

P 9702019

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



77119

BRACON HEBETOR DARÁZSBÓL SZÁRMAZÓ ROVARTOXINOK

ZENECA LIMITED, London, Nagy-Britannia

COMMONWEALTH SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION,
Parkville, Victoria, Ausztrália

A bejelentés napja: 1995. 11. 21.

Elsőbbségei: 1994. 11. 22. (9423540.5) GB
 1995. 01. 19. (9501074.0) GB
 1995. 06. 29. (9513293.2) GB

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB95/02720

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/16171

K i v o n a t

A találmány Bracon hebetorból származó új rovar-toxinokra, az ezeket kódoló DNS-szekvenciákra, a toxinokat kódoló DNS-szekvenciákat tartalmazó rekombináns DNS-szerkezetekre, továbbá ezeket a rovartoxinokat, DNS-szekvenciákat vagy rekombináns DNS-szerkezeteket tartalmazó biológiai kártevőirtó szerekre vonatkozik.

Fredrich

Képviselő: Dr.Jalsovszky Györgyné ügyvéd

Társképviselő: Dr.Tóth-Urbán László ügyvéd

158/1040

BRACON HEBETOR DARÁZSBÓL SZÁRMAZÓ ROVARTOXINOK

ZENECA LIMITED, London, Nagy-Britannia

COMMONWEALTH SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION,

Parkville, Victoria, Ausztrália

Feltalálók:

WINDASS John David, Wokingham, Berkshire,

DUNCAN Rachael Elizabeth, Reading, Berkshire,

Nagy-Britannia

CHRISTIAN Peter Daniel, Macgregor,

BAULE Valerie Jayne, Kambah,

Ausztrália

A bejelentés napja: 1995. 11. 21.

Elsőbbségei: 1994. 11. 22. (9423540.5) GB

1995. 01. 19. (9501074.0) GB

1995. 06. 29. (9513293.2) GB

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB95/02720

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/16171

A találmány új rovartoxínokra, rovarokra nézve toxikus fehérjét kódoló DNS-szekvenciákra, rovarokra nézve toxikus fehérjét kódoló DNS-szekvenciákat tartalmazó rekombináns DNS-szerkezetekre, továbbá ezeket a rovartoxínokat, DNS-szekvenciákat vagy rekombináns DNS-szerkezeteket tartalmazó biológiai kártevőirtó szerekre vonatkozik.

A társasan élő darázsfajták számos képviselőjének mérgét már igen széles körben tanulmányozták, és megállapították, hogy azok egy sor nagyhatású biológiailag aktív a-mint, fájdalomkeltő neuropeptidet, allergént és neurotoxint tartalmaznak [Piek: Toxicon 29, 139-149 (1991)]. Sokkal kevésbé ismertek a magányosan élő darazsak, közülük is elsősorban a parazita módon élő darazsak mérgei. A magányosan élő parazita darazsak számos képviselője rovarokon élőszködik, és több mint 250 olyan fajtájuk ismert, amely bénítja a gazdaszervezetet [ezekről Piek és Spanjer "Venoms of the Hymenoptera" c. könyvének (szerk.: T. Piek, kiadó: Academic Press, London, 1986) 161-307. oldala ad áttekintést]. Az említett darázsfajták számos képviselője a Braconidae családba tartozik. A braconid darazsak többsége primer parazita. A kifejlett példányok csaknem kizárólag más rovarokra vagy más rovarokba tojják petéiket, és a petékből kikelt darázslárvák a gazdarovarból táplálkoznak. A braconid darázsfajták egyik figyelmet keltő képviselője a Bracon hebetor (Bracon = Microbracon = Habrobracon). A Bracon hebetor (B. hebetor) a rejtőzködő vagy begubózó életmódú Lepidoptera lárvák kisméretű (3 mm) parazitája. A kifejlett nőstény darazsak a gazdalárvák külsején rakják le petéiket, és ezzel egyidőben bénító mérget injektálnak a gazdaszervezetbe. A gazdalárvák percek

belül koordinálatlanokká válnak, és látszólag teljesen megbénulnak. Noha ez a bénulás nem közvetlenül halálos, de tartós, és mindaddig immobilizálja a rovar, amíg a darázslárvák a petékből kikelve táplálkozni nem kezdenek a gazdaszervezeten. A *B. hebetor* mérge rendkívül erős bénító hatást fejt ki. *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) lárvákon például becslések szerint a *B. hebetor* mérge 1 rész méreg : 200 millió rész gazdaszervezeti vér-nyiroknedv arányban már teljes és tartós bénulást idéz elő [Beard: Conn. Agric. Exp. Stn. New Haven Bulletin 27, 562 (1952)]. Ugyanakkor a méreg szelektíven csak rovarokra nézve toxikus, és ezen belül is csak egyes rovar-rendekre hat. A pók-, rák-, béka- patkány- és tengerimalac-ideg- és izompreparátumok a méregre egyaránt érzéketlennek bizonyultak [Rathmayer és Walther: Animal, Plant and Microbial Toxins 2, 299-307 (Plenum Press, New York, 1976); Deitmer: Die Wirkung des Griffes der Schlupf-wespe *Habrobracon* Say auf die neuromuskuläre Übertragung am Sartoriusmuskel des Frosches (diplomamunka, Universitaet Bonn, 1973)].

A *B. hebetor* mérgének bénító komponense vélhetően úgy fejti ki hatását, hogy (valószínűleg a szinaptikus veszikulumok felszabadulásának gátlásával) preszinaptikusan blokkolja az ingerlő glutamaterg átvitelt a neuromuszkuláris kapcsolatoknál [Walther és Reinecke: Neuroscience 9, 213-224 (1983); Piek és Mantel: Comp. Gen. Pharmacol. 1, 87-92 (1970); Piek: J. Insect. Physiol. 12, 561-568 (1966)].

A rovarokon élősködő ízeltlábúak számos képviselőjének mérgéről kimutatták, hogy rovarokra szelektíven ható toxinokat tartalmaznak. Ezek a rovar-szelektív neurotoxinok

értékes molekuláris eszközök lehetnek a rovarok neurobiológiájának tanulmányozásában. A B. hebetor toxin hatásmódja és rovar-szelektivitása alapján várható, hogy ez az anyag a Lepidopterák neuromuszkuláris transzmissziójának és a Lepidopterák neuromuszkuláris kapcsolatainak való vezikulum-felszabadulásnak a tanulmányozásában hasznosítható. Az is várható, hogy a toxin rovar-szelektivitása igen előnyösen hasznosítható rovarkártevők irtására. Figyelembe véve azonban, hogy a B. hebetorból származó fehérje-jellegű toxinokról közölt ismeretek arra utalnak, hogy sokféle toxin létezik, először a Lepidoptera-lárvákkal szemben erős neurotoxikus hatást kifejtő toxint kellett megtisztítani és azonosítani. Munkánk során két neurotoxikus fehérjét tisztítottunk meg és azonosítottunk; ezeket az egyszerűség érdekében 1. és 2. bracon toxinnak (a továbbiakban: Brh-TX-1 és Brh-TX2) nevezzük.

A találmány tárgya tehát négy polipeptid alegységet tartalmazó rovar toxin, ahol a polipeptid alegységek N-terminális aminosav szekvenciája rendre a csatolt szekvencia-jegyzékben feltüntetett 1., 2., 3. és 4. szekvenciának felel meg. Ez a rovar toxin a BrhTX-1-nek nevezett toxin.

A találmány tárgya továbbá élősd darázsból származó rovar toxin, amelynek - a későbbiekben ismertetendő SDS-polí(akril-amid) gél-elektroforézist alkalmazó módszerrel mért - becsült molekulatömege körülbelül 34 000 dalton, körülbelül 21 000 dalton, körülbelül 18 500 dalton és körülbelül 17 000 dalton. Ez a rovar toxin a Brh-TX-2-nek nevezett toxin.

Legalább a BrhTX-1 polipeptid alegységeit is elkülönítettük és azonosítottuk.

A találmány tárgyát képezik a következő nukleinsav-szekvenciák is: a csatolt szekvencia-jegyzékben feltüntetett 19. szekvenciát tartalmazó izolált DNS, a 19. szekvenciával legalább 60 %-ban homológ nukleinsav-szekvenciák, a 19. szekvenciához hibridizálódó nukleinsav-szekvenciák, valamint a 19. szekvencia genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

A találmány tárgyát képezik a következő nukleinsav-szekvenciák is: a csatolt szekvencia-jegyzékben feltüntetett 46. szekvenciát tartalmazó izolált DNS, a 46. szekvenciával legalább 60 %-ban homológ nukleinsav-szekvenciák, a 46. szekvenciához hibridizálódó nukleinsav-szekvenciák, valamint a 46. szekvencia genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

A találmány tárgyát képezik a következő nukleinsav-szekvenciák is: a csatolt szekvencia-jegyzékben feltüntetett 57. szekvenciát tartalmazó izolált DNS, az 57. szekvenciával legalább 60 %-ban homológ nukleinsav-szekvenciák, az 57. szekvenciához hibridizálódó nukleinsav-szekvenciák, valamint az 57. szekvencia genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

A találmány tárgyát képezik a következő nukleinsav-szekvenciák is: a csatolt szekvencia-jegyzékben feltüntetett 36. szekvenciát tartalmazó izolált DNS, a 36. szekvenciával legalább 60 %-ban homológ nukleinsav-szekvenciák, a 36. szekvenciához hibridizálódó nukleinsav-szekvenciák, valamint a 36. szekvencia genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

A találmány szerinti DNS cDNS, genomiális DNS vagy szintetizált DNS lehet.

Miként már közöltük, a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti DNS-szekvenciákkal legalább 60 %-ban homológ DNS-ek is. Az utóbbi szekvenciák nukleotidjainak előnyösen ≥ 65 %-a, még előnyösebben ≥ 70 %-a, különösen előnyösen ≥ 75 %-a vagy ≥ 80 %-a közös a találmány szerinti DNS-szekvenciák nukleotidjaival. Kiemelkedően előnyösek azok a szekvenciák, amelyek 85 %-ban, 90 %-ban, 95 %-ban, 99 %-ban vagy ennél nagyobb mértékben homológok a találmány szerinti DNS-szekvenciákkal.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti DNS-ekkel hibridizálódó DNS-ek is. A hibridizáció előnyösen kis, köztes és nagy szorosságú körülmények között megy végbe. Általánosságban a 3 x SSC (körülbelül szobahőmérséklet és 65°C közötti hőmérsékleten) tekinthető kis, míg a 0,1 x SSC (körülbelül 65°C-on) tekinthető nagy szorosságú körülménynek. Az SSC betűjelzés egy 0,15 mól nátrium-kloridot és 0,015 mól trinátrium-citrátot tartalmazó puffer neve; a 3 x SSC jelölés az SSC-nél háromszor töményebb puffert jelöl.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti DNS-ek genetikus kódjának eredményeként degenerált DNS-ek is.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti DNS-ek bármelyike által kódolt polipeptid rovartoxinek, az azokkal normál körülmények között együtt előforduló más fehérjéktől lényegében mentes állapotban, valamint az ilyen polipeptidek származékai.

Így a találmány tárgyát képezik a csatolt szekven-
cia-jegyzékben feltüntetett 20., 47., 58. és 37. aminosav-
-szekvenciájú polipeptidek és azok származékai.

Ezek az aminosav-származékok előnyösen homológ va-
riánsok lehetnek, ahol az aminosavak előnyösen legalább 80 %-
-a, különösen előnyösen legalább 90 %-a közös. A szekvenciák-
ban észlelhető változások előnyösen konzervatív aminosav-cse-
rék lehetnek. A "konzervatív aminosav-csere" megjelölésen
olyan aminosav-cserét értünk, amikor egy meghatározott ami-
nosav-csoportba (azaz a hidrofób, poláris, savas és bázikus
csoportok egyikébe) tartozó aminosav helyén egy ugyanabba a
csoportba tartozó másik aminosav áll. Ilyen csere például a
valin helyettesítése metioninnal és viszont.

A találmány továbbá az egyedi kognát gének primer
transzkripciós termékeinek alternatív összesodródásmódjaiból
származó mRNS-ekről leolvasott polipeptidekre vonatkozik. A
találmány tárgyát képezik a fenti polipeptidek leolvasás utá-
ni módosításaival kialakított polipeptidek is. Ilyen leolva-
sás utáni módosítás például a peptidhasítás, a prosztetikus
csoportok bevitele, a glükozliezés, vagy a több alegységből
álló szerkezetek kialakítása.

A találmány szerinti cDNS-ek a találmány szerinti
rovartoxint alkotó polipeptideket kódolják. A találmány sze-
rinti polipeptidek a találmány szerinti rovar toxin alegysége-
inek felelnek meg.

Ezen túlmenően a találmány szerinti egyedi cDNS
szekvenciák olyan polipeptideket is kódolnak, amelyek minde-
gyike toxikus hatást fejthet ki rovarokkal szemben. Így tehát

a találmány szerinti polipeptidek mindegyike rovarokra nézve toxikus lehet.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti DNS-szekvenciákat tartalmazó rekombináns DNS-szerkezetek. Ezek a szerkezetek klónozó vektorokat, így plazmidokat, és a kívánt sejt transzformálására alkalmas fágokat foglalnak magukba. A találmány szerinti rekombináns DNS-szerkezetek továbbá kifejező vektorok is lehetnek. Oltalmi igényünk a fenti szerkezetek összes lehetséges képviselőjére kiterjed. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti rekombináns szerkezeteket tartalmazó transzformált rendszerek is. Ezek a rendszerek például emlősök sejtjei, nememlős gerincesek és gerinctelenek sejtjei, rovarsejtek és növényi sejtek lehetnek. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti rekombináns szerkezetekkel transzformált baktériumok, élesztőfélek és - különösen előnyösen - gombák is, valamint azok a vírusok, amelyek genomjai közvetlen vagy közvetett genetikai manipuláció révén a találmány szerinti DNS-ek beépítésére alkalmassá váltak. A transzformálásra, illetve genetikai manipulációkra alkalmas rendszerek szakember számára jól ismertek. Az ilyen rekombináns szerkezetek és rendszerek kialakításának módja a találmány szempontjából nem bír különösebb jelentőséggel; a kívánt cél elérésére alkalmas bármely módszer alkalmazható. Ezek a módszerek szakember számára ismertek.

A találmány szerinti DNS-ek, toxinok és polipeptidek parazita darazsák, például az Ichneumonidea főcsaládba tartozó darazsák, nyerhetők. Előnyösek a Braconidae családba tartozó darazsák, nyerhető toxinok. A Braconidae család

tagjai közül példaként az Apanteles, Bracon, Microbracon és Stenobracon nemzetséget említjük meg.

Egy különösen előnyös megoldás szerint a DNS-eket, toxinokat és polipeptideket Bracon hebetorból nyerjük. Megjegyezzük azonban, hogy a találmány szerinti DNS-ek, toxinok és polipeptidek más forrásokból és/vagy más módszerekkel (például hagyományos klónozási technikával vagy szintetikus úton) is nyerhetők.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti rovartoxinokat, polipeptideket, rekombináns DNS-szerkezeteket vagy transzformált rendszereket tartalmazó biológiai kártevőirtó szerek. Ezek a biológiai kártevőirtó szerek a felsorolt hatóanyagokat előnyösen mezőgazdaságilag elfogadható szilárd vagy folyékony hordozóanyagokkal együtt tartalmazzák. A találmány tárgya továbbá eljárás rovarkártevők irtására oly módon, hogy a kártevőket vagy azok tartózkodási helyét a találmány szerinti rovartoxin hatásos mennyiségével kezeljük. A találmány tárgyát képezik azok a biológiai kártevőirtó szerek is, amelyeknek a találmány szerinti nukleinsavakat az adott nukleinsav kifejeződését lehetővé tevő promotor szekvencia vezérlése alatt tartalmazó genomjuk van. A "biológiai kártevőirtó szer" megjelölésen tehát olyan vírusszerkezeteket, prokarióta szerkezeteket és eukarióta szerkezeteket is értünk, amelyek rovarokkal érintkezésbe jutva képesek azokat megfertőzni, és a rovarok normális biológiai, fiziológiai vagy elektrofiziológiai folyamataiba oly mértékben beavatkozni, ami végül a rovarok pusztulásához vezet. A találmány szerinti biológiai kártevőirtó szerek alkalmas képviselői a rovarok bakteriális, vírus- és gombakártevőin ala-

puló kártevőirtó szerek. A rovarok bakteriális kártevői közül példaként a *Bacillus*-fajtaikat, így a *B. thuringiensis*t és a *B. cereus*t említjük meg. A rovarok gombakártevői közé tartoznak például a *Beauvaria*-fajtaik, így a *B. bassiana*.

A biológiai kártevőirtó szer továbbá genetikusan módosított növényi élősdit lehet, amelynek genomja - a végrehajtott módosítás révén - a találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák legalább egyikét tartalmazza. Ha egy ilyen növényi élősdit növényvel hozunk érintkezésbe, az élősd hatására az adott nukleinsav által kódolt toxin kifejeződik a növényben, és kifejtheti toxikus hatását a növényen táplálkozó vagy a növényen tartózkodó rovarokra.

Egy további változat szerint a biológiai kártevőirtó szer maga a növény - előnyösen táplálék- vagy rosttermelés céljából termesztett haszonnövény - lehet, amelynek növényi genomja - a végrehajtott módosítás révén - a találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák legalább egyikét tartalmazza.

A találmányt az oltalmi kör korlátozása nélkül a következő példákban részletesebben ismertetjük. A példákban a csatolt rajzokra hivatkozunk, amelyek közül az 1. ábra a méregmirigyből elkülönített B-1 és B-2 extraktum és a tisztított BrhTX-1 és BrhTX-2 toxin SDS-PAGE elemzésének eredményét szemlélteti [SDS = nátrium-dodecilszulfát, PAGE = poli(akril-amid) gél-elektroforézis]; a 2. ábra a nem-denaturáló PAGE-sel kapott extraktum anioncserés kromatografálással végzett további szétválasztásakor kapott eredményeket szemlélteti;

- a 3. ábra a B-1 extraktum méretfrakcionáló kromatografálásának eredményeit szemlélteti;
- a 4. ábra a natív B-1 toxin molekulatömegének kiszámításához használt grafikont szemlélteti;
- az 5. ábra a BrhTX-1 toxin PAGE-sel, redukáló és nemredukáló körülmények között végzett frakcionálásának eredményeit szemlélteti;
- a 6. ábra a BrhTX-1 toxinból kapott alegységek N-terminális aminosav-szekvenciáit mutatja be;
- a 7. ábra a BrhTX-1(a) alegység N-terminális aminosav-szekvenciáját és a megfelelő degenerált BH(a)A, BH(a)B és BH(a)I oligonukleotidok szekvenciatervét mutatja be;
- a 8. ábra a BrhTX-1(a) alegység cDNS-szekvenciáját és az abból levezetett aminosav-szekvenciát mutatja be;
- a 9. ábra a BrhTX-1(d) alegység N-terminális aminosav-szekvenciáját és a megfelelő degenerált BH(d)A, BH(d)B és BH(d)I oligonukleotidok szekvenciatervét mutatja be;
- a 10. ábra a BrhTX-1(d) alegység cDNS-szekvenciáját és az abból levezetett aminosav-szekvenciát mutatja be;
- a 11. ábra a pBrhTX-1(b)1 inszertjének cDNS szekvenciáját és az abból levezetett aminosav-szekvenciát mutatja be; az ábrán a BH(b)C és BH(b)D primer szekvenciák vastag betűkkel szerepelnek, és az 5'-3' irányt nyílhegyek mutatják;
- a 12. ábra a pBrhTX-1(b)6 plazmidból származó BrhTX-1(b) alegység vélelmezett cDNS-szekvenciáját és az abból levezetett aminosav-szekvenciát mutatja be;

a 13. ábra a BrhTX-1(b) alegység vélelmezett cDNS-ének fehérje-transztlációját mutatja be (a teljes peptidet aláhúzással jelöltük);

a 14. ábra a BrhTX-1(b) alegység konszenzus cDNS-szekvenciáját és az abból levezetett aminosav-szekvenciát mutatja be;

a 15. ábra a BrhTX-1(c) alegységből származó peptid-fragmenteket és azok vélelmezett kódoló szekvenciáját szemlélteti;

a 16. ábra a BrhTX-1(c) alegységből polimer láncreakcióval, BH(c)A és BH(c)B primerek felhasználásával kapott megsokszorozott termék szekvenciáját mutatja be;

a 17. ábra a BrhTX-1(c) alegység cDNS-szekvenciáját és az abból levezetett aminosav-szekvenciát mutatja be.

1. példa

A BrhTX-1 és BrhTX-2 toxin elkülönítése és azonosítása

Anyagok és módszerek

(i) Rovarok:

Beállt B. hebetor populációt [amit Dr. R.T. Arbo-gast (USDA-ARS, P.O.Box 22909, Savannah, Georgia, USA) bocsátott rendelkezésünkre] 16 órás megvilágítás/8 órás sötétség fotoperiódus fenntartásával 25°C-on indiai lisztmoly (Plodia interpunctella) lárváin tenyésztettünk. A P. interpunctella és G. mellonella lárvákat a Commonwealth Scientific and Industrial Research Corporation rovar-tani osztályán tartott beállt populációkból szereztük be, és 25°C-on neveltük a következő tápanyagokon: G. melonella: 600 g csecsemőtápszerezliszt, 60 g sörélesztő, 125 ml méz és 125 ml glicerin; P. interpunctella: 1000 g szójaliszt, 500 g korpa, 250 g

szárított élesztő, 250 g búzacsíra, 500 g tört búza, 500 g tört zab és 375 g glicerin.

