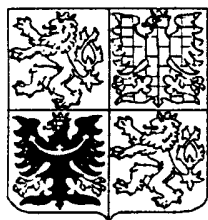


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 07.05.93
(32) 08.05.92
(31) 92/9209993
(33) GB
(40) 16.08.95

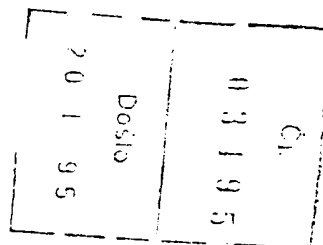
(21) 2744-94

(13) A3

6(51)

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

- (71) The Biotechnology and Biological Sciences Research Council, Babraham, GB;
- (72) Graham Margaret, Linton, GB;
Smith Trevor Stanley, Linton, GB;
Munn Edward Albert, Fulbourn, GB;
Knox David Patrick, Cockenzie, GB;
Oliver Joanna Jane, Edinburgh, GB;
Newton Susan Elizabeth, Strathmore, AU;
- (54) Molekuly nukleových kyselin, vektor pro expresi nebo klonování, syntetické polypeptidy, způsob jejich výroby, vakcína, použití nukleové kyseliny pro výrobu vakcíny a oligosacharidy
- (57) Molekuly nukleových kyselin, které obsahují kodové řetězce pro aminopeptidázy hlístů, jejich antigenní fragmenty nebo funkčně ekvivalentní varianty, řešení se týká také použití těchto nukleových kyselin pro výrobu vakcíny, způsobu výroby syntetických polypeptidů, pro něž jsou kodem tyto nukleové kyseliny, polypeptidů jako takových a vektoru pro expresi nebo klonování, v němž jsou uloženy molekuly uvedených nukleových kyselin. Řešení se také týká vakcíny pro stimulaci imunologické odpovědi proti parazitickým hlístům a některých oligosacharidů.



Molekuly nukleových kyselin, vektor pro expresi nebo klonování, syntetické polypeptidy, způsob jejich výroby, vakcína, použití nukleové kyseliny pro výrobu vakcíny a oligosacharidy

Oblast techniky

Vynález se týká rekombinantních molekul DNA, které jsou kódovými molekulami pro aminopeptidázy, vektorů pro expresi nebo klonování s obsahem těchto nukleových kyselin a použití těchto nukleových kyselin při výrobě vakcín proti infekci parazity, zejména hlísty.

Dosavadní stav techniky

Parazitární infekce jsou zodpovědné za celou řadu onemocnění domácích zvířat, vedoucích ke ztrátě reprodukce a často k uhynutí zvířat a mají tedy velký ekonomický význam. Například parazit *Haemonchus*, který se živí krví, infikuje vazivovou tkáň žaludečního a střevního traktu přežvýkavců, způsobuje anémii a ztrátu hmotnosti a bez léčení často vede k uhynutí zvířete. Zvířata, infikovaná příbuzným parazitem *Ostertagia* rovněž neprosplívají a v případě, že infekce není léčena, mohou uhynout. Také další paraziti mají ekonomický význam, jde například o *Trichostrongylus* a *Nematodirus*, způsobující záněty střevní sliznice u různých živočichů a také paraziti ze skupiny trematodů.

Značné problémy také vznikají při infekci různými nematody, jako jsou například měchovci, jako *Necator*, *Ancylostoma*, *Uncinaria* a čeledě *Bunostomum* a další podobné čeledi parazitů, jako *Fasciola*, *Paramphistomum* a *Dicrocoelium*, které kromě přežvýkavců a domácích zvířat mohou infikovat také člověka, často se smrtelným výsledkem.

Potlačení parazitů tohoto typu spočívá především v použití anthelmintik a také v různých opatřeních, která se týkají způsobu pastvy. Tyto postupy však mají řadu nevýhod. Jde především o nutnost častého podávání léčiv a také opatření, týkající se pastvy se často velmi nesnadno provádějí, mimoto se objevuje řada kmenů, které již jsou odolné proti podávaným léčivům.

Bylo by proto zapotřebí nalézt účinnou vakcinaci proti těmto chorobám, v tomto směru již byly v posledních letech vyvíjeny intenzivní snahy. Až dosud však nebyla připravena žádná molekulární nebo podobná vakcína pro hlavní čeledi, zvláště pro gastrointestinální nematody u přežvýkavců, jako jsou *Haemonchus* a *Ostertagia*.

Nejslibnější výsledky byly až dosud získány při použití nových bílkovin, izolovaných z *Haemonchus*, které jsou považovány za potenciální ochranné antigeny nejen proti *Haemonchus*, avšak také proti řadě dalších parazitů. Bylo prokázáno, že zvláště proteinový dublet H110D, který se nachází na povrchu vnitřního prostoru střev *H. contortus*, může vyvolat imunitu proti heamonchose u ovcí.

H110D z *H. contortus* má přibližnou molekulovou hmotnost 110 000 za redukčních a neredukčních podmínek, jak bylo prokázáno elektroforézou na SDS-PAGE a byl popsán v mezinárodních patentových přihláškách, zveřejněných pod čísly W088/00835 a W090/11086. Pojem H110D je užíván k označení proteinového dubletu H110D, tak jak byl definován ve svrchu uvedených patentových přihláškách. V poslední době byly prokázány odpovídající bílkoviny také v jiných čeledích, například v čeledi *Necator americanus*.

V mezinárodní patentové přihlášce WC88/00835 je popsána řada metod pro čištění H110D, které jsou dostatečné pro zjištění vlastností této bílkoviny a je možno je použít k výrobě této bílkoviny v množství, dostatečném pro pokusné i komerční účely. Bylo by však zapotřebí nalézt dostatečný zdroj, z něžž by bylo možno získat nejen H110D ale také příbuzné antigenní bílkoviny, zejména by bylo zapotřebí nalézt postup na bázi rekombinantní technologie DNA, kterým by bylo možno dosáhnout exprese těchto bílkovin v prokaryotických a/nebo eukaryotických organismech, vhodným způsobem transformovaných.

Vynález si klade za úkol navrhnout takový zlepšený postup. Byla provedena analýza řetězce cDNA pro H110D z *Haemonchus contortus* a bylo prokázáno, že zjištěný řetězec aminokyselin je homologní se skupinou aminopeptidáz, integrálních v různých membránách a systematickým názvem uváděných jako mikrosomální hydrolázy alfa-aminoacylpeptidů.

Aminopeptidázy, integrální v membránách ssavců jsou uloženy v řadě tkání, například v řasinkovém epitolu malých klků ve střevech a také v ledvinách. Jejich úloha v ledvinách není zcela jasná, avšak jejich funkcí ve střevech je štěpení malých peptidů, které jsou konečnými produkty v průběhu trávení, jak je zřejmé například ze souhrnných publikací Kenny a Maroux, 1982, Kenny a Turner, 1987, Noren a další, 1986 a Semenza, 1986.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří molekuly nukleových kyselin, obsahující jeden nebo větší počet nukleotidových řetězců, které jsou kódovými řetězci pro aminopeptidázy hlístů nebo jejich antigenní části, v podstatě odpovídající celým

nukleotidovým řetězcům nebo jejich částem, znázorněným na obr. 2, 3, 4 nebo 5 (řetězce č. 1 až 15) nebo může jít o řetězce, které jsou kódovými řetězci pro aminopeptidázy hlístů a jsou v podstatě homologní nebo hybridizují s kterýmkoliv ze svrchu uvedených řetězců.

V případě nukleových kyselin podle vynálezu může tedy jít o DNA, cDNA nebo RNA s jednoduchým nebo s dvojitým řetězcem.

Variace v nukleotidových řetězcích, které jsou kódovými řetězci pro aminopeptidázy se mohou objevit mezi různými kmeny hlístů v rámci jedné čeledi, v různých stádiích životního cyklu hlístů, například mezi stadiem larvy a stadiem dospělého jedince, mezi podobnými kmeny různého zeměpisného původu a někdy také u stejných hlístů. Také tyto variace jsou zahrnuty do rozsahu vynálezu.

"V podstatě homologní" jsou ty řetězce, které mají totožný řetězec na 50 a více procent, například na 60 % nebo více a také může jít o funkčně ekvivalentní allelové varianty a příbuzné řetězce, modifikované výměnou jedné nebo většího počtu bazí nebo přidáním a/nebo vypuštěním některých bazí. Pod pojmem "funkčně ekvivalentní" se rozumí řetězce nukleových kyselin, které jsou kódovými řetězci pro látky s účinností aminopeptidázy, přičemž tyto enzymy jsou podobným způsobem imunoreaktivní, to znamená, že vyvolávají u hostitele tvorbu ochranných protilátek proti hlístům.

Molekuly nukleových kyselin, které hybridizují s řetězcem na obr. 2, 3, 4 nebo 5 (jde o řetězce č. 1 až 15) nebo jakékoliv v podstatě homologní nebo funkčně ekvivalentní řetězce ve svrchu uvedeném významu jsou rovněž zahrnuty do rozsahu vynálezu. Pojem "hybridizace" definuje ty řetězce,

které se mohou za neomezujících podmínek (6 x SSC/50% formamid při teplotě místnosti) vázat a být vymyty za málo omezujících podmínek (2 x SSC při teplotě místnosti nebo s výhodou 2 x SSC při teplotě 42 °C) nebo za více omezujících podmínek, například 2 x SSC při 65 °C, kde SSC = 0,15M NaCl a 0,015M citrátu sodného o pH 7,2.

Způsoby pro výrobu takových derivátů uvedených řetězců, například cílená produkce mutací, statistická produkce mutací nebo enzymatické štěpení a/nebo vazba nukleových kyselin jsou dobře známy stejně jako způsoby, jimiž je možno stanovit, zda takto modifikovaná nukleová kyselina má podstatnější homologii s určitým řetězcem, například může jít o hybridizaci.

Při použití nukleové kyseliny podle vynálezu je tedy možno připravit rekombinantní aminopeptidázy nebo imunogenní fragmenty těchto enzymů v množství, které až dosud nebylo dostupné, čímž je možno usnadnit vývoj vakcíny proti hlístům.

Podstatu vynálezu tedy tvoří molekuly nukleových kyselin, které obsahují jeden nebo větší počet nukleotidových řetězců, které jsou kódovými řetězci pro jeden nebo větší počet polypeptidů, schopných vyvolat tvorbu ochranných protilátek proti hlístům, přičemž tyto řetězce obsahují jednu nebo větší počet oblastí, určujících antigenní vlastnosti v kódových řetězcích pro aminopeptidázy z obr. 2, 3, 4 nebo 5 (řetězce č. 1 až 15).

Podstatu vynálezu tvoří také syntetické polypeptidy, obsahující jeden nebo větší počet řetězců aminokyselin, tvořících enzym aminopeptidázu nebo antigenní část tohoto enzymu,

v podstatě odpovídající celému řetězci nebo části nukleotidového řetězce z obr. 2, 3, 4 nebo 5 (řetězce č. 1 až 15) nebo funkčně ekvivalentní variantě těchto řetězců, odlišné od syntetického polypeptidu, odpovídajícího proteinovému dubletu H110D nebo od syntetického polypeptidu, odpovídajícího jakémukoliv jednotlivému polypeptidovému řetězci, popsanému v přihlášce WO90/11086.

Vynález se tedy týká také syntetických polypeptidů, které obsahují řetězce aminokyselin, tvořících enzym aminopeptidázy nebo její antigenní část, v podstatě odpovídající celému řetězci nebo části nukleotidového řetězce z obr. 2, 3, 4 nebo 5 (řetězce č. 1 až 15) nebo může jít o funkčně ekvivalentní variantu takového řetězce, v podstatě prostou jiných složek *Haemonchus contortus*.

Vynález se dále týká vakcíny pro stimulaci imunologické odpovědi proti hlístům u člověka nebo u jiného živočicha, vakcína obsahuje alespoň jeden svrchu definovaný syntetický polypeptid spolu s nosičem, přijatelným z farmaceutického hlediska.

V mezinárodní patentové přihlášce WO90/11086 se popisuje celá řada polypeptidů nebo částí polypeptidových řetězců, získaných proteolytickým rozštěpením nebo chemickým štěpením proteinového dubletu H110D, může jít o následující řetězce:

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

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

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

Tam, kde nebylo dosaženo jistoty, je tato skutečnost vyjádřena například ve formě Phe/Gly , kde první kód ze tří písmen znamená pravděpodobně správný zbytek aminokyseliny podle síly signálu, nebo byla nejistota znázorněna uvedením otazníku, popřípadě je formou "-" naznačena, že běží o zbytek, jehož povaha dosud není známa.

Vynález se týká svrchu uvedených typů řetězců s výjimkou těch, které byly uvedeny v mezinárodní patentové přihlášce č. W090/11086.

Pod pojmem "polypeptid" jsou zahrnuty jak bílkoviny s plnou délkou, tak kratší řetězce peptidů.

"Funkční ekvivalent" se ve vztahu k polypeptidovému řetězci aminokyselin rozumí jako polypeptidový řetězec, příbuzný nebo odvozený od svrchu uvedených polypeptidových řetězců, přičemž řetězec aminokyselin byl modifikován substitucí jedné nebo většího počtu aminokyselin, jejich adicí nebo vypuštěním, může také jít o řetězec, v nichž byly aminokyseliny chemicky modifikovány včetně glykosylace nebo deglykosylace, avšak které si nicméně uchovávají protektivní antigenní nebo imunogenní účinnost. Takové funkčně ekvivalentní varianty se mohou vyskytovat jako přirozené biologické variace nebo je možno je připravit při použití známých postupů, je například možno připravit funkčně ekvivalentní

rekonbinantní polypeptidy při použití známých postupů pro cílenou produkci mutací, pro statistickou tvorbu mutací nebo enzymatickým štěpením a/nebo vazbou aminokyselin.

Syntetické polypeptidy podle vynálezu je možno obecně označit jako řetězce s ochranným antigenním účinkem. Pod pojmem "ochranný antigen", tak jak se v průběhu přihlášky používá, se rozumí antigeny, které jsou schopné u hostitele vyvolat ochrannou imunologickou odpověď, to znamená takovou odpověď, která vede ke vzniku imunologických efektorových buněk, molekul nebo protilátek, které poškozují, inhibují nebo usmrcují parazity a tím "chrání" hostitele od klinických nebo subklinických projevů onemocnění a od zhoršení celkového stavu. Taková ochranná imunologická odpověď se může za běžných okolností projevit tvorbou protilátek, schopných způsobit inhibici metabolických funkcí parazita, což vede ke zpomalení jeho růstu, vymizení produkce vajíček a/nebo uhynutí.

Syntetické polypeptidy podle vynálezu je možno připravit expresí v hostitelské buňce, která obsahuje rekonbinantní molekulu DNA s nukleotidovým řetězcem ve svrchu uvedeném širokém významu, operativně vázaným na řetězec pro řízení exprese, nebo může jít o vektor pro klonování rekonbinantní DNA s obsahem takové molekuly DNA. Exprese polypeptidů je možno dosáhnout také přímým vstříknutím molekuly DNA podle vynálezu do hostitelské buňky.

Syntetické polypeptidy, k jejichž expresi tímto způsobem došlo, mohou být polypeptidy, získané fúzí a obsahující část, která je imunogenní a zahrnuje celou aminopeptidázu nebo její část a další polypeptid, pro nějž je kódem, uvedena DNA nebo rekombinantní molekula, s ní spojená. Může být například žádoucí získat složenou bílkovinu, která obsahuje syntetickou aminopeptidázu nebo jiný polypeptid podle vynálezu.

vázaný na bílkovinu, například beta-galaktosidázu, fosfatázu, glutathion-S-transferázu, ureázu, antigen jádra hepatitidy B (Francis a další, 1989) a podobně. Většina složených bílkovin je získána expresí rekombinantního genu, v němž jsou spojeny dva kódové řetězce ve fázi ve čtecím rámci. Je však možno polypeptidy navázat také chemickým způsobem in vitro. Všechny takové deriváty molekuly nukleové kyseliny, která je kódem pro aminopeptidázu a její řetěze aminokyselin jsou do vynálezu zahrnuty. Technika pro expresi pro rekombinantní DNA a polypeptidu je popsána například v publikaci Sambrook a další, 1989. Syntetické polypeptidy je možno získat také chemickým způsobem, například známou Merrifieldovou syntézou na pevné fázi.

Vynález se rovněž týká použití svrchu definovaných molekul nukleových kyselin nebo syntetických peptidů nebo polypeptidů pro výrobu vakcíny pro stimulaci imunologické odpovědi u člověka a jiných živočichů, s výhodou u ssavců proti infekci hlísty.

Uvedené řetězce podle vynálezu je tedy možno využít ke stimulaci imunologické odpovědi u člověka nebo u jiných živočichů, s výhodou u ssavců proti infekci hlísty, k tomuto účelu se těmto živočichům podává vakcína, která obsahuje jeden nebo větší počet polypeptidů, pro něž jsou kódovými řetězci svrchu definované nukleotidové řetězce.

Vakcíny je možno připravit při použití postupů, které jsou pro výrobu vakcín obecně známé. Vakcína může obsahovat jeden nebo větší počet syntetických polypeptidů podle vynálezu a popřípadě jeden nebo větší počet vhodných pomocných prostředků, jako jsou například hydroxid hlinitý, saponin, Quila nebo jeho vysoce čištěné formy, muramyldipeptid, minerální oleje nebo Novasomy a jeden nebo větší počet z farmaceutického hlediska přijatelných nosičů nebo

ředidel. Vhodnými nosiči mohou být kapalná prostředí, například roztoky chloridu sodného, vhodné pro podání peptidů nebo polypeptidů nemocným. Prostředky mohou obsahovat ještě další složky, například konzervační činidla.

Vakcína může obsahovat virus nebo hostitelskou buňku, například mikroorganismus, může jít o virus vaccinia, o adenovirus nebo o Salmonelly, tyto organismy pak obsahují molekulu nukleové kyseliny, například molekulu DNA podle vynálezu pro stimulaci imunologické odpovědi proti polypeptidu, pro nějž je kódem uložená molekula nukleové kyseliny.

Vakcinu je možno podávat jakýmkoliv běžným způsobem, například perorálně nebo parenterálně, s výhodou nitrosva-
lovou injekcí, popřípadě v určitých intervalech, je například možno použít dvou injekcí, podaných v intervalech 7 až 28 dnů.

Jak již bylo uvedeno, řetězec aminokyselin, získaný z nukleotidového řetězce, znázorněného na obr. 2, 3, 4 nebo 5, má homologii řetězce se skupinou aminopeptidáz, které jsou integrovány v membránách. Tato skutečnost byla prokázána analýzou různých databází, které jsou k dispozici v softwaru Genetics Computer Group Sequence, verze 7.01, z listopadu 1991, jak je také uvedeno v publikaci Devereux a další, 1984, bylo použito translace řetězců z obr. 2, 3, 4 nebo 5. Dvojí srovnání uvedeného typu je například znázorněno na obr. 6.

Expresí kódových řetězců pro aminopeptidázy podle vynálezu je možno dosáhnout při použití známých postupů a známých systémů pro expresi včetně použití prokaryotických buněk, například buněk *E. coli* a eukaryotických buněk, například kvasinek nebo systému hmyzích buněk, infikovaných

baculovirem nebo transformovaných buněk ssavců, použít je možno také transgenních živočichů a rostlin. Zvláště výhodné je dosáhnout exprese nukleotidových řetězců s použitím transgenických systémů nematodů, například systému pro nematoda *Caenorhabditis*, systém byl popsán například v publikacích Fire, 1986, Fire a další, 1989, Spieth a další, 1988, Han a další, 1990.

Vynález se týká také způsobu výroby syntetického polypeptidu, tak jak byl svrchu definován, postupuje se tak, že se pěstuje eukaryotická nebo prokaryotická buňka s obsahem svrchu definované molekuly nukleové kyseliny za podmínek, při nichž dochází k expresi a polypeptid, získaný tímto způsobem se izoluje.

Podstatu vynálezu tvoří také vektory pro klonování a expresi, které obsahují nukleotidové řetězce podle vynálezu. Takové vektory pro expresi zahrnují příslušné řídicí řetězce, například řetězce pro translaci, jako kodony pro počátek a konec a také řídicí prvky pro transkripci, například oblasti promotor-operátor, místa pro vazbu ribosomu, stop řetězce pro ukončení transkripce, tyto prvky jsou zařazeny ve čtecím rámci s molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu.

Vektory podle vynálezu zahrnují plasmidy a viry včetně bakteriofágů a eukaryotických virů, je možno je získat známým způsobem a dosáhnout exprese v celé řadě systémů pro expresi, jak je v oboru všeobecně známo. Vhodným virovým vektorem ve svrchu uvedeném smyslu je například baculovirus a také adenovirus a viry vaccinia. Je popsána ještě celá řada jiných virových vektorů.

Jsou známy různé postupy, které je možno použít pro uložení takových vektorů do prokaryotických nebo eukaryotických buněk k dosažení exprese nebo je možno tyto vektory uložit do zárodečné linie nebo do somatických buněk za vzniku transgenických živočichů. Vhodné postupy pro transformaci nebo transfekci jsou dostatečně popsány v literatuře.

Transformované eukaryotické nebo prokaryotické hostitelské buňky, buňky po transfekci nebo transgenické organismy s obsahem nukleové kyseliny podle vynálezu, tak jak byla svrchu definována, tvoří rovněž součást podstaty vynálezu.

Obecně je možno uvést, že eukaryotické systémy pro expresi a zvláště systémy pro expresi z nematodů mají výhodu, která spočívá v tom, že může docházet k post-translačnímu zpracování a zvláště může dojít ke glykosylaci, přičemž v případě transgenického systému z nematodů tato glykosylace odpovídá zpracování, k němuž dochází v případě nativní bílkoviny. Tato skutečnost je velmi důležitým znakem způsobu podle vynálezu vzhledem k tomu, že v celé řadě případů je zapotřebí rekombinantní bílkovinu dále zpracovávat pro dosažení optimálního biologického účinku.

Expres v systémech buněk ssavců má také celou řadu výhod. Buněčný materiál ze ssavce může zajistit dobrou reprodukci nativní formy a protektivních epitopů antigenu vzhledem k tomu, že v eukaryotickém systému pro expresi bude docházet k příbuznějším způsobům glykosylace, ke vzniku disulfidových vazeb a dalších post-translačních modifikací než v případě *E. coli*, kde může dojít k produkci nerozpustné bílkoviny, vyžadující další zpracování a vykazující nedostatečnou reprodukci v nativní formě. Mimoto při glykosylaci v buněčném materiálu ssavců patrně nebude docházet k vyvolání

imunologické odpovědi, která snižuje protektivní odpověď proti bílkovině. V případě, že má být chráněn člověk nebo hospodářská zvířata, je tedy výhodné použít buněčné linie fibroblastů nebo myelomových buněk člověka nebo hospodářských zvířat, jako jsou linie HeLa-lidská buněčná linie, BHK-buněčná linie ledvin zárodku křečka, VERO, ledvinová buněčná linie opic, FR3T3-linie Fusharových fibroblastů krysy, NIH3T3-buněčná linie fibroblastů myši, C127I-buněčná linie nádoru mléčné žlázy myši, CV-1-buněčná linie ledvinových fibroblastů afrických zelených opic, 3T6-linie fibroblastů myších embryí, L-buňky-myší buněčná linie, CHO buněčná linie vaječníků čínského křečka, NSO, NSI, SP2 a další buněčné linie myšího myelomu a také buněčné linie krysího myelomu, jako YB2/O a Y3.

Vektory, vhodné pro různé typy buněčných linií ssavců jsou známy. Obecně budou tyto vektory obsahovat promotor a/nebo zesilovač transkripce, operativně spojený s kódovým nukleotidovým řetězcem pro antigen nebo jeho fragment. Vhodnými promotory jsou například promotory typu SV40, například vektor PSVL, promotor z cytomegaloviru CMV, promotor myšího metallothioneinu I a dlouhý opakující se terminální řetězec viru nádoru myší mléčné žlázy. Vektor s výhodou obsahuje vhodné označení, například gen pro reduktázu dihydrofolátu nebo pro glutaminsyntetázu. Vektory těchto typů byly popsány ve zveřejněných mezinárodních přihláškách W086/05807, W087/04462, W089/01036 a W0/89/10404.

Transfekci hostitelských buněk je možno uskutečnit při použití standardních postupů, například při použití fosforečnanu vápenatého, DEAE dextranu, polybrenu, při použití fúze protoplastů, liposomů, přímé injekce, nebo otevření pórů působením elektrického proudu. Poslední z uvedených postupů je výhodný, způsoby transfekce buněčných linií ssavců

při použití otevření pórů působením elektrického proudu bylo popsáno v publikaci Andreason a další, 1980. Obecně se lineární DNA do buněk ukládá snadněji než cirkulární DNA.

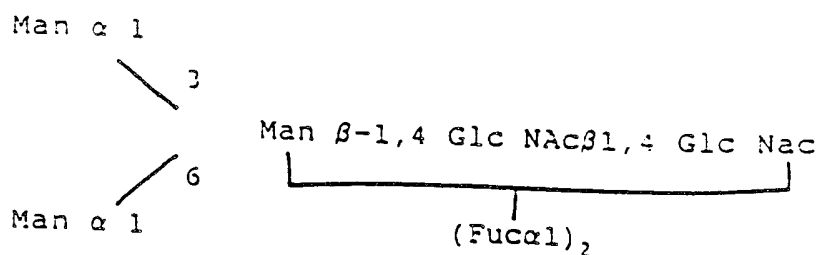
Bylo prokázáno, že bílkovina H110D je jedinečným a neobvyklým způsobem glykosylována, což patrně přispívá k imunologickému účinku vzhledem k tomu, že celá řada až dosud získaných monoklonálních protilátek proti H110D z *Haemonchus* rozpoznává uhlohydrátové epitopy, které mohou být velmi důležité při vývoji vhodné vakcíny.

Zvláště byly prokázány následující zvláštnosti glykosylace H110B z *Haemonchus*:

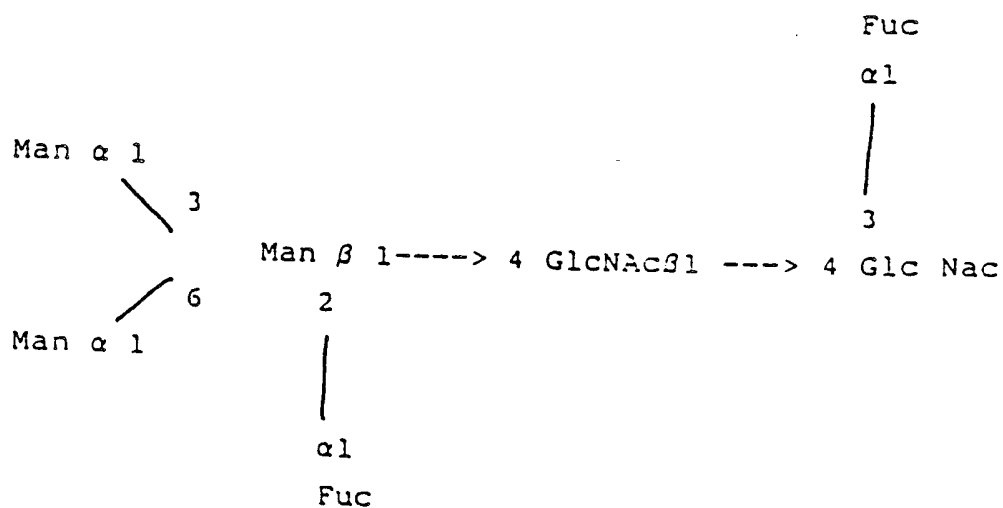
- i) přibližně 65 % oligosacharidů je vázáno na atom dusíku, zbytek na atom kyslíku,
- ii) převážná část, například 48 % oligosacharidů, vázaného na atom dusíku je komplexního typu,
- iii) v podstatě veškerý oligosacharid, například více než 95 % této látky je prosté náboje,
- iv) relativní molární obsah pro monosacharidy je N-acetylglaktosamin 1,0, fukosa 3,6, galaktosa 4,1, glukosa 4,4, mannosy 6,2 a N-acetylglukosamin 5,2,
- v) oligosacharidy, odlišné od hlavního oligosacharidu (označovaného jako oligosacharid D) jsou v podstatě odolné proti degradaci různými exoglykosidázami, jako jsou alfa-D-amnositáza, beta-D-mannositáza, beta-D-glukositáza, beta-D-galaktositáza, alfa-D-galaktositáza, alfa-L-fukositáza, beta-D-xylositáza a beta-D-N-acetylglukosaminidáza.

Oligosacharid D glykoproteinu H10D z *Haemonchus* je vázán přes atom dusíku a má novou strukturu, která je tvořena dvěma zbytky fukosy, spojenými vazbou alfa-1,3 a alfa-1,2 s jádrem, tvořeným mannosu (N-acetylglukosaminem)₂.

Podstatu vynálezu tedy tvoří rovněž oligosachard, který je možno vyjádřit vzorcem



a zvláště vzorcem:



a to zvláště v případě vazby na bílkovinu, například na rekombinantní bílkovinu, jako bílkovinu typu aminopeptidázy

z hlístů nebo její antigenní fragment nebo v případě použití ke tvorbě antiidiotypických antigenů, zvláště pro imunizaci velmi mladých živočichů.

Živočišné glykoproteiny mají obvykle oligosacharid s vazbou fukosa-alfa-1,6, takže vazba fukosa-alfa-3 v oligosacharidu podle vynálezu je neobvyklá.

Vynález bude dále podrobněji popsán se zvláštním ohledem na bílkovinu H11OD z *Haemonchus contortus*. Je nutno zdůraznit, že různými postupy, například histochemickými postupy a hybridizací DNA bylo možno prokázat ekvivalenty bílkoviny D11OD také v jiných čeledích parazitů. Je pravděpodobné, že bílkovina H11OD je komplex, jehož tvorby se účastní větší počet genů a že mimoto může kódový nukleotidový řetězec jevit různé variace řetězce mezi různými kmeny a také v různých stádiích životního cyklu hlístů. Mimoto mohou existovat vícečetné formy enzymu, tak zvané isoenzymy, k jejichž expresi může docházet odlišným způsobem v různých stupních nebo v různých kmenech. Při těchto postupech byly řetězce DNA a tím také následné řetězce aminokyselin stanovovány z klonů cDNA a produktů PCR, získaných z mRNA, odpovídající genu pro H11OD rekombinantní technologií s použitím DNA z různých zdrojů a v různých životních stádiích parazita *H. contortus*.

Analýza řetězce cDNA a produktů PCR umožnila identifikovat tři blízce příbuzné řetězce pro H11OD, které byly označeny H11-1 (řetězec č. 19), H11-2 (řetězec č. 20) a H11-3 (řetězec č. 21). H11-1 je tvořen třemi překrývajícími se řetězci, klonem cDNA AustB1 (řetězec č. 6), PCR-produktem A-648 (řetězec č. 9) a 3'-zakončením PCR-produktu O14-178 (řetězec č. 12). Řetězec H11-2 obsahuje PCR-produkty A-650 a produkt o velikosti 2,5 kb (řetězec č. 10 a 7).

H11-3 obsahuje PCR-produkty o velikosti 3,5 kb a A-649 (řetězce č. 8 a 11). Specifické vztahy mezi jednotlivými analyzovanými typy cDNA a klony PCR-produktů a mezi H11-1, H11-2 a H11-3 jsou shrnuty na obr. 1 a podrobněji znázorněny na obr. 3, 4 a 5.

Rozdíly a variace v řetězcích, které byly získány z klonů cDNA a z PCR-produktů jsou zřejmé zejména z obr. 2, 3, 4 a 5 (řetězce č. 1 až 15 a 19 až 21), výsledky jsou také shrnuty v tabulce 1.

T a b u l k a 1

Homologie odvozených řetězců aminokyselin, získaných translací nukleotidových řetězců z obr. 2

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

Rozdíly jsou patrně způsobeny odlišnými mRNA (ve skupině genů). Mimoto mohou být variace alespoň z části způsobeny různými variantami kódového řetězce pro H11OD nebo mRNA, přítomné v různých stádiích životního cyklu nebo ve kmenech, lišících se zeměpisným původem.

V následující tabulce 2 jsou dále uvedeny stupně totožnosti a podobnosti mezi odpovídajícím odvozeným řetězcem aminokyselin a dvěma známými řetězci pro aminopeptidázy ssavců.

T a b u l k a 2

Homologie řetězce aminokyselin H11OD, aminopeptidázy M (ApM) krysy a aminopeptidázy A (ApA) myši

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

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněna mapa analyzované cDNA pro H11OD z *H. contortus* a klonů PCR-produktů a jejich vztahy a relativní polohy v mRNA pro H11OD.

Na obr. 2 je znázorněn nukleotidový řetězec H11OD označený H11-3 (řetězec č. 21, odvozený od klonovaných PCR produktů s řetězcí č. 8 a 11 a klon cDNA M1AUS s řetězcem č. 5), dále H11-2 (řetězec č. 20, odvozený od klonovaných PCR-produktů s řetězcí 7 a 10) a H11-1 (řetězec č. 19, odvozený od klonovaných PCR produktů s řetězcí č. 9 a 12 a klon cDNA AustB1 s řetězcem č. 6).

Na obr. 3 je znázorněn řetězec H11-3 (řetězec č. 21 z obr. 2) spolu s klony cDNA M1 a M1AUS (řetězce č. 1 a 5).

Na obr. 4 je znázorněn řetězec H11-2 (řetězece č. 20 z obr. 2) a klon cDNA B2 (řetězec č. 4).

Na obr. 5 je znázorněn řetězec H11-1 (řetězec č. 19) a jeho srovnání s cDNA B1A a Aust B1 (řetězce č. 2 a 6).

Na obr. 6 jsou znázorněny a) odvozené řetězce aminokyselin (řetězce č. 22, 23 a 24) od řetězců DNA H11-1, H11-2 a H11-3 z obr. 2, dále bi) a ii) jsou odvozené řetězce aminokyselin z H11-3 ve srovnání se známým řetězcem aminokyselin pro aminopeptidázu M z krysích mikrosomů (Watt a další, 1989) a s řetězcem pro aminopeptidázu A z myších mikrosomů (Wu a další, 1990). Totožné úseky jsou v rámečcích, pomlčky označují prostory, které byly zavedeny tak, aby bylo možno vyznačit homologii mezi srovnávanými řetězci. Je použit kód pro aminokyseliny s využitím jediného písmene pro každou aminokyselinu. Horizontální čára nad řetězcem označuje polohu transmembránové oblasti, hvězdičkami je znázorněna poloha části řetězce pro vazbu zinku. Stupně podobnosti jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Na obr. 7 jsou srovnávány řetězce aminokyselin (označené Pep A, Pep B, Pep C, Pep D a Pep E), získané z CNBr a Lys-C-fragmentů bílkoviny H11OD svrchu popsaným způsobem (podle mezinárodní patentové přihlášky WO90/11086, polypeptidové řetězce a), b), e), k) a aa)), uvedeny jsou také tři nové řetězce (řetězce č. 16, 17 a 18) získané z bílkoviny H11OD štěpením, elastázou nebo termolysinem při translaci a) H11-1, b) H11-2 a c) H11-3.

Na obr. 8 je znázorněn Western blot integrálních bílkovin membrány, které se nacházejí v extraktu dospělých jedinců *Haemonchus contortus* po použití afinitních čištěných protilátek z potenciálních klonů H11OD a) antigeny v extraktu *Haemonchus* s použitím smáčedla, rozpoznávané antiserem proti extraktu, b) protilátky, vymývané z téhož proužku jako v případě a) po opakované zkoušce proti blotu uvedeného extraktu, potvrzena je úspěšná eluce, c) protilátky stejné

v případě b), schopná se vázat na klon M1 bílkoviny po expresi silně rozpoznávají oblast s velikostí 110 000 (a poměrně ostře ohraničený pás s molekulovou hmotností 205 000) a d) nedochází k vazbě protilátky v případě, že se spolu se sérem užíje nerekombinantní bílkovina.

Na obr. 9 je znázorněn Northern blot pro čištěnou mRNA z *Haemonchus contortus* ve stáří 11, 15 a 23 dnů po použití a) cDNA, klonu M1 (řetězec č. 1), b) cDNA, klon M1 AUS (řetězec č. 5), c) cDNA, klon B1A (řetězce č. 2 a 3), d) cDNA, klon AustB1 (řetězec č. 6), e) klonovaný PCR-produkt O14-872 (3,5 - 2, řetězec č. 8), a f) klonovaný PCR-produkt O14-O15 (řetězec č. 7). Čísla 11, 15 a 23 označují stáří *Haemonchus*, z něhož byla získána mRNA.

Na obr. 10 je znázorněn Southern blot DNA-genomu *Haemonchus contortus* při použití cDNAm klonu M1AUS (řetězec č. 5), B1A (řetězce č. 2 a 3) a AustB1 (řetězec č. 6) a PCR-produktů O14-872 (3,5 - 2, řetězec č. 8) a O14-O15 (řetězec č. 7).

a) bloty byly promyty při mírně omezujících podmínkách,
b) bloty byly promyty při vysoce omezujících podmínkách.
V případě každého vzorku obsahovala dráha 1 vzorek lambda-DNA, rozštěpené HindIII jako označení nebo neobsahovala žádné označení, dráhy 2 a 3 obsahovaly DNA genomu *Haemonchus*, rozštěpenou enzymy EcoRI a HindIII.

Na obr. 11 je znázorněn Western blot rekombinantních složených bílkovin GST-M1 a GST-B1A, jako sonda byly použity protilátky proti elektroforeticky čištěné bílkovině H110D (H110DE), čištěné afinitní chromatografií.

Na obr. 12 je znázorněn Western blot antigenu ConA H110D, jako sonda bylo použito antisérum proti ConA H110D

a antisérum proti rekombinantním složeným bílkovinám GST-M1 a GST-B1A.

Na obr. 13 jsou znázorněny a) výsledky analýzy bílkovin H110D a aktivita enzymu aminopeptidázy ve frakcích, které byly získány chromatografií na iontoměničích při použití ConA H110D na sloupci MonoQ, b) SDS-PAGE pro frakce, znázorněné na obr. 13a).

