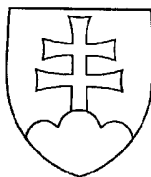


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 862

- (21) Číslo prihlášky: **1375-93**
(22) Dátum podania: **05.06.1992**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **9100989**
(32) Dátum priority: **07.06.1991**
(33) Krajina priority: **NL**
(40) Dátum zverejnenia: **07.09.1994**
(45) Dátum zverejnenia udelenia
vo Vestníku: **14.08.2000**
(86) Číslo PCT: **PCT/NL92/00097, 05.06.1992**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl⁷:

C 12N 15/00
C 12N 15/38
A 61K 39/265
C 12P 21/08
A 61K 39/395
C 12Q 1/70
G 01N 33/569
C 12N 7/00

(73) Majiteľ patentu: Stichting Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, NL;

(72) Pôvodca vynálezu: Rijsewijk Franciscus Antonius Maria, Amsterdam, NL;
Van Oirschot Johannes Theodorus, Lelystad, NL;
Maes Roger Kamiel, Okemos, MI, US;

(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov vynálezu: **Mutant bovinného herpesového vírusu typu 1 (BHV-1), prostriedok s jeho obsahom, očkovací prostriedok, diagnostická súprava a spôsob stanovenia infekcie zvierat BHV-1**

(57) Anotácia:

Delečný mutant bovinného herpesového vírusu typu 1 (BHV-1), ktorý má deléciu v glykoproteínovom gE-géne. Mutant môže ďalej obsahovať deléciu v tymidínkinázovom géne a/alebo v glykoproteínovom gl-géne, alebo môže mať vložený heterológny gén. Prostriedok obsahuje rekombinantnú nukleovú kyselinu, gE-gén BHV-1, špecifickú časť tohto gE-génu alebo gE-špecifickú nukleotidovú sekvenciu odvodenú z tohto gE-génu, pričom gE je proteín, ktorý má predovšetkým v BHV-1 kmeni aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A. Je opísaný aj očkovací prostriedok, diagnostická súprava a spôsob stanovenia infekcie zvierat BHV-1.

Oblasť techniky

Vynález sa týka mutantu bovinného herpesového vírusu typu 1 (BHV-1), prostriedku s jeho obsahom na vakcináciu a diagnostiku chorôb, ktoré sú spôsobené patogénmi, očkovacieho prostriedku, diagnostickej súpravy a spôsobu stanovenia infekcie zvierat mutantom BHV-1. Ide predovšetkým o ochranu zvierat, najmä hovädzieho dobytku, proti BHV-1 prostriedkom podľa vynálezu, ktorý je nielen bezpečný a účinný, ale vytvára tiež možnosť rozlíšenia infikovaných od neinfikovaných zvierat v očkovanej populácii.

Doterajší stav techniky

BHV-1 vrátane infekčného bovinného vírusu rhinotracheitídy (IBRV) a infekčného vírusu pustulárnej vulvovaginitídy (IPVV), hrá dôležitú úlohu v patogenéze chorôb dýchacieho orgánu a porúch plodnosti hovädzieho dobytku. Po akútnej infekcii BHV-1 často zostáva prítomný v hostiteľovi v latentnej forme. Latentný vírus môže byť reaktivovaný vplyvom *inter alia* stresu, a môže, ale nemusí byť doprevádzaný klinickými príznakmi, a následne vylučovaný. Následkom toho musí byť infikovaný dobytok považovaný za celoživotného potenciálneho prenášača BHV-1. BHV-1 sa objavuje endemicky v 75 % dánskych dobytčích fariem.

Najmä starší dobytok je sérologicky pozitívny.

Existuje mnoho inaktivovaných (mŕtvych) vakcín a mnoho atenuovaných (živých) vakcín dostupných na očkovanie proti infekcii BHV-1. Inaktivované vakcíny sú pripravené umrtnením vírusu BHV-1, napr. teplom, žiarením, etanolom lebo formalínom. To však poskytuje nedostatočnú ochranu. Atenuované vakcíny sú pripravované početným pasážovaním v homológnych (bovinných) alebo heterológnych bunkách, napr. prasačích alebo psích a niekedy je navyše vírus ešte fyzikálne alebo chemicky upravený. Týmto spôsobom sa vo vírusovom genóme vyvinú neznáme mutácie/delécie, ktoré často redukujú patogénne vlastnosti vírusu. Atenuované živé vakcíny poskytujú lepšiu ochranu ako inaktivované vakcíny okrem iného preto, že prezentujú viac vírusových antigénov imunitnému systému hostiteľa. Ďalšou dôležitou výhodou živých vakcín je to, že môžu byť podávané intranazálne, to je v mieste, kde sa prvý raz pomnoží divoký vírus po infekcii. Živé vakcíny zatiaľ nechávajú dostatok priestoru na zlepšenie. Zdá sa, že niektoré živé vakcíny majú stále schopnosť spôsobovať aborty, čo je výrazné najmä po intramuskulárnej aplikácii. Aj tak pravdepodobne všetky živé vakcíny zostávajú latentne prítomné v očkovanej krave. Navyše, ak sa vakcína odlišuje len veľmi málo od divokého typu vírusu, môže sa objaviť reverzia virulencie. Ale hlavný problém je to, že vakcíny BHV-1 nemôžu zabrániť infekcii divokým typom vírusu. Výsledkom je to, že očkovaný dobytok môže tiež šíriť divoký typ vírusu BHV-1.

Na vhodný program na zvládnutie BHV-1 je nevyhnutné mať k dispozícii účinnú a bezpečnú vakcínu, ktorá môže byť odlišená od divokého typu vírusu, pretože aplikácia účinnej vakcíny môže výrazne redukovať cirkulujúci BHV-1, a teda test, ktorý môže rozlíšiť medzi vakcínou a divokým typom vírusu, umožní detegovať (a potom odstrániť) infikovaných jedincov v očkovanej populácii.

Doteraz boli vyvinuté BHV-1 vakcíny, ktoré sa zdajú byť bezpečnejšie ako konvenčné vakcíny a sú odlišiteľné od divokého typu vírusu. Bol izolovaný delečný mutant s defektom v géne pre tymidínkinázu, ktorý spôsobuje aborty v menšom stupni, stáva sa menej často latentný a nemôže

býť reaktivovaný. Ďalej bola s použitím techník rekombinantnej DNA, vytvorená BHV-1 vakcína, ktorá má deléciu v géne pre glykoproteín gIII, čo umožní túto vakcínu odlišiť od divokého typu BHV-1 sérologickými technikami. Napriek tomu existujú isté námietky proti týmto vakcínam. Na jednej strane gén pre tymidínkinázu je potrebný na vírusovú replikáciu a menšia replikácia znižuje ochrannú funkciu vakcíny. Na druhej strane glykoproteín gIII je dôležitý na vznik ochranných protilátok, a preto vakcína s deléciou gIII je menej účinná. Praktický problém je, že intranazálne podanie, ktoré všeobecne poskytuje najlepšiu ochranu, nie je v niektorých krajinách pre rekombinantné vakcíny povolené. Preto je vyžadovaná taká vakcína, ktorá je bezpečná a tiež účinná a ešte môže byť odlišená od divokého typu BHV-1 a je ďalej žiaduce, aby najmenej jedna z takýchto vakcín bola založená na víruse atenuovanom skôr konvenčnou cestou ako na víruse vytvorenom technikami rekombinantnej DNA.

Pasážami v tkanivových kultúrach bol teraz získaný kmeň BHV-1, ktorý nemá gén pre glykoproteín gE. Prvé výsledky nášho výskumu naznačujú, že tento gén je užitočný na sérologické rozlíšenie s ohľadom na divoký typ BHV-1 a že je zapojený v expresii virulencie. Preto jeho delécia prispieva k bezpečnosti a môže tak spraviť deléciu v géne pre tymidínkinázu prebytočnou. Glykoproteín gE sa zdá byť menej dôležitý na indukciu ochrany ako glykoproteín gIII. Konvenčne atenuovaný kmeň BHV-1, ktorý môže byť sérologicky odlišný od divokého typu vírusu, je unikátny. Umiestnenie a sekvencia DNA génu gE, ani z nej odvodené oligonukleotidy, polypeptidy a oligopeptidy neboli skôr známe a sú tu opísané prvý raz. Test na sérologické rozlíšenie na podklade génu pre gE je tiež unikátny.

Dôležitá výhoda tohto "konvenčného" gE delečného mutantu ("konvenčná" sa vzťahuje na použitie konvenčnej metódy na izoláciu atenuovaného vírusu) je to, že bude možné podávať ju intranazálne i v krajinách, kde je toto pre rekombinantné vakcíny zakázané.

Vzhľadom na odlišné názory na bezpečnosť boli navyše k týmto konvenčným delečným vakcínam skonštruované tiež dobre definované rekombinantné vakcíny. Tieto rekombinantné vakcíny majú tiež gE deléciu a môžu alebo nemusia mať tiež deléciu v tymidínkinázovom géne a tiež môžu byť použité ako vektory na expresiu heterológnych génov. Všetky tieto rekombinantné vakcíny je možné rozlíšiť od divokého typu vírusu rovnakým testom špecifickým pre gE. Použitie štandardného testu pre súbor rôznych vakcín môže byť veľká výhoda v medzinárodnom boji proti BHV-1. Takýto prístup týkajúci sa odboru BHV-1 vakcín nebol doteraz opísaný.

Sérologické analýzy odpovede proti BHV-1 dobytku ukázali, že dôležitý podiel protilátok anti-gE je namierený proti komplexu tvorenému glykoproteínom gE a ďalším BHV-1 glykoproteínom, a sice gI. Sérologické testy, ktoré tiež dokazujú prítomnosť protilátok špecifických pre taký komplex, môžu byť viac citlivé ako testy, ktoré detekujú len protilátky anti-gE. Dobytok očkovaný jednoduchými gE delečnými mutantmi môže produkovať protilátky anti-gI, ktoré môžu interferovať s detekciou protilátok anti-gI/gE. Preto tento vynález obsahuje tiež vakcínu s dvojitou gI/gE deléciou.

Podstata vynálezu

Podstatou tohto vynálezu je predovšetkým delečný mutant BHV-1, ktorý má deléciu v géne pre glykoproteín gE. Slová "delécia v" znamenajú deléciu génu ako celku.

Mutant bovinného herpesového vírusu typu 1 (BHV-1) obsahuje deléciu v glykoproteínovom gE-géne, kde gE je proteín, ktorý v očkovačom BHV-1 kmeni obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A a kde delécia umožňuje sérologické rozlíšenie od divokého typu BHV-1 a bola vytvorená stlmujúcim postupom, technikou rekombinantnej DNA.

Mutant BHV-1 je kmeň Difivac-1, uložený v Inštitúte Pasteura, Francúzsko pod depozitným číslom I-1213.

Mutant BHV-1 má okrem delécie v gE-géne navyše deléciu v tymidínkinázovom géne a v glykoproteínovom gl-géne.

Mutant BHV-1 je selektovateľný alebo zvolený spôsobom rozoznávania medzi BHV-1 vírusom, ktorý má intaktný gE-gén a BHV-1 vírusom, ktorý má deléciu v gE-géne, spôsob zahŕňa krok vyšetrenia, či nukleová kyselina vírusu reaguje s gE-špecifickou sondou alebo primérom odvodeným z nukleotidovej sekvencie kódujúcej gE.

Mutant BHV-1 je selektovateľný alebo zvolený spôsobom rozoznávania medzi BHV-1 vírusom expresujúcim gE a BHV-1 vírusom, ktorý má deléciu v gE-géne, spôsob zahŕňa krok vyšetrenia, či vírus reaguje s vyvolanou gE-špecifickou protilátkou proti gE alebo proti peptidom odvodeným z aminokyselinovej sekvencie gE.

Mutant BHV-1 obsahuje heterológny gén vložený technikou rekombinantnej DNA do miesta gE-génu a ktorý je pod kontrolou regulačných sekvencií, napríklad gE-génu alebo heterológneho génu a voliteľne je pripojený k časti gE-génu, ktorá kóduje signálny peptid.

Mutant BHV-1 má okrem delécie v gE-géne deléciu v tymidínkinázovom géne, deléciu v gl-géne alebo v oboch, pričom heterológny gén je vložený do miesta aspoň jednej z týchto delécií alebo s podmienkou, že ak mutant s dvojistou deléciou zahŕňa deléciu v gE-géne a deléciu v tymidínkinázovom géne, heterológny gén nie je vložený do miesta tymidínkinázového génu a nie je to bovinný dýchací syncytiálny vírus F alebo N gén.

Mutant BHV-1, ktorý okrem delécie v gE-géne má deléciu v tymidínkinázovom géne, deléciu v gl-géne alebo v oboch, pričom heterológny gén je vložený do miesta aspoň jednej z týchto delécií s podmienkou, že ak mutant s dvojistou deléciou zahŕňa deléciu v gE-géne a deléciu v tymidínkinázovom géne, sú vložené najmenej dva heterológne gény. Vložený gén kóduje imunogénny proteín alebo peptid iného patogénu alebo kóduje cytokín.

Ďalším predmetom vynálezu je prostriedok obsahujúci rekombinantnú nukleovú kyselinu obsahujúcu gE-gén BHV-1, špecifickú časť tohto gE-génu alebo gE-špecifickú nukleotidovú sekvenciu odvodenú z tohto gE-génu, gE je proteín, ktorý v očkovačom BHV-1 kmeni obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A.

Tento prostriedok môže tiež obsahovať klonovací alebo expresný vektor, ktorý má vloženú rekombinantnú nukleovú kyselinu obsahujúcu gE-gén BHV-1, gE-špecifickú časť tohto gE-génu alebo gE-špecifickú nukleotidovú sekvenciu odvodenú z tohto gE-génu. Môže tiež obsahovať peptid odvodený z gE BHV-1 alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1, gE je proteín, ktorý v očkovačom BHV-1 kmeni obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A.

Prostriedok môže tiež obsahovať protilátku, ktorá je špecifická pre gE BHV-1, monoklonálnu protilátku alebo polyklonálnu protilátku, ktorá je špecifická pre gE BHV-1.

Podstatou vynálezu je aj očkovací prostriedok na očkovanie zvierat, najmä cicavcov a hlavne hovädzieho dobytku na ochranu proti BHV-1, obsahujúci živú alebo inaktívnu vakcínu mutantu BHV-1 a vhodný nosič alebo adjuvans.

Tento očkovací prostriedok na ochranu proti patogénom, obsahuje živú alebo inaktívnu vakcínu mutantu BHV-1, ktorý má deléciu v gE-géne a obsahuje heterológny gén, ktorý bol vložený technikami rekombinantnej DNA a kóduje imunogénny proteín alebo peptid patogénu, a ďalej vhodný nosič alebo adjuvans.

Ďalším predmetom vynálezu je diagnostická súprava na detekciu nukleovej kyseliny BHV-1, detekciu protilátok, detekciu proteínov vo vzorke, najmä v biologickej vzorke, ako je krv alebo krvné sérum, krvné bunky, mlieko, telové tekutiny ako slzy, tekutina z výplachu pľúc, nosový sekrét, spermie, osobitne semenná tekutina, sliny, spútum alebo tkanivo, najmä nervové tkanivo zvierat, osobitne cicavca, najmä hovädzieho dobytku obsahujúci sondu nukleovej kyseliny alebo primér s nukleotidovou sekvenciou odvodenou z gE-génu BHV-1, gE je proteín, ktorý v očkovačom kmeni BHV-1 obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A, a detekčné prostriedky vhodné na detekčnú skúšku na nukleové kyseliny, protilátky a proteíny.

Predmetom vynálezu je aj spôsob stanovenia infekcie zvierat BHV-1, najmä cicavca, osobitne hovädzieho dobytku zahŕňajúci vyšetrenie vzorky zvierat, najmä biologickej vzorky na prítomnosť nukleových kyselín obsahujúcich gE-gén BHV-1 alebo na prítomnosť gE BHV-1 alebo komplexu glykoproteínov gE a gl BHV-1, alebo na prítomnosť protilátok, ktoré sú špecifické pre gE BHV-1 alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1, gE je proteín, ktorý v očkovačom BHV-1 kmeni obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A, pričom vyšetřované vzorky sú vzorky zo zvierat očkovaných očkovacím prostriedkom podľa vynálezu.

Syntéza oligopeptidov, polypeptidov a glykoproteínov odvodených z kódujúcej sekvencie génu pre glykoproteín gE a gl vírusu BHV-1

Výsledky sekvenčnej analýzy DNA génu pre glykoproteín gE (obrázok 3A) a izolované fragmenty DNA, ktoré kódujú tento gén, opísané v príkladoch, umožňujú s použitím štandardných molekulárno biologických postupov či už syntetizovať peptidy proteínu gE (oligo- alebo polypeptidy) lebo exprimovať proteín gE v celosti lebo vo veľkých častiach prostredníctvom prokaryót (v baktériách) lebo eukaryót (napr. v myšiacich bunkách). Týmto spôsobmi môže byť získaný špecifický antigén, ktorý môže napríklad slúžiť na vytvorenie monoklonálnych protilátok (Mabs) špecifických pre gE. Antigén špecifický pre gE (a monoklonálne protilátky, Mabs, špecifické pre gE) môžu byť použité v sérologických testoch na to, aby stanovili rozdiely medzi zvieratami očkovanými vakcínou s delečným gE mutantom BHV-1 a zvieratami infikovanými divokým typom BHV-1.

Výsledky čiastočnej sekvenčnej analýzy DNA génu pre glykoproteín gl, opísané v príkladoch, a izolované fragmenty DNA, ktoré kódujú tento gén, spoločne s eukaryotickými bunkami exprimujúcimi glykoproteín gE, dovoľujú expresiu komplexu gl/gE v eukaryotických bunkách (obrázky 13 a 14). Tento glykoproteínový komplex môže byť použitý na vytvorenie monoklonálnych protilátok špecifických pre gl/gE. Komplex gl/gE môže byť tiež použitý ako antigén v sérologických testoch na rozlíšenie medzi dobytkom očkovaným jednoduchým gE delečným mutantom BHV-1 alebo dvojítm, gl/gE delečným mutantom BHV-1 a dobytkom infikovaným divokým typom BHV-1.

gE špecifické peptidy

Na základe znalosti sekvencie kódujúcej proteín môžu byť s použitím automatického syntetizátora vytvorené polypeptidy dlhé najmenej 40 až 50 aminokyselín. Teraz, keď proteínová sekvencia glykoproteínu gE vírusu BHV-1

kmeňa Lam bola objasnená (obr. 3A), polypeptidy tohto gE vírusu BHV-1 môžu byť syntetizované. S takými polypeptidmi podľa štandardných metód môžu byť imunizované experimentálne zvieratá, ako sú myši alebo králiky na vytvorenie gE-spezifických protilátok. Ďalej s použitím týchto gE-spezifických peptidov môžu byť ďalej špecifikované miesta, kde anti-gE protilátky reagujú s gE proteínom (epitopy), napr. metódou PEPSCAN (Geysen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81, 3998-4002), gE-spezifické oligopeptidy môžu byť tiež použité v sérologických testoch, ktoré demonštrujú anti-gE protilátky.

