



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004102205/13, 28.06.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.06.2002

(30) Конвенционный приоритет:
28.06.2001 US 60/302,077
29.03.2002 US 60/369,224

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2005

(45) Опубликовано: 20.06.2007 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: DURIGON E.L. et. al., «Multiple primer
pairs for polymerase chain reaction (PCR)
amplification of human parvovirus B19 DNA», J
Virol Methods. 1993 Oct; 44(2-3):155-65. RU
2146372 C1, 10.03.2000. US 6004044, 20.03.2001.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
28.01.2004

(86) Заявка РСТ:
US 02/20684 (28.06.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 03/002753 (09.01.2003)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. N 517

(72) Автор(ы):

ПИКУАНТЕС Серджо (US),
ШИАМАЛА Венкатакришна (US)

(73) Патентообладатель(и):

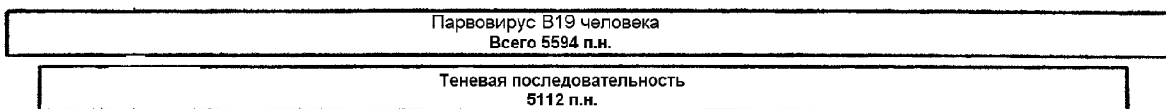
ЧИРОН КОРПОРЕЙШН (US)

(54) СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАРВОВИРУСА В19 ЧЕЛОВЕКА В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБРАЗЦЕ (ВАРИАНТЫ) И НАБОР ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен способ выявления парвовируса В19 человека. Способ предусматривает выделение нуклеиновых кислот и амплификацию выделенных аминокислот с использованием смыслового и антисмыслового праймера. При этом выделение нуклеиновых кислот проводят путем взаимодействия биологического образца с твердой подложкой, включающей связанные с ней захваченные

парвовирус-специфичные нуклеиновые кислоты. В качестве смысловых праймеров используют праймеры SEQ ID NO:60 и 88, а в качестве антисмысловых праймеров SEQ ID NO:59 и 89. Предложен также набор для осуществления такого способа. Изобретение позволяет выявлять парвовирус В19 человека в биологическом образце. Изобретение может быть использовано в медицине и вирусологии. 3 н. и 23 з.п. ф-лы, 12 ил., 1 табл.



Петля стебля
-179-203

Петля стебля
5081-5413

NS1
436-2451

VP2
3125-4789

VP1
2444-4789

ПЦР
217-4893
~4678 п.н.

ПЦР
2936-3635
700 п.н.

ПЦР
3073-3442
370 п.н.

ПЦР
4728-4941
214 п.н.

ФИГ.1

RU 2301263 C2

RU 2301263 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/35 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2004102205/13, 28.06.2002

(24) Effective date for property rights: 28.06.2002

(30) Priority:
28.06.2001 US 60/302,077
29.03.2002 US 60/369,224

(43) Application published: 10.06.2005

(45) Date of publication: 20.06.2007 Bull. 17

(85) Commencement of national phase: 28.01.2004

(86) PCT application:
US 02/20684 (28.06.2002)

(87) PCT publication:
WO 03/002753 (09.01.2003)

Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. N 517

(72) Inventor(s):
PIKUANTES Serdzhо (US),
ShIAMALA Venkatakrishna (US)

(73) Proprietor(s):
ChIRON KORPOREJShN (US)

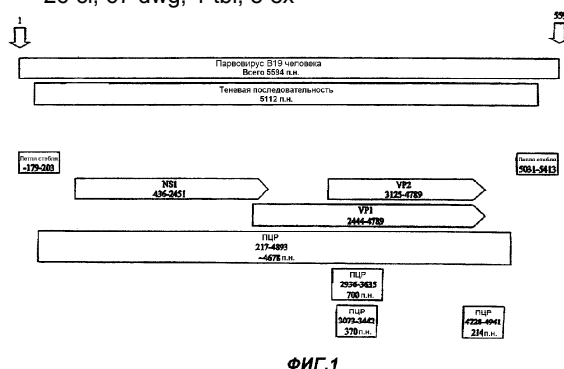
(54) METHOD FOR DETECTING HUMAN PARVOVIRUS B19 IN BIOLOGICAL SAMPLE (VARIANTS) AND SET FOR ITS REALIZATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine, virology, biotechnology.

SUBSTANCE: invention proposes a method for detection of human parvovirus B19. Method involves isolation of nucleic acids and amplification of isolated nucleic acids using sense and anti-sense primer. Nucleic acids are isolated by interaction of biological sample with a solid backing comprising captured parvovirus-specific nucleic acids associated with a backing. Primers SEQ ID NO:60 and 88 are used as sense primers and SEQ ID NO:59 and 89 are used as anti-sense primers. Also, invention proposes a set for realizing a method. Invention provides detecting human parvovirus B19 in a biological sample.

EFFECT: improved method of detection.
26 cl, 67 dwg, 1 tbl, 5 ex



ФИГ.1

Область техники

Настоящее изобретение относится, главным образом, к диагностике вирусов. В частности, изобретение относится к анализам на основе нуклеиновой кислоты для точной диагностики инфекции, вызванной парвовирусом B19, а также к праймерам и зондам для применения в указанных анализах.

Предпосылки к созданию изобретения

Парвовирус B19 человека является членом семейства Parvoviridae, рода Erythrovirus и представляет собой маленький 22 нм двадцатигранный безоболочечный вирус с линейной одноцепочечной молекулой ДНК, состоящей приблизительно из 5600 нуклеотидов.

Вирусный геном кодирует три главных белка, VP1, VP2 и NS1. См. Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 и фиг.1 в настоящей заявке. VP1 (83 кДа) и VP2 (58 кДа) представляют собой структурные капсидные белки. Указанные два белка кодируются в перекрывающихся рамках считывания приблизительно от нуклеотидов 2444 до 4789 и от 3125 до 4789, соответственно. VP2 составляет 95% капсида, а белок больших размеров VP1 - только 5% капсида. VP1 требуется для зрелой конформации вируса. NS1 (77 кДа) представляет собой неструктурный белок и присутствует только в ядерной фракции инфицированных клеток и отсутствует в цитоплазме и интактных вирионах в сыворотке крови.

Парвовирус B19 был первым вирусом, открытым в сыворотке здоровых доноров крови, и является единственным членом семейства Parvoviridae, известным как патогенный для человека. Данный вирус связан с обширным рядом болезненных проявлений. Парвовирус B19 человека обычно вызывает бессимптомную или умеренную самоограничивающуюся инфекцию у детей. У взрослых парвовирус B19 может вызывать сыпь, преходящую симметричную полиартралгию и артрит. Парвовирус B19 связан с преходящим апластическим кризисом (ТАС) у пациентов с имеющимися гемолитическими нарушениями. Сообщается о хронической инфекции B19 и персистирующей анемии у иммуносупрессированных пациентов с острым лейкозом, врожденными иммунодефицитами, СПИДом и состояниями после пересадки костного мозга. Парвовирус B19 также связан с внутриутробной гибелью плода у беременных женщин.

В большинстве стран инфицирование вирусом B19 обычно наблюдается в детстве; приблизительно 50% детей к 15-летнему возрасту имеют анти-B19 антитела. Распространенность антител против B19 может в дальнейшем возрастать в течение жизни и достигает величин более 90% среди лиц старшего возраста.

При инфицировании парвовирусом B19 человека первоначальная репликация вируса, как полагают, происходит в дыхательных путях. Затем вирус поражает клетки костного мозга. Это приводит к широкомасштабной репликации вируса с виремией, по сообщениям, от 10^2 до 10^{14} частиц/мл, наблюдающейся через 7-10 дней после инфицирования, но до появления симптомов. Исчезновение виремии совпадает с выявлением специфичных IgM антител, уровень которых остается повышенным в течение двух - трех месяцев. Анти-B19 IgG антитела выявляются спустя несколько дней после появления антител IgM и сохраняются в течение всей жизни.

Отсутствие липидной оболочки и ограниченное содержание ДНК делают парвовирус B19 крайне резистентным к физико-химической инактивации. Парвовирус B19, особенно в высокой концентрации, может выдерживать обычную тепловую обработку продуктов крови, и документально подтверждена передача B19 через введение препаратов фактора VIII, прошедшего обработку растворителем и детергентом, и факторов VIII и IX, прошедших тепловую паровую или сухую обработку.

Парвовирус B19 человека нельзя выращивать в обычных клеточных культурах, что делает лабораторное выявление и выделение вируса крайне трудным. Так, в течение многих лет единственным источником антигена являлась сыворотка крови пациентов с виремией. В качестве попытки обойти указанные проблемы для использования в серологических анализах были получены рекомбинантные антигены. См., например, Sisk и Berman, Biotechnology (1987) 5:1077-1080; патент США № 6204044. Иммуноферментные

анализы с захватом IgM использовались для выявления анти-B19 IgM, а также для диагностики недавнего заражения B19. Диагностическая эффективность ряда имеющихся в продаже тестов, однако, неоднородна. Кроме того, диагностические тесты на основе IgM не могут обнаружить вирус на вирусемической стадии инфицирования, а после того, как антитела IgM синтезированы, они могут оставаться в кровотоке в течение нескольких месяцев после окончания вирусемии.

Большая распространенность антител против B19 в здоровой популяции, а также тот факт, что вирусемия высокой степени обычно сохраняется в течение только одной недели, делают использование тестов на серологической основе непрактичными. Помимо этого, у иммунокомпрометированных пациентов серологический диагноз может быть ненадежным.

Для обнаружения B19 используются анализы на основе гибридизации нуклеиновой кислоты, такие как дот-блоттинг и гибридизация *in situ*. Указанные анализы обычно имеют пределы обнаружения от 1 до 0,1 пг вирусной ДНК ($\sim 10^4$ - 10^5 вирусных частиц). ПЦР имеет более высокую чувствительность (~ 100 геномных копий). Однако методики гибридизации ДНК занимают много времени и ограничены в применении, а ПЦР является непрактичной для скрининга больших количеств образцов.

Следовательно, остается потребность в разработке надежных диагностических тестов для обнаружения парвовируса B19 в вирусемических образцах с целью предотвращения передачи вируса с препаратами крови и плазмы или путем близкого личного контакта.

Краткое описание существа изобретения

Настоящее изобретение основано на открытии уникальных праймеров и зондов для применения в анализах на основе нуклеиновой кислоты, а также на разработке чувствительного надежного диагностического теста на основе нуклеиновой кислоты для обнаружения парвовируса B19 в биологических образцах от потенциально инфицированных лиц. В методике, описанной в настоящей заявке, используется экстрагированный ДНК-образец в качестве матрицы для амплификации консервативных областей последовательности генома B19, с использованием опосредованной транскрипцией амплификации (ТМА), как в анализе с 5'-нуклеазой, таком как методика TaqManTM. Данные способы позволяют обнаруживать ДНК B19 в вирусемических образцах, имеющих такие низкие вирусные титры как 10^3 вирусных частиц/мл. Соответственно, инфицированные образцы можно идентифицировать и исключить из трансфузии, а также не использовать их для изготовления препаратов крови. Зонды и праймеры, описанные в настоящем изобретении, также пригодны, например, для стандартных гибридных методов, а также для методик на основе ПЦР, амплификации на основе последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA) и анализов, в которых используются разветвленные молекулы ДНК.

Соответственно, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу обнаружения инфицирования парвовирусом B19 человека в биологическом образце. Способ включает:

(а) выделение нуклеиновой кислоты из биологического образца, предположительно содержащего ДНК парвовируса B19 человека, причем нуклеиновая кислота включает последовательность-мишень РНК;

(b) взаимодействие выделенной нуклеиновой кислоты парвовируса B19 с первым олигонуклеотидом, который включает первый праймер, включающий способную образовывать комплекс последовательность, достаточно комплементарную 3'-концевой части последовательности-мишени РНК для образования с ней комплекса, причем первый праймер дополнительно включает промотор для ДНК-зависимой РНК-полимеразы 5' и функционально связан со способной образовывать комплекс последовательностью, причем взаимодействие происходит в таких условиях, которые обеспечивают образование комплекса олигонуклеотид/последовательность-мишень и инициацию синтеза ДНК;

(с) изменение первого праймера в реакции изменения с использованием последовательности-мишени РНК в качестве матрицы, с получением первого продукта удлинения ДНК-праймера, комплементарного последовательности-мишени РНК;

(d) отделение первого продукта удлинения ДНК-праймера от последовательности-мишени РНК с использованием фермента, который избирательно расщепляет последовательность-мишень РНК;

(е) обработку продукта удлинения ДНК-праймера вторым олигонуклеотидом, который включает второй праймер, включающий способную образовывать комплекс последовательность, достаточно комплементарную 3'-концевой части продукта удлинения ДНК-праймера, чтобы образовывать с ней комплекс, в таких условиях, которые обеспечивают образование комплекса олигонуклеотид/последовательность-мишень и инициацию синтеза ДНК;

(f) удлинение 3'-конца второго праймера в реакции удлинения ДНК с получением второго продукта удлинения ДНК-праймера, в результате чего получают матрицу для ДНК-зависимой РНК-полимеразы;

(g) использование матрицы для получения множества РНК-копий последовательности-мишени с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая распознает последовательность промотора;

и (h) использование РНК-копий со стадии (g) для аутокаталитического повторения стадий с (b) по (g) для амплификации последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадии:

(i) добавление меченого олигонуклеотидного зонда к продукту стадии (h), причем олигонуклеотидный зонд является комплементарным части последовательности-мишени, в таких условиях, которые обеспечивают гибридизацию зонда с последовательностью-мишенью, с образованием комплекса зонд:мишень; и

(j) выявление наличия или отсутствия метки как показателя наличия или отсутствия последовательности-мишени.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения метка представляет собой сложный эфир акридиния.

В еще одних вариантах осуществления настоящего изобретения первый и второй праймеры и зонд, используемые в описанных выше способах, получают из VP1 области генома парвовируса В19 человека, такого как из полинуклеотидной последовательности, изображенной на любой из фиг.2A-2U или 11A-11Z.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу обнаружения инфицирования парвовирусом В19 человека в биологическом образце. Способ включает:

(a) выделение нуклеиновой кислоты из биологического образца, предположительно содержащего ДНК парвовируса В19 человека, причем нуклеиновая кислота включает последовательность-мишень РНК;

(b) взаимодействие выделенной нуклеиновой кислоты парвовируса В19 с первым олигонуклеотидом, который включает первый праймер, включающий способную образовывать комплекс последовательность, достаточно комплементарную 3'-концевой части последовательности-мишени РНК, чтобы образовывать с ней комплекс, причем первый праймер дополнительно включает промотор для ДНК-зависимой РНК-полимеразы 5' и функционально связан со способной образовывать комплекс последовательностью, причем первый праймер включает последовательность, полученную из полинуклеотидной последовательности, изображенной на любой из фиг.2A-2U или фиг.11A-11Z, а взаимодействие осуществляют в таких условиях, которые обеспечивают образование комплекса олигонуклеотид/последовательность-мишень и инициацию синтеза ДНК;

(c) удлинение первого праймера в реакции удлинения с использованием последовательности-мишени РНК в качестве матрицы, с получением первого продукта удлинения ДНК-праймера, комплементарного последовательности-мишени РНК;

(d) отделение первого продукта удлинения ДНК-праймера от последовательности-мишени РНК с использованием фермента, который избирательно расщепляет последовательность-мишень РНК;

(е) обработку продукта удлинения ДНК-праймера вторым олигонуклеотидом, который включает второй праймер, включающий способную образовывать комплекс последовательность, достаточно комплементарную 3'-концевой части продукта удлинения ДНК-праймера, чтобы образовывать с ней комплекс, причем второй праймер получают из полинуклеотидной последовательности, изображенной на любой из фиг.2А-2U или фиг.11А-11Z, а обработку осуществляют в таких условиях, которые обеспечивают образование комплекса олигонуклеотид/последовательность-мишень и инициацию синтеза ДНК;

(f) удлинение 3'-конца второго праймера в реакции удлинения ДНК, с получением второго продукта удлинения ДНК-праймера, в результате чего получают матрицу для ДНК-зависимой РНК-полимеразы;

(g) использование матрицы для получения множества РНК-копий последовательности-мишени с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая распознает последовательность промотора;

и (h) использование РНК-копий со стадии (g) для аутокаталитического повторения стадий с (b) по (g) для амплификации последовательности-мишени;

(i) добавление меченного сложным эфиром акридиния олигонуклеотидного зонда к продукту стадии (h), причем олигонуклеотидный зонд является комплементарным части указанной последовательности-мишени, и зонд получают из полинуклеотидной последовательности, изображенной на любой из фиг.2А-2U, причем зонд добавляют в таких условиях, которые обеспечивают гибридизацию зонда с последовательностью-мишенью, с образованием комплекса зонд:мишень; и

(j) выявление наличия или отсутствия метки как показателя наличия или отсутствия последовательности-мишени.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу амплификации нуклеотидной последовательности-мишени парвовируса В19. Способ включает:

(a) выделение нуклеиновой кислоты из биологического образца, предположительно содержащего ДНК парвовируса В19 человека, причем нуклеиновая кислота включает последовательность-мишень РНК;

(b) добавление одного или более праймеров, способных к гибридизации с последовательностью-мишенью РНК, причем один или более праймеров получают из полинуклеотидных последовательностей, изображенных на любой из фиг.2А-2U и фиг.11А-11Z;

(c) добавление олигонуклеотидного зонда, способного к гибридизации с последовательностью-мишенью РНК 3', сходной с одним или более праймерами;

(d) удлинение одного или более праймеров с использованием полимеразы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность-мишень РНК стадии (a) подвергают обратной транскрипции для получения кДНК, и способ может дополнительно включать амплификацию кДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) или асимметричной гэл-лигазной цепной реакции (RT-AGLCR). В других вариантах осуществления настоящего изобретения полимеразы представляют собой термостабильную полимеразу, такую, без ограничения, как Taq-полимераза или Vent-полимераза. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения полимеразы представляют собой ДНК-полимеразу I E.coli, фрагмент Klenow ДНК-полимеразы I E.coli или ДНК-полимеразу T4.

В некоторых вариантах осуществления различных способов, описанных выше, обеспечивается внутренний контроль. Внутренний контроль может осуществляться с помощью последовательности, изображенной на фиг.12 (SEQ ID NO:92). В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения внутренний контроль включает SEQ ID NO:90.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретение относится к способу обнаружения инфицирования парвовирусом В19 человека в биологическом

образце. Способ включает:

(а) выделение нуклеиновой кислоты из биологического образца, предположительно содержащего ДНК парвовируса В19 человека, причем нуклеиновая кислота включает последовательность-мишень;

5 (b) взаимодействие выделенной нуклеиновой кислоты парвовируса В19 с меченным поддающейся обнаружению меткой зондом, достаточно комплементарным и способным к гибридизации с последовательностью-мишенью, причем зонд получают из полинуклеотидных последовательностей, изображенных на любой из фиг.2А-2U и фиг.11А-11Z, и причем взаимодействие происходит в таких условиях, которые обеспечивают
10 образование комплекса зонд/последовательность-мишень; и

(с) выявление наличия или отсутствия метки как показателя наличия или отсутствия последовательности-мишени.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, включающему нуклеотидную последовательность, включающую любую из нуклеотидных
15 последовательностей, изображенных на фиг.2А-2U или фиг.11А-11Z.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, как описано выше, в котором нуклеотидная последовательность состоит из нуклеотидной последовательности, изображенной на фиг.2А, 2В, 2С, 2D, 2Е, 2F, 2G, 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O, 2P, 2Q, 2R, 2S, 2T, 2U, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F,
20 11G, 11H, 11I, 11J, 11K, 11L, 11M, 11N, 11O, 11P, 11Q, 11R, 11S, 11T, 11U, 11V, 11W, 11X, 11Y или 11Z.

В еще одних вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, включающему нуклеотидную последовательность, включающую любую из нуклеотидных последовательностей, изображенных на фиг.3А-3С или 4А-4С.

25 В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, как описано выше, в котором нуклеотидная последовательность состоит из нуклеотидной последовательности, изображенной на фиг.3А-3С или на фиг.4А-4С.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к олигонуклеотидному праймеру, состоящему из промоторной области, распознаваемой ДНК-
30 зависимой РНК-полимеразой, функционально связанной со специфичной для парвовируса В19 человека способной образовывать комплекс последовательностью приблизительно из 10-75 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения промоторная область представляет собой промотор Т7, а указанная полимераза представляет собой РНК-полимеразу Т7. Помимо этого, специфичная для парвовируса В19
35 человека последовательность может состоять из VP1 области генома парвовируса В19 человека, такая как из полинуклеотидной последовательности, изображенной на любой из фиг.2А-2U или фиг.11А-11Z.

В еще одних вариантах осуществления настоящее изобретение относится к олигонуклеотидному праймеру, состоящему из промотора Т7, функционально связанному
40 со специфичной для парвовируса В19 человека способной образовывать комплекс последовательностью приблизительно из 10-75 нуклеотидов, причем специфичную для парвовируса В19 человека способную образовывать комплекс последовательность получают из полинуклеотидной последовательности, изображенной на любой из фиг.2А-2U или 11А-11Z.

45 В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к олигонуклеотидному зонду, включающему специфичную для парвовируса В19 гибридизующуюся последовательность приблизительно из 10-50 нуклеотидов, связанную с меткой, представляющей собой сложный эфир акридиния. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения специфичную для парвовируса В19 человека
50 гибридизующуюся последовательность получают из VP1 области генома парвовируса В19 человека, такого как из полинуклеотидной последовательности, изображенной на любой из фиг.2А-2U или фиг.11А-11Z.