Na obr. 14 jsou znázorněny

- a) hodnoty pH při nichž byly získány frakce při pokusu se stanovením isoelektrického bodu,
- b) elektroforéza na SDS-PAGE za redukčních podmínek pro frakce z obr. 14a), spodní pás dubletu H110D je ve frakci 6 a horní pás ve frakci 16, množství v jednotlivých frakcích se mění,
- c) Western blot pro frakce, znázorněné na obr. 14b), jako sonda byly použity i) monoklonální protilátky TS 3/19,7 a ii) afinitní chromatografií čištěné polyklonální protilátky proti M1, kontrolní protilátky nevyvolaly žádnou zjistitelnou reakci.

Na obr. 15 jsou znázorněny a) hodnoty pH, při nichž byly získány frakce při dalším pokusu pro získání hodnoty isoelektrického bodu, b) elektroforéza na SDS-PAGE za redukčních podmínek pro frakce z obr. 15a), spodní pás dubletu H110D se nachází ve frakcích 4 až 6 a spodní pás ve frakcích 16 až 18, množství v jednotlivých frakcích se mění, c) specifické účinnosti frakcí z obr. 15b) vzhledem k mikrosomální aminopeptidáze.

Na obr. 16 je znázorněna ochrana ovcí vakcinací při použití odděleného horního pásu (U), spodního pásu (L),

směsi pásů (U+L) a dubletu (D) bílkoviny H11OD.

- a) Kladení vajíček (počet vajíček na 1 g výkalů),
- b) uhynulí červi relativně ve srovnání s kontrolami.

Na obr. 17 je znázorněna ochrana ovcí po vakcinaci při použití ve vodě rozpustného fragmentu H11S, získaného z bílkoviny H11OD rozštěpením působením elastázy a při použití H11A, fragmentu, rozpustného ve smáčeďle z bílkoviny H11OD.

- a) Kladení vajíček (počet vajíček na 1 g výkalů),
- b) uhynulí červi relativně ve srovnání s kontrolami (C).

Na obr. 18 jsou znázorněny příklady vztahů mezi inhibicí Ai), Bi) účinnosti, podobné aminopeptidáze M a Aii), Bii) účinnosti podobné aminopeptidáze A bílkoviny H11OD po působení antisér jednotlivých ovcí, očkovaných bílkovinou H11OD, ochrana byla měřena v případě Ai) a Aii) procentem redukce uhynulých červů a v případě Bi) a Bii) redukcí snížení počtu vajíček ve výkalech v procentech. Prázdné čtverečky znamenají účinnost proti H11OD, plné čtverečky účinnost proti ferritinu koně jako kontrolní látce.

Na obr. 19 je znázorněna histochemická lokalizace účinnosti enzymu aminopeptidázy u dospělých jedinců *Haemonchus contortus*, mikrofotografie zmrazených řezů dospělých samic *Haemonchus contortus* prokazují účinnost aminopeptidázy (červené reakční produkty se jeví jako tmavý pás, označený šipkou) ve spojení s mikrokly (mv) střeva (i). Žádná z dalších tkání, například pokožka (c), hypodermis (h), genitální systém (gt), nebo svalovina stěny (wm) neobsahovala enzym. Na obr. 19a byl jako substrát použit L-leucin-4-methoxy-beta-naftylamid, na obr. 19b byl jako substrát použit alfa-(4-methoxy-beta-naftylamid) kyseliny glutamové.

Na obr. 20 je znázorněna mapa PCR-produktu 3,5, klon 2 (řetězec č. 8) po subklonování ve vektoru pro expresi pBlueBacII z baculoviru.

Na obr. 21 je znázorněn Western blot extraktu z hmyzu *Spodoptera frugiperda* po infekci baculovirem, extrakt byl připraven z buněk (Sf)9 při použití protilátek proti H11ODN jako sondy. U dvou klonovaných plaků, P3A a P4A došlo k expresi imunopositivní bílkoviny H11OD v plné délce (označen šipkou), v případě kontrol nebylo možno expresi prokázat.

Podstatu vynálezu tvoří také molekuly nukleových kyselin, obsahující jeden nebo větší počet nukleotidových řetězců, v podstatě odpovídajících nebo v podstatě komplementárních k jednomu nebo většímu počtu řetězců z klonů M1, B1A, B1A-3', B2, M1AUS, AustB1, 014-015 (2,5 PCR), 014-872 (3,5 PCR klon 2), A-648 (5'-zakončení B1), A-650 (5'-zakončení 2,5 PCR), A-649 (5'-zakončení 3,5 PCR), 014-178 (3'-zakončení AustB1, klon 2), 014-178 (3'-zakončení AustB1, klony 6 a 6), 014-872 (3,5 PCR, klon 10) a 014-872 (3,5 PCR, klon 19), H11-1, H11-2, a H11-3, řetězce č. 1 až 15 a 19 až 21 z obr. 2, 3, 4 a 5 nebo řetězce, které jsou s těmito řetězci v podstatě homologní, nebo které hybridizují s kterýmkoliv z uvedených řetězců.

Jak již bylo uvedeno, při srovnání řetězců různých svrchu uvedených klonů a počítačových databází známých řetězců bylo možno prokázat podstatnou homologii pro skupinu mikrosomálních aminopeptidáz (Ec. 3.4.11.-). Enzymatické studie a studie, týkající se inhibitorů, prováděné s bílkovinou H11OD a s jejími frakcemi potvrzují, že bílkovina je ve skutečnosti mikrosomální aminopeptidázou (mikrosomální hydrolázou alfa-aminoacylpeptidu). Tyto zkoušky dále prokázaly přítomnost účinnosti typu aminopeptidázy A a aminopeptidázy M, takže pro každou ze složek dubletu H11OD je možno jednotlivě prokázat enzymatickou účinnost.

Byly také provedeny zkoušky s proteolytickým štěpením bílkoviny H110D. Při použití enzymu elastázy bylo možno prokázat, že bílkovinu H110D lze částečně rozštěpit za vzniku dvou frakcí, a to frakce, rozpustné ve smáčedlech, která zůstává spojená s membránou a frakce, která je rozpustná ve vodě a byla označena H11S. H11S se vyskytuje ve formě dimeru bílkoviny, který je možno rozložit na dvě složky. Je zajímavé, že bylo prokázáno, že ve vodě rozpustná frakce H11S má pouze účinnost typu aminopeptidázy M, kdežto frakce, která je rozpustná ve smáčedlech, má pouze účinnost typu aminopeptidázy A.

V následujícím příkladu je podrobně popsána řada pokusů, které vedly ke stanovení řetězců, znázorněných na obr. 1 až 7.

Příklad provedení vynálezu

Metody

Konstrukce banky U.K. lambdaGT11

Izolace mRNA

0,5 g dospělých jedinců *Haemonchus contortus* původu UK, zmrazených v kapalném dusíku bylo rozdrceno v kapalném dusíku při použití předem zchlazeného moždíře a tlouku. RNA byla z mletého materiálu extrahována při použití 10 objemů 4M guanidinhydrochloridu ve 25 mM citrátu sodného s obsahem 0,5 % sarkosylu a 0,7 % 2-merkapt ethanolu s následnou extrakcí fenolem a chloroformem při použití postupu podle publikace Chomczynski a Sacchi, 1987. Z tohoto materiálu byla připravena mRNA afinitní chromatografií na oligo dT celulóze, dvakrát opakovanou podle publikace Maniatis a další, 1982, kvalita byla ověřena translací in vitro při

použití zkušebního balíčku s lyzátem retikulocytů králíka a ^{35}S -methioninu (Amersham International plc) podle návodu výrobce. Tímto způsobem byly prokázány polypeptidy až do molekulové hmotnosti 120 000.

Příprava komplementární DNA

DNA, komplementární k prvnímu řetězci (cDNA) byla syntetizována z 1 mikrogramu mRNA při použití náhodné syntézy s použitím primeru a reverzní transkriptázy ptáků, druhý řetězec byl syntetizován při použití RNázy H a DNA polymerázy I z *E. coli*, načež byly upraveny 3'-přečnívající konce při použití T4 DNA polymerázy způsobem podle publikace Gubler a Hoffman, 1983. Výtěžek cDNA s dvojitým řetězcem (ds) byl přibližně 400 ng z 1 mikrogramu mRNA. Tato ds cDNA byla analyzována elektroforézou na 1% agarozovém gelu a pak autoradiografií a bylo prokázáno, že její velikost je v rozmezí 0,2 až 9,4 kb, přičemž většina materiálu měla velikost v rozmezí 0,5-2,3 kb.

Klonování cDNA v lambdagt11

Vybraná cDNA bez vymezení velikosti molekul byla použita pro konstrukci banky v lambdagt11 při použití systému pro klonování cDNA, zkušebního balíčku č. RPN 1280 (Amersham International plc) a zkušebního balíčku č. N 334, obsahující příslušné extrakty pro postup in vitro (Amersham International plc) podle návodu výrobce, současně byly použity oligonukleotidové spojovníky se zakončením po štěpení enzymem EcoRI (5'GGAATTCC). Výsledná banka byla použita spolu s kmenem *E. coli* Y1090 v přítomnosti isopropylthio-beta-D-galaktosidu (IPTG) a 5-brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galaktosidu (X-gal), za těchto podmínek se rekombinantní lambdagt11 jeví jako čiré "bílé" plaky a přírodní lambdagt11

se jeví jako modré plaky. Banka obsahovala 90 % bílých plaků a účinnost klonování byla vypočítána jako 4×10^7 jednotek pro tvorbu plaků, pfu/mikrogram cDNA, titer banky byl 2×10^6 pfu/ml. Analýza DNA ve 20 náhodně odebraných vzorcích prokázala průměrnou velikost uloženého řetězce 0,51 kb. Tento průměr byl však poněkud měněn přítomností jediného klonu s velikostí uloženého řetězce 3,5 kb. Většina uložených řetězců obsahovala více než 300 párů bází, bp. Pak byla tato banka lambdagt11 bez amplifikace, odvozená od uvedené mRNA vyšetřena na imunologickou účinnost.

Příprava protilátek pro použití jako sondy

Antiserum proti bílkovinám, integrovaným v membráně

Z dospělých jedinců *Haemonchus contortus* (původu UK) byla vyjmuta střeva a homogenizována v ledovém fyziologickém roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrům o pH 7,4 s obsahem 1 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové, EDTA a 1 mM fenylmethylsulfonylfluoridu, PMSF. Homogenát byl 10 minut odstřeďován v mikroadstředivce a usazenina byla znovu uvedena do suspenze ve stejném pufru s obsahem 0,1 % objemových Tween 20. Po opakovaném odstředění byla usazenina znovu uvedena do suspenze v tomtéž pufru s obsahem 2 % objemových prostředku Triton X-100 a pak byla směs extrahována 2 hodiny při teplotě 4 °C. Extrakt byl odstředěn stejným způsobem jako svrchu, čímž byl získán supernatant, obsahující bílkovinu, typickou pro integrovanou bílkovinu v membráně, IMP.

Ovce byla hyperimunizována při použití IMP ve Freundově úplném pomocném prostředku FCA nitrosvalovou injekcí 50, 50, 120 a 130 mikrogramů IMP, injekce byly postupně v uvedeném pořadí podány v týdnech 0, 7, 11 a 15. Šest týdnů po poslední injekci bylo odebráno sérum a označeno EE-068.

Příprava integrálních bílkovin membrány extrakcí *Haemonchus contortus* s použitím smáčedla

Extrakt byl připraven tak, že hlísti byli homogenizováni v 5 až 10 objemech PBS s obsahem 1 mM EDTA a 1 mM PMSF. Suspenze byla odstředěna při 10 000 g celkem 20 minut při teplotě 4 °C a usazenina byla promyta tímtež pufrem s obsahem 0,1 % objemových prostředku Tween 20, pak byl materiál extrahován pěti objemy Tritonu X-100 v koncentraci 2 % objemová svrchu uvedeným způsobem. Supernatant byl znovu odstředěn 1 hodinu při 100 000 g a výsledný supernatant, obohacený o H110D a obsahující ještě další IMP, byl použit pro Western blot a pro přípravu nedenaturované bílkoviny H110D, jak bude dále uvedeno.

Příprava H110D a protilátka proti H110DN, čištěná afinitním způsobem

Extrakt, obohacený H110D byl podroben afinitní chromatografii na ConA-agarose, pak byla provedena chromatografie na iontoměniči na sloupci MonoQ (podle patentových přihlášek W088/00835 a W090/11086). Čištěná bílkovina H110D byla nitrosvalově podána jehnatům ve FCA. Byly podány tři dávky po 100 mikrogramech v intervalu 3 týdny. Sérum bylo odebráno 4 týdny po poslední injekci a čištěno afinitním postupem absorpcí na sloupec, obsahující čištěnou bílkovinu H110D, vázanou na Sepharose (Pharmacia), aktivovanou bromkyanem. Vazba H110D na Sepharose, vazba antisera a eluce protilátek proti H110D byly uskutečněny podle instrukcí Pharmacia. Tyto protilátky, čištěné uvedeným afinitním způsobem byly označeny anti-H110DN. Písmeno "N" odlišuje tyto protilátky od protilátek, které byly produkovány proti denaturované, elektroforeticky čištěné bílkovině H110D, tyto protilátky byly označeny anti-H110DE.

Western blot

Western blot byl proveden obvyklým způsobem podle publikace Johnstone a další, 1982.

Izolace a charakterizace klonů

Vyšetření banky lambdagt11 (původ UK) na imunologickou účinnost

Pro zjištění imunologické účinnosti banky byl v podstatě použit postup, popsáný v publikaci Bowtell a další, 1986. Před použitím bylo sérum (EE-068) zbaveno protilátek proti *E. coli* absorpcí lyzátem a úplnými buňkami kmene *E. coli* Y1090. Pak byla banka nanesena na plotny s *E. coli* Y1090 v množství 10^3 pfu na jednu plotnu s průměrem 90 mm. Plotny byly převrstveny nitrocelulosovými filtry, impregnovanými IPTG a inkubovány přes noc. Filtry byly omyty TBST (50 mM tris o pH 7,4, 150 mM NaCl a 0,05 % objemových Tween 20) a pak byly blokovány koňským sérem v TBST s koncentrací 5 % objemových po dobu 2 hodiny. Pak bylo přidáno sérum EE-068, ředěné v poměru 1 : 200 v TBST s obsahem 5 % koňského séra a filtry byly inkubovány 4 hodiny za mírného kolébavého pohybu. Pak byly filtry znovu promyty TBST a inkubovány spolu s koňskými protilátkami proti ovčímu IgG, konjugovanými s peroxidázou z křenu, HRP v ředění 1 : 500 v TBST s obsahem 5 % objemových koňského séra po dobu 2 hodiny. (Anti-serum proti ovčímu IgG bylo získáno z koně, protilátka proti IgG ovce byla čištěna afinitní chromatografií na sloupci Sepharose s ovčím IgG a protilátka byla konjugována s HRP podle publikace Nakane a Kawaoi, 1974). Filtry byly znovu promyty TBST a pozitivní plaky byly zjištěny při použití 0,6 mg/ml 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) a 0,1% peroxidu vodíku (% objemová). Bylo odebráno

25 klonů s pravděpodobnou pozitivitou a tyto klony byly znovu sledovány na přítomnost protilátky proti afinitně čištěné bílkovině H110DN svrchu uvedeným způsobem. Po této druhé zkoušce bylo 5 rekombinantních klonů stále ještě pozitivních, přičemž u klonu, označeného M1 byl prokázán nejsilnější signál.

Afinitní čištění protilátky na rekombinantním fágu

Byly připraveny plotny se souvislou vrstvou buněk kmene E. coli Y1090 tak, že na každou plotnu bylo nanášeno 10^3 pfu každého z klonů lambda, pozitivních na tvorbu protilátek nebo totéž množství nerekombinantního negativního kontrolního fágu lambdagt11. Plotny byly inkubovány 4 hodiny při teplotě 42 °C a pak na ně byly uloženy filtry, impregnované IPTG a plotny byly dále inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Pak byly filtry z ploten odstraněny a promyty TBST, načež byly blokovány koňským sérem v koncentraci 5 % objemových po dobu 1 hodiny. Pak byly filtry inkubovány 6 hodin v antiséru EE-068 v ředění 1 : 100, načež byly důkladně opláchnuty TBST. Vázané protilátky byly z filtrů vymyty při použití 2 x 2 ml elučního pufru (5 mM glycinu, 500 mM NaCl, 0,2% Tween 20, pH 2,3) po dobu 2 až 3 minuty pokaždé, načež byl materiál neutralizován přidáním 200 mikrolitrů 1M pufru tris-HCl o pH 7,4, materiál byl zředěn v poměru 1 : 200 a použit pro vyšetření imunologické účinnosti metodou Western blot při použití obohaceného extraktu H110D.

Řetězce DNA v klonu M1

Z klonu M1 byla izolována lambda DNA způsobem podle publikace Maniatis a další, 1982. Fragment s velikostí 2,38 kb po štěpení enzymy KpnI-SstI, obsahující fragment

M1 o velikosti 300 bp se izoluje elektroforézou na gelu a pak čistí při použití zkušebního balíčku GENE CLEAN (Stratagene, GENE CLEAN je chráněná slovní známka BIO101) a pak se subklonuje v plasmidu pBluescript II SK (Stratagene). Fragment po štěpení enzymem EcoRI se čistí stejným způsobem a pak se znovu subklonuje ve stejném vektoru.

Nukleotidový řetězec uloženého řetězce M1 se stanoví při použití balíčku pro analýzu řetězce T7 (Pharmacia, U.K.) při použití běžných i reversních primerů M13.

Příprava banky hlístu australského původu v lambdagt11 a lambdaZAP

Izolace mRNA

5 g dospělých jedinců *Haemonchus contortus* (australský kmen McMaster) bylo zmrazeno v kapalném dusíku a pak mleto rovněž v kapalném dusíku a RNA byla extrahována horkým fenolem podle publikace Cordingley a další, 1983. Výtěžek RNA celkem byl 10,35 mg. Pak bylo 1,3 mg této RNA užito pro přípravu mRNA afinitní chromatografií na oligo dT celulóse při použití dvojího čištění způsobem podle publikace Maniatis a další, 1982. Výtěžek mRNA byl 21,6 mikrogramů. Kvalita mRNA byla ověřena in vitro translací s použitím lyzátu retikolucytů králíka v přítomnosti ³⁵S-methioninu (Amersham) podle návodu výrobce. Získaný produkt translace měl zřetelně odlišitelné pásy včetně pásu s velikostí vyšší než molekulová hmotnost 200 000, jak bylo prokázáno elektroforézou na SDS-polyakrylamidových gelech s následným provedením fluorografie.

Syntéza cDNA a příprava banky

Pro přípravu cDNA s použitím oligo dT nebo statistických primerů bylo užito 1 mikrogramu mRNA a zkušebního balíčku pro syntézu cDNA (Amersham International plc) podle návodu výrobce. Bylo získáno 115 ng ds cDNA. Tato cDNA byla analyzována elektroforézou po označení ^{32}p na alkalickém agarosovém gelu podle instrukcí na zkušebním balíčku. Velikost řetězce cDNA, stanovená srovnáním s označením, k němuž byl použit lambda-HindIII (New England Biolabs) byla 150 bp až více než 10 kb, přičemž většina řetězců produktu měla velikost v rozmezí 0,6 až 5 kb. Při použití oligo Dt-primerů a statistických primerů byly získané vzorky ds cDNA spojeny a navázány na přebytek spojovníků s obsahem 8 bazí po štěpení EcoRI, 5'-GGAATTCC3' (New England Biolabs, číslo katalogu 1018) po označení gamma- ^{32}p -ATP a T4-polynukleotidkinázou. Takto vázaná cDNA pak byla rozštěpena enzymem EcoRI a přebytečné spojovníky byly odstraněny chromatografií na Sepharose 4B (Pharmacia) způsobem podle publikace Maniatis a další, 1982. Frakce ze sloupce byly spojeny do dvou podílů, z nichž jeden obsahoval cDNA o větší velikosti než 2 kb a druhý cDNA s velikostí nižší než 2 kb. Každý podíl pak byl odděleně navázán na 1 mikrogram lambdaZapII po zpracování enzymem EcoRI a fosfatázou (Stratagene) a zpracován odděleně při použití balíčku Gigapack Gold (Stratagene). Při použití cDNA s větším řetězcem bylo získáno $1,3 \times 10^5$ rekombinantních klonů, při použití cDNA s kratším řetězcem bylo získáno $1,4 \times 10^5$ rekombinantních klonů, klony byly spojeny, čímž byla získána banka, obsahující $2,7 \times 10^5$ klonů. Tato banka lambdaZap byla amplifikována při použití buněk XL1-Blue (Stratagene) a banky v množství 2×10^4 pfu na jednu plotnu s průměrem 135 mm. Titr amplifikované banky byl 7×10^7 pfu/ml.

Další 2 mikrogramy mRNA byly užity pro přípravu cDNA svrchu uvedeným způsobem, avšak jako primer byl použit pouze oligo dT. Výtěžek ds cDNA byl 740 ng. Tato cDNA byla zpracována EcoRI methylázou způsobem podle publikace Maniatis a další, 1982, pak byly přidány spojovníky EcoRI, v tomto případě spojovníky s 12 bazemi, 5'CCGGAATTCCGG3' (New England Biolabs, č. katalogu 1019). Po rozštěpení takto vázané cDNA působení EcoRI byly všechny frakce ze sloupce Sepharose 4B, které obsahovaly cDNA spojeny a navázány na 2 mikrogramy lambdagt11 po rozštěpení EcoRI a po zpracování fosfatázou (Stratagene). Vazná směs byla rozdělena na dva podíly, které byly zpracovány s použitím dvou podílů Gigapack Gold (Stratagene) a získané materiály byly opět spojeny za vzniku banky lambdagt11 s obsahem 7×10^6 pfu. Tato banka byla amplifikována při použití buněk ST9 a 5×10^5 pfu na jednu plotnu s průměrem 135 mm. Titr amplifikované banky lambdagt11 byl $4,5 \times 10^{11}$ pfu/ml.

Vyšetření banky lambdagt11 z australských hlístů při použití antiséra proti H110D

Antiséra byla získána tak, že ovcím byla injekčně podána bílkovina H110D (původu UK) po elektroeluci z polyakrylamidového gelu po elektroforéze na SDS následujícím způsobem. ConA H110D, získaný podle zveřejněných patentových přihlášek WO 88/00835 a WO 90/11086 byl podroben elektroforéze na SDS polyakrylamidovém gelu podle publikace Laemmli, 1970, čímž byla získána bílkovina H110D. Po elektroforéze byla oblasť polyakrylamidového gelu s obsahem bílkoviny H110D vyříznuta, uložena do zařízení pro elektroeluci (Atto) a eluce byla prováděna 3 hodiny při 10 W. Bílkovina H110D, získaná elektroelucí a označena H110DE byla koncentrována v zařízení Centriprep 10 (Amicon) a pak byla uskutečněna výměna pufru na sloupci PD10 (Pharmacia), pufr byl

vyměněn za 50 mM uhličitan amonný s 0,07 % SDS, pak byl materiál smísen s pomocnými prostředky a injekčně podán ovčím. Imunoglobuliny ze sér byly vysráženy síranem amonným podle publikace Johnstone a Thorpe, 1982. Vysrážené protilátky byly znovu uvedeny do suspenze v množství 60 mg/ml ve fyziologickém roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrém a roztok byl dialyzován proti roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrém a pak zředěn v poměru 1 : 10 ve fyziologickém roztoku chloridu sodného s tris-pufrém (TBS) s obsahem 5 % hmotnostních práškovaného odtučněného mléka. 10 mg ConA H110D bylo rozpuštěno na roztok s obsahem 0,5 % SDS, roztok byl zahřát na 3 minuty na 100 °C a pak byl sušen na nitrocelulosovém filtru. Po promytí TBS s obsahem 0,2 % objemová Tween 20 a 0,5 % Tritonu X-100 (TBSTT) byl filtr inkubován 1 až 2 hodiny při teplotě místnosti s protilátkami proti H110DE. Po promývání filtru 2 hodiny při použití TBSTT byly vázané protilátky vymývány při použití 3 ml 0,1M glycinu, 0,15M chloridu sodného o pH 2,6 celkem 2 minuty, načež bylo pH roztoku okamžitě upraveno na neutrální přidáním 75 mikrolitrů 1,5 M tris o pH 8,0. Tyto protilátky, čištěné afinitním postupem a označené anti-H110DE byly použity k analýze 5×10^5 pfu banky cDNA lambdagt11 z hlístů australského původu tak, jak již bylo popsáno svrchu.

5×10^5 rekombinantních klonů z banky lambdagt11, odvozené od australského hlísta *Haemonchus contortus* bylo vyšetřeno na imunologickou účinnost a byly izolovány tři pozitivní klony. Po dalším vyšetření byly dva z těchto rekombinantních klonů stále ještě pozitivní, tyto klony byly označeny B1A a B2.

Analýza řetězce z klonů B1A a B2

Uvedené dva klony byly rozštěpeny enzymem EcoRI a byl získán jediný uložený úsek řetězce o přibližně 500 bp z B1A a 3 fragmenty, B2A o přibližně 400 bp, B2B o přibližně 100 bp a B2C o přibližně 100 bp v případě B2. Tyto řetězce byly subklonovány v plasmidu pBluescript SK (Stratagene) a jejich řetězec byl analyzován při použití zkušebního balíčku Sequenase 2,0 (United States Biochemicals).

Exprese klonů M1 a B1A

Řetězce pro M1 (řetězec č. 1) a pro B1A (řetězec č. 2 a 3) byly pro dosažení exprese uloženy do *E. coli* při použití vektoru pGEX podle publikace Smith a Johnson, 1988. Při použití tohoto vektoru je možno dosáhnout exprese bílkovin na C-terminálním zakončení glutathion-S-transferázy (GST) ze *Schistosoma japonicum*. Uložené řetězce M1 a B1A po rozštěpení enzymem EcoRI byly navázány na materiál pGEX1 po rozštěpení EcoRI a po působení fosfatázy a pak byl výsledný produkt použit k transformaci *E. coli*, kmene JM101 podle publikace Maniatis a další, 1982. Z každé transformace bylo užito 8 vzorků a kultury po dvou ml byly pěstovány 6 hodin při teplotě 37 °C. Pak byl přidán IPTG k indukci syntézy složených bílkovin a inkubace pokračovala přes noc. Buněčný materiál byl oddělen odstředěním, rozrušen povařením v pufru pro odběr vzorku (Laemmli, 1974) a extrakty byly analyzovány elektroforézou na SDS-PAGE a metodou Western blot při použití ovčích protilátek, čištěných afinitním způsobem a specifických proti SDS denaturovanému dubletu H110D (anti-H110DE, jak bylo uvedeno svrchu). Vázané protilátky byly prokázány při použití konjugátu alkalické fosfatázy s králičí protilátkou proti IgG ovce (Jackson Immunoresearch) a pak následovala detekce pomocí 5-brom-4-chlor-3-indolyl-

fosfátu (BCIP) a tetrazoliové nitromodři (NBT). Kultury imunopozitivních klonů pak byly pěstovány a indukovány svrchu uvedeným způsobem a pak rozrušeny pomocí ultrazvuku. Materiál po působení ultrazvuku byl rozdělen na rozpustnou a nerozpustnou frakci odstředěním v odstředivce Sorvall RC-2B s rotorem HS4 30 minut při 7000 ot/min a při teplotě 4 °C. Nerozpustné usazeniny byly znovu uvedeny do suspenze v 8M močovině při použití ultrazvuku a vzorky jednotlivých frakcí byly podrobeny elektroforéze na SDS-PAGE. Bylo prokázáno, že složené bílkoviny se nacházejí v nerozpustné frakci inkluzních tělísek. Každý z těchto vzorků byl použit k vakcinaci dvou ovcí 3x po sobě, pro každou dávku bylo použito 150 mikrogramů složené bílkoviny ve Freundově pomocném prostředku. Pozitivní kontrolní ovce byly imunizovány nativní bílkovinou ConA H110D, negativní kontrolní ovce byly imunizovány solubilizovanou bílkovinou z *E. coli* s obsahem vektoru pGEX bez uloženého řetězce z *Haemonchus*. Séra z vakcinovaných ovcí byla analyzována metodou Western blot proti H110B.

Vyšetření banky lambdaZAP australského původu při použití hybridizace DNA s uloženými řetězci M1 a B1A

DNA plasmidů M1 a B1A (klonované v pBluescript) byly rozštěpeny enzymem EcoRI a uložené řetězce byly izolovány elektroforézou v TBE (tris-boritan-EDTA s obsahem 89 mM tris-boritanu, 89 mM kyseliny borité a 2 mM EDTA, pH přibližně 8,3) v 1% agarozovém gelu, pak byl materiál čištěn při použití balíčku GENE CLEAN. Izolace a čištění bylo opakováno tak, aby nedošlo ke kontaminaci sondy řetězce DNA plasmidu, který by hybridizoval s řetězcem lambdaZAP a tak nežádoucím způsobem zvýšil pozadí. Čištěné řetězce uložených DNA byly značeny pomocí alfa-³²P-dCTP při použití balíčku pro simulovanou translaci (Promega Biotech) podle návodu výrobce. Značená DNA byla oddělena od neuložené značené DNA chromatografií

na sloupci za současného odstředění podle publikace Maniatis a další, 1982. Na osm ploten s průměrem 135 mm s obsahem banky lambdaZAP bylo nanášeno 10^5 pfu/plotna a vzniklé plaky byly přeneseny na nitrocelulosové filtry podle publikace Maniatis a další, 1982. Po zahřívání ve vakuové peci 2 hodiny na teplotu 80°C byly filtry předem hybridizovány 2 hodiny a pak byly hybridizovány přes noc při teplotě 42°C tak, jak bude dále popsáno v odstavcích, popisujících analýzu Southern blot. Byly analyzovány čtyři filtry se sondou M1 a čtyři filtry se sondou B1A. Filtry byly dvakrát omyty při použití 2 x SSC s obsahem 0,5 % SDS, jednou 1 x SSC s obsahem 0,5 % SDS a pak ještě jednou 0,5 x SSC s obsahem 0,5 % SDS, vždy při teplotě 50°C a pak byla provedena autoradiografie. Byly odebrány potenciálně pozitivní plaky a znovu analyzovány při použití týchž sond. Zásobní fágy s vysokým titrem byly připraveny z pozitivních vzorků (byly označeny M1AUS pro M1-hybridizující klon a AusB1 pro B1A-hybridizující klon) a klony byly znovu uloženy do plasmidu pBluescript podle instrukcí výrobce lambdaZAP (Stratagene) při použití kmene BB4 E. coli jako hostitelského kmene. Malé množství DNA plasmidu z výsledných kolonií bylo připraveno rozrušením buněk za alkalických podmínek podle publikace Maniatis a další, 1982, vzorky DNA pak byly rozštěpeny enzymem EcoRI. Materiál byl analyzován elektroforézou na agarozovém gelu.

Analýza uloženého řetězce v M1AUS

Analýza řetězce DNA byla provedena na čištěné DNA plasmidu pBluescript při použití balíčků s 2,0 Sequenázou (United States Biochemicals), postup byl prováděn podle návodu výrobce. Nejprve byly užity primery pro zakončení řetězců vektoru. Údaje, získané z těchto reakcí byly užity pro konstrukci druhého páru primerů a z údajů, které byly získány pomocí druhých primerů byla uskutečněna konstrukce

třetího páru primerů. Tímto způsobem byl analyzován celý řetězec DNA postupně od obou zakončení, 5'-zakončení i 3'-zakončení.

Analýza uloženého řetězce v AustBl

Tento řetězec byl analyzován při použití balíčku Sequenáza 2,0 T7 (USB Biochemicals) podle návodu výrobce obdobným způsobem jako v případě M1AUS.

PCR-reakce

Příprava cDNA

1 mikrogram mRNA z *H. contortus* původu U.K. 11 dnů po infekci, připravené způsobem, popsáním pro dospělé hlís-ty se smísí s T17 adaptorem-primerem se vzorcem 5' GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT 3' v diethylpyrokarbonátu DEPC ve vodě, a pak se směs zahřívá 5 minut na 65 °C, načež se okamžitě uloží do ledu. Pak se přidá hydroxid methyl-měďnatý do konečné koncentrace 28,6 mM a směs se inkubuje 3 minuty při teplotě místnosti. Pak se přidá 2-merkaptoethanol do konečné koncentrace 14,2 mM a směs se uloží do ledu. Aby bylo možno syntetizovat cDNA, byla přidána RNA-áza Guard (Pharmacia) v množství 1 jednotka/mikrolitr, pufr pro reverzní transkriptázu (Life Sciences) v běžné koncentraci, dATP, dGTP, dCTP a dTTP vždy do koncentrace 1 mM a referzní transkriptáza AMV (Life Sciences) v množství 2 jednotky/mikrolitr (jde vždy o konečné koncentrace). Vzorky byly inkubovány 75 minut při teplotě 41 °C a pak byly extrahovány fenolem a chloroformem a čištěny chromatografií na sloupci za současného odstředění podle publikace Maniatis a další, 1982. Čištěné reakční směsi byly 2,5x zředěny a uloženy při teplotě 4 °C.

PCR-amplifikace cDNA při použití primerů, specifických pro M1AUS

PCR-reakce byly prováděny při použití programovatelného zařízení pro cyklické tepelné zpracování (M. J. Research Inc.). Reakční směs obsahovala 1 mikrolitr z 250 mikrolitrů zředěné cDNA, připravené svrchu uvedeným způsobem, 25 pmol prvního řetězce adaptoru-primeru T17, 25 pmol druhého řetězce amplifikačního primeru (může jít o primer na bazi poloh 865 až 884, 5' ACGGGTGTTTCGGTTTCCGTAT 3', nebo na bazi poloh 30 až 49, 5' GCTGAATCTAACTCCAATCC 3' řetězce M1AUS, jde o řetězec č. 5) 1 x Taq pufr (Northumbria Biologicals Ltd) a 0,5 mM každého z dATP, dTTP, dGTP a dCTP v reakčním objemu 100 mikrolitrů, vzorky byly převrstveny 40 mikrolitry minerálního oleje k zábraně odpařování. Uvedená směs pak byla zahřívána 2 minuty v zařízení pro cyklické tepelné zpracování na teplotu 95 °C a pak byla udržována na teplotě 72 °C. Při této teplotě byly přidány dvě jednotky Taq polymerázy (Northumbria Biologicals Ltd) a směs byla opatrně promíchána s dalšími reakčními složkami. Pak byl v zařízení pro tepelné zpracování uskutečněn následující program:

- stupeň 1: zahřívání 5 minut na 50 °C
- stupeň 2: zahřívání 40 minut na 72 °C
- stupeň 3: denaturace 40 sekund při 94 °C
- stupeň 4: zahřívání 2 minuty na 50 °C
- stupeň 5: zahřívání 3 minuty na 72 °C
- stupeň 6: 39 cyklů stupňů 3 až 5
- stupeň 7: konečné zahřívání 15 minut na 72 °C
- stupeň 8: udržování na 4 °C.

Tyto podmínky byly převzaty podle publikace Frohman a další, 1988.

Klonování PCR-produktů

PCR-produkty ze svrchu uvedených reakcí byly děleny elektroforézou na agarosovém gelu. Pásky DNA s velikostí přibližně 2,5 a 3,5 kb byly odděleny elektroelucí při použití materiálu ze skelných vláken (Whatman), extrahovány fenolem a čištěny chromatografií na G50 (Pharmacia) podle publikace Sambrook a další, 1989. Čištěná DNA byla navázána na pT7Blue T-vektor (Novagene) podle návodu výrobce.

Analýza řetězce produktů PCR o velikosti 2,5 kb a 3,5 kb

Analýza řetězce DNA byla prováděna při použití balíčku Sequenase 2,0 (US Biochemicals) při postupu podél řetězce, tak jak byl popsán svrchu při analýze řetězce MIAUS.

PCR-reakce pro 5'-zakončení

Příprava prvního řetězce cDNA

1 mikrogram mRNA *Haemonchus contortus* původu UK 11 dnů po infekci, získané způsobem, popsaným pro dospělé hlísty byl smísen s konstantním primerem s řetězcem 5' AAIGAAAGCGGATGGCTTGAIGC 3', který byl konstruován z konzervované oblasti v AustB1 a s produkty 2,5 kb PCR a 3,5 kb PCR, jde o řetězce č. 6, 7 a 8. Směs byla zahřívána 5 minut na teplotu 65 °C, pak byla uložena do ledu a byl přidán hydroxid methylnědnatý do konečné koncentrace 28,6 mM. Směs byla inkubována 5 minut při teplotě místnosti, pak byl přidán 2-merkapt ethanol do konečné koncentrace 14,2 mM a směs byla uložena do ledu. DNA prvního řetězce byla připravena při použití reakčních činidel ze systému 5' RACE (Gibco/BRL) v konečné koncentraci 20 mM Tris/HCl o pH 8,4, 50 mM KCL, 2,5 mM MgCl₂, 100 mikrogramů/ml BSA, a 0,5 mM

každého z dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Pak bylo přidáno ještě 200 jednotek reverzní transkriptázy Superscript a reakční směs byla inkubována 30 minut při teplotě 42 °C a pak zahřáta ještě na 5 minut na teplotu 55 °C. Pak byla přidána RNAáza H do konečné koncentrace 100 jednotek/ml, reakční směs byla inkubována ještě 10 minut při teplotě 55 °C a pak byla uložena do ledu. Pak byla cDNA čištěna na sloupci Glassmax (Gibco/BRL), získaný materiál byl pak uložen při teplotě -20 °C.

C-prodloužení cDNA

1/5 prvního řetězce cDNA byla zahřívána 5 minut na 70 °C a pak byl materiál 1 minutu chlazen v ledu. Pak byla přidána reakční činidla ze systému 5'RACE (Gibco/BRL) do konečné koncentrace 10 mM Tris/HCl o pH 8,4, 25 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 50 mikrogramů/ml BSA a 0,2 mM dCTP. Pak bylo přidáno ještě 500 jednotek/ml terminální transferázy, reakční směs byla inkubována 10 minut při 37 °C, pak byla zahřáta na 15 minut na 70 °C a pak skladována v ledu.

PCR-amplifikace při použití specifických primerů AusB1, 2,5 kb PCR a 3,5 kb PCR

PCR-reakce byly prováděny na programovatelném zařízení pro cyklické tepelné zpracování (M. J. Research Inc). Pro 3'-zakončení byl užit jeden z následujících tří primerů.