Prokaryotická expresia gE

Na syntézu proteínu gE v baktériách (t. j. prokaryotickú expresiu gE) musí byť DNA fragmenty kódujúce glykoproteín gE alebo jeho časti klonované v prokaryotických expresných vektoroch. Prokaryotické expresné vektory sú cirkulárne DNA molekuly, ktoré môžu udržiavať samy seba v baktérii ako separátne sa replikujúce molekuly (plazmidy). Tieto expresné vektory obsahujú jeden alebo viac génových markerov, ktoré kódujú rezistenciu na antibiotiká a tak umožňujú selekciu baktérií s expresným vektorom. Ďalej expresné vektory obsahujú (často regulovateľný) úsek promótoru, za ktorý môžu byť pripojené DNA fragmenty, ktoré sú potom exprimované pod vplyvom promótoru. V mnohých obvyklých prokaryotických expresných vektoroch je požadovaný proteín exprimovaný v spojení (fúzaný) s takzvaným bielkovinovým nosičom. Na tento účel je vo vektore za promótorom lokalizovaná kódujúca sekvencia pre bielkovinový nosič, priamo priľahlá k miestu, kam môže byť pripojený (ligovaný) požadovaný DNA fragment. Fúzané proteíny sú často oveľa stabilnejšie a ľahšie sa rozoznávajú lebo izolujú. Ustálený stav, ktorý môže dosiahnuť konkrétny fúzaný proteín v určitom bakteriálnom kmeni, sa líši od fúzie k fúzii a od kmeňa ku kmeňu. Zvyčajne sa skúšajú rôzne kombinácie.

Eukaryotická expresia glykoproteínu gE-génu

Aj keď prokaryotická expresia proteínov poskytuje niektoré výhody, proteíny postrádajú modifikácie ako napr. glykozylácie a pod., ku ktorým dochádza v eukaryotických bunkách. Výsledok je, že proteín exprimovaný v eukaryotoch je často oveľa vhodnejší antigén. Na heterológnu expresiu proteínov v eukaryotických bunkách, ako napr. myšiacích, sa používajú eukaryotické expresné vektory. Tieto vektory sú plazmidy, ktoré nie sú množiteľné len v *E. coli*, ale udržia sa nažive tiež v eukaryotických bunkách. Okrem prokaryotického selekčného markeru obsahujú tiež eukaryotický selekčný marker. Analogicky k prokaryotickým expresným vektorom, eukaryotické expresné vektory obsahujú úsek promótoru, za ktorý môžu byť vkladané (ligované) požadované gény. Ale sekvencie promótoru v eukaryotických vektoroch sú špecifické pre eukaryoty. V eukaryotických vektoroch sa fúzia s bielkovinovými nosičmi používa len zriedka. Tieto vektory sú zavedené do eukaryotických buniek pomocou štandardnej transfekčnej metódy (F. L. Graham, A.J. van der Eb, 1973, Virology 52, 456-467). Okrem eukaryotických plazmidových vektorov sú tiež vírusové vektory, kde heterológny gén je zavedený do genómu vírusu (napr. retrovírusy, herpesvírusy a vírus vakcinie). Eukaryotické bunky môžu potom byť infikované rekombinantnými vírusmi.

Všeobecne nemôžeme predpovedať, ktorý vektor a bunkový typ sú najvhodnejšie pre konkrétny génový produkt. Väčšinou sa skúša niekoľko kombinácií.

Eukaryotická expresia obidvoch glykoproteínov gE a gI

Konečná štruktúra, ktorú získa proteín, závisí od jeho primárnej sekvencie aminokyselín, jeho zvinutia či rozloženia (folding), potranslačných modifikácií atď. Dôležitý faktor, ktorý prispieva ku štruktúre proteínu, je jeho interakcia s jedným alebo viac inými proteínmi. Zistili sme, že tiež glykoproteín gE vírusu BHV-1 vytvára komplex s prínajmenším jedným iným glykoproteínom: glykoproteínom gI vírusu BHV-1. Prvá známka takého komplexu sa objavila v našich výsledkoch s testovanými anti-gE monoklonálnymi protilátkami (Mabs) 1, 51, 67, 75 a 78 (pozri tabuľka 2). Tieto Mabs nereagovali s Difivacom-1 ani s Lam gE, ale tiež zlyhali pri rozpoznaní 3T3 buniek exprimujúcich glykoproteín gE. Ale, tieto Mabs reagovali s gE-exprimujúcimi 3T3 bunkami po infekcii Difivacom-1, preukazujúc, že pre tieto Mabs sú potrebné doplnujúce faktory dodávajúce glykoproteínu gE vlastnú antigénnu konformáciu. V niektorých našich rádio-imunoprecipitačných pokusoch s Mab 81 sme našli koprecipitáciu proteínu s molekulovou hmotnosťou 63 kD. Vzhľadom na fakt, že glykoproteín gE vírusu herpes simplex tvorí komplex s proteínom s porovnateľnou molekulovou hmotnosťou (HSV1 glykoproteín gI), sme usudzovali, že glykoproteín gE vírusu BHV-1 tvorí komplex s homológom glykoproteínu gI vírusu BHV-1. Na štúdium tohto komplexu gE/gI vírusu BHV-1 a na produkciu antigénu gE s vhodnou antigénnou štruktúrou sme exprimovali obidva glykoproteíny v jednej eukaryotickej bunke. Použili sme rovnaké procedúry, aké boli opísané na eukaryotickú expresiu glykoproteínu gE samotného. Jediný predpoklad navyše je použitie expresných vektorov s odlišnými eukaryotickými selekčnými markermi.

Sérologické testy

Sérologické metódy vhodné na rozlišovanie medzi dobytkom očkovaným Difivacom-1 a dobytkom infikovaným divokým typom vírusu BHV-1 na báze protilátok proti gE sú založené na použití monoklonálnych protilátok namierených proti gE. Tieto môžu byť použité nasledujúcimi spôsobmi:

a) podľa princípu, ktorý publikovali Van Oirschot et al. (Journal of Virological methods 22, 191-206, 1988). V tejto metóde ELISA na detekciu gI protilátok proti vírusu Aujeszkyho choroby sú protilátky demonštrované blokujúcim účinkom na reakciu dvoch monoklonálnych protilátok (Mabs), ktoré majú dva odlišné epitopy na gI. Test sa vykonáva nasledovne. Mikrotitračné doštičky sú potiahnuté (coated) Mab 1, cez noc v 37 °C, a potom sú uskladnené, napr. v 4 °C alebo v -20 °C. Vyšetrované sérum je preinkubované s antigénom v oddelených nepotiahnutých mikrotitračných doštičkách, napr. 2 hodiny v 37 °C. Doštičky potiahnuté Mab 1 sú premyté, napr. 5-krát, a potom je na tieto doštičky pridaná Mab 2 spojená s chrenovou peroxidázou (HRPO). Potom je na doštičky prenesená preinkubovaná zmes sérum-protilátka, v ktorej sú lokalizované dve Mabs, všetko nasledované inkubáciou, napr. 1 hodinu pri 37 °C. Doštičky sú potom odmyté a do každej jamky je pridaný substrát. Po napr. 2 hodinách v izbovej teplote sú doštičky hodnotené spektrofotometricky. 4 negatívne kontrolné séra a 4 sériové riedenia pozitívneho séra sú zahrnuté na každej doštičke. Sérum, ktoré má hodnotu optickej denzity (OD) menej ako 50 % priemernej hodnoty OD 4 negatívnych kontrolných sér, ktoré boli vyšetrené na rovnakej doštičke, sa považuje za pozitívne.

b) Podľa princípu IDAS (Nepriamy sendvič dvojitej protilátky, Indirect Double Antibody Sandwich). Tu sú mikrotitračné doštičky potiahnuté Mab alebo polyklonálnym sérom namiereným proti proteínu gE. Inkubácia s gE-antigénom

má za následok naviazanie gE na potiahnuté jamky. Protilátky špecificky namierené proti gE vo vyšetrovanom bovinom sére sa potom viažu na gE. Tieto naviazané protilátky sú rozpoznané konjugátom anti-bovinného imunoglobulínu. Protilátky v tomto konjugáte sú kovalentne viazané na enzým peroxidázu. Nakoniec je naviazaný konjugát zviditeľnený pridaním chromogénneho substrátu. Špecifická reakcia je kontrolovaná vykonaním rovnakej procedúry s gE-negatívnou kontrolou miesto prípravku s gE-antigénom. Na každej mikrotitračnej dosičke sú tiež pozitívne a negatívne kontrolné séra. Test je platný, ak pozitívne sérum je pozitívne v určitom riedení. Sérum je pozitívne, ak zaznamenáme OD, ktorá je o 0,2 vyššia ako štandardné negatívne kontrolné sérum.

c) Podľa princípu IDAS, ktorý je opísaný v b), ale po inkubácii vyšetrovaného séra sa použije anti-gE Mab/HRPO miesto konjugátu anti-bovinného imunoglobulínu. Anti-gE peptidové sérum alebo anti-gE polyklonálne sérum môže byť použité miesto anti-gE Mab. Doštičky sú premyté a do každej jamky je pridaný chromogénny substrát. Po napr. 2 hodinách v izbovej teplote sú doštičky odčítané spektrofotometricky. Každá doštička obsahuje štyri negatívne kontrolné séra a štyri rádivé riedenia pozitívneho séra. Sérum, ktoré má hodnotu OD menšiu ako 50 % priemernej hodnoty OD 4 negatívnych kontrolných sér vyšetrovaných na rovnakej doštičke, je považované za pozitívne.

d) Podľa princípu blokujúcej ELISA, kde je vírusovým antigénom, ktorý môže alebo nemusí byť purifikovaný, potiahnutá cez noc mikrotitračná doštička.

e) Podľa princípu blokujúcej ELISA, kde je vírusovým antigénom, ktorý môže alebo nemusí byť purifikovaný, cez noc potiahnutá mikrotitračná doštička. Na týchto doštičkách je vyšetrované sérum inkubované napr. 2 hodiny alebo dlhšie pri teplote 37°C. Po premývacej procedúre je na doštičky pridaná anti-gE Mab a nasleduje inkubácia napr. 1 hodinu pri 37°C. Miesto anti-gE Mab môže byť použité anti-gE peptidové sérum alebo anti-gE polyklonálne sérum. Doštičky sú premyté a do každej jamky je pridaný chromogénny substrát. Po napr. 2 hodinách pri izbovej teplote sú doštičky spektrofotometricky hodnotené. Každá doštička obsahuje štyri negatívne kontrolné séra a štyri rádivé riedenia pozitívneho séra. Sérum, ktoré má hodnotu OD menšiu ako 50 % priemeru hodnôt OD štyroch negatívnych kontrolných sér vyšetrovaných na rovnakej doštičke, je považované za pozitívne.

Vo všetkých opísaných úpravách môže byť použitý konvenčne vypestovaný vírusový antigén, ktorý obsahuje gE, ale rovnako tak gE-antigén, ktorý je exprimovaný prokaryotmi alebo eukaryotmi. Alebo by mohli byť použité miesto konvenčného antigénu v opísaných diagnostických testoch oligopeptidy založené na sekvencii gE vírusu BHV-1. Navyše by také polypeptidy mohli byť použité na vývoj takzvaných "cow-side" testov podľa princípu, ktorý opísali Kemp et al., Science 241, 1352-1354, 1988. Taký test by potom bol založený na väzbe antigénnej sekvencie oligopeptidu s protilátkami namierenými proti gE, prítomným v infikovaných zvieratách. Na taký test by mal byť oligopeptid spojený s Mab namierenou proti boviným erytrocytom.

Analýza nukleových kyselín s použitím polymerázovej reťazovej reakcie

Oligonukleotidy (sondy a priméry) môžu byť použité napríklad v polymerázovej reťazovej reakcii, aby sme rozlíšili očkované a infikované zvieratá. Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je technika, pomocou ktorej nukleové kyseliny patogénu môžu byť v krátkom čase milióny násobne namnožené (De polymerase kettingreactie, P.F. Hilderink,

J.A. Wagenaar, J.W.B. van der Giessen and B.A.M. van der Zeijst, 1990, Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 115, 1111-1117). Oligonukleotidy gE môžu byť vybrané tak, že v genóme pozitívnom v gE sa tvorí odlišný produkt ako v genóme negatívnom v gE. Výhoda toho je, že tiež zviera, ktoré bolo očkované gE delečnou vakcínou dáva pozitívny signál v PCR teste. Ale tento prístup závisí od prítomnosti vírusových nukleových kyselín vo vzorke, napr. krvi, pochádzajúcej z testovaného zvieraťa.

Po akútnej BHV-1 infekcii je veľká šanca, že nukleové kyseliny špecifické pre BHV-1 môžu byť preukázané v krvi, ale zatiaľ ešte nebolo zistené, či nukleové kyseliny BHV-1 môžu byť preukázané v krvi tiež počas latencie.

Použitie BHV-1 ako vektora

Na expresiu heterológnych génov v genóme BHV-1 je nevyhnutelné mať k dispozícii presné informácie o oblasti, kam má byť vložený heterológny gén. Nemalo by dôjsť k žiadnemu porušeniu nevyhnutelných sekvencií a tiež regulačné sekvencie musia byť dostupné na expresiu heterológneho génu. V zásade je gén pre glykoproteín gE vhodným miestom na expresiu heterológnych génov. gE-gén nie je nevyhnutelný, preto nie je námietok k jeho nahradeniu. heterológnym genómom. Teda heterológny gén môže byť umiestnený tak, že bude pod vplyvom regulačných sekvencií génu gE. Ale nie je nevyhnutelné použiť regulačné sekvencie gE génu. Expresia heterológnych génov môže byť riadená eventuálne inými, napr. silnejšími regulačnými sekvenciami odlišných génov. Je tiež možné pripojiť heterológny gén k exportnému signálnemu peptidu génu gE, takže môže byť ovplyvnená sekrécia produktu heterológneho génu. Je teda jasné, že detailná znalosť génu a proteínu gE poskytuje možnosť využiť BHV-1 ako vektor. Vyvinuté vektory môžu navyše byť sérologicky odlišné od divokého typu. Konštrukcia mutantov BHV-1, ktoré exprimujú heterológne gény môže byť vykonaná rovnakým spôsobom ako konštrukcia gE delečných mutantov ukázaná v príkladoch. Ale delečné fragmenty by potom mali byť nahradené fragmentom, na ktorom je lokalizovaný heterológny gén v mieste delécie.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1

Analýza podľa Southerna (Southern blot) vírusových BHV-1 kmeňov Difivac-1 a Iowa

A. Kresba autorádiogramu Southernovho blotu genómovej DNA vírusu Difivac-1 a Iowa. V radoch 1 a 3 bola použitá DNA Difivac-1 po štepení restriktčným enzýmom HindIII a PstI. V radoch 2 a 4 bola použitá DNA Iowa po štepení restriktčným enzýmom HindIII a PstI. Veľkosť fragmentov je udaná v kilobázach (kb).

Vírusová DNA bola izolovaná centrifugáciou tkanivového média (70 ml/kultivačná fľaša pribl. 450 cm³) s vírusom infikovanými Ebtr bunkami po 2 hodiny na 25 % (w/w) sacharózovom gradiente, v 10mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl a 1mM EDTA v 20 krpm v rotore Beckman SW27 ultracentrifúgy L5-65. Z takto získanej vírusovej pelety bola izolovaná DNA podľa štandardných metód (J. Sambrook, E.F. Fritsch a T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Táto DNA bola štepená restriktčnými enzýmami od Boehringer Mannheim v SuRE-cut pufroch dodaných výrobcom.

Po separácii v 0,7 % agarózovom géli pri horizontálnej elektroforéze a prenesení na nitrocelulózový filter (Schle-

cher & Schuell, Inc.) bol filter prehybridizovaný 6 hodín vo 42°C v 50% formamide, 3x SSC 1x SSC = 0,15 M NaCl a 0,015 M Na citrát, pH 7,4), 50 µl denaturovanej salmon sperm DNA (Sigma)/ml a 0,02 % boviný sérový albumín, 0,02 % polyvinyl pyrrolidón a 0,02 % ficoll a 0,1 % Na dodecylsulfát (SDS). Potom bola urobená hybridizácia pridaním ³²p dCTP (Amersham) inakčeným HindIII K fragmentom do toho istého roztoku. (Výber HindIII K fragmentu je založený na: Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain), John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOrt, Alphonso R. Campbell and David A Reed, Journal of Virology (1983) 259-264). Po 12-14 hodinách hybridizácie bol filter premytý po 2 hodiny v 0,1 % SDS a 0,1 x SSC v 60 °C. HindIII K fragment bol klonovaný vo vektore pUC18 podľa štandardných klonovacích procedúr (J. Sambrook, E.F. Fritsch a T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Po HindIII štiepení pUC/8,4 HindIII klonu bol separovaný vektor pUC18 od 8,4 kb HindIII K fragmentu znova elektroforeticky v 0,7 % agarózovom géle s nízkym (low melting) teplotou topenia (BRL, Lime Technologies, Inc.) a izolovaný z agarózy štandardnou fenolovou extrakciou a etanolovou precipitáciou. Izolovaný HindIII K fragment bol označený pomocou kitu Random Primed DNA Labeling Kit 1004.760 od Boehringer Mannheim. Autorádiografia hybridizovaných filtrov bola vykonávaná počas 36-hodinovej expozície Kodak XAR filmu v -70 °C, s použitím odrážacej clony.

B. Fyzikálna mapa 8,4 kb veľkého HindIII K fragmentu z Iowa a 7,4 kb Hind III fragmentu z Difivac-1. Vzhľadom na komigráciu 6 kb PstI fragmentov a neprítomnosti 1,8 kb PstI fragmentu v Difivac-1 sa dá predpokladať delécia v šrafovej oblasti.

Obrázok 2

Subklonovanie fragmentov BHV-1 divokého v oblasti chýbajúcej v Difivac-1

V A sú ukázané časti genómu BHV-1: unikátna dlhá (U_L) oblasť; unikátna krátka (U_S) oblasť a dve opakované oblasti (repeats Ir a Tr). Táto mapa je založená na publikovanej analýze kmeňa Cooper (John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOrt, Alphonso R. Campbell a David A. Reed, Journal of Virology (1983) 259-264).

V B sú ukázané fragmenty z U_S oblasti, ktoré boli klonované v prokaryotických vektoroch: A 15,2 kb EcoRI fragment v pACYC, 8,4 kb Hind III fragment v pUC18 a 2,7 kb a 4,1 kb EcoRI-HindIII fragment v pBR322. Izolácie fragmentov vírusovej DNA boli vykonané postupmi, ktoré sú v legendách obrázku 1A. Klonovanie týchto fragmentov v rôznych vektoroch bolo vykonané podľa štandardných procedúr (J. Sambrook, E.F. Fritsch a T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

V C je ukázaná fyzikálna mapa oblasti, kde je lokalizovaná predpokladaná delécia v Difivac-1.

V D sú vyznačené niektoré subklony tejto oblasti, ktoré boli použité na ďalšie analýzy. Dva PstI fragmenty boli klonované v pKUN19 a zostávajúce fragmenty v pUC18.

Obrázok 3

A: Nukleotidová sekvencia 2027 nukleotidov z U_S oblasti BHV-1 kmeňa Lam v okolí predpokladaného miesta, ktoré bolo deletované v Difivac-1, ako je vyznačené v obr. 2C (z AluI miesta extrémne naľavo k HincII miestu extrémne napravo). Nukleotidová sekvencia inzertov subklonov zobrazená na obr. 2D bola určená analýzou oboch vlá-

kien dideoxy-sekvenačnou metódou Sangera et al. (F. Sanger, S. Nicklen a A.R. Coulson, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Na to bol použitý sekvenačný kit T7 od Pharmacia a postup podľa výrobcu. Na rádioaktívne značenie bol použitý [35S] dATP (Amersham). Sekvenčná analýza oblastí bohatých na GC s kompresnými artefaktmi bola opakovaná s 7-deaza-dGTP variantom sekvenčného kitu Pharmacia. Pod nukleotidovou sekvenciou je vyznačená v trojpísmennom kóde sekvencia aminokyselín (aa) otvoreného čítacieho rámca 575 aa rezidui, ktorá bola nájdená po teoretickej translácii nukleotidovej sekvencie. Táto translácia je založená na univerzálnom kóde a bola vykonaná počítačovým programom PC/gene (PC/gene verzia 1.03, november 1987). Tento otvorený čítací rámec 575 sa začína metionínom v nt 168 a končí stop- kodónom v nukleotide 1983.