В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение

относится к набору для диагностического исследования, включающему один или более олигонуклеотидных праймеров, описанных в настоящей заявке, и инструкции по проведению диагностического исследования. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор для исследования дополнительно включает

- 5 олигонуклеотидный зонд, включающий специфичную для парвовируса В19 гибридизирующую последовательность приблизительно из 10-50 нуклеотидов, связанную с меткой, представляющей собой сложный эфир акридиния.

Указанные и другие аспекты настоящего изобретения будут очевидны для специалиста в данной области благодаря следующему подробному описанию и прилагаемым рисункам.

- 10 Краткое описание фигур

Фиг.1 представляет собой схему генома парвовируса В19 человека, изображающую различные кодирующие области вируса. Изображены три ПЦР фрагмента, один приблизительно из 700 п.н., соответствующих нуклеотидным положениям 2936-3635 генома парвовируса В19, описанным в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936; один

15 приблизительно из 370 п.н. в пределах фрагмента из 700 п.н., соответствующих нуклеотидным положениям 3073-3442 генома парвовируса В19, описанным в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936; и один приблизительно из 214 п.н., соответствующих нуклеотидным положениям 4728-4941 генома парвовируса В19, описанным в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

- 20 Фиг.2А-2U (SEQ ID NO:1-21) изображают последовательности ДНК из различных изолятов парвовируса В19 человека, которые включают последовательности, соответствующие нуклеотидным положениям 2936-3635 генома парвовируса В19, описанным в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 (фрагмент из 700 п.н., изображенный на фиг.1). Фиг.2А (SEQ ID NO:1) представляет собой соответствующую
- 25 последовательность из изолята CH47-26; фиг.2В (SEQ ID NO:2) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH48-29; фиг.2С (SEQ ID NO:3) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH33-2; фиг.2D (SEQ ID NO:4) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH33-3; фиг.2Е (SEQ ID NO:5) представляет собой соответствующую последовательность
- 30 из изолята CH33-4; фиг.2F (SEQ ID NO:6) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH42-7; фиг.2G (SEQ ID NO:7) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH42-18; фиг.2H (SEQ ID NO:8) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH42-19; фиг.2I (SEQ ID NO:9) представляет собой соответствующую последовательность из изолята
- 35 CH46-23; фиг.2J (SEQ ID NO:10) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH1-1; фиг.2K (SEQ ID NO:11) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH1-6; фиг.2L (SEQ ID NO:12) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH2-8; фиг.2M (SEQ ID NO:13) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH2-10;
- 40 фиг.2N (SEQ ID NO:14) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH2-11C; фиг.2O (SEQ ID NO:15) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH5-13; фиг.2P (SEQ ID NO:16) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH7-22; фиг.2Q (SEQ ID NO:17) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH13-27; фиг.2R (SEQ ID NO:18) представляет собой соответствующую последовательность из изолята
- 45 CH14-33; фиг.2S (SEQ ID NO:19) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH62-2; фиг.2T (SEQ ID NO:20) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH64-2; и фиг.2U (SEQ ID NO:21) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH67-2.

- 50 Фиг.3А-3С (SEQ ID NO:22) показывают последовательность ПЦР-фрагмента приблизительно из 4,7 т.п.н., показанного на фиг.1, из клона 2-В1 парвовируса В19. Последовательность представляет собой фрагмент из 4677 нуклеотидов, соответствующий нуклеотидным положениям 217-4893, описанным в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-

936. Изображенная последовательность содержит полную открытую рамку считывания парвовируса B19, которая кодирует NS1, VP1 и VP2, плюс дополнительные нетранслируемые последовательности 5' и 3'.

Фиг.4A-4C (SEQ ID NO:23) показывают последовательность ПЦР-фрагмента

- 5 приблизительно из 4,7 т.п.н., показанного на фиг.1, из клона 2-B6 парвовируса B19. Последовательность представляет собой фрагмент из 4677 нуклеотидов, соответствующий нуклеотидным положениям 217-4893, описанным в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Изображенная последовательность содержит полную открытую рамку считывания парвовируса B19, которая кодирует NS1, VP1 и VP2, плюс дополнительные
- 10 нетранслируемые последовательности 5' и 3'.

Фиг.5A (SEQ ID NO:24) и 5B (SEQ ID NO:25) показывают нуклеотидную и белковую последовательности NS1, соответственно, из клона 2-B1 парвовируса B19.

Фиг.6A (SEQ ID NO:26) и 6B (SEQ ID NO:27) показывают нуклеотидную и белковую последовательности VP1, соответственно, из клона 2-B1 парвовируса B19.

- 15 Фиг.7A (SEQ ID NO:28) и 7B (SEQ ID NO:29) показывают нуклеотидную и белковую последовательности VP2, соответственно, из клона 2-B1 парвовируса B19.

Фиг.8A (SEQ ID NO:30) и 8B (SEQ ID NO:31) показывают нуклеотидную и белковую последовательности NS1, соответственно, из клона 2-B6 парвовируса B19.

- 20 Фиг.9A (SEQ ID NO:32) и 9B (SEQ ID NO:33) показывают нуклеотидную и белковую последовательности VP1, соответственно, из клона 2-B6 парвовируса B19.

Фиг.10A (SEQ ID NO:34) и 10B (SEQ ID NO:35) показывают нуклеотидную и белковую последовательности VP2, соответственно, из клона 2-B6 парвовируса B19.

- Фиг.11A-11Z (SEQ ID NO:62-87) изображают последовательности ДНК из различных
 25 изолятов парвовируса B19, которые включают последовательности, соответствующие нуклеотидным положениям 2936-3635 генома парвовируса B19, описанным в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 (фрагмент из 700 п.н., изображенный на фиг.1). Фиг.11A (SEQ ID NO:62) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH80-1; фиг.11B (SEQ ID NO:63) представляет собой соответствующую последовательность из изолята CH81-3; фиг.11C (SEQ ID NO:64) представляет собой
 30 соответствующую последовательность из изолята B19SCL1-4; фиг.11D (SEQ ID NO:65) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL2-1; фиг.11E (SEQ ID NO:66) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL3-1; фиг.11F (SEQ ID NO:67) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL4-3; фиг.11G (SEQ ID NO:68) представляет собой
 35 соответствующую последовательность из изолята B19SCL5-2; фиг.11H (SEQ ID NO:69) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL6-2; фиг.11I (SEQ ID NO:70) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL7-3; фиг.11J (SEQ ID NO:71) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL8-2; фиг.11K (SEQ ID NO:72) представляет собой
 40 соответствующую последовательность из изолята B19SCL9-1; фиг.11L (SEQ ID NO:73) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL9-9; фиг.11M (SEQ ID NO:74) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL10-2; фиг.11N (SEQ ID NO:75) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL11-1; фиг.11O (SEQ ID NO:76) представляет собой
 45 соответствующую последовательность из изолята B19SCL12-1; фиг.11P (SEQ ID NO:77) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL13-3; фиг.11Q (SEQ ID NO:78) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL14-1; фиг.11R (SEQ ID NO:79) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL15-3; фиг.11S (SEQ ID NO:80) представляет собой
 50 соответствующую последовательность из изолята B19SCL16-2; фиг.11T (SEQ ID NO:81) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL17-1; фиг.11U (SEQ ID NO:82) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL18-1; фиг.11V (SEQ ID NO:83) представляет собой соответствующую

последовательность из изолята B19SCL19-1; фиг.11W (SEQ ID NO:84) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL20-3; фиг.11X (SEQ ID NO:85) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL21-3; фиг.11Y (SEQ ID NO:86) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL22-11; фиг.11Z (SEQ ID NO:87) представляет собой соответствующую последовательность из изолята B19SCL2-14.

Фиг.12 (SEQ ID NO:92) изображает пример последовательности, из которой можно получить внутренний контроль (IC) для захвата и амплификации мишени.

Подробное описание изобретения

Для осуществления настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы химии, биохимии, методики рекомбинантной ДНК и вирусологии, известные специалистам в данных областях. Данные методики исчерпывающим образом раскрыты в научной литературе. См., например, Fundamental Virology, 2-е издание, тома I и II (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., последнее дополнение); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2-е издание, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

Следует отметить, что в данном описании и прилагаемой формуле изобретения единственные формы существительных включают в себя и упомянутые значения во множественном числе, если в контексте ясно не указано иное. Так, например, ссылка на "антиген" включает в себя смесь двух или более антигенов и т.п. В тексте используются следующие аббревиатуры для аминокислот:

Аланин: Ala (A)	Аргинин: Arg (R)
Аспарагин: Asn (N)	Аспарагиновая кислота: Asp (D)
Цистеин: Cys (C)	Глутамин: Gln (Q)
Глутаминовая кислота: Glu (E)	Глицин: Gly (G)
Гистидин: His (H)	Изолейцин: Ile (I)
Лейцин: Leu (L)	Лизин: Lys (K)
Метионин: Met (M)	Фенилаланин: Phe (F)
Пролин: Pro (P)	Серин: Ser (S)
Треонин: Thr (T)	Триптофан: Trp (W)
Тирозин: Tyr (Y)	Валин: Val (V)

I. Определения

При описании настоящего изобретения будут использоваться следующие термины, которые имеют определения, указанные ниже.

Термины "полипептид" и "белок" относятся к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, и не ограничиваются минимальной длиной продукта. Так, пептиды, олигопептиды, димеры, мультимеры и т.п. включены в данное определение. Данное определение охватывает также полноразмерные белки и их фрагменты. Данные термины также включают постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Кроме того, для целей настоящего изобретения "полипептид" относится к белку, который включает модификации, такие как делеции, добавления и замещения (обычно консервативные по природе), нативной последовательности, при условии, что белок сохраняет желательную активность. Данные модификации могут быть преднамеренными, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, посредством мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или посредством ошибок при ПЦР-амплификации.

Полипептид парвовируса B19 представляет собой полипептид, как определено выше, полученный из белка, кодируемого геном B19, такой как полипептид из неструктурных белков, NS1 и NS2, а также из белков, которые образуют капсид вируса, VP1 (длиной около 781 аминокислоты) или VP2 (длиной около 554 аминокислот). Характерные последовательности NS1, VP1 и VP2 изображены на фиг.5-10 в настоящей заявке. Полипептид необязательно должен быть физически получен из парвовируса B19, а может

быть получен синтетическим или рекомбинантным путем. Более того, полипептид может быть получен из любого из различных штаммов и изолятов парвовируса В19. Среди данных штаммов и изолятов известен ряд консервативных и вариабельных областей, и, в общем, аминокислотные последовательности, например, эпитопов, полученных из указанных областей, будут иметь высокую степень гомологии последовательности, например, гомологию аминокислотной последовательности более 30%, предпочтительно, более 40%, при сопоставлении двух последовательностей. Так, например, термин "VP1" полипептид относится к нативному VP1 из любого из различных штаммов и изолятов парвовируса В19. Полные геноотипы и последовательности для упомянутых выше белков многих штаммов и изолятов парвовируса В19 известны. См., например, Shade et al., J. Virol. (1986) 58: 921-936; Gallinella et al., J. Virol. Methods (1993) 41:203-211. Более того, эпитопы из парвовируса В19, полученные из указанных областей, также известны. См., например, патент США № 5436127 и международную публикацию № WO 91/12269.

Термины "аналог" и "мутеин" относятся к биологически активным производным ссылочной молекулы или к фрагментам указанных производных, которые сохраняют желательную активность, такую как иммунологическая реактивность в диагностических анализах. В общем, термин "аналог" относится к соединениям, имеющим последовательность и структуру нативного полипептида с одним или более добавлений, замещений (обычно консервативных по природе) и/или делеций аминокислот, по сравнению с нативной молекулой, при условии, что модификации не уничтожают иммуногенную активность. Термин "мутеин" относится к пептидам, имеющим один или более пептидомиметиков ("пептоидов"), например, которые описаны в международной публикации № WO 91/04282. Предпочтительно, аналог или мутеин имеет по меньшей мере такую же иммунологическую активность, как у нативной молекулы. Способы получения полипептидных аналогов и мутеинов известны специалистам в данной области и дополнительно описаны ниже.

Особенно предпочтительные аналоги включают замещения, которые являются консервативными по природе, т.е. такие замещения, которые имеют место в пределах семейства аминокислот, имеющих родственные боковые цепи. Конкретно, аминокислоты обычно разделяют на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) не имеющие заряда полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Например, можно с полным основанием предсказать, что изолированная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартат на глутамат, треонин на серин или сходная консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту, не окажет большого влияния на биологическую активность. Например, полипептид, представляющий интерес, может включать приблизительно до 5-10 консервативных или неконсервативных аминокислотных замещений, или даже приблизительно до 15-25 консервативных или неконсервативных аминокислотных замещений, или любое целое число от 5 до 25, если желательная функция молекулы остается прежней. Специалист может легко определить области молекулы, представляющей интерес, которые могут перенести изменения, в соответствии со схемами Hopp/Woods и Kyte-Doolittle, хорошо известными специалистам в данной области.

Под "выделенным", если речь идет о полипептиде, подразумевают, что указанная молекула находится отдельно от целого организма, в котором молекулу находят в природе, или присутствует в практическом отсутствии других биологических макромолекул того же типа. Под термином "выделенный", если речь идет о полинуклеотиде, подразумевают молекулу нуклеиновой кислоты, лишенную, полностью или частично, последовательностей, обычно связанных с ней в природе; или последовательность, в том виде, в котором она существует в природе, но имеющую связанные с ней гетерологичные последовательности; или молекулу, отделенную от хромосомы.

Полинуклеотид, "полученный из" или "специфичный в отношении" обозначенной последовательности, относится к полинуклеотидной последовательности, которая включает смежную последовательность по меньшей мере приблизительно из 6 нуклеотидов, предпочтительно, по меньшей мере приблизительно из 8 нуклеотидов, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно из 10-12 нуклеотидов, и даже более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно из 15-20 нуклеотидов, соответствующую, т.е. идентичную или комплементарную области обозначенной нуклеотидной последовательности. Полученный полинуклеотид не обязательно будет получен физически из нуклеотидной последовательности, представляющей интерес, но может быть получен любым способом, включая, без ограничения, химический синтез, репликацию, обратную транскрипцию или транскрипцию, который основан на информации, обеспеченной последовательностью оснований в области (областях), из которой получен полинуклеотид. В качестве такового он может представлять смысловую или антисмысловую ориентацию исходного полинуклеотида.

"Гомологичность" относится к проценту сходства между двумя полинуклеотидными или двумя полипептидными частями. Две ДНК или две полипептидные последовательности являются "практически гомологичными" друг с другом, когда последовательности имеют по меньшей мере приблизительно 50%, предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 75%, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 80%-85%, предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 90%, и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 95%-98% сходства последовательности по определенной длине молекул. Используемый в настоящей заявке термин "практически гомологичные" также относится к последовательностям, демонстрирующим полную идентичность конкретной ДНК или полипептидной последовательности.

В общем, "идентичность" относится к точному нуклеотид-нуклеотидному или аминокислота-аминокислотному соответствию двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей, соответственно. Процент идентичности можно определить прямым сравнением информации о последовательности между двумя молекулами путем сопоставления последовательностей, подсчета точного количества совпадений между двумя сопоставленными последовательностями, деления на длину более короткой последовательности и умножения результата на 100.

Для облегчения анализа гомологии и идентичности можно использовать общедоступные компьютерные программы, такие как ALIGN, Dayhoff, M.O., в Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, которые адаптируют локальный алгоритм гомологичности Смита-Уотермана Advances in Appl. Math. 2:482-489, 1981, для анализа пептидов. Программы для определения гомологии нуклеотидных последовательностей имеются в пакете Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 (от компании Genetics Computer Group, Madison, WI), например, программы BESTFIT, FASTA И GAP, которые также основаны на алгоритме Смита-Уотермана. Указанные программы легко используются с параметрами по умолчанию, рекомендованными производителем, и описаны в пакете Wisconsin Sequence Analysis Package, упоминавшемся выше. Например, процент гомологии конкретной нуклеотидной последовательности по отношению к ссылочной последовательности можно определить с помощью алгоритма гомологии Смита-Уотермана с таблицей количественных показателей и потери по пробелу в шесть нуклеотидных положений по умолчанию.

Другим способом определения процента гомологии в контексте настоящего изобретения является использование пакета программ MPSRCH, авторское право университета Эдинбурга, разработанного John F. Collins и Shane S. Sturrok и распространяемого компанией IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Из этого комплекта пакетов можно применять алгоритм Смита-Уотермана, где для таблицы количественных показателей используются параметры по умолчанию (например, потери по открытому пробелу 12, потери по протяженности пробела один и пробел шесть). Из полученных данных величина

"Match" отражает "гомологию последовательности". Другие подходящие программы для расчета процента идентичности или сходности последовательностей обычно известны специалистам в данной области, например, другой программой для сопоставления является BLAST, которую используют с параметрами по умолчанию. Например, можно использовать BLASTN и BLASTP со следующими параметрами по умолчанию: генетический код = стандарт; фильтр = отсутствует; цепь = обе; отсекающая величина = 60; ожидание = 10; матрикс = BLOSUM62; описания = 50 последовательностей; сортировка посредством = HIGH SCORE; базы данных = не резервируемые, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS трансляции + швейцарский белок + Spupdate + PIR. Подробности указанных программ можно найти по следующему адресу в интернете: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Альтернативно, гомологию можно определить путем гибридизации полинуклеотидов в таких условиях, при которых образуются стабильные дуплексы между гомологичными областями, с последующим отщеплением специфичной в отношении одной цепи нуклеазой (нуклеазами) и определением размеров отщепленных фрагментов. Последовательности ДНК, которые являются практически гомологичными, могут быть идентифицированы в эксперименте гибридизации с использованием саузерн-блоттинга, например, при строгих условиях, как определено для данной конкретной системы. Определение адекватных условий гибридизации известно специалистам в данной области. См., например, Sambrook et al., указано выше; DNA Cloning, указано выше; Nucleic Acid Hybridization, указано выше.

"Функционально связанный" относится к такому расположению элементов, при котором описанные таким образом компоненты имеют такую конфигурацию, которая позволяет им осуществлять желательную функцию. Так, данный промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, способен влиять на транскрипцию, а в случае кодирующей последовательности, на экспрессию кодирующей последовательности, если имеются соответствующие факторы транскрипции и т.п. Промотор необязательно должен быть смежным с последовательностью нуклеиновой кислоты, если он в состоянии осуществлять функцию управления ее транскрипцией и/или экспрессией. Так, например, вставочные нетранслируемые, хотя и транскрибируемые, последовательности могут присутствовать между промоторной последовательностью и кодирующей последовательностью, как это может быть с транскрибируемыми интронами, а промоторная последовательность все равно может считаться "функционально связанной" с кодирующей последовательностью.

"Рекомбинантный", когда используется в настоящей заявке для описания молекулы нуклеиновой кислоты, означает полинуклеотид геномного, кДНК, вирусного, полусинтетического или синтетического происхождения, который, в силу своего происхождения или произведенных с ним манипуляций, не связан со всем полинуклеотидом или с его частью, с которыми он связан в природе. Термин "рекомбинантный", когда он используется в отношении белка или полипептида, означает полипептид, полученный экспрессией рекомбинантного полинуклеотида. В общем, ген, представляющий интерес, клонируют, а затем экспрессируют в трансформированных организмах, как описано далее. Организм-хозяин экспрессирует чужеродный ген для продуцирования белка в условиях, необходимых для экспрессии.

"Контролирующий элемент" относится к полинуклеотидной последовательности, которая способствует транскрипции и/или трансляции нуклеотидной последовательности, с которой она связана. Термин включает промоторы, последовательности терминации транскрипции, "верхние" регуляторные домены, сигналы полиаденилирования, нетранслируемые области, включая 5'-UTR и 3'-UTR, и, когда необходимо, лидерные последовательности и энхансеры, которые все вместе обеспечивают транскрипцию и трансляцию кодирующей последовательности в клетке-хозяине.

"Промотор", когда используется в настоящей заявке, означает регулируемую область, способную связывать полимеразу и инициировать транскрипцию нуклеотидной последовательности по ходу транскрипции (в направлении 3'), функционально связанную с

ней. Для целей настоящего изобретения промоторная последовательность включает минимальное количество оснований или элементов, необходимое для инициации транскрипции последовательности, представляющей интерес, на уровнях, поддающихся обнаружению по сравнению с фоном. В пределах промоторной последовательности

находится сайт инициации транскрипции, а также протеин-связывающие домены (консунсусные последовательности), ответственные за связывание РНК- или ДНК-полимеразы. Например, промотор может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая распознается ДНК-зависимой РНК-полимеразой ("транскриптазой") в качестве сигнала к связыванию с нуклеиновой кислотой и началу транскрипции РНК на специфичном сайте. Для связывания указанным транскриптазам обычно требуется ДНК, которая имеет двухцепочечную структуру в части, включающей промоторную последовательность, и ее комплемент; матричная часть (последовательность, подлежащая транскрипции) не должна быть обязательно двухцепочечной. Отдельные ДНК-зависимые РНК-полимеразы распознают ряд различных промоторных последовательностей, которые могут значительно отличаться друг от друга по своей эффективности способствовать транскрипции. Когда РНК-полимераза связывается с промоторной последовательностью для инициации транскрипции, то промоторная последовательность не является частью транскрибируемой последовательности. Так, полученные таким образом транскрипты РНК не будут включать данную последовательность.

Контролирующая последовательность "управляет транскрипцией" нуклеотидной последовательности, когда РНК- или ДНК-полимераза свяжется с промоторной последовательностью и будет транскрибировать смежную последовательность.

