

P9602959

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

10548

4 A^u

62.958/BE

K I V O N A T

Pók-neurotoxinok és eljárás előállításukra

BRITISH TECHNOLOGY GROUP LIMITED, LONDON, GB

A bejelentés napja: 1995.04.24.

Elsőbbsége: 1994.04.27., GB 9408466.2

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB95/00917

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/29235

A találmány egy olyan új toxinra vonatkozik, amely egy gerinctelen-specifikus neurotoxinnak, a δ -latroinszektotoxinnak (δ -LIT) az izolált származékát vagy analógját tartalmazza. A toxin egy, a fekete özvegy pók genomjából származó gén csonka formájának megfelelő nukleotid szekvencia bakteriális gazdasejtben való kifejezése révén képződik. A gén egy nem-toxikus prekursor proteint kódol, míg a csonka forma az aktív toxint kódolja.

Feladatok

1054

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A

62.958/BE

BRITISH TECHNOLOGY GROUP LIMITED, LONDON, GB

BELL David Robert,	NOTTINGHAM,	GB
USHERWOOD Peter Norman Russell,	NOTTINGHAM,	GB
DULUBOVA Irina,	NEW YORK, NY,	US
VOLKOVA Tatiana,	MOSCOW,	RU
GRISHIN Eugene,	MOSCOW,	RU
KRASNOPEROV Valery,	TUXEDO, NY,	US
GALKINA Tatiana Genrikhovna,	MOSCOW,	RU
KHOVOTCHEV Mikhail Vladimirovich,	MOSCOW,	RU
PLUZHNIKOV Kirill Andreevich,	MOSCOW,	RU
SHAMOTIENKO Oleg Grigorievich,	LONDON,	GB

A bejelentés napja: 1995.04.24.

Elsőbbsége: 1994.04.27., GB 9408466.2

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB95/00917

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/29235

A találmány egy új toxinra és a toxin előállítására szolgáló eljárásra vonatkozik. A találmány pontosabban — elsősorban, de nem kizárólag — egy rovar-specifikus neurotoxinra, a δ -latroinszektotoxinra (δ -LIT), valamint ennek előállítására szolgáló eljárásra vonatkozik.

A fekete özvegy nevű pók (*Latrodectus mactans* Tredecimguttatus) mérgében nagy molekulatömegű neurotoxinokból álló családot fedeztek fel. Néhány ilyen toxinról megállapították, hogy ezek vagy gerincesekre vagy gerinctelenekre specifikusak. Az α -latrotoxin (α -LT) és az α -latroinszektotoxin (α -LIT) két olyan neurotoxin, amelyekről leírták, hogy gerincesekre, illetve gerinctelenekre specifikusak. Meghatározták e proteinek primer szerkezetét, de a klónozott toxinok szerkezeti sajátosságainak a vizsgálatára nem volt lehetőség, mivel génjeik expresszióját nem sikerült megvalósítani a gyakorlatban.

A találmány tárgyát egy új toxin és rekombináns technológia használatával egy olyan toxin termelésére alkalmas eljárás képezi, amely egy prekursor protein poszt-transzlációs módosulása révén rendszerint a természetben képződik.

A találmány szerint egy olyan polipeptidet — ilyen egy toxin — állítunk elő, amely egy génszekvencia — vagy analógja — csonka formájának a kifejeződése révén képződik.

A polipeptid előnyösen egy neurotoxin, és előnyös, ha a génszekvencia által kódolt, lényegében nem-toxikus prekursor polipeptid toxikus származékának felel meg. A polipeptid olyan aminosavszekvenciából állhat, amely lényegében a nem-toxikus prekursor polipeptid toxikus származékának felel meg. A

polipeptid olyan aminosavszekvenciából állhat, amely lényegében a nem-toxikus prekursor polipeptid csonka formájú aminosavszekvenciájának felel meg. Előnyös, ha a polipeptid aminosavszekvenciája a lényegében karboxi-terminális (C) végén, lehetőleg körülbelül 150-200 aminosavval megcsonkított prekursor polipeptid aminosavszekvenciájának felel meg.

A polipeptid aminosavszekvencia ezenkívül olyan prekursor polipeptid aminosavszekvenciának is megfelelhethet, amely aminosav-terminális (N) végén, előnyösen kevesebb, mint 50 aminosavval és lehetőleg 7 vagy 28 aminosavval van megcsonkítva.

A polipeptid aminosavszekvenciája a δ -latroinszekstotoxin (δ -LIT) nevű rovar-specifikus neurotoxin vagy egy aktív származéka aminosavszekvenciájával lehet homológ, és előnyösen az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciát vagy ennek aktív származékát tartalmazza. A toxin előnyösen egy olyan nukleotid szerkezetből vagy egy olyan szekvencia csonka formájából fejeződik ki, amely az 1. számú szekvencia szerinti szekvenciát vagy aktív változatát tartalmazza. Előnyös, ha a toxin olyan szekvenciából fejeződik ki, amely lényegében a The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited intézményben NCIMB 40632 letéti szám alatt letétbe helyezett mikroorganizmusban áll rendelkezésre.

A találmány toxin gyanánt hasznosítható olyan proteinre is vonatkozik, amely lényegében az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciát vagy aktív változatát tartalmazza.

A találmány további elemét olyan nukleotid szekvencia képezi,

amely egy génszekvencia csonka formájából vagy ennek analógjából áll, és ezt a nukleotid szekvenciát egy polipeptid, például toxin, kifejezésére használjuk fel.

A nukleotid szekvencia előnyösen egy olyan génnek felel meg, amely a 3' végén megcsonkított prekursor polipeptidet vagy pedig ennek aktív származékát kódolja. A nukleotid szekvencia előnyösen körülbelül 400-650 nukleotid bázissal és előnyösebben 550-600 nukleotid bázissal megcsonkított génnek felel meg.

A nukleotid szekvencia az előnyösen 100-nál kevesebb nukleotid bázissal és előnyösebben vagy 84 vagy 21 nukleotid bázissal 5' végén megcsonkított génnek is megfelelelhet.

Előnyös, ha a nukleotid szekvencia egy olyan gén-résznek felel meg, amely a fekete özvegy pók (*Latrodectus mactans* Tredecimguttatus) mérgeében lévő neurotoxint vagy ennek aktív származékát kódolja.

A nukleotid szekvencia a δ -latroinszektoxin (δ -LIT) nevű rovar-specifikus toxin prekursor polipeptidjét vagy aktív származékát kódoló gén-résznek is megfelelelhet. A nukleotid szekvencia előnyösen egy 991 aminosavból álló szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol.

A nukleotid szekvencia előnyösen az 1. számú szekvencia szerinti bázisszekvenciából vagy ennek aktív származékából áll és előnyösen egy olyan bázisszekvenciából, amelyet a The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited intézményben NCIMB 40632 letéti számon letétbehelyezett mikroorganizmus tartalmaz.

A nukleotid szekvencia előnyösen olyan polipeptidet kódol,

amelynek az aminosavszekvenciája az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia által bemutatott szekvencia vagy ennek aktív származéka lehet.

A nukleotid szekvencia egy olyan cDNS szekvencia is lehet, amelyet reverz transzkriptáz enzim használatával mRNS-ből kapunk. A nukleotid szekvencia olyan oligonukleotid DNS szerkezet is lehet, amelyet esetleg polimeráz láncreakcióval (polymerase chain reaction = PCR) állítunk elő.

A találmány további elemét képezi egy polipeptid előállítására alkalmas eljárás. Az eljárás a következő lépéseket tartalmazza: olyan rekombináns DNS molekulát állítunk elő, amely egy gén csonka formájából áll, és a csonka formát gazdasejt expressziós rendszerben — ilyen egy virális vagy bakteriális expressziós rendszer — fejezzük ki a polipeptid előállítása végett.

A kapott polipeptid előnyösen aktív toxin, főképpen egy lényegében előbb meghatározott neurotoxin. Előnyös, ha a csonka forma olyan gén-részből áll, amely egy nem-toxikus prekursor polipeptidet kódol.

A csonka forma előnyösen lényegében az előbbieken meghatározott és az 1. számú szekvenciával leírt nukleotid szekvenciát vagy ennek aktív származékát foglalja magába. Az expressziós rendszer előnyösen a szekvencia csonka formáját tartalmazó pT7-7 vektorral transzformált E.coli BL21 (DE3) baktérium sejteket tartalmazza, amelyeket lényegében ilyen módon helyeztünk letétbe a The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited intézményben NCIMB 40632 letéti számon. Az expressziós rendszer bakulovírus rendszert is tartalmazhat.

A találmány további elemeként rekombináns DNS molekulát állítunk elő. Ez a molekula olyan vírus és főképpen olyan bakulovírus lehet, amely az előzőekben általánosságban ismertett toxin-kódoló csonka formájú gént tartalmazza, és ez a gén lényegében a NCIMB 40632 letéti számon letétbe helyezett mikroorganizmusban rendelkezésre áll.

A találmány a továbbiakban még egy olyan expressziós vektorra is vonatkozik, amely egy gén csonka formáját tartalmazza, és e csonka forma egy fentiekben általánosságban meghatározott toxint kódol.

A találmány tárgyát képezi egy olyan sejt is, például egy virális vagy bakteriális sejt, amelyet a fent meghatározott rekombináns molekulával transzformáltunk.

A találmány egy olyan rovarirtó szerre is vonatkozik, amely az előzőekben meghatározott toxint tartalmazza. A rovarirtó szert úgy készíthetjük el, hogy azt szájon át (orálisan) vagy helyileg alkalmazhassuk. A rovarirtó szer permetlé is lehet.

A találmány olyan eszközökkel rendelkező rovarirtó rendszerre is vonatkozik, amely lehetővé teszi, hogy egy gén csonka formájának a kifejeződése révén egy rovarban az előbbiekben leírt toxin képződjék, és hogy ez a toxin a rovar megölje vagy inaktiválja. A rovarirtó rendszer virális expressziós rendszert is tartalmazhat, mégpedig előnyösen egy bakulovírus expressziós rendszert.

A találmány további elemét képezi egy lényegében fent ismertett génszekvencia csonka formáját tartalmazó, genetikailag módosított sejtet hordozó növény is.

A találmány még további elemét képezi egy lényegében fentiekben leírt génszekvencia csonka formáját tartalmazó, genetikailag módosított sejtet tartalmazó nem-emberszabású állat is.

A találmány további elemét egy olyan toxin képezi, amely lényegében egy izolált, nem-toxikus prekursor polipeptid feldolgozása révén képződik.

A toxin előnyösen egy neurotoxin, amely úgy képződik, hogy a prekursor polipeptid karboxi-terminális (C) végénél megcsonkítjuk a szekvenciát, mégpedig előnyösen helyre-irányuló mutagenezissel. A toxin aminosavszekvenciája általánosságban előnyösen a prekursor polipeptid 150-200 aminosavval megcsonkított aminosavszekvenciájának felel meg. A toxin aminosavszekvenciáját úgy is kialakíthatjuk, hogy a prekursor polipeptid aminosavszekvenciáját ennek amino-terminális (N) végénél csonkítjuk meg. Az innen lehasított fragmentum előnyösen jelentősen kisebb, mint a karboxi-terminális végről lehasított fragmentum, és 7 vagy 28 aminosavat tesz ki.

A toxin aminosavszekvenciája előnyösen a fekete özvegy pók (*Latrodectus mactans* *Tredecimguttatus*) egy gén-részlete által kódolt polipeptidnek felel meg. A toxin a δ -latroinszektotoxin (δ -LIT) nevű rovar-specifikus neurotoxinból vagy egy aktív származékából vagy egy analógjából áll.

Előnyös, ha a toxin az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia által bemutatott aminosavszekvenciát tartalmazza, vagy ennek aktív származékát.

A találmány további elemét egy olyan eljárás képezi, amelyben egy inaktív prekursor polipeptidből aktív polipeptidet állítunk

elő, és az eljárás abból áll, hogy az izolált prekursor polipeptidet megcsonkítjuk.

Előnyös, ha az izolált polipeptidet karboxi-terminális végén csonkítjuk meg, esetleg proteolitikus hasítással vagy előnyösen helyre irányuló mutagenézissel. A csonkítást az N-terminális végnél is elvégezhetjük. Az aktív polipeptid előnyösen egy lényegében előzőekben leírt toxin.

A találmány egy másik elemének megfelelően egy olyan izolált nukleotid bázis szekvenciát ismertetünk, amely egy fent meghatározott és előnyösen a 4. számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciával rendelkező toxin prekursor polipeptidet kódol vagy ennek aktív származékát. A bázisszekvencia előnyösen a 3. számú szekvenciából vagy ennek egy származékából áll. A nukleotid bázisszekvencia előnyösen a δ -latroinszekstotoxin (δ -LIT) nevű neurotoxin egy prekursor polipeptidjét kódolja. A bázisszekvencia lényegében az NCIMB 40633 letéti számon letétbe helyezett mikroorganizmusban rendelkezésre áll.

A találmány még egy olyan rekombináns DNS molekulára is vonatkozik, mint amilyen egy vírus, pontosabban egy olyan bakulovírus, amely az előző bekezdésben meghatározott szekvenciát tartalmazza.

A találmány tárgyát képezi egy olyan sejt, például egy olyan bakteriális sejt vagy virális sejt, amelyet egy előző bekezdésben ismertetett rekombináns DNS molekulával transzformáltunk.

A találmány tárgyát képezi egy olyan rovarirtó rendszer is, amelynek az eszközei egy fent leírt gén kifejezését biztosítják egy fenti prekursor polipeptid előállításához, valamint a

prekurzor polipeptid feldolgozását, hogy egy rovarban olyan toxin képződjék, amely a rovarat megöli vagy inaktívvá teszi. A rovarirtó rendszer virális expressziós rendszert, előnyösen bakulovírus expressziós rendszert tartalmazhat.

Egy további elem szerint olyan növényt ismertetünk, amely egy fent leírt gént tartalmazó, genetikailag módosított sejtet tartalmaz.

A találmány még további eleme szerint olyan nem-emberszabású állatot ismertetünk, amely egy fent leírt gént tartalmazó genetikailag módosított sejtet hordoz.

