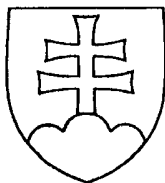


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

1323-94

(22) Dátum podania: 07.05.93

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 92 09993.6

(32) Dátum priority: 08.05.92

(33) Krajina priority: GB

(43) Dátum zverejnenia: 11.07.95

(86) Číslo PCT: PCT/GB93/00943, 07.05.93

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/30,
C 12 N 15/62,
9/64,
C 07 K 9/00,
A 61 K 39/00,
C 07 H 13/04

(71) Prihlasovateľ: The Biotechnology and Biological Sciences Research Council, Cambridge, GB;

(72) Pôvodca vynálezu: Graham Margaret, Linton, Cambridge, GB;
Smith Trevor Stanley, Linton, Cambridge, GB;
Munn Edward Albert, Fulbourn, Cambridge, GB;
Knox David Patrick, Cockenzie, GB;
Oliver Joanna Jane, Edinburgh, GB;
Newton Susan Elizabeth, Victoria, AU;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Rekombinantné molekuly DNA kódujúce amino- peptidázové enzýmy a ich použitie na prípravu vakcín**

(57) Anotácia:
Molekuly nukleových kyselín, ktoré obsahujú kódové reťazce pre aminopeptidázy hľíst, ich antigénne fragmenty alebo funkčne ekvivalentné varianty, použitie týchto nukleových kyselín na výrobu vakcíny, spôsob výroby syntetických polypeptidov, pre ktoré sú kódom tieto nukleové kyseliny, polypeptidy samotné a vektor na expresiu alebo klonovanie, v ktorom sú uložené molekuly uvedených nukleových kyselín. Riešenie sa týka aj vakcíny na stimuláciu imunologickej odpovede proti parazitickým hľístam a niektorých oligosacharidov.

- 1 -

Molekuly nukleových kyselín, vektor na expresiu alebo klonovanie, syntetické polypeptidy, spôsob ich výroby, vakcína, použitie nukleovej kyseliny na výrobu vakcíny a oligosacharidy

Oblasť techniky

Vynález sa týka rekombinantných molekúl DNA, ktoré sú kódovými molekulami pre aminopeptidázy, vektorov na expresiu alebo klonovanie s obsahom týchto nukleových kyselín a použitie týchto nukleových kyselín pri výrobe vakcín proti infekcii parazitmi, najmä hlístami.

Doterajší stav techniky

Parazitárne infekcie sú zodpovedné za celý rad ochorení domácich zvierat. vedúcich k strate reprodukcie a často k uhynutiu zvierat a majú teda veľký ekonomický význam. Napríklad parazit *Haemonchus*, ktorý sa živí krvou, infikuje väzbové tkanivo žalúdočného a črevného traktu prežúvavcov, spôsobuje anémiu a stratu hmotnosti a bez liečenia často vedie k uhynutiu zvieraťa. Zvieratá, infikované príbuzným parazitom *Ostertagia* taktiež neprospievajú a v prípade, že infekcia nie je liečená, môžu zahynúť. Tiež ďalší paraziti majú ekonomický význam, ide napríklad o *Trichostrongylus* a *Nematodirus*, spôsobujúce zápal črevnej sliznice u rôznych živočíchov a tiež o parazity zo skupiny trematódov.

Značné problémy tiež vznikajú pri infekcii rôznymi nematódami, ako sú napríklad machovci, ako *Necator*, *Ancylostoma*, *Uncinaria* a čeľaď *Bunostomum* a ďalšie podobné čeľade parazitov, ako *Fasciola*, *Paramphistomum* a *Dicrocoelium*, ktoré okrem prežúvavcov a domácich zvierat môžu infikovať aj človeka, často so smrteľným výsledkom.

Potlačenie parazitov tohto typu spočíva predovšetkým v použití antelmintík a tiež v rôznych opatreniach, ktoré sa týkajú spôsobu pastvy. Tieto postupy však majú rad nevýhod. Ide predovšetkým o nutnosť častého podávania liečiv a tiež

opatrenia, týkajúce sa pastvy sa často veľmi ťažko vykonávajú, okrem toho sa objavuje rad kmeňov, ktoré už sú odolné proti podávaným liečivám.

Bolo by preto potrebné nájsť účinnú vakcináciu proti týmto chorobám, v tomto smere už boli v posledných rokoch vyvíjané snahy. Až dosiaľ nebola pripravená žiadna molekulárna alebo podobná vakcína pre hlavné čelade, najmä pre gastrointestinálne nematódy u prežúvavcov, ako sú *Haemonchus* a *Ostertagia*.

Najslúbnejšie výsledky boli až dosiaľ získané za použitia nových bielkovín, izolovaných z *Haemonchus*, ktoré sú považované sa potenciálne ochranné antigény nielen proti *Haemonchus*, avšak tiež proti radu ďalších parazitov. Bolo dokázané, že najmä proteínový dublet H110D, ktorý sa nachádza na povrchu vnútorného priestoru čriev *H. contortus*, môže vyvolať imunitu proti haemonchóze oviec.

H110D z *H. contortus* má približnú molekulovú hmotnosť 110 000 za redukčných a neredukčných podmienok, ako bolo dokázané elektroforézou na SDS-PAGE a bol opísaný v medzinárodných patentových prihláškach, zverejnených pod číslami W088/00835 a W090/11086. Pojem H110D je používaný na označenie proteínového dubletu H110D, tak ako bol definovaný vo vyššie uvedených patentových prihláškach. V poslednej dobe boli dokázané zodpovedajúce bielkoviny aj v iných čaladiach, napríklad v čeladi *Necator americanus*.

V medzinárodnej patentovej prihláške W088/00835 je opísaný rad metód na čistenie H110D, ktoré sú dostatočné na zistenie vlastností tejto bielkoviny a je možné ich použiť na výrobu tejto bielkoviny v množstve, dostatočnom na pokusné aj komerčné účely. Bolo by však potrebné nájsť dostatočný zdroj, v ktorom by bolo možné získať nielen H110D ale aj príbuzné antigénne bielkoviny, najmä by bolo potrebné nájsť postup na báze rekombinantnej technológie DNA, ktorým by bolo možné dosiahnuť expresiu týchto bielkovín v prokaryotických a/alebo eukaryotických organizmoch, vhodným spôsobom transformovaných.

Vynález si kladie za úlohu navrhnúť takýto zlepšený

postup. Bola vykonaná analýza reťazca cDNA pre H110D z *Haemonchus contortus* a bolo dokázané, že zistený reťazec aminokyselín je homogénny so skupinou aminopeptidáz, integrálnych v rôznych membránach a systematickým názvom uvádzaných ako mikrosomálne hydrolázy alfa-aminoacylpeptidov.

Aminopeptidázy, integrálne v membránach cicavcov sú uložené v rade tkanív, napríklad v riasinkovom epitole malých klkov v črevách a tiež v obličkách. Ich úloha v obličkách nie je celkom jasná, avšak ich funkciou v črevách je štiepenie malých peptidov, ktoré sú konečnými produktami v priebehu trávenia, ako je zrejmé napríklad zo súhrnnych publikácií Kenny a Maroux, 1982, Kenny a Turner, 1987, Noren a ďalší, 1986 a Semenza, 1986.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoria molekuly nukleových kyselín, obsahujúce jeden alebo väčší počet nukleotidových reťazcov, ktoré sú kódovými reťazcami pre aminopeptidázy hlíst alebo ich antigénnej časti, v podstate zodpovedajúce celým nukleotidovým reťazcom alebo jej častiam, znázorneným na obr. 2, 3, 4 alebo 5 (reťazec č. 1 až 15) alebo môže ísť o reťazce, ktoré sú kódovými reťazcami pre aminopeptidázy hlíst a sú v podstate homológne alebo hybridizujú s ktorýmkoľvek z vyššie uvedených reťazcov.

V prípade nukleových kyselín podľa vynálezu môže teda ísť o DNA, cDNA alebo RNA s jednoduchým alebo s dvojitém reťazcom.

Variácie v nukleotidových reťazcoch, ktoré sú kódovými reťazcami pre aminopeptidázy sa môžu objaviť medzi rôznymi kmeňmi hlíst v rámci jednej čelade, v rôznych štádiách životných cyklov hlíst, napríklad medzi štádiom larvy a štádiom dospelého jedinca, medzi podobnými kmeňmi rôzneho zeme-pisného pôvodu a niekedy tiež u rovnakých hlíst. Aj tieto variácie sú zahrnuté do rozsahu vynálezu.

"V podstate homológne" sú tie reťazce, ktoré majú to-
tožný reťazec na 50 a viac percent, napríklad na 60 % alebo

viac a tiež môže ísť o funkčne ekvivalentné allelové varianty a príbuzné reťazce, modifikované výmenou jednej alebo väčšieho počtu báz alebo pridaním a/alebo vypustením niektorých báz. Pod pojmom "funkčne ekvivalentný" sa rozumejú reťazce nukleových kyselín, ktoré sú kódovými reťazcami pre látky s účinnosťou aminopeptidázy, pričom tieto enzýmy sú podobným spôsobom imunoreaktívne, to znamená, že vyvolávajú u hostiteľa tvorbu ochranných protilátok proti hlístam.

Molekuly nukleových kyselín, ktoré hybridizujú s reťazcami na obr. 2, 3, 4 alebo 5 (ide o reťazce č. 1 až 15) alebo akékoľvek v podstate homológne alebo funkčne ekvivalentné reťazce vo vyššie uvedenom význame sú taktiež zahrnuté do rozsahu vynálezu. Pojem "hybridizácia" definuje tie reťazce, ktoré sa môžu za neobmedzujúcich podmienok (6 x SSC/50% formamid pri teplote miestnosti) viazať a byť vymyté za málo obmedzujúcich podmienok (2 x SSC pri teplote miestnosti alebo s výhodou 2 x SSC pri teplote 42 °C) alebo za viac obmedzujúcich podmienok, napríklad 2 x SSC pri 65 °C, kde SSC = 0,15 M NaCl a 0,015 M citrátu sodného s pH 7,2.

Spôsoby na výrobu takýchto derivátov uvedených reťazcov, napríklad cielená produkcia mutácií, štatistická produkcia mutácií alebo enzymatické štiepenie a/alebo väzba nukleových kyselín sú dobre známe rovnako ako spôsoby, ktorými je možné stanoviť, či takto modifikovaná nukleová kyselina má podstatnejšiu homológiu s určitým reťazcom, napríklad môže ísť o hybridizáciu.

Za použitia nukleovej kyseliny podľa vynálezu je teda možné pripraviť rekombinantné aminopeptidázy alebo imunogénne fragmenty, čím je možné uľahčiť vývoj vakcíny proti hlístam.

Podstatu vynálezu teda tvoria molekuly nukleových kyselín, ktoré obsahujú jeden alebo väčší počet nukleotidových reťazcov, ktoré sú kódovými reťazcami pre jeden alebo väčší počet polypeptidov, schopných vyvolávať tvorbu ochranných protilátok proti hlístam, pričom tieto reťazce obsahujú jednu alebo väčší počet oblastí, určujúcich antigénne vlastnosti v kódových reťazcoch pre aminopeptidázy z obr. 2, 3, 4

alebo 5 (reťazce č. 1 až 15).

Podstatu vynálezu tvoria aj syntetické polypeptidy, obsahujúce jeden alebo väčší počet reťazcov aminokyselín, tvoriacich enzým aminopeptidázu alebo antigénnu časť tohto enzýmu, v podstate zodpovedajúcu celému reťazcu alebo časti nukleotidového reťazca z obr. 2, 3, 4 alebo 5 (reťazce č. 1 až 15) alebo funkčne ekvivalentnému variantu týchto reťazcov, odlišné od syntetického polypeptidu, zodpovedajúceho proteínovému dubletu H110D alebo od syntetického polypeptidu, zodpovedajúceho akémukoľvek jednotlivému polypeptidovému reťazcu, opísanému v prihláške W090/11086.

Vynález sa teda týka aj syntetických polypeptidov, ktoré obsahujú reťazce aminokyselín, tvoriacich enzým aminopeptidázy alebo jej antigénnu časť, v podstate zodpovedajúcu celému reťazcu alebo časti nukleotidového reťazca z obr. 2, 3, 4 alebo 5 (reťazec č. 1 až 15) alebo môže ísť o funkčne ekvivalentný variant takéhoto reťazca, v podstate zbavený iných zložiek *Haemonchus contortus*.

Vynález sa ďalej týka vakcíny na stimuláciu imunologickej odpovede proti hlístam u človeka alebo u iného živočícha, vakcína obsahuje aspoň jeden vyššie definovaný syntetický polypeptid spolu s nosičom, prijateľným z farmaceutického hľadiska.

V medzinárodnej patentovej prihláške W090/11086 sa opisuje celý rad polypeptidov alebo časti polypeptidových reťazcov, získaných proteolytickým rozštiepením alebo chemickým štiepením proteínového dubletu H110D, môže ísť o nasledujúce reťazce:

- (a) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu
Phe
- (b) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser
- (c) Met Gly/Phe Asn Phe Lys Ile Glu/Val Thr/Glu
Ala Gly
- (d) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Lys Asp/Ala Thr/Lys
Leu - Ile Thr

- (e) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Val
- (f) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val
- (g) Met Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Glu Ala
Phe Tyr
- (h) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln
Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro
- (i) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu
Asn/Leu Leu Asn/Gly
- (j) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn
- (k) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp -
Ile - - - Lys Gly
- (l) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe
Asp Asp Ile Thr? Tyr - - Gly Pro Ser
- (m) Lys - Glu Glu Thr Glu Ile Phe Asn Met
- (n) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala
Leu
- (o) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys
- (p) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu
Phe -Ala Thr Ala Leu
- (q) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser -
Tyr? - Thr
- (r) Met Glu/Phe Asn Phe Leu Ile Glu/Val Thr/Glu
Ala Gly - Ile Thr
- (s) Met Gly Phe Leu Val Thr Val Glu Ala Phe
Tyr - Thr Ser
- (t) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln
Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro
- (u) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Leu Asp/Ala Thr/Lys
Leu - Ile Thr - Gly
- (v) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Val
Gly?
- (w) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val
- (x) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu
Asn/Leu Leu Asn/Gly
- (y) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn
- (z) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp -
Ile - - - Lys Gly

(aa)	Lys	Ala	Val	Glu	Val/Pro	Ala	Glu	Ala	Phe
	Asp	Asp	Ile	Thr?	Tyr	-	-	Gly	Pro Ser
(bb)	Lys	-	Glu	Gln	Thr	Glu	Ile	Phe	Asn Met
(cc)	Lys	-	-	-	Pro	Phe	Asn/Asp	Ile	Glu
	Ala	Leu							
(dd)	Asp	Gln	Ala	Phe	Ser	Thr	Asp	Ala	Lys

Tam, kde nebola dosiahnutá istota, je táto skutočnosť vyjadrená napríklad vo forme Phe/Gly, kde prvý kód z troch písmen znamená pravdepodobne správny zvyšok aminokyseliny podľa sily signálu alebo bola neistota znázornená uvedením otáznika, prípadne je formou "-" naznačená, že ide o zvyšok, ktorého povaha dosiaľ nie je známa.

Vynález sa týka vyššie uvedených typov reťazcov s výnimkou tých, ktoré boli uvedené v medzinárodnej patentovej prihláške č. WO90/11086.

Pod pojmom "polypeptid" sú zahrnuté tak bielkoviny s plnou dĺžkou, tak aj kratšie reťazce peptidov.

"Funkčný ekvivalent" sa vo vzťahu k polypeptidovému reťazcu aminokyselín rozumie ako polypeptidový reťazec, príbuzný alebo odvodený od vyššie uvedených polypeptidových reťazcov, pričom reťazec aminokyselín bol modifikovaný substitúciou jednej alebo väčšieho počtu aminokyselín, ich adíciou alebo vypustením, môže tiež ísť o reťazce, v ktorých boli aminokyseliny chemicky modifikované vrátane glykolýzy alebo deglykolýzy, avšak ktoré si uchovávajú protektívnu antigénnu alebo imunogénnu účinnosť. Takéto funkčne ekvivalentné varianty sa môžu vyskytovať ako prirodzené biologické variácie alebo je možné ich pripraviť za použitia známych postupov, je napríklad možné pripraviť funkčne ekvivalentné rekombinantné polypeptidy za použitia známych postupov pre cielenú produkciu mutácií, pre štatistickú tvorbu mutácií alebo enzymatickým štiepením a/alebo väzbou aminokyselín.

Syntetické polypeptidy podľa vynálezu je možné všeobecne označiť ako reťazce s ochranným antigénnym účinkom. Pod pojmom "ochranný antigén", tak ako sa v priebehu prihlášky používa, sa rozumejú antigény, ktoré sú schopné u hostiteľa

vyvolať ochrannú imunologickú odpoveď, to znamená takú odpoveď, ktorá vedie k vzniku imunologických efektorových buniek, molekúl alebo protilátok, ktoré poškodzujú, inhibujú alebo usmrcujú parazity a tým "chránia" hostiteľa od klinických alebo subklinických prejavov ochorenia a odpoveď sa môže za bežných okolností prejaviť tvorbou protilátok, schopných spôsobiť inhibíciu metabolických funkcií parazita, čo vedie k spomaleniu jeho rastu, vymiznutia produkcie vajíčok a/alebo uhynutiu.

Syntetické polypeptidy podľa vynálezu je možné pripraviť expresiou v hostiteľskej bunke, ktorá obsahuje rekombinantnú molekulu DNA s nukleotidovým reťazcom vo vyššie uvedenom širokom význame, operatívne viazaným na reťazec na riadenie expresie alebo môže ísť o vektor na klonovanie rekombinantnej DNA s obsahom takejto molekuly DNA. Expresiu polypeptidov je možno dosiahnuť aj priamym vstreknutím molekuly DNA podľa vynálezu do hostiteľskej bunky.

Syntetické polypeptidy, k expresii ktorých týmto spôsobom došlo, môžu byť polypeptidy, získané fúziou a obsahujúce časť, ktorá je imunogénna a zahŕňa celú aminopeptidázu alebo jej časť a ďalší polypeptid, pre ktorý je kódom, uvedená DNA alebo rekombinantná molekula, s ňou spojená. Môže byť napríklad žiaduce získať zloženú bielkovinu, ktorá obsahuje syntetickú aminopeptidázu alebo iný polypeptid podľa vynálezu, viazaný na bielkovinu, napríklad beta-galaktozidázu, fosfatázu, glutatión-S-transferázu, ureázu, antigén jadra hepatitídy B (Francis a ďalší, 1989) a podobne. Väčšina zložených bielkovín je získaná expresiou rekombinantného génu, v ktorom sú spojené dva kódové reťazce vo fáze v čítacom rámci. Je však možné polypeptidy naviazať aj chemickým spôsobom in vitro. Všetky takéto deriváty molekuly nukleovej kyseliny, ktorá je kódom pre aminopeptidázu a jej reťazce aminokyselín sú do vynálezu zahrnuté. Technika na expresiu pre rekombinantnú DNA a polypeptid je opísaná napríklad v publikácii Sambrook a ďalší, 1989. Syntetické polypeptidy je možné získať aj chemickým spôsobom, napríklad známou Merrifieldovou syntézou na tuhej fáze.

Vynález sa týka aj použitia vyššie definovaných molekúl nukleových kyselín alebo syntetických peptidov alebo polypeptidov na výrobu vakcíny na stimuláciu imunologickej odpovede u človeka a iných živočíchov, s výhodou u cicavcov proti infekcii hlístami.

Uvedené reťazce podľa vynálezu je teda možné využiť na stimuláciu imunologickej odpovede u človeka alebo iných živočíchov, s výhodou u cicavcov proti infekcii hlístami, na tento účel sa týmto živočíchom podáva vakcína, ktorá obsahuje jeden alebo väčší počet polypeptidov, pre ktoré sú kódovými reťazcami vyššie definované nukleotidové reťazce.

Vakcíny je možné pripraviť za použitia postupov, ktoré sú na výrobu vakcín všeobecne známe. Vakcína môže obsahovať jeden alebo väčší počet syntetických polypeptidov podľa vynálezu a prípadne jeden alebo väčší počet vhodných pomocných prostriedkov, ako sú napríklad hydroxid hlinitý, saponín, QuilA alebo jeho vysoko čistené formy, muramyl-dipeptid, minerálne oleje alebo Novasomy a jeden alebo väčší počet z farmaceutického hľadiska prijateľných nosičov alebo riedidiel. Vhodnými nosičmi môžu byť kvapalné prostredia, napríklad roztoky chloridu sodného, vhodné na podanie peptidov alebo polypeptidov chorým. Prostriedky môžu obsahovať ešte ďalšie zložky, napríklad konzervačné činidlá.

Vakcína môže obsahovať vírus alebo hostiteľskú bunku, napríklad mikroorganizmus, tieto organizmy potom obsahujú molekulu nukleovej kyseliny, napríklad molekulu DNA podľa vynálezu na stimuláciu imunologickej odpovede proti polypeptidu, pre ktorý je kódom uložená molekula nukleovej kyseliny.

Vakcínu je možné podávať akýmkoľvek bežným spôsobom, napríklad perorálne alebo parenterálne, s výhodou vnútrosvetovou injekciou, prípadne v určitých intervaloch, je napríklad možné použiť dve injekcie, podané v intervale 7 až 28 dní.

Ako už bolo uvedené, reťazec aminokyselín, získaný z nukleotidového reťazca, znázorneného na obr. 2, 3, 4 alebo 5 má homológiu reťazca so skupinou aminopeptidáz, ktoré sú

integrované v membránach, Táto skutočnosť bola dokázaná analýzou rôznych databáz, ktoré sú k dispozícii v software Genetics Computer Group Sequence, verzia 7.01, z novembra 1991, ako je uvedené v publikácii Devereux a ďalší, 1984, bola použitá translácia reťazcov z obr. 2, 3, 4 alebo 5. Dvojaké porovnanie uvedeného typu je napríklad znázornené na obr. 6.

Expresiu kódových reťazcov pre aminopeptidázy podľa vynálezu je možné dosiahnuť za použitia známych postupov a známych systémov pre expresiu vrátane použitia prokaryotických buniek, napríklad buniek *E. coli* a eukaryotických buniek, napríklad kvasiniek alebo systému hmyzových buniek, infikovaných baculovírusom alebo transformovaných buniek cicavcov, použiť je možné aj transgénnych živočíchov a rastlín. Zvlášť výhodné je dosiahnuť expresiu nukleotidových reťazcov za použitia transgenických systémov nematódov, napríklad systému pre nematóda *Caenorhabditis*, systém bol opísaný napríklad v publikáciách Fire, 1986, Fire a ďalší, 1989, Spieth a ďalší, 1988, Han a ďalší, 1990.

Vynález sa týka aj spôsobu výroby syntetického polypeptidu tak, ako bol vyššie definovaný, postupuje sa tak, že sa pestuje eukaryotická alebo prokaryotická bunka s obsahom vyššie definovanej molekuly nukleovej kyseliny za podmienok, pri ktorých dochádza k expresii a polypeptid, získaný týmto spôsobom sa izoluje.

Podstatu vynálezu tvoria aj vektory na klonovanie a expresiu, ktoré obsahujú nukleotidové reťazce podľa vynálezu. Takéto vektory na expresiu zahrňujú príslušné riadiace reťazce, napríklad reťazce na transláciu, ako kodóny pre začiatok a koniec a tiež riadiace prvky na transkripciu, napríklad oblasti promótor-operátor, miesta pre väzbu ribozómu, stop reťazca na ukončenie transkripcie, tieto prvky sú zaradené v čítacom rámci s molekulou nukleovej kyseliny podľa vynálezu.

Vektory podľa vynálezu zahrňujú plazmidy a vírusy vrátane bakteriofágov a eukaryotických vírusov, je možné ich získať známym spôsobom a dosiahnuť expresiu v celom rade

systémov na expresiu, ako je v danej oblasti techniky všeobecne známe. Vhodným vírusovým vektorom vo vyššie uvedenom zmysle je napríklad baculovírus a aj adenovírus a vírusy vaccinia. Je opísaný ešte celý rad iných vírusových vektorov.

Sú známe rôzne postupy, ktoré je možné použiť na uloženie takýchto vektorov do prokaryotických alebo eukaryotických buniek na dosiahnutie expresie alebo je možné tieto vektory uložiť do zárodkovej expresie alebo do somatických buniek za vzniku transgenických živočíchov. Vhodné postupy na transformovanie alebo transfekciu sú dostatočne opísané v literatúre.

Transformované eukaryotické alebo prokaryotické hostiteľské bunky, bunky po transfekcii alebo transgenické organizmy s obsahom nukleovej kyseliny podľa vynálezu, tak ako boli uvedené vyššie, tvoria tiež súčasť podstaty vynálezu.

Všeobecne je možné uviesť, že eukaryotické systémy na expresiu a najmä systémy na expresiu z nematódov majú výhodu, ktorá spočíva v tom, že môže dochádzať k post-translačnému spracovaniu a najmä môže dôjsť ku glykozylácii, pričom v prípade transgenického systému z nematódov táto glykozylácia zodpovedá spracovaniu, ku ktorému dochádza v prípade natívnej bielkoviny. Táto skutočnosť je veľmi dôležitým znakom spôsobu podľa vynálezu vzhľadom na to, že v celom rade prípadov je potrebné rekombinantnú bielkovinu ďalej spracovávať na dosiahnutie optimálneho biologického účinku.

Expresia v systémoch buniek cicavcov má aj celý rad výhod. Bunkový materiál z cicavca môže zaistiť dobrú reprodukciu natívnej formy a protektívnych epitóпов antigénu vzhľadom na to, že v eukaryotickom systéme na expresiu bude dochádzať k príbuznejším spôsobom glykozylácie, k vzniku disulfidových väzieb a ďalších post-translačných modifikácii než v prípade *E. coli*, kde môže dôjsť k produkcii nerozpustnej bielkoviny, vyžadujúcej ďalšie spracovanie a vykazujúcej nedostatočnú reprodukciu v natívnej forme. Okrem toho pri glykozylácii v bunkovom materiáli cicavcov zrejme nebude dochádzať k vyvolaniu imunologickej odpovede, ktorá znižuje

protektívnu odpoveď proti bielkovine. V prípade, že má byť chránený človek alebo hospodárske zvieratá, je teda výhodné použiť bunkové línie fibroplastov alebo myelómových buniek človeka alebo hospodárskych zvierat, ako sú línie HeLa-ľudská bunková línia, BHK-bunková línia obličiek zárodku škrečka, VERO-obličková bunková línia opíc, FR3T3-línia Fusharových fibroblastov potkana, NIH3T3-bunková línia fibroblastov myši, C127I-bunková línia nádoru mliečnej žľazy myši, CV-1-bunková línia obličkových fibroblastov myších embryí, L-bunky-myši bunková línia, CHO-bunková línia vaječníkov čínskeho škrečka, NSO, NSI, SP2 a ďalšie bunkové línie myšieho myelómu a aj bunkové línie potkanieho myelómu, ako YB2/0 a Y3.

Vektory, vhodné pre rôzne typy bunkových línií cicavcov sú známe. Všeobecne tieto vektory budú obsahovať promótor a/alebo zosilňovač transkripcie, operatívne spojený s kódovým nukleotidovým reťazcom pre antigén alebo jeho fragment. Vhodnými promótorami sú napríklad promótor typu SV40, napríklad vektor PSVL, promótor z cytomegalovírusu CMV, promótor myšieho metalotioneínu I a dlhý opakujúci sa terminálny reťazec vírusu nádoru myšej mliečnej žľazy. Vektor s výhodou obsahuje vhodné označenie, napríklad gén pre reduktázu dihydrofolátu alebo pre glutamínsyntetázu. Vektory týchto typov boli opísané vo zverejnených medzinárodných prihláškach WO86/05807, WO87/04462, WO89/01036 a WO/89/10404.

Transfekciu hostiteľských buniek je možné uskutočniť za použitia štandardných postupov, napríklad za použitia fosforečnanu vápenatého, DEAE dextránu, polybrénu, za použitia fúzie protoplastov, lipozómov, priamej injekcie alebo otvorenie pórov pôsobením elektrického prúdu. Posledný z uvedených postupov je výhodný, spôsoby transfekcie bunkových línií cicavcov za použitia otvorenia pórov pôsobením elektrického prúdu boli opísané v publikácii Andreason a ďalší, 1980. Všeobecne sa lineárna DNA do buniek ukladá ľahšie než cirkulárna DNA.

Bolo dokázané, že bielkovina H110D je jedinečným a nezvyčajným spôsobom glykozylovaná, čo zrejme prospieva

k imunologickému účinku vzhľadom na to, že celý rad až dosiaľ získaných monoklonálnych protilátok proti H110D z *Haemonchus* rozpoznáva uhľohydrátové epitópy, ktoré môžu byť veľmi dôležité pri vývoji vhodnej vakcíny.

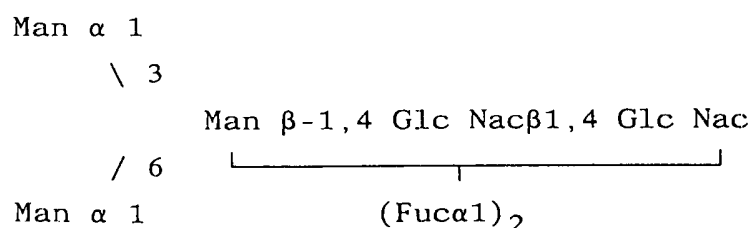
Zvlášť boli dokázané nasledujúce zvláštnosti glykozylácie H110B z *Haemonchus*:

- i) približne 65 % oligosacharidov je viazaných na atóm dusíka, zvyšok na atóm kyslíka,
- ii) prevažná časť, napríklad 48 % oligosacharidov, viazaného na atóm dusíka, je komplexného tvaru
- iii) v podstate všetok oligosacharid, napríklad viac než 95 % tejto látky je zbavených náboja,
- iv) relatívny molárny obsah pre monosacharidy je N-acetyl-galaktózamín 1,0, fukóza 3,6, galaktóza 4,1, glukóza 4,4, manóza 6,2 a N-acetylglukózamín 5,2,
- v) oligosacharidy, odlišné od hlavného oligosacharidu (označovaného ako oligosacharid D) sú v podstate odolné proti degradácii rôznymi exoglykozidázami, ako sú alfa-D-manozidáza, beta-D-manozidáza, beta-D-glukozidáza, beta-D-galaktozidáza, alfa-D-galaktozidáza, alfa-L-fukozidáza, beta-D-xylozidáza a beta-D-N-acetylglukózamidáza.

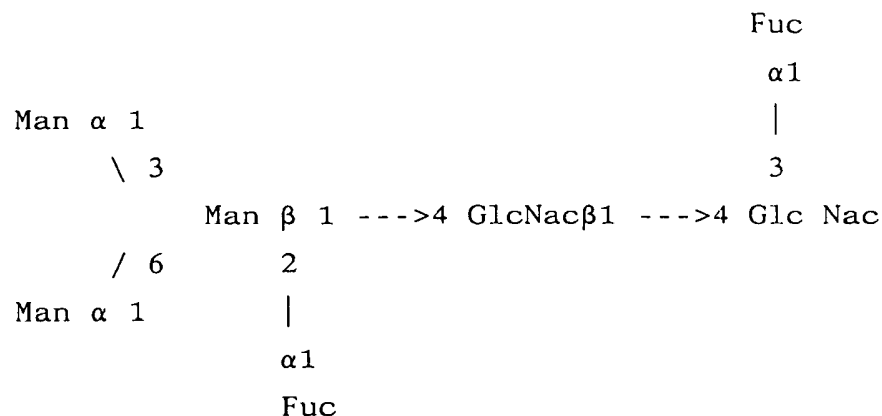
Oligosacharidy a glykoproteíny tohto typu potom taktiež tvoria podstatu vynálezu.

Oligosacharid D glykoproteínu H110D z *Haemonchus* je viazaný dvoma zvyškami fukózy, spojenými väzbou alfa-1,3 a alfa-1,2 s jadrom, tvoreným manozo-(N-acetylglukóзамínom)₂.

Podstatu vynálezu teda tvorí aj oligosacharid, ktorý je možné vyjadriť vzorcom



a najmä vzorcom:



a to najmä v prípade väzby na bielkovinu, napríklad na rekombinantnú bielkovinu, ako bielkovinu typu aminopeptidázy z hlíst alebo jej antigénny fragment alebo v prípade použitia na tvorbu antiidiotypických antigénov, najmä na imunizáciu veľmi mladých živočíchov.

Živočíšne glykoproteíny majú zvyčajne oligosacharid s väzbou fukóza-alfa-1,6, takže väzba fukóza-alfa-3 v oligosacharide podľa vynálezu je nezvyčajná.

Vynález bude ďalej podrobnejšie opísaný so zvláštnym ohľadom na bielkovinu H110D z *Haemonchus contortus*. Je nutné zdôrazniť, že rôznymi postupmi, napríklad histochemickým postupom a hybridizáciu DNA bolo možné dokázať ekvivalenty bielkoviny D110D aj v iných čeladiach parazitov. Je pravdepodobné, že bielkovina H110D je komplex, ktorého tvorby sa zúčastní väčší počet génov a že okrem toho môže kódový nukleotidový reťazec javiť rôzne variácie reťazca medzi rôznymi kmeňmi a aj v rôznych štádiách životného cyklu hlíst. Okrem toho môžu existovať viacpočetné formy enzýmu, takzvané izoenzýmy, k expresii ktorých môže dochádzať odlišným spôsobom v rôznych stupňoch alebo v rôznych kmeňoch. Pri týchto postupoch boli reťazce DNA a tým aj následné reťazce aminokyselín stanovované z klonov cDNA a produktov PCR, získaných z mRNA, zodpovedajúce génu pre H110D rekombinantnou technológiou za použitia DNA z rôznych zdrojov a v rôznych životných štádiách parazita *H. contortus*.

Analýza reťazca cDNA a produktov PCR umožnila identifikovať tri blízko príbuzné reťazce pre H110D, ktoré boli označené H11-1 (reťazec č. 19), H11-2 (reťazec č. 20) a H11-3 (reťazec č. 21). H11 je tvorený troma prekrývajúcimi sa reťazcami, klonom cDNA AustB1 (reťazec č. 6). PCR-produktom A-648 (reťazec č. 9) a 3'-zakončením PCR-produktu 014-178 (reťazec č. 12). Reťazec H11-2 obsahuje PCR-produkty A-650 a produkt s veľkosťou 2,5 kb (reťazec č. 10 a 7). H11-3 obsahuje PCR-produkty s veľkosťou 3,5 kb a A-649 (reťazce č. 8 a 11). Špecifické vzťahy medzi jednotlivými analyzovanými typmi cDNA a klonmi PCR-produktov a medzi H11-1, H11-2 a H11-3 sú zhrnuté na obr. 1 a podrobnejšie znázornené na obr. 3, 4 a 5.

Rozdiely a variácie v reťazcoch, ktoré boli získané z klonov cDNA a z PCR-produktov sú zrejmé najmä z obr. 2, 3, 4 a 5 (reťazce č. 1 až 15 a 19 až 21), výsledky sú tiež zhrnuté v tabuľke 1.

T a b u ľ k a 1

Homológia odvodených reťazcov aminokyselín, získaných transláciou nukleotidových reťazcov z obr. 2

	% podobnosti	% totožnosti
H11-1 : H11-2	77	63
H11-1 : H11-3	79	65
H11-2 : H11-3	82	69

Rozdiely sú zrejmé spôsobené odlišným mRNA (v skupine génov). Okrem toho môžu byť variácie aspoň z časti spôsobené rôznymi variantami kódového reťazca pre H110D alebo mRNA, prítomné v rôznych štádiách životného cyklu alebo v kmeňoch, líšiacich sa zemepisným pôvodom.

V nasledujúcej tabuľke 2 sú ďalej uvedené stupne totožnosti a podobnosti medzi zodpovedajúcim odvodeným reťazcom

aminokyselín a dvoma známymi reťazcami pre aminopeptidázy cicavcov.

T a b u ľ k a 2

Homológia reťazca aminokyselín H110D, aminopeptidázy M (ApM) potkana a aminopeptidázy A (ApA) myši

	% podobnosti	% totožnosti
H11-1 : ApM	55	32
H11-1 : ApA	55	31
H11-2 : ApM	52	31
H11-2 : ApA	54	31
H11-3 : ApM	53	32
H11-3 : ApA	52	30

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 je znázornená mapa analyzovanej cDNA pre H110D z *H. contortus* a klonov PCR-produktov a ich vzťahy a relatívne polohy v mRNA pre H110D.

Na obr. 2 je znázornený nukleotidový reťazec H110D označený H11-3 (reťazec č. 21), odvodený od klonovaných PCR produktov z reťazcami č. 8 a 11 a klon cDNA M1AUS s reťazcom č. 5), ďalej H11-2 (reťazec č. 20, odvodený od klonovaných PCR-produktov s reťazcami 7 a 10) a H11-1 (reťazec č. 19, odvodený od klonovaných PCR-produktov s reťazcami č. 9 a 12 a klon cDNA AustB1 s reťazcom č. 6).

Na obr. 3 je znázornený reťazec H11-3 (reťazec č. 21 z obr. 2) spolu s klonmi cDNA M1 a M1AUS (reťazec č. 1 a 5).

Na obr. 4 je znázornený reťazec H11-2 (reťazec č. 20 z obr. 2) a klon cDNA B2 (reťazec č. 4).

Na obr. 5 je znázornený reťazec H11-1 (reťazec č. 19) a jeho porovnanie s cDNA B1A a Aust B1 (reťazce č. 2 a 6).

Na obr. 6 sú znázornené a) odvodené reťazce aminokyselín (reťazec č. 22, 23 a 24) od reťazcov DNA H11-1, H11-2 a H11-3 z obr. 2, ďalej bi) a ii) sú odvodené reťazce aminokyselín z H11-3 v porovnaní so známym reťazcom aminokyselín pre aminopeptidázu M z potkaních mikrozómov (Watt a ďalší, 1989) a s reťazcom pre aminopeptidázu A z myších mikrozómov (Wu a ďalší, 1990). Totožné úseky sú v rámcikoch, pomlčky označujú priestory, ktoré boli zavedené tak, aby bolo možné vyznačiť homológiu medzi porovnanými reťazcami. Je použitý kód pre aminokyseliny s využitím jediného písmena pre každú aminokyselinu. Horizontálna čiara nad reťazcom označuje polohu transmembránovej oblasti, hviezdikami je znázornená poloha časti reťazca pre väzbu zinku. Stupne podobnosti sú uvedené v tabuľkách 1 a 2.

Na obr. 7 sú porovnané reťazce aminokyselín (označené Pep A, Pep B, Pep C, Pep D a Pep E), získané z CNBr a Lys-C-fragmentov bielkoviny H110D vyššie opísaným spôsobom (podľa medzinárodnej patentovej prihlášky W090/11086, polypeptidové reťazce a), b), e), k) a aa)), uvedené sú tiež tri nové reťazce (reťazce č. 16, 17 a 18) získané z bielkoviny H110D štiepením, elastázou alebo termolyzínom pri translácii a) H11-1, b) H11-2 a c) H11-3.

Na obr. 8 je znázornený Western blot integrálnych bielkovín membrány, ktoré sa nachádzajú v extrakte dospelých jedincov *Haemonchus contortus* po použití afinitných čistených protilátok z potenciálnych klonov H110D a) antigény v extrakte *Haemonchus* za použitia zmáčadla, rozpoznávané antisérom proti extraktu, b) protilátky, vymývané v toho istého prúžku ako v prípade a) po opakovanej skúške proti blotu uvedeného extraktu, potvrdená je úspešná elúcia, c) protilátky rovnaké ako v prípade b), schopné sa viazať na klon M1 bielkoviny po expresii silno rozpoznávajú oblasť s veľkosťou 110 000 (a pomerne ostro ohraničený pás s molekulovou hmotnosťou 205 000) a d) nedochádza k väzbe protilátky v prípade, že sa spolu so sérom použije nerekombinovaná bielkovina.

Na obr. 9 je znázornený Northern blot pre čistenú mRNA

z *Haemonchus contortus* vo veku 11, 15 a 23 dní po použití a) cDNA, klonu M1 (reťazec č. 1), b) cDNA, klon M1 AUS (reťazec č. 5), c) cDNA, klon B1A (reťazec č. 2 a 3), d) cDNA, klon AustB1 (reťazec č. 6), e) klonovaný PCR-produkt 014-872 (3,5 - 2, reťazec č. 8) a f) klonovaný PCR-produkt 014-015 (reťazec č. 7). Čísla 11, 15 a 23 označujú vek *Haemonchus*, z ktorého bola získaná mRNA.

Na obr. 10 je znázornený Southern blot DNA-genómu *Haemonchus contortus* za použitia cDNA klonu M1AUS (reťazec č. 5), B1A (reťazec č. 2 a 3) a AustB1 (reťazec č. 6) a PCR-produktov 014-872 (3,5 - 2, reťazec č. 8) a 014-015 (reťazec č. 7).

a) bloty boli premyté pri mierne obmedzujúcich podmienkach,

b) bloty boli premyté pri vysoko obmedzujúcich podmienkach.

V prípade každej vzorky obsahovala dráha 1 vzorku lambda-DNA, rozštiepené HindIII ako označenie alebo neobsahovala žiadne označenie, dráhy 2 a 3 obsahovali DNA genómu *Haemonchus*, rozštiepenú enzýmami EcoRI a HindIII.

Na obr. 11 je znázornený Western blot rekombinantných zložených bielkovín GST-M1 a GST-B1A, ako sonda boli použité protilátky proti elektroforeticky čistenej bielkovine H110D (H110DE), čistené afinitnou chromatografiou.

Na obr. 12 je znázornený Western blot antigénu ConA H110D, ako sonda bol použitý antisérum proti ConA H110D a antisérum proti rekombinantným zloženým bielkovinám GST-M1 a GST-B1A.

Na obr. 13 sú znázornené a) výsledky analýzy bielkovín H110D a aktivita enzýmu aminopeptidázy vo frakciách, ktoré boli získané chromatografiou na ionomeniči za použitia ConA H110D na stĺpci MonoQ, b) SDS-PAGE pre frakcie, znázornené na obr. 13a).

Na obr. 14 sú znázornené

a) hodnoty pH, pri ktorých boli získané frakcie pri pokuse so stanovením izoelektrického bodu,

b) elektroforéza na SDS-PAGE za redukčných podmienok pre frakcie z obr. 14a), spodný pás dubletu H110D je vo frakcii 6 a horný pás vo frakcii 16, množstvo v jednot-

livých frakciách sa zmení,

- c) Western blot pre frakcie, znázornené na obr. 14b), ako sonda boli použité i) monoklonálne protilátky TS 3/19,7 a ii) afinitnou chromatografiou čistené polyklonálne protilátky proti M1, kontrolné protilátky nevyvolali žiadnu zistiteľnú reakciu.

Na obr. 15 sú znázornené a) hodnoty pH, pri ktorých boli získané frakcie pri ďalšom pokuse na získanie hodnoty izoelektrického bodu, b) elektroforézou na SDS-PAGE za redukčných podmienok pre frakcie z obr. 15a), spodný pás dubletu H110D sa nachádza vo frakciách 4 až 6 a spodný pás vo frakciách 16 až 18, množstvo v jednotlivých frakciách sa mení, c) špecifické účinnosti frakcií z obr. 15b) vzhľadom na mikrosomálnu aminopeptidázu.

Na obr. 16 je znázornená ochrana oviec vakcináciou za použitia oddeleného horného pásu (U), spodného pásu (L), zmesi pásov (U + L) a dubletu (D) bielkoviny H110D.

- a) Kladenie vajíčok (počet vajíčok na + g výkalov),
b) uhynuté červy relatívne v porovnaní s kontrolami.

Na obr. 17 je znázornená ochrana oviec po vakcinácii za použitia vo vode rozpustného fragmentu H11S, získaného z bielkoviny H110D rozštiepením pôsobením elastázy a za použitia H11A fragmentu, rozpusteného v zmáčadle z bielkoviny H110D.

- a) Kladenie vajíčok (počet vajíčok na 1 g výkalov),
b) uhynuté červy relatívne v porovnaní s kontrolami (C).

Na obr. 18 sú znázornené príklady vzťahov medzi inhibíciou Ai), Bi) účinnosťou podobné aminopeptidáze M a Aii), Bii) účinnosťou podobné aminopeptidáze A bielkoviny H110D po pôsobení antisér jednotlivých oviec, očkovaných bielkovinou H110D, ochrana bola meraná v prípade Ai) a Aii) percentom redukcie uhynutých červov a v prípade Bi) a Bii) redukciou zníženia počtu vajíčok vo výkaloch v percentách. Prázdne štvorčeky znamenajú účinnosť proti H110D, plné štvorčeky účinnosť proti ferritínu koňa ako kontrolnej látke.

Na obr. 19 je znázornená histochemická lokalizácia účinnosti enzýmu aminopeptidázy u dospelých jedincov Haemon-

chus contortus, mikrofotografie zmrazených rezov dospělých samíc *Haemonchus contortus* dokazují účinnost aminopeptidázy (červené reakčné produkty sa javia ako tmavý pás, označený šípkou) v spojení s mikrokľmkmi (mv) čreva (i). Žiadne z ďalších tkanív, napríklad pokožka (c), hypodermis (h), genitálny systém (gt) alebo svalovina steny (wm) neobsahovala enzým. Na obr. 19a bol ako substrát použitý L-leucín-4-metoxi-beta-naftylamid, na obr. 19b bol ako substrát použitý alfa-(4-metoxi-beta-naftylamid) kyseliny glutamovej.

Na obr. 20 je znázornená mapa PCR-produktu 3,5, klon 2 (reťazec č. 8) po subklonovaní vo vektore na expresiu pBlueBacII z baculovírusu.

Na obr. 21 je znázornený Western blot extraktu z hmyzu *Spodoptera frugiperda* po infekcii baculovírusom, extrakt bol pripravený z buniek (Sf)9 za použitia protilátok proti H110DN ako sondy. U dvoch klonovaných plakov, P3A a P4A došlo k expresii imunopozitívnej bielkoviny H110D v plnej dĺžke (označené šípkou), v prípade kontrol nebolo možné expresiu dokázať.

Podstatu vynálezu tvoria aj molekuly nukleových kyselín, obsahujúce jeden alebo väčší počet nukleotidových reťazcov, v podstate zodpovedajúcich alebo v podstate komplementárnych k jednému alebo väčšiemu počtu reťazcov z klonov M1, B1A, B1A-3', B2, M1AUS, AustB1, 014-015 (2,5 PCR), 014-872 (3,5 PCR klon 2), A-648 (5'-zakončenie B1), A-650 (5'-zakončenie AustB1, klon 2), 014-178 (3'-zakončenie AustB1, klony 6 a 6), 014-872 (3,5 PCR, klon 10) a 014-872 (3,5 PCR, klon 19) až 21 z obr. 2, 3, 4 a 5 alebo reťazce, ktoré sú s týmito reťazcami v podstate homológne alebo ktoré hybridizujú s ktorýmkoľvek z uvedených reťazcov.

Ako už bolo uvedené, pri porovnávaní reťazcov rôznych vyššie uvedených klonov a počítačových databáz známych reťazcov bolo možné dokázať podstatnú homológiu pre skupinu mikrosomálnych aminopeptidáz (Ec. 3.4.11-). Enzymatické štúdie a štúdie, týkajúce sa inhibítorov, vykonávané s bielkovinou H110D a s jej frakciami potvrdzujú, že bielkovina je v skutočnosti mikrosomálnou aminopeptidázou (mikrosomálnou

hydrolázou alfa-aminoacylpeptidu). Tieto skúšky ďalej dokázali prítomnosť účinnosti typu aminopeptidázy A a aminopeptidázy M, takže pre každú zo zložiek dubletu H11OD je možné jednotlivo dokázať enzymatickú účinnosť.