"ДНК-зависимая ДНК-полимераза" представляет собой фермент, который синтезирует комплементарную ДНК-копию на ДНК-матрице. Примерами являются ДНК-полимераза I из *E.coli* и ДНК-полимераза бактериофага T7. Все известные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы для инициации синтеза требуют комплементарного праймера. При подходящих условиях ДНК-зависимая ДНК-полимераза может синтезировать комплементарную ДНК-копию на РНК-матрице.

"ДНК-зависимая РНК-полимераза" или "транскриптаза" представляет собой фермент, который синтезирует многочисленные РНК-копии из двухцепочечной или частично двухцепочечной молекулы ДНК, имеющей (обычно двухцепочечную) промоторную последовательность. Молекулы РНК ("транскрипты") синтезируются в направлении от 5' к 3', начиная с конкретного положения, расположенной непосредственно ниже промотора. Примерами транскриптаз являются ДНК-зависимая РНК-полимераза из *E.coli* и бактериофагов T7, T3 и SP6.

"РНК-зависимая ДНК-полимераза" или "обратная транскриптаза" представляет собой фермент, который синтезирует комплементарную ДНК-копию на РНК-матрице. Все известные обратные транскриптазы также обладают способностью синтезировать комплементарную ДНК-копию на ДНК-матрице; таким образом, они являются как РНК-, так и ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами. Для инициации синтеза как на РНК-, так и на ДНК-матрицах требуется праймер.

"РНКаза Н" представляет собой фермент, который отщепляет часть РНК от дуплекса РНК:ДНК. Указанные ферменты могут представлять собой эндонуклеазы или экзонуклеазы.

Большинство обратных транскриптаз, помимо своей полимеразной активности, обычно обладает активностью РНказы Н. Однако имеются другие источники РНказы Н, не имеющие ассоциированной полимеразной активности. Результатом отщепления может быть отделение РНК от комплекса РНК:ДНК. Альтернативно, РНКаза Н может просто разрезать РНК в разных местах так, что части РНК исчезают, или позволять ферментам раскручивать части РНК.

Термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид", "нуклеиновая кислота" и "молекула нуклеиновой кислоты", используемые в настоящей заявке, включают полимерную форму нуклеотидов любой длины, как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов. Данный

термин относится только к первичной структуре молекулы. Так, термин включает трех-, двух- и одноцепочечную ДНК, а также трех-, двух- и одноцепочечную РНК. Он также включает модификации, такие как модификации, полученные метилированием и/или кэпированием, и немодифицированные формы полинуклеотида. Более конкретно, термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид", "нуклеиновая кислота" и "молекула нуклеиновой кислоты" включают полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2-дезоксид-рибозу), полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу), любой другой тип полинуклеотида, который представляет собой N- или C-гликозид пуринового или пиримидинового основания, и другие полимеры, содержащие ненуклеотидные скелеты, например, полиамидные (например, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК)) и полиморфолиновые (продаются компанией Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregon, как Neugene) полимеры, и другие синтетические полимеры нуклеиновых кислот со специфичными последовательностями, при условии, что полимеры содержат нуклеотидные основания в такой конфигурации, которая позволяет образование пар и стекинг оснований, такие, которые имеются в ДНК и РНК. Между терминами "полинуклеотид", "олигонуклеотид", "нуклеиновая кислота" и "молекула нуклеиновой кислоты" не предусмотрено преднамеренного различия по длине, и данные термины будут использоваться взаимозаменяемым образом. Данные термины относятся только к первичной структуре молекулы. Так, данные термины включают, например, 3'-дезоксид-2',5'-ДНК, олигодезоксирибонуклеотидные N3'P5' фосфорамидаты, 2'-О-алкилзамещенную РНК, двух- и одноцепочечную ДНК, а также двух- и одноцепочечную РНК, гибриды ДНК:РНК и гибриды между ПНК и ДНК или РНК, а также включают известные типы модификаций, например, метки, известные специалистам в данной области, метилирование, "кэпы", замещение одного или более встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации с не имеющими заряда связями (например, метилфосфонаты, сложные фосфотриэфиры, фосфорамидаты, карбаматы и т.п.), с отрицательно заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.п.) и с положительно заряженными связями (например, аминокислотфосфорамидаты, сложные аминокислотфосфотриэфиры), модификации, содержащие боковые части, такие как, например, белки (включая нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.п.), модификации, содержащие интеркаляторы (например, акридин, псорален и т.п.), модификации, содержащие хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.п.), модификации, содержащие алкиляторы, модификации, содержащие модифицированные связи (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.п.), а также немодифицированные формы полинуклеотида или олигонуклеотида. В частности, ДНК представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту.

Используемый в настоящей заявке термин "область-мишень нуклеиновой кислоты" или "нуклеиновая кислота-мишень" обозначает молекулу нуклеиновой кислоты с "последовательностью-мишенью", подлежащей амплификации. Нуклеиновая кислота-мишень может быть как одноцепочечной, так и двухцепочечной, и может включать другие последовательности, помимо последовательности-мишени, которые могут не амплифицироваться. Термин "последовательность-мишень" относится к конкретной последовательности в нуклеиновой кислоте-мишени, которая должна быть амплифицирована. Последовательность-мишень может включать область гибридизации с зондом, содержащуюся в молекуле-мишени, с которой зонд будет образовывать стабильный гибрид при желательных условиях. "Последовательность-мишень" может также включать способные образовывать комплекс последовательности, с которыми образуют комплекс олигонуклеотидные праймеры и которые могут удлиняться с помощью последовательности-мишени в качестве матрицы. В случае, когда нуклеиновая кислота-мишень исходно является одноцепочечной, термин "последовательность-мишень" также относится к последовательности, комплементарной "последовательности-мишени", в том виде, в котором она присутствует в нуклеиновой кислоте-мишени. Если "нуклеиновая кислота-мишень" исходно является двухцепочечной, термин "последовательность-мишень"

относится и к плюс (+), и к минус (-) цепям.

Термин "праймер" или "олигонуклеотидный праймер", используемый в настоящей заявке, относится к олигонуклеотиду, функция которого заключается в инициации синтеза комплементарной цепи ДНК при помещении в условия, при которых индуцируется синтез продукта удлинения праймера, т.е. в присутствии нуклеотидов и агента, индуцирующего полимеризацию, такого как ДНК- или РНК-полимераза, и при подходящей температуре, pH, концентрации металлов и концентрации солей. Для максимальной эффективности при амплификации праймер предпочтительно является одноцепочечным, но альтернативно может быть двухцепочечным. Если праймер двухцепочечный, его сначала обрабатывают для разделения цепей, перед использованием для получения продуктов удлинения. Данный этап денатурации обычно осуществляют с помощью нагревания, но альтернативно его можно осуществлять с помощью щелочи, с последующей нейтрализацией. Таким образом, "праймер" является комплементарным по отношению к матрице и способен образовывать комплекс посредством водородных связей или гибридизации с матрицей, с образованием комплекса праймер/матрица для инициации синтеза полимеразой, который удлиняется добавлением ковалентно связанных оснований, связанных своим 3'-концом комплементарно матрице, с процессе синтеза ДНК.

Используемый в настоящей заявке термин "зонд" или "олигонуклеотидный зонд" относится к структуре, составленной из полинуклеотида, как определено выше, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты, присутствующей в нуклеиновой кислоте-мишени, подвергаемой анализу. Полинуклеотидные области зондов могут быть составлены из ДНК и/или РНК и/или синтетических нуклеотидных аналогов. В случае, если "олигонуклеотидный зонд" должен использоваться в 5'-нуклеазном анализе, таком как методика TaqMan™, зонд будет содержать по меньшей мере один флуоресцентный агент и по меньшей мере один гаситель, который расщепляется 5'-эндонуклеазной активностью полимеразы, используемой в реакции, с целью выявления любых амплифицированных олигонуклеотидных последовательностей-мишеней. В данном контексте олигонуклеотидный зонд будет иметь достаточное количество сложных фосфодиэфирных связей, смежных с его 5'-концом, таким образом, чтобы направленная от 5' к 3' используемая нуклеазная активность могла эффективно отщеплять связанный зонд для отделения флуоресцентных агентов и гасителей. В случае, когда олигонуклеотидный зонд используют в методике TMA, его будут соответствующим образом метить, как описано ниже.

Следует оценить тот факт, что гибридизующиеся последовательности необязательно должны быть абсолютно комплементарными, чтобы образовывать стабильные гибриды. Во многих ситуациях будут образовываться стабильные гибриды, когда менее приблизительно 10% оснований спарены ошибочно, игнорируя петли из четырех или более нуклеотидов. Соответственно, используемый в настоящей заявке термин "комплементарный" относится к олигонуклеотиду, который образует стабильный дуплекс со своим "комплементом" в условиях анализа, обычно когда гомологичность составляет приблизительно 90% или более.

Термины "гибридизировать" и "гибридизация" относятся к образованию комплексов между нуклеотидными последовательностями, которые являются достаточно комплементарными для образования комплекса посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику. В случае, когда праймер "гибридизуется" с мишенью (матрицей), такие комплексы (или гибриды) являются достаточно стабильными, чтобы выполнять затравочную функцию, требующуюся, например, ДНК-полимеразе для инициации синтеза ДНК.

Используемый в настоящей заявке термин "связывающаяся пара" относится к первой и второй молекулам, которые специфичным образом связываются друг с другом, таким как комплементарные полинуклеотидные пары, способные образовывать дуплексы нуклеиновых кислот. О "специфичном связывании" первого члена связывающейся пары со

вторым членом связывающейся пары в образце свидетельствует связывание первого члена со вторым членом, или наоборот, с более высокой аффинностью и специфичностью, чем с другими компонентами в образце. Связывание между членами связывающейся пары обычно является нековалентным. Если в контексте ясно не указано иное, термины

5 "аффинная молекула" и "аналит-мишень", используемые в настоящей заявке, относятся к первому и второму членам связывающейся пары, соответственно.

Термины "специфично связывающаяся молекула" и "аффинная молекула" в настоящей заявке используются взаимозаменяемым образом и относятся к молекуле, которая будет избирательно связываться посредством химических или физических средств, с

10 выявляемым веществом, присутствующим в образце. Под "избирательным связыванием" подразумевается, что молекула предпочтительно связывается с мишенью, представляющей интерес, или связывается с более высокой аффинностью с мишенью, чем с другими молекулами. Например, молекула ДНК будет связываться с практически комплементарной последовательностью, а не с неродственными последовательностями.

15 "Температура плавления" или " $T_{пл.}$ " двухцепочечной ДНК определяется как температура, при которой половина спиральной структуры ДНК утрачивается из-за нагревания или другой диссоциации водородных связей между парами оснований, например, благодаря обработке кислотой или щелочью, и т.п. $T_{пл.}$ молекулы ДНК зависит от ее длины и нуклеотидного состава. Молекулы ДНК, содержащие много пар оснований

20 GC, имеют более высокую $T_{пл.}$, чем молекулы ДНК, содержащие множество пар оснований AT. Разделенные комплементарные цепи ДНК спонтанно реассоциируют или отжигаются с образованием дуплекса ДНК, когда температуру понижают ниже $T_{пл.}$. Наивысшая скорость гибридизации нуклеиновой кислоты наблюдается при температуре приблизительно на 25°C ниже $T_{пл.}$. $T_{пл.}$ можно установить с помощью следующего отношения: $T_{пл.} = 69,3 +$

25 $0,41 (GC)\%$ (Marmur et al. (1962) J. Mol. Biol. 5:109-118).

Используемый в настоящей заявке термин "биологический образец" относится к образцу ткани или жидкости, выделенной от субъекта, который обычно включает антитела, выработанные субъектом. Типичные образцы, которые включают указанные антитела, известны специалистам в данной области, и включают, без ограничения, кровь, плазму,

30 сыворотку, фекалии, мочу, костный мозг, желчь, спинномозговую жидкость, лимфу, образцы кожи, секреты кожи, дыхательных, кишечных и мочеполовых путей, слезы, слюну, молоко, клетки крови, органы, биоптаты, а также образцы составных частей клеточных культур in vitro, включая, без ограничения, кондиционированные среды, полученные в результате роста клеток и тканей в культуральной среде, например, рекомбинантные

35 клетки и клеточные компоненты.

Используемые в настоящей заявке термины "метка" и "детектируемая метка" относятся к молекуле, способной быть обнаруженной, включая, без ограничения, радиоактивные изотопы, флуоресцентные агенты, хемилюминесцентные агенты, хромофоры, ферменты, ферментные субстраты, кофакторы ферментов, ингибиторы ферментов, хромофоры,

40 краски, ионы металлов, золи металлов, лиганды (например, биотин, авидин, стрепавидин или гаптены) и т.п. Термин "флуоресцентный агент" относится к веществу или его части, которые способны флуоресцировать в выявляемых пределах.

II. Способы осуществления настоящего изобретения

Перед описанием настоящего изобретения в подробностях, следует понять, что данное

45 изобретение не ограничивается конкретными композициями или параметрами процессов, поскольку таковые могут, разумеется, изменяться. Следует понять также, что терминология, используемая в настоящем изобретении, служит только целям описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначена для какого бы то ни было ограничения.

50 Несмотря на то, что при осуществлении настоящего изобретения можно использовать ряд композиций и способов, сходных или эквивалентных описанным в настоящей заявке, здесь описаны предпочтительные материалы и методы.

Как отмечалось выше, настоящее изобретение основано на открытии новых праймеров

и зондов и диагностических способов для точного обнаружения инфицирования парвовирусом В19 в биологическом образце. Способы основаны на чувствительной методике выявления нуклеиновых кислот, которая позволяет идентифицировать последовательности-мишени нуклеиновой кислоты парвовируса В19 в образцах,

5 содержащих малые количества вируса.

В частности, авторы изобретения охарактеризовали области в геноме парвовируса В19, которые являются желательными мишенями для диагностических тестов. Праймеры и зонды, полученные из указанных областей, являются крайне полезными для обнаружения инфицирования парвовирусом В19 в биологических образцах.

10 Праймеры и зонды парвовируса В19, описанные выше, используют в анализах на основе нуклеиновой кислоты для обнаружения инфицирования парвовирусом В19 человека в биологических образцах.

В частности, праймеры и зонды для применения в данных анализах предпочтительно получают из фрагмента генома парвовируса В19 приблизительно из 4,7 т.п.н.,

15 соответствующего нуклеотидным положениям 217-4678, описанным Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Нуклеотидные последовательности данной области из двух различных изолятов парвовируса В19 изображены на фиг.3А-3С и 4А-4С настоящей заявки. Как объяснялось выше, указанный фрагмент содержит кодирующие области NS1, VP1 и VP2.

Особенно предпочтительные праймеры и зонды для применения в настоящих анализах

20 конструируют из высококонсервативных областей генома парвовируса В19 для возможности обнаружения инфицирования парвовирусом В19 в различных изолятах. Как описано в настоящей заявке, высококонсервативная область генома парвовируса В19 обнаружена в области из 700 п.н., перекрывающей нуклеотидные положения 2936-3635, пронумерованные относительно генома парвовируса В19, описанного в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Данная область обнаружена в пределах VP1 области генома.

Последовательность данной области из 21 различного изолята парвовируса В19 показана в 25 настоящей заявке на фиг.2А-2U. Последовательности из дополнительных 26 изолятов показаны в настоящей заявке на фиг.11А-11Z. Сравнение последовательностей показывает, что данная область демонстрирует гомологичность последовательностей из различных изолятов приблизительно от 98% до 99,5%, что делает их весьма желательной последовательностью-мишенью. Также желательной для построения праймеров и зондов является область из 370 п.н., обнаруженная в пределах VP1, которая перекрывает нуклеотидные положения приблизительно 3073-3442, пронумерованные согласно Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936, а также фрагмент из 214 п.н., изображенный на 30 фиг.1, который наблюдается в пределах 3' части фрагмента из 4,7 т.п.н. и перекрывает нуклеотидные положения 4728-4941, пронумерованные согласно Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

Области из 4,7 т.п.н., 700 п.н. и 370 п.н. легко получают из дополнительных 40 изолятов, используя части последовательности парвовируса В19, обнаруженные в данных конкретных участках, в качестве праймеров в ПЦР-реакциях, таких, которые описаны в настоящей заявке, а также в патентах США №№ 4683195, 4683202 и 4889818, и на основе последовательностей, полученных в настоящем изобретении. Другой способ получения нуклеотидных последовательностей с желательными последовательностями заключается в 45 отжиге комплементарных серий перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов,

полученных с помощью обычного автоматизированного синтезатора полинуклеотидов, с 50 последующим лигированием подходящей ДНК-лигазой и амплификацией лигированной нуклеотидной последовательности посредством ПЦР. См., например, Jayaraman et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084-4088. После того, как последовательности были изготовлены или выделены, их можно клонировать в любой подходящий вектор или репликон. Многочисленные клонирующие векторы известны специалистам в данной области, и предметом выбора является селекция подходящего клонирующего вектора.

Подходящие векторы включают, без ограничения, плазмиды, фаги, транспозоны, космиды, хромосомы или вирусы, которые способны реплицироваться, когда связываются с

подходящими контролирующими элементами.

Рекомбинантные клоны легко идентифицируются рестрикционным анализом и электрофорезом в полиакриламидном или агарозном геле, с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области и описанных в примерах ниже.

- 5 Праймеры и зонды для использования в анализах по настоящему изобретению получают из указанных последовательностей и легко синтезируются с помощью обычных методик, например, твердофазного синтеза через реакции с фосфорамидатом, как описано в патентах США №№ 4458066 и 4415732; Beaucage et al. (1992) *Tetrahedron* 48:2223-2311 и Applied Biosystems User Bulletin № 13 (1 апреля 1987 г.). Другие способы
- 10 химического синтеза включают, например, фосфотриэфирный метод, описанный Narang et al., *Meth. Enzymol.* (1979) 68:90, и фосфодиэфирный метод, описанный Brown et al., *Meth. Enzymol.* (1979) 68:109. Поли(А) или поли(С) или другие некомплементарные нуклеотидные изменения могут быть включены в зонды с помощью тех же способов. Удлинения оксида гексаэтилена можно сопрягать в зондами с помощью способов,
- 15 известных специалистам в данной области. Cload et al. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113: 6324-6326; патент США № 4914210, выданный Levenson et al.; Durand et al. (1990) *Nucleic Acid Res.* 18:6353-6359 и Horn et al. (1986) *Tet. Lett.* 27:4705-4708. Обычно длина праймерных последовательностей составляет 10-75 нуклеотидов, такая как 15-60, 20-40 и т.д., более типично, в пределах длины 18-40 нуклеотидов, и любая длина в
- 20 указанных пределах. Обычная длина зонда составляет 10-50 нуклеотидов, такая как 15-40, 18-30 и т.д., и любая длина в указанных пределах.

- Помимо этого, для обнаружения зонды можно сопрягать с метками. Существует несколько средств, известных для дериватизации олигонуклеотидов реакционно активными функциональностями, которые позволяют добавить метку. Например, имеется несколько
- 25 подходов для биотинилирования зондов так, что радиоактивные, флуоресцентные, хемилюминесцентные, ферментативные или электронноплотные метки могут быть присоединены через авидин. См., например, Broken et al., *Nucl. Acids Res.* (1978) 5: 363-384, где описано применение ферритин-авидин-биотиновых меток, и Chollet et al. *Nucl. Acids Res.* (1985) 13:1529-1541, где описано биотинилирование 5'-концов
- 30 олигонуклеотидов через аминокилфосфорамидное линкерное плечо. Имеется также несколько способов для синтеза amino-дериватизированных олигонуклеотидов, которые легко метить флуоресцентными или другими типами соединений, дериватизированных аминореактивными группами, такими как изотиоцианат, N-гидроксисукцинимид и т.п., см., например, Connolly (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:3131-3139, Gibson et al. (1987) *Nucl.*
- 35 *Acids Res.* 15:6455-6467 и патент США № 4605735, выданный Miyoshi et al. Имеются также способы синтеза сульфгидрил-дериватизированных олигонуклеотидов, которые могут взаимодействовать с тиол-специфичными метками, см., например, патент США № 4757141, выданный Fung et al., Connolly et al. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13:4485-4502 и Spoot et al. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:4837-4848. Исчерпывающий обзор методик мечения
- 40 фрагментов ДНК представлен в Mattews et al., *Anal. Biochem.* (1998) 169:1-25.

- Например, зонды можно метить флуоресцентной меткой путем связывания флуоресцентной молекулы с нелигирующим концом зонда. Руководство по отбору подходящих флуоресцентных меток можно найти в Smith et al., *Meth. Enzymol.* (1987) 155: 260-301; Karger et al., *Nucl. Acids Res.* (1991) 19:4955-4962; Haugland (1989)
- 45 *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Предпочтительные флуоресцентные метки включают флуоресцеин и его производные, такие, которые описаны в патенте США № 4318846 и в Lee et al., *Cytometry* (1989) 10:151-164, и 6-FAM, JOE, TAMRA, ROX, HEX-1, HEX-2, ZOE, TET-1 или NAN-2 и т.п.