A találmány következőkben leírt előnyös kiviteli alakjait csak példaképpen ismertetjük. Ezek a példák nem korlátozzák a találmány oltalmi körét. A példákban a mellékelt, alább ismertett szekvenciákra hivatkozunk.

Az 1. számú a találmány egyik eleme szerinti gén csonka formájának és az általa kódolt polipeptidnek a nukleotid bázis szekvenciáját és a megfelelő aminosavszekvenciát írja le.

A 2. számú szekvencia az 1. számú szekvencia szerinti polipeptid szekvenciát mutatja be.

A 3. számú szekvencia a találmány egy másik eleme szerinti génnek és az általa kódolt polipeptidnek a nukleotid bázis szekvenciáját és az ennek megfelelő aminosavszekvenciát írja le.

A 4. számú szekvencia a 3. számú szekvencia szerinti polipeptid szekvenciát mutatja be.

A szekvenciákra vonatkozólag megjegyezzük, hogy a 2. számú szekvenciával leírt polipeptid egy olyan toxin, amely egy génszekvencia csonka formájának (1. számú szekvencia) vagy ana-

lógjának az expressziója révén képződik.

A fekete özvegy pók (*Latrodectus mactans* Tredecimguttatus) mérgét (Black Widow Spider Venom = BWSV), a δ -latroinszekstotoxint (δ -LIT) tisztítottuk, és kimutattuk rovar-specifikus toxicitását. Mint alább leírjuk, a δ -LIT szerkezeti gént klónoztuk, és szekvenáltuk, és meghatároztuk a natív (prekurzor) és a működőképes protein-toxin N- és C-terminális végeit. A δ -LIT cDNS helyre irányuló mutagenézise lehetővé tette az érett protein-termék (toxin) baktériumokban való kifejezését. Kimutattuk továbbá, hogy ez a termék toxikus a sáskákra.

Sem ennek a toxinnak, sem más ilyen toxinoknak a kifejezése és termelése bakteriális expressziós rendszerekben eddig nem volt lehetséges. A találmány magába foglalja a prekursor protein azon hasítási helyeinek az azonosítását, amelyek a toxin termeléséhez szükségesek és a génszekvencia csonkításának pontos helyét, amely lehetővé teszi, hogy a toxin baktériumokban és még más alkalmas gazdasejtekben is kifejeződjék.

A mikroorganizmusokat a Budapesti Egyezmény alapján 1994. május 3-án helyeztük letétbe a The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited intézményben (23. St.Machar Drive, Aberdeen, Skócia, Egyesült Királyság). A génszekvencia csonka formájával klónozott *Escherichia coli* (XL-1 Blue pT7.8M) sejteket 40632 letéti számon és a lényegében teljes génszekvenciával klónozott *Escherichia coli* (HMS 174 pT7.8FL) sejteket 40633 letéti számon helyeztük letétbe.

A cDNS klónozását és szekvenálását — részletesebben kifejtve — a következőképpen végeztük. A fekete özvegy pók

(*Latrodectus mactans* *Tredecimguttatus*) méregmirigyeiből poli(A⁺)-RNS-t izoláltunk, és cDNS tárat (gyűjteményt) létesítettünk a pSP65 plazmid vektorban Kiyatkin és munkatársai (1993) szerint. Egy 6×10^4 klónt tartalmazó gyűjteményt olyan vég-jelzett 23-mer oligonukleotid szondával szűrtünk, amely a δ -LIT N-terminális aminosavszekvenciáján alapult (1-8 aminosav-maradék):

5' -GA (C/T) GA (A/G) GA (A/G) GA (C/T) GG (A/T) GAAATGAC-3'

Elvégeztük a hibridizálást, majd a telepeket pozitív klónokra tisztítottuk, és ezeket restrikciós térképezéssel analizáltuk. Az inszertumokat kihasítottuk, és ultrahanggal fragmentáltuk Sambrook és munkatársai (1989) szerint, majd a pBluescript II SK⁺ és SK⁻ vektorok (Stratagene, USA) SmaI helyére klónoztuk be. VCS helper fággal (Stratagene) való fertőzés után egyszálú temp-látokat kaptunk a szekvenáláshoz. A DNS szekvenciákat a Sanger és munkatársai szerinti (1977) lánc-terminációs módszerrel határoztuk meg Sequenase 2.0 version kit (USB Corporation) és T7 és T3 vektor-specifikus primerek (Stratagene) használatával. Minden szekvenciát legalább kétszer határoztunk meg, mindkét szálán. Szintetikus primereket használtunk azon szekvencia szakaszokhoz, amelyeket nem fedtek az izolált szubklónozott fragmentumok.

DNS és protein szekvencia analízishez a DNASTAR (Dnastar Inc.) és PCGENE (Intelligenetics Inc.) számítógép szoftvert használtuk. Ennél a munkánál a SERC Daresbury SEQNET berendezésre vitt GCG program volt segítségünkre [Devereux, Haberli, Smithies, Nucl.Acids Res., 12, 387-395 (1984)].

A teljes hosszúságú cDNS-t a következőképpen szerkesztettük. Két oligonukleotid primer készletet használtunk a δ -LIT kódoló

szekvenciák N- és C-terminális egymást átfedő részeinek polimeráz láncreakcióval történő előállítására. Az expressziós vektorba való szubklónozás megkönnyítése végett az 5' szensz primer (P1) (TTGGGATCCGATGAAGAAGATGGAGAA)

és a 3' antiszensz primer

(P8) (CAATGGTCGACACAGAAGGAATGGTA)

BamHI és SalI restriktációs enzim helyet tartalmazott. Két másik primert — P9 szensz (GTCTGAACCATTTACTGTCC) (1283 - 1302 pozíciók) és P3 antiszensz (GTAAGATTACCATCTGCAAC) (a 2253 - 2277 pozíciókkal komplementer) — választottunk olyan egymást átfedő fragmentumok előállítására, amelyek egy belső NcoI (2056) restriktációs helyet tartalmaznak. A protein szekvencia befejezéséhez a 991. aminosav után a következő nukleotidot szántuk:

5' -CGTTTCGTCGACTCATTCCGGTAAAGTACGACGAAA-3' .

A polimeráz láncreakciót 1 egység Taq polimerázzal (Promega) standard körülmények között (30 ciklus; 55°C 1 percig, 72°C 3 percig, 94°C 1 percig; 100-100 pmól az egyes primerekből és 1-10 ng az első cDNS szálból) végeztük. Az első ciklusban a denaturálás idejét 5 percre hosszabbítottuk meg. A sokszorozott anyag molekulatömegét agaróz gélben ellenőriztük. A cDNS első szálának a szintetizálását First-strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) használatával, mind random, mind specifikus primerekkel végeztük a gyártó cég ajánlásai szerint. A PCR termékeket agaróz gélből tisztítottuk GeneClean Kit (BIO 101 Inc.) segítségével, a megfelelő enzim-párokkal (BamHI és NdeI az N-terminális részhez és SalI/NdeI a C-terminális részhez) emésztettük, és a hasonló enzim-párokkal hasított pT7-7 vektorba klónoztuk be. A teljes

hosszúságú cDNS-t egy három-lépéses ligálás eredményezte: N-terminális BamHI/NdeI fragmentum, C-terminális NdeI/SalI fragmentum és a BamHI/SalI-gyel emésztett pT7-7 vektor. A végső szerkezet nyolc további aminosav csoportot tartalmazott az amino-terminális végen (MARIRARG). Minden plazmid-szerkezetet úgy ellenőriztünk, hogy mindkét végétől a csatlakozási szakaszon át, szekvencia analízist végeztünk. A teljes hosszúságú szerkezetet pT7 δ .FL jelzéssel láttuk el, és ebből mintát helyeztünk le-tétbe az NCIMB-nél 40633 letéti számon. A csonkított klón (1-991 aminosav) jele: pT7. δ M (NCIMB szám: 40632).

A δ -LIT cDNS azonosságának az igazolása végett ezt a klónt a bakteriális pT7-7 vektorból, E.coli BL21 (DE3) sejtekben fejeztük ki. Egy teljes hosszúságú toxin cDNS-t szerkesztettünk (megfelel a 4. számú szekvencia — 1214 aminosav — 29-es Asp maradékától az 1186. maradékig terjedő résznek), amelynek pT7- δ FL elnevezést adtunk. Az első 28 aminosavat valószínűleg a pók méregmirigyében lévő prekursor polipeptid tartalmazza, ezek azonban az N-terminális feldolgozás folyamán lehasadnak. A rekombináns protein a teljes bakteriális protein lizátumnak mintegy 10 %-át teszi ki. Pók méregmirigyből tisztított δ -LIT ellen specifikus poliklonális antitestet termeltünk, és kimutattuk, hogy specifikus a δ -toxinra. Ez a protein egy 130 kD tömegű proteint mutatott ki specifikusan olyan baktériumokban, amelyek rekombináns teljes hosszúságú δ -LIT-et fejeztek ki. A bakteriálisan kifejezett teljes hosszúságú δ -LIT és a méregmirigyekből tisztított toxin molekulatömegének az összehasonlítása körülbelül 23 kD méret-különbséget mutatott, és ez egyezik a számított

molekulatömeggel. A teljes hosszúságú δ -LIT rovarokra nem toxikus, és vélhetően a toxin egy inaktív prekursor formája.

A méregmirigyekből tisztított δ -LIT-et tömegspektrometriával analizáltuk (a mérést Kratos Kompact MALDI 3 tömegspektrométeren végeztük, szinapinsav mátrix használatával; a nitrogén lézer gerjesztés 337 nm-en történt, és a pozitív iont lineáris módon detektáltuk). A vizsgálat egy 110916 m/z+ hányadosú, jól észlelhető molekula-iont eredményezett. Ez az eredmény teljesen megfelel a 991. aminosavnál megcsonkított δ -LIT várt molekulatömegének. Összehasonlító vizsgálatban a bakteriálisan kifejezett teljes hosszúságú δ -LIT 133631 m/z+ hányadossal rendelkező molekula-iont eredményezett (VK, DRB, PNRU, az adatokat nem mutatjuk be), és ez az érték a számított értékhez képest 100 D-on belülre esett. Helyre irányuló mutagenézist használtunk egy olyan új δ -LIT cDNS klón (pT7. δ M) előállításához, amely a δ -LIT szekvencia 991. aminosava után van megcsonkítva (2. számú szekvencia). Ezt a proteint baktériumokban fejeztük ki, és az expresszió a pók méregből izolált érett toxin molekulatömegéhez hasonló molekulatömegű proteint eredményezett.

A pT7 klónokkal transzformált E.coli BL21 (DE3) sejteket 100 mg ampicillin/ml tartalmú LB táptalajban tenyésztettük 30 °C-on, amíg el nem érte a körülbelül $A_{600 \text{ nm}} = 0,5$ értéket. Az expressziót ezután úgy indítottuk meg, hogy a táptalajhoz IPTG-t (1 mM) adtunk, és az inkubálást 1 órán át tovább folytattuk. Funkciós vizsgálatok céljára a baktériumokat mostuk, 50 mM trisz.HCl, 100 mM nátrium-klorid, 10 mM kálium-klorid, 0,4% Triton X-100, 12% (tömeg/térf) szacharóz, 5 mM DTT, 2 μ g/ml aprotinin és 2 mM EDTA

(pH 8) tartalmú oldatban reszuszpendáltuk, és jégen ultrahanggal kezeltük. A derített felülúszóhoz annyi ammónium-szulfátot adtunk, hogy a végső koncentráció 20 %-os telítettséget érjen el, majd az üledéket DTT mentes pufferben reszuszpendáltuk. Ezeket a mintákat (5 - 15 μ l) adtuk torakális injekcióként sáskáknak (100-300 mg-os test-tömeg); minden teszthez 4-nél több sáskát használtunk, és a sáskákat 24 órán át vizsgáltuk toxicitásra. A pT7-7 és a pT7. δ FL kivonatok hatástalanok voltak a sáskákra, de a pT7. δ M-et hordozó baktériumokból kapott kivonatok gyors elhullást okoztak. A sáskák elhullásának időpontja 5 perctől 4 óráig változott, a toxin tétel hatékonyságától függően.

Előzetes vizsgálatokat végeztünk kifejlett sáskák (hím és nőstény) utótori lábából (metatorakális láb) izolált ideg-ingerelt és nyugvó karom-visszahúzó (musculus retractor unguis) idegizom preparátumokkal (Usherwood, Machili, 1968). A δ -LIT-et standard sáska sóoldatban (180 mM nátrium-klorid, 10 mM kálium-klorid, 2 mM kalcium-klorid, 10 mM HEPES; pH 6,8) alkalmaztuk. Néhány vizsgálatot végeztünk olyan sóoldattal, amelyből kihagytuk a kalcium-kloridot. A mechanikai válaszokat Grass öníró regisztráló készülékkel összekapcsolt Grass féle műszerrel regisztráltuk. Intracelluláris mikroelektrodokkal (körülbelül 10 $m\Omega$ ellenállás) kifejlett_sáskák (mindkét nemből) metatorakális lábszárának feszítő izomrostjaiból (musculus extensor tibiae) miniatűr excitációs posztzinaptikus potenciálokat regisztráltunk. A δ -LIT-et vagy standard sáska sóoldatban vagy olyan sóoldatban, amely nátrium-klorid helyett magnézium-kloridot tartalmazott, alkalmaztuk. A miniatűr potenciálokat video-kazettán

rögzítettük, és MassComp számítógéppel analizáltuk in-house software használatával. Membrán kettősrétegeket képeztünk ki patch pipetták hegyénél (átmérő: 1-2 μm ; készült Clark Electromedical üvegből) vagy difitanoil-foszfátidil-kolinból vagy 9 rész izolecitin és 1 rész koleszterin keverékéből álló egyrétegekből, pipetta dipping technika segítségével (Montal, Muller, 198). Hasonló patch pipettákat használtunk akkor, amikor sáska metatorakális lábszár feszítő izomrostokból membrán-részecskéket metszettünk be (Huddle et al.; patch clamp technika). Az endogén kálium-csatornák aktivitásának a csökkentése végett a pipettából és a sóoldat-fürdőből eltávolítottuk a kálium-kloridot.

