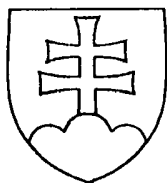


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

2641-92

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 7/01

C 12 N 7/08

15/00

15/64

A 61 K 39/275

(22) Dátum podania: 26.08.92

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 07/750 080, 07/914 738

(32) Dátum priority: 26.08.91, 20.07.92

(33) Krajina priority: US, US

(43) Dátum zverejnenia: 09.08.95

(86) Číslo PCT:

(71) Prihlasovateľ: Immuno Aktiengesellschaft, Wien, AT;

(72) Pôvodca vynálezu: Dörner Friedrich prof.dr., Wien, AT;
Scheiflinger Friedrich Ing., Orth/Donau, AT;
Pfleiderer Michael, Breitstetten, AT;
Falkner Falko Günther, dr., Mannsdorf, AT;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Priame molekulárne klonovanie modifikovaného genómu eukaryotického cytoplazmatického DNA-vírusu**

(57) Anotácia:

Opísaný spôsob obsahuje stupne: I) modifikovanie za extracelulárnych podmienok DNA molekuly, obsahujúcej genóm prvého cytoplazmatického DNA-vírusu, takže sa získa modifikovaná DNA molekula obsahujúca modifikovaný genóm cytoplazmatického DNA-vírusu, II) zavedenie modifikovanej DNA molekuly do prvej hostiteľskej bunky, ktorá obaľuje modifikované DNA molekuly do infekčných viriónov a III) izolovanie viriónov obsahujúcich modifikovaný vírusový genóm z hostiteľskej bunky. Hostiteľská bunka sa infikuje pomocným vírusom. Pri expresii sa modifikovaný vírusový genóm obaľuje infekčnými viriónmi. Sú opísané tiež nové vektory vírusu kiahní pre priame molekulárne klonovanie otvorených čítacích oblastí do miesta štiepenia restriktčným enzýmom jedinečným vo vektore.

Přímé molekulární klonování modifikovaného genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru

Tato přihláška je částečným pokračováním přihlášky č. 07/750080 ze dne 26. srpna 1991, nyní opuštěné.

Oblast techniky

Tento vynález se týká modifikovaných genomů eukaryotických DNA-virů, které se replikují v cytoplasmě hostitelské buňky, jako jsou například viry neštovic a iridoviry. Podrobněji se tento vynález týká přímého molekulárního klonování modifikovaného genomu cytoplasmatického DNA-viru, který je produkován modifikováním vyčištěné DNA molekuly obsahující genom cytoplasmatického DNA-viru za extracelulárních podmínek. Molekula modifikované DNA se pak pakáží (vbalí) do infekčních virionů v buňce infikované pomocným cytoplasmatickým DNA-virem. Ve výhodném uspořádání podle tohoto vynálezu se fragment cizí DNA obsahující žádaný gen vloží přímo do genomu DNA-viru neštovic v místě štěpení restrikční endonukleasou, která je jedinečná ve virovém genomu. Modifikovaný DNA-vir se vbalí do virionů transfekcí do buněk infikovaných pomocným virem neštovic.

Dosavadní stav techniky

Eukaryotické cytoplasmatické DNA-viry zahrnují různé viry neštovic a iridoviry nalézající se u obratlovců a u hmyzu. Viry neštovic, které mají rekombinantní genomy, se používají pro expresi rozmanitých vložených genů. Tak ^{ovce} viry neštovic se mohou používat pro produkci biologicky aktivních polypeptidů (například) v buněčných kulturách a pro dodávání vakcinových antigenů přímo do zvířecího nebo lidského imunitního systému. Zdá se, že konstrukce rekombinantních iridovirových genomů pro expresi cizích genů není dokumentována v odborné literatuře týkající se genetického inženýrství.

Konvenční techniky konstrukce rekombinantních genomů viru neštovic obsahující cizí geny spočívají v rekombinaci

PRIL
A OBJEVY
PRO VYNÁLEZY
ÚRAD
2 3 X 3 2
0500
0 5 9 7 3 2
2

po částech nebo in vivo (intracelulární). Použití intracelulární rekombinace bylo poprvé popsáno jako způsob "marker rescue" se subgenovými fragmenty virové DNA (Lamb a Habel: Ann. Virol. (Institut Pasteur) 132E, 135 (1981)). Tito autoři ukázali, že na teplotu citlivý mutant viru neštovic by mohl být "získán" intracelulární rekombinací s fragmentem subgenové DNA viru neštovic králíků. Způsoby, které použili pro intracelulární rekombinaci, se stále ještě dodnes používají.

Konstrukce rekombinantních virů neštovic obsahujících geny, které nejsou geny viru neštovic ("cizí" geny), byla později popsána Panicali a Peppercorn: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4927 až 4931 (1982), Mackettam a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415 až 7419 (1982) a v USA patentu č. 4 769 330. Technologie přípravy rekombinantních virů neštovic zahrnuje dva stupně. Nejprve se připraví fragment DNA, který má oblasti homologní s genomem viru neštovic obklopující cizí gen. "Insertní" plasmid lze konstruovat také in vitro (extracelulárně) rekombinací nížeho genu s plasmidem. Tento plasmid obsahuje krátké virové DNA sekvence, které jsou homologní s oblastí genomu viru neštovic, kde je částečně konečná inserce genu. Cizí gen se vloží do plasmidu v místě obklopeném sekvencemi virové DNA a typicky po směru vládního promotoru viru neštovic, který kontroluje transkripci vloženého genu. V druhém stupni se insertní plasmid navede do hostitelských buněk infektovaných cílovým virem neštovic. Tento gen se pak nejlépe vloží do genomu viru neštovic intracelulární rekombinací mezi homologní virové sekvence v genomu viru neštovic a část plasmidu zahrnující cizí gen. Výsledný rekombinantní genom se pak replikuje. Tím se připraví infekční vir neštovic.

Inserce každého příslušného genu do genomu viru neštovic dosud vyžadovala plasmid, který obsahoval tento gen obklopený virovými sekvencemi vybranými pro účinnou inserce. Obtížnost tohoto přístupu spočívala v tom, že rekombinantní vir neštovic je potřebný pro konstrukci plasmidu. Každý plasmid se musí kontrolovat a

způsobem extracelulární rekombinace DNA, amplifikovat v bakteriální buňce, pračně izolovat a dobře vyčistit před tím, než se přidá do hostitelské buňky infektované virem neštovic.

Jiným problémem dosavadní metodologie je nízký výtěžek rekombinantních genomů. To může způsobit, že je nutné testovat stovky individuálních virů, aby se našel jediný žádaný rekombinant. Nízký výtěžek souvisí s nízkým výskytem jednotlivých intracelulárních rekombinací spojených s požadavkem násobných událostí tohoto druhu, aby se dosáhlo integrace insertního plasmidu do virového genomu. Výsledkem je, že většina virových genomů získávaných způsoby intracelulární rekombinace jsou rodičovské genomy, kterým chybí oizi gen. Často je tedy nutné zavést do genomu viru neštovic gen selektivního markeru spolu s jakoukoliv jinou žádoucí sekvencí, aby se umožnila okamžitá detekce žádaných vzácných rekombinantů bez potřeby charakterizovat izolované DNA z početných klonů jednotlivých virů.

Vyčištěné DNA cytoplasmových DNA z eukaryotických virů nejsou schopny replikace, jestliže se vloží do vnímavé hostitelské buňky způsoby, které iniciují infekci virovými DNA, které se replikují v jádře. Tento nedostatek infekitivity DNA cytoplasmových DNA virů vede ke skutečnosti, že virová transkripce musí být iniciována v infektovaných buňkách virově specifickou RNA polymerasou, která je normálně k dispozici uvnitř infektujících virionů.

"Reaktivace" DNA viru neštovic, v nichž genomová DNA uvnitř deaktivované, neinfekční částice viru neštovic je vbalena (pakázována) do infekčních virionů koinfekcí živým pomocným virem neštovic, je známa desítky let. Například viz Fenner a Woodroffe: *Virology* 11, 185 až 201 (1960). V roce 1981 Sam a Dumbell prokázali, že izolovaná neinfekční genomová DNA prvního viru neštovic může být vbalena do infekčních virionů viru neštovic v buňkách infektovaných druhým geneticky rozdílným virem neštovic (Sam a Dumbell: *Ann. Virol. (Institut Pasteur)* 132B, 135 (1981)). Toto

vbalení nahé DNA viru neštovic bylo poprvé prokázáno transfekcí nemodifikované DNA obsahující první genom přírodního viru neštovic izolované z virionů nebo infektovaných buněk do buněk infektovaných druhým genomem v přírodě se vyskytujícího viru neštovic. Avšak heterologní pakážování (vbalo-
vání), pakážování DNA z jednoho rodu neštovic životaschopnými viriony jiného rodu (například neštovic ptáků) nebylo dosud popsáno.

Použití intracelulární rekombinace pro zkonstruování rekombinantního genomu viru neštovic, který expresí poskytuje geny viru nikoliv neštovic, bylo popsáno krátce potom, co Sam a Dumbell poprvé popsali intracelulární pakážování nahé DNA viru neštovic do virionů viru neštovic a získání markeru fragmenty DNA intracelulární rekombinací (viz Panicali a Paoletti: 1982 a Mackett a spol.: 1982.). V odborné literatuře následujícího desetiletí však není popsáno přímé molekulární klonování, tj. konstrukce pouhým extracelulárním genetickým inženýrstvím, modifikovaného genomu kterékoli cytoplasmové DNA eukaryotického viru, zvláště pak viru neštovic. V literatuře dokonce ani není uveden rozšířený názor jakékoliv výhodnosti možné realizace takového přímého klonování. Naopak, autoritativní spis konstatuje, že přímé molekulární klonování není praktické v souvislosti s genetickým inženýrstvím virů neštovic, protože DNA viru neštovic není infekční (F. Fenner, R. Wittek a K. R. Dumbell: "The Poxviruses", Academic Press, 1989.). Podobně i jiné práce v této oblasti odepsali endonukleasové štěpení a religaci DNA viru neštovic, i když rozeznali jistý potenciál infekčních virů izolovaných DNA obsahujících rekombinantní genom viru neštovic. Viz například Mackett a Smith: J. Gen. Virol. 67, 2067 až 2082 (1986.). Nedávné souhrnné články navíc navrhlý názor, že jediným proveditelným způsobem konstrukce rekombinantního genomu viru neštovic je způsob používající rekombinaci (viz Miner a Hruby: TIBTECH 8, 20 až 25 (1990) a Moss a Flexner: Ann. Rev. Immunol. 5, 305 až 324 (1987)).

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je tedy získat způsob konstrukce modifikovaných genomů eukaryotických cytoplasmatických DNA-virů, zvláště virů neštovic, který překonává shora uvedená omezení související s konvenčními technikami založenými na intracelulární rekombinaci.

Jiným předmětem tohoto vynálezu je získání technik konstrukce genomu cytoplasmatického DNA-viru, které poskytují podstatně vyšší výtěžky rekombinantů než stávající metodologie.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je získat způsob modifikování genomu cytoplasmatického DNA-viru přímou modifikací genomové virové DNA a intracelulární pakázováním modifikované virové DNA do virionů funkce pomocného viru.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je získat způsoby konstrukce genomu cytoplasmatického DNA-viru, který v jednom rekombinantním reakčním stupni poskytuje modifikované genomy se segmentem cizí DNA vloženým v každé ze dvou možných orientací a modifikované genomy, které mají násobné inserce segmentu cizí DNA.

Ještě jiným předmětem tohoto vynálezu je získat způsob získání modifikovaných DNA molekul vhodných pro přímé molekulární klonování cizích genů do modifikovaného genomu cytoplasmatického DNA-viru, který obsahuje dvě části genomové virové DNA produkované štěpením endonukleasami specifickými pro sekvence v místě, které je jedinečným místem ve virovém genomu.

Ještě jiným předmětem tohoto vynálezu je získání cytoplasmatického DNA-viru, zvláště viru neštovic, který má modifikovaný genom obsahující cizí DNA vložen do jedinečného místa štěpení endonukleasami specifickými pro sekvence.

Ještě jiným předmětem tohoto vynálezu je získání

plasmidů, které umožňují konstrukci a přenos genových kaset do cytoplasmatického DNA-viru, zvláště do viru neštovic, s využitím přímého molekulárního klonování.

Při uskutečňování těchto a dalších předmětů tohoto vynálezu byl získán v souladu s jedním aspektem tohoto vynálezu způsob přípravy modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru přímým molekulárním klonováním modifikované DNA molekuly obsahující genom modifikovaného cytoplasmatického DNA-viru. Tento vynalezený způsob obsahuje tři stupně: I) modifikování vyčištěné DNA molekuly obsahující první genom cytoplasmatického DNA-viru za bezbuněčných podmínek tak, aby se získala modifikovaná DNA molekula obsahující modifikovaný virový genom, II) zavedení modifikované DNA molekuly do první hostitelské buňky, která vbalí (pakažuje) modifikovanou DNA molekulu do infekčních virionů a III) izolování infekčních virionů obsahujících modifikovaný virový genom z první hostitelské buňky.

Podle jednoho uspořádání tohoto způsobu stupeň modifikace molekuly DNA za extracelulárních podmínek obsahuje stupeň štěpení molekuly DNA endonukleasou specifickou pro sekvenci. Podle jiného uspořádání stupeň modifikování molekuly DNA obsahuje stupeň vložení první DNA sekvence do prvního virového genomu. S výhodou se tato první DNA sekvence vloží do prvního genomu v místě štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci. Je tedy třeba si při tom uvědomit, že v případě, kdy příslušná endonukleasa specifická pro sekvenci, jako je například bakteriální restriční enzym, je zde popsána pouze názvem, tento název znamená také jakýkoliv isoschizomer pojmenované nukleasy.

Stupeň modifikování molekuly DNA podle tohoto vynálezu obsahuje popřípadě také stupeň použití fosfatasy pro odstranění fosfatové skupiny z konce DNA segmentu, který se získá štěpením molekuly DNA endonukleasou specifickou pro sekvenci.

V některých uspořádáních podle tohoto způsobu virový

genom znamená genom viru vakcínie a jedinečné místo znamená místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI nebo bakteriální restrikční endonukleasou SmaI. První genom může obsahovat také druhou DNA sekvenci nevyskytující se přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, při čemž tato druhá RNA sekvence obsahuje jedinečné místo štěpení. Například první genom může znamenat genom viru drábežích neštovic obsahující sekvenci genu β -galaktosidasy Escherichia coli a jedinečné místo znamená místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI, které je umístěno v tomto genu.

V jiných formách tohoto způsobu se první DNA sekvence vloží do prvního virového genomu mezi první místo štěpení první endonukleasou specifickou pro sekvenci a druhé místo štěpení druhou endonukleasou specifickou pro sekvenci. Obě místa štěpení, první a druhé místo štěpení, jsou jedinečnými místy štěpení v první virovém genomu.

Podle jiných uspořádání způsobu podle tohoto vynálezu alespoň část první DNA sekvence, která je vložena do prvního genomu, je pod transkripční kontrolou promotoru. Tento promotor může být umístěn do první DNA sekvence, která je vložena do prvního virového genomu. Promotor je umístěn také v modifikovaném virovém genomu po směru vlákna první DNA sekvence, která je vložena do prvního genomu. V některých případech je promotor využíván RNA polymerasou kódevanou modifikovaným virovým genomem. Tento promotor může být také vhodný pro iniciaci transkripce RNA polymerasou eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, který má být modifikován. V některých případech promotor zahrnuje modifikaci přirozeně se vyskytujícího promotoru eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru.

Stupeň modifikace DNA molekuly podle způsobu podle tohoto vynálezu může obsahovat stupeň deletování DNA sekvence z prvního genomu. Tento stupeň také obsahuje stupeň substituování DNA sekvence prvního genomu.

Stupeň modifikování prvního virového genomu může

také obsahovat stupně infikování první hostitelské buňky druhým eukaryotickým cytoplasmatickým DNA-virem obsahujícím druhý genom, který je expresován. Tím se modifikovaný virový genom pakáží do infekčních virionů. Stupeň zavedení modifikované DNA molekuly do první hostitelské buňky se provádí asi jednu hodinu po stupni infikování první hostitelské buňky druhým eukaryotickým cytoplasmatickým DNA-virem.

V jedné variantě tohoto způsobu se první hostitelská buňka vybere tak, aby exprese druhého genomu v první hostitelské buňce neprodukovala infekční viriony obsahující druhý virový genom. Například jestliže modifikovaný virový genom znamená modifikovaný genom viru vakcinie a druhý genom znamená genom viru drůbežích neštovic, vybere se jako první hostitelská buňka savčí buňka.

V některých způsobech modifikování virového genomu stupeň izolace infekčních virionů obsahujících modifikovaný virový genom zahrnuje stupeň infikování druhé hostitelské buňky infekčními viriony produkovánými první hostitelskou buňkou; to se provádí za takových podmínek, aby exprese druhého genomu v druhé hostitelské buňce neprodukovala infekční viriony obsahující druhý genom. Například jestliže modifikovaný virový genom je modifikován genomem viru vakcinie, druhý genom může být genomem viru drůbežích neštovic a druhá hostitelská buňka je savčí buňkou. Modifikovaný virový genom také obsahuje gen funkční hostitelské oblasti potřebný pro produkci infekčních virionů v druhé hostitelské buňce a druhému genomu chybí takový gen funkční hostitelské oblasti. Tato ilustrace je dána příkladem, kdy modifikovaný virový genom znamená modifikovaný genom viru vakcinie obsahující gen funkční hostitelské oblasti. Produkují se tak infekční viriony v lidské buňce s druhou hostitelskou buňkou je lidská buňka.

Podle jiného způsobu modifikovaný virový genom obsahuje gen selektivního markeru, druhému genomu chybí gen selektivního markeru a stupeň infikování druhé hostitelské buňky se provádí za podmínek, které jsou selektivní pro gen expresující gen selektivního markeru. S výhodou exprese genu

selektivního markeru v druhé hostitelské buňce propůjčuje druhé hostitelské buňce resistenci na cytotoxickou látku, která je přítomna během infektování v tekových hladinách, které jsou postačující pro selekci genomu, který expresí poskytuje gen selektivního markeru.

Podle jiného aspektu tohoto vynálezu se získává modifikovaný eukaryotický cytoplasmatický DNA-virus produkovaný přímým molekulárním klonováním modifikovaného virového genomu podle způsobů zde shora souhrnně uvedených.

Ještě jiný aspekt tohoto vynálezu se týká modifikace eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru obsahujícího modifikovaný virový genom, při čemž tento modifikovaný virový genom obsahuje: I) první genom prvního eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Tento první genom sestává z místa štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci a toto místo štěpení je jedinečným místem v prvním genomu. Modifikovaný genom dále obsahuje II) první DNA sekvenci vloženou do jedinečného místa prvního genomu.

Podle hlavního uspořádání podle vynálezu první DNA sekvence je sekvence, která se nevyskytuje přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. V některých případech, výhodných případech, první genom znamená genom viru vakcínie a jedinečné místo znamená místo štěpení bakteriální restriční endonukleasou vybranou ze skupiny sestávající z NotI a SmaI.

První genom může obsahovat druhou DNA sekvenci, která se nevyskytuje přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Druhá sekvence DNA obsahuje jedinečné místo štěpení. V jednom příkladu první genom znamená genom viru drůbežích neštovic obsahující druhou DNA sekvenci Escherichia coli genu β -galaktosidasy a jedinečným místem štěpení v tomto genu je místo štěpení bakteriální endonukleasou NotI.

V některých modifikovaných virech podle tohoto vynálezu alespoň část uvedená první DNA sekvence, která je vložena

do jedinečného místa štěpení, je pod transkripční kontrolou promotoru. Tento promotor je umístěn v první DNA sekvenci, která je vložena do prvního genomu. V některých případech první genom znamená genom viru neštovic a promotor obsahuje promotor viru neštovic, buď přirozeně se vyskytující promotor viru neštovic nebo jeho modifikaci.

Ještě jiný aspekt tohoto vynálezu se týká modifikací eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru obsahujícího modifikovaný virový genom, kde tento modifikovaný virový genom obsahuje I) první genom prvního eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Tento první genom obsahuje první místo štěpení endonukleasou specifickou pro první sekvenci a druhé místo štěpení endonukleasou specifickou pro druhou sekvenci. Každé z těchto míst je jedinečným místem v prvním genomu.

Modifikovaný genom v tomto modifikovaném viru dále obsahuje II) první DNA sekvenci vloženou do prvního genomu mezi první jedinečné místo a druhé jedinečné místo. V některých formách tohoto modifikovaného viru první DNA sekvence se nevyskytuje přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru; v některých případech první genom obsahuje druhou DNA sekvenci přirozeně se nevyskytující v eukaryotickém cytoplasmatickém DNA-viru. Tato druhá DNA sekvence obsahuje první DNA sekvenci vloženou mezi první jedinečné místo a druhé jedinečné místo. Například tento modifikovaný vir může obsahovat první genom, který je genomem viru vackinie, a obě místa štěpení, první místo štěpení a druhé místo štěpení, jsou místy štěpení bakteriální restrikční endonukleasou, která je vybrána ze skupiny sestávající z NotI, SmaI, ApaI a RsaII.

Ještě jiný eukaryotický cytoplasmatický DNA-virus sestává z modifikovaného virového genomu, který obsahuje I) první genom prvního eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Tento první genom obsahuje první DNA sekvenci a tato první DNA sekvence obsahuje první místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, která je jedinečným místem štěpení v tomto modifikovaném virovém genomu. Tento genom tohoto modifikovaného viru dále obsahuje II) promotor, který je umístěn

tak, že DNA sekvence vložená do jedinečného místa štěpení ve virovém genomu je pod transkripční kontrolou promotoru. V jistých formách chybí této první DNA sekvenci start kodon translace mezi promotorem a jedinečným insertním místem. Touto první DNA sekvencí může být sekvence přirozeně se nevyskytující v cytoplasmovém eukaryotickém DNA-viru. Tento modifikovaný virus znamená virus, v němž prvním genomem je genom viru vakcínie a první DNA sekvence obsahuje násobné klonovací místo obsahující místo štěpení bakteriálními restrikčními endonukleasami NotI, SmaI, ApaI a RsaII.

Ještě jiný aspekt tohoto vynálezu se týká modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu, kde exprese první sekvence v modifikovaném virovém genomu (vložená sekvence, o kterou se jedná) v hostitelské buňce vede k produkci proteinu.

Podle jiného aspektu se tento vynález týká také DNA molekuly obsahující modifikovaný virový genom modifikovaného viru podle tohoto vynálezu. Zvláště některé formy této DNA molekuly obsahují jeden konec modifikovaného virového genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, v němž I) konec modifikovaného virového genomu obsahuje DNA sekvenci přirozeně se nevyskytující v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. V této DNA molekule II) modifikovaný virový genom obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je jedinečným místem štěpení v tomto modifikovaném virovém genomu, a III) molekula DNA má konec, který je homologní s koncem, který se produkuje štěpením jedinečného místa v modifikovaném virovém genomu endonukleasou specifickou pro sekvenci.

V některých formách této DNA molekuly DNA sekvence přirozeně se nevyskytující v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je jedinečným místem štěpení v tomto modifikovaném virovém genomu.

Ještě jiný aspekt tohoto vynálezu se týká sestavy pro přímé molekulární klonování modifikovaného virového genomu

cytoplasmové DNA eukaryotického viru obsahující: I) vyčištěné DNA molekuly podle tohoto vynálezu, II) DNA ligasu a III) roztoky pufru s reakčních činidel vhodných pro ligaci DNA segmentů, takže se získá modifikovaná DNA molekula obsahující modifikovaný virový genom. V jedné formě tato sestava dále obsahuje plasmid obsahující kazetu pro expresi genu obklopenou místy štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, která jsou slučitelná s insercí této kazety do jedinečného místa štěpení modifikovaného virového genomu kodovaného DNA molekulou v sestavě. Tato sestava může dále obsahovat první hostitelskou buňku a druhý vir vhodné pro pakážování modifikovaného virového genomu do infekčních virionů.

Podle dalšího aspektu se tento vynález týká plasmidu obsahujícího DNA segment, který má na obou koncích místo štěpení bakteriální restriční endonukleasou NotI. DNA segment v tomto plasmidu obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je v tomto plasmidu jedinečné. Příklad tohoto plasmidu, jak je to ukázáno na obrázku 1.3, je označen pN2 a obsahuje sekvenci sekvence číslo 1. DNA segment v tomto plasmidu může dále obsahovat gen selektivního markeru pod transkripční kontrolou promotoru viru neštovic. Mezi takové plasmidy patří například plasmidy, které jsou označeny pN2-gpt^a obsahující sekvenci číslo 2 a pN2-gpt^b obsahující sekvenci číslo 3.

Jiný plasmid podle tohoto vynálezu obsahuje DNA segment, který dále obsahuje promotor viru neštovic odštepitelně n^a-pojený na DNA sekvenci obsahující místo štěpení restriční endonukleasou. DNA segment vložený do tohoto místa štěpení je tedy pod transkripční kontrolou tohoto promotoru. Mezi příklady patří plasmidy označené pA1-S2, které obsahují sekvenci číslo 11 a plasmid pA2-S2, který obsahuje sekvenci číslo 12. Příkladem takové plasmidu, který obsahuje dále gen selektivního markeru pod kontrolou odděleného promotoru viru neštovic, je plasmid pN2gpt-S4, který obsahuje sekvenci číslo 14.

Ještě jiný plasmid obsahuje segment genomu viru neštovic, který obsahuje gen thymidin-kinasy tohoto viru neštovic. Tento gen thymidin-kinasy je modifikován tak, aby preventivně bránil expresi aktivní thymidin-kinasy, jako je například v plasmidu označeném pHindJ-2 obsahujícím sekvenci číslo 4 a pHindJ-3 obsahujícím sekvenci číslo 5.

Jiný plasmid obsahuje promotor viru neštovic odštěpitelně navázaný na translační start kodon. Tento translační start kodon bezprostředně následuje předřuhým místem štěpení restriční endonukleasou, které je vhodně uspořádáno tak, aby umožňovalo translaci otevřené čtecí oblasti vložené do místa štěpení druhou restriční endonukleasou. Mezi příklady tohoto plasmidu patří plasmidy označené pA1-S1 obsahující sekvenci číslo 9, pA2-S1 obsahující sekvenci č. 10 a plasmid pN2gpt-S3A obsahující sekvenci číslo 13.

Jeden konkrétní plasmid tohoto typu dále obsahuje DNA sekvenci kodující lidský protrombin; DNA sekvence je odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic a start kodon, jak je to ilustrováno na obrázku 5.1 plasmidem označeným pA1S1-PT. Tento plasmid obsahuje sekvenci číslo 15.

Jiný plasmid dále obsahuje DNA sekvenci kodující lidský plasminogen včetně translačního start kodonu, kde DNA sekvence je odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic. Jak ukazuje obrázek 5.2, příkladem tohoto plasmidu jsou plasmidy odvozené od pN2gpt-S4, jako je například pN2gpt-GPg, kodující lidský plasminogen a obsahující sekvenci číslo 17, a pN2gpt-LPg, kodující lys-plasminogen a obsahující sekvenci číslo 18.

Ještě jiný plasmid podle tohoto vynálezu, jak shora uvedeno, dále obsahuje DNA sekvenci kodující vir lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) gp160, včetně translačního start kodonu, která je odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic, jak je to ukázáno na obrázku 5.4, plasmidem pN2gpt-gp160 obsahujícím sekvenci číslo 19. A konečně, jiný plasmid obsahuje DNA sekvenci kodující lidský von Willebrandův faktor, jak je to ukázáno na obrázku 6.2.

Tento příklad je označen plasmid pvWF. Obsahuje sekvenci číslo 20.

Některé plasmidy podle tohoto vynálezu obsahují místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je jedinečné v genomu viru neštovic. Příklady jsou uvedeny na obrázku 4.3, včetně pA0 obsahujícího sekvenci číslo 6, pA1 obsahujícího sekvenci číslo 7 a pA2 obsahujícího sekvenci číslo 8.

Jiný plasmid obsahuje modifikovaný EcoRI K fragment DNA viru vakcínie z něhož byl deletován gen KIL hostitelské oblasti, jak je to uvedeno na obrázku 8.1. Dvěma příklady jsou pEcoK-dhr obsahující sekvenci číslo 21 a pdhr-gpt obsahující sekvenci číslo 22.

Jiné předměty, rysy a výhody tohoto vynálezu se ozřejmí z následujícího podrobného popisu. Tomu by však mělo být rozuměno tak, že podrobný popis a specifické příklady, i když představují výhodná uspořádání podle tohoto vynálezu, jsou uvedena pouze jako ilustrace neboť různé změny a modifikace v duchu a rozsahu tohoto vynálezu budou odborníkům zřejmé z tohoto podrobného popisu.

V následující části tohoto spisu budou stručně popsány připojené obrázky.

Obrázek 1.1 ilustruje expresi genů markeru modifikovanými genomy viru neštovic získanými reaktivací DNA nahého viru neštovic. Je ukázán stříbrem obarvený polyakrylamidový gel proteinů připravených v kultuře supernatantů buněk infektovaných pakážovanými viry (vpPg č. 1 až vpPg č. 8) a přírodním typem viru (WT) jako kontrola. Horní šipka ukazuje pás markeru plasminogenu, dolní šipka pás hlavního sekretovaného proteinu markeru 35K vakcínie. Pásky 1 a 9 znamenají proteiny markeru, pásky 2 a 10 znamenají standard lidského plasminogenu (10 ng), pás 3 znamená rekombinant vPgD vakcínie (zdroj pakážované DNA), pásky 4 až 7 a 11 až 14 znamenají vpPg č. 1 až 8 a pásky 8 a 15 znamenají vakcínii přírodního typu (WR WT).

Obrázek 1.2 je schematický diagram ilustující molekulární klonování genomů viru neštovic obsahujících kazetu genu pro expresi genu markeru (E.coli gpt gen) za kontroly promotorem viru vakcínie.

Obrázek 1.3 je schematická ilustrace konstrukce plasmidů (pN2-gpta a pN2-gptb), které jsou prekursori pro konstrukci kazet pro expresi genů, inserci promotoru a otevřené čtecí oblasti. Takové kazety jsou určeny pro přímý molekulový transfer do vektorů viru vakcínie pomocí jedinečného insertního místa a genu selektovatelného markeru (gpt) řízený promotorem viru vakcínie. MCS znamená násobné klonovací místo. P7.5 znamená promotor genu polypeptidu 7.5K vakcínie a P11 znamená promotor genu polypeptidu 11K vakcínie. Šipky označují směry transkripce od promotorů.

Obrázek 1.4 ukazuje, že genomy viru neštovic, produkováné přímým molekulárním klonováním, obsahují kazetu genu gpt markeru vloženého do jedinečného (NotI) místa štepení jak ukazují Southernovy blotové analýzy přes plak přečištěných virových DNA rozštěpených působením endonukleasy HindIII pomocí sondy gpt-gemu. Pás 1 znamená DNA markeru (DNA fágu lambda rozštěpená působením HindIII), pásy 2 a 3 znamenají DNA přírodního viru vakcínie (WR) rozštěpenou působením HindIII (500 ng a 100 ng), pásy 4 až 9 znamenají DNA buněk infektovaných plaky podle 2.1.1 až 7.1.1, pásy 10 až 12 znamenají DNA buněk infektovaných plaky podle 10.1.1 až 12.1.1. Šipky ukazují velikosti restrikčních fragmentů markeru v tisících párech nukleotidů.

Obrázek 1.5 dále ilustruje struktury modifikovaných DNA viru neštovic pomocí Southernových blotů DNA (rozštěpených působením NotI) buněk infektovaných různými izoláty a hybridizovaných sondou gpt-gemu. Pás 1 znamená DNA markeru (DNA fágu lambda rozštěpená působením HindIII), pás 2 znamená DNA přírodního viru vakcínie (WR) rozštěpenou působením NotI (50 ng), pásy 3 až 8 znamenají DNA buněk infektovaných rekonstruovanými plaky podle 2.1.1 až 7.1.1, pásy 9 až 11 znamenají DNA buněk infektovaných plaky podle 10.1.1 až 12.1.1.

Obrázek 1.6 ukazuje srovnání DNA z přírodní (WT) vakcínie a modifikovaného klonu (vp7) DNA fragmentů, které jsou rozštěpeny uvedenými restriktivními endonukleasami a odděleny na agarosovém gelu po vybarvení ethidiumbromidem. Pásky 1 a 2 znamenají WT a vp7 rozštěpené působením *NotI*, pásky 3 a 4 znamenají WT a vp7 rozštěpené působením *HindIII*, pásky 6 a 7 znamenají WT a vp7 rozštěpené současně působením *HindIII* a *NotI*, pásky 7 a 8 ukazují WT a vp7 rozštěpené působením *PstI*, pásky 9 a 10 znamenají WT a vp7 rozštěpené současně působením *PstI* a *NotI*, pásky 11 a 12 znamenají WT a vp7 rozštěpené působením *Sall*, pás 13 znamená DNA markeru (ligovaná a působením *HindIII* rozštěpená DNA fagu lambda; fág ØX rozštěpený působením *HaeIII*). Šipky na levé straně označují velikost fragmentů (v tisících párech nukleotidů) vakcínie WT rozštěpené působením *NotI*, šipky vpravo označují markery. Všimněte si, že pásky 1 a 2 obsahují asi desetkrát méně DNA než jiné pásky.

Obrázek 1.7 ukazuje Southernův blot gelu uvedeného na obrázku 1.6 pomocí sondy *gpt*-genu. Šipky označují velikosti markeru.

Obrázek 1.8 ukazuje Southernovu blotovou analýzu DNA viru vakcínie infektovaných buněk rozštěpenou působením *NotI* a hybridizovanou sondou viru vakcínie. Pásky 1 až 4 znamenají DNA buněk infektovaných plaky označenými A1 až A4, pásky 5 až 8 znamenají plaky C1 až C4, pásky 9 až 12 znamenají plaky E1 až E4, pás 13 znamená DNA vakcínie WT, pás 14 znamená DNA neinfektovaných buněk hostitele CV-1, pás 15 znamená DNA markeru (DNA fagu lambda rozštěpenou působením *HindIII* a fág ØX rozštěpený působením *HaeIII*).

Obrázek 1.9 ukazuje Southernovu blotovou analýzu stejného vzorku jako v gelu na obrázku 1.8 pomocí sondy *gpt*-genu. Pásky 1 až 12 znamenají jak uvedeno na obrázku 1.8, pás 13 znamená DNA neinfektovaných buněk hostitele CV-1, pás 14 znamená DNA vakcínie WT, pás 15 znamená DNA markeru (DNA fagu lambda rozštěpená působením *HindIII* a fág ØX rozštěpený působením *HaeIII*).

Obrázek 1.10 ukazuje Southernovu blotovou analýzu stejných virových DNA jako v gelu na obrázku 1.8 rozštěpených působením PstI pomocí sondy gpt-gemu. Pásky 1 až 12 znamenají jak uvedeno na obrázku 1.8, pás 13 znamená DNA neinfekovaných buněk hostitele GV-1, pás 14 znamená DNA vakcinie WT, pás 15 znamená DNA markeru (DNA lambda fagu rozštěpená působením HindIII a fág ØX rozštěpený působením HaeIII).

Obrázek 1.11 představuje schéma předpověděné struktury modifikovaných PstI "g" fragmentů DNA viru vakcinie s jednou nebo dvěma insercemi kasety gpt-gen. P znamená místo štěpení PstI a N znamená místo štěpení NotI. Čísle znamenají velikost příslušných PstI fragmentů. Tučným typem čísel jsou označeny fragmenty, u nichž je očekávána hybridizace sondou gpt-gemu. Šipky označují směr transkripce gpt-gemu (800 párů nukleotidů) promotorem viru vakcinie (300 párů nukleotidů).

Obrázek 2.1 ukazuje analýzu rekombinantů genomů ptáčích neštovic (drůbeží neštovice, FP) štěpením působením restriktivní endonukleasy NotI a rozdělením FICE na 1% agarosovém gelu. Pás 5 znamená marker (fragmenty fagu lambda rozštěpeného působením HindIII, nerozštěpený fág lambda a vakcinie WR), pásy 1 a 2 znamenají DNA HP1.441 viru drůbežích neštovic, nerozštěpenou a rozštěpenou působením NotI, pásy 3 a 4 znamenají DNA f-TK2a viru drůbežích neštovic, nerozštěpenou a rozštěpenou působením NotI.

Obrázek č. 2.2 ilustruje konstrukci virů drůbežích neštovic, které expresí poskytují cizí geny přímým molekulárním klonováním. Kazeta exprese genu, sestávající z E.coli gpt genu kontrolovaného promotorem (P) viru neštovic, se liguje s pravým a levým DNA raménkem (ra, respektive la) viru drůbežích neštovic (f-TK2a) získaných štěpením působením NotI. Pakálování se provádí pomocným virem (jmen HP2) drůbežích neštovic ve fibroblastech kuřecího zárodku.

Obrázek 3.1 ilustruje způsob konstrukce modifikovaných

virů neštovic extracelulárním genomovým inženýrstvím a intracelulárním pakázováním. Kazeta genu sestávající z gpt genu kontrolovaného promotorem viru vakcinie, se liguje s "právním raménkem" (ra) a "levým raménkem" (la) DNA viru vakcinie rozštěpené v jedinečném místě působením endonukleasy SmaI. Pakázování se provádí pomocným virem drůbežích neštovic (kmen HP1.441) ve fibroblastech kuřecího zárodku. Pl znamená promotor genu viru vakcinie kodující polypeptid o molekulové hmotě 7 500.

Obrázek 3.2 ukazuje, že sestrojené genomy viru vakcinie pakázované pomocným virem drůbežích neštovic obsahují očekávaný insert v jedinečném místě štěpení SmaI, jak bylo stanoveno analýzou Southernovým blotem. Celková DNA izolovaná z infektovaných buněk se rozštěpí působením HindIII a blot se hybridizuje sondou gpt-genu. Pásky 1 až 8 znamenají DNA z buněk infektovaných plaky označenými F12.2 až F12.9, pásky 9 až 13 znamenají plaky F13.1 až F13.5, pásky 14 a 15 znamenají DNA, která je izolována z neinfektovaných buněk nebo z buněk infektovaných virem vakcinie (WR přírodního typu), která je rozštěpena působením HindIII a pás 16 znamená markery (DNA fágu lambda rozštěpená působením HindIII). DNA v páse 8 se hybridizuje, protože virový isolát č. F 12.9 se nereplikuje.

Obrázek 3.3 ukazuje schematický nástin očekávaných struktur modifikovaných genomů vakcinie, které mají genovou kazetu vloženou do jedinečného místa SmaI, zvláště modifikované HindIII "A" fragmenty virů s jednou nebo dvěma insercemi. H znamená místo štěpení restriktivní endonukleasou HindIII a S znamená místo štěpení restriktivní endonukleasou SmaI. Čísla označují velikosti fragmentů HindIII. U těch, které jsou uvedeny tučným písmem, se očekává, že hybridizují sondou gpt-genu. Kazeta gpt-genu sestává z promotoru viru vakcinie (o velikosti asi 300 párů nukleotidů) oddělených vnitřním místem HindIII z gpt sekvencí (asi 800 párů nukleotidů). Šipky označují směr transkripce gpt-genu.

Obrázek 4.1 ukazuje schematický plán konstrukce vektoru

vdTK viru vakcínie s modifikovaným genem thymidin-kinasy (tk). WR-WT znamená přírodní (WT) "Western Reserve" (WR) kmen viru vakcínie (VV). Na obrázku 4.1A je ukázán způsob používající pouze přímou molekulární modifikaci genomu viru vakcínie, včetně delecí nežádoucích míst NotI a SmaI. Na obrázku 4.1B je nastíněn alternativní přístup pro delecí místa NotI technikami získávání markeru s virem vakcínie a modifikovaným plasmidem. Na obrázku 4.1C je uveden alternativní způsob delecí místa SmaI získáváním markeru.

Obrázek 4.2 ilustruje konstruování vektoru (vdTK) viru vakcínie, jehož gen thymidin-kinasy (tk) je nabízen násobným klonovacím místem. Šipka označuje počátek a směr transkripce genu viru vakcínie tk (VV-tk) do HindIII J fragmentu klonovaného v plasmidu pHindJ-1. Gen tk je nahrazen a konečný plasmid pHindJ3 se použije pro vložení modifikovaného HindIII J fragmentu do viru vakcínie.

Obrázek 4.3 nastiňuje konstrukci plasmidů (pA1 a pA2), které jsou prekursori konstrukce kazety pro expresi genu insercí promotoru a otevřené čtecí fáze. Takové kazety jsou vhodné pro přímý molekulární přenos do vektoru vakcínie vdTK přímým (násilným) klonováním.

Obrázek 4.4 ilustruje konstrukci plasmidů (pA1-S1 a pA2-S1) obsahujících kazety pro expresi genů vhodných pro asociaci otevřených čtecích oblastí se syntetickým promotorem viru neštovic (S1) a start kodonem translace. Tyto kazety jsou určeny pro přímý molekulární přenos do vektoru viru vakcínie vdTK násilným klonováním. Promotor S1 je přítomen v různých orientacích ve dvou plasmidech, jak označují šipky, které ukazují směr transkripce.

Obrázek 4.5 nastiňuje konstruování plasmidů (pA1-S2 a pA2-S2) sestávajících z kazet exprese genu, které jsou vhodné pro asociaci otevřených čtecích oblastí, které mají start kodon translace, se syntetickým promotorem viru neštovic (S2), před přímým molekulárním přenosem do viru vakcínie vdTK násilným klonováním. Promotor S2 je přítomen

v různých orientacích ve dvou plasmidech, jak označují šipky, které ukazují směr transkripce.

Obrázek 4.6 ukazuje konstrukci plasmidů pN2-gpta a pN2-gptb.

Obrázek 4.7 ukazuje konstrukci plasmidů (pN2-gpt-S3A a pN2-gpt-S4) obsahující kazety exprese genu, kterým buď chybí (S3A) nebo které mají (S4) start kodon translace. se syntetickým promotorem (S3A, popřípadě S4), před přímým molekulárním přenosem do jedinečného místa ve vektoru viru vakcínie vđTK. Zkratky jsou uvedeny na obrázku 1.3.

Obrázek 5.1 ilustruje konstrukci kazet exprese genu (pALS1-PT) pro expresi lidského protrombinu ve vektoru viru vakcínie vđTK. Zkratky mají stejný význam jako na obrázku 1.3. Šipky označují směr transkripce.

Obrázek 5.2 představuje konstrukci plasmidu s kazetou exprese genu (pN2gpt-GPg) pro expresi lidského glu-plasminogenu ve vektoru viru vakcínie vđTK. S4 znamená syntetický promotor viru neštovic. Ostatní zkratky mají stejný význam jako na obrázku 1.3.

Obrázek 5.3 ukazuje konstrukci plasmidu s kazetou exprese genu (pN2gpt-LPg) pro expresi lidského lya-plasminogenu ve vektoru viru vakcínie vđTK. Zkratky mají význam stejně jako na obrázku 1.3.

Obrázek 5.4 nastiňuje konstrukci plasmidu s kazetou exprese genu (pN2gpt-gpl60) pro expresi antigenu lidského viru (HIVgpl60) ve vektoru viru vakcínie vđTK. Zkratky mají stejný význam jako je shora uvedeno na obrázku 1.3.

Obrázek 5.5 ilustruje přístup k testování modifikovaných virů vakcínie připravených přímým molekulárním klonováním založeném na protiproudé inserci genu markeru (*E. coli* lacZ gen), která uděluje vizuálně různý fenotyp ("modrý" plak ve srovnání s normálními "bílymi" plaky virů, jimž chybí lacZ gen).

Obrázek 5.6 ilustruje konstrukci plasmidů pTZS4-lacZa a pTZS4-lacZb.

Obrázek 6.1 ilustruje konstrukci vektoru viru vakcinie (vS4) s přímým základním klonovacím místem pod kontrolou silného pozdního promotoru viru vakcinie (S4).

Obrázek 6.2 ukazuje konstrukci modifikovaného viru vakcinie (vvWF) pro expresi von-Willebrandova faktoru přímou molekulární insercí otevřené čtecí oblasti do vektoru viru vakcinie vS4. vWF znamená cDNA von-Willebrandova faktoru. Šipky označují směr transkripce ^{od} promotoru S4.

Obrázek 7.1 ilustruje vliv množství přidané DNA na pakážování DNA viru vakcinie pomocným virem drůbežích neštovic do savčích buněk (CV-1), v nichž se vir drůbežích neštovic nereplikuje úplně. Pět kultur bylo infektováno virem drůbežích neštovic a následně transfektováno vyznačenými množstvími DNA viru vakcinie. První sloupec znamená kulturu bez přidané DNA a bez viru drůbežích neštovic, pátý sloupec znamená kulturu bez přidané DNA, ale infektovanou virem drůbežích neštovic.

Obrázek 8.1 nastiňuje konstrukci viru vakcinie (vdhr) vhodného pro použití jako pomocný vir s rozsáhlými mutacemi hostitele, které zabráňují replikaci v některých lidských buněčných liniích. hr-gen znamená gen hostitelské oblasti umístěný v EcoRI K fragmentu viru vakcinie. Ostatní zkratky mají stejný význam jako na obrázku 1.3.

Obrázek 9.1 ukazuje konstrukci plasmidů pS2gpt-P2 a pP2gpl60MN. Šipky uvnitř plasmidů ukazují směr transkripce příslušných genů.

Obrázek 9.2 je schematický nástin konstrukce virů vP2-gpl60MN-A a vP2-gpl60MN-B.

Obrázek 9.3 ukazuje mapy PstI-E-fragmentu viru vakcinie přírodního typu a PstI-fragmentů chimerních virů

obsahujících gpl60 geny. Šipky označují směr transkripce genu gpl60. Čísla označují velikosti fragmentů v tisících párech nukleotidů.

Obrázek 9.4 ukazuje konstrukci plasmidu pselP-gpt-L2. Šipky označují směr transkripce příslušných genů.

Obrázek 9.5 A) ukazuje konstrukci plasmidu pselP-gpl60MN a obrázek 9.5 B) ukazuje sekvenci kolem translačních start kodonů přírodního (sekvence čísla 73) a modifikovaného (sekvence číslo 75) gpl60-genu.

Obrázek 9.6 je schematický nástin konstrukce chimerních virů vakcinie vselP-gpl60MNA a vP2-gpl60MNB. Šipky označují směr transkripce gpl60-genu.

Obrázek 9.7 je mapa SalI-P-fragmentu viru vakcinie přírodního typu a SalI-fragmentů chimerních virů vakcinie vselP-gpl60MNA a vP1-gpl60MNB. Šipky ukazují směr transkripce gpl60-genu. Čísla označují velikosti fragmentů v tisících párech nukleotidů.

Obrázek 10.1 A) ukazuje strukturu plasmidu pN2-gptaProtS. Kazeta dvou genů sestávající z gpt genu kontrolovaného P7.5 promotorem vakcinie (P7.5) a genu lidského proteinu S (leuProtS) kontrolovaného syntetickým promotorem viru neštovic (selP) je obklopena restrikčními místy NotI. Obrázek 10.1 B) ukazuje sekvence kolem translačních start kodonů genu přírodního proteinu S (sekvence číslo 77) a genu proteinu S v chimerách (sekvence číslo 79).

Obrázek 10.2 ukazuje Southernovu blotovou analýzu chimerních virů vakcinie nesoucích gen proteinu S. A) Celková buněčná DNA rozštěpená působením SacI a hybridizovaná SacI fragmentem vakcinie přírodního typu. B) Stejný materiál rozštěpený působením NotI a sondovaný sekvencemi lidského proteinu S. C) Schematický nástin SacI-I-fragmentu přírodního typu a chimerního SacI-fragmentu po ligaci insertu.

Obrázek 10.3 ukazuje Westernovu blotovou analýzu od

plasmu odvozeného proteinu S (pdProtS, pásy 1 a 2) a rekombinantního proteinu S (rProtS). Supernatanty buněčné kultury (10 mikrolitrů) buněk SK Hep1 byly analyzovány po inkubačních periodách 24 až 72 hodiny.

Obrázek 11.1 ukazuje strukturu plasmidu pN2gpt⁺-FIX. Kazeta dvou genů sestávající z gpt genu kontrolovaného P7.5 promotorem vakcinie (P7.5) a genu lidského faktoru IX kontrolovaného syntetickým promotorem viru neštovic (seIF) je obklopena restrikčními místy NotI.

Obrázek 11.2 ukazuje Southernovu blotovou analýzu chimerních virů nesoucích gen lidského faktoru IX. A): Celkové buněčné DNA rozštěpené působením Sfu a hybridizované sondou genu lidského faktoru IX (plasmid pBluscript-FIX). Ve všech 6 ampicisolátech (č. 1 až 6, 9 a 10) měl insert orientaci "A", m znamená marker, VV-WT/WR znamená vakcinie přírodního typu, WR-kmen. B): Předpověděné genomové struktury chimerních virů.

Obrázek 11.3 ukazuje Westernovu blotovou analýzu od plasmu odvozeného faktoru IX (pdFIX, pásy 1 a 2) a rekombinantního faktoru IX, získaného expresí chimerním virem vakcinie v buňkách VERO. Supernatanty buněčné kultury (10 μ l) se analyzují po dvasedmdesátihodinové inkubaci. Č. 1 a 6, 9 a 10 znamenají izoláty plekl, pd FIX znamená od plasmu odvozený faktor IX.

Obrázek 12.1 ilustruje konstrukci chimerního viru drůbežích neštovic f-env-III^B přímým molekulárním klonováním HIVIII^B env genu.

Obrázek 12.2 A) ukazuje Southernovy bloty SspI-fragmentů izolátů chimerního viru drůbežích neštovic ukazující inserty env genu. Pásy 1 až 12 znamenají virové izoláty f-IPa-1, pásy 13 a 14 znamenají HP1.441 a f-TK2a (negativní kontroly), pás 15 znamená SspI štěp (10 ng) pN2gpt-gp160 (pozitivní kontrola). Obrázek 12.2 B) ukazuje restrikční mapy SspI fragmentů insertů ve dvou možných orientacích v chimerním viru drůbežích neštovic. Čísla označují velikosti Ssp I-fragmentů v tisících párech nukleotidů. Šipky označují orien-

tací insertu, která odpovídá směru transkripce transkripční jednotky gpl60.

Obrázek 12.3 ukazuje expresi HIV obalových glykoproteinů ve fibroblastech kuřecích zárodků (Westernovy bloty). Pásky 1 až 8 znamenají virové izoláty f-LP2a až h, pásky 9 a 15 znamenají standard gpl60 (poskytnutý A. Mittererem, Immuno Ag, Orth/donau, Rakousko), pásky 10 až 13 znamenají virové izoláty f-LP2i až l, pás 14 znamená proteiny markeru, pásky 16 a 17 znamenají viry neštovic drůbeže HPl.441 a f-TK2a (negativní kontroly).

Obrázek 12.4 ukazuje detekci HIV gp41 produkovaných chimerními viry vakcínou v infektovaných fibroblastech kuřecího zárodku (Westernovy bloty). Pásky 1 až 8 znamenají virové izoláty f-LP2a až h, pásky 9 a 15 znamenají standard gpl60, pásky 10 až 13 znamenají virové izoláty f-LP2i až l, pás 4 znamená proteiny markeru, pásky 16 a 17 znamenají viry drůbežích neštovic HPl.441 a f-TK2a (negativní kontroly).

V následující části tohoto spisu jsou podrobně popsána výhodná uspořádání tohoto vynálezu.

Tento vynález znamená první konstrukci modifikovaného genomu cytoplasmové DNA eukaryotického viru, jako je například vir neštovic, úplně mimo hranici živé buňky. Tato konstrukce se sestaví tak, že se použije virová genomová DNA, která se rozštěpí endonukleasou specifickou pro sekvenci a potom se religuje cizí DNA. Výsledná modifikovaná DNA se pak pakáží do infekčních virionů viru neštovic transfekcí do hostitelských buněk infektovaných jiným virem neštovic, který slouží jako pomocný vir.

Tento vynález umožňuje různé strategie získávání vektorů z cytoplasmatických eukaryotických virů, které byly dříve aplikovány na jiné DNA-viry pro řešení různých problémů v genetickém inženýrství. Například přístup přímého klonování nabízí možnost klonování genů přímo do cytoplasmatických DNA-virů, jako jsou například viry neštovic, které nemohou být klono-

vány v bakteriálních systémech, ať už proto, že jsou pro bakteriální systémy příliš velké nebo proto, že jsou pro bakterie toxické a nebo že jsou v bakteriích nestálé. Přímé molekulární klonování dovozuje větší přenos než zkonstruování virových genomů, za optimálních podmínek může zvýšit rychlost klonování a produkuje se také různé konstrukce v jediné lisační směsi, které mají násobné inserty s různými orientacemi. To umožňuje rychlé testování (skrining) uspořádání, které poskytuje optimální expresi cizího genu.

Pojem "eukaryotický cytoplasmatický DNA-virus", jak je zde používán, zahrnuje jak iridoviry tak viry neštovic. Mezi "iridoviry" patří jakýkoliv virus, který je klasifikován jako virus třídy Iridoviridae, jako je například virus africké horečky prasat, a také viry obojživelníků a viry hmyzu. Mezi "viry neštovic" patří jakýkoliv člen rodu Poxviridae včetně podrodů Chordopoxviridae (viry neštovic obratlovců) a Entomopoxviridae (viry neštovic hmyzu). Viz například B. Moss a B. N. Fields, D. M. Knipe a spol. "Virology" 2080 (Raven Press, 1990). Mezi viry neštovic obratlovců (Chordopoxviridae) patří mimo jiné následující rody, z nichž některé zvláštní příklady (uvedené v závorkách) jsou zde diskutovány: Orthopoxvirus (vakcínie), Avipoxvirus (virus drůbežích neštovic), Capripoxvirus (neštovice ovce), Leporipoxvirus (firbom králíků (Shope), myxom) a Suipoxvirus (neštovice prasat). Entomopoxviridae zahrnují tři rody: A, B a C.

Podle jednoho aspektu tohoto vynálezu se získává způsob přípravy modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru přímým molekulárním klonováním modifikovaného genomu cytoplasmatického DNA-viru. Tento způsob zahrnuje stupeň modifikování za extracelulárních podmínek vyčištěné DNA molekuly obsahující první genom cytoplasmatického DNA-viru. Připraví se tak modifikovaná molekula DNA, která obsahuje genom cytoplasmatického DNA-viru.

Vyčištěná DNA molekula vhodná pro modifikaci podle tohoto vynálezu se připravuje, například izolací genomové

DNA z částíček viru podle standardních způsobů izolace genomové DNA z cytoplasmového eukaryotického ^{DNA} viru. Viz například zde dále uvedený příklad 1. Některé nebo všechny tyto vyčištěné DNA molekuly se mohou připravovat molekulárním klonováním nebo chemickou syntézou.

Modifikování vyčištěné DNA molekuly, která obsahuje virový genom podle tohoto vynálezu, zahrnuje provedení jakékoli dědičné změny v DNA sekvenci tohoto genomu. Mezi takové změny patří, například, vložení DNA sekvence do tohoto genomu, delece DNA z tohoto genomu nebo substituce DNA v tomto genomu jinou DNA sekvencí. Tato DNA sekvence, která je vložena, vynechána nebo substituována, se skládá z jednoho DNA páru nukleotidů nebo více než jednoho DNA páru nukleotidů.

Podle tohoto aspektu vynálezu se stupeň modifikování DNA molekuly, která obsahuje první genom DNA-viru, provádí jakoukoliv technikou, která je vhodná pro extracelulární modifikování sekvence DNA molekuly. Například modifikování DNA molekuly podle tohoto vynálezu zahrnuje modifikování vyčištěné DNA molekuly fyzikálním mutagenem, jako je například ultrafialové světlo, nebo chemickým mutagenem. V oblasti genetického inženýrství jsou dobře známy četné metody extracelulární mutagenese vyčištěných DNA molekul.

Podle jiného uspořádání stupeň modifikování DNA molekuly zahrnuje spojení segmentů DNA za vzniku modifikované DNA molekuly, která obsahuje modifikovaný virový genom. Podle jednoho aspektu tohoto vynálezu některé nebo všechny DNA segmenty napojené spolu za vzniku modifikované DNA molekuly se produkují štěpením DNA molekuly obsahující první virový genom nukleasou, s výhodou nukleasou specifickou pro sekvenci. Některé nebo všechny DNA segmenty napojené spolu za vzniku modifikované DNA molekuly se produkují také chemickou syntézou dobře známými způsoby.

V některých uspořádáních stupeň spojování DNA segmentů za vzniku modifikované DNA molekuly obsahuje extracelulární

stupeň ligace takových DNA segmentů mezi sebou pomocí ligasy, jako je například bakteriální nebo bakteriofagová ligasa, podle obecně známých metod rekombinace DNA. Tento stupeň modifikování DNA molekuly obsahuje také zreagování konců DNA segmentů, které byly vyštěpeny z DNA molekuly obsahující první genom viru, fosfatasou, například telecí střevní fosfatasou. Tento enzym odstraňuje fosfatové zbytky a zabraňuje tedy opětovnému navázání (religaci) DNA segmentu, získaného štěpením DNA molekuly, s jiným takovým segmentem.

V alternativním přístupu spojování DNA segmentů se některé nebo všechny DNA segmenty spojí extracelulárním anelováním kohesivních konců, které jsou dostatečně dlouhé, aby umožnily transfekci modifikované DNA molekuly do hostitelské buňky, kde dochází k ligaci anelovaných DNA segmentů.

V jiném uspořádání tohoto způsobu stupeň modifikování DNA molekuly obsahující genom prvního viru zahrnuje stupeň spojení alespoň několika DNA segmentů, které se získají štěpením genomové DNA molekuly prvního viru s dalším DNA segmentem. Získá se tak modifikovaná DNA molekula. Ve výhodném uspořádání tohoto aspektu podle tohoto vynálezu tento stupeň obsahuje štěpení genomové virové DNA molekuly endonukleasou specifickou pro sekvenci v jedinečném místě štěpení genomu prvního viru. Získají se tak dvě DNA "raménka" genomové virové DNA. Tato dvě raménka se pak spojí (ligují) s cizí DNA, která obsahuje sekvenci, o kterou se jedná. DNA sekvence, o kterou se jedná, jak je zde popsána sekvence cizího DNA segmentu, která se liguje s raménky virové DNA, obsahuje v prvním případě DNA sekvenci, která se nevyskytuje přirozeně v genomu cytoplasmového eukaryotického viru. DNA sekvence, o kterou se jedná, obsahuje sekvenci sestávající ze sekvence, která se vyskytuje přirozeně v genomu cytoplasmového eukaryotického viru a také sekvenci, která se nevyskytuje přirozeně v takovém genomu. A dále, sekvence, o kterou se jedná, může obsahovat pouze sekvence, které se vyskytují přirozeně v cytoplasmovém eukaryotickém viru, kde taková sekvence je vložena do místa v genomu takové cytoplasmové DNA-viru, které se liší od místa, v

němž se tato sekvence přirozeně nachází. A navíc, inserce přirozeně se vyskytující virové sekvence, o kterou se jedná, z jedné DNA viru do jiné nebo z jedné části jednoho virového genomu do jiné části tohoto genomu, nutně vytvoří sekvenci, která se nevyskytuje přirozeně v genomu cytoplasmového DNA-viru podle tohoto vynálezu při nspojení virového genomu a inserované virové sekvence, o kterou se jedná.

Tento cizí DNA segment, který se liguje se dvěma raménky genomové virové DNA, obsahuje konce, které jsou slučitelné pro ligaci s konci ramének virové DNA. Těmito slučitelnými konci mohou být doplňkové kohesivní konce nebo zarovnané konce. Stupeň ligace tohoto způsobu poskytuje modifikovanou DNA molekulu, která obsahuje genom prvního viru s DNA sekvencí cizí DNA vložené do genomu prvního viru v jedinečném místě štěpení.

Toto uspořádání, při němž se DNA sekvence vkládá do genomu prvního viru, je zde ilustrováno příkladem, mimo jiné, způsobu vložení kazety exprese genu do genomu viru vakcinie v jedinečném místě štěpení bakteriální endonukleasou NotI nebo SmaI, jak je to popsáno v příkladu 1, respektive v příkladu 3. Toto uspořádání je také ilustrováno příkladem vložení kazety genu do genomu rekombinantního vektoru viru drůbežích neštovic v jedinečném místě štěpení NotI v sekvenci bakteriálního genu genomu rekombinantního viru drůbežích neštovic, jak je to popsáno v příkladu 2.

Vložení (inserce) cizí DNA do jedinečného místa v genomu cytoplasmové DNA eukaryotického viru podle tohoto vynálezu je užitečné pro expresi žádaného proteinu, zvláště lidského proteinu. Například příklad 5 popisuje inserci genů pro plasminogen, protrombin a glykoprotein 160 viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV gp160) do jedinečného místa štěpení vektoru viru vakcinie a použití výsledných modifikovaných virů vakcinie pro přípravu těchto proteinů. Tyto cizí proteiny se mohou připravovat v buněčných kulturách (při přípravě vyčištěných proteinů) nebo přímo v lidském nebo zvířecím hostiteli (při imunizaci hostitele vak-

očinou, která obsahuje modifikovaný vir podle tohoto vynálezu.

V některých uspořádáních stupeň modifikování virového genomu insercí DNA sekvence obsahuje zavedení nebo odstranění funkce genu markeru pro rozlišení modifikovaného virového genomu od prvního virového genomu. Podle jednoho takového uspořádání DNA sekvence vložená do prvního virového genomu obsahuje gen selektivního markeru a stupeň izolace infekčních modifikovaných virionů viru neštovic produkovaných první hostitelskou buňkou obsahuje stupeň infektování druhé hostitelské buňky těmito infekčními viriony za podmínek, kdy dochází k selekci genomu viru neštovic, který expresí poskytuje gen selektivního markeru. Ve výhodném uspořádání tohoto přístupu podle tohoto vynálezu exprese genu selektivního markeru v druhé hostitelské buňce uděluje druhé hostitelské buňce resistenci na cytotoxickou látku. Tato látka je přítomna během infektování druhé hostitelské buňky v hladinách, které jsou dostatečné pro selekci genomu viru neštovic, který expresí poskytuje gen selektivního markeru. V tomto případě tato látka vybere (selektuje) modifikovaný virový genom, který má vložen gen selektivního markeru, ale nikoliv genom, kterému chybí tento gen markeru.

Inserce DNA sekvence obsahující gen selektivního markeru pro rozlišení modifikovaného virového genomu od prvního virového genomu je zvláště užitečná, jestliže genomová DNA molekula prvního viru je rozštěpena v jedinečném místě štěpení a tedy výsledná raménka virové DNA se pravděpodobně religují (znovu naváží) bez vložení DNA sekvence, která je žádána. Tento přístup je ukázán na příkladu způsobu vložení genu pro enzym xanthin-guanin-fosforibosyl-transferasu Escherichia coli (dále zde označovaný "gpt" gen) do, mimo jiné, genomu viru vakcinie nebo genomu viru drůbežích neštovic v jedinečném místě štěpení NotI, jak je to popsáno v příkladech 1, respektive 2.

Způsob odstraňování funkce genu markeru z prvního virového genomu pro rozlišení modifikovaného virového genomu od prvního genomu je uveden v příkladu 2. Tento

způsob se týká inserce cizí DNA sekvence do genomu viru drůbežích neštovic v místě NotI v E. coli lacZ genu kodujícímu β -galaktosidasu. Jak je to popsáno v příkladu 2 (neštovice ptáků), inserce DNA sekvence do tohoto místa přerušuje lacZ kodující sekvenci a zabráňuje tedy produkci β -galaktosidasy. Exprese tohoto enzymu poskytuje fenotyp "modrý plak" pro vir nesoucí lacZ gen. Modifikovaný virový genom, který nese v tomto místě inserci DNA sekvence, vykazuje fenotyp bílého plaku. Tímto způsobem se odliší modifikovaný vir od prvního viru. V jiném uspořádání způsobů podle tohoto vynálezu se funkční E.coli lacZ gen přenesl do vektoru s jiným genem, o který se jedná. Slouží pak jako marker modifikovaných virů, které obsahují žádaný insert.

V ještě jiných uspořádáních podle tohoto vynálezu stupeň modifikování DNA molekuly obsahuje zavedení nového místa štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci do prvního virového genomu. Jeden příklad tohoto uspořádání obsahuje vložení cizí DNA obsahující syntetický DNA "linker" do existujícího jedinečného místa v prvním genomu viru neštovic, jak je to popsáno v příkladu 6. Tento linker obsahuje "násobné klonovací místo", obsahující několik míst štěpení úzce přilehlých, která jsou užitečná pro vložení cizí DNA do modifikovaného genomu viru neštovic. Místa štěpení v násobném klonovacím místě s výhodou nejsou přítomna v prvním virovém genomu a tedy jsou jedinečnými v modifikovaném virovém genomu.

Podrobněji - stupeň modifikování DNA molekuly obsahující první virový genom zahrnuje také vložení DNA sekvence mezi první a druhé místo štěpení nukleasou specifickou pro sekvenci. Podle jednoho takového uspořádání první virový genom obsahuje násobné klonovací místo obsahující místa štěpení, která jsou jedinečná v prvním virovém genomu. Podle tohoto způsobu štěpení DNA molekuly, která obsahuje první virový genom ve dvou takových jedinečných místech v násobném klonovacím místě, poskytuje dvě raménka virové DNA, která mají kohesivní konce, které nejsou slučitelné s ligací navzájem mezi sebou. DNA segment mezi těmito dvěma

jedinečnými místy štěpení v násobném klonovacím místě se odstraní od rozštěpených ramének virové DNA, například vysrážením těchto ramének ethanolem, jak je to popsáno při inserci genu lidského protrombinu do modifikovaného vektoru viru neštovic v příkladu 5.

Vložení DNA segmentu do virového genomu mezi dvě jedinečná místa štěpení je užitečné pro "násilné" klonování DNA insertů, které mají kohesivní konce slučitelné s ligací s každým raménkem vektoru. Jinými slovy, tento způsob, obsahující štěpení virové DNA ve dvou místech, je užitečný pro zvýšení výtěžku virových genomů, které pocházejí od ligace ramének virové DNA, ve srovnání s raménky připravenými štěpením virové DNA v jediném místě, protože raménka podle tohoto způsobu nemají konce slučitelné s ligací. Tento násilný způsob klonování také řídí orientaci DNA vložené do modifikovaného virového genomu, protože pouze jedno raménko virové DNA je slučitelné s ligací s každým z konců vložené DNA.

Způsob násilného klonování podle tohoto vynálezu je ukázán například vložení kazety exprese genu obsahující gen lidského protrombinu do násobného klonovacího místa vektoru viru vakcinie, jak je to popsáno v příkladu 5.

Ve výhodném uspořádání DNA segment mezi dvěma jedinečnými místy štěpení v prvním virovém genomu není podstatný pro replikaci prvního virového genomu a tedy ani delece této sekvence ani její náhrada jiným DNA segmentem nezabrání replikaci výsledného modifikovaného genomu. Tento DNA segment lze také nahradit DNA segmentem obsahujícím takovou část této sekvence, která je podstatná pro virovou replikaci, svázanou s další DNA sekvencí, která se má vložit do prvního virového genomu.

Podle jiného aspektu tohoto způsobu stupeň modifikování prvního virového genomu obsahuje eliminaci nežádoucího místa štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci. Modifikace tohoto typu se mohou provádět opakovaně, jestliže je to nutné, například pro vynechání přebytečných míst štěpení něk-

terými nukleasami, čímž se získá modifikovaný virový genom, který má jedinečné místo štěpení pro příslušnou nukleasu.

Způsoby, které jsou zvláště vhodné pro odstranění míst štěpení z virového genomu, jsou dobře známy odborníkům. Patří mezi ně různé způsoby obvykle místně řízené mutagenese. Jedním ze způsobu odstranění místa štěpení endonukleasou z virového genomu, je extracelulární zpracování genomové virové DNA, aby se tak vybraly mutanty genomových DNA molekul, které jsou resistantní na štěpení příslušnou endonukleasou.

Jiným způsobem odstranění místa štěpení z virového genomu je ligace rozštěpené virové DNA molekuly s DNA segmentem, například syntetickým DNA segmentem, který obsahuje konec slučitelný s ligací s rozštěpenou virovou DNA, ale kterému chybí část rozpoznávací sekvence pro nukleasu, která štěpí tuto virovou DNA. Podle tohoto způsobu místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, která štěpí virovou DNA, obsahuje rozpoznávací sekvenci pro nukleasu, která se nachází mimo sekvence obklopující kohezivní konec v sekvencích bezprostředně přiléhajících ke kohezivním koncům. Tento syntetický linker obsahuje kohezivní konce slučitelné s ligací s raménky virové DNA rozštěpené v jediném místě. Avšak tato sekvence bezprostředně přiléhající k jednomu kohezivnímu konci syntetického insertu se liší od rozpoznávací sekvence, která je požadována pro štěpení enzymem, který štěpí virovou DNA. Ligace tohoto konce syntetického DNA segmentu s virovým raménkem tedy nevytváří znovu funkční místo pro štěpení nukleasou, která štěpí virovou DNA. Příklad tohoto způsobu odstraňování místa štěpení z virového genomu je uveden v příkladu 4, kdy se syntetický DNA fragment obsahující násobné klonovací místo vloží do jedinečného místa štěpení virového genomu.

Aby se zabránilo deaktivaci virového genomu jako důsledku modifikace, je zřejmé, že modifikace virového genomu podle tohoto vynálezu se musí provádět v takové oblasti virového

genomu, která není podstatná pro multiplikaci viru v buněčné kultuře za podmínek používaných pro množení výsledného modifikovaného viru. Mezi genomové oblasti DNA-viru obsahující sekvence, které nejsou podstatné pro multiplikaci v buněčné kultuře a jinak jsou vhodné pro modifikaci podle tohoto způsobu, patří sekvence mezi geny (tj. intergenové oblasti) a sekvence genů, které nejsou potřebné pro multiplikaci modifikovaného virového genomu.

Nepodstatné místo vhodné pro modifikování vybraného genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu lze identifikovat tak, že se připraví žádané modifikace a stanoví se, zda taková modifikace interferuje s replikací tohoto genomu za žádaných infekčních podmínek. Podrobněji - místo štěpení restriktivními enzymy ve virovém genomu včetně jedinečných míst v tomto genomu se identifikují například rozštěpením genomové DNA a analýzou výsledných fragmentů postupy, které jsou dobře známy odborníkům. Tento genom lze rozštěpit pokusnou insercí krátkého segmentu syntetické DNA do vybraného cílového místa štěpení způsobem přímého klonování podle tohoto vynálezu. Isolace viru, který obsahuje insert v cílovém místě štěpení, je přímou indikací toho, že cílové místo je nepodstatnou oblastí tohoto genomu. Jestliže neexistuje žádné použitelné místo štěpení v příslušném genomovém cílovém místě, může se takové místo zavést buď přímým molekulárním klonováním nebo konvenční konstrukcí genomu založené na technice ziskání markru. V tomto případě úspěšná izolace viru, který obsahuje vložené místo štěpení v cílovém místě, je přímou indikací toho, že cílové místo je nepodstatnou oblastí vhodnou pro modifikaci podle tohoto vynálezu.

Byly popsány jisté nepodstatné genomové oblasti viru neštovic, které jsou vhodné pro účely podle tohoto vynálezu. Viz například citaci Goebel a spol.: *Virology* 179, 247 až 266 (1990), tabulka 1, která je zde uvedena jako odkaz.

V dalších uspořádáních tohoto způsobu je alespoň část

DNA sekvence, která je vložena do prvního virového genomu, pod transkripční kontrolou promotoru. V některých uspořádáních je tento promotor umístěn v DNA sekvenci, která je vložena do prvního virového genomu a tedy kontroluje transkripci této části vložené DNA sekvence po směru vlákna od promotoru. Příkladem tohoto postupu je inserce genové kazy obsahující promotor funkčně navázaný na otevřenou čtecí oblast do genomu viru neštovic, jak je to popsáno v příkladech 1 až 5.

V jiném výhodném uspořádání je promotor kontrolující transkripci DNA sekvence, která je vložena do prvního virového genomu, umístěn v modifikovaném virovém genomu proti směru vlákna vložené DNA sekvence. Tento přístup je ilustrován insercí cDNA kodující protein lidského von Willebrandova faktoru do násobného klonovacího místa, které je funkčně navázano na promotor proti směru vlákna ve vektoru viru vakcinie, jak je to popsáno v příkladu 6.

V některých uspořádáních je promotor kontrolující vloženou DNA sekvenci rozeznáván RNA polymerasou kodovanou modifikovaným virovým genomem. Tento promotor může být rozeznáván pouze RNA polymerasou kodovanou jiným genomem, například jiným virovým genomem nebo buněčným genomem. Touto RNA polymerasou může být například polymerasa T7 bakteriofágu, která je kodována jiným genomem cytoplasmové DNA-viru nebo genomem modifikované hostitelské buňky. Polymerasa T7 a promotor byly použity například u rekombinantních virů neštovic pro zvýšení exprese vložené DNA sekvence. Viz například Fuerst T. R. a spol.: J. Mol. Biol. 205, 333 až 348 (1989). T7 RNA polymerasa na odděleném genomu se používá pro zabránění exprese DNA sekvence vložené do modifikovaného genomu viru neštovic vyjma toho, kdy je oddělený genom přítomen.

V ještě jiných uspořádáních je promotor kontrolující insert vhodný pro iniciaci transkripce RNA polymerasou cytoplasmatického DNA-viru. V některých uspořádáních promotor obsahuje modifikaci DNA sekvence přirozeně se

vyskytujícího virového promotoru. Příkladem jednoho takového uspořádání je použití "syntetického" promotoru viru vakcinie, jako je například "S3A" nebo "S4" promotor popsáný mimo jiné v příkladu 5 a příkladu 6.

Konstrukce genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu dále zahrnuje stupeň zavedení modifikované DNA molekuly obsahující modifikovaný virový genom do první hostitelské buňky, která pakázuje modifikovanou DNA molekulu do virionů modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Modifikovaná DNA molekula se zavede do první hostitelské buňky způsobem vhodným pro transfekce této první hostitelské buňky DNA molekulou, např. způsoby, které jsou známy odborníkům, transfekce jiných DNA do srovnatelných hostitelských buněk. Například ve výhodném uspořádání se modifikovaná DNA molekula zavádí do první hostitelské buňky technikou sražení fosforečnanem vápenatým podle Grahama a van der Eba: *Virology* 52, 46 až 467 (1973).

Ve výhodném uspořádání tohoto způsobu přípravy modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru dále obsahuje stupeň infikování první hostitelské buňky druhým cytoplasmatickým DNA-virem obsahujícím genom druhého cytoplasmatického DNA-viru, který expresí pakázuje modifikovanou DNA molekulu do infekčních virionů modifikovaného cytoplasmatického DNA-viru. Při způsobu, který zahrnuje infikování první hostitelské buňky druhým virem se zavedení rekombinantní DNA molekuly do první hostitelské buňky provádí s výhodou asi jednu hodinu po infikování hostitelské buňky druhým virem.

