Isoleucin:	Ile (I)
	Leucin:	Leu (L)
25	Lysin:	Lys (K)
	Metionin:	Met (M)
	Fenylalanin:	Phe (F)
	Prolin:	Pro (P)
	Serin:	Ser (S)
30	Treonin:	Thr (T)
	Tryptofan:	Trp (W)
	Tyrosin:	Tyr (Y)
	Valin:	Val (V)

35 I. Definisjoner

De følgende uttrykk benyttes, og er ment å være definert som indikert nedenfor.

Uttrykkene "polypeptid" og "protein" refererer til en polymer med aminosyrerester, og er ikke begrenset til en minimumslengde av produktet. Peptider, oligopeptider, dimerer, multimerer og liknende er således inkludert i definisjonen. Både fullengdeproteiner og fragmenter derav omfattes av definisjonen. Uttrykkende

5 inkluderer også postekspresjonsmodifikasjoner av polypeptidet, for eksempel glykosylering, acetylering, fosforylering og liknende. Videre refererer et "polypeptid" til et protein som inkluderer modifikasjoner, slik som delesjoner, addisjoner og substitusjoner (generelt konservative av natur) til den native sekvensen så lenge proteinet opprettholder den ønskete aktivitet. Disse modifikasjonene kan være bevisste

10 som gjennom setedirigert mutagenese, eller være tilfeldige, slik som gjennom mutasjoner av verter som produserer proteiner eller feil på grunn av PCR-opppforming.

Et parvovirus-B19-polypeptid er et polypeptid som definert ovenfor, utledet fra et protein kodet av B19-genomet, slik som fra de ikke-strukturelle proteinene NS1 og NS2, så vel som fra proteinene som danner den virale proteinkappen VP1 (omkring 781

15 aminosyrer i lengde) eller VP2 (omtrent 554 aminosyrer i lengde). Representative NS1-, VP1- og VP2-sekvenser er vist i figurene 5-10. Polypeptidet trenger ikke fysisk å være utledet fra parvovirus-B19, det kan være syntetisk eller produsert rekombinant. Polypeptidet kan være utledet fra enhver av de forskjellige parvovirus-B19-stammer og isolater. En rekke konserverte og variable regioner mellom disse stammene og isolater

20 er kjente, og generelt vil aminosyresekvenser til for eksempel epitoper utledet fra disse regionene ha en høy grad av sekvenshomologi, for eksempel aminosyresekvenshomologi på mer enn 30 %, foretrukket mer enn 40 %, når de to sekvensene oppstilles. Eksempelvis refererer uttrykket "VP1"-polypeptidet for eksempel således til nativ VP1 fra enhver av de forskjellige parvovirus-B19-stammene

25 og isolatene. De fullstendige genotypene og sekvensene for de ovennevnte proteiner fra mange parvovirus-B19-stammer og isolater er kjente. Se for eksempel Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936; Gallinella et al., *J. Virol. Methods* (1993) 41:203-211. Epitoper fra parvovirus-B19 utledet fra disse regioner er også kjente. Se for eksempel U.S. patent nr. 5 436 127 og Internasjonal Publikasjon nr. WO 91/12269.

30 Uttrykkene "analog" og "mutein" refererer til biologisk aktive derivater av referansemolekylet eller fragmenter av slike derivater, som bevarer ønsket aktivitet, slik som immunreaktivitet i diagnostiske analyser. Generelt refererer uttrykket "analog" til forbindelser som har en nativ polypeptidsekvens og struktur med en eller flere aminosyretilsetninger, substitusjoner (generelt konservative av natur) og/eller delesjoner,

35 relativt til det native molekylet så lenge modifikasjonene ikke ødelegger immunogen aktivitet. Uttrykket "mutein" refererer til peptider som har ett eller flere

peptidetterlikninger ("peptoider"), slik som de beskrevet i Internasjonal Publikasjon nr. WO 91/04282. Fortrinnsvis har analogen eller muteinet minst den samme immunreaktiviteten som det native molekylet. Fremgangsmåter for å lage polypeptidanaloger og muteiner er kjent i fagfeltet, og er videre beskrevet nedenfor.

5 Særlig foretrukne analoger inkluderer substitusjoner som er konservative av natur, dvs. de substitusjoner som finner sted innen en aminosyrefamilie som er relatert til deres sidekjerder. Spesielt er aminosyrer inndelt i fire familier: (1) sure – aspartat og glutamat; (2) basiske – lysin, arginin, histidin; (3) ikke-polare – alanin, valin, leusin, isoleusin, prolin, fenylalanin, metionin, tryptofan; og (4) uladet polare – glysin, asparagin, glutamin, cystein, serin, treonin, tyrosin. Fenylalanin, tryptofan og tyrosin klassifiseres noen ganger som aromatiske aminosyrer. For eksempel er det rimelig forutsigbart at en isolert erstatning av leusin med isoleusin eller valin, en aspartat med et glutamat, en treonin med en serin, eller en liknende konservativ erstatning av en aminosyre med en strukturell relatert aminosyre, ikke vil ha stor effekt på den biologiske aktiviteten. For eksempel kan polypeptidet av interesse inkludere opptil 5-10 konservative eller ikke-konservative aminosyresubstitusjoner, eller til og med opptil omkring 15-25 konservative eller ikke-konservative aminosyresubstitusjoner, eller ethvert heltall mellom 5-25, så lenge den ønskete molekylfunksjon forblir intakt. En fagperson kan lett bestemme regioner i molekylet av interesse som kan tolerere forandringer, med referanse til Hopp/Woods og Kyte-Doolittle-plottinger, velkjent i fagfeltet.

Når det refereres til et polypeptid har uttrykket "isolert" betydningen at det indikerte molekyl er separat og atskilt fra den hele organsimen der molekylet finnes i naturen, eller er til stede i det vesentlige fraværet av andre biologiske makromolekyler av samme type. Med hensyn til et polynukleotid har uttrykket "isolert" betydningen et nukleinsyremolekyl som er fritt for, fullstendig eller delvis, sekvenser som normalt assosieres med det i naturen; eller en sekvens slik som den eksisterer i naturen, men som har heterologe sekvenser assosiert dermed; eller et molekyl som er disassosiert fra kromosomet.

30 Et polynukleotid "utledet fra" eller "spesifikk for" en utpekt sekvens refererer til en polynukleotidsekvens omfattende en sammenhengende sekvens på omtrent minst 6 nukleotider, foretrukket minst ca. 8 nukleotider, mer foretrukket minst ca. 10-12 nukleotider, enda mer foretrukket minst ca. 15-20 nukleotider som korresponderer, dvs. identiske eller komplementære til en region i den utpekte nukleotidsekvensen. Det utledete polynukleotid vil ikke nødvendigvis være utledet fysisk fra nukleotidsekvensen av interesse, men kan være laget på enhver måte, inkludert, men ikke begrenset til,

kjemisk syntese, replikering, revers transkripsjon eller transkripsjon, basert på informasjon tilveiebrakt fra sekvensen med baser i regionen(e) som polynukleotidet er utledet fra. Det kan således representere enten en sens eller en antisens orientering av det originale polynukleotidet.

- 5 "Homologi" refererer til prosentlikhet mellom to polynukleotid eller to polypeptiddeler. To DNA eller to polypeptidsekvenser er "vesentlig homologe" til hverandre når sekvensene utviser minst ca. 50 %, foretrukket minst omkring ca. 75 %, mer foretrukket minst ca. 80 % - 85 %, foretrukket minst ca. 90 %, og mest foretrukket minst ca. 95 % - 98 % sekvenslikhet over en definert lengde av molekylerne. Som
10 anvendt heri refererer vesentlig homologt også til sekvenser som viser fullstendig identitet til den spesifiserte DNA- eller polypeptidsekvensen.

- Generelt refererer "identitet" til en eksakt nukleotid-til-nukleotid eller aminosyre-til-aminosyre korrespondering av henholdsvis to polynukleotider eller polypeptidsekvenser. Prosentidentitet kan bestemmes ved en direkte sammenlikning av
15 sekvensinformasjon mellom to molekyler ved å stille opp sekvensene og telle det eksakte antall treff mellom de to oppstilte sekvensene, dividere med lengden av den kortere sekvensen, og så multiplisere resultatet med 100.

- Lett tilgjengelige dataprogrammer kan anvendes for å avhjelpe analyseringen av homologi og identitet, slik som ALIGN, Dayhoff, M. O. i *Atlas of Protein Sequence and*
20 *Structure* M. O. Dayhoff, red., 5 Suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC, som tilpasser den lokale, homologe algoritmen til Smith og Waterman, *Advances in Appl. Math.* 2:482-489, 1981 for peptidanalyse. Programmer for å bestemme nukleotidsekvenshomologi er tilgjengelige i Wisconsin Sequence Analysis Package, versjon 8 (tilgjengelig fra Genetics Computer Group, Madison, WI)
25 for eksempel programmene BESTFIT, FASTA og GAP, som også baserer seg på Smith og Waterman algoritmen. Disse programmene anvendes enkelt med standardparametrene som anbefales av produsenten og er beskrevet i Wisconsin Sequence Analysis Package, referert til ovenfor. For eksempel kan prosenthomologi av en bestemt nukleotidsekvens til en referansesekvens bestemmes ved anvendelse av
30 homologialgoritmen til Smith og Waterman med en standard scoringstabell og en gap-straff på seks nukleotidposisjoner.

- En annen fremgangsmåte for å fastslå prosenthomologi er å anvende MPSRCH-programpakken som universitetet i Edinburgh har opphavsretten til, utviklet av John F. Collins og Shane S. Sturrock, og distribuert av IntelliGenetics, Inc. (Mountain View,
35 CA). Fra dette programsettet kan Smith-Waterman-algoritmen brukes der standardparametre anvendes for scoringstabellen (for eksempel gap-åpningsstraff på 12,

gap-ekstensjonsstraff på 1, og et gap på seks). Fra de genererte data vil verdien "Treff" reflektere "sekvenshomologo". Andre passende programmer for å beregne prosentidentitet eller sekvenslikhet er generelt kjent i fagfeltet, for eksempel er et annet oppstillingsprogram BLAST, som anvendes med standard parametre. For eksempel kan

5 BLASTN og BLASTP anvendes ved å bruke de følgende standardparametrene: genetisk kode = standard; filter = ingen; tråd = begge; cutoff = 60; forvent = 10; Matrise = BLOSUM62; Beskrivelser = 50 sekvenser; sortert ved = HØY SCORE; Databaser = ikke-overflødig, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translasjoner + Swiss protein + Spupdate + PIR. Programdetaljer finnes på denne internettadressen:

10 <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Homologi kan alternativt bestemmes ved hybridisering av polynukleotider under betingelser som danner stabile duplekser mellom homologe regioner, etterfulgt av fordøyning med enkeltrådspesifisert nuklease(r), og størrelsesbestemmelse av de fordøyde fragmenter. DNA-sekvenser som er vesentlig homologe kan identifiseres i et

15 Southern hybridiseringseksperiment under for eksempel stringente betingelser, som definert for det bestemte system. Å definere passende hybridiseringsbetingelser er innenfor fagfeltet. Se for eksempel Sambrook et al., *supra*; *DNA Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

"Operativt koblet" refererer til et elementarrangement hvori komponentene

20 beskrevet er slik konfigurert at de utfører deres ønskete funksjon. En gitt promoter er således operativt tilkoblet en nukleinsyresekvens som er i stand til å påvirke transkripsjonen, og i tilfellet av en kodende sekvens, ekspresjonen av den kodende sekvens når passende transkripsjonsfaktorer etc. er til stede. Promoterer trenger ikke å være i sammenheng med nukleinsyresekvensen så lenge den fungerer slik at den

25 dirigerer transkripsjonen og/eller ekspresjonen derav. For eksempel kan således mellomliggende uttranslaterte, men dog transkriberte sekvenser være til stede mellom promotersekvensen og den kodende sekvens, slik som transkriberte introner, og promotersekvensen kan fremdeles betraktes som "operativt bundet" til den kodende sekvens.

30 "Rekombinant" som anvendt heri for å beskrive et nukleinsyremolekyl, betyr et polynukleotid av genomisk, cDNA, viral, semisyntetisk eller syntetisk opprinnelse, som i kraft av sin opprinnelse eller manipulering ikke er assosiert med hele eller en del av polynukleotidet som det naturlig er assosiert med. Uttrykket "rekombinant" som anvendt med hensyn til et protein eller polypeptid betyr et polypeptid produsert ved

35 ekspresjon av et rekombinant polynukleotid. Generelt klones genet av interesse for så å

uttrykkes i transformerte organismer, som beskrives nedenfor. Vertsorganismen uttrykker det fremmede genet for å produsere proteiner under uttrykingsbetingelser.

Et ”kontrollelement” refererer til en polynukleotidsekvens som hjelper til i transkripsjonen og/eller translasjonen av en nukleotidsekvens som den er tilkoblet.

5 Uttrykket inkluderer promotere, transkripsjonstermineringssekvenser, oppstrømsregulatoriske doméner, polyadenyleringssignaler, utranslaterte regioner inkluderende 5’-UTR og 3’-UTR og når det er passende, ledesequenser og forsterkere, som kollektivt tilveiebringer transkripsjonen og translasjonen av en kodende sekvens i en vertscelle.

10 En ”promoter” som anvendt her, er en regulatorisk region som er i stand til å binde en polymerase og initiere transkripsjon av en nedstrøms (3’ retning) nukleotidsekvens som er operativt koblet til den. En promotersekvens inkluderer det minimum antall baser eller elementer som er nødvendig for å starte transkripsjon av en sekvens av interesse i nivåer som er påvisbare over bakgrunn. Innen promotersekvensen
15 er et transkripsjonsinitieringssete, så vel som proteinbindende doméner (konsensussekvenser) som er ansvarlige for binding av RNA- eller DNA-polymerasen. For eksempel kan en promoter være en nukleinsyresekvens som gjenkjennes av en DNA-avhengig RNA-polymerase (”transkriptase”) som et signal for å binde seg til nukleinsyren og begynne transkripsjonen av RNA på et spesifikt sted. For binding
20 krever slike transkriptaser generelt dobbeltrådet DNA i den delen som omfatter promotersekvensen og dens komplement; templatdelen (sekvensen som skal transkribes) trenger ikke være dobbeltrådet. Individuelle DNA-avhengige RNA-polymeraser gjenkjenner en rekke forskjellige promotersekvenser som kan variere markert i deres transkripsjonsfremmende effektivitet. Når en RNA-polymerase binder til
25 en promotersekvens for å starte transkripsjon er ikke promotersekvensen del av den transkriberte sekvensen. RNA-transkriptene som produseres vil således ikke inkludere den sekvensen.

En kontrollsekvens ”dirigerer transkripsjonen” av en nukleotidsekvens når RNA- eller DNA-polymerasen vil binde promotersekvensen og transkribere den
30 tilstøtende sekvensen.

En ”DNA-avhengig DNA-polymerase” er et enzym som syntetiserer en komplementær DNA-kopi fra et DNA-templat. Eksempler er DNA-polymerase-I fra *E. coli* og bakteriofag T7-DNA-polymerase. Alle kjente DNA-avhengige DNA-polymeraser krever en komplementær primer for å starte syntesen. Under passende
35 betingelser kan en DNA-avhengig DNA-polymerase syntetisere en komplementær DNA-kopi fra et RNA-templat.

En "DNA-avhengig RNA-polymerase" eller en "transkriptase" er et enzym som syntetiserer flere RNA-kopier fra et dobbeltrådet eller delvis dobbeltrådet DNA-molekyl som har en (vanligvis dobbeltrådet) promotersekvens. RNA-molekylet ("transkriptene") syntetiseres i den 5' - til 3'-retningen ved en spesifikk posisjon rett nedstrøms for promoteren. Eksempler på transkriptaser er den DNA-avhengige polymerasen fra *E. coli* og bakteriofagene T7, T3 og SP6.

En "RNA-avhengig DNA-polymerase" eller "revers transkriptase" er et enzym som syntetiserer en komplementær DNA-kopi fra et RNA-templat. Alle kjente revers transkriptaser har også evne til å produsere en komplementær DNA-kopi fra et DNA-templat; således er både RNA- og DNA-avhengige DNA-polymeraser. En primer er nødvendig for å starte syntesen med både RNA- og DNA-templater.

"RNase H" er et enzym som degraderer RNA-delen av en RNA:DNA-dupleks. Disse enzymene kan være endonukleaser eller exonukleaser. De fleste revers transkriptaseenzymer inneholder normalt en RNase-H aktivitet i tillegg til deres polymeraseaktivitet. Andre kilder av RNase-H er imidlertid tilgjengelige uten en assosiert polymeraseaktivitet. Degraderingen kan resultere i separering av RNA fra et RNA:DNA-kompleks. Alternativt kan RNase-H enkelt kutte RNA ved forskjellige lokaliseringer slik at deler av RNA smelter av eller tillater enzymer å opptvinne deler av RNA.

Uttrykkene "polynukleotid", "oligonukleotid", "nukleinsyre" og "nukleinsyremolekyl" brukes her for å inkludere en polymer form av nukleotider av enhver lengde, enten ribonukleotider eller deoksyribonukleotider. Dette uttrykk refererer bare til den primære molekylstruktur. Uttrykket inkluderer således trippel-, dobbel- og enkeltrådet-DNA så vel som trippel-, dobbel- og enkeltrådet-RNA. Det inkluderer også modifikasjoner, slik som ved metylering og/eller capping, og umodifiserte former av polynukleotidet. Mer bestemt inkluderer uttrykkene "polynukleotid", "oligonukleotid", "nukleinsyre" og "nukleinsyremolekyl" polydeoksyribonukleotider (inneholdende 2-deoksy-D-ribose), polyribonukleotider (inneholdende D-ribose), enhver annen type polynukleotid som er et N- eller C-glykosid av en purin- eller pyrimidinbase, og andre polymerer som inneholder ikkenukleotidryggrader, for eksempel polyamid (for eksempel peptidnukleinsyre (PNA)) og polymorfolin (kommersielt tilgjengelig fra Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregon, som Neugene) polymerer, og andre syntetiske sekvensspesifikke nukleinsyrepolymerer som tilveiebringer at polymerene inneholder nukleobaser i en konfigurasjon som tillater baseparing og basestabling, slik som finnes i DNA og RNA. Det er ingen tilsiktet forskjell i lengde mellom uttrykkene "polynukleotid",

”oligonukleotid”, ”nukleinsyre” og ”nukleinsyremolekyl”, og disse uttrykkene brukes om hverandre i denne beskrivelsen. Disse uttrykkene refererer bare til den primære molekulstrukturen. Disse uttrykkene inkluderer således for eksempel 3’-deoksy-2’,5’-DNA, oligodeoksyribonukleotid N3’ P5’ fosforamidater, 2’-O-alkyl-substituert RNA, 5 dobbel- og enkeltrådet DNA, så vel som dobbel- og enkeltrådet RNA, DNA:RNA-hybrider, og hybrider mellom PNA og DNA eller RNA, og inkluderer også kjente modifikasjonstyper, for eksempel merkinger som er velkjente innen faget, metylering, ”caps”, substitusjon av en eller flere av de naturlig forekommende nukleotider med en analog, internukleotidmodifikasjoner slik som for eksempel de med uladete koblinger 10 (for eksempel metylfosfonat, fosfotriester, fosforamidater, karbamater osv.), de med negativt ladete koblinger (for eksempel fosfotioater, fosfoditioater osv.), de med positivt ladete koblinger (for eksempel aminoalkylfosforamidater, aminoalkylfosfotriester), de som inneholder tilleggsdeler, slik som for eksempel proteiner (inkluderende nukleaser, toksiner, antistoffer, signalpeptider, poly-L-lysin osv.), og de med interkalatorer (for 15 eksempel acridin, psoralen osv.), de inneholdende chelatorer (for eksempel metaller, radioaktive metaller, bor, oksidative metaller osv.), de som inneholder alkylatorer, de med modifiserte koblinger (for eksempel alfa-anomere nukleinsyrer osv.), så vel som umodifiserte former av polynukleotidet eller oligonukleotidet. I særdeleshet er DNA deoksyribonukleinsyre.

20 Som anvendt heri betyr betegnelsen ”målnukleinsyreregion” eller ”målnukleinsyre” et nukleinsyremolekyl med en ”målsekvens” som skal oppformes. Målnukleinsyren kan enten være enkeltrådet eller dobbeltrådet og kan inkludere andre sekvenser ved siden av målsekvensen som ikke skal oppformes. Uttrykket ”målsekvens” refererer til den bestemte nukleotidsekvensen i målnukleinsyren som skal 25 oppformes. Målsekvensen kan inkludere en probehybridiserende region som finnes innen mål-molekylet som proben vil danne en stabil hybrid med under ønskete betingelser. ”Målsekvensen” kan også inkludere kompleksdannende sekvenser som oligonukleotidprimerne danner kompleks med, og som utvides ved anvendelse av målsekvensen som et templat. Der hvor målnukleinsyren opprinnelig er enkeltrådet, 30 refererer uttrykket ”målsekvens” også til sekvenskomplementariteten til ”målsekvensen” som er til stede i målnukleinsyren. Hvis ”målnukleinsyren” opprinnelig er dobbeltrådet, refererer uttrykket ”målsekvens” både til pluss (+) og minus (-) trådene.

Uttrykket ”primer” eller ”oligonukleotidprimer” som anvendes heri, refererer til 35 et oligonukleotid som virker slik at det starter syntesen av en komplementær DNA-tråd når den plasseres under betingelser hvor syntesen av et primerutvidelsesprodukt blir

indusert, dvs. i nærvær av nukleotider og et polymeriseringsinduserende middel, slik som en DNA- eller RNA-polymerase, og en passende temperatur, pH, metall- og saltkonsentrasjon. Primeren er fortrinnsvis enkeltrådet for maksimal effekt i oppformering, men kan alternativt være dobbeltrådet. Dersom den er dobbeltrådet blir
 5 primeren først behandlet for å separere trådene før den anvendes til produksjon av utvidelsesprodukter. Dette denatureringstrinnet utføres typisk ved varme, men kan alternativt utføres ved anvendelse av alkali, etterfulgt av nøytralisering. En "primer" er således komplementær til et templat, og danner kompleks med hydrogenbinding eller hybridisering med templatet for å gi et primer/templatkompleks for initiering av en
 10 polymerasesyntese, som utvides ved tilsetning av kovalent bundne baser tilkoblet sin 3' ende komplementært til templatet i DNA-synteseprosessen.

Som det er anvendt heri refererer uttrykket "probe" eller "oligonukleotidprobe" til en struktur omfattende et oligonukleotid, som definert ovenfor, inneholdende en nukleinsyresekvens komplementær til en nukleinsyresekvens til stede i målnukleinsyren
 15 som skal analyseres. Polynukleotidregionene i probene kan være sammensatte av DNA og/eller RNA og/eller syntetiske nukleotidanaloger. Når en "oligonukleotidprobe" anvendes i en 5' nukleaseanalyse, slik som ved "TaqMan"-teknikken, vil proben minst inneholde fluorescens og minst en bremser som spaltes av den 5' endonukleaseaktiviteten til en polymerase anvendt i reaksjonen for påvisning av enhver
 20 amplifisert måloligonukleotidsekvens. I denne sammenhengen vil oligonukleotidproben ha et tilstrekkelig antall av fosfodiesterbindinger tilstøtende til sin 5'-ende, slik at den benyttete 5'- til 3'-nukleaseaktiviteten effektivt kan degradere den bundne proben for å separere fluorescensene og bremserne. Når en oligonukleotidprobe anvendes i TMA-teknikken, vil den være passende merket, som beskrevet nedenfor.

25 Det vil forstås at hybridiseringssekvensene ikke trenger perfekt komplementaritet for å gi for stabile hybrider. I mange situasjoner vil stabile hybrider dannes der mindre enn ca. 10 % av basene ikke er like, og vil ignorere sløyfer på fire eller flere nukleotider. Som anvendt heri refererer følgende uttrykket "komplementær til" til et oligonukleotid som danner en stabil dupleks med sitt "komplement" under
 30 analysebetingelser, generelt der homologien er omkring 90 % eller høyere.

Uttrykkene "hybridisere" og "hybridisering" refererer til dannelsen av komplekser mellom nukleotidsekvenser tilstrekkelig komplementære til å danne komplekser via Watson-Crick baseparing. Der en primer "hybridiserer" med mål (templat), er slike komplekser (eller hybrider) tilstrekkelig stabile til å tjene den
 35 primerfunksjonen som er nødvendig for at for eksempel DNA-polymerasen skal starte DNA-syntese.

Som anvendt heri refererer uttrykket "bindingspar" til første og andre molekyler som spesifikt binder til hverandre, slik som komplementære polynukleotidpar som er i stand til å danne nukleinsyreduplekser. "Spesifikk binding" av det første medlemmet av bindingsparet til det andre medlemmet av bindingsparet i en prøve, viser seg ved

5 bindingen av det første medlemmet til det andre medlemmet, eller motsatt, med større affinitet og spesifisitet enn til andre komponenter i prøven. Bindingen mellom medlemmene av bindingsparet er typisk ikke kovalent. Med mindre sammenhengen klart indikerer noe annet, blir uttrykkene "affinitetsmolekyl" og "målanalytt" anvendt heri for å referere til henholdsvis første og andre medlem av et bindingspar.

10 Uttrykkene "spesifikt bindingsmolekyl" og "affinitetsmolekyl" anvendes om hverandre heri, og referer til et molekyl som gjennom kjemisk eller fysisk hjelp selektivt vil binde seg til påvisbar substans til stede i en prøve. Med "selektivt binde" menes at molekylet fortrinnsvis binder til målet av interesse eller binder seg med større affinitet til målet enn til andre molekyler. For eksempel vil et DNA-molekyl binde seg

15 til en vesentlig komplementær sekvens og ikke til urelaterte sekvenser.

"Smeltetemperaturen" eller " T_m " til dobbeltrådet DNA er definert som temperaturen der halvparten av den heliske strukturen til DNA er tapt pga. oppvarming eller annen dissosiasjon av hydrogenbindingen mellom basepar, for eksempel ved syrebehandling eller alkalisk behandling, eller liknende. T_m til et DNA-molekyl er

20 avhengig av dets lengde- og basesammensetning. DNA-molekyler rike på GC-basepar har høyere T_m enn de med overskudd av AT-basepar. Separerte komplementære tråder av DNA reassosierer spontant eller de anniler for å danne dupleks DNA når temperaturen senkes under T_m . Den høyeste hyppighet av nukleinsyrehybridisering opptrer ved omtrent 25 °C under T_m . T_m kan anslås ved anvendelse av det følgende forhold:

25 $T_m = 69,3 + 0,41 (\text{GC}) \%$ (Marmur et al. (1962) *J. Mol. Biol.* 5:109-118).