- Помимо этого, зонды можно метить сложным эфиром акридиния (АЕ) с использованием
- 50 методики, описанной ниже. Современные технологии позволяют помещать метку АЕ в любой участок зонда. См., например, Nelson et al. (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" в *Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing*, Kricka L.J. (ed) Academic Press, San Diego, CA; Nelson et al. (1994) "Application of the

Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR" в The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks et al., Clin. Chem. (1983) 29:1474-1479; Berry et al., Clin. Chem. (1988) 34:2087-2090. Молекулу АЕ можно непосредственно присоединять к зонду с использованием реакций с линкерами на нуклеотидной основе, которые позволяют помещать метку в любой участок зонда. См., например, патенты США №№ 5585481 и 5185439.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения внутренний контроль (IC) или внутренний стандарт добавляют, чтобы он служил контролем для захвата и амплификации мишени. Предпочтительно, IC включает последовательность, которая отличается от последовательности-мишени, способна гибридизоваться с последовательностями зонда, используемыми для отделения олигонуклеотидов, специфичных для организма из образца, и способна амплифицироваться. Использование IC позволяет контролировать процесс разделения, процесс амплификации и систему обнаружения, и позволяет осуществлять мониторинг хода анализа и количественного определения для образца (образцов). Пример последовательности, из которой можно получить IC, показан на фиг.12. IC можно включать в любой подходящий участок, например, в лизисный буфер. В одном варианте осуществления настоящего изобретения IC включает оцДНК M13, содержащую нуклеотидную последовательность из парвовируса В19 и уникальную последовательность, которая гибридизуется с зондом, например, включающую последовательности из области VP1, где последовательность-мишень модифицируется путем замещения или делеции 5-20 оснований или более, предпочтительно, 5-15 оснований, например, 5, 10 или 15 оснований или любого количества в указанных пределах. Замещенные или делетированные основания предпочтительно имеют место по всей длине последовательности-мишени, таким образом, что заменяются только 2 или 3 последовательности подряд. Так, например, если последовательность-мишень представляет собой CТАCTTGCTGCGGGAGAAAAACACCT (SEQ ID NO:91), то в IC последовательность может быть замещена на, например, AGCTAGACCTGCATGTCACTG (SEQ ID NO:90).

Твердая подложка может дополнительно включать зонды, специфичные для внутреннего стандарта (IC зонд), что облегчает захват при использовании IC зонда. IC зонд может быть, необязательно, сопряжен с детектируемой меткой, которая отличается от детектируемой метки для последовательности-мишени. В тех вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых детектируемая метка представляет собой флуорофор, IC можно количественно определять спектрофотометрическим способом и ограничением исследований по обнаружению. Обычно количество копий IC, которое не мешает обнаружению мишени, определяют титрованием IC с фиксированной МЕ мишени, предпочтительно, по нижней границе, а стандартную кривую получают разведением образца международно принятой МЕ. Для количественного определения парвовируса B19 можно использовать панель с восемью ячейками от 8000 МЕ до 125 МЕ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения IC, как описано в настоящей заявке, объединяют с РНК, выделенной из образца, согласно стандартным методикам, известным специалистам в данной области и описанным в настоящей заявке. РНК затем подвергают обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы для получения ДНК-копии. Последовательности кДНК можно, необязательно, амплифицировать (например, посредством ПЦР) с использованием меченых праймеров. Продукты амплификации разделяют, обычно, электрофорезом, и определяют количество радиоактивности (пропорционально количеству амплифицированного продукта). Затем рассчитывают количество мРНК в образце путем сравнения с сигналом, получаемым от известных стандартов.

Праймеры и зонды, описанные выше, можно использовать в методике на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), чтобы обнаружить инфицирование парвовирусом B19 в биологических образцах. ПЦР представляет собой методику для амплификации желательной последовательности-мишени нуклеиновой кислоты, содержащейся в

молекуле или смеси молекул нуклеиновой кислоты. В ПЦР используют пару праймеров в избыточном количестве, чтобы гибридизировать комплементарные цепи нуклеиновой кислоты-мишени. Каждый праймер удлиняют с помощью полимеразы с использованием нуклеиновой кислоты-мишени в качестве матрицы. Продукты удлинения сами становятся

5 последовательностями-мишенями после отщепления от исходной цепи-мишени. Новые праймеры затем гибридизуются и распрямляются полимеразой, и цикл повторяется с геометрическим увеличением количества молекул последовательности-мишени. Метод ПЦР для амплификации последовательностей-мишеней нуклеиновой кислоты в образце хорошо известен специалистам в данной области и описан, например, в Innis et al. (eds.) PCR Protocols (Academic Press, NY 1990); Taylor (1991) Polymerase chain reaction: basic principles and automation, в PCR: A Practical Approach, McPherson et al. (eds.) IRL Press, Oxford; Saiki et al. (1986) Nature 324:163; а также в патентах США №№ 4683195, 4683202 и 4889818.

В частности, в ПЦР используют относительно короткие олигонуклеотидные праймеры, 15 которые фланкируют нуклеотидную последовательность-мишень, которую нужно амплифицировать, ориентированные таким образом, что их 3'-концы обращены друг на друга, каждый праймер удлиняется по направлению к другому. Полинуклеотидный образец экстрагируют и денатурируют, предпочтительно, нагреванием, и гибридизуют с первым и вторым праймерами, которые присутствуют в молярном избытке. Полимеризацию 20 катализируют в присутствии четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP-dATP, dGTP, dCTP и dTTP), используя праймер- и матрица-зависимый полинуклеотидный полимеризующий агент, такой как любой фермент, способный продуцировать продукты удлинения праймера, например, ДНК-полимераза I *E.coli*, фрагмент Klenow ДНК-полимеразы I, ДНК-пролимераза T4, термостабильные ДНК-полимеразы, выделенные из 25 *Thermus aquaticus* (Taq), которые можно приобрести у многих компаний (например, Perkin Elmer), *Thermus thermophilus* (United States Biochemicals), *Bacillus stereothermophilus* (Bio-Rad) или *Thermococcus litoralis* ("Vent" полимеразы, New England Biolabs). В результате получают два "длинных продукта", которые содержат соответствующие праймеры на своих 5'-концах, ковалентно связанные с вновь 30 синтезированными комплементами исходных цепей. Реакционную смесь затем возвращают в условия полимеризации, например, понижением температуры, инактивацией денатурирующего агента или добавлением дополнительного количества полимеразы, и инициируется второй цикл. В результате второго цикла получают две исходные цепи, два длинных продукта с первого цикла, два новых длинных продукта, реплицированных с 35 исходных цепей, и два "коротких продукта", реплицированных с длинных продуктов. Короткие продукты имеют последовательность последовательности-мишени с праймером на каждом конце. В каждом дополнительном цикле образуются два дополнительных длинных продукта, а также количество коротких продуктов, равное количеству длинных и коротких продуктов, остающихся к концу предыдущего цикла. Таким образом, количество 40 коротких продуктов, содержащих последовательность-мишень, возрастает по экспоненте с каждым циклом. Предпочтительно, ПЦР осуществляют с коммерчески доступным термальным циклером, например, Perkin Elmer.

РНК можно амплифицировать посредством обратной транскрипции мРНК в кДНК, а затем осуществляя ПЦР (ОТ-ПЦР), как описано выше. Альтернативно, для обоих этапов 45 можно использовать единственный фермент, как описано в патенте США № 5322770. мРНК также можно обратно транскрибировать в кДНК, с последующей асимметричной гэтаплигазной цепной реакцией (RT-AGLCR), как описано Marshall et al. (1994) PCR Meth. App. 4:80-84.

Флуорогенный анализ с 5'-нуклеазой, известный как анализ TaqManTM (Perkin Elmer), 50 представляет собой эффективную и гибкую систему обнаружения нуклеиновых кислот-мишеней на основе ПЦР. Следовательно, праймеры и зонды, полученные из областей генома парвовируса В19, описанные в настоящей заявке, можно использовать в анализах TaqManTM для обнаружения присутствия инфекции в биологическом образце. Анализ

выполняют в сочетании с термальным циклированием путем мониторинга генерации флуоресцентных сигналов. Система анализа обходится без электрофореза и обладает способностью генерировать количественные данные, позволяющие определить количество копий мишени.

Флуорогенный анализ с 5'-нуклеазой удобно выполнять с использованием, например, ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold™, которая обладает эндогенной 5'-нуклеазной активностью, для расщепления внутреннего олигонуклеотидного зонда, меченного флуоресцентным репортерным красителем и гасителем (см. Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:7276-7280; и Lee et al., Nucl. Acid Res. (1993) 21:3761-

3766). Результаты анализа выявляются путем измерения изменений флуоресценции, которые наблюдаются во время цикла амплификации после расщепления флуоресцентного зонда, отсоединения меток красителя и гасителя и вызывая увеличение флуоресцентного сигнала, которое пропорционально амплификации ДНК-мишени.

Продукты амплификации можно обнаружить в растворе или с использованием твердых подложек. В данном способе конструируется зонд TaqMan™ для гибридизации с последовательностью-мишенью внутри желательного ПЦР-продукта. 5'-конец зонда TaqMan™ содержит флуоресцентный рецепторный краситель. 3'-конец зонда блокируется для предотвращения удлинения зонда и содержит краситель, который будет гасить флуоресценцию 5' флуорофора. Во время последующей амплификации 5' флуоресцентная метка отщепляется, если в реакционной смеси присутствует полимеразы с 5'-экзонуклеазной активностью. Врезание 5' флуорофора приводит к повышению флуоресценции, которое можно обнаружить.

В частности, олигонуклеотидный зонд конструируют таким образом, чтобы зонд существовал по меньшей мере в одной одноцепочечной конформации, когда он не гибридизирован, где молекула-гаситель находится достаточно близко к молекуле-репортеру, чтобы гасить флуоресценцию молекулы-репортера. Олигонуклеотидный зонд также существует по меньшей мере в одной конформации, когда он гибридизирован с полинуклеотидом-мишенью, таким образом, чтобы молекула гасителя не располагалась достаточно близко к молекуле-репортеру, чтобы гасить флуоресценцию молекулы-репортера. Принимая указанные гибридизированные и негибридизированные конформации, молекула-репортер и молекула-гаситель в зонде проявляют флуоресцентные сигналы разной интенсивности, когда зонд гибридизирован и не гибридизирован. В результате становится возможным определить, гибридизирован зонд или не гибридизирован на основании изменения интенсивности флуоресценции молекулы-репортера, молекулы-гасителя или их комбинации. Помимо этого, поскольку зонд можно сконструировать таким образом, что молекула-гаситель гасит молекулу-репортер, когда зонд не гибридизирован, зонд можно сконструировать таким образом, что молекула-репортер будет проявлять ограниченную флуоресценцию, пока зонд не будет гибридизирован или отщеплен.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу амплификации нуклеотидной последовательности-мишени парвовируса В19 с использованием полимеразы нуклеиновых кислот, обладающей нуклеазной активностью в направлении от 5' к 3', одного или более праймеров, способных гибридизоваться с последовательностью-мишенью В19, и олигонуклеотидного зонда, способного гибридизоваться с последовательностью-мишенью В19 3' относительно праймера. Во время амплификации полимеразы расщепляет олигонуклеотидный зонд, когда он гибридизирован с последовательностью-мишенью, отделяя, таким образом, молекулу-репортер от молекулы-гасителя. По мере осуществления амплификации осуществляют мониторинг флуоресценции молекулы-репортера; при этом флуоресценция соответствует наличию амплификации нуклеиновой кислоты. Молекула-репортер предпочтительно представляет собой флуоресцентный краситель, а молекула-гаситель предпочтительно представляет собой родаминовый краситель.

В то время как праймеры и зонды могут варьировать по длине, последовательности

зондов выбирают таким образом, чтобы они имели более низкую температуру плавления, чем последовательности праймеров. Следовательно, последовательности праймеров обычно длиннее, чем последовательности зондов. Обычно длина последовательности праймеров составляет 10-75 нуклеотидов, более обычно, в пределах 20-45. Типичная
 5 длина последовательности зондов составляет 10-50 нуклеотидов, более обычно, в пределах 15-40 нуклеотидов.

Если используется твердая подложка, олигонуклеотидный зонд может быть присоединен к твердой подложке различными способами. Например, зонд может быть присоединен к твердой подложке присоединением 3'- или 5'-концевого нуклеотида зонда к твердой
 10 подложке. Более предпочтительно, зонд присоединяют к твердой подложке посредством линкера, который служит дистанцированию зонда от твердой подложки. Линкер обычно имеет длину по меньшей мере 15-30 атомов, более предпочтительно, длину по меньшей мере 15-50 атомов. Требуемая длина линкера будет зависеть от конкретной используемой твердой подложки. Например, линкер из шести атомов обычно является
 15 достаточным, когда в качестве твердой подложки используется сшитый полистирол.

Специалистам в данной области известен обширный ряд линкеров, которые можно использовать для присоединения олигонуклеотидного зонда к твердой подложке. Линкер может быть образован любым соединением, который значительным образом не мешает
 20 гибридизации последовательности-мишени с зондом, присоединенным к твердой подложке. Линкер может быть образован гомополимерным олигонуклеотидом, которые можно легко добавлять к линкеру посредством автоматизированного синтеза. Альтернативно, в качестве линкера можно использовать полимеры, такие как функционализированный полиэтиленгликоль. Указанные полимеры являются предпочтительными по сравнению с
 25 гомополимерными олигонуклеотидами, поскольку они значительным образом не мешают гибридизации зонда с последовательностью-мишенью. Особенно предпочтительным является полиэтиленгликоль.

Связи между твердой подложкой, линкером и зондом предпочтительно не разрываются во время удаления защитных групп нуклеотидов при основных условиях с высокой температурой. Примеры предпочтительных связей включают карбаматные и амидные
 30 связи.

Примеры предпочтительных типов твердых подложек для иммобилизации олигонуклеотидного зонда включают контролируемое пористое стекло, стеклянные пластины, полистирол, полистироловые гранулы, покрытые авидином, целлюлозу, нейлон, акриламидный гель и активированный декстран.

35 Подробное описание анализа TaqManTM, реагентов и условий для его осуществления см., например, в Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:7276-7280; в патентах США №№ 5538848, 5723591 и 5876930.

Последовательности парвовируса В19, описанные в настоящей заявке, можно также использовать в качестве основы для анализов опосредованной транскрипцией
 40 амплификации (ТМА). ТМА обеспечивает способ идентификации последовательностей-мишеней нуклеиновых кислот, присутствующих в биологическом образце в очень малых количествах. Указанные последовательности может быть трудно или невозможно обнаружить с помощью прямых аналитических методов. В частности, ТМА представляет собой изотермальную, аутокаталитическую систему амплификации нуклеиновой кислоты-
 45 мишени, которая может давать более миллиарда РНК-копий последовательности-мишени. Анализ может служить качественным анализом для точного обнаружения наличия или отсутствия последовательности-мишени в биологическом образце. Анализ может также обеспечивать количественное измерение количества последовательности-мишени в пределах концентрации в несколько порядков величин. ТМА обеспечивает способ
 50 аутокаталитического синтеза множества копий последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, без повторных манипуляций с условиями реакции, такими как температура, концентрация ионов и рН.

Обычно ТМА включает следующие стадии: (а) выделение нуклеиновой кислоты, включая

РНК, из биологического образца, представляющего интерес, предположительно инфицированного парвовирусом В19; и (b) объединение в реакционную смесь (i) выделенной нуклеиновой кислоты, (ii) первого и второго олигонуклеотидных праймеров, причем первый праймер имеет способную образовывать комплекс последовательность, достаточно комплементарную 3'-концевой части последовательности-мишени РНК, если она присутствует (например, (+) цепь), чтобы образовывать с ней комплекс, и второй праймер имеет способную образовывать комплекс последовательность, достаточно комплементарную 3'-концевой части последовательности-мишени или ее комплементу (например (-) цепь), чтобы образовывать с ней комплекс, при этом первый олигонуклеотид дополнительно включает последовательность 5' в отношении способной образовывать комплекс последовательности, которая включает промотор, (iii) обратную транскриптазу или РНК- или ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, (iv) обладает ферментативной активностью, которая избирательно разрушает цепь РНК комплекса РНК-ДНК, (такой как РНКазы Н), и (v) РНК-полимеразы, которая распознает промотор.

Компоненты реакционной смеси можно объединять поэтапно или сразу. Реакционную смесь инкубируют при таких условиях, при которых образуется комплекс олигонуклеотид/последовательность-мишень, включая прайминг ДНК и условия для синтеза нуклеиновой кислоты (включая рибонуклеотидтрифосфаты и дезоксирибонуклеотидтрифосфаты), в течение периода времени, достаточного для получения множества копий последовательности-мишени. Реакция благоприятно протекает в условиях, подходящих для поддержания стабильности компонентов реакции, таких как ферменты, и не требует модификации или манипуляций с условиями реакции в ходе реакции амплификации. Соответственно, реакция может протекать в таких условиях, которые являются практически изотермальными и включают практически постоянную концентрацию ионов и рН. Удобно, что реакция не требует стадии денатурации для разделения комплекса РНК-ДНК, полученного в результате первой реакции удлинения ДНК. Подходящие ДНК-полимеразы включают обратные транскриптазы, такие как обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц (AMV) (которую можно приобрести, например, у компании Seikagaku America, Inc.) и обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Moloney (MMLV) (которую можно приобрести, например, у компании Bethesda Research Laboratories).

Промоторы или промоторные последовательности, подходящие для включения в праймеры, представляют собой последовательности нуклеиновой кислоты (встречающиеся в природе, полученные синтетически или продукт рестрикционного расщепления), которые специфично распознаются РНК-полимеразами, которые распознают и связываются с такой последовательностью и иницируют процесс транскрипции, во время которого продуцируются транскрипты РНК. Последовательность может, необязательно, включать нуклеотидные основания, лежащие вне истинного сайта распознавания для РНК-полимеразы, которые могут сообщать дополнительную стабильность или чувствительность к процессам деградации или повышенную эффективность транскрипции. Примеры подходящих промоторов включают промоторы, которые распознаются определенными полимеразы бактериофагов, такими как полимеразы из бактериофага Т3, Т7 или SP6, или промотор из E.coli. Указанные РНК-полимеразы легко доступны из коммерческих источников, такие как New England Biolabs и Epicentre.

Некоторые из обратных транскриптаз, подходящих для применения в способах, упомянутых в настоящей заявке, обладают активностью РНКазы Н, такие как обратная транскриптаза AMV. Может быть, однако, предпочтительным добавление экзогенной РНКазы Н, такой как РНКазы Н E.coli, даже когда используется обратная транскриптаза AMV. РНКазу Н можно легко приобрести, например, у компании Bethesda Research Laboratories.

Транскрипты РНК, полученные данными способами, могут служить матрицами для получения дополнительных копий последовательности-мишени, посредством описанных выше механизмов. Система является аутокаталитической, и амплификация наблюдается

аутокаталитически, без необходимости повторной модификации или изменения условий реакции, таких как температура, pH, концентрация ионов и т.п.

Обнаружение можно осуществлять с помощью обширного ряда способов, включая прямое секвенирование, гибридизацию со специфичными в отношении

- 5 последовательности олигомерами, электрофорез в геле и масс-спектрометрию. В данных способах можно использовать гетерогенный или гомогенный форматы, изотопные или неизотопные метки, а также вовсе не использовать метки.

- Одним предпочтительным способом обнаружения является применение олигонуклеотидных зондов, специфичных в отношении последовательности-мишени, 10 полученных из фрагментов из 4,7 т.п.н., 700 п.н. и 214 п.н., описанных выше. Зонды можно использовать в анализах защиты гибридизации (HPA). В данном варианте осуществления настоящего изобретения зонды удобно метить сложным эфиром акридиния (АЕ), молекулой с высокой интенсивностью хемилюминесценции. См., например, Nelson et al. (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" в Nonisotopic 15 Probing, Blotting and Sequencing, Kricka L.J. (ed) Academic Press, San Diego, CA; Nelson et al. (1994) "Application of the Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR" в The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks et al., Clin. Chem. (1983) 29:1474-1479; Berry et al., Clin. Chem. (1988) 34:2087-2090. Молекулу АЕ можно непосредственно присоединять к зонду с использованием 20 реакций с линкерами на нуклеотидной основе, которые позволяют помещать метку в любой участок зонда. См., например, патенты США №№ 5585481 и 5185439. Запуском хемилюминесценции служит реакция с щелочным пероксидом водорода, которая дает возбужденный N-метилакридон, который впоследствии разряжается до "земли" с эмиссией фотона. Кроме того, АЕ вызывает гидролиз сложного эфира, в результате чего получается 25 агент, не обладающий хемилюминесценцией, метилакридиний-карбоновая кислота.

- В случае, когда молекула АЕ ковалентно связана с зондом из нуклеиновой кислоты, гидролиз происходит быстро в слабощелочной среде. В случае, когда меченный АЕ зонд является абсолютно комплементарным нуклеиновой кислоте-мишени, скорость гидролиза АЕ сильно уменьшается. Так, гибридизированный и негибридизированный меченный АЕ 30 зонд можно обнаружить непосредственно в растворе, без необходимости физического разделения.

- HPA обычно состоит из следующих стадий: (а) меченный АЕ зонд гибридизуют с нуклеиновой кислотой-мишенью в растворе в течение приблизительно от 15 до 30 минут. Затем добавляют слабый раствор щелочи, и АЕ, соединенный с негибридизованным 35 зондом, подвергается гидролизу. Данная реакция занимает приблизительно от 5 до 10 минут. Оставшийся АЕ, связанный с гибридом, выявляют как меру количества присутствующей мишени. Данная стадия занимает приблизительно от 2 до 5 секунд. Предпочтительно, стадию дифференциального гидролиза осуществляют при той же температуре, что и стадию гибридизации, обычно от 50 до 70°C. Альтернативно, вторую 40 стадию дифференциального гидролиза можно выполнять при комнатной температуре. Это позволяет использовать повышенную величину pH, например, в пределах 10-11, что дает более выраженную разницу в скорости гидролиза между гибридизованным и негибридизованным меченным АЕ зондом. HPA подробно описан, например, в патентах США №№ 6004745, 5948899 и 5283174.