V jiném uspořádání podle tohoto vynálezu podle tohoto způsobu se nutné pakázování do první hostitelské buňky provede jiným genetickým prvkem než úplným genomem druhého viru, jako je například plasmid nebo jiný expresní vektor vhodný pro transformování první hostitelské buňky a expresování žádaných funkcí pomocného viru. Použití nevirového genetického prvku pro dosažení pomocných funkcí umožňuje

přípravu geneticky stabilních pomocných buněk, které neprodukují infekční pomocný vir. Použití této pomocné buňky jako první hostitelské buňky pro pakážování modifikované DNA molekuly s výhodou produkuje pouze viriony obsahující tyto modifikované DNA molekuly.

Při způsobu, při němž dochází k infekci první hostitelské buňky druhým virem, se druhý vir vybere tak, že exprese druhého virového genomu v první hostitelské buňce pakáží modifikovanou DNA molekulu do infekčních virionů obsahujících modifikovaný virový genom. Podle tohoto vynálezu je možné uskutečnit intracelulární pakážování modifikované DNA obsahující genom eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru transfekcí do buněk infikovaných blízce příbuzným virem. Například DNA prvního viru rodu neštovic se pakáží hostitelskou buňkou infikovanou druhým virem neštovic stejné podčeledi viru neštovic, ať už ze stejného nebo různého rodu.

V jistých uspořádáních exprese druhého virového genomu v první hostitelské buňce poskytuje infekční viriony obsahující druhý virový genom stejně jako modifikovaný virový genom. K této situaci dochází, například v případě homologního pakážování DNA prvního viru neštovic jednoho rodu druhým virem stejného rodu. I když transfektovaná DNA by se mohla teoreticky pakážovat přímo, tj. bez transkripce transfektovaného genomu, homologní pakážování transfektované DNA molekuly možná zahrnuje transkripci a replikaci jak transfektované DNA tak DNA pomocného viru. Tato situace je ilustrována mimo jiné homologním pakážováním DNA viru neštovic v příkladech 1 a 2.

Avšak v jiných uspořádáních exprese druhého virového genomu v první hostitelské buňce neprodukuje infekční viriony obsahující druhý virový genom. V případě heterologního pakážování, například pasivní pakážování samotné nemůže produkovat životaschopné virové částice z transfektované DNA. V takovém případě je výhodný druhý (pomocný) vir, který poskytne RNA polymerasu, která rozeznává transfektovanou DNA jako templát a tedy slouží pro iniciaci transkripce a

nakonec replikaci transfektované DNA. Tento případ je příkladem reaktivace modifikovaného genomu vektoru viru neštovic (vakcínie) pomocným virem ptačích neštovic (drůbežích neštovic) v savčí první hostitelské buňce, v níž vir ptačích neštovic není schopen produkovat infekční viriony obsahující genom viru ptačích neštovic, jak je to popsáno v příkladu 3.

Použití heterologního viru pro pakážování modifikované DNA molekuly, jako je například použití viru neštovic drůbeže nebo viru myších neštovic (ektromelie) jako pomocného viru pro konstrukci viru vakcínie, s výhodou minimalizuje rekombinační události mezi pomocným virovým genomem a transfektovaným genomem, který je přítomen při tom, když homologní sekvence blízce příbuzných virů jsou přítomny v jedné buňce. Viz Fenner a Comben (1958) a Fenner (1959).

V jistých uspořádáních způsobu, kdyse pomocný vir používá pro DNA pakážování, stupeň izolování infekčních virionů obsahujících modifikovaný virový genom obsahuje stupeň infikování druhé hostitelské buňky infekčními viriony produkovanými první hostitelskou buňkou. Druhá hostitelská buňka se s výhodou infikuje za takových podmínek, že exprese druhého virového genomu v druhé hostitelské buňce se neprodukuje infekční viriony obsahující druhý virový genom. Jinými slovy - druhá hostitelská buňka je infikována za podmínek, které selektují replikaci modifikovaného viru, nikoliv pomocného viru. Příkladem tohoto způsobu je způsob, při němž modifikovaný genom znamená modifikovaný genom viru vakcínie, druhý genom znamená genom viru drůbežích neštovic a druhá hostitelská buňka znamená savčí buňku. Podle tohoto způsobu se modifikovaný vir vyčistí přes plak v kulturách savčí hostitelské buňky, v nichž vir drůbežích neštovic neprodukuje infekční viriony, jak je to popsáno v příkladu 3.

V jiném uspořádání, v němž druhá hostitelská buňka se infikuje za podmínek, kdy dochází k selekci modifikovaného viru, modifikovaný virový genom obsahuje funkční gen hostitelské oblasti potřebný pro produkci infekčních virionů

v druhé hostitelské buňce. Druhému virovému genomu chybí tento funkční gen hostitelské oblasti. Toto uspořádání je ilustrováno způsobem, při němž modifikovaný virový genom znamená modifikovaný virový genom vakcínie obsahující funkční gen hostitelské oblasti potřebné pro produkci viru vakcínie v lidské (MRC 5) buňce, která se používá jako druhá hostitelská buňka, jak je to popsáno v příkladu 8.

V ještě jiném uspořádání zahrnujícím selekci modifikovaného viru v druhé hostitelské buňce modifikovaný virový genom obsahuje gen selektivního markeru, kterému chybí genom druhého viru a stupeň infikování druhé hostitelské buňky se provádí za podmínek, za kterých dochází k selekci virového genomu expresujícího gen selektivního markeru. Například exprese genu selektivního markeru v druhé hostitelské buňce může této buňce udělit resistenci na cytotoxickou látku. Tato látka se dodá během infikování druhé hostitelské buňky v takových hladinách, které postačují pro selekci virového genomu expresujícího gen selektivního markeru. Tento přístup je ukázán na příkladu způsobu vložení genu pro *E. coli* gpt gen do genomu viru vakcínie, jako například v příkladu 1, nebo genomu viru drůbežích neštovic, jako například v příkladu 2; v obou případech se používá pomocný vir, kterému chybí gen selektivního markeru.

V ještě jiném uspořádání zahrnujícím selekci modifikovaného viru v druhé hostitelské buňce obsahuje modifikovaný virový gen ^{om}deleci genu selektivního markeru, který je přítomen v druhém virovém genomu. V tomto případě se stupeň infikování druhé hostitelské buňky provádí za podmínek, za kterých dochází k selekci virového genomu expresujícího gen selektivního markeru. Například exprese genu thymidin-kinasy (tk) viru neštovic v druhé hostitelské buňce (tj. hostitelská buňka negativní na thymidin-kinasu) způsobuje, že druhý (pomocný) vir je sensitivní na metabolický inhibitor, 5-brom-deoxyfudin. Příklad 4 popisuje použití těchto inhibitorů během infikování druhé hostitelské buňky; dochází tak k selekci vektoru viru vakcínie (vdTK),

v němž je tk gen deletován a nahrazen násobným klonovacím místem.

Jiný aspekt tohoto vynálezu se týká eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru obsahujícího modifikovaný virový genom. Modifikovaný genom cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu obsahuje různé sekvence DNA, které jsou od sebe odlišitelné, například rutinní hybridizací nukleovými kyselinami nebo DNA sekvenováním.

V některých uspořádáních modifikovaný virový genom obsahuje první genom prvního eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Tento první genom obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, která je jedinečným místem štěpení v prvním genomu. V tomto uspořádání ty sekvence modifikovaného genomu, které obsahují první virový genom, jsou homologní s genomem přirozeně se vyvíjejícího eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Dále pak jsou sekvence tohoto prvního viru přerušeny DNA sekvencí, o kterou se zde jedná.

Pro stanovení, jestli tato sekvence je vložena do jedinečného místa štěpení v prvním virovém genomu, jak je to potřebné pro uspořádání modifikovaného virového genomu, se sekvence, které bezprostředně obklopují insert, srovnají se sekvencemi místa štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci.

V jedné formě tohoto uspořádání, v němž DNA sekvence je vložena do jedinečného místa štěpení prvního virového genomu, je vložena sekvence v prvním virovém genomu obklopena dvěma identickými neporušenými místy štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci. Tato dvě místa jsou jedinými místy pro tuto nukleasu v úplném modifikovaném genomu. Každé z těchto dvou míst obsahuje spojené části rozštěpených míst a prvního virového genomu a vložené DNA sekvence.

Podrobněji lze uvést, že každé vlákno dvojitě vlákenné DNA obsahující místo štěpení endonukleasou specifickou pro

sekvenci může být považováno za vlákno, které obsahuje sekvenci úplného místa štěpení ($S_L S_R$) sestávající ze sekven-
ce levého místa štěpení (S_L) a sekven-
ce pravého místa ště-
pení (S_R) oddělených monofosfátovou vazbou, které je pře-
rušeno štěpením příslušnou nukleasou. V jistých formách
tohoto uspořádání inserce DNA sekven-
ce do jedinečného
restrikčního místa reprodukuje dvě úplná místa obklopující
insert.

V jiných formách tohoto uspořádání však inserce DNA sek-
ven-
ce do jedinečného místa štěpení nevytváří znovu původní
místo štěpení na každém konci vložené DNA sekven-
ce. Viz na-
příklad způsob odstraňování místa štěpení, který je popsán
v příkladu 6. Vložená DNA může být tedy obklopena na jednom
konci (například na levém konci) úplným místem štěpení
($S_L S_R$), zatímco pravý konec končí sekvencí, která se liší
od S_L přímo navázané na S_R sekvenci v prvním virovém genomu.
Obecněji - v jakémkoliv modifikovaném virovém genomu podle
tohoto vynálezu bude DNA sekven-
ce vložená do jedinečného
místa v prvním virovém genomu obklopena dvěma párovými část-
mi (S_L a S_R) míst štěpení, která se nevyskytují v modifi-
kovaném virovém genomu mimo vloženou DNA.

V jiných uspořádáních modifikovaný virový genom sestá-
vá z DNA sekven-
ce, která je vložena mezi dvě jedinečná mís-
ta v prvním virovém genomu. V tomto případě, jestliže první
virový genom znamená přirozeně se vyskytující genom eukary-
otického cytoplasmatického DNA-viru, insert bude obklopen
virovými sekvencemi oddělenými od cizí DNA sekven-
ce alespoň
rozpoznatelnou S_L a S_R částí dvou různých původních míst ště-
pení.

V dalších uspořádáních modifikovaný virový genom obse-
huje jedinečné místo štěpení umístěné v DNA sekvenci, která
se nevyskytuje přirozeně v genomu eukaryotického plasmatic-
kého DNA-viru. V tomto případě tato cizí DNA sekven-
ce není
oddělena od přírodních virových DNA sekvencí rozpoznatelnou
 S_L a S_R částí míst štěpení. V jistých formách tohoto uspo-
řádání je první cizí DNA sekven-
ce přerušena druhou cizí
DNA sekvencí vloženou do jedinečného místa štěpení v první

sekvenci nebo mezi dvě taková místa v první sekvenci. V těchto uspořádáních je druhá cizí DNA sekvence oddělena od první cizí DNA sekvence rozpoznatelnou S_L a S_R částí míst štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci. V tomto případě všechny sekvence obklopující tuto druhou cizí DNA sekvenci obsahují genom prvního viru podle tohoto vynálezu.

Mezi výhodná uspořádání modifikovaného eukaryotického plasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu patří první hlavní uspořádání, v němž modifikovaný virový genom obsahuje I) první genom prvního eukaryotického plasmatického DNA-viru, který obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci. Toto místo je jedinečným místem v prvním virovém genomu. Modifikovaný virový genom podle tohoto uspořádání obsahuje také II) první DNA sekvenci, o kterou se jedná. Tato DNA sekvence je vložena do jedinečného místa v prvním genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru.

V jedné variaci tohoto prvního uspořádání modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru první virový genom obsahující jedinečné místo znamená přirozeně se vyskytující virový genom. Tato variace je zde ukázána na příkladu modifikovaného genomu viru neštovic obsahujícího přirozeně se vyskytující genom viru vakcínie, který má jedinečné místo štěpení (jedinečná místa štěpení) bakteriálními restrikčními endonukleasami NotI a SmaI, jak je to popsáno v příkladu 1 a v příkladu 3. V tomto uspořádání je příkladem první DNA sekvence, o kterou se jedná, která je vložena do jedinečného místa, E. coli gpt gen řízený přirozeně se vyskytujícím promotorem viru vakcínie vložený do NotI místa (příklad 1) nebo SmaI místa (příklad 3) genomu viru vakcínie.

Ve druhé formě tohoto prvního uspořádání modifikovaného viru první virový genom obsahující jedinečné místo obsahuje také druhou DNA sekvenci přirozeně se nevyskytující ve virovém genomu. Tato druhá DNA sekvence dále zahrnuje jedinečné místo pro vložení první DNA sekvence. Tato varianta je zde ukázána na příkladu modifikovaného genomu

viru drůbežích neštovic obsahujícího DNA sekvenci kodující gen Escherichia coli β -galaktosidasy, jak je to popsáno v příkladu 2. Tento bakteriální gen zahrnuje místo štěpení bakteriální restriční endonukleasou Not I, které je jedinečné v modifikovaném genomu viru drůbežích neštovic, a je tedy zvláště vhodný pro vložení sekvencí cizích DNA.

V jiné variantě tohoto prvního uspořádání modifikovaného viru alespoň část první DNA sekvence, která je vložena do jedinečného místa štěpení, je pod transkripční kontrolou promotoru. V některých případech je promotor umístěn v první DNA sekvenci, která je vložena do prvního virového genomu. K tomu dochází například tehdy, jestliže vložená DNA obsahuje genovou kazetu včetně promotoru a funkčně napojeného genu, jak je to popsáno, mimo jiné, v příkladech 1 a 2.

V druhém uspořádání modifikovaného cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu modifikovaný virový genom obsahuje I) první virový genom obsahující první a druhé místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, kde každé z těchto míst je jedinečné v prvním virovém genomu. V jedné výhodné variantě tohoto uspořádání první virový genom obsahuje násobné klonovací místo sestavené z několika jedinečných míst štěpení.

V tomto druhém uspořádání modifikovaný virový genom obsahuje také II) první DNA sekvenci přirozeně se nevyskytující v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Tato DNA sekvence je vložena do prvního virového genomu mezi první a druhé jedinečné místo štěpení.

Ve třetím uspořádání modifikovaného cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu modifikovaný virový genom obsahuje I) první virový genom obsahující první DNA sekvenci přirozeně se nevyskytující v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Tato DNA sekvence obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je jedinečným místem v modifikovaném virovém genomu. Modifikovaný virový genom podle tohoto uspořádání dále obsahuje II) promotor

umístěný tak, že DNA sekvence, vložená do jedinečného místa, je pod transkripční kontrolou promotoru. První DNA sekvence nemá start kodon translace mezi promotorem a jedinečným místem použitým pro inserci DNA sekvence. Příkladem tohoto uspořádání je vektor viru vakuinie (vS4) popsáný v příkladu 6, který má promotor "syntetického" viru neštovic umístěn tak, že tento promotor kontroluje transkripci DNA sekvence vložené do násobného klonovacího místa určeného pro vložení otevřených čtecích oblastí.

Jiný aspekt tohoto vynálezu se týká DNA molekuly obsahující modifikovaný virový genom modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu. Ve výhodném uspořádání se tato DNA molekula připravuje extrakcí genomových DNA molekul z virionů modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu nebo z buněk infikovaných modifikovaným virem podle tohoto vynálezu. Způsoby, které jsou vhodné pro extrahování modifikovaných virových genomových DNA z virionů, jsou známy odborníkům. Navíc jsou vhodné způsoby přípravy DNA eukaryotických cytoplasmatických DNA-virů popsány v příkladu 1 tohoto episu.

Ještě jiný aspekt tohoto vynálezu se týká genomových DNA ramének eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu. Tato genomová DNA raménka jsou užitečná pro přímé molekulární klonování virových genomů obsahujících cizí DNA. Podrobněji se tento aspekt podle vynálezu týká dvou DNA molekul, levého a pravého genomového raménka modifikovaného virového genomu eukaryotických cytoplasmatických DNA-virů. Při praktickém provádění shora popsaného přímého klonování podle tohoto vynálezu buď jedno nebo obě tato raménka sestávají zcela z DNA sekvence, která se přirozeně vyskytuje v cytoplasmatickém DNA-viru. Ale nová DNA molekula zde popisovaného aspektu podle tohoto vynálezu je modifikované raménko virového genomu, jinými slovy je to DNA molekula obsahující jeden konec modifikovaného virového genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Tento konec modifikovaného virového genomu obsahuje DNA sekvenci,

o kterou se jedná, která odlišuje tuto DNA molekulu od genomových ramének sestávajících pouze ze sekvence, která se přirozeně vyskytuje v cytoplasmatickém DNA-viru. Navíc, modifikovaný virový genom, od něhož je nové raménko odvozeno, obsahuje jedinečné místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci. Dále, tato DNA molekula má konec, který je homologní s produktem štěpení jedinečného místa v modifikovaném virovém genomu endonukleasou specifickou pro sekvenci.

Ve výhodném uspořádání se tato DNA molekula obsahující genomové raménko připravuje štěpením genomové DNA modifikovaného viru v jedinečném místě endonukleasou specifickou pro sekvenci. Tato DNA molekula se může připravovat také modifikováním jiné DNA molekuly. Získá se tak konec, který je homologní s koncem připraveným štěpením jedinečného místa v modifikovaném virovém genomu. Například DNA molekula podle tohoto aspektu podle tohoto vynálezu se může připravit z ramének přirozeně se vyskytujícího virového raménka, například ligací se syntetickým "adaptozem", DNA segmentem obsahujícím kohesivní konec odvozený od místa štěpení, které není přítomno v prvním virovém genomu. V tomto případě konec prvního virového genomu a ligovaný adaptot společně obsahují jeden konec modifikovaného virového genomu. Tato příslušná DNA molekula se nezískává štěpením modifikované virové genomové DNA, ale obsahuje konec, který je homologní s koncem, který se získává štěpením jedinečného místa v modifikovaném virovém genomu.

V jiném uspořádání modifikovaného virového raménka DNA podle tohoto vynálezu, DNA sekvence nevyskytující se přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je jedinečné v modifikovaném virovém genomu. Toto místo štěpení dále obsahuje sekvenci levého místa štěpení (S_L) pro levé genomové raménko nebo sekvenci pravého místa štěpení (S_R) pro pravé genomové DNA raménko. Tím se získá úplná sekvence místa štěpení ($S_L S_R$), která je jedinečná v modifikovaném virovém genomu. Příkladem tohoto

uspořádání. jsou mimo jiné DNA raménka připravená z vektoru viru drábových neštovic bakteriální restrikční endonukleasou NotI, jak je to popsáno v příkladu 2 nebo raménka vektoru viru vakcinie (vS4) rozštěpeného v kterémkoliv z několika jedinečných míst vloženého násobného klonovacího místa, tak jak je to popsáno v příkladu 6.

Ještě jiný aspekt tohoto vynálezu se týká sestavy pro přímé molekulární klonování modifikovaného virového genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru. Tato sestava obsahuje I) vyčištěné DNA molekuly podle tohoto vynálezu. Tyto molekuly obsahují buď genomová virová DNA raménka podle tohoto vynálezu nebo úplný neporušený modifikovaný virový genom podle tohoto vynálezu nebo obojí. Virová DNA raménka jsou užitečná pro přímou ligaci s cizími DNA segmenty, které se mají klonovat, zatímco neporušené virové DNA se používají pro klonování po štěpení například endonukleasou specifickou pro sekvenci v místě, které je jedinečné v modifikovaném virovém genomu.

Tato sestava dále obsahuje II) DNA ligasu a III) roztoky pufru nebo jiných reakčních činidel vhodných pro ligaci DNA segmentů. Získá se tak modifikovaná DNA molekula obsahující uvedený modifikovaný virový genom. Vhodný pufr a vhodná reakční činidla pro ligaci jsou popsána například v příkladu 1.

V jednom uspořádání tato sestava dále obsahuje plasmid obsahující kazetu exprese genu obklopenou místy štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci. Jestliže se štěpí příslušnou endonukleasou specifickou pro sekvenci místa obklopující kazetu, produkuje se konce, které jsou slučitelné s insercí této kazety jedinečného místa štěpení modifikovaného virového genomu, který je kodován DNA molekulou.

V jiném uspořádání tato klonovací sestava dále obsahuje první hostitelskou buňku a druhý (pomocný) vir vhodný pro pakálování modifikovaného virového genomu do infekčních virionů.

Ještě jiný aspekt tohoto vynálezu se týká plasmidů, které jsou zvláště vhodné jako meziprodukty pro konstrukci modifikovaných vektorů cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu. Podle jednoho uspořádání podle tohoto vynálezu podle tohoto aspektu se získává plasmid obsahující DNA segment, který má na koncích stejné místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci. Toto místo je také jedinečným místem v prvním genomu cytoplasmatického DNA-viru podle tohoto vynálezu. Tento DNA segment obsahuje násobné klonovací místo obsahující několik těsně přilehlých míst štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, která jsou v tomto plasmidu jedinečná a jsou tedy užitečná pro inserci cizích DNA segmentů do plasmidu.

Tento plasmid je užitečný pro vložení genů do jedinečného místa štěpení DNA segmentu pro následný přenos tohoto segmentu do jedinečného místa štěpení cytoplasmatického DNA-viru způsobem přímého molekulárního klonování podle tohoto vynálezu. Jako příklad tohoto plasmidu lze uvést plasmid pN2 (viz příklad 1, obrázek 1.3), který má DNA segment obsahující násobné klonovací místo obklopeno místy NotI obsahující následující další místa štěpení bakteriálními restrikčními enzymy v uvedeném pořadí: XbaI, SpeI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, EcoRV, HindIII a ClaI.

Jiný plasmid podle tohoto vynálezu obsahuje DNA segment, který má na koncích místo štěpení, které je jedinečným místem v cytoplasmatickém DNA viru. DNA segment tohoto plasmidu také obsahuje několik míst štěpení restrikčními enzymy, která jsou v tomto plasmidu jedinečná. Tento DNA segment dále obsahuje gen selektivního markeru (např. E. coli gpt gen) za transkripční kontroly promotorem cytoplasmatického DNA-viru (např. promotorem P7.5 viru vakuinie). Příklady těchto plasmidů jsou dva plasmidy označené pN2-gpta a pN2-gptb, které obsahují DNA segment obklopený místy NotI a obsahující E. coli gpt gen za transkripční kontroly promotorem P7.5 viru vakuinie. Tento plasmid byl vytvořen insercí kazety promotor-gen do místa SmaI plasmidu pN2, jak je to popsáno na obrázku 1.3.

V další modifikaci shora uvedeného plasmidu DNA segment dále obsahuje druhý promotor viru neštovic operativně napojený na DNA sekvenci obsahující místo štěpení restriční endonukleasou. Příkladem tohoto plasmidu je plasmid pN2gpt-S3A (obrázek 4.7), který lze použít pro vložení otevřených čtecích oblastí, jimž chybí jejich vlastní iniciační kodon, pro přenos do vektoru viru vakcinie. Podobně lze použít plasmid pN2gpt-S4 (obrázek 4.7) pro vložení úplných otevřených čtecích oblastí včetně start kodonu AUG-translace.

V jiném uspořádání tento plasmid obsahuje DNA sekvenci kodující lidský plasminogen, kde DNA sekvence je odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic a start kodon. Příkladem tohoto plasmidu je plasmid pN2gpt-GPg, kodující lidský glu-plasminogen, a plasmid pN2gpt-LPg, kodující lys-plasminogen, kde kodující oblast pro aminokyseliny 1 až 77 lidského plasminogenu je vynechána (obrázek 5.2 a 5.3).

V příbuzné formě tento plasmid dále obsahuje DNA sekvenci kodující vir lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) gpl60, kde DNA sekvence je odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic a start kodon. Jako příklad lze uvést plasmid pN2gpt-gpl60, který má gpl60 gen kontrolovaný syntetickým promotorem viru vakcinie S4 (obrázek 5.4).

Jiný plasmid podle tohoto vynálezu obsahuje segment genomu cytoplasmatického DNA-viru, v němž je umístěn virový gen thymidin-kinasy (tk). V tomto plasmidu je modifikována (deletována) kodující oblast tk genu, aby se zabránilo expresi aktivního tk-enzymu. Tento plasmid je užitečný jako meziprodukt při konstruování vektoru cytoplasmatického DNA-viru, který má defektní tk gen využitím konvenčních způsobů vzniku markeru, jak je to popsáno pro tk gen viru vakcinie použitím plasmidu pHindJ-3. V příbuzném uspořádání plasmid obsahující modifikovanou oblast tk genu cytoplasmatického DNA-viru, obsahuje násobné klonovací místo obsahující několik úzce přilehlých míst štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, která je jedinečná v tomto plasmidu. Dále, každé z těchto míst je nepřítomno v cytoplasmatickém

DNA-viru, do něhož má být vložena modifikovaná oblast tk genu. Po inserci modifikované oblasti tk genu, obsahující tato jedinečná místa, do virového genomu, jsou tedy tato místa užitečná pro inserci cizích DNA segmentů do genomu cytoplasmatického DNA-viru nesoucího modifikovanou oblast tk genu způsobem přímého klonování podle tohoto vynálezu.

Příkladem tohoto plasmidu, který obsahuje oblast modifikovaného tk-genu obsahující násobné klonovací místo, je plasmid p_{HindJ}-3, v němž modifikovaná oblast tk genu viru vakcinie plasmidu p_{HindJ}2 má vloženo násobné klonovací místo s jedinečnými místy NotI, SmaI, ApaI a RsrII, obklopené místy SfiI (obrázek 4.2). Aby se dále usnadnilo násobné klonování ve vektoru viru vakcinie, každé z těchto dvou SfiI míst se upraví tak, aby bylo jedinečné ve vektoru. Provede se to tak, že se využije proměnlivá povaha SfiI rozpoznávací sekvence, jak je to podrobněji uvedeno v příkladu 4.

V ještě jiném uspořádání plasmid obsahuje místo štěpení nukleasou specifickou pro sékvenci, které je jedinečné v genomu tohoto viru. Takové plasmidy jsou zvláště vhodné pro konstrukci kazet exprese genu pro přenos do vektoru, který má shora uvedené jedinečné místo. Plasmid pAO je příkladem základního plasmidu, který obsahuje hlavní klonovací místo obsahující jedinečná místa hlavního klonovacího místa vektoru v_{DTK} viru vakcinie (obrázek 4.3). Pro inserci DNA segmentů, například fragmentů syntetického nebo přírodního promotoru, byly navrženy příbuzné plasmidy pA1 a pA2. Tyto plasmidy byly konstruovány vložím pAO linkeru obsahujícího druhé násobné klonovací místo enzymů, které neštěpí pAO, do místa XhoI. Oba plasmidy mají stejnou strukturu až na orientaci druhého násobného klonovacího místa (obrázek 4.3).

V ještě jiném uspořádání plasmid obsahuje promotor viru neštovic odštěpitelně navázaný na translační oblast start kodonu, při čemž po tomto start kodonu bezprostředně následuje druhé místo štěpení restriktční endonukleasou, které je vhodně uspořádáno tak, aby umožnilo translaci otevřené čtecí oblasti do druhého místa štěpení podle tohoto vynálezu. Příkladem tohoto plasmidu jsou plasmidy pA1-S1 a pA2-S1,

které poskytují silný syntetický promotor S1 viru neštovic včetně translačního start kodonu, po němž následuje jednoduché EcoRI místo vhodné pro inserci otevřených čtecích oblastí, které nemají asociovaný start kodon (obrázek 4.4). Plasmidy pA1-S2 a pA2-S2 jsou podobné plasmidům pA1-S1 a pA2-S1, ale mají jiný promotor viru neštovic, S2 (obrázek 4.5).

V podobném uspořádání shora uvedený plasmid dále obsahuje DNA sekvenci kodující ¹lásky protrombin, v němž uvedená DNA sekvence je odštěpitelně napojena na uvedený promotor viru neštovic a uvedený start kodon. Příkladem tohoto plasmidu je plasmid pA1S1-PT (obrázek 5.1), v němž je modifikovaná protrombinová oblast vložena do jediného EcoRI místa plasmidu pA1-S1.

Jiný plasmid podle tohoto vynálezu obsahuje modifikovaný EcoRI K fragment DNA viru vakcinie, z něhož je deletován gen KIL hostitelské oblasti. Pomocný vir ²dh_r, jemuž chybí jak gen KIL tak C7L hostitelské oblasti se zkonstruuje z C7L-negativního kmene WR-6/2 získáním markeru s modifikovaným EcoRI K fragmentem, z něhož je ^edeletován gen KIL hostitelské oblasti. Viz obrázek 3.1. Tento modifikovaný EcoRI fragment obsahuje gen selektivního markeru (E. coli gpt gen) pro usnadnění selekce rekombinantních WR-6/2 genomů obsahujících modifikovaný EcoRI K fragment použitím intracelulárního získání markeru, jak je to popsáno Samem a Dumbellem (1981). Příkladem plasmidu je plasmid označený pEcoK-dh_r (obrázek 3.1).

V dalším stupni se pEcoK-dh_r linearizuje působením NotI a liguje se s každou P7.5 - gpt gen (o 1100 párech nukleotidů) odvozenou od plasmidu pN2-gpta (příklad 4) štěpením působením NotI. Výsledný plasmid pdh_r-gpt (obrázek 3.1) se používá v pokusech získávání markeru pro generaci pomocného viru ³dh_r způsobem získávání markeru podle Sama a Dumbella (1981).

Tento vynález je zde dále popsán pomocí následujících ilustrujících příkladů.

V následujících příkladech jsou některé konstrukce ilustrovány tabulkami, kde jsou uvedeny jejich vlastnosti. V těchto tabulkách jsou používány následující zkratky:

ODS znamená kodující sekvence

rc znamená reversní komplementární sekvence

rcODS znamená reversní komplementární kodující sekvence,
arabská čísla udávají polohy nukleotidů

ATG znamená translační start kodon

EMBL ID znamená identifikátor v EMBL DATABANK

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Přímé molekulární klonování cizí DNA obsahující gen selektivního markeru (gpt E. coli gen) do jedinečného (NotI) místa štěpení v genomu viru neštovic (vakuínie)

Tento příklad demonstruje přímé molekulární klonování kazety exprese genu do genomu viru neštovic podle tohoto vynálezu intracelulárním pakázováním geneticky sestavené DNA viru neštovic. Tento příklad dále ilustruje použití postupu genetické selekce pro účinnou izolaci modifikovaných virů vakuínie obsahující vložený gen selektivního markeru. Pokusné výsledky také odhalují, že k rekombinaci dochází často mezi DNA, která má být pakázována, a DNA infikujícího pomocného viru během pakázování, jestliže DNA pomocného viru je homologní s DNA, která má být pakázována.

Podrobněji uvedeno - první pokus přímého molekulárního klonování níže zde popsany ukazuje, že kazeta genu markeru (gpt-gen) se může vložit jako NotI restrikční fragment do DNA viru vakuínie rozštěpené působením NotI, načež se pakáží do savčích buněk infikovaných virem vakuínie. Jeden z devíti zkoumaných plaků obsahoval vir, který má předpověděnou strukturu jediného insertu gpt-genu s "a" orientací (viz obrázek 1.11). Struktura tohoto klonu (označená vp7) byla stabilní při replikaci ve velkém měřítku v nepřítomnosti selekčního činidla.

Ve druhé serii klonovacích pokusů mělo očekávanou strukturu sedm z dvanácti zkoumaných plaků. Tato serie však obsahovala čtyři malé plaky (E1 až E4) pomalu replikujících virů, i když s výhodou tyto plaky se obvykle nevyberou pro praktické použití podle tohoto vynálezu. Za selektivních podmínek byly získány také rekombinanty s násobnými inserty genu selektivního markeru. Stabilita těchto násobných insertů nebyla zkoumána v nepřítomnosti selektivního činidla, o němž je známo, že stabilizuje jisté nestabilní struktury. Viz Falkner a Moss: J. Virol. 64, 3108 až 3111 (1990).

Relativně nízký výtěžek předpověděných struktur není očekáván na základě známých přímých způsobů genetického inženýrství pro místně specifické štěpení a ligaci DNA molekul. Avšak příslušná sekvence vybraná pro vložení do tohoto modelového systému, kazeta gpt-genu, obsahovala DNA sekvenci viru vakcínie P7.5 promotoru, která je homologní se dvěma endogenními promotory ve vektoru vakcínie, které řídí dva geny polypeptidu viru vakcínie o 7 500 párech nukleotidů, umístěné v převrácených koncových opakováních genomu vakcínie. Viz Venkatesan B., Baroudy B. M. a Moss B.: Cell 25, 305 až 313 (1981). Tento P7.5 promotor byl použit pro konstrukci rekombinantů viru vakcínie konvenční intracelulární rekombinací a lze ho stabilně integrovat do genu thymidin-kinasy vakcínie (Mackett a Smith (1986).). Příležitostně se však během analýz konvenčních rekombinantů objevují submolekulární množství DNA fragmentů, která mohou pocházet ze sekundárních rekombinací. Jestliže se P7.5 promotor vloží blízko endogenních P7.5 promotorů (tj. v rozmezí několika tisíc párů nukleotidů), jsou stabilní pouze ty rekombinanty, které mají převrácenou opakovanou strukturu. Využitím tohoto pozorování byl vyvinut způsob delece založený na inserci tandemového opakování segmentu P7.5 promotoru (Spehner D., Drillien R. a Lecocq J.-P.: J. Virol. 64, 527 až 533 (1990).).

V tomto případě inserce kazety gpt-genu do místa NotI viru vakcínie je vzdálenost mezi P7.5 promotory levého převráceného konceového opakování a vložené kazety asi 30 000 párů nukleotidů, což je pravděpodobně dost blízko na to,

aby to způsobilo destabilizující sekundární rekombinace. Ve skutečnosti pouze struktury několika pomalu se replikujících klonů mají insert s "b" orientací", který by produkoval tandemové opakování uspořádání vloženého s endogenního promotoru. Vzácný výskyt těchto struktur lze tedy nejpravděpodobněji vysvětlit blízkostí umístění P7.5 promotorů, kazety kazety gpt-genu a endogenních P7.5 promotorů a známou nestabilitu tandemově se opakujeících kopií promotoru P7.5.

Naopak vir vp7 a některé další izoláty (A1, A4, C1 a C2) měly inserty s "a" orientací a byly stabilní. Strukturní analýza jednoho izolátu, C4, odpovídala dvojitému insertu hlava-pata.

Titry pakážívaných na gpt-gen pozitivních virů v druhé serii klonovacích pokusů (pět různých vzorků) byly přibližně $1 \cdot 10^5$ plak tvořících jednotek (pfu) na $3 \cdot 10^6$ buněk, zatímco v prvním pokusu byl pro stejný počet buněk získán titer 1 až $2 \cdot 10^2$ plak tvořících jednotek. Titr modifikovaných virů bude ovlivněn několika faktory. Mezi tyto faktory patří účinnost ligace, účinnost pakážívání, reakční podmínky, podmínky kultivace při klonovacím procesu a péče, která je věnována oddělování vektorové DNA o vysoké molekulové hmotě během postupu. Za standardních podmínek níže zde popsaných se obvykle očekávají titry asi 10^5 jednotek tvořících plak na $3 \cdot 10^6$ buněk.

I když tento příklad ukazuje, že pro inserci cizí DNA lze použít jedinečné intergenové místo NotI viru vakcinie, ilustruje také potřebu uvažování o tom, zda navržený insert může obsahovat virové sekvence typu a orientace, které jsou známy nebo pravděpodobně způsobují nestabilitu modifikovaných virů. Inserty, kterým chybí homologie s virovými sekvencemi blízko místa inserce (například v rozmezí 60 000 párů nukleotidů) by měly být výhodné z důvodu stability. Také inserty, které obsahují pouze krátké sekvence syntetického promotoru, které jsou rozeznávány transkripčním systémem vektoru, jsou výhodné ve srovnání s těmi, které obsahují dlouhé segmenty virové DNA včetně přirozených promotorů

virového vektoru. Viz například dále uvedený promotor S1 v příkladu 4.

V tomto a ve třech následujících příkladech se používají následující materiály a způsoby, pokud není uvedeno jinak.

Čištění viru neštovic a DNA: Vir vakcínie (přírodního typu kmene WR (Western Reserve), Americká sbírka typů kultur (American Type Culture Collection, ATCC) č. VR 119) se vyčistí přes dva po sobě následující sacharosové gradienty podle Macketta a spol. v D. M. Glover: "DNA Cloning. A Practical Approach.", str. 191 až 211 (IRL Press, 1985). Virová DNA se připraví postupem s proteinasou K-SDS podle Gross-Bellarda a spol.: Eur. J. Biochem. 36, 32 až 28 (1973).

Sestavení izolované DNA viru neštovic: Virová DNA (typicky 2 až 5 mikrogramů) se rozštěpí příslušnými množstvími jedné nebo více endonukleas specifických pro sekvenci (například bakteriální restriční endonukleasou NotI), popřípadě se nechá zreagovat s telecí střevní alkalickou fosfatase (Boehringer, Inc.) a vyčistí extrakcí fenolem a vysrážením ethanolem podle rutinních způsobů rekombinace DNA. Výsledná virová DNA raménka se ligují s pěti- až padesátinásobkem molárního nadbytku DNA fragmentu, který má být vložen, s konci, které jsou slučitelné s ligací s virovými raménky. Část této ligační reakce se analyzuje gelovou elektroforezou s inverzí pole.

Podrobněji - v druhé serii pokusů (A až E) níže popsané se 2 μ g DNA vakcínie, která nebyla nechána reagovat s fosfatase, rozštěpené působením NotI, ligují se 200 až 600 ng insertu kazety gpt-genu v objemu 30 μ l s 5 až 15 jednotkami T4 ligasy čtyřicet osm hodin při teplotě 12 °C, jak je to souhrnně uvedeno v tabulce I.

In vivo pakážování v savčích buňkách: 3..0⁶ buněk africké zelené opice (CV-1) se infikuje pomocným virem (buď vakcínie WR přírodního typu nebo virem WR 6/2 nebo jinými viry, jak je to uvedeno) v množství 0,2 plak tvořících

jednotek na buňku dvě hodiny. Po úvodním průkazu pakážování neporušenou DNA izolovanou z virionů se použije 20 μ g virové (vPgd) DNA. Pro pakážování extracelulárně sestavených genomů se použije 1 mikrogram DNA vyčištěné z ligační reakce. DNA se transfektují do buněk srážecí technikou fosforečnanem vápenatým (Graham F. L. a van der Eb: 1973.). Tyto buňky se inkubují patnáct minut za teploty místnosti. Potom se k buňkám přidá 9 ml média (DMEM, 10 % telecího plodového sera, glutamin a antibiotika) na 1 ml sraženiny. Po čtyřech hodinách se medium vymění a v inkubaci se pokračuje další dva dny.

Zásobní surový vir se připraví podle standardních postupů (Mackett a spol.: 1985). Testování plaků a výběr podmínek pro E. coli gpt gen jsou známy odborníkům (viz: Falkner a Moss: J. Virol. 62, 1849 až 1854 (1988) a Boyle a Coupar: Gene 65, 123 až 128 (1988)).

Gelová elektroforéza s inverzním polem (FIGE): Virová DNA se dělí na 1% agarosovém gelu v pufru Tris/octan/EDTA (40mM Tris/20mM ledová kyselina octová/2mM EDTA, pH 8,0) s dodávkou proudu regulovanou mikropočítačem (Consort Model E790). Pro rozdělení celé oblasti fragmentů byly postupně použity čtyři následující programy způsobem, který je zde nyní uveden: 1. 5 hodin při 7V/cm puls vpřed (F) 6 vteřin, zpětný puls (R) 3 vteřiny, přestávka 1 vteřina; program 2: 5 hodin při 7V/cm puls F 4 vteřiny, R 2 vteřiny, přestávka 1 vteřinu; program 3: 5 hodin při 7V/cm, F 2 vteřiny, R 1 vteřinu, přestávka 1 vteřinu a program 4: 5 až 10 hodin při 7V/cm, F 3 vteřin, R 4 vteřiny a přestávka 1 vteřinu.

Konstrukce plasmidu pN2: Plasmid Bluescript II SK (Stratagene, Inc.) se rozštěpí působením HindIII a liguje se s NotI linkery (Pharmacia, Inc.). Výsledný plasmid, pN2, má násobné klonovací místo obklopeno místy NotI.

Podrobněji - násobné klonovací místo pN2 sestává z následujících míst v uvedeném pořadí: NotI, XbaI, SpeI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, EcoRV, HindIII, ClaI a NotI.

Vložená sekvence NotI linkeru pN2 a dvacet bází 5'- a 3'-obklopujících oblastí pBluscriptu II SK (Stratagene, Inc., La Jolla, USA) jsou uvedeny v sekvenci číslo 1. Sekvence insertu začíná v poloze 21 a končí v poloze 28 (První zbytek "T" na 5'-konci odpovídá poloze číslo 2266, poslední zbytek "G" na 3'-konci odpovídá poloze číslo 2313 plasmidu pN2.).

Konstrukce plasmidů pN2-gpta a pN2-gptb: HpaI-DraI fragment o 1100 párech nukleotidů (obsahující P7.5 promotor-gpt genovou kazetu) se izoluje z plasmidu pTKgpt-Fls (Falkner a Moss: 1988.) a vloží se do místa SmaI plasmidu pN2 (obrázek 1.3). Dva výsledné plasmidy jsou orientačními isomery. Označí se pN2-gpta a pN2-gptb. Kazeta P7.5 promotor viru vakcinie - E.coli gpt-gen a dvacet bází 5'- a 3'-obklopujících oblastí plasmidu pN2 jsou pro pN2-gpta uvedeny v sekvenci číslo 2. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 1113. A-zbytek translačního iniciačního kodonu gpt-genu odpovídá poloze 519. T-zbytek translačního stop kodonu gpt-genu odpovídá poloze číslo 975 (První "C" zbytek na 5'-konci odpovídá poloze číslo 2227, poslední "T" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze číslo 3359 plasmidu pN2-gpta.).

Reversní doplňková forma kazety P7.5 promotor viru vakcinie - E.coli gpt gen a 20 nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících oblastí pN2 jsou pro pN2-gptb uvedeny v sekvenci číslo 3. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 1113. T-zbytek (reversní doplněk) translačního iniciačního kodonu CAT odpovídá poloze 615. A-zbytek (reversní doplněk) translačního stop kodonu gpt genu odpovídá poloze číslo 159.

Jiné standardní techniky rekombinantní DNA analýzy (Southernův blot, PAGE, zářezová translace, například) se provádějí způsobem podle literatury (J. Sambrook a spol.: "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.).

Pakážování nahé virové DNA: Pro stanovení podmínek potřebných pro pakážování DNA nahých virů neštovic pomocným

virem se neporušená DNA izolovaná z virionů rekombinantu viru vakcinie (vPgD) transfektuje do opičích buněk (CV-1) infikovaných pomocným virem (vakcinie WR přírodního typu). Vybraný rekombinantní vir má několik snadno testovatelných fenotypových markerů. Genom v PgD tedy inkorporuje do místa virové thymidin-kinasy (tk) gen markeru resistance na látku (gen enzymu xanthin-guanin-fosforibosyl-transferasa Escherichia coli, tj. "gpt" gen) a gen proteinu vhodně detegovatelného markeru (lidský plasminogen). Tento vir byl původně zkonstruován z kmene viru vakcinie IWR 6/2; Moss a spol.: J. Virol. 40, 387 až 395 (1960), který má ^adlouhý asi 9000 párů nukleotidů a tedy expresí neposkytuje gen virového hlavního sekretovaného 35K proteinu, popsáný Kotwalem a spol.: Nature 335, 176 až 178 (1988).]. Očekávaný fenotyp pakážívaného viru je tedy: tk-negativní (tj. replikace v přítomnosti bromdeoxyuridinu), gpt-positivní (tj. replikace v přítomnosti mykofenolové kyseliny a xanthinu), expresí poskytuje gen lidského plasminogenu a expresí neposkytuje sekretovaný 35K protein.

Bylo analyzováno osm gpt-positivních plaků ze shora uvedeného pokusu pakážívaní. Všechny ^{byly} tk-negativní a jak ukazuje obrázek 1.1, všechny expresí poskytovaly plasminogen. Šest z těchto isolátů (pásky 5, 6, 7, 11, 12 a 14) expresí neposkytovaly 35 K sekretovaný protein vakcinie a tedy vykazovaly všechny vlastnosti transfektované genomové DNA. Dva z těchto plaků expresí poskytují také marker 35K proteinu (pásky 4 a 13), jde tedy o rekombinanty pomocného přírodního viru (Pásky 8 a 15) a vklad virových genomů.

Tento pokus ukázal, že DNA nahého viru neštovic extrahovaná z virionů se pakáží, jestliže je transfektována do buněk infikovaných pomocným virem za testovaných podmínek. Tyto podmínky byly proto použity pro transfekce genomové DNA viru neštovic, která byla modifikována přímým molekulárním klonováním, jak ukazuje obrázek 1.2.

Pakážívaní extracelulárně sestavené DNA viru neštovic: Genom viru vakcinie obsahuje jediné místo štěpení endonukle-

sou NotI specifickou pro sekvenci v oblasti známé jako HindIII F fragment. Zkoumání sekvence kolem tohoto místa (Goebel a spol.: 1990.) odhalilo, že je umístěna v intergenové oblasti, u níž je nepravděpodobné, že by byla podstatná pro virovou replikaci. Zkonstruuje se kazeta exprese genu markeru ve dvou plasmidech (pN2-gpta a pN2-gptb; obrázek 1.3) insercí E. coli gpt genu do obou možných orientací. Gen gpt se kontroluje promotorem genu viru vakcínie kodujícím protein o molekulové hmotě 7 500, jak popisuje Cochran a spol.: J. Virol. 54, 30 až 37 (1985) (labelovaný P1 na obrázku 1.2 a P7.5 na obrázku 1.3). Kazeta genu celého markeru je umístěna na jediném NotI fragmentu o 1100 párech nukleotidů tohoto plasmidu. Tento restriční fragment z pN2-gpta se liguje s WR DNA přírodního typu rozštěpené působením NotI a transfektuje se do buněk, které byly infikovány pomocným virem (WR).

V prvním pokusu klonování se provede analýza Southernovým blotem genomových struktur plaků fenotypově gpt-positivních progenů. Virové izoláty se třikrát přečistí přes plak a amplifikují se za gpt-selektce. DNA fragmenty rozštěpené působením HindIII buněk (CV-1) infikovaných různými viry se rozdělí na 1% agarosovém gelu kombinací normální elektroforesy a gelové elektroforesy s inverzním polem. Gel se pak blotuje a hybridizuje ³²P-značenou DNA vakcínie WR a značenou sondou obsahující gpt sekvence. Výsledky potvrdily, že všechny klony fenotypicky pozitivní na marker obsahovaly gpt insert o 1100 párech nukleotidů.

Obrázek 1.4 ukazuje bloty HindIII DNA fragmentů z buněk infikovaných devíti virovými izoláty (sloupce 4 až 12), plakky 2.1.1 až 7.1.1 a 10.11 až 12.1.1. Byl pozorován očekávaný HindIII fragment o 800 párech nukleotidů, který obsahuje gpt-sekvence. V pásech 2 a 3, kde byla nanášena DNA viru přírodního typu rozštěpená působením HindIII, nebyla viditelná žádná zkřížená hybridizace s virovými sekvencemi.

V dalším pokusu byly celkové DNA z kultury buněk CV-1 rozštěpeny působením NotI (kultura buněk CV-1 byla infikována devíti různými plaky). Southernův blot rozdělených

fragmentů je uveden na obrázku 1.5. Neočekávaně byly ve větší virových izolátů viditelné dva pásy, předpověděný insert o 1100 párech nukleotidů a druhý - velký fragment. Jenom plak č. 7.1.1 (pás 8) vykazoval očekávaný jediný pás o 1100 párech nukleotidů. I když hybridizační signál většího fragmentu je stejně silný ve všech zkoumaných DNA, intenzita pásu o 1100 párech nukleotidů se měnila od DNA k DNA. To ukazuje na možnost, že insert o 1100 párech nukleotidů může být v různých genomech přítomen v různých molárních množstvích. Kontrola viru přírodního typu (sloupec 2) se nehybridizovala sondou gpt-genomu.

Stejný blot se hybridizuje sondou DNA viru vakcinie. Očekává se vznik tří fragmentů o velikosti asi 145 000, 45 000 a 1 100 párů nukleotidů. Bylo však zjištěno, že vedle očekávaných fragmentů byl identifikován také fragment o asi 5000 párech nukleotidů. Jenom plak, který je označen 7.1.1, neposkytl tento⁹ očekávaný fragment o asi 5000 párech nukleotidů.

Orientace DNA insertu ve vybraných sestavených genomech vakcinie byla zkoumána také Southernovým blotováním. Jak je ukázáno na obrázku 1.2, insert ve virových DNA může mít buď "a" nebo "b" orientaci, které jsou odlišitelné štěpením DNA příslušnými restrikčními enzymy. Podle předběžných analýz se zdálo, že izolát 7.1.1, který by označen jako klon vp7, má genomovou strukturu očekávaného modifikovaného viru. Byl tedy rozmnožen a vyčištěn. DNA tohoto klonu byla srovnána s DNA viru přírodního typu štěpením několika restrikčními enzymy a rozdělením na agarosovém gelu gelovou elektroforezou s inverzním polem (obrázek 1.6). V Noří štěpu vp7 obarveném ethidiumbromidem (sloupec 2) pouze fragmenty o 145 000 párech nukleotidů a 45 000 párech nukleotidů obsahovaly dostatečné množství DNA tak, aby byly viditelné. Pás, který byl vyhodnocen jako insert o 1100 párech nukleotidů, obsahoval pouze asi 3 ng DNA. Hybridizací gpt-specifickou sondou byl však zjištěn slabý pás o 1100 párech nukleotidů (obrázek 1.7, sloupec 2).

Ve štěpech získaných působením HindIII byly pozorovány očekávané pásy o 1400 párech nukleotidů a 800 párech nukleotidů. Jak bylo předpověděno, pás o 800 párech nukleotidů se hybridizuje sondou gpt-genu (obrázek 1.6 a 1.7, sloupec 4). Při dvojnásobném štěpení působením NotI a HindIII byl pozorován očekávaný pás o 800 párech nukleotidů (obrázek 1.6 a obrázek 1.7, sloupec 6).

Ve štěpech vp7 DNA působením PstI byl pozorován očekávaný fragment o 4100 párech nukleotidů obsahující gpt sekvence (obrázek 1.6 a 1.7, sloupec 8; pás obarvený ethidiumbromidem o 4100 párech nukleotidů na obrázku 1.6 je ve skutečnosti dublet fragmentů o 4100 párech nukleotidech, z nichž jeden obsahuje gpt insert). Po štěpení působením jak PstI tak NotI se kazeta gpt genu uvolní jako fragment o 1100 párech nukleotidů (obrázek 1.6 a 1.7, sloupec 10).

Obrázky štěpů, které se získají působením těchto a dalších restričních endonukleas, včetně SalI (obrázek 1.6 a obrázek 1.7, sloupce 12), jsou v souladu s interpretací, že vp7 je stabilně modifikovaný vir, který má gpt-gen integrovaný do NotI místa genomu viru vakcinie v "a" orientaci (viz obrázek 1.11).

Druhé serie klonovacích pokusů byly prováděny za mírně modifikovaných podmínek (viz tabulka I a shora uvedené způsoby). Bylo provedeno pět různých ligačních reakcí (A až E) obsahujících konstantní množství DNA vektoru vakcinie rozštěpené působením NotI a zvyšující se množství vložené DNA. Pakázování bylo provedeno za standardních podmínek v buňkách CV-1 infikovaných virem vakcinie. Titry virů vakcinie pozitivních na gpt byly ve všech případech 1.10^5 plak tvořících jednotek na 8.10^6 buněk. Populace plaků ve všech pokusech klonování byla heterologní, pokud jde o velikost: asi polovina měla normální velikost, zatímco druhá polovina měla menší než normální velikost.

Tabulka I

Vliv poměru insertu k vektorové DNA na výtěžek modifikovaných virů

pokus:	A	B	C	D	E
vektorová DNA rozštěpená působením NotI (μ g)	2	2	2	2	2
insert gpt-genu (μ g)	0,2	0,2	0,4	0,4	0,6
molární nadbytek insertu	17	17	34	34	51
T4 ligasa (jednotek)	5	15	5	15	15
gpt-positivních virů (10^5 pfu/ $3 \cdot 10^6$ buněk)	1,12		0,96		1,16
	0,88		0,96		

Bylo izolováno dvanáct plaků pozitivních na gpt, po čtyřech v každé ze tří serií označených A, C a E, které obsahovaly osm plaků o normální velikosti (velké) (A1 až A4 a C1 až C4) a čtyři malé plaky (E1 až E4). Každý z těchto plaků byla analyzována infikováním buněk CV-1 v gpt-selektivním mediu, izolováním celkových buněčných DNA a jejich rozštěpením restrikcí endonukleasami, oddělením fragmentů FIGE a blotováním na nitroceluloseové membráně.

Na obrázku 1.8 jsou vzorky DNA rozštěpené působením NotI hybridizované sondou DNA viru vakcinie (A1 až 4, sloupce 1 až 4, C1 až C4, sloupce 5 až 8 a E1 až E4, sloupce 9 až 12). Vzhledem k předávkování gelu jsou tyto pásy poněkud rozmazané, ale jejich rysy jsou zřetelně viditelné. Hlavní signál poskytuje pásy o 145 000 párech nukleotidů a 45 000 párech nukleotidů. V některých těchto vzorcích lze vidět slabý pás neznámého původu o asi 5000 párech nukleotidů. Pás o 1100 párech nukleotidů, obsahující kazetu P7.5 promotor-gpt-gen, tvoří pouze 0,6 % virového genomu a obsahuje pouze 300 párů nukleotidů hybridizující sekvence (tj. P7.5 promotor). O tomto pásu nelze očekávat, že poskytne detegovatelný hybridizační signál za použitých podmínek. Při delší expozici blotu, jestliže jsou větší pásy snažně přeexponovány, pásy o 1100 párech nukleotidů se staly viditelné.

Pokud jde o fenotyp malých plaků, malé plaky E1, E3 a E4 poskytovaly pouze slabé hybridizační signály (obrázek 1.8, sloupce 9 až 12). To ukazuje, že vir se v těchto placích nereplikoval tak intenzivně, jako je replikován v placích o normální velikosti (sloupce 1 až 8). Isolát E2 neprodukoval detegovatelné množství DNA (sloupec 10).

Vzorky, které jsou uvedeny na obrázku 1.8, byly hybridizovány také sondou gpt-genu (obrázek 1.9). Očekávaný jeden hybridizační signál byl získán s plaky A1, A4, C1, C2, C4, E3 a E4 (obrázek 1.9, sloupce 1, 4, 5, 6, 8, 11 a 12). Plak A2 (sloupec 2) měl gpt-gen integrovaný do pásu o 45 000 párech nukleotidů (Slabý pás o 145 000 párech nukleotidů může pocházet od znečištění druhým minoritním druhem nebo od sekundárních rekombinací.). Plak A3 (sloupec 3) má sekvence gpt-genu integrované do pásů o 145 000 párech nukleotidů a 45 000 párech nukleotidů, zatímco plak C3 (sloupec 7) má integrované tyto sekvence do pásu o 145 000 párech nukleotidů a do místa NotI. Plaky A2, A3 a C3 jsou možná ty rekombinanty, které vznikly nelegitimní intracelulární rekombinací homologních sekvencí přítomných v insertu kazety modelového genu a v převrácených opakováních virové DNA.

Pokud jde o sondu DNA viru vakcínie, malé plaky E1 až E4 poskytovaly pouze slabší hybridizační signály (obrázek 1.9, sloupce 9 až 12), což znamená, že vir v těchto placích se nereplikoval tak intenzivně, jako se replikuje v placích o normální velikosti. DNA viru přírodního typu a DNA neinfikovaných CV-1 buněk se nehybridizovaly sondou gpt-genu (obrázek 1.9, sloupce 13 a 15).

Orientace a počet kopií insertů gpt-genu se stanovují štěpením vzorků uvedených na obrázku 1.9 působením PstI a Southernovou blotovou analýzou. Očekávané velikosti nových PstI fragmentů, pocházejících od inserce gpt-genu, jsou uvedena na obrázku 1.11. Hybridizace sondou gpt-genu odhalila, že sestava plaků A1, A4, C1 a C2 (obrázek 1.10, sloupce 1, 4, 5 a 6) obsahuje jediný PstI fragment o 4100 párech nukleotidů, jak bylo očekáváno pro jeden insert v "a" orientaci (obrázek 1.11). U plaku E1 byl slabý hybridizační signál

od pásu o 21 000 párech nukleotidů, který byl pozorován pouze při dlouhých expozicích blotů, v souhlasu s "b" orientací insertu gpt- genu.

Struktury virových DNA z plaků O4 a E3 (obrázek 1.10, sloupce 8 a 11) byly v souhlasu s dvojitou tandemovou insercí v "b" orientaci. V tomto případě byly očekávány hybridizující fragmenty o 21 000 a 1 100 párech nukleotidů (obrázek 1.11). Struktura viru v plaku E4, který obsahuje dva fragmenty o 4 100 a 1 100 párech nukleotidů, je v souhlasu s tandemovou insercí dvou gpt-genů v "a" orientaci. DNA z plaků A2, A3 a C3 vykazovala složitější sestavu, což ukazuje na inserce do násobných míst, které nebyly dále analyzovány.

Souhrnně lze říci, že v druhém klonovacím pokusu pět z osmi plaků o normální velikosti mělo genomové struktury, které byly očekávány pro inserci jediné kazety gpt-gemu do jedinečného místa NotI genomu viru vakcinie. Pomaleji rostoucí plaky o malé velikosti vykazovaly nestabilní struktury, které byly ztraceny během následujících stupňů čištění přes plaky.

Příklad 2

Přímé molekulární klonování genu selektivního markeru (*E. coli* gpt) do jedinečného místa štěpení (NotI) modifikovaného genomu viru ptačích neštovic (klon f-TK2a viru drůbežích neštovic)

Tento příklad ilustruje obecnou použitelnost přímého molekulárního klonování modifikovaných genomů cytoplasmatických DNA-virů tím, že ilustruje aplikaci na modifikované genomy virů ptačích neštovic, které jsou geneticky sestaveny in vitro a pakážovány in vivo. Viry ptačích neštovic mají největší genomy z čeledi neštovic. Genom viru drůbežích neštovic (FPV) má velikost asi 300 000 párů nukleotidů a proto FPV rekombinanty, které expresí poskytují cizí geny, jsou zkonstruovány pouze technikami získávání markeru

[viz například: Boyle a Coupar: Virus Res. 120, 343 až 356 (1988), Taylor a spol.: Vaccine 2, 497 až 503 (1988).].

Tento příklad ilustruje přípravu modifikovaných virů drůbežích neštovic přímým molekulárním klonováním kazety exprese genu sestávající z promotoru viru neštovic, který směřuje E. coli gpt gen do jedinečného místa NotI v genomu rekombinantního viru drůbežích neštovic, f-TK2a. Toto NotI místo je umístěno v lacZ genu, který byl již dříve vložen do tohoto rekombinantu intracelulární rekombinací. Sestavená DNA se pakáží v primárních fibroblastech kuřecího zárodku infikovaných HP2 pomocným virem drůbežích neštovic, který se replikuje pomaleji než rekombinant f-TK2a. Selektce gpt-positivních plaků vede k izolaci sestavených virů drůbežích neštovic. Jelikož gen lacZ markeru je deaktivován insercí do místa NotI, progenový vir je odlišitelný od vektorového viru, jemuž chybí insert, bezbarvým fenotypem v testu modrých plaků na expresi lacZ genu.

Čištění viru drůbežích neštovic a DNA: Čištění se provádí následujícím způsobem. Vir drůbežích neštovic (FPV) kmen HP1 (Mayr a Malicki: Zentralblatt f. Veterinärmedizin, Reihe B, 13, 1 až 12 (1966).) a atenuovaný kmen HP1.441 (pasážové číslo 441 HP1) byly získány od A. Mayra (Mnichov). Vir drůbežích neštovic kmen HP2 byl odvozen od HP1.441 čištěním přes plak. Primární fibroblasty kuřecího zárodku (CEF) byly připraveny podle způsobu, který je popsán v evropské patentové přihlášce č. 0 338 807. Buňky byly kultivovány v mediu 199 pro tkáňovou kulturu (TCM199, Gibco BRL) doplněném 5 % plodového telecího sera, glutaminem a antibiotiky. Virus drůbežích neštovic byl vyčištěn dvěma postupnými sacharosovými gradienty podle Joklike W. K.: Virology 18, 9 až 18 (1962). Virová DNA byla připravena postupem s proteinasou K/SDS podle Gross-Bellarida a spol.: Eur. J. Biochem. 36, 32 až 38 (1973).

Konstrukce vektoru viru drůbežích neštovic (f-TK2a) s jedinečným (NotI) místem štěpení ve vloženém DNA segmentu:

Do intergenové oblasti mezi tk-gen a 3'-orf viru drůbežích neštovic se vloží tk-gen viru vakcínie spolu s E.coli lacZ genem. Plasmidy pTKm-VVtka a pTKm-VVtkb byly zkonstruovány klonováním funkčního tk-genu viru vakcínie do mezireprodukčního plasmidu pTKm-sP11. Po intracelulární rekombinaci pTKm-VVtka a pTKm-VVtkb s DNA viru drůbežích neštovic přírodního typu se vytvořily dvě nové FPV vektory nazvané f-TK2a a f-TK2b. Každý vektor obsahuje dva funkční tk-geny, endogenní FPV gen a vložený tk-gen viru vakcínie. Vedle vloženého lacZ genu kterýkoliv z nich může být použit jako nepodstatné místo pro vložení cizí DNA. Místo NotI v lacZ genu je jedinečným místem štěpení ve vektorech f-TK2a a f-TK2b a je tedy výhodné pro přímé molekulární klonování cizí DNA do těchto vektorů. Všechny podrobnosti konstrukce vektorů drůbežích neštovic, f-TK2a a f-TK2b, jsou popsány v USA patentové přihlášce nazvané "Rekombinantní vir drůbežích neštovic" (Scheifflinger a spol.), v níž jsou uvedeny priority ekvivalentní s Evropskou patentovou přihláškou podanou současně s touto přihláškou. Celý obsah této přihlášky je zde zahrnut jako citace.

In vivo pakážování v ptačích buňkách: $8 \cdot 10^6$ buněk CEF se infikuje 0,2 plak tvořících jednotek/buňku pomocného viru (HP2) dvě hodiny. Po pakážování sestavených FPV genomů se použije 1 mikrogram vyčištěného ligačního reakčního produktu. Buňky se transfektují DNA technikou sražením fosforečnanem vápenatým (Graham a van der Eb: 1973.) a inkubují se patnáct minut za teploty místnosti. Osm mililitrů média (TCM199, 10 % plodového telecího sera, glutamin a antibiotika) na 1 ml sražení se přidá k buňkám. Po čtyřech hodinách se medium vymění a dále se inkubuje dva dny. Zásoby surového viru se připraví podle standardních postupů (Mackett a spol.: 1985.). Analýza plaků a gpt-selektce se provádějí podle způsobu, který popsal Scheifflinger a spol.: 1991.

Přímé molekulární klonování do jedinečného místa štěpení NotI genomu viru drůbežích neštovic: Rekombinantní FPV kmen f-TK2a (Scheifflinger a spol.: 1991.) je vhodný jako

vektor pro přímé klonování kazety genu, např. modelové kazety gpt genu jak zde popsáno, do jedinečného místa štěpení NotI. Toto NotI místo vektoru je kodující oblast lacZ genu, který slouží jako barevný marker pro testování (vyhledávání), který je deaktivován po vložení genu. LacZ-positivní viry tedy tvoří modré plaky v přítomnosti chromogenního substrátu (X-gal), zatímco viry s inserty v tomto NotI místě vykazují fenotyp bílých plaků. Genom vektoru f-TK2a zahrnuje gen thymidin-kinasy (tk) viru vakuinie, který slouží také jako alternativní oblast pro inserci genu. Jak lacZ gen tak tk gen byl vložen do genomu viru drůbežích neštovic v intergenové oblasti mezi gen thymidin-kinasy viru drůbežích neštovic a 3'-otevřenou čtecí oblast konvenčními způsoby (Scheifflinger a spol.: 1991).

Sestavy DNA rozštěpené působením NotI byly získány pro genomové DNA FPV virů HPl.441 a vektorového kmene f-TK2a (obrázek 2.1). HPl.441 byl odvozen od virulentního FPV kmene atenuací seriálovým pasážováním ve fibroblastech kuřecího zárodku. HPl.441 znamená 441. pasáž HPl. Používá se jako vakcínový kmen proti viru drůbežích neštovic (Mayr a Malicki, 1966.). Dobře se adaptuje pro rychlou replikaci v buněčné kultuře.

DNA z HPl.441 se analyzuje jako reference pro FPV vektorový kmen f-TK2a, který je derivátem HPl.441. Restrikční analýza DNA HPl.441 (obrázek 2.1, sloupce 1 a 2) ukázala, že tento kmen nemá žádná NotI místa. Štěpení vektorové f-TK2a DNA působením NotI vede ke dvěma velkým fragmentům o asi 100 000 párech nukleotidů a 200 000 párech nukleotidů (obrázek 2.1, sloupec 4).

Přímá molekulární konstrukce viru drůbežích neštovic, který expresí poskytuje gpt-gen: Modelová kazeta exprese genu obsahující *E. coli* gpt gen byla zkonstruována v plasmidu pN2-gpts, který obsahuje gpt gen řízený časným/pozdním promotorem viru neštovic obklopeným místy NotI (obrázek 1.3).

Pro klonování do vektoru f-TK2a se kazeta gpt-genu vystřihne z jeho plasmidu a liguje se s genomovou DNA z f-TK2a

rozštěpenou působením NotI, jak je to nastíněno na obrázku 2.2. Ligovaná DNA se transfektuje do buněk CEF, které jsou infikovány virem drůbežích neštovic. Plaky, které jsou pozitivní na gpt a které zůstávají bílé po převrstvení vrstvou obsahující X-gal, se dále analyzují Southernovým blotováním po infikování fibroblastů kuřecího zárodku. Isoluje se celková buněčná DNA a oddělené NotI fragmenty se podrobí Southernovu blotování ^{32}P -značenými DNA pomocného viru drůbežích neštovic (HP2) a sekvencí gpt genu, jak je to popsáno v příkladu 1. Gpt-~~positivní~~ viry obsahující gpt gen v NotI fragmentu o 1100 párech nukleotidů ukazují, že ve stupni klonování došlo ke správné ligaci.

Příprava modifikovaných virů s oběma orientacemi vzorků v jednom konstrukčním stupni: Tento příklad ilustruje také to, jak mohou být izolovány viry s jednou kopií vložené kazety genu v kterékoliv orientaci a rovněž i viry obsahující více kopií vloženého genu z jediného stupně přímého molekulárního klonování. Orientace DNA insertu ve vybraných genomech geneticky sestaveného viru drůbežích neštovic se stanoví Southernovým blotováním DNA rozštěpených příslušnými restriktčními enzymy. Jak ukazuje obrázek 2.2, může mít DNA vložená do virové DNA buď "a" nebo "b" orientaci. Při předběžné analýze počtu insertů a orientace modelovou kazetou genu se celková DNA buněk infikovaných vybranými plaky rozštěpí restriktčními endonukleasami ClaI a NotI a rozdělí se na 0,8% agarosovém gelu. Blot se hybridizuje sondou gpt genu a sondou viru drůbežích neštovic. V DNA vzorcích rekombinantních virů, které se roštěpí působením NotI, se gpt kazeta vystříhne jako fragment o 1100 párech nukleotidů. Štěpení DNA, které mají insert s a- nebo b-orientací, působením ClaI také vede k rozdílným charakteristickým fragmentům hybridizujícím se sondou gpt genu, jak to bylo stanoveno ze struktur uvedených na obrázku 2.2.

Příklad 3

Heterologní pakážování geneticky sestavených genomových DNA viru neštovic (vakcinie) pomocným virem ptačích neštovic

(drůbežích neštovic) a následná selekce rekombinantů v hostitelských buňkách druhů, v nichž se pomocný virus nemůže replikovat.

Heterologní pakážování DNA viru neštovic, například pakážování DNA viru neštovic virem ptačích neštovic, nebylo dosud popsáno. Tento příklad však ukazuje, že in vivo pakážování extracelulárně sestavené DNA viru vakcinie lze docílit virem drůbežích neštovic ve fimbriálních oblastech kuřecího zárodku. Použití vektorového viru, který má jinou hostitelskou oblast než pomocný vir, poskytuje jednoduchý a účinný postup čištění sestaveného viru v jednomstupňové analýze přes plak. V tomto příkladu se tedy rekombinantní virus neštovic izoluje analýzou přes plak na savčích (CV-1) buňkách, které plně nepodporují replikaci pomocného viru ptačích neštovic. Zahrnutí dominantního selektivního markeru do DNA vložené do vektoru s výhodou usnadňuje použití selektivních podmínek analýzy přes plak pro eliminaci virů obsahujících vektorovou DNA, které chybí žádaný insert.

Jinou výhodou přístupu heterologního pakážování je snížená možnost rekombinace vektoru s pomocnými viry. Například viry neštovic a ptačích neštovic patří k různým rodům, mají různé morfologie, různě snadné možnosti replikace a sdílejí pouze minimální homologii sekvencí, jak na to ukazuje chybějící zkřížená hybridizace za standardních hybridizačních podmínek. Homologní rekombinace genomů virů ptačích neštovic a neštovic (vakcinie) je tedy nepravděpodobná. Použití těchto dvou virů může prakticky odstranit nežádoucí rekombinace, ke kterým často dochází mezi homologními sekvencemi blízce příbuzných virů (Fenner a Comben: *Virology* **5**, 530 až 548 (1958), Fenner: *Virology* **8**, 499 až 507 (1959)). Alternativním přístupem preventivního zabránění rekombinací vektoru s pomocným virem během pakážování je používání rekombinací deficitních virových kmenů nebo hostitelských buněk.

V tomto příkladu modelová kazeta exprese obsahující gen markeru (*E. coli* gpt gen řízený promotorem viru neštovic) byla vložena extracelulárně do jedinečného *Sma*I místa DNA viru vakcinie. Použití tohoto restriktivního enzymu

pro štěpení virové DNA poskytuje zarovnané konce, které mohou být ligovány s inserty DNA se zarovnanými konci připravenými jakoukoliv jinou nukleasou, která produkuje zarovnané konce nebo například použitím polymerasy nebo exonukleasy se vytvoří zarovnané konce z insertu, který má jednovláknové konce.

Pro pakážování se geneticky sestavená genomová DNA transfektuje do hostitelských buněk infikovaných virem drůbežích neštovic, v nichž mohou replikovat jak viry vakcínie tak viry drůbežích neštovic (fibroblasty kuřecího zárodku). Jelikož hostitelské rozmezí pomocného viru drůbežích neštovic je omezeno na ptačí buňky, klony viru vakcínie se vyberou vyčištěním progenu z transfektovaných buněk na savčí hostitelské buňky (buňky CV-1 ledvin africké zelené opice) čištěním přes plak. Pro izolaci pouze modifikovaných virů vakcínie se použijí simultánní selekce na expresi gpt genu. Na rozdíl od konvenčního způsobu získávání rekombinantů viru neštovic, kde do jednoho intracelulárního genetického zkrřížení lze obvykle vložit pouze jednu kopii cizího genu v jediné orientaci, v tomto příkladu byly jako produkty jediné extracelulární genomové modifikační reakce identifikovány obě možné orientace jediného insertu stejně jako dvojí inserce modelové kazety genu.

Experimentální výsledky v tomto příkladu ukazují, že účinnost pakážování ligovaných DNA viru vakcínie pomocným virem drůbežích neštovic byla velmi nízká ve srovnání s pakážováním neporušené DNA viru vakcínie virem drůbežích neštovic, které poskytuje výtěžek v rozmezí $5 \cdot 10^3$ až $1 \cdot 10^4$ plak tvořících jednotek na $6 \cdot 10^6$ fibroblastů kuřecího zárodku po třech dnech replikace. V jednom pokusu pakážování (produkujícím plaky označené "F12" serie, viz výše) byl výtěžek pakážovaných modifikovaných virů $9 \cdot 10^2$ plak tvořících jednotek a v druhém pokusu (produkujícím plaky "F13" serie) $5 \cdot 10^2$ plak tvořících jednotek na $6 \cdot 10^6$ kuřecích buněk. Jedním důvodem tohoto relativně nízkého pakážování v těchto pokusech je chybějící defosforylační zpracování vektorových DNA ramének, která proto byla schopna se

úspěšně religovat bez jakékoliv inserce. Toto zpracování bylo vynecháno, protože defosforylace DNA fragmentů se zarovnanými konci je obvykle neúčinná. Tento problém lze překonat konstrukcí takových kmenů virů hostitele, které mají násobná místa štěpení s "přečnívejícími" konci, která umožňují přímé ("násilné") klonování. Tím se značně zlepší účinnost vkládání cizích DNA fragmentů.

Jiným faktorem, který ovlivňuje účinnost pakázování, je interference mezi pomocným a pakázovacím virem na buněčné úrovni. Za standardních podmínek pakázování během tří dnů inkubace pomocné^{ho} viru (viru drůbežích neštovic) obvykle replikují na titry asi $1 \cdot 10^8$ plak tvořících jednotek na $6 \cdot 10^6$ fibroblastů kuřecího zárodku. Velký nadbytek viru drůbežích neštovic ve srovnání s pakázovaným virem vakcínie vytváří podmínky, které poskytují negativní interferenční jevy a inhibuje replikaci pakázovaného viru.

Tato interference je minimalizována tím, že se použijí pro pakázování savčí buňky v kombinaci s pomocným virem drůbežích neštovic, jak je to popsáno v příkladu 7. V tomto případě hostitelské buňky nepodporují plně replikaci pomocného viru drůbežích neštovic. Ačkoliv nebylo děláno žádné testování ligované DNA viru vakcínie na účinnost pakázování virem drůbežích neštovic v savčí hostitelské buňce, výtěžek pakázování $2 \cdot 10^6$ plak tvořících jednotek na $8 \cdot 10^6$ savčích (CV-1) buněk byl získán s nerozštěpenou^{DNA} viru vakcínie.