(ii) A toxin-aktivitás vizsgálata biológiai módszerekkel:

A B. hebetor fehérje-preparátumok bénító hatását G. mellonella lárvákön vizsgáltuk. A biológiai vizsgálatokba bevont lárvák korát és fejlettségi állapotát nem határoztuk meg, a vizsgálatokhoz azonban csak 0,15 g és 0,2 g közötti testtömegű lárvákat használtunk. A biológiai vizsgálatok során 10 µl fehérjemintát vagy kontroll puffert injektáltunk a lárvák előlábai között a haemocoeliumba. Ha a lárvák külső ingerlés nélkül nem mozogtak, és hátukra fordítva 30 másodpercen belül nem tudtak maguktól visszafordulni, a bénulást beálltnak tekintettük. A toxin hatásának pontosabb értékelésére a vizsgálandó kivonatból sorozathígítást készítettünk, és azok aktivitásának mérésével végpont-vizsgálatot végeztünk. A bénító hatást a Galleria egységek (GU) módosított meghatározásával mértük [Drenth: Toxicon 12, 188-192 (1974)]. A 10 µl injektált kivonat GU-értéke a lárvákat az injektálást követő kb. 2 óra elteltével még bénító kivonatminta hígítási fokának reciproka. A kapott számot 100-zal megszorozva kaptuk a GU/ml kivonat értéket.

(iii) A méregmirigy-komponensek kivonása:

Nőstény darazsakat 4°C-on érzéstelenítettünk, és a rovarokat jégen tartva finom fogóval gyengén meghúzogattuk azok peterakó csövét. Az így kivont méregmirigyeket ötvenesével extraháltuk 50 µl izoozmotikus Pringle-féle sóoldattal (9 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l CaCl₂, 4 g/l dextróz), ami

(iv) Fehérjemeghatározás és töményítés:

(v) Poli(akril-amid) gél-elektroforézis és anion-
cserés kromatográfia:

A denaturáló SDS-PAGE-t Laemmli módszerével [Nature 222, 680-685 (1970)] végeztük, 15 %-os tömbgél (11 cm x 14 cm x 0,075 cm) és 4 %-os ráhalmazott gél használva. A fehérjemintákat 0,125 mmólos Trisz-HCl pufferoldattal (pH 6,8), 10 % glicerinnel, 10 % SDS-tal (nátrium-dodecil-szulfát), 0,25 %

β -merkapto-etanollal és 0,025 % brómfenol-kékkel kevertük össze, és a géltre való felvitel előtt 5 percig 95-100°C-on tartottuk. A fehérjéket 200 V feszültségen frakcionáltuk mindaddig, amíg a brómfenol-kék nyomjelző festék el nem jutott a gél alapjáig (ez kb. 45 percet igényelt). A fehérjéket Coomassie Blue festékkel (a Gradipore cég gyártmánya) 2 órán át való festéssel és ezt követő, desztillált vizes festékel-távolítással, vagy ezüst detektáló festékkel mutattuk ki.

A fehérjék molekulatömegét a következő standard fehérjék molekulatömegével való összehasonlítás alapján becsültük meg: nyúlizom foszforiláz b (97 400 dalton), szarvasmarha szérum albumin (66 200 dalton), tojásalbumin (45 000 dalton), szarvasmarha carbonic, vízmentes (31 000 dalton), szója tripszin inhibítor (21 500 dalton), lizozim (14 400 dalton).

A nemdenaturáló natív PAGE-hoz 7,5 %-os poli(akrilamid) tömbgélt (11 cm x 14 cm x 0,075 cm) és 4 %-os ráhalmozott gélt használtunk. A natív géleket az SDS-PAGE gélekhez hasonlóan készítettük, azzal a különbséggel, hogy sem a gélhez, sem a futtatott pufferekhez nem adtunk SDS-t. A mintákhoz 0,125 mmólos Trisz-HCl pufferoldatot (pH 6,8) és 10 % glicerint adtunk, és a mintákat a géltre való felvitel előtt nem hőkezeltük. Az elektroforézist 200 V feszültségen, 4°C-on 1,5 órán át végeztük.

Az oldható méregmirigy-fehérjék kezdeti szétválasztását natív PAGE-sel végeztük. Minden egyes géltre 600 méregmirigy kivonatát vittük fel. Az elektroforézis után a géleket vízszintesen 4 mm-es szalagokra vágtuk szét, és a gélseleleteket 600 μ l 50 mmólos Trisz-HCl pufferoldatban (pH 8,0) enyherázatás közben 16 órán át 4°C-on áztatva a fehérjéket passzív

módon leoldottuk a gélseleletekről. A kapott eluátumok alikvot részeit 50 mmólos Trisz-HCl pufferoldattal (pH 8,0) ötvenszeresre hígítottuk, és a fent ismertetett módon vizsgáltuk azok *G. mellonella*-ra kifejtett bénító hatását.

A bénító hatásúnak bizonyult eluátumokat SMART kromatografáló rendszert használva (Pharmacia) Mini Q anioncsérelő oszlopon (PC, 3,2 mm x 3 cm, a Pharmacia cég gyártmánya) tovább tisztítottuk. A natív PAGE-sel elkülönített, bénító hatásúnak bizonyult eluátumokat az oszlopra való felvitel előtt 0,22 μ m pórusméretű szűrőkön (Millipore) bocsátottuk át. Az oszlopot 50 mmólos Trisz-HCl pufferoldattal (pH 8,0) egyensúlyba hoztuk, és a fehérjéket 200 μ l/perc sebességgel eluáltuk, lineáris NaCl-gradienst alkalmazva (0 és 1 mól között). Az oszlopról leoldott fehérjéket az eluátum 280 nm-nél mért abszorbanciája alapján detektáltuk. Az eluátumból 200 μ l térfogatú frakciókat gyűjtöttünk, és vizsgáltuk azok bénító hatását. A bénító hatásúaknak bizonyult frakciókat SDS-PAGE-sel tovább elemeztük.

(vi) Gélszűrési kromatografálás:

A natív bénító toxin molekulatömegének becslése céljából a natív PAGE-eluátumok bénító hatást mutató frakcióiból 50-50 μ l térfogatú mintát Superose 12 gélszűrő oszlopra (PC, 3,2 mm x 30 cm, Pharmacia) vittünk fel. Az oszlopot előzetesen a következő standard fehérjékkel kalibráltuk: tiroglobulin (670 000 dalton), gamma-globulin (158 000 dalton), tojásalbumin (44 400 dalton), miogloblin (17 000 dalton), B₁₂ vitamin (1350 dalton). Az oszlopot előzetesen 50 mmólos Trisz-HCl pufferoldattal (pH 8,0) és 150 mmólos nátrium-klo-

rid oldattal egyensúlyba hoztuk, és a fehérjét ugyanezzel az eluálószerrel 40 μ l/perc sebességgel eluáltuk. Az oszlopról leoldódott fehérjét az eluátum abszorbanciájának 280 nm-en való folyamatos mérésével detektáltuk. Az eluátumot 40 μ l térfogatú frakciókba gyűjtöttük, és a frakciókat a bénító hatás vizsgálata előtt 50 mmólos Trisz-HCl pufferoldattal 8pH 8,0) hússzoros térfogatra hígítottuk.

Eredmények:

(i) A kiindulási anyag megválasztása:

A kifejlett B. hebetor kis (2-3 mm-es) méretére - következésképpen a méregmirigy igen kis méretére - tekintettel először azt vizsgáltuk, hogy a neurotoxin elkülönítéséhez a teljes darazsak és az elkülönített méregmirigyek közül melyik az alkalmasabb kiindulási anyag. Három, egyenként 25-25 teljes nőstény darázsból, illetve elkülönített méregmirigyből készítettünk preparátumot, és vizsgáltuk azok fehérjetartalmát és bénító aktivitását (GU). Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét típusú preparátum összemérhető toxikus hatással rendelkezik (körülbelül 25 000 GU), de a teljes nőstény darazsakból nyert kivonatok oldható fehérjetartalma az elkülönített méregmirigyekből nyert kivonatokénak mintegy tízszerese (lásd az 1. táblázatot). Az 1. táblázat adataiból két fontos következtetés vonható le: az észlelt neurotoxikus hatás a méregmirigyek oldható komponenseihez kötődik, és a méregmirigy-kivonatokban a neurotoxinok tízszeresre dúsulnak fel. Ezért a neurotoxinok tisztításához kiindulási anyagként a méregmirigyeket használtuk.

1. táblázat*

A kivonat eredete	Toxintarta- lom, GUx1000	Fehérjear- lom, mg	Fajlagos aktivitás GU/mg x 1000
Homogenizált mé- regmirigy	25 $\pm$ 5	0,100 $\pm$ 0,007	252 $\pm$ 55
Teljes nőstény darázs	25 $\pm$ 12	0,98 $\pm$ 0,2	24 $\pm$ 8

*Három, egyenként 25 darázból vagy méregmirigyből készített preparátum átlagértékei ($\pm$ standard deviáció).

(ii) Poli(akril-amid) gél-elektroforézis és anion-
cserés kromatográfia:

A méregmirigyekből nyert oldható kivonatokat elő-
ször natív PAGE szétválasztásnak vetettük alá. Az elektrofo-
rézis után a gél vízszintesen 4 mm-es szeletekre vágtuk
szét, és a gélseleteket a fehérjék passzív leoldódása céljá-
ból pufferoldatba helyeztük. A neurotoxikus aktivitás általá-
ban meglehetősen diffúzan jelentkezett a gél nagy területén.
Végpont-elemzéssel azonban megállapítottuk, hogy 2 órás e-
lektroforézis-idő után az aktivitás elsősorban a gél első 2-3
cm-es szakaszában dúsult fel. Az ebből a géltartományból el-
különített toxint a továbbiakban B-1-nek nevezzük. Az elekt-
roforézis idejét 3-4 órára növelve a toxikus aktivitás már
nem vándorolt jelentős mértékben. Az elkülönített toxinnal
beoltott *G. mellonella* lárvákön neuromuszkuláris bénulásra
jellemző mérgezési tünetek léptek fel. Vázizomzati hatást nem
észleltünk, a szájrészek azonban láthatóan aktívak voltak, és
véladékokat bocsátottak ki. Esetenként egy második, bénító ha-
tással rendelkező frakciót (a továbbiakban: B-2) is észlel-



tünk, ami a B-1-nél kissé gyorsabban vándorolt. Minthogy a két aktív frakció sok esetben egymással nem szomszédos gél-szeletekben jelent meg, és mindkettő teljesen leoldható volt, ezeket két különálló, egymástól megkülönböztethető hatóanyag-nak tekintettük.

Miként a 2. táblázat adataiból megállapítható, a natív PAGE frakcionálás a teljes darazsakból nyert B-1 neurotoxikus aktivitás 90-szeres feldúsulását eredményezte; a teljes toxikus aktivitás 41 %-át különítettük el.

2. táblázat^{a)}

Tisztítási lépés	Fehérje, μg	Toxikus aktivitás, $\text{GU} \times 10^3$	Fajlagos aktivitás, $\text{GU}/\mu\text{g}$ fehérje	Elkülönítés, %	Tisztítási fok (...-szoros)
Méregmirigy kivonat	$772 \pm 3^{\text{b)}$	203 ± 46	263	100	$10^{\text{c)}$
Natív PAGE	37 ± 9	84 ± 34	2270	41	86
Anioncsere	4	13	3333	7	127

^{a)}Három, egyenként 300 méregmirigyet tartalmazó preparátum natív PAGE-sel végzett szétválasztásakor kapott értékek. A natív PAGE-sel kapott preparátumokat az anioncserés kromatografálás előtt egyesítettük. Az összehasonlíthatóság érdekében az anioncserés kromatografálás után kapott fehérje- és toxinmennyiségeket 3-mal osztottuk.

^{b)}Átlagérték $\pm$ standard deviáció

^{c)}A teljes nőstény darazsból és a méregmirigyből nyert kivonatok egybevetése (lásd az 1. táblázatot)

A B-1 és B-2 méregmirigy-kivonat SDS-PAGE-sel végzett szétválasztását az 1. ábra szemlélteti. Az 1. ábrán az



1. sáv a méregmirigy-kivonatnak, a 2. sáv a natív PAGE-sel tisztított B-1-nek, a 3. sáv a natív PAGE-sel tisztított B-2-nek, a 4. sáv az anioncserével tisztított BrhTX-1-nek (kb. 1 μg), az 5. sáv az anioncserével tisztított BrhTX-2-nek (kb. 3 μg), a 6. sáv pedig a móltömeg meghatározásához felhasznált fehérjéknek felel meg. Noha az anyagok fehérje-összetétele még mindig komplex, körülbelül 22 000, 18 000, 17 000 és 16 000 dalton móltömegnél négy specifikus polipeptid feldúsulása észlelhető.

A végső tisztítási lépésben a B-1 és B-2 jelű extraktumot anioncserés kromatografálással tovább frakcionáltuk. Az extraktumokat külön-külön átbocsátva az oszlopon az egyedi aktivitásokat körülbelül 200 mmólos NaCl oldattal eluáltuk, és a 2. ábrán a B-1 extraktumra bemutatott kromatográfiás csúcsok egyikének megfelelő egyedi frakcióvá egyesítettük. [A 2. ábra a B-1 extraktumot tartalmazó 400 μl natív PAGE eluátum kromatogramja.] A teljes bénító hatás a 9. frakcióban jelent meg. Az összegyűjtött frakciók biológiai hatásvizsgálata azt mutatta, hogy mind a B-1, mind a B-2 extraktum teljes mérhető bénító aktivitása ebben az egy frakcióban jelent meg. A B-1 aktivitást a natív PAGE és az anioncserés kromatografálás együttes alkalmazásával a teljes darázsra, mint kiindulási anyagra vonatkoztatva 126-szorosára tisztítottuk, és ugyanakkor a kiindulási toxikus aktivitás 7 %-át nyertük vissza. Az anioncserével tisztított B-1 és B-2 extraktum SDS-PAGE-sel redukáló körülmények között végzett elemzése azt mutatta, hogy mindkét aktív anyag hasonló, és mindkettő négy polipeptidre bontható, amelyeket a továbbiakban a B-1 ekstrak-

tum esetén BrhTX-1(a), BrhTX-1(b), BrhTX-1(c) és BrhTX-1(d) alegységnek, a B-2 extraktum esetén pedig BrhTX-1(e), BrhTX-2(f), BrhTX-2(g) és BrhTX-2(h) alegységnek nevezünk. A tisztított toxinokat bracon toxin-1-nek (BrhTX-1) és bracon toxin-2-nek (BrhTX-2) nevezzük. A tisztításnak ebben a szakaszában a BrhTX-1 a méregmirigy-kivonatokból származó oldható fehérjék kb. 0,5 %-ának felelt meg. A felsorolt módszerek eredményei azt mutatják, hogy a BrhTX-1(a), BrhTX-1(b), BrhTX-1(c) és BrhTX-1(d) polipeptid becsült molekulatömege rendre 15 000, 17 000, 21 000 és 34 000 dalton, míg a BrhTX-2(e), BrhTX-2(f), BrhTX-2(g) és BrhTX-2(h) polipeptid becsült molekulatömege rendre 17 000, 18 500, 21 000 és 34 000 dalton.

(iii) Gélszűrési kromatográfia:

A BrhTX-1 és a BrhTX-2 várható (a SDS-PAGE-sel leoldott négy polipeptidéből számított) molekulatömege 87 000, illetve 90 500 dalton. A BrhTX-1 és BrhTX-2 natív molekulatömegének meghatározására a natív PAGE-sel kapott frakciókat Superose 12 gélszűrő oszlopon további szétválasztásnak vetettük alá. A toxikus aktivitás túlnyomó része két frakcióban jelent meg, amelyek a kromatogram egyetlen fő csúcsának feleltek meg. A BrhTX-1-re kapott eredményeket a 3. ábrán szemléltetjük. A 3. ábra a BrhTX-1 méretfrakcionálós kromatogramját szemlélteti; a bénító hatást mutató frakciók a bevonalkázott csúcsnak felelnek meg. Miként a 4. ábrán látható, a natív BrhTX-1 toxin molekulatömege (az oszlop kalibrálásához felhasznált standard fehérjékkel felvett standard görbe alapján számítva) körülbelül 81 000 dalton. A számítást a következőképpen végeztük: minden egyes standardra kiszámítottuk a K_{av} értéket, és ezt a fehérje molekulatömegének függvényében

ábrázoltuk. Ezután a toxikus hatású frakció K_{av} értéke és a standardokra felvett regressziós vonal meredeksége és tengelymetszete alapján ($r^2 = 0,98$) kiszámítottuk a bénító hatású frakció molekulatömegét. A BrhTX-2 így számított molekulatömege szintén körülbelül 81 000 dalton volt.

(iv) A BrhTX-1 másodlagos szerkezetének elemzése:

A BrhTX-1 másodlagos szerkezetét SDS-PAGE-sel vizsgáltuk redukáló és nemredukáló körülmények között. Az eredményeket az 5. ábrán szemléltetjük, ahol az 1. sáv a SDS-PAGE-sel redukálószer távollétében frakcionált BrhTX-1, a 2. sáv pedig az 1. sávon futtatottal egyébként azonos, de előzetesen 3 % β -merkapto-etanolnak kitett minta adatait szemlélteti. Miként az 5. ábráról leolvasható, az (a) és a (b) polipeptid vándorlását a redukálószer jelenléte vagy hiánya nem befolyásolja lényegesen, bár úgy tűnik, hogy nemredukáló körülmények között a (b) polipeptid dublettként van jelen. Ezzel szemben nemredukáló körülmények között a (c) és (d) polipeptid nem látható, és egy új, körülbelül 45 000 molekulatömegű polipeptid észlelhető. Ez a sáv SDS-PAGE-sel redukáló körülmények között újra frakcionálva két, egyenként 34 000 dalton és 21 000 dalton molekulatömegű polipeptidre esik szét (az adatokat az ábrán nem szemléltettük). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a (c) és (d) polipeptid intra- vagy intermolekuláris diszulfid-kötésekkel egymáshoz kapcsolódik. Ez az eredmény igen meglepő, mert a korábbi vizsgálatok azt jelezték, hogy ha a mérget DTT és BME redukálószer hatásának teszik ki, a B. hebetor bénító hatása megszűnik [Visser és munkatársai: Comp. Biochem. Physiol. Bz5B, 523-538 (1983)].

Diszkusszió:

A 25 méregmirigyből és 25 teljes nőstény darázsból nyert kivonatok mennyiségi vizsgálati eredményei szerint mindkét kiindulási anyag átlagosan 13 500 egységnyi (GU) bénító hatóanyagot tartalmazott. Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy a G. mellonellán végzett biológiai elemzésekkel feltárt toxikus aktivitás a méregmirigy oldható komponenseihez kötődik. A bénító hatóanyag tisztítása végett a méregmirigy-kivonatokat első lépésben natív PAGE-sel frakcionáltuk. Az elektroforézis általunk alkalmazott körülményei között a toxikusan aktív anyag lassan vándorolt. Minthogy a natív PAGE töltés és méret szerinti elválasztást végez, ez azt jelzi, hogy a toxikus anyagnak bázikus össztöltése és/vagy nagy molekulatömege van. A két különálló aktív frakció (B-1 és B-2) szétválása (amelyek molekulatömege csak 3500 daltonnal tért el egymástól) arra utal, hogy a toxin vándorlási sebességét elsődlegesen a töltés határozza meg.

A B-1 extraktum anioncserés kromatografálásával egyetlen fehérjét kaptunk. Ez a tisztított preparátum (BrhTX-1) a méregmirigy-kivonatok (és vélhetően a teljes nőstény darazsak) kiindulási bénító aktivitásának 7 %-át, az oldható méregmirigy-fehérjéknek pedig 0,5 %-át képezte. A toxikus aktivitás összevont feldúsulásának mértéke 127-szeres volt, és a kapott preparátum fajlagos toxikus aktivitása 3333 egység/ μ g fehérje volt.

Az itt közölt adatok azt bizonyítják, hogy két oligomer toxint (BrhTX-1 és BrhTX-2) különítettünk el, amelyek natív PAGE vagy enyhe kromatográfiás körülmények között nem disszociálnak. Mindkét toxin négy, egymástól SDS-PAGE-sel el-

választható polipeptidből áll. A BrhTX-1 SDS-PAGE-sel redukáló és nemredukáló körülmények között végzett szétválasztásának eredményei azt jelzik, hogy a négy alegység közül kettőt - a BrhTX-1(c) és BrhTX-1(d) alegységet - diszulfid-kötések kapcsolnak egymáshoz.

2. példa

A BrhTX-1 szekvencia-analízise

(i) Fehérjetisztítás:

45 000 méregmirigyet natív PAGE-sel és SMART rendszerben végzett anioncserés kromatográfiával tisztítva 300 µg BrhTX-1-et különítettünk el. SDS-PAGE elemzés és ezüst-detektálás szerint a toxin lényegében homogén volt, és négy polipeptidből [BrhTX-1(a), BrhTX-1(b), BrhTX-1(c) és BrhTX-1(d)] állt. A végső preparátum fajlagos aktivitása 3 250 000 GU/mg fehérje volt. A kapott adatok alapján a 0,2 g tömegű *G. mellonella* lárvák teljes bénításához szükséges tisztított toxinmennyiség 0,3 ng-ra becsülhető.