Boli tiež vykonané skúšky s proteolytickým štiepením bielkoviny H11OD. Pri použití enzýmu elastázy bolo možné dokázať, že bielkovinu H11OD je možné čiastočne rozštiepiť za vzniku dvoch frakcií a to frakcie, rozpustnej v zmáčadlách, ktorá zostáva spojená s membránou a frakcie, ktorá je rozpustná vo vode a bola označená H11S. H11S sa vyskytuje vo forme diméru bielkoviny, ktorý je možné rozložiť na dve zložky. Je zaujímavé, že bolo dokázané, že vo vode rozpustná frakcia H11S má len účinnosť typu aminopeptidázy M, ale frakcia, ktorá je rozpustná v zmáčadlách, má len účinnosť typu aminopeptidázy A.

V nasledujúcom príklade je podrobne opísaný rad pokusov, ktoré viedli k stanoveniu reťazcov, znázornených na obr. 1 až 7.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Metódy

Konštrukcia banky U.K. lambdaGT11

Izolácia mRNA

0,5 g dospelých jedincov *Haemonchus contortus* pôvodu UK, zmrazených v kvapalnom dusíku bolo rozdrvených v kvapalnom dusíku za použitia vopred ochladeného mažiara a tlčika. RNA bola z rozdrveného materiálu extrahovaná za použitia 10 objemov 4 M guanidínhydrochloridu v 25 mM citráte sodného s obsahom 0,5 % sarkosylu a 0,7 % 2-merkaptoetanolu s následnou extrakciou fenolom a chloroformom za použitia postupu podľa publikácie Chomczynski a Sacchi, 1987. Z tohto materiálu bola pripravená mRNA afinitnou chromatografiou na oligo dT celulóze, dvakrát opakovanou podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982, kvalita bola overená transláciou in vitro za

použitia skúšobného balíčka s lyzátom retikulocytov králika a ^{35}S -metionínu (Amersham International plc) podľa návodu výrobcu. Týmto spôsobom boli dokázané polypeptidy až do molekulovej hmotnosti 120 000.

Príprava komplementárnej DNA

DNA, komplementárna k prvému reťazcu (cDNA) bola syntetizovaná z 1 mikrogramu mRNA za použitia náhodnej syntézy za použitia priméru a reverznej transkriptázy vtákov, druhý reťazec bol syntetizovaný za použitia RNázy H a DNA polymerázy I z *E. coli*, potom boli upravené 3'-prečnievajúce konce za použitia T4 DNA polymerázy spôsobom podľa publikácie Gubler a Hoffman, 1983. Výťažok cDNA s dvojitém reťazcom (ds) bol približne 400 ng z 1 mikrogramu mRNA. Táto ds cDNA bola analyzovaná elektroforézou na 1% agarózovom géli a potom autorádiografiou a bolo dokázané, že jej veľkosť je v rozmedzí 0,5 až 2,3 kb.

Klonovanie cDNA v lambdagt11

Vybraná cDNA bez vymedzenia veľkosti molekúl bola použitá na konštrukciu banky v lambdagt11 za použitia systému na klonovanie cDNA, skúšobného balíčka č. RPN 1280 (Amersham International plc) a skúšobného balíčka č. N 334, obsahujúca príslušné extrakty na postup *in vitro* (Amersham International plc) podľa návodu výrobcu, súčasne boli použité oligonukleotidové spojovníky so zakončením po odštiepení enzýmom EcoRI (5'GGAATTCC). Výsledná banka bola použitá spolu s kmeňom *E. coli* Y1090 v prítomnosti izopropyltio-beta-D-galaktozidu (IPTG) a 5-bróm-4-chlór-3-indolyl-beta-D-galaktozidu (X-gal), za týchto podmienok sa rekombinantná lambdagt11 javí ako číre "biele" plaky a prírodná lambdagt11 sa javí ako modré plaky. Banka obsahovala 90 % bielych plakov a účinnosť klonovania bola vypočítaná ako 4×10^7 jednotiek na tvorbu plakov, pfu/mikrogram cDNA, titer banky bol 2×10^6 pfu/ml. Analýza DNA v 20 náhodne odobratých vzorkách dokázala prie-

mernú veľkosť uloženého reťazca 0,51 kb. Tento priemer bol však o niečo menený prítomnosťou jediného klonu s veľkosťou uloženého reťazca 3,5 kb. Väčšina uložených reťazcov obsahovala viac než 300 párov báz, bp. Potom bola táto banka λ mbdagtl1 bez amplifikácie, odvodená od uvedenej mRNA vyšetrená na imunologickú účinnosť.

Príprava protilátok na použitie ako sondy

Antisérum proti bielkovinám, integrovaným v membráne

Z dospelých jedincov *Haemonchus contortus* (pôvodu UK) boli vybraté čreva a homogenizovaná v ľadovom fyziologickom roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufróm s pH 7,4 s obsahom 1 mM kyseliny etyléndiamíntetraoctovej, EDTA a 1 mM fenylmetylsulfonylfluoridu, PMSF. Homogenát bol 10 minút odstredovaný v mikroadstredivke a usadenina bola znova uvedená do suspenzie v rovnakom pufri s obsahom 0,1 % objemových Tween 20. Po opakovanom odstredení bola usadenina znova uvedená do suspenzie v tom istom pufri s obsahom 2 % objemových prostriedku Triton X-100 a potom bola zmes extrahovaná 2 hodiny pri teplote 4 °C. Extrakt bol odstredený rovnakým spôsobom ako je uvedené vyššie; čím bol získaný supernatant, obsahujúci bielkovinu, typickú pre integrovanú bielkovinu v membráne, IMP.

Ovce boli hyperimunizované za použitia IMP vo Freundovom úplnom pomocnom prostriedku FCA vnútro svalovou injekciou 50, 50, 120 a 130 mikrogramov IMP, injekcie boli postupne v uvedenom poradí podané v týždňoch 0, 7, 11 a 15. Šesť týždňov po poslednej injekcii bolo odobrané sérum a označené EE-068.

Príprava integrálnych bielkovín membrány extrakciou *Haemonchus contortus* za použitia zmáčadla

Extrakt bol pripravený tak, že hlísty boli homogenizované v 5 až 10 objemoch PBS s obsahom 1 mM EDTA a 1 mM PMSF. Suspenzia bola odstredená pri 10 000 x g celkom 20 minút pri

teplote 4 °C a usadenina bola premytá tým istým pufrom s obsahom 0,1 % objemových prostriedku Tween 20, potom bol materiál extrahovaný piatimi objemami Tritonu X-100 v koncentrácii 2 % objemové vyššie uvedeným spôsobom. Supernatant bol znovu odstredený 1 hodinu pri 100 000 x g a výsledný supernatant, obohatený o H110D a obsahujúci ďalší IMP, bol použitý pre Western blot a na prípravu nedenaturovanej bielkoviny H110D, ako bude ďalej uvedené.

Príprava H110D a protilátka proti H110DN, čistená afinitným spôsobom

Extrakt, obohatený H110D bol podrobený afinitnej chromatografii na ConA-agaróze, potom bola vykonaná chromatografia na ionomeniči na stĺpci MonoQ (podľa patentových prihlášok W088/00835 a W090/11086). Čistená bielkovina H110D bola vnútrosvalovo podaná jahňatám v FCA. Boli podané tri dávky po 100 mikrogramoch v intervale 3 týždne. Sérum bolo odobrané 4 týždne po poslednej injekcii a čistené afinitným postupom absorpciou na stĺpec, obsahujúci čistenú bielkovinu H110D, viazanú na Sepharose (Pharmacia), aktivovanou brómkyánom. Väzba H110D na Sepharose, väzba antiséra a elúcia protilátok proti H110D boli uskutočnené podľa inštrukcií Pharmacia. Tieto protilátky, čistené uvedeným afinitným spôsobom boli označené anti-H110DN. Písmeno "N" odlišuje tieto protilátky od protilátok, ktoré boli produkované proti denaturovanej, elektroforeticky čistenej bielkovine H110D, tieto protilátky boli označené anti-H110DE.

Western blot

Western blot bol vykonaný zvyčajným spôsobom podľa publikácie Johnstone a ďalší, 1982.

Izolácia a charakterizácia klonov

Vyšetrenie banky lambdagt11 (pôvod UK) na imunologickú

účinnosť

Na zistenie imunologickej účinnosti banky bol v podstate použitý postup, opísaný v publikácii Bowtell a ďalší, 1986. Pred použitím bolo sérum (EE-068) zbavené protilátok proti *E. coli* absorpciou lyzátom a úplnými bunkami kmeňa *E. coli* Y1090. Potom bola banka nanosená na platne s *E. coli* Y1090 v množstve 10^3 pfu na jednu platňu s priemerom 90 mm. Platne boli prevrstvené nitrocelulózovými filtrami, impregnovanými IPTG a inkubované cez noc. Filtre boli premyté TBST (50 mM Tris s pH 7,4, 150 mM NaCl a 0,05 % objemových Tween 20) a potom boli blokované konským sérom v TBST s koncentráciou 5 % objemových po dobu 2 hodiny. Potom bolo pridané sérum EE-068, riedené v pomere 1:200 v TBST s obsahom 5 % konského séra a filtre boli inkubované 4 hodiny za mierneho kolísavého pohybu. Potom boli filtre znova premyté TBST a inkubované spolu s konskými protilátkami proti ovčiemu IgG, konjugovanými s peroxidázou z chrenu, HRP v riedení 1:500 v TBST s obsahom 5 % objemových konského séra po dobu 2 hodín. (Anti-sérum proti ovčiemu IgG bolo získané z koňa, protilátka proti IgG ovce bola čistená afinitnou chromatografiou na stĺpci Sepharose s ovčím IgG a protilátky boli konjugované s HRP podľa publikácie Nakane a Kawaoi, 1974). Filtre boli znova premyté TBST a pozitívne plaky boli zistené za použitia 0,6 mg/ml 3,3'-diaminobenzidínu (DAB) a 0,1% peroxidu vodíka (% objemové). Bolo odobratých 25 klonov s pravdepodobnou pozitivitou a tieto klony boli znovu sledované na prítomnosť protilátky proti afinitne čistenej bielkovine H11ODN vyššie uvedeným spôsobom. Po tejto druhej skúške bolo 5 rekombinantných klonov stále ešte pozitívnych, pričom u klonu, označeného M1 bol dokázaný najsilnejší signál.

Afinitné čistenie protilátky na rekombinantnom fágu

Boli pripravené platne so súvislou vrstvou buniek kmeňa *E. coli* Y1090 tak, že na každú platňu bolo nanosených 10^3

pľu každého z klonov lambda, pozitívnych na tvorbu protilátok alebo toho istého množstva nerekombinantného negatívneho kontrolného fágu lambdagt11. Platne boli inkubované 4 hodiny pri teplote 42 °C a potom na ne boli uložené filtre, impregnované IPTG a platne boli ďalej inkubované cez noc pri teplote 37 °C. Potom boli filtre z platní odstránené a premyté TBST, potom boli blokové konským sérom v koncentrácii 5 % objemových po dobu jednej hodiny. Potom boli filtre inkubované 6 hodín v antisére EE-068 v riedení 1:100, potom boli dôkladne opláchnuté TBST. Viazané protilátky boli z filtra vymyté za použitia 2 x 2 ml elučného pufra (5 mM glycínu, 500 mM NaCl, 0,2% Tween 20, pH 2,3) vždy po dobu 2 až 3 minúty, potom bol materiál neutralizovaný pridaním 200 mikrolitrov 1 M pufra Tris/HCl s pH 7,4, materiál bol zriedený v pomere 1:200 a použitý na vyšetrenie imunologickej účinnosti metódou Western blot za použitia obohateného extraktu H110D.

Reťazce DNA v klone M1

Z klonu M1 bola izolovaná lambda DNA spôsobom podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Fragment s veľkosťou 2,38 kb po štiepení enzýmami KpnI-SstI, obsahujúci fragment M1 s veľkosťou 300 bp sa izoluje elektroforézou na géli a potom sa čistí za použitia skúšobného balíčka GENE CLEAN (Stratagene, GENE CLEAN je chránená slovná známka BIO101) a potom sa subklonuje v plazmide pBluescript II SK (Stratagene). Fragment po štiepení enzýmom EcoRI sa čistí rovnakým spôsobom a potom sa znova subklonuje v rovnakom vektore.

Nukleotidový reťazec uloženého reťazca M1 sa stanoví za použitia balíčka na analýzu reťazca T7 (Pharmacia, U. K.) za použitia bežných aj reverzných primérov M13.

Príprava banky hľisty austrálskeho pôvodu v lambdagt11 a lambdaZAP

Izolácia mRNA

5 g dospelých jedincov *Haemonchus contortus* (austrálsky kmeň McMaster) bolo zmrazených v kvapalnom dusíku a potom mletých taktiež v kvapalnom dusíku a RNA bola extrahovaná horúcim fenolom podľa publikácie Cordingley a ďalší, 1983. Výťažok RNA bol celkom 10,35 mg. Potom bolo 1,3 mg tejto RNA použitých na prípravu mRNA afinitnou chromatografiou na oligo dT celulóze za použitia dvojitého čistenia spôsobom podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Výťažok mRNA bol 21,6 mikrogramov. Kvalita mRNA bola overená in vitro transláciou za použitia lyzátu retikolucytov králika v prítomnosti ^{35}S -metionínu (Amersham) podľa návodu výrobcu. Získaný produkt translácie mal zreteľne odlišné pásy vrátane pásov s veľkosťou vyššou než molekulová hmotnosť 200 000, ako bolo dokázané elektroforézou na SDS-polyakrylamidových géloch s následným vykonaním fluorografie.

Syntéza cDNA a príprava banky

Na prípravu cDNA za použitia oligo dT alebo štatistických primérov bol použitý 1 mikrogram mRNA a skúšobný balíček na syntézu cDNA (Amersham International plc) podľa návodu výrobcu. Bolo získaných 115 ng ds cDNA. Táto cDNA bola analyzovaná elektroforézou po označení ^{32}p na alkalickom agarózovom géli podľa inštrukcií na skúšobnom balíčku. Veľkosť reťazca cDNA, stanovená porovnaním s označením, ku ktorému bol použitý lambda-HindIII (New England Biolabs) bola 150 bp až viac než 10 kb, pričom väčšina reťazcov produktu mala veľkosť v rozmedzí 0,6 až 5 kb. Za použitia oligo dT-primérov a štatistických primérov boli získané vzorky ds cDNA spojené a naviazané na prebytok spojovníkov s obsahom 8 báz po štiepení EcoRI, 5'-GGAATTC3' (New England Biolabs, číslo katalógu 1018) po označení gama- ^{32}p -ATP a T4-polynukleotidkinázou. Takto viazaná cDNA potom bola rozštiepená enzýmom EcoRI a prebytočné spojovníky boli odstránené chromatografiou na Sepharose 4B (Pharmacia spôsobom

podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Frakcie zo stĺpca boli spojené do dvoch podielov, z ktorých jeden obsahoval cDNA s väčšou veľkosťou než 2 kb a druhý cDNA s veľkosťou nižšou než 2 kb. Každý podiel bol potom oddelene naviazaný na 1 mikrogram lambdaZapII po spracovaní enzýmom EcoRI a fosfatázou (Stratagene) a spracovaný oddelene za použitia balíčka Gipack Gold (Stratagene). Za použitia cDNA s väčším reťazcom bolo získaných $1,3 \times 10^5$ rekombinantných klonov, za použitia cDNA s kratším reťazcom bolo získaných $1,4 \times 10^5$ rekombinantných klonov, klony boli spojené, čím bola získaná banka, obsahujúca $2,7 \times 10^5$ klonov. Táto banka lambdaZap bola amplifikovaná za použitia buniek XL1-Blue (Stratagene) a banky v množstve 2×10^4 pfu na jednu platňu s priemerom 135 mm. Titer amplifikovanej banky bol 7×10^7 pfu/ml.

Ďalšie 2 mikrogramy mRNA boli použité na prípravu cDNA vyššie uvedeným spôsobom, avšak ako primér bol použitý len oligo dT. Výťažok ds cDNA bol 740 ng. Táto cDNA bola spracovaná EcoRI metylázou spôsobom podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982, potom boli pridané spojovníky EcoRI, v tomto prípade spojovníky s 12 bázami, 5'CCGGAATTCCGG3' (New England Biolabs, č. katalógu 1019). Po rozštiepení takto viazanej cDNA pôsobením EcoRI boli všetky frakcie zo stĺpca Sepharose 4B, ktoré obsahovali cDNA, spojené a naviazané na 2 mikrogramy lambdagt11 po rozštiepení EcoRI a po spracovaní fosfatázou (Stratagene). Naviazaná zmes bola rozdelená na dva podiely, ktoré boli spracované za použitia dvoch podielov Gigapack Gold (Stratagene) a získané materiály boli opäť spojené za vzniku banky lambdagt11 s obsahom 7×10^6 pfu. Táto banka bola amplifikovaná za použitia buniek ST9 a 5×10^5 pfu na jednu platňu s priemerom 135 mm. Titer amplifikovanej banky lambdagt11 bol $4,5 \times 10^{11}$ pfu/ml.

Vyšetrenie banky lambdagt11 z austrálskych hlíst za použitia antiséra proti H110D

Antiséra boli získané tak, že sa ovciám bola injekčne

podaná bielkovina H110D (pôvodu UK) po elektroforéze z polyakrylamidového gélu po elektroforéze na SDS nasledujúcim spôsobom. ConA H110D, získaný podľa zverejnených patentových prihlášok WO 88/00835 a WO 90/11086 bol podrobený elektroforéze na SDS polyakrylamidovom géli podľa publikácie Laemmli, 1970, čím bola získaná bielkovina H110D. Po elektroforéze bola oblasť polyakrylamidového gélu s obsahom bielkoviny H110D vybratá, uložená do zariadenia pre elektroelúciu (Atto) a elúcia bola vykonávaná 3 hodiny pri 10 V. Bielkovina H110D, získaná elektroelúciou a označená H110DE bola koncentrovaná v zariadení Centriprep 10 (Amicon) a potom bola uskutočnená výmena na stĺpci PD10 (Pharmacia), pufer bol vymenený za 50 mM uhličitan amónny s 0,07 % SDS, potom bol materiál zmiešaný s pomocnými prostriedkami a injekčne podaný ovciam. Imunoglobulíny zo sér boli vyzrážané síranom amónnym podľa publikácie Johnstone a Thorpe, 1982. Vyzrážané protilátky boli znova uvedené do suspenzie v množstve 60 mg/ml vo fyziologickom roztoku chloridu sodného s fosfátovým puferom a roztok bol dialyzovaný proti roztoku chloridu sodného s fosfátovým puferom a potom zriedený v pomere 1:10 vo fyziologickom roztoku chloridu sodného s Tris-puferom (TBS) s obsahom 5 % hmotnostných práškoveho odtučneného mlieka. 10 mg ConA H110D bolo rozpustených na roztok s obsahom 0,5 % SDS, roztok bol zahriaty na 3 minúty na 100 °C a potom bol sušený na nitrocelulóзовom filtri. Po premytí TBS s obsahom 0,2 % objemových Tween 20 a 0,5 % Tritonu X-100 (TBSTT) bol filter inkubovaný 1 až 2 hodiny pri laboratórnej teplote s protilátkami proti H110DE. Po premývaní filtra 2 hodiny pri použití TBSTT boli viazané protilátky vymývané za použitia 3 ml 0,1 M glycínu, 0,15 M chloridu sodného s pH 2,6 celkom 2 minúty, potom bolo pH roztoku okamžite upravené na neutrálne pridaním 75 mikrolitrov 1,5 M Tris s pH 8,0. Tieto protilátky, čistené afinitným postupom a označené anti-H110DE boli použité na analýzu 5×10^5 pfu banky cDNA lambdagt11 z hlíst austrálskeho pôvodu tak, ako už bolo opísané vyššie.

5×10^5 rekombinantných klonov z banky lambdagt11, odvodených od austrálskej hlísty *Haemonchus contortus* bolo vy-

šetrených na imunologickú účinnosť a boli izolované tri pozitívne klony. Po ďalšom vyšetrení boli dva z týchto rekombinantných klonov stále ešte pozitívne, tieto klony boli označené B1A a B2.

Analýza reťazca z klonov B1A a B2

Uvedené dva klony boli rozštiepené enzýmom EcoRI a bol získaný jediný uložený úsek reťazca s približne 500 bp z B1A a 3 fragmenty, B2A s približne 400 bp, B2B s približne 100 bp a B2C s približne 100 bp v prípade B2. Tieto reťazce boli subklonované v plazmide pBluescript SK (Stratagene) a ich reťazec bol analyzovaný za použitia skúšobného balíčka Sequenaza 2,0 (United States Biochemicals).

Expresia klonov M1 a B1A

Reťazec pre M1 (reťazec č. 1) a pre B1A (reťazec č. 2 a 3) boli na dosiahnutie expresie uložené do E. coli za použitia vektora pGEX podľa publikácie Smith a Johnson, 1988. Za použitia tohto vektora je možné dosiahnuť expresiu bielkovín na C-terminálnom zakončení glutation-S-transferázy (GST) zo Schistosoma japonicum. Uložené reťazce M1 a B1A po rozštiepení enzýmom EcoRI boli naviazané na materiál pGEX1 po rozštiepení EcoRI a po pôsobení fosfatázy a potom bol výsledný produkt použitý na transformáciu E. coli, kmeňa JM101 podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Z každej transformácie bolo použitých 8 vzoriek a kultúry po 2 ml boli pestované 6 hodín pri teplote 37 °C. Potom bol pridaný IPTG na indukciu syntézy zložených bielkovín a inkubácia pokračovala cez noc. Bunkový materiál bol oddelený odstredením, rozrušený povarením v pufri na odber vzorky (Laemmli, 1974) a extrakty boli analyzované elektroforézou na SDS-PAGE a metódou Western blot za použitia ovčích protilátok, čistených afinitným spôsobom a špecifických proti SDS denaturovanému dubletu H110D (anti-H110DE, ako bolo uvedené vyššie). Viazané protilátky boli dokázané za použitia konju-

gátu alkalickéj fosfatázy s králičou protilátkou proti IgG ovce (Jackson ImmunoResearch) a potom nasledovala detekcia pomocou 5-bróm-4-chlór-3-indolyl-fosfátu a tetrazólievej modrej (NBT). Kultúry imunopozitívnych klonov boli potom pestované a indukované vyššie uvedeným spôsobom a potom rozrušené pomocou ultrazvuku. Materiál po pôsobení ultrazvuku bol rozdelený na rozpustnú a nerozpustnú frakciu odstredením v odstredivke Sorvall RC-2B s rotorom HS4 30 minút pri 7000 ot/minútu a pri teplote 4 °C. Nerozpustné usadeniny boli znova uvedené do suspenzie v 8 M močovine za použitia ultrazvuku a vzorky jednotlivých frakcií boli podrobené elektroforéze na SDS-PAGE. Bolo dokázané, že zložené bielkoviny sa nachádzajú v nerozpustnej frakcii inklúzných teliesok. Každá z týchto vzoriek bola použitá na vakcináciu dvoch oviec 3 x po sebe, pre každú dávku bolo použitých 150 mikrogramov zloženej bielkoviny vo Freundovom pomocnom prostriedku. Pozitívne kontrolné ovce boli imunizované natívnou bielkovinou ConA H110D, negatívne kontrolné ovce boli imunizované solubilizovanou bielkovinou z *E. coli* s obsahom vektora pGEX bez uloženého reťazca z *Haemonchus*. Séra z vakcinovaných oviec boli analyzované metódou Western blot proti H110B.

Vyšetrenie banky lambdaZAP austrálskeho pôvodu za použitia hybridizácie DNA s uloženými reťazcami M1 a B1A

DNA plazmidov M1 a B1A (klonované v pBluescript) boli rozštiepené enzýmom EcoRI a uložené reťazce boli izolované elektroforézou v TBE (Tris-boritan-EDTA s obsahom 89 mM Tris-boritanu, 89 mM kyseliny boritej a 2 mM EDTA, pH približne 8,3) v 1% agarózovom géli, potom bol materiál čistený za použitia balíčka GENECLAN. Izolácia a čistenie bolo opakované tak, aby nedošlo ku kontaminácii sondy reťazca DNA plazmidu, ktorý by hybridizoval s reťazcom lambdaZAP a tak nežiaducim spôsobom zvýšil pozadie. Čistené reťazce uložených DNA boli značené pomocou alfa-³²P-dCTP za použitia balíčka na stimulovanú transláciu (Promega Biotech) podľa ná-

vodu výrobcu. Značená DNA bola oddelená od neuloženej značenej DNA chromatografiou na stĺpci za súčasného odstredenia podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Na osem platní s priemerom 135 mm s obsahom banky lambdaZAP bolo nanesených 10^5 pfu/platňu a vzniknuté plaky boli prenesené na nitrocelulózové filtre podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Po zohrievaní vo vákuovej peci 2 hodiny na teplotu 80 °C boli filtre vopred hybridizované 2 hodiny a potom boli hybridizované cez noc pri teplote 42 °C tak, ako bude ďalej opísané v odstavcoch, opisujúcich analýzu Southern blot. Boli analyzované štyri filtre so sondou M1 a štyri filtre so sondou B1A. Filtre boli dvakrát premyté za použitia 2 x SSC s obsahom 0,5 % SDS, raz 1 x SSC s obsahom 0,5 % SDS a potom ešte raz 0,5 x SSC s obsahom 0,5 % SDS, vždy pri teplote 50 °C a potom bola vykonaná autorádiografia. Boli odobrané potenciálne pozitívne plaky a znova analyzované za použitia tých istých sond. Zásobné fázy s vysokým titrom boli pripravené z pozitívnych vzoriek (boli označené M1AUS pre M1-hybridizujúci klon a AusB1 pre B1A-hybridizujúci klon) a klony boli znova uložené do plazmidu pBluescript podľa inštrukcií výrobcu lambdaZAP (Stratagene) za použitia kmeňa BB4 E. coli ako hostiteľského kmeňa. Malé množstva plazmidu z výsledných kolónií boli pripravené rozrušením buniek za alkalických podmienok podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982, vzorky DNA potom boli rozštiepené enzýmom EcoRI. Materiál bol analyzovaný elektroforézou na agarózovom géli.

Analýza uloženého reťazca v M1AUS

Analýza reťazca DNA bola vykonaná na čistenej DNA plazmidu pBluescript za použitia balíčka s 2,0 Sequenázou (United States Biochemicals), postup bol vykonaný podľa návodu výrobcu. Najskôr boli použité priméry na zakončenie reťazcov vektora. Údaje, získané z týchto reakcií boli použité na konštrukciu druhého páru primérov a z údajov, ktoré boli získané pomocou druhých primérov bola uskutočnená konštrukcia tretieho páru primérov. Týmto spôsobom bol analyzovaný celý

reťazec DNA postupne od oboch zakončení, 5'-zakončenie a 3'-zakončenie.

Analýza uloženého reťazca v AustB1

Tento reťazec bol analyzovaný za použitia balíčka Sequenase 2,0 T7 (USB Biochemicals) podľa návodu výrobcu obdobným spôsobom ako v prípade M1AUS.

PCR-reakcia

Príprava cDNA

1 mikrogram mRNA z *H. contortus* pôvodu U.K. 11 dní po infekcii, pripravenej spôsobom, opísaným pre dospelé hlísty sa zmieša s T17 adaptorom-primérom so vzorcom 5' GACTCGAGTC-GACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' v dietylpYROKARBONÁTE DEPC vo vode a potom sa zmes zohrieva 5 minút na 65 °C, potom sa okamžite uloží do ľadu. Potom sa pridá hydroxid metylmeďnatý do konečnej koncentrácie 28,6 mM a zmes sa inkubuje 3 minúty pri laboratórnej teplote. Potom sa pridá 2-merkaptóetanol do konečnej koncentrácie 14,2 mM a zmes sa uloží do ľadu. Aby bolo možné syntetizovať cDNA, bola pridaná RNA-áza Guard (Pharmacia) v množstve 1 jednotka/mikroliter, pufer pre reverznú transkriptázu (Life Science) v bežnej koncentrácii, dATP, dGTP, dCTP a dTTP vždy do koncentrácie 1 mM a reverzná transkriptáza AMV (Life Sciences) v množstve 2 jednotky/mikroliter (ide vždy o konečné koncentrácie). Vzor-ky boli inkubované 75 minút pri teplote 41 °C a potom boli extrahované fenolom a chloroformom a čistené chromatografiou na stĺpci za súčasného odstredenia podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Čistené reakčné zmesi boli 2,5 x zriedené a uložené pri teplote 4 °C.

PCR-amplifikácia cDNA za použitia primérov, špecifických pre M1AUS

PCR-reakcie boli vykonávané za použitia programovateľ-

ného zariadenia pre cyklické tepelné spracovanie (M. J. Research Inc.). Reakčná zmes obsahovala 1 mikroliter z 250 mikrolitrov zriedenej cDNA, pripravenej vyššie uvedeným spôsobom, 25 pmol prvého reťazca adaptoru-priméru T17, 25 pmol druhého reťazca amplifikačného priméru (môže ísť o primér na báze polôh 865 až 884, 5' ACGGGTGTTCGGTTTCCGTAT 3' alebo na báze polôh 30 až 49, 5' GCTGAATCTAACTCCAATCC 3' reťazca M1AUS, ide o reťazec č. 5) 1 x Taq pufer (Northumbria Biologicals Ltd) a 0,5 mM každého z dATP, dTTP, dGTP a dCTP v reakčnom objeme 100 mikrolitrov, vzorky boli prevrstvené 40 mikrolitrami minerálneho oleja na zabránenie odparovania. Uvedená zmes potom bola zohrievaná 2 minúty v zariadení na cyklické tepelné spracovanie na teplotu 95 °C a potom bola udržiavaná na teplote 72 °C. Pri tejto teplote boli pridané dve jednotky Taq polymerázy (Northumbria Biologicals Ltd) a zmes bola opatrne premiešaná s ďalšími reakčnými zložkami. Potom bol v zariadení na tepelné spracovanie uskutočnený nasledujúci program:

- stupeň 1: zohrievanie 5 minút na 50 °C
- stupeň 2: zohrievanie 40 minút na 72 °C
- stupeň 3: denaturácia 40 sekúnd pri 94 °C
- stupeň 4: zohrievanie 2 minúty na 50 °C
- stupeň 5: zohrievanie 3 minúty na 72 °C
- stupeň 6: 39 cyklov stupňov 3 až 5
- stupeň 7: konečné zohrievanie 15 minút na 72 °C
- stupeň 8: udržiavanie na 4 °C.

Tieto podmienky boli prevzaté podľa publikácie Frohman a ďalší, 1988.

Klonovanie PCR-produktov

PCR-produkty z vyššie uvedených reakcií boli delené elektroforézou na agarózovom géli. Pásky DNA s veľkosťou približne 2,5 a 3,5 kb boli oddelené elektroelúciou za použitia materiálu zo sklenených vlákien (Whatman), extrahované fenolom a čistené chromatografiou na G50 (Pharmacia) podľa publikácie Sambrook a ďalší, 1989. Čistená DNA bola naviaza-

ná na pT7Blue T-vektor (Novagene) podľa návodu výrobcu.

Analýza reťazca produktov PCR s veľkosťou 2,5 kb a 3,5 kb

Analýza reťazca DNA bola vykonávaná za použitia balíčka Sequenáza 2,0 (US Biochemicals) za použitia postupu pozdĺž reťazca tak, ako bol opísaný vyššie pri analýze reťazca M1AUS.

PCR-reakcie pre 5'-zakončenie

Príprava prvého reťazca cDNA

1 mikrogram mRNA *Haemonchus contortus* pôvodu UK 11 dní po infekcii, získanej spôsobom, opísaným pre dospelé hlísty bol zmiešaný s konštantným primérom s reťazcom 5' AAIGAAAGC-GGATGGCTTGAIGC 3', ktorý bol konštruovaný z konzervovanej oblasti v AustB1 a s produktami 2,5 kb PCR a 3,5 kb PCR, ide o reťazce č. 6, 7 a 8. Zmes bola zohrievaná 5 minút na teplote 65 °C, potom bola uložená do ľadu a bol pridaný hydroxid metylmednatý do konečnej koncentrácie 28,6 mM. Zmes bola inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote, potom bol pridaný 2-merkaptetoetanol do konečnej koncentrácie 14,2 mM a zmes bola uložená do ľadu. DNA prvého reťazca bola pripravená za použitia reakčných činidiel zo systému 5' RACE (Gibco/BRL) v konečnej koncentrácii 20 mM Tris/HCl s pH 8,4, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 100 mikrogramov/ml BSA a 0,5 mM každého z dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Potom bolo pridaných ešte 200 jednotiek reverznej transkriptázy Superscript a reakčná zmes bola inkubovaná 30 minút pri teplote 42 °C a potom zohriata ešte na 5 minút na teplotu 55 °C. Potom bola pridaná RNAáza H do konečnej koncentrácie 100 jednotiek/ml, reakčná zmes bola inkubovaná ešte 10 minút pri teplote 55 °C a potom bola uložená do ľadu. potom bola cDNA čistená na stĺpci Glassmax (Gibco/BRL), získaný materiál bol potom uložený pri teplote -20 °C.

C-predĺženie cDNA

1/5 prvého reťazca cDNA bola zohrievaná 5 minút na 70 °C a potom bol materiál 1 minútu chladený v ľade. Potom boli pridané reakčné činidlá zo systému 5' RACE (Gibco/BRL) do konečnej koncentrácie 10 mM Tris/HCl s pH 8,4, 25 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 50 mikrogramov/ml BSA a 0,2 mM dCTP. Potom bolo pridaných ešte 500 jednotiek terminálnej transferázy, reakčná zmes bola inkubovaná 10 minút pri 37 °C, potom bola zohriata na dobu 15 minút na 70 °C a potom skladovaná v ľade.

PCR-amplifikácia za použitia špecifických primérov AusB1 2, 5 kb PCR a 3,5 kb PCR

PCR-reakcie boli vykonávané na programovateľnom zariadení na cyklické spracovanie (M. J. Research Inc). Pre 3'-zakončenie bol použitý jeden z nasledujúcich troch primérov.

1. Primér špecifický pre PCR-produkt s 2,5 kb na báze polôh 374 až 394, 5' TGTGTGGCTAATTTCGTCCA 3'.
2. Primér špecifický pre PCR-produkt s 3,5 kb na báze polôh 1210 až 1229, 5' CATCTTIAGTTATCTGACCAG 3'.
3. Primér špecifický pre klon AustB1 cDNA na báze polôh 357 až 377, 5' GACCATCGCTGATGAAGTCGG 3'.

Pre 5'-zakončenie bol pri tejto reakcii použitý spoločný "primér na zakotvenie", ktorý je možné vyjadriť reťazcom 5' CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG 3'. Každá reakčná zmes obsahovala 4 mikrolitre z 50 mikrolitrov cDNA s C-predĺžením, 25 pmol príslušných dvoch primérov, 1 x pufer pre Taq polymerázu (Boehringer Mannheim) a 0,5 mM každého z dATP, dCTP, dTTP, konečný objem vzorky bol 100 mikrolitrov. Zmes bola prevrstvená 50 mikrolitrami minerálneho oleja a vo vyššie uvedenom zariadení zohriata na 2 minúty na 95 °C. Potom bolo k reakčnej zmesi pri teplote 80 °C pridaných 0,6 jednotiek Taq-polymerázy, potom bol zaradený nasledujúci program:

1. zohrievanie 5 minút na 50 °C

2. extenzia 10 minút pri 72 °C
3. denaturácia 45 sekúnd pri 94 °C
4. zohrievanie 1 minútu na 50 °C
5. extenzia 2,5 minút pri 72 °C
6. 39 cyklov 3 až 5
7. extenzia 15 minút pri 72 °C
8. udržovanie na 4 °C.

Klonovanie 5'-PCR-produktu

PCR-produkty boli od seba oddelené elektroforézou na agarózovom géli a pásy s očakávanou veľkosťou približne 1,3 kb boli vybraté a DNA bola čistená za použitia balíčka GENE-CLEAN a naviazaná na PT7Blue T-vektor (Novagene) podľa návodu výrobcu.

PCR-reakcie na produkciu 3'-zakončenia AustB1

Prvý reťazec, použitý pre cDNA bol reťazec, ktorý bol opísaný pre cDNA za použitia spolu s priméromi M1AUS. Bol použitý špecifický primér na báze polôh 1414 až 1435, 5' TCTTGAAGAAATGAAAAAGCTT 3' v AustB1 s reťazcom č. 6 spolu s T17-adaptorovým primérom, použitým pre PCR v prípade M1AUS, reakcia bolo vykonaná v zariadení na cyklické tepelné spracovanie (M. J. Research Inc.). Reakčná zmes obsahovala 25 pmol každého priméru, 2 mikrolitre cDNA, 1 x pufer pre Taq-polymerázu (Boehringer Mannheim), 0,5 mM každého z dATP, dCTP, dGTP a dTTP v konečnom objeme 100 mikrolitrov. Zmes bola prevrstvená 50 mikrolitrami minerálneho oleja a zohrievaná 2 minúty na teplotu 95 °C. Potom bolo pridaných 0,6 mikrolitrov Taq polymerázy a bol uskutočnený ten istý program ako v prípade 5'-PCR tak, ako bolo vyššie opísané.

Klonovanie a analýza reťazca 3'-produktu

Produkty PCR boli od seba oddelené elektroforézou na agarózovom géli a pás s očakávanou veľkosťou 1,3 kb bol vy-

bratý a DNA bola čistená za použitia balíčka GENE CLEAN a naviazaná na PCR-Script (Stratagene) podľa návodu výrobcu.

Analýza reťazca klonovaných PCR-produktov

DNA z klonov, získaných PCR bola analyzovaná za použitia balíčka Sequenáza 2,0 (United States Biochemical) podľa návodu výrobcu. Vyššie uvedeným spôsobom boli skonštruované oligonukleotidové priméry postupne pozdĺž reťazca DNA pre jednotlivé klony súčasne od oboch zakončení, 5'-zakončenia aj 3'-zakončenia.

Analýza všetkých reťazcov DNA

Reťazce boli analyzované za použitia Softwaru pre analýzu reťazca GCG (Genetics Computers Group) podľa publikácie Devereux a ďalší, 1984.

Analýza Northern blot a Southern blot

Príprava Northern blot

Analýza Northern blot bola vykonávaná na formaldehydových géloch v podstate podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Vzorky mRNA z jedincov *H. contortus* vo veku 11, 15 a 23 dní boli spracované pôsobením formaldehydu s koncentráciou 17,5 % objemových a formamidu s koncentráciou 50 % objemových v pufri MOPS (20 mM kyseliny 3-(N-morfolín)propán-sulfónovej s pH 7,0, 8 mM octanu sodného, 1 mM EDTA) 15 minút pri teplote 65 °C, potom boli vzorky ochladené v ľade. Gély boli podrobené elektroforéze v pufri MOPS a potom bol vykonaný blot na membrány z Duralonu pomocou kapilárneho prenosu podľa publikácie Sambrook a ďalší, 1989.

Príprava Southern blot

2 g dospelých jedincov *Haemonchus contortus* boli zmrazené v kvapalnom dusíku a mleté na jemný prášok v kvapalnom

dusíku. Prášok bol potom pomaly pridaný k 25 ml pufra na rozrušenie buniek s obsahom 0,05 M Tris-HCl s pH 7, 0,1 M EDTA, 1 % hmotnostné Sarkosylu a 0,05 mg/ml proteínázy K (Boehringer Mannheim) a vzniknutá zmes bola inkubovaná 2 hodiny pri teplote 65 °C. Potom bola suspenzia extrahovaná dvakrát vždy jedným objemom fenolu s chloroformom, potom ešte dvakrát dvoma objemami chloroformu a potom bol materiál vyžrážaný etanolom. Vyžrážaná DNA genómu bola znova uvedená do suspenzie v 20 ml pufra Tris s EDTA (TE, pH 8) cez noc pri teplote 4 °C na kolísavej podložke a potom bol materiál dialyzovaný proti 1 litru pufra TE, ktorý bol dvakrát vymenený. RNA bola odstránená inkubáciou s RNA-ázou typ 1, zba-venou DNA-ázou (Sigma) v konečnej koncentrácii 20 mikrogramov/ml po dobu 1 hodiny pri teplote 37 °C, potom bola vykonaná extrakcia fenolom a chloroformom, ďalšia extrakcia chloroformom a materiál bol vyžrážaný etanolom rovnako ako je uvedené vyššie. Vyžrážaná usadenina DNA genómu bola dvakrát premytá etanolom s koncentráciou 70 % objemových a znova uvedená do suspenzie v 1 ml TE rovnakým spôsobom ako je uvedené vyššie.

Potom bola DNA genómu rozštiepená enzýmami EcoRI a HindIII (25 mikrogramov DNA pre každé štiepenie) cez noc pri teplote 37 °C a potom bola vykonaná elektroforéza za použitia 5 mikrogramov materiálu v jednej dráhe na 1% agarózovom géli v Tris-acetátovom pufri. Gél bol použitý na analýzu Southern blot za použitia kapilárneho prenosu podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982 a membrány Hybond-N (Amersham International). DNA bola na membránu fixovaná za použitia ultrafialového svetla podľa doporučenia výrobcu.

Príprava sond

Plazmidy pBluescript s obsahom uložených reťazcov M1AUS, B1A alebo AustB1 boli rozštiepené pôsobením enzýmu EcoRI. Plazmidy pT7Blue, obsahujúce uložený reťazec 3,5 kb PCR boli rozštiepené enzýmom BamHI a tie isté plazmidy, obsahujúce uložený reťazec 2,5 kb PCR boli rozštiepené enzy-

mami BamHI a XbaI. Rozštiepený materiál bol podrobený elektroforéze, uložené reťazce boli izolované a rádioaktívne označené pomocou alfa- ^{32}P -dCTP a simulovanej translácie vyššie uvedeným spôsobom pri analýze banky lambdaZAP.

Hybridizačné podmienky

Podmienky pre Southern blot

Membrány boli rozrezané na prúžky a vopred hybridizované v hybridizačnom pufri 3 hodiny pri teplote 28 °C vyššie uvedeným spôsobom. Prúžky Southern blot DNA genómu boli hybridizované za použitia každej z vyššie uvedených sond cez noc pri teplote 28 °C, potom boli dvakrát premyté pri laboratórnej teplote 24 °C a potom ešte dvakrát pri teplote 42 °C za použitia 2 x SSC s obsahom 0,1 % SDS (mierne obmedzujúce podmienky) a potom bola vykonaná autorádiografia. Po vyvíjaní autorádiografických záznamov boli prúžky premyté za vysoko obmedzujúcich podmienok za použitia 0,1 x SSC, 0,1% SDS pri 65 °C a znovu bola vykonaná autorádiografia.

Podmienky pre Northern blot

Podmienky pre sondy M1, M1AUS a B1A (reťazce č. 1, 5 a 2)

Ako sonda pre Northern blot mRNA z *Haemonchus contortus* vo veku 11, 15 a 23 dní bol najskôr uložený reťazec M1. Filter bol vopred hybridizovaný 2 hodiny pri 42 °C v 2 x SSC (20 x SSC = 3 M NaCl, 0,3 M citrátu sodného s pH 7,2) s obsahom 5 x Denhardt's (0,1% Ficoll 400 (Pharmacia), 0,1% polyvinylpyrolidón, 0,1% sérový hovädzí albumín, frakcia V (Sigma Chemical Corp.), 0,5% SDS (dodecylsírán sodný), 10% dextránsulfát, 0,1 mg/ml DNA v varlat lososa a 50% deionizovaný formamid. Hybridizácia na sondu bola uskutočnená v tom istom pufri cez noc pri teplote 42 °C. Filtre boli dvakrát premyté 30 minút v 2 x SSC s obsahom 0,5% SDS a 50% formamidu, potom ešte dvakrát 30 minút v 2 x SSC s obsahom 0,5% SDS a ešte dvakrát 30 minút v 2 x SSC. Prvé premytie

bolo uskutočnené pri teplote 42 °C, ostatné pri teplote 37 °C. Po autorádiografii boli membrány premyté vo vriacom 0,1% SDS a znova podrobené autorádiografii tak, aby bolo možné overiť odstránenie sondy. Ten istý blot bol spracovaný uloženým reťazcom M1AUS ako sondou, premytý a podrobený autorádiografii. Po premytí bolo znovu overené odstránenie sondy, potom bol ako sonda použitý uložený reťazec B1A. Blot bol potom spracovaný rovnako ako bude ďalej uvedené.

Podmienky pre sondy AustB1, 2,5 kb a 3,5 kb PCR-produkty (reťazce č. 6, 7 a 8)

Northern blot bol hybridizovaný za použitia uloženého reťazca AustB1 a mierne obmedzujúcich podmienok tak, ako bolo opísané pri hybridizácii Southern blot. Po autorádiografii bola membrána premytá vriacim 0,1% SDS podľa pokynov výrobcu membrány (Amersham), potom bol ako sonda použitý uložený reťazec 2,5 kb PCR (klon 2), po opätovnom premytí bol ako sonda použitý uložený reťazec 3,5 kb PCR (klon 2).

Štiepenie bielkoviny H110D a stanovenie enzymatickej účinnosti

Príprava H110D

Natívna bielkovina H110D (H110DN) bola pripravená spôsobom opísaným vo zverejnených patentových prihláškach WO88/00835 a WO90/11086.

Príprava elastázového fragmentu H11S z bielkoviny H110D

Dospelí jedinci *Haemonchus* boli homogenizovaní v 10 objemoch ľadového PBS s 0,02 % azidu sodíka a potom bol materiál odstránený 20 minút pri 13000 ot/minútu. Usadenina bola znova uvedená do suspenzie v 10 objemoch PBS s azidom, znova homogenizovaná a bolo opakované odstredenie. Po resuspenzii v 50 mM pufra MOPS s pH 7,4 (objem suspenzie je 1 ml na každých 0,17 g hlíst) a po predohriatí na dobu 30 minút

na 37 °C sa materiál z usadeniny rozštiepi pôsobením elastázy po dobu 1 hodiny, použije sa 800 mikrolitrov na 20 ml suspenzie, vždy 1 mg/ml zásobného roztoku sa doplní 1 mM HCl a 2 mM vápenatých iónov. Štiepenie sa zastaví pridaním 3,4-dichlórizokumarínu, použije sa 300 mikrolitrov zásobného roztoku 10 mM v DMSO na 20 ml rozštiepeného materiálu. Zmes sa potom odstredí 20 minút pri 13000 ot/minútu, usadený materiál sa uloží a supernatant sa odstredí 1 hodinu a 20 minút v ultraodstredivke pri 100 000 x g. Výsledný supernatant sa nanesie na stĺpec ConA, čím sa získajú naviazané frakcie. Na analýzu sa táto frakcia spracováva elektroforézou na SDS-polyakrylamidovom géli a elektroforeticky sa prenesie na polyvinylidéndifluoridovú membránu Immobilon-P (Millipore), slabo sfarbenou Coomassieovou modrou, vyberie sa pás so 105 kd a analyzuje sa v automatickom zariadení na analýzu aminokyselín v plynnej fáze. Po vakcinácii sa frakcie, viazané na ConA ďalej čistia zahustením a nanesením na stĺpec Seprose 12 (Pharmacia), po tejto filtrácii na géli sa odobierajú frakcie, ktoré obsahujú aminopeptidázu.