V každém virovém rekombinantu generovaném intracelulární rekombinací s daným insertním plasmidem má insert jednu orientaci záviselou na polaritě homologních obklopujících oblastí v tomto plasmidu. Díky transkripčním interferenčním jevům (například Ink a Pickup, 1989), hladiny exprese genů vložených do vektoru viru neštovic závisí na orientaci cíleho genu vzhledem k virovému genomu. Je tedy žádoucí získat v jednom reakčním stupni modifikované viry s jakoukoliv možnou orientací. Jedna z výhod postupu v tomto příkladu je to, že obě možné orientace vložené DNA jsou získány v jedné ligační reakci, umožňující bezprostřední testování variant,

kteře mají nejvyšší úroveň exprese. Výhodná orientace kazety tohoto příkladu ve vybraném SmaI inserčním místě viru vakcinie je "b" orientace, jak bylo prokázáno skutečností, že většina modifikovaných virů měla tuto genomovou strukturu. V této kazetě je P7.5 promotor kontrolující cizí gen v převrácené opakovací orientaci vzhledem k endogennímu genu polypeptidu o molekulové hmotě 7500. Jak bylo diskutováno v příkladu 1, endogenní geny polypeptidu o molekulové hmotě 7500 jsou umístěny v převrácených koncových opakováních genomu vakcinie. Vzdálenost P7.5 promotoru gpt genu od P7.5 promotoru v levém koncovém opakování je asi 20 000 párů nukleotidů. Orientace "a" by měla být tedy méně stabilní a měla by se získávat méně často v souladu s pozorováním, že tato orientace byla nalezena pouze dvakrát. Virové izoláty Fl3.4 (orientace a) a vFl2.5 (orientace b) byly však množeny ve velkém měřítku a gpt selekcí a bylo zjištěno, že mají stabilní předpověděné struktury. Zbývá stanovit stabilitu různých struktur obsahujících násobné inserty bez selekce.

Ligace obsahovaly několikanásobný nadbytek insertu k vektoru. Tím se usnadňuje inserce více kopií kazety, jak to bylo pozorováno. Není však jasné, proč v tomto příkladu byla dvojitá inserce častější než v příkladu 1. Vzhledem k vnitřním rekombinacím se očekává, že jsou stabilní jenom některé konfigurace násobných insertů. Pro vyhodnocení stability virů násobných insertů a optimálního poměru vektoru k insertu na stabilitu a hladinu exprese, která závisí na počtu kopií, lze provést další studie, pokud je to potřeba, pro každou konstrukci, podle toho, jak je to popsáno v této přihlášce.

Čištění viru a DNA: Byly použity viry a způsoby uvedené v příkladu 1 a v příkladu 2.

Sestavování virové DNA: Virová DNA vyčištěná z virionů se rozštěpí působením SmaI a vyčistí se jednou extrakcí fenolem a třemi extrakcemi chloroformem. V prvním výše uvedeném pokusu se dva mikrogramy rozštěpené DNA viru ligují se 400 nanogramy (34-násobný molární nadbytek) fragmentu insertu (HpaI-DraI fragment o 1100 párech nukleotidů vyštěpený z

plasmidu pTKgpt-Fls) v objemu 30 mikrolitrů 40 hodin s 15 jednotkami T₄ ligasy (Boehringer, Inc.). Druhý pokus ligace byl proveden za stejných podmínek až na to, že se použije sedmáctinásobný molární nadbytek SmaI insertu o 1100 párech nukleotidů a 5 jednotek ligasy.

In vivo heterologní pakážování^V ptačích buňkách: Fibroblasty kuřecího zárodku ($6 \cdot 10^6$) byly infikovány pomocným virem (0,5 plak tvořících jednotek na buňku HP1.441) a inkubovány dvě hodiny. Do infikovaných buněk se transfektují dva mikrogramy ligované DNA. Pak se pokračuje stejně jako je to shora popsáno pro postup homologního pakážování v příkladu 1.

Ukázka pakážování modifikované DNA viru vakcínie pomocným virem drůbežích neštovic: Návrh tohoto pokusu je ukázán na obrázku 3.1. Genomová DNA viru vakcínie byla připravena z virionů vyčištěním sacharosovým gradientem, rozštěpena restriční endonukleasou SmaI a ligována s kasetou cizího genu se zarovnanými konci. Ligovaná DNA se transfektuje do fibroblastů kuřecího zárodku infikovaných virem drůbežích neštovic pro pakážování. Progenový vir se identifikuje analýzou plaků na savčích (CV-1) buňkách, které nepodporují úplnou replikaci viru drůbežích neštovic za vzniku infekčních virionů.

Podrobněji - nejdříve se HpaI-DraI fragment nesoucí kasetu modelového genu (obsahující gpt gen řízený P7.5 promotorem viru vakcínie) vyštěpí z plasmidu pTKgpt-Fls (Falkner a Moss: 1988.) a liguje se přímo do jedinečného místa SmaI viru vakcínie přírodního typu (kmen WR). Vybere se gpt gen, který umožní pozitivní selekci modifikovaných virů (Boyle a Coupar: 1988 a Falkner a Moss: 1988.). Jediné SmaI místo v DNA viru vakcínie je umístěno v otevřené čtecí oblasti A51R v HindIII A fragmentu genomu. A51R gen je nepodstatný pro virovou replikaci v buněčné kultuře (Goebel a spol.: 1990.).

Ligovaný materiál se transfektuje do fibroblastů kuřecího

zárodku infikovaných pomocným virem drůbežích neštovic. Po třech dnech se buňky izolují a připraví se surový zásobní virus. Pakážovaný virus vakcínie se identifikuje analýzou plaků na linii buněk (CV-1) ledvin africké zelené opice v mediu, která vybere buňky infikované virem nesoucím gpt gen. Toto reakční schéma zabrání virům obsahujícím samoligovanou DNA viru vakcínie přírodního typu tvořit plak, ale umožňuje tvoření plaků modifikovanými viry, které obsahují vloženou kazetu modelového gpt genu.

V původních pokusech byla četnost pakážování nízká. Titr gpt-positivního viru vakcínie v surovém zásobním stavu připraveném z $6 \cdot 10^6$ fibroblastů kuřecího embrya byl v rozmezí $1 \cdot 10^2$ až $1 \cdot 10^3$ plak tvořících jednotek.

Třináct gpt-positivních plaků bylo amplifikováno za gpt-selektce v buňkách CV-1. Isoluje se celková DNA infikovaných buněk, rozštěpí se působením HindIII, rozdělí se na 0,7% agarosovém gelu a analyzuje se Southernovým blotováním sondou gpt-genu. Jak ukazuje obrázek 3.2, bylo získáno několik virů, které měly sestavy blotu předpověděné pro různé modifikované genomové struktury.

Ve sloupcích 2, 4, 11 a 13 (odpovídajících plakům č. F12.3, F12.5, F13.3 a F13.5) je viditelný jeden hybridizující fragment o asi 45 000 párech nukleotidů, který je očekáván, jestliže je do virového genomu vložena jedna kopie kazety genu v "b" orientaci (viz obrázek 3.3). Ve všech případech je přítomný také očekávaný nový fragment o 5200 párech nukleotidů a objevuje se také, jestliže jsou stejné DNA jako na obrázku 3.2 testovány pomocí sondy viru vakcínie.

Dva viry, jejichž sestava je v souladu s "a" orientací, byly získány ve sloupcích 7 a 12 (odpovídající plakům č. F12.8 a F13.4), kde je očekáván jediný gpt-hybridizující fragment o asi 5700 párech nukleotidů. Fragment s 5700 páry nukleotidů ve sloupci 7 je viditelnější při delších exposicích auto-radiografu. Sestava, která je vidět ve sloupci 5 (plak F12.6), může představovat jediný insert v "a" orien-

taci, ale očekávaný pás o 5700 párech nukleotidů je z neznámých důvodů poněkud větší.

Sestava tří virových isolátů je v souladu s tandemovou insercí v "a" orientaci (sloupce 1, 6 a 10 odpovídající plakům č. F12.2, F12.7 a F13.2). V těchto případech jsou očekávány dva gpt-positivní hybridizující fragmenty, o 5700 párech nukleotidů a 1100 párech nukleotidů (viz také obrázek 3.3). Fragmenty o 5700 párech nukleotidů a 4100 párech nukleotidů byly také pozorovány v ekvimolárních množstvích u virové DNA v blotu hybridizovaném sondou viru vakcinie.

Genom isolátu ve sloupci 3 (plak č. F12.4) možná obsahuje insert tandemových duplikátů v "b" orientaci. V tomto případě se očekává, že dva fragmenty o 45 000 párech nukleotidů a 1100 párech nukleotidů se hybridizují gpt-genem.

Virová DNA ve sloupci 9 (plak č. F13.1) může obsahovat dvojitou inserci hlave-hlava. V tomto případě se očekává fragment o 45 000 párech nukleotidů a 5700 párech nukleotidů hybridizující se sondou gpt-gemu. Navíc by však taková DNA měla obsahovat nový fragment o 600 párech nukleotidů, který se hybridizuje sondou DNA vakcinie. Tento fragment byl skutečně detegován na blotu hybridizovaném sondou vakcinie. Nicméně očekávaný fragment o 5700 párech nukleotidů byl o něco menší než předpověděný a poskytoval hybridizační signál, který je slabší než bylo očekáváno. Potvrzení struktury tohoto rekombinantu vyžaduje tedy podrobnější analýzu.

Další analýza odhalila, že viry F12.7 a F12.3, které byly interpretovány jako viry s dvojitou insercí tandemu "a" struktur, a virus F12.4, který byl interpretován jako virus s dvojitou insercí tandemu "b" struktur", mají ve skutečnosti násobné tandemové inserty v "a" a "b" orientaci. Southernova blotová analýza na obrázku 3. 2 nerozlišuje mezi inserty dvojitého tandemu a násobného tandemu.

Příklad 4

Konstrukce vektoru viru neštovic (vakcinie) (vdTK) s řídicím hlavním klonovacím místem a plasmidů se slučitelnými kazetami exprese

Tento příklad demonstruje aplikaci způsobů podle tohoto vynálezu při tvoření nových klonovacích vektorů virů neštovic přímou molekulární modifikací a klonováním existujících genomů viru neštovic. Tento příklad popisuje vektor viru vakcinie (vdTK), který umožňuje řízenou inserci (tj. "násilné klonování") cizích genů do krátkého segmentu "násobného klonovacího místa" obsahujícího místa štěpení různými nukleasami, při čemž každé z nich je jedinečné v genomu vektoru. Násilné klonování odstraňuje potřebu postupu výběru (selekce) nebo testování při odlišení žádaných rekombinantů od viru vektoru, jemuž chybí insert, neboť neslučitelnost DNA konců rozštěpených různými nukleasami brání religaci vektorových ramének bez cizího insertu. Přístup s násilným klonováním je nejúčinnějším způsobem vložení cizího genu do virového vektoru.

Řídicí vektor vdTK se vytvoří vložением násobného klonovacího místa (obsahující jedinečná místa NotI, SmaI, ApaI a BsrI) do místa genu thymidin-kinasy (tk) viru vakcinie (viz obrázek 4.1A). Toto nepodstatné místo je místem nejčastěji používaným pro vložení cizích genů do viru vakcinie, hlavně kvůli tomu, že je možná pozitivní selekce tk-negativních virů. Jestliže se tedy DNA ligovaného vdTK vektoru pakáží tk-positivním pomocným virem, může se s nadbytkem pomocných virů vybrat vektorový virus. A dále, vložení cizí DNA do tk-místa viru vakcinie konvenčními způsoby obecně vede ke stabilním rekombinantům.

Násobné klonovací místo nového vdTK vektoru obsahuje místa štěpení NotI a SmaI, která jsou v tomto vektoru jedinečná. Před vložением násobného klonovacího místa se místa štěpení NotI a SmaI, která před tímto vložением existují ve

viru vakcinie přírodního typu (kmen WR), vynechají přímými molekulárními modifikacemi podle tohoto vynálezu. Viry, které mají žádané modifikace, se detegují testovacími (vyhledávacími, skrining) technikami, které jsou založeny na PCR metodě (polymerase chain reaction) amplifikace sekvencí specifických nukleových kyselin.

Tento příklad popisuje také řadu plasmidů, které usnadňují expresi DNA kodujících úplně nebo částečně otevřených čtecích oblastí ve vektoru vakcinie vdtK. Tento vynález v sobě zahrnuje inserci otevřené čtecí oblasti přímo do expresního vektoru viru neštovic, který má všechny příslušné regulační prvky vhodně umístěné pro expresi vložené otevřené čtecí oblasti. Avšak tento vdtK vektor nemá takové regulační sekvence pro expresi vložené otevřené čtecí oblasti, které chybí její vlastní transkripční a translační signály. Plasmidy podle tohoto vynálezu podle tohoto příkladu tedy poskytují vhodné kazety exprese genů pro rutinní navázání otevřených čtecích oblastí na promotory viru neštovic a popřípadě na translační start kodon. Otevřená čtecí oblast a související regulační sekvence jsou tedy efektivně přeneseny do vdtK vektorového hlavního místa klonování násilným klonováním. Modifikované viry, které mají insert v jakékoliv orientaci, se mohou získat použitím jednoho ze dvou plasmidů, které mají kazetu exprese se žádanou orientací v jeho hlavním místě klonování. Kazety exprese genu plasmidů, jejichž příklady jsou zde uvedeny, mají dvě uhníždění řady míst štěpení restrikčními enzymy, což usnadňuje klonování otevřených čtecích oblastí do vdtK vektoru. Tyto kazety mají hlavní místo klonování, které obsahuje stejná jedinečná místa, jako hlavní místo klonování vdtK vektoru. A navíc, ve středu tohoto hlavního místa klonování tyto kazety obsahují různá místa často se vyskytujícími štěpicími enzymy, která jsou užitečná pro vložení otevřených čtecích oblastí do kazet. DNA, které jsou vloženy do kazet pomocí často se vyskytujícími míst štěpení, jsou obklopeny na kterékoliv straně několika různými jedinečnými místy, která jsou vhodná pro násilné klonování kazety do hlavního místa klonování vdtK vektoru.

Tento příklad také popisuje kazety exprese genů vhodné pro vložení do jediného jedinečného místa ve vektoru vdtK viru vakcinie. Pro překonání snížené klonovací účinnosti při používání jediného enzymu pro štěpení DNA kazety exprese těchto plasmidů obsahují E. coli gpt gen jako selekční marker.

Vektorový systém vdtK vakcinie se s výhodou používá ve spojení s heterologním pskážovacím postupem popsaným v příkladech 3 a 7. Plasmidy obsahující gpt marker se mohou používat také s homologním pomocným virem, kterému chybí gpt marker. Příklady konstrukcí pro expresi poly-peptidů, používající vdtK vektor a příbuzné plasmidové systémy jsou zde uvedeny níže v příkladu 5.

Vedle shora uvedených výhod expresní kazetové plasmidy podle tohoto vynálezu poskytují také prostředek pro překonání obecného problému neslučitelnosti mezi konci rozštěpených vektorových DNA viru neštovic a mnoha DNA inserty, jako vhodnou alternativou k obvyklému použití segmentů DNA syntetického adaptoru. Isolace DNA fragmentů, které kodují otevřené čtecí oblasti, je obvykle usnadněna tím, že se používají restriční endonukleasy, které mají rozeznávací sekvence, které jsou krátké a náhodně se vyskytují ve vysokých frekvencích ve všech přírodních DNA sekvencích. Na druhé straně takové často se vyskytující štěpicí enzymy obvykle nejsou vhodné pro účinné přímé klonování do tak velkých genomů, jako jsou například genomy viru neštovic, protože takové enzymy štěpí velké DNA na mnoho fragmentů. K reasagaci těchto fragmentů by docházelo v náhodném pořadí za vzniku několika neparušených virových genomů. Insertní místa ve vektoru vakcinie s výhodou znamenají místa štěpení ne příliš často se vyskytujícími štěpicími restričními endonukleas, které se pravděpodobně obecně nepoužívají pro izolaci fragmentů otevřené čtecí oblasti nebo DNA insertu. Zde uvedené plasmidy překonávají tuto obecnou neslučitelnost tím, že umožňují efektivní inserce fragmentů z často se vyskytujícími štěpicími enzymy do plasmidu a následující účinný přenos do vektoru vakcinie použitím štěpicích enzymů, které

se často nevyskytují.

Delece jedinečného místa štěpení NotI viru vakcínie přírodního typu (WR): Jedinečné místo štěpení NotI²viru vakcínie lze odstranit tak, že se do tohoto místa vloží segment "NotI deleční adaptor", který má kohesivní konce slučitelné s ligací s DNA rozštěpenou působením NotI, ale které chybí sekvence potřebné pro rozpoznávání NotI endonukleasou. Sekvence tvořené ligovanými kohesivními konci virové DNA rozštěpené působením NotI, virové DNA a adaptoru nejsou štěpitelné působením NotI. Tento adaptor obsahuje také několik vybraných míst štěpení restriktivními endonukleasami pro řízenou inserci DNA fragmentů.

Podrobněji - 1 mikrogram DNA viru vakcínie WR přírodního typu se rozštěpí působením NotI a liguje se s jedním mikrogramem dvojitě vláknového NotI-delečního adaptoru. Tento adaptor sestává ze dvou částečně doplňkových vláken: odN1 (sekvence identifikační číslo 16) a odN2 (sekvence identifikační číslo 23). Střední část tohoto adaptoru obsahuje místa štěpení restriktivními endonukleasami StuI, DraI, SspI a EcoRV. Anelované adaptorové oligonukleotidy se používají pro ligační reakce. Ligovaný materiál se transfektuje do fibroblastů kuřecího zárodku infikovaného virem drůbežích neštovic a pakáží se jak je to popsáno v příkladu 3.

Alternativní postup deletování jediného NotI místa viru vakcínie (kmen WR) je nastíněn na obrázku 4.1, panel B. V prvním stupni se DNA viru vakcínie rozštěpí působením SacI. SacI "I"fragment se izoluje na nízkotající agarose a klonuje se do SmaI místa vhodného plasmidu, jako je například pTZ19R (získatelného od firmy Pharmacia, Inc.). Výsledný plasmid, pTZ-SacI, se rozštěpí působením NotI, nechá se zreagovat s Klenowovou polymerasou, aby se doplnil na přechodných koncích a religuje se. Ligovaný materiál se transfektuje do buněk E. coli (HB 101). Standardními klonovacími postupy se izolují kolonie. Výsledný plasmid, pTZ-SacIdN, má deletované místo NotI a používá se v pokusu reverzní gpt-selekce jak je to popsáno Isaacsem S. N., Kotwalem G. a

Mosses B.: *Virology* 178, 626 až 630 (1990) způsobem upraveným následujícím způsobem: CV-1 buňky ($3 \cdot 10^6$) se infikují 0,2 plak tvořícími jednotkami virového isolátu vp7, viru vakcinie, který byl integrován do jediného místa NotI kazety gpt-gemu (viz příklad 1). Potom se sraženina fosforečnanem vápenatým, která obsahuje 20 μ g DNA z modifikovaného SacI fragmentu připraveného z plasmidu pTZ-SacIdN transfektuje do buněk. Tyto buňky se dále zpracují jak je to popsáno v pakážovacím postupu v příkladu 1. Zásobní surový virus se použije pro infikování myších buněk STO (získaných z Americké sbírky typů kultur (American Type Culture Collection), Rockville, Md., ATCC č. CRL 1503) v přítomnosti 6-thioguaninu (6-TG). Toto je negativní selektivní postup, který vyžaduje ztrátu gpt-gemu u viru, který se replikuje (Issacs a spol., 1990.) a vede tedy v tomto případě k integraci modifikovaného SacI "I" fragmentu a tudíž k deleci gpt-gemu. Všem plakům, které rostou v přítomnosti 6-TG, by měl chybět gpt-gen a měly by obsahovat modifikovaný SacI I fragment. Odhadnutý výtěžek je v rozmezí 0,1 a 0,2 % ze všech plaků (tj. normální frekvence rekombinantů v tomto typu pokusů získávání markeru). Jelikož selekční postup je mimořádně účinným postupem (Issacs a spol.: 1990.), nepředpokládá se, že by identifikace přesných struktur vyžadovala zkoumání velkého počtu klonů. Ať se však pro deleci jediného NotI viru vakcinie použije shora uvedený první postup nebo tento alternativní postup, pro identifikování žádané konstrukce se může použít následující testovací postup.

Identifikace PCR-testováním viru (vdN), který má deletován místo NotI: Klony viru vakcinie, které mají deletovaný místo NotI, se mohou identifikovat analýzou plaků rostoucích v buněčné linii (CV-1), která nepodporuje růst pomocného viru drůbežích neštovic. DNA virů v jednotlivých placích se analyzují PCR-testovací metodou následujícím způsobem.

Prvním primerem pro PCR reakci je oligonukleotid odN1 (sekvence identifikační číslo 16), druhým primerem je odN3 (sekvence identifikační číslo 24). Sekvence druhého primeru je umístěna v genomu viru vakcinie asi 770 párů nukleotidů

po směru vlákna sekvence prvního primeru. Templátem je celková DNA z $1 \cdot 10^6$ CV-1 buněk infikovaných polovinou viru jedinečného plaku. DNA se připraví standardními technikami. Pro PCR reakci se použije asi 50 ng. PCR reakce se provádějí podle standardních technik komerčně dostupnými PCR sestavami. Positivní PCR reakce produkují DNA fragment o asi 770 párech nukleotidů. Takový virus, který má deletováno místo NotI, se označuje "vdN".

Delece jedinečného restrikčního místa SmaI z viru vakcínie vdN: WR kmen viru vakcínie obsahuje jediné SmaI místo v otevřené čtecí oblasti (A51R), které není podstatné pro replikaci viru v buněčné kultuře (Goebel a spol.: 1990). I když se toto místo může použít pro vložení cizího genu, v tomto příkladu je však toto místo deletováno ve prospěch vytvoření se mnohostrannějšího vektoru viru vakcínie zavedením nového jedinečného místa SmaI jako části kazety násobného klonovacího místa.

DNA vdN viru (1 μ g) se tedy rozštěpí působením SmaI a liguje se nadbytkem hexamerového linkeru, který má rozpoznávací sekvenci pro restrikční endonukleasu HindIII (odst. 3.1.1, 5'-AAGCTT-3'). Ingrese tohoto linkeru do místa štěpení SmaI viru vakcínie vede k destrukci sekvence rozeznávající SmaI a k zavedení nové HindIII rozpoznávací sekvence. Ligovaný materiál se pakáží do eva buněk, které byly infikovány v drůbežích neštovic, jak je to popsáno v příkladu 7.

Jediné SmaI místo viru vakcínie (kmén WR) se modifikovat také podle postupu nastíněného na obrázku 4.1.1 modifikováním klonovaného fragmentu DNA viru vakcínie přímého modifikování úplné DNA viru vakcínie. V tomto případě se DNA viru vakcínie rozštěpí působením SmaI. Fragment se izoluje z nízkotající agarosy a klonuje do SmaI vhodného plasmidu, jako je například pTZ19 (od firmy Pharmacia, Inc.). Výsledný plasmid obsahuje místo SmaI, jedno v násobném klonovacím místě sekvencí vakcínie (obrázek 4.1, panel 6). Plasmid se částečně rozštěpí působením SmaI a přidají

následujícím postupem: první vlákno, I-SceI linker (sekvence identifikační číslo 25) a jeho doplňkové vlákno, I-SceI linker 2 (sekvence identifikační číslo 26). Správný plasmid, který má deletováno místo SmaI v sekvencích vakcínie, se identifikuje štěpením působením SmaI a I-SceI. Konečný plasmid, pTZ-SalFds, se použije pro zavedení delece SmaI do genomu viru vakcínie s použitím pokusu reversní selekce gpt-genu, jak je to popsáno pro deletování místa NotI až na to, že výhodným virem, který má být modifikován, je izolát Fl2.5 virus, který je integrován do jediného SmaI místa kazety gpt-genu (viz příklad 3).

Výsledná inserce místa pro endonukleasu I-SceI je výhodná pro přímé molekulární klonování, protože tento enzym, izolovaný z kvasinek, rozeznává 18-merní místo a tedy štěpí náhodné DNA sekvence mimořádně řídka. Například I-SceI štěpí genom kvasinek kenom jednou (Thierry A., Perrin A., Boyer J.M. Fairhead C., Dujon B., Frey B. a Schmitz G.: Nucleic Acids Res. 19, 139 až 190 (1991).). I-SceI je komerčně dostupná od Boehringer, Inc. I-SceI místo se s výhodou zavádí do vektoru, který nemá žádná předem existující místa pro tento enzym. Vytváří se tím nový vektor s jediným místem, které může být použito pro genové inserce. Místo štěpení působením I-SceI, ať už DNA viru vakcínie nebo DNA jiných vektorů, může být stanoveno rutinní restrikční analýzou vektorové DNA.

Jestliže se používá tento alternativní postup pro deleci místa SmaI z DNA viru vakcínie, pořadí stupňů pro zkonstruování vektoru v_{DTK} je následující: delece místa SmaI vedoucí k viru v_{dS} (viz výše), delece místa NotI insercí kazety NotI gpt-gen (viz příklad 1) do jediného NotI místa viru v_{dS} klonováním a pakážováním, což vede k viru v_{dSNgpt}, reversní selekce (gpt-selekce) jak shora popsáno s použitím v_{dSNgpt} a pTZ-SacI_{DN} jako substrátů pro pokus získání markeru s delece tk-genu, jak je to nastíněno níže v tomto příkladu.

Alternativní postup, podle kterého byl vektor v_{DTK}

skutečně zkonstruován, je následující. Místo Smal viru vakcínie přírodního typu se deletuje. Vytvoří se tak mezi-produkt - virus vdS. V druhém pokusu se deletuje místo NotI viru vakcínie přírodního typu. Vytvoří se tak meziproduct - virus vdN. Virus vdSN byl získán koinfekcí buněk CV-1 oběma viry a PCR-testováním rekombinantního viru (který byl vytvořen jednoduchým genetickým zkříženým postupem). Životnost různých meziproductů byla stanovena titracemi.

Tabulka 4.1A ukazuje výsledky po tom, co jednotlivé izoláty z vdN klonovacího pokusu byly vyčištěny pětkrát přes plak (aby bylo jisté, že byly získány klony bez viru přírodního typu) a potom amplifikovány. Po titraci byly surové virové kmeny z první amplifikace společně s kontrolou přírodního typu (WR-WT) použity pro infikování CV-1 buněk v množství 0,1 pfu/buňku. Tyto buňky se po 48 hodinách izolují a použijí se pro přípravu kmenů, které se přetitrují. Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.1B. Izoláty vdN/Al č. 6.1111 a vdN/Al č. 10.1111 byly označeny jako klony vdN č. 6 a vdN č. 10 a použity pro přípravu viru ve velkém měřítku.

Tabulka 4.2A ukazuje výsledky po tom, co jednotlivé izoláty vdS klonovacího pokusu byly pětkrát přečištěny přes plak a potom amplifikovány a ztitrovány. Pro infikování buněk CV-1 v množství 0,1 plak tvořících jednotek na buňku byly použity surové kmeny z první amplifikace spolu s přírodní kontrolou (WR-WT). Buňky byly izolovány po 48 hodinách. Výsledné surové zásoby byly přetitrovány. Tyto výsledky jsou uvedeny na obrázku 4.2B. Izoláty vdS č. 7.11 byly označeny jako klony vdS č. 2 a vdS č. 7 a použity pro přípravu viru ve velkém měřítku. V každém případě se virový izolát, který vykazuje nejlepší růstové vlastnosti, vybere pro amplifikaci a pro kultivace ve velkém měřítku.

Tabulka 4.1

Studie životaschopnosti virového mezíproduktu vdN

A) Titr po první amplifikaci šesti virových vdN-isolátů
(překů tvořících jednotek na ml surového kmene):

vdN/A1 č.	2.1111	$1,0 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdN/A1 č.	4.1111	$1,3 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdN/A1 č.	6.1111	$9,0 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdN/A1 č.	8.1111	$8,0 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdN/A1 č.	10.1111	$4,0 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdN/A1 č.	12.1111	$1,1 \cdot 10^8$	pfu/ml

B) Titr po druhé amplifikaci:

vdN/A1 č.	2.1111	$3,6 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdN/A1 č.	4.1111	$2,5 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdN/A1 č.	6.1111	$5,9 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdN/A1 č.	8.1111	$4,2 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdN/A1 č.	10.1111	$4,3 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdN/A1 č.	12.1111	$2,2 \cdot 10^8$	pfu/ml
WR-WT		$5,4 \cdot 10^8$	pfu/ml

Tabulka 4.2

Studie životaschopnosti virových mezíproduktů vdS

A) Titr po první amplifikaci pěti živých vdS-virových isolátů (pfu/ml surového kmene)

vdS č.	2.11	$4,1 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdS č.	3.11	$6,5 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdS č.	4.11	$8,0 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdS č.	5.11	$2,7 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdS č.	7.11	$4,7 \cdot 10^7$	pfu/ml

B) Titr po druhé amplifikaci:

vdS č.	2.11	$1,6 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdS č.	3.11	$1,4 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdS č.	4.11	$8,0 \cdot 10^7$	pfu/ml
vdS č.	5.11	$1,3 \cdot 10^8$	pfu/ml
vdS č.	7.11	$1,7 \cdot 10^8$	pfu/ml
WR-WT		$2,8 \cdot 10^8$	pfu/ml

Identifikace viru (vdSN), který má deletováno místo SmaI, PCR-testováním: Klony vdSN viru vakcínie, které mají místo SmaI deletováno, byly identifikovány PCR testováním následujícím způsobem.

Prvním primerem pro PCR reakci je oligonukleotid odS2 (sekvence identifikační číslo 27) a druhým primerem je oligonukleotid odS3 (sekvence identifikační číslo 28). Sekvence oligonukleotidu odS2 je umístěna v genomu vakcínie asi 340 párů nukleotidů proti směru vlákna od místa SmaI. Sekvence oligonukleotidu odS3 je umístěna asi 340 párů nukleotidů po směru vlákna tohoto místa. Templátem je celková DNA buněk CV-1 infikovaných pláskem viru jak shora popsáno pro vdN identifikaci. PCR-amplifikovaný pás o asi 680 párech nukleotidů se testuje na vnímavost na SmaI s resistencí na SmaI štěpení indukující inserci HindIII nebo ISceI linkeru, zatímco přírodní kontrolní DNA je štěpena na dva kusy o asi 340 párech nukleotidů. Virus vakcínie, který má žádanou inserci linkeru v místě SmaI, se označí vdSN.

Delece kodující oblasti genu thymidin-kinasy z viru vakcínie vdSN: Z viru vakcínie vdSN byl vyvinut nový vektorový kmen (označený vdTK) náhradou genu thymidin-kinasy (tk), který je umístěn v geneticky stabilní oblasti genomu vakcínie, segmentem obsahujícím několik míst štěpení jedinečnou restrikční endonukleasou (obrázek 4.1A).

Nejprve se deletuje sekvence kodující thymidin-kinasu (tk) z plasmidu (pHindJ-1), který obsahuje segment genomu vakcínie (HindIII J segment), v němž je umístěn tk-gen (viz obrázek 4.2). Do místa tk-genu se pak vloží násobné klonovací místo s jedinečnými místy NotI, SmaI, ApaI a RsrII, obklopené místy SfiI. Nakonec se přenesou modifikovaný segment viru do genomu vdSN viru vakcínie, který se pak označí vdTK (obrázek 4.1A). Aby se násilné klonování dále usnadnilo, obě místa SfiI se stancují jedinečnými místy ve vektoru tím, že se využije přirozená povaha rozpoznávací sekvence SfiI (GGCCNNNN'NGGCC). Sekvence dvou SfiI míst jsou pak následující: SfiI(1), GCCGGGT'AGGCC (sekvence identifikač-

ni číslo 29) a SfiI(2), GGCCATAT'AGGCC (sekvence identifikační číslo 30). Tento plasmid, který obsahuje konečnou modifikaci tk-genu (pHindJ-3), se zkonstruuje z prekursorového plasmidu pHindJ-1 smyčkovou mutagenesí. Delece tk-genu se potvrdí sekvenační analýzou.

Konstrukce prekursorového plasmidu pHindJ-1: DNA viru vakcinie přírodního typu se rozštěpí působením HindIII. Výsledné fragmenty se rozdělí na 0,8% gelu nízkotající agarosy. Fragment HindIII J se vyštěpí pod ultravioletovým světlem a připraví se podle standardních technik. Tento fragment se vloží do jediného HindIII místa plasmidu pTZ19R (Pharmacia, Inc.). Získá se tak pHindJ-1.

Konstrukce plasmidu pHindJ-2: Plasmid pHindJ-1 se transformuje do E. coli kmene NM522. Jednovláknová DNA se připraví superinfekcí pomocným fágem M13KO7 podle protokolu dodávaného firmou Pharmacia. Jednovláknová DNA slouží jako template pro místně řízenou mutagenesi s primerem odTKI (sekvence identifikační číslo 31). Tento primer je doplňkový k promotorové oblasti a k oblasti kolem translačního stop kodonu tk-genu. Ve středové části obsahuje jedinečná restriční místa BamHI, HpaI, NruI a EcoRI. Postup mutagenese se provádí se sestavou pro mutagenesi dodávanou firmou Amersham, Inc. podle příručky dodávané dodavatelem.

Pro konstrukci pHindJ-2 byly popsány sekvence tk-genu v práci Weira J. P. a Mosse B.: J. Virol. 46, 530 až 537 (1983). Sekvence tk-genu je dostupná v EMBL Data Library pod identifikačním označením (ID) PVHINLJ. Sekvence vektorové části (pTZ19R) plasmidu je dostupná od firmy Pharmacia, Inc. Sekvence kolem deleťovaného genu thymidin-kinasy (tk-gen) viru vakcinie v plasmidu pHindJ-2 je uvedena v sekvenci identifikační číslo 4. 5'-Oblast tk-genu (nukleotidy číslo 1 až 19 v tomto seznamu, nukleotidy č. 4543 až 4561 v ID PVHINLJ) je následována jedinečnými restričními místy BamHI, HpaI, NruI a EcoRI a 3'-oblastí tk-genu (nukleotidy číslo 44 až 67 v tomto seznamu, nukleotidy č. 5119 až 5142 v ID PVHINLJ). Nukleotidy číslo 4562 až 5118 v ID PVHINLJ,

9/ které obsahují část tk-prmotoru a oblast kodující tk-gen, jsou v pHindJ-2 deletovány.

Konstrukce plasmidu pHindJ-3: Plasmid pHindJ-2 se rozštěpí působením BamHI a EcoRI. Vloží se dvouvláknový linker obsahující jedinečná restriční místa NotI, SmaI, RsrII a ApaI, která jsou obklopena místy SfiI. Tento linker sestává z oligonukleotidů P-J(1) (sekvence identifikační číslo 32) a P-J(2) (sekvence identifikační číslo 33).

Modifikované sekvence plasmidu pHindJ-3 je uvedena v sekvenci identifikační číslo 5. Vložené násobné klonovací místo odpovídá oligonukleotidu P-J(1). Vložená sekvence začíná v poloze 21 a končí v poloze 99. Obklopující sekvence jsou stejné jako je to popsáno výše u HindJ-2.

5/ Po vložení tk-delece do viru vakcinie se plasmid pHindJ-3 rozštěpí působením HindIII. Při pokusu získání markeru se použije obrácený HindIII J fragment, který má delecí tk-genu, jak je to popsáno Samem a Dumbellem (1981). Viry, které mají deletován tk-gen, se izolují tk-negativní selekcí (Mackett a spol.: 1982) a identifikují se následným PCR-testováním.

Podrobněji - modifikovaný HindIII fragment, přítomný v HindJ-3, se vyštěpí působením HindIII a izoluje se na gelu nízkotající agarosy. Získání markeru se provádí v podstatě tak, jak je to popsáno Samem a Dumbellem (1981) s následujícími modifikacemi. $5 \cdot 10^6$ buněk CV-1 se infikuje 0,2 plak tvořících jednotek na buňku vdsN viru vakcinie. Po jednohodinové inkubaci se jeden mililitr sraženího koeforečnanem vápenatým obsahující 1 μ g modifikovaného HindIII J fragmentu transfektuje do infikovaných buněk. Po dvou dnech růstu se připraví podle postupu shora popsaného v příkladu 1 surový virový kmen a titruje se na lidské 143B tk-negativní buňky v přítomnosti bromdeoxyuridinu (BrdU) jak popsali Mackett a spol. v roce 1982. Tk-negativní plaky se mohou dále analyzovat PCR testováním.

Identifikace viru s delecí thymidin-kinasy (vdtK)

PCR-testování: Prvním primerem pro PCR reakci je oligonukleotid odTK2 (sekvenci identifikační číslo 34), sekvence, která je umístěn asi 300 párů nukleotidů proti směru vlákně tk-genu. Druhý primer, odTK3 (sekvenci identifikační číslo 35), je umístěn asi 220 párů nukleotidů po směru vlákně stop kodonu tk-genu. Templátem je celková DNA buněk CV-1 infikovaných pláskem viru, jak je to popsáno pro vdN testování. Amplifikační produkt, který pochází od viru majícího delecii tk-genu, má asi 520 párů nukleotidů, zatímco přírodní kontrola poskytuje fragment o asi 1100 párech nukleotidů.

Konstrukce plasmidů obsahujících kazety exprese genu pro přenos do vdTK vektoru: Plasmid pAO je základní plasmid, který obsahuje hlavní klonovací místo vektoru obsahující jedinečná místa hlavního klonovacího vektoru vdTK viru vakcínie. Plasmid pAO byl zkonstruován nahrazením násobného klonovacího místa komerčně dostupného plasmidu segmentem obsahujícím jedinečná místa vektoru vdTK a místo XhoI, jak je to ilustrováno na obrázku 4.3.

Podrobněji - při deletování násobného klonovacího místa plasmidu Bluescript II SK-phagemid (Stratagene) se plasmid rozštěpí působením SacI a Asp718. Velký vektorový fragment se liguje s adaptorem obsahujícím azelované oligonukleotidy P-A (0.1) (sekvence identifikační číslo 36) a P-A (0.2) (sekvence identifikační číslo 37).

Násobné klonovací místo pAO (odpovídající oligonukleotidu P-A(0.1) s 20 nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících oblastí pBluescript II SK- jsou uvedeny v sekvenci identifikační číslo 6. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 95 (První "A" zbytek na 5'-konci odpovídá poloze číslo 2187, poslední "G" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze číslo 2301 plasmidu pAO.).

Konstrukce plasmidů pA1 a pA2: Plasmidy pA1 a pA2 byly navrženy pro inserci DNA segmentů, například fragmentů syntetického ^{neby} přírodního promotoru. Byly zkonstruovány vložení linkeru obsahujícího druhé klonovací místo často štěpicích

enzymů, které neštěpí pAO, do KhoI místa pAO. Oba plasmidy mají stejnou strukturu až na orientaci druhého násobného klonovacího místa (obrázek 4.3).

Plasmid pAO se rozštěpí působením KhoI a liguje se s adaptorem obsahujícím anelované oligonukleotidy P-A(1.1) a P-A(1.2). Byly izolovány obě možné orientace adaptoru a označeny pA1 a pA2.

Násobné klonovací místo pA1 odpovídající oligonukleotidu P-A(1.1) a 20 nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících oblastí pAO jsou uvedeny v sekvenci identifikační číslo 7. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 35 (První "C" zbytek na 5'-konci odpovídá poloze číslo 2322, poslední "C" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze 2324 plasmidu pA1.).

Násobné klonovací místo pA2 (odpovídající oligonukleotidu P-A(1.2)) a 20 nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících oblastí pA2 jsou uvedeny v sekvenci identifikační číslo 10. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 195 (První "C" zbytek na 5'-konci odpovídá poloze 2252, poslední "C" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze číslo 2466 plasmidu pA2-S1.).

Konstrukce plasmidů pA1-S1 a pA2-S1: Plasmidy pA1-S1 a pA2-S1 poskytují silný syntetický promotor S1 viru neštovic zahrnující translační start kodon následovaný jediným EcoRI místem vhodným pro inserci otevřených čtecích oblastí, které nemají asociovaný start kodon. Promotor S1 modifikované verze silného pozdního promotoru viru neštovic označeného P2.

Plasmidy pA1-S1 a pA2-S1 se získají vložením fragmentu prvního dvouvláknového promotoru do místa NdeI a BamHI pA1 nebo pA2 násilným klonováním (obrázek 4.4, panel A). Podrobněji lze uvést, že vektor pA1 se rozštěpí působením NdeI a BamHI a liguje se s adaptorem sestávajícím z anelovaných oligonukleotidů P-P2ml.1 a P-P2ml.2. Výsledný plasmid se označí pA1-S1.

Sekvence syntetického promotoru z pA1-S1 (odpovídající oligonukleotidu P-P2ml.1) a 20 nukleotidů 5'- a 3'-obklo-

půjících oblastí pA1 jsou uvedeny v sekvenci identifikační číslo 9. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 193 (První "G" insert na 5'-konci odpovídá poloze číslo 2228, poslední "G" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze číslo 2440 plasmidu pA1-S1.).

Vektor pA2 se rozštěpí působením *BdeI* a *BamHI* a liguje se s adaptorem sestávajícím z natovených oligonukleotidů P-P2ml.1 a P-P2ml.2, jako shora pro pA1-S1. Výsledný plasmid se označí pA2-S1.

Sekvence syntetického promotoru z pA2-S1 (odpovídající oligonukleotidu P-P2ml.2) a 20 nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících oblastí pA2 jsou uvedeny v sekvenci identifikační číslo 10. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 195 (První "G" zbytek na 5'-konci odpovídá poloze číslo 2252, poslední "G" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze číslo 2466 plasmidu pA2-S1.).

Konstrukce plasmidů pA1-S2 a pA2-S2: Plasmidy pA1-S2 a pA2-S2 obsahují silný syntetický promotor S2, modifikovanou verzi silného pozdního promotoru viru neštovic (popsaného Davisonem a Mossem: *J. Mol. Biol.* 210, 771 až 784 (1989)). Tyto plasmidy neposkytují translační start kodon a promotorem a jsou tedy vhodné pro inserci úplných otevřených čtecích oblastí, které zahrnují start kodon. Promotory mají různé orientace vzhledem k vektoru hlavnímu klonovacímu místu v těchto dvou plasmidech. Plasmidy pA1-S2 a pA2-S2 se získávají násilným klonováním fragmentu druhého dvouvláknového promotoru do míst *HpaI* a *EcoRI* pA1 a pA2 (obrázek 4.5, panel A). Podrobněji - plasmid pA1 se rozštěpí působením enzymů *HpaI* a *EcoRI* a liguje se se sekvencí syntetického linkeru obsahující enclované oligonukleotidy P-artP(5) a P-artP(6). Výsledný plasmid se označí pA1-S2.

Sekvence syntetického promotoru z pA1-S2 (odpovídající oligonukleotidu P-artP(5) a 20 nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících oblastí pA1 jsou uvedeny v sekvenci identifikační číslo 11. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 68.

(První "T" zbytek na 5'-konci odpovídá poloze číslo 2240, poslední "A" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze číslo 2327 plasmidu pA1-S2.).

Podobně plasmid pA2 se rozštěpí působením enzymů HpaI a EcoRI a liguje se s anelovanými oligonukleotidy P-artP(5) a P-art P(6) jako u pA1S2. Výsledný plasmid se označí pA2-S2. Sekvence syntetického promotoru z pA2-S2 (odpovídající oligonukleotidu P-artP(6)) a dvacet nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících oblastí z pA2 jsou uvedeny v sekvenci identifikační číslo 12. Insert začíná v poloze 21 a končí v poloze 72. (První "T" zbytek na 5'-konci odpovídá poloze číslo 2263, poslední "A" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze číslo 2354 plasmidu pA2-S2.).

Po vložení otevřené čtecí oblasti do kteréhokoliv z plasmidů pA1-S1, pA2-S1, pA1-S2 nebo pA2-S2, lze úplnou kazetu exprese vyštěpit a násilným klonováním vložit do odpovídajících míst ve vektoru vdtK viru. Kazeta může být vložena do genomu viru v jakékoliv orientaci podle toho, jaký klonovací plasmid se použije.

Konstrukce plasmidů obsahujících kazety exprese se selektivním markerem (pN2gpt-S3A a pN2-gpt-S4): Vedle shora popsanych plasmidů určených pro násilné klonování byly zkonstruovány dva další plasmidy pro přenos genů do jedinečného (NotI) místa ve vektoru viru neštovic pomocí genu E.coli gpt selektovatelného markeru. Vedle shora popsanych promotorů S1 a S2 poskytují také dva další promotory viru neštovic.

Plasmid pN2gpt-S3A (obrázek 4.7) lze použít pro vložení otevřených čtecích oblastí, jimž chybí jejich vlastní iniciační kodon. Geny, které se mají přenést do viru vakcinie (gpt marker a otevřená čtecí oblast), se mohou vyštěpit buď působením NotI samotné nebo působením dvou enzymů, například NotI a SmaI (nebo RsrII nebo ApaI). Vyštěpený fragment se pak vloží do odpovídajícího místa (odpovídajících míst) vektoru vdtK viru.

Plasmid pN2gpt-S4 (obrázek 4.7) lze použít pro vložení úplných otevřených čtecích oblastí zahrnujících AUG translační start kodon. Tyto kazety obsahující gen gpt-markeru a otevřenou čtecí oblast se mohou vyštěpit jak shora popsáno pro pN2gpt-S3A. Promotory S3A a S4 jsou modifikovanými versemi silných pozdních promotorů viru neštovic.

Tyto plasmidy byly zkonstruovány tak, že se nejdříve připraví plasmidy pN2-gpta a pN2-gptb (obrázek 4.6), které obsahují E. coli gpt gen řízený P7.5 promotorem viru vakcínie obklopeným několika jedinečnými restrikčními místy včetně NotI (obrázek 1.3). Insece S3A nebo S4 promotorového fragmentu do jedinečných míst PstI a ClaI v pN2-gptb poskytuje plasmidy pN2gpt-S3A a pN2gpt-S4.

Konstrukce plasmidů pN2gpta a pN2gptb: viz příklad 1 a obrázek 4.6.

Konstrukce plasmidu pN2gpt-S3A: Rodičovský plasmid pN2gptb se rozštěpí působením PstI a ClaI a liguje se se sekvencí syntetickým linkerem sestávajícím z oligonukleotidů P-artP(7) a P-artP(8) (sekvence identifikační číslo 40). Výsledný plasmid se označí pN2gpt-S3A.

Sekvence syntetického promotoru plasmidu pN2gpt-S3A (odpovídající oligonukleotidu P-artP(7) a dvacet nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících oblastí z pN2-gptb jsou uvedeny pro pN2gpt-S3A v sekvenci identifikační číslo 13. Vložená DNA sekvence začíná v poloze 21 a končí v poloze 107 (První "T" zbytek na 5'-konci odpovídá poloze číslo 3328, poslední "A" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze číslo 3454 plasmidu pN2gpt-S3A.).

Konstrukce plasmidu pN2gpt-S4: Plasmid pN2-gptb se rozštěpí působením PstI a ClaI a liguje se s adaptorovou sekvencí sestávající z oligonukleotidů P-artP(9) a P-artP(10) (sekvence identifikační číslo 41). Výsledný plasmid se označí pN2gpt-S4.

Sekvence syntetického promotoru z pN2gpt-S4 (odpovídá-

jící oligonukleotidu P-art(9) a dvacet nukleotidů 5'- a 3'- obklopujících oblastí pN2gptb jsou uvedeny pro pN2gpt-S4 v sekvenci identifikační číslo 14. Vložená DNA sekvence začíná v poloze 21 a končí v poloze 114 (První "T" zbytek na 5'- konci odpovídá nukleotidu číslo 3328, poslední "A" zbytek na 3'-konci odpovídá poloze nukleotidu číslo 3461 plasmidu pN2gpt-S4).

Příklad 5

Expresce polypeptidů ve vektoru vakcínie (vdTK) přímou molekulární insercí kazet exprese genu

Tento příklad demonstduje snadnost, s níž mohou být klonované geny vloženy do vektoru (vdTK) viru vakcínie podle tohoto vynálezu při rychlém vytvoření konstrukcí exprese viru neštovic pomocí přímé molekulární inserce kazet exprese genu popsaných v příkladu 4. Zde je popsáno použití systému vdTK vektor-kazeta pro vytvoření konstrukcí expresujících několik příslušných modelových polypeptidů včetně lidských krevních proteinů (protrombin a varianty plasminogenu) a antigenu lidského viru (HIV gp160).

Konstrukce modifikovaného viru vakcínie (vPT1), který expresí poskytuje lidský protrombin: Lidský protrombin (PT) slouží jako model pro expresi cizího proteinu ve vektoru viru vakcínie podle tohoto vynálezu. Dříve bylo ukázáno, že cDNA kodující protrombin je expresovatelná konvenčně zkonstruovaným rekombinantním virem vakcínie, jak je to popsáno v patentové přihlášce PCT/EP91/00139 (Falkner a spol. ("Falknerova přihláška").), tento celý popis je zde zshrnut jako citace.

Modifikovaná protrombinová cDNA se vyštípne jako EcoRI fragment o 2000 párech nukleotidů z plasmidu pTKgpt-PTEBb a vloží se do jedinečného EcoRI místa plasmidu pAl-S1 (Příklad 4, obrázek 4.4). Získá se tak plasmid pAlS1-PT (obrázek 5.1). V expresní kazetě tohoto plasmidu je protrombinová cDNA řízena syntetickým promotorem S1 viru neštovic, který také poskytuje translační iniciační kodon.

Sekvence lidského protrombinu je publikována: Dagen S. J. F., MacGillivray R. T. A. a Davie E.: *Biochemistry* **22**, 2087 až 2097 (1983). Tato sekvence je dostupná z EMBO Data Library pod identifikátorem (ID) HSTHR1. Sekvence v ID HSTHR1 není úplná. Chybí jí prvních 19 párů nukleotidů oblasti kodující protrombin. Autoři tohoto vynálezu sekvenovali chybějící část cDNA v ID HSTHR1 a výsledek je zde uveden níže. Vzhledem ke mnoha modifikacím a změnám nukleotidů je úplná sekvence zde uvedeného cDNA klonu lidského protrombinu včetně S1 promotoru a dvaceti nukleotidů obklopujících sekvencí plasmidu uvedeno v sekvenci identifikační číslo 15.

Konstrukčními stupni nastíněnými ve Falknerově přihlášce (POT/EP-91/00139) se cDNA modifikuje následujícím způsobem: zavedou se dva další kodony (nukleotidy č. 22 až 27), což vede k inkorporaci dvou nových aminokyselin. 3'-Ne-překládaná sekvence se odstraní zavedením EcoRI místa: nukleotid číslo 1963 až 1965 (č. 1920 až 1922 ID HSTHR1) se změní z TGG na GAA místně řízenou mutagenesí.

Jedna změna párů nukleotidů byla nelezena v PT-cDNA. To vede k novému místu NcoI: nukleotid číslo 525 (číslo 482 v ID HSTHR1) je změněn na A z C. V tomto případě jde o tichou mutaci, protože kodon CCC (Pro) je změněn na CCA (Pro), což vede k novému místu NcoI. (První nukleotid sekvence identifikační číslo 15 z pALSI-PT odpovídá nukleotidu číslo 2394, poslední nukleotid odpovídá nukleotidu č. 4381 úplné sekvence plasmidu pALSI-PT).

Pro přenos do vektoru včTK vakcinie se kazeta vyštípně z plasmidu pALSIPT působením endonukleas NotI a RsrII a izoluje se po dělení na gelu nízkotahbí agarosy. DNA vektoru včTK viru se rozštěpí působením NotI a RsrII, extrahuje se fenolem a vysráží se ethanolom. Během stupně srážení ethanolom se ztratí malý NotI-RsrII spojující fragment násobného klonovacího místa DNA vektoru. Raménka vektoru vakcinie se ligují s dvacetinásobným molárním přebytkem kazety. Pakázování ligované DNA viru vakcinie pomocným virem drůbežích neštovic v kuřecích buňkách je popsáno v příkladu 3.

Pakázované viry z plátek získaných infikováním CV-1 buněk jsou plásky opět vyčištěny ^{přes plásk.} Připraví se tak malé srovnávací kmeny. Virové izoláty se mohou dále analyzovat Southernovým blotováním a analýzou expresí, jak je to popsáno ve Falknerově přihlášce. Virový izolát, který má správnou genomovou strukturu pro inserci cDNA protrombinu, se označí vPT1. Podobný rekombinantní virus vakcínie, který se připraví získáním markeru, indukoval expresi protrombinu v buňkách Vero na úrovních aktivit asi 50 až 60 milijednotek/ml supernatantu buněčné kultury. Viz Falknerova přihláška.

Konstrukce viru vakcínie (vGPgl), který expresí poskytuje lidský glu-plasminogen: Aminový konec přírodní formy plasminogenu (Pg) začíná aminokyselinou glu (glutamová kyselina). Nazývá se proto glu-plasminogen (glu-Pg). Částečně opracovaná forma plasminogenu, které chybí prvních 77 aminokyselin na aminovém konci (aktivační peptid) se nazývá lys-plasminogen (lys-Pg). Afinita lys-Pg k jeho substrátu fibrinu je mnohem vyšší než afinita glu-Pg. Navíc, rekombinantní lys-Pg je značně stabilnější než glu-Pg v supernatantech buněčných kultur infikovaných (konvenčním) rekombinantním rekombinantem vakcínie nesoucím gen glu-Pg.

Úplná cDNA lidského plasminogenu (včetně translačního start a stop kodonu) se vyštípne z plasmidu (pHPlas-6) jako Ball-SmaI fragment. Sekvence lidského plasminogenu již byla publikována Forsgrenem M., Radenem B., Israelssonem M., Larssonem K. a Hedenem L. O.: FEBS Letters 213, 254 až 260 (1987). Je přístupná z EMBO Data Library (GenBank) pod identifikátorem (ID) HSPMGK. Sekvence tohoto plasmidu tedy nebyly zařazeny ve zde uvedené sekvenci, protože tento plasmid není jediným zdrojem sekvence DNA plasminogenu. Kodující oblast této sekvence plasminogenu se však liší od publikované sekvence alespoň v jednom nukleotidu: Zbytek "A" v poloze číslo 112 (ID HSPMGK) odpovídá zbytku "G" v DNA zde uvedené, což znamená substituci aminokyselin (Lys, Glu).

cDNA plasminogenu se vloží do HpaI místa plasmidu

pN2gpt-S4 (příklad 4, obrázek 4.7), který byl vybrán pro zkonstruování kazety exprese genu se selektovatelným markerem, protože cDNA plasminogenu obsahuje dvě ApaI místa a jedno RsrII místo a nedovoluje tedy použít kazety exprese navržené pro násilné klonování. Výsledný plasmid byl označen pN2gpt-GPg (podle obrázku 5.2).

Oblast napojení promotoru S4 zahrnující iniciační kodon plasminogenu (nukleotid číslo 52 této sekvence, nukleotid číslo 55 v ID HSPMGR) je pro pN2gpt-GPg uvedena v sekvenci identifikační číslo 17. Kodující oblast glu-plasminogenu byla v seznamu sekvencí vynechána. Tato sekvence pokračuje stop kodonem (nukleotid č. 35 této sekvence, nukleotid číslo 2435 v ID HSPMGR) a dvaceti pěti nukleotidy 3'-nepřekládané sekvence plasminogenu. Po této sekvenci následuje 29 nukleotidů násobného klonovacího místa phPlas6 a dvacet nukleotidů násobného klonovacího místa plasmidu pN2gpt-S4.

Aby se převáděla kazeta genu glu-plasminogenu do genomu viru vakcinie, NotI fragment plasmidu pN2gpt-GPg, který obsahuje dva geny a jejich promotory (P7.5 promotor kontrolující gpt-selekční marker a S4-promotor kontrolující gen glu-plasminogenu), se izoluje z gelu nízkotající agarosy a vyčistí se. Tato kazeta se liguje s raménky včTK DNA viru vakcinie rozštěpené působením NotI. Pakážování a čištění přes plak je popsáno v příkladu 3. Virus, který má správnou strukturu vložené kazety genu plasminogenu, se označí vN2gpt-GPg. Tento virus se použije pro expresi plasminogenu v buňkách W-1, jak je to popsáno pro analogický virus vakcinie zkonstruovaný technikami získání markeru. Sekretovaný glu-Pg v supernatantech buněčné kultury byl detegován na úrovni asi $1,5 \mu\text{g}/10^6$ buněk 24 hodin po infikování konvenčně zkonstruovaným virem vakcinie za standardních podmínek kultivace vektorů viru vakcinie při expresi cizích proteinů v kultuře buněk. Glu-plasminogen v supernatantu kultury buněk byl detegovatelný pouze v přítomnosti inhibitoru proteasy (50 mikrogramů na mililitr aprotininu).

Konstrukce viru vakcinie (vLEgl), který expresi posky-

tuje lidský lys-plasminogen: Sekvence, která koduje lys-plasminogen, se připraví delecí oblasti o 231 páru nukleotidů kodujících prvních 77 aminokyselin (Glu 1 až Lys 77) plasminogenu z úplné cDNA plasminogenu, jak je to ukázáno na obrázku 5.3. Tato sekvence se vloží do kazety exprese genu z plasmidu (pN2gpt-S4), který má gen selektivního markeru (*E. coli* gpt). Získá se tak plasmid, který je označen pN2gpt-LPg (obrázek 5.3).

V tomto plasmidu je presekvence (kodující signální peptid, který zprostředkuje sekreci) přímo napojená na první nukleotid lysinového zbytku 78 v plasminogenu. Místo štěpení nového signálního peptidu vytvořené napojením, je podobné mnoha známým signálním místům štěpení. Viz například von Heinje: *Eur. J. Biochem.* **133**, 17 až 21 (1983).

Do místa iniciačního kodonu cDNA Pg bylo zavedeno také místo NcoI, aby se usnadnilo klonování do jediného NcoI místa plasmidu pN2gpt-S4 a aby se dosáhlo optimální souvislosti promotoru s oblastí, která koduje Pg. Aby se usnadnilo vyštěpení Pg cDNA působením NcoI, jedno ze dvou vnitřních míst NcoI míst (NcoI(2), obrázek 5.3) se deletuje z Pg cDNA následujícím postupem.

Plasmid pHlas6 se přenesse do *E. coli* kmene NM522. Jednovláknová DNA se připraví superinfekcí pomocným fágem M13KO7. První kolo mutagenese se provede se dvěma oligonukleotidy, oNco1 a oNco2. Použije se jednovláknová pHlas 6 DNA jako templát s komerčně dostupnou sestavou pro mutagenese (Amersham, Inc.). Oligonukleotid oNco1 převádí dva A-zbytky proti směru vlákna start kodonu plasminogenu na dva C-zbytky. Získá se tak NcoI místo kolem start kodonu bez měnění oblasti kodující presekvenci plasminogenu. Oligonukleotid oNco2 převádí T zbytek na C zbytek ve vnitřním NcoI místě (NcoI(2)) Pg cDNA. Dojde tak k tiché mutaci, která deaktivuje toto NcoI místo.

Kodující oblast aminokyselin 1 až 77 plasminogenu se deletuje ve stupni smyčkové mutagenese použitím oligonuk-

leotidu oNco3 o 42 párech nukleotidů. Všechny mutace byly potvrzeny sekvenováním a restrikční analýzou.

Plasmid pHLplas, který má tři mutace, se linearizuje působením SmaI a částečně se rozštěpí působením NcoI. Isoluje se fragment NcoI-SmaI o 2200 párech nukleotidů a vloží se do plasmidu pN2gpt-S4, který se rozštěpí působením NcoI a SmaI. Výsledný plasmid se označí pN2gpt-LPg.

Kvůli mnoha modifikacím cDNA plasminogenu v pN2gpt-LPg je úplná sekvence NcoI-SmaI fragmentu plasmidu pLplas včetně dvaceti nukleotidů S4 promotoru a 20 nukleotidů plasmidové oblasti plasmidu pN2gpt-S4 po směru vlákna uvedena v sekvenci identifikační číslo 18. Sekvence cDNA plasminogenu byla modifikována následujícím způsobem: dva A-zbytky v polohách číslo 19 a číslo 20 (nukleotidy číslo 53 a 54 v ID HSPMGR) se změni na dva C-zbytky. Získá se tak místo NcoI. Nukleotid číslo 21 v tomto číslování (nukleotid číslo 55 v ID HSP MGR) znamená A-zbytek start kodonu plasminogenu, nukleotid číslo 2220 (nukleotid číslo 2485 v ID HSPMGR) znamená T-zbytek stop kodonu, nukleotid číslo 111 v ID HSPMGR (nukleotid číslo 77 v tomto číslování) se napojí s nukleotidem číslo 343 v ID HSPMGR (nukleotid číslo 78 v tomto číslování). Dojde tak k delecí sekvence kodující "aktivační peptid". T-zbytek číslo 926 (nukleotid číslo 1191 v ID HSPMGR) se změni na C-zbytek (konzervativní výměna), což vede ke zmizení vnitřního místa NcoI.

Pro přenesení kazety genu lys-plasminogenu do genomu viru vakcinie se NcoI fragment plasmidu pN2gpt-LPg, který obsahuje kazetu exprese genu obsahující dvě kombinace promotor-gen (P7.5 promotor - gpt-gen a S4 promotor - gen lys-plasminogenu) liguje s včTK vektorovou DNA viru vakcinie rozštěpenou působením NotI a pakázuje se jak je to shora popsáno v příkladu 7. Isolát, který má příslušnou strukturu vložené kazety genu, označený vN2gpt-LPg, se použije pro expresi lys-plasminogenu v buňkách CV-1 za podmínky použitých dříve pro konvenčně zkonstruovaný rekombinant za standardních podmínek kultivace expresních vektorů viru

vakcinie. V buněčné kultuře se tak produkují proteiny. Sekretovaný lys-Pg v supernatantech buněčné kultury se detekuje na úrovni asi 1,0 až 2,0 $\mu\text{g}/10^6$ buněk po dvaceti čtyř hodinách od infekce konvenčním rekombinantem. Lys-plasminogen v supernatantu buněčné kultury byl stabilní bez přidání inhibitoru proteasy.

Konstrukce viru vakcinie (vgpl60-1) pro přípravu glykoproteinu 160, viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV gpl60) expresí: Úplná otevřená čtecí oblast glykoproteinu HIV gpl60 se získá na EcoRV fragmentu o 2500 párech nukleotidů vyštěpením z replikační formy (RF) DNA fágu M13 mpPEenv, Fuerst a spol.: Mol. Cell. Biol. 7, 2538 až 2544 (1987). Tento fragment se vloží do plasmidu pN2gpt-S4, jak je to nastíněno na obrázku 5.4. Ve výsledném plasmidu pN2gpt-gpl60 je gen gpl60 kontrolován syntetickým promotorem S4 viru vakcinie.

Sekvence HIV gpl60 byla publikována Ratnerem L. a spol.: Nature 313, 277 až 284 (1985). Sekvence klonu BH3 je dostupná z EMBO Data Library (GenBank) pod identifikátorem (ID) HIVH3BH3. Proto není sekvence gpl60 zahrnuta v sekvenci identifikační číslo 19, ale oblast spojení S4 promotoru a EcoRI HIV-gpl60 fragmentu včetně iniciačního kodonu genu gpl60 (nukleotid číslo 28 v této sekvenci, nukleotid číslo 226 v ID HIVH3BH3) je uvedena. EcoRV HIV-gpl60 fragment se nachází proti směru vlákna od mpPEenv fágu M13 (replikační forma), jak popisuje Fuerst T. R., Earl P. a Moss B.: Mol. Cell. Biol. 7, 2538 až 2544 (1987). Tato sekvence pokračuje stop kodonem (nukleotid číslo 31 v této sekvenci, nukleotid číslo 2279 v ID HIVH3BH3) a polovinou EcoRV místa po směru vlákna. Po této sekvenci následuje dvacet nukleotidů násobného klonovacího místa plasmidu pN2gpt-S4. První nukleotid (T) této sekvence odpovídá nukleotidu číslo 3368, poslední nukleotid (G) odpovídá nukleotidu číslo 5973 v sekvenci pN2gpt-gpl60.

Při přenosu kazety exprese genu HIV gpl60 do genomu viru vakcinie se NotI fragment obsahující obě kombinace

gen-promotor (P7.5 promotor - gpt selekční marker a S4 promotor - gen gpl60) ligují s DNA vektoru vdTK viru vakcinie rozštěpenou působením NotI a pakáží se, jak je to popsáno v příkladu 7. Isolát, který má správnou strukturu insertu kazety, označený vN2gpt-gpl60, se použije pro expresi gpl60 v buňkách africké zelené opice (Vero) za podmínek, které byly dříve popsány pro konvenčně zkonstruovaný rekombinant (Barrett a spol.: AIDS Research and Human Retroviruses 6, 159 až 171 (1989)).

Konstrukce vektoru viru vakcinie pro testování modifikovaných virů nesoucích inserce koinsercí lacZ genu: Pro testování inserce koinsercí E. coli lacZ genu v kombinaci s přístupem přímého klonování je užitečnou modelovou konstrukcí plasmid pTZgpt-S3AlacZ (obrázek 5.5). Plasmid pTZ19R (Pharmacia, Inc.) se rozštěpí působením PvuII. Připraví se velký vektorový fragment o 2500 párech nukleotidů a ten se liguje s NotI linkery (Boehringer, Inc.). Výsledný plasmid pTZ-N má delecí násobného klonovacího místa, které je umístěno v sekvencích alfa doplňkového peptidu v plasmidu pTZ19R. Jsou proto vyloučeny možné rekombinace mezi sekvencemi alfa doplňkového peptidu a lacZ genem, který se má vložit do pTZ-N.

Při konstruování kazety exprese genu pro přímé molekulární klonování se NotI fragment o 1200 párech nukleotidů, obsahující kazetu gpt-genu a S3A promotor, vyštěpí z pN2gpt-S3A (příklad 4) a vloží se do pTZ-N. Získá se tak plasmid pTZgpt-S3A. EcoRI lacZ fragment o 3000 párech nukleotidů (vystřižený z plasmidu pTKgpt-Fla3; Falkner a Moss: 1988.) se vloží do jediného EcoRI místa plasmidu pTKgpt-S3A.lacZ. Výsledný plasmid se označí pTZgpt-S3AlacZ.

NotI fragment tohoto plasmidu o 4400 párech nukleotidů, sestávající ze dvou genů markeru (E. coli gpt a lacZ), se liguje s DNA viru vdTK rozštěpené působením NotI (příklad 4). Podmínky ligace a pakážování jsou popsány v příkladu 3. Odhadnutý výtěžek modifikovaných virů v případě gpt-selekce je popsán v příkladu 3.

Další vektor viru vakcinie byl zkonstruován následujícím způsobem. Plasmidy pTZS4-lacZa a pTZS4-lacZb poskytují užitečné modelové konstrukce (obrázek 5.6). Plasmid pTZN se zkonstruuje jak shora uvedeno. Kazeta exprese genu, NotI fragment o 1200 párech nukleotidů obsahující kazetu gpt-genu a S4 promotor, se vystřihne z pN2gpt-S4 (příklad 4) a vloží se do pTZ-N. Získá se tak plasmid pTZgpt-S4. SmaI-StuI lacZ fragment o 3300 párech nukleotidů se vystřihne z plasmidu placZN+, který byl zkonstruován štěpením plasmidu pFP-Zsart (evropská patentová přihláška č. 91 114 300.-6, Rekombinantní virus drůbežích neštovic) působením NotI a ligací pFP-Zsart s oligonukleotidem P-NotI (5'-GGCCAT-3'). Tento SmaI-StuI lacZ fragment o 3300 párech nukleotidů byl vložen do jediného SmaI místa plasmidu pTZgpt-S4. Výsledné plasmidy se označí pTZS4-lacZa a pTZS4-lacZb.

NotI fragment tohoto plasmidu o 4500 párech nukleotidů byl ligován s DNA viru včTK rozštěpenou působením NotI a pakážován jak shora uvedeno.

Kombinace lacZ a gpt-selektce v jediném klonovacím stupni nepokřytuje žádnou výhodu, protože všechny gpt-positivní plaky budou obsahovat lacZ gen. Pro konstrukci virů, které mají inserce v různých místech, je však žádoucí druhý způsob testování. Markerem, který se vybere jako první (výhodnější), je gpt marker; lacZ testování nabízí alternativní způsob detekce insertů, například jestliže cílový virový genom již obsahuje kopii selektovatelného markeru, jako je například E. coli gpt gen.

Při tomto testování se dva ml zředění 1 : 10, 1 : 100, resp. 1 : 1000 surových virových kmenů připravených po pakážování (viz příklad 3 výše) vysejí na třicet velkých (o průměru 8,5 cm) Petriho misek (10 Petriho misek pro jedno zředění). Test modrého plaku se provádí podle standardních postupů (Chakrabarti S., Brechling K. a Moss B.: Mol. Cell. Biol. 5, 3403 až 3409 (1985)).

Příklad 6

Konstrukce vektoru (vS4) viru vakcinie s řídicím hlavním klonovacím místem za transkripční kontroly silného pozdního promotoru viru vakcinie

Tento příklad popisuje klonovací vektor (vS4) viru vakcinie, který je navržen pro přímou molekulární inserci úplné čtecí oblasti (otevřené čtecí oblasti) do hlavního klonovacího místa, které je funkčně navázáno na promotor viru vakcinie. Použití tohoto vektoru podle způsobů podle tohoto vynálezu umožňuje inserci genů přímo do vektoru viru neštovic bez odděleného zkonstruování insertního plasmidu, jak je to potřebné při konvenčním konstruování rekombinantních virů neštovic intracelulární rekombinací. Tento vektor také obchází potřebu odděleného zkonstruování kazety exprese genu pro přenos do vektoru viru vakcinie přímou molekulární insercí, jak je to shora popsáno.

Hlavní klonovací místo vektoru S4 je umístěno v geneticky stabilní centrální oblasti genomu viru vakcinie a obsahuje několik míst štěpení, která jsou jedinečná v tomto vektoru, což umožňuje přímou inserci. S4 promotor bezprostředně proti směru vlákna hlavního klonovacího místa je silná syntetická verze pozdního promotoru viru vakcinie. Tento expresní vektor je vhodný pro přímé klonování a pro expresi velkých otevřených čtecích oblastí, které obsahují transkripční start kodon, jak je to zde ilustrováno cDNA, která koduje lidský krevní protein, von Willebrandův faktor (vWF).

Konstrukce vektoru vS4 viru vakcinie: Adaptor, který obsahuje syntetický promotor S4 viru vakcinie, se vloží do vektoru vDTK viru vakcinie (příklad 4, obrázek 4.1) v jedinečném místě NotI (obrázek 6.1). Inserce se deaktivuje místo NotI proti směru vlákna, zatímco místo NotI po směru vlákna zůstává funkční jako jedinečné klonovací místo.

Podrobněji - DNA (1 μ g) vektoru vDTK (příklad 4, obrázek 4.1) se rozštěpí působením NotI a liguje se s (0,5 μ g) anelovanými oligonukleotidy P-artP(11)

(sekvence identifikační číslo 38) a P-*artP*(12) (sekvence identifikační číslo 39). Ligační směs se pakáží a plaky se identifikují jak je to popsáno v příkladu 3. Plaky se PCR-testují jak shore popsáno (příklad 4, identifikace viru v Δ TK PCR testováním). Isolát, který má insert se správnou orientací, se označí vS4.

Insertce cDNA von Willebrandova faktoru do vS4: Plasmid pvWF obsahuje úplnou cDNA von Willebrandova faktoru obklopenou místy NotI. Sekvence lidského vWF byla publikována: Bouthron D. a spol.: Nucl. Acids Res. 14, 7125 až 7128 (1986). Tato sekvence je dostupná z EMBO Data Library pod identifikátorem (ID) HSVWFR1. Sekvence identifikační číslo 20 ukazuje napojení v genomu viru vWF virového S4 promotoru a 5'-nepřekládané oblasti cDNA vWF v plasmidu pvWF až translačnímu start kodonu (nukleotid číslo 249 v této sekvenci, nukleotid číslo 100 v ID HSVWFR1). Oblast kodující vWF byla v této sekvenci vynechána. Sekvence pokračuje stop kodonem (nukleotid číslo 252, nukleotid číslo 8539 v ID HSVWFR1) a 3'-nepřekládanou sekvencí až k NotI místu (nukleotid číslo 304) a dvaceti nukleotidy překryvu s 3'-oblastí vWF virového genomu.

vWF cDNA fragment se uvolní působením NotI, izoluje se a liguje s vS4 vektorovou DNA, která je rozštěpena působením NotI a zpracována s fosfatasou, jak ilustruje obrázek 6.2.

Jeden mikrogram ligované DNA se pakáží jak je to popsáno v příkladu 7. Plaky se vyberou a analyzují se PCR-testováním. Prvním primerem pro PCR reakci je oligonukleotid *odTK2*, který je umístěn asi 300 párů nukleotidů proti směru vlákna tk-*genu*, reversní primer *ovWF1* je umístěn v *genu* vWF asi 50 párů nukleotidů po směru vlákna iniciačního kodonu. K PCR amplifikaci dochází pouze tehdy, jestliže vWF insert má správnou orientaci vzhledem k S4 promotoru ve vektoru. PCR-positivní plaky se identifikují a dále se analyzují. Jestliže výtěžek žádaného modifikovaného viru je nízký, řádově 0,1 až 0,01 %, potom mohou být identifikovány

in situ způsoby hybridizace plaků přizpůsobenými podle těch, které jsou známy z literatury. Viz například Villareal L. P. a Berg P.: Science 196, 183 až 185 (1977).

Virový klon, který má cDNA insert podle PCR nebo hybridizace a který vykazuje očekávanou restriční sestavu při štěpení působením PvuII, se označí vvWF. Takové vektory se mohou testovat na expresi von Willebrandova faktoru způsoby, jak je to popsáno pro jiné lidské proteiny v příkladu 5, upravenými podle příslušných zásad genetického inženýrství, které jsou dobře známy odborníkům.

Příklad 7

Heterologní pakážování genomové DNA viru neštovic (vaksinie) pomocným virem ptačích neštovic (drůbežích neštovic) a současná selekce modifikovaného viru v hostitelských buňkách druhů, v nichž se pomocný virus nemůže replikovat.

Příklad 3 popisuje pakážování modifikované DNA viru vakcinie pomocným virem drůbežích neštovic v ptačích buňkách a následnou izolací plaků progenu viru v savčích (CV-1) buňkách, v nichž se pomocný virus ptačích neštovic nemůže replikovat. Tento příklad ilustruje pakážování DNA viru vakcinie drůbežími neštovicemi přímo v CV-1 buňkách, čímž se umožní současné pakážování a výběr hostitele pro pakážený virus. Vedle eliminace původního viru z pomocného kmene progenu, tento postup obchází požadavek přípravy primárních kultur fibroblastů kuřecího zárodku pro každý pokus pakážování. Místo toho se také mohou pro pakážování viru vakcinie pomocným virem drůbežích neštovic použít kontinuální savčí buněčné linie, které se obvykle používají pro replikaci viru vakcinie.

Je známo, že virus drůbežích neštovic (FPV) se replikuje v ptačích buňkách. Žádný živý progenový virus nebyl získán z infikovaných savčích buněk. Přesný bod v životním cyklu FPV, při němž dochází k selhání replikace v savčích buňkách, není známý. Je však známo, že FPV produkuje v sav-

cích buňkách virové proteiny a dokonce indukuje ochrannou imunitu, jestliže se používá jako živá vakcína (Taylor a spol.: Vaccine 6, 497 až 503 (1983)). Nicméně však dosud nebylo ukázáno, že FPV má schopnost pakážovat heterologní genomovou DNA viru neštovic, zvláště přímo sestavenou DNA viru vakcínie.