Štruktúrna analýza otvoreného čítacieho rámca 575 aa rezidui bola tiež vykonaná počítačovým programom PC/gene. Prvých 26 aa tvorí eukaryotický exportný signál označený v obrázku ako "signálny peptid". So skóre 6,2 sa dá predpovedať štiepenie tejto signálnej sekvencie medzi aa 26 a aa 27. Sekvencia 575 aa má 3 možné N-glykozylačné miesta (NXT/S) vyznačené líniou pod aminokyselinovými reziduami. Podľa metódy podľa Raa a Argose je medzi aa 423 a aa 450 transmembránová oblasť, označená na obrázku "transmembránová skrutkovica". Rozpoznávacie sekvencie pre reštrikčné enzýmy AsuI, Sma I, HindIII a EcoNI sú podčiarknuté. Vypočítaná molekulárna hmotnosť tohto polypeptidu je 61212.

B: Schématické znázornenie štruktúrnych charakteristik zmieneného otvoreného čítacieho rámca dlhého 575 aa.

Obrázok 4

Porovnanie sekvencie aminokyselín génu gE vírusu BHV-1 so sekvenciou aminokyselín génu gE vírusu herpes simplex (HSV) a s ostatnými homológmi génu gE [gI vírusu pseudorabies (PRV) a gPI vírusu varicella-zoster (VZV)]

Sekvencie použité na toto porovnanie pochádzajú z nasledujúcich publikácií: HSV: Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplexvirus type 1. D.J. McGeoch, A. Dolan, S. Donald a F.J. Rixon (1985) Journal Mol. Biol. 181, 1-13. VZV: DNA sequence of the Us component of the varicella-zoster virus genome. A.J. Davidson (1983), EMBO Journal 2, 2203-2209. PRV: Use of lambda-gt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simplex virus and varicella-zoster virus glycoproteins. E.A. Petrovskis, J.G. Timmins a L.E. Post (1986) Journal of Virology 60, 185-193. Tieto sekvencie boli porovnané s použitím programu Multalin pre sekvenčnú analýzu (F. Corpet, 1988, Nucl. Acids Res. 16, 10881-10890).

V diagrame A sú schématicky znázornené všetky štyri sekvencie aminokyselín. Tu sú pod každou sekvenciou vyznačené predpokladané transmembránové časti (TM). Okrem predpovedaných exportných signálnych sekvencií (SP) s možnými N-glykozylačnými miestami (I) sú ukázané dve konzervatívne oblasti, v ktorých je často stabilná relatívna pozícia cysteinových rezidui (C C C).

V B sú ukázané výsledky porovnania oblastí bohatých na centrálne lokalizovaný cysteín štyroch verzií gE, získané programom Multalin. Hviezdičky označujú identické aminokyseliny a dvojbodky analogické aminokyseliny.

Obrázok 5

Kresba fotografií získaných analýzou kmeňov Difivac-1 a Iowa podľa Southerna

Panel A: Genomická DNA z vírusu Dificac-1 a Iowa, štepená restriktívnymi enzýmami BstI (1, 2), EcoRI (3, 4) a HindIII (5, 6) separovaná na 0,7 % agarózovom géli, prenesená na nitrocelulózu a hybridizovaná s ³²P značeným HindIII K fragmentom BHV-1 kmeňa Lam podľa postupov špecifikovaných v legendách obrázku 1A.

Panel B: Nitrocelulóзовý blot toho istého gélu ako v A hybridizovaný s BHV-1 gE-špecifickou sondou p318. Táto sonda obsahuje celú AluI-HincII oblasť vyznačenú v obr. 2C.

Obrázok 6

Konštrukcia gE delečného fragmentu BHV-1

V A sú ukázané pozície génu gE a použitých klonov. Súčasťou genómu BHV-1 sú: unikátna dlhá (U_L) oblasť; unikátna krátka (U_S) oblasť a dva repeaty (IR a TR). Aby sa získala oblasť lokalizovaná na 5' strane génu gE, bol v miestach SmaI a PstI plazmidu pUC18 subklonovaný 1,4 kb PstI-SmaI fragment z 8,4 kb HindIII K fragmentu z BHV-1 kmeňa Lam. Tento klon bol nazvaný p515 a je ukázaný v B. V unikátnom AsuII mieste p515 bol klonovaný EcoNI-SmaI fragment lokalizovaný na 3' strane gE, pochádzajúci z 4,1 kb HindIII-EcoRI klonu. Aby bolo možné pripojiť zvyšok EcoNI ku zvyšku AsuII, bol klon p515 štepený s AsuII, ošetrovaný Klenow enzýmom (Boehringer Mannheim) a dCTP kvôli získaniu jedného cytozínového rezídua v AsuII zvyšku podľa štandardných metód (Sambrook et al., 1989). Tento prídavný cytozín je označený hviezdičkou v D. Potom bol tiež štepený p515 enzýmom SmaI, aby mohol byť vnesený EcoNI fragment do tohto vektoru. Takto vytvorený klon bol nazvaný p519.

Obrázok 7

A. Kresba fotografie získanej analýzou Southernova blotu izolátov DNA z IB7, IB8 a 2H10. DNA izolácie, štiepenie restriktívnymi enzýmami, blotovanie a hybridizácie boli vykonané podľa procedúr opísaných v legendách obr. 1A. Po PstI-DraI dvojitoštepnení izolátov DNA IB7, IB8 a 2H10 boli fragmenty separované na 0,7 % agarózovom géli a následne prenesené na nitrocelulóзовý filter. Tento filter bol hybridizovaný s ³²P dCTP značeným 2,3 kb PstI-DraI delečným fragmentom ako sondou. V líniiach 1 až 3 boli separované vzorky IB7, IB8 a 2H10, resp. V línii 4 bola použitá DNA divokého typu BHV-1 kmeňa Lam a v línii 5 delečný fragment 2,3 kb.

B. Fyzikálna mapa 15,2 kb EcoRI fragmentu BHV-1 kmeňa Lam. Mapa ukazuje pozície PstI, DraI a HindIII rozpoznávacích miest a pozíciu hybridizačnej sondy zmienenéj v 7A.

Obrázok 8

Prokaryotická expresia gE vírusu BHV-1

K prokaryotickej expresii gE vírusu BHV-1 bol fúzaný 600 bp SmaI fragment génu gE v troch čítacích rámcoch ku kódujúcej oblasti génu pre glutatión-S-transferázu zo Schistosoma japonicum vo vektore pGEX-2T (D. B. Smith a K.S.Johnson, Gene 67 (1988) 31-40). Rekombinantné molekuly s vhodnou (syn) orientáciou SmaI fragmentu boli identifikované pomocou restriktívnej analýzy s použitím štandardných metód. E. coli DH5a klony s týmto fúzaným konštruktom boli nazvané pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 a pGEX-2T600s3.

A. Diagram jedného z pGEX-2T600s konštruktov. Na NH₂ strane oblasti, ktorá kóduje GST-gE fúzaný produkt, je lokalizovaná oblasť pre tac promótor indukateľný izopropylthiogalaktozidom (IPTG).

B. Kresba fotografií získaných analýzou Western blotu celkových proteínových izolátov buniek DH5a transformovaných pGEX-2T600s. Celonočné kultúry buniek DH5a transfekovaných pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 a pGEX-2T600s3 pokračovali v 1/10 Luria-Bertani (LB) médiu s 50 µg/ml ampicilínom a po 1 hodine bol rast indukovaný IPTG po 5 hodín. Tieto indukované kultúry boli centrifugované 5 min. v 6 000xg a spojené s 1x vrstviacou zmesou (2 % SDS, 10% glycerol, 5% merkaptotanol a 0,01% bromofenol blue) [1,5 ml kultúry sa spojí s 500 µl zmesi] a zahriate na 95 °C 5 minút. Potom bolo separované 50 µl na jednu dráhu na vertikálnom 12,5 % polyakrylamidovom géli, podľa štandardných procedúr a následne prenesené (Semi-dry blotted) na nitrocelulóзовý filter s použitím systému LKB-multiphor II Nova Blot podľa podmienok stanovených výrobcom.

V dráhach M bol použitý predom naľadený markerový proteín (BRL Life Technologies, Inc. 236k, 112k, 71k, 44k, 28k, 18k a 15k) a v dráhach 1, 2 a 3 celkové proteínové izoláty z buniek DH5a transfekovaných konštrukmi s tromi zodpovedajúcimi rámcami: pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 a pGEX-2T600s3.

Na paneli A je vidieť výsledok analýzy Western blotu s anti-GST sérom. K tomu bol filter inkubovaný podľa štandardných procedúr (E. Harlow a D. Lane, 1988, Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) v blokujúcom pufri (PBS + 2 % sušené mlieko a 0,05 % Tween 20) a následne s polyklonálnym anti-GST králičím sérom. Potom bol filter premytý a inkubovaný so sérom obsahujúcim kozí protikráličí imunoglobulín konjugovaný s chrenovou peroxidázou (HRPO). Potom boli chromogénom (diaminobenzidín, chloronaphtol a H₂O₂)-imunochemicky detekované naviazané kozie protilátky. GST fúzaný produkt, ktorý je označený šípku má predpokladanú veľkosť približne 47 k len v rámci 3.

Na pane l: B je vidieť výsledok analýzy Western blotovania s monoklonálnou protilátkou Mab 4, ktorá rozpoznáva gE proteín. K tomu bol blokovaný dvojitoštepnený filter ako v paneli A inkubovaný s Mab, premytý a inkubovaný s HR-PO konjugovaným králičím protimýšiacim sérom. Potom boli naviazané králičie protilátky imunochemicky detekované chromogénom. Pruhy, ktoré je viditeľné v rade 3 (rámec 3) je 47k veľký a je označený šípku.

Obrázok 9

Konštrukcia plazmidu pEVHisgE na eukaryotickú expresiu génu gE vírusu BHV-1

Na eukaryotickú expresiu génu gE bola klonovaná celá gE kódujúca oblasť v správnej orientácii za HCMV promótorovou oblasťou expresného vektoru pEVHis s použitím štandardných procedúr (Sambrook et al. 1989). K tomu bol klonovaný 394 bp AluI fragment začínajúci 55 bp pred otvoreným čítacím rámcom gE v pUC18 a nazvaný p201. Potom po naštepení p201 enzýmom HincII bol do p201 klonovaný 1740 bp HincII fragment, ktorý zahŕňa väčšiu časť génu gE. To viedlo k plazmidu p318, ktorý v polylinkeri pUC18 obsahuje celú gE kódujúcu oblasť od AluI miesta 55 bp pred počiatočným kodónom gE do HincII miesta 133 bp za stop-kodónom gE. S použitím restriktívnych miest v polylinkeri vektore bol tento fragment vyštepnený z p318 enzýmami BamHI a SphI. Najskôr bol p318 štepený SphI a potom bolo SphI miesto vyplnené s použitím Klenowovej polymerázy a dNTP. Po štepení BamHI bol 1,9 kb inzert separovaný z vektora pUC18 v agaróze s nízkou teplotou topenia a ligovaný do vektora pEVHis, ktorý bol k tomu naštepený BamHI a EcoRV. Takto vytvorený plazmid bol nazvaný pEVHisgE.

Obrázok 10

Poloha gE-špecifických primérov a sondy pre metódu PCR na detekciu DNA vírusu BHV-1

Na obrázku je ukázaná sekvencia nukleovej kyseliny glykoproteínu gE vírusu BHV-1 od nukleotidu 1272 do 2027 (sekvencia bola prevzatá z obr. 3). Použité priméry pre gE-špecifickú techniku PCR boli nazvané P₃ a P₄. Miesta viažuce priméry P₃ a P₄ sú podčiarknuté. Nukleotidová sekvencia P₃ je 5'-ACG-TGG-TGG-TGC-CAG-TTA-GC-3' (SEQ ID NO: 2). Nukleotidová sekvencia P₄ je (komplementárna k sekvencii viažucej primér určenej vyššie) 5'-ACC-AAA-CTT-TGA-ACC-CAG-AGC-G-3' (SEQ ID NO:3). Sonda, ktorá bola použitá na hybridizáciu Southern blotu na detekciu DNA amplifikovanej v PCR, je 137 bp TaqI fragment lokalizovaný medzi miestami viažucimi priméry, konce tohto fragmentu sú označené. Na porovnanie s obr. 3 sú tiež označené miesta HindIII a EcoNI.

Obrázok 11

Mapovanie gE delécie vo víruse Difivac-1

A ukazuje fyzikálnu mapu 15,5 kb EcoRI fragmentu divokého typu BHV-1 kmeňa Lam. B ukazuje fyzikálnu mapu 14, 5 kb EcoRI fragmentu Difivac-1. Obe EcoRI fragmenty pokrývajú kompletne unikátne krátke oblasti genómov príslušných vírusov. Pozícia génu gE a predpokladaná pozícia génu gI boli označené otvorenými rámcami. Mapy A a B sú umiestnené tak, že 6 kb PstI fragmenty v každej mape sa prekrývajú. V oboch mapách vnútorne (internal repeat) a koncové opakované sekvencie (terminal repeat) boli označené šrafovanými rámcami. Šípky pod opakovanými sekvenciami označujú orientáciu týchto sekvencií.

V A je označená časť U_S oblasti, ktorá chýba v kmeni Difivac-1.

C ukazuje pozície klonovaných fragmentov Difivac-1 použitých na mapovanie delécie gE a na získanie fyzikálnej mapy ukázanej v B. Šípky pod inzertami klonov p728, p737 a p754 označujú oblasti, ktoré boli sekvenované na určenie rekombinačného miesta.

Skratky:

A = AluI, E - EcoRI, P = PstI, H - HindIII, r = miesto rekombinácie, IR - vnútorná opakovaná sekvencia, TR - koncová opakovaná sekvencia.

Obrázok 12

Určenie presného miesta rekombinácie v oblasti U_S vírusu Difivac-1

Na určenie presných hraníc gE delécie nájdené v kmeni Difivac-1 boli sekvenované klon p754 a konce klonov p728 a p737. Inzerty týchto klonov boli označené na obrázku 11. Použité sekvenačné procedúry boli opísané v legendách obrázku 3.

V A je ukázaná sekvencia väčšiny AluI-PstI fragmentu. Táto sekvencia začína v oblasti promótoru génu gE. Predpokladaný TATA rámeček je podčiarknutý. V bode r (=miesto rekombinácie) je táto promótorová oblasť fúzovaná so sekvenciou tiež nájdenou na náprotivnom mieste oblasti U_S nazvanej: invertovaná opakovaná sekvencia (repetícia). Presné miesto rekombinácie bolo určené porovnaním opakovanej sekvencie nájdené v gE promótorovej oblasti s kópiou opakovanej sekvencie nájdené na náprotivnom mieste oblasti U_S. Bod, kde sa tieto sekvencie rozchádzajú, je označený v B (bod I) 'r'. Podobné porovnanie bolo vykonané s gE promótorovou sekvenciou nájdenou v Difivac-1 a gE promótorom nájdeným v divokom type kmeňa Lam. Bod, kde sa tieto sekvencie rozchádzajú je ukázaný v B

(pod II) a tiež označený 'r'. Nájdené rekombinačné miesta sú totožné.

Obrázok 13

Čiastočná sekvenčná analýza génu gI BHV-1

S použitím 1,8 kb PstI klonu BHV-1 kmeňa Lam, ktorý zasahuje do oboch génov gE a gI vírusu BHV-1 (pozri obr. 11), bola určená sekvencia 284 nukleotidov v kódujúcej oblasti BHV-1 gI. Použité sekvenačné procedúry boli opísané v legendách obrázku 3. Sekvencia bola preložená univerzálnym kódom počítačovým programom PC/gene, verzia 1.03 (november 1987). Sekvencia aminokyselín zakódovaná druhým čítacím rámcem je uvedená v jednopísmennom kóde pod nukleotidovou sekvenciou. Táto aminokyselinová sekvencia je homológna ku kódujúcej oblasti iných homológov gI vírusov herpes (pozri obr. 14).

Obrázok 14

Porovnanie čiastočnej aminokyselinovej sekvencie predpokladaného génu gI vírusu BHV-1 so zodpovedajúcimi časťami kódujúcej oblasti génu gI vírusu herpes simplex (HSV1), génu gp63 vírusu pseudorabie (PRV) a génu gpIV vírusu varicella-zoster (VZV).

Sekvencia PRV začína v aminokyseline 82, HSV1 sekvencia začína v aa 80 a sekvencia VZV začína v aa 76 príslušných kódujúcej oblasti. Použité sekvencie boli publikované v článkoch zmienených v legendách obrázku 4. Porovnanie bolo vykonané s použitím počítačového programu Multalin. Hviezdičky označujú identické aminokyseliny a dvojbodky označujú analogické aminokyseliny.

Obrázok 15

Konštrukcia plazmidu MSVneoGI na eukaryotickú expresiu génu gI vírusu BHV-1

Na základe porovnania aminokyselín čiastočnej sekvencie génu gI BHV-1, bola určená predpokladaná poloha génu gI. Z tohto určenia sa dá usudzovať, že 1,7 kb SmaI fragment by mohol obsahovať kompletnú kódujúcu oblasť génu gE BHV-1. Pozícia tohto 1,7 kb SmaI fragmentu je označená v A. K tupým koncom tohto 1,7 kb SmaI fragmentu boli s použitím štandardných procedúr ligované BamHI linkery. Výsledný produkt bol štepený BamHI a ligovaný do eukaryotického expresného vektora MSV-neo. MSV-neo vektor má unikátne BamHI miesto za MSV-LTR, ktoré má silnú promótorovú aktivitu. Tento vektor bol opísaný v práci Rijsewijk et al., 1987 EMBO J. 6, 127-131.

Obrázok 16

Konštrukcia gI/gE dvojitého delečného fragmentu BHV-1

Poloha glykoproteínového génu gE a predpokladaná poloha glykoproteínového génu gI v U_S oblasti BHV-1 sú zobrazené v diagrame A. Šrafované bloky označujú opakované sekvencie, ktoré ohraničujú U_S oblasť. B ukazuje fyzikálnu mapu miest niektorých hlavných restriktčných enzýmov sa zreteľom na pozíciu oboch génov. Ku konštrukcii gI/gE delečného fragmentu je klon p1,7-SmaI/o obsahujúci 1,7 kb SmaI fragment, ktorý zahrnuje gén gI, štepený PstI. PstI miesto zostávajúceho 350 bp SmaI-PstI inzertu bude vytvorené s tupými koncami s použitím štandardných molekulárne biologických procedúr. EcoNI-SmaI fragment (pozri obr. 6B), izolovaný z 4,1 kb HindIII-EcoRI fragmentu opísaného v obrázku 6A, je tiež vytvorený s tupými koncami a ligovaný k modifikovanému PstI miestu. Toto je znázornené v C a D. Z výsledného klonu p-delta-IE môže byť izolovaný 1,4 kb SmaI-DraI fragment na rekombináciu s DNA divokého typu BHV-1.

Skratky:

E = EcoRI, H = HindIII, S = Sma I, P = PstI, ENI = EcoNI,
D = DraI, kb = kilobáza, Us = unikátna krátka sekvencia.

Obrázok 17

Priemerné nazálne vylučovanie vírusu teľatami po očkovaní: = očkované Difivac-1, 0 = neočkovaná kontrola.