Štiepenie H110D termolýzínom

H110D vo forme dubletu sa čistí elektroelúciou z 8% SDS-polyakrylamidového géli, čím sa získa H110DE, ako bolo opísané vo zverejnenej medzinárodnej patentovej prihláške WO90/11086, elektroelúciou sa získa dimérna forma s molekulovou hmotnosťou tesne nad 200 000 (poskytujúca charakteristický dublet pri 110 000 pri opakovanej elektroforéze na SDS-PAGE), čím sa získa H110DE. Roztoky H110DE sa zahustia na 200 mikrolitrov, pridá sa chlorid vápenatý do molárnej koncentrácie 5 mM a zmes sa zohreje na 37 °C. Potom sa pridá čerstvo pripravený roztok 1 mg/ml termolýzínu (v 1 mM HCl, 2 mM CaCl_2) v pomere 0,1 mikrogram termolýzínu na 1 mikrogram H110DE. Zmes sa inkubuje 120 minút pri teplote 37 °C a potom sa reakcia zastaví pridaním 5 mikrolitrov 0,5 M EDTA.

Fragmenty bielkoviny sa oddelia elektroforézou na 15%

SDS-polyakrylamidovom géli a materiál sa elektroforeticky preniesie na polyvinylidéndifluoridovú membránu (Immobilon-P, Millipore). Po odfarbení Coomassieovou modrou sa najintenzívnejšie pásy vyberú a analyzujú v zariadení na analýzu reťazca aminokyselín v plynnej fáze.

Príprava frakcie H11A bielkoviny H110D, obohatenej o aminopeptidázu A

Usadený materiál, získaný po pôsobení elastázy a po 20 minútovom odstredení pri 17 000 x g vyššie uvedeným spôsobom sa znova uvedie do suspenzie v PBS pri teplote 4 °C, potom sa znova odstredí a usadenina sa znova uvedie do suspenzie v 1% Tween v PBS s azidom a potom sa 1 hodinu mieša. Potom sa suspenzia odstredí po dobu 20 minút pri 17 000 x g a supernatant sa odstráni. Usadenina sa opakovane extrahuje 1% Thesitom v PBS s azidom. Supernatanty po odstredení 20 minút pri 17 000 x g sa spoja a odstredia 1 hodinu a 20 minút v ultraodstredivke pri 100 000 x g. Supernatant sa nanesie na afinitný stĺpec ConA (Affigel, Biorad) a naviazaný materiál sa vymýva a ďalej delí chromatografiou na ionomeniči MonoQ.

Stanovenie enzymatickej účinnosti

Účinnosť alfa-aminoacylpeptidhydrolázy, (mikrosomálnej) aminopeptidázy v H110D je možné stanoviť skúškami v roztoku za použitia L-leucínu, metionínu, fenylalanínu, kyseliny alfa-glutamovej a lyzín-p-nitroanilidov (pNA). Všetky p-nitroanilidy aminokyselín ako substráty (s výnimkou kyseliny alfa-glutamovej), boli získané od Sigma, Poole, Dorset UK, kyselina alfa-glutamová bola získaná od Fluka, Dorset UK. Jednotlivé hydrofóbne (leucín- alebo fenylalanín-) a jednotlivé aminokyseliny s nábojom (derivát pNA kyseliny alfa-glutamovej) sú substráty pre aminopeptidázu cicavcov M (ApM) a A (ApA) a boli zvolené na meranie účinku inhibítora enzýmu a na stanovenie inhibície účinnosti aminopeptidázy

H110D v krvnom sére.

a) Skúška na mikroplatniach

Platne mikro-ELISA (Dynatech Immulon 1, Virginia, USA) a to jednotlivé vyhlbenia týchto platní boli naplnené 250 mikrolitrami 50 mM HEPES alebo MOPS s pH 7, okrem toho bolo pridaných 1 až 10 mikrolitrov skúmanej frakcie. Platne potom boli vopred inkubované 10 minút pri teplote 37 °C a potom bolo pridaných 10 mikrolitrov 25 mM p-nitroanilidu aminokyseliny ako substrátu na jedno vyhlbenie. Potom bola meraná optická hustota OD pri 405 nm v čase 0 za použitia odčítacieho prístroja pre platne ELISA a platne potom boli inkubované 15 až 30 minút pri teplote 37 °C. Konečné odčítanie OD bolo vykonané rovnakým spôsobom a bola vypočítaná zmena OD za minútu na mg bielkoviny.

b) Citlivosť na inhibítor

Bol použitý postup na stanovenie enzýmu rovnako ako v odstavci a) s tým rozdielom, že k 250 mikrolitrom pufra plus 1 mg/ml ConA H110D boli pridané inhibítory a zmes bola inkubovaná 10 minút pri teplote 37 °C, potom boli pridané substráty, leucín-pNA alebo kyselina alfa-glutamová-pNA). Inhibícia v percentách bola vypočítaná podľa vzťahu

$$\frac{x - y}{x} \times 100 = \text{inhibícia v \%},$$

kde

x = deltaOD/min pre enzým bez inhibítora a

y = deltaOD/min pre enzým s pridaným inhibítorom.

Jednotlivo bolo skúšaných deväť zlúčenín s rozdielnou inhibíciou enzýmu a to: amastatín betastatín (metaloproteáza, aminopeptidáza), 1,10 fenantrolín, EDTA (metaloproteáza), fosforamidon (metaloproteáza, termolýzín, kolagenáza).

za), aprotinín (serínproteáza), pepstatín (proteáza kyseliny asparagovej), PMSF (proteáza serínu a cysteínu) a E64 (proteáza cysteínu). Amastatín, bestatín, 1,10 fenantrolín, PMSF a pepstatín boli získané od Sigma, Dorset UK. Všetky ostatné inhibítory boli získané od Boehringer Mannheim. Každý inhibítor bol použitý v dvoch koncentráciách, rovných alebo vyšších než maximálna koncentrácia, doporučená Boehringer Mannheim.

c) Skúška na inhibíciu enzýmu pôsobením antiséra

Skúška bola vykonaná rovnako ako v stupni a) uvedenom vyššie s tým rozdielom, že boli použité dve mikroplochy ELISA. Na jednej platni bolo inkubovaných 10 mikrolitrov ConA H110D (1 mg/ml) s 10 mikrolitrami antiséra od každej ovce, 15 minút pri teplote 37 °C. Na druhej platni bolo taktiež vopred inkubovaných 250 mikrolitrov HEPES/hydrogenuhličitanového pufru s 10 mikrolitrami fenylalanín-pNA alebo alfa-glutamovej kyseliny-pNA v jednom vyhlbení, taktiež 15 minút pri teplote 37 °C. Potom boli k zmesi pufru a substrátu pridané zmesi ConA H110D-sérum na druhej platni pomocou viacpočetnej pipety. Potom bola stanovená hodnota $\Delta OD/min$. Na účely korelácie bola vypočítaná inhibícia v percentách za použitia vzorca, uvedeného v odstavci b), kde x znamená priemer $\Delta OD/min$ na vyhlbenie, obsahujúce enzým a sérum z negatívnych kontrolných oviec (po vakcinácii ferritínom z konskej sleziny) a y = hodnota $\Delta OD/min$ na vyhlbenie, obsahujúca enzým a sérum z jednotlivých oviec po vakcinácii H110D. Na účely korelácie (obr. 18) bola ochrana v percentách vypočítaná za použitia vyššie uvedeného vzorca, v ktorom x = priemerný počet vajíčok v 1 g výkalov alebo celkový priemerný počet hlíst u kontrol a y = počet vajíčok na 1 g výkalov u pokusných zvierat alebo počet hlíst u jednotlivých oviec, ktoré boli očkované podaním H110D.

Lokalizácia enzýmu histochemickým spôsobom

Účinnosť aminopeptidázy bola dokázaná na zmrazených re-
zoch s hrúbkou 10 mikrometrov z dospelých jedincov *Haemon-
chus contortus* za použitia L-leucín-4-metoxy-beta-naftylami-
du a 4-metoxy-beta-naftylamidu kyseliny alfa-L-glutamovej
ako substrátov za použitia postupov podľa publikácií Nachlas
a ďalší, 1957, Nakane a ďalší, 1974 a Lojda a ďalší, 1980.

Expresia rekombinantného H110D systému baculovírus-hmy-
zia bunka

Konštrukcia plazmidu na expresiu

Vyššie uvedené 3,5-PCR-fragmenty boli získané amplifi-
káciou za použitia oligo-dT-adaptora (s obsahom miesta pôso-
benia *SalI*) a oligonukleotidu 872, reprezentujúceho bázy č.
30 až 49 v reťazci M1AUS a fragmenty boli klonované vo vek-
tore pT7Blue. Klon pT73,5-2 je orientovaný tak, že susedí
s miestom *BamHI* viacväzbového spojovníka na svojom
5'-zakončení a s miestami pôsobenia *HindIII*, *XbaI* a *SalI* na
svojom 3'-zakončení. Reťazec na 5'-zakončení je možné cha-
rakterizovať nasledujúcim spôsobom:

```
BamHI      *!-----oligo 872-----!--3,5K-----  
5' GG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC C .....3'  
          Leu Asn Leu Phr Pro Ile .....
```

Hviezdička označuje 3' dT/dTA prečnievajúci koniec,
použitý na klonovanie vo vektore pT7Blue.

Potom bol 3,5 PCR klon 2 rozštiepený enzýmom *HindIII*
(jediné miesto vo viacväzbovom spojovníku vektora na
3'-zakončení génu 3,5 K) a konce boli vyplnené pomocou de-
oxynukleotidov za použitia DNA polymerázy I (Klenowov frag-
ment) podľa publikácie Maniatis a ďalší, 1982. Na zarovnané
konce bol naviazaný spojovník *BamHI* (5' CGGATCCG 3', New
England Biolabs, č. v katalógu 1021) a boli vybrané klony
s miestom pôsobenia *BamHI* navyše, u ktorých bolo možné vy-
štiepiť gén pre H110D v celej dĺžke ako fragment po rozštie-

pení enzýmom BamHI. Fragment BamHI bol izolovaný elektroforézou na 0,6% agarózovom géli v Tris-acetátovom pufri s následným čistením za použitia balíčka GENECLAN (BIO101). Tento postup bol vykonaný dvakrát. Čistený fragment bol potom naviazaný na plazmid pBlueBac II po pôsobení fosfatázy a rozštiepení BamHI (Invitrogen Corp.) a klony s uvedeným fragmentom v správnej orientácii (to znamená s 5'-zakončením 3,5 PCR klonu 2 pod riadením polyhedrinového promótora baculovírus) boli stanovené rozštiepením enzýmami NheI a XbaI. Výsledný plazmid bol čiastočne rozštiepený enzýmom BamHI a zakončenia boli vyplnené vyššie uvedeným spôsobom. Potom bol pridaný spojovník NcoI, obsahujúci ATG (5' CCCATGGG 3', New England Biolabs, č. v katalógu 1040) a zmes bola naviazaná. Klony, obsahujúce spojovník na 5' zakončení s miestom BamHI v 3,5 PCR klonu 2 a nie na 3' zakončení boli stanovené štiepením enzýmom NcoI. Výsledný plazmid bol označený pBB3,5-2(N) a je schematický znázornený na obr. 19.

Táto konštrukcia má za následok uloženie ATG do čítacieho rámca na 5'-zakončení 3,5 PCR klonu 2 tak, aby mohla byť zahájená translácia. Ďalej je znázornený výsledný reťazec s obsahom tohto kodónu ATG:

BamHI--NcoI väzba-BamHI----*!-----oligo 872-----!--
5' GGATCCCC ATG GGG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC C..
Met Gly Ile Arg Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ile ...

V bielkovine po expresii budú chýbať aminokyseliny 2 až 9 zodpovedajúceho reťazca H110D a navyše budú prítomné tri aminokyseliny reťazca spojovníka, ktorý nasleduje bezprostredne po kodóne ATG.

Konštrukcia rekombinantného baculovírusu, obsahujúceho reťazec pre H110D

Plazmid pBB3,5-2(N) bol použitý na transfekciu buniek *Spodoptera frugiperda* (Sf9), bunky boli získané od Invitro-

gen Corp. a postup bol vykonávaný za použitia lineárneho vírusu pre polyhedrózu jadier *Autographica californica* (ACNPV) a táto DNA aj katiónové lipozómy (Invitrogen Corp., modul na transfekciu), boli použité podľa návodu výrobcu. Bunky boli pestované na prostredí TC-100 (Sigma), doplnenom fetálnym telacím sérom (CSL Ltd, sérum bolo inaktivované 45 minút pri teplote 56) antibiotikami (penicilín/streptomycín, gentamycín, CSL Ltd.). Bola tiež vykonaná kontrolná transfekcia za použitia plazmidu pBB3,5-2(N) s kodónom ATG, uloženým na 3' zakončení 3,5 PCR klonu 2. Rekombinantné plaky boli izolované na báze skutočnosti, že vektor pBlueBac II je taktiež kódovým reťazcom pre beta-galaktozidázu *E. coli* (beta-gal), postup bol vykonávaný tak, že X-gal bol uložený do prevrstvujúcej vrstvy agarózy v doporučenej koncentrácii. Potom boli jednotlivé plaky izolované podľa modrého zafarbenia a boli ešte dvakrát čistené, po tejto dobe už súvislé vrstvy buniek neboli kontaminované divokým typom vírusu (čo by sa prejavilo zmeneným tvarom jadier). Čistený vírus bol označený 3,5-2-P2A, 3,5-2-P3A a 3,5-2-P4A a bol amplifikovaný pred použitím dvojitou opakovanou infekciou buniek Sf9. Plak, čistený po tejto kontrolnej transfekcii bol označený 3,5-2-rev.

Dôkaz expresie H110D v hmyzích bunkách, infikovaných rekombinantným baculovírusom

Súvislé vrstvy buniek Sf9 (1 a 10^6 buniek vo fľašiach s objemom 25 ml) boli infikované vírusom 3,5-2, divokým typom vírusu (wt), kontrolným vírusom, u ktorého dochádza k expresii beta-gal alebo neboli vôbec infikované. Po 4 dňoch rastu pri teplote 26 °C boli súvislé vrstvy buniek uvoľnené jemným potriasaním, bunkový materiál bol izolovaný odstredením 10 minút pri 200 ot/minútu a usadeniny buniek boli rozrušené trojitým opakovaným zmrazením a roztopením. Rozrušený materiál bol uvedený do suspenzie v 500 mikrolitroch PBS a podiely po 25 mikrolitroch boli sledované na účinnosť ApM vo vyhlíbeniach na mikroplatniach.

Podiely rozrušeného materiálu po 15 mikrolitroch (3×10^4 buniek) boli podrobené elektroforéze na denaturujúcom 7,5% SDS-polyakrylamidovom géli. Jedna zo vzoriek bola sfarbená Coomassieovou modrou, aby bolo možné stanoviť veľkosť expresie. Druhá vzorka bola analyzovaná metódou Western blot za použitia sondy s protilátkou proti H110D, ako už bolo opísané vyššie.

Výsledky

Analýza imunopozitívnych klonov

Analýza afinity protilátok, čistených na klone M1

Boli pripravené afinitne čistené protilátky, špecifické pre každý z piatich klonov, pozitívnych na protilátky a protilátky boli použité ako sondy pri analýze extraktu, obohateného o H110D metódou Western blot. Ako je zrejmé z obr. 8, všetkých päť klonov rozpoznáva dublet H110D. Avšak pri reakcii s klonom M1 bol pozorovaný najsilnejší signál (obr. 8d) v porovnaní s blotom negatívnej kontroly lambdagt11 (obr. 8e). Tento klon bol preto ďalej analyzovaný.

Analýza Northern blot klonu M1

Analýza Northern blot mRNA z *Haemonchus contortus* za použitia uloženého reťazca M1 ako sondy je znázornená na obr. 9. Bolo možné pozorovať jediný pás mRNA s veľkosťou približne 3,5 kb. Táto veľkosť je dostatočná na to, aby išlo o kódový reťazec pre bielkovinu s molekulovou hmotnosťou približne 110 000.

Analýza reťazca klonu M1

Analýza uvedenej DNA po rozštiepení EcoRI dokázala, že veľkosť uloženého reťazca M1 je približne 300 bp. Bol stanovený reťazec DNA fragmentu M1, ktorý je znázornený na obr. 3. Fragment obsahuje 295 párov báz pri otvorenom čítacom rámci, začínajúcom na báze č. 3.

Analýza Northern blot klonu B1A

Analýza mRNA z *Haemonchus contortus* metódou Northern blot za použitia sondy vo forme uloženého reťazca B1A je znázornená na obr. 9c. Rovnako ako v prípade M1 je možné pozorovať jediný pás mRNA s veľkosťou približne 3,5 kb.

Analýza reťazca klonov B1A a B2

Klony B1A boli analyzované (reťazce č. 2 a 3) a bol dokázaný úplný reťazec pre H11-1 (reťazec č. 19) a reťazcom pre AustB1 (reťazec č. 6). Uložená časť má dĺžku 484 bp a od prvej bázy má otvorený čítací rámec. Bol analyzovaný reťazec všetkých troch fragmentov B2, vzniknutých štiepením enzýmom EcoRI, úplný reťazec pre B2 (reťazec č. 4) má dĺžku 581 bp a je znázornený v porovnaní s reťazcom pre H11-2 na obr. 4. Reťazec má otvorený čítací rámec od polohy 2 do polohy 213, stop kodón a neprenášaná oblasť zodpovedá oblasti produktu 2,5 kb PCR (reťazec č. 7).

Expresia M1 a B1A v *E. coli*

Pri subklonovaní vo vektore na expresiu GST boli získané klony, u ktorých dochádzalo k expresii zložených bielkovín s veľkosťou 38 000 až 40 000 v prípade M1 a 45 000 v prípade B1A. Tieto výsledky zodpovedajú predpokladanej veľkosti uvedených reťazcov, ide o molekulovú hmotnosť glutatión-S-transferázy. Obe zložené bielkoviny veľmi silno reagovali pri metóde Western blot s afinitne čistenými protilátkami proti H110DE (obr. 11). K expresii zložených bielkovín došlo vo forme nerozpustných inklúzných teliesok.

Tvorba protilátok u oviec po vakcinácii M1-GST a B1A-GST zloženými bielkovinami

Antiséra z oviec, ktorým boli injekčne podané zložené bielkoviny, boli skúmané metódou Western blot proti H110D.

Ako pri podaní GST-M1, tak pri podaní GST-D1A došlo k tvorbe protilátok, ktoré špecificky rozpoznali dublet H110D (obr. 12). Séra z negatívnych kontrolných oviec tento dublet nerozpoznávajú.

Izolácia a stanovenie vlastností klonov, vybraných hybridizáciou pomocou uloženej DNA typu M1 alebo B1A

Pozitívny klon, hybridizujúci so sondou M1 bol označený M1AUS (reťazec č. 5), klon, hybridizujúci s B1A bol označený AustB1 (reťazec č. 6). Štiepenie čistenej DNA plazmidu enzýmom EcoRI dokázal, že veľkosť uloženého reťazca je 900 bp pre M1AUS a približne 1,6 kb pre AustB1. Ako je zrejmé z obr. 9b a 9d, hybridizujú pri metóde Northern blot reťazce M1AUS a AustB1 s mRNA tej istej veľkosti približne 3,5 kb rovnako ako M1 a B1A.

Analýza reťazca M1AUS

Úplná analýza fragmentu M1AUS bola uskutočnená za použitia syntetických oligonukleotidov postupne pozdĺž celého reťazca DNA od oboch koncov. Analýza dokázala, že uložený reťazec M1AUS má veľkosť 948 bp, ako je znázornené na obr. 3. Tento reťazec (reťazec č. 5) začína kodónom ATG pre metionín a po celej dĺžke má otvorený čítací rámec. Reťazec je o 19 párov báz dlhší než reťazec M1 na 5' zakončení a o 634 bp dlhší na 3' zakončení. Reťazce, spoločné obom klonom (bázy 20 až 314) boli totožné a líšili sa len dvoma nukleotidami v treťom kodóne. Porovnanie všetkých čítacích rámcov z rôznych databáz dokázalo, že čítací rámec, začínajúci ATG na báze č. 1 je homológny s reťazcami zo skupiny mikrosomálnych aminopeptidáz.

Reťazec AustB1

Analýza celého reťazca fragmentu AustB1 bola uskutočnená za použitia syntetických oligonukleotidov postupne pozdĺž

reťazca DNA od oboch koncov. Reťazec tejto DNA (reťazec č. 6) je znázornený na obr. 5. Klon má dĺžku 1689 bp a má otvorený čítací rámec od zvyšku č. 2. Tento reťazec tvorí časť H11-1, ako je zrejmé z obr. 1. Translácia aminokyselín tohto reťazca dokázala miesto pre väzbu zinku, ktoré je charakteristické pre enzým aminopeptidázu.

Amplifikácia PCR cDNA pre mRNA H110D za použitia primérov M1AUS

Uvedená cDNA bola syntetizovaná z mRNA, pričom ako primér bol použitý oligo-dT, obsahujúci reťazec adaptora na uľahčenie následného klonovania a manipulácie s DNA. Získaná cDNA bola potom použitá na amplifikáciu reťazca M1AUS pomocou PCR, pričom ako primér pre 5'-zakončenie bol použitý syntetický oligonukleotid na báze polôh 865 až 885. Bol amplifikovaný PCR-fragment s veľkosťou približne 2,5 kb. Ide približne o očakávanú veľkosť fragmentov na báze známej veľkosti mRNA a na báze reťazca cDNA pre aminopeptidázu cicavcov.

Druhá skupina PCR-reakcií bola uskutočnená za použitia priméru v blízkosti 5'-zakončenia M1AUS, bázy 30 až 49. Na agarózovom géli boli dokázané štyri pásy. Najväčší z nich s veľkosťou 3,5 kb zodpovedá predpokladanej veľkosti pre produkt PCR.

Klonovanie a analýza reťazca produktov PCR s veľkosťou 2,5 kb a 3,5 kb za použitia primérov M1AUS

PCR produkty s veľkosťou 2,5 kb a 3,5 kb boli klonované a označené 2,5 PCR (reťazec č. 7) a 3,5 PCR (reťazce č. 8, 15 a 15 pre klony č. 2, 10 a 19). Pri metóde Northern blot hybridizovali 2,5 PCR a 3,5 PCR (klon 2, 3,5 PCR-2) s mRNA s veľkosťou približne 3,5 kb (obr. 9e, f) rovnakým spôsobom (vzhľadom k veku *Haemonchus*, ktorý bol použitý na získanie mRNA) ako M1, B1A, M1AUS a AustB1.

Analýza celého reťazca týchto klonov bola vykonávaná postupne za použitia oligonukleotidu. Ako je zrejmé z obr. 1, je reťazec pre produkt s 2,5 kb (reťazec č. 7) časťou reťazca pre H11-2 (reťazec č. 20) a reťazec pre produkt s veľkosťou 3,5 kb (reťazec č. 8) tvorí hlavnú časť reťazca pre H11-3 (reťazec č. 21). Translácia aminokyselín pre oba tieto reťazce, znázornená na obr. 6 dokazuje skupinu pre väzbu zinku, His Glu Xaa Xaa His Xaa Trp (HEXXHXW), ktorá je charakteristická pre mikrosomálne aminopeptidázy.

Stanovenie reťazca na 5'-zakončení PCR klonov

Zodpovedajúca cDNA bola syntetizovaná za použitia primérov, zodpovedajúcich konzervovanému reťazcu v klone cDNA AustB1, 2,5 PCR a 3,5 PCR (reťazce č. 6, 7 a 8), tieto reťazce hybridizujú s mRNA uvedených reťazcov približne vo vzdialenosti 1,3 kb od 5'-zakončenia. Tieto cDNA boli C-predĺžené na 5'-zakončení a potom boli vykonané PCR reakcie za použitia univerzálneho zakotvujúceho priméru (A) pre 5'-zakončenie a troch primérov, špecifických pre každý z reťazcov AUSB1, 2,5 PCR a 3,5 PCR klon 2 (reťazce č. 6, 7 a 8) na 3'-zakončení. Pri reakciách vznikli produkty s predpokladanou veľkosťou tesne pod 1,3 kb: 1301 bp (reťazec č. 9), 1280 bp (reťazec č. 10) a 1292 bp (reťazec č. 11). Všetky tri tieto reťazce majú neprenášanú oblasť na svojom 5'-zakončení, ako je zrejmé z obr. 2. Všetky tieto reťazce začínajú rovnakou počiatočnou časťou s 22 párami báz, 5' GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG 3', ktorý je známy ako vedúci reťazec 1 (SL1) a nachádza sa v neprenášanej 5'-oblasti celého radu druhov nematódov, ako bolo opísané v publikácii Huang a ďalší, 1990. V reťazcoch č. 9 a 10 sa reťazec SL1 nachádza bezprostredne pred iniciačným kodónom ATG. V reťazci č. 11 sa medzi reťazcom SL1 a iniciačným kodónom ATG nachádza ešte 13 párov báz. Všetky tri reťazce majú úplný otvorený čítací rámec.

Analýza reťazca AustB1 na 3'-zakončení PCR klonu

Za použitia špecifického priméru pre polohy 1414 až 1438 v AustB1 (reťazec č. 6), bolo možné získať PCR produkt s pásom s predpokladanou veľkosťou približne 1,3 kb. Pri analýze klonovaného pásu boli získané reťazce č. 12 a 13. Tieto reťazce mali otvorený čítací rámec v rozsahu párov báz 1 až 615 a neprenášanú oblasť.

Analýza reťazca klonovaných PCR produktov

Na obr. 2 sú uvedené reťazce zložených bielkovín označených H11-1, H11-2 a H11-3. Reťazec aminokyselín, odvodený od týchto reťazcov je uvedený na obr. 6a. Platnosť predpovedanej translácie týchto reťazcov DNA je v podstate potvrdená analýzou reťazcov aminokyselín pomocou Edmonovej degradácie z CNBr s fragmentov po proteolytickom štiepení, ako je zrejmé z obr. 7. To znamená, že 27 zvyškov z 29 zvyškov N-terminálneho reťazca H11-S (reťazec č. 16) zodpovedá reťazcu H11-2 v rozmedzí zvyškov 61 až 90, ako je zrejmé z obr. 7b. Zodpovedajúci valín (V) v polohe 78 a glycín (G) v polohe 90 sú charakteristické pre H11-2 vzhľadom na to, že H11-3 obsahuje asparagín (N) v polohe 90 a H11-1 obsahuje leucín (L) v polohe 86, ktorá zodpovedá v polohe 78 H11-2. Dva zvyšky na N-terminálnom zakončení reťazca aminokyselín H11-S (reťazec č. 16) neodpovedá žiadnemu z troch reťazcov H110D, ako boli uvedené. Je treba uviesť, že existujú presné identické úseky reťazcov vo veľmi podobných, avšak inak odlišných reťazcoch Pep A a B (ktoré boli skôr opísané vo W090/11086) a H11-2 a H11-1 v oblasti zvyškov 540 až 555. Podobne v oblasti zvyškov 450 až 470 obsahuje PepD krátky reťazec, ktorý presne zodpovedá H11-2, ale podobný, avšak odlišný reťazec Pep E je bližší reťazcu H11-3.

Na obr. 6b je prenášaný reťazec aminokyselín z jedného z reťazcov v jeho plnej dĺžke (H11-3) porovnávaný s dvoma reťazcami pre mikrosomálnu aminopeptidázu cicavcov. Homológia prenášaného reťazca H110D s týmito aminopeptidázami je znázornená tak, že totožné aminokyseliny sú uzavreté do rám-

čekov. Charakteristickou skupinou aminokyselín pre mikrosomálne aminopeptidázy je reťazec HEXXH₂W, ktorý je určený pre väzbu zinku podľa publikácií Jongeneel a ďalší, 1989, Valle a ďalší, 1990, ako je znázornené na obr. 6 hviezdikami. Tento reťazec, ktorý je prítomný v prenášanej oblasti H11-1, H11-2 a H11-3, je konzervovaný vo všetkých mikrosomálnych aminopeptidázach. Ďalšou vlastnosťou, ktorá je spoločná mikrosomálnym aminopeptidázam cicavcov a Haemonchus, je prítomnosť pomerne krátkej intracelulárnej oblasti, ktorým je jediný transmembránový reťazec v blízkosti N-zakončenia, okrem toho je prítomných niekoľko potenciálnych miest pre glykozyláciu. Úroveň homológie (podobnosť 52 až 55 % a totožnosť 30 až 32 %) H11-1, H11-2 a H11-3 s mikrosomálnymi aminopeptidázami cicavcov je znázornená na obr. 2.

Analýza Southern blot

Výsledky analýzy Southern blot za použitia DNA genómu *H. contortus* a rôznych H110D cDNA klonov a PCR produktov ako sond sú znázornené na obr. 10. Pre všetky sondy je možné dokázať viacpočetné pásy hybridizácie, čo je typické pre skupinu génov s obsahom väčšieho počtu génov. Ako bolo očakávané, je možné pre B1A a AustB1 dokázať podobný typ hybridizácie rovnako ako pre M1AUS a 3,5 PCR. Avšak tieto typy sa od seba navzájom líšili a súčasne sa líšili aj od hybridizácie pre 2,5 kb PCR a to aj za mierne obmedzujúcich podmienok, ako je znázornené na obr. 10A, čo odráža odlišné úrovne homológie medzi týmito tromi reťazcami cDNA.

Dôkaz účinnosti typu aminopeptidázy pre H110D

Účinnosť typu mikrosomálnej aminopeptidázy bola dokázaná pre tie frakcie, ktoré obsahovali H110D, to znamená pre supernatanty po extrakcii Thesitu v ultraodstredivke, pre frakcie po väzbe ConA (ConA H110D) a tiež pre tie frakcie s obsahom H110D, ktoré boli získané chromatografiou na ionomieniči za použitia stĺpca MonoQ, ako je zrejmé z nasledujú-

cej tabuľky 3. Špecifická účinnosť sa v prípade všetkých skúmaných substrátov zvyšovala súbežne s čistotou H110D.

T a b u ľ k a 3

Enzymatická účinnosť frakcií typickej šarže H110D

frakcia	špecifická účinnosť enzýmu (O.D./min/mg bielkoviny)				
	fenyl- alanín -pNA	leucín -pNA	lyzín -pNA	kyselina alfa- glutamo- vá-pNA	metionín -pNA
fyziologický roztok NaCl s fosfátovým pufrom(PBS)	0,20	0,08	0,12	0,01	0,16
1% Tween 20 (PBS)	0,15	0,15	0,09	0,01	0,09
1% Thesit/PBS	1,94	1,25	0,57	0,64	1,91
ConA H110D	4,08	3,01	1,43	2,09	3,84
CamQ H110D	6,55	5,01	3,01	3,90	6,41

Účinok inhibítorov aminopeptidáz cicavcov na účinnosť aminopeptidázy H110D

Pridanie inhibítora betastatínu, ktorý inhibuje mikrosomálnu aminopeptidázu cicavcov k ConA H110D v koncentrácii doporučenej výrobcom (Boehringer Mannheim) znížilo účinnosť oproti leucín-p-nitroanilidu o približne 70 %. Bol vykonaný rad pokusov s rôznymi inhibítormi proteáz. Inhibičný účinok mali tie inhibítory, ktoré sú špecifické pre metaloproteázy alebo aminopeptidázy. Účinok týchto inhibítorov na rýchlosť reakcie je uvedený v nasledujúcej tabuľke 4. Najúčinnější bol fenantrolín v koncentrácii 5 mM.

T a b u ľ k a 4

Inhibícia účinku aminopeptidázy H110D rôznymi inhibítormi proteáz

inhibítor	koncen- trácia	Inhibícia v % p-nitroanilid alfaglutamovej kyseliny ¹	inhibícia v % p-nitroanilid leucínu ²
Amastatín	10 µM	0	61
	50 µM	0	66
Bestatín	50 µM	23	63
	100 µM	35	68
EDTA	1 mM	17	8
	10 mM	21	16
1,10fenantrolín	1 mM	78	78
	10 mM	85	87
Fosforamidon	10 µM	1	0,8
	50 µM	1	7

¹ substrát pre aminopeptidázu A cicavcov

² substrát pre aminopeptidázu M cicavcov.

Subfrakcionácia H110D

Distribúcia účinnosti vo frakciách po chromatografii ConAH110D na stĺpci ionomeniča MonoQ je znázornená na obr. 13a, elektroforéza na SDS-PAGE pre jednotlivé frakcie je znázornená na obr. 13b.

Enzymatická účinnosť bola spojená s podielmi frakcií H110D, ktoré bolo možné od seba oddeliť opakovaným stanovením izoelektrického bodu, ako je znázornené na obr. 14 a 15. Pri nižších hodnotách pI (pH 4,5) obsahujú tieto podiely len väčšie z pásov, tvoriacich dublet H110D pri elek-

troforéze na SDS-PAGE a pri vyšších hodnotách (pH 6,5) obsahujú tieto podiely len menšie z pásov pre dublet H110D. Medzifrakcie obsahujú dva tieto pásy. Menší pás môže byť tiež získaný ako samostatná frakcia pri chromatografii na ionome-niči MonoQ za použitia Pharmacia SMART^R. Všetky tieto podie-ly a menšie frakcie sú schopné viazať ovčie protilátky opro-ti afinitne čistenej bielkovine H110D po expresii klonu lambdagt11 M1, hoci protilátky z lambdagt11 bez uloženého reťazca nie sú schopné väzby, ako je zrejmé z obr. 14c. Všetky malé frakcie sú schopné sa viazať na myšie monoklo-nálne protilátky, označené TS 3/19,7 (obr. 14c), ktoré sú taktiež schopné sa viazať na rekombinantnú bielkovinu, k expresii ktorej dochádza klonom M1. Všetky podfrakcie majú účinnosť mikrosomálnej aminopeptidázy (obr. 15c), napriek tomu, že táto účinnosť je pomerne nízka u frakcií, získaných pri najvyšších a najnižších hodnotách pI. Táto nižšia účin-nosť môže byť spôsobená nižšou koncentráciou bielkoviny, účinkom extrémneho pH pri delení frakcií alebo požiadavkou na prítomnosť malého a veľkého pásu pre maximálnu účinnosť produktu.

Vakcinácia jednotlivými zložkami H110D

Oddelené horné a spodné pásy, získané stanovením izo-elektrického bodu alebo chromatografiou na ionomeniči vyvo-lávajú tvorbu ochranných protilátok po vstreknutí ovciam, ako je možné dokázať nasledujúcim pokusom. 30 oviec vo veku približne 6 mesiacov bolo rozdelených do piatich skupín po šiestich ovciach tak, aby každá zo skupín mala približne rovnakú hmotnosť. Každdej ovci bolo injekčne podaných celkom 150 mikrogramov bielkovín v troch rovnakých dávkach podľa publikácií Munn a ďalší, 1992 a Tavernor a ďalší, 1992a, b v priebehu 54 dní. Zvieratá v skupine L boli očkované po-daním menšieho pásu z dubletu H110, zvieratá v skupine U bo-li očkované horným pásom, v skupine U+L bola podaná zmes horného a spodného menšieho pásu, skupine D bol podaný ne-rozdelený pás v zmesi horného a spodného pásu, získaný pri

stredných hodnotách pH a kontrolnej skupine C bol podaný ferritín zo sleziny koní ako antigénne nepríbuzná bielkovina. Ovciam bolo po troch týždňoch po očkovaní podané po tretej injekcii 10 000 infekčných lárvi a pokus bol ukončený 29 až 31 dní po tejto infekcii. Výsledok pokusu je zhrnutý na obr. 16. Injekčné podanie akejkoľvek zo substrakcií znižuje výskyt vajícok parazitov v priebehu pokusu približne o 90 % a celkový počet hlíst o 63 až 84 %, vo všetkých prípadoch ide o štatisticky významný rozdiel (p je menšie než 0,5) v porovnaní s kontrolnými zvieratami. Zníženie 70 až 88 % bolo väčšie pre samice hlíst než pre samcov hlíst (avšak s výnimkou zníženia počtu samcov u oviec so zmesou horného a spodného pásu, kde p bolo menšie než 0,07), zníženie pre obe pohlavia bolo vo všetkých prípadoch štatisticky významné pri p menšom než 0,05.

Očkovanie pomocou H11S a H11A

Skrátenú, vo vode rozpustnú formu H110D (H11S, ktorá si uchováva svoju enzymatickú účinnosť) je možné získať z prírodnej molekuly pôsobením elastázy. Bolo dokázané, že táto forma má účinnosť, prevažne podobnú účinnosti enzýmu ApM, extrakt materiálu po štiepení elastázou, extrahovaný Thesisom (H11A) bol obohatený o účinnosť typu ApA, ako je zrejmé z nasledujúcej tabuľky 5.

T a b u ľ k a 5

Pomer	
aminopeptidáza-M : aminopetidáza-A	
(leucín-pNA)	(kyselina alfa-glutamová-pNA)
H110D	1,44 : 1
H11S	26,0 : 1
H11A	0,48 : 1

Nasledujúci pokus dokazuje, že vakcinácia oviec pomocou H11S a H11A poskytuje ochranu proti infekcii *Haemonchus*. Skupina 18 oviec vo veku približne 8 mesiacov bola rozdelená na tri časti po šiestich ovciach tak, aby každá skupina šiestich oviec mala približne rovnakú hmotnosť. Každému zvieraťu bolo injekčne podaných v dvoch rovnakých dávkach približne 100 mikrogramov bielkoviny podľa publikácií Munn a ďalší, 1992 a Tavernor a ďalší, 1991a, b v priebehu 23 dní. Zvieratám v skupine A bola injekčne podaná frakcia H11A, zvieratám v skupine S frakcia H11S a zvieratám v skupine C bol podaný ferritín zo sleziny koní ako antigénne nepríbuzná bielkovina, to znamená ako negatívna kontrola. 25 dní po druhej injekcii bolo ovciam podaných 10 000 infekčných lariev a pokus bol ukončený 34 až 36 dní po infekcii. Výsledky pokusu sú zhrnuté na obr. 17. Injekčné podanie H11S znížilo množstvo vajíčok vo výkaloch o 89 % a celkový počet hlíst o 76 %. Injekčné podanie H11A znížilo množstvo vajíčok vo výkaloch o 98 % a celkový počet hlíst o 84 %. Ide teda o štatisticky významný rozdiel pri p menšom než 0,5 oproti kontrolám.

Inhibícia účinku aminopeptidázy H110B protilátkami

Roztoky s obsahom 110B boli inkubované spolu so vzorkami sér z jednotlivých oviec po injekčnom podaní frakcií s obsahom H110D alebo so vzorkami sér kontrolných oviec. Potom boli roztoky sledované na účinnosť aminopeptidázy za použitia fenolalanínu-p-NA a kyseliny alfa-glutamovej-p-NA ako substrátu. Inhibícia účinnosti, ktorej hodnota bola maximálne 80 %, bola v korelácii so stupňom ochrany u jednotlivých oviec, ktorým bolo odobraté sérum, ako je zrejmé z obr. 18.

Lokalizácia enzymatickej účinnosti

Zmrazené rezy dospelých jedincov *Haemonchus contortus* boli skúmané na účinnosť aminopeptidázy. Ako je zrejmé

z obr. 19, je účinnosť aminopeptidázy lokalizovaná v presvite čreva. Bielkovina H110D je taktiež špecificky uložená v tejto lokalizácii.

Expresia H110D (3,5 PCR klon 2) za použitia eukaryotického systému baculovírus-hmyzie bunky

Expresia účinnosti aminopeptidázy v hmyzích bunkách

Infikované bunky boli skúmané na účinnosť aminopeptidázy za použitia phe-, leu-, met- a lys-pNA ako substrátu. Analýza bola komplikovaná skutočnosťou, že hmyzie bunky obsahujú aminopeptidázu, ktorá výrazne prednostne štiepi amidové väzby lyzínu. Avšak bunkové extrakty s obsahom H110D po expresii okrem toho štiepili aj väzby leu-, met- a phe-pNA v uvedenom poradí prednosti.

Molekulová hmotnosť a imunoreaktivita bielkoviny H110D (3,5 PCR klon 2) po expresii

Vzorky extraktov infikovaných alebo kontrolných buniek boli podrobené elektroforéze na 7,5% SDS-polyakrylamidovom géli, ktorý potom bol farbený Coomassieovou modrou. Lyzáty infikovaných buniek 3,5-2-P3A a 3,5-2-p4A obsahovali pásy rovnakého rozmeru ako pás pre H110D s molekulovou hmotnosťou 110 000, ktorý sa pohyboval priamo pod pásom pre beta-gal s molekulovou hmotnosťou 120 000, k expresii dochádzalo súčasne. Tento pás s molekulovou hmotnosťou 110 000 nebol prítomný v rozrušených negatívnych kontrolných lyzátoch. Bol taktiež neprítomný v lyzáte buniek P2A, u ktorých nedochádza k expresii enzýmu.

Gél bol dvakrát opakovane analyzovaný metódou Western blot, ako sonda bola použitá protilátka proti H110DN, ako je zrejmé z obr. 21. Bolo možné pozorovať veľmi silnú špecifickú imunologickú reakciu na pás s molekulovou hmotnosťou 110 000, k expresii ktorého dochádza bunkami 3,5-2-P3A a tiež 3,5-2-P4A a oproti natívnemu dubletu H110D v kontrolnej drá-

he, obsahujúcej ConA H110D, žiadnu reakciu nebolo možné pozorovať v negatívnych kontrolných dráhach.