V původním pokusu se CV-1 buňky ($5 \cdot 10^6$) infikují jednou plak tvořící jednotkou (pfu) na buňku viru drúbežích neštovic (kmen HP1.441) a inkubují se jednu hodinu. Potom se sraženina fosforečnanem vápenatým (jeden mililitr obsahující jeden mikrogram DNA viru vakcínie přírodního typu) transfektuje do infikovaných buněk. Po patnácti minutách za teploty místnosti se přidá 10 ml média (DMEM, 10 % plodového telecího sera). Buňky se inkubují čtyři hodiny a medium se vymění. Buňky se pak inkubují šest dnů. Připraví se tak surový virový kmen. Progenový virus se titruje na CV-1 buňky. Typické plaky vakcínie byly viditelné po dvou dnech.

Závislost účinnosti pakážování na množství genomové virové DNA byly stanovovány pro DNA v množstvích od 0,1 do 10 mikrogramů na $5 \cdot 10^6$ CV-1 buněk. Viz obrázek 7.1. Množství DNA více než 1 mikrogram (například 10 mikrogramů) poskytovala surovou sraženinu fosforečnanem vápenatým, což snižuje účinnost transfekce v hodnotách pfu/ μ g vnesené DNA. Viz obrázek 7.1.

výtěžku

Závislost ~~v~~ pakážovaného viru vakcínie na době inkubace pakážování byla analyzována s použitím konstantního množství DNA viru vakcínie přírodního typu (1 μ g) a konstantního množství pomocného viru FPV (1 pfu/buňku) za shora popsaných podmínek pro původní pokus v tomto příkladu a tím, že medium přidané 15 minut po transfekci bylo vyměněno po čtyřech hodinách a že buňky byly potom inkubovány další jeden až pět dnů před přípravou surového virového kmene (celkový objem 2 ml). Virový kmen z kontrolních buněk infikovaných pouze FPV a inkubovaných pět dnů neposkytl žádné viditelné plaky. Tento pokus byl třikrát zopakován. Typický výsledek je uveden níže v tabulce 7.1.

Tabulka 7.1

Vliv inkubační doby na výtěžek viru vakcinie z DNA pakázování pomocným virem drábežích neštovic v savcích (CV-1) buňkách

inkubační doba (hodiny)	titr (pfu/ml)
24	$1,0 \cdot 10^2$
48	$4,6 \cdot 10^4$
72	$5,0 \cdot 10^5$
96	$5,6 \cdot 10^6$
120	$2,1 \cdot 10^7$

Titř pakázovaného viru vakcinie, detegovaného analýzou plaku na savcích (CV-1) buňkách, se postupně zvyšoval od asi 10^2 plak tvořících jednotek na ml po 24 hodinách do asi $2 \cdot 10^7$ po 120 hodinách. Inkubační doby v rozmezí od 48 do 72 hodin poskytovaly vhodné hladiny pakázovaného viru vakcinie (mezi 10^4 a 10^6 pfu/ml) a jsou tedy vhodné pro rutinní pakázování DNA viru vakcinie virem drábežích neštovic v savcích buňkách.

DNA vakcinie může být pakázována v savcích buňkách nepodařeně infikovaných virem drábežích neštovic. Již bylo ukázáno, že virus drábežích neštovic může infikovat také savčí buňky, ale virový životní cyklus není v těchto netypických hostitelských buňkách úplný. Podle typu buněk se virový růst zastaví buď v časném nebo v pozdním stupni a nevytvoří se životaschopný virus drábežích neštovic (Taylor a spol., 1988.). Tato zjištění byla příčinou výzkumu pakázování DNA vakcinie v kontinuální savčí buněčné linii.

Konfluentní monovrstvy buněk CV-1 se infikují 0,05 pfu na buňku FPV kmene HPL441. Potom se transfektují liguční směsí sestávající z DNA viru vakcinie rozštěpené působením NotI. Podrobněji - DNA vakcinie (1 mikrogram) se rozštěpí působením NotI a liguje se s uvedenými množstvími DNA (kazeta P7.5 gpt genu). Jediné místo NotI ve viru vakcinie je umístěno v intergenové oblasti v HindIII F fragmentu

(Goebel a spol.: Virology 179, 247 (1990)). Po třídenní inkubaci se buňky izolují a surový virový kmen se titruje na CV-1-buňkách v přítomnosti (+MPA) a v nepřítomnosti (-MPA) gpt-selektivního média. Výsledek je souhrnně uveden v tabulce 7.2.

Tabulka 7.2

Titry po nezdařeném pakázování

pokus č.	insert (ng)	titry		chimery (%)
		(pfu, $10^{-2}/6,10^6$ buněk)		
		- MPA ⁺	+ MPA	
1	200	17,2	1,6	9,3
2	200	42,5	5,1	12,3
3	400	64,0	3,8	5,9
4	400	26,8	3,8	14,2
5		210,0		

* MPA znamená mykofenolová kyselina

Nejdůležitějším výsledkem bylo, že virus drábežích neštovic by mohl pakázovat modifikovanou DNA vakcínie v buněčném typu, který brání jeho vlastnímu růstu. Navíc, výtěžek chimerních plaků byl v rozmezí 5 až 10 %. Toto srovnání je příznivé ve srovnání s klasickou in vivo rekombinační technikou, při níž obvykle asi 0,1 % z celkového množství plaků jsou rekombinanty. Ligace vektorových ramének samotných (tabulka 7.2, pokus č. 5) vede k vyššímu titru při srovnání s ligačními pokusy 1 až 4 s insertem, možná proto, že ohybějí znečištěniny, které jsou přítomny v molekulách insertu vyčištěných na agarose.

Některé z izolovaných virů byly vyčištěny přes plak a byly dále charakterizovány. Vykazovaly typické HindIII restriční sestavy viru vakcínie a navíc pásy cizího genu charakteristické pro dvě možné orientace jediného insertu. Při inserci do místa NotI nebyl pozorován žádný virus s násobnými inserty.

Heterologní pakázované chimerní viry vakcínie se

nehybridizují zkříženě s virem drůbežích neštovic. Pro studium vlivů heterologního pakážování virem drůbežích neštovic (FPV) na strukturu chimerních virů vakcínie se DNA isolátů F13.4, F12.5, F13.2 a F12.4 spolu s DNA čtyř vyčištěných isolátů z NotI klonovacího pokusu a kontrol viru drůbežích neštovic rozštěpí působením HindIII. Výsledné fragmenty se rozdělí elektroforesou a analyzují se Southernovou hybridizací sondou viru drůbežích neštovic připravenou z virionů vyčištěných přes gradient sacharósy. Nebyla pozorována žádná zkřížená hybridizace viru vakcínie s FPV DNA.

Příklad 3

Homologní pakážování sestavené DNA viru vakcínie mutantem hostitelské oblasti viru vakcínie (vdhr), který není schopen replikace v lidské buněčné linii

Tento příklad ilustruje konstrukci a využití pomocného viru neštovic obsahující delece, které omezují jeho hostitelský rozsah, zvláště schopnost replikovat v jistých buněčných liniích. Modifikovaný virus vakcínie bez pomocného viru lze připravit pakážováním vektorové DNA s tímto mutantním pomocným virem a izolováním klonů sestaveného viru infekováním příslušných lidských buněk.

Tento mutantní pomocný virus je odvozen od mutantů hostitelské řady viru vakcínie, které nejsou schopny replikovat se v různých lidských buňkách a které mají pozměněné cytopathické účinky na mnoho jiných buněk, jež jsou dovoleny pro infekci přírodním virem vakcínie (viz například Drillean a spol.: *Virology* 111, 488 až 499 (1981)). Podrobněji řečeno - genom tohoto pomocného viru obsahuje mutace dvou genů hostitelských oblastí, které společně zabraňují replikaci v lidských (MRC 5) buňkách, v nichž pouze genomy viru vakcínie mají alespoň jeden neporušený gen hostitelské oblasti, který může replikovat.

Konstrukce mutovaného viru vakcínie hostitelské oblasti vdhr: Genomové umístění a DNA sekvence jednoho genu viru

vakcinie potřebného pro replikaci v lidských buňkách byla popsána Gillardem a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5573 až 5577 (1986). V nedávné době byl tento gen označen KIL (Goebel a spol.: 1990.). Byl zmapován druhý gen hostitelské oblasti viru vakcinie (Perkus a spol.: J. Virology 63, 3829 až 3836 (1990).). Tento druhý gen (označený podle Goebela a spol. (1990) jako C7L) leží v oblasti zahrnující částí HindIII C a HindIII N fragmentů. Tato oblast je deletována ve viru vakcinie kmene WR6/2 (Moss a spol.: J. Virol. 40, 387 až 395 (1981).). Kmen WR6/2 tedy chybí gen C7L hostitelské oblasti.

Pomocný virus, jemuž chybí jak ¹KL tak C7L gen oblasti hostitelů, se zkonstruuje z C7L-negativního kmene WR-6/2 získáním markeru s modifikovaným EcoRI K fragmentem, z něhož je deletován KIL gen hostitelské oblasti. Viz obrázek 8.1. Tento modifikovaný EcoRI K fragment obsahuje gen selektivního markeru (E. coli gpt gen), který usnadňuje selekci modifikovaných WR-6/2 genomů obsahujících modifikovaný EcoRI K fragment využitím intracelulárního získávání markeru, jak to popsali Sam a Dumbell (1981). Podmíněný lethální mutant, kterému chybí schopnost růst na lidských buněčných liniích, byl popsán také Perkusanem a spol. (1989).

DNA

Podrobněji - EcoRI K fragment viru vakcinie přírodního typu je subklonován do plasmidu pFP-tkl81. Výsledný plasmid se označí pFP-EcoK1. Gen KIL hostitelské oblasti viru vakcinie (Gillard a spol. 1986) se deletuje. Současně se zavede jedinečné místo NotI smyčkovou mutagenesí pomocí oligonukleotidu P-hr(3) (sekvenční identifikační číslo 42). Výsledný plasmid se označí pEcoK-dhr.

Plasmid pFP-tkl81 se zkonstruuje modifikací plasmidu pFP-tk-10.4 (viz Falkner a spol.: Evropská patentová přihláška číslo 89303887.7, publikovaná evropská patentová přihláška O 338 801, příklady 3 a 8; celý objev této přihlášky je zde zahrnut jako odkaz). Plasmid pFP-tk10.4 se rozštěpí působením NcoI a liguje se s adaptorem obsahujícím anelované nukleotidy P-NcoI(1) a P-NcoI(2). Výsledkem je zavedení

násobného klonovacího místa do jediného Nco místa FPV tk-
-genu s místy štěpení restrikcí endonukleasami EcoRI,
NotI a HindIII.

Sekvence viru vakcinie byla publikována Goebelen S. J.
a spol.: Virology 179, 247 až 266 (1990). Je dostupná z
"EMBO Data Library" (GenBank) pod číslem M35027. Sekvence
genu KIL hostitelského rozmezí viru vakcinie byla publiko-
vána Gillardem S. a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA
83, 5573 až 5577 (1986) a je dostupná z "EMBO Data Library"
pod identifikátorem (ID) PXVACMHC. Kodující sekvence genu
KIL tedy není zahrnuta v sekvenci identifikační číslo 21.
Gen KIL v pEcoK-dhr je deletován a je nahrazen NotI místem.
Oblast napojení mezi PXVACMHC sekvencí a vloženým NotI
místem (nukleotidy číslo 1 až 20 této sekvence odpovídají
nukleotidům čísla 72 až 91 v ID PXVACMHC). Oblast kodující
KIL se deletuje a nahradí se NotI místem následovaným dvěma
G zbytky (nukleotidy číslo 21 až 30 v této sekvenci). Sek-
vence obsahuje obklopující oblast o 20 párech nukleotidů
(nukleotidy číslo 31 až 50 v této sekvenci, nukleotidy č.
944 až 963 v ID PXVACMHC).

V dalším stupni se pEcoK-dhr linearizuje působením
NotI a liguje se s kazetou P7.5-gpt-gen o 1100 párech
nukleotidů odvozenou od plasmidu pM2-gpta (příklad 4)
štěpením působením NotI. Výsledný plasmid pdhr-gpt se pou-
žije pro generaci pomocného viru vdhr.

Kazeta NotI (obsahující kazetu P7.5 promotor - gpt-gen)
vložená do pEcoK-dhr a 20 nukleotidů 5'- a 3'-obklopujících
oblastí jsou pro pdhr-gpt uvedeny v sekvenci identifikační
číslo 22. Obklopující oblast (nukleotidy číslo 1 až 20
této sekvence) odpovídá nukleotidům číslo 72 až 91 v ID
PXVACMHC (viz sekvence identifikační číslo 21 pro EcoK-dhr).
Vložená DNA sekvence začíná v poloze 21 (první "G"-zbytek
místa NotI) a končí v poloze 1139 (poslední "C"-zbytek místa
NotI). A-zbytek translačního iniciačního kodonu gpt-genu
odpovídá poloze číslo 548. T-zbytek translačního stop kodonu
gpt-genu odpovídá poloze číslo 1004. Sekvence obsahuje

dvacet nukleotidů obklopující oblasti (nukleotidy číslo 1192 až 1209 této sekvence, nukleotidy číslo 944 až 961 v ID PXVACMHC). Dva "G" zbytky číslo 1190 a 1191 této sekvence odpovídají polohám 29 a 30 v pEcoK-dhr.

Při přenosu EcoK fragmentu do viru vakcínie se plasmid transfektuje do primárních fibroblastových buněk kuřecího zárodku infikovaných delečním mutantem viru vakcínie WR-6/2. Modifikované viry se vyberou jako gpt-positivní (pomocí mykofenolové kyseliny). Gpt-positivní viry se vyčistí přes plak (třikrát) v CEF buňkách a označí se vdhr.

Charakterizace pomocného viru vdhr: Struktura gpt-positivního viru vakcínie vdhr se analyzuje Southernovým blotováním a testy hostitelské oblasti. Virus vdhr je schopný tvořit plaky na fibroblastech kuřecího zárodku a na dvou opičích buněčných liniích (BSO40 a Vero), ale je defektivní při replikaci v lidské buněčné linii MRC-5.

Pakážování vestavené DNA viru vakcínie využitím mutantu hostitelské oblasti vdhr jako pomocného viru. Konstrukce pro expresi cDNA, která koduje lidský protrombin, demonstruje užitečnost tohoto přístupu. Produkt z ligační směsi popsané v příkladu 5, obrázek 5.1, se transfektuje do fibroblastů kuřecího zárodku infikovaných vdhr jako pomocným virem. Po dvou dnech se buňky izolují a připraví se surový vironový kmen. Pakážovaný virus se testuje tvorbou plaků na lidských (MRC 5) buňkách, v nichž žádaný virus vakcínie replikuje, ale mutovaný vdhr pomocný virus nereplikuje.

Po třech dnech se buňky obarví neutrální červení. Vyberou se plaky pro další analýzu Southernovým blotováním. Identifikují se modifikované klony viru vakcínie, které mají žádanou strukturu. Očekávány jsou také viry, které podlehly rekombinaci s vysoce homologním pomocným virem.

Příklad 9

Konstrukce nových chimerních virů vakcínie kodujících HIV gp160 (vP2-gp160_{MN}A, vP2-gp160_{MN}B a vselP-gp160_{MN}) a

exprese rekombinantu gp160_{MN} v buňkách Vero

Tento příklad ilustruje konstrukci HIV-1_{MN} isolátu přímým molekulárním klonováním rekombinantu viru vakcinie pro přípravu gp160 ve velkém měřítku. Příprava gp160 isolátu HIV_{IIIB} popsaná Ratnerem a spol.: *Nature* **313**, 277 až 284 (1985), využitím konvenčně zkonstruovaného expresního vektoru viru vakcinie, byla popsána Barrettem a spol.: *AIDS Research and Human Retroviruses* **2**, 159 až 171 (1989). Isolát HIV_{IIIB} je však vzácnou variantou. Úsilí vyvinout vakcíny, kterou jsou založeny na HIV obalových proteinech, by mělo zahrnovat representativnější HIV-1 isoláty, jako je například MN-isolát. Gargo a spol.: *Virology* **164**, 531 až 536 (1988), Carrow a spol.: *Aids Research and Human Retroviruses* **2**, 831 až 839 (1991). Zde uvedené vektory viru vakcinie byly proto zkonstruovány přímým molekulárním klonováním tak, aby exprese poskytovaly gp160 proteinu HIV_{MN} isolátu.

Konstrukce plasmidu pP2-gp160_{MN} a chimerních virů vP2-gp160_{MN} a vP2-gp160_{MN}B: Strategie vložení gp160-genu do viru vakcinie zahrnuje: i) modifikování gp160-genu odstraněním velké 5'-nepřekládané oblasti (5'-UTR) a zavedení vhodného klonovacího místa proti směru vlákna start kodonu, ii) klonování modifikovaného gp160-genu po směru vlákna silného pozdního P2-promotoru viru drůbežích neštovic (evropská patentová přihláška č. 91 114 300.-6, 26. srpna 1991) a iii) vložení fragmentu se zarovnaným koncem, který obsahuje kazety P2-gp160 a P7.5-gpt-gen, do jediného místa štěpení restriční endonukleasou příslušných kmenů virového hostitele, například do SmaI místa hostitelského kmene vdtK vakcinie (příklad 4), SmaI nebo NotI míst kmene WR 6/2 vakcinie (Moss a spol.: *J. Virol.* **40**, 337 (1981).) nebo kmene WR vakcinie přírodního typu.

Pro tyto účely se zavede nové SmaI místo do plasmidu pN2gpt-S4 (příklad 4). Výsledkem je plasmid pS2gpt-S4 (obrázek 9.1, sekvence identifikační číslo 62). Potom byl S4 promotor vyměněn za P2-promotor. Získal se tak plasmid

pS2gpt-P2 (sekvence identifikační číslo 63). Tento plasmid umožňuje klonování úplné otevřené čtecí oblasti (orfs), ale může být použit také pro klonování neúplné orfs, které chybí její vlastní start kodon. Start kodon se získá například tak, že se klonuje do jediného NcoI místa (CCATGG) tohoto plasmidu. Konstrukce plasmidů a virů je podrobně popsána níže. Při modifikaci gp160-genu se PCR-generovaný sousední fragment změnil na kazetu gp-160-genu s minimálním 5'-UTR. Tato kazeta je přítomna v konečné konstrukci, plasmidu pP2-gp160_{MN} (obrázek 9.1, sekvence identifikační číslo 69). Další vlastnosti plasmidu jsou uvedeny v následující tabulce.

Plasmid pP2gp160_{MN} (6926 párů nukleotidů) (sekvence identifikační číslo 69):

umístění	popis
1 až 3529	pS2gpt-P2 sekvence
2396 až 2851	reCDS <u>E. coli</u> gpt genu
2851	T re iniciačního kodonu TAC gpt genu
2395	A re stop kodonu TTA
3081 až 3323	re P7.5 promotoru vakcinie
3358 až 3526	sekvence P2 promotoru podle evropské přihlášky Avipox "Intergenic region"
3534 až 6001	CDS HIV-1 kmene MN gp160 sekvence (EMBL: ID RHHEVIMNC)
3534	A iniciačního kodonu ATG z gp160 _{MN}
6102	T stop kodonu TAA z gp160 _{MN}
6173 až 6926	pS2gpt-P2 sekvence

Plasmidy byly konstruovány následujícími postupy.

Plasmid pS2gpt-S4: Plasmid pN2gpt-S4 (příklad 4) se rozštěpí působením XbaI a liguje se SmaI-adaptorem (sekvence identifikační číslo 43: 5'-CTAGCCCGGG-3') deaktivujícím místo XbaI a tvořícím místo SmaI. Výsledný plasmid se označí pS2gpt-S4 (sekvence identifikační číslo 62). Další vlastnosti plasmidu jsou uvedeny v následující tabulce.

Plasmid pS2gpt-S4 (4145 párů nukleotidů) (sekvence identifikační číslo 62)

umístění: popis:

1 až 2226 pN2gpt-S4 sekvence sekvence identifikačního čísla 14. Poloha 1 odpovídá prvnímu nukleotidu G 5'-TGGCACTTT TCGGGGAAAT-3'.

2227 až 2236 SmaI-adaptor 5'-CTAGCCCGGG-3'

2396 až 2851 rcCDS E.coli gpt genu

2851 T rc iniciačního kodonu TAC gpt genu

2395 A rc stop kodonu TTA

3081 až 3323 rc P7.5 promotoru vakcinie

3358 až 3451 S4-promotor sekvence identifikační číslo 14 (oligonukleotid P-artP(9) viz strana 42)

2237 až 4145 pN2gpt-S4 sekvence sekvence identifikačního čísla 14

Plasmid pS2gpt-P2: S4-promotorový segment plasmidu pS2gpt-S4 se odstraní štěpením působením PstI a HpaI a nahradí se PstI-HpaI P2-promotorovým segmentem o 172 párech nukleotidů. Tento promotorový segment se generuje PCR plasmidem pTZgpt-P2a (Falkner a spol.: evropská patentová přihláška číslo 91 114 300.-6, 26. srpna 1991) jako templát a oligonukleotidy P-P2 5'(1) a P-P2 3'(1) jako primery. PCR-produkt byl rozštěpen působením PstI a HpaI a ligován s velkým fragmentem plasmidu pS2gpt-S4 rozštěpeným působením PstI a HpaI. Sekvence P-P2 5'(1) (sekvence identifikační číslo 44) je: 5'-GTACGTACGG CTGCAGTTGT TAGAGCTTGG TATAGCGGAC AACTAAG-3', sekvence P-P2 3'(1) (sekvence identifikační číslo 45) je: 5'-TCTGACTGAC GTTAAAGATT TATAGGCTAT AAAAAATAGT ATTTTCTACT-3'. Přesná sekvence PCR fragmentu byla potvrzena sekvenováním konečného plasmidu, označeného pS2gpt-P2 (sekvence identifikační číslo 63). Jako sekvence primeru byla použita P-SM(2) (sekvence identifikační číslo 46), 5'-GTC TTG AGT ATT GGT ATT AC-3' a P-SM(3) (sekvence identifikační číslo 47), 5'-CGA AAC TAT CAA AAC GCT TTA TG-3'. Další vlastnosti plasmidu pS2gpt-P2 jsou uvedeny v následující tabulce.

Plasmid pS2gpt-P2 (4277 párů nukleotidů) (sekvence identifikační číslo 63)

umístění	popis
1 až 3357	pS2gpt-S4 sekvence
2306 až 2851	rcCDS <u>E. coli</u> gpt genu
2851	T rc iniciačního kodonu TAC gpt genu
2395	A rc stop kodonu TTA
3081 až 3323	rr P7.5 promotoru vakcinie
3358 až 3526	sekvence P2 promotoru podle evropské příhlášky Avipox "intergenic region"
3527 až 4277	pS2gpt-S4 sekvence

Plasmid pMNenv2: Plasmid pMNenv1 poskytl R. Gallo (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland). Obsahuje gpl60-gen HIV MN-kmene klonovaného jako EcoRI-PvuII fragment o 3100 párech nukleotidů ve vektoru pSP72 (Promega, Inc.). EcoRI-Asp718 fragment o 600 párech nukleotidů z pMNenv1 se nahradí EcoRI-Asp718 fragmentem o 130 párech nukleotidů.

Odstraní se tak velké části 5'-nepřekládané oblasti gpl60-genu. Tento fragment o 130 párech nukleotidů se generuje PCR použitím plasmidu pMNenv1 jako templátu a oligonukleotidů P-MN(1) a P-MN(2) jako primerů. První primer P-MN(1) zavedl navíc místo StuI jeden pár nukleotidů proti směru vlákna start kodonu. Sekvence P-MN (1) (sekvence identifikační číslo 48) je sekvence 5'-AGCTAGCTGA ATTCAGGCCT CATGAGAGTG AAGGGGATCA GGAGGAATTA TCA-3'; sekvence P-MN(2) (sekvence identifikační číslo 49) je sekvence 5'-CATCTGATGC ACAAAATAGA GTGGTGCTTG-3'. Výsledný plasmid se označí pMNenv2. Pro vyloučení mutací byl PCR generovaný fragment in tomto plasmidu sekvenován primery P-seq (2) (sekvence identifikační číslo 50) 5'-CTG TGG GTA CAC AGG CTT GTG TGG CCC-3' a P-Seq(3) (sekvence identifikační číslo 51) 5'-CAA TTT TTC TGT AGC ACT ACA GAT C-3'.

Plasmid pP2-gpl60MN: StuI-PvuII fragment o 2700 párech nukleotidů obsahující MN gpl60-gen, který byl izolován z plasmidu pMNenv-2, se vloží do HpaI místa plasmidu pS2gpt-P2. Získá se tak plasmid pP2-gpl60MN (sekvence identifikační číslo 69).

Chimerní viry vP2-gpl60_{MN}A a vP2-gpl60_{MN}B byly zkonstruovány následujícím postupem: SmaI-fragment, který obsahuje kazety P2-gpl60 a p7.5-gpt-gen, se vloží přímým molekulárním klonováním do jediného SmaI místa hostitelského kmene vđTK vakcínie (příklad 4). Získají se chimerní viry vP2-gpl60_{MN}A a vP2-gpl60_{MN}B (obrázek 9.2). vđTK viru vakcínie z příkladu 4 se rozštěpí v jediném SmaI místě a liguje se se SmaI fragmentem o 4000 párech nukleotidů, který obsahuje kazety p7.5-gpt gen a P2-gpl60-gen. Kmen WR 6/2 vakcínie se rozštěpí v jediném SmaI místě (NotI) a liguje se se SmaI (NotI) fragmentem o 4000 párech nukleotidů, který obsahuje kazety P7.5-gpt-gen a P2-gpl60-gen. Postupy klonování jsou ahora popsány v příkladu 1. Ve viru vP2-gpl60_{MN}A se gpl60-gen transkribuje ve stejném směru jako geny kolem virového genu thymidin-kinasy. Ve viru vP2-gpl60_{MN}B se gen gpl60 transkribuje v opačném směru. Jelikož vlivy polohy genu mohou ovlivnit hladiny exprese v konstrukcích vakcínie, SmaI (NotI)-fragment se také vloží (obsahující kazety p2-gpl60 a P7.5-gpt-gen) do SmaI (NotI) místa kmene WR 6/2. Pakážování in vivo se provádí podle shora popsaného příkladu 3.

Struktura chimerních virů: Pro potvrzení teoretických struktur chimerních virů (obrázek 9.3) byla provedena analýza Southernovým blotováním. DNA vyčištěných virů se roštěpí působením PstI. Výsledné fragmenty se rozdělí na agarosovém gelu, přenesou se na nitrocelulosovou membránu a hybridizují se sondou genu thymidin-kinasy (tk) a gpl60-genu. U sondy tk-genu v případě vP2-gpl60_{MN}A jsou viditelné předpověděné fragmenty o 6900 párech nukleotidů a 14 300 párech nukleotidů. U vP2-gpl60_{MN}B jsou viditelné předpověděné fragmenty o 8700 párech nukleotidů a 12 500 párech nukleotidů. U sondy gpl60-genu (pMN env1) je viditelný předpověděný fragment o 14 300 párech nukleotidů u vP2-gpl60_{MN}A a o 8700 párech nukleotidů u vP2-gpl60_{MN}B. To potvrzuje integraci kazet cizích genů ve dvou různých orientacích.

Studie exprese s chimerními viry vP2-gpl60_{MN}A a vP2-gpl60_{MN}B: Pro studie exprese byly vybrány buňky Vero. kultivace buněk, infikování chimerními viry a čištění re-

kombinantního gpl60 proteinu se provádí tak, jak je to popsáno shora Barrettem a spol.

Westernovy bloty gpl60: Westernovy bloty se provádějí v podstatě tak, jak je to popsáno Towbinem a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6672 až 6676 (1979). První protilátkou je myší monoklonální anti-HIV-gpl20 protilátka (Du Pont, Inc. č. NEA 9305) používaná ve zředění 1 : 500. Druhou protilátkou je kozi-protinyší IgG (H+L) kondenzovaný s alkalickou fosfatasou (BioRad. Inc., č. 170-6520) používaná ve zředění 1 : 1000. Reakční činidla (BCIP/NBT) a postupy vybarvování jsou od firmy Promega, Inc.

Konstrukce plasmidu pselP-gpl60MN a chimerního viru vselP-gpl60_{MN}: V tomto příkladu byl použit syntetický časný /pozdní promotor selP (sekvence identifikační číslo 70) (S. Chakrabarti a B. Moss, viz evropská patentová přihláška číslo 91 114 300.-6, Rekombinantní virus drůbežích neštovic), který je jedním z nejsilnějších známých promotorů viru vakcínie pro expresi gpl60-genu kmene HIV-1 MN. Nejdříve se zkonstruuje plasmid pselP-gpt-L2 (obrázek 9.4). Tento plasmid obsahuje selP-promotor, po němž následuje násobné klonovací místo pro inserci cizích genů, buď jako úplné nebo neúplné otevřené čtecí oblasti, a translační stop kodony ve všech čtecích fázích následované časným transkripčním stop signálem viru vakcínie, TTTTNT (Rohrmann a spol.: *Cell* 46, 1029 až 1035 (1986)). Kazeta P7.5-gpt-gen je umístěna vedle promotoru a slouží jako dominantní selekční marker (Falkner a spol.: *J. Virol.* 62, 1849 až 1854 (1988)). Kazety selP-promotor/marker jsou obklopeny místy štěpení restriktivními endonukleasami, které jsou jedinečné v genomu viru vakcínie (SfiI, NotI, RsrII) a mohou být vystřiženy jako fragmenty se zarezvanými konci (například štěpením působením HpaI a SnaBI). Aby bylo možné vložit gpl60-gen do pselP-gpt-L2, zavedlo se kolem translačního start kodonu místo NcoI. Tato mutace vede k substituci aminokyseliny arginin (AGA) alaninem (GCC). Tato mutace v druhé aminokyselině signálního peptidu pravděpodobně neinterferuje s účinnou expresí gpl60-genu. Postup klonování a sekvence okolo přírodního a

a modifikovaného gpl60-genu je nastíněna na obrázku 9.5. Aby se tato mutace zavedla do gpl60-genu, byl změněn PCR-generovaný sousední fragment. Konstrukce plasmidů je podrobněji popsána níže.

Plasmid pL2: Při konstrukci plasmidu pL2 se XbaI-ClaI fragment plasmidu pTM3 o 600 párech nukleotidů (Moss a spol.: Nature 343, 91 (1990).) substituuje XbaI-ClaI adaptorovým fragmentem sestávajícím z anelovaných oligonukleotidů o-542 (sekvence identifikační číslo 52) 5'-CGA TTA CGT AGT TAA CGC GGC CGC GGC CTA GCC GGC CAT AAA AAT-3' a o-544 (sekvence identifikační číslo 53) 5'-CTA GST TTT TAT GGC CGG CTA GGC CGC GGC CGC GTT AAC TAC GTA AT-3'. Výsledný plasmidový meziprodukt, který se získá z tohoto stupně klonováním, se nazývá pL1. AatII-SphI fragment o 340 párech nukleotidů (části nekodujících gpt-sekvencí) se substituuje AatII-SphI adaptorovým fragmentem sestávajícím z anelovaných oligonukleotidů o-541 (sekvence identifikační číslo 54) 5'-CTT TTT CTG CGG CCG CGG ATA TGG CCC GGT CCG GTT AAC TAC GTA GAC GT-3' a o-543 (sekvence identifikační číslo 55) 5'-CTA CGT AGT TAA CCG GAC CGG GCC ATA TAG GCC GCG GCC GCA GAA AAA GCA TG-3'. Výsledný plasmid se nazývá pL2.

Plasmid pTZ-L2: XbaI-SphI fragment (sestávající ze segmentu T7-promotor-BMC-T7-terminátor, násobné klonovací místo a kazeta P7.5-gpt-gen) se nechá zreagovat s klenowovou polymerasou a vloží se mezi PvuII místa plasmidu pTZ19R (Pharmacia, Inc.). Výsledný plasmid byl nazván pTZ-L2 (sekvence identifikační číslo 64). Další vlastnosti tohoto plasmidu jsou uvedeny v tabulce níže.

Plasmid pTZ-L2 (4701 párů nukleotidů) (sekvence identifikační číslo 64)

umístění:	popis:
1 až 55	pTZ19R sekvence (Pharmacia)
56 až 108	linker I v rc orientaci (5TNT, NotI, SfiI, RsrII, HpaI, SnaBI a AatII)

110 až 360	<u>E.coli</u> gpt sekvenční v ro orientaci; gpt otevřená čtecí oblast začíná ro TAC start kodonem v poloze 860 a končí ro ATT stop kodonem v poloze 403
361 až 1338	p7.5 promotorová sekvenční viru vakcinie v ro orientaci
1339 až 1344	HpaI místo mezi T7 terminátorem bakteriofágu a p7.5 promotorem viru vakcinie
1345 až 1488	sekvenční terminátoru T7 bakteriofágu v ro orientaci (Studier a spol.)
1489 až 1558	násobné klonovací místo v ro orientaci (Sall, transalční stop kodony pro všechny tři otevřené čtecí oblasti, StuI, XhoI, PstI, BamHI, SpeI, SacI, SmaI, EcoRI, NcoI)
1559 až 2131	sekvenční 5'-nepřekládané oblasti viru encefalomyokarditidy (EMC-virus) () v ro orientaci
2132 až 2187	sekvenční promotoru T7 bakteriofágu v ro orientaci ()
2190 až 2242	linker II v ro orientaci (SnaBI, HpaI, NotI, SfiI, 5TNT)
2243 až 4701	ptZ19R sekvenční (Pharmacia)

Plasmidy PTZselP-L2 a pselP-gpt-L2: ClaI-NcoI fragment o 600 párech nukleotidů (sekvenční T7-promotor-EMC) se nahradí syntetickým promotorovým fragmentem sestávajícím z anelovaných oligonukleotidů oselPI (sekvenční identifikační číslo 56: 5'-CGA TAA AAA TTG AAA TTT TAT TTT TTT TTT TTG GAA TAT AAA TAA GGC CTC-3', 51-mer) a o-selPII (sekvenční identifikační číslo 57: 5'-CAT GGA GGC CTT ATT TAT ATT CCA AAA AAA AAA AAT AAA ATT TCA ATT TTT AT 3'). Výsledný plasmidový meziproduct ptZselP-L2 ještě obsahuje T7-terminátor a HpaI místo, které byly odstraněny v následujícím stupni klonování ^{vešnění} časného transkripčního stop signálu vakcinie a snížením velikosti fragmentu P7.5 promotoru z 280 párů nukleotidů na 130.

Sall-NdeI fragment o 239 párech nukleotidů se substituuje Sall-NdeI adaptorem obsahujícím anelované oligonukleotidy o-830 (sekvenční identifikační číslo 58: 5'-TCG ACT TTT TAT CA-3') a o-857 (sekvenční identifikační číslo 59: 5'-TAT GAT AAA AAC-3'). Výsledný plasmid se nazývá pselP-gpt-L2 (sek-

vence identifikační číslo 65). Další vlastnosti této konstrukce jsou uvedeny v tabulce níže.

Plasmid pselP-gpt-l2 (3878 párů nukleotidů) (sekvence identifikační číslo 65)

umístění:	popis:
1 až 55	pTZ19R sekvence (Farmacia)
56 až 103	linker I v rc orientaci (5TNT, NotI, SfiI, RsrII, HpaI, SnaBI, AatII)
110 až 360	<u>E. coli</u> gpt sekvence v rc orientaci, otevřená čtecí fáze začíná rc TAC start kodonem v poloze 360 a končí rc ATT stop kodonem v poloze 403
361 až 1245	sekvence promotoru p7.5 viru vakcinie v rc orientaci počínající p7.5 vnitřním NdeI místem v poloze 1241
1246 až 1258	časný transkripční stop signál viru vakcinie v rc orientaci obklopený NdeI místem (poloha 1245) a Sall místem (poloha 1253)
1259 až 1322	násobné klonovací místo v rc orientaci (Sall translační stop kodony pro všechny tři čtecí oblasti, StuI, XhoI, PstI, BamHI, SpeI, SacI, SmaI, EcoRI, NcoI)
1323 až 1374	syntetický časný pozdní promotor viru vakcinie v rc orientaci obklopený místem NcoI v poloze 1317 a ClaI místem v poloze 1370
1375 až 1414	linker II v rc orientaci (SnaBI, HpaI, NotI, SfiI, 5TNT)
1415 až 3878	sekvence pTZ19R (Pharmacia)

Plasmid pselP-gpl60_{MN}: env gen o 3100 párech nukleotidů, obsahující EcoRI-PvuII fragment plasmidu pM_{env}-I, se vloží do plasmidu pselP-gpt-l2, který je rozštěpen působením EcoRI a StuI. Získá se meziproductový plasmid pselP-gpl60.1. NcoI-NsiI fragment plasmidu pselP-gpl60 o 800 párech nukleotidů se substituuje PCR-generovaným NcoI-NsiI fragmentem o 310 párech nukleotidů. Získá se tak konečný plasmid pselP-gpl60_{MN} (sekvence identifikační číslo 66). Další vlastnosti tohoto plasmidu jsou uvedeny v následující tabulce.

Plasmid pself-gpl60MN (6474 párů nukleotidů) (sekvence identifikační číslo 66)

umístění:	poloha:
1 až 55	pTZ19R sekvence (Pharmacia)
56 až 108	linker I v rc orientaci (5TNT, SfiI, RsrII, HpaI, SnaBI, AatII)
110 až 860	<u>E. coli</u> gpt sekvence v rc orientaci, gpt otevřená čtecí fáze začíná v poloze 860 rc TAC start kodonem a končí v poloze 403 rc ATT stop kodonem
861 až 1245	sekvence promotoru p7.5 viru vakuinie v rc orientaci počínající p7.5 vnitřním místem NdeI v poloze 1241
1246 až 1258	časný transkripční stop signál viru vakuinie v rc orientaci (poloha 1245 až 1252) obklopený NdeI místem v poloze 1241 a Sall místem v poloze 1253
1259 až 3916	HIV-MN env gen v rc orientaci, ORF začíná v poloze 3916 rc TAC start kodonem a končí v poloze 1348 rc ATT stop kodonem
3917 až 3970	syntetický pozdní časný promotor viru vakuinie v rc orientaci obklopený KcoI místem (poloha 3913) a ClaI místem (poloha 3966)
3971 až 4015	linker II v rc orientaci (SnaBI, HpaI, NotI, SfiI, 5TNT)
4016 až 6474	pTZ19R sekvence (Pharmacia)

Pro PCR-reakci byly použity primery o-NcoI (40-mer) (sekvence identifikační číslo 60): 5'-GAG CAG AAG ACA GTG GCC ATG GCC CTG AAG GGG ATC AGG A-3' a o-NsiI (30-mer) (sekvence identifikační číslo 61): 5'-CAT AAA CTG ATT ATA TCC TCA TGC ATC TGT-3'. Pro další klonování se PCR produkt rozštěpí působením NcoI a NsiI.

Chimerní viry vself-gpl60_{MN}^A a vself-gpl60_{MN}^B byly zkonstruovány následujícím způsobem: HpaI-fragment sestávající z kazet self-gpl60 a P7.5-gpt-gen se vloží přímým

molekulárním klonováním (obrázek 9.6) do jediného místa SmaI kmene WR6/2 vakcínie Moss a spol.: J. Virol. 40, 387 až 395 (1981).], který je vysoce atenuovaným kmenem viru vakcínie [viz Buller a spol.: Nature 317, 803 až 815 (1985).]. Kmen WR 6/2 viru vakcínie Moss a spol.: viz výše.] se rozštěpí v jediném SmaI místě a liguje se s HpaI fragmentem o 4000 párech nukleotidů, který obsahuje kazety P7.5-gpt-gen a selP-gpl60-gen. Postup klonování je stejný jako shora popsáno v příkladu 1.

Výsledné chimerní viry, vselP-gpl60_{MN}A a vselP-gpl60_{MN}B, se vyčistí a dále se charakterizují. Ve viru vselP-gpl60_{MN}A se gpl60-gen přepisuje ve stejném směru (zleva doprava) jako geny nahromaděné kolem insertního místa LA51R otevřená čtecí oblast; Goebel a spol.: Virology 122, 247 až 266 (1990).]. Ve viru vselP-gpl60_{MN}B se gen gpl60 přepisuje v opačném směru. Postup in vivo pakázování je stejný jako shora popsáno v příkladu 3.

Struktura chimerních virů: Teoretické struktury chimerních virů (obrázek 9.7) byly potvrzeny analýzou Southernovým blotováním. DNA vyčištěných virů se rozštěpí působením Sall. Fragmenty se rozdělí na agarosovém gelu, přenesou se na nitrocelulosovou membránu a hybridizují se sondou SalF-fragmentu vakcínie (pTZ-SalF) a sondou gpl60-genu (pMNenv-1). Sondou SalF-fragmentu byly^u vselP-gpl60_{MN}A viditelné předpověděné fragmenty o 6100 párech nukleotidů a 10 700 párech nukleotidů. U vselP-gpl60_{MN}B jsou viditelné předpověděné fragmenty o 3500 párech nukleotidů a 13 700 párech nukleotidů. U sondy gp-160-genu jsou vidět stejné fragmenty, ale fragment o 10 700 párech nukleotidů u vselP-gpl60_{MN}A a fragment o 3500 párech nukleotidů u vselP-gpl60_{MN}B poskytují méně intenzivní signály, protože pouze asi 400 párů nukleotidů z každého fragmentu je homologních se sondou.

Jelikož přímé klonování také vede k integraci tandemových vicemerních struktur, DNA těchto virů se také rozštěpí působením XbaI, která neštěpí vloženou DNA. XbaI přírodní fragment má velikost 447 párů nukleotidů. Integrace jedné

kopie insertu o velikosti 3800 párů nukleotidů vede k fragmentu se 4300 páry nukleotidů. Ve vícemerních strukturách se velikost fragmentu o 4300 párech nukleotidů zvýší o přírůstek 3800 párů nukleotidů.

Studie exprese s chimerními viry vselF-gp160_{MTA} a vselF-gp160_{MTB}: Pro studie exprese se použijí buňky Vero. Růst buněk, infekování chimerními viry a čištění rekombinantního gp160 proteinu se provádí podle Barritte a spol.: viz výše.

Příklad 10

Konstrukce nových chimerních virů vakcinie, které kodují lidský protein S (vProtS) a exprese rekombinantního proteinu S

Tento příklad ilustruje konstrukci rekombinantního proteinu S, který se získává expresí chimerním virem vakcinie. Lidský protein S je glykoprotein o molekulové hmotě 70 000, který funguje při regulaci srážlivosti krve (DiScipio a spol.: Biochemistry 18, 89 až 904 (1979).). cDNA a genomová DNA proteinu S byly klonovány⁸ charakterizovány (Lundwall a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 6716 (1986); Hoskins a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84, 349 (1987), Ebenhardt a spol.: Biochemistry 29, 7861 (1990) a Schmiedel a spol.: Biochemistry 29, 7845 (1990).).

Lidský protein S, normálně syntetizovaný jako protein o molekulové hmotě 28 000 v jaterních a endotheliálních buňkách (DiScipio a spol.: shora uvedená citace.) je expreseován ve stálých buněčných liniích odvozených od lidských 293 buněk a buněk AV12-264 křečka (transformovaná buněčná linie adenovirem) v hladinách 7 mikrogramů na 10⁶ buněk za den (Grimell a spol.: Blood 76, 2546 (1990).) nebo v systému myších C127 buněk/virusu papilomu v podobných hladinách exprese (Malm a spol.: Eur. J. Biochem. 187, 737 (1990).). Protein, který byl odvozen od později uvedených buněk, byl větší než protein S odvozený z plasmy, možná díky odchylce glykosylaci.

Zde uvedená exprese proteinu S používá kazetu se dvěma geny obsahující komplementární DNA lidského krevního faktoru proteinu S a gpt genu, v obou případech kontrolovaných promotorem vakcinie. Tato kazeta byla klonována do jedinečného místa NotI a pakážována v savčích buňkách infikovaných pomocným virem drůbežích neštovic. K expresi lidského proteinu S v infikovaných buňkách Vero dochází v úrovních čtyři až šest mikrogramů na 10^6 buněk.

Při testování buněk na optimální expresi proteinu chimerním virem vakcinie se použije pět různých hostitelských buněčných linií, WI 38 (lidský mechyonální plicní fibroblast), buňky CV-1, buňky Vero (buňky ledvin opic), jaterní buňky Chang a SK Hepl. Protein S byl nerozlišitelný od proteinu odvozeného z plasmu podle několika kritérií: rekombinantní materiál odvozený od infikovaných buněk této buněčné linie vykazoval stejné elektroforetické migrační sestavy a stejné chromatografické eluční profily jako protein S odvozený od plasmu. To ukazuje, že došlo ke správné post-translační modifikaci tohoto komplexního glykoproteinu. Tyto způsoby jsou podrobněji popsány níže.

Konstrukce plasmidu pW2-gpt-ProtS: jednovláknová DNA, která se připraví z plasmidu pBluescript-ProtS a která obsahuje cDNA kodující lidský protein S (poskytnutý R. T. A. McGillivrayem), se použije pro mutagenizování oblasti kolem translačního start kodonu oblasti kodující protein S v NcoI místě (CCATGG). Mutagenní primer o⁺ProtS1 (sekvence identifik-kační číslo 68) má sekvenci 5'-ACC CAG GAC CGC CAT GCC GAA GCG CGC-3'. Mutagenese se provádí podle postupu, který je uveden v mutagenizačním protokolu (Amersham, Inc.). Signální peptid je mutován tak, že se druhá aminokyselina změní z Arg na Ala (obrázek 10.1B a sekvence identifik-kační číslo 77 a 79). Tím se zavede NcoI místo, které je potřebné pro další klonování, a ATG start kodon se vnese do optimální polohy pro translaci. Tím se může zlepšit sekrece proteinu S.

cDNA proteinu S se pak vystřihne jako NcoI-NotI fragment a vloží se do insertního plasmidu pTKgpt-selp vakcinie

(Falkner a spol.: viz výše.). Získá se silný syntetický promotor vakcinie. Kazeta promotor-gen proteinu S se pak vystříhne jako BglII-NotI fragment a vloží se do plasmidu pN2-gpta (příklad 1). Získá se tak plasmid pN2-gptaProtS (sekvence identifikační číslo 67). Další vlastnosti této konstrukce jsou uvedeny v následující tabulce.

Plasmid pN2-gptaProt S (6811 párů nukleotidů) (sekvence identifikační číslo 67)

umístění:	popis:
1 až 2217	sekvence Bluescript II-SK (Stratagene)
2218 až 2225	místo NotI 1
2226 až 5938	sekvence ProtS v rc orientaci, otevřená čtecí fáze (oblast) začíná v poloze 4938 rc TAC start kodonu a končí v poloze 2910 rc ATT stop kodonu
4939 až 4992	syntetický časný pozdní promotor viru vakcinie v rc orientaci obklopený NcoI místem (poloha 4935) a napojené BglII/BamHI místo (poloha 4987 až 4992). NcoI místo nese Prot S rc start kodon TAC
4993 až 5493	sekvence P7.5 promotoru viru vakcinie
5494 až 6127	<u>E. coli</u> gpt sekvence. ORF začíná v poloze 5494 ATG start kodonem a končí v poloze 5950 TAA stop kodonem.
6128 až 6235	NotI místo 2
6236 až 6811	sekvence Bluescript II SK- (Stratagene)

V tomto plasmidu gpt-gen kontrolovaný P7.5 promotorem viru vakcinie a cDNA protein S jsou transkribovány rozdílně a jsou obklopeny místy NotI.

Inserce cDNA lidského proteinu S do jediného místa NotI viru vakcinie za vzniku vProtS: NotI-fragment, sestávající z kazet gpt genu a genu proteinu S, se liguje s raménky vektoru vakcinie a transfektuje se do savčích CV-1 buněk infikovaných FPV. Za těchto podmínek se multiplikoval pouze pakážovaný virus vakcinie. Podrobněji - DNA vakcinie přírodního typu kmene WR (1 mikrogram) se rozštěpí působením NotI.

Enzym se deaktivuje teplem při 65 °C po dobu třiceti minut. Vektor se liguje přes noc s jedním mikrogramem kazety genů gpt-Protein S o 3800 párech nukleotidů (vyštěpené jako NotI fragment z plasmidu pN2gpt-ProtS) ve 30 mikrolitrech pomocí 15 jednotek T4 DNA ligasy.

Surové virové kmeny připravené po pěti dnech inkubace se ztitrují v přítomnosti a v nepřítomnosti mykofenolové kyseliny (MPA). Tento postup rozlišuje chimerní virus od zpětně navázaného viru přírodního typu. S MPA bylo získáno $4 \cdot 10^4$ a bez MPA bylo získáno $6 \cdot 10^5$ plak tvořících jednotek na 10^6 hostitelských buněk. Asi 6 až 7 % virových plaků byly chimerní viry. Deset z gpt-positivních izolátů bylo dvakrát přečištěno přes plak, byly nechány vyrůst na malé surové kmeny a byly použity pro infikování buněk CV-1. Byla připravena celková DNA, rozštěpena restrikčními enzymy SacI a NotI s podrobená analýze Southernovým blotováním (obrázek 10.2). SacI štěp, hybridizovaný klonovaným SacI-I fragmentem (plasmid pTZ-SacI, příklad 4), umožnil stanovit orientaci vložené DNA, protože SacI štěpí inserty asymetricky. Ve všech deset izolátech byly inserty v "a"-orientaci (fragменты o 6300 a 4600 párech nukleotidů, viz obrázek 10.2A a C). To ukazuje, že taková konfigurace je silně výhodná. NotI-fragменты byly hybridizovány sondou proteinu S. V tomto případě byla uvolněna kazeta NotI genu o 3800 párech nukleotidů (obrázek 10.2B).

Expresce lidského proteinu S chimerním virem vakcínací: Byly nechány vyrůst surové kmeny z gpt-positivních chimerních virů a použity pro infikování různých savčích buněčných linií. Monovrstvy $5 \cdot 10^5$ buněk se infikují 0,1 pfu na buňku v přítomnosti medie bez sera (DMEM) doplněného o 50 µg/ml vitamínu K a inkubují se 72 hodiny. Odebere se supernatant. Antigen proteinu S se stanoví sestavou pro test ELISA od firmy Boehringer Mannheim, SRN (sestava číslo 1360264). Množství syntetizovaného proteinu S jsou uvedena v tabulce 1 v milijednotkách (jedna jednotka odpovídá 25 µg proteinu S).

Analýza se může provádět také tak, že se 10 μ l supernatantu buněk Vero analyzuje Westernovým blotováním se standardem 50 ng proteinu S odvozeného od lidské plasmy a s myším polyklonálním serem specifickým pro "hu Prot S" Axell) (obrázek 10.3). Bloty se obarví kezm proti-myším polyklonálním serem konjugovaným s alkalickou fosfataseou (Dakopatts) a NBT/BCIF jako substrátem.

Vyčištění rekombinantního proteinu S ze supernatantů buněčné kultury se provádí podle postupu popsaného Grinnellem a spol. (1990).

Tabulka 10.1

buněčná linie	ATCC č.	mjednotek huProtS na 10^6 buněk
SK Hep1	(HTB52)	750
Vero	(CCL 81)	127
Chang-jaterní	(CCL 13)	135
CV-1	(CCL 70)	450
WI 38	(CCL 75)	440

Příklad 11

Konstrukce nových chimerních virů vakcínie kodujících lidský faktor IX a exprese rekombinantního faktoru IX

Kazeta se dvěma geny, která obsahuje cDNA lidského krevního faktoru IX a gpt-gen, každý kontrolovaný promotorem vakcínie, se klonuje do jedinečného místa NotI genomu viru vakcínie WR a pakázuje se v savčích buňkách infikovaných pomocným virem drůbežích neštovic. Lidský faktor IX byl získán expresí v několika typech buněk.

Lidský srážecí faktor IX je glykoprotein o molekulové hmotě 56 000, který se účastní regulace srážení krve. Tento srážecí faktor podléhá složitým posttranslačním modifikacím: na vitamínu K závislé γ -karboxylaci prvních dvanácti glutamových zbytků, glykosylaci, 3-hydroxylaci kyseliny asparagové a opracování proteinu na aminovém konci (Davie E. W.:

"The Blood Coagulation Factors: Their cDNAs, Genes and Expression", Hemostasis and Thrombosis, Colman R. W., Hirsh J., Marder V. J. a Salzman E. W. (red.), J. B. Lippincott Co. (1987).]. Hemofilie B, porucha krvácivosti související s X chromosomem, je způsobena mutací faktoru IX. Pacienti s hemofilií jsou průběžně léčeni náhradou faktorem IX odvozeným od plasmy.

cDNA a genomová DNA faktoru IX ("FIX") byly klonovány a charakterizovány. FIX byl získáván expresí ve stálých buněčných liniích [Busby a spol.: Nature 316, 271 (1985), Kaufman a spol.: J. Biol. Chem. 261, 9622 (1986), Balland a spol.: Eur. J. Biochem. 172, 565 (1988) a Lin a spol.: J. Biol. Chem. 265, 144 (1990).]. Byla popsána také exprese faktoru IX v rekombinantech vakcinie Ide la Salle a spol.: Nature 316, 268 (1985).].

V následující části tohoto spisu budou popsány konstrukce plasmidů.

Plasmid pN2gpt-Fix: FIX cDNA (laskavě poskytnutá R. T. A. MacGillivrayem) se vyštěpí působením EcoRI z plasmidu pBluescript-FIX a liguje se s EcoRI linearizovaným plasmidem pTM3 [Moss a spol.: Nature 348, 91 (1990).]. Z rekombinantního plasmidu se izoluje jednovláknová DNA, která obsahuje FIX insert ve správné orientaci. NotI místo se zavede (místo CCATGG) do oblasti kódu FIX ATG start kodonu oligonukleotidem zprostředkovanou místně řízenou mutagenesí pomocí oligonukleotidu oFIX.1 (sekvence identifikační číslo 71: 5'-TCA TGT TCA CGS GGT CCA TGG CCG CGG CCG CAG C-3') a komerční sestavou pro mutagenesí (Amersham, Inc., sestava číslo PPN 1523.). Vektor a FIX NcoI místo se spojí, insert DNA se izoluje rozštěpením působením NcoI a NotI a liguje se s vektorem pTKgpt-self rozštěpeným působením NcoI/NotI (Falkner a spol.: viz výše.). Kazeta promotor/FIX se vyštěpí z plasmidu působením BglII a NotI a liguje se s vektorem pN2-gpt linearizovaným BamHI/NotI (příklad 1). Z této konstrukce se izoluje kazeta NotI obsahující FIX cDNA (pod kontrolou promotoru self) a gpt gen (pod kontrolou promotoru

P7.5 vakcínie) a použijí se pro in vitro molekulární klonování a pakážování jak je to popsáno v příkladu 10. Další vlastnosti tohoto plasmidu jsou uvedeny v následující tabulce.

Plasmid pN2gpta-FIX (5532 párů nukleotidů) (sekvence identifikační číslo 72)

umístění:	popis:
1 až 2217	Bluscript II SK-sekvence (Stratagene)
2218 až 2225	NotI místo 1
2226 až 3659	FIX sekvence v rc orientaci. Otevřená čtecí oblast začíná v poloze 3659 rc TAC start kodonem a končí v poloze 2276 rc ATT stop kodonem
3660 až 3713	syntetický časný pozdní promotor viru vakcínie v rc orientaci obklopený NcoI místem (poloha 3656) a napojené BglII/BamHI místo (poloha 3708 až 3713). NcoI místo nese FIX rc start kodon TAC
3714 až 4214	sekvence P7.5 promotoru viru vakcínie
4215 až 4848	<u>E. coli</u> gpt sekvence. ORF začíná v poloze 4215 ATG start kodonem a končí v poloze 4671 TAA stop kodonem
4849 až 4856	NotI místo 2
4857 až 5532	Bluescript II SK-sekvence (Stratagene)

Inserce cDNA lidského faktoru IX do jediného NotI místa viru vakcínie: Před insercí cDNA faktoru IX do viru vakcínie se tato cDNA vloží do plasmidu pN2-gpta. Získá se tak plasmid pN2gpta-FIX (obrázek 11.1A, sekvence identifikační číslo 72). Pro získání optimální souvislosti sekvencí syntetického promotoru vakcínie a oblasti kodující faktor IX se 5'-nepřekládaná oblast faktoru IX deletuje zavedením nového NcoI místa se start kodonem faktoru IX a napojením tohoto NcoI místa s NcoI místem poskytnutým promotorem. Tato mutace vede k mutovanému signálnímu peptidu (obrázek 11.1B). V přírodním faktoru IX je druhou aminokyselinou signálního peptidu glutaminový zbytek, zatímco v pN2gpta-FIX je druhou aminokyselinou zbytek kyseliny glutamové.

NotI fragment, který obsahuje kazety gpt-genu a genu faktoru IX, se liguje s vektorovými roňonky vakcinie a trans-fektuje se do savčích CV-1 buněk infikovaných PPV. Za těchto podmínek multiplikoval pouze pakážovaný virus vakcinie. Surové virové kmény, které byly připraveny po pětidenní inkubaci, se ztitrují v přítomnosti a v nepřítomnosti mykofenolové kyseliny (MPA). Tímto postupem se rozliší chimerní forms viru od zpětně ligovaného přírodního viru. Bylo získáno $5 \cdot 10^4$ plak tvořících jednotek na 10^6 hostitelských buněk v případě, že byla přítomna MPA a $5 \cdot 10^6$ plak tvořících jednotek na 10^6 hostitelských buněk v případě, že nebyla přítomna MPA. V tomto příkladu bylo asi 1 % z virových plaků chimerních virů. Deset gpt-positivních isolátů bylo dvakrát vyčištěno přes plak, byly vykultivovány malé surové kmény a ty byly použity pro infikování CV-1 buněk. Celková DNA byla připravena z osmi buněčných kultur infikovaných příslušnými virovými isoláty, rozštěpena restrikčními enzymy SfuI, NdeI, NotI a podrobena analýze Southernovým blotem.

SfuI štěp, hybridizovaný sondou faktoru IX, umožnil stanovení orientace vložené DNA, protože SfuI štěpí inserty asymetricky. Ve všech osmi isolátech byly inserty v "a"-orientaci (fragmety o 6300 párech nukleotidů a 4600 párech nukleotidů, viz obrázek 11.2). To znamená, že tato konfigurace je silně výhodná. NdeI (NotI) fragmety, byly hybridizovány také sondou faktoru IX. V tomto případě převažoval fragment o 656 000 párech nukleotidů (kazeta NotI genu o 3800 párech nukleotidů), což potvrzuje předpokládanou strukturu.

Expresse lidského faktoru IX: Z osmi isolátů jednotlivých plaků byly vykultivovány surové kmény, které se používají pro infikování různých savčích buněčných linií. $5 \cdot 10^6$ buněk v 10cm Petriho miskách se infikuje 0,1 pfu/buňku v přítomnosti media bez sera (DMEM) s 50 mikrogramy vitamínu K v 1 ml. Infikované buňky se inkubují 72 hodin, dokud se buňky nezačnou odtaňovat ode dna Petriho misek. Supernatanty se spojí, buněčné fragmenty se odstraní odstředováním a množství FIX se stanoví sestavou pro test ELISA od firmy

Boehringer Mannheim, SRN (soustava číslo 1360299). Množství antigenu FIX a aktivity faktoru IX jsou uvedeny v tabulce 11.1.

Deset mikrolitrů supernatantu z buněk Vero lze analyzovat také Westernovým blotem pomocí 50 ng hu FIX odvozeného od lidské plasmy jako standardu a myšního polyklonálního sera specifického pro hu FIX (Axell). Bloty byly obarveny konjugátem alkalické fosfatasy a kozím protimyším polyklonálním serem (Dakopatts) a NBT/BCIP jako substrátem. Jak ukazuje obrázek 11.3, rekombinantní materiál migroval jako široký pás podobný standardnímu faktoru IX odvozenému od plasmy. Srážecí testy částečně vyčištěného faktoru IX odvozeného od buněk Vero ukázaly, že asi 50 % materiálu je aktivní faktor IX. Virový izolát číslo 5, který je označen vFIX č. 5, byl kultivován ve velkém měřítku a byl použit pro další pokusy.

Jako v případě chimerních virů proteinu S (příklad 10), faktor IX, který expresí poskytuje chimery, měl inserty v jedné výhodné orientaci.

Protein genu, o který nám jde (faktor IX a protein S), byl transkribován zprava doleva, tj. ve stejném směru jako geny nahromaděné kolem místa NotI. Zdá se tedy, že silně transkribované jednotky musí být seřazeny ve výhodném směru transkripce, jestliže se klonuje do oblasti NotI. Viry s touto konfigurací, o které jde, jsou silně výhodné a vykazují nejlepší růstové vlastnosti. Směr transkripce kazety druhého genu, P7.5-gpt-genu, byl zleva doprava. Segment P7.5 promotoru je tedy v invertované opakovací konfiguraci vzhledem k vedlejšímu endogennímu genu, který koduje protein o molekulové hmotě 7500, tj. očekávaná stabilní konfigurace je výhodná. Jelikož nebyly nalezeny žádné chimery s opačnou orientací, "b"-orientace je pravděpodobně nestálá. Vložení shora uvedených kazet genu v "b"-orientaci in vivo rekombinací by selhalo. To vede k chybnému vysvětlení, že intergenové oblast NotI je podstatná pro virový růst. Tato situace ilustruje jeden z výhod přístupu přímého klonování: tvoří se pouze "dovolené" struktury.

Vložení kazet jediného malého genu se získají obě orientace a multimery (příklad 1), zatímco vložení kazet složitějšího genu (různě transkribované kazety dvou genů s homologizací vnitřních genů, jako je například segment P7.5 promotoru) se tvoří výhodné struktury.

Testování buněk na optimální expresi faktoru IX ukázalo, že infikování buněk CV-1 a SK Hep1 vede k nejvyšším hladinám antigenů. Materiál z buněk CV-1 měl největší sražecí účinnosti (tabulka 11.1), což ukazuje, že tato buněčná linie má účinné post-translační modifikační systémy. Faktor IX byl již dříve získáván v konvenční vakcíně expresí pomocí P7.5 promotoru a buněk HepG2 a BHK (de la Salle a spol., 1985). Buněčné linie s lepšími růstovými vlastnostmi, jako jsou například buňky Vero a CV-1, poskytovaly vyšší úroveň exprese u zde uvedených virů díky zlepšeným promotorům a způsobům. Navíc se zdá, že delece 5'-nepřekládané oblasti cDNA faktoru IX a modifikace signálního peptidu mají pozitivní vlivy na úroveň sekrece a exprese.

Tabulka 11.1

Expresce faktoru IX v různých buněčných liniích

buněčná linie	ATOC č.	antigen	aktivita (mj./10 ⁶ buněk)*	podíl (%)
SK Hep1	(HTB52)	810	183	22,5
Vero	(CCL81)	500	282	56,4
Chang J.	(CCL13)	190	100	52,6
CV-1	(CCL70)	850	1290	151,8
RK13	(CCL37)	300	460	153,3

* Jedna jednotka odpovídá 5 µg FIX ze ml lidské plazmy.

Příklad 12

Konstrukce chimerního viru drůbežích neštovic f-envIIIIB a exprese rekombinantních HIVIIIIB obalových proteinů ve fibroblastech kuřecího zárodku

Nedávno byla popsána příprava gp160 ve velkém měřítku v expresním systému viru vakcínie - buňky Vero (Barrett a spol.,

1989). Jelikož virus vakcinie je ještě pathogenní pro mnohé obratlovce včetně savců a virus drůbežích neštovic je omezen pokud jde o hostitele na ptačí hostitele, vyvinuli jsme expresní systém, který je založen na ptačích neštovicích (USA patentová přihláška 07/734 741 a její CIP). Byly zkonstruovány chimerní viry drůbežích neštovic přímým molekulárním klonováním. Tím lze expresí získat obelový gen HIV-1 IIIB izolátu (Ratner a spol., 1985.). V tomto rekombinantním viru je env gen kontrolován silným syntetickým pozdním promotorem. Při přípravě obelových glykoproteinů se chimerní virus drůbežích neštovic použije pro infikování agregátu buněčných kultur kuřecího zárodku (Mundt a spol.: PCT/WO 91 709 937.).

Konstrukce a struktura chimerního viru drůbežích neštovic f-envIIIB: Při konstrukci f-envIIIB (obrázek 12.1) se kazeta se dvěma geny, obsahující P7.5 promotor/gpt gen a S4-promotor/gpl60 gen, vystřihne jako NotI fragment z plasmidu pN2gpt-gpl60 (příklad 5). Tato kazeta se liguje s genomovou DNA viru drůbežích neštovic f-TK2a (příklad 2) rozštěpenou působením NotI. Chimerní virus se izoluje podle postupu, který je popsán na počátku příkladů provedení vynálezu. Výsledná celková DNA (z fibroblastů kuřecího zárodku infikovaných dvanácti různými plaky) se rozštěpí působením SspI a dále se analyzuje Southernovým blotováním a hybridizací izolovaným gpl60 fragmentem jako sondou (obrázek 12.2A). V jedenácti případech byly nalezeny předpověděné segmenty o 3700, 1000 a 800 párech nukleotidů. To ukazuje, že gpl60 gen byl integrován v "b" orientaci (obrázek 12.2B). Jeden virový izolát, f-LF2e, nehybridizoval gpl60 sondu.

Skutečnost, že existuje jedna výhodná orientace insertu, vede k možnosti, že virus s "b"-orientací je výhodnější pokud jde o růst ve srovnání s "a"-orientací; "a"-orientace může být dokonce nestabilní. To, že se virovému vektoru ponechá možnost vybrat nejlepší orientaci, může být považováno za výhodou přístupu přímého klonování.

Studie exprese s chimerním virem f-envIIIB: Studie

expresy byly prováděny ve fibroblastech kuřecího zárodku (CEF). Konfluentní monovrstvy CEF se infikují 0,1 plak tvořících jednotek na buňku různých virových surových kmenů a nechají se růst pět dnů. Na 10% polyakrylamidových gelech se oddělí celkové buněčné proteiny, přenesou se na nitrocelulosové membrány a dále se postupuje jako je to uvedeno na počátku části "Příklady provedení vynálezu". Westernův blot, který ukazuje na expresi gp160, gp120 a gp41, je uveden na obrázcích 12.3 a 12.4. Všechny virové izoláty, vyjma f-LF2e, indukovaly expresi env glykoproteinů. Virus f-LF2e byl negativní také v Southernově blotu a nenese tedy sekven-
ce genu gp160.

Konstrukce fenv-IIIB: Dva mikrogramy DNA vektoru f-TK2a hostitelského viru (příklad 2) se rozštěpí působením NotI a ligují se s 500 ng kazety genů obsahující P.7 promoter/gpt gen a S4-promotor/gp160 gen. Ligace se provádí v objemu 20 mikrolitrů s pěti jednotkami ligasy čtyři dny při teplotě 12 °C. Ligační směs se transfektuje do $6 \cdot 10^6$ CEF infikovaných 0,5 pfu HP2 na buňku izolátu drůbežích neštovic získaného čištěním HPL441 přes plak. Po inkubační době pět dnů byl připraven surový kmen (konečný objem jeden ml), který byl amplifikován. Surový kmen se titruje na CEF na deskách se šesti jamkami a nechá se růst pět dnů se gpt-selekcí (25 µg/ml mykofenolové kyseliny, 125 ng xanthinu). Buňky, u nichž minimální ředění vedlo k viditelnému cytopathickému efektu, byly izolovány a dvakrát amplifikovány podle stejného postupu. Surový kmen, který se získá z druhé amplifikace, se ztižuje^{na} CEF v přítomnosti gpt-selekcí. Vybere se dvanáct jednotlivých plaků (f-LF2a-1).