A fajlagos aktivitási érték alapján a toxin egybevethető a szalma-tüszőatka (*Pyemotes tritici*) toxinjával. Az utóbbi toxin közölt bénító dózisa 330-550 µg/kg *G. mellonella* lárva, míg a BrhTX-1 bénító dózisa körülbelül 2 µg/kg *G. mellonella* lárva. A BrhTX-1 4°C-on tartva igen stabilnak bizonyult, és még több hetes tárolás után is megőrizte az aktivitás több mint 90 %-át.

(ii) Szekvencia-analízis:

Körülbelül 200 µg BrhTX-1 toxint SDS-PAGE-sel és azt követő elektrotranszferrel [10 mmól Caps ikerionos puffer (pH 11,0)/10 % metanol, 60 milliamper, 1 óra, szobahőmér-

séklet] alegységeire bontottunk. A szétválasztott alegységeket elektromos úton PVDF (poli/vinilidén-fluorid/) membránra vittük át. Az átvitel után a kártyákat 1 órán át Milli-Q vízzel mostuk, majd vákuumban szárítottuk. A fehérjesávokat 0,0005 % szulforodamin-B-t (a Sigma cég gyártmánya) tartalmazó 30 %-os metanol/0,2 %-os ecetsav eleggyel megfestve tettük láthatóvá, majd vízzel kimostuk a festéket. A felvételeket a körülmények optimalizálása céljából kis mennyiségű (körülbelül 10 µg) toxinnal kezdtük, majd a szekvencia-elemzéshez 150 µg toxint vittünk fel.

A szekvenáláshoz ABI 477A fehérje-szekvenáló rendszert (gyártja az Applied Biosystems cég) használtunk. A BrhTX-1(a), BrhTX-1(b) és BrhTX-1(c) szekvenálásakor nehézségek léptek fel: nevezetesen 2 vagy 3 ciklus után az aminosav-analizátorról eltűnt egy jól detektálható jel, ami arra utalt, hogy a szekvenálás során a fehérje nagy részét eltávolítottuk a membránról. Ezt a nehézséget úgy küszöböltük ki, hogy a membránra nagyobb mennyiségű fehérjét vittünk fel.

A négy alegység N-terminális aminosav-szekvenciáját a 6. ábrán mutatjuk be (a csillaggal jelölt aminosav-maradékokat nem tudtuk kétséget kizáróan azonosítani). A BrhTX-1(a), BrhTX-1(b), BrhTX-1(c) és BrhTX-1(d) alegység így meghatározott szekvenciáját a csatolt szekvencia-jegyzékben is feltüntettük rendre 1., 2., 3. és 4. számon.

(iii) Az alegységek szerkezetének vizsgálata:

Tapasztalataink szerint a toxikus aktivitás a BrhTX-1 egy kisméretű, 14 000 és 14 000 dalton közötti molekulatömegű polipeptidjéhez kapcsolódik, amit Triton X-100-at tartalmazó natív PAGE-sel különítettünk el. Ezekből a gélek-

ből a teljes felvitt körülbelül 30 000 GU aktivitásból körülbelül 1500 GU-nyi aktivitást különítettünk el. Noha ez az érték a gélre felvitt össz-aktivitás csupán mintegy 5 %-ának felel meg, az aktivitás nagy része csak kismértékben vándorol a gélbe. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az adott alegység jelentős aktivitással rendelkezik.

(iv) Western blot analízisek:

A BrhTX-1(a), BrhTX-1(c) és BrhTX-1(d) alegységekkel szemben a fent ismertetett közvetlen fehérje-szekvenálással meghatározott N-terminális szekvenciájuk alapján (lásd a szek-vencia-jegyzék 1., 3. és 4. sz. szekvenciáját) antitesteket alakítottunk ki. Ezeket az antitesteket Chiron Mimitopes (Clayton, Victoria) felhasználásával képeztük a következő módon:

A megadott szekvenciának megfelelő szintetikus peptideket képeztünk, és azokat diftéria toxin-hordozóhoz kapcsoltuk. Az így kapott konjugátumokkal három újjélandi fehérnyulat immunizáltunk. A nyulakat intramuszkulárisan immunizáltuk Freund-féle komplett adjuvánssal elegyített 0,39 mg peptiddel.

Az első immunizálás után a nyulak fülvénájából kanüllel vért vettünk, majd a vérvételt a 14., 35. és 42. napon megismételtük. A vérmintákat 30 percig 37°C-on inkubáltuk, ezután 15 órán át jéggel hűtöttük, majd kis sebességű centrifugálással eltávolítottuk a sejtanyagokat. Az így kapott szérumot -20°C-on tároltuk.

Mindegyik nyers antiszérumot ELISA-val titráltuk az immunizáló peptid biotinilezett származékával, diftéria-toxinnal és avidinnel szemben. Ezekben a titrálásokban az ELISA

lemezt avidinnel fedtük, és ehhez szekvenciálisan kapcsoltuk a biotinilezett peptidet és a vizsgált antitestet. Az antitest számszerűsítését torna-peroxidázhoz kapcsolt anti-nyúl IgG szérummal végeztük. Ezután, az egyes alegységekkel szemben a legnagyobb faktorú szérummintákat használva, a tisztított és a fentiekben ismerttetett SDS-PAGE-sel alkotó alegységeire bontott BrhTX-1-alegységekkel szemben Western blot futtatásokat végeztünk. Az elektroforézis után a fehérjéket nitrocellulózra (Biorad, Hercules, California) vittük fel.

10 μ l (körülbelül 8 μ g) tisztított és SDS-PAGE-sel szétválasztott BrhTX-1-et felhasználva mindhárom vizsgált alegység specifikus reakciót adott a neki megfelelő szérummal szemben.

(v) Peptid-emésztés és szekvenálás:

Körülbelül 800 μ g BrhTX-1-et a korábbiakban ismerttetett SDS-PAGE-sel alkotó alegységeire bontottunk. Az elektroforézis elvégzése után az alegységeket Coomassie Brilliant Blue-val végzett festéssel tettük láthatóvá a gélben. Ezután az egyes alegységeknek megfelelő sávokat kivágtuk a gélből, és 0,02 % Tween-20-at tartalmazó 0,2 mólos ammónium-hidrogén-karbonát pufferoldattal kétszer mosva a gélről leoldottuk az SDS-t. Ezután 0,5 μ g szekvenáló minőségű tripszint (Promega, Madison, Wisconsin) adagoltunk be, és a gél körülbelül 20 μ l 0,2 mólos ammónium-hidrogén-karbonát oldattal teljesen rehidratáltuk. Ezután a gélseleket mikrocentrifuga csövébe helyeztük, 0,02 % Tween-20-at tartalmazó 0,2 mólos ammónium-hidrogén-karbonát oldattal fedtük, és éjszakán át 30°C-on inkubáltuk. Ezután 0,1 térfogatrészt 10 tömeg/térfogat %-os

trifluor-ecetsav oldat beadagolásával leállítottuk a reakciót.

Emésztés után a gélt 0,1 tömeg/térfogat % trifluor-ecetsavat tartalmazó 60 %-os acetonitrillel 40 percig 30°C-on extrahálva leoldottuk a kapott peptideket. A kapott felülúszót Hetovac forgó bepárló készüléken (gyártja a Heto cég, Skandinávia) 20 µl végtérfogatra betöményítettük.

A peptideket SMART rendszerben, µRPC C2/C18 SC2.1 1/10 oszlopon végzett reverz fázisú kromatografálással elkülönítettük egymástól. Az oszlopot 0,065 % és 0,05 % között grádiens szerint változó mennyiségű trifluor-ecetsavat tartalmazó 40 %-os acetonitrillel eluáltuk. A frakciókat "Peak Fractionation" üzemmódban gyűjtöttük.

A fenti kromatografálás során akpott egyedi frakciókat az elkülönített peptidek méretének meghatározása céljából tömegspektroszkópiásan vizsgáltuk. A spektrumokat Tofspec készüléken (gyártja a Fisons Instruments cég) vettük fel. Ezután a csúcsokat Procise-HT szekvenátorral (gyártja az Applied Biosystems cég) szekvenáltuk. A BrhTX-1 alegységeiből kapott triptikus fragmensek szekvenciáit a 3. táblázatban közöljük.

3. táblázat

Alegység	Szekvenált frag- mensek száma	Kapott szekvenciák ⁽¹⁾
BrhTX-1 (d)	5	INI (Q/R) VA QIVTYYLD (I/H) K
BrhTX-1 (c)	6	GIAQDVGHAAHSFTK (H/G) VHNPGNFR
BrhTX-1 (b)	5	MIKPGETYGDVTNK EWVHDNAGTLLPR DVHDNAGTLLPR PHTVYDKHESLQ
BrhTX-1 (a)	4	FNPEHR EAYIQNHGA

⁽¹⁾ Ahol a szekvencia egyes elemeinek azonosítása nem volt egyértelmű, a lehetséges variációkat zárójelben, egymástól ferde vonallal elválasztva adtuk meg.

3. példa

A BrhTX-1 alegységeinek klónozása

cDNS könyvtár képzése és a könyvtár szélesztése

Folyékony nitrogénben lefagyasztott és -70°C-on tárolt frissen kikelt nőstény B. hebetor darazsakból elkülönítettük a teljes RNS-t. A teljes RNS elkülönítésére körülbelül 1 g lefagyasztott darazsat folyékony nitrogénben porrá őröltünk. A port kézi homogenizátor segítségével 20 ml 8 mólos guanidínium-klorid oldattal homogenizáltuk. A nagyméretű oldhatatlan anyag-törmelékét 10 percig 10 000 g gyorsuláson végzett centrifugálással eltávolítottuk, és a teljes RNS-t 32 térfogat %-os etanol jelenlétében kicsaptuk. A teljes RNS-t Sambrook és munkatársai által leírtak szerint [Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Spring Harbor Press, 1989)] tovább tisztítottuk.

A teljes RNS-ből oligo (dT)-cellulóz csavart oszlopok [a Pharmacia Biotech cég (Uppsala, Svédország) gyártmánya] segítségével, a gyártó utasításai szerint eljárva elkülönítettük az mRNS-t. A cDNS-szintézishez körülbelül 5 µg mRNS-t használtunk. Az Eco RI-vel emésztett λgt11 DNS-hez ligált és kereskedelemben kapható E. coli Y1090-be transzformált tompavégű kettősszálú cDNS-hez Eco RI/NotI kapcsolókat ligáltunk, majd ismert módon megsokszoroztuk. A titrálást a könyvtár szűrése előtt végeztük ismert módon (Sambrook, 1989), kereskedelemben kapható E. coli LE392 törzsből származó szélesztett sejtek felhasználásával. A könyvtár titere $1,25 \times 10^9$ pfu (plakk-képző egység)/ml volt.

Szűrés céljára 10 db 140 mm átmérőjű Petri-csészébe összesen 500 000 plakk-képző egységet (csészénként körülbelül 50 000 egységet) helyeztünk ki. A plakkokat ismert módon (Sambrook, 1989), háromszoros ismétlésben Hybond-N membránokra (gyártja az Amersham International cég) helyeztük ki.

4. példa

A BhrTX-1 (a) alegységének klónozása

(i) Próbák képzése:

Három olyan degenerált oligonukleotidot [jelük: BH(a)A, BH(a)B és BH(a)I] terveztünk, amelyek a BrhTX-1(a) }-terminális szekvenciájának legalább egy részét kódolják. Teljes mértékű degeneráció esetén inozinokat (jele: I) használtunk. Ezeket az oligonukleotidokat a 7. ábrán szemléltetjük; szekvenciájuk a szekvencia-jegyzék 5., 6. és 7. szekvenciájának felel meg (itt az inozint N-nel jelöltük). Az oligonukleotidokat standard módszerekkel szintetizáltuk Applied

Biosystems 380B típusú DNS-szintetizátorral. A kapott egyedi oligonukleotidokról 16 órán át 55°C-on végzett kezeléssel lehasítottuk a védőcsoportokat, majd három csavarkupakos mikrocentrifuga-csőbe osztottuk szét, és vákuumban megszáritottuk. A kapott egyedi oligonukleotidok 1/3-át 100 µl vízben oldottuk, és UV spektroszkópiával mértük azok mennyiségét (1 OD₂₆₀/ml 25 µg/ml-nek felel meg).

(ii) A könyvtár szűrése és a klónok elkülönítése:

Minden egyes szűrősorozatra egy-egy oligonukleotidból [Bh(a)A, BH(a)B vagy BH(a)I] próbát vittünk fel. 25-25 ng oligonukleotidot ismert módon (Sambrook, 1989) az 5'-végnél foszforilezéssel jeleztünk, ³²P-ATP (Amersham International) és T4 polinukleotid kináz (Northumbria Biologicals Ltd.) felhasználásával. Az inkubálást 30 percig 37°C-on végeztük. A szűrőket 2 órán át 45°C-on előhibridizáltuk 5 x SSPE [a 20 x SSPE összetétele: 3,6 mól NaCl, 0,2 mól NaH₂PO₄, 0,02 mól EDTA (pH 7,7)], 5 x Denhardt reagens [az 50 x Denhardt reagens összetétele: 5 g Ficoll (400-as típus, Pharmacia), 5 g poli(vinil-pirrolidon), 5 g szarvasmarha szérum albumin (V. frakció, Sigma)], 0,5 % SDS és 200 µg/ml lazacsperma DNS jelenlétében. A hibridizálást 5 x SSPE, 5 x Denhardt reagens, 0,5 % SDS és a jelzett próba jelenlétében 45°C-on 16 órán át végeztük.

A szűrőket 45°C-on 4x15 percig 6 x SSC és 0,1 % SDS elegyével mostuk, majd -80°C-on, növekvő intenzitású szűréssel, Kodak X-AR filmre exponáltuk.

Három plakk mind a BH(a)A-val, mind a BH(a)-I-vel hibridizálódott, egy plakk mind a BH(a)B-vel és a BH(a)I-vel

hibridizálódott. Egy plakk sem hibridizálódott mind a három próbával. Három ezt követő plakk-tisztítási művelet után a négy plakk közül hármát homogenitásig tisztítottunk. Ezek továbbra is hibridizálódtak a BH(a)I-vel. A fág-plakkokat 1 ml SM puffer [összetétele: 50 mmól Trisz-HCl (pH 7,5), 0,1 mól NaCl, 0,2 tömeg/térfogat % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 tömeg/térfogat % zselatin] és 10 μl kloroform elegyében helyeztük.

(iii) A klónok jellemzése:

A plakkok formájában tisztított fágokat polimeráz láncreakciós (a továbbiakban: PCR) elemzéssel vizsgáltuk cDNS inszertek jelenlétére és azok méretére. Két oligonukleotidot (λgt 11 forward és λgt 11 reverz) használtunk, amelyek szekvenciája a következő (lásd még a szekvencia-jegyzékben szereplő 8. és 9. szekvenciát):

λgt 11 forward 5'-GACTCCTGGAGCCCG-3'

λgt 11 reverz 5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3'

Ezek az oligonukleotidok λgt 11-re specifikusak, és az Eco RI klónozó helyet szegélyezik.

A PCR reakciókat 0,5 ml-es polipropilén mikrocentrifuga-csövekben végeztük, 25-25 mól koncentrált primert, 0,5 μl fág-törzssoldatot, 8 μl ultratiszta dNTP-keveréket (az egyedi dNTP-eket 1,23-1,23 mmól koncentrációban tartalmazza; gyártja a Pharmacia cég), 2,5 μl pufferoldatot [összetétele: 500 mmól KCl, 100 mmól Trisz (pH 8,4), 15 mmól MgCl_2 , 0,1 tömeg/térfogat % zselatin] és 0,2 μl (1 egység) Taq DNS polimerázt (Perkin/Elmer Cetus) használva. Az elegyekhez 1-1 csepp könnyű ásványolajat (Sigma) adtunk. A csöveket Techne PHC-1

típusú programozható fűtőblokkba helyeztük, és a következő program szerint hőkezeltük:

5 másodperc 94°C-on,

1 másodperc 94°C-on, 2 másodperc 40°C-on és 3 másodperc 72°C-on (35 ciklusban),

végző inkubálás 7 másodpercig 72°C-on.

10-10 µl így kapott reakcióelegyet agaróz gél-elektroforézissel elemeztünk. Mindhárom fág-törzsoldat PCR-többszörözött fragmenst generált, amelyekben a következő méretű cDNS inszertek jelentek meg:

λBrhTX-1(a)1.1 - körülbelül 600 bázispár (bp),

λBrhTX-1(a)1.2 - körülbelül 620 bp, és

λBrhTX-1(a)1.3 - körülbelül 590 bp.

(iv) Szubklónozás és a klónok szekvenálása:

D. Grossberger módszerével [Nucleic Acid Research 15(10), 6737 (1987)] fág DNS-preparátumokat készítettünk. A λBrhTX-1(a)1.1-ből és a λBrhTX-1(a)1.2-ből Eco RI emésztéssel felszabadítottuk a cDNS inszerteket. A λBrhTX-1(a)1.3-ből nem szabadult fel az inszert, ami valószínűleg annak tulajdonítható, hogy az eredeti könyvtárszerkesztés során az Eco RI helyek nem alakultak vissza. A két felszabadított inszertet T4 DNS ligáz felhasználásával, megfelelően pufferolt közegben (Sambrook, 1989) külön-külön Eco RI-vel emésztett, foszfatázal kezelt pUC19 plazmidba ligáltuk. A ligációs elegyekkel standard körülmények között (Sambrook, 1989) kompetens, kereskedelembe kapható E. coli DH5α sejteket transzformáltunk. A transzformátumokat - amelyeket pBrhTX-1(a)1.1-gyel és

pBrhTX-1(a)1.2-vel jelölünk - 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB agarlemezekeken szelektáltuk.

A pBrhTX-1(a)1.1 klón inszertjét Sequenase készlettel (gyártja: USB, Cleveland, Ohio) és az alábbiakban felsorolt 9 szintetikus oligo-primerrel (lásd még a szekvencia-jegyzékben szereplő 10-18. szekvenciát) szekvenáltuk:

PUC4	5'-GCTGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG-3'
PUC1	5'-TTCACAGAGGAAACAGCTATGAC-3'
BH(a)F1	5'-TCGTGAAGTGAAGAATTA-3'
BH(a)F2	5'-AATGTGTTTGCACTCACG-3'
BH(a)F3	5'-CATATACAGCGAAGTACC-3'
BH(a)F4	5'-TTATATGAAGTTCTTAGA-3'
BH(a)R1	5'-GGCGCAATAATTCTTCAC-3'
BH(a)R2	5'-TAACTATGGGATTCTTAG-3'
BH(a)R3	5'-ATATTTAAAGCCTCCCGC-3'

A primerek közül kettő, a PUC4 és a PUC1, a mc-ket szegélyező pUC19 régiókhoz hibridizál. A többi primert a kezdeti PUC4 és PUC1 szekvenálási műveletekben nyert szekvencia-adatok felhasználásával terveztük. A kapott nukleotid szekvenciája a szekvencia-jegyzék 19. szekvenciájának felel meg. A nukleotid-szekvencia leolvasásával 125 aminosavból álló nyitott leolvasási kerethez (a továbbiakban: ORF) jutottunk. Ezt a származékos aminosav-szekvenciát a szekvencia-jegyzéken 20. számon szerepeltettük. A 17-36. aminosav az (a) alegység N-terminális szekvenciájának felel meg (lásd az 1. szekvenciát). Az 1-16. aminosav a fehérjebevitel szignál-szekvenciájának jellemzőivel rendelkezik. A 8. ábrán ezt a nukleinsav-szekvenciát és a megfelelő aminosav-szekvenciát is bemutatjuk.

(v) A klónok elemzése:

Peptid-emésztés/szekvenálás:

A peptid-emésztéses módszerrel kapott szekvenciák és a cDNS-ekről leolvasással képezhető aminosav-szekvenciák a következőképpen párosíthatók:

- | | |
|-----------------------|-----------|
| 1) Peptid-szekvencia: | FNPETHR |
| cDNS-szekvencia: | FNPETHR |
| 2) Peptid-szekvencia: | EAYIQNHGA |
| cDNS-szekvencia: | EACIQNHGA |

A második esetben észlelt eltérés azzal magyarázható, hogy a cisztein-felismerés esetenként nem megbízható.

Genomiális Southern blot elemzés:

Kifejlett hím és nőstény B. hebetor darazsakból a következőképpen állítottunk elő genomiális DNS-t: Körülbelül 0,1 g fagyasztott darazsat 500 µl Lifton oldattal (összetétele: 0,2 mól szacharóz, 0,05 mól EDTA, 0,5 mól SDS, 0,1 mól Trisz-HCl pH 9,0) gyengén homogenizáltunk. Az anyag főtömegének feltörése után újabb 500 µl Lifton oldatot adtunk be, és a homogenizátumot a szövetek aggregálódásának megszűnéséig kevertük. A homogenizátumot 30 percig 65°C-on inkubáltuk, majd 250 µl 0,6 mólos acetát oldatot adtunk hozzá. A kapott oldatot gyengén összekevertük, és 1 órán át jégen tartottuk. Ezután a nagyméretű részecskéket lapos tetejű centrifugán 4°C-on 10 percig 10 000 fordulat/perc sebességgel végzett centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszót egymás után a felülúszóéval azonos térfogatú fenollal (TE-vel telített), fenollal és 24:1 térfogatarányú kloroform/izo-amil-alkohol eleggyel, majd izo-amil-alkohollal extraháltuk. Az elegyhez

10 µg/ml végső koncentráció eléréséhez szükséges mennyiségben RNS-áz A-t adtunk, és az elegyet 15 percig 37°C-on inkubáltuk. Az oldathoz 2 térfogatrész etanolt adtunk, és a DNS-t lapostetejű centrifugán szobahőmérsékleten 15 percig 8000 fordulat/perc sebességgel végzett centrifugálással elkülönítettük. Az elkülönített DNS-t 80 %-os etanollal mostuk, szárítottuk, majd 50 µl TE-ben újra szuszpendáltuk, és spektrofotometriásan mértük a DNS koncentrációját.

