



H U 0 0 0 2 1 8 0 4 1 B

(19) Országkód

HU

MAGYAR
KÖZTÁRSASÁGMAGYAR
SZABADALMI
HIVATALSZABADALMI
LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

218 041 B

- (21) A bejelentés ügyszám: P 94 03209
(22) A bejelentés napja: 1993. 05. 07.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01
(30) Elsőbbségi adatok:
9209993.6 1992. 05. 08. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 93/00943
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 93/23542

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/30

C 12 N 15/62

C 12 N 9/64

C 07 K 9/00

C 07 H 13/04

A 61 K 39/00

- (40) A közzététel napja: 1996. 02. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 05. 29.

(72) Feltalálók:

Graham, Margaret, Linton, Cambridgeshire (GB)
Knox, David Patrick, Cockenzie, Hampshire (GB)
Munn, Edward Albert, Fulbourn, Cambridgeshire (GB)
Newton, Susan Elizabeth, Strathmore, Victoria (AU)
Oliver, Joanna, Jane, Edinburgh, Skócia (GB)
Smith, Trevor Stanley, Linton, Cambridgeshire (GB)

(73) Szabadalmaz:

The Biotechnology and Biological Sciences
Research Council, Cambridge, Cambridgeshire (GB)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

- (54) **Aminopeptidáz-enzimeket kódoló DNS-molekulák, a DNS-molekulákat tartalmazó vektorok és transzgenikus sejtek, a DNS-molekulák által kódolt immunogén polipeptidek, ezeket tartalmazó bélféreg elleni oltóanyag-készítmények, és eljárás a polipeptidek előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgyát elősködő bélférgekből származó amino-peptidázokat vagy azok immunválaszt kiváltó részeit kódoló nukleinsavszakaszok, ezeknek megfelelő polipeptidek képezik, továbbá egy eljárás a találmány szerinti polipeptidek gazdasejtekkel történő termeltetésére. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti nukleotidszekvenciákat tartalmazó klónozó- és expressziós vektorok, transzgenikus sejtek és transzgenikus szervezetek.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti immunogén polipeptideket tartalmazó bélféreg elleni oltóanyag-készítmények is.

A találmány tárgyát képezik továbbá a H110D-fehérje egyedi és szokatlan glikolizációs mintázatban található oligoszacharidmolekulák, melyek az állatok glikoproteinjeiben általában fellelhető α -1,6-kötéssel rendelkező fukóz helyett, α -1,3-kötéssel rendelkező fukózt tartalmaznak.

A találmány tárgyát elősködő bélférgekből származó aminosavpeptidázokat vagy azok immunválaszt kiváltó részeit kódoló nukleinsavszakaszok, ezeknek megfelelő polipeptidek képezik, továbbá egy eljárás a találmány szerinti polipeptidek gazdasejtekkel történő termeltetésére. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik klónozó- és expressziós vektorok, valamint transzgenikus sejtek és szervezetek, melyek találmány szerinti nukleotidszekvenciákat tartalmaznak.

A találmány tárgyát képező eljárás rekombináns aminosavpeptidáz-enzimeknek vagy azok immunogén fragmenteinek az eddigieknél nagyobb mennyiségben történő előállítását teszi lehetővé, amivel lehetőség nyílik feregellenes oltóanyagok előállítására.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti immunogén polipeptideket tartalmazó oltóanyag-készítmények is.

A találmány tárgyát képezik továbbá a H110D-fehérje egyedi és szokatlan glikolizációs mintázatban található oligoszacharidmolekulák, melyek az állatok glikoproteinjeiben általában fellelhető α -1,6-kötéssel rendelkező fákóz helyett, α -1,3-kötéssel rendelkező fukózt tartalmaznak.

Az elősködő bélférgek a háziállatok megbetegedéseinek széles skálájáért felelősek. Ezek a betegségek gazdasági szempontból igen jelentősek, amennyiben termelésekiesést, sőt elhullást okoznak. Így például a *Haemonchus* nevű fonálféreg a kérődzők gyomor-bél szakaszának nyálkahártyáját fertőzi, vért szív, vérszegénységet, súlyvesztést okoz és ha a fertőzést nem kezelik, az gyakran az állat elpusztulásához vezet. A rokon, de nem vérszívó *Ostertagia* fonálféreggel fertőzött állatok szintén legyengülnek és elpusztulhatnak. Egyéb, gazdasági jelentőségű bélféregcsoportok például a *Trichostrongylus* és a *Nematodirus*, melyek különféle állatokban bélgyulladást okoznak, valamint a szívóférgek vagy mótelyek (*Trematodes*).

Más fonálférgek, mint a horgasfejű férgek (például *Necator*, *Ancylostoma*, *Uncinaria* és *Bunostomum* fajok), valamint a mótelyek (például *Fasciola*, *Paramphistomum* és *Dicrocoelium*) és rokonaik a kérődzők és kedvtelésből tartott állatok mellett az embert is fertőzik, nem ritkán végzetes következményekkel.

A bélférgek elleni védekezés jelenleg a legelők megfelelő kezelésén és feregűző szerek használatán alapul. Ezen eljárásoknak azonban számos hátrányuk van – a gyógyszerek gyakori adása és a legelők kezelése sokszor gyakorlati szempontból hátrányos, és a gyógyszereknek ellenálló, rezisztens feregűzők egyre jobban terjednek.

Ennek alapján a szakterületen belül igény mutatkozik hatékony feregellenes oltóanyagra, vakcinára, és az utóbbi években számos próbálkozás történt ez ügyben. Mindazonáltal jelenleg sincs kereskedelmi forgalomban semmilyen fontos feregűző elleni molekuláris vagy alegység-oltóanyag, különösen a kérődzők bélférgei, mint a *Haemonchus* és az *Ostertagia* ellen nincs elérhető vakcina.

A legígéretesebb eredményeket a *Haemonchus*-ból elkülönített új fajta fehérjékkel lehet elérni, melyek nemcsak a *Haemonchus*, hanem egy sor más bélféreg

ellen is védenek. Különösen a H110D jelű kettős fehérje, amely a *H. contortus* bélcsatornájának belső felszínén található, mutatkozik hatékonyan a juhok haemonchiozisének megelőzésében.

A *H. contortus*-ból nyert H110D molekulatömege mintegy 110 kilodalton (kD) redukáló és nem redukáló körülmények között egyaránt, amint az SDS-PAGE-módszerrel meghatározható, a WO 88/00835 és WO 90/11086 számú nemzetközi közzétételi iratokban leírtak szerint. A továbbiakban H110D alatt a WO 88/00835 és WO 90/11086 számú nemzetközi közzétételi iratokban meghatározott H110D kettős fehérjét értjük. Hasonló fehérjéket újabban más feregűzőkben, például a *Necator americanus*-ban is találtak.

A H110D tisztítására számos módszert ismertet a WO 88/00835, mely módszerek elégségesek a fehérje jellemzésére, és a fehérje kísérleti, valamint kereskedelmi célú termeléséhez üzemeshető. Mindazonáltal szükség van olyan forrásra, amelyből nemcsak H110D-t, hanem hasonló antigénfehérjéket is kényelmesen lehet kinyerni. Különösen előnyösek a rekombináns DNS-technológián és a megfelelően transzformált eukarióta vagy prokarióta szervezetekben történő fehérjetermelésen (expresszió) alapuló eljárások.

A jelen találmány tárgya egy ilyen javított eljárás. A *H. contortus*-ból nyert H110D–cDNS bázissorrendjét meghatározva, a következtetett aminosavsorrend homológiát mutat az integrális membrán-aminopeptidázokkal [hivatalos elnevezés: α -aminoacil-peptidhidroláz (mikroszomális)].

Az emlősök integrális membrán-aminopeptidázai számos szövetben megtalálhatók, például a bélbolyhokban vagy a vesében. Szerepük a vesében nem tisztázott, de a bélben az emésztés végtermékeit képező kisebb peptideket hasítják (összefoglaló közlemények: Kenny és Maroux, 1982; Kenny és Turner, 1987; Noren és munkatársai, 1986; Semenza, 1986).

A találmány tárgyát képezik tehát egyfelől nukleinsavmolekulák, melyek egy vagy több olyan nukleotidszekvenciát tartalmaznak, amelyek bélférgek aminopeptidázait vagy azok antigén fragmenteinek kódolják, és megfelelnek a 2., 3., 4. és 5. ábrán látható, 1–15. és 19–21. azonosító számú szekvenciák egészének vagy valamely részének, illetve olyan szekvenciáknak, melyek lényegében homológok vagy hibridizálnak a fenti szekvenciákkal.

A találmány tárgyát képező nukleinsav tehát lehet egy- vagy kétláncú DNS, cDNS vagy RNS.

Az aminopeptidáz-kódoló nukleotidszekvenciák különbözőzhetnek egy feregűzőn belül törzsenként, a fereg életciklusának megfelelően (például lárv- és felnőttállapot), különböző lelőhelyekről származó hasonló törzsek között, sőt ugyanazon feregűzőn belül is. Mindezen variánsok a jelen találmány tárgyát képezik.

A „lényegében homológ” kifejezés, ahogyan a leírásban használjuk, magában foglalja a körülbelül 50%-os vagy jobb egyezést (például 60%) a szekvenciák között, valamint a funkcionálisan egyenértékű allélikus variánsokat, továbbá a rokon szekvenciákat, melyek egyetlen vagy többszörös bázishelyettesítés, hozzáadás vagy delé-

ció eredményei. A „funkcionálisan egyenértékű” kifejezés olyan nukleinsavszekvenciákat jelöl, amelyek hasonló immunreaktivitású, feregfertőzés ellen védő ellenanyagválaszt kiváltó, aminosavszekvenciájú polipeptidázokat kódolnak.

Szintén a találmány tárgyát képezik olyan nukleinsavmolekulák, amelyek hibridizálnak a 2., 3., 4. és 5. ábrán látható szekvenciákkal (szekvenciaazonosító szám 1–15 és 19–21), valamint bármely lényegében homológ vagy funkcionálisan egyenértékű variánsuk. A „hibridizál” kifejezés a jelen találmányi leírás vonatkozásában olyan szekvenciákra vonatkozik, amelyek a leírt szekvenciákhoz kötődnek nem sztringens ($6 \times \text{SSC}/50\%$ formamid, szobahőmérséklet) vagy kevésbé sztringens körülmények között ($2 \times \text{SSC}$, szobahőmérséklet, vagy előnyösebben $2 \times \text{SSC}$, 42°C), avagy nagyon sztringens körülmények között ($2 \times \text{SSC}$, 65°C) ($\text{SSC} = 0,15 \text{ mol/liter NaCl}$, $0,015 \text{ mol/liter nátrium-citrát}$, $\text{pH} = 7,2$).

Az ilyen rokon szekvenciák létrehozására szolgáló módszerek a technika állása szerint közismertek, például a helyspecifikus mutagenézis, a véletlenszerű (*random*) mutagenézis, a nukleinsavak enzimatis hasítása és összekapcsolása (*ligálása*). Ugyancsak közismertek azok a módszerek, melyek segítségével eldönthető, hogy az így módosított nukleinsav mutat-e jelentős homológiát a kérdéses szekvenciával; ilyen módszer például a hibridizálás.

A találmány tárgyát képező eljárás tehát rekombináns aminosavszekvenciákhoz vagy azok immunogén fragmenseinek az eddigieknél nagyobb mennyiségben történő előállítását teszi lehetővé, amivel lehetőség nyílik feregellenes oltóanyagok előállítására.

Másfelől a találmány tárgyát képezik olyan nukleinsavmolekulák, amelyek egy vagy több olyan, polipeptidkódoló nukleotidszekvenciát tartalmaznak, mely polipeptidok képesek bélféreg-élősködők ellen védő ellenanyagok termelését kiváltani, és amely szekvenciák a 2., 3., 4. vagy 5. ábrák (szekvenciaazonosító szám: 1–5 és 19–21) valamelyikén bemutatott aminosav-

dáz-kódoló szekvenciákban található egy vagy több antigén-determináns régiót tartalmaznak. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti nukleinsavmolekulák előállítására szolgáló eljárások is.

5 A találmány tárgyát képezik továbbá olyan szintetikus polipeptidok, amelyek tartalmaznak egy aminosavszekvenciát – vagy annak egy antigén-determináns részletét – megfelelő aminosavszekvencia-részletet, amely szekvenciárészlet lényegében azonos a 2., 3., 4. vagy 5. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciák (szekvenciaazonosító szám: 1–15 és 19–21) valamelyike által kódolt aminosavszekvencia egészével vagy annak valamely részletével, vagy az aminosavszekvencia funkcionálisan ekvivalens variánsának megfelelő szekvenciát tartalmaz, kivéve a H110D kettős fehérjének megfelelő szintetikus polipeptidet, valamint azokat a polipeptideket, melyek megfelelnek a WO 90/11086 számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt bármely egyedi polipeptidszekvenciának.

20 Más szemszögből a találmány tárgyát képezik olyan szintetikus polipeptidok, amelyek tartalmazzák egy vagy több aminosavszekvenciát vagy ezek egy vagy több immunogénrészletének aminosavsorrendjét, mely sorrendek a 2., 3., 4. vagy 5. ábrák (szekvenciaazonosító szám: 1–15 és 19–21) valamelyikén bemutatott nukleotidszekvenciák valamelyikének egészen vagy részben megfelelnek, vagy ezekkel funkcionálisan egyenértékűek, és lényegében mentesek a *Haemonchus contortus* más alkotóelemeitől.

30 A találmány tárgyát képezik továbbá emberben vagy állatban a bélféreg elleni immunválaszt segítő, legalább egy fentebb ismertetett polipeptidet tartalmazó oltóanyag-készítmények a gyógyszerkészítmények előállításánál szokásosan alkalmazott hordozó- és/vagy egyéb segédanyagokkal együtt.

35 A WO 90/11086 számú nemzetközi közzétételi irat számos, a H110D kettős fehérje proteolitikus emésztésével nyert polipeptid- vagy részleges polipeptidszekvenciát feltár, amint az itt látható:

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

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

Egyes, bizonytalanul meghatározott aminosavakat a Phe/Gly-hez hasonló formában jelöltünk, ahol az első három betű a valószínűleg helyes aminosav (a jel erősségéből ítélve), vagy egy kérdőjellel; a kötőjel ismeretlen aminosavat jelez.

A WO 09/11086. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt egyedi polipeptidszekvenciák nem képezik a jelen találmány tárgyát.

A „polipeptid” kifejezés jelen értelmében magában foglalja a teljes hosszúságú fehérjét és a rövidebb pep-tidszekvenciákat is.

50

A fentiekkel kapcsolatban használt „funkcionálisan egyenértékű” kifejezés olyan polipeptidet jelöl, amelyik a fent említett polipeptidszekvenciákkal rokon, vagy azokból származik úgy, hogy az aminosavsze-kvenciát egy vagy több aminosav kicserélésével, hozzá-adásával vagy kihagyásával módosítjuk, továbbá olyan szekvenciákat, ahol az aminosavakat kémiai úton módo-sítjuk, beleértve a glikozilálást és deglikozilálást, mely szekvenciák azonban megtartják védő immunogén tulaj-donságaikat. Ilyen funkcionálisan egyenértékű varián-sok keletkezhetnek természetes biológiai változékon-

55

60

ság okán, vagy létrehozhatók ismert eljárások alapján. Például rekombináns peptidok esetén használhatóak a helyspecifikus mutagenézis, a véletlenszerű mutagenézis és az aminosavak enzimátikus hasításának és összekapcsolásának (ligálásának) módszerei.

Általában a találmány tárgyát képező polipeptidok védőhatású immunogén peptidok. A „védőhatású” kifejezés itt azokat az antigéneket jelöli, amelyek a gazdaszervezetben immunválaszt váltanak ki, amely immunvégrehajtó molekulák, ellenanyagok és sejtek képződésével jár, mely utóbbiak a parazitát jelölik, gátolják, károsítják vagy terméketlenné teszik, és ezáltal a gazdaszervezetet a klinikai és szubklinikai betegségtől, valamint a termelékenységcsökkenéstől megvédik. Az ilyen védőhatású immunválasz általában ellenanyagok keletkezését eredményezi, mely ellenanyagok képesek a parazita anyagcsere-folyamatait gátolni, ezáltal növekedését leállítani, petetermelését meggátolni és/vagy a parazitát megölni.

A találmány tárgyát képező szintetikus polipeptidok többek között valamely gazdasejtben lehet termelni olyan rekombináns DNS-molekula segítségével, amely tartalmazza a fent ismertetett nukleotidszekvenciát valamely alkalmas expressziószabályozó szekvenciához kötve, vagy rekombináns DNS-klónozó vektorban. Más eljárás szerint a polipeptidet a találmány szerinti natív DNS-molekulának a gazdasejtbe történő közvetlen injektálásával is expresszálhatjuk.

Az ilyen módon termeltetett (expresszált) fehérje lehet fúziós fehérje, mely tartalmazza valamely aminosav-aminopeptidáz-enzim teljes vagy részleges immunogenitást mutató valamely szakaszát, és egy további polipeptidet; ez utóbbit az a DNS kódolja, amelyekhez a kérdéses szakaszt kötöttük. Példának okáért előnyös lehet olyan fúziós fehérjét termeltetni, amelyik valamely aminosav-aminopeptidázból vagy a találmány szerinti más polipeptidból és egy másik fehérjéből, például β -galaktozidázból, foszfatazból, glutation-S-transzferázból, ureázból, hepatitis-B-core-antigénből (Francis és munkatársai, 1989) vagy hasonló fehérjéből áll. A legtöbb fúziós fehérje olyan rekombináns gén expressziója során keletkezik, mely génben két kódolószekvenciát fuzionáltak úgy, hogy a *reading frame*-ek, azaz a fehérjekódoló szakaszok azonos fázisban legyenek.

Más eljárás szerint a polipeptideket *in vitro* vegyi úton lehet összekötni. Minden ilyen, aminosav-aminopeptidázokat kódoló nukleinsavszakaszokból vagy az ezeknek megfelelő aminosavsorrendekből származó fúziós vagy hibrid termék a találmány tárgyát képezi. Megfelelő rekombináns DNS- és fehérjetermelítési eljárásokat például Sambrook és munkatársai írtak le 1989-ben. Más eljárás szerint a szintetikus polipeptideket vegyi úton is elő lehet állítani, például a közismert Merrifield-féle szilárd fázisú módszerrel.

A találmány tárgya továbbá valamely fent ismertetett nukleinsavmolekula, szintetikus peptid vagy polipeptid alkalmazása oltóanyag- (vakcina-) készítmények előállítására, mely oltóanyagok alkalmasak emberben vagy állatban a belférges elleni immunválasz serkentésére.

Más szempontból a találmány tárgyát képezik olyan eljárások, melyek alkalmasak emberben vagy állatban, előnyösen emlőállatban a belféregfertőzések elleni immunválasz serkentésére. Az eljárás szerint az állatnak a fentiekben ismertetett nukleotidszekvencia által meghatározott polipeptidet tartalmazó oltóanyag-készítményt adunk.

A találmány szerinti oltóanyag-készítményt az oltóanyagiparban közismert eljárásokkal lehet előállítani. Hagyományos oltóanyagok a találmány szerinti egy vagy több polipeptidet tartalmazhatnak egy vagy több megfelelő adjuvánssal együtt, mint például az alumínium-hidroxid, szaponin, QuilA vagy ezek tisztítottabb formái, muramil-dipeptid, ásványi olajok vagy Novasome a gyógyszerkészítmények előállításánál szokásosan alkalmazott hordozó- és/vagy egyéb segédanyagokkal együtt. Az alkalmas hordozóanyagok közé tartoznak folyékony közegek, például peptidok vagy polipeptidok betegbe juttatására alkalmas sóoldatok. Egyéb alkotórészek, mint például konzerválószerkezők szintén használhatók.

Alternatív oltóanyag-készítmények valamely vírus vagy gazdasejtet tartalmazhatnak, például valamely mikroorganizmust (például vakcinavírus, adenovírus, *Salmonella*), amelybe a találmány tárgyát képező nukleinsavat (például DNS-t) építettünk be annak érdekében, hogy a beépített nukleinsavmolekula által kódolt polipeptidok elleni immunválaszt serkentse.

Az oltóanyag-készítmény beadása történhet hagyományos úton (például szájon át) vagy parenterálisan (például izomba adott injekcióval), szükség szerint többször bizonyos idő elteltével, például kétszeri injekcióval 7–28 nap különbséggel.

Mint fentebb már említettük, a 2., 3., 4. és 5. ábrán látható nukleotidszekvenciák aminosavmegfelelői homológiát mutatnak az integrális membrán-aminopeptidázok családjával. Ezt különféle nyilvános adatbázisokban való kereséssel határoztuk meg, a „Genetics Computer Group Sequence Analysis” számítógépes programcsomag segítségével (Devereux és munkatársai, 1984). Két ilyen összehasonlítást mutat a 6. ábra.

A találmány szerinti aminosav-aminopeptidáz kódoló szekvenciák expresszióját, mint azt fentebb taglaltuk, ismert eljárások és expressziós rendszerek egész sora segítségével lehet elérni; prokarióta sejtekben, mint például az *E. coli*; vagy eukarióta sejtekben, mint például az élesztő, avagy a baculovírus-rovarsejtrendszer; továbbá transzgenikus állatokban és növényekben. Különösen előnyösen lehet a nukleotidszekvenciákat transzgenikus fonalférgekben, például *Caenorhabditis*-ben expresszáltatni (például Fire, 1986; Fire és munkatársai, 1989; Spieth és munkatársai, 1988; Han és munkatársai, 1990).

A találmány tárgya továbbá a fentebb ismertetett szintetikus polipeptidok készítésére szolgáló eljárás, mely szerint a fentebb ismertetett nukleinsavmolekulák valamelyikét tartalmazó eukarióta vagy prokarióta sejtet olyan körülmények között tenyésztjük, ahol a fenti polipeptid expresszálódik, majd az így termeltetett polipeptidet kinyerjük, vagy a polipeptidet kémiai szintézissel előállítjuk.

A találmány tárgyát képezik továbbá klónozó és expressziós vektorok, melyek a találmány szerinti nukleotidszekvenciákat tartalmaznak. Az ilyen expressziós vektorok tartalmazznak még szabályozóelemeket, például translációs (például start- és stopkodonok) és transzkripció (például promoter-operátor régiók, riboszóma-kötőhelyek, terminátorszekvenciák) szabályozóelemeket a találmány szerinti nukleinsavmolekulákkal azonos leolvasási fázisban.

A találmány szerinti vektorok között lehetnek plazmidok és vírusok (bakteriofágok és eukarióta vírusok egyaránt) a technika állása szerint közismert eljárásoknak megfelelően; a vektorokat számos különböző expressziós rendszerben lehet kifejeztetni, ezek szintén közismertek a technika állása szerint. Az alkalmas vírusvektorok között lehetnek, mint azt fentebb említettük, a baculovírus, adenovírusok és vacciniavírusok. Számos egyéb virális vektor is ismert a technika állása szerint.

Sokféle eljárás ismert és használható az ilyen vektorok bejuttatására prokarióta vagy eukarióta sejtekbe expresszió céljából, vagy csírasejtekbe, illetve szomatikus sejtekbe transzgenikus állatok létrehozása céljából. Alkalmas transzformáló és transzfektáló eljárások megfelelő leírásait az irodalom tartalmazza.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti nukleinsavmolekulákat tartalmazó transzformált vagy transzfektált eukarióta vagy prokarióta gazdas sejtek és transzgenikus szervezetek.

Az eukarióta expressziós rendszereknek általában, a fonalféregexpressziós rendszereknek pedig különösen előnyük, hogy a transláció utáni módosítások, különösen a glikozilálás végbemehet – a transzgenikus fonalféreg esetében várhatóan a természetes fehérjének megfelelő módon. Ez a találmány szerinti megoldás egy igen fontos eleme, hiszen számos esetben a rekombináns fehérjetranszláció utáni módosítása (*processing*) az optimális biológiai aktivitáshoz nélkülözhetetlen.

Az emlőssejtek expressziós rendszerei szintén számos előnnyel bírnak. Az emlős-gazdasejtek az antigén természetes formáját és védő epitópjait jól reprodukálják, hiszen az eukarióta expressziós rendszer által biztosított glikolizációs mintázatok, diszulfidhidak és más transláció utáni módosítások közelebb állnak az eredetiekhez, mint az *E. coli*-ban, amely sokszor oldhatatlan, rossz szerkezetű, a természetes formát rosszul leképező fehérjét termel. Emellett az emlőssejtben történő glikolizáció kevésbé valószínű, hogy immunválaszt vált ki, amely a védőhatású immunválasztól eltéríti a szervezetet. Emberek és háziállatok védelmére ezért előnyös emberi vagy állati eredetű fibroblasztsejtek használata, mint például a HeLa – emberi sejtvonal; BHK – baby hamster kidney cells=újszülött hősögvesesejtek; VERO – egy majomsejtvonal; FR3T3 – Fisher-patkány fibroblasztjai; NIH3T3 – egy egér-fibroblasztvonal; C127I – egy egér-embriósejtvonal; CV-1 – afrikai zöld majomból származó vesefibroblasztok; 3T6 – egérembrío-fibroblasztok; L-sejtek, egy egérsejtvonal; CHO – egy aranyhősög-petefészek-sejtvonal; NSO, NS1, Sp2 és más egérmielóma-sejtvonalak, valamint patkánymielóma-sejtvonalak, például az YB2/0 és az Y3.

Az különféle emlőssejtvonalakhoz alkalmazható vektorok a technika állása szerint jól ismertek. Általában ezek valamilyen promotert és/vagy enhanszert tartalmaznak az antigént vagy annak fragmensét kódoló nukleotidszekvenciához kapcsolva. Az alkalmas promoterek közé tartozik az SV40 korai és késői promotere, például a PSVL jelű vektorban; a citomegalovírus-promoter, az egér-metallotionein-I-promoter és az egér-embriósejt vírus hosszú, terminális ismétlődést tartalmazó szakasza. A vektor előnyösen valamilyen alkalmas jelzőmolekulát, markert is tartalmaz, mint például a dihidrofolát-reduktáz vagy a glutamin-szintetáz génjét. Ilyen típusú vektorok leírásait a WO 086/05807, WO 87/04462, WO 89/01036 és WO 89/10404 számú közzétételi iratokban találhatjuk meg.

A gazdasejtek *transzfekcióját*, átfertőzését közismert eljárásokkal lehet megoldani, például kalcium-foszfát, DEAE-dextrán, polibrén segítségével, protoplasztfúzióval, liposzómákkal, közvetlen mikroinjekcióval, gényágyúval vagy elektroporációval. Az utóbbi a legelőnyösebb; emlőssejtvonalak elektroporációs transzfekcióját Andreason és munkatársai írták le 1980-ban. Általában a lineáris DNS-t könnyebb bevinni, mint a cirkulárisat.

A H110D-fehérje esetében egyedi és szokatlan glikolizációs mintázatot találtunk, melynek szerepe lehet az immunreaktivitásában, hiszen számos, a *Haemonchus*-ból származó H110D-vel reagáló monoklonális ellenanyag szénhidratepitópot ismer fel, mely epitópok fontosak lehetnek használható oltóanyagok kifejlesztésénél.

A *Haemonchus*-ból származó H110D esetében a következő glikolizációs mintázatot ismertük fel:

i) az oligoszacharidok körülbelül 65%-a N-kötött, a maradék O-kötött;

ii) az N-kötött oligoszacharidok nagy része (körülbelül 48%-a) a komplex osztályba tartozik;

iii) lényegében az összes (>95%) oligoszacharid töltetlen;

iv) a monoszacharidok relatív molekuláris aránya: N-acetil-galaktóz-amin 1,0; fukóz 3,6; galaktóz 4,1; glukóz 4,4; mannóz 6,2 és N-acetil-glukóz-amin 5,2.

v) a fő oligoszacharid („D”-oligoszacharid) kivételével a többi lényegében ellenáll az exoglikozidázok hatásának (például α -D-mannozidáz, β -D-mannozidáz, β -D-glukozidáz, β -D-galaktozidáz, α -D-galaktozidáz, α -L-fukozidáz, β -D-xilozidáz, β -D-N-acetil-glukóz-aminidáz).

Az ilyen oligoszacharidok és az őket tartalmazó glikoproteinek szintén a találmány tárgyát képezik.

A *Haemonchus* H110D-glikoproteinjének D-oligoszacharidja N-kötött, és újszerű szerkezettel bír, amennyiben két fukózmaradékból áll, melyek egy α -1,3-kötéssel és egy α -1,2-kötéssel kapcsolódnak egy mannóz (N-acetil-glukóz-amin)₂ maghoz.

A jelen találmány tárgyát képezi tehát az (I) szerkezeti képletű oligoszacharidmolekula, különösen pedig a (II) szerkezeti képletű oligoszacharidmolekula, kiváltva amennyiben fehérjéhez kötött állapotban található, például valamely rekombináns fehérjében, mint egy belféreg-aminopeptidáz vagy ennek immunogén fragmense, vagy ha antiidiotípus ellenanyagok előállítására

használják, különösen nagyon fiatal állatok immunizálása céljából.

Az állatok glikoproteinjeiben általában a fukóz α -1,6-kötéssel rendelkezik, így a jelen találmány szerinti α -1,3-kötéssel rendelkező fukóz meglepő sajátosság.

Most a találmány részletesebb leírása következik, különös tekintettel a *Haemonchus contortus*-ból származó H110D-fehérjére. Mindazonáltal a HD110-hez hasonló fehérjét más élősködő fajokból is kimutattak egy sor módszerrel, mint a hisztokémia és a DNS-hibridizálás. Feltehetően a H110D-fehérje több gén terméke, ráadásul az öt kódoló nukleotidszekvenciák a férgek különféle törzsei és életciklus-stádiumai szerint jelentős szekvenciaváltozatokat mutathat. Létezhetnek továbbá olyan enzimformák (izoenzimok), melyek az egyedfejlődés különböző szakaszaiban vagy különböző törzsekben különbözőképpen jutnak kifejeződésre. A jelen leírás esetében a DNS-szekvenciákat és a belőlük következő aminosavsorrendeket különböző forrásokból származó, és az egyedfejlődés különböző szakaszaiban lévő *H. contortus*-okból nyert, a HD110-génnek megfelelő cDNS-klónok és PCR-termékek vizsgálatával határozzuk meg.

A cDNS és a PCR-termékek szekvenálása alapján három, közeli rokonságot mutató H110D-szekvenciát azonosítottunk: H11-1 (szekvenciaazonosító szám: 19); H11-2 (szekvenciaazonosító szám: 20) és H11-3 (szekvenciaazonosító szám: 21). A H11-1 három, nem folytatódó, átfedő szakaszból áll: az AustB1-cDNS-klónból (szekvenciaazonosító szám: 6), az A-648 jelű PCR-termékből (szekvenciaazonosító szám: 9), valamint a 3'-véghez tartozó, 014-178 jelű PCR-termékből (szekvenciaazonosító szám: 12). A H11-2-t az A-650 és 2,5 kb jelű PCR-termékek adják (szekvenciaazonosító szám: 10 és 7). A H11-3 a 3,5 kb és az A-649 jelű PCR-termékekből áll (szekvenciaazonosító szám: 8 és 11). Az egyedi szekvencia-meghatározásnak alávetett cDNS-ek és PCR-termékek, valamint a H11-1, -2 és -3 közötti viszonyokat az 1. ábra foglalja össze, a 3., 4. és 5. ábrák pedig részletezik.

A cDNS-szakaszok és PCR-termékek szekvenciái között különbségek és változások figyelhetők meg, amint azt különösen a 2., 3., 4. és 5. ábrák mutatják (szekvenciaazonosító szám: 1-15 és 19-21), és amint azt az 1. táblázat összefoglalja.

1. táblázat

A 2. ábrán szereplő nukleotidszekvenciák fordításával nyert aminosavsorrendek homológiafokai

	Hasonlóság (%)	Azonos aminosavak (%)
H11-1:H11-2	77	63
H11-1:H11-3	79	65
H11-2:H11-3	82	69

A különbségek a multigén család különféle mRNS-eknek tulajdoníthatók. Emellett a különbségek legalábbis

résben a különböző földrajzi eredetű törzsekben, illetve különböző egyedfejlődési stádiumokban jelen lévő mRNS-ek vagy H110D-kódoló szekvenciák variánsaira vezethetők vissza.

- 5 A 2. táblázat emellett a szóban forgó féreg-aminopeptidázok és két, publikus emlős-aminopeptidázszekvencia közötti hasonlóságot és azonosságot mutatja be.

2. táblázat

10 A H110D aminosavsorrendjének homológiái a patkány-aminopeptidáz-M-mel (ApM) és az egér-aminopeptidáz-A-val (ApA)

	Hasonlóság (%)	Azonos aminosavak (%)
15 H11-1:ApM	55	32
H11-1:ApA	55	31
H11-2:ApM	52	31
20 H11-2:ApA	54	31
H11-3:ApM	53	32
H11-3:ApA	52	30

- 25 Az 1. ábra a *H. contortus* H110D-nek megfelelő cDNS- és PCR-terméklónok szekvenciáit, ezek rokonságát és relatív pozícióikat mutatja a H110D-mRNS-hez képest.

- 30 A 2. ábra a H110D három nukleotidszekvenciáját mutatja. A H11-3 (szekvenciaazonosító szám: 21) a szekvenciaazonosító szám 8 és 11 jelű PCR-termékekből, valamint az M1AUS-cDNS-klónból (szekvenciaazonosító szám: 5) származik. A H11-2 (szekvenciaazonosító szám: 20) a szekvenciaazonosító szám 7 és 10 jelű PCR-termékekből származik. A H11-1 (szekvenciaazonosító szám: 19) a szekvenciaazonosító szám: 9 és 12 jelű PCR-termékekből és az AustB1 jelű cDNS-klónból (szekvenciaazonosító szám: 6) származik.

- 35 A 3. ábra a 2. ábrán már bemutatott H11-3-at (szekvenciaazonosító szám: 21) mutatja ismét az M1 és M1AUS jelű cDNS-klónokhoz (szekvenciaazonosító szám: 1 és 5) illesztve.

- 40 A 4. ábra a 2. ábrán már bemutatott H11-2-t (szekvenciaazonosító szám: 20) mutatja ismét a B2 jelű cDNS-klónhoz (szekvenciaazonosító szám: 4) illesztve.

- 45 Az 5. ábra a 2. ábrán már bemutatott H11-1-et (szekvenciaazonosító szám: 19) mutatja ismét a B1A és AustB1 jelű cDNS-klónokhoz (szekvenciaazonosító szám: 2 és 6) illesztve.

- 50 A 6. ábra a) a 2. ábrán bemutatott H11-1, H11-2 és H11-3 DNS-szekvenciákból következtetett aminosavsorrendeket mutatja (szekvenciaazonosító szám: 22, 23 és 24). A bI) és bII) a H11-3 következtetett aminosavsorrendjét hasonlítja össze a patkány-mikroszomális aminopeptidáz-M-mel (Watt és munkatársai, 1989) és az egér-mikroszomális aminopeptidáz-A-val (Wu és munkatársai, 1990); az azonos szakaszokat kerekítés, az egyes szekvenciákba a maximális homológia érdekében illesztett üres helyeket kötőjelek jelzik. Az aminosavak jelzésére a hagyományos egybetűs rendszert használjuk. A szekvenciák feletti vízszintes vonal

a sejtmembránon belüli szakaszt, a csillagok a cinkkötő régiót jelölik. A hasonlósági fokokat az 1. és 2. táblázat tartalmazza.

A 7. ábra a H110D-ből CNBr- és Lys-C-emésztéssel a korábban (WO 90/11086 és más korábban említett nemzetközi közzétételi iratok) leírtak szerint nyert fragmensek [korábban a), b), e), k) és aa)] és három új, a H110D elasztáz és termolizines emésztésével nyert fragmens (szekvenciaazonosító szám: 16, 17 és 18) aminosavsorrendjeinek a H11-1 (7. ábra) a), H11-2 b) és H11-3 c) szekvenciákból következtetett aminosavsorrendekhez való illesztését mutatja.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan nukleinsavmolekulák, melyek olyan nukleinsavszekvencia-részlet(ek)et tartalmaznak, melyek lényegében megegyezik (megegyeznek) az M1-, B1A-, B1A-3', B2-, M1AUS-, AustB1, 014-015- (2,5PCR-), 014-872- (3,5PCR-2-), A-648- (a B1-klón 5'-vége), A-650- (a 2,5PCR-klón 5'-vége), A-649- (a 3,5PCR-klón 5'-vége), 014-178- (az AustB1-2-klón 3'-vége), 014-178- (az AustB1-3- és AustB1-6-klónok 3'-vége), 014-872- (3,5PCR-10-), valamint 014-872- (3,5PCR-19-), H11-1-, H11-2- és H11-3-klónokban található, a 2., 3., 4. vagy 5. ábrán bemutatott egy vagy több szekvenciárészlettel (szekvenciaazonosító szám: 1-15, valamint 19-21) vagy lényegében komplementerei) azoknak vagy azokkal lényegében homológok vagy velük hibridizálódni képesek.

Mint már említettük, a fenti klónokban található szekvenciák homológiát mutatnak számítógépes adatbázisokban található mikroszomális aminosavszekvenciákkal (E. C. 3.4.11.-). A H110D-fehérjével és szubfrakcióival végzett enzimaktivitási és gátlóhatósági kísérletek megerősítik, hogy ez a fehérje valóban egy mikroszomális aminosavszekvenciát (α-amino-acil-peptidhidroláz, mikroszomális). Ilyen kísérletek kimutatták továbbá, hogy mind aminosavszekvenciát-A-szerű, mind aminosavszekvenciát-M-szerű aktivitás tapasztalható, és hogy a H110D kettős mindkét komponense egyaránt aktív.

A H110D proteolitikus emésztésével kapcsolatos kísérletek szintén történtek. Az elasztáz nevű enzim használatával a H110D-t részlegesen lehet emésztetni két frakció képződése mellett. Ezek egyike detergenssel oldható (a sejtthártyához kötve marad), a másik vízoldható (a H11S jelet kapta). A H11S fehérjedimer, mely két alegységre redukálható. Érdekes módon a vízoldható H11S-frakció csak aminosavszekvenciát-M-aktivitást mutat, míg az aminosavszekvenciát-A-szerű aktivitás a detergenssel oldható frakcióban marad.

Az alábbiakban bemutatott példával a találmány szerinti megoldást kívánjuk tovább szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetett korlátozásokra. A példa leírja az 1-7. ábrákon bemutatott szekvenciák meghatározásához vezető tanulmányokat, hivatkozással további ábrákra.