Obrázok 18

Priemerný denný klinický stav teľiat po teste (challenge) virulentným kmeňom BHV-1, kľúč ako v obr. 17.

Obrázok 19

Priemerná rektálna teplota teľiat testovaných virulentným kmeňom BHV-1, kľúč ako v obr. 17.

Obrázok 20

Priemerný rast teľiat po teste virulentným kmeňom BHV-1, kľúč ako v obr. 17.

Obrázok 21

Priemerné nazálne vylučovanie vírusu teľatami po teste virulentným kmeňom BHV-1, kľúč ako v obr. 17.

Obrázok 22

Priemerná rektálna teplota teľiat po teste virulentným kmeňom BHV-1,
= očkované Lam gE⁻, očkované Lam gE⁻/TK⁻, x = neočkovaná kontrola.

Obrázok 23

Priemerný rast teľiat po teste virulentným kmeňom BHV-1, kľúč ako v obr. 22.

Obrázok 24

Priemerný denný klinický stav teľiat po teste virulentným kmeňom BHV-1, kľúč ako v obr. 22.

Príklady uskutočnenia vynálezu

1. Izolácia a identifikácia prírodného gE delečného mutantu;

a) Izolácia prírodného mutantu

Genomická DNA bola izolovaná z radu konvenčne atenuovaných vakcín podľa štandardných metód a analyzovaná s použitím reštrikčných enzýmov. Konkrétne sme pátrali po genomických odchýlkach, ktoré by boli vhodné na rozlíšenie od divokého typu BHV-1.

Konkrétne bola pozornosť namierená na oblasť Us genómu vírusu BHV-1, pretože v tejto oblasti - analogicky s vírusom herpes simplex - je pravdepodobne lokalizovaný rad génov kódujúcich neesenciálne glykoproteíny (Identification of a herpes simplex virus 1 glycoprotein gene within a gene cluster dispensable for growth in cell culture, R. Longnecker, S. Chatterjee, R.J. Whitley a B. Roizman (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4303-4307).

Po veľkom počte pasáží na bunkách bovinej embryonálnej obličky a bunkách bovinej embryonálnej trachey (Ebtr) bolo preukázané, že súbor vakcín BHV-1, pochádzajúci z Univerzity Záhreb, Jugoslávia (Lugovic et al., Veterinarski Arhiv 55, (241-245, 1985), má okrem normálnej Us oblasti tiež odlišnú Us oblasť. Táto vakcína nadto vytvárala aj veľké aj malé plaky na Ebtr bunkách. Z tejto zmiešanej populácie bol tromi konečnými riediacimi krokmi izolovaný vírus s odlišnou Us oblasťou, keď boli každý raz vybrané malé plaky. Vírus izolovaný touto cestou bol

ďalej skúmaný a nazvaný Difivac-1. bol uložený v Institut Pasteur, Paríž, Francúzsko, 27. mája 1992, pod číslom I-1213.

b) Identifikácia delécie v géne gE vírusu Difivac-1

K ďalšej analýze tejto odchýlky v oblasti Us bola izolovaná genomická DNA vírusu Difivac-1 podľa štandardných metód a podrobená analýze prenosom (blotom) podľa Sutherna (obr. 1A). Hybridizácia tohto blotu s ³²p značenými HindIII k fragmentom divokého typu potvrdila, že tento fragment lokalizovaný centrálne v Us oblasti je asi o 0,1 kilobázy (kb) kratší v Difivac-1. Navyše bola touto analýzou približne zistená pozícia chýbajúcej časti (obr. 1B). K ďalšej analýze tejto delécie bola izolovaná Us oblasť divokého kmeňa Lam a klonovaná v prokaryotických vektorech. Nakoniec bola izolovaná podľa štandardných metód genomická DNA, kmeňa Lam (obr. 2A) a kolonovaná vo vektorech pUC18, pACYC a pBR322 (obr. 2b). Bola vytvorená fyzikálna mapa oblasti okolo predpokladaného miesta delécie (obr. 2C). Na základe tejto fyzikálnej mapy boli konštruované vo vektorech pKUN19 a pUC18 subklony vhodné na určenie nukleotidovej sekvencie tejto oblasti (obr. 2D). S použitím týchto subklonov bola určená Sangerovou metódou nukleotidová sekvencia oboch reťazcov celej oblasti (ukázané na obr. 20). Táto nukleotidová sekvencia (SEQ OD NO:1) bola analyzovaná s použitím programu PC/Gene. Na základe počítačovej translácie sa ukázalo, že nukleotidy (nt)165 až 1993 kódujú otvorený čítací rámec 575 aminokyselín (obr. 3A). Ďalšia analýza ukázala, že táto sekvencia aminokyselín má charakteristiku transmembránového glykoproteínu, ako je ukázané na obr. 3B. Faktom je, že oblasť prvých 26 aminokyselín (aa) je rozpoznávaná ako typický eukaryotický exportný signál a oblasť medzi aa 423 a aa 450 je rozpoznávaná ako transmembránová oblasť. Navyše sa v tejto sekvencii objavili tri potenciálne N-glykozylačné miesta. Takto predpovedaná sekvencia aminokyselín má jasnú podobnosť s génom pre glykoproteín gE vírusu herpes simplex (HSV); pozri obr. 4A a 4B. Tieto a iné podobnosti oprávajú záver, že nájdený gén je gE homológ vírusu BHV-1. Z tohto dôvodu je gén nazývaný gE. Na určenie toho, do akej miery chýba tento gE gen vírusu BHV-1 vo víruse Difivac-1, bol izolovaný fragment p318. Fragment p318 začína v AluI mieste 55 nt pred otvoreným čítacím rámcom predpokladaného gE a končí 133 nt za ním. S týmto p318 fragmentom bola analyzovaná s použitím Southernovej hybridizácie genomová DNA vírusu Difivac-1. Tak sa zistilo, že Difivac-1 neobsahuje žiadnu p318 detekovateľnú sekvenciu (obr. 5). Tento experiment potvrdil, že Difivac-1 obsahuje deléciu a jasne demonštruje, že táto delécia zaujíma celý gén gE.

Na určenie veľkosti a pozície deletovanej oblasti boli v prokaryotických vektorech klonované genomové sekvencie pokrývajúce oblasť Us vírusu Difivac-1, pozri obr. 11C. EcoRI fragment s veľkosťou 14,5 kb bol klonovaný vo vektore pACYC a pomenovaný p775. HindIII fragment s veľkosťou 7,4 bol nazávisle klonovaný vo vektore pUC18 a nazvaný p728. Z klonu p728 boli izolované dva subklony: PstI fragment veľkosti 1,4 kb v klone p737 a AluI-PstI fragment veľkosti 350bp v klone p754. Analýza týchto klónov reštrikčnými enzýmami a blotmi podľa Sutherna (dáta nie sú ukázané) dokázala, že delécia gE v Difivac-1 je 2,7 kb dlhá, začína práve od 5'konca génu gE a končí na hranici Us oblasti. Týchto 2,7 kb je nahradených duplikáciou 1 kb segmentu, lokalizovaného v oblasti Us opačne ku génu gE, ako aberantná extenzia opakovanej (repeat) oblasti, pozri obr. 11B. K potvrdeniu výsledkov tejto analýzy a na určenie presného miesta rekombinácie bola určená nukleotidová

sekvencia väčšej časti inzertu klonu p754 a porovnaná so sekvenciami divokého typu, pozri obr. 12. Táto analýza ukázala, že miesto rekombinácie je lokalizované 77 bp proti-smerne (upstream) od počiatočného kodónu génu gE.

c) Hodnotenie bezpečnosti a účinnosti vírusu Difivac-1

Difivac-1 bol testovaný v BHV-1 séronegatívnych teľatách, starých 7 týždňov, neobsahujúcich špecifický patogén. 8 teľat bolo intranazálne očkovaných 10^5 TCID₅₀ po 2 ml, každému bol rozprášaný 1 ml do každej nozdry. 8 BHV-1 séronegatívnym teľatám starým 7 týždňov, bez zistenia špecifického patogénu, ktoré boli umiestnené v oddelenej izolačnej jednotke, boli intranazálne podané 2 ml média s kultúrou a slúžili ako neočkované kontroly. 5 týždňov po vakcinácii vakcinované a kontrolné teľatá boli intranazálne testované 10^7 TCID₅₀ vysoko virulentného kmeňa BHV-1 Iowa. 6 týždňov po teste všetky teľatá boli ošetrované intramuskulárne Dexamethasonom po 5 dní kvôli reaktivovaniu predpokladaného latentného vírusu. Boli monitorované klinické príznaky, rektálne teploty a telesný rast. Z nazálnych výterov boli robené izolácie vírusu, v sére boli určované titry neutralizačných protilátok.

Správanie, chuť k jedlu, rektálne teploty a tempo rastu teľat zostalo po vakcinácii normálne, ale vakcinované teľatá mali trochu serózný výtok z nosa a mierne zvýšené slinenie. Nebolo pozorované poškodenie nazálnej sliznice. Po vakcinácii bol Difivac-1 vylučovaný z nazálnych výterov (obr. 17). Všetky očkované teľatá produkovali neutralizačné protilátky k BHV-1.

Po teste všetky neočkované kontrolné teľatá prejavovali apatiu, stratu chuti k jedlu, očný a nosný výtok, začervenie d'asna dolnej čeluste, vážne poškodenia nosnej sliznice až do 14 dní po teste a zástavu rastu o 4 dni. Očkované teľatá mali malé, rýchlo sa hojace poškodenia nosnej sliznice a nemali spomalený rast. Denné klinické výsledky, rektálna teplota a rastový vývoj po teste sú udané na obrázkoch 18, 19 a 20. Po teste vylučovali vírus nosom všetky teľatá, ale množstvo a čas exkrécie vírusu boli u očkovaných teľat zreteľne znížené (obr. 21). U očkovaných teľat sa vyvinula sekundárna protilátková odpoveď a všetky neočkované teľatá produkovali protilátky po teste.

Po reaktivácii bol testovaný vírus izolovaný z jedného očkovaného teľaťa a z 5 neočkovaných. Difivac-1 nemohol byť reaktivovaný.

Uvedené výsledky demonštrujú, že Difivac-1 sotva vyvolal akýkoľvek príznak choroby u mladých teľat a nebol schopný reaktívácie. Difivac-1 význačne znížil vážnosť ochorení a intenzitu exkrécie vírusu po teste.

Dá sa povedať, že Difivac-1 je bezpečná a účinná vakcína, ktorá môže byť použitá u dobytky proti infekciám BHV-1.

2. Konštrukcia rekombinantných gE delečných mutantov vírusu BHV-1

Aby boli k dispozícii odlišiteľné vakcíny BHV-1, ktoré sú molekulárne lepšie definované ako Difivac-1 a ktoré, pokiaľ by bola taká požiadavka, obsahujú deléciu napr. v géne pre tymidínkinázu okrem delécie v gE géne, boli okrem Difivac-1 vytvorené rekombinantné gE delečné mutanty. gE delečné fragmenty mohli byť vytvorené za predpokladu určenia polohy génu pre glykoproteín gE a s použitím klonovaných fragmentov DNA, ktoré ohraničujú (flank) gE gén. S použitím štandardnej techniky (F. L. Graham a A.J. van der Eb, 1973, Virology 52, 456-467) mohol byť tento delečný fragment vložený do genómu divokého typu vírusu BHV-1, čo viedlo k vytvoreniu gE delečného mutantu.

a) Konštrukcia gE delečného fragmentu

Na konštrukciu gE delečného fragmentu bol vybraný fragment, ktorý na jednej strane postráda celú sekvenciu gE a na druhej strane obsahuje dostatočnú ohraničujúcu (flanking) sekvenciu, aby dovolila rekombináciu s genómom divokého typu. Na 5'(upstream) konci bol vybraný fragment PstI-AsuII veľký 1,2 kb, ktorý končí 18 nukleotidov pred počiatočným kodónom gE génu. Na 3' (downstream) konci bol vybraný 1,2 kb EcoNI-DraI fragment, ktorý začína 2 nt pred koncovým kodónom gE génu (obr. 6).

Na vytvorenie gE delečného fragmentu bol v SmaI a PstI mieste plazmidu pUC18 subklónovaný 1,4 kb PstI-SmaI fragment pochádzajúci z 8,4 kb HindIII K fragmentu BHV-1 kmeňa Lam, lokalizovaný v 5' mieste génu gE. Tento klon bol nazvaný p515. EcoNI-SmaI fragment, lokalizovaný v 3' mieste gE pochádzajúci zo 4,1 kb HindIII-EcoRI klonu, bol klonovaný v unikátnom AsuII mieste p515. Takto bola dovŕšená konštrukcia delečného fragmentu gE a klon takto vytvorený bol nazvaný p519. Aj keď by v princípe celý PstI-SmaI inzert p519 mohol byť použitý ako gE delečný fragment, nedá sa to doporučiť. Fakt je, že PstI-SmaI zasahuje približne 100-150 bp do opakovanej sekvencie, ktorá ohraničuje oblasť Us. Tento úsek 100-150 bp by mohol rekombinovať s opakovanou sekvenciou na jednej strane Us oblasti, kde nie je lokalizovaný gén gE, a mohol by tak poskytovať nežiaduce rekombinačné produkty. Z tohto dôvodu bol na rekombinačný pokus vybraný PstI-DraI fragment, takže 100 bp opakovanej sekvencie bolo odstránených.

b) rekombinácia gE delečného fragmentu s genómom divokého typu vírusu BHV-1

Aby sa uskutočnila rekombinácia medzi vytvoreným gE delečným fragmentom a genómom divokého typu BHV-1, kotransfekcia buniek embryonálnej bovinnej trachey (Ebtr) mikrogramovým množstvom oboch DNA molekúl sa uskutočňuje podľa štandardnej metódy, ktorú opísali F.L. Graham a A.J. van der Eb (1973, Virology 52, 456-467). Bunkové mechanizmy rekombinácie vedú k rekombinácii malého percenta DNA molekúl (2-4 %), ktoré boli prijaté bunkami. Na selekciu rekombinovaných gE delečných mutantov je vírusová zmes, ktorá vznikne po transfekcii, vysiata na tkanivovú kultúru Ebtr. Vo väčšine prípadov takto vzniknú oddelené vírusové populácie (plaky), ktoré pochádzajú z jedného vírusu. Na izoláciu gE delečných mutantov BHV-1 kmeňa Lam bolo 230 týchto plakov izolovaných a vyšetrovaných podľa štandardných imunologických metód s BHV-1 špecifickými monoklonálnymi protilátkami (Mabs), ktoré nereagujú s bunkami infikovanými Difivac-1. Tieto Mabs sú namierené priamo proti glykoproteínu gE. 5 z 230 plakov nereagovalo s týmito Mabs. Ďalej bola vyšetrovaná tiež DNA týchto plakov.

c) DNA analýza vytvorených gE delečných mutantov vírusu BHV-1 kmeňa Lam

DNA izolované zo 3 (1B7, 1B8 a 2H10) zmienených 5 možných gE delečných mutantov boli ďalej vyšetrované s použitím štandardnej techniky blotu podľa Southerna (Sambrook et al. 1989). Dvojité štiepenie týchto DNA s PstI a DraI, nasledované gélovou elektroforézou a hybridizáciou Southernovho blotu s 2,3 kb PstI-DraI delečným fragmentom ako sondou ukazuje, že gén gE genómu vírusovej populácie 1B7 a 1B8 bol požadovaným spôsobom presne odstránený; pozri obr. 7A a 7B. Populácia 2H10 má odlišný PstI-DraI fragment. Hybridizácie Southernových blotov s gE-špecifickou sondou ukazujú, že žiadne gE sekvencie nie sú lokalizované v akomkoľvek z troch DNA izolátov (vý-

sledky nie sú ukázané). BHV-1 vírusové populácie 1B7 a 1B8 sú zamýšľané rekombinantné gE delečné mutanty. Populácia 1B7 vírusu BHV-1 bola testovaná na vlastnosti vakcíny.

d) Vytvorenie dvojitych delečných mutantov tymidínkináza/gE

Pretože rekombinantné delečné mutanty BHV-1 s deléciou len v jednom gène by nemuseli mať dostatočne redukovanú virulenciu, boli tiež zvažované delécie v tymidínkinázovom (TK) gène BHV-1 kmeňa Lam a Harberink. Tieto mutanty boli vytvorené analogickým spôsobom k zmienenému spôsobu použitému pre gE delečné mutanty (výsledky nie sú ukázané). Tieto TK delečné mutanty boli použité na vytvorenie TK/gE dvojitych delečných mutantov.

e) Vytvorenie dvojitych glykoproteín gl/glykoproteín gE delečných mutantov

Pretože dobytok očkovaný jednoduchým gE delečným mutantom, môže produkovať anti-gl protilátky, ktoré môžu interferovať s detekciou protilátok anti gl/gE (diskutované nižšie), vyrobili sme tiež vakcínu s gl/gE dvojitou deléciou. Taký gl/gE dvojitý delečný mutant môže byť vytvorený s použitím rovnakých procedúr použitých ku konštrukcii gE jednoduchého delečného mutantu. Čiastočná nukleotidová sekvenčná analýza protismerného (upstream) konca 1,8 kb PstI fragmentu - ktorý pokrýva 5' koniec gE génu - odhalila otvorený čítací rámec s významnou homológiou ku gl homológom nájdeným pri iných herpesvírusoch, pozri obrázky 13 a 14. S použitím 350 bp SmaI-PstI fragmentu, ktorý zahŕňa predpokladaný koniec gl génu, a EcoNI-SmaI fragmentu lokalizovaného po smeru (downstream) od génu gE, môže byť vytvorený gl/gE delečný fragment. Tento fragment môže rekombinovať s genómom divokého typu za vzniku gl/gE delečného mutantu BHV-1, pozri obrázok 16. 80-90 aminokyselín, ktoré - teoreticky - môžu ešte vzniknúť, nebudú schopné vytvoriť protilátky, ktoré môžu interferovať s detekciou anti-gl/gE protilátok. Ďalšia sekvenčná analýza génu gl umožní vytvorenie gl delécie, ktorá pokryje kompletnú kódujúcu oblasť gl. Tento gl/gE dvojitý delečný mutant bol pomenovaný Difivac-1E.

f) Hodnotenie bezpečnosti a účinnosti mutantov Lam gE⁻ a Lam gE⁻,TK⁻

Vlastnosti vakcíny Lam gE⁻ a Lam gE⁻,TK⁻ mutantných kmeňov BHV-1 boli testované na teľatách, starých 7 týždňov, BHV-1 séronegatívnych, neobsahujúcich špecifický patogén. Každý mutantný kmeň bol intranazálne rozprášený 6 teľatám. Každému teľatu bola daná celková dávka 10^5 TCID₅₀ vo 2 ml média s kultúrou, do každej nozdrý bol rozprášený 1 ml. Iným 6 teľatám bolo intranazálne vstreknuté tkanivové médium bez vírusu a slúžili ako neočkované kontroly. 5 týždňov po vakcinácii všetky teľatá, vakcinované a kontrolné, boli intranazálne testované s 10^7 TCID₅₀ vysoko virulentného kmeňa BHV-1 Iowa. Po očkovaní a po teste boli monitorované klinické príznaky, rektálne teploty a telesná váha.

Správanie, chuť k jedlu, rektálne teploty a tempo rastu teľiat po vakcinácii zostali normálne. Serózný nazálny výtok a malé poškodenia nazálnej sliznice boli pozorované u všetkých očkovaných teľiat. Vírus mohol byť izolovaný z nosov očkovaných teľiat po približne 7 dňoch (tabuľka 1).

