

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 108526 A
7(51) C 12 Q 1/00



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 108526

(22) Заявено на 13.01.2004

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 302077	(32) 28.06.2001	(33) US
365956	19.03.2002	US
369224	29.03.2002	US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 9 на 30.09.2004

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

CHIRON CORPORATION
EMERYVILLE, CA (US)

(72) Изобретател(и):

Sergio Pichuantes, El Cerrito, CA
Venkatakrishna Shyamala, Oakland, CA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Фани Владимирова Божинова,
1000 София, п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:

PCT/US2002/020684, 28.06.2002

(87) № и дата на PCT публикация:

WO2003/002753, 09.01.2003

(54) ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ НА PARVOVIRUS B19

(57) Изобретението се отнася до праймери и проби на човешки Parvovirus B19, произлезли от консервативни области на генома на Parvovirus B19, до изследвания, основаващи се на нуклеинови киселини, при които се използват праймерите и пробите.

83 претенции

BG 108526 A

ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ НА PARVOVIRUS B19

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение се отнася най-общо до вирусна диагностика. По-специално, изобретението се отнася до изследвания на основата на нуклеинови киселини за прецизна диагностика на инфекции, причинени от Parvovirus B19 и праймери и проби за използване в тези изследвания.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Човешкия Parvovirus B19 е член на семейството на Parvoviridae, род Erythrovirus и е малък 22-nm двадесетостеннен вирус без обвивка с линейна едноверижна ДНК молекула от приблизително 5,600 нуклеотида. Вирусният геном кодира три главни протеина, VP1, VP2 и NS1. виж Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 и фигура 1, от настоящото. VP1 (83 kDa) и VP2 (58 kDa) са структурни протеини от

капсида. Двата протеина се кодират в препокриващи се рамки на разчитане от приблизителен брой нуклеотиди 2444 до 4789 и от приблизително 3125 до 4789, съответно. VP2 съставя 95% от капсида, а големия VP1 протеин единствено 5% от капсида. VP1 е необходим за зрялата конформация на вируса. NS1 (77 kDa) е неструктурен протеин и присъства единствено в ядрената фракция на инфектирани клетки и липсва в цитоплазмата и в интактен вирион в серумите.

Parvovirus B19 е открит първоначално в серуми от нормални кръвни донори и е единствения член на семейството на Parvoviridae, известен да е патогенен при хора. Вирусът се асоциира със широк кръг болестни прояви. Човешкият Parvovirus B19 обикновено причинява асимптомна или самоограничаваща се инфекция при деца. При възрастни, Parvovirus B19 може да причини обрив, преходнасиметрична полиартралгия и артрит. Parvovirus B19 се асоциира с преходна апластична криза (ТАС) при пациенти с подчертани химолитични смущения. Съобщава се за хронична B19 инфекция и персистираща анемия при имунокомпрометирани пациенти с остра анемия, вроден имунодефицит, СПИН, и след трансплантация на костен мозък. Parvovirus B19 се асоциира, също така с ембрионална смърт при бременни жени.

В повечето страни, B19 вирусна инфекция обикновено се среща в детска възраст, като приблизително 50% от децата имат анти-B19 антитела до възраст от 15 години. Преобладаването на B19 антитялото може после да се увеличи по време на живота и да достигне стойности по-високи от 90% при възрастни индивиди.

При човешка Parvovirus B19 инфекция, първоначално вирусна реепликация се предполага, че се състои в респираторния тракт. След това, вирусът се насочва към клетки от костния мозък. Това води до широкомащабна вирусна репликация със съобщения за вiremия от 10^2 до 10^{14} частици/ml, което се случва 7-10 дни след инфектирането, но преди проявата на симптоми. Прекратяването на вiremията съвпада с откриването на специфични IgM антитела, които се запазват във високи нива в продължение на два, три месеца. Анти-B19 IgG антитела се откриват няколко дни след появата на IgM антителата и остават през останалата част на живота.

Липсата на липидна обвивка и ограниченото съдържание на ДНК прави Parvovirus B19 изключително резистентен на физикохимично инактивиране. Документирано е Parvovirus B19, особено във високи концентрации, че може да издържи на конвенционално температурно инактивиране на кръвни продукти и предаване на Parvovirus B19 чрез прилагане на разтворител-детергент-обработен фактор VIII и поточно- или сухо-изсушен фактор VIII и XI препарати.

Човешки Parvovirus B19 не може да се култивира в конвенционални клетъчни култури, което прави лабораторното откриване и изолиране на вируса изключително трудно. Следователно, в продължение на много години, единственият източник на антиген се състоял в серуми от вiremични (с вирус) пациенти. В опит да се преодолеят тези проблеми са продуцирани рекомбинантни антигени, за използване в серологични изследвания. Виж Sisk and Berman, Biotechnology (1987) 5:1077-1080; U.S. Patent No 6,204,044. изследвания на имуноензиматично улавяне на IgM са използвани за откриване

на анти-B19 IgM, както и за диагностициране на скорошна B19 инфекция. диагностичното изпълнение на на голям брой достъпни на пазара тестове, въпреки това, не е хомогенно. В допълнение, основани на IgM диагностични тестове не могат да открият вируса по време на вiremичния етап на инфекцията, и щом като се синтезират IgM антитела, те могат да останат в кръвообръщението в продължение на няколко месеца след края на вiremията.

Широкото разпространение на B19 антитела в нормална популация, заедно с факта, че силната вiremия обикновено се задържа само за една седмица, прави използването на серологично основаващи се тестове непрактично. В допълнение, при имунокомпрометирани пациенти, серологичната диагноза може да е несигурна.

Изследвания, базирани се на хибридизирането на нуклеинови киселини, като dot blot и in situ хибридизиране, са използвани за откриване на B19. тези изследвания обикновено имат ограничения на откриваемост от 0,1 pg вирусна ДНК ($\sim 10^4$ - 10^5 вирусни частици). PCR е с по-голяма чувствителност (~ 100 геномни копия). Въпреки това, техниките за хибридизиране на ДНК са трудоемки и ограничени по отношение на използването е PCR е непрактично за скриниране на голям брой проби.

Поради това, остава необходимост от развитието на сигурни диагностични тестове за откриване на Parvovirus B19 във вiremични проби, с цел да се предотврати предаването на вируса чрез кръвни и плъзмени производни или чрез близък личен контакт.

СЪДЪРЖАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение се основава на откриването на единствени праймери и проби за използване при изследвания, базираци се на нуклеинови киселини, както и на развитието на чувствителен, сигурен диагностичен тест, базиращ се на нуклеинови киселини за откриване на Parvovirus B19 ДНК в биологични проби от потенциално инфектирани индивиди. Описаните в настоящото техники използват екстрахирана проба ДНК, като матрица за амплифициране на консервативни геномни области от B19 последователност, при използване на транскрипционно медирана амплификация (ТМА), както и при 5' нуклеазни изследвания, като TaqMan™ техника. Методите дават възможност за откриване на B19 ДНК във времеични проби, притежаващи вирусни титри, толкова ниски, колкото 10^3 вирусни частици /ml. В съответствие, инфектираните проби могат да се идентифицират и да се изключат от преливане на кръв, както и от приготвянето на кръвни производни продукти. Пробите и праймерите, описани в настоящото, са полезни, също така, при например, стандартни хибридизационни методи, както при основаващи се на PCR техники, амплифициране на основата на последователности на нуклеинови киселини (NASBA) и изследвания, които използват разклонени ДНК молекули.

В съответствие, при един вариант за изпълнение, настоящото изобретение е насочено към метод за откриване на инфекция на човешки Parvovirus B19 в биологични проби. Методът се състои от:

(а) изолира се нуклеинова киселина от биологична проба, за която се подозира, че съдържа ДНК от човешки

Parvovirus B19, където нуклеиновата киселина включва РНК-ова последователност мишена;

(b) изолираната нуклеинова киселина на Parvovirus B19 влиза в реакция с един първи олигонуклеотид, който съдържа един първи праймер, съдържащ последователност образуваща комплекс, достатъчно комплементарна на 3'-терминален участък от РНК-ова последователност мишена за създаване на комплекс с нея, при което първият праймер съдържа, също така, промотор за ДНК-зависима РНК полимераза 5' и операционно свързана към последователността образуваща комплекс, като реагирането се осъществява при условия, които обезпечават образуването на комплекс олигонуклеотид/ мишена последователност и инициирането на синтез на ДНК;

(c) удължава се първият праймер при едана реакция на удължаване, като се използва РНК-овата последователност мишена, като матрица за получаване на първия продукт на удължаване на ДНК праймера, комплементарен на РНК-овата последователност мишена;

(d) отделяне на първия продукт на удължаване на ДНК праймера от РНК-овата последователност мишена, при използванена ензим, който избирателно разгражда РНК-овата последователност мишена;

(e) третира се продукта на удължаване на ДНК праймера с втори олигонуклеотид, който съдържа втори праймер, включващ последователност, образуваща комплекс, достатъчно комплементарна на 3'-терминалния участък на продукта на удължаване на ДНК праймера с него, при условия, обезпечавачи образуването на

олигонуклеотид/мишена последователност комплекс и инициране на синтез на ДНК;

(f) удължава се 3'-терминуса на втория праймер при реакцията за удължаването на ДНК, за да се получи втори продукт на удължаване на ДНК праймера, като по този начин се продуцира матрица за ДНК-зависимата РНК полимераза;

(g) матрицата се използва за продуциране на множество РНК копия на последователността мишена, като се използва ДНК-зависима РНК полимераза, която разпознава промоторната последователност; и

(h) използват се РНК копията от етап (g), автокаталитично повторение на етапите (b) до (g) за амплифициране на последователността мишена.

При някои варианти за изпълнение на изобретението, методът включва, също така, етапите на :

(i) прибавя се олигонуклеотидната проба към продукта от етап (h), при което олигонуклеотидната проба става комплементарна на участък от последователността мишена , при условия, които обезпечават хибридизация на пробата с последователността мишена, за да образуват комплекс проба:мишена ; и

(j) открива се присъствието или отсъствието на маркар, като индикация за присъствие или отсъствие на последователността мишена.

При един друг вариант за изпълнение, се бележи с акридинов естер.

При друг вариант за изпълнение, първият и вторият праймери, и пробата, които се използват в методите, произлизат от VP1 областта на генома на човешки Parvovirus

B19, както и от полинуклеотидната последователност, посочена на коя да е от фигурите 2A-2U или 11A-11Z.

При един друг вариант за изпълнение, изобретението е насочено към метод за откриване на инфекция на човешки Parvovirus B19 в биологична проба. Методът включва:

(a) изолира се нуклеинова киселина от биологична проба, за която се подозира, че съдържа ДНК от човешки Parvovirus B19, където нуклеиновата киселина включва РНК-ова последователност мишена;

(b) изолираната нуклеинова киселина на Parvovirus B19 влиза в реакция с един първи олигонуклеотид, който съдържа един първи праймер, съдържащ последователност образуваща комплекс, достатъчно комплементарна на 3'-терминален участък от РНК-овата последователност мишена за създаване на комплекс с нея, при което първият праймер съдържа, също така, промотор за ДНК-зависима РНК полимераза 5' и е операционно свързана към последователността образуваща комплекс, като първият праймер съдържа последователност, произлезла от полинуклеотидната последователност, посочена на коя да е от фигурите 2A-2U или фигурите 11A-11Z и реакцията се провежда при условия, които обезпечават образуването на комплекс олигонуклеотид/мишена последователност и инициирането на синтеза на ДНК;

(c) удължава се първият праймер при едана реакция на удължаване, като се използва РНК-овата последователност мишена, като матрица за получаване на първия продукт на удължаване на ДНК праймера, комплементарен на РНК-овата последователност мишена;

(d) отделя се първия продукт на удължаване на ДНК праймера от РНК-овата последователност мишена, при използване на ензим, който избирателно разгражда РНК-овата последователност мишена;

(e) третира се продукта на удължаване на ДНК праймера с втори олигонуклеотид, който съдържа втори праймер, включващ последователност, образуваща комплекс, достатъчно комплементарна на 3'-терминалния участък на продукта на удължаване на ДНК праймера с него, при което вторият праймер произлиза от полинуклеотидната последователност, посочена на коя да е от фигурите 2A-2U или фигурите 11A-11Z и третирането се провежда при условия, които обезпечават образуването на комплекс олигонуклеотид/мишена последователност и инициирането на синтеза на ДНК;

(f) удължава се 3'-терминуса на втория праймер при реакцията за удължаването на ДНК, за да се получи втори продукт на удължаване на ДНК праймера, като по този начин се продуцира матрица за ДНК-зависимата РНК полимераза;

(g) матрицата се използва за продуциране на множество РНК копия на последователността мишена, като се използва ДНК-зависима РНК полимераза, която разпознава промоторната последователност; и

(h) използват се РНК копията от етап (g), автокаталитично повторение на етапите (b) до (g) за амплифициране на последователността мишена;

(i) прибавя се проба на олигонуклеотид, белязан с акридинов естер към продукта от етап (h), при което олигонуклеотидната проба става комплементарна на участък

от последователността мишена, като пробата произлиза от полинуклеотидна последователност, посочена на коя да е от фигурите 2A-2U, като пробата се прибавя при условия, които обезпечават хибридизирането на пробата с последователността мишена, за да образуват комплекс проба:мишена ; и

(j) открива се присъствието или отсъствието на маркер, като индикация за присъствие или отсъствие на последователността мишена.

При един друг вариант за изпълнение, изобретението се отнася до метод за амплифициране на нуклеотидна последователност мишена на Parvovirus B19. методът включва:

а) изолира се нуклеинова киселина от биологична проба, за която се подозира, че съдържа ДНК от човешки Parvovirus B19, където нуклеиновата киселина включва РНК-ова последователност мишена;

(b) прибавят се един или повече праймери, способни да хибридизират към РНК-ова последователност мишена, където единият или повече праймери произлизат от полинуклеотидната последователност, посочена на която и да е фигура от 2A-2U и фигури 11A до 11Z;

(c) удължават се единият или повече праймери, като се използва полимераза;

При някои варианти за изпълнение на изобретението, РНК-овата последователност мишена от етап (a) се транскрибира обратно, за да осигури сДНК и методът може да включва, осван това, амплифициране на сДНК, при използване на полимеразна верижна леакция (RT-PCR) или

асиметрична гар лигазна верижна реакция (RT-AGLCR). При други варианти за изпълнение, полимеразата е термостабилна полимераза, като, но без да се ограничава до, Taq полимераза или Vent полимераза. В допълнителни варианти за изпълнение, полимеразата е E. coli ДНК полимераза I, Klenow фрагмент от E. coli ДНК полимераза I, или T4 ДНК полимераза.

При някои варианти на различните методи, описани по-горе, се предоставя вътрешен контрол. Ватрешният контрол може да произлиза от последователност на фигура 12 (SEQ ID NO:92). При други варианти за изпълнение, вътрешният контрол включва SEQ ID NO:90.

При допълнителни варианти за изпълнение, изобретението се отнася до метод за откриване на инфекция на човешки Parvovirus B19 в биологична проба. Методът включва:

а) изолира се нуклеинова киселина от биологична проба, за която се подозира, че съдържа ДНК от човешки Parvovirus B19, където нуклеиновата киселина включва последователност мишена;

(b) изолираната нуклеинова киселина на Parvovirus B19 влиза в реакция с откриваемо маркирана проба, достатъчно комплементарна към и способна да хибридизира с последователност мишена, при което пробата произлиза от полинуклеотидната последователност; посочена на която и да е от фигури 2A-2U и фигури 11A-11Z, и освен това, където реагирането се провежда при условия, обезпечаващи образуването на комплекс проба/мишена последователност; и

(с) открива се присъствието или отсъствието на маркер, като индикация за присъствие или отсъствие на последователност мишена.

При други варианти за изпълнение, изобретението се отнася до полинуклеотид, който съдържа нуклеотидна последователност, включваща която и да е от нуклеотидните последователности, посочени на фигури 2A-2U или фигури 11A-11Z.

При допълнителни варианти за изпълнение, изобретението се отнася до полинуклеотид, както по-горе, където нуклеотидната последователност се състои от нуклеотидна последователност, посочена на фигури 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O, 2P, 2Q, 2R, 2S, 2T, 2U, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G, 11H, 11J, 11K, 11L, 11M, 11N, 11O, 11P, 11Q, 11R, 11S, 11T, 11U, 11V, 11W, 11X, 11Y и 11Z.

При още по-други варианти за изпълнение, въпросното изобретение се отнася до полинуклеотид, включващ нуклеотидна последователност, съдържаща която и да е от нуклеотидните последователности, посочени на фигури 3A-3C или 4A-4C.

При допълнителни варианти за изпълнение, изобретението е насочено към полинуклеотид, както по-горе, където нуклеотидната последователност се състои от нуклеотидна последователност, посочена на посочени на фигури 3A-3C или 4A-4C.

При друг вариант за изпълнение, изобретението се отнася до олигонуклеотиден праймер, състоящ се от промоторна област, който разпознава ДНК-зависима РТК

полимераза, операционно свързана към човешки Parvovirus B19-специфична образуваща комплекс последователност от приблизително 10 до приблизително 75 нуклеотида. При някои варианти за изпълнение, промоторната област е T7 промотор и посочената полимераза е T7 РНК полимераза. Допълнително, човешки Parvovirus B19-специфична последователност може да е образуващата от VP1 областта на генома на човешки Parvovirus B19, както и от полинуклеотидната последователност, посочена на коя да е от фигури 2A-2U или 11A-11Z.

При други варианти за изпълнение, изобретението се отнася до олигонуклеотиден праймер от T7 промотор, операционно свързан с човешки Parvovirus B19-специфична, образуваща комплекс последователност от приблизително 10 до приблизително 75 нуклеотида, където човешката Parvovirus B19-специфична образуваща комплекс последователност произлиза от полинуклеотидна последователност, посочена на коя да е от фигури 2A-2U или 11A-11Z.

При друг вариант за изпълнение, изобретението се отнася до олигонуклеотидна проба, включваща Parvovirus B19-специфична хибридираща последователност от приблизително 10 до приблизително 50 нуклеотида, свързани към маркер от акридинов естер. При някои варианти за изпълнение, човешка Parvovirus B19-специфична хибридираща последователност е от VP1 областта на генома на човешки Parvovirus B19, както и от полинуклеотидна последователност, посочена на коя да е от фигури 2A-2U или 11A-11Z.

При друг допълнителна вариант, изобретението се отнася до диагностичен тест комплект, включващ един или повече олигонуклеотидни праймери, описани в настоящото, и инструкции за провеждане на диагностичния тест. При някои варианти, тест комплектът съдържа, освен това, олигонуклеотидна проба, съдържаща Parvovirus B19-специфична хибридираща последователност от приблизително 10 до приблизително 50 нуклеотида, свързани към маркер от акридинов естер.

Тези, както и други аспекти на настоящото изобретение ще се изяснят от следващото подробно описание и прилежащите фигури.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фигура 1 е диаграмно представяне на генома на човешки Parvovirus B19, което обрисова различните кодиращи области на вируса. Три PCR фрагмента са изобразени, единия с приблизително 700 bp, съответстващ на нуклеотидни позиции 2936-3635 от генома на Parvovirus B19, описан в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936; един с приблизително 370 bp в 700 bp фрагмента, съответстващ на нуклеотидни позиции 3073-3442 от генома на Parvovirus B19, описан в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936; и един с приблизително 214 bp, съответстващ на нуклеотидни позиции 4728-4941 от генома на Parvovirus B19, описан в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

Фигури 2A до 2U (SEQ ID NOS 1-21) показват ДНК последователности от различни Parvovirus B19 изолати, които включват последователности, съответстващи на нуклеотидни

позиции 2936-3635 от генома на Parvovirus B19, описан от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 (700 bp фрагментът от фигура 1). Фигура 2A (SEQ ID NO:1) е съответната последователност от изолат CH47-26; Фигура 2B (SEQ ID NO:2) е съответната последователност от изолат CH48-29; Фигура 2C (SEQ ID NO:3) е съответната последователност от изолат CH33-2; Фигура 2D (SEQ ID NO:4) е съответната последователност от изолат CH33-3; Фигура 2E (SEQ ID NO:5) е съответната последователност от изолат CH33-4; Фигура 2F (SEQ ID NO:6) е съответната последователност от изолат CH42-7; Фигура 2G (SEQ ID NO:7) е съответната последователност от изолат CH42-18; Фигура 2H (SEQ ID NO:8) е съответната последователност от изолат CH42-19; Фигура 2I (SEQ ID NO:9) е съответната последователност от изолат CH46-23; Фигура 2J (SEQ ID NO:10) е съответната последователност от изолат CH1-1; Фигура 2K (SEQ ID NO:11) е съответната последователност от изолат CH1-6; Фигура 2L (SEQ ID NO:12) е съответната последователност от изолат CH2-8; Фигура 2M (SEQ ID NO:13) е съответната последователност от изолат CH2-10; Фигура 2N (SEQ ID NO:14) е съответната последователност от изолат CH2-11C; Фигура 2O (SEQ ID NO:15) е съответната последователност от изолат CH5-13; Фигура 2P (SEQ ID NO:16) е съответната последователност от изолат CH7-22; Фигура 2Q (SEQ ID NO:17) е съответната последователност от изолат CH13-27; Фигура 2R (SEQ ID NO:18) е съответната последователност от изолат CH14-33; Фигура 2S (SEQ ID NO:19) е съответната последователност от изолат CH62-2; Фигура 2T (SEQ ID NO:20) е съответната последователност от изолат CH64-2;

Фигура 2U (SEQ ID NO:21) е съответната последователност от изолат CH67-2.

Фигури 3A-3C (SEQ ID NO:22) показва последователност за приблизително 4,7 kbp PCR фрагмент, показан на фигура 1 от Parvovirus B19 клон 2-B1. Последователността е фрагмент от 4677 нуклеотида, съответстващ на нуклеотидни позиции 217-4893 от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Изобразената последователност съдържа отворена рамка на четен в пълна дължина на Parvovirus B19, която кодира NS1, VP1 и VP2, и допълнителни 5' и 3' натранслирани последователности.

Фигури 4A-4C (SEQ ID NO:23) показва последователност за приблизително 4,7 kbp PCR фрагмент, показан на фигура 1 от Parvovirus B19 клон 2-B6. Последователността е фрагмент от 4677 нуклеотида, съответстващ на нуклеотидни позиции 217-4893 от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Изобразената последователност съдържа отворена рамка на четен в пълна дължина на Parvovirus B19, която кодира NS1, VP1 и VP2, и допълнителни 5' и 3' натранслирани последователности.

Фигури 5A (SEQ ID NO:24) и 5B показват (SEQ ID NO:25) NS1 нуклеотина и протеинова последователности, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B1.

Фигури 6A (SEQ ID NO:26) и 6B (SEQ ID NO:27) показват VP1 нуклеотина и протеинова последователности, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B1.

Фигури 7A (SEQ ID NO:28) и 7B (SEQ ID NO:29) показват VP2 нуклеотина и протеинова последователности, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B1.

Фигури 8A (SEQ ID NO:30) и 8B показват (SEQ ID NO:31) NS1 нуклеотина и протеинова последователности, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B6.

Фигури 9A (SEQ ID NO:32) и 9B показват (SEQ ID NO:33) VP1 нуклеотина и протеинова последователности, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B6.

Фигури 10A (SEQ ID NO:34) и 10B показват (SEQ ID NO:35) VP2 нуклеотина и протеинова последователности, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B6.

Фигури 11A до 11Z (SEQ ID NOS:62-87) изобразяват ДНК последователности от различни изолати на Parvovirus B19, които включват последователности съответстващи на нуклеотидни позиции 2936-3635 от генова на Parvovirus B19, описан от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 (700 bp фрагмента от фигура 1). Фигури 11A (SEQ ID NO:62) е съответната последователност от изолат CH80-1; Фигури 11B (SEQ ID NO:63) е съответната последователност от изолат CH81-3; Фигури 11C (SEQ ID NO:64) е съответната последователност от изолат B19SCL1-4; Фигури 11D (SEQ ID NO:65) е съответната последователност от изолат B19SCL2-1; Фигури 11E (SEQ ID NO:66) е съответната последователност от изолат B19SCL3-1; Фигури 11F (SEQ ID NO:67) е съответната последователност от изолат B19SCL4-1; Фигури 11G (SEQ ID NO:68) е съответната последователност от изолат B19SCL5-2; Фигури 11H (SEQ ID NO:69) е съответната последователност от изолат B19SCL6-2; Фигури 11I (SEQ ID NO:70) е съответната последователност от изолат B19SCL7-3; Фигури 11J (SEQ ID NO:71) е съответната последователност от изолат B19SCL8-2; Фигури 11K (SEQ ID NO:72) е

съответната последователност от изолат B19SCL9-1; Фигури 11L (SEQ ID NO:73) е съответната последователност от изолат B19SCL9-9; Фигури 11M (SEQ ID NO:74) е съответната последователност от изолат B19SCL10-2; Фигури 11N (SEQ ID NO:75) е съответната последователност от изолат B19SCL11-1; Фигури 11O (SEQ ID NO:76) е съответната последователност от изолат B19SCL12-1; Фигури 11P (SEQ ID NO:77) е съответната последователност от изолат B19SCL3-3; Фигури 11Q (SEQ ID NO:78) е съответната последователност от изолат B19SCL14-1; Фигури 11R (SEQ ID NO:79) е съответната последователност от изолат B19SCL15-3; Фигури 11S (SEQ ID NO:80) е съответната последователност от изолат B19SCL16-2; Фигури 11T (SEQ ID NO:8165) е съответната последователност от изолат B19SCL17-1; Фигури 11U (SEQ ID NO:82) е съответната последователност от изолат B19SCL18-1; Фигури 11V (SEQ ID NO:83) е съответната последователност от изолат B19SCL19-1; Фигури 11W (SEQ ID NO:84) е съответната последователност от изолат B19SCL20-3; Фигури 11X (SEQ ID NO:85) е съответната последователност от изолат B19SCL21-3; Фигури 11Y (SEQ ID NO:86) е съответната последователност от изолат B19SCL22-11; Фигури 11Z (SEQ ID NO:87) е съответната последователност от изолат B19SCL2-14.

Фигура 12 (SEQ ID NO:92) изобразява примерна последователност, от която вътрешен контрол (IC) може да произлезе, за улавяне на мишената и амплифициране.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

В практиката, настоящото изобретение използва, ако не е уточнено нещо друго, конвенционални методи на химията, биохимията, рекомбинантни ДНК техники и вирусология, във възможностите на специалиста в областа. Такива техники са обяснено напълно в литературата. Виж например, *Fundamental Virology* 2nd edition, vol. I&II (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (World Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (2nd edition, 1989); *Methods in Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, eds., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

Трябва да се отбележи, че както се използва в заявката и прилежащите патентни претенции, формите в единствено число включват множественият форми, ако съдържанието не означава друго. Така, например, литературната отправка "антиген" включва смес от повече от два или повече антигена, и други подобни.

Използват се следните съкращения на аминокиселини в текста:

Аланин : Ala (A)

Аспарагин : Asn (N)

Цестуен : Cys (C)

Глутаминова киселина : Glu (E)

Хистидин : His (H)

Левцин : Leu (L)

Метионин : Met (M)

Пролин : Pro (P)

Треонин : Thr (T)

Тирозин : Tyr (Y)

Аргинин : Arg (R)

Аспаргинова киселина : Asn (D)

Глутаминова киселина : Glu (Q)

Глицин : Gly (G)

Изолевцин : Ile (I)

Лизин : Lys (K)

Фенилаланин : Phe (F)

Серин : Ser (S)

Триптофан : Trp (W)

Валин : Val (V)

I. Дефиниции

При описанието на настоящото изобретение, се използват следните термини, и се счита, че се дефинират, както е посочено по-долу.

Термините “полипептид” и “протеин” се отнасят до полимер на аминокиселинен остатък и не се ограничават до минимална дължина на продукта. Следователно, пептиди, олигопептиди, димери, мултимери, и други подобни, се включват в дефиницията. Термините включват, също така, постекспресионни модификации на полипептида, например, гликозилиране, ацетилиране, фосфорилиране, и други подобни. Освен това, за целите на настоящото изобретение, “полипептид” се отнася до протеин, който включва модификации, като делеции, прибавяния и замествания (най-общо консервативни в природата), до нативна последователност, до толкова, доколкото протеинът

поддържа желаната активност. Тези модификации могат да са преднамерени, като чрез сайт-насочен мутагенез, или могат да са случайни, като чрез мутации в гостоприемника, който продуцира протеините, или грешки, дължащи се на PCR амплифициране.

Полипептид от Parvovirus B19, както е дефиниран по-горе, произлезъл от протеин, кодиран от генома на B19, както от неструктурни протеини, NS1 и NS2, така и от протеини, които образуват вирусния капсид, VP1 (приблизително 781 аминокиселини дължина) или VP2 (приблизително 554 аминокиселини дължина). Представителни NS1, VP1 и VP2 последователности са показани на фигури 5-10 в настоящото. Полипептидът не се нуждае от това, физически да произлиза от Parvovirus B19, но може да е синтетично или рекомбинантно продуциран. Освен това, полипептидът може да произлиза от който и да е от различните щамове и изолати на Parvovirus B19. Известни са голям брой консервативни и вариабилни области измежду тези щамове и изолати и, най-общо, аминокиселинните последователности на, например, епитопи, произлизащи от тези области, беха имали висока степен на хомоложност на последователностите, например хомоложност на аминокиселини от повече от 30%, за предпочитане повече от 40%, когато две последователности са линеаризирани. Така, например, терминът "VP1" полипептид се отнася до нативен VP1 от който и да е от различните щамове и изолати на Parvovirus B19. Пълният генотип и последователности на горните протеини на много щамове на Parvovirus B19 са известни. Виж например, Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936; Gallinella et al., J. Virol.

Methods (1993) 41:203-211. Също така са известни епитопи на Parvovirus B19, произлизащи от тези области. Виж например патент на САЩ № 5,436,127; и международна заявка № WO91/12269.

Термините "аналог" и "мутеин" се отнасят до биологичноактивни производни на сравнителната молекула, или фрагменти на такива производни, които задържат желаната активност, като имунореактивност при диагностичните изследвания. Най-общо, терминът "аналог" се отнася до съединения, които притежават нативни полипептидни последователности и структури с едно или повече прибавяния, замествания (обикновено консервативни в прородата) и/или делеции на аминокиселини, свързани с нотивната молекула, до толкова, доколкото модификациите да не разрушават имуногенната активност. Терминат "мутеин" се отнася до пептид, който притежава един или повече миметици на пептиди ("пептоиди"), като описаните в международна заявка № WO91/04282. За предпочитане, аналогът или мутеинът имат най-малкото подобна имуноактивност, като нативната молекула. Методи за получаване на аналози на полипептиди и мутеини са известни от предшестващото състояние на техниката и са описани по-долу.