A 8. ábra a kifejlett *Haemonchus contortus* detergenskivonatában található fehérjéről készült Western-blotot mutat be, mely potenciális H110D-klónokon affinitástisztított ellenanyagokkal készült. a) A *Haemon-*

chus detergenskivonatával készült ellenanyagok reakciója a kivonat fehérjéivel; b) az a)-hoz hasonló csíkról eluált ellenanyagok reakciója a detergenskivonattal megerősíti az elúció sikerességét; c) a b) szerint előállított ellenanyagok, melyek az M1-klón által kifejezett fehérjével reagálnak, erősen kötődnek egy 110 kD körüli régióhoz, és egy viszonylag éles csíkhöz 205 kD-nál; d) nem rekombináns klónhoz nem kötődnek ellenanyagok.

A 9. ábra 11, 15 és 23 napos *Haemonchus contortus*-okból nyert mRNS-minták Northern-blotját mutatja, ahol a próba a) az M1 jelű cDNS-klón (szekvenciaazonosító szám: 1); b) az M1AUS jelű cDNS-klón (szekvenciaazonosító szám: 5); c) a B1A jelű cDNS-klón (szekvenciaazonosító szám: 2 és 3); d) az AustB1 jelű cDNS-klón (szekvenciaazonosító szám: 6); e) a 014-872 jelű klónozott PCR-termék (3,5-2, szekvenciaazonosító szám: 8); f) a 014-015 jelű klónozott PCR-termék (szekvenciaazonosító szám: 7). A számok (11, 15, 27) a *Haemonchus* korát jelzik napokban.

A 10. ábra a *Haemonchus contortus* genomi DNS-ének Southern-blotjait mutatja, ahol a próba az M1AUS jelű cDNS-klón (szekvenciaazonosító szám: 5); a B1A jelű cDNS-klón (szekvenciaazonosító szám: 2 és 3); az AustB1 jelű cDNS-klón (szekvenciaazonosító szám: 6); a 014-872 jelű klónozott PCR-termék (3,5-2, szekvenciaazonosító szám: 8); a 014-015 jelű klónozott PCR-termék (szekvenciaazonosító szám: 7); a) a blotokat mérsékelt sztringens körülmények között mosva; b) a blotokat erősen sztringens körülmények között mosva; mindegyik próba esetében az első csík a λ-DNS HindIII-emésztésének termékeit tartalmazza, vagy üres; a 2. és 3. csík a *Haemonchus contortus* genomi DNS-ének EcoRI és HindIII-emésztvényeit tartalmazza.

A 11. ábra a rekombináns GST-M1 és GST-B1A fúziós fehérjék Western-blotjait mutatja, ahol a próba az elektroforetikus tisztított H110D ellen termelt, affinitástisztított ellenanyag.

A 12. ábra a ConA-H110D-antigén Western-blotját mutatja, ahol a próbák a ConA-H110D, a rekombináns GST-M1 és GST-B1A ellen termelt ellenanyagok.

A 13a. ábra a ConA-H110D-fehérje MonoQ-oszlopon végzett ioncserés kromatográfiájának eredményeként nyert frakciók fehérjetartalmát (UV elnyelését) és aminosavszekvenciát-M-aktivitását mutatja.

A 13b. ábra ezen frakciók SDS-PAGE képét mutatja.

A 14a. ábra bemutatja azon pH-értékeket, amelyeken a szabadfolyású izoelektromos fókuszálási kísérlet frakcióit gyűjtöttük;

a 14b. ábra bemutatja a 14. ábra szerint gyűjtött frakciók SDS-PAGE képét redukáló körülmények között, ahol a H110D-kettős alsó csíkja a 6. frakcióban, felső csíkja a 16. frakcióban található, a köztes frakciókban változó mennyiségben mindkettő;

a 14c. ábra a 14b. ábra szerinti elektroforézisről készült Western-blotot mutatja, ahol a próba i) a TS3/19.7 jelű monoklonális ellenanyag; ii) affinitástisz-

tított, poliklonális anti-M1-ellenanyag (kontrollellenanyagok nem adtak érzékelhető reakciót).

A 15. ábra bemutatja a) azon pH-értékeket, amelyeken egy másik szabadfolyású izoelektromos fókuszálási kísérlet frakcióit gyűjtöttük;

a 15b. ábra bemutatja a 15a. ábra szerint gyűjtött frakciók SDS-PAGE képét redukáló körülmények között, ahol a H110D-kettős alsó csíkja a 4–6. frakcióban, felső csíkja a 16–18. frakcióban található, a köztes frakciókban változó mennyiségben mindkettő;

a 15c. ábra bemutatja a 15b. ábra szerinti frakciók mikroszomális aminoszteroid-aktivitását.

A 16. ábra bemutatja, hogy birkák megvédhetők a fertőzéstől elválasztott felső (U), alsó (L), újra összerakott (U+L) és köztes kettős (D) H110D-csíkokkal; a) a parazita petetermelése db/széklet gramm egységekben; b) féregmennyiség boncoláskor; a kontrollokhoz viszonyítva.

A 17. ábra bemutatja, hogy birkák megvédhetők a fertőzéstől a H110D elasztázos emésztésével nyert H11S vízdíszható fragmenssel és a maradékdetergenssel oldható H110D-vel; a) a parazita petetermelése db/széklet gramm egységekben; b) féregmennyiség boncoláskor; a kontrollokhoz viszonyítva.

A 18. ábra bemutatja az összefüggést egyedi birkák savójának H110D aminoszteroid-aktivitást gátló hatása és a fertőzés elleni védőhatás között. Ai), Bi): aminoszteroid-M-szerű aktivitás; Aii), Bii): aminoszteroid-A-szerű aktivitás. Ai), Aii): a parazita petetermelése db/széklet gramm egységekben; Bi), Bii) féregmennyiség boncoláskor; a kontrollokhoz viszonyítva. Üres négyzetek: anti-H110D; sötét négyzetek: antiló-ferritin (kontroll).

A 19. ábra a kifejlett *Haemonchus contortus* aminoszteroid-aktivitásának szövettani lokalizációját mutatja. A kifejlett nőstény *Haemonchus contortus* fagyasztott metszeteinek fénymikroszkópos vizsgálata szerint (a vörös reakció a fekete-fehér fotókon mint sötét terület jelenik meg) aminoszteroid-aktivitás csak a bél mikrovillusokban (mv) található. Semmilyen más szövet (például a kültakaró-c, hipodermisz-h, nemi szervek-g, izomzat-wm) nem mutat aktivitást. Az a.) ábrán a szubsztát L-leucin-4-metoxi- β -naftilamid; a b.) ábrán L-glutaminsav- α -(4-metoxi- β -naftilamid).

A 20. ábra a 3,5 jelű PCR-termék (2. klón) térképét mutatja (szekvencaazonosító szám: 8) a baculovírus pBlueBacII jelű expressziós vektorba történt szubklonozás után.

A 21. ábra a baculovírusal fertőzött *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-sejtek kivonatainak Western-blotjait mutatja anti-H110DN ellenanyagokkal való reagáltatás után. Két klonozott plazma, a P3A és P4A jelűek expresszálják a teljes hosszúságú, immunológiailag reaktív H110D-t, a kontrollok nem.

Példa

MÓDSZEREK

Brit λ gt11-könyvtár készítése

mRNS-izolálás

Brit eredetű kifejlett *Haemonchus contortus*-okból 0,5 g-t hirtelen lefagyasztunk folyékony nitrogénben,

előre behűtött mozsárban. Eldörzsölés után az RNS-t a következő oldat 10 térfogatával vonjuk ki: 4 mol/liter guanidin-hidroklorid, 25 mmol/liter nátrium-citrát, 0,5 vegyes% szarkozil, 0,7 vegyes% 2-merkapto-etanol. Ezután fenolos és kloroformos kirázás következik Chomczynski és Sacchi (1987) módszere szerint. A hirtelen (*messenger*) RNS-t oligo-dT-cellulózra végzett (kétszeri) affinitási kromatográfiával nyerjük ki, ahogyan azt Maniatis és munkatársai (1982) leírják, majd a minőséget *in vitro* transzlációval ellenőrizzük (nyúlretikulocita-lizátum és ^{35} S-metionin felhasználásával, a gyártó, az Amersham International plc. utasításai szerint). 120 kD nagyságig észlelünk polipeptideket.

Komplementer DNS készítése

Az első komplementerláncot (cDNS) 1 μ g RNS-ből szintetizáljuk *random priming* és madár-reverz-transzkriptáz segítségével; a második láncot RN-áz-H-val és *E. coli* DNS-polimeráz-I-gyel szintetizáljuk, majd a 3'-túlnyúló szakaszt T4 DNS-polimerázzal javítjuk, Gubler és Hoffman (1983) módszere szerint. A kettős láncú (ds) DNS mennyisége tipikusan 400 ng az 1 μ g RNS-re vonatkoztatva. A ds-cDNS-t elektroforézissel vizsgáljuk 1%-os agarózgélben, majd autoradiográfiát végzünk. A ds-cDNS általában 0,2–9,4 kilobázis (kb) nagyságú, a zöm a 0,5–2,3 kb tartományba esik.

A cDNS klónozása a λ gt11-be

A nagyság szerint nem válogatott cDNS-t használjuk könyvtárkészítésre az Amersham International plc cDNS-klónozó rendszerének (RPN 1280 reagenskészlet) és *in vitro packaging* kivonatának (N334 reagenskészlet) segítségével a gyártó utasításai szerint EcoRI-linker-oligonukleotidokkal (5'GGAATTCC). A könyvtárat *E. coli* Y1090 törzsre terítjük izopropil-tio- β -D-galaktozid (IPTG) és 5-bróm-4-klor-3-indolil- β -D-galaktozid (X-gal) jelenlétében, mely körülmények között a rekombináns λ gt11 tiszta („fehér”) foltok (plakkok) képeiben jelenik meg, a vad típusú nem rekombináns λ gt11 pedig kék foltként. A könyvtár általában 90% fehér foltot tartalmaz, így a számított klónozási hatékonyság 4×10^7 plakk-képző egység/ μ g DNS; a könyvtár titere 2×10^6 pfu (*plaque forming units*, plakk-képző egység)/ml. 20 véletlenszerűen kiválasztott rekombináns klón DNS-ének elemzéséből az átlagos inszertnagyság mintegy 0,51 kb. Az átlagot azonban torzíthatja például egyetlen 3,5 kb nagyságú inszert; az inszertek többsége 300 bázispárnál (bp) nagyobb.

Az így elkészített brit féreg-mRNS-eredetű λ gt11-könyvtárat immunológiai módszerrel vizsgáljuk.

Jelzett ellenanyagok (ellenanyagpróbák) készítése Integrális membránfehérjék elleni ellenanyag készítése

Brit eredetű kifejlett *Haemonchus contortus*-okból a bélszakaszt kivágjuk, és jéghideg pH=7,4-es PBS-ben (*phosphate buffered saline*, foszfáttal pufferolt sóoldat), mely 1 mmol/liter EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav) és 1 mmol/liter PMSF-et (fenil-metil-szulfonil-fluorid) tartalmaz, homogenizáljuk. A homogenizátumot 10 percig centrifugáljuk egy mikrocentrifugában, és az üledéket újra felkeverjük ugyanazon pufferben,

mely még 0,1 térfogat% Tween-20-at is tartalmaz. Újracentrifugálás után az üledéket ugyanazon pufferben, mely még 2 térfogat% Triton-X-100-at is tartalmaz, felkeverjük és 2 órán át 4 °C-on tartjuk. Újabb centrifugálás után a felülúszó tartalmazza az integrális membránfehérjéket (IMP).

Egy birkát hiperimmunizálunk az IMP-vel Freund-féle komplett adjuvánsban (FCA), izomba adott injekcióval, a 0., 7., 11. és 15. héten 50, 50, 120 és 130 µ IMP-vel. Az utolsó injekció után hat héttel a szérumot lebocsátjuk és EE-068-nak jelöljük.

Integrális membránfehérjék tisztítása a Haemonchus contortus detergens extrakciójával

A kivonatot a férgek homogenizálásával készítjük 5–10 térfogat PBS-ben, mely 1 mmol/liter EDTA-t és 1 mmol/liter PMSF-et is tartalmaz. A szuszpenziót 10 000 g-vel centrifugáljuk 20 percig 4 °C-on, az üledéket 0,1% Tween-20-at tartalmazó ugyanazon pufferrel mossuk, majd kivonjuk 5 térfogat 2% Triton-X-100-zal a fentebb leírtak szerint. A felülúszót ismét centrifugáljuk, ezúttal 100 000 g-vel 1 óra hosszat, és a felülúszót, mely feldúsult H110D-re nézve (bár még tartalmaz más IMP-eket), használjuk a Western-blot-kísérletekben és a nem denaturált H110D készítéséhez.

H110D tisztítása és affinitástisztított anti-H110DN készítése

A H110D-re nézve dúsított kivonatot ConA-agarózson affinitási kromatográfiának vetjük alá, majd MonoQ-n ioncseréljük (a WO 88/00835 és WO 90/11086 számú nemzetközi közzétételi iratokban leírtak szerint). A tisztított H110D-t FCA-ban bárányok izomzatába injektáljuk három alkalommal, háromhetes intervallumokkal, egyenként 100 µg-ot. Az utolsó injekció után 4 héttel a bárányoktól savót veszünk, és azt affinitási kromatográfiával tisztítjuk bróm-cián-aktivált Sepharose-hoz (Pharmacia) kötött H110D-n. A H110D Sepharose-hoz kötését, az antiszérum felvitelét és az anti-H110D ellenanyagok elúcióját a Pharmacia utasításai szerint végezzük. Ezen affinitástisztított ellenanyagokat az anti-H110DN jelzéssel látjuk el. Az „N” jel megkülönbözteti ezen ellenanyagokat azoktól, melyeket denaturált, elektroforetikus tisztított H110D ellen termelünk, és amelyeket anti-H110DE jellel illetünk.

Western-blot

A Western-blotot szokásos eljárások szerint készítjük (Johnstone és munkatársai 1982).

Klónok izolálása és jellemzése

A brit λgt11 könyvtár immunokémiai vizsgálata

A könyvtár immunológiai vizsgálatához használatos módszerek lényegében a Bowtell és munkatársai által 1986-ban leírtaknak felelnek meg. Használat előtt a szérumból (EE-086) az anti-*E. coli*-ellenanyagokat kimerítjük az *E. coli* Y1090 egész sejtjeivel és lizátumával. A könyvtárat *E. coli* Y1090 sejtekre szélesztjük 10³ pfu/90 mm átmérőjű Petri-csésze-sűrűségben. A csészéket IPTG-vel átitatott nitrocellulóz szűrőkkel fedjük, és egy éjszakán át inkubáljuk. A szűrőket TBST-vel mossuk (50 mmol/liter Tris, pH=7,4; 150 mmol/liter NaCl; 0,05 térfogat% Tween-20), majd

TBST-be kevert 5 térfogat% lósavóval blokkoljuk 2 óra hosszat. Az EE-068 jelű szérumot 200-szorosa hígítjuk 5% lósavótartalmú TBST-vel, a szűrőkre öntjük, és 4 óra hosszat gyengéd rázás közben inkubáljuk. A szűrőket ismét mossuk TBST-vel, majd tormagyökér-peroxidázzal (*horse radish peroxidáz*, HRP) jelölt, lóban birka-IgG ellen termelt, 5% lósavót tartalmazó TBST-sel 500-szorosan hígított ellenanyagot öntünk rájuk, és 2 óráig állni hagyjuk. (A birka-IgG elleni antiszérumot egy lóban termeltetjük, az ellenanyagot birka-IgG-t hordozó Sepharose-oszlopon affinitási kromatográfiával tisztítjuk, majd HRP-vel jelöljük Nakane és Kawaoi 1974-es módszere szerint). A szűrőket ismét mossuk TBST-vel, a pozitív plakkokat 0,6 mg/ml 3,3'-diaminobenzidin (DAB) és 0,1 térfogat% hidrogén-peroxid elegyével detektáljuk. Tipikusan 24 valószínű pozitív plakkot kapunk, ezeket izoláljuk és affinitástisztított anti-H110DN segítségével a fentiek szerint újravizsgáljuk. Ezen ismételt vizsgálat után például 5 rekombináns lesz továbbra is pozitív, esetünkben a legerősebb jelet az M1 jelű klón adta.

Az ellenanyag tisztítása rekombináns fagon

E. coli Y1090-sejtekkel fedett Petri-csészéket ellenanyag-pozitív λgt11-klónok vagy nem rekombináns λgt11-fág 10³ pfu-nyi mennyiségével fertőzünk. A csészéket 4 óra hosszat 42 °C-on tartjuk, majd IPTG-vel átitatott szűrőkkel fedjük. Egy éjszakán át 37 °C-on tartva, a szűrőket eltávolítjuk, és TBST-vel mossuk, majd 5% lósavóval blokkoljuk 1 óra hosszat. A szűrőket ezután az EE-068 jelű antiszérum 1:100-as hígításával inkubáljuk 6 óra hosszat, majd ismét mossuk TBST-vel. A kötött ellenanyagokat a szűrőkről 2×2 ml elúciós pufferrel (5 mmol/liter glicin, 500 mmol/liter NaCl, 0,2% Tween-20, pH=2,3) mossuk le, egyenként 2-3 perces áztatással, majd azonnal 0,2 ml 1 mol/liter, pH=7,4-es Tris-HCl-lel semlegesítjük, és a H110D-re dúsított Western-blot immunokémiai vizsgálatára használjuk.

Rekombináns klón (például M1) DNS-szekvenálása

A klónból a lambda-DNS-t Maniatis és munkatársai 1982-ben leírt módszere szerint izoláljuk. A 2,38 kb hosszú KpnI-SstI-fragmenst, amely a 300 kb nagyságú rekombináns fragmenst tartalmazza, gélelektroforézissel izoláljuk, és GENE CLEAN reagenskészlettel (Stratagene; a BIO101 bejegyzett kereskedelmi márkanév) tisztítjuk, majd pBlueScriptII SK⁺-ba (Stratagene) szubklónozzuk. Az EcoRI-fragmenst ugyanezen módszer szerint tisztítjuk, és ugyanezen vektorba szubklónozzuk.

Az inszert nukleotidszekvenciáját a T7 szekvenáló reagenskészlettel (Pharmacia) határozzuk meg, az M13 előre- és visszamatató (*forward és reverse*) primerek használatával.

Ausztrál λgt11- és λZAP-könyvtárak készítése mRNS kinyerése

A *Haemonchus contortus* ausztrál, úgynevezett McMaster-törzsének kifejtett egyedeiből 5 g-ot hirtelen lefagyasztunk folyékony nitrogénben, és az RNS-t forró fenollal kivonjuk Cordingley és munkatársai (1983) módszere szerint. A teljes RNS mennyisége tipikusan

10,35 mg. Ezen RNS 1,3 mg-ját használjuk mRNS készítésére. A hírvívő (*messenger*) RNS-t oligo-dT-celulózson végzett (kétszeri) affinitási kromatográfiával nyerjük ki, ahogyan azt Maniatis és munkatársai 1982-ben leírták. A nyert mRNS mennyisége szokásosan 21,6 µg. A minőséget *in vitro* transzlációval ellenőrizzük (nyúl-retikulocitázátum és ³⁵S-metionin felhasználásával, a gyártó, az Amersham International plc utasításai szerint). SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis és fluorográfia segítségével 200 kD nagyságig észlelünk világosan megkülönböztethető polipeptideket.

cDNS szintézise és könyvtár készítése

cDNS-t 1 µg RNS-ből szintetizálunk random primer-ek és oligo-dT segítségével, az Amersham International plc. cDNS-szintetizáló reagenskészletével a gyártó utasításai szerint. A kitermelés tipikusan 115 ng kettős láncú (ds) cDNS. A ³²P-vel jelölt ds-cDNS-t elektroforézissel vizsgáljuk lúgos agarózgélben az Amersham-reagenskészlet utasításai szerint. A ds-cDNS 0,15–10 kb nagyságú, a zöm a 0,6–5 kb tartományba esik λ-HindIII-markerekhez viszonyítva. Az oligo-dT-vel és a random primerekkel készített cDNS-t összeöntjük, és 8 tagú EcoRI-linker-oligonukleotid (5'GGAATTC3'; New England Biolabs, katalógusszám: 1018; előzően T4 polinukleotid-kináz segítségével γ-32-ATP-vel jelölve) feleslegével ligáljuk. A linkerrel ellátott cDNS-t EcoRI-enzimmal emésztjük, és a felesleges linkereket Sepharose 4B-kromatográfiával eltávolítjuk Maniatis és munkatársai 1982-ben leírt módszerei szerint. Az oszlopról kapott frakciókat két adagba összeöntjük; az egyik tartalmazza a 2 kb-nál kisebb, a másik az annál nagyobb cDNS-molekulákat. A két adagot ezután külön-külön ligáljuk 1 µg EcoRI-gyel hasított, foszfatázkezelt λZapII-karral (*arm*) (Stratagene), és „Gigapack Gold” (Stratagene, bejegyzett név) használatával fágba visszük (*packaging*). A nagyobb méretű cDNS-frakció tipikusan $1,3 \times 10^5$ rekombináns ad, a kisebb méretű frakció $1,4 \times 10^5$ -t; a kettőt összeöntjük, ekkor $2,7 \times 10^5$ rekombinánsunk lesz. A λZap-könyvtárat XL1-Blue sejtekre (Stratagene) szélesztéssel növesztjük, 135 mm átmérőjű Petri-csészénként 2×10^4 pfu-t adva. A felnövesztett könyvtár titere mintegy 7×10^7 pfu/ml lesz.

További 2 µg mRNS-ből szintén a fentiek szerint, de csak oligo-dT-vel készítünk cDNS-t; tipikusan 740 ng cDNS-t kapunk. Ezt a cDNS-t EcoRI-metilázzal kezeljük, Maniatis és munkatársai 1982-ben közölt módszere szerint, az EcoRI-linkerek hozzáadása előtt. Ez esetben 12 tagú linkert használunk (5'CCGGAATTCGG3'; New England Biolabs, katalógusszám: 1019). A linkerrel ellátott cDNS EcoRI-emésztése után a Sepharose-4B-oszlopról kapott összes, cDNS-tartalmú frakciót összeöntjük, és ligáljuk 2 µg EcoRI-gyel hasított, foszfatázkezelt λgt11-karral (*arm*) (Stratagene). A keveréket két részre osztjuk, és Gigapack Gold (Stratagene) használatával fágba visszük (*packaging*). A két adagot összeöntve például 7×10^6 pfu-t kapunk. A könyvtárat ST9-sejtekre (Stratagene) szélesztéssel növesztjük, 135 mm átmérőjű Petri-csészénként 5×10^5 pfu-t adva. A felnövesztett λgt11-könyvtár titere mintegy $4,5 \times 10^{11}$ pfu/ml lesz.

Az ausztrál λgt11 könyvtár immunokémiai vizsgálata

Brit eredetű H110D-fehérjét a WO 88/00835 és WO 90/11086 számú nemzetközi közzétételi iratok szerint tisztítunk. Az így nyert ConA-H110D-t Laemmli 1970-es módszere szerint SDS-poliakrilamid-gélben elektroforetizálunk, ezzel elektroeluált HD110D-t kapunk. Elektroforézis után a gélből kivágjuk a H110D-t tartalmazó területet, egy elektroeluterbe helyezzük, és 3 órán át 10 watt teljesítménnyel eluáljuk. Az elektroeluált H110D-t (H110DE) egy Centriprep-10-es készüléken (Amicon) koncentrálnak, majd a pufferét kicseréljük egy PD10-es oszlopon (Pharmacia) 50 mmol/liter ammónium-bikarbonátra, amely 0,07% SDS-t tartalmaz. A fehérjét ezután adjuvánssokkal keverjük és antiszérum termeltetése céljából birkákat oltunk vele. A szérumból az immunglobulinokat ammóniumsulfáttal csapjuk ki (Johnstone és Thorpe 1982). A kicsapott ellenanyagokat 60 mg/ml töménységben oldjuk foszfáttal puffertolt sóoldatban, ugyanezen oldattal szemben dializáljuk, majd tízszeres térfogatra hígítjuk Tris-pufferelt sóoldattal (Tris buffered saline, TBS), amely 5 vegyes% sovány tejpórt tartalmaz. 10 mg ConA-H110D-t felveszünk 0,5% SDS-ben, 3 percig 100 °C-on tartjuk, és egy nitrocellulóz szűrőre szárítjuk. A szűrőt 0,2 térfogat% Tween-20-at és 0,5% Triton-X-100-at tartalmazó TBS-sel (TBSTT) mossuk, majd a HD110E ellen termelt ellenanyagokkal 1-2 órán át szobahőmérsékleten tartjuk. Miután a szűrőt 2 óra hosszat mostuk TBSTT-vel, a kötött ellenanyagokat 0,1 mol/liter glicin, 0,15 mol/liter NaCl pH=2,6 oldat 3 ml-ével mossuk le, azonnal semlegesítjük 75 µl 1,5 mol/liter, pH=8,0-s Trisz-szel. Az előbbieket szerint affinitástisztított ellenanyagokat anti-H110DE-vel jelöljük, és az ausztrál λgt11-cDNS-könyvtár 5×10^5 pfu-jának vizsgálatára használjuk a fent leírtak szerint.

Az ausztrál *Haemonchus contortus*-ból származó 5×10^5 rekombináns vizsgálatával tipikusan 3 valószínű pozitív plakkot kapunk, ezeket izoláljuk, és a fentiek szerint újravizsgáljuk. Ezen ismételt vizsgálat után például 2 rekombináns lesz továbbra is pozitív; esetünkben ezek a B1A és B2 jelet kapták.

Rekombináns klón (például B1A és B2) DNS-szekvenálása

A klónokat EcoRI-gyel emésztjük, melynek eredményképpen egyetlen, 500 bp körüli inszertet kapunk a B1A-klónból, és három fragmenst a B2-klónból (B2A: kb 400 bp; B2B: kb 100 bp; B2C: kb 100 bp). Ezeket pBluescript SK⁺ (Stratagene) vektorba szubklónozzuk, majd Sequenase 2.0 reagenskészlettel (United States Biochemicals) szekvenáljuk.

Az M1- és B1A-klónok expressziója

Az M1- (szekvenciaazonosító szám: 1) és B1A-inszerteket (szekvenciaazonosító szám: 2 és 3) *E. coli*-ban expresszáljuk pGEX-vektor segítségével (Smith és Johnson, 1988). Ez a vektor a fehérjét a Schistosoma japonicum glutation-S-transzferáz (GST) enzimjének C-terminusához kapcsolva termeli. Az M1- és B1A-EcoRI-inszerteket EcoRI-gyel hasított, foszfatázkezelt

pGEX-hez ligáljuk, és *E. coli* JM101-sejtekbe transzformáljuk Maniatis és munkatársai 1982-ben közölt módszere szerint. Minden egyes transzformációból 8 utódtelepet veszünk fel, és 2 ml-es tenyészetekben 6 órán át 37 °C-on növesztjük. IPTG-t adunk a fehérjetermelés megindítása céljából, majd a tenyésztést folytatjuk egy éjszakán át. A sejteket centrifugálással kinyerjük, Laemmli-féle (1974) mintafellevő pufferben megforraljuk, és SDS-PAGE-t követő Western-blottal vizsgáljuk anti-H110DE, azaz SDS-denaturált H110D ellen termelt ellenanyagok használatával. A kötött ellenanyagokat lúgos foszfátazzal jelölt, nyúlban termelt, birka-IgG elleni ellenanyaggal (Jackson Immunoresearch), majd 5-Br-4-Cl-3-indolil-foszfát (BCIP) és nitroblue-tetrazolium (NBT) színreakciójával mutatjuk ki. Az immunpozitív klónokat tovább tenyésztjük a fentiek szerint, és ultrahanggal elroncsoljuk. A feltárt sejteket oldható és oldhatatlan frakciókra osztjuk centrifugálással (Sorvall-RC-2B-centrifuga, HS4-rotor, 7000 fordulát/perc, 30 perc, 4 °C). Az oldhatatlan üledéket 8 mol/liter karbamidban ultrahang segítségével feloldjuk, és a frakciók mintáit SDS-PAGE-vel vizsgáljuk. A fúziós fehérjéket az oldhatatlan, úgynevezett *inclusion body*-frakcióban találjuk. Ezen készítményekkel 2-2 birkát oltunk 3 alkalommal, 150 µg fúziós fehérjével alkalmanként, Freund-adjuvánsban. A pozitív kontrollbirkákat natív ConA-H110D-fehérjével immunizáljuk, a negatív kontrollállatokat *Haemonchus*-inszert nélküli pGEX-vektort tartalmazó *E. coli* kivonattal. Az oltott birkák savóját Western-blottal elemezzük anti-H110D ellenanyagok jelenlétére.

Az ausztrál λZAP-könyvtár vizsgálata az M1- és B1A-inszertekkel való DNS-hibridizálással

Az M1 és B1A jelű (pBluescriptben klónozott) plazmid DNS-t EcoRI-gyel emésztjük, és az inszerteket elektroforézissel izoláljuk TBE-ben (Tris-borát-EDTA, 89 mmol/liter Tris-borát, 89 mmol/liter bórsav, 2 mmol/liter EDTA, pH körülbelül 8,3), 1%-os agarózgélben, majd GENE CLEAN reagenskészlettel tisztítjuk. Az izolálást és tisztítást megismételjük, hogy a λZAP-szekvenciákkal hibridizáló plazmid-DNS-ek ne szennyezzék a próbát, mert ez elfogadhatatlanul magas háttérrel eredményezne. A tisztított inszert-DNS-t α-³²P-dCTP-vel jelöljük a Promega Biotech *nicktranszlációs* reagenskészletével a gyártó előírásai szerint. A jelölt DNS-t a szabad jeltől centrifugált oszlopkromatográfiával választjuk el Maniatis és munkatársai (1982) szerint. A λZAP-könyvtárból 8 db 135 mm-es Petri-csészét fedünk egyenként 10⁵ pfu-val, majd a plakkokat nitrocellulóz szűrőre visszük át (Maniatis és munkatársai, 1982). Vákuumsütőben 2 óráig 80 °C-on sűtve a szűrőket, két óráig előhibridizáljuk, majd 42 °C-on egy éjszakán át hibridizáljuk (az alább, a Southern-blottnál leírtak szerint). Négy szűrőt vizsgálunk az M1-próbával, négyet a B1A-próbával. A szűrőket kétszer mossuk 0,5 SDS-t tartalmazó 2×SSC-vel, egyszer 0,5% SDS-tartalmú 1×SSC-vel, és egyszer 0,5% SDS-tartalmú 0,5×SSC-vel. A pozitív plakkokat felvesszük, és újra vizsgáljuk a próbákkal. A megerősített pozitívokból ma-

gas titerű fágkészítményt állítunk elő (az M1-gyel hibridizáló klón esetében M1AUS jelzéssel, a B1A hibridizáló klón esetében AustB1 jelzéssel), és a klónokat pBluescriptbe reklónozzuk a Stratagene λZAP-reagenskészlet utasításainak megfelelően, a B4 *E. coli*-törzset használva gazdaszervezetként. Az így kapott utódszervezetekből plazmid-DNS-t tisztítunk lúgos lízissel (Maniatis és munkatársai, 1982), amit EcoRI-gyel emésztünk. Az emésztett DNS-t agarózgél-elektroforézissel elemezzük.

Az M1AUS-inszert szekvenálása

A tisztított pBLUESCRIPT-plazmid DNS-szekvenálását a United States Biochemicals 2.0-s verziós számú Sequenase reagenskészletével végezzük a gyártó előírásai szerint. Az első szekvenálási reakcióban a vektorszekvenciák végeiről származó primereket használunk. Az így kapott szekvenciaadatok alapján egy második primer párt tervezünk, az ezzel kapott adatokból pedig egy harmadikat. Így végig szekvenáljuk a DNS-t mindkét végéről kiindulva.

Az AustB1-inszert szekvenálása

A szekvenálás a fentiek szerint történik Sequenase 2.0 T7 polimeráz felhasználásával (USB Biochemicals).

Polimeráz-láncreakció

cDNS készítése

A fertőzéstől számítva 11 napos *H. contortus*-okból a kifejlett brit férgek esetére fentebb leírt módszerek szerint kinyert 1 µg mRNS-t dietil-pirokarbonát (DEPC)-kezelt vízben összekeverjük a T17-adapter-primerrel (5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTT-TTTTTTTTTT3'), majd 5 percre 65 °C-ra melegítjük, utána azonnal jégre tesszük. Metil-merkuri-hidroxidot adunk 28,6 mmol/liter végkoncentrációban, és az elegyet szobahőmérsékleten tartjuk 3 percig. 2-merkaptotetanolt adunk 14,2 mmol/liter végkoncentrációban, és az elegyet jégre tesszük. cDNS szintézise céljából RN-áz Guard-ot (Pharmacia) adunk 1 egység/µl-ben, *Reverse Transcriptase Buffer*-t (Life Sciences) 1-szeres koncentrációban, dATP-t, dGTP-t, dCTP-t és dTTP-t 1 mmol/liter végkoncentrációban, valamint AMV-reverztranszkriptázt (Life Sciences) 2 egység/µl-ben. A reakcióelegyet 41 °C-on tartjuk 75 percig, majd fenollal és kloroformmal extraháljuk, és oszlopkromatográfiával tisztítjuk (Maniatis és munkatársai, 1982). A tisztított reakcióelegyet 2,5-szeresre hígítjuk, és 4 °C-on tároljuk.

A cDNS amplifikációja M1AUS-specifikus primerekkel

A PCR-reakciót (*polymerase chain reaction*) egy programozható ciklizáló termosztáttal (M. J. Research Inc.) végezzük. A reakcióelegy a fentiek szerint készített 250 µl hígított cDNS-ből 1 µl-t tartalmaz, továbbá az első lánchoz szükséges T17-adapter primerből 25 pmol-t, szintén 25 pmol-t a második lánchoz szükséges amplifikációs primerből (mely a M1AUS-szekvenciából (szekvenciaazonosító szám: 5) vagy a 865–884. pozícióknak megfelelő 5'-ACGGGTGTTCCG TTCCGTAT3' vagy a 30–49. pozícióknak megfelelő 5'-GCTGAATCTAACTCCAATCC3'); 1×Taq-puffert

(Northumbria Biologicals Ltd.), és a dATP, dTTP, dGTP, dCTP mindegyikéből 0,5 mmol/litert 0,1 ml reakció-térfogatban, a párolgás megelőzésére 40 µl ásványi olajjal fedve. Ezt a keveréket azután a hőmérsékletváltóban 95 °C-ra fűtjük fel 2 perc időtartamra, majd 72 °C-on tartjuk. Ezen a hőmérsékleten 2 egység Taq-polimerázt (Northumbria Biologicals) adunk, gyengéden összekeverjük. Ezután a következő programot hajtjuk végre a hőmérsékletváltóval:

1. Primer hibridizáció 50 °C-on 5 percig.
2. Lánchosszabbítás 72 °C-on 40 percig.
3. Láncszétválasztás (denaturálás) 94 °C-on 40 másodpercig.
4. Primer hibridizáció 50 °C-on 2 percig.
5. Lánchosszabbítás 72 °C-on 3 percig.
6. A 3–4–5. lépések ismétlése 39-szer.
7. Végső lánchosszabbítás 72 °C-on 15 percig.
8. 4 °C-on tartás.

Ezeket a körülményeket Frohman és munkatársai (1988) közleményéből vettük át.

A PCR-termékek klónozása

A fenti reakció eredményeképpen kapott PCR-termékeket elektroforézissel agarózgélben választjuk el. A körülbelül 2,5 és 3,5 kb hosszú DNS-csíkokat Whatman-üvegszálaspapírra elektroelúáljuk, fenollal kirázzuk és G50-kromatográfiával (Pharmacia) tisztítjuk (Sambrook és munkatársai, 1989). A tisztított DNS-t pT7Blue T vektorba (Novagene) klónozzuk a gyártó útmutatása szerint.

A 2,5 és a 3,5 kb PCR-termékek szekvenálása

A szekvencia meghatározását Sequenase 2.0 reagenskészlettel (US Biochemicals) végezzük az M1AUS szekvenálásánál ismertett „sétálási” technika segítségével.

Polimeráz-láncreakciók az 5'-végeken

Az első lánc elkészítése

A fertőzéstől számítva 11 napos *H. contortus*-okból a kifejtett brit férgek esetére a fentebb leírt módszerek szerint kinyert 1 µg mRNS-t összekeverjük az 5'-AAIGAAAGCGGATGGCTTGAIGC3' állandó primerrel, melyet az AustB1 konzervatív régiójából és a 2,5 kb PCR-ből, valamint a 3,5 kb PCR-ből (szekvenciaazonosító szám: 6, 7, 8) származtattunk. A keveréket 65 °C-on tartjuk 5 percig, majd azonnal jégre tesszük. Metil-merkuri-hidroxidot adunk 28,6 mmol/liter végkoncentrációban, és az elegyet szobahőmérsékleten tartjuk 3 percig. 2-merkaptotetanolt adunk 14,2 mmol/liter végkoncentrációban, és az elegyet jégre tesszük. Az első DNS-láncot az 5'-RACE-reagenskészlet (Gibco/BRL) reagenszeinek felhasználásával készítjük el 20 mmol/liter Tris-HCl-ben pH=8,4-en, 50 mmol/liter KCl, 2,5 mmol/liter MgCl₂, 100 µg/ml BSA, 0,5 mmol/liter dATP, dCTP, dGTP és dTTP jelenlétében. 200 egység Superscript reverz transzkriptázt adunk, és a reakciót 42 °C-on folytatjuk 30 percig, majd 55 °C-ra melegítjük 5 percre. RN-áz-H-t adunk 100 egység/ml végkoncentrációban, és az elegyet 55 °C-on 10 percig tartjuk, majd jégre tesszük. A cDNS-t Glassmax centrifugálható oszlopon (Gibco/BRL) tisztítjuk, és -20 °C-on tároljuk.

A cDNS meghosszabbítása citidinekkel

A fentiek szerint elkészített cDNS egyötödét 70 °C-ra hevítjük 5 percre, majd jégen 1 percig hűtjük. Az 5'-RACE-reagenskészlet (Gibco/BRL) reagensait adjuk a következő végkoncentrációkban: 10 mmol/liter Tris-HCl pH=8,4; 25 mmol/liter KCl; 1,25 mmol/liter MgCl₂; 50 µg/ml BSA és 0,2 mmol/liter dCTP. Terminális transzferázt adunk, majd a reakcióelegyet 37 °C-on tartjuk 10 percig, ezután 70 °C-ra melegítjük 15 percre, majd jégen tároljuk.