A tisztított DNS-t Pst I, Bcl I és Acc I restrikciós enzimekkel emésztettük, és a fragmenseket TAE pufferben, 0,7 %-os agaróz gélen végzett elektroforézissel szétválasztottuk. A DNS-t Hybond C⁺ nitrocellulóz membránra (gyártja az Amersham International cég) vittük fel 20 x 2 x SSC gradiensben, és 4 órán át 80°C-on végzett hőkezeléssel a membránhoz kötöttük. A BH(a)R1 és BH(a)R3 primereket és cél-DNS-ként a pBrhTX-1(a)1.1 plazmid klónt felhasználva PCR technikával ³²P-ral jelzett cDNS próbákat szintetizáltunk. A próbák szintézisét a következő műveleti körülmények között végeztük:

5 perc 95°C-on, majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 45°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), ezután

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 50°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), végül

5 perc 72°C-on.

Az előhibridizálást és a hibridizálást a következő körülmények között végeztük:

Előhibridizálás: 2 óra 42°C-on a következő összetételű előhibridizáló oldatban: 6 x SSC, 5 x Denhardt reagens, 0,5 % SDS, 50 % formamid, 0,1 % nátrium-pirofoszfát és 100

$\mu\text{g/ml}$ lazacsperma DNS (beadás előtt hangbesugárzással kezelve és forralva).

Hibridizálás: éjszakán át 42°C -on ^{32}P -ral jelzett próbát is tartalmazó előhibridizáló oldatban. A próbát felforraltuk, majd jéggel gyorsan lehűtöttük, és ezután adtuk a szűrőhöz és az előhibridizáló oldathoz.

Hibridizálás után a szűrőket 42°C -on $2 \times \text{SSC} + 0,1\%$ SDS eleggyel nlgyyszer mostuk. Mosás után a szűrőkre átvit-tük a vizsgálandó nukleinsavat, a szűrőket tapadó filmbe gön-gyöltük, és Fuji orvosi filmre exponáltuk.

Az eredmények azt mutatták, hogy a szekvenciának csak egyetlen másolata van jelen a genomban: (1) a Pst I-el emésztett genomiális DNS egyetlen, körülbelül 3040 bp méretű hibridizáló fragmenst adott; (2) a Bcl I-el emésztett anyag egyetlen, 1400 bp méretű hibridizáló fragmenst adott (a cDNS szekvencia közvetlenül a próbával hibridizáló szekvencia után egy Bcl I helyet tartalmaz); és (3) az Acc I-el emésztett a-nyag két hibridizáló fragmenst szolgáltatott, ami összhangban van azzal, hogy a cDNS szekvenciában 357 bp-nál egy Acc I hely van (lásd a 8. ábrát).

5. példa

A BrhTX-1 (d) alegységének klónozása

(i) Próbák képzése:

Három degenerált oligomert [jelük: BH(d)A, BH(d)B és BH(d)I] terveztünk. Teljes mértékű degeneráció esetén ino-zinokat használtunk. Ezeket az oligonukleotidokat a 9. ábrán szemléltetjük; szekvenciájuk a szekvencia-jegyzék 21., 22. és 23. szekvenciájának felel meg. Az oligonukleotidokat standard

módszerekkel szintetizáltuk Applied Biosystems 380B típusú DNS-szintetizátorral. A kapott egyedi oligonukleotidokról 16 órán át 55°C-on végzett kezeléssel lehasítottuk a védőcsoportokat, majd két csavarkupakos polipropilén mikrocentrifugacsőbe osztottuk szét, és vákuumban megszáritottuk. A kapott egyedi oligonukleotidok felét 100 µl vízben oldottuk, és UV spektroszkópiával mértük azok mennyiségét (1 OD₂₆₀/ml 25 µg/ml-nek felel meg).

(ii) A könyvtár szűrése és a klónok elkülönítése:

A könyvtár szűrését a BrhTX-1(a) alegységgel kapcsolatban leírtak szerint végeztük.

A BH(d)I-hez hét plakk hibridizálódott. Három ezt követő plakk-tisztítási művelet után hat plakkot homogenitásig tisztítottunk. Ezek továbbra is hibridizálódtak a BH(d)I-hez. A fág-plakkokat 1 ml SM puffer és 10 µl kloroform elegybe helyeztük.

(iii) A klónok jellemzése:

A plakkok formájában tisztított fágokat a BrhTX-1(a) alegységgel kapcsolatban leírtak szerint szűrtük és analizáltuk.

A hat fág-törzsoldat közül öt generált PCR-többszörözött fragmenst, amelyekben a következő méretű cDNS inszertek jelentek meg (az azonos eredeti fág másolatainak méretét is megadjuk):

λBhrTX-1(d)1.1 - kb. 1200 bp, λBhrTX-1(d)1.2 - kb. 1200 bp

λBhrTX-1(d)2.1 - kb. 1200 bp

λBhrTX-1(d)3.1 - kb. 1800 bp, λBhrTX-1(d)3.2 - kb. 1800 bp,

λBhrTX-1(d)3.3 - kb. 1800 bp, λBhrTX-1(d)3.4 - kb. 1800 bp

λ BhrTX-1(d)4.1 - kb. 1200 bp, λ BhrTX-1(d)4.2 - kb. 1200 bp,

λ BhrTX-1(d)4.3 - kb. 1200 bp

λ BhrTX-1(d)5.1 - kb. 700 bp

(iv) Szubklónozás és a klónok szekvenálása:

Miként a BrhTX-1(a) alegységgel kapcsolatban közöltük, a fág DNS preparátumokat D. Grossberger (1987) módszerével készítettük. A λ BhrTX-1(d)1.2-ből, λ BhrTX-1(d)3.1-ből, λ BhrTX-1(d)3.3-ből, λ BhrTX-1(d)3.4-ből és λ BhrTX-1(d)4.3-ből Eco RI emésztéssel felszabadítottuk a cDNS inszerteket. A többi inszert nem szabadult fel, ami vélhetően annak tulajdonítható, hogy az eredeti könyvtárszerkesztés során az Eco RI helyek nem alakultak vissza. A felszabadított inszerteket pUC19 plazmid Eco RI helyébe klónoztuk, majd a BrhTX-1(a) alegységnél leírtak szerint E. coli DH5 α sejtekbe transzformáltuk.

A pBrhTX-1(d)1.2 klón inszertjét 14 szintetikus oligo-primer - köztük a fent ismertetett PUC4 és PUC1 primer (szekvenciájuk a szekvencia-jegyzékben szereplő 10. és 11. szekvenciának felel meg) - felhasználásával a BrhTX-1(a) alegységnél leírtak szerint szekvenáltuk. A fennmaradt 12 primert a kezdeti PUC4 és PUC1 szekvenálási műveletekben nyert szekvencia-adatok felhasználásával terveztük, és az alábbiakban soroljuk fel (lásd még a szekvencia-jegyzékben szereplő 24-35. szekvenciát):

BH(d)F1 5'-CTTCAAATTAGTGTACGA-3'

BH(d)F2 5'-TGTGGCAATGCACAGAAC-3'

BH(d)F3 5'-TCAAGATGCTAGATTGTC-3'

BH(d)F4 5'-TAATAAATGGTCATGATG-3'



BH(d) F5	5'-CGCTTTCAAATAGTCACT-3'
BH(d) R1	5'-ATTCACCATCTGAGCAAT-3'
BH(d) R2	5'-ACACAATTAGCCACTGTC-3'
BH(d) R3	5'-TTGTACTCAGAATGGACT-3'
BH(d) R4	5'-ATGTATGGAGCGATACCA-3'
BH(d) R5	5'-ACATCATGAATTGCCTTG-3'
BH(d) R6	5'-TGTAATGTGTAGTGGGT-3'
BH(d) R7	5'-GCGAGAAATTCATCA-3'

A kapott nukleotid szekvenciája a szekvencia-jegyzék 36. szekvenciájának felel meg. A nukleotid szekvencia leolvasásával 275 aminosavból álló nyitott leolvasási kerethez jutottunk. A 25-35. aminosav a BrhTX-1(d) alegység N-terminális szekvenciájának felel meg. Az 1-22. aminosav egy szignál-szekvencia-jelöltet tartalmaz. A cDNS-el kódolt kész fehérje becsült molekulatömege 28,2 kilodalton. A származtatott aminosav-szekvenciákat a szekvencia-jegyzékben 37. számon szerepeltettük. A nukleotid-szekvenciát és az aminosav-szekvenciát a 10. ábrán is bemutatjuk.

(v) A klónok elemzése:

Peptid-emésztés/szekvenálás:

A BrhTX-1(a) alegységnél leírtak szerint jártunk el. A származtatott aminosav-leolvasásokból kapott szekvenciák a következőképpen párosíthatók:

Peptid-szekvencia: INI(Q/R)VA QIVTYYLD(S/I/H)K

cDNS-szekvencia: GNIK VA QIVTYYLDW I K

Az illeszkedési eltérések a mesterségesen előidézett szekvenálási változásoknak tulajdoníthatók.



Genomiális Southern blot elemzés:

A 4. példában leírtak szerint genomiális DNS-t készítettünk. A hím és nőstény eredetű DNS-eket Bcl I, Nde I, Bgl II és Pst I felhasználásával emésztettük, és az emésztett DNS-t TAE pufferoldatban, 0,7 %-os agaróz géleken elektroforézissel elkülönítettük. A DNS-t ezután Hybond C⁺ nitrocellulóz membránra vittük fel 2-20 x SSC gradiensben, és 4 órán át 80°C-on végzett hőkezeléssel a membránhoz kötöttük.

A BH(d)F4 és BH(d)R7 primereket és cél-DNS-ként a pBrhTX-1(d)1.2 plazmid DNS-t felhasználva PCR technikával ³²P-ral jelzett próbákat szintetizáltunk a következő műveleti körülmények között:

5 perc 95°C-on,

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 43°C-on, 1 perc 82°C-on (35 ciklus), majd

5 perc 72°C-on.

A hím és nőstény DNS-re kapott eredmények azonosak voltak. A Bcl I-el végzett emésztés terméke két hibridizáló fragmenst szolgáltatott, az egyik 10,0 kbp, a másik 9,1 kbp méretű volt. Ez az eredmény egybevág azzal, hogy a cDNS szekvenciának a próbával hibridizáló tartományában egy Nde I hely van. A Bgl II-vel és Pst I-el végzett emésztés termékei egy-egy hibridizáló fragmenst szolgáltatottak (méretük 18,5 kbp, illetve 22,1 kbp volt), ami egybevág azzal, hogy a cDNS szekvenciának a próbával hibridizáló tartományában az adott helyek egyike sem szerepel.

6. példa

A BrhTX-1 (b) alegységének klónozása

(i) Próbák képzése:

A szekvencia-jegyzékben 2. számon feltüntetett N-terminális szekvenciából két multispecies primert terveztünk, amelyek szekvenciája a következő volt (lásd még a szekvencia-jegyzékben 38. és 39. számon szereplő szekvenciákat):

BH(b)A 5'-AC(TCA) TTG TT(TC) AC(TCA) GA(TC) CG(TC) AA-3'

BH(b)B 5'-GG (ATG)CC (AG)AA (AGT)GT (TC)TT (AG)TC-3'

Ezeket a primereket a korábbiakban ismertetett PCR technikában használtuk fel nőstény mRNS-ből szintetizált cDNS PCR-termékének kialakítására. A PCR szintézist 0,2 µl Taq DNS polimeráz/50 µl reakcióelegy felhasználásával a következő körülmények között végeztük:

5 perc 95°C-on, majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 50°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 55°C-on, 1 perc 72°C-on (30 ciklus), végül

5 perc 72°C-on.

A PCR-el kapott termék mérete (TBE pufferben 15 %-os géleken végzett PAGE alapján becsülve) körülbelül 54 bp volt. A többszörözött termékeket etidínium-bromiddal végzett festéssel tettük láthatóvá a gélben. A fragmenst ezután előzetesen Taq DNS polimeráz felhasználásával timidin maradékkal farkalt (T-farkalás), kereskedelembe kapható pBluescript SK plazmid EcoRV helyére klónoztuk. A T-farkalást 50 mmól KCl, 10 mmól Trisz-HCl (pH 8,3), 1,5 mmól MgCl₂, 2 mmól dTTP ösz-szetételű elegyben 2 órán át 70°C-on végeztük. A klónozott PCR-terméket a következő, Applied Biosystems Inc. gyártmányú festő-primerek felhasználásával szekvenáltuk:

Universal M13-20 festő-primer: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

M13 reverz festő-primer: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'

A szekvenálást ABI 370 A típusú DNS-elemző rendszerrel (gyártja az Applied Biosystem Inc.) végeztük. A PCR-termék szekvenciája a következő volt (lásd még a szekvencia-jegyzékben szereplő 40. sz. szekvenciát): 5'-ACC TGG TTT ACA GAC CGC AAG TGG TGT GGA CGT GCC GAT AAG ACT TTCGGC CC-3'

(ii) A könyvtár szűrése és a klónok elkülönítése:

A könyvtár szélesztését a fent közöltek szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy a plakkokat kétszeres ismétlésben 137 mm x 0,45 µm méretű Nitropure nitrocellulóz membránokra (gyártja a Microb Separations cég, Westboro, Maryland, USA) vittük fel. A primer szűrés során összesen 4 szűrőn szűrőnként $3,6 \times 10^5$ plakkot szűrtünk, míg a szekunder és a terciér szűrés során szűrőnként 100-250 plakkot szűrtünk.

A ^{32}P -ral jelzett próbákat PCR technikával készítettük. A PCR-t ^{32}P -dATP jelenlétében végeztük, a szekvencia-jegyzékben 38. és 39. számon szereplő szekvenciájú BH(b)A és BH(b)B oligonukleotidokat, valamint cél-DNS-ként a 40. sz. szekvenciát tartalmazó klónozott PCR-terméket használva. A reakciókörülmények a következők voltak:

5 perc 95°C-on a Taq polimeráz hozzáadása előtt, majd
30 másodperc 95°C-on 1,5 perc 45°C-on és 1 perc 72°C-on (5 ciklus), ezután
30 másodperc 95°C-on, 1,30 perc 50°C-on és 1 perc 72°C-on (30 ciklus), végül
5 perc 72°C-on (1 ciklus).

A szűrőkön a BrhTX-1(a) alegység genomialis Southern blot elemzésénél ismerttetett előhibridizálási és hibridi-



zálási körülmények között hibridizáltattuk a ^{32}P -ral jelzett próbát. Kezdetben tíz olyan plakkot azonosítottunk, amely a próbával hibridizálódik. Ezek közül hármát második és harmadik szűréssel homogenitásig tisztítottunk. A plakként tisztított fagot 1 ml SM puffer és 10 μl kloroform elegyében helyeztük.

(iii) A klónok jellemzése:

A plakkok formájában tisztított fagot PCR elemzéssel vizsgáltuk cDNS inszert jelenlétére és annak méretére. A PCR műveletekhez szükséges λDNS -t tisztított törzsoldatokból készítettük úgy, hogy 10 μl törzsoldatot 5 percig forraltunk. A PCR műveletekben 2 μl így kapott törzsoldatot használtunk fel. A többszörözött fragmenseket TAE pufferoldatban, 0,8 %-os agaróz géleken, ismert méretű jelzőanyagok felhasználásával méret szerint osztályoztuk. A három tisztított fág közül az egyik fágban - amit $\lambda\text{BhrTX-1(b)1}$ -el jelöltünk - egy körülbelül 500 bp méretű inszertet mutattunk ki. A másik két tisztított fágban nem tudtunk inszertet kimutatni.

(iv) Szubklónozás és a klónok szekvenálása:

A fág DNS-t CsCl-ban végzett izopiknikus centrifugálással (lásd Sambrook és munkatársai, 1989) tisztítottuk.

A $\lambda\text{BhrTX-1(b)1}$ -ből Not I-el végzett emésztéssel elkülönítettük a cDNS-inszertet, és előzetesen Not I-el emésztett és foszfátázzal kezelt pBluescript SK-ba ligáltuk. A klón inszertjét a korábbiakban leírtak szerint, ABI festék-primer szekvenáló készlettel szekvenáltuk. A pBrhTX-1(b)1 plazmid klón inszertjének szekvenciáját (ami a szekvencia-jegyzékben 41. számon szerepel) a 11. ábrán szemléltetjük. A

27-44. aminosav a szekvencia-jegyzékben szereplő 2. sz. N-terminális szekvencia vonatkozó aminosavjainak felel meg, de a 41. szekvencia által kódolt nyitott leolvasási keret igen kis látszólagos mérete arra utal, hogy a klón nagymértékben meg volt csonkítva. Ezért a klón 5' végénél lévő nyitott leolvasási kerethez két primert - a BH(b)C és BH(b)D primert (szekvenciájuk a szekvencia-jegyzék 42. és 43. szekvenciájának felel meg) - terveztünk. Ezeket a primereket, valamint célként pBhrTX-1(b)1.1-et használva PCR technikával egy ³²P-ral jelzett próbát alakítottunk ki a következő körülmények között:

5 perc 95°C-on, majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 45°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 50°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), végül

5 perc 72°C-on.

Ezután a könyvtárt a fent ismertetett körülmények között újra szűrtük. Hat erősen hibridizáló plakkot három tisztítási műveletsorral homogenitásig tisztítottunk. A fág-ból Not I-el végzett emésztéssel elkülönítettük a cDNS inszerteket, és előzetesen Not I-el emésztett és foszfatázzal kezelt pBluescript SK-ba ligáltuk. Az inszertek méretét Not I-el végzett emésztés és a restrikciós fragmensek TAE puffer-oldatban, 0,8 %-os agaróz gélen való szétválasztása alapján becsültük. A következő becsült méretű cDNS inszerteket kaptuk: λBhrTX-1(b)2 - kb. 500 bp; továbbá λBhrTX-1(b)3, λBhrTX-1(b)4, λBhrTX-1(b)5 és λBhrTX-1(b)6 - egyenként kb. 1200 bp.

A pBrhTX-1(b)6 plazmidot ABI 370 A DNS-elemző rendszer és a korábbiakban ismertetett festék-primerek felhasználásával szekvenáltuk. A szekvenálás teljessé tételéhez az ABI festék-terminátor rendszert használtuk a szekvencia-jegyzékben szereplő 42. és 43. szekvenciájú BH(b)C és BH(b)D primerrel és két további, az alábbiakban megadott szekvenciájú primerrel együtt (lásd még a szekvencia-jegyzékben szereplő 44. és 45. szekvenciát):

BH(b)E GTTGTC AATACACCCTG

BH(b)F AGAACGAGATGTTATTGTAT

A kapott nukleotid szekvenciája a szekvencia-jegyzékben szereplő 46. szekvenciának felel meg. A nukleotid szekvencia leolvasásával a 47. szekvencia képződik, ami - a felhasznált iniciáló kodontól függően - 182 vagy 165 aminosavból álló fehérje. Az alternatív fehérjének 21 vagy 4 aminosavból álló hidrofób leader szekvenciájuk van; a teljes peptid 161 aminosavból áll. A BrhTX-1(b) alegység nukleotid szekvenciáját és a megfelelő aminosav-szekvenciát a 12. ábrán mutatjuk be, ahol a vélt nyitott leolvasási keret dőlt betűkkel szerepel. A cDNS-ről leolvasott fehérjét a 13. ábrán szemléltetjük, ahol az aláhúzott rész a kész peptidnek felel meg.

(v) A klónok elemzése:

Peptid-emésztés/szekvenálás:

A származtatott aminosavak leolvasásával kapott szekvenciák párosítása a következő:

- | | | |
|-----------------------|----------------|---------------|
| 1) Peptid-szekvencia: | MIKPGETYGDVTNK | EWVHDNAGTLLPR |
| cDNS-szekvencia: | MIKPGETYGDVTNK | EWVHDNA LLPR |
| 2) Peptid-szekvencia: | PHTVYDKHESLQ | DVHDNAGTLLPR |

cDNS-szekvencia: PHTVYDKHESLY WVHDNA LLPQ

Nem szokatlan, hogy a terminális aminosavak helytelenül szekvenálódnak; a két külön alkalommal szekvenált peptidszekvenciák egyike azonban egy jellegzetes GT aminosav-párt tartalmaz. Ez a GT aminosav-pár hiányzik a szekvenált klón vélt nyitott leolvasási keretéből. Ebből arra következtettük, hogy vagy a pBrhTX-1(b)6 klón tartalmazott mesterségesen előidézett szekvenálási változást, vagy pedig a klón képzéséhez felhasznált cDNS volt hibás, azaz a szintézis/klónozás hat bázispár kihagyásával zajlott le. Ezért a látszólagos "GT" párt/kihagyást tartalmazó régiót PCR-el újra klónoztuk. A PCR eljárásban a többszörözött termék képzésére primereként BH(b)E és BH(b)F primert, célként pedig cDNS-t használtunk. A cDNS-t a 3. példában a cDNS könyvtár képzésénél leírtak szerint szintetizáltuk nőstény B. hebetor mRNS-ből.