Som anvendt her refererer en "biologisk prøve" til en prøve av vev eller væske isolert fra et individ, som vanligvis inkluderer antistoffer produsert av individet. Typiske prøver som inkluderer slike antistoffer er kjente i fagfeltet og inkluderer, men er ikke begrenset til blod, plasma, serum, avføringsmaterie, urin, benmarg, galle,

30 spinalvæske, lymfevæske, hudprøve, hudutsondringer, luft, tarm og urogenitale veier, tårer, spytt, melk, blodceller, organer, biopsier og også *in vitro* cellekulturbestanddeler som inkluderer, men ikke er begrenset til kondisjonert medium som er et resultat fra cellevekster og cellevev i kulturmedium, for eksempel rekombinante celler og cellekomponenter.

35 Som anvendt her refererer uttrykkene "merking" og "påvisbar merking" til et molekyl i stand til å påvises, inkludert, men ikke begrenset til radioaktive isotoper,

fluorescerende stoffer, kjemiluminiserende stoffer, kromoforer, enzymer, enzymsubstrater, enzymkofaktorer, enzymhemmere, fargestoffer, metallioner, metall "sols", ligandere (for eksempel biotin, avidin, streptavidin eller haptener) og liknende. Uttrykket "fluorescerende stoff" refererer til en substans eller et de derav som er i stand
 5 til å oppvise fluorescens i det påvisbare området.

II. Måter for utførelse av oppfinnelsen

Før den foreliggende oppfinnelse blir beskrevet i detalj, må det forstås at foreliggende oppfinnelse ikke er begrenset til bestemte formuleringer eller
 10 prosessparametre etter som slike selvfølgelig kan variere. Det må også forstås at terminologien anvendt her kun er for formålet å beskrive bestemte utførelsesformer av oppfinnelsen, og er ikke ment å være begrensende.

Selv om et antall sammensetninger og fremgangsmåter som er like eller ekvivalente med de beskrevet heri kan anvendes i utførelsen av den foreliggende
 15 oppfinnelse, er de foretrukne materialene og fremgangsmåtene beskrevet heri.

Som bemerket ovenfor er den foreliggende oppfinnelse basert på oppdagelsen av nye primere, prober og diagnostiske fremgangsmåter for nøyaktig påvisning av parvovirus-B19-infeksjon i en biologisk prøve. Fremgangsmåtene baserer seg på sensitive, nukleinsyrebaserte påvisningsteknikker som tillater identifikasjon av
 20 parvovirus-B19-målnukleinsyresekvenser i prøver inneholdende små mengder virus.

Spesielt har oppfinnerne heri karakterisert regioner innen parvovirus-B19-genomet som er ønskelige mål for diagnostiske tester. Primere og prober utledet fra disse regionene er veldig nyttige for påvisning av parvovirus-B19-infeksjon i biologiske prøver.

25 Disse parvovirus-B19-primere og -probene anvendes i nukleinsyrebasert analyse for påvisning av humant parvovirus-B19-infeksjon i biologiske prøver.

Spesielt er primere og prober for anvendelse i disse analysene fortrinnsvis utledet fra det omtrentlige 4,7 kb fragmentet i parvovirus-B19-genomet som korresponderer til nukleotidposisjonene 217-4678 i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-
 30 936. Nukleotidsekvensene i denne regionen fra to forskjellige parvovirus-B19-isolater er vist i figurene 3A-3C og 4A-4C heri. Som forklart ovenfor inneholder dette fragmentet NS1-, VP1- og VP2-kodende regioner.

Primerne og probene for anvendelse i de foreliggende analysene er konstruert fra meget konserverte regioner i parvovirus-B19-genomet for å tillate påvisning av
 35 parvovirus B19-infeksjon forårsaket av en rekke isolater. Som beskrevet heri, er en meget konservert region av parvovirus-B19-genomet funnet innen 700 bp-regionen som

dekker nukleotidposisjonene 2936-3635, nummerert relativt til parvovirus-B19-genomet beskrevet i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936. Denne regionen finnes innen VP1-regionen i genomet. Sekvensen i denne regionen fra 21 forskjellige parvovirus-B19-isolater er vist heri i figurene 2A-2U. Sekvensene fra ytterligere 26 isolater er vist i figurene 11A-11Z heri. Sammenlikning av sekvensene viser at denne regionen utviser fra ca. 98 % -99,5 % sekvenshomologi fra isolat til isolat, noe som gjør den til en meget ønskelig målsekvens. Også ønskelig for konstruksjonen av primere og prober i den 370 bp regionen, som finnes innen VP1 som dekker ca. nukleotidposisjonene 3073-3442, nummerert relativt til Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936, så vel som fragment 214 bp, vist i figur 1, som finnes innen den 3'-delen av fragment 4,7 kb, og dekker nukleotidposisjonene 4728-4941, nummerert relativt til Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936.

Regionene 4,7 kbp, 700 bp og 370 bp kan lett skaffes tilveie fra ytterligere isolater ved anvendelse av deler av parvovirus-B19-sekvensen som finnes innen disse bestemte regionene som primere i PCR-reaksjoner slik som dem beskrevet heri, så vel som i U.S. patent nr. 4 683 195, 4 683 202 og 4 889 818, og basert på sekvensene tilveiebrakt heri. En annen fremgangsmåte for å tilveiebringe nukleotidsekvenser med de ønskete sekvenser, er ved å annile komplementære sett av overlappende syntetiske oligonukleotider produsert i en konvensjonell, automatisert polynukleotidsyntesemaskin, etterfulgt av ligering med en passende DNA-ligase og oppformering av den ligerte nukleotidsekvensen via PCR. Se for eksempel Jayaraman et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4084-4088. Med en gang sekvensene er konstruert eller isolert, kan de klones inn i enhver passende vektor eller replikon. Flere kloningsvektorer er kjent blant fagfolk, og valget av en passende kloningsvektor er et spørsmål om valg. Passende vektorer inkluderer, men er ikke begrenset til plasmider, phag, transposoner, kosmider, kromosomer eller virus som er i stand til replikasjon når de assosieres med passende kontrollerelementer.

Rekombinante kloner kan lett identifiseres ved restriksjonsenzymanalyse og polyakrylamid eller agarosegелеlektroforese, ved å anvende teknikker kjent i fagfeltet, og som er beskrevet i eksemplene nedenfor.

Primere og prober for anvendelse i analysene heri, er utledet fra disse sekvensene og kan lett syntetiseres ved hjelp av standard teknikker, for eksempel fastfase syntese via fosforamiditkjemi, beskrevet i U.S. patent nr. 4 458 066 og 4 415 732; Beacage et al. (1992) *Tetrahedron* 48:2223-2311; og Applied Biosystems User Bulletin No. 13 (1. april 1987). Andre kjemiske syntesemetoder inkluderer for eksempel fosfotriesterfremgangsmåten beskrevet av Narang et al., *Meth. Enzymol.*

(1979) 68:90, og fosfodiesterfremgangsmåten beskrevet av Brown et al., *Meth. Enzymol.* (1979) 68:109, Poly(A) eller poly(C), eller andre ikkekomplementære nukleotidutvidelser som kan inkorporeres inn i proben ved anvendelse av disse samme fremgangsmåtene. Heksaetylenoksidutvidelser kan kobles til prober ved

5 fremgangsmåter kjent innen faget. Cload et al. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113:6324-6326; U.S. patent nr. 4 914 219 til Levenson et al.; Durand et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:6353-6359; og Horn et al. (1986) *Tet. Lett.* 27:4705-4708. Typisk er primersekvenser i størrelsesområdet mellom 10-75 nukleotider i lengde, slik som 15-60, 20-40 osv., mer typisk i størrelsesområdet mellom 18-40 nukleotider lange, og enhver

10 lengde mellom de fastlagte områdene. Den typiske proben er i området mellom 10-50 nukleotider i lengde, slik som 15-40, 18-30 osv., og enhver lengde mellom de fastlagte områder.

Videre kan probene kobles til merkinger for påvisning. Det er flere måter kjent for å derivatisere oligonukleotider med reaktive funksjonaliteter som tillater tillegging

15 av en merking. For eksempel er flere tilnærminingsmåter tilgjengelige for å biotinylere prober slik at radioaktive, fluorescerende, kjemiluminiserende, enzymatiske eller elektrontette merkinger kan festes via avidin. Se for eksempel Broken et al., *Nucl. Acids Res.* (1978) 5:363-384, som beskriver anvendelsen av ferritin-avidin-biotin-merkinger; og Chollet et al. *Nucl. Acids Res.* (1985) 13:1529-1541, som beskriver biotinylering av

20 den 5' enden av oligonukleotider via en aminoalkylfosforamidkoblingsarm. Flere fremgangsmåter er også tilgjengelige for å syntetisere aminoderivatiserte oligonukleotider som lett kan merkes med fluorescens eller andre typer forbindelser derivatisert ved aminoreaktive grupper, slik som isotiocyanat, N-hydroksysuksinimid eller liknende, se for eksempel Conolly (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:3131-3139, Gibson

25 et al. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:6455-6467 og U.S. patent nr. 4 605 735 til Miyoshi et al. Fremgangsmåter er også tilgjengelige for syntetisering av sulfhydrylderivatiserte oligonukleotider som kan reagere med tiolspesifikke merkinger, se for eksempel U.S. patent nr. 4 757 141 til Fung et al., Conolly et al. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13:4485-4502 og Spoot et al. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:4837-4848. En omfattende oversikt over

30 metodologier for merking av DNA-fragmenter tilveiebringes i Matthews et al., *Anal Biochem.* (1988) 169:1-25.

Prober kan for eksempel fluorescensmerkes ved å koble et fluorescensmolekyl til den ikkeligerende delen av proben. Veiledning for valg av passende fluorescerende merking finnes i Smith et al., *Meth. Enzymol.* (1987) 155:260-301; Karger et al., *Nucl.*

35 *Acids Res.* (1991) 19:4955-4962; Haugland (1989) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Foretrukne

fluorescerende merkelapper inkluderer fluorescein og derivater derav, slik som beskrevet i U.S. patent nr. 4 318 846 og Lee et al., *Cytometry* (1989) 10:151-164, og 6-FAM, JOE, TAMRA, ROX, HEX-1, HEX-2, ZOE, TET-1 eller NAN-2 og liknende.

Prober kan i tillegg merkes med en acridinester (AE) ved anvendelse av teknikkene beskrevet nedenfor. Nåværende teknologier tillater at AE-merking plasseres ved enhver lokalisering innen proben. Se for eksempel Nelson et al. (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" in *Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing*, Kricka, L. J. (red.) Academic Press, San Diego, CA; Nelson et al. (1994) "Application of the Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR" in *The Polymerase Chain Reaction*, Mullis et al. (red.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks et al., *Clin. Chem.* (1983) 29:1474-1479; Berry et al., *Clin. Chem.* (1988) 34:2087-2090. Et AE-molekyl kan festes direkte til proben ved anvendelse av ikke-nukleotidbasert koblingsarm-kjemi som tillater plassering av merking ved enhver lokalisering innen proben. Se for eksempel U.S. patent nr. 5 585 481 og 5 185 439.

I visse utførelsesformer legges en internkontroll (IC) eller en intern standard til som skal tjene som målfangings- og oppformeringskontroll. Fortrinnsvis inkluderer IC en sekvens som skiller seg fra målsekvensen, og som er i stand til å hybridisere med probesekvensen som anvendes for å separere oligonukleotidene som var spesifikke for organsimen fra prøven, og som er i stand til oppformering. Anvendelse av IC tillater kontroll av separeringsprosessen, oppformeringsprosessen og påvisningssystemet, og tillater måling av analyseutførelsen og kvantifiseringen av prøven(e). En representativ sekvens som IC kan oppnås ifra, er vist i figur 12. IC kan inkluderes ved ethvert passende punkt, for eksempel i lysisbufferen. I en utførelsesform omfatter IC M13 ssDNA inneholdende en nukleotidsekvens fra et parvovirus-B19 og en unik sekvens som hybridiserer med proben, for eksempel som omfatter sekvensen fra VP1-regionen, hvor målsekvensen er modifisert ved substitusjon eller delesjon av 5-20 baser eller mer, fortrinnsvis 5-15 baser, slik som 5, 10 eller 15 baser eller ethvert antall innenfor dette området. De substituerte eller deleterte basene finnes fortrinnsvis over hele målsekvensens lengde, slik at bare 2 eller 3 sammenhengende sekvenser blir erstattet. Dersom målsekvensen for eksempel er CTACTTGCTGCGGGAGAAAAACACCT (SEKV. ID nr. 91), kan således sekvensen substitueres med for eksempel AGCTAGACCTGCATGTCACTG (SEKV. ID nr. 90) i IC.

Den faste støtten kan i tillegg inkludere prober som er spesifikke for den interne standarden (IC-probe), og dermed lette fanging ved anvendelse av IC-proben. IC-proben kan valgfritt kobles med en påvisbar merking, som er ulik målsekvensens påvisbare

merking. I utførelsesformer hvor den påvisbare merkingen er en fluorofor, kan IC spektrofotometrisk kvantifiseres og ved begrensning av påvisningsstudier. Typisk blir kopiantallet av IC som ikke interfererer med måldeteksjonen bestemmes ved å titrere IC med en fast IU hos målet, fortrinnsvis i den nederste enden, og en standard kurve genereres ved å fortynne en prøve med internasjonalt akseptert IU. For parvovirus-B19-
 5 kvantifisering kan et panel på åtte medlemmer med 8000 IU-125 IU anvendes.

En IC, som beskrevet heri, konbineres med RNA isolert fra prøven ifølge standard teknikker, kjent for fagfolk, og beskrevet heri. RNA reverstranskriberes ved anvendelse av en revers transkriptase for å tilveiebringe kopi-DNA. cDNA-sekvensene kan valgfritt oppformerer (for eksempel med PCR) ved anvendelse av merkete primere. Oppformeringsproduktene separeres, vanligvis med elektroforese, og mengden radioaktivitet (proporsjonalt med mengden oppformert produkt) bestemmes. Mengden mRNA i prøven beregnes deretter ved sammenlikning med signalet produsert av de kjente standardene.

15 Primerne og probene kan anvendes i polymerasekjedereaksjon (PCR) baserte teknikker for påvisning av parvovirus-B19-infeksjon i biologiske prøver. PCR er en teknikk for oppformering av en ønsket målnukleinsyresekvens som finnes i et nukleinsyremolekyl eller blanding av molekyler. I PCR blir et primerpar anvendt i overskudd for å hybridisere til de komplementære trådene i målnukleinsyren. Primerne utvides begge med en polymerase ved anvendelse av målnukleinsyren som et templat. Utvidelsesproduktene blir selv målsekvenser etter dissosiasjon fra den originale måltråden. Nye primere blir så hybridisert og utvidet med en polymerase, og syklusen repeteres for geometrisk å øke antallet målsekvensmolekyler. PCR-fremgangsmåten for oppformering av målnukleinsyresekvenser i en prøve er velkjent i fagfeltet og er
 20 beskrevet i for eksempel Innis et al. (red.) *PCR Protocols* (Academic Press, NY 1990); Taylor (1991) *Polymerase chain reaction: basic principles and automation*, in *PCR: A Practical Approach*, Mc. Pherson et al. (red.) IRL Press, Oxford; Saiki et al. (1986) *Nature* 324:163; så vel som i U.S. patent nr. 4 683 195, 4 683 202 og 4 889 818.

I særdeleshet anvender PCR relativt korte oligonukleotidprimere som flankerer
 30 målnukleotidsekvensene som skal oppformerer, orientert slik at deres 3' ender vender mot hverandre, hver primer utvides mot den andre. Polynukleotidprøven ekstraheres og denatureres fortrinnsvis med varme, og hybridiseres med første og andre primerpar som er til stede i molart overskudd. Polymeriseringen blir katalysert i nærvær av de fire deoksyribonukleotidtrifosfatene (dNTP -- dATP, dGTP, dCTP og dTTP) ved
 35 anvendelse av et primer- og templatavhengig polynukleotidpolymeriserende middel, slik som ethvert enzym i stand til å produsere primerutvidelsesprodukter, for eksempel

E. coli-DNA-polymerase-I, Klenow-fragment av DNA-polymerase-I, T4-DNA-polymerase-I, T4-DNA-polymerase, termotabile DNA-polymeraser isolert fra *Thermus aquaticus* (Taq), tilgjengelig fra en rekke kilder (for eksempel Perkin Elmer), *Thermus thermophilus* (United States Biochemicals), *Bacillus stearothermophilus* (Bio-Rad),
 5 eller *Thermococcus litoralis* ("Vent"-polymerase, New England Biolabs). Dette resulterer i to "lange produkter" inneholdende de respektive primerne ved deres 5' ender, kovalent tilkoblet de nylig syntetiserte komplementene av de originale trådene. Reaksjonsblandingen returneres så til polymeriseringsbetingelsene, for eksempel ved å senke temperaturen, inaktivere et denaturerende middel, eller ved tilsetning av mer
 10 polymerase, og en andre syklus blir startet. Den andre syklusen tilveiebringer de to originale trådene, de to lange produktene fra den første syklusen, to nye lange produkter replikert fra de originale trådene, og to "korte produkter" replikert fra de lange produktene. De korte produktene har målsekvensens sekvens med en primer i hver ende. Ved hver tilleggssyklus blir ytterligere to lange produkter produsert, og en rekke korte
 15 produkter lik antallet lange og korte produkter forblir ved enden av den foregående syklus. Dermed vokser antallet korte produkter inneholdende målsekvensen eksponentielt innen hver syklus. Fortrinnsvis utføres PCR på en kommersielt tilgjengelig termal syklisator, for eksempel Perkin Elmer.

RNA kan amplifiseres ved revers transkribering av mRNA til cDNA, og deretter
 20 ved utførelse av PCR (RT-PCR), som beskrevet ovenfor. Alternativt kan et enkelt enzym anvendes til begge trinnene, som beskrevet i U.S. patent nr. 5 322 770. mRNA kan også reverstranskriberes til cDNA, etterfulgt av asymmetrisk gap-ligase kjedereaksjon (RT-AGLCR), som beskrevet av Marshall et al. (1994) *PCR Meth. App.* 4:80-84.

25 Den fluorogene 5'-nukleaseanalysen kjent som "TaqMan"-analysen (Perkin-Elmer), er et kraftig og allsidig PCR-basert deteksjonssystem for nukleinsyremål. Primere og prober utledet fra parvovirus-B19-genomregioner beskrevet heri, kan derfor anvendes i "TaqMan"-analyse for å påvise tilstedeværelse av infeksjon i biologisk prøve. Analyse utføres i sammenheng med termal syklisering ved å måle generering av
 30 fluorescerende signaler. Analysesystemet overflødiggjør behovet for gélelektroforeseanalyse, og har evnen til å generere kvantitative data som tillater bestemmelse av antall målkopier.

Den fluorogene 5' nukleaseanalysen utføres vanligvis ved anvendelse av for eksempel "AmpliTaq Gold" DNA-polymerase, som har endogent 5' nukleaseaktivitet
 35 til å fordøye en intern oligonukleotidprobe som er merket med både en fluorescerende rapportørfarge og en bremser. (Se Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991)

88:7276-7280; og Lee et al., *Nucl. Acids Res.* (1993) 21:3761-3766). Analyseresultater påvises ved måling av forandringer i fluorescens som finner sted i løpet av oppformeringssyklusen ettersom den fluorescerende proben blir fordøyd, og ved frakobling av farge og bremser(quencher) merkinger og forårsaker en økning i det fluorescerende signal, som er proporsjonalt med oppformeringen av mål-DNA.

Amplifiseringsproduktene påvises i løsning eller ved anvendelse av faste støtter. I denne fremgangsmåten konstrueres "TaqMan"-proben slik at den hybridiserer til en målsekvens innenfor det ønskete PCR-produktet. "TaqMan"-probens 5' ende inneholder en fluorescerende rapportørfarge. Probens 3' ende er blokkert for å hindre probeutvidelse, og inneholder en farge som vil bremse fluorescensen av den 5' fluorofor. Under etterfølgende oppformering kuttes den 5' fluorescerende merkingen av, dersom en polymerase med 5' ekstra nukleaseaktivitet er til stede i reaksjonen. Bortkuttingen av den 5' fluoroforen resulterer i en fluorescensøkning som kan påvises.

Spesielt konstrueres oligonukleotidproben slik at proben eksisterer i minst en enkeltrådet konformasjon når den ikke er hybridisert der bremsemolekylet er nær nok rapportørmolekylet til å bremse rapportørmolekylets fluorescens. Oligonukleotidproben eksisterer også i minst én konformasjon når den hybridiserer til et målpolynukleotid slik at bremsermolekylet ikke er posisjonert nær nok til rapportørmolekylet for å bremse fluorescensen av rapportørmolekylet. Ved å innta disse hybridiserte og ikke-hybridiserte konformasjonene viser rapportørmolekylet og bremsermolekylet på proben forskjellige fluorescenssignalintensiteter når proben er hybridisert og ikke-hybridisert. Som et resultat er det mulig å bestemme om proben er hybridisert eller ikke ved forandring i den fluorescerende intensiteten til rapportørmolekylet, bremsermolekylet, eller en kombinasjon derav. Fordi proben kan konstrueres slik at bremsermolekylet bremser rapportørmolekylet når proben ikke er hybridisert, kan proben i tillegg konstrueres slik at rapportørmolekylet viser begrenset fluorescens med mindre proben enten er hybridisert eller fordøyd.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører seg følgelig til fremgangsmåter for oppformering av en målparvovirus-B19-nukleotidsekvens ved anvendelse av en nukleinsyrepolymerase med 5' til 3' nukleaseaktivitet, én eller flere primere som er i stand til å hybridisere til mål-B19-sekvensen, og en oligonukleotidprobe som er i stand til å hybridisere til mål-B19-sekvensen 3' relativt til primeren. Under oppformeringen fordøyer polymerasen oligonukleotidproben når den hybridiserer til målsekvensen, og dermed separeres rapportørmolekylet fra bremsermolekylet. Ettersom oppformeringen utføres blir fluorescensen på rapportørmolekylet målt med fluorescens som korresponderer til nukleinsyreoppformeringsbegivenheten. Rapportørmolekylet er

fortrinnsvis en fluorescerende farge og bremsermolekylet er fortrinnsvis en rhodaminfarge.

Mens lengde av primere og prober kan variere, velges probesekvensene slik at de har et lavere smeltepunkt enn primersekvensene. Primersekvensene er derfor generelt lenger enn probesekvensene. Vanligvis er primersekvenser i området mellom 10-75 nukleotider lange, mer vanlig i området 20-45. Den vanligste proben er i området mellom 10-50 nukleotider lang, mer vanlig 15-40 nukleotider i lengde.

Hvis en fast støtte anvendes, kan oligonukleotidproben festes til den faste støtten på en rekke måter. For eksempel kan proben festes til den faste støtten ved at den 3' eller 5' terminale nukleotid av proben festes på den faste støtten. Mer foretrukket festes proben til den faste støtten med en linker som tjener til å distansere proben fra den faste støtten. Linkeren er vanligvis minst 15-30 atomer i lengde, mest foretrukket minst 15-50 atomer i lengde. En linkers nødvendige lengde avhenger av den bestemte, faste støtten som anvendes. For eksempel er en seks atomers linker vanligvis tilstrekkelig når høyt krysskoblet polystyrén anvendes som fast støtte.

En rekke linkere som kan anvendes for festing av oligonukleotidproben til den faste støtten er kjent innen fagfeltet. Linkere kan dannes av enhver forbindelse som ikke spesielt interfererer med hybridiseringen av målsekvensen til proben, som er festet til den faste støtten. Linkeren kan være formet av et homopolymert oligonukleotid som lett kan tilsettes til linkeren ved automatisert syntese. Alternativt kan polymerer, slik som funksjonalisert polyetylenglykol anvendes som linker. Slike polymerer foretrekkes over homopolymere oligonukleotider da de ikke interfererer spesielt med hybridiseringen av probe til måloligonukleotidet. Polyetylenglykol er spesielt foretrukket.

Koblingen mellom den faste støtten, linkeren og proben kløves helst ikke under fjerningen av basebeskyttende grupper under basiske betingelser ved høy temperatur. Eksempler på foretrukne koblinger inkluderer karbamat- og amidkoblinger.

Eksempler på foretrukne typer med faste støtter for immobilisering av oligonukleotidproben inkluderer kontrollert poreglass, glassplater, polystyrén, avidinbelagte polystyrénkuler, cellulose, nylon, akrylamidgel og aktivert dekstran.

For en detaljert beskrivelse av "TaqMan"-analysen, reagenser og betingelser for anvendelse deri, se for eksempel Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:7276-7280; U.S. patent nr. 5 538 848, 5 723 591 og 5 876 930.

Parvovirus-B19-sekvenser beskrevet heri kan også anvendes som basis for transkripsjonsstyrt oppformering (TMA) analyser. TMA tilveiebringer en fremgangsmåte for identifikasjon av målnukleotidsyresekvensene til stede i veldig små mengder i en biologisk prøve. Slike sekvenser kan være vanskelige eller umulige å

påvise ved anvendelse av direkte analysefremgangsmåter. Spesielt er TMA et isothermalt, autokatalytisk nukleinsyremåloppformeringsystem som kan tilveiebringe mer enn en milliard RNA-kopier av en målsekvens. Analysen kan gjøres kvalitativt for nøyaktig påvisning av nærvær eller fravær av målsekvensen i en biologisk prøve.

- 5 Analysen kan også tilveiebringe et kvantitativt mål på mengden målsekvens over et konsentrasjonsområde på flere størrelsesordener. TMA tilveiebringer en fremgangsmåte for autokatalytisk syntetisering av flere kopier av en målnukleinsyresekvens uten repetitiv manipulering av reaksjonsbetingelsene slik som temperatur, ionestyrke og pH.