A sáska visszahúzó karom-izom neurálisan kiváltott görcsös összehúzódását 10^{-11} M δ -LIT (standard sóoldatban alkalmazva) körülbelül 40 %-kal csökkentette, és 10^{-10} M toxin alkalmazása megszüntette. A δ -LIT alkalmazása alatt kisebb spontán összehúzódások néha előfordultak. A rángás amplitudójában bekövetkezett változásokat irreverzibilis izom-összehúzódás kísérte. Amikor a δ -LIT koncentrációját csökkentettük, az összehúzódás (kontraktura) késleltetve jelentkezett, és amplitudója is csökkent. Izom kontraktura akkor is előfordult, amikor a toxint akkor alkalmaztuk, amikor az izom idegi stimulust nem kapott. Görcsös összehúzódások kalciummentes sóoldatban nem fordultak elő, és ha olyan preparátumhoz alkalmaztunk 10^{-10} M toxint, amelyet ezzel a sóoldattal hoztunk egyensúlyba, még a toxin alkalmazása után 30 perc múlva sem következett be összehúzódás.

Amikor a sáska izomrostok esetén inside-out részecskéket tet-

tünk ki 10^{-11} M δ -LIT hatásának a patch pipettában, körülbelül maximum 40 pS vezetőképesség mellett, csatorna nyitásokat figyeltünk meg. Toxin nélkül ilyen típusú csatorna nyitásokat soha nem láttunk. A csatorna-áram befelé történő áramlást mutatott, ha a patch pipetta és a fürdő azonos összetételű sókat (beleértve 2 mM kalcium-kloridot) tartalmazott, és a csatorna nyitási idők hosszabbak voltak negatív pipetta potenciáloknál, mint pozitív potenciáloknál. Amikor a membrán-részecskén át tízszeres Ca^{2+} grádienst mértünk, a csatorna-áram reverz potenciálja ± 15 mV volt, ugyanis ez a jelenség a Ca^{2+} grádienstől függ.

A mesterséges kettősréteg kísérletekben, amelyekben 10^{-11} M δ -LIT-et alkalmaztunk a patch pipettákban, körülbelül 30 pS vezetőképesség mellett figyeltünk meg egy-egy csatorna-nyitást. Ilyen csatornák nem voltak láthatók, amikor a toxint kihagytuk a patch pipettából. Amikor a patch pipetta és a fürdő azonos sóoldatot (2 mM kalcium-klorid tartalommal) tartalmazott, az α -LIT csatorna áramfeszültségének karakterisztikája szigmoid volt 0 mV melletti reverz potenciállal. Kimutattuk, hogy a csatorna kalcium-szelektívvé válik, ha mind a patch pipetta, mind a fürdő ion-környezetét manipuláljuk.

A méregmirigy cDNS-ből kapott cDNS tárat egy 23 bp méretű olyan oligonukleotid szondával szűrtük, amely a δ -LIT N-terminális szekvenciájának felel meg (mint fent leírtuk). A bizonytalan nukleotidok számának a csökkentése érdekében az α -LIT és α -LT nukleotid szekvenciákból származó kodon használat adatait vettük figyelembe (Kiyatkin et al., 1990; Kiyatkin et al., 1993). Öt pozitív cDNS klón telepet tisztítottunk és

szekvenáltunk. A leghosszabb klón (pDT-1) több mint 2 kb méretű δ -LIT kódoló szakaszt tartalmazott. A cDNS gyűjtemény újbóli szűréséhez egy PstI-3' fragmentumot használtunk, hogy olyan klónokat keressünk, amelyek a toxin C-terminális részét kódolják. Egy további cDNS klónt — pDT-17 — izoláltunk, amely a δ -LIT C-terminális kódoló szakaszát fedte le. Két egymást fedő klónt, amelyek a teljes nyílt leolvasási keretet fedték le, teljes egészükben szekvenáltunk. Az átfedő szakaszon végzett polimeráz láncreakcióval — két külön primer készlet használatával — kimutattuk, hogy a két klón a méregmirigyekből származó egyetlen összefüggő RNS részét alkotja. Az összetett klónok egy 3642 bp hosszú kerettel rendelkező cDNS-t kódolnak, amely az első kereten belüli (in-frame) metioninnal kezdődik, és a TAA stop kodonnal végződik (3. számú szekvencia).

A Met csoportot egy in-frame stop kodon előzi meg, és ez igazolja, hogy a levezetett szekvencia teljes hosszúságú.

A fekete özvegy pók méregből homogenitásig tisztítottuk a δ -LIT-et. A tisztítást Krasnoperov és munkatársai (1992) szerint oszlopkromatográfiával három menetben végeztük. A δ -LIT N-terminális szekvenciájának 23 aminosavmaradékát szekvenáltuk. A tiszta toxint tripszinnel emésztettük, amikor is hét egyedi peptidet izoláltunk és részlegesen szekvenáltunk.

A közvetlen N-terminális szekvencia meghatározás kimutatta, hogy az érett protein a DEEDGEM..., szekvenciával indul, tehát az 1. számú és 2. számú szekvenciában az 1-es csoport ennek a szekvenciának az első Asp csoportja. Az Asp (+1) csoporttól kezdődő kikövetkeztetett polipeptid 1186 aminosavból áll (lásd a 3.

számú és a 4. számú szekvenciát a 29-es Asp csoporttól az 1214-es csoportig), amelynek az előrelátható molekulatömege 132671 dalton, és pI értéke (izoelektromos pontja) 5,4. Az érett protein mindazon peptidszekvenciákat tartalmazza, amelyeket aminosavszekvencia analízissel határoztunk meg. Az érett protein két olyan kereten belüli Met csoportot (-7 és -28) tartalmaz N-terminális végétől 5' irányban (lásd a 3. számú szekvenciát), amelyek transzlációt indító helyek gyanánt szolgálhatnak. A Met (-7) ATG kodonját környező nukleotid szekvencia jobb egyezést mutat a klasszikus Kozak féle általánosan elfogadott (konszenzus) szekvenciával, de a Met (-28) körüli nukleotidok elrendeződése nagymértékben megfelel legalább két másik olyan protein kezdőpontjának, amelyeket pókfélékből izoláltak, így például a fő házipor atka allergént (AAAATGA) (Yuuki et al., 1991) és egy alacsony molekulatömegű proteint, amelyet az α -latrotoxinnal együtt tisztítottak (AAATGA) (Kiyatkin et al., 1992). Az érett protein N-terminális végét megelőző, kikövetkeztetett szekvencia egyik esetben sem felel meg a klasszikus szignálpeptid szerkezeteknek. Azt a következtetést vontuk le, hogy a δ -LIT N-terminális végének poszttranszlációs módosulása 7 vagy 28 aminosavmaradék eltávolítására korlátozódik. A pozitív aminosavmaradékokból — Arg-X-Lys-Arg (-1-4) — álló csoport jelenléte, amely potenciális endopeptidáz hasítási helyként szolgálhat, alátámasztja azt a hipotézist, hogy a poszttranszlációs feldolgozás az N-terminális végen történik.

A levezetett δ -LIT szerkezet analízise PEST tartalomra (S. Rogers et al., 1986) egy olyan aminosavszekvencia jelenlétét

igazolta, amely P, E, S és T-ben (prolin, glutamin, szerin, treonin) gazdag, és ezt előzőleg összefüggésbe hozták az intracelluláris proteinek gyors degradációjával (Gottesman és Maurizi, 1992). Ennek a szakasznak a szekvenciája

EESGAPEGSFDSPSS,

amely a 956-970 csoportok között helyezkedik el. A PEST-szakasz jelenléte a δ -LIT C-terminális részén összhangban van a protein C-terminális feldolgozásával.

A δ -LIT számítógépes analízise három vélt transzmembrán hélixet feltételez, amelyek közül kettő a végszakaszokban (39-67 és 221-240 csoportok) és a minimális hosszúságú harmadik a központi szakaszban helyezkedik el. A második vélt transzmembrán hélix (221-240 csoportok) egy olyan erősen állandó szakaszt képvisel, amely minden pók eredetű nagy molekulatömegű neurotoxin proteinre jellemző (Kiyatkin et al., 1993).

A feltételezett δ -LIT aminosavszekvencia dot-mátrix analízise a protein molekula központi részében egy ismétlődő motívum jelenlétét fedte fel. A δ -LIT primer szerkezet 460 aminosav csoportja egymásutáni (tandem) elrendezésben ankyrin-szerű ismétlődő szakaszok hibás másolatait tartalmazza (ankyrin = vörösvérsejt membrán protein; szinonimák: anchorin, syndein) (Michaely és Bennett, 1992). Megállapították, hogy amíg az α -LT és az α -LIT (Kiyatkin et al., 1990; Kiyatkin et al., 1993) nem kevesebb, mint 20 ismétlődő szakaszt tartalmaz, addig a δ -LIT csak 13 egymásután ismétlődő egységet tartalmaz. Ezek optimális egymáshoz igazítását — fáziseltolással — eredetileg Lux és munkatársai (1990) javasolták. Az első ismétlődő szakaszt (repeat) meg-

előző 13 aminosavból álló szekvenciát, egy konszenzus szekvenciával való jó egyezése alapján, redukált ismétlődő egységnek tekinthetjük. A δ -LIT ismétlődő egységek túlnyomó része 33-34 aminosav hosszúságú, de két ismétlődő szakasz 35 (R1), illetve 36 (R6) csoportot tartalmaz.

A PCOMPARE programmal végzett analízis a két rovar-specifikus toxin ismétlődő egységei között egyenes összefüggést mutatott ki. A δ -LIT R2-R9 ismétlődő szakaszainak az α -LIT analóg ismétlődő szakaszaival való összehasonlítása erős lineáris egyezést mutatott (Kiyatkin et al., 1993). A δ -LIT-ben lévő első repeat nem felel meg teljesen az α -LIT első szakaszának, de nagy hasonlóságot mutat az α -LIT R7 szakaszával. A δ -LIT R10 repeat leginkább az α -LIT R19 szakaszához hasonló: ez az ismétlődő szakasz annyiban szokatlan, hogy Ser, illetve Gly csoportot tartalmaz a 8., illetve 31. pozícióban. A következő hasonlóságot a δ -LIT R11-R13 szakaszok és az α -LIT R10-R12 szakaszok között találták. Előzőleg megjegyeztük, hogy az inszektotoxinokban az R7, R2 és R9 ismétlődő szakaszok a leginkább állandóak, ami arra enged következtetni, hogy funkciós szerepük van az inszektotoxicitásban. Kimutatták, hogy a vörösvérsejt ankyrin ismétlődő szakaszok nem egyenértékűek, ami a különböző proteineket kötő képességüket illeti (Davis et al., 1991), tehát feltételezhető, hogy a toxin ismétlődő szakaszai különbözőképpen járulnak hozzá funkciójuk teljesítéséhez.

A δ -LIT és α -LIT dot-mátrix analízissel való összehasonlítása kimutatta, hogy általános szerkezetük hasonló, hogy egy erős centrális átlós egyszeri törést tartalmaznak (a δ -LIT 900. és

1130. aminosavcsoportja között), amely mindkét toxin utolsó 160 aminosavánál kijavítódik. A centrális átló elmozdulása a toxinok hosszának különbözőségét tükrözi; a δ -LIT 190 aminosavval rövidebb, mint rovar-specifikus megfelelője.

Az érett protein számos szerkezeti doménre osztható: egy N-terminális végre, amely körülbelül 470 aminosav csoportból áll, és erős lineáris homológiát mutat az α -LIT-tel; a körülbelül 430 aminosavból álló centrális doménre, amelyet majdnem teljesen befoglalnak a tandem elrendezésű ankyrin-szerű ismétlődő egységek és egy körülbelül 160 aminosavból álló C-terminális doménre.

Az inszektotoxin protein szekvenciák egymáshoz igazításával kimutattuk, hogy mind az N-terminális, mind a C-terminális szerkezeti doménekben eléggé eltérő szekvenciákkal elválasztott, nagymértékben azonos szakaszok jelenléte látható, nagymértékű azonossági szinttel (az N-terminális doménnél 44,9%, a C-terminális végnél 37,1%). A két inszektotoxin primer szerkezetében a legdrámaibb különbségek az ismétlődő szakaszokat tartalmazó domének C-terminális részeire koncentrálódnak. A homológia a δ -LIT 13 ankyrin ismétlődő egységeire terjed ki. Ezt a szakaszt egy körülbelül 110 aminosav csoportból álló olyan szekvencia követi, amelynek sem az α -LIT-tel vagy α -LT-vel, sem az NBRF-PIR adatbázis egyetlen más proteinjével sincs nyilvánvaló homológiája. Érdekes, hogy az a domén, amely a δ -LIT-ből hiányzik, az α -LIT primer szerkezetében egy olyan specifikus szakaszt alkot, amely szokatlanul sok Cys csoportot tartalmaz, és amely az emlős-specifikus α -LT-vel mutat homológiát (Kiyatkin et al.,

1993). A két neurotoxin között meglévő ezen feltűnő szerkezeti különbségek arra utalnak, hogy az ankyrin-szerű ismétlődő domén C-terminális része különleges szerepet játszik, amennyiben megadja különböző funkcionális tulajdonságaik strukturális bázisát.

A fekete özvegy pók mérgéből származó nagy molekulatömegű protein toxinok a toxinok hatásos és specifikus osztályát alkotják. Ezek a toxinok komoly lehetőséget biztosítanak a neurális proteinek funkciójának felderítése és a rovar-specifikus toxinokkal való ellátás területén. Ezt a lehetőséget azonban ezelőtt nem tudták kihasználni, minthogy ezeket a protein toxinokat bármilyen funkcióval sem sikerült kifejezni. A találmány egy új rovar-specifikus toxint kódoló új DNS átírat klónozását, e toxin és más polipeptidek baktériumokban való működőképes állapotban történő kifejeződését ismerteti.