Изключително предпочитани аналози включват замествания, които са консервативни в природата, например, тази замествания, които протичат в семайство аминокиселини, които са свързани по тяхните странични варики. По-специално, аминокиселините обикновено се разделят на четири семейства: (1) кисели – аспартат и глутамат; (2) основни – лизин, аргинин, хистидин; (3) неполярни – аланин,

валин, левцин, изолевцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаредени полярни – глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин понякога се класифицират, като ароматни аминокиселини. Например, разумно е да се предскаже, че едно изолирано заместване на ревцин с изолевцин или валин, адин аспартат с глутамат, треонин със серин, или подобно консервативно заместване на аминокиселина със структурно свързана аминокиселина, няма да има голям ефект върху биологичната активност. Например, полипептидът, представляващ интерес може да съдържа приблизително 5-10 консервативни или неконсервативни аминокиселинни замествания, или даже до 15-25 консервативни замествания на аминокиселини, или което и да е цяло число между 5-25, дотолкова, доколкото желаното действие на молекулата да остане интактно. Специалистът в областта може лесно да определи областите на молекулата, представляваща интерес, които могат да допуснат промяна в сравнение с Hoppe/Woods and Kyte-Doolittle plots, така както е известно от предшестващото състояние на техниката.

Под "изолиран" се има предвид, когато се отнася до полипептид, който е отделен от посочената молекула и недвързан от целия организъм, с който молекулата се намира в природата или присъства отсъствието по същество на други биологични макромолекули от същия вид. Терминът "изолиран", по отношение на полинуклеотида е молекула нуклеинова киселина, лишена, като цяло или в частност, от нормални последователности, асоциирани с него в природата; или последователност, както съществува в

природата, но с хетероложни последователности в асоциация с тях; или молекула, дисоциирана от хромозомата.

Полинуклеотидна “произлезла от” или “специфична за” означена последователност се отнася до полинуклеотидна последователност, която съдържа съседна последователност от най-малко приблизително 6 нуклеотида, за предпочитане най-малко приблизително 8 нуклеотида, по-предпочитано най-малко приблизително 10-12 нуклеотида, и даже по-предпочитано най-малко приблизително 15-20 нуклеотида, съответстващи, например, на съответни или комплементарни на, област от означена последователност. Произлезлият полинуклеот не е задължително произлезъл от нуклеотидна последователност, която представлява интерес, но може да се генерира по който и да е начин, включително, но без да се ограничава до, химичен синтез, репликация, обратна транскрипция или транскрипция, което се базира на информацията, предоставена чрез последователността на базите в областта(ите), от която произлиза полинуклеота. Като такава, тя може да представлява или сенс или антисенс ориентация на оригиналния полинуклеотид.

“Хомоложност” се отнася до процента на сходство между два полинуклеотида или две полинуклеотидни частици. Две ДНК, или две полинуклеотидни последователности са “хомоложни по същество” една на друга, когато последователностите проявяват най-малкото приблизително 50%, за предпочитане най-малкото приблизително 70%, по предпочитано най-малкото приблизително 80%-85%, за предпочитане най-малкото приблизително 90%, и най-предпочитано най-малкото приблизително 95%-98%

подобност на последователности при една определена дължина на молекули. Както се използва в настоящото, хомоложност по същество се отнася, също така, до последователности, проявяващи пълна идентичност на определена ДНК или полипептидна последователност.

Най-общо, "идентичен" се отнася до точно съответствие на нуклеотид-към-нуклеотид или аминокиселина-към-аминокиселина на два полинуклеотидни последователности, съответно. Процентът на иденчност може да се определи чрез директно сравняване на информацията от последователността между две молекули чрез линеаризиране на последователности, преброяване на точния брой на съответствия между две линеаризирани последователности, разделяне на дължината на по-късата последователност, и умножение на резултата по 100.

Лесно достъпни компютърни програми могат да се използват в помощ на анализирането на хомоложността и идентичността, като ALIGN, Dayhoff, M. O. in Atlas of Protein Sequence and Structure M. O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, които адаптират алгоритъма на локалната хомоложност на Smith and Waterman Advances in Appl. Math. 2:482-489, 1981 за пептиден анализ. Програми за определяне на хомоложност на нуклеотидна последователност се предоставят от Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (предоставен от Genetics Computer Group, Medison, WI) например, BESTFITT, FASTA и GAP програми, които се основават, също така, на алгоритъма на Smith and Waterman. Програмите лесно се използват със заложените по подразбиране параметри, препоръчани от

производителя и описани в от Wisconsin Sequence Analysis Package, посочен по-долу. Например, процентът на хомоложност на посочена нуклеотидна последователност към посочена за справка последователност може да се опраедели при използване на алгоритъм на хомоложност на Smith and Waterman с таблица на резултатите по подразбиране и gap penalty от шест нуклеотидни позиции.

Друг метод за определяне на процента на хомоложност в контакта на настоящото изобретение е използването на MPSRCH пакетиране на програми, защитени с авторско право от Университета в Edinburg, разработени от John F. Collins and Shane S. Sturrock, и разпространявани от IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). От този комплект пакети, алгоритъма на Smith and Waterman може да се използва, когато параметрите по подразбиране се използват за таблицата с резултатите (например, отворен gap penalty от 12, удължаване на gap penalty на някой, и gap от шест. От генерираните данни от стойността на "съвпадение" се отразява хомоложността на последователностите. Други подходящи програми за изчисляване на процент на идентичност или на сходство между две последователности се обикновено известни от предшестващото състояние на техниката, например, друга програма за линеаризиране BLAST, използвана с параметрите по подразбиране. Например, BLASTIN и BLASTP могат да се използват при употреба на следните параметри по подразбиране: генетичен код = стандартен; филтър = няма; верижност = и двете; скъсяване = 60; очакван = 10; Матрица = BLOSUM62; описания = 50 последователности; сортиране по = НАЙ-ВИСОК РЕЗУЛТАТ; база данни = не прекалена, GenBank

+ EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS трансляция + Swiss протеин + Spupdate + PIR. Подробности за тези програми могат да се открият на следните Интернет адреси : <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Алтернативно, хомоложност може да се определи чрез хибридизиране на полинуклеотиди при условия, при които образуват стабилни дуплекси между хомоложни области, последвано от смилане с специфични-за-единични-вериги нуклеази, и определяне на размера на сляните фрагменти. ДНК последователности, които са хомоложни по същество могат да се идентифицират при експеримент на хибридизиране по Southern при, например, строги условия, както е дефинирано за тази определена система. Дефинирането на подходящите условия на хибридизиране е в уменията на специалиста в областта. Виж например, Sambrook, et al., по-горе; DNA cloning, по-горе; Nucleic Acid Hybridization, по-горе.

“Операционно свързани” се отнася до подреждане на елементи, при което компонентите, така описани, се конфигурират, така че да изпълнят желаната функция. Следователно, определен промотор, операционно свързан към последователност на нуклеинова киселина е способен да извърши транскрибирането, и в случай на кодираща последователност, експресията на кодиращата последователност, когато същинските транскрибиращи фактори присъстват. Не е необходимо промоторът да е съседен на последователността на нуклеиновата киселина, доколкото тя функционира да насочва транскрибирането и/или експресията. Следователно, например, намесването на

нетранслирани, но вече транскрибирани последователности може да присъства между промоторната последователност и кодиращата последователност, както могат транскрибирани интрони, и промоторната последователност може, все още, да се приема за "операционно свързана" към кодиращата последователност.

"Рекомбинантен", както се използва в настоящото за описване на молекула нуклеинова киселина, означава полинуклеотид от геномен, сДНК, вирусен, полусинтетичен, или синтетичен произход, която въз основа на произхода си или манипулиране, не е асоциирана с всички, или част от, полинуклеотиди, с които е асоциирана в природата. Терминът "рекомбинантен", както се използва по отношение на протеин или полипептид, означава полипептид, продуциран чрез експресиране на рекомбинантен полинуклеотид. Най-общо, генът представляващ интерес се клонира и се експресира след това в трансформирани организми, както е описано по-долу. Организмът гостоприемник експресира чуждият ген, за да продуцира протеина, при условия на експресия.

"Контролен елемент" се отнася до полинуклеотидна последователност, която спомага при транскрипцията и/или трансляцията на нуклеотидната последователност, към която е свързан. Терминът обхваща промотори, последователности за края на транскрипцията, upstream регулаторни домени, сигнали за полиаденилиране, нетранслирани области, включително 5'-UTRs и 3'-UTRs, и когато е подходящо, лидерни последователности и ехансери, които колективно осигуряват транскрипцията и трансляцията на кодираща последователности в клетка гостоприемник.

“Промотор”, както се използва в настоящото, е регулаторна област, способна да свързва полимераза и да инициира транскрипция на downstream (3' посока) нуклеотидна последователност, операционно свързана към нея. За целите на настоящото изобретение, промоторна последователност включва минималния брой бази или елементи, необходими да иницират транскрипция на последователността, представляваща интерес, при откриваемите степени над фона. В промоторната последователност е сайт за инициране на транскрипцията, както и домени за свързване на протеини (консенсус последователности), отговорни за свързването на РНК или ДЗНК полимераза. Например, промоторът може да е последователност на нуклеинова киселина, която се разпознава от ДНК-зависима РНК полимераза (“транскриптаза”), като сигнал за свързване към нуклеинова киселина и начало на транскрипция на РНК при специфичен сайт. За свързване, такива транскриптази, обикновено изискват ДНК, която двуверижна в участъка, съдържащ промоторната последователност и нейния комплемент; участъкът на матрицата (последователност, която трябва да се транскрибира) не е необходимо да е двуверижна. Отделни ДНК-зависими РНК полимерази разпознават голямо разнообразие от промоторни последователности, които подчертано могат да варират по тяхната ефикасност за съдействие на транскрипцията. Когато РНК полимераза се свързва към промоторна последователност, за да иницира транскрипция, тази промоторна последователност не е част от транскрибираната последователност. Следователно, РНК-

овите транскрипти, получени по този начин, не включват тази последователност.

Контролна последователност "насочва транскрипцията" на нуклеотидна последователност, когато РНК или ДНК полимераза се свържи към промоторната последователност и транскрибира прилежащата последователност.

"ДНК-зависима ДНК полимераза" е ензим, който синтезира комплементарно ДНК копие от ДНК матрица. Примери са ДНК полимераза I от *E. coli* и ДНК полимераза от бактериофаг Т7. Всички известни ДНК-зависими ДНК полимерази изискват комплементарен праймер, за инициране на синтеза. При подходящи условия, ДНК-зависима ДНК полимераза може да синтезира комплементарно ДНК копие от РНК матрица.

"ДНК-зависима РНК полимераза" или "транскриптаза" е ензим, който синтезира множество РНК копия от двуверижна или частично двуверижна ДНК молекула, притежаваща (обикновено двуверижна) промоторна последователност. РНК молекулите ("транскрипти") се синтезират в 5' към 3' посока, като се започва от специфична позиция, точно downstream от промотора. Примери за транскриптази са ДНК-зависима РНК полимераза от *E. coli* и от бактериофаг Т7, Т3 и SP6.

"РНК-зависима ДНК полимераза" или "обратна транскриптаза" е ензим, който синтезира комплементарно копие на ДНК от РНК матрица. Всички известни обратни транскриптази също имат способност да правят комплементарно ДНК копие от ДНК матрица; следователно, те са както РНК-, така и ДНК-зависими ДНК полимерази.

Необходим е праймер за инициране на синтез с двете - РНК и ДНК матрици.

“РНаза Н” е ензим, който разгражда РНК-овия участък от РНК:ДНК дуплекса. Тези ензими могат да са ендонуклеази или екзонуклеази. Повечето обратно транскриптазни ензими, нормално съдържат РНаза Н активност допълнително към тяхната полимеразна активност- въпреки това, други източници на РНаза Н са достъпни без асоциирана полимеразна активност. Разграждането може да доведе до разделяне на РНК от РНК:ДНК комплекс. Алтернативно, РНаза Н може просто да срязва РНК на различни места, така че тези участъци от РНК се стопяват или позволяват ензимите да развият участъци от РНК.

Термините “полинуклеотид”, “олигонуклеотид”, “нуклеинова киселина” и “молекула на нуклеинова киселина” се използват в настоящото, като включват полимерна форма на нуклеотиди с каквато и да е дължина, било то рибонуклеотиди или дезоксирибонуклеотиди. Този термин ксе отнася единствено до първична структура на молекулата. Следователно, терминът включва три-, дву- и едноверижна ДНК, така както и три-, дву- и едноверижна РНК. Тя включва, също така, и модификации, както чрез метилиране и/или чрез покриване и немодифицирани форми на полинуклеотида. По-специално, термините “полинуклеотид”, “олигонуклеотид”, “нуклеинова киселина” и “молекула на нуклеинова киселина” включват полидезоксирибонуклеотиди (съдържащи 2-дезокси-D-рибоза), полирибонуклеотиди (съдържащи D-рибоза), който и да е друг вид полинуклеотид, който е N- или C-гликозид на пуринова или пиримидинова база; и други полимери,

съдържащи не-нуклеотидни скелети, например, полиамид, (неепример, пептидни нуклеинови киселини (PNAs)) и полиморфолино (достъпен в търговската мрежа от Anti-Virals, Inc., Corvillis, Oregon, като Neugene) полимери, и други синтетични специфични за последователността полимери на нуклеинови киселини, при условие, че полимерите съдържат нуклеобазы в конфигурация, която позволява сдвояване на базите и струпване на бази, както се открива при ДНК и РНК. Не се предвижда разграничаване по дължина между термините "полинуклеотид", "олигонуклеотид", "нуклеинова киселина" и "молекула на нуклеинова киселина" и тези термини се използват като взаимозаменяеми. Тези термини се отнасят единствено до първична структура на молекулата. Следователно тези термини включват, например, 3'-дезокси-2',5'-ДНК, олигодезоксирибонуклеотид МЗ' Р5' фосфорамидати, 2'-О-алкил-заместена РНК, дву- и едноверижна ДНК, така както и дву и едноверижна РНК, ДНК:РНК хибриди, и хибриди между PNAs и ДНК или РНК, и включват, също така, известни видове на модификации, например, маркери, които са известни от предшестващото състояние на техниката, метилиране, "caps", заместване на един или повече срещащи се естествено в природата нуклеотида с адин аналог, междунуклеотидни модификации, като например, тези с незаредени връзки (например, метил фосфонати, фосфотриестери, фосфорамидати, карбамати, и т.н.), с отрицателно заредени връзки (например, фосфоротиоати, фосфородитиоати, т.н.), и с положително заредени връзки (например, аминоксилфосфорамидати, аминоксилфосфотриестери), тези съдържащи висящи части,

като например, протеини (включително нуклеази, токсини, антитела, единични пептиди, поли-L-лизин, и др.), тези с интеркалиращи средства (разделящи) (например, акридин, псорален и т.н.), тези съдържащи хелатори (например, метали, радиоактивни метали, бор, оксидативни метали и т.н.), тези съдържащи алкилиращи средства, тези с модифицирани връзки (например, абфа аномерни нуклеинови киселини, и т.н.), както и немодифицирани форми на полинуклеотиди или олигонуклеотиди. По-специално, ДНК е дезоксирибонуклеинова киселина.

Както се използва в настоящото, "област мишена на нуклеинова киселина" или "нуклеинова киселина мишена" означава молекула нуклеинова киселина с "последователност мишена", за амплифициране. Нуклеиновата киселина мишена може да е както едноверижна, така и двуверижна и може да включва други последователности, освен последователността мишена, които не могат да се амплифицират. Терминът "последователност мишена" се отнася до определена нуклеотидна последователност от нуклеинова киселина мишена, която трябва да се амплифицира. Последователността мишена може да включва хибридираща с проба област, съдържаща се в молекулата мишена, с която пробата ще образува стабилен хибрид при желани условия. "последователността мишена" може да съдържа, също така, образуваща комплекс последователност, към която се свързват в комплекс олигонуклеотидни праймери и може да се удължи, при използване на последователността мишена, като матрица. Когато нуклеиновата киселина мишена е оригинална едноверижна, терминът "последователност

мишена" се отнася, също така, до последователност, комплементарна на "последователността мишена", както присъства в нуклеиновата киселина мишена. Ако "нуклеиновата киселина мишена" е оригинално двuverижна, терминът "последователност мишена" се отнася до и до двете, както до (+), така и до (-) веригите.

Терминът "праймер" или "олигонуклеотиден праймер", както се използва в настоящото, се отнася до олигонуклеотид, който действа за инициране на синтеза на комплементарна ДНК верига, когато се постави при условия, при които се индуцира синтезът на продукт от удължаването на праймера, т.е., в присъствие на нуклеотиди и индуциращи полимеризация средства, като ДНК или РНК полимераза и при подходяща температура, рН, концентрация на метали, и концентрация на соли. За предпочитане, праймерът е едноверижен за максимална ефикасност при амплификацията, но може алтернативно да е двuverижен. Ако е двuverижен, праймерът първо се третира за отделяне на неговите вериги преди да се използва за получаване на продуктите на удължаването. Този етап на денатуриране характерно се извършва чрез топлинна обработка, но може алтернативно да се проведе при използване на основи, с последващо неутрализиране. Следователно, "праймер"-ът е комплементарен на матрицата, и образува комплекс чрез водородна връзка или хибридизиране с матрицата, за да се получи праймер/матрица комплекс, за инициране на синтез чрез полимераза, който се удължава чрез прибавянето на ковалентно свързани бази, свързани при 3' края комплементарно към матрицата в процеса на синтез на ДНК.

Както се използва в настоящото, терминът “проба” или “олигонуклеотидна проба” се отнася до структура, която се състои от полинуклеотид, както е дефинирано по-горе, който съдържа последователност на нуклеинова киселина, комплементарна на последователност на нуклеинова киселина, присъстваща в анализираната нуклеиновата киселина мишена. Полинуклеотидните области на пробите могат да съставени от ДНК, и/или РНК, и/или синтетични нуклеотидни аналози. Когато една “олигонуклеотидна проба” трябва да се използва при 5' нуклеазно изследване, като TaqMan™ пробата ще съдържа най-малко едно флуоресциращо средство и най-малко един гасител, който се смила чрез 5' ендонуклеазна активност на полимераза, която се използва в реакцията, с цел да се открие каквато и да амплифицирана олигонуклеотидна последователност мишена. В този контекст, олигонуклеотидната проба трябва да има достатъчен брой фосфодиестерни връзки, съседни на неговия 5' край, така че 5' до 3' използваната нуклеазна активност може ефикасно да разгради свързаната проба, за да раздели флуоресциращото средство и гасителя. Когато се използва олигонуклеотидна проба в ТМА техника, тя трябва да е подходящо маркирана, както се описва по-долу.

Оценява се, че хибридиращите последователности не трябва да имат перфектна комплементарност, за да доставят стабилни хибриди. В много ситуации, стабилни хибриди се образуват, където по-малко от 10% от базите съответстват, като се игнорират бримките от четири или повече нуклеотида. В съответствие, както се използва в настоящото, терминът “комплементарен” се отнася до олигонуклеотид, който

образува стабилен дуплекс с неговия “комплемент” при условия, при които обикновено има приблизително 90% или повече хомоложност.

Теермините “хибридизира” и “хиприд” се отнасят до образуването на комплекси между нуклеотидни последователности, които са достатъчно комплементарни, за да образуват комплекси чрез Watson-Crick образуване на базови двойки. Когато праймер “хибридизира” с мишена (матрица), такива комплекси (или хиприди) са достатъчно стабилни, за да обслужват стимулирането функцията необходима за, например, ДНК полимеразата да инициира синтеза на ДНК.

Както се използва в настоящото, терминът “ свързани двойки” се отнася до първи и втори молекули, които специфично се свързват една към друга, като комплементарни полинуклеотидни двойки, способни да образуват дуплекси на нуклеинови киселини. “специфично свързване” на парвия член от свързваната двойка към втория член от свързаната двойка в проба, се доказва чрез свързването на първия член към втория член, или обратното, с по-голям афинитет, отколкото другите компоненти в пробата. Свързването между членовете на свързаните двойки е характерно нековалентно. Ако контекстът не посочва ясно друго нещо, термините “афинитет на молекула” и “анализирана мишена” се използват в настоящото, що се отнася до парвия и втория членове на свързващата двойка, съответно.

Термините “специфично-свързваща молекула” и “афинитетна молекула” се използват взаимозаменяемо в настоящото и се отнасят до молекула, която се свързва

селективно по химически или физически начини към откриваемо вещество, присъстващо в пробата. Под "селективно свързване" се има предвид, че молекулата се свързва за предпочитане към мишената, представляваща интерес, или се свързва с по-голям афинитет към мишената, отколкото към други молекули. Например, ДНК молекула се свързва към комплементарна по същество последователност, а не към несвързани последователности.

"Температурата на топене" или "Tm" на двуверижна ДНК се дефинира, като температурата, при която половината от спиралната структура на ДНК се загубва поради загряване или друго дисоцииране на водородните връзки между базовите двойки, например, чрез третиране с киселина или основа. Tm на ДНК молекулата зависи от нейната дължина и от нейния състав на бази. ДНК молекули, богати на GC базови двойки имат по-висока Tm, отколкото тези, които имат изобилие от AT базови двойки. Разделените комплементарни вериги на ДНК спонтанно се реасоциират или се хибридизират, за да образуват дуплексна ДНК, когато температурата е по-ниска от Tm. Най-високата степен на хибридизиране на нуклеинови киселини се проявява приблизително при 25°C под Tm. Tm може да се определя при използване на следното отнасяне: $Tm = 69,3 + 0,41(GC)\%$ (Marmur et al., (1962) J.Mol.Biol. 5:109-118).

Както се използва в настоящото, "биологична проба" се отнася до проба тъкан или течност, изолирана от субект, която обикновено включва антитела, продуцирани от субекта. Характерно, проби, които съдържат такива антитела са известни от прадшествашкото състояние на техниката включват, но без да се ограничават до, кръв, плазма, серум,

фекалии и вещества, урина, костан мозък, жлъчка, гръбначномозъчна течност, лимфна течност, проби от кожа, секрети от кожата, дишането, черва, и генитало-уринарния тракт, слъзи, кърма, кръвни клетки, органи, биопсии, и проби от съдържимо на *in vitro* клетъчни култури, включително, но без да се ограничава до, кондиционирана среда, получена от култивирането на клетки, тъкани в култураална среда, например, рекомбинантни клетки, и клетъчни компоненти.

Както се използва в настоящото, термините "маркер" и "откриваемо макиран" се отнасят до молекула, способна да открива, включително, но без да се ограничава до, радиоактивни изотопи, флуоресценцентни средства, хемилуминисцентни средства, хромофори, ензимни субстрати, ензимни кофактори, ензимни инхибитори, хромофори, багрила, метални йони, метални соли, лиганди (например, биотин, авидин, стрептавидин или хептени) и други подобни. Терминът "флуоресценцентно средство" се отнася до вещество или негова част, което е способно да проявява флуоресценция в степен на откриване.

II. Начини за осъществяване на изобретението

Преди подробно да се опише настоящото изобретение, трябва да се разбере, че изобретението не се ограничава до определени формулировки или, че параметрите на процесите, като такива, могат да варират. Трябва да се разбира, освен това, че използваната терминология в настоящото е с единствена цел да се опишат определени варианти за осъществяване на изобретението, и не се счита за ограничаваща.

Въпреки големия брой състави и методи, подобни или еквивалентни на тези, описани в настоящото могат да се използват в практиката на изобретението, в настоящото са описани предпочитаните материали и методи.

Както е отбелязано по-горе, настоящото изобретение се основава на откритието на нови праймери и проби и диагностични методи за прецизно откриване на инфекция от Parvovirus B19 в биологична проба. Методите се основават на чувствителни техники за определяне на нуклеинови киселини, които позволяват идентифициране на последователности на нуклеинови кесулени мишена на Parvovirus B19 в проби, съдържащи малки количества вирус.

По-специално, изобретателите на настоящото, охарактеризират области в генома на Parvovirus B19, които са желани мишени за тестове за диагностика. Праймери и проби, произлезли от тези области са изключително полезни за откриване на биологични проби на Parvovirus B19.

Праймери и проби на Parvovirus B19, описани по-горе, се използват при анализите, базирани на нуклеинови киселини, за откриване на инфекция от човешки Parvovirus B19 в биологични проби.

По-специално, праймери и проби за използване тези изследвания, за предпочитане, произлизат от 4,7 kb фрагмент приблизително, от генома на Parvovirus B19, съответстващ на нуклеотидни позиции 217-4678 от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. нуклеонидните последователности от тази област от два различни изолата на Parvovirus B19 са изобразени на фигури 3A-3C и 4A-4C, в настоящото.

Както е обяснено по-горе, фрагментът съдържа NS1, VP1 и VP2 кодиращи области.

Изключително предпочетени праймери и проби, за използване при настоящите изследвания се проектират от високо консервативни области на генома на Parvovirus B19, за да се позволи откриването на инфекция от Parvovirus B19, причинена от различни изолати. Както се описва в настоящото, високо консервативни области на генома на Parvovirus B19 се откриват в 700 bp област, простираща се на нуклеотидни позиции 2936-3635, номерирани спрямо генома на Parvovirus B19, описан от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Тази област се открива в VP1 областа на генома. Последователността на тази област от 21 различни изолати на Parvovirus B19 е показана в настоящото на фигури 2A-2U. Последователностите от допълнителни 26 изолати са показани на фигури 11A-11Z, в настоящото. Сравнение на последователностите показва, че тази област показва от приблизително 98% до 99,5% хомоложност на последователностите от изолат до изолат, което я прави силно желана последователност мишена. Също така желана за проектирането на проби и праймери е 370 kb област, открита в VP1, която се разпростира приблизително над нуклеотидни позиции 30703-3442, номерирани относително по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936, както и 214 kb фрагмент, изобразен на фигура 1, който се среща в 3' участъка на 4,7 kb фрагмент и обхваща нуклеотидни позиции 4728-4941, относително номерирани по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

Областите 6,7 kbp, 700 kbp и 370 kbp се получават лесно от допълнителни изолати, при използване на участъци от

последователност на Parvovirus B19, открита в тези специални области, като праймери в PCR реакции, като тези, описани в настоящото, както и в патнети на САЩ No 4,683,195; 4,683,202 и 4,889,818, и основани на последователността, осигурени от настоящото. Друг метод за получаване на нуклеотидини последователности с желани последователности е хибридизирането на комплементарни комплекти от припокриващи се синтетични олигонуклеотиди, продуцирани в конвенционален, автоматичен синтезатор на полинуклеотиди, последвано от лигиране с подходящи ДНК лигази и амплифициране на лигираната нуклеотидна последователност чрез PCR. Виж например, Jayarman et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084-4088. След като веднъж последователностите са получени или изолирани, те могат да се клонират в подходящ вектор или репликон. Многобройни вектори на клониране са известни на специалистите в областта, и селекцията на подходящ вектор за клониране е въпрос на избор. Подходящи вектори включват, без да се ограничават до, плазмиди, фаги, транспозони, космиди, хромозоми или вируси, които способни на репликация, когато се асоциират с присъщ контролен елемент.

Рекомбинантни клонове лесно се идентифицират чрез анализ с рестрикционни ензими и полиакриламидна или агарозна електрофореза, при използване на техники, добре известни от предшестващото състояние на техниката и описани в примерите за изпълнение на изобретението, по-долу.

Праймери и проби за използване при изследването произлизат от тези последователности и лесно се синтезират чрез стандартни техники, например, твърдо-фазов синтез от химията на фосфорамидити, както се описва в патенти на САЩ Nos 4,458,066 и 4,415,732; Beucage et al., (1992) *Tetrahedron* 48:2223-2311; и Applied Biosystems User Bulletin No. 13 (01. 04.1987). Други методи на химичен синтез включват, например, фосфотриестерния метод, описан от Narang et al., *Meth. Enzymol.* (1979) 68:90 и фосфодиестерния метод, описан от Brown et al., *Meth. Enzymol.* (1979) 68:109. Poly(A) или poly(C), или други некомплементарни нуклеотидни удължения могат да се инкорпорират в проби при използване на същите методи. Хексаетилен оксидно удължаване може да се присъедини към проби чрез методи, известни от предшестващото състояние на техниката. Cload et al., (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113:6324-6326; патент на САЩ № 4,914,210 на Levenson et al.; Durant et al., (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:6353-6359; и Horn et al., (1986) *Tet. Lett.* 27:4705-4708. характерно, праймерните последователности са в граници между 10-75 нуклеотида дължина, като 15-60, 20-40 и така нататък, по-специално в граници между 18-40 нуклеотида дължина, и която и да е дължина в границите на установената дължина. Типичната проба е с дължина в граници между 10-50 нуклеотида дължина, както и 15-40, 18-30, и така нататък, и която и да е дължина между установените граници.

Освен това, пробите могат да се присъединят към маркери за откриване. Съществуват няколко известни начина за получаване на производни на олигонуклеотиди с реактивни функционални групи, които позволяват прибавянето

на маркер. Например, няколко подхода са достъпни за биотинилиране на проби, така че, радиоактивни, флуоресцентни, хемилуминесцентни, ензимни или електронни плътни маркери могат да се прикрепят чрез авидин. Виж например, Broken et al., *Nucleic Acids Res.* (1978) 5:363-384, където се описва използването на феритин-авидин-биотин маркери; и Chollet et al., *Nucleic Acids Res.* (1985) 13:1529-1541, където се описва биотинилиране на 5' краищата на олигонуклеотиди чрез аминоксил-фосфорамидно линкерно средство. На разположение са известен брой методи за синтезиране аминоксил-производни олигонуклеотиди, които лесно се бележат чрез флуоресцентни или друг вид съединения, произлезли чрез аминоксил-реактивни групи, като изотиоцианат, N-хидроксисукционимид, или подобни, виж например Connolly (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:3131-3139, Gibson et al., (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6455-6467 и патент на САЩ No 4,605,735 на Miyoshi et al. на разположение са, също така, и методи за синтезиране на сулфхидрилови производни олигонуклеотиди, които могат да влизат в реакция с тиол-специфични маркери, виж например, патент на САЩ No 4,757,141 на Fung et al., Connolly et al., (1985) *Nucleic Acids Res.* 13:4485-4502 и Spoot et al., (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:4837-4848. по-подробен преглед на методологии за белязване на ДНК фрагменти се предоставя в Matthews et al., *Anal. Biochem.* (1988) 169:1-25.