- 45 ТМА подробно описан, например, в патенте США № 5399491. В одном примере типичного анализа, образец выделенной нуклеиновой кислоты, предположительно содержащий последовательность-мишень парвовируса В19, смешивают с буферным концентратом, содержащим буфер, соли, магний, нуклеотидтрифосфаты, праймеры, дитиотреитол и спермидин. Реакционную смесь, необязательно, инкубируют 50 приблизительно при 100°C в течение приблизительно двух минут для денатурации любой вторичной структуры. После охлаждения до комнатной температуры добавляют обратную транскриптазу, РНК-полимеразу и РНКазу H, и смесь инкубируют в течение двух - четырех часов при 37°C. Реакционную смесь затем можно анализировать путем денатурации

продукта, добавления раствора зонда, инкубации в течение 20 минут при 60°C, добавления раствора для избирательного гидролиза негибридизованного зонда, инкубации реакционной смеси в течение шести минут при 60°C и измерения оставшейся хемилюминесценции на люминометре.

Олигонуклеотидные молекулы по настоящему изобретению можно также использовать для амплификации на основе последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA). Данный способ представляет собой регулируемый промотором ферментативный процесс, который индуцирует *in vitro* непрерывную, гомогенную и изотермальную амплификацию специфичной нуклеиновой кислоты для получения РНК-копий нуклеиновой кислоты.

Реагенты для выполнения NASBA включают первый ДНК-праймер с 5'-концом, включающим промотор, второй ДНК-праймер, обратную транскриптазу, РНКазу-Н, РНК-полимеразу Т7, NTP и dNTP. С помощью NASBA генерируются большие количества одноцепочечной РНК как с одноцепочечной РНК или ДНК, так и с двухцепочечной ДНК. Если нужно амплифицировать РНК, оцРНК служит матрицей для синтеза первой цепи ДНК путем удлинения первого праймера, содержащего сайт распознавания РНК-полимеразы. Указанная цепь ДНК, в свою очередь, служит матрицей для синтеза второй, комплементарной, цепи ДНК путем удлинения второго праймера, в результате чего получают двухцепочечный активный РНК-полимеразный промоторный сайт, а вторая цепь ДНК служит матрицей для синтеза больших количеств первой матрицы, оцРНК, с помощью РНК-полимеразы. Методика NASBA известна специалистам в данной области и описана, например, в европейском патенте 329822, международной патентной заявке № WO 91/02814 и патентах США №№ 6063603, 5554517 и 5409818.

Последовательности парвовируса В19, описанные в настоящей заявке, являются также пригодными для методик гибридизации и амплификации нуклеиновых кислот, в которых используются разветвленные молекулы ДНК. В базовом анализе гибридизации нуклеиновых кислот одноцепочечную анализируемую нуклеиновую кислоту гибридизуют с меченой одноцепочечной нуклеиновой кислотой-зондом и выявляют полученные меченые дуплексы. Разработаны вариации указанной базовой схемы для облегчения разделения дуплексов, подлежащих выявлению в маргинальных материалах, и/или для амплификации выявляемого сигнала. В одном способе амплификации сигнала используют мультимеры амплификации, которые представляют собой полинуклеотиды с первым сегментом, который специфично гибридизуется с анализируемой нуклеиновой кислотой или цепью нуклеиновой кислоты, связанной с аналитом, и итерациями второго сегмента, который специфично гибридизуется с меченым зондом. Амплификация теоретически является пропорциональной числу итераций второго сегмента. Мультимеры могут быть как линейными, так и разветвленными. Два общих типа разветвленных мультимеров являются пригодными для указанных методик: вилкообразные и гребнеобразные. Способы получения и применения разветвленных молекул нуклеиновых кислот известны специалистам в данной области и описаны, например, в патенте США № 5849481.

В другом аспекте настоящего изобретения два или более тестов, описанных выше, выполняют для подтверждения присутствия организма. Например, если первый тест использовали для опосредованной транскрипцией амплификации (ТМА), чтобы амплифицировать нуклеиновые кислоты для их обнаружения, то выполняют альтернативный анализ тестирования нуклеиновой кислоты (НАТ), например, с использованием ПЦР-амплификации, ОТ-ПЦР и т.п., как описано в настоящей заявке. Таким образом, парвовирус В19 можно специфично и избирательно обнаружить, даже когда образец содержит другие организмы, такие как ВИЧ и вирус гепатита В, например.

Легко можно видеть, что схему анализов, описанных в настоящей заявке, можно подвергать различным изменениям, и специалистам в данной области известно множество форматов. Приведенные выше описания служат лишь руководством, и специалист может легко модифицировать описанные протоколы, используя методики, хорошо известные специалистам в данной области.

Описанные выше реагенты для анализов, включая праймеры, зонды, твердую подложку

с присоединенными зондами, а также другие реагенты для обнаружения, могут поставляться в наборах, с подходящими инструкциями и другими необходимыми реагентами, с целью проведения анализов, как описано выше. Набор обычно будет содержать в отдельных контейнерах комбинацию праймеров и зондов (уже

- 5 присоединенные к твердой подложке или отдельные реагенты для связывания их с матриксом), контрольные композиции (положительные и/или отрицательные), меченые реагенты, если формат анализа требует их наличия, и реагенты, генерирующие сигнал (например, субстрат фермента), если метка не генерирует сигнал непосредственным образом. Инструкции (например, написанные, напечатанные, в виде VCR, CD-ROM и т.п.)
- 10 по выполнению анализа обычно будут включаться в набор. Набор может также содержать, в зависимости от конкретного используемого анализа, другие упакованные реагенты и материалы (т.е. промывающие буферы и т.п.). С помощью указанных наборов можно выполнять стандартные анализы, такие как те, которые описаны выше.

III. Экспериментальная часть

- 15 Ниже описаны конкретные варианты для осуществления настоящего изобретения. Данные примеры предлагаются только для целей иллюстрации и не предназначены для какого бы то ни было ограничения объема настоящего изобретения.

- Предпринимались попытки обеспечения точности с точки зрения используемых числовых значений (например, количеств, температур и т.п.), но, разумеется, некоторые
- 20 ошибки и отклонения экспериментов являются допустимыми.

В следующих примерах ферменты приобретались в коммерческих источниках и использовались согласно инструкциям производителей. Нитроцеллюлозные фильтры и т.п. материалы также приобретались в коммерческих источниках.

- Для выделения фрагментов ДНК, за исключением особо отмеченных, все манипуляции с
- 25 ДНК выполнялись согласно стандартным процедурам. См. Sambrook et al., указано выше. Рестрикционные ферменты, ДНК-лигазу T4, E.coli, ДНК-полимеразу I, фрагмент Klenow и другие биологические реагенты можно приобрести у коммерческих поставщиков и использовать согласно инструкциям производителей. Фрагменты двухцепочечной ДНК разделяли на агарозных гелях.

- 30 Пример 1

Экстракция нуклеиновой кислоты парвовируса B19 для ПЦР

- Образцы человеческой сыворотки, которые предварительно тестировались на наличие парвовируса B19 человека с помощью анализов с IgM или ПЦР и показали положительный
- 35 последующих ПЦР-экспериментов. До использования образцы хранили при -80°C.

- ДНК экстрагировали из 0,2 мл сыворотки, используя QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA), согласно описанию производителя, при следующих условиях. ДНК-носитель добавляли к лизисному буферу для усиления связывания и выхода нуклеиновой кислоты. В частности, добавляли 5,6 мкг на образец полиадениловой кислоты 5' (Sigma,
- 40 St. Louis, MO) или poly-dA (Roche, Indianapolis, IN). Дополнительно ДНК парвовируса B19 элюировали 200 мкл буфера AE (Qiagen) вместо воды.

Пример 2

Обнаружение образцов, положительных на нуклеиновую кислоту парвовируса B19, с помощью ПЦР

- 45 Две различные процедуры ПЦР использовали для амплификации фрагментов парвовируса B19. Один способ, описанный в подробностях ниже, использовали для амплификации фрагментов приблизительно из 700 п.н., 370 п.н. и 214 п.н. (см. фиг.1). Высокора разрешающую ПЦР (Roche) использовали для амплификации фрагментов приблизительно из 4,7 т.п.н. Фрагмент приблизительно из 700 п.н. соответствует
- 50 нуклеотидным положениям 2936-3635 генома парвовируса B19, описанного в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Приблизительно 370 п.н. наблюдается в пределах фрагмента из 700 п.н. в нуклеотидных положениях 3073-3442. Фрагмент приблизительно из 4,7 т.п.н. представляет собой фрагмент из 4677 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидным

положениям 217-4893 по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

С целью амплификации фрагментов В19 приблизительно из 700 п.н., 370 п.н. и 214 п.н. использовали праймеры, показанные в таблице 1.

Таблица 1

Таблица 1

	<u>Область</u> <u>праймера</u>	<u>Последовательность</u>	<u>Продукт</u> <u>ПЦР</u>	<u>Геномный</u>
10	VP-5	AGGAAGTTTGCCGGAAGTTC (SEQ ID NO:36)	370 п. н.	VP1
	VP-3	GTGCTGAAACTCTAAAGGTG (SEQ ID NO:37)	370 п. н.	VP1
15	VP2-5	GACATGGATATGAAAAGCCTGAAG (SEQ ID NO:38)	214 п. н.	
	VP1/VP2			
	VP2-3	GTTGTTTCATATCTGGTTAAGTACT (SEQ ID NO:39)	214 п. н.	
	VP1/VP2			
20	K-1sp	ATAAATCCATATACTCATT (SEQ ID NO:40)	700 п. н.	
	VP1/VP2			
	K-2sp	CTAAAGTATCCTGACCTTG (SEQ ID NO:41)	700 п. н.	
25	VP1/VP2			

Для данного эксперимента ПЦР выполняли в конечном объеме 100 мкл с использованием 2 мкл очищенной ДНК парвовируса В19 (очищенной как описано выше), 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата и 1,25 единиц готовой к употреблению ДНК-полимеразы (Stratagene, La Jolla, CA). Профиль амплификации включал денатурацию при 94°C в течение 2 минут, отжиг праймера при 37°C в течение 3 минут и удлинение при 72°C в течение 3 минут, в течение 35 циклов. 3-минутная предварительная инкубация при 94°C для обеспечения первоначальной денатурации и конечная 7-минутная инкубация при 72°C для обеспечения полного удлинения фрагментов, предшествовала и следовала, соответственно, в течение 35 циклов ПЦР. Продукты ПЦР подвергали электрофорезу на 7% полиакриламидных гелях, окрашивали бромидом этидия и визуализировали под У/Ф источником. Очистку амплифицированных фрагментов выполняли с использованием набора QiaQuick PCR purification kit (QIAGEN).

Гнездную ПЦР для амплификации фрагмента В19 из 370 п.н. выполняли, если 700 п.н. полоса не визуализировалась на полиакриламидных гелях. Для гнездной ПЦР использовали материал ДНК из 700 п.н. с использованием праймеров, показанных в таблице 1.

Высокоразрешающую ПЦР (Roche) использовали для амплификации фрагментов парвовируса В19 из 4,7 т.п.н. следующим образом. Набор для высокоразрешающей ПЦР (Roche) и праймеры Hicks-5 (5'CCCGCCTTATGCAAATGGGCAG3') (SEQ ID NO:42) и Hicks-3 (5'TTGTGTTAGGCTGTCTTATAGG3') (SEQ ID NO:43) использовали в соответствии с рекомендациями продавца. Условия амплификации представляли собой 94°C в течение 1 минуты, 50°C в течение 2 минут и 68°C в течение 4 минут, в течение 35 или 45 циклов. Также были включены предварительная инкубация при 94°C в течение 2 минут и последующая инкубация при 75°C в течение 7 минут. Продукты ПЦР разделяли на 1% агарозных гелях и очищали с использованием набора ПЦР Purification kit (Promega, Madison, WI).

Пример 3

Клонирование фрагментов ДНК парвовируса В19

ПЦР-фрагменты клонировали в векторы TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Клонирование в данные векторы сильно облегчается, если амплифицированная ДНК

5 содержит единственный дезоксиаденозин (А) на своем 3'-конце. Соответственно, использовали каталитическую реакцию для добавления верхушки 3'(А). Реакционная смесь содержала 1,25 мМ dATP, 0,5 единиц Taq-полимеразы (Perkin Elmer, Boston, MA), и реакция протекала при 72°C в течение 15 минут.

10 ПЦР-Фрагменты клонировали в вектор pCR2.1-TOPO с использованием набора TA cloning kit компании Invitrogen (TOPO™ TA Cloning^R Kit с One Shot TOP10 Electrocompetent Cells), согласно описаниям производителя. Бактериальные клетки инкубировали при 37°C на планшетах с бульоном Luria, содержащих ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, 0,66 мМ IPTG и 0,033% X-Gal. Ряд белых колоний инокулировали в 4 мл бульона Luria с ампициллином (100 мкг/мл) и инкубировали в течение ночи при 37°C

15 при встряхивании. Три мл инкубированных в течение ночи культур использовали для изготовления ДНК-плазмиды с использованием набора QIAprep Miniprep kit (QIAGEN). Рекомбинантные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного анализа с EcoRI (New England and Biolabs) и электрофореза в 7% полиакриламидном или 1% агарозном геле, как описано выше.

20 Для того, чтобы определить последовательности клонов ДНК, изготавливали большие количества плазмид из рекомбинантных клонов, как описано выше, и ДНК суспендировали в ТЕ (10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ EDTA) в концентрации 0,2 мг/мл. Определение последовательности нуклеотидов фрагментов парвовируса В19 выполняли с использованием секвенатора ДНК Applied Biosystems модели 373 (или модели 377). Фиг.2A-2U (SEQ ID NO:1-21) изображают последовательности ДНК из 21 изолята парвовируса В19, очищенные, амплифицированные и секвенированные, как описано выше, которые

25 соответствуют нуклеотидным положениям 2936-3635 генома парвовируса В19, описанного в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 (фрагмент из 700 п.н., изображенный на фиг.1 и описанный выше). Фиг.2A (SEQ ID NO:1) представляет собой последовательность из изолята CH47-26; фиг.2B (SEQ ID NO:2) представляет собой последовательность из

30 изолята CH48-29; фиг.2C (SEQ ID NO:3) представляет собой последовательность из изолята CH33-2; фиг.2D (SEQ ID NO:4) представляет собой последовательность из изолята CH33-3; фиг.2E (SEQ ID NO:5) представляет собой последовательность из изолята CH33-4; фиг.2F (SEQ ID NO:6) представляет собой последовательность из изолята CH42-7; фиг.2G (SEQ ID NO:7) представляет собой последовательность из изолята CH42-18; фиг.2H (SEQ ID NO:8) представляет собой последовательность из изолята CH42-19; фиг.2I (SEQ ID NO:9) представляет собой последовательность из изолята CH46-23; фиг.2J (SEQ ID NO:10) представляет собой последовательность из изолята CH1-1; фиг.2K (SEQ ID NO:11) представляет собой последовательность из изолята CH1-6; фиг.2L (SEQ ID NO:12) представляет собой последовательность из изолята CH2-8; фиг.2M (SEQ ID NO:13) представляет собой последовательность из изолята CH2-10; фиг.2N (SEQ ID NO:14) представляет собой последовательность из изолята CH2-11C; фиг.2O (SEQ ID NO:15) представляет собой последовательность из изолята CH5-13; фиг.2P (SEQ ID NO:16) представляет собой последовательность из изолята CH7-22; фиг.2Q (SEQ ID NO:17)

45 представляет собой последовательность из изолята CH13-17; фиг.2R (SEQ ID NO:18) представляет собой последовательность из изолята CH14-33; фиг.2S (SEQ ID NO:19) представляет собой последовательность из изолята CH62-2; фиг.2T (SEQ ID NO:20) представляет собой последовательность из изолята CH64-2 и фиг.2U (SEQ ID NO:21) представляет собой последовательность из изолята CH67-2.

50 Фиг.11A-11Z (SEQ ID NO:62-87) изображают последовательности ДНК из дополнительных 26 изолятов парвовируса В19, очищенные, амплифицированные и секвенированные, как описано выше, которые соответствуют нуклеотидным положениям 2936-3635 генома парвовируса В19, описанного в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-

936 (фрагмент из 700 п.н., изображенный на фиг.1 и описанный выше). Фиг.11A (SEQ ID NO:62) представляет собой последовательность из изолята CH80-1; фиг.11B (SEQ ID NO:63) представляет собой последовательность из изолята CH81-3; фиг.11C (SEQ ID NO:64) представляет собой последовательность из изолята B19SCL1-4; фиг.11D (SEQ ID NO:65) представляет собой последовательность из изолята B19SCL2-1; фиг.11E (SEQ ID NO:66) представляет собой последовательность из изолята B19SCL3-1; фиг.11F (SEQ ID NO:67) представляет собой последовательность из изолята B19SCL4-3; фиг.11G (SEQ ID NO:68) представляет собой последовательность из изолята B19SCL5-2; фиг.11H (SEQ ID NO:69) представляет собой последовательность из изолята B19SCL6-2; фиг.11I (SEQ ID NO:70) представляет собой последовательность из изолята B19SCL7-3; фиг.11J (SEQ ID NO:71) представляет собой последовательность из изолята B19SCL8-2; фиг.11K (SEQ ID NO:72) представляет собой последовательность из изолята B19SCL9-1; фиг.11L (SEQ ID NO:73) представляет собой последовательность из изолята B19SCL9-9; фиг.11M (SEQ ID NO:74) представляет собой последовательность из изолята B19SCL10-2; фиг.11N (SEQ ID NO:75) представляет собой последовательность из изолята B19SCL11-1; фиг.11O (SEQ ID NO:76) представляет собой последовательность из изолята B19SCL12-1; фиг.11P (SEQ ID NO:77) представляет собой последовательность из изолята B19SCL13-3; фиг.11Q (SEQ ID NO:78) представляет собой последовательность из изолята B19SCL14-1; фиг.11R (SEQ ID NO:79) представляет собой последовательность из изолята B19SCL15-3; фиг.11S (SEQ ID NO:80) представляет собой последовательность из изолята B19SCL16-2; фиг.11T (SEQ ID NO:81) представляет собой последовательность из изолята B19SCL17-1; фиг.11U (SEQ ID NO:82) представляет собой последовательность из изолята B19SCL18-1; фиг.11V (SEQ ID NO:83) представляет собой последовательность из изолята B19SCL19-1; фиг.11W (SEQ ID NO:84) представляет собой последовательность из изолята B19SCL20-3; фиг.11X (SEQ ID NO:85) представляет собой последовательность из изолята B19SCL21-3; фиг.11Y (SEQ ID NO:86) представляет собой последовательность из изолята B19SCL22-11; фиг.11Z (SEQ ID NO:87) представляет собой последовательность из изолята B19SCL2-14.

Сравнение последовательностей выявило 98%-99,5% гомологию последовательностей данной последовательности из 700 п.н. между различными изолятами.

Фиг.3A-3C (SEQ ID NO:22) показывают последовательность ПЦР-фрагмента приблизительно из 4,7 т.п.н., показанного на фиг.1 и описанного выше, из клона 2-B1 парвовируса B19. Последовательность, изображенная на данных фигурах, представляет собой фрагмент из 4677 нуклеотидов, соответствующий нуклеотидным положениям 217-4893, по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Изображенная последовательность содержит полную открытую рамку считывания парвовируса B19, которая кодирует NS1, VP1 и VP2, плюс дополнительные нетранслируемые последовательности 5' и 3'. Секвенированный фрагмент содержал дополнительный нуклеотид в 5' некодирующей области между нуклеотидными положениями 367 и 368 последовательности B19, описанной Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

Фиг.4A-4C (SEQ ID NO:23) показывают последовательность ПЦР-фрагмента приблизительно из 4,7 т.п.н., показанного на фиг.1, из клона 2-B6 парвовируса B19. Последовательность представляет собой фрагмент из 4677 нуклеотидов, соответствующий нуклеотидным положениям 217-4893, по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Изображенная последовательность содержит полную открытую рамку считывания парвовируса B19, которая кодирует NS1, VP1 и VP2, плюс дополнительные нетранслируемые последовательности 5' и 3'. Секвенированный фрагмент содержал дополнительный нуклеотид в 5' некодирующей области между нуклеотидными положениями 367 и 368 последовательности B19, описанной Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

Пример 4

Клонирование и экспрессия рекомбинантных белков NS1, VP1 и VP2 парвовируса B19
Фрагменты, кодирующие NS1, VP1 и VP2 (см. фиг.1), амплифицировали с использованием фрагмента парвовируса B19 из 4,7 т.п.н., клонированного в pCR2.1-ТОРО

(описано выше). В частности, ПЦР-праймеры (см. ниже) были сконструированы для осуществления ПЦР областей NS1, VP1 и VP2 парвовируса B19. Для облегчения клонирования указанных областей в экспрессирующие векторы дрожжей, в праймеры, как это требуется, были внесены сайты рестрикции XbaI, HindIII и Sall.