A δ -LIT cDNS-t egy olyan oligonukleotiddal klónoztuk, amely a toxin 1-23 aminosavszekvenciáján alapult, azonosságát további peptid szekvenciákkal, immunkémiai azonosságát pedig egy δ -LIT-re specifikus antitest használatával igazoltuk. A δ -LIT kikövetkeztetett primer szerkezete nagymértékben hasonlatos az emlős-specifikus α -LT-hez és a rovar-specifikus α -LIT-hez, ami arra utal, hogy ezek a toxinok egy hasonló szerkezetű családhoz tartoznak. A három protein olyan centrális domént tartalmaz, amely „ankyrin-szerű” ismétlődő szakaszokból áll. A δ -LIT 13 ilyen ismétlődő szakaszt tartalmaz. Az ankyrin családhoz tartozó proteinek a spectrint számos különböző belső membránproteinhez kötik (Bennett, 1992), és az a nézet alakult ki, hogy az ankyrinek „ankyrin repeat” doménje felelős a proteinekhez való való speci-

fikus kötődésért [Davis, Bennett, J.Biol.Chem., 265, 10589-10596 (1990); Davis et al., J.Biol.Chem., 266, 11163-11169 (1991)]. Az ankyrin családdal való strukturális hasonlóságot tükrözik a lat-rotoxinok ismert funkciós tulajdonságai; ismeretes, hogy az α -LT nagy affinitással ($K_d = 10^{-9}$ M) kötődik egy receptorhoz. Még meghatározandó, hogy az α -LT receptorhoz való specifikus kötődést vajon a toxin ankyrin repeat szakasza közvetíti-e.

Meglepő módon a δ -LIT nem mutat nagyobb hasonlóságot a rovar-specifikus α -LIT-hez (38%), mint az emlős-specifikus α -LT-hez (37%). Míg a δ -LIT-ben csak 13 ismétlődő szakasz van, addig az α -LT és az α -LIT 19, illetve 20 ankyrin repeat-et tartalmaz. Az utóbbi 6/7 repeat-nek nincs megfelelője a δ -LIT-ben, és lehetséges, hogy ez egy szerkezeti egység, minthogy mindkét α -toxin ebben a szakaszban 6 cisztein csoportot tartalmaz úgy, hogy egymástól való távolságuk részben állandó. Azonban, ami az α -LT és α -LIT toxicitási célpontjainak különböző voltát illeti, ezt a strukturális képet nem lehet azonosítani a rovar-specifikus toxicitással.

A δ -LIT-ben jelentős az ellentmondás a toxin cDNS szekvenciából levezetett molekulatömege és a méregből tisztított tiszta toxin relatív mobilitása között. Míg a protein N-terminális végét protein szekvenálással egyértelműen azonosítottuk, addig a C-terminális vég pontos helyzetének bizonyítása nehézséget okozott. A teljes hosszúságú cDNS baktériumokban való kifejezése azt mutatta, hogy a számított molekulatömeget pontosan tükrözi a protein relatív mobilitása SDS-PAGE rendszerben, és hogy a természetes méreg nagy része, hacsak nem az egésze, proteolitikus

C-terminális feldolgozás eredménye. A teljes hosszúságú rekombináns proteint tisztítottuk ugyan, de nem volt toxikus a sáskákra semmilyen körülmények között. A teljes hosszúságú protein a működőképes toxin inaktív prekurzora.

A méregből tisztított δ -LIT C-terminális végének pontos helyét MALDI tömegspektrometriával állapítottuk meg. (MALDI = matrix assisted laser desorption ionization). A mérés a hasítási helyet a protein 991. aminosavánál lokalizálta. A cDNS-t úgy módosítottuk, hogy egy 991 aminosavból álló proteint állítson elő olyan szekvenciával, mint amilyen a 2. számú szekvencia, és amely baktériumokban fejeződik ki. Az érett rekombináns protein oldható, és sáskákra letális hatású. A protein részleges tisztítása alapján arra lehetett következtetni, hogy a toxin erősen toxikus hatású.

A teljes génszekvencia csonka formájának a felhasználásával kapott érett toxin kifejezése — mint fent leírtuk — jelentős előnyökkel jár. Először, a toxint viszonylag könnyen előállíthatjuk — működőképesen — a csonka forma bakteriális rendszerben való expressziójával, miáltal elkerüljük, hogy pókok méregmirigyéből legyen szükséges a toxint tisztítani. Az eljárás lehetővé teszi a toxin ipari előállítását, ennek következtében kereskedelmi hasznosítását, azaz például, egy rovarirtó rendszerben fő komponensként való felhasználását.

A toxin számára ez a szokásos módszereken kívül — mint a permetezés — egyéb rendszerekben való alkalmazásra ad lehetőséget. Lehetőség nyílik például olyan módosított növényi sejt vagy növény — például gabona — előállítására, amely a csonka szek-

venciát magába foglaló rekombináns molekulát tartalmazza. Ilyen rendszer a csonka formát tartalmazó rekombináns bakulovírus. Ezek a vírusok erősen fertőzőképesek in vivo, gazdasejtekben rezisztensek az inaktiválással szemben, és képesek a beépített nukleotidszekvencia magas szintű kifejezésére gazda-rovar sejtekben. A növényre valószínűleg nem ártalmasak, sőt gerincesekre sem. Amikor egy rovar elfogyasztja a növényi szövetet, ezzel magához veszi a rekombináns molekulát és/vagy a toxint, amely végül a rovar pusztulását eredményezi. Minthogy a toxin rovar-specifikus, elfogyasztása esetén nem lesz káros hatása sem emberre, sem állatra.

A találmány egyik elemének a felhasználása esetén például bakteriális expressziós rendszerben fejezünk ki egy toxint, amely rendszerint biológiai rendszerekben egy prekursor protein poszttranszlációs módosulása révén keletkezik. Az eljárás értékét mutatja, hogy más proteineket kódoló más gének csonka formája is kifejezhető ilyen módon, és ez az elem szintén a találmány oltalmi köréhez tartozik.

A találmány olyan toxinra is vonatkozik, amely egy teljes izolált gén expressziója révén keletkezik, mint prekursor polipeptid, amely ezután poszttranszlációs úton módosul. A prekursor polipeptid aminosavszekvenciáját a 4. számú szekvencia, a toxin szekvenciáját pedig a 2. számú szekvencia írja le.

A δ -LIT toxinnak megfelelő prekursor polipeptidet kódoló izolált gén (3. számú szekvencia) (vagy egy analóg) vektorba klónozzható a prekursor polipeptid kifejezése céljából, amikor is bakulovírus expressziós rendszert használhatunk. Az ilyen módon

termelt prekursor polipeptidet ezután a fentiekben megjelölt helyeken, helyre irányuló mutagenezissel csonkíthatjuk, aktív toxin előállítására véget. Ez az eljárás lehetővé teszi, hogy a δ -LIT toxint vagy ennek aktív származékát a fekete özvegy póktól függetlenül állítsuk elő, mégpedig ipari méretekben, mint említettük, rovarirtó szerként való felhasználás céljára.

A fenti részletes leírásban jóllehet törekedtünk arra, hogy felhívjuk a figyelmet a találmány azon jellemzőire, amelyekről azt gondoljuk, hogy különlegesen fontosak, mégis meg kell jegyeznünk, hogy oltalmat igénylünk az előbbiek során említett vagy az ábrákban bemutatott minden olyan szabadalomképes elemre vagy ilyen elemek kombinációjára, ezeket akár különösen kihangsúlyoztuk, akár nem.

SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE

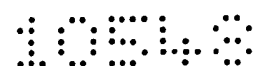
AZ 1.SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 (A) HOSSZÚSÁG: 2976 bázispár
 (B) TÍPUS: nukleinsav
 (C) SZÁL-TÍPUS: kettős
 (D) TOPOLOGIA: ismeretlen
- (ii) MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav
 (A) LEÍRÁS: /desc = "PLAZMID DNS"
- (vi) EREDETI SZÁRMAZÁS:
 (A) SZERVEZET: LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS
- (vii) KÖZVETLEN FORRÁS:
 (B) KLÓN: pT7.deltaM
- (ix) SAJÁTOSság:
 (A) NÉV/JEL: CDS
 (B) HELYZET:1..2973
- (xi) AZ 1.SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAT GAA GAA GAT GGA GAA ATG ACT CTA GAA GAA AGA CAA GCA CAA TGC	48
Asp Glu Glu Asp Gly Glu Met Thr Leu Glu Glu Arg Gln Ala Gln Cys	
1 5 10 15	
AAA GCA ATA GAG TAC AGC AAT TCA GTT TTT GGG ATG ATC GCT GAT GTA	96
Lys Ala Ile Glu Tyr Ser Asn Ser Val Phe Gly Met Ile Ala Asp Val	
20 25 30	
GCT AAC GAC ATC GGT TCC ATT CCT GTA ATT GGC GAA GTA GTT GGC ATT	144
Ala Asn Asp Ile Gly Ser Ile Pro Val Ile Gly Glu Val Val Gly Ile	
35 40 45	
GTA ACT GCC CCA ATT GCC ATC GTA AGT CAC ATT ACT AGC GCA GGC TTG	192
Val Thr Ala Pro Ile Ala Ile Val Ser His Ile Thr Ser Ala Gly Leu	
50 55 60	
GAT ATA GCT TCT ACG GCA TTA GAT TGT GAT GAT ATA CCT TTT GAT GAG	240
Asp Ile Ala Ser Thr Ala Leu Asp Cys Asp Asp Ile Pro Phe Asp Glu	
65 70 75 80	
ATT AAG GAA ATA TTA GAA GAA AGA TTC AAT GAA ATA GAT AGA AAG TTG	288
Ile Lys Glu Ile Leu Glu Glu Arg Phe Asn Glu Ile Asp Arg Lys Leu	
85 90 95	
GAC AAG AAC ACA GCT GCT TTG GAA GAG GTC TCT AAA CTG GTA AGT AAA	336
Asp Lys Asn Thr Ala Ala Leu Glu Glu Val Ser Lys Leu Val Ser Lys	
100 105 110	



ACT	TTT	GTT	ACG	GTG	GAA	AAA	ACA	AGG	AAT	GAA	ATG	AAC	GAA	AAT	TTT	384
Thr	Phe	Val	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Arg	Asn	Glu	Met	Asn	Glu	Asn	Phe	
		115					120					125				
AAG	CTT	GTT	TTG	GAA	ACT	ATA	GAA	AGC	AAA	GAA	ATA	AAA	TCA	ATT	GTA	432
Lys	Leu	Val	Leu	Glu	Thr	Ile	Glu	Ser	Lys	Glu	Ile	Lys	Ser	Ile	Val	
	130					135					140					
TTC	AAA	ATA	AAT	GAT	TTT	AAA	AAG	TTT	TTT	GAA	AAA	GAA	CGA	CAA	AGA	480
Phe	Lys	Ile	Asn	Asp	Phe	Lys	Lys	Phe	Phe	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Arg	
145					150					155					160	
ATT	AAA	GGT	TTG	CCT	AAA	GAT	AGG	TAT	GTT	GCT	AAG	CTT	CTA	GAA	CAA	528
Ile	Lys	Gly	Leu	Pro	Lys	Asp	Arg	Tyr	Val	Ala	Lys	Leu	Leu	Glu	Gln	
				165					170					175		
AAA	GGT	ATT	TTA	GGT	TCT	TTA	AAA	GAA	GTA	AGA	GAA	CCA	TCT	GGA	AAC	576
Lys	Gly	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Val	Arg	Glu	Pro	Ser	Gly	Asn	
			180					185					190			
AGT	CTG	AGC	TCC	GCG	TTA	AAT	GAA	CTC	TTA	GAC	AAA	AAC	AAC	AAC	TAT	624
Ser	Leu	Ser	Ser	Ala	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Asp	Lys	Asn	Asn	Asn	Tyr	
		195					200					205				
GCC	ATC	CCA	AAA	GTG	GTT	GAT	GAT	AAT	AAG	GCC	TTT	CAG	GCG	CTG	TAT	672
Ala	Ile	Pro	Lys	Val	Val	Asp	Asp	Asn	Lys	Ala	Phe	Gln	Ala	Leu	Tyr	
	210					215					220					
GCT	TTA	TTT	TAT	GGA	ACT	CAG	ACT	TAT	GCA	GCC	GTT	ATG	TTT	TTC	TTA	720
Ala	Leu	Phe	Tyr	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ala	Ala	Val	Met	Phe	Phe	Leu	
225					230					235					240	
CTC	GAA	CAA	CAT	TCT	TAT	CTG	GCT	GAT	TAT	TAT	TAC	CAA	AAA	GGT	GAT	768
Leu	Glu	Gln	His	Ser	Tyr	Leu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	Lys	Gly	Asp	
				245					250					255		
GAT	GTA	AAT	TTT	AAT	GCA	GAA	TTT	AAT	AAT	GTA	GCA	ATT	ATT	TTT	GAT	816
Asp	Val	Asn	Phe	Asn	Ala	Glu	Phe	Asn	Asn	Val	Ala	Ile	Ile	Phe	Asp	
			260					265					270			
GAC	TTT	AAA	TCA	TCA	CTA	ACA	GGA	GGA	GAT	GAC	GGA	TTA	ATA	GAT	AAT	864
Asp	Phe	Lys	Ser	Ser	Leu	Thr	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Leu	Ile	Asp	Asn	
		275					280					285				
GTC	ATT	GAG	GTT	CTT	AAC	ACC	GTG	AAA	GCA	TTA	CCA	TTT	ATA	AAG	AAC	912
Val	Ile	Glu	Val	Leu	Asn	Thr	Val	Lys	Ala	Leu	Pro	Phe	Ile	Lys	Asn	
	290					295					300					
GCC	GAC	AGT	AAA	CTA	TAC	AGA	GAA	TTA	GTA	ACT	AGA	ACA	AAA	GCT	TTA	960
Ala	Asp	Ser	Lys	Leu	Tyr	Arg	Glu	Leu	Val	Thr	Arg	Thr	Lys	Ala	Leu	
305					310					315					320	
GAG	ACT	CTT	AAA	AAT	CAA	ATC	AAA	ACG	ACT	GAT	TTG	CCT	CTT	ATA	GAT	1008
Glu	Thr	Leu	Lys	Asn	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Ile	Asp	
				325					330					335		