Az AustB1, 2,5 kb PCR és 3,5 kb PCR PCR-amplifikációja specifikus primerekkel

A PCR-reakciót programozható hőmérsékletváltóban (M. J. Research, Inc.) végezzük. A 3'-végekre a következő primerek egyikét használjuk.

1. A 2,5 kb PCR-termékre specifikus, a 374–394. pozícióknak megfelelő primert (5'TGTTGTGGCTAA-TTTCGTTCCA3').

2. A 3,5 kb PCR-termékre specifikus, az 1210–1229. pozícióknak megfelelő primert (5'CATCT-TIAGTTATCTCTGACCAG3').

3. Az AustB1 cDNS-klónra specifikus, a 357–377. pozícióknak megfelelő primert (5'GACCATCGCTG-ATGAAGTTCGG3').

Az 5'-végekre egy közös „kifogó primert” használunk (5'CUACUACU ACUAGGCCACGCGTCGACT-AGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG3'). Minden egyes reakcióelegy tartalmazza a következőket: 50 µl C-farokkal ellátott cDNS, a megfelelő primerekből 25 pmol, 1 × Taq-polimeráz-puffer (Boehringer Mannheim), dATP, dCTP, dGTP és dTTP-ből 0,5 mmol/liter, 0,1 ml végtérfogatban. A keverékeket 0,05 ml ásványolajjal fedjük, majd 95 °C-ra hevítjük a hőmérsékletváltóban 2 percre. Ezután 80 °C-on tartjuk, ezalatt 0,6 egység Taq-polimerázt adunk hozzá, és a következő programot hatjuk végre:

1. Primerhibridizáció 50 °C-on 5 percig.
2. Lánchosszabbítás 72 °C-on 10 percig.
3. Láncszétválasztás (denaturálás) 94 °C-on 45 másodpercig.
4. Primer hibridizáció 50 °C-on 1 percig.
5. Lánchosszabbítás 72 °C-on 2,5 percig.
6. A 3–4–5. lépések ismétlése 39-szer.
7. Végső lánchosszabbítás 72 °C-on 15 percig.
8. 4 °C-on tartás.

Az 5'-PCR-termékek klónozása

A fenti reakció eredményeképpen kapott PCR-termékeket elektroforézissel agarózgélben választjuk el. A körülbelül 1,3 kb hosszú DNS-csíkokat kivágjuk, GENE CLEAN-reagenskészlettel tisztítjuk. A tisztított DNS-t pT7Blue T vektorba (Novagene) klónozzuk a gyártó útmutatása szerint.

Az AustB1 3'-végének előállítás PCR-reakcióval

Az első lánc ugyanaz, mint amelyiket az M1AUS primerek használatához szükséges cDNS előállításánál leírtunk. A hőmérsékletváltóban (M. J. Research Inc.) az AustB1 (szekvenciaazonosító szám: 6) 1414–1435. pozícióinak megfelelő specifikus primert (5'TCTTGA-AGAAATGAAAAAG CTT3') használjuk az M1AUS-

PCR-hez is használt T17 adapter primerrel. A reakcióelegy összetétele: 25 pmol a primerekből, 2 µl cDNS, 1 × Taq-polimeráz-puffer (Boehringer Mannheim), 0,5 mmol/liter dATP, dCTP, dGTP és dTTP. A keverékeket 0,05 ml ásványolajjal fedjük, majd 95 °C-ra hevítjük a hőmérsékletváltóban 2 percre. Ezután 80 °C-on tartjuk, ezalatt 0,6 egység Taq-polimerázt adunk, és az 5'-végek PCR-reakciójánál fentebb ismertetett programot hajtjuk végre.

A 3'-végtermékek klónozása

A fenti reakció eredményeképpen kapott PCR-termékeket elektroforézissel agarózgélben választjuk el. A körülbelül 1,3 kb hosszú DNS-csíkokat kivágjuk, GENE CLEAN-reagenskészlettel tisztítjuk. A tisztított DNS-t pT7Blue T vektorba (Novagene) klónozzuk a gyártó útmutatása szerint.

A klónozott PCR-termékek szekvenálása

A PCR-klónok szekvenálására a Sequenase 2.0 reagenskészletet (United States Biochemical) használjuk a gyártó előírásai szerint. Oligonukleotid primereket használunk a DNS mentén történő „sétára” mindkét (5' és 3') végről kiindulva.

A DNS-szekvenciák elemzése

A szekvenciákat a GCG (Genetics Computer Group) „Sequence Analysis Software Package” programmal elemezzük (Devereux és munkatársai, 1984.)

Northern- és Southern-blotok

Northern-blotok készítése

A blotokat formaldehidgélben készítjük, lényegében Maniatis és munkatársai 1982-es közlése szerint. 11, 15 és 23 napos *H. contortus*-okból nyert mRNS-mintákat 17,5 térfogat% formaldehiddel és 50 térfogat formamiddal kezelünk MOPS-pufferben [20 mmol/liter 3-(N-morfolino)-propánszulfonsav, pH=7,0; 8 mmol/liter nátrium-acetát; 1 mmol/liter EDTA] 65 °C-on 15 percig, majd jégen lehűtjük. A géleket MOPS-pufferben elektroforetizáljuk, és Duralon membránokra blotoljuk kapilláris transzferrel, amint azt Sambrook és munkatársai 1989-ben leírták.

Southern-blotok készítése

2 g kifejtett *Haemonchus contortus*-t folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztunk, majd szintén folyékony nitrogénben finom porrá őrölünk. A port lassan adjuk 25 ml lízispufferhez [0,05 mol/liter Tris-HCl, pH=8, 0,1% EDTA, 1 vegyes% Sarkosyl, 0,05 mg/ml proteináz-K (Boehringer Mannheim)] és 2 óra hosszat 65 °C-on tartjuk. A szuszpenziót ezután kétszer kirázzuk azonos térfogatú fenol-kloroformmal, és etanollal kicsapjuk. A kicsapott genomi DNS-t felvesszük 20 ml Tris-EDTA-pufferben (TE, pH=8), egy éjszakán át rázatva 4 °C-on, majd 2 × 1 liter TE-pufferrel szemben dializáljuk. Az RNS-t DN-áz-mentes RN-áz-A-val (Sigma, Type I) távolítjuk el 20 µg/ml végkoncentrációban, 37 °C-on 1 óra hosszat. Ezután egyszer fenol-kloroformmal, egyszer kloroformmal kirázzuk, és etanollal kicsapjuk, mint fent. A kicsapott DNS-üledéket kétszer mossuk 70 térfogat%-os etanollal, és a fentiek szerint felvesszük 1 ml TE-ben.

A genomi DNS-t EcoRI-gyel vagy HindIII-mal emésztjük (25 µg DNS-t adva minden egyes emésztésbe) egy éjszakán át 37 °C-on, majd 1%-os agarózgélben futtatóhelyenként 5 µg-ot elektroforetizálunk Tris-acetátpufferben. A gélt Southern-blotoljuk kapilláris transzfer útján, Maniatis és munkatársai 1982-es leírása szerint Hybond-N-membránra (Amersham International). A DNS-t ibolyántúli fénnel rögzítjük a membránhoz a gyártó előírásai szerint.

Próbák készítése

Az M1AUS-, B1A- vagy AustB1-inszerteket tartalmazó plazmidokat EcoRI-gyel emésztjük. A 3,5 kb PCR-terméket tartalmazó pT7Blueplazmidokat BamHI-gyel, a 2,5 kb PCR-terméket tartalmazó plazmidokat BamHI-gyel és XbaI-gyel emésztjük. Az emésztett termékeket elektroforetizáljuk, az inszerteket kinyerjük, és radioaktív α-³²P-dCTP-vel jelöljük nicktranszlációval, amint azt fentebb a λZAP-könyvtár vizsgálatánál leírtuk.

Hibridizációs körülmények

A Southern-blotok esetében a membránokat csíkokra vágjuk, és a korábban leírtak szerint előhibridizáljuk a hibridizáló pufferben 3 óra hosszat 28 °C-on. A genomi DNS-ek Southern-blotjait a fenti próbákkal hibridizáljuk egy éjszakán át 28 °C-on, kétszer mossuk szobahőmérsékleten (24 °C-on), majd kétszer 42 °C-on, 0,1% SDS-t tartalmazó 2 × SSC-ben (mérésékelt sztringens feltételek), és autoradiografáljuk. Az autoradiogramok elkészülte után a csíkokat újra mossuk erősen sztringens körülmények között (0,1% SDS, 0,1 × SSC, 65 °C-on), és újra autoradiografáljuk.

Northern-blotok esetében

Az M1-, M1AUS- és B1A-próbák (szekvenciaazonosító szám: 1, 5 és 2) használatakor a 11, 15 és 23 napos *Haemonchus contortus*-okból készített Northern-blotokat először az M1-inszerttel vizsgáljuk. A szűrőt prehibridizáljuk 2 óra hosszat 42 °C-on 2 × SSC-ben (ahol az SSC: 3 mol/liter NaCl, 0,3 mol/liter nátrium-citrát, pH=7,2), amely még 5 × Denhardt-oldatot [0,1 vegyes% Ficoll 400 (Pharmacia); 0,1% poli(vinil-pirrolidon); 0,1% marha-szérumalbumin (V. frakció, Sigma Chemical Corp.)], 0,5% SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát), 10% dextrán-szulfátot, 0,1% lazachere-DNS-t és 50% deionizált formamidot is tartalmaz. Ugyanezen pufferben hibridizálunk egy éjszakán át 42 °C-on. A szűrőket kétszer 30 percig mossuk 0,5% SDS-t és 50% formamidot tartalmazó 2 × SSC-ben, kétszer 30 percig 0,1% SDS-t tartalmazó 2 × SSC-ben, és kétszer 30 percig 2 × SSC-ben. Az első mosást 42 °C-on végezzük, a többi 37 °C-on. Autoradiografálás után a blotot a próbától forrásban lévő 0,1% SDS-sel való mosással mentesítjük, és ennek ellenőrzésére újra autoradiografáljuk. Ugyanazon blotot ezután az M1AUS-inszerttel hibridizáljuk, mossuk és autoradiografáljuk, majd próbamentesítjük, ellenőrizzük és a B1A-inszerttel hasonlóképpen járunk el. Ezután a blotot az AustB1-, 2,5 kb és 3,5 kb PCR-termékekkel (szekvenciaazonosító szám: 6, 7 és 8) hibridizáljuk. Az AustB1-gyel a Southern-blotnál leírt mérsékelt sztringens körülmények között hibridizálunk. A szűrőről a próbát forrásban lévő 0,1% SDS-sel eltávolítjuk a gyártó (Amersham) utasításai szerint,

majd a 2,5 kb PCR-inszert 2. számú klónjával hibridizáljuk; ismét próbamentesítjük, és a 3,5 kb PCR-inszerttel (2. számú klón) hibridizáljuk.

A H110D emésztése és enzimaktivitásának meghatározása

H11D készítése

Natív H110D-t (H110DN) a WO 88/00835 és WO 090/11086 számú nemzetközi közzétételi iratokban leírtak szerint készítünk.

A H110D elasztáz fragmensének (H11S) készítése

Kifejlett *Haemonchus*-okat 10 térfogatnyi, 0,02% nátrium-azidot tartalmazó jéghideg PBS-ben elhomogenizálunk, majd 20 percig (13 000 fordulat/perc) centrifugáljuk. Az üledéket felvesszük 10 térfogatnyi PBS-azidban, újra elhomogenizáljuk, és ismét centrifugáljuk. Az üledéket 50 mmol/liter MOPS-pufferben pH=7,4-en felvesszük (0,17 g főlegből 1 ml szuszpenzió lesz), 30 percig előmelegítjük 37 °C-ra, majd 1 óra hosszat elasztázzal emésztjük (800 µl/20 ml szuszpenzió; a törzsoldat frissen készül 1 mmol/liter HCl-ben, mely 2 mmol/liter Ca²⁺-t tartalmaz). A keveréket 13 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk 20 percig, az üledéket megtartjuk. A felülúszót ultracentrifugáljuk 100 000 g-vel 1 óra 20 perc időtartamig. A felülúszót egy ConA-oszlopra tesszük, a kötődő frakciókat kinyerjük. Elemzési célból a frakciókat SDS-poliakrilamid-gélen futtatjuk, és elektromos erőterben polivinilidén-difluorid-membránra (Immobilon-P, Millipore) visszük át, gyengéden festjük *Coomassie*-késsel, a 105 kD-os csíkot kivágjuk, és gázfázisú aminosavszekvenátorban elemezzük. Oltási célból a ConA-hoz kötődő frakciókat tovább tisztítjuk koncentrációval és Superose 12 (Pharmacia) gélszűrővel; az aminopeptidázaktivitású frakciókat gyűjtjük.

A H110D emésztése termolizinnel

A H110D-kettőst preparatív 8%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel tisztítjuk a WO 90/11086 számú nemzetközi közzétételi irat szerint, továbbá elektroelúcióval, az éppen 200 kD fölött futó csíkból (mely SDS-PAGE-n a jellegzetes 110 kD-os kettőst adja); mindkét esetben H110DE-hez jutunk. A H110DE-oldatokat 200 µl-re töményítjük, kalcium-kloridot adunk 5 mmol/liter koncentrációig, és a keveréket 37 °C-ra melegítjük. Termolizin 1 mmol/liter HCl+2 mmol/liter CaCl₂-ben frissen készített 1 mg/ml-es oldatából adunk annyit, hogy 0,1 µg Termolizin jusson a H110DE minden µg-jára. A keveréket 37 °C-on tartjuk 120 percig, majd a reakciót 5 µl 0,5 mol/literes EDTA hozzáadásával leállítjuk.

A fehérjefragmentumokat 15% SDS-poliakrilamid-gél-elektroforézissel választjuk el, és elektroforetikus úton polivinilidén-difluorid-membránra (Immobilon-P, Millipore) visszük át. *Coomassie*-kékfestés után a leg-erősebb különálló csíkokat kivágjuk, és gázfázisú aminosavszekvenátorban elemezzük.

Aminopeptidázaktivitásra dúsított H110D-frakció (H11A) készítése

Az elasztázemésztésből 17 000 g-vel 20 percig tartó centrifugálással kapott üledéket felvesszük PBS-ben

4 °C-on, ismét centrifugáljuk, újból felvesszük 1% Tween-t tartalmazó PBS-azidban, és 1 óra hosszat keveretjük. A szuszpenziót 17 000 g-vel 20 percig centrifugáljuk, majd a felülúszót elöntjük. Az üledéket többször kivonjuk PBS-azid+1% Thesittel. A 17 000 g-vel 20 percig tartó centrifugálással kapott felülúszókat összeöntjük, és 1 óra 20 percig 100 000 g-n ultracentrifugáljuk. A felülúszót ConA-affinitási oszlopra (Affigel, BioRad) visszük, a kötődött anyagot eluáljuk és tovább frakcionáljuk MonoQ-oszlopon, ioncsere-kromatográfiával.

Enzimaktivitás-mérések

A H110D-készítmények α-aminoacil-peptid-hidroláz- (mikroszomális aminopeptidáz) aktivitását oldatban az L-leucin, metionin, fenil-alanin és lizin p-nitroanilidjaival (pNA) határozzuk meg. Mindezen aminosav-p-nitroanilid-származékokat a Sigma-tól szerezzük be, kivéve az α-glutaminsavszármazékot, amelyet a Fluka-tól veszünk. Ezen hidrofób (leucin és fenil-alanin) és töltött (α-glutaminsav) aminosavakból készített pNA-származékok az emlős-aminopeptidáz-M-nek és -A-nak ismert szubsztrátjai, ezért választjuk őket a H110D aminopeptidáz aktivitásának mérésére, enzimgátlók és gátló savók hatásának tanulmányozására.

a) Mikrotálcás mérés

Mikro-ELISA-tálcák (Dynatech Immulon 1, Virginia, USA) mélyületeibe 250 µl 50 mmol/literes, pH=7-es HEPES- vagy MOPS-puffert töltünk, valamint a meghatározandó frakcióból 1–10 µl-t. A tálcákat ezután 37 °C-on előmelegítjük 10 percig, majd 10 µl 25 mmol/literes aminosav-p-nitroanilid-szubsztrátot adunk. A kezdeti fényelnyelést (*optical density*, OD) 405 nm-en mérjük egy ELISA-tálca-leolvasóval, majd a tálcát 37 °C-on tartjuk 15–30 percig. A végpon-ti OD-t leolvassuk, és az OD percenkénti változását adjuk meg 1 mg fehérjére vonatkoztatva.

b) Gátlószer-érzékenység

A fenti a) módszert használjuk azzal a különbséggel, hogy a 250 µl pufferbe adjuk a gátlószert, valamint 10 µl ConA-H110D-t, és 37 °C-on 10 percig előmelegítjük, mielőtt a szubsztrátot (leucin-pNA vagy glutaminsav-pNA) hozzáadnánk. A százalékos gátlást a következő képlet szerint számoljuk:

$$\frac{x-y}{x} \times 100 = \text{gátlási százalék}$$

ahol x=az enzim által okozott ΔOD/perc gátlószer nélkül, y=az enzim által okozott ΔOD/perc gátlószer jelenlétében. Különböző osztályokba tartozó enzimeket gátló kilenc szert vizsgálunk külön-külön: Amastatin, Bestatin (metalloproteáz, aminopeptidáz), 1,10-fenantrolin, EDTA (metalloproteáz), foszforamidon (metalloproteáz, termolizin, kollagenáz), Aprotinin (szerin-proteáz), Pepstatin (aszparaginsav-proteáz), PMSF (szerin- és ciszteinproteáz) és E64 (ciszteinproteáz). Amastatint, bestatint, 1,10-fenantrolint, PMSF-t és pepsztatint a Sigma-tól szerzünk be; a többi inhibitort a Boehringer Mannheimtól. Minden egyes inhibitort két Bestatint, 1,10-fenantrolint, PMSF-t és pepsztatint a Sigma-tól szerzünk be; a többi inhibitort a Boehringer Mannheimtól. Minden egyes inhibitort kétféle töménységben használ-

lunk, melyek egyenlők vagy nagyobbak a Boehringer Mannheim által ajánlott legnagyobb töménységénél.

c) Az enzim gátlása antiszérummal

A módszer azonos az a) pontban leírttal, azonban két ELISA-tálcát használunk. Az elsőre mélyületenként 10 µl 1 mg/ml-es ConA-H110D-t, és minden egyes birkából származó immunsavóból 10 µl-t teszünk, a keveréket 15 percig melegítjük 37 °C-on. A második tálcára mélyületenként 250 µl HEPES-bikarbonát-puffert, valamint 10 µl szubsztátot (fenilalanin-pNA vagy α-glutaminsav-pNA) teszünk, és szintén előmelegítjük 15 percig 37 °C-on. Ezután a ConA-H110D+savókeverékeket hozzáadjuk a második tálcán lévő puffershubsztát-keverékekhez, majd a ΔOD/perc értékeket meghatározzuk. Összehasonlítási okokból a b) pont alatt ismertetett képlettel számoljuk a százalékos gátlást, ahol ez esetben $x = \Delta OD / \text{perc}$ az enzimet és kontrollsavót (lólépferritinrel immunizált birkák savója) tartalmazó mélyületek esetében $y = x = \Delta OD / \text{perc}$ az enzimet és egyedi anti-H110D-immunsavót tartalmazó mélyületek esetében. Szintén összehasonlítási célból (18. ábra) védési százalékokat is számolunk a b) alatti képlet segítségével, ahol $x = a$ kontrollállatokban mért átlagos

peteszám a széketben vagy átlagos feregterhelés, $y = a$ H110D-vel immunizált állatokban mért átlagos peteszám a széketben vagy átlagos feregterhelés.

Az enzimaktivitás helyének meghatározása hisztokémiail módszerekkel

Az aminoszintázaktivitást kifejezett *Haemonchus contortus*-okból készült 10 µm vastagságú fagyasztott metszeteken mutatjuk ki L-leucin-4-metoxi-β-naftilamid és L-glutaminsav-4-metoxi-β-naftilamid szubsztátokkal (Nachlas és munkatársai, 1957, Nakane és munkatársai, 1974, Lojda és munkatársai, 1980).

A rekombináns H110D expressziója az eukarióta baculovírus rovarsejt-rendszerben

Expressziós plazmidok készítése

A fentebb leírt 3,5 kb PCR-fragmenseket, egy oligo-dT-adapter (mely egy SalI-hasítóhelyet tartalmaz) és az M1AUS-szekvencia 30–49. bázisainak megfelelő oligo–872 közötti amplifikációval készítettünk, és pT7Blue vektorba klónoztunk. A pT73.5-2-klónban a vektor-polilinker BamHI-helye az inszert 5'-végén, a HindIII-, XbaI- és SalI-helyek a 3'-végén találhatók. Az 5'-vég szekvenciája a következő:

```
BamHI      *!-----oligo 872-----!---3.5K-----
5' GG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC C .....3'
Leu Asn Leu Thr Pro Ile .....
```

A csillag a 3' dT/dA hosszabbítást jelzi, amelyet a pT7Blue vektorba klónozásnál használtunk.

A 3,5 PCR 2-klónját HindIII-mal emésztjük (egyetlen hasítóhelye a vektor-polilinkerszekvenciában van, a 3,5 kd gén 3'-végénél), és a végeket deoxinukleotidokkal töltjük fel DNS-polimeráz-I (Klenow-fragmens) segítségével Maniatis és munkatársai (1982) módszere szerint. A végekhez egy BamHI-linkert (5'CGGATCCG3'; New England Biolabs katalógusszám: 1021) kötünk, és az extra BamHI-hellyel rendelkező klónokat választjuk ki, melyekből a teljes H110D-gén kivágható BamHI-gyel. A BamHI-fragmenst 0,6 vegyes%-os agarózgélben és Tris-acetát-pufferben végzett elektroforézissel izoláljuk, majd GENE CLEAN- (Bio101) készüléken tisztítjuk; a műveletet kétszer végezzük el. A tisztított fragmenst ezután BamHI-emésztett, foszfatázkezelt pBlueBac-II-be (Invitrogen Corp.) ligáljuk, és a frag-

menst a helyes irányban (azaz a 3,5 PCR 2-klón 5'-végét a baculovírus poliédron-promoterének ellenőrzése alá helyezve) tartalmazó klónokat NheI- és XbaI-emésztéssel azonosítjuk. A kapott plazmidot részlegesen emésztjük BamHI-gyel, és a végeket a fentiek szerint feltöltjük. Egy ATG-t tartalmazó NcoI-linkert (5'CCCATGGG3'; New England Biolabs katalógusszám: 1040) adunk, és a keveréket ligáljuk. Azokat a klónokat, amelyekben a linker a 3,5 PCR 2. számú klón 5'-BamHI-helyéhez kötődött, és nem a 3'-helyhez, NcoI-emésztéssel azonosítjuk. A kapott plazmidot, melyet pBB3.5-2(N) jellel látunk el, a 19. ábra ismerteti.

Ezen műveletek során egy leolvasási keretbe eső ATG-t illesztettünk a 3,5 PCR 2-klón-inszert 5'-végéhez, ami a transzláció megindításához szükséges. A kezdő ATG-t körülvevő szekvencia a következő:

```
BamHI--NcoI link-BamHI----*!-----oligo 872-----
!--
5'GGATCCCC ATG GGG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC
C..
Met Gly Ile Arg Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ile
...
```

A termeltetett fehérjéből hiányzik a H110D-szekvencia 2–9. aminosavmaradékainak megfelelő szakasz, viszont az ATG-t követő linkerszekvenciának megfelelő 3 aminosavat tartalmazni fogja.

H110D-szekvenciát tartalmazó rekombináns baculovírus készítése

A pBB3.5-2(N)-plazmidot *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-sejtekbe (kapható az Invitrogen Corp.-nál) transz-

fektáljuk, lineáris *Autographica californica* nukleáris polihedrózis vírus és kationos liposzómák segítségével (Invitrogen Corp. transzfekciós reagenskészlet) a gyártó útmutatásai szerint. A sejteket TC-100-tápfolyadékban (Sigma) tartjuk, főtális borjúsavó (CLS Ltd.; 56 °C-on 45 percig hőinaktiválva) és antibiotikumok (penicillin, streptomycin és gentamicin; CLS Ltd.) jelenlétében. Kontrolltranszfekciót is végzünk olyan pBB3.5-2-plazmida, amelyben a beillesztett ATG a 3,5 PCR 2-klón-szekvencia 3'-végéhez került. A rekombináns plakkokat azon az alapon választjuk ki, hogy a pBlueBac-II-vektor *E. coli* β -galaktozidázt is kódol, ezért X-galt adunk a fedőagarozba. A kék plakkokból felvesszünk, és két további plakk tisztítási körben mentesítjük a szennyező vad típusú vírustól (melynek jelenlétére a nukleáris polihedronok utalnak). A tisztított vírusokat 3.5-2-P2A, -P3A és -P4A jellel látjuk el, és kétszeri Sf9-fertőzéssel felszaporítjuk. A kontrolltranszfekcióból egy plakkot veszünk fel, ezt 3.5-2-rev-nek nevezzük.

A H110D-termelés meghatározása a rekombináns baculovirussal fertőzött rovarsejtekben

Egy rétegben növekvő Sf9-sejteket (1×10^6 sejt egy 25 cm²-es edényben) fertőzünk a 3.5-2 vírussal, a vad típusú (*wild type*, wt) vírussal, egy β -galaktozidázt termelő vírussal vagy semmivel. Négy napig 26 °C-on növesztés után a sejteket gyengéd rázással elválasztjuk az aljzattól, centrifugálással (2000 fordulat/perc 10 perc) összegyűjtjük, és a sejtes üledéket háromszori lefagyasztás-felolvasztással elroncsoljuk. Az üledéket 0,5 ml PBS-ben felvesszük, 25 μ l-es mintákból az aminopeptidáz-M-aktivitást meghatározzuk a fenti mikrotálcás módszer segítségével.

15 μ l-es mintákat (3×10^4 sejtnek felel meg) elektroforezálunk denaturáló 7,5%-os SDS-poliakrilamidgélekben. Az egyik gél *Coomassie Blue* festékkel festjük a fehérjetermelés szintjének meghatározása céljából. A másik gél Western-blotoljuk, a blotot anti-H110D-vel vizsgáljuk (a korábban leírtak szerint).

EREDMÉNYEK

Az immunológiai szempontból pozitív klónok vizsgálata

Az M1-klónon tisztított ellenanyagok vizsgálata

Az öt, ellenanyaggal reagáló klónon tisztított ellenanyagokat egy H110D-re dúsított kivonatból készült Western-bloton vizsgáljuk. Amint azt a 8. ábra mutatja, mind az öt klónon tisztított ellenanyag felismeri a H110D-kettőst. Mindazonáltal esetünkben az M1-klónnal tapasztaltuk a legerősebb reakciót (8d. ábra) a λ gt11 negatív kontrollblothoz képest. Ezért ezt a klónt vizsgáltuk tovább.

Northern-blot-vizsgálat az M1-klónnal

A *Haemonchus contortus* mRNS-ből készült Northern-blotot az M1-inszerttel vizsgálva a 9. ábra szerinti képet kapjuk. Egyetlen mRNS-csíkot látunk, körülbelül 3,5 kb nagyságút. Ez elegendő egy körülbelül 110 kD-os fehérje kódolásához.

Az M1-klón szekvenciaanalízise

Az EcoRI-emésztéssel nyert DNS-fragmentumok elemzése szerint az M1-inszert mintegy 300 bp hosszú.

A DNS-szekvenciát a 3. ábra mutatja. A fragmens 295 bp hosszú, a nyitott leolvasási keret a 3. számú bázisnál kezdődik.

A B1A-klón Northern-blot-elemzése

A *Haemonchus contortus* mRNS-ből készült Northern-blotot a B1A-inszerttel vizsgálva a 9c. ábra szerinti képet kapjuk. Hasonlóan az M1-hez, egyetlen mRNS-csíkot látunk, körülbelül 3,5 kb nagyságút.

A B1A- és B2-klónok szekvenciaanalízise

A B1A-klónok szekvenálásának eredményét (szekvenciaazonosító szám: 2 és 3) és a teljes szekvenciát (szekvenciaazonosító szám: 2) az 5. ábra mutatja a H11-1 (szekvenciaazonosító szám: 19) és az AustB1 (szekvenciaazonosító szám: 6) szekvenciákhoz igazítva. Az inszert 484 bp hosszú, és az első bázison kezdődik egy nyitott leolvasási keret. A B2 EcoRI-emésztéséből nyert 3 fragmens alapján összeállított szekvenciát (szekvenciaazonosító szám: 4), mely 581 bp hosszú, a 4. ábra mutatja a H11-2-höz igazítva. A szekvenciában egy nyitott leolvasási keret található, mely a 3-213. bázisok között van; a stopkodon és a lefordításra nem kerülő régió megfelel a 2,5 kb PCR-szekvenciának (szekvenciaazonosító szám: 7).

Az M1 és a B1A expressziója E. coli-ban

GST-expressziós vektorba klónozás után olyan klónokat kapunk, amelyek az M1 esetében 38-40 kb, a B1A esetében 45 kD nagyságú fúziós fehérjét termelnek. Ez megfelel az inszertek nagyságának, a glutation-S-transzferáz nagyságának figyelembevételével. Mindkét fúziós fehérje igen erősen reagál Western-bloton a H110DE ellen termelt, affinitástisztított ellenanyagokkal (11. ábra). A fúziós fehérjét oldhatatlan, úgynevezett *inclusion body*-kban (fehérjezárványokban) találjuk.

Az M1-GST és B1A-GST fúziós fehérjékkel immunizált birkák ellenanyagválasza

A fúziós fehérjékkel injektált birkák szérumát Western-blotokon vizsgáljuk H110D-készítményekkel szemben. Mind az M1-GST, mind a B1A-GST ellenanyagokat vált ki, melyek fajlagosan felismerik a H110D-kettőst (13. ábra). A negatív kontrollbirkákból származó savó nem ismeri fel a H110D-kettőst.

M1- vagy B1A-inszert-DNS-sel hibridizáló klónok kiválasztása és jellemzése

Az M1-próbával hibridizáló pozitív klónt M1AUS-nak nevezzük (szekvenciaazonosító szám: 5), a B1A-val hibridizálót pedig AustB1-nek (szekvenciaazonosító szám: 6). A tisztított plazmid-DNS EcoRI-emésztése szerint az inszert mintegy 900 bp hosszú az M1AUS esetében, és 1,6 kb hosszú az AustB1 esetében. A 9b. és 9d. ábrák szerint Northern-bloton az M1AUS és az AustB1 ugyanolyan nagyságú (körülbelül 3,5 kb hosszú) mRNS-hez hibridizál, mint az M1 és a B1A.

Az M1AUS szekvenciaanalízise

Az M1AUS-fragmens teljes szekvenálását szintetikus oligonukleotidokat használó „sétáló”-technika segítségével végezzük mindkét végről kiindulva. A szekvencia szerint az M1AUS-inszert 948 bp hosszú, amint azt a 3. ábra mutatja. A szekvencia (szekvenciaazono-

sító szám: 5) ATG-vel kezdődik (ami a metionin kódja), és teljes hosszában egy nyitott leolvasási keretet alkot. A szekvencia 19 bázispárral hosszabb az 5'-végén, mint az M1-szekvencia, és 634 bázispárral hosszabb a 3'-végén. A két klónban közös szekvencia (20–314) csak két nukleotidkülönbséget mutat a harmadik kodonpozícióban. Az összes lehetséges leolvasási keret összehasonlítása különféle adatbázisokkal azt mutatja, hogy az első bázisnál ATG-vel kezdődő keret mutat homológiát a mikroszomális aminosavszekvenciák családjának tagjaival.

Az AustB1 szekvenciája

Az Aust1-fragmens teljes szekvenálását szintetikus oligonukleotidokat használó „sétáló”-technika segítségével végezzük mindkét végről kiindulva. A DNS-szekvencia (szekvencaazonosító szám: 6) az 5. ábrán látható. A klón 1689 bp hosszú, és a 2. nukleotidtól kezdve egy nyitott leolvasási keretet tartalmaz. Ez a szekvencia része az 1. ábrán bemutatott H11-1-nek. A szekvencia aminosavfordítása az aminosavszekvenciákra jellemző cinkkötő részt tartalmaz.

A H110D-mRNS-ekből készült cDNS PCR-amplifikációja M1AUS-primerrel

Haemonchus contortus mRNS-ből cDNS-t szintetizálunk, a DNS további kezelését és klónozását segítő adaptorszekvenciát tartalmazó oligo-dT-primer használatával. Ezt a cDNS-t azután az M1AUS-szekvencia PCR-amplifikációjára használjuk, 5'-primerként a 865–885. pozíciókon alapuló szintetikus oligonukleotidot alkalmazva. Egy körülbelül 2,5 kb PCR-fragmentst amplifikálunk. Ez körülbelül a várható nagyság az mRNS hosszának és emlős-aminopeptidáz-cDNS-szekvenciák hosszának ismeretében.

Egy második sorozat PCR-reakciót is végzünk, az M1AUS 5'-végéhez közel eső primerrel (30–49. bázisok). Az agarózgélben négy csíkot észlelünk. Ezek legnagyobbika 3,5 kb hosszú, ami megfelel a PCR-termék megjósolt nagyságának.

Az M1AUS primerrel készült 2,5 kb és 3,5 kb PCR-termékek klónozása és szekvenálása

A 2,5 kb és 3,5 kb PCR-termékeket klónozzuk, és 2,5 PCR (szekvencaazonosító szám: 7), illetve 3,5 PCR (szekvencaazonosító szám: 8, 14 és 15 a 2., 10. és 19. számú klónok esetében) jelzéssel látjuk el. Northern blotokon a 2,5 PCR, valamint a 3,5 PCR (2. számú klón, 3,5 PCR–2) hibridizál egy körülbelül 3,5 kb hosszú mRNS-sel (9. ábra e, f), hasonló mintázatban (az mRNS forrásul szolgáló *Haemonchus* korának függvényében), mint az M1, B1A, M1AUS és az AustB1.

A klónok teljes szekvenálását úgynevezett oligonukleotidséta módszerével végezzük. Amint azt az 1. ábra mutatja, a 2,5 kb termék szekvenciája (szekvencaazonosító szám: 7) része a H11-2-nek (szekvencaazonosító szám: 20), és a 3,5 kb termék (szekvencaazonosító szám: 18) a H11-3 (szekvencaazonosító szám: 21) nagyobb részét alkotja. Mindkét szekvencia aminosavfordítása (6. ábra) tartalmazza a His Glu Xaa Xaa His Xaa Trp (HEXXHXW) cinkkötő elemet, mely a mikroszomális aminosavszekvenciák jellemzője.

Az 5'-végről származó PCR-klónok szekvenálása

A cDNS-t olyan primerrel szintetizáljuk, amelyik az AustB1-cDNS-klónban, a 2,5 PCR-ben és a 3,5 PCR-ben egyaránt megtalálható konzervált szakasznak felel meg, mely szakasz az ezen szekvenciáknak megfelelő mRNS-sel az 5'-végtől körülbelül 1,3 kb távolságra hibridizál. A cDNS-ekre C-farkat rakunk az 5'-végén, majd végrehajtjuk a PCR-reakciókat az 5'-végén egy univerzális rögzítő (*anchor*, A) primerrel, a 3'-végén specifikus AUSTB1-, 2,5 PCR- és 3,5 PCR 2. számú klónprimerekkel (szekvencaazonosító szám: 6, 7, 8). Minden egyes reakció a várt nagyságú terméket adja, 1,3 kb körül: 1301 bp (szekvencaazonosító szám: 9); 1280 bp (szekvencaazonosító szám: 10); 1292 bp (szekvencaazonosító szám: 11). Mindhárom szekvencia tartalmaz az 5'-végén egy le nem fordított szakaszt (2. ábra). Ezek ugyanazon 22 bp szekvenciával kezdődnek (5'GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG3'); ez *Spliced Leader Sequence-1* (SL1) néven ismert, és számos fonalféreg génjeinek 5'-végi le nem fordított szakaszában jelen van (Huang és munkatársai, 1990). A szekvencaazonosító szám 9 és 10 jelű szekvenciákban az SL1-szekvencia közvetlenül a kezdő ATG előtt van. A szekvencaazonosító szám: 11-ben 13 bázis ékeződik az ATG és az SL1 közé. Mindhárom szekvenciában van teljes hosszúságú nyitott leolvasási keret.

Az AustB1 3'-végi PCR-klónjának szekvenálása

A szekvencaazonosító szám: 6 jelű, az AustB1 1414–1438. pozíciójának megfelelő specifikus primer alkalmazásával végzett PCR-terméke a várt nagyságú szekvenciával kezdődik. A klónozott csík szekvenálása a szekvencaazonosító szám: 12 és 13 jelű szekvenciákat adja. Ezekben nyitott leolvasási keret van az 1–615. bázisok között, továbbá egy nagyobb le nem fordított szakasz.

A klónozott PCR-termékek szekvencaanalízise

A fent leírt szekvenciákból összeállított H11-1, H11-2 és H11-3 szekvenciákat a 2. ábra mutatja, az ezekből következtetett aminosavszekvenciákat pedig a 6a. ábra. A bemutatott DNS-szekvenciák következtetett aminosavfordításait megerősítik az Edman- és CNBr-fragmentsek aminosavsorrendjeivel talált egyezések (7. ábra). Így például a H11S (szekvencaazonosító szám: 16) 29 N-terminális aminosavából 27 megegyezik a H11-2 61–90. aminosavjaival (7b. ábra). A 78. pozícióban lévő valin (V) és a 90. pozícióban lévő glicin (G) egyezése jellemző a H11-2-re, hiszen a H11-3-ban a 90. pozícióban aszparagin (N) van, a H11-1-ben pedig a 86. pozícióban (mely a H11-2-ben a 78-nak felel meg) leucin (L). A H11S N-terminális aminosavsorrendjéből (szekvencaazonosító szám: 16) két aminosav nem egyezik az itt ismertetett három H110D-szekvencia egyikével sem. Különösen figyelemreméltó a nagyon hasonló, de mégis különálló Pep-A és -B (korábban a WO 90/11086-ban közölt) szekvenciák tökéletes egyezése a H11-2-vel, illetve H11-1-gyel az 540–555. régióban. Hasonlóképpen a 450–470. régióban a Pep-D tökéletesen egyezik a H11-2-vel, míg a hasonló, de nem azonos Pep-E-fragmens inkább a H11-3-mal egyezik.