- Generelt inkluderer TMA de følgende trinnene: (a) å isolere nukleinsyre,
 10 inkludert RNA, fra den biologiske prøven av interesse som er mistenkt for å være infisert med parvovirus-B19; og (b) å kombinere i en reaksjonsblanding (i) den isolerte nukleinsyre, (ii) første og andre oligonukleotidprimere, den første primer har en kompleksdannende sekvens tilstrekkelig komplementær til den 3' terminale delen av en RNA-målsekvens, hvis den er til stede (for eksempel (+)tråden), til å danne kompleks
 15 med den, og den andre primer har en kompleksdannende sekvens tilstrekkelig komplementær til den 3' terminale delen av målsekvensen til sitt komplement (for eksempel (-)tråden) til å danne kompleks med den, hvor det første oligonukleotidet videre omfatter en sekvens 5' til den kompleksdannende som inkluderer en promoter, (iii) en revers transkriptase eller RNA- og DNA-avhengig DNA-polymerase, (iv) en
 20 enzymaktivitet som selektivt degraderer RNA-tråden i et RNA-DNA-kompleks (slik som en RNase H) og (v) en RNA-polymerase som gjenkjenner promoteren.

- Komponentene i reaksjonsblandingen kan kombineres trinnvis eller med en gang. Reaksjonsblandingen inkuberes under betingelser som gjør at en oligonukleotid/målsekvens dannes, inkludert DNA-priming og
 25 nukleinsyresyntetiserende betingelser (inkludert ribonukleotidtrifosfater og deoksyribonukleotidtrifosfater) i en tidsperiode tilstrekkelig til å tilveiebringe flere kopier av målsekvensen. Reaksjonen finner fordelaktig sted under betingelser passende for opprettholdelse av stabiliteten av reaksjonskomponentene, slik som komponentenzymene, og uten å kreve modifikasjon eller manipulering av
 30 reaksjonsbetingelsene under forløpere av oppformeringsreaksjonen. Reaksjonen kan følgelig finne sted under betingelser som er vesentlig isotermales og som inkluderer vesentlig konstant ionestyrke og pH. Reaksjonen trenger fordelaktig ikke et denatureringsstrinn for å separere RNA-DNA-komplekset som produseres av den første DNA-utvidelsesreaksjonen.

- 35 Passende DNA-polymerase inkluderer revers transkriptase, slik som avian myeloblastosis virus (AMV) revers transkriptase (tilgjengelig fra for eksempel

Seikagaku America, Inc.) og Moloney murint leukemivirus (MMLV) revers transkriptase (tilgjengelig fra for eksempel Bethesda Research Laboratories).

Promotere og promotersekvenser som er passende for inkorporering i primere er nukleinsyresekvenser (enten naturlig forekommende, produsert syntetisk eller et
 5 produkt av en restriksjonsspaltning) som vesentlig gjenkjennes av en RNA-polymerase som gjenkjenner og binder til sekvensen, og starter transkripsjonsprosessen, mens RNA-transkripter produseres. Sekvensen kan valgfritt inkludere nukleotidbaser som utvides utover det aktuelle gjenkjenningssetet for RNA-polymerasen, som kan gi tilleggsstabilitet eller mottakelighet for degraderingsprosesser eller øket
 10 transkripsjonseffektivitet. Eksempler på nyttige promotere inkluderer de som gjenkjennes av visse bakteriofage polymeraser, slik som de fra bakteriofag T3, T7 eller SP6, eller en promoter fra *E. coli*. Disse RNA-polymeraser er lett tilgjengelige fra kommersielle kilder, slik som *New England Biolabs and Epicentre*.

Noen revers transkriptaser passende for anvendelse i fremgangsmåtene heri har
 15 en RNase-H-aktivitet, slik som AMV-revers transkriptase. Det kan imidlertid være fordelaktig å tilsette eksogent RNase-H, slik som *E. coli*-RNase-H, selv når AMV-revers transkriptase anvendes. RNase-H er lett tilgjengelig fra for eksempel Bethesda Research Laboratories.

RNA-transkriptene som produseres ved hjelp av disse fremgangsmåtene kan
 20 tjene som templatere for produksjon av tilleggskopier av målsekvensen via de ovenfor beskrevne mekanismene. Systemet er autokatalytisk og oppformering finner sted autokatalytisk uten behov for repeterte modifiseringer eller forandring av reaksjonsbetingelser slik som temperatur, pH, ionestyrke og liknende.

Påvisning utføres ved anvendelse av en rekke fremgangsmåter, inkludert direkte
 25 sekvensering, hybridisering med sekvensspesifikke oligomerer, gelelektroforese og massespektrometri. Disse fremgangsmåtene kan anvende heterogene eller homogene formater, isotopiske eller ikke-isotopiske merking, så vel som ingen merking i det hele tatt.

En fremgangsmåte for påvisning er anvendelse av målsekvensspesifikke
 30 oligonukleotidprober utledet fra 4.7 kbp-, 700 bp-, 370 bp- og 214 bp-fragmentene beskrevet ovenfor. Probene kan anvendes i hybridiseringsbeskyttelsesanalyser (HPA). I denne utførelsesformen merkes probene fordelaktig med acridinester (AE), et sterkt kjemiluminiserende molekyl. Se for eksempel Nelson et al. (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" in *Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing*, Kricka, L. J. (red.), Academic Press, San Diego, CA.; Nelson et al. (1994)
 35 "Application of the Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR" in *The Polymerase*

Chain Reaction, Mullis et al. (red.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks et al., *Clin. Chem.* (1983) 29:1474-1479; Berry et al., *Clin. Chem.* (1988) 34:2087-2090. Ett AE-molekyl festes direkte til proben ved anvendelse av en ikke-nukleotidbasert linkerarmkjemi som tillater plassering av merkingen ved enhver lokalisering innen proben. Se for eksempel

5 U.S. patent nr. 5 585 481 og 5 185 439. Kjemiluminiscens utløses ved reaksjon med alkalisk hydrogenperoksid som gir en eksitert N-metylacridon som deretter kollapser til grunntilstanden med emisjonen av et foton. AE forårsaker i tillegg esterhydrolyse som gir den ikke-kjemiluminiserende-metylacridinkarboksylsyre.

Når AE-molekylet er kovalent festet til en nukleinsyreprøbe er hydrolysen raskt

10 under milde, alkaliske betingelser. Når den AE-merkete proben er nøyaktig komplementær til målnukleinsyren reduseres graden av AE-hydrolyse mye. Dermed kan hybridisert og ikke-hybridisert AE-merket probe påvises direkte i løsning uten behov for fysisk separering.

HPA består vanligvis av de følgende trinnene: (a) den AE-merkete proben

15 hybridiseres med målnukleinsyren i løsning i omkring 15 til 30 minutter. En mild, alkalisk løsning tilsettes og AE er tilkoblet til den ikke-hybridiserte proben er hydrolysert. Denne reaksjonen trenger ca. 5 til 10 minutter. Det gjenværende hybridassosierte AE detekteres som et mål (measure) på mengden av mål (target) som er til stede. Dette trinn trenger ca. 2 til 5 sekunder. Det differensielle hydrolysetrinnet

20 utføres fortrinnsvis ved den samme temperatur som hybridiseringstrinnet, vanligvis ved 50 °C til 70 °C. Alternativt kan et andre differensieringshydrolysetrinn utføres i romtemperatur. Dette tillater anvendelse av øket pH, for eksempel i området 10 til 11, som gir større forskjeller i graden av hydrolyse mellom hybridisert og ikke-hybridisert AE-merket probe. HPA er detaljbeskrevet i for eksempel U.S. patent nr. 6 004 745;

25 5 948 899; og 5 283 174.

TMA er beskrevet i detalj i for eksempel U.S. patent nr. 5 399 491. I et eksempel på en typisk analyse blandes en isolert nukleinsyreprøve, som er mistenkt for

30 innehold av parvovirus-B19-målsekvens, med et bufferkonsentrat inneholdende bufferen, salter, magnesium, nukleotidtrifosfater, primere, ditiotreitol og spermidin. Reaksjonen inkuberes valgfritt ved omkring 100 °C i omkring to minutter for å denaturere enhver sekundær struktur. Etter nedkjøling til romtemperatur tilsettes revers transkriptase, RNA-polymerase og RNase-H, og blandingen inkuberes i to til fire timer ved 37 °C. Reaksjonen kan så undersøkes ved å denaturere produktet, tilsette en probeløsning, inkubere i 20 minutter ved 60 °C, tilsette en løsning for selektiv hydrolyse

35 av den ikke-hybridiserte proben, og inkubere reaksjonen i seks minutter ved 60 °C, og måle den gjenværende kjemiluminiscens i et luminometer.

Oligonukleotidmolekylene som her er beskrevet kan også anvendes i nukleinsyresekvensbasert oppformering (NASBA). Denne fremgangsmåten er en promoterstyrt, enzymatisk prosess som induserer *in vitro* kontinuerlig, homogent og isothermalt, oppformering av en spesifikk nukleinsyre for å tilveiebringe RNA-kopier av nukleinsyren. Reagensene for å utføre NASBA inkluderer en første DNA-primer med en 5' hale omfattende en promoter, en andre DNA-primer, revers transkriptase, RNase-H, T7-RNA-polymerase, NTP og dNTP. Ved anvendelse av NASBA genereres store mengder enkeltrådet RNA fra enten singeltrådet RNA eller DNA, eller dobbeltrådet DNA. Når RNA skal oppformes, tjener ssRNA som et templat for syntesen av en første DNA-tråd ved elongering av en første primer inneholdende et RNA-polymerase gjenkjenningssete. Denne DNA-tråden tjener så som templatet for syntesen av en sekundær, komplementær DNA-tråd ved å forlenge en andre primer, som resulterer i et dobbeltrådet, aktiv RNA-polymerasepromotersete, og den andre DNA-tråden tjener som et templat for syntese av store mengder av det første templatet, ssRNA ved hjelp av en RNA-polymerase. NASBA-teknikken er kjent i fagfeltet og beskrevet i for eksempel Europa patent 329 822, Internasjonal patentsøknad nr. WO 91/02814, og U.S. patent nr. 6 063 603; 5 554 517 og 5 409 818.

Parvovirus-B19-sekvensene beskrevet heri er også nyttige i nukleinsyrehybridisering og oppformeringsteknikker som benytter forgrenete DNA-molekyler. I en basal nukleinsyrehybridiseringsanalyse hybridiseres en enkeltrådet analytt nukleinsyre til en merket enkeltrådet nukleinsyreprobe og de resulterende, merkete duplekser påvises. Variasjoner av dette basale skjema er utviklet for å forenkle separering av dupleksene som skal påvises fra fremmede materialer og/eller for å oppformere det påviste signalet. En fremgangsmåte for oppformering av signalene anvender oppformeringsmultimerer som er polynukleotider med et første segment som hybridiserer spesifikt til analytt nukleinsyre eller en tråd med nukleinsyre bundet til analytten, og gjentakelser av et andre segment som hybridiserer spesifikt til en merket probe. Oppformeringen er teoretisk proporsjonal med antall gjentakelser av det andre segmentet. Multimerene kan enten være lineære eller forgrenete. To generelle typer av forgrenete multimerer er nyttige i disse teknikkene: gaffelformet og kjemmet. Fremgangsmåter for å konstruere og anvende forgrenete nukleinsyremolekyler er kjent i fagfeltet og beskrevet i for eksempel U.S. patent nr. 5 849 481.

To eller flere av testene, beskrevet ovenfor, kan utføres for å bekrefte tilstedeværelsen av organismen. For eksempel hvis den første testen anvendte den transkripsjonsstyrte oppformeringen (TMA) for oppformering av nukleinsyre for deteksjon, blir deretter en alternativ nukleinsyretestanalyse (NAT) utført, for eksempel

ved anvendelse av PCR-oppformering, RT-PCR eller liknende, som beskrevet heri. Parvovirus-B19 kan således spesifikt og selektivt påvises selv når prøven inneholder andre organismer, slik som HIV- og Hepatitt B-virus, for eksempel.

Som det tydelig fremgår er analysekonstruksjonene beskrevet heri gjenstand for en stor del variasjoner, og mange formater er kjent innen faget. Beskrivelsene ovenfor er kun gitt som veiledning, og en fagperson kan lett modifisere de beskrevne protokollene ved anvendelse av teknikker kjent innen fagfeltet.

De ovenfor beskrevne analysereagensene inkludert primerne, probene, faste støtter med bundne prober, så vel som andre deteksjonsreagenser, kan tilveiebringes i sett med passende instruksjoner og andre nødvendige reagenser for utførelse av de ovenfor beskrevne analysene. I de separate beholderne vil settet normalt inneholde kombinasjonen av primere og prober (enten allerede bundet til en fast matriks eller separat med reagenser for å binde dem til matriksen), kontrollformuleringer (positive og/eller negative), merkete reagenser når analyseformatet krever dette og signalgenererende reagenser (for eksempel enzymsubstrat) dersom merkingen ikke direkte genererer et signal. Instruksjoner (for eksempel skrevne, eller på bånd, VCR, CD-ROM osv.) for utførelse av analysen vil vanligvis være inkludert i settet. Det kan også inneholde andre reagenspakker og materialer, avhengig av den anvendte analysen, for eksempel vaskebuffer og liknende. Standard analyser, slik som de beskrevet ovenfor, kan utføres ved anvendelse av disse settene.

III. Eksperimentelt

Nedenfor beskrives eksempler av spesifikke utførelsesformer for den foreliggende oppfinnelse utførelse. Eksemplene tilbys kun med det formål å illustrere, og er ikke ment på noen måte å begrense de vedheftede kravenes omfang.

Anstrengelser er gjort for å sikre nøyaktighet med hensyn til tall som er anvendt (for eksempel mengde, temperatur osv.), men noen eksperimentelle feil og avvik bør selvfølgelig tillates.

I de påfølgende eksempler ble enzymerne innkjøpt fra kommersielle kilder, og anvendt ifølge produsentens retningslinjer. Nitrocellulosefiltre og liknende ble også innkjøpt fra kommersielle kilder.

Ved isolering av DNA-fragmenter, unntatt der det er bemerket, ble alle DNA-manipuleringer utført i henhold til standard prosedyrer. Se Sambrook et al., *supra*. Restriksjonsenzymer, T₄-DNA-ligase, *E. coli*, DNA-polymerase-I, Klenow-fragment og andre biologiske reagenser kan kjøpes fra kommersielle leverandører og anvendes i

henhold til produsentens retningslinjer. Dobbeltrådet DNA-framenter ble separert på agarosegél.

Eksempel 1

5 Parvovirus-B19-nukleinsyrestraksjon for PCR

Humane serumprøver som tidligere hadde testet positivt for humant parvovirus-B19 ved enten IgM- eller PCR-tester, ble skaffet tilveie fra kommersielle kilder og anvendt for å isolere DNA for etterfølgende PCR-eksperimenter. Prøvene ble lagret ved -80 °C inntil anvendelse.

10 DNA ble ekstrahert fra 0,2 ml serum ved anvendelse av QIAamp DNA Blood miniset (QIAGEN, Valencia, CA.) ved å følge produsentens spesifikasjoner med de følgende betraktninger. Bærer-DNA ble tilsatt til lysisbufferen for å øke nukleinsyrebinding og utbytte. Spesielt ble en mengde på 5,6 µl pr. prøve med polyadenylinsyre 5' (Sigma, St. Louis, MO) eller poly-dA (Roche, Indianapolis, IN)
15 tilsatt. I tillegg ble parvovirus-B19-DNA eluert med 200 µl AE-buffert (Qiagen) i stedet for vann.

Eksempel 2

Påvisning av parvovirus-B19-nukleinsyrepositive prøver ved PCR

20 To forskjellige PCR-fremgangsmåter ble anvendt for oppformering av parvovirus-B19-framenter. En fremgangsmåte beskrevet i detalj nedenfor, ble anvendt for oppformering av framenter på ca. 700 bp, 370 bp og 214 bp (se figur 1). High Fidelity Expand PCR (Roche) ble anvendt for oppformering av framenter på ca. 4,7 kb. Det omtrentlige 700 bp-framenteret korresponderer til nukleotidposisjonene 2936-
25 3635 i parvovirus-B19-genomet beskrevet av Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936. Det omtrentlige 370 bp finnes innen det 700 bp-framenteret ved nukleotidposisjonene 3073-3442. Det omtrentlige 4,7 kb-framenteret er et 4677 nukleotidfragment som korresponderer til nukleotidposisjonene 217-4893 av Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936.

30 For å oppformere B19-framenterene på omtrentlig 700 bp, 370 bp og 214 bp ble primerne vist i tabell 1 anvendt.

Tabell 1

Primer		PCR-	
Region	Sekvens	produkt	Genomisk
VP-5	AGGAAGTTTGCCGGAAGTTC (SEKV. ID nr. 36)	370 bp	VP1
VP-3	GTGCTGAAACTCTAAAGGTG (SEKV. ID nr. 37)	370 BP	Vp1

VP2-5	GACATGGATATGAAAAGCCTGAAG (SEKV. ID nr. 38)	214 bp
VP1/VP2		
VP2-3	GTTGTTTCATATCTGGTTAAGTACT (SEKV. ID nr. 39)	214 bp
VP1/VP2		
K-1sp	ATAAATCCATATACTCATT (SEKV. ID nr. 40)	700 bp
VP1/VP2		
K-2ps	CTAAAGTATCCTGACCTTG (SEKV. ID nr. 41)	700 bp
VP1/VP2		

For dette eksperiment ble PCR utført i et sluttvolum på 100 µl ved anvendelse av 200 ml rensset parvovirus-B19-DNA (renset som beskrevet ovenfor), 0,2 mM av hver deoksynukleotidtrifosfat og 1,25 enheter Pfu-DNA-polymerase (Stratagene, La Jolla, CA). Oppformeringsprofilen involverte denaturering ved 94 °C i 2 minutter, primeranniling ved 37 °C i 3 minutter og utvidelse ved 72 °C i 3 minutter i 35 sykluser. En 3 minutters preinkubering ved 94 °C for sikre initial denaturering og en sluttinkubering på 7 minutter ved 72 °C for å sikre full utvidelse av fragmentene henholdsvis før og etter de 35 PCR-syklusene. PCR-produktene ble kjørt i elektroforese på 7 % polyakrylamidgélér, farget med etidiumbromid og visualisert under en UV-kilde. Rensing av amplifiserte fragmenter ble utført ved anvendelse av QiaQuick PCR rensesett (QIAGEN).

Nestet PCR for oppformering av det 370 bp B19-fragmentet ble utført når det 700 bp-båndet ikke ble visualisert på polyakrylamidgélene. Det 700 bp-DNA-materialet ble anvendt til det nestete PCR ved anvendelse av primerne vist i tabell 1.

High Fidelity Expand PCR (Roche) ble anvendt som følger for å oppformere parvovirus-B19-fragmentet på 4,7 kb. High Fidelity Expand PCR-settet (Roche) og primerne Hicks-5 (5' CCCGCCTTATGCAAATGGGCAG 3') (SEKV. ID nr. 42) og Hicks-3 (5' TTGTGTTAGGCTGTCTTATAGG 3') (SEKV. ID nr. 43) ble anvendt ved å følge leverandørens anbefalinger. Oppformeringsbetingelsene var 94 °C i 1 minutt, og 50 °C i 2 minutter og 68 °C i 4 minutter i 35 eller 45 sykluser. En preinkubering på 94 °C i 2 minutter og en postinkubering på 75 °C i 7 minutter ble også inkludert. PCR-produktene ble separert på 1 % agarosegélér og rensset ved anvendelse av PCR Purification Kit (Promega, Madison, WI).

Eksempel 3

Kloning av parvovirus-B19-DNA-fragmenter

PCR-fragmentene ble klonet inn i TPOP-TA-vektorer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Kloning inn i disse vektorene er meget enkelt når de oppformerte DNA inneholder
 5 en enkelt deoksyadenosin (A) ved sin 3' ende. En katalytisk reaksjon for tilsetning av det 3' (A) overhenget ble følgelig anvendt. Reaksjonsblandingen inneholdt 1,25 mM dAPT, 0,5 Taq-polymeraseenheter (Perkin Elmer, Boston, MA) og fortsatte ved 72 °C i 15 minutter.

PCR-fragmentene ble klonet inn i pCR2.1-TOPO-vektoren ved anvendelse av
 10 Invitrogen's TA-kloningssett ("TOPO" TA Cloning^R Kit med One Shot TOP10 Electrocompetent Cells) ved å følge produsentens spesifikasjoner. Bakterielle celler ble inkubert ved 37 °C på Luria Broth-plater inneholdende ampicillin på 100 µ/ml, 0,66 mM IPTG og 0,033 % X-Gal. En rekke hvite kolonier ble inokkulert i 4 ml Luria-Broth ampicillin (100 µ/ml) og inkubert over natten ved 37 °C med rysting. 3 ml av over-
 15 natten-kulturene ble anvendt for å tilberede plasmid-DNA ved anvendelse av QIAprep Miniprep settet (QIAGEN). Rekombinante kloner ble identifisert ved restriksjonsenzymanalyse med *EcoRI* (New England and Biolabs) og 7 % polyakrylamid eller 1 % agarosegелеlektroforese som beskrevet ovenfor.

For å bestemme klonenes DNA-sekvens ble store mengder plasmider fra
 20 rekombinante kloner tilberedt som ovenfor, og DNA ble suspendert i TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA) ved 0,2 mg/ml. Nukleotidsekvensbestemmelse av parvovirus-B19-fragmentene ble utført ved anvendelse av et Applied Biosystems Modell 373 (eller Modell 377) DNA-Sequencer system.

Figurene 2A til 2U (SEKV. ID nr. 1-21) viser DNA-sekvenser fra 21 parvovirus-
 25 B19-isolater, rensset, oppformert og sekvensert som beskrevet ovenfor, som korresponderer til nukleotidposisjonene 2936-3635 i parvovirus-B19-genomet beskrevet av Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936 (700 bp-fragmentet fra figur 1, og som er beskrevet ovenfor).

Figur 2A (SEKV. ID nr. 1) er sekvensen fra isolat CH47-26;
 30 Figur 2B (SEKV. ID nr. 2) er sekvensen fra isolat CH48-29;
 Figur 2C (SEKV. ID nr. 3) er sekvensen fra isolat CH33-2;
 Figur 2D (SEKV. ID nr. 4) er sekvensen fra isolat CH33-3;
 Figur 2E (SEKV. ID nr. 5) er sekvensen fra isolat CH33-4;
 Figur 2F (SEKV. ID nr. 6) er sekvensen fra isolat CH42-7;
 35 Figur 2G (SEKV. ID nr. 7) er sekvensen fra isolat CH42-18;
 Figur 2H (SEKV. ID nr. 8) er sekvensen fra isolat CH42-19;

- Figur 2I (SEKV. ID nr. 9) er sekvensen fra isolat CH46-23;
 Figur 2J (SEKV. ID nr. 10) er sekvensen fra isolat CH1-1;
 Figur 2K (SEKV. ID nr. 11) er sekvensen fra isolat CH1-6;
 Figur 2L (SEKV. ID nr. 12) er sekvensen fra isolat CH2-8;
 5 Figur 2M (SEKV. ID nr. 13) er sekvensen fra isolat CH2-10;
 Figur 2N (SEKV. ID nr. 14) er sekvensen fra isolat CH2-11C;
 Figur 2O (SEKV. ID nr. 15) er sekvensen fra isolat CH5-13;
 Figur 2P (SEKV. ID nr. 16) er sekvensen fra isolat CH7-22;
 Figur 2Q (SEKV. ID nr. 17) er sekvensen fra isolat CH13-27;
 10 Figur 2R (SEKV. ID nr. 18) er sekvensen fra isolat CH14-33;
 Figur 2S (SEKV. ID nr. 19) er sekvensen fra isolat CH62-2;
 Figur 2T (SEKV. ID nr. 20) er sekvensen fra isolat CH64-2; og
 Figur 2U (SEKV. ID nr. 21) er sekvensen fra isolat CH67-2.

- Figurene 11A til 11Z (SEKV. ID nr. 62-87) viser DNA-sekvenser fra ytterligere
 15 26 parvovirus-B19-isolater, rensset, oppformert og sekvensert som beskrevet ovenfor,
 som korresponderer til nukleotidposisjonene 2936-3635 i parvovirus-B19-genomet,
 beskrevet i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936 (700 bp-fragmentet fra figur 1, og
 beskrevet ovenfor).

- Figur 11A (SEKV. ID nr. 62) er sekvensen fra isolat CH80-1;
 20 Figur 11B (SEKV. ID nr. 63) er sekvensen fra isolat CH81-3;
 Figur 11C (SEKV. ID nr. 64) er sekvensen fra isolat B19SCL1-4;
 Figur 11D (SEKV. ID nr. 65) er sekvensen fra isolat B19SCL2-1;
 Figur 11E (SEKV. ID nr. 66) er sekvensen fra isolat B19SCL3-1;
 Figur 11F (SEKV. ID nr. 67) er sekvensen fra isolat B19SCL4-3;
 25 Figur 11G (SEKV. ID nr. 68) er sekvensen fra isolat B19SCL5-2;
 Figur 11H (SEKV. ID nr. 69) er sekvensen fra isolat B19SCL6-2;
 Figur 11I (SEKV. ID nr. 70) er sekvensen fra isolat B19SCL7-3;
 Figur 11J (SEKV. ID nr. 71) er sekvensen fra isolat B19SCL8-2;
 Figur 11K (SEKV. ID nr. 72) er sekvensen fra isolat B19SCL9-1;
 30 Figur 11L (SEKV. ID nr. 73) er sekvensen fra isolat B19SCL9-9;
 Figur 11M (SEKV. ID nr. 74) er sekvensen fra isolat B19SCL10-2;
 Figur 11N (SEKV. ID nr. 75) er sekvensen fra isolat B19SCL11-1;
 Figur 11O (SEKV. ID nr. 76) er sekvensen fra isolat B19SCL12-1;
 Figur 11P (SEKV. ID nr. 77) er sekvensen fra isolat B19SCL13-3;
 35 Figur 11Q (SEKV. ID nr. 78) er sekvensen fra isolat B19SCL14-1;
 Figur 11R (SEKV. ID nr. 79) er sekvensen fra isolat B19SCL15-3;

Figur 11S (SEKV. ID nr. 80) er sekvensen fra isolat B19SCL16-2;
 Figur 11T (SEKV. ID nr. 81) er sekvensen fra isolat B19SCL17-1;
 Figur 11U (SEKV. ID nr. 82) er sekvensen fra isolat B19SCL18-1;
 Figur 11V (SEKV. ID nr. 83) er sekvensen fra isolat B19SCL19-1;
 5 Figur 11W (SEKV. ID nr. 84) er sekvensen fra isolat B19SCL20-3;
 Figur 11X (SEKV. ID nr. 85) er sekvensen fra isolat B19SCL21-3;
 Figur 11Y (SEKV. ID nr. 86) er sekvensen fra isolat B19SCL22-11;
 Figur 11Z (SEKV. ID nr. 87) er sekvensen fra isolat B19SCL2-14.