GAT ATA CCC GAA ACT TTG TCT CAA GTG AAC TTT CCG AAT GAC GAA AAT	1056
Asp Ile Pro Glu Thr Leu Ser Gln Val Asn Phe Pro Asn Asp Glu Asn	
340 345 350	
CAA TTG CCT ACA CCA ATA GGA AAT TGG GTT GAT GGC GTA GAA GTT AGG	1104
Gln Leu Pro Thr Pro Ile Gly Asn Trp Val Asp Gly Val Glu Val Arg	
355 360 365	
TAC GCA GTA CAG TAT GAA AGT AAG GGC ATG TAT TCG AAA TTC AGT GAA	1152
Tyr Ala Val Gln Tyr Glu Ser Lys Gly Met Tyr Ser Lys Phe Ser Glu	
370 375 380	
TGG TCT GAA CCA TTT ACT GTC CAA GGT AAC GCT TGT CCG ACT ATA AAA	1200
Trp Ser Glu Pro Phe Thr Val Gln Gly Asn Ala Cys Pro Thr Ile Lys	
385 390 395 400	
GTT CGT GTT GAT CCG AAA AAG AGA AAT AGA CTT ATC TTT AGG AAG TTC	1248
Val Arg Val Asp Pro Lys Lys Arg Asn Arg Leu Ile Phe Arg Lys Phe	
405 410 415	
AAC TCA GGA AAA CCT CAG TTT GCT GGA ACC ATG ACT CAT TCA CAA ACA	1296
Asn Ser Gly Lys Pro Gln Phe Ala Gly Thr Met Thr His Ser Gln Thr	
420 425 430	
AAT TTT AAA GAT ATT CAT CGT GAT CTA TAC GAT GCA GCC TTA AAT ATT	1344
Asn Phe Lys Asp Ile His Arg Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Leu Asn Ile	
435 440 445	
AAT AAG TTG AAA GCA GTG GAT GAA GCT ACA ACT TTG ATT GAA AAG GGT	1392
Asn Lys Leu Lys Ala Val Asp Glu Ala Thr Thr Leu Ile Glu Lys Gly	
450 455 460	
GCA GAC ATA GAA GCA AAA TTT GAC AAT GAC AGA AGT GCA ATG CAC GCA	1440
Ala Asp Ile Glu Ala Lys Phe Asp Asn Asp Arg Ser Ala Met His Ala	
465 470 475 480	
GTT GCA TAT CGA GGA AAT AAC AAA ATA GCC TTA AGA TTT CTT TTG AAA	1488
Val Ala Tyr Arg Gly Asn Asn Lys Ile Ala Leu Arg Phe Leu Leu Lys	
485 490 495	
AAT CAA TCC ATT GAC ATC GAG TTA AAA GAT AAA AAC GGC TTT ACT CCT	1536
Asn Gln Ser Ile Asp Ile Glu Leu Lys Asp Lys Asn Gly Phe Thr Pro	
500 505 510	
CTA CAC ATC GCA GCT GAA GCA GGT CAG GCA GGA TTT GTT AAG TTA CTA	1584
Leu His Ile Ala Ala Glu Ala Gly Gln Ala Gly Phe Val Lys Leu Leu	
515 520 525	
ATA AAT CAT GGA GCT GAT GTG AAT GCA AAA ACA AGT AAG ACA AAT TTG	1632
Ile Asn His Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Thr Ser Lys Thr Asn Leu	
530 535 540	
ACA CCA TTA CAT CTT GCA ACA CGT AGT GGA TTT TCA AAA ACT GTA AGA	1680
Thr Pro Leu His Leu Ala Thr Arg Ser Gly Phe Ser Lys Thr Val Arg	
545 550 555 560	



AAT TTA CTA GAA AGC CCA AAT ATT AAG GTA AAT GAA AAG GAG GAT GAC	1728
Asn Leu Leu Glu Ser Pro Asn Ile Lys Val Asn Glu Lys Glu Asp Asp	
565 570 575	
GGA TTT ACA CCT TTG CAT ACT GCA GTA ATG AGT ACT TAT ATG GTT GTC	1776
Gly Phe Thr Pro Leu His Thr Ala Val Met Ser Thr Tyr Met Val Val	
580 585 590	
GAT GCT TTG CTA AAT CAT CCA GAC ATT GAT AAA AAT GCG CAG TCT ACG	1824
Asp Ala Leu Leu Asn His Pro Asp Ile Asp Lys Asn Ala Gln Ser Thr	
595 600 605	
TCA GGA TTG ACT CCT TTC CAT TTA GCA ATT ATT AAT GAA AGT CAA GAA	1872
Ser Gly Leu Thr Pro Phe His Leu Ala Ile Ile Asn Glu Ser Gln Glu	
610 615 620	
GTT GCA GAA TCT TTA GTG GAA AGT AAT GCT GAT CTA AAT ATT CAG GAT	1920
Val Ala Glu Ser Leu Val Glu Ser Asn Ala Asp Leu Asn Ile Gln Asp	
625 630 635 640	
GTT AAC CAT ATG GCT CCT ATT CAT TTT GCA GCT TCA ATG GGT AGT ATT	1968
Val Asn His Met Ala Pro Ile His Phe Ala Ala Ser Met Gly Ser Ile	
645 650 655	
AAA ATG CTT AGA TAT CTC ATT TCC ATA AAA GAT AAA GTT AGT ATT AAT	2016
Lys Met Leu Arg Tyr Leu Ile Ser Ile Lys Asp Lys Val Ser Ile Asn	
660 665 670	
TCT GTG ACT GAG AAT AAT AAC TGG ACA CCT TTA CAT TTT GCT ATA TAT	2064
Ser Val Thr Glu Asn Asn Asn Trp Thr Pro Leu His Phe Ala Ile Tyr	
675 680 685	
TTT AAA AAA GAA GAT GCT GCA AAA GAA TTG TTG AAA CAA GAT GAC ATA	2112
Phe Lys Lys Glu Asp Ala Ala Lys Glu Leu Leu Lys Gln Asp Asp Ile	
690 695 700	
AAT TTA ACA ATT GTT GCA GAT GGT AAT CTT ACC GTT TTA CAT CTT GCT	2160
Asn Leu Thr Ile Val Ala Asp Gly Asn Leu Thr Val Leu His Leu Ala	
705 710 715 720	
GTT TCG ACA GGA CAA ATA AAT ATA ATT AAA GAA TTA TTG AAG AGA GGC	2208
Val Ser Thr Gly Gln Ile Asn Ile Ile Lys Glu Leu Leu Lys Arg Gly	
725 730 735	
TCC AAT ATA GAA GAA AAA ACT GGA GAA GGA TAT ACA TCT CTC CAC ATC	2256
Ser Asn Ile Glu Glu Lys Thr Gly Glu Gly Tyr Thr Ser Leu His Ile	
740 745 750	
GCT GCG ATG CGA AAG GAG CCA GAG ATA GCT GTT GTT TTG ATT GAA AAC	2304
Ala Ala Met Arg Lys Glu Pro Glu Ile Ala Val Val Leu Ile Glu Asn	
755 760 765	
GGT GCT GAC ATA GAA GCT CGA TCA GCT GAT AAT TTA ACA CCT TTA CAT	2352
Gly Ala Asp Ile Glu Ala Arg Ser Ala Asp Asn Leu Thr Pro Leu His	
770 775 780	

TCT	GCC	GCA	AAA	ATA	GGA	AGG	AAA	TCT	ACA	GTA	CTT	TAC	TTA	TTA	GAA	2400
Ser	Ala	Ala	Lys	Ile	Gly	Arg	Lys	Ser	Thr	Val	Leu	Tyr	Leu	Leu	Glu	
785					790					795					800	
AAA	GGA	GCT	GAC	ATT	GGA	GCT	AAA	ACA	GCA	GAC	GGT	TCT	ACT	GCC	TTG	2448
Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Asp	Gly	Ser	Thr	Ala	Leu	
				805					810					815		
CAT	TTA	GCT	GTA	TCT	GGT	CGT	AAA	ATG	AAA	ACT	GTT	GAA	ACT	CTA	TTA	2496
His	Leu	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Lys	Met	Lys	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Leu	
			820					825						830		
AAT	AAA	GGA	GCA	AAT	TTA	AAA	GAA	TAC	GAT	AAC	AAT	AAA	TAT	TTG	CCA	2544
Asn	Lys	Gly	Ala	Asn	Leu	Lys	Glu	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Tyr	Leu	Pro	
		835					840					845				
ATA	CAT	AAA	GCT	ATT	ATT	AAT	GAT	GAC	CTT	GAC	ATG	GTA	CGT	TTG	TTT	2592
Ile	His	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Met	Val	Arg	Leu	Phe	
	850					855					860					
CTT	GAA	AAA	GAT	CCC	AGT	CTC	AAA	GAT	GAT	GAA	ACA	GAA	GAG	GGT	AGA	2640
Leu	Glu	Lys	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Arg	
865					870					875					880	
ACT	TCA	ATT	ATG	TTA	ATT	GTT	CAG	AAA	TTG	CTT	CTT	GAA	TTA	TAT	AAC	2688
Thr	Ser	Ile	Met	Leu	Ile	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Tyr	Asn	
				885					890					895		
TAT	TTT	ATA	AAT	AAT	TAT	GCT	GAA	ACT	TTG	GAT	GAA	GAA	GCT	TTA	TTC	2736
Tyr	Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Ala	Glu	Thr	Leu	Asp	Glu	Glu	Ala	Leu	Phe	
			900					905					910			
AAC	CGC	TTA	GAT	GAA	CAA	GGG	AAA	TTA	GAG	CTT	GCA	TAT	ATC	TTC	CAT	2784
Asn	Arg	Leu	Asp	Glu	Gln	Gly	Lys	Leu	Glu	Leu	Ala	Tyr	Ile	Phe	His	
		915					920					925				
AAT	AAA	GAA	GGT	GAT	GCA	AAA	GAG	GCT	GTT	AAG	CCA	ACT	ATC	CTT	GTT	2832
Asn	Lys	Glu	Gly	Asp	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	
	930					935					940					
ACA	ATT	AAA	CTT	ATG	GAA	TAC	TGC	TTA	AAA	AAA	CTT	CGC	GAA	GAG	TCT	2880
Thr	Ile	Lys	Leu	Met	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu	Ser	
945					950					955					960	
GGA	GCT	CCT	GAA	GGT	AGT	TTC	GAT	TCT	CCA	TCT	TCA	AAG	CAA	TGT	ATT	2928
Gly	Ala	Pro	Glu	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Pro	Ser	Ser	Lys	Gln	Cys	Ile	
				965					970					975		
TCT	ACC	TTT	TCA	GAG	GAT	GAA	ATG	TTT	CGT	CGT	ACT	TTA	CCG	GAA	TGA	2976
Ser	Thr	Phe	Ser	Glu	Asp	Glu	Met	Phe	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Glu	*	
			980					985					990			

A 2.SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 (A) HOSSZÚSÁG: 991 aminosav
 (B) TÍPUS: aminosav
 (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: protein

(xi) A 2.SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

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

Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Thr	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Arg
545					550					555					560
Asn	Leu	Leu	Glu	Ser	Pro	Asn	Ile	Lys	Val	Asn	Glu	Lys	Glu	Asp	Asp
			565						570					575	
Gly	Phe	Thr	Pro	Leu	His	Thr	Ala	Val	Met	Ser	Thr	Tyr	Met	Val	Val
			580					585					590		
Asp	Ala	Leu	Leu	Asn	His	Pro	Asp	Ile	Asp	Lys	Asn	Ala	Gln	Ser	Thr
		595					600					605			
Ser	Gly	Leu	Thr	Pro	Phe	His	Leu	Ala	Ile	Ile	Asn	Glu	Ser	Gln	Glu
	610					615					620				
Val	Ala	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ser	Asn	Ala	Asp	Leu	Asn	Ile	Gln	Asp
625					630					635					640
Val	Asn	His	Met	Ala	Pro	Ile	His	Phe	Ala	Ala	Ser	Met	Gly	Ser	Ile
				645					650					655	
Lys	Met	Leu	Arg	Tyr	Leu	Ile	Ser	Ile	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Ile	Asn
			660					665					670		
Ser	Val	Thr	Glu	Asn	Asn	Asn	Trp	Thr	Pro	Leu	His	Phe	Ala	Ile	Tyr
		675					680					685			
Phe	Lys	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Gln	Asp	Asp	Ile
	690					695					700				
Asn	Leu	Thr	Ile	Val	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Thr	Val	Leu	His	Leu	Ala
705					710					715					720
Val	Ser	Thr	Gly	Gln	Ile	Asn	Ile	Ile	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Arg	Gly
			725						730					735	
Ser	Asn	Ile	Glu	Glu	Lys	Thr	Gly	Glu	Gly	Tyr	Thr	Ser	Leu	His	Ile
			740					745					750		
Ala	Ala	Met	Arg	Lys	Glu	Pro	Glu	Ile	Ala	Val	Val	Leu	Ile	Glu	Asn
		755					760					765			
Gly	Ala	Asp	Ile	Glu	Ala	Arg	Ser	Ala	Asp	Asn	Leu	Thr	Pro	Leu	His
	770					775					780				
Ser	Ala	Ala	Lys	Ile	Gly	Arg	Lys	Ser	Thr	Val	Leu	Tyr	Leu	Leu	Glu
785					790					795					800
Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Asp	Gly	Ser	Thr	Ala	Leu
			805						810					815	
His	Leu	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Lys	Met	Lys	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Leu
			820					825					830		
Asn	Lys	Gly	Ala	Asn	Leu	Lys	Glu	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Tyr	Leu	Pro
		835					840					845			