Példaképpen a H11-3 aminosav fordítását teljes hosszában hasonlítjuk az emlős-aminopeptidázok két

képviselőjéhez a 6b. ábrán. A H110D homológiáját ezen aminopeptidázokhoz a keretezett, azonos aminosavak mutatják. A mikroszomális aminopeptidázok jellegzetes eleme (*motif*) a HEXXH₂W szekvencia, amely cinkkötőhelyként működik (Jongenee és munkatársai, 1989; Vallee és munkatársai, 1990); ezt a 6. ábrán csillagok jelzik. Ez a szekvencia, mely a H11-1, H11-2 és H11-3 fordításaiban egyaránt jelen van, az összes mikroszomális aminopeptidázban megőrződött. Vanak a mikroszomális emlős- és *Haemonchus*-aminopeptidázoknak más közös tulajdonságai is, mint a viszonylag rövid sejten belüli szakasz, az N-terminushoz közeli egyetlen transzmembránrégió és számos potenciális glikolizálási pont. A H11-1, H11-2 és H11-3 szekvenciáknak az emlős-aminopeptidázokhoz mért homológiájának fokát (52–55% hasonlóság, 30–32% azonosság) a 2. táblázat mutatja be.

Southern-blot-analízis

A *H. contortus* genomi DNS-ének Southern-blotjait különböző H110D-cDNS-klónokkal és PCR-termékek-

kel kezelve az eredményeket a 10. ábra mutatja. Minden próba több csíkkal hibridizál; ez jellegzetesen többgénés géncsaládra utal. Amint az várható, a B1A és az AustB1 egymáshoz képest hasonló hibridizációs mintázatot mutat, mint ahogyan az M1AUS és a 3,5 kb PCR is. Mindazonáltal ezen mintázatok észrevehetően különböznek egymástól és a 3,5 kb PCR-próba által mutatottól még közepesen sztringens körülmények között is (10. ábra A), a három cDNS különböző homológiaszintjeinek megfelelően.

A H110D-hez kötött aminopeptidázaktivitás kimutatása

A mikroszomális aminopeptidázaktivitás a H110D-t tartalmazó frakciókban mutatható ki, azaz a Thesit-kivonatok ultracentrifugálási felülúszóiban, a ConA-kötő frakciókban (ConA-H110D) és a MonoQ-oszlopról nyert, H11D-tartalmú frakciókban (3. táblázat). Az összes használt szubsztrátra nézve nő a specifikus aktivitás, ahogyan a H110D tisztasága növekszik.

3. táblázat

Egy tipikus H110D-tisztítás frakcióinak enzimaktivitása (OD/perc/mg fehérje)

	Fenilalanin-pNA	Leucin-pNA	Lizin-pNA	α -glutaminsav-pNA	Mctionin-pNA
PBS	0,20	0,08	0,12	0,01	0,16
1% Tween20/PBS	0,15	0,15	0,09	0,01	0,09
1% Thesit/PBS	1,94	1,25	0,57	0,54	1,91
ConA-H110D	4,08	3,01	1,43	2,09	3,84
CamQ-H110D	6,55	5,01	3,01	3,90	6,41

Az emlős-aminopeptidázok gátlószereinek hatása a H110D aminopeptidáz aktivitására

A bestatin nevű inhibitor a ConA-H110D-hez adva a gyártó (Boehringer Mannheim) által ajánlott koncentrációban a leucin-p-nitroaniliddel szemben mutatott aktivitást mintegy 70%-kal csökkenti. Kísérletsorozatot végzünk egy sor proteázinhibitor aktivitásgátló hatásának tesztelésre. A metalloproteázokra és aminopeptidázokra

nem specifikus gátlószerek nem csökkentették a reakció sebességét. A metalloproteázokat vagy aminopeptidázokat ismerten gátló inhibitorok csökkentik a reakció sebességét, amint azt a 4. táblázat mutatja. A leghatékonyabb inhibitor 5 mmol/liter fenantrolin. A két szubsztrát közül az egyik, az α -glutaminsav-p-nitroanilid az emlős-aminopeptidáz–A szubsztrátja, a másik, a leucin-pNA az emlős-aminopeptidáz–M szubsztrátja.

4. táblázat

A H110D aminopeptidáz aktivitásának gátlása különféle proteázgátlókkal (gátlási százalék)

Inhibitor	Koncentráció	α -glutaminsav-pNA ¹	Leucin-pNA ²
Amastatin	10 μ mol/liter	0	61
Amastatin	50 μ mol/liter	0	66
Bestatin	50 μ mol/liter	23	63
Bestatin	100 μ mol/liter	35	68
EDTA	1 mmol/liter	17	8
EDTA	10 mmol/liter	21	16
1,10-fenantrolin	1 mmol/liter	78	78

4. táblázat (folytatás)

Inhibitor	Koncentráció	α -glutaminsav-pNA ¹	Leucin-pNA ²
1,10-fenantrolin	10 mmol/liter	85	87
Foszforamidon	10 μ mol/liter	1	0,8
Foszforamidon	50 μ mol/liter	1	7

¹ Emlős aminosztrát – A szubsztát.

² Emlős aminosztrát – M szubsztát.

A H110D további frakcionálása

A ConA-H110D-ioncserés kromatográfiájával, MonoQ-oszlopon kapott frakciók aktivitását a 13a. ábra, a frakciók SDS-PAGE elektroforézisének eredményét a 13b. ábra mutatja.

Az enzimaktivitás továbbá a reciklizáló, szabadfolyású izoelektromos fókuszálással kapott szubfrakciókban is megtalálható (14. és 15. ábra). Alacsonyabb pI-értékeknél (pH=4,5) ezek a szubfrakciók csak a H110D-kettőst alkotó, SDS-PAGÉ-val detektálható nagyobb molekulatömegű csíkot, magasabb pI-értékeknél (pH=6,5) a kisebb molekulatömegű csíkot tartalmazzák. A köztes frakciók mindkét csíkot tartalmazzák. A kisebb csíkot MonoQ-n végzett ioncserés kromatográfiával is ki lehet nyerni egy Pharmacia SMART®-készüléken. Mindezen szubfrakciók kötik a H110D elleni ellenanyagokat, amelyeket az M1 jelű λ gt11-klón által termelt fehérjén affinitási kromatográfiával tisztítottunk, szemben az inszertet nem tartalmazó λ gt11-klónon tisztított ellenanyagokkal (14c. ábra). Az összes szubfrakció köti a TS3/19.7 jelű monoklonális ellenanyagot (14c. ábra), amely ellenanyag szintén kötődik az M1-klón által termelt rekombináns fehérjéhez. Az összes szubfrakció mutat mikroszomális aminosztrátaktivitást (15c. ábra), habár ezen aktivitás viszonylag alacsony a legalacsonyabb és legmagasabb pH-n nyert frakciókban. Ezen alacsonyabb aktivitás alighanem az alacsonyabb fehérjekoncentrációnak tudható be, vagy a szubfrakcionálás során elszennvedett extrém pH-k hatásainak, vagy annak, hogy a kisebb és a nagyobb csíkoknak egyaránt jelen kell lenniük a maximális aktivitáshoz.

Védőoltása H110D elválasztott komponenseivel

Az izoelektromos fókuszálással vagy ioncserés kromatográfiával elválasztott felső és alsó csíkok védőhatású ellenanyagokat váltanak ki, ha birkába oltjuk őket, amint azt a következő kísérlet bemutatja. Harminc, körülbelül hat hónapos birkát 5 csoportba osztunk úgy, hogy az egyes csoportok súly szerint azonos eloszlást mutassanak. Minden egyes állatba összesen 150 μ g fehérjét oltunk 3 egyenlő adagban, 54 nap alatt, amint azt Munn és munkatársai (1992), továbbá Tavernor és munkatársai (1992 a, b) leírják. Az L csoportba tartozó állatokba a H110D-kettős kisebb molekulatömegű komponensét oltjuk, az U jelűekbe a nagyobb komponensét, az U+L jelű csoportba az újraegyesített alsó és felső csíkokat, míg a D csoportba az izoelektromos fókuszálás köztes pH-értékein kapott fehérjét oltjuk. A kontroll- (C)

csoport tagjaiba lóól származó lépferritint injekciózunk (mint nem rokon antigént). A birkákat 10 000 fertőzőképes lárvával fertőzzük a harmadik injekció után három héttel, ezután 29–31 nappal a kísérletet befejezzük. A kísérlet eredményeit a 16. ábra foglalja össze. Bármelyik szubfrakció beadása csökkenti a parazita petetermelését mintegy 90%-kal, és a teljes féregszámot 63–84%-kal, mely különbségek minden esetben statisztikailag szignifikánsak ($p < 0,05$) a kontrollhoz képest. A nőstény férgek száma erősebben csökken (70–88%), mint a hím férgek száma, és ez a különbség is szignifikáns ($p < 0,05\%$), kivéve azt az esetet, amikor a birkákat az újraegyesített alsó és felső csíkokkal oltjuk; ekkor a hím férgek számának csökkenése $p < 0,07$ szinten szignifikáns.

Védőoltás H11S-sel és H11A-val

A H110D rövidített, vízdoldékony formája, mely megtartja enzimaktivitását, és a H11S jelet kapta, a teljes molekulából elasztázos emésztéssel állítható elő. Ez a forma túlnyomóan ApM-szerű enzimaktivitást mutat, míg az elasztázal emésztett üledék (H11A) Theresit-kivonata ApA-szerű aktivitásra dúsul (lásd az 5. táblázatot).

5. táblázat

Az enzimaktivitások aránya a H110D frágenseiben (aminosztrát–M : A; leucin-pNA : α -glutaminsav-pNA)

H110D	1,44 : 1
H11S	26,0 : 1
H11A	0,48 : 1

A következő kísérlet megmutatja, hogy a birkák oltása akár H11S-sel, akár H11A-val védőhatást vált ki a *Haemonchus*-fertőzéssel szemben. 18, körülbelül 8 hónapos birkát hatosával 3 csoportba osztunk úgy, hogy a csoportok testsúly szerint azonos összetételt mutassanak. Minden egyes állatba összesen 100 μ g fehérjét oltunk 2 egyenlő adagban, 23 nap alatt, amint azt Munn és munkatársai (1992), továbbá Tavernor és munkatársai (1992 a, b) leírják. Az A csoportba tartozó állatokba H11A-t oltunk, az S jelűekbe H11S-t; a kontroll- (C) csoport tagjaiba lóól származó lépferritint injekciózunk (mint nem rokon antigént). A birkákat 10 000 fertőzőképes lárvával fertőzzük a második injekció után 25 nappal, ezután 34–36 nappal a kísérletet befejezzük. A kísérlet eredményeit a 17. ábra foglalja össze.

A H11S beadása csökkenti a parazita petetermelését mintegy 89%-kal, és a teljes férégszámot 76%-kal; a H11A csökkenti a parazita petetermelését mintegy 98%-kal, és a teljes férégszámot 84%-kal, mely különbségek minden esetben statisztikailag szignifikánsak ($p < 0,05$) a kontrollhoz képest, nem paraméteres statisztikai eljárások alkalmazása esetén.

A H110D aminopeptidáz aktivitásának gátlása ellenanyagokkal

H110D-t tartalmazó oldatokat H110D-tartalmú frakciókkal injekciózott vagy kontrollbirkából származó sávoval inkubálunk. Az oldatok aminopeptidázaktivitását mérjük fenilalanin- és α -glutaminsav-pNA szubsztátokkal. Az aktivitás gátlásának szintje (maximum 80%) összefüggést mutat az adott birkában tapasztalt védőhatással (lásd a 18. ábrát).

Az enzimaktivitás lokalizációja

Kifejlett *Haemonchus contortus*-okból készült fagyasztott metszetet vizsgálunk aminopeptidázaktivitásra. Amint azt a 19. ábra mutatja, az aminopeptidázaktivitás a vékonybél belső felszínén található. A H110D-fehérjét szintén itt találjuk.

A H110D (3,5 PCR 2. számú klón) termeltetése eukarióta baculovírus rovarsejtszisztemben

Az aminopeptidázaktivitás kifejeződése a rovarsejtekben

A fertőzött sejteket összegyűjtjük, és aminopeptidázaktivitásukat meghatározzuk phe-, leu- met- és lys-pNA szubsztátokkal. A meghatározást bonyolítja, hogy a rovarsejteknek maguknak is van aminopeptidázaktivitásuk, amely elsősorban a lizin mellett hasít. Mindazonáltal a termelt H110D-t tartalmazó sejt kivonatok emellett a leu-, met- és phe-pNA-t is hasították csökkenő aktivitás szerinti sorrendben.

A termeltetett H110D (3,5 PCR 2. számú klón) molekulatömege és immunreaktivitása

Fertőzött és kontrollsejtekből származó kivonatokot 7,5%-os SDS-poliakrilamidgélén elektroforetizálunk, majd a gél *Coomassie Blue*-val festjük. A 3,5-2-P3A- és 3,5-2-P4A-fertőzött sejtek lizátumai egyaránt tartalmaznak egy csíkot, mely a H110D-vel egyezően 110 kD nagyságú, és közvetlenül a koexpresszált β -galaktozidáz alatt fut, mely utóbbi molekulatömege 120 kD. Ez a 110 kD csík hiányzik a negatív kontroll-lizátumokból. (Szintén hiányzik a P2A-lizátumokból, melyeknek nincs enzimaktivitásuk.)

Egy másik hasonló, gél Western-blotolunk és anti-H110DN ellenanyagokkal kezelünk (21. ábra). Nagyon erős, specifikus pozitív immunreakciót kapunk a 3,5-2-P3A és 3,5-2-P4A sejtek által termelt 110 kD csík esetében, továbbá a ConA-H110D-t tartalmazó kontrollsávban a natív H110D-kettős esetében, míg a negatív kontrollsávok egyikén sem tapasztalunk reakciót.

HIVATKOZÁSOK

Andreason, G. L. & Evans, G. A. (1980) *Biotechniques* 6, 650.
Blin, N. & Stafford, D. W. (1976). *Nucleic Acids Research* 3, 2303–2308.

- Bowtell, D. D. L., Saint, R. B., Rickard, M. D. & Mitchell, G. F. (1986). *Parasitology* 93, 599–610.
Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). *Analytical Biochemistry* 162, 156–159.
5 Cordingley, J. S., Taylor, D. W., Dunne, D. W. & Butterworth, A. E. (1983). *Gene* 26, 25–39.
Devereux, J., Haerberli, S. & Smithies, O. (1984), *Nucleic Acids Research* 12, 387–395.
Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). *Analytical Biochemistry* 132, 6–13.
10 Fire, A. (1986) *EMBO. Journal* 5, 2673–2680.
Fire, A. & Waterston, R. H. (1989). *EMBO Journal* 8., 3419–3428.
Francis, M. J. & Clarke, B. E. (1989). *Methods in Enzymology* 178, 659.
15 Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988). *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington* 85, 3998–9002.
Gubler, U. & Hoffman, B. J. (1983). *Gene* 25, 263–265.
20 Han, M. & Sternberg, P. W. (1990). *Cell* 63, 921–931.
Huang, X. Y. & Hirsch, D. (1990). *Proceedings of the National Academy of Sciences Washington* 86, 8640–8644.
Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982). *Immunochemistry in Practice*. Blackwell Scientific. London.
25 Jongeneel, C. V., Bouvier, J. & Bairoch, A. (1989). *FEBS Letters* 242, 211–214.
Kenny, A. J. & Maroux, S. (1982). *Physiological Reviews*, 62, 91–128.
30 Kenny, A. J. & Turner, A. J. (1987). *Mammalian Ecto-enzymes*. Elsevier Press, Amsterdam. Volume 14 of *Research Monographs in Cell and Tissue Biology*. (Editors J. T. Dingle & J. L. Gordon).
Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227, 680–685.
35 Lojda, Z. & Gossrau, R. (1980). *Histochemistry* 67, 267–290.
Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Publication.
40 Merrifield, R. B. (1964). *Biochemistry* 3, 1385–1390.
Munn, E. A., Smith T. S., Graham, M., Greenwood, C. A., Tavernor, A. S. & Coetzee, G. (1992). *Parasitology* 106, 63–66.
Nachlas, M. M., Crawford, D. T. and Seligman, A. M. (1957). *J Histochem. & Cytochem.* 5, 264–278.
45 Nakane, P. K. & Kawoi, A. K. (1974). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 22, 1084–1091.
Novén, O., Sjöström, H., Danielsen, E. M., Cowell, G. M. & Skovbjerg, H. (1986). *The Enzymes of the Erythrocyte Plasma Membrane*. In *Molecular and Cellular Basis of Digestion*. Elsevier Press, Amsterdam. (Editors P. Desnuelle, H. Sjöström & O. Noren).
Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd Edition.
55 Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Semenza, G. (1986). *Annual Review of Cell Biology*, 2, 255–313.
Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988). *Gene* 67, 31–40.
Spieth, J. MacMorris, M., Broverman, S., Greenspoon, S. & Blumenthal, T. (1988). *Dev. Biol.* 130, 285–293.
60

Tavernor, A. S., Smith, T. S., Langford, C. F., Graham, M. & Munn, E. A. (1992a). *Parasite Immunol.* 14, 671–675.

Tavernor, A. S., Smith, T. S., Langford, C. F., Munn, E. A. & Graham, M. (1992b). *Parasite Immunol.* 14, 645–655.

Vallee, B. L. & Auld, D. S. (1990). *Biochemistry* 29, 5647–5659.

Watt, V. M. & Yip, C. C. (1989). *Journal of Biological Chemistry* 264, 5480–5487.

Woodward, MP, Young, WW Jr and Bloodgood, RA (1985). Detection of Monoclonal Antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Meth.* 78, 143–153.

Wu, Q., Lahti, J. M., Air, G. M., Burrows, F. D. & Cooper, M. D. (1990). *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington*, 87, 993–997.

5 AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 295 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

10 HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 1

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

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 484 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 2

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

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 216 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

35 TOPOLÓGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 3

ACCTGGTCAG	CAAGCGACCG	ACTGCGTAAA	GGTAACTGCT	CCTCTCAAAA	CTGTTTACTG	60
CTATGGGGTC	CAGGAAGGCG	GTGATGAGGC	ATTCCACAAG	GTGATGGAAC	TATATAATGC	120
GGAACAAGTG	CAGTTGGAGA	AAGACAGTCT	ACGTGAAGCA	TTGGGATGCC	ATAAAGACGT	180
TACAGCTCTA	AAGGACTTTC	TTATGCTGGC	TTTGGA			216

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 581 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

45 TOPOLÓGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 4

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

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 948 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 5

5

ATGACGTCGC	AGGGGAGAAC	GCGGACATTG	CTGAATCTAA	CTCCAATCCG	TCTTATTGTC	60
GCATTATTTT	TAGTAGCTGC	TGCAGTCGGC	CTCTCTATTG	GTCTCACCTA	TTACTTTTACT	120
CGCAAAGCGT	TCGATACCTC	AGAAAAGCCA	GGGAAGGATG	ATACTGGTGG	CAAGGACAAA	180
GACAATTCTC	CCTCTGCGGC	GGAACCTACTC	CTTCCAAGTA	ATATAAAACC	ATTGTCTTAC	240
GACTTGACGA	TCAAAACATA	TCTACCTGGT	TATGTGGACT	TCCCACCGGA	GAAAAACCTC	300
ACATTTCGATG	GGCGTGTGGA	AATATCAATG	GTTGTAATTG	AGCCAACAAA	GAGTATCGTA	360
CTCAATTCAA	AGAAGATCTC	TGTAATACCC	CAAGAATGTG	AACTGGTATC	GGGCGATAAA	420
AAATTGCAAA	TTGAAAAGTG	AAAGGAGCAC	CCAAGACTGG	AAAAGGTTGA	GTTTCTTATC	480
AAAAGCCAAC	TGAAAAAGA	TTCAAAATC	TTGCTCAAGT	CGGCTTACAT	CGGTCTCATC	540
AGCAACAGCC	TTGGTGGAA	CTACCAGACC	ACTTATACCA	CCCCGGATGG	CACCCCTAAG	600
ATCGCTGCAG	TTTCACAAA	TGAGCCCAT	GATGCTCGTC	GAATGGTACC	ATGCATGGAT	660
GAACCGAAAT	ACAAAGCAA	CTGGACCGTT	ACTGTCATTC	ATCCAAAAGG	CACCAAAGCC	720
GTCTCGAATG	GAATCGAAGT	GAACGGAGAT	GGAGAGATCA	GTGGTGATTG	GATCACATCG	780
AAGTTCTTGA	CTACTCCACG	GATGTCATCC	TACTTGTGGG	CAGTTATGGT	TTCAGAATTT	840
GAATACATCG	AAGGTGAAAC	AAAGACGGGT	GTTGCGTTCC	GTATATGGTC	ACGCCAGAG	900
GCAAAGAAGA	TGACACAATA	TGCTCTGCAA	TCTGGTATCA	AGTGCATA		948

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 1689 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 6

25

AATTCCGGCT	CGTCCGGAAG	CTATGAAGAT	GACAGAATAT	GCCATGATAG	CTGGAATCAA	60
ATGTTTGGAT	TACTATGAGG	ACTTCTTCGG	GATCAAATTC	CCACTTCCAA	AACAAGATAT	120
GGTTGCTCTT	CCTGACTTCT	CATCTGGTGC	TATGGAGAAC	TGGGGTCTCA	TCACATACAG	180
GGAGGGTTCC	GTGCTCTACG	ATGAAAACCT	CTACGGACCA	ATGAATAAGG	AGCGGGTTGC	240
AGAAGTGATC	GCGCACGAAC	TTGCACATCA	GTGGTTCCGG	AATTTGGTCA	CGATGAAGTG	300
GTGGGATAAC	CTATGGCTGA	ACGAAGGATT	CGCGTCATTC	GTGGAATACA	TCGGAGCCGA	360
CTTCATCAGC	GATGGTCTAT	GGGAAATGAA	AGATTCTTTC	CTGCTGGCAC	CGTACACAAG	420
TGGTATTACG	GCTGATGCAG	TAGCTTCAAG	CCATCCGCTT	TCCTTCAGAA	TAGATAAGGC	480
TGCAGATGTA	TCAGAAGCGT	TCGATGATAT	CACATACCGT	AAAGGAGCAT	CCGTTCTTCA	540
AATGCTATTG	AATTTAGTTG	GGGACGAAAA	TTTCAAGCAG	TCTGTTTCGC	GTTACCTCAA	600
GAAGTTTTC	TATGATAATG	CGGCTGCTGA	AGATTATG	GCAGCATTCG	ACGAAACCGT	660
CCAAGGATA	ACCGACCTA	ATGGTGGACC	ATTGAAAATG	TCCGAGTTTG	CGCCACAATG	720
GACAACCTCAG	ATGGGGTTCC	CTGTTCTTAC	GTGCGAGTCG	GTTAACGCAA	CGACTTTGAA	780
AGTCACCCAA	AAACGATACA	GGCAGAACAA	GGATGCAAA	GAACAGAGA	AGTACCGTCA	840
TCCAACCTTAT	GGGTTCAAAT	GGGATGTTCC	TCTGTGGTAT	CAGGAAGATG	AACAGCAAGT	900
GAAAAGAACT	TGGTTAAAAA	GAGAGGAACC	GCTCTATTTC	CATGTAAGCA	ATTCTGATTC	960
GTGAGTTGTG	GTGAATGCCG	AACGTCGTGC	TTTTTGCCGA	TCAAATATG	ACGCTAACGG	1020
TTGGAGGAAC	ATTATGAGAA	GACTCAAGCA	GAATCATAAG	GTCTATGGTC	CACGAACAAG	1080
AAACGCTCTC	ATAAGTGATG	CGTTTGACGC	AGCTGCAGTT	GAGGAAATGA	ATTACGAGAC	1140
CGTATTTGAA	ATGCTCAAAT	ACACCGTGAA	AGAAGAGGAT	TACTTACCAT	GGAAGGAGGC	1200
AATATCAGGA	TTCAATACAA	TTTTGGACTT	TTTCGGCAGC	GAACCCGAAT	CTCAATGGGC	1260
TTCCGAATAC	ATGCGAAAC	TGATGAAGCC	AATTTATGAC	AAGAGTAGCA	TCAAGTTTAT	1320
AGCGGAGAAC	TACAAAAAG	ATTGCTTTT	CTTCAAAAT	AATCTCCAAA	TAGCTGTTAT	1380
TGACACATAC	TGTGGTCTTG	GAGGCAAGA	ATGCTTGAA	GAAATGAAAA	AGCTTTTGA	1440
CAAGGAGGTC	ATGAAATGTC	AACCTGGTCA	GCAAGCGACC	GAATGCGTAA	AGGTAACCTGC	1500
TCCTCTCCGA	AAAACGTGTT	ACTGCTATGG	GGTCCAGGAA	GGCGGTGATG	AGGCATTGCA	1560
CAAGGTGATG	GAACATATATA	ATGCGGAACA	AGTGCAGTTG	GAGAAAGACA	GTCTACGTGA	1620
AGCATTGGGA	TGCCATAAAG	ACGTTACAGC	TCTAAAGGGA	CTTCTTATGC	TGGCTTTGGA	1680
TCGGAATTC						1689

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 2472 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 7

55

ACGGGTGTTT	GGTTCCGTAT	ATGGTCTCGA	CCAGAGGCGA	AACGAATGAC	GGCATACGCT	60
TTGGATGCTG	GCATCAGATG	CCTGGAGTTC	TATGAGAAGT	TCTTTGACAT	AAAATTCCTT	120
CTGGAAAAAC	AAGATATGAT	TGCTCTTCTT	GATTTTCCCG	CTGGTGCCAT	GGAAAACTGG	180
GGCCTTATCA	CTTATAGAGA	GGATTCTCTC	CTATACGATG	AAAAAATTTA	TGCACCGATG	240

AATAACAGC	GGGTGCTCT	CGTAGTTGCT	CACGAGCTTG	CTCATCAGTG	GTTCCGCAAT	300
CTGGTCACAC	TGAAGTGGTG	GGATGATACG	TGGTTGAACG	AAGGTTTTGC	AACATTTGTT	360
GAGTATCTTG	GAATGGACGA	AATTAGCCAC	AACAATTTC	GAACGCAAGA	TTTCTTCTTG	420
CTCGATGGAA	TGGATCGCGG	AATGAGAGCT	GACTCGGCAG	CATCGAGCCA	TCCGCTTTCG	480
TTTAGGATTG	ACAAAGCGGC	AGAAGTTGCC	GAAGCCTTTG	ACGATATTTT	ATACGCCAAG	540
GGAGCGTCAG	TTCTCACTAT	GCTACGGGCT	TTGATTGGAG	AGGACAATTA	CAGGAATGCT	600
GTTGTGCAAT	ACCTCAAGAA	GTTCTCCTAC	AGCAATGCAC	AAGCAGCCGA	TCTGTGGAAC	660
GTCTTCAATG	AAGTTGTCAA	AGGTGTTAAG	GGTCTGACG	GCAACGTCAT	GAAAATCGAC	720
CAATTTACCG	ATCAGTGGAC	GTATCAGATG	GGTTATCCTG	TGGTTAAAGT	AGAAGAATTT	780
AATGCGACCG	CCCTAAAGGT	TACGCAGAGC	CGGTACAAGA	CAAATAAAGA	CGCCTTGGAA	840
CCAGAGAAAT	ATCGTAATCC	AAAATACGGG	TTCAAGTGGG	ATGTTCCCCT	ATGGTATCAG	900
GAAGGCAATA	GCAAAGAGGT	GAAGCGAACA	TGGCTAAAAA	GAGATGAACC	GCTGTACTTG	960
AACGTCAACA	ATCGGGATAC	ATCCCTTGTTG	GTGAACGCTG	ATCGACATGG	ATTTTATCGA	1020
CAAACTATG	ATGCCAACGG	TTGGAAAAAG	ATAATCAAGC	AGCTCAAGAA	AGATCACAAG	1080
GTCTTCGGTC	CAAGGACAAG	GAACGCTATC	ATAAGCGATG	CATTTGCTGC	AGCTACGATT	1140
GACGCAATCG	ACTATGAAAT	TCTATTGAAAT	TGATTCGAAT	ATGCCAAAAA	TGAAGAGGAA	1200
TTCTTGCCCTT	GGAAGGAAGC	TCTGTCCGGC	ATGTTCCGAG	TTTTAAAGTT	CTTCGGTAAT	1260
GAGCCGGAGA	CAAAACCAGC	TAGAGCTTAC	ATGATGAGCA	TATTAGAACC	GATGTATAAT	1320
AAGAGCAGCA	TTGATTACAT	CGTCAAGAAT	TATTTGCGATG	ATACGTTATT	CACAAAAATT	1380
AATACTCAA	AGGATATCAT	TGATGCATAT	TGTTCCCTTG	GATCAAAGGA	CTGTATAAAG	1440
CAATAAAGG	ATATCTTCTA	CGATGAGGTT	ATGCCCAAGT	GTAAGGCCGG	GGAAGCAGCA	1500
ACCAAAATGCG	TTAAGGTTTC	CGCTCCTCTT	CGAGCCAATG	TTTACTGTTA	TGGTGTTACAG	1560
GAAGGTGGTG	AAGAAGCTTT	TGAAAAGGTG	ATGGGGCTGT	ATCTAGCAGA	AGATGTTCAA	1620
CTGGAGAAGG	GTATCCTGTT	CAAAGCCTTG	GCATGCCACA	AAGATGTTAC	AGCTCTAAAA	1680
GAACCTCTTT	TGCGAGCCCT	GGACCGTAAA	TGCTCGTTTG	TGCGTCTTCA	GGATGTCCCT	1740
ACCGCTTTCC	GTGCTGTATC	TGAAAACCTT	GTGGGCGAAG	AATTCATGTT	CAATTTCCCTA	1800
ATGGAGAGAT	GGGAGGAAAT	CACGCGGAGC	TTGGAAACAG	AACACAGAGC	AGTTGATAAA	1860
GTGGTCGGCG	CTTGTTGCAC	AGGAATTCGC	TCCCAACAAC	AAATAGATCA	GCTGAAGAAAT	1920
CTACAGAAGA	ACAATGCGCA	GGCTAAGAAG	TTCGGCTCAT	TCACCCAGGA	AATCGAAAAA	1980
GGAGAACATA	AAATTGCCTG	GATCAAGAAA	CATTTTCACA	GATTATCGGA	ATTCTTCAAG	2040
AGAGCAAGAT	CATAGCTTTT	CACACTGAGC	TCCAATTTTA	ACGTCTTCAA	ACTAGGAGAC	2100
AGTTTTGCTG	AAAAGTCAGT	TTCACATTTT	CCGTTTGAAT	GCCATCCATT	CGAATACAAC	2160
CAATAATACC	ATTTTAAGTA	CCTTTCATTC	ACAGTGATTA	CTGAATTTTG	AATATATCAT	2220
GAAGCTTGTA	TCTTGAACGT	TATGATCGGT	GACTTTCAAT	TTATAGAGCT	CACCTCCCAT	2280
TTTGTAGCTG	TGATGACTTG	CATTTAAGAC	CCACCATTTA	CCAGCCTAGA	ATCTTTCCCC	2340
AATACATTCC	AAACTCCGAT	CACCTCCACC	GCTGACAATG	CCCAGATTTG	TTTTTTTGTC	2400
TGCTATCCAT	CTAACTGTTT	CGATCGCCGG	TTGTTTGTC	ATTGCTTATC	TGATAAATAT	2460
TGACGTTGGT	GT					2472

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:
A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
HOSSZA: 3305 bázispár
TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: :kettős szálú
TOPOLOGIÁJA: lineáris
A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-
SÍTÓ SZÁM: 8

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTTATTGT	CGCATTATTT	CTAGTAGCTG	CTGCAGTCGG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCCGAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGACAA	AGACAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAACCTACT	180
CCTTCCAAGT	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	GCACTTGACG	ATCAAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGGAC	TTCCCACCGG	AGAAAAACCT	CACATTCGAT	GGGCGTGTGG	AAATATCAAT	300
GGTTGTAATT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	ACTCAATTCA	AAGAAGATCT	CTGTAATACC	360
CCAAGAATGT	GAAGTGGTAT	CGGGCGATAA	AAAACCTCGAA	ATTGAAAGTG	TAAAGGAGCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTTG	AGTTTCTTAT	CAAAAACCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTCCGCTACA	TCCGTCTCAT	CAGCAACAGC	TTTGGTGGAA	TCTACCGAGC	540
CACTTATACC	ACCCCGGATG	GCACCCCTAA	GATCGCTGCA	GTTTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGAATGGTAC	CATGCATGGA	TGAACCGAAA	TACAAAGCAA	ACTGGACCGT	660
TACTGTCAAT	CATCCAAAAG	GCACCAAAGC	CGTCTCGAAT	GGAATCGAAG	TGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATCACATC	GAAGTTCCTG	ACTACTCCAC	GGATGTCATC	780
CTACTTGTTG	GCAGTTATGG	TTTCAGAATT	TGAATACATC	GAAGGTGAAA	CAAAGACGGG	840
TGTTCCGGTT	CGTATATGGT	CACGCCGAGA	GGCAAGAAGG	ATGACACAAT	ATGCTCTGCA	900
ATCTGGTATC	AAGTGCATAG	AATTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAGAT	TCCCTCTGAA	960
GAAACAAGAT	ATGATTGCCC	TTCTTGATTT	CTCTGCCGGT	GCCATGGAGA	ATTGGGGCCT	1020
CATCACTTAC	AGGGAAAACT	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCTCAT	CAGTGGTTCG	GCGACTTGGT	1140
TACGATGAAG	TGGTGGGATA	ATTTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TACAGAAATT	1200
TATTGGAGCT	GCTCAGATAA	CTCAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TCTGTATGTA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTC	GGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCTTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	CTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380

TTCTGTTCTT	ACTATGCTGA	GAGCCTTGAT	TGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCAGTATC	1440
GCAGTACCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
TGATGAAGTT	GTCAGTGACG	TCGAAGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACAGAGTT	1560
TGCAAGTCAG	TGGACGACTC	AGATGGGCTT	CCCAGTTATT	TCCGTAGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTTTG	AAATTAACGC	AAAGTCGATA	TGAGGCGAAT	AAAGACGCTG	TGGAGAAAGA	1680
GAAGTACCGT	CACCCGAAAT	ACGGATTTAA	ATGGGATATT	CCACTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGATAAAGC	GAACATGGTT	GAGAAGAGAT	GAACCGCTTT	ACTTGCATGT	1800
TAGTGATGCT	GGCGCTCCCT	TTGTGGTGAA	CGCAGACCGC	TATGGATTTT	ATCGACAAAA	1860
TCATGACGCT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGATAATC	ATGAGGTTTA	1920
CAGTCCCCGG	ACAAGGAATG	TCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCGGCTG	CAACTGACGC	1980
AATTGAGTAT	GAGACTGTAT	TTGAACTTCT	GAATTATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATATCT	2040
ACCATTAGAA	ATCGCAATGT	CCGGGATCTC	TTCCGATTTG	AAATACTTCC	CTACCGAGCC	2100
AGAGGCAAG	CCAGCTCAAA	CATACATGAT	GAACATATTG	AAACCGATGT	ATGAAAAAAG	2160
CAGTATCGAC	TTCATTGCCA	ATAACTACAG	AAATGACAAG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAAGAT	GTCATTGATA	TGTTCTGCGC	CCTCGGATCG	CAAGACTGCA	GGAAGAAATA	2280
TAAAAAAGTT	TTCGATGACG	AAGTCATGAA	CAATGTCAGG	GATGGTCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTAAGA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTATTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTCCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TGCCTCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTGGGATG	TCATAAAGAT	GTTACTGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCTTGCGG	GCTCTGGACA	GGAATTCGTC	GTTCGTACGT	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTTATTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCATTG	AAAGTATAGG	ACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAGTGAT	2700
ACCAGCCTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAGCAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760
GAAAAATGGC	ATGAACGCTC	GTCAATTCGG	TGCATTTCGAT	AAAGCAATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGTA	TTCGAATTAC	ATTGCCAGTA	ATCCAGATCT	TAAAGTTCAT	GAAGGAATAT	2940
GACAGGGAAC	TGACTGTCTG	TTGGTCACTG	TTCCACTGAA	TGGAAGTTTT	TACCTACAAA	3000
AAATTTTATC	GTTATATTTG	CCTTCCGTGA	GGGGTCATTG	TTGTCACTTG	AATAGTAAAC	3060
AAAGCTACAT	ATTGGCAACC	GTAGAACAAAT	ATTACTTTCCG	CTTCATCAAA	TGTGTATCTT	3120
CCCTATACCC	TCTTCTTAAC	TGAATTCGGA	AATTTGTTCA	TATTCGTTTG	TAGTCTGTTG	3180
CTCAGAACAC	TTTCTCTCA	ATAGCTTCTT	GTTTGTTTTT	TTTTTGATTG	TATTGATCGT	3240
TTTACAATTG	TATAGATTAG	TTATCTTATA	AATATTGATG	GTTAAAAAAA	AAAAAATAAA	3300
AAAAA						3305

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 1301 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 9

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG	AGACGCAGCA	60
ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG	TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	120
GGTAGCTGCT	GCCGTCGGCC	TCTCAATCGG	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAGCTTT	180
TGATACTACT	GGCGGAAATG	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGATGATA	ATTCCCCATC	240
AGCTGAAGAA	TTACGCTCTC	CAACAACCAT	AAAACCTTTG	ACATACGACT	TAGTAATCAA	300
AACGTATCTG	CCAAACTATG	TAAACTATCC	ACCTGAGAAA	GATTTGCTTA	TTGATGGGAC	360
TGTGGTGATT	GCTATGGAAG	TTGTGGAGCC	AACAAAGTCT	ATTGTGCTCA	ATTGCAAAAA	420
TATTCCTGTA	ATTGCAGACC	AGTGCAGAACT	GTTTTCTAAC	AACCAAAAAC	TCGACATCGA	480
AAAGGTTGTG	GATCAGCCAA	GGCTGGAGAA	AGTCGAATTC	GTTTTGAAGA	AAAAGCTGGA	540
GAAGAATCAG	AAAATCACGC	TCAAGATTGT	ATACATTGGC	CTTATCAACG	ACATGCTTGG	600
AGGACTTTAT	CGAACAACTT	ACACGGATAA	AGATGGTACA	ACCAAGATTG	CTGCATGCAC	660
TCATATGGAA	CCGACGGACG	CCCGTCTTAT	GGTCCCCTGT	TTGACGAGC	CGACGTTTAA	720
GGCAAACCTG	ACTGTGACTG	TGATTTCATCC	GAAGGGCACC	AGTGCCGTGT	CGAATGGAAT	780
AGAAAAGGGA	GAAGGAGAAG	TCTCTGGCGA	TTGGGTCAAC	ACCAGATTCC	ATCCAACCCC	840
GCGAATGCCT	TGCTATTGTA	TTGCTCTTGT	GATTTCCGAA	TTTAAGTACA	TTGAAAATTA	900
TACGAAAAGC	GGTGTTTCAT	TCCGAATATG	GGCTCGTCCG	GAAGCTATGA	AGATGACAGA	960
ATATGCCATG	TAGCTGGAA	TCAAATGCTT	GGATTACTAT	GAGGACTTCT	TCCGGATCAA	1020
ATTCCCTCTT	CCAAAACAAG	ATATGGTTGC	TCTTCTTGAC	TTCTCATCTG	GTGCTATGGA	1080
GAAGTGGGGT	CTCATCACAT	ACAGGGAGGG	TTCCGTACTA	TACGATGAAA	ACCTCTATGG	1140
ACCAATGAAT	AAGGAGCGGG	TTGCAGAACT	GATTGCACAC	GAGCTTGCAC	ATCAGTGGTT	1200
CGGTAATTTG	GTCACGATGA	AGTGGTGGGA	TAACCTATGG	CTAAACGAAG	GATTGCGGTC	1260
ATTCGTAGAA	TACATTGGAG	CCGACTTCAT	CAGCGATGGT	C		1301