A többszörözött termékeket ezután az előzőekben leírtak szerint T-farkalt pBluescript EcoRV helyére klónoztuk, majd a kapott klónokat szekvenáltuk. Mindegyik klónban megtaláltuk a pBrhTX-1(b)6-nak a látszólagos GT anomáliát szegélyező szekvenciáját, de ezen kívül a G és a T kodonjainak megfelelő hat további bázispár (GGAAC) is megjelent.

Ezekből az adatokból az tűnik ki, hogy a GT anomália az eredeti λ klón cDNS-ének szintézisekor/klónozásakor alakult ki. A pBrhTX-1(b) cDNS és a vélhető nyitott leolvasási keret konszenzus szekvenciáját (amelyek a szekvencia-jegyzékben szereplő 48. és 49. szekvenciának felelnek meg) a 14. ábrán mutatjuk be. Oltalmi igényünk ezekre a szekvenciákra is kiterjed.

Genomiális Southern blot elemzés:

Hím és nőstény B. hebetor genomiális DNS-ét a korábbiakban ismertetett módon Pst I-el, EcoRV-el, Acc I-el és Xho I-el emésztettük, és az emésztett termékeket a korábban közöltek szerint membránra vittük fel. A pBrhTX-1(b)6 klón 5' régiójából BH(b)C és BH(b)D primert felhasználva PCR technikával ^{32}P -ral jelzett próbát alakítottunk ki a következő körülmények között:

5 perc 95°C-on, majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 45°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 50°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), végül

5 perc 72°C-on.

A próbát a korábbiakban leírtak szerint hibridizáltattuk. A hím és a nőstény DNS-ekre azonos eredményeket kaptunk. A Pst I-el emésztett termékben két (13,0 kbp és 4,1 kbp méretű) hibridizáló sávot észleltünk. Ez az eredmény egybevág azzal, hogy a cDNS szekvenciának a próbával hibridizáló régiója egy Pst I helyet tartalmaz. Az EcoRV-el, Acc I-el és Xho I-el emésztett termékek egy-egy hibridizáló sávot szolgáltatnak, méretük rendre 3,3 kbp, 13,0 kbp és 7,0 kbp volt.

Egy további kísérletben a pBrhTX-1(b)5 klón 3' régiójából készítettünk ^{32}P -ral jelzett próbákat a BH(b)E és BH(b)F primer felhasználásával a következő körülmények között:

5 perc 95°C-on, majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 45°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), majd

30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 50°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), végül
5 perc 72°C-on.

Hím és nőstény B. hebetor genomialis DNS-t Bcl I-el, Nde I-el, Bgl II-el és Pst I-el emésztettünk, az emésztett termékeket a korábbiakban közöltek szerint membránra vittük fel, és ott a fenti próbákkal hibridizáltuk. A hím és a nőstény DNS-ekre azonos eredményeket kaptunk. A Bcl I-el és Bgl II-el emésztett termékeknél egy-egy hibridizáló sávot észleltünk, amelyek mérete 1,7 kbp, illetve 9,1 kbp volt. Noha ezek az eredmények nem feleltek meg pontosan annak, hogy a próbával hibridizáló régió mindkét helyet tartalmazza (normál esetben két-két hibridizáló sáv megjelenésére számíthattunk), figyelembe kell venni, hogy mindkét hely viszonylag közel van a próbával hibridizáló régió végéhez, és a hibridizáló régió kisebb részét tartalmazó fragmens a vizsgálatban felhasznált nagyméretű próbával csak nehezen mutatható ki. A Nde I-el és Pst I-el emésztett termékekben egyedi hibridizáló sávokat mutattunk ki, méretük 2,4 kbp, illetve 22,2 kbp volt.

7. példa

A BrhTX-1 (c) alegységének klónozása

A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 3. N-terminális szekvencia az azt kódoló gén PCR-technikával való elkülönítésére elégtelen volt. Ezért a fentiekben ismertetett peptid-emésztési módszerrel képeztünk peptid-fragmenseket. Az így kapott peptid-szekvenciákat és azok vélhető kódoló szekvenciáját - amelyek a szekvencia-jegyzékben szereplő 50. és 51. szekvenciának felelnek meg - a 15. ábrán szemléltetjük (az ábrán szereplő kérdőjel az első aminosav bizonytalanságát

jelzi; ahol két különböző aminosav jelenlétére van lehetőség, az egyik lehetséges aminosavat zárójelben tüntettük fel). Ezekből a szekvenciákból a következő - BH(c)A és BH(c)B jelű - multispecies primereket szintetizáltuk (lásd még a szekven-
cia-jegyzékben szereplő 52. és 53. szekvenciát):

BH(c)A 5'-TG (ATG)CC (AGT)AC(AG)TC(AGT)GC-3'

BH(c)B 5'-GT(TCAG)CA(TC)AA(TC)CC(ACT)GG(TAC)AA-3'

Ezeket a primereket a BrhTX-1(b) alegységnél leírt módon használtuk fel B. hebetor cDNS PCR-termékének kialakí-
tására. A PCR szintézist a következő körülmények között vé-
geztük:

5 perc 95°C-on (1 ciklus), majd

30 másodperc 95°C-on, 1 perc 45°C-on, 1 perc 72°C-on (5 cik-
lus), majd

30 másodperc 95°C-on, 1 perc 50°C-on, 1 perc 72°C-on (30 cik-
lus), majd

5 perc 72°C-on (1 ciklus).

Körülbelül 300 bp méretű PCR terméket alakítottunk ki, amit T-farkalt pBluescript SK-ba klónoztunk, és a koráb-
biakban leírt módon szekvenáltunk. Ennek a PCR terméknek a
szekvenciája a szekven-
cia-jegyzékben szereplő 54. szekvenciá-
nak felelt meg; a szekvenciát a 16. ábrán szemléltetjük.

(ii) A könyvtár szűrése és a klónok elkülönítése:

A könyvtár szélesztését a BrhTX-1(b) alegységnél leírtak szerint végeztük. PCR technikával, BH(c)A és BH(c)B primer felhasználásával, cél-DNS-ként az 54. szekvenciát hor-
dozó klónozott PCR terméket használva ³²P-ral jelzett próbá-
kat állítottunk elő. A PCR szintézist a következő körülmények
között végeztük:

5 perc 95°C-on (1 ciklus), majd
 30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 45°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), majd
 30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 50°C-on, 1 perc 72°C-on (30 ciklus), majd
 5 perc 72°C-on (1 ciklus).

Három tisztítási műveletsort alkalmazva öt plakkot a korábbiakban közöltek szerint homogenitásig tisztítottunk.

(iii) A klónok jellemzése:

A cDNS inszertek méretét PCR technikával, a korábbiakban ismertetett λ GT 11 forward és reverz primerek felhasználásával becsültük meg. A becsült inszert-méretetek a következők voltak:

λ BhrTX-1(c)1 - kb. 690 bp

λ BhrTX-1(c)2 - kb. 1800 bp

λ BhrTX-1(c)3 - kb. 690 bp

λ BhrTX-1(c)4 - kb. 700 bp

λ BhrTX-1(c)6 - kb. 690 bp

(iv) Szubklónozás és a klónok szekvenálása:

A fág DNS-t CsCl-ban végzett izopiknikus centrifugálással (lásd Sambrook és munkatársai, 1989) tisztítottuk. A λ BhrTX-1(c)5-ből Not I-el végzett emésztéssel felszabadítottuk a cDNS inszertet, és azt a korábbiakban leírtak szerint pBluescript SK Not I helyébe klónoztuk. Ezt a plazmid klónt pBrhTX-1(c)5-tel jelöljük.

A pBrhTX-1(c)5-ben lévő inszertet a korábban ismertetett ABI festék-primerek és ABI festék-terminátor szekvená-

ló rendszer felhasználásával a következő primerekkel szekvenáltuk:

BH(c) F1 CGCTCTGGCAAACACTCTAT

BH(c) R1 GGTGGAGCAAGCAAACATAA

A fenti primerek szekvenciája a szekvencia-jegyzékben szerelő 55. és 56. szekvenciának felel meg.

A kapott nukleotid szekvenciája a szekvencia-jegyzékben szereplő 57. szekvenciának felel meg. Erről a cDNS szekvenciáról vélhetően egy 145 aminosavból álló, 18,8 kilodalton várható molekulatömegű nyitott leolvasási keret olvasható le (lásd az 58. szekvenciát). A cDNS nukleotid szekvenciáját és vélhető aminosav szekvenciáját a 18. ábrán szemléltetjük.

(v) A klónok elemzése:

Peptid-emésztés/szekvenálás:

A közvetlenül a BrhTX-1(c) alegységből kapott N-terminális fehérje-szekvencia és az azzal párba állított, a klónozott cDNS-ből származtatott aminosav-szekvencia a következő:

Peptid-szekvencia: MDDGE--E--MNP--D

cDNS-szekvencia: MDDGETCERCLNPLEL

A közvetlen fehérje-szekvencia második felében észlelhető illeszkedési eltérések mesterséges szekvenálási változásoknak tulajdoníthatók, amelyek arra vezethetők vissza, hogy viszonylag kevés fehérje állt rendelkezésre. Ugyanennek tulajdoníthatók az aminosav-hiányok is (amelyek a szekvenálás során értékelhetetlen csúcsokat szolgáltattak).

A triptikus peptid-szekvencia és az azzal párba állított, a cDNS-ből származtatott aminosav-szekvencia a következő:

Peptid-szekvencia: (G/H)VHNPGNFR

cDNS-szekvencia: H VHNPGNFR

A fenti szekvencia végén észlelhető egyezéshiány, illetve kétség a fehérje-szekvenáláskor fellépő mesterséges változásoknak tulajdonítható.

Genomiális Southern blot elemzés:

Hím és nőstény B. hebetor genomiális DNS-et a korábbiakban ismertetett módon Bcl I-el, Nde I-el és Bgl II-el emésztettük, és az emésztett termékeket a korábban közöltek szerint membránra vittük fel. A BH(c)F1 és BH(c)R1 primert felhasználva a pBrhTX1(c)5 klón 5' régiójából PCR technikával ³²P-ral jelzett próbát alakítottunk ki a következő körülmények között:

5 perc 95°C-on, majd 30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 45°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), majd 30 másodperc 95°C-on, 1,5 perc 50°C-on, 1 perc 72°C-on (5 ciklus), végül 5 perc 72°C-on.

A próbát a korábbiakban leírtak szerint hibridizáltattuk. A hím és a nőstény DNS-ekre azonos eredményeket kaptunk. A Bcl I-el emésztett termékben két (3,3 kbp és 1,8 kbp méretű) hibridizáló sávot észleltünk. Ez az eredmény egybevághat azzal, hogy a cDNS szekvenciának a próbával hibridizáló régiója egy Bcl I helyet tartalmaz. Az Nde I-el és Bgl II-el emésztett termékekben egy-egy hibridizáló sáv jelent meg, méretük 3,1 kbp, illetve 17,6 kbp volt.

A szekvencia-jegyzékben használt betűjelzések jelentése:

Egybetűs kód	Csoport	Nukleotid(ok)
A	A	adenin
C	C	citozin
T	T	timin (DNS-ben)
U	U	uracil (RNS-ben)
Y	C vagy T(U)	pirimidin
R	A vagy G	purin
M	A vagy C	amino
K	G vagy T(U)	keto
S	G vagy C	erős kölcsönhatás (3 hidrogén-hidas kötés)
W	A vagy T(U)	gyenge kölcsönhatás (2 hidrogén-hidas kötés)
H	A vagy C vagy T(U)	nem-G
B	G vagy T(U) vagy C	nem-A
V	G vagy C vagy A	nem-T vagy nem-U
D	G vagy A vagy T(U)	nem-C
N	G, A, C vagy T(U)	bármilyen

Egybetűs kód	Hárombetűs kód	Aminosav
A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Aszparagin
D	Asp	Aszparaginsav
C	Cys	Cisztein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsav
G	Gly	Glicin
H	His	Hisztidin
I	Ile	Izoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lizin
M	Met	Metionin
F	Phe	Fenilalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Szerin
T	Thr	Treonin
W	Trp	Triptofán
Y	Tyr	Tirozin
V	Val	Valin
B	Asx	Aszparaginsav vagy aszparagin
Z	Glx	Glutaminsav vagy glutamin
X	Xaa	Bármilyen aminosav

SZEKVENCIA-JEGYZÉK

1. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 20 aminosav
 (B) típus: aminosav
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: peptid

(xi) A szekvencia leírása:

Phe	Asn	Pro	Glu	Thr	His	Arg	Glu	Cys	Lys	Asn	Tyr	Cys	Ala	Lys	Glu
1				5					10					15	
His	Gly	Glu	Glu												
			20												

2. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 18 aminosav
 (B) típus: aminosav
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: peptid

(xi) A szekvencia leírása:

Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Arg	Lys	Trp	Ser	Gly	Arg	Ala	Asp	Lys	Thr	Phe
1				5					10					15	
Gly	Pro														

3. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 16 aminosav
 (B) típus: aminosav
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: peptid

(xi) A szekvencia leírása:

Met	Asp	Asp	Gly	Glu	Xaa	Xaa	Glu	Xaa	Xaa	Met	Asn	Pro	Xaa	Xaa	Asp
1				5					10					15	

4. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 25 aminosav
 (B) típus: aminosav
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: peptid

(xi) A szekvencia leírása:

Ile	Ile	Asp	Gly	His	Asp	Ala	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe	Pro	Pro	Thr	Ala
1				5					10					15	
Tyr	Met	Thr	Arg	Met	Ala	Arg	Asn	Val							
			20					25							

5. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 23 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TTYAAYCCNG ARACNCA YNG NGA 23

6. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 20 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GCNAAAGARC ASGGNGARGA 20

7. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 59 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TTCAACCCNG ARACNCACNG NGARNNNAAR AACTACNNNG CNAARGARCA TGGNGARGA 59

8. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 15 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GACTCCTGGA GCCCG 15

9. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 24 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TTGACACCAG ACCAACTGGT AATG 24

10. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 25 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GCTGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAG 25

11. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 23 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TTCACAGAGG AACAGCTAT GAC 23

12. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 18 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TCGTCAAGTG AAGAATTA 18

13. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 18 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

AATGTGTTTG CACTCACG 18

14. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 18 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

CATATACAGC GAAGTACC 18

15. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 18 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TTATATGAAG TTCTTAGA 18

16. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 18 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GGCGCAATAA TTCTTCAC 18

17. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 18 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TAACTATGGG ATTCTTAG 18

18. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 18 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ATATTTAAAG CCTCCCGC 18

19. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 563 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(ix) Jelleg:

- (A) név/kód: CDS
 (B) elhelyezkedés: 13...387

(xi) A szekvencia leírása:

TTTGGATAAA TC ATG AAA TTT TTA TAT CTA ATA CTC CTT TTA ATT GCA	48
Met Lys Phe Leu Tyr Leu Ile Leu Leu Leu Ile Ala	
1 5 10	
GGA GTA GTA TCA TTC AAT CCG GAG ACA CAT CGT GAA TGT AAG AAT TAT	96
Gly Val Val Ser Phe Asn Pro Glu Thr His Arg Glu Cys Lys Asn Tyr	
15 20 25	
TGC GCC AAA GAG CAC GGC GAG GAA TAT CGT ACG TGG TCT TTC CGT TAC	144
Cys Ala Lys Glu His Gly Glu Glu Tyr Arg Thr Trp Ser Phe Arg Tyr	
30 35 40	
GAA CTT GGT GAT ATT TTT AAA TGT GTT TGC ACT CAC GGA AAG AAT CTT	192
Glu Leu Gly Asp Ile Phe Lys Cys Val Cys Thr His Gly Lys Asn Leu	
45 50 55 60	



ATG	GGA	AGC	GAG	AAT	TAT	GGT	AAG	TGT	AGAGAA	GCA	TGT	ATT	CAA	AAT		240
Met	Gly	Ser	Glu	Asn	Tyr	Gly	Lys	Cys	Arg	Glu	Ala	Cys	Ile	Gln	Asn	
				65					70					75		
CAT	GGA	GCG	GGA	GGC	TTT	AAA	TAT	GCC	TTT	CCC	ATA	TAC	AGC	GAA	GTA	288
His	Gly	Ala	Gly	Gly	Phe	Lys	Tyr	Ala	Phe	Pro	Ile	Tyr	Ser	Glu	Val	
			80					85					90			
CCA	GCA	TCA	TGG	GCA	TGC	ATA	TCA	CTC	AGG	AGA	AAA	ATA	AGA	CAT	TTT	336
Pro	Ala	Ser	Trp	Ala	Cys	Ile	Ser	Leu	Arg	Arg	Lys	Ile	Arg	His	Phe	
		95					100					105				
GTA	TAC	ATG	CTT	GCT	CAG	AAA	TTC	ATC	ACA	AGG	CCC	CAC	CTA	AGA	ATC	384
Val	Tyr	Met	Leu	Ala	Gln	Lys	Phe	Ile	Thr	Arg	Pro	His	Leu	Arg	Ile	
	110					115					120					
CCA	TAGTTAATGAA	AAATGGACAA	TGCTACTACC	AAGATCACAG	GGGTGTTGAC											437
Pro																
125																
AGGTATTGTG	AAGTTTATAT	GAAGTTCTTA	GATGCGTTGG	AATCAATTTA	ACAATGATCA											497
AATTCATGTT	ATCAATGAAG	GAAGAATAAT	GAATTAATAA	TAATTATCAA	AAATCAAAAA											557
AAAAAA																563

20. szekvencia

- (i) A szekvencia jellemzői:
(A) hossz: 125 aminosav
(B) típus: aminosav
(D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása:

Met	Lys	Phe	Leu	Tyr	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Gly	Val	Val	Ser	
1				5					10					15		
Phe	Asn	Pro	Glu	Thr	His	Arg	Glu	Cys	Lys	Asn	Tyr	Cys	Ala	Lys	Glu	
			20					25					30			
His	Gly	Glu	Glu	Tyr	Arg	Thr	Trp	Ser	Phe	Arg	Tyr	Glu	Leu	Gly	Asp	
		35					40					45				
Ile	Phe	Lys	Cys	Val	Cys	Thr	His	Gly	Lys	Asn	Leu	Met	Gly	Ser	Glu	
	50					55					60					
Asn	Tyr	Gly	Lys	Cys	Arg	Glu	Ala	Cys	Ile	Gln	Asn	His	Gly	Ala	Gly	
65					70					75				80		
Gly	Phe	Lys	Tyr	Ala	Phe	Pro	Ile	Tyr	Ser	Glu	Val	Pro	Ala	Ser	Trp	
			85					90					95			
Ala	Cys	Ile	Ser	Leu	Arg	Arg	Lys	Ile	Arg	His	Phe	Val	Tyr	Met	Leu	
			100					105					110			
Ala	Gln	Lys	Phe	Ile	Thr	Arg	Pro	His	Leu	Arg	Ile	Pro				
		115					120					125				

21. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 23 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ATNATNAAYG GNCAYGAYGC NAC

23

22. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 23 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GAYGCNACNG ARGARCARTT YCC

23

23. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 71 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ATNATNAWCG GNCATGWCGC NACNGARCAR TTYCCNCCNA CNGANTAYAT GACNNGNATG 60
GCNNGNAAAYG T 71

24. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 18 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

CTTCAAATTA GTGTACGA

18

25. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 18 bázispár

- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TGTGGCAATG CACAGAAC

18

26. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 18 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TCAAGATGCT AGATTGTC

18

27. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 18 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TAATAAATGG TCATGATG

18

28. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 18 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

CGCTTTCAA TAGTCACT

18

29. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 18 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú

(D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ATTCACCATC TGAGCAAT

18

30. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossz: 18 bázispár

(B) típus: nukleinsav

(C) száltípus: egyszálú

(D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ACACAATTAG CCACTGTC

18

31. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossz: 18 bázispár

(B) típus: nukleinsav

(C) száltípus: egyszálú

(D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TTGTACTCAG AATGGACT

18

32. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossz: 18 bázispár

(B) típus: nukleinsav

(C) száltípus: egyszálú

(D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ATGTATGGAG CGATACCA

18

33. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossz: 18 bázispár

(B) típus: nukleinsav

(C) száltípus: egyszálú

(D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ACATCATGGA TTGCCTTG

18

34. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 18 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TGTAAATGTG TAGTGGGT

18

35. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 18 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GCGAGAAATT CACTATCA

18

36. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 1058 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(ix) Jelleg:

- (A) név/kód: CDS
- (B) elhelyezkedés: 95...919

(xi) A szekvencia leírása:

CGCGGCCGCT GTTGATATAT AACAAATTTAT TAAAAATTTTC AAGTGGAAG AAAAATATC 60

TTGTTTTTTT TTTTGT TTTTGT TTTTGT TTTTGT TTTTGT TTTTGT TTTTGT TTTTGT TTTTGT 112
Met His Phe Phe Ala Ser
1 5

ATC CTG GTA TCC TTC TTA CTG GGC AAG GCA ATT CAT GAT GTG GAA GGA 160
Ile Leu Val Ser Phe Leu Leu Gly Lys Ala Ile His Asp Val Glu Gly