Sekvenssammenlikninger viste omkring 98 % til 99,5 % sekvenshomologi av
 10 denne 700 bp sekvens mellom de forskjellige isolatene.

Figur 3A-3C (SEKV. ID nr. 22) viser sekvensen for det ca. 4,7 kbp PCR-
 fragmentet vist i figur 1 og beskrevet ovenfor fra parvovirus-B19-klon-2-B1. Sekvensen
 vist i figurene er et 4677-nukleotidfragment som korresponderer til
 nukleotidposisjonene 217-4893 i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936. Sekvensen
 15 som er vist inneholder den fullengde åpne leseramme fra parvovirus-B19 som koder for
 NS1, VP1 og VP2, og ytterligere 5' og 3' utranslaterte sekvenser. Det sekvenserte
 fragmentet viste et ytterligere nukleotid i den 5' ikkekodende regionen mellom
 nukleotidposisjon 367 og 368 i forhold til B19-sekvensen rapportert av Shade et al., *J.*
Virol. (1986) 58:921-936.

20 Figurene 4A-4C (SEKV. ID nr. 23) viser sekvensen for PCR-fragmentet på ca.
 4,7 kbp vist i figur 1 fra parvovirus-B19-klon-2-B6. Sekvensen er et 4677
 nukleotidfragment korresponderende til nukleotidposisjonene 217-4893 fra Shade et al.,
J. Virol. (1986) 58:921-936. Sekvensen som er vist inneholder den fullengde åpne
 leseramme hos parvovirus-B19 som koder for NS1, VP1 og VP2, og ytterligere 5' og 3'
 25 utranslaterte sekvenser. Det sekvenserte fragmentet inneholdt et ytterligere nukleotid i
 den 5' ikkekodende regionen mellom nukleotidposisjon 367 og 368 i B19-sekvensen
 rapportert av Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936.

Eksempel 4

30 Kloning og ekspresjon av parvovirus-B19 NS1-, VP1- og VP2-rekombinante proteiner

Fragmenter som koder for NS1, VP1 og VP2 (se figur 1) ble oppformert ved
 anvendelse av det 4,7 kb-fragmentet fra parvovirus-B19 som er klonet inn i pCR2.1-
 TOPO (beskrevet ovenfor). Spesielt ble PCR-primere (se nedenfor) konstruert for å
 PCR ut NS1, VP1 og VP2 regionene i parvovirus-B19. For å tilpasse kloningen av disse
 35 regionene inn i gjærekspresjonsvektorer, ble *Xba*I-, *Hind*III- og *Sal*I-restriksjonssteder
 introdusert i primerne etter behov.

Primerne anvendt for å klone og oppformere parvovirus-B19-fragmenter for gjærekspresjon av NS1-, VP1- og VP2-rekombinante proteiner, var basert på sekvensene oppnådd ovenfor, og var som følger:

5 NS1-5 (sensprimer)

5'ATACTATATCGACAAAACAAAATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAAGT
TTCT3' (SEKV. ID nr. 44)

NS1-3 (antisensprimer)

10 5'GAGTATGTCGACTTACTCATAATCTACAAAGCTTTGCAATCCAGACAG3'
(SEKV. ID nr. 45)

VP1-5SN (sensprimer)

5'ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGAGTAAAGAAAGTGGCAAATGGTGG
15 GAAAGT3' (SEKV. ID nr. 46)

VPALL-3 (antisensprimer)

5'GAGTATGTCGACTTACAATGGGTGCACACGGCTTTTGGCTGTCCACAATTC
3' (SEKV. ID nr. 47)

20

VP2-5SN (sensprimer)

5'ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCA
GCACT3' (SEKV. ID nr. 48)

25 PCR-primere ble syntetisert, renset og suspendert i 300 µl dH₂O og deres optiske tetthet på 260 nm ble bestemt. Reaksjonsblandingen inneholdt 0,25 ng templat, 100 pmol av hver primer, 10 µl 1,25 mM av hver dNTP og 1 enhet Taq-polymerase (Perkin Elmer, Boston, MA) i et sluttvolum på 50 µl. Oppformeringsbetingelsene var 94 °C i 1 minutt, 50 °C i 2 minutter, og 68 °C i 4 minutter i 35 sykluser. En 7 minutters
30 sluttinkubering ved 75 °C ble tillagt for å sikre full utvidelse av fragmentene. Alikvoter på 5 µl ble anvendt for å kontrollere PCR-syntesen ved elektroforese på 1 % agarosegéler. Hele PCR-produktet ble så elektroforert og fragmentene som hadde de forventete størrelsene ble renset fra gélene ved anvendelse av PCR rensesett (Promega) etter leverandørens anbefalinger. Omkring 0,8 µg renset PCR-DNA ble spaltet med
35 passende restriksjonsenzymmer (Roche) i 3 timer ved 37 °C og produktene ble videre renset ved anvendelse av Promega PCR Purification Kit.

Plasmid pBS24.1 ble anvendt for heterolog ekspresjon av parvovirus-B19 rekombinante proteiner. Denne gjærekspresjonsvektoren inneholder 2 mikrosekvenser og inverterte repetisjoner (IR) for autonom replikering i gjær, α -faktorterminatoren for å sikre transkripsjonsterminering, og gjæren *leu2-d* og URA3 for seleksjon. ColE1-oppri-
 5 nnelsen for replikasjon og β -laktamasegenet er også til stede for formering og seleksjon i *E. coli* (Pichuan-
 tes et al. (1996) "Expression of Heterologous Gene Products in Yeast." In: *Protein Engineering: A Guide to Design and Production*, kapittel 5. J. L. Cleland og C. Craik, red., Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y., s. 129-161. Plasmid pBS24.1 ble spaltet med *Bam*HI/*Sal*I og defosforylert med 10 enheter av alkalisk
 10 fosfatase fra kalvetarm (Boheringer Mannheim, Indianapolis, IN) under betingelser anbefalt av leverandøren. De fordøyde og rensete PCR-fragmentene ble blandet med *Bam*HI/*Sal*I-fordøyd pBS24.1 og med et DNA-fragment som inneholdt gjærhybridpromoter-
 en ADH2/GAPDH (Cousens et al., *Gene* (1987) 61:265-275) fordøyd enten med *Bam*HI/*Sfu*I eller et *Bam*HI/*Hind*III, avhengig av restriksjonssetene
 15 til stede i PCR-fragmentene som skulle klones. Ligering ble utført med Roche Rapid Ligation sett og protokoll. Ligeringsblandingen ble så anvendt for å transformere *E. coli* HB101-kompetente celler, og transformantene ble selektert i Luria-Broth-plater inneholdende ampicillin i 100 μ g/ml etter inkubering ved 37 °C over natten. Flere kolonier for hver transformering ble plukket og inokkulert i 3 ml Luria-Broth med
 20 ampicillin i 100 μ g/ml og inkubert ved 37 °C med rysting over natten.

Plasmid-DNA ble tillaget ved anvendelse av 1,5 ml kulturer og QIAprep Miniprep-settet (QIAGEN). Rekombinante kloner ble identifisert ved analytisk restriksjonsanalyse med *Bam*HI-*Sal*I. Storskala fremstilling av rekombinante plasmider ble utført for å utføre sekvensering for bekreftelse av nukleotidsekvensen av de klonete
 25 parvovirus-B19-fragmentene.

Gjærekspresjonsplasmider som viste de forventete sekvensene for NS1, VP1 og VP2 ble anvendt for gjærtransformasjon, som følger. Kompetente *Saccharomyces cerevisiae* AD3-celler [*Mat a*, *trp1* +, *ura3-52*, *prb1-1122*, *pep4-3*, *prc1-407*, [*cir*⁰], *:pDM15(pGAP/ADRI::G418^R)*], *leu2*(Δ AD)] ble transformert med plasmid-DNA
 30 som koder for NS1, VP1 eller VP2, klonet som beskrevet ovenfor. Seleksjon av gjærrekombinanter ble oppnådd ved to runder av uracil-mangelfulle plater etterfulgt av en runde med leucin-mangelfulle plater etter inkubering ved 30 °C i 48-72 timer. Kulturene ble så dyrket i leucin-mangelfullt medium og så i YEP supplert med 2 % glukose (Pichuan-
 tes et al., *Proteins: Struct. Funct. Genet.* (1989) 6:324-337) i 48 timer
 35 før ekspresjonskontroll av de rekombinante proteinene.

Sekvensene for de forskjellige proteinene fra to forskjellige isolater er vist i figurene 5-10. Spesielt viser figur 5A (SEKV. ID nr. 24) og 5B (SEKV. ID nr. 25) henholdsvis NS1-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B1. Figur 6A (SEKV. ID nr. 26) og 6B (SEKV. ID nr. 27) viser henholdsvis VP1-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B1. Figur 7A (SEKV. ID nr. 28) og 7B (SEKV. ID nr. 29) viser henholdsvis VP2-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B1. Figur 8A (SEKV. ID nr. 30) og 8B (SEKV. ID nr. 31) viser henholdsvis NS1-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B6. Figur 9A (SEKV. ID nr. 32) og 9B (SEKV. ID nr. 33) viser henholdsvis VP1-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B6. Figur 10A (SEKV. ID nr. 34) og 10B (SEKV. ID nr. 35) viser henholdsvis VP2-nukleotidet og proteinsekvensene fra parvovirus-B19 klon 2-B6.

Eksempel 5

Påvisning og kvantifisering av parvovirus-B19-DNA ved "TaqMan"

En sensitiv, diagnostisk fremgangsmåte for påvisning av parvovirus-B19-infeksjon ble konstruert som følger. "TaqMan" PCR-teknologi ble spesielt anvendt for påvisning og kvantifisering av parvovirus-B19-DNA. Kvantitativ PCR krever effektiv ekstraksjon av nukleinsyre. Volumet av plasma/serum som anvendes for DNA-ekstraksjon påvirket også påvisningsfølsomheten. To tilnærminger ble anvendt for å isolere nukleinsyre fra 0,5 ml plasma/serum. DNA ble spesielt ekstrahert ved (a) binding til silika; og (b) anniling til målspesifikke oligonukleotider.

(a) Isolering av nukleinsyre ved binding til silika

I nærvær av høy konsentrasjon av chaotropiske salter, slik som guanidinium isotiocyanat binder nukleinsyrer til silika. Nukleinsyrer av liten størrelse binder mer effektivt til silika under betingelser med sur pH. De bundne nukleinsyrene elueres effektivt i buffer med lavt salt og alkalisk pH ved høye temperaturer. Substitusjonen av magnetisert silika i stedet for vanlig silika forenkler vasking og elueringstrinnene ved nukleinsyreisolering. Et magnetisk fundament ble anvendt for å fange de nukleinsyrebundne silikapartiklene, således elimineres behovet for sentrifugering for å sedimentere vanlige silikapartikler.

Lysisbufferen som ble anvendt var fra Organon-Teknika (Durham, NC). Denne lysisbufferen inneholder guanidinium isotiocyanat for å løse proteiner og inaktivere RNaser og DNaser. Triton X-100 detergenten forenkler videre

solubiliseringsprosessen og disintegring av cellestruktur og nukleære proteiner, og således frigjøring av nukleinsyre. Lysisreagensen ble surgjort for å øke nukleinsyrebinding, og 50 µl alkalisk elueringsbuffer ble anvendt for å eluere den bundne nukleinsyren. Etter nukleinsyreisolering ble nærværet av parvovirus-DNA bestemt ved å utføre "TaqMan"-PCR som beskrevet nedenfor.

(b) Isolering av nukleinsyre ved å annele til målspesifikke oligonukleotider

Selv om anvendelse av magnetisert silika svært forenkler hurtig og enkel håndtering gjennom vaskingen og elueringstrinnene, er fortsatt isolering av nukleinsyre arbeids- og tidskrevende. En-trinns fanging av spesifikke nukleinsyremål fra plasma eller serum ved anvendelse av magnetiske kuler ble derfor brukt. For å gjøre dette anvendelig for en rekke virale nukleinsyreinnfangningstester, ble det anvendt felles magnetiske kuler koblet med oligo-dT. Sera-Mag magnetiske oligo (dT) kuler (Seradyn, Indianapolis, IN) med en oligo-dT lengde på 14-mer ble anvendt i kombinasjon med "Capture" oligonukleotider inneholdende 20 poly-A ved den 3' ende i nær forbindelse med den parvoviruspesifikke sekvensen som ble anvendt (vist ved enden av sekvensen spesifisert nedenfor).

Antisens innfangingsoligonukleotidene som ble anvendt, ble utledet fra det 700 bp-fragmentet og var som følger:

VSPC1-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCTTAACAGCAATTTCTGATA (nt 3492-3514) (*) (SEKV. ID nr. 49)

VSPC2-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCCCTGTAGTGCTGTCAG (nt 3549-3568) (SEKV. ID nr. 50)

VSPC3-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATACCCAAATAGGAAGTTCTG (nt 3639-3660) (SEKV. ID nr. 51)

VSPC4-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAATGCTGATTCTTCACTTGC (nt 3737-3759) (SEKV. ID nr. 52)

VSPC5-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCTGTACCTCCTGTACCTA (nt 3789-3808) (SEKV. ID nr. 53)

VSPC6-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCTCTAAATTTTCTGGG (nt 3838-3857) (SEKV. ID nr. 54)

5 VSPC7-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCTAATGTGTCAGGAACC (nt 3910-3929) (SEKV. ID nr. 55)

(*) Nukleotidnummereringen er i henhold til Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936.

10 De magnetiske kulene ble suspendert i Novagen lysisbuffer (Madison, WI) og en rekke på syv innfangingsoligonukleotider (VSPC1-VSPC7, beskrevet ovenfor) ble testet individuelt eller i kombinasjon for å fange parvovirus-B19-DNA fra et panel skaffet tilveie fra FDA Center for Biologic Evaluation and Research, U.S. Department of Health and Human Services (FDA-CBER).

15 (c) Vasking av kulene med en vaskebuffer

Etter innfangning ble kulene vasket med en buffer inneholdende 10 mM Hepes bufret til pH 7,5 i 0,3 M NaCl og 0,5 % NP-40. Etter serumbehandling med lysisbuffer, hybridisering, magnetisk adsorpsjon av kulene, og fjerning av lysisbufferen, ble 1,5 ml av vaskebufferen tilsatt til kulene. Etter den vanlige vorteksingen, magnetiske
20 adsorpsjonen og fjerningen av vaskebufferen, ble kulene vasket igjen i 0,5 ml i den samme bufferen, slik at de magnetiske kulene kan sammenpresses for lett suspensjon i 100 ml Universal PCR-buffert inneholdende alle reagensene for TaqMan-analysen. Kulene med det fangete DNA ble overført til en "TaqMan"-plate for påvisning av "TaqMan"-PCR, som beskrevet nedenfor. Flere oligonukleotidkombinasjoner var
25 effektive i å fange B19 som påvist av "TaqMan"-analyse.

"TaqMan"-teknologien oppformerer spesielt innfanget målnukleinsyre som DNA-"ampliconer". Et alternativ er oppformering av det fangete målet som RNA. For dette besto oppformeringsoligonukleotidene av en parvovirus-B19-spesifikk primer med en T7-promotersekvens, for å generere RNA-ampliconer ved anvendelse av T7-RNA-
30 polymerase. Tre oppformeringsprimere (VSA1-A3, beskrevet nedenfor), utledet fra den 700 bp-sekvensen som korresponderer til nukleotidene 2936-3635 i parvovirus-B19-genomet, beskrevet i Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936, ble testet for deres evne til oppformering.

Primerne var som følger:

Senstråd oppformeringsprimere

VSA1-

5 AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCATATACTCATTGGACTGT
(nt 2942-2961) (SEKV. ID nr. 56)

VSA2-

10 AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCAGAGCACCATTATAA
(nt 3272-3288) (SEKV. ID nr. 57)

VSA3-

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACAATGCCAGTGGAAA
(nt 3317-3333) (SEKV. ID nr. 58)

15

VSP2-GTGCTGAAACTCTAAAGGT

(Antisens primer- nt 3424-3442) (SEKV. ID nr. 59)

20 RNamplifire-sett (Qiagen) reagenser ble anvendt for å undersøke
oppformeringseffektiviteten ved anvendelse av 50 kopier av parvovirus-DNA som mål i
et sluttvolum på 20 ml. Oppformeringsprimerne ble testet individuelt eller i
kombinasjon ved anvendelse av VSP2 som den andre primeren. Etter en times
inkubering ved 42 °C, som anbefalt av produsenten, ble en alikvot av det oppformerte
materialet fortynnet 100 ganger for påvisning ved "TaqMan"-analysen for å undersøke
25 effektiviteten av oppformeringsprimerne. En kombinasjon av to oppformeringsprimere,
VSA2 og VSA3 med VSP2, var veldig effektive i generering av RNA-ampliconer.

Sensitiviteten til "TaqMan"-analysen og velegnetheten til PCR-primerne og de
optimale reaksjonsbetingelsene, ble etablert ved anvendelse av plasmid-DNA
inneholdende det 4,7 kb-fragmentet, beskrevet ovenfor. Dette fragmentet inkluderer
30 VP1-regionen, så vel som NS1- og VP2-regionene (se figur 1). PCR-
oppformeringsprimerne utledet fra VP1-regionen, i detalj nedenfor, ble anvendt.
Nummereringen er relativ til Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936. X representerer
5'-fluorescein fosforamidit og Z representerer DABCYL-dT, begge oppnådd fra Glen
Research Corporation, Sterling, VA. Nummereringen som er vist på høyre side av
35 sekvensen refererer til nukleotidene i primerne fra parvovirus-B19-sekvensen.

VSP1-GGAGGCAAAGGTTTGCA (Sens primer-nt 3334-3350)
(SEKV. ID nr. 60)

VSP2-GTGCTGAAACTCTAAAGGT (Antisens primer-nt 3424-3442)
5 (SEKV. ID nr. 59)

VSPPR1-XCCCATGGAGATATTTAGATTZ (Probe-nt 3379-3398)
(SEKV. ID nr. 61)

10 Vpara 8: TCCATATGACCCAGCGCACCA (nt 3262-3460)
(SEKV. ID nr. 88)

Vpara 9: TTTCCACTGGCATTGTGGC (Antisens primer-nt 3313-3331)
(SEKV. ID nr. 89)

15 Vpara 10: XAGCTAGACCTGCATGTCCTGZ, der X er Fam og Z er Tamra.
(nt 3286-3310) (SEKV. ID nr. 90)

Plasmid-DNA konsentrasjonen ble estimert spektrofotometrisk og
20 seriefortynninger ble utført for å skaffe tilveie 5,000-10 kopier/20 µl.
Reaksjonsblandingen i et sluttvolum på 50 µl inneholdt 20 µl prøve, 1 x Gold Taq-
amplifiseringsbuffer (Perkin Elmer) med 3,2 mM MgCl₂, 300 µM av hver av dNTP, 1
pmol av hver av oppformeringsprimerne, 0,4 pmol av proben og 1 enhet av AmpliTaq-
enzym. Reaksjonsbetingelsene inkluderte 10 minutter ved 95 °C for å aktivere enzymet,
25 etterfulgt av 45 sykluser ved 30 sekunder ved 95 °C, alternerende med 60 °C i en ABI
7700 Sequence Detector.

Ved anvendelse av primerparet VSP1 og VSP2, som genererte et 109 bp PCR-
produkt og proben VSPPR1, var så få som 10 kopier/analyse målbare. Fordi
prøvevolumet var 20 µl i et sluttvolum på 50 µl, tydet dette på at plasmaprøvene, som
30 inneholdt så få som 50 kopier/ml parvovirus-B19-DNA, kunne ekstraheres og påvises
med "TaqMan"-teknologi. Fordi parvovirus er et høytitervirus, kunne plasma/serum-
volumer på 50 µl ekstraheres og anvendes for analyse.

Ved anvendelse av den FDA-CBER-parvovirus-B19-DNA-positive prøven
(10⁶ kopier/ml), detekterte "TaqMan"-teknologien så få som 50 kopier pr. analyse. I et
35 forsøk på å korrelere nukleinsyren og immunitet, ble den virale DNA-lasten
kvantifisert i flere antistoffpositive prøver.

Nye humane parvovirus-B19-sekvenser og påvisningsanalyser som anvender disse sekvensene er følgelig blitt beskrevet.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for påvisning av human parvovirus-B19-infeksjon i en biologisk prøve,
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte fremgangsmåte omfatter:

(a) å isolere nukleinsyre fra en biologisk prøve mistenkt for å inneholde humant
 parvovirus-B19-DNA, hvori nevnte nukleinsyre omfatter en målsekvens;

(b) å oppformere målsekvensen ved å benytte en nukleinsyrepolymerase med 5'- til 3'-
 10 nukleaseaktivitet, et primerpar som er i stand til å hybridisere til målsekvensen, og
 en oligonukleotidprobe designet for å hybridisere 3' til den ene av primerne i den
 oppformerte sekvensen,
 hvori

- 15 (i) nevnte primerpar består av en sensprimer av SEKV ID nr. 88 og en
 antisensprimer av SEKV ID nr. 89;
- (ii) probens 5' ende inneholder en fluorescerende rapportørfarge, og probens
 3' ende er blokkert for å hindre probeutvidelse og inneholder en farge
 som bremser fluorescensen av den 5' fluorofor;
- 20 (iii) under oppformering fordøyer polymerasen oligonukleotidproben når den
 hybridiserer til målsekvensen, for dermed å separere rapportørmolekylet
 fra bremsermolekylet; og
- (iv) ettersom oppformeringen er utført, blir fluorescensen på
 rapportørmolekylet målt, med fluorescens som korresponderer til
 25 nukleinsyreoppformeringsbegivenheten.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at rapportørmolekylet er
 en fluorescerende farge.

30

3.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at bremsermolekylet er en rhodaminfarge.

35

4.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
karakterisert ved at nevnte nukleinsyrepolymerase er en *Thermus*
5 *aquaticus* (Taq)-polymerase.

5.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
karakterisert ved at isoleringstrinnet omfatter anniling av nukleinsyren til
10 et målspesifikt innfangingsoligonukleotid, hvori innfangingsoligonukleotidet har en
polynukleotidsekvens valgt fra SEKV ID nr. 49-55.

6.

Fremgangsmåte for påvisning av human parvovirus-B19-infeksjon i en biologisk prøve,
15 karakterisert ved at nevnte fremgangsmåte omfatter:

(a) å isolere nukleinsyre fra en biologisk prøve mistenkt for å inneholde humant
parvovirus-B19-DNA, hvori nevnte nukleinsyre omfatter en målsekvens;

(b) å reagere den isolerte parvovirus-B19-nukleinsyren med et første oligonukleotid
20 omfattende en første primer som omfatter en kompleksdannende sekvens
tilstrekkelig komplementær til den 3'-terminale delen av målsekvensen som den
skal danne kompleks med, hvori nevnte første primer videre omfatter en promoter
for en DNA-avhengig RNA-polymerase 5' og operativt koblet til den
kompleksdannende sekvensen, hvori nevnte reaksjon er gjort under betingelser som
25 tilveiebringer dannelse av et oligonukleotid/målsekvenskompleks og initiering av
DNA-syntese;

(c) å utvide den første primeren i en utvidelsesreaksjon ved å anvende målsekvensen
som et templat for å gi et første DNA-primerutvidelsesprodukt som er
komplementært til målsekvensen;

(d) å behandle DNA-primerutvidelsesproduktet med et andre oligonukleotid omfattende
30 en andre primer som omfatter en kompleksdannende sekvens tilstrekkelig
komplementær til den 3'-terminale delen av DNA-primerutvidelsesproduktet til å
danne kompleks dermed, under betingelser som tilveiebringer dannelse av et
oligonukleotid/målsekvenskompleks og initiering av DNA syntese;

- (e) å utvide den 3'-terminale del av den andre primeren i en DNA-utvidelsesreaksjon for å gi et andre DNA-primerutvidelsesprodukt, og dermed produsere et templat for den DNA-avhengige RNA-polymerase;
- (f) å anvende templatene for produksjon av flere RNA-kopier av målsekvensen ved anvendelse av en DNA-avhengig RNA-polymerase som gjenkjenner promotersekvensen; og
- (g) autokatalytisk repetere trinnene (b) til (f) ved anvendelse av RNA-kopiene fra trinn (f) for oppformering av målsekvensen, hvori nevnte første og andre primer har polynukleotidsekvensen til SEKV ID nr. 88 og 89.

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter trinnene:

- (h) å tilsette en merket oligonukleotidprobe til produktet fra trinn (g), hvori nevnte oligonukleotidprobe er komplementær til en del av nevnte målsekvens, under betingelser som tilveiebringer hybridiseringen av nevnte probe med nevnte målsekvens for å danne et probe:målkompleks; og
- (i) å påvise nærvær eller fravær av merking som en indikasjon på nærvær eller fravær av målsekvensen.

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte merking er en acridiniumester.

9.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at den videre omfatter å tilveiebringe en internkontroll.

10.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at internkontrollen omfatter SEKV. ID nr. 90.

11.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den muliggjør påvisning av B19-DNA i viremiske
prøver med så lave virale titere som 10^3 viruspartikler/ml.