Westernovy bloty gp160: Westernovy bloty byly dělány v podstatě stejným způsobem, jako to popsal Towbin a spol. (shora uvedená citace). Při detekci gp160/gp120 byla první protilátka myší monoklonální^{anti-HIV-gp120} protilátka (Du Pont, Inc. č. NEA 9305) použita v ředění 1 : 500. Pro detekci gp41 byla použita lidská anti-HIV-gp41 3D6 Mab (poskytnutá H. Katin-gerem, Universität für Bodenkultur, Inst. für Angewandte Mikrobiologie) v ředění 1 : 500. Druhou protilátkou byl kozí

proti-myši IgG (H+L) kondenzovaný s alkalickým fosfátem (BioRad, Inc. č. 170-6520) použitý v ředění 1 : 1000. Reakční činidla (BCIP a NBT) a postupy barvení byly od firmy Promega, Inc.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

- (i) žadatel: Dorner F., Scheifflinger F., Falkner F. G.,
Pfleiderer M.
- (ii) Název vynálezu: Přímé molekulární klonování modifikovaného genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru
- (iii): počet sekvencí: 84
- (iv): Korespondenční adresa:
 - (A) adresát: Foley a Lardner
 - (B) ulice: 1800 Diagonal Road, Suite 500
 - (C) město: Alexandria
 - (D) stát: Va.
 - (E) země: USA
 - (F) poštovní směrovací číslo: 22313-0299
- (v) forma počítačového vyjádření:
 - (A) typ media: floppy disk
 - (B) počítač: IBM PC kompatibilní
 - (C) operační systém: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) software: PatentIn Release č. 1.0, verze č. 1.25
- (vi) údaje o přihlášce:
 - (A) číslo přihlášky: 07/750,080
 - (B) datum podání: 26. srpna 1991
 - (C) klasifikace: neznámá
- (viii) informace o zástupci/agentovi:
 - (A) jméno: Bent Stephen A.
 - (B) registrační číslo: 29 768
 - (C) odkaz (docket number) 30472/106 IMMU
- (ix) informace o telekomunikačním spojení:
 - (A) telefon: (703) 836-9300
 - (B) fax: (703) 683-4109
 - (C) telex: 899149

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 1:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 48 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druhá vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: pN2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 1:

TCAAGCTTAT CGATACCGTC GCGGCCGCGA CCTCGAGGGG GGGCCCGG 48

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 2:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 1133 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: pN2-gpta

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 2:

CTAGAACTAG TGGATCCCCC AACTTAAGGG TACCGCCTCG ACATCTATAT ACTATATAGT	60
AATACCAATA CTCAAGACTA CGAAACTGAT ACAATCTCTT ATCATGTGGG TAATGTTCTC	120
GATGTCGAAT AGCCATATGC CGGTAGTTGC GATATACATA AACTGATCAC TAATCCAAA	180
CCCACCCGCT TTTTATAGTA AGTTTTTCAC CCATAAATAA TAAATACAAT AATTAATTTT	240
TCGTAAAAGT AGAAAATATA TTCTAATTTA TTGCACGGTA AGGAAGTAGA ATCATAAAGA	300
ACAGTGACGG ATGATCCCCA AGCTTGGACA CAAGACAGGC TTGCGAGATA TGTTGAGAA	360
TACCACTTTA TCCCGCGTCA GGGAGAGGCA GTGCGTAAAA AGACGCGGAC TCATGTGAAA	420
TACTGGTTTT TAGTGCGCCA GATCTCTATA ATCTCGCGCA ACCTATTTTC CCCTCGAACA	480
CTTTTTAAGC CGTAGATAAA CAGGCTGGGA CACTTCACAT GAGCGAAAAA TACATCGTCA	540
CCTGGGACAT GTTGCAGATC CATGCACGTA AACTCGCAAG CCGACTGATG CCTTCTGAAC	600
AATGGAAAGG CATTATTGCC GTAAGCCGTG GCGGTCTGGT ACCGGGTGCG TTAATGGCGC	660
GTGAACTGGG TATTCGTCAT GTCGATACCG TTTGTATTTT CAGCTACGAT CACGACAACC	720

AGCGCGAGCT TAAAGTGCTG AAACGCGCAG AAGGCGATGG CGAAGGCTTC ATCGTTATTG	780
ATGACCTGGT GGATACCGGT GGTACTGCGG TTGCGATTCTG TGAAATGTAT CCAAAGCGC	840
ACTTTGTCAC CATCTTCGCA AAACCGGCTG GTCGTCCGCT GGTTGATGAC TATGTTGTTG	900
ATATCCCGCA AGATACCTGG ATTGAACAGC CGTGGGATAT GGGCGTCGTA TTCGTCCCGC	960
CAATCTCCGG TCGCTAATCT TTTCAACGCC TGGCACTGCC GGGCGTTGTT CTTTTTAACT	1020
TCAGGCGGGT TACAATAGTT TCCAGTAAGT ATTCTGGAGG CTGCATCCAT GACACAGGCA	1080
AACCTGAGCG AAACCCTGTT CAAACCCCGC TTTGGGCTGC AGGAATTCGA TAT	1133

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 3:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 1133 párů nukleotidů
- (B) typ : nukleová kyselina
- (C) typ vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: pN2-gptb

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 3:

CTAGAACTAG TGGATCCCCC AAAGCGGGGT TTGAACAGGG TTTCGCTCAG GTTTCCTGT	60
GTCATGGATG CAGCCTCCAG AATACTTACT GGAACTATT GTAACCCGCC TGAAGTTAAA	120
AAGAACAACG CCCGGCAGTG CCAGGCGTTG AAAAGATTAG CGACCGGAGA TTGGCGGGAC	180
GAATACGACG CCCATATCCC ACGGCTGTTC AATCCAGGTA TCTTGC GGGA TATCAACAAC	240
ATAGTCATCA ACCAGCGGAC GACCAGCCGG TTTTGC GAAG ATGGTGACAA AGTGCGCTTT	300
TGGATACATT TCACGAATCG CAACCGCAGT ACCACCGGTA TCCACCAGGT CATCAATAAC	360
GATGAAGCCT TCGCCATCGC CTTCTGCGCG TTTCAGCACT TTAAGCTCGC GCTGGTTGTC	420
GTGATCGTAG CTGGAAATAC AAACGGTATC GACATGACGA ATACCCAGTT CACGCGCCAG	480
TAACGCACCC GGTACCAGAC CGCCACGGCT TACGGCAATA ATGCCTTTCC ATTGTTTACA	540
AGGCATCAGT CGGCTTGCGA GTTTACGTGC ATGGATCTGC AACATGTCCC AGGTGACGAT	600
GTATTTTTTCG CTCATGTGAA GTGTCCCAGC CTGTTTATCT ACGGCTTAAA AAGTGTTTCA	660
GGGGAAAATA GGTTCGCGCA GATTATAGAG ATCTGGCGCA CTAAAAACCA GTATTTTACA	720
TGAGTCCGCG TCTTTTTTACG CACTGCCTCT CCCTGACGCG GGATAAAGTG GTATTCTCAA	780
ACATATCTCG CAAGCCTGTC TTGTGTCCAA GCTTGGGGAT CATCCGTCAC TGTTCTTTAT	840
GATTCTACTT CTTACCGTG CAATAAATTA GAATATATTT TCTACTTTTA CGAGAAATTA	900

ATTATTGTAT TTATTATTTA TGGGTGAAAA ACTTACTATA AAAAGCGGGT GGGTTTGGAA	960
TTAGTGATCA GTTTATGTAT ATCGCAACTA CCGGCATATG GCTATTTCGAC ATCGAGAACA	1020
TTACCCACAT GATAAGAGAT TGTATCAGTT TCGTAGTCTT GAGTATTGGT ATTACTATAT	1080
AGTATATAGA TGTCGAGGCG GTACCCCTTAA GTTGGGCTGC AGGAATTCGA TAT	1133

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 4:

(i) Vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 66 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: pHindJ-2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 4:

CGCATTCTTCT AACGTGATGG GATCCGTTAA CTCGCGAGAA TTCTGTAGAA	50
AGTGTTACAT CGACTC	66

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 5:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 127 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: pHindJ-3

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 5:

CGCATTCTTCT AACGTGATGG GATCCGGCCG GCTAGGCCGC GGCCGCCCGG	50
GTTTTTATCT CGAGACAAAA AGACGGACCG GGCCCGGCCA TATAGGCCCA	100
ATTCTGTAGA AAGTGTTACA TCGACTC	127

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 6:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 115 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) dopid: syntetický DNA oligonukleotid

- (vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pAO

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 6:
AGGGAACAAA AGCTGGAGCT AGGCCGGCTA GGCCGCGGCC GCGCGGGTTT 50
TTATCTCGAG AAAAAAGAC GGACCGGGCC CGGCCATATA GGCCAGTACC 100
CAATTCGCCC TATAG 115

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 7:

- (i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 103 páry nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární

- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

- (vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pA1

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 7:
CGGCGCGCCG GGTTTTATC TCGACATATG CTGCAGTTAA CGAATTCAT 50
GGGGATCCGA TATCAAGCTT AGGCCTGTCG ACGTCGAGAC AAAAAGACGG 100
ACC 103

(2) Informace o sekvenci číslo 8:

- (i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 103 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární

- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

- (vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pA2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 8:
CGGCGCGCCG GGTTTTATC TOGACGTCGA CAGGCCTAAG CTTGATATCG 50
GATCCOCATG GAATTCGTTA ACTGCAGCAT ATGTCGAGAC AAAAAGACGG 100
ACC 103

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 9:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 213 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pA1-S1

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 9:

CCCGGGTTTT TATCTCGACA TAGCGTTGG TATAGCGGAC AACTAAGTAA	50
TTGTAAAGAA GAAAACGAAA CTATCAAAAC CGTTTATGAA ATGATAGAAA	100
AAAGAAATATA AATAATCCTG TATTTTAGTT TAAGTAACAG TAAAAATAATG	150
AGTAGAAAAT ACTATTTTTT ATAGCCTATA AATCATGAAT TCGGATCCGA	200
TATCAAGCTT AGG	213

(2) informace o sekvenci číslo 10:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 215 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pA2-S1

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 10:

CAGGCCTAAG CTGATATCG GATCCGAATT CATGATTTAT AGGCTATAAA	50
AAATAGTATT TTCTACTCAT TATTTTACTG TTACTTAAAC TAAAAATACAG	100
GATTATTTAT ATTCTTTTTT CTATCATTTC ATAAACGCTT TTGAATGTTT	150
CGTTTTCTTC TTACAATTA CTTAGTTGTC CGCTATACCA AGCCGTATGT	200
CGAGACAAAA AGAAG	215

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 11:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 88 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pA1-S2
(xi): popis sekvence: sekvence identifikační číslo 11:
TCTCGACATA TGOTGCAGTT GGGAAGCTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTGGC 50
ATATAAATAG GGTGCAGGAA TTCATGGGG ATCCGATA 88

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 12:

(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 92 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pA2-S2
(xi): popis sekvence: sekvence identifikační číslo 12:
TTGATATCGG ATCCCCATGG AATTCCTGCA GCCTATTTAT ATGCCAAAAA 50
AAAAAAAAAAAA AAAAAGCTTC CCAACTGCAG CATATGTCGA GA 92

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 13:

(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 127 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pN2gpt-S3A (obrázek 4.7)
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 13:
TACCGTTAAG TTGGGCTGCA GAAGCTTTTT TTTTTTTTTT TTTTGGCAT 50
ATAAATGAAT TCCATGGCCC GGGAAGGCT CCGACGGGGC CCGGCCATAT 100
AGGCCAGOGA TACCGTCGCG GCGGOGA 127

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 14:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 134 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pN2gpt-S4

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 14:

TACCCCTTAAG TTGGGCTGCA GAAGCTTTTT TTTTTTTTTT TTTTGGGAT	50
ATAAATCGTT AACGAATTCC ATGGCCCGGG AAGGCCTGG ACCGGGCCCCG	100
GCCATATAGG CCAGCGATAC CGTCGCGGCC GCGA	134

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 15:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 1988 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pA1S1-PT

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 15:

TTTTATAGCC TATAAATCAT GAATTCGCG CACGTCCGAG GCTTGCAGCT GCCTGGCTGC	60
CTGGCCCTGG CTGCCCTGTG TAGCCTTGTG CACAGCCAGC ATGTGTTTCCT GGCTCCTCAG	120
CAAGCACGGT CGCTGCTCCA GCGGGTCCGG CGAGCCAACA CCTTCTTGGA GGAGGTGCGC	180
AAGGGCAACC TAGAGCGAGA GTGCGTGGAG GAGACGTGCA GCTACGAGGA GGCCTTCGAG	240
GCTCTGGAGT CCTCCACGGC TACGGATGTG TTCTGGGCCA AGTACACAGC TTGTGAGACA	300
GCGAGGACGC CTCGAGATAA GCTTGCTGCA TGTCTGGAAG GTAACGTGTC TGAGGGTCTG	360
GGTACGAACT ACCGAGGGCA TGTGAACATC ACCCGGTCAG GCATTGAGTG CCAGCTATGG	420
AGGAGTCGCT ACCCACATAA GCCTGAAATC AACTCCACTA CCCATCCTGG GGCCGACCTA	480
CAGGAGAATT TCTGCCGCAA CCCCACAGC AGCAACACGG GACCATGGTG CTACACTACA	540
GACCCACCG TGAGGAGGCA GGAATGCAGC ATCCCTGTCT GTGGCCAGGA TCAAGTCACT	600

GTAGCGATGA CTCCACGCTC CGAAGGCTCC AGTGTGAATC TGTCACCTCC ATTGGAGCAG	660
TGTGTCCCTG ATCGGGGGCA GCAGTACCAG GGGCGCCTGG CGGTGACCAC ACATGGGCTC	720
CCCTGCCTGG CCTGGGCCAG CGCACAGGCC AAGGCCCTGA GCAAGCACCA GGACTTCAAC	780
TCAGCTGTGC AGCTGGTGGA GAACTTCTGC CGCAACCCAG ACGGGGATGA GGAGGGCGTG	840
TGGTGCTATG TGGCCGGGAA GCCTGGCGAC TTTGGGTACT GCGACCTCAA CTATTGTGAG	900
GAGGCCGTGG AGGAGGAGAC AGGAGATGGG CTGGATGAGG ACTCAGACAG GGCCATCGAA	960
GGGCGTACCG CCACAAGTGA GTACCAGACT TTCTTCAATC CGAGGACCTT TGGCTCGGGA	1020
GAGGCAGACT GTGGGCTGCG ACCTCTGTTC GAGAAGAAGT CGCTGGAGGA CAAAACCGAA	1080
AGAGAGCTCC TGGAAATCCTA CATCGACGGG CGCATTGTGG AGGGCTCGGA TGCAGAGATC	1140
GGCATGTCAC CTTGGCAGGT GATGCTTTTC CGGAAGAGTC CCCAGGAGCT GCTGTGTGGG	1200
GCCAGCCTCA TCAGTGACCG CTGGGTCCTC ACCGCCGCCC ACTGCCTCCT GTACCCGCCC	1260
TGGGACAAGA ACTTCACCGA GAATGACCTT CTGGTGCGCA TTGGCAAGCA CTCCCGCACC	1320
AGGTACGAGC GAAACATTGA AAAGATATCC ATGTTGGAAA AGATCTACAT CCACCCAGG	1380
TACAACTGGC GGGAGAACCT GGACCGGGAC ATTGCCCTGA TGAAGCTGAA GAAGCCTGTT	1440
GCCTTCAGTG ACTACATTCA CCCTGTGTGT CTGCCCAGCA GGGAGACGGC AGCCAGCTTG	1500
CTCCAGGCTG GATACAAGGG GCGGGTGACA GGCTGGGGCA ACCTGAAGGA GACGTGGACA	1560
GCCAACGTTG GTAAGGGGCA GCCCAGTGTC CTGCAGGTGG TGAACCTGCC CATTGTGGAG	1620
CGGCCGGTCT GCAAGGACTC CACCCGGATC CGCATCACTG ACAACATGTT CTGTGCTGGT	1680
TACAAGCCTG ATGAAGGGAA ACGAGGGGAT GCCTGTGAAG GTGACAGTGG GGGACCCTTT	1740
GTCATGAAGA GCCCCTTTAA CAACCGCTGG TATCAAATGG GCATCGTCTC ATGGGGTGAA	1800
GGCTGTGACC GGGATGGGAA ATATGGCTTC TACACACATG TGTTCCGCCT GAAGAAGTGG	1860
ATACAGAAGG TCATTGATCA GTTTGGAGAG TAGGGGGCCA CTCATATTCT GGGCTCCTGG	1920
AACCAATCCC GTGAAAGAAT TATTTTGTG TTTCTAAAC TAGAATTCGG ATTCGATATC	1980
AAGCTTAG	1988

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 16:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 26 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: odN1

(xi): popis sekvence: sekvence identifikační číslo 16:

GGCCSGGCCT TTAAATTAA GATATC

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 17:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 111 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: pN2gpt-GPg

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 17:

```
TTTTTGGCAT ATAAATCGTT CCAGTCCCAA AATGTAATTG GACGGGAGAC AGAGTGACGC      60
ACGCGGCCGC TCTAGAACTA GTGGATCCCC CAACGAATTC CATGGCCCCG G              111
```

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 18:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 2296 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A): popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: pN2gpt-EPg

(xi): popis sekvence: sekvence identifikační číslo 18:

```
ATAAATCGTT AACGAATTCC ATGGAACATA AGGAAGTGGT TCTTCTACTT CTTTTATTTC      60
TGAAATCAGG TCAAGGAAAA GTGTATCTCT CAGAGTGCAA GACTGGGAAT GGAAAGAACT      120
ACAGAGGGAC GATGTCCAAA ACAAAAAATG GCATCACCTG TCAAAAATGG AGTTCCACTT      180
CTCCCCACAG ACCTAGATTG TCACCTGCTA CACACCCCTC AGAGGGGACTG GAGGAGAACT      240
ACTGCAGGAA TCCAGACAAC GATCCGCAGG GGCCCTGGTG CTATACTACT GATCCAGAAA      300
AGAGATATGA CTAAGTGCAC ATTCTTGAGT GTGAAGAGGA ATGTATGCAT TGCAGTGGAG      360
AAAACTATGA CGGCAAAATT TCCAAGACCA TGTCTGGACT GGAATGCCAG GCCTGGGACT      420
CTCAGAGCCC ACACGCTCAT GGATACATTC CTTCCAAATT TCCAAACAAG AACCTGAAGA      480
AGAATTACTG TCGTAACCCC GATAGGGAGC TCGGGCCTTG GTGTTTCACC ACCGACCCCA      540
ACAAAGCGTG GGAACCTTGC GACATCCCCC GCTGCACAAC ACCTCCACCA TCTTCTGGTC      600
```

CCACCTACCA GTGTCTGAAG GGAACAGGTG AAAACTATCG CGGGAATGTG GCTGTTACCG	660
TTTCCGGGCA CACCTGTCAG CACTGGAGTG CACAGACCCC TCACACACAT AACAGGACAC	720
CAGAAAACCTT CCCCTGCAAA AATTTGGATG AAAACTACTG CCGCAATCCT GACGGAAAAA	780
GGGCCCCATG GTGCCATACA ACCAACAGCC AAGTGCGGTG GGAGTACTGT AAGATACCGT	840
CCTGTGACTC CTCCCCAGTA TCCACGGAAC AATTGGCTCC CACAGCACCA CCTGAGCTAA	900
CCCCTGTGGT CCAGGACTGC TACCACGGTG ATGGACAGAG CTACCGAGGC ACATCCTCCA	960
CCACCACCAC AGGAAAGAAG TGTCAGTCTT GGTCACTCTAT GACACCACAC CGGCACCAGA	1020
AGACCCCAAG AAACTACCCA AATGCTGGCC TGACAATGAA CTACTGCAGG AATCCAGATG	1080
CCGATAAAGG CCCCTGGTGT TTTACCACAG ACCCCAGCGT CAGGTGGGAG TACTGCAACC	1140
TGAAAAAATG CTCAGGAACA GAAGCGAGTG TTGTAGCACC TCCGCCTGTT GTCCTGCTTC	1200
CAGATGTAGA GACTCCTTCC GAAGAAGACT GTATGTTTGG GAATGGGAAA GGATACCGAG	1260
GCAAGAGGGC GACCACTGTT ACTGGGACGC CATGCCAGGA CTGGGCTGCC CAGGAGCCCC	1320
ATAGACACAG CATTTTCACT CCAGAGACAA ATCCACGGGC GGGTCTGGAA AAAAATTACT	1380
GCCGTAACCC TGATGGTGAT GTAGGTGGTC CCTGGTGCTA CACGACAAAT CCAAGAAAAC	1440
TTTACGACTA CTGTGATGTC CCTCAGTGTG CGGCCCTTC ATTTGATTGT GGAAGCCTC	1500
AAGTGGAGCC GAAGAAATGT CCTGGAAGGG TTGTGGGGGG GTGTGTGGCC CACCCACATT	1560
CCTGGCCCTG GCAAGTCAGT CTTAGAACAA GGTTTGGAAT GCACCTCTGT GGAGGCACCT	1620
TGATATCCCC AGAGTGGGTG TTGACTGCTG CCCACTGCTT GGAGAAGTCC CCAAGGCCTT	1680
CATCCTACAA GGTATCCTG GGTGCACACC AAGAAGTGAA TCTCGAACCG CATGTTCAGG	1740
AAATAGAAGT GTCTAGGCTG TTCTTGAGC CCACACGAAA AGATATTGCC TTGCTAAAGC	1800
TAAGCAGTCC TGCCGTCATC ACTGACAAAG TAATCCAGC TTGTCTGCCA TCCCCAAATT	1860
ATGTGGTCGC TGACCGGACC GAATGTTTCA TCACTGGCTG GGGAGAAACC CAAGGTACTT	1920
TTGGAGCTGG CCTTCTCAAG GAAGCCCAGC TCCCTGTGAT TGAGAATAAA GTGTGCAATC	1980
GCTATGAGTT TCTGAATGGA AGAGTCCAAT CCACCGAAT CTGTGCTGGG CATTTGGCCG	2040
GAGGCACTGA CAGTTGCCAG GGTGACAGTG GAGGTCCTCT GGTTTGCTTC GAGAAGGACA	2100
AATACATTTT ACAAGGAGTC ACTTCTTGGG GTCTTGCTG TGCACGCCCC AATAAGCCTG	2160
GTGTCTATGT TCGTGTTC AAGTTTGTGA CTTGGATTGA GGGAGTGATG AGAAATAATT	2220
AATTGGACGG GAGACAGAGT GACGCACGCG GCCGCTCTAG AACTAGTGGA TCCCCGGGA	2280
AGGCCTCGGA CCGGGC	2296

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 19:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 56 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pN2gpt-gpl60
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 19:
TTTTTGGCAT ATAAATCGTT ATCCACCATG TAAGATAACG AATTCCATGG CCCGGG 56

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 20:

- (i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 331 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pvWF
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 20:

TTTTTTTTTGG CATATAAATC GCGGCCGCGG GTGGTTGGTG GATGTCACAG CTTGGGCTTT	60
ATCTCCCCCA GCAGTGGGAT TCCACAGCCC CTGGGCTACA TAACAGCAAG ACAGTCCGGA	120
GCTGTAGCAG ACCTGATTGA GCCTTTGCAG CAGCTGAGAG CATGGCCTAG GGTGGGCGGC	180
ACCATTGTCC AGCAGCTGAG TTTCCCAGGG ACCTTGGAGA TAGCCGCAGC CCTCATTTGC	240
AGGGGAAGAT GTGAGGCTGC TGCAGCTGCA TGGGTGCCTG CTGCTGCCTG CCTTGGCCTG	300
ATGGCGGCCG CCCGGGTTTT TATCTCGAGA C	331

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 21:

- (i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 50 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) typologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: pEcoK-dhr
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 21:

ATTAGCGTCT CGTTTCAGAC GCGGCCGCGG TAATTAGATT CTCCACATT 50

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 22:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 1209 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pdhr-gpt

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 22:

ATTAGCGTCT CGTTTCAGAC GCGGCCGCTC TAGAACTAGT GGATCCCCCA ACTTAAGGGT	60
ACCGCCTCGA CATCTATATA CTATATAGTA ATACCAATAC TCAAGACTAC GAAACTGATA	120
CAATCTCTTA TCATGTGGGT AATGTTCTCG ATGTGGAATA GCCATATGCC GGTAGTTGCG	180
ATATACATAA ACTGATCACT AATTCCAAAC CCACCCGCTT TTTATAGTAA GTTTTTCACC	240
CATAAATAAT AAATACAATA ATTAATTTCT CGTAAAAGTA GAAAATATAT TCTAATTTAT	300
TGCACGGTAA GGAAGTAGAA TCATAAAGAA CAGTGACGGA TGATCCCCAA GCTTGGACAC	360
AAGACAGGCT TGCGAGATAT GTTTGAGAAT ACCACTTTAT CCCGCGTCAG GGAGAGGCAG	420
TGCGTAAAAA GACGCGGACT CATGTGAAAT ACTGGTTTTT AGTGCGCCAG ATCTCTATAA	480
TCTCGCGCAA CCTATTTTCC CCTCGAACAC TTTTAAAGCC GTAGATAAAC AGGCTGGGAC	540
ACTTCACATG AGCGAAAAAT ACATCGTCAC CTGGGACATG TTGCAGATCC ATGCACGTAA	600
ACTCGCAAGC CGACTGATGC CTTCTGAACA ATGGAAAGGC ATTATTGCCG TAAGCCGTGG	660
CGGTCTGGTA CCGGGTGCGT TACTGGCGCG TGAAGTGGT ATTCTGTCATG TCGATACCGT	720
TTGTATTTCC AGCTACGATC ACGACAACCA GCGCGAGCTT AAAGTGCTGA AACGCGCAGA	780
AGGCGATGGC GAAGGCTTCA TCGTTATTGA TGACCTGGTG GATACCGGTG GTAATGCGGT	840
TGCGATTCTG GAAATGTATC CAAAAGCGCA CTTTGTCCACC ATCTTCGCAA AACCGGCTGG	900
TCGTCCGCTG GTTGATGACT ATGTTGTTGA TATCCCAGCA GATACCTGGA TTGAACAGCC	960
GTGGGATATG GCGGTCGTAT TCGTCCCGCC AATCTCCGGT CGCTAATCTT TTCAACGCCT	1020
GGCACTGCCG GCGGTTGTTC TTTTAACTT CAGGCGGGT ACAATAGTTT CCAGTAAGTA	1080
TTCTGGAGGC TGCATCCATG ACACAGGCAA ACCTGAGCGA AACCCTGTTC AAACCCCGCT	1140
TTGGGCTGCA GGAATTCGAT ATCAAGCTTA TCGATACCGT CGCGGCCGCG GTAATTAGAT	1200
TCTCCACA	1209

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 23:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 26 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: cdN2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 23:

GGCCGATATC TTAATTAAA AGGCCT

26

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 24:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 24 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: cdN3

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 24:

CGAATGTTAC GTGGGTACA TCAG

24

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 25:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 18 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: I-SceI linker 1

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 25:

TAGGGATAAC AGGGTAAT

18

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 26:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 18 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: I-SceI linker 2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 26:

ATTACCOTGT TATGCCTA

18

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 27:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 23 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: odS2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 27:

GTATAAAGTC CGACTATTGT TCT

23

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 28:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 26 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: odS3

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 28:

TCTGAGGCCT AATAGACCTC TGTACA

26

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 29:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 13 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: SfII (1)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 29:

GGCCGGCTAG GCC

13

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 30:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 13 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: SfII (2)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 30:

GGCCATATAG GCC

13

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 31:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 66 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: odTKI

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 31:

GAGTCGATGT AACACTTTCT ACAGGATCCG TTAACGCGG AGAATTCCAT
CACGTTAGAA AATGCG

50

66

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 32:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 79 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: jednovláknová

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: P-J(1)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 32:

GATCGGCGCG GCTAGGCGCG GCGCGCGCGG GTTTTATCT CGAGACAAAA	50
AGACGGACCG GCGCGCGCGG TATAGGCGCG	79

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 33:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 79 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: P-J(2)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 33:

AATTGGGCGT ATATGGCGCG GCGCGGTGCG TCTTTTCTC TCGAGATAAA	50
AACCGCGGCG GCGCGGCGT AGCGGCGCG	79

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 34:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 18 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: odTK2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 34:
AGAAGCCCGTG GGTCAATTG

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 35:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 21 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: odTK3

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 35:
TACCGTGTCG CTGTAACTTA C

21

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 36:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 75 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: P-A(0.1)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 36:
AGGCCGGGCTA GCGCGCGGCC GCCCGGGTTT TTATCTCGAG AAAAAAGAC
GGACCGGGCC CGGCATATA GGCCA

50

75

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 37:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 83 párů nukleotidů

(B) typ: jiná nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: P-A(0.2)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 37:

GTACTGGCCT ATATGGCCGG GCCCGGTCCG TCTTTTGTG TCGAGATAAA 50

AACCGGGGGG GCCCGGGCCT AGCCGGCCTA GCT 83

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 38:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 55 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: P-artP(11)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 38:

GGCCACGTTT TTATGGGAAG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGGCATATAA 50

ATCGC 55

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 39:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 55 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: P-artP(12)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 39:

GGCCGCGATT TATATGCCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAGC TTCCCATAAA 50

AACGT 55

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 40:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 93 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová
 (D) topologie: lineární
 (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
 (vii) bezprostřední zdroj:
 (B) klon: P-ertP(8)
 (xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 40:
 CGGTGGGCTA TATGGCCGGG CCCTGTCGGA GGCTTCGGG GGCCATGGAA 50
 TTCATTTATA TGCCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGCTTCT GCA 93

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 41:

(i) vlastnosti sekvence:
 (A) délka: 97 párů nukleotidů
 (B) typ: nukleová kyselina
 (C) druh vlákna: jednovláknová
 (D) topologie: lineární
 (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
 (vii) bezprostřední zdroj:
 (B) klon: P-ertP(10)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 41:
 CGGTGGGCTA TATGGCCGGG CGTCCGAGGG CTTCGCGGGG CATGGAATTC 50
 GPTAACGATT TATATGCCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAGG TTGTGCA 97

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 42:

(i) vlastnosti sekvence:
 (A) délka: 50 párů nukleotidů
 (B) typ: nukleová kyselina
 (C) druh vlákna: jednovláknová
 (D) topologie: lineární
 (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
 (vii) bezprostřední zdroj:
 (B) klon: oligonukleotid P-hr(3)

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 42:
 ATTAGGCTCT CGTTTGAGAC GCGGCGCGGG TAATTAGATT CTCCCACATT 50

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 43:

(i) vlastnosti sekvence:
 (A) délka: 10 párů nukleotidů

- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
- (xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 43:
GTAGCCCGGG 10

- (2) informace o sekvenci identifikační číslo 44:
 - (i) vlastnosti sekvence:
 - (A) délka: 47 párů nukleotidů
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) druh vlákna: jednovláknová
 - (D) topologie: lineární
 - (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
 - (vii) bezprostřední zdroj:
 - (B) klon: P-P2 5'(1)
 - (xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 44:
GTACGTAACGG CTGCAGTTGT TAGAGCTTGG TATAGCCGAC AACTAAG 47

- (2) informace o sekvenci identifikační číslo 45:
 - (i) vlastnosti sekvence:
 - (A) délka: 50 párů nukleotidů
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) druh vlákna: jednovláknová
 - (D) topologie: lineární
 - (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
 - (vii) bezprostřední zdroj:
 - (B) klon: P-P2 3'(1)
 - (xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 45:
TCTGACTGAC GTTAACGATT TATAGGCTAT AAAAAATAGT ATTATTOTACT 50

- (2) informace o sekvenci identifikační číslo 46:
 - (i) vlastnosti sekvence:
 - (A) délka: 20 párů nukleotidů
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: P-SM(2)
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 46:
GTCTTGAGTA TTGGTATTAC 20

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 47:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 23 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: P-SM(3)
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 47:
CGAAACTATC AAAACGCTTT ATG 23

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 48:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 53 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: P-MN (1)
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 48:
AGCTAGCTGA ATTCAGGCCT CATGSGAGTG AAGGGGATCA GGAGGAATTA TCA 53

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 49:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 30 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: P-MN (2)
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 49:
CATGTGATGC ACAAAATAGA GTGGTGGTTG 30

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 50:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 27 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: P-seq(2)
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 50:
GTGTGGGTAC ACAGGCTTCT GTGCCCC 27

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 51
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 25 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: P-seq(3)
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 51:
CAATTTTCT GTAGCACTAC AGATC 25

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 52:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 45 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: o-542
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 52:
CGATTACGTA GTTAACGGGG GCGCGGCGTA GCCGGCCATA AAAAT 45

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 53:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 47 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: o-544
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 53:
CTAGATTTTT ATGGCCGGGT AGGCCGGGG CCGGTTAACT ACGTAAT 47

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 54:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 50 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: o-541
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 54:
CTTTTTCGGC GCGCGCGGAT ATGCGGCGGT CCGGTTAACT ACGTAGACGT 50

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 55:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 53 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární

(11) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: o-543
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 55
GTACGTAGTT AACCGGACCG GGCCATATAG GCCGCGGCG CAGAAAAAGC ATG 53

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 56:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 51 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: o-selPI

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 56:

CGATAAAAAT TGAAATTTTA TTTTTTTTTT TTGCAATATA AATAAGGCOT C 51

(2) Informace o sekvenci identifikační číslo 57:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 53 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: o-selPII

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 57:

CATGGAGGCC TTATTTATAT TCCAAAAAAA AAAAATAAAA TTTCAATTTT TAT 53

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 58:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 14 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: o-830
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 58:
TCGACTTTTT ATCA 14

- (2) informace o sekvenci identifikační číslo 59:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 12 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: o-857
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 59:
TATGATAAAA AC 12

- (2) informace o sekvenci identifikační číslo 60:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 40 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: o-NcoI
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 60:
GAGCAGAAGA CAGTGGCCAT GGCCGTGAAG GGGATCAGGA 40

- (2) informace o sekvenci identifikační číslo 61:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 30 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: jednovláknová
(D) topologie: lineární

- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
- (vii) bezprostřední zdroj:
 - (B) klon: oNsiI

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 61:
 CATAAACTGA TTATATCCTC ATGCATCTGT

30

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 62:

- (i) vlastnosti sekvence:
 - (A) délka: 4145 párů nukleotidů
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) druh vlákn: jednovláknová
 - (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
- (vii) bezprostřední zdroj:
 - (B) klon: pS2gpt-S4
- (xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 62:

GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT	60
CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA	120
GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCTGT TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT	180
GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT	240
TGGGTGCACG AGTGGGTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT	300
TTCCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG	360
TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG CCGCATACAC TATTCTCAGA	420
ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA	480
GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC TTACTTCTGA	540
CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA	600
CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA	660
CCACGATGCC TGTAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACCT ATTAACCTGGC GAACTACTTA	720
CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC	780
TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC	840
GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG	900
TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA	960
TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTGAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT	1020

AGATTGATTT AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA	1080
ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG	1140
AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA	1200
CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT	1260
TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC	1320
CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA	1380
TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA	1440
GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTTCG TGCACACAGC	1500
GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA	1620
CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCTG	1680
GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC	1740
TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTTCTT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG	1800
CTCACATGTT CTTTCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG	1860
AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG	1920
AAGCGGAAGA GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT	1980
GCAGCTGGCA CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG	2040
TGAGTTAGCT CACTCATTAG GCACCCCAGG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATGT	2100
TGTGTGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTTT ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG	2160
CCAAGCGCGC AATTAACCCT CACTAAAGGG AACAAAAGCT GGAGCTCCAC CGCGGTGGCG	2220
GGCGCTCTAG CCCGGGCTAG AACTAGTGGA TCCCCCAAAG CGGGGTTTGA ACAGGGTTTC	2280
GCTCAGGTTT GCCTGTGTCA TGGATGCAGC CTCCAGAATA CTTACTGGAA ACTATTGTAA	2340
CCCGCCTGAA GTTAAAAAGA ACAACGCCCG GCAGTGCCAG GCGTTGAAAA GATTAGCGAC	2400
CGGAGATTGG CGGGACGAAT ACGACGCCCA TATCCCACGG CTGTTCAATC CAGGTATCTT	2460
GCGGGATATC AACACATAG TCATCAACCA GCGGACGACC AGCCGGTTTTT GCGAAGATGG	2520
TGACAAAGTG CGCTTTTGGA TACATTTTAC GAATCGCAAC CGCAGTACCA CCGGTATCCA	2580
CCAGGTCATC AATAACGATG AAGCCTTCGC CATCGCCTTC TGCGCGTTTC AGCACTTTAA	2640
GCTCGCGCTG GTTGTCTGTA TCGTAGCTGG AAATACAAAC GGTATCGACA TGACGAATAC	2700
CCAGTTACAG CGCCAGTAAC GCACCCGGTA CCAGACCGCC ACGGCTTACG GCAATAATGC	2760
CTTTCCATTG TTCAGAAGGC ATCAGTCGGC TTGCGAGTTT ACGTGCATGG ATCTGCAACA	2820
TGTCCCAGGT GACGATGTAT TTTTCGCTCA TGTGAAGTGT CCCAGCCTGT TTATCTACGG	2880
CTTAAAAAGT GTTCGAGGGG AAAATAGGTT GCGCGAGATT ATAGAGATCT GGCGCACTAA	2940
AAACCAGTAT TTCACATGAG TCCGCGTCTT TTTACGCACT GCCTCTCCCT GACGCGGGAT	3000
AAAGTGGTAT TCTCAAACAT ATCTCGCAAG CCTGTCTTGT GTCCAAGCTT GGGGATCATC	3060

CGTCACTGTT CTTTATGATT CTACTTCCTT ACCGTGCAAT AAATTAGAAT ATATTTTCTA	3120
CTTTTACGAG AAATTAATTA TTGTATTTAT TATTTATGGG TGAAAAACTT ACTATAAAAA	3180
GCGGGTGGGT TTGGAATTAG TGATCAGTTT ATGTATATCG CAACTACCGG CATATGGGCTA	3240
TTCGACATCG AGAACATTAC CCACATGATA AGAGATTGTA TCAGTTTCGT AGTCTTGAGT	3300
ATTGGTATTA CTATATAGTA TATAGATGTC GAGGCGGTAC CCTTAAGTTG GGCTGCAGAA	3360
GCTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGGCATATA AATCGTTAAC GAATTCCATG GCGCGGGAAG	3420
GCCTCGGACC GGGCCCGGCC ATATAGGCCA GCGATACCGT CGCGGCCGCG ACCTCGAGGG	3480
GGGGCCCGGT ACCCAATTCG CCCTATAGTG AGTCGTATTA CGCGCGCTCA CTGGCCGTCG	3540
TTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTGCAGCAC	3600
ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG CACCGATCGC CCTTCCCAAC	3660
AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGAAAT TGTAAGCGTT AATATTTTGT TAAAATTCGC	3720
GTTAAATTTT TGTTAAATCA GCTCATTTTT TAACCAATAG GCCGAAATCG GCAAAATCCC	3780
TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG GTTGAGTGTT GTTCCAGTTT GGAACAAGAG	3840
TCCACTATTA AAGAACGTGG ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA	3900
TGGCCCCACTA CGTGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTTG GGGTCGAGGT GCCGTAAAGC	3960
ACTAAATCGG AACCCTAAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGGA AGCCGGCGAA	4020
CGTGCGGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT	4080
AGCGGTCACG CTGCGCGTAA CCACCACACC CGCCGCGCTT AATGCGCCGC TACAGGGCGC	4140
GTCAG	4145

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 63:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 4277 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pS2gpt-P2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 63:

GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT	60
CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA	120
GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT	180

GCCTTCCTGT	TTTTGCTCAC	CCAGAAACGC	TGGTGAAAGT	AAAAGATGCT	GAAGATCAGT	240
TGGGTGCACG	AGTGGGTAC	ATCGAACTGG	ATCTCAACAG	CGGTAAGATC	CTTGAGAGTT	300
TTCGCCCCGA	AGAACGTTTT	CCAATGATGA	GCACTTTTAA	AGTTCTGCTA	TGTGGCGCGG	360
TATTATCCCG	TATTGACGCC	GGGCAAGAGC	AACTCGGTCTG	CCGCATACAC	TATTCTCAGA	420
ATGACTTGGT	TGAGTACTCA	CCAGTCACAG	AAAAGCATCT	TACGGATGGC	ATGACAGTAA	480
GAGAATTATG	CAGTGCTGCC	ATAACCATGA	GTGATAACAC	TGCGGCCAAC	TTACTTCTGA	540
CAACGATCGG	AGGACCGAAG	GAGCTAACCG	CTTTTTTGCA	CAACATGGGG	GATCATGTAA	600
CTCGCCTTGA	TCGTTGGGAA	CCGGAGCTGA	ATGAAGCCAT	ACCAAACGAC	GAGCGTGACA	660
CCACGATGCC	TGTAGCAATG	GCAACAACGT	TGCGCAAAC	ATTAAGTGGC	GAAGTACTTA	720
CTCTAGCTTC	CCGGCAACAA	TTAATAGACT	GGATGGAGGC	GGATAAAGTT	GCAGGACCAC	780
TTCTGCGCTC	GGCCCTTCCG	GCTGGCTGGT	TTATTGCTGA	TAAATCTGGA	GCCGGTGAGC	840
GTGGGTCTCG	CGGTATCATT	GCAGCACTGG	GGCCAGATGG	TAAGCCCTCC	CGTATCGTAG	900
TTATCTACAC	GACGGGGAGT	CAGGCAACTA	TGGATGAACG	AAATAGACAG	ATCGCTGAGA	960
TAGGTGCCTC	ACTGATTAAG	CATTGGTAAC	TGTCAGACCA	AGTTTACTCA	TATATACTTT	1020
AGATTGATTT	AAAACCTTCAT	TTTTAATTTA	AAAGGATCTA	GGTGAAGATC	CTTTTTGATA	1080
ATCTCATGAC	CAAAATCCCT	TAACGTGAGT	TTTCGTTCCA	CTGAGCGTCA	GACCCCGTAG	1140
AAAAGATCAA	AGGATCTTCT	TGAGATCCTT	TTTTTCTGCG	CGTAATCTGC	TGCTTGCAAA	1200
CAAAAAAACC	ACCGCTACCA	GCGGTGGTTT	GTTTGCCGGA	TCAAGAGCTA	CCAACTCTTT	1260
TTCCGAAGGT	AACTGGCTTC	AGCAGAGCGC	AGATACCAAA	TACTGTCCCT	CTAGTGTAGC	1320
CGTAGTTAGG	CCACCACTTC	AAGAACTCTG	TAGCACCGCC	TACATACCTC	GCTCTGCTAA	1380
TCCTGTTACC	AGTGGCTGCT	GCCAGTGGCG	ATAAGTCGTG	TCTTACCGGG	TTGGACTCAA	1440
GACGATAGTT	ACCGGATAAG	GCGCAGCGGT	CGGGCTGAAC	GGGGGGTTCG	TGCACACAGC	1500
CCAGCTTGGA	GCGAACGACC	TACACCGAAC	TGAGATACCT	ACAGCGTGAG	CTATGAGAAA	1560
GCGCCACGCT	TCCCGAAGGG	AGAAAGGCGG	ACAGGTATCC	GGTAAGCGGC	AGGGTCGGAA	1620
CAGGAGAGCG	CACGAGGGAG	CTTCCAGGGG	GAAACGCCTG	GTATCTTTAT	AGTCCTGTCTG	1680
GGTTTCGCCA	CCTCTGACTT	GAGCGTCGAT	TTTTGTGATG	CTCGTCAGGG	GGGCGGAGCC	1740
TATGGAAAAA	CGCCAGCAAC	GCGGCCTTTT	TACGGTTCCT	GGCCTTTTGC	TGGCCTTTTG	1800
CTCACATGTT	CTTTCCTGCG	TTATCCCCTG	ATTCTGTGGA	TAACCGTATT	ACCGCCTTTG	1860
AGTGAGCTGA	TACCGCTCGC	CGCAGCCGAA	CGACCGAGCG	CAGCGAGTCA	GTGAGCGAGG	1920
AAGCGGAAGA	GCGCCCAATA	CGCAAACCGC	CTCTCCCCGC	GCGTTGGCCG	ATTCATTAAAT	1980
GCAGCTGGCA	CGACAGGTTT	CCCGACTGGA	AAGCGGGCAG	TGAGCGCAAC	GCAATTAATG	2040
TGAGTTAGCT	CACTCATTAG	GCACCCAGG	CTTTACACTT	TATGCTTCCG	GCTCGTATGT	2100
TGTGTGGAAT	TGTGAGCGGA	TAACAATTTT	ACACAGGAAA	CAGCTATGAC	CATGATTACG	2160
CCAAGCGCGC	AATTAACCCT	CACTAAAGGG	AACAAAAGCT	GGAGCTCCAC	CGCGGTGGCG	2220

GCCGCTCTAG CCCGGGCTAG AACTAGTGGG TCCCCCAAAG CGGGGTTTGA ACAGGGTTTC	2280
GCTCAGGTTT GCCTGTGTCA TGGATGCAGC CTCCAGAATA CTTACTGGAA ACTATTGTAA	2340
CCCGCCTGAA GTTAAAAAGA ACAACGCCCC GCAGTGCCAG GCGTTGAAAA GATTAGCGAC	2400
CGGAGATTGG CGGGACGAAT ACGACGCCCC TATCCCACGG CTGTTCAATC CAGGTATCTT	2460
GCGGGATATC AACAAACATAG TCATCAACCA GCGGACGACC AGCCGGTTTT GCGAAGATGG	2520
TGACAAAGTG CGCTTTTGGG TACATTTTAC GAATCGCAAC CGCAGTACCA CCGGTATCCA	2580
CCAGGTCATC AATAACGATG AAGCCTTCGC CATCGCCTTC TGC GCGTTTT AGCACTTTAA	2640
GCTCGCGCTG GTTGTCTGTA TCGTAGCTGG AAATACAAAC GGTATCGACA TGACGAATAC	2700
CCAGTTCACG CGCCAGTAAC GCACCCGGTA CCAGACCGCC ACGGCTTACG GCAATAATGC	2760
CTTTCCATTG TTCAGAAGGC ATCAGTCGGC TTGCGAGTTT ACGTGCATGG ATCTGCAACA	2820
TGTCCCAGGT GACGATGTAT TTTTCGCTCA TGTGAAGTGT CCCAGCCTGT TTATCTACGG	2880
CTTAAAAAGT GTTCGAGGGG AAAATAGGTT GCGCGAGATT ATAGAGATCT GGCGCACTAA	2940
AAACCAGTAT TTCACATGAG TCCGCGTCTT TTTACGCACT GCCTCTCCCT GACGCGGGAT	3000
AAAGTGGTAT TCTCAAACAT ATCTCGCAAG CCTGTCTTGT GTCCAAGCTT GGGGATCATC	3060
CGTCACTGTT CTTTATGATT CTACTTCCTT ACCGTGCAAT AAATTAGAAT ATATTTTCTA	3120
CTTTTACGAG AAATTAATTA TTGTATTTAT TATTTATGGG TGAAAACTT ACTATAAAAA	3180
GCGGGTGGGT TTGGAATTAG TGATCAGTTT ATGTATATCG CAACTACCGG CATATGGCTA	3240
TTTGACATCG AGAACATTAC CCACATGATA AGAGATTGTA TCAGTTTCGT AGTCTTGAGT	3300
ATTGGTATTA CTATATAGTA TATAGATGTC GAGGCGGTAC CCTTAAGTTG GGCTGCAGTT	3360
GTTAGAGCTT GGTATAGCGG ACAACTAAGT AATTGTAAAG AAGAAAAACGA AACTATCAAA	3420
ACCGTTTATG AAATGATAGA AAAAGAATA TAAATAATCC TGTATTTTAG TTTAAGTAAC	3480
AGTAAAAATA TGAGTAGAAA ATACTATTTT TTATAGCCTA TAAATCGTTA ACGAATTCCA	3540
TGGCCCGGGA AGGCCTCGGA CCGGGCCCGG CCATATAGGC CAGCGATACC GTCGCGGCCG	3600
CGACCTCGAG GGGGGGCCCC GTACCCAATT CGCCCTATAG TGAGTCGTAT TACGCGCGCT	3660
CACTGGCCGT CGTTTTACAA CGTCGTGACT GGGAAAACCC TGGCGTTACC CAACTTAATC	3720
GCCTTGCAGC ACATCCCCCT TTCGCCAGCT GGCCTAATAG CGAAGAGGCC CGCACCAGTC	3780
GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGGAA ATTGTAAGCG TTAATATTTT	3840
GTAAAAATTC GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT TTTAACCAAT AGGCCGAAAT	3900
CGGCAAAATC CCTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT	3960
TTGGAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGAATCCAAC GTCAAAGGGC GAAAAACCGT	4020
CTATCAGGGC GATGGCCAC TACGTGAACC ATCACCCTAA TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG	4080
GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC CGATTTAGAG CTTGACGGGG	4140
AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC	4200
GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC TTAATGCGCC	4260
GCTACAGGGC GCGTCAG	4277

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 64:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 4701 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pTZ-L2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 64:

AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTTTT	60
TCTGCGGCCG CGGCCTATAT GGCCCGGTCC GGTAACTAC GTAGACGTCG AGGATTTTCGC	120
GTGGGTCAAT GCCGCGCCAG ATCCACATCA GACGGTTAAT CATGCGATAC CAGTGAGGGA	180
TGGTTTTACC ATCAAGGGCC GACTGCACAG GCGGTTGTGC GCCGTGATTA AAGCGGCGGA	240
CTAGCGTCGA GGTTTCAGGA TGTTTAAAGC GGGGTTTGAA CAGGGTTTCG CTCAGGTTTG	300
CCTGTGTCAT GGATGCAGCC TCCAGAATAC TTACTGGAAA CTATTGTAAC CCGCCTGAAG	360
TTAAAAAGAA CAACGCCCCG CAGTGCCAGG CGTTGAAAAG ATTAGCGACC GGAGATTGGC	420
GGGACGAATA CGACGCCCAT ATCCCACGGC TGTTCAATCC AGGTATCTTG CGGGATATCA	480
ACAACATAGT CATCAACCAG CGGACGACCA GCCGGTTTTG CGAAGATGGT GACAAAGTGC	540
GCTTTTGGAT ACATTTACAG AATCGCAACC GCAGTACCAC CGGTATCCAC CAGGTCATCA	600
ATAACGATGA AGCCTTCGCC ATCGCCTTCT GCGCGTTTCA GCACTTTAAG CTCGCGCTGG	660
TTGTCGTGAT CGTAGCTGGA AATACAAACG GTATCGACAT GACGAATACC CAGTTCACGC	720
GCCAGTAACG CACCCGGTAC CAGACCGCCA CGGCTTACGG CAATAATGCC TTTCCATTGT	780
TCAGAAGGCA TCAGTCGGCT TCGGAGTTTA CGTGCAATGA TCTGCAACAT GTCCCAGGTG	840
ACGATGTATT TTTCGCTCAT GTGAAGTGTC CCAGCCTGTT TATCTACGGC TTAAAAAGTG	900
TTGAGGGGA AAATAGGTTG CGCGAGATTA TAGAGATCTG GCGCACTAAA AACCAGTATT	960
TCACATGAGT CCGCGTCTTT TTACGCACTG CCTCTCCCTG ACGCGGGATA AAGTGGTATT	1020
CTCAAACATA TCTCGCAAGC CTGTCTTGTC TCCAAGCTTG GGGATCATCC GTCACTGTTC	1080
TTTATGATTC TACTTCCTTA CCGTGCAATA AATTAGAATA TATTTTCTAC TTTTACGAGA	1140
AATTAATTAT TGTATTTATT ATTTATGGGT GAAAAACTTA CTATAAAAAG CGGGTGGGTT	1200
TGGAATTAGT GATCAGTTTA TGTATATCGC AACTACCGGC ATATGGCTAT TCGACATCGA	1260
GAACATTACC CACATGATAA GAGATTGTAT CAGTTTCGTA GTCTTGAGTA TTGGTATTAC	1320
TATATAGTAT ATNNNNNNGG TAACNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1380
NNNNNNNAGA TCTCGATCCG GATATAGTTC CTCCTTTTCAG CAAAAAACC CTCAAGACCC	1440

GTTTAGAGGC CCCAAGGGGT TATGCTAGTT ATTGCTCANN NNNNNNNNGT CGACTTAATT	1500
AATTAGGCCT CTCGAGCTGC AGGGATCCAC TAGTGAGCTC CCCGGGGAAT TCCCATGGTA	1560
TTATCGTGTT TTTCAAAGGA AAAAAACGTC CCGTGGTTCG GGGGGCTCTN NNNNNNNNNN	1620
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1680
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1740
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1800
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1860
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1920
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1980
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	2040
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	2100
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NCCGCTAGAG GGAAACCGTT GTGGTCTCCC	2160
TATAGTGAGT CGTATTAATT TCGCGGGATC GATCGATTAC GTAGTTAACG CGGCCGCGGC	2220
CTAGCCGGCC ATAAAAATCT AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT	2280
CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGGAAATTGT AAACGTTAAT ATTTTGTAA	2340
AATTGCGGTT AAATTTTGT TAAATCAGCT CATTTTAA CCAATAGGCC GAAATCGGCA	2400
AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGGTT GAGTGTGTT CCAGTTTGGA	2460
ACAAGAGTCC ACTATTAAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCTATC	2520
AGGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC CCTAATCAAG TTTTTTGGGG TCGAGGTGCC	2580
GTAAAGCACT AAATCGGAAC CCTAAAGGGA GCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAAGC	2640
CGGCGAACGT GGCGAGAAAG GAAGGAAGA AAGCGAAAGG AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG	2700
CAAGTGTAGC GGTACGCTG CGCGTAACCA CCACACCCGC CGCGCTTAAT GCGCCGCTAC	2760
AGGGCGCGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT	2820
TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT	2880
AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATCCCTTTT	2940
TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG	3000
CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA	3060
TCCTTGAGAG TTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC	3120
TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTGTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC	3180
ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG	3240
GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA	3300
ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG	3360
GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCAGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG	3420
ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGCAGCAA TGGCAACAAC GTTGCAGCAA CTATTAAC TG	3480

GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG	3540
TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG	3600
GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT	3660
CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC	3720
AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT	3780
CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTTAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA	3840
TCCTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTC CACTGAGCGT	3900
CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT	3960
GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC	4020
TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC	4080
TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC	4140
TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG	4200
GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT	4260
CGTGACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG	4320
AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG	4380
GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT	4440
ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTTGTGA TGCTCGTCAG	4500
GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCCT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT	4560
GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA	4620
TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT	4680
CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA G	4701

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 65:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 3878 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pselP-gpt-L2

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 65:

AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTTTT	60
TCTGCGGCCG CGGCCTATAT GGCCCGGTCC GGTAACTAC GTAGACGTCG AGGATTTTCG	120

GTGGGTCAAT GCCGCGCCAG ATCCACATCA GACGGTTAAT CATGCGATAC CAGTGAGGGA	180
TGGTTTTTACC ATCAAGGGCC GACTGCACAG GCGGTTGTGC GCCGTGATTA AAGCGGCGGA	240
CTAGCGTCGA GGTTCAGGA TGTTTAAAGC GGGGTTTGAA CAGGGTTTCG CTCAGGTTTG	300
CCTGTGTCAT GGATGCAGCC TCCAGAATAC TTACTGGAAA CTATTGTAAC CCGCCTGAAG	360
TTAAAAAGAA CAACGCCCCG CAGTGCCAGG CGTTGAAAAG ATTAGCGACC GGAGATTGGC	420
GGGACGAATA CGACGCCCAT ATCCACCGG TGTTC AATCC AGGTATCTTG CGGGATATCA	480
ACAACATAGT CATCAACCAG CGGACGACCA GCCGGTTTTG CGAAGATGGT GACAAAGTGC	540
GCTTTTGGAT ACATTTACG AATCGCAACC GCAGTACCAC CCGTATCCAC CAGGTCATCA	600
ATAACGATGA AGCCTTCGCC ATCGCCTTCT GCGCGTTTCA GCACTTTAAG CTCGCGCTGG	660
TTGTCGTGAT CGTAGCTGGA AATACAAACG GTATCGACAT GACGAATACC CAGTTCACGC	720
GCCAGTAACG CACCCGGTAC CAGACGCCA CGGCTTACGG CAATAATGCC TTTCCATTGT	780
TCAGAAGGCA TCAGTCGGCT TCGGAGTTTA CGTGCATGGA TCTGCAACAT GTCCCAGGTG	840
ACGATGTATT TTTGCTCAT GTGAAGTGTC CCAGCCTGTT TATCTACGGC TTAAAAAGTG	900
TTGAGGGGA AAATAGGTTG CGCGAGATTA TAGAGATCTG GCGCACTAAA AACCAGTATT	960
TCACATGAGT CCGCGTCTTT TTACGCACTG CCTCTCCCTG ACGCGGGATA AAGTGGTATT	1020
CTCAAACATA TCTCGCAAGC CTGTCTTG TG TCAAGCTTG GGGATCATCC GTCCTGTTC	1080
TTTATGATTC TACTTCCTTA CCGTGCAATA AATTAGAATA TATTTTCTAC TTTTACGAGA	1140
AATTAATTAT TGTATTTATT ATTTATGGGT GAAAACTTA CTATAAAAAG CGGGTGGGTT	1200
TGGAATTAGT GATCAGTTTA TGTATATCGC AACTACCGGC ATATGATAAA AAGTCGACTT	1260
AATTAATTAG GCCTCTCGAG CTGCAGGGAT CCACTAGTGA GCTCCCCGGG GAATTCCCAT	1320
GGAGGCCTTA TTTATATTCC AAAAAAAAAA AATAAAATTT CAATTTTTAT CGATTACGTA	1380
GTTAACGCGG CCGCGGCTTA GCCGGCCATA AAAATCTAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC	1440
CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GGCGAATGGG AAATTGTAAA	1500
CGTTAATATT TTGTTAAAAT TCGCGTTAAA TTTTGTGTTAA ATCAGCTCAT TTTTAAACCA	1560
ATAGGCCGAA ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG	1620
TGTTGTTCCA GTTTGGAACA AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG	1680
GCGAAAAACC GTCTATCAGG GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCCCT AATCAAGTTT	1740
TTTGGGGTCG AGGTGCCGTA AAGCACTAAA TCGGAACCCT AAAGGGAGCC CCCGATTAG	1800
AGCTTGACGG GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAGAAAG CGAAAGGAGC	1860
GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC	1920
GCTTAATGCG CCGCTACAGG GCGCGTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGCGCGGAAC	1980
CCCTATTTGT TTATTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC	2040
CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC ATTTCCGTGT	2100
CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTGCTCACC CAGAAACGCT	2160

GGTGAAAGTA	AAAGATGCTG	AAGATCAGTT	GGGTGCACGA	GTGGGTTACA	TCGAACTGGA	2220
TCTCAACAGC	GGTAAGATCC	TTGAGAGTTT	TCGCCCCGAA	GAACGTTTTT	CAATGATGAG	2280
CACTTTTAAA	GTTCTGCTAT	GTGGCGCGGT	ATTATCCCGT	GTTGACGCCG	GGCAAGAGCA	2340
ACTCGGTGCG	CGCATACACT	ATTCTCAGAA	TGACTTGGTT	GAGTACTCAC	CAGTCACAGA	2400
AAAGCATCTT	ACGGATGGCA	TGACAGTAAG	AGAATTATGC	AGTGCTGCCA	TAACCATGAG	2460
TGATAACACT	GCGGCCAACT	TACTTCTGAC	AACGATCGGA	GGACCGAAGG	AGCTAACCGC	2520
TTTTTTGAC	AACATGGGGG	ATCATGTAAC	TCGCCTTGAT	CGTTGGGAAC	CGGAGCTGAA	2580
TGAAGCCATA	CCAAACGACG	AGCGTGACAC	CACGATGCCT	GCAGCAATGG	CAACAACGTT	2640
GCGCAAATA	TTAACTGGCG	AACTACTTAC	TCTAGCTTCC	CGGCAACAAT	TAATAGACTG	2700
GATGGAGGCG	GATAAAGTTG	CAGGACCACT	TCTGCGCTCG	GCCCTTCCGG	CTGGCTGGTT	2760
TATTGCTGAT	AAATCTGGAG	CCGGTGAGCG	TGGGTCTCGC	GGTATCATTG	CAGCACTGGG	2820
GCCAGATGGT	AAGCCCTCCC	GTATCGTAGT	TATCTACACG	ACGGGGAGTC	AGGCAACTAT	2880
GGATGAACGA	AATAGACAGA	TCGCTGAGAT	AGGTGCCTCA	CTGATTAAGC	ATTGGTAACT	2940
GTCAGACCAA	GTTTACTCAT	ATATACTTTA	GATTGATTTA	AAACTTCATT	TTTAATTTAA	3000
AAGGATCTAG	GTGAAGATCC	TTTTTGATAA	TCTCATGACC	AAAATCCCTT	AACGTGAGTT	3060
TTCGTTCCAC	TGAGCGTCAG	ACCCCGTAGA	AAAGATCAAA	GGATCTTCTT	GAGATCCTTT	3120
TTTTCTGCGC	GTAATCTGCT	GCTTGCAAAC	AAAAAAACCA	CCGCTACCAG	CGGTGGTTTTG	3180
TTTGCCGGAT	CAAGAGCTAC	CAACTCTTTT	TCCGAAGGTA	ACTGGCTTCA	GCAGAGCGCA	3240
GATACCAAAT	ACTGTCCTTC	TAGTGTAGCC	GTAGTTAGGC	CACCACTTCA	AGAACTCTGT	3300
AGCACCGCCT	ACATACCTCG	CTCTGCTAAT	CCTGTTACCA	GTGGCTGCTG	CCAGTGCGCA	3360
TAAGTCGTGT	CTTACCGGGT	TGGACTCAAG	ACGATAGTTA	CCGGATAAGG	CGCAGCGGTC	3420
GGGCTGAACG	GGGGGTTCGT	GCACACAGCC	CAGCTTGGAG	CGAACGACCT	ACACCGAACT	3480
GAGATACCTA	CAGCGTGAGC	ATTGAGAAAAG	CGCCACGCTT	CCCGAAGGGA	GAAAGGCGGA	3540
CAGGTATCCG	GTAAGCGGCA	GGGTCGGAAC	AGGAGAGCGC	ACGAGGGAGC	TTCCAGGGGG	3600
AAACGCCTGG	TATCTTTATA	GTCCTGTCCG	GTTTCGCCAC	CTCTGACTTG	AGCGTCGATT	3660
TTTGTGATGC	TCGTCAGGGG	GGCGGAGCCT	ATGGAAAAAC	GCCAGCAACG	CGGCCTTTTTT	3720
ACGGTTCCTG	GCCTTTTGCT	GGCCTTTTGC	TCACATGTTT	TTTCCTGCGT	TATCCCCTGA	3780
TTCTGTGGAT	AACCGTATTA	CCGCCTTTGA	GTGAGCTGAT	ACCGCTCGCC	GCAGCCGAAC	3840
GACCGAGCGC	AGCGAGTCAG	TGAGCGAGGA	AGCGGAAG			3878

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 66:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 6476 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pselP-gpl60MN

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 66:

AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTTTT	60
TCTGCGGCCG CGGCCTATAT GGCCCGGTCC GGTAACTAC GTAGACGTCG AGGATTTTCGC	120
GTGGGTCAAT GCCGCGCCAG ATCCACATCA GACGGTTAAT CATGCGATAC CAGTGAGGGA	180
TGGTTTTACC ATCAAGGGCC GACTGCACAG GCGGTTGTGC GCCGTGATTA AAGCGGCGGA	240
CTAGCGTCGA GGTTCAGGA TGTTTAAAGC GGGGTTTGAA CAGGGTTTCG CTCAGGTTTG	300
CCTGTGTCAT GGATGCAGCC TCCAGAATAC TTA CTGTTGTAAC CCGCCTGAAG	360
TTAAAAAGAA CAACGCCCGG CAGTGCCAGG CGTTGAAAAG ATTAGCGACC GGAGATTGGC	420
GGGACGAATA CGACGCCCAT ATCCCACGGC TGTTCAATCC AGGTATCTTG CGGGATATCA	480
ACAACATAGT CATCAACCAG CGGACGACCA GCCGGTTTTG CGAAGATGGT GACAAAGTGC	540
GCTTTTGGAT ACATTTTCAG AATCGCAACC GCAGTACCAC CGGTATCCAC CAGGTCATCA	600
ATAACGATGA AGCCTTCGCC ATCGCCTTCT GCGCGTTTCA GCACTTTAAG CTCGCGCTGG	660
TTGTGCTGAT CGTAGCTGGA AATACAAACG GTATCGACAT GACGAATACC CAGTTCACGC	720
GCCAGTAACG CACCCGGTAC CAGACCGCCA CGGCTTACGG CAATAATGCC TTTCCATTGT	780
TCAGAAGGCA TCAGTCGGCT TGCGAGTTTA CGTGCAATGA TCTGCAACAT GTCCCAGGTG	840
ACGATGTATT TTTGCTCAT GTGAAGTGTC CCAGCCTGTT TATCTACGGC TTA AAAAGTG	900
TTTCGAGGGA AAATAGGTTG CGCGAGATTA TAGAGATCTG GCGCACTAAA AACCAGTATT	960
TCACATGAGT CCGCGTCTTT TTACGCACTG CCTCTCCCTG ACGCGGGATA AAGTGGTATT	1020
CTCAAACATA TCTCGCAAGC CTGTCTTGTC TCCAAGCTTG GGGATCATCC GTCAGTGTTC	1080
TTTATGATTC TACTTCCTTA CCGTGCAATA AATTAGAATA TATTTTCTAC TTTTACGAGA	1140
AATTAATTAT TGTATTTATT ATTTATGGGT GAAAACTTA CTATAAAAAG CGGGTGGGT	1200
TGGAATTAGT GATCAGTTTA TGTATATCGC AACTACCGGC ATATGATAAA AAGTCGACTT	1260
AATTAATTAG GCTGGTTCAG CTCGTCTCAT TCTTTCCCTT ACAGTAGGCC ATCCAGTCAC	1320

ACGTTTTGAC	CATTTGCCAC	CCATCTTATA	GCAAAGCCCT	TTCCAAGCCC	TGTCTTATTC	1380
TTGTAGGTAT	GTGGAGAATA	GCTCTACCAG	CTCTTTGCAG	TACTTCTATA	ACCCTATCTG	1440
TCCCTCAGC	TACTGCTATA	GCTGTGGCAT	TAAGCAAGCT	AACAGCACTA	CTCTTTAGTT	1500
CCTGACTCCA	ATACTGTAGG	AGATTCCACC	AATATTTGAG	GACTTCCCAC	CCCCTGCGTC	1560
CCAGAAGTTC	CACAATCCTC	GCTGCAATCA	AGAGTAAGTC	TCTGTGGTGG	TAGCTGAAGA	1620
GGAACAGGCT	CCGCAGGTCG	ACCCAGATAA	TTGCTAAGAA	TCCATGCACT	AATCGACCGG	1680
ATGTGTCTCT	GTCTCTCTCT	CCACCTTCTT	CTTCGATTCC	TTCGGGCCTG	TCGGGTCCCC	1740
TCGGAAGTGG	GGGGCGGGTC	TGCAACGACA	ATGGTGAGTA	TCCCTGCCTA	ACTCTATTCA	1800
CTATAGAAAG	TACAGCAAAA	ACTATTCTTA	AACCTACCAA	GCCTCCTACT	ATCATTATGA	1860
ATATTTTTAT	ATACCACAGC	CAATTTGTTA	TGTCAAACCA	ATTCCACAAA	CTTGCCCATT	1920
TATCCAATTC	CAATAATTCT	TGTTCAATTCT	TTTCTTGTTG	GGTTTGCGAT	TTTTCTAGTA	1980
ATGAGTATAT	TAAGCTTG TG	TAATTGTCAA	TTTCTCTTTC	CCACTGCATC	CAGGTCATGT	2040
TATTCCAAAT	ATCATCCAGA	GATTTATTAC	TCCAAGTAGC	ATTCCAAGGC	ACAGTAGTGG	2100
TGCAAATGAG	TTTCCAGAG	CAACCCCAAA	ACCCAGGAG	CTGTTGATCC	TTTAGGTATC	2160
TTTCCACAGC	CAGGACTCTT	GCCTGGAGCT	GCTTGATGCC	CCAGACTGTG	AGTTGCAACA	2220
TATGCTGTTG	CGCCTCAATG	GCCCTCAGCA	AATTGTTCTG	CTGTTGCACT	ATACCAGACA	2280
ATAATAGTCT	GGCCTGTACC	GTCAGCGTCA	CTGACGCTGC	GCCCATAGTG	CTTCCTGCTG	2340
CTCCTAAGAA	CCCAAGGAAC	AGAGCTCCTA	TCGCTGCTCT	TTTTTCTCTC	TGCACCACTC	2400
TTCTCTTTGC	CTTGGTGGGT	GCTACTCCTA	ATGGTTCAAT	TGTTACTACT	TTATATTTAT	2460
ATAATTCACT	TCTCCAATTG	TCCCTCATAT	CTCCTCCTCC	AGGTC'TGAAG	ATCTCGGTGT	2520
CGTTCGTGTC	CGTGTCCCTA	CCACCATCTC	TTGTTAATAG	TAGCCCTGTA	ATATTTGATG	2580
AACATCTAAT	TTGTCCTTCA	ATGGGAGGGG	CATACATTGC	TTTTCCCTACT	TCCTGCCACA	2640
TGTTTATAAT	TTGTTTTATT	TTGCATTGAA	GTGTGATATT	GTTATTTGAC	CCTGTAGTAT	2700
TATTCOAAGT	ATTATTACCA	TTCCAAGTAC	TATTAAACAG	TGGTGATGTA	TTACAGTAGA	2760
AAAATTCCCC	TCCACAATTA	AAACTGTGCA	TTACAATTTT	TGGGTCCCCCT	CCTGAGGATT	2820
GATTAAAGAC	TATTGTTTTA	TTCTTAAATT	GTTCTTTTAA	TTTGCTAACT	ATCTGTCTTA	2880
AAGTGTCAAT	CCATTTTGCT	CTACTAATGT	TACAATGTGC	TTGTCTTATA	GTTCTTATTA	2940
TATTTTTTGT	TGTATAAAAT	GCTCTCCCTG	GTCCTATATG	TATCCTTTTTT	CTTTTATTGT	3000
AGTTGGGTCT	TGTACAATTA	ATTTGTACAG	ATTCATTTCAG	ATGTACTATG	ATGGTTTTAG	3060
CATTATCAGT	GAAATTCTCA	GATCTAATTA	CTACCTCTTC	TTCTGCTAGA	CTGCCATTTA	3120
ACAGCAGTTG	AGTTGATACT	ACTGGCCTAA	TTCCATGTGT	ACATTGTACT	GTGCTGACAT	3180
TTTTACATGA	TCCTTTTCCA	CTGAACTTTT	TATCGTTACA	TTTTAGAATC	GCAAAACCAG	3240
CCGGGGCACA	ATAGTGTATG	GGAATTGGCT	CAAAGGATAT	CTTTGGACAA	GCTTGTGTAA	3300

TGACTGAGGT	ATTACAACCTT	ATCAACCTAT	AGCTGGTACT	ATCATTATCT	ATTGATACTA	3360
TATCAAGTTT	ATAAAGAAGT	GCATATTCTT	TCTGCATCTT	ATCTCTTATG	CTTGTGGTGA	3420
TATTGAAAGA	GCAGTTTTTC	ATTTCTCCTC	CCTTTATTGT	TCCCTCGCTA	TTACTATTGT	3480
TATTAGCAGT	ACTATTATTG	GTATTAGTAG	TATTCCTCAA	ATCAGTGCAA	TTTAAAGTAA	3540
CACAGAGTGG	GGTTAATTTT	ACACATGGCT	TTAGGCTTTG	ATCCCATAAA	CTGATTATAT	3600
CCTCATGCAT	CTGTTCTACC	ATGTTATTTT	TCCACATGTT	AAAATTTTCT	GTCACATTTA	3660
CCAATTCTAC	TTCTTGTGGG	TTGGGGTCTG	TGGGTACACA	GGCTTGTGTG	GCCCAAACAT	3720
TATGTACCTC	TGTATCATAT	GCTTTAGCAT	CTGATGCACA	AAATAGAGTG	GTGGTTGCTT	3780
CTTTCCACAC	AGGTACCCCA	TAATAGACTG	TGACCCACAA	TTTTTCTGTA	GCACTACAGA	3840
TCATTAATAA	CCCAAGGAGC	ATCGTGCCCC	ATCCCCACCA	GTGCTGATAA	TTCTCCTGA	3900
TCCCCTTTAC	GGCCATGGAG	GCCTTATTTA	TATTCCAAAA	AAAAAAAATA	AAATTTCAAT	3960
TTTTATCGAT	TACGTAGTTA	ACGCGGCCGC	GGCCTAGCCG	GCCATAAAAA	TCTAGCTGGC	4020
GTAATAGCGA	AGAGGCCCGC	ACCGATCGCC	CTTCCCAACA	GTTGCGCAGC	CTGAATGGCG	4080
AATGGGAAAT	TGTAAACGTT	AATATTTTGT	TAAAATTCGC	GTTAAATTTT	TGTTAAATCA	4140
GCTCATTTTT	TAACCAATAG	GCCGAAATCG	GCAAAATCCC	TTATAAATCA	AAAGAATAGA	4200
CCGAGATAGG	GTTGAGTGTT	GTTCCAGTTT	GGAACAAGAG	TCCACTATTA	AAGAACGTGG	4260
ACTCCAACGT	CAAAGGGCGA	AAAACCGTCT	ATCAGGGCGA	TGGCCCACTA	CGTGAACCAT	4320
CACCCTAATC	AAGTTTTTTG	GGGTCGAGGT	GCCGTAAAGC	ACTAAATCGG	AACCCTAAAG	4380
GGAGCCCCCG	ATTTAGAGCT	TGACGGGGAA	AGCCGGCGAA	CGTGGCGAGA	AAGGAAGGGA	4440
AGAAAGCGAA	AGGAGCGGGC	GCTAGGGCGC	TGGCAAGTGT	AGCGGTCACG	CTGCGCGTAA	4500
CCACCACACC	CGCCGCGCTT	AATGCGCCGC	TACAGGGCGC	GTCAGGTGGC	ACTTTTCGGG	4560
GAAATGTGCG	CGGAACCCCT	ATTTGTTTAT	TTTTCTAAAT	ACATTCAAAT	ATGTATCCGC	4620
TCATGAGACA	ATAACCCTGA	TAAATGCTTC	AATAATATTG	AAAAAGGAAG	AGTATGAGTA	4680
TTCAACATTT	CCGTGTCGCC	CTTATTCCTT	TTTTTGCGGC	ATTTTGCCTT	CCTGTTTTTG	4740
CTCACCAGAG	AACGCTGGTG	AAAGTAAAAG	ATGCTGAAGA	TCAGTTGGGT	GCACGAGTGG	4800
GTTACATCGA	ACTGGATCTC	AACAGCGGTA	AGATCCTTGA	GAGTTTTTCGC	CCCGAAGAAC	4860
GTTTTCCAAT	GATGAGCACT	TTTAAAGTTC	TGCTATGTGG	CGCGGTATTA	TCCCGTGTTG	4920
ACGCCGGGCA	AGAGCAACTC	GGTCGCCGCA	TACACTATTC	TCAGAATGAC	TTGGTTGAGT	4980
ACTCACCAGT	CACAGAAAAG	CATCTTACGG	ATGGCATGAC	AGTAAGAGAA	TTATGCAGTG	5040
CTGCCATAAC	CATGAGTGAT	AACACTGCGG	CCAACCTTACT	TCTGACAACG	ATCGGAGGAC	5100
CGAAGGAGCT	AACCGCTTTT	TTGCACAACA	TGGGGGATCA	TGTAACCTCGC	CTTGATCGTT	5160
GGGAACCGGA	GCTGAATGAA	GCCATACCAA	ACGACGAGCG	TGACACCACG	ATGCCTGCAG	5220
CAATGGCAAC	AACGTTGCGC	AAACTATTAA	CTGGCGAACT	ACTTACTCTA	GCTTCCCGGC	5280

AACAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCCC	5340
TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA	5400
TCATTGCAGC ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG	5460
GGAGTCAGGC AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA	5520
TTAAGCATTG GTAACGTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAAC	5580
TTCATTTTTTA ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA	5640
TCCCTTAACG TGAGTTTTTCG TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT	5700
CTTCTTGAGA TCCTTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC	5760
TACCAGCGGT GGTTTGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAACTG	5820
GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC	5880
ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCACTGG	5940
CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG	6000
ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA	6060
CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG	6120
AAGGGAGAAA GGCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA	6180
GGGAGCTTCC AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT	6240
GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAACGCCA	6300
GCAACGCGGC CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC	6360
CTGCGTTATC CCCTGATTCT GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG	6420
CTCGCCGCAG CCGAACGACC GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAG	6474

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 67:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 6811 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pN2-gpta ProtS

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo: 67:

GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTTC TAAATACATT	60
CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA	120
GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT	180
GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT	240
TGGGTGCACG AGTGGGTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT	300
TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG	360
TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTG CCGCATAAC TATTCTCAGA	420
ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA	480
GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC TTACTTCTGA	540
CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA	600
CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA	660
CCACGATGCC TGTAGCAATG GCAACAACGT TCGCAAACCT ATTAAGTGGC GAACTACTTA	720
CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC	780
TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC	840
GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG	900
TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA	960
TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT	1020
AGATTGATTT AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA	1080
ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG	1140
AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA	1200
CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT	1260
TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC	1320
CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA	1380
TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA	1440
GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTG TGACACACAGC	1500
CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA	1560
GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA	1620
CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTGCG	1680
GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC	1740
TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCTTTTTCG TGGCCTTTTG	1800
CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCTG ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG	1860

TTCATTCTTA	AGCTGAACTT	CAATCTTTCC	ACCACGAAGT	GCAATCAGGA	GCCACGCTGA	3900
GTGATCGATA	GATTCTGCGT	ACAGTATCAC	GCCTTCTGAA	TCATATGTCC	GGAAATCAAA	3960
TTCTGCTGAA	AATCTGCTGA	TTTCTGGCAA	ACGAAATTTT	AAATATAAAA	CAACCCCTGC	4020
AAACTGCTCC	GCCAAGTAAA	GTAATTCATA	CTTTGTGTCA	AGGTTCAAGG	GAAGGCACAC	4080
TGAAACAACC	TCACAACCTCT	TCTGATCTTG	GGCAAGTTTG	AATCCTTTCT	TCCCATCACA	4140
ATAGCAAGTG	TAACCTCCAG	GGTAATTGAC	ACAAAGCTGA	GCACACATGT	TCTCAGAGCA	4200
TTCATCTATA	TCTTCACAAG	ACTTTGATTT	GAGATTATAT	CTGTAGCCTT	CGGGGCATTC	4260
ACATTCAAAA	TCTCCTGGGA	TGTTCTTGCA	CACAGCTGTG	CCACAAATGC	TTGGCTTCAA	4320
AGAGCATTCA	TCCACATCTT	TACAATCTTT	CTTATTTGAA	AGCATAACAA	AACCATTTTT	4380
ACAGGAACAG	TGGTAACTTC	CAGGTGTATT	ATCACAAATT	TGACTGCAAC	CTCCATTTAT	4440
ATTTGAGGGA	TCTTTGCATT	CATTTATGTC	AAATTCACAC	TTTTCTCCTT	GCCAACCTGG	4500
TTTACAAGTG	CAAGTAAAAG	AAGCTTTTCC	ATCTTTGCAG	CTCATATATC	CATCTTCATT	4560
GCATGGCAGA	GGACTACACT	GGTCTGGAAT	GGCATTGACA	CAGCTTCTTA	GGTCAGGATA	4620
AGCATTAGTT	GA CTGACGTG	CAGCAGTGAA	TAACCCAGTT	TGAAAAGAGC	GAAGACAAAC	4680
TAAGTATTTT	GGATAAAAAT	AATCCGTTTC	CGGGTCATTT	TCAAAGACCT	CCCTGGCTTC	4740
TTCTTTATTG	CACAGTTCTT	CGATGCATTC	TCTTTCAAGA	TTACCCTGTT	TGGTTTCTTC	4800
AAGTAAAGAA	TTTGCACGAC	GCTTCCTAAC	CAGGACTTGT	GAAGCCTGTT	GCTTTGACAA	4860
AAAGTTTGCC	TCTGAGACGG	GAAGCACTAG	GAGGAGACAC	GCCAGCAACG	CCCCGCAGCG	4920
CCCACCCAGG	ACCCCATGG	AGGCCTTATT	TATATTCCAA	AAAAAAAAAA	TAAAATTTCA	4980
ATTTTTAGAT	CCCCCAACTT	AAGGGTACCG	CCTCGACATC	TATATACTAT	ATAGTAATAC	5040
CAATACTCAA	GA CTACGAAA	CTGATACAAT	CTCTTATCAT	GTGGGTAATG	TTCTCGATGT	5100
CGAATAGCCA	TATGCCGGTA	GTTGCGATAT	ACATAAACTG	ATCACTAATT	CCAAACCCAC	5160
CCGCTTTTTA	TAGTAAGTTT	TTCACCCATA	AATAATAAAT	ACAATAATTA	ATTTCTCGTA	5220
AAAGTAGAAA	ATATAATTCTA	ATTTATTGCA	CGGTAAGGAA	GTAGAATCAT	AAAGAACAGT	5280
GACGGATGAT	CCCCAAGCTT	GGACACAAGA	CAGGCTTGCG	AGATATGTTT	GAGAATACCA	5340
CTTTATCCCG	CGTCAGGGAG	AGGCAGTGCG	TAAAAAGACG	CGGACTCATG	TGAAATACTG	5400
GTTTTTAGTG	CGCCAGATCT	CTATAATCTC	GCGCAACCTA	TTTTCCCCTC	GAACACTTTT	5460
TAAGCCGTAG	ATAAACAGGC	TGGGACACTT	CACATGAGCG	AAAAATACAT	CGTCACCTGG	5520
GACATGTTGC	AGATCCATGC	ACGTAAACTC	GCAAGCCGAC	TGATGCCCTTC	TGAACAATGG	5580
AAAGGCATTA	TTGCCGTAAG	CCGTGGCGGT	CTGGTACCGG	GTGCGTACT	GGCGCGTGAA	5640
CTGGGTATTG	GTCATGTCGA	TACCGTTTGT	ATTTCCAGCT	ACGATCACGA	CAACCAGCGC	5700
GAGCTTAAAG	TGCTGAAACG	CGCAGAAGGC	GATGGCGAAG	GCTTCATCGT	TATTGATGAC	5760
CTGGTGGATA	CCGGTGGTAC	TGCGGTTGCG	ATTCGTGAAA	TGTATCCAAA	AGCGCACTTT	5820