10			15			20														
ATA	ATA	AAT	GGT	CAT	GAT	GCT	ACT	GAG	GGA	CAA	TTT	CCC	CAT	ATG	GCT					208
Ile	Ile	Asn	Gly	His	Asp	Ala	Thr	Glu	Gly	Gln	Phe	Pro	His	Met	Ala					
		25					30					35								
TAT	TTA	CAA	GCA	TCA	GCT	GGA	AAG	TGT	TCT	TAT	GTA	TGT	GGC	GGT	GCT					256
Tyr	Leu	Gln	Ala	Ser	Ala	Gly	Lys	Cys	Ser	Tyr	Val	Cys	Gly	Gly	Ala					
	40					45					50									
CTT	CTA	ACT	AAA	AAA	CAT	ATT	ATG	ACA	GCT	GCT	CAT	TGT	GTA	GCA	ATG					304
Leu	Leu	Thr	Lys	Lys	His	Ile	Met	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Ala	Met					
55					60					65					70					
CAC	AGA	ACG	GGA	AAT	ATT	AAA	GTA	GCC	CTT	GGT	GTT	ACT	GAT	TTT	CAT					352
His	Arg	Thr	Gly	Asn	Ile	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Val	Thr	Asp	Phe	His					
				75					80					85						
AAT	AAG	CCA	TCA	ATG	CAA	CAA	AGA	AAG	GTT	GAA	CAT	ATA	AAA	GTC	CAT					400
Asn	Lys	Pro	Ser	Met	Gln	Gln	Arg	Lys	Val	Glu	His	Ile	Lys	Val	His					
			90					95					100							
TCT	GAG	TAC	AAA	GGA	GGA	AGG	CGT	AAG	TCA	TTA	AAA	AAT	TGG	TAT	CGC					448
Ser	Glu	Tyr	Lys	Gly	Gly	Arg	Arg	Lys	Ser	Leu	Lys	Asn	Trp	Tyr	Arg					
		105					110					115								
TCC	ATA	CAT	CGT	ACA	TTT	ACA	GGA	CCG	TCT	GGG	GAT	AAA	GAA	TAC	AAT					496
Ser	Ile	His	Arg	Thr	Phe	Thr	Gly	Pro	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Tyr	Asn					
	120					125					130									
GAT	ATT	GCT	ATT	ATA	ACG	TTG	AGC	CAG	GAA	GTA	ACA	CTA	GGA	CCA	GTA					544
Asp	Ile	Ala	Ile	Ile	Thr	Leu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Gly	Pro	Val					
135					140					145					150					
GTA	AAG	ACT	ATT	AAT	TTA	CCC	CCA	AAG	AGC	TAT	CGG	CTT	CCT	TTT	GAT					592
Val	Lys	Thr	Ile	Asn	Leu	Pro	Pro	Lys	Ser	Tyr	Arg	Leu	Pro	Phe	Asp					
				155				160						165						
CAA	GAT	GCT	AGA	TTG	TCG	GGC	TTT	GGG	CGA	ACA	GTC	ATT	GTC	AAA	GAA					640
Gln	Asp	Ala	Arg	Leu	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	Val	Ile	Val	Lys	Glu					
			170					175					180							
AAT	GAT	CCA	ATT	CCT	CCA	CCC	ACT	ACA	CAT	TTA	CAA	TGG	CTA	GAT	ATG					688
Asn	Asp	Pro	Ile	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	His	Leu	Gln	Trp	Leu	Asp	Met					
		185					190					195								
AAG	GTT	CTT	CAT	TCA	CGA	GAT	GCT	ATT	GTC	ACT	GAT	AGT	GAA	TTT	CTC					736
Lys	Val	Leu	His	Ser	Arg	Asp	Ala	Ile	Val	Thr	Asp	Ser	Glu	Phe	Leu					
	200					205					210									
GCT	GAT	AAA	GAA	TAT	GGT	GAT	GGA	ACT	TGG	TCT	AAT	GCA	GCT	AAG	GGA					784
Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Gly	Asp	Gly	Thr	Trp	Ser	Asn	Ala	Ala	Lys	Gly					
215					220				225					230						
GAC	AGC	GGT	AGT	CCC	TTA	GTC	AAG	GAT	AAT	CAA	GTA	ATT	GGC	GTA	GCC					832
Asp	Ser	Gly	Ser	Pro	Leu	Val	Lys	Asp	Asn	Gln	Val	Ile	Gly	Val	Ala					
				235				240						245						

GTT TCT GTG AGT GAT GAA GAA CAT ACT ACA CGC TTT CAA ATA GTC ACT	880
Val Ser Val Ser Asp Glu Glu His Thr Thr Arg Phe Gln Ile Val Thr	
250 255 260	
TAT TAT TTG GAT TGG ATC AAG AAA TAT GCC GAA CTT GCG TAAAAAGAAT	929
Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile Lys Lys Tyr Ala Glu Leu Ala	
265 270 275	
AAAGAGCAAA ATTGCTCAGA TGGTGAATAT ACATTTTTCCT AATAAGCTCA GAAAAAATCG	989
ATTTATATGT AATTAAAAAA ATTAAAGATT GTTTTTTCTC TTTTAACAGA	1039
AGAATTTGGC GCGTGAATT	1058

37. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossz: 275 aminosav

(B) típus: aminosav

(D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása:

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

Arg Phe Gln Ile Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile Lys Lys Tyr Ala
 260 265 270
Glu Leu Ala
 275

38. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 20 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ACHTTGTTYA CHGAYCGYAA 20

39. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 17 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GGDCCRAADG TYTTRTC 17

40. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 53 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ACCTTGTTTA CAGACCGCAA GTGGTGTGGA XGTCCGATA AGACTTTCGG CCC 53

41. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) hossz: 462 bázispár
 - (B) típus: nukleinsav
 - (C) száltípus: egyszálú
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

```
AATTTTTCCT CATAACAATG TCAATCATAT GTAAAATAAT CTTGTTGGTG CTACTGAGTT 60
GGACATCGAT GGTATCGTCA ACATTATTTA CAGACCGAAA GTGGTGTGGA CGTGCCGATA 120
AGACTTTTGG TCCTTCACGG TCGCTAGGAG GAGGTGTTGG TGATTGCTGC AGAAGTCATA 180
ACAGCTGTGG CCGCATGATT AAACCAGGAG AGACTTATGG AGATGTTACG AATAAAGGAT 240
TTTCAAATAT GTAATGTCTG ATGATTATTA CCAACACTAA ATCTTGATTA AGAAGCTGTA 300
AAAATATCAT TTTGAGGAAA TACTCGATAT TTTTACTTTC CTCCGAATGT TATTTCTTCA 360
GCTTTTCAAC TAAAATTTCT TAATCAACTT GACAATTGTT AAAAATAACA TATTTAATTA 420
TGATTATTAT TTATTTGATT AAAGTTGGGA AAAAAAAAC TG 462
```

42. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 19 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ACATTATTTA CAGACCGAA

19

43. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 20 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

CTGAATACCT CTACAATGCT

20

44. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 17 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GTTGTCAATA CACCCTG

17

45. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 20 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

AGAACGAGAT GTTATTGTAT

20

46. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 1197 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(xi) A szekvencia leírása:

CACGCCTACT	TAGATAATTT	CTCAATTCTT	TGCAAATTAT	GAAATAAGTG	CAAGAGATGT	60
GTATGACACC	TCAATCTGAG	TTTGTTTATA	ATTCGAGAGG	GATAAATAAG	GAAGTCTCTG	120
TGTACAAAAG	AAAACTACCT	CATATAAATC	TTGCATTTTT	CCGTGAGAGA	GAAAAAAAAA	180
CCCTGAAAAA	CTGAGTAAGG	CAATAATTTT	NCCTCATAAC	AATGTCAATC	ATATGTAAAA	240
TAATCTTGTT	GGTGCTACTG	AGTTGGACAT	CGATGGTATC	GTCAACATTA	TTTACAGACC	300
GAAAGTGGTG	TGGACGTGCC	GATAAGACTT	TTGGTCCTTC	ACGGTCGCTA	GGAGGAGGTG	360
TTGGTGATTG	CTGCAGAAGT	CATGACAGCT	GTGGCCGCAT	GATTAAACCA	GGAGAGACTT	420
ATGGAGATGT	TACGAATAAA	GGATTTTCAA	ATATTTGGGA	ATGCCGATGT	GACTATGCAT	480
TTTTTCAATG	TCTTCAGCGT	TCCAATGGTA	AAATGAAAAA	TGTTGTGGAA	ATATTGCATT	540
TTGACGTTGT	CAATACACCC	TGTTACTTCA	TGAAAGATGG	CCGTCCTAAA	ATATCACCCC	600
ATACTGTATA	TGATAAACAC	GAATCACTCT	ATCAACTTAT	ACTACACAAA	GATAATTTTA	660
AGGAGTGGGT	GCATGATAAT	GCTCTTCTCC	CGCAAGAGCT	GGGGATTAAA	GATGAGCATG	720
TGTGGGAGAC	ACTGATGGCA	TGGATGGACT	TTAGATTTCC	AACTGAATAA	TAAATATTCC	780
AAATACAGAT	ATCCTTTTGA	TAAAATGTCG	TAAACATGAT	TGTTTAGATG	AATGGTAAAT	840

TAATGAAAAG ATTGATTGAA AATGTCTGAA GTAACNNNG GATNNGACAT ATAATATATA 900
 ATATTTGCTT TATTNGATAA ACTTCTACCN TTAANAAAGG AAAAAGGAGG AGGNGTAGGA 960
 GGAGGATTAG GATATTTTAC AAGGATTTTA AAAATAATTA AACAATTAGA TCTTCTGTAA 1020
 ATTGATTGAT CATGTATTAA ATACAATAAC ATCTCGTTCT CATAGTACAA TGAAAAAGAA 1080
 CATAACAGTA TGCACAAAAA TAATGACGGT AAATATCTAT GTATGTATGT AGAGAGAAGA 1140
 AAATAAAAAT AGTTAGACAG GTACCAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1197

47. szekvencia

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 182 aminosav
- (B) típus: aminosav
- (C) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása:

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

48. szekvencia

(i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossz: 1201 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) száltípus: egyszálú
- (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS

(ix) Jelle:

(A) név/kód: CDS

(b) elhelyezkedés: 222...773

(xi) A szekvencia leírása:

CACGCCTACT	TAGATAATTT	CTCAATTCTT	TGCAAATTAT	GAAATAAGTG	CAAGAGATGT	60
GTATGACACC	TCAATCTGAG	TTTGTTTCATA	ATTCGAGAGG	GATAAATAAG	GAAGTCTCTG	120
TGTACAAAAG	AAAACTACCT	CATATAAATC	TTGCATTTTTT	CCGTGAGAGA	GAAAAA	180
CCCTGAAAAA	CTGAGTAAGG	CAATAATTTT	CCCTCATAAC	A ATG TCA ATC ATA		233
				Met Ser Ile Ile		
				1		
TGT AAA ATA ATC TTG TTG GTG CTA CTG AGT TGG ACA TCG ATC GTA TCG						281
Cys Lys Ile Ile Leu Leu Val Leu Leu Ser Trp Thr Ser Met Val Ser						
5 10 15 20						
TCA ACA ATA TTT ACA GAC CGA AAG TGG TGT GGA CGT GCC GAT AAG ACT						329
Ser Thr Leu Phe Thr Asp Arg Lys Trp Cys Gly Arg Ala Asp Lys Thr						
25 30 35						
TTT GGT CCT TCA CGG TCG CTA GGA GGA GGT GTT GGT GAT TGC TGC AGA						377
Phe Gly Pro Ser Arg Ser Leu Gly Gly Gly Val Gly Asp Cys Cys Arg						
40 45 50						
AGT CAT GAC AGC TGT GGC CGC ATG ATT AAA CCA GGA GAG ACT TAT GGA						425
Ser His Asp Ser Cys Gly Arg Met Ile Lys Pro Gly Glu Thr Tyr Gly						
55 60 65						
GAT GTT ACG AAT AAA GGA TTT TCA AAT ATT TGG GAA TGC CGA TGT GAC						473
Asp Val Thr Asn Lys Gly Phe Ser Asn Ile Trp Glu Cys Arg Cys Asp						
70 75 80						
TAT GCA TTT TTT CAA TGT CTT CAG CGT TCC AAT GGT AAA ATG AAA AAT						521
Tyr Ala Phe Phe Gln Cys Leu Gln Arg Ser Asn Gly Lys Met Lys Asn						
85 90 95 100						
GTT TGT GAA ATA TTG CAT TTT GAC GTT GTC AAT ACA CCC TGT TAC TTC						569
Val Val Glu Ile Leu His Phe Asp Val Val Asn Thr Pro Cys Tyr Phe						
105 110 115						
ATG AAA GAT GGC CGT GCT AAA ATA TCA CCC CAT ACT GTA TAT GAT AAA						617
Met Lys Asp Gly Arg Ala Lys Ile Ser Pro His Thr Val Tyr Asp Lys						
120 125 130						
CAC GAA TCA CTC TAT CAA CTT ATA CTA CAC AAA GAT AAT TTT AAG GAG						665
His Glu Ser Leu Tyr Gln Leu Ile Leu His Lys Asp Asn Phe Lys Glu						
135 140 145						
TGG GTG CAT GAT AAT GCT GGA ACT CTT CTC CCG CAA GAG CTG GGG ATT						713
Trp Val His Asp Asn Ala Gly Thr Leu Leu Pro Gln Glu Leu Gly Ile						
150 155 160						

```

AAA GAT GAG CAT GTG TGG GAG ACA CTG ATG GCA TGG ATG GAC TTT AGA      761
Lys Asp Glu His Val Trp Glu Thr Leu Met Ala Trp Met Asp Phe Arg
165                      170                      175                      180

TTT CCA ACT GAA TAATAAATAT TCCAAATACA GATAATCCTTT TGATAAAATG      813
Phe Pro Thr Glu

TCGTAAACAT GATTGTTTAG ATGAATGGTA AATTAATGAA AAGATTGATT GAAAATGTCT  873

GAAGTAACTT TTGGATTTTA CATATAATAT ATAATATTTG CCTTATTTGA TAAACTTCTA  933

AATTAAAAAA GAAAAAGGAG GAGGAGTAGG AGGAGGATTA GGATATTTTA CAAGGATTTT  993

AAAAATAATT AAACAATTAG ATCTTCTGTA AATTGATTGA TCATGTATTA AATACAATAA 1053

CATCTCGTTC TCATAGTACA ATGAAAAAGA ACATAACAGT ATGCACAAAA ATAATGACGG 1113

TAAATATCTA TGTATGTATG TAGAGAGAAG AAAATAAAAA TAGTTAGACA GGTACCAAAA 1173

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA                                1201

```

49. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) hossz: 184 aminosav
 - (B) típus: aminosav
 - (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása:

```

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

```

50. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 24 aminosav
 (B) típus: aminosav
 (C) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: peptid

(xi) A szekvencia leírása:

Xaa	Ile	Ala	Xaa	Asp	Val	Gly	His	Ala	Ala	His	Ser	Phe	Thr	Lys	Xaa
1				5				10						15	
Val	His	Asn	Pro	Gly	Asn	Phe	Arg								
				20											

51. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 66 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

ATHGCNCARG	AYGTNGGDCA	YGCNGCNCAY	WSNTTYACNA	ARGTNCAYAA	YCCNGGNAAY	60
TTYMGN						66

52. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 14 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

TGDCCDACRT	CDGC	14
------------	------	----

53. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 17 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

GTNCAYAAAYC	CHGGHAA	17
-------------	---------	----

54. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 275 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

```
GTGCACAATC CAGGAAACTT CCGAGTCTCC AAATGTGTAT GCGACATTGC GCTCAAGGAG 60
TGCCTCACTA CTCATCCTGA AATGAGTTTC AAATTTGTTA AAGCACTCTT TTTTGATTTG 120
CTTGCTCCAC CCTGTTTTGA TCAGATTGCT GATTGGGGTA AGAAAAAATT GAAAAATAAG 180
CAGGCATTTT CACTGCATGA TTTACAATCA GCTGCCCACG CGCTCTGGCA AACACTCTAT 240
GACGCTGTCA AGGGCATAGC TCAAGATGTC GGCCA 275
```

55. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 20 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

```
CGCTCTGGCA AACACTCTAT 20
```

56. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 20 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS

(xi) A szekvencia leírása:

```
GGTGGAGCAA GCAAACATAA 20
```

57. szekvencia:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) hossz: 685 bázispár
 (B) típus: nukleinsav
 (C) száltípus: egyszálú
 (D) topológia: lineáris

GCGCGCGCAG CAAGACTAAG AGTAAGAGAG GGGAACATAG AAGAGTGTTC ACAATAGTGG																60
AGATGTGGGG GCTTTCATTT CTATTAGTTC CGTGCTGGAG TTTTTC AACC TACGCTGGGT																120
GTGGTGGATA TAATCGGTCC ATTACTAAGC GACAG ATG GAC GAT GGT GAG ACG																173
Met Asp Asp Gly Glu Thr																
1 5																
TGC GAA AGG TGT TTG AAT CCA CTC GAA TTA GTA AAT GAC GCT GTA GAC																221
Cys Glu Arg Cys Leu Asn Pro Leu Glu Leu Val Asn Asp Ala Val Asp																
10 15 20																
TCG TGC ATT GAA GCT CAT GAG GAA TGT GAG GAA TTC ATG GAA GGC GGG																269
Ser Cys Ile Glu Ala His Glu Glu Cys Glu Glu Phe Met Glu Gly Gly																
25 30 35																
ATG GAA ATG CTT CAT GTA CAC ATT CCA GGA AAC TTC CGA GTC TCC AAA																317
Met Glu Met Leu His Val His Asn Pro Gly Asn Phe Arg Val Ser Lys																
40 45 50																
TGT GTA TGC GAC ATT GCG CTC AAG GAG TGC CTC ACT ACT CAT CCT GAA																365
Cys Val Cys Asp Ile Ala Leu Lys Glu Cys Leu Thr Thr His Pro Glu																
55 60 65 70																
ATG AGT TTC AAA TCT GTT AAA GCA CTC TTT TTT GAT TTG CTT GCT CCA																413
Met Ser Phe Lys Ser Val Lys Ala Leu Phe Phe Asp Leu Leu Ala Pro																
75 80 85																
CCC TGT TTT GAC CAG ATT GCT GAT TGG GGT AAG AAA AAA TTG AAA AAT																461
Pro Cys Phe Asp Gln Ile Ala Asp Trp Gly Lys Lys Lys Leu Lys Asn																
90 95 100																
AAG CAG GCA TTT CCA CTG CAT GAT TTA CAA TCA GCT GCC CAC GCG CTC																509
Lys Gln Ala Phe Pro Leu His Asp Leu Gln Ser Ala Ala His Ala Leu																
105 110 115																
TGG CAA ACA CTC TAT GAC GCT GTC AAG GGC ATA GCT CAG GAT GTC GGA																557
Trp Gln Thr Leu Tyr Asp Ala Val Lys Gly Ile Ala Gln Asp Val Gly																
120 125 130																
CAT GCT GCA CAT TCT TTT GAA AAA ATG TTA CAG TAACAGTTAA ATATGAAAAA																610
His Ala Ala His Ser Phe Glu Lys Met Leu Gln																
135 140 145																
GGTCCATGAT AGTAGAATAC AGTTATTGTT GTATAAATAA ATAATATATT CAGAATGATA																670
AAAAAAAACG GCCGC																685

58. szekvencia:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossz: 145 aminosav

(B) típus: aminosav

(D) topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása:

Met	Asp	Asp	Gly	Glu	Thr	Cys	Glu	Arg	Cys	Leu	Asn	Pro	Leu	Glu	Leu	1	5	10	15
Val	Asn	Asp	Ala	Val	Asp	Ser	Cys	Ile	Glu	Ala	His	Glu	Glu	Cys	Glu	20	25	30	
Glu	Phe	Met	Glu	Gly	Gly	Met	Glu	Met	Leu	His	Val	His	Asn	Pro	Gly	35	40	45	
Asn	Phe	Arg	Val	Ser	Lys	Cys	Val	Cys	Asp	Ile	Ala	Leu	Lys	Glu	Cys	50	55	60	
Leu	Thr	Thr	His	Pro	Glu	Met	Ser	Phe	Lys	Ser	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	65	70	75	80
Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Cys	Phe	Asp	Gln	Ile	Ala	Asp	Trp	Gly	85	90	95	
Lys	Lys	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Gln	Ala	Phe	Pro	Leu	His	Asp	Leu	Gln	100	105	110	
Ser	Ala	Ala	His	Ala	Leu	Trp	Gln	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Val	Lys	Gly	115	120	125	
Ile	Ala	Gln	Asp	Val	Gly	His	Ala	Ala	His	Ser	Phe	Glu	Lys	Met	Leu	130	135	140	
Gln																			
145																			

Szabadalmi igénypontok

1. A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 19. szekvenciát tartalmazó izolált DNS, a 19. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciával legalább 60 %-ban homológ szekvenciák, a 19. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciához hibridizálódó szekvenciák, és a 19. szekvencia szerinti nukleinsav genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

2. A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 46. szekvenciát tartalmazó izolált DNS, a 46. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciával legalább 60 %-ban homológ szekvenciák, a 46. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciához hibridizálódó szekvenciák, és a 46. szekvencia szerinti nukleinsav genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

3. A 2. igénypont szerinti izolált DNS, amely a szekvencia-jegyzékben feltüntetett 48. szekvenciát tartalmazza, a 48. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciával legalább 60 %-ban homológ szekvenciák, a 48. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciához hibridizálódó szekvenciák, és a 48. szekvencia szerinti nukleinsav genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

4. A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 57. szekvenciát tartalmazó izolált DNS, az 57. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciával legalább 60 %-ban homológ szekvenciák, az 57. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciához hibridizálódó szekvenciák, és az 57. szekvencia szerinti nuk-

leinsav genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

5. A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 36. szekvenciát tartalmazó izolált DNS, a 36. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciával legalább 60 %-ban homológ szekvenciák, a 36. szekvencián bemutatott nukleinsav-szekvenciához hibridizálódó szekvenciák, és a 36. szekvencia szerinti nukleinsav genetikus kódjának eredményeként degenerált és ugyanazt a polipeptidet kódoló szekvenciák.