1. Primer, specifický pro PCR-produkt o 2,5 kb na bazi poloh 374 až 394, 5' TGTGTGGCTAATTCGTCCA 3'.
2. Primer, specifický pro PCR produkt o 3,5 kb na bazi poloh 1210 až 1229, 5' CATCTTIAGTTATCTGACCAG 3'.
3. Primer, specifický pro klon AustB1 cDNA na bazi poloh 357 až 377, 5' GACCATCGCTGATGAAGTCGG 3'.

Pro 5'-zakončení byl při této reakci použit společný "primer pro zakotvení", který je možno vyjádřit řetězcem 5' CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG 3'. Každá reakční směs obsahovala 4 mikrolitry z 50 mikrolitrů cDNA s C-prodloužením, 25 pmol příslušných dvou primerů, 1x pufr pro Taq polymerázu (Boehringer Mannheim) a 0,5 mM každého z dATP, DCTP, dGTP a dTTP, konečný objem vzorku byl 100 mikrolitrů. Směs byla převrstvena 50 mikrolitry minerálního oleje a ve svrchu uvedeném zařízení zahřáta na 2 minuty na 95 °C. Pak bylo k reakční směsi při teplotě 80 °C přidáno 0,6 jednotek Taq-polymerázy, načež byl zařazen následující program:

1. zahřívání 5 minut na 50 °C
2. extenze 10 minut při 72 °C
3. denaturace 45 sekund při 94 °C
4. zahřívání 1 minutu na 50 °C
5. extenze 2,5 minut při 72 °C
6. 39 cyklů 3 až 5
7. extenze 15 minut při 72 °C
8. udržování na 4 °C.

Klonování 5'-PCR produktu

PCR-produkty byly od sebe odděleny elektroforézou na agarozovém gelu a pásy s očekávanou velikostí přibližně 1,3 kb byly vyříznuty a DNA byla čištěna při použití balíčků GENE CLEAN a navázána na PT7Blue T-vektor (Novagene) podle návodu výrobce.

PCR-reakce pro produkci 3'-zakončení AustB1

První řetězec, použitý pro cDNA byl řetězec, který byl popsán pro cDNA při použití spolu s primery M1AUS. Byl použit specifický primer na bazi poloh 1414 až 1435, 5' TCTTGAAGAAATGAAAAAGCTT 3' v AustB1 s řetězcem č. 6 spolu s T17-adaptorovým primerem, použitým pro PCR v případě M1AUS, reakce byla prováděna v zařízení pro cyklické tepelné zpracování (M. J. Research Inc.). Reakční směs obsahovala 25 pmol každého primeru, 2 mikrolitry cDNA, 1x pufr pro Taq polymerázu (Boehringer Mannheim), 0,5 mM každého z dATP, dCTP, dGTP a DTTP v konečném objemu 100 mikrolitrů. Směs byla převrstvena na 50 mikrolitry minerálního oleje a zahřívána 2 minuty na teplotu 95 °C. Pak bylo přidáno 0,6 mikrolitrů Taq polymerázy a byl uskutečněn tentýž program jako v případě 5'-PCR, tak jak bylo svrchu popsáno.

Klonování a analýza řetězce 3'-produktu

Produkty PCR byly od sebe oděleny elektroforézou na agarozovém gelu a pás s očekávanou velikostí 1,3 kb byl vyříznut a DNA byla čištěna při použití balíčku GENE CLEAN a navázána na PCR-Script (Stratagene) podle návodu výrobce.

Analýza řetězce klonovaných PCR-produktů

DNA z klonů, získaných PCR byla analyzována při použití balíčku Sequenase 2,0 (United States Biochemical) podle návodu výrobce. Svrchu uvedeným způsobem byly konstruovány oligonukleotidové primery postupně podél řetězce DNA pro jednotlivé klony současně od obou zakončení, 5'-zakončení i 3'-zakončení.

Analýza všech řetězců DNA

Řetězce byly analyzovány při použití Softwaru pro analýzu řetězce GCG (Genetics Computer Group) podle publikace Devereux a další, 1984.

Analýza Northern blot a Southern blot

Příprava Northern blot

Analýza Northern blot byla prováděna na formaldehydových gelech v podstatě podle publikace Maniatis a další, 1982. Vzorky mRNA z jedinců *H. contortus* ve stáří 11, 15 a 23 dnů byly zpracovány působením formaldehydu s koncentrací 17,5 % objemových a formamidu s koncentrací 50 % objemových v pufru MOPS (20 mM kyseliny 3-(N-morfolin)propansulfonové o pH 7,0, 8 mM octanu sodného, 1 mM EDTA) 15 minut při teplotě 65 °C, pak byly vzorky zchlazeny v ledu. Gely byly podrobeny elektroforéze v pufru MOPS a pak byl proveden blot na membrány z Duralonu pomocí kapilárního přenosu podle publikace Sambrook a další, 1989.

Příprava Southern blot

2 g dospělých jedinců *Haemonchus contortus* byly po zmrazení v kapalném dusíku mlety na jemný prášek v kapalném dusíku. Prášek byl pak pomalu přidán ke 25 ml pufru pro rozrušení buněk s obsahem 0,05 M tris-HCl o pH 7, 0,1 M EDTA, 1 % hmotnostní Sarkosylu a 0,05 mg/ml proteinázy K (Boehringer Mannheim) a vzniklá směs byla inkubována 2 hodiny při teplotě 65 °C. Pak byla suspenze extrahována dvakrát vždy jedním objemem fenolu s chloroformem, pak ještě dvakrát dvěma objemy chloroformu a pak byl materiál vysrážen ethanol. Vysrážená DNA genomu byla znovu uvedena do suspenze

ve 20 ml pufru Tris s EDTA (TE, pH 8) přes noc při teplotě 4 °C na kolébající se podložce a pak byl materiál dialyzován proti 1 litru pufru TE, který byl dvakrát vyměněn. RNA byla odstraněna inkubací s RNAázou typ 1, prostou DNAázou (Sigma) v konečné koncentraci 20 mikrogramů/ml po dobu 1 hodina při teplotě 37 °C, pak byla provedena extrakce fenolem a chloroformem, další extrakce chloroformu a materiál byl vysrážen ethanolem stejně jako svrchu. Vysrážená usazenina DNA genomu byla dvakrát promyta ethanolem s koncentrací 70 % objemových a znovu uvedena do suspenze v 1 ml TE stejným způsobem jako svrchu.

Pak byla DNA genomu rozštěpena enzymy EcoRI a HindIII (25 mikrogramů DNA pro každé štěpení) přes noc při teplotě 37 °C a pak byla provedena elektroforéza při použití 5 mikrogramů materiálu v jedné dráze na 1% agarozovém gelu v tris-acetátovém pufru. Gel byl použit pro analýzu Southern blot s použitím kapilárního přenosu podle publikace Maniatis a další, 1982 a membrány Hybond-N (Amersham International). DNA byla na membránu fixována při použití ultrafialového světla podle doporučení výrobce.

Příprava sond

Plasmidy pBluescript s obsahem uložených řetězců M1AUS, B1A nebo AustB1 byly rozštěpeny působením enzymu EcoRI. Plasmidy pT7Blue, obsahující uložený řetězec 3,5 kb PCR byly rozštěpeny enzymem BamHI a tytéž plasmidy, obsahující uložený řetězec 2,5 kb PCR byly rozštěpeny enzymy BamHI a XbaI. Rozštěpený materiál byl podroben elektroforéze, uložené řetězce byly izolovány a radioaktivně označeny pomocí alfa-³²P-dCTP a simulované translace svrchu uvedeným způsobem při analýze banky lambdaZAP.

Hybridizační podmínky

Podmínky pro Southern blot

Membrány byly rozřezány na proužky a předem hybridizovány v hybridizačním pufru 3 hodiny při teplotě 28 °C svrchu uvedeným způsobem. Proužky Southern blot DNA genolu byla hybridizovány při použití každé ze svrchu uvedených sond přes noc při teplotě 28 °C, pak byly dvakrát omyty při teplotě místnosti 24 °C a pak ještě dvakrát při teplotě 42 °C s použitím 2 x SSC s obsahem 0,1 % SDS (mírně omezující podmínky) a pak byla provedena autoradiografie. Po vyvíjení autoradiografických záznamů byly proužky promyty za vysoce omezujících podmínek při použití 0,1 x SSC, 0,1% SDS při 65 °C a znovu byla provedena autoradiografie.

Podmínky pro Northern blot

Podmínky pro sondy M1, M1AUS a B1A (řetězce č. 1, 5 a 2)

Jako sonda pro Northern blot mRNA z *Haemonchus contortus* ve stáří 11, 15 a 23 dnů byl nejprve užit uložený řetězec M1. Filtr byl předem hybridizován 2 hodiny při 42 °C ve 2 x SSC (20 x SSC = 3 M NaCl, 0,3 M citrátu dosného o pH 7,2) s obsahem 5 x Denhardt's (0,1% Ficoll 400 (PHarmacia), 0,1% polyvinylpyrrolidon, 0,1% sérový albumin skotu, frakce V (Sigma Chemical Corp.)), 0,5% SDS (dodecylsíran sodný), 10% dextranulfát, 0,1 mg/ml DNA z varlat lososa a 50% deionizovaný formamid. Hybridizace na sondu byla uskutečněna v tomtéž pufru přes noc při teplotě 42 °C. Filtry byly dvakrát promývány 30 minut v 2 x SSC s obsahem 0,5% SDS a 50% formamidu, pak ještě dvakrát 30 minut ve 2 x SSC s obsahem 0,5% SDS a ještě dvakrát 30 minut ve 2 x SSC. První promytí bylo uskutečněno při teplotě 42 °C, zbývající při teplotě

37 °C. Po autoradiografii byly membrány promyty ve vroucím 0,1% SDS a znovu podrobeny autoradiografii tak, aby bylo možno ověřit odstranění sondy. Tentýž blot byl pak zpracován uloženým řetězcem M1AUS jako sondou, promyt a podroben autoradiografii. Po promytí bylo znovuoověřeno odstranění sondy, načež byl jako sonda použit uložený řetězec B1A. Blot byl pak zpracován stejně jako bude dále uvedeno.

Podmínky pro sondy AustB1, 2,5 kb a 3,5 kb PCR-produkty (řetězce č. 6, 7 a 8)

Northern blot byl hybridizován při použití uloženého řetězce AustB1 a mírně omezujících podmínek tak, jak bylo popsáno při hybridizaci Southern blot. Po autoradiografii byla membrána promyta vroucím 0,1% SDS podle pokynů výrobce membrány (Amersham), pak byl jako sonda použit uložený řetězec 2,5 kb PCR (klon 2), po opětném promytí byl jako sonda použit uložený řetězec 3,5 kb PCR (klon 2).

Štěpení bílkoviny H110D a stanovení enzymatické účinnosti

Příprava H110D

Nativní bílkovina H110D (H110DN) byla připravena způsobem popsaným ve zveřejněných patentových přihláškách W088/00835 a W090/11086.

Příprava elastázového fragmentu H11S z bílkoviny H110D

Dospělí jedinci *Haemonchus* byli homogenizováni v 10 objemech ledového PBS s 0,02 % azidu sodíku a pak byl materiál odstředěn 20 minut při 13000 ot/min. Usazenina byla znovu uvedena do suspenze v 10 objemech PBS s azidem, znovu homogenizována a bylo opakováno odstředění. Po

resuspenzi v 50 mM pufru MOPS o pH 7,4 (objem suspenze je 1 ml na každých 0,17 g hlístů) a po předeřtání na 30 minut na 37 °C se materiál z usazeniny rozštěpí působením elastázy po dobu 1 hodiny, užije se 800 mikrolitrů na 20 ml suspenze, vždy 1 mg/ml zásobního roztoku se doplní 1 mM HCl a 2 mM vápenatých iontů. Štěpení se zastaví přidáním 3,4-dichlorisokumarinu, užije se 300 mikrolitrů zásobního roztoku 10 mM v DMSO na 20 ml rozštěpeného materiálu. Směs se pak odstředí 20 minut při 13000 ot/min, usazený materiál se uloží a supernatant se odstředí 1 hodinu a 20 minut v ultraodstředivce při 100 000 g. Výsledný supernatant se nanese na sloupec ConA, čímž se získají vazné frakce. Pro analýzu se tato frakce zpracovává elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a elektroforeticky se přenesse na polyvinylidendifluoridovou membránu Immobilon-P (Millipore), slabě zbarvenou modří Coomassie, vyřízne se pás o 105 000 a analyzuje se v automatickém zařízení pro analýzu aminokyselin v plynné fázi. Pro vakcinaci se frakce, vázané na ConA dále čistí zahuštěním a nanesením na sloupec Superose 12 (Pharmacia), po této filtraci na gelu se odebírají frakce, které obsahují aminopeptidázu.

Štěpení H110D thermolysinem

H110D ve formě dubletu se čistí elektroelucí z 8% SDS-polyakrylamidového gelu, čímž se získá H110DE, jak bylo popsáno ve zveřejněné mezinárodní patentové přihlášce WO90/11086, elektroelucí se získá dimerní forma s molekulovou hmotností těsně nad 200 000 (poskytující charakteristický dublet při 110 000 při opakované elektroforéze na SDS-PAGE), čímž se získá H110DE. Roztoky H110DE se zahustí na 200 mikrolitrů, přidá se chlorid vápenatý do molární

koncentrace 5 mM a směs se zahřeje na 37 °C. Pak se přidá čerstvě připravený roztok 1 mg/ml thermolysinu (v 1 mM HCl, 2 mM CaCl₂) v poměru 0,1 mikrogram thermolysinu na 1 mikrogram H110DE. Směs se inkubuje 120 minut při teplotě 37 °C a pak se reakce zastaví přidáním 5 mikrolitrů 0,5M EDTA.

Fragmenty bílkoviny se oddělí elektroforézou na 15% SDS-polyakrylamidovém gelu a materiál se elektroforeticky přenesse na polyvinylidendifluoridovou membránu (Immobilon-P, Millipore). Po barvení modří Coomassie se nejintenzivnější souvislé pásy vyříznou a analyzují v zařízení pro analýzu řetězce aminokyselin v plynné fázi.

Příprava frakce H11A bílkoviny H110D, obohacené o aminopeptidázu A

Usazený materiál, získaný po působení elastázy a po 20 minutovém odstředění při 17 000 g svrchu uvedeným způsobem se znovu uvede do suspenze v PBS při teplotě 4 °C, pak se znovu odstředí a usazenina se znovu uvede do suspenze v 1% Tween v PBS s azidem a pak se 1 hodinu míchá. Pak se suspenze odstředí po dobu 20 minut při 17 000 g a supernatant se odstraní. Usazenina se opakovaně extrahuje 1% Thesitem v PBS s azidem. Supernatanty po odstředění 20 minut při 17 000g se spojí a odstředí 1 hodinu a 20 minut v ultraodstředivce při 100 000 g. Supernatant se nanese na afinitní sloupec ConA (Affigel, Biorad) a navázaný materiál se vymývá a dále dělí chromatografií na iontoměničích MonoQ.

Stanovení enzymatické účinnosti

Účinnost alfa-aminoacylapeptidhydrolázy, (mikrosomální) aminopeptidázy v H110D je možno stanovit zkouškami v roztoku při použití L-leucinu, methioninu, fenylalaninu,

kyseliny alfa-glutamové a lysin-p-nitroanilidů (pNA). Všechny p-nitroanilidy aminokyselin jako substráty (s výjimkou kyseliny alfa-glutamové), byly získány od Sigma, Poole, Dorset UK, kyselina alfa-glutamová byla získána od Fluka, Dorset UK. Jednotlivé hydrofobní (leucin- nebo fenylalanin-) a jednotlivé aminokyseliny s nábojem (derivát pNA kyseliny alfa-glutamové) jsou substráty pro aminopeptidázu ssavců M (ApM) a A (ApA) a byly zvoleny pro měření účinku inhibitoru enzymu a pro stanovení inhibice účinnosti aminopeptidázy H110D v krevním séru.

a) Zkouška na mikroplotnách

Plotny mikro-ELISA (Dynatech Immulon 1, Virginia, USA), a to jednotlivá vyhloubení těchto ploten byla naplněna 250 mikrolitry 50 mM HEPES nebo MOPS o pH 7, mimoto bylo přidáno 1 až 10 mikrolitrů zkoumané frakce. Plotny pak byly předem inkubovány 10 minut při teplotě 37 °C a pak bylo přidáno 10 mikrolitrů 25 mM p-nitroanilidu aminokyseliny jako substrátu na jedno vyhloubení. Pak byla měřena optická hustota OD při 405 nm v čase 0 při použití odečítacího přístroje pro plotny ELISA a plotny pak byly inkubovány 15 až 30 minut při teplotě 37 °C. Konečné odečtení OD pak bylo provedeno stejným způsobem a byla vypočítána změna OD za minutu na mg bílkoviny.

b) Citlivost na inhibitor

Bylo použito postupu pro stanovení enzymu stejně jako v odstavci a) s tím rozdílem, že ke 250 mikrolitrů pufru plus 1 mg/ml ConA H110D byly přidány inhibitory a směs byla inkubována 10 minut při teplotě 37 °C, načež byly přidány substráty, leucin-pNA nebo kyselina alfa-glutamová-pNA). Inhibice v procentech byla vypočítána podle vztahu

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

kde

x = deltaOD/min pro enzym bez inhibitoru a

y = deltaOD/min pro enzym s přidaným inhibitorem.

Jednotlivě bylo zkoušeno devět sloučenin s rozdílnou inhibicí enzymu a to: amastatin, bestatin (metalloproteáza, aminopeptidáza), 1,10 fenanthrolin, EDTA (Metalloproteáza), fosforamidon (metalloproteáza, thermolysin, kolagenáza), aprotinin (serinproteáza), pepstatin (proteáza kyseliny asparagové), PMSF (proteáza serinu a cysteinu) a E64 (proteáza cysteinu). Amastatin, bestatin, 1,10 fenanthrolin, PMSF a pepstatin byly získány od Sigma, Dorset, UK. Všechny ostatní inhibitory byly získány od Boehringer, Mannheim. Každý inhibitor byl použit ve dvou koncentracích, rovných nebo vyšších než maximální koncentrace, doporučená Boehringer, Mannheim.

c) Zkouška na inhibici enzymu působením antisera

Zkouška byla provedena stejně jako ve stupni a) svrchu s tím rozdílem, že byly použity dvě mikroplošné ELISA. Na jedné plošce bylo inkubováno 10 mikrolitrů ConA H110D (1 mg/ml) s 10 mikrolitry antisera od každé ovce 15 minut při teplotě 37 °C. Na druhé plošce bylo rovněž předem inkubováno 250 mikrolitrů HEPES/hydrogenuhličitanového pufru s 10 mikrolitry fenylalanin-pNA nebo alfa-glutamové kyseliny-pNA v jednom vyhloubení, rovněž 15 minut při teplotě 37 °C. Pak byly ke směsi pufru a substrátu přidány směsi ConA H110D-serum na druhé plošce pomocí vícečetné pipety. Pak byla stanovena hodnota deltaOD/min. Pro účely korelace byla vypočítána inhibice v procentech při použití vzorce, uvedeného svrchu v odstavci b), kde x znamená průměr deltaOD/min pro vyhloubení, obsahující enzym a serum z negativních

kontrolních ovcí (po vakcinaci ferritinem z koňské sleziny) a y = hodnota $\Delta OD/min$ pro vyhloubení, obsahující enzym a serum z jednotlivých ovcí po vakcinaci H110D. Pro účely korelace (obr. 18) byla ochrana v procentech vypočítána při použití svrchu uvedeného vzorce, v němž x = průměrný počet vajíček v 1 g výkalů nebo celkový průměrný počet hlístů u kontrol a y = počet vajíček na 1 g výkalů u pokusných zvířat nebo počet hlístů u jednotlivých ovcí, které byly očkovány podáním H110D.

Lokalizace enzymu histochemickým způsobem

Účinnost aminopeptidázy byla prokazována na zmrazených řezech s tloušťkou 10 mikrometrů z dospělých jedinců *Heomonchus contortus* při použití L-leucin-4-methoxy-beta-naftylamidu a 4-methoxy-beta-naftylamidu kyseliny alfa-L-glutamové jako substrátů při použití postupů podle publikací Nachlas a další, 1957, Nakane a další, 1974 a Lojda a další, 1980.

Expres rekombinantního H110D v eukaryotickém systému baculovirus-hmyzí buňka

Konstrukce plasmidu pro expresi

Svrchu uvedené 3,5-PCR-fragmenty byly získány amplifikací při použití oligo-dT-adaptoru (s obsahem místa působení SalI) a oligonukleotidu 872, reprezentujícího baze č. 30 až 49 v řetězci M1AUS a fragmenty byly klonovány ve vektoru pT7Blue. Klon pT73,5-2 je orientován tak, že sousedí s místem BamHI vícevazného spojovníku na svém 5'-zakončení a s místy působení HindIII, XbaI a SalI na svém 3'-zakončení. Řetězec na 5'-zakončení je možno charakterizovat následujícím způsobem:

BamHI *!-----oligo 872-----!--3,5K-----
5' GG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC C3'
Leu Asn Leu Phr Pro Ile

Hvězdička označuje 3' dT/dA přechýlující konec, užitý pro klonování ve vektoru pT7 Blue.

Pak byl 3,5 PCR klon 2 rozštěpen enzymem HindIII (jediné místo ve vícevazném spojovníku vektoru na 3'-zakončení genu 3,5K) a konce byly vyplněny pomocí deoxynukleotidů při použití DNA polymerázy I (Klenowův fragment) podle publikace Maniatis a další, 1982. Na zarovnané konce byl navázán spojovník BamHI (5' CGGATCCG 3', New England Biolabs, č. v katalogu 1021) a byly vybrány klony s místem působení BamHI navíc, u nichž bylo možno vyštěpit gen pro H110D v celé délce jako fragment po rozštěpení enzymem BamHI. Fragment BamHI byl izolován elektroforézou na 0,6% agarosovém gelu v tris-acetátovém pufru s následným čištěním při použití balíčku GENE CLEAN (BIO101). Tento postup byl proveden dvakrát. Čištěný fragment byl pak navázán na plasmid pBlueBac II po působení fosfatázy a rozštěpení BamHI (Invitrogen Corp.) a klony s uvedeným fragmentem ve správné orientaci (to znamená s 5'-zakončením 3,5 PCR klonu 2 pod řízením polyhedrinového promotoru baculovirus) byly stanoveny rozštěpením enzymy NheI a XbaI. Výsledný plasmid byl částečně rozštěpen enzymem BamHI a zakončení byla vyplněna svrchu uvedeným způsobem. Pak byl přidán spojovník NcoI, obsahující ATG (5' CCCATGGG 3', New England Biolabs, č. v katalogu 1040) a směs byla navázána. Klony, obsahující spojovník na 5' zakončení s místem BamHI v 3,5 PCR klonu 2 a nikoliv na 3' zakončení byly stanoveny štěpením enzymem NcoI. Výsledný plasmid byl označen pBB3,5-2(N) a je schematicky znázorněn na obr. 19.

Tato konstrukce má za následek uložení ATG do čtecího rámce na 5' zakončení 3,5 PCR klonu 2 tak, aby mohla být zahájena translace. Dále je znázorněn výsledný řetězec s obsahem tohoto kodonu ATG:

```
BamHI--NcoIvazba-BamHI----*!-----ologo 872-----  
!--  
5'GGATCCCC ATG GGG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC  
C..
```

Met Gly Ile Arg Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ile
...

V bílkovině po expresi budou scházet aminokyseliny 2 až 9 odpovídajícího řetězce H110D a navíc budou přítomny tři aminokyseliny řetězce spojovníku, který následuje bezprostředně po kodonu ATG.

Konstrukce rekombinantního baculoviru, obsahujícího řetězec pro H110D

Plasmid pBB3,5-2(N) byl užit k transfekci buněk *Spodoptera frugiperda* (Sf9), buňky byly získány od Invitrogen Corp. a postup byl prováděn s použitím lineárního viru pro polyhedrosu jader *Autographica californica* (ACNPV) a tato DNA i kationtové liposomy (Invitrogen Corp., modul pro transfekci), byly užity podle návodu výrobce. Buňky byly pěstovány na prostředí TC-100 (Sigma), doplněném fetálním telecím sérem (CSL Ltd, sérum bylo inaktivováno 45 minut při teplotě 56 °C) a antibiotiky (penicilin/streptomycin, gentamycin, CSL Ltd.). Byla také provedena kontrolní transfekce s použitím plasmidu pBB3,5-2(N) s kodonem ATG, uloženým na 3' zakončení 3,5 PCR klonu 2. Rekombinantní plaky byly izolovány na bazi skutečnosti, že vektor pBlueBac II je rov-

něž kódovým řetězcem pro beta-galaktosidázu E. coli (beta-gal), postup byl prováděn tak, že X-gal byl uložen do převrstvující vrstvy agarosy v doporučené koncentraci. Pak byly jednotlivé plaky izolovány podle svého modrého zbarvení a byly ještě dvakrát čištěny, po této době již souvislé vrstvy buněk nebyly kontaminovány divokým typem viru (což by se projevilo změněným tvarem jader). Čištěný virus byl označen 3,5-2-P2A, 3,5-2-P3A a 3,5-2-P4A a byl amplifikován před použitím dvojí opakovanou infekcí buněk Sf9. Plak, čištěný po této kontrolní transfekci byl označen 3,5-2-rev.

Průkaz exprese H110D v hmyzích buňkách, infikovaných rekombinantním baculovirem

Souvislé vrstvy buněk Sf9 (1×10^6 buněk v lahvích s objemem 25 ml) byly infikovány virem 3,5-2, divokým typem viru (wt), kontrolním virem, u něžž dochází k expresi beta-gal nebo nebyly vůbec infikovány. Po 4 dnech růstu při teplotě 26°C byly souvislé vrstvy buněk uvolněny jemným potřásáním, buněčný materiál byl izolován odstředěním 10 minut při 2000 ot/mín a usazeniny buněk byly rozrušeny trojím opakovaným zmrazením a roztátím. Rozrušený materiál byl uveden do suspenze v 500 mikrolitrech PBS a podíly po 25 mikrolitrech byly sledovány na účinnost ApM ve vyhloubeních na mikroplotnách.

Podíly rozrušeného materiálu po 15 mikrolitrech (3×10^4 buněk) byly podrobeny elektroforéze na denaturujícím 7,5% SDS-polyakrylamidovém gelu. Jeden ze vzorků byl pak zbarven modří Coomassie, aby bylo možno stanovit velikost exprese. Druhý vzorek byl analyzován metodou Western blot při použití sondy s protilátkou proti H110DN, jak již bylo popsáno svrchu.

Výsledky

Analýza imunopositivních klonů

Analýza afinity protilátek, čištěných na klonu M1

Byly připraveny afinitně čištěné protilátky, specifické pro každý z pěti klonů, pozitivních na protilátky a protilátky byly použity jako sondy při analýze extraktu, obohaceného o H110D metodou Western blot. Jak je zřejmé z obr. 8, všech pět klonů rozpoznává dublet H110D. Avšak při reakci s klonem M1 byl pozorován nejsilnější signál (obr. 8d) ve srovnání s blotem negativní kontroly lambdagt11 (obr. 8e). Tento klon byl proto dále analyzován.

Analýza Northern blot klonu M1

Analýza Northern blot mRNA z *Haemonchus contortus* při použití uloženého řetězce M1 jako sondy je znázorněn na obr. 9. Bylo možno pozorovat jediný pás mRNA o velikosti přibližně 3,5 kb. Tato velikost je dostatečná k tomu, aby šlo o kódový řetězec pro bílkovinu s molekulovou hmotností přibližně 110 000.

Analýza řetězce klonu M1

Analýza uvedené DNA po rozštěpení EcoRI prokázala, že velikost uloženého řetězce M1 je přibližně 300 bp. Byl stanoven řetězec DNA fragmentu M1, který je znázorněn na obr. 3. Fragment obsahuje 295 párů bazí při otevřeném čtecím rámci, začínajícím na bazi č. 3.

Analýza Northern blot klonu BlA

Analýza mRNA z *Haemonchus contortus* metodou Northern blot při použití sondy ve formě uloženého řetězce BlA je znázorněna na obr. 9c. Stejně jako v případě M1 je možno pozorovat jediný pás mRNA s velikostí přibližně 3,5 kb.

Analýza řetězce klonů BlA a B2

Klony BlA byly analyzovány (řetězec č. 2 a 3) a byl prokázán úplný řetězec (řetězec č. 2), který je na obr. 5 srovnáván s řetězcem pro H11-1 (řetězec č. 19) a řetězcem pro AustBl (řetězec č. 6). Uložená část má délku 484 bp a od první baze má otevřený čtecí rámec. Byl analyzován řetězec všech tří fragmentů B2, vzniklých štěpením enzymem EcoRI úplný řetězec pro B2 (řetězec č. 4) má délku 581 bp a je znázorněn ve srovnání s řetězcem pro H11-2 na obr. 4. Řetězec má otevřený čtecí rámec od polohy 2 do polohy 213, stop kodon a nepřenášená oblast odpovídá oblasti produktu 2,5 kb PCR (řetězec č. 7).

Expresí M1 a BlA v *E. coli*

Při subklonování ve vektoru pro expresi GST byly získány klony, u nichž docházelo k expresi složených bílkovin o velikosti 38 000 až 40 000 v případě M1 a 45 000 v případě BlA. Tyto výsledky odpovídají předpověděné velikosti uvedených řetězců, jde o molekulovou hmotnost glutathion-S-transferázy. Obě složené bílkoviny velmi silně reagovaly při metodě Western blot s afinitně čištěnými protilátky proti H11ODE (obr. 11). K expresi složených bílkovin došlo ve formě nerozpustných inkluzních tělísek.

Tvorba protilátek u ovcí po vakcinaci M1-GST a B1A-GST složenými bílkovinami

Antisera z ovcí, jimž byly injekčně podány složené bílkoviny, byla zkoumána metodou Western blot proti H110D. Jak při podání GST-M1, tak při podání GST-B1A došlo ke tvorbě protilátek, které specificky rozpoznávaly dublet H110D (obr. 12). Séra z negativních kontrolních ovcí tento dublet nerozpoznávají.

Izolace a stanovení vlastností klonů, vybraných hybridizací pomocí uložené DNA typu M1 nebo B1A

Pozitivní klon, hybridizující se sondou M1 byl označen M1AUS (řetězec č. 5), klon, hybridizující s B1A byl označen AustB1 (řetězec č. 6). Štěpení čištěné DNA plasmidu enzymem EcoRI prokázal, že velikost uloženého řetězce je 900 bp pro M1AUS a přibližně 1,6 kb pro AustB1. Jak je zřejmé z obr. 9b a 9d, hybridizují při metodě Northern blot řetězce M1AUS i AustB1 s mRNA téže velikosti přibližně 3,5 kb stejně jako M1 a B1A.

Analýza řetězce M1AUS

Úplná analýza fragmentu M1AUS byla uskutečněna při použití syntetických oligonukleotidů postupně podél celého řetězce DNA od obou konců. Analýza prokázala, že uložený řetězec M1AUS má velikost 948 bp, jak je znázorněno na obr. 3. Tento řetězec (řetězec č. 5) začíná kodonem ATG pro methionin a po celé své délce má otevřený čtecí rámec. Řetězec je o 19 párů bazí delší než řetězec M1 na 5' zakončení a o 634 bp delší na 3' zakončení. Řetězce, společné oběma klonům (baze 20 až 314) byly totožné a lišily se pouze dvěma nukleotidy ve třetím kodonu. Srovnání všech čtecích rámců

z různých databází prokázalo, že čtecí rámec, začínající ATG na bazi č. 1 je homologní s řetězcí ze skupiny mikrosomálních aminopeptidáz.

Řetězec AustB1

Analýza celého řetězce fragmentu AustB1 byla uskutečněna při použití syntetických oligonukleotidů postupně podél řetězce DNA od obou konců. Řetězec této DNA (řetězec č. 6) je znázorněn na obr. 5. Klon má délku 1689 bp a má otevřený čtecí rámec od zbytku č. 2. Tento řetězec tvoří část H11-1, jak je zřejmé z obr. 1. Translace aminokyselin tohoto řetězce prokázala místo pro vazbu zinku, které je charakteristické pro enzym aminopeptidázu.

Amplifikace PCR cDNA pro mRNA H11OD při použití primerů M1 AUS

Uvedená cDNA byla syntetizována z mRNA, přičemž jako primer byl použit oligo-dT, obsahující řetězec adaptoru k usnadnění následného klonování a manipulace s DNA. Získaná cDNA pak byla užita k amplifikaci řetězce M1AUS pomocí PCR, přičemž jako primer pro 5'-zakončení byl použit syntetický oligonukleotid na bazi poloh 865 až 885. Byl amplifikován PCR-fragment o velikosti přibližně 2,5 kb. Jde přibližně o očekávanou velikost fragmentů na bazi známé velikosti mRNA a na bazi řetězce cDNA pro aminopeptidázu ssavců.

Druhá skupina PCR-reakcí byla uskutečněna při použití primeru v blízkosti 5'-zakončení M1AUS, baze 30 až 49. Na agarosovém gelu byly prokázány čtyři pásy. Největší z nich s velikostí 3,5 kb odpovídá předpokládané velikosti pro produkt PCR.

Klonování a analýza řetězce produktů PCR o velikosti 2,5 kb a 3,5 kb při použití primerů M1AUS

PCR produkty o velikosti 2,5 kb a 3,5 kb byly klonovány a označeny 2,5 PCR (řetězec č. 7) a 3,5 PCR (řetězec č. 8, 15 a 16 pro klony č. 2, 10 a 19). Při metodě Northern blot hybridizovaly 2,5 PCR a 3,5 PCR (klon 2, 3,5 PCR-2) s mRNA o velikosti přibližně 3,5 kb (obr. 9e, f) stejným způsobem (vzhledem ke stáří *Haemonchus*, který byl použit pro získání mRNA) jako M1, B1A, M1AUS a AustB1.

Analýza celého řetězce těchto klonů byla prováděna postupně při použití oligonukleotidu. Jak je zřejmé z obr. 1, je řetězec pro produkt o 2,5 kb (řetězec č. 7) částí řetězce pro H11-2 (řetězec č. 20) a řetězec pro produkt o velikosti 3,5 kb (řetězec č. 8) tvoří hlavní část řetězce pro H11-3 (řetězec č. 21). Translace aminokyselin pro oba tyto řetězce, znázorněná na obr. 6 prokazuje skupinu pro vazbu zinku, His Glu Xaa Xaa His Xaa Trp (HEXXHXW), která je charakteristická pro mikrosomální aminopeptidázy.

Stanovení řetězce na 5'-zakončení PCR klonů

Odpovídající cDNA byla syntetizována při použití primerů, odpovídajících konzervovanému řetězci v klonu cDNA AustB1, 2,5 PCR a 3,5 PCR (řetězce č. 6, 7 a 8), tyto řetězce hybridizují s mRNA uvedených řetězců přibližně ve vzdálenosti 1,3 kb od 5'-zakončení. Tyto cDNA byly C-prodlouženy na 5'-zakončení a pak byly provedeny PCR reakce při použití univerzálního zakotvujícího primeru (A) pro 5'-zakončení a tří primerů, specifických pro každý z řetězců AUSTB1, 2,5 PCR a 3,5 PCR klon 2 (řetězce č. 6, 7, 8) na 3'-zakončení. Při reakcích vznikly produkty s předpokládanou velikostí těsně pod 1,3 kb: 1301 bp (řetězec č. 9), 1280 bp (řetězec č. 10) a 1292 bp (řetězec č. 11). Všechny tři tyto řetězce

mají nepřenášenou oblast na svém 5'-zakončení, jak je zřejmé z obr. 2. Všechny tyto řetězce začínají stejnou počáteční částí o 22 párech bazí, 5' GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG 3', který je znám jako vedoucí řetězec 1 (SL1) a nachází se v nepřenášené 5'-oblasti celé řady druhů nematodů, jak bylo popsáno v publikaci Huang a další, 1990. V řetězcích č. 9 a 10 se řetězec SL1 nachází bezprostředně před iniciačním kodonem ATG. V řetězci č. 11 se mezi řetězcem SL1 a iniciačním kodonem ATG nachází ještě 13 párů bazí. Všechny tři řetězce mají úplný otevřený čtecí rámec.

Analýza řetězce AustB na 3'-zakončení PCR klonu

Při použití specifického primeru pro polohy 1414 až 1438 v AustB1 (řetězec č. 6), bylo možno získat PCR produkt s pásem s předpověděnou velikostí přibližně 1,3 kb. Při analýze klonovaného pásu byly získány řetězce č. 12 a 13. Tyto řetězce měly otevřený čtecí rámec v rozsahu párů bazí 1 až 615 a nepřenášenou oblast.

Analýza řetězce klonovaných PCR produktů

Na obr. 2 jsou uvedeny řetězce složených bílkovin, označených H11-1, H11-2 a H11-3. Řetězec aminokyselin, odvozený od těchto řetězců je uveden na obr. 6a. Platnost předpověděné translace těchto řetězců DNA je v podstatě potvrzena analýzou řetězců aminokyselin pomocí Edmanovy degradace z CNBr a fragmentů po proteolytickém štěpení, jak je zřejmé z obr. 7. To znamená, že 27 zbytků z 29 zbytků N-terminálního řetězce H11-S (řetězec č. 16) odpovídá řetězci H11-2 v rozmezí zbytků 61 až 90, jak je zřejmé z obr. 7b. Odpovídající valin (V) v poloze 78 a glycin (G) v poloze 90 jsou charakteristické pro H11-2 vzhledem k tomu, že H11-3 obsahuje asparagin (N) v poloze 90 a H11-1 obsahuje leucin (L)

v poloze 86, která odpovídá v poloze 78 v H11-2. Dva zbytky na N-terminálním zakončení řetězce aminokyselin H11-S (řetězec č. 16) neodpovídají žádnému ze tří řetězců H11OD, jak byly uvedeny. Je třeba uvést, že existují přesné identické úseky řetězců ve velmi podobných, avšak jinak odlišných řetězcích Pep A a B (které byly dříve popsány ve WO 90/11086) a H11-2 a H11-1 v oblasti zbytků 540 až 555. Podobně v oblasti zbytků 450 - 470 obsahuje Pep D krátký řetězec, který přesně odpovídá H11-2, kdežto podobný, avšak odlišný řetězec Pep E je bližší řetězci H11-3.