Po teste všetky neočkované kontrolné teľatá prejavovali apatiu, stratu chuti k jedlu, očné a nosný výtok, začervnenie dásna dolnej čeľuste, vážne poškodenie nosnej sliznice a bol spomalený rast. Všetky teľatá očkované Lam gE⁻,TK⁻ mali nejaký nosný výtok a menšie poškodenie nosnej sliznice. Nie všetky teľatá očkované Lam gE⁻ mali nosný výtok

alebo poškodenie nosnej sliznice. Apatie, strata chuti k jedlu alebo iné klinické príznaky ochorenia u očkovaných teľiat neboli pozorované. Rektálna teplota, rast a klinické výsledky po teste sú ukázané na obr. 22, 23 a 24. Neočkované teľatá vylučovali vírus nosom dva razy dlhšie ako očkované teľatá (tabuľka 1).

Uvedené výsledky preukazujú, že mutantné kmene Lam gE⁻ a Lam gE⁻,TK⁻ vírusu BHV-1 sotva vyvolali akýkoľvek príznak choroby u mladých teľiat. Obe dva mutantné kmene zamedzili chorobe po teste a znížili obdobie nazálneho vylučovania vírusu o 50 %.

Mutantné kmene Lam gE⁻ a Lam gE⁻,TK⁻ vírusu BHV-1 sú bezpečné a účinné na použitie ako vakcína u dobytky proti BHV-1 infekciám.

3. Prokaryotická expresia gE

K prokaryotickej expresii génu pre glykoproteín gE vírusu BHV-1 boli vytvorené vektory založené na zatiaľ užívaných expresných vektoroch pGEX (D. B. Smith a K.S. Johnson, Gene 67 (1988) 31-40). Vektory pGEX kódujú bielkovinný nosič glutatión S-transferázu (GST) zo Schistosoma japonicum, ktorý je pod vplyvom promótoru tac, ktorý môže byť indukovaný k expresii izopropyltiogalaktózidom (IPTG). Príklad GST-gE fúzaného proteínu je produkt konštruktu pGEX-2T600s3 (obr. 8A). V tomto konštrukte bol, s použitím štandardných molekulárno-biologických techník (Sambrook et al. 1989) 600 bp veľký SmaI fragment, ktorý kóduje N-terminálnu oblasť 200 aminokyselín gE proteínu, pripojený za gén GST. Tento konštrukt bol navrhnutý v troch variantoch, každý raz s odlišným čítacím rámcom 600 bp fragmentu, ktorý bol pripojený k GST. Všetky 3 konštrukty boli zavedené do Escherichia coli, kmeňa DH5a, indukované s IPTG a vytvorené proteíny boli prenesené na nitrocelulózu po elektroforéze na polyakrylamidovom géli pomocou Western blotu. Imunologická detekcia s anti-GST protilátkami preukázala, že len vlastný čítací rámec (č. 3), ktorý kóduje proteínovú oblasť gE, vedie k expresii fúzaného proteínu predpokladanej veľkosti 27k (GST) + 20k (gE) - 47 k. Tri z Mabs nami izolovaných, ktoré nereagujú s Difivac-1, rozoznávajú 47 kD GST-gE fúzaný proteín vo Western blote; pozri obrázok 8B.

4. Eukaryotická expresia génu pre glykoproteín gE

Pro eukaryotickú expresiu génu pre glykoproteín gE bol už skôr inter alia vybraný vektor pEVHis. Vektor pEVHis má ako eukaryotický marker gén HisD kódujúci histidinol dehydrogenázu [EC 1.1.1.23] (C. Hartmann a R. Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8047-8051), ktorý umožňuje bunkám prežiť toxickú koncentráciu 2,5 mM histidinolu. Vektor navyše obsahuje promótorovú oblasť bezprostredného včasného génu ľudského cytomegalovírusu (HCMV) s unikátnymi reštrikčnými miestami lokalizovanými za ním. K vytvoreniu pEVHis/gE expresného vektoru bol použitý fragment zahrnujúci celú kódujúcu oblasť génu pre glykoproteín gE. Začína v AluI mieste 55 bp pred predpokladaným otvoreným čítacím rámcom gE a končí 133 bp za ním. Táto oblasť bola klonovaná za HCMV promótor vektoru pEVHis, pomocou ktorého bol vytvorený konštrukt pEVHis/gE (obr. 9). pEVHis/gE bol rozmnožený v bunkách DH5a E. coli a prečistený pomocou céziumchloridového gradientu (Sambrook et al., 1989). Táto purifikovaná DNA bola transfekovaná do Balb/C-3T3 buniek podľa metódy Grahama a van der Eba. Transformované bunky boli selektované histidinolom, po ktorého aplikácii bolo izolovaných 20 histidinol-rezistentných kolónií. Tieto kolónie boli vyšetrené s Mab

81 pomocou imunologického testu s peroxidázou na monovrstve (Immuno Peroxidase Monolayer Assay - IPMA). V štyroch kolóniách bola preukázaná expresia proteínu gE. Z týchto štyroch kolónií boli použité bunky 3T3 gE klón 9 na izoláciu subklonu, ktorý mal vysokú expresiu gE. Klon izolovaný touto metódou (nazvaný 3T3gE 9, 5) bol použitý na bližšie určenie možných anti-gE monoklonálnych protilátok.

5. Eukaryotická expresia oboch glykoproteínov gE a gI vírusu BHV-1 v jednej bunke

Na expresiu glykoproteínu gI vírusu BHV-1 v jednej bunke spoločne s glykoproteínom gE vírusu BHV-1 sme najskôr určili predpokladanú pozíciu génu gI vo víruse BHV-1. Pretože gén pre glykoproteín gI vírusu herpes simplex je lokalizovaný práve protismerne od génu pre glykoproteín gE, dalo sa predpokladať, že gén gI BHV-1 by mohol byť lokalizovaný v zodpovedajúcej pozícii. Aby sa toto preukázalo, bola určená sekvencia oblasti 283 nukleotidov, lokalizovaná približne 1 kb protismerne od začiatku génu gE vírusu BHV-1. Teoretická translácia tejto oblasti ukázala, že druhý čítací rámec kóduje 94 aminokyselín a ich sekvencia je homológna s glykoproteínom gI vírusu herpes simplex (obrázky 13 a 14). Pretože homológny segment je asi 80 aminokyselín od počiatočného kodónu, predpokladaný začiatok otvoreného čítacieho rámca génu gI vírusu BHV-1 môže byť asi 250 nt protismerne od sekvenovanej oblasti. Z tohto bolo odvodené, že 1,7 kb SmaI fragment, ktorý začína 400 nt protismerne od sekvenovanej oblasti a končí v géne gE by mohol obsahovať kompletnú kódujúcu oblasť génu gI vírusu BHV-1. Tento 1,7 kb SmaI fragment bol klonovaný v eukaryotickom vektore MSV-neo (pozri obr. 15). Tento vektor obsahuje silný promótor vírusu myšacieho sarkómu a selekčný gén neo, ktorý kóduje rezistenciu proti antibiotiku G-418 sulfátu Geneticin. Výsledný konštrukt MSVneoGI bol množený v bunkách E. coli DH5a a bol transfekovaný do 3T3gE 9,5 buniek s použitím metód Grahama a van der Eba. Transfektované bunky boli selektované v tkanivovom médiu s 400 µg Geneticinu/ml a rezistentné kolónie boli izolované a testované s možnými anti-gE Mabs, ktoré zlyhali v reakcii s 3T3gE 9,5 bunkami. Z toho sme vybrali 3T3gE/gI R20 klon, ktorý reagoval napr. s Mab 66 a tiež s divokým typom BHV-1.

6. Charakterizácia možných anti-gE monoklonálnych protilátok (Mabs)

Mabs boli produkované proti divokému typu vírusu BHV-1 a selektované na ich neschopnosť reagovať s bunkami embryonálnej bovínnej trachey (Ebtr) infikovanými vírusom Difivac-1. Tieto Mabs boli vyšetrené na reaktivitu s:

- a) Lam gE- delecijným mutantom;
- b) s opísaným prokaryotickým expresným produktom vo Western blote;
- c) s opísanými gE-expresnými bunkami Balb/c-3T3;
- d) bunky zmienené za c) a infikované Difivac-1 a
- e) Balb/c-3T3 bunky exprimujúce gE/gI komplex.

Na reaktivitu testovanú v a), c), d) a e) bol použitý test imunoperoxidázovej monovrstvy (IPMA). Výsledky v tabuľke 2 ukazujú, že sa vytvárali Mabs, ktoré boli namierené proti gE (čísla 2, 3, 4, 52, 66, 68, 72 a 81) a Mabs (čísla 1, 51, 53, 67, 75 a 78), ktoré môžu byť namierené proti štruktúrnym antigénym doménam na gE/gI komplex. Antigénne domény rozpoznávané rôznymi Mabs pri kompetitívnej IPMA indikovali, že prinajmenšom 4 antigénne domény sú prítomné na glykoproteíne gE a že jedna domé-

na je pravdepodobne tvorená komplexom gE/gI (tabuľka 2).

Detekcia protilátok anti-gE u dobytká infikovaného BHV-1

Na vyšetrenie toho, či sú v sére infikovaného dobytká prítomné protilátky proti gE, bol použitý nepriamy blokujúci test IPMA so 16 možnými gE-Mabs a nasledujúcimi 8-mi vybranými sérami:

- 2 séra hovädzieho dobytká očkovaného Difivac-1 a testovaného virulentným kmeňom Iowa, ktoré boli zbierané 14 dní po teste;
 - 2 séra hovädzieho dobytká experimentálne infikovaného vírusom BHV-1 subtypom 1, ktoré boli zbierané 20 mesiacov po infekcii. Jedno zviera bolo infikované kontaktnou expozíciou;
 - 2 séra hovädzieho dobytká experimentálne infikovaného vírusom BHV-1 subtypom 2b, ktoré boli zbierané 20 mesiacov po infekcii. Jedno zviera bolo infikované kontaktnou expozíciou;
 - sérum teľaťa bez špecifického patogénu očkovaného ts mutantnou vakcínou a testovaného 3 týždne neskôr vírusom BHV-1 subtypom 2b, ktoré bolo zbierané 7 týždňov po teste;
 - sérum gnotobiotického teľaťa očkovaného ts mutantnou vakcínou a testovaného 3 týždne neskôr vírusom BHV-1 subtypom 2b, ktoré bolo zbierané 7 týždňov po teste.
- Tabuľka 2 ukazuje, že všetky tieto séra obsahovali protilátky proti antigénym doménam III a IV na gE a proti antigénnej doméne I, ktorá je pravdepodobne lokalizovaná na komplex gE/gI. Môžeme potvrdiť, že gE sa javí ako vhodný sérologický markerem na rozlíšenie medzi dobytkom infikovaným BHV-1 a dobytkom očkovaným.

7. Detekcia BHV-1 nukleových kyselín pomocou procedúry PCR a primérov špecifických pre gE vírusu BHV-1

Na základe určenej nukleotidovej sekvencie génu gE vírusu BHV-1 bol vybraný pár primérov vhodný pre PCR s použitím programu na výber primérov od Lowe et al. (T. Lowe, J. Sharefkin, S. Qi Yang a C.W. Dieffenbach, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 1757-1761). Tieto priméry boli nazvané P₃ a P₄ a sú ukázané na obr. 10. Priméry sú lokalizované 159 nt od seba a vedú k amplifikácii fragmentu 200 nt. Použitím primérov P₃ a P₄ a izolovanej DNA vírusu BHV-1 boli optimalizované podmienky pre metódu PCR. To znamená najmä variácie v koncentrácii MgCl₂, koncentrácii glycerolu a v podmienkach na cyklovanie. Bol nájdený optimálny pufer na použitie P₃ a P₄ k amplifikácii DNA BHV-1, jeho zloženie je 10 mM Tris pH 8,0, 50 mM KCl, 0,01% želatína, 2,6 mM MgCl₂ a 20 % glycerol. Optimálne podmienky na cyklovanie (Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler) sú pre cykly 1-5: 1 min. 98 °C, 30 sec. 55 °C a 45 sec. 72 °C a pre cykly 6-35: 30 sec. 96 °C, 30 sec. 55 °C a 45 sec. 72 °C. Po amplifikácii PCR bol získaný DNA fragment dlhý 200 nt podrobený elektroforéze v 2 % agarózovom géli, prenesený blotovaním na nitrocelulózu a následne podrobený analýze Southernovou hybridizáciou. Značená sonda ³²P dCTP použitá na Southernovú analýzu je 137 bp TaqI fragment, ktorý je lokalizovaný medzi miestami, kde sa viažu priméry (obr. 10). Po autoradiografii hybridizovaného filtra môže byť pozorovaný prúžok zodpovedajúci dĺžke 200 bp. Táto amplifikácia pŕuhých 10 BHV-1 genómov (pribl. 1,5 x 10⁻¹⁵ µg DNA) vedie k dostatočne detekovateľnému signálu (výsledok nie je ukázaný). Porovnateľným spôsobom bola vyvinutá metóda PCR používajúca priméry, ktoré sú založené na kódujúcej sekvencii glykoproteínu gIII vírusu BHV-1 (D. R. Fitzpatrick, L.A. Babiuk a T. Zamb, 1989, Virology 173, 46-57).

Aby bolo možné rozlíšiť medzi DNA divokého typu BHV-1 a gE delečnou mutantnou vakcínou, obidve DNA vzorky boli podrobené obidvom PCR analýzám

- špecifickej pre gE a špecifickej pre gIII. V takom teste sa našiel izolát DNA Difivac-1 gIII pozitívny a gE negatívny. Pretože detekcia DNA vírusu BHV-1 v býčom semene bude dôležitým využitím BHV-1 špecifickej PCR procedúry, bola pokusne vykonaná PCR špecifická pre gE na býčom semene infikovanom BHV-1. Neznáme komponenty v semene však majú silný inhibičný účinok na polymerázovú reťazovú reakciu. Preto bol vyvinutý protokol na izoláciu DNA BHV-1 z býčieho semena. Na izoláciu DNA z býčieho semena je 30 µl semena inkubovaných s 1 mg/ml proteínázy K (pK) v celkovom objeme 300 µl 0,15M NaCl, 0,5 % Na-Sarkosylu a 40 mM DIT pri 60 °C. Po 1 hodine je vzorka ochladená na izbovú teplotu a je pridané 300 µl 6M NaI a inkubuje sa 5 min. Z tejto zmesi je DNA izolovaná štandardnou chloroform/ izoamylalkoholovou extrakciou a precipitovaná jedným objemom izopropanolu. Precipitát je omytý 2,5 M NH₄Ac/70 % etanolom a resuspendovaný v 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 % Tween 80 a 0,1 mg/ml pK na druhú inkubáciu jednu hodinu v 60°C. Tento izolát DNA môže byť priamo podrobený polymerázovej reťazovej reakcii.

TABUĽKA 1

Nazálne vylučovanie vírusu tetračami po očkovaní Lam gE⁻ lebo Lam gE⁻/TK⁻ a po teste virulentným BHV-1 kmeňom týchto očkovaných a kontrolných teliat

Skupina	Priemerný počet dní nazálneho vylučovania vírusu	
	Po očkovaní	Po teste
Kontrola	0	10,33 ± 1,51
Lam gE ⁻	7,00 ± 0,89	4,83 ± 1,17
Lam gE ⁻ /TK ⁻	7,17 ± 1,33	5,17 ± 0,98

TABUĽKA 2

Charakteristika gE-Mabs

Mab	REAKTIVITA MOŽNEJ gE-Mab S:						
	Difivac-1 3T3/ EBTR	Lam gE ⁻	Prok.	3T3 gE Difivac-1	3T3 gE gE/gI	Ag sku- pina	Ab doby- tok
1	-	-	nd	-	+	?	I
2	-	-	+	+	+	+	II
3	-	-	+	+	+	+	?
4	-	-	+	+	+	+	?
42	-	-	nd	-	-	?	V?
51	-	-	nd	-	+	+	III
52	-	-	+	+	+	+	?
53	-	-	nd	-	-	+	III
59	-	-	nd	-	-	+	III
66	-	-	nd	+	+	+	III
67	-	-	nd	-	+	+	III
68	-	-	-	+	+	+	IV
72	-	-	-	+	+	+	V
75	-	-	nd	-	+	?	I
78	-	-	nd	-	+	?	nd
81	-	-	-	+	+	+	II?

+: Všetkých 8 testovaných sér dosahuje v napriamej blokujucej IPMA viac ako 50% účinku.
±: Séra dosahujú blokujuce percento ± 50%.
-: Séra dosahujú blokujuce percento < 50%.

VÍRUS SERVENIE

Číslo SERVENIE (SEQ ID) C15.: 1
Dĺžka: 2027 nukleotidov, 575 aminokyselín
TYP: nukleotidy a aminokyseliny
TYP VLÁKNA: jednoduché