6. Az előző igénypontok bármelyike szerinti izolált DNS-ek, azzal j e l l e m e z v e , hogy a szekvencia-jegyzékben feltüntetett 19., 46., 48., 57. vagy 36. nukleinsav-szekvenciával legalább 70 %-ban homológok.

7. Az előző igénypontok bármelyike szerinti izolált DNS-ek, azzal j e l l e m e z v e , hogy azok cDNS-ek vagy szintetizált DNS-ek.

8. Izolált DNS, azzal j e l l e m e z v e , hogy genomiális DNS, és ugyanazt a polipeptidet kódolja, mint az előző igénypontok bármelyike szerinti DNS.

9. Az előző igénypontok bármelyike szerinti DNS által kódolt izolált polipeptid és származékai.

10. A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 20. szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmazó izolált polipeptid és származékai.

11. A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 47. szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmazó izolált polipeptid és származékai.

12. A 11. igénypont szerinti izolált polipeptid, azzal j e l l e m e z v e , hogy a szekvencia-jegyzékben fel-

tüntetett 49. szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciát vagy származékait tartalmazza.

13. A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 58. szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmazó izolált polipeptid és származékai.

14. A szekvencia-jegyzékben feltüntetett 37. szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmazó izolált polipeptid és származékai.

15. Izolált polipeptid, azzal j e l l e m e z v e , hogy a 10-14. igénypontok bármelyike szerinti izolált polipeptid homológ változata, és a szekvencia-jegyzékben feltüntetett 20., 47., 49., 58. és 37. szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciák bármelyikével legalább 80 %-ban homológ.

16. A 15. igénypont szerinti izolált polipeptid, azzal j e l l e m e z v e , hogy a szekvencia-jegyzékben feltüntetett 20., 47., 49., 58. vagy 37. szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciával legalább 90 %-ban homológ.

17. Izolált polipeptid, azzal j e l l e m e z v e , hogy a 8. igénypont szerinti genomiális DNS primer transzkripció termékének variáns összevágásával képződik.

18. Rekombináns DNS szerkezet, azzal j e l l e m e z v e , hogy az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti DNS-ek legalább egyikét tartalmazza.

19. A 18. igénypont szerinti rekombináns DNS szerkezet, azzal j e l l e m e z v e , hogy az egy klónozó vektor.

20. A 18. igénypont szerinti rekombináns DNS szerkezet, azzal j e l l e m e z v e , hogy az egy kifejező vektor

21. Transzformált emlős-sejt, nememlős gerinces- vagy gerinctelen-sejt, rovarsejt, növényi sejt, baktérium

vagy élesztő, azzal j e l l e m e z v e , hogy a 18. igénypont szerinti rekombináns DNS szerkezetet tartalmazza.

22. A 21. igénypont szerinti transzformált élesztő, azzal j e l l e m e z v e , hogy az egy gomba.

23. Genetikailag manipulált vírus, azzal j e l l e m e z v e , hogy az 1-8. igénypontok szerinti DNS-ek legalább egyikét tartalmazza.

24. Rovartoxin, azzal j e l l e m e z v e , hogy négy polipeptid alegységet tartalmaz, amelyek N-terminális aminosav-szekvenciája a szekvencia-jegyzékben feltüntetett 1., 2., 3. és 4. szekvenciának felel meg.

25. Rovartoxin, azzal j e l l e m e z v e , hogy egy vagy több, a 9. igénypont szerinti polipeptidet tartalmaz.

26. Rovartoxin, azzal j e l l e m e z v e , hogy a 10-17. igénypontok bármelyike szerinti egy vagy több polipeptidet tartalmaz.

27. Élősdí darázból kinyerhető rovarroxin, azzal j e l l e m e z v e , hogy négy polipeptidet tartalmaz, amelyek molekulatömege az itt leírt SDS-poli(akril-amid) gél-elektroforézissel meghatározva rendre mintegy 34 000, 21 000, 18 500 és 17 000 dalton.

28. Biológiai kártevőirtószer, azzal j e l l e m e z v e , hogy

- (i) a 24-27. igénypontok bármelyike szerinti rovarroxin,
- (ii) a 10-17. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet,
- (iii) a 18. igénypont szerinti rekombináns DNS szerkezetet,
- vagy
- (iv) a 21-23. igénypontok bármelyike szerinti transzformált rendszert tartalmaz.

29. Eljárás rovarkártevők irtására, azzal j e l -
l e m e z v e , hogy a kártevőt vagy annak tartózkodási helyét
a 28. igénypont szerinti biológiai kártevőirtószer hatásos
mennyiségével kezeljük.

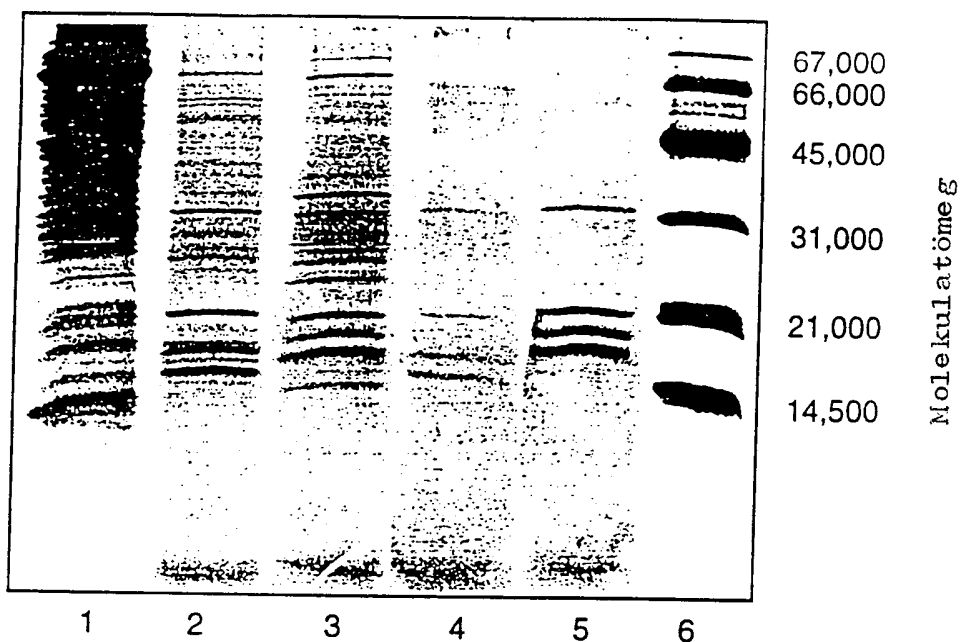
A bejelentő helyett

a meghatalmazott:

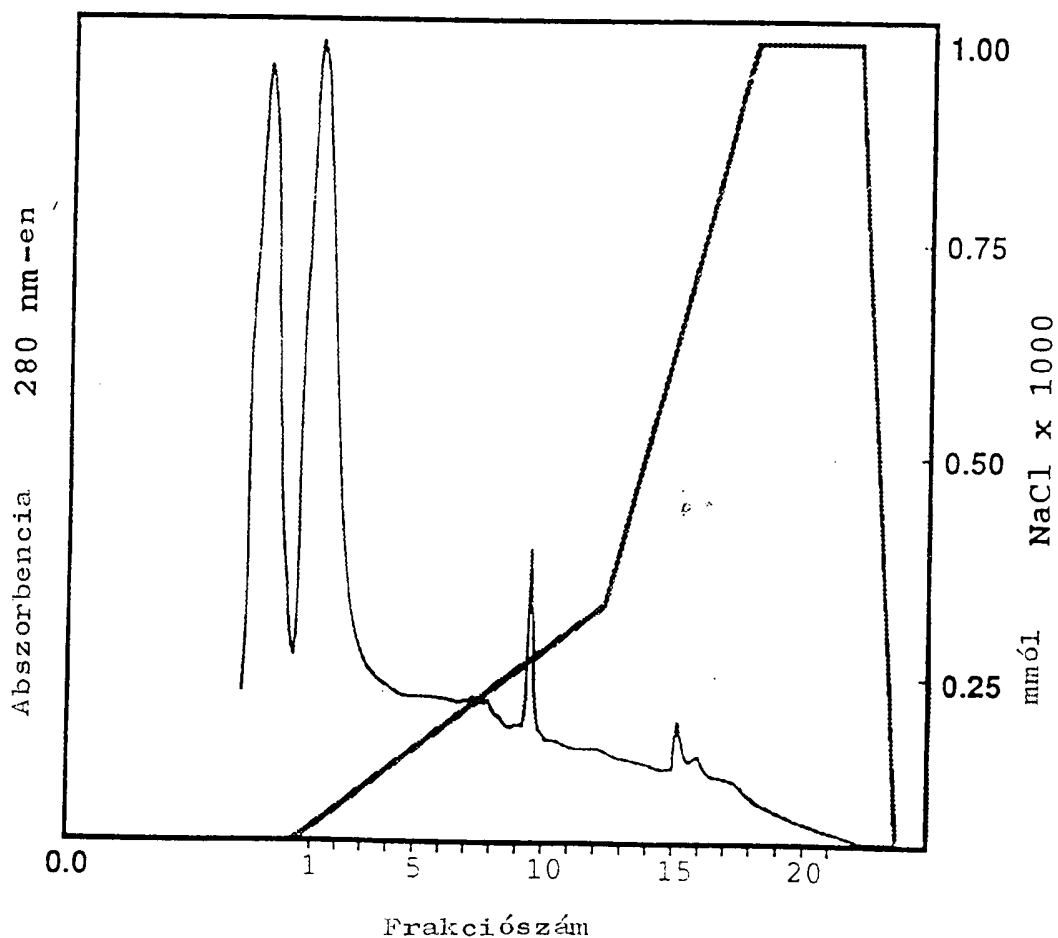
Dr. Jalsovszky Györgyné
ügyvéd
1093 Budapest, Kőraktár u. 24.
Tel.: 218-4148 Fax: 218-4506

2007. 1.

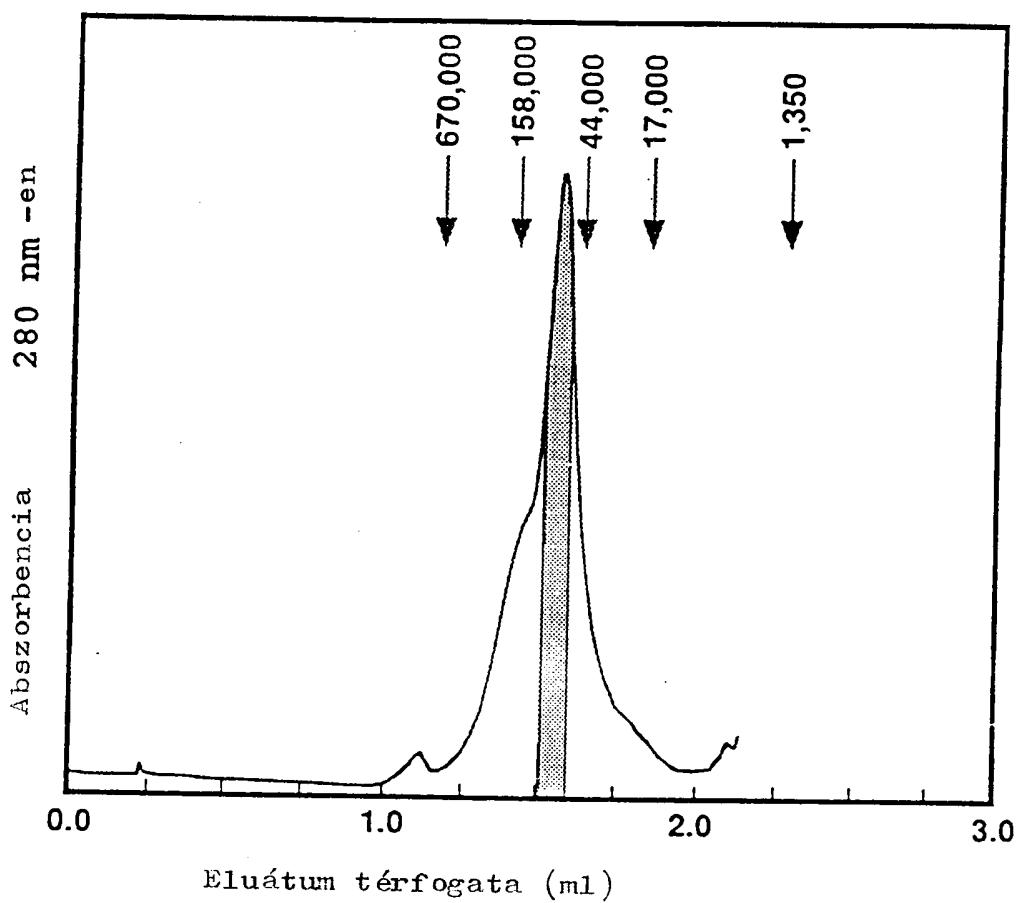
1. ábra



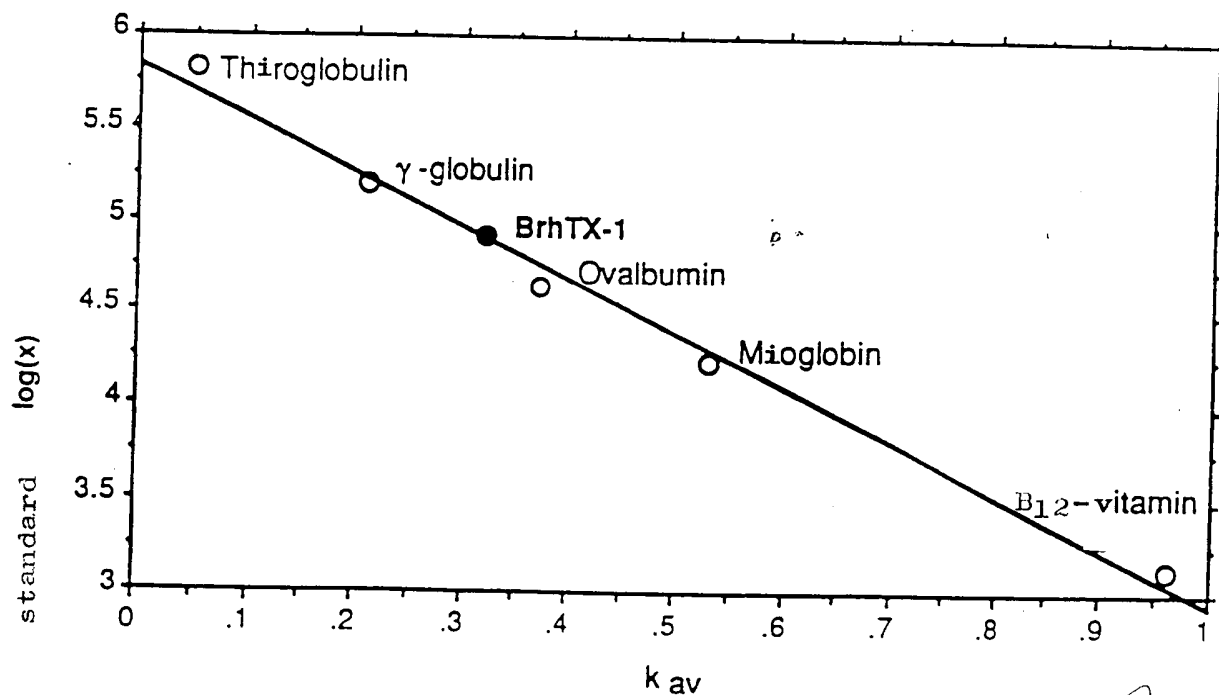
2. ábra



3. ábra

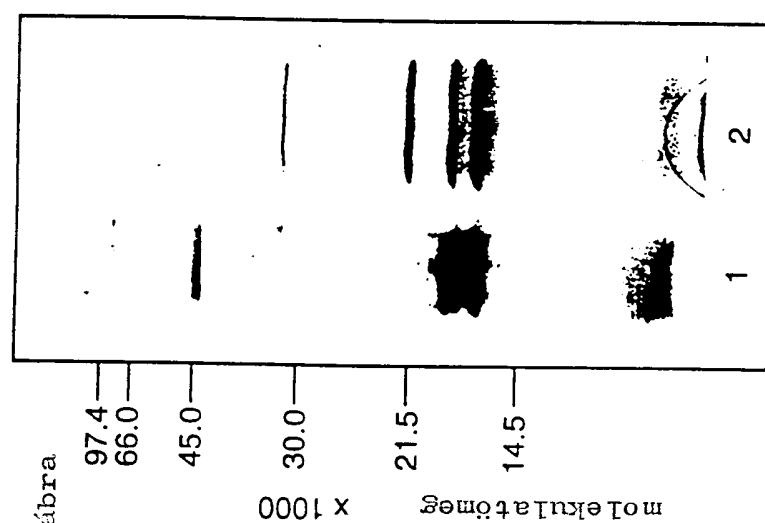


4. ábra



158/1040

Dr. Jaisovszky Györgyné
1093 Budapest, Központ u. 24.
Tel.: 218-4148 Fax: 218-4506



7. ábra

BH(a)A	PHE	ASN	PRO	GLU	THR	HIS	ARG	GLU	-	LYS	ASN	TYR	-	ALA	LYS	GLU	HIS	GLY	GLU	GLU
	TTC	AAC	CCI	GAA	ACI	CAC	IGI	GA						GCI	AAA	GAA	CAC	GGI	GAA	GA
	T	T		G		T								G	G	G	T		G	
BH(a)B	TTC	AAC	CCI	GAA	ACI	CAC	IGI	GAA	III	AAA	AAC	TAC	III	GCI	AAA	GAA	CAT	GGI	GAA	GA
				G				G		G				G	G	G	G		G	
BH(a)I																				

158/1050

Dr. Jaisovszky Györgyné
1093 Budapest, Központ u. 24.
Tel.: 218-4148 Fax: 218-4506

6. ábra

Maradék	BrhTX-1 alegység			
	(a)	(b)	(c)	(d)
1	Phe	Thr	Met	Ile
2	Asn	Leu	Asp	Ile
3	Pro	Phe	Asp	Asn
4	Glu	Thr	Gly	Gly
5	Thr	Asp	Glu	His
6	His	Arg	-	Asp
7	Arg	Lys	-	Ala
8	Glu	Trp*	Glu	Thr
9	-	Ser*	-	Glu
10	Lys	Gly	-	Glu
11	Asn	Arg	Met	Gln
12	Tyr	Ala	Asn	Phe
13	-	Asp	Pro*	Pro
14	Ala	Lys*	-	Pro*
15	Lys	Thr*	-	Thr*
16	Glu	Phe	Asp*	Ala
17	His	Gly	-	Tyr
18	Gly	Pro	-	Met*
19	Glu	-	-	Thr*
20	Glu	-	-	Arg*
21				Met*
22				Ala
23				Arg*
24				Asn
25				Val

8. ábra

10 20 30 40 50 60
| | | | |
CCAGTGAATTCGCNNCCGCTTTGGATAAATCATGAAATTTTATATCTAATACTCCTTTT
EcoRI NotI

M K F L Y L I L L L

70 80 90 100 110 120
| | | | |
AATTGCAGGAGTAGTATCATTCAATCCGGAGACACATCGTGAATGTAAGAATTATTGCGC

I A G V V S F N P E T H R E C K N Y C A

130 140 150 160 170 180
| | | | |
CAAAGAGCACGGCGAGGAATATCGTACGTGGTCTTCCGTTACGAACTTGGTGATATTTT

K E H G E E Y R T W S F R Y E L G D I F

190 200 210 220 230 240
| | | | |
TAAATGTGTTTGCACTCACGGAAAGAATCTTATGGGAAGCGAGAATTATGGTAAGTGTAG

K C V C T H G K N L M G S E N Y G K C R

250 260 270 280 290 300
| | | | |
AGAAGCATGTATTCAAATCATGGAGCGGGAGGCTTTAAATATGCCTTTCCCATATACAG

E A C I Q N H G A G G F K Y A F P I Y S

310 320 330 340 350 360
| | | | |
CGAAGTACCAGCATCATGGGCATGCATATCACTCAGGAGAAAAATAAGACATTTTGTATA

E V P A S W A C I S L R R K I R H F V Y



8. ábra (folyt.)