Например, проби могат да се маркират флуоресцентно чрез свързване на флуоресцентна молекула към не-лигирания терминал на пробата. Ръководство за избор на подходящи флуоресцентни маркери може да се открие в Smith et al., *Meth.*

Enzymol. (1987) 155:260-301; Karger et al., Nucl. Acids Res. (1991) 19:4955-4962; Haugland (1989) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Предпочитани флуоресцентни маркери включват флуоресцеин и негови производни, както се описва в патент на САЩ № 4,318,846 и Lee et al., Cytometry (1989) 10:151-164, и 6-FAM, JOE, TAMRA, ROX, HEX-1, HEX-2, ZOE, TET-1 или NAN-2, и други подобни.

Допълнително, пробите могат да се маркират с акридинов естер (АЕ), при използване на техниките, описани по-долу. Настоящите технологии позволяват АЕ маркер да се постави в каквато и да е позиция в пробата. Виж, например, Nelson et al., (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" in Nonisotope Probing, Blotting and Sequencing, Kricka L.J.(ed.) Academic Press, San Diego, CA; Nelson et al., (1994) "Application of the Hybridisation Protection Assays (HPA) to PCR" in the Polymerase Chain Reaction, Muulis et al., (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks et al., Clin. Chem. (1983) 29:1474-1479; Berry et al., Clin. Chem. (1988) 34:2087-2090. АЕ молекула може директно да се прикрепя към проба, чрез използване химията на не-нуклеотидно-основаващо се линкерно средство, който да позволява разполагането на маркери в която и да е позиция в пробата. Виж, например, патент на САЩ № 5,585,481.

При някои варианти за изпълнение на изобретението, се прибавя вътрешен контрол (IC) или вътрешен стандарт, за да служи като контрол за залавянето на мишената и амплифицирането. За предпочитане, IC включва последователност, която се различава от последователността

мишена, е способен да хибридизира с последователностите на пробата, използвани за разделяне на олигонуклеотидите специфични за организма от пробата, и е способен да амплифицира. Използването на IC позволява контролирането на процеса на разделяне, процеса на амплифициране, и системата за откриване, и позволява проследяването на изпълнението на изследването и количественото определяне на пробите. Представителна последователност, от която може да се получи IC е показана на фигура 12. IC може да се включи в която и да е подходяща точка, например, в лизисния буфер. При един вариант за изпълнение, IC включва M13 ssДНК съдържаща нуклеотидна последователност от Parvovirus B19 и единствена последователност, която хибридизира с пробата, например, съдържаща последователности от VP1 областта, където последователността мишена се модифицира чрез заместване или делетиране на 5-20 бази или повече, за предпочитане 5-15 бази, като 5, 10 или 15 бази или което и да е число в тези граници. Заместените или делетирани бази, за предпочитане, се срещат по цялата дължина на последователността мишена, така че само 2 или 3 последователни последователности се заместват. Така например, ако последователността мишена е

СТАСТTGCTGCGGGAGAAAAACACCT (SEQ ID NO:91), след което последователността може да се замени с, например, AGCTAGACCTGCATGTCACTG (SEQ ID NO:90) в IC.

Твърдата подложка може допълнително да включва проби, специфични за вътрешен стандарт (IC проба), като по този начин се улеснява заляването, когато се използва IC

проба. IC пробата може, по желание, да се прикрепи към откриваем маркер, който е различен от откриваемия маркер за последователността мишена. При варианти за изпълнение, при които откриваемия маркер е флуорофор, IC може да се определи количествено спектрофотометрично и чрез изследване на граници на откриване. Характерно, броят копия на IC, който не интерферира с откриваемата мишена се определя чрез титруване на IC с фиксирана IU мишена, за предпочитане в по-ниския край, и се построява стандартна крива чрез разреждане на проба на международно приет IU. За количествено определяне на Parvovirus B19, може да се използва осем-членен панел от 8000IU-125IU.

При друг вариант за изпълнение, IC, както е описано в настоящото, се комбинира с РНК, изолирана от пробата, съгласно стандартни техники, известни на специалистите в областта, и описана в настоящото. След това РНК се подлага на обратно транскрибиране при използване на облатна транскриптаза, за да се осигури копие на ДНК. сДНК последователности могат, при желание, да се амплифицират (например, чрез PCR), при използване на маркирани маркери. Продуктите на амплификацията се разделят определя се, характерно чрез електрофореза, и количеството на радиоактивност (пропорционално на количеството на амплифицирания продукт). Количеството на иРНК в пробата, след това, се изчислява чрез сравняване със сигнала, продуциран по известните стандарти.

Праймерите и пробите, описани по-гореу могат да се използват в техники, основаващи се на полимеразна верижна реакция (PCR), за откриване на инфекция от Parvovirus B19 в

биологични проби. PCR е техника за амплифициране на желана последователност на нуклеинова киселина мишена, съдържаща се в молекула на нуклеинова киселина или смес от молекули. При PCR, се използва двойка проймери в излишък за хибридиране с комплементарните вериги на нуклеиновата киселина мишена. Всеки праймер се удължава чрез полимераза, при използване на нуклеиновата киселина мишена, като мишена. Продуктите на удължаването стават последователности мишени, сами те, след отделяне от оригиналната верига мишена. След това, нови праймери се хибридизират и се удължават чрез полимераза, и цикълът се повтаря за геометрично нарастване на броя на молекулите последователности мишени. PCR методът за амплифициране на последователностите на нуклеинови киселини мишени е добре известен от предшестващото състояние на техниката и е описан в, например, Innis et al., (eds.) PCR Protocols (Academic Press, NY 1990); Taylor (1991) Polymerase Chain Reaction: basic principle and automation, in PCR: A Practical Approach, McPherson et al., (eds.) IRL Pres, Oxford; Saiki et al., (1986) Nature 324:163; така както и патенти на САЩ № 4,683,195; 4,683,202 и 4,889,818.

По-специално, PCR използва относително къси олигонуклеотдини праймери, които ограничават нуклеотидната последователност мишена, която трябва да се амплифицира, ориентирани са така, че тяхните 3' краища да са един срещу друг, всеки праймер се удължава до другия. Полинуклеотидната проба се екстрахира и се денатурира, за предпочитане чрез загряване, и се хибридизира с първи и втори праймери, които присъстват в моларен излишък.

Полимеризирането се катализира в присъствие на четири дезоксирибонуклеотидни трифосфата (dNTPs—dATP, dGTP, dCTP и dTTP) при използване на зависимо от праймера и от матрицата полимеризиращо полинуклеотиди средство, като който и да е ензими, способен да продуцира продукти на удължаванете на праймера, например, ДНК полимераза I от *E. coli*, фрагмент на Klenow от ДНК полимераза I, T4 ДНК полимераза, термостабилни ДНК полимерази, изолирани от *Thermus aquaticus* (Taq), достъпни от многобройни източници (например, Perkin Elmer), *Thermus thermophilus* (United States Biochemicals), *Bacillus stereothermophilus* (Bio-Rad), или *Thermococcus litoralis* ("Vent" polymerase, New England Biolabs). Резултатите в два "дълги продукта", които съдържат съответните праймери в тяхните 5' краища, ковалентно свързани към ново синтезираните комплементи на оригиналните вериги. След това, реакционната смес се връща при условия на полимеризиране, например, чрез понижаване на температурата, инактивиране на денатуриращо средство, или добавяне на повече полимераза, и се инициира втори цикъл. Вторият цикъл предоставя двете оригинални вериги, двата дълги продукта от първия цикъл, два нови дълги продукта, репликрани от оригиналните вериги, и два "къси продукта", репликрани от дългите продукти. Късите продукти притежават последователност на последователността мишена с праймер на всеки край. На всеки допълнителен цикъл се продуцират допълнително два нови дълги продукта и известен брой къси продукти, равен на броя на къси и дълги продукти, оставащи в края на предишния цикъл. Следователно, броят на къси продукти, съдържащи последователността мишена

нараства експоненциално с всеки цикъл. За предпочитане, PCR се провежда с достъпен в търговската мрежа термично средство за провеждане на циклите, например, Perkin Elmer.

РНК-и могат да се амплифицират чрез обратно транскрибиране на иРНК в сДНК, и след това да се проведе PCR (RT-PCR), както е описано по-горе. Алтернативно, единичен ензим може да се използва за двата етапа, описани в патент на САЩ № 5,322,770. иРНК също може да бъде обратно транскрибирана в сДНК, със следваща асиметрична гар лигазна верижна реакция (RT-AGLCR), както е описано от Marshall et al., (1994) PCR Meth. App. 4:80-84.

Флуорогенното 5' нуклеазно изследване, известно като TaqMan™ изследване (Parkin-Elmer) е мощна и всестранна PCR-основана система за откриване на нуклеинови киселини мишени. Оттук, праймери и проби, произлезли от области от генома на Parvovirus B19, описан в настоящото, могат да се използват в TaqMan™ изследването за откриване присъствието на инфекция в биологична проба. Анализът се провежда заедно с термичен цикъл при проследяване на генерирането на флуоресцентни сигнали. Системата на изследването се освобождава от необходимостта от гел електрофоретимен анализ, и има възможност да генерира количествени данни, позволяващи определянето на брой копия мишени.

Флуорогенното 5' нуклеазно изследване се провежда конвенционално при използване на, например, AmpliTaq Gold™ ДНК полимераза, която има ендогенна 5' нуклеазна активност, за да се смели вътрешна олигонуклеотдна проба, маркирана и с двете, флуоресцентно репортер багрило и

гасител (виж Hollander et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:7276-7280; и Lee et al., Nucl. Acids. Res. (1993) 21:3761-3766. Изследването води до откриване чрез измерване на промени във флуоресценцията, което протича по време на цикъла на амплифициране, като флуоресцентната проба се смила, отделя се багрилният и гасителният маркер и се причинява нарастване на флуоресцентния сигнал, който е пропорционален на амплифицирането на ДНК-та мишена.

Продуктите на амплифицирането могат да се открият в разтвор или при използване на твърди подложки. При този метод, TaqMan™ пробата се проектира за хибридизиране към последователност мишена в желаните PCR продукт. 5' краят на TaqMan™ пробата съдържа флуоресцентен репортер багрило. 3' краят на пробата се блокира, за да се предотврати удължаването на пробата и съдържа багрило, което ще изгаси флуоресценцията на 5' флуорофора. По време на последващото амплифициране, 5' флуоресцентният маркер се отцепва, ако полимера с 5' екзонуклеазна активност присъства в реакцията. Изрязването на 5' флуорофора води до нарастване на флуоресценцията, което може да се открие.

По-специално, олигонуклеотидната проба се конструира така, че пробата да съществува поне в една еденоверижна конформация, когато е нехибридизирана, където молекулата на гасителя е достатъчно близо до репортер молекулата, за да погаси флуоресценцията на репортер молекулата. Олигонуклеотидната проба съществува, също така, в поне една конформация, където е хибридизирана с полинуклеотид мишена, така че молекулата на гасителя да не е разположена достатъчно близо до репортер молекулата, за да се загаси

флуоресценцията на репортер молекулата. Чрез приемане на тези хибридизирани и нехибридизирани конформации, репортер молекулата и молекулата на гасителя върху тази проба проявяват различен интензитет на флуоресцентния сигнал, когато пробата е хибридиизирана или нехибридиизирана. Като резултат от това е възможно да се определи дали пробата е хибридиизирана или нехибридиизирана, на основата на промяна на интензитета на флуоресценция на репортер молекулата, молекулата на гасителя, или на тяхната комбинация. В допълнение, поради това, че пробата може да се проектира така, че молекулата на гасителя да загаси репортер молекулата, когато пробата е нехибридиизирана, пробата може да се проектира така, че репортер молекулата да проявява ограничена флуоресценция, освен ако пробата не е хибридиизирана или смляна.

В съответствие, настоящото изобретение се отнася до методи за амплифициране на Parvovirus B19 мишена нуклеотидна последователност при използване на полимераза на нуклеинова киселина, притежаваща 5' до 3' нуклеазна активност, адин или повече праймери способни да хибридизират към последователността на Parvovirus B19 мишена, и една олигонуклеотдна проба способна да хибридизира към последователността 3' на Parvovirus B19 мишена по отношение на праймера. По време на амплифицирането, полимеразата смила олигонуклеотдната проба, когато е хибридиизирана към последователност мишена, като по този начин се разделя репортер молекулата от молекулата на гасителя. По време на протичането на

амплифицирането, флуоресценцията на репортер молекулата се проследява, с флуоресценция съответстваща на наличието на амплифициране на нуклеинова киселина. За предпочитане, репортер молекулата е флуоресцеиново багрило, а гасителната молекула е за предпочитане родаминово багрило.

Докато дължината на праймерите и пробите може да варира, последователностите на пробите се избират така, че да имат по-ниска температура на топене от последователностите на праймера. Следователно, последователностите на праймера са обикновено по-дълги от последователностите на пробите. Характерно, последователностите на праймерите са с дължина от порядъка между 10-75 нуклеотида, по-характерно в граници между 20-45. типичната проба е в граници между 10-50 нуклеотида дължина, по-типично 15-40 нуклеонидна дължина.

Ако се използва твърда подложка, олигонуклеотидната проба може да се прикачи към твърдата подложка по най-разнообразни начини. Например, пробата може да се прикачи към твърдата подложка чрез прикрепяне на 3' или 5' крайния нуклеотид на пробата към твърдата подложка. По-предпочитано, пробата се прикрепя към твърдата подложка чрез линкер, който служи за отдалечаване на пробата от твърдата подложка. Линкерът е обикновено от най-малко 15-30 атома дължина, по-предпочитано най-малко 15-50 атома дължина. Необходимата дължина на линкера ще зависи от конкретната използвана твърда подложка. Например, линкер с дължина шест атома обикновено е достатъчна, когато се използва силно омержен полистирол като твърда подложка.

Голямо разнообразие от линкери са известни от предшестващото състояние на техниката, които могат да се използват за прикрепяне на олигонуклеотдната проба към твърдата подложка. Линкерът може да се образува от което и да е съединение, което не се намесва значително при хибридизирането на последователността мишена към пробата, която е прикрепена към твърдата подложка. Линкерът може да се образува от хомополимерен олигонуклеотд, който лесно може да се прибави върху линкера чрез автоматизиран синтез. Алтернативно, полимери като полиетиленгликол с функционални групи могат да се използват като бинкери. Такива полимери се предпочитат пред хомополимерните олигонуклеотди, поради това, че те не се намесват значително при хибридизирането на пробата към олигонуклеотда мишена. Особено предпочитан е полиетиленгликола.

Връзките между твърдата подложка, линкера и пробата, за предпочитане не се разцепват по време на отделянето предпазващите базите групи, при основни условия при висока температура. Примери за предпочитани връзки включват карбаматни и амидни връзки.

Примери за предпочитани видове твърди подложки за имобилизиране на олигонуклеотдна проба включват стъкло с контролирани пори, стъклени блюда, полистирен, полистиренови перли с обвивка от авидин, целулоза, найлон, акриламиден гел и активиран декстран.

За подробно описание на TaqMan[™] изследването, реагентите и условията за използване в настоящото, виж например, Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991)

88:7276-7280; патенти на САЩ № 5,538,848; 5,723,591 и 5,876,930.

Последователностите на Parvovirus B19, описани в настоящото, могат да се използват, също така, като основа за транскрипционно медирана амплификация (ТМА). ТМА предоставя метод за идентифициране на последователности на нуклеинови киселини мишени, присъстващи в много малки количества в биологична проба. Такива последователности могат да се трудни или невъзможни за идентифициране при използване на директни методи на изследване. По-специално, ТМА е изотермично, автокаталитична система за амплифициране на нуклеинова киселина мишена, което може да предостави повече от милиард РНК копия на последователност мишена. Изследването може да се проведе качествено, за да се открие правилно присъствието или отсъствието на последователност мишена в биологична проба. Изследването може, също така, да достави количествени измервания на количеството последователност мишена над границата на концентрация от различна степен на сила. ТМА предоставя метод за автокаталитично синтезиране на множество копия на последователност на нуклеинова киселина мишена без повтарящи се манипулации на условията на реакцията, като температура, йонна сила и рН.

Обикновено ТМА включва следните етапи: (а) изолиране на нуклеиновата киселина, включително РНК, от биологична проба, представляваща интерес, за което се предполага, че е инфектирана с Parvovirus B19; и (b) комбиниране в реакционна смес (i) изолираната нуклеинова киселина, (ii) първи и втори олигонуклеотдни праймери, като първият праймер има

последователност образуваща комплекс, достатъчно комплементарна към 3' терминален участък от РНК последователност мишена, ако присъства (например (+) веригата), за да образува комплекс с нея, и вторият праймер, който притежава образуваща комплекс последователност, достатъчно комплементарна към 3' терминалния участък на последователността мишена на нейния комплемент (например (+) веригата), за да образува комплекс с нея, при което първият олигонуклеотд включва, освен това, 5' последователност за последователността, образуваща комплекс, която включва промотор, (iii) обратна транскриптаза или РНК и ДНК зависима полимераза, (iv) ензимна активност, която селективно разгражда РНК веригата на РНК-ДНК комплекса (като РНаза H) и (v) РНК полимераза, която разпознава промотора.

Съставните части на реакционната смес могат да се комбинират постепенно или наведнъж. Реакционната смес се инкубира при условия, при които се образува олигонуклеотд/последователност мишена, включващ прикрепване на ДНК праймер и условия за синтезиране на нуклеинова киселина (включително рибонуклеотид трифосфати и дезоксирибонуклеотид трифосфати) за достатъчен период от време за предоставяне на множество копия от последователността мишена. С предимство, реакцията се провежда при условия, които са подходящи за поддържани на стабилността на реакционните съставки, като съставката ензими и без да има необходимост от модифициране или манипулиране на условията на реакцията по време на провеждането на реакцията на амплифициране.

съответствие, реакцията може да се проведе при условия, при които по същество са изотермични и включват по същество константна йонна сила и рН. Конвенционално, реакцията не се нуждае от етап на денатуриране, за да се раздели РНК-ДНК комплекса, продуциран чрез първата реакция на удължаване на ДНК-та.

Подходящи ДНК полимерази включват обратни транскриптази, като обратна транскриптаза от вирус на птича миелобластома (AMV) (на разположение от, например, Seikagaku America, Inc.) и обратна транскриптаза на Moloney вируса на миша левкимия (MMLV) (на разположение от, например, Bethesda Research Laboratories).

Промотори или промоторни последователности, подходящи за инкорпориране в праймери са последователности на нуклеинови киселини (или естествено съществуващи в природата или продукт на рестрикционно смилане), които специфично се разпознават от ЛНК полимеразата, която разпознава и свързва тази последователност и инициира процеса на транскрибиране, при който се продуцират РНК транскриптите. По жератние, последователността може да включва нуклеотидни бази извън същинския сайт на разпознаване на РНК полимеразата, които могат да придадат стабилност или чувствителност на процеса на процесите на разпадане или да усилят ефикасността на транскрибиране. Примери за полезни промотори включват тези, които се разпознават от някои бактериофаги, като тези от бактериофаги Т3, Т7 или SP6, или промотор от *E. coli*. Тези РНК полимерази са лесно достъпни от търговската мрежа, като New England Biolabs и Epicentre.

Някои от обратните транскриптази подходящи за използване при тези методи имат RNаза H активност, като AMV обратна транскриптаза. Може да се предпочете, въпреки това, да се прибави екзогенна RNаза H, като RNаза H от *E. coli*, даже когато се използва AMV обратната транскриптаза. RNаза H ледно се доставя от, например, Bethesda Research Laboratories.

RНК транскриптите, продуцирани по тези методи могат да послужат за матрици за продуциране на допълнителни копия на последователност мишена посредством горе-описаните механизми. Системата е автокаталитична и амплифицирането става автокаталитично, лез необходимост от повторно модифицирани и променящи се условия на реакцията, като температури, рН, йонна сила и други подобни.

Откриването може да се направи при използване на многообразни методи, включително директно секвениране, хибридиране със специфични за последователността олигомери, гел електрофореза и масс спектрометрия. Тези методи могат да използват хетерогенни или хомогенни формати, изотопни или неизотопни маркери, така както и без маркери въобще.

Един предпочитан метод на откриване е използването на специфични за последователността олигонуклеотидни проби, произлезли от 4,7 kbp, 700 bp и 214 bp фрагменти, описани по-горе. Пробите могат да се използват при изследвания за предпазване на хибридизация (HРА). При този вариант за изпълнение, пробите се маркират конвенционално с акридинов естер (АЕ), високолуминесцентна молекула. Виж

например, Nelson et al., (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" in Nonisotope Probing, Blotting and Sequencing, Kricka L.J.(ed.) Academic Press, San Diego, CA; Nelson et al., (1994) "Application of the Hybridisation Protection Assays (HPA) to PCR" in the Polymerase Chain Reaction, Muulis et al., (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks et al., Clin. Chem. (1983) 29:1474-1479; Berry et al., Clin. Chem. (1988) 34:2087-2090. Една АЕ молекула се прикрепя директно към пробата, като се използва химия на ненуклеотид-основаващо се средство, което позволява поставянето на маркер на което и да е място в пробата. Виж, например, патенти на САЩ № 5,585,481 и 5,185,439. Хемилуминесценцията се задейства чрез реагиране с алкален водороден пероксид, който дава един възбуден N-метил акридон, който след това силно спада до нормално състояние с излъчване на фотон. Допълнително, АЕ причинява естерна хидролиза, което води до нехемилуминесцентна-метил акридинова карбоксилна киселина.

Когато АЕ молекулата е ковалентно прикрепена към проба нуклеинова киселина, хидролизата е бърза, при умерено алкални условия. Когато АЕ-белязана проба е изцяло комплементарна на нуклеиновата киселина мишена, скоростта на хидролизата е силно понижена. Следователно, хибридизирана и нехибридизирана АЕ-белязана проба може да се открие директно в разтвор, без необходимост от физично разделяне.

HPA обикновено се състои от следните етапи: (а) АЕ-белязаната проба се хибридизира с нуклеиновата киселина мишена в разтвор за приблизително 15 до 30 минути. След

това се добавя умерено алкален разтвор и АЕ прикрепен към хибридиизираната проба се хидролизират. Реакцията се провежда за приблизително 5 до 10 минути. Останалото хибрид-асоцииран АЕ се открива, като измерване на количеството на присъстващата мишена. Този етап отнема приблизително 2 до 5 секунди. За предпочитане, етапът на диференциална хидролиза се провежда при същата температура, както и етапа на хидролизиране, характерно, от 50 до 70°C. Алтернативно, може да се проведе втори етап на диференциална хидролиза при стайна температура. Това позволява да се използват високи рН стойности, например, в граници от 10 до 11, което води до по-големи разлики в скоростта на хидролиза между хибридизирана и нехибридизирана АЕ-маркирана проба. НРА се описва подробно в, например, патенти на САЩ № 6,004,745; 5,948,899 и 5,283,174.

ТМА се описва подробно в, например, патент на САЩ № 5,399,491. При един пример за характерно изследване, проба на нуклеинова киселина, за която се предполага, че съдържа последователност мишена на Parvovirus B19, се смесва с буфериран концентрат, съдържащ буфер, соли, магнезий, нуклеотид трифосфати, праймери, дитиотреитол, и спермидин. По желание, реакцията се инкубира при приблизително 100°C за приблизително две минути, за да се денатурира каквато и да е вторична структура. След охлаждане до стайна температура, се прибавят обратна транскриптаза, РНК полимераза, и РН-аза H и сместта се инкубира за два до четири часа при 37°C. След това реакцията може да се изследва чрез денатуриране на

продукта, прибавяне на разтвор на проба, инкубиране 20 минути при 60°C, прибавяне на разтвор за селективно хидролизиране на нехибридизиралата проба, инкубиране на реакцията шест минути при 60°C, и измерване на останалата хемилуминесценция в луминометър.

Олигонуклеотидните молекули на настоящото изобретение могат, също така, да се използват при основоващо се на последователности на нуклеинови киселини амплифициране (NASBA). Този метод е насочен към промотора ензимен процес, който включва *in vitro* непрекъснато, хомогенно и изотермално амплифициране на специфична нуклеинова киселина, за да се осигурят РНК копия на нуклеиновата киселина. Реагентите за провеждане на NASBA включват първи ДНК праймер с 5' опашка, съдържаща промотор, втори ДНК праймер, обратна транскриптаза, РН-аза Н, Т7 РНК полимераза, NTP's и dNTP's. Като се използва NASBA, големи количества едноверижна РНК се генерират или от едноверижната РНК или ДНК, или от двуверижната ДНК. Когато РНК трябва да се амплифицира, ssРНК служи като матрица за синтезата на първа ДНК верига чрез удължаване на първи праймер, съдържащ сайт за разпознаване на РНК полимераза. Тази ДНК верига, на свой ред, служи като матрица за синтезата на втора, комплементарна ДНК верига чрез удължаване на втори праймер, което дава двуверижен активен сайт за промотор на РНК-полимераза, а втората ДНК верига служи като матрица за синтез на големи количества от първата матрица, ssРНК-та, с помощта на РНК полимераза. NASBA техниката е известна от предшестващото състояние на техниката и се описва в,

например, Европейски Патент 329,822, заявка на Международен патент № WO91/02814, и патенти на САЩ 6,063,603 и 5,409,818.

Последователностите на Parvovirus B19, описани в настоящото са полезни, също така, за техники на хибридизиране на нуклеинови киселини и амплифициране, които използват разклонени ДНК молекули. При основното изследване на хибридизирането на нуклеинови киселини се открива едноверижна анализирана нуклеинова киселина, хибридизирана към маркирана едноверижна проба на нуклеинова киселина и водеща до дуплекси. Варианти на тази основна схема са разработени, за да се улесни разделянето на дуплекси, за да се открият от външен материал и/или за да се амплифицира сигнал, който се открива. Един метод за амплифициране на сигнала използва амплифицирани мултимери, които са полинуклеотиди с първи сегмент, който хибридизира към анализирана нуклеинова киселина или верига на нуклеинова киселина, свързана към анализираната и повтаряна на втория сегмент, които хибридизират специфично към маркираната проба. Амплифицирането теоретично е пропорционално на броя на повторения на втория сегмент. Мултимерите могат да са или линейни или разклонени. Използват се два общи вида разклонени мултимери при тези техники: вилообразни (разцепени) и гребеновидни. Методи за получаване и използване на разклонени молекули на нуклеинови киселини са известни от предшествващото състояние на техниката и са описани в, например, патент на САЩ № 5,849,481.

При един друг аспект на настоящото изобретение, два или повече от описаните по-горе тестове се провеждат, за да се потвърди присъствието на организъм. Например, ако първият тест използва медираното от транскрипцията амплифициране (ТМА) за да се амплифицират нуклеиновите киселини за откриване, тогава алтернативно се провежда изследване за тестване на нуклеинови киселини (NAT), например, при използване на PCR амплифициране, RT PCR и други подобни, както е описано в настоящото. Следователно, Parvovirus B19 може специфично и селективно да се открие, даже когато пробата съдържа други организми, като H)V, и вируса на хепатит В, например.

Както е видно, проектирането на изследвания, описани в настоящото, е обект на големи вариации, и много формати, известни от предшестващото състояние на техниката. Горните описания са представени просто за опъване и специалистът в областта лесно може да модифицира описаните протоколи, при използване на техники, добре известни от предшестващото състояние на техниката.

Горе-описаните реагенти на изследванията, включително праймери, проби, твърди носители с прикрепени проби, така както и други реагенти за откриване, могат да се доставят на комплекти (китове), с подходящи инструкции и други необходими реагенти, с цел да се проведат изследванията, описани по-горе. Комплекта съдържа, обикновено, в различни контейнери, комбинацията от праймери и проби (или вече свързани към твърд носител или разделени, с реагенти за свързването им към матрикса), контролни лекарствени форми (позитивна и/или негативна

контрола), маркирани реагенти, когато формата на изследването изисква това и реагенти генериращи сигнали (например, ензимен субстрат) ако маркерът не генерира директно сигнал. Инструкции (например, написани, записани, VCR, CD-ROM, и други) за провеждане на изследването се включват обикновено в комплекта. Комплектът може да съдържа, също така, в зависимост от определеното използвано изследване, други пакетирани реагенти и материали (т.е., промивни буфери и други подобни). Стандартни изследвания, като описаните по-горе, могат да се проведат при използване на тези комплекти.

III ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Следват примери на специфични варианти за изпълнение на изобретението. Примерите се предлагат с илюстративна цел единствено, и не се считат за ограничаващи обхвата на настоящото изобретение, по какъвто и да е начин.

Направени са усилия да се осигури точност по отношение на използваните числа (например, количества, температури и др.), но се допуска да са направени някои експериментални грешки и отклонения.

При следващите примери, ензимите се доставят от търговската мрежа, и се използват съгласно опътването на производителя. Нитроцелулозни филтри и други такива също се доставят от търговската мрежа.

При изолирането на ДНК фрагменти, с изключение на това когато е отбелязано, всички манипулации с ДНК се

провеждат съгласно старндартни процедури. Виж, Sambrook et al., по-горе. Рестрикционни ензими, T₄ ДНК лигаза, E. coli, ДНК полимераза I, фрагмент на Klenow и други биологични реагенти могат да се доставят от пазарни доставчици и да се използват според препоръките на производителя. Двуверижни ДНК фрагменти се разделят върхе агарозни гелове.

ПРИМЕР 1

Екстрахиране на нуклеинова киселина на Parvovirus B19 за PCR

Проби от човешки серум, които са дали положителни проби за човешки Parvovirus B19 или чрез IgM или PCR тестове се получават от търговската мрежа и се използват за изолиране на ДНК за последващи PCR експерименти. Пробите се съхраняват при -80°C до използването им.

ДНК се екстрахи от 0,2 mL серум, при използване на QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) според указанията на производителя, при следните съображения. Носител на ДНК се добавя към лизисния буфер за да се засили свързването на нуклеиновата киселина и добива. По-специално, прибавя се едно количество от 5,6 µg на проба полиаденилова киселина 5' (Sigma, St. Louis, MO) или поли-dA (Roche, Indianapolis, IN). Допълнително, ДНК на Parvovirus B19 се елюира с 200 µL буфран AE (Qiagen), вместо с вода.

ПРИМЕР 2

Откриване чрез PCR на положителни проби на нуклеинова киселина на Parvovirus B19

Използват се две различни PCR процедури за амплифициране на фрагменти на Parvovirus B19. един метод, описан подробно по-долу, се използва за амплифициране на фрагменти от приблизително 700 bp, 370bp и 214 bp (виж фигура 1). За амплифициране на фрагменти от приблизително 4,7 kb се използва High Fidelity Expand PCR (Roche). Фрагментът от приблизително 700 bp съответства на нуклеотидни позиции 2936-3635 на генома на Parvovirus B19, описан в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Приблизително 370 bp се среща в 700 bp фрагмента при нуклеотидни позиции 3073-3442. Приблизително 4,7 kb фрагментът е 4677 нуклеотиден фрагмент, съответстващ на нуклеотидни позиции 217-4893 от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. С цел да се амплифицира фрагментите на Parvovirus B19 от приблизително 700 bp, 370 bp и 214 bp, се използва праймерът, показан на таблица 1.