Informácie o reťazcoch

počet reťazcov: 24

Informácie pre reťazec č. 1:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 295 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 1:

CGCGGACATT	GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTTATTGT	CGCATTATTT	CTAGTAGCTG	60
CTGCAGTCGG	CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAGCG	TTCGATACCT	120
CAGAAAAGCC	AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGACAA	AGACAAATTCT	CCCTCTGCGG	180
CGGAACACT	TCTTCCAAGT	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	CGACTTGACG	ATCAAAACAT	240
ATCTACCTGG	TTATGTGGAC	TTCCCACCGG	AGAAAAACCT	CACATTTCGAC	GGGCG	295

Informácie pre reťazec č. 2:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 484 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 2:

GCAATATCAG	GATTCAATAC	AATTTTGGAC	TTTTTCGGCA	GCGAACCCGA	ATCTCAATGG	60
GCTTCGGAAT	ACATGCGAAA	ACTGATGAAG	CCAATTTATG	ACAAGAGTAG	CATCAAGTTT	120
ATAGCGGAGA	ACTACAAAAA	AGATTGCTT	TTCTTCAAAA	ATAATCTCCA	AATAGCTGTT	180
ATTGACACAT	ACTGTGGTCT	TGGAGGCAAA	GAATGTCTTG	AAGAAATGAA	AAAGCTTTTT	240
GACAAGGAGG	TCATGAAATG	TCAACCTGGT	CAGCAAGCGA	CCGACTGCGT	AAAGGTAACT	300
GCTCCTCTCC	GAAAACTGT	TTACTGCTAT	GGGGTCCAGG	AAGGCGGTGA	TGAGGCATTC	360
GACAAGGTGA	TGGAACTATA	TAATGCGGAA	CAAGTGCACT	TGGAGAAAGA	CAGTCTACGT	420
GAAGCATTGG	GATGCCATAA	AGACGTTACA	GCTCTAAAGG	GACTTCTTAT	GCTGGCTTTG	480
GATC						484

Informácie pre reťazec č. 3:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 216 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 3:

ACCTGGTCAG	CAAGCGACCG	ACTGCGTAAA	GGTAACTGCT	CCTCTCAAAA	CTGTTTACTG	60
CTATGGGGTC	CAGGAAGGCG	GTGATGAGGC	ATTCGACAAG	GTGATGGAAC	TATATAATGC	120
GGAACAAGTG	CAGTTGGAGA	AAGACAGTCT	ACGTGAAGCA	TTGGGATGCC	ATAAAGACGT	180
TACAGCTCTA	AAGGGACTTC	TTATGCTGGC	TTTGGG			216

Informácie pre reťazec č. 4:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 581 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 4:

GGGAGGAAAT	CACTGCGAGC	TTGGAAACAG	AACACAGAGC	AGTTGATAAA	GTGGTCGGCG	60
CTTGTTGCAC	AGGAATTTCG	TCCCAACAAC	AAATAGATCA	GCTGAAGAAG	AATCTACAGA	120
AGAACAATGC	GCAGGCTAAG	AAGTTCCATA	AAATTGCCTG	GATCAAGAAA	CATTTTCACA	180
GATTATCGGA	ATTCTTCAAG	AGAGCAAGAT	CATAGCTTTT	CACACTGAGC	TCCAATTTTA	240
ACGTCTTCAA	ACTAGGAGAC	AGTTTTGCTG	AAAAGTCAGT	TTTACATTTT	CCGTTTGAAT	300
GCCATCCATT	CGAATACAAC	CAACCCCAT	TTAAGTACCT	TTTATTTCACA	GTGATTACTA	360
AATTTTGAAT	ATATTATGAA	GCTTGATATCT	TGAACGTTAT	GATCGGTGAC	TTTCAATTTA	420
TAGAGCTCAC	TCTCCATTTT	GTAAGCTGTGA	TGACTTGCAT	TTAAGACCCA	CCATTTACCA	480
GCCTATAATC	TTTCCCCAAT	ACATTCCAAA	CTCCGATCAC	CTCCACCGCT	GACAATGCCC	540
AGATTTGTTT	CTTTGTCTGC	TATCCATCTA	ACTGTTTCGA	T		581

Informácie pre reťazec č. 5:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 948 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 5:

ATGACGTCGC	AGGGGAGAAC	GCGGACATTG	CTGAATCTAA	CTCCAATCCG	TCTTATTGTC	60
GCATTATTTT	TAGTAGCTGC	TGCAGTCGGC	CTCTCTATTG	GTCTCACCTA	TTACTTTACT	120
CGCAAAGCGT	TCGATACCTC	AGAAAAGCCA	GGGAAGGATG	ATACTGGTGG	CAAGGACAAA	180
GACAATTCTC	CCTCTGCGGC	GGAACACTCT	CTTCCAAGTA	ATATAAAACC	ATTGTCTTAC	240
GACTTGACGA	TCAAAACATA	TCTACCTGGT	TATGTGGACT	TCCCACCGGA	GAAAAACCTC	300
ACATTTCGATG	GGCGTGTGGA	AATATCAATG	GTTGTAATTG	AGCCAACAAA	GAGTATCGTA	360
CTCAATTCAA	AGAAGATCTC	TGTAATACCC	CAAGAATGTG	AACTGGTATC	GGGCGATAAA	420
AAATTTCGAAA	TTGAAAGTGT	AAAGGAGCAC	CCAAGACTGG	AAAAGGTTGA	GTTTCTTATC	480
AAAAGCCAAC	TGGA AAAAGA	TTCACAAATC	TTGCTCAAGT	CGGCTTACAT	CGGTCTCATC	540
AGCAACAGCC	TTGGTGGAAT	CTACCAGACC	ACTTATACCA	CCCCGGATGG	CACCCCTAAG	600
ATCGCTGCAG	TTTCACAAAA	TGAGCCCATA	GATGCTCGTC	GAATGGTACC	ATGCATGGAT	660
GAACCGAAAT	ACAAAGCAAA	CTGGACCGTT	ACTGTCAATC	ATCCAAAAGG	CACCAAAGCC	720
GTCTCGAATG	GAATCGAAGT	GAACGGAGAT	GGAGAGATCA	GTGGTGATTG	GATCACATCG	780
AAGTTCTTGA	CTACTCCACG	GATGTCTATC	TACTTGTTGG	CAGTTATGGT	TTCAGAATTT	840
GAATACATCG	AAGGTGAAAC	AAAGACGGGT	GTTCCGGTTC	GTATATGGTC	ACGCCAGAG	900
GCAAAGAAGA	TGACACAATA	TGCTCTGCAA	TCTGGTATCA	AGTGCATA		948

Informácie pre reťazec č. 6:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 1689 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 6:

AATTCCGGCT	CGTCCGGAAG	CTATGAAGAT	GACAGAATAT	GCCATGATAG	CTGGAATCAA	60
ATGTTTGGAT	TACTATGAGG	ACTTCTTCGG	GATCAAATTC	CCACTTCCAA	AACAAGATAT	120
GGTTGCTCTT	CCTGACTTCT	CATCTGGTGC	TATGGAGAAC	TGGGGTCTCA	TCACATACAG	180
GGAGGGTTCC	GTGCTCTACG	ATGAAAACCT	CTACGGACCA	ATGAATAAGG	AGCGGGTTGC	240
AGAAGTGATC	GCGCACGAAC	TTGCACATCA	GTGGTTCGGT	AATTTGGTCA	CGATGAAGTG	300
GTGGGATAAC	CTATGGCTGA	ACGAAGGATT	CGCGTCATTC	GTGGAATACA	TCCGAGCCGA	360
CTTCATCAGC	GATGGTCTAT	GGGAAATGAA	AGATTTCTTC	CTGCTGGCAC	CGTACACAAG	420
TGGTATTACG	GCTGATGCAG	TAGCTTCAAG	CCATCCGCTT	TCCTTCAGAA	TAGATAAGGC	480
TGCAGATGTA	TCAGAAGCGT	TCCGATGATAT	CACATACCGT	AAAGGAGCAT	CCGTTCTTCA	540
AATGCTATTG	AATTTAGTTG	GGGACGAAAA	TTTCAAGCAG	TCTGTTTCGC	GTTACCTCAA	600
GAAGTTTTC	TATGATAATG	CGGCTGCTGA	AGATTTATGG	GCAGCATTCG	ACGAAACCGT	660
CCAAGGTATA	ACCGGACCTA	ATGGTGGACC	ATTGAAAATG	TCCGAGTTTG	CGCCACAATG	720
GACAACTCAG	ATGGGGTTCC	CTGTTCTTAC	TGTCGAGTCG	GTAAACGCAA	CGACTTTGAA	780
AGTCACCCAA	AAACGATACA	GGCAGAACAA	GGATGCAAAG	GAACCAGAGA	AGTACCGTCA	840
TCCAACCTTAT	GGGTTCAAAT	GGGATGTTCC	TCTGTGGTAT	CAGGAAGATG	AACAGCAAGT	900
GAAAAGAAGT	TGGTTAAAAA	GAGAGGAACC	GCTCTATTTT	CATGTAAGCA	ATTCTGATTG	960
GTCAGTTGTG	GTGAATGCCG	AACGTCGTGC	TTTTTGCCGA	TCAAACCTATG	ACGCTAACGG	1020
TTGGAGGAAC	ATTATGAGAA	GACTCAAGCA	GAATCATAAG	GTCTATGGTC	CACGAACAAG	1080
AAACGCTCTC	ATAAGTGATG	CGTTTGCGAG	AGCTGCAGTT	GAGGAAATGA	ATTACGAGAC	1140
CGTATTTGAA	ATGCTCAAAT	ACACCGTGAA	AGAAGAGGAT	TACTTACCAT	GGAAGGAGGC	1200
AATATCAGGA	TTCAATACAA	TTTTGGACTT	TTTCGGCAGC	GAACCCGAAT	CTCAATGGGC	1260
TTCCGAATAC	ATGCGAAAAA	TGATGAAGCC	AATTTATGAC	AAGAGTAGCA	TCAAGTTTAT	1320
AGCGGAGAAC	TACAAAAAAG	ATTGCTTTT	CTTCAAAAAT	AATCTCCAAA	TAGCTGTTAT	1380
TGACACATAC	TGTGGTCTTG	GAGGCAAGA	ATGCTTGAA	GAAATGAAAA	AGCTTTTTTGA	1440
CAAGGAGGTC	ATGAAATGTC	AACCTGGTCA	GCAAGCGACC	GACTGCGTAA	AGGTAAGTGC	1500
TCCTCTCCGA	AAAAGTGT	ACTGCTATGG	GGTCCAGGAA	GGCGGTGATG	AGGCATTGCA	1560
CAAGGTGATG	GAACTATATA	ATGCGGAACA	AGTGCAATTG	GAGAAAAGACA	GTCTACGTGA	1620
AGCATTTGGGA	TGCCATAAAG	ACGTTACAGC	TCTAAAGGGA	CTTCTTATGC	TGGCTTTGGA	1680
TCCGAATTC						1689

Informácie pre reťazec č. 7:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 2472 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojitý

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 7:

ACGGGTGTTT	GGTTCCTGAT	ATGGTCTCGA	CCAGAGGCGA	AACGAATGAC	GGCATACGCT	60
TTGGATGCTG	GCATCAGATG	CCTGGAGTTC	TATGAGAAAT	TCTTTGACAT	AAAAATCCCT	120
CTGGAAAAAC	AAGATATGAT	TGCTCTTCCT	GATTTACCCG	CTGGTGCCAT	GGAAAACTGG	180
GGCCTTATCA	CTTATAGAGA	GGATTCTCTC	CTATACGATG	AAAAAATTTA	TGCACCGATG	240
AATAAACAGC	GGGTTGCTCT	CGTAGTTGCT	CACGAGCTTG	CTCATCAGTG	GTTTCGGCAAT	300
CTGGTCACAC	TGAAGTGGTG	GGATGATACG	TGGTTGAACG	AAGGTTTTGC	AACATTTGTT	360
GAGTATCTTG	GAATGGACGA	AATTAGCCAC	AACAATTTCA	GAACGCAAGA	TTTCTTCTTG	420
CTCGATGGAA	TGGATCGCGG	AATGAGAGCT	GACTCGGCAG	CATCGAGCCA	TCCGCTTTTC	480
TTTAGGATTG	ACAAAGCGGC	AGAAGTTGCC	GAAGCCTTTG	ACGATATTTT	ATACGCCAAG	540
GGAGCGTCAG	TTCTCACTAT	GCTACGGGCT	TTGATTGGAG	AGGACAATTA	CAGGAATGCT	600
GTTGTGCAAT	ACCTCAAGAA	GTTCTCCTAC	AGCAATGCAC	AAGCAGCCGA	TCTGTGGAAC	660
GTCTTCAATG	AAGTTGTCAA	AGGTGTTAAG	GGTCTGACG	GCAACGTCAT	GAAAATCGAC	720
CAATTTACCG	ATCAGTGGAC	GTATCAGATG	GCTTATCCTG	TGGTTAAAGT	AGAAGAATTT	780
AATGCGACCG	CCCTAAAGGT	TACGCAGAGC	CGGTACAAAG	CAAATAAAGA	CGCCTTGGAA	840
CCAGAGAAAT	ATCGTAATCC	AAAATACGGG	TTCAAGTGGG	ATGTTCCCTT	ATGGTATCAG	900
GAAGGCAATA	GCAAAGAGGT	GAAGCGAACA	TGGCTAAAAA	GAGATGAACC	GCTGTACTTG	960
AACGTCAACA	ATCGGGATAC	ATCCCTTGTT	GTGAACGCTG	ATCGACATGG	ATTTTATCGA	1020
CAAACTATG	ATGCCAACGG	TTGGAAAAAG	ATAATCAAGC	AGCTCAAGAA	AGATCACAAG	1080
GTCTTCGGTC	CAAGGACAAG	GAACGCTATC	ATAAGCGATG	CATTTGCTGC	AGCTACGATT	1140
GACGCAATCG	ACTATGAAAC	TGTATTGCGA	CTACTTGAAT	ATGCCAAAAA	TGAAGAGGAA	1200
TTCTTGCTTT	GGAAGGAAGC	TCTGTCCGGC	ATGTTGCGAG	TTTTAAAGTT	CTTCGGTAAT	1260
GAGCCGAGAG	CAAAACCAGC	TAGAGCTTAC	ATGATGAGCA	TATTAGAACC	GATGTATAAT	1320
AAGAGCAGCA	TTGATTACAT	CGTCAAGAAT	TATTTGGATG	ATACGTTATT	CACAAAAAAT	1380
AATACTCAAA	AGGATATCAT	TGATGCATAT	TGTTCCCTTG	GATCAAAGGA	CTGTATAAAG	1440
CAATATAAGG	ATATCTTCTA	CGATGAGGTT	ATGCCCAAGT	GTAAGGCCGG	GGAAGCAGCA	1500
ACCAAATGCG	TAAAGGTTTC	CGCTCCTCTT	CGAGCCAATG	TTTACTGTTA	TGGTGTACAG	1560
GAAGGTGGTG	AAGAAGCTTT	TGAAAAGGTG	ATGGGGCTGT	ATCTAGCAGA	AGATGTTCAA	1620
CTGGAGAAGG	GTATCCTGTT	CAAAGCCTTG	GCATGCCACA	AAGATGTTAC	AGCTCTAAAA	1680
GAACCTCTTT	TGCGAGCCCT	GGACCGTAAA	TCGTCGTTTG	TGCGTCTTCA	GGATGTCCCT	1740
ACCGCTTTTC	GTGCTGTATC	TGAAAACCCCT	GTGGGCGAAG	AATTCATGTT	CAATTTCCCTA	1800
ATGGAGAGAT	GGGAGGAAAT	CACTGCGAGC	TTGGAAACAG	AACACAGAGC	AGTTGATAAA	1860
GTGGTCGGCG	CTTGTGTCAC	AGGAATTCGC	TCCCAACAAC	AAATAGATCA	GCTGAAGAAT	1920
CTACAGAAGA	ACAATGCGCA	GGCTAAGAAG	TTCGGCTCAT	TCACCCAGGA	AATCGAAAAA	1980
GGAGAACATA	AAATTGCCTG	GATCAAGAAA	CATTTTCACA	GATTATCGGA	ATTCTTCAAG	2040
AGAGCAAGAT	CATAGCTTTT	CACACTGAGC	TCCAATTTTA	ACGTCTTCAA	ACTAGGAGAC	2100
AGTTTTGCTG	AAAAGTCAGT	TTCAATTTT	CCGTTTGAAT	GCCATCCATT	CGAATACAAC	2160
CAATAATACC	ATTTTAAGTA	CCTTTCATTC	ACAGTGATTA	CTGAATTTTC	AATATATCAT	2220
GAAGCTTGTA	TCTTGAACGT	TATGATCGGT	GACTTTCAAT	TTATAGAGCT	CACTCTCCAT	2280
TTTGTAGCTG	TGATGACTTG	CATTTAAGAC	CCACCATTTA	CCAGCCTAGA	ATCTTTCCCC	2340
AATACATTCC	AAACTCCGAT	CACCTCCACC	GCTGACAATG	CCCAGATTTG	TTTTTTTGTC	2400
TGCTATCCAT	CTAACTGTTT	CGATCGCCGG	TTGTTTGTC	ATTGCTTATC	TGATAAATAT	2460
TGACGTTGGT	GT					2472

Informácie pre reťazec č. 8:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 3305 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 8:

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTTATTGT	CGCATTATTT	CTAGTAGCTG	CTGCAGTCCG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGACAA	AGACAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAACTACT	180
CCTTCCAAGT	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	CGACTTGACG	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGGAC	TTCCCAACCG	AGAAAAACCT	CACATTCGAT	GGGCGTGTGG	AAATATCAAT	300
GGTTGTAATT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	ACTCAATTCA	AAGAAGATCT	CTGTAATACC	360
CCAAGAATGT	GAAGTGGTAT	CGGGCGATAA	AAAACTCGAA	ATTGAAAGTG	TAAAGGAGCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTTG	AGTTTCTTAT	CAAAA3CCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTCGGCTACA	TCGGTCTCAT	CAGCAACAGC	TTTGGTGGAA	TCTACCAGAC	540
CACTTATACC	ACCCCGGATG	GCACCCCTAA	GATCGCTGCA	GTTTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGAATGGTAC	CATGCATGGA	TGAACCGAAA	TACAAAGCAA	ACTGGACCGT	660
TACTGTCAAT	CATCCAAAAG	GCACCAAAGC	CGTCTCGAAT	GGAATCGAAG	TGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATCACATC	GAAGTTCTTG	ACTACTCCAC	GGATGTCATC	780
CTACTTGTGG	GCAGTTATGG	TTTCAGAATT	TGAATACATC	GAAGGTGAAA	CAAAGACGGG	840
TGTTCCGGTTC	CGTATATGGT	CACGCCCCAGA	GGCAAAGAAG	ATGACACAAT	ATGCTCTGCA	900
ATCTGGTATC	AAGTGCATAG	AATTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAGAT	TCCCTCTGAA	960
GAAACAAGAT	ATGATTGCCC	TTCTGTGATT	CTCTGCCGGT	GCCATGGAGA	ATTGGGGCCT	1020
CATCACTTAC	AGGGAAAACT	CTTTGTGTGA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCTCAT	CAGTGGTTTCG	GCGACTTGGT	1140
TACGATGAAG	TGGTGGGATA	ATTTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACAGAATT	1200
TATTGGAGCT	GGTCAGATAA	CTCAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAAGTACT	TTCTGATTGA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTG	GATGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCTTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	CTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACTATGCTGA	GAGCCTTGAT	TGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCAGTATC	1440
GCAGTACCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
TGATGAAGTT	GTCAGTACG	TGAAGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACAGAGTT	1560
TGCAAGTCAG	TGGACGACTC	AGATGGGCTT	CCCAGTTATT	TCCGTAGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTTTG	AAATTAACGC	AAAGTCGATA	TGAGGCGAAT	AAAGACGCTG	TGGAGAAAGA	1680
GAAGTACCGT	CACCCGAAAT	ACGGATTTAA	ATGGGATATT	CCACTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGATAAAGC	GAACATGGTT	GAGAAGAGAT	GAACCGCTTT	ACTTGCATGT	1800
TAGTGATGCT	GGCGCTCCCT	TTGTGGTGAA	CGCAGACCGC	TATGGATTTT	ATCGACAAAA	1860
TCATGACGCT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGATAATC	ATGAGGTTTA	1920
CAGTCCCGCG	ACAAGGAATG	TCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCGGCTG	CAACTGACGC	1980
AATTGAGTAT	GAGACTGTAT	TTGAACCTCT	GAATTATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATATCT	2040
ACCATTAGAA	ATCGCAATGT	CCGGGATCTC	TTTCGATTTG	AAATACTTCC	CTACCGAGCC	2100
AGAGGCAAAAG	CCAGCTCAAA	CATACATGAT	GAACATATTG	AAACCGATGT	ATGAAAAAAG	2160
CAGTATCGAC	TTCAATTGCCA	ATAACTACAG	AAATGACAAG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAAGAT	GTCATTGATA	TGTTCTGCGC	CCTCGGATCG	CAAGACTGCA	GGAAGAAATA	2280
TAAAAAACTT	TTTCGATGACG	AAGTCATGAA	CAATGCAGG	GATGGTCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTAAGA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTATTG	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTCCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TCGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTGGGATG	TCATAAAGAT	GTTACTGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCTTGCGG	GCTCTGGACA	GGAATTCGTC	GTTTCGTACG	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTTATTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCATTG	AAAGTATAGG	AACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAGTGAT	2700
ACCAGCCTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAGCAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760
GAAAAATGGC	ATGAACGCTC	GTCATTCGGT	TGCATTCGAT	AAAGCAATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGTA	TTTCAATTAC	ATTGCCAGTA	ATCCAGATCT	TAAAGTTTAT	GAAGGAATAT	2940
GACAGGGAAC	TGACTGTCTG	TTGGTCACTG	TTCCACTGAA	TGGAAGTTTT	TACCTACAAA	3000
AATTTTATC	GTTATATTTG	CCTTCCGTGA	GGGGTCATTG	TTGTCACTTG	AATAGTAAAC	3060
AAAGCTCAGT	ATTGGCAACC	GTAGAACAA	ATTACTTTTC	CTTCATCAAA	TTGTTATCTT	3120
CCCTATACCC	TCTTCTAAC	TGAATTCGGA	AATTTGTTCA	TATTCGTTTG	TAGTCTGTTG	3180
CTCAGAACAC	TTTCTCCTCA	ATAGCTTCTT	GTTTGTTTTT	TTTTTGATTG	TATTGATCGT	3240
TTTACAATTG	TATAGATTAG	TTATCTTATA	AATATTGATG	GTTAAAAAAA	AAAAAAAAAA	3300
AAAAA						3305

Informácie pre reťazec č. 9:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 1301 párov báz
typ: nukleová kyselina
typ reťazca: dvojitý
topológia: lineárna

Opis reťazca č. 9:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG	AGACGCAGCA	60
ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG	TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	120
GGTAGCTGCT	GCCGTCGGCC	TCTCAATCGG	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAGCTTT	180
TGATACTACT	GGCGGAAATG	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGATGATA	ATTCCCCATC	240
AGCTGAAGAA	TTACGTCTCC	CAACAACCAT	AAAACCTTTG	ACATACGACT	TAGTAATCAA	300
AACGTATCTG	CCAAACTATG	TAAACTATCC	ACCTCAGAAA	GATTTGCTA	TTGATGGGAC	360
TGTGGTGATT	GCTATGGAAG	TTGTGGAGCC	AACAAAGTCT	ATTGTGCTCA	ACTCGAAAAA	420
TATTCCTGTA	ATTGCAGACC	AGTGCGAACT	GTTTTCTAAC	AACCAAAAAAC	TCGACATCGA	480
AAAGGTTGTG	GATCAGCCAA	GGCTGGAGAA	AGTCGAATTC	GTTTTGAAGA	AAAAGCTGGA	540
GAAGAATCAG	AAAATCACGC	TCAAGATTGT	ATACATTGGC	CTTATCAACG	ACATGCTTGG	600
AGGACTTTAT	CGAACAACCT	ACACGGATAA	AGATGGTACA	ACCAAGATTG	CTGCATGCAC	660
TCATATGGAA	CCGACGGACG	CCCGTCTTAT	GGTCCCCTGT	TTTCGACGAGC	CGACGTTTAA	720
GGCAAACTGG	ACTGTGACTG	TGATTTCATCC	GAAGGGCACC	AGTGCCGTGT	CGAATGGAAT	780
AGAAAAGGGA	GAAGGAGAAG	TCTCTGGCGA	TTGGGTCACA	ACCAGATTCT	ATCCAACCCC	840
GCGAATGCCT	TCGTATTTGA	TTGCTCTTGT	GATTTCCGAA	TTTAAGTACA	TTGAAAATTA	900
TACGAAAAGC	GGTGTTTCGAT	TCCGAATATG	GGCTCGTCCG	GAAGCTATGA	AGATGACAGA	960
ATATGCCATG	GTAGCTGGAA	TCAAATGCTT	GGATTACTAT	GAGGACTTCT	TCGGGATCAA	1020
ATTCCCTCTT	CCAAAACAAG	ATATGGTTGC	TCTTCCTGAC	TTCTCATCTG	GTGCTATGGA	1080
GAAGTGGGGT	CTCATCACAT	ACAGGGAGGG	TTCCGTACTA	TACGATGAAA	ACCTCTATGG	1140
ACCAATGAAT	AAGGAGCGGG	TTGCAGAAGT	GATTGCACAC	GAGCTTGCAC	ATCAGTGGTT	1200
CGGTAATTTG	GTCACGATGA	AGTGGTGGGA	TAACTATGG	CTAAACGAAG	GATTCGCGTC	1260
ATTCGTAGAA	TACATTGGAG	CCGACTTCAT	CAGCGATGGT	C		1301

Informácie pre reťazec č. 10:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 1280 párov báz
typ: nukleová kyselina
typ reťazca: dvojitý
topológia: lineárna

Opis reťazca č. 10:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACGGC	GGAGTGGCAG	AAGCGTCGAA	TCTTGGGCTT	60
CTCACCTATC	AGCCTACTTT	GTACATTATT	TGTATTAGCT	GCTGCCGTTG	GACTCTCCAT	120
TGGTCTTACC	TATTACTTCA	CTCGTAAAGC	ATTTCGATACC	ACACAAAAAG	AACAGAAGGA	180
TGACAGTGGT	GGTAAAGAAA	AGGATAATTC	TCCTTCTGCA	GAAGAACTAC	TTCTTCCAAC	240
GAACATAAAA	CCAGTCTCGT	ACGACTTGAA	CATCAAAAACA	TATCTACCGG	GTTACGTGAA	300
CTTTCCACCA	GAAAAGAATC	TCACATTTGA	TGCCCATGTG	GAGATTGCTA	TGGTTGTGGT	360
TGAGCCTACA	AATAGTATTG	TGCTGAACTC	GAAGAAAATC	ACTTTGGCAC	AAGGAGGATG	420
CGAACTGTTT	TCAGGTAATC	AGAAACTTGA	CATCGAAAAGT	GTAAAGATGC	AGGAAAGACT	480
TGACAAGCTT	GAGATTACCC	TCAAAAATCA	GCTGCAAAAA	GATCTGAAAA	TCCTGCTCAA	540
GATCACTTAC	ACCGGCCCTT	TTAGCGACAC	TCTCGGTGGG	CTCTACCAGT	CCATCTACAC	600
TGATAAGGAC	GGAAAACTA	AGATCGTTGC	TGTTTCACAA	AATGAACCAT	CAGACGCTCG	660
TCGTATAGCG	CCATGCTTTG	ACGAACCGAA	GTACAAGGCA	ACATGGACTG	TCACCGTCGT	720
TCATCCCAAA	GGTACAAAGG	CTGCATCGAA	CGGCATTGAA	GCAAATGGAA	AAGGGGAGCT	780
CAAGGGTGAT	TGGATAACGT	CTAAATTTAA	AACTACCCCA	CCGATGTCGT	CCTATTTATT	840
GGCTATTATT	GTTTGTGAAT	TTGAATACAT	TGAAGGATTT	ACAAAAACAG	GTGTACGGTT	900
CCGTATATGG	TCTCGACCAG	AGGCGATGGC	AATGACGGGA	TATGCCCTGG	ATGCTGGCAT	960
CAGATGTCTG	GAGTTCATG	AGAGATTCTT	TGACATCAAA	TTCCCTCTGG	AAAAACAAGA	1020
TATGATTGCT	CTACCTGATT	TCACCGCTGG	TGCTATGGAA	AACTGGGGTC	TTATCACTTA	1080
CAGAGAGGAT	TCTCTTCTAT	ACGATGAGAA	AATTTATGCG	CCGATGAATA	AGCAGCGGGT	1140
TGCTCTCGTA	TTTGACACAG	AGCTTGCTCA	TCAGTGTTTC	GGCAATCTGG	TCACATTGAA	1200
GTGGTGCGAT	GATACGTGGT	TGAACGAAGG	TTTTGCGACA	TTTGTGGAAT	ATCTTGGGAAT	1260
GGACGAAATT	AGCCACAACA					1280

Informácie pre reťazec č. 11:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 1293 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 11:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA	TCTAGATGAC	GTCGCAGGGG	AGAACGCGGA	60
CATTGCTGAA	TCTAACTCCA	ATCCGTCTTA	TTGTGCGATT	ATTTCTAGTA	GCTGCTGCAG	120
TCGGCCTCTC	TATTGGTCTC	ACCTATTACT	TTACTCGCAA	AGCGTTCGAT	ACCTCAGAAA	180
AGCCAGGGAA	GGATGATACT	GGTGGCAAGG	ACAAAGACAA	TTCTCCCTCT	GCGGCGGAAC	240
TACTCCTTCC	AAGTAATATA	AAACCATTGT	CTTACGACTT	GACGATCAAA	ACATATCTAC	300
CTGGTTATGT	GGACTTCCCA	CCGGAGAAAA	ACCTCACATT	CGATGGGCGT	GTGGAAATAT	360
CAATGGTTGT	AATTGAGCCA	ACAAAGAGTA	TCGTACTCAA	TTCAAAGAAG	ATCTCTGTAA	420
TACCCCAAGA	ATGTGAACTG	GTATCGGGCG	ATAAAAAACT	CGAAATTGAA	AGTGTAAGG	480
AGCACCCAAG	ACTGGAAAAAG	GTTGAGTTTC	TTATCAAAAAG	CCAACTGGAA	AAAGATCAAC	540
AAATCTTGCT	CAAGGTGGGC	TACATCGGTC	TCATCAGCAA	CAGCCTTGGT	GGAATCTACC	600
AGACCACTTA	TACCACCCCG	GATGGCACCC	CTAAGATCGC	TGCAGTTTCA	CAAAATGAGC	660
CCATAGATGC	TCGTGGAATG	GTACCATGCA	TGGATGAACC	GAAATACAAA	GCAAACTGGA	720
CCGTTACTGT	CATTATCCA	AAAGGCACCA	AAGCCGTCTC	GAATGGAATC	GAAGTGAACG	780
GAGATGGAGA	GATCAGTGGT	GATTGGATCA	CATCGAAGTT	CTTGACTACT	CCACGGATGT	840
CATCCTACTT	GTTGGCAGTT	ATGGTTTCAG	AATTTGAATA	CATCGAAGGT	GAAACAAAGA	900
CGGGTGTTTC	GTTCCGTATA	TGGTCACGCC	CAGAGGCAAA	GAAGATGACA	CAATATGCTC	960
TGCAATCTGG	TATCAAGTGC	ATAGAATTCT	ACGAAGATTT	CTTTGATATC	AGATTCCCTC	1020
TGAAGAAACA	AGATATGATT	GCCCTTCCTG	ATTTCTCTGC	CGGTGCCATG	GAGAATTGGG	1080
GCCTCATCAC	TTACAGGGAA	AACTCTTTGT	TGTACGATGA	CAGATTCTAT	GCACCGATGA	1140
ATAAACAGCG	AATTGCTCGC	ATTGTTGCTC	ATGAGCTTGC	TCATCAGTGG	TTGGGCGACT	1200
TGGTTACGAT	GAAGTGGTGG	GATAATTTGT	GTTTGAATGA	AGGTTTTGCA	AGATTCACAG	1260
AATTCACTGC	AGCTGGTCAG	ATAACTCAAG	ATG			1293

Informácie pre reťazec č. 12:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 746 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 12:

CTTGAAGAAA	TGAAAAAGCT	TTTTGACAAG	GAGGTCATGA	AATGTCAACC	TGGTCAGCAA	60
GCGACCGACT	GCGCGAAGGT	AACTGCTCCT	CTCCGAAAAA	CTGTTTACTG	CTATGGGGTC	120
CAGGAAGGCG	GTGATGAGGC	ATTCGACAAG	GTGATGGAAC	TATATAATGC	GGAACAAGTC	180
CAGTTGGAGA	AAGACAGTCT	ACGTGAAGCA	TTGGGATGTC	ATAAAGACGT	TACTGCTCTA	240
AAGGGACTTC	TTATGCTGGC	GTTGGATCGG	AATTCGTCAT	TTGTGCGTCT	TCAAGATGCT	300
CATGATGTGT	TTAACATTGT	ATCCAGAAAT	CCTGTTGGAA	ACGAACTGCT	GTTCAATTTT	360
CTCACAGAGC	GATGGGAAGA	GATACTTGAA	AGTTTGTCAA	TACGACACAG	ATCAGTTGAT	420
CGAGTGATCA	AAGCCTGTAC	TCGAGGACTA	CGATCCAGGG	AACAAGTACA	ACAGTTGAAG	480
AATCTATACA	AAAATGACAA	GCGTGCTCGC	GAATACGGTG	CATTTGGTGG	GGCAATAGAA	540
AGATCGGAAC	ACAGAGTCAA	ATGGATTGAG	AAACATTTCC	GAAAAC TAGC	AGCTTTCTTC	600
AAAAAATCTA	ATTCATAATT	CTGAAATGGC	TATAACTAGC	ACACTGGATA	GTTGTCTCGA	660
ATCATCCAAA	AAGATTAATG	ATGTTTTTTT	ACTAGATAAT	ATGGAGATAT	TCTGTAAATT	720
TGTCATCGAT	TCAAGTGTCT	GTATTG				746

Informácie pre reťazec č. 13:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 1274 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 13:

TCTTGAAGAA	ATGAAAAAGC	TTTTCGACGA	AGAGGTCATG	AAAAAATGTA	GACCTGGTCA	60
GCAAGCGACC	GACTGCGTAA	AGGTAAC TGC	TCCTCTCCGA	AAAAC TGT T	ACTGCTATGG	120
GGTCCAGGAA	GGCGGTGATG	AGGCATTCGA	CAAGGTGATG	GAAC TATATA	ATGCGGAACA	180
AGTCCAATTG	GAGAAAGACA	GTCTACGTGA	AGCATTGGGA	TGTCATAAAG	ACGTTACTGC	240
TCTAAAGGGA	CTTCTTATGC	TGGCTTTGGA	TCGGAATTCG	TCATTTGTGC	GTCTTCAAGA	300
TGCTCATGAT	GTGTTTAACA	TTGTATCCAG	AAATCCTGTT	GGAAACGAAC	TGCTGTTCAA	360
TTTCCTCACA	GAGCGATGGG	AAGAGATACT	TGAAAAGTTTG	TCAATACGAC	ACAGATCAGT	420
TGATCGAGTG	ATCAAAGCCT	G TACTCGAGG	ACTACGATCC	AGGGAACAAG	TACAACAGTT	480
GAAGAATCTA	TACAAAAATG	ACAAGCGTGC	TCGCGAATAC	GGTG CATTTG	GTGGGGCAAT	540
AGAAAGATCG	GAACACAGAG	TCAAATGGAT	TGAGAAACAT	TTCCGAAAAC	TAGCAGCTTT	600
CTTCAAAAAA	TCTAATT CAT	AATTCTGAAA	TGGCTATAAC	TAGCACACTG	GATAGTTGTC	660
TCGAATCATC	CAAAAAAGATT	AATGATGTTT	TTTTACTAGA	TAATATGGAG	ATATTCTGTA	720
AATTTGTCAT	CGATTCAAGT	GTCTGTATTG	CAGCCACATT	ACATATCTCG	ATGGTTCTGT	780
GAATTTT TGA	TGGAATTATT	TTCTCCTCAA	AATAGACACT	ATGCGCTAAC	TCCCATTTAT	840
ACCAATCTTT	GAGAGAAATC	TTTTGCAATA	TACCCTAAAT	AGCCCTTGGG	AAC TACGCTTT	900
TTTCATTATT	GTAATTTT TG	TACTCTTCAA	ATGACGTATT	TCCAACATGA	CACATTCTCA	960
GTGATTTACT	CGAGTAATTT	TATTCTTCTC	AATTGCAGTG	CCTTATTGTT	ATTGCTTTTG	1020
AGACTTTGTA	GCTCAACTGT	TTTCTGCCCT	GCTGTCTTCT	TCTCTTTATC	TACTACTTCA	1080
GTGATGAACT	TACCTGAAGT	TGTAGGTTTT	AAGAAAGAAA	TAACTATTTT	CCATAACTCA	1140
TCTTCATGCC	ATTGTTCTTT	GGACTTTCTC	ATGCTTCACA	TTGTAGAGAT	ATTTACTAAA	1200
AATGGAATTC	TAATTTTCGT	TTACTTACAT	AAAAATCACT	TATTGCCTAA	AAAAAAAAAA	1260
AAAAAAAAAA	AAAA					1274

Informácie pre reťazec č. 14:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 3296 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 14:

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTAATTTT	TGCATTATTT	CTAGTAGCTG	CTGCAGTCGG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGGCAA	AGACAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAACACT	180
TCTTCCAACC	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	CGATTTGACG	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGAAC	TTCCCACCGG	AGAAGAATCT	CACATTTCGAT	GGGCGTGTGG	AAATATCAAT	300
GGTTGTAATT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	GCTCAATTCA	AAGAAGATCT	CTGTGATACC	360
CCAAGAATGT	GAAGTGGTAT	CGGGCGATAA	AAAACACGAA	ATTGAAAGTG	TAAAGGAGCA	420
CCCAAGACTG	GAAGAGGTCG	AGTTTCTTCT	TAAGAACCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTCGGCTATA	TCGGCCTCAT	CAGCAACAGT	CTTGGAGGAA	TCTACCAGAC	540
CACTTACACC	ACCCCGAATG	GCACCCCTAA	GATCGCTGCA	GTTTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGAATGGTAC	CATGCATGGA	CGAACCGAAA	TACAAAGCAA	ACTGGACCGT	660
TACTGTCATT	CATCCAAAAG	GCACCAAAGC	CGTCTCGAAT	GGAATCGAAG	TGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATCACATC	GAAGTTCTTG	ACTACTCCAC	GGATGTCATC	780
CTACTTGTTG	GCAGTTATGG	TTTCAGAATT	TGAATACATT	GAAGGTGAAA	CAAGGACGGG	840
TGTCCGGTTC	CGCATATGGT	CACGCCCAGA	GGCCAAGAAG	ATGACAAAAC	TTGCTTTGGA	900
TTATGGTATC	AAATGCATAG	AGTTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAAAT	TCCCTCTGAA	960
AAAAACAAGT	ATGATCGCCC	TTCTGTATTT	CTCAGCAGGA	GCCATGGAGA	ACTGGGGTCT	1020
TATCACTTAC	AGGGAAAAC	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCCCAT	CAGTGGTTTG	GGGACTTGGT	1140
TACAATGAAG	TGGTGGGATA	ATCTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACGGAATT	1200
CATTGGAGCT	GGTCAGATAA	CTAAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TTCTGATTGA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTG	GGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCCTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAAG	TTGAAGAAGC	CTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACTATGTTGA	GAGCCTTGAT	TGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCAGTATC	1440
GCAGTACCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
CGATGAAGTT	GTCAGTGACG	TCGAAGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACGGAATT	1560
TGCAAGTCAG	TGGACGACTC	AGATGGGCTT	CCCAGTTATT	TCCGTAGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTTTG	AAATTAACGC	AAAGTCGATA	TAAGGCGAAT	AAAGACGCTG	TGGAGAAAGA	1680
GAAGTACCGT	CATCCGAAAT	ACGGATTTAA	ATGGGATATT	CCATTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGATAAAGC	GAACATGGCT	GAGAAGAGAT	GAACCGCTTT	ACTTGCATGT	1800
TAGTAATCCT	GGTGCTCCAT	TTGTGGTGAA	CGCAGACCGC	TATGGATTTT	ATCGACAAAA	1860
TCATGACGCT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGACAATC	ATGAGGTTTA	1920
TAGTCCCTCG	ACAAGGAATG	TCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCAGCCG	CAACTGACGC	1980
AATTGAGTAT	GAGACTGTTT	TTGAACTTCT	GAAATATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATACCT	2040
ACCGTTGGAA	ATAGCAATGT	CCGGGATCTC	TTCGATTTTG	AAGTACTTCG	GTACCGAGCC	2100
GGAAGCAAAG	CCAGCTCAAG	TGTACATGAT	GAACATATTG	AAGCCGATGT	ATGAAAAAAG	2160
CAGTATCGAG	TTCAATTACCA	ATAACTACAG	AAACGACACG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAGGAT	GTCGTTGATA	TGTTCTGCGC	CCTTCGATCG	CAAGACTGCA	GGCAGAAATA	2280
TAAAAAATTT	TTCGATGACG	AAGTCATGGC	GAAATGCAGG	GATGGTCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTGAGA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTTTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTTCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TTGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTAGGATG	TCACAAAGAT	GTTACTGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCTTGCGG	GCTCTGGACA	GGAATTTCGT	ATTTCGTACG	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTCATTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCATTG	AAAGTATAGG	AACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAGTGAT	2700
ACCAGCCTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAGCAGATT	GACCAGCTGA	AGAACTCTGA	2760
GAAAAATGGC	ATAAATGCTC	TCCAATTTGG	TGCATTTCGAT	AAAGCAATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGTAG	TTTGAATTAC	GTCGCCATTA	ATCCAGATCT	TAAAGCTCGC	TAAGGAATAT	2940
GTGGGAAGCT	ACTGTGTGTT	GGTTACTGTT	CCACTGAATG	GAAGTTTTTA	CCCACAAAAA	3000
TTTTTACCAT	TTGCCTTCCA	TGAGGGGTCA	TTGTGTGCAC	TTGAATAGTA	AACAAAGCTC	3060
AGTATTAGGA	CCCAGTGATC	AATATTACTT	TTGCTTCTAC	AAATTGTTAC	CTTCTCTATA	3120
CCCTCTTCTT	ACCTGAATTC	AGAAATTTGT	TCATATTTCG	TTGTAGTCTG	TTGCTCAGAA	3180
CACTTTCTCC	TCGATAGCTT	TTTGTTTGTT	TTTCTTTTGA	TTGTATTGAT	CGTTTTACAA	3240
TTGTATAGAT	TAGTTATCTG	ATAAATATTG	ATGCCTAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAA	3296

Informácie pre reťazec č. 15:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 3319 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 15:

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTAATTTT	TGCATTATTT	CTAGTAGCCG	CTGCAGTCGG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
AGGGAAAGAT	GATACTGGTG	GTAAAGACAA	AGATAATTCT	CCCTCTGCCG	CGGAACTACT	180
TCTTCCAACC	AACATAAAAC	CATTGTCTTA	CGATTTGACA	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGAAC	TTCCCACCGG	AGAAGAATCT	CACATTTGAT	GGGCGTGTCT	AAATTTCAAC	300
GGTTGTCATT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	GCTCAATTCA	AAGAAGATCT	CAGTAATACC	360
CCCTGAATGT	GAAGTGGTAT	CGGGCGGTAA	AAAACCTCGAA	ATCGAAAATG	TAAAGGATCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTTG	AGTTTCTTCT	TAAGAACCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTTGCCTACA	TCGGCCTCAT	CAGCAACAGC	CTTGGCGGAA	TCTACCAGAC	540
CACCTTACACA	ACCCCGGATG	GCACCCCCAA	GATCGCTACA	GTGTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGGATGGTGC	CATGCATGGA	TGAACCGAAA	TACAAAGCGA	ATTGGACCGT	660
TACTGTCATT	CATCCAAAAG	GTACAAAAGC	CGTCTCGAAT	GGCATCGAAA	CGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATTACGTC	GAAGTTCTTG	ACTACTCCGA	GGATGTCATC	780
CTACTTGTTG	GCAGTTATGG	TATCAGAATT	TGAATTTATC	GAGGGTAAAA	CAAAGACAGA	840
TGTTCCGTTT	CGTATATGGT	CACGCCCAGA	GGCCAAGAAG	ATGACAAAAC	TTGCTTTGGA	900
TTATGGTATC	AAATGCATAG	AGTTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAGAT	TCCCCTTAAA	960
GAAACAAGAT	ATGATCGCCC	TTCCTGATTT	CTCAGCAGGA	GCCATGGAGA	ACTGGGGTCT	1020
TATCACTTAC	AGGGAAAACC	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCCCAT	CAGTGGTTTG	GCGACTTGGT	1140
TACGATGAAG	TGGTGGGATA	ATCTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACAGAATT	1200
CATTGGAGCT	GGTAAGATAA	CTGAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TCCTGATTGA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTG	CGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCCTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	GTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACGATGCTGA	GAGCGTTGAT	CGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCGGTATC	1440
GCAGTATCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
CGATGAAGTT	GTCACTGATG	TCGAGGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACGGGAATT	1560
CGCAAGCTAG	TGGACAACCT	AGATGGGCTT	TCCAGTAATT	TCTGTGGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTCTG	AAACTAACGC	AAAGTCGATA	TAAGGCGAAT	AAGGACGCTG	TTGAGAAAGA	1680
GAAATACCGT	CATCCGAAAT	ACGGATTCAA	GTGGGATATT	CCATTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGGTAAAGC	GAGCATGGTT	AAGAAGAGGT	GAACCGCTTT	ACTTGTCATG	1800
GAGTGATCCT	GGCGCTCCAT	TTGTGGTGAA	TGCGGACCGC	TATGGATTTT	ACCGACAAAA	1860
CCACGACACT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGATAATC	ATGAGGTTTA	1920
CAGTCCCCGG	ACAAGGAATG	CCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCGGCTG	CAACTGACGC	1980
GATTGAGTAC	GAGACTGTAT	TCGAACTTCT	GAAATATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATACCT	2040
ACCGTTGGAA	ATAGCAATGT	CTGGAATCTC	TTCGATTTTG	AAGTACTTCG	GTACCGAGCC	2100
CGAGGCAAAG	CCAGCTCAAA	CATACATGAT	GAACATATTG	AAGCCGATGT	ATGAGAAAAG	2160
CGATATCGAC	TTCAATTGCCA	AAAACCTACAA	GGACGACAAG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAAGAT	GTCATTGATA	TGTTCTGCGC	CCTTG3ATCG	CAAGACTGCA	GGAAGAAAATA	2280
TAAAAAACTT	TTCGATGACA	AAGTCATGGC	GAAATGCAGG	GATGGCCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTGAAA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTTTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTTTCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TCGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTAGGATG	TCACAAAGAT	GTTACCGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCCTGCGG	GCTCTGGACA	GGAATTCGTC	GTTCTGTACGA	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTTATTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCGTTG	AAAGTATAGG	AACGAAACAC	ACATATGTTG	AAAAAGTGAT	2700
ACCAGCTTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAACAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760
GAAAAATGGC	ATAAACGCTC	GTCAATTTGG	TGCATTTCGAT	AAAGCGATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGTA	TTCGTATTAC	ATCACCATGA	ATCCAGATCT	TAAAACTCAC	TAAGGAATGT	2940
GTGGGAACCT	ACTGTCTGTT	GCTTACTGTT	CCACTGAATG	GAAGTTTTTA	CCCATAAAAA	3000
TTTTTACCAT	TTGCCCTCCG	TGAGGGGTCA	TTGTTGTCAC	TTGAATAGTA	AACAAAGCTC	3060
AGTATTGGAC	CCAGTGATCA	ATATTACTTT	CGCTTCATCG	AATTGTTACC	TTCTCTATAC	3120
CCTCGTCTTA	CCTGAATTCA	CACATTTGTT	CATATTTGTT	TGTAGTCTGT	TGCTCAGAAC	3180
ACTTTCTCTT	CGATAGCTTT	TTGTTTGTTC	TTCTTTTGAT	TGTATTGATC	GTTTTACAAT	3240
TGTATAGATT	AGTTATCTGA	TAAATATTGA	TGCCTAACGA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	3300
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA					3319

Informácie pre reťazec č. 16:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 30 aminokyselín

typ: peptid

Opis reťazca č. 16:

Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	Asn	Ile
1				5				10						15
Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Lys	Ile	Ala	Thr	Tyr	Leu	Pro	Gly
				20				25						30

Informácie pre reťazec č. 17:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 15 aminokyselín

typ: peptid

Opis reťazca č. 17:

Leu	Tyr	Leu	Ala	Glu	Asp	Val	Gln	Leu	Xaa	Lys	Gly	Ile	Leu	Phe
1				5				10						15

Informácie pre reťazec č. 18:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 15 aminokyselín

typ: peptid

Opis reťazca č. 18:

Leu	Ala	Tyr	Asp	Glu	Lys	Ser	Tyr	Ala	Pro	Asp	Asn	Lys	Gln	Tyr
1				5				10						15

Informácie pre reťazec č. 19:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 3084 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 19:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG	AGACGCAGCA	60
ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG	TCTCTCTTTG	CTTTGTAGT	120
GGTAGCTGCT	GCCGTCGGCC	TCTCAATCGG	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAGCTTT	180
TGATACTACT	GGCGGAAATG	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGATGATA	ATTCCTCATC	240
AGCTGAAGAA	TTACGTCTCC	CAACAACCAT	AAAACCTTTG	ACATACGACT	TAGTAATCAA	300
AACGTATCTG	CCAACTATG	TAACTATCC	ACCTGAGAAA	GATTTGCTCA	TTGATGGGAC	360
TGTGGTGATT	GCTATGGAAG	TTGTGGAGCC	AACAAAGTCT	ATTGTGCTCA	ACTCGAAAAA	420
TATTCCTGTA	ATTGCAGACC	AGTGCGAACT	GTTTTCTAAC	AACCAAAAAC	TCGACATCGA	480
AAAGGTTGTG	GATCAGCCAA	GGCTGGAGAA	AGTCGAATTC	GTTTTGAAGA	AAAAGCTGGA	540
GAAGAATCAG	AAAATCAGCG	TCAAGATTGT	ATACATTGGC	CTTATCAACG	ACATGCTTGG	600
AGGACTTTAT	CGAACAACCT	ACACGGATAA	AGATGGTACA	ACCAAGATTG	CTGCATGCAC	660
TCATATGGAA	CCGACGGACG	CCCGTCTTAT	GGTCCCCTGT	TTCGACGAGC	CGACGTTTAA	720
GGCAAACCTG	ACTGTGACTG	TGATTTCATCC	GAAGGGCACC	AGTGCCGTGT	CGAATGGAAT	780
AGAAAAGGGA	GAAGGAGAAG	TCTCTGGCGA	TTGGGTCACA	ACCAGATTCT	ATCCAACCCC	840
GCGAATGCCT	TCGTATTTGA	TTGCTCTTGT	GATTTCCGAA	TTTAAGTACA	TTGAAAATTA	900
TACGAAAAGC	GGTGTTTCGAT	TCCGAATTCC	GGCTCGTCCG	GAAGCTATGA	AGATGACAGA	960
ATATGCCATG	ATAGCTGGAA	TCAAATGTTT	GGATTACTAT	GAGGACTTCT	TCGGGATCAA	1020
ATTCCCCTT	CCAAAACAAG	ATATGGTTGC	TCTTCCTGAC	TTCTCATCTG	GTGCTATGGA	1080
GAAGTGGGGT	CTCATCACAT	ACAGGGAGGG	TTCCGTGCTC	TACGATGAAA	ACCTCTACGG	1140
ACCAATGAAT	AAGGAGCGGG	TTGCAGAAAT	GATCGCGCAC	GAAGTGGCAC	ATCAGTGGTT	1200
CGGTAATTTG	GTCACGATGA	AGTGGTGGGA	TAACCTATGG	CTGAACGAAG	GATTCGCGTC	1260
ATTCGTGGAA	TACATCGGAG	CCGACTTCAT	CAGCGATGGT	CTATGGGAAA	TGAAAGATTT	1320
CTTCCTGCTG	GCACCGTACA	CAAGTGGTAT	TACGGCTGAT	GCAGTAGCTT	CAAGCCATCC	1380
GCTTTCCTTC	AGAATAGATA	AGGCTGCAGA	TGTATCAGAA	GCGTTCGATG	ATATCACATA	1440
CCGTAAAGGA	GCATCCGTTT	TTCAAATGCT	ATTGAATTTA	GTTGGGGACG	AAAATTTCAA	1500
GCAGTCTGTT	TCGCGTTACC	TCAAGAAGTT	TTCATATGAT	AATGCGGCTG	CTGAAGATTT	1560
ATGGGCAGCA	TTGACGAGAA	CCGTCCAAGG	TATAACCGGA	CCTAATGGTG	GACCAATTGAA	1620
AATGTCCGAG	TTTGCGCCAC	AATGGACAAC	TACGATGGGG	TTCCCTGTTT	TTACTGTCTG	1680
GTCCGTTAAC	GCAACGACTT	TGAAAGTCAC	CCAAAAACGA	TACAGGCAGA	ACAAGGATGC	1740
AAAGGAACCA	GAGAAGTACC	GTCATCCAAC	TTATGGGTTT	AAATGGGATG	TTCTCTGTGT	1800
GTATCAGGAA	GATGAACAGC	AAGTGAAGAA	AACTTGGTTA	AAAAGAGAGG	AACCGCTCTA	1860
TTTCCATGTA	AGCAATTCTG	ATTGCTCAGT	TGTGGTGAAT	GCCGAACGTC	GTGCTTTTGT	1920
CCGATCAAAC	TATGACGCTA	ACGGTTGGAG	GAACATTATG	AGAAGACTCA	AGCAGAATCA	1980
TAAGGTCTAT	GGTCCACGAA	CAAGAAACGC	TCTCATAAGT	GATGCGTTTG	CAGCAGCTGC	2040
AGTTGAGGAA	ATGAATTACG	AGACCGTATT	TGAAATGCTC	AAATACACCG	TGAAAGAAGA	2100
GGATTACTTA	CCATGGAAGG	AGGCAATATC	AGGATTCAAT	ACAATTTTGG	ACTTTTTCGG	2160
CAGCGAACCC	GAATCTCAAT	GGGCTTCGGA	ATACATGCGA	AAACTGATGA	AGCCAATTTA	2220
TGACAAGAGT	AGCATCAAGT	TTATAGCGGA	GAAGTACAAA	AAAGATTTCG	TTTTCTTCAA	2280
AAATAATCTC	CAAATAGCTG	TTATTGACAC	ATACTGTGGT	CTTGAGGCA	AAGAATGTCT	2340
TGAAGAAATG	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA	GGTCATGAAA	TGTCAACCTG	GTCAGCAAGC	2400
GACCGACTGC	GTAAAGGTAA	CTGCTCCTCT	CCGAAAAACT	GTTTACTGCT	ATGGGGTCCA	2460
GGAAGGCGGT	GATGAGGCAT	TCGACAAGGT	GATGGAACTA	TATAATGCGG	AACAAGTGCA	2520
GTTGGAGAAA	GACAGTCTAC	GTGAAGCATT	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA	CAGCTCTAAA	2580
GGGACTTCTT	ATGCTGGCTT	TGGATCGGAA	TTGCTCATTT	GTGCGTCTTC	AAGATGCTCA	2640
TGATGTGTTT	AACATTGTAT	CCAGAAATCC	TGTTGGAAAC	GAAGTGTGCT	TCAATTTTCT	2700
CACAGAGCGA	TGGGAAGAGA	TACTTGAAAG	TTTGTCAATA	CGACACAGAT	CAGTTGATCG	2760
AGTGATCAAA	GCCTGTACTC	GAGGACTACG	ATCCAGGGAA	CAAGTACAAC	AGTTGAAGAA	2820
TCTATACAAA	AATGACAAGC	GTGCTCGCGA	ATACGGTGCA	TTTGGTGGGG	CAATAGAAAG	2880
ATCGGAACAC	AGAGTCAAAT	GGATTGAGAA	ACATTTCCGA	AAACTAGCAG	CTTTCTTCAA	2940
AAAATCTAAT	TCATAATTCT	GAAATGGCTA	TAAGTAGCAC	ACTGGATAGT	TGTCTCGAAT	3000
CATCCAAAAA	GATTAATGAT	GTITTTTTC	TAGATAATAT	GGAGATATTC	TGTAAATTTG	3060
TCATCGATTG	AAGTGTCTGT	ATTG				3084