370 380 390 400 410 420
| | | | |
CATGCTTGCTCAGAAATTCATCACAAAGGCCCCACCTAAGAATCCCATAGTTATGAAAAAT

M L A Q K F I T R P H L R I P -

430 440 450 460 470 480
| | | | |
GGACAATGCTACTACCAAGATCACAGGGGTGTTGACAGGTATTGTGAAGTTTATATGAAG

490 500 510 520 530 540
| | | | |
TTCTTAGATGCGTTGGAATCAATTAAACAATGATCAAATTCATGTTATCAATGAAGGAAG

550 560 570 580 590 600
| | | | |
AATAATGAATTAATAATAATTATCAAAAATCAAAAAAAAAAGCGGCCGCGAATTCGAGC
NotI EcoRI

610 620 630 640 650 660
| | | | |
TCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGTCATGCAACTTGGCGTAATCATGG

670 680
| |
TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAA

10. ábra

27

54

GGT TTT TCC CAG TCA CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAA TTC GCG GCC GCT
CCA AAA AGG GTC AGT GCT GCA ACA TTT TGC TGC CGG TCA CTT AAG CGC CGG CGA

EcoRI

81

108

GTT GAT ATA TAA CAA TTT ATT AAA AAT TTC AAG TGG AAA GAA AAA CTA TCT TGT
CAA CTA TAT ATT GTT AAA TAA TTT TTA AAG TTC ACC TTT CTT TTT GAT AGA ACA

135

162

TTT TTT TTT TGT TTT TTT TCA TAA TTT AAA ATG CAT TTC TTC GCC TCC ATC CTG
AAA AAA AAA ACA AAA AAA AGT ATT AAA TTT TAC GTA AAG AAG CGG AGG TAG GAC

M H F F A S I L

189

216

GTA TCC TTC TTA CTG GGC AAG GCA ATT CAT GAT GTG GAA GGA ATA ATA AAT GGT
CAT AGG AAG AAT GAC CCG TTC CGT TAA GTA CTA CAC CTT CCT TAT TAT TTA CCA
V S F L L G K A I H D V E G I I N G

243

270

CAT GAT GCT ACT GAG GGA CAA TTT CCC CAT ATG GCT TAT TTA CAA GCA TCA GCT
GTA CTA CGA TGA CTC CCT GTT AAA GGG GTA TAC CGA ATA AAT GTT CGT AGT CGA
H D A T E G Q F P H M A Y L Q A S A



10. ábra (1.folyt.)

297

324

GGA AAG TGT TCT TAT GTA TGT GGC GGT GCT CTT CTA ACT AAA AAA CAT ATT ATG
CCT TTC ACA AGA ATA CAT ACA CCG CCA CGA GAA GAT TGA TTT TTT GTA TAA TAC
G K C S Y V C G G A L L T K K H I M

351

378

ACA GCT GCT CAT TGT GTA GCA ATG CAC AGA ACG GGA AAT ATT AAA GTA GCC CTT
TGT CGA CGA GTA ACA CAT CGT TAC GTG TCT TGC CCT TTA TAA TTT CAT CGG GAA
T A A H C V A M H R T G N I K V A L

405

432

GGT GTT ACG GAT TTT CAT AAT AAG CCA TCA ATG CAA CAA AGA AAG GTT GAA CAT
CCA CAA TGC CTA AAA GTA TTA TTC GGT AGT TAC GTT GTT TCT TTC CAA CTT GTA
G V T D F H N K P S M Q Q R K V E H

459

486

ATA AAA GTC CAT TCT GAG TAC AAA GGA GGA AGG CGT AAG TCA TTA AAA AAT TGG
TAT TTT CAG GTA AGA CTC ATG TTT CCT CCT TCC GCA TTC AGT AAT TTT TTA ACC
I K V H S E Y K G G R R K S L K N W

513

540

TAT CGC TCC ATA CAT CGT ACA TTT ACA GGA CCG TCT GGG GAT AAA GAA TAC AAT
ATA GCG AGG TAT GTA GCA TGT AAA TGT CCT GGC AGA CCC CTA TTT CTT ATG TTA
Y R S I H R T F T G P S G D K E Y N

567

594

GAT ATT GCT ATT ATA ACG TTG AGC CAG GAA GTA ACA CTA GGA CCA GTA GTA AAG
CTA TAA CGA TAA TAT TGC AAC TCG GTC CTT CAT TGT GAT CCT GGT CAT CAT TTC
D I A I I T L S Q E V T L G P V V K

10. ábra (2.folyt.)

621

648

ACT ATT AAT TTA CCC CCA AAG AGC TAT CGG CTT CCT TTT GAT CAA GAT GCT AGA
TGA TAA TTA AAT GGG GGT TTC TCG ATA GCC GAA GGA AAA CTA GTT CTA CGA TCT
T I N L P P K S Y R L P F D Q D A R

675

702

TTG TCG GGC TTT GGG CGA ACA GTC ATT GTC AAA GAA AAT GAT CCA ATT CCT CCA
AAC AGC CCG AAA CCC GCT TGT CAG TAA CAG TTT CTT TTA CTA GGT TAA GGA GGT
L S G F G R T V I V K E N D P I P P

729

756

CCC ACT ACA CAT TTA CAA TGG CTA GAT ATG AAG GTT CTT CAT TCA CGA GAT GCT
GGG TGA TGT GTA AAT GTT ACC GAT CTA TAC TTC CAA GAA GTA AGT GCT CTA CGA
P T T H L Q W L D M K V L H S R D A

783

810

ATT GTC ACT GAT AGT GAA TTT CTC GCT GAT AAA GAA TAT GGT GAT GGA ACT TGG
TAA CAG TGA CTA TCA CTT AAA GAG CGA CTA TTT CTT ATA CCA CTA CCT TGA ACC
I V T D S E F L A D K E Y G D G T W

837

864

TCT AAT GCA GCT AAG GGA GAC AGC GGT AGT CCC TTA GTC AAG GAT AAT CAA GTA
AGA TTA CGT CGA TTC CCT CTG TCG CCA TCA GGG AAT CAG TTC CTA TTA GTT CAT
S N A A K G D S G S P L V K D N Q V

10. ábra (3. folyt.)

891

918

ATT GGC GTA GCC GTT TCT GTG AGT GAT GAA GAA CAT ACT ACA CGC TTT CAA ATA
TAA CCG CAT CGG CAA AGA CAC TCA CTA CTT CTT GTA TGA TGT GCG AAA GTT TAT
I G V A V S V S D E E H T T R F Q I

945

972

GTC ACT TAT TAT TTG GAT TGG ATC AAG AAA TAT GCC GAA CTT GCG TAA AAA GAA
CAG TGA ATA ATA AAC CTA ACC TAG TTC TTT ATA CGG CTT GAA CGC ATT TTT CTT
V T Y Y L D W I K K Y A E L A .

999

1026

TAA AGA GCA AAA TTG CTC AGA TGG TGA ATA TAC ATT TTT CCA ATA AGC TCA GAA
ATT TCT CGT TTT AAC GAG TCT ACC ACT TAT ATG TAA AAA GGT TAT TCG AGT CTT

1053

1080

AAA ATC GAT TTA TAT GTA ATT AAA AAA ATT AAA GAT TGT TTT TTC TCT TTT AAC
TTT TAG CTA AAT ATA CAT TAA TTT TTT TAA TTT CTA ACA AAA AAG AGA AAA TTG

1107

AGA AGA ATT TGG CGN NCG TGA ATT CGA GCT CGG TAC CCG GGG
TCT TCT TAA ACC GCN NGC ACT TAA GCT CGA GCC ATG GGC CCC

EcoRI

11. ábra

AATTTTTCCTCATAACAATGTCAATCATATGTAAAATAATCTTGGTGGTACTGAGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TTAAAAAGGAGTATTGTTACAGTTAGTATACATTTTATTAGAACAACCACGATGACTCAA
F F L I T M S I I C K I I L L V L L S W
BH(b)C
>>>>
GGACATCGATGGTATCGTCAACATTATTTACAGACCGAAAGTGGTGTGGACGTGCCGATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCTGTAGCTACCATACAGTTGTAATAAATGTCTGGCTTTCACCACACCTGCACGGCTAT
T S M V S S T L F T D R K W C G R A D K
AGACTTTTGGTCCTTCACGGTCGCTAGGAGGAGGTGTTGGTGATTGCTGCAGAAGTCATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TCTGAAAACCGGAAGTGCCAGCGATCCTCCTCCACAACCACTAACGACGTCTTCAGTAC
T F G P S R S L G G G V G D C C R S H D -
ACAGCTGTGGCCGCATGATTAAACCAGGAGAGACTTATGGAGATGTTACGAATAAAGGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TGTCGACACCGCGTACTAATTTGGTCCTCTCTGAATACCTCTACAATGCTTATTTCTTA
BH(b)D <<<<
S C G R M I K P G E T Y G D V T N K G F
TTTCAAATATGTAATGTCTGATGATTATTACCAACACTAAATCTTGATTAAGAAGCTGTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
AAAGTTTATACATTACAGACTACTAATAATGGTTGTGATTTAGAATAATTCTTCGACAT
S N M * C L M I I T N T K S * L R S C K
AAAATATCATTGAGGAAATACTCGATATTTTACTTTCCTCCGAATGTTATTTCTTCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTTTATAGTAAACTCCTTTATGAGCTATAAAAAATGAAAGGAGGCTTACAATAAAGAAGT
N I I L R K Y S I F L L S S E C Y F F S
GCTTTTCAACTAAAATTTCTTAATCAACTTGACAATTGTTAAAAATAACATATTTAATTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CGAAAAGTTGATTTTAAAGAATTAGTTGAAGTGTAAACAATTTTATTGTATAAATTAAT
F S T K I S * S T * Q L L K I T Y L I M
TGATTATTATTTATTTGATTAAAGTTGGGAAAAAAAAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 462
ACTAATAATAATAAATAAATAAATTTCAACCTTTTATTTTGGAC
I I I Y L I K V G K K K T

12. ábra

CACGCCTACTTAGATAATTTCTCAATTCCTTGCAAATTATGAAATAAGTGCAAGAGATGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTGCGGATGAATCTATTAAAGAGTTAAGAAACGTTTAATACTTTATTCACGTTCTCTACA
R L L R * F L N S L Q I M K * V Q E M C -

GTATGACACCTCAATCTGAGTTTGTTCATAATTCGAGAGGGATAAATAAGGAAGTCTCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CATACTGTGGAGTTAGACTCAAACAAGTATTAAGCTCTCCCTATTTATTCCTTCAGAGAC
M T P Q S E F V H N S R G I N K E V S V -

TGTACAAAAGAAAACCTACCTCATATAAATCTTGCATTTTTCCGTGAGAGAGAAAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
ACATGTTTTCTTTTGATGGAGTATATTTAGAACGTAAAAAGGCACTCTCTCTTTTTTTTT
Y K R K L P H I N L A F F R E R E K K T -

CCCTGAAAAACTGAGTAAGGCAATAATTTXCTCATAACAATGTCAATCATATGTAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GGGACTTTTTGACTCATTCCGTTATTAAXGGAGTATTGTTACAGTTAGTATACATTTT
L K N * V R Q * F ? L I T M S I I C K I -

TAATCTTGTGGTGCTACTGAGTTGGACATCGATGGTATCGTCAACATTATTTACAGACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
ATTAGAACAACCACGATGACTCAACCTGTAGCTACCATAGCAGTTGTAATAAATGTCTGG
I L L V L L S W T S M V S S T L F T D R -

GAAAGTGGTGTGGACGTGCCGATAAGACTTTTTGGTCCTTCACGGTCGCTAGGAGGAGGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CTTTCACCACACCTGCACGGCTATTCTGAAAACCAGGAAGTGCCAGCGATCCTCCTCCAC
K W C G R A D K T F G P S R S L G G G V -

TTGGTGATTGCTGCAGAAGTCATGACAGCTGTGGCCGCATGATTAAACCAGGAGAGACTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AACCCTAACGACGTCTTCAGTACTGTGACACCGGCGTACTAATTGGTCCTCTCTGAA
G D C C R S H D S C G R M I K P G E T Y -

12. ábra (1.folyt.)

ATGGAGATGTTACGAATAAAGGATTTTCAAATATTTGGGAATGCCGATGTGACTATGCAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 TACCTCTACAATGCTTATTTTCCTAAAAGTTTATAAACCCCTTACGGCTACACTGATACGTA
 G D V T N K G F S N I W E C R C D Y A F -

 TTTTCAATGTCTTCAGCGTTCCAATGGTAAAATGAAAAATGTTGTGGAAATATTGCATT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 AAAAAGTTACAGAAGTCGCAAGGTTACCATTTTACTTTTACAACACCTTTATAACGTAA
 F Q C L Q R S N G K M K N V V E I L H F -

 TTGACGTTGTCAATACACCCTGTTACTTCATGAAAGATGGCCGTGCTAAAATAACACCCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 AACTGCAACAGTTATGTGGGACAATGAAGTACTTTCTACCGGCACGATTTTATAGTGGGG
 D V V N T P C Y F M K D G R A K I S P H -

 ATACTGTATATGATAAACACGAATCACTCTATCAACTTATACTACACAAAGATAATTTTA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TATGACATATACTATTTGTGCTTAGTGAGATAGTTGAATATGATGTGTTTCTATTAAAT
 T V Y D K H E S L Y Q L I L H K D N F K -

 AGGAGTGGGTGCATGATAATGCTCTTCTCCCGCAAGAGCTGGGGATTAAAGATGAGCATG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 TCCTCACCCACGTACTATTACGAGAAGAGGGCGTTCTCGACCCCTAATTTCTACTCGTAC
 E W V H D N A L L P Q E L G I K D E H V -

 TGTGGGAGACACTGATGGCATGGATGGACTTTAGATTTCCAACTGAATAATAAATATTCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 ACACCCTCTGTGACTACCGTACCTACCTGAAATCTAAAGGTTGACTTATTATTATAAGG
 W E T L M A W M D F R F P T E * * I F Q -

 AAATACAGATATCCTTTTGATAAAATGTCGTAAACATGATTGTTTAGATGAATGGTAAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 TTTATGTCTATAGGAAAACCTATTTTACAGCATTGTACTAACAATCTACTTACCATTTA
 I Q I S F * * N V V N M I V * M N G K L -

 TAATGAAAAGATTGATTGAAAATGTCTGAAGTAACTXXXGGATXXGACATATAATATATA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 ATTACTTTTCTAACTAACTTTTACAGACTTCATTGAXXXCCTAXXCTGTATATTATATAT
 M K R L I E N V * S N ? ? ? ? H I I Y N -

Dr. Jaisovszky Györgyné
 ürvéd
 1093 Budapest, Kozraktár u. 24.
 Tel.: 218-4148 Fax: 218-4506

14. ábra

1 CACGCCTACT TAGATAATTT CTCAATTCTT TGCAAATTAT GAAATAAGTG
51 CAAGAGATGT GTATGACACC TCAATCTGAG TTTGTTTCATA ATTTCGAGAGG
101 GATAAATAAG GAAGTCTCTG TGTACAAAAG AAAACTACCT CATATAAATC
151 TTGCATTTTTT CCGTGAGAGA GAAAAAAAAA CCCTGAAAAA CTGAGTAAGG
201 CAATAATTTT CCCTCATAAC AATGTCAATC ATATGTAAAA TAATCTTGTT
251 GGTGCTACTG AGTTGGACAT CGATGGTATC GTCAACATTA TTTACAGACC
301 GAAAGTGGTG TGGACGTGCC GATAAGACTT TTGGTCCTTC ACGGTCGCTA
351 GGAGGAGGTG TTGGTGATTG CTGCAGAAGT CATGACAGCT GTGGCCGCAT
401 GATTAAACCA GGAGAGACTT ATGGAGATGT TACGAATAAA GGATTTTCAA
451 ATATTTGGGA ATGCCGATGT GACTATGCAT TTTTTC AATG TCTTCAGCGT
501 TCCAATGGTA AAATGAAAAA TGTTGTGGAA ATATTGCATT TTGACGTTGT
551 CAATACACCC TGTTACTTCA TGAAAGATGG CCGTGCTAAA ATATCACCCC
601 ATACTGTATA TGATAAACAC GAATCACTCT ATCAACTTAT ACTACACAAA
651 GATAATTTTA AGGAGTGGGT GCATGATAAT GCTGGAACTC TTCTCCCGCA
701 AGAGCTGGGG ATTAAAGATG AGCATGTGTG GGAGACACTG ATGGCATGGA
751 TGGACTTTAG ATTTCCAAC GAATAATAAA TATTCCAAAT ACAGATATCC
801 TTTTGATAAA ATGTCGTAAA CATGATTGTT TAGATGAATG GTAAATTAAT
851 GAAAAGATTG ATTGAAAATG TCTGAAGTAA CTTTGGATT TTACATATAA
901 TATATAATAT TTGCCTTATT TGATAAACTT CTAAATTAAA AAAGAAAAAG
951 GAGGAGGAGT AGGAGGAGGA TTAGGATATT TTACAAGGAT TTTAAAAATA
1001 ATTAAACAAT TAGATCTTCT GTAAATTGAT TGATCATGTA TTAAATACAA
1051 TAACATCTCG TTCTCATAGT ACAATGAAAA AGAACATAAC AGTATGCACA
1101 AAAATAATGA CGGTAAATAT CTATGTATGT ATGTAGAGAG AAGAAAATAA
1151 AAATAGTTAG ACAGGTACCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
1201 A

1 MSIICKIILL VLLSWTSMVS STLFTDRKWC GRADKTEGFS RSLGGGVGDC
51 CRSHDSCGRM IKPGETYGDV TNKGFSNIWE CRCDYAFFQC LQRSNGKMKN
101 VVEILHFDVV NTPCYFMKDG RAKISPHTVY DKHESLYQLI LHKDNFKEWV
151 HDNAGTLLPQ ELGIKDEHVW ETLMAWMDFR FPTE*

P 9702019

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

2018.05.07

18/17

15. ábra

? (T)

G	I	A	Q	D	V	G	H	A	A	H	S	F	T	K
ATT	GCT	CAA	GAT	GTT	GGT	CAT	GCT	GCT	CAT	TCT	TTC	ACT	AAA	
C	C	G	C	C	A	C	C	C	C	AGC	T	C	G	
A	A			A	A		A	A		G		A		
	G			G	G		G	G		A		G		

(H)

(G)

V	H	N	P	G	N	F	R
GTT	CAT	AAT	CCA	GGT	AAT	TTC	AGA
C	C	C	C	A	C	T	C
A			G	C			C
G			T	G			G

16. ábra

GTGCACAATCCAGGAACTTCCGAGTCTCCAAATGTGTATGCGACATTGCGCTCAAGGAGTGCC
TCACTACTCATCCTGAAATGAGTTTCAAATTTGTTAAAGCACTCTTTTTTGATTGCTTGCTCC
ACCCTGTTTTGATCAGATTGCTGATTGGGGTAAGAAAAAATTGAAAAATAAGCAGGCATTTTCA
CTGCATGATTTACAATCAGCTGCCCCACGCGCTCTGGCAAACACTCTATGACGCTGTCAAGGGCA
TAGCTCAAGATGTCGGCCA

Dr. Jaisovszky Györgyné
1093 Budapest, Központ u. 24.
Tel.: 218-4148 Fax.: 218-4506

158/1040

AAAAGACTAAAAATAAGAAAAAAACATAGAAGAATGTTTACAATAATTTATATTTTAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTCTGATTTTATTCTTTTTTTTTTGTATCTTCTTACAAATGTTATTAAATATAAAAAAT
K T K N K K K K H R R M F T I I Y I F K
AACTTTTCATTTCTATTAGTTCCGTGCTGGAGTTTTTCAACCTACGCTGGGTATGGTGAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGAAAGTAAAGATAATCAAGGCACGACCTCAAAGTTGGATGCGACCCATACCACTTA
L S F L L V P C W S F S T Y A G Y G E Y
ATAATCGGTCCATTACTAAGCGACAGATGGACGATGGTGAGACGTGCGAAAGGTGTTTGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATTAGCCAGGTAATGATTCGCTGTCTACCTGCTACCACTCTGCACGCTTTCCACAACT
N R S I T K R Q M D D G E T C E R C L N -
ATCCACTCGAATTAGTAAATGACGCTGTAGACTCGTGCATTGAAGCTCATGAGGAATGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGGTGAGCTTAATCATTACTGCGACATCTGAGCACGTAACCTCGAGTACTCCTTACAC
P L E L V N D A V D S C I E A H E E C E -
AGGAATTCATTGAAGGCGGGATGGAAATGCTTCATGTACACAATCCAGGAACTTCCGAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCTTAAGTAACTTCCGCCCTACCTTTACGAAGTACATGTGTTAGGTCTTTGAAGGCTC
E F I E G G M E M L H V H N P G N F R V -
TCTCCAAATGTGTATGCGACATTGCGCTCAAGGAGTGCCTCACTACTCATCCTGAAATGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAGGTTTACACATACGCTGTAACGCGAGTTCCCTCACGGAGTGATGAGTAGGACTTTACT
S K C V C D I A L K E C L T T H P E M S -
GTTTCAAATTTGTTAAAGCACTCTTTTTTGATTTGCTTGCTCCACCCTGTTTTGATCAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAAAGTTTAAACAATTTTCGTGAGAAAAAACTAAACGAACGAGGTGGGACAAAAGTAGTCT
F K F V K A L F F D L L A P P C F D Q I -
TTGCTGATTGGGGTAAGAAAAAATTGAAAAATAAGCAGGCATTTTCACTGCATGATTTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACGACTAACCCCATTTCTTTTTTAACTTTTTTATTCGTCCGTAAAAGTGACGTACTAAATG
A D W G K K K L K N K Q A F S L H D L Q -
AATCAGCTGCCCACGCGCTCTGGCAAACACTCTATGACGCTGTCAAGGGCATAGCTCAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAGTCGACGGGTGCGCGAGACCGTTTGTGAGATACTGCGACAGTTCCCGTATCGAGTCC
S A A H A L W Q T L Y D A V K G I A Q D -
ATGTCGGACATGCTGCACATTCTTTTGAAAAAATGTTACAGTAACAGTTAAATATGAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACAGCCTGTACGACGTGTAAGAAAACTTTTTTACAATGTCAATTGTCAATTTATACTTTT
V G H A A H S F E K M L Q
AGGTCCATGATAGTAGAATACAGTTATTGTTGTATAAATAAATAATATATTCAGAAATGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCAGGTACTATCATCTTATGTCAATAACAACATATTTTATTATTATATAAGTCTTACTA
AAAAAAA
----- 669
TTTTTTTTT