1/38

Humant parvovirus-B19

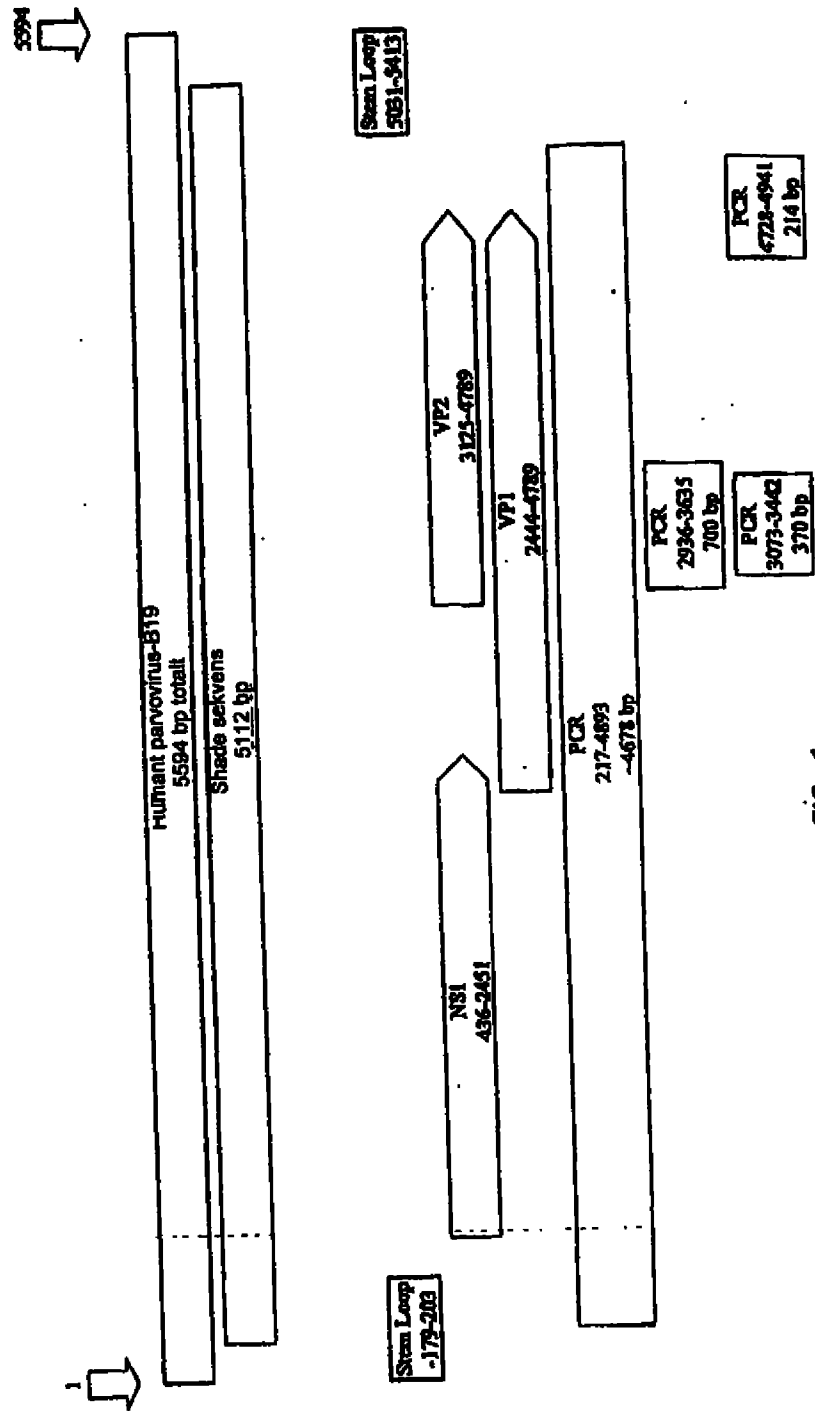


FIG. 1

2/38

CH47-26

ataaatccatatactcatggactgtagcagatgaagagccttataaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgcc
ggaagtcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcaccataatgggatactc
aaccatggagatatttagattttaatgctttaaaattgtttttcaccttttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgcgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtacaagttactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatattgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2A**CH48-29**

ataaatccatatactcatggactgtagcagatgaagagccttataaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgcc
ggaagtcccgcttacaacgcctcagaacaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcaccataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaaattttttttcaccttttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgcgttaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggtacaggttactgacagcactacaggggcgcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catattgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2B

3/38

CH33-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaagggaagtttgc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaacaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaaatttttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2C**CH33-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaagggaagtttgc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaacaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaaatttttttcaccttttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2D

4/38

CH33-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggcccattttcaaggaagttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtggggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacattttcagacagttttaattccataatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatactca
actccatggagatatattagatttaagtcttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgtttaactgtaaccataatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2E**CH42-7**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggcccattttcaaggaagttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttcaggcagttttaattccataatgacccagagcaccattataaggtgttttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatattagatttaagtcttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacctaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgtttaactgtaaccataatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2F

5/38

CH42-18

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggcccattttcaagggaagttigcc
ggaagtccccgcttacaacgccicagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggagggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaagggttgaccattagtcctaatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2G**CH42-19**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggcccattttcaagggaagttigcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggagggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaagggttgaccattagtcctaatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2H

6/38

CH46-23

attaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcitttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
 ncacaagtagtaaaagacttacttttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
 ggaagtcccgcctacaacgccctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
 tgggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaagggggccacttttagtgccaac
 tctgtaactgtacattttccaggcagttttaattccatatgacccagagcaccattataagggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagataattagatttaaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
 ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

FIG. 2I**CH1-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcitttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
 gcacaagtagtaaaagacttacttttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
 ggaagtcccgcctacaacgccctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
 tgggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaagggggccacttttagtgccaac
 tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataagggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagataattagatttaaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
 ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

FIG. 2J

7/38

CH1-6

ataaatccatatactcatggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtccaac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcacataatgggatact
caaccccatggagataattagattttaatgctttaaatttatttttcaccttagagttcagcacttaattgaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggagggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagacatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2K**CH2-8**

ataaatccatatactcatggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcacataatgggatactc
aaccccatggagataattagattttaatgctttaaatttatttttcaccttagagttcagcacttaattgaaat
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagacatgaataaagtac
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2L

8/38

CH2-10

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagatttaaatgctttaattttttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacagaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2M**H2-11C**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagatttaaatgctttaattttttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2N

9/38

CH5-13

ctaaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggagggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgacctagagcaccattataaggtgttttcccgc
gcaagtagctgccacaatgccagtggaagaggcaaggttgcactattagtcctataatgggatactca
accccatggagatatttagaatttaagcttttaattttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaattat
ggcagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacagggtactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatacaagtacc
caatgtgttagggcaaggcaggatactttag

FIG. 2O**CH7-22**

ataaatccatgtactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggagggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgacctagagcaccattataaggtgttttcccgc
gcaagtagctgccacaatgccagtggaagaggcaaggttgcaccattagtcctataatgggatactc
aaccatggagatatttagaatttaagcttttaattgtttttttcaccttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtacaaggtactgacagcactaccggcgccatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggcaggatactttag

FIG. 2P

10/38

CH13-27

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
ggaagtcccgcctacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaatctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggggggagtaattctgtcaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtctaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgca
gcgagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccatcagtcaccataatgggatactc
aaccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttccacttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacaggggcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

FIG. 2Q**CH14-33**

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
ggaagtcccgcctacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaatctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaactc
tgaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgca
caagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcaccataatgggatactcaa
cccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttccacttttagagtttcagcacttaattgaaaattatg
gtagtagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaagatgttacagacaaaactggag
ggggggtacaggttactgacagcactacaggggcctatgcatgttagtggaaccatgaatacaagtaccca
tatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

FIG. 2R

11/38

CH62-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagcact
gggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaactgtacaktttccagacagttttaatccatatgaccagagcaccattataaggtgttttccccgca
gccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttacccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggggtacaggttactgacagcactacaggccgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2S**CH64-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaatccatatgaccagagcaccattataaggtgttttccccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccccatggagatacttagattttaatgctttaaatttatttttacccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacaggccgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2T

CH67-2

ataaatccataactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgcc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaactgtacattttcagacagttttaattccatatgacctagagcaccattataaggtgttttcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaagaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccocatggagataatttagattttaatgctttaaattattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgcttlaactgtaaccatatcagaaattgctgttaagatgttacagacaaaactg
gaggggggtacagggtactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtgaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 2U

13/38

Parvovirus B19 clone #2-B1

1 cccgccttat gcaaattgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
 61 ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttcciggaact tacttgctgt tttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctactgttta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt tcttctaag ttctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctctttact
 301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata
 361 cttaaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccaactagcag ggtgcttgta
 421 ctttttcaa gtagaatgt acaaatgtga agaaggetat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtggtgtga gagggttat ttaataatgt
 541 actttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggc aaatac ttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 tttaaatgtt gtatgggtgt ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aaggagctt gccatgcaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggtgtgc catttaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagtcca aactatggta aactgggtgt gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttc aaattcaag tgcactaaa ctagcaattt ataaagcaac
 1021 taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttagcnaag ttatgtgtat
 1081 taaaaacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaac tatgaccccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta
 1201 tgggccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgtcaaaa gtgtccagt
 1261 atatggcatg gttaacggga ataattgaaa cttccattt aatgaigtg caggaaaaag
 1321 ctggtgtgtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttaggggg caaccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtg ctgtgcctgg
 1441 agtacctgtg gttataacca gcaatgggtg cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
 1501 acaactgtg catgctaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatgggtt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatgggt
 1621 taatgcacaa agctgggacc actatgaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc
 1681 tggaaattaat gcagatgcc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gcttttttaa
 1801 cctcatcacc ccaggeccct ggaacactga aacccgcgc tctagtacgc ccateccgg
 -----1861 gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttcc tccgaagttg tagctgcate-----
 1921 gtgggaagaa gccttctaca cactttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttgggt
 1981 tgattatgtg tgggacggtg taaggggtt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa

FIG. 3A

14/38

2041 tagtggggga ggettgggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg
 2101 atggaaattt cgagaattta cccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taatcccttt tctgtctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgc aaagctt
 2221 ttagattat gagtaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa ttgtctaaag
 2281 ctgtgtatca gcaatttgtg gaattttatg aaaagggttac tggacagac ttagagctta
 2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccetaga aaccatect
 2401 cttgtttga cttagtgtc cgtattaaaa ataacctaa aaactctcca gacttatata
 2461 gtcacattt tcaagtcac ggacagttat ctgaccacce ccagcctta tcatccagta
 2521 gcagtcacgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacagc
 2581 ctgggcaagt tagctgaca ctaccggta ctaactatgt tgggcttggc aatgagctac
 2641 aagctgggccc cccgcaagt gctgtgaca gtgtgcaag gattcatgac tttaggtata
 2701 gccaaactgc taagtggga ataatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt tcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
 2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc atttcaagg aagtttccc gaagtcccc
 2881 cttacaacgc ctcaaaaaa tacciaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaactctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt
 3001 ttagtgcaa ctctgtaact gtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taagggttt tctccgcag caagtagctg ccacaatgce agtggaaagg
 3121 aggc aaagg tgcaccatt agtccataa tgggatactc aaccctatgg agatatttag
 3181 attttaatgc ttaaattta ttttttcac ctttagagt ttagcactta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agtctctgat gtttaactg taaccatate agaaattgct gtttaaggatg
 3301 ttacggacaa aactggaggg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca
 3361 ttttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggtaaa gatactttag
 3421 cccagaaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagtaggag
 3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 tttatgttt ggaacacagt tctttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtg ccccgagaa atttagaggg ctgcagtaaa cacttttatg
 3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatccgct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gcccaaaac tcatgcccag
 3781 ggccactagt aaactcagt tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
 3841 aagcctaac aggccttag acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgccctg
 3901 ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggtcagacc acttatggta acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 -----4021 tgggtagatt tcaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt aeaggggtta naatgcaca -----
 4081 cctactttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc cccctaatgg
 4141 tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaatc
 4201 caaatttaga tgacagttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggtagg ggtttgcatc

FIG. 3B

15/38

4261 agccacctcc tcaaatattt ttaaaaatat taccacaag tgggccaatt ggaggtatta
4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgcegtggg aattatgaca gtaacctga
4381 catttaaatt ggggccccgt aaagetacgg gaegggtggaa tcctcaacct ggagtgatc
4441 cccgcacgc agcaggatcat ttaccatatg tactatatga cccacagct acagatgcaa
4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
4561 tgcaccatt gtaaacactc cccacgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgcca
4621 ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa

FIG. 3C

Parvovirus B19 clone #2-B6

1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggcagtt
 61 ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc tttctttctg ggttctttt ttcctggact tacttgcgtg tttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gettcaagtt tcttctaag ttctggactg tgetaacgat aactgggtgt gctctttact
 301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata
 361 ctttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta
 421 cttttttcaa gtagaatgta acaatttga agaagctat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
 541 actttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcaaatat ttagagatg gagagcagtt tatagaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 tttaatgtt gtatgggtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aaggagctt gccatgcca gaaacccgc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgtctggg agtctagcgg cacaggggca gaggttctgc cattaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagttica aactatggta aactgggtgt gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttc aaattcaaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac
 1021 taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat
 1081 taaagacaat aaaattgta aattgttact ttgtcaaac tatgacccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta
 1201 tggaccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt
 1261 atatggcatg gttactgga ataataaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 ctgggtggte tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagecat
 1381 tttagggggg caaccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgectgg
 1441 agtaccctgt gttataacca gcaatggta cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatgggtt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatgggt
 1621 taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc
 1681 tggaaattaat gcagatgccc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcage agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagea gcttttttaa
 1801 cctcatcacc ccaggegeet ggaacaciga aaccccgccg tctagtacgc ccateccggg
 -----1861 gaccagttca ggagaatcat ctgtcgggaag cccagtftcc tccgaagtgt tagctgcate
 1921 gtgggaagaa gccttctaca caecttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttggggg
 1981 tgattatgtg tgggacgggt taaggggtt accgtctctg tgtgtgcaac atattaacaa
 2041 tagtggggga ggcttgggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg

FIG. 4A

2101 atggaaattt cgagaattta cccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taateccctt tetgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaaagctt
 2221 tgtagattat gagtaaagaa agtgggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa ttgctnaag
 2281 ctgtgtatca gcaatttgig gaattttatg aaaagggttac tggaacagac ttagagctta
 2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt cttagataa tccctagaa aaecctect
 2401 cttgtttga cttagttgct cgtattaaaa ataaccttaa aaactctcca gacttatata
 2461 gtcacattt tcaagtcct ggacagttat ctgaccaccc ccattgctta tcatccagta
 2521 gcagtcatgc agaactaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccggta ctaactatgt tgggctggc aatgagctac
 2641 aagctgggcc cccgcaagt gctgtgaca gtgctgcaag gattcatgac ttaggtata
 2701 gccactggc taagtggga ataaatccat atactcatg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactactta
 2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc atttcaagg aagtttgcg gaagttccg
 2881 cttaaacgc ctcaaaaaa taccgaaga tgaactcagt taattctga gaagccaga
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaatctg tgaaaagcat gtggagtga ggggccactt
 3001 ttagtgccaa ctctgtaact tgcacattt ccagacaatt ttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taagggttt tctccgcag caagtagctg ccacaaatgc agtggaaagg
 3121 aggcnaaggi ttgcaccatt agtccataa tgggatactc aacccatgg agatattag
 3181 attttaatgc tttaaattha ttttttcac cttagagtt tcagcactta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agctctgat gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg
 3301 ttacaacaa aactggagg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca
 3361 tgttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttag gcaaggtaaa gatactttag
 3421 cccagaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagtaggag
 3481 atgttaacac acaaggaatt tetggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 tttatgtttt ggaacacagt tctttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtg ccccgagaa atttagaggg ctgcagtaaa cacttttatg
 3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatecctg taggggttc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaanattag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gcccnaaac tcatgccag
 3781 ggccactagt aaactcagtg tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
 3841 aagcctaac aggccttagc acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgcctg
 3901 ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
 3961 ccattttctc tggtcagacc acttatggta acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 4021 tgggttagatt tccaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acagggttta aacatgcaca
 4081 cctactttcc caataaagga-accagcaat-atacagataa-aattgagcgc-ccccaatgg-
 4141 tgggttctgt atggaacaga agagccctc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaatc
 4201 caaatttaga tgacagttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggtagg ggtttgcac
 4261 agccacctcc tcaaatattt ttaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta

FIG. 4B

18/38

4321 aatcaatggg aattactacc ttagtccagt atgccgtggg aattatgaca gtaacctga
4381 catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacgggtggaa tctcaacct ggagtgtatc
4441 cccgcacgc agcaggcat ttaccatag tactatatga cccacagct acagatgcaa
4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaage ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
4561 tgcacccatt gtaaacactc cccacgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgcca
4621 ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa

FIG. 4C

19/38

Clone B1-NS1 single stranded DNA sequence:

atattcttcgaacaaaacaaatggagctatttagaggggtgcttcaagtttcttcaatgttctggactgtgctaactggtggtgctctt
 tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactacatactaacagactaatggcaatatacttaagcagtgtggcttaagctgacttta
 ctggggggccactagcagggtgcttgaactttttcaagtagaatgaacaaattgaagaaggctatcatattcatgttggttaattggggggcca
 ggtttaaaccagaaacctcacagtgtgttagaggggttatttaataatgtactttatcaccttgaactgaaaatcgaagctaaaattttgc
 caggaatgactacaaaaggcaaatcttagagatggagagcagttatagaaaactatttaataaaaaataaccttaaatgtgtatggtgt
 gttactaatatgtatggacatatagatacctgtatttctgctacttttagaaaggagcttgcctatccaagaaccccgcaaccacagccat
 aaatgatactagtactgatgctggggagctagcgggcacaggggcagaggtgtgccaattaatgggaagggaactaaggctagcataaag
 ttcaaacatggttaacttggtgtgtgaaaacagaggtttacagaggalaagtggaactagttagctttaaccagtaactttactaagcagt
 agtcacagtggaagttttcaattcaagtgcaactaaactagcaatttataaagcaactaatttagtgcctactagcacattttattgcatacag
 actttgagcaagttatgtgtattaaaaacaataaaattgttaattgttactttgtcaaaactatgacccctatttagtggggcagcagtgttaag
 tggattgataaaaaatgtggcaaaaaacacactgtggtttatggcgccaagtacagggaaaaaacttgcaantggccattgctaa
 aagtgtccagtataatggcatggttaactggataatgaaaactttcatttaattgatgtagcaggaaaaagcttggtgtctgggtgaag
 gtatttaagctacaaatgtagaagctgcaaaagccattttagggcggaaccaccagggtatgataaaaaatgcgtggaagtgtagctg
 tgcctggagctacgtgtgttataaccagcaatgggtgacattactttgttgaagcggaacactacaacactgtacatgctaaagocctaaaa
 gagcgcatggttaagttaaactttactgtatgatgcagccctgacatgggttactaacagaggctgatgataacagtggttcatatggtgt
 aatgcacaaagctgggaccactatgaaaactggcaataaactacacttttatttccctggaaatgaatgcagatgcccaccacagacctcc
 aaaccacccaattgtcacagacaccagatcagcagcagtggtgtggaagctctgaagaactcagtgaaagcagcttttaacctcatca
 cccagggcgcttgaacactgaaccccgcgctctagtagccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgtcgggaagcccagtttc
 ctccgaagtgtagctgcatctgtgggaagaagccttctacacacctttggcagaccagtttctgtaactgttagttgggttgattatgtgtggg
 acggtgtaaggggttacctgtctgtgtgtgcaacataataaafatgtgggggaggttgggactttgccccattgcatatgtaggggt
 tggataatgtaggaatttcgagaatttaccacagatttggtgcgatgtagctgccatgtgggagcttctaacccttttctgtcctaactgca
 aaaaatgtgcttacctgtctgattgcaagcittgtagattatgagtaagtcgacatactc

FIG. 5A

Clone B1 NS1 amino acid sequence:

MBLFRGVLQVSSNVLDCAANDNWCSLLDLDTSDWEPLTHTNRLMAIYLSVAS
 KLDFTGGPLAGCLYFFQVBCNKFEEGYHIHVIGGPGLNPRNLTVCVBGLFNNVLYHLVT
 ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKA
 CHAKKPRITTAINDTSDAGESSGTGAEVVPFNGKGTKASIKFQTMVNWLCENRVPTDK
 WKLVDNFQYTLSSSHSGSFQISALKLAIYKATNLVPTSTIFLLHTDFBQVMCIKNNKIV
 KLLLQNYDPLLVGQHVWKWIDKKCGKKNLWIFYGPPSTGKTNLAMAIKSVVYGMVNW
 NNENFPFNDVAGKSLVVWDEGIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSAVPGVPVVT
 SNGDITEVVSQNTTTTTHAKALKERMVKLNFTVRCSPDMGLLTDADVQQWLTWCNAQSWD
 HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVTDTSISSSGGESSEELSESSFFNLITPGA
 WNTBTPRSSTPIPGTSSGESSVGSFVSSEVVAASWBEAFYTPLADQFRELLVGVDYVWDG
 VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTPDLVRCSCHVGASNPFSVL
 TCKKCAYLSGLQSFVDYE

FIG. 5B

20/38

B1 VP1 single stranded DNA sequence:

atctcaagcttacaacacaaatgagtaagaagtgcaaatgggtgggaagtgatgalaatttgctaaagctgtgtatcagcaattgttggaattta
 tgaagaggttacttggaacagacttagagcttattcaaatataaagatcattataatcttcttagataatccctag
 aaacccatctcttctgttactgtgtctgtattaaaaaaccttaaaaactctccagacttatatagcatcat
 tticaagtcattgacagattatctgaccaccccatgcccattatccagtagcagtcagcagaacctagaggagaaga
 tgcagtaattctatgtgaagacttacacaagcctgggcaagttagcgtacaactacccggtacttaactgttggcctg
 gcaatgagctacaagctgggccccgcaagtgctgtgacagtgctgcaaggattcatgacttaggtatagccaactg
 gctaagttgggaataatccatacttactgtgactgtgacagatgaagagcttttaaaaaataaaaaagaaactgg
 gtticaagcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtcagctgcccctgtggccattttcaagggaagttgc
 cgggaattccgcttaacgcccagaaaaatacccaagcatgacttcaagtaattctgcagaagccagcactgtgtgca
 ggaggggggggagtaattctgtgaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtccaactctgttaactgtacatt
 ttccagacaaattttaattccatagaccagagaccattataggtgttttctcccgacgaagtagctgccaaatg
 ccagtggaaggaggcaagggttgcacattagtcocataatgggatactcaacccatggagatatagattttaat
 gcttaaatatttttttaccctttaggtttcagcacttaattgaaattatggagatagcttctgtatgcttaac
 tgaaccatattcagaattgtctgttaagatgttacggacaaaactggagggggggtgcagggtactgacagcactacag
 ggccctatgcaigttagtagaccatgaattatagttccatattgtttagggcagggtcaagatacttagccccagaa
 ctctctatttgggtatcttcccccatactgcttacttaacagtaggagatgttaacacacaggaatttctggaga
 cagcaaaaattggcaagtgaaatcagcattttatgttttgaacacagttctttcagcttttaggtacaggaggta
 cagcaactatgtcttaagtttccctcagtgccccagaaaatttagagggtcagcttaacattttatgaattgtac
 aaccccttatcggatccgcttaggggttccgacacattaggagggtgacccaaatttagatcttaacacatgaaga
 ccattgcaattcagccccaaactcagccaggccacttagtaactcagtgcttcaaaaggaggagacagctctagta
 ctggagctggaaagcccttaacaggcccttagcacaaggtacccttcaaaaacactagaatatcttaccgcccggccagtg
 tctcagccctacccactgggacacagataaattgtcaggaataaattgccatttcacatgctcagaccattatgg
 taacgtcagacaaagagtaicagcaaggagtggttagatttccaaatgaagaagacagctaaacagttacagggtt
 taacatgcacacacttctcccaataaagggaacccagcaatatacagatcaaatgagcccccaatgggtgggtct
 gtatggaacagaagcccttctacatgaagccagctgtggagttaaatccaaatttagatgacagttttaaactca
 gtttcagcccttggaggatgggttgcacagccacttcccaaatatttttaaaattattaccacaaagtgggccaa
 ttggaggtatataaactaattgggaattactacattgtatcagatgcccgtgggaattatgacagtaaccatgacatttaa
 ttggggccccgtaagctacgggacgggtgaatcccaacctggagtgatcccccgacgcagcagcaggtcatttaccata
 tgtactatagccccacagctcagatgcanaaacacaccacagacatgatatgaagccctgaagaattgttgacag
 ccaaaagccgtgtgcacccattgtaagtgcacatact

FIG. 6A

B1 VP1 amino acid sequence:

MSKESGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYEKVTGTDLELIQLKDHYNISLDNPL
 ENPSSIFDLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPREGDAVLSSSE
 DLHKPGQVSVQLPGTNYVGPNGELQAGPPQSAVDSAAIRHDFRYSQLAKLGINPYTHWTV
 ADEELLKNKNETGFGQAQVVKDYFTLKGA AAPVAHPQGSLEVPVAYNASEKYPSMTSVNS
 ABASTGAGGGGNSNPVKSMWSEGA TFSANSVTCIFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
 ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWR YLDFNALNLFFSPLEFQHLIENY GSIAPDALTVTISEI
 AVKDVTDK TGGGVQVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYFVYVLGQQQD TLAPELPIWVYFPPQYAY
 LTVGDVNTQGIGSDSKKLASEESA FYVLEHSSPQLLGTGGTATMSYKFPVPPENLBGCS
 QHFYEMYNPLYGSRLGVPTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPLVNSVSTKEGDSSS
 TGAQKALGTSLSTGTSQNTSRISLRPGFVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
 YQGQVGRFPNKEBQLKQLQGLNMHTYFPNKG TQQYTDQIBRPLMVGSVWNRRLHYESQL
 WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITT LVQYAVGIM
 TVTMTFKLGP RKATGRWNPQGVYPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGYEKPEELWT
 AKSRVHPL

FIG. 6B

21/38

B1 VP2 single stranded DNA sequence:

atactcaagcttacaaaacaaatgacttcagttatctgcagaagccagcactggcgaggagggggggcagtaalcctgtgaaagcatgtggagtgagggggc
 cacttttagtgccaactctgaactgtacatttccagacaattttaattccatagaccagagcaccatt
 ataaggtgttttctccgcagcagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaagggttgcaccatttagtccata
 atgggatactcaaccccatggagatatttagatttaattgcttaaatattttttacccttagagtttcagcaatt
 aattgaaaattatggaagtatagctcctgaatcttaactgtacacatcagaaattgcgttaaggatgttacggaca
 aaactggagggggggcgagggttacgacagcactacaggggcctatgcatgttagtagaccatgaataatagtaacca
 tatgtgttagggcagggtcaagatacttagcccagaacttctatttgggtatcttcccccataacgcttactt
 aacagttaggagatgttaacacaaaggaatttctggagacagcaaaaattggcaagtgaagaatcagcattttgttt
 tggaaacacagtctttttagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgcttataagtttctcagtgcccccagaa
 aatttagagggtcgtcagtcacacattttatgaattgacaaccccttatcggatcccgcttaggggttctcagacatt
 aggaggtgacccaaaatttagatcttaacacatgagaacatgcattcagccccaaacttcagccagggtcactag
 taactcagtgctacaaaggaggagacagctctagctcgtgagctggaaagcccttaacaggcccttagcagaggtacc
 tctcaaaaacactagaatatcttaagccctggccagtgctcagccgtacacacatgggacacagataaatatgtac
 aggaataaattgccatttctcagtgacacacattatgttaacgctgaagacaagagatcagcaaggagtggttagat
 ttccaaatgaanaagaaacagctaaacagttacaggggttaacatgcacaccttctccaaaggaacccagca
 tatcagatcaaataggcgccccaaatgggtgtctgtatggaacagaagagcccttactatgaagccagctgtg
 ggttaaaattccaaatttagatgacagtttaaaactagtttcagcccttagggagatgggttgcacagccactc
 ctcaaatatttttaaaatatccacaagtgggccaattggaggttttaaatcaatgggaattactaccttagttcag
 tatgcgtgggaattatgacagttaacatgaatttggggcccgtaagctacgggacaggtggaatctcaacc
 tggagtgatacccccgcagcagcaggtcatttaccatattgtactatagccccacagctacagatgcaasaaacacc
 acagacatggatataaagccctgaagaattgtggacagccaaaagccgtgtgcacccattgtaagtcgacatactc