AGGAGGAG GTTGGAGGCG CCGAGGCGCG CCGGTTGTTT AAATGGTTCT CCGGCGGCTC	60
GTGTTTCAC AGCGGCGAG AAGGAGGCGG AGCTTGGCTG CCGTGTTCAC CCGAGGCGCG	120
TTTCGGGAA CCGGCGGCGG GAGAGGCTTC GAAAGGCGCA TTTCGCA	180
ATG CAA CCG ACC GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	240
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg	300
SIGNÁLNY PEPTID	
CGG CAG TTA TTG CTT TTC GCG CTS ARG GCG GAG GCG AAG CCG GCG ACC	360
Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Ala Lys Phe Thr Ala Thr	420
SaaI	
GAA ACC CCG GCG TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACC GCG CCG GCT	480
Gla Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala	540
GCG GCG CCG GTC TTT CTC CCA GCG CCG GCG CCG CCG GCG GTC GCG	600
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg	660
GCG GTT CCG GCG TCG ACC GTC GTC GCG GCG GCG GCG TCG CCG CCG GTC	720
Ala Val Arg Gly Tyr Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val	780
CTG GAG CCG GTC TCG CTT CAC GAC CCG GAG CCG GTC ACC GAC GTC GCG	840
Phe Gln Pro Val Cys Leu Asp Asp Arg Gly Cys Phe Thr Asp Val Ala	900
CTG GAC GCG CCG TCG CCG CCA ACC GCG CCG GTC GCG CCG CCG CCG ATC	960
Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile	1020
GCG GAG CCG CCG GAG CCG CCG GAC TCA ACC GCG GAG AAA GAG TTT GTT	1080
Ala Gln Leu Ala Gln Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val	1140
PvuII	
CTG GCG CCG CCG GAC GTC TCG GCG GAG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG	1200
Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Ala Ala Thr Gly	1260
GTG CCG ATC GCG CCG GCG GCG GAG GAG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG	1320
Val Leu Ile Ala Ala Ala Ala Gly Asp Gly Gly Val Tyr Phe Leu	1380
TAC GAG CCG CCG ATC GTC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG	1440
Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Gln Glu Thr Gln Leu Ala	1500
CTG ACC CCG GCG CCG ACC GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	1560
Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp	1620
GAG GAG AAG GAA CCA GCG ACC GCG CCG ACC CCG CCG CCG CCG CCG CCG	1680
Glu Gln Arg Gly Pro Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro Pro His	1740
CGC ACC ACC ACA CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	1800
Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg Arg Ala Gly Ala Arg Phe Arg	1860
GTG CCG TAC CAC TTC CAG GTA TAC ACC CCG CCG GAT TTC TTC CCG	1920
Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu	1980
CTA TCG GTG CCG CCG CCG CAG TCT GAG TTT TTC GAG GAG GCT CCG TTC	2040
Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser	2100
GCG ACC ATC CAG TCG TAC TTC CCG ACC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG	2160
Ala Ser Ile Asp Tyr Tyr Phe Leu Arg Tyr Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu	2220
ATC CCG ATA CAG ACC GCG CCG GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	2280
Ile Arg Ile Tyr Gln Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys	2340
CTG CAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG	2400
Leu His Pro Ala Asp Ala Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser	2460
GAG ACC GTT TAC ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	2520
Glu Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	2580
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	2640
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	2700
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	2760
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	2820
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	2880
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	2940
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3000
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	3060
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3120
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	3180
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3240
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	3300
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3360
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	3420
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3480
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	3540
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3600
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	3660
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3720
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	3780
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3840
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	3900
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	3960
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	4020
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	4080
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	4140
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	4200
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	4260
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	4320
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	4380
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	4440
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	4500
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	4560
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	4620
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	4680
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	4740
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	4800
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	4860
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	4920
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	4980
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	5040
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	5100
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	5160
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	5220
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	5280
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	5340
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	5400
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	5460
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	5520
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	5580
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	5640
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	5700
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	5760
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	5820
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	5880
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	5940
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6000
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	6060
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6120
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	6180
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6240
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	6300
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6360
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	6420
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6480
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	6540
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6600
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	6660
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6720
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	6780
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6840
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	6900
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	6960
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	7020
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	7080
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	7140
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	7200
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	7260
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	7320
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	7380
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	7440
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	7500
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	7560
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	7620
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	7680
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	7740
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	7800
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	7860
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	7920
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	7980
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	8040
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	8100
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	8160
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	8220
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	8280
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	8340
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	8400
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	8460
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	8520
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	8580
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	8640
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	8700
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	8760
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	8820
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	8880
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	8940
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9000
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	9060
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9120
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	9180
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9240
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	9300
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9360
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	9420
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9480
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	9540
GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9600
Ala Pro Ala His Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Ala	9660
GAG CAG GTT GAG ACC CCG CCG GAG CAG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9720
Gly Thr Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Cys Arg Phe Pro Ala	9780
GCT CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9840
Gly Asp Tyr Pro Phe Ala Cys Cys Glu His Ala Thr Ala Phe Val	9900
GCG CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	9960
Ala His Leu Arg Pro Ala Ser Ala Ser Val Thr Thr Ser Asp Asp	10020

```

GAG GAC AGC GAC GAT GAC GGG GCG GCG AGC AAC GCG GCG GCG GAT GCG 1782
AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1783
505 510 515

TAC GAC CTC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1791
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1792
515 520 525

COC GCG AAC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1799
FAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1800
525 530 535

AAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1807
AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1808
540 545 550

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1815
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1816
555 560 565

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1822
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1823
565 570 575

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1830
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1831
575 580 585

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1838
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1839
585 590 595

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1845
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1846
595 600 605

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1852
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1853
605 610 615

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1859
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1860
615 620 625

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1866
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1867
625 630 635

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1873
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1874
635 640 645

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1880
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1881
645 650 655

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1887
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1888
655 660 665

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1894
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1895
665 670 675

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1901
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1902
675 680 685

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 1908
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1909
685 690 695

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1915
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1916
695 700 705

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1922
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1923
705 710 715

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1929
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1930
715 720 725

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1936
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1937
725 730 735

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1943
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1944
735 740 745

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1950
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1951
745 750 755

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1957
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1958
755 760 765

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1964
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1965
765 770 775

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1971
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1972
775 780 785

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1978
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1979
785 790 795

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1985
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1986
795 800 805

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1992
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 1993
805 810 815

GAG GAC GCG CTC GAG GAC GAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1999
TTC AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 2000
815 820 825

```

Priemyslená využiteľnosť

Vynález sa týka súboru vakcín BHV-1, buď živých alebo inaktivovaných, ktorým je spoločné to, že postrádajú buď celý gén alebo časť génu pre glykoproteín gE. Tento súbor obsahuje prirodzený gE delečný mutant, ako aj vytvorené gE delečné mutanty, ktoré môžu, ale nemusia obsahovať delécie v géne pre tymidínkinázu alebo géne pre glykoproteín gI a vytvorené gE delečné mutanty, ktoré sú použité ako vektory pre heterológne gény. Vynález sa ďalej týka nukleotidových sekvencií kódujúcich gén pre glykoproteín gE vírusu BHV-1, oligonukleotidov odvodených z týchto sekvencií, samotného glykoproteínu gE, peptidov, ktoré sú z neho odvodené a (monoklonálnych alebo polyklonálnych) protilátok, ktoré sú namierené proti glykoproteínu gE a z neho odvodeným peptidom. Vynález sa ďalej týka komplexov glykoproteínov gE a gI vírusu BHV-1 a protilátok namierených proti takým komplexom.

Tieto materiály môžu byť podľa vynálezu použité na:

1. očkovanie dobytky proti chorobám spôsobeným BHV-1, a to tak, že môžu byť odlišené zvieratá infikované BHV-1 od očkovaných zvierat; konvenčná a skonštruovaná vakcína môžu byť použité vedľa seba;
2. očkovanie dobytky tak proti chorobám spôsobeným BHV-1, ako i chorobám spôsobeným inými patogénmi, ktorých sekvencie kódujúce ochranné antigény môžu byť vložené do delečných mutantov BHV-1;
3. testovanie krvi, séra, mlieka alebo iných telových tekutín z dobytky sérologicky alebo technikami detekcie nukleových kyselín (napr. PCR), či sú infikované divokým typom BHV-1 alebo sú očkované gE delečným mutantom.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mutant bovinného herpesového vírusu typu 1 (BHV-1) obsahujúci deléciu v glykoproteínovom gE-géne, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v BHV-1 kmene aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A a kde delécia umožňuje sérologické rozlíšenie od divokého typu BHV-1.

2. Mutant BHV-1 podľa nároku 1, v ktorom delécia v gE-géne bola vytvorená atenuačným postupom.

3. Mutant BHV-1 podľa nároku 2, ktorým je Difivac-1, uložený v CNCM pod depozitným číslom I-1213.

4. Mutant BHV-1 podľa nároku 1, v ktorom delécia v gE-géne bola vytvorená technikou rekombinantnej DNA.

5. Mutant BHV-1 podľa nároku 1, ktorý má okrem delécie v gE-géne navyše deléciu v tymidínkinázovom géne.

6. Mutant BHV-1 podľa nároku 1, ktorý má okrem delécie v gE-géne navyše deléciu v glykoproteínovom gI-géne.

7. Mutant BHV-1 podľa nároku 1, ktorý má okrem delécie v gE-géne navyše deléciu v tymidínkinázovom géne a deléciu v gI-géne.

8. Mutant BHV-1 podľa nároku 1 selektovateľný alebo zvolený spôsobom rozlíšenia medzi BHV-1 vírusom, ktorý má intaktný gE-gén a BHV-1 vírusom, ktorý má deléciu v gE-géne, spôsob zahrnuje krok vyšetrenia, či nukleová kyselina vírusu reaguje s gE-špecifickou sondou alebo primérom odvodeným z nukleotidovej sekvencie kódujúcej gE.

9. Mutant BHV-1 podľa nároku 1 selektovateľný alebo zvolený spôsobom rozlíšenia medzi BHV-1 vírusom exprimujúcim gE a BHV-1 vírusom, ktorý má deléciu v gE-géne, spôsob zahrnuje krok vyšetrenia, či vírus reaguje s vytvorenou gE-špecifickou protilátkou proti gE alebo proti peptidom odvodeným z aminokyselinovej sekvencie gE.

10. Mutant BHV-1 podľa nároku 1 obsahujúci heterológny gén vložený technikou rekombinantnej DNA.

11. Mutant BHV-1 podľa nároku 10, v ktorom heterológny gén je vložený do miesta gE-génu a ktorý je pod kontrolou regulačných sekvencií, napríklad gE-génu alebo heterológneho génu a voliteľne je pripojený k časti gE-génu, ktorá kóduje signálny peptid.

12. Mutant BHV-1 podľa nároku 10, ktorý má okrem delécie v gE-géne deléciu v tymidínkinázovom géne, deléciu v gI-géne alebo v obidvoch, pričom heterológny gén je vložený do miesta aspoň jednej z týchto delécií.

13. Mutant BHV-1 podľa nároku 10, ktorý má okrem delécie v gE-géne deléciu v tymidínkinázovom géne, deléciu v gI-géne alebo v obidvoch, pričom heterológny gén je vložený do miesta aspoň jednej z týchto delécií s podmienkou, že ak mutant s dvojitou deléciou zahrnuje deléciu v gE-géne a deléciu v tymidínkinázovom géne, heterológny gén nie je vložený do miesta tymidínkinázového génu.

14. Mutant BHV-1 podľa nároku 10, ktorý okrem delécie v gE-géne obsahuje deléciu v tymidínkinázovom géne, deléciu v gI-géne alebo v obidvoch, pričom heterológny gén je vložený do miesta aspoň jednej z týchto delécií s podmienkou, že ak mutant s dvojitou deléciou zahrnuje deléciu v gE-géne a deléciu v tymidínkinázovom géne, heterológny gén nie je bovinný dýchací syncytiálny vírusový alebo N gén.

15. Mutant BHV-1 podľa nároku 10, ktorý okrem delécie v gE-géne deléciu v tymidínkinázovom géne, deléciu v gI-géne alebo v obidvoch, pričom heterológny gén je vložený do miesta aspoň jednej z týchto delécií s podmienkou, že ak mutant s dvojitou deléciou zahrnuje deléciu v gE-géne a deléciu v tymidínkinázovom géne, sú vložené najmenej dva heterológne gény.

16. Mutant BHV-1 podľa niektorého z nárokov 10 až 15, v ktorom vložený gén kóduje imunogénny proteín alebo peptid iného patogénu alebo kóduje cytokín.

17. Prostriedok obsahujúci rekombinantnú nukleovú kyselinu obsahujúcu gE-gén BHV-1, špecifickú časť tohto gE-génu alebo gE-špecifickú nukleotidovú sekvenciu, odvodenú z tohto gE-génu, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v BHV-1 kmene aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A.

18. Prostriedok podľa nároku 17, ktorý obsahuje klonovací alebo expresný vektor, ktorý má vloženú rekombinantnú nukleovú kyselinu obsahujúcu gE-gén BHV-1, gE-špecifickú časť tohto gE-génu alebo gE-špecifickú nukleotidovú sekvenciu odvodenú z tohto gE-génu.

19. Prostriedok obsahujúci gE BHV-1, špecifickú časť tohto gE, gE-špecifický peptid odvodený z tohto gE alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým BHV-1 kmeni aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A.

20. Prostriedok obsahujúci protilátku, ktorá je špecifická pre gE BHV-1, špecifickú časť tohto gE, špecifický peptid odvodený z tohto gE alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v BHV-1 kmeni aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A.

21. Prostriedok podľa nároku 20, obsahujúci monoklonálnu protilátku, ktorá je špecifická pre gE BHV-1, špecifickú časť tohto gE, špecifický peptid odvodený z tohto gE alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1.

22. Prostriedok podľa nároku 20, obsahujúci polyklonálnu protilátku, ktorá je špecifická pre gE BHV-1, špecifickú časť tohto gE, špecifický peptid odvodený z tohto gE alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1.

23. Očkovací prostriedok na očkovanie zvierat, najmä cicavcov a hlavne hovädzieho dobytku na ochranu proti BHV-1, obsahujúci živú alebo inaktívnu vakcínu mutantu BHV-1 podľa niektorého z nárokov 1 až 16 a vhodný nosič alebo adjuvans.

24. Očkovací prostriedok na očkovanie zvierat, najmä cicavcov a hlavne hovädzieho dobytku na ochranu proti patogénom, obsahujúci živú alebo inaktívnu vakcínu mutantu BHV-1 podľa niektorého z nárokov 1 až 16, ktorý má deléciu v gE-géne a obsahuje heterológný gén, ktorý bol vložený technikami rekombinantnej DNA a kóduje imunogénny proteín alebo peptid patogénu, a vhodný nosič alebo adjuvans.

25. Diagnostická súprava na detekciu nukleovej kyseliny BHV-1 vo vzorke, najmä v biologickej vzorke, ako je krv alebo krvné sérum, krvné bunky, mlieko, telové tekutiny ako slzy, tekutina z výplachu pľúc, nosný sekrét, spermie, osobitne semenná tekutina, sliny, spútum alebo tkanivo, najmä nervové tkanivo zvierat, osobitne cicavca, najmä hovädzieho dobytku, obsahujúca sondu nukleovej kyseliny alebo primer s nukleotidovou sekvenciou odvodenou z gE-génu BHV-1, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v kmeni BHV-1, aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A, a detekčné prostriedky vhodné na detekčnú skúšku na nukleové kyseliny.

26. Diagnostická súprava na detekciu protilátok, ktoré sú špecifické pre BHV-1 vo vzorke, najmä v biologickej vzorke, ako je krv alebo krvné sérum, sliny, spútum, telové tekutiny ako slzy, tekutina z výplachu pľúc, nosný sekrét, mlieko alebo tkanivo zvierat, osobitne cicavca, najmä hovädzieho dobytku obsahujúca gE BHV-1, špecifickú časť tohto gE, špecifický peptid odvodený z gE alebo komplex glykoproteínu gE a gl BHV-1, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v kmeni BHV-1, aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A, a detekčné prostriedky vhodné na detekčnú skúšku na protilátky.

27. Diagnostická súprava podľa nároku 26, ktorá ďalej obsahuje jednu alebo viac protilátok, ktoré sú špecifické pre gE BHV-1 alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1.

28. Diagnostická súprava na detekciu protilátok, ktoré sú špecifické pre BHV-1 vo vzorke, najmä v biologickej vzorke ako je krv alebo krvné sérum, sliny, spútum, telové tekutiny ako slzy, tekutina z výplachu pľúc, nosný sekrét, mlieko alebo tkanivo zvierat, osobitne cicavca, najmä hovädzieho dobytku obsahujúca protilátku, ktorá je špecifická pre gE BHV-1 alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v kmeni

BHV-1, aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A, a detekčné prostriedky vhodné na detekčnú skúšku na protilátky.

29. Diagnostická súprava na detekciu proteínov BHV-1 vo vzorke, najmä v biologickej vzorke, ako je krv alebo krvné sérum, krvné bunky, mlieko, telové tekutiny ako slzy, tekutina z výplachu pľúc, nosný sekrét, spermie, osobitne semenná tekutina, sliny, spútum alebo tkanivo, najmä nervové tkanivo zvierat, osobitne cicavca, najmä hovädzieho dobytku obsahujúca protilátku, ktorá je špecifická pre gE BHV-1 alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v kmeni BHV-1, aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A, a detekčné prostriedky vhodné na detekčnú skúšku na proteíny.

30. Spôsob stanovenia infekcie zvierat BHV-1, najmä cicavca, osobitne hovädzieho dobytku zahrnujúci vyšetrenie vzorky zvierat, najmä biologickej vzorky, akou je krv alebo krvné sérum, krvné bunky, spermie, najmä semenná tekutina, sliny, spútum, telové tekutiny ako slzy, tekutina z výplachu pľúc, nosný sekrét, mlieko alebo tkanivo, najmä nervové tkanivo, na prítomnosť nukleových kyselín obsahujúcich gE-gén BHV-1 alebo na prítomnosť glykoproteínu BHV-1 alebo komplexu glykoproteínov gE a gl BHV-1, alebo na prítomnosť protilátok, ktoré sú špecifické pre gE BHV-1 alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v BHV-1 kmeni obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A.

31. Spôsob stanovenia infekcie zvierat BHV-1, najmä cicavca, osobitne hovädzieho dobytku zahrnujúci vyšetrenie vzorky zvierat, najmä biologickej vzorky, akou je krv alebo krvné sérum, krvné bunky, spermie, najmä semenná tekutina, sliny, spútum, telové tekutiny ako slzy, tekutina z výplachu pľúc, nosný sekrét, mlieko alebo tkanivo, najmä nervové tkanivo, na prítomnosť nukleových kyselín obsahujúcich gE-gén BHV-1 alebo na prítomnosť glykoproteínu BHV-1 alebo komplexu glykoproteínov gE a gl BHV-1, alebo na prítomnosť protilátok, ktoré sú špecifické pre gE BHV-1 alebo komplex glykoproteínov gE a gl BHV-1, kde gE je proteín, ktorý má predovšetkým v BHV-1 kmeni, aminokyselinovú sekvenciu znázornenú na obrázku 3A, pričom vyšetované vzorky sú vzorky zo zvierat očkovaných očkovacím prostriedkom podľa nároku 23.

30 výkresov

1/30

H P
D I D I

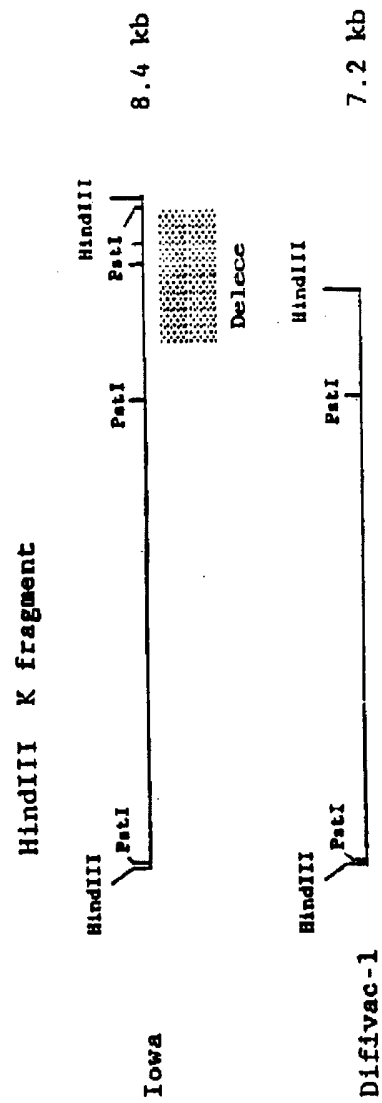
8,4 kb = — — — — 6 kb
7,2 kb = — — — —

— —

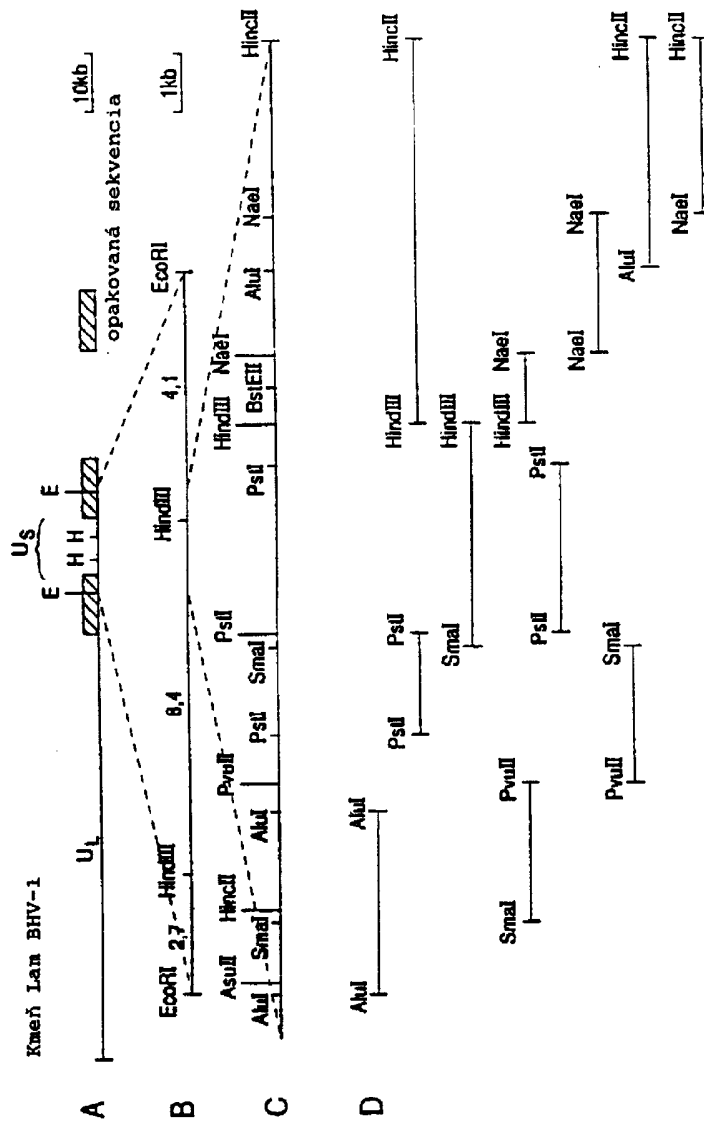
1 2 3 4

OBR. 1A

2/30



OBR. 1B



4/30

```

AGGCGGAGC GTTACGGGC CCGACCGCG CCGGTTGTT AATGGTCT CGCGGGCTC 60
|----> deletované v Difivac-1
GTGGTTCCAC ACGCGCGGAG AACCAGCGG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGGG 120

TTCCGGGAA CCGCGCACGC GAGAGGTTT GAAAGGGCA TTTCGCA 167
AsuII

ATG CAA CCC ACC GCG CCC CCG CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG 215
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu 15
1 ----- SIGNALNY PEPTID -----
CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC ANG CCC GCG ACC 263
Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr 30
-----
GAA ACC CCG GGC TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG CGC GCT 311
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala 45
SmaI
GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG CGC CCG GAC GTG CGC 359
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg 60
50
GCC GTT CCG GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG 407
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val 80
65