Ile	His	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Met	Val	Arg	Leu	Phe
850						855					860				
Leu	Glu	Lys	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Arg
865					870					875					880
Thr	Ser	Ile	Met	Leu	Ile	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Tyr	Asn
			885						890					895	
Tyr	Phe	Ile	Asn	Asn	Tyr	Ala	Glu	Thr	Leu	Asp	Glu	Glu	Ala	Leu	Phe
			900					905					910		
Asn	Arg	Leu	Asp	Glu	Gln	Gly	Lys	Leu	Glu	Leu	Ala	Tyr	Ile	Phe	His
		915					920					925			
Asn	Lys	Glu	Gly	Asp	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Val
	930					935					940				
Thr	Ile	Lys	Leu	Met	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu	Ser
945					950					955					960
Gly	Ala	Pro	Glu	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Pro	Ser	Ser	Lys	Gln	Cys	Ile
				965					970					975	
Ser	Thr	Phe	Ser	Glu	Asp	Glu	Met	Phe	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Glu	
			980					985					990		

A 3.SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 - (A) HOSSZÚSÁG: 3706 bázispár
 - (B) TÍPUS: nukleinsav
 - (C) SZÁL-TÍPUS: kettős
 - (D) TOPOLOGIA: cirkuláris
- (ii) MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav
 - (A) LEÍRÁS: /desc = "PLAZMID DNS"
- (vi) ERDETI SZÁRMAZÁS:
 - (A) SZERVEZET: LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS
- (vii) KÖZVETLEN FORRÁS:
 - (B) KLÓN: pT7.deltaFL
- (ix) SAJÁTOSSÁG:
 - (A) NÉV/JEL: CDS
 - (B) HELYZET:45..3686
- (xi) A 3.SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGTCAATTGA AACTTTATGA TAGGATTCAC TTTCTTATAT AGAA ATG CAT TCC AAA	56
Met His Ser Lys	995
GAA TTA CAA ACT ATT TCA GCA GCG GTA GCA CGA AAA GCA GTA CCC AAT	104
Glu Leu Gln Thr Ile Ser Ala Ala Val Ala Arg Lys Ala Val Pro Asn	1000 1005 1010
ACT ATG GTT ATT CGG TTG AAA AGA GAT GAA GAA GAT GGA GAA ATG ACT	152
Thr Met Val Ile Arg Leu Lys Arg Asp Glu Glu Asp Gly Glu Met Thr	1015 1020 1025
CTA GAA GAA AGA CAA GCA CAA TGC AAA GCA ATA GAG TAC AGC AAT TCA	200
Leu Glu Glu Arg Gln Ala Gln Cys Lys Ala Ile Glu Tyr Ser Asn Ser	1030 1035 1040
GTT TTT GGG ATG ATC GCT GAT GTA GCT AAC GAC ATC GGT TCC ATT CCT	248
Val Phe Gly Met Ile Ala Asp Val Ala Asn Asp Ile Gly Ser Ile Pro	1045 1050 1055
GTA ATT GGC GAA GTA GTT GGC ATT GTA ACT GCC CCA ATT GCC ATC GTA	296
Val Ile Gly Glu Val Val Gly Ile Val Thr Ala Pro Ile Ala Ile Val	1060 1065 1070 1075
AGT CAC ATT ACT AGC GCA GGC TTG GAT ATA GCT TCT ACG GCA TTA GAT	344
Ser His Ile Thr Ser Ala Gly Leu Asp Ile Ala Ser Thr Ala Leu Asp	1080 1085 1090
TGT GAT GAT ATA CCT TTT GAT GAG ATT AAG GAA ATA TTA GAA GAA AGA	392
Cys Asp Asp Ile Pro Phe Asp Glu Ile Lys Glu Ile Leu Glu Glu Arg	1095 1100 1105
TTC AAT GAA ATA GAT AGA AAG TTG GAC AAG AAC ACA GCT GCT TTG GAA	440
Phe Asn Glu Ile Asp Arg Lys Leu Asp Lys Asn Thr Ala Ala Leu Glu	1110 1115 1120
GAG GTC TCT AAA CTG GTA AGT AAA ACT TTT GTT ACG GTG GAA AAA ACA	488
Glu Val Ser Lys Leu Val Ser Lys Thr Phe Val Thr Val Glu Lys Thr	1125 1130 1135
AGG AAT GAA ATG AAC GAA AAT TTT AAG CTT GTT TTG GAA ACT ATA GAA	536
Arg Asn Glu Met Asn Glu Asn Phe Lys Leu Val Leu Glu Thr Ile Glu	1140 1145 1150 1155
AGC AAA GAA ATA AAA TCA ATT GTA TTC AAA ATA AAT GAT TTT AAA AAG	584
Ser Lys Glu Ile Lys Ser Ile Val Phe Lys Ile Asn Asp Phe Lys Lys	1160 1165 1170
TTT TTT GAA AAA GAA CGA CAA AGA ATT AAA GGT TTG CCT AAA GAT AGG	632
Phe Phe Glu Lys Glu Arg Gln Arg Ile Lys Gly Leu Pro Lys Asp Arg	1175 1180 1185
TAT GTT GCT AAG CTT CTA GAA CAA AAA GGT ATT TTA GGT TCT TTA AAA	680
Tyr Val Ala Lys Leu Leu Glu Gln Lys Gly Ile Leu Gly Ser Leu Lys	1190 1195 1200



GAA GTA AGA GAA CCA TCT GGA AAC AGT CTG AGC TCC GCG TTA AAT GAA Glu Val Arg Glu Pro Ser Gly Asn Ser Leu Ser Ser Ala Leu Asn Glu 1205 1210 1215	728
CTC TTA GAC AAA AAC AAC AAC TAT GCC ATC CCA AAA GTG GTT GAT GAT Leu Leu Asp Lys Asn Asn Asn Tyr Ala Ile Pro Lys Val Val Asp Asp 1220 1225 1230 1235	776
AAT AAG GCC TTT CAG GCG CTG TAT GCT TTA TTT TAT GGA ACT CAG ACT Asn Lys Ala Phe Gln Ala Leu Tyr Ala Leu Phe Tyr Gly Thr Gln Thr 1240 1245 1250	824
TAT GCA GCC GTT ATG TTT TTC TTA CTC GAA CAA CAT TCT TAT CTG GCT Tyr Ala Ala Val Met Phe Phe Leu Leu Glu Gln His Ser Tyr Leu Ala 1255 1260 1265	872
GAT TAT TAT TAC CAA AAA GGT GAT GAT GTA AAT TTT AAT GCA GAA TTT Asp Tyr Tyr Tyr Gln Lys Gly Asp Asp Val Asn Phe Asn Ala Glu Phe 1270 1275 1280	920
AAT AAT GTA GCA ATT ATT TTT GAT GAC TTT AAA TCA TCA CTA ACA GGA Asn Asn Val Ala Ile Ile Phe Asp Asp Phe Lys Ser Ser Leu Thr Gly 1285 1290 1295	968
GGA GAT GAC GGA TTA ATA GAT AAT GTC ATT GAG GTT CTT AAC ACC GTG Gly Asp Asp Gly Leu Ile Asp Asn Val Ile Glu Val Leu Asn Thr Val 1300 1305 1310 1315	1016
AAA GCA TTA CCA TTT ATA AAG AAC GCC GAC AGT AAA CTA TAC AGA GAA Lys Ala Leu Pro Phe Ile Lys Asn Ala Asp Ser Lys Leu Tyr Arg Glu 1320 1325 1330	1064
TTA GTA ACT AGA ACA AAA GCT TTA GAG ACT CTT AAA AAT CAA ATC AAA Leu Val Thr Arg Thr Lys Ala Leu Glu Thr Leu Lys Asn Gln Ile Lys 1335 1340 1345	1112
ACG ACT GAT TTG CCT CTT ATA GAT GAT ATA CCC GAA ACT TTG TCT CAA Thr Thr Asp Leu Pro Leu Ile Asp Asp Ile Pro Glu Thr Leu Ser Gln 1350 1355 1360	1160
GTG AAC TTT CCG AAT GAC GAA AAT CAA TTG CCT ACA CCA ATA GGA AAT Val Asn Phe Pro Asn Asp Glu Asn Gln Leu Pro Thr Pro Ile Gly Asn 1365 1370 1375	1208
TGG GTT GAT GGC GTA GAA GTT AGG TAC GCA GTA CAG TAT GAA AGT AAG Trp Val Asp Gly Val Glu Val Arg Tyr Ala Val Gln Tyr Glu Ser Lys 1380 1385 1390 1395	1256
GGC ATG TAT TCG AAA TTC AGT GAA TGG TCT GAA CCA TTT ACT GTC CAA Gly Met Tyr Ser Lys Phe Ser Glu Trp Ser Glu Pro Phe Thr Val Gln 1400 1405 1410	1304
GGT AAC GCT TGT CCG ACT ATA AAA GTT CGT GTT GAT CCG AAA AAG AGA Gly Asn Ala Cys Pro Thr Ile Lys Val Arg Val Asp Pro Lys Lys Arg 1415 1420 1425	1352

AAT AGA CTT ATC TTT AGG AAG TTC AAC TCA GGA AAA CCT CAG TTT GCT Asn Arg Leu Ile Phe Arg Lys Phe Asn Ser Gly Lys Pro Gln Phe Ala 1430 1435 1440	1400
GGA ACC ATG ACT CAT TCA CAA ACA AAT TTT AAA GAT ATT CAT CGT GAT Gly Thr Met Thr His Ser Gln Thr Asn Phe Lys Asp Ile His Arg Asp 1445 1450 1455	1448
CTA TAC GAT GCA GCC TTA AAT ATT AAT AAG TTG AAA GCA GTG GAT GAA Leu Tyr Asp Ala Ala Leu Asn Ile Asn Lys Leu Lys Ala Val Asp Glu 1460 1465 1470 1475	1496
GCT ACA ACT TTG ATT GAA AAG GGT GCA GAC ATA GAA GCA AAA TTT GAC Ala Thr Thr Leu Ile Glu Lys Gly Ala Asp Ile Glu Ala Lys Phe Asp 1480 1485 1490	1544
AAT GAC AGA AGT GCA ATG CAC GCA GTT GCA TAT CGA GGA AAT AAC AAA Asn Asp Arg Ser Ala Met His Ala Val Ala Tyr Arg Gly Asn Asn Lys 1495 1500 1505	1592
ATA GCC TTA AGA TTT CTT TTG AAA AAT CAA TCC ATT GAC ATC GAG TTA Ile Ala Leu Arg Phe Leu Leu Lys Asn Gln Ser Ile Asp Ile Glu Leu 1510 1515 1520	1640
AAA GAT AAA AAC GGC TTT ACT CCT CTA CAC ATC GCA GCT GAA GCA GGT Lys Asp Lys Asn Gly Phe Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Glu Ala Gly 1525 1530 1535	1688
CAG GCA GGA TTT GTT AAG TTA CTA ATA AAT CAT GGA GCT GAT GTG AAT Gln Ala Gly Phe Val Lys Leu Leu Ile Asn His Gly Ala Asp Val Asn 1540 1545 1550 1555	1736
GCA AAA ACA AGT AAG ACA AAT TTG ACA CCA TTA CAT CTT GCA ACA CGT Ala Lys Thr Ser Lys Thr Asn Leu Thr Pro Leu His Leu Ala Thr Arg 1560 1565 1570	1784
AGT GGA TTT TCA AAA ACT GTA AGA AAT TTA CTA GAA AGC CCA AAT ATT Ser Gly Phe Ser Lys Thr Val Arg Asn Leu Leu Glu Ser Pro Asn Ile 1575 1580 1585	1832
AAG GTA AAT GAA AAG GAG GAT GAC GGA TTT ACA CCT TTG CAT ACT GCA Lys Val Asn Glu Lys Glu Asp Asp Gly Phe Thr Pro Leu His Thr Ala 1590 1595 1600	1880
GTA ATG AGT ACT TAT ATG GTT GTC GAT GCT TTG CTA AAT CAT CCA GAC Val Met Ser Thr Tyr Met Val Val Asp Ala Leu Leu Asn His Pro Asp 1605 1610 1615	1928
ATT GAT AAA AAT GCG CAG TCT ACG TCA GGA TTG ACT CCT TTC CAT TTA Ile Asp Lys Asn Ala Gln Ser Thr Ser Gly Leu Thr Pro Phe His Leu 1620 1625 1630 1635	1976
GCA ATT ATT AAT GAA AGT CAA GAA GTT GCA GAA TCT TTA GTG GAA AGT Ala Ile Ile Asn Glu Ser Gln Glu Val Ala Glu Ser Leu Val Glu Ser 1640 1645 1650	2024

AAT GCT GAT CTA AAT ATT CAG GAT GTT AAC CAT ATG GCT CCT ATT CAT Asn Ala Asp Leu Asn Ile Gln Asp Val Asn His Met Ala Pro Ile His 1655 1660 1665	2072
TTT GCA GCT TCA ATG GGT AGT ATT AAA ATG CTT AGA TAT CTC ATT TCC Phe Ala Ala Ser Met Gly Ser Ile Lys Met Leu Arg Tyr Leu Ile Ser 1670 1675 1680	2120
ATA AAA GAT AAA GTT AGT ATT AAT TCT GTG ACT GAG AAT AAT AAC TGG Ile Lys Asp Lys Val Ser Ile Asn Ser Val Thr Glu Asn Asn Asn Trp 1685 1690 1695	2168
ACA CCT TTA CAT TTT GCT ATA TAT TTT AAA AAA GAA GAT GCT GCA AAA Thr Pro Leu His Phe Ala Ile Tyr Phe Lys Lys Glu Asp Ala Ala Lys 1700 1705 1710 1715	2216
GAA TTG TTG AAA CAA GAT GAC ATA AAT TTA ACA ATT GTT GCA GAT GGT Glu Leu Leu Lys Gln Asp Asp Ile Asn Leu Thr Ile Val Ala Asp Gly 1720 1725 1730	2264
AAT CTT ACC GTT TTA CAT CTT GCT GTT TCG ACA GGA CAA ATA AAT ATA Asn Leu Thr Val Leu His Leu Ala Val Ser Thr Gly Gln Ile Asn Ile 1735 1740 1745	2312
ATT AAA GAA TTA TTG AAG AGA GGC TCC AAT ATA GAA GAA AAA ACT GGA Ile Lys Glu Leu Leu Lys Arg Gly Ser Asn Ile Glu Glu Lys Thr Gly 1750 1755 1760	2360
GAA GGA TAT ACA TCT CTC CAC ATC GCT GCG ATG CGA AAG GAG CCA GAG Glu Gly Tyr Thr Ser Leu His Ile Ala Ala Met Arg Lys Glu Pro Glu 1765 1770 1775	2408
ATA GCT GTT GTT TTG ATT GAA AAC GGT GCT GAC ATA GAA GCT CGA TCA Ile Ala Val Val Leu Ile Glu Asn Gly Ala Asp Ile Glu Ala Arg Ser 1780 1785 1790 1795	2456
GCT GAT AAT TTA ACA CCT TTA CAT TCT GCC GCA AAA ATA GGA AGG AAA Ala Asp Asn Leu Thr Pro Leu His Ser Ala Ala Lys Ile Gly Arg Lys 1800 1805 1810	2504
TCT ACA GTA CTT TAC TTA TTA GAA AAA GGA GCT GAC ATT GGA GCT AAA Ser Thr Val Leu Tyr Leu Leu Glu Lys Gly Ala Asp Ile Gly Ala Lys 1815 1820 1825	2552
ACA GCA GAC GGT TCT ACT GCC TTG CAT TTA GCT GTA TCT GGT CGT AAA Thr Ala Asp Gly Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Val Ser Gly Arg Lys 1830 1835 1840	2600
ATG AAA ACT GTT GAA ACT CTA TTA AAT AAA GGA GCA AAT TTA AAA GAA Met Lys Thr Val Glu Thr Leu Leu Asn Lys Gly Ala Asn Leu Lys Glu 1845 1850 1855	2648
TAC GAT AAC AAT AAA TAT TTG CCA ATA CAT AAA GCT ATT ATT AAT GAT Tyr Asp Asn Asn Lys Tyr Leu Pro Ile His Lys Ala Ile Ile Asn Asp 1860 1865 1870 1875	2696