FIG. 7A

B1 VP2 amino acid sequence:

MTSVNSAEASTGAGGGGSSNPVKS MWSEGA TFSANSVTCTFSRQFLIPYDPBHH
 YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWR YLDFNALNLFSPLEFQHLIENYGS
 LAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGGQDTLAPB
 LPWVVFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSPQLLGTGGTATMSYK
 FPPVPFENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPTDLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPI
 VNSVSTKBGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVVTGINAIS
 HGQTTYGNAEDKBYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIBRPLMVGS
 VWNRRALHYBSQLWSKIPNLDDSPKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKLPSQPIGGIKSM
 GTITLVQYAVGIMVTMTFKLGRKATGRWNPQGVYPHAAAGHLFPYVLYDPTATDAKQH
 HRHGYEKPBEELWTAKS RVHPL

FIG. 7B

22/38

B6 NS1 single stranded DNA sequence:

atactctcgaacaaaacaaatggagctatttagaggggtgctcaagttcttctaattgtctggactgtgctaacgataactgggtgctctt
 tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactacatacagactaatggcaatatacttaagcagtggtgcttctaagcttgacttta
 ctggggggccactagcaggggtgctgtactttttcaagtagaatgtaacaaattgaagaaggctatcatattcatgtggttattggggggcca
 gggtaaacccagaaacctcacagtggtgttagaggggtatttaataatgtactttacaccttgtaactgaaaatctgaagctaaaattttgc
 caggaatgactacaaaaggcaatacttttagatggagagcagtttatagaaaactatttaalgaaaaataacctttaaatgttgtatgtgt
 gttactaataatgatggacatagatacctgtattctgctacttttagaaaggagcttgccatgccaaagaaaccccgatcaccacagccat
 aaatgatactagtactgatgtctggggagcttagcggcacaggggcagaggttgccatttaattgggaagggaactaaggctagcataaag
 ttcaactatggtaaactggtgtgtgaaacagagtggtttacagaggataaagggaactagtgtactttaaccagttacactttactaagcagt
 agtcacagtggaagtgtttcaaatcaagtgcactaaaactagcaatttataaagcaactaatttagtgcctactagcacattttattgcatacag
 actttgagcaagtgtatgttattaaagacaataaaatgttaattgttactttgtcaaaactatgacccctatttagtggggcagcatgtgttaag
 tggatigataaaaaatgtggcaagaaaaacacactgtgttttatggaccgccaagtacagggaaaaacaaacttggcaatggccattgctaa
 aagtgtccagttatgtgtaataagacaataaaatgttaattgttactttgtcaaaactatgacccctatttagtggggcagcatgtgttaag
 ttattaaagttacaattgtagaagctgcaaaagccatttagggcgggcaaccaccagggtagatcaaaaaatgctgggaagtgtagctgtgc
 ctggagtaccctgtgttataaccagcaatgtgtgacattactttgttgaagcgggaacactacaacaactgtacatgctaaagccttaaaaga
 cgcgatggtaaaagttaaacctttactgtaatgtcagccctgacatgggttactaacagagcctgatgtacaacagtggttcatatggtgtaat
 gcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacacttttgatttccctggaattaatgcagatgccctccaccagacctcaa
 accaccccaattgtcacagacaccagatcagcagcagtggtgtggaagctctgaagaactcagtgaaagcagcttttttaacctcatcacc
 ccaggcgccctggaacactgaacccccgcgtctagtacgccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgtcgaagccagtttcc
 tccgaagtgtagctgcatcgtgggaagaagccttctacacacctttggcagaccagtttctgaactgttagttgggggtgattatgtgtggga
 cgggtgaaggggtttaccgtctgtgtgtgcaacataataacaatagtgggggaggcttgggactttgtcccattgcattatgtaggggctt
 ggtataatggatggaatttcgagaatttaccagatttgggtgcgatgtagctgccatgtgggagcttctaacccttttctgtgtaacctgca
 aaaaatgtgcttacctgtctggaatgcaaagctttgtagattatagtaagtcgacatactc

FIG. 8A

B6 NS1 amino acid sequence:

MELFRGVLQVSSNVLDLCANDNWWCSLLDLDTSDWEPLTHTNRLMAIYLSSVAS
 KLDFTGGFLAGCLYFFQVECNKFEEGYHHV VIGGPGLNPRNLTVCEGLFNNVLYHLVT
 ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKOA
 CHAKKPRITTAINDTSTDAGESSGTGAEVVPFNGKGTASIKFQTMVNWLCENRVFTBDK
 WKLVDFNQYTLSSSHSGSFQIQSALKLAITYKATNLVPTSTFLLHTDFBQVMCIKDNKIV
 KLLLCQNYDPLLVGQHV LKWKCKGKKNLWFYGGPSTGKTNLAMAIKSVVYGMVNW
 NNENFPFNDVAGKSLVVWDEGIKSTIVBAKAILGGQPTRVDQKMRGSAVPGVPVVIT
 SNGDITFVVSNTTTTVHAKALKERMVKLNFTVRCSPDMGLL TEADVQQLTWCNAQSWD
 HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVTDTSISSSGBSSEBELSESSFFNLITPA
 WNTETPRSTPIPGTSSGESSVGSVPSSEVVAAASWEEAFYTPLADQFRELLVGVDYVWVG
 VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTPDVRCSCHVGASNPFSVL
 TCKKCAYL SGLQSFVDYE

FIG. 8B

24/38

4

B6 VP2 single stranded DNA sequence:

atactcaagcttcaaaaacaaatgacttcagttatctgcagaagccagcactgtgtcagggagggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggc
 cacttttagtgcacactgtgttaactgtacattttccagacaatttttaattccatttgacccagagcaccatt
 ataagggtgttttcccgagcaagtagctgccacaatgccagtggaagggagggcaaggtttgcaccattagtccata
 atgggatactcaaccccatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttacacttttagagtttcagcactt
 aattgaaattatgggaagtatagctcctgatgctttaactgttaaccataatcagaaattgctgttaaggatgttacaaca
 aaactggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagtaacca
 tatgtgttagggcaaggtcaagatatttagccccagaacttccatttgggtatactttcccccataacgcttactt
 aacagtagggatgttaacacacaaggaaatttctggagacagcaaaaattggcaagtgaaatcagcattttatgttt
 tggacaacagttctttcagcttttaggtacaggggtacagcaactatgtcttataagtttccctcagtgccccagaa
 aatttagagggctgcagctcaacactttatgaattgtacaaccccttatcggatcccgcttaggggttccctgacacatt
 agggaggtgacccaaaatttagatctttaacacatgaagaccatgcattcagccccaaaacttgcaggggocactag
 taactcagtgcttacaagaggaggagacagctcagtagctggagctggaanaagccttaacagggccttagcacaggtacc
 tctcaaaacactagaatttcccttagccctggccaggtgtctcagccgtaccacccactgggacacagataaattgtcac
 aggaataattgccatttctcaggtcagaccatttggtacgctgaagacaaagagtagcaagggaggtggtagat
 ttcaaatgaaaagaaacagctaaacagttacaggggtttaacatgcacacccctactttcccaataaaggaaocccagcaa
 tatacagatacaatttagcggccccaatgtgtgtgtctgtatggaacagagaccccttactatgaagccagctgtg
 gagttaatttccaaatttagatgacagtttaaaactcagtttcagoccttagggatgggtttgcatcagccaacc
 ctcaaatatttttaaaaataattaccacaagtgaggccaaattggaggtatataatcattgggaatttactccttagtttag
 tatgcctgtgggaatttatgacagtaaccatgacatttaattggggcccgtaagctacgggacgggtggaatcccaacc
 tggagtgatcccccgcacgcagcaggtcatttccatgtactatgacccacagctacagatgcaaaacaacacc
 acagacatggatatgaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgtgtgcaccattgtaagtgcacatactc

FIG. 10A

B6 VP2 amino acid sequence:

MTSVNSAEASTGAGGGGSPVKSMSWSEBGFSAANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
 YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEBFQHLIENYGS
 IAPDALTVTISBLAVKDVNTKYGQVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQQQDTLAPE
 LPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASBESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYK
 FPPVFPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDITLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPL
 VNSVSTKEBGSSSTGAGKALTGLSTGTSQNTIRSLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
 HGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKBQLQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIBRPLMVGS
 VWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKILPQSGPIGGIKSM
 GHTLVQYAVGIMTVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAAGHLPVVLVDPTATDAKQH
 HRHGYEKPBLWTAKS RVHPL

FIG. 10B

25/38

CH80-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttacittaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccataatgaccagagcaccattataaggtgttttcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaattgtttttcaccttttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccataatcagaaatgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtagacaagtactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

FIG. 11A**CH81-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttacittaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccataatgaccagagcaccattataaggtgttttcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccccatggagatacttagattttaatgctttaaattgtttttcaccttttagagtttcagcatttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccataatcagaaatgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

FIG. 11B

B19SCL1-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtgccataatgggatactc
aaccatggagataatttagatttaattgcttaaaattttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgtacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11C**B19SCL2-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtgccataatgggatactc
aaccatggagataatttagatttaattgcttaaaattttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgtacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11D

27/38

B19SCL3-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaaagttgcc
ggaagtcccgcttacacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttccccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcaccataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaatgctttaaattttttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagtag
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11E**B19SCL4-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaaagttgcc
ggaagtcccgcttacacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttccccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcaccataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaatgctttaaattttttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagtag
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11F

28/38

B19SCL5-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatalgaccagagcaccattataaggtgtttctccgcga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatactc
aaccatggagataattagatttaaatgcttaaatattttttacccttagagttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaagggtcaggatacttag

FIG. 11G**B19SCL6-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatalgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
caaccatggagataattagatttaaatgcttaaatattttttacccttagagttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaagggtcaggatacttag

FIG. 11H

29/38

B19SCL7-3

ataaatccatatactcatigggactgtagcagatgaagagcctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcagggtactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11I**B19SCL8-2**

ataaatccatatactcatigggactgtagcagatgaagagcctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttaggttttaatgctttaaatttatttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcagggtactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11J

30/38

B19SCL9-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggttttctcccg
 cagccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatac
 tcaaccccatggagatattagatttaaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaa
 ttatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaac
 tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagt
 acccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

FIG. 11K**B19SCL9-9**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggttttctcccg
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatac
 caaccccatggagatattagatttaaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

FIG. 11L

31/38

B19SCL10-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaalcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtaattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcaccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11M**B19SCL11-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaalcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtaattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcaccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

FIG. 11N

32/38

B19SCL12-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggigcagctgccctgtggcccattttcaaggaagtttg
 cggaagttcccgttacaacgctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggigcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtgactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccc
 cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtccgataatgggatac
 tcaaccccatggagataatttagattttaatgcittaaattatTTTTTcaccttttagagtttcagcacttaattgaaa
 ttatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
 ggaggggggggtgcaagttactgacagcagtagcaggggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11O**B19SCL13-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggigcagctgccctgtggcccattttcaaggaagtttg
 cggaagttcccgttacaacgctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggigcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtgcattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccc
 cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcccataatgggatac
 tcaaccccatggagataatttagattttaatgcittaaattatTTTTTcaccttttagagtttcagcacttaattgaaa
 ttatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaac
 tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcgcctatgcatgttagtagaccatgaataataagt
 acccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11P

33/38

B19SCL14-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggagtaaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgcittaaatttattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgtagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 11Q**B19SCL15-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggagtaaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgcittaaatttattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgtagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 11R

34/38

B19SCL16-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcaccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttat

FIG. 11S**B19SCL17-1**

ataaatccatatacttattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaaciggggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcaccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttat

FIG. 11T

35/38

B19SCL18-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaacttgtaattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcagaagggttgcaccattagtcaccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaaatgctttaaattttttttcaccttagagtgcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11U**B19SCL19-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaacttgtaattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcagaagggttgcaccattagtcaccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaaatgctttaaattttttttcaccttagagtgcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11V

36/38

B19SCL20-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccccgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagataattagattttaatgctttaaatattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctccgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 ccataatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11W**B19SCL21-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccccgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagataattagattttaatgctttaaatattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctccgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 ccataatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11X

37/38

B19SCL22-11

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcctttaaataataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagttgc
cggaagtcccgcttacaacgccicagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcgggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
caaccccatggagatatttagatttaatgctttaattttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

FIG. 11Y**B19SCL2-14**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcctttaaataataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagttgc
cggaagtcccgcttacaacgccicagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
caaccccatggagatatttagatttaatgctttaattttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

FIG. 11Z

SEQUENCE LISTING

<110> PICHUANTES, Sergio
SHYAMALA, Venkatakrishna

<120> DIAGNOSTIC ASSAYS FOR PARVOVIRUS B19

<130> 2301-17194 / PP17194.004

<140> 10/187,253

<141> 2002-06-28

<150> 60/302,077

<151> 2001-06-28

<150> 60/365,956

<151> 2002-03-19

<150> 60/369,224

<151> 2002-03-29

<160> 93

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH47-26

<400> 1

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagtcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtggtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaatttg 480
tttttttac ctttagagtt tcagcattta attgaaaact atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatatt agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 2

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH48-29

<400> 2

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagtcccg cttacaacgc ctcagaacaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgccaa ctctgtaact 300
```

2

```

tgtacat tttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctccgcag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gatttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgcc tgttagtaga ccatgaatac 660

```

```

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 3

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH33-2

<400> 3

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaacaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgcaa ctctgtaact 300
tgtacat tttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctccgcag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gatttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgcc tgttagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 4

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH33-3

<400> 4

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaca 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgcaa ctctgtaact 300
tgtacat tttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctccgcag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gatttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgcc tgttagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 5

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH33-4

3

<400> 5

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggtggc 240
 agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgcaa ctctgtaact 300

tgtacatddd ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
 tctccgcag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gatttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
 ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgcc tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 6

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH42-7

<400> 6

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300
 tgtacatddd ccaggcagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
 tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
 ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 7

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH42-18

<400> 7

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300
 tgtacatddd ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
 tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 8

<211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH42-19

<400> 8

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacagg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 9
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (76)

<223> where 'n' is A, T, C or G

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH46-23

<400> 9

```
attaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaancaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccaggcagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacagg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 10
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH1-1

<400> 10

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
```

5

```

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

```

```

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 11

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH1-6

<400> 11

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 12

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH2-8

<400> 12

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 13

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH2-10

<400> 13

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
```

```
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacathtt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaaggc ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccataatc agaaattgct gttaaggatg ttacagacag aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 14

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH2-11C

<400> 14

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacathtt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaaggc ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccataatc agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 15

<211> 699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH5-13

<400> 15

```
ctaaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacathtt ccagacagtt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaaggc ttgcactatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggcagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccataatc agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccaa tgtgttaggg caaggtcagg atactttag 699
```

7

<210> 16
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH7-22

<400> 16

```
ataaatccat gtactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgitt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaatttg 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcattta attgaaaact atggaaglat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtaccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 17
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH13-27

<400> 17

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaattctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgctaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgitt 360
tctccgcag cgagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagg ttgcaccatc 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcattta attgaaaatt atggaaglat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtaccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 18
 <211> 699
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH14-33

<400> 18

```
ataaatccat atactcattg gactgtggca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggga 240
gtaatcctgt taaaagcatg tggagttagg gggccacttt tagtgccaac tctgtaactt 300
gtacattttc cagacagttt ttaattccat atgaccagga gcaccattat aagggtgttt 360
ctccgcagc aagtagctgc cacaatgcca gtggaaaaga ggcaaagggt tgcaccatta 420
gtcccataat gggatactca accccatgga gatatttaga ttttaatgct ttaaatattt 480
```

8

ttttttcacc ttttagagttt cagcacttaa ttgaaaatta tggtagtata gctcctgatg 540
 ctttaactgt aaccatatca gaaattgctg ttaaagatgt tacagacaaa actggagggg 600

gggtacaggt tactgacagc actacagggc gcctatgcat gttagtggac catgaataca 660
 agtaccata tgtgttaggg caaggtcagg atactttag 699

<210> 19

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH62-2

<400> 19

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 tacccaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacakttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
 tctcccgag ccagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggc ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
 ggggtacagg ttactgacag cactacaggc cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 20

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH64-2

<400> 20

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
 tcgcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggc ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggc cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 21

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH67-2

<400> 21

ataaatccat atactcattg gactgtggca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

```

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggg 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgocaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaag aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatattttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaagatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtgga ccataaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 22

<211> 4678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 4.7 kbp PCR fragment
from parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 22

```

cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt 60
ttgtaacggg taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact 120
gccgcagctc tttctttctg ggcctgcttt ttccctggact tacttgctgt tttttgtgag 180
ctaactaaca ggtatttata ctacttggtt acataactaac atggagctat ttagaggggt 240
gcttcaagtt tcttctaatt ttctggactg tgctaacgat aactgggtgg gctctttact 300
ggatttagac acttctgact ggggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata 360
cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta 420
cttttttcaa gtagaattga acaaatttga agaaggctat catattcatg tggttatttg 480
ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt 540
actttatcac cttgtaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa 600
aggcaaatat tttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc 660
tttaaatgtt gtatgggtgt ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc 720
tacttttaga aaggagctt gccatgccaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga 780
tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgtgc catttaatgg 840
gaagggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactggttgt gtgaaaacag 900
agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag 960
tagtcacagt ggaagttttc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac 1020
taatttagtg cctactagca cttttttatt gcatacagac tttgagcaag ttatgtgtat 1080
taaaaacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaaac tatgaccccc tattagtggg 1140
gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta 1200
tgggcccga agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt 1260
atatggcatg gttaactgga ataataaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag 1320
cttgggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat 1380
tttaggcggg caaccacca ggttagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgcctgg 1440
agtacctgtg gttataacca gcaatggtga cattactttt gttgtaagcg ggaacactac 1500
aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag 1560
atgcagccct gacatggggt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatgggtg 1620
taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc 1680
tggaattaat gcagatgccc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac 1740
cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gcttttttaa 1800
cctcatcacc ccaggcgctt ggaacactga aacccgcgc tctagtacgc ccaccccg 1860
gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag ccagtttccc tccgaagttg tagctgcac 1920
gtgggaagaa gccttctaca cacctttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttgggg 1980
tgattatgtg tgggacgggt taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa 2040
tagtggggga ggttgggac tttgtcccca ttgcattaat gtaggggcctt ggtataatgg 2100
atggaaattt cgagaattta cccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc 2160
taatcccttt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt 2220

tgtagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa tttgctaaag 2280

```

```

ctgtgtatca gcaatttgtg gaattttatg aaaaggttac tggaaacagac ttagagctta 2340
ttcaaatatt aaaagatcat tataaatattt ctttagataa tcccctagaa aaccatcct 2400
ctttgtttga cttagttgct cgtattaaaa ataaccttaa aaactctcca gacttatata 2460
gtcatcattt tcaaagtcac ggacagttat ctgaccaccc ccatgcctta tcatccagta 2520
gcagtcagtc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc 2580
ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccgggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac 2640
aagctggggc cccgcaaagt gctgttgaca gtgctgcaag gattcatgac tttaggtata 2700
gccaactggc taagttggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc 2760
ttttaaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta 2820
ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg 2880
cttacaacgc ctcaaaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca 2940
ctggtgcagg aggggggggc agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt 3000
ttagtgccaa ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc 3060
agcaccatta taaggtgttt tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg 3120
aggcaaagggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag 3180
attttaattgc tttaaattta tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt 3240
atggaagtat agctcctgat gctttaactg taaccatact agaaattgct gttaaggatg 3300
ttacggacaa aactggaggg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca 3360
tgtagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcaa gatactttag 3420
ccccagaact tctattttgg gtatactttc cccctcaata cgcttactta acagtaggag 3480
atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat 3540
tttatgtttt ggaacacagt tcttttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt 3600
cttataagtt tctccagtg cccccagaaa attttagagg ctgcagtcaa cacttttatg 3660
aaatgtacaa ccccttatac ggatcccgct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc 3720
caaatattag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gccccaaaac ttcattgccag 3780
ggccactagt aaactcagt tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa 3840
aagccttaac aggccttagc acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgccctg 3900
ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg 3960
ccattttctc tggtcagacc acttatggta acgctgaaga caaagagtat cagcaaggag 4020
tgggtagatt tccaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acagggttta aacatgcaca 4080
cctactttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc cccctaattg 4140
tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaaattc 4200
caaatattaga tgacagtttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcatc 4260
agccacctcc tcaaatattt ttaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta 4320
aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaaccatga 4380
catttaaat gggtccccgt aaagctacgg gacggtggaa tctcaacct ggagtgtatc 4440
ccccgcagc agcaggtcat ttaccatatg tactatatga cccacagct acagatgcaa 4500
aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg 4560
tgcacccatt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgcca 4620
ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa 4678

```

<210> 23

<211> 4678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 4.7 kbp PCR fragment
from parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 23

```

ccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt 60
ttgtaacggg taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact 120
gccgcagctc tttctttctg ggtgctttt ttctggact tacttgctgt tttttgtgag 180
ctaactaaca ggtatttata ctacttggtt acatactaac atggagctat ttagaggggt 240
gcttcaagtt tcttctaatt ttctggactg tgctaacgat aactggtggg gctctttact 300
ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcactac aacagactaa tggcaatata 360

cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta 420
cttttttcaa gtagaatgta acaaatttga agaaggctat catattcatg tggttatttg 480
ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt 540

```

actttatcac	cttghtaactg	aaaatctgaa	gctaaaattt	ttgccaggaa	tgactacaaa	600
aggcaaatac	tttagagatg	gagagcagtt	tatagaaaac	tatttaatga	aaaaaatacc	660
tttaaatgtt	gtatgggtgtg	ttactaatat	tgatggacat	atagatacct	gtattttctgc	720
tacttttaga	aagggagctt	gccatgccaa	gaaaccccg	atcaccacag	ccataaatga	780
tactagtact	gatgctgggg	agtctagcgg	cacaggggca	gaggttgtgc	catttaaatgg	840
gaagggaaact	aaggctagca	taaagtttca	aactatggta	aactggttgt	gtgaaaacag	900
agtgtttaca	gaggataagt	ggaaactagt	tgactttaac	cagtacactt	tactaagcag	960
tagtcacagt	ggaagttttc	aaattcaaag	tgactataaa	ctagcaattt	ataaagcaac	1020
taatttagtg	cctactagca	cattttttatt	gcatacagac	tttgagcaag	ttatgtgtat	1080
taaagacaat	aaaattgtta	aattgttact	ttgtcaaaa	tatgaccccc	tatttagtggg	1140
gcagcatgtg	ttaaagtggg	ttgataaaaa	atgtggcaag	aaaaacacac	tgtggtttta	1200
tggaccgcca	agtacaggga	aaacaaactt	ggcaatggcc	attgtctaaa	gtgttccagt	1260
atatggcatg	gttaactgga	ataatgaaaa	ctttccattt	aatgatgtag	caggaaaaag	1320
cttgggtggtc	tgggtgaag	gtattattaa	gtctacaatt	gtagaagctg	caaaagccat	1380
tttaggcggg	caaccaccca	gggtagatca	aaaaatgcgt	ggaagtgtag	ctgtgcctgg	1440
agtaccggtg	gttataacca	gcaatgggtg	cattactttt	gttgtaagcg	ggaacactac	1500
aacaactgta	catgctaaag	ccttaaaaaga	gcgcattggt	aagttaaact	ttactgtaag	1560
atgcagccct	gacatgggtt	tactaacaga	ggctgatgta	caacagtggc	ttacatgggt	1620
taatgcacaa	agctgggacc	actatgaaaa	ctgggcaata	aactacactt	ttgatttccc	1680
tggaaattaat	gcagatgccc	tccacccaga	cctccaaacc	accccaattg	tcacagacac	1740
cagtatcagc	agcagtgggt	gtgaaagctc	tgaagaactc	agtgaagca	gcttttttaa	1800
cctcatcacc	ccaggcgctt	ggaacactga	aaccccgccg	tctagtacgc	ccatccccgg	1860
gaccagttca	ggagaatcat	ctgtcggga	cccagtttcc	tccgaagttg	tagctgcctc	1920
gtgggaagaa	gccttctaca	cacctttggc	agaccagttt	cgtgaactgt	tagttggggg	1980
tgattatgtg	tgggaacgggt	taaggggttt	acctgtctgt	tgtgtgcaac	atattaacaa	2040
tagtggggga	ggcttggggc	tttgtcccca	ttgcattaat	gtaggggctt	ggtataatgg	2100
atggaaattt	cgagaattta	ccccagattt	ggtgcgatgt	agctgccatg	tgggagcttc	2160
taatcccttt	tctgtgctaa	cctgcaaaaa	atgtgcttac	ctgtctggat	tgcaaagctt	2220
tgtagattat	gagtaaagaa	agtggcaaat	ggtgggaaag	tgatgataaa	tttgctaaag	2280
ctgtgtatca	gcaatttgtg	gaattttatg	aaaaggttac	tggaaacagac	ttagagctta	2340
ttcaaatatt	aaaagatctg	tataatattt	ctttagataa	tcccctagaa	aacctatcct	2400
ctttgtttga	cttagttgct	cgtatttaaa	ataaccttaa	aaactctcca	gacttatata	2460
gtcatcattt	tcaaagtcac	ggacagttat	ctgaccaccc	ccatgcctta	tcattccagta	2520
gcagtcatgc	agaacctaga	ggagaagatg	cagtattatc	tagtgaagac	ttacacaagc	2580
ctgggcaagt	tagcgtacaa	ctaccgggta	ctaactatgt	tgggcctggc	aatgagctac	2640
aagctggggc	cccgcaaagt	gctgttgaca	gtgctgcaag	gattcatgac	tttaggtata	2700
gccaactggc	taagttggga	ataaatccat	atactcattg	gactgtagca	gatgaagagc	2760
ttttaaaaaa	tataaaaaat	gaaactgggt	ttcaagcaca	agtagtaaaa	gactacttta	2820
ctttaaaagg	tgcagctgcc	cctgtggccc	attttcaagg	aagtttgccg	gaagttcccg	2880
cttacaacgc	ctcagaaaaa	tacccaagca	tgacttcagt	taattctgca	gaagccagca	2940
ctggtgcagg	aggggggggc	agtaatcctg	tgaaaagcat	gtggagtga	ggggccactt	3000
ttagtgccaa	ctctgtaact	tgtacatttt	ccagacaatt	tttaattcca	tatgacccag	3060
agcaccatta	taaggtgttt	tctcccgag	caagtagctg	ccacaatgcc	agtggaaagg	3120
aggcaaaggt	ttgcaccatt	agtcccataa	tgggatactc	aaccccatgg	agatatttag	3180
attttaatgc	tttaaattta	tttttttcac	cttttagagtt	tcagcactta	attgaaaatt	3240
atggaagtat	agctcctgat	gctttaactg	taaccatac	agaaattgct	gttaaggatg	3300
ttacaaacaa	aactggaggg	ggggtgcagg	ttactgacag	cactacaggg	cgccatgca	3360
tglttagtaga	ccatgaatat	aagtacccat	atgtgttagg	gcaagggtcaa	gatactttag	3420
ccccagaact	tcctattttg	gtatactttc	ccctcaata	cgttacttta	acagtaggag	3480
atgttaacac	acaaggaatt	tctggagaca	gcaaaaaatt	ggcaagtga	gaatcagcat	3540
tttatgtttt	ggaacacagt	tcttttcagc	tttttaggtac	aggaggtaca	gcaactatgt	3600
cttataagtt	tcctccagtg	ccccagaaa	attttagagg	ctgcagtcaa	cactttttatg	3660
aaatgtacaa	ccctttatag	ggatcccgt	taggggttcc	tgacacatta	ggaggtgacc	3720
caaaatttag	atctttaaca	catgaagacc	atgcaattca	gccccaaaac	ttcatgccag	3780
ggccactagt	aaactcagtg	tctacaaagg	aggagacag	ctctagtact	ggagctggaa	3840
aagccttaac	aggccttagc	acaggtacct	ctcaaaacac	tagaatatcc	ttacgccctg	3900
ggccagtgtc	tcagccgtac	caccactggg	acacagataa	atatgtcaca	ggaataaatg	3960
ccattttctca	tggtcagacc	acttatggta	acgctgaaga	caaagagtat	cagcaaggag	4020
tgggtagatt	tccaaatgaa	aaagaacagc	taaaacagtt	acagggttta	aacatgcaca	4080
cctactttcc	caataaagga	accagcaaat	atacagatca	aattgagcgc	cccctaattg	4140

12