ТАБЛИЦА 1

Област на праймера	Последователност	PCR продукт	Геномен
VP-5	AGGAAGTTTGCCGGAAGTTC (SEQ ID NO: 36)	370 bp	VP1
VP-3	GTGCTGAAACTCTAAAGGTG (SEQ ID NO: 37)	370 bp	VP1
VP-5	GACATGGATATGAAAAGCCTGAAG (SEQ ID NO: 38)	214 bp	
VP1/VP2			
VP2-3	GTTGTTTCATATCTGGTTAAGTACT (SEQ ID NO: 39)	214 bp	
VP1/VP2			
K-1sp	ATAAATCCATATACTCATT (SEQ ID NO: 40)	700 bp	
VP1/VP2			
K-2sp	CTAAAGTATCCTGACCTTG (SEQ ID NO: 41)	700 bp	
VP1/VP2			

За този експеримент, PCR се провежда в краен обем от 100 μ L, при използване на 2 μ L пречистена ДНК от Parvovirus B19 (пречистена, както е описано по-горе), 0,2 mM от всеки дезокси нуклеотид трифосфат и 1,25 единици Pfu ДНК полимераза (Stratagene, La Jolla, CA). профилът на амплифициране включва денатуриране при 94°C за 2 минути, хибридиране на праймера при 37°C за 3 минути, и удължаване при 72°C за 3 минути в продължение на 35 цикъла. 3-минутно предварително инкубиране при 94°C, за да се осигури началното денатуриране и крайно 7-минутно инкубиране на 72°C, за да осигури пълното удължаване на фрагментите, предхождат и следват, съответно, 35-те PCR цикъла. PCR продуктите се подлагат на електрофореза върху 7% полиакриламидни гелове, оцветяват се с етидиев бромид и се визуализират под UV източник. Пречистване на амплифицираните фрагменти се провежда при използване на QiaQuick PCR комплект за пречистване (QIAGEN).

Серия PCR за амплифициране на 370 bp B19 фрагмент се провежда, когато 700 bp ивицата не се визуализира върху полиакриламидните гелове. 700 bp ДНК материалът се използва за серията PCR, при използване на праймери, показани на таблица 1.

High Fidelity Expand PCR (Roche) се използва за амплифициране на Parvovirus B19 фрагмент от 4,7 kb, както следва. High Fidelity Expand PCR (Roche) и праймери Hicks-5 (5' CCCGCCTTATGCAAATGGGCAG 3') (SEQ ID NO: 42) и Hicks-3 (5' TTGTGTTAGGCTGTCTTATAGG 3') (SEQ ID NO: 43) се използват според препоръките на производителя.

Условията на амплифициране са 94°C за 1 минута, 50°C за 2 минути, и 68°C за 4 минути за 35 или 45 цикъла. Пред-инкубиране при 94°C за 2 минути и след-инкубиране при 75°C за 7 минути също се включват. PCR продуктите се разделят върху 1% агарозни гелове и се пречистват при използване на PCR Purification kit (Promega, Madison, WI).

ПРИМЕР 3

Клониране на ДНК фрагменти на Parvovirus B19

PCR фрагментите се клонират в TOPO-TA вектори (Invitrogen, Carlsbad, CA). Клонирането в тези вектори е силно улеснено, когато амплифицираната ДНК съдържа единичен дезоксиаденозин (A) при нейния 3' край. В съответствие, се използва каталитична реакция за прибавяне на 3' (A) главичка. Реакционната смес съдържа 1,25 mM dATP, 0,5 единици Taq полимераза (Perkin Elmer, Boston, MA) и се извършва при 72°C за 15 минути.

PCR фрагменти се клонират в pCR2.1-TOPO вектор, при използване на Invitrogen TA cloning kit (TOPO™ Cloning® Kit with One Shot TOP10 Electrocomponent Cells) следвайки инструкциите на производителя. Бактериалните клетки се инкубират при 37°C върху Luria Broth блюда, съдържащи ампицилин при 100 µg/ml, 0,66 mM IPTG и 0,033% X-Gal. Голям брой бели колонии се инокулират в 4 mL Luria Broth ампицилин (100 µg/ml) и се инкубират през цялата нощ при 37°C с разклащане. Три милилитра от нощните култури се използват за приготвяне на плазмидна ДНК чрез използване на QIAprep Miniprep kit (QIAGEN). Рекомбинантните клонове

се идентифицират чрез анализ с рестрикционни ензими с EcoRI (New England and Biolabs) и 7% полиакриламидна или 1% агарозна гел електрофореза, както е описано по-горе.

С цел да се определят ДНК последователностите на клоновете, големи количества плазмиди от рекомбинантните клонове се приготвят, както по-горе, и ДНК се суспендира в TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) при 0,2 mg/ml. Определянето на нуклеотидната последователност на фрагментите на Parvovirus B19 се провежда при използване на Applied Biosystems Model 373 (или модел 377) ДНК секвенаторна система.

Фигери 2A до 2U (SEQ ID NOS: 1-21) изобразяват ДНК последователности от 21 изолата на Parvovirus B19, пречистени, амплифицирани и секвенирани, както е описано по-горе, което отговаря на нуклеотидни позиции 2936-3635 на генома на Parvovirus B19, описан от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 (700 bp фрагментът от фигура 1 и описан по-горе). Фигура 2A (SEQ ID NO: 1) е последователността от изолат CH47-26; фигура 2B (SEQ ID NO: 2) е последователността от изолат CH48-29; Фигура 2C (SEQ ID NO: 3) е последователността от изолат CH33-2; Фигура 2D (SEQ ID NO: 4) е последователността от изолат CH33-263; Фигура 2E (SEQ ID NO: 5) е последователността от изолат CH33-4; Фигура 2F (SEQ ID NO: 6) е последователността от изолат CH42-7; Фигура 2G (SEQ ID NO: 7) е последователността от изолат CH42-18; Фигура 2H (SEQ ID NO: 8) е последователността от изолат CH42-2619; Фигура 2I (SEQ ID NO: 9) е последователността от изолат CH46-23; Фигура 2J (SEQ ID NO: 10) е последователността от изолат CH1-1; Фигура 2K

(SEQ ID NO: 11) е последователността от изолат CH1-6; Фигура 2L (SEQ ID NO: 12) е последователността от изолат CH2-8; Фигура 2M (SEQ ID NO: 13) е последователността от изолат CH2-10; Фигура 2N (SEQ ID NO: 14) е последователността от изолат CH2-11; Фигура 2O (SEQ ID NO: 15) е последователността от изолат CH5-13; Фигура 2P (SEQ ID NO: 16) е последователността от изолат CH7-22; Фигура 2Q (SEQ ID NO: 17) е последователността от изолат CH13-27; Фигура 2R (SEQ ID NO: 18) е последователността от изолат CH14-18; Фигура 2S (SEQ ID NO: 19) е последователността от изолат CH62-2; Фигура 2T (SEQ ID NO: 20) е последователността от изолат CH64-2; Фигура 2U (SEQ ID NO: 21) е последователността от изолат CH67-2.

Фигури 11A до 11Z (SEQ ID NO: 62-87) изобразяват ДНК последователности от допълнителни 26 изолата на Parvovirus B191 пречистени, амплифицирани и секвенирани, както е описано по-горе, което отговаря на нуклеотидни позиции 2936-3635 на генома на Parvovirus B19, описан в Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 (700 bp фрагмента от фигура 1 и аписон по-горе). Фигура 11A (SEQ ID NO: 62) е последователността от изолат CH80-1; фигура 11B (SEQ ID NO: 63) е последователността от изолат CH81-3; фигура 11C (SEQ ID NO: 64) е последователността от изолат B19SCL1-4; фигура 11D (SEQ ID NO: 65) е последователността от изолат B19SCL2-1; фигура 11E (SEQ ID NO: 66) е последователността от изолат B19SCL3-1; фигура 11F (SEQ ID NO: 67) е последователността от изолат B19SCL4-3; фигура 11G (SEQ ID NO: 68) е последователността от изолат B19SCL5-2; фигура 11H (SEQ ID NO: 69) е

последователността от изолат B19SCL6-2; фигура 11I (SEQ ID NO: 70) е последователността от изолат B19SCL7-3; фигура 11J (SEQ ID NO: 71) е последователността от изолат B19SCL8-2; фигура 11K (SEQ ID NO: 72) е последователността от изолат B19SCL9-1; фигура 11L (SEQ ID NO: 73) е последователността от изолат B19SCL9-9; фигура 11M (SEQ ID NO: 74) е последователността от изолат B19SCL10-2; фигура 11N (SEQ ID NO: 75) е последователността от изолат B19SCL11-1; фигура 11O (SEQ ID NO: 76) е последователността от изолат B19SCL12-1; фигура 11P (SEQ ID NO: 77) е последователността от изолат B19SCL13-3; фигура 11Q (SEQ ID NO: 78) е последователността от изолат B19SCL14-1; фигура 11R (SEQ ID NO: 79) е последователността от изолат B19SCL15-3; фигура 11S (SEQ ID NO: 80) е последователността от изолат B19SCL16-2; фигура 11T (SEQ ID NO: 81) е последователността от изолат B19SCL17-1; фигура 11U (SEQ ID NO: 82) е последователността от изолат B19SCL18-1; фигура 11V (SEQ ID NO: 83) е последователността от изолат B19SCL19-1; фигура 11W (SEQ ID NO: 84) е последователността от изолат B19SCL20-3; фигура 11X (SEQ ID NO: 85) е последователността от изолат B19SCL21-3; фигура 11Y (SEQ ID NO: 86) е последователността от изолат B19SCL22-11; фигура 11Z (SEQ ID NO: 87) е последователността от изолат B19SCL2-14.

Сравняването на последователностите показва приблизително 98% до 99,5% хомоложност на последователностите от тази 700 bp последователност между различните изолати.

Фигури 3A-3C (SEQ ID NO: 22) показват последователността на приблизително 4,7 kbp PCR фрагмент, показан на фигура 1 и описан по-горе, от Parvovirus B19 клон 2B1. Изобразената последователност на фигурите е 4677 нуклеотиден фрагмент, съответстващ на нуклеотидни позиции 217-4893 по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. Изобразената последователност съдържа пълната дължина на отворената рамка на разчитане на Parvovirus B19, която кодира NS1, VP1 и VP2, плюс допълнителни 5' и 3' нетранслирани последователности. Секвенираният фрагмент съдържа един допълнителен нуклеотид в 5' не кодиращата област между нуклеотидни позиции 367 и 368 на последователността на Parvovirus B19, посочена от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. фигури 4A-4C (SEQ ID NO: 23) показва последователността на приблизително 4,7 kbp PCR фрагмент, показана на фигура 1 на Parvovirus B19 клон 2-B6. последователността е 4677 нуклеотиден фрагмент, съответстващ на нуклеотидни позиции 217-4893 по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. изобразената последователност съдържа пълната дължина на отворената рамка на разчитане на Parvovirus B19, която кодира NS1, VP1 и VP2, плюс допълнително 5' и 3' нетранслирани последователности. Този секвениран фрагмент съдържа допълнителен нуклеотид в 5' не кодиращата област между нуклеотидни позиции 367 и 368 на последователността на Parvovirus B19 докладвана от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936.

ПРИМЕР 4**Клониране и експресиране на Parvovirus B19, VP1 и VP2 рекомбинантни протеини**

Фрагменти, кодиращи NS1, VP1 и VP2 (виж фигура 1) се амплифицират при използване на 4,7 kb фрагмент на Parvovirus B19, клониран в pCR2.1-TOPO (описан по-горе). Поспециално, PCR праймери (виж по-долу) се проектират за PCR на NS1, VP1 и VP2 области на Parvovirus B19, за да се улесни клонирането на тези области в дрождеви експресионни вектори. XbaI, HindIII и SalI рестрикционни сайтове се въвеждат в праймерите, каквото е изискването.

Използваните праймери за клониране и амплифициране на фрагменти от Parvovirus B19 за дрождева експресия в NS1, VP1 и VP2 рекомбинантни протеини се основават на последователностите, получени по-горе и са както следва:

NS1-5 (сенс праймер)

5' ATACTCTCTAGACAAAACAAAATGGAGCTATTTAGAGGGG
TGCTTCAAGTTTCT 3' (SEQ ID NO :44)

NS1-3 (анти-сенс праймер)

5' GAGTATGTCGACTTACTCATAATCTACAAAGCTTTGCAAT
CCAGACAG 3' (SEQ ID NO :45)

VP1-5SN (сенс праймер)

5' ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGAGTAAAGAAAGTGG
CAAATGGTGGGAAAGT 3' (SEQ ID NO :46)

VPALL-3 (анти-сенс праймер)

5' GAGTATGTCTGACTTACAATGGGTGCACACGGCTTTT
GGCTGTCCACAATTC 3' (SEQ ID NO :47)

VP2-5SN (сенс праймер)

5' ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGACTTCAGTTAATT
CTGCAGAAGCCAGCACT 3' (SEQ ID NO :48)

PCR праймери се синтезират, пречистват и се суспендират в 300 μL dH_2O и се определя тяхната оптическа плътност при 260 nm. Реакционната смес съдържа 0,25 ng чатрица, 100 pmol от всеки праймер, 10 μL 1,25 mM от всеки dNTP и 1 единица Taq полимераза (Perkin Elmer, Boston, MA) в краен обем от 50 μL . Условиата на амплифицирането са 94°C за 1 минута, 50°C за 2 минути, и 68°C за 4 минути, в продължение на 35 цикъла. Прибавят се 7-минутно пост-инкубиране при 75°C, за да се осигури пълното удалжаване на фрагментите. Аликвотни части от 5 μL се използват за проверка на PCR синтеза чрез електрофореза върху 1% агарозни гелове. Целият PCR продукт след това се подлага на електрофореза и фрагментите, които проявяват очакваните размери се пречистват от геловите при използване на PCR Purification kit (Promega), като се спазват инструкциите на производителя. Приблизително 0,8 μg пречистена PCR ДНК се смилат с подходящи рестрикционни ензими (Roche) за 3 часа при 37°C и продуктите се пречистват, след това, чрез използване на Promega PCR Purification kit.

Плазамид ,BS24.1 се използва за хетероложна експресия на Parvovirus B19 рекомбинантни протеини. Дрождевият експресионен вектор съдържа 2 μ последователности и обратни промотори (IR) за автономно репликтиране в дрожди, α -фактор терминатор за осигуряване завършването на транскрипцията, и дрождев leu2-d и URA3 за селекция. ColE1 началото на репликация и β -лактамазния ген също присъстват за размножаване и селектиране на *E. coli* (Pichuanes et al., (1996) "Expression of Heterologous Gene Products in Yeast" In: Protein Engineering: A Guide to Design and Production, Chapter 5. J.L. Ckeand and C. Craik, eds., Wiley-Liss, Inc. , New York, N.Y. pp. 129-161. Плазмид pBS24.1 се смила с BamHI/SacII и се дефосфорилира с 1- единици телешка чревна алкална фосфатаза (Boeringer Mannheim, Indianapolis, IN) при условия, препоръчани от производителя. Смляните и пречистени фрагменти се смесват с BamHI/SacII смлян pBS24.1 и ДНК фрагмент, съдържащ дрождев хибриден промотор ADH2/GAPDH (Cousens et al., (1987) 61:265-275) смляни или с BamHI/SfuI или с BamHI/HindIII, според рестрикционните сайтове в PCR фрагментите, които трябва да се клонират. Сместта за лигиране се използва, след това, за трансформиране на *E. coli* HB101 компетентни клетки и трланнсформантите се селектират в Luria-Broth блюда, съдържащи ампицилин 100 μ g/ml, след инкубиране през цялата нощ при 37°C. Няколко колонии от всяко трансформиране са взимат и се инкубират в 3 mL Luria-Broth ампицилин при 100 μ g/ml и се инкубират при 37°C, при разклащане през цялата нощ.

Плазмидна ДНК се приготвя при използване на 1,5 mL култури и QIAprep Miniprep kit (QUIAGEN). Рекомбинантни клонове се идентифицират чрез аналитичен рестрикционен ензимен анализ с BamHI-Sall. Препарати в голям мащаб на рекомбинантни плазмиди се приготвят за получаване на секвениране, за да се потвърди нуклеотидната последователност на клонираните Parvovirus B19 фрагменти.

Дрождеви експресионни плазмиди проявяващи очаквана последователност за NS1, VP1 и VP2 се използват за трансформиране на дрожди, както следва. Компетентни *Saccharomyces cerevisiae* AD3 клетки [Mat a, trp1+, ura3-52, prb1-1122, pep4-3, prc1-407, [cir⁰],::pDM15(pGAP/ADR1::G148^R)], leu2(ΔAD)] се трансформират с плазмидна ДНК-и, кодиращи NS1, VP1 и VP2, клонирани както е описано по-горе. селектирането на рекомбинантните дрожди се извършва на два тура на блюда с недостиг на урацил, с последващ тур на блюда с недостиг на левцин, след инкубиране на при 30°C за 48-72 часй. След това, културите се развиват в среда с недостиг на левцин, а после с добавка на YEP с 2% глюкоза (Pichuanes et al., Proteins: Struct. Funct. Genet. (1989) 6:324-337) в продължение на 48 часа преди да се провери експресията на рекомбинантни протеини.

Секвенирането на различни протеини от два различни изолата са показани на фигури 5-10. По-специално, фигури 5A (SEQ ID NO:24) и 5B (SEQ ID NO:25) показват последователностите на NS1 нуклеотид и протеин, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B1. Фигури 6A (SEQ ID NO:26) и 6B (SEQ ID NO:27) показват VP1 нуклеотидна и протеинова последователност, съответно, от Parvovirus B19

клон 2-B1. Фигури 7A (SEQ ID NO:28) и 7B (SEQ ID NO:29) показват VP2 нуклеотидна и протеинова последователност, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B1. NS1 нуклеотидна и протеинова последователност, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B6. Фигури 9A (SEQ ID NO:32) и 9B (SEQ ID NO:33) показват VP1 нуклеотидна и протеинова последователност, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B6. Фигури 10A (SEQ ID NO:34) и 10B (SEQ ID NO:35) показват VP2 нуклеотидна и протеинова последователност, съответно, от Parvovirus B19 клон 2-B6.

ПРИМЕР 5

Откриване и количествено определяне на Parvovirus B19 ДНК чрез TaqMan™

Чувствителен диагностичен метод за откриване на Parvovirus B19 инфекция се проектира както следва. Поспециално се използва TaqMan™ PCR технология за откриване и количествено определяне на ДНК на Parvovirus B19. количествения PCR изисква ефикасно екстрахиране на нуклеинова киселина. Използваното количество на плазма/серум за екстрахиране на ДНК също влияе върху чувствителността на откриване. Използват се два подхода за изолиране на нуклеинова киселина от 0,5 ml плазма/серум. поспециално, ДНК се екстрахира чрез (а) свързване към силициев двуоксид; и (b) хибридизиране към олигонуклеотиди специфични за мишени.

(а) Изолиране на нуклеинова киселина чрез свързване към силициев двуоксид

В присъствие на високи концентрации на хаотропни соли, като гуанидин изоцианат, нуклеинови киселини свързани към силициев двуоксид. Нуклеиновикиселини с малки размери се свързват по-ефикасно към силициев двуоксид при условия на кисело рН. Свързаните нуклеинови киселини ефикасно се елюират в слаба сол, алкален рН буфер при висока температура. Заместването на магнезиниран силициев двуоксид с редовен силициев двуоксид силно улеснява етапите на промиване и елюиране на изолирана нуклеинова киселина. Магнитизирана основа се използва за залавяне на частиците нуклеинови киселини свързани към силициев двуоксид, като по този начин се елиминира центрофугирането, което се изисква за утаяване на частици на редовен силициев двуоксид.

Използваният лизисен буфер е от Organon-Teknika (Durham, NC). Този лизисен буфер съдържа гуанидин изотиоцианат за постигане на разтворимост на протеините и за инактивиране на РН-ази и ДН-ази. Детергентът Triton X-100 допълнително улеснява процеса на разтваряне и дезинтегриране на клетъчната структура и ядрени протеини, като така се отделя нуклеиновата киселина. Лизисният реагент се подкислява, за да се засли свързването на нуклеиновата киселина, и 50 µl алкален буфер за елюиране се използват за елюиране на свързаната нуклеинова киселина. След изолирането на нуклеиновата киселина, присъствието на ДНК от Parvovirus B19 се определя чрез провеждане на TaqMan™ PCR, както е описано по-долу.

(b) изолиране на нуклеинова киселина чрез хибридиране към специфични към мишената олигонуклеотиди

Въпреки че използването на магнитизиран силициев двуоксид много улеснява бързото и лесно боравене по време на етапите на промиване и елюиране, изолирането на нуклеинова киселина е все още е трудоемко и изисква време. Затова се използва едноетапното залавяне на специфична нуклеинова киселина мишенва от плазмата или серума, при използване на магнитни перли. За да се направи това приложимо за голямо разнообразие от тестове за залавяне на нуклеинова киселина се използват генерични магнитни перли, прикрепени към обиго dT. Sera-Mag магнитни олиго (dT) перли (Seradyn, Indianapolis, IN) с олиго dT с 14-мерна дължина се използват в комбинация с Capture олигонуклеотиди, съдържащи 20 поли A's при 3' края граничещ с използваната специфична Parvovirus последователност (проектирана на края на описаната по-долу последователност).

Използваните антисенс олигонуклеотиди за залавяне произлизат от 700 bp фрагмент и са както следва:

VSPC1-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCTTAACAGCAATTT
CTGATA (nt 3492-3514) (*)
(SEQ ID NO :49)

VSPC2-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCCCTGTAGTGCTGT
CAG (nt 3549-3568)
(SEQ ID NO :50)

VSPC3-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATACCCAAATAGGAA
 GTTCTG (nt 3639-3660)
 (SEQ ID NO :51)

VSPC4-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAATGCTGATTCTTCA
 CTTGC (nt 3737-3759)
 (SEQ ID NO :52)

VSPC5-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCTGTACCTCCTG
 TACCTA (nt 3789-3800)
 (SEQ ID NO :53)

VSPC6-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCTCTAAATTTT
 CTGGG (nt 3838-3857)
 (SEQ ID NO :54)

VSPC7-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCTAATGTGTCA
 GGAACC (nt 3910-3929)
 (SEQ ID NO :55)

(*) Нуклеотидните номера са съгласно Shade et al., J. Virol.
 (1986) 58:921-936

Магнитните перли се суспендират в Novagen лизисен буфер (Madison, WI) и серия от седем олигонуклеотида за залавяне (VSPC1- VSPC7, описан по-горе) се тества индивидуално или в комбинация, за заловена ДНК на Parvovirus B19 от панел, получен от FDA Center for Biologic and Research, U.S. Department of Health and Human Services (FDA-CBER).

(с) Промиване на перлите с промивен буфер

Сед залавянето, перлите се промиват с буфер, съдържащ 10 mM Hepes, буфериран до pH 7,5 в 0,3 M NaCl., и 0,5% NP-40. след обработване на серума с лизисен буфер, хибридизиране, магнитна абсорбция на перлите, и отстраняване на лизисния буфер, 1,5 ml от промивния буфер се добавят към перлите. След рутинното вортексиране, магнитната абсорбция, и отстраняването на промивния буфер, перлите се промиват втори път в 0,5 ml от същия буфер, така че магнитните перли да могат да се приведат в компактна маса, за по-лесно суспендиране в 100 ml Universal PCR буфер, съдържащ всички реагенти за TaqMan изследване. Перлите със заловената ДНК се прехвърлят в TaqMan™ блюда за откриване чрез TaqMan™ PCR, както е описано по-долу. Няколко комбинации на олигонуклеотиди са ефикасни при залавянето на B19, както се открива чрез TaqMan™ изследване.

По-специално, TaqMan™ технологията амплифицира заловената нуклеинова киселина мишена, като ДНК ампликони. Една алтернатива е амплифицирането на заловената мишена като РНК. За тази цел, заловените олигонуклеотиди се състоят от Parvovirus B19-специфичен праймер с T7 промоторна последователност, с цел да се генерира РНК ампликони, при използване на T7 РНК полимераза. Три амплификационни праймера (VSA1-A3, описани по-долу, произлезли от 700 bp последователност, съответстваща на нуклеотиди 2936-3635 на Parvovirus B19 генома, описан от Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936 се

тастват за тяхната способност за амплифициране.
 Праймерите са както следва:

сенс верига на амплификационни праймери

VSA1-AATTCTAATATGACTCACTATAGGGAGAAGGCCATATAC
 TCATTGGACTGT (nt 2942-2961)
 (SEQ ID NO :56)

VSA2-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCAGAGC
 ACCATTATAA (nt 3272-3288)
 (SEQ ID NO :57)

VSA3-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACAATG
 CCAGTGGAAG (nt 3317-3333)
 (SEQ ID NO :58)

VSP2-GTGCTGAAACTCTAAAGGT
 (анти-сенс праймер nt 3424-3442) (SEQ ID NO :59)

Реагенти от кит за амплифициране на РНК (Qiagen) се използват за проучване на ефикасността на амплифицирането, при използване на 50 копия на ДНК от Parvovirus като мишени в един краен обем от 20 ml. Амплификационните праймери се тестват по отделно или в комбинация при използване на VSP2 като втори праймер. След инкубиране за един час при 42°C, както се препоръчва от производителя, една аликвотна част от амплифицирания материал се разтваря 100-кратно, за изследване чрез TaqMan™ изследване, за да се установи ефикасността на

амплификационните праймери. Комбинация от два амплификационни праймера, VSA2 и VSA3 с VSA2 е силно ефикасна при генериране на РНК ампликони.

Чувствителността на TaqMan™ изследването, стабилността на PCR праймерите и оптималните условия на реакцията се установяват при използване на плазмидна ДНК съдържаща 4,7 kb фрагмента, описан по-горе. този фрагмент включва VP1 областа, както и NS1 и VP2 областите (виж фигура 1). Използват се PCR амплификационни праймери, произлизащи от VP1 областа, както са дадени подробно по-долу. Номерирането е относително по Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936. X представлява 5'-флуоресцеин фосфорамидит, а Z представлява DABCYL-dT, и двете получени от Glen Research Corporation, Sierling, VA. Номерата, посочени от дясната страна на последователността се отнасят до нуклеотидите в праймерите от последователността на Parvovirus B19.

VSP1-GGAGGCAAAGGTTTGCA (сенси праймер-nt 3334-3350)
(SEQ ID NO :60)

VSP2-GTGCTGAACTCTAAAGGT
(анти-сенси праймер-(nt 3424-3442) (SEQ ID NO :59)

VSPPR1-XCCCATGAAGATATTTAGATTZ (проба nt 3379-3398)
(SEQ ID NO :61)

Vpra 8: TCCATATGACCCAGAGCACCA (nt 3262-3460)
(SEQ ID NO :88)

Vpra 9: TTTCCACTGGCATTGTGGC

(анти-сенс праймер-nt 3313-3331)

(SEQ ID NO :89)

Vpra 10: X AGCTAGACCTGCATGTCACTG Z,

където X е Fam, а Z е Tamra.

(nt 3286-3310)

(SEQ ID NO :90)

Концентрацията на плазмидна ДНК се изчислява на спектрофотометрично и се провежда серийно разреждане, за да се получат 5,000-10 копия/20 µl. Реакционната смес в краен обем от 50 µl съдържа 20 µl проба, 1 X Gold Taq амплификационен буфер (Perjın Elmer) с 3,2 mM MgCl₂, 300 µM от всеки от dNTPs, 1 pmol от всеки от амплификационните праймери, 0,4 pmol от пробата, и 1 единица AmpliTaq ензим. Реакционните условия включват 10 минути при 95°C за активиране на ензима, следвано от 45 цикъла по 30 секунди при 95°C, като се редуват с 60°C в ABI 7700 Sequence Detector.

Чрез използавен на праймерната двойка VSP1 и VSP2, който генерира 109 bp PCR продукт и проба VSPR1, се откриват най-малко до 10 копия. Тъй като обема на пробата е 20 µl в краен обем 50 µl, това подсказва, че плазмените проби съдържащи най-малко 50 копия/ml от Parvovirus B19 ДНК биха могли да се екстрахират и да се открият чрез TaqMan™ технология. Тъй като Parvovirus е високо титърен вирус, плазма/серум обеми от 50 µl биха могли да се екстрахират и да се използват за анализ.

При използване на FDA-CBER Parvovirus B19 ДНК положителна проба (10^6 копия/ml) TaqMan™ технологията открива поне 50 копия на изследване. В опит да се свържи нуклеиновата киселина и имунотитъра, заредената вирусна ДНК се изследва количествено при няколкопозитивни на антиляло проби.

В съответствие, описват се нови последователности на човешки Parvovirus B19 и изследвания за откриване, които използват тези последователности. От горе-изложеното, става ясно, че въпреки че са описани специфични варианти за получаване на изобретението са описани в настоящото с илюстративна цел, различни модификации могат да се направят без да се излиза от идеята и обхвата му.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за откриване на инфекция от човешки Parvovirus B19 в биологична проба, където

(a) се изолира нуклеинова киселина от биологична проба, за която се предполага, че съдържа човешки Parvovirus B19, характеризиращ се с това че посочената нуклеинова киселина включва РНК последователност мишена;

(b) изолираната нуклеинова киселина на човешки Parvovirus B19 влиза в реакция с един първи олигонуклеотид, който съдържа един първи праймер, включващ последователност образуваща комплекс, достатъчно комплементарна към 3'-терминалния участък на последователността мишена на РНК за образуване на комплекс с него, като посоченият първи праймер съдържа, освен това, промотор за ДНК зависима РНК полимераза 5' и е операционно свързан към последователността образуваща комплекс, при което реагирането се провежда при условия осигуряващи образуването на комплекс олигонуклеотид/ последователност мишена и инициране на синтеза на ДНК;

(c) удължава се първият праймер при една реакционна удължаване чрез използване на РНК последователността мишена, като матрица, до получаване на продукт на удължаването на първия ДНК праймер, комплементарен на РНК последователността мишена;

(d) разделя се продукта от удължаването на първия ДНК праймер от РНК последователността мишена при използване на ензим, който избирателно разгражда РНК последователността мишена;

(е) третира се продукта от удължаването на ДНК праймера с втори олигонуклеотид, съдържащ втори праймер, включващ последователност образуваща комплекс, достатъчно комплементарна на 3'-терминалния участък на продукта на удължаването на ДНК праймера, за образуване на комплекс с него при условия осигуряващи образуването на комплекс олигонуклеотид/последователност мишена и инициране на синтеза на ДНК;

(f) удължава се 3'-терминуса на втория праймер в реакция за удължаване на ДНК до получаване на продукта на удължаването на втория ДНК праймер, като се получава матрица за ДНК-зависима РНК полимераза;

(g) използва се матрицата да получаване на множество РНК копия на последователността мишена, при използване на ДНК-зависима РНК полимераза, разпознаваща промоторната последователност; и

(h) използват се РНК копията от етап (g), аавтокаталитично се повтарят етапи (b) до (g) за амплифициране на последователността мишена.