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 1280 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 10

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

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA- 20

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TAI:

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 11

HOSSZA: 1293 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA	TCTAGATGAC	GTCGCAGGGG	AGAACGCGGA	60
CATTGCTGAA	TCTAACTCCA	ATCCGTCTTA	TTGTGCGATT	ATTTCTAGTA	GCTGCTGCAG	120
TCGGCCTCTC	TATTGGTCTC	ACCTATTACT	TTACTCGCAA	AGCGTTCGAT	ACCTCAGAAA	180
AGCCAGGGAA	GGATGATACT	GGTGGCAAGG	ACAAAGACAA	TTCTCCCTCT	GCGGCGGAAC	240
TACTCCTTCC	AAGTAATATA	AAACCATTTG	CTTACGACTT	GACGATCAAA	ACATATCTAC	300
CTGGTTATGT	GGACTTCCCA	CCGGAGAAAA	ACCTCACATT	CGATGGGCGT	GTGGAAATAT	360
CAATGGTTGT	AATTGAGCCA	ACAAAGAGTA	TCGTACTCAA	TTCAAAGAAG	ATCTCTGTAA	420
TACCCCAAGA	ATGTGAACTG	GTATCGGGCG	ATAAAAACT	CGAAATTGAA	AGTGTAAGG	480
AGCACCCAAG	ACTGGAAGAA	GTTGAGTTTC	TTATCAAAAG	CCAACCTGAA	AAAGATCAAC	540
AAATCTTGCT	CAAGGTCGGC	TACATCGGTC	TCATCAGCAA	CAGCCTTGGT	GGAATCTACC	600
AGACCACTTA	TACCACCCG	GATGGCACCC	CTAAGATCGC	TGCAGTTTCA	CAAAATGAGC	660
CCATAGATGC	TCGTGCAATG	GTACCATGCA	TGGATGAACC	GAAATACAAA	GCAAACTGGA	720
CCGTTACTGT	CATTTCATCA	AAAGGCACCA	AAGCCGTCTC	GAATGGAATC	GAAGTGAACG	780
GAGATGGAGA	GATCAGTGGT	GATTGGATCA	CATCGAAGTT	CTTGACTACT	CCACGGATGT	840
CATCCTACTT	GTTGGCAGTT	ATGGTTTCAG	AATTTGAATA	CATCGAAGGT	GAAACAAAGA	900
CGGGTGTTCG	GTTCCGTATA	TGGTCACGCC	CAGAGGCAAA	GAAGATGACA	CAATATGCTC	960
TGCAATCTGG	TATCAAGTGC	ATAGAATTCT	ACGAAGATTT	CTTTGATATC	AGATTCCCTC	1020
TGAAGAAACA	AGATATGATT	GCCCTTCCTG	ATTTCTCTGC	CGGTGCCATG	GAGAATTGGG	1080
GCCTCATCAC	TTACAGGGAA	AACTCTTTGT	TGTACGATGA	CAGATTCTAT	GCACCGATGA	1140
ATAAACAGCG	AATTGCTCGC	ATTGTTGCTC	ATGAGCTTGC	TCATCAGTGG	TTCCGGCGACT	1200
TGGTTACGAT	GAAGTCGTGG	GATAATTTGT	GGTTGAATGA	AGGTTTTGCA	AGATTCACAG	1260
AATTCACCTG	AGCTGGTCAG	ATAACTCAAG	ATG			1293

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA- 45

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TAI:

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 12

HOSSZA: 746 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

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

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-
TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 1274 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-
SÍTÓ SZÁM: 13

5

TCTTGAAGAA	ATGAAAAAGC	TTTTTCGACGA	AGAGGTCATG	AAAAAATGTA	GACCTGGTCA	60
GCAAGCGACC	GA CTGCGTAA	AGGTA ACTGC	TCTCTCCGA	AAA ACTGTTT	ACTGCTATGG	120
GGTCCAGGAA	GGCGGTGATG	AGGCATT CGA	CAAGGTGATG	GA ACTATATA	ATGCGGAACA	180
AGTCCAATTG	GAGAAAGACA	GTCTACGTGA	AGCATTGGGA	TGTCATAAAG	ACGTTACTGC	240
TCTAAAGGGA	CTTCTTATGC	TGGCTTTGGA	TCGGAATTCG	TCATTTGTGC	GTCTTCAAGA	300
TGCTCATGAT	GTGTTTAAAC	TTGTATCCAG	AAATCCTGTT	GGAAACGAAC	TGCTGTTCAA	360
TTTCCTCACA	GAGCGATGGG	AAGAGATACT	TGAAAGTTTG	TCAATACGAC	ACAGATCAGT	420
TGATCGAGTG	ATCAAAGCCT	GTA CTGAGG	ACTACGATCC	AGGGAACAAG	TACAACAGTT	480
GAAGAATCTA	TACAAAAATG	ACAAGCGTGC	TCGCGAATAC	GGTGCAATTTG	GTGGGGCAAT	540
AGAAAGATCG	GAACACAGAG	TCAAATGGAT	TGAGAAACAT	TTCCGAAAAC	TAGCAGCTTT	600
CTTCAAAAAA	TCTAATTCAT	AATTCTGAAA	TGGCTATAAC	TAGCACACTG	GATAGTTGTC	660
TCGAATCATC	CAAAAAGATT	AATGATGTTT	TTTTACTAGA	TAATATGGAG	ATATTCTGTA	720
AATTTGTCAT	CGATTCAAGT	GTCTGTATTG	CAGCCACATT	ACATATCTCG	ATGGTCTCTG	780
GAATTTTGTG	TGGAATTATT	TTCTCCTCAA	AATAGACACT	ATGCGCTAAC	TCCCATTATT	840
ACCAATCTTT	GAGAGAAATC	TTTTGCAATA	TACCTAAAT	AGCCCTTGGG	AACTAGCTTT	900
TTTCATTATT	GTAATTTTGT	TACTCTTCAA	ATGACGTATT	TCCAACATGA	CACATTCTCA	960
GTGATTTACT	CGAGTAATTT	TATTCTTCTC	AATTGCAGTG	CCTTATTGTT	ATTTCGCTTG	1020
AGACTTTGTA	GCTCAACTGT	TTTCTGCCCT	GCTGTCTTCT	TCTCTTTATC	TACTACTTCA	1080
GTGATGAAT	TACCTGAAGT	TGTAGGTTT	AAGAAAGAAA	TA ACTATTTT	CCATAACTCA	1140
TCTTCATGCC	ATTGTTCTTT	GGACTTTCTC	ATGCTTCACA	TTGTAGAGAT	ATTTACTAAA	1200
AATGGAATTC	TAATTTTCGT	TTACTTACAT	AAAAATCACT	TATTGCCTAA	AAAAAAAAAA	1260
AAAAAAAAAA	AAAA					1274

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-
TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 3296 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-
SÍTÓ SZÁM: 14

30

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTAATTTT	TGCATTATTT	CTAGTAGCTG	CTGCAGTCGG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGGCAA	AGACAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAATCACT	180
TCTTCCAACC	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	CGATTTGACG	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGAAC	TTCCCAACCG	AGAAGAATCT	CACATTCGAT	GGCGGTGTGG	AAATATCAAT	300
GGTTGTAATT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	GCTCAATTCA	AAGAAGATCT	CTGTGATACC	360
CCAAGAAATG	GA ACTGGTAT	CGGGCGATAA	AAAACACGAA	ATTGAAAGTG	TAAAGGAGCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTCG	AGTTTCTTCT	TAAGAACCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTCGGCTATA	TCGGCCTCAT	CAGCAACAGT	CTTGAGGAGAA	TCTACCAGAC	540
CACTTACACC	ACCCCGAATG	GCACCCCTAA	GATCGCTGCA	GTTTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGAATGGTAC	CATGCATGGA	CGAACCGAAA	TACAAAGCAA	ACTGGACCGT	660
TACTGTCTATT	TATCCAAAAG	GCACCAAAGC	CGTCTCGAAT	GGAAATCGAAG	TGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATCACATC	GGAAGTTCTG	ACTACTCCAC	GGATGTCATC	780
CTACTTGTTG	GCAGTTATGG	TTTCAGAATT	TGAATACATT	GAAGGTGAAA	CAAGGACGGG	840
TGTCCGGTTC	CGCATATGGT	CACGCCCAGA	GGCCAAGAAG	ATGACAAAAC	TTGCTTTGGA	900
TTATGGATATC	AAATGCATAG	AGTTCTACGA	AGATTCTTTT	GATATCAAAT	TCCCTCTGAA	960
AAAACAAGAT	ATGATCGCCC	TTCTGATTTT	CTAGCAGGGA	GCCATGGAGA	TTCCTGGTCT	1020
TATCACTTAC	AGGGAAAAC	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCCCAT	CAGTGGTTTG	GGGACTTGGT	1140
TACAAATGAAG	TGGTGGGATA	ATCTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACGGAATT	1200
CATTGGAGCT	GGTCAGATAA	CTAAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TTCTGATTGA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTC	GGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTCTCTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	CTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTCTCT	ACTATGTTGA	GAGCCTTGAT	TGAGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCAGTATC	1440
GCAGTACCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
CGATGAAGTG	GTCAGTGACG	TGGAAGGTC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACGGAATT	1560
TGCAAGTCAG	TGGACGACTC	AGATGGGCTT	CCGAGTTATT	TCCGTAGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTTTG	AAATTAACGC	AAAGTCGATA	TAAGGCGAAT	AAAGACGCTG	TGGAGAAAGA	1680
GAAGTACCGT	CATCCGAAAT	ACCGATTTAA	ATGGGATATT	CCATTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAA	GAGATAAAGC	GAACATGGCT	GAGAAGAGAT	GAACCGCTTT	ACTTGCATGT	1800
TAGTAATCCT	GGTGCTCCAT	TTGTGGTGAA	CGCAGACCGC	TATGGATTTT	ATCGACAAAA	1860
TCATGACGCT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGACAAATC	ATGAGGTTTA	1920
TAGTCCTCGG	ACAAGGAATG	TCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCAGCCG	CAACTGACGC	1980
AATTGAGTAT	GAGACTGTTT	TTGAACTTCT	GAAATATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATACCT	2040
ACCGTTGGAA	ATAGCAATGT	CCGGGATCTC	TTCGATTTTG	AAGTACTTCG	GTACCGAGCC	2100
GGAAGCAAAG	CCAGCTCAAG	TGTACATGAT	GAACATATTG	AAGCCGATGT	ATGAAAAAAG	2160

CAGTATCGAG	TTCATTACCA	ATAACTACAG	AAACGACACG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAAGGAT	GTCGTTGATA	TGTTCTGCGC	CCTTCGATCG	CAAGACTGCA	GGCAGAAATA	2280
TAAAAAACTT	TTCCGATGACG	AAGTCATGGC	GAAATGACAGG	GATGCGTCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTGAGA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTATTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTTTCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTTATACG	GCCGAAACAC	TTGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTAGGATG	TCACAAAGAT	GTTACTGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCTTGCGG	GCTCTGGACA	GGAAATCGTC	ATTCTGACGT	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTCATTTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCATTG	AAAGTATAGG	AACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAGTGAT	2700
ACCAGCCTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAGCAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760
GAAAAATGGC	ATAAATGCTC	GTCAATTTGG	TGCATTTCGAT	AAAGCAATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGTAG	TTTGAATTAC	GTCGCCATTA	ATCCAGATCT	TAAAGCTCGC	TAAGGAATAT	2940
GTGGGAACTG	ACTGTGTGTT	GGTTACTGTT	CCACTGAATG	GAAGTTTTTA	CCCACAAAAA	3000
TTTTTACCAT	TTGCCTTCCA	TGAGGGGTCA	TTGTTGTCAC	TTGAATAGTA	AACAAAGCTC	3060
AGTATTAGGA	CCCAGTGATC	AATATTACTT	TTGCTTCATC	AAATTGTTAC	CTTCTCTATA	3120
CCCTCTTCCCT	ACCTGAATTC	AGAAATTTGT	TCATATTTCGT	TTGTAGTCTG	TTGCTCAGAA	3180
CACCTTCTCC	TCGATAGCTT	TTTGTGTTGT	TTTCTTTTGA	TTGTATTGAT	CGTTTTTACAA	3240
TTGTATAGAT	TAGTTATCTG	ATAAATATTG	ATGGCTAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAA	3296

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 3319 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

20 A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 15

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTAATTTT	TGCATTATTT	CTAGTAGCCG	CTGCAGTCCG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAAGCC	120
AGGGAAAGAT	GATACTGGTG	GTAAGACAAA	AGATAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAACCTACT	180
TCTTCCAACC	AACATAAAAC	CATTGTCTTA	CGAATTTGACA	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGAAC	TTCCCAACCG	AGAAGAATCT	CACATTTGAT	GGGCGTGTG	AAATTTCAAC	300
GGTTGTCAAT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	GCTCAATTCA	AAGAAGATCT	CAGTAATACC	360
CCCTGAATGT	GAAGTGGTAT	CGGGCGGTAA	AAAACCTCGAA	ATCGAAAATG	TAAAGGATCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTTG	AGTTTCTTCT	TAAGAACCAC	CTGGAAGGAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTTGCCCTACA	TCGGCCTCAT	CAGCAACAGC	CTTGGCGGAA	TCTACCAGAC	540
CACCTTACACA	ACCCCGGATG	GCACCCCAAA	GATCGCTACA	GTGTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGGATGGTGC	CATGCATGGA	TGAACCGAAA	TACAAAGCGA	ATTGGACCGT	660
TACTGTCAAT	CATCCAAAAG	GTACAAAAGC	CGTCTCGAAT	GGCATCGAAA	CGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATTACGTC	GAAGTTCTTG	ACTACTCCGA	GGATGTCATC	780
CTACTTGTGG	GCAGTTATGG	TATCAGAATT	TGAATTTATC	GAGGGTAAAA	CAAAGACAGA	840
TGTTCCGGTT	CGTATATGGT	CACGCCCAGA	GGCCAAGAAG	ATGACAAAAC	TTGCTTTGGA	900
TTATGGTATC	AAATGCATAG	AGTTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAGAT	TCCCTTTAAA	960
GAAACAAGAT	ATGATCGCCC	TTCTGATTT	CTCAGCAGGA	GCCATGGAGA	ACTGGGGTCT	1020
TATCACTTAC	AGGGAAGAAC	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCCCAT	CAGTGGTTTG	GCGACTTGGT	1140
TACGATGAAG	TGGTGGGATA	ATCTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACAGAATT	1200
CATTGGAGCT	GGTAAGATAA	CTGAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TCCTGATTGA	1260
TGTATTGAA	CGCGCGTTGA	AAGCTGATTC	CGTACGCTCA	AGCCATCCAC	TTTCTGTCAG	1320
AATCCAGAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	GTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACGATGCTGA	GAGCGTTGAT	CGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCGGTATC	1440
GCAGTATCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
CGATGAAGTT	TGCACATGAT	TCGAGGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAA	CCACGGAAAT	1560
CGCAAGTCA	GTTGACAACT	AGATGGGCTT	TCCAGTAATT	TCTGTGGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTCTG	AAACTAACGC	AAAGTCGATA	TAAGGCGAAT	AAGGACGCTG	TTGAGAAAGA	1680
GAAATACCGT	CATCCGAAAT	ACGGATTCAA	GTGGGATATT	CCATTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGGTAAAGC	GAGCATGGTT	AAGAAGAGGT	GAACCGCTTT	ACTTGCAATG	1800
GAGTGATCCT	GGCGCTCCAT	TTGTGGTGAA	TGCGGACCGC	TATGGATTTT	ACCGACAAAA	1860
CCACGACACT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGATAATC	ATGAGGTTTA	1920
CAGTCCCCGG	ACAAGGAATG	CCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCGGCTG	CAACTGACGC	1980
GATTGAGTAC	GAGACTGTAT	TCGAACTTCT	GAAATATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATACCT	2040
ACCGTTGGAA	ATAGCAATGT	CTGGAATCTC	TTCGATTTTG	AAGTACTTCG	GTACCGAGCC	2100
CGAGGCAAG	CCAGCTCAAA	CATACATATTG	GAACATATTG	AAGCCGATGT	ATGAGAAAAG	2160
CGATATCGAC	TTCAATTGCCA	AAAACATCAA	GGAGCACAAG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAAGAT	GTCATTGATA	TGTTCTGCGC	CCTTGSATCG	CAAGACTGCA	GGAAGAAATA	2280
TAAAAAACTT	TTCCGATGACA	AAGTCATGGC	GAAATGACAGG	GATGGCCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTGAAA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTATTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTTTCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTTATACG	GCCGAAACAC	TTGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTAGGATG	TCACAAAGAT	GTTACCGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCCTGCGG	GCTCTGGACA	GGAATTCGTC	GTTCGTACGA	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTTATTGA	2640
GAGATGGCCA	GATATCGTTG	AAAGTATAGG	AACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAGTGAT	2700
ACCAGCTTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAACAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760

GAAAAATGGC	ATAAACGCTC	GTCAATTTGG	TGCATTTCGAT	AAAGCGATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGTA	TTCGTATTAC	ATCACCATGA	ATCCAGATCT	TAAAACTCAC	TAAGGAATGT	2940
GTGGGAACTG	ACTGTCTGTT	GCTTACTGTT	CCACTGAATG	GAAGTTTTTA	CCCATAAAAA	3000
TTTTTACCAT	TTGCCTTCCG	TGAGGGGTCA	TTGTTGTCAC	TTGAATAGTA	AACAAAGCTC	3060
AGTATTGGAC	CCAGTGATCA	ATATTACTTT	CGCTTCATCG	AATTGTTACC	TTCTCTATAC	3120
CCTCGTCCTA	CCTGAATTCA	CACATTTGTT	CATATTTGTT	TGTAGTCTGT	TGCTCAGAAC	3180
ACTTTCTCTT	CGATAGCTTT	TTGTTTGT	TTCTTTTGAT	TGTATTGATC	GTTTTACAAT	3240
TGTATAGATT	AGTTATCTGA	TAAATATTGA	TGGCTAAGGA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	3300
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA					3319

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA- 10 HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú
 TAI: TOPOLOGIÁJA: lineáris
 A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-
 HOSSZA: 30 aminosav SÍTÓ SZÁM: 16
 TÍPUSA: peptid

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

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA- HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú
 TAI: TOPOLOGIÁJA: lineáris
 A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-
 HOSSZA: 15 aminosav SÍTÓ SZÁM: 17
 TÍPUSA: peptid 25

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

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA- 30 HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú
 TAI: TOPOLOGIÁJA: lineáris
 A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-
 HOSSZA: 15 aminosav SÍTÓ SZÁM: 18
 TÍPUSA: peptid

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

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA- HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú
 TAI: 40 TOPOLOGIÁJA: lineáris
 A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-
 HOSSZA: 3084 bázispár SÍTÓ SZÁM: 19
 TÍPUSA: nukleinsav

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG	AGACGCAGCA	60
ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG	TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	120
GGTAGCTGCT	GCCGTCGGCC	TCTCAATCGG	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAGCTTT	180
TGATACTACT	GGCGGAAATG	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGATGATA	ATTCCCCATC	240
AGCTGAAGAA	TTACGTCTCC	CAACAACCAT	AAAACCTTTG	ACATACGACT	TAGTAATCAA	300
AACGTATCTG	CCAACTATG	TAAACTATCC	ACCTGAGAAA	GATTTGCTA	TTGATGGGAC	360
TGTGGTGATT	GCTATGGAAG	TTGTGGAGCC	AACAAAGTCT	ATTGTGCTCA	ACTCGAAAAA	420
TATTCCTGTA	ATTGCAGACC	AGTGCAGACT	GTTTTCTAAC	AACCAAAAAC	TCGACATCGA	480
AAAGGTTGTG	GATCAGCCAA	GGCTGGAGAA	AGTCGAATTC	GTTTTGAAGA	AAAAGCTGGA	540
GAAGAATCAG	AAAATCACGC	TCAAGATTGT	ATACATTGGC	CTTATCAACG	ACATGCTTGG	600
AGGACTTTAT	CGAACAACCT	ACACGGATAA	AGATGGTACA	ACCAAGATTG	CTGCATGCAC	660
TCATATGGAA	CGACGGACG	CCCGTCTTAT	GGTCCCCTGT	TTCGACGAGC	CGACGTTTAA	720
GGCAAATGCG	ACTGTGACTG	TGATTTCATCC	GAAGGGCACC	AGTGCCGTGT	CGAATGGAAT	780
AGAAAAGGGA	GAAGGAGAAG	TCTCTGGCGA	TTGGGTCACA	ACCAGATTCT	ATCCAACCCC	840
GCGAATGCCT	TGCTATTTGA	TTGCTCTTGT	GATTTCCGAA	TTTAAGTACA	TTGAAAATTA	900
TACGAAAAGC	GGTGTTTCGAT	TCCGAAATTC	GGTTCGTCCG	GAAGCTATGA	AGATGACAGA	960
ATATGCCATG	ATAGCTGGAA	TCAAATGTTT	GGATTACTAT	GAGGACTTCT	TCGGGATCAA	1020
ATTCCCACCT	CCAAAACAAG	ATATGGTTGC	TCTTCCTGAC	TTCTCATCTG	GTGCTATGGA	1080
GAACTGGGGT	CTCATCACAT	ACAGGGAGGG	TTCCGTGCTC	TACGATGAAA	ACCTCTACGG	1140
ACCAATGAAT	AAGGAGCGGG	TTGCAGAAGT	GATCGCGCAC	GAAGTTGCAC	ATCAGTGGTT	1200

CGGTAATTTG	GTCACGATGA	AGTGGTGGGA	TAACCTATGG	CTGAACGAAG	GATTCGCGTC	1260
ATTCGTGGAA	TACATCGGAG	CCGACTTCAT	CAGCGATGGT	CTATGGGAAA	TGAAAGATTT	1320
CTTCCTGCTG	GCACCGTACA	CAAGTGGTAT	TACGGCTGAT	GCAGTAGCTT	CAAGCCATCC	1380
GCTTTCTTTC	AGAATAGATA	AGGCTGCAGA	TGTATCAGAA	GCGTTTCGATG	ATATCACATA	1440
CCGTAAAGGA	GCATCCGTTT	TTCAAATGCT	ATTGAATTTA	GTTGGGGACG	AAAAATTTCAA	1500
GCAGTCTGTT	TCGCGTTACC	TCAAGAAAGT	TTCAATATGAT	AATGCGGCTG	CTGAAGATTT	1560
ATGGGCAGCA	TTCCGACGAA	CCGTCCAAGG	TATAACCGGA	CCTAATGGTG	GACCATTGAA	1620
AATGTCCGAG	TTTGCGCCAC	AATGGACAAC	TCAGATGGGG	TTCCCTGTTT	TTACTGTCTGA	1680
GTCGGTTAAC	GCAACGACTT	TGAAAGTCAC	CCAAAAACGA	TACAGGCAGA	ACAAGGATGC	1740
AAAGGAACCA	GAGAAGTACC	GTCATCCAAC	TTATGGGTTT	AAATGGGATG	TTCTCTGTG	1800
GTATCAGGAA	GATGAACAGC	AAGTGAAGAG	AACTTGGTTA	AAAAGAGAGG	AACCGCTCTA	1860
TTTCCATGTA	AGCAATTCTG	ATTTCGTAGT	TGTGGTGAAT	GCCGAACGTC	GTGCTTTTTG	1920
CCGATCAAAC	TATGACGCTA	ACGGTTGGAG	GAACATTATG	AGAAGACTCA	AGCAGAAATCA	1980
TAAGGTCTAT	GGTCCACGAA	CAAGAAACGC	TCTCATAAGT	GATGCGTTTG	CAGCAGCTGC	2040
AGTTGAGGAA	ATGAATTACG	AGACCGTATT	TGAAATGCTC	AAATACACCG	TGAAAGAAGA	2100
GGATTACTTA	CCATGGAAGG	AGGCAATATC	AGGATTCAAT	ACAATTTTGG	ACTTTTTTCGG	2160
CAGCGAACCC	GAATCTCAAT	GGGCTTCGGA	ATACATGCGA	AAACTGATGA	AGCCAAATTTA	2220
TGACAAGAGT	AGCATCAAGT	TTATAGCGGA	GAACACAAA	AAAGATTGCG	TTTTCTTCAA	2280
AAATAATCTC	CAATAGCTG	TTATTGACAC	ATACTGTGGT	CTTGGAGGCA	AAGAATGTCT	2340
TGAAGAAATG	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA	GGTCATGAAA	TGTCAACCTG	GTCCGCAAGC	2400
GACCGACTGC	TAAAAGGTAA	CTGCTCCTCT	CCGAAAAACT	GTTTACTGCT	ATGGGCTCCA	2460
GGAAGGCGGT	GATGAGGCAT	TCGACAAGGT	GATGGAACTA	TATAATGCGG	AACAAGTGCA	2520
GTTGGAGAAA	GACAGTCTAC	GTGAAGCATT	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA	CAGCTCTAAA	2580
GGGACTTCTT	ATGCTGGCTT	TGGATCGGAA	TTCTGCATT	GTGCGTCTTC	AAGATGCTCA	2640
TGATGTGTTT	AACATTGTAT	CCAGAAATCC	TGTTGGAAAC	GAAGTGTGCT	TCAATTTCTT	2700
CACAGAGCGA	TGGGAAGAGA	TACTTGAAAG	TTTGTCAATA	CGACACAGAT	CAGTTGATCG	2760
AGTGATCAAA	GCCTGTACTC	GAGGACTACG	ATCCAGGGAA	CAAGTACAAC	AGTTGAAGAA	2820
TCTATACAAA	AATGACAAGC	GTGCTCGCGA	ATACGGTGCA	TTTGGTGGGG	CAATAGAAAAG	2880
ATCGGAACAC	AGAGTCAAA	GGATTGAGAA	ACATTTCCGA	AAACTAGCAG	CTTTCTTCAA	2940
AAAATCTAAT	TCAATAATCT	GAAATGGCTA	TAAGTAGCAC	ACTGGATAGT	TGCTCCGAAT	3000
CATCCAAAAA	GATTAATGAT	GTITTTTTTAC	TAGATAATAT	GGAGATATTC	TGTAAATTTG	3060
TCATCGATTG	AAGTGTCTGT	ATTG				3084

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 3358 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

30 A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 20

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACGGC	GGAGTGGCAG	AAGCGTCGAA	TCTTGGGCTT	60
CTCACCTATC	AGCCTACTTT	GTACATTATT	TGTATTAGCT	GCTGCCGTTG	GACTCTCCAT	120
TGGTCTTACC	TATTACTTCA	CTCGTAAAGC	ATTCGATACC	ACACAAAAAG	AACAGAAGGA	180
TGACAGTGGT	GGTAAAGAAA	AGGATAATTC	TCCTTCTGCA	GAAGAACTAC	TTCTTCCAAC	240
GAACATAAAA	CCAGTCTCGT	ACGACTTGAA	CATCAAAACA	TATCTACCGG	GTTACGTGAA	300
CTTTCCACCA	GAAAAGAATC	TCACATTTGA	TGCCCATGTG	GAGATTGCTA	TGGTGTGGT	360
TGAGCCTACA	AATAGTATTG	TGCTGAACTC	GAAGAAAAATC	ACTTTGGCAC	AAGGAGGATG	420
CGAAGTGTTC	TCAGGTAATC	AGAAACTTGA	CATCGAAAGT	GTAAGATGTC	AGGAAAGACT	480
TGACAAGCTT	GAGATTACCC	TCAAAAATCA	GCTGCAAAAA	GATCTGAAAA	TCCTGCTCAA	540
GATCACTTAC	ACCGGCCTTA	TTAGCGACAC	TCTCGGTGGG	CTCTACCAAGT	CCATCTACAC	600
TGATAAGGAC	GGAAAACTA	AGATCGTTGC	TGTTTCACAA	AATGAACCAT	CAGACGCTCG	660
TCGTATAGCG	CCATGCTTTG	ACGAACCGAA	GTACAAGGCA	ACATGGACTG	TCACCGTCTG	720
TCATCCCAAA	GGTACAAAGG	CTGCATCGAA	CGGCATTGAA	GCAAAATGGA	AAGGGGAGCT	780
CAAGGGTGAT	TGGATAACGT	CTAAATTTAA	AACTACCCCA	CCGATGTCGT	CCTATTTATT	840
GGCTATTATT	GTTTGTGAAT	TTGAATACAT	TGAAGGATTT	ACAAAAACGG	GTGTTCCGTT	900
CCGTATATGG	TCTCGACCAG	AGGCGAAACG	AATGACGGCA	TACGCTTTGG	ATGCTGGCAT	960
CAGATGCCTG	GAGTTCTATG	AGAAGTTCTT	TGACATAAAA	TTCCCTCTGG	AAAAACAAGA	1020
TATGATTGCT	CTTCCTGATT	TCACCGCTGG	TGCCATGGAA	AACTGGGGCC	TTATCACTTA	1080
TAGAGAGGAT	TCTCTCCTAT	ACGATGAAAA	AATTTATGCA	CCGATGAATA	AACAGCGGGT	1140
TGCTCTCGTA	GTTGCTCACC	AGCTTGCTCA	TCAGTGGTTT	GGCAATCTGG	TCACACTGAA	1200
GTGGTGGGAT	GATACGTGGT	TGAACGAAGG	TTTTGCAACA	TTTGTGAGT	ATCTTGGAAT	1260
GGACGAAATT	AGCCACAACA	ATTTTCAAGC	GCAAGATTTC	TTCTTGCTCG	ATGGAATGGA	1320
TCGCGGAATG	AGAGCTGACT	CGGCAGCATC	GAGCCATCCG	CTTTCGTTTA	GGATTGACAA	1380
AGCGGCAGAA	GTTGCCGAAG	CCTTTGACGA	TATTTTCATC	GCCAAGGGAG	CGTCAGTTCT	1440
CACTATGCTA	CGGGCTTTGA	TTGGAGAGGA	CAATTACAGG	AATGCTGTTG	TGCAATACCT	1500
CAAGAAAGTT	TCTTACAGCA	ATGCACAAGC	AGCCGATCTG	TGGAACGCTT	TCAATGAAGT	1560
TGTCAAAGGT	GTTAAGGGTC	CTGACGGCAA	CGTCATGAAA	ATCGACCAAT	TTACCGATCA	1620
GTGGACGTAT	CAGATGGGTT	ATCCTGTGGT	TAAAGTAGAA	GAATTTAATG	CGACCGCCTT	1680
AAAGGTTACG	CAGAGCCGGT	ACAAGACAAA	TAAAGACGCC	TTGGAACCCG	AGAAATATCG	1740
TAATCCAAAA	TACGGGTTCA	AGTGGGATGT	TCCCTATGG	TATCAGGAAG	GCAATAGCAA	1800
AGAGGTGAAG	CGAACATGGC	TAAAAAGAGA	TGAACCGCTG	TACTTGAACG	TCAACAATCG	1860
GGATACATCC	CTTGTGGTGA	ACGCTGATCG	ACATGGATTT	TATCGACAAA	ACTATGATGC	1920
CAACGGTTGG	AAAAAGATAA	TCAAGCAGCT	CAAGAAAGAT	CACAAGGTCT	TCGGTCCAAG	1980
GACAAGGAAC	GCTATCATAA	GCGATGCATT	TGCTGCAGCT	ACGATTGACG	CAATCGACTA	2040

TGAAACTGTA	TTCGAACTAC	TTGAATATGC	CAAAAATGAA	GAGGAATTCT	TGCCTTGGAA	2100
GGAAAGCTCTG	TCCGGCATGT	TCGCAGTTTT	AAAGTTCTTC	GGTAATGAGC	CGGAGACAAA	2160
ACCAGCTAGA	GCTTACATGA	TGAGCATATT	AGAACCGATG	TATAATAAGA	GCAGCATTGA	2220
TTACATCGTC	AAGAATTATT	TGGATGATAC	GTTATTACACA	AAAATTAATA	CTCAAAAGGA	2280
TATCATTGAT	GCATATTGTT	CCCTTGGATC	AAAGGACTGT	ATAAAGCAAT	ATAAGGATAT	2340
CTTCTACGAT	GAGGTTATGC	CCAAGTGTA	GGCCGGGGAA	GCAGCAACCA	AATGCGTTAA	2400
GGTTTCCGCT	CCTCTTCGAG	CCAATGTTTA	CTGTTATGGT	GTACAGGAAG	GTGGTGAAGA	2460
AGCTTTTGAA	AAGGTGATGG	GGCTGTATCT	AGCAGAAAGAT	GTTCAACTGG	AGAAGGGTAT	2520
CCTGTTCAAA	GCCTTGGCAT	GCCACAAAGA	TGTTACAGCT	CTAAAAGAAC	TTCTTTTGGC	2580
AGCCCTGGAC	CGTAAATCGT	CGTTTGTGCG	TCTTCAGGAT	GTCCCTACCG	CTTTCCGTGC	2640
TGTATCTGAA	AACCCCTGTG	GCGAAGAATT	CATGTTCAAT	TTCCCTAATGG	AGAGATGGGA	2700
GGAAATCACT	GCGAGCTTGG	AAACAGAACA	CAGAGCAGTT	GATAAAGTGG	TCGGCGCTTG	2760
TTGCACAGGA	ATTTCGCTCCC	AACAACAAAT	AGATCAGCTG	AAGAACTCTAC	AGAAGAACAA	2820
TGCGCAGGCT	AAGAAGTTCG	GCTCATTAC	CCAGGAAATC	GAAAAAGGAG	AACATAAAAT	2880
TGCCTGGATC	AAGAAACATT	TTACAGATT	ATCGGAATTC	TTCAAGAGAG	CAAGATCATA	2940
GCTTTTCACA	CTGAGCTCCA	ATTTTAACGT	CTTCAAACTA	GGAGACAGTT	TTGCTGAAAA	3000
GTCAGTTTCA	CATTTTCCGT	TTGAATGCCA	TCCATTGCGA	TACAACCAAT	AATACCATTT	3060
TAAGTACCTT	TCATTACACAG	TGATTACTGA	ATTTTCGAATA	TATCATGAAG	CTTGATCTTT	3120
GAACGTTATG	ATCGGTGACT	TTCAATTTAT	AGAGCTCACT	CTCCATTTTG	TAGCTGTGAT	3180
GACTTGCATT	TAAGACCCAC	CATTTACCAG	CCTAGAATCT	TTCCCCAATA	CATTCCAAAC	3240
TCCGATCACC	TCCACCGCTG	ACAATGCCCA	GATTTGTTTT	TTTGTCTGCT	ATCCATCTAA	3300
CTGTTTCGAT	CGCCGGTTGT	TTGTCAATTG	CTTATCTGAT	AAATATTGAC	GTTGGTGT	3358

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 3369 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