GAC CTT GAC ATG GTA CGT TTG TTT CTT GAA AAA GAT CCC AGT CTC AAA Asp Leu Asp Met Val Arg Leu Phe Leu Glu Lys Asp Pro Ser Leu Lys 1880 1885 1890	2744
GAT GAT GAA ACA GAA GAG GGT AGA ACT TCA ATT ATG TTA ATT GTT CAG Asp Asp Glu Thr Glu Glu Gly Arg Thr Ser Ile Met Leu Ile Val Gln 1895 1900 1905	2792
AAA TTG CTT CTT GAA TTA TAT AAC TAT TTT ATA AAT AAT TAT GCT GAA Lys Leu Leu Leu Glu Leu Tyr Asn Tyr Phe Ile Asn Asn Tyr Ala Glu 1910 1915 1920	2840
ACT TTG GAT GAA GAA GCT TTA TTC AAC CGC TTA GAT GAA CAA GGG AAA Thr Leu Asp Glu Glu Ala Leu Phe Asn Arg Leu Asp Glu Gln Gly Lys 1925 1930 1935	2888
TTA GAG CTT GCA TAT ATC TTC CAT AAT AAA GAA GGT GAT GCA AAA GAG Leu Glu Leu Ala Tyr Ile Phe His Asn Lys Glu Gly Asp Ala Lys Glu 1940 1945 1950 1955	2936
GCT GTT AAG CCA ACT ATC CTT GTT ACA ATT AAA CTT ATG GAA TAC TGC Ala Val Lys Pro Thr Ile Leu Val Thr Ile Lys Leu Met Glu Tyr Cys 1960 1965 1970	2984
TTA AAA AAA CTT CGC GAA GAG TCT GGA GCT CCT GAA GGT AGT TTC GAT Leu Lys Lys Leu Arg Glu Glu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ser Phe Asp 1975 1980 1985	3032
TCT CCA TCT TCA AAG CAA TGT ATT TCT ACC TTT TCA GAG GAT GAA ATG Ser Pro Ser Ser Lys Gln Cys Ile Ser Thr Phe Ser Glu Asp Glu Met 1990 1995 2000	3080
TTT CGT CGT ACT TTA CCG GAA ATT GTA AAA GAA ACG AAC AGC AGA TAT Phe Arg Arg Thr Leu Pro Glu Ile Val Lys Glu Thr Asn Ser Arg Tyr 2005 2010 2015	3128
TTA CCA CTA AAG GGC TTT TCT CGC AGC CTA AAT AAG TTT CTC CCT TCT Leu Pro Leu Lys Gly Phe Ser Arg Ser Leu Asn Lys Phe Leu Pro Ser 2020 2025 2030 2035	3176
CTA AAA TTT GCC GAA AGT AAG AAT AGC TAC AGA TCT GAA AAT TTT GTT Leu Lys Phe Ala Glu Ser Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Asn Phe Val 2040 2045 2050	3224
AGC AAT ATT GAT TCC AAC GGA GCA TTA CTT TTA CTC GAT GTA TTT ATC Ser Asn Ile Asp Ser Asn Gly Ala Leu Leu Leu Leu Asp Val Phe Ile 2055 2060 2065	3272
AGA AAG TTT ACT AAT GAG AAA TAC AAT TTG ACT GGA AAA GAA GCT GTA Arg Lys Phe Thr Asn Glu Lys Tyr Asn Leu Thr Gly Lys Glu Ala Val 2070 2075 2080	3320
CCC TAT CTG GAA GCA AAG GCT TCA TCA TTA CGT ATC GCT TCT AAA TTT Pro Tyr Leu Glu Ala Lys Ala Ser Ser Leu Arg Ile Ala Ser Lys Phe 2085 2090 2095	3368

A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(ii) MOLEKULATÍPUS: protein
(xi) A 4.SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met	His	Ser	Lys	Glu	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Lys
1				5					10					15	
Ala	Val	Pro	Asn	Thr	Met	Val	Ile	Arg	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Glu	Asp
			20					25					30		
Gly	Glu	Met	Thr	Leu	Glu	Glu	Arg	Gln	Ala	Gln	Cys	Lys	Ala	Ile	Glu
		35					40					45			
Tyr	Ser	Asn	Ser	Val	Phe	Gly	Met	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Asn	Asp	Ile
	50					55					60				
Gly	Ser	Ile	Pro	Val	Ile	Gly	Glu	Val	Val	Gly	Ile	Val	Thr	Ala	Pro
65					70					75					80

Ile	Ala	Ile	Val	Ser	His	Ile	Thr	Ser	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile	Ala	Ser	85	90	95
Thr	Ala	Leu	Asp	Cys	Asp	Asp	Ile	Pro	Phe	Asp	Glu	Ile	Lys	Glu	Ile	100	105	110
Leu	Glu	Glu	Arg	Phe	Asn	Glu	Ile	Asp	Arg	Lys	Leu	Asp	Lys	Asn	Thr	115	120	125
Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Thr	130	135	140
Val	Glu	Lys	Thr	Arg	Asn	Glu	Met	Asn	Glu	Asn	Phe	Lys	Leu	Val	Leu	145	150	155
Glu	Thr	Ile	Glu	Ser	Lys	Glu	Ile	Lys	Ser	Ile	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	165	170	175
Asp	Phe	Lys	Lys	Phe	Phe	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Arg	Ile	Lys	Gly	Leu	180	185	190
Pro	Lys	Asp	Arg	Tyr	Val	Ala	Lys	Leu	Leu	Glu	Gln	Lys	Gly	Ile	Leu	195	200	205
Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Val	Arg	Glu	Pro	Ser	Gly	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	210	215	220
Ala	Leu	Asn	Glu	Leu	Leu	Asp	Lys	Asn	Asn	Asn	Tyr	Ala	Ile	Pro	Lys	225	230	235
Val	Val	Asp	Asp	Asn	Lys	Ala	Phe	Gln	Ala	Leu	Tyr	Ala	Leu	Phe	Tyr	245	250	255
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ala	Ala	Val	Met	Phe	Phe	Leu	Leu	Glu	Gln	His	260	265	270
Ser	Tyr	Leu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	Lys	Gly	Asp	Asp	Val	Asn	Phe	275	280	285
Asn	Ala	Glu	Phe	Asn	Asn	Val	Ala	Ile	Ile	Phe	Asp	Asp	Phe	Lys	Ser	290	295	300
Ser	Leu	Thr	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Leu	Ile	Asp	Asn	Val	Ile	Glu	Val	305	310	315
Leu	Asn	Thr	Val	Lys	Ala	Leu	Pro	Phe	Ile	Lys	Asn	Ala	Asp	Ser	Lys	325	330	335
Leu	Tyr	Arg	Glu	Leu	Val	Thr	Arg	Thr	Lys	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	340	345	350
Asn	Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Ile	Asp	Asp	Ile	Pro	Glu	355	360	365
Thr	Leu	Ser	Gln	Val	Asn	Phe	Pro	Asn	Asp	Glu	Asn	Gln	Leu	Pro	Thr	370	375	380

Pro	Ile	Gly	Asn	Trp	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala	Val	Gln	385			390		395					400	
Tyr	Glu	Ser	Lys	Gly	Met	Tyr	Ser	Lys	Phe	Ser	Glu	Trp	Ser	Glu	Pro		405				410					415	
Phe	Thr	Val	Gln	Gly	Asn	Ala	Cys	Pro	Thr	Ile	Lys	Val	Arg	Val	Asp		420				425				430		
Pro	Lys	Lys	Arg	Asn	Arg	Leu	Ile	Phe	Arg	Lys	Phe	Asn	Ser	Gly	Lys		435				440				445		
Pro	Gln	Phe	Ala	Gly	Thr	Met	Thr	His	Ser	Gln	Thr	Asn	Phe	Lys	Asp		450				455				460		
Ile	His	Arg	Asp	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys		465				470				475		480
Ala	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Thr	Leu	Ile	Glu	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Glu				485						490		495
Ala	Lys	Phe	Asp	Asn	Asp	Arg	Ser	Ala	Met	His	Ala	Val	Ala	Tyr	Arg				500						505		510
Gly	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala	Leu	Arg	Phe	Leu	Leu	Lys	Asn	Gln	Ser	Ile				515						520		525
Asp	Ile	Glu	Leu	Lys	Asp	Lys	Asn	Gly	Phe	Thr	Pro	Leu	His	Ile	Ala		530				535				540		
Ala	Glu	Ala	Gly	Gln	Ala	Gly	Phe	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Asn	His	Gly		545				550				555		560
Ala	Asp	Val	Asn	Ala	Lys	Thr	Ser	Lys	Thr	Asn	Leu	Thr	Pro	Leu	His				565						570		575
Leu	Ala	Thr	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Leu	Leu	Glu				580						585		590
Ser	Pro	Asn	Ile	Lys	Val	Asn	Glu	Lys	Glu	Asp	Asp	Gly	Phe	Thr	Pro				595						600		605
Leu	His	Thr	Ala	Val	Met	Ser	Thr	Tyr	Met	Val	Val	Asp	Ala	Leu	Leu		610				615				620		
Asn	His	Pro	Asp	Ile	Asp	Lys	Asn	Ala	Gln	Ser	Thr	Ser	Gly	Leu	Thr		625				630				635		640
Pro	Phe	His	Leu	Ala	Ile	Ile	Asn	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Ala	Glu	Ser				645						650		655
Leu	Val	Glu	Ser	Asn	Ala	Asp	Leu	Asn	Ile	Gln	Asp	Val	Asn	His	Met				660						665		670
Ala	Pro	Ile	His	Phe	Ala	Ala	Ser	Met	Gly	Ser	Ile	Lys	Met	Leu	Arg				675						680		685

Tyr	Leu	Ile	Ser	Ile	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Glu
	690					695					700				
Asn	Asn	Asn	Trp	Thr	Pro	Leu	His	Phe	Ala	Ile	Tyr	Phe	Lys	Lys	Glu
705					710					715					720
Asp	Ala	Ala	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Gln	Asp	Asp	Ile	Asn	Leu	Thr	Ile
				725					730					735	
Val	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Thr	Val	Leu	His	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Gly
			740					745					750		
Gln	Ile	Asn	Ile	Ile	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Arg	Gly	Ser	Asn	Ile	Glu
		755					760					765			
Glu	Lys	Thr	Gly	Glu	Gly	Tyr	Thr	Ser	Leu	His	Ile	Ala	Ala	Met	Arg
	770					775					780				
Lys	Glu	Pro	Glu	Ile	Ala	Val	Val	Leu	Ile	Glu	Asn	Gly	Ala	Asp	Ile
785					790					795					800
Glu	Ala	Arg	Ser	Ala	Asp	Asn	Leu	Thr	Pro	Leu	His	Ser	Ala	Ala	Lys
				805					810					815	
Ile	Gly	Arg	Lys	Ser	Thr	Val	Leu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Asp
			820					825					830		
Ile	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Asp	Gly	Ser	Thr	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Val
		835					840					845			
Ser	Gly	Arg	Lys	Met	Lys	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Leu	Asn	Lys	Gly	Ala
	850					855					860				
Asn	Leu	Lys	Glu	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Tyr	Leu	Pro	Ile	His	Lys	Ala
865					870					875					880
Ile	Ile	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Met	Val	Arg	Leu	Phe	Leu	Glu	Lys	Asp
			885						890					895	
Pro	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Arg	Thr	Ser	Ile	Met
			900					905					910		
Leu	Ile	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Tyr	Asn	Tyr	Phe	Ile	Asn
		915					920					925			
Asn	Tyr	Ala	Glu	Thr	Leu	Asp	Glu	Glu	Ala	Leu	Phe	Asn	Arg	Leu	Asp
	930					935					940				
Glu	Gln	Gly	Lys	Leu	Glu	Leu	Ala	Tyr	Ile	Phe	His	Asn	Lys	Glu	Gly
945					950					955					960
Asp	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Ile	Lys	Leu
				965					970					975	
Met	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu	Ser	Gly	Ala	Pro	Glu
			980					985					990		