2. Метод, съгласно претенция 1, който включва освен това етапите на :

(i) прибавя се маркирана олигонуклеотидна проба към продукта от етап (h), характеризиращ се с това че, посочената олигонуклеотидна проба е комплементарна на участък от посочената последователност мишена, при условия, които предоставят възможност за хибридизиране на посочената проба с посочената последователност мишена за да се образува комплекс проба:мишена ; и

(j) открива се присъствието или отсъствието на маркер, като означение за присъствие или отсъствие на последователност мишена.

3. Метод, съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че посоченият маркер е акридинов естер.

4. Метод, съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че посочените първи и втори праймери, и посочената проба произлизат от VP1 областа на генома на човешки Parvovirus B19.

5. Метод, съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че посочените първи и втори праймери, и посочената проба произлизат от нуклеотидна последователност посочена на коя да е от фигури 2A-2U или фигури 11A-11Z.

6. Метод, съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че предоставя, освен това, вътрешен контрол в етап (b).

7. Метод, съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че вътрешният контрол произлиза от последователността от фигура 12 (SEQ ID NO:92).

8. Метод, съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че вътрешният контрол включва SEQ ID NO:90.

9. Метод за откриване на инфекция от човешки Parvovirus B19 в биологична проба, като посоченият метод включва:

(a) се изолира нуклеинова киселина от биологична проба, за която се предполага, че съдържа човешки Parvovirus B19, характеризиращ се с това че посочената нуклеинова киселина включва РНК последователност мишена;

(b) изолираната нуклеинова киселина на човешки Parvovirus B19 влиза в реакция с един първи олигонуклеотид,

който съдържа един първи праймер, включващ последователност образуваща комплекс, достатъчно комплементарна към 3'-терминалния участък на последователността мишена на РНК за образуване на комплекс с него, като посоченият първи праймер съдържа, освен това, промотор за ДНК зависима РНК полимераза 5' и е операционно свързан към последователността образуваща комплекс, при което посоченият първи праймер включва последователност произлизаща от полинуклеотидната последователност изобразена на коя да е от фигури 2A-2U или фигури 11A-11Z, като реагирането се провежда при условия осигуряващи образуването на комплекс олигонуклеотид/последователност мишена и инициране на синтеза на ДНК;

(с) удължава се първият праймер при една реакция на удължаване чрез използване на РНК последователността мишена като матрица, до получаване на продукт на удължаването на първия ДНК праймер, комплементарен на РНК последователността мишена;

(d) разделя се продукта от удължаването на първия ДНК праймер от РНК последователността мишена при използване на ензим, който избирателно разгражда РНК последователността мишена;

(е) третира се продукта от удължаването на ДНК праймера с втори олигонуклеотид, съдържащ втори праймер, включващ последователност образуваща комплекс, достатъчно комплементарна на 3'-терминалния участък на продукта на удължаването на ДНК праймера, за образуване на комплекс с него, при което посоченият втори праймер

произлиза от полинуклеотидна последователност, изобразена на коя да е фигура от 2A-2U или фигура 11A-11U, като реакцията протича при условия осигуряващи образуването на комплекс олигонуклеотид/последователност мишена и инициране на синтеза на ДНК;

(f) удължава се 3'-терминуса на втория праймер в реакция за удължаване на ДНК до получаване на продукта на удължаването на втория ДНК праймер, като се получава матрица за ДНК-зависима РНК полимераза;

(g) използва се матрицата за получаване на множество РНК копия на последователността мишена, при използване на ДНК-зависима РНК полимераза, разпознаваща промоторната последователност; и

(h) използват се РНК копията от етап (g), автокаталитично се повтарят етапи (b) до (g) за амплифициране на последователността мишена.

(i) прибавя се маркирана с акридинов естер олигонуклеотидна проба към продукта от етап (h), характеризиращ се с това че, посочената олигонуклеотидна проба е комплементарна на участък от посочената последователност мишена, като посочената проба произлиза от полинуклеотидна последователност, изобразена на коя да е фигура от 2A-2U или фигура 11A-11U, като посочената проба си прибавя при условия, които предоставят възможност за хибридизиране на посочената проба с посочената последователност мишена за да се образува комплекс проба:мишена ; и

(j) открива се присъствието или отсъствието на маркер, като означение за присъствие или отсъствие на последователността мишена.

10. Метод, съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че предоставя, освен това, вътрешен контрол в етап (b).

11. Метод, съгласно претенция 10, характеризиращ се с това, че вътрешният контрол произлиза от последователността от фигура 12 (SEQ ID NO:92).

12. Метод, съгласно претенция 10, характеризиращ се с това, че вътрешният контрол включва SEQ ID NO:90.

13. Метод за амплифициране на нуклеотидна последователност мишена на Parvovirus B19, характеризиращ се с това, че:

(a) изолира се нуклеинова киселина от биологична проба, за която се предполага, че съдържа ДНК от човешки Parvovirus B19, като посочената нуклеинова киселина включва РНК последователност мишена;

(b) прибавят се един или повече праймери способни да хибридизират с РНК последователността мишена, при което посочените един или повече праймери произлизат от полинуклеотидна последователност, изобразена на коя да е фигура от 2A-2U или фигура 11A-11U;

(c) прибавя се олигонуклеотидна проба, способна да хибридизира към РНК последователността мишена 3' отнасяща се към единия или повече праймери;

(d) удължават се единия или повече праймери при използване на полимераза.

14. Метод, съгласно претенция 13, характеризиращ се с това, че РНК последователността мишена от етап (а) се транскрибира обратно, за получаване на сДНК.

15. Метод, съгласно претенция 14, характеризиращ се с това, че освен това се амплифицира сДНК-та при използване на полимеразна верижна реакция (RT-PCR) или асиметрична гар лигазна верижна реакция (RT-AGLCR).

16. Метод, съгласно претенция 13, характеризиращ се с това, че полимеразата е термостабилна полимераза.

17. Метод, съгласно претенция 16, характеризиращ се с това, че термостабилната полимераза е Taq полимераза или Vent полимераза.

18. Метод, съгласно претенция 13, характеризиращ се с това, че полимеразата е E. coli ДНК полимераза I, Klenow фрагмент от E. coli ДНК полимераза I, или T4 ДНК полимераза.

19. Метод, съгласно претенция 13, характеризиращ се с това, че освен това в етап (b) се предоставя вътрешен контрол.

20. Метод, съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че вътрешният контрол произлиза от последователността на фигура 12 (SEQ ID NO:92).

21. Метод, съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че вътрешният контрол съдържа SEQ ID NO:90.

22. Полинуклеотид, включващ нуклеотидна последователност, която включва която и да е от нуклеотидните последователности, изобразени на фигури 2A-2U или фигури 11A-11Z.

23. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2A.

24. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2B.

25. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2C.

26. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2D.

27. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2F. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2E.

28. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2F.

29. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна

последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2G.

30. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2H.

31. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2I.

32. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2J.

33. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2K.

34. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2L.

35. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2M.

36. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна

последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2N.

37. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2O.

38. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2P.

39. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2Q.

40. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2R.

41. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2S.

42. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2T.

43. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна

последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 2U.

44. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11A.

45. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11B.

46. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11C.

47. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11D.

48. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11E.

49. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11F.

50. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна

последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11G.

51. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11H.

52. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11I.

53. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11J.

54. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11K.

55. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11L.

56. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11M.

57. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна

последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11N.

58. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11O.

59. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11P.

60. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11Q.

61. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11R.

62. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11S.

63. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11T.

64. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна

последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11U.

65. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11V.

66. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11W.

67. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11X.

68. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11Y.

69. Полинуклеотид, съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че посочената нуклеотидна последователност се състои от нуклеотидна последователност, изобразени на фигура 11Z.

70. Полинуклеотид, съдържащ нуклеотидна последователност, която включва която и да е нуклеотидна последователност, изобразена на фигури 3A-3C или 4A-4C.

71. Полинуклеотид, съгласно претенция 70, характеризиращ се с това, че се състои от нуклеотидна последователност, изобразена на фигури 3A-3C.

72. Полинуклеотид, съгласно претенция 70, характеризиращ се с това, че се състои от нуклеотидна последователност, изобразена на фигури 4A-4C.

73. Олигонуклеотиден праймер, състоящ се от промоторна област, която се разпознава от ДНК-зависима РНК полимерата операционна свързана към последователност специфично образуваща комплекс с човешки Parvovirus B19 от приблизително 10 до приблизително 75 нуклеотида.

74. Олигонуклеотиден праймер, съгласно претенция 73, характеризиращ се с това, че посочената промоторна област е T7 промотор и посочената полимерата е T7 РНК полимерата.

75. Олигонуклеотиден праймер, съгласно претенция 73, характеризиращ се с това, че посочената последователност специфично образуваща комплекс с човешки Parvovirus B19 е от VP1 областта на генома на човешки Parvovirus B19.

76. Олигонуклеотиден праймер, съгласно претенция 75, характеризиращ се с това, че посочената последователност специфично образуваща комплекс с човешки Parvovirus B19 произлиза от полинуклеотидна последователност, изобразена на коя да е от фигури 2A-2U.

77. Олигонуклеотиден праймер, състоящ се от T7 промотор, операционно свързан към последователност специфично образуваща комплекс с човешки Parvovirus B19 от приблизително 10 до приблизително 75 нуклеотида, където посочената последователност специфично образуваща комплекс с човешки Parvovirus B19 произлиза от нуклеотидна последователност, изобразена на коя да е от фигури 2A-2U или фигури 11A-11Z.

78. Олигонуклеотидна проба, състояща се от последователност специфично хибридираща с човешки Parvovirus B19 от приблизително 10 до приблизително 50 нуклеотида, свързани към маркер на акридинов естер.

79. Олигонуклеотидна проба, съгласно претенция 78, характеризираща се с това, че посочената последователност специфично хибридираща с човешки Parvovirus B19 е от VP1 областа на генома на човешки Parvovirus B19.

80. Олигонуклеотидна проба, съгласно претенция 79, характеризираща се с това, че посочената последователност специфично хибридираща с човешки Parvovirus B19 произлиза от полинуклеотидна последователност, изобразена на фигури 2A-2U или фигури 11A-11Z.

81. Комплект за диагностичен тест съдържащ праймер, съгласно претенция 73, и инструкции за провеждане на диагностичния тест.

82. Комплект за диагностичен тест, съгласно претенция 81, съдържащ освен това олигонуклеотидна проба, която включва последователност специфично хибридираща с човешки Parvovirus B19 от приблизително 10 до приблизително 50 нуклеотида, свързани към маркер на акридинов естер.

83. Метод за откриване на инфекция от човешки Parvovirus B19 в биологична проба, характеризиращ се с това, че:

(а) изолира се нуклеинова киселина от биологична проба, за която се подозира, че съдържа ДНК от човешки Parvovirus B19, където нуклеиновата киселина включва последователност мишена;

(b) изолираната нуклеинова киселина на Parvovirus B19 влиза в реакция с откриваемо маркирана проба, достатъчно комплементарна на и способна да хиибридизира с последователността мишена, при което пробада произлиза от полинуклеотидна последователност, изобразена на фигури 2A-2U или фигури 11A-11Z, и където реагирането са осъществява при условия, които обезпечават образуването на комплекс проба/мишена последователност и;

(c) открива се присъствието или отсъствието на маркер, като индикация за присъствие или отсъствие на последователността мишена.

СПИСЪК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

<110> CHIRON CORPORATION

<120> ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ НА PARVOVIRUS B19

<130> 2301-17194.40

<140>

<141>

<160> 92

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 700

<212> ДНК

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат СН47-26

<400> 1

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag caagtagctg ccacaatgcc agtggaagg agggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaaatgc tttaaatttg 480
ttttttttcac ctttagagtt tcagcattta attgaaaact atggaaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtagc gatacttttag 700
```

<210> 2

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат СН48-29

<400> 2

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaacaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag ctatagctg ccacaatgcc agtggaagg agggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaaatgc tttaaattta 480
ttttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaaagtat agctcctgat 540
gatttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacagg cgcctatgcc tgttagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtagc gatacttttag 700
```

<210> 3

<211> 700

<212> ДНК

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат SN33-2

<400> 3

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaca 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgcca cttctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gattttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgct tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700
```

<210> 4

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат SN33-3

<400> 4

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaca 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgcca cttctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gattttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgcc tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700
```

<210> 5

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат SN33-4

<400> 5

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgcca cttctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gattttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgcc tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700
```

<210> 6
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат SN42-7

<400> 6

ataaatccat	atactcattg	gactgtagca	gatgaagagc	ttttaaaaaa	tataaaaaat	60
gaaactgggt	ttcaagcaca	agtagtaaaa	gactacttta	ctttaaaagg	tgtagctgcc	120
cctgtggccc	attttcaagg	aagtttgccg	gaagtccccg	cttacaacgc	ctcagaaaaa	180
tacccaagca	tgacttcagt	taattctgca	gaagccagca	ctggtgcagg	aggggggggc	240
agtaatcctg	tcaaaagcat	gtggagttag	ggggccactt	ttagtgccaa	ctctgtaact	300
tgtacatttt	ccaggcagtt	tttaattcca	tatgaccagg	agcaccatta	taagggtgtt	360
tctcccgcag	caagtagctg	ccacaatgcc	agtggaaagg	aggcaaagg	ttgcaccatt	420
agtcccataa	tgggatactc	aaccccatgg	agatatttag	attttaatgc	tttaaattta	480
tttttttcac	cttttagagt	tcagcactta	attgaaaatt	atggaagtat	agctcctgat	540
gctttaactg	taaccatata	agaaattgct	gttaaggatg	ttacagacaa	aactggaggg	600
ggggtacagg	ttactgacag	cactacaggg	cgccatgca	tgtagtaga	ccatgaatac	660
aagtacccat	atgtgttagg	gcaaggtagc	gatactttag			700

<210> 7
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат SN42-18

<400> 7

ataaatccat	atactcattg	gactgtagca	gatgaagagc	ttttaaaaaa	tataaaaaat	60
gaaactgggt	ttcaagcaca	agtagtaaaa	gactacttta	ctttaaaagg	tgtagctgcc	120
cctgtggccc	attttcaagg	aagtttgccg	gaagtccccg	cttacaacgc	ctcagaaaaa	180
tacccaagca	tgacttcagt	taattctgca	gaagccagca	ctggtgcagg	aggggggggc	240
agtaatcctg	tcaaaagcat	gtggagttag	ggggccactt	ttagtgccaa	ctctgtaact	300
tgtacatttt	ccagacagtt	tttaattcca	tatgaccagg	agcaccatta	taagggtgtt	360
tctcccgcag	caagtagctg	ccacaatgcc	agtggaaagg	aggcaaagg	ttgcaccatt	420
agtcccataa	tgggatactc	aaccccatgg	agatatttag	attttaatgc	tttaaattta	480
tttttttcac	cttttagagt	tcagcactta	attgaaaatt	atggaagtat	agctcctgat	540
gctttaactg	taaccatata	agaaattgct	gttaaggatg	ttacagacaa	aactggaggg	600
ggggtgcagg	ttactgacag	cactacaggg	cgccatgca	tgtagtaga	ccatgaatac	660
aagtacccat	atgtgttagg	gcaaggtagc	gatactttag			700

<210> 8
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат SN42-19

<400> 8

ataaatccat	atactcattg	gactgtagca	gatgaagagc	ttttaaaaaa	tataaaaaat	60
gaaactgggt	ttcaagcaca	agtagtaaaa	gactacttta	ctttaaaagg	tgtagctgcc	120
cctgtggccc	attttcaagg	aagtttgccg	gaagtccccg	cttacaacgc	ctcagaaaaa	180
tacccaagca	tgacttcagt	taattctgca	gaagccagca	ctggtgcagg	aggggggggc	240
agtaatcctg	tcaaaagcat	gtggagttag	ggggccactt	ttagtgccaa	ctctgtaact	300
tgtacatttt	ccagacagtt	tttaattcca	tatgaccagg	agcaccatta	taagggtgtt	360
tctcccgcag	caagtagctg	ccacaatgcc	agtggaaagg	aggcaaagg	ttgcaccatt	420
agtcccataa	tgggatactc	aaccccatgg	agatatttag	attttaatgc	tttaaattta	480
tttttttcac	cttttagagt	tcagcactta	attgaaaatt	atggaagtat	agctcctgat	540
gctttaactg	taaccatata	agaaattgct	gttaaggatg	ttacagacaa	aactggaggg	600

ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 9
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат СН46-23

<400> 9
attaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaancaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccaggcagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaagg aggcagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatattc agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 10
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат СН1-1

<400> 10
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaagg aggcagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatattc agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 11
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат СН1-6

<400> 11
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaagg aggcagggt ttgcaccatt 420

```

agtcacataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 12
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат CH2-8

```

<400> 12
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccacagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggg ttgcaccatt 420
agtcacataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 13
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат CH2-10

```

<400> 13
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccacagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggg ttgcaccatt 420
agtcacataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacag aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 14
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат CH2-11C

```

<400> 14
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccacagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

```

```

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg agggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccataatc agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 15

<211> 699

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат СН5-13

<400> 15

```

ctaaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg agggcaaagg ttgcactatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggcagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccataatc agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccaa tgtgttaggg caaggtcagg atacttttag 699

```

<210> 16

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат СН7-22

<400> 16

```

ataaatccat gtactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg agggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaatttg 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcattta attgaaaact atggaaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccataatc agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 17

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат СН13-27

<400> 17

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

```

```

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaattctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgctaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaggt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag cgagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatc 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 18

<211> 699

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат СН14-33

```

<400> 18
ataaatccat atactcattg gactgtggca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
gtaatcctgt taaaagcatg tggagttagg gggccacttt tagtgccaac tctgtaactt 300
gtacattttc cagacagttt ttaattccat atgaccaga gcaccattat aagggtgttt 360
ctcccgagc aagtagctgc cacaatgcca gtggaaaaga ggcaaaggtt tgcaccatta 420
gtcccataat gggatactca accccatgga gatatttaga ttttaatgct ttaaatttat 480
ttttttcacc ttttagagtt cagcacttaa ttgaaaatta tggtagtata gctcctgat 540
ctttaactgt aaccatatac gaaattgctg ttaaagatgt tacagacaaa actggagggg 600
gggtacaggt tactgacagc actacagggc gcctatgcat gttagtggac catgaatac 660
agtcccataa tgtgttaggg caaggtcag atactttag 699

```

<210> 19

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат СН62-2

```

<400> 19
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacakttt ccagacaggt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag ccagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 20

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат СН64-2

<400> 20

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
taccgaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tcgcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatactttag 700
```

<210> 21

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат СН67-2

<400> 21

```
ataaatccat atactcattg gactgtggca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
taccgaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtgga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatactttag 700
```

<210> 22

<211> 4678

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: 4,7 kbp PCR
фрагмент от Parvovirus B19 клон 2-B1

<400> 22

```
ccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt 60
ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact 120
gcccagctc tttctttctg ggctgctttt ttcttggaact tacttgctgt tttttgtgag 180
ctaactaaca ggtatttata ctacttgcta acatactaac atggagctat ttagaggggt 240
gcttcaagtt tcttctaatt ttctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctctttact 300
ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata 360
cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta 420
cttttttcaa gtagaatgta acaaatttga agaaggctat catatttcag tggttattgg 480
ggggccaggg ttaaaccaca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt 540
actttatcac cttgtaactg aaaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa 600
aggcaatac ttttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc 660
tttaaatggt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtattttctgc 720
tactttttaga aaggagctt gccatgcca gaaaccccg atcaccacag ccataaatga 780
tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggtgtgct catttaattgg 840
gaagggaact aaggtagca taaagtttca aactatggt aactggtgtg gtgaaaacag 900
agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgacttttaac cagtacactt tactaagcag 960
tagtcacagt ggaagttttc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac 1020
```

taatttagtg	cctactagca	cattttttatt	gcatacacag	tttgagcaag	ttatgtgtat	1080
taaaaacaat	aaaattgtta	aattgttact	ttgtcaaaac	tatgaccccc	tattagtggg	1140
gcagcatgtg	ttaaagtggg	ttgataaaaa	atgtggcaag	aaaaacacac	tgtgggttta	1200
tgggcccgcga	agtacaggga	aaacaaactt	ggcaatggcc	attgctaaaa	gtgttccagt	1260
atatggcatg	gttaactgga	ataatgaaaa	ctttccattt	aatgatgtag	caggaaaaag	1320
cttgggtggtc	tgggatgaag	gtattattaa	gtctacaatt	gtagaagctg	caaaagccat	1380
tttaggcggg	caaccaccca	gggtagatca	aaaaatgctg	ggaagtgtag	ctgtgcctgg	1440
agtacctgtg	gttataacca	gcaatgggtg	cattactttt	gttgtaagcg	ggaacactac	1500
aacaactgta	catgctaaag	ccttaaaaga	gcgcagtgta	aagttaaact	ttactgtaag	1560
atgcagccct	gacatggggt	tactaacaga	ggctgatgta	caacagtggtc	ttacatgggtg	1620
taatgcacaa	agctgggacc	actatgaaaa	ctgggcaata	aactacactt	ttgattttccc	1680
tggaaattaat	gcagatgccc	tccaccacga	cctccaaacc	accccaattg	tcacagacac	1740
cagtatcagc	agcagtggtg	gtgaaagctc	tgaagaactc	agtgaagca	gcttttttaa	1800
cctcatcacc	ccaggcgctt	ggaacactga	aaccccgctc	tctagtacgc	ccatccccgg	1860
gaccagttca	ggagaatcat	ctgtcgggag	cccagtttcc	tccgaagtgt	tagctgcate	1920
gtgggaagaa	gccttctaca	cacctttggc	agaccagttt	cgtgaactgt	tagttggggg	1980
tgattatgtg	tgggacgggtg	taagggtttt	acctgtctgt	tgtgtgcaac	atattaacaa	2040
tagtggggga	ggcttgggac	tttgtcccca	ttgcattaat	gtaggggctt	ggtataatgg	2100
atggaaattt	cgagaattta	ccccagattt	ggtgcgatgt	agctgccatg	tgggagcttc	2160
taatcccttt	tctgtgctaa	cctgcaaaaa	atgtgcttac	ctgtctggat	tgcaaaagctt	2220
tgtagattat	gagtaaaaga	agtggcaaat	gtgggaaag	tgatgataaa	tttgcataag	2280
ctgtgtatca	gcaatttgtg	gaattttatg	aaaaggttac	tggaaacagc	ttagagctta	2340
ttcaaatatt	aaaagatcat	tataatattt	cttttagata	tccctagaa	aacccatcct	2400
ctttgtttga	cttagttgct	cgtattaaaa	ataaccttaa	aaactctcca	gacttatata	2460
gtcatcattt	tcaaagtcac	ggacagttat	ctgaccaccc	ccatgcctta	tcacccagta	2520
gcagtcattg	agaacctaga	ggagaagatg	cagatttatc	tagtgaagac	ttacacaagc	2580
ctgggcaagt	tagcgtacaa	ctaccgggta	ctaactatgt	tgggcctggc	aatgagctac	2640
aagctgggcc	cccgcacagt	gctgttgaca	gtgctgcaag	gattcatgac	tttaggtata	2700
gccaactggc	taagttagga	ataaatccat	atactcattg	gactgtagca	gatgaagagc	2760
ttttaaaaaa	tataaaaaat	gaaactgggt	ttcaagcaca	agtagtaaaa	gactacttta	2820
ctttaaaagg	tgcagctgcc	cctgtggccc	atthtcaagg	aagtttgccg	gaagttcccc	2880
cttacaacgc	ctcagaaaaa	tacccaagca	tgacttcagt	taattctgca	gaagccagca	2940
ctgggtgcagg	aggggggggg	agtaatcctg	tgaaaaagcat	gtggagtggg	ggggccactt	3000
ttagtgccaa	ctctgtaact	tgtacatttt	ccagacaatt	tttaattcca	tatgaccagg	3060
agcaccatta	taaggtgttt	tctcccgcat	caagtagctg	ccacaatgcc	agtggaaagg	3120
aggcaaagg	ttgcaccatt	agtcccataa	tgggatactc	aaccccatgg	agatatttag	3180
atthtaatgc	tttaaattta	tttttttcac	cttttagagt	tcagcactta	attgaaaatt	3240
atggaagtat	agctcctgat	gctttaactg	taaccatata	agaaattgct	gttaaggatg	3300
ttacggacaa	aactggaggg	ggggtgcagg	ttactgacag	cactacaggg	cgccctatga	3360
tgttagtaga	ccctgtatata	aagtacccat	atgtgttagg	gcaaggtcaa	gatactttag	3420
cccagaact	tcctattttg	gtatactttc	cccccaata	cgcttactta	acagtaggag	3480
atgttaacac	acaaggaatt	tctggagaca	gcaaaaaatt	ggcaagtga	gaatcagcat	3540
tttatgtttt	ggaacacagt	tcttttcagc	tttttaggtac	aggaggtaca	gcaactatgt	3600
cttataagtt	tcctccagtg	ccccagaaa	atttagaggg	ctgcagtcaa	cactttttatg	3660
aatgtacaa	ccccttatata	ggatcccgtt	taggggttcc	tgacacatta	ggaggtgacc	3720
caaaatttag	atctttaaca	catgaagacc	atgcaattca	gccccaaac	ttcatgccag	3780
ggccactagt	aaactcagtg	tctacaaagg	agggagacag	ctctagtact	ggagctggaa	3840
aagccttaac	aggccttagc	acaggtaacct	ctcaaaacac	tagaatatcc	ttacgccctg	3900
ggccagtgtc	tcagccgtgac	caccactggg	acacagataa	atatgtcaca	ggaataaatg	3960
ccattttctca	tggctcagacc	acttatggta	acgctgaaga	caaagagtat	cagcaaggag	4020
tgggtagatt	tccaaatgaa	aaagaacagc	taaaacagtt	acagggttta	aacatgcaca	4080
cctactttcc	caataaagga	accagcaaat	atacagatca	aattgagcgc	cccctaattg	4140
tgggttctgt	atggaacaga	agagcccttc	actatgaaag	ccagctgtgg	agtaaaattc	4200
caaattttaga	tgacagtttt	aaaactcagt	ttgcagcctt	aggaggatgg	ggtttgcac	4260
agccacctcc	tcaaatattt	ttaaaaatat	taccacaaag	tgggccaatt	ggagggtatta	4320
aatcaatggg	aattactacc	ttagttcagt	atgccgtggg	aattatgaca	gtaaccatga	4380
catttaaat	ggggccccgt	aaagctacgg	gacggtggaa	tcctcaacct	ggagtgtatc	4440
ccccgcagc	agcaggtcat	ttaccatatg	tactatatga	ccccacagct	acagatgcac	4500
aacaacacca	cagacatgga	tatgaaaagc	ctgaagaatt	gtggacagcc	aaaagccgtg	4560
tgcacccatt	gtaaacactc	cccacgtg	cctcagccag	gatgtgtaac	taaacgccca	4620
ccagtaccac	ccagactgta	cctgccccct	cctataccta	taagacagcc	taacacaa	4678

<211> 4678
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: 4.7 kbp PCR
фрагмент от Parvovirus B19 клон 2-B6

<400> 23
cccccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt 60
ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact 120
gccgcagctc ttctcttctg ggctgctttt ttccctggact tacttgctgt tttttgtgag 180
ctaactaaca ggtattttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt 240
gcttcaagtt tcttctaag ttctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctctttact 300
ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcactact aacagactaa tggcaatata 360
cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta 420
cttttttcaa gtagaatgta acaaatttga agtgtgtgta gaaggctat catattcatg tggttatttg 480
ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt 540
actttatcac cttgtaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa 600
aggcaaatat ttttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc 660
tttaaatggt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc 720
tactttttaga aagggaagctt gccatgccaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga 780
tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttggtc catttaatgg 840
gaaggggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactggttgt gtgaaaacag 900
agtgtttaca gaggataagt ggaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag 960
tagtcacagt ggaagtttcc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac 1020
taattttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat 1080
taaagacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaac tatgacccc catttagtggg 1140
gcagcatgtg ttaaagtga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta 1200
tggaccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt 1260
atatggcatg gttaaactga ataagaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag 1320
cttggtgggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat 1380
tttaggcggg caaccaccca ggttagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgcctgg 1440
agtaccctgt gttataacca gcaatggtga cattactttt gttgtaagcg ggaacactac 1500
aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaaact ttactgtgag 1560
atgcagccct gacatgggtg tactaacaga ggctgatgta caacagtggtc ttacatggtg 1620
taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc 1680
tgggaattaat gcagatgccc tccaccacga cctccaaacc accccaattg tcacagacac 1740
cagtatcagc agcagtgggtg gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gcttttttaa 1800
cctcatcacc ccaggcgccct ggaacactga aaccccgccg tctagtacgc ccatcccggt 1860
gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttcc tccgaagttg tagctgcac 1920
gtgggaagaa gccttctaca cacctttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttgggtg 1980
tgattatgtg tgggacgggtg taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa 2040
tagtggggga ggcttgggac tttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg 2100
atggaaattt cgagaattta ccccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc 2160
taatcccttt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaagctt 2220
ttagattat gagtaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa tttgctaaag 2280
ctgtgtatca gcaatttgtg gaattttatg aaaaggttac tggaaacagac ttagagctta 2340
ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aacccatcct 2400
ctttgtttga cttagtgtct cgtattaaaa ataaccttaa aaactctcca gacttatata 2460
gtcatcattt tcaaaagtcag ggacagttat ctgaccacce ccatgcctta tcatccagta 2520
gcagtcagtc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc 2580
ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccgggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac 2640
aagctgggccc ccgcgaaagt gctgttgaca gtgtgcaag gattcatgac tttaggtata 2700
gccaaactggc taagttggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc 2760
ttttaaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta 2820
ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagtttccg gaagttccc 2880
cttacaacgc ctacagaaaa taccgaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca 2940
ctggtgcagg aggggggggc agtaatctg tgaaaagcat gtggagttag gggggcactt 3000
ttagtgcaca ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag 3060
agcaccatta taaggtgttt tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg 3120
aggcaaggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttg 3180
attttaatgc tttaaattta tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt 3240

atggaagtat	agctcctgat	gctttaactg	taaccatata	agaaattgct	gttaaggatg	3300
ttacaaacaa	aactggaggg	ggggtgcagg	ttactgacag	cactacaggg	cgccatagca	3360
tgtagtaga	ccatgaatat	aagtacccat	atgtgttagg	gcaagggtcaa	gatacttttag	3420
ccccagaact	tcctatttgg	gtatactttc	ccctcaata	cgcttactta	acagtaggag	3480
atgttaacac	acaaggaatt	tctggagaca	gcaaaaaatt	ggcaagtga	gaatcagcat	3540
tttatgtttt	ggaacacagt	tcttttcagc	ttttaggtac	aggaggtaca	gcaactatgt	3600
cttataagtt	tcctccagtg	ccccagaaa	atttagaggg	ctgcagtcaa	cacttttatg	3660
aaatgtacaa	ccccctatac	ggatcccgt	taggggttcc	tgacacatta	ggaggtgacc	3720
caaaatttag	atctttaaca	catgaagacc	atgcaattca	gccccaaaac	ttcatgccag	3780
ggccactagt	aaactcagtg	tctacaaagg	aggggagacag	ctctagtact	ggagctggaa	3840
aagccttaac	aggccttagc	acaggtacct	ctcaaaacac	tagaatatcc	ttacgccctg	3900
ggccagtgtc	tcagccgtac	caccactggg	acacagataa	atatgtcaca	ggaataaatg	3960
ccatttctca	tggtcagacc	acttatggta	acgctgaaga	caaagagtat	cagcaaggag	4020
tggttagatt	tccaaatgaa	aaagaacagc	taaaacagtt	acagggttta	aacatgcaca	4080
cctactttcc	caataaagga	accagcaat	atacagatca	aattgagcgc	cccctaattg	4140
tggtttctgt	atggaacaga	agagcccttc	actatgaaag	ccagctgtgg	agtaaaattc	4200
caaattaga	tgacagtttt	aaaactcagt	ttgcagcctt	aggaggtggg	ggtttgcatc	4260
agccacctcc	tcaaatattt	ttaaaaatat	taccacaaag	tgggccaatt	ggaggtatta	4320
aatcaatggg	aattactacc	ttagttcagt	atgccgtggg	aattatgaca	gtaaccatga	4380
catttaaatt	ggggcccccgt	aaagctacgg	gacggtggaa	tcctcaacct	ggagtgtatc	4440
ccccgcacgc	agcaggtcat	ttaccatag	tactatatga	ccccacagct	acagatgcaa	4500
aacaacacca	cagacatgga	tatgaaaagc	ctgaagaatt	gtggacagcc	aaaagccgtg	4560
tgacccatt	gtaaacactc	cccaccgtgc	cctcagccag	gatgtgtaac	taaacgcccc	4620
ccagtaccac	ccagactgta	cctgccccct	cctataccta	taagacagcc	taacacaa	4678