Na obr. 6b je přenášeny řetězec aminokyselin z jednoho z řetězců v jeho plné délce (H11-3) srovnáván se dvěma řetězci pro mikrosomální aminopeptidázu ssavců. Homologie přenášeného řetězce H11OD s těmito aminopeptidázami je znázorněna tak, že totožné aminokyseliny jsou uzavřeny do rámečků. Charakteristickou skupinou aminokyselin pro mikrosomální aminopeptidázu je řetězec HEXXHXW, který je určen pro vazbu zinku podle publikací Jongeneel a další, 1989, Vallee a další, 1990, jak je znázorněno na obr. 6 hvězdičkami. Tento řetězec, který je přítomen v přenášené oblasti H11-1, H11-2 a H11-3, je konzervován ve všech mikrosomálních aminopeptidázách. Další vlastností, která je společná mikrosomálním aminopeptidázám ssavců a Haemonchus, je přítomnost poměrně krátké intracelulární oblasti, kterým je jediný transmembránový řetězec v blízkosti N-zakončení, mimoto je přítomno několik potenciálních míst pro glykosylaci. Úroveň homologie (podobnost 52 až 55 % a totožnost 30 až 32 %) H11-1, H11-2 a H11-3 s mikrosomálními aminopeptidázami ssavců je znázorněna na obr. 2.

Analýza Southern blot

Výsledky analýzy Southern blot při použití DNA genu *H. contortus* a různých H110D cDNA klonů a PCR produktů jako sond jsou znázorněny na obr. 10. Pro všechny sondy je možno prokázat vícečetné pásy hybridizace, což je typické pro skupinu genů s obsahem většího počtu genů. Jak bylo očekáváno, je možno pro BlA a AustBl prokázat podobný typ hybridizace stejně jako pro M1AUS a 3,5 kb PCR. Avšak tyto typy se od sebe navzájem lišily a současně se lišily také od hybridizace pro 2,5 kb PCR, a to i za mírně omezujících podmínek, jak je znázorněno na obr. 10A, což odráží odlišné úrovně homologie mezi těmito třemi řetězci cDNA.

Průkaz účinnosti typu aminopeptidázy pro H110D

Účinnost typu mikrosomální aminopeptidázy byla prokázána pro ty frakce, které obsahovaly H110D, to znamená pro supernatanty po extrakci Thesitu v ultraodstředivce, pro frakce po vazbě ConA (ConA H110D) a také pro ty frakce s obsahem H110D, které byly získány chromatografií na iontoměniči při použití sloupce MonoQ, jak je zřejmé z následující tabulky 3. Specifická účinnost se v případě všech zkoumaných substrátů zvyšovala souběžně s čistotou H110D.

T a b u l k a 3

Enzymatická účinnost frakcí typické šarže H110D

frakce	specifická účinnost enzymu (O.D./min/mg bílkoviny)				
	fenyl- alanin -pNA	leucin -pNA	lysin -pNA	kyselina alfa-glu- tamová- -pNA	methionin -pNA
Fyziologický roztok NaCl s fosfátovým pufrem (PBS)	0,20	0,08	0,12	0,01	0,16
1% Tween 20(PBS)	0,15	0,15	0,09	0,01	0,09
1% Thesit/PBS	1,94	1,25	0,57	0,64	1,91
ConA H110D	4,08	3,01	1,43	2,09	3,84
CamQ H110D	6,55	5,01	3,01	3,90	6,41

Účinek inhibitorů aminopeptidáz ssavců na účinnost
aminopeptidázy H110D

Přidání inhibitoru bestatinu, který inhibuje mikrosomální aminopeptidázu ssavců ke ConA H110D v koncentraci doporučené výrobcem (Boehringer Mannheim) snížilo účinnost proti leucin-p-nitroanilidu o přibližně 70 %. Byla provedena řada pokusů s různými inhibitory proteáz. Inhibiční účinek měly ty inhibitory, které jsou specifické pro metalloproteázy nebo aminopeptidázy. Účinek těchto inhibitorů na rychlost reakce je uveden v následující tabulce 4. Nejúčinnější byl fenanthrolin v koncentraci 5 mM.

T a b u l k a 4

Inhibice účinku aminopeptidázy H110D různými inhibitory proteáz

inhibitor	koncentrace	Inhibice v % p-nitroanilid kyseliny alfa- glutamové ¹	inhibice v % p-nitroanilid leucinu ²
Amastatin	10 / μ M	0	61
	50 / μ M	0	66
Bestatin	50 / μ M	23	63
	100 / μ M	35	68
EDTA	1 mM	17	8
	10 mM	21	16
1,10 fenanthrolin	1 mM	78	78
	10 mM	85	87
Fosforamidon	10 / μ M	1	0,8
	50 / μ M	1	7

¹ substrát pro aminopeptidázu A ssavců

² substrát pro aminopeptidázu M ssavců.

f

Subfrakcionace H110D

Distribuce účinnosti ve frakcích po chromatografii ConAH110D na sloupci iontoměniče MonoQ je znázorněna na obr. 13a, elektroforéza na SDS-PAGE pro jednotlivé frakce je znázorněna na obr. 13b.

Enzymatická účinnost byla spojena s podíly frakcí H110D, které bylo možno od sebe oddělit opakovaným stanovením isoelektrického bodu, jak je znázorněno na obr. 14 a 15. Při nižších hodnotách pI (pH 4,5) obsahují tyto podíly pouze větší z pásů, tvořících dublet H110D při elektroforéze na SDS-PAGE a při vyšších hodnotách (pH 6,5) obsahují tyto podíly pouze menší z pásů pro dublet H110D. Mezifrakce obsahují oba tyto pásy. Menší pás může být také získán jako samostatná frakce při chromatografii na iontoměniči MonoQ při použití Pharmacia SMART^R. Všechny tyto podíly a menší frakce jsou schopné vázat ovčí protilátky proti afinitně čištěné bílkovině H110D po expresi klonu lambda_{gt11} M1, kdežto protilátky z lambda_{gt11} bez uloženého řetězce nejsou schopné vazby, jak je zřejmé z obr. 14c. Všechny malé frakce jsou schopné se vázat na myší monoklonální protilátky, označené TS 3/19,7 (obr. 14c), které jsou rovněž schopné se vázat na rekombinantní bílkovinu, k jejíž expresi dochází klonem M1. Všechny podfrakce mají účinnost mikrosomální aminopeptidázy (obr. 15c), přestože tato účinnost je poměrně nízká u frakcí, získaných při nejvyšších a nejnižších hodnotách pI. Tato nižší účinnost může být způsobena nižší koncentrací bílkoviny, účinkem extrémního pH při dělení frakcí nebo požadavkem na přítomnost malého i velkého pásu pro maximální účinnost produktu.

Vakcinace jednotlivými složkami H11CD

Oddělené horní a spodní pásy, získané stanovením isoelektrického bodu nebo chromatografií na iontoměničích vyvolávají tvorbu ochranných protilátek po vstříknutí ovcím, jak je možno prokázat následujícím pokusem. 30 ovcí ve stáří přibližně 6 měsíců bylo rozděleno do pěti skupin po šesti ovcích tak, aby každá ze skupin měla přibližně stejnou hmotnost. Každé ovci bylo injekčně podáno celkem 150 mikrogramů bílkovin ve třech stejných dávkách podle publikací Munn a další, 1992 a Tavernor a další, 1992a, b v průběhu 54 dnů. Zvířata ve skupině L byla očkována podáním menšího pásu z dubletu H110, zvířata ve skupině U byla očkována horním pásem, ve skupině U+L byla podána směs horního a spodního menšího pásu, skupině D byl podán nerozdělený pás ve směsi horního a spodního pásu, získaný při středních hodnotách pH a kontrolní skupině C byl podán ferritin ze sleziny koní jako antigenně nepřibuzná bílkovina. Ovcím bylo po třech týdnech po očkování podáno po třetí injekci 10 000 infekčních larev a pokus byl ukončen 29 až 31 dnů po této infekci. Výsledek pokusu je shrnut na obr. 16. Injekční podání jakékoliv ze subfrakcí snižuje výskyt vajíček parazitů v průběhu pokusu přibližně o 90 % a celkový počet hlístů o 63 až 84 %, ve všech případech jde o statisticky významný rozdíl (p je menší než 0,5) ve srovnání s kontrolními zvířaty. Snížení 70 až 88 % bylo větší pro samice hlístů než pro samce hlístů, avšak s výjimkou snížení počtu samců u ovcí se směsí horního a spodního pásu, kde pravděpodobnost byla pro p je menší než 0,07 bylo ve všech případech snížení pro obě pohlaví statisticky významné při p menším než 0,05.

Očkování pomocí H11S a H11A

Zkrácenou, ve vodě rozpustnou formu H11OD (H11S, která si uchovává svou enzymatickou účinnost) je možno získat z přírodní molekuly působením elastázy. Bylo prokázáno, že tato forma má účinnost, převážně podobnou účinnosti enzymu ApM, extrakt materiálu po štěpení elastázou, extrahovaný Thesitem (H11A) byl obohacený o účinnost typu ApA, jak je zřejmé z následující tabulky 5.

T a b u l k a 5

Poměr

	aminopeptidáza-M : aminopeptidáza-A (leucin-pNA) (kyselina alfa-glutamová-pNA)
H11OD	1,44 : 1
H11S	26,0 : 1
H11A	0,48 : 1

Následující pokus prokazuje, že vakcinace ovcí pomocí H11S nebo H11A poskytuje ochranu proti infekci Haemonchus. Skupina 18 ovcí ve stáří přibližně 8 měsíců byla rozdělena na tři části po šesti ovcích tak, aby každá skupina šesti ovcí měla přibližně stejnou hmotnost. Každému zvířeti bylo injekčně podáno ve dvou stejných dávkách přibližně 100 mikrogramů bílkoviny podle publikací Munn a další, 1992 a Tavernor a další, 1992a, b v průběhu 23 dnů. Zvířatům ve skupině A byla injekčně podána frakce H11A, zvířatům ve skupině S frakce H11S a zvířatům ve skupině C byl podán ferritin ze sleziny koní jako antigeně nepříbuzná bílkovina, to znamená jako negativní kontrola. 25 dnů po druhé injekci bylo

ovcím podáno 10 000 infekčních larev a pokus byl ukončen 34 až 36 dnů po infekci. Výsledky pokusu jsou shrnuty na obr. 17. Injekční podání H11S snížilo množství vajíček ve výkalech o 89 % a celkový počet hlístů o 76 %. Injekční podání H11A snížilo množství vajíček ve výkalech o 98 % a celkový počet hlístů o 84 %. Běží tedy o statisticky významný rozdíl při p menším než 0,5 oproti kontrolám.

Inhibice účinku aminopeptidázy H110B protilátkami

Roztoky s obsahem 110B byly inkubovány spolu se vzorky sér z jednotlivých ovcí po injekčním podání frakcí s obsahem H110D nebo se vzorky sér kontrolních ovcí. Pak byly roztoky sledovány na účinnost aminopeptidázy při použití fenolalaninu-p-NA a kyseliny alfa-glutamové-p-NA jako substrátu. Inhibice účinnosti, jejíž hodnota byla maximálně 80 %, byla v korelaci se stupněm ochrany u jednotlivých ovcí, jimž bylo odebráno sérum, jak je zřejmé z obr. 18.

Lokalizace enzymatické účinnosti

Zmrazené řezy dospělých jedinců *Haemonchus contortus* byly zkoumány na účinnost aminopeptidázy. Jak je zřejmé z obr. 19, je účinnost aminopeptidázy lokalizováno v průsvitu střeva. Bílkovina H110D je rovněž specificky uložena v této lokalizaci.

Expres H110D (3,5 PCR klon 2) při použití eukaryotického systému baculovirus-hmyzí buňky

Expres účinnosti aminopeptidázy v hmyzích buňkách

Infikované buňky byly zkoumány na účinnost aminopeptidázy při použití phe-, leu-, met- a lys-pNA jako substrátu. Analýza byla komplikována skutečností, že hmyzí buňky obsahují aminopeptidázu, která výrazně přednostně štěpí amidové vazby lysinu. Avšak buněčné extrakty s obsahem H110D po expresi mimoto štěpily také vazby leu-, met- a phe-pNA v uvedeném pořadí přednosti.

Molekulová hmotnost a imunoreaktivita bílkoviny H110D
(3,5 PCR klon 2) po expresi

Vzorky extraktů infikovaných nebo kontrolních buněk byly podrobeny elektroforéze na 7,5% SDS-polyakrylamidovém gelu, který pak byl barven modří Coomassie. Lysáty infikovaných buněk 3,5-2-P3A a 3,5-2-p4A obsahovaly pásy stejného rozměru jako pás pro H110D s molekulovou hmotností 110 000, který se pohyboval přímo pod pásem pro beta-gal s molekulovou hmotností 120 000, k jejíž expresi docházelo současně. Tento pás s molekulovou hmotností 110 000 nebyl přítomen v rozrušených negativních kontrolních lysátech. Byl rovněž nepřítomen v lysátu buněk P2A, u nichž nedochází k expresi enzymu.

Gel byl ve dvojím opakování analyzován metodou Western blot, jako sonda byla použita protilátka proti H110DN, jak je zřejmé z obr. 21. Bylo možno pozorovat velmi silnou specifickou imunologickou reakci na pás s molekulovou hmotností 110 000, k jehož expresi dochází buňkami 3,5-2-P3A a také 3,5-2-P4A a proti nativnímu dubletu H110D v kontrolní dráze, obsahující ConA H110D, žádnou reakci nebylo možno pozorovat v negativních kontrolních drahách.

Literatura

- Andreason, G.L. & Evans, G.A. (1980) *Biotechniques* 6, 650.
- Blin, N., & Stafford, D.W. (1976). *Nucleic Acids Research* 3, 2303-2308.
- Bowtell, D.D.L., Saint, R.B., Rickard, M.D. & Mitchell, G.F. (1986). *Parasitology* 93, 599-610.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- Cordingley, J.S., Taylor, D.W., Dunne, D.W. & Butterworth, A.E. (1983) *Gene* 26, 25-39.
- Devereux, J., Haerberli, S. & Smithies, O. (1984), *Nucleic Acids Research* 12, 387-395
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983). *Analytical Biochemistry* 132, 6-13.
- Fire, A. (1986) *EMBO Journal* 5, 2673-2680.
- Fire, A. & Waterston, R.H. (1989) *EMBO Journal* 8, 3419-3428.
- Francis, M.J. & Clarke, B.E. (1989) *Methods in Enzymology* 178, 659
- Frohman, M.A., Dush, M.K. and Martin, G.R. (1988). *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington* 85, 8998-9002.
- Gubler, U. & Hoffman, B.J. (1983). *Gene* 25, 263-265.
- Han, M. & Sternberg, P.W. (1990) *Cell* 63, 921-931.

- Huang, X.-Y. & Hirsch, D. (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences Washington 86, 8640-8644.
- Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982) Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific. London
- Jongeneel, C.V., Bouvier, J. & Bairoch, A. (1989). FEBS Letters 242, 211-214.
- Kenny, A.J. & Maroux, S. (1982). Physiological Reviews, 62, 91-128.
- Kenny, A.J. & Turner, A.J. (1987). Mammalian Ectoenzymes. Elsevier Press, Amsterdam. Volume 14 of Research Monographs in Cell and Tissue Biology. (editors J.T.Dingle & J.L.Gordon).
- Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
- Lojda, Z. & Gossrau, R. (1980) Histochemistry 67, 267-290.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Publication.
- Merrifield, R.B. (1964) Biochemistry 3, 1385-1390.
- Munn, E.A., Smith T.S., Graham, M., Greenwood, C.A., Tavernor, A.S. & Coetzee, G. (1992) Parasitology 106, 63-66.
- Nachlas, M.M., Crawford, D.T. and Seligman, A.M. (1957). J Histochem & Cytochem. 5, 264-278.
- Nakane, P.K. & Kawoi, A.K. (1974). Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 22, 1084-1091.

- Noren, O., Sjostrom, H., Danielsen, E.M., Cowell, G.M. & Skovbjerg, H. (1986). The Enzymes of the Enterocyte Plasma Membrane. In Molecular and Cellular Basis of Digestion. Elsevier Press, Amsterdam, (editors P.Desnuelle, H.Sjostrom & O.Noren).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Semenza, G. (1986). Annual Review of Cell Biology, 2, 255-313.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988) Gene 67, 31-40.
- Spieth, J. MacMorris, M., Broverman, S., Greenspoon, S. & Blumenthal, T. (1988) Dev. Biol. 130, 285-293.
- Tavernor, A.S., Smith, T.S., Langford, C.F., Graham, M. & Munn, E.A. (1992a) Parasite Immunol. 14, 671-675.
- Tavernor, A.S., Smith, T.S., Langford, C.F., Munn, E.A. & Graham, M. (1992b) Parasite Immunol 14, 645-655.
- Vallee, B.L. & Auld, D.S. (1990) Biochemistry 29, 5647-5659.
- Watt, V.M. & Yip, C.C. (1989) Journal of Biological Chemistry 264, 5480-5487.
- Woodward, MP, Young, WW Jr and Bloodgood, RA (1985). Detection of Monoclonal Antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J. Immunol. Meth. 72, 143-153.
- Wu, Q., Lahti, J.M., Air, G.M., Burrows, P.D. & Cooper, M.D. (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington 87, 993-997.

Informace o řetězcích

počet řetězců: 24

Informace pro řetězec č. 1:

Vlastnosti řetězce:

délka: 295 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 1:

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

Informace pro řetězec č. 2:

Vlastnosti řetězce:

délka: 484 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 2:

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

Informace pro řetězec č. 3:

Vlastnosti řetězce:

délka: 216 párů bazí
typ: nukleová kyselina
typ řetězce: dvojitý
topologie: lineární

Popis řetězce č. 3:

ACCTGGGTCAG	CAAGCGACCG	ACTGCGTAA	GGTAACTGCT	CCTCTCAAAA	CTGTTTACTG	60
CTATGGGGTC	CAGGAAGGCG	GTGATGAGGC	ATTCGACAAG	GTGATGGAAC	TATATAATGC	120
GSAACAAGTG	CAGTTGGAGA	AAGACAGTCT	ACGTGAAGCA	TTGGGATGCC	ATAAAGACCT	180
TACAGCTCTA	AAGGGACTTC	TTATGCTGGC	TTTGGA			216

Informace pro řetězec č. 4:

Vlastnosti řetězce:

délka: 581 párů bazí
typ: nukleová kyselina
typ řetězce: dvojitý
topologie: lineární

Popis řetězce č. 4:

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

Informace pro řetězec č. 5:

Vlastnosti řetězce:

délka: 948 párů bazí
typ: nukleová kyselina
typ řetězce: dvojitý
topologie: lineární

Popis řetězce č. 5:

ATGACGTCGC	AGGGGAGAAC	GCGGACATTG	CTGAATCTAA	CTCCAATCCG	TCTTATTGTC	60
GCAATTATTC	TAGTAGCTGC	TGCAGTCGGC	CTCTCTATTG	GTCTCACCTA	TTACTTTACT	120
CGCAAAGCCT	TCGATACCTC	AGAAAAGCCA	GGAAGGATG	ATACTGGTGG	CAAGGACAAA	180
GACAACTCTC	CCTCTGCGGC	GGAACCTACTC	CTTCCAAGTA	ATATAAAACC	ATTGTCTTAC	240
GACTTGACGA	TCAAAACATA	TCTACCTGGT	TATGTGGACT	TCCCACCGGA	GAAAAACCTC	300
ACATTCGATG	GGCGTGTTGA	AATATCAATG	GTTGTAATTG	AGCCACACAA	GAGTATCGTA	360
CTCAATTCAA	AGAAGATCTC	TGTAATACCC	CAAGAATGTG	AACTGGTATC	GGGCGATAAA	420
AAATTCGAAA	TTGAAAGTGT	AAAGGAGCAC	CCAAGACTGG	AAAAGGTTGA	GTTTCTTATC	480
AAAAGCCAAC	TGGAAAAAGA	TTCACAAATC	CTACCAAGCC	CGGCTTACAT	CGGTCTCATC	540
AGCAACAGCC	TTGGTGGAAT	CTACCAGACC	ACTTATACCA	CCCCGGATGG	CACCCCTAAG	600
ATCGCTGCAG	TTTCACAAAA	TGAGCCCATTA	GATGCTCGTC	GAATGGTACC	ATGCATGGAT	660
GAACCGAAAT	ACAAAACAAA	CTGGACCGTT	ACTGTCAATC	ATCCAAAAGG	CACCAAAGCC	720
GTCTCGAATG	GAATCGAAGT	GAACGGAGAT	GGAGAGATCA	GTGGTGATTG	GATCAGATCG	780
AAGTTCTTGA	CTACTCCACG	GATGTCATCC	TACTTGTGGG	CAGTTATGGT	TTTCAAAATT	840
GAATACATCG	AAGGTGAAAC	AAAGACGGGT	GTTCCGTTCC	GTATATGGTC	ACGCCCAGAG	900
GCAAAGAAGA	TGACACAATA	TGCTCTGCAA	TCTGGTATCA	AGTGCAATA		948

Informace pro řetězec č. 6:

Vlastnosti řetězce:

délka: 1689 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

AATTCCGGCT	CGTCCGGAAG	CTATGAAGAT	GACAGAATAT	GCCATGATAG	CTGGAATCAA	60
ATGTTTGGAT	TACTATGAGG	ACTTCTTCGG	GATCAAATTC	CCACTTCCAA	AACAAGATAT	120
GGTTGCTCTT	CCTGACTTCT	CATCTGGTGC	TATGGAGAAC	TGGGGTCTCA	TCACATACAG	180
GGAGGGTTCC	GTGCTCTACG	ATGAAAACCT	CTACGGACCA	ATGAATAAGG	AGCGGGTTGC	240
AGAAGTGATC	GCGCACGAAC	TTGCACATCA	GTGGTTCGGT	AATTTGGTCA	CGATGAAGTG	300
GTGGGATAAC	CTATGGCTGA	ACGAAGGATT	CGCGTCATTC	GTGGAATACA	TCGGAGCCGA	360
CTTCATCAGC	GATGGTCTAT	GGGAAATGAA	AGATTTCTTC	CTGCTGGCAC	CGTACACAAG	420
TGGTATTACG	GCTGATGCAG	TAGCTTCAAG	CCATCCGCTT	TCCTTCAGAA	TAGATAAGGC	480
TGCAGATGTA	TCAGAAGCGT	TCGATGATAT	CACATACCGT	AAAGGAGCAT	CCGTTCTTCA	540
AATGCTATTG	AATTTAGTTG	GGGACGAAAA	TTTCAAGCAG	TCTGTTTCGC	GTTACCTCAA	600
GAAGTTTTCA	TATGATAATG	CGGCTGCTGA	AGATTTATGG	GCAGCATTCC	ACGAAACCGT	660
CCAAGGTATA	ACCGGACCTA	ATGGTGGACC	ATTGAAAATG	TCCGAGTTTG	CGCCACAATG	720
GACAACTCAG	ATGGGGTTCC	CTGTTCTTAC	TGTCGAGTCG	GTTAACGCAA	CGACTTTGAA	780
AGTCACCCAA	AAACGATACA	GGCAGAACAA	GGATGCAAAG	GAACCAAGAGA	AGTACCGTCA	840
TCCAACCTTAT	GGGTTCAAAT	GGGATGTTCC	TCTGTGGTAT	CAGGAAGATG	AACAGCAAGT	900
GAAAAGAAGT	TGGTTAAAAA	GAGAGGAACC	GCTCTATTTC	CATGTAAGCA	ATTCTGATTTC	960
GTCAATTGTG	GTGAATGCCG	AACGTCGTGC	TTTTTGCCGA	TCAAACCTATG	ACGCTAACGG	1020
TTGGAGGAAC	ATTATGAGAA	GACTCAAGCA	GAATCATAAG	GTCTATGGTC	CACGAACAAG	1080
AAACGCTCTC	ATAAGTGATG	CGTTTGACAG	AGCTGCAGTT	GAGGAAATGA	ATTACGAGAC	1140
CGTATTTGAA	ATGCTCAAAT	ACACCGTGAA	AGAAGAGGAT	TACTTACCAT	GGAAGGAGGC	1200
AATATCAGGA	TTCAATACAA	TTTTGGACTT	TTTCGGCAGC	GAACCCGAAT	CTCAATGGGC	1260
TTCCGGAATAC	ATGCGAAAAAC	TGATGAAGCC	AATTTATGAC	AAGAGTAGCA	TCAAAGTTTAT	1320
AGCGGAGAAC	TACAAAAAAG	ATTGCTTTTT	CTTCAAAAAT	AATCTCCAAA	TAGCTGTTAT	1380
TGACACATAC	TGTGGTCTTG	GAGGCAAAGA	ATGTCTTGAA	GAAATGAAAA	AGCTTTTTTGA	1440
CAAGGAGGTC	ATGAAAATGTC	AACCTGGTCA	GCAAGCGACC	GAATGCGTAA	AGGTAACCTGC	1500
TCCTCTCCGA	AAAACCTGTTT	ACTGCTATGG	GGTCCAGGAA	GGCGGTGATG	AGGCATTTCGA	1560
CAAGGTGATG	GAACATATATA	ATGCGGAACA	AGTGCAGTTG	GAGAAAGACA	GTCTACGTGA	1620
AGCATTGGGA	TGCCATAAAG	ACGTTACAGC	TCTAAAGGGA	CTTCTTATGC	TGGCTTTGGA	1680
TCGGAATTC						1689

Informace pro řetězec č. 7:

Vlastnosti řetězce:

délka: 2472 párů bazí

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 7:

ACGGGTGTTT	GGTTCCGTAT	ATGGTCTCGA	CCAGAGGCGA	AACGAATGAC	GGCATACGCT	60
TTGGATGCTG	GCATCAGATG	CCTGGAGTTT	TATGAGAAAT	TCTTTGACAT	AAAAATCCCT	120
CTGGAAAAAC	AAGATATGAT	TGCTCTTCCT	GATTTTACCG	CTGGTGCCAT	GGAAAACTGG	180
GGCCTTATCA	CTTATAGAGA	GGATTCTCTC	CTATACGATG	AAAAAATTTA	TGCACCGATG	240
AATAAACAGC	GGGTTGCTCT	CGTAGTTGCT	CACGAGCTTG	CTCATCAGTG	GTTCCGGCAAT	300
CTGGTCACAC	TGAAGTGGTG	GGATGATACG	TGGTTGAACG	AAGGTTTTGC	AACATTTGTT	360
GAGTATCTTG	GAATGGACGA	AATTAGCCAC	AACAATTTCA	GAACGCAAGA	TTTCTTCTTG	420
CTCGATGGAA	TGGATCGCGG	AATGAGAGCT	GACTCGGCAG	CATCGAGCCA	TCCGCTTTCC	480
TTTAGGATTG	ACAAAGCGGC	AGAAGTTGCC	GAAGCCTTTG	ACGATATTTT	ATACGCCAAG	540
GGAGCGTCAG	TTCTCACTAT	GCTACGGGCT	TTGATTGGAG	AGGACAATTA	CAGGAATGCT	600
GTTGTGCAAT	ACCTCAAGAA	GTTCTCCTAC	AGCAATGCAC	AAGCAGCCGA	TCTGTGGAAC	660
GTCTTCAATG	AAGTTGTCAA	AGGTGTTAAG	GGTCCTGACC	GCAACGTCAT	GAAAAATCGAC	720
CAATTTACCG	ATCAGTGGAC	GTATCAGATG	GGTTATCCTG	TGGTTAAAGT	AGAAGAATTT	780
AATGCGACCG	CCCTAAAGGT	TACGCAGAGC	CGGTACAAGA	CAAATAAAGA	CGCCTTGGAA	840
CCAGAGAAAT	ATCGTAATCC	AAAATACGGG	TTCAAGTGGG	ATGTTCCCTT	ATGGTATCAG	900
GAAGGCAATA	GCAAAGAGGT	GAAGCGAACA	TGGCTAAAAA	GAGATGAACC	GCTGTACTTG	960
AACGTCAACA	ATCGGGATAC	ATCCCTTGTT	GTGAACGCTG	ATCGACATGG	ATTTTATCGA	1020
CAAACTATAT	ATGCCAACGG	TTGGAAAAAG	ATAATCAAGC	AGCTCAAGAA	AGATCACAAG	1080
GTCTTCGGTC	CAAGGACAAG	GAACGCTATC	ATAAGCGATG	CATTTGCTGC	AGCTACGATT	1140
GACGCAATCG	ACTATGAAAC	TGTATTGCAA	CTACTTGAAT	ATGCCAAAAA	TGAAGAGGAA	1200
TTCTTGCCCT	GGAAGGAAGC	TCTGTCCGGC	ATGTTCCGAG	TTTTAAAGTT	CTTCGGTAAT	1260
GAGCCGGAGA	CAAAACCAGC	TAGAGCTTAC	ATGATGAGCA	TATTAGAACC	GATGTATAAT	1320
AAGAGCAGCA	TTGATTACAT	CGTCAAGAAT	TATTTGGATG	ATACGTTATT	CACAAAAATT	1380
AATACTCAAA	AGGATATCAT	TGATGCATAT	TGTTCCCTTG	GATCAAAGGA	CTGTATAAAG	1440
CAATATAAGG	ATATCTTCTA	CGATGAGGTT	ATGCCCAAGT	GTAAGGCCCG	GGAAGCAGCA	1500
ACCAAATGCG	TTAAGGTTTC	CGCTCCTCTT	CGAGCCCAAT	TTTACTGTTA	TGGTGTACAG	1560
GAAGGTGGTG	AAGAAGCTTT	TGAAAAGGTG	ATGGGGCTGT	ATCTAGCAGA	AGATGTTCAA	1620
CTGGAGAAGG	GTATCCTGTT	CAAAGCCTTG	GCATGCCACA	AAGATGTTAC	AGCTCTAAAA	1680
GAACCTCTTT	TGCGAGCCCT	GGACCGTAAA	TCGTGTTTTG	TGCGTCTTCA	GGATGTCCCT	1740
ACCGCTTTCC	GTGCTGTATC	TGAAAACCCT	GTGGGCGAAG	AATTCATGTT	CAATTTCCCTA	1800
ATGGAGAGAT	GGGAGGAAAT	CACTGCCAGC	TTGGAAACAG	AACACAGAGC	AGTTGATAAA	1860
GTGGTCGGCG	CTTGTTGCAC	AGGAATTCGC	TCCCAACAAC	AAATAGATCA	GCTGAAGAAT	1920
CTACAGAAGA	ACAATGCGCA	GGCTAAGAA	TTGGGCTCAT	TCACCCAGGA	AATCGAAAAA	1980
GGAGAACATA	AAATTGCTTG	GATCAAGAAA	CATTTTCACA	GATTATCGGA	ATTCTTCAAG	2040
AGAGCAAGAT	CATAGCTTTT	CACACTGAGC	TCCAATTTTA	ACGTCTTCAA	ACTAGGAGAC	2100
AGTTTGTGCT	AAAAGTCAGT	TTACATTTT	CCGTTTGAAT	GCCATCCATT	CGAATACAAC	2160
CAATAATACC	ATTTTAAAGTA	CCTTTCAATC	ACAGTGATTA	CTGAATTTTG	AATATATCAT	2220
GAAGCTTGTA	TCTTGAACGT	TATGATCGGT	GACTTTCAAT	TTATAGAGCT	CACTCTCCAT	2280
TTTGTAGCTG	TGATGACTTG	CATTTAAGAC	CCACCATTTA	CCAGCCTAGA	ATCTTTCCCC	2340
AATACATTCC	AAACTCCGAT	CACCTCCACC	GCTGACAATG	CCCAGATTTG	TTTTTTTGTG	2400
TGCTATCCAT	CTAACTGTTT	CGATCGCCGG	TTGTTTGTCA	ATTGCTTATC	TGATAAATAT	2460
TGACGTTGGT	GT					2472

Informace pro řetězec č. 8:

Vlastnosti řetězce:

délka: 3305 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 8:

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTTATTGT	CGCATTATTT	CTAGTAGCTG	CTGCAGTCGG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGACAA	AGACAATTCT	CCCTCTGCCG	CGGAACTACT	180
CCTTCCAAGT	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	CGACTTGACG	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGGAC	TTCCCACCGG	AGAAAAACCT	CACATTTCGAT	GGGCGTGTGG	AAATATCAAT	300
GGTTGTAATT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	ACTCAATTCA	AAGAAGATCT	CTGTAATACC	360
CCAAGAATGT	GAACTGGTAT	CGGGCGATAA	AAAACCTCGAA	ATTGAAAGTG	TAAAGGAGCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTTG	ACTTTCTTAT	CAAAAGCCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTCCGCTACA	TCGGTCTCAT	CAGCAACAGC	TTTGGTGGAA	TCTACCAGAC	540
CACCTATACC	ACCCCGGATG	GCACCCCTAA	GATCGCTGCA	GTTTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGAATGGTAC	CATGCATGGA	TGAACCGAAA	TACAAAGCAA	ACTGGACCGT	660
TACTGTCAAT	CATCCAAAAG	GCACCAAAGC	CGTCTCGAAT	GGAAATCGAAG	TGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATCACATC	GAAGTTCTTG	ACTACTCCAC	GGATGTCATC	780
CTACTTGTTG	GCAGTTATGG	TTTCAGAATT	TGAATACATC	GAAGGTGAAA	CAAAGACGGG	840
TGTTCCGGTTC	CGTATATGGT	CACGCCCCAGA	GGCAAAGAAG	ATGACACAAT	ATGCTCTGCA	900
ATCTGGATAG	AAGTGCAATG	AATTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAGAT	TCCCTCTGAA	960
GAAACAAGAT	ATGATTGCCC	TTCTGATTTT	CTCTGCCGGT	GCCATGGAGA	ATTGGGGCCT	1020
CATCACTTAC	AGGGAAAAC	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCTCAT	CAGTGGTTCC	GCGACTTGCT	1140
TACGATGAAG	TGGTGGGATA	ATTTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACAGAATT	1200
TATTGGAGCT	GGTCAGATAA	CTCAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TCCTGATTGA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTC	GGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCCTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	CTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACTATGCTGA	GAGCCTTGAT	TGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCAGTATC	1440
GCAGTACCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
TGATGAAGTT	GTCACTGACG	TCGAAGGCTC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACAGAGTT	1560
TGCAAGTCAG	TGGACGACTC	AGATGGGCTT	CCCAGTTATT	TCCGTAGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTTTG	AAATTAACGC	AAAGTCGATA	TGAGGCGAAT	AAAGACGCTG	TGGAGAAAGA	1680
GAAGTACCGT	CACCCGAAAT	ACGGATTTAA	ATGGGATATT	CCACTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGATAAAGC	GAACATGGTT	GAGAAGAGAT	GAACCGCTTT	ACTTGCAATG	1800
TAGTGATGCT	GGCGCTCCCT	TTGTGGTGAA	CCGACACCGC	TATGGATTTT	ATCGACAAAA	1860
TCATGACGCT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGATAATC	ATGAGGTTTA	1920
CAGTCCCCCG	ACAAGGAATG	TCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCGGCTG	CAACTGACGC	1980
AATTGAGTAT	GAGACTGTAT	TTGAACTTCT	GAATTATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATATCT	2040
ACCATTAGAA	ATCGCAATGT	CCGGGATCTC	TTTCGATTTT	AAATACTTCC	CTACCGAGCC	2100
AGAGGCAAAG	CCAGCTCAAA	CATACATGAT	GAACATATTG	AAACCGATGT	ATGAAAAAAG	2160
CAGTATCGAC	TTCAATTGCCA	ATAACTACAG	AAATGACAAG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAAGAT	GTCATTGATA	TGTTCTGCGC	CCTCGGATCG	CAAGACTGCA	GGAAGAAATA	2280
TAAAAAATTT	TTTCGATGACG	AAGTCATGAA	CAAATGCAGG	GATGGTCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTAAGA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTTTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTCCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TCGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTGGGATG	TCATAAAGAT	GTTACTGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCTTGCGG	GCTCTGGACA	GGAATTTCGT	GTTTCGTACG	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTTATTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCATTG	AAAGTATAGG	AACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAGTGAT	2700
ACCAGCCTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAGCAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760
GAAAAATGGC	ATGAACGCTC	GTCAATTCGG	TGCATTTCGAT	AAAGCAATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880

CACCTTGTA	TTCGAATTAC	ATTGCCAGTA	ATCCAGATCT	TAAAGTTCA	GAAGGAATAT	2940
GACAGGGAAC	TGACTGTCTG	TTGGTCACTG	TTCCACTGAA	TGGAGTTTT	TACCTACAAA	3000
AAATTTTATC	GTTATATTTG	CCTTCCGTGA	GGGGTCATTG	TTGTCACTTG	AATAGTAAAC	3060
AAAGCTCAGT	ATTGGCAACC	GTAAGAACA	ATTACTTTTCG	CTTCATCAAA	TTGTTATCTT	3120
CCCTATACCC	TCTTCCTAAC	TGAATTCGGA	AAATTTGTTCA	TATTCGTTTTG	TAGTCTGTTG	3180
CTCAGAACAC	TTTCTCCTCA	ATAGCTTCTT	GTTTGTTTTT	TTTTTGATTG	TATTGATCGT	3240
TTTACAATTG	TATAGATTAG	TTATCTTATA	AATATTGATG	GTAAAAAAA	AAAAAAAAAA	3300
AAAAA						3305

Informace pro řetězec č. 9:

Vlastnosti řetězce:

délka: 1301 párů bazí

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 9:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG	AGACGCAGCA	60
ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG	TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	120
GGTAGCTGCT	GCCGTGCGCC	TCTCAATCGG	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAAGCTTT	180
TGATACTACT	GGCGGAAATG	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGATGATA	ATTCCCCATC	240
AGCTGAAGAA	TTACGTCTCC	CAACAACCAT	AAAACCTTTG	ACATACGACT	TAGTAATCAA	300
AACGTATCTG	CCAAACTATG	TAAACTATCC	ACCTCAGAAA	GATTTTCGCTA	TTGATGGGAC	360
TGTGGTGATT	GCTATGGAAG	TTGTGGAGCC	AACAAAGTCT	ATTGTGCTCA	ACTCGAAAAA	420
TATTCCTGTA	ATTGCAGACC	AGTCCGAAC	GTTTTCTAAC	AACCAAAAAC	TCGACATCGA	480
AAAGGTTGTG	GATCAGCCAA	GGCTGGAGAA	AGTCGAATTC	GTTTTGAAGA	AAAAGCTGGA	540
GAAGAATCAG	AAAATCACGC	TCAAGATTGT	ATACATTGGC	CTTATCAACG	ACATGCTTGG	600
AGGACTTTAT	CGAACAACCT	ACACGGATAA	AGATGGTACA	ACCAAGATTG	CTGCATGCAC	660
TCATATGGAA	CCGACGGACG	CCCGTCTTAT	GSTCCCTGT	TTCGACGAGC	CGACGTTTAA	720
GGCAAACCTG	ACTGTGACTC	TGATTTCATCC	GAAGGGCACC	AGTGCCGTGT	CGAATGGAAT	780
AGAAAAGGGA	GAAGGAGAAG	TCTCTGGCGA	TTGGGTCA	ACCAGATTCTG	ATCCAACCCC	840
GCGAATGCCT	TGCTATTTGA	TTGCTCTTGT	GATTTCCGAA	TTTAAGTACA	TTGAAAATTA	900
TACGAAAAGC	GGTGTTTCGAT	TCCGAATATG	GGCTCGTCCG	GAAGCTATGA	AGATGACAGA	960
ATATGCCATG	GTAGCTGGAA	TCAAATGCTT	GGATTACTAT	GAGGACTTCT	TCGGGATCAA	1020
ATTCCCTCTT	CCAAAACAAG	ATATGGTTGC	TCTTCCTGAC	TTCTCATCTG	GTGCTATGGA	1080
GAACTGGGGT	CTCATCACAT	ACAGGGAGGG	TTCCGTACTA	TACGATGAAA	ACCTCTATGG	1140
ACCAATGAAT	AAGGAGCGGG	TTGCAGAAAT	GATTGCACAC	GAGCTTGAC	ATCAGTGGTT	1200
CGGTAATTTG	GTCACGATGA	AGTGCTGGGA	TAACCTATGG	CTAAACGAAG	GATTCCGCTC	1260
ATTCGTAGAA	TACATTGGAC	CCGACTTCAT	CAGCGATGGT	C		1301

Informace pro řetězec č. 10:

Vlastnosti řetězce:

délka: 1280 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 9:

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

Informace pro řetězec č. 11:

Vlastnosti řetězce:

délka: 1293 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 11:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA	TCTAGATGAC	GTCSCAGGGG	AGAACGCGGA	60
CATTGCTGAA	TCTAACTCCA	ATCCGTCTTA	TTGTGCGATT	ATTTCTAGTA	GCTGCTGCAG	120
TCCGCCCTCTC	TATTGGTCTC	ACCTATTACT	TTACTCGCAA	AGCCTTCGAT	ACCTCAGAAA	180
AGCCAGGGAA	GGATGATACT	GGTGGCAAGG	ACAAAGACAA	TTCTCCCTCT	GCGGCGGAAC	240
TACTCCTTCC	AAGTAATATA	AAACCATTTG	CTTACGACTT	GACGATCAAA	ACATATCTAC	300
CTGGTTATGT	GGACTTCCCA	CCGGAGAAAA	ACCTCACATT	CGATGGGCGT	GTGGAATAT	360
CAATGGTTGT	AATTGAGCCA	ACAAAGAGTA	TCGTACTCAA	TTCAAAGAAG	ATCTCTGTAA	420
TACCCCAAGA	ATGTGAAGTG	GTATCGGGCG	ATAAAAACT	CGAAATTGAA	AGTGTAAGG	480
AGCACCCAAAG	ACTGGAAAAG	GTTGAGTTTC	TTATCAAAAG	CCAAGTGGAA	AAAGATCAAC	540
AAATCTTTGCT	CAAGGTCGGC	TACATCGGTC	TCATCAGCAA	CAGCCTTGCT	GGATCTTACC	600
AGACCACTTA	TACCACCCCG	GATGGCACCC	CTAAGATCGC	TGCACTTTCA	CAAAATGAGC	660
CCATAGATGC	TCGTGGAATG	GTACCATGCA	TGGATGAACC	GAAATACAAA	GCAAACTGGA	720
CCGTTACTGT	CATTATCCA	AAAGGCACCA	AAGCCGTCTC	GAATGGAATC	GAAGTGAACG	780
GAGATGGAGA	GATCAGTGCT	GATTGGATCA	CATCGAAGTT	CTTGACTACT	CCACGGATGT	840
CATCCTACTT	GTTGGCAGTT	ATGTTTTAG	AATTTGAATA	CATCGAAGGT	GAAACAAAGA	900
CGGCTGTTCC	GTTCCGTATA	TGGTCACGCC	CAGAGGCAAA	GAAGATGACA	CAATATGCTC	960
TGCAATCTGG	TATCAAGTGC	ATAGAATTCT	ACGAAGATTT	CTTTGATATC	AGATTCCCTC	1020
TGAAGAAACA	AGATATGATT	GCCCTTCCTG	ATTTCTCTGC	CGGTGCCATG	GAGAATTGGG	1080
GCCTCATCAC	TTACAGGGAA	AATCTTTTGT	TGTACGATCA	CAGATTCTAT	GCACCGATGA	1140
ATAAACAGCG	AATTGCTCGC	ATTGTTGCTC	ATGAGCTTGC	TCATCAGTGG	TTCCGCGACT	1200
TGOTTACGAT	GAACTGCTGG	GATAATTTGT	GTTTGAATGA	AGGTTTTTGA	AGATTCACAG	1260
AATTCACCTG	AGCTGGTCAG	ATAACTCAAG	ATG			1293

Informace pro řetězec č. 12:

Vlastnosti řetězce:

délka: 746 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 12:

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

Informace pro řetězec č. 13:

Vlastnosti řetězce:

délka: 1274 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 13:

TCTTGAAGAA	ATGAAAAAGC	TTTTCGACGA	AGAGGTCATG	AAAAAATGTA	GACCTGGTCA	60
GCAAGCGACC	GACTGCGTAA	AGGTAACGTC	TCCTCTCCGA	AAAACTGTTT	ACTGCTATGG	120
GGTCCAGGAA	GGCGGTGATG	AGGCATTGCA	CAAGGTGATG	GAACATATATA	ATGCGGAACA	180
AGTCCAATTG	GAGAAAGACA	GTCTACGTGA	AGCATTGGGA	TGTCATAAAG	ACGTTACTGC	240
TCTAAAGGGA	CTTCTTATGC	TGGCTTTGGA	TCGGAATTTCG	TCATTTGTGC	GTCTTCAAGA	300
TGCTCATGAT	GTGTTTAACA	TTGTATCCAG	AAATCCTGTT	GGAAACGAAC	TGCTGTTCAA	360
TTTCCTCACA	GAGCGATGGG	AAGAGATACT	TGAAAGTTTG	TCAATACGAC	ACAGATCAGT	420
TGATCGAGTG	ATCAAAGCCT	GTAATCGAGG	ACTACGATCC	AGGGAACCAAG	TACAACAGTT	480
GAAGAATCTA	TACAAAAATG	ACAAGCGTGC	TCGCGAATAC	GGTGCAATTTG	GTGGGGCAAT	540
AGAAAGATCG	GAACACAGAG	TCAAATGGAT	TGAGAAACAT	TTCCGAAAAAC	TAGCAGCTTT	600
CTTCAAAAAA	TCTAATTCAT	AATTCTGAAA	TGGCTATAAC	TAGCACACTG	GATAGTTGTC	660
TCGAATCATC	CAAAAAGATT	AATGATGTTT	TTTTACTAGA	TAATATGGAG	ATATTCTGTA	720
AATTTGTGAT	CGATTCAAGT	GTCTGTATTG	CAGCCACATT	ACATATCTCG	ATGGTTCTGT	780
GAATTTTGA	TGGAATTATT	TTCTCCTCAA	AATAGACACT	ATGCGCTAAC	TCCCATTTATT	840
ACCAATCTTT	GAGAGAAATC	TTTTGCAATA	TACCCTAAAT	AGCCCTTGGG	AACTAGCTTT	900
TTTCATTATT	GTAATTTTTG	TACTCTTCAA	ATGACGTATT	TCCAACATGA	CACATTCTCA	960
GTGATTTACT	CGAGTAATTT	TATTCTTCTC	AATTGCAGTG	CCTTATTGTT	ATTCGCTTTG	1020
AGACTTTGTA	GCTCAACTGT	TTTCTGCCCT	GCTGTCTTCT	TCTCTTTATC	TACTACTTCA	1080
GTGATGAACT	TACCTGAAGT	TGTAGGTTTT	AAGAAAGAAA	TAATATTTTT	CCATAACTCA	1140
TCTTCATGCC	ATTGTTCTTT	GGACTTTCTC	ATGCTTCACA	TTGTAGAGAT	ATTTACTAAA	1200
AATGGAATTC	TAATTTTCGT	TTACTTACAT	AAAAATCACT	TATTGCCTAA	AAAAAAAAAA	1260
AAAAAAAAAA	AAAA					1274

Informace pro řetězec č. 14:

Vlastnosti řetězce:

délka: 3296 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 14:

GCTGAATCTA	ACTCCAAATCC	GTCTAATTTT	TGCATTATTT	CTAGTAGCTG	CTGCAGTCGG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCCGAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAAGCC	120
AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGGCAA	AGACAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAACTACT	180
TCTTCCAACC	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	CGATTTGACG	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGAAC	TTCCCAACCG	AGAAGAATCT	CACATTCGAT	GGGCGTGTGG	AAATATCAAT	300
GGTTGTAAAT	GAGCCAAACAA	AGAGTATCCT	GCTCAATTCA	AAGAAGATCT	CTGTGATACC	360
CCAAGAATGT	GAACTGGTAT	CGGGCGATAA	AAAAACACGAA	ATTGAAAGTG	TAAAGGAGCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAAGGTGG	AGTTTCTTCT	TAAGAACCAC	CTGGAAAAAG	ATCPACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTCGGCTATA	TCCGGCTCAT	CAGCAACAGT	CTTGGAGGAA	TCTACCAGAC	540
CACCTACACC	ACCCCGAATG	GCACCCCTAA	GATCGCTGCA	GTTTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGAATGGTAC	CATGCATGGA	CGAACCGAAA	TACAAAGCAA	ACTGGACCGT	660
TACTGTCAAT	CATCCAAAAG	GCACCAAAGC	CGTCTCGAAT	GGAAATCGAAG	TGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATCACATC	GAAGTCTTTG	ACTACTCCAC	GGATGTCATC	780
CTACTTGTGG	GCAGTTATGG	TTTCAGAATT	TGAATACATT	GAAGGTGAAA	CAAGGACGGG	840
TGTCCGGTTC	CGCATATGGT	CACGCCCCAGA	GGCCAAGAAG	ATGACAAAAC	TTGCTTTGGA	900
TTATGGTATC	AAATGTCATAG	AGTTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAAAT	TCCCTCTGAA	960
AAAAACAAGAT	ATGATCGCCC	TTCCCTGATT	CTCAGCAGGA	GCCATGGAGA	ACTGGGGTCT	1020
TATCACTTAC	AGGGAAAACT	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	CGTTGCCCAT	CAGTGGTTTG	GGGACTTGGT	1140
TACAATGAAG	TGGTGGGATA	ATCTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACGGAAAT	1200
CATTGGAGCT	GGTCAGATAA	CTAAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACACT	TTCTGATTGA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTC	GGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCCTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAA	TTGAAGAAGC	CTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACTATGTTGA	GAGCCTTGAT	TGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCAGTATC	1440
GCAGTACCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAAGC	ACTGATCTAT	GGGCGATTTT	1500
CGATGAAGTT	GTCACTGACG	TCGAAGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACGGAAAT	1560
TGCAAGTCAG	TGGACGACTC	AGATGGGCTT	CCCAGTTATT	TCCGTAGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTTTG	AAATTAACGC	AAAGTCGATA	TAAGGCGAAT	AAAGACGCTG	TGGAGAAAGA	1680
GAAGTACCGT	CATCCGAAAT	ACGGATTTAA	ATGGGATATT	CCATTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGATAAAGC	GAACATGGCT	GAGAAGAGAT	GAACCGCTTT	ACTTGCATGT	1800
TAGTAATCCT	GGTGCTCCAT	TTGTGGTGAA	CGCAGACCGC	TATGGATTTT	ATCGACAAAA	1860
TCATGACGCT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGACAATC	ATGAGGTTTA	1920
TAGTCCTCGG	ACAAGGAATG	TCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCAGCCG	CAACTGACGC	1980
AATTGAGTAT	GAGACTGTTT	TTGAACTTCT	GAAATATGCC	GAAAAAAGAAA	CGGAATACCT	2040
ACCSTTGGAA	ATAGCAATGT	CCGGGATCTC	TTCGATTTTG	AAGTACTTCG	GTACCGAGCC	2100
GGAAGCAAAG	CCAGCTCAAG	TGTACATGAT	GAACATATTG	AAGCCGATGT	ATGAAAAAAG	2160
CAGTATCGAG	TTCAATTACCA	ATAACTACAG	AAACGACACG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAGGAT	GTCGTTGATA	TGTTCTGCGC	CCTTCGATCG	CAAGACTGCA	GGCAGAAATA	2280
TAAAAAACTT	TTCGATGACG	AAGTCATGGC	GAAATGCAGG	GATGGTCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTGAGA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTTTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTTCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TTGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTAGGATG	TCACAAAGAT	GTTACTGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCTTGCGG	GCTCTGGACA	GGAAATTCGT	ATTCTGATCG	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTCATTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCATTG	AAAGTATAGG	AACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAGTGAT	2700
ACCAGCCTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAGCAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760
GAAAAATGGC	ATAAATGCTC	GTCAATTTGG	TGCATTCGAT	AAAGCAATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGATG	TTTGAATTAC	GTCGCCATTA	ATCCAGATCT	TAAAGCTCGC	TAAGGAATAT	2940
GTGGGAACCTG	ACTGTGTGTT	GGTTACTGTT	CCACTGAATG	GAAGTTTTTA	CCCACAAAAA	3000
TTTTTACCAT	TTGCCTTCCA	TGAGGGGTTC	TTGTTGTCAC	TTGAATAGTA	AACAAAGCTC	3060
AGTATTAGGA	CCCAGTGATC	AATATTACTT	TTGCTTCATC	AAATTGTTAC	CTTCTCTATA	3120
CCCTCTTCCT	ACCTGAATTC	AGAAATTTGT	TCATATTCTG	TTGTAGTCTG	TTGCTCAGAA	3180
CACCTTCTCC	TCGATAGCTT	TTTGTTCGTT	TTTCTTTTGA	TTGTATTGAT	CGTTTTACAA	3240
TTGTATAGAT	TAGTTATCTG	ATAAATATTG	ATGGCTAAAA	AAAAAATAAA	AAAAAA	3296

Informace pro řetězec č. 15:

Vlastnosti řetězce:

délka: 3319 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 15:

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTAATTTT	TGCATTATTT	CTAGTAGCCG	CTGCAGTCGG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TGCGAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
AGGGAAAGAT	GATACTGGTG	GTAAGACAA	AGATAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAACTACT	180
TCTTCCAACC	AACATAAAAC	CATTGTCTTA	CGATTTGACA	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGAAC	TTCCCACCGG	AGAAGAATCT	CACATTTGAT	GGGCGTGTCT	AAATTTCAAC	300
GGTTGTCTAT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	GCTCAATTCA	AAGAAGATCT	CAGTAATACC	360
CCCTGAATGT	GAACTGGTAT	CGGGCGGTAA	AAAACCTCGAA	ATCGAAAATG	TAAAGGATCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTTG	AGTTTCTTCT	TAAGAACCAA	CTGGAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTTGCCTACA	TGCGCCTCAT	CAGCAACAGC	CTTGGCGGAA	TCTACCAGAC	540
CACCTTACACA	ACCCCGGATG	GCACCCCCAA	GATCGCTACA	GTGTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGGATGGTGC	CATGCATGGA	TGAACCGAAA	TACAAAGCGA	ATTGGACCGT	660
TACTGTCTAT	CATCCAAAAG	GTACAAAAGC	CGTCTCGAAT	GGCATCGAAA	CGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATTACGTC	GAAGTCTTCT	ACTACTCCGA	GGATGTCATC	780
CTACTTGTGT	GCAGTTATGG	TATCAGAATT	TGAATTTATC	GAGGGTAAAA	CAAAGACAGA	840
TGTTCCGGTTC	CGTATATGGT	CACGCCCAGA	GGCCCAAGAG	ATGACAAAAC	TTGCTTTGGA	900
TTATGGTATC	AAATGCATAG	AGTTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAGAT	TCCCCCTAAA	960
GAAACAAGAT	ATGATCGCCC	TTCTGTATTT	CTCAGCAGGA	GCCATGGAGA	ACTGGGGTCT	1020
TATCACTTAC	AGGGAAAACC	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCCCAT	CAGTGGTTTG	GCGACTTGTT	1140
TACGATGAAG	TGGTGGGATA	ATCTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACAGAATT	1200
CATTGGAGCT	GGTAAGATAA	CTGAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TCCTGATTGA	1260
IGTACTTGAA	CGCGCGTTGA	AAGCTGATTC	CGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCTTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	GTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACGATGCTGA	GAGCGTTGAT	CGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCGGTATC	1440
GCAGTATCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
CGATGAAGTT	GTCAGTGATG	TCGAGGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACGGAAAT	1560
CGCAAGTCAG	TGGACAATCT	AGATGGGCTT	TCCAGTAATT	TCTGTGGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTCTG	AAACTAACGC	AAAGTCGATA	TAAGGCGAAT	AAGGACGCTG	TTGAGAAAGA	1680
GAAATACCGT	CATCCGAAAT	ACGGATTCAA	GTGGGATATT	CCATTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGGTAAAGC	GAGCATGGTT	AAGAAGAGGT	GAACCGCTTT	ACTTGCAATG	1800
GAGTGATCCT	GGCGCTCCAT	TTGTGGTGAA	TGCGGACCGC	TATGGATTTT	ACCGCAAAA	1860
CCACGACACT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGATAATC	ATGAGGTTTA	1920
CAGTCCCCGG	ACAAGGAATG	CCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCGGCTG	CAACTGACGC	1980
GATTGAGTAC	GAGACTGTAT	TCGAACTTCT	GAAATATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATACCT	2040
ACCGTTGGAA	ATAGCAATGT	CTGGAATCTC	TTCGATTTTG	AAGTACTTCG	GTACCGAGCC	2100
CGAGGCAAG	CCAGCTCAAA	CATACATGAT	GAACATATTG	AAGCCGATGT	ATGAGAAAAG	2160
CGATATCGAC	TTTATTGCCA	AAAACATCAA	GGACGACAAG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CAAAAAAGAT	GTCATTGATA	TGTTCTGCGC	CCTTGSATCG	CAAGACTGCA	GGAAGAAAATA	2280
TAAAAAACTT	TTCCATGACA	AAGTCATGGC	GAAATGCAGG	GATGGCCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTGAAA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTATTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTTTCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TCGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTAGGATG	TCACAAAGAT	GTTACCGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCCTGCGG	GCTCTGGACA	GGAAATTCGT	GTTCGTACGA	ATGCCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTTATTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCGTTG	AAAGTATAGG	AACGAAACAC	ACATATGTTG	AAAAAGTGAT	2700
ACCAGCTTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAACAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760
GAAAAATGGC	ATAAACGCTC	GTCAATTTGG	TGCATTTCGAT	AAAGCGATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGTA	TTCTGATTAC	ATCACCATGA	ATCCAGATCT	TAAAACTCAC	TAAGGAATGT	2940
GTGGGAATCT	ACTGTCTGTT	GCTTACTGTT	CACTGAATG	GAAGTTTTTA	CCCATAAAA	3000
TTTTTACCAT	TTGCCCTTCCG	TGAGGGCTCA	TTGTTGTCAC	TTGAAATAGTA	AACAAAGCTC	3060
AGTATTGGAC	CCAGTGATCA	ATATTACTTT	CGCTTCATCG	AATTGTTACC	TTCTCTATAC	3120
CCTCGTCCTA	CCTGAATTCA	CACATTTGTT	CATATTTGTT	TGTAGTCTGT	TGCTCAGAAC	3180
ATTTTCTCTT	CGATAGCTTT	TTGTTTGT	TTCTTTTGT	TGTATTGATC	GTTTTACAAT	3240
TGTATAGATT	AGTTATCTGA	TAAATATTGA	TGGCTAAGGA	AAAAAAA	AAAAAAA	3300
AAAAAAA	AAAAAAA					3319

Informace pro řetězec č. 16:

Vlastnosti řetězce:

délka: 30 aminokyselin

typ: peptid

Popis řetězce č. 16:

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

Informace pro řetězec č. 17:

Vlastnosti řetězce:

délka: 15 aminokyselin

typ: peptid

Popis řetězce č. 17:

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

Informace pro řetězec č. 18:

Vlastnosti řetězce:

délka: 15 aminokyselin

typ: peptid

Popis řetězce č. 18:

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

Informace pro řetězec č. 19:

Vlastnosti řetězce:

délka: 3084 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 19:

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG	AGACGCAGCA	60
ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG	TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	120
GGTAGCTGCT	GCCGTCGGCC	TCTCAATCGG	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAGCTTT	180
TGATACTACT	GGCGGAAATG	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGATGATA	ATTCCCCATC	240
AGCTGAAGAA	TTACGTCTCC	CAACAACCAT	AAAACCTTTG	ACATACGACT	TAGTAATCAA	300
AACGTATCTG	CCAAACTATG	TAAACTATCC	ACCTGAGAAA	GATTTGCTCA	TTGATGGGAC	360
TGTGGTGATT	GCTATGGAAG	TTGTGGAGCC	AACAAAGTCT	ATTGTGCTCA	ACTCGAAAAA	420
TATTCTTGTA	ATTGCAGACC	AGTGCGAACT	GTTTTCTAAC	AACCAAAAAA	TCGACATCGA	480
AAAGGTTGTG	GATCAGCCAA	GGCTGGAGAA	AGTCGAATTC	GTTTTGAAGA	AAAAGCTGGA	540
GAAGAATCAG	AAAATCACGC	TCAAGATTGT	ATACATTGGC	CTTATCAACG	ACATGCTTGG	600
AGGACITTTAT	CGAACCAACCT	ACACGSAATA	AGATGGTACA	ACCAAGATTG	CTGCATGCAC	660
TCATATGGAA	CCGACGGACG	CCCGTCTTAT	GGTCCCCTGT	TTCGACGAGC	CGACGTTTAA	720
GGCAAACCTGG	ACTGTGACTG	TGATTCATCC	GAAGGGCACC	AGTGCCGTGT	CGAATGGAAT	780
AGAAAAGGGA	GAAGGAGAAG	TCTCTGGCGA	TTGGGTCACA	ACCAGATTCC	ATCCAACCCC	840
GCGAATGCCT	TCGTATTTGA	TTGCTCTTGT	GATTTCCGAA	TTTAAGTACA	TTGAAAATTA	900
TACGAAAAGC	GGTGTTTCGAT	TCCGAATTCC	GGCTCGTCCG	GAAGCTATGA	AGATGACAGA	960
ATATGCCATG	ATAGCTGGAA	TCAAATGTTT	GGATTACTAT	GAGGACTTCT	TCGGGATCAA	1020
ATTCCCACCT	CCAAAACAAG	ATATGGTTGC	TCTTCTTGAC	TTCTCATCTG	GTGCTATGGA	1080
GAACCTGGGT	CTCATCACAT	ACAGGGAGGG	TTCCGTGCTC	TACGATGAAA	ACCTCTACGG	1140
ACCAATGAAT	AAGGAGCGGG	TTGCAGAAGT	GATCGCGCAC	GAACCTGCAC	ATCAGTGGTT	1200
CGGTAATTTG	GTCACGATGA	AGTGGTGGGA	TAACCTATGG	CTGAACGAAG	GATTCGCGTC	1260
ATTCGTTGAA	TACATCGGAG	CCGACTTCAT	CAGCGATGGT	CTATGGGAAA	TGAAAGATTT	1320
CTTCTTGCTG	GCACCGTACA	CAAGTGGTAT	TACGGCTGAT	GCAGTAGCTT	CAAGCCATCC	1380
GCTTTCTTTC	AGAATAGATA	AGGCTGCAGA	TGTATCAGAA	GCGTTCGATG	ATATCACATA	1440
CCGTAAGGA	GCATCCGTTT	TTCAAATGCT	ATTGAATTTA	GTGCGGGACG	AAAATTTCAA	1500
GCACTCTGTT	TCGCGTTACC	TCAAGAAGTT	TTCATATGAT	AATGCGGCTG	CTGAAGATTT	1560
ATGGGCAGCA	TTTCGACGAA	CCGTCCAAGG	TATAACCGGA	CCTAATGGTG	GACCATTGAA	1620
AATGTCCGAG	TTTGCGCCAC	AATGGACAAC	TCAGATGGGG	TTCCCTGTTC	TTACTGTCTG	1680
GTCCGTTAAC	GCAACGACTT	TGAAAGTCAC	CCAAAAACGA	TACAGGCAGA	ACAAGGATGC	1740
AAAGGAACCA	GAGAAGTACC	GTCAATCAAC	TTATGGGTTT	AAATGGGATG	TTCCCTCTGT	1800
GTATCAGGAA	GATGAACAGC	AAGTGAAGAG	AACCTGGTTA	AAAAGAGAGG	AACCGCTCTA	1860
TTTCCATGTA	AGCAATTCTG	ATTCGTCACT	TGTGGTGAAT	GCCGAACGTC	GTGCTTTTTG	1920
CCGATCAAAAC	TATGACGCTA	ACGGTTGGAG	GAACATTATG	AGAAGACTCA	AGCAGAATCA	1980
TAAGGTCTAT	GGTCCAGGAA	CAAGAAACGC	TCTCATAAGT	GATGCGTTTG	CAGCAGCTGC	2040
AGTTGAGGAA	ATGAATTACG	AGACCGTATT	TGAAATGCTC	AAATACACCG	TGAAAGAAGA	2100
GGATTACTTA	CCATGGAAGG	AGGCAATATC	AGGATTCAAT	ACAATTTTGG	ACTTTTTTCG	2160
CAGCGAACCC	GAATCTCAAT	GGGCTTCGGA	ATACATGCGA	AAACTGATGA	AGCCAATTTA	2220
TGACAAGAGT	AGCATCAAGT	TTATAGCGGA	GAACATACAA	AAAGATTGCG	TTTTCTTCAA	2280
AAATAATCTC	CAAAATAGCT	TTATTGACAC	ATACTGTGGT	CTTGAGGGCA	AAGAATGTCT	2340
TGAAGAATATG	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA	GGTCATGAAA	TGTCAACCTG	GTCAGCAAGC	2400
GACCGAATGC	GTAAGGTAA	CTGCTCCTCT	CCGAAAAACT	GTTTACTGCT	ATGGGGTCCA	2460
GGAAGGCGGT	GATGAGGCAT	TCGACAAGGT	GATGGAACCT	TATAATGCGG	AACAAGTGCA	2520
GTTGGAGAAA	GACAGTCTAC	GTGAAGCATT	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA	CAGCTCTAAA	2580
GGGACTTCTT	ATGCTGGCTT	TGGATCGGAA	TTTCGTCAATT	GTGCGTCTTC	AAGATGCTCA	2640
TGATGTGTTT	AACATTGTAT	CCAGAAATCC	TGTTGGAAAC	GAACGTCTGT	TCAATTTTCT	2700
CACAGAGCGA	TGGGAAGAGA	TACTTGAAAG	TTTGTCATAA	CGACACAGAT	CAGTTGATCG	2760
AGTGATCAAA	GCCTGTACTC	GAGGACTACG	ATCCAGGGAA	CAAGTACAAC	AGTTGAAGAA	2820
TCTATACAAA	AATGACAAGC	GTGCTCGCGA	ATACGGTGCA	TTTGGTGGGG	CAATAGAAAG	2880
ATCGGAACAC	AGAGTCAAAAT	GGATTGAGAA	ACATTTCCGA	AAACTAGCAG	CTTTCTTCAA	2940
AAAATCTAAT	TCATAATTCT	GAAATGGCTA	TAACATGCAC	ACTGGATAGT	TGTCTCGAAT	3000
CATCCAAAAA	GATTAATGAT	GTTTTTTTTAC	TAGATAATAT	GGAGATATTC	TGTAATTTTG	3060
TCATCGATTTC	AAGTGCTCTG	ATTG				3084

Informace pro řetězec č. 20:

Vlastnosti řetězce:

délka: 3358 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 20:

GOTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACGGC	GGAGTGGCAG	AAGCGTCGAA	TCTTGGGCTT	60
CTCACCTATC	AGCCTACTTT	GTACATTATT	TGTATTAGCT	GCTGCCGTTG	GACTCTCCAT	120
TGGTCTTACC	TATTACTTCA	CTCGTAAAGC	ATTTCGATACC	ACACAAAAAG	AACAGAAGGA	180
TGACAGTGGT	GGTAAAGAAA	AGGATAATTG	TCCTTCTGCA	GAAGAACTAC	TTCTTCCAAC	240
GAACATAAAA	CCAGTCTCGT	ACGACTTGAA	CATCAAAACA	TATCTACCGG	GTTACGTGAA	300
CTTTCCACCA	GAAAAGAATC	TCACATTGTA	TGCCCCATGTG	GAGATTGCTA	TGGTTGTGGT	360
TGAGCCTACA	AATAGTATTG	TGCTGAACTC	GAAGAAAATC	ACTTTGGCAC	AAGGAGGATG	420
CGAACTGTTC	TCAGGTAATC	AGAAACTTGA	CATCGAAAAGT	GTAAAGATGC	AGGAAAGACT	480
TGACAAGCTT	GAGATTACCC	TCAAAAATCA	GCTGCAAAAA	GATCTGAAAA	TCCTGCTCAA	540
GATCACTTAC	ACCGGCCCTTA	TTAGCGACAC	TCTCGGTGGG	CTCTACCAGT	CCATCTACAC	600
TGATAAGGAC	GGAAAACTA	AGATCGTTGC	TGTTTCACAA	AATGAACCAT	CAGACGCTCG	660
TCGTATAGCG	CCATGCTTTG	ACGAACCGAA	GTACAAGGCA	ACATGGACTG	TCACCGTCGT	720
TCATCCCAAA	GGTACAAAGG	CTGCATCGAA	CGGCATTGAA	GCAAATGGAA	AAGGGGAGCT	780
CAAGGGTGAT	TGGATAACGT	CTAAATTTAA	AACTACCCCA	CCGATGTCGT	CCTATTTATT	840
GGCTATTATT	GTTTGTGAAT	TTGAATACAT	TGAAGGATTT	ACAAAAACGG	GTGTTCCGTT	900
CCGTATATGG	TCTCGACCAG	AGGCGAAACG	AATGACGGCA	TACGCTTTGG	ATGCTGGCAT	960
CAGATGCCTG	GAGTTCCTATG	AGAAGTCTTT	TGACATAAAA	TTCCCTCTGG	AAAAACAAGA	1020
TATGATTGCT	CTTCCTGATT	TCACCGCTGG	TGCCATGGAA	AACTGGGGCC	TTATCACTTA	1080
TAGAGAGGAT	TCTCTCCTAT	ACGATGAAAA	AATTTATGCA	CCGATGAATA	AACAGCGGGT	1140
TGCTCTCGTA	GTTGCTCAGG	AGCTTGCTCA	TCAGTGGTTC	GGCAATCTGG	TCACACTGAA	1200
GTGGTGGGAT	GATACGTGGT	TGAACGAAGG	TTTTGCAACA	TTTGTGTAGT	ATCTTGGAAAT	1260
GGACGAAATT	AGCCACAACA	ATTTCAGAAC	GCAAGATTTT	TTCTTGCTCG	ATGGAATGGA	1320
TGCGCGAATG	AGAGCTGACT	CGGCAGCATC	GAGCCATCCG	CTTTCTGTTA	GGATTGACAA	1380
AGCGGCAGAA	GTTGCCGAAG	CCTTTGACGA	TATTTCATAC	GCCAAGGGAG	CGTCAGTTCT	1440
CACATATGCT	CGGGCTTTGA	TTGGAGAGGA	CAATTACAGG	AATGCTGTTG	TGCAATACCT	1500
CAAGAAGTTC	TCCTACAGCA	ATGCACAAGC	AGCCGATCTG	TGGAACGTCT	TCAATGAAGT	1560
TGTCAAAGGT	GTTAAGGGTC	CTGACGGCAA	CGTCATGAAA	ATCGACCAAT	TTACCGATCA	1620
GTGGACGTAT	CAGATGGGTT	ATCCTGTGGT	TAAAGTAGAA	GAATTTAATG	CGACCGCCCT	1680
AAAGGTTACG	CAGAGCCGGT	ACAAGACAAA	TAAAGACGCC	TTGGAACCAG	AGAAATATCG	1740
TAATCCAAAA	TACGGGTTCA	AGTGGGATGT	TCCCCTATGG	TATCAGGAAG	GCAATAGCAA	1800
AGAGGTGAAG	CGAACATGGC	TAAAAAGAGA	TGAACCGCTG	TACTTGAACG	TCAACAATCG	1860
GGATACATCC	CTTGTTGGTGA	ACGCTGATCG	ACATGGATTT	TATCGACAAA	ACTATGATGC	1920
CAACGGTTGG	AAAAAGATAA	TCAAGCAGCT	CAAGAAGATG	CACAAGGTCT	TCCGTCCAAG	1980
GACAAGGAAC	GCTATCATAA	GCGATGCATT	TGCTGCAGCT	ACGATTGACG	CAATCGACTA	2040
TGAAACTGTA	TTCGAACTAC	TTGAATATGC	CAAAAATGAA	GAGGAATTCT	TGCCTTGGAA	2100
GGAAAGCTCTG	TCCGGCATGT	TGCGAGTTTT	AAAGTCTTTC	GGTAATGAGC	CGGAGACAAA	2160
ACCAGCTAGA	GCTTACATGA	TGAGCATATT	AGAACCGATG	TATAATAAGA	GCAGCATTGA	2220
TTACATCGTC	AAGAAATTATT	TGGATGATAC	GTTATTACAA	AAAATTAATA	CTCAAAAGGA	2280
TATCATTGAT	GCAATTTGTT	CCCTTGGATC	AAAGGACTGT	ATAAAGCAAT	ATAAGGATAT	2340
CTTCTACGAT	GAGGTTATGC	CCAAGTGTA	GGCCGGGGAA	GCAGCAACCA	AATGCGTTAA	2400
GGTTTCCGCT	CCTCTTCGAG	CCAATGTTTA	CTGTTATGGT	GTACAGGAAG	GTGGTGGAAG	2460
AGCTTTTGAA	AAGGTGATGG	GGCTGTATCT	AGCAGAAGAT	GTTCAACTGG	AGAAGGGTAT	2520
CCTGTTCAAA	GCCTTGGCAT	GCCACAAAGA	TGTTACAGCT	CTAAAAGAAC	TTCTTTTGCG	2580
AGCCCTGGAC	CGTAAATCGT	CGTTTGTGCG	TCTTCAGGAT	GTCCCTACCG	CTTTCGGTGC	2640
TGTATCTGAA	AACCTGTGG	GCGAAGAATT	CATGTTCAAT	TTCTTAATGG	AGAGATGGGA	2700
GGAAATCACT	GCGAGCTTGG	AAACAGAACA	CAGAGCAGTT	GATAAAGTGG	TCCGCGCTTG	2760
TTGCACAGGA	ATTTCGCTCCC	AAACAACAAAT	AGATCAGCTG	AAGAATCTAC	AGAAGAACAA	2820
TGCGCAGGCT	AAGAAAGTTCG	GCTCATTAC	CCAGGAAATC	GAAAAAGGAG	AACATAAAAT	2880
TGCCTGGATC	AAGAAACATT	TTACACAGATT	ATCGGAATTC	TTCAAGAGAG	CAAGATCATA	2940
GCTTTTCACA	CTGAGCTCCA	ATTTTAACGT	CTTCAAACTA	GGAGACAGTT	TTGCTGAAAA	3000
GTCAGTTTCA	CATTTTCCGT	TTGAATGCCA	TCCATTTCGAA	TACAACCAAT	AATACCATTT	3060
TAAGTACCTT	TCATTACACAG	TGATTACTGA	ATTTTCGAATA	TATCATGAAG	CTTGATCTTT	3120
GAACGTTATG	ATCGGTGACT	TTCAATTTAT	AGAGCTCACT	CTCCATTTTG	TAGCTGTGAT	3180
GACTTGCAAT	TAAGACCCAC	CATTTACCAG	CCTAGAATCT	TTCCCAATA	CATTTCAAAC	3240
TCCGATCACC	TCCACCGCTG	ACAATGCCCA	GATTTGTTTT	TTTGTCTGCT	ATCCATCTAA	3300
CTGTTTCGAT	CGCCGGTTGT	TTGTCAATTG	CTTATCTGAT	AAATATTGAC	GTTGGTGT	3358

Informmace pro řetězec č. 21:

Vlastnosti řetězce:

délka: 3369 párů bází

typ: nukleová kyselina

typ řetězce: dvojitý

topologie: lineární

Popis řetězce č. 21:

GOTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA	TCTAGATGAC	GTCGCAGGGG	AGAACCCGGA	60
CATTGCTGAA	TCTAACTCCA	ATCCGTCTTA	TTGTGCGATT	ATTTCTAGTA	GCTGCTGCAG	120
TCCGGCTCTC	TATTGGTCTC	ACCTATTACT	TTACTCGCAA	AGCGTTTCGAT	ACCTCAGAAA	180
AGCCAGGGAA	GGATGATACT	GGTGGCAAGG	ACAAAGACAA	TTCTCCCTCT	GCGGCGGAAC	240
TACTCCTTCC	AAGTAATATA	AAACCATTGT	CTTACGACTT	GACGATCAAA	ACATATCTAC	300
CTGOTTATGT	GGACTTCCCA	CCGGAGAAAA	ACCTCACATT	CGATGGGCGT	GTGGAAATAT	360
CAATGOTTGT	AATTGAGCCA	ACAAAGAGTA	TCGTACTCAA	TTCAAAGAAG	ATCTCTGTAA	420
TACCCCAAGA	ATGTGAACGT	GTATCGGGCG	ATAAAAACT	CGAAATTGAA	AGTGTAAGG	480
AGCACCCAG	ACTGGAAAAG	GTTGAGTTTC	TTATCAAAAG	CCAACTGGAA	AAAGATCAAC	540
AAATCTTGCT	CAAGGTCCGC	TACATCGGTC	TCATCAGCAA	CAGCTTTGGT	GGAACTACC	600
AGACCACCTTA	TACCACCCCG	GATGGCACCC	CTAAGATCGC	TGCAGTTTCA	CAAAATGAGC	660
CCATAGATGC	TCGTGGAATG	GTACCATGCA	TGGATGAACC	GAAATACAAA	GCAAACTGGA	720
CCGTTACTGT	CATTTCATCCA	AAAGGCACCA	AAGCCGTCTC	GAATGGAATC	GAAGTGAACG	780
GAGATGGAGA	GATCAGTGGT	GATTGGATCA	CATCGAAGTT	CTTGACTACT	CCACGGATGT	840
CATCCTACTT	GTTGGCAGTT	ATGOTTTCAG	AATTTGAATA	CATCGAAGGT	GAAACAAAGA	900
CGGGTGTTCC	GTTCCGTATA	TGGTCACGCC	CAGAGGCAAA	GAAGATGACA	CAATATGCTC	960
TGCAATCTGG	TATCAAGTGC	ATAGAATTCT	ACGAAGATTT	CTTTGATATC	AGATTCCCTC	1020
TGAAGAAACA	AGATATGATT	GCCCTTCCTG	ATTTCTCTGC	CGGTGCCATG	GAGAATTGGG	1080
GCCTCATCAC	TTACAGGGAA	AACCTTTTGT	TGTACGATGA	CAGATTCTAT	GCACCGATGA	1140
ATAAACAGCG	AATTGCTCGC	ATTGTTGCTC	ATGAGCTTGC	TCATCAGTGG	TTCCGGCAGT	1200
TGGTTACGAT	GAAGTGGTGG	GATAATTTGT	GTTTGAATGA	AGGTTTGGCA	AGATTTCACAG	1260
AATTTATTGG	AGCTGGTCAG	ATAACTCAAG	ATGACGCCAG	AATGAGGAAC	TACTTCCTGA	1320
TTGATGTACT	TGAACGCGCT	TTGAAAGCTG	ATTCCGTTAGC	GTCAAGCCAT	CCACTTTCCT	1380
TCAGAACTCGA	CAAAGCTGCA	GAAGTTGAAG	AAGCCTTTGA	TGATATCACA	TACGCCAAAG	1440
GAGCTTCTGT	TCTTACTATG	CTGAGAGCCT	TGATTGGAGA	AGAAAAACAT	AAGCATGCAG	1500
TATCGCAGTA	CCTCAAGAAG	TTCTCGTATA	GCAATGCAGA	AGCGACTGAT	CTATGGGCAG	1560
TTTTTGATGA	AGTTGTCACT	GACGTGGAAG	GTCCAGACGG	CAAACTTATG	AAAACCACAG	1620
AGTTTGCAAG	TCAGTGGACG	ACTCAGATGG	GCTTCCAGT	TATTTCCGTA	GCAGAGTTTA	1680
ACTCGACTAC	TTTGAAATTA	ACGCAAAGTC	GATATGAGGC	GAATAAAGAC	GCTGTGGAGA	1740
AAGAGAAGTA	CCGTCAACCG	AAATACGGAT	TTAAATGGGA	TATTCCACTG	TGGTATCAGG	1800
AAGGCGATGA	GAAGGAGATA	AAGCGAACAT	GGTTGAGAAG	AGATGAACCG	CTTTACTTGC	1860
ATGTTAGTGA	TGCTGGCGCT	CCCTTTGTGG	TGAACGCAGA	CCGCTATGGA	TTTATCGAC	1920
AAAATCATGA	CGCTAATGGT	TGGAAAAAGA	TAATCAAGCA	GCTCAAGGAT	AATCATGAGG	1980
TTTACAGTCC	CCGGACAAGG	AATGTCATCA	TTAGCGATGC	GTTTGCTGCG	GCTGCAACTG	2040
ACGCAATTGA	GTATGAGACT	GTATTTGAAC	TTCTGAATTA	TGCCGAAAAA	GAAACGGAAT	2100
ATCTACCAAT	AGAAATCGCA	ATGTCCGGGA	TCTCTTCGAT	TTTGAAATAC	TTCCCTACCG	2160
AGCCAGAGGC	AAAGCCAGCT	CAAAACATACA	TGATGAACAT	ATTGAAACCG	ATGTATGAAA	2220
AAAGCAGTAT	CGACTTCATT	GCCAATAACT	ACAGAAATGA	CAAGCTGTTT	TTCCAAATCA	2280
ACCTCCAAAA	AGATGTCATT	GATATGTTCT	GCGCCCTCGG	ATCGCAAGAC	TGCAGGAAGA	2340
AATATAAAAA	ACTTTTCGAT	GACGAAAGTCA	TGAACAAATG	CAGGGATGGT	CAAGCAGCAA	2400
CCGAATGCGT	AAGAATCGCC	GCTCCTCTCC	GATCAAGTGT	TTATTGTTAT	GGTGTGAAGG	2460
AAGGCGGTGA	TTATGCTTCC	GACAAGGTGA	TGGAGCTTTA	TACGGCCGAA	ACACTCGCCC	2520
TAGAAAAAGA	CTTCCTACGC	CTAGCATTGG	GATGTCATAA	AGATGTTACT	GCTTTGAAAG	2580
GACTTCTCTT	GCGGGCTCTG	GACAGGAATT	CGTCGTTCTG	ACGTATGCAG	GATATCCCAA	2640
GTGCTTTCAA	CGATGTAGCA	GCAAACTCTA	TTGCCGAAGA	ATTCATTTTC	AATTTCTCTA	2700
TTGAGAGATG	GCCAGATATC	ATTGAAAAGTA	TAGGAACGAA	GCACACATAT	GTTGAGAAAG	2760
TGATACCAGC	CTGCACITCA	GGAATCCGCT	CACAACAGCA	GATTGACCAG	CTGAAGAATC	2820
TGCAGAAAAA	TGGCATGAAC	GCTCGTCAAT	TCCGTGCATT	CGATAAAGCA	ATCGAACGAG	2880
CACAAAAATAG	GGTGGATTGG	ATTAAAAAAC	ATTTCCAAAA	ATTAGCGGCT	TTCTTCAAGA	2940
AAGCCACCTT	GTAATTCGAA	TTACATTGCC	AGTAATCCAG	ATCTTAAAGT	TCATGAAGGA	3000
ATATGACAGG	GAACTGACTG	TCTGTTGGTC	ACTGTTCCAC	TGAATGGAAG	TTTTTACCTA	3060
CAAAAAATTTT	TATCGTTATA	TTTGCCTTCC	TGAGGGGCTC	ATTGTTGTCA	CTTGAATAGT	3120
AAACAAAGCT	CAGTATTGGC	AACCGTAGAA	CAATATTACT	TTCGCTTCAT	CAAAATGTTA	3180
TCTTCCCTAT	ACCCTCTTCC	TAACTGAAAT	CGGAAATTTG	TTTCATATTG	TTTGATGCTT	3240
GTTGCTCAGA	ACACTTCTCT	CTCAATAGCT	TCTTGTGTTG	TTTTTTTTTTG	ATTGTATTGA	3300
TCGTTTTACA	ATTGTATAGA	TTAGTTATCT	TATAAATATT	GATGTTTAAA	AAAAAAAAAA	3360
AAAAAAAAAA						3369

Informace pro řetězec č. 22:

Vlastnosti řetězce:

délka: 977 aminokyselin

typ: peptid

Popis řetězce č. 22:

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

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

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

Informace pro řetězec č. 23:

Vlastnosti řetězce:

délka: 972 aminokyselin

typ: peptid

Popis řetězce č. 23:

Met	Thr	Ala	Glu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro	1
Ile	Ser	Leu	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	5
Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Arg	Lys	Ala	Phe	Asp	10
Thr	Thr	Gln	Lys	Glu	Gln	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gly	Lys	Glu	Lys	15
Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	Asn	Ile	20
Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Asn	Ile	Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Gly	25
Tyr	Val	Asn	Phe	Pro	Pro	Glu	Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Asp	Ala	His	30
Val	Glu	Ile	Ala	Met	Val	Val	Val	Glu	Pro	Thr	Asn	Ser	Ile	Val	35
Leu	Asn	Ser	Lys	Lys	Ile	Thr	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	40
Phe	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	Ile	Glu	Ser	Val	Lys	Met	Gln	45
Glu	Arg	Leu	Asp	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Gln	Leu	Gln	50
Lys	Asp	Leu	Lys	Ile	Leu	Leu	Lys	Ile	Thr	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	55
Ser	Asp	Thr	Leu	Gly	Gly	Leu	Tyr	Gln	Ser	Ile	Tyr	Thr	Asp	Lys	60
Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Asn	Glu	Pro	Ser	65
Asp	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	Pro	Cys	Phe	Asp	Glu	Pro	Lys	Tyr	Lys	70
Ala	Thr	Tyr	Thr	Val	Thr	Val	Val	His	Pro	Lys	Gly	Thr	Lys	Ala	75
Ala	Ser	Asn	Gly	Ile	Glu	Ala	Asn	Gly	Lys	Gly	Glu	Leu	Lys	Gly	80
Asp	Tyr	Ile	Thr	Ser	Lys	Phe	Lys	Thr	Pro	Pro	Met	Ser	Ser	Ser	85
Tyr	Leu	Leu	Ala	Ile	Ile	Val	Cys	Glu	Phe	Glu	Tyr	Ile	Glu	Gly	90
Phe	Thr	Lys	Thr	Gly	Val	Arg	Phe	Arg	Ile	Tyr	Ser	Arg	Pro	Glu	95
Ala	Lys	Arg	Met	Thr	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Ile	Arg	Cys	100
Leu	Glu	Phe	Tyr	Glu	Lys	Phe	Phe	Asp	Ile	Lys	Phe	Pro	Leu	Glu	105
Lys	Gln	Asp	Met	Ile	Ala	Leu	Pro	Asp	Phe	Thr	Ala	Gly	Ala	Met	110
Glu	Asn	Tyr	Gly	Leu	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Asp	Ser	Leu	Leu	Tyr	115
Asp	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ala	Pro	Met	Asn	Lys	Gln	Arg	Val	Ala	Leu	120

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

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

Informace pro řetězec č. 24:

Vlastnosti řetězce:

délka: 972 aminokyselin

typ: peptid

Popis řetězce č. 24:

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

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

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

Zastupuje:

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Molekuly nukleových kyselin tvořené jedním nebo větším počtem kódových nukleotidových řetězců pro aminopeptidázu z hlístů nebo pro jejich antigenně účinnou část, přičemž tyto řetězce obsahují celý řetězec nebo část nukleotidového řetězce z obr. 2, 3, 4 nebo 5, to znamená řetězce č. 1 až 15 nebo jsou molekuly nukleových kyselin tvořeny kódovými řetězci pro aminopeptidázu hlístů s identitou řetězce 50 % nebo vyšší nebo s hybridizací s kterýmkoliv z uvedených řetězců za podmínek 2 x SSC při teplotě místnosti, kde SSC obsahuje 0,15 M chloridu sodného a 0,015 M citronanu sodného při pH 7,2.

2. Molekuly nukleových kyselin, tvořené jedním nebo větším počtem kódových nukleových řetězců pro polypeptid, schopný vyvolat tvorbu protilátek proti parazitickým hlístům, přičemž tyto řetězce obsahují jednu nebo větší počet kódových oblastí pro antigenní determinanty z kódových řetězců pro aminopeptidázy z obr. 2, 3, 4 nebo 5, to znamená z řetězců č. 1 až 15.

3. Molekuly nukleových kyselin, tvořené jedním nebo větším počtem nukleotidových kódových řetězců, které odpovídají nebo které jsou komplementární k jednomu nebo většímu počtu řetězců klonů, identických alespoň na 50 % s řetězcem z obr. 2, 3, 4 a 5 nebo může jít o řetězce s totožností více než 50 % nebo o řetězce, které hybridizují s kterýmkoliv z uvedených řetězců za podmínek 2 x SSC, kde SSC obsahuje 0,15 M chloridu sodného a 0,015 M citronanu sodného při pH 7,2.

4. Vektor pro expresi nebo klonování, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že obsahuje molekulu nukleové
kyseliny podle nároků 1, 2 nebo 3.

5. Prokaryotická nebo eukaryotická buňka nebo trans-
genický organismus, v y z n a č u j í c í s e t í m , že
obsahuje molekulu nukleové kyseliny podle nároků 1, 2 nebo 3.

6. Syntetický polypeptid, v y z n a č u j í c í s e
t í m , že obsahuje řetězec aminokyselin enzymu aminopeptidá-
zy nebo jeho antigenní části, odpovídající celému řetězci
nebo části nukleotidového řetězce z obr. 2, 3, 4 nebo 5,
to znamená řetězce 1 až 15 nebo odpovídající funkční ekvi-
valentní variantě, přičemž řetězec syntetického polypeptidu
je odlišný od bílkoviny H110D ve formě dubletu nebo od syn-
tetického polypeptidu ze skupiny:

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

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

7. Syntetické polypeptidy podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou tvořeny řetězcem aminokyselin enzymu aminopeptidázy nebo antigenní části tohoto enzymu, odpovídající celému řetězci nebo části nukleotidových řetězců z obr. 2. 3, 4 nebo 5, jde o řetězec č. 1 až 15, nebo jde o funkčně ekvivalentní variantu, v podstatě prostou jiných složek *Haemonchus contortus*.

8. Syntetické polypeptidy podle nároku 6 nebo 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jde o složený polypeptid, obsahující ještě další polypeptid, vázaný na řetězec aminokyselin podle nároku 6 nebo 7.

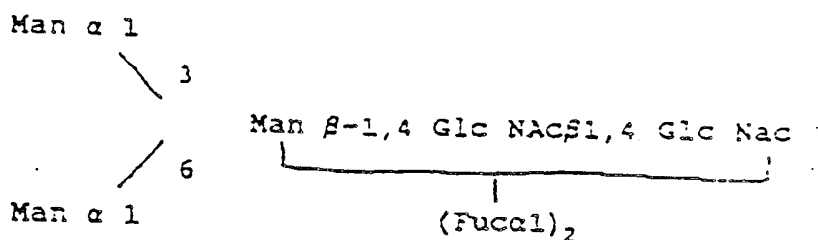
9. Způsob výroby syntetického polypeptidu podle nároků 6, 7 nebo 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se pěstuje prokaryotická nebo eukaryotická buňka, obsahující molekulu nukleové kyseliny podle nároků 1, 2 nebo 3, za podmínek, při nichž dochází k expresi polypeptidu, který se pak izoluje.

10. Vakcína pro stimulaci imunologické odpovědi proti parazitickým hlístům u člověka nebo jiného živočicha, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jeden syntetický polypeptid podle nároků 6, 7 nebo 8 nebo virus nebo hostitelskou buňku s obsahem nukleové kyseliny podle nároků 1, 2 nebo 3 pro stimulaci imunologické odpovědi na polypeptidy, pro něž je kódem uložená molekula nukleové kyseliny, spolu s farmaceutickým nosičem.

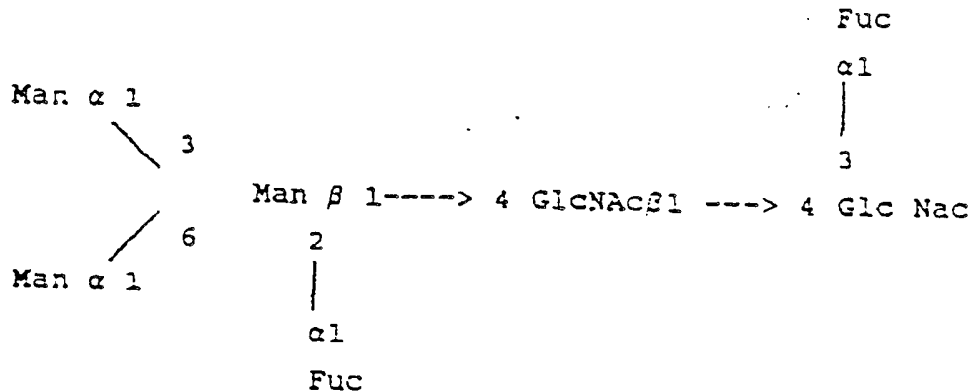
11. Použití molekuly nukleové kyseliny podle nároků 1, 2 nebo 3 nebo syntetického polypeptidu podle nároků 6, 7 nebo 8 pro výrobu vakcíny pro stimulaci imunologické odpovědi proti parazitickým hlístům u člověka nebo u jiného živočicha.

~~12. Způsob stimulace imunologické odpovědi proti parazitickým hlístům u člověka nebo jiného živočicha, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se podává vakcína podle nároku 10.~~

12. Oligosacharid se strukturov

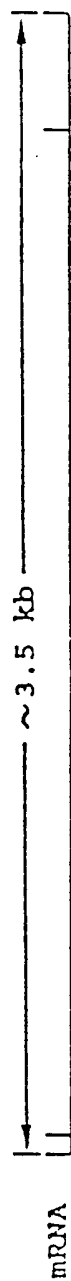


13. Oligosacharid podle nároku 13, se strukturou



14. Oligosacharid podle nároku 13 nebo 14, vázaný na syntetický polypeptid podle nároku 6, 7 nebo 8.

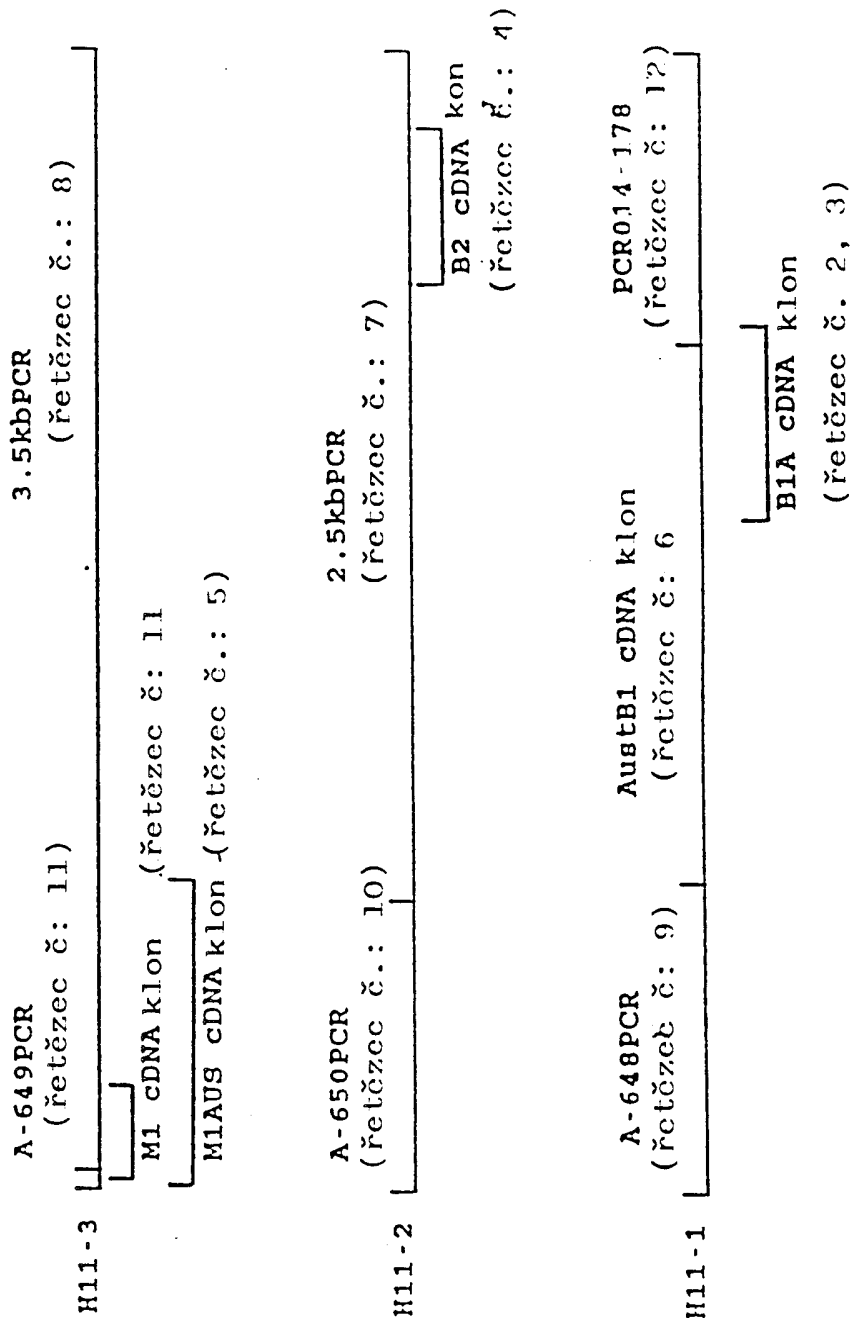
Zastupuje:



5' nepřenášená oblast

3' nepřenášená oblast

FIG.1



1 / 44



2/44

H11-3	1	GGTTTAAATTA	CCCAAGTTTTC	AGGGTCTCCA	TCTAG.....	50
H11-2		GGTTTAAATTA	CCCAAGTTTTC	AG.....	A	
H11-1		GGTTTAAATTA	CCCAAGTTTTC	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG
51						
H11-3		TGACGTCGCA	GGGGAGAACC	CGGACATTGC	TGAATCTAAC	100
H11-2		TGACGGCGGA	GTGGCAGAAG	CGTCGAATCT	TGGGCTTCTC	TCCAATCCGT
H11-1		AGACGCAGCA	ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG
101						
H11-3		CTTATTGTCTG	CATTATTTCT	AGTAGCTGCT	GCAGTCGGCC	150
H11-2		CTACTTTGTA	CATTATTTGT	ATTAGCTGCT	GCCGTTGGAC	TCTCTATTGG
H11-1		TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	GGTAGCTGCT	GCCGTCGGCC	TCTCCATTGG
151						
H11-3		TCTCACCTAT	TACTTTACTC	GCAAAGCGTT	CGATACCTCA	200
H11-2		TCTTACCTAT	TACTTCACTC	GTAAGCATT	CGATACCACA	GAAAAGCCAG
H11-1		TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAGCTTT	TGATACTACT	CAAAAAGAAC
201						
H11-3		GGAAGGATGA	TACTGGTGGC	AAGGACAAAG	ACAATTCTCC	250
H11-2		AGAAGGATGA	CAGTGGTGGT	AAAGAAAAGG	ATAATTCTCC	CTCTGCGGCG
H11-1		GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGAT...G	ATAATTCGCC	TTCTGCAGAA
251						
H11-3		GAACACTCC	TTCCAAGTAA	TATAAAACCA	TTGTCTTACG	300
H11-2		GAACACTTC	TTCCAACGAA	CATAAAACCA	GTCTCGTACG	ACTTGACGAT
H11-1		GAATTACGTC	TCCCAACAAC	CATAAAACCT	TTGACATACG	ACTTGAACAT
301						
H11-3		CAAAACATAT	CTACCTGGTT	ATGTGGACTT	CCCACCGGAG	350
H11-2		CAAAACATAT	CTACCGGGTT	ACGTGAACTT	TCCACCAGAA	AAAAACCTCA
H11-1		CAAAACGTAT	CTGCCAAACT	ATGTAAACTA	TCCACCTGAG	AAGAATCTCA
351						
H11-3		CATTTCGATGG	GCGTGTGGAA	ATATCAATGG	TTGTAATTGA	400
H11-2		CATTTCGATGC	CCATGTGGAG	ATTGCTATGG	TTGTGGTTGA	GCCAACAAAG
H11-1		CTATTGATGG	GACTGTGGTG	ATTGCTATGG	AAGTTGTGGA	GCCTACAAAT
401						
H11-3		AGTATCGTAC	TCAATTCAAA	GAAGATCTCT	GTAATACCCC	450
H11-2		AGTATTGTGC	TGAACCTCGAA	GAAAATCACT	TTGGCACAAG	AAGAATGTGA
H11-1		TCTATTGTGC	TCAACTCGAA	AAATATTCTT	GTAATTGCAG	GAGGATGCGA
451						
H11-3		ACTGGTATCG	GGCGATAAAA	AACTCGAAAT	TGAAAGTGTA	500
H11-2		ACTGTTCTCA	GGTAATCAGA	AACTTGACAT	CGAAAGTGTA	AAGGAGCACC
H11-1		ACTGTTTTCT	AAACAACCAA	AACTCGACAT	CGAAAAGGTT	AAGATGCAGG
501						
H11-3		CAAGACTGGA	AAAGGTTGAG	TTTCTTATCA	AAAGCCAAC	550
H11-2		AAAGACTTGA	CAAGCTTGAG	ATTACCCTCA	AAAATCAGCT	GGAAAAAGAT
H11-1		CAAGGCTGGA	GAAAGTCGAA	TTCGTTTTGA	AGAAAAAGCT	GCAAAAAGAT
551						
H11-3		CAACAAAATCT	TGCTCAAGGT	CGGCTACATC	GGTCTCATCA	600
H11-2		CTGAAAATCC	TGCTCAAGAT	CACTTACACC	GGCCTTATTA	GCAACAGCTT
						GCGACACTCT

FIG. 2

3/44

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

FIG. 2 (pokračování)

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

5/44

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

FIG. 2 (pokračování)

6/44

H11-1 AAATAGCTGT TATTGACACA TACTGTGGTC TTGGAGGCCAA AGAATGTCTT
2351

H11-3 AAGAAATATA AAAAACTTTT CGATGACGAA GTCATGAACA AATGCAGGGA 2400
H11-2 AAGCAATATA AGGATATCTT CTACGATGAG GTTATGCCCA AGTGTAAGGC
H11-1 GAAGAAATGA AAAAGCTTTT TGACAAGGAG GTCATG...A AATGTCAACC

2401

H11-3 TGGTCAAGCA GCAACCGAAT GCGTAAGAAT CGCCGCTCCT CTCCGATCAA 2450
H11-2 CGGGGAAGCA GCAACCAAAT GCGTTAAGGT TTCCGCTCCT CTTCGAGCCA
H11-1 TGGTCAGCAA GCGACCGACT GCGTAAAGGT AACTGCTCCT CTCCGAAAAA

2451

H11-3 GTGTTTATTG TTATGGTGTG AAGGAAGGCG GTGATTATGC TTCCGACAAG 2500
H11-2 ATGTTTACTG TTATGGTGTA CAGGAAGGTG GTGAAGAAGC TTTTGAAAAG
H11-1 CTGTTTACTG CTATGGGGTC CAGGAAGGCG GTGATGAGGC ATTTCGACAAG

2501

H11-3 GTGATGGAGC TTTATACGGC CGAAACACTC GCCCTAGAAA AAGACTTCCT 2550
H11-2 GTGATGGGGC TGTATCTAGC AGAAGATGTT CAACTGGAGA AGGGTATCCT
H11-1 GTGATGGAAC TATATAATGC GGAACAAGTG CAGTTGGAGA AAGACAGTCT

2551

H11-3 ACGCCTAGCA TTGGGATGTC ATAAAGATGT TACTGCTTTG AAAGGACTTC 2600
H11-2 GTTCAAAGCC TTGGCATGCC ACAAAGATGT TACAGCTCTA AAAGAACTTC
H11-1 ACGTGAAGCA TTGGGATGCC ATAAAGACGT TACAGCTCTA AAGGGACTTC

2601

H11-3 TCTTGCGGGC TCTGGACAGG AATTCGTCGT TCGTACGTAT GCAGGATATC 2650
H11-2 TTTTGCGAGC CCTGGACCGT AAATCGTCGT TTGTGCGTCT TCAGGATGTC
H11-1 TTATGCTGGC TTTGGATCGG AATTCGTCAT TTGTGCGTCT TCAAGATGCT

2651

H11-3 CCAAGTGCTT TCAACGATGT AGCAGCAAAT CCTATTGGCG AAGAATTCAT 2700
H11-2 CCTACCGCTT TCCGTGCTGT ATCTGAAAAC CCTGTGGGCG AAGAATTCAT
H11-1 CATGATGTGT TTAACATTGT ATCCAGAAAT CCTGTTGGAA ACGAACTGCT

2701

H11-3 TTTCAATTTT CTTATTGAGA GATGGCCAGA TATCATTGAA AGTATAGGAA 2750
H11-2 GTTCAATTTT CTAATGGAGA GATGGGAGGA AATCACTGCG AGCTTGAAAA
H11-1 GTTCAATTTT CTCACAGAGC GATGGGAAGA GATACTTGAA AGTTTGTCAA

2751

H11-3 CGAAGCACAC ATATGTTGAG AAAGTGATAC CAGCCTGCAC TTCAGGAATC 2800
H11-2 CAGAACACAG AGCAGTTGAT AAAGTGGTCG GCGCTTGTTG CACAGGAATT
H11-1 TACGACACAG ATCAGTTGAT CGAGTGATCA AAGCCTGTAC TCGAGGACTA

2801

H11-3 CGCTCACAAC AGCAGATTGA CCAGCTGAAG AATCTGCAGA AAAATGGCAT 2850
H11-2 CGCTCCCAAC AACAAATAGA TCAGCTGAAG AATCTACAGA AGAACAATGC
H11-1 CGATCCAGGG AACAAAGTACA ACAGTTGAAG AATCTATACA AAAATGACAA

2851

H11-3 GAACGCTCGT CAATTCGGTG CATTCGATAA AGCAATCGAA CGAGCACAAA 2900
H11-2 GCAGGCTAAG AAGTTCGGCT CATTCACCCA GGAAATCGAA AAAGGAGAAC
H11-1 GCGTGCTCGC GAATACGGTG CATTTGGTGG GGCAATAGAA AGATCGGAAC

2901

FIG.2 (pokračování)

2950

7 / 44

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

FIG.2 (pokračování)

8/44

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

FIG. 3

9/44

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

FIG.3 (pokrač.)

10/44

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

FIG. 3 (pokrač.)

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

FIG. 3 (pokrač.)

12/44

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

FIG. 4

13/44

H11-2	CGGGCTTTGA	TTGGAGAGGA	CAATTACAGG	AATGCTGTTG	TGCAATACCT	1500
H11-2	CAAGAAGTTC	TCCTACAGCA	ATGCACAAGC	AGCCGATCTG	TGGAACGTCT	1550
H11-2	TCAATGAAGT	TGTCAAAGGT	CTTAAGGGTC	CTGACCGCAA	CGTCATGAAA	1600
H11-2	ATCGACCAAT	TTACCGATCA	GTGGACGTAT	CAGATGGGTT	ATCCTGTGGT	1650
H11-2	TAAAGTAGAA	GAATTTAATG	CGACCGCCCT	AAAGGTTACG	CAGAGCCGGT	1700
H11-2	ACAAGACAAA	TAAAGACGCC	TTGGAACCAG	AGAAATATCG	TAATCCAAAA	1750
H11-2	TACGGGTTCA	AGTGGGATGT	TCCCCTATGG	TATCAGGAAG	GCAATAGCAA	1800
H11-2	AGAGGTGAAG	CGAACATGGC	TAAAAAGAGA	TGAACCGCTG	TACTTGAACG	1850
H11-2	TCAACAATCG	GGATACATCC	CTTGTGGTGA	ACGCTGATCG	ACATGGATTT	1900
H11-2	TATCGACAAA	ACTATGATGC	CAACGGTTGG	AAAAAGATAA	TCAAGCAGCT	1950
H11-2	CAAGAAAGAT	CACAAGGTCT	TCGGTCCAAG	GACAAGGAAC	GCTATCATAA	2000
H11-2	GCGATGCATT	TGCTGCAGCT	ACGATTGACG	CAATCGACTA	TGAAACTGTA	2050
H11-2	TTCGAACTAC	TTGAATATGC	CAAAAATGAA	GAGGAATTCT	TGCCTTGGAA	2100
H11-2	GGAAGCTCTG	TCCGGCATGT	TCGCAGTTTT	AAAGTTCTTC	GGTAATGAGC	2150
H11-2	CGGAGACAAA	ACCAGCTAGA	GCTTACATGA	TGAGCATATT	AGAACCGATG	2200
H11-2	TATAATAAGA	GCAGCATTGA	TTACATCGTC	AAGAATTATT	TGGATGATAC	2250
H11-2	GTTATTCACA	AAAATTAATA	CTCAAAGGA	TATCATTGAT	GCATATTGTT	2300
H11-2	CCCTTGGATC	AAAGGACTGT	ATAAAGCAAT	ATAAGGATAT	CTTCTACGAT	2350
H11-2	GAGGTTATGC	CCAAGTGTA	GGCCGGGGAA	GCAGCAACCA	AATGCGTTAA	2400
H11-2	GGTTTCCGCT	CCTCTTCGAG	CCAATGTTTA	CTGTTATGGT	GTACAGGAAG	2450
H11-2	GTGGTGAAGA	AGCTTTTGAA	AAGGTGATGG	GGCTGTATCT	AGCAGAAGAT	2500
H11-2	GTTCAACTGG	AGAAGGGTAT	CCTGTTCAAA	GCCTTGGCAT	GCCACAAAGA	2550
H11-2	TGTTACAGCT	CTAAAAGAAC	TTCTTTTGCG	AGCCCTGGAC	CGTAAATCGT	2600
H11-2	CGTTTGTGCG	TCTTCAGGAT	GTCCCTACCG	CTTCCGTGC	TGTATCTGAA	2650
B2						
H11-2	AACCCTGTGG	GCGAAGAATT	CATGTTCAAT	TTCCTAATGG	AGAGATGGGA	2700
B2						
H11-2	GGAAATCACT	GCGAGCTTGG	AAACAGAACA	CAGAGCAGTT	GATAAAGTGG	54
H11-2	GGAAATCACT	GCGAGCTTGG	AAACAGAACA	CAGAGCAGTT	GATAAAGTGG	2750
B2						
H11-2	TCCGCGCTTG	TTGCACAGGA	ATTCGCTCCC	AACAACAAAT	AGATCAGCTG	104
H11-2	TCCGCGCTTG	TTGCACAGGA	ATTCGCTCCC	AACAACAAAT	AGATCAGCTG	2800
B2						
H11-2	AAGAAGAATC	TACAGAAGAA	CAATGCGCAG	GCTAAGAACT	TC.....	154

FIG. 4 (pokrač.)

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

FIG. 4 (pokrač.)

15/44

H11-1	1	GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGACT CAGGAGCAGG	50
H11-1	51	AGACGCAGCA ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCCAATCAAG	100
H11-1	101	TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG	150
H11-1	151	TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT TGATACTACT GGCGGAAATG	200
H11-1	201	GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGATGATA ATTCCCCATC AGCTGAAGAA	250
H11-1	251	TTACGTCTCC CAACAACCAT AAAACCTTTG ACATACGACT TAGTAATCAA	300
H11-1	301	AACGTATCTG CCAAACCTATG TAAACTATCC ACCTGAGAAA GATTTCGCTA	350
H11-1	351	TTGATGGGAC TGTGGTGATT GCTATGGAAG TTGTGGAGCC AACAAAGTCT	400
H11-1	401	ATTGTGCTCA ACTCGAAAAA TATTCCTGTA ATTGCAGACC AGTGCGAACT	450
H11-1	451	GTTTTCTAAC AACCAAAAAC TCGACATCGA AAAGGTTGTG GATCAGCCAA	500
H11-1	501	GGCTGGAGAA AGTCGAATTC GTTTTGAAGA AAAAGCTGGA GAAGAATCAG	550
H11-1	551	AAAATCACGC TCAAGATTGT ATACATTGGC CTTATCAACG ACATGCTTGG	600
H11-1	601	AGGACTTTAT CGAACAACCT ACACGGATAA AGATGGTACA ACCAAGATTG	650
H11-1	651	CTGCATGCAC TCATATGGAA CCGACGGACG CCCGTCTTAT GGTCCCCTGT	700
H11-1	701	TTCGACGAGC CGACGTTTAA GGCAAACTGG ACTGTGACTG TGATTCAATC	750
H11-1	751	GAAGGGCACC AGTGCCGTGT CGAATGGAAT AGAAAAGGGA GAAGGAGAAG	800
H11-1	801	TCTCTGGCGA TTGGGTCACA ACCAGATTCG ATCCAACCCC GCGAATGCCT	850
H11-1	851	TCGTATTTGA TTGCTCTTGT GATTTCCGAA TTAAAGTACA TTGAAAATTA	900
AustB1	901	AATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA	950
H11-1		TACGAAAAGC GGTGTTTCGAT TCCGAATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA	

FIG. 5

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

FIG. 5 (pokrač.)