20 HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 21

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA	TCTAGATGAC	GTGCGAGGGG	AGAACGCGGA	60
CATTGCTGAA	TCTAACTCCA	ATCCGTCTTA	TTGTGCGATT	ATTTCTAGTA	GCTGCTGCAG	120
TCGGCCTCTC	TATTTGGTCTC	ACCTATTACT	TTACTCGCAA	AGCGTTTCGAT	ACCTCAGAAA	180
AGCCAGGGAA	GGTGATACT	GGTGGCAAGG	ACAAAGACAA	TTCTCCCTCT	CGCGCGGAAC	240
TACTCCTTCC	AAGTAATATA	AAACCATTGT	CTTACGACTT	GACGATCAAA	ACATATCTAC	300
CTGGTTATGT	GGACTTCCCA	CCGGAGAAAA	ACCTCACATT	CGATGGGCGT	GTGGAATAT	360
CAATGGTTGT	AATTGAGCCA	ACAAAGAGTA	TGCTACTCAA	TTCAAAGAAG	ATCTCTGTAA	420
TACCCCAAGA	ATGTGAACTG	GTATCGGGCG	ATAAAAAAT	CGAAATTGAA	AGTGTAAAGG	480
AGCACCCAAG	ATCGAAAAAG	GTTGAGTTTC	TTATCAAAAG	CCAACTGGAA	AAAGATCAAC	540
AAATCTTGCT	CAAGGTGCGC	TACATCGGTC	TCATCAGCAA	CAGCTTTGGT	GGAATCTACC	600
AGACCACTTA	TACCACCCCG	GATGGCACCC	CTAAGATCGC	TGCAGTTTCA	CAAAATGAGC	660
CCATAGATGC	TCGTCGAATG	GTACCATGCA	TGGATGAACC	GAAATACAAA	GCAAACTGGA	720
CCGTACTGT	ATTCATCCA	AAAGGCACCA	AAGCCGTCTC	GAATGGAATC	GAAGTGAACG	780
GAGATGGAGA	GATCAGTGGT	GATTGGATCA	CATCGAAGTT	CTTGACTACT	CCACGGATGT	840
CATCCTACTT	GTTGGCAGTT	ATGGTTTCAG	AATTTGAATA	CATCGAAGGT	GAAACAAAGA	900
CGGGTGTTCTG	GTTCCGTATA	TGGTCACGCC	CAGAGGCAAA	GAAGATGACA	CAATATGCTC	960
TGCAATCTGG	TATCAAGTGC	ATAGAATTCT	ACGAAGATTT	CTTTGATATC	AGATTCCCTC	1020
TGAAGAAACA	AGATATGATT	GCCTTCTCTG	ATTTCTCTGC	CGGTGCCATG	GAGAAATGGG	1080
GCCTCATCAC	TTACAGGGAA	AACTCTTTGT	TGTACGATGA	CAGATTCTAT	GCACCGATGA	1140
ATAAACAGCG	AATTGCTCGC	ATTGTTGCTC	ATGAGCTTGC	TCATCAGTGG	TTCCGGCGACT	1200
TGGTTACGAT	GAAAGTGGTG	GATAATTTGT	GGTTGAATGA	AGGTTTGTGA	AGATTACACG	1260
AATTTATTGG	AGCTGGTCAG	ATAACTCAAG	ATGACGCCAG	AATGAGGAAC	TACTTCTCTGA	1320
TTGATGTAAT	TGAACGCGCT	TTGAAAGCTG	ATTCCGTTAGC	GTCAAGCCAT	CCACTTTCCCT	1380
TCAGAATCGA	CAAAGCTGCA	GAAGTTGAAG	AAGCCTTTGA	TGATATCACA	TACGCCAAAG	1440
GAGCTTCTGT	TCTTACTATG	CTGAGAGCCT	TGATTGGAGA	AGAAAAACAT	AAGCATGCAG	1500
TATCGCAGTA	CCTCAAGAAG	TTCTCGTATA	GCAATGCAGA	AGCGACTGAT	CTATGGGCAG	1560
TTTTTGATGA	AGTTGTCACT	GACGTCGAAG	GTCCAGACGG	CAAACTATG	AAAACCAAG	1620
AGTTTGCAG	TCAGTGGACG	ACTCAGATGG	GCTTCCAGT	TATTTCCGTA	GCAGAGTTTA	1680
ACTCGACTAC	TTTGAAATTA	ACGCAAGTTC	GATATGAGGC	GAATAAAGAC	GCTGTGGAGA	1740
AAGAGAGTA	CCGTACCCCG	AAATACGGAT	TTAAATGGGA	TATTTCCACTG	TGGTATCAGG	1800
AAGGCGATAA	GAAAGGAGATA	AAGCGAACAT	GGTTGAGAAG	AGATGAACCG	CTTTACTTGC	1860
ATGTTAGTGA	TGCTGGCGCT	CCCTTTGTGG	TGAACGCAGA	CCGCTATGGA	TTTTATCGAC	1920
AAAAATCATGA	CGCTAATGGT	TGGAAAAAGA	TAATCAAGCA	GCTCAAGGAT	AATCATGAGG	1980
TTTACAGTCC	CCGGACAAGG	AATGTCATCA	TTAGCGATGC	GTTTGCTGCG	GCTGCAACTG	2040
ACGCAATTGA	TATGAGACT	GTATTTGAAC	TTCTGAATTA	TGCCGAAAAA	GAAACGGAAT	2100
ATCTACCATT	AGAAATCGCA	ATGTCGCGGA	TCTCTTCGAT	TTTGAAATAC	TTCCCTACCG	2160
AGCCAGAGGC	AAAGCCAGCT	CAACATACA	TGATGAACAT	ATTGAAACCG	ATGTATGAAA	2220
AAAGCAGTAT	CGACTTCATT	GCCAAATACT	ACAGAAATGA	CAAGCTGTTT	TTCCAAATCA	2280
ACCTCCAAAA	AGATGTCATT	GATATGTTCT	GCGCCCTCGG	ATCGCAAGAC	TGCAGGAAGA	2340
AATATAAAAA	ACTTTTCGAT	GACGAAAGTCA	TGAACAAATG	CAGGGATGGT	CAAGGACGAA	2400
CCGAATGCGT	AAGAATCGCC	GCTCCTCTCC	GATCAAGTGT	TTATTGTTAT	GGTGTGAAGG	2460
AAGGCGGTGA	TTATGCTTCC	GACAAGGTGA	TGGAGCTTTA	TACGGCCGAA	ACACTCGCCC	2520
TAGAAAAAGA	CTTCCTACGC	CTAGCATTTG	GATGTCATAA	AGATGTTACT	GCTTTGAAAG	2580
GACTTCTCTT	GCGGGCTCTG	GACAGGAATT	CGTCGTTCTG	ACGTATGCAG	GATATCCCAA	2640

GTGCTTTCAA	CGATGTAGCA	GCAAATCCTA	TTGGCGAAGA	ATTCATTTTC	AATTTCTTCA	2700
TTGAGAGATG	GCCAGATATC	ATTGAAAAGTA	TAGGAACGAA	GCACACATAT	GTTGAGAAAAG	2760
TGATACCAGC	CTGCACTTCA	GGAATCCGCT	CACAACAGCA	GATTGACCAG	CTGAAGAATC	2820
TGCAGAAAAA	TGGCATGAAC	GCTCGTCAAT	TCCGTGCATT	CGATAAAGCA	ATCGAACGAG	2880
CACAAAATAG	GGTGGATTGG	ATTAATAAAC	ATTTCCAAAA	ATTAGCGGCT	TTCTTCAAGA	2940
AAGCCACCTT	GTAATTCGAA	TTACATTGCC	AGTAATCCAG	ATCTTAAAGT	TCATGAAGGA	3000
ATATGACAGG	GAACGACTG	TCTGTTGGTC	ACTGTTCCAC	TGAATGGAAG	TTTTTACCTA	3060
CAAAAATTTT	TATCGTTATA	TTTGCCTTCC	GTGAGGGGTC	ATTGTTGTCA	CTTGAATAGT	3120
AAACAAAGCT	CAGTATTGGC	AACCGTAGAA	CAATATTACT	TTCGCTTCAT	CAAATTGTTA	3180
TCTTCCCTAT	ACCCTCTTCC	TAACCTGAAT	CGGAAATTTG	TTCATATTCG	TTTGTAGTCT	3240
GTTGCTCAGA	ACACTTTCTC	CTCAATAGCT	TCTTGTGTTG	TTTTTTTTTG	ATTGTATTGA	3300
TCGTTTTACA	ATTGTATAGA	TTAGTTATCT	TATAAATATT	GATGGTTAAA	AAAAAAAAAA	3360
AAAAAAAAAA						3369

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 977 aminosav

TÍPUSA: peptid

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

15 A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 22

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

Trp	Leu	Asn	Glu	Gly	Phe	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Tyr	Ile	Gly	Ala	410	415	420
Asp	Phe	Ile	Ser	Asp	Gly	Leu	Trp	Glu	Met	Lys	Asp	Phe	Phe	Leu	425	430	435
Leu	Ala	Pro	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ile	Thr	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Ser	440	445	450
Ser	His	Pro	Leu	Ser	Phe	Arg	Ile	Asp	Lys	Ala	Ala	Asp	Val	Ser	455	460	465
Glu	Ala	Phe	Asp	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Lys	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	470	475	480
Gln	Met	Leu	Leu	Asn	Leu	Val	Gly	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	Gln	Ser	485	490	495
Val	Ser	Arg	Tyr	Leu	Lys	Lys	Phe	Ser	Tyr	Asp	Asn	Ala	Ala	Ala	500	505	510
Glu	Asp	Leu	Trp	Ala	Ala	Phe	Asp	Glu	Thr	Val	Gln	Gly	Ile	Thr	515	520	525
Gly	Pro	Asn	Gly	Gly	Pro	Leu	Lys	Met	Ser	Glu	Phe	Ala	Pro	Gln	530	535	540
Trp	Thr	Thr	Gln	Met	Gly	Phe	Pro	Val	Leu	Thr	Val	Glu	Ser	Val	545	550	555
Asn	Ala	Thr	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Gln	Lys	Arg	Tyr	Arg	Gln	Asn	560	565	570
Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Pro	Glu	Lys	Tyr	Arg	His	Pro	Thr	Tyr	Gly	575	580	585
Phe	Lys	Trp	Asp	Val	Pro	Leu	Trp	Tyr	Gln	Glu	Asp	Glu	Gln	Gln	590	595	600
Val	Lys	Arg	Thr	Trp	Leu	Lys	Arg	Glu	Glu	Pro	Leu	Tyr	Phe	His	605	610	615
Val	Ser	Asn	Ser	Asp	Ser	Ser	Val	Val	Val	Asn	Ala	Glu	Arg	Arg	620	625	630
Ala	Phe	Cys	Arg	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn	Gly	Trp	Arg	Asn	Ile	635	640	645
Met	Arg	Arg	Leu	Lys	Gln	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Gly	Pro	Arg	Thr	650	655	660
Arg	Asn	Ala	Leu	Ile	Ser	Asp	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	665	670	675
Glu	Met	Asn	Tyr	Glu	Thr	Val	Phe	Glu	Met	Leu	Lys	Tyr	Thr	Val	680	685	690
Lys	Glu	Glu	Asp	Tyr	Leu	Pro	Trp	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Gly	Phe	695	700	705
Asn	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Phe	Gly	Ser	Glu	Pro	Glu	Ser	Gln	Trp	710	715	720
Ala	Ser	Glu	Tyr	Met	Arg	Lys	Leu	Met	Lys	Pro	Ile	Tyr	Asp	Lys	725	730	735
Ser	Ser	Ile	Lys	Phe	Ile	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Ser	Leu	740	745	750
Phe	Phe	Lys	Asn	Asn	Leu	Gln	Ile	Ala	Val	Ile	Asp	Thr	Tyr	Cys	755	760	765
Gly	Leu	Gly	Gly	Lys	Glu	Cys	Leu	Glu	Glu	Met	Lys	Lys	Leu	Phe	770	775	780
Asp	Lys	Glu	Val	Met	Lys	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Gln	Ala	Thr	Asp	785	790	795
Cys	Val	Lys	Val	Thr	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Tyr	Cys	Tyr	800	805	810
Gly	Val	Gln	Glu	Gly	Gly	Asp	Glu	Ala	Phe	Asp	Lys	Val	Met	Glu	815	820	825
Leu	Tyr	Asn	Ala	Glu	Gln	Val	Gln	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Leu	Arg	830	835	840
Glu	Ala	Leu	Gly	Cys	His	Lys	Asp	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Gly	Leu	845	850	855
Leu	Met	Leu	Ala	Leu	Asp	Arg	Asn	Ser	Ser	Phe	Val	Arg	Leu	Gln	860	865	870
Asp	Ala	His	Asp	Val	Phe	Asn	Ile	Val	Ser	Arg	Asn	Pro	Val	Gly	875	880	885
Asn	Glu	Leu	Leu	Phe	Asn	Phe	Leu	Thr	Glu	Arg	Trp	Glu	Glu	Ile	890	895	900
Leu	Glu	Ser	Leu	Ser	Ile	Arg	His	Arg	Ser	Val	Asp	Arg	Val	Ile	905	910	915
Lys	Ala	Cys	Thr	Arg	Gly	Leu	Arg	Ser	Arg	Glu	Gln	Val	Gln	Gln	920	925	930
Leu	Lys	Asn	Leu	Tyr	Lys	Asn	Asp	Lys	Arg	Ala	Arg	Glu	Tyr	Gly			

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

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 972 aminosav

TÍPUSA: peptid

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-

10 SÍTÓ SZÁM: 23

Met	Thr	Ala	Glu	Trp	Gln	Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro
1				5					10					15
Ile	Ser	Leu	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Gly
				20					25					30
Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Arg	Lys	Ala	Phe	Asp
				35					40					45
Thr	Thr	Gln	Lys	Glu	Gln	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gly	Lys	Glu	Lys
				50					55					60
Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	Asn	Ile
				65					70					75
Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Asn	Ile	Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Gly
				80					85					90
Tyr	Val	Asn	Phe	Pro	Pro	Glu	Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Asp	Ala	His
				95					100					105
Val	Glu	Ile	Ala	Met	Val	Val	Val	Glu	Pro	Thr	Asn	Ser	Ile	Val
				110					115					120
Leu	Asn	Ser	Lys	Lys	Ile	Thr	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu
				125					130					135
Phe	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	Ile	Glu	Ser	Val	Lys	Met	Gln
				140					145					150
Glu	Arg	Leu	Asp	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Gln	Leu	Gln
				155					160					165
Lys	Asp	Leu	Lys	Ile	Leu	Leu	Lys	Ile	Thr	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile
				170					175					180
Ser	Asp	Thr	Leu	Gly	Gly	Leu	Tyr	Gln	Ser	Ile	Tyr	Thr	Asp	Lys
				185					190					195
Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Asn	Glu	Pro	Ser
				200					205					210
Asp	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	Pro	Cys	Phe	Asp	Glu	Pro	Lys	Tyr	Lys
				215					220					225
Ala	Thr	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Val	His	Pro	Lys	Gly	Thr	Lys	Ala
				230					235					240
Ala	Ser	Asn	Gly	Ile	Glu	Ala	Asn	Gly	Lys	Gly	Glu	Leu	Lys	Gly
				245					250					255
Asp	Trp	Ile	Thr	Ser	Lys	Phe	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Ser	Ser
				260					265					270
Tyr	Leu	Leu	Ala	Ile	Ile	Val	Cys	Glu	Phe	Glu	Tyr	Ile	Glu	Gly
				275					280					285
Phe	Thr	Lys	Thr	Gly	Val	Arg	Phe	Arg	Ile	Trp	Ser	Arg	Pro	Glu
				290					295					300
Ala	Lys	Arg	Met	Thr	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Ile	Arg	Cys
				305					310					315
Leu	Glu	Phe	Tyr	Glu	Lys	Phe	Phe	Asp	Ile	Lys	Phe	Pro	Leu	Glu
				320					325					330
Lys	Gln	Asp	Met	Ile	Ala	Leu	Pro	Asp	Phe	Thr	Ala	Gly	Ala	Met
				335					340					345
Glu	Asn	Trp	Glv	Leu	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Asp	Ser	Leu	Leu	Tyr
				350					355					360
Asp	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ala	Pro	Met	Asn	Lys	Gln	Arg	Val	Ala	Leu
				365					370					375
Val	Val	Ala	His	Glu	Leu	Ala	His	Gln	Trp	Phe	Glv	Asn	Leu	Val
				380					385					390
Thr	Leu	Lys	Trp	Trp	Asp	Asp	Thr	Trp	Leu	Asn	Glu	Gly	Phe	Ala
				395					400					405
Thr	Phe	Val	Glu	Tyr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Ile	Ser	His	Asn	Asn
				410					415					420
Phe	Arg	Thr	Gln	Asp	Phe	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Met	Asp	Arg	Gly
				425					430					435
Met	Arg	Ala	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	His	Pro	Leu	Ser	Phe	Arg
				440					445					450

Ile	Asp	Lys	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Glu	Ala	Phe	Asp	Asp	Ile	Ser
				455					460					465
Tyr	Ala	Lys	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Met	Leu	Arg	Ala	Leu	Ile
				470					475					480
Gly	Glu	Asp	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	Val	Val	Gln	Tyr	Leu	Lys	Lys
				485					490					495
Phe	Ser	Tyr	Ser	Asn	Ala	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Trp	Asn	Val	Phe
				500					505					510
Asn	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Val	Lys	Gly	Pro	Asp	Gly	Asn	Val	Met
				515					520					525
Lys	Ile	Asp	Gln	Phe	Thr	Asp	Gln	Trp	Thr	Tyr	Gln	Met	Gly	Tyr
				530					535					540
Pro	Val	Val	Lys	Val	Glu	Glu	Phe	Asn	Ala	Thr	Ala	Leu	Lys	Val
				545					550					555
Thr	Gln	Ser	Arg	Tyr	Lys	Thr	Asn	Lys	Asp	Ala	Leu	Glu	Pro	Glu
				560					565					570
Lys	Tyr	Arg	Asn	Pro	Lys	Tyr	Gly	Phe	Lys	Trp	Asp	Val	Pro	Leu
				575					580					585
Trp	Tyr	Gln	Glu	Gly	Asn	Ser	Lys	Glu	Val	Lys	Arg	Thr	Trp	Leu
				590					595					600
Lys	Arg	Asp	Glu	Pro	Leu	Tyr	Leu	Asn	Val	Asn	Asn	Arg	Asp	Thr
				605					610					615
Ser	Leu	Val	Val	Asn	Ala	Asp	Arg	His	Gly	Phe	Tyr	Arg	Gln	Asn
				620					625					630
Tyr	Asp	Ala	Asn	Gly	Trp	Lys	Lys	Ile	Ile	Lys	Gln	Leu	Lys	Lys
				635					640					645
Asp	His	Lys	Val	Phe	Gly	Pro	Arg	Thr	Arg	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser
				650					655					660
Asp	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Thr	Ile	Asp	Ala	Ile	Asp	Tyr	Glu	Thr
				665					670					675
Val	Phe	Glu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Lys	Asn	Glu	Glu	Glu	Phe	Leu
				680					685					690
Pro	Trp	Lys	Glu	Ala	Leu	Ser	Gly	Met	Phe	Ala	Val	Leu	Lys	Phe
				695					700					705
Phe	Gly	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Lys	Pro	Ala	Arg	Ala	Tyr	Met	Met
				710					715					720
Ser	Ile	Leu	Glu	Pro	Met	Tyr	Asn	Lys	Ser	Ser	Ile	Asp	Tyr	Ile
				725					730					735
Val	Lys	Asn	Tyr	Leu	Asp	Asp	Thr	Leu	Phe	Thr	Lys	Ile	Asn	Thr
				740					745					750
Gln	Lys	Asp	Ile	Ile	Asp	Ala	Tyr	Cys	Ser	Leu	Gly	Ser	Lys	Asp
				755					760					765
Cys	Ile	Lys	Gln	Tyr	Lys	Asp	Ile	Phe	Tyr	Asp	Glu	Val	Met	Pro
				770					775					780
Lys	Cys	Lys	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Thr	Lys	Cys	Val	Lys	Val	Ser
				785					790					795
Ala	Pro	Leu	Arg	Ala	Asn	Val	Tyr	Cys	Tyr	Gly	Val	Gln	Glu	Gly
				800					805					810
Gly	Glu	Glu	Ala	Phe	Glu	Lys	Val	Met	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ala	Glu
				815					820					825
Asp	Val	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Ile	Leu	Phe	Lys	Ala	Leu	Ala	Cys
				830					835					840
His	Lys	Asp	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
				845					850					855
Asp	Arg	Lys	Ser	Ser	Phe	Val	Arg	Leu	Gln	Asp	Val	Pro	Thr	Ala
				860					865					870
Phe	Arg	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Pro	Val	Glv	Glu	Glu	Phe	Met	Phe
				875					880					885
Asn	Phe	Leu	Met	Glu	Arg	Trp	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Ser	Leu	Glu
				890					895					900
Thr	Glu	His	Arg	Ala	Val	Asp	Lys	Val	Val	Gly	Ala	Cys	Cys	Thr
				905					910					915
Gly	Ile	Arg	Ser	Gln	Gln	Gln	Ile	Asp	Gln	Leu	Lys	Asn	Leu	Gln
				920					925					930
Lys	Asn	Asn	Ala	Gln	Ala	Lys	Lys	Phe	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Glu
				935					940					945
Ile	Glu	Lys	Gly	Glu	His	Lys	Ile	Ala	Trp	Ile	Lys	Lys	His	Phe
				950					955					960
His	Arg	Leu	Ser	Glu	Phe	Phe	Lys	Arg	Ala	Arg	Ser			
				965					970					

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-
TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 972 aminosav

TÍPUSA: peptid

HÁNY SZÁLÚ: kettős szálú

TOPOLOGIÁJA: lineáris

A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: SZEKVENCIAAZONO-
SÍTÓ SZÁM: 24

5

Met	Thr	Ser	Gln	Gly	Arg	Thr	Arg	Thr	Leu	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro
1				5					10					15
Ile	Arg	Leu	Ile	Val	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Gly
				20					25					30
Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Arg	Lys	Ala	Phe	Asp
				35					40					45
Thr	Ser	Glu	Lys	Pro	Gly	Lys	Asp	Asp	Thr	Gly	Gly	Lys	Asp	Lys
				50					55					60
Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Ala	Glu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Asn	Ile
				65					70					75
Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Ile	Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Gly
				80					85					90
Tyr	Val	Asp	Phe	Pro	Pro	Glu	Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Arg
				95					100					105
Val	Glu	Ile	Ser	Met	Val	Val	Ile	Glu	Pro	Thr	Lys	Ser	Ile	Val
				110					115					120
Leu	Asn	Ser	Lys	Lys	Ile	Ser	Val	Ile	Pro	Gln	Glu	Cys	Glu	Leu
				125					130					135
Val	Ser	Gly	Asp	Lys	Lys	Leu	Glu	Ile	Glu	Ser	Val	Lys	Glu	His
				140					145					150
Pro	Arg	Leu	Glu	Lys	Val	Glu	Phe	Leu	Ile	Lys	Ser	Gln	Leu	Glu
				155					160					165
Lys	Asp	Gln	Gln	Ile	Leu	Leu	Lys	Val	Gly	Tyr	Ile	Gly	Leu	Ile
				170					175					180
Ser	Asn	Ser	Phe	Gly	Ile	Tyr	Gln	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Thr	Pro
				185					190					195
Asp	Gly	Thr	Pro	Lys	Ile	Ala	Ala	Val	Ser	Gln	Asn	Glu	Pro	Ile
				200					205					210
Asp	Ala	Arg	Arg	Met	Val	Pro	Cys	Met	Asp	Glu	Pro	Lys	Tyr	Lys
				215					220					225
Ala	Asn	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Ile	His	Pro	Lys	Gly	Thr	Lys	Ala
				230					235					240
Val	Ser	Asn	Gly	Ile	Glu	Val	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Ile	Ser	Gly
				245					250					255
Asp	Trp	Ile	Thr	Ser	Lys	Phe	Leu	Thr	Thr	Pro	Arg	Met	Ser	Ser
				260					265					270
Tyr	Leu	Leu	Ala	Val	Met	Val	Ser	Glu	Phe	Glu	Tyr	Ile	Glu	Gly
				275					280					285
Glu	Thr	Lys	Thr	Gly	Val	Arg	Phe	Arg	Ile	Trp	Ser	Arg	Pro	Glu
				290					295					300
Ala	Lys	Lys	Met	Thr	Gln	Tyr	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys
				305					310					315
Ile	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asp	Phe	Phe	Asp	Ile	Arg	Phe	Pro	Leu	Lys
				320					325					330
Lys	Gln	Asp	Met	Ile	Ala	Leu	Pro	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Ala	Met
				335					340					345
Glu	Asn	Trp	Gly	Leu	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Asn	Ser	Leu	Leu	Tyr
				350					355					360
Asp	Asp	Arg	Phe	Tyr	Ala	Pro	Met	Asn	Lys	Gln	Arg	Ile	Ala	Arg
				365					370					375
Ile	Val	Ala	His	Glu	Leu	Ala	His	Gln	Trp	Phe	Gly	Asp	Leu	Val
				380					385					390
Thr	Met	Lys	Trp	Trp	Asp	Asn	Leu	Trp	Leu	Asn	Glu	Gly	Phe	Ala
				395					400					405
Arg	Phe	Thr	Glu	Phe	Ile	Gly	Ala	Gly	Gln	Ile	Thr	Gln	Asp	Asp
				410					415					420
Ala	Arg	Met	Arg	Asn	Tyr	Phe	Leu	Ile	Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Ala
				425					430					435
Leu	Lys	Ala	Asp	Ser	Val	Ala	Ser	Ser	His	Pro	Leu	Ser	Phe	Arg
				440					445					450
Ile	Asp	Lys	Ala	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Ala	Phe	Asp	Asp	Ile	Thr
				455					460					465
Tyr	Ala	Lys	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Met	Leu	Arg	Ala	Leu	Ile
				470					475					480
Gly	Glu	Glu	Lys	His	Lys	His	Ala	Val	Ser	Gln	Tyr	Leu	Lys	Lys
				485					490					495
Phe	Ser	Tyr	Ser	Asn	Ala	Glu	Ala	Thr	Asp	Leu	Trp	Ala	Val	Phe
				500					505					510
Asp	Glu	Val	Val	Thr	Asp	Val	Glu	Gly	Pro	Asp	Gly	Lys	Pro	Met
				515					520					525
Lys	Thr	Thr	Glu	Phe	Ala	Ser	Gln	Trp	Thr	Thr	Gln	Met	Gly	Phe
				530					535					540

Pro	Val	Ile	Ser	Val	Ala	Glu	Phe	Asn	Ser	Thr	Thr	Leu	Lys	Leu
				545					550					555
Thr	Gln	Ser	Arg	Tyr	Glu	Ala	Asn	Lys	Asp	Ala	Val	Glu	Lys	Glu
				560					565					570
Lys	Tyr	Arg	His	Pro	Lys	Tyr	Gly	Phe	Lys	Trp	Asp	Ile	Pro	Leu
				575					580					585
Trp	Tyr	Gln	Glu	Gly	Asp	Lys	Lys	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Trp	Leu
				590					595					600
Arg	Arg	Asp	Glu	Pro	Leu	Tyr	Leu	His	Val	Ser	Asp	Ala	Gly	Ala
				605					610					615
Pro	Phe	Val	Val	Asn	Ala	Asp	Arg	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Arg	Gln	Asn
				620					625					630
His	Asp	Ala	Asn	Gly	Trp	Lys	Lys	Ile	Ile	Lys	Gln	Leu	Lys	Asp
				635					640					645
Asn	His	Glu	Val	Tyr	Ser	Pro	Arg	Thr	Arg	Asn	Val	Ile	Ile	Ser
				650					655					660
Asp	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Asp	Ala	Ile	Glu	Tyr	Glu	Thr
				665					670					675
Val	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Tyr	Ala	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Tyr	Leu
				680					685					690
Pro	Leu	Glu	Ile	Ala	Met	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Ile	Leu	Lys	Tyr
				695					700					705
Phe	Pro	Thr	Glu	Pro	Glu	Ala	Lys	Pro	Ala	Gln	Thr	Tyr	Met	Met
				710					715					720
Asn	Ile	Leu	Lys	Pro	Met	Tyr	Glu	Lys	Ser	Ser	Ile	Asp	Phe	Ile
				725					730					735
Ala	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Asp	Lys	Leu	Phe	Phe	Gln	Ile	Asn	Leu
				740					745					750
Gln	Lys	Asp	Val	Ile	Asp	Met	Phe	Cys	Ala	Leu	Gly	Ser	Gln	Asp
				755					760					765
Cys	Arg	Lys	Lys	Tyr	Lys	Lys	Leu	Phe	Asp	Asp	Glu	Val	Met	Asn
				770					775					780
Lys	Cys	Arg	Asp	Gly	Gln	Ala	Ala	Thr	Glu	Cys	Val	Arg	Ile	Ala
				785					790					795
Ala	Pro	Leu	Arg	Ser	Ser	Val	Tyr	Cys	Tyr	Gly	Val	Lys	Glu	Gly
				800					805					810
Gly	Asp	Tyr	Ala	Ser	Asp	Lys	Val	Met	Glu	Leu	Tyr	Thr	Ala	Glu
				815					820					825
Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Lys	Asp	Phe	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Gly	Cys
				830					835					840
His	Lys	Asp	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
				845					850					855
Asp	Arg	Asn	Ser	Ser	Phe	Val	Arg	Met	Gln	Asp	Ile	Pro	Ser	Ala
				860					865					870
Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	Gly	Glu	Glu	Phe	Ile	Phe
				875					880					885
Asn	Phe	Leu	Ile	Glu	Arg	Trp	Pro	Asp	Ile	Ile	Glu	Ser	Ile	Gly
				890					895					900
Thr	Lys	His	Thr	Tyr	Val	Glu	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Cys	Thr	Ser
				905					910					915
Gly	Ile	Arg	Ser	Gln	Gln	Gln	Ile	Asp	Gln	Leu	Lys	Asn	Leu	Gln
				920					925					930
Lys	Asn	Gly	Met	Asn	Ala	Arg	Gln	Phe	Gly	Ala	Phe	Asp	Lys	Ala
				935					940					945
Ile	Glu	Arg	Ala	Gln	Asn	Arg	Val	Asp	Trp	Ile	Lys	Lys	His	Phe
				950					955					960
Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Phe	Phe	Lys	Lys	Ala	Thr	Leu			
				965					970					

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több, a 2., 3., 4. vagy 5. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciák (szekvenciaazonosító szám: 1–15. és 19–21.) valamelyike egészének vagy egy részének megfelelő, bélféreg eredetű aminopeptidáz enzim – vagy annak egy antigén-determináns régióját – kódoló nukleotidszekvenciát; vagy

bélféreg eredetű aminopeptidáz enzim kódoló és a fenti szekvenciák bármelyikével legalább 50%-ban azonos szekvenciát; vagy

a fenti szekvenciák bármelyikével 2×SSC-pufferben (ahol az SSC-puffer összetétele: 0,15 mol/l NaCl,

0,015 mol/l nátrium-citrát, pH=7,2) szobahőmérsékleten hibridizálódó szekvenciát tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy emberbe vagy állatba juttatva bélféreg elleni védőhatású ellenanyagok termelődését kiváltó, a 2., 3., 4. vagy 5. ábrán bemutatott aminopeptidáz kódoló nukleotidszekvenciák (szekvenciaazonosító szám: 1–15. és 19–21.) valamelyikének egy vagy több antigén-determináns kódoló régióját magába foglaló nukleotidszekvenciá(ka)t tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, *azzal jellemezve*, hogy

az M1-, B1A-, B1A-3', B2-, M1AUS-, AustB1, 014–015- (2,5 PCR-), 014–872- (3,5 PCR-2-), A-648-

(a B1-klón 5'-vége), A-650- (a 2,5PCR-klón 5'-vége), A-649- (a 3,5PCR-klón 5'-vége), 014-178- (az AustB1-2-klón 3'-vége), 014-178- (az AustB1-3- és AustB1-6-klónok 3'-vége), 014-872- (3,5PCR-10-), valamint 014-872- (3,5PCR-19-), H11-1-, H11-2- vagy H11-3-klónokban található, a 2., 3., 4. vagy 5. ábrán bemutatott egy vagy több nukleotidszekvenciával (szekvenciaazonosító szám: 1-15., valamint 19-21.) megegyező vagy azzal komplementer nukleotidszekvenciá(ka)t; vagy

a fenti szekvenciák bármelyikével legalább 50%-ban azonos szekvenciát; vagy

a fenti szekvenciák bármelyikével 2×SSC-pufferben (ahol az SSC-puffer összetétele: 0,15 mol/l NaCl, 0,015 mol/l nátrium-citrát, pH=7,2) szobahőmérsékleten hibridizálódó szekvenciát tartalmaz.

4. Expressziós vagy klónozó vektor, *azzal jellemezve*, hogy az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulát tartalmaz.

5. Prokarióta vagy eukarióta sejt vagy transzgenikus szervezet, *azzal jellemezve*, hogy az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulát tartalmaz.

6. Szintetikus polipeptid, *azzal jellemezve*, hogy a 2., 3., 4. vagy 5. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciák (szekvenciaazonosító szám: 1-15. és 19-21.) bármelyike által kódolt aminosavszekvencia egészét vagy egy részét képező, egy aminopeptidáz enzimnek vagy annak egy antigén-determináns részének – megfelelő aminosavszekvenciát; vagy

annak funkcionálisan ekvivalens variánsát tartalmazza,

amely szekvencia a H110D-kettős fehérjének megfelelő szintetikus polipeptid szekvenciájától, továbbá az alább felsorolt polipeptidek bármelyikének szekvenciájától eltérő:

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

n) Lys – – – Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu

o) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys

p) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe – Ala Thr Ala Leu

5 q) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser – Tyr – Thr

r) Met Glu/Phe Asn Phe Leu Ile Glu/Val Thr/Glu Ala Gly – Ile Thr

10 s) Met Gly Phe Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr – Thr Ser

t) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro

u) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Leu Asp/Ala Thr/Lys Leu – Ile Thr – Gly

15 v) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser – Phe Val Gly

w) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val

x) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu Asn/Leu Leu Asn/Gly

y) Lys – Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn

20 z) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp – Ile – – – Lys Gly

aa) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr Tyr – – Gly Pro Ser

bb) Lys – Glu Gln Thr Glu Ile Phe Asn Met

25 cc) Lys – – – Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu

dd) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys

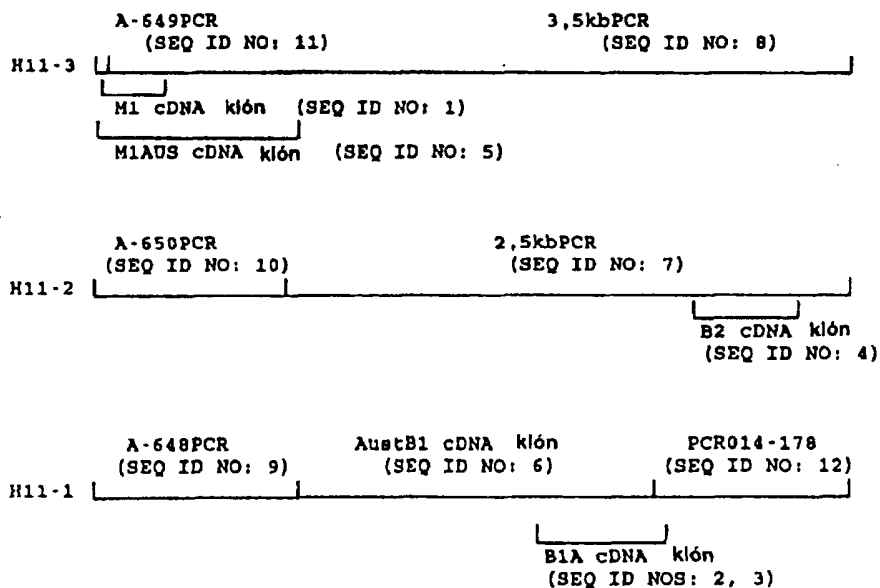
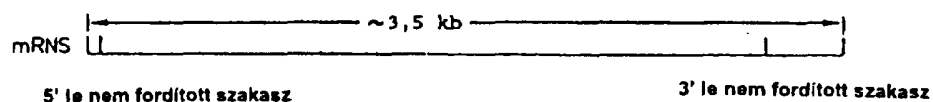
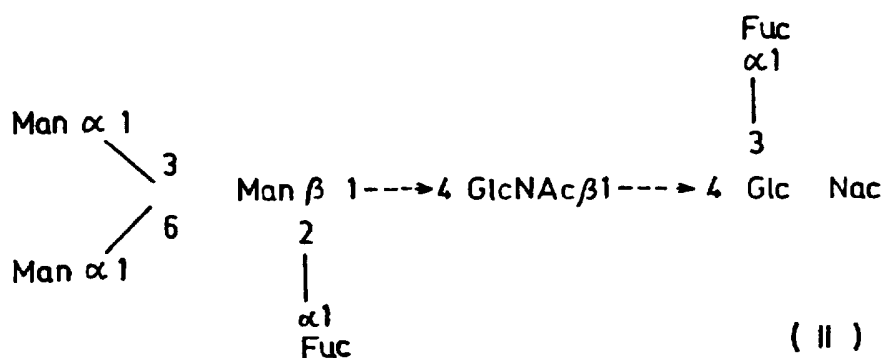
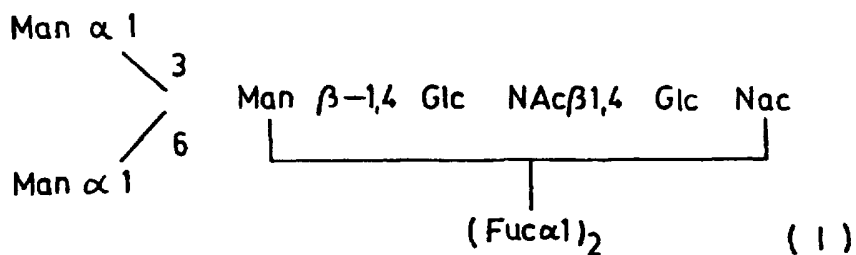
7. A 6. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, *azzal jellemezve*, hogy lényegében mentes minden egyéb *Haemonchus contortus* eredetű összetevőtől.

30 8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, *azzal jellemezve*, hogy a 6. vagy 7. igénypont szerinti aminosavszekvenciához fuzionáltatva egy más polipeptidet is tartalmazó fúziós polipeptid.

35 9. Eljárás a 6-8. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulát tartalmazó prokarióta vagy eukarióta sejteket a polipeptid expresszáására alkalmas körülmények között tenyésztünk, és a termelődött polipeptidet kinyerjük, vagy a polipeptidet kémiai szintézissel előállítjuk.

10. Oltóanyag-készítmény bélféreg elleni immunválasz kiváltására emberben vagy állatban, *azzal jellemezve*, hogy legalább egy, a 6-8. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptidet, vagy az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulát – az általa kódolt polipeptid kifejezésére és így immunválasz kiváltására alkalmas módon – beépítve hordozóvírust vagy gazdasejtet, valamint gyógyászatilag elfogadható hordozó- és/vagy egyéb segédanyagokat tartalmaz.

50 11. Eljárás az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekula előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a molekulát kémiai szintézissel vagy enzimatisz polimerizációval előállítjuk.