5 Праймеры, которые использовались для клонирования и амплификации фрагментов парвовируса B19 для экспрессии в дрожжах рекомбинантных белков NS1, VP1 и VP2, были основаны на последовательностях, полученных выше, и были следующими:

NS1-5 (смысловый праймер)

5'ATACTCTCTAGACAAAACAAAATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAAGTTTCT3'

10 (SEQ ID NO:44)

NS1-3 (антисмысловый праймер)

5'GAGTATGTCGACTTACTCATAATCTACAAAGCTTTGCAATCCAGACAG3'

(SEQ ID NO:45)

VP1-5SN (смысловый праймер)

15 5'ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGAGTAAAGAAAGTGGCAAATGGTGGGAAAGT3'

(SEQ ID NO:46)

VPALL-3 (антисмысловый праймер)

5'GAGTATGTCGACTTACAATGGGTGCACACGGCTTTTGGCTGTCCACAATTC3'

(SEQ ID NO:47)

20 VP2-5SN (смысловый праймер)

5'ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACT3'

(SEQ ID NO:48)

ПЦР-праймеры синтезировали, очищали и суспендировали в 300 мкл dH₂O и определяли их оптическую плотность на 260 нм. Реакционная смесь содержала 0,25 нг матрицы, 100 пмоль каждого праймера, 10 мкл 1,25 mM каждого dNTP и 1 единицу Taq-полимеразы (Perkin Elmer, Boston, MA) в конечном объеме 50 мкл. Условия амплификации представляли собой 94°C в течение 1 минуты, 50°C в течение 2 минут и 68°C в течение 4 минут, в течение 35 циклов. Была включена последующая инкубация при 75°C в течение 7 минут для обеспечения полного удлинения фрагментов. Для проверки ПЦР-синтеза путем электрофореза в 1% агарозных гелях использовали аликвоты 5 мкл. Вест продукт ПЦР затем подвергали электрофорезу, а фрагменты ожидаемых размеров очищали с использованием набора ПЦР Purification kit (Promega, Madison, WI), согласно рекомендациям продавца. Приблизительно 0,8 мкг очищенной ПЦР ДНК расщепляли соответствующими рестрикционными ферментами (Roche) в течение 3 часов при 37°C, а продукты еще раз очищали с использованием набора ПЦР Purification kit компании Promega.

Для гетерологичной экспрессии рекомбинантных белков парвовируса B19 использовали плазмиду pBS24.1. Данный дрожжевой экспрессирующий вектор содержит 2 мк последовательности и инвертированные повторы (IR) для автономной репликации в дрожжах, терминатор α -фактора для обеспечения терминации транскрипции и дрожжевые leu2-d и URA3 для селекции. Точка начала репликации ColE1 и β -лактамазы также присутствуют для размножения и селекции в E.coli (Pichuanes et al. (1996) "Expression of Heterologous gene Products in Yeast". В источнике: Protein Engineering: A Guide to Design and Production, глава 5. J.L. Cleland and C. Craik, eds., Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y., стр. 129-161. Плазмиду pBS24.1 расщепляли с использованием BamHI/Sall и дефосфорилировали 10 единицами щелочной фосфатазы кишечника теленка (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) в условиях, рекомендованных продавцом. Расщепленные и очищенные ПЦР-фрагменты смешивали с pBS24.1, расщепленной с использованием BamHI/Sall, и с фрагментом ДНК, содержащим дрожжевой гибридный промотор ADH2/GAPDH (Cousens et al., Gene (1987) 61:265-275), расщепленным с использованием BamHI/SfuI или BamHI/HindIII, в зависимости от сайтов рестрикции, присутствующих в ПЦР-фрагментах, подлежащих клонированию. Лигирование осуществляли с использованием набора и протокола Roche Rapid Ligation. Лигированную

смесь затем использовали для трансформации компетентных клеток *E.coli* HB101, а трансформанты отбирали на планшетах с бульоном Luria, содержащих ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, после инкубации в течение ночи при 37°C. Несколько колоний каждой трансформации собирали и инокулировали в 3 мл бульона Luria с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл и инкубировали при 37°C при встряхивании в течение ночи.

Плазмидную ДНК изготавливали с использованием 1,5 мл культур и набора QIAprep Miniprep (QIAGEN). Рекомбинантные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного анализа с BamHI/Sall. Для выполнения секвенирования с целью подтверждения нуклеотидной последовательности клонированных фрагментов парвовируса B19 изготавливали препараты рекомбинантных плазмид в большом количестве. Для трансформации дрожжей использовали дрожжевые экспрессирующие плазмиды, демонстрирующие ожидаемую последовательность для NS1, VP1 и VP2, следующим образом. Компетентные клетки *Saccharomyces cerevisiae* AD3 [Mat a, trp1+, ura3-52, prbl-1122, per4-3, prcl-407, [cir⁰],::pDM15(pGAP/ADR1::G418^R), leu2(ΔAD)] трансформировали плазмидными ДНК, кодирующими NS1, VP1 или VP2, клонированными, как описано выше. Селекцию дрожжевых рекомбинантов осуществляли двумя циклами на планшетах без урацила, с последующим одним циклом на планшетах без лейцина, после инкубации при 30°C в течение 48-72 часов. Культуры затем выращивали на средах без лейцина, а затем на YEP с добавлением 2% глюкозы (Pichuanes et al., *Proteins: Struct. Funct. Genet.* (1989) 6:324-337) в течение 48 часов перед проверкой экспрессии рекомбинантных белков.

Последовательности для различных белков из двух разных изолятов показаны на фиг.5-10. В частности, фиг.5A (SEQ ID NO:24) и 5B (SEQ ID NO:25) показывают нуклеотидную и белковую последовательности NS1, соответственно, из клона 2-B1 парвовируса B19. Фиг.6A (SEQ ID NO:26) и 6B (SEQ ID NO:27) показывают нуклеотидную и белковую последовательности VP1, соответственно, из клона 2-B1 парвовируса B19. Фиг.7A (SEQ ID NO:28) и 7B (SEQ ID NO:29) показывают нуклеотидную и белковую последовательности VP2, соответственно, из клона 2-B1 парвовируса B19. Фиг.8A (SEQ ID NO:30) и 8B (SEQ ID NO:31) показывают нуклеотидную и белковую последовательности NS1, соответственно, из клона 2-B6 парвовируса B19. Фиг.9A (SEQ ID NO:32) и 9B (SEQ ID NO:33) показывают нуклеотидную и белковую последовательности VP1, соответственно, из клона 2-B6 парвовируса B19. Фиг.10A (SEQ ID NO:34) и 10B (SEQ ID NO:35) показывают нуклеотидную и белковую последовательности VP2, соответственно, из клона 2-B6 парвовируса B19.

Пример 5

Обнаружение и количественное определение ДНК парвовируса B19 посредством TaqManTM

Чувствительный диагностический способ для обнаружения инфицирования парвовирусом B19 был построен следующим образом. В частности, для обнаружения и количественного определения ДНК парвовируса B19 использовали технологию ПЦР TaqManTM. Количественная ПЦР требует эффективной экстракции нуклеиновой кислоты. Объем плазмы/сыворотки, используемый для экстракции ДНК, также влияет на чувствительность обнаружения. Для выделения нуклеиновой кислоты из 0,5 мл плазмы/сыворотки использовали два подхода. В частности, ДНК экстрагировали (а) связыванием с диоксидом кремния и (б) отжигом со специфичными в отношении мишени олигонуклеотидами.

(а) Выделение нуклеиновой кислоты связыванием с диоксидом кремния

В присутствии высоких концентраций хаотропной соли, такой как изотиоцианат гуанидиния, нуклеиновые кислоты связываются с диоксидом кремния. Нуклеиновые кислоты маленького размера более эффективно связываются с диоксидом кремния при кислых величинах pH. Связанные нуклеиновые кислоты эффективно элюируются слабосолевым буфером с щелочным значением pH при высоких температурах. Замена обычного диоксида кремния на намагниченный диоксид кремния сильно облегчает стадии промывки и элюирования при выделении нуклеиновых кислот. Магнитную основу

использовали для захвата частиц нуклеиновых кислот, связанных с диоксидом кремния, избавляясь, таким образом, от центрифугирования, которое требуется для осаждения частиц с обычным диоксидом кремния.

Использовали лизисный буфер от Organon-Teknika (Durham, NC). Указанный лизисный буфер содержит изотиоцианат гуанидиния для солюбилизации белков и инактивации РНКаз и ДНКаз. Детергент Triton X-100 еще более облегчает процесс солюбилизации и дезинтеграции клеточной структуры и ядерных белков, высвобождая, таким образом, нуклеиновую кислоту. Лизисный реагент подкисляли для усиления связывания нуклеиновой кислоты и использовали 50 мкл щелочного элюирующего буфера для элюирования связанной нуклеиновой кислоты. После выделения нуклеиновой кислоты определяли наличие парвовирусной ДНК с помощью ПЦР TaqManTM, как описано ниже.

(b) Выделение нуклеиновой кислоты отжигом со специфичными в отношении мишени олигонуклеотидами

Несмотря на то, что использование намагниченного диоксида кремния сильно облегчает быстрые и легкие манипуляции на стадиях промывки и элюирования, выделение нуклеиновой кислоты все еще остается трудоемким и длительным процессом. Поэтому использовали одноэтапный захват специфичной нуклеиновой кислоты-мишени из плазмы или сыворотки с использованием магнитных гранул. Для того, чтобы указанный способ можно было применять для тестов по захвату обширного ряда вирусных нуклеиновых кислот, использовали обычные магнитные гранулы, с присоединенными олиго dT. Магнитные олиго (dT) гранулы Sera-Mag (Seradyn, Indianapolis, IN) с длиной олиго dT 14 мономеров использовали в комбинации с олигонуклеотидами-ловушками, содержащими 20 поли А на 3'-конце, смежные с используемой парвовирус-специфичной последовательностью (обозначенной на конце последовательности, описанной ниже).

Использованные антисмысловые олигонуклеотиды-ловушки были получены из фрагмента из 700 п.н. и были следующими:

VSPC1 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCTTAACAGCAATTTCTGATA (nt 3492-3513)(*) (SEQ ID NO:49)

VSPC2 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCCCTGTAGTGCTGTCAG (nt 3549-3568) (SEQ ID NO:50)

VSPC3 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATACCCAAATAGGAAGTTCTG (nt 3639-3660) (SEQ ID NO:51)

VSPC4 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAATGCTGATTCTTCACTTGC (nt 3737-3759) (SEQ ID NO:52)

VSPC5 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCTGTACCTCCTGTACCTA (nt 3789-3808) (SEQ ID NO:53)

VSPC6 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCTCTAAATTTTCTGGG (nt 3838-3857) (SEQ ID NO:54)

VSPC7 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCTAATGTGTCAGGAACC (nt 3910-3929) (SEQ ID NO:55)

(*) Нумерация нуклеотидов по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

Магнитные гранулы суспендировали в лизисном буфере Novagen (Madison, WI) и серию из семи олигонуклеотидов-ловушек (VSPC1-VSPC7, описаны выше) испытывали по отдельности или в комбинации для захвата ДНК парвовируса В19 из панели, полученной из центра FDA Center for Biologic Evaluation and Research (FDA-CBER) департамента здравоохранения США.

(c) Промывка гранул промывающим буфером

После захвата гранулы промывали буфером, содержащим 10 mM Hepes с величиной pH, доведенной до 7,5, в 0,3 M NaCl и 0,5% NP-40. После обработки сыворотки лизисным буфером, гибридизации, магнитной адсорбции гранул и удаления лизисного буфера, к гранулам добавляли 1,5 мл промывающего буфера. После обычного перемешивания с использованием вихревой воронки, магнитной адсорбции и удаления промывающего буфера, гранулы промывали второй раз с использованием 0,5 мл того же буфера, так,

чтобы магнитные гранулы можно было получить в компактном виде для легкого суспендирования в 100 мл универсального буфера для ПЦР, содержащего все реагенты для анализа Taqman. Гранулы с захваченной ДНК переносили на планшет для обнаружения посредством ПЦР TaqManTM, как описано ниже. Несколько олигонуклеотидных комбинаций оказались эффективными для захвата В19, как было установлено в анализе TaqManTM.

В частности, технология TaqManTM амплифицирует захваченную нуклеиновую кислоту-мишень в виде ДНК-ампликонов. Альтернативой является амплификация захваченной мишени в виде РНК. Для этого олигонуклеотиды для амплификации состояли из праймера, специфичного в отношении парвовируса В19, с промоторной последовательностью Т7, с целью генерировать РНК-ампликоны с использованием РНК-полимеразы Т7. Три праймера для амплификации (VSA1-A3, описаны ниже), полученных из последовательности из 700 п.н., соответствующей нуклеотидным положениям 2936-3635 генома парвовируса В19, описанного в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936, испытывали на предмет их способности к амплификации. Праймеры были следующими:

Смысловые праймеры для амплификации цепи

VSA1 - AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCATATACTCATTGGACTGT (nt 2942-2961) (SEQ ID NO:56)

VSA2 - AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCAGAGCACCATTATAA (nt 3272-3288) (SEQ ID NO:57)

VSA3 - AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACAATGCCAGTGGAAA (nt 3317-3333) (SEQ ID NO:58)

VSP2 - GTGCTGAAACTCTAAAGGT (антисмысловой праймер - nt 3424-3442) (SEQ ID NO: 59)

Набор реагентов RNamplifire (Qiagen) использовали для изучения эффективности амплификации с использованием 50 копий ДНК парвовируса В19 в качестве мишени, в конечном объеме 20 мл. Праймеры для амплификации испытывали по отдельности или в комбинации, с использованием VSP2 в качестве второго праймера. После одного часа инкубации при 42°C, как рекомендует производитель, аликвоту амплифицированного материала разводили в 100 раз для обнаружения посредством анализа TaqManTM, для оценки эффективности праймеров для амплификации.

Комбинация двух праймеров для амплификации, VSA2 и VSA3, с VSP2 оказалась высокоэффективной для генерации РНК-ампликонов.

Чувствительность анализа TaqManTM, удобство ПЦР-праймеров и оптимальные условия реакции устанавливали с использованием плазмидной ДНК, содержащей фрагмент из 4,7 т.п.н., описанный выше. Указанный фрагмент включает область VP1, а также области NS1 и VP2 (см. фиг.1). Использовали праймеры для ПЦР-амплификации, полученные из области VP1, как подробно описано ниже. Нумерация представлена согласно Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. X представляет фосфорамидит 5'-флуоресцеина, а Z представляет DABCYL-dT, оба получены от компании Glen Research Corporation, Sterling, VA. Числа, указанные справа от последовательности, относятся к нуклеотидам в праймерах из последовательности парвовируса В19.

VSP1 - GGAGGCAAAGGTTTGCA (смысловой праймер - nt 3334-3350) (SEQ ID NO:60)

VSP2 - GTGCTGAAACTCTAAAGGT (антисмысловой праймер - nt 3424-3442) (SEQ ID NO: 59)

VSPPR1 - XCCCATGGAGATATTTAGATTZ (зонд - nt 3379-3398) (SEQ ID NO:61)

Vpara 8: TCCATATGACCCAGAGCACCA (nt 3262-3460) (SEQ ID NO:88)

Vpara 9: TTTCCACTGGCATTGTGGC (антисмысловой праймер - nt 3313-3331) (SEQ ID NO:89)

Vpara 10: X AGCTAGACCTGCATGTCACTG Z, где X представляет собой Fam, а Z представляет собой Tamra. (nt 3286-3310) (SEQ ID NO:90)

Концентрацию плазмидной ДНК оценивали спектрофотометрически и выполняли серию разведений для получения 5000 - 10 копий/20 мкл. Реакционная смесь в конечном объеме

50 мкл содержала 20 мкл образца, 1X буфера для амплификации Gold Taq (Perkin Elmer) с 3,2 mM MgCl₂, 300 мкМ каждого из dNTP, 1 пмоль каждого из праймеров для амплификации, 0,4 пмоль зонда и 1 единицу фермента AmpliTaq. Условия реакции включали 10 минут при 95°C для активации фермента, с последующими 45 циклами по 30 секунд при температуре 95°C, перемежающейся с 60°C, на детекторе последовательностей ABI 7700.

С использованием пары праймеров VSP1 и VSP2, которые генерировали ПЦР-продукт из 109 п.н., и зонд VSPPR1 поддавались обнаружению 10 копий на анализ. Поскольку объем образца составлял 20 мкл в конечном объеме 50 мкл, это позволяет предположить, что образцы плазмы, содержащие всего 50 копий/мл ДНК парвовируса B19, можно экстрагировать и выявлять в них вирус с помощью технологии TaqManTM. Поскольку парвовирус представляет собой вирус с высоким титром, объемы плазмы/сыворотки в 50 мкл можно экстрагировать и использовать для анализа.

При использовании положительного образца ДНК парвовируса B19 FDA-CBER (10⁶ копий/мл) технология TaqManTM обнаруживала всего 50 копий в анализе. Пытаясь скоррелировать нуклеиновую кислоту и иммунный титр, нагрузку вирусной ДНК количественно определяли в нескольких образцах, положительных на наличие антител.

Соответственно, раскрыты новые последовательности парвовируса B19 человека и анализы, в которых используются указанные последовательности. Из вышеизложенного будет ясно, что, несмотря на то, что для целей иллюстрации в настоящей заявке были описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, можно производить различные модификации, не отклоняясь от его идеи и объема.

Формула изобретения

1. Способ выявления парвовируса B19 человека в биологическом образце, включающий: выделение нуклеиновых кислот из биологического образца, предположительно содержащего парвовирус человека, путем взаимодействия твердой подложки, включающей связанные с ней захваченные парвовирус-специфичные нуклеиновые кислоты, с биологическим образцом в условиях гибридизации, при этом цепи нуклеиновой кислоты-мишени, если присутствуют в биологическом образце, гибридизуются с захваченными нуклеиновыми кислотами, и отделения твердой подложки от образца;

амплификацию выделенных нуклеиновых кислот с использованием смыслового и антисмыслового праймера, при этом каждый из праймеров не превышает в длину 60 нуклеотидов и в достаточной степени комплементарен части антисмысловой и смысловой цепей, соответственно, нуклеиновой кислоты-мишени для возможности гибридизации с ней; и где

(а) смысловой праймер включает (i) SEQ ID NO:60 или нуклеотидную последовательность, обладающую по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к ней, или (ii) SEQ ID NO:88 или нуклеотидную последовательность, обладающую по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к ней, и

(б) антисмысловой праймер включает (i) SEQ ID NO:59 или нуклеотидную последовательность, обладающую по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к ней в случае, когда смысловой праймер включает SEQ ID NO:60 или нуклеотидную последовательность, обладающую по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к ней, или (ii) SEQ ID NO:89 или нуклеотидную последовательность, обладающую по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к ней в случае, когда смысловой праймер включает SEQ ID NO:88 или нуклеотидную последовательность, обладающую по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к ней; и

выявление наличия амплифицированных нуклеиновых кислот как показателя наличия парвовируса B19 человека в образце.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что твердая подложка включает гранулы.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что гранулы представляют собой магнитные гранулы.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что захваченная нуклеиновая кислота дополнительно включает гомополимерную цепь для связывания захваченной нуклеиновой кислоты с твердой подложкой.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что гомополимерная цепь представляет собой поли А-цепь.

6. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что захваченные нуклеиновые кислоты включают один или более олигонуклеотидов, выбранных из группы, состоящей из олигонуклеотида с последовательностью TCCTTAACAGCAATTTCTGATA, олигонуклеотида с последовательностью CGCCCTGTAGTGCTGTCAG, олигонуклеотида с последовательностью TATACCCAAATAGGAAGTTCTG, олигонуклеотида с последовательностью TGCTGATTCTTCACTTGC, олигонуклеотида с последовательностью TGCTGTACCTCCTGTACCTA, олигонуклеотида с последовательностью GCCCTCTAAATTTTCTGGG, олигонуклеотида с последовательностью CTCCTAATGTGTCAGGAACC, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к олигонуклеотиду с последовательностью TCCTTAACAGCAATTTCTGATA, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к олигонуклеотиду с последовательностью CGCCCTGTAGTGCTGTCAG, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к олигонуклеотиду с последовательностью TATACCCAAATAGGAAGTTCTG, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к олигонуклеотиду с последовательностью TGCTGATTCTTCACTTGC, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к олигонуклеотиду с последовательностью TGCTGTACCTCCTGTACCTA, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к олигонуклеотиду с последовательностью GCCCTCTAAATTTTCTGGG, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к олигонуклеотиду с последовательностью CTCCTAATGTGTCAGGAACC.

7. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что захваченные нуклеиновые кислоты включают один или более олигонуклеотидов, выбранных из группы, состоящей из олигонуклеотида с SEQ ID NO:49, олигонуклеотида с SEQ ID NO:50, олигонуклеотида с SEQ ID NO:51, олигонуклеотида с SEQ ID NO: 52, олигонуклеотида с SEQ ID NO: 53, олигонуклеотида SEQ ID NO:54, олигонуклеотида с SEQ ID NO:55, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к SEQ ID NO:49, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к SEQ ID NO:50, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к SEQ ID NO:51, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к SEQ ID NO:52, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к SEQ ID NO:53, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к SEQ ID NO:54, олигонуклеотида, обладающего по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к SEQ ID NO:55.

8. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что амплификация включает ОТ-ПЦР, амплификацию, опосредованную транскрипцией, флуорогенный анализ с 5'-нуклеазой или их сочетания.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что амплификация включает флуорогенный анализ с 5'-нуклеазой с использованием смыслового праймера и антисмыслового праймера и выявление осуществляют с использованием по крайней мере одного зонда, включающего выявляемую метку.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что выявляемая метка представляет собой флуоресцентную метку, выбранную из группы, состоящей из 6-карбоксифлуоресцеина (6-FAM), тетраметилпродамина (TAMRA) и 2', 4', 5', 7'-тетрахлор-4-7-дихлорфлуоресцеина

(ТЕТ).

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что зонд дополнительно включает выявляемые метки на 5'-конце и 3'-конце.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что по крайней мере один зонд не превышает в длину 50 нуклеотидов и включает (i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:61 в случае, когда смысловой праймер включает SEQ ID NO:60 или нуклеотидную последовательность, обладающую по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к ней, или (и) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:93 в случае, когда смысловой праймер включает SEQ ID NO:88 или нуклеотидную последовательность, обладающую по крайней мере 90%-ной идентичностью по последовательности к ней.

13. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что присутствует внутренняя контрольная последовательность.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что внутренняя контрольная последовательность получена из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:92.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что дополнительно включает выявляемую меченую последовательность зонда для внутренней контрольной последовательности.

16. Способ выявления парвовируса В19 человека в биологическом образце с использованием флуорогенного анализа с 5'-нуклеазой, включающий:

(а) выделение нуклеотидных кислот из биологического образца, предположительно содержащего парвовирус В19 человека, путем взаимодействия магнитных гранул, включающих связанные с ними захваченные нуклеиновые кислоты, с биологическим образцом в условиях гибридизации, при этом цепи нуклеиновой кислоты, если присутствуют в биологическом образце, гибридизуются с захваченными нуклеиновыми кислотами, при этом захваченные нуклеиновые кислоты включают один или более олигонуклеотидов, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:49-55, и отделения магнитных гранул от образца;

(b) амплификацию нуклеиновых кислот с использованием смыслового и антисмыслового праймеров, при этом каждый из праймеров не превышает в длину 60 нуклеотидов и в достаточной степени комплементарен части смысловой и антисмысловой цепей, соответственно, выделенной нуклеиновой кислоты для возможности гибридизации с ней, при этом (i) смысловой праймер включает SEQ ID NO:60 и антисмысловой праймер включает SEQ ID NO:59 или (ii) смысловой праймер включает SEQ ID NO:88 и антисмысловой праймер включает SEQ ID NO:89; и

(с) выявление наличия амплифицированных нуклеиновых кислот с использованием зонда, не превышающего в длину 50 нуклеотидов, который включает (i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:61 в случае, когда смысловой праймер включает SEQ ID NO:60, или (ii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:93 в случае, когда смысловой праймер включает SEQ ID NO:88 как показателя наличия парвовируса В19 человека в образце.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что присутствует внутренняя контрольная последовательность.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что внутренняя контрольная последовательность получена из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:92.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что дополнительно включает выявляемую меченую последовательность зонда для внутренней контрольной последовательности.

20. Набор для выявления парвовируса В19 человека в биологическом образце, включающий:

захваченные нуклеиновые кислоты, включающие один или более олигонуклеотидов, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:49-55;

пару олигонуклеотидных праймеров, при этом каждый из олигонуклеотидных праймеров не превышает в длину 60 нуклеотидов и (i) один из олигонуклеотидных праймеров включает SEQ ID NO:60 и другой олигонуклеотидный праймер включает SEQ ID NO:59 или

(ii) один из олигонуклеотидных праймеров включает SEQ ID NO:88 и другой олигонуклеотидный праймер включает SEQ ID NO:89; и

письменные инструкции для идентификации наличия парвовируса В19 человека.

21. Набор по п.20, отличающийся тем, что дополнительно включает полимеразу и буферы.

22. Набор по п.20, отличающийся тем, что дополнительно включает по крайней мере один олигонуклеотидный зонд, включающий выявляемую метку.

23. Набор по п.22, отличающийся тем, что выявляемая метка представляет собой флуоресцентную метку, выбранную из группы, состоящей из 6-карбоксифлуоресцеина (6-FAM), тетраметилродамина (TAMRA) и 2', 4', 5', 7'-тетрахлор-4-7-дихлорфлуоресцеина (TET).

24. Набор по п.23, отличающийся тем, что зонд дополнительно включает выявляемые метки на 5'-конце и 3'-конце.

25. Набор по п.24, отличающийся тем, что по крайней мере один зонд не превышает в длину 50 нуклеотидов и включает (i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:61 в случае, когда один из олигонуклеотидных праймеров включает SEQ ID NO:60, или (ii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:93 в случае, когда один из олигонуклеотидных праймеров включает SEQ ID NO:88.

26. Набор по п.20, отличающийся тем, что дополнительно включает внутреннюю контрольную последовательность, полученную из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:92.

Приоритет по пунктам формулы изобретения:

28.06.2001 - признаки, ассоциированные с SEQ ID NO:59, 60 и 61.

29.03.2002 - признаки, ассоциированные с SEQ ID NO:88, 89 и 93.

CH47-26

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtttaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaact
ctgtaacttgtaattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcaccataatgggatactc
aaccctatggagataatttagatttaagtctttaaattgtttttcacctttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggagtacaagttactgacagcactaccgggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2А**CH48-29**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaacaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaact
ctgtaacttgtaattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcaccataatgggatactca
actccatggagatatttagatttaagtctttaaatttattttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagtcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcctgttagtagaccatgaatacaagttacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2В**CH33-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaacaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaact
ctgtaacttgtaattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcaccataatgggatactca
actccatggagatatttagatttaagtctttaaatttattttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagtcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgctgttagtagaccatgaatacaagttacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2С

CH33-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgccaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaact
ctgtaacttgtaattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcacataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaatfttttttccactttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggggtacaggttactgacagcactacaggggcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2D**CH33-4**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgccaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaact
ctgtaacttgtaattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcacataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaatfttttttccactttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggggtacaggttactgacagcactacaggggcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2E**CH42-7**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaac
tctgtaacttgtaattttccaggcagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcacataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatfttttttccactttagagtttcagcacctaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacaggggcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2F

CH42-18

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcctttaaataataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgctcagaaaaataaccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagcagtaacctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagcattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcagaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2G**CH42-19**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcctttaaataataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgctcagaaaaataaccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagcagtaacctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagcattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcagaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2H**CH46-23**

attaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcctttaaataataaaaaatgaaactgggtttcaa
ncacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgctcagaaaaataaccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagcagtaacctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagcattttccaggcagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcagaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2I

CH1-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagctttccagacagttttaattccatagacccagagcaccattataagggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagataatttagatttaaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacaggggcgctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2J**CH1-6**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagctttccagacagttttaattccatagacccagagcaccattataagggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagataatttagatttaaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacaggggcgctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2K**CH2-8**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagctttccagacaattttaattccatagacccagagcaccattataagggtgtttctccgcga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccccatggagataatttagatttaaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtcaggttactgacagcactacaggggcgctatgcatgttagtagaccatgaataaagtac
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2L

CH2-10

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagcattttccagacaatttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttccccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcacataatgggatactc
aaccocatggagatatattagattttaatgctttaaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacagaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaataatagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2М**H2-11C**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagcattttccagacaatttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttccccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcacataatgggatactc
aaccocatggagatatattagattttaatgctttaaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaataatagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2N**CH5-13**

ctaaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaact
ctgtaacttgtagcattttccagacagtttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttccccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaaggaggcaaaaggtttgcactattagtcacataatgggatactca
aaccocatggagatatattagattttaatgctttaaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaattat
ggcagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtacc
caatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2O

CH7-22

ataaatccatgtactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcaccataatgggatactc
aaccatggagatatattagatttaaatgctttaaaattgtttttcaccttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggagtacaagttactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГ.2P**CH13-27**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagtaattctgtcaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgtaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccga
gcgagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccatcagtcaccataatgggatactc
aaccatggagatatattagatttaaatgctttaaaattgtttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtacaggttactgacagcactacaggggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГ.2Q**CH14-33**

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaactc
tgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccga
caagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcaccataatgggatactcaa
cccatggagatatattagatttaaatgctttaaaattgtttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaattatg
tagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaagatgttacagacaaaactggag
gggggggtacaggttactgacagcactacaggggcgcctatgcatgttagtgaccatgaatacaagtaccca
tatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГ.2R

CH62-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagcact
ggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaacttgtaactttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgca
gccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccocatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggggtacaggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2S**CH64-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaacttgtaactttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccocatggagatacttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2Т**CH67-2**

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaacttgtaactttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccocatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggggtacaggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagtggaaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.2U

Клон № 2-В1 парвовируса В19

1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
 61 ttgtaacggg taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttctggact tacttgctgt ttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt tcttctaatg ttctggactg tgetaacgat aactgggtgt gctctttact
 301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata
 361 cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta
 421 ctttttcaa gtagaatgta acaaattga agaaggctat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacecca gaaacctac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
 541 actttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 agggcaatac tttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aanaataacc
 661 ttttaatgtt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aaggagctt gccatgccaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggtgtgc catttaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagttca aactatggta aactggtgt gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaactagt tgactttaac cagtacact tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac
 1021 taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac ttgagcaag ttatgtgtat
 1081 taaaaacaat aaaattgta aattgttact ttgtcaaac tatgacccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggttta
 1201 tgggcgccca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttcag
 1261 atatggcatg gtaactgga ataatgaaaa ctttcattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 ctggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttaggcggg caaccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgcctgg
 1441 agtacctgtg gttataacca gcaatggta cattacttt gtgtgaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgctaaag cttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatggggg tactaacaga ggetgatgta caacagtggc ttacatgggt
 1621 taatgcaca agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgattccc
 1681 tggaaattaat gcagatgcc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagea gctttttta
 1801 cctcaccacc ccaggcgctt ggaacactga aacccgcgc tctagtacgc ccatccccg
 1861 gaccagtcca ggagaatcat ctgtcggaag cccagttcc tccgaagtgt tagctgcatc
 1921 gtgggaagaa gccttctaca caccttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttgggt
 1981 tgattatgtg tgggacgggt taaggggtt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa

ФИГ.3А

2041 tagtggggga ggcttgggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg
 2101 atggaaattt cgagaattta cccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taatcccttt tetgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaangctt
 2221 ttagattat gagtaangaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa ttgtctaaag
 2281 ctgtgtatca gcaatttgtg gaattttatg aaaagggttac tggaacagac ttagagetta
 2341 tcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tccctagaa aaccatect
 2401 cttgtttga cttagtgtct cgtattaaaa ataaccttaa aaactctcca gacttatata
 2461 gtcateattt tcaaagtcac ggacagttat ctgaccaccc ceatgectta tcatccagta
 2521 gcagtcacgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac
 2641 aagctgggccc cccgcaaatg gctgttgaca gtgtgcaag gattcatgac ttaggtata
 2701 gccaaactggc taagtggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt tcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
 2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagtttgcg gaagtcccg
 2881 cttacaacgc ctcaaaaaa taccacagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaactctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt
 3001 ttagtgcaca ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taagggtttt tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg
 3121 aggcaaagggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag
 3181 attttaatgc tttaattta ttttttca ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agtccctgat gcttaactg taaccatctc agaaatgct gtttaaggatg
 3301 ttacggacaa aactggaggg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca
 3361 tgttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcaa gatactttag
 3421 cccagaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagtaggag
 3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 tttatgtttt ggaacacagt tctttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtgc cccccagaaa atttagaggg ctgcagtcac cacttttatg
 3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatccgct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atcttaaca catgaagacc atgcaattca gcccacaaac tcatgcccag
 3781 ggccactagt aaactcagt tctacaaagg agggagacag ctctagtaact ggagctggaa
 3841 aagccttaac aggccttagc acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgcctg
 3901 ggccagtgtc tcagcgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggtcagacc acttatggta acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 4021 tgggtagatt tcaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acagggttta aaatgcaca
 4081 cctacttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc ccctaattg
 4141 tgggttctgt atggaacaga agagccctc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaattc
 4201 caaatttaga tgacagtttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcatc

ФИГ.3В

4261 agccacctcc tcaaatattt taaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta
 4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaaccatga
 4381 catttaaat ggggccccgt aaagctacgg gacgggtgaa tctcaacct ggagtgtatc
 4441 ccccgacgc agcaggtcat ttaccatag tactatatga cccacagct acagatgcaa
 4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
 4561 tgcaccttatt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgccc
 4621 ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa

ФИГ.3С

Клон № 2-B6 парвовируса B19

1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
 61 ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc ttctttctg ggctgctttt ttctggact tacttgctgt tttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt tcttctaag ttctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctctttact
 301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcact aacagactaa tggcaatata
 361 cttaaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta
 421 ctttttcaa gtagaatgta acaaattga agaaggctat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaaccceca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
 541 actttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcaaatat ttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 tttaaagtgt gtatgggtgt ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aaggagcctt gccatgccaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgctc catttaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactgggtgt gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttc aaattcaaag tgcactaaaa ctageaatat ataaagcaac
 1021 taatttagtg cetactagca catttttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat
 1081 taaagacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaac tatgacccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggttta
 1201 tggaccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgtccagt
 1261 atatggcatg gttactgga ataataaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 cttggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttaggcggg caaccacca gggtagatca aaaaatgctt ggaagtgtag ctgtgcttg
 1441 agtaccctg gttataacca gcaatgggtg cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatggggt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatgggt
 1621 taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgattccc
 1681 tgggaattaat gcagatgcc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaangca gcttttttaa
 1801 cctcateacc ccagcgctt ggaacactga aacccgcgc tctagtacgc cctccccgg
 1861 gaccagtcca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttcc tccgaagtgt tagctgcac
 1921 gtgggaagaa gccttctaca cactttggtc agaccagttt cgtgaactgt tagttgggt
 1981 tgattatgtg tgggacgggt taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa
 2041 tagtggggga ggcttgggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg

ФИГ.4А

2101 atggaaattt egagaattta cccagattt ggtgcatgt agctgcatg tgggagctt
 2161 taatccctt tctgtctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagett
 2221 ttagattat gagtaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa tttgctaaag
 2281 ctgtgtatca gcaatttctg gaattttatg aaaagggttac tggaacagac ttagagctta
 2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aaccctect
 2401 cttgtttga cttagttgt cgtattaaaa ataacctaa aaactctcca gacttatata
 2461 gtcacattt tcaaagtcac ggacagttat ctgaccaccc ccatgctta tcatccagta
 2521 gcagtcacgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagctgaca ctaccctgga ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac
 2641 aagctgggccc cccgcaagt gctgttgaca gtgtgcaag gattcatgac ttaggtata
 2701 gccactggc taagtggga ataatccat atactcattg gactgtgca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactactta
 2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc atttcaagg aagtttgcg gaagttccc
 2881 cttacaacgc ctcagaaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaatctg tgaaaagcat gtggagtga ggggccactt
 3001 ttagtccaa ctctgtaact tgtacattt cagacaatt ttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taagggttt tctcccgag caagtagct ccacaatgcc agtggaagg
 3121 aggcaagggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatact aaccccatgg agatatttag
 3181 attttaatgc tttaattta ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agtctctgat gcttaactg taaccatata agaaattgct gtaaggatg
 3301 ttacaacaa aactggagg ggggtgcagg ttactgacag cactacagg cgcctatgca
 3361 tgttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttag gcaaggta gatacttag
 3421 cccagaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagtaggag
 3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 tttatgtttt ggaacacagt tttttcage ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtg ccccgagaa atttagagg ctgcagta cactttatg
 3661 aaatgtaca cccctatac ggatccgct taggggttc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atcttaaca catgaagacc atgcaattca gcccnaaac tcatgcccag
 3781 ggccactagt aaactcagtg tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
 3841 aagccttaac aggccttagc acaggtacct ctaaaaacac tagaatatcc ttacgcctg
 3901 ggccagtgtc tcagcgtac caccactggg acacagataa atatgtaca ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggcagacc acttatggt acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 4021 tgggtagatt tcaaagtga aaagaacagc taaaacagtt acagggttta aacatgcaca
 4081 cctacttcc caataaagga acceagcaat atacagataa aattgagcgc cccctaatgg
 4141 tgggtctgt atggaacaga agagccctc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaatc
 4201 caaatttaga tgacagttt aaaactcag ttgcagcctt aggaggatgg ggttgcac
 4261 agccacctcc tcaaatattt ttaaaaatat taccacaag tgggccaatt ggaggtatta

ФИГ.4В

4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgcccgtgg aattatgaca gtaaccatga
 4381 catttaaat ggggcccctg aaagctacgg gacgggtgaa tctcaacct ggagtgtatc
 4441 ccccgcagc agcaggctat ttaccatag tactatatga cccacagct acagatgcaa
 4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaagccgtg
 4561 tgacccatt gtaaacact cccacgtgc ctcagccag gatgtgtaac taaagccca
 4621 ccagtaccac ccagactgta cctgcccct cctataccta taagacagcc taacacaa

ФИГ.4С

Последовательность одноцепочечной ДНК клона В1-NS1:

atactctcgaacaaaacaaatggagctatttagaggggtgcttcaagttcttctaattgttctggactgtgctaacgataactgggtgctctt
tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactacatacagactaatggcaataacttaagcagtggtgcttcaagcttgacttta
ctggggggccactagcaggggtgctgtactttttcaagtagaatgaacaaattgaagaaggctatcatattcatgttggtattggggggcca
gggttaaaccacagaacccacagtggtgtgtagaggggtatttaataatgtactttatcaccttgtaactgaaaatctgaagctaaaattttgc
caggaatgactacaaaaggcaatactttagagatggagagcagttatagaaaactatttaataaaaaataacctttaaatgttgatggtgt
gttactaatattgtagacatatagatactgtatttctgctacttttagaaaggagcgtgccatgccaaagaaaccccgatcaccacagccat
aaatgatactagtagtgatgctggggagctagcggcacaggggcagaggtgtgccattaatgggaagggaactaaggctagcataaag
tttcaactatggtaactggttgtgtaaaacagagtggttacagaggataagtggaaactagttagctttaaccagtagactttactaagcagt
agtcacagtggaagtgtttcaattcaagtgcactaaaactagcaattataaagcaactaatitagtgccactagcacattttattgcatacag
actttgagcaagtattgtgtattaaaaacaataaaattgttaattgttacttttgcaaaaactatgaccccctatttagtggggcagcatgtgtiaaag
tggattgataaaaaatgtggcaagaaaaacacactgtggtttatgggccgccaaagtacagggaacaaacacttgcaatggccattgctaa
aagtgttccagtatatggcatggttaactggaataatgaaaactttccatttaatatgtagtagcaggaaaaagcttggtggtctgggatgaag
gtattattaagctacaaattgtagaagctgcaaaagccattttagcggggcaaccaccagggtagatcaaaaaatgcgtggaagtgttagctg
tgccatggagtagctgtgttataaccagcaatggtagactttgtgtgaagcgggaacactacaacactgtacatgctaaagccctaaaa
gagcgcagtggtaaagttaaactttactgtaagatgcagccctgacatggggttactaacagaggctgatgtacaacagtggttactatggtgt
aatgcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacacttttgatttccctggaattatgcagatgccctccaccagacctcc
aaaccaccccaattgtcacagacaccagtagcagcagcagtggtgtggaagctctgaagaactcagtgaaagcagctttttaacctcatca
ccccaggcgccctggaacactgaacccccgcctctagtagcccatccccgggaccagttcaggagaaatcatctgtcgggaagcccagtttc
ctcgaagtgttagctgcatcgtgggaagaagccctctacacacactttggcagaccagtttcgtgaactgttagttggggtgattatgtgtggg
acgggtgaagggtttacctgtctgtgtgtgcaacatattaacaatagtgggggaggcttgaggactttgtcccatgcatatgaaggggct
tggtataatggatggaatttcgagaatttaccacagatttggtgcgtagtgctgcatgtgggagcttctaataccctttctgtgtaacctgca
aaaaatgtgcttacctgtctggattgcaaagcttttagattatgagtaagtcgacatactc

ФИГ.5А

Аминокислотная последовательность клона В1 NS1:

MELFRGVLQVSSNVLDLCANDNWWCSLLDLTSDWBLTHTNRLMAIYLSVAS
KLDFTGGPLAGCLYFFQVECNKFEEGYHIVVIGGPGLNPRNLTVCEGLFNNAVLYHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKGA
CHAKKPRITTAINDTSTDAGESSGTGAEVVPFNGKGTKASIKFQTMVNWLCENRVFTEDK
WKLVDNFQYTLSSSHSGSFQIQSALKLAIYKATNLVPTSTFLLHTDFEQVMCIKNNKIV
KLLLCQNYDPLLVGQHVWKWDKKCGKKNLWFYGPSTGKTNLAMAIKSVVPVYGMVNW
NNENFPFNDVAGKSLVVWDEGHIKSTVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSVAVPGVPVVT
SNGDITEVVSNGNTTTTVHAKALKERMVKNFTVRCSPDMGLLTBADYQQWLTCNAQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVTDTSISSGGESSEELSESSFFNLITPGA
WNTETPRSSSTPIPGTSSGESSVGSFVSSEVVAASWEBAFYTPLADQFRELLVGVDYVWDG
VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCNVGAWYNGWKFREFTPDLVRCSCHVGASNPFSVL
TCKKCAIYLSGLQSFVDYE