17/44

H11-1	TCAGATGGGG	TTCCCTGTTT	TTACTGTCTG	GTCCGTTAAC	GCAACGACTT	
	1701					1750
AustB1	TGAAAGTCAC	CCAAAAACGA	TACAGGCAGA	ACAAGGATGC	AAAGGAACCA	
H11-1	TGAAAGTCAC	CCAAAAACGA	TACAGGCAGA	ACAAGGATGC	AAAGGAACCA	
	1751					1800
AustB1	GAGAAGTACC	GTCATCCAAC	TTATGGGTTC	AAATGGGATG	TTCCTCTGTG	
H11-1	GAGAAGTACC	GTCATCCAAC	TTATGGGTTC	AAATGGGATG	TTCCTCTGTG	
	1801					1850
AustB1	GTATCAGGAA	GATGAACAGC	AAGTGAAAAG	AACTTGGTTA	AAAAGAGAGG	
H11-1	GTATCAGGAA	GATGAACAGC	AAGTGAAAAG	AACTTGGTTA	AAAAGAGAGG	
	1851					1900
AustB1	AACCGCTCTA	TTTCCATGTA	AGCAATTCTG	ATTCGTCAGT	TGTGGTGAAT	
H11-1	AACCGCTCTA	TTTCCATGTA	AGCAATTCTG	ATTCGTCAGT	TGTGGTGAAT	
	1901					1950
AustB1	GCCGAACGTC	GTGCTTTTTG	CCGATCAAAC	TATGACGCTA	ACGGTTGGAG	
H11-1	GCCGAACGTC	GTGCTTTTTG	CCGATCAAAC	TATGACGCTA	ACGGTTGGAG	
	1951					2000
AustB1	GAACATTATG	AGAAGACTCA	AGCAGAATCA	TAAGGTCTAT	GGTCCACGAA	
H11-1	GAACATTATG	AGAAGACTCA	AGCAGAATCA	TAAGGTCTAT	GGTCCACGAA	
	2001					2050
AustB1	CAAGAAACGC	TCTCATAAGT	GATGCGTTTG	CAGCAGCTGC	AGTTGAGGAA	
H11-1	CAAGAAACGC	TCTCATAAGT	GATGCGTTTG	CAGCAGCTGC	AGTTGAGGAA	
	2051					2100
AustB1	ATGAATTACG	AGACCGTATT	TGAAATGCTC	AAATACACCG	TGAAAGAAGA	
H11-1	ATGAATTACG	AGACCGTATT	TGAAATGCTC	AAATACACCG	TGAAAGAAGA	
	2101					2150
AustB1	GGATTACTTA	CCATGGAAGG	AGGCAATATC	AGGATTCAAT	ACAATTTTGG	
B1a			GCAATATC	AGGATTCAAT	ACAATTTTGG	
H11-1	GGATTACTTA	CCATGGAAGG	AGGCAATATC	AGGATTCAAT	ACAATTTTGG	
	2151					2200
AustB1	ACTTTTTTCGG	CAGCGAACCC	GAATCTCAAT	GGGCTTCGGA	ATACATGCGA	
B1a	ACTTTTTTCGG	CAGCGAACCC	GAATCTCAAT	GGGCTTCGGA	ATACATGCGA	
H11-1	ACTTTTTTCGG	CAGCGAACCC	GAATCTCAAT	GGGCTTCGGA	ATACATGCGA	
	2201					2250
AustB1	AAACTGATGA	AGCCAATTTA	TGACAAGAGT	AGCATCAAGT	TTATAGCGGA	
B1a	AAACTGATGA	AGCCAATTTA	TGACAAGAGT	AGCATCAAGT	TTATAGCGGA	
H11-1	AAACTGATGA	AGCCAATTTA	TGACAAGAGT	AGCATCAAGT	TTATAGCGGA	
	2251					2300
AustB1	GAACTACAAA	AAAGATTTCG	TTTTCTTCAA	AAATAATCTC	CAAATAGCTG	
B1a	GAACTACAAA	AAAGATTTCG	TTTTCTTCAA	AAATAATCTC	CAAATAGCTG	
H11-1	GAACTACAAA	AAAGATTTCG	TTTTCTTCAA	AAATAATCTC	CAAATAGCTG	
	2301					2350
AustB1	TTATTGACAC	ATACTGTGGT	CTTGGAGGCA	AAGAATGTCT	TGAAGAAATG	
B1a	TTATTGACAC	ATACTGTGGT	CTTGGAGGCA	AAGAATGTCT	TGAAGAAATG	
H11-1	TTATTGACAC	ATACTGTGGT	CTTGGAGGCA	AAGAATGTCT	TGAAGAAATG	

FIG. 5 (pokrač.)

18/44

	2351		2400
AustB1	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA	GGTCATGAAA
Bla	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA	GGTCATGAAA
H11-1	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA	GGTCATGAAA
	2401		2450
AustB1	GACCGACTGC	GTAAAGGTAA	CTGCTCCTCT
Bla	GACCGACTGC	GTAAAGGTAA	CTGCTCCTCT
H11-1	GACCGACTGC	GTAAAGGTAA	CTGCTCCTCT
	2451		2500
AustB1	ATGGGGTCCA	GGAAGGCGGT	GATGAGGCAT
Bla	ATGGGGTCCA	GGAAGGCGGT	GATGAGGCAT
H11-1	ATGGGGTCCA	GGAAGGCGGT	GATGAGGCAT
	2501		2550
AustB1	TATAATGCGG	AACAAGTGCA	GTTGGAGAAA
Bla	TATAATGCGG	AACAAGTGCA	GTTGGAGAAA
H11-1	TATAATGCGG	AACAAGTGCA	GTTGGAGAAA
	2551		2600
AustB1	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA	CAGCTCTAAA
Bla	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA	CAGCTCTAAA
H11-1	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA	CAGCTCTAAA
	2601		2650
AustB1	TGGATCGGAA	TTC	
Bla	TGGATC		
H11-1	TGGATCGGAA	TTGTCATTT	GTGCGTCTTC
	2651		2700
H11-1	AACATTGTAT	CCAGAAATCC	TGTTGGAAAC
	2701		2750
H11-1	CACAGAGCGA	TGGGAAGAGA	TACTTGAAAG
	2751		2800
H11-1	CAGTTGATCG	AGTGATCAA	GCCTGTACTC
	2801		2850
H11-1	CAAGTACAAC	AGTTGAAGAA	TCTATACAAA
	2851		2900
H11-1	ATACGGTGCA	TTTGGTGGGG	CAATAGAAAG
	2901		2950
H11-1	GGATTGAGAA	ACATTTCCGA	AAACTAGCAG
	2951		3000
H11-1	TCATAATTCT	GAAATGGCTA	TAACTAGCAC
	3001		3050
H11-1	CATCCAAAAA	GATTAATGAT	GTTTTTTTAC
	3051		3084
H11-1	TGTAAATTTG	TCATCGATTC	AAGTGTCTGT

FIG.5 (pokrač.)

H11-3
H11-2
H11-1

R V O W I
K Y A W I
R Y A W I

K K H F Q R L
K K H F N R K
K K H F N R K

L A S A A
A A C F F
F F K R K

K A R S N
L - -

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 HTAFESQEETQOPRKHITVLRITPIKSLFALLVVAALVOLSIOLTYFTRKAFDTTGOHOKODQPIVDDHNSPSAEELRLPTTIKPLTYDLVIKTYLPHYV
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 NYPPEKDFAIIDGTVVIAHEVVEPTKSIVLNISKHPIPIADQCELFSSHIQKIDIEKVVDQPRLEKVEFVLKCKLEKIQKITLKIVYIOLINDHLOGLYRTTY
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TDKDGTTKIAACTHMEPTDARLMVPCFDEPTFKAJHTVTVIHPKOTSAVSNQIEKOEVSODHVTTTRFDPTPRMPSYLIALLVISSEFKYIENYTKSQRV
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 RIPARPEANQCHTEYAHIAQIKCLDYEDFFQIKFPLPKQDHVALLPDFSSQAHENHOLITYREOSVLYDENLYQPMKERVAEVIAHELAIHQHTONLVTHK
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 WYDHLVNLHEGFASFVEYIOADFIISDOLWEMKDFLLAPYTISOITADAVASHPLSFRIDKADVSEAFDDITYRKQASVLQMLLNLVODENFKQSVSRYL
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 KXFSYDHAALAEIDLHAAFDETVQGITOPHGOPLKHSEFAPQHTTQMHFPVLTVESVHATTLKVTKRYRQKQDAKEPEKYRHPITYQFKWDVPLHYQEDEQO
 HOPFVLTVES
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 VKRTHLKREEPLYFHVSNDSVSVVVAERRAFGRSHYDANQHNIMRRLLKQHKVYQPRTRHALLISDAFAAAAVEEMQYETVTFEMLYTVKCEDYLPWKE
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 AISOFTILDFQSEPEQWASEYMRKLMKPIYDKS9IKFIAENYKQDSLFQKNLQIAVIDTYCLOOKECELEEMKCLFDKEVAKCQPOQOATDCVKVT
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 APLRXTVYCYQVQEOODEAFDKVHMLYHAEQVQLEKDSUREALOCIKKDVTAALKOLLMLALDRHSSFVRLQADHVDVFNIVSRHPVONELLFNFLTERWEEI
 HLLDYH8XfV

Pep. B

Pep. C

FIG. 7a

910 920 930 940 950 960 970
 LESLSIRHSVDRIKACTRGLRSREQVQQLKHLYTHDKRAREYQAFQOAIERSEHRVKHIEKHFRKLAALFFKKSNS*

[illegible]

```

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
T F D A U V E I A H V V V E P T N S I V L N S K X I T L A Q G O C E L F S G N Q K L D I E S V M Q R L D K L E I T L K I Q I Q K D L K I L L K I T Y T O L I S D T L G G L Y Q S I Y T D K D G K T X
      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
I V A V S Q M E P S D A R R I A P C F D E P K Y K A T H T V T V V I P K G T K A A S N O I E A N Q G E L K O D W I T S K F K T P P M S Y L L A I I V C E F E Y I E G F T K T O V T F R I H S R P E
      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
A K R H T A Y A L D A G I R C L E F Y E K F F D I K F L E K Q D H I A L P D F T A O A H E N H O L I T Y R E D S L L Y D E K I Y A P H K Q R V A L V V A H E L A H Q H F G N L V T L K H H D D T L
      L A Y D E K S Y A P D N K Q Y

```

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 NEGATTFVEYLGHDEISHNNFRTQDFFLLDGHDRGRADSAAASHPLSGFRIDKAAAEVAEATDDISYAKGASVLTMLRALIGEDNTRYHVVQYLLKXFSYSH
 |||||
 KAAEVAEATDIXXXKG

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AQLADLWVFIHVVGKVGKPGDGNVHKIDQFTDQWYQHGYPVVVKVEEFNATATLKVTSRYKTHKDALEPEKYRHPKYQGFKWDVPLWYQEONSGKEVKRTWL
 |||||
 HGYPVVVKVEEFXATATL

[illegible]

TEHRAVDKVVQACCTOIRSQQQIDQLKHLQKNAQAKCFQSTQBIEKGEHKIAWIKOCHFRLSEFFKARS*

FIG. 7b

25/44

FIG. 8

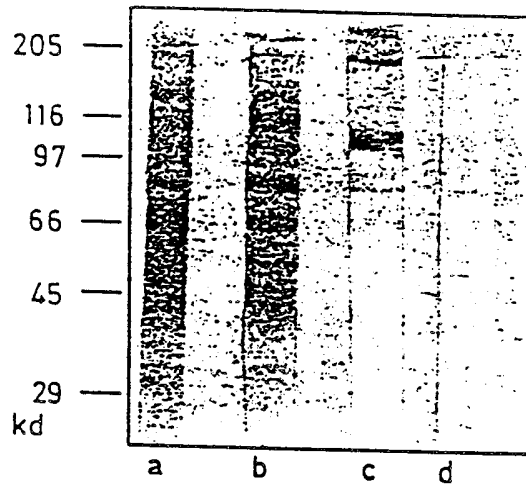
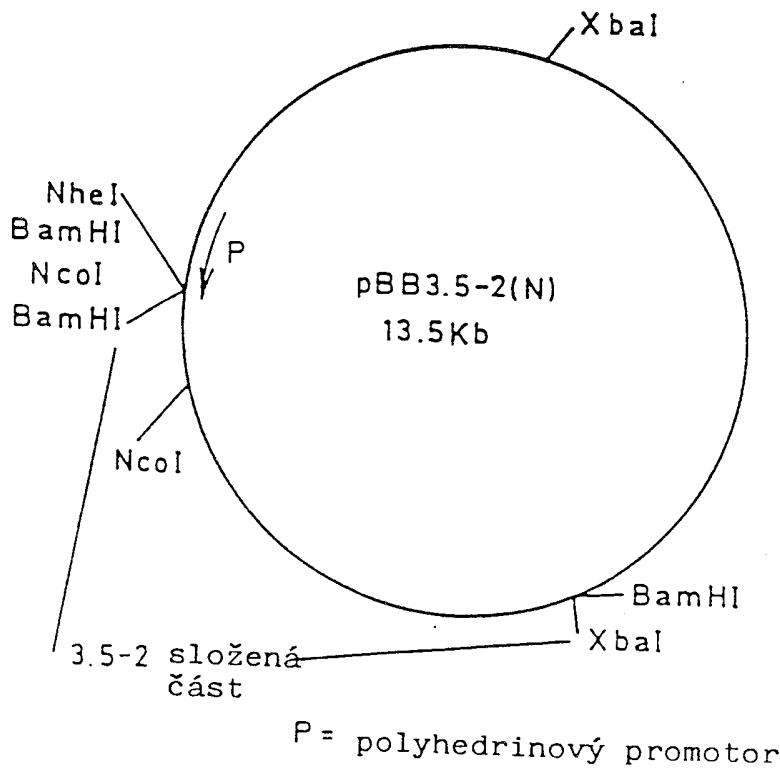
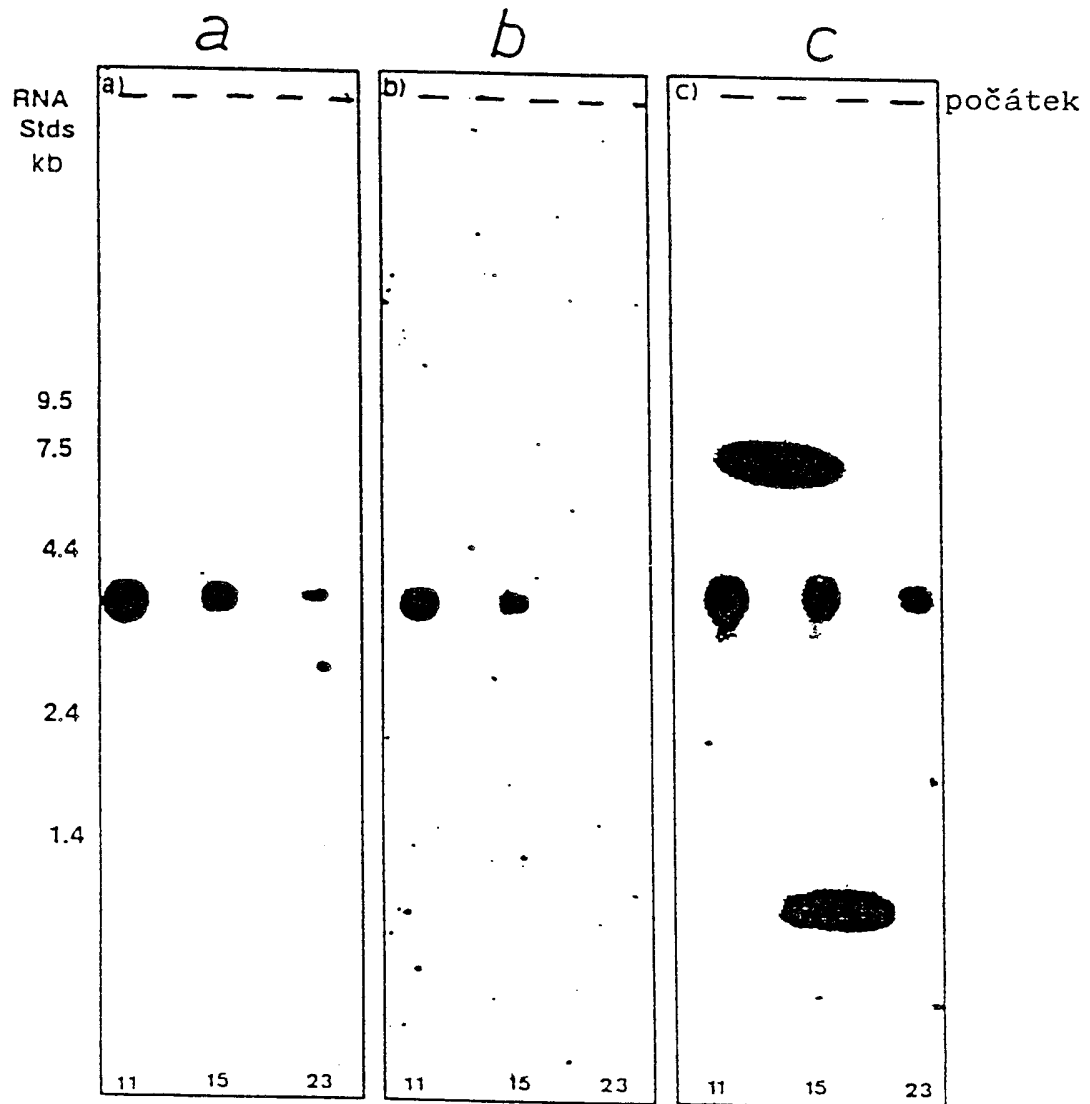