Informácie pre reťazec č. 20:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 3358 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 20:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACGGC	GGAGTGGCAG	AAGCGTCGAA	TCTTGGGCTT	60
CTCACCTATC	AGCCTACTTT	GTACATTATT	TGTATTAGCT	GCTGCCGTTG	GACTCTCCAT	120
TGGTCTTACC	TATTACTTCA	CTCGTAAAGC	ATTCGATACC	ACACAAAAAG	AACAGAAGGA	180
TGACAGTGGT	GGTAAAGAAA	AGGATAATTC	TCCTTCTGCA	GAAGAACTAC	TTCTTCCAAC	240
GAACATAAAA	CCAGTCTCGT	ACGACTTGAA	CATCAAAACA	TATCTACCGG	GTTACGTGAA	300
CTTTCCACCA	GAAAAGAATC	TCACATTTGA	TGCCCCATGTG	GAGATTGCTA	TGGTTGTGGT	360
TGAGCCTACA	AATAGTATTG	TGCTGAACTC	GAAGAAAATC	ACTTTGGCAC	AAGGAGGATG	420
CGAACTGTTT	TCAGGTAATC	AGAAAATTGA	CATCGAAAAGT	GTAAAGATGC	AGGAAAGACT	480
TGACAAGCTT	GAGATTACCC	TCAAAAATCA	GCTGCAAAAA	GATCTGAAAA	TCCTGCTCAA	540
GATCACTTAC	ACCGGCCTTA	TTAGCGACAC	TCTCGGTGGG	CTCTACCAGT	CCATCTACAC	600
TGATAAGGAC	GGAAAACTA	AGATCGTTGC	TGTTTCACAA	AATGAACCAT	CAGACGCTCG	660
TCGTATAGCG	CCATGCTTTG	ACGAACCGAA	GTACAAGGCA	ACATGGACTG	TCACCGTCGT	720
TCATCCCAAA	GGTACAAAGG	CTGCATCGAA	CGGCATTGAA	GCAAATGGAA	AAGGGGAGCT	780
CAAGGGTGAT	TGGATAACGT	CTAAATTTAA	AACTACCCCA	CCGATGTCGT	CCTATTTATT	840
GGCTATTATT	GTTTGTGAAT	TTGAATACAT	TGAAGGATTT	ACAAAAACGG	GTGTTCCGTT	900
CCGTATATGG	TCTCGACCAG	AGGCGAAACG	AATGACGGCA	TACGCTTTGG	ATGCTGGCAT	960
CAGATGCCTG	GAGTTCTATG	AGAAGTTCTT	TGACATAAAA	TTCCCTCTGG	AAAAACAAGA	1020
TATGATTGCT	CTTCTGTATT	TCACCGCTGG	TGCCATGGAA	AACTGGGGCC	TTATCACTTA	1080
TAGAGAGGAT	TCTCTCCTAT	ACGATGAAAA	AATTTATGCA	CCGATGAATA	AACAGCGGGT	1140
TGCTCTCGTA	GTTGCTCAGG	AGCTTGCTCA	TCAGTGGTTC	GGCAATCTGG	TCACACTGAA	1200
GTGGTGGGAT	GATACGTGGT	TGAACGAAGG	TTTGTGCAACA	TTTGTGAGT	ATCTTGAAT	1260
GGACGAAATT	AGCCACAACA	ATTTCAGAAC	GCAAGATTTC	TTCTTGCTCG	ATGGAATGGA	1320
TCGCGGAATG	AGAGCTGACT	CGGCAGCATC	GAGCCATCCG	CTTTCGTTTA	GGATTGACAA	1380
AGCGGCAGAA	GTTGCCGAAG	CCTTTGACGA	TATTTCAATC	GCCAAGGGAG	CGTCAGTTCT	1440
CACTATGCTA	CGGGCTTTGA	TTGGAGAGGA	CAATTACAGG	AATGCTGTTG	TGCAATACCT	1500
CAAGAAGTTC	TCCTACAGCA	ATGCACAAGC	AGCCGATCTG	TGGAACGTCT	TCAATGAAGT	1560
TGTCAAAGGT	GTTAAGGGTC	CTGACGGCAA	CGTCATGAAA	ATCGACCAAT	TTACCGATCA	1620
GTGGACGTAT	CAGATGGGTT	ATCCTGTGGT	TAAAGTAGAA	GAATTTAATG	CGACCGCCT	1680
AAAGGTTACG	CAGAGCCGGT	ACAAGACAAA	TAAAGACGCC	TTGGAACCAG	AGAAATATCG	1740
TAATCCAAAA	TACGGGTTCA	AGTGGGATGT	TCCCTATGG	TATCAGGAAG	GCAATAGCAA	1800
AGAGGTGAAG	CGAACATGGC	TAAAAAGAGA	TGAACCGCTG	TACTTGAACG	TCAACAATCG	1860
GGATACATCC	CTTGTGGTGA	ACGCTGATCG	ACATGGATTT	TATCGACAAA	ACTATGATGC	1920
CAACGGTTGG	AAAAAGATAA	TCAAGCAGCT	CAAGAAAGAT	CACAAGGTCT	TCGGTCCAAG	1980
GACAAGGAAC	GCTATCATAA	GCGATGCATT	TGCTGCAGCT	ACGATTGACG	CAATCGACTA	2040
TGAAACTGTA	TTCGAACTAC	TTGAATATGC	CAAAAATGAA	GAGGAATTCT	TGCTTGGGAA	2100
GGAAGCTCTG	TCCGCGATGT	TCGCGATTTT	AAAGTTCTTC	GGTAATGAGC	CGGAGACAAA	2160
ACCAGCTAGA	GCTTACATGA	TGAGCATATT	AGAACCGATG	TATAATAAGA	GCAGCATTGA	2220
TTACATCGTC	AAGAATTATT	TGGATGATAC	GTTATTACAC	AAAAATTAATA	CTCAAAAGGA	2280
TATCATTGAT	GCATATTGTT	CCCTTGGATC	AAAGGACTGT	ATAAAGCAAT	ATAAGGATAT	2340
CTTCTACCAT	GAGGTTATGC	CCAAGTGTAA	GGCCGGGGAA	GCAGCAACCA	AATGCGTTAA	2400
GGTTTCCGCT	CCTCTTCGAG	CCAATGTTTA	CTGTTATGGT	GTACAGGAAG	GTGGTGAAGA	2460
AGCTTTTGAA	AAGGTGATGG	GGCTGTATCT	AGCAGAAGAT	GTTCAACTGG	AGAAGGGTAT	2520
CCTGTTCAAA	GCCTTGCCAT	GCCACAAAGA	TGTTACAGCT	CTAAAAAGAAC	TTCTTTTGCG	2580
AGCCCTGGAC	CGTAAATCGT	CGTTTGTGCG	TCTTCAGGAT	GTCCCTACCG	CTTTCGTGTC	2640
TGATCTGAA	AACCCGTGCG	GCGAAGAAAT	CATGTTCAAT	TTCTTAATG	AGAGATGGGA	2700
GGAAATCACT	GCGAGCTTGG	AAACAGAACA	CAGAGCAGTT	GATAAAGTGG	TCCGCGCTTG	2760
TTGCACAGGA	ATTCTGCTCC	AACAACAAAT	AGATCAGCTG	AAGAATCTAC	AGAAGAACAA	2820
TGCGCAGGCT	AAGAAGTTCC	GCTCATTAC	CCAGGAAATC	GAAAAAGGAG	AACATAAAAT	2880
TGCTTGATC	AAGAAACATT	TTACACAGATT	ATCGGAATTC	TTCAAGAGAG	CAAGATCATA	2940
GCTTTTCACA	CTGAGCTCCA	ATTTTAACGT	CTTCAAACTA	GGAGACAGTT	TTGCTGAAAA	3000
GTCAGTTTCA	CATTTTCCGT	TTGAATGCCA	TCCATTGCAA	TACAACCAAT	AATACCATTT	3060
TAAGTACCTT	TCATTACACG	TGATTACTGA	ATTTGCAATA	TATCATGAAG	CTTGATCTTT	3120
GAACGTTATG	ATCGGTGACT	TTCAATTTAT	AGAGCTCACT	CTCCATTTTG	TAGCTGTGAT	3180
GACTTGCAAT	TACAGCCAC	CATTTACCAG	CCTAGAATCT	TTCCCAATA	CATTCCAAAC	3240
TCCGATCAC	TACACCGCTG	ACAATGCCCA	GA'TTCTTTT	TTTGTCTGCT	ATCCATCTAA	3300
CTGTTTCGAT	CGCCGGTTCT	TTGTCAAATG	CTTATCTGAT	AAATATTGAC	CTTCGTGT	3358

Informácie pre reťazec č. 21:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 3369 párov báz

typ: nukleová kyselina

typ reťazca: dvojité

topológia: lineárna

Opis reťazca č. 21:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA	TCTAGATGAC	GTCGCAGGGG	AGAACGCGGA	60
CATTGCTGAA	TCTAACTCCA	ATCCGTCTTA	TTGTCCGATT	ATTTCTAGTA	GCTGCTGCAG	120
TCGGCCTCTC	TATTGGTCTC	ACCTATTACT	TTACTCGCAA	AGCGTTCGAT	ACCTCAGAAA	180
AGCCAGGGAA	GGATGATACT	GGTGGCAAGG	ACAAAGACAA	TTCTCCCTCT	GCGGCGGAAC	240
TACTCCTTCC	AAGTAATATA	AAACCATTGT	CTTACGACTT	GACGATCAAA	ACATATCTAC	300
CTGGTTATGT	GGACTTCCCA	CCGGAGAAAA	ACCTCACATT	CGATGGGCGT	GTGGAAATAT	360
CAATGGTTGT	AATTGAGCCA	ACAAAGAGTA	TCGTACTCAA	TTCAAAGAAG	ATCTCTGTAA	420
TACCCCAAGA	ATGTGAACTG	GTATCGGGCG	ATAAAAAACT	CGAAATTGAA	AGTGTAAGG	480
AGCACCCAAG	ACTGGAAAAG	GTTGAGTTTC	TTATCAAAAAG	CCAACTGGAA	AAAGATCAAC	540
AAATCTTGCT	CAAGGTCGGC	TACATCGGTC	TCATCAGCAA	CAGCTTTGGT	GGAATCTACC	600
AGACCACTTA	TACCACCCCG	GATGGCACCC	CTAAGATCGC	TGCAGTTTCA	CAAAATGAGC	660
CCATAGATGC	TCGTGCAATG	GTACCATGCA	TGGATGAACC	GAAATACAAA	GCAAACTGGA	720
CCGTTACTGT	CATTCAATCA	AAAGGCACCA	AAGCCGTCTC	GAATGGAATC	GAAGTGAACG	780
GAGATGGAGA	GATCAGTGGT	GATTGGATCA	CATCGAAGTT	CTTGACTACT	CCACGGATGT	840
CATCCTACTT	GTTGGCAGTT	ATGGTTTCAG	AATTTGAATA	CATCGAAGGT	GAAACAAAGA	900
CGGGTGTTCC	GTTCCGTATA	TGGTCACGCC	CAGAGGCAAA	GAAGATGACA	CAATATGCTC	960
TGCAATCTGG	TATCAAGTGC	ATAGAATTCT	ACGAAGATTT	CTTGATATC	AGATTCCCTC	1020
TGAAGAAACA	AGATATGATT	GCCCTTCCTG	ATTTCTCTGC	CGGTGCCATG	GAGAATTGGG	1080
GCCTCATCAC	TTACAGGGAA	AACCTCTTGT	TGTACGATGA	CAGATTCTAT	GCACCGATGA	1140
ATAAACAGCG	AATTGCTCGC	ATTGTTGCTC	ATGAGCTTGC	TCATCAGTGG	TTCCGGCGACT	1200
TGGTTACGAT	GAAGTGGTGG	GATAATTTGT	GGTTGAATGA	AGGTTTTGCA	AGATTTCACAG	1260
AAATTTATTGG	AGCTGGTCAG	ATAACTCAAG	ATGACGCCAG	AATGAGGAAC	TACTTCCTGA	1320
TTGATGTACT	TGAACGCGCT	TTGAAAGCTG	ATTCCGGTAGC	GTCAAGCCAT	CCACTTTCCT	1380
TCAGAATCGA	CAAAGCTGCA	GAAGTTGAAG	AAGCCTTTGA	TGATATCACA	TACGCCAAAG	1440
GAGCTTCTGT	TCTTACTATG	CTGAGAGCCT	TGATTGGAGA	AGAAAAACAT	AAGCATGCAG	1500
TATCGCAGTA	CCTCAAGAAG	TTCTCGTATA	GCAATGCAGA	AGCGACTGAT	CTATGGGCAG	1560
TTTTTGATAG	AGTTGTCACT	GACGTCSAAG	GTCCAGACGG	CAAACCTATG	AAAACCACAG	1620
AGTTTGCAAG	TCAGTGGACG	ACTCAGATGG	GCTTCCAGT	TATTTCCGTA	GCAGAGTTTA	1680
ACTCGACTAC	TTTGAAATTA	ACGCAAAGTC	GATATGAGGC	GAATAAAGAC	GCTGTGGAGA	1740
AAGAGAAGTA	CCGTCAACCG	AAATACGGAT	TTAAATGGGA	TATTTCCACTG	TGGTATCAGG	1800
AAGGCGATAA	GAAGGAGATA	AAGCGAACAT	GGTTGAGAAG	AGATGAACCG	CTTTACTTGC	1860
ATGTTAGTGA	TGCTGGCGCT	CCCTTTGTGG	TGAACGCAGA	CCGCTATGGA	TTTTATCGAC	1920
AAAATCATGA	CGCTAATGGT	TGGAAAAAGA	TAATCAAGCA	GCTCAAGGAT	AATCATGAGG	1980
TTTACAGTCC	CCGGACAAGG	AATGTCATCA	TTAGCGATGC	GTTTGCTGCG	GCTGCCAECTG	2040
ACGCAATTGA	GTATGAGACT	GTATTTGAAC	TTCTGAATTA	TGCCGAAAAA	GAAACGGAAT	2100
ATCTACCATT	AGAAATCGCA	ATGTCCGGGA	TCTCTTCGAT	TTTGAAATAC	TTCCCTACCG	2160
AGCCAGAGGC	AAAGCCAGCT	CAAACATACA	TGATGAACAT	ATTGAAACCG	ATGTATGAAA	2220
AAAGCAGTAT	CGACTTCATT	GCCAATAACT	ACAGAAATGA	CAAGCTGTTT	TTCCAAATCA	2280
ACCTCCAAAA	AGATGTCATT	GATATGTTCT	GCGCCCTCGG	ATCGCAAGAC	TGCAGGAAGA	2340
AATATAAAAA	ACTTTTCGAT	GACGAAGTCA	TGAACAAATG	CAGGGATGGT	CAAGCAGCAA	2400
CCGAATGCGT	AAGAATCGCC	GCTCCTCTCC	GATCAAGTGT	TTATTGTTAT	GGTGTGAAGG	2460
AAGGCGGTGA	TTATGCTTCC	GACAAGGTGA	TGGAGCTTTA	TACGGCCGAA	ACACTCGCCC	2520
TAGAAAAAGA	CTTCCTACGC	CTAGCATTGG	GATGTCATAA	AGATGTTACT	GCTTTGAAAG	2580
GACTTCTCTT	GCGGGCTCTG	GACAGGAATT	CGTCGTTCTG	ACGTATGCAG	GATATCCCAA	2640
GTGCTTTCAA	CGATGTAGCA	GCAAATCETA	TTGGCGAAGA	ATTCAATTTT	AATTTCTTTA	2700
TTGAGAGATG	CCGAGATATC	ATTGAAAGTA	TAGGAACGAA	GCACACATAT	GTTGAGAAAG	2760
TGATACCAGC	CTGCACTTCA	GGAATCCGCT	CACAACAGCA	GATTGACCAG	CTGAAGAATC	2820
TGCAGAAAAA	TGGCATGAAC	GCTCGTCAAT	TCGGTGCATT	CGATAAAGCA	ATCGAACGAG	2880
CACAAAATAG	GGTGGATTGG	ATTAAAAAAC	ATTTCCAAAA	ATTAGCGGCT	TTCTTCAAGA	2940
AAGCCACCTT	GTAATTGCGA	TTACATTGCC	AGTAATCCAG	ATCTTAAAGT	TCATGAAGGA	3000
ATATGACAGG	GAACGACTG	TCTGTTGGTC	ACTGTTCCAC	TGAATGGAAG	TTTTTACCTA	3060
CAAAAATTTT	TATCGTTATA	TTTGCCCTTC	GTGAGGGGTC	ATTGTTGTCA	CTTGAATAGT	3120
AAACAAAGCT	CAGTATTGGC	AACCGTAGAA	CAATATTACT	TTCGCTTCAT	CAAAATTGTTA	3180
TCTTCCCTAT	ACCCTCTTCC	TAAGTGAATT	CGGAAATTTG	TTCATATTCC	TTTGTAAGTC	3240
GTTGCTCAGA	ACACTTTCTC	CTCAATAGCT	TCTTGTTTGT	TTTTTTTTTG	ATTGTATTGA	3300
TCGTTTTACA	ATTGTATAGA	TTAGTTATCT	TATAAATATT	GATGGTTAAA	AAAAAAAAAA	3360
AAAAAAAAAA						3369

Informácie pre reťazec č. 22:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 977 aminokyselín

typ: peptid

Opis reťazca č. 22:

Met	Thr	Ala	Glu	Glu	Ser	Gln	Glu	Gln	Glu	Thr	Gln	Gln	Pro	Arg	
1				5					10					15	
Lys	Asn	Thr	Val	Leu	Arg	Leu	Thr	Pro	Ile	Lys	Ser	Leu	Phe	Ala	
				20					25					30	
Leu	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Thr	
				35					40					45	
Tyr	Tyr	Phe	Thr	Arg	Lys	Ala	Phe	Asp	Thr	Thr	Gly	Gly	Asn	Gly	
				50					55					60	
Lys	Gly	Asp	Gln	Pro	Ile	Val	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Glu	
				65					70					75	
Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Thr	Thr	Ile	Lys	Pro	Leu	Thr	Tyr	Asp	Leu	
				80					85					90	
Val	Ile	Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Asn	Tyr	Val	Asn	Tyr	Pro	Pro	Glu	
				95					100					105	
Lys	Asp	Phe	Ala	Ile	Asp	Gly	Thr	Val	Val	Ile	Ala	Met	Glu	Val	
				110					115					120	
Val	Glu	Pro	Thr	Lys	Ser	Ile	Val	Leu	Asn	Ser	Lys	Asn	Ile	Pro	
				125					130					135	
Val	Ile	Ala	Asp	Gln	Cys	Glu	Leu	Phe	Ser	Asn	Asn	Gln	Lys	Leu	
				140					145					150	
Asp	Ile	Glu	Lys	Val	Val	Asp	Gln	Pro	Arg	Leu	Glu	Lys	Val	Glu	
				155					160					165	
Phe	Val	Leu	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Lys	Asn	Gln	Lys	Ile	Thr	Leu	
				170					175					180	
Lys	Ile	Val	Tyr	Ile	Gly	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	
				185					190					195	
Tyr	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	Asp	Lys	Asp	Gly	Thr	Thr	Lys	Ile	Ala	
				200					205					210	
Ala	Cys	Thr	His	Met	Glu	Pro	Thr	Asp	Ala	Arg	Leu	Met	Val	Pro	
				215					220					225	
Cys	Phe	Asp	Glu	Pro	Thr	Phe	Lys	Ala	Asn	Trp	Thr	Val	Thr	Val	
				230					235					240	
Ile	His	Pro	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Val	Ser	Asn	Gly	Ile	Glu	Lys	
				245					250					255	
Gly	Glu	Gly	Glu	Val	Ser	Gly	Asp	Trp	Val	Thr	Thr	Arg	Phe	Asp	
				260					265					270	
Pro	Thr	Pro	Arg	Met	Pro	Ser	Tyr	Leu	Ile	Ala	Leu	Val	Ile	Ser	
				275					280					285	
Glu	Phe	Lys	Tyr	Ile	Glu	Asn	Tyr	Thr	Lys	Ser	Gly	Val	Arg	Phe	
				290					295					300	
Arg	Ile	Pro	Ala	Arg	Pro	Glu	Ala	Met	Lys	Met	Thr	Glu	Tyr	Ala	
				305					310					315	
Met	Ile	Ala	Gly	Ile	Lys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Phe	Phe	
				320					325					330	
Gly	Ile	Lys	Phe	Pro	Leu	Pro	Lys	Gln	Asp	Met	Val	Ala	Leu	Pro	
				335					340					345	
Asp	Phe	Ser	Ser	Gly	Ala	Met	Glu	Asn	Trp	Gly	Leu	Ile	Thr	Tyr	
				350					355					360	
Arg	Glu	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Gly	Pro	Met	
				365					370					375	
Asn	Lys	Glu	Arg	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Ala	His	Glu	Leu	Ala	His	
				380					385					390	
Gln	Trp	Phe	Gly	Asn	Leu	Val	Thr	Met	Lys	Trp	Trp	Asp	Asn	Leu	
				395					400					405	
Trp	Leu	Asn	Glu	Gly	Phe	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Tyr	Ile	Gly	Ala	
				410					415					420	
Asp	Phe	Ile	Ser	Asp	Gly	Leu	Trp	Glu	Met	Lys	Asp	Phe	Phe	Leu	
				425					430					435	

Leu Ala Pro Tyr Thr Ser Gly Ile Thr	Ala Asp Ala Val Ala Ser	440	445	450
Ser His Pro Leu Ser Phe Arg Ile Asp	Lys Ala Ala Asp Val Ser	455	460	465
Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr Tyr Arg	Lys Gly Ala Ser Val Leu	470	475	480
Gln Met Leu Leu Asn Leu Val Gly Asp	Glu Asn Phe Lys Gln Ser	485	490	495
Val Ser Arg Tyr Leu Lys Lys Phe Ser	Tyr Asp Asn Ala Ala Ala	500	505	510
Glu Asp Leu Trp Ala Ala Phe Asp Glu	Thr Val Gln Gly Ile Thr	515	520	525
Gly Pro Asn Gly Gly Pro Leu Lys Met	Ser Glu Phe Ala Pro Gln	530	535	540
Trp Thr Thr Gln Met Gly Phe Pro Val	Leu Thr Val Glu Ser Val	545	550	555
Asn Ala Thr Thr Leu Lys Val Thr Gln	Lys Arg Tyr Arg Gln Asn	560	565	570
Lys Asp Ala Lys Glu Pro Glu Lys Tyr	Arg His Pro Thr Tyr Gly	575	580	585
Phe Lys Trp Asp Val Pro Leu Trp Tyr	Gln Glu Asp Glu Gln Gln	590	595	600
Val Lys Arg Thr Trp Leu Lys Arg Glu	Glu Pro Leu Tyr Phe His	605	610	615
Val Ser Asn Ser Asp Ser Ser Val Val	Val Asn Ala Glu Arg Arg	620	625	630
Ala Phe Cys Arg Ser Asn Tyr Asp Ala	Asn Gly Trp Arg Asn Ile	635	640	645
Met Arg Arg Leu Lys Gln Asn His Lys	Val Tyr Gly Pro Arg Thr	650	655	660
Arg Asn Ala Leu Ile Ser Asp Ala Phe	Ala Ala Ala Ala Val Glu	665	670	675
Glu Met Asn Tyr Glu Thr Val Phe Glu	Met Leu Lys Tyr Thr Val	680	685	690
Lys Glu Glu Asp Tyr Leu Pro Trp Lys	Glu Ala Ile Ser Gly Phe	695	700	705
Asn Thr Ile Leu Asp Phe Phe Gly Ser	Glu Pro Glu Ser Gln Trp	710	715	720
Ala Ser Glu Tyr Met Arg Lys Leu Met	Lys Pro Ile Tyr Asp Lys	725	730	735
Ser Ser Ile Lys Phe Ile Ala Glu Asn	Tyr Lys Lys Asp Ser Leu	740	745	750
Phe Phe Lys Asn Asn Leu Gln Ile Ala	Val Ile Asp Thr Tyr Cys	755	760	765
Gly Leu Gly Gly Lys Glu Cys Leu Glu	Glu Met Lys Lys Leu Phe	770	775	780
Asp Lys Glu Val Met Lys Cys Gln Pro	Gly Gln Gln Ala Thr Asp	785	790	795
Cys Val Lys Val Thr Ala Pro Leu Arg	Lys Thr Val Tyr Cys Tyr	800	805	810
Gly Val Gln Glu Gly Gly Asp Glu Ala	Phe Asp Lys Val Met Glu	815	820	825
Leu Tyr Asn Ala Glu Gln Val Gln Leu	Glu Lys Asp Ser Leu Arg	830	835	840
Glu Ala Leu Gly Cys His Lys Asp Val	Thr Ala Leu Lys Gly Leu	845	850	855
Leu Met Leu Ala Leu Asp Arg Asn Ser	Ser Phe Val Arg Leu Gln	860	865	870
Asp Ala His Asp Val Phe Asn Ile Val	Ser Arg Asn Pro Val Gly	875	880	885
Asn Glu Leu Leu Phe Asn Phe Leu Thr	Glu Arg Trp Glu Glu Ile	890	895	900
Leu Glu Ser Leu Ser Ile Arg His Arg	Ser Val Asp Arg Val Ile	905	910	915
Lys Ala Cys Thr Arg Gly Leu Arg Ser	Arg Glu Gln Val Gln Gln	920	925	930
Leu Lys Asn Leu Tyr Lys Asn Asp Lys	Arg Ala Arg Glu Tyr Gly			

	935		940		945
Ala Phe Gly Gly	Ala Ile Glu Arg Ser	Glu His Arg Val Lys	Trp		
	950		955		960
Ile Glu Lys His	Phe Arg Lys Leu Ala	Ala Phe Phe Lys Lys	Ser		
	965		970		975
Asn Ser					

Informácie pre reťazec č. 23:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 972 aminokyselín

typ: peptid

Opis reťazca č. 23:

Met	Thr	Ala	Glu	Trp	Gln	Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro
1				5					10					15
Ile	Ser	Leu	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Gly
				20					25					30
Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Arg	Lys	Ala	Phe	Asp
				35					40					45
Thr	Thr	Gln	Lys	Glu	Gln	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gly	Lys	Glu	Lys
				50					55					60
Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	Asn	Ile
				65					70					75
Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Asn	Ile	Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Gly
				80					85					90
Tyr	Val	Asn	Phe	Pro	Pro	Glu	Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Asp	Ala	His
				95					100					105
Val	Glu	Ile	Ala	Met	Val	Val	Val	Glu	Pro	Thr	Asn	Ser	Ile	Val
				110					115					120
Leu	Asn	Ser	Lys	Lys	Ile	Thr	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu
				125					130					135
Phe	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	Ile	Glu	Ser	Val	Lys	Met	Gln
				140					145					150
Glu	Arg	Leu	Asp	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Gln	Leu	Gln
				155					160					165
Lys	Asp	Leu	Lys	Ile	Leu	Leu	Lys	Ile	Thr	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile
				170					175					180
Ser	Asp	Thr	Leu	Gly	Gly	Leu	Tyr	Gln	Ser	Ile	Tyr	Thr	Asp	Lys
				185					190					195
Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Asn	Glu	Pro	Ser
				200					205					210
Asp	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	Pro	Cys	Phe	Asp	Glu	Pro	Lys	Tyr	Lys
				215					220					225
Ala	Thr	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Val	His	Pro	Lys	Gly	Thr	Lys	Ala
				230					235					240
Ala	Ser	Asn	Gly	Ile	Glu	Ala	Asn	Gly	Lys	Gly	Glu	Leu	Lys	Gly
				245					250					255
Asp	Trp	Ile	Thr	Ser	Lys	Phe	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Ser	Ser
				260					265					270
Tyr	Leu	Leu	Ala	Ile	Ile	Val	Cys	Glu	Phe	Glu	Tyr	Ile	Glu	Gly
				275					280					285
Phe	Thr	Lys	Thr	Gly	Val	Arg	Phe	Arg	Ile	Trp	Ser	Arg	Pro	Glu
				290					295					300
Ala	Lys	Arg	Met	Thr	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Ile	Arg	Cys
				305					310					315
Leu	Glu	Phe	Tyr	Glu	Lys	Phe	Phe	Asp	Ile	Lys	Phe	Pro	Leu	Glu
				320					325					330
Lys	Gln	Asp	Met	Ile	Ala	Leu	Pro	Asp	Phe	Thr	Ala	Gly	Ala	Met
				335					340					345
Glu	Asn	Trp	Gly	Leu	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Asp	Ser	Leu	Leu	Tyr
				350					355					360
Asp	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ala	Pro	Met	Asn	Lys	Gln	Arg	Val	Ala	Leu
				365					370					375

Val Val Ala His	Glu Leu Ala His Gln	Trp Phe Gly Asn Leu	Val
	380	385	390
Thr Leu Lys Trp	Trp Asp Asp Thr Trp	Leu Asn Glu Gly Phe	Ala
	395	400	405
Thr Phe Val Glu	Tyr Leu Gly Met Asp	Glu Ile Ser His Asn	Asn
	410	415	420
Phe Arg Thr Gln	Asp Phe Phe Leu Leu	Asp Gly Met Asp Arg	Gly
	425	430	435
Met Arg Ala Asp	Ser Ala Ala Ser Ser	His Pro Leu Ser Phe	Arg
	440	445	450
Ile Asp Lys Ala	Ala Glu Val Ala Glu	Ala Phe Asp Asp Ile	Ser
	455	460	465
Tyr Ala Lys Gly	Ala Ser Val Leu Thr	Met Leu Arg Ala Leu	Ile
	470	475	480
Gly Glu Asp Asn	Tyr Arg Asn Ala Val	Val Gln Tyr Leu Lys	Lys
	485	490	495
Phe Ser Tyr Ser	Asn Ala Gln Ala Ala	Asp Leu Trp Asn Val	Phe
	500	505	510
Asn Glu Val Val	Lys Gly Val Lys Gly	Pro Asp Gly Asn Val	Met
	515	520	525
Lys Ile Asp Gln	Phe Thr Asp Gln Trp	Thr Tyr Gln Met Gly	Tyr
	530	535	540
Pro Val Val Lys	Val Glu Glu Phe Asn	Ala Thr Ala Leu Lys	Val
	545	550	555
Thr Gln Ser Arg	Tyr Lys Thr Asn Lys	Asp Ala Leu Glu Pro	Glu
	560	565	570
Lys Tyr Arg Asn	Pro Lys Tyr Gly Phe	Lys Trp Asp Val Pro	Leu
	575	580	585
Trp Tyr Gln Glu	Gly Asn Ser Lys Glu	Val Lys Arg Thr Trp	Leu
	590	595	600
Lys Arg Asp Glu	Pro Leu Tyr Leu Asn	Val Asn Asn Arg Asp	Thr
	605	610	615
Ser Leu Val Val	Asn Ala Asp Arg His	Gly Phe Tyr Arg Gln	Asn
	620	625	630
Tyr Asp Ala Asn	Gly Trp Lys Lys Ile	Ile Lys Gln Leu Lys	Lys
	635	640	645
Asp His Lys Val	Phe Gly Pro Arg Thr	Arg Asn Ala Ile Ile	Ser
	650	655	660
Asp Ala Phe Ala	Ala Ala Thr Ile Asp	Ala Ile Asp Tyr Glu	Thr
	665	670	675
Val Phe Glu Leu	Leu Glu Tyr Ala Lys	Asn Glu Glu Glu Phe	Leu
	680	685	690
Pro Trp Lys Glu	Ala Leu Ser Gly Met	Phe Ala Val Leu Lys	Phe
	695	700	705
Phe Gly Asn Glu	Pro Glu Thr Lys Pro	Ala Arg Ala Tyr Met	Met
	710	715	720
Ser Ile Leu Glu	Pro Met Tyr Asn Lys	Ser Ser Ile Asp Tyr	Ile
	725	730	735
Val Lys Asn Tyr	Leu Asp Asp Thr Leu	Phe Thr Lys Ile Asn	Thr
	740	745	750
Gln Lys Asp Ile	Ile Asp Ala Tyr Cys	Ser Leu Gly Ser Lys	Asp
	755	760	765
Cys Ile Lys Gln	Tyr Lys Asp Ile Phe	Tyr Asp Glu Val Met	Pro
	770	775	780
Lys Cys Lys Ala	Gly Glu Ala Ala Thr	Lys Cys Val Lys Val	Ser
	785	790	795
Ala Pro Leu Arg	Ala Asn Val Tyr Cys	Tyr Gly Val Gln Glu	Gly
	800	805	810
Gly Glu Glu Ala	Phe Glu Lys Val Met	Gly Leu Tyr Leu Ala	Glu
	815	820	825
Asp Val Gln Leu	Glu Lys Gly Ile Leu	Phe Lys Ala Leu Ala	Cys
	830	835	840
His Lys Asp Val	Thr Ala Leu Lys Glu	Leu Leu Leu Arg Ala	Leu
	845	850	855
Asp Arg Lys Ser	Ser Phe Val Arg Leu	Gln Asp Val Pro Thr	Ala
	860	865	870
Phe Arg Ala Val	Ser Glu Asn Pro Val	Glv Glu Glu Phe Met	Phe

	875		880		885
Asn Phe Leu Met	Glu Arg Trp Glu Glu	Ile Thr Ala Ser Leu	Glu		
	890		895		900
Thr Glu His Arg	Ala Val Asp Lys Val	Val Gly Ala Cys Cys	Thr		
	905		910		915
Gly Ile Arg Ser	Gln Gln Gln Ile Asp	Gln Leu Lys Asn Leu	Gln		
	920		925		930
Lys Asn Asn Ala	Gln Ala Lys Lys Phe	Gly Ser Phe Thr Gln	Glu		
	935		940		945
Ile Glu Lys Gly	Glu His Lys Ile Ala	Trp Ile Lys Lys His	Phe		
	950		955		960
His Arg Leu Ser	Glu Phe Phe Lys Arg	Ala Arg Ser			
	965		970		

Informácie pre reťazec č. 24:

Vlastnosti reťazca:

dĺžka: 972 aminokyselín

typ: peptid

Opis reťazca č. 24:

Met	Thr	Ser	Gln	Gly	Arg	Thr	Arg	Thr	Leu	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro
1				5					10					15
Ile	Arg	Leu	Ile	Val	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Gly
				20					25					30
Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Arg	Lys	Ala	Phe	Asp
				35					40					45
Thr	Ser	Glu	Lys	Pro	Gly	Lys	Asp	Asp	Thr	Gly	Gly	Lys	Asp	Lys
				50					55					60
Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Ala	Glu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Asn	Ile
				65					70					75
Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Ile	Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Gly
				80					85					90
Tyr	Val	Asp	Phe	Pro	Pro	Glu	Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Arg
				95					100					105
Val	Glu	Ile	Ser	Met	Val	Val	Ile	Glu	Pro	Thr	Lys	Ser	Ile	Val
				110					115					120
Leu	Asn	Ser	Lys	Lys	Ile	Ser	Val	Ile	Pro	Gln	Glu	Cys	Glu	Leu
				125					130					135
Val	Ser	Gly	Asp	Lys	Lys	Leu	Glu	Ile	Glu	Ser	Val	Lys	Glu	His
				140					145					150
Pro	Arg	Leu	Glu	Lys	Val	Glu	Phe	Leu	Ile	Lys	Ser	Gln	Leu	Glu
				155					160					165
Lys	Asp	Gln	Gln	Ile	Leu	Leu	Lys	Val	Gly	Tyr	Ile	Gly	Leu	Ile
				170					175					180
Ser	Asn	Ser	Phe	Gly	Gly	Ile	Tyr	Gln	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Pro
				185					190					195
Asp	Gly	Thr	Pro	Lys	Ile	Ala	Ala	Val	Ser	Gln	Asn	Glu	Pro	Ile
				200					205					210
Asp	Ala	Arg	Arg	Met	Val	Pro	Cys	Met	Asp	Glu	Pro	Lys	Tyr	Lys
				215					220					225
Ala	Asn	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Ile	His	Pro	Lys	Gly	Thr	Lys	Ala
				230					235					240
Val	Ser	Asn	Gly	Ile	Glu	Val	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Ile	Ser	Gly
				245					250					255
Asp	Trp	Ile	Thr	Ser	Lys	Phe	Leu	Thr	Thr	Pro	Arg	Met	Ser	Ser
				260					265					270
Tyr	Leu	Leu	Ala	Val	Met	Val	Ser	Glu	Phe	Glu	Tyr	Ile	Glu	Gly
				275					280					285
Glu	Thr	Lys	Thr	Gly	Val	Arg	Phe	Arg	Ile	Trp	Ser	Arg	Pro	Glu
				290					295					300
Ala	Lys	Lys	Met	Thr	Gln	Tyr	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys
				305					310					315
Ile	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asp	Phe	Phe	Asp	Ile	Arg	Phe	Pro	Leu	Lys

	320		325		330
Lys Gln Asp Met	Ile Ala Leu Pro Asp	Phe Ser Ala Gly Ala Met			
	335		340		345
Glu Asn Trp Gly	Leu Ile Thr Tyr Arg	Glu Asn Ser Leu Leu Tyr			
	350		355		360
Asp Asp Arg Phe	Tyr Ala Pro Met Asn	Lys Gln Arg Ile Ala Arg			
	365		370		375
Ile Val Ala His	Glu Leu Ala His Gln	Trp Phe Gly Asp Leu Val			
	380		385		390
Thr Met Lys Trp	Trp Asp Asn Leu Trp	Leu Asn Glu Gly Phe Ala			
	395		400		405
Arg Phe Thr Glu	Phe Ile Gly Ala Gly	Gln Ile Thr Gln Asp Asp			
	410		415		420
Ala Arg Met Arg	Asn Tyr Phe Leu Ile	Asp Val Leu Glu Arg Ala			
	425		430		435
Leu Lys Ala Asp	Ser Val Ala Ser Ser	His Pro Leu Ser Phe Arg			
	440		445		450
Ile Asp Lys Ala	Ala Glu Val Glu Glu	Ala Phe Asp Asp Ile Thr			
	455		460		465
Tyr Ala Lys Gly	Ala Ser Val Leu Thr	Met Leu Arg Ala Leu Ile			
	470		475		480
Gly Glu Glu Lys	His Lys His Ala Val	Ser Gln Tyr Leu Lys Lys			
	485		490		495
Phe Ser Tyr Ser	Asn Ala Glu Ala Thr	Asp Leu Trp Ala Val Phe			
	500		505		510
Asp Glu Val Val	Thr Asp Val Glu Gly	Pro Asp Gly Lys Pro Met			
	515		520		525
Lys Thr Thr Glu	Phe Ala Ser Gln Trp	Thr Thr Gln Met Gly Phe			
	530		535		540
Pro Val Ile Ser	Val Ala Glu Phe Asn	Ser Thr Thr Leu Lys Leu			
	545		550		555
Thr Gln Ser Arg	Tyr Glu Ala Asn Lys	Asp Ala Val Glu Lys Glu			
	560		565		570
Lys Tyr Arg His	Pro Lys Tyr Gly Phe	Lys Trp Asp Ile Pro Leu			
	575		580		585
Trp Tyr Gln Glu	Gly Asp Lys Lys Glu	Ile Lys Arg Thr Trp Leu			
	590		595		600
Arg Arg Asp Glu	Pro Leu Tyr Leu His	Val Ser Asp Ala Gly Ala			
	605		610		615
Pro Phe Val Val	Asn Ala Asp Arg Tyr	Gly Phe Tyr Arg Gln Asn			
	620		625		630
His Asp Ala Asn	Gly Trp Lys Lys Ile	Ile Lys Gln Leu Lys Asp			
	635		640		645
Asn His Glu Val	Tyr Ser Pro Arg Thr	Arg Asn Val Ile Ile Ser			
	650		655		660
Asp Ala Phe Ala	Ala Ala Ala Thr Asp	Ala Ile Glu Tyr Glu Thr			
	665		670		675
Val Phe Glu Leu	Leu Asn Tyr Ala Glu	Lys Glu Thr Glu Tyr Leu			
	680		685		690
Pro Leu Glu Ile	Ala Met Ser Gly Ile	Ser Ser Ile Leu Lys Tyr			
	695		700		705
Phe Pro Thr Glu	Pro Glu Ala Lys Pro	Ala Gln Thr Tyr Met Met			
	710		715		720
Asn Ile Leu Lys	Pro Met Tyr Glu Lys	Ser Ser Ile Asp Phe Ile			
	725		730		735
Ala Asn Asn Tyr	Arg Asn Asp Lys Leu	Phe Phe Gln Ile Asn Leu			
	740		745		750
Gln Lys Asp Val	Ile Asp Met Phe Cys	Ala Leu Gly Ser Gln Asp			
	755		760		765
Cys Arg Lys Lys	Tyr Lys Lys Leu Phe	Asp Asp Glu Val Met Asn			
	770		775		780
Lys Cys Arg Asp	Gly Gln Ala Ala Thr	Glu Cys Val Arg Ile Ala			
	785		790		795
Ala Pro Leu Arg	Ser Ser Val Tyr Cys	Tyr Gly Val Lys Glu Gly			
	800		805		810
Gly Asp Tyr Ala	Ser Asp Lys Val Met	Glu Leu Tyr Thr Ala Glu			
	815		820		825

Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Lys	Asp	Phe	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Gly	Cys	
				830					835					840	
His	Lys	Asp	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	
				845					850					855	
Asp	Arg	Asn	Ser	Ser	Phe	Val	Arg	Met	Gln	Asp	Ile	Pro	Ser	Ala	
				860					865					870	
Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	Gly	Glu	Glu	Phe	Ile	Phe	
				875					880					885	
Asn	Phe	Leu	Ile	Glu	Arg	Trp	Pro	Asp	Ile	Ile	Glu	Ser	Ile	Gly	
				890					895					900	
Thr	Lys	His	Thr	Tyr	Val	Glu	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Cys	Thr	Ser	
				905					910					915	
Gly	Ile	Arg	Ser	Gln	Gln	Gln	Ile	Asp	Gln	Leu	Lys	Asn	Leu	Gln	
				920					925					930	
Lys	Asn	Gly	Met	Asn	Ala	Arg	Gln	Phe	Gly	Ala	Phe	Asp	Lys	Ala	
				935					940					945	
Ile	Glu	Arg	Ala	Gln	Asn	Arg	Val	Asp	Trp	Ile	Lys	Lys	His	Phe	
				950					955					960	
Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Phe	Phe	Lys	Lys	Ala	Thr	Leu				
				965					970						

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Molekuly nukleových kyselín tvorené jedným alebo väčším počtom kódových nukleotidových reťazcov pre aminopeptidázu alebo pre jej antigénne účinnú časť, pričom tieto reťazce obsahujú celý reťazec alebo časť nukleotidového reťazca z obr. 2, 3, 4 alebo 5, to znamená reťazce č. 1 až 15 alebo sú molekuly nukleových kyselín tvorené kódovými reťazcami pre aminopeptidázu hlíst s identitou reťazca 50 % alebo vyššou alebo s hybridizáciou s ktorýmkoľvek z uvedených reťazcov za podmienok 2 x SSC pri laboratórnej teplote, kde SSC obsahuje 0,15 M chlorid sodný a 0,015 M citronan sodný pri pH 7,2.

2. Molekuly nukleových kyselín tvorené jedným alebo väčším počtom kódových nukleotidových reťazcov pre polypeptid, schopný vyvolať tvorbu protilátok proti parazitickým hlístam, pričom tieto reťazce obsahujú jednu alebo väčší počet kódových oblastí pre antigénne determinanty z kódových reťazcov pre aminopeptidázy z obr. 2, 3, 4 alebo 5, to znamená z reťazcov č. 1 až 15.

3. Molekuly nukleových kyselín tvorené jedným alebo väčším počtom kódových nukleotidových reťazcov, ktoré zodpovedajú alebo ktoré sú komplementárne k jednému alebo väčšiemu počtu reťazcov klonov, identických aspoň na 50 % s reťazcami z obr. 2, 3, 4 a 5 alebo môže ísť o reťazce s totožnosťou viac než 50 % alebo o reťazce, ktoré hybridizujú s ktorýmkoľvek z uvedených reťazcov za podmienok 2 x SSC, kde SSC obsahuje 0,15 M chlorid sodný a 0,015 M citronan sodný pri pH 7,2.

4. Vektor na expresiu alebo klonovanie, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že obsahuje molekulu nukleovej kyseliny podľa nárokov 1, 2 alebo 3.

5. Prokaryotická alebo eukaryotická bunka alebo transgenický organizmus, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, - že obsahuje molekulu nukleovej kyseliny podľa nárokov 1, 2 alebo 3.