ФИГ.5В

Последовательность одноцепочечной ДНК В1 VP1:

atactcaagcttacaaaacaaaatgagtaagaagtggaatggtgggaagtgatgataaattgctaaagctgtgtatcagcaattgtggaatttta
 tgaaaagggttactggaacagacttagagcttattcaaatattaaaagatcattataatttttagataatccctag
 aaaacccatcctcttggtagttagtctgtattaaaaataaccttaaaaactctccagacttatatagtcacat
 tticaaagtcagtgacagttatctgaccacccccatgecttatcatccagtagcagtcagcagaacctagaggagaaga
 tgcagtattatctagtgaagacttacacaagcctgggcaagttagcgtacaactacccggtagtaactatgttgggctg
 gcaatgagctacaagctgggccccgcaaagtgtgttgacagtgctgcaaggattcatgacttaggtatagccaactg
 gctaagttgggaataatccatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgg
 gttcaagcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccccgtggccattttcaagggaagttgc
 cggaggtccccgcttacaacgctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttatctgcagaagccagcactggtgca
 ggaggggggggcagtaactctgtgaaaagcatgtggagtgaggggggccattttagtgccaactctgtaactgtacatt
 ttccagacaaattttaattccatagaccagagcaccattataagggtgttttctccgcagcaagtagctgccaatg
 ccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagtcacataatgggatactcaaccccatggagatattagattttaat
 gctttaaattttttttaccttttagagtticagcacttaattgaaaattatggaagtagctcctgatgctttaac
 tgaaccatatacagaattgctgttaaggatgttacggacaaaactggagggggggtgcagggttactgacagcactacag
 ggcgctatgcatgttagtagaccatgaatataagtagccatagtgttagggcaagggtcaagatactttagcccagaa
 ctctctattttgggtatactttccccctcaatagcttacttaacagtaggagatgttaacacacaagggaatttctggaga
 cagcaaaaattggcagtgaaagatcagcattttatgttttgaacacagttctttcagcttttaggtacaggaggta
 cagcaactatgtcttataagtttctccagtgccccagaaaatttagagggtgctgcagtcacacttttagaatgtac
 aaccccttatccggtacccgcttaggggttctctgacacattaggaggtagcccaaaatttagatctttaacacatgaaga
 ccatgcaattcagccccaaaacttcatgcccaggccactagtaaaactcagtgcttacaaggaggagacagctctagta
 ctggagctggaagcccttaacagggccttagcacagggtacctctcaaaacactagaatactcttagccctgggccagtg
 tctcagccgtacccacactgggacacagataaatatgtcacaggaaataatgccatttctatggtcagaccactatgg
 taacgctgaagcaaaagagtagcagcaagggtggtagatttccaaatgaaaagaacagctaaacagttacagggtt
 taaacatgcacacctacttccaataaaggaaacccagcaatatacagatcaaatgagcggcccoctaatgttggttct
 gtatggaaacagaagagcccttactatgaagccagctgtgagtaaaattccaaatttagatgacagttttaaaactca
 gtttgagccatgagggatgggggttgcatcagccaccicctcaaatatttttaaaatattaccacaagtgggccaa
 ttggaggtataatcaatgggaattactaccttagttcagtatgccgtgggaattatgacagtaacctgacatttaa
 ttggggcccgtaagctacgggacgggtggaatcccaacctggagtgtatccccgcagcagcagcaggtcattaccata
 gtactatatgacccacagctacagatgcaaaacaacaccacagacatggatatgaaagcctgaagaattgtggacag
 ccaaaagccgtgtgcaccattgtaagtcgacatactc

ФИГ.6А

Аминокислотная последовательность В1 VP1:

MSKESGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYBKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPL
 ENPSSLFDLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPRGEDAVLSSE
 DLHKPGQVSVQLPGTNYVGPGBELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTV
 ADEBELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYPSMTSVNS
 AEASTGAGGGGSPVVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
 ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTISEI
 AVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYYPVVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAY
 LTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPENLBGCS
 QHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPLVNSVSTKEBGDSSS
 TGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
 YQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTOQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQL
 WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITLVQYAVGIM
 TVTMTFKLQPRKATGRWNPQPGVYPHAAGHLPPVLYDPTATDAKQHHRHGYEKPPEELWT
 AKSRVHPL

ФИГ.6В

Последовательность одноцепочечной ДНК В1 VP2:

atactcaagcttcaaaaacaaatgacttcagttattctgcagaagccagcactggtgcaggagggggggcagtaactctgtgaaaagcatgtggagtggggggc
 cacttttagtgccaactctgttaactgttacatttccagacaatttttaattccatagaccagagcaccatt
 ataaggtgttttcccgagcaagtagctgccacaatgccagtgaagaggagcaagggtttgcaccattagtcacata
 atgggatactcaacccatggagatatttagatttaagctttaatttttttacccttagagtttcagcactt
 aattgaaaatttaggaagtatagctcctgtatgctttaactgttaaccatacagaattgctgttaaggatgttacggaca
 aaactggaggagggggtgcagggtactgacagcactacaggggcctatgcatgttagtaacctgaatataagtaacca
 tatgtgttagggcaagggtcaagatacttttagccccagaacttctatttgggtatacttccccctcaatacagcttactt
 aacagtaggagatgttaacacacaaggaaatttctggagacagcaaaaaatggcaagtgaaatcagcattttatgttt
 tggaaacagtttctttagcttttaggtacagggaggtacagcaactatgtcttaagtttccctcagtgccccagaa
 aatttagagggtcagcagcaactttatgaaatgtacaaccccttatacggatcccgcttaggggttctcagacactt
 agggaggtgacccaaaatttagatctttaacatgaagaccatgcaattcagccccaaaacttcatgcccaggggccactag
 taaacacagtgcttacaaggaggagagacagctctagtactggagctggaaaagccttaacaggccttagcacagggtacc
 tctcaaaactagaaatattcttaccgcccgtggccaggtctcagccgtacacccactgggacacagataaatatgtcac
 aggaataatgccatttctcatgtgcagaccacitattgttaacgtgaagacaagagtatcagcaaggagtgggtagat
 ttccaagtgaaaaagacagctaaacaggttaacatgcacacacttcttcccaataaagggaaccagcaa
 tatacagatacaaatgagcgcgccctaatgtgggttctgtatggaacagaagagcccttactatgaagccagctgtg
 gagttaaatttcaaatatttagatgacagttttaaaactagtttgcagcccttagggaggtgggttgcacagocaccctc
 ctcaaatatttttaaaaattattaccacaagtgggccaatttgagggtattaaatcaatgggaattactacctttagttcag
 tatgcccgtgggaattatgacagtaacctgacatttaattggggcccgtaagctacgggaggtgggaatcccaacc
 tggagtgatccccgcacgcagcaggttcatttaccatattgtactatgacccccagctacagatgcaaaacaaacc
 acagacatggatgaaaagccgtgaagaaattgtggacagccaaagccgtgtgacccattgtaagtcgacatactc

ФИГ.7А

Аминокислотная последовательность В1 VP2:

MTSVNSAEASTGAGGGGSNPVKSMWSEGAFTSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
 YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGS
 IAPDALVTITSEIAVKDVIDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDITLAP
 LPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYK
 FFPVPENLEGC SQHFYEMYNPLYGSRLGVFDITLGGDPKFRSLTHEDHAIQFQNFMPGPL
 VNSVTNKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTIRISLRPGVPVSYQYHHWDTDKYVTGNAIS
 HGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGS
 VWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKLIPQSGPIGGIKSM
 GITTLVQYAVGIMTVMTFKLGPRKATGRWNRPQGVYPPHAAHLPVYLDPTATDAKQH
 HRHGYEKPPELWTAKS RVHPL

ФИГ.7В

Последовательность одноцепочечной ДНК В6 NS1:

atactcttgaacaaaacaaatggagctatttagagggtgcttcaagtttcttctaattgttctggactgtgctaacgataactgggtggtctctt
 tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactcatactaacagactaatggcaatafacttaagcagtggtgcttctaagcttgacttta
 ctggggggccactagcagggtgctgtactttttcaagtagaatgtaacaaattgaagaaggctatcatattcatgttggttattggggggcca
 gggttaaaccacagaacacctcacagtggtgttagagggttatttaataatgtactttatcaccttgtaactgaaaatctgaagctaaaattttgc
 cagggaatgactacaaaaggcaaatcttttagagatggagagcagtttatagaaaactatttaalgaaaaaataacctttaaatgttgatgggtg
 gttactaataattgtagacatagataacctgtatttctgctacttttagaaaggagcttgccatgccaagaaaccccgcatcaccacagccat
 aatgatactagtagctgctggggagtgtagcggcacaggggcagaggttgccatttaattgggaagggaactaaggctagcataaag
 ttcaaaactatggtaaactggttggtgaaacagagtggttacagaggataagtggaaactagttagctttaaccagtagactttactaagcagt
 agtcacagtggaagtttcaaatcaaatgcaactaaactagcaattataaagcaactaatttagtgccactagcacattttattgcatacag
 actttgagcaagttatgtgtattaaagacaataaaatgttaaatgttactttgtcaaaactatgacccctatttagtggggcagcatgtgttaaag
 tggatigataaaaaatgtgcaagaaaaacacactgtgtttatggaccgccaagtacagggaacaaacttgcaatggccattgctaa
 aagtgtccagttatgtgcatgttgaactggaaatgaaaactttccatttaattgatgtagcaggaaaaagcttggtggtctgggatgaaggta
 ttattaaagtctacaattgtagaagctgcaaaagccatttttagcggggcaaccaccagggttagatcaaaaatgctgtggaagtgtagctgtgc
 ctggagtagccgtggttataaccagcaatggtagactttttgttgaagcgggaacactacaacaactgtacatgctaaggcccttaaaaga
 gcgcatggtaagtttaactttactgtgaagatgcagccctgacatgggggttactaacagaggctgatgtacaacagtggttacatggtgtaat
 gcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacacttttgatttccctggaattatgcagatgcccctccaccagacctccaa
 accaccccaattgtcacagacaccagatcagcagcagtggtggtgaaagctctgaagaactcagtgaaagcagctttttaacctcatacc
 ccaggcgccctggaacactgaacccccgcgctctagtagcccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgtcggaagcccagtttcc
 tccgaagtttagctgcatctggtggaagaagccttctacacacctttggcagaccagtttctgtaactgttagttgggttgattatgtgtggga
 cgggtgaagggtttacctgtctgtgtgtgcaacataaacaatagtgggggagggttggtgactttgtccccattgcaatagtaggggtt
 ggtataatggatgaaatttcagaaatttaccacagatttggtgcgatgtagctgccatgtgggagcttctaacccttttctgtgtaacctgca
 aaaaatgtgcttacctgtctggaattgcaagctttgtagattatgagtaagtcgacatactc

ФИГ.8А

Аминокислотная последовательность B6 NS1:

MELFRGVLVQVSSNVLDLCANDNWWCSLLDLTSDWBPLTHTNRLMAIYLSSVAS
 KLDFTGGPLAGCLYFFQVECNKFEEGYHHVVGPGPLNPRNLTVCEGLFNNVLYHLVT
 ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTINIDGHIDTCISATFRKGA
 CHAKKPRITTAINDTSTDA GESSGTGAEBVVPFNGKGTKASIKFQTMVNWLCENRVFTBDK
 WKLVDFNQYTLSSSHSGSFQIQSALKLAIYKATNLVPTSTFLHTDFEQVMCIKDNKIV
 KILLCCQNYDPLLVGQHVLLKWIDKKCGKKNTLWFGPPSTGKTNLAMAIKSVPVYGMVNW
 NNENFPFNDVAGKSLVVWDEGIIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSVAVPGPVVIT
 SNGDITFVSGNTTTTVHAKALKERMVKLNFTVRCSPDMGLLTEADVQQWLTWCNAQSWD
 HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVTDTSISSSGGESSEELSESSFFNLITPGA
 WNTETPRSSPTIPGTSSGESSVSGSPVSEVVAAASWBEAFYTPLADQFRELLVGVDYVWDG
 VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTDPLVRCSHVGASNPFSVL
 TCKKCAVLSGLQSFVDYE

ФИГ.8В

Последовательность одноцепочечной ДНК B6 VP1:

atactcaagcttacaaaacaaaatgagtaagaagtggaatggtgggaagtgtatgataaatttgctaaagctgtgtatcagcaattgtg
 gaattttatgaaaaggttactggaacagacttagacttattcaaatattaaaagatcattataatatttcttagataatcccctagaaaacccatc
 ctcttgtttgacttagttgctcgtattaaaaataaccttaaaaactctccagacttatatagtcattttcaaaagctatggacagttatctgaccac
 ccccatgccattatcaccagtagcagtcagcagaacctagaggagaagatgcagttatctagtgaaagcttacacaagcctgggcaagtt
 agcgtacaactacccgggtactaactatgttggccctggcaatgagctacaagctgggccccgcaaagtgtgttgacagtgctgcaaggat
 tcatgacttttaggtatagccaactggctaagttgggaataaatccatatactacttgactgtgacagatgaagagcttttaaaaaatataaaaa
 tgaacctgggttcaagcacaaagtagtaaaagactacttacttaaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaaagttgcccggaa
 gttcccgcttacaacgcctcagaaaaatcccaagcatgacttctcagtttaattctgcagaagccagcactgtgcaggagggggggcagta
 atcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgcacactctgtaactgtacatttccagacaatttttaattccatagaccag
 agcaccattataaggtgtttctcccgagcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaaaggttgaccattagtcaccataatgg
 gatactcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttacccttttagagtttcagcacttaattgaaaattatggaagtatagct
 cctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacaacaaaactggagggggggtgcaggttactgacagcactaca
 gggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtagcccatatgtgttagggcaaggtaagatactttagcccagaacttctatttgggt
 atactttccccctcaatacgttacttaacagtaggagatgttaacacacaaggaaatttctggagacagcaaaaaattggcaagtgaagaatca
 gcattttatgtttggaacacagttctttttagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttataagtttctccagtgccccagaaaattt
 agagggtgcagtaacacitttatgaaatgtacaaccccttatacggatcccgttaggggttctgacacattaggaggtgacccaaaattt
 agaictttaacacatgaagaccatgcaattcagccccaaaacttcagccagggccactagtaaaactcagtgcttacaaggaggagagacag
 ctctagtactggagctggaagcccttaacaggcccttagcacaggtacacctcacaacactagaatatcttacgcctggggcagtgctca
 gccgtaccaccactgggacacagataaatatgtcacaggaataaatgccatttctcatgttcagaccacttatgttaacgctgaagacaag
 agtatcagcaaggagtggttagatttccaatgaaaaagaacagctaaaacagttacagggtttaaacatgcacacctactttccaataaag
 gaaccagcaataatagatcaaatgagcggccctaatgtgtgggttctgtatggaacagaagagcccttcactatgaaagccagctgttg
 agtaaaattccaatttagatgacagttttaaactcagtttgagcccttaggaggtatggggttgcacagccacctcctcaaatattCtaaaa
 atattaccacaaagtgggccaat tggaggtattaaatcaatgggaattactaccttagttcagtatgccgtgggaattatgacagtaacctga
 catttaaa ttggggccccgtaaagctacgggacgggtggaatcccaacctggagtgtatccccgcacgcagcaggtcatttaccata tga
 ctatagacccacagctacagatgcaaaacaaccacagacatggatatgaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgt gtg
 caccatgtataagtcagacatactc

ФИГ.9А

Аминокислотная последовательность B6 VP1:

MSKESGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYBKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPL
 ENPSSLFDLVARIKNNLNKSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPREGDAVLSSSE
 DLHKPGQVSVQLPGTNYVGPONELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTV
 ADEELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYPSMTSVNS
 AEASTGAGGGGSPVKSMMWSEGA TFSANSVTCFTRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
 ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQHLENYGSIAPDALTVTISEI
 AVKDVNTKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHBYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAY
 LTVGDVNTQGISGDSKKLASSESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPENLEBGS
 QHFYEMYNPLYGSRLGVPDVLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPLVNSVSTKEGDS
 TGAGKALTGLSTGTSQNTSLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
 YQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQYQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQL
 WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIM
 TVTMTFKLGRKATGRWNPQGVYPPHAAHGLPYVLYDPTATDAKQHHRHGYEKPBEELWT
 AKSRVHPL

ФИГ.9В

Последовательность одноцепочечной ДНК В6 VP2:

atactcaagcttacaaaaaataactgacttcagtttaattctgcagaagccagcactggtgcaggagggggggcagtaantcctgtgaaaagcatgtggagtggggggc
 cacttttagtgccaactctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccatt
 ataagggtgttttcccgagcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaaagggttgaccattagtccata
 atgggatactcaacccctggagatatttagattttaatgctttaaatttttttccacttttaggtttcagcactt
 aattgaaattatggaagtatagctcctgtagctttaactgtaaccatatcagaattgctgtaaggatgttacaaca
 aaactggagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtagaccatgaatataagtaacca
 tatgtgttagggcgaaggctcaagatacttttagcccgaaacttctatttgggtatatttccctcaatacgttactt
 aacagtaggagatgttaacacacagaaggaatttctggagacagcaaaaatggcgaagtgaagaatcagcattttatgtt
 tggaaacacagttcttttagcgttttaggtacagggaggtacagcaactatgtcttataagtttccctcagtgccccagaa
 aatttagagggtcgcagtcacacttttatgaatgtacaaccccttatcggatcccgcttaggggttccctgacacatt
 aggggttgacccaaaatttagaictttaacacatgaagaccatgcaattcagccccaaacttcatgccaggccactag
 taaactcagtgctacaaaggaggggagacagctcttagtactggagctggaaagccttaacaggcccttagcacaggtacc
 tctcaaaacactagaatactttacgcccctggcaggtgtctcagccgtaccaccactgggacacagataataatgicac
 aggaataaattgccatttctatgttcagaccacttatgtgtaacgtgaagacaagagatcagcaaggagtggtgat
 ttccaantgaaaagaacagctaaacagttacaggggttaaacatgcacaccttcttccantaaggaaccagcaa
 tatacagatcaaatgagcgccccctaatgggtgtctgtatggaacagaagagccctcactatgaagccagctgtg
 gagttaaattccaaatttagatgacagtttaaaactagtttcagcccttagggaggtgggttgcacagccacctc
 ctcaaatattttaaaaaatattaccacaagtgggccaattggaggtatnaatcaatgggaattactccttagttcag
 tatgcccgtgggaattatgacagtaacctgacatttaaatggggccccgttaagctacgggacgggtggaatcccaacc
 tggagtgtatccccgcacgcagcaggtcatttaccatatgtactatgacccacagctacagatgcaaaacaacc
 acagacatgcatatgaagcctgaagaattgtggacagccaaagccgtgtgcacccattgtaagtcgacatactc

ФИГ.10А

Аминокислотная последовательность В6 VP2:

MTSVNSAEASTGAGGGGSSNPVKSWMSEGA TFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
 YKVFSPAASSCHNASGKBAKYCTISPMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGS
 IAPDALTVTISEIAVKDVTNK TGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGGQD TLAPE
 LPFWVYFPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEBSAFYVLEHSSFQLLGTTGAT TMSYK
 FPPVPENLEGCSQH FYEMYNPLYGSR LGVPD T LGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPL
 VNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTIRSLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
 HGQTTYGNAEDKBYQGGVGRFPNEKBQLKQLQLNMHTYFPNKGTQYTDQIERPLMVGS
 VWNRRALHYESQLWSKIPNLDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKL PQSGPIGOIKSM
 GITL VQYAVGIMVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQH
 HRHGYEKPEELWTA KSRVHPL

ФИГ.10В

CH80-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
 gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgcc
 ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
 tgggtcaggaggggggggcagtaactctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaact
 ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
 gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaagggttgaccattagtcccataatgggatactc
 aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaattgtttttcaccttttagagtttcagcatttaattgaaaact
 atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
 gaggggggagtacaagttactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
 ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.11А

CH81-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttcgcgccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccctatggagatacttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГ.11В**B19SCL1-4**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccctatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГ.11С**B19SCL2-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccctatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГ.11D

B19SCL3-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagctttccagacaatttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcacataatgggatactc
aaccocatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatacagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11Е**B19SCL4-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagctttccagacaatttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcacataatgggatactc
aaccocatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatacagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11F**B19SCL5-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtagctttccagacaatttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcacataatgggatactc
aaccocatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatacagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11G

B19SCL6-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtagatctccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagataatttagatttaattgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.11H**B19SCL7-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtagatctccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagataatttagatttaattgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.11I**B19SCL8-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtagatctccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcacataatgggatact
caaccccatggagataatttaggtttaattgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.11J

B19SCL9-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagccttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtagctttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccg
 cagccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatac
 tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaa
 ttatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaac
 tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagt
 acccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.11К**B19SCL9-9**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagccttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtagctttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccg
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatac
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatattgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.11L**B19SCL10-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagccttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtagctttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccg
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatac
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatattgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.11М

B19SCL11-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgttaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcaccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaatttattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

ФИГ.11N**B19SCL12-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtgactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcgcataatgggatac
 tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaatttattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaa
 ttatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaaact
 ggaggggggggtgcaagttactgacagcagtacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

ФИГ.11O**B19SCL13-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgttaactgtgcattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcaccataatgggatac
 tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaatttattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaa
ttatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaaac
tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 accatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

ФИГ.11P

B19SCL14-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaagggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtaactttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgcittaaatttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatactcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11Q**B19SCL15-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaagggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtaactttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaaatttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatactcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11R**B19SCL16-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaagggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtaactttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaaatttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatactcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11S

B19SCL17-1

ataaatccatatactattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgccccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11Т**B19SCL18-1**

ataaatccatatactattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgccccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11У**B19SCL19-1**

ataaatccatatactattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgccccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11V

B19SCL20-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11W**B19SCL21-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11X**B19SCL22-11**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГ.11Y

B19SCL2-14

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatctagatttaatgctttaaattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgtagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГ.11Z

GAATTCACCTGTACATTTTCCAGACAATTTTAAATTCATATGACCCAGAGCACCATTAT
 ACAGTGACATGCAGGTCTAGCTCTGCCACAATGCCAGTGGAAGGAGGCAAAGGTTTGCA
 CCATTAGTCCCATAAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATGCTTTAA
 ATTTATTTTTTTTACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAAATTATGGAAGTATAGCTC
 CTGATGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACGGACAAAACTG
 GAGGGGGGGTGCAGGTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATG
 AATATAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCAAGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCTA
 TTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATACGCTTACTTAACAGTAGGAGATGTTAACACACAAG
 GAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTTGGCAAGTGAAGAATCAGCATTTTATGTTTTTGGAAC
 ACAGTTCTTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCCTC
 CAGTGCCCCCAGAAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAACCCCT
 TATACGGATCCCGCTGTCGAC (SEQ ID NO.:92)

ФИГ.12