FIG. 20



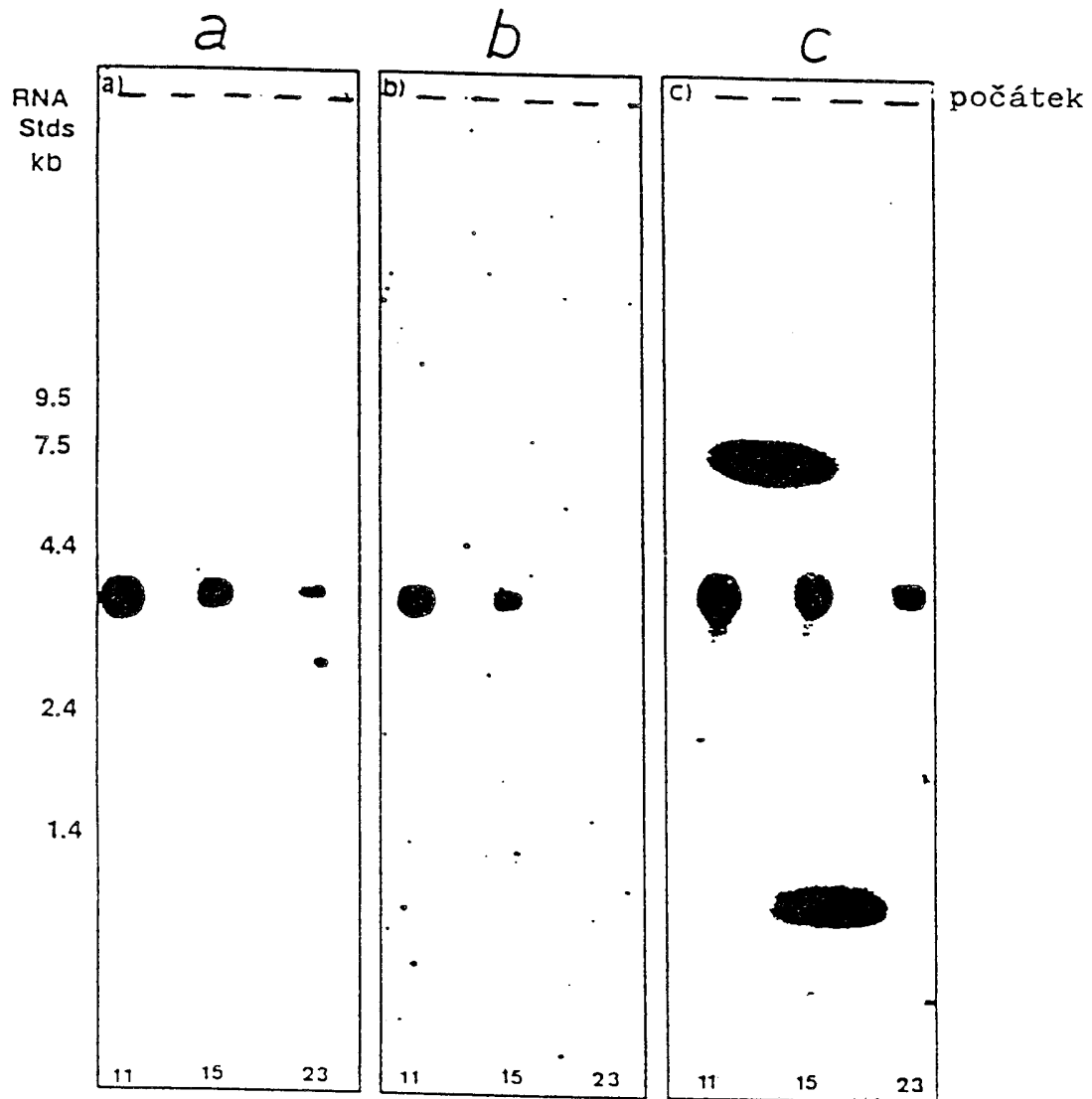
26/44

FIG. 9



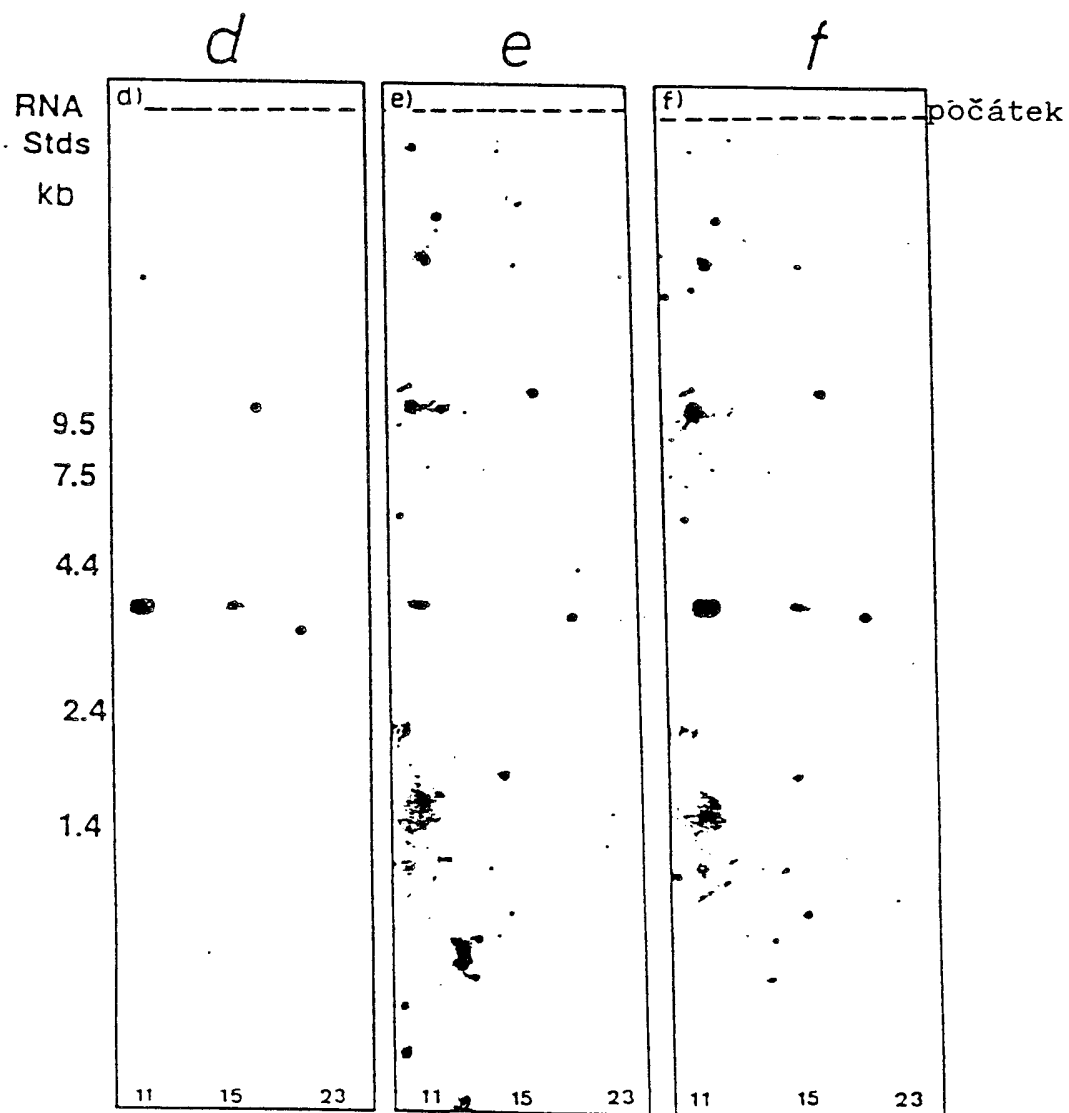
27/44

FIG. 9



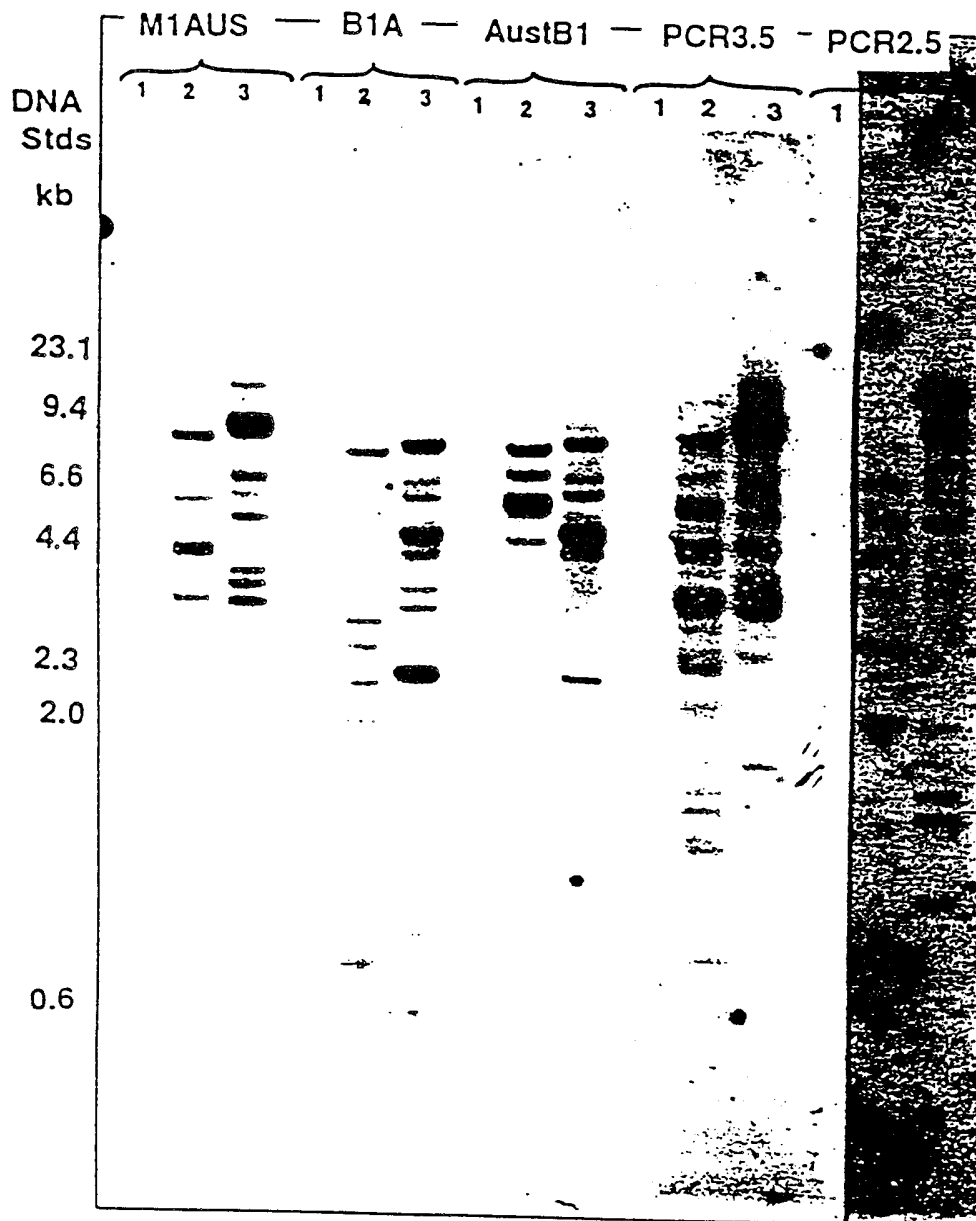
28/44

FIG. 9



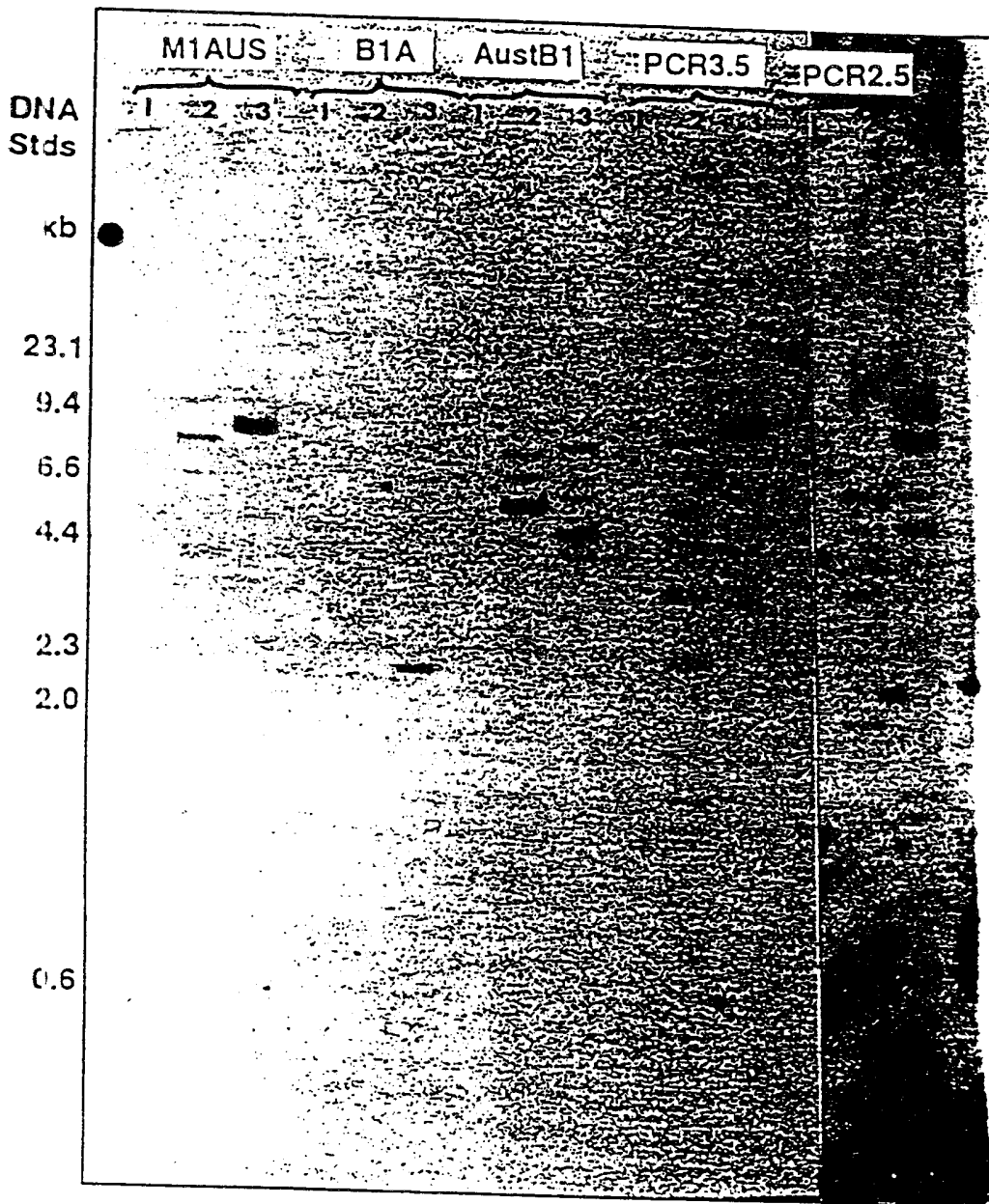
29/44

FIG. 10a



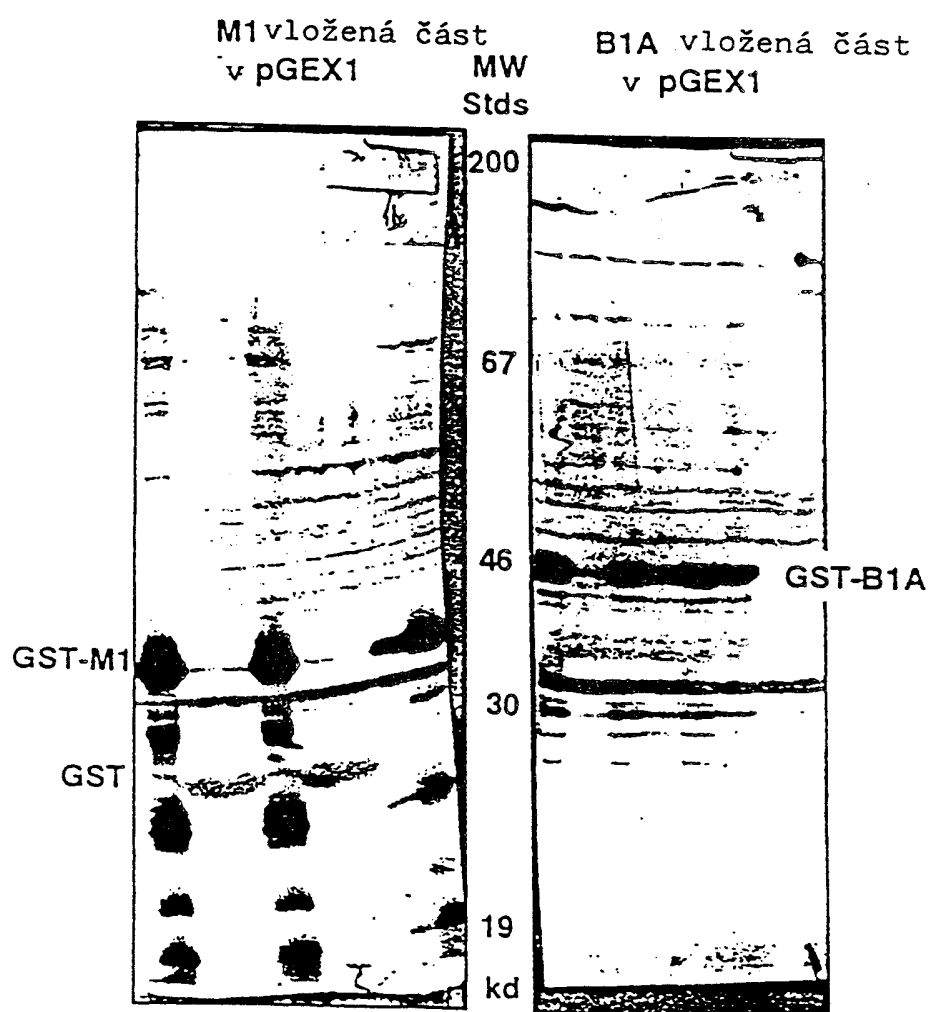
30/44

FIG. 10b



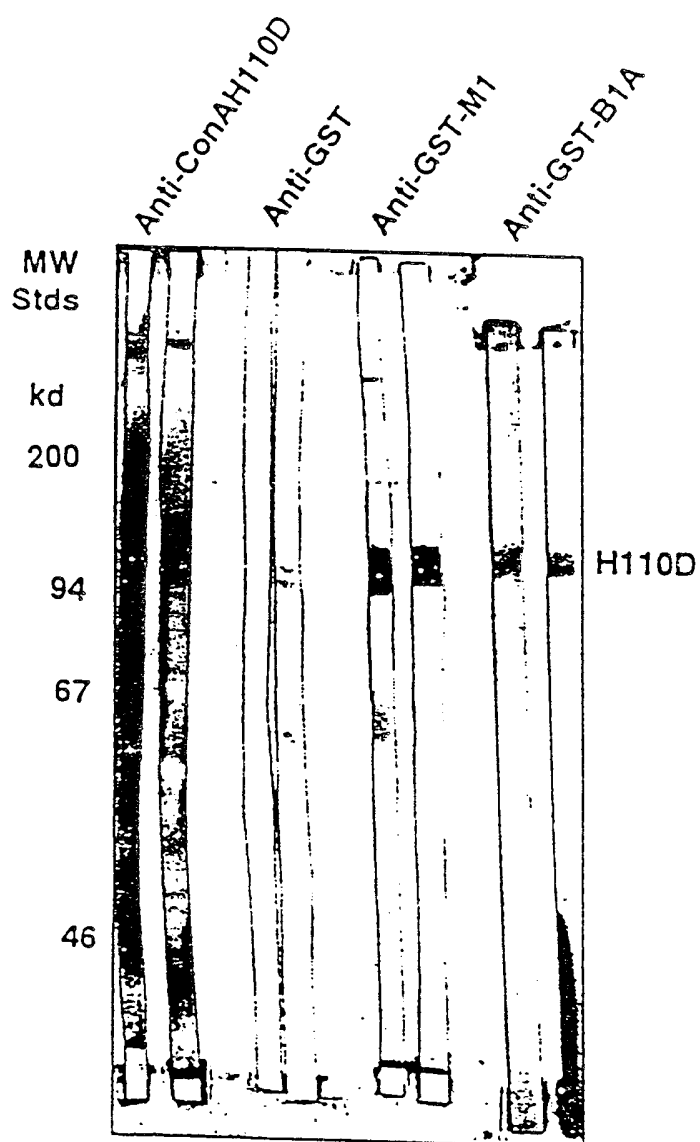
31/44

FIG. 11



32/44

FIG. 12



33/4Δ

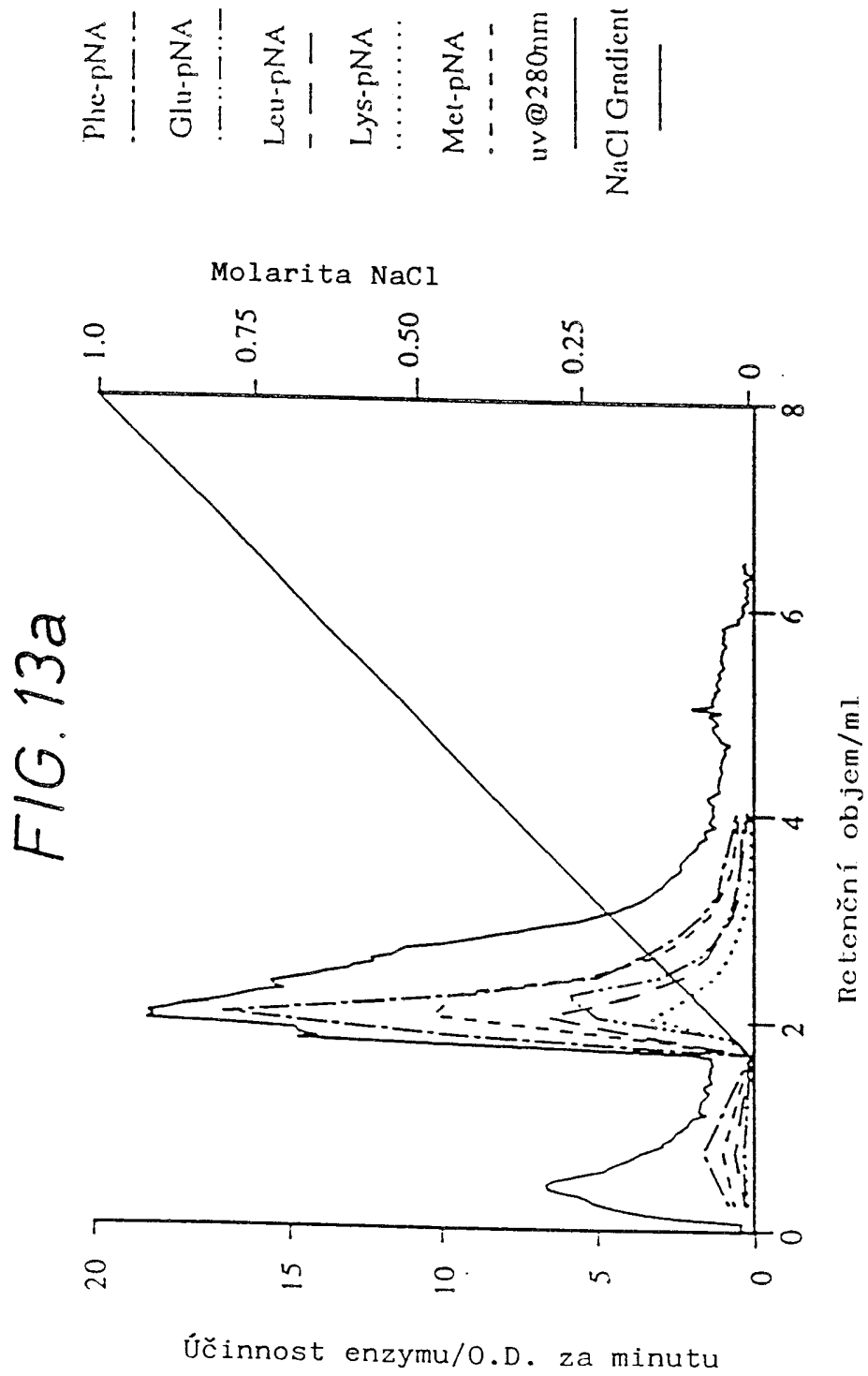
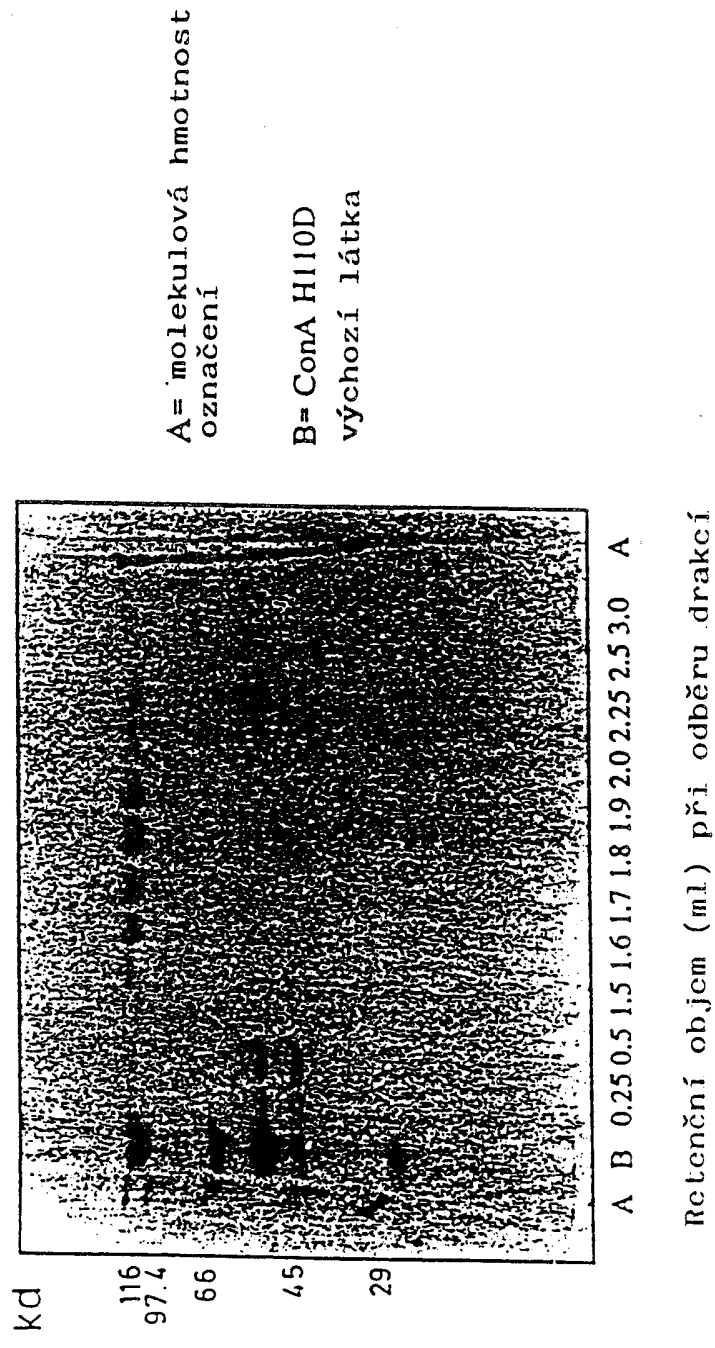
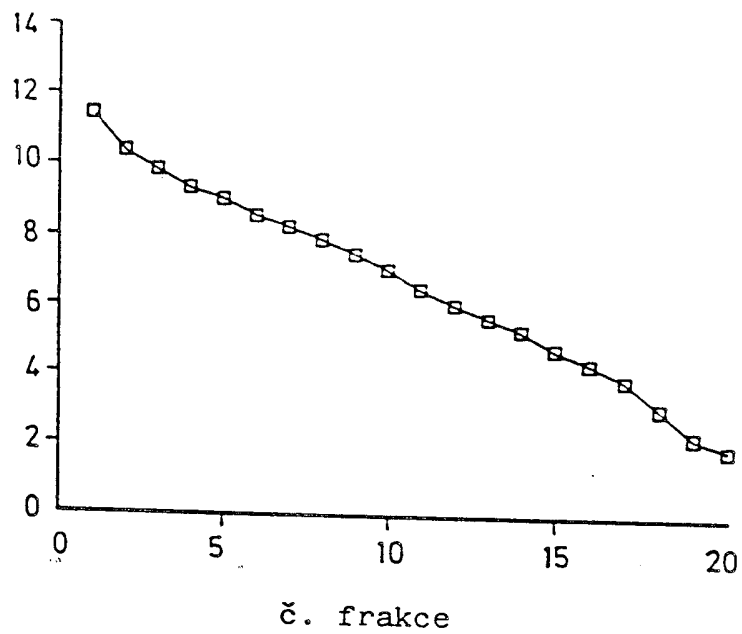


FIG. 13b



35/44

FIG.14a



molekulová
hmotnost
(tisíce)

FIG.14b

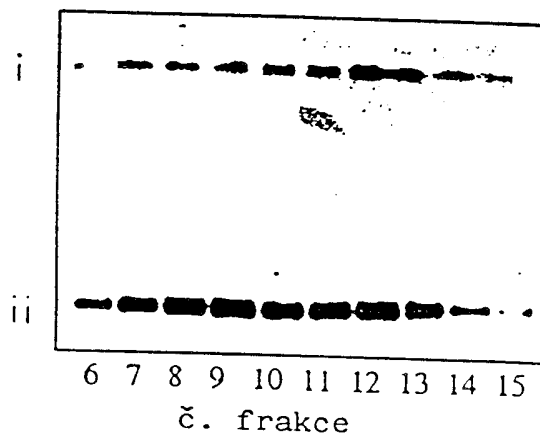
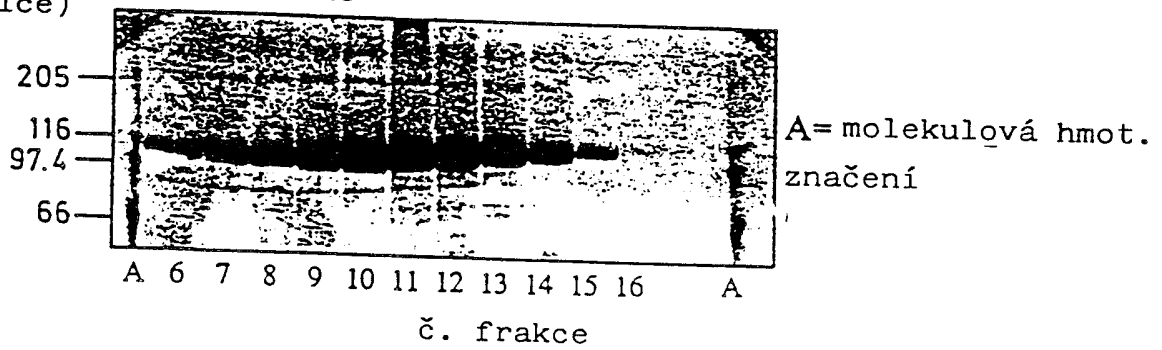
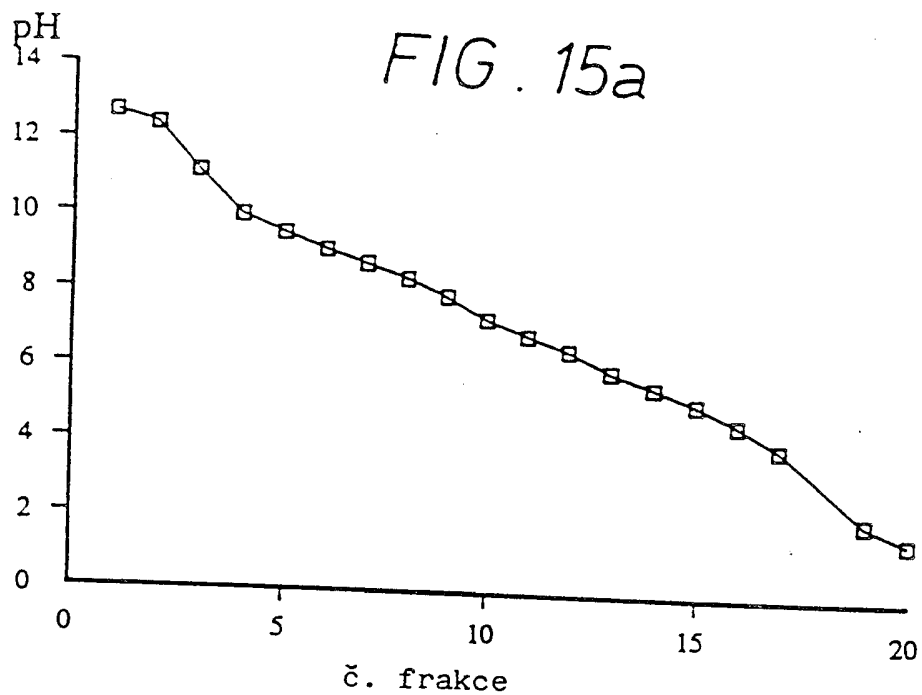
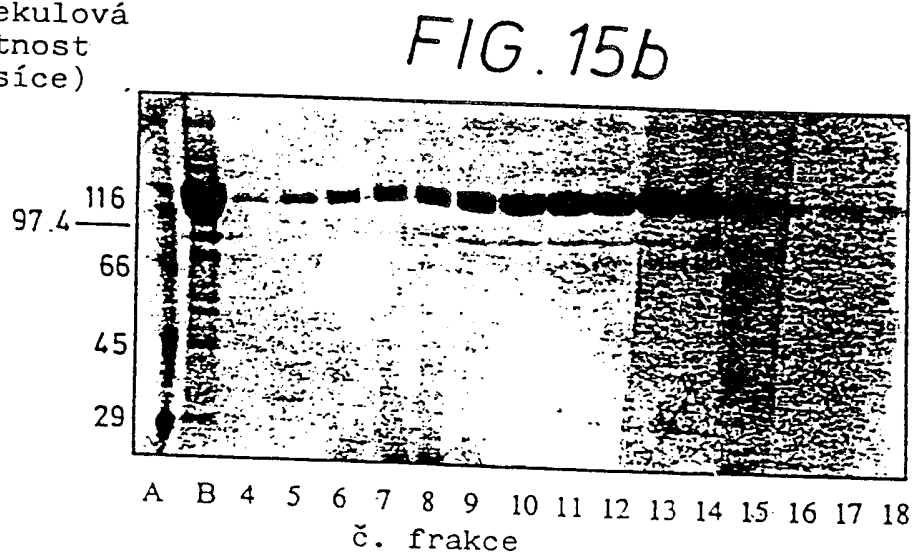


FIG.14c

36/44



molekulová
hmotnost
(tisíce)

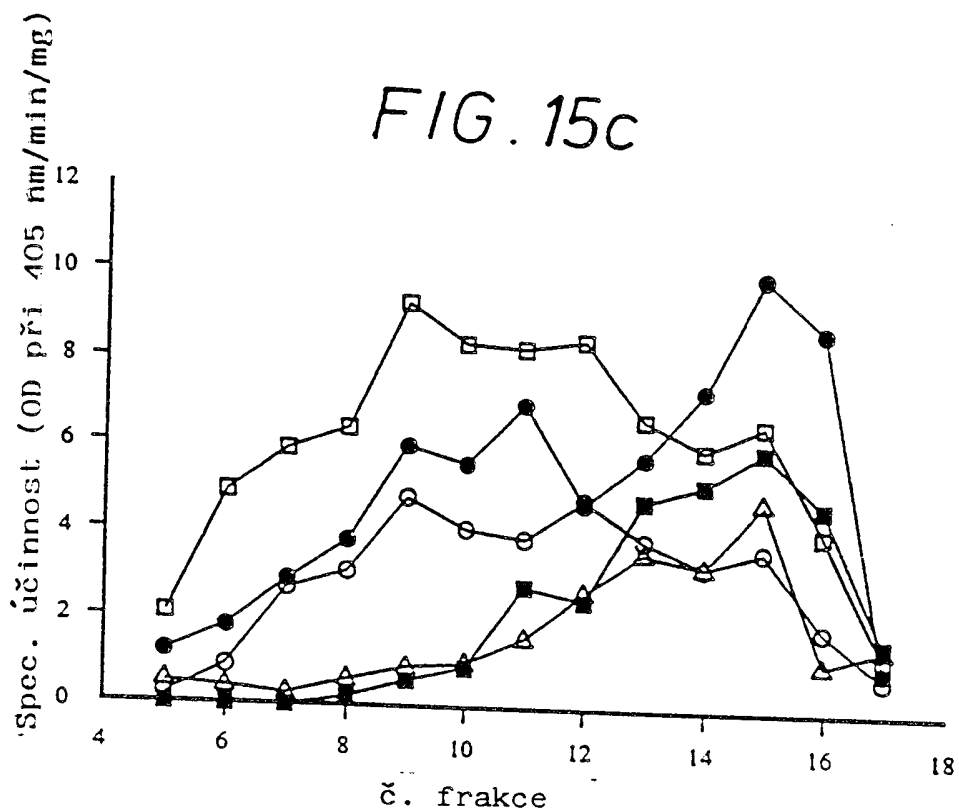


A = molekulová hmotnost
značení

B = ConA H110D
váchozí látka

37/44

FIG. 15c



- fenylalanin
- △— Lysine
- Leucin
- α kyselina glutamová
- Methionin

38/44

FIG.16a

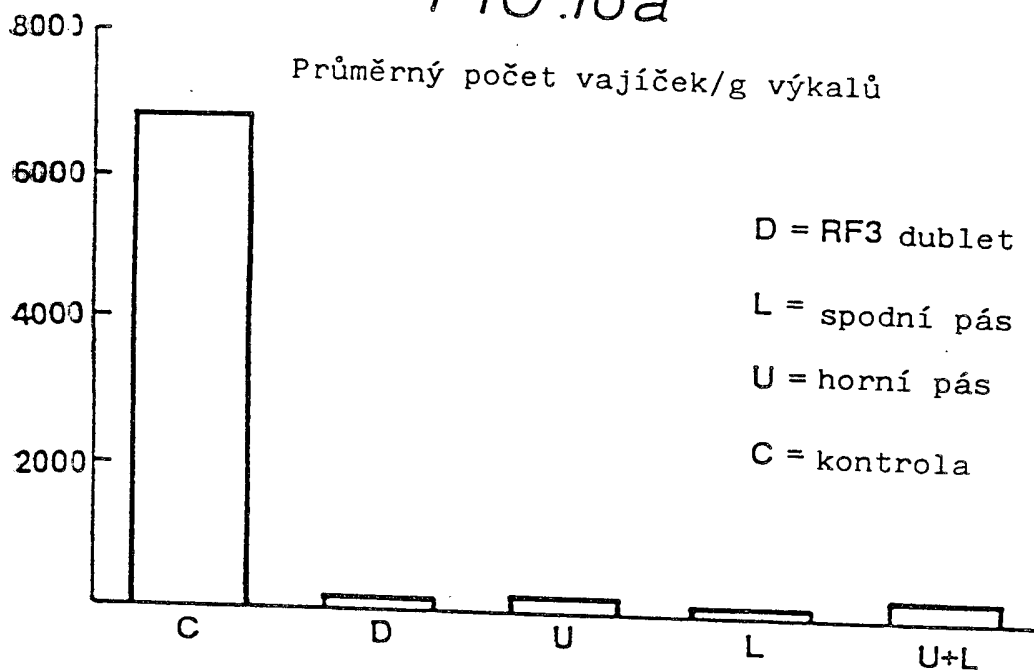
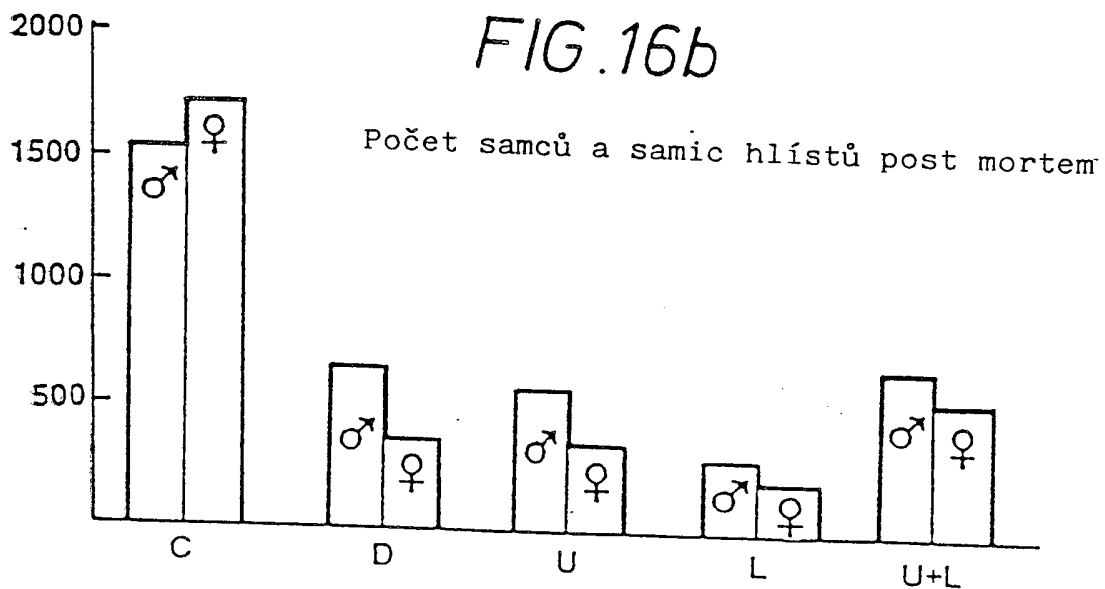
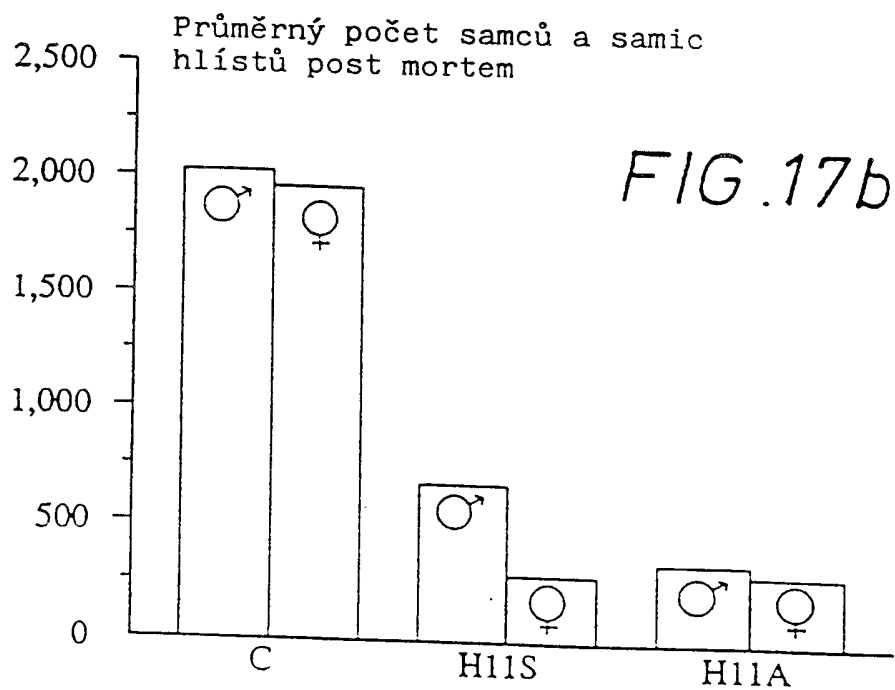
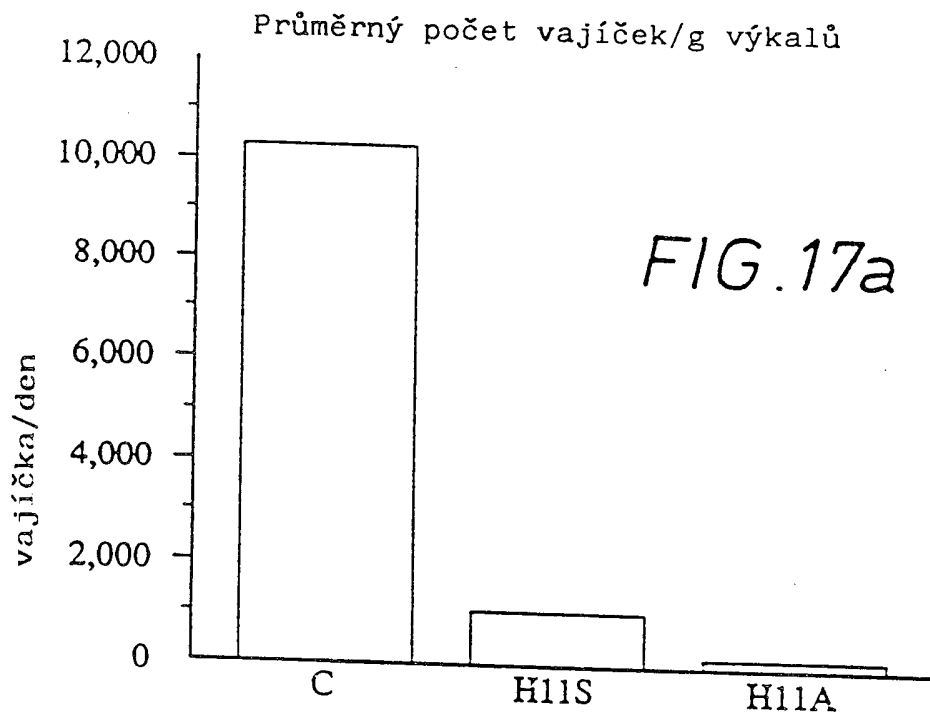


FIG.16b



39/44



40/44

FIG. 18a)i

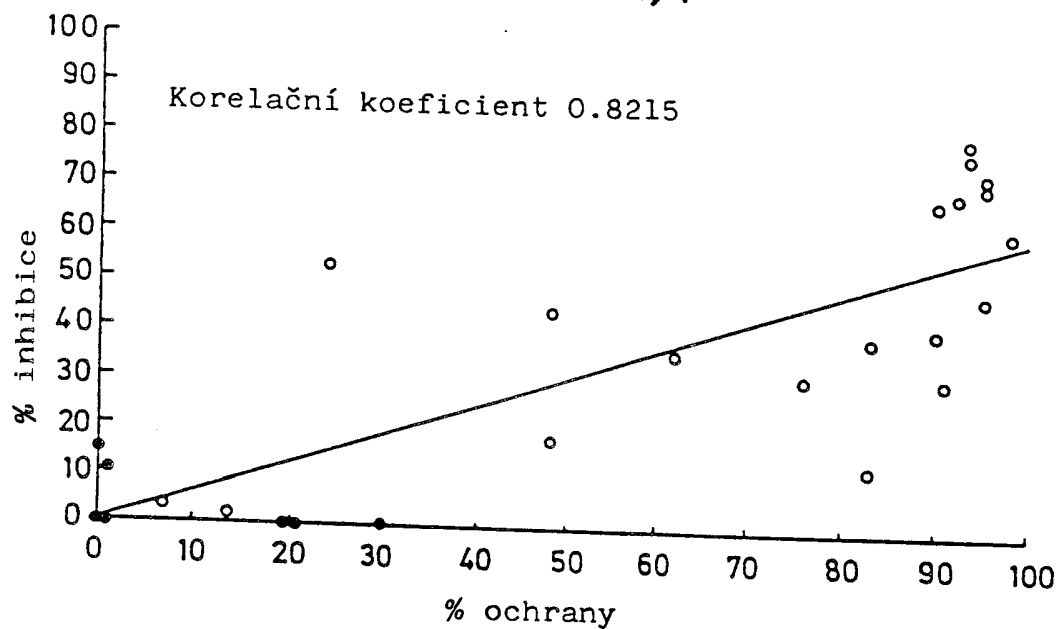
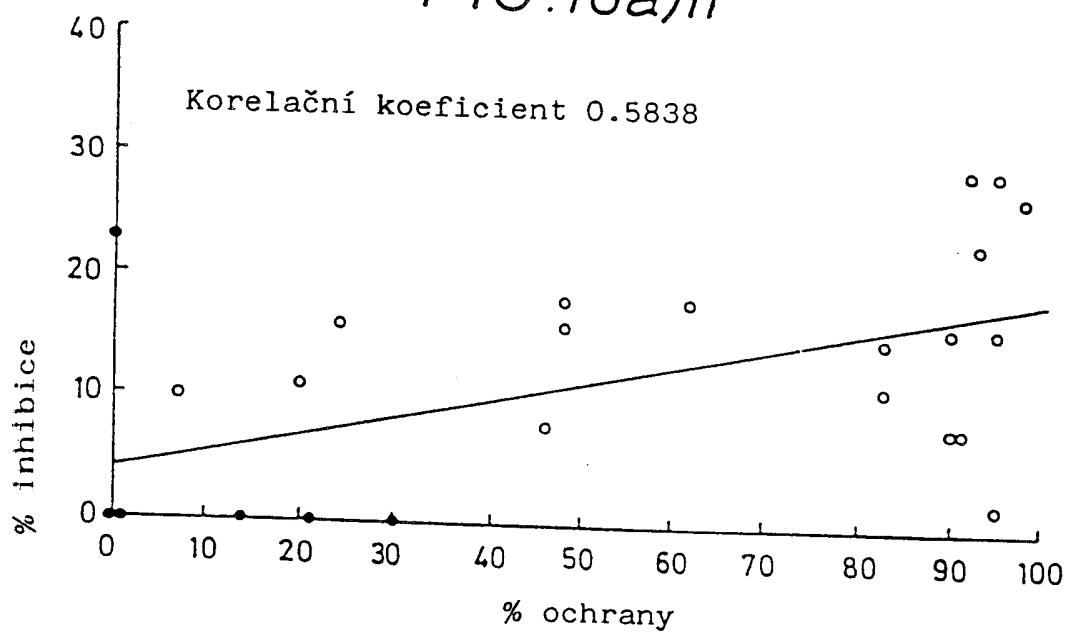


FIG. 18a)ii



41/44

FIG.18b)i

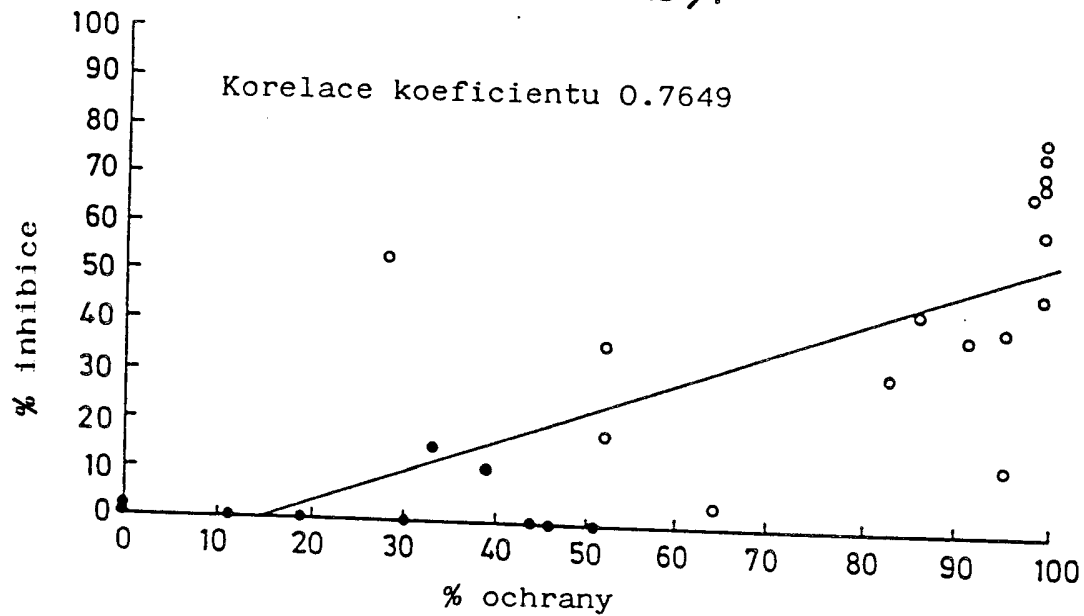
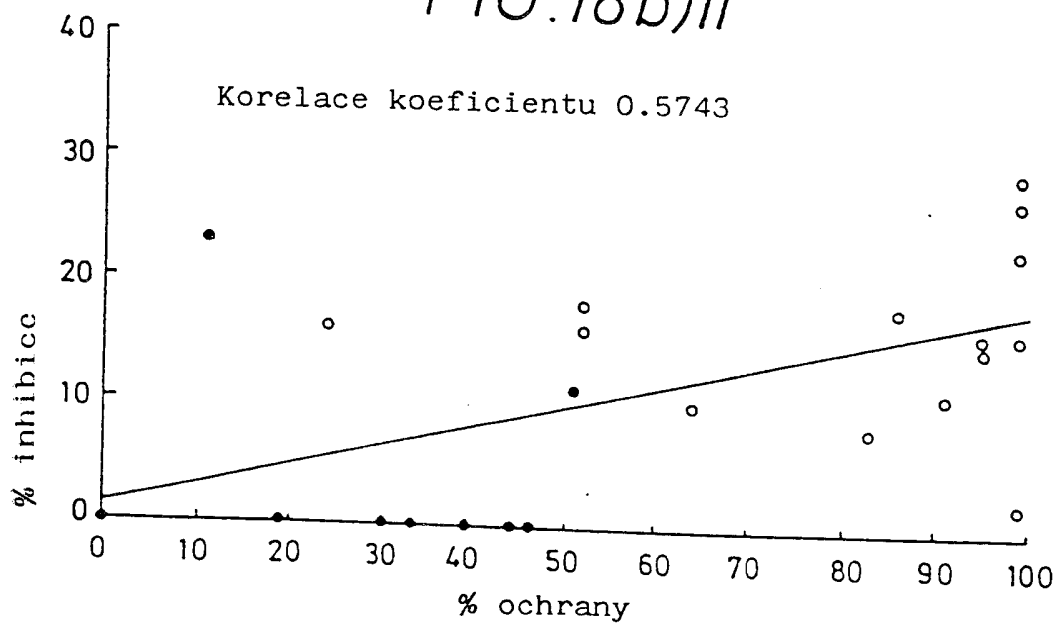


FIG.18b)ii



42/44

FIG. 19a

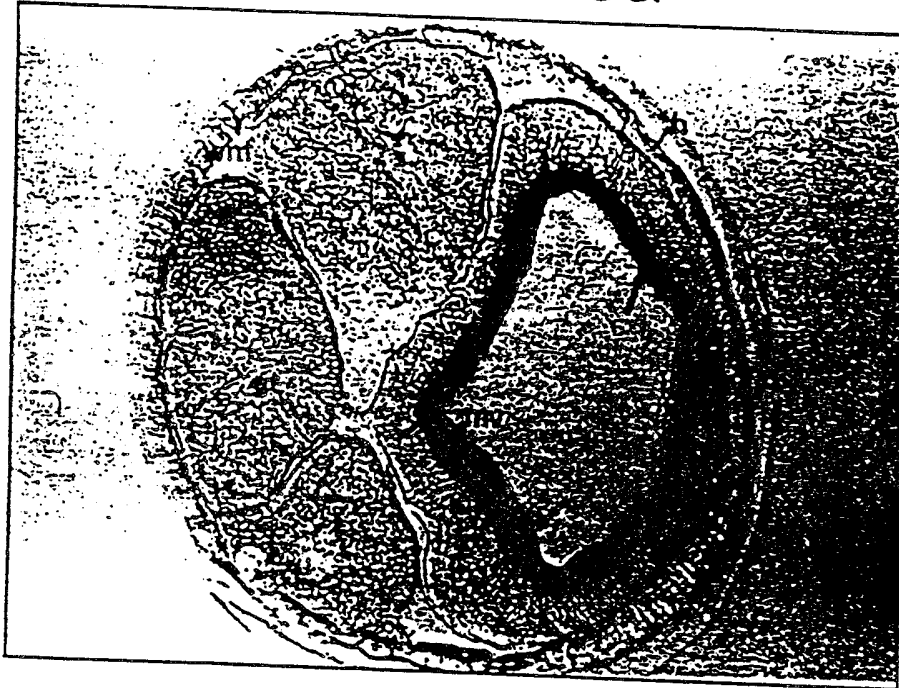


FIG. 19b

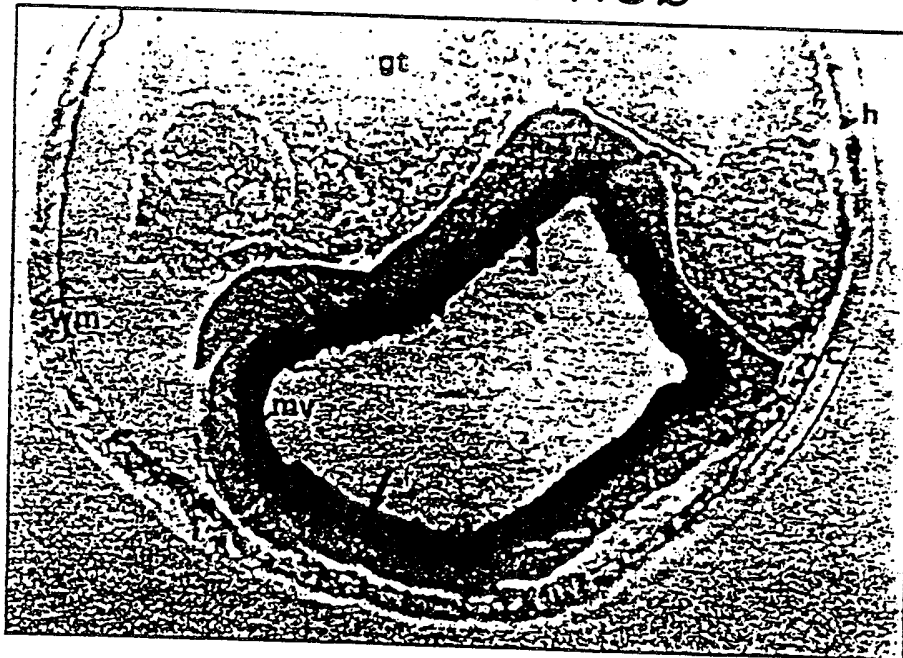
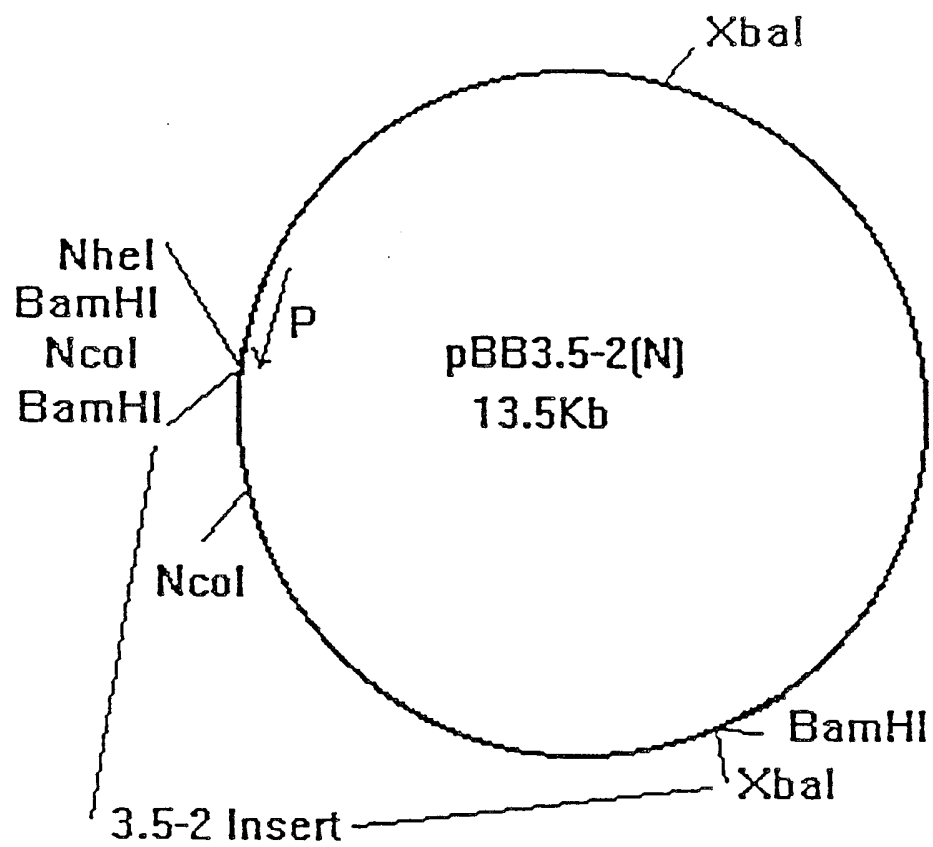


FIG. 20



P = polyhedrinový promotor

44/44

FIG. 21