1. ábra

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

2. ábra

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

2. ábra (folytatás)

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

2. ábra (folytatás)

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

2. ábra (folytatás)

H11-1 AAATAGCTGT TATTGACACA TACTGTGGTC TTGGAGGCCAA AGAATGTCTT

2351 2400

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

2401 2450

H11-3 TGGTCAAGCA GCAACCGAAT GCGTAAAGAAT CGCCGCTCCT CTCCGATCAA
H11-2 CGGGGAAGCA GCAACCAAT GCGTTAAGGT TTCCGCTCCT CTTCGAGCCA
H11-1 TGGTCAGCAA GCGACCGACT GCGTAAAGGT AACTGCTCCT CTCCGAAAAA

2451 2500

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

2501 2550

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

2551 2600

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

2601 2650

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

2651 2700

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

2701 2750

H11-3 TTTCAATTTC CTTATTGAGA GATGGCCAGA TATCATTGAA AGTATAGGAA
H11-2 GTTCAATTTC CTAATGGAGA GATGGGAGGA AATCACTGCG AGCTTGGAAG
H11-1 GTTCAATTTC CTCACAGAGC GATGGGAAGA GATACTTGAA AGTTTGTCAG

2751 2800

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

2801 2850

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

2851 2900

H11-3 GAACGCTCGT CAATTCCGGT CATTTCGATAA AGCAATCGAA CGAGCACAAA
H11-2 GCAGGCTAAG AAGTTCCGGT CATTACCCCA GGAAATCGAA AAAGGAGAAC
H11-1 GCGTGCTCGC GAATACGGTG CATTTCGGTGG GGCAATAGAA AGATCGGAAC

2901 2950

2. ábra (folytatás)

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

2. ábra (folytatás)

	1		50
M1		C GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG	
AustM1	ATGACGTCGC AGGGGAGAAC GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG		
H11-3	ATGACGTCGC AGGGGAGAAC GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG		
	51		100
M1	TCTTATTGTC GCATTATTTT TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG		
AustM1	TCTTATTGTC GCATTATTTT TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG		
H11-3	TCTTATTGTC GCATTATTTT TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG		
	101		150
M1	GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA		
AustM1	GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA		
H11-3	GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA		
	151		200
M1	GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC		
AustM1	GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC		
H11-3	GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC		
	201		250
M1	GGAACTACTT CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA		
AustM1	GGAACTACTC CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA		
H11-3	GGAACTACTC CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA		
	251		300
M1	TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC		
AustM1	TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC		
H11-3	TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC		
	301		350
M1	ACATTCGACG GGCG		
AustM1	ACATTCGATG GGGGTGTGGA AATATCAATG GTTGTAATTG AGCCAACAAA		
H11-3	ACATTCGATG GGGGTGTGGA AATATCAATG GTTGTAATTG AGCCAACAAA		
	351		400
AustM1	GAGTATCGTA CTCAATTCAA AGAAGATCTC TGTAATACCC CAAGAATGTG		
H11-3	GAGTATCGTA CTCAATTCAA AGAAGATCTC TGTAATACCC CAAGAATGTG		
	401		450
AustM1	AACTGGTATC GGGCGATAAA AAATTCGAAA TTGAAAGTGT AAAGGAGCAC		
H11-3	AACTGGTATC GGGCGATAAA AAATTCGAAA TTGAAAGTGT AAAGGAGCAC		
	451		500
AustM1	CCAAGACTGG AAAAGGTTGA GTTTCTTATC AAAAGCCAAC TGGAAAAAGA		
H11-3	CCAAGACTGG AAAAGGTTGA GTTTCTTATC AAAAGCCAAC TGGAAAAAGA		
	501		550
AustM1	TTACAAATC TTGCTCAAGT CGGCTTACAT CGGTCTCATC AGCAACAGCT		
H11-3	TCAACAAATC TTGCTCAAGG TCGGCTACAT CGGTCTCATC AGCAACAGCT		
	551		600
AustM1	TTGGTGGAAT CTACCAGACC ACTTATACCA CCCCCGATGG CACCCCTAAG		
H11-3	TTGGTGGAAT CTACCAGACC ACTTATACCA CCCCCGATGG CACCCCTAAG		
	601		650
AustM1	ATCGCTGCAG TTTCACAAAA TGAGCCCATG GATGCTCGTC GAATGGTACC		
H11-3	ATCGCTGCAG TTTCACAAAA TGAGCCCATG GATGCTCGTC GAATGGTACC		

3. ábra

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

3. ábra (folytatás)

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

3. ábra (folytatás)

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

3. ábra (folytatás)

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

4. ábra

H11-2 CGGGCTTTGA TTGGAGAGGA CAAATTACAGG AATGCTGTTG TGCAATACCT 1500
H11-2 CAAGAAGTTC TCCTACAGCA ATGCACAGC AGCCGATCTG TGGAACGTCT 1550
H11-2 TCAATGAAGT TGTCAAAGGT GTTAAGGGTC CTGACGGCAA CGTCATGAAA 1600
H11-2 ATCGACCAAT TTACCGATCA GTGGACGTAT CAGATGGGTT ATCCTGTGGT 1650
H11-2 TAAAGTAGAA GAATTTAATG CGACCGCCCT AAAGGTTACG CAGAGCCGGT 1700
H11-2 ACAAGACAAA TAAAGACGCC TTGGAACCAG AGAAATATCG TAATCCAAAA 1750
H11-2 TACGGGTTCA AGTGGGATGT TCCCTATGG TATCAGGAAG GCAATAGCAA 1800
H11-2 AGAGGTGAAG CGAACATGGC TAAAAAGAGA TGAACCGCTG TACTTGAACG 1850
H11-2 TCAACAATCG GGATACATCC CTTGTGGTGA ACGCTGATCG ACATGGATTT 1900
H11-2 TATCGACAAA ACTATGATGC CAACGGTTGG AAAAAGATAA TCAAGCAGCT 1950
H11-2 CAAGAAAGAT CACAAGGTCT TCGGTCCAAG GACAAGGAAC GCTATCATAA 2000
H11-2 GCGATGCATT TGCTGCAGCT ACGATTGACG CAATCGACTA TGAAACTGTA 2050
H11-2 TTCGAACTAC TTGAATATGC CAAAAATGAA GAGGAATTCT TGCCTTGGAA 2100
H11-2 GGAAGCTCTG TCCGGCATGT TCGCAGTTTT AAAGTTCTTC GGTAATGAGC 2150
H11-2 CGGAGACAAA ACCAGCTAGA GCTTACATGA TGAGCATATT AGAACCGATG 2200
H11-2 TATAATAAGA GCAGCATTGA TTACATCGTC AAGAATTATT TGGATGATAC 2250
H11-2 GTTATTCACA AAAATTAATA CTCAAAGGA TATCATTGAT GCATATTGTT 2300
H11-2 CCCTTGGATC AAAGGACTGT ATAAAGCAAT ATAAGGATAT CTTCTACGAT 2350
H11-2 GAGGTTATGC CCAAGTGTA GGCCGGGGAA GCAGCAACCA AATGCGTTAA 2400
H11-2 GGTTTCCGCT CCTCTTCGAG CCAATGTTTA CTGTTATGGT GTACAGGAAG 2450
H11-2 GTGGTGAAGA AGCTTTTGAA AAGGTGATGG GGCTGTATCT AGCAGAAGAT 2500
H11-2 GTTCAACTGG AGAAGGGTAT CCTGTTCAA GCCTTGGCAT GCCACAAAGA 2550
H11-2 TGTACAGCT CTAAAAGAAC TTCTTTTGCG AGCCCTGGAC CGTAAATCGT 2600
H11-2 CGTTTGTGCG TCTTCAGGAT GTCCCTACCG CTTTCCGTGC TGTATCTGAA 2650
B2 GGGG 4
H11-2 AACCTGTGG CGAAGAATT CATGTTCAAT TTCCTAATGG AGAGATGGGA 2700
B2 GGAAATCACT GCGAGCTTGG AAACAGAACA CAGAGCAGTT GATAAAGTGG 54
H11-2 GGAAATCACT GCGAGCTTGG AAACAGAACA CAGAGCAGTT GATAAAGTGG 2750
B2 TCGGCGCTTG TTGCACAGGA ATTCGCTCCC AACAACAAAT AGATCAGCTG 104
H11-2 TCGGCGCTTG TTGCACAGGA ATTCGCTCCC AACAACAAAT AGATCAGCTG 2800
B2 AAGAAGAATC TACAGAAGAA CAATGCCGAG CCTAAGAACT TC..... 154

4. ábra (folytatás)

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

4. ábra (folytatás)

```

1 50
H11-1 GGTTTAATT A CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGG

51 100
H11-1 AGACGCAGCA ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCCAATCAAG

101 150
H11-1 TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG

151 200
H11-1 TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT TGATACTACT GGCGGAAATG

201 250
H11-1 GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGATGATA ATTCCCCATC AGCTGAAGAA

251 300
H11-1 TTACGTCTCC CAACAACCAT AAAACCTTTG ACATACGACT TAGTAATCAA

301 350
H11-1 AACGTATCTG CCAAACCTATG TAAACTATCC ACCTGAGAAA GATTTCGCTA

351 400
H11-1 TTGATCGGAC TGTGGTGATT GCTATGGAAG TTGTGGAGCC AACAAAGTCT

401 450
H11-1 ATTGTGCTCA ACTCGAAAAA TATTCCTGTA ATTGCAGACC AGTGCGAACT

451 500
H11-1 GTTTTCTAAC AACCAAAAAC TCGACATCGA AAAGGTTGTG GATCAGCCAA

501 550
H11-1 GGCTGGAGAA AGTCGAATTC GTTTTGAAGA AAAAGCTGGA GAAGAATCAG

551 600
H11-1 AAAATCACGC TCAAGATTGT ATACATTGGC CTTATCAACG ACATGCTTGG

601 650
H11-1 AGGACTTTAT CGAACAACCT ACACGGATAA AGATGGTACA ACCAAGATTG

651 700
H11-1 CTGCATGCAC TCATATGGAA CCGACGGACG CCCGTCTTAT GGTCCCCCTGT

701 750
H11-1 TTCGACGAGC CGACGTTTAA GGCAAACCTGG ACTGTGACTG TGATTCAATCC

751 800
H11-1 GAAGGGCACC AGTGCCGTGT CGAATGGAAT AGAAAAGCGA GAAGGAGAAG

801 850
H11-1 TCTCTGGCGA TTGGGTCACA ACCAGATTCG ATCCAACCCC GCGAATGCCT

851 900
H11-1 TCGTATTTGA TTGCTCTTGT GATTTCGAA TTTAAGTACA TTGAAAATTA

901 950
AustB1 AATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA
H11-1 TACGAAAAGC GGTGTTTCGAT TCCGAATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA

```

5. ábra

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

5. ábra (folytatás)

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

5. ábra (folytatás)

	2351		2400
AustB1	AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGTCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC		
B1a	AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGTCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC		
H11-1	AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGTCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC		
	2401		2450
AustB1	GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT		
B1a	GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT		
H11-1	GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT		
	2451		2500
AustB1	ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAAC TA		
B1a	ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAAC TA		
H11-1	ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAAC TA		
	2501		2550
AustB1	TATAATGCCG AACAAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT		
B1a	TATAATGCCG AACAAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT		
H11-1	TATAATGCCG AACAAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT		
	2551		2600
AustB1	GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT		
B1a	GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT		
H11-1	GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT		
	2601		2650
AustB1	TGGATCGGAA TTC		
B1a	TGGATC		
H11-1	TGGATCGGAA TTCGTCATT GTGCGTCTTC AAGATGCTCA TGATGTGTTT		
	2651		2700
H11-1	AACATTGTAT CCAGAAATCC TGTGGAAAC GAACTGCTGT TCAATTCCT		
	2701		2750
H11-1	CACAGAGCGA TGGGAAGAGA TACTTGAAAG TTTGTCAATA CGACACAGAT		
	2751		2800
H11-1	CAGTTGATCG AGTGATCAAA GCCTGTACTC GAGGACTACG ATCCAGGGAA		
	2801		2850
H11-1	CAAGTACAAC AGTTGAAGAA TCTATACAAA AATGACAAGC GTGCTCGCGA		
	2851		2900
H11-1	ATACGGTGCA TTTGGTGGGG CAATAGAAAG ATCGGAACAC AGAGTCAAAT		
	2901		2950
H11-1	GGATTGAGAA ACATTTCGGA AAAC TAGCAG CTTTCTTCAA AAAATCTAAT		
	2951		3000
H11-1	TCATAATTCT GAAATGGCTA TAACTAGCAC ACTGGATAGT TGTCTCGAAT		
	3001		3050
H11-1	CATCCAAAAA GATTAATGAT GTTTTTTTAC TAGATAATAT GGAGATATTC		
	3051	3084	
H11-1	TGTAAATTTG TCATCGATTC AAGTGTCTGT ATTG		

5. ábra (folytatás)

6a. ábra

Rat = patkány

6b.I. ábra

6b.II. ábra

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
HTAESOEQETQOPRQITVLRLTPKSLFALLVVAALVLSIOLTYTTRKAFDITTOONOKODQPIVDDNSPSEELRLPTTIKPLTYDLVLIKTYLPIHVV
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
NYPPKDFAIIDOTVIAHEVNEPTKSIVLNSKNIPIVIAOQELFSNNOKLDIEKVVDPRLKVEFVLKOKLEKQKIKITLKIYVLIOLINDHLOOLYRTTY
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
TDKDGTTKIAACTHHEPTDARLMVPCFDEPTFKANWTVTHPKOTSAVSNGIEKQGEVSDHVTTRFDPTFRMPSYLIALVISEFKYIENYTKSQRV
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
RIPARPEADQOTTEYAMIAQIKCLDYTEDFQIKFPLPKQDHVALLPDFSSOAMENHOLITYREOSVLYDENLYOPMKERVASEVIAJELAHQWTONLVTHK
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
WHDNLWLNQOFASVVEYIOADFIISDOLWEKDFLLAPYTSQITADAVASSHPLSFRIDCAADVSEAFDDITYRKQASVLOHLLNLVODENFKQSVRYL
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
KXFSYDHAJLEDLWAAFDETVQGITOPNGOPLKMSFAPQHTTOMOFFVLTVESVHATTLKVTOKRYRQNDAKEPEKYRHFTYGFKQDVPLHYQDEEQ
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
VBRTHLKRFEPLVHVNSDSVVVNAERRAFCRSNTDANQHTNINHRRLKQHKVYOPRTRNALISDAFAAJAAVTEKQYETVTEMLKTYTKCEEDYLPKXE
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
AISOFTILDFQSEPEQWASEYHRKLMKFIYDKS9IKFIENYQOSLFFKNNLQIAVIDTYCOLOKKECLEEMOCLFDKEVHKCQPOQOATDCVKT
810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
APLRKTVYCQVQEOODEAFQKVHLYNAEQVLEKQ9LREALQCHQDVTAALKQNLHJALDRNS9FVRLQDAHDVFNIVSRPVONELLNFTLTERWEEI
910 920 930 940 950 960 970
LE9LSIRHRSVDRVIFKACTRQLRSREQVQQLKHLXTQDQJAREYQAFQGAITERSEHNVKHWIEKIFRGLAJFTKENS*

Pep. B

Pep. C

7a. ábra

SEQ ID NO: 16

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
HTAEHQRRILQSPISLLCTLVLAALVGLS	IOLTYITRKA	FDTTQEQKDDSOQKEKDHSPSAEELLP	TNIKPVSYDLN	IKTYLP	POVYNFPPEQNL				
		DHSPSAEELLP	TNIKPVSYDLK	IATYLPQ					

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

TFDAKVEIAHVVVEPTNSIVLNSKKITL

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

IVAVSQNEPSDARRIAPCFDEPKYKATHTVTVVHPKOTKAASNGISIAHKOELKODHITSKFKTTTPHSSYLLAIIVCEFEYIEGFTKTOVRFRIMSRPE

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

AKRHTAYALDAGIRCLFEYKFFDIKFFPLEKQDMIALPDFTAQAMENHQLITYREDSLLYDEKIYAPHNKORVALVVAHIAHQHFGNLVTLKMHDDTTL

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

NEGFAATFVEYLGKDEISHNNFRNQDFFLLDGMGRMRADSAASSHPUSFRIDKAAEVAAFDODISYAKGASVLTMLRALIGEDNYRNAVVOYLKXKFSYSN

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

AGAAADLWVFNVEVYKGVKQPDQNMVKIDQFTDQWYQHQYFVVKVVEFNATALKVTQSRKYTKMCDALPEKYRNPKYQFKWDVPLTYQEQNSKEVKTTL

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

KRDEPLYNVNRNDSLVVNADRYGFYRQNYDANGHKKIKQLKDHKVGPRTFNAAIISDAFAAATIDAIIDYETVFELEYYAONEEFLPHKEALSGMF

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

AVLKEFGNEPETKPARAYMHSILEPHYKSSIDYIVONYLDDTLFTKINTQMDIDAYCSLOSQCICKQKQKIDFYDEVHAPKCKAOEAAATKCVKVSAPLRA

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

NTYCYGVQEGGEAEFKVMGLYLAEDVQLEKQILFKALACHQDVTAUKELLRALDRSSFTVLQDVPTAFRAVSENFPVQEEFHFNFILMERHWEIITAGLE

910 920 930 940 950 960 970

TEHRAVDKVVQACCTOIRSQQQIDQLXNLQKNALQAKKQSFQSEIKQGEHKIANHGHFHLSEFFKRLRS*

SEQ ID NO: 17

LYLAEDVQLEKQILF

SEQ ID NO: 18

LAYDEKSYAPDNKQY

PeP D

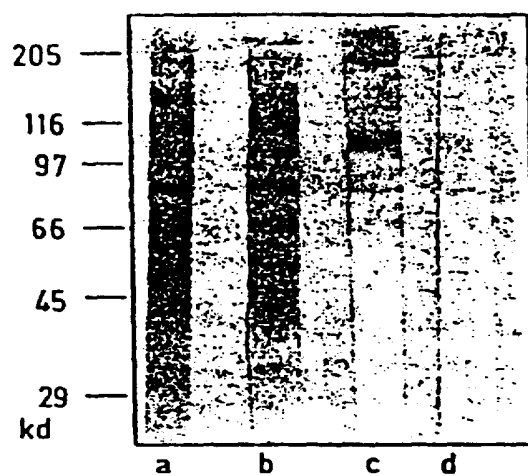
PeP A

7b. ábra

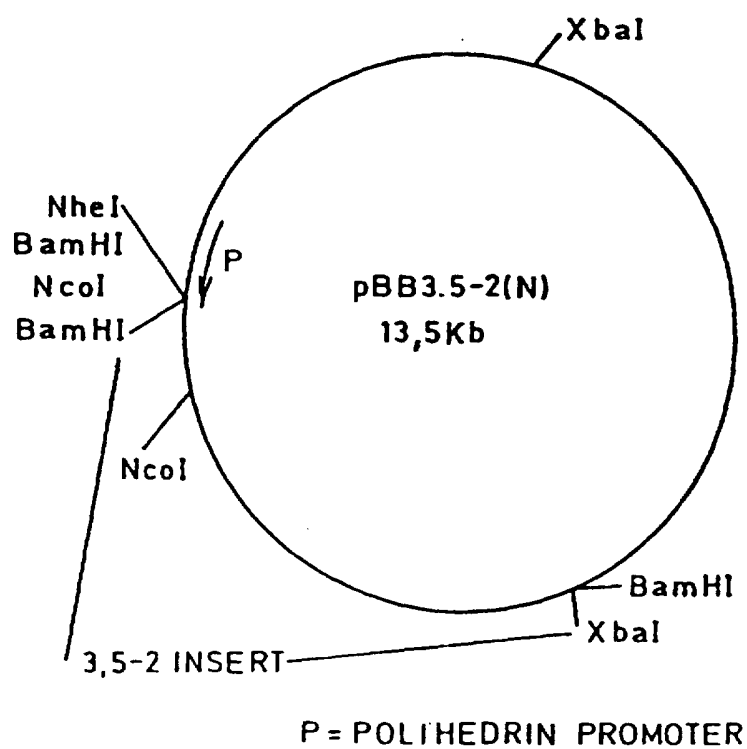
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
HTSQRTILNLTPIRLIVAFVAAVGLSGLTYTFTRKAFDTSEKFKMDTODKDNKNSPAAELLLPSNHIKPLSYDLTIKTYLPQYVDFPPEKIL
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TFQORVEISHVVIPTKSIIVLNSKISVIPQECELVSODKLEIESVKEPRLKEVFLIKSLEKQOILLKVOYIOLISNSFGOIYQITTTTTPDGTPK
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
IAAVSQHEPIDARRHVPCHEPKYKANTVTVIHPKQTKAVSNGIEVNGDGEISQDNITSKFLTTPRMSSYLLAVRVSEFEYIEGETKTQVTRFIWSRPE
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
AVOCHTOYALQSGIKICIEFYEDFFDIRFPLKXQDHIALPDSAGAMENHOLITYRENSLLYDDRFPAPMOKQRIARIVAKELAHQWFODLVTHKCHWDNLWL
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
NEGFARFTEFIGAGQITODDARWRNYFLIDVLERALKADSVASSHPSPRIDKAAEVEZAFDDITYAKOASVLTTHLRALIGEECHQIAVSQYCKFSYSN
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
KAVEVALAFDDITYXKOPS
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
AEATDLWAVFDEWVTOVEGPDOCKPMKTTTEFASQMTQMGFFVISVAEFSNSTLKLTSRSEYEAHKDAVEKEKYRHPKYOFKWDIFPLHWQEGDIOCEIKRTWL
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
RRDEPLYLHVSDAGAPFVNVHADRYGFYRQNHDAHGWOKI IKQKDNHEVYSFRTNRNVIISDAFALAAATDÄIEYETVTELLMYAEKETETYLPLEIAMSGIS
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
SILKTFPTEPEAKPAQTNGNLIKPMHYEKSISDFIANNYENDKLFQNLQKDVIDHFCALOSQDCRUKYTKLFDDEVAKORDGQAAATECVRIAAPLR9
810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
SVYCQVKEGGOYASDKVHELYTAETLAEKDFLRLALQCHKDVTALKQILLRALDRHSSFVRHQDIPSAFNDVAANPIGEEFIFNFLIERHFDIESIO
910 920 930 940 950 960 970
TQHTYVEKVI PACTSOIRSQQIOQLKNLQKQKQHWARQGFQAFDKAIERAQNRVNDHKKHIFQELAAFFQATL*