GTCACCATCT TCGCAAAACC GGCTGGTCGT CCGCTGGTTG ATGACTATGT TGTGATATC	5880
CCGCAAGATA CCTGGATTGA ACAGCCGTGG GATATGGGCG TCGTATTCGT CCCGCCAATC	5940
TCCGGTCGCT AATCTTTTCA ACGCCTGGCA CTGCCGGGCG TTGTTCTTTT TAACTTCAGG	6000
CGGGTTACAA TAGTTTCCAG TAAGTATTCT GGAGGCTGCA TCCATGACAC AGGCAAACCT	6060
GAGCGAAACC CTGTTCAAAC CCCGCTTTGG GCTGCAGGAA TTCGATATCA AGCTTATCGA	6120
TACCGTCGCG GCCGCGACCT CGAGGGGGGG CCCGGTACCC AATTCGCCCT ATAGTGAGTC	6180
GTATTACGCG CGCTCACTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT	6240
TACCCAACTT AATCGCCTTG CAGCACATCC CCCTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA	6300
GGCCCGCACC GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGAAATTGTA	6360
AGCGTTAATA TTTTGTAAA ATTTCGCTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC	6420
CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA GATAGGGTTG	6480
AGTGTGTTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAAA	6540
GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTG AACCATCACC CTAATCAAGT	6600
TTTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT	6660
AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA	6720
GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC CACACCCGCC	6780
GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCA G	6811

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 68:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 27 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: oProtSl

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 68:

ACCCAGGACC GCCATGGCGA AGCGCGC

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 69:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 6926 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: pP2-gp160MN

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 69:

GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT	60
CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA	120
GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT	180
GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT	240
TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT	300
TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG	360
TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTG CCGCATACAC TATTCTCAGA	420
ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA	480
GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC TTACTTCTGA	540
CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA	600
CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA	660
CCACGATGCC TGTAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACCT ATTAACCTGGC GAACTACTTA	720
CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC	780
TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC	840
GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG	900
TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA	960
TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATGGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT	1020
AGATTGATTT AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA	1080
ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG	1140
AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA	1200
CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT	1260
TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC	1320
CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACC GCC TACATACCTC GCTCTGCTAA	1380
TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA	1440
GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC	1500

CCAGCTTGGA	GCGAACGACC	TACACCGAAC	TGAGATACCT	ACAGCGTGAG	CTATGAGAAA	1560
GCGCCACGCT	TCCCGAAGGG	AGAAAGGCGG	ACAGGTATCC	GGTAAGCGGC	AGGGTCGGAA	1620
CAGGAGAGCG	CACGAGGGAG	CTTCCAGGGG	GAAACGCCTG	GTATCTTTAT	AGTCCTGTCTG	1680
GGTTTCGCCA	CCTCTGACTT	GAGCGTCGAT	TTTTGTGATG	CTCGTCAGGG	GGGCGGAGCC	1740
TATGGAAAAA	CGCCAGCAAC	GCGGCCTTTT	TACGGTTCCT	GGCCTTTTGC	TGGCCTTTTG	1800
CTCACATGTT	CTTTCCTGCG	TTATCCCCTG	ATTCTGTGGA	TAACCGTATT	ACCGCCTTTG	1860
AGTGAGCTGA	TACCGCTCGC	CGCAGCCGAA	CGACCGAGCG	CAGCGAGTCA	GTGAGCGAGG	1920
AAGCGGAAGA	GCGCCCAATA	CGCAAACCGC	CTCTCCCCGC	GCGTTGGCCG	ATTCATTAAT	1980
GCAGCTGGCA	CGACAGGTTT	CCCGACTGGA	AAGCGGGCAG	TGAGCGCAAC	GCAATTAATG	2040
TGAGTTAGCT	CACTCATTAG	GCACCCAGG	CTTTACACTT	TATGCTTCCG	GCTCGTATGT	2100
TGTGTGGAAT	TGTGAGCGGA	TAACAATTTT	ACACAGGAAA	CAGCTATGAC	CATGATTACG	2160
CCAAGCGCGC	AATTAACCTT	CACTAAAGGG	AACAAAAGCT	GGAGCTCCAC	CGCGGTGGCG	2220
GCCGCTCTAG	CCCGGGCTAG	AACTAGTGGA	TCCCCCAAAG	CGGGGTTTGA	ACAGGGTTTC	2280
GCTCAGGTTT	GCCTGTGTCA	TGGATGCAGC	CTCCAGAATA	CTTACTGGAA	ACTATTGTAA	2340
CCCGCCTGAA	GTTAAAAAGA	ACAACGCCCC	GCAGTGCCAG	GCGTTGAAAA	GATTAGCGAC	2400
CGGAGATTGG	CGGGACGAAT	ACGACGCCCC	TATCCCACGG	CTGTTCAATC	CAGGTATCTT	2460
GCGGGATATC	AACAACATAG	TCATCAACCA	GCGGACGACC	AGCCGGTTTT	GCGAAGATGG	2520
TGACAAAGTG	CGCTTTTGGG	TACATTTTCA	GAATCGCAAC	CGCAGTACCA	CCGGTATCCA	2580
CCAGGTCATC	AATAACGATG	AAGCCTTCGC	CATCGCCTTC	TGCGCGTTTC	AGCACTTTAA	2640
GCTCGCGCTG	GTTGTCTGTA	TCGTAGCTGG	AAATACAAAC	GGTATCGACA	TGACGAATAC	2700
CCAGTTCACG	CGCCAGTAAC	GCACCCGGTA	CCAGACCGCC	ACGGCTTACG	GCAATAATGC	2760
CTTTCCATTG	TTCAGAAGGC	ATCAGTCGGC	TTGCGAGTTT	ACGTGCATGG	ATCTGCAACA	2820
TGTCCCAGGT	GACGATGTAT	TTTTCGCTCA	TGTGAAGTGT	CCCAGCCTGT	TTATCTACGG	2880
CTTAAAAAGT	GTTTCGAGGGG	AAAATAGGTT	GCGCGAGATT	ATAGAGATCT	GGCGCACTAA	2940
AAACCAGTAT	TTCACATGAG	TCCGCGTCTT	TTTACGCACT	GCCTCTCCCT	GACGCGGGAT	3000
AAAGTGGTAT	TCTCAAACAT	ATCTCGCAAG	CCTGTCCTGT	GTCCAAGCTT	GGGGATCATC	3060
CGTCACTGTT	CTTTATGATT	CTACTTCCTT	ACCGTGCAAT	AAATTAGAAT	ATATTTTCTA	3120
CTTTTACGAG	AAATTAATTA	TTGTATTTAT	TATTTATGGG	TGAAAACTT	ACTATAAAAA	3180
GCGGGTGGGT	TTGGAATTAG	TGATCAGTTT	ATGTATATCG	CAACTACCGG	CATATGGCTA	3240
TTCGACATCG	AGAACATTAC	CCACATGATA	AGAGATTGTA	TCAGTTTCGT	AGTCTTGAGT	3300
ATTGGTATTA	CTATATAGTA	TATAGATGTC	GAGGCGGTAC	CCTTAAGTTG	GGCTGCAGTT	3360
GTTAGAGCTT	GGTATAGCGG	ACAATAAGT	AATTGTAAAG	AAGAAAACGA	AACTATCAAA	3420
ACCGTTTATG	AAATGATAGA	AAAAAGAATA	TAAATAATCC	TGTATTTTAG	TTTAAGTAAC	3480
AGTAAAATAA	TGAGTAGAAA	ATACTATTTT	TTATAGCCTA	TAAATCGTTC	CTCATGAGAG	3540

TGAAGGGGAT	CAGGAGGAAT	TATCAGCACT	GGTGGGGATG	GGGCACGATG	CTCCTTGGGT	3600
TATTAATGAT	CTGTAGTGCT	ACAGAAAAAT	TGTGGGTCAC	AGTCTATTAT	GGGGTACCTG	3660
TGTGGAAAGA	AGCAACCACC	ACTCTATTTT	GTGCATCAGA	TGCTAAAGCA	TATGATACAG	3720
AGGTACATAA	TGTTTGGGCC	ACACAAGCCT	GTGTACCCAC	AGACCCCAAC	CCACAAGAAG	3780
TAGAATTGGT	AAATGTGACA	GAAAAATTTTA	ACATGTGGAA	AAATAACATG	GTAGAACAGA	3840
TGCATGAGGA	TATAATCAGT	TTATGGGATC	AAAGCCTAAA	GCCATGTGTA	AAATTAACCC	3900
CACTCTGTGT	TACTTTAAAT	TGCACTGATT	TGAGGAATAC	TACTAATACC	AATAATAGTA	3960
CTGCTAATAA	CAATAGTAAT	AGCGAGGGAA	CAATAAAGGG	AGGAGAAATG	AAAACTGCCT	4020
CTTTC AATAT	CACCACAAGC	ATAAGAGATA	AGATGCAGAA	AGAATATGCA	CTTCTTTATA	4080
AACTTGATAT	AGTATCAATA	GATAATGATA	GTACCAGCTA	TAGGTTGATA	AGTTGTAATA	4140
CCTCAGTCAT	TACACAAGCT	TGTCCAAAGA	TATCCTTTGA	GCCAATTCCC	ATACACTATT	4200
GTGCCCCGGC	TGGTTTTGCG	ATTCTAAAAAT	GTAACGATAA	AAAGTTCAGT	GGAAAAGGAT	4260
CATGTAAAAA	TGTCAGCACA	GTACAATGTA	CACATGGAAT	TAGGCCAGTA	GTATCAACTC	4320
AACTGCTGTT	AAATGGCAGT	CTAGCAGAAG	AAGAGGTAGT	AATTAGATCT	GAGAAITTTCA	4380
CTGATAATGC	TAAAACCATC	ATAGTACATC	TGAATGAATC	TGTACAAATT	AATTGTACAA	4440
GACCCAACTA	CAATAAAAAGA	AAAAGGATAC	ATATAGGACC	AGGGAGAGCA	TTTTATACAA	4500
CAAAAAATAT	AATAGGAACT	ATAAGACAAG	CACATTGTAA	CATTAGTAGA	GCAAAATGGA	4560
ATGACACTTT	AAGACAGATA	GTTAGCAAAT	TAAAAGAACA	ATTTAAGAAT	AAAACAATAG	4620
TCTTTAATCA	ATCCTCAGGA	GGGGACCCAG	AAATTGTAAT	GCACAGTTTT	AATTGTGGAG	4680
GGGAATTTTT	CTACTGTAAT	ACATCACCAC	TGTTTAATAG	TACTTGGAAT	GGTAATAATA	4740
CTTGGAATAA	TACTACAGGG	TCAAATAACA	ATATCACACT	TCAATGCAAA	ATAAAACAAA	4800
TTATAAACAT	GTGGCAGGAA	GTAGGAAAAG	CAATGTATGC	CCCTCCCATT	GAAGGACAAA	4860
TTAGATGTTT	ATCAAATATT	ACAGGGCTAC	TATTAACAAG	AGATGGTGGT	AAGGACACGG	4920
ACACGAACGA	CACCGAGATC	TTCAGACCTG	GAGGAGGAGA	TATGAGGGAC	AATTGGAGAA	4980
GTGAATTATA	TAAATATAAA	GTAGTAACAA	TTGAACCATT	AGGAGTAGCA	CCCACCAAGG	5040
CAAAGAGAAG	AGTGGTGCAG	AGAGAAAAAA	GAGCAGCGAT	AGGAGCTCTG	TTCTTGGGT	5100
TCTTAGGAGC	AGCAGGAAGC	ACTATGGGCG	CAGCGTCAGT	GACGCTGACG	GTACAGGCCA	5160
GACTATTATT	GTCTGGTATA	GTGCAACAGC	AGAACAATTT	GCTGAGGGCC	ATTGAGGCGC	5220
AACAGCATAT	GTTGCAACTC	ACAGTCTGGG	GCATCAAGCA	GCTCCAGGCA	AGAGTCCTGG	5280
CTGTGGAAAG	ATACCTAAAG	GATCAACAGC	TCCTGGGGTT	TTGGGGTTGC	TCTGGAAAAC	5340
TCATTTGCAC	CACTACTGTG	CCTTGGAATG	CTAGTTGGAG	TAATAAATCT	CTGGATGATA	5400
TTTGGAATAA	CATGACCTGG	ATGCAGTGGG	AAAGAGAAAT	TGACAATTAC	ACAAGCTTAA	5460
TATACTCATT	ACTAGAAAAA	TCGCAAACCC	AACAAGAAAA	GAATGAACAA	GAATTATTGG	5520
AATTGGATAA	ATGGGCAAGT	TTGTGGAATT	GGTTTGACAT	AACAAATTGG	CTGTGGTATA	5580

TAAAAATATT CATAATGATA GTAGGAGGCT TGGTAGGTTT AAGAATAGTT TTTGCTGTAC	5640
TTTCTATAGT GAATAGAGTT AGGCAGGGAT ACTCACCATT GTCGTTGCAG ACCCGCCCCC	5700
CAGTTCCGAG GGGACCCGAC AGGCCCCAAG GAATCGAAGA AGAAGGTGGA GAGAGAGACA	5760
GAGACACATC CGGTCGATTA GTGCATGGAT TCTTAGCAAT TATCTGGGTC GACCTGCGGA	5820
GCCTGTTCTT CTTTCAGCTAC CACCACAGAG ACTTACTCIT GATTGCAGCG AGGATTGTGG	5880
AACTTCTGGG ACGCAGGGGG TGGGAAGTCC TCAAATATTG GTGGAATCTC CTACAGTATT	5940
GGAGTCAGGA ACTAAAGAGT AGTGCTGTTA GCTTGCTTAA TGCCACAGCT ATAGCAGTAG	6000
CTGAGGGGAC AGATAGGGTT ATAGAAGTAC TGCAAAGAGC TGGTAGAGCT ATTCTCCACA	6060
TACCTACAAG AATAAGACAG GGCTTGGAAG GGGCTTTGCT ATAAGATGGG TGGCAAATGG	6120
TCAAAACGTG TGAAGTGGAT GCCTACTGTA AGGGAAAGAA TGAGACGAGC TGAACCAGAA	6180
CGAATTCCAT GGCCCGGGAA GGCTTCGGAC CGGGCCCGGC CATATAGGCC AGCGATACCG	6240
TCGCGGCCGC GACCTCGAGG GGGGGCCCGG TACCCAATTC GCCCTATAGT GAGTCGTATT	6300
ACGCGCGCTC ACTGGCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCTT GGCCTTACCC	6360
AACTTAATCG CCTTGCAGCA CATCCCCCTT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCCC	6420
GCACCGATCG CCCTTCCCAA CAGTTGCGCA GCCTGAATGG CGAATGGAAA TTGTAAGCGT	6480
TAATATTTTG TTAAATTCG CGTTAAATTT TTGTTAAATC AGCTCATTTT TTAACCAATA	6540
GGCCGAAATC GGCAAATCC CTTATAATC AAAAGAATAG ACCGAGATAG GGTGAGTGT	6600
TGTTCCAGTT TGGAAACAAGA GTCCACTATT AAAGAACGTG GACTCCAACG TCAAAGGGCG	6660
AAAAACCGTC TATCAGGGCG ATGGCCCACT ACGTGAACCA TCACCCTAAT CAAGTTTTTT	6720
GGGGTCGAGG TGCCGTAAAG CACTAAATCG GAACCCTAAA GGGAGCCCCC GATTTAGAGC	6780
TTGACGGGGA AAGCCGGCGA ACGTGGCGAG AAAGGAAGGG AAGAAAGCGA AAGGAGCGGG	6840
CGCTAGGGCG CTGGCAAGTG TAGCGGTCAC GCTGCGCGTA ACCACCACAC CCGCCGCGCT	6900
TAATGCGCCG CTACAGGGCG CGTCAG	6926

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 70:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 49 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: jednovláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: self promotor

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 70:

TATGAGATCT AAAAATTGAA ATTTTATTTT TTTTTTTTGG AATATAAAT

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 71:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 34 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: oFIX.1

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 71:

TCATGTTTAC GCGCTCCATG GCCGCGGCCG CACC

34

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 72:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 5532 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: jednovláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) klon: pN2gpta-FIX

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 72:

GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTTC TAAATACATT	60
CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA	120
GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT	180
GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT	240
TGGGTGCACG AGTGGGTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT	300
TTGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG	360
TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTG CCGCATACAC TATTCTCAGA	420
ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA	480
GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TCGGCGCAAC TTACTTCTGA	540
CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA	600
CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA	660
CCACGATGCC TGTAGCAATG GCAACAACGT TCGCCTAACT ATTAAGTGGC GAACTACTTA	720
CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC	780
TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC	840
GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG	900

TTATCTACAC	GACGGGGAGT	CAGGCAACTA	TGGATGAACG	AAATAGACAG	ATCGCTGAGA	960
TAGGTGCCTC	ACTGATTAAG	CATTGGTAAC	TGTCAGACCA	AGTTTACTCA	TATATACTTT	1020
AGATTGATTT	AAAAC TTCAT	TTTTAATTTA	AAAGGATCTA	GGTGAAGATC	CTTTTTGATA	1080
ATCTCATGAC	CAAAATCCCT	TAACGTGAGT	TTTCGTTCCA	CTGAGCGTCA	GACCCCGTAG	1140
AAAAGATCAA	AGGATCTTCT	TGAGATCCTT	TTTTTCTGCG	CGTAATCTGC	TGCTTGCAAA	1200
CAAAAAAACC	ACCGCTACCA	GCGGTGGTTT	GTTTGCCGGA	TCAAGAGCTA	CCAACTCTTT	1260
TTCCGAAGGT	AACTGGCTTC	AGCAGAGCGC	AGATACCAAA	TACTGTCCCT	CTAGTGTAGC	1320
CGTAGTTAGG	CCACCACTTC	AAGAACTCTG	TAGCACC GCC	TACATACCTC	GCTCTGCTAA	1380
TCCTGTTACC	AGTGGCTGCT	GCCAGTGGCG	ATAAGTCGTG	TCTTACCGGG	TTGGACTCAA	1440
GACGATAGTT	ACCGGATAAG	GCGCAGCGGT	CGGGCTGAAC	GGGGGGTTCG	TGCACACAGC	1500
CCAGCTTGGA	GCGAACGACC	TACACCGAAC	TGAGATACCT	ACAGCGTGAG	CTATGAGAAA	1560
GCGCCACGCT	TCCCGAAGGG	AGAAAGGCGG	ACAGGTATCC	GGTAAGCGGC	AGGGTCGGAA	1620
CAGGAGAGCG	CACGAGGGAG	CTTCCAGGGG	GAAACGCCTG	GTATCTTTAT	AGTCCTGTCTG	1680
GGTTTCGCCA	CCTCTGACTT	GAGCGTCGAT	TTTTGTGATG	CTCGTCAGGG	GGGCGGAGCC	1740
TATGGAAAAA	CGCCAGCAAC	GCGGCCTTTT	TACGGTTCCT	GGCCTTTTGC	TGGCCTTTTG	1800
CTCACATGTT	CTTTCCTGCG	TTATCCCCTG	ATTCTGTGGA	TAACCGTATT	ACCGCCTTTG	1860
AGTGAGCTGA	TACCGCTCGC	CGCAGCCGAA	CGACCGAGCG	CAGCGAGTCA	GTGAGCGAGG	1920
AAGCGGAAGA	GCGCCCAATA	CGCAAACCGC	CTCTCCCCGC	GCGTTGGCCG	ATTCAATTAAT	1980
GCAGCTGGCA	CGACAGGTTT	CCCGACTGGA	AAGCGGGCAG	TGAGCGCAAC	GCAATTAATG	2040
TGAGTTAGCT	CACTCATTAG	GCACCC CAGG	CTTTACACTT	TATGCTTCCG	GCTCGTATGT	2100
TGTGTGGAAT	TGTGAGCGGA	TAACAATTTT	ACACAGGAAA	CAGCTATGAC	CATGATTACG	2160
CCAAGCGCGC	AATTAACCCT	CACTAAAGGG	AACAAAAGCT	GGAGCTCCAC	CGCGGTGGCG	2220
GCCGCTTGTT	AATTTTCAAT	TCCAATGAAT	TAACCTTGGA	AATCCATCTT	TCATTAAGTG	2280
AGCTTTGTTT	TTTCCTTAAT	CCAGTTGACA	TACCGGGATA	CCTTGGTATA	TATTCCATAT	2340
TTGCCTTTCA	TTGCACACTC	TTCACCCCAG	CTAATAATTC	CAGTTAAGAA	ACTGGTCCCT	2400
TCCACTTCAG	TAACATGGGG	TCCCCCACTA	TCTCCTTGAC	ATGAATCTCT	ACCTCCTTCA	2460
TGGAAGCCAG	CACAGAACAT	GTTGTTATAG	ATGGTGAACT	TTGTAGATCG	AAGACATGTG	2520
GCTCGGTCAA	CAAGTGGAAC	TCTAAGGTAC	TGAAGAACTA	AAGCTGATCT	CCCTTTGTGG	2580
AAGACTCTTC	CCCAGCCACT	TACATAGCCA	GATCCAAATT	TGAGGAAGAT	GTTTCGTGTAT	2640
TCCTTGTCAG	CAATGCAAAT	AGGTGTAACG	TAGCTGTTTA	GCACTAAGGG	TTCGTCCAGT	2700
TCCAGAAGGG	CAATGTCATG	GTTGTACTTA	TTAATAGCTG	CATTGTAGTT	GTGGTGAGGA	2760
ATAATTCGAA	TCACATTTTCG	CTTTTGCTCT	GTATGTTCTG	TCTCCTCAAT	ATTATGTTCA	2820
CCTGCGACAA	CTGTAATTTT	AACACCAGTT	TCAACACAGT	GGGCAGCAGT	TACAATCCAT	2880
TTTTCAATTA	CGATAGAGCC	TCCACAGAAT	GCATCAACTT	TACCATTCAA	AACAACCTGC	2940

CAAGGGAATT GACCTGGTTT GGCATCTTCT CCACCAACAA CCCGAGTGAA GTCATTAAAT	3000
GATTGGGTGC TTTGAGTGAT GTTATCCAAA ATGGTTTCAG CTTCAGTAGA ATTTACATAG	3060
TCCACATCAG GAAAAACAGT CTCAGCACGG GTGAGCTTAG AAGTTTGTGA AACAGAAACT	3120
CTTCCACATG GAAATGGCAC TGCTGGTTCA CAGGACTTCT GGTTTTCTGC AAGTCGATAT	3180
CCCTCAGTAC AGGAGCAAAC CACCTTGTTA TCAGCACTAT TTTTACAAAA CTGCTCGCAT	3240
CTGCCATTCT TAATGTTACA TGTTACATCT AATTCACAGT TCTTTCCTTC AAATCCAAAG	3300
GGACACCAAC ATTCATAGGA ATTAATGTCA TCCTTGCAAC TGCCGCCATT TAAACATGGA	3360
TTGGACTCAC ACTGATCTCC ATCAACATAC TGCTTCCAAA ATTCAGTTGT TCTTTCAGTG	3420
TTTTCAAAAA CTTCTCGTGC TTCTTCAAAA CTACACITTT CTTCCATACA TTCTCTCTCA	3480
AGGTTCCCTT GAACAAACTC TTCCAATTTA CCTGAATTAT ACCTCTTTGG CCGATTGAGA	3540
ATTTTGTGG CGTTTTCATG ATCAAGAAAA ACTGTACATT CAGCACTGAG TAGATATCCT	3600
AAAAGGCAGA TGGTGATGAG GCCTGGTGAT TCTGCCATGA TCATGTTTAC GCGCTCCATG	3660
GAGGCCTTAT TTATATTCCA AAAAAAAAAA ATAAAAATTC AATTTTTAGA TCCCCCAACT	3720
TAAGGGTACC GCCTCGACAT CTATATACTA TATAGTAATA CCAATACTCA AGACTACGAA	3780
ACTGATACAA TCTCTTATCA TGTGGGTAAT GTTCTCGATG TCGAATAGCC ATATGCCGGT	3840
AGTTGCGATA TACATAAACT GATCACTAAT TCCAAACCCA CCCGCTTTTT ATAGTAAGTT	3900
TTTCACCCAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTTCTCGT AAAAGTAGAA AATATATTCT	3960
AATTTATTGC ACGGTAAGGA AGTAGAATCA TAAAGAACAG TGACGGATGA TCCCCAAGCT	4020
TGGACACAAG ACAGGCTTGC GAGATATGTT TGAGAATACC ACTTTATCCC GCGTCAGGGA	4080
GAGGCAGTGC GTAAAAAGAC GCGGACTCAT GTGAAATACT GGTTTTTAGT GCGCCAGATC	4140
TCTATAATCT CGCGCAACCT ATTTTCCCCT CGAACACTTT TTAAGCCGTA GATAAACAGG	4200
CTGGGACACT TCACATGAGC GAAAAATACA TCGTCACCTG GGACATGTTG CAGATCCATG	4260
CACGTAAACT CGCAAGCCGA CTGATGCCTT CTGAACAATG GAAAGGCATT ATTGCCGTAA	4320
GCCGTGGCGG TCTGGTACCG GGTGCGTTAC TGGCGCGTGA ACTGGGTATT CGTCATGTCG	4380
ATACCGTTTG TATTTCCAGC TACGATCAGC ACAACCAGCG CGAGCTTAAA GTGCTGAAAC	4440
GCGCAGAAGG CGATGGCGAA GGCTTCATCG TTATTGATGA CCTGGTGGAT ACCGGTGGTA	4500
CTGCGGTTGC GATTCTGTAA ATGTATCCAA AAGCGCACTT TGTACCATC TTCGCAAAAC	4560
CGGCTGGTCG TCCGCTGGTT GATGACTATG TTGTTGATAT CCCGCAAGAT ACCTGGATTG	4620
AACAGCCGTG GGATATGGGC GTCGTATTCT TCCCGCCAAT CTCCGGTCGC TAATCTTTTC	4680
AACGCCTGGC ACTGCCGGGC GTTGTTCTTT TTAACCTCAG GCGGGTTACA ATAGTTTCCA	4740
GTAAGTATTC TGGAGGCTGC ATCCATGACA CAGGCAAACC TGAGCGAAAC CCTGTTCAAA	4800
CCCCGCTTTG GGCTGCAGGA ATTCGATATC AAGCTTATCG ATACCGTCGC GGCCGCGACC	4860
TCGAGGGGGG GCCCGGTACC CAATTGCCCC TATAGTGAGT CGTATTACGC GCGCTCACTG	4920
GCCGTCGTTT TACAACGTCG TGACTGGGAA AACCCTGGCG TTACCCAACCT TAATCGCCTT	4980

GCAGCACATC CCCCTTTTCGC CAGCTGGCGT AATAGCGAAG AGGCCCGCAC CGATCGCCCT	5040
TCCCAACAGT TGCAGCAGCT GAATGGCGAA TGGAAATTGT AAGCGTTAAT ATTTTGTAA	5100
AATTCGCGTT AAATTTTGT TAAATCAGCT CATTTTTTAA CCAATAGGCC GAAATCGGCA	5160
AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGGTT GAGTGTGTT CCAGTTTGGA	5220
ACAAGAGTCC ACTATTAAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCTATC	5280
AGGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC CCTAATCAAG TTTTTTGGGG TCGAGGTGCC	5340
GTAAAGCACT AAATCGGAAC CCTAAAGGGA GCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAAGC	5400
CGGCGAACGT GCGGAGAAAAG GAAGGGAAGA AAGCGAAAGG AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG	5460
CAAGTGTAGC GGTCACGCTG CGCGTAACCA CCACACCCGC CGCGCTTAAT GCGCCGCTAC	5520
AGGGCGCGTC AG	5532

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 73:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 14 párů nukleotidů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) druh vlákna: dvouvláknová
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: přírodní gpl60MN

(ix) vlastnosti:

- (A) název/klíč: CDS
- (B) umístění: 3..14

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 73:

CA ATG AGA GTG AAG

14

Met Arg Val Lys

1

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 74:

(i) vlastnosti sekvence:

- (A) délka: 4 aminokyseliny
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 74:

Met Arg Val Lys

1

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 75:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 14 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: dvojvláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: gp160 ve viru vselP-gp160

(ix) povaha:

(A) název/klíč: CD3

(B) umístění: 3..14

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 75:

CC ATG GCG GTG AAG

14

Met Ala Val Lys

1

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 76:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 4 aminokyseliny

(B) typ: aminokyselina

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 76:

Met Ala Val Lys

1

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 77:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 13 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: dvojvláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: Protein S přírodního typu

(ix) povaha:

(A) název/klíč: CDS

(B) umístění: 4..18

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 77:

GAA ATG AGG GTC CTG GGT

Met Arg Val Leu Gly

1

5

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 78:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 5 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(C) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 78:

Met Arg Val Leu Gly

1

5

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 79:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 18 párů nukleotidů

(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: dvouvláknová

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) klon: Protein S v chimerách

(ix) povaha:

(A) název/klíč: CDS

(B) umístění: 4..18

(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 79:

GCG ATG GCG GTC CTG GGT

Met Ala Val Leu Gly

1

5

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 80:

(i) vlastnosti sekvence:

(A) délka: 5 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: protein
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 80:
Met Ala Val Leu Gly
1 5

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 81:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 17 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina
(C) druh vlákna: dvouvláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: přírodní faktor IX
(ix) povaha:
(A) název/klíč: CDS
(B) umístění: 3...17
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 81:
TT ATG CAG CGC GTG AAC
Met Gln Arg Val Asn
1 5

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 82:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 5 aminokyselin
(B) typ: aminokyselina
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: protein
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 82:
Met Gln Arg Val Asn
1 5

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 83:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 17 párů nukleotidů
(B) typ: nukleová kyselina

(C) druh vlákna: dvouvláknová
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) popis: syntetický DNA oligonukleotid
(vii) bezprostřední zdroj:
(B) klon: faktor IX vFIX č. 5
(ix) povaha:
(A) název/klíč: ODS
(B) umístění 3..17
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 83:
CC ATG GAG CGC GTG AAC
Met Glu Arg Val Asn
1 5

(2) informace o sekvenci identifikační číslo 84:
(i) vlastnosti sekvence:
(A) délka: 5 aminokyselin
(B) typ: aminokyselina
(D) topologie: lineární
(ii) typ molekuly: protein
(xi) popis sekvence: sekvence identifikační číslo 84:
Met Glu Arg Val Asn
1 5

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy modifikovaného eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru přímým molekulárním klonováním modifikovaného virového genomu, v y z n a č u j í e í s e t í m , že tento způsob zahrnuje stupně:
I) modifikování za extracelulárních podmínek vyčištěné DNA molekuly, která obsahuje první genom prvního eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, čímž se získá modifikovaná DNA molekula, která obsahuje uvedený modifikovaný virový genom,
II) zavedení uvedené modifikované DNA molekuly do první hostitelské buňky, která pakáží uvedený modifikovaný virový genom do infekčních virionů, a
III) izolaci infekčních virionů obsahujících modifikovaný virový genom z první hostitelské buňky.
2. Způsob podle bodu 1, v y z n a č u j í e í s e t í m , že stupeň modifikování DNA molekuly za extracelulárních podmínek obsahuje stupeň štěpení DNA molekuly endonukleasou specifickou pro sekvenci.
3. Způsob podle bodu 1, v y z n a č u j í e í s e t í m , že stupeň modifikování DNA molekuly obsahuje stupeň vložení první DNA sekvence do prvního genomu.
4. Způsob podle bodu 3. v y z n a č u j í e í s e t í m , že první DNA sekvence je vložena do prvního genomu v místě štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci.
5. Způsob podle bodu 4, v y z n a č u j í e í s e t í m , že místem štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci je jedinečné místo v prvním genomu.
6. Způsob podle bodu 5, v y z n a č u j í e í s e t í m , že stupeň modifikování DNA molekuly obsahuje stupeň použití fosfatasy, při kterém se odstraní fosforečnanový zbytek z konce DNA segmentu, který se připraví štěpením DNA molekuly endonukleasou specifickou pro sekvenci v jedinečném místě.

7. Způsob podle bodu 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako první genom používá genom viru vakcinie a že se jako jediné místo používá místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI nebo místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou SmaI.
8. Způsob přípravy podle bodu 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že první genom obsahuje druhou DNA sekvenci, která se nevyskytuje přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru a že tato druhá DNA sekvence obsahuje jediné místo štěpení.
9. Způsob přípravy podle bodu 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako první genom používá genom viru drůbežích neštovic obsahující sekvenci Escherichia coli β -galaktosidasového genu a že se jako jediné místo štěpení používá místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI.
10. Způsob přípravy podle bodu 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že první DNA sekvence je vložena do prvního genomu viru mezi první místo štěpení první endonukleasou specifickou pro sekvenci a druhé místo štěpení druhou endonukleasou specifickou pro sekvenci.
11. Způsob přípravy podle bodu 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jak první tak druhé místo štěpení je jediné v prvním genomu.
12. Způsob podle bodu 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že alespoň část první DNA sekvence, která je vložena do prvního genomu je pod transkripční kontrolou promotoru.
13. Způsob podle bodu 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že promotor je umístěn v první DNA sekvenci, která je vložena do prvního genomu.
14. Způsob podle bodu 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že promotor je umístěn v modifikovaném virovém genomu proti směru vlákna první DNA sekvence, která je vložena do prvního genomu.

15. Způsob podle bodu 12, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že promotor je využíván RNA polymerasou kodovanou modifi-
kovaným virovým genomem.
16. Způsob podle bodu 15, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že promotor je vhodný pro iniciaci transkripce RNA poly-
merasou uvedeného eukaryotického cytoplasmatického DNA-víru.
17. Způsob podle bodu 15, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že promotor obsahuje modifikaci přirozeně se vyskytujícího
promotoru eukaryotického cytoplasmatického DNA-víru.
18. Způsob podle bodu 1, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že stupeň modifikování DNA molekuly obsahuje stupeň dele-
tování DNA sekvence z prvního genomu.
19. Způsob podle bodu 1, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že stupeň modifikování DNA molekuly obsahuje stupeň sub-
stituování DNA sekvence z prvního genomu.
20. Způsob podle bodu 1, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že stupeň infikování první hostitelské buňky druhým eukary-
otickým cytoplasmatickým DNA-vírem obsahuje druhý genom,
který je expresován, modifikovaný virový genom se tak paká-
zuje do infekčních virionů.
21. Způsob podle bodu 20, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že stupeň zavedení modifikované DNA molekuly do první hos-
titelské buňky se provádí asi jednu hodinu po stupni infi-
kování první hostitelské buňky druhým eukaryotickým
cytoplasmatickým DNA-vírem.
22. Způsob podle bodu 20, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že se expresí druhého genomu v první hostitelské buňce ne-
produkuje infekční viriony obsahující druhý genom.
23. Způsob podle bodu 20, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že se jako modifikovaný virový genom používá modifikovaný
genom viru vakcinie, jako druhý genom genom viru drůbežích

neštovic a jako první hostitelská buňka savčí buňka.

24. Způsob podle bodu 20, v y z n a ě u j í o í s e t í m , že stupeň izolování infekčních virionů obsahujících modifikovaný virový genom obsahuje stupeň infikování druhé hostitelské buňky infekčními viriony produkoványými první hostitelskou buňkou za takových podmínek, kdy exprese druhého genomu v druhé hostitelské buňce neposkytuje infekční viriony obsahující druhý genom.
25. Způsob podle bodu 24, v y z n a ě u j í o í s e t í m , že se jako modifikovaný virový genom používá modifikovaný genom viru vakcinie, jako druhý genom genom viru drůbežích neštovic a jako druhá hostitelská buňka savčí buňka.
26. Způsob podle bodu 24, v y z n a ě u j í o í s e t í m , že modifikovaný virový genom obsahuje funkční gen hostitelské oblasti, který je potřebný pro to, aby se v druhé hostitelské buňce produkovaly infekční viriony a druhému genomu chybí funkční gen hostitelské oblasti.
27. Způsob podle bodu 26, v y z n a ě u j í o í s e t í m , že se jako modifikovaný virový genom používá modifikovaný genom viru vakcinie obsahující funkční gen hostitelské oblasti, který je potřebný pro to, aby se v lidské buňce produkovaly infekční viriony a jako druhá hostitelská buňka se používá lidská buňka.
28. Způsob podle bodu 24, v y z n a ě u j í o í s e t í m , že modifikovaný virový genom obsahuje gen selekčního markeru, druhému genu chybí gen selekčního markeru a stupeň infikování druhé hostitelské buňky se provádí za podmínek, které vedou k výběru genomu, který expresí poskytuje gen selekčního markeru.
29. Způsob podle bodu 24, v y z n a ě u j í o í s e t í m , že exprese genu selekčního markeru v druhé hostitelské buňce uděluje druhé hostitelské buňce resistenci na cytotoxickou látku, která je během infikování druhé hostitel-

ské buňky přítomna v takové hladině, která je dostatečná pro výběr genomu, který expresí poskytuje gen selekčního markeru.

30. Modifikovaný eukaryotický cytoplasmatický DNA-virus, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se připravuje přímým molekulárním klonováním modifikovaného virového genomu podle způsobu podle kteréhokoliv z bodů 5, 11 nebo 14.
31. Modifikovaný eukaryotický cytoplasmatický DNA-virus obsahující modifikovaný virový genom, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že modifikovaný virový genom obsahuje:
- I) první genom prvního eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, při čemž první genom obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci a toto místo štěpení je jedinečným místem v tomto virovém genomu, a
 - II) první DNA sekvenci vloženou do tohoto jedinečného místa štěpení v prvním genomu.
32. Modifikovaný virus podle bodu 31, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že první DNA sekvence se nevyskytuje přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru.
33. Modifikovaný virus podle bodu 32, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se jako první genom používá genom viru vakcinie a jedinečným místem je místo štěpení bakteriální endonukleasou, která je vybrána ze skupiny sestávající z NotI a SmaI.
34. Modifikovaný virus podle bodu 32, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že první genom obsahuje druhou DNA sekvenci, která se nevyskytuje přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, a tato druhá DNA sekvence obsahuje uvedené jedinečné místo.
35. Modifikovaný virus podle bodu 34, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se jako první sekvence používá genom viru drůbežích neštovic obsahující druhou DNA sekvenci genu β -galaktosidasy Escherichia coli a jedinečným

místem je místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI.

36. Modifikovaný virus podle bodu 32, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že alespoň část první DNA sekvence, která je vložena do jedinečného místa, je pod transkripční kontrolou promotoru.
37. Modifikovaný virus podle bodu 36, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že promotor je umístěn v první DNA sekvenci, která je vložena do prvního genomu.
38. Modifikovaný virus podle bodu 37, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se jako první genom používá genom viru neštovic a promotor obsahuje modifikaci přirozeně se vyskytujícího promotoru viru neštovic.
39. Modifikovaný eukaryotický cytoplasmatický DNA-virus obsahující modifikovaný virový genom, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že tento modifikovaný virový genom obsahuje:
- I) první genom prvního eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, kde tento první genom obsahuje první místo štěpení první endonukleasou specifickou pro sekvenci a druhé místo štěpení druhou endonukleasou specifickou pro sekvenci a každé z uvedených míst štěpení je jedinečným místem v prvním genomu, a
 - II) první DNA sekvenci vloženou do prvního genomu mezi první jedinečné místo a druhé jedinečné místo.
40. Modifikovaný eukaryotický cytoplasmatický DNA-virus podle bodu 39, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že první DNA sekvence se přirozeně nevyskytuje v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru.
41. Modifikovaný virus podle bodu 40, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že první genom obsahuje druhou DNA sekvenci, která se přirozeně nevyskytuje v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru a druhá DNA sekvence obsahuje první DNA sekvenci vloženou mezi první jedinečné místo a

druhé jedinečné místo.

42. Modifikovaný virus podle bodu 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako první genom používá genom viru vakcinie a že první místo štěpení i druhé místo štěpení znamenají místa štěpení bakteriální restrikční endonukleasou, která je vybrána ze skupiny nukleas sestávající z NotI, SmaI, ApaI a RarII.
43. Modifikovaný eukaryotický cytoplasmatický DNA-virus obsahující modifikovaný virový genom, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento modifikovaný virový genom obsahuje I) první genom prvního eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, kde tento první genom obsahuje první DNA sekven- ci a tato první DNA sekvence obsahuje místo štěpení endo- nukleasou specifickou pro sekven- ci, které je jedinečným místem štěpení v modifikovaném virovém genomu, a II) promotor, který je umístěn tak, že DNA sekvence vlo- žená do jedinečného místa je pod transkripční kontrolu promotoru, při čemž první DNA sekvencí chybí translační start kodon mezi promotorem a jedinečným místem.
44. Modifikovaný virus podle bodu 43, v y z n a č u j í c í s e t í m , že první DNA sekvence se nevyskytuje při- rozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru.
45. Modifikovaný virus podle bodu 44, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako první genom používá genom viru vakcinie a že první DNA sekvence obsahuje násobné klo- novací místo obsahující místa štěpení bakteriální restrik- ční endonukleasou NotI, SmaI, ApaI a RarII.
46. DNA molekula, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje modifikovaný virový genom modifikovaného viru po- dle bodu 30.
47. DNA molekula, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje modifikovaný virový genom modifikovaného viru po- dle kteréhokoliv z bodů 31, 39 nebo 43.

48. DNA molekula, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje jeden konec modifikovaného virového genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, při čemž
- I) tento konec modifikovaného virového genomu obsahuje DNA sekvenci, která se přirozeně nevyskytuje v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru,
 - II) modifikovaný virový genom obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je jedinečným místem v tomto modifikovaném virovém genomu, a
 - III) DNA molekula má konec, který je homologní s koncem, který se získá štěpením uvedeného jedinečného místa v modifikovaném virovém genomu endonukleasou specifickou pro sekvenci.
49. DNA molekula podle bodu 48, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že DNA sekvence nevyskytující se přirozeně v genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je jedinečným místem v modifikovaném virovém genomu.
50. Sestava pro přímé molekulární klonování modifikovaného virového genomu eukaryotického cytoplasmatického DNA-viru, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje:
- I) vyčištěnou DNA molekulu podle bodu 48 nebo bodu 49,
 - II) DNA ligasu a
 - III) roztoky pufru a reakčních činidel vhodných pro ligaci DNA segmentů za vzniku modifikované DNA molekuly obsahující modifikovaný virový genom.
51. Sestava podle bodu 50, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje plasmid obsahující kazetu exprese genu obklopenou místy štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, která jsou slučitelná s insercí uvedené kazety do jedinečného místa štěpení modifikovaného virového genomu kodovaného DNA molekulou.
52. Sestava podle bodu 50, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje první hostitelskou buňku a druhý virus vhodný pro pakázování modifikovaného virového genomu do

infekčních virionů.

53. Plasmid, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje segment DNA, který má místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI na každém konci, při čemž uvedený DNA segment obsahuje místo štěpení endonukleasou specifickou pro sekvenci, které je jedinečné v uvedeném plasmidu.
54. Plasmid podle bodu 53, jak je uveden na obrázku 1.3, který je označen pN2, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci identifikační číslo 1.
55. Plasmid podle bodu 53, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že DNA segment dále obsahuje gen selekčního markeru pod transkripční kontrolou promotoru viru neštovic.
56. Plasmid podle bodu 53, jak je uveden na obrázku 1.3, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že je vybrán ze skupiny plasmidů označených pN2-gpta obsahujících sekvenci identifikační číslo 2 a pN2-gptb obsahujících sekvenci identifikační číslo 3.
57. Plasmid podle bodu 55, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že DNA segment dále obsahuje druhý promotor viru neštovic odštěpitelně napojený na DNA sekvenci obsahující místo štěpení restrikční endonukleasou.
58. Plasmid podle bodu 57, jak je uveden na obrázku 4.7, který je označen pN2gpt-84, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci identifikační číslo 14.
59. Plasmid podle bodu 57, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje translační start kodon odštěpitelně napojený na DNA sekvenci, která obsahuje místo štěpení restrikční endonukleasou.
60. Plasmid podle bodu 59, jak je uveden na obrázku 4.7, označený pN2gpt-83A, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci identifikační číslo 13.

61. Plasmid, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje první hlavní klonovací místo obsahující jedinečná místa druhého hlavního klonovacího místa vektoru viru vakcínie, označeného vdtK, který je vybrán z následující skupiny plasmidů uvedených na obrázku 4.3: pA0 obsahujícího sekvenci identifikační číslo 6, pA1 obsahujícího sekvenci identifikační číslo 7 a pA2 obsahujícího sekvenci identifikační číslo 8.
62. Plasmid podle bodu 61, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje promotor viru neštovic a translační start kodon odštěpitelně napojený na první hlavní klonovací místo, jak ukazuje obrázek 4.4, který je vybrán ze skupiny plasmidů: pA1-S1 obsahující sekvenci identifikační číslo 9 a pA2-S1 obsahující sekvenci identifikační číslo 10.
63. Plasmid podle bodu 61, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje promotor viru neštovic odštěpitelně napojený na první hlavní klonovací místo, jak ukazuje obrázek 4.5, který je vybrán ze skupiny plasmidů: pA1-S2 obsahující sekvenci identifikační číslo 11 a pA2-S2 obsahující sekvenci identifikační číslo 12.
64. Plasmid podle bodu 62, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že tento plasmid dále obsahuje DNA sekvenci kodující lidský protrombin, v němž je tato DNA sekvence odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic a start kodon.
65. Plasmid podle bodu 64, jak je uveden na obrázku 5.1, označený jako plasmid pA1S1-PT, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci identifikační číslo 15.
66. Plasmid podle bodu 58, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že tento plasmid dále obsahuje DNA sekvenci kodující lidský plasminogen, v němž je tato sekvence DNA odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic a start kodon.
67. Plasmid podle bodu 66, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že je vybrán z této skupiny plasmidů: pN2gpt-GPg,

jak je uveden na obrázku 5.2, který koduje lidský glu-plasminogen a který obsahuje sekvenci identifikační číslo 17, a pN2-gpt-LPg, jak je uveden na obrázku 5.3, který koduje lys-plasminogen a který obsahuje sekvenci identifikační číslo 18.

68. Plasmid podle bodu 58, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že tento plasmid dále obsahuje DNA sekvenci, která koduje virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) gp160, při čemž tato sekvence je odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic a start koden.
69. Plasmid podle bodu 68, jak je uveden na obrázku 5.4, označený pN2gpt-gp160, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci identifikační číslo 19.
70. Plasmid, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje modifikovaný EcoRI K fragment DNA viru vakcinie, z něhož je deletován genKIL hostitelské oblasti.
71. Plasmid podle bodu 70, jak je uveden na obrázku 8.1, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že je vybrán z této skupiny plasmidů: pEcoK-dhr obsahujícího sekvenci identifikační číslo 21 a pdhr-gpt obsahujícího sekvenci identifikační číslo 22.
72. Plasmid, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje segment genomu viru neštovic, který obsahuje gen thymidin-kinasy viru neštovic, při čemž gen thymidin-kinasy je modifikován tak, aby zabránil expresi aktivní thymidin-kinasy.
73. Plasmid podle bodu 72, jak je uveden na obrázku 4.2, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že je vybrán z této skupiny plasmidů: pMindJ-2 obsahujícího sekvenci identifikační číslo 4 a pMindJ-3 obsahujícího sekvenci identifikační číslo 5.
74. Modifikovaný virus vakcinie, v y z n a ě u j í c í s e

tím, že obsahuje modifikaci genomu viru vakcínie přírodního typu, který má jediné místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI, při čemž tato uvedená modifikace odstraňuje toto jediné místo štěpení.

75. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 74, který je popsán na obrázku 4.1A a který je označen vDN.

76. Modifikovaný virus vakcínie, v y z n a č u j í o í s e t í m , že obsahuje modifikaci genomu viru vakcínie přírodního typu, který má jediné místo štěpení restrikční endonukleasou SmaI, při čemž uvedená modifikace odstraňuje toto jediné místo štěpení.

77. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 76, který je popsán na obrázku 4.1A a který je označen vđSN.

78. Modifikovaný virus vakcínie, v y z n a č u j í o í s e t í m , že obsahuje modifikaci genomu viru vakcínie přírodního typu, který má jediné místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI, jediné místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou SmaI a gen thymidin-kinasy, při čemž tato modifikace zahrnuje:

- I) modifikaci, která odstraňuje místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI,
- II) modifikaci, která odstraňuje místo pro bakteriální restrikční endonukleasu SmaI a
- III) modifikaci, která obsahuje inserci v genu thymidin-kinasy, který obsahuje jediné místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI a jediné místo štěpení bakteriální restrikční endonukleasou SmaI.

79. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 78, který je popsán na obrázku 4.1A a který je označen vđTK.

80. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 79, označený vPTI, v y z n a č u j í o í s e t í m , že dále obsahuje DNA sekvenci, která koduje lidský protrombín, při čemž tato sekvence obsahuje část plasmidu pAlSl-PT obsahujícího

sekvenci identifikační číslo 15, která leží mezi místy štěpení endonukleasami NotI a BsrII, kde poslední uvedená sekvence je vložena do vdTK mezi místa štěpení endonukleasami NotI a BsrII.

81. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 79, označený vGPg, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje DNA sekvenci, která obsahuje část plasmidu pN2gpt-GPg kodující lidský glu-plasminogen a obsahující sekvenci identifikační číslo 17, která leží mezi místy štěpení endonukleasami NotI, kde poslední uvedená sekvence je vložena do vdTK v místě štěpení endonukleasou NotI.
82. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 79, označený VIPgl, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje tu část plasmidu pN2gpt-IPg kodující lya-plasminogen a obsahující sekvenci identifikační číslo 18, která leží mezi dvěma místy štěpení endonukleasami NotI, kde poslední uvedená sekvence je vložena do vdTK v místě štěpení endonukleasou NotI.
83. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 79, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje DNA sekvenci kodující virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) gp160, při čemž uvedená sekvence obsahuje část plasmidu pN2gpt-gp160 obsahujícího sekvenci identifikační číslo 19, která leží mezi místy štěpení endonukleasou NotI, kde poslední uvedená sekvence je vložena do vdTK v místě štěpení endonukleasou NotI.
84. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 79, označený vS4, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje DNA sekvenci kodující syntetický promotor S4 viru neštovic, při čemž uvedená DNA sekvence obsahuje sekvenci oligonukleotidu P-artP(11) sekvence identifikačního čísla 38, kde poslední uvedená sekvence je vložena do vdTK v místě štěpení endonukleasou NotI.
85. Modifikovaný virus vakcínie podle bodu 84, označený vWWF,

v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje DNA sekvenci kodující lidský von Willebrandův faktor, při čemž uvedená DNA sekvence obsahuje část plasmidu pvWF obsahující sekvenci identifikační číslo 20, která leží mezi místy štěpení endonukleasou NotI, kde poslední uvedená sekvence je vložena do vs4 v místě štěpení endonukleasou NotI.

86. Modifikovaný virus vakcinie, označený vāhr, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje modifikovaný genom, kterému chybí jak funkční gen KIL hostitelské oblasti tak funkční gen C7L hostitelské oblasti, při čemž uvedený modifikovaný genom obsahuje genom C7L-negativního kmene viru vakcinie (WR-6/2), který má sekvenci identifikační číslo 22 vloženu do KIL místa viru vakcinie přírodního typu v místě genu KIL.
87. Modifikovaný virus připravený podle bodu 30, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že exprese první sekvence v hostitelské buňce vede k produkci proteinu.
88. Modifikovaný virus připravený podle bodu 31 nebo 39, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že exprese první sekvence v hostitelské buňce vede k produkci proteinu.
89. Modifikovaný virus podle bodu 30, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se jako modifikovaný virový genom používá modifikovaný genom viru neštovic.
90. Modifikovaný virus podle kteréhokoliv z bodů 31, 39 nebo 43, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se jako modifikovaný virový genom používá modifikovaný genom viru neštovic.
91. DNA molekula podle bodu 46, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se jako modifikovaný virový genom používá modifikovaný genom viru neštovic.
92. DNA molekula podle bodu 47, v y z n a ě u j í c í s e

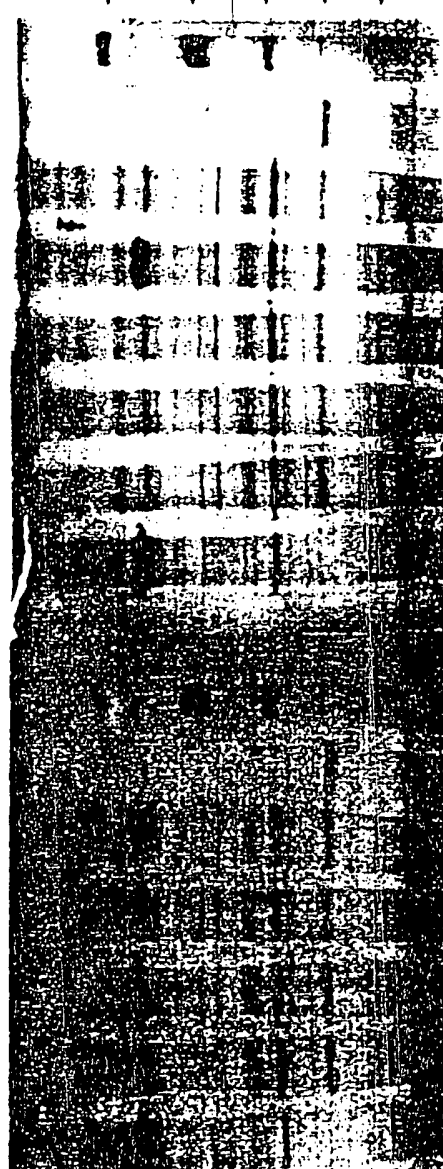
tím, že se jako modifikovaný genom používá modifikovaný genom viru neštovic.

93. Plasmid podle bodu 68, jak je uveden na obrázku 9.1, označený pP2-gp160_{MM} a obsahující sekvenční identifikační číslo 69.
94. Modifikovaný virus vakcinie podle bodu 79, v y z n a ě u - j í c í s e t í m , že dále obsahuje DNA sekvenční kodující virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) gp 160, při čemž uvedená sekvenční obsahuje tu část plasmidu pP2gpt-gp160 obsahujícího sekvenční identifikační číslo 69, která leží mezi místy štěpení endonukleasou SmaI, kde poslední uvedená sekvenční je vložena do vATK v místě štěpení endonukleasou SmaI.
95. Plasmid podle bodu 58, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že tento plasmid dále obsahuje DNA sekvenční kodující lidský protein S, při čemž poslední uvedená DNA sekvenční je odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic a start kodon.
96. Plasmid podle bodu 95, označený pN2-gptAProtS, jak je uvedeno na obrázku 10.1, kodující lidský protein S, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenční identifikační číslo 67.
97. Modifikovaný virus vakcinie podle bodu 79, označený vPrj68 v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje DNA sekvenční obsahující část plasmidu pN2gptAProtS kodující lidský protein S a obsahující sekvenční identifikační číslo 67, která leží mezi dvěma místy štěpení endonukleasou NotI, při čemž poslední uvedená sekvenční je vložena do vATK v místě štěpení endonukleasou NotI.
98. Plasmid podle bodu 58, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že tento plasmid dále obsahuje DNA sekvenční kodující lidský faktor IX, při čemž poslední uvedená DNA sekvenční je odštěpitelně napojena na promotor viru neštovic a start kodon.

99. Plasmid podle bodu 98, označený pN2gpt-FIX, jak je uveden na obrázku 11.1, kodující lidský faktor IX, v y z n a ě u - j í c í s e t í m , že obsahuje sekvenci identifikační číslo 72.
100. Modifikovaný virus vakcinie podle bodu 79, označený vFIX 8.5, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje DNA sekvenci obsahující část plasmidu pN2gpt-FIX kodující lidský faktor IX a obsahující sekvenci identifikační číslo 72, která leží mezi dvěma místy štěpení endonukleasou NotI, při čemž poslední uvedená sekvence je vložena do vektu v místě štěpení endonukleasou NotI.
101. Modifikovaný virus podle bodu 35, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že genom viru drůbežích neštovic dále obsahuje DNA sekvenci kodující HIV envIIIB gen vložený do sekvence Escherichia coli β -galaktosidasového genu v místě štěpení bakteriální restrikční endonukleasou NotI.
102. Modifikovaný virus drůbežích neštovic podle bodu 101, označený jako f-envIIIB, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že dále obsahuje část plasmidu pN2gpt-gp150 obsahující sekvenci identifikační číslo 19, která leží mezi místy štěpení endonukleasou NotI.

PV 2641-92771

č.j.	0 5 9 7 3 2
DOSTO	2 3 X 9 2
ÚŘAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	200 → 97 → 68 → 43 → 29 →
PRIL.	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
														
↑ Pg														
↑ 35K														

Obrázek 1.1

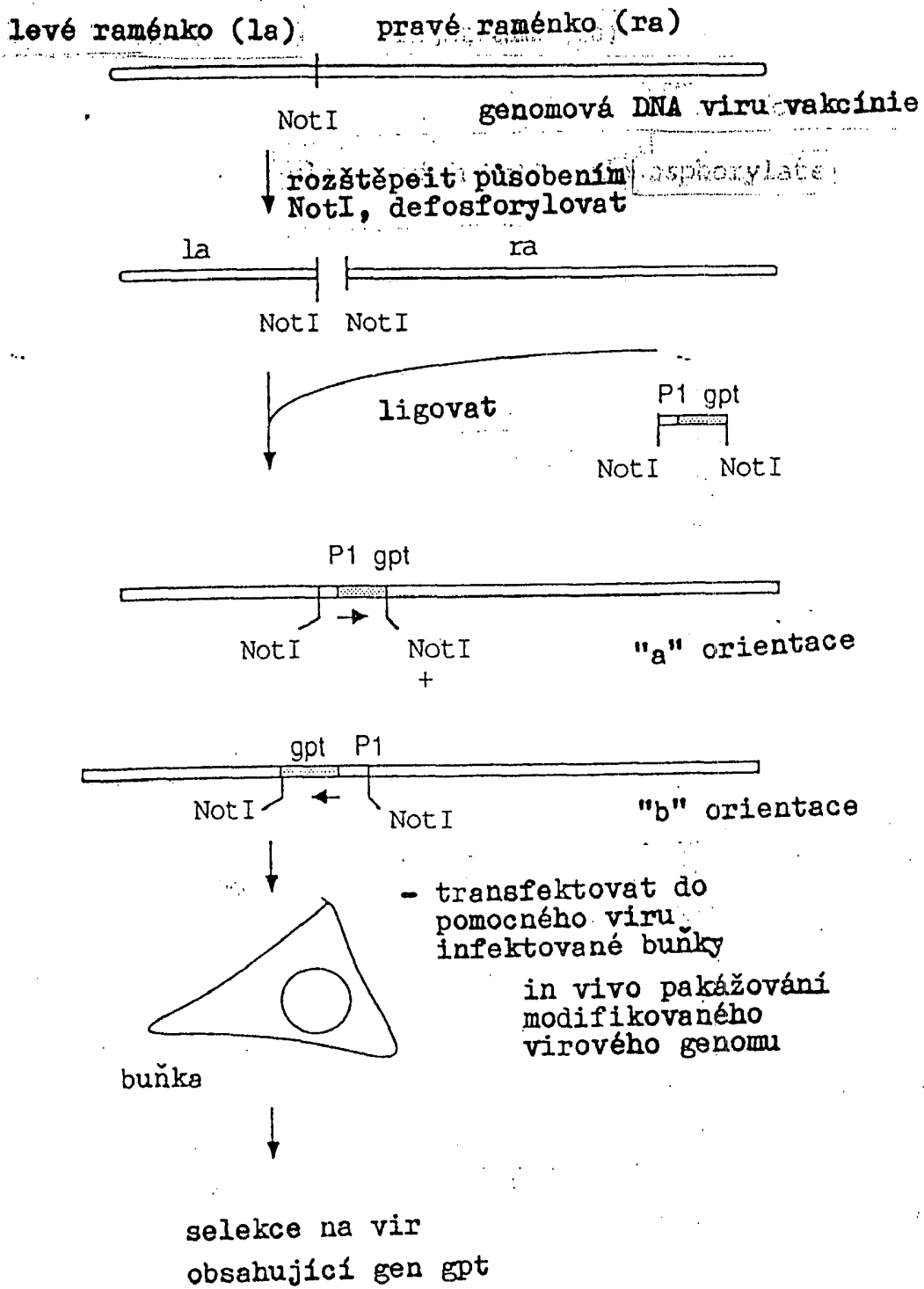
PATENTSERVIS
PRAHA

hadlecor

Fig. 1.2

PU-2641-92

Číslo	059732
Dostupnost	23. X. 92
UŘAD	PROVĚŘENÍ A OBEJEV

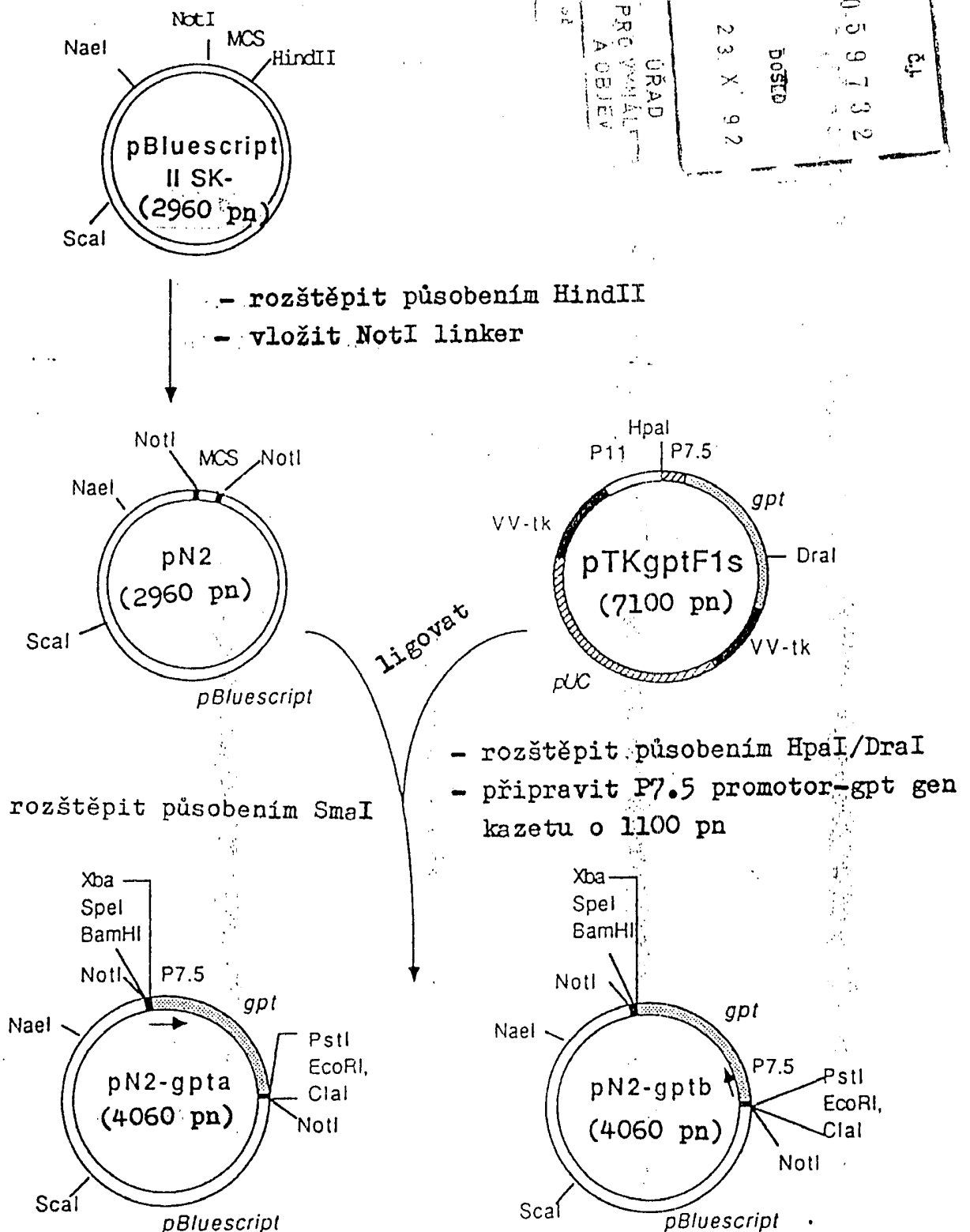


Obrázek 1.2

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

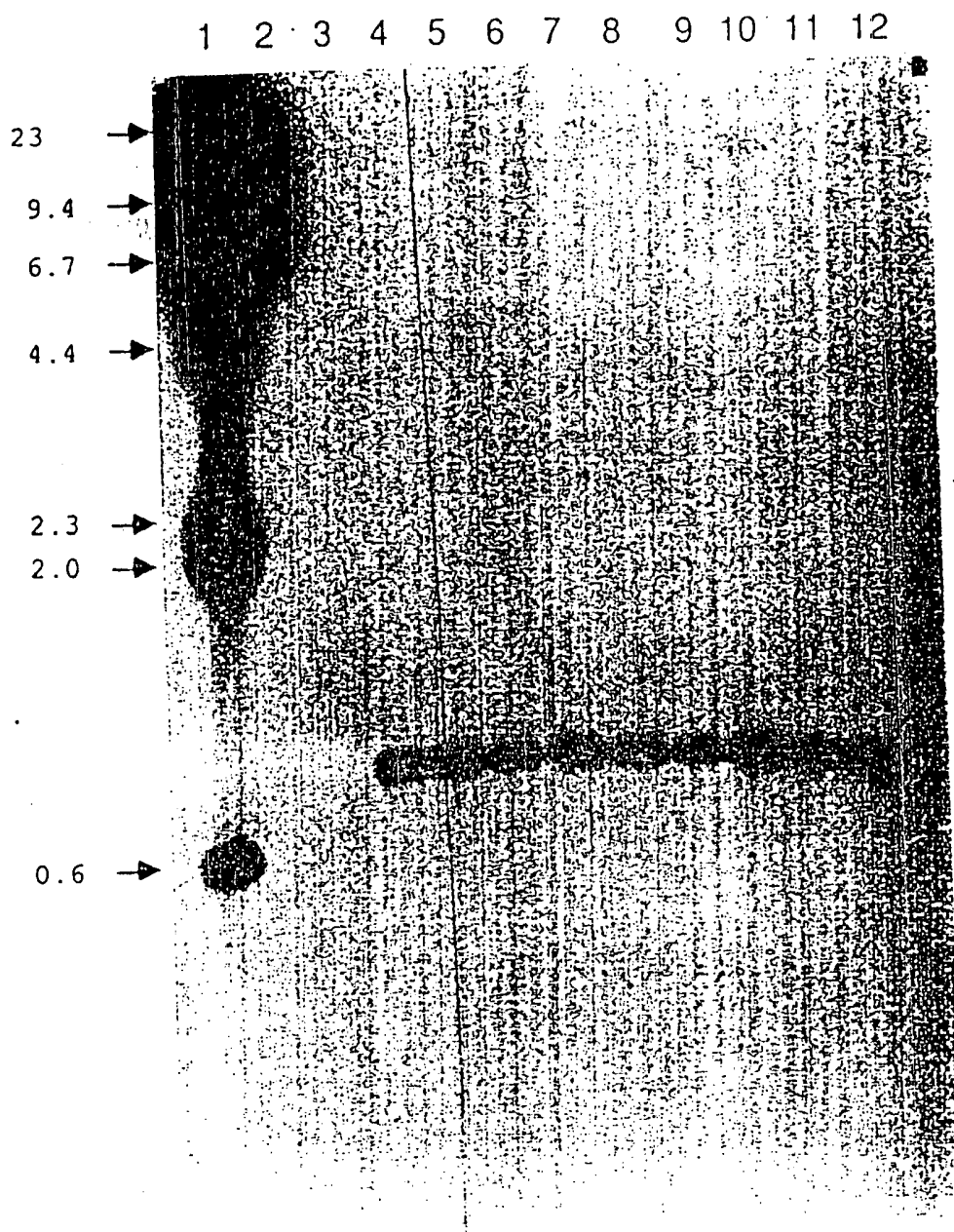
Konstrukce plasmidů pN2-gpta a pN2-gptb



Obrázek 1.3

9V 2641-92

059732	23 X 92	URAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	Přil.
DOSTO			

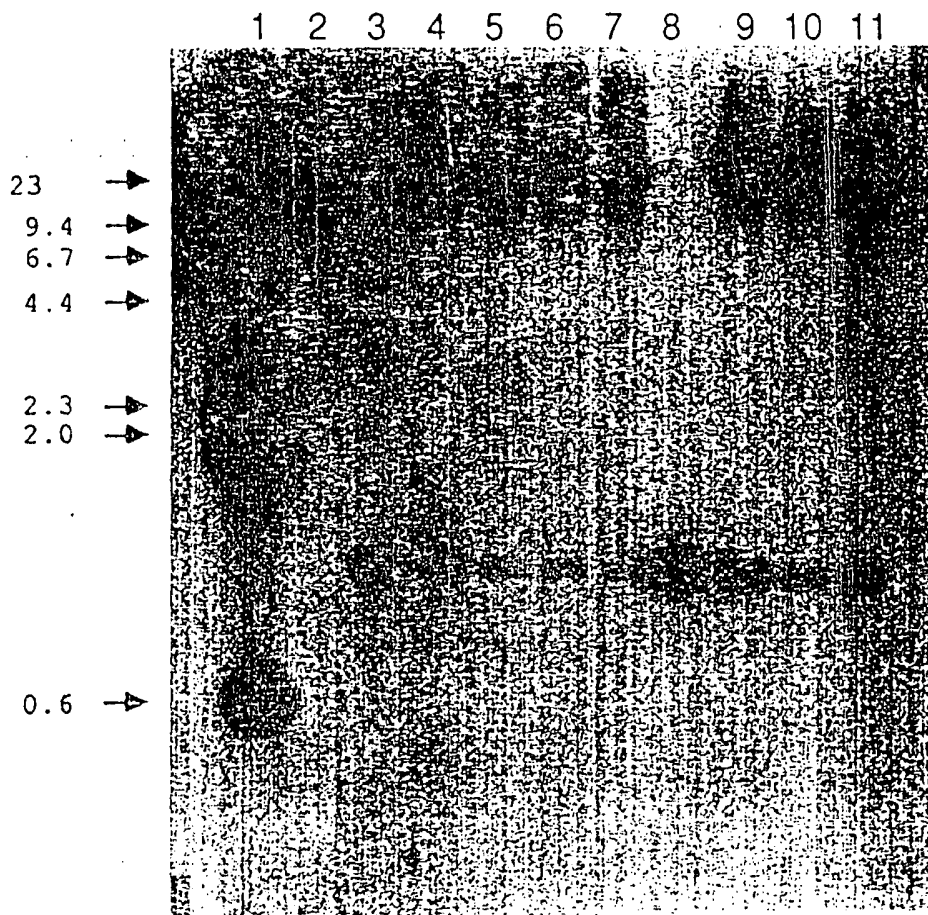


Obrázek 1.4

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

č.j.	059732
DOSLO	23 X 92
ÚŘAD PRO VYVÁLEZY A OBJEVY	
PŘIL.	