<210> 24
 <211> 2049
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: NS1 от Parvovirus B19 клон 2-B1

<400> 24						
atactcttcg	aacaaaacaa	aatggagcta	tttagagggg	tgcttcaagt	ttcttcta	60
gttctggact	gtgctaacga	taactgggtg	tgtctcttac	tggtattaga	cacttctgac	120
tggaaccac	taactcatac	taacagacta	atggcaatat	acttaagcag	tggtgcttct	180
aagctttgact	ttactggggg	gccactagca	gggtgcttgt	acttttttca	agtagaatgt	240
aacaaatttg	aagaaggcta	tcatattcat	gtggttattg	gggggccagg	gttaaacccc	300
agaaacctca	cagtgtgtgt	agaggggtta	tttaataatg	tactttatca	ccttgtaact	360
gaaaatctga	agctaaaatt	tttgccagga	atgactacaa	aaggcaaata	ctttagagat	420
ggagagcagt	ttatagaaaa	ctattttaatg	aaaaaaatac	ctttaatgt	tgatgggtgt	480
gttactaata	ttgatggaca	tatagatacc	tgattttctg	ctacttttag	aaagggagct	540
tgccatgccca	agaaaccccc	catcaccaca	gccataaatg	atactagtac	tgatgctggg	600
gagtctagcg	gcacaggggc	agaggttgtg	ccatttaatg	ggaagggaac	taaggctagc	660
ataaagtttc	aaactatggt	aaactgggtg	tgtagaaaaca	gagtgtttac	agaggataag	720
tggaactag	ttgactttaa	ccagtacact	ttactaagca	gtagtccag	tggaagtgtt	780
caaattcaaa	gtgcactaaa	actagcaatt	tataaagcaa	ctaatttagt	gcctactagc	840
acatttttat	tgcatacaga	ctttgagcaa	gttatgtgta	ttaaaaacaa	taaaattgtt	900
aaattgttac	tttgtcaaaa	ctatgacccc	ctattagtgg	ggcagcatgt	gttaaagtgg	960
attgataaaa	aatgtggcaa	gaaaaacaca	ctgtggtttt	atgggccgcc	aagtacaggg	1020
aaaacaaact	tggaatggc	cattgctaaa	agtgttccag	tatatggcat	ggttaactgg	1080
aataatgaaa	actttccatt	taatgatgta	gcaggaaaaa	gcttgggtgt	ctgggatgaa	1140
ggtattatta	agtctacaat	tgtagaagct	gcaaaagcca	ttttaggcgg	gcaaccaccc	1200
agggtagatc	aaaaaatgcg	tggaagtgtg	gctgtgcctg	gagtaacctg	ggttataacc	1260
agcaatggtg	acattacttt	tggtgtgaagc	gggaacacta	caacaactgt	acatgctaaa	1320
gccttaaaaag	agcgcatggt	aaagttaaac	tttactgtaa	gatgcagccc	tgacatgggg	1380
ttactaacag	aggctgatgt	acaacagtgg	cctacatggt	gtaatgcaca	aagctgggac	1440
cactatgaaa	actgggcaat	aaactacact	tttgatttcc	ctggaattaa	tgcatgtgcc	1500
ctccaccacag	acctccaaac	caccccaatt	gtcacagaca	ccagtatcag	cagcagtggt	1560
ggtgaaagct	ctgaagaact	cagtgaagac	agctttttta	acctcatcac	cccaggcgcc	1620
tggaacactg	aaaccccgcg	ctctagtacg	ccatcccccg	ggaccagttc	aggagaatca	1680

tctgtcggaa gccagtttc ctccgaagtt gtagctgcat cgtgggaaga agccttctac 1740
acacctttgg cagaccagtt tcgtgaactg ttagttgggg ttgattatgt gtgggacggg 1800
gtaaggggtt tacctgtctg ttgtgtgcaa catattaaca atagtggggg aggcttggga 1860
ctttgtcccc attgcattaa ttaggggct tggataatg gatggaaatt tcgagaattt 1920
accccgatt tgggtcgatg tagctgcat gtgggagctt ctaatccctt ttctgtgcta 1980
acctgcaaaa aatgtgctta cctgtctgga ttgcaaagct ttgtagatta tgagtaagtc 2040
gacatactc 2049

<210> 25

<211> 671

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: NS1
аминокиселина от Parvovirus B19 клон 2-B1

<400> 25

Met Glu Leu Phe Arg Gly Val Leu Gln Val Ser Ser Asn Val Leu Asp
1 5 10 15

Cys Ala Asn Asp Asn Trp Trp Cys Ser Leu Leu Asp Leu Asp Thr Ser
20 25 30

Asp Trp Glu Pro Leu Thr His Thr Asn Arg Leu Met Ala Ile Tyr Leu
35 40 45

Ser Ser Val Ala Ser Lys Leu Asp Phe Thr Gly Gly Pro Leu Ala Gly
50 55 60

Cys Leu Tyr Phe Phe Gln Val Glu Cys Asn Lys Phe Glu Glu Gly Tyr
65 70 75 80

His Ile His Val Val Ile Gly Gly Pro Gly Leu Asn Pro Arg Asn Leu
85 90 95

Thr Val Cys Val Glu Gly Leu Phe Asn Asn Val Leu Tyr His Leu Val
100 105 110

Thr Glu Asn Leu Lys Leu Lys Phe Leu Pro Gly Met Thr Thr Lys Gly
115 120 125

Lys Tyr Phe Arg Asp Gly Glu Gln Phe Ile Glu Asn Tyr Leu Met Lys
130 135 140

Lys Ile Pro Leu Asn Val Val Trp Cys Val Thr Asn Ile Asp Gly His
145 150 155 160

Ile Asp Thr Cys Ile Ser Ala Thr Phe Arg Lys Gly Ala Cys His Ala
165 170 175

Lys Lys Pro Arg Ile Thr Thr Ala Ile Asn Asp Thr Ser Thr Asp Ala
180 185 190

Gly Glu Ser Ser Gly Thr Gly Ala Glu Val Val Pro Phe Asn Gly Lys
195 200 205

Gly Thr Lys Ala Ser Ile Lys Phe Gln Thr Met Val Asn Trp Leu Cys
210 215 220

Glu Asn Arg Val Phe Thr Glu Asp Lys Trp Lys Leu Val Asp Phe Asn
225 230 235 240

Gln Tyr Thr Leu Leu Ser Ser Ser His Ser Gly Ser Phe Gln Ile Gln
 245 250 255
 Ser Ala Leu Lys Leu Ala Ile Tyr Lys Ala Thr Asn Leu Val Pro Thr
 260 265 270
 Ser Thr Phe Leu Leu His Thr Asp Phe Glu Gln Val Met Cys Ile Lys
 275 280 285
 Asn Asn Lys Ile Val Lys Leu Leu Cys Gln Asn Tyr Asp Pro Leu
 290 295 300
 Leu Val Gly Gln His Val Leu Lys Trp Ile Asp Lys Lys Cys Gly Lys
 305 310 315 320
 Lys Asn Thr Leu Trp Phe Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Gly Lys Thr Asn
 325 330 335
 Leu Ala Met Ala Ile Ala Lys Ser Val Pro Val Tyr Gly Met Val Asn
 340 345 350
 Trp Asn Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp Val Ala Gly Lys Ser Leu
 355 360 365
 Val Val Trp Asp Glu Gly Ile Ile Lys Ser Thr Ile Val Glu Ala Ala
 370 375 380
 Lys Ala Ile Leu Gly Gly Gln Pro Thr Arg Val Asp Gln Lys Met Arg
 385 390 395 400
 Gly Ser Val Ala Val Pro Gly Val Pro Val Val Ile Thr Ser Asn Gly
 405 410 415
 Asp Ile Thr Phe Val Val Ser Gly Asn Thr Thr Thr Thr Val His Ala
 420 425 430
 Lys Ala Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Leu Asn Phe Thr Val Arg Cys
 435 440 445
 Ser Pro Asp Met Gly Leu Leu Thr Glu Ala Asp Val Gln Gln Trp Leu
 450 455 460
 Thr Trp Cys Asn Ala Gln Ser Trp Asp His Tyr Glu Asn Trp Ala Ile
 465 470 475 480
 Asn Tyr Thr Phe Asp Phe Pro Gly Ile Asn Ala Asp Ala Leu His Pro
 485 490 495
 Asp Leu Gln Thr Thr Pro Ile Val Thr Asp Thr Ser Ile Ser Ser Ser
 500 505 510
 Gly Gly Glu Ser Ser Glu Glu Leu Ser Glu Ser Ser Phe Phe Asn Leu
 515 520 525
 Ile Thr Pro Gly Ala Trp Asn Thr Glu Thr Pro Arg Ser Ser Thr Pro
 530 535 540
 Ile Pro Gly Thr Ser Ser Gly Glu Ser Ser Val Gly Ser Pro Val Ser
 545 550 555 560
 Ser Glu Val Val Ala Ala Ser Trp Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Pro Leu
 565 570 575

Ala Asp Gln Phe Arg Glu Leu Leu Val Gly Val Asp Tyr Val Trp Asp
580 585 590

Gly Val Arg Gly Leu Pro Val Cys Cys Val Gln His Ile Asn Asn Ser
595 600 605

Gly Gly Gly Leu Gly Leu Cys Pro His Cys Ile Asn Val Gly Ala Trp
610 615 620

Tyr Asn Gly Trp Lys Phe Arg Glu Phe Thr Pro Asp Leu Val Arg Cys
625 630 635 640

Ser Cys His Val Gly Ala Ser Asn Pro Phe Ser Val Leu Thr Cys Lys
645 650 655

Lys Cys Ala Tyr Leu Ser Gly Leu Gln Ser Phe Val Asp Tyr Glu
660 665 670

<210> 26
<211> 2380
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: VP1 от Parvovirus В19 клон 2-В1

<400> 26

atactcaagc	ttacaaaaca	aaatgagtaa	agaaagtggc	aaatgggtggg	aaagtgatga	60
taaatttgct	aaagctgtgt	atcagcaatt	tgtggaattt	tatgaaaagg	ttactggaac	120
agacttagag	cttattcaaa	tattaaaaga	tcattataat	atttcttttag	ataatccctt	180
agaaaacca	tcctctttgt	ttgacttagt	tgctcgattt	aaaaataacc	ttaaaaactc	240
tccagactta	tatagtcac	attttcaaa	tcattggacag	ttatctgacc	accccatg	300
cttatcatcc	agtagcagtc	atgcagaacc	tagaggagaa	gatgcagtat	tatctagtga	360
agacttacac	aagcctgggc	aagttagcgt	acaactaccc	ggtactaact	atgttggg	420
tggcaatgag	ctacaagctg	ggccccgca	aagtgtgtt	gacagtgtg	caaggattca	480
tgactttagg	tatagccaac	tggctaagtt	gggaataaat	ccatatactc	attggactgt	540
agcagatgaa	gagcttttaa	aaaatataaa	aaatgaaact	gggtttcaag	cacaagtagt	600
aaaagactac	tttactttaa	aaggtgcagc	tgccccgtg	gcccattttc	aagggaagtt	660
gccggaagtt	cccgtttaca	acgcctcaga	aaaataccca	agcatgactt	cagttaattc	720
tgcagaagcc	agcactggtg	caggaggggg	gggcagtaat	cctgtgaaaa	gcatgtggag	780
tgagggggcc	acttttagtg	ccaactctgt	aacttgtaca	ttttccagac	aattttta	840
tccatatgac	ccagagcacc	attataaggt	gttttctccc	gcagcaagta	gctgccacaa	900
tgccagtgga	aaggaggcaa	aggtttgcac	cattagtccc	ataatgggat	actcaacccc	960
atggagatat	ttagatttta	atgcttttaa	tttatttttt	tcacctttag	agtttcagca	1020
cttaattgaa	aattatggaa	gtatagctcc	tgatgcttta	actgtaacca	tatcagaaat	1080
tgctgttaag	gatgttacgg	acaaaactgg	aggggggggtg	cagggtactg	acagcactac	1140
agggcgctta	tgcatgttag	tagaccatga	atataagtac	ccatatgtgt	tagggcaagg	1200
tcaagatact	ttagccccag	aacttcctat	ttgggtatac	tttccccctc	aatacgctta	1260
cttaacagta	ggagatgtta	acacacaagg	aatttctgga	gacagcaaaa	aattggcaag	1320
tgaagaatca	gcattttatg	ttttggaaca	cagttctttt	cagcttttag	gtacaggagg	1380
tacagcaact	atgtcttata	agtttctctc	agtgtcccca	gaaaatttag	agggtgcag	1440
tcaacacttt	tatgaaatgt	acaacccctt	atacgatcc	cgcttagggg	ttcctgacac	1500
attaggaggt	gacccaaaat	ttagatcttt	aacacatgaa	gaccatgcaa	ttcagcccca	1560
aaacttcctg	ccagggccac	tagtaaacct	agtgtctaca	aaggaggagg	acagctctag	1620
tactggagct	ggaaaagcct	taacaggcct	tagcacaggt	acctctcaaa	acactagaat	1680
atccttacgc	cctggggccag	tgtctcagcc	gtaccaccac	tgggacacag	ataaatatgt	1740
cacaggaata	aatgccattt	ctcatggtca	gaccacttat	ggtaacgctg	aagacaaaga	1800
gtatcagcaa	ggagtgggta	gatttccaaa	tgaaaaagaa	cagctaaaac	agttacaggg	1860
tttaaacatg	cacacctact	ttcccaataa	aggaaccacg	caatatacag	atcaaattga	1920
gcgcccccta	atggtggggt	ctgtatggaa	cagaagagcc	cttactatg	aaagccagct	1980
gtggagtaaa	attccaaatt	tagatgacag	ttttaaact	cagtttgcag	ccttaggagg	2040

```

atgggggttg catcagccac ctctcaaat atttttaaaa atattaccac aaagtgggccc 2100
aattggaggt attaaatcaa tgggaattac taccttagtt cagtatgccg tgggaattat 2160
gacagtaacc atgacattta aattggggccc cgttaaagct acgggacggt ggaatcctca 2220
acctggagtg tatccccgcg acgcagcagg tcatattacca tatgtactat atgacccac 2280
agctacagat gcaaaacaac accacagaca tggatatgaa aagcctgaag aattgtggac 2340
agccaaaagc cgtgtgcacc cattgtaagc cgacatactc 2380

```

<210> 27

<211> 781

<212> PRT

<213> **Изкуствена последователност**

<220>

<223> **Описание на изкуствена последователност: VP1**

аминокиселина от Parvovirus B19 клон 2-B1

<400> 27

```

Met Ser Lys Glu Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala
 1           5           10           15

Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly
      20           25           30

Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser
      35           40           45

Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala
      50           55           60

Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His
      65           70           75           80

Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser
      85           90           95

Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asp Ala Val Leu Ser Ser
      100          105          110

Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr
      115          120          125

Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser
      130          135          140

Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu
      145          150          155          160

Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu
      165          170          175

Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val
      180          185          190

Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His
      195          200          205

Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys
      210          215          220

Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala
      225          230          235          240

Gly Gly Gly Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala

```

245	250	255
Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu		
260	265	270
Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala		
275	280	285
Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile		
290	295	300
Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn		
305	310	315
Ala Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu		
325	330	335
Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu		
340	345	350
Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val		
355	360	365
Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr		
370	375	380
Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu		
385	390	395
Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val		
405	410	415
Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala		
420	425	430
Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu		
435	440	445
Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val		
450	455	460
Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr		
465	470	475
Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly		
485	490	495
Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro		
500	505	510
Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu		
515	520	525
Gly Asp Ser Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser		
530	535	540
Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val		
545	550	555
Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile		
565	570	575
Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys		

580	585	590
Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg	Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu	
595	600	605
Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly		
610	615	620
Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser		
625	630	635
Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys		
645	650	655
Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly		
660	665	670
Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu		
675	680	685
Pro Gln Ser Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr		
690	695	700
Leu Val Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys		
705	710	715
Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val		
725	730	735
Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro		
740	745	750
Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro		
755	760	765
Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu		
770	775	780

<210> 28
 <211> 1699
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност
 <223>

Описание на изкуствена последователност: VP2 от Parvovirus B19 клон 2-B1

<400> 28

ataactcaagc	ttacaaaaaca	aaatgacttc	agtttaattct	gcagaagcca	gcactgggtgc	60
aggagggggg	ggcagtaatc	ctgtgaaaag	catgtggagt	gagggggcca	cttttagtgc	120
caactctgta	acttgtagat	tttccagaca	atttttaatt	ccatatgacc	cagagcacca	180
ttataagggtg	ttttctcccg	cagcaagtag	ctgccacaat	gccagtggaa	aggaggcaaa	240
ggtttgcacc	attagtccca	taatgggata	ctcaacccca	tggagatatt	tagattttaa	300
tgctttaaat	ttattttttt	cacctttaga	gtttcagcac	ttaattgaaa	attatggaag	360
tatagctcct	gatgctttta	ctgtaaccat	atcagaaatt	gctgttaagg	atgttacgga	420
caaaactgga	gggggggtgc	aggttactga	cagcactaca	gggcgcctat	gcatgttagt	480
agaccatgaa	tataagtacc	catatgtgtt	agggcaaggt	caagatactt	tagccccaga	540
acttcttatt	tgggtatact	ttccccctca	atacgcttac	ttaacagtag	gagatgttaa	600
cacacaagga	atttctggag	acagcaaaaa	attggcaagt	gaagaatcag	cattttatgt	660
tttggaaacac	agttcttttc	agcttttagg	tacaggaggt	acagcaacta	tgtcttataa	720
gtttctccca	gtgccccccag	aaaatttaga	gggctgcagt	caacactttt	atgaaatgta	780
caacccttta	tacggatccc	gcttaggggt	tcctgacaca	ttaggaggtg	acccaaaatt	840

```

tagatcttta acacatgaag accatgcaat tcagcccca aacttcatgc cagggccact 900
agtaaaactca gtgtctacaa aggagggaga cagctctagt actggagctg gaaaagcctt 960
aacaggcctt agcacaggta cctctcaaaa cactagaata tccttacgcc ctgggccagt 1020
gtctcagccg taccaccact gggacacaga taaatatgtc acaggaataa atgccatttc 1080
tcattggtcag accacttatg gtaacgctga agacaaagag tatcagcaag gagggtgtag 1140
atttccaaat gaaaaagaac agctaaaaca gttacagggt ttaaactatgc acacctactt 1200
tcccaataaaa ggaacccagc aatatacaga tcaaattgag cgccccctaa tgggtgggttc 1260
tgtatggaac agaagagccc ttcactatga aagccagctg tggagtaaaa ttccaaattt 1320
agatgacagt tttaaaactc agtttgagc cttaggagga tggggtttgc atcagccacc 1380
tcctcaaata tttttaaaaa tattaccaca aagtgggcca attggaggtg ttaaactaat 1440
gggaattact accttagttc agtatgccgt gggaattatg acagtaacca tgacatttaa 1500
attggggccc cgtaaagcta cgggacggtg gaatcctcaa cctggagtgt atccccgcga 1560
cgcagcaggt catttaccat atgtactata tgacccca cgtacagatg caaaacaaca 1620
ccacagacat ggatatgaaa agcctgaaga attgtggaca gccaaaagcc gtgtgcaccc 1680
attgtaagtc gacatactc                                     1699

```

<210> 23

<211> 554

<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: VP2

аминокиселина от Parvovirus B19 клон 2-B1

<400> 29

```

Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly
 1             5             10             15

Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser
 20             25             30

Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr
 35             40             45

Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys
 50             55             60

His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile
 65             70             75             80

Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn
 85             90             95

Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly
100             105             110

Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val
115             120             125

Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser
130             135             140

Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro
145             150             155             160

Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile
165             170             175

Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val
180             185             190

Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu

```

195					200					205					
Ser	Ala	Phe	Tyr	Val	Leu	Glu	His	Ser	Ser	Phe	Gln	Leu	Leu	Gly	Thr
210						215					220				
Gly	Gly	Thr	Ala	Thr	Met	Ser	Tyr	Lys	Phe	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Glu
225					230					235					240
Asn	Leu	Glu	Gly	Cys	Ser	Gln	His	Phe	Tyr	Glu	Met	Tyr	Asn	Pro	Leu
				245					250					255	
Tyr	Gly	Ser	Arg	Leu	Gly	Val	Pro	Asp	Thr	Leu	Gly	Gly	Asp	Pro	Lys
			260					265					270		
Phe	Arg	Ser	Leu	Thr	His	Glu	Asp	His	Ala	Ile	Gln	Pro	Gln	Asn	Phe
		275					280					285			
Met	Pro	Gly	Pro	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Ser	Thr	Lys	Glu	Gly	Asp	Ser
	290					295					300				
Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Gly	Leu	Ser	Thr	Gly	Thr
305					310					315					320
Ser	Gln	Asn	Thr	Arg	Ile	Ser	Leu	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Ser	Gln	Pro
				325					330					335	
Tyr	His	His	Trp	Asp	Thr	Asp	Lys	Tyr	Val	Thr	Gly	Ile	Asn	Ala	Ile
			340					345					350		
Ser	His	Gly	Gln	Thr	Thr	Tyr	Gly	Asn	Ala	Glu	Asp	Lys	Glu	Tyr	Gln
		355					360					365			
Gln	Gly	Val	Gly	Arg	Phe	Pro	Asn	Glu	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Gln	Leu
	370					375					380				
Gln	Gly	Leu	Asn	Met	His	Thr	Tyr	Phe	Pro	Asn	Lys	Gly	Thr	Gln	Gln
385					390					395					400
Tyr	Thr	Asp	Gln	Ile	Glu	Arg	Pro	Leu	Met	Val	Gly	Ser	Val	Trp	Asn
			405						410					415	
Arg	Arg	Ala	Leu	His	Tyr	Glu	Ser	Gln	Leu	Trp	Ser	Lys	Ile	Pro	Asn
			420					425					430		
Leu	Asp	Asp	Ser	Phe	Lys	Thr	Gln	Phe	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Trp	Gly
		435					440					445			
Leu	His	Gln	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Phe	Leu	Lys	Ile	Leu	Pro	Gln	Ser
	450					455					460				
Gly	Pro	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Ser	Met	Gly	Ile	Thr	Thr	Leu	Val	Gln
465					470					475					480
Tyr	Ala	Val	Gly	Ile	Met	Thr	Val	Thr	Met	Thr	Phe	Lys	Leu	Gly	Pro
				485					490					495	
Arg	Lys	Ala	Thr	Gly	Arg	Trp	Asn	Pro	Gln	Pro	Gly	Val	Tyr	Pro	Pro
			500				505						510		
His	Ala	Ala	Gly	His	Leu	Pro	Tyr	Val	Leu	Tyr	Asp	Pro	Thr	Ala	Thr
		515				520					525				
Asp	Ala	Lys	Gln	His	His	Arg	His	Gly	Tyr	Glu	Lys	Pro	Glu	Glu	Leu

530

535

540

Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu
545 550

<210> 30

<211> 2049

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: NS1 от Parvovirus B19 клон 2-B6

<400> 30

```

atactcttcg aacaaaacaa aatggagcta tttagagggg tgcttcaag. ttcttcta 60
gttctggact gtgctaacga taactggtgg tgctctttac tggatttaga cacttctgac 120
tggaaccac taactcatac taacagacta atggcaatat acttaagcag tgtggcttct 180
aagcttgact ttactggggg gccactagca ggggtgctgt acttttttca agtagaatgt 240
aacaatttg aagaaggcta tcatattcat gtggttattg gggggccagg gttaaacccc 300
agaaacctca cagtgtgtgt agaggggtta ttaataatg tactttatca ccttgtaact 360
gaaaatctga agctaaaatt ttggccagga atgactacaa aaggcaaata ctttagagat 420
ggagagcagt ttatagaaaa ctatttaatg aaaaaatac ctttaaatgt tgtatggtgt 480
gttactaata ttgatggaca tatagatacc tgtatttctg ctacttttag aaaggagct 540
tgccatgcc aagaaccccg catcaccaca gccataaatg atactagtag tgatgctggg 600
gagtctagcg gcacaggggc agaggttgtg ccatttaatg ggaagggaac taaggctagc 660
ataaagtctc aaactatggt aaactgggtg tgtgaaaaca gagtgtttac agaggataag 720
tggaactag ttgactttaa ccagtacact ttactaagca gtagtcacag tggaaagttt 780
caaattcaaa gtgcactaaa actagcaatt tataaagcaa ctaatttagt gcctactagc 840
acatttttat tgcatacaga ctttgagcaa gttatgtgta ttaaagacaa taaaattggt 900
aaattgttac ttgtcaaaa ctatgacccc ctattagtgg ggcagcatgt gttaaagtgg 960
attgataaaa aatgtggcaa gaaaaacaca ctgtggtttt atggaccgcc aagtacaggg 1020
aaaacaaact tggcaatggc cattgctaaa agtgttccag tatatggcat ggttaactgg 1080
aataatgaaa actttccatt taatgatgta gcaggaaaaa gcttgggtgg ctgggatgaa 1140
ggtattatta agtctacaat tgtagaagct gcaaaagcca ttttaggcgg gcaaccacc 1200
agggtagatc aaaaaatgcg tggaaagtga gctgtgcctg gagtaccctg ggttataacc 1260
agcaatggtg acattacttt tgttgtaagc gggaaacta caacaactgt acatgctaaa 1320
gccttaaaag agcgcatggt aaagttaaac tttactgtaa gatgcagccc tgacatgggg 1380
ttactaacag aggtgatgt acaacagtgg cttacatggt gtaatgcaca aagctgggac 1440
cactatgaaa actgggcaat aaactacact tttgatttcc ctggaattaa tgcagatgcc 1500
ctccaccag acctccaaac caccctaatt gtcacagaca ccagtatcag cagcagtggg 1560
ggtgaaagct ctgaagaact cagtgaagc agctttttta acctcatcac ccagggcgcc 1620
tggaacactg aaaccccgcg ctctagtacg cccatccccg ggaccagttc aggagaatca 1680
tctgtcggaa gccagtttc ctccgaagtt ttagctgcac cgtgggaaga agccttctac 1740
acacctttgg cagaccagtt tcgtgaactg ttagttgggg ttgattatgt gtgggacggg 1800
gtaaggggtt tacctgtctg ttgtgtgcaa catattaaca atagtggggg aggccttggg 1860
ctttgtcccc attgcattaa tgtaggggct tgggtataat gatggaaatt tcgagaattt 1920
acccagatt tgggtgcgat tagctgccat gtgggagctt ctaatccctt ttctgtgcta 1980
acctgcaaaa aatgtgctta cctgtctgga ttgcaaagct ttgtagatta tgagtaagtc 2040
gacatactc

```

<210> 31

<211> 671

<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220> Описание на изкуствена последователност: VP1 от Parvovirus

<223>

B19 клон 2-B6

<400> 31

Met Glu Leu Phe Arg Gly Val Leu Gln Val Ser Ser Asn Val Leu Asp

1		5		10		15
Cys	Ala	Asn	Asp	Asn	Trp	Trp
		20				
25						
30						
35						
40						
45						
50						
55						
60						
65						
70						
75						
80						
85						
90						
95						
100						
105						
110						
115						
120						
125						
130						
135						
140						
145						
150						
155						
160						
165						
170						
175						
180						
185						
190						
195						
200						
205						
210						
215						
220						
225						
230						
235						
240						
245						
250						
255						
260						
265						
270						
275						
280						
285						
290						
295						
300						
305						
310						
315						
320						
325						
330						
335						