```

OBR. 3A

5/30

455 CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC
 Pro Glu Pro Val Cys Leu Asp Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala 95
 90

503 CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CCG CTG GCC ATC
 Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile 110
 100 105

551 GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT
 Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val 125
 115 120

599 CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG
 Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asn Ala Thr Gly 140
 130 135

647 GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GTG TAC TTC CTG
 Val Leu Ile Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Val Tyr Phe Leu 160
 145 150

695 TAC GAC CCG CTC ATC GGC GAC GCC GCG GAG GAG ACG CAG TTG GCG
 Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Glu Glu Thr Gln Leu Ala 175
 165 170

743 CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GCG CAG GCG GCC GCG CGG GAC
 Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp 190
 180 185

OBR. 3A

6/30

791
 GAG GAG AGG GAA CCA GCG ACC GGG CCC ACC CCC GGC CCG CCG CCC CAC
 Glu Glu Arg Glu Thr Pro Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro His
 195 200 205
 839
 CGC ACG ACG ACA CCG GCG CCC CCG CCG CCG CAC GGC GCG GCG TTC CCG
 Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg
 210 215 220
 887
 GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC CCG GGC GAT TCC TTT CTG
 Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu
 225 230 235
 935
 CTA TCG GTG CCG CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GCT CCC TTC TCG
 Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser
 245 250 255
 983
 GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CCG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC
 Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu
 260 265 270
 1031
 ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC
 Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys
 275 280 285
 1079
 CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CCG TCC
 Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser
 290 295 300

OBR. 3A

7/30

1127 GAG ACC GTG TAC AGC CGG CTG TAC GAG CAG TGC CGC CGC GAC CCT GCC
 Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala
 305 310 315 320
 1175 GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT
 Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Tyr Ala Ala Pro Val
 325 330 335
 1223 GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC
 Ala His Leu Arg Pro Ala Asn Asn Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp
 340 345 350
 1271 GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC
 Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn
 355 360 365
 1319 GGC CAC GTG GAA GCT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT
 Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg
 370 375 380
 HindIII
 1367 TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CCG GCC GAG GCC GCA GCC GCC
 Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala
 385 390 395 400
 1415 GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GGC GCG
 Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala
 405 410 415

OBR. 3A

8/30

```

CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG CTG GTG GCG GCG CTT GGA 1463
Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly
420 425 430
-----TRANSMEMBRÁNOVÝ HÉLIX -----
CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG 1511
Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala
435 440 445
-----
CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG 1559
Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly
450 455 460
CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG 1607
Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val
465 470 475 480
CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT 1655
Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp
485 490 495
GAC GAC AGC AGC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT CCC 1703
Asp Asp Ser Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala
500 505 510

```

OBR. 3A

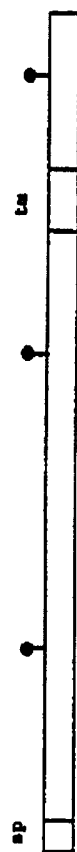
9/30

TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC 1751
 Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala
 515 520 525
 CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT 1799
 Pro Ala Asn Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe
 530 535 540
 AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA 1847
 Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala
 545 550 555
 CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC GCG TAG 1895
 Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *
 560 565 570 575
 GCGCCCCCCC CCCCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGGAAA GCACCCGGCCT GTAGGGCTGC 1955
 ATATTAATGG AGCGCTCACA CAAGCCTCG TCGCGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA 2015
 CGCAGCGTGG TC 2027

OBR. 3A

10/30

BHV-1 GE



575 aminokyselín

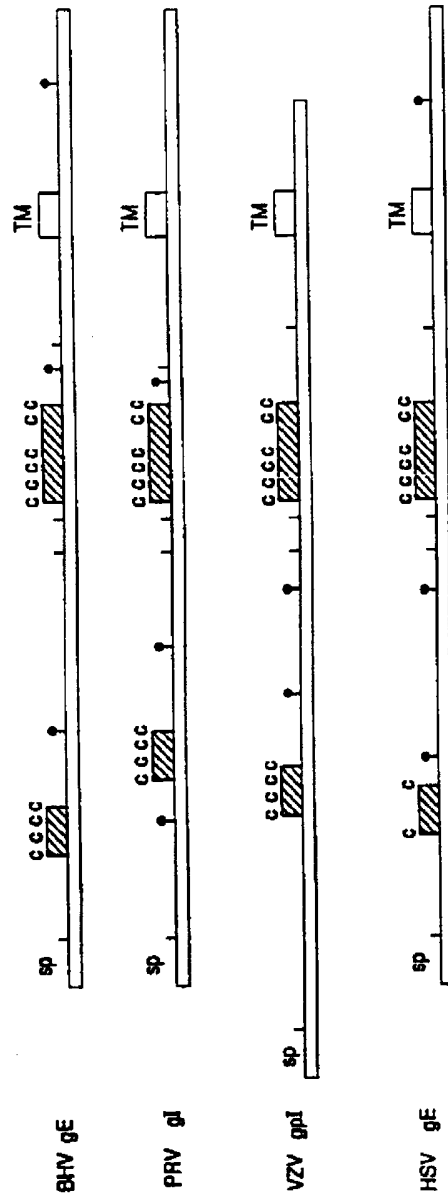
sp - signálny peptid 26 zvyškov

† - predpokladané N-glykozylačné miesto

tm - transmembránový hélix, zvyšky 423-450

OBR. 3B

11/30



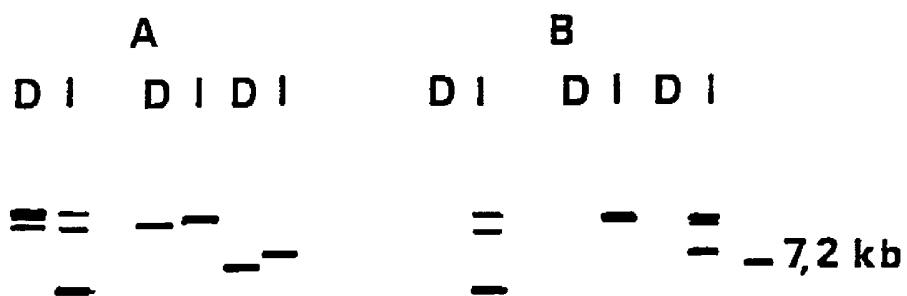
OBR. 4A

[illegible]

OBR. 4B

SUBSTITUTE SHEET

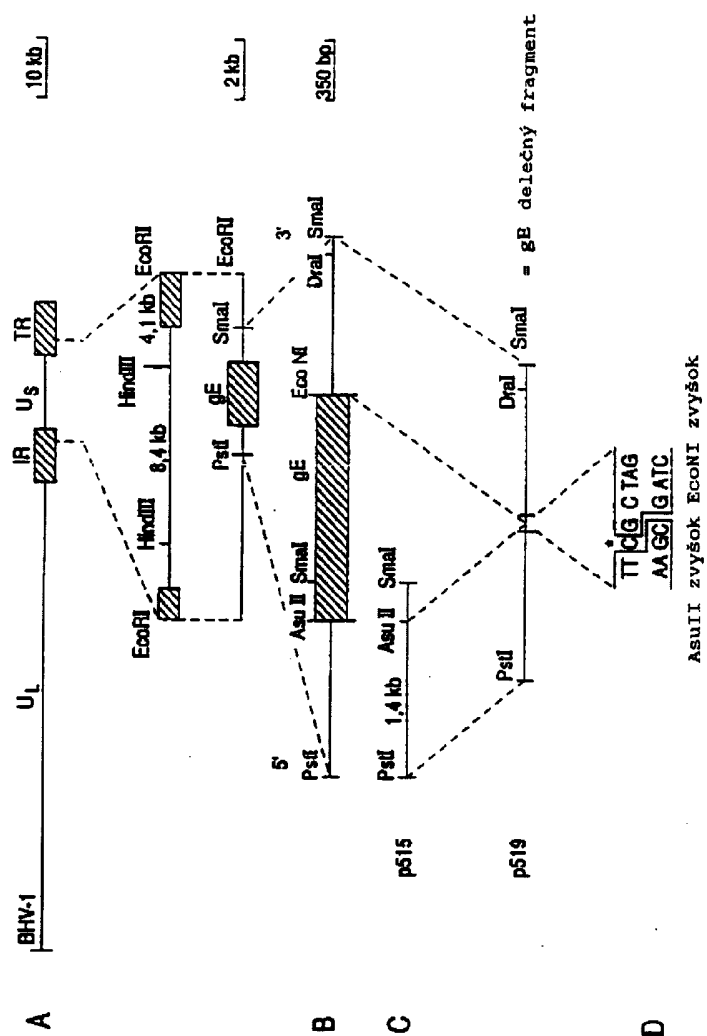
13/30



1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6

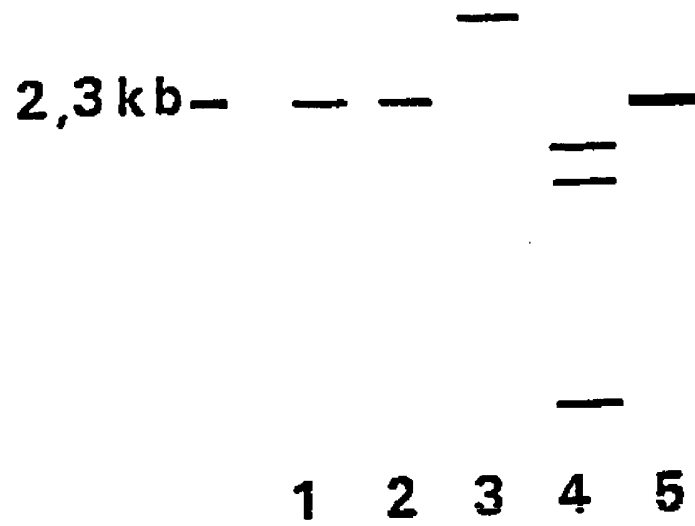
OBR. 5

14/30



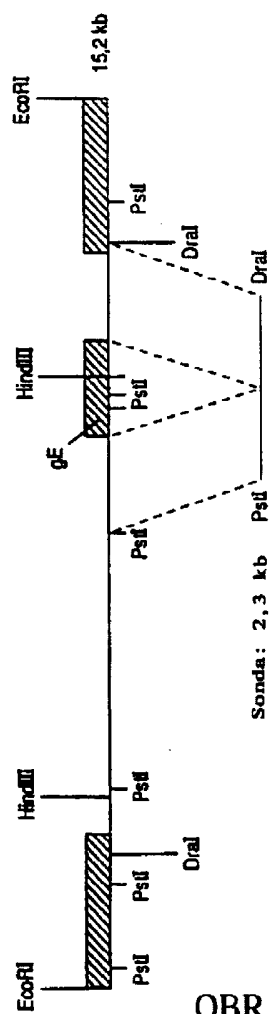
OBR. 6

15/30



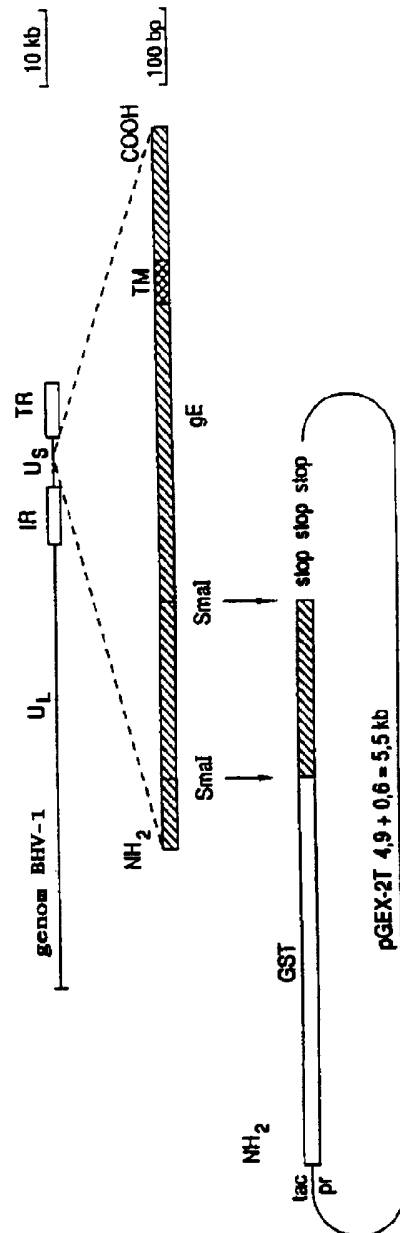
OBR. 7A

16/30



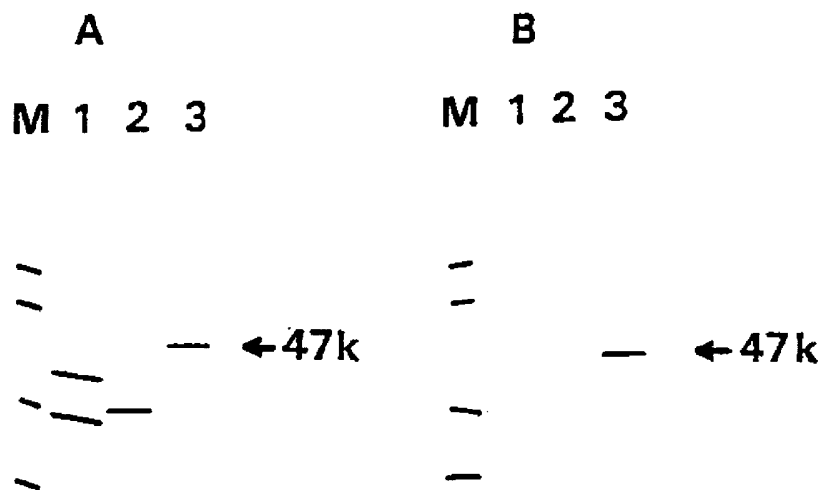
OBR. 7B

17/30



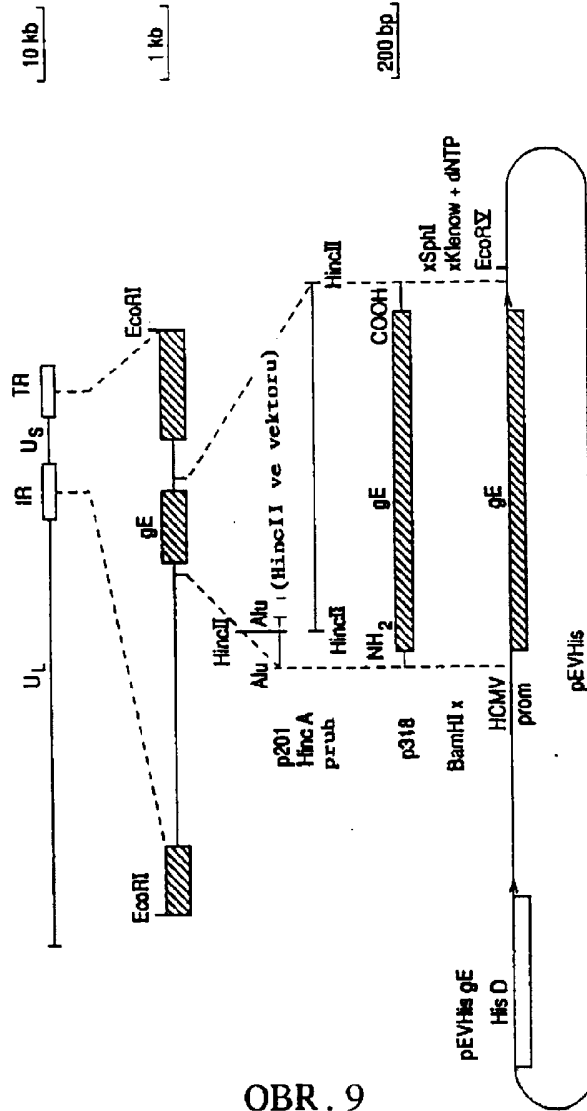
OBR. 8A

18/30



OBR . 8B

19/30

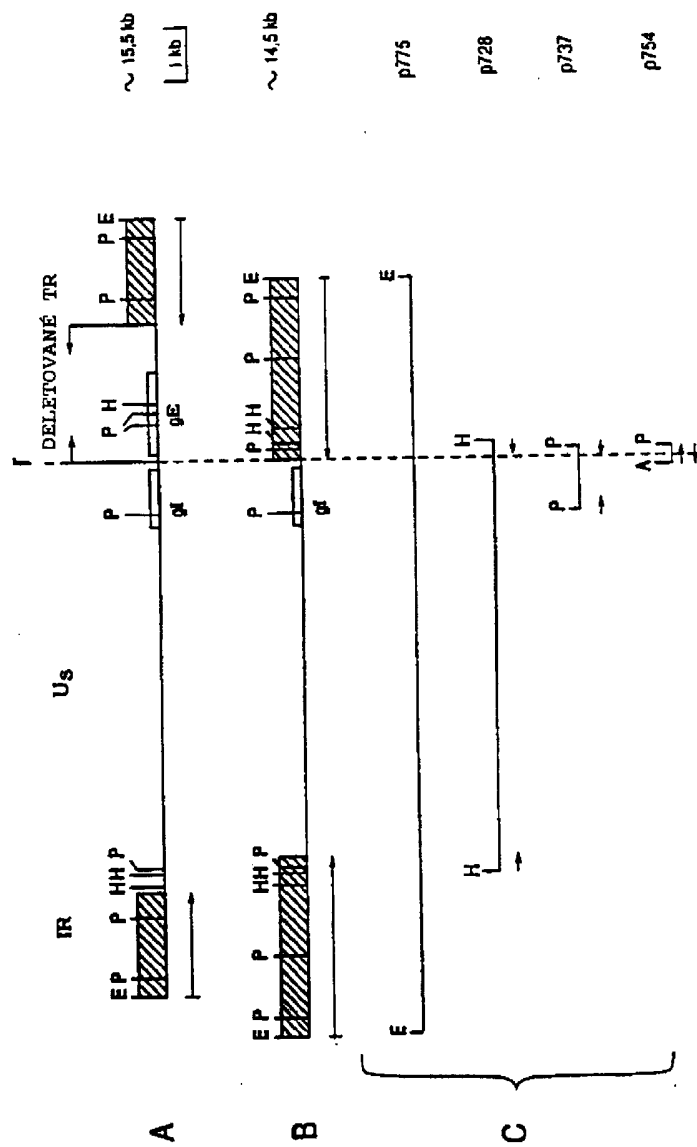


OBR. 9

1272 GGCCACGTGGAAGCTTGGACTACAGCCTAGTCGTACTTCGGACCGTTTGGTGGCGCGGTACCC
HindIII
GACCACACGGGCCCCGAGGCCCGCAGCGCCGACGCTCCCGAGCCAGGCCCCACCGCTACCGAGGAGCCGGGGCGCG
CCACCGGGCCCCGCCCTTGGCTTGTGTGCTGTGTGGCGCGCTTGGACTCGCGGGACTGGTGGGCATCGAGGCCCTC
GCCGTTCGGGTGTGCGCGGCCCGCCAGCCAGCGCACTACGACATCTCAACCCCTTCGGGCCCGTATACACC
AGCTTGCCGACCAACGAGCCGCTCGACGTGTGGTGGCCAGTTAGGACGACGAAATTTCCCTCAGCGAAGACTCTTTT
P₃ TaqI
GCGGATGACGACAGCGACGATGACGGGCCCGCTAGCAACCCCTCGGGATGCCCTACGACCTCGCGGGCGCCCGACGAG
CCAACTAGCGGGTTTGGCGGAGCCCCCGCCAAACGGCAGCGGCTCGAGTGGCTCTGGGTTCAGAGTTTGGTTTAGGGAC
CCGCTTGAAGACGATGCGCGCCAGCGGCGACCCCGCCGACACAGATTACACCGTGGTAGCAGCGCGACTCAAGTCC
P₄ TaqI
ATCTTCGGCTAGGCGCCCCCCCCCGCGCTGTGCGCTGTGACGGAAGCAACCCGCGTGTAGGGCTGCATATAA
EcoNI
ATGAGCGGCTCACAAAGCCCTCGTGGGCTGCTTCGAAGGCAATGGAGAGTCCACGACGCTCGTC 207