6. Syntetický polypeptid, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje reťazec aminokyselín enzýmu aminopeptidázy alebo jeho antigénnej časti, zodpovedajúci celému reťazcu alebo časti nukleotidového reťazca z obr. 2, 3, 4 alebo 5, to znamená reťazce č. 1 až 15 alebo zodpovedajúci funkčnému ekvivalentnému variantu, pričom reťazec syntetického polypeptidu je odlišný od bielkoviny H110D vo forme dubletu alebo od syntetického polypeptidu zo skupiny:

- (a) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu
Phe
- (b) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser
- (c) Met Gly/Phe Asn Phe Lys Ile Glu/Val Thr/Glu
Ala Gly
- (d) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Lys Asp/Ala Thr/Lys
Leu - Ile Thr
- (e) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Val
- (f) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val
- (g) Met Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Glu Ala
Phe Tyr
- (h) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln
Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro
- (i) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu
Asn/Leu Leu Asn/Gly
- (j) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn
- (k) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp -
Ile - - Lys Gly
- (l) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe
Asp Asp Ile Thr? Tyr - - Gly Pro Ser
- (m) Lys - Glu Glu Thr Glu Ile Phe Asn Met
- (n) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala
Leu

- (o) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys
(p) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu
Phe -Ala Thr Ala Leu
(q) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser -
Tyr? - Thr
(r) Met Glu/Phe Asn Phe Leu Ile Glu/Val Thr/Glu
Ala Gly - Ile Thr
(s) Met Gly Phe Leu Val Thr Val Glu Ala Phe
Tyr - Thr Ser
(t) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln
Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro
(u) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Leu Asp/Ala Thr/Lys
Leu - Ile Thr - Gly
(v) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Val
Gly?
(w) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val
(x) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu
Asn/Leu Leu Asn/Gly
(y) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn
(z) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp -
Ile - - - Lys Gly
(aa) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe
Asp Asp Ile Thr? Tyr - - Gly Pro Ser
(bb) Lys - Glu Gln Thr Glu Ile Phe Asn Met
(cc) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu
Ala Leu
(dd) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys

7. Syntetické polypeptidy podľa nároku 6, v y z n a - č u j ú c e s a t ý m, že sú tvorené reťazcom aminokyselín enzýmu aminopeptidázy alebo antigénnej časti tohto enzýmu, zodpovedajúcim celému reťazcu alebo časti nukleotidových reťazcov z obr. 2, 3, 4 alebo 5, ide o reťazce č. 1 až 15 alebo ide o funkčne ekvivalentný variant, v podstate zbavený iných zložiek *Haemonchus contortus*.

8. Syntetické polypeptidy podľa nároku 6 alebo 7, v y - z n a č u j ú c i s a t ý m, že ide o zložený polypeptid, obsahujúci ešte ďalší polypeptid, viazaný na reťazec aminokyselín podľa nároku 6 alebo 7.

9. Spôsob výroby syntetického polypeptidu podľa nárokov 6, 7 alebo 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pestuje prokaryotická alebo eukaryotická bunka, obsahujúca molekulu nukleovej kyseliny podľa nárokov 1, 2 alebo 3, za podmienok, pri ktorých dochádza k expresii polypeptidu, ktorý sa potom izoluje.

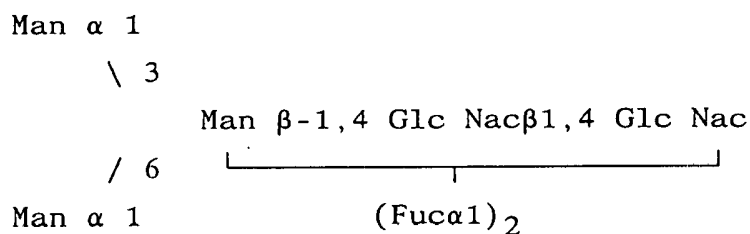
10. Vakcína na stimuláciu imunologickej odpovede proti parazitickým hlístam u človeka alebo iného živočícha, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje aspoň jeden syntetický polypeptid podľa nárokov 6, 7 alebo 8 alebo vírus alebo hostiteľskú bunku s obsahom nukleovej kyseliny podľa nárokov 1, 2 alebo 3 na stimuláciu imunologickej odpovede pre polypeptidy, pre ktoré je kódom uložená molekula nukleovej kyseliny, spolu s farmaceutickým nosičom.

11. Použitie molekuly kyseliny podľa nárokov 1, 2 alebo 3 alebo syntetického polypeptidu podľa nárokov 6, 7 alebo 8 na výrobu vakcíny na stimuláciu imunologickej odpovede proti parazitickým hlístam u človeka alebo u iného živočícha.

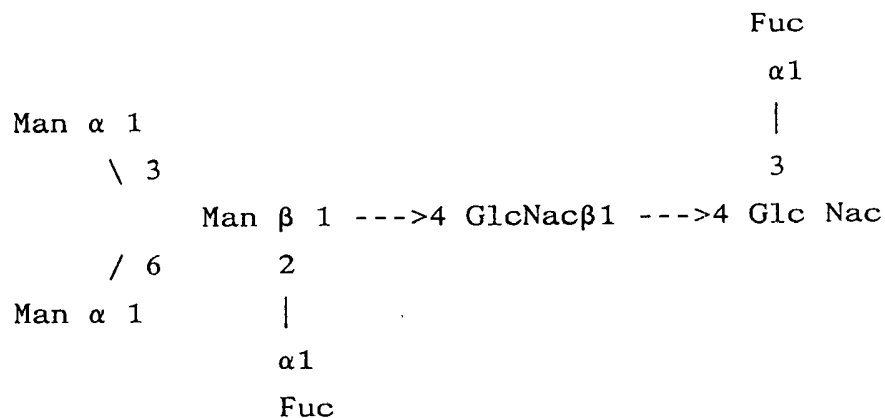
12. Spôsob stimulácie imunologickej odpovede proti parazitickým hlístam u človeka alebo iného živočícha,

v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podáva vakcína podľa nároku 10.

13. Oligosacharid so štruktúrou

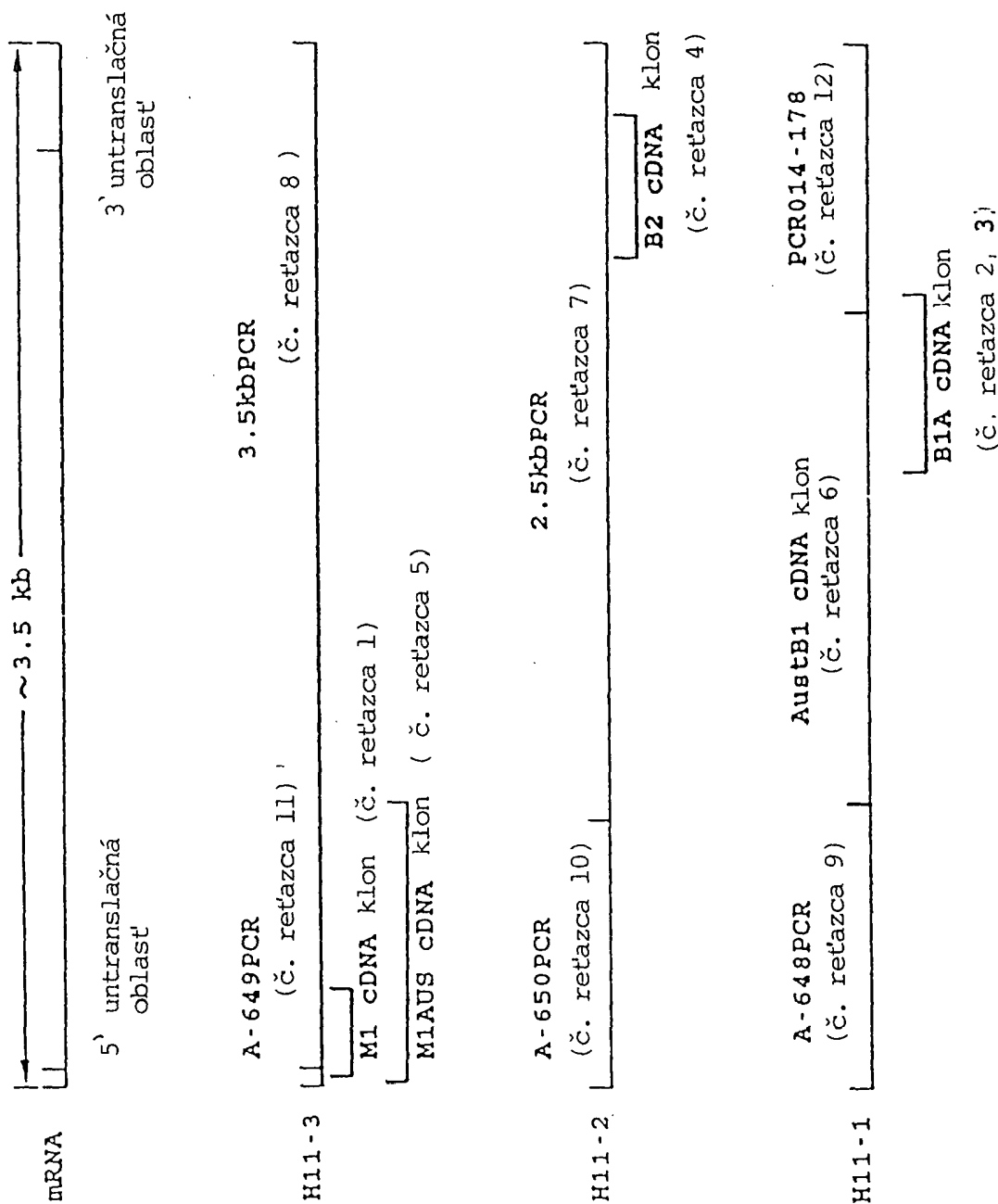


14. Oligosacharid podľa nároku 13, so štruktúrou



15. Oligosacharid podľa nároku 13 alebo 14, viazaný na syntetický polypeptid podľa nároku 6, 7 alebo 8.

1 / 44



2/44

	1		50
H11-3	GGTTTAAATT	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA TCTAG.....A
H11-2	GGTTTAAATT	CCCAAGTTTG	AG.....A
H11-1	GGTTTAAATT	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGG
	51		100
H11-3	TGACGTCGCA	GGGGAGAACG	CGGACATTGC TGAATCTAAC TCCAATCCGT
H11-2	TGACGGCGGA	GTGGCAGAA	CGTCGAATCT TGGGCTTCTC ACCTATCAGC
H11-1	AGACGCAGCA	ACCACGAAAA	AATACAGTGC TACGGCTCAC CCAATCAAG
	101		150
H11-3	CTTATTGTCG	CATTATTTCT	AGTAGCTGCT GCAGTCGGCC TCTCTATTGG
H11-2	CTACTTTGTA	CATTATTTGT	ATTAGCTGCT GCCGTTGGAC TCTCCATTGG
H11-1	TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG
	151		200
H11-3	TCTCACCTAT	TACTTTACTC	GCAAAGCGTT CGATACCTCA GAAAAGCCAG
H11-2	TCTTACCTAT	TACTTCACTC	GTAAAGCATT CGATACCACA CAAAAGAAC
H11-1	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAGCTTT TGATACTACT GCGGAAATG
	201		250
H11-3	GGAAGGATGA	TACTGGTGGC	AAGGACAAAG ACAATTCTCC CTCTGCGGCG
H11-2	AGAAGGATGA	CAGTGGTGGT	AAAGAAAAGG ATAATTCTCC TTCTGCAGAA
H11-1	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGAT...G ATAATTCCCC ATCAGCTGAA
	251		300
H11-3	GAACTACTCC	TTCCAAGTAA	TATAAAACCA TTGTCTTACG ACTTGACGAT
H11-2	GAACTACTTC	TTCCAACGAA	CATAAAACCA GTCTCGTACG ACTTGAACAT
H11-1	GAATTACGTC	TCCCAACAAC	CATAAAACCT TTGACATACG ACTTAGTAAT
	301		350
H11-3	CAAAACATAT	CTACCTGGTT	ATGTGGACTT CCCACCGGAG AAAAACCTCA
H11-2	CAAAACATAT	CTACCGGGTT	ACGTGAACCT TCCACCAGAA AAGAATCTCA
H11-1	CAAAACGTAT	CTGCCAAACT	ATGTAAACTA TCCACCTGAG AAAGATTTCG
	351		400
H11-3	CATTCGATGG	GCGTGTGGAA	ATATCAATGG TTGTAATTGA GCCAACAAAG
H11-2	CATTTGATGC	CCATGTGGAG	ATTGCTATGG TTGTGGTTGA GCCTACAAAT
H11-1	CTATTGATGG	GACTGTGGTG	ATTGCTATGG AAGTTGTGGA GCCAACAAAG
	401		450
H11-3	AGTATCGTAC	TCAATTCAAA	GAAGATCTCT GTAATACCCC AAGAATGTGA
H11-2	AGTATTGTGC	TGAACTCGAA	GAAAATCACT TTGGCACAAG GAGGATGCCA
H11-1	TCTATTGTGC	TCAACTCGAA	AAATATTCCCT GTAATTGCAG ACCAGTGCGA
	451		500
H11-3	ACTGGTATCG	GGCGATAAAA	AACTCGAAAT TGAAAGTGTA AAGGAGCACC
H11-2	ACTGTTCTCA	GGTAATCAGA	AACTTGACAT CGAAAGTGTA AAGATGCAGG
H11-1	ACTGTTTCT	AAACAAACAAA	AACTCGACAT CGAAAAGGTT GTGGATCAGC
	501		550
H11-3	CAAGACTGGA	AAAGGTTGAG	TTTCTTATCA AAAGCCAACT GCAAAAAGAT
H11-2	AAAGACTTGA	CAAGCTTGAG	ATTACCCTCA AAAATCAGCT GCAAAAAGAT
H11-1	CAAGGCTGGA	GAAAGTCGAA	TTCGTTTTGA AGAAAAGCT GGAGAAGAAT
	551		600
H11-3	CAACAAATCT	TGCTCAAGGT	CGGCTACATC GGTCTCATCA CCAACAGCTT
H11-2	CTGAAAATCC	TGCTCAAGAT	CACTTACACC GGCCTTATTA GCGACACTCT

3/44

H11-1 CAGAAAAATCA CGCTCAAGAT TGTATACATT GGCCTTATCA ACGACATGCT
601 650
H11-3 TGGTGGAAATC TACCAGACCA CTTATACCAAC CCCGGATGGC ACCCCTAAGA
H11-2 CGGTGGGCTC TACCAGTCCA TCTACACTGA TAAGGACGGA AAAACTAAGA
H11-1 TGGAGGACTT TATCGAACAA CCTACACGGA TAAAGATGGT ACAACCAAGA
651 700
H11-3 TCGCTGCAGT TTCACAAAAT GAGCCCATAG ATGCTCGTCG AATGGTACCA
H11-2 TCGTTGCTGT TTCACAAAAT GAACCATCAG ACGCTCGTCG TATAGCGCCA
H11-1 TTGCTGCATG CACTCATATG GAACCGACGG ACGCCCGTCT TATGGTCCCC
701 750
H11-3 TGCATGGATG AACCGAAATA CAAAGCAAAC TGGACCGTTA CTGTCAATTCA
H11-2 TGCTTTGACG AACCGAAGTA CAAGGCAACA TGGACTGTCA CCGTCGTTCA
H11-1 TGTTCGACG AGCCGACGTT TAAGGCAAAC TGGACTGTGA CTGTGATTCA
751 800
H11-3 TCCAAAAGGC ACCAAAGCCG TCTCGAATGG AATCGAAGTG AACGGAGATG
H11-2 TCCCAAAGGT ACAAAGGCTG CATCGAACGG CATTGAAGCA AATGGAAAAG
H11-1 TCCGAAGGGC ACCAGTGCCG TGTCGAATGG AATAGAA... AAGGGAGAAG
801 850
H11-3 GAGAGATCAG TGGTGATTGG ATCACATCGA AGTTCCTTGAC TACTCCACGG
H11-2 GGGAGCTCAA GGGTGATTGG ATAACGTCTA AATTTAAAAC TACCCACCG
H11-1 GAGAAGTCTC TGGCGATTGG GTCACAACCA GATTCGATCC AACCCCGCGA
851 900
H11-3 ATGTCATCCT ACTTGTTGGC AGTTATGGTT TCAGAATTG AATACATCGA
H11-2 ATGTCGTCCT ATTTATTGGC TATTATTGTT TGTGAATTG AATACATTGA
H11-1 ATGCCTTCGT ATTTGATTGC TCTTGTGATT TCCGAATTTA AGTACATTGA
901 950
H11-3 AGGTGAAACA AAGACGGGTG TTCGGTTCCG TATATGGTCA CGCCAGAGG
H11-2 AGGATTTACA AAAACGGGTG TTCGGTTCCG TATATGGTCT CGACCAGAGG
H11-1 AAATTATACG AAAAGCGGTG TTCGATTCCG AATTCCGGCT CGTCCGGAAG
951 1000
H11-3 CAAAGAAGAT GACACAATAT GCTCTGCAAT CTGGTATCAA GTGCATAGAA
H11-2 CGAAACGAAT GACGGCATA CTTTGGATG CTGGCATCAG ATGCCTGGAG
H11-1 CTATGAAGAT GACAGAATAT GCCATGATAG CTGGAATCAA ATGTTTGGAT
1001 1050
H11-3 TTCTACGAAG ATTTCTTTGA TATCAGATTC CCTCTGAAGA AACAAGATAT
H11-2 TTCTATGAGA AGTTCCTTTGA CATAAAATTC CCTCTGGAAA AACAAGATAT
H11-1 TACTATGAGG ACTTCTTCGG GATCAAATTC CCACTTCCAA AACAAGATAT
1051 1100
H11-3 GATTGCCCTT CCTGATTTCT CTGCCGGTGC CATGGAGAAT TGGGGCCTCA
H11-2 GATTGCTCTT CCTGATTTCA CCGCTGGTGC CATGGAAAAC TGGGGCCTTA
H11-1 GGTGCTCTT CCTGACTTCT CATCTGGTGC TATGGAGAAC TGGGGTCTCA
1101 1150
H11-3 TCACTTACAG GGAAAACTCT TTGTTGTACG ATGACAGATT CTATGCACCG
H11-2 TCACTTATAG AGAGGATTCT CTCCTATACG ATGAAAAAAT TTATGCACCG
H11-1 TCACATACAG GGAGGGTCC GTGCTCTACG ATGAAAACCT CTACGGACCA
1151 1200

4 / 44

H11-3	ATGAATAAAC	AGCGAATTGC	TCCGATTGTT	GCTCATGAGC	TTGCTCATCA
H11-2	ATGAATAAAC	AGCGGGTTGC	TCTCGTAGTT	GCTCACGAGC	TTGCTCATCA
H11-1	ATGAATAAGG	AGCGGGTTGC	AGAAGTGATC	GCGCACGAAC	TTGCACATCA
	1201				1250
H11-3	GTGGTTCGGC	GACTTGGTTA	CGATGAAGTG	GTGGGATAAT	TTGTGGTTGA
H11-2	GTGGTTCGGC	AATCTGGTCA	CACTGAAGTG	GTGGGATGAT	ACGTGGTTGA
H11-1	GTGGTTCGGT	AATTTGGTCA	CGATGAAGTG	GTGGGATAAC	CTATGGCTGA
	1251				1300
H11-3	ATGAAGGTTT	TGCAAGATTC	ACAGAATTTA	TTGGAGCTGG	TCAGATAACT
H11-2	ACGAAGGTTT	TGCAACATTT	GTTGAGTATC	TTGGAATGGA	CGAAATTAGC
H11-1	ACGAAGGATT	CGCGTCATTC	GTGGAATACA	TCGGAGCCGA	CTTCATCAGC
	1301				1350
H11-3	CAAGATGACG	CCAGAATGAG	GAAGTACTTC	CTGATTGATG	TACTTGAACG
H11-2	CACAACAATT	TCAGAACGCA	AGATTTCTTC	TTGCTCGATG	GAATGGATCG
H11-1	GATGGTCTAT	GGGAAATGAA	AGATTTCTTC	CTGCTGGCAC	CGTACACAAG
	1351				1400
H11-3	CGCTTTGAAA	GCTGATTCCG	TAGCGTCAAG	CCATCCACTT	TCCTTCAGAA
H11-2	CGGAATGAGA	GCTGACTCCG	CAGCATCGAG	CCATCCGCTT	TCGTTTAGGA
H11-1	TGGTATTACG	GCTGATGCAG	TAGCTTCAAG	CCATCCGCTT	TCCTTCAGAA
	1401				1450
H11-3	TCGACAAAGC	TGCAGAAGTT	GAAGAAGCCT	TTGATGATAT	CACATACGCC
H11-2	TTGACAAAGC	GGCAGAAGTT	GCCGAAGCCT	TTGACGATAT	TTCATACGCC
H11-1	TAGATAAGGC	TGCAGATGTA	TCAGAAGCGT	TCGATGATAT	CACATACCGT
	1451				1500
H11-3	AAAGGAGCTT	CTGTTCTTAC	TATGCTGAGA	GCCTTGATTG	GAGAAGAAAA
H11-2	AAGGGAGCGT	CAGTTCTCAC	TATGCTACGG	GCTTTGATTG	GAGAGGACAA
H11-1	AAAGGAGCAT	CCGTTCTTCA	AATGCTATTG	AATTTAGTTG	GGGACGAAAA
	1501				1550
H11-3	ACATAAGCAT	GCAGTATCGC	AGTACCTCAA	GAAGTTCTCG	TATAGCAATG
H11-2	TTACAGGAAT	GCTGTTGTGC	AATACCTCAA	GAAGTTCTCC	TACAGCAATG
H11-1	TTTCAAGCAG	TCTGTTTCGC	GTTACCTCAA	GAAGTTTTC	TATGATAATG
	1551				1600
H11-3	CAGAAGCGAC	TGATCTATGG	GCAGTTTTTG	ATGAAGTTGT	CACTGACGTC
H11-2	CACAAGCAGC	CGATCTGTGG	AACGTCTTCA	ATGAAGTTGT	CAAAGGTGTT
H11-1	CGGCTGCTGA	AGATTTATGG	GCAGCATTCG	ACGAAACCGT	CCAAGGTATA
	1601				1650
H11-3	GAAGGTCCAG	ACGGCAAACC	TATGAAAACC	ACAGAGTTTG	CAAGTCAGTG
H11-2	AAGGGTCCTG	ACGGCAACGT	CATGAAAATC	GACCAATTTA	CCGATCAGTG
H11-1	ACCGGACCTA	ATGCTGGACC	ATTGAAAATG	TCCGAGTTTG	CGCCACAATG
	1651				1700
H11-3	GACGACTCAG	ATGGGCTTCC	CAGTTATTTT	CCTAGCAGAG	TTTAACTCGA
H11-2	GACGTATCAG	ATGGCTTATC	CTGTGGTTAA	AGTAGAAGAA	TTTAATGCCA
H11-1	GACAATCTCAG	ATGGGGTTCC	CTGTCTTAC	TGTCCGAGTCG	GTTAACGCAA
	1701				1750
H11-3	CTACTTTGAA	ATTAACGCAA	AGTCGATATG	AGGCGAATAA	AGACGCTGTG
H11-2	CCGCCCTAAA	GGTTACGCAG	AGCCGGTACA	AGACAAATAA	AGACGCCTTG
H11-1	CGACTTTGAA	AGTCACCCAA	AAACGATACA	GGCAGAACAA	GGATGCAAAG

5/44

	1751	1800
H11-3	GAGAAAGAGA AGTACCGTCA CCCGAAATAC GGATTTAAAT GGGATATTCC	
H11-2	GAACCAGAGA AATATCGTAA TCCAAAATAC GGGTTCAAAGT GGGATGTTCC	
H11-1	GAACCAGAGA AGTACCGTCA TCCAACTTAT GGGTTCAAAT GGGATGTTCC	
	1801	1850
H11-3	ACTGTGGTAT CAGGAAGGCG ATAAGAAGGA GATAAAGCGA ACATGGTTGA	
H11-2	CCTATGGTAT CAGGAAGGCA ATAGCAAAGA GGTGAAGCGA ACATGGCTAA	
H11-1	TCTGTGGTAT CAGGAAGATG AA...CAGCA AGTGAAAAGA ACTTGGTTAA	
	1851	1900
H11-3	GAAGAGATGA ACCGCTTTAC TTGCATGTTA GTGATGCTGG CGCTCCCTTT	
H11-2	AAAGAGATGA ACCGCTGTAC TTGAACGTCA ACAATCGGGA TACATCCCTT	
H11-1	AAAGAGAGGA ACCGCTCTAT TTCCATGTAA GCAATTCTGA TTCGTCAATT	
	1901	1950
H11-3	GTGGTGAACG CAGACCGCTA TGGATTTTAT CGACAAAATC ATGACGCTAA	
H11-2	GTGGTGAACG CTGATCGACA TGGATTTTAT CGACAAAATC ATGATGCCAA	
H11-1	GTGGTGAATG CCGAACGTCG TGCTTTTTCG CGATCAAATC ATGACGCTAA	
	1951	2000
H11-3	TGGTTGGAAA AAGATAATCA AGCAGCTCAA GGATAATCAT GAGGTTTACA	
H11-2	CGGTTGGAAA AAGATAATCA AGCAGCTCAA GAAAGATCAC AAGGTCTTCG	
H11-1	CGGTTGGAGG AACATTATGA GAAGACTCAA GCAGAATCAT AAGGTCTATG	
	2001	2050
H11-3	GTCCCCGGAC AAGGAATGTC ATCATTAGCG ATGCGTTTGC TCGGGCTGCA	
H11-2	GTCCAAGGAC AAGGAACGCT ATCATAAGCG ATGCATTTGC TGCAGCTACG	
H11-1	GTCCACGAAC AAGAAACGCT CTCATAAGTG ATGCGTTTGC AGCAGCTGCA	
	2051	2100
H11-3	ACTGACGCAA TTGAGTATGA GACTGTATTT GAACTTCTGA ATTATGCCGA	
H11-2	ATTGACGCAA TCGACTATGA AACTGTATTC GAACTACTTG AATATGCCAA	
H11-1	GTTGAGGAAA TGAATTACGA GACCGTATTT GAAATGCTCA AATACACCGT	
	2101	2150
H11-3	AAAAGAAACG GAATATCTAC CATTAGAAAT CGCAATGTCC GGGATCTCTT	
H11-2	AAATGAAGAG GAATTCTTGC CTTGGAAGGA AGCTCTGTCC GGCATGTTTCG	
H11-1	GAAAGAAGAG GATTACTTAC CATGGAAGGA GGCAATATCA GGATTCAATA	
	2151	2200
H11-3	CGATTTTGAA ATACTTCCCT ACCGAGCCAG AGGCAAAGCC AGCTCAAACA	
H11-2	CAGTTTTAAA GTTCTTCGGT AATGAGCCGG AGACAAAACC AGCTAGAGCT	
H11-1	CAATTTTGGA CTTTTTCGGC AGCGAACCCG AATCTCAATG GGCTTCGGAA	
	2201	2250
H11-3	TACATGATGA ACATATTGAA ACCGATGTAT GAAAAAAGCA GTATCGACTT	
H11-2	TACATGATGA GCATATTAGA ACCGATGTAT AATAAGAGCA GCATTGATTA	
H11-1	TACATGCGAA AACTGATGAA GCCAATTTAT GACAAGAGTA GCATCAAGTT	
	2251	2300
H11-3	CATTGCCAAT AACTACAGAA ATGACAAGCT GTTTTTCCAA ATCAACCTCC	
H11-2	CATCGTCAAG AATTATTTGG ATGATACGTT ATTCAAAAAA ATTAATACTC	
H11-1	TATAGCGGAG AACTACAAAA AAGATTTCGT TTTCTTCAAA AATAATCTCC	
	2301	2350
H11-3	AAAAAGATGT CATTGATATG TTCTGCGCCC TCGGATCGCA AGACTGCAGG	
H11-2	AAAAGGATAT CATTGATGCA TATTGTTCCC TTGGATCAAA GGAAGTGTATA	

6/44

H11-1 AAATAGCTGT TATTGACACA TACTGTGGTC TTGGAGGCAA AGAATGTCTT
2351 2400
H11-3 AAGAAATATA AAAAACTTTT CGATGACGAA GTCATGAACA AATGCAGGGA
H11-2 AAGCAATATA AGGATATCTT CTACGATGAG GTTATGCCCA AGTGTAAAGC
H11-1 GAAGAAATGA AAAAGCTTTT TGACAAGGAG GTCATG...A AATGTCAACC
2401 2450
H11-3 TGGTCAAGCA GCAACCGAAT GCGTAAGAAT CGCCGCTCCT CTCCGATCAA
H11-2 CGGGGAAGCA GCAACCAAAT GCGTTAAGGT TTCCGCTCCT CTTGAGGCCA
H11-1 TGGTCAGCAA GCGACCGACT GCGTAAAGGT AACTGCTCCT CTCCGAAAAA
2451 2500
H11-3 GTGTTTATTG TTATGGTGTG AAGGAAGGCG GTGATTATGC TTCCGACAAG
H11-2 ATGTTTACTG TTATGGTGTG CAGGAAGGTG GTGAAGAAGC TTTTGAAAAG
H11-1 CTGTTTACTG CTATGGGGTC CAGGAAGGCG GTGATGAGGC ATTGACAAG
2501 2550
H11-3 GTGATGGAGC TTTATACGGC CGAAACACTC GCCCTAGAAA AAGACTTCCT
H11-2 GTGATGGGGC TGTATCTAGC AGAAGATGTT CAACTGGAGA AGGGTATCCT
H11-1 GTGATGGAAC TATATAATGC GGAACAAGTG CAGTTGGAGA AAGACAGTCT
2551 2600
H11-3 ACGCCTAGCA TTGGGATGTC ATAAAGATGT TACTGCTTTG AAAGGACTTC
H11-2 GTTCAAAGCC TTGGCATGCC ACAAAGATGT TACAGCTCTA AAAGAAGTTC
H11-1 ACGTGAAGCA TTGGGATGCC ATAAAGACGT TACAGCTCTA AAGGGACTTC
2601 2650
H11-3 TCTTGCGGGC TCTGGACAGG AATTCGTCGT TCGTACGTAT GCAGGATATC
H11-2 TTTTGCGAGC CCTGGACCGT AAATCGTCGT TTGTGCGTCT TCAGGATGTC
H11-1 TTATGCTGGC TTTGGATCGG AATTCGTCAT TTGTGCGTCT TCAAGATGCT
2651 2700
H11-3 CCAAGTGCTT TCAACGATGT AGCAGCAAAT CCTATTGGCG AAGAATTCAT
H11-2 CCTACCGCTT TCCGTGCTGT ATCTGAAAAC CCTGTGGGCG AAGAATTCAT
H11-1 CATGATGTGT TTAACATTGT ATCCAGAAAT CCTGTTGGAA ACGAAGTCT
2701 2750
H11-3 TTTCAATTTT CTTATTGAGA GATGGCCAGA TATCATTGAA AGTATAGGAA
H11-2 GTTCAATTTT CTAATGGAGA GATGGGAGGA AATCACTGCG AGCTTGAAAA
H11-1 GTTCAATTTT CTCACAGAGC GATGGGAAGA GATACTTGAA AGTTTGTCAA
2751 2800
H11-3 CGAAGCACAC ATATGTTGAG AAAGTGATAC CAGCCTGCAC TTCAGGAATC
H11-2 CAGAACACAG AGCAGTTGAT AAAGTGGTCG GCGCTTGTTG CACAGGAATT
H11-1 TACGACACAG ATCAGTTGAT CGAGTGATCA AAGCCTGTAC TCGAGGACTA
2801 2850
H11-3 CGCTCACAAC AGCAGATTGA CCAGCTGAAG AATCTGCAGA AAAATGGCAT
H11-2 CGCTCCCAAC AACAAATAGA TCAGCTGAAG AATCTACAGA AGAACAATGC
H11-1 CGATCCAGGG AACAAGTACA ACAGTTGAAG AATCTATACA AAAATGACAA
2851 2900
H11-3 GAACGCTCGT CAATTCGGTG CATTTCGATA AGCAATCGAA CGAGCACAAA
H11-2 GCAGGCTAAG AAGTTCCGGT CATTACCCA GGAAATCGAA AAAGGAGAAC
H11-1 GCGTGCTCGC GAAATACGGTG CATTTCGGTG GGCAATAGAA AGATCGGAAC
2901 2950

7/44

H11-3	ATAGGGTGGG	TTGGATTAAA	AAACATTTCC	AAAAATTAGC	GGCTTTCTTC
H11-2	ATAAAATTGC	CTGGATCAAG	AAACATTTTC	ACAGATTATC	GGAATTCTTC
H11-1	ACAGAGTCAA	ATGGATTGAG	AAACATTTCC	GAAAACTAGC	AGCTTTCTTC
	2951		2958		
H11-3	AAGAAAGCCA	CCTTGTA			
H11-2	AAGAGAGCAA	GATCATAG			
H11-1	AAAAAATCTA	ATTCATTA			

Obr. 2 (pokračovanie)

8/44

	1				50
M1			C	GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG	
AustM1	ATGACGTCGC AGGGGAGAAC GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG				
H11-3	ATGACGTCGC AGGGGAGAAC GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG				
	51				100
M1	TCTTATTGTC GCATTATTTT TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG				
AustM1	TCTTATTGTC GCATTATTTT TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG				
H11-3	TCTTATTGTC GCATTATTTT TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG				
	101				150
M1	GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA				
AustM1	GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA				
H11-3	GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA				
	151				200
M1	GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC				
AustM1	GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC				
H11-3	GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC				
	201				250
M1	GGAACACTCTT CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA				
AustM1	GGAACACTCTC CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA				
H11-3	GGAACACTCTC CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA				
	251				300
M1	TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC				
AustM1	TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC				
H11-3	TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC				
	301				350
M1	ACATTCGACG GGCG				
AustM1	ACATTCGATG GGCGTGTGGA AATATCAATG GTTGTAATTG AGCCAACAAA				
H11-3	ACATTCGATG GGCGTGTGGA AATATCAATG GTTGTAATTG AGCCAACAAA				
	351				400
AustM1	GAGTATCGTA CTCAATTCAA AGAAGATCTC TGTAATACCC CAAGAATGTG				
H11-3	GAGTATCGTA CTCAATTCAA AGAAGATCTC TGTAATACCC CAAGAATGTG				
	401				450
AustM1	AACTGGTATC GGGCGATAAA AAATTCGAAA TTGAAAGTGT AAAGGAGCAC				
H11-3	AACTGGTATC GGGCGATAAA AAATTCGAAA TTGAAAGTGT AAAGGAGCAC				
	451				500
AustM1	CCAAGACTGG AAAAGGTTGA GTTTCTTATC AAAAGCCAAC TGGAAAAAGA				
H11-3	CCAAGACTGG AAAAGGTTGA GTTTCTTATC AAAAGCCAAC TGGAAAAAGA				
	501				550
AustM1	TTACACAAATC TTGCTCAAGT CGGCTTACAT CGGTCTCATC AGCAACAGCC				
H11-3	TCAACAAATC TTGCTCAAGG TCGGCTACAT CGGTCTCATC AGCAACAGCT				
	551				600
AustM1	TTGGTGGAAT CTACCAGACC ACTTATACCA CCCC GGATGG CACCCCTAAG				
H11-3	TTGGTGGAAT CTACCAGACC ACTTATACCA CCCC GGATGG CACCCCTAAG				
	601				650
AustM1	ATCGCTGCAG TTTCACAAAA TGAGCCCATG GATGCTCGTC GAATGGTACC				
H11-3	ATCGCTGCAG TTTCACAAAA TGAGCCCATG GATGCTCGTC GAATGGTACC				

9/44

	651	700
AustM1	ATGCATGGAT GAACCGAAAT ACAAAGCAAA CTGGACCGTT ACTGTCATTC	
H11-3	ATGCATGGAT GAACCGAAAT ACAAAGCAAA CTGGACCGTT ACTGTCATTC	
	701	750
AustM1	ATCCAAAAGG CACCAAAGCC GTCTCGAATG GAATCGAAGT GAACGGAGAT	
H11-3	ATCCAAAAGG CACCAAAGCC GTCTCGAATG GAATCGAAGT GAACGGAGAT	
	751	800
AustM1	GGAGAGATCA GTGGTGATTG GATCACATCG AAGTTCTTGA CTACTCCACG	
H11-3	GGAGAGATCA GTGGTGATTG GATCACATCG AAGTTCTTGA CTACTCCACG	
	801	850
AustM1	GATGTCATCC TACTTGTTGG CAGTTATGGT TTCAGAAATT GAATACATCG	
H11-3	GATGTCATCC TACTTGTTGG CAGTTATGGT TTCAGAAATT GAATACATCG	
	851	900
AustM1	AAGGTGAAAC AAAGACGGGT GTTCGGTTCC GTATATGGTC ACGCCCAGAG	
H11-3	AAGGTGAAAC AAAGACGGGT GTTCGGTTCC GTATATGGTC ACGCCCAGAG	
	901	950
AustM1	GCAAAGAAGA TGACACAATA TGCTCTGCAA TCTGGTATCA AGTGCATA	
H11-3	GCAAAGAAGA TGACACAATA TGCTCTGCAA TCTGGTATCA AGTGCATAGA	
	951	1000
H11-3	ATTCTACGAA GATTTCTTTG ATATCAGATT CCCTCTGAAG AAACAAGATA	
	1001	1050
H11-3	TGATTGCCCT TCCTGATTTC TCTGCCGGTG CCATGGAGAA TTGGGGCCCTC	
	1051	1100
H11-3	ATCACTTACA GGGAAAATC TTTGTTGTAC GATGACAGAT TCTATGCACC	
	1101	1150
H11-3	GATGAATAAA CAGCGAATTG CTCGCATTGT TGCTCATGAG CTTGCTCATC	
	1151	1200
H11-3	AGTGGTTCGG CGACTTGGTT ACGATGAAGT GGTGGGATAA TTTGTGGTTG	
	1201	1250
H11-3	AATGAAGGTT TTGCAAGATT CACAGAATTT ATTGGAGCTG GTCAGATAAC	
	1251	1300
H11-3	TCAAGATGAC GCCAGAATGA GGAACACTT CCTGATTGAT GTACTTGAAC	
	1301	1350
H11-3	GCGCTTTGAA AGCTGATTCC GTAGCGTCAA GCCATCCACT TTCCTTCAGA	
	1351	1400
H11-3	ATCGACAAAAG CTGCAGAAGT TGAAGAAGCC TTTGATGATA TCACATACGC	
	1401	1450
H11-3	CAAAGGAGCT TCTGTTCTTA CTATGCTGAG AGCCTTGATT GGAGAAGAAA	
	1451	1500
H11-3	AACATAAGCA TGCAGTATCG CAGTACCTCA AGAAGTTCTC GTATAGCAAT	
	1501	1550

10/44

H11-3 GCAGAAGCGA CTGATCTATG GGCAGTTTTT GATGAAGTTG TCACTGACGT
 1551 1600
 H11-3 CGAAGGTCCA GACGGCAAAC CTATGAAAAC CACAGAGTTT GCAAGTCAGT
 1601 1650
 H11-3 GGACGACTCA GATGGGCTTC CCAGTTATTT CCGTAGCAGA GTTTAACTCG
 1651 1700
 H11-3 ACTACTTTGA AATTAACGCA AAGTCGATAT GAGGCGAATA AAGACGCTGT
 1701 1750
 H11-3 GGAGAAAGAG AAGTACCGTC ACCCGAAATA CGGATTTAAA TGGGATATTC
 1751 1800
 H11-3 CACTGTGGTA TCAGGAAGGC GATAAGAAGG AGATAAAGCG AACATGGTTG
 1801 1850
 H11-3 AGAAGAGATG AACCGCTTTA CTTGCATGTT AGTGATGCTG GCGCTCCCTT
 1851 1900
 H11-3 TGTGGTGAAC GCAGACCGCT ATGGATTTTA TCGACAAAAT CATGACGCTA
 1901 1950
 H11-3 ATGGTTGGAA AAAGATAATC AAGCAGCTCA AGGATAATCA TGAGGTTTAC
 1951 2000
 H11-3 AGTCCCCGGA CAAGGAATGT CATCATTAGC GATGCGTTTG CTGCGGCTGC
 2001 2050
 H11-3 AACTGACGCA ATTGAGTATG AGACTGTATT TGAACTTCTG AATTATGCCG
 2051 2100
 H11-3 AAAAAGAAAC GGAATATCTA CCATTAGAAA TCGCAATGTC CGGGATCTCT
 2101 2150
 H11-3 TCGATTTTGA AATACTTCCC TACCGAGCCA GAGGCAAAGC CAGCTCAAAC
 2151 2200
 H11-3 ATACATGATG AACATATTGA AACCGATGTA TGAAAAAGC AGTATCGACT
 2201 2250
 H11-3 TCATTGCCAA TAACTACAGA AATGACAAGC TGTTTTTCCA AATCAACCTC
 2251 2300
 H11-3 CAAAAAGATG TCATTGATAT GTTCTGCGCC CTCGGATCGC AAGACTGCAG
 2301 2350
 H11-3 GAAGAAATAT AAAAACTTT TCGATGACGA AGTCATGAAC AAATGCAGGG
 2351 2400
 H11-3 ATGGTCAAGC AGCAACCGAA TCGTAAGAA TCGCCGCTCC TCTCCGATCA
 2401 2450
 H11-3 AGTGTTTATT CTTATGGTCT GAAGGAAGGC GGTGATTATG CTTCCGACAA
 2451 2500
 H11-3 GGTGATGGAG CTTTATACGG CCGAAACACT CGCCCTAGAA AAAGACTTCC

11/44

H11-3	2501		2550
	TACGCCCTAGC	ATTGGGATGT CATAAAGATG TTA	CTGCTTT GAAAGGACTT
H11-3	2551		2600
	CTCTTGCGGG	CTCTGGACAG GAATTTCGTTCG TTCGTACGTA	TGCAGGATAT
H11-3	2601		2650
	CCCAAGTGCT	TTCAACGATG TAGCAGCAAA TCCTATTGGC	GAAGAATTCA
H11-3	2651		2700
	TTTTCAATTT	CCTTATTGAG AGATGGCCAG ATATCATTGA	AAGTATAGGA
H11-3	2701		2750
	ACGAAGCACA	CATATGTTGA GAAAGTGATA CCAGCCTGCA	CTTCAGGAAT
H11-3	2751		2800
	CCGCTCACAA	CAGCAGATTG ACCAGCTGAA GAATCTGCAG	AAAAATGGCA
H11-3	2801		2850
	TGAACGCTCG	TCAATTCGGT GCATTCGATA AAGCAATCGA	ACGAGCACAA
H11-3	2851		2900
	AATAGGGTGG	ATTGGATTAA AAAACATTTC CAAAAATTAG	CGGCTTTCTT
H11-3	2901	2919	
	CAAGAAAGCC	ACCTTGTA	

Obr. 3 (pokračovanie)

12/44

H11-2	GGTTTAATT	CCCAAGTTTG	AGATGACGGC	GGAGTGGCAG	AAGCGTCGAA	50
H11-2	TCTTGGGCTT	CTCACCTATC	AGCCTACTTT	GTACATTATT	TGTATTAGCT	100
H11-2	GCTGCCGTTG	GACTCTCCAT	TGGTCTTACC	TATTACTTCA	CTCGTAAAGC	150
H11-2	ATTGATACC	ACACAAAAAG	AACAGAAGGA	TGACAGTGGT	GGTAAAGAAA	200
H11-2	AGGATAATTC	TCCTTCTGCA	GAAGAACTAC	TTCTTCCAAC	GAACATAAAA	250
H11-2	CCAGTCTCGT	ACGACTTGAA	CATCAAAACA	TATCTACCGG	GTTACGTGAA	300
H11-2	CTTTCCACCA	GAAAAGAATC	TCACATTTGA	TGCCCATGTG	GAGATTGCTA	350
H11-2	TGGTTGTGGT	TGAGCCTACA	AATAGTATTG	TGCTGAACTC	GAAGAAAATC	400
H11-2	ACTTTGGCAC	AAGGAGGATG	CGAACTGTTC	TCAGGTAATC	AGAAACTTGA	450
H11-2	CATCGAAAGT	GTAAAGATGC	AGGAAAGACT	TGACAAGCTT	GAGATTACCC	500
H11-2	TCAAAAATCA	GCTGCAAAAA	GATCTGAAAA	TCCTGCTCAA	GATCACTTAC	550
H11-2	ACCGGCCTTA	TTAGCGACAC	TCTCGGTGGG	CTCTACCAGT	CCATCTACAC	600
H11-2	TGATAAGGAC	GGAAAAACTA	AGATCGTTGC	TGTTTCACAA	AATGAACCAT	650
H11-2	CAGACGCTCG	TCGTATAGCG	CCATGCTTTG	ACGAACCGAA	GTACAAGGCA	700
H11-2	ACATGGACTG	TCACCGTCGT	TCATCCCAAA	GGTACAAAGG	CTGCATCGAA	750
H11-2	CGGCATTGAA	GCAAATGGAA	AAGGGGAGCT	CAAGGGTGAT	TGGATAACGT	800
H11-2	CTAAATTTAA	AACTACCCCA	CCGATGTCGT	CCTATTTATT	GGCTATTATT	850
H11-2	GTTTGTGAAT	TTGAATACAT	TGAAGGATTT	ACAAAAACGG	GTGTTCGGTT	900
H11-2	CCGTATATGG	TCTCGACCAG	AGGCGAAACG	AATGACGGCA	TACGCTTTGG	950
H11-2	ATGCTGGCAT	CAGATGCCTG	GAGTTCTATG	AGAAGTTCTT	TGACATAAAA	1000
H11-2	TTCCCTCTGG	AAAAACAAGA	TATGATTGCT	CTTCCTGATT	TCACCGCTGG	1050
H11-2	TGCCATGGAA	AACTGGGGCC	TTATCACTTA	TAGAGAGGAT	TCTCTCCTAT	1100
H11-2	ACGATGAAAA	AATTTATGCA	CCGATGAATA	AACAGCGGGT	TGCTCTCGTA	1150
H11-2	GTTGCTCAG	AGCTTGCTCA	TCAGTGGTTC	GGCAATCTGG	TCACACTGAA	1200
H11-2	GTGGTGGGAT	GATACGTGGT	TGAACGAAGG	TTTTGCAACA	TTTGTTGAGT	1250
H11-2	ATCTTGGAAT	GGACGAAATT	AGCCAACAACA	ATTTCAGAAC	GCAAGATTTT	1300
H11-2	TTCTTGCTCG	ATGGAATGGA	TCGCGGAATG	AGAGCTGACT	CGGCAGCATC	1350
H11-2	GAGCCATCCG	CTTTCGTTTA	GGATTGACAA	ACCGGCAGAA	GTTGCCGAAG	1400
H11-2	CCTTTGACGA	TATTTTCATAC	GCCAAGGGAG	CGTCAGTTCT	CACTATGCTA	1450