340										345										350																									
Trp	Asn	Asn	Glu	Asn	Phe	Pro	Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Gly	Lys	Ser	Leu																														
		355						360				365																																	
Val	Val	Trp	Asp	Glu	Gly	Ile	Ile	Lys	Ser	Thr	Ile	Val	Glu	Ala	Ala																														
		370				375					380																																		
Lys	Ala	Ile	Leu	Gly	Gly	Gln	Pro	Thr	Arg	Val	Asp	Gln	Lys	Met	Arg																														
		385			390					395					400																														
Gly	Ser	Val	Ala	Val	Pro	Gly	Val	Pro	Val	Val	Ile	Thr	Ser	Asn	Gly																														
				405					410					415																															
Asp	Ile	Thr	Phe	Val	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Val	His	Ala																														
				420				425						430																															
Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Arg	Met	Val	Lys	Leu	Asn	Phe	Thr	Val	Arg	Cys																														
				435			440					445																																	
Ser	Pro	Asp	Met	Gly	Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Asp	Val	Gln	Gln	Trp	Leu																														
						455					460																																		
Thr	Trp	Cys	Asn	Ala	Gln	Ser	Trp	Asp	His	Tyr	Glu	Asn	Trp	Ala	Ile																														
					470				475					480																															
Asn	Tyr	Thr	Phe	Asp	Phe	Pro	Gly	Ile	Asn	Ala	Asp	Ala	Leu	His	Pro																														
				485					490					495																															
Asp	Leu	Gln	Thr	Thr	Pro	Ile	Val	Thr	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser																														
				500				505						510																															
Gly	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Phe	Phe	Asn	Leu																														
				515			520							525																															
Ile	Thr	Pro	Gly	Ala	Trp	Asn	Thr	Glu	Thr	Pro	Arg	Ser	Ser	Thr	Pro																														
						535					540																																		
Ile	Pro	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Val	Gly	Ser	Pro	Val	Ser																														
					550					555				560																															
Ser	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Trp	Glu	Glu	Ala	Phe	Tyr	Thr	Pro	Leu																														
				565				570						575																															
Ala	Asp	Gln	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Val	Gly	Val	Asp	Tyr	Val	Trp	Asp																														
				580				585						590																															
Gly	Val	Arg	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Cys	Val	Gln	His	Ile	Asn	Asn	Ser																														
				595			600						605																																
Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Leu	Cys	Pro	His	Cys	Ile	Asn	Val	Gly	Ala	Trp																														
				610		615					620																																		
Tyr	Asn	Gly	Trp	Lys	Phe	Arg	Glu	Phe	Thr	Pro	Asp	Leu	Val	Arg	Cys																														
					630					635				640																															
Ser	Cys	His	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Phe	Ser	Val	Leu	Thr	Cys	Lys																														
				645				650						655																															
Lys	Cys	Ala	Tyr	Leu	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	Asp	Tyr	Glu																															
				660				665						670																															

<210> 32
 <211> 2380
 <212> ДНК
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Описание на изкуствена последователност: VP1 от Parvovirus 19 клон 2-B6

<400> 32
 atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatgggtggg aaagtgatga 60
 taaatttgct aaagctgtgt atcagcaatt tgtggaattt tatgaaaagg ttactggaac 120
 agacttagag cttattcaaa tattaanaaga tcattataat atttcttttag ataatcccct 180
 agaaaaacca tcctctttgt ttgacttagt tgctcgtatt aaaaataacc ttaaaaactc 240
 tccagactta tatagtcatac attttcaaaag tcatggacag ttatctgacc acccccatgc 300
 cttatcatcc agtagcagtc atgcagaacc tagaggagaa gatgcagtat tatctagtga 360
 agacttacac aagcctggtc aagtttagctt acaactaccc ggtactaact atgttggggc 420
 tggcaatgag ctacaagctg gggccccgca aagtgtgtgt gacagtgtctg caaggattca 480
 tgactttagg tatagccaat tggctaagtt ggggaataaat ccatatactc attggactgt 540
 agcagatgaa gagctttttaa aaaatataaaa aaatgaaact ggggttcaag cacaagtagt 600
 aaaagactac ttacttttaa aaggtgcagc tgccccctgtg gcccattttc aagggaagttt 660
 gccggaagtt ccgctttaca acgcctcaga aaaataccca agcatgactt cagttaattc 720
 tgcagaagcc agcactggtg caggaggggg gggcagtaat cctgtgaaaa gcattgtggag 780
 tgaggggggtc acttttagtg ccaactctgt aacttgtaca ttttccagac aatttttaat 840
 tccatatgac ccagagcacc attataaggt gttttctccc gcagcaagta gctgccacaa 900
 tgccagtggg aaggaggcaa aggtttgcac cattagtccc ataatgggat actcaacccc 960
 atggagatat ttagatttta atgtctttaa tttatttttt tcaccttag agtttcagca 1020
 ctttaattgaa aattatggaa gtatagctcc tgatgcttta actgtaacca tatcagaaat 1080
 tgctgttaag gatgttaca acaaaactgg aggggggggtg caggttactg acagcactac 1140
 agggcgcccta tgcattgttag tagaccatga atataagtag ccatatgtgt tagggcaagg 1200
 tcaagatact ttagccccag aacttcctat ttgggtatac tttccccctc aatacgctta 1260
 ctttaacagta ggagatgtta acacacaagg aatttctgga gacagcaaaa aattggcaag 1320
 tgaagaatca gcattttatg ttttggaaaca cagttctttt cagcttttag gtacaggagg 1380
 tacagcaact atgtcttata agtttctctc agtgccccca gaaaatttag agggctgcag 1440
 tcaacacttt tatgaaatgt acaacccctt atacggatcc cgcttagggg ttcttgacac 1500
 attaggaggt gacccaaaat ttagatcttt aacacatgaa gaccatgcaa ttcagccccca 1560
 aaacttcatg ccagggccac tagtaaaactc agtgtctaca aaggaggagg acagctctag 1620
 tactggagct ggaaaagcct taacaggcct tagcacaggt acctctcaaa acactagaat 1680
 atccttacgc cctgggccag tgtctcagcc gtaccaccac tgggacacag ataaatatgt 1740
 cacaggaata aatgccattt ctcatggtca gaccacttat ggtaacgctg aagacaaaaga 1800
 gtatcagcaa ggagtgggta gatctccaaa tgaaaaagaa cagctaaaac agttacaggg 1860
 ttttaacatg cacacctact ttcccaataa aggaaccag caatatacag atcaaaattga 1920
 ggcgccctta atgggtgggt ctgtatggaa cagaagagcc cttcactatg aaagccagct 1980
 gtggagtaaa attccaatt tagatgacag ttttaaaact cagtttgtag ccttaggagg 2040
 atgggggttg catcagccac ctctcctcaat attcttaaaa atattaccac aaagtggggc 2100
 aattggaggt attaaatcaa tgggaattac taccttagtt cagtatgccg tgggaattat 2160
 gacagtaacc atgacattta aattggggcc ccgtaaaagt acgggagcgt ggaatcctca 2220
 acctggagtg tatccccgc acgcagcagg tcatttacca tatgtactat atgacccac 2280
 agctacagat gcaaaaaca accacagaca tggatatgaa aagcctgaag aattgtggac 2340
 agccaaaagc cgtgtgcacc cattgtaagt cgacatactc 2380

<210> 33
 <211> 781
 <212> PRT
 <213> Изкуствена последователност

<220>
 <223> Описание на изкуствена последователност: VP1

аминокиселина от Parvovirus B19 клон 2-B6

<400> 33
 Met Ser Lys Glu Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala
 1 5 10 15

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

Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asn Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val
 355 360 365
 Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr
 370 375 380
 Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu
 385 390 395 400
 Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val
 405 410 415
 Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala
 420 425 430
 Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu
 435 440 445
 Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val
 450 455 460
 Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr
 465 470 475 480
 Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly
 485 490 495
 Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro
 500 505 510
 Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu
 515 520 525
 Gly Asp Ser Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser
 530 535 540
 Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val
 545 550 555 560
 Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile
 565 570 575
 Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys
 580 585 590
 Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu
 595 600 605
 Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly
 610 615 620
 Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser
 625 630 635 640
 Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys
 645 650 655
 Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly
 660 665 670
 Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu
 675 680 685

Pro Gln Ser Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr
690 695 700

Leu Val Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys
705 710 715 720

Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val
725 730 735

Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro
740 745 750

Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro
755 760 765

Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu
770 775 780

<210> 34
<211> 1699
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: VP2 от Parvovirus B19 клон 2-B6

<400> 34

atactcaagc	ttacaaaaca	aaatgacttc	agttaattct	gcagaagcca	gcactgggtgc	60
aggagggggg	ggcagtaatc	ctgtgaaaag	catgtggagt	gagggggcca	cttttagtgc	120
caactctgta	acttgtagat	tttccagaca	atttttaatt	ccatatgacc	cagagcacca	180
ttataagggtg	ttttctcccg	cagcaagtag	ctgccacaat	gccagtggaa	aggaggcaaa	240
ggtttgcacc	attagtccca	taatgggata	ctcaaccca	tggagatatt	tagattttaa	300
tgttttaaat	ttattttttt	cacctttaga	gtttcagcac	tttaattgaa	attatggaag	360
tatagctcct	gatgctttaa	ctgtaacat	atcagaaatt	gctgttaagg	atgttacaaa	420
caaaactgga	gggggggtgc	aggttactga	cagcactaca	gggcgcctat	gcattgttagt	480
agaccatgaa	tataagtacc	catatgtgtt	agggcaaggt	caagatactt	tagccccaga	540
acttcttatt	tgggtatact	ttccccctca	atagccttac	ttaacagtag	gagatgttaa	600
cacacaagga	atttctggag	acagcaaaaa	attggcaagt	gaagaatcag	cattttatgt	660
tttgggaacac	agttcttttc	agcttttagg	tacaggaggt	acagcaacta	tgtcttataa	720
gtttctcca	gtgccccag	aaaatttaga	gggctgcagt	caacactttt	atgaaatgta	780
caacccttta	tacggatccc	gcttaggggt	tcctgacaca	ttaggaggtg	acccaaaatt	840
tagatcttta	acacatgaag	accatgcaat	tcagcccca	aacttcatgc	cagggccact	900
agtaaaactca	gtgtctacaa	aggagggaga	cagctctagt	actggagctg	gaaaagcctt	960
aacaggcctt	agcacaggta	cctctcaaaa	cactagaata	tccttacgcc	ctgggccagt	1020
gtctcagccg	taccaccact	gggacacaga	taaataatgtc	acaggaataa	atgccatttc	1080
tcatgggtcag	accacttatg	gtaacgctga	agacaaagag	tatcagcaag	gagtgggtag	1140
atttccaaat	gaaaaagaac	agctaaaaca	gttacagggt	ttaaacatgc	acacctactt	1200
tcccaataaa	ggaacccagc	aatatacaga	tcaaattgag	cgccccctaa	tgggtgggttc	1260
tgtatggaac	agaagagccc	ttcactatga	aagccagctg	tggagtataa	ttccaaattt	1320
agatgacagt	tttaaaactc	agtttgcagc	cttaggagga	tggggtttgc	atcagccacc	1380
tcctcaaata	tttttaaaaa	tattaccaca	aagtgggcca	attggaggta	ttaaatcaat	1440
gggaattact	accttagttc	agtatgccgt	gggaattatg	acagtaacca	tgacatttaa	1500
attggggccc	cgtaaaagcta	cgggacggtg	gaatcctcaa	cctggagtgt	atcccccgca	1560
cgcagcaggt	catttaccat	atgtactata	tgacccca	gctacagatg	caaaacaaca	1620
ccacagacat	ggatatgaaa	agcctgaaga	attgtggaca	gccaaaagcc	gtgtgcaccc	1680
attgtaagtc	gacatactc					1699

<210> 35
<211> 554
<212> PRT
<213> Изкуствена последователност

<220> Описание на изкуствена последователност: VP2 от Parvovirus
<223>

B19 клон 2-B6

<400> 35

```

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

```

305 310 315 320
 Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val Ser Gln Pro
 325 330 335
 Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile
 340 345 350
 Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln
 355 360 365
 Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu
 370 375 380
 Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln
 385 390 395 400
 Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn
 405 410 415
 Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn
 420 425 430
 Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly
 435 440 445
 Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu Pro Gln Ser
 450 455 460
 Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr Leu Val Gln
 465 470 475 480
 Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro
 485 490 495
 Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val Tyr Pro Pro
 500 505 510
 His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr
 515 520 525
 Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu
 530 535 540
 Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu
 545 550

<210> 36
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223> Описание на изкуствена последователност: праймер VP-5

<400> 36
 aggaagtttg ccggaagttc

20

<210> 37
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213>

Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: праймер VP-3

<400> 37

gtgctgaaac tctaaagtg

20

<210> 38

<211> 24

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер VP2-5

<400> 38

gacatggata tgaaaagcct gaag

24

<210> 39

<211> 24

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер VP2-3

<400> 39

gttggtcata tctgggtaag tact

24

<210> 40

<211> 19

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер K-1sp

<400> 40

ataaatccat atactcatt

19

<210> 41

<211> 19

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер K-2sp

<400> 41

ctaaagtatc ctgaccttg

19

<210> 42

<211> 22

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер Hicks-5

<400> 42

cccgcccttat gcaaatgggc ag

22

<210> 43

<211> 22

<212> ДНК

<213>

Изкуствена последователност

<220>

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер Hicks-3

<400> 43

ttgtgttagg ctgtcttata gg

22

<210> 44

<211> 54

<212> ДНК

<213>

Изкуствена последователност

<220>

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер NS1-3

<400> 44

atactctcta gacaaaacaa aatggagcta ttttagagggg tgcttcaagt ttct

54

<210> 45

<211> 48

<212> ДНК

<213>

Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: праймер NS1-3

<400> 45

gagtatgtcg acttactcat aatctacaaa gctttgcaat ccagacag

48

<210> 46

<211> 55

<212> ДНК

<213>

Изкуствена последователност

<220>

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер VP1-5SN

<400> 46

atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatggtggg aaagt

55

<210> 47

<211> 51

<212> ДНК

<213>

Изкуствена последователност

<220>

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер VPALL-3

<400> 47

gagtatgtcg acttacaatg ggtgcacacg gcttttggt gtcacaatt c

51

<210> 48

<211> 55

<212> ДНК

<213>

Изкуствена последователност

<220>

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер VP2-5SN

<400> 48

atactcaagc ttacaaaaca aaatgacttc agttaattct gcagaagcca gcact

55

<210> 49
<211> 43
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: VSPC1

<400> 49

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa atccttaaca gcaatttctg ata

43

<210> 50
<211> 39
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: VSPC2

<400> 50

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa cgccctgtag tgctgtcag

39

<210> 51
<211> 42
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: VSPC3

<400> 51

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa tatacccaaa taggaagttc tg

42

<210> 52
<211> 43
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: VSPC4

<400> 52

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa taaaatgctg attcttcact tgc

43

<210> 53
<211> 40
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: VSPC5

<400> 53

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa tgctgtacct cctgtacct

40

<210> 54
<211> 40
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: VSPC6

<400> 54
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agccctctaa attttctggg 40
 <210> 55
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213>
 <220> Изкуствена последователност
 <223> Описание на изкуствена последователност: VSPC7
 <400> 55
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctcctaagt gtcaggaacc 40
 <210> 56
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213>
 <220> Изкуствена последователност
 <223> Описание на изкуствена последователност: VSA1
 <400> 56
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccatatact cattggactg t 51
 <210> 57
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213>
 <220> Изкуствена последователност
 <223> Описание на изкуствена последователност: VSA2
 <400> 57
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccagagcac cattataa 48
 <210> 58
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213>
 <220> Изкуствена последователност
 <223> Описание на изкуствена последователност: VSA3
 <400> 58
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcacaatgcc agtggaaa 48
 <210> 59
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213>
 <220> Изкуствена последователност
 <223> Описание на изкуствена последователност: VSP2
 <400> 59
 gtgctgaaac tctaaaggt 19
 <210> 60
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213>

Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: VSP1

<400> 60

ggaggcaaag gtttgca

17

<210> 61

<211> 20

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<221>

<222> misc-характеристика

<223>

Където "с" е модифициран 5' с флуоресцеин фосфорамидит

<220>

<221> misc-характеристика

<222> (20)

<223> Където "t" е модифициран 3' с DABCYL

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer VSPPR1

<400> 61

cccatggaga tathtagatt

20

<210> 62

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат CN80-1

<400> 62

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag gggggccact ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgtag caagttagtg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaatttg 480
ttttttttac ctttagagtt tcagcattta attgaaaact atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggat ttacagacaa aactggaggg 600
ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatactttag 700
```

<210> 63

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат CN81-3

<400> 63

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
```

```

agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tcgcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggc cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtaccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 64
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL1-4

```

<400> 64
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggc cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtaccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 65
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL2-1

```

<400> 65
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggc cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtaccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 66
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL3-1

```

<400> 66
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

```

```

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 67

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL4-3

<400> 67

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 68

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL5-2

<400> 68

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 69

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL6-2

<400> 69

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtagc gatacttttag 700
```

<210> 70

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL7-3

<400> 70

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtagc gatacttttag 700
```

<210> 71

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL8-2

<400> 71

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag gttttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtagc gatacttttag 700
```

<210> 72

<211> 700

<212> ДНК

<213>

Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL9-1

<400> 72

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag ccagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg tgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700
```

<210> 73

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL9-9

<400> 73

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg tgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700
```

<210> 74

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL10-2

<400> 74

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg tgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700
```

<210> 75

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL11-1

<400> 75

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccc cttacaacgc ctcaaaaaa 180
taccacaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg tgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggat ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttat 700
```

<210> 76

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL12-1

<400> 76

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccc cttacaacgc ctcaaaaaa 180
taccacaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtgact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg tgcaccatt 420
agtccgataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggat ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcaag ttactgacag cagtacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 77

<211> 700

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL13-3

<400> 77

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccc cttacaacgc ctcaaaaaa 180
taccacaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtgcatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg tgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggat ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 78
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL14-1

<400> 78
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacagg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 79
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL15-3

<400> 79
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacagg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 80
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL16-2

<400> 80
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttat 700

<210> 81
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL17-1

<400> 81
ataaatccat atacttattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagtgg gggggccact ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 82
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL18-1

<400> 82
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagtgg gggggccact ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 83
<211> 700
<212> ДНК
<213>

<220> Изкуствена последователност
<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL19-1

<400> 83
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagtgg gggggccact ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaagggt ttgcaccatt 420

```

agtcaccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 84
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL20-3

```

<400> 84
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcat caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcaccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 85
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL21-3

```

<400> 85
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcat caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcaccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 86
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223> Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL22-11

```

<400> 86
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

```

```

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 87
 <211> 700
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат B19SCL2-14

```

<400> 87
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccgaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatacttttag 700

```

<210> 88
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: изолат Vpara 8

```

<400> 88
tccatatgac ccagagcacc a

```

21

<210> 89
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: праймер Vpara 9