OBR. 10

21/30



OBR. 11

12/30

A

```

-----> OBLASŤ PROMÓTORU gE ----->
5' GAGCGGGCGACGGCGGGGGTTGTTAAATGGGTCTCGGGGGGCTCGTCTTCAGACGGCGGAGAA
      ↑
----->|<----- INVERTOVANÁ OPAKOVANÁ SEKVENCIA.-----
CCAGCGG|TCCGAGGGGGGCTTCGCTCGGCTCCGACTCTTTAAGGCGTCCCGCCAGCAAGAAGACGGG
< INVERTOVANÁ OPAKOVANÁ SEKVENCIA <-----
CTGTATGCTATGCTCCCGCGGACTATTTTCGGGTGGTGGCGTCTGCCAAGCGGCTCTGTTGTAAGTT 3'

```

B(I)

```

Unikátna krátka ↑ opakovaná sekvencia
Náprotivná hranica opakovanej sekvencie: GCGACCGCTCCCGGA|TCCGAGGGGGGCTTGG
(inverzná sekvencia)      * * |*****
Rekombinovaná oblasť:      CCGGAGAACCAGCGG|TCCGAGGGGGGCTTGG

```

B(II)

```

Rekombinovaná oblasť: CCGGAGAACCAGCGG|TCCGAGGGGGGCTTGG
*****|* * * *
Oblasť divokého typu: CCGGAGAACCAGCGG|GAGCTTCGCTCGGTGTC
                        |
                        --->
                        gE zavádzacia sekvencia

```

OBR. 12

23/30

10	20	30	40	50	60
CTACCACGCGCGGGGCGACTGCTTCGTTATGCTGCAGACGACCGCGTTTCGCTCCTGCCC					
Y H A A G A C F V M L Q T T A F A S C P					
70	80	90	100	110	120
GCGCGTCGCGAACGACGCGCTTTCGCTCCTGCCTGCACGCCGACACGCGCCCCGCTCGCAG					
R V A N D A F R S C L H A D T R P A R S					
130	140	150	160	170	180
CGAGCGGCGCGCGAGCGCGCGGTCGAAAACCACGTGCTCTTCTCCATCGCCCATCCGCG					
E R R A S A A V E N H V L F S I A H P R					
190	200	210	220	230	240
CCCAATAGACTCAGGGCTCTACTTTCTGCGCGTCGGCATCTACGGCGGCACCGCGGGCAG					
P I D S G L Y F L R V G I Y G G T A G S					
250	260	270	280		
CGAGCGCGCGCGAGACGTCTTTCCTTGGCGCGGTTTGTACACA					
E R R R D V F P L A A F V H					

OBR. 13

24/30

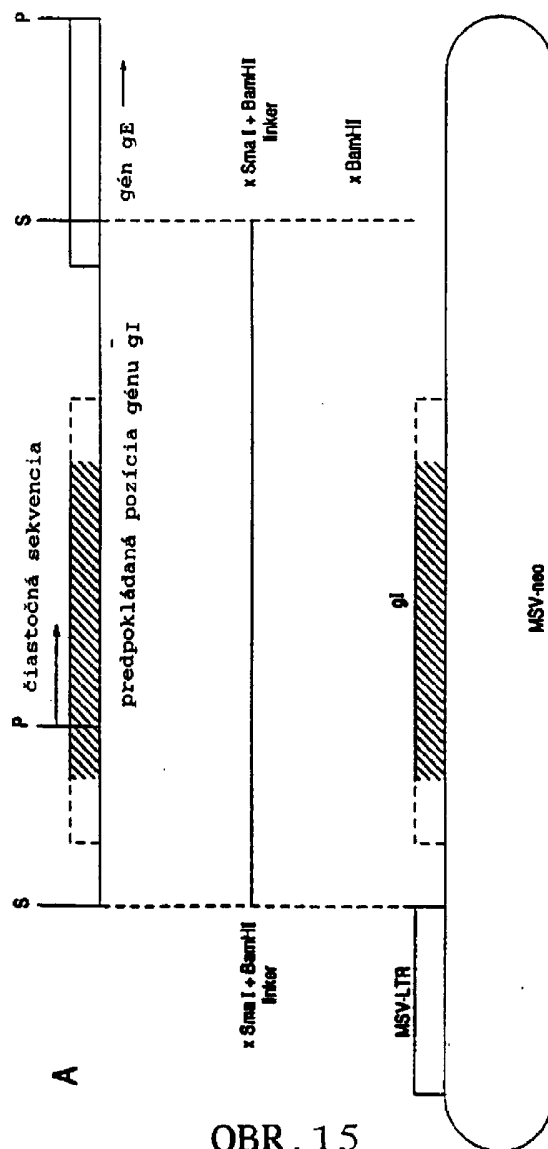
symbol comparison table : DAYHOFF.DAT; gap penalty : 8

	1	10	20	30	40	50
BHV1	YHAAGD.CFVNLQTTAFASCFRVAN.AFRSCLHADTRF.ARSERRASAAVENHVLFSIA					
	*	:	***	: ***	:	*****
FRV	RIDPKRA.CYTREYAAEYDLCFKVHHEAFEGCLR...KR.EPLARRASAAVEARRLLFVS					
	:	*	***	**	:	***
HSV1	YPMCHK.CPRVVHVVTIACPRRPAVAFALCRATDSTH.SPAYFTLELNLAQQELLEVO					
	*	*	***	**	*	*
VZV	YADTVAFCFRSVQVIRYDGGPRIETSAFISCRYKHSWHYGNSTDRISTEPDAGVHLKIT					
	1	10	20	30	40	50

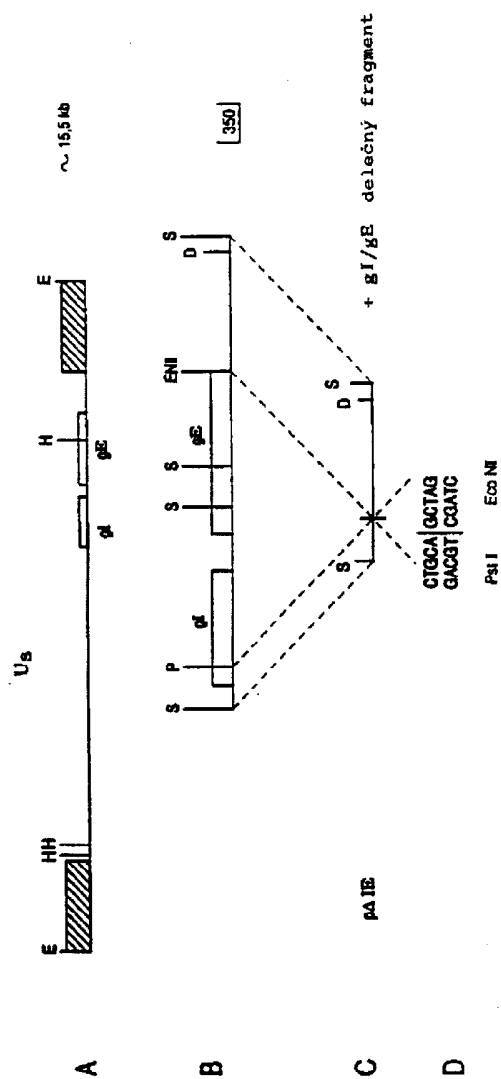
	60	70	80	90	93
BHV1	HPRPIDSGLYFLEVGIYGG.TACSERERDVFFLAAFVH				
	*	*	*	*	*
FRV	RPAPFDAGSYVLKVR..NG.TIDLFVLTALVFFRGRPHU				
	*	*	*****	:	***
HSV1	RATEDYAGVTVLEVVUGDAPNASLFVLGMALAAEG				
	:	:	*****	*	*
VZV	KPGINDAGVTVLLVRLDHSRSTGFTILGVNVYTAG				
		70	80	90	94

OBR.14

25/30

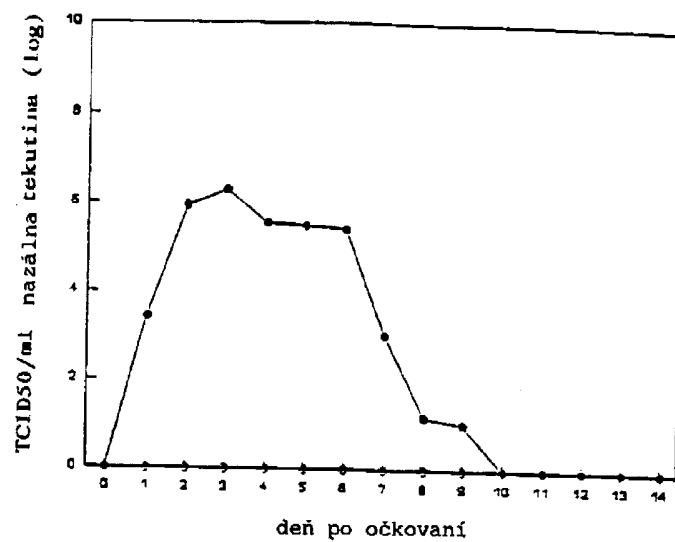


OBR. 15

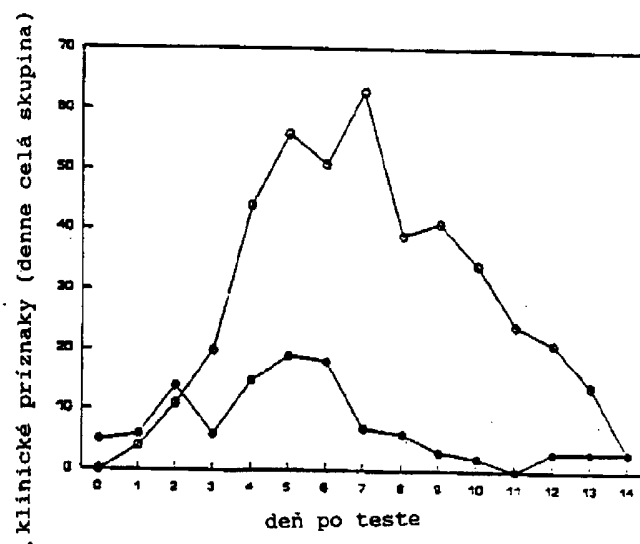


OBR. 16

27/30

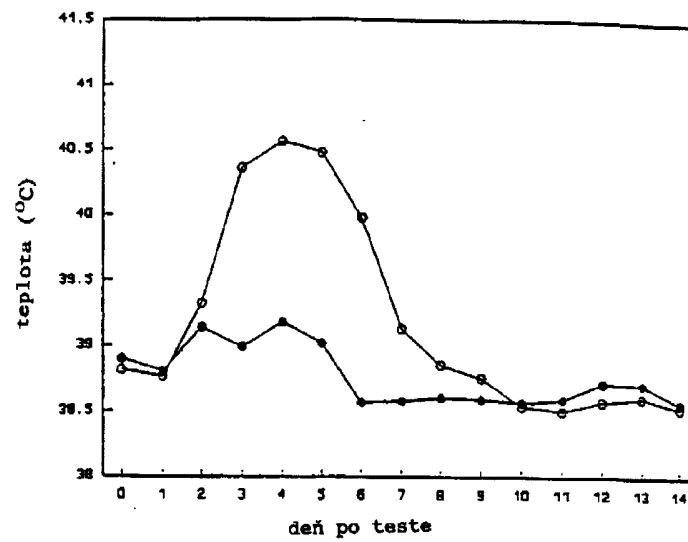


OBR. 17

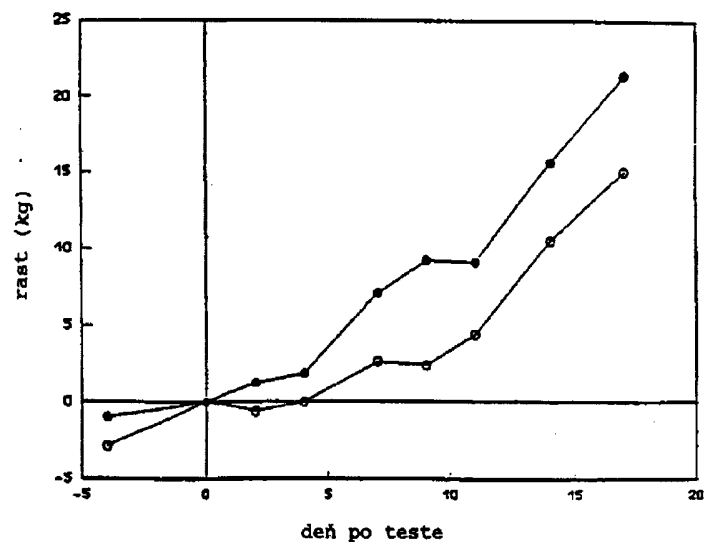


OBR. 18

28/30

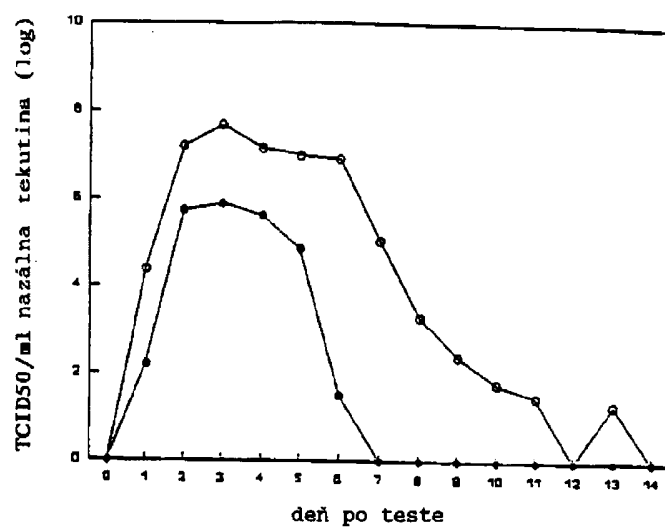


OBR. 19

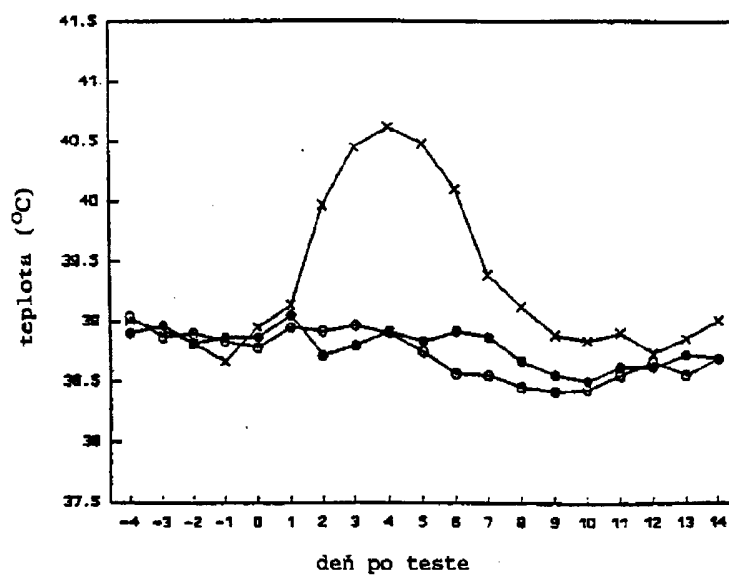


OBR. 20

29/30

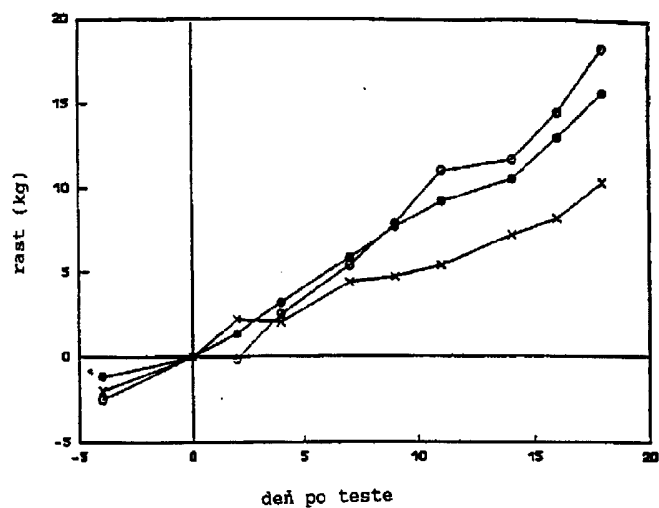


OBR. 21

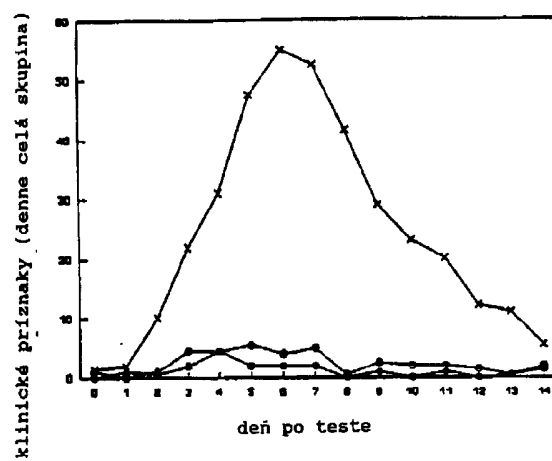


OBR. 22

30/30



OBR. 23



OBR. 24

Koniec dokumentu