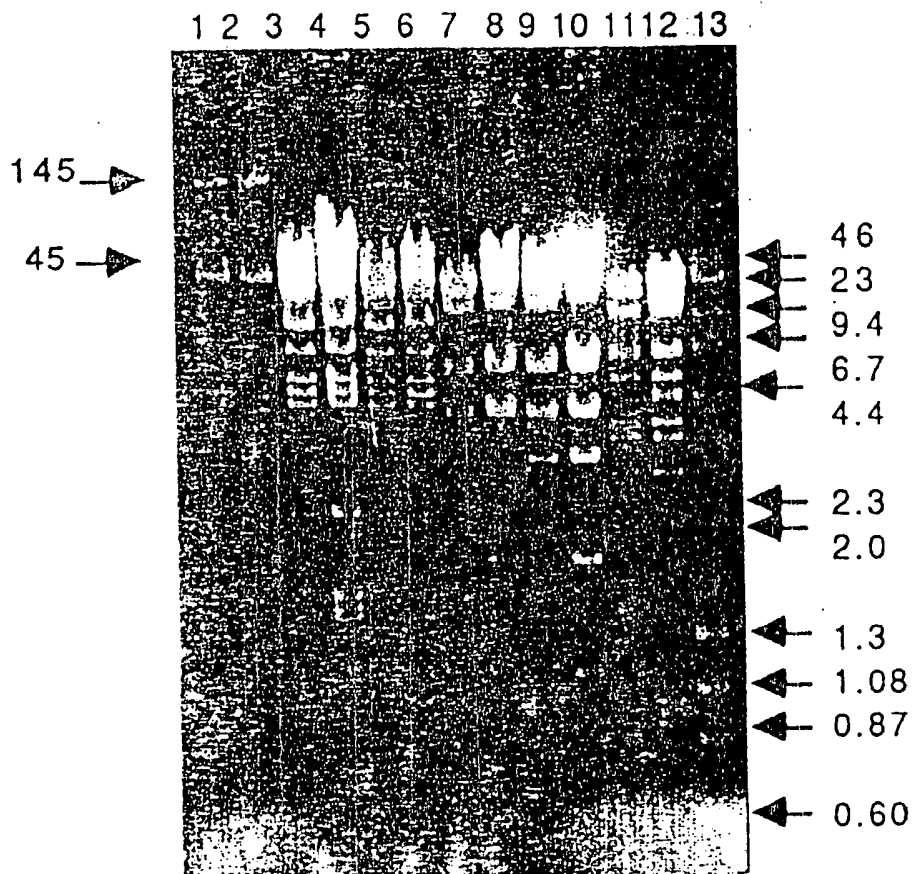


Obrázek 1.5

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlecová

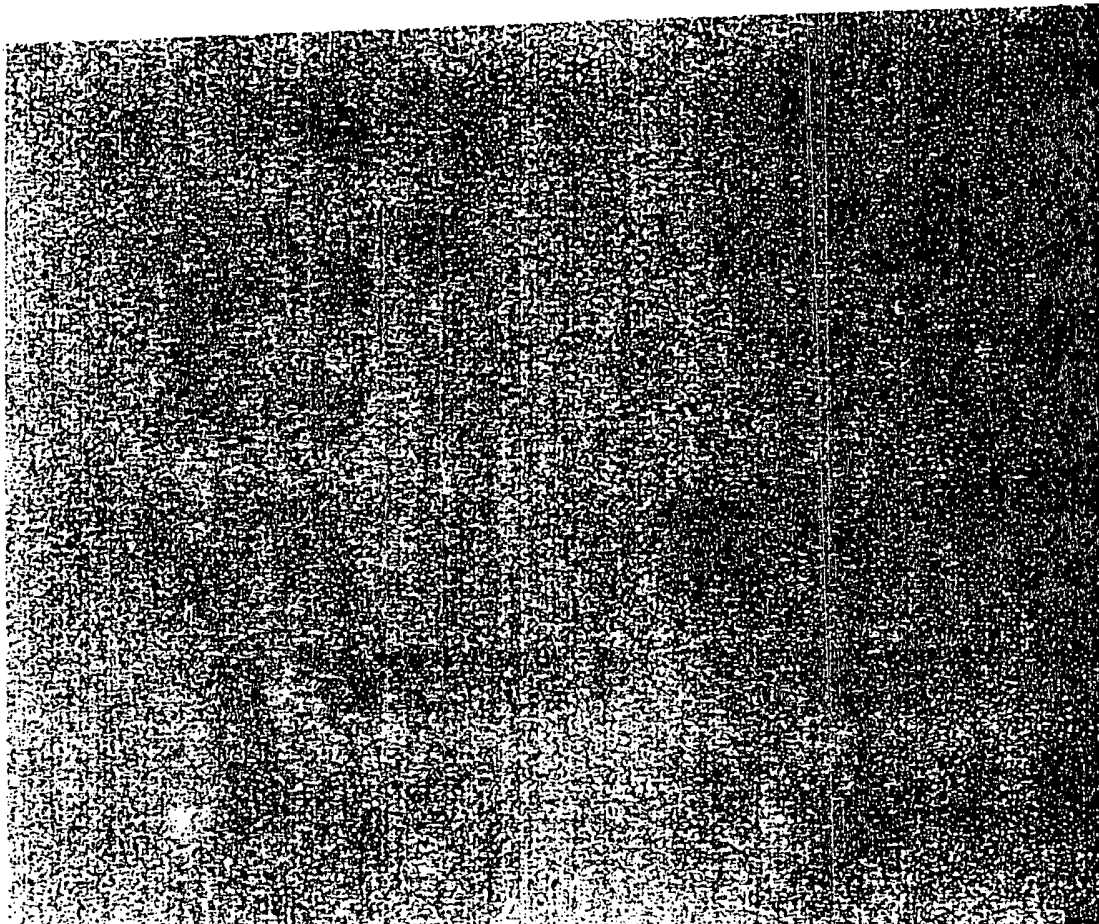
PRIL	URAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	23. X. 92	11 5 9 7 3 2	6.1
------	----------------------------------	-----------	--------------	-----



Obrázek 1.6

PV 2641-92

Čj.	59732
POSTO	23 X .92
ÚŘAD PRO VYVÁLEZY A OBJEVY	PŘIL.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

↑ 2.3
↑ 9.4
↑ 6.7
↑ 4.4
↑ 2.3
↑ 2.0
↑ 1.3
↑ 1.08
↑ 0.87

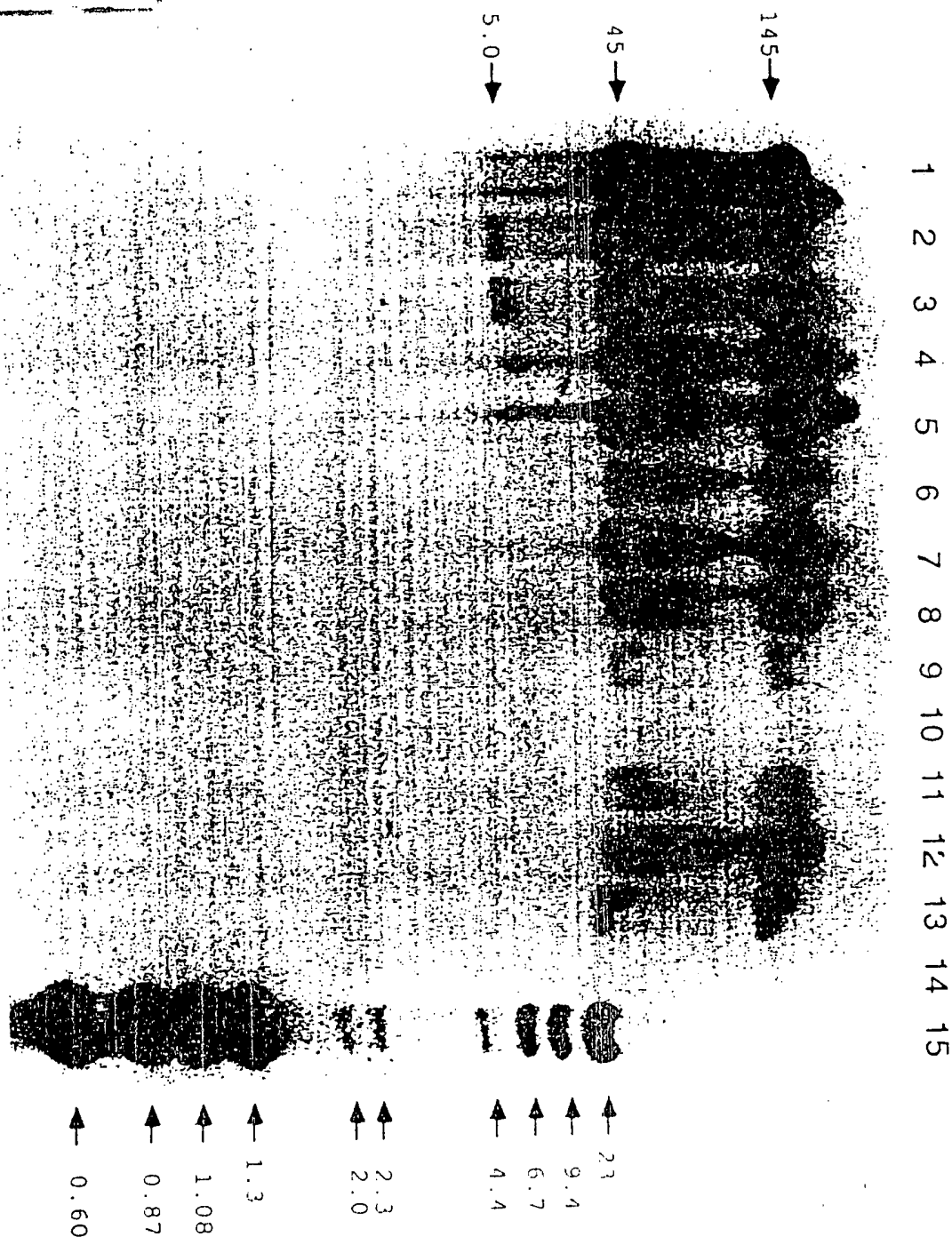
Obrázek 1.7

PATENTSERVIS
PRAHA

Kudlincová

PV 2641-92

č.j.	0 5 9 7 3 2
Doslo	23 X 92
URAD	PRO VYNALEZY
PRIL	A OBJEVY



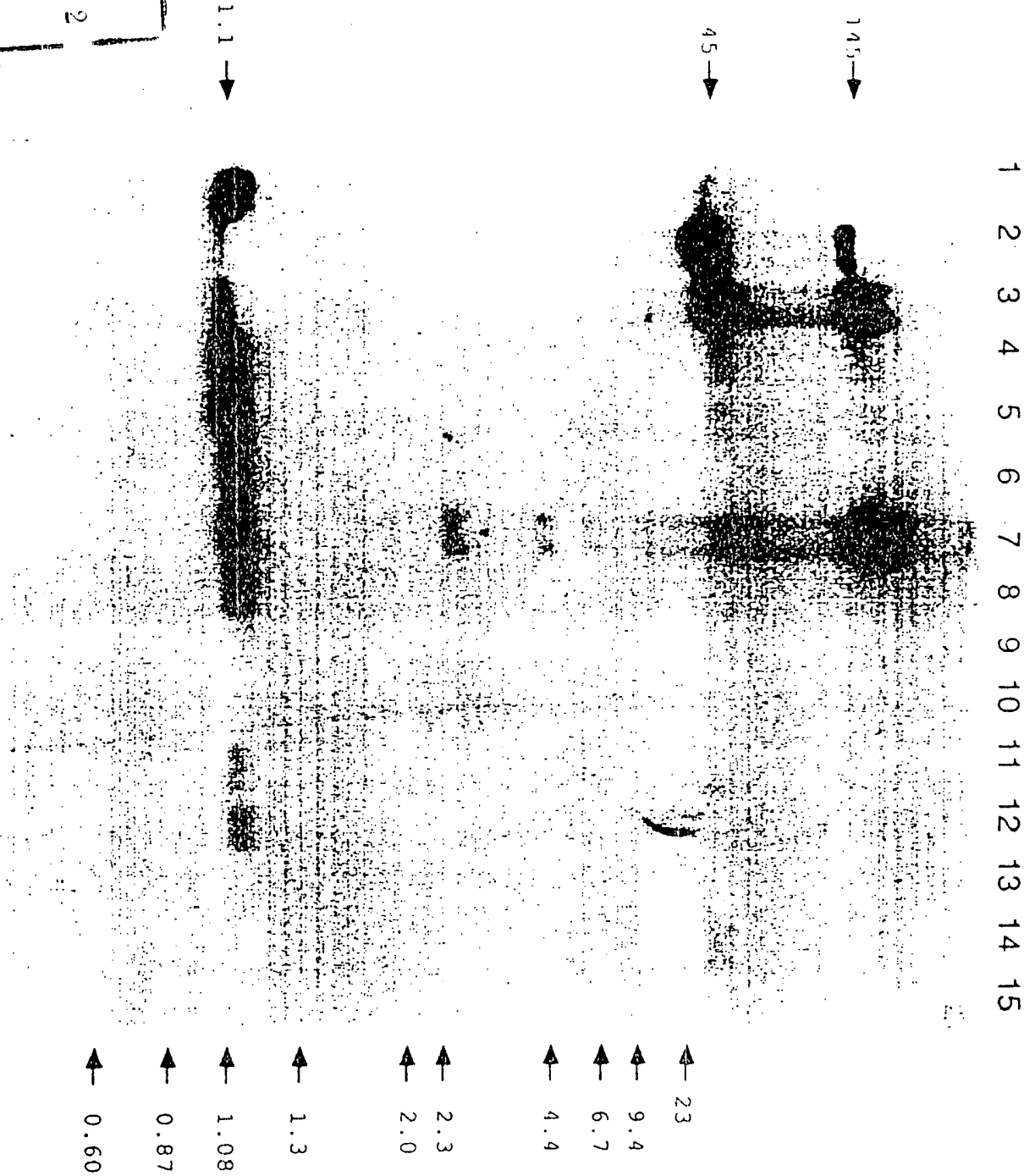
Obrázek 1.8

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

PV 2641-92

č.j.	0 5 9 7 3 2
Dosled	
23. X 92	
ÚŘAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	



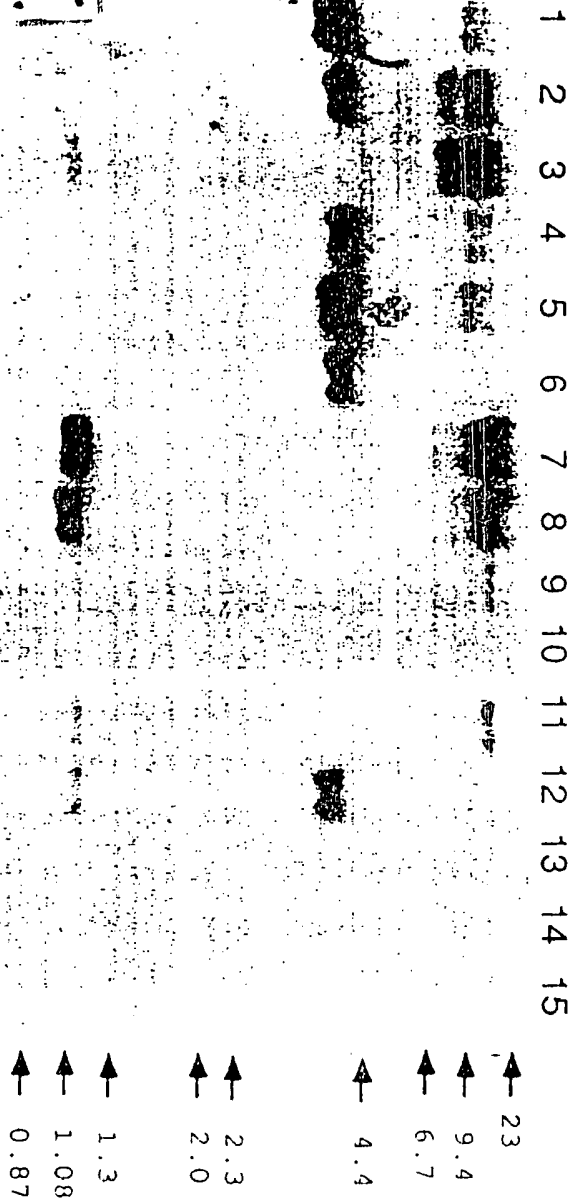
Obrázek 1.9

PATENTSERVIS
PRAHA

Radecor

PV 2641-92

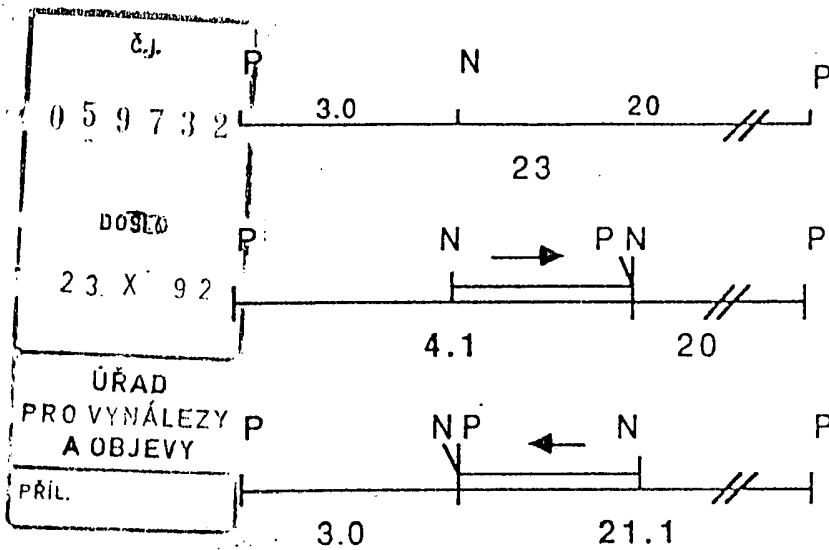
ČJ.	0 5 9 7 3 2
DOŠLO	23. X 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	
PŘÍL.	



Obrázek 1.10

PATENTSERVIS
PRAHA

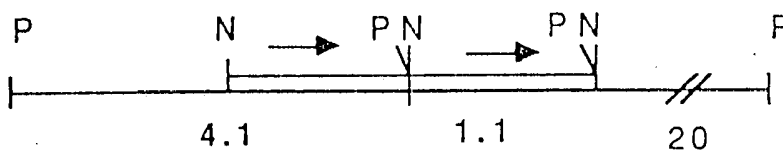
Kadlec



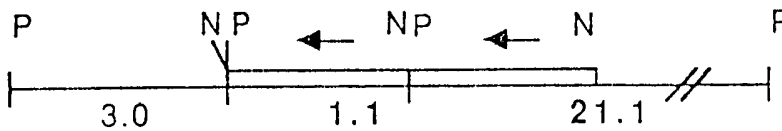
Pst C fragment
přírodního viru

jediná inserce
"a" orientace

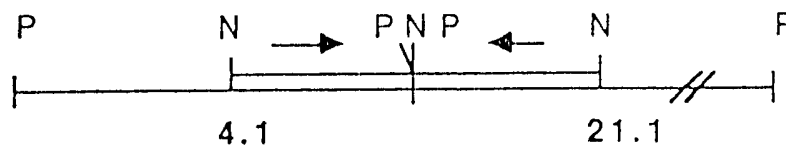
jediná inserce
"b" orientace



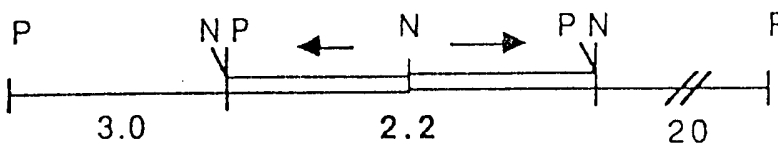
dvojná inserce
tandem "a"



dvojná inserce
tandem "b"



dvojná inserce
pata-pata



dvojná inserce
hlava- hlava

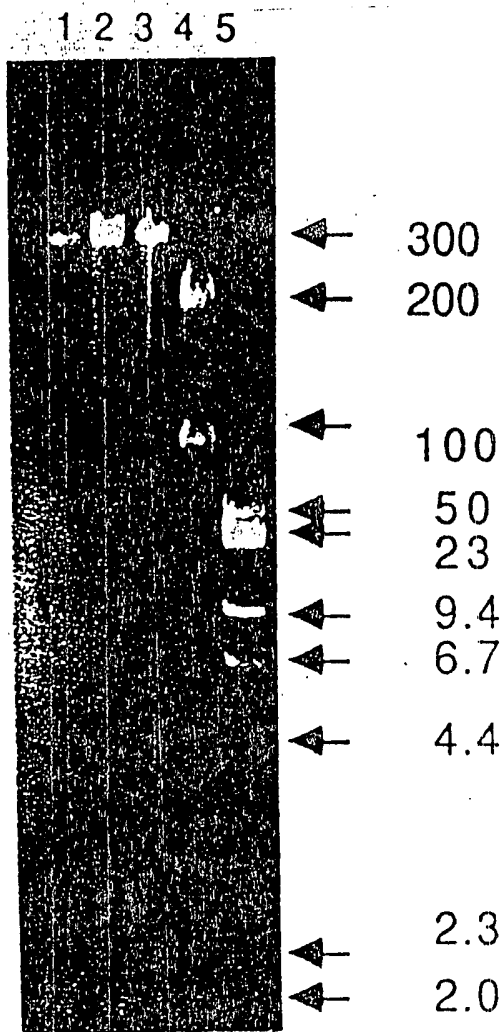
Obrázek 1.11

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

PV 2641-92

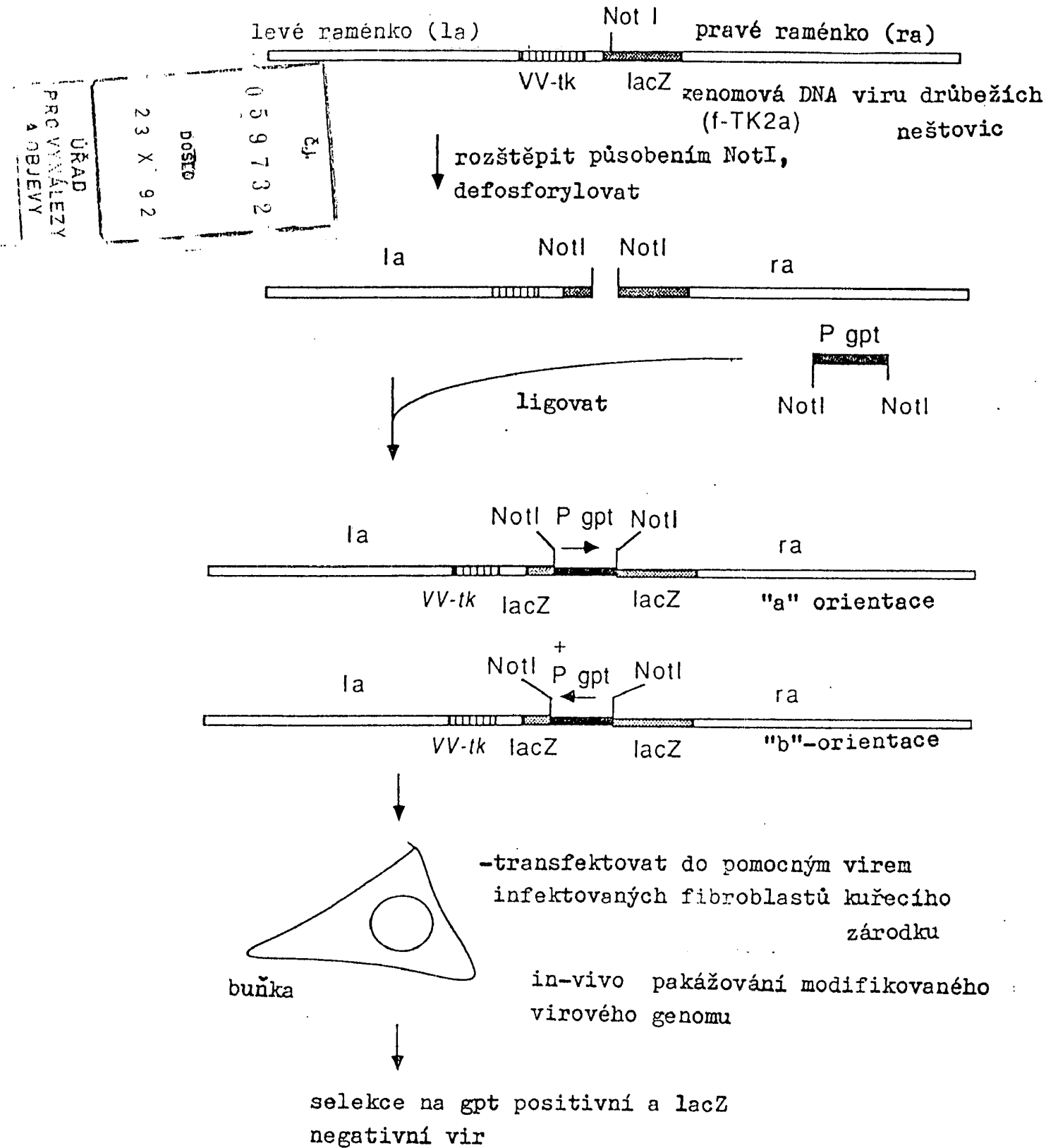
PRIL	URAD PROVNÁLEZY A OBJEVY	0 5 9 7 3 2	č.j.
		2 3 X 9 2	POSID



Obrázek 2.1

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlecová



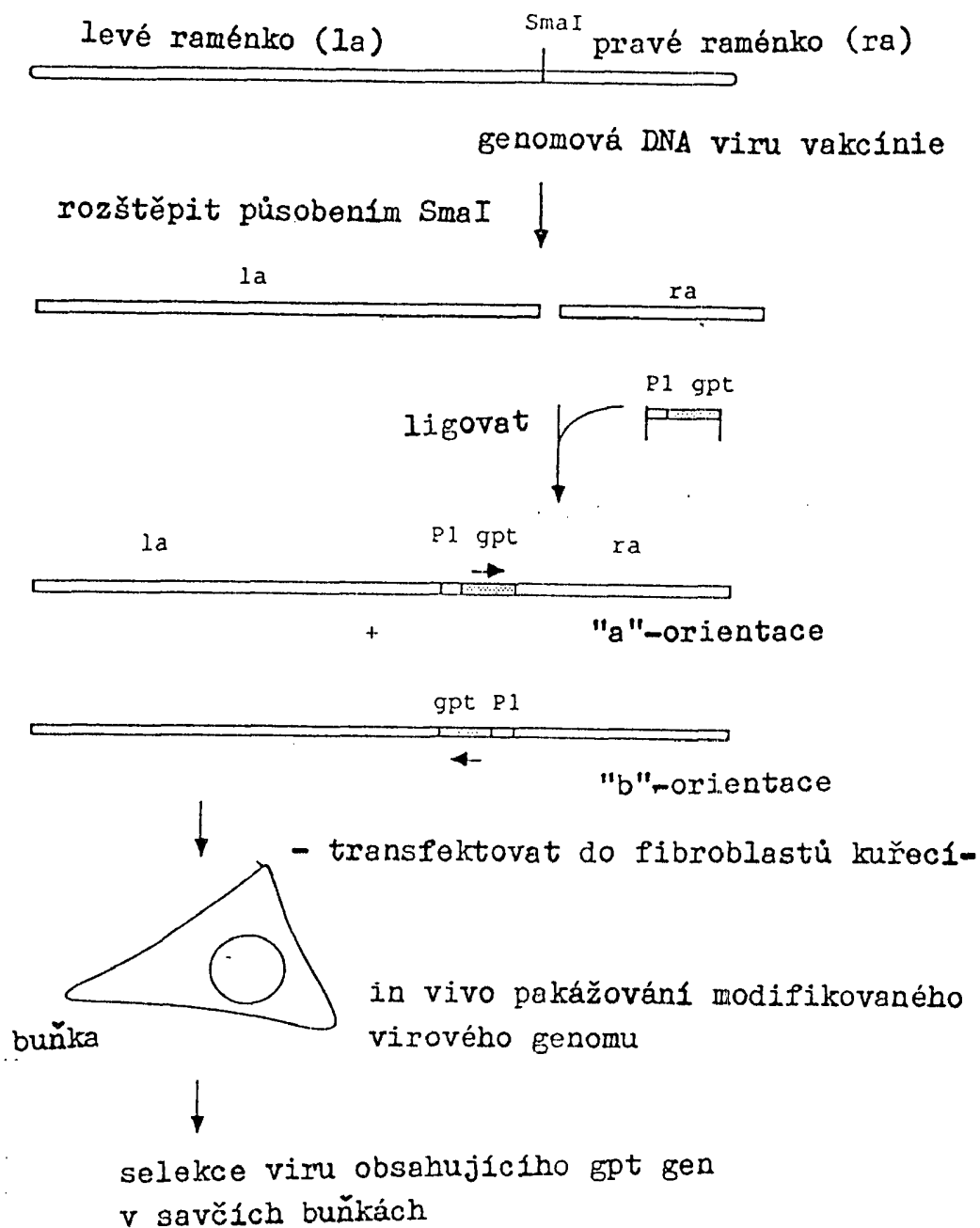
Obrázek 2.2

PATENTOVANÉ
PRAHA

Kadlecová

PRIL.	ÚŘAD PRO VYHÁLEZY A OBJEVY	DOŠLO 23. X. 92	č.j. 159732
-------	----------------------------------	--------------------	----------------

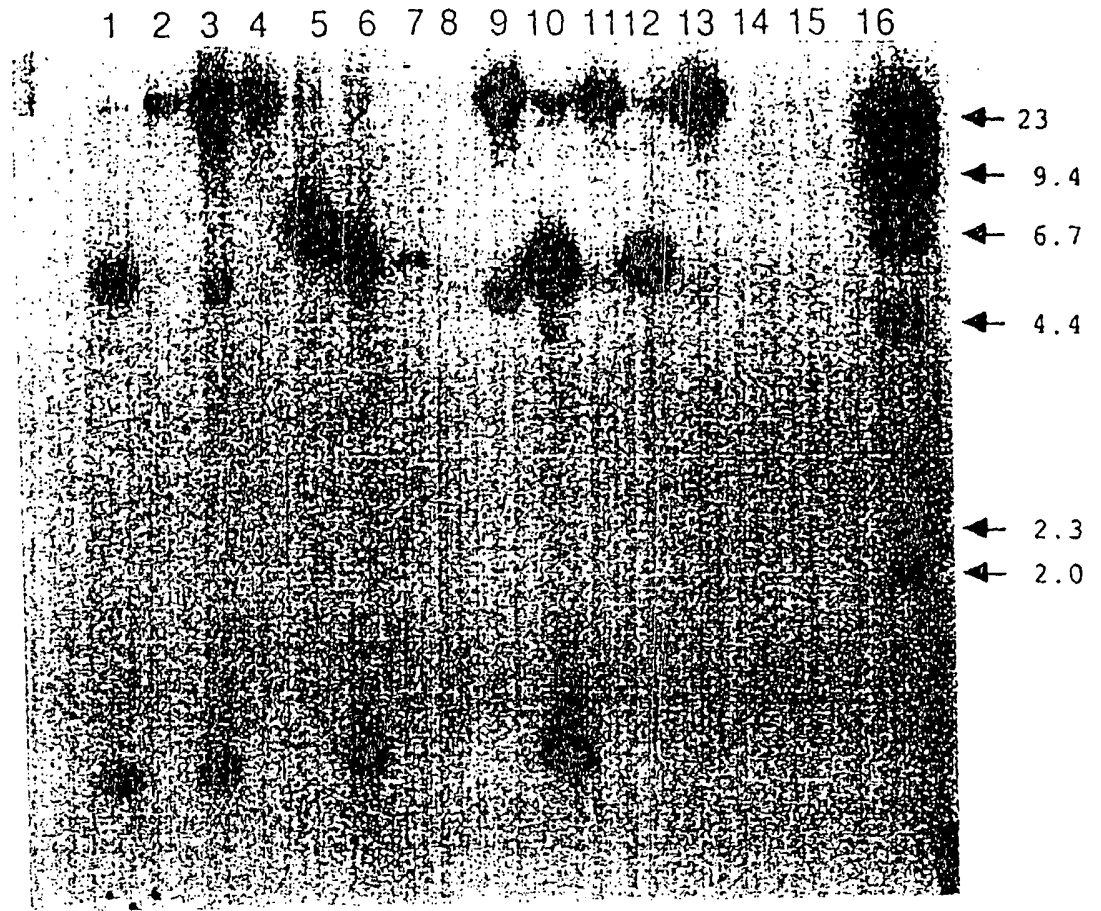
PV 2641-92



Obrázek 3.1

PATENTSERVIS
PRAHA

Radkiewicz

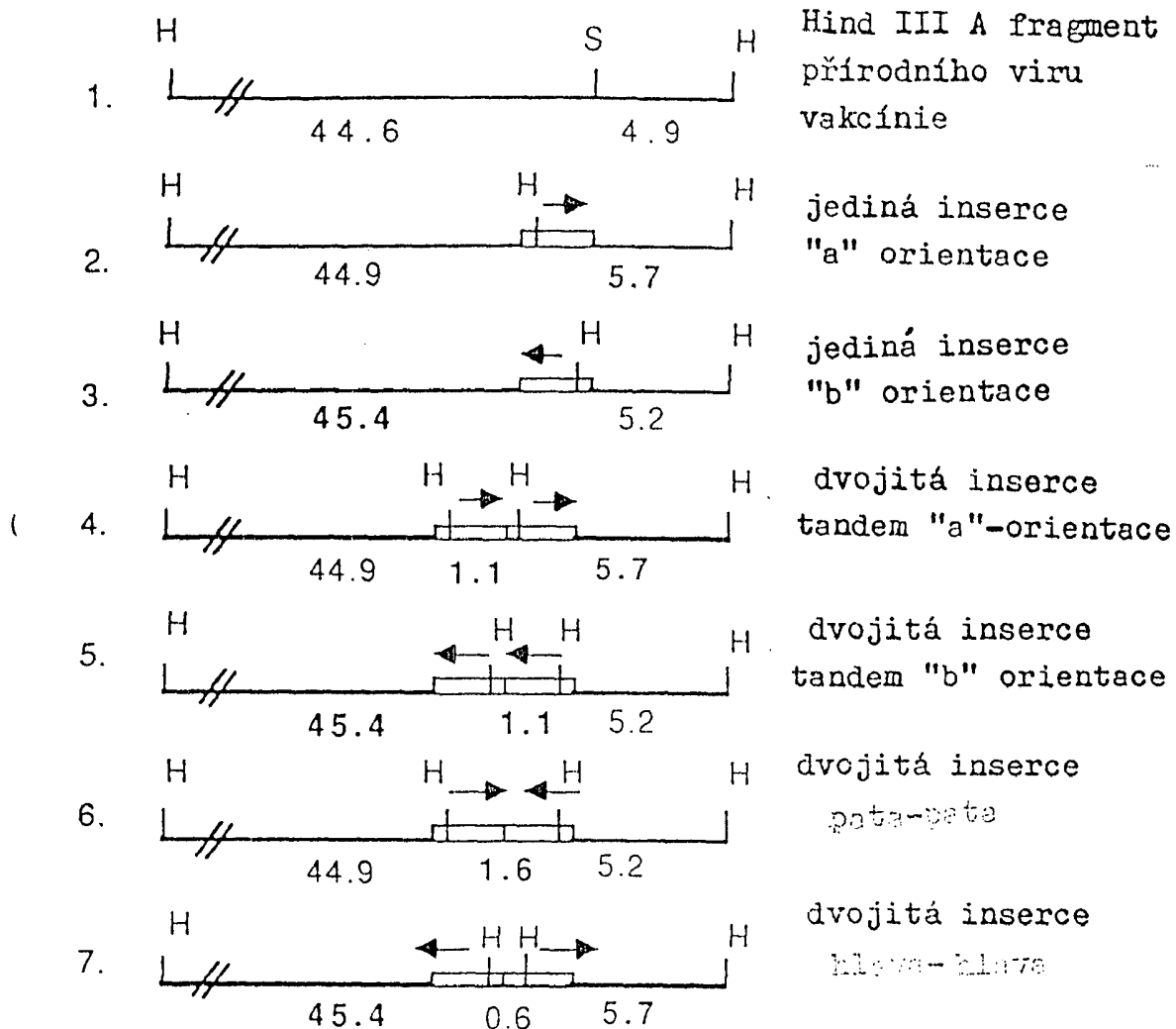


Obrázek 3.2

č.j.	059732	POSLO	23. X. 92	ÚŘAD PRO VYVÁNĚZKY A OBJEVY	PŘIL
------	--------	-------	-----------	-----------------------------------	------

**PATENTSERVIS
PRAHA**

Kadlec

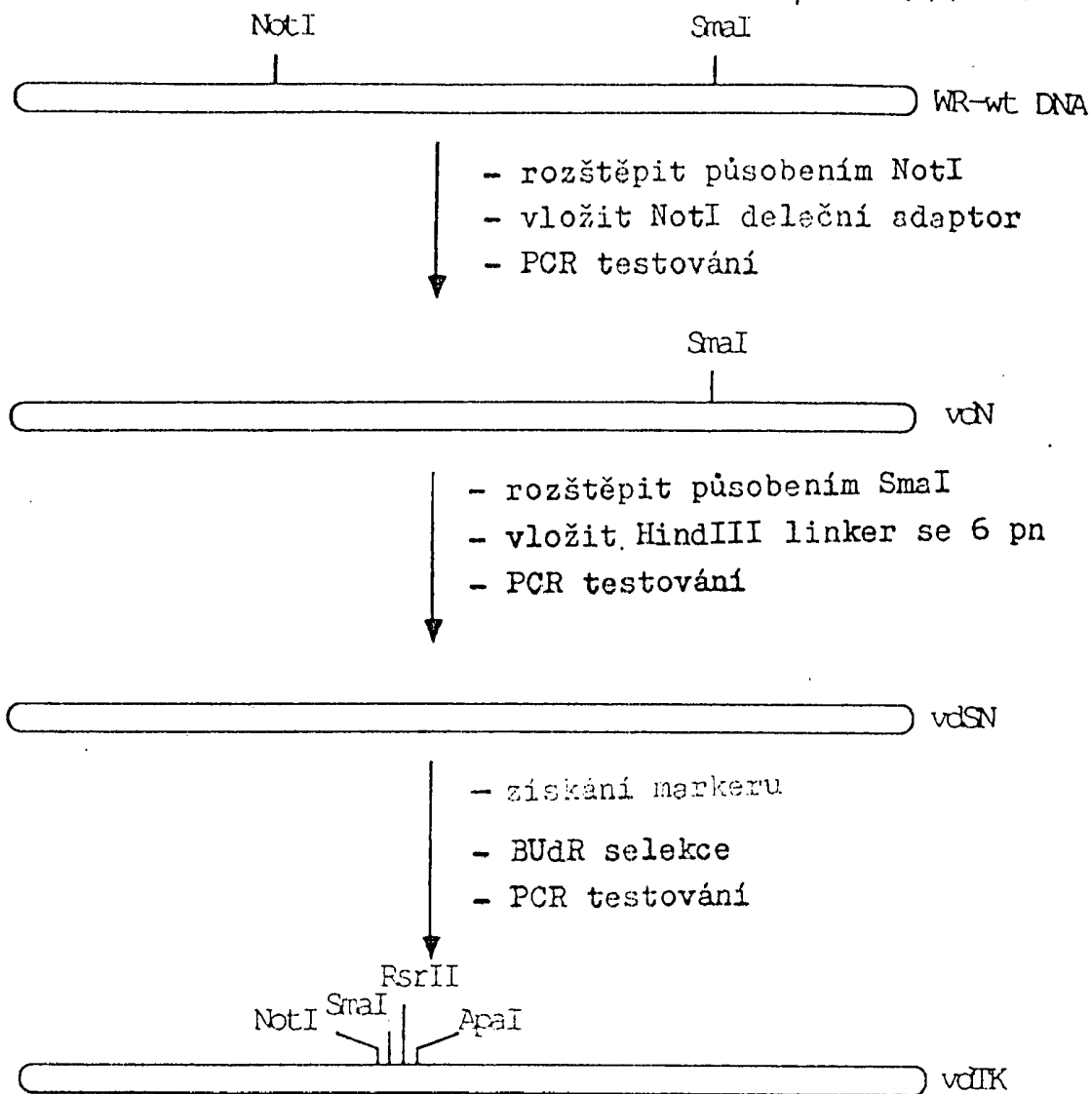


Obrázek 3.3

č.j.	0 5 9 7 3 2	01500	23. X. 92
ÚŘAD PRŮMYŠLENÉHO VÝZKUMU A VÝVOJE			
PŘÍL.			

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

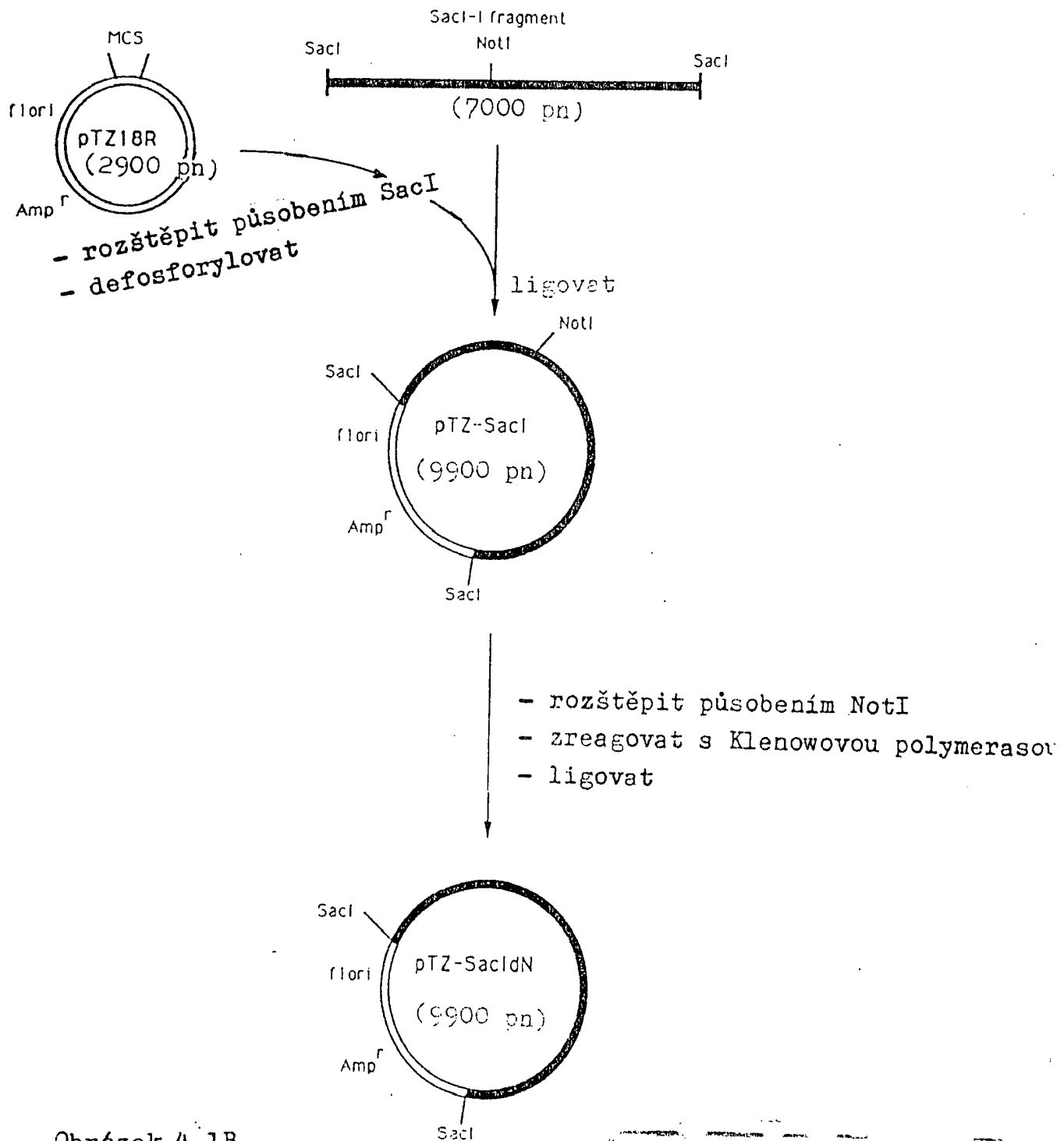


Obrázek 4.1A

číslo	059732	datum	23. X. 92
úřad	ÚŘAD	pro vynálezy	A OBJEVY
podpis		pečet	

**PATENTSERVIS
PRAHA**

Kadlec



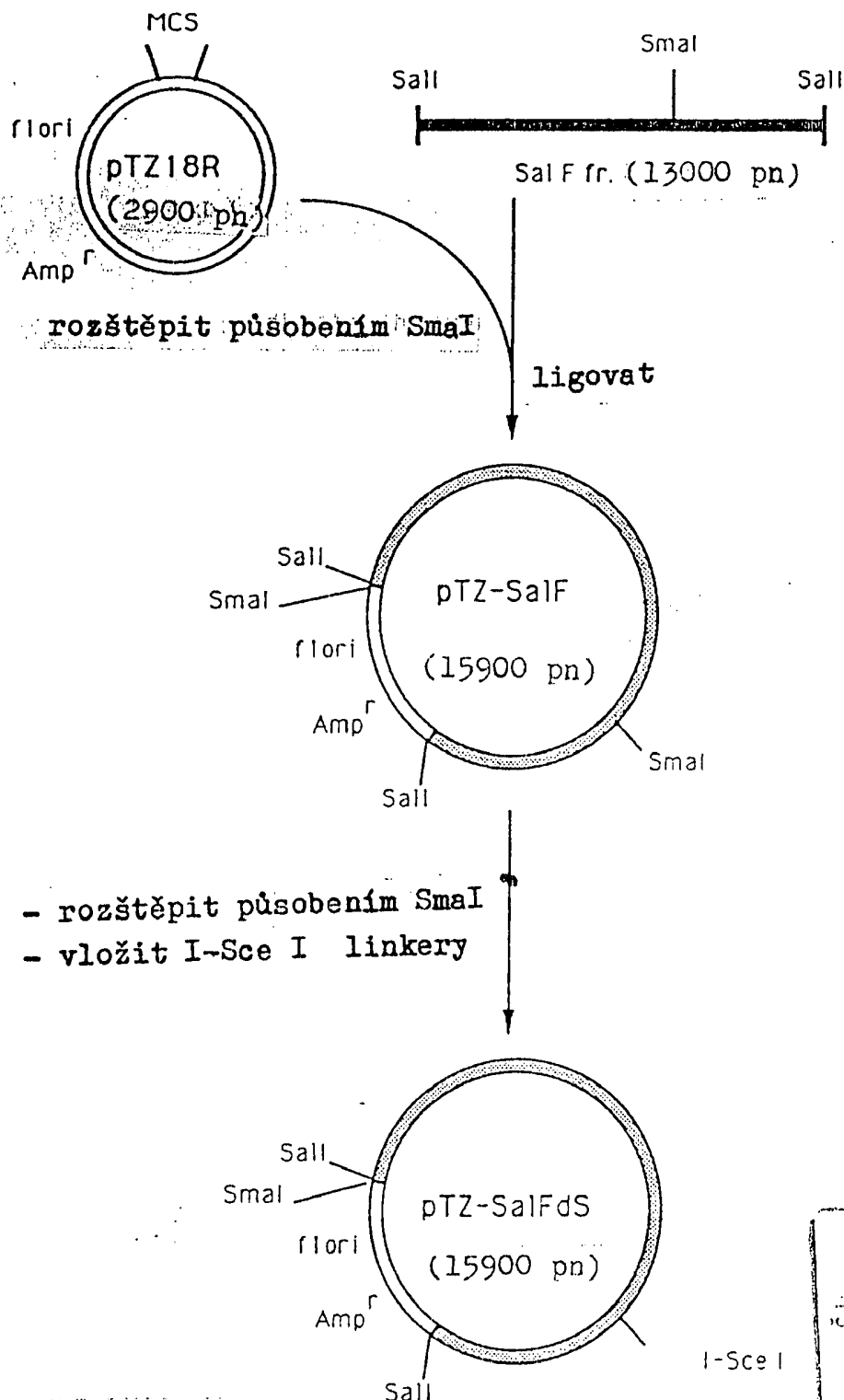
Obrázek 4.1B.

č.j.	059732	0250	23. X. 92	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBEJEVY	PÁUL
------	--------	------	-----------	-----------------------------------	------

PATENTSERVIS
PRAHA

Kudlincová

Konstrukce plasmidu pTZ-SalFH



- rozštěpit působením SmaI
- vložit I-Sce I linkery

Obrázek 4.1C

I-Sce I

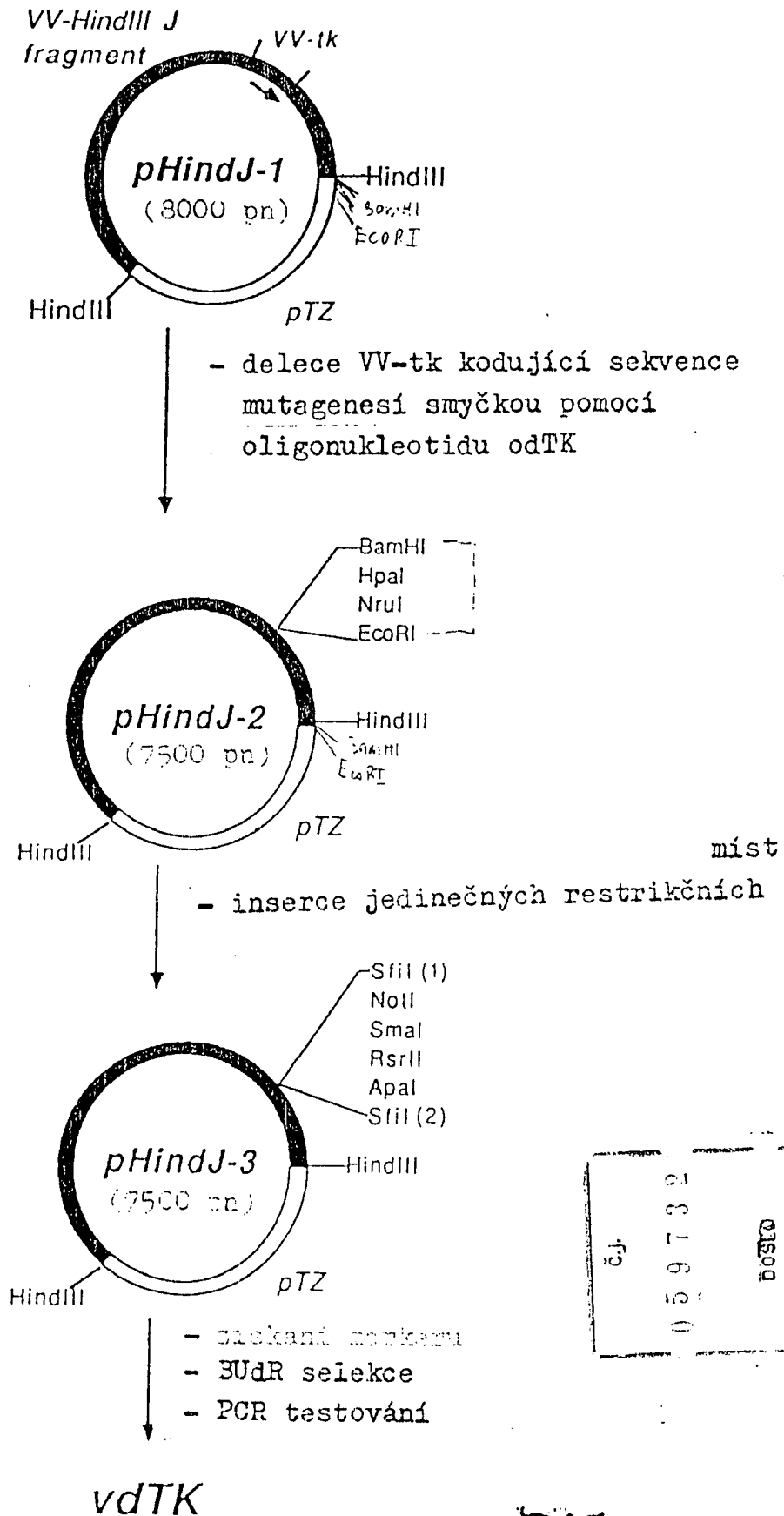
059732	059732	23 X 92
--------	--------	---------

ÚŘAD PRŮVĚRY A OBJEVY PŘÍL.

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlecová

Konstrukce plasmidu pHind J-3



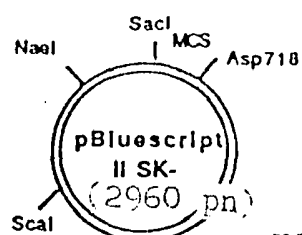
č.j.	0 5 9 7 3 2	DOŠLO	2 3 X 9 2	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
------	-------------	-------	-----------	----------------------------------

Obrázek 4.2

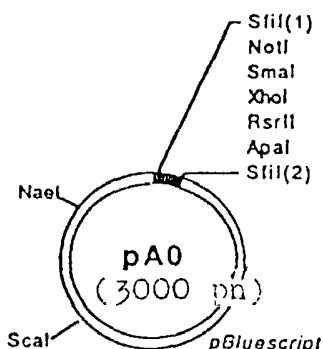
**PATENTSERVIS
PRAHA**

Kadlecová

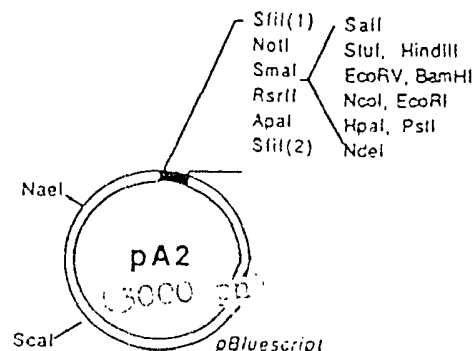
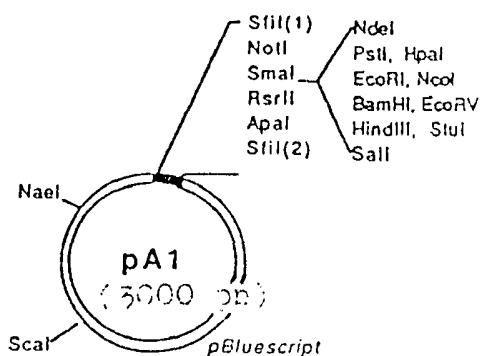
Konstrukce plasmidů pA1 a pA2



- rozštěpení působením SacI a Asp718
- nahrazení násobného klonovacího místa pBluescript II SK adaptorem sestávajícím z oligonukleotidů P-A(0.1) a P-A(0.2)



- rozštěpit působením XhoI
- vložit adaptor sestávající z oligonukleotidů P-A(1.1) a P-A(1.2)
- izolovat obě orientace



Obrázek 4.3

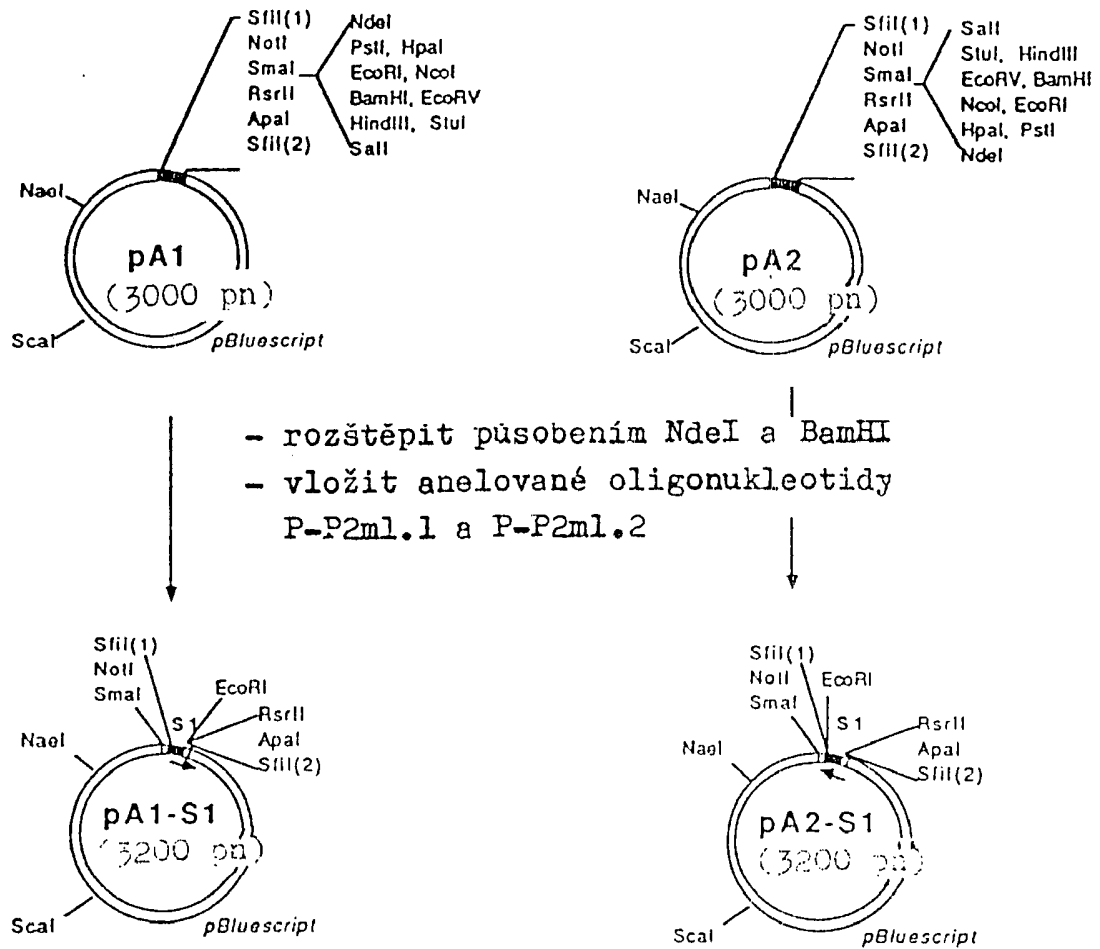
Čj.	0 5 9 7 3 2	DOŠLO	23. X. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY			

**PATENTSERVIS
PRAHA**

Kadlec

Konstrukce plasmidů pA1-S1 a pA2-S2

A)



B)

Struktura promotoru S1:

TACGGCTTGG TATAGCGGAC AACTAAGTAA TTGTAAGAA GAAACGAAA CTATCAAAAC CGTTTATGAA
 ATGATAGAAA AAAGAATATA AATAATCCTG TATTTTAGTT TAAGTAACAG TAAAATAATG AGTAGAAAAAT
 ACTATTTTTT ATAGCCTATA AATCATGAATTCG

EcoRI

→

Č.j.	059732	DOŠLO	23 X 92	URAD	PRO VYNALEZY	A OBJEVY	PŘIL.
------	--------	-------	---------	------	--------------	----------	-------

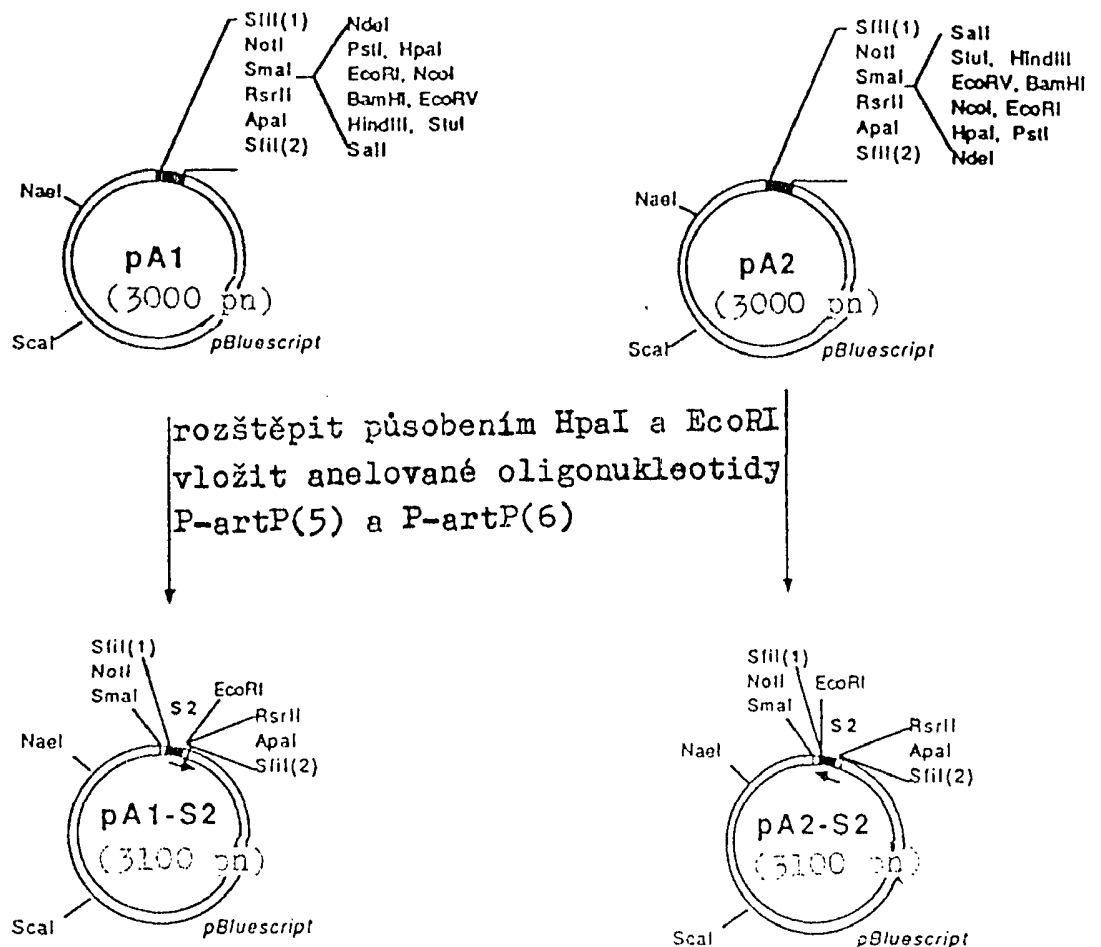
Obrázek 4.4

PATENTSERVIS
 PRAHA

Kadlec

Konstrukce plasmidů pA1-S2 a pA2-S2

A)



B)

Struktura promotoru S2:

GGGAAGCTTT TTTTTTTT TTTTTTGGC ATATAAATAG GCTGCAGG AATTC
PstI EcoRI
vektor DNA

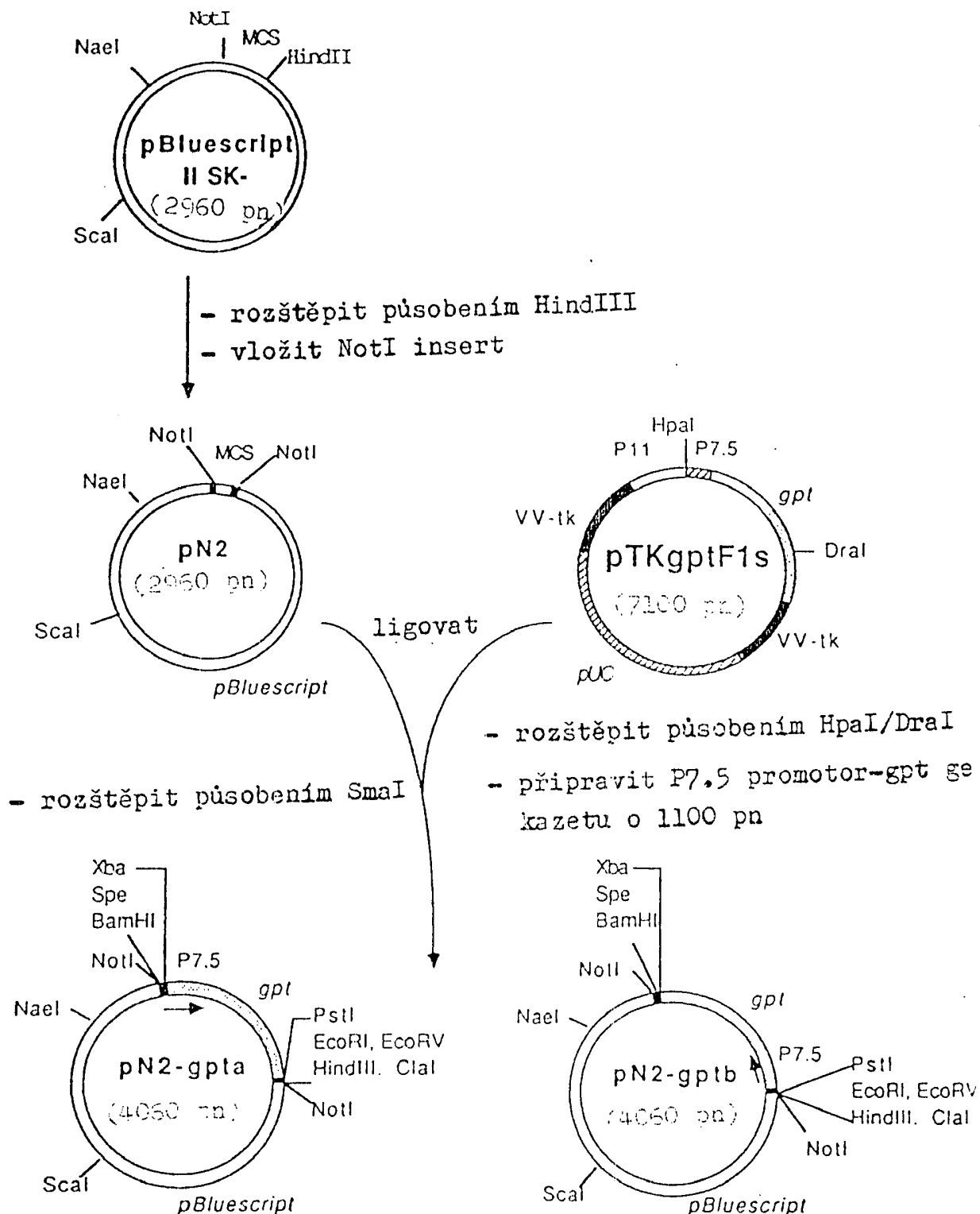
Obrázek 4.5

č.j.	059732	POSLO	23. X. 92	URAD	PRO VYNALEZY	A OBJEVY	PAT.
------	--------	-------	-----------	------	--------------	----------	------

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

Konstrukce plasmidů pN2-gpta a pN2-pn2-gptbb



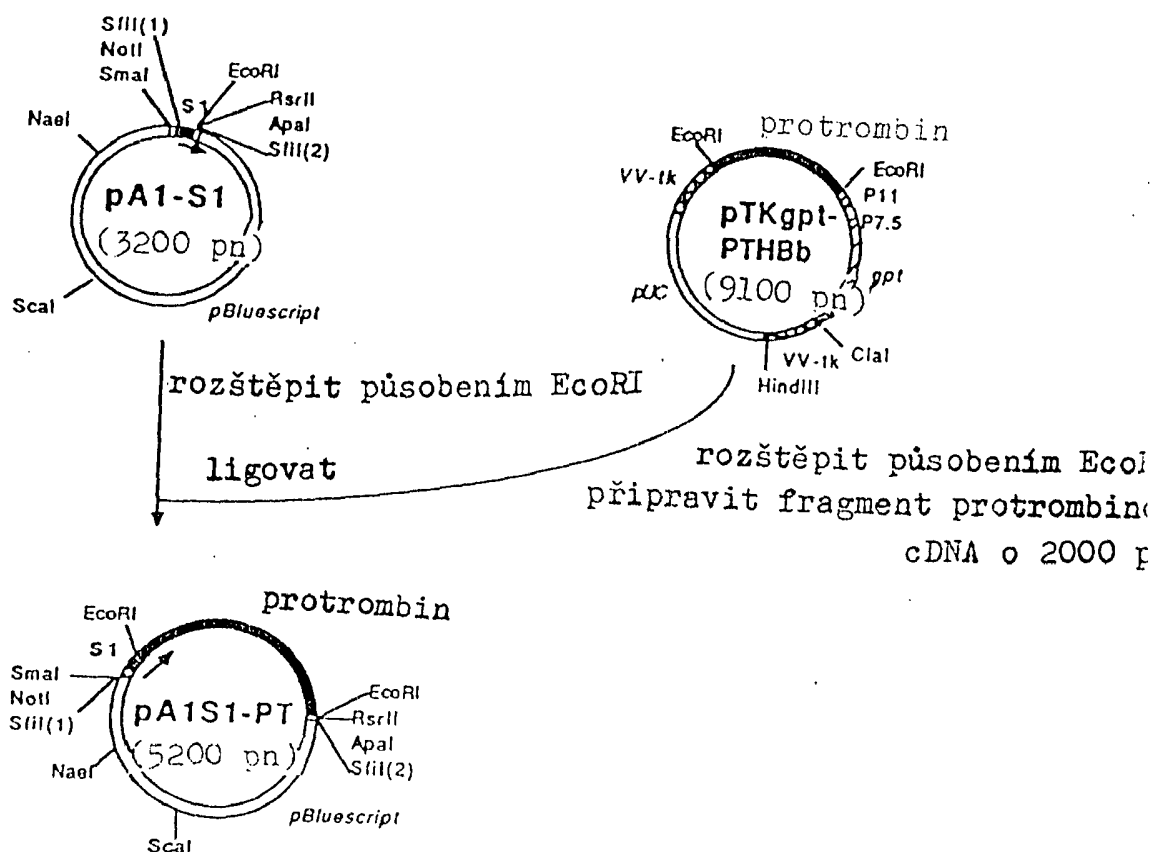
Obrázek 4.6

Čj.	0 5 9 7 3 2	DOŠLO	23. X. 92	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PÁŘ.
-----	-------------	-------	-----------	----------------------------------	------

PATENTSERVIS
PRAHA

Radice

Konstrukce plasmidu pA1S1-PT



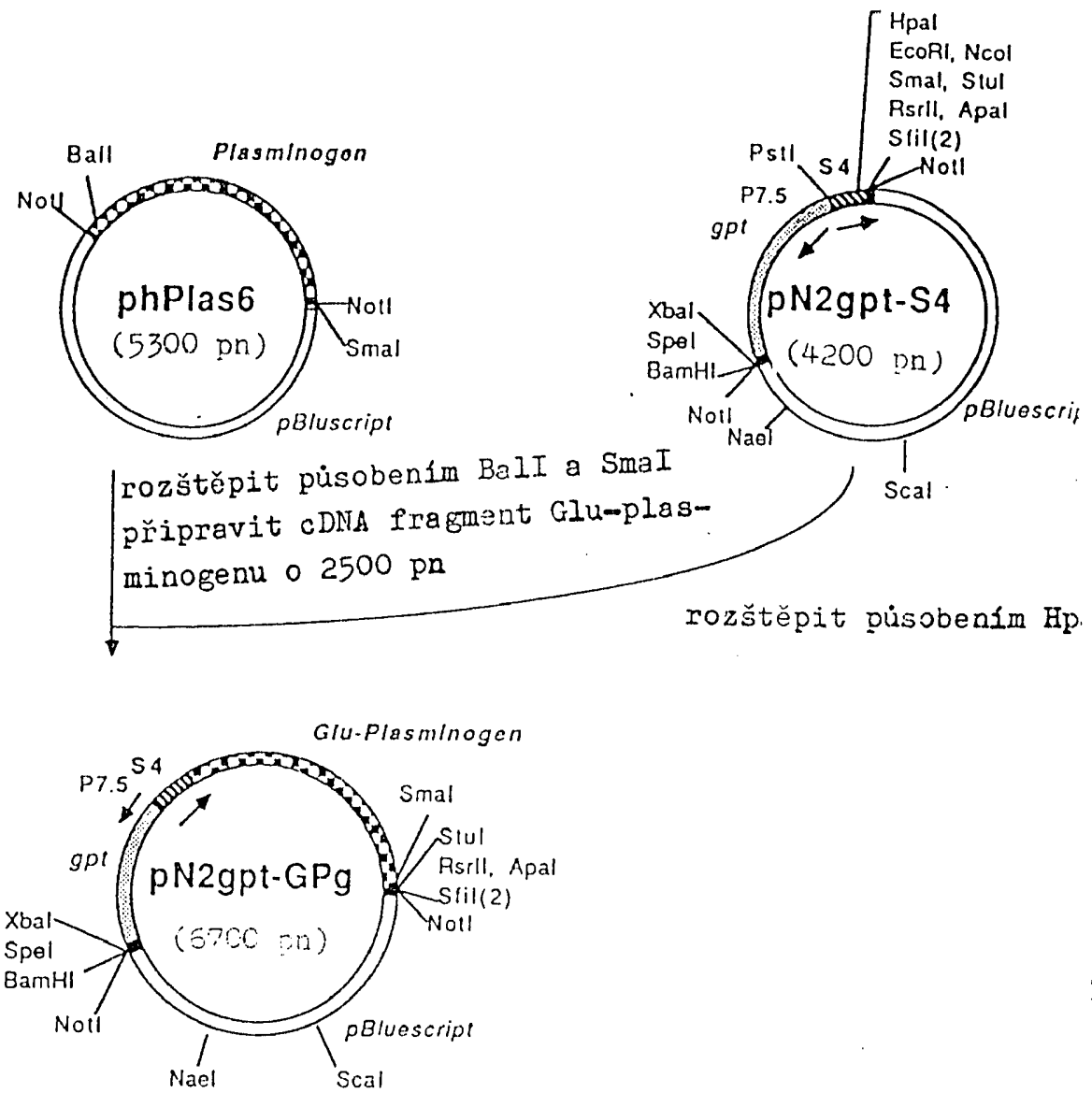
Obrázek 5.1

č.j.	059732	01500	23. X 92	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	příl.
------	--------	-------	----------	----------------------------------	-------

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

Konstrukce plasmidu pN2gpt-GPg



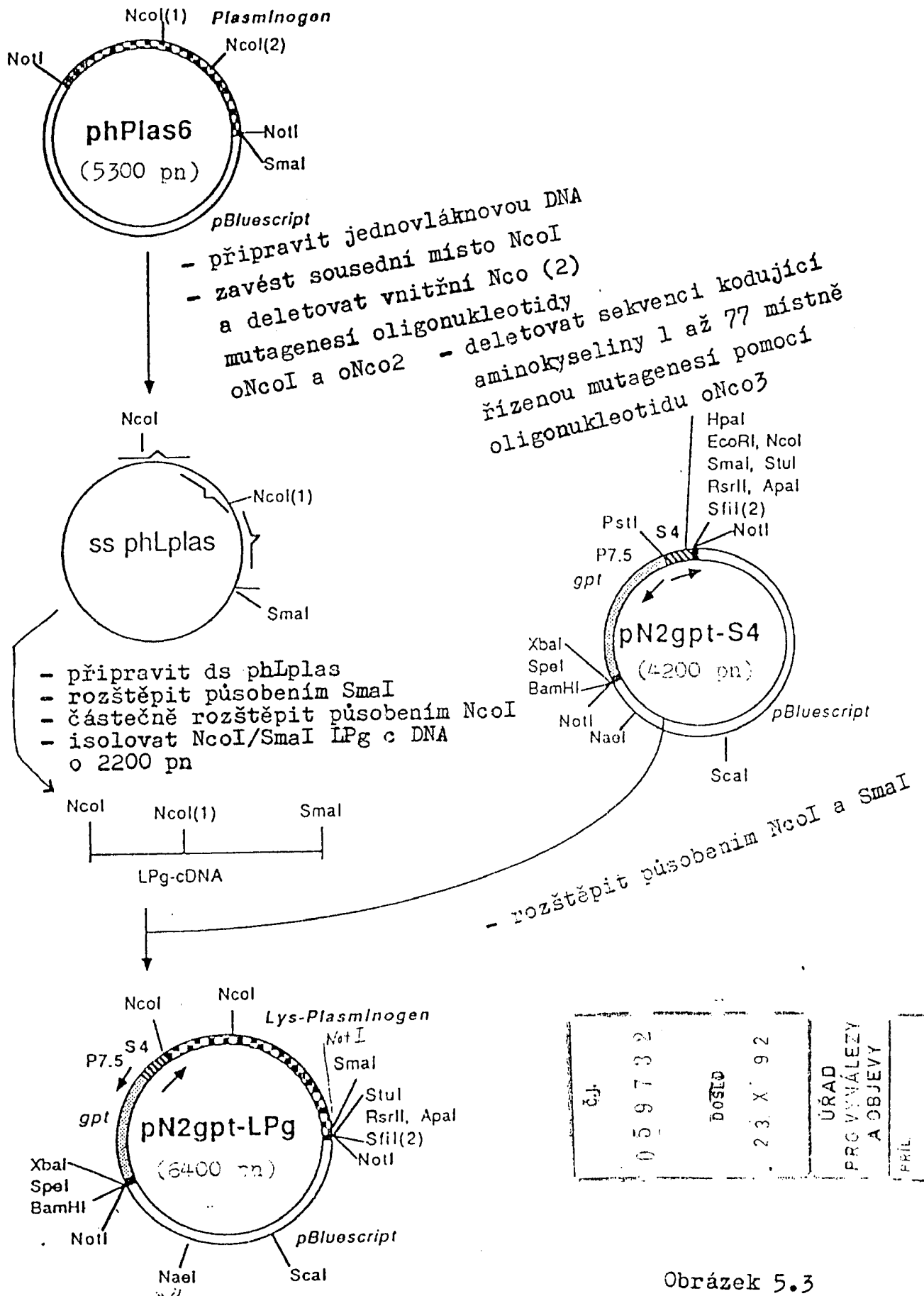
Obrázek 5.2

č.j.	0 5 9 7 3 2	došlo	23. X. 92	ÚŘAD PRO VYHLEDÁVÁNÍ A OBJEVY
------	-------------	-------	-----------	-------------------------------------