Gly Ser Phe Asp Ser Pro Ser Ser Lys Gln Cys Ile Ser Thr Phe Ser
 995 1000 1005
 Glu Asp Glu Met Phe Arg Arg Thr Leu Pro Glu Ile Val Lys Glu Thr
 1010 1015 1020
 Asn Ser Arg Tyr Leu Pro Leu Lys Gly Phe Ser Arg Ser Leu Asn Lys
 1025 1030 1035 1040
 Phe Leu Pro Ser Leu Lys Phe Ala Glu Ser Lys Asn Ser Tyr Arg Ser
 1045 1050 1055
 Glu Asn Phe Val Ser Asn Ile Asp Ser Asn Gly Ala Leu Leu Leu Leu
 1060 1065 1070
 Asp Val Phe Ile Arg Lys Phe Thr Asn Glu Lys Tyr Asn Leu Thr Gly
 1075 1080 1085
 Lys Glu Ala Val Pro Tyr Leu Glu Ala Lys Ala Ser Ser Leu Arg Ile
 1090 1095 1100
 Ala Ser Lys Phe Glu Glu Leu Leu Thr Glu Val Lys Gly Ile Pro Ala
 1105 1110 1115 1120
 Gly Glu Leu Ile Asn Met Ala Glu Val Ser Ser Asn Ile His Lys Ala
 1125 1130 1135
 Ile Ala Ser Gly Lys Pro Val Ser Lys Val Leu Cys Ser Tyr Leu Asp
 1140 1145 1150
 Thr Phe Ser Glu Leu Asn Ser Gln Gln Met Glu Glu Leu Val Asn Thr
 1155 1160 1165
 Tyr Leu Ser Thr Lys Pro Ser Val Ile Thr Ser Ala Ser Ala Asp Tyr
 1170 1175 1180
 Gln Lys Leu Pro Asn Leu Leu Thr Ala Thr Cys Leu Glu Pro Glu Arg
 1185 1190 1195 1200
 Met Ala Gln Leu Ile Asp Val His Gln Lys Met Phe Leu Arg
 1205 1210

S Z A B A D A L M I I G É N Y P O N T O K

1. Aktív rovar-specifikus neurotoxin polipeptid, azzal jellemezve, hogy a fekete özvegy pók (*Latrodectus mactans* Tredecimguttatus) mérgében jelenlévő rovarspecifikus δ -latroinszektoxin (δ -LIT) neurotoxin prekursor peptidjét kódoló gén csonka formájának megfelelő nukleotid szekvencia kifejeződése révén keletkezik, és hogy a polipeptid aminosavszekvenciája homológ az aktív rovar-specifikus neurotoxin vagy aktív származéka vagy analógja aminosavszekvenciájával.

2. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amelynek az aminosavszekvenciája elsősorban a karboxi-terminális (C) végén megcsonkított polipeptid aminosavszekvenciájának felel meg.

3. A 2. igénypont szerinti polipeptid, amelyben a csonkítás körülbelül 150-200 aminosavat tesz ki.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, amelynek az aminosavszekvenciája az amino-terminális (N) végén megcsonkított prekursor polipeptid aminosavszekvenciájának felel meg.

5. A 4. igénypont szerinti polipeptid, amelyben a csonkítás 50 aminosavat, előnyösen 7 vagy 28 aminosavat tesz ki.

6. Az előző igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, azzal jellemezve, hogy a polipeptid egy olyan aminosavszekvenciát tartalmaz, amelyet az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia mutat be, vagy ennek aktív változatát.

7. Az előző igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, azzal jellemezve, hogy a toxint egy nukleotid szerkezet fejezi ki,

amely vagy az 1. számú szekvencia által bemutatott génszekvencia csonka formája vagy ennek aktív változata.

8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, amelyet lényegében egy olyan mikroorganizmusban rendelkezésre álló szekvencia fejez ki, amelyet NCIMB 40632 letéti számmal a The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited intézménynél helyeztünk letétbe.

9. Polinukleotid, azzal jellemezve, hogy a fekete özvegy pók (*Latrodectus mactans* Tredecimguttatus) mérgében jelenlévő rovar-specifikus δ -latroinszekstotoxin (δ -LIT) neurotoxin prekursor peptidjét kódoló génszekvencia csonkított formájának vagy aktív származékának vagy analógjának megfelelő olyan nukleotid szekvenciát tartalmaz, amely az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid expresszióját kódolja.

10. A 9. igénypont szerinti polinukleotid, amelyben a nukleotidszekvencia a 3' végén megcsonkított δ -LIT prekursor polipeptid szekvenciának felel meg.

11. A 10. igénypont szerinti polinukleotid szekvencia, amelyben a nukleotidszekvencia a körülbelül 400-650 nukleotid bázissal és előnyösen 550-600 nukleotid bázissal megcsonkított génnek felel meg.

12. A 9-11. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid szekvencia, amelyben a nukleotidszekvencia az 5' végén megcsonkított génnek felel meg.

13. A 12. igénypont szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy a csonkítás 100 nukleotid bázisnál kevesebbre terjed ki, és előnyösen vagy 84 vagy 21 nukleotid bázist érint.

14. A 9-13. igénypont bármelyike szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy a nukleotidszekvencia egy 991 aminosavat tartalmazó polipeptidet kódol.

15. A 9-14. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy a nukleotidszekvencia egy 1. számú szekvencia szerinti bázisszekvenciát tartalmaz vagy ennek aktív származékát.

16. A 9-15. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvencia egy olyan bázisszekvenciát tartalmaz, amelyet lényegében a The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited intézményben NCIMB 40632 letéti számon letétbehelyezett mikroorganizmus tartalmaz.

17. A 9-16. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvencia egy olyan polipeptidet kódol, amely az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciát tartalmazza vagy ennek aktív származékát.

18. A 9-17. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvencia egy olyan cDNS, amely mRNS-ből származik, például reverz transzkriptáz enzim használata révén.

19. A 9-18. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvencia egy oligonukleotid DNS szerkezet.

20. A 9-19. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy egy rekombináns DNS molekula.

21. A 20. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula, azzal jellemezve, hogy a molekula vírust tartalmaz.

22. A 21. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula, azzal jellemezve, hogy a molekula bakulovírust tartalmaz.

23. A 20. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula, azzal jellemezve, hogy lényegében az NCIMB 40632 letéti számmal letétbe helyezett mikroorganizmus tartalmazza.

24. Expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy általánosságban a 9-23. igénypontok bármelyike szerinti gén csonka formáját tartalmazza.

25. Sejt — ilyen egy virális vagy bakteriális sejt — azzal jellemezve, hogy lényegében a 20. vagy a 24. igénypont szerinti rekombináns molekulával vagy expressziós vektorral transzformáltak.

26. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid előállítására szolgáló eljárás, azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll: előállítunk egy, a 9-23. igénypontok bármelyike szerinti csonka formájú génnek megfelelő nukleotid szekvenciát tartalmazó rekombináns DNS molekulát, és a csonka formát gazda expressziós rendszerben — például bakteriális expressziós rendszerben — fejezzük ki a polipeptid előállítása céljából.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expressziós rendszer olyan E.coli BL21 (DE3) baktérium sejtet tartalmaz, amelyeket a szekvencia csonka formáját tartalmazó pT7-7 vektorral transzformáltunk.

28. A 26. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expressziós rendszer bakulovírus rendszert tartalmaz.

29. Aktív toxin, azzal jellemezve, hogy a fekete özvegy pók (*Latrodectus mactans* *Tredecimguttatus*) mérgében jelenlévő rovar-specifikus δ -latroinszekstotoxin (δ -LIT) neurotoxin szekvenciának megfelelő aminosavszekvenciájú, lényegében izolált nem-toxikus prekursor polipeptid feldolgozása révén állítjuk elő.

30. A 29. igénypont szerinti toxin, azzal jellemezve, hogy a toxint a prekursor polipeptid karboxi-terminális (C) vége területén végrehajtott csonkítással állítjuk elő.

31. A 30. igénypont szerinti toxin, azzal jellemezve, hogy a toxin aminosavszekvenciája általánosságban a 150-200 aminosavval megcsonkított prekursor polipeptid aminosavszekvenciájának felel meg.

32. A 29-31. igénypontok bármelyike szerinti toxin, azzal jellemezve, hogy a prekursor polipeptid aminosavszekvenciájának amino-terminális (N) vége területén végrehajtott csonkítással állítjuk elő.

33. A 32. igénypont szerinti toxin, azzal jellemezve, hogy az amino-terminális végről lehasított fragmentum jelentősen kisebb, mint a karboxi-terminális végről lehasított fragmentum.

34. A 32. vagy a 33. igénypont szerinti toxin, azzal jellemezve, hogy a lehasított fragmentum 7 vagy 28 aminosavból áll.

35. A 29-34. igénypontok bármelyike szerinti toxin, azzal jellemezve, hogy a toxin olyan aminosavszekvenciát tartalmaz, amelyet az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia mutat be, vagy ennek aktív változatát.

36. Rovarölő készítmény, azzal jellemezve, hogy lényegében az 1-8. vagy a 29. vagy a 35. igénypontok bármelyike szerinti to-

xint tartalmazza.

37. A 36. igénypont szerinti rovarölő készítmény, amelyet alkalmazassá tettünk szájon át vagy helyileg történő alkalmazásra.

38. A 36. vagy a 37. igénypont szerinti rovarölő készítmény, amelyet alkalmasá tettünk spray-ként való alkalmazásra.

39. Rovarölő rendszer, azzal jellemezve, hogy eszközöket tartalmaz a fekete özvegy pók (*Latrodectus mactans* *Tredecimguttatus*) mérgében jelenlévő rovar-specifikus δ -latroinszektotoxin (δ -LIT) neurotoxin prekursor peptidjét kódoló gén csonkított formájának megfelelő olyan polinukleotid szekvencia vagy aktív származéka vagy analógja kifejezéséhez, amikor is az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti toxin keletkezik egy rovarban, és ez vagy megöli, vagy inaktívvá teszi a rovar.

40. A 39. igénypont szerinti rovarölő rendszer, amely virális expressziós rendszert tartalmaz.

41. A 40. igénypont szerinti rovarölő rendszer, amelyben a virális expressziós rendszer bakulovírus expressziós rendszerből áll.

42. Növény, amely egy — lényegében a 9-19. igénypontok bármelyike szerinti — génszekvencia csonka formájának megfelelő polinukleotid szekvenciát tartalmazó, genetikailag módosított sejtet foglal magába.

43. Nem-emberszabású állat, amely egy — lényegében a 9-19. igénypontok bármelyike szerinti — génszekvencia csonka formájának megfelelő polinukleotid szekvenciát tartalmazó, genetikailag módosított sejtet foglal magába.

44. Eljárás aktív rovar-specifikus neurotoxin polipeptid elő-

állítására, azzal jellemezve, hogy egy izolált, inaktív, olyan prekursor polipeptidből nyerjük, amelynek az aminosavszekvenciája a fekete özvegy pók (*Latrodectus mactans* Tredecimguttatus) mérgében jelenlévő rovar-specifikus δ -latroinszekstotoxin (δ -LIT) neurotoxin vagy aktív származéka vagy analógja aminosavszekvenciájának felel meg, és az eljárás szerint az izolált prekursor polipeptidet megcsonkítjuk.

45. A 44. igénypont szerinti eljárás, amelyben az izolált prekursor polipeptidet C-terminális végén csonkítjuk meg.

46. A 44. vagy a 45. igénypontok szerinti eljárás, amelyben a csonkítást proteolitikus hasítással és előnyösen helyre irányuló mutagenézissel hajtjuk végre.

47. A 44-46. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben a csonkítást az N-terminális végén hajtjuk végre.

48. A 44-47. igénypontok szerinti eljárás, amelyben az aktív polipeptid lényegében az 1-8. és a 37-43. igénypontok bármelyike szerinti toxin.

49. Izolált polinukleotid, amely a 4. számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciát tartalmazó toxin prekursor polipeptidet kódolja vagy ennek aktív származékát.

50. Izolált polinukleotid, amely a 3. számú szekvencia szerinti bázis szekvenciát tartalmazza vagy ennek származékát.

51. Izolált polinukleotid, amely lényegében az NCIMB 40633 letéti számon letétbe helyezett mikroorganizmusban áll rendelkezésre.

52. Rekombináns DNS molekula, amely lényegében a 49-51. igénypontok bármelyike szerinti szekvenciát tartalmazza.

53. Az 52. igénypont szerinti rekombináns molekula, amely vírust tartalmaz.

54. Az 53. igénypont szerinti rekombináns molekula, amely bakulovírust tartalmaz.

55. Sejt — ilyen egy bakteriális vagy virális sejt — amelyet lényegében a 49-51. igénypontok bármelyike szerinti egy rekombináns DNS molekulával transzformáltunk.

56. Rovarölő rendszer, amely eszközöket tartalmaz ahhoz, hogy lényegében a 49-51. igénypontok bármelyike szerinti bázis szekvencia kifejeződjék, amikor is egy prekursor polipeptid képződik, és hogy a prekursor polipeptid feldolgozása révén egy olyan toxin képződjék egy rovarban, amely a rovar megöli vagy inaktívvá teszi.

57. Az 56. igénypont szerinti rovarölő rendszer, amely virális expressziós rendszert tartalmaz.

58. Az 57. igénypont szerinti rovarölő rendszer, amelyben a virális expressziós rendszer bekulovírust tartalmaz.

59. Növény, amely lényegében egy, a 49-51. igénypontok bármelyike szerinti nukleotid szekvenciát tartalmazó genetikailag módosított sejtet foglal magába.

60. Nem-emberszabású állat, amely lényegében egy, a 49-51. igénypontok bármelyike szerinti nukleotid szekvenciát tartalmazó genetikailag módosított sejtet foglal magába.

61. Izolált új toxin, amelynek az aminosavszekvenciáját az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia írja le.

62. Izolált polipeptid, amelynek az aminosavszekvenciáját a 3. számú szekvencia és a 4. számú szekvencia írja le.

63. Lényegében az 1. számú szekvencia és a 2. számú szekvencia által bemutatott aminosavszekvenciát tartalmazó proteinnek, vagy aktív analógjának, vagy származékának toxinként való felhasználása.

A meghatalmazott:

Beliczay László
magánjogi képviselő
a SZÉCHÉNYI EGYETEM
Gazdaságtudományi Karán
Tisztelt Kollégák!

Tisztelettel