13/44

H11-2 CGGGCTTTGA TTGGAGAGGA CAAATTACAGG AATGCTGTTG TGCAATACCT 1500
 H11-2 CAAGAAGTTC TCCTACAGCA ATGCACAAGC AGCCGATCTG TGGAACGTCT 1550
 H11-2 TCAATGAAGT TGTCAAAGGT GTTAAGGGTC CTGACGCCAA CGTCATGAAA 1600
 H11-2 ATCGACCAAT TTACCGATCA GTGGACGTAT CAGATGGGTT ATCCTGTGGT 1650
 H11-2 TAAAGTAGAA GAATTTAATG CGACCGCCCT AAAGGTTACG CAGAGCCGGT 1700
 H11-2 ACAAGACAAA TAAAGACGCC TTGGAACCAG AGAAATATCG TAATCCAAAA 1750
 H11-2 TACGGGTTCA AGTGGGATGT TCCCCTATGG TATCAGGAAG GCAATAGCAA 1800
 H11-2 AGAGGTGAAG CGAACATGGC TAAAAAGAGA TGAACCGCTG TACTTGAACG 1850
 H11-2 TCAACAATCG GGATACATCC CTTGTGGTGA ACGCTGATCG ACATGGATTT 1900
 H11-2 TATCGACAAA ACTATGATGC CAACGGTTGG AAAAAGATAA TCAAGCAGCT 1950
 H11-2 CAAGAAAGAT CACAAGGTCT TCGGTCCAAG GACAAGGAAC GCTATCATAA 2000
 H11-2 GCGATGCATT TGCTGCAGCT ACGATTGACG CAATCGACTA TGAAACTGTA 2050
 H11-2 TTCGAACTAC TTGAATATGC CAAAAATGAA GAGGAATTCT TGCCTTGGAA 2100
 H11-2 GGAAGCTCTG FCCGGCATGT TCGCAGTTTT AAAGTTCTTC GGTAATGAGC 2150
 H11-2 CGGAGACAAA ACCAGCTAGA GCTTACATGA TGAGCATATT AGAACCGATG 2200
 H11-2 TATAATAAGA GCAGCATTGA TTACATCGTC AAGAATTATT TGGATGATAC 2250
 H11-2 GTTATTCACA AAAATTAATA CTCAAAAGGA TATCATTGAT GCATATTGTT 2300
 H11-2 CCCTTGGATC AAAGGACTGT ATAAAGCAAT ATAAGGATAT CTTCTACGAT 2350
 H11-2 GAGGTTATGC CCAAGTGTA GGGCGGGGAA GCAGCAACCA AATGCGTTAA 2400
 H11-2 GGTTCCTCGCT CCTCTTCGAG CCAATGTTTA CTGTTATGGT GTACAGGAAG 2450
 H11-2 GTGGTGAAGA AGCTTTTGAA AAGGTGATGG GGCTGTATCT AGCAGAAGAT 2500
 H11-2 GTTCAACTGG AGAAGGGTAT CCTGTTCAAA GCCTTGGCAT GCCACAAAGA 2550
 H11-2 TGTTACAGCT CTAAAAGAAC TTCTTTTGGC AGCCCTGGAC CGTAAATCGT 2600
 H11-2 CGTTTGTGCG TCTTCAGGAT GTCCCTACCG CTTTCCGTGC TGTATCTGAA 2650
 B2
 H11-2 AACCCTGTGG GCGAAGAATT CATGTTCAAT TTCCTAATGG AGAGATGGGA 2700
 B2
 H11-2 GGAAATCACT GCGAGCTTGG AAACAGAACA CAGAGCAGTT GATAAAGTGG 2750
 B2
 H11-2 TCGGCGCTTG TTGCACAGGA ATTCGCTCCC AACAACAAAT AGATCAGCTG 2800
 B2
 H11-2 AAGAAGAATC TACAGAAGAA CAATGCGCAG CCTAAGAAGT TC..... 154

14 / 44

H11-2	AAGAA...TC	TACAGAAGAA	CAATGCGCAG	GCTAAGAAGT	TCGGCTCATT	2850
B2			CATAA	AATTGCCTGG	ATCAAGAAAC	204
H11-2	CACCCAGGAA	ATCGAAAAAG	GAGAACATAA	AATTGCCTGG	ATCAAGAAAC	2900
B2	ATTTTCACAG	ATTATCGGAA	TTCTTCAAGA	GAGCAAGATC	ATAGCTTTTC	
H11-2	ATTTTCACAG	ATTATCGGAA	TTCTTCAAGA	GAGCAAGATC	ATAGCTTTTC	2950
B2	ACACTGAGCT	CCAATTTTAA	CGTCTTCAAA	CTAGGAGACA	GTTTTGCTGA	
H11-2	ACACTGAGCT	CCAATTTTAA	CGTCTTCAAA	CTAGGAGACA	GTTTTGCTGA	3000
B2	AAAGTCAGTT	TCACATTTTC	CGTTTGAATG	CCATCCATTG	GAATACAACC	
H11-2	AAAGTCAGTT	TCACATTTTC	CGTTTGAATG	CCATCCATTG	GAATACAACC	3050
B2	AA...CCCCA	TTTTAAGTAC	CTTTCATTCA	CAGTGATTAC	TAAATTTTCGA	
H11-2	AATAATACCA	TTTTAAGTAC	CTTTCATTCA	CAGTGATTAC	TGAATTTTCGA	3100
B2	ATATATTATG	AAGCTTGTAT	CTTGAACGTT	ATGATCGGTG	ACTTTCAATT	
H11-2	ATATATCATG	AAGCTTGTAT	CTTGAACGTT	ATGATCGGTG	ACTTTCAATT	3150
B2	TATAGAGCTC	ACTCTCCATT	TTGTAGCTGT	GATGACTTGC	ATTTAAGACC	
H11-2	TATAGAGCTC	ACTCTCCATT	TTGTAGCTGT	GATGACTTGC	ATTTAAGACC	3200
B2	CACCATTTAC	CAGCCTATAA	TCTTTCCCCA	ATACATTCCA	AACTCCGATC	
H11-2	CACCATTTAC	CAGCCTAGAA	TCTTTCCCCA	ATACATTCCA	AACTCCGATC	3250
B2	ACCTCCACCG	CTGACAATGC	CCAGATTTGT	TTCTTTGTCT	GCTATCCATC	
H11-2	ACCTCCACCG	CTGACAATGC	CCAGATTTGT	TTTTTTGTCT	GCTATCCATC	3300
B2	TAACTGTTTC	GAT				
H11-2	TAACTGTTTC	GATCGCCGGT	TGTTTGTCAA	TTGCTTATCT	GATAAATATT	3350
H11-2	GACGTTGGTG	T				3361

Obr. 4 (pokračovanie)

15/44

H11-1 1 GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGG 50
 H11-1 51 AGACGCAGCA ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCCAATCAAG 100
 H11-1 101 TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT GGTAGCTGCT GCCGTGGGCC TCTCAATCGG 150
 H11-1 151 TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT TGATACTACT GGC GGAAATG 200
 H11-1 201 GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGATGATA ATTCCCCATC AGCTGAAGAA 250
 H11-1 251 TTACGTCTCC CAACAACCAT AAAACCTTTG ACATACGACT TAGTAATCAA 300
 H11-1 301 AACGTATCTG CCAAACCTATG TAAACTATCC ACCTGAGAAA GATTTTCGCTA 350
 H11-1 351 TTGATGGGAC TGTGGTGATT GCTATGGAAG TTGTGGAGCC AACAAAGTCT 400
 H11-1 401 ATTGTGCTCA ACTCGAAAAA TATTCCTGTA ATTGCAGACC AGTGCGAACT 450
 H11-1 451 GTTTTCTAAC AACCAAAAAC TCGACATCGA AAAGGTTGTG GATCAGCCAA 500
 H11-1 501 GGCTGGAGAA AGTCGAATTC GTTTTGAAGA AAAAGCTGGA GAAGAATCAG 550
 H11-1 551 AAAATCACGC TCAAGATTGT ATACATTGGC CTTATCAACG ACATGCTTGG 600
 H11-1 601 AGGACTTTAT CGAACAACCT ACACGGATAA AGATGGTACA ACCAAGATTG 650
 H11-1 651 CTGCATGCAC TCATATGGAA CCGACGGACG CCCGTCTTAT GGTCCCCTGT 700
 H11-1 701 TTGACGAGC CGACGTTTAA GGCAAACCTG ACTGTGACTG TGATTCATCC 750
 H11-1 751 GAAGGGCACC AGTGCCGTGT CGAATGGAAT AGAAAAGGGA GAAGGAGAAG 800
 H11-1 801 TCTCTGGCGA TTGGGTCACA ACCAGATTCG ATCCAACCCC GCGAATGCCT 850
 H11-1 851 TCGTATTTGA TTGCTCTTGT GATTTCGAA TTAAAGTACA TTGAAAATTA 900
 AustBl 901 AATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA 950
 H11-1 TACGAAAAGC GGTGTTTCGAT TCCGAATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA

16/44

	951		1000
AustB1	AGATGACAGA ATATGCCATG ATAGCTGGAA TCAAATGTTT GGATTACTAT		
H11-1	AGATGACAGA ATATGCCATG ATAGCTGGAA TCAAATGTTT GGATTACTAT		
	1001		1050
AustB1	GAGGACTTCT TCGGGATCAA ATTCCCACTT CCAAACAAG ATATGGTTGC		
H11-1	GAGGACTTCT TCGGGATCAA ATTCCCACTT CCAAACAAG ATATGGTTGC		
	1051		1100
AustB1	TCTTCCTGAC TTCTCATCTG GTGCTATGGA GAACTGGGGT CTCATCACAT		
H11-1	TCTTCCTGAC TTCTCATCTG GTGCTATGGA GAACTGGGGT CTCATCACAT		
	1101		1150
AustB1	ACAGGGAGGG TTCCGTGCTC TACGATGAAA ACCTCTACGG ACCAATGAAT		
H11-1	ACAGGGAGGG TTCCGTGCTC TACGATGAAA ACCTCTACGG ACCAATGAAT		
	1151		1200
AustB1	AAGGAGCGGG TTGCAGAAGT GATCGCGCAC GAACTTGAC ATCAGTGGTT		
H11-1	AAGGAGCGGG TTGCAGAAGT GATCGCGCAC GAACTTGAC ATCAGTGGTT		
	1201		1250
AustB1	CGGTAATTTG GTCACGATGA AGTGGTGGGA TAACCTATGG CTGAACGAAG		
H11-1	CGGTAATTTG GTCACGATGA AGTGGTGGGA TAACCTATGG CTGAACGAAG		
	1251		1300
AustB1	GATTGCGGTC ATTCTGTTGAA TACATCGGAG CCGACTTCAT CAGCGATGGT		
H11-1	GATTGCGGTC ATTCTGTTGAA TACATCGGAG CCGACTTCAT CAGCGATGGT		
	1301		1350
AustB1	CTATGGGAAA TGAAAGATTT CTTCCTGCTG GCACCGTACA CAAGTGGTAT		
H11-1	CTATGGGAAA TGAAAGATTT CTTCCTGCTG GCACCGTACA CAAGTGGTAT		
	1351		1400
AustB1	TACGGCTGAT GCAGTAGCTT CAAGCCATCC GCTTTCCTTC AGAATAGATA		
H11-1	TACGGCTGAT GCAGTAGCTT CAAGCCATCC GCTTTCCTTC AGAATAGATA		
	1401		1450
AustB1	AGGCTGCAGA TGTATCAGAA GCGTTCGATG ATATCACATA CCGTAAAGGA		
H11-1	AGGCTGCAGA TGTATCAGAA GCGTTCGATG ATATCACATA CCGTAAAGGA		
	1451		1500
AustB1	GCATCCGTTT TTCAAATGCT ATTGAATTTA GTTGGGGACG AAAATTTCAA		
H11-1	GCATCCGTTT TTCAAATGCT ATTGAATTTA GTTGGGGACG AAAATTTCAA		
	1501		1550
AustB1	GCAGTCTGTT TCGCGTTACC TCAAGAAGTT TTCATATGAT AATGCGGCTG		
H11-1	GCAGTCTGTT TCGCGTTACC TCAAGAAGTT TTCATATGAT AATGCGGCTG		
	1551		1600
AustB1	CTGAAGATTT ATGGGCAGCA TTCGACGAAA CCGTCCAAGG TATAACCGGA		
H11-1	CTGAAGATTT ATGGGCAGCA TTCGACGAAA CCGTCCAAGG TATAACCGGA		
	1601		1650
AustB1	CCTAATGGTG GACCATTGAA AATGTCCGAG TTTGCGCCAC AATGGACAAC		
H11-1	CCTAATGGTG GACCATTGAA AATGTCCGAG TTTGCGCCAC AATGGACAAC		
	1651		1700
AustB1	TCAGATGGGG TTCCCTGCTC TTAATGTCCA GTCGGTTAAC GCAACGACTT		

17/44

H11-1 TCAGATGGCG TTCCCTGTTT TTA CTGTGCA GTCCGTTAAC GCAACGACTT
 1701 1750
 AustB1 TGAAGATCAC CCAAAAACGA TACAGGCAGA ACAAGGATGC AAAGGAACCA
 H11-1 TGAAGATCAC CCAAAAACGA TACAGGCAGA ACAAGGATGC AAAGGAACCA
 1751 1800
 AustB1 GAGAA GTACC GTCATCCAAC TTATGGGTTT AAATGGGATG TTCCTCTGTG
 H11-1 GAGAA GTACC GTCATCCAAC TTATGGGTTT AAATGGGATG TTCCTCTGTG
 1801 1850
 AustB1 GTATCAGGAA GATGAACAGC AAGTGAAAAG AACTTGGTTA AAAAGAGAGG
 H11-1 GTATCAGGAA GATGAACAGC AAGTGAAAAG AACTTGGTTA AAAAGAGAGG
 1851 1900
 AustB1 AACC GCTCTA TTTCCATGTA AGCAATTCTG ATTCGTCAGT TGTGGTGAAT
 H11-1 AACC GCTCTA TTTCCATGTA AGCAATTCTG ATTCGTCAGT TGTGGTGAAT
 1901 1950
 AustB1 GCCGAACGTC GTGCTTTTTG CCGATCAAAC TATGACGCTA ACGGTTGGAG
 H11-1 GCCGAACGTC GTGCTTTTTG CCGATCAAAC TATGACGCTA ACGGTTGGAG
 1951 2000
 AustB1 GAACATTATG AGAAGACTCA AGCAGAATCA TAAGGTCTAT GGTCCACGAA
 H11-1 GAACATTATG AGAAGACTCA AGCAGAATCA TAAGGTCTAT GGTCCACGAA
 2001 2050
 AustB1 CAAGAAACGC TCTCATAAGT GATGCGTTTG CAGCAGCTGC AGTTGAGGAA
 H11-1 CAAGAAACGC TCTCATAAGT GATGCGTTTG CAGCAGCTGC AGTTGAGGAA
 2051 2100
 AustB1 ATGAATTACG AGACCGTATT TGAAATGCTC AAATACACCG TGAAAGAAGA
 H11-1 ATGAATTACG AGACCGTATT TGAAATGCTC AAATACACCG TGAAAGAAGA
 2101 2150
 AustB1 GGATTACTTA CCATGGAAGG AGGCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG
 Bla GCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG
 H11-1 GGATTACTTA CCATGGAAGG AGGCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG
 2151 2200
 AustB1 ACTTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA
 Bla ACTTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA
 H11-1 ACTTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA
 2201 2250
 AustB1 AAAC TGATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA
 Bla AAAC TGATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA
 H11-1 AAAC TGATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA
 2251 2300
 AustB1 GAACTACAAA AAAGATTCCG TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG
 Bla GAACTACAAA AAAGATTCCG TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG
 H11-1 GAACTACAAA AAAGATTCCG TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG
 2301 2350
 AustB1 TTATTGACAC ATACTGTGCT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG
 Bla TTATTGACAC ATACTGTGCT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG
 H11-1 TTATTGACAC ATACTGTGCT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG

18/44

	2351		2400
AustBl	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA GGTCAATGAAA TGTCAACCTG	GTCAGCAAGC
Bla	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA GGTCAATGAAA TGTCAACCTG	GTCAGCAAGC
H11-1	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA GGTCAATGAAA TGTCAACCTG	GTCAGCAAGC
	2401		2450
AustBl	GACCGACTGC	GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT	GTTTACTGCT
Bla	GACCGACTGC	GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT	GTTTACTGCT
H11-1	GACCGACTGC	GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT	GTTTACTGCT
	2451		2500
AustBl	ATGGGGTCCA	GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT	GATGGAACATA
Bla	ATGGGGTCCA	GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT	GATGGAACATA
H11-1	ATGGGGTCCA	GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT	GATGGAACATA
	2501		2550
AustBl	TATAATGCGG	AACAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC	GTGAAGCATT
Bla	TATAATGCGG	AACAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC	GTGAAGCATT
H11-1	TATAATGCGG	AACAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC	GTGAAGCATT
	2551		2600
AustBl	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT	ATGCTGGCTT
Bla	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT	ATGCTGGCTT
H11-1	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT	ATGCTGGCTT
	2601		2650
AustBl	TGGATCGGAA	TTC	
Bla	TGGATC		
H11-1	TGGATCGGAA	TTCGTCATTT GTGCGTCTTC AAGATGCTCA	TGATGTGTTT
	2651		2700
H11-1	AACATTGTAT	CCAGAAATCC TGTGGAAGAC GAACTGCTGT	TCAATTTCTT
	2701		2750
H11-1	CACAGAGCGA	TGGGAAGAGA TACTTGAAAG TTTGTCAATA	CGACACAGAT
	2751		2800
H11-1	CAGTTGATCG	AGTGATCAAA GCCTGTACTC GAGGACTACG	ATCCAGGGAA
	2801		2850
H11-1	CAAGTACAAC	AGTTGAAGAA TCTATACAAA AATGACAAGC	GTGCTCGCGA
	2851		2900
H11-1	ATACGGTGCA	TTTGGTGGGG CAATAGAAAG ATCGGAACAC	AGAGTCAAAT
	2901		2950
H11-1	GGATTGAGAA	ACATTTCCGA AAACATAGCAG CTTTCTTCAA	AAAATCTAAT
	2951		3000
H11-1	TCATAATTCT	GAAATGGCTA TAACTAGCAC ACTGGATAGT	TGTCTCGAAT
	3001		3050
H11-1	CATCCAAAAA	GATTAATGAT GTTTTTTTAC TAGATAATAT	CGAGATATTC
	3051		3084
H11-1	TGTAAATTTG	TCATCGATTC AAGTGTCTGT	ATTG

[illegible]

20/44

M11-3
 R21-12m
 WISOCRTJRLNLTPIRLI VALCULVAAVCLSI CLITTYTIRKAFDTSIXK-----PCXODDGGCKDKEHSPSAEL
 -----UAKCFYISKILCLICILCULVAAVCLSI ALSVVYADCKHRNAE NSAIAPILPGSTSAIISITIMPAIDISKPDHGT

 M11-3
 R21-12m
 LEP SNIKPLSTDLITITLPGTVDFPPELKNML-TIFOGRVCEISMYVILPFXSYLMHSMXKISVIPOLCCLV-----SCCKLE
 RLPKTLIPDSYQVJLRPLYL-----PNEOGLYIFKGSSTVRFICNEITINVIJHSMKXLYINXGNHRVYALRALCD:3AP:

 M11-3
 R21-12m
 ICSYKCMPIRLICMYCFLLXSOLCKXDOOQILLLKXVGYICLISNCFGCGLYIRSEYME-CLNKKYVVAITIOQAAADAPKSLIPGFI:2PA:
 IDITELVLRITZTLVYVHLQCSLVKXCHQYCHDSEFOCLELADDLAOFYIRSEYME-CLNKKYVVAITIOQAAADAPKSLIPGFI:2PA:

 M11-3
 R21-12m
 YKA NMTVTHTPFGCTKAVSNGLCVNGDG-ELSGOMITSKFLITPRMSISYLLAVMVSEFCTICGCTKTCVRFRITXSRP:CAK
 VCA SFNITLILKPNHLTALSWMPLKDSRTLOCPSMHYTCFHPITPKMSITYLLAYIVSEFKYVYLA VSPNRVORIMXARPSLI

 M11-3
 R21-12m
 KM--TOTYALQSGIKCILEFYCOFFDIFRFPKXQOMIALPOTJACAMENWGLITYRNSTLYODRFTYAPWKKORIMARI VAME
 OCHGOLYALQVTCPLLNLFYAOHTNTATPLLEKSDQIALPDMACAHENWGLVITYRSALYVFOPOSSSISNKKERBYVTVILME

 M11-3
 R21-12m
 LAHQWFGOLVYHXMWMDNLWLNEGFARFTEFI CAGQITODDARMRNYFLIDVLEALKADSVASSHPLSIR--IOKA:V
 LANQWFGOLVYHXMWMDNLWLNEGFAS YVEFLCA-DYAEPTWHLKDLVLNDVYTRVMAYVDAALASSHPLSSPANCVHTPAOI

 M11-3
 R21-12m
 LCAFDITTSKCAASYLRULRALICCEKHKHAYVSOYTKXFISSSHAEATOLMAYFOEYVITDVECPDCKPWXKTI:CAK
 SCLFOSITTSKCAASYLRULRALICCEKHKHAYVSOYTKXFISSSHAEATOLMAYFOEYVITDVECPDCKPWXKTI:CAK

 M11-3
 R21-12m
 WCFPVYSYAEFHSITLKLITQSRYEANKDQAVCKEYRHPKYGCFKMOIPLMTQEGDCKEIXRTWLRDCEPLYLHVSDACAPF
 WCFPVYSYAEFHSITLKLITQSRYEANKDQAVCKEYRHPKYGCFKMOIPLMTQEGDCKEIXRTWLRDCEPLYLHVSDACAPF

 M11-3
 R21-12m
 VYMAOR YCFTRQMHOMAMCMKKIILKOLKONHCEVYSPRTRHVTITSDAFIAAATDAL EYETVFE LLYH YACKEITETLP:CAK
 LLMNMYTGTTOVWYDLENNWARKIQNQLQTDL SVIPYINRAOITHDSTHNLASACKLSITLPLSHTLFLASEITETLP:CAK

 M11-3
 R21-12m
 CISSILXYTPTPCAXPAOTIMHNLIXPHYKSSSTDFIANNYRNDKTLFQIHLQKDVITDMFCALQSDOCCRAXKXKXLFODL
 SLNHYKLVFDRSCYTCPLMKRULKXQVITPLFYFRIKITHNWLORPPTLWCEQYH-ELMALISTACSSGLCECR-----DCL

 M11-3
 R21-12m
 YHNCROGOAATCEVRIIAPCRSVYCYGV--KELGODYASDQVWELYTAEITLALCKOIFLRILALGCHKDVITALXGLLRA
 YVCLYSOMMNSONNPLHPMLRSITVYCHAIASCCEAWFAWATVPE-----RITLVMEADKLRSAVGRSNELVWILNRYLSTI

 M11-3
 R21-12m
 LORHSSCYAMWODLPSAFNDVYANVYVCGQILVWDFYRSHWKKLFDYGOOSFSFANLIDOOVITRRFSSSEFELQQLCOI:KMLCH
 LORHSSCYAMWODLPSAFNDVYANVYVCGQILVWDFYRSHWKKLFDYGOOSFSFANLIDOOVITRRFSSSEFELQQLCOI:KMLCH

 M11-3
 R21-12m
 NAROFGL--TALQXALERQALCKTRANI KMWVXKHXFOKLAAPXKATL--
 NAROFGL--TALQXALERQALCKTRANI KMWVXKHXFOKLAAPXKATL--

Obr. 6bI

22/44

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 HTAESEOEETQOPRCHTVLRTPIKGLFALLVVAAAAGLSIOLTYYFTRKAFDTTOOHOKODQPIVDDNSPSAEELRLPTTIKPLTYDLVIKTYLPHYV
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 NYPRXDFAIIDOTVVIAMENVETK3IVLNSXNIPIVIADQCELF3NHQKIDIEKVVDPRLKVEFVLKXGKLEKIQKITIKIYIOLINDMLGGLYRTTY
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TDKGGTTKIAACTHMEPTDARLMVPCFDEPTFKAJHTVTVIHPKOT3AV3HNGIEKOEGEV3ODHVTTRDPTPRMPSVLI3LVISEFKYIENYTK3OVRF
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 RIPARPEAGGOTTEYAHIAOIKCLDYEDFIOIKFPLPKQDHVALPDF39QAKENHOLITYREGSVLYDENLYOPMKERVAEVI3AH3ELAHQWTONLVTHX
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 WTONHLWLN3E0F3GFVEYIGADFI3DOLWEMKDFFL3APYT3OITADAV3SHPL3FRIDK3AADV3EAFDDITYRKO33VLQ3MLLH3LVODENFKQ3V3RYL
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 KXTPSYDN3AA3EDLW3AFDETVOOITOPHOOPLK3H3EFAPQHTTQMOFFVLTVESV3N3ATTLKVTQKRYRQ3NKDAKEPEKY3RJ3PTYO3FKYDV3PLHYQ3EDEQ3
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 VKR3TLKRE3PL3YFHV3H3SD33VV3N3A3ERR3AF3CR3SH3YDA3H3O3W3R3NI3H3R3RLK3QH3KV3O3P3TR3NAL3ISDA3AAA3VE3H3Y3ET3V3F3E3MLK3Y3TV3X3E3D3Y3L3PH3X3E
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 A3ISO3FNT3ILD3F3O3SE3PE3Q3H3A3SE3Y3MR3KL3MK3PI3YDK333IK3FI3A3ENT3Y3O3D33L3FF3K3NL3Q3IA3VID3TY3C3O3L3O3K3E3C3LE3H3K3L3FD3KE3V3H3K3Q3P3O3Q3AT3DC3VK3V3I
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 APL3R3XT3V3CY3O3VO3Q3E3O3DE3AF3DK3V3H3E3LY3H3A3EQ3V3Q3LE3KD33L3E3AL3O3CH3KD3VT3AL3K3O3LL3H3L3AL3DR3N33SV3FL3Q3DA3ID3V3H3IV3SR3NP3VO3H3ELL3FN3FL3TER3H3EE3I
 910 920 930 940 950 960 970
 LE3L3S3IR3H3RS3VDR3V3IK3ACT3R3OL3RS3RE3Q3V3O3QL3K3N3LY3O3JD3K3A3RE3Y3O3AF3O33I3ER3SE3H3RV3K3H3IE3KH3FR3K3LA3AF3FK3K3NS3*
 H3L3AL3DY3H3SX3FV

Pop. B

Pop. C

Obr. 7a

23/44

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
HTAEMOKRRILGFSPI9LLCTLFVLAAGVLSIOLTYFFTRKAFDTTQKEQDDSOOKEKDN9PSAEELLPTNPKPV9YDLNPKTYLPQVYVFPPEXHL
DN9PSAEELLPTNPKPV9YDLNPKTYLPQVYVFPPEXHL
SEQ ID NO: 16

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TFDAIVIAVAVVEPTN9IVLH9KXITLAQCOCELF9GHOXLDIESVHQERLDKLEITLKNQLQDKILLKITYTOLISDTLGGLYQ3IYTDKDGKTK
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
IVAVSQNEP9DARRIAPCFDEPKYKATHTVTVVHPKGTAA9NGIEANGKQELKODHITSKFKTTPPH9SYLLAIIVCFEYIEGFTKTQVRFRIH9RPE
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
AKRTAYALDAGIRCLEFYEXFFDIKFPLEKQDMIALPDTAOMENHQLITYREDSLLYDEKIYAPHNKQORVALVVAHELAIHQWFGNLVTLKNWDDOTHL
LAYDEKSYAPDNKQY
SEQ ID NO: 18

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
NEGFAFVYELQWDEI9HNNFRTQDFFLDGMGRHRA9S9HPLSFRIDKAAEVAAEFDDISYAKGASVLTMLRALIGEDNYRNAVYQYLYKXFSY9N
KAAEVAAEFDDISYAKGASVLTMLRALIGEDNYRNAVYQYLYKXFSY9N
Pep D

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
AQAADLWVNEVVKGVKCPDGHVXKIDQFTDQHTYQMGYPVVKVEEFNATALKVTQSRKYTKNDALPEKYRNPKYQFKVDVPLWYQONSKEVKRTWL
MOYFVVKVEEFNATAL
Pep A

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
KRDEPLYLVNIRDTSLVNVADRUGFYRQNYDANGWKKI1KQLKXDHKVFOPTRNAIISDAFAAATIDAIDYETVFELLEYAONEEFLLPWKEALSOMF
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
AVLXFTGNEPETKPARAYM9SILEPMYK9SIDYIVWGYLDDTLFTKINTQKDIIDAYCSLGSKDCIKQYKDIIFYDEVHFKCKAGEAATKCVKVSAPLRA

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
NMYCYGVQEGGEAEKVMGLYLAEDVQLEKGIILFKALACHKDVTKALXELLRALDRKSSVRLQDVPTAFRAVSEN9VQEEFNFILMERHWEITASLE
LYLAEDVQLEKGIILF
SEQ ID NO: 17

910 920 930 940 950 960 970
TEHRAVDKVVQACCTGIRSQQQIQQLGNLQ9NAQAQXQFSFTQEI9KEGHIKIAWIKCHIFHRLSEFFKPARS*
Obr. 7b

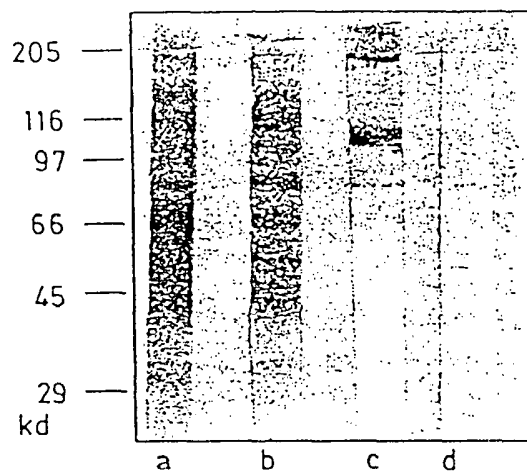
24/44

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 HT9QORRTLLHLTPIRLIVALFLVAAAVGLSIGLTYFFTRKAFDTSEKPKDDTOOKDHPSPAAELLPSNIKPLS9DLTIKTLYLPQYVDFPPEMIL
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TFGGRVEIGHVIEPTKSIVLN9KXI9VIPOECELV3ODKXLEIESVKEHPRLKVEFLIKSQLEKDKQQLLKVGVIOLISN9FGOIYQTTTTPDGTPK
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 IAAV9QHEPIDARRVPCHEDEPKYKJHTVTVIHPKGTKAV9NGIEVNGDOEISGDWITSKFLTPRMSSYLLAVMVSEFEYIEGETKTQVRFIRMSRPE
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 AJSOHTOVALQSGIKCIEFYEDFFDIRFPLKXQDMIALPDF9AGAHENHOLITYRENSLLYDDRFPYAPHKQRIARIIVAJHAIQHFCDLVTHKWTDLHLWL
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 NEQFARTEFIGAQITQDDARMRYFLIDVLERALKAD9VAS9HPLSFRIDKAAAEVEAFDDITYAKQASVLTHLRALICEEKHCHAVS9YLKXFSYSH
 |||||
 KAVEVAEAFDDITYXXOPS
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AEATDLHAAVFDEVVTDVEGPDGKPHKTTEFASQHTTQMOPFVIGVAEFN9TTLKLTQSRYEAKDAVEKEKYRHPKYOFKWDIPLWYQEOGXOEIKRTHL
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 RRDEPLYLHV9DACAPFVWNAADRYGFRQHDANOWKXI KQLKDNHEVY9PRTRNVIISDAFAAAATDAIEYETVTELLNYAEKETETVPLEIAH9SIS
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 SILKTFPTEPEAKPAQTYTGNILKPHYEKSSIOFIANNYRHDKLPFFQINLQBDVIDHFCALQ9QDCRKYTKCLFDDEVWVKCRDQQAATCVRIAAPLR9
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 SVYCYGKEGGDYASDKVMELYTAETLALEXDFLRALALOXHVDVTALXKOLLRALDRN9SFVRHQDIP9AFNDVAANPIGEEFIFNFIERHPDIIIESIO
 910 920 930 940 950 960 970
 TKHTYVEKVIIPACTSGIR9QQIDQLXCHLQKNGHARQFQAFDKAIERAQRVVDHINQHFQKLAFAFFKXATL