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

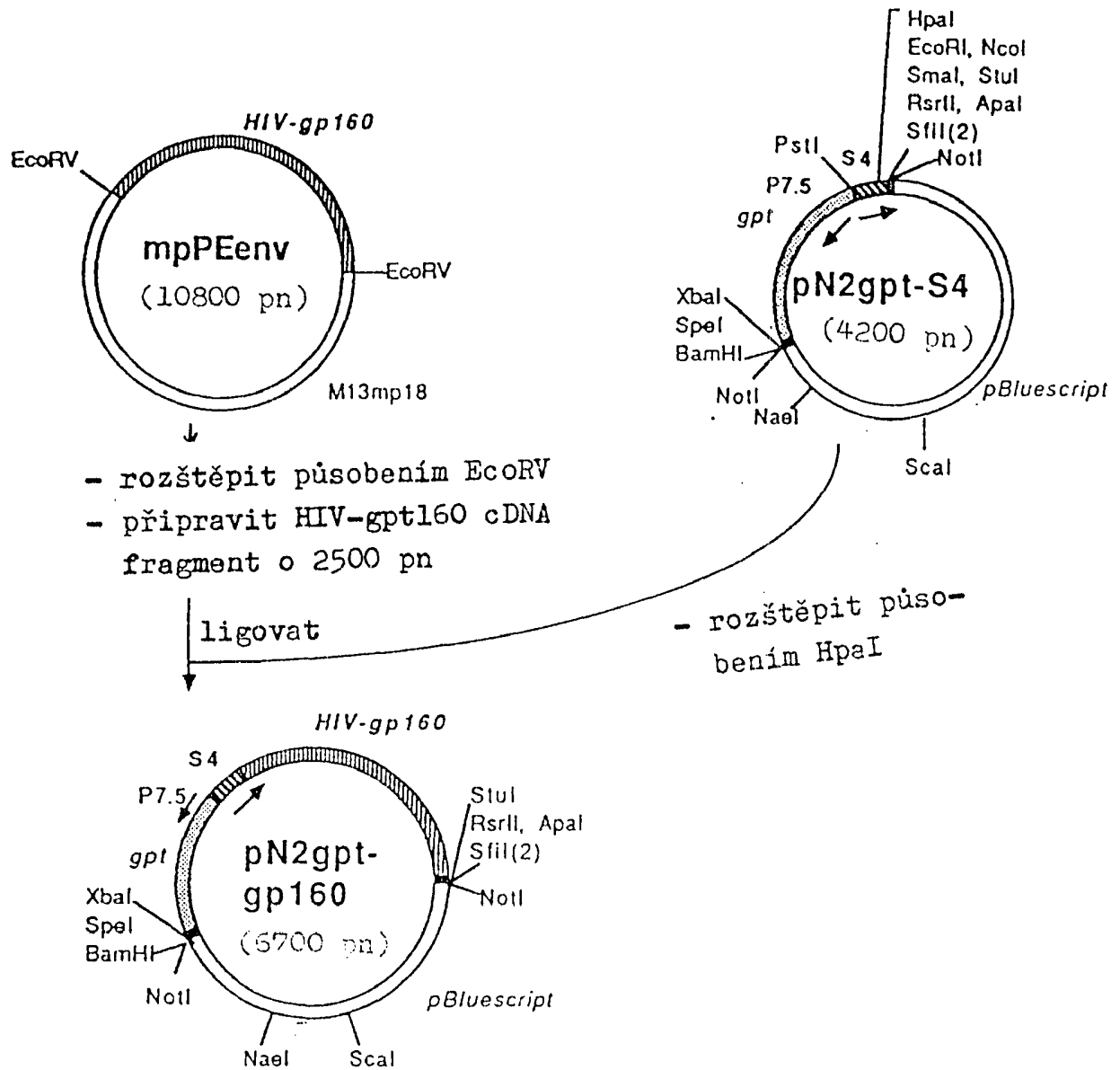
Konstrukce plasmidu pN2gpt-LPg



č.j.	0 5 9 7 3 2	došlo	2 3 X 9 2	ÚŘAD PRO VYVÁLEZY A OBJEVY	PRIL
------	-------------	-------	-----------	----------------------------------	------

Obrázek 5.3

Konstrukce plasmidu pN2gpt-gpt60



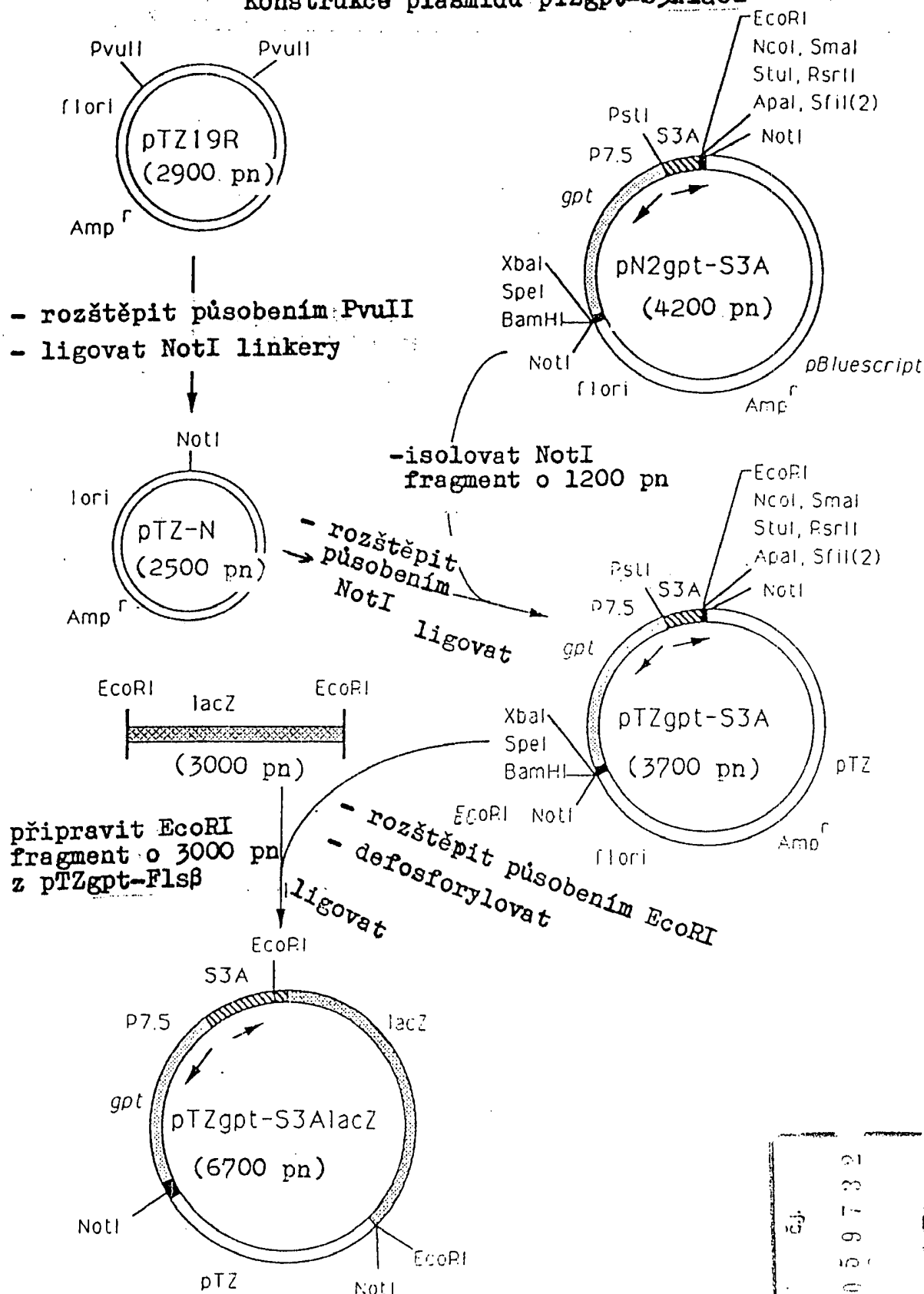
Obrázek 5.4

č.j.	0 5 9 7 3 2	božlo	23. X. 92	ÚŘAD PRO VYHÁLEŽKY A OBJEVY	PRIL.
------	-------------	-------	-----------	-----------------------------------	-------

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

Konstrukce plasmidu pTZgpt-S3AlacZ



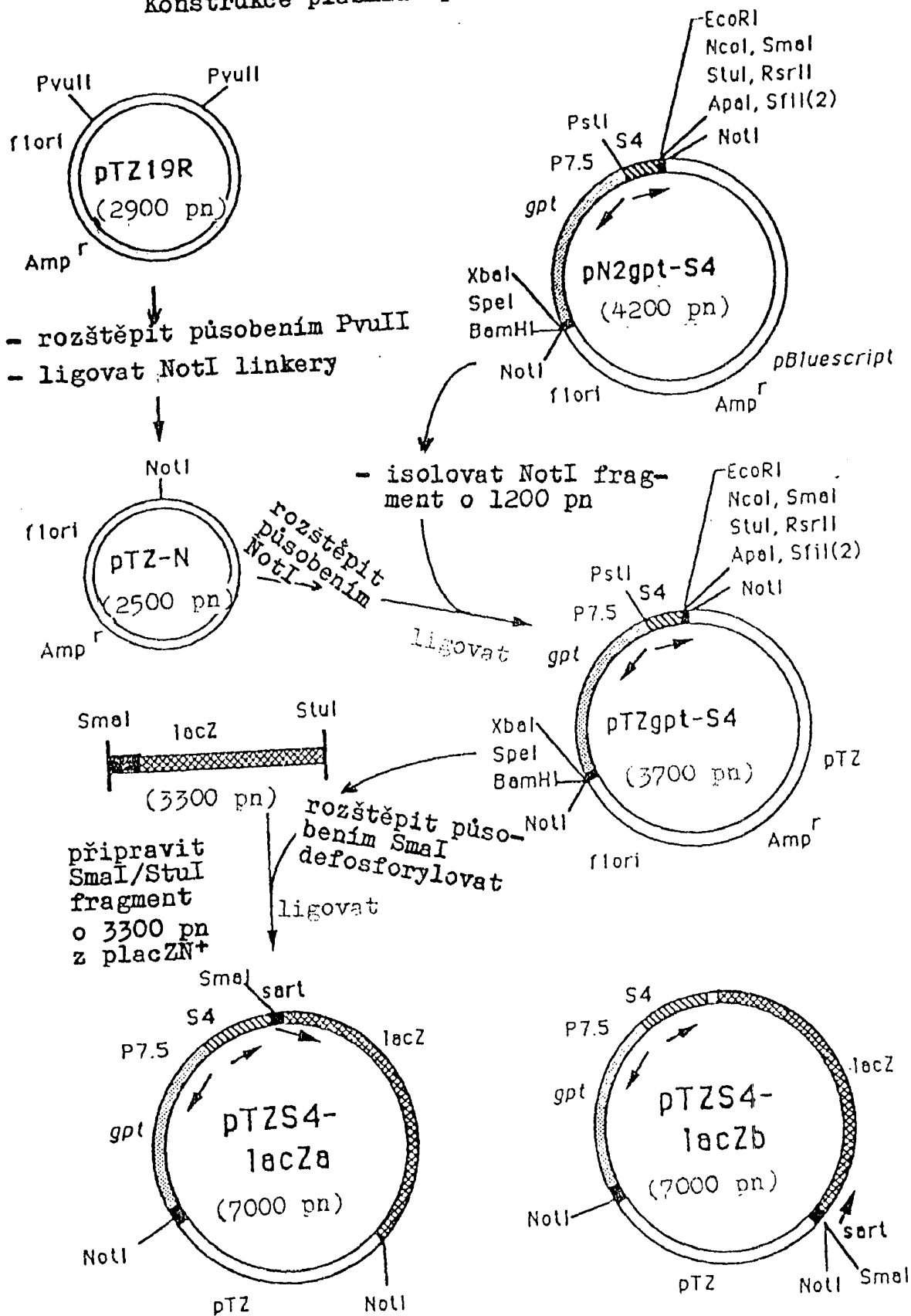
Obrázek 5.5

č.j.	0 5 9 7 3 2	DOŠLO	23. X. 92	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PŘIL.
------	-------------	-------	-----------	----------------------------------	-------

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlecová

Konstrukce plasmidů pTZS4-lacZa/b



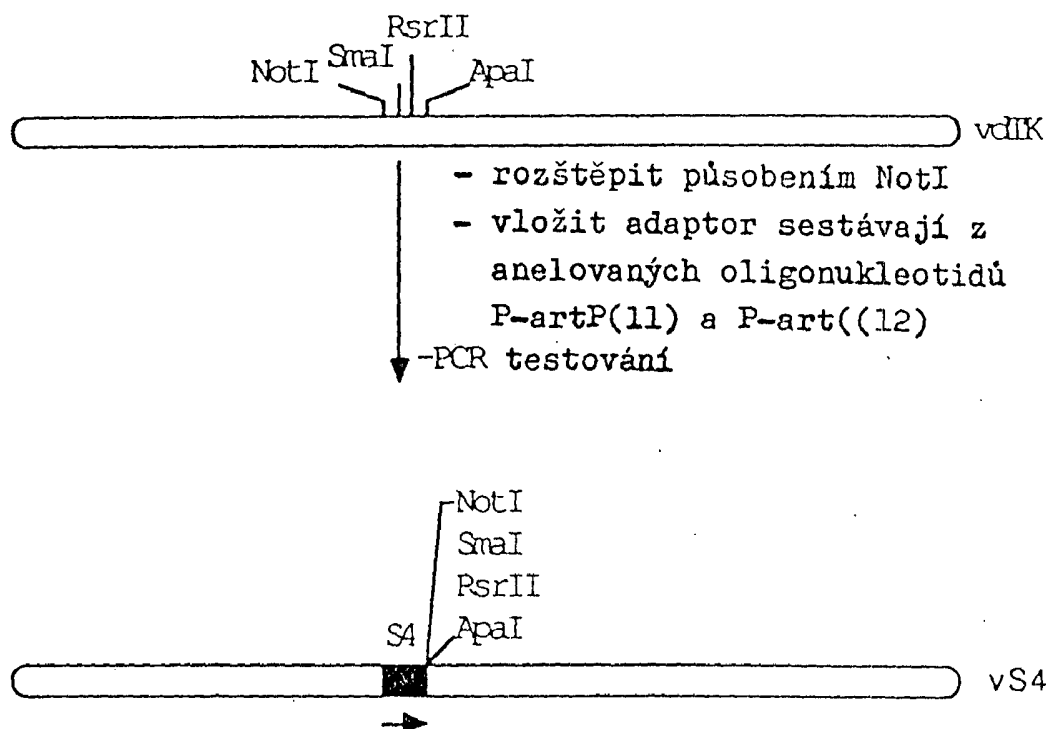
Číslo	0 5 9 7 3 2	ROZLO	23 X 92	ÚŘAD PRO VYHLEDÁVÁNÍ A OBJEVY	PŘÍL.
-------	-------------	-------	---------	-------------------------------	-------

Obrázek 5.6

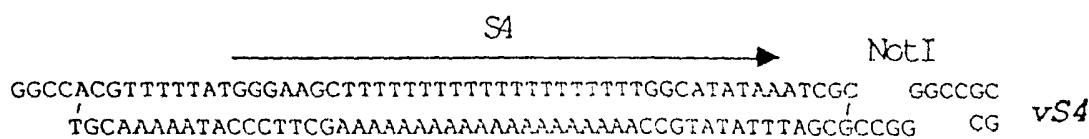
PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlecová

Konstrukce VV vektoru vS4



Struktura promotor-adaptoru v vS4

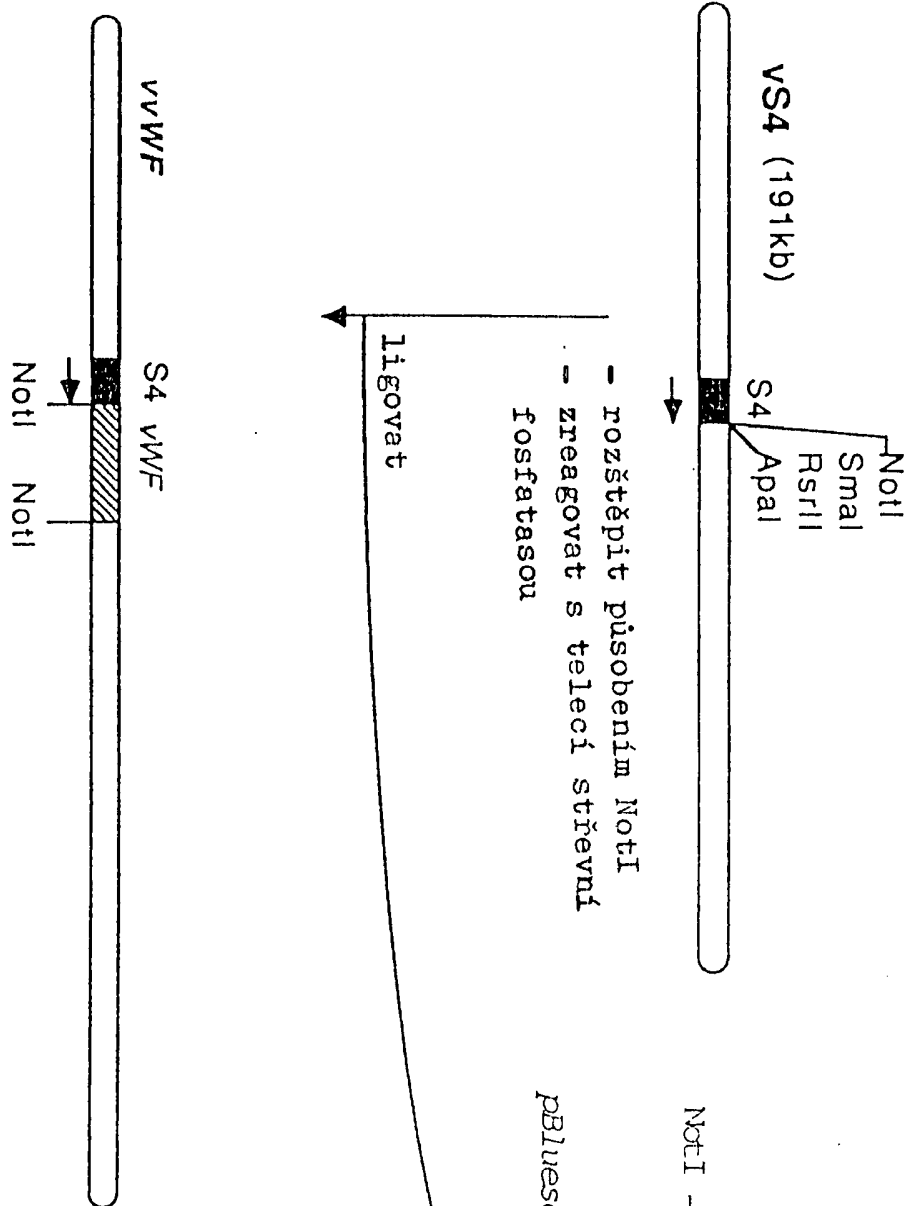


Obrázek 6.1

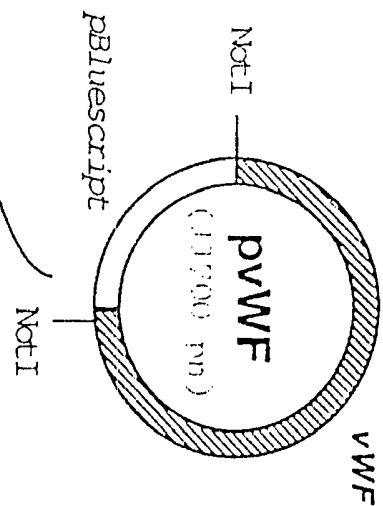
54	059732	0030	23 X 92	ÚŘAD PRO VYVÁLEZY A OBJEVY PŘÍC.
----	--------	------	---------	---

PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlecová



- rozštěpit působením NotI
- připravit vWF cDNA fragment o 8500 pb

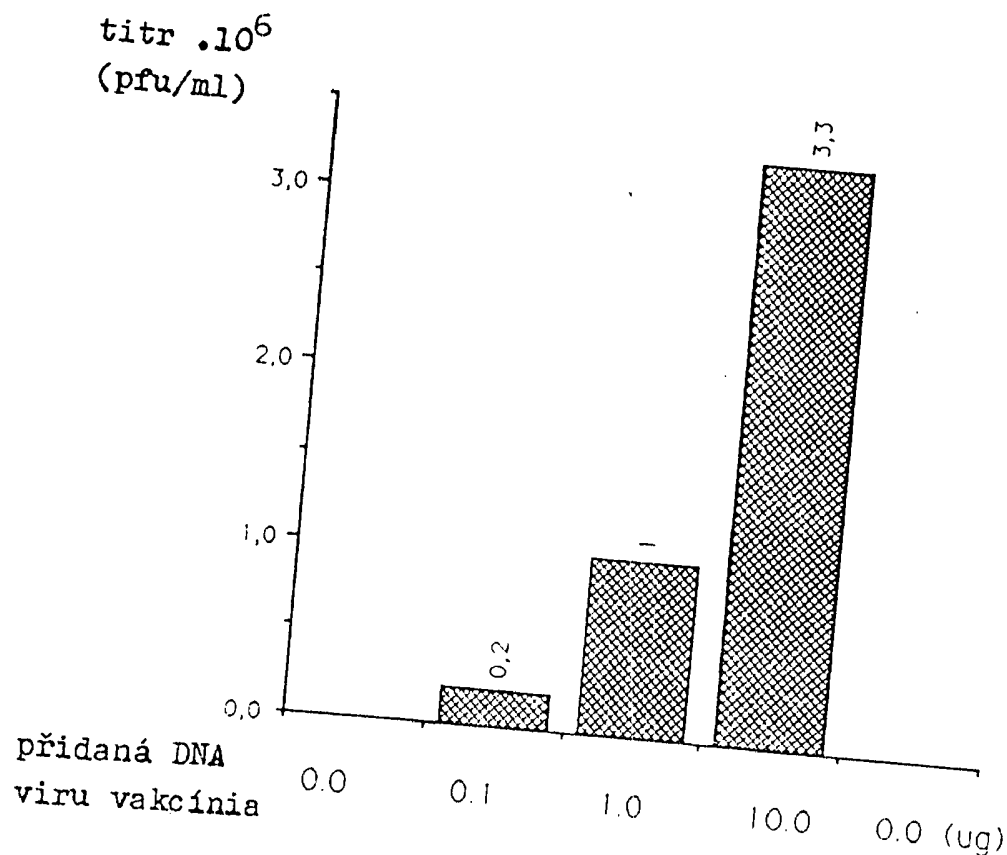


PATENTSERVIS
PRAHA

Ladislav

Obrázek 6.2

Číslo	26 X 92
Objekt	01500
Úřad	23760
Pracoviště	13



in vivo pakážování DNA viru vakcínae
s virem drůbežích neštovic v savčích
bunčkách (CV-1)

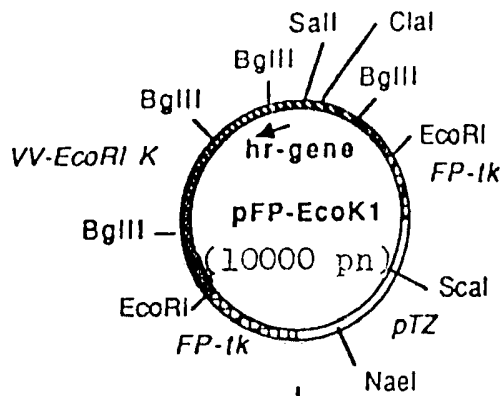
Obrázek 7.1

č.j.	0 5 9 7 3 2	posl.	23. X. 92	ÚŘAD PRO VYVÁLEŽY A OBJEVY	PŘIL.
------	-------------	-------	-----------	----------------------------------	-------

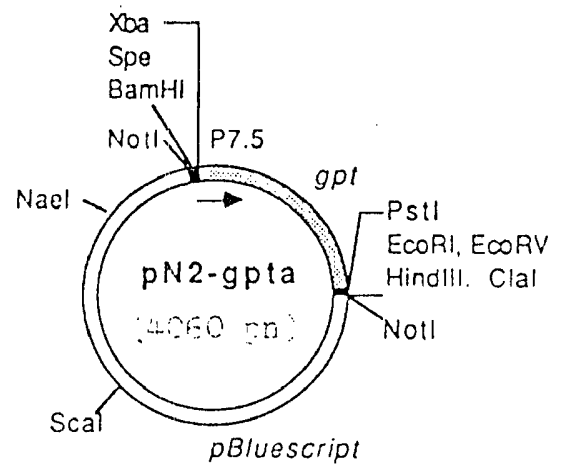
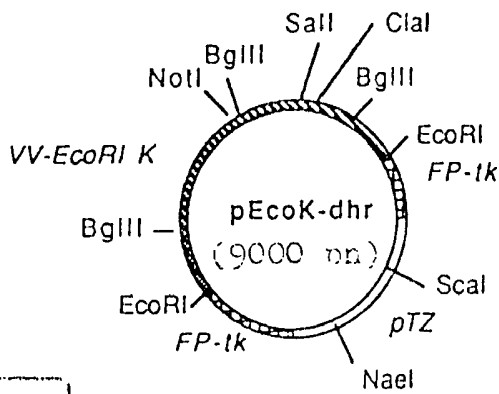
PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlecová

Konstrukce plasmidu pEco-dhr

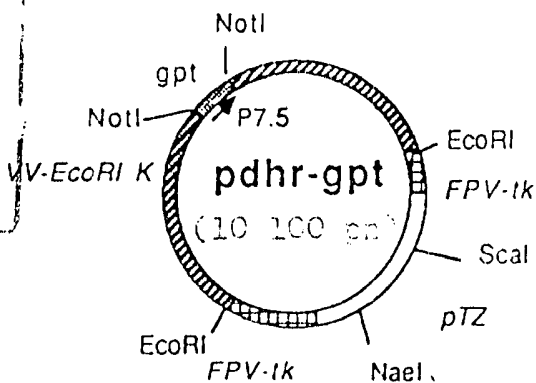


- izolovat jednovláknovou DNA
- smyčková mutagenese oligonukleotidem P-hr(3)



- rozštěpit působením NotI

- rozštěpit působením NotI
- připravit kazetu P7.5/gpt gen o (1100 bp)



cliskání novkernu

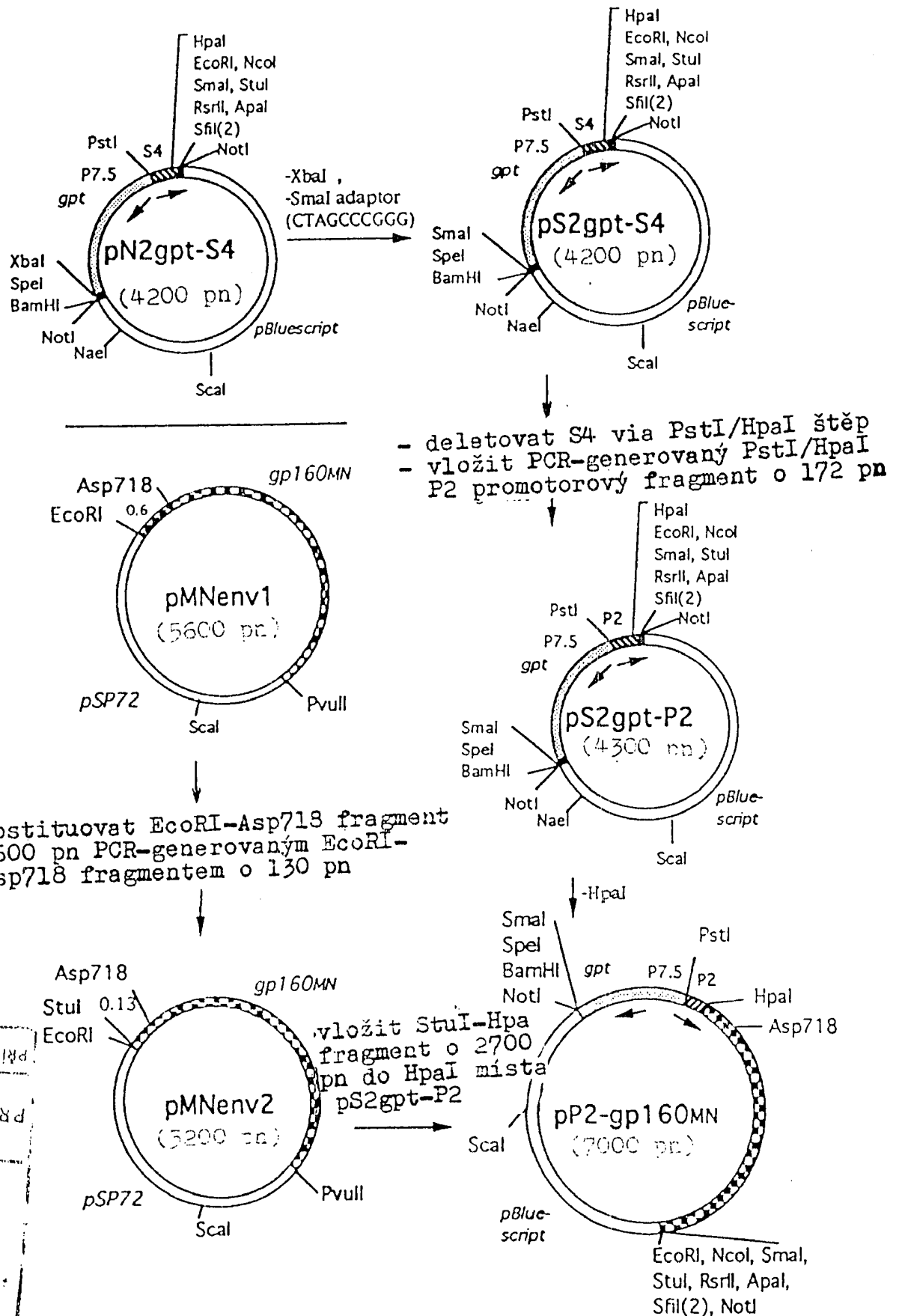
vdhr

Obrázek 8.1

PATENTSERVIS
PRAHA

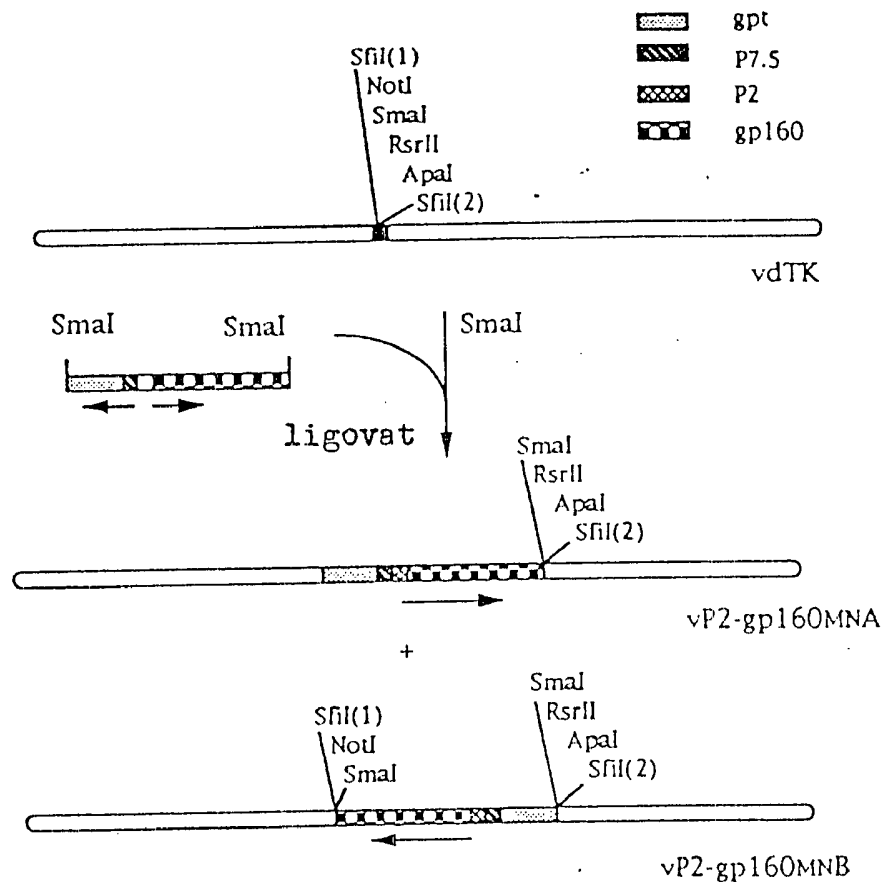
Kadlecova

Konstrukce plasmidů pS2gpt-P2 a pp2gpt160MN



Obrázek 9.1/1 CIP DMC

Konstrukce chimerních virů
vP2-gp160MNA a vP2-gp160MNB



Obrázek 9.2/1 CIP DMC

Schematický nástin konstrukce virů
vP2-gp160MN-A a vP2-gp160MN-B

č.j.	059732	DOSLO	23. X. 92	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	přil.
------	--------	-------	-----------	----------------------------------	-------

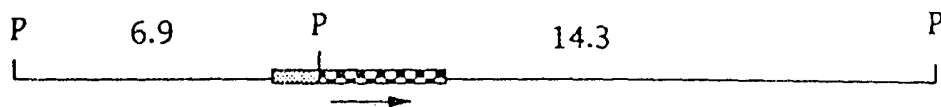
PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlec

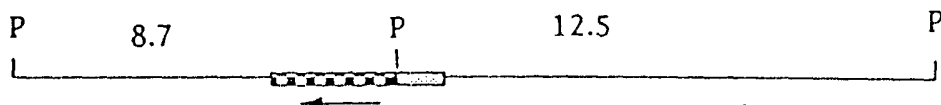
PstI-E-fragment (přirodní vir)



PstI-fragmenty v vP2-gp160MNA



v vP2-gp160MNB



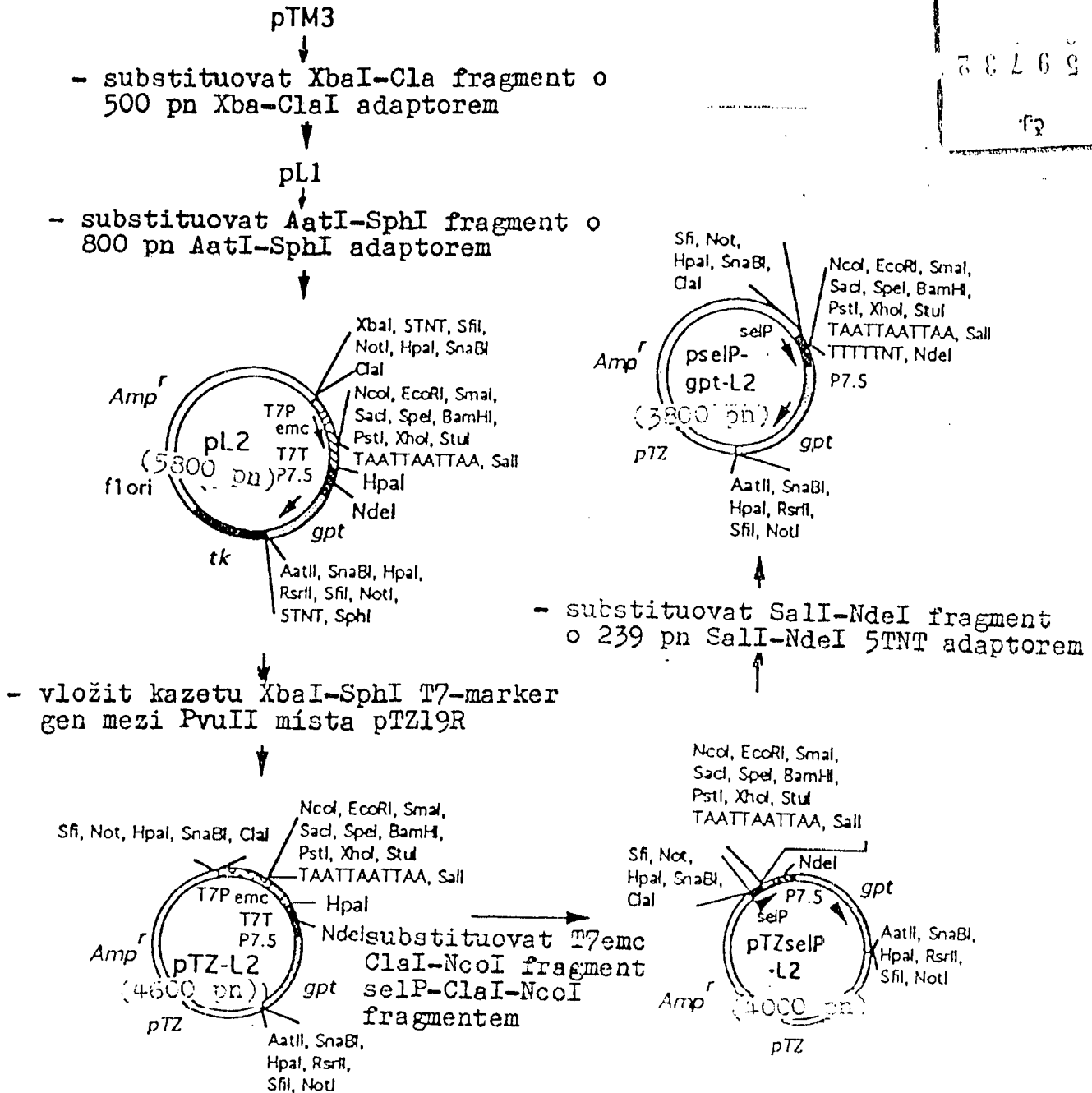
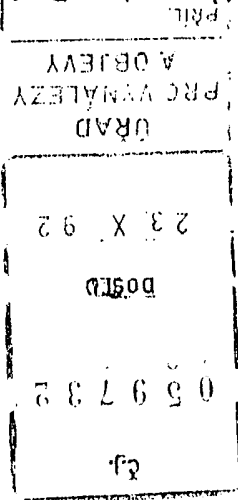
Obrázek 9.3/1 CIP DMC

Čj.	0 5 9 7 3 2	DOŠLO	23. X. 92	ÚŘAD PRŮVÁNĚLEZY A OBJEVY	PŘIL.
-----	-------------	-------	-----------	---------------------------------	-------

PATENTSERVIS
PRAHA

Kudlakov

Konstrukce plasmidů pTZ-L2, pTZselP-L2 a pselP-gpt-L2

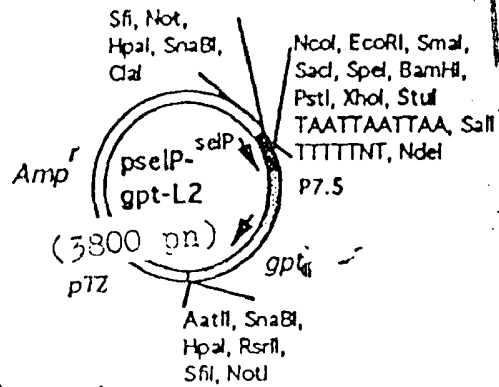
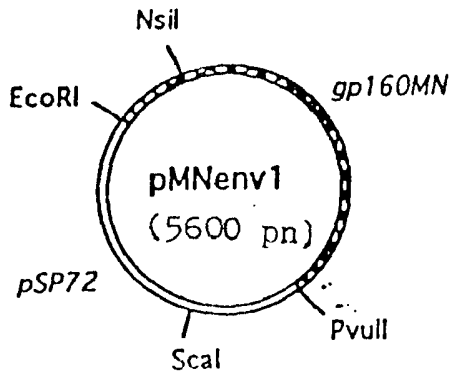


Obrázek 9.4

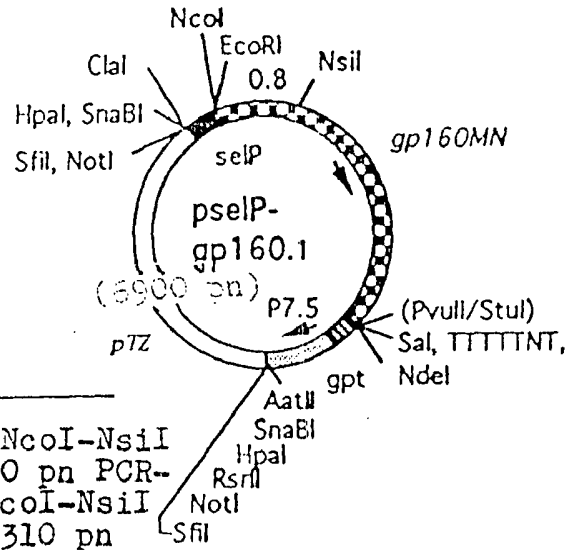
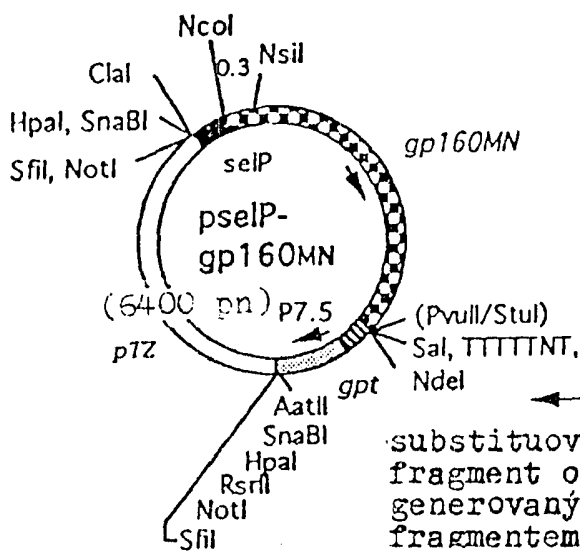
Konstrukce plasmidu pselP-gp160MN

přirodní gp160MN:

A)



vložit EcoRI-PvuII fragment o 3100 bp
pMNenv1 do EcoRI-StuI míst
pselP-gpt-L2



substituovat NcoI-NsiI
fragment o 800 bp PCR-
generovaným NcoI-NsiI
fragmentem o 310 bp

B)

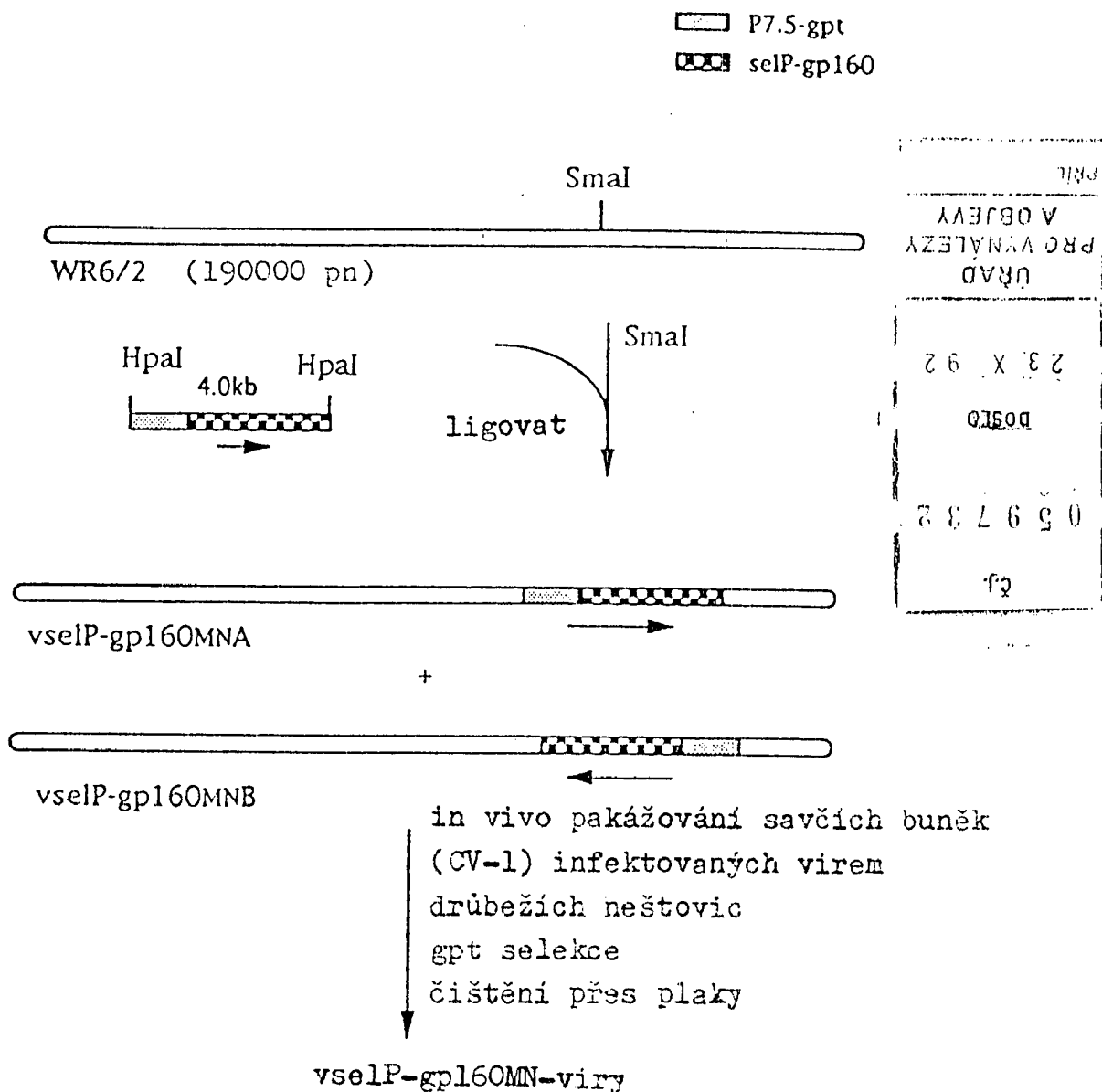
gp160MN přirodního typu:

MET ARG VAL LYS
CA ATG AGA GTG AAG

gp 160 v vselP-gp160-viru:

MET ALA VAL LYS
CC ATG GCC GTG AAG
NcoI

Konstrukce chimerních virů vselP-gp160MNA a vselP-gp160MNB

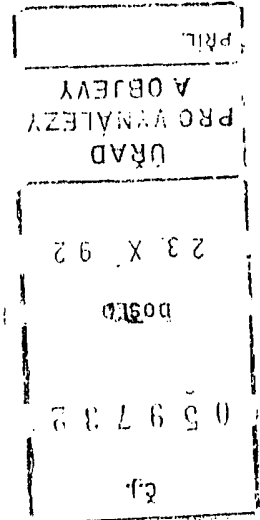
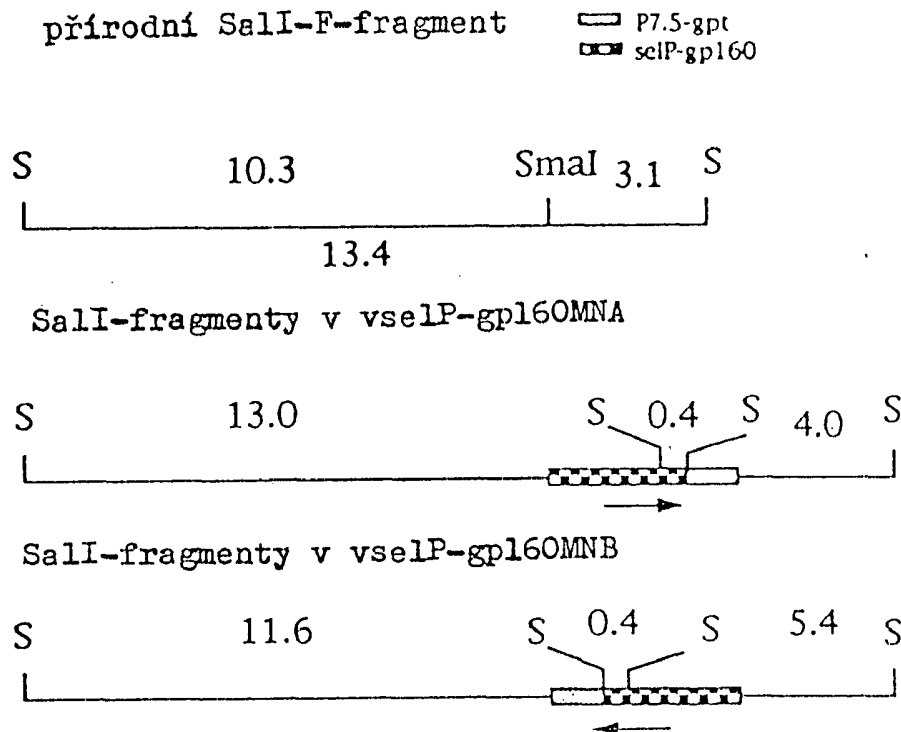


Obrázek 9.6

Schematický nástin konstrukce virů
vselP-gp160MNA a vP2-gp160MNB

PATENTOVANÉ
PRAHA

Kučera



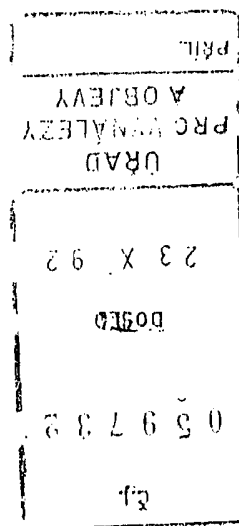
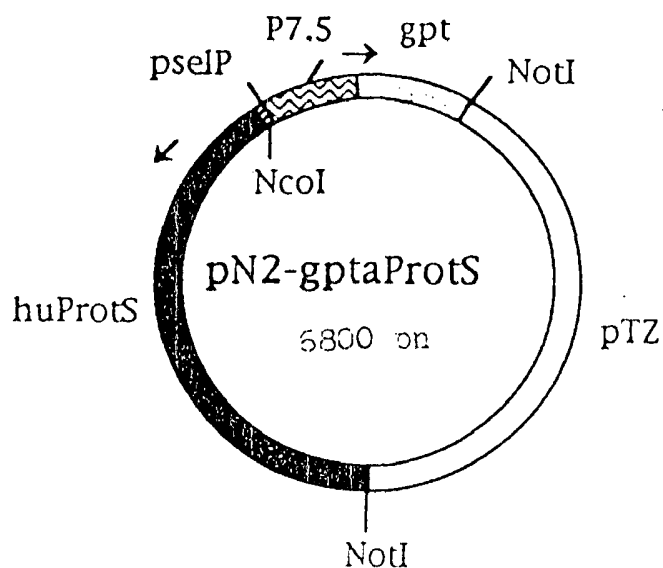
Obrázek 9.7

PATENTSERVIS
 PRAHA

Kadlecová

Struktura plasmidu pN2-gptaProtS

A)



B)

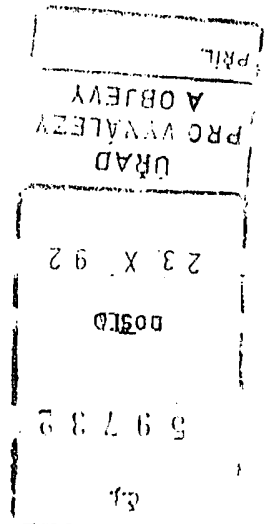
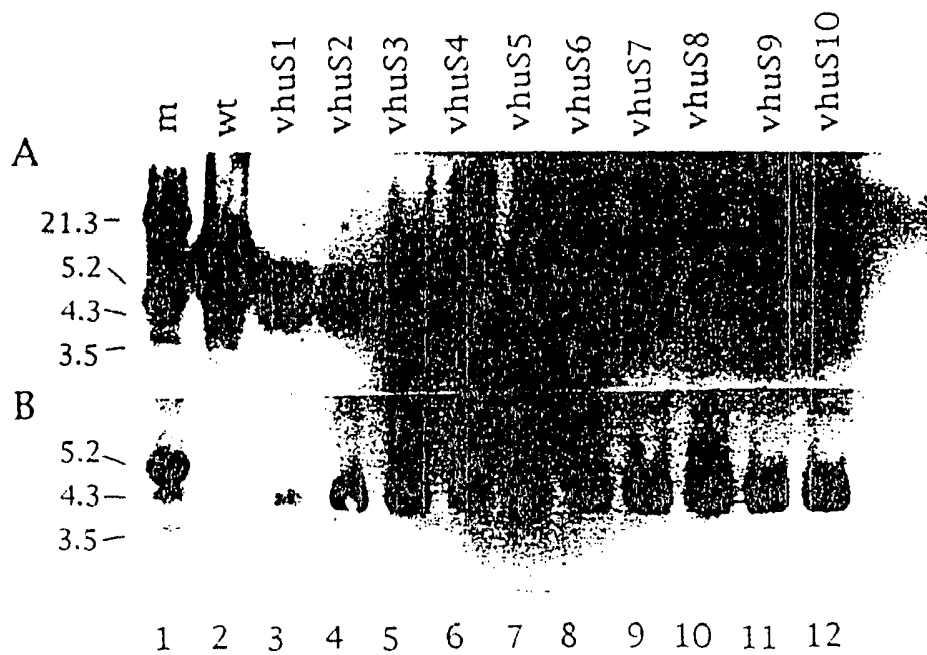
přírodní protein S: met arg val leu gly
 GAA ATG AGG GTC CTG GGT

protein S v chimerách: met ala val leu gly
 GCC ATG GCG GTC CTG GGT
 NcoI

Obrázek 10.1

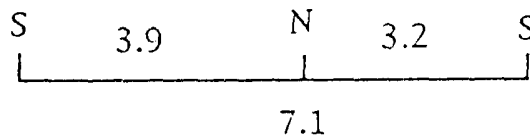
PATENTSERVIS
 PRAHA

Kudla

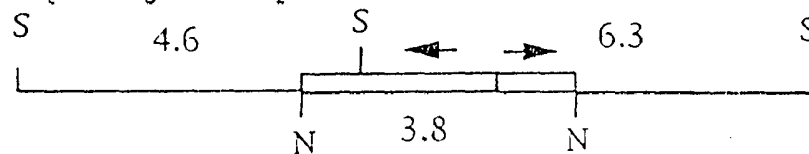


C

SacI fragment viru vakcína wt



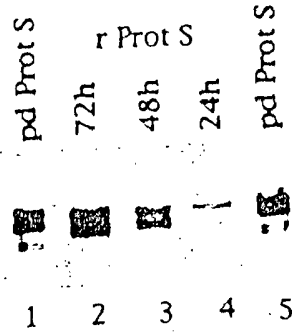
modifikovaný SacI-fragment ve virech
expresujících protein S



Obrázek 10.2

PATENTSERVIS
PRAHA

Kučla.com



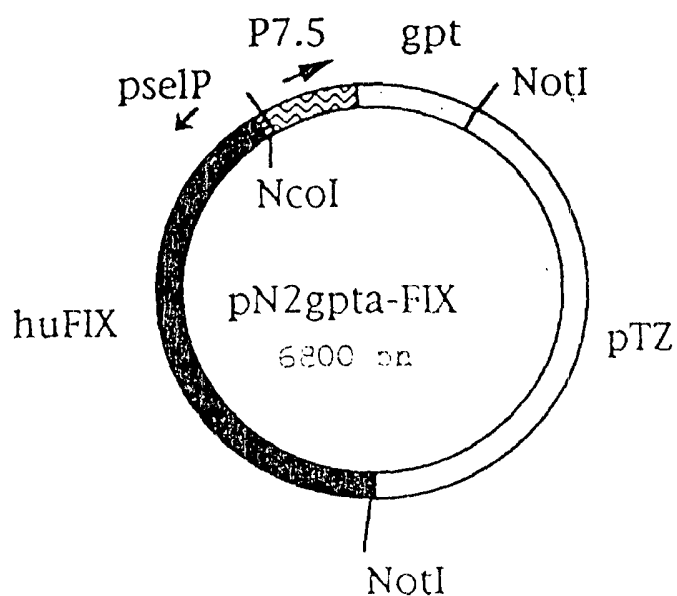
PRILE
A OBJEVY
PRO VYMALEZY
URAD
23. X 92
0510
05 9 7 3 2
Cj.

Obrázek 10.3

PRIL
PRO VYNALEZY
URAD
23.X.92
05.6.90
7.8.92
2

Struktura plasmidu pN2gpta-FIX

A)



B)

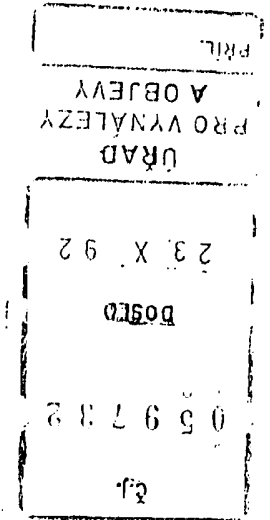
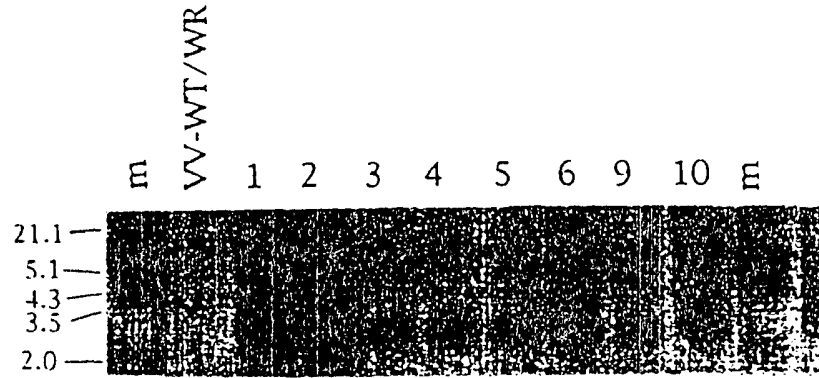
met gln arg val asn
 přírodní faktor IX: TT ATG CAG CGC GTG AAC
 met glu arg val asn
 faktor IX vFIX č. 5: CC ATG GAG CGC GTG AAC

Obrázek 11.1

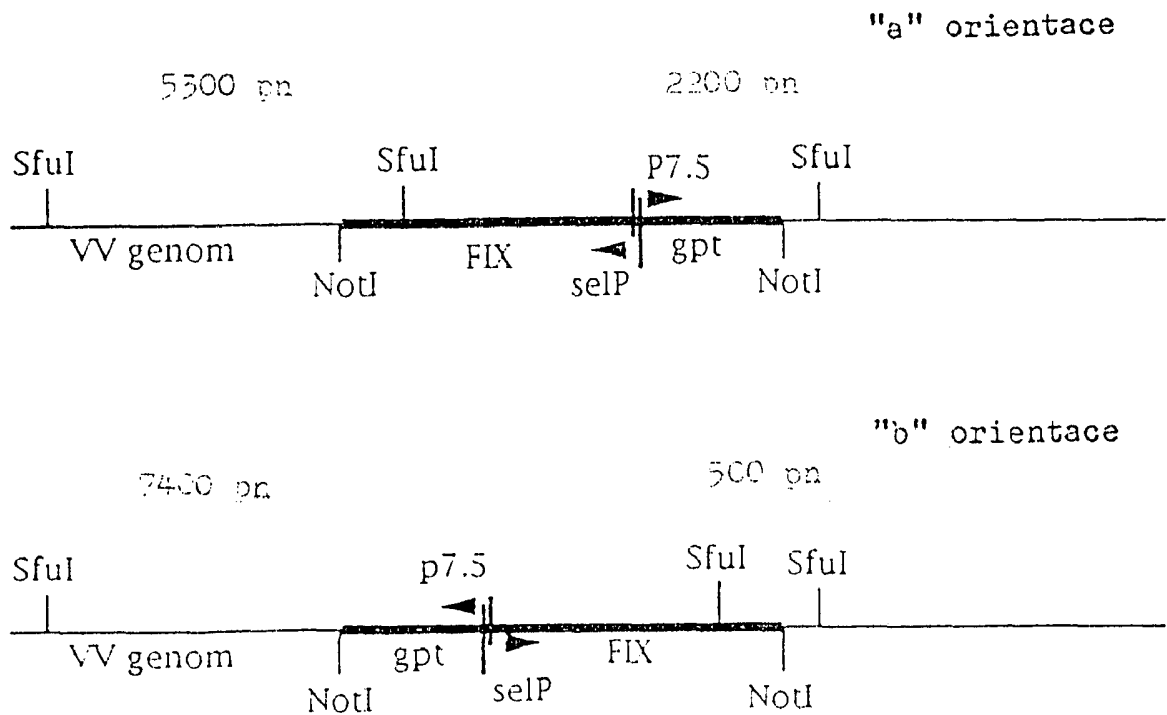
PATENTSERVIS
PRAHA

Kadlecová

A



B

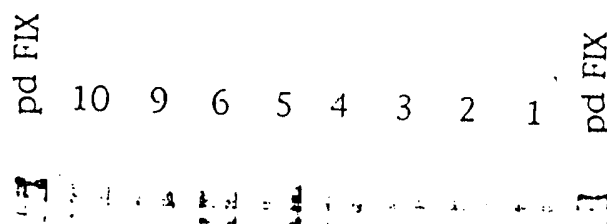


Obrázek 11.2

Southernova blotová analýza chimer
faktoru IX

PATENTSERVIS
PRAHA

Radlmeov



PRIL
PRO VYNALEZY
A OBJEVY
URAD
23. X. 92
poslo
059732
21

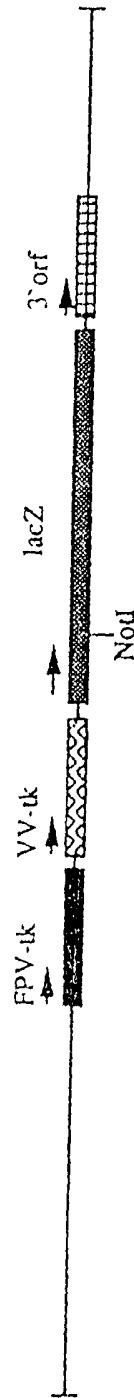
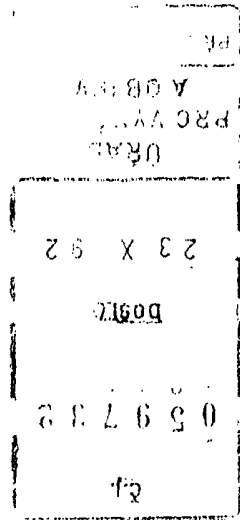
Obrázek 11.3 Westernova blotová analýza exprese faktoru IX v buňkách Vero

PATENTSERVIS
PRAHA

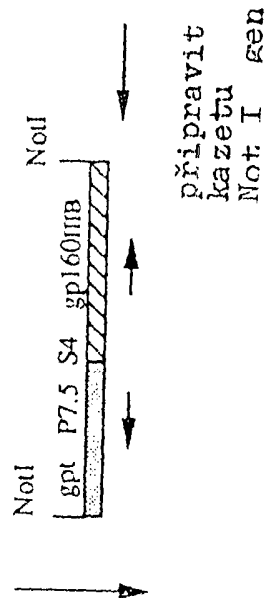
Klaolleeovf

Konstrukce chimerního viru drůbežích
neštovic f-env IIIIB přímým molekulár-
ním klonováním

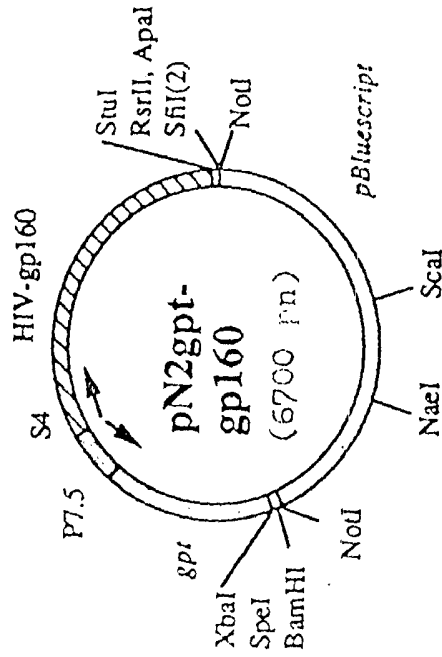
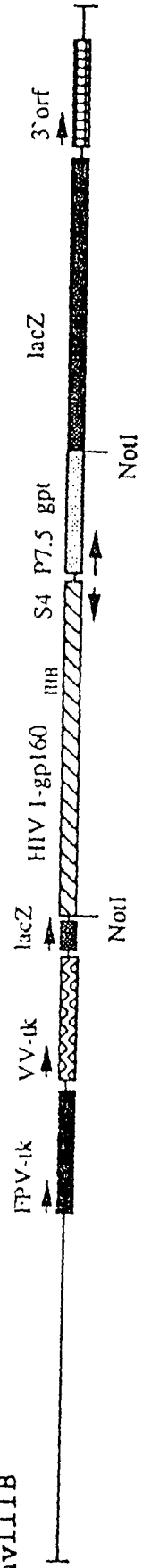
FPV rekombinant f-TK2a (300 pn)



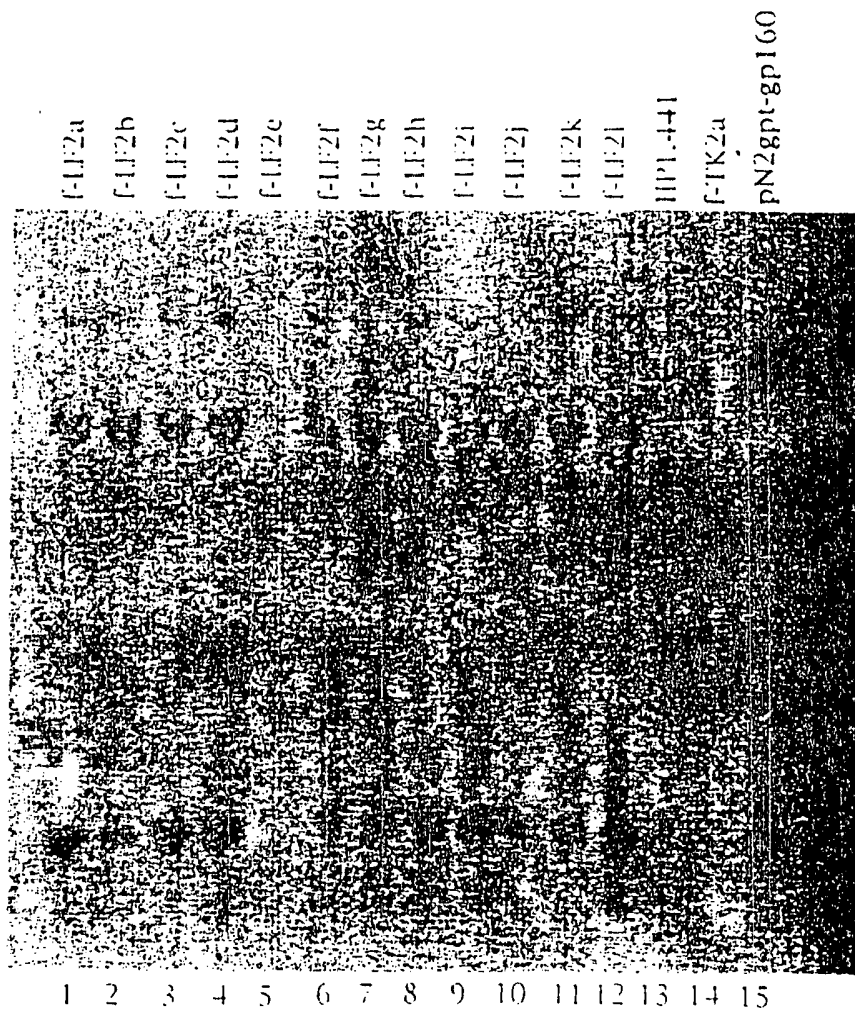
- rozštěpit působením NotI
- ligovat kazetu NotI gen



in vitro klonovaný vir
drůbežích neštovic
f-envIIIIB



Obrázek 12.1



PRIL
 A OBJEVY
 PRO VYNALEZY
 ÚRAD
 23 X 92
 03500
 059732
 6j

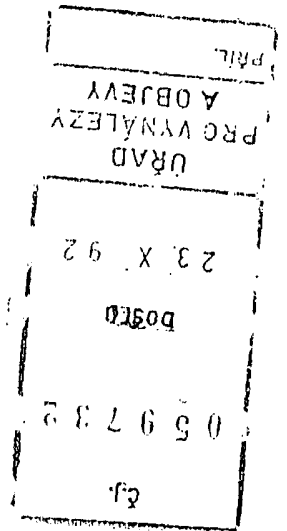
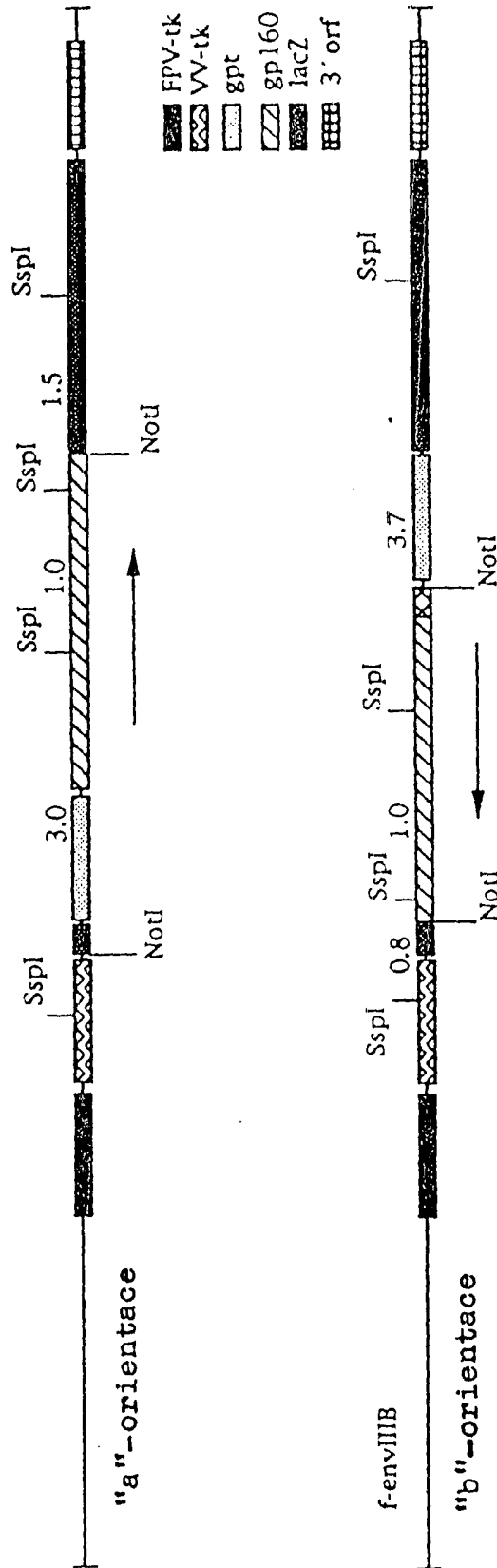
Southernova blotová analýza in vitro
 klonovaných virů drůbežích neštovic

Obrázek 12.2A

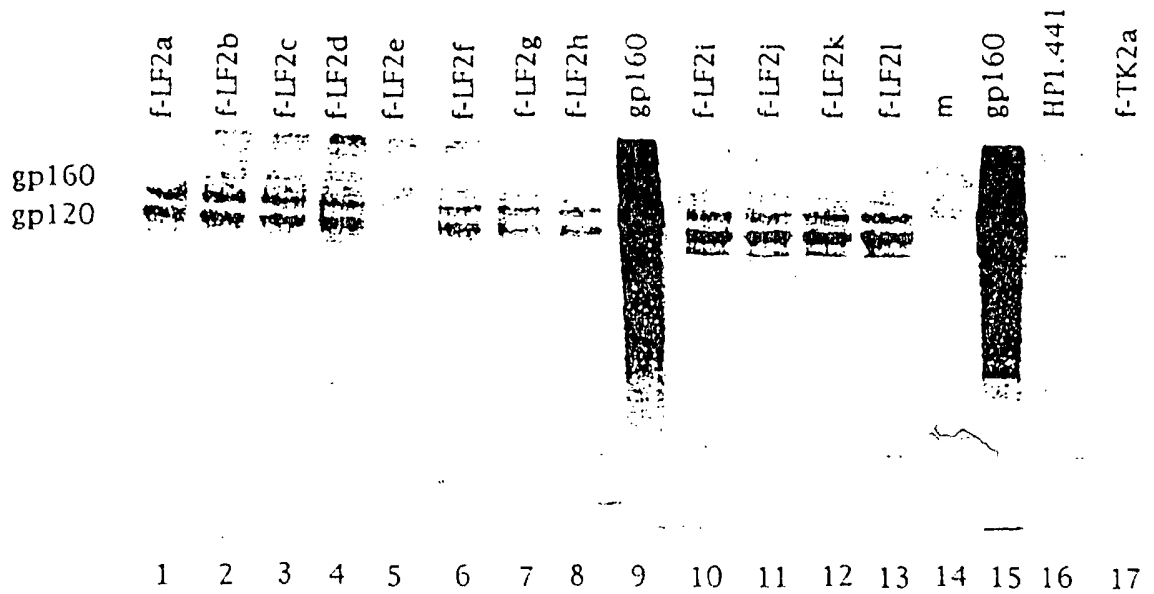
PATENTOVANIS
 PRAHA

Kadlcová

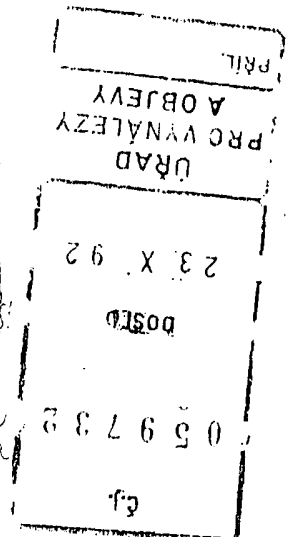
B) mapy SspI resktirnkčních fragmentů
chimerních virů drůbežích neštovic



Obrázek 12.2B



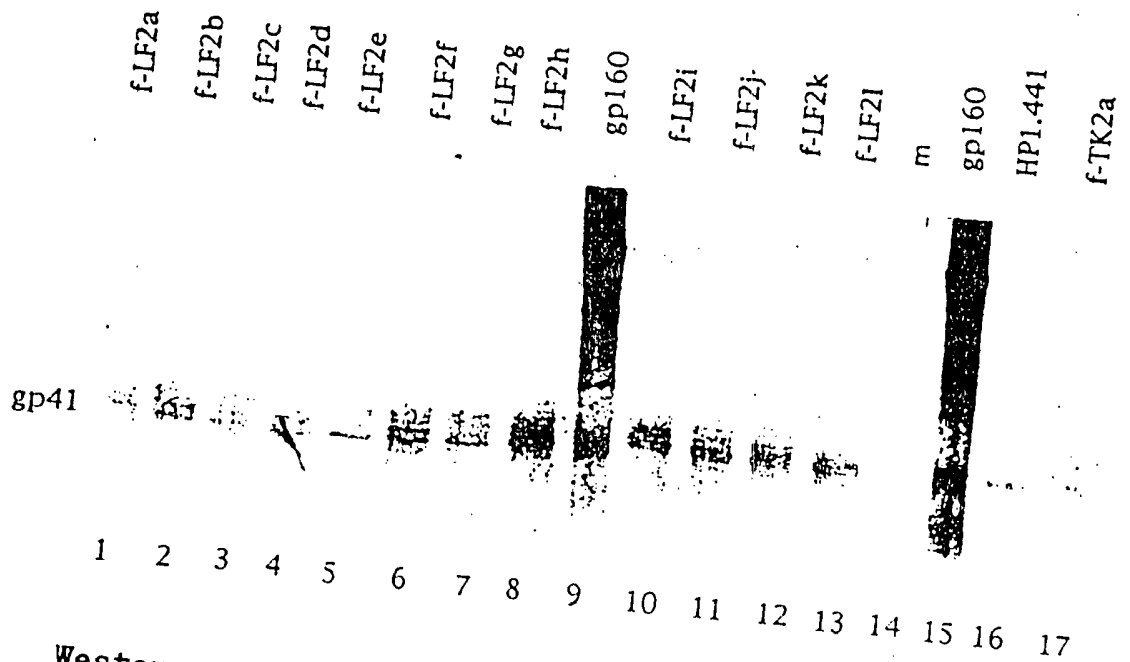
Westernova blotová analýza/gp160
 exprese ve fibroblastech kuřecího
 zárodku chimerními viry drůbežích
 neštovic



Obrázek 12.3

PATENTSERVIS
 PRAHA

Kallicorn



Westernova blotová analýza/gp41
 exprese ve fibroblastech kuřecího
 zárodku chimerními viry drůbežích
 neštovic

PRIL
PRO VYNALEZY
A OBJEVY
ÚŘAD
23 X 92
DOSTO
059732
2

Obrázek 12.4

Kučera