```

<400> 89
tttccactgg cattgtggc

```

19

<210> 90
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213>

<220> Изкуствена последователност

<221> misc-характеристика

<222> (1)

<223> Където "а" е водифициран 5' с Fam

<220> misc-характеристика

<221> (21)

<223> Където "g" е водифициран 3' с Tamra

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: праймер Vpra 10

<400> 90

agctagacct gcatgtcact g

21

<210> 91

<211> 26

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

Описание на изкуствена последователност: последователност мишена

<400> 91

ctacttgctg cgggagaaaa acacct

26

<210> 92

<211> 681

<212> ДНК

<213>

<220> Изкуствена последователност

<223>

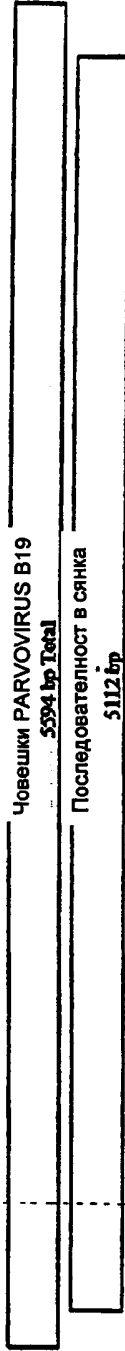
Описание на изкуствена последователност: последователност
за вътрешен контрол

<400> 92

gaattcactt gtacattttc cagacaattt ttaattccat atgacccaga gcaccattat 60
acagtacat gcaggtctag ctctgccaca atgccagtgg aaaggaggca aaggtttgca 120
ccattagccc cataatggga tactcaaccc catggagata tttagatttt aatgctttta 180
atattatttt ttacacctta gagtttcagc acttaattga aaattatgga agtatagctc 240
ctgatgcttt aactgtaacc atatcagaaa ttgctgttaa ggatgttacg gacaaaactg 300
gagggggggt gcaggttact gacagcacta cagggcgctt atgcatgtta gtagaccatg 360
aatataagta cccatatgtg ttagggcaag gtcaagatac tttagcccca gaacttccta 420
tttgggtata ctttccccct caatacgctt acttaacagt aggagatgtt aacacacaag 480
gaatttcttg agacagcaaa aaattggcaa gtgaagaatc agcattttat gttttggaac 540
acagttcttt tcagctttta ggtacaggag gtacagcaac tatgtcttat aagtttcctc 600
cagtgtcccc agaaaattta gagggctgca gtcaacactt ttatgaaatg tacaaccctc 660
tatacggatc ccgctgtcga c 681

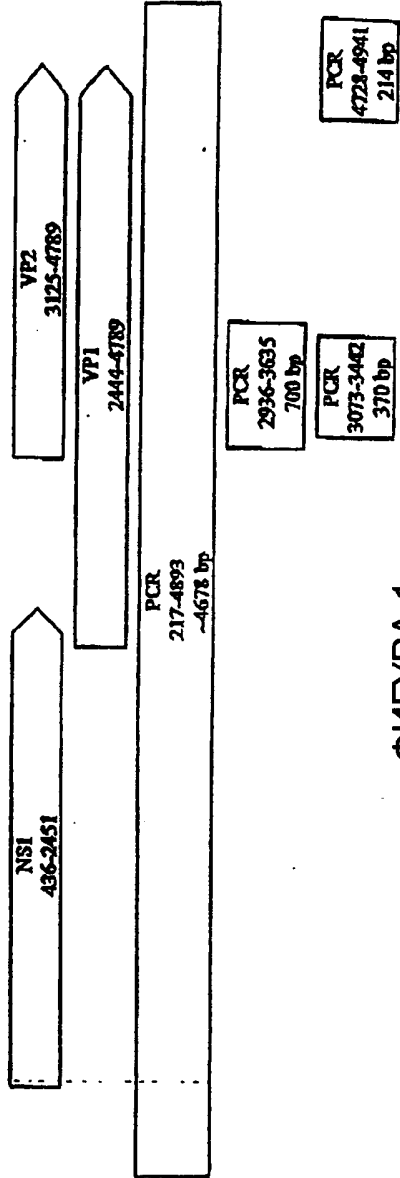
ЧОВЕШКИ PARVOVIRUS B19

5594



Стволова бримка
1-179-203

Стволова бримка
5081-9413



ФИГУРА 1

CH47-26

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagtccccgttacaacgctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttcagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaaatgcttaaatgtttttcacctttagagttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaatgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtacagttactgacagcactaccgggcctatgcatgttagacctgaatacaagc
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 2А**CH48-29**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagtccccgttacaacgctcagaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttcagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactca
actccatggagatatttagatttaaatgcttaaatgtttttcaccttttagagttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaatgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggttacagggtactgacagcactacaggggcctatgcctgttagacctgaatacaagc
catatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 2В

CH33-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttacittaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagttcccgtttacaacgcctcagaacaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggtggcagtaatcctgcaaaaagcatgtggagtggggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgtttaaatttttttccacttttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggttacaggttactgacagcactacagggcgctatgctgttagtagaccatgaatacaagtacc
cataatgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 2С**CH33-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttacittaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagttcccgtttacaacgcctcagaacaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggtggcagtaatcctgcaaaaagcatgtggagtggggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgtttaaatttttttccacttttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggttacaggttactgacagcactacagggcgctatgctgttagtagaccatgaatacaagtacc
cataatgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 2D

CH33-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggcccattttcaaggaagttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcccataatgggatactca
actccatggagatattagattttaatgctttaaattttttcaccttttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgtttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgctatgcctgttagtagacatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 2Е**CH42-7**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggcccattttcaaggaagttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccaggcagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatattagattttaatgctttaaattttttcaccttttagagtttcagcacctaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgtttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggagggggggtacaggttactgacagcactacagggcgctatgcctgttagtagacatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 2F

CH42-18

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtaattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagatttaatgctttaattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaagggtcaggatact .tag

ФИГУРА 2G**CH42-19**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtaattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagatttaatgctttaattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaagggtcaggatacttttag

ФИГУРА 2H

CH46-23

attaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
ncacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccaggcagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggagggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 2I**CH1-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggagggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 2J

CH1-6

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgc
ggaagttcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacctagagcaccattataagggttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagataattagattttaatgctttaaatattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggagggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

ФИГУРА 2К**CH2-8**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgc
ggaagttcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgacctagagcaccattataagggttttctcccgc
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaataaagtac
cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

ФИГУРА 2L

CH2-10

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatagacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccctatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttcaccttttagagttcagcacctaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacagaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 2М**H2-11C**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatagacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccctatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttcaccttttagagttcagcacctaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 2N

CH5-13

ctaaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagacttctttaaagggtgcagctgcccctgtggccatttcaaggagtttgcc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataagggtgtttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaaggagcgaagggttgactattagtcataatgggatactca
accccatggagatatttagatttaatgctttaattttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaattat
ggcagtatagtcctgatgtttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtacc
caa'gtgttagggcaagggtcaggatactttag

ФИГУРА 20**CH7-22**

ataaatccatgtactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagacttctttaaagggtgcagctgcccctgtggccatttcaaggagtttgcc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataagggtgtttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaaggagcgaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaatgctttaattgtttttcaccttagagttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagtcctgatgtttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtacaagttactgacagcactacggggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

ФИГУРА 2Р

CH13-27

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
ggaagttcccgttacacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaattctgtcaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgtaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacctagagcaccattataagggtgtttctcccga
gcgagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccatcagtcaccataatgggatactc
aaccatggagatatttagattttaatgctttaaattattttttcaccttagagtccagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 2Q**CH14-33**

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
ggaagttcccgttacacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaactc
tgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacctagagcaccattataagggtgtttctcccgcag
caagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggttgcaccattagtcaccataatgggatactcaa
cccatggagatatttagattttaatgctttaaattattttttcaccttagagtccagcacttaattgaaaattatg
gtagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaagatgttacagacaaaactggag
ggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtgaccatgaatacaagtaccca
tatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 2R

CH62-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagcact
gggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacaktttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttccccgca
gccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagataatttagatttaaatgcttaaatattttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtacaggttactgacagcactacaggccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcag gatacttag

ФИГУРА 2S**CH64-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttccccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatacttagatttaaatgcttaaatattttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtcaggttactgacagcactacaggccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 2Т

CH67-2

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgcc
ggaagttcccgttacaacgctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataagggtgtttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaagaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaatgctttaattttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaagatgttacagacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtgaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaagggtcaggatac.ttag

ФИГУРА 2U

Parvovirus B19 клон #2-B1

1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
 61 ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc ttctttctg ggctgctttt ttcctggact tacttgctgt tttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt tcttctaagt ttctggactg tgctaacgat aactggtggt gctctttact
 301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata
 361 ctttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccaactagcag ggtgcttgta
 421 ctttttcaa gtagaatgta acaaattga agaaggctat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacccea gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
 541 actttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcaaatac ttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 tttaaatggt gtatgggtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aaggagctt gccatgccaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgctc catttaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagttca aactatggta aactggttgt gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttc aaattcaaag tgcactaaa ctagcaattt ataaagcaac
 1021 taatttagtg cctactagca cattttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat
 1081 taaaacaat aaaattgta aattgttact ttgtcaaac tatgaccccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta
 1201 tggcccgcca agtacaggga aaacaaact ggcaatggcc attgtcaaaa gtgtccagt
 1261 atatggcatg gtaactgga ataataaaaa cttccattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 cttggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttagggggg caaccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgcttgg
 1441 agtacctgtg gttataacca gcaatgggtg cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatggggg tactaacaga ggctgatgta caacagtgge ttacatgggtg
 1621 taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgattccc
 1681 tggattaat gcagatgccc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaacte agtgaagca gcttttttaa
 1801 cctcatcacc ccagcgccct ggaacactga aaccccgccg tctagtacgc ccatcccggt
 -----1861 gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttc tccgaagttg tagctgcac-----
 1921 gtgggaagaa gccttctaca caccttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttggggg
 1981 tgattatgtg tgggacgggt taaggggtt accgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa

ФИГУРА 3А

2041 tagtggggga ggcttgggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg
 2101 atggaaattt cgagaattta cccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taateccctt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt
 2221 tgtagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa ttgtctaaag
 2281 ctgtgtatca gcaatttgig gaattttatg aaaagggtac tggacagac ttagagetta
 2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aaccatect
 2401 cttgtttga cttagtgtct cgtattaaaa ataacctaa aaactctcca gacttatata
 2461 gtcacattt tcaaagtcac ggacagttat ctgaccacce ccatgcctta tcatccagta
 2521 gcagtcacgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac
 2641 aagctgggccc cccgcaaagt gctgttgaca gtctgcaag gattcatgac ttiaggata
 2701 gccactggc taagtggga ataatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt tcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
 2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc atttcaagg aagtttgcg gaagttccc
 2881 cttacaacgc ctcaaaaaa taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaacctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt
 3001 ttagtgcaa cctctgaact tgtacattt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taagggttt tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg
 3121 aggcaaagg ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag
 3181 atttaatgc tttaattta tttttcac ctttagagt tcagcactta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agtccctgat gctttaactg taaccatac agaaattgct gttaaggatg
 3301 ttacggacaa aactggaggg ggggtgcagg ttaactgacag cactacaggg cgcctatgca
 3361 tgtagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggtaa gatacttag
 3421 cccagaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagtaggag
 3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 ttatgtttt ggaacacagt tctttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagt cccccagaaa atttagaggg ctgcagtcac cacttttatg
 3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatcccgt taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atcttaaca catgaagacc atgcaattca gcccacaaac tcatgccag
 3781 ggccactagt aaactcagt tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctgga
 3841 aagcctaac aggccttag acaggtacct ctcaaacac tagaatatcc ttacgccctg
 3901 ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggtcagacc acttatggta acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 -----4021 tgggtagatt teenaatgaa aaagaacage taaacagtt aeaggggtta acaatgcaca-----
 4081 cctacttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc cccctaatgg
 4141 tgggttctgt atggaacaga agagccctc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaatc
 4201 caaatttaga tgacagttt aaaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcatc

ФИГУРА 3В

4261 agccacctcc tcaaatattt ttaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta
4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaacctga
4381 catttaaatt ggggccccgt aaagetacgg gacgggtggaa tectcaacct ggagtgtatc
4441 cccgcacgc agcaggatcat ttaccatatg tactatatga cccacagct acagatgcaa
4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaage ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
4561 tgcaccatt gtaaactc cccacgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaagccca
4621 ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa

ФИГУРА 3С

Parvovirus B19 клон #2-B6

1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
 61 ttgtaacggg taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttcctggact taettgctgt tttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt tcttctaagt ttctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctctttact
 301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata
 361 cttaaagcag gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta
 421 ctttttcaa gtagaatgta acaaatttga agaaggetat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacecca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
 541 actttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcaaatac ttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 tttaaatgtt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aaggagcctt gccatgccaa gaaacccgcg atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgtgc catttaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactgggtgt gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttcc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac
 1021 taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat
 1081 taaagacaat aaaatigtta aattgttact ttgtcaaac tatgacccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtggg ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtgggttta
 1201 tggaccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt
 1261 atatggcatg gttactgga ataataaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 cttggtgggc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttaggcggg caaccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgectgg
 1441 agtaccctgt gttataacca gcaatgggtg cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatggggg tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatgggtg
 1621 taatgcacaa agctggggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc
 1681 tggaaattaat gcagatgccc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaanga gcttttttaa
 1801 cctcatcacc ccaggcgctt ggaacactga aacccgcgcg tctagtacgc ccatccccgg
 -----1861 gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttcc tccgaagtgt tagctgcac-----
 1921 gtgggaagaa gccttctaca cactttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttggggt
 1981 tgattatgtg tgggacgggt taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa
 2041 tagtggggga ggcttgggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg

2101 atggaaattt cgagaattta cccagattt ggtgcatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taateccctt tctgtctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt
 2221 ttagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa ttgtctaaag
 2281 ctgtgtatca gcaatttgg gaattttatg aaaagggttac tggaacagac ttagagctta
 2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt cttagataa tcccctagaa aacccatcct
 2401 ctttgttga cttagtgtc cgtattaaaa ataacctaa aaactctcca gacttatata
 2461 gtcacatatt tcaaagtcac ggacagttat ctgaccaccc ccatgacctta tcatccagta
 2521 gcagtcacgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccgggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac
 2641 aagctgggcc ccgcgaaagt gctgttgaca gtctgcaag gattcatgac ttaggtata
 2701 gccat.ctggc taagttggga ataatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
 2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagtttgcg gaagttcccg
 2881 cttacaacgc ctcagaaaaa taccgaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtga gggggcactt
 3001 ttagtgcaa cctgttaact tgtacattt cagacaatt ttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taaggtgtt tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg
 3121 aggcaaaggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag
 3181 attttaatgc ttaaatita tttttcac ctttagagt tcaacctta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agctctgat gctttaactg taaccatac agaaattgct gtttaggatg
 3301 ttacaaacaa aactggagg ggggtgcagg ttactgacag cactacagg cgctatgca
 3361 tgtagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggtaa gatacttag
 3421 cccagaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagttagg
 3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 ttatgtttt ggaacacagt tctttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtg ccccagaaa atttagaggg ctgcagtaa cactttatg
 3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatcccgct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gcccacaaac tcatgccag
 3781 ggccactagt aaactcagtg tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
 3841 aagccttaac aggccttagc acaggtacct ctcaaacac tagaatatcc ttacgccctg
 3901 ggccagtgc ttagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggtagacc acttatggta acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 4021 tggtagatt tccaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acagggttta aacatgcaca
 4081 cctacttcc caataaagga acceagcaat atacagataa aattgagcgc cccetaatgg
 4141 tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaattc
 4201 caaatttaga tgacagttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcac
 4261 agccacctcc tcaaatattt taaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta

ФИГУРА 4В

4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaacatga
4381 catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacggtggaa tectcaacct ggagtgtatc
4441 ccccgcaagc agcaggtcat ttaccatag tactatatga cccacagct acagatgcaa
4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
4561 tgcaccatt gtaaacaact cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgcca
4621 ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa

ФИГУРА 4С

Клон В1-NS1 едноверижна ДНК последователност

atactcttgaacaaaacaaatggagctatttagaggggtgcttcaagttcttctaatgttctggactgtgtaacgataactgggtgctctt
tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactcatactaaacagactaatggcaatatacttaagcagtgtggcttctaagcttgacttta
ctggggggccactagcaggggtgctgtactttttcaagtagaatgaacaaattgaagaaggctatcatactcatgtggttattggggggcca
gggttaaccccagaaacctcacagtgtgttagaggggttatttaataatgtactttatcacctgttaactgaaatctgaagctaaaattttgc
caggatgactacaaaaggcaatacttttagagatggagagcagttatagaaaactttaatgaaaaaaatacctttaaatgttgatggtgt
gttactaatatgtatggacatatagatacctgtatttctgctacttttagaaaggagccttgcctgccaagaaccccgcatcaccacagccat
aatgatactagtactgatgctggggagtctagcggcacaggggcagagggttgccatttaattgggaagggaactaaggctagcataaag
tttcaaaactatggtaaactggtgtgtgaaacagagtggttacagaggataagtggaactagttagctttaaccagtacactttactaagcagt
agtcacagtgggaagtttcaattcaagtgactaaaactagcaatttataaagcaactaatttagtgcctactagcacattttattgcatacag
actttgagcaagttatgttattaaaaacaalaaattgttaattgttactttgtcaaaactatgacccctattagtggggcagcaigtgttaag
tggtatgataaaaaatgtggcaagaaaaacacac igtggtttatgggcccgaagtacagggaaaaacaaactggcaatggccattgctaa
aagtgtccagtataiggaigtgtaactggaataatgaaaacttccatttaatatgtatgtagcaggaagaaagcgttggtgtctgggatgaag
gtattattaagtctacaattgtagaagctgcaaaagccatttagcgggcaaccaccagggtatgataaaaaatgcgtggaagttagctg
tgcttgagtagctgtgttataaccagcaatggtgacattactttgttgaagcgggaacactacaacaaactgtacatgctaaagccttaaaa
gagcgcagtggttaaagttaaactttactgtaagatgcagccctgacatggggttactaacagaggctgatgtacaacagtggccttacatggtgt
aatgcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacacttttgatttccctggaattaatgcagatgccctccaccagacccccc
aaaccaccccaattgtcacagacaccagtatcagcagcagtggtggtgaaagctctgaagaactcagtgaagcagcctttttaacctcatca
ccccaggcgcctggaacactgaaaccccgctctagtagccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgctggaagcccagtttc
ctccgaagtgttagctgcatcgtgggaagaagccttctacacaccttggcagaccagtttcgtgaactgttagttggggttgattatgtgtggg
acggtgtaaggggttacctgtctgtgtgtgcaacatattaacaatagtggggaggccttgggacttgtcccatgcatatgtaggggct
tggtataatggatggaaattcgagaatttaccagattgtgcatgtatgctgcatgtgggagcttctaataccctttctgtgctaacctgca
aaaaatgtgctacctgtctgattgcaaagcctttagattatgagtaagtcgacatactc

ФИГУРА 5А

Клон В1-NS1 аминокиселинна последователност

MELFRGVLQVSSNVLD C ANDNWWCSLLDLD TSDWEPLTHTNRLMAIYLSVAS
KLDFTGGPLAGCLYFFQVECNKFEEGYHIHVIGGPGLNPRNLTVCEGLFNNVLYHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKGA
CHAKKPRITTAINDTSTDAGESSGTGAEVVFFNGKGTKASIKFQTMVNWLCENRVFTEDK
WKLVDENQYTLSSSHSGSFQIQSALKLAIFYKATNLVPTSTFLLHTDFEQVMCIKNNKIV
KLLLCQNYDPLLVGQHV LKWDKKCGKKNLWIFYGPPSTGKTNLAMAIKSVPVYGMVNW
NNENFPFNDVAGKSLVWDEGIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSVA VPGVPVVIT
SNGDITFVSGNTTTTVHAKALKERMVKLNFTYRCSPDMGLLTRADVQQWL TWCN AQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTPIVTDTSISSSGGESSEELSESSFFNLITPGA
WNTETPRSTPIPGTSSGESSVGSVSEVVAAASWBEAFYTPLADQFREL VGV D YVWDG
VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTPLVRCSCHVGASNPFSVL
TCKKCA YLSGLQSFVDYE

ФИГУРА 5В

Клон В1-VP1 едноверижна ДНК последователност

atactcaagcttacaaaacaaaatgagtaagaaagtggaatggtggaaagtgatgataattgctaagctgtgtatcagcaatttggaatttta
 tgaaaagggttactggaacagacttagagcttattcaaatattaaagatcattataatttcttagataatcccctag
 aaaacccatctcttggtagcttagtgctgtattaaaaaaccttaaaaactctccagacttatatagcatcat
 ttcaaaagtcaggacagttatctgaccaccccatgacctatcatcagtagcagtcagcagaacctagaggagaaga
 tgcagtattatctagtagaagacttacacaagcctgggcaagttagcgtacaactaccggtagtaactatgttgggctg
 gcaatgagctacaagctgggcccccgaaaagtgctgtgacagtgctgcaaggattcatgacttaggtatagccaactg
 gctaagttgggaataaatccatactacatggactgttagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgg
 gttcaagcacaagtagtaaaagactcttactttaaaagggtgagctgccccgtggccccatttcaaggaggttgc
 cggaaagtcccgcttacacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttatctgcagaagccagcactgtgtca
 ggagggggggcagtaactcctgtgaaaaagcatgttgagtgagggggccacttttagtgccaactctgtaactgtacatt
 tccagacaaatttattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctccgcagcaagtagctgcccaatg
 ccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtccttaattgggatactcaaccccatggagatatitgattttaat
 gctttaaattatttttacccttagagtttcagcacttaattgaaattat ,gaagtatagctcctgtagctttaa
 tgttaaccatatcagaattgctgttaaggatgttacggacaaaactggaggggggtgcaggttactgacagcactacag
 ggccgctatgcatgttagacacatgataatagtaaccatatgtgttagggcaaggctcaagatacttagccccagaa
 ctctctatttgggtatcttccccctcaatagcttacttaacagtaggagatgttaacacacaaggaatttctggga
 cagcaaaaaatggcagtgaaagatcagcattttatgttttgaacacagttctttcagcttttaggtacaggagga
 cagcaactatgtctataagtttctccagtgccccagaaaaatttaggggtgcagtcacactttatgaattgtac
 aaccccttatacggatcccgcttaggggttctgacacattaggggtgaccccaatttagatctttaaaccatgaaga
 ccattgcaatcagccccaaaacttcatgcccaggccactagtaaacctcagtgctacaaaaggaggagacagctctagta
 ctggagctggaaggccttaacaggcccttagcacaggtacctctcaaaaactagaatatccttacgccccggccagtg
 tctcagccgtaccacccatgggacacagataaatatgtcacaggaataaatgccatttctcatggtcagaccattatgg
 taacgtgaagacaaaagagtagatcagcaaggagtggttagatttccaaatgaaaaagacagctaaacagttacagggtt
 taacatgcacacacttcttcccaataaaggaaacccagcaatatacagatcaaatgagcggccccctaatgtgtgttct
 gtatggaacagaagagcccttactatgaaagccagctgtgagtaaaattccaaatttagatgacagttttaaactca
 gtttcagcccttaggaggaagggttgcacagcccttctcaaatatttttaaaaaataataccacaaagggtggccaa
 ttggaggtattataatcaatgggaattactaccttagttcagiatgcccgtgggaattatgacagtaacctgacatttaa
 ttggggccccgtaaagctacgggacgtggaatcctcaacctggagtgtatccccgcagcagcaggtcatttaccata
 tgtactatataccccacagctacagatgcaaaacaaccacagacatggatatgaaaagcctgaagaattgtggacag
 ccaaaagccgtgtgcacccattgtaagtcgacatactc

ФИГУРА 6А

Клон В1-VP1 аминокиселинна последователност

MSKESGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYKVTGTDLELIQLKDHYNISLDNPL
 ENPSSLFDLVARIKNNLNKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPREGDAVLSSSE
 DLHKPGQVSVQLPGTINYVGPGNELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQAKLGINPYTHWTV
 ADEELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPVAYNASEKYPSMTSVNS
 AEASTGAGGGGSPVKSMMWSEGATFSANSVTCFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
 ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTISEI
 AVKDVTDKTTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYYPVVLGQGDITLAPELPIWVYFPPQYAY
 LTVGDVNTQGISGDSKILASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVTPPENLEGCS
 QHFYEMYNPLYGSRLGVPDITLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMFGLVNSVSTKEGDSSS
 TGAGKALTGLSTGTSQNTIRISLRPGVSPQYHHWDTDKYVTGNAISHGQTTYGNAEDKE
 YQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRRLHYESQL
 WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIM
 TVTMTFKLQPRKATGRWNPQPGVYPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHRHRYEKEPEELWT
 AKSRVHPL

ФИГУРА 6В

B1-VP2 едноверижна ДНК последователност

atactcaagcttcaaaaaaagacttcagttattctgcagaagccagcactgggtcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggc
 cacttttagtgccaactctgtactgtacattttccagacaatttttaattccatagacccagagcaccatt
 ataagggtgttttccccgcagcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaagggtttgcaccattagtcaccata
 atgggatactcaacccatggagataatttagattttaatgctttaaattatttttcaccttagagttcagcactt
 aattgaaaattatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaccatacagaattgtgttaaggatgttacggaca
 aaactggaggggggggtgcagggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagaccatgaataagtagccca
 tatgtgttagggcaagggtcaagatacttttagccccaagacttctatttgggtatactttcccccataacgcttactt
 aacagtaggagatgtttaacacacagaaggaaattctggagacagcaaaaaattggcaagtgaagaatcagcattttatgttt
 tggaaacaggttctttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttataagtttctccagtgcccccagaa
 aatttagagggctgcagtcacacttttagaaatgtacaacccctatacggatcccgcttaggggttctctgacacatt
 aggaggtgacccaaaatttagatctttaacacatgaagaccatgcaatcagccccaaaacttaicccagggtccactag
 taacacagtgctctcaaggaggagacagctctagtactggagctggaaggccctaacaggcccttagcagaggtacc
 tctcaaaacactgaatatccttacgccctggccagtgctcagccgtaccaccactgggacacagataaattatgtcac
 aggaataaattgccatttctatgtgtcagaccacttatgttaacgctgaagacaaagagtatcagcaaggagtggttagat
 ttccaatgaagaaagacagctaaacaggttacagggtttaacatgcacactctttcccaataaaggaaacccagcaa
 tatacagatcaaatgagcgccccctaatgtgtgtgtgtatggaacagaagagcccttactatgaagccagctgtg
 gagtaaaattccaaatttagatgacaggttttaaaactcagtttgagcccttaggaggtgggttttgcatcagccaccic
 ctcaaatatttttaaaatataccacaaggtgggccaattggaggtatttaaatcaatgggaattactaccttagttcag
 tatgccgtgggaattatgacagtaaccatgacatttaattggggccccgtaaaagctacgggacgggtggaatcctcaacc
 tggagtgtatccccgcagcagcaggtcatttaccatagtactatagacccacagctacagatgcaaaacaacacc
 acagacatggatgaaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgtgtgcacccattgtaagtcacatactc

ФИГУРА 7А

B1-VP2 аминокиселинна последователност

MTSVNSAEASTGAGGGGSSNPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
 YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQHLENYGS
 IAPDALTVTISEIAVKDVIDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPE
 LPWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKCLASESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYK
 FPPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDITLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPL
 VNSVSTKEBGDSSSTGAGKALTGLSTGTSQNTIRSLRPGPVSQPYHHWDITDKYVTGINAIS
 HGQTTYGNAEDKBYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGS
 VWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPFPQIFLKILPQSGPIGGIKSM
 GITTLVQYAVGIMTVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAAGHLFPYVLYDPTATDAKQH
 HRHGYEKPEELWTAKSrvHPL

ФИГУРА 7В

В6 NS1 едноверижна ДНК последователност

atactcttgaacaaaacaaatggagctatttagaggggtgcttcaagttcttctaattgttctggactgtgctaacgataactgggtggtgctctt
tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactcataactaactaatggcaatatacttaagcagtggtgcttaagcttgacttta
ctggggggccactagcagggtgcttgactttttcaagtagaatgtaacaaattgaagaaggctatcatacttggttattggggggcca
gggttaaacccagaaacctcacagtggtgtagaggggttatttaaatgtactttatcaccttgtaactgaaatctgaagctaaaattttgc
caggaatgactacaaaaggcaatacttagagatggagagcagtttatgaaaactatttaataaaaaaacctttaaatgttgatggtgt
gttactaatatgatggacataagataacctgtatttctgacttttagaaaggagcttgccatgccaaagaaacccgcacaccacagccat
aatgatactagtactgatgctggggagctagcggcacaggggcagaggttgccatttaattgggaagggaactaaggctagcataaag
tttcaaaactaggttaactggtgtgaaaacagagtgtttacagaggataagtggaactagttagcttaaccagtagactttactaagcagt
agtcacagtggaagtgttcaattcaagtgcactaaaactagcaattataaagcaactaatttagtgcctactagcacattttattgcatacag
actttgagcaagttagtgtattaaagacaataaaattgttaattgttactttgtcaaaactatgacccctatttagtggggcagcatgtgttaag
tggattgataaaaaatgtggcaagaaaacacactgtggtttatggaccgcaagtaca,ggaaaaaaacttgcaatggccattgctaa
aagtgtccagtatatggcatggttaactggaataatgaaaacttccatttaattgatgtagcaggaaaaagcttggtggtcgggatgaaggta
ttattaagtctacaattgtagaagctgcaaaagccatttagcgcggaacccaccagggtgatcaaaaaatcggtggaagttagctgtgc
ctggagtaccggtgttataaccagcaatggtgacattactttgttgaagcggggaacactacaacaactgtacatgctaaagccttaaaaga
gcgcatggttaaggttaactttactgtaagatgcagccctgacatgggggtactaacagaggctgatgtacaacagtggttacctggttaat
gcacaaagctgggaccactatgaaaacgggcaataaactacacttttgattccctggaattaatgcagatgccctccaccagacctcaa
accacccaattgtcacagacaccagtaicagcagcagtggtggtgaaagctctgaagaactcagtgaaagcagctttttaacctcatcacc
ccagcgccctggaacactgaaacccgcgctctagtacgccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgtcgggaagcccagtttcc
tccgaagtgtagctgcatcgtgggaagaagccttctacacacctttggcagaccagtttcgtgaactgttagttgggggttgattatgtgtggga
cgggtgaaggggttacctgtctgtgtgtgcaacataaataaagtagtgggggaggttggtgactttgccccattgcaattaatgtaggggctt
ggataatgatggaatttcgagaatttaccagatttggtgcgatgtagctgccatgtgggagcttctaacccttttctgtgtaacctgca
aaaaatgtgcttacctgtctggattgcaagcctttagattatgtagtaagtcgacatactc

ФИГУРА 8А

В6 NS1 аминокиселинна последователност

MELFRGVLVSSNVLDCAANDNWCSLLDLTSDWEPLTHNRLMAIYLSVAS
KLDFTGGPLAGCLYFFQVECNKFEEGYHIVVIGGPGLNPRNLTVCEGLFNNVLYHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKGA
CHAKKPRITTAINDTSDAGESSGTGAEBVVPFNGKGTASIKFQTMVNWLCENRVFTEDK
WKLVDNFQYTLSSSHSGSFQISALKLAIFYKATNLVPTSTFLHTDFEQVMCIKDNKIV
KILLOQNYDPLLVGQHVLKWIDKKCGKKNLWFYGPSTGKTNLAMAIAKSVFPVYGMVNW
NNENFFPNDVAGKSLVVWDEGIKSTTVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSVAVPGPVVIT
SNGDITFVSGNTTTTVHAKALKERMVKNLFTVRCSPDMGLLTEADVQQLTWCNAQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVDTSSISSGGESSEELSESSFFNLITPGA
WNTETPRSSPTPIGTSSGESSVGSFVSSEVVAASWEEAFYTPLADQFRELLVGVDYVWDG
VRGLPVCCVQHINNNGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTPDLVRCCHVGASNPFSVL
TCKKCAYLSQLQSFDYE

ФИГУРА 8В

B6 VP1 едноверижна ДНК последователност

atactcaagcttacaaaacaaatgagtaaagaagtggaatggtgggaaagtgatgataaattgctaagctgtgtatcagcaattgtg
gaattttatgaaaagggtactggaacagacttagagcttattcaaatattaaaagatcattataatatttcttagataatcccctagaaaaccatc
ctctttgtttgacttagtgcctgtattaaaaataacctiaaaaactctccagacttatatagtcattttcaagtcagtgacagttatctgaccac
ccccatgccttatcatccagtagcagtcagcagaacctagaggagaagatgcagtattatctagtgaagacttacacaagcctgggcaagtt
agcgtacaactaccgggtactaactatgttgggcccgtgcaatgagctacaagctgggcccccgcaagtgctgttgacagtgctgcaaggat
tcatgacttttaggtatagccaactggctaagttgggaataatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaa
tgaacttgggttcaagcacaagtagtaaaagactctttactttaaagggtgcagctgccccgtggccatttcaaggaagtttccggaa
gttccccgttacacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcactgggtcaggaggggggggcagta
atcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacitttagtccaactctgttaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccag
agca-cattataaggttttctccgcagcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcacaage'ttgcaccattagtcacataatgg
gatactcaacccataggagataattagatttaaatgcittaaattttttcaccttttaggtttcagcacttaattgaaaattatggaagtatagct
cctgatgctttaactgtaaccataicagaaattgctgttaaggatgttacaacaaaactggagggggggtgcaggttactgacagcactaca
gggcccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtagccatagtggttagggcaaggicaagatactttagccccagaacttcctatttgggt
atactttccccctcaatagccttacttaacagtaggagatgttaacacacaaggaattctggagacagcaaaaaattggcaagtgaagaatca
gcattttatgttttgaacacagttctttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttataagtttctccagtgccccagaaaatt
agagggtgcagtcacacattttatgaaatgtacaacccccttatacggatcccgcttaggggttctgcacattaggaggtgacccaaaatt
agaictttaacacatgaagaccatgcaattcagccccaaaactctcagccaggccactagtaaaactcagtgctacaaaaggaggagacag
ctctagtactggagctggaaaagccttaacaggcccttagcacaggttaccttctcaaaacactagaaatattcctacgccctgggccagtgctca
gccgtaccaccactgggacacagataaatatgicacaggaataatgccatttctatggtcagaccacttggttaacgctgaagacaaaag
agtatcagcaaggagtggttagatttcaaatgaaaaagaacagctaaaacagttacagggtttaaacatgcacacctactttccaataaag
gaaccagcaatatacagatcaaatgagcgcctccatgggtgggtctgtatggaacagaagagcccttactatgaagccagctgtgg
agtaaaattccaaatttagatgacagttttaaactcagttgcagcccttaggaggtgggttgcacagccacctccatcaaatattCttaaaa
atattaccacaaagtgggccaa ttggaggtattaaatcaatgggaattactaccttagttcagtagccgtgggaattatgacagtaacctga
cattttaa ttggggcccgtaaagctacgggacgggtggaactcacaacctggagtgatccccgcacgcagcaggtcatttaccata tga
ctatatgacccacagctacagatgcaaaacaacaccacagacatgatatgaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgt gtg
caccattgttaagtcacatactc

ФИГУРА 9А

B6 VP1 аминокиселинна последователност

MSKESGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPL
ENPSSFLDLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPREGEDAVLSSE
DLHKPGQVSVQLPGTINYVGPGBNLQAGPPQSAVDSAAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTV
ADELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYPSMTSVNS
AEASTGAGGGGSGNPVKSMMWSEGAIFSANSVTCIFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
ASGKEAKVCTISPIMGYSTFWRYLDFNALNLFSPLEFQHLENYGSIAPDALTVTISEI
AVKDVINKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDILAPELPIWVYFPPQYAY
LTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPPEENLEGCS
QHIFYEMYNPLYGSRLGVPDILGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGLVNSVSTKEGDSSS
TGAGKALTGLSTGTSQNTIRSLRPGPVSQPYHHWDIDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
YQQGVGRFFNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQL
WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGTTLVQYAVGIM
TVIMTFKLGPBKATGRWNPQPGVYPHAAGHLPPVLYDPTATDAKQHHRHGYEKPBEELWT
AKSRVHPL

ФИГУРА 9В

В6 VP2 едноверижна ДНК последователност

atactcaagcttacaaaacaatgacttcagtttaattctgcagaagccagcactgggtcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggc
cacttttagtgccaactctgttaactgtacatttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccatt
ataaggtgttttctccgcagcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaagggttgaccatttagtccata
atgggatactcaaccccatggagataattaatttaattgcttaaaattattttttcaccttagagtticagcacti
aattgaaaattatggaagtatagctcctgatgcttaactgttaaccatcagaaattgctgtaaggatgttaacaaca
aaactggaggggggggtcagggttactgacagcactacaggggcctatgcatgtagtagccatgaataagtaacca
tatgtgttagggcgaaggtaagatacttagccccagaacttctattgggtatacttcccccataacgcttactt
aacagtaggagatgttaacacacaaggaaatttctggagacagcaaaaaatggcaagtgaagaatcagcattttatgtt
tggacaacagttctttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttaagtttctccagtgccccagaa
aatttaggggtcgtcagtcacacttttatgaaatgtacaacccctatacggatcccgcttaggggttccgacacatt
aggaggtgacccaaaatttagatcttaacacatgaagaccatgcaattcagcccaaaactcatgccaaggccactag
taactcagtgcttacaaggaggagacagctctagtagctggaagccttaacaggccttagcacaggtacc
tctcaaaacactagaatact/ itacccctgggccagtgctcagccgtaccaccactgggacacagataaatgtcac
aggataaatgccatttctcatgtcagaccattatgttaacgtgaagacaagatcagcaaggagtggttagat
ttccaaatgaaaaaagacagctaaacagttacagggtttaaacatgcacacctactttcccaataagg_aaccagcaa
tatcagatcaaatgagcgcgccctaatgttggttctgtatggaacagaagagcccttactatgaagccagctgtg
gagtaaaattccaaatttagatgacagttttaaactcagtttgcagccttaggaggaagggttgcatcagccacctc
ctcaaatattttaaaaalattaccacaaagtggccaattggaggtattaatcaatgggaattactaccttagtcag
tatgccgtgggaattatgacagtaaccatgacatttaattggggcccgtaagctacgggacgttggaalcccaacc
tgaggtgatccccgcagcagcaggtcatttaccatgtactatgacccacagctacagatgcaaaacaacacc
acagacatgatatgaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgtgtgcacccattgtagtcgacatactc

ФИГУРА 10А

В6 VP2 аминокиселинна последователност

MTSVNSAEASTGAGGGGSGNPVKSMWSEGA TFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQHLIENYGS
IAPDALTVTISEIAVKDVTNKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQQGDTLAPE
LPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYK
FPPVPPENLEGCSQHIFYEMYNPLYGSRLGVPDITLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPL
VNSVSTKEBGDSSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSPYHHWDTDKYVTGINAIS
HGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKBLKQLQGLNMHTYFPNKGTYQYTDQIERPLMVG
VWNRRLHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPFPQIFLKLIPQSGPIGGIKSM
GITTLVQYAVGIMTVMTFKLGP RKATGRWNPQGVYPPHAAAGHLPPVLYDPTATDAKQH
HRHGYEKPEBLWAKSRVHPL

ФИГУРА 10В

CH80-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagattttaatgctttaaattgtttttcacctttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggagtacaagttatgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11А**CH81-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttcgcggca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcccataatgggatactc
aaccocatggagatacttagattttaatgctttaaattattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11В

B19SCL1-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11С**B19SCL2-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11D

B19SCL3-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggagtaacctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaaatgctttaattttttcaccttttagagttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaaggcgccatgcatgtagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 11Е**B19SCL4-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggagtaacctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaaatgctttaattttttcaccttttagagttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggcgccatgcatgtagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 11F

B19SCL5-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgaccattagtcaccataatgggatactc
aaccatggagataatttagattttaatgctttaaaattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11G

B19SCL6-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccgcc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgaccattagtcaccataatgggatactc
caaccatggagataatttagattttaatgctttaaaattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11H

B19SCL7-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataagggttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaattattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcagggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgtt igtacacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11I**B19SCL8-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataagggttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttaggttttaatgctttaaattattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcagggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11J

B19SCL9-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccg
 cagccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcataatgggatac
 tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaa
 ttatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaac
 tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgtta₁tagaccatgaatataagt
 acccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11K**B19SCL9-9**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcataatgggatac
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11L

B19SCL10-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtttttccccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

ФИГУРА 11M

B19SCL11-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtttttccccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

ФИГУРА 11N

B19SCL12-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgc
cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtgactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggttttctcccg
cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaagggttgaccattagtcggataatgggatac
tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaa
ttatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtgcaagttactgacagcagtagcagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 110**B19SCL13-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgc
cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgttaactgtgcattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggttttctcccg
cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaagggttgaccattagtcggataatgggatac
tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaa
ttatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaac
tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagt
acccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11Р

B19SCL14-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaaatgctttaattttttttcaccttagagttagcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttact;acagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 11Q**B19SCL15-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaaatgctttaattttttttcaccttagagttagcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 11R

B19SCL16-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgcaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcacacagggcgccatgcatgttagtagacctgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttat

ФИГУРА 11S**B19SCL17-1**

ataaatccatatacttattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgcaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagacctgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

ФИГУРА 11T

B19SCL18-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cgggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgcaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatattagattttaatgctttaaatttattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcagggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

ФИГУРА 11U**B19SCL19-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cgggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgcaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatattagattttaatgctttaaatttattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcagggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatactttag

ФИГУРА 11V

B19SCL20-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtgtgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcagggtactgacagcactacagggcgctatg atgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11W**B19SCL21-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtgtgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcagggtactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11X

B19SCL22-11

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagtcccgttacacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcgggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaa
ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatagattttaatgctttaaatttatttttcaccttttagagttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11Y

B19SCL2-14

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagtcccgttacacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaa
ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatctagattttaatgctttaaatttatttttcaccttttagagttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

ФИГУРА 11Z

ФИГУРА 12

5 GAATTCACCTGTACATTTTCCAGACAATTTTAATTCCATATGACCCAGAGCACCATTAT
ACAGTGACATGCAGGTCTAGCTCTGCCACAATGCCAGTGGAAGGAGGCAAAGGTTTGCA
CCATTAGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATGCTTTAA
ATTTATTTTTTTCACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTC
CTGATGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACGGACAAAACCTG
10 GAGGGGGGGTGCAGGTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATG
AATATAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCAAGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCTA
TTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATACGCTTACTTAACAGTAGGAGATGTTAACACACAAG
GAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTGGCAAGTGAAGAATCAGCATTTTATGTTTTGGAAC
ACAGTTCTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCCTC
15 CAGTGCCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAACCCCT
TATACGGATCCCGCTGTCGAC (SEQ ID NO.:92)