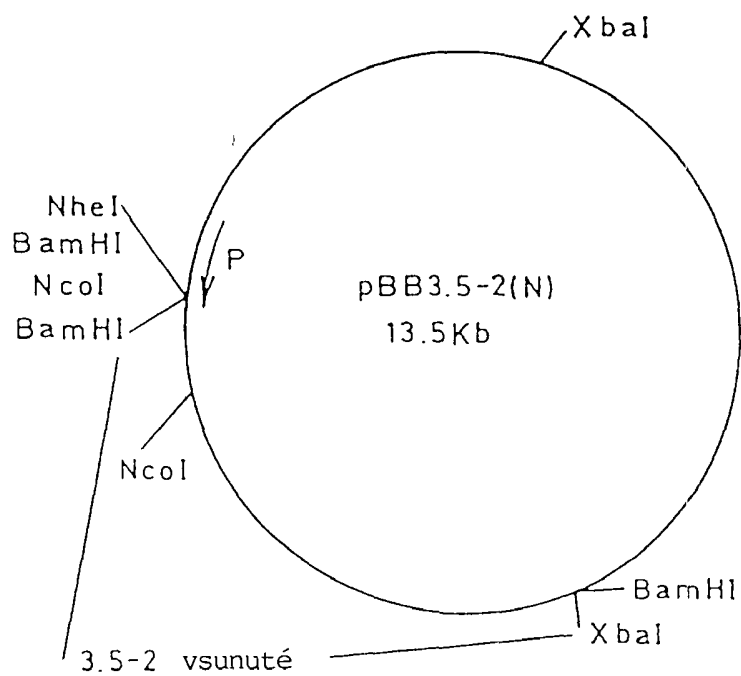
PeP E

Obr. 7c

25/44



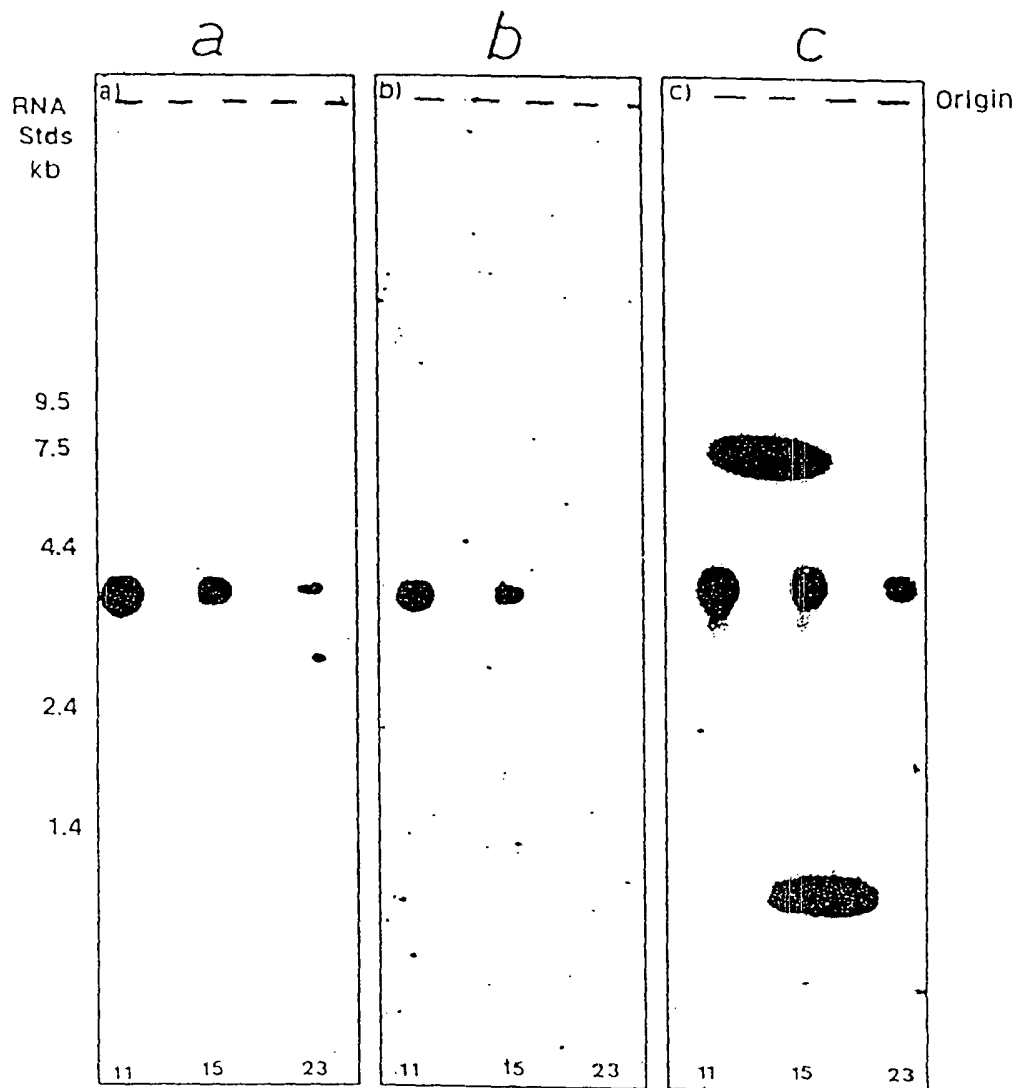
Obr. 8



P - polyhedrinový promótor

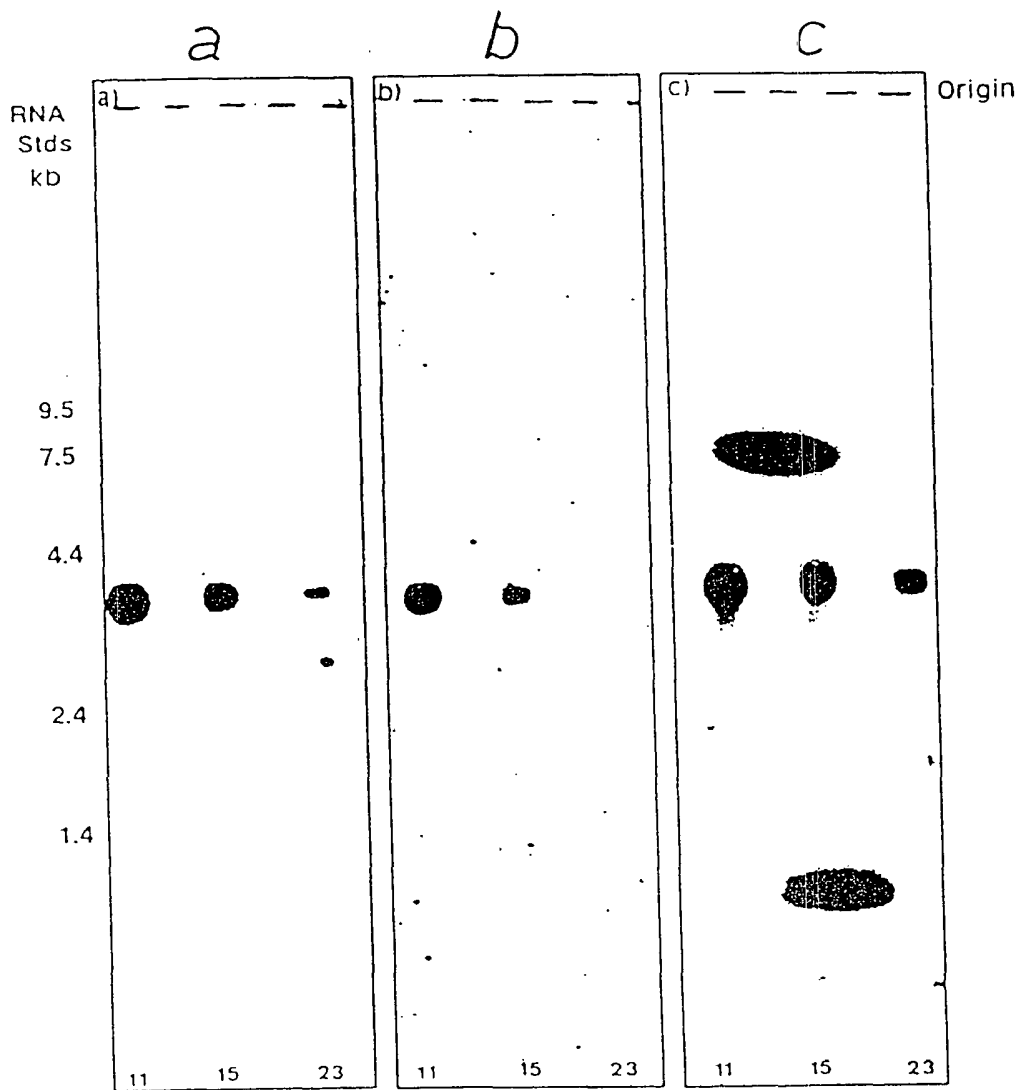
Obr. 20

26/44

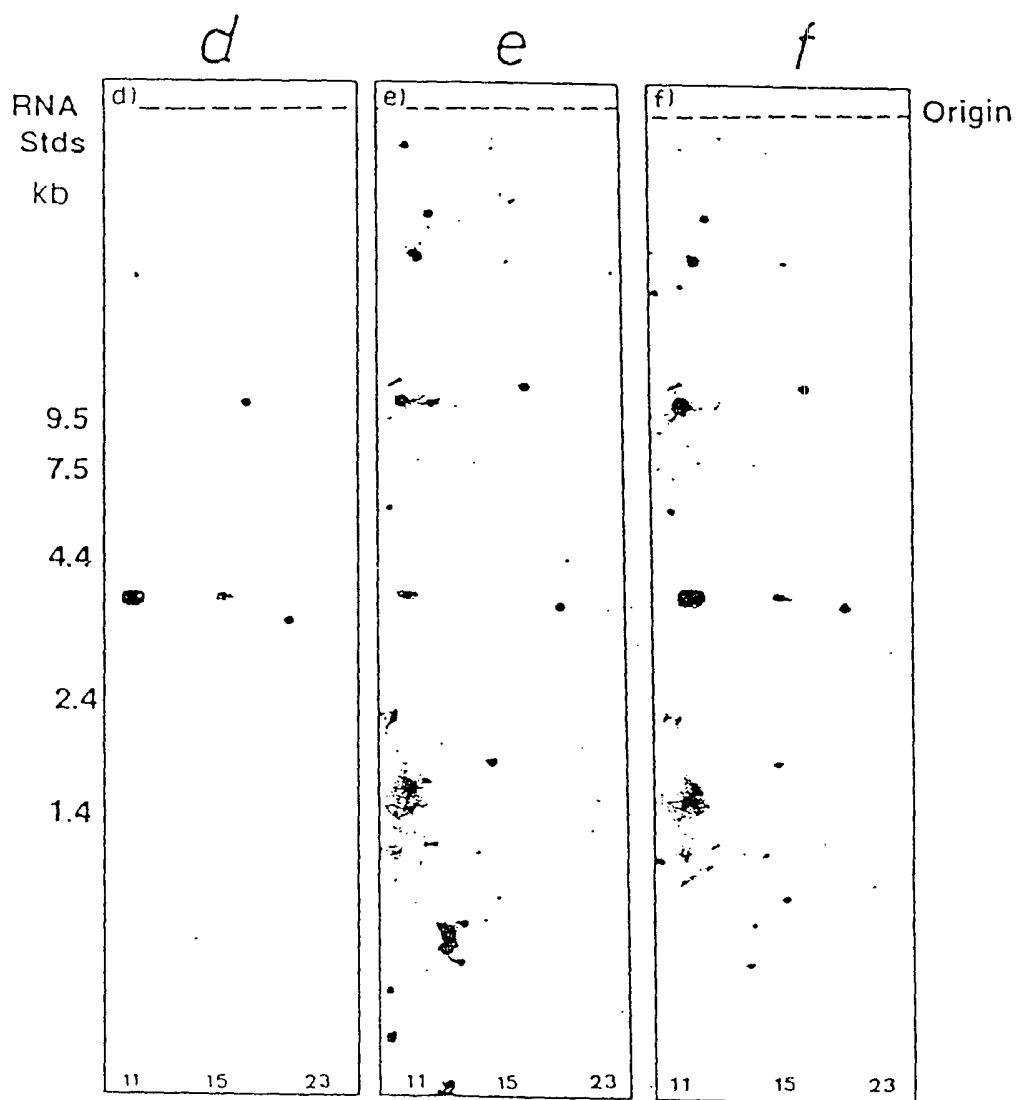


Obr. 9

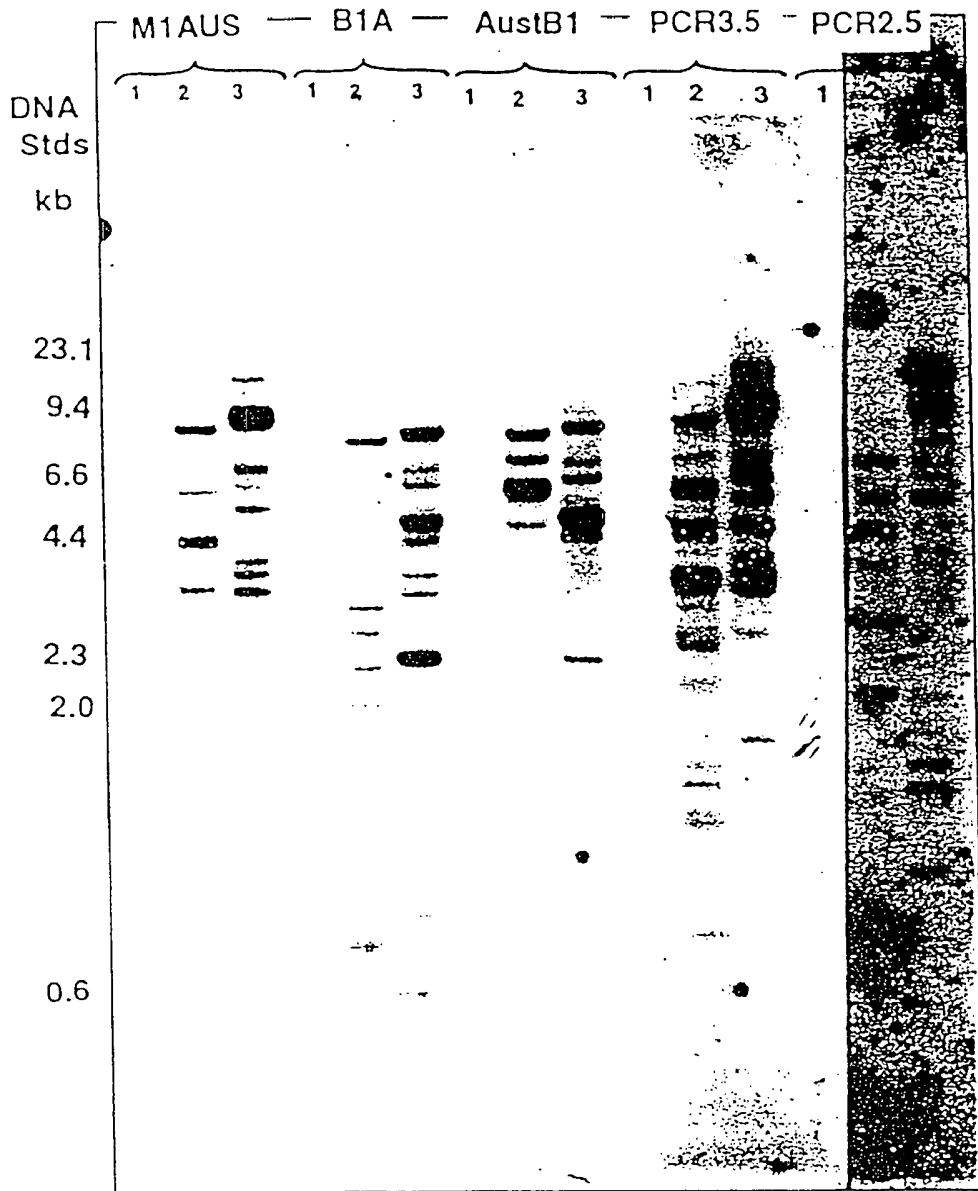
27/44



28/44

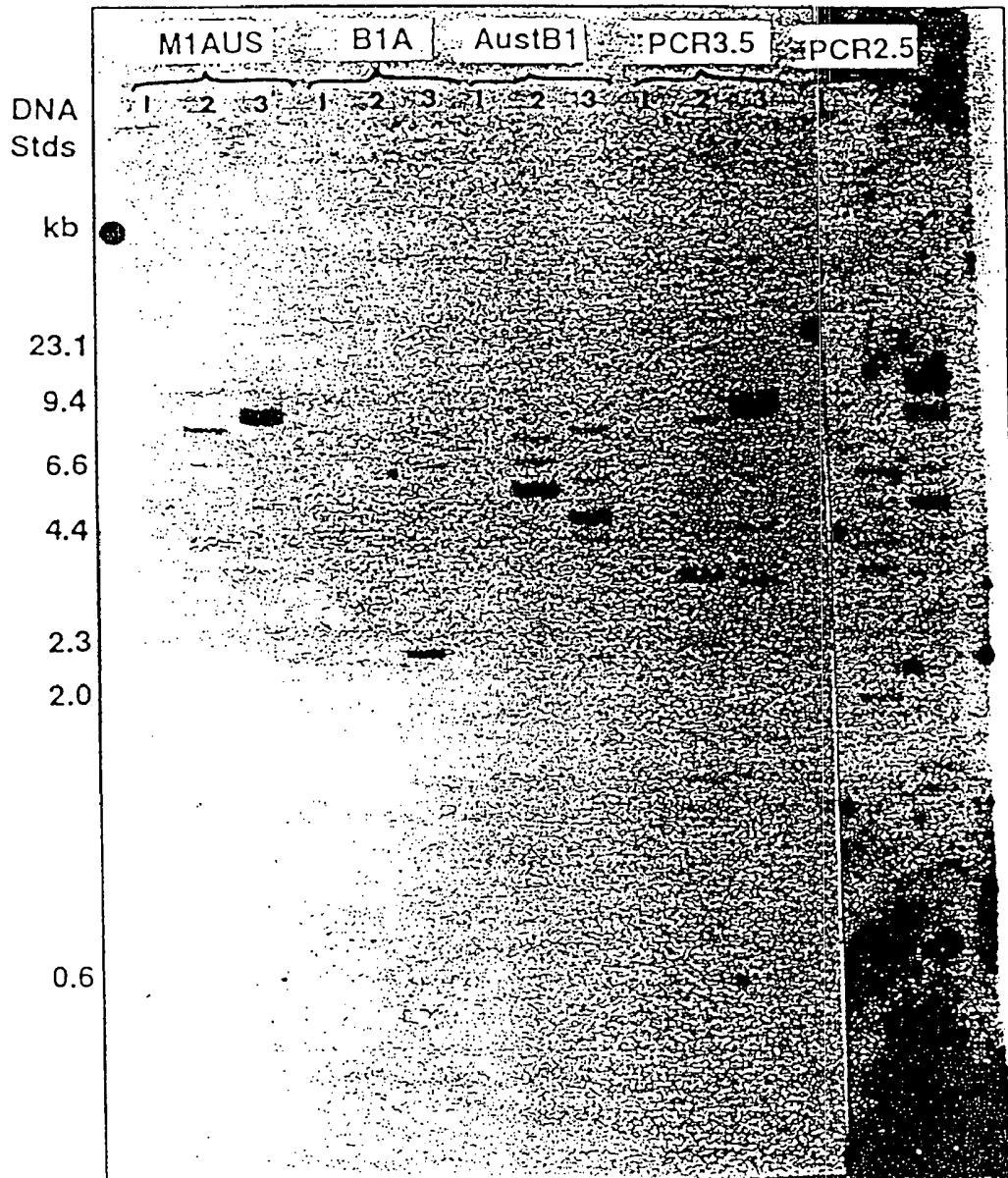


29/44



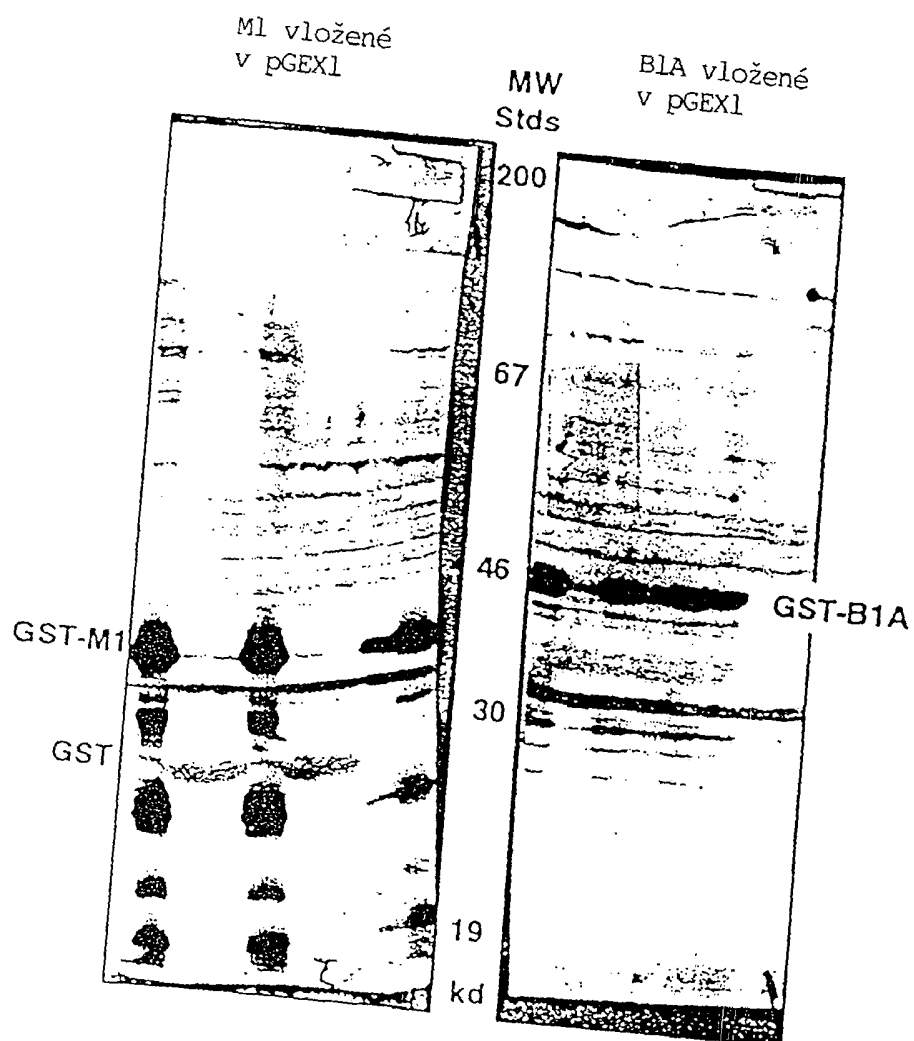
Obr. 10a

30/44



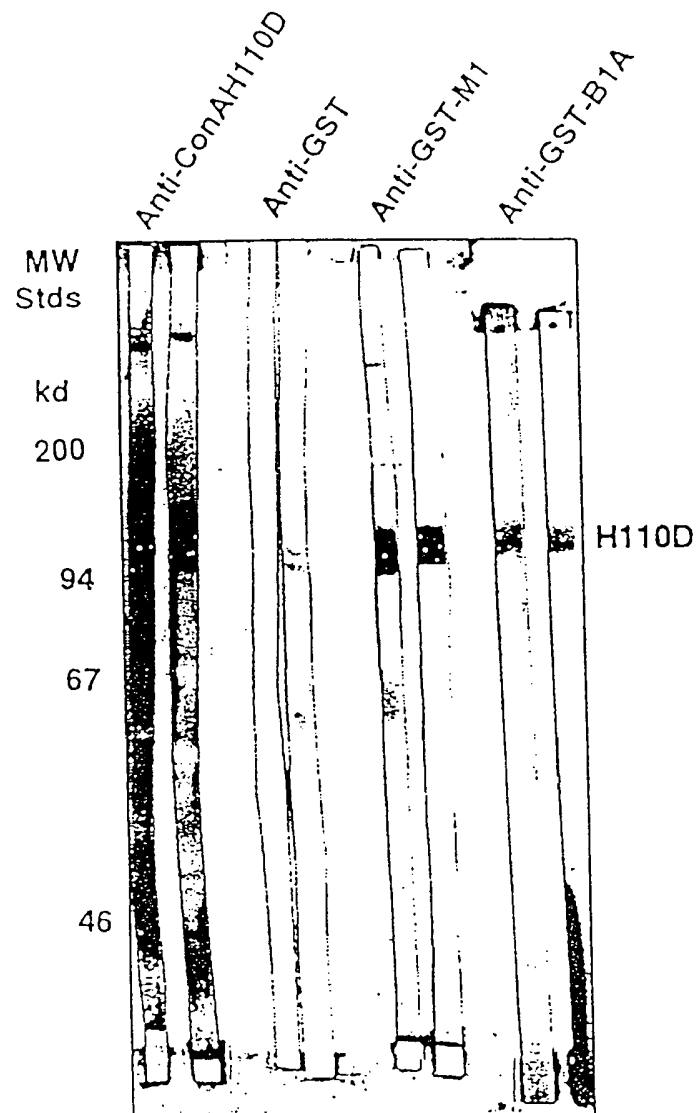
Obr. 10b

31/44



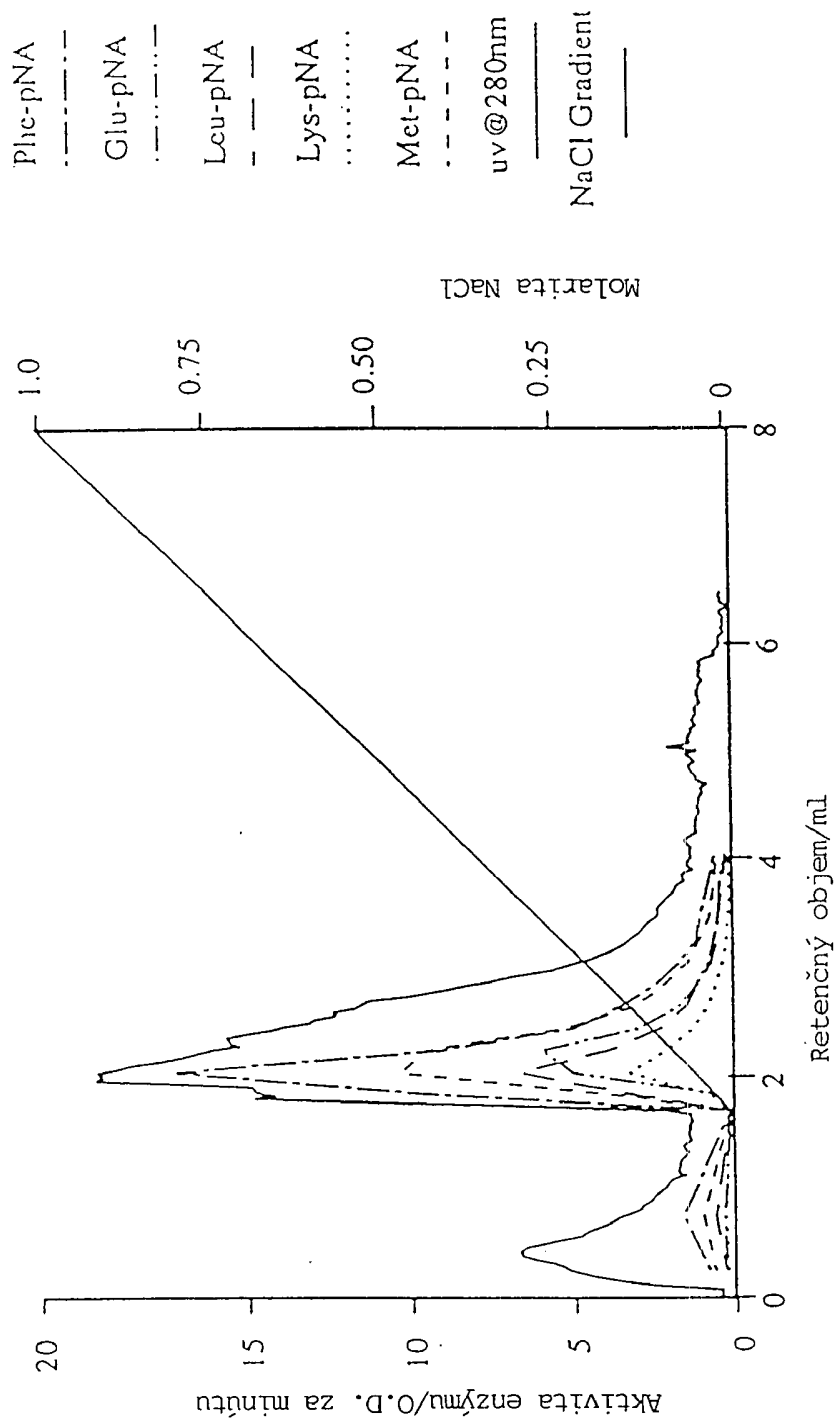
Obr. 11

32/44



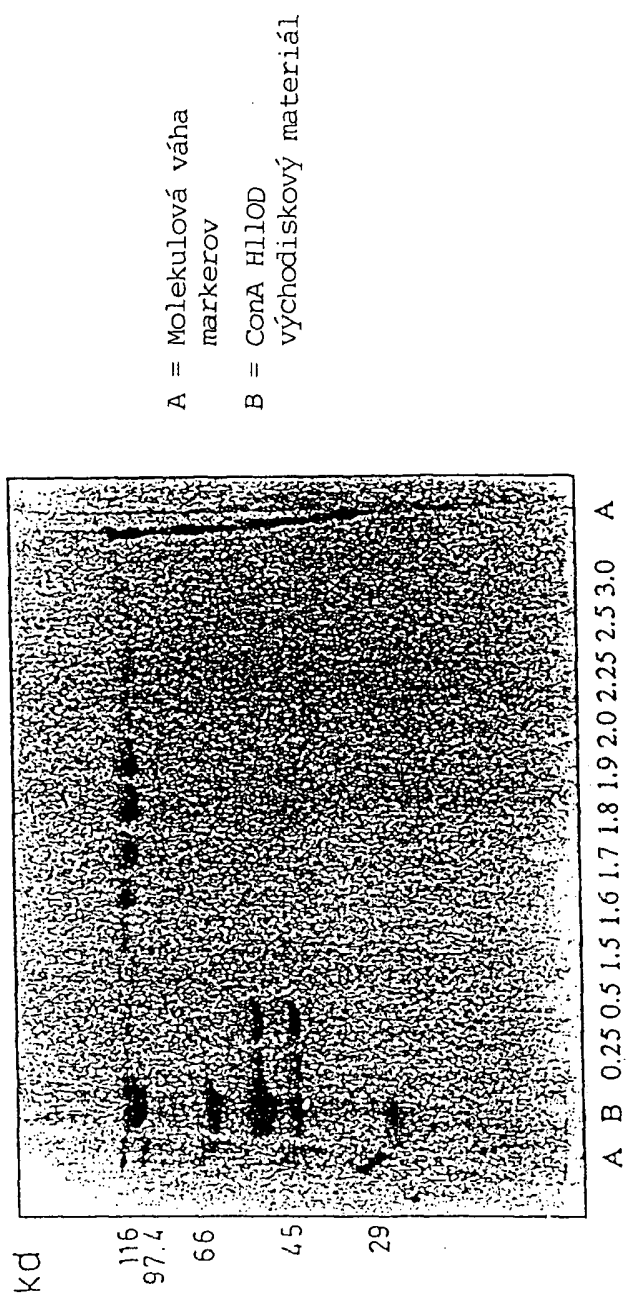
Obr. 12

33/4Δ



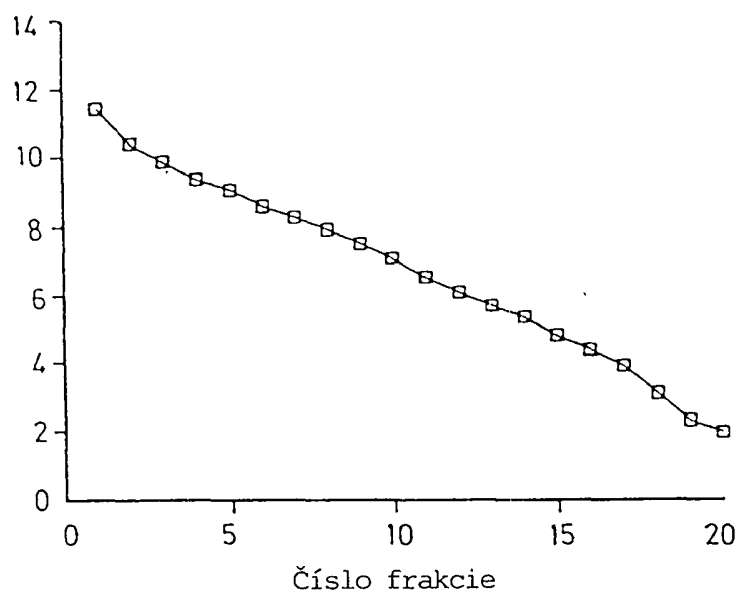
Obr. 13a

34/44



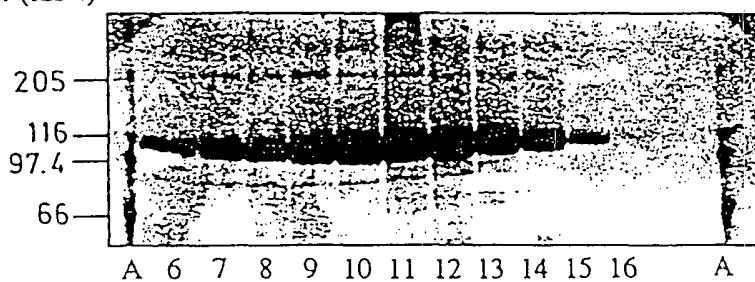
Obr. 13b

35/44



Obr. 14a

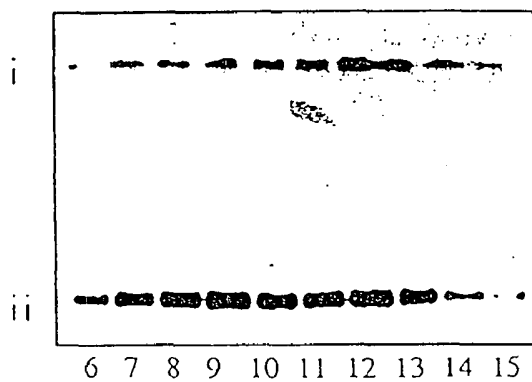
M.W. (kDa)



A = molekulová váha markerov

Číslo frakcie

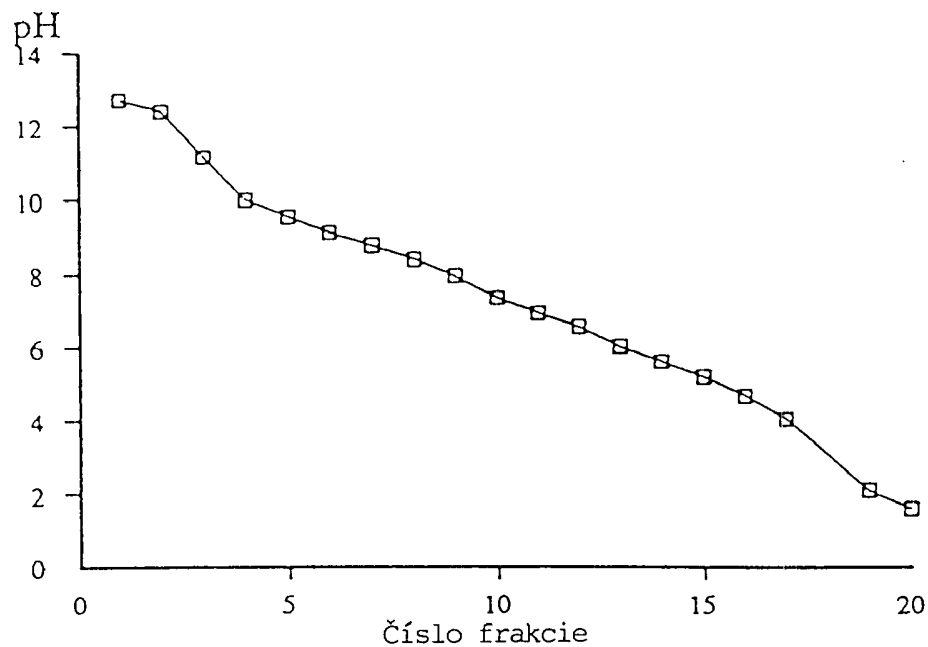
Obr. 14b



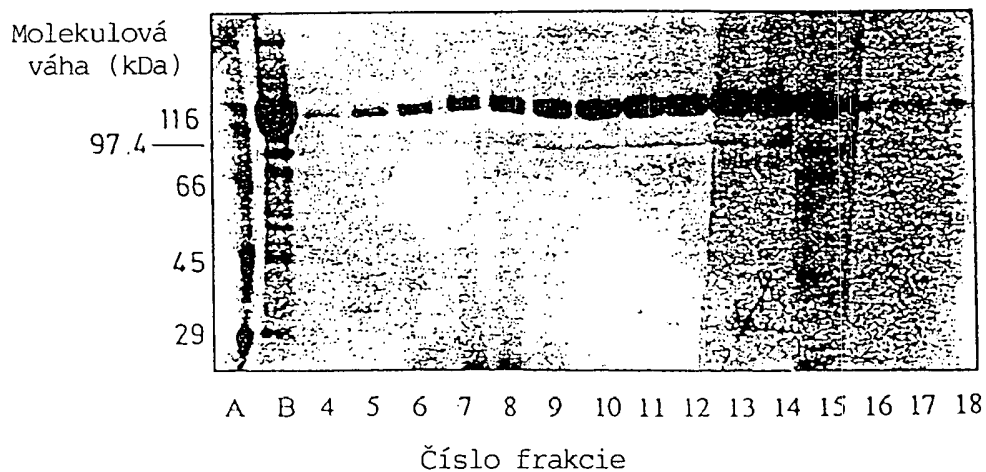
Číslo frakcie

Obr. 14c

36/44



Obr. 15a

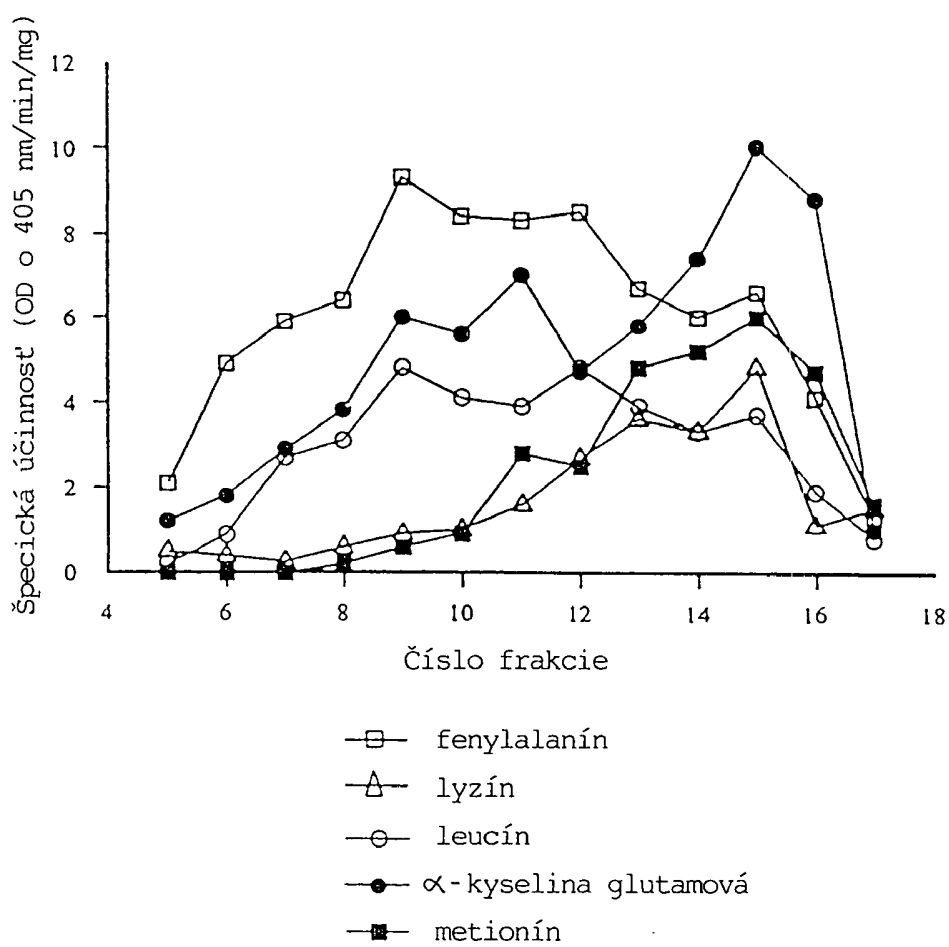


A = molekulová váha
markerov

B = ConA H110D
východiskový materiál

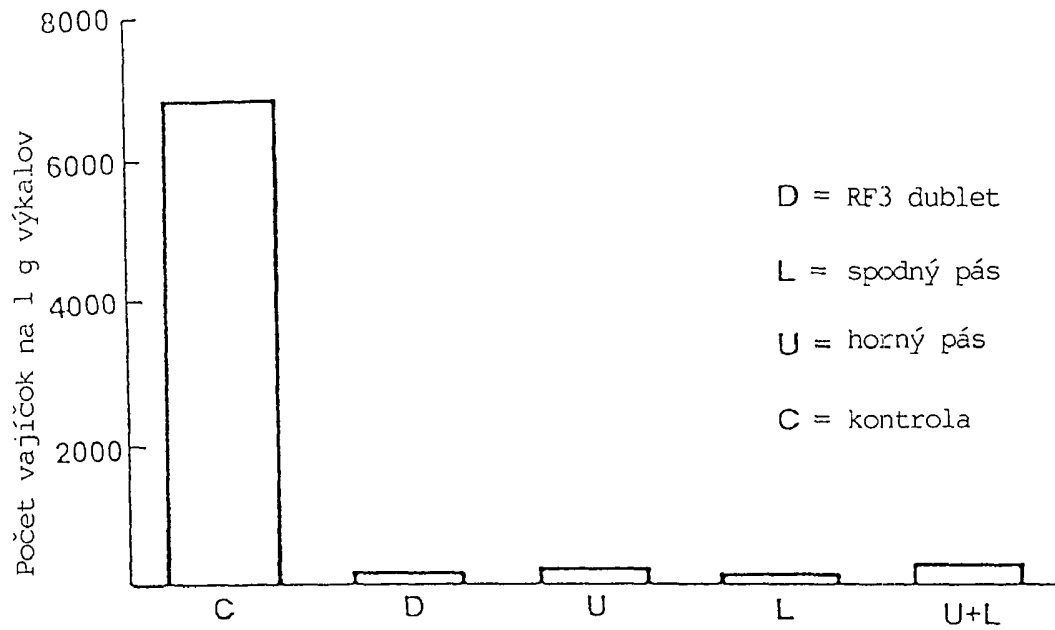
Obr. 15b

37/44

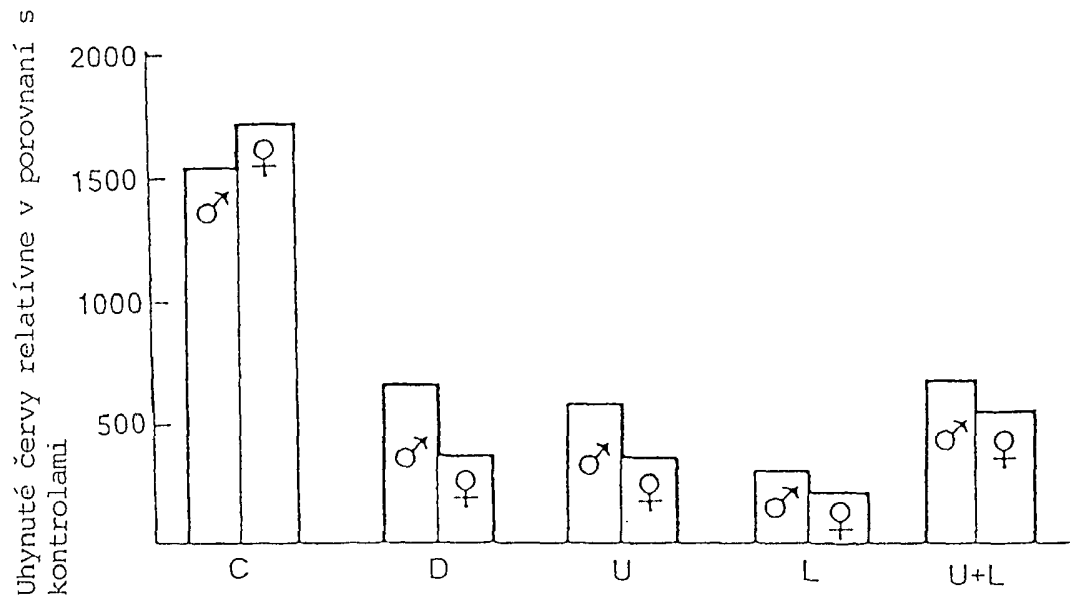


Obr. 15c.

38/44

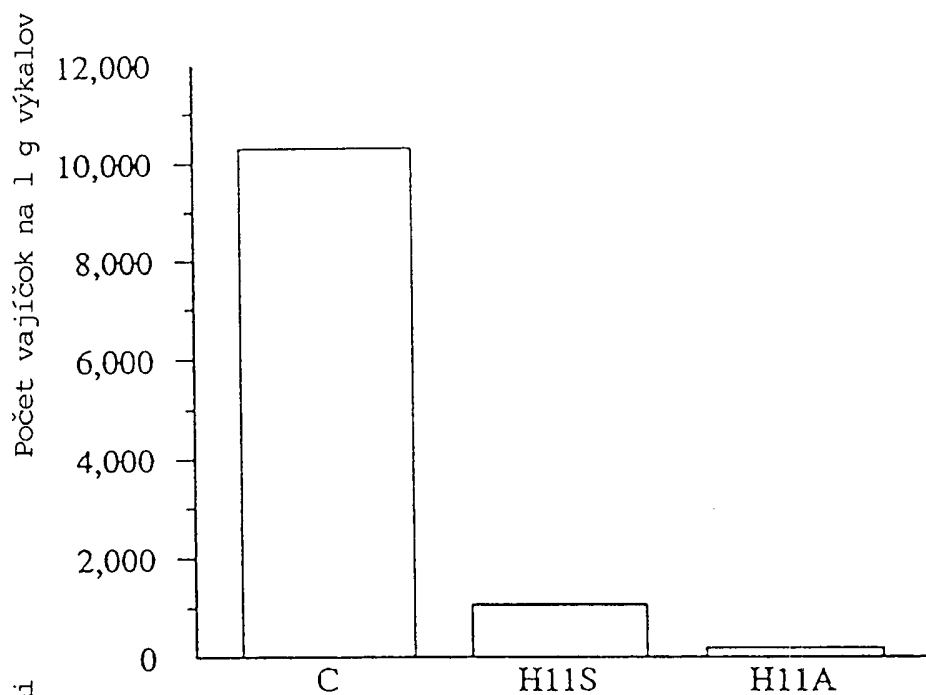


Obr. 16a

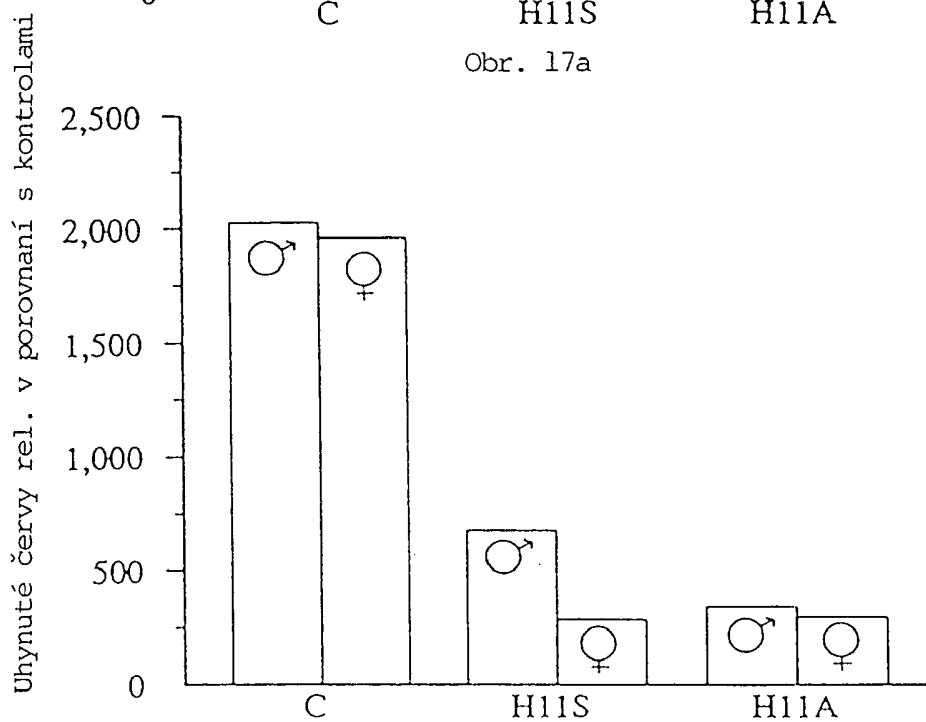


Obr. 16b

39/44

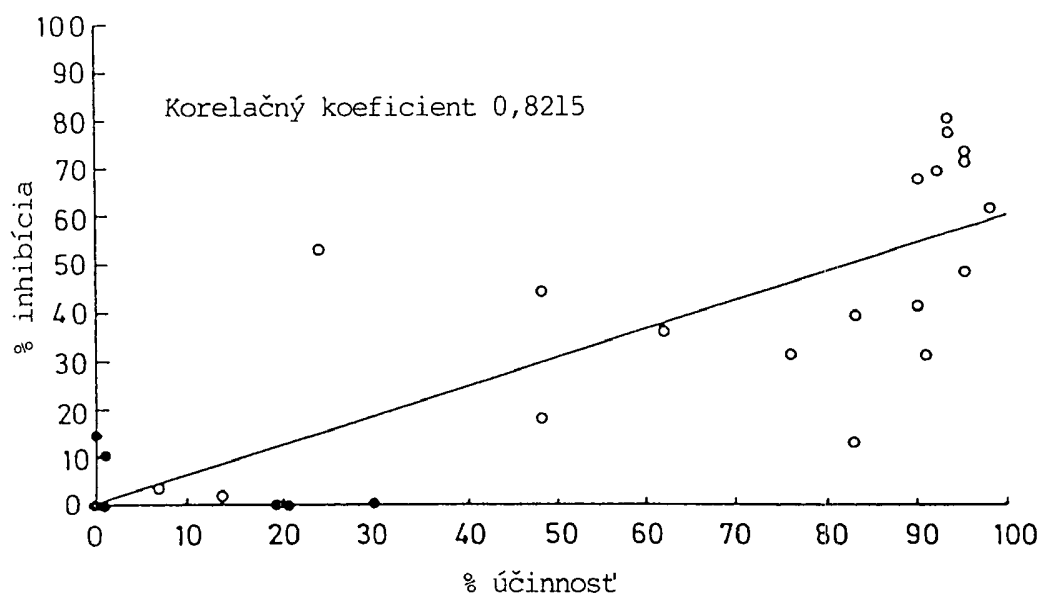


Obr. 17a

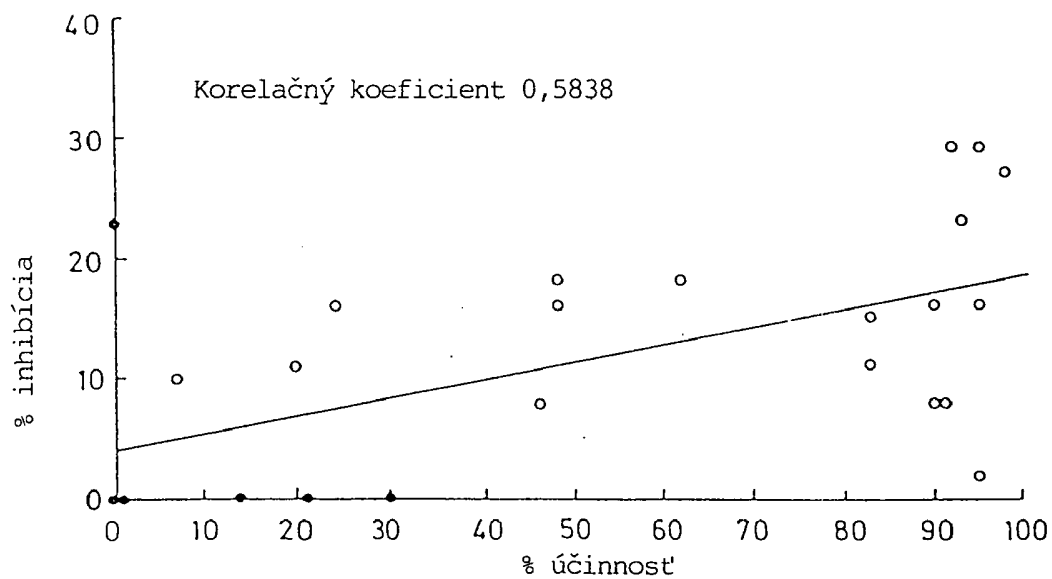


Obr. 17b

40/44

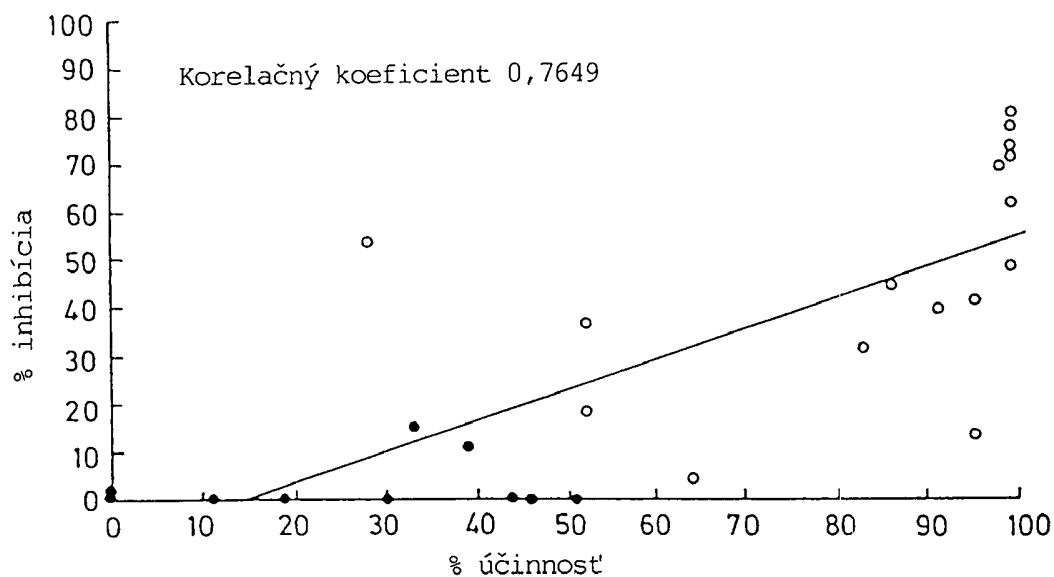


Obr. 18a)i

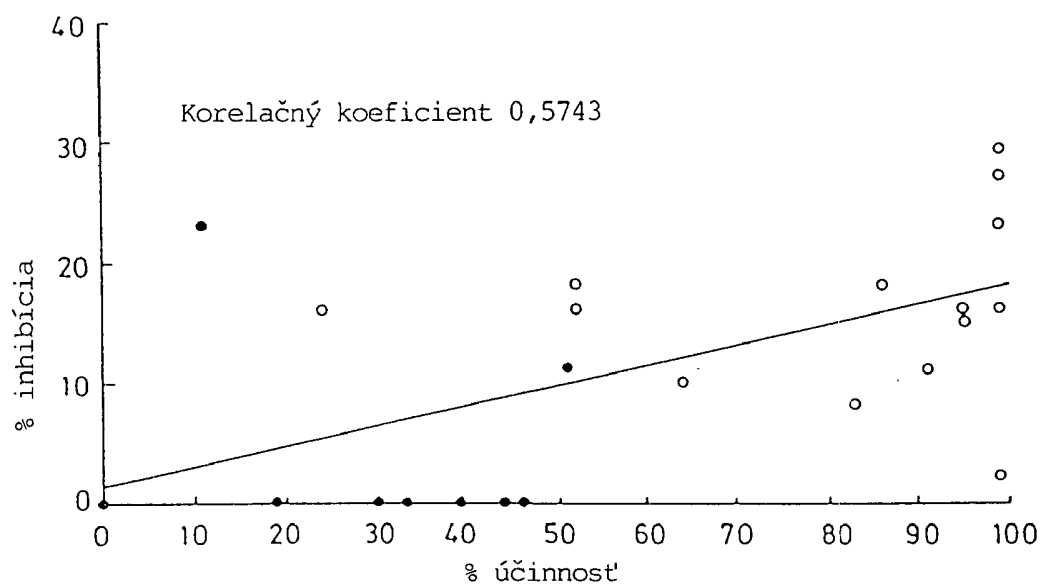


Obr. 18a)ii

41/44

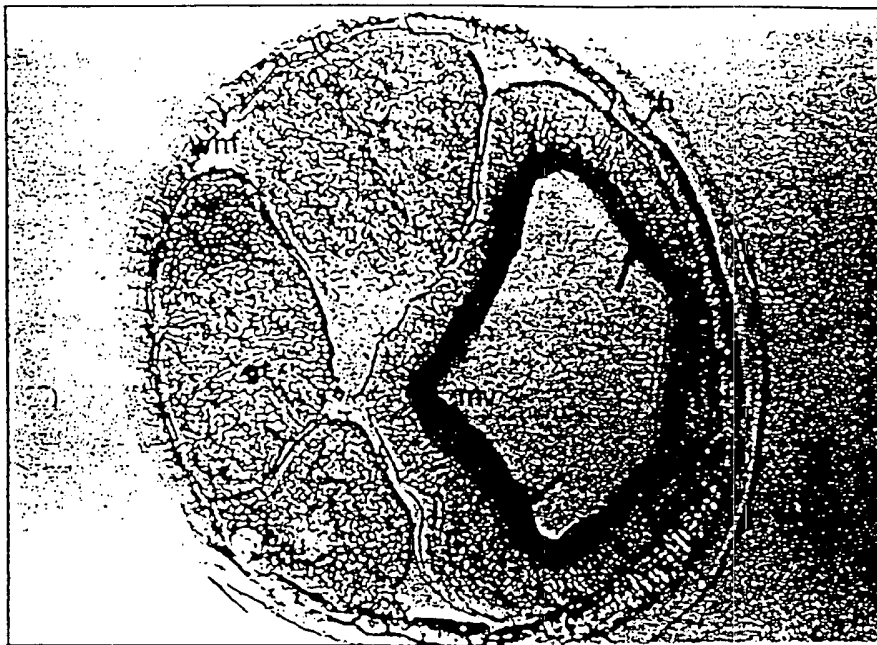


Obr. 18b)i

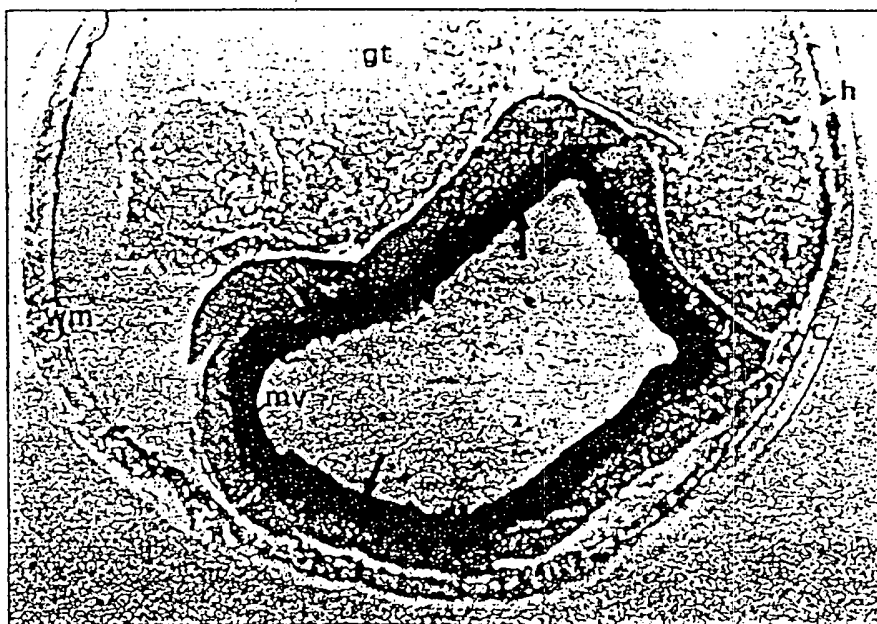


Obr. 18b)ii

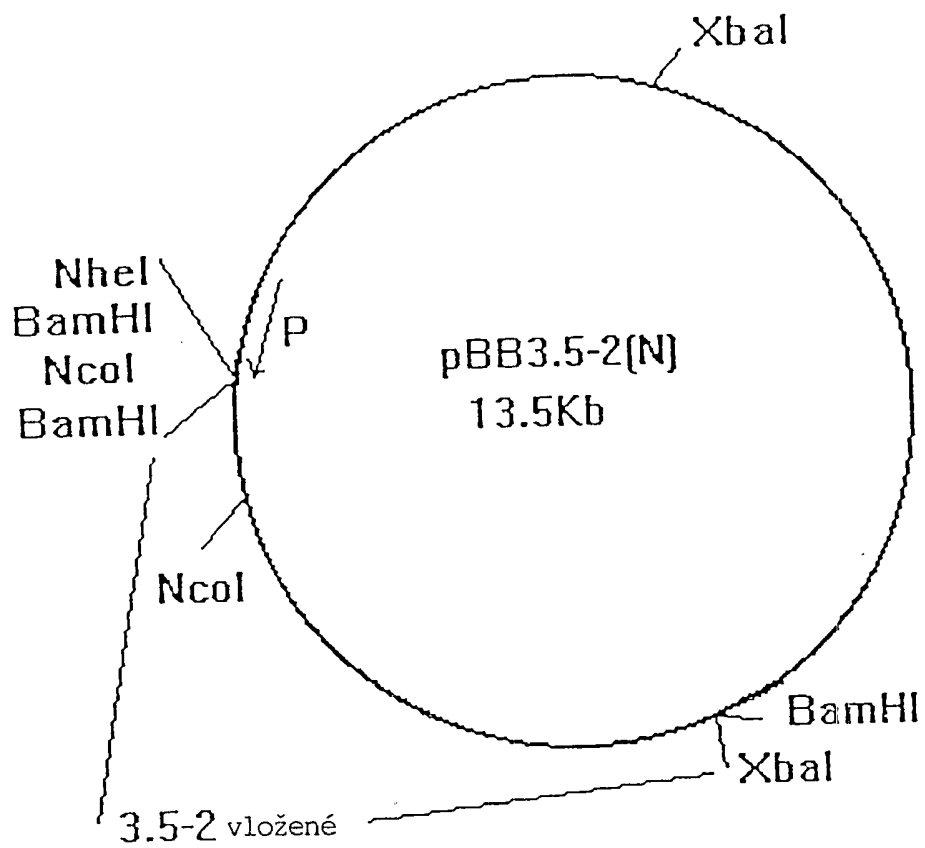
42/44



Obr. 19a



Obr. 19b



P = polyhedrinový promótor

44/44