```

tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaattc 4200
caaatTTAGA tgacagtttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcattc 4260
agccacctcc tcaaatatTT ttaaaaaatat taccacaaag tgggccaaatt ggaggtatta 4320
aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaaccatga 4380
catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gaagggtggaa tcctcaacct ggagtgtatc 4440
ccccgcacgc agcaggtcat ttaccatatg tactatatga cccacagct acagatgcaa 4500
aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg 4560
tgcaccatt gtaaactctc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgcccc 4620
ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa 4678

```

<210> 24

<211> 2049

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: NS1 from
parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 24

```

atactcttcg aacaaaacaa aatggagcta tttagagggg tgcttcaagt ttcttctaatt 60
gttctggact gtgctaacga taactgggtg tgctctttac tggatttaga cactttctgac 120
tgggaaccac taactcatat taacagacta atggcaatat acttaagcag tgtggcttct 180
aagcttgact ttactggggg gccactagca ggggtgcttg acttttttca agtagaatgt 240
aacaattttg aagaaggcta tcatattcat gtggttattg gggggccagg gttaaacccc 300
agaaacctca cagtgtgtgt agaggggtta ttaataatg tactttatca ccttgtaact 360
gaaaatctga agctaaaatt ttgcccagga atgactacaa aaggcaaata ctttagagat 420
ggagagcagt ttatagaaaa ctatttaaty aaaaaaatac ctttaaattgt tgtatggtgt 480
gttactaata ttgatggaca tatagatacc tgtatttctg ctacttttag aaagggagct 540
tgccatgcca agaaaccccc catcaccaca gccataaatg atactagtac tgatgctggg 600
gagtcatagc gcacaggggc agaggttgtg ccatttaaty ggaaggggaa taaggctagc 660
ataaagtttc aaactatggt aaactggttg tgtgaaaaca gagtgtttac agaggataag 720
tggaactttg ttgactttta ccagtacact ttactaagca gtatgcacag tggaaagttt 780
caaattcaaa gtgcactaaa actagcaatt tataaagcaa ctaatttagt gcctactagc 840
acatttttat tgcatacaga ctttgagcaa gttatgtgta ttaaaaacaa taaaattgtt 900
aaattgttac ttgtcaaaa ctatgacccc ctattagtgg ggcagcatgt gttaaagtgg 960
attgataaaa aatgtggcaa gaaaaacaca ctgtggtttt atgggcccgc aagtacaggg 1020
aaaacaaact tggcaatggc cattgctaaa agtgttccag tatatggcat ggttaactgg 1080
aataatgaaa actttccatt taatgatgta gcaggaaaaa gcttggtggg ctgggatgaa 1140
ggtattatta agtctacaat tgtagaagct gcaaaagcca ttttaggcgg gcaacccacc 1200
agggtagatc aaaaaatgcg tgggaagtga gctgtgcctg gagtacctgt ggttataacc 1260
agcaatggtg acattacttt tgttgtaagc gggaacacta caacaactgt acatgctaaa 1320
gccttaaaag agegcagtgt aaagttaaac tttactgtaa gatgcagccc tgacatgggg 1380
ttactaacag aggetgatgt acaacagtgg cttacatggt gtaatgcaca aagctgggac 1440
cactatgaaa actgggcaat aaactacact tttgatttcc ctggaattaa tgcagatgcc 1500
ctccaccagc acctccaaac caccccaatt gtcacagaca ccagtatcag cagcagtggg 1560
ggtgaaagct ctgaagaact cagtgaagc agctttttta acctcatcac cccagggccc 1620
tggaacactg aaaccccgcg ctctagtacg cccatccccg ggaccagttc aggagaatca 1680
tctgtcggaa gccagtttcc ctccgaagtt gtactgcat cgtgggaaga agccttctac 1740
acacctttgg cagaccagtt tcgtgaactg ttagtggggg ttgattatgt gtgggacggg 1800
gtaaggggtt tacctgtctg ttgtgtgcaa catattaaca atagtggggg aggcttggga 1860
ctttgtcccc attgcattaa tgtaggggct tggataatg gatggaaatt tgcagaattt 1920
acccagatt tgggtgcgat tagctgccat gtgggagctt ctaatccctt ttctgtgcta 1980

acctgcaaaa aatgtgctta cctgtctgga ttgcaaagct ttgtagatta tgagtaagtc 2040
gacatactc                                     2049

```

<210> 25

<211> 671

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: NS1 amino acid from
parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 25

Met	Glu	Leu	Phe	Arg	Gly	Val	Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Asn	Val	Leu	Asp	1	5	10	15
Cys	Ala	Asn	Asp	Asn	Trp	Trp	Cys	Ser	Leu	Leu	Asp	Leu	Asp	Thr	Ser	20	25	30	
Asp	Trp	Glu	Pro	Leu	Thr	His	Thr	Asn	Arg	Leu	Met	Ala	Ile	Tyr	Leu	35	40	45	
Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Thr	Gly	Gly	Pro	Leu	Ala	Gly	50	55	60	
Cys	Leu	Tyr	Phe	Phe	Gln	Val	Glu	Cys	Asn	Lys	Phe	Glu	Glu	Gly	Tyr	65	70	75	80
His	Ile	His	Val	Val	Ile	Gly	Gly	Pro	Gly	Leu	Asn	Pro	Arg	Asn	Leu	85	90	95	
Thr	Val	Cys	Val	Glu	Gly	Leu	Phe	Asn	Asn	Val	Leu	Tyr	His	Leu	Val	100	105	110	
Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	Leu	Lys	Phe	Leu	Pro	Gly	Met	Thr	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Lys	Tyr	Phe	Arg	Asp	Gly	Glu	Gln	Phe	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Met	Lys	130	135	140	
Lys	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Val	Trp	Cys	Val	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	His	145	150	155	160
Ile	Asp	Thr	Cys	Ile	Ser	Ala	Thr	Phe	Arg	Lys	Gly	Ala	Cys	His	Ala	165	170	175	
Lys	Lys	Pro	Arg	Ile	Thr	Thr	Ala	Ile	Asn	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Ala	180	185	190	
Gly	Glu	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Asn	Gly	Lys	195	200	205	
Gly	Thr	Lys	Ala	Ser	Ile	Lys	Phe	Gln	Thr	Met	Val	Asn	Trp	Leu	Cys	210	215	220	
Glu	Asn	Arg	Val	Phe	Thr	Glu	Asp	Lys	Trp	Lys	Leu	Val	Asp	Phe	Asn	225	230	235	240
Gln	Tyr	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	His	Ser	Gly	Ser	Phe	Gln	Ile	Gln	245	250	255	
Ser	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	Tyr	Lys	Ala	Thr	Asn	Leu	Val	Pro	Thr	260	265	270	
Ser	Thr	Phe	Leu	Leu	His	Thr	Asp	Phe	Glu	Gln	Val	Met	Cys	Ile	Lys	275	280	285	

Asn Asn Lys Ile Val Lys Leu Leu Leu Cys Gln Asn Tyr Asp Pro Leu
 290 295 300
 Leu Val Gly Gln His Val Leu Lys Trp Ile Asp Lys Lys Cys Gly Lys
 305 310 315 320
 Lys Asn Thr Leu Trp Phe Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Gly Lys Thr Asn
 325 330 335
 Leu Ala Met Ala Ile Ala Lys Ser Val Pro Val Tyr Gly Met Val Asn
 340 345 350
 Trp Asn Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp Val Ala Gly Lys Ser Leu
 355 360 365
 Val Val Trp Asp Glu Gly Ile Ile Lys Ser Thr Ile Val Glu Ala Ala
 370 375 380
 Lys Ala Ile Leu Gly Gly Gln Pro Thr Arg Val Asp Gln Lys Met Arg
 385 390 395 400
 Gly Ser Val Ala Val Pro Gly Val Pro Val Val Ile Thr Ser Asn Gly
 405 410 415
 Asp Ile Thr Phe Val Val Ser Gly Asn Thr Thr Thr Thr Val His Ala
 420 425 430
 Lys Ala Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Leu Asn Phe Thr Val Arg Cys
 435 440 445
 Ser Pro Asp Met Gly Leu Leu Thr Glu Ala Asp Val Gln Gln Trp Leu
 450 455 460
 Thr Trp Cys Asn Ala Gln Ser Trp Asp His Tyr Glu Asn Trp Ala Ile
 465 470 475 480
 Asn Tyr Thr Phe Asp Phe Pro Gly Ile Asn Ala Asp Ala Leu His Pro
 485 490 495
 Asp Leu Gln Thr Thr Pro Ile Val Thr Asp Thr Ser Ile Ser Ser Ser
 500 505 510
 Gly Gly Glu Ser Ser Glu Glu Leu Ser Glu Ser Ser Phe Phe Asn Leu
 515 520 525
 Ile Thr Pro Gly Ala Trp Asn Thr Glu Thr Pro Arg Ser Ser Thr Pro
 530 535 540
 Ile Pro Gly Thr Ser Ser Gly Glu Ser Ser Val Gly Ser Pro Val Ser
 545 550 555 560
 Ser Glu Val Val Ala Ala Ser Trp Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Pro Leu
 565 570 575
 Ala Asp Gln Phe Arg Glu Leu Leu Val Gly Val Asp Tyr Val Trp Asp
 580 585 590
 Gly Val Arg Gly Leu Pro Val Cys Cys Val Gln His Ile Asn Asn Ser
 595 600 605

Gly Gly Gly Leu Gly Leu Cys Pro His Cys Ile Asn Val Gly Ala Trp
610 615 620

Tyr Asn Gly Trp Lys Phe Arg Glu Phe Thr Pro Asp Leu Val Arg Cys
625 630 635 640

Ser Cys His Val Gly Ala Ser Asn Pro Phe Ser Val Leu Thr Cys Lys
645 650 655

Lys Cys Ala Tyr Leu Ser Gly Leu Gln Ser Phe Val Asp Tyr Glu
660 665 670

<210> 26

<211> 2380

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VP1 from
parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 26

```

atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatgggtggg aaagtgatga 60
taaatttgct aaagctgtgt atcagcaatt tgtggaattt tatgaaaagg ttactggaac 120
agacttagag cttattcaaa tattaagaaga tcattataat atttcttttag ataatccctt 180
agaaaaccca tcctctttgt ttgacttagt tgctcgtatt aaaaataacc ttaaaaactc 240
tccagactta tatagtcata attttcaaag tcatggacag ttatctgacc acccccatgc 300
cttatcatcc agtagcagtc atgcagaacc tagaggagaa gatgcagtat tatctagtga 360
agacttacac aagcctgggc aagtttagcgt acaactaccc ggtactaact atgttgggcc 420
tggcaatgag ctacaagctg ggcctccgca aagtgtctgt gacagtgtct caaggattca 480
tgacttttag tatagccaac tggctaagtt ggaataaat ccatatactc attggactgt 540
agcagatgaa gagcttttaa aaaatataaa aaatgaaact gggtttcaag cacaagtagt 600
aaaagactac tttactttaa aaggtgcagc tgccctgtg gccattttc aaggaagttt 660
gcgggaagtt ccgcttaca acgcctcaga aaaataccca agcatgactt cagttaattc 720
tgcagaagcc agcactggtg caggaggggg gggcagtaat cctgtgaaaa gcatgtggag 780
tgagggggcc acttttagtg ccaactctgt aacttgtaca ttttccagac aatttttaat 840
tccatatgac ccagagcacc attataaggt gttttctccc gcagcaagta gctgccacaa 900
tgccagtgga aaggaggcaa aggtttgcac cattagtccc ataatgggat actcaacccc 960
atggagatat ttagatttta atgcttttaa tttatttttt tcacctttag agtttcagca 1020
cttaattgaa aattatggaa gtatagctcc tgatgtctta actgtaacca tatcagaaat 1080
tgctgttaag gatgttacgg acaaaactgg aggggggggtg caggttactg acagcactac 1140
agggcgccct tgcagttag tagaccatga atataagtac ccatatgtgt tagggcaagg 1200
tcaagatact ttagcccccag aacttccctat ttgggtatac tttcccccctc aatacgttta 1260
cttaacagta ggagatgtta acacacaagg aatttctgga gacagcaaaa aattggcaag 1320
tgaagaatca gcattttatg ttttggaaca cagttctttt cagcttttag gtacaggagg 1380
tacagcaact atgtcttata agtttccctc agtgccccc aaaaatttag agggctgcag 1440

tcaacacttt tatgaaatgt acaacccctt atacggatcc cgcttagggg ttcctgacac 1500
attaggaggt gacccaaaat ttagatcttt aacacatgaa gaccatgcaa ttcagcccca 1560
aaacttcatg ccagggccac tagtaaaactc agtgtctaca aaggagggag acagctctag 1620
tactggagct ggaaaagcct taacaggcct tagcacaggt acctctcaa acactagaat 1680
atccttacgc cctgggccag tgtctcagcc gtaccaccac tgggacacag ataaatatgt 1740
cacaggaata aatgccattt ctcatggtca gaccatttat ggtaacgctg aagacaaaga 1800
gtatcagcaa ggagtgggta gatttccaaa tgaaaaagaa cagctaaaac agttacaggg 1860
tttaaacatg cacacctact ttcccaataa aggaacccag caatatacag atcaaattga 1920
gcgcccccta atgggtgggtt ctgtatggaa cagaagagcc cttcactatg aaagccagct 1980
gtggagttaa attccaaatt tagatgacag ttttaaaact cagtttgcag ccttaggagg 2040
atggggtttg catcagccac ctccctcaaat atttttaaaa atattaccac aaagtgggcc 2100
aattggaggt attaaatcaa tgggaattac taccttagtt cagtatgccg tgggaattat 2160
gacagtaacc atgacattta aattggggcc ccgtaaagct acgggacggt ggaatcctca 2220

```

16

acctggagtg tatccccgc acgcagcagg tcatttacca tatgtactat atgacccac 2280
 agctacagat gcaaaacaac accacagaca tggatatgaa aagcctgaag aattgtggac 2340
 agccaaaagc cgtgtgcacc cattgtaagt cgacatactc 2380

<210> 27

<211> 781

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VP1 amino acid from
 parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 27

Met	Ser	Lys	Glu	Ser	Gly	Lys	Trp	Trp	Glu	Ser	Asp	Asp	Lys	Phe	Ala	
1				5					10					15		
Lys	Ala	Val	Tyr	Gln	Gln	Phe	Val	Glu	Phe	Tyr	Glu	Lys	Val	Thr	Gly	
			20					25					30			
Thr	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Gln	Ile	Leu	Lys	Asp	His	Tyr	Asn	Ile	Ser	
		35					40					45				
Leu	Asp	Asn	Pro	Leu	Glu	Asn	Pro	Ser	Ser	Leu	Phe	Asp	Leu	Val	Ala	
		50				55					60					
Arg	Ile	Lys	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Ser	Pro	Asp	Leu	Tyr	Ser	His	His	
		65			70					75					80	
Phe	Gln	Ser	His	Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	His	Pro	His	Ala	Leu	Ser	Ser	
			85					90						95		
Ser	Ser	Ser	His	Ala	Glu	Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Ala	Val	Leu	Ser	Ser	
			100					105					110			
Glu	Asp	Leu	His	Lys	Pro	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	
		115					120					125				
Asn	Tyr	Val	Gly	Pro	Gly	Asn	Glu	Leu	Gln	Ala	Gly	Pro	Pro	Gln	Ser	
		130				135					140					
Ala	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Arg	Ile	His	Asp	Phe	Arg	Tyr	Ser	Gln	Leu	
		145			150					155					160	
Ala	Lys	Leu	Gly	Ile	Asn	Pro	Tyr	Thr	His	Trp	Thr	Val	Ala	Asp	Glu	
					165					170					175	
Glu	Leu	Leu	Lys	Asn	Ile	Lys	Asn	Glu	Thr	Gly	Phe	Gln	Ala	Gln	Val	
			180					185					190			
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Thr	Leu	Lys	Gly	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Ala	His	
		195					200					205				
Phe	Gln	Gly	Ser	Leu	Pro	Glu	Val	Pro	Ala	Tyr	Asn	Ala	Ser	Glu	Lys	
		210				215					220					
Tyr	Pro	Ser	Met	Thr	Ser	Val	Asn	Ser	Ala	Glu	Ala	Ser	Thr	Gly	Ala	
		225			230					235					240	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Val	Lys	Ser	Met	Trp	Ser	Glu	Gly	Ala	

	245		250		255	
Thr Phe Ser	Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu					
	260		265		270	
Ile Pro Tyr	Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala					
	275		280		285	
Ser Ser Cys	His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile					
	290		295		300	
Ser Pro Ile	Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn					
305		310		315		320
Ala Leu Asn	Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu					
	325		330			335
Asn Tyr Gly	Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu					
	340		345			350
Ile Ala Val	Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val					
	355		360			365
Thr Asp Ser	Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr					
	370		375		380	
Lys Tyr Pro	Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu					
385		390		395		400
Leu Pro Ile	Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val					
	405		410			415
Gly Asp Val	Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala					
	420		425			430
Ser Glu Glu	Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu					
	435		440		445	
Leu Gly Thr	Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val					
	450		455		460	
Pro Pro Glu	Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr					
465		470		475		480
Asn Pro Leu	Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly					
	485		490			495
Asp Pro Lys	Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro					
	500		505			510
Gln Asn Phe	Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu					
	515		520			525
Gly Asp Ser	Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser					
	530		535		540	
Thr Gly Thr	Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val					
545		550		555		560
Ser Gln Pro	Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile					
	565		570			575

18

Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys
 580 585 590
 Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu
 595 600 605
 Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly
 610 615 620
 Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser
 625 630 635 640
 Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys
 645 650 655
 Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly
 660 665 670
 Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu
 675 680 685
 Pro Gln Ser Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr
 690 695 700
 Leu Val Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys
 705 710 715 720
 Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val
 725 730 735
 Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro
 740 745 750
 Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro
 755 760 765
 Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu
 770 775 780

<210> 28

<211> 1699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VP2 from
 parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 28

atactcaagc ttacaaaaca aaatgacttc agttaattct gcagaagcca gcactgggtgc 60
 aggagggggg ggcagtaatc ctgtgaaaag catgtggagt gagggggcca ctttttagtgc 120
 caactctgta acttgtacat tttccagaca atttttaatt ccatatgacc cagagcacca 180
 ttataaggtg ttttctcccg cagcaagtag ctgccacaat gccagtggaa aggaggcaaa 240
 ggtttgcacc attagtccca taatgggata ctcaacccca tggagatatt tagattttta 300
 tgctttaaat ttattttttt cacctttaga gtttcagcac ttaattgaaa attatggaag 360
 tatagctcct gatgctttta ctgtaaccat atcagaaatt gctgttaagg atgttacgga 420
 caaaactgga ggggggggtgc aggttactga cagcactaca gggcgccctat gcatgttagt 480
 agaccatgaa tataagtacc catatgtgtt agggcaaggt caagatactt tagccccaga 540

```

acttcctatt tgggtatact ttccccctca atacgcttac ttaacagtag gagatgttaa 600
cacacaagga atttctggag acagcaaaaa attggcaagt gaagaatcag cattttatgt 660
tttggaaacac agttcttttc agctttttagg tacaggagggt acagcaacta tgtcttataa 720
gtttcctcca gtgccccccag aaaattttaga gggctgcagt caacactttt atgaaatgta 780
caacccctta tacggatccc gcttaggggt tcctgacaca ttaggagggtg acccaaaatt 840
tagatcttta acacatgaag accatgcaat tcagcccca aacttcatgc caggggccact 900
agtaaactca gtgtctacaa aggagggaga cagctctagt actggagctg gaaaagcctt 960
aacaggcctt agcacaggta cctctcaaaa cactagaata tccttacgcc ctggggccagt 1020
gtctcagccg taccaccact gggacacaga taaatatgtc acaggaataa atgccatttc 1080
tcatggctcag accacttatg gtaacgctga agacaaagag tatcagcaag gagtgggtag 1140
atttccaaat gaaaaagaac agctaaaaca gttacagggt ttaaacaatgc acacctactt 1200
tcccaataaa ggaaccagc aatatacaga tcaaattgag cgccccctaa tgggtgggttc 1260
tgtatggaac agaagagccc ttcactatga aagccagctg tggagtaaaa ttccaaattt 1320
agatgacagt tttaaaactc agtttgcagc cttaggagga tgggggtttgc atcagccacc 1380
tcctcaaata tttttaaaaa tattaccaca aagtgggcca attggaggta ttaaatacat 1440
gggaattact accttagttc agtatgccgt gggaattatg acagtaacca tgacatttaa 1500
attggggccc cgtaaagcta cgggacgggt gaatcctcaa cctggagtgt atcccccgca 1560
cgcagcaggt catttaccat atgtactata tgaccacaca gctacagatg caaaacaaca 1620
ccacagacat ggatatgaaa agcctgaaga attgtggaca gccaaaagcc gtgtgcaccc 1680
attgtaagtc gacatactc                                     1699

```

<210> 29

<211> 554

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VP2 amino acid from
parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 29

```

Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly
 1              5              10              15

Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser
      20              25              30

Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr
      35              40              45

Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys
      50              55              60

His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile
      65              70              75              80

Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn
      85              90              95

Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly
      100             105             110

Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val
      115             120             125

Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser
      130             135             140

Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro
      145             150             155             160

```

Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile
 165 170 175
 Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val
 180 185 190
 Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu
 195 200 205
 Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu Gly Thr
 210 215 220
 Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu
 225 230 235 240
 Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr Asn Pro Leu
 245 250 255
 Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly Asp Pro Lys
 260 265 270
 Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro Gln Asn Phe
 275 280 285
 Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu Gly Asp Ser
 290 295 300
 Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser Thr Gly Thr
 305 310 315 320
 Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val Ser Gln Pro
 325 330 335
 Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile
 340 345 350
 Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln
 355 360 365
 Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu
 370 375 380
 Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln
 385 390 395 400
 Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn
 405 410 415
 Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn
 420 425 430
 Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly
 435 440 445
 Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu Pro Gln Ser
 450 455 460
 Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr Leu Val Gln
 465 470 475 480

21

Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro
485 490 495

Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val Tyr Pro Pro
500 505 510

His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr
515 520 525

Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu
530 535 540

Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu
545 550

<210> 30

<211> 2049

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: NS1 from
parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 30

atactcttcg aacaaaacaa aatggagcta tttagagggg tgcttcaagt ttcttctaata 60
gttctggact gtgctaacga taactggttg tgctctttac tggatttaga cacttctgac 120
tgggaaccac taactcatac taacagacta atggcaatat acttaagcag tgtggcttct 180
aagcttgact ttactggggg gccactagca ggggtgcttg acttttttca agtagaatgt 240
aacaaatttg aagaaggcta tcatattcat gtggttattg gggggccagg gttaaaccac 300
agaaacctca cagtgtgtgt agaggggtta tttataaatg tactttatca ctttgtaact 360
gaaaatctga agctaaaatt tttgccagga atgactacaa aaggcaaata ctttagagat 420
ggagagcagt ttatagaaaa ctatttaatg aaaaaatac ctttaaatgt tgtatggtgt 480
gttactaata ttgatggaca tatagatacc tgtatttctg ctacttttag aaaggagact 540

tgccatgcc aaaaaccccg catcaccaca gccataaatg atactagtag tgatgctggg 600
gagctctagc gcacaggggc agaggttgtg ccatttaatg ggaagggaac taaggctagc 660
ataaagtttc aaactatggt aaactggttg tgtgaaaaca gagtggttac agaggataag 720
tggaaactag ttgactttta ccagtagact ttactaagca gtagtcacag tggaggtttt 780
caaattcaaa gtgcactaaa actagcaatt tataaagcaa ctaatttagt gcctactagc 840
acatttttat tgcatacaga ctttgagcaa gttatgtgta ttaaagacaa taaaattggt 900
aaattgttac tttgtcaaaa ctatgacccc ctattagtag ggcagcatgt gttaaagtgg 960
attgataaaa aatgtggcaa gaaaaacaca ctgtgggttt atggaccgcc aagtacaggg 1020
aaaacaaact tggcaatggc cattgtctaaa agtgttccag tatatggcat gggttaactgg 1080
aataatgaaa actttccatt taatgatgta gcaggaaaaa gcttgggtgg ctgggatgaa 1140
gggtattatta agtctacaat tgtagaagct gcaaaagcca ttttaggcgg gcaaccacac 1200
agggtagatc aaaaaatgcg tggaaagtga gctgtgacct gagtaccggt ggttataacc 1260
agcaatggtg acattacttt tgttgtaagc ggggaacacta caacaactgt acatgctaaa 1320
gccttaaaag agcgcatggt aaagttaaac tttactgtaa gatgcagccc tgacatgggg 1380
ttactaacag aggtgatgt acaacagtgg cttacatggt gtaatgcaca aagctgggac 1440
cactatgaaa actgggcaat aaactacact tttgatttcc ctggaattaa tgcagatgcc 1500
ctccaccagc acctccaaac ccccccaatt gtcacagaca ccagtatcag cagcagtggt 1560
gggtgaaagct ctgaagaact cagtgaagc agctttttta acctcatcac cccaggcgcc 1620
tggaaactcg aaaccccgcg ctctagtagc cccatccccg ggaccagttc aggagaatca 1680
tctgtcggaa gccagtttct ctccgaagtt gtagctgcat cgtgggaaga agccttctac 1740
acacctttgg cagaccagtt tegtgaactg ttagttgggg ttgattatgt gtgggacggt 1800
gtaaggggtt tacctgtctg ttgtgtgcaa catattaaca atagtggggg aggccttggg 1860
ctttgtcccc attgcattaa tgtaggggct tggataaatg gatggaaatt tgcagaattt 1920
acccagatt tgggtgcgat tagctgccat gtgggagctt ctaatccctt ttctgtgcta 1980
acctgcaaaa aatgtgctta cctgtctgga ttgcaaagct ttgtagatta tgagtaagtc 2040

gacatactc

2049

<210> 31

<211> 671

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: NS1 amino acid from
parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 31

Met	Glu	Leu	Phe	Arg	Gly	Val	Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Asn	Val	Leu	Asp
1				5					10					15	

Cys	Ala	Asn	Asp	Asn	Trp	Trp	Cys	Ser	Leu	Leu	Asp	Leu	Asp	Thr	Ser
		20					25						30		

Asp	Trp	Glu	Pro	Leu	Thr	His	Thr	Asn	Arg	Leu	Met	Ala	Ile	Tyr	Leu
		35					40					45			

Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Thr	Gly	Gly	Pro	Leu	Ala	Gly
	50					55					60				

Cys	Leu	Tyr	Phe	Phe	Gln	Val	Glu	Cys	Asn	Lys	Phe	Glu	Glu	Gly	Tyr
65					70					75					80

His	Ile	His	Val	Val	Ile	Gly	Gly	Pro	Gly	Leu	Asn	Pro	Arg	Asn	Leu
			85						90					95	

Thr	Val	Cys	Val	Glu	Gly	Leu	Phe	Asn	Asn	Val	Leu	Tyr	His	Leu	Val
			100					105					110		

Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	Leu	Lys	Phe	Leu	Pro	Gly	Met	Thr	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			

Lys	Tyr	Phe	Arg	Asp	Gly	Glu	Gln	Phe	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Met	Lys
	130					135					140				

Lys	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Val	Trp	Cys	Val	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	His
145					150					155					160

Ile	Asp	Thr	Cys	Ile	Ser	Ala	Thr	Phe	Arg	Lys	Gly	Ala	Cys	His	Ala
			165						170					175	

Lys	Lys	Pro	Arg	Ile	Thr	Thr	Ala	Ile	Asn	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Ala
			180					185					190		

Gly	Glu	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Asn	Gly	Lys
		195					200					205			

Gly	Thr	Lys	Ala	Ser	Ile	Lys	Phe	Gln	Thr	Met	Val	Asn	Trp	Leu	Cys
	210					215					220				

Glu	Asn	Arg	Val	Phe	Thr	Glu	Asp	Lys	Trp	Lys	Leu	Val	Asp	Phe	Asn
225					230					235					240

Gln	Tyr	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	His	Ser	Gly	Ser	Phe	Gln	Ile	Gln
			245						250					255	

23

Ser Ala Leu Lys Leu Ala Ile Tyr Lys Ala Thr Asn Leu Val Pro Thr
 260 265 270
 Ser Thr Phe Leu Leu His Thr Asp Phe Glu Gln Val Met Cys Ile Lys
 275 280 285
 Asp Asn Lys Ile Val Lys Leu Leu Leu Cys Gln Asn Tyr Asp Pro Leu
 290 295 300
 Leu Val Gly Gln His Val Leu Lys Trp Ile Asp Lys Lys Cys Gly Lys
 305 310 315 320
 Lys Asn Thr Leu Trp Phe Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Gly Lys Thr Asn
 325 330 335
 Leu Ala Met Ala Ile Ala Lys Ser Val Pro Val Tyr Gly Met Val Asn
 340 345 350
 Trp Asn Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp Val Ala Gly Lys Ser Leu
 355 360 365
 Val Val Trp Asp Glu Gly Ile Ile Lys Ser Thr Ile Val Glu Ala Ala
 370 375 380
 Lys Ala Ile Leu Gly Gly Gln Pro Thr Arg Val Asp Gln Lys Met Arg
 385 390 395 400
 Gly Ser Val Ala Val Pro Gly Val Pro Val Val Ile Thr Ser Asn Gly
 405 410 415
 Asp Ile Thr Phe Val Val Ser Gly Asn Thr Thr Thr Thr Val His Ala
 420 425 430
 Lys Ala Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Leu Asn Phe Thr Val Arg Cys
 435 440 445
 Ser Pro Asp Met Gly Leu Leu Thr Glu Ala Asp Val Gln Gln Trp Leu
 450 455 460
 Thr Trp Cys Asn Ala Gln Ser Trp Asp His Tyr Glu Asn Trp Ala Ile
 465 470 475 480
 Asn Tyr Thr Phe Asp Phe Pro Gly Ile Asn Ala Asp Ala Leu His Pro
 485 490 495
 Asp Leu Gln Thr Thr Pro Ile Val Thr Asp Thr Ser Ile Ser Ser Ser
 500 505 510
 Gly Gly Glu Ser Ser Glu Glu Leu Ser Glu Ser Ser Phe Phe Asn Leu
 515 520 525
 Ile Thr Pro Gly Ala Trp Asn Thr Glu Thr Pro Arg Ser Ser Thr Pro
 530 535 540
 Ile Pro Gly Thr Ser Ser Gly Glu Ser Ser Val Gly Ser Pro Val Ser
 545 550 555 560
 Ser Glu Val Val Ala Ala Ser Trp Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Pro Leu
 565 570 575

24

Ala Asp Gln Phe Arg Glu Leu Leu Val Gly Val Asp Tyr Val Trp Asp
580 585 590

Gly Val Arg Gly Leu Pro Val Cys Cys Val Gln His Ile Asn Asn Ser
595 600 605

Gly Gly Gly Leu Gly Leu Cys Pro His Cys Ile Asn Val Gly Ala Trp
610 615 620

Tyr Asn Gly Trp Lys Phe Arg Glu Phe Thr Pro Asp Leu Val Arg Cys
625 630 635 640

Ser Cys His Val Gly Ala Ser Asn Pro Phe Ser Val Leu Thr Cys Lys
645 650 655

Lys Cys Ala Tyr Leu Ser Gly Leu Gln Ser Phe Val Asp Tyr Glu
660 665 670

<210> 32

<211> 2380

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VP1 from
parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 32

```

atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatggtggg aaagtgatga 60
taaatttgct aaagctgtgt atcagcaatt tgtggaattt tatgaaaagg ttactggaac 120
agacttagag cttattcaaa tattaagaaga tcattataat atttccttag ataatccctt 180
agaaaaccca tcctctttgt ttgacttagt tgctcgtatt aaaaataacc ttaaaaactc 240
tccagactta tatagtcac attttcaaag tcatggacag ttatctgacc acccccatgc 300
cttatcatcc agtagcagtc atgcagaacc tagaggagaa gatgcagtat tatctagtga 360
agacttacac aagcctgggc aagttagcgt acaactaccc ggtactaact atgttgggcc 420
tggcaatgag ctacaagctg ggccccgcga aagtgcgtgt gacagtgcgt caaggattca 480
tgactttagg tatagccaac tggcctaagt gggaataaat ccatatactc attggactgt 540
agcagatgaa gagcttttaa aaaatataaa aaatgaaact ggggtttcaag cacaagtagt 600
aaaagactac ttacttttaa aaggtgcagc tgccccgtgt gccattttc aagggaagttt 660
gccggaagtt ccgcttaca acgcctcaga aaaataccca agcatgactt cagttaattc 720
tgcagaagcc agcactggtg caggaggggg gggcagtaat cctgtgaaaa gcatgtggag 780
tgagggggcc acttttagtg ccaactctgt aacttgtaca tttccagac aatttttaat 840
tccatatgac ccagagcacc attataaggt gttttctccc gcagcaagta gctgccacaa 900
tgccagtgga aaggaggcaa aggtttgcac cattagtccc ataatgggat actcaacccc 960
atggagatat ttagatttta atgcttttaa tttatttttt tcaccttag agtttcagca 1020
cttaattgaa aattatggaa gtatagctcc tgatgcttta actgtaacca tatcagaaat 1080
tgctgttaag gatgttaca acaaaactgg aggggggggtg caggttactg acagcactac 1140
agggcgccct tgcatttag tagaccatga atataagtac ccataatgtgt tagggcaagg 1200
tcaagatact ttagccccag aacttccat ttgggtatac tttccccctc aatacgttta 1260
cttaacagta ggagatgtta acacacaagg aatttctgga gacagcaaaa aattggcaag 1320
tgaagaatca gcattttatg ttttggaaag cagttctttt cagcttttag gtacaggagg 1380
tacagcaact atgtcttata agtttctcc agtgccccc gaaaatttag agggctgcag 1440
tcaacacttt tatgaaatgt acaacccctt atacggatcc cgcttagggg ttcttgacac 1500
attaggaggt gacccaaaat ttagatcttt aacacatgaa gaccatgcaa ttcagcccca 1560
aaacttcatt ccaggggccac taglaaactc agtgtctaca aaggaggggag acagctctag 1620
tactggagct ggaaaagcct taacaggcct tagcacaggt acctctcaa acactagaat 1680
atccttacgc cctgggccag tgtctcagcc gtaccaccac tgggacacag ataaatatgt 1740
cacaggaata aatgccattt ctcatggtca gaccatttat ggtaacgctg aagacaaaga 1800
gtatcagcaa ggagtgggta gatttccaaa tgaaaaagaa cagctaaaac agttacaggg 1860

```

25

```

ttaaacaatg cacacctact ttccaataa aggaaccag caatatacag atcaaattga 1920
gcgcccccta atgggtgggt ctgtatggaa cagaagagcc cttcactatg aaagccagct 1980
gtggagtaaa attccaaatt tagatgacag ttttaaaact cagtttgcag ccttaggagg 2040
atgggggttg catcagccac ctctcaaat attcttaaaa atattaccac aaagtgggcc 2100
aattggaggt attaaatcaa tgggaattac tacottagtt cagtatgccg tgggaattat 2160
gacagtaacc atgacattta aattggggcc ccgtaaagct acgggacggt ggaatcctca 2220
acctggagtg tatccccgc acgcagcagg tcatttacca tatgtactat atgaccccac 2280
agctacagat gcaaaacaac accacagaca tggatatgaa aagcctgaag aattgtggac 2340
agccaaaagc cgtgtgcacc cattgtaagt cgacatactc 2380

```

<210> 33

<211> 781

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VP1 amino acid from
parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 33

```

Met Ser Lys Glu Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala
 1              5              10              15

Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly
      20              25              30

Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser
      35              40              45

Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala
      50              55              60

Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His
      65              70              75              80

Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser
      85              90              95

Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asp Ala Val Leu Ser Ser
      100             105             110

Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr
      115             120             125

Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser
      130             135             140

Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu
      145             150             155             160

Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu
      165             170             175

Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val
      180             185             190

Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His
      195             200             205

Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys

```

26

210	215	220
Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala 225 230 235 240		
Gly Gly Gly Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala 245 250 255		
Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu 260 265 270		
Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala 275 280 285		
Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile 290 295 300		
Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn 305 310 315 320		
Ala Leu Asn Leu Phe Glu Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu 325 330 335		
Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu 340 345 350		
Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asn Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val 355 360 365		
Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr 370 375 380		
Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu 385 390 395 400		
Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val 405 410 415		
Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala 420 425 430		
Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu 435 440 445		
Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val 450 455 460		
Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr 465 470 475 480		
Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly 485 490 495		
Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro 500 505 510		
Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu 515 520 525		
Gly Asp Ser Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser 530 535 540		

Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val
 545 550 555 560
 Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile
 565 570 575
 Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys
 580 585 590
 Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu
 595 600 605
 Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly
 610 615 620
 Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser
 625 630 635 640
 Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys
 645 650 655
 Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly
 660 665 670
 Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu
 675 680 685
 Pro Gln Ser Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr
 690 695 700
 Leu Val Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys
 705 710 715 720
 Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val
 725 730 735
 Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro
 740 745 750
 Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro
 755 760 765
 Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu
 770 775 780

<210> 34

<211> 1699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VP2 from
parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 34

atactcaagc ttacaaaaca aaatgacttc agttaattct gcagaagcca gcaactggtgc 60
 aggagggggg ggcagtaatc ctgtgaaaag catgtggagt gagggggcca cttttagtgc 120
 caactctgta acttgtacat ttccagaca atttttaatt ccatatgacc cagagcacca 180

```

ttataagggtg ttttctcccg cagcaagtag ctgccacaat gccagtggaa aggaggcaaa 240
ggtttgcacc attagtccca taatgggata ctcaacccca tggagatatt tagattttaa 300
tgctttaaat ttattttttt cacctttaga gtttcagcac ttaattgaaa attatggaa 360
tatagctcct gatgctttta ctgtaaccat atcagaaatt gctgttaagg atgttacaaa 420
caaaactgga ggggggggtgc aggttactga cagcactaca gggcgccctat gcatgttagt 480
agaccatgaa tataagtacc catatgtgtt agggcaaggc caagatactt tagccccaga 540
acttcctatt tgggtatact ttccccctca atacgcttac ttaacagtag gagatgttaa 600
cacacaagga atttctggag acagcaaaaa attggcaagt gaagaatcag cattttatgt 660
tttggaacac agttcttttc agcttttagg tacaggaggc acagcaacta tgtcttataa 720
gtttcctcca gtgccccagc aaaattttaga gggctgcagt caacactttt atgaaatgta 780
caacccttta tacggatccc gcttaggggt tcctgacaca ttaggagggtg acccaaaatt 840
tagatcttta acacatgaag accatgcaat tcagcccca aacttcatgc caggggccact 900
agtaaaactca gtgtctacaa agggaggaga cagctctagt actggagctg gaaaagcctt 960
aacaggcctt agcacaggta cctctcaaaa cactagaata tccttacgcc ctggggccagt 1020
gtctcagccg taccaccact gggacacaga taaatatgtc acaggaataa atgccatttc 1080
tcatggtcag accacttatg gtaacgctga agacaaagag tatcagcaag gagtgggtag 1140
atttccaaat gaaaaagaac agctaaaaca gttacagggt ttaaaccatgc acacctactt 1200
tcccaataaa ggaacccagc aatatacaga tcaaatgtag cgccccctaa tgggtgggttc 1260
tgtatggaac agaagagccc ttactatga aagccagctg tggagtaaaa ttccaaattt 1320
agatgacagt tttaaaactc agtttgcagc cttaggagga tgggggtttgc atcagccacc 1380
tcctcaaata tttttaaaaa tattaccaca aagtgggcca attggaggta ttaaatcaat 1440

gggaattact acctagttc agtatgccgt ggggaattatg acagtaacca tgacatttaa 1500
attggggccc cgtaaagcta cgggacggtg gaatcctcaa cctggagtgt atcccccgca 1560
cgcagcaggt catttaccat atgtactata tgaccacaca gctacagatg caaaacaaca 1620
ccacagacat ggatatgaaa agcctgaaga attgtggaca gccaaaagcc gtgtgcaccc 1680
attgtaagtc gacatactc                                     1699

```

<210> 35

<211> 554

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VP2 amino acid from
parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 35

```

Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly
 1             5             10             15

Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser
      20             25             30

Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr
      35             40             45

Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys
      50             55             60

His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile
      65             70             75             80

Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn
      85             90             95

Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly
      100            105            110

Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val
      115            120            125

```

Lys Asp Val Thr Asn Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser
 130 135 140
 Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro
 145 150 155 160
 Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile
 165 170 175
 Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val
 180 185 190
 Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu
 195 200 205
 Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu Gly Thr
 210 215 220
 Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu
 225 230 235 240
 Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr Asn Pro Leu
 245 250 255
 Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly Asp Pro Lys
 260 265 270
 Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro Gln Asn Phe
 275 280 285
 Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu Gly Asp Ser
 290 295 300
 Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser Thr Gly Thr
 305 310 315 320
 Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val Ser Gln Pro
 325 330 335
 Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile
 340 345 350
 Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln
 355 360 365
 Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu
 370 375 380
 Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln
 385 390 395 400
 Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn
 405 410 415
 Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn
 420 425 430
 Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly
 435 440 445

30

Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu Pro Gln Ser
 450 455 460
 Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr Leu Val Gln
 465 470 475 480
 Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro
 485 490 495
 Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val Tyr Pro Pro
 500 505 510
 His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr
 515 520 525
 Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu
 530 535 540
 Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu
 545 550

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP-5

<400> 36
 aggaagtttg ccggaagttc 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP-3

<400> 37
 gtgctgaaac tctaaaggtg 20

<210> 38
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP2-5

<400> 38
 gacatggata tgaaaagcct gaag 24

<210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP2-3

 <400> 39
 gttgttcata tctggttaag tact 24

 <210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer K-1sp

 <400> 40
 ataaatccat atactcatt 19

 <210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer K-2sp

 <400> 41
 ctaaagtatc ctgaccttg 19

 <210> 42
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer Hicks-5

 <400> 42
 cccgccttat gcaaattgggc ag 22

 <210> 43
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer Hicks-3

 <400> 43
 ttgtgttagg ctgtcttata gg 22

 <210> 44
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer NS1-5

 <400> 44

atactctcta gacaaaacaa aatggagcta tttagagggg tgcttcaagt ttct 54

<210> 45

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer NS1-3

<400> 45

gagtatgtcg acttactcat aatctacaaa gctttgcaat ccagacag 48

<210> 46

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer VP1-5SN

<400> 46

atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatgggtggg aaagt 55

<210> 47

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer VPALL-3

<400> 47

gagtatgtcg acttacaatg ggtgcacacg gcttttggct gtccacaatt c 51

<210> 48

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer VP2-5SN

<400> 48

atactcaagc ttacaaaaca aaatgacttc agttaattct gcagaagcca gcact 55

<210> 49

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VSPC1

<400> 49

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atccttaaca gcaatttctg ata 43

<210> 50

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VSPC2

<400> 50

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cgccctgtag tgctgtcag

39

<210> 51

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VSPC3

<400> 51

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa tatacccaaa taggaagttc tg

42

<210> 52

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VSPC4

<400> 52

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa taaaatgctg attcttcact tgc

43

<210> 53

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VSPC5

<400> 53

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa tgctgtacct cctgtaccta

40

<210> 54

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VSPC6

<400> 54

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agccctctaa attttctggg

40

<210> 55

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VSPC7

<400> 55
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctcctaattgt gtcaggaacc 40

<210> 56
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSA1

<400> 56
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccatatact cattggactg t 51

<210> 57
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSA2

<400> 57
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccagagcac cattataa 48

<210> 58
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSA3

<400> 58
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcacaatgcc agtggaaa 48

<210> 59
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSP2

<400> 59
 gtgctgaaac tctaaaggt 19

<210> 60
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSP1

<400> 60
 ggaggcaaag gtttgca 17

<210> 61
 <211> 20

35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)

<223> where 'c' is modified 5' with fluorescein

phosphoramidite

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)

<223> where 't' is modified 3' with DABCYL

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer VSPPR1

<400> 61

cccatggaga tatttagatt

20

<210> 62

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH80-1

<400> 62

ataaatccat	atactcattg	gactgtagca	gatgaagagc	ttttaaaaaa	tataaaaaat	60
gaaactgggt	ttcaagcaca	agtagtaaaa	gactacttta	ctttaaaagg	tgcagctgcc	120
cctgtggccc	attttcaagg	aagtttgccg	gaagttcccg	cttacaacgc	ctcagaaaaa	180
taccaagca	tgacttcagt	taattctgca	gaagccagca	ctggtgcagg	aggggggggc	240
agtaatcctg	ttaaaagcat	gtggagttag	ggggccactt	ttagtgccaa	ctctgtaact	300
tgtacatttt	ccagacagtt	tttaattcca	tatgaccag	agcaccatta	taaggtgttt	360
tctccgcag	caagtagctg	ccacaatgcc	agtggaaagg	aggcaaagg	ttgcaccatt	420
agtcccataa	tgggatactc	aaccccatgg	agatatttag	attttaatgc	tttaaatttg	480
tttttttcac	ctttagagtt	tcagcattta	attgaaaact	atggaagtat	agctcctgat	540
gctttaactg	taaccataatc	agaaattgct	gttaaggatg	ttacagacaa	aactggaggg	600
ggagtacaag	ttactgacag	cactaccggg	cgctatgca	tgtagtaga	ccatgaatac	660
aagtacccat	atgtgttagg	gcaaggtcag	gatactttag			700

<210> 63

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH81-3

<400> 63

ataaatccat	atactcattg	gactgtagca	gatgaagagc	ttttaaaaaa	tataaaaaat	60
gaaactgggt	ttcaagcaca	agtagtaaaa	gactacttta	ctttaaaagg	tgcagctgcc	120
cctgtggccc	attttcaagg	aagtttgccg	gaagttcccg	cttacaacgc	ctcagaaaaa	180
taccaagca	tgacttcagt	taattctgca	gaagccagca	ctggtgcagg	aggggggggc	240
agtaatcctg	ttaaaagcat	gtggagttag	ggggccactt	ttagtgccaa	ctctgtaact	300
tgtacatttt	ccagacagtt	tttaattcca	tatgaccag	agcaccatta	taaggtgttt	360
tcgcccgcag	caagtagctg	ccacaatgcc	agtggaaagg	aggcaaagg	ttgcaccatt	420
agtcccataa	tgggatactc	aaccccatgg	agatacttag	attttaatgc	tttaaattta	480
tttttttcac	ctttagagtt	tcagcattta	attgaaaatt	atggaagtat	agctcctgat	540

36

```

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 64

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL1-4

<400> 64

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 65

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL2-1

<400> 65

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 66

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL3-1

<400> 66

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

```

37

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccocag agcaccattt taagggtgtt 360

tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

<210> 67

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL4-3

<400> 67

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccocag agcaccattt taagggtgtt 360
 tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

<210> 68

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL5-2

<400> 68

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccocag agcaccattt taagggtgtt 360
 tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

<210> 69

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL6-2

<400> 69

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 70

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL7-3

<400> 70

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 71

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL8-2

<400> 71

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag gttttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

39

<210> 72
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL9-1

<400> 72

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacctcaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag ccagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 73
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL9-9

<400> 73

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacctcaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 74
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL10-2

<400> 74

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacctcaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
```

40

```

agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatattag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatacttttag 700

```

<210> 75

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL11-1

<400> 75

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgcaa ctctgttaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcat caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaaggc ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatattag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatactttat 700

```

<210> 76

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL12-1

<400> 76

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtgact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcat caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaaggc ttgcaccatt 420
agtccgataa tgggatactc aaccccatgg agatatattag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcaag ttactgacag cagtacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatacttttag 700

```

<210> 77

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL13-3

<400> 77

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

```

41

```

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtgcathtt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 78

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL14-1

<400> 78

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacathtt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 79

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL15-3

<400> 79

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacathtt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 80

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL16-2

<400> 80

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatathtag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttat 700

```

<210> 81

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL17-1

<400> 81

```

ataaatccat atacttattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatathtag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 82

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL18-1

<400> 82

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatathtag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

```

43

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

<210> 83

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL19-1

<400> 83

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700
```

<210> 84

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL20-3

<400> 84

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700
```

<210> 85

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL21-3

<400> 85

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
```

44

```

tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacagg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 86

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL22-11

<400> 86

```

ataaatccat ataactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcggg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacagg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 87

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL2-14

<400> 87

```

ataaatccat ataactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacagg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Vpara 8

<400> 88

tccatatgac ccagagcacc a 21

<210> 89
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer Vpara 9

<400> 89
 tttccactgg cattgtggc 19

<210> 90
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: substitute sequence in the internal control

<400> 90
 agctagacct gcatgtcact g 21

<210> 91
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: target sequence

<400> 91
 ctacttgctg cgggagaaaa acacct 26

<210> 92

<211> 681
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: internal control

<400> 92
 gaattcactt gtacattttc cagacaattt ttaattccat atgacccaga gcaccattat 60
 acagtgacat gcaggtctag ctctgccaca atgccagtgg aaaggaggca aagggtttgca 120
 ccattagtc c cataatggga tactcaaccc catggagata tttagatttt aatgctttta 180
 atttattttt ttaccttta gagtttcagc acttaattga aaattatgga agtatagctc 240
 ctgatgcttt aactgtaacc atatcagaaa ttgctgttaa ggatgttacg gacaaaactg 300
 gagggggggg gcaggttact gacagcacta cagggcgccct atgcatgtta gtagaccatg 360
 aatataagta cccatatgtg ttagggcaag gtcaagatac tttagcccca gaacttccta 420
 tttgggtata ctttccccct caatacgctt acttaacagt aggagatgtt aacacacaag 480
 gaattttctgg agacagcaaa aaattggcaa gtgaagaatc agcattttat gttttggaac 540
 acagttcttt tcagctttta ggtacaggag gtacagcaac tatgtcttat aagtttcctc 600
 cagtgtcccc agaaaattta gagggctgca gtcaacactt ttatgaaatg tacaaccctc 660
 tatacggatc ccgctgtcga c 681