PeP E

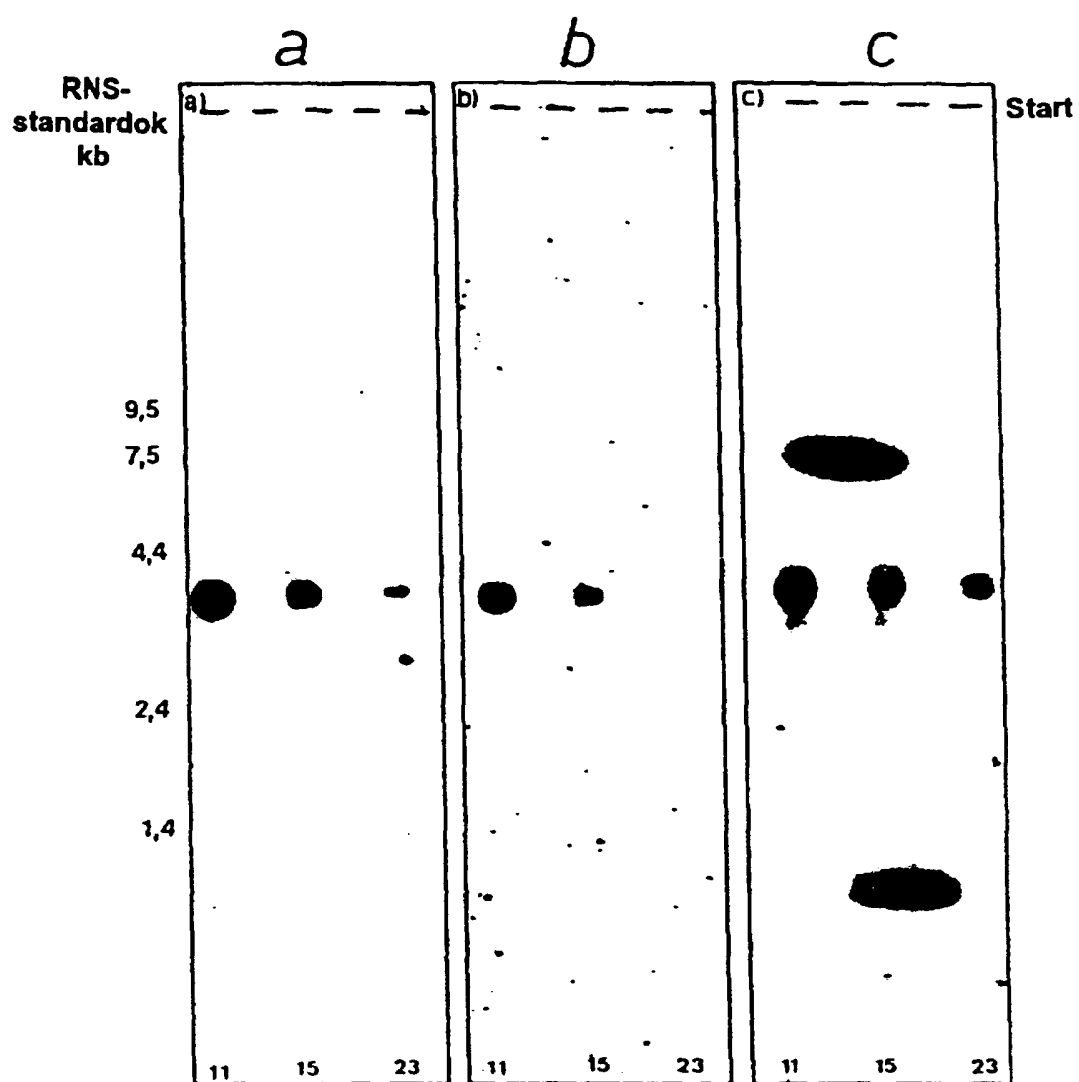
7c. ábra



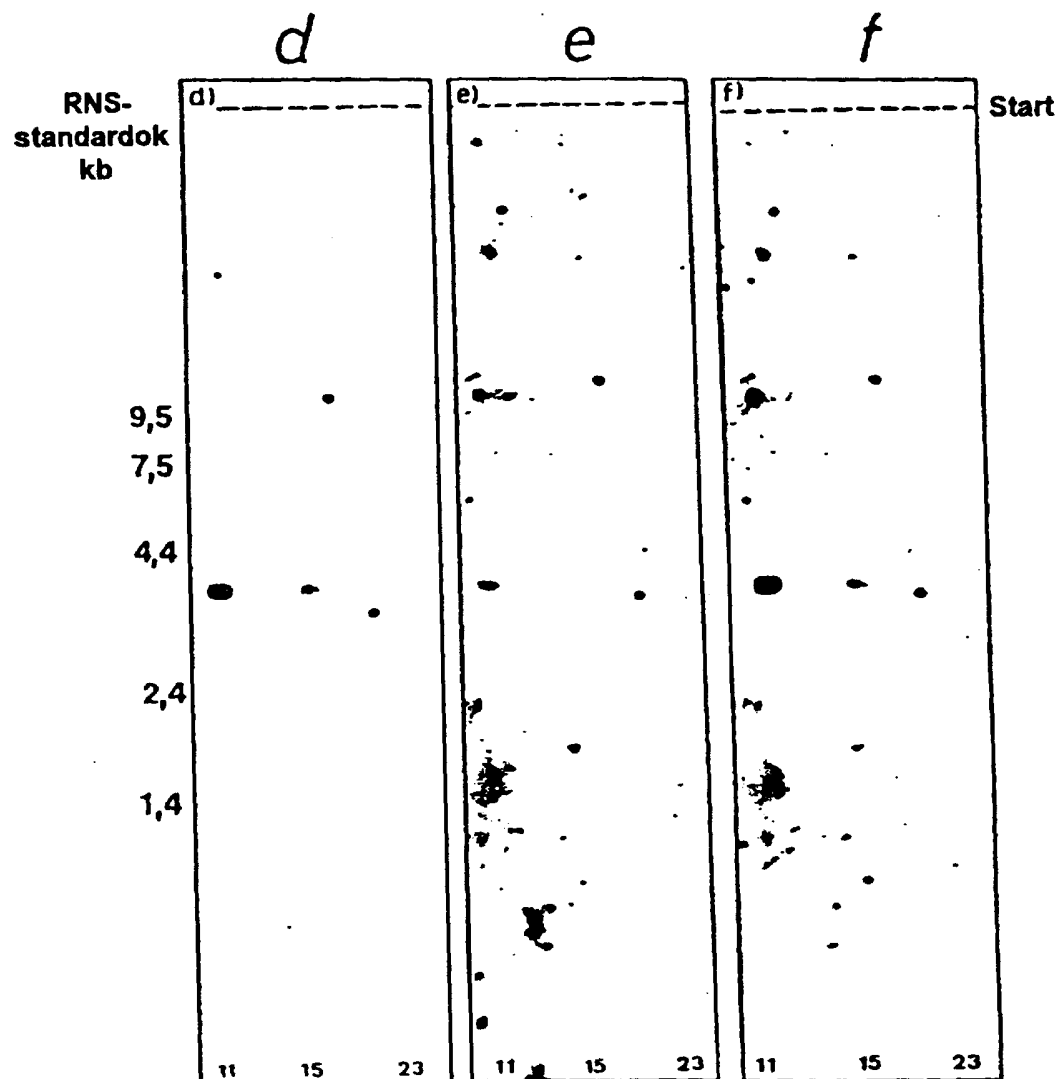
8. ábra



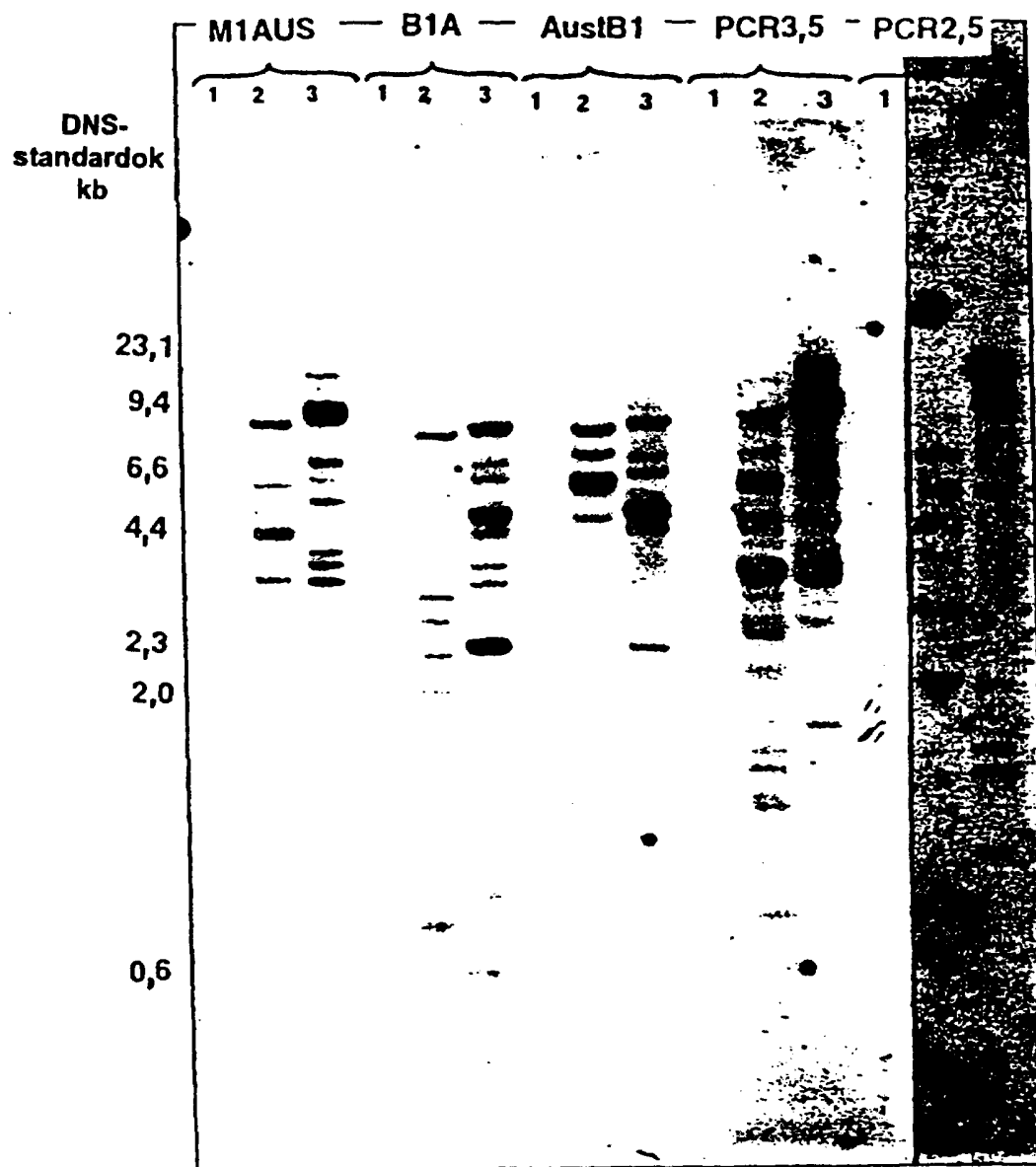
20. ábra



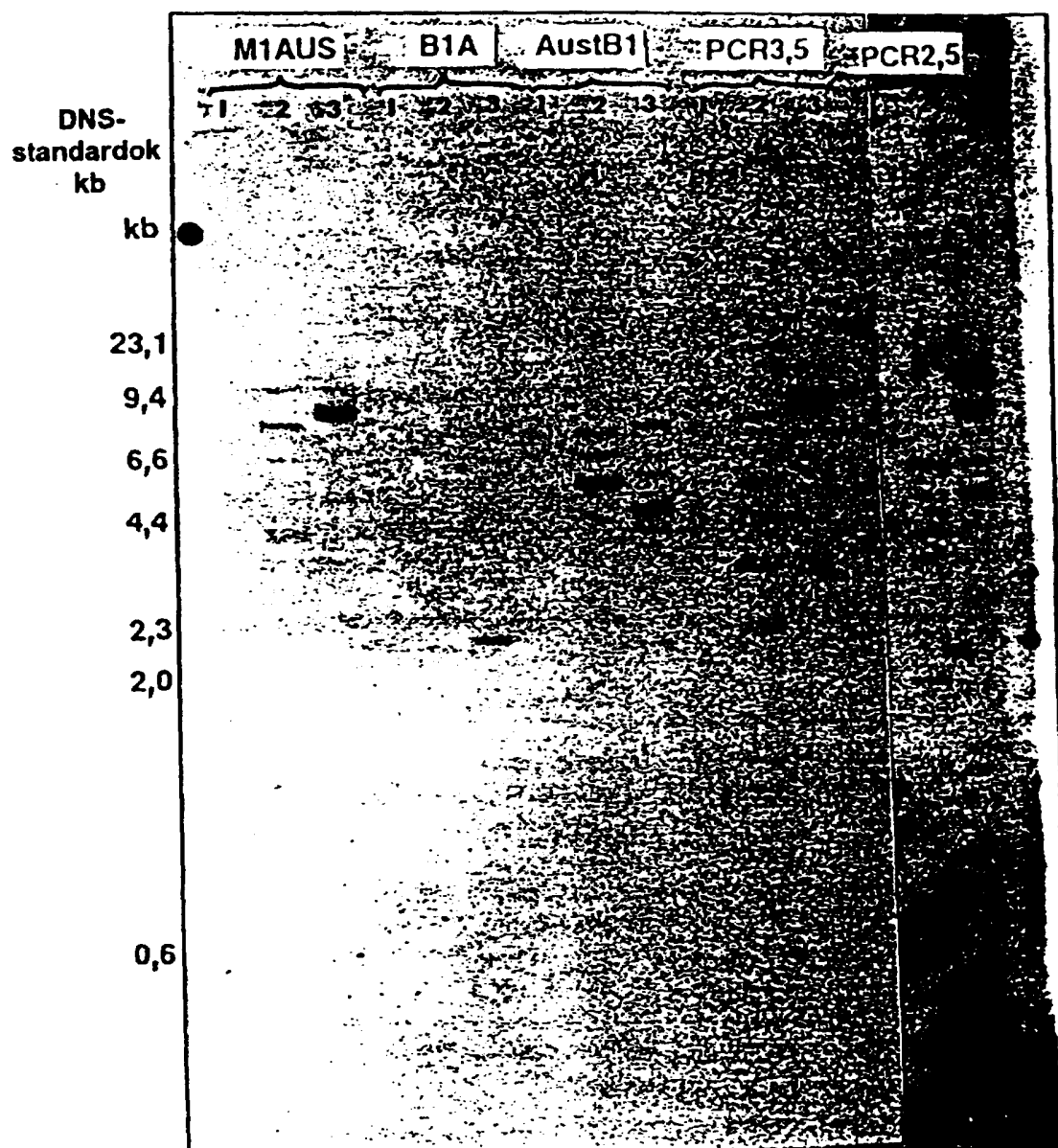
9. ábra



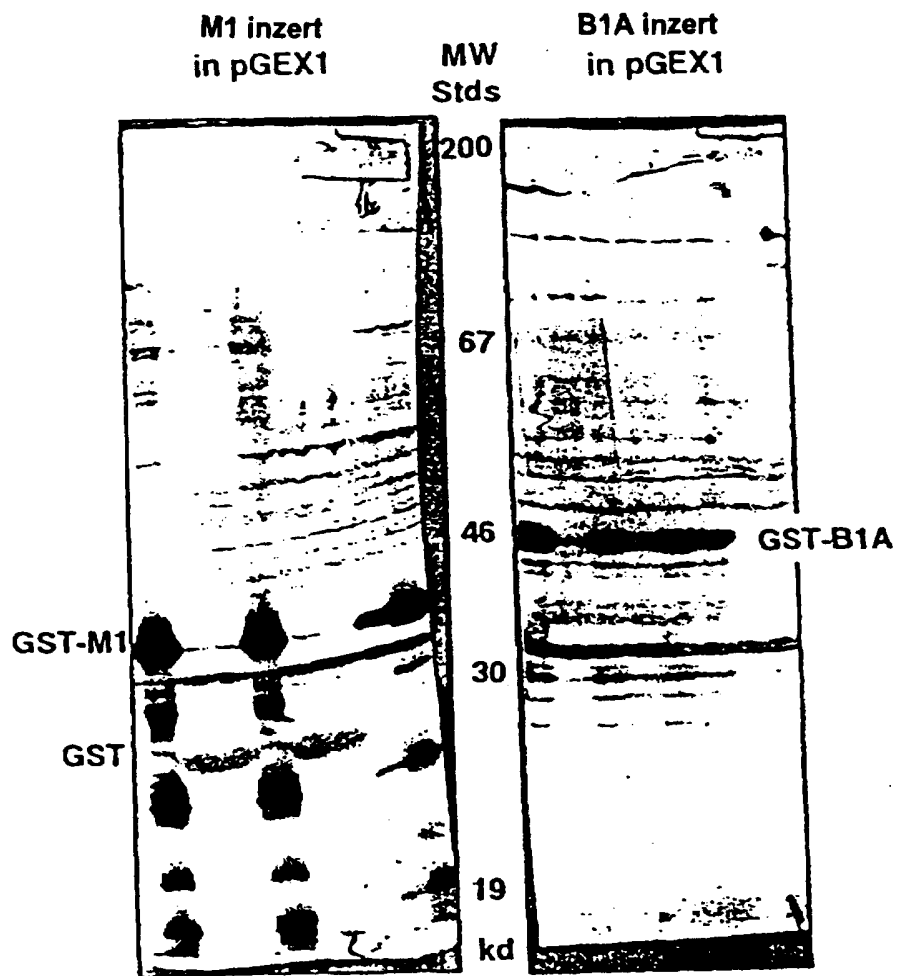
9. ábra



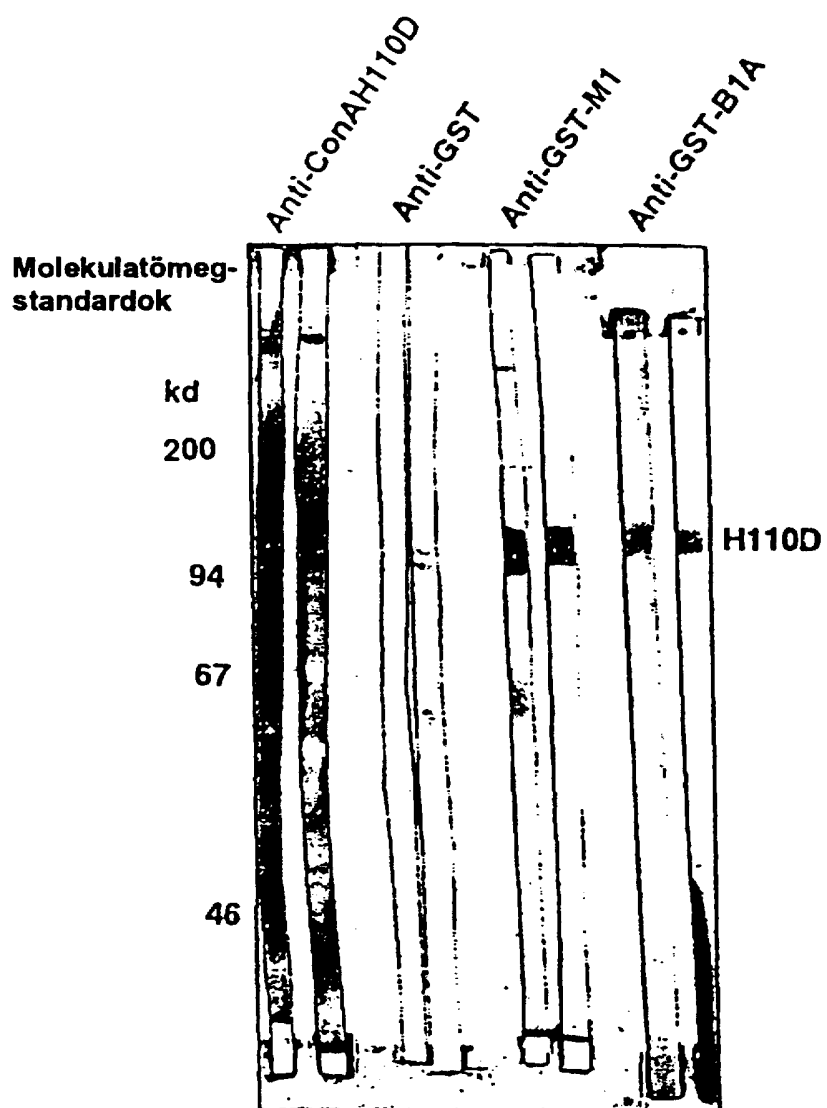
10a. ábra



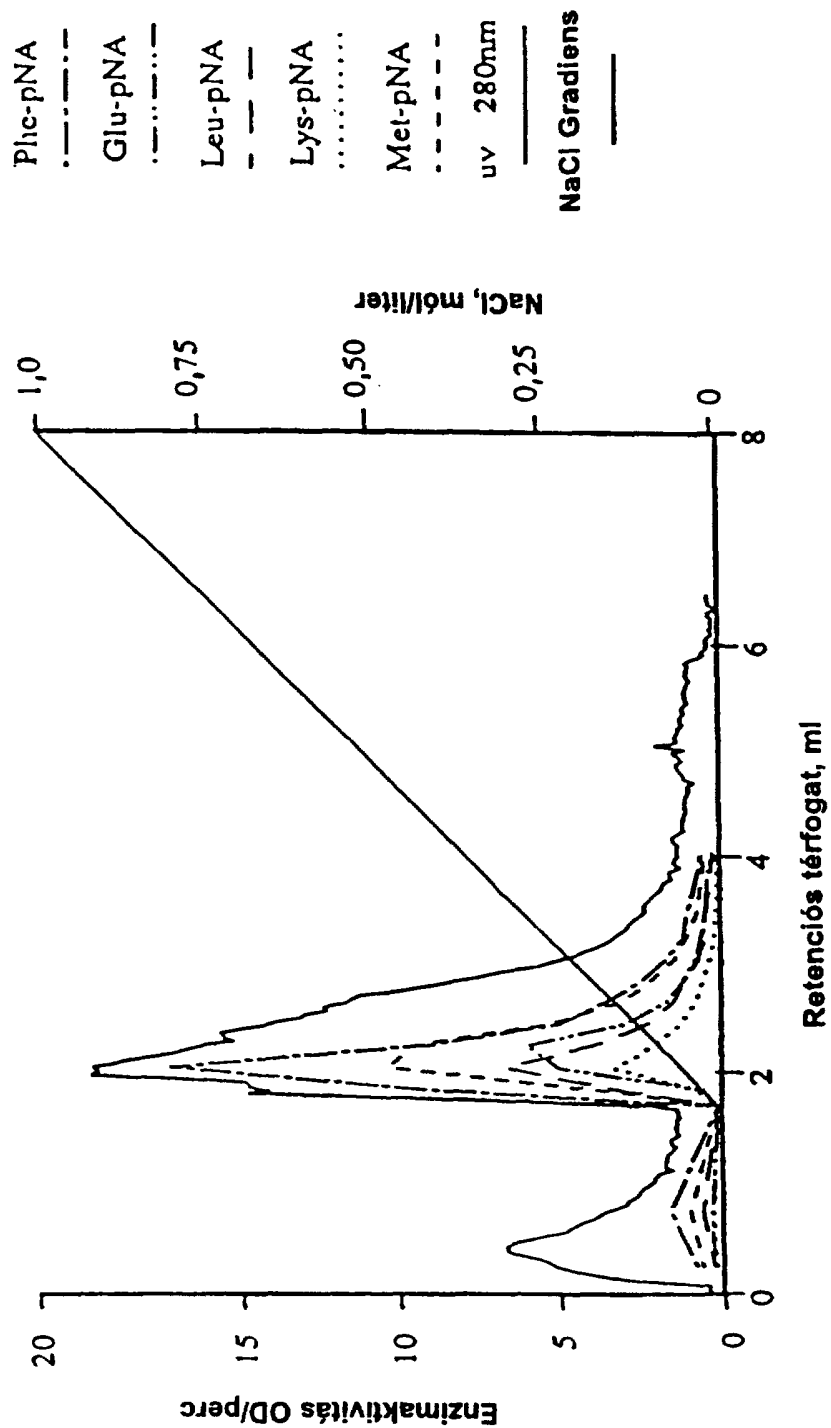
10b. ábra



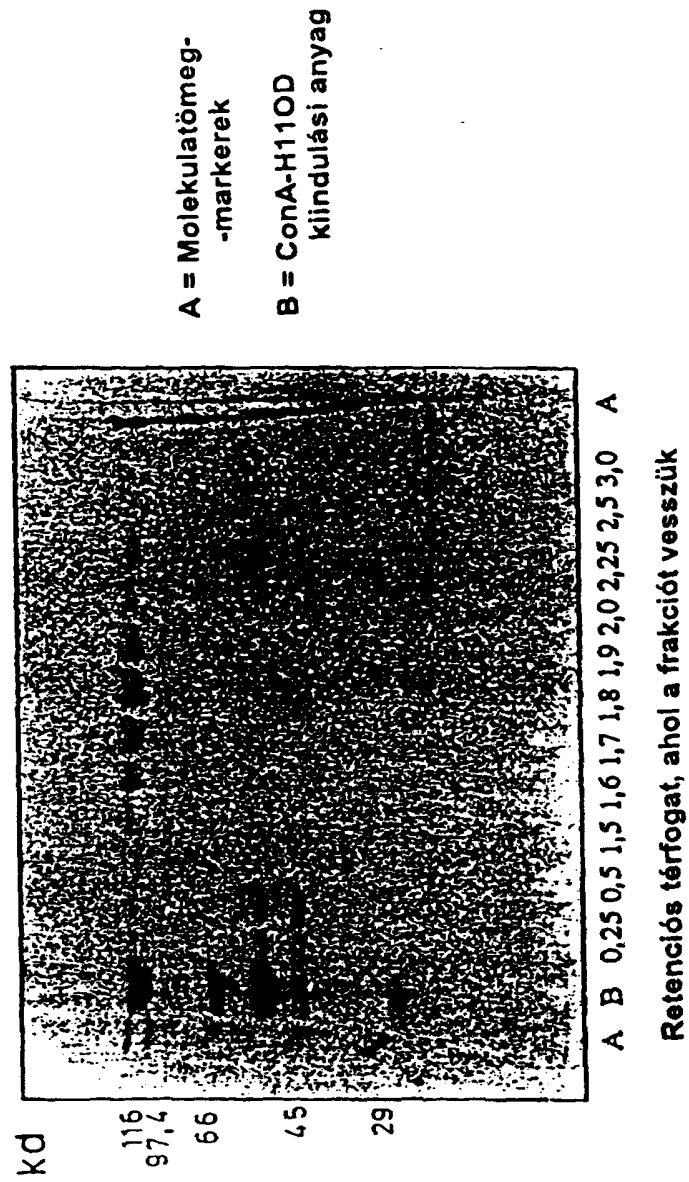
11. ábra



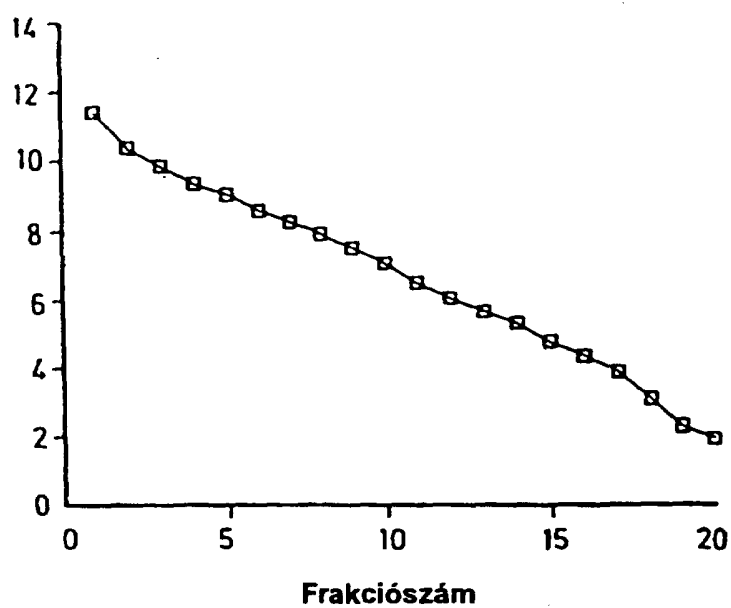
12. ábra



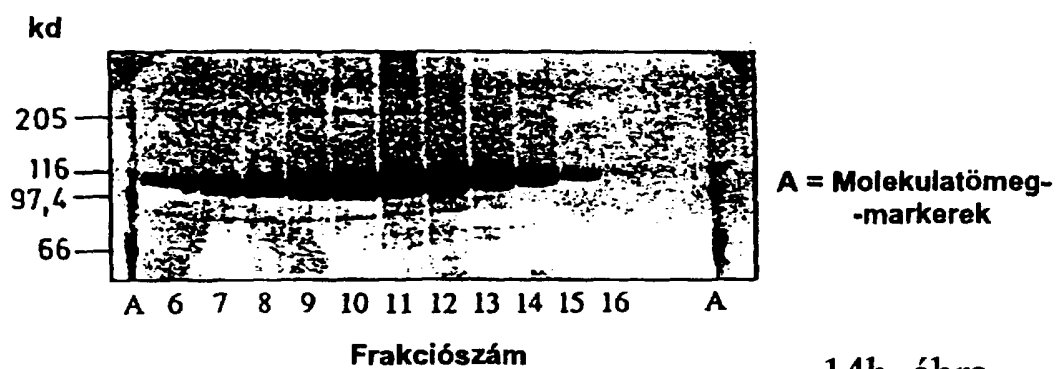
13a. ábra



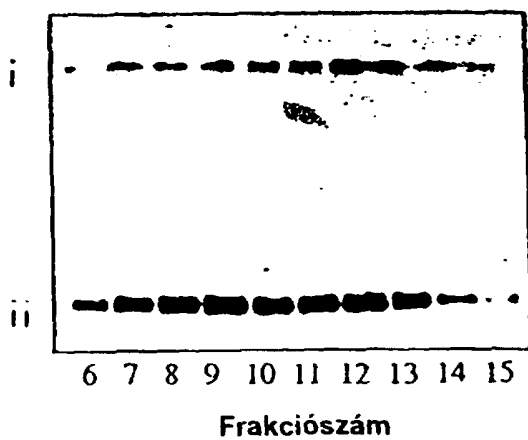
13b. ábra



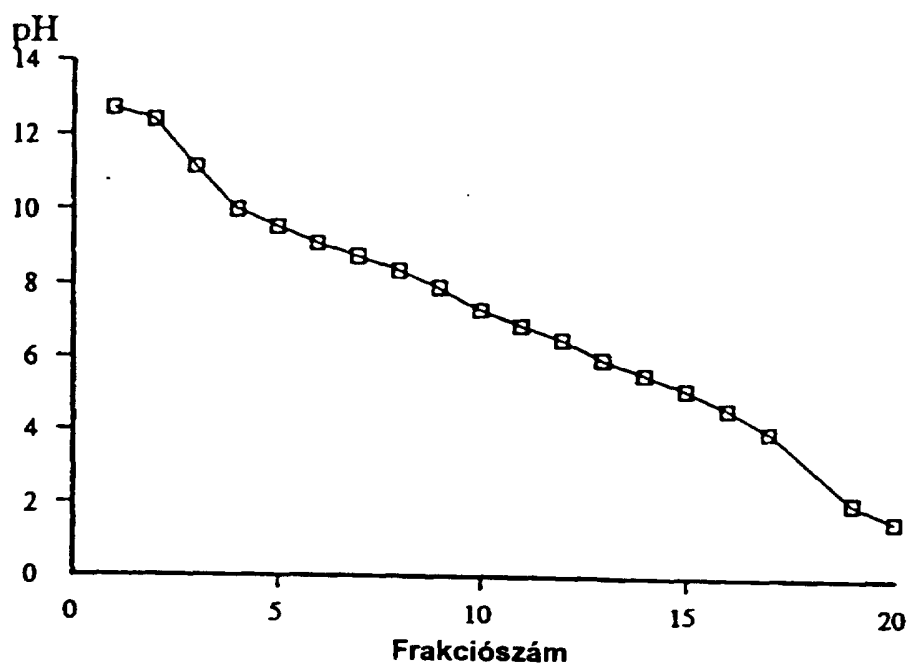
14a. ábra



14b. ábra

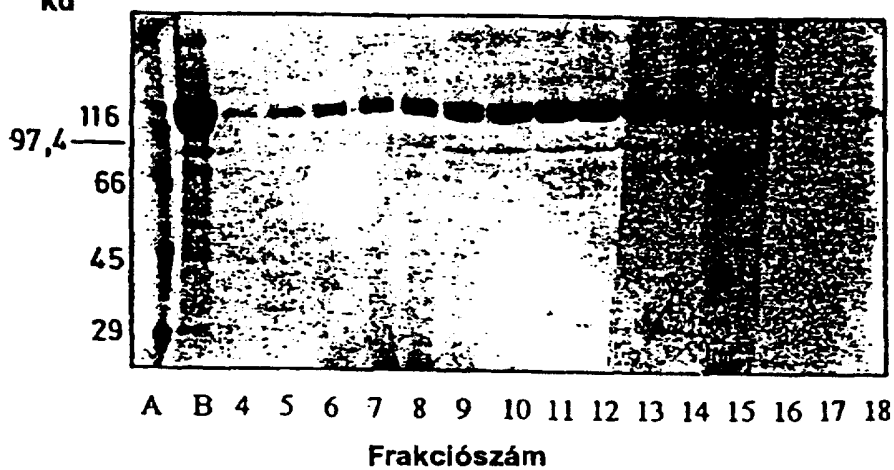


14c. ábra



15a. ábra

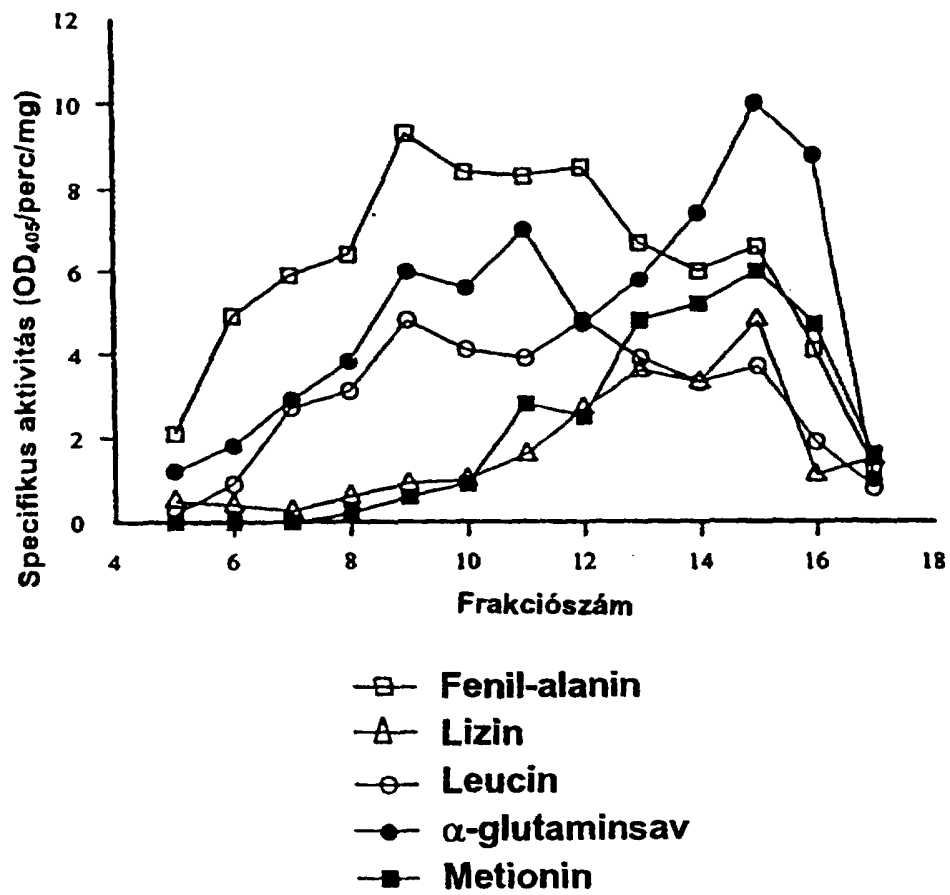
Molekulatömeg,
kd



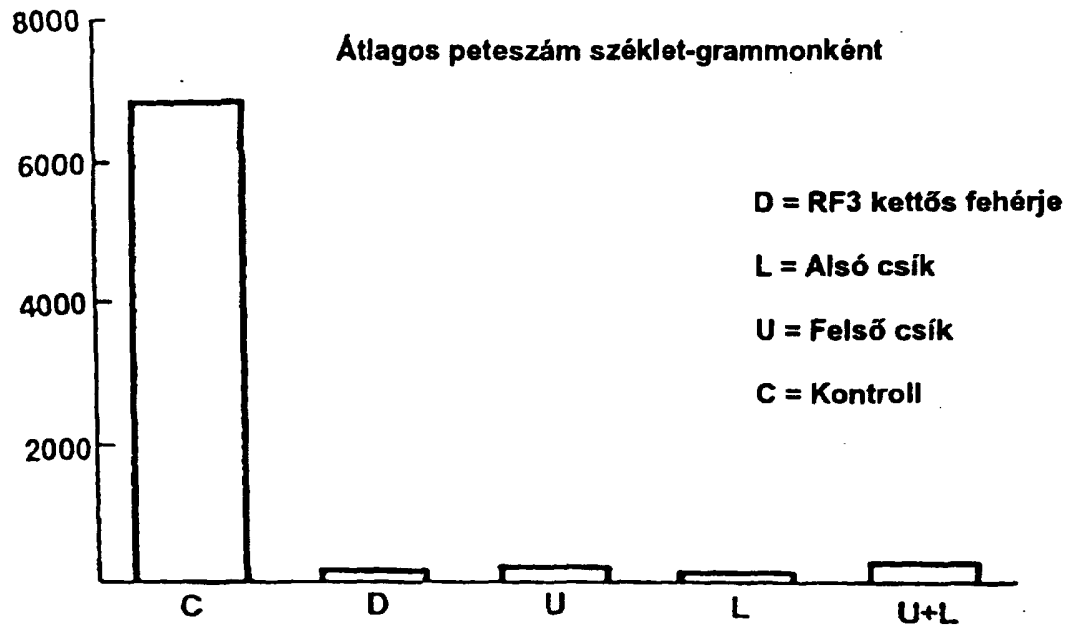
A = Molekulatömeg-
-markerek

B = ConA-H11OD
kiindulási anyag

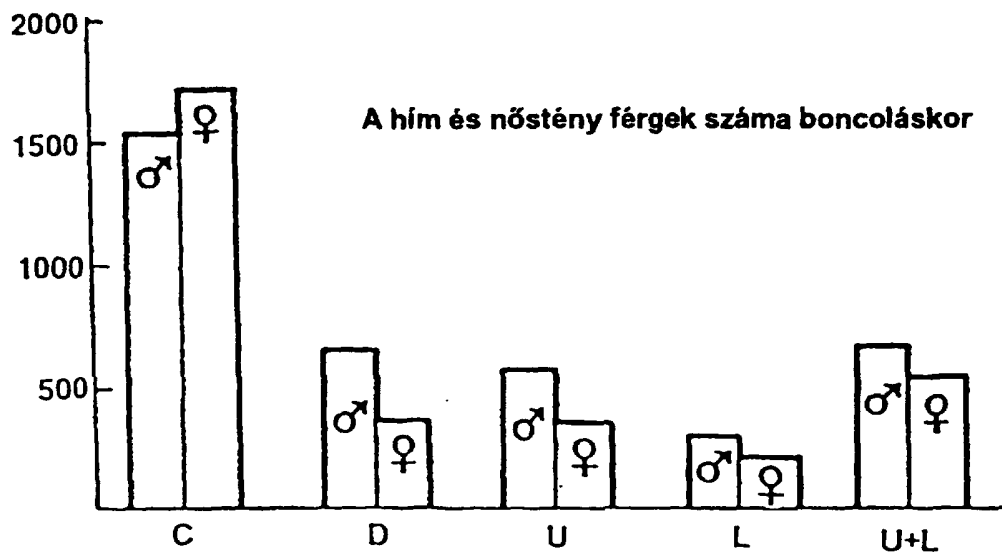
15b. ábra



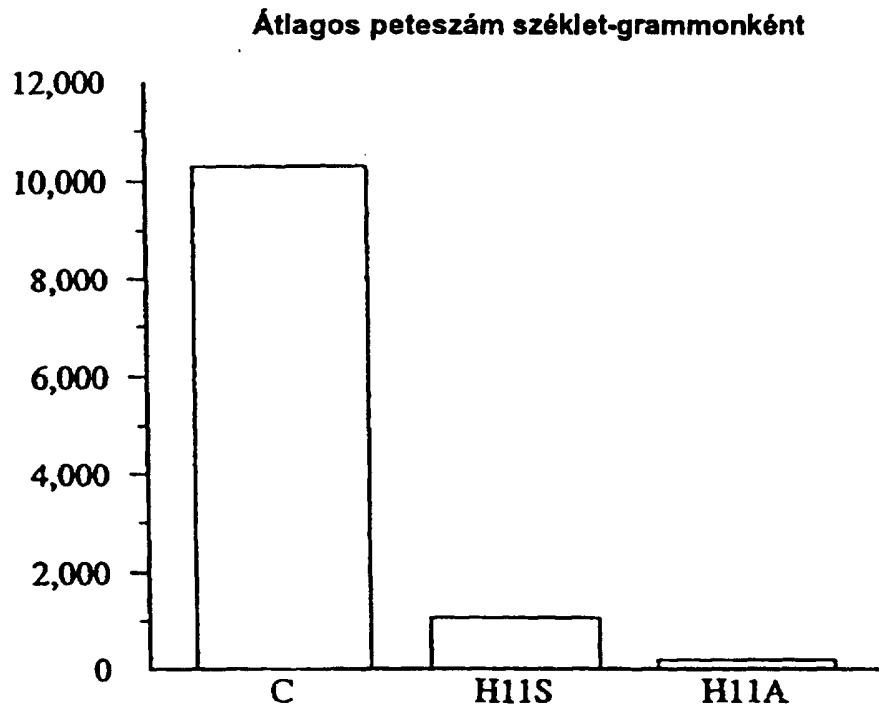
15c. ábra



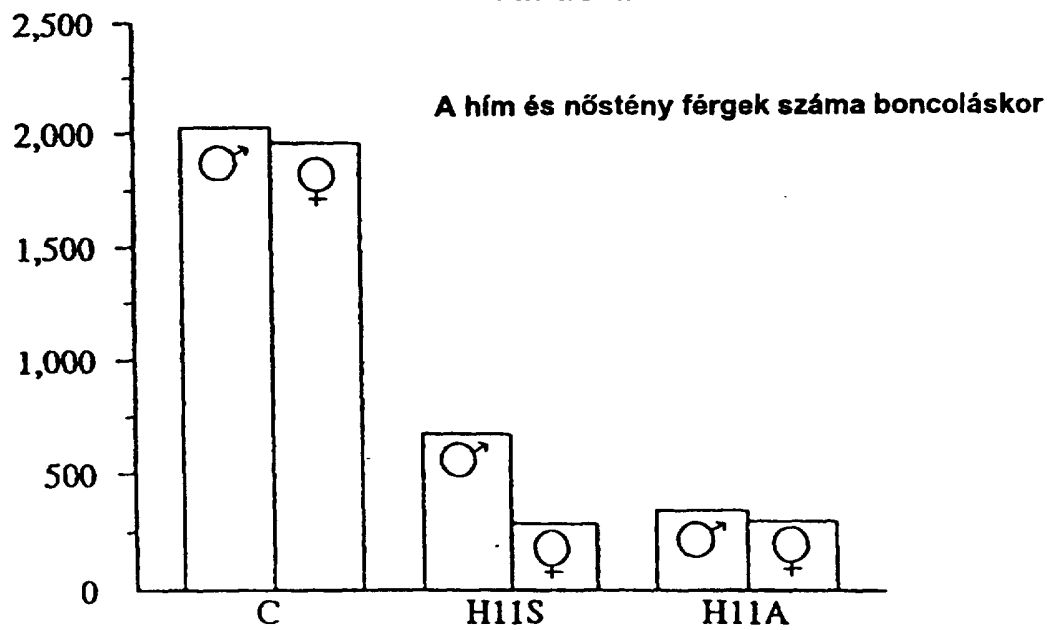
16a. ábra



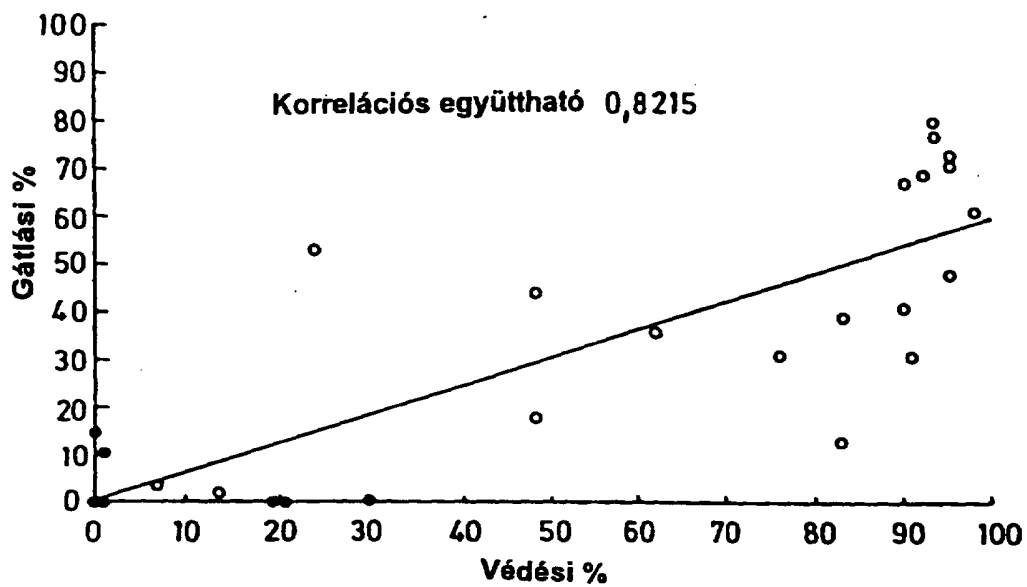
16b. ábra



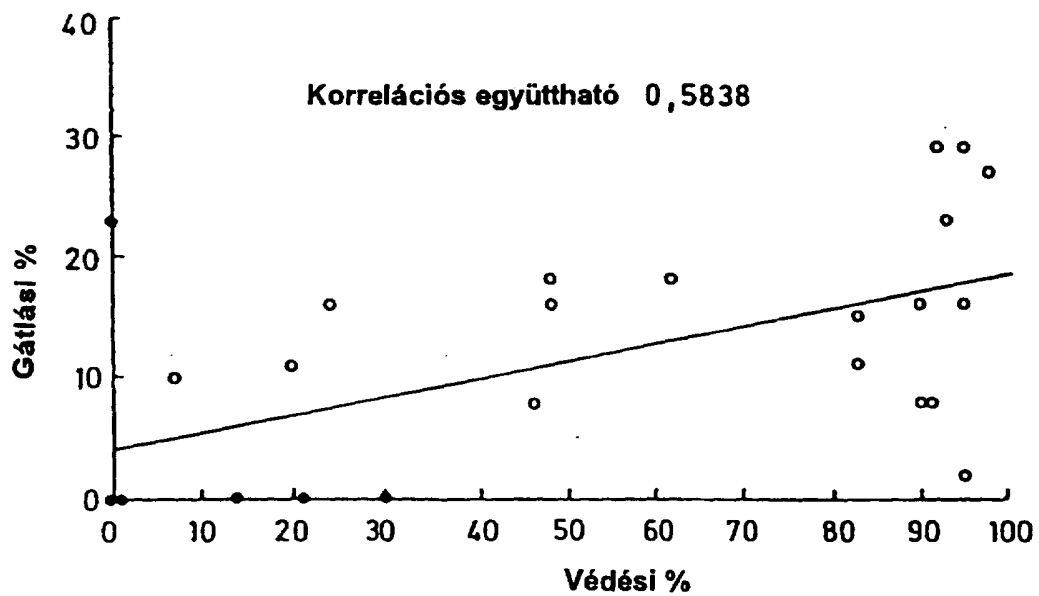
17a. ábra



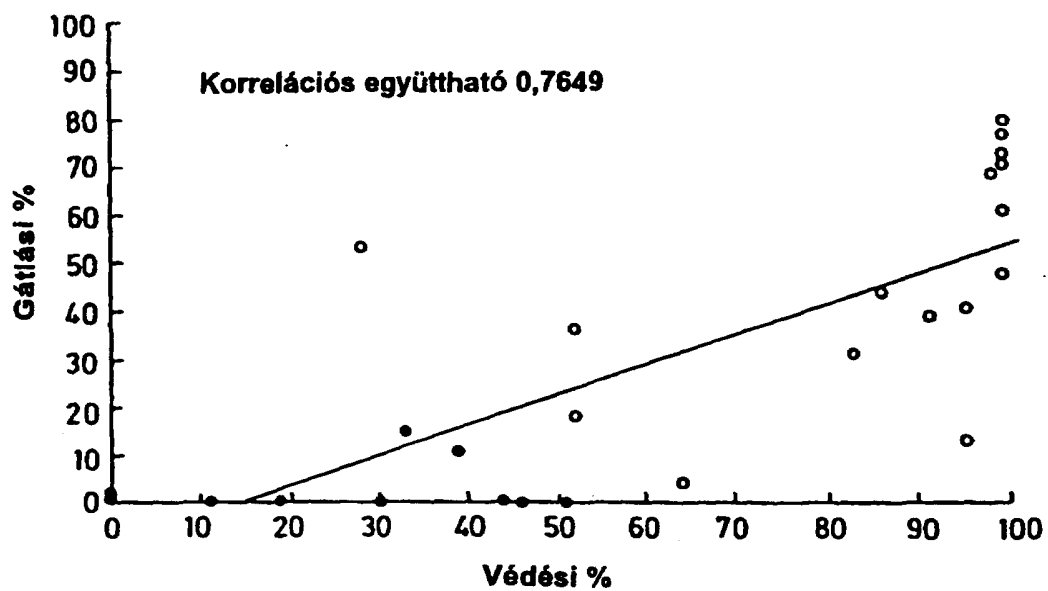
17b. ábra



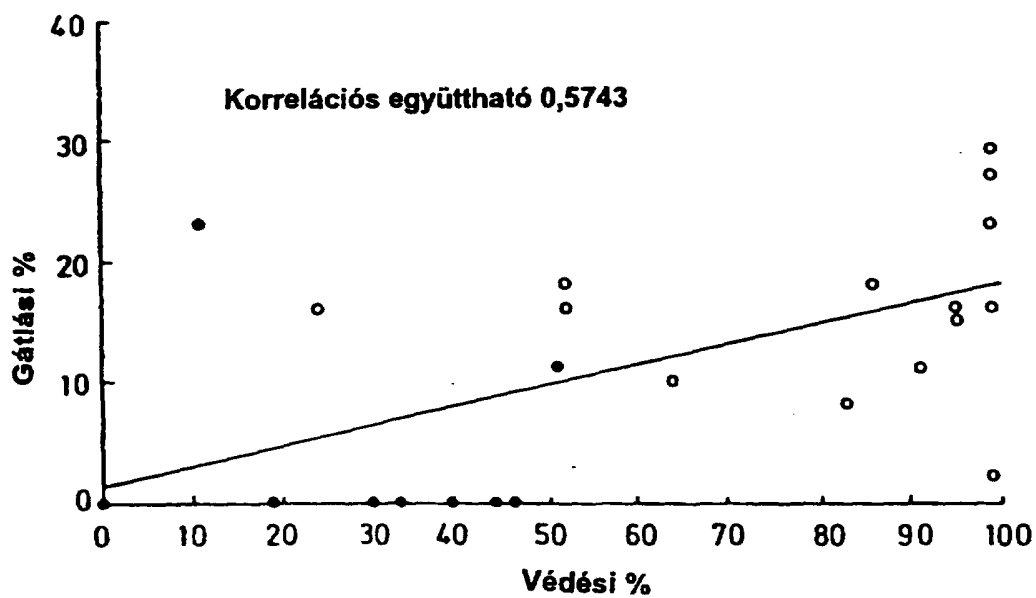
18a.i. ábra



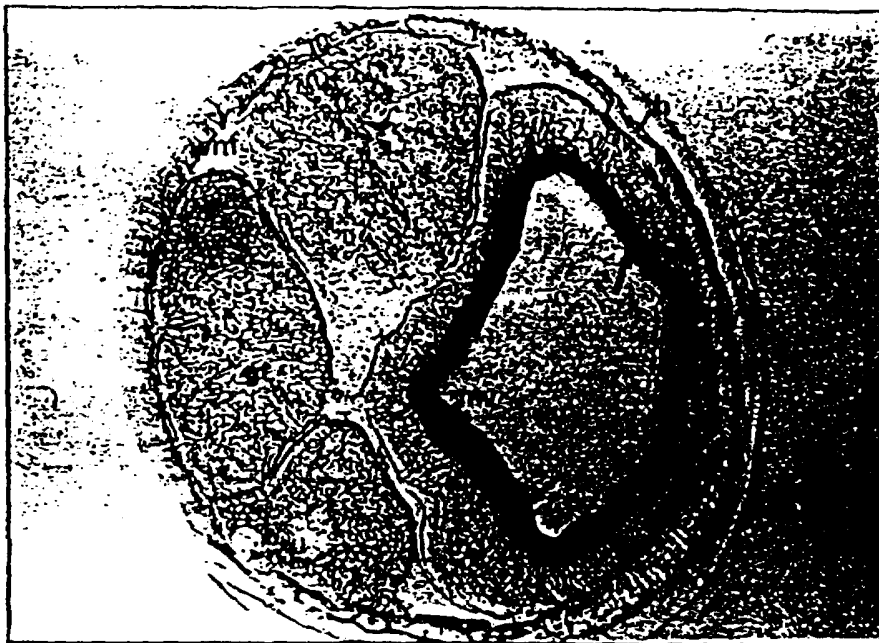
18a.ii. ábra



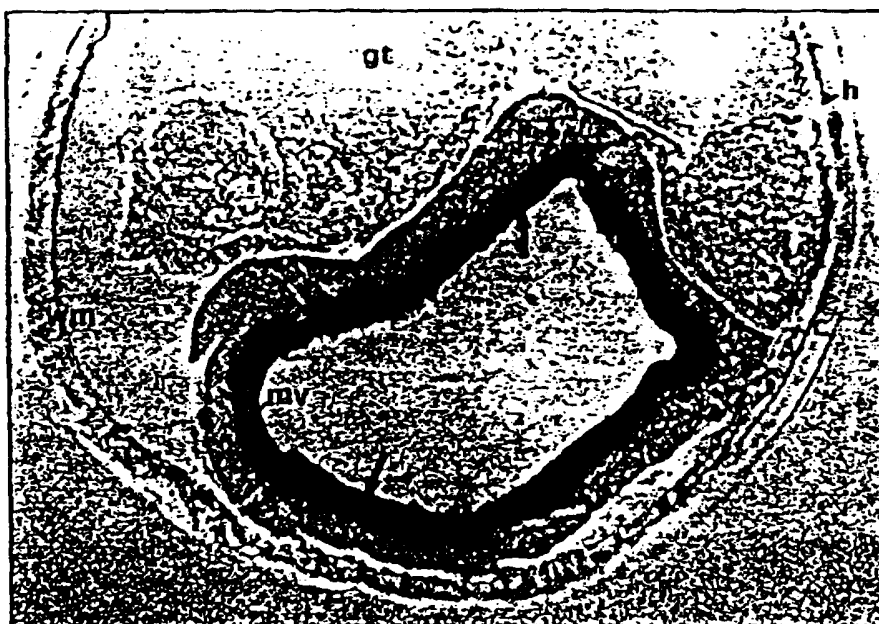
18b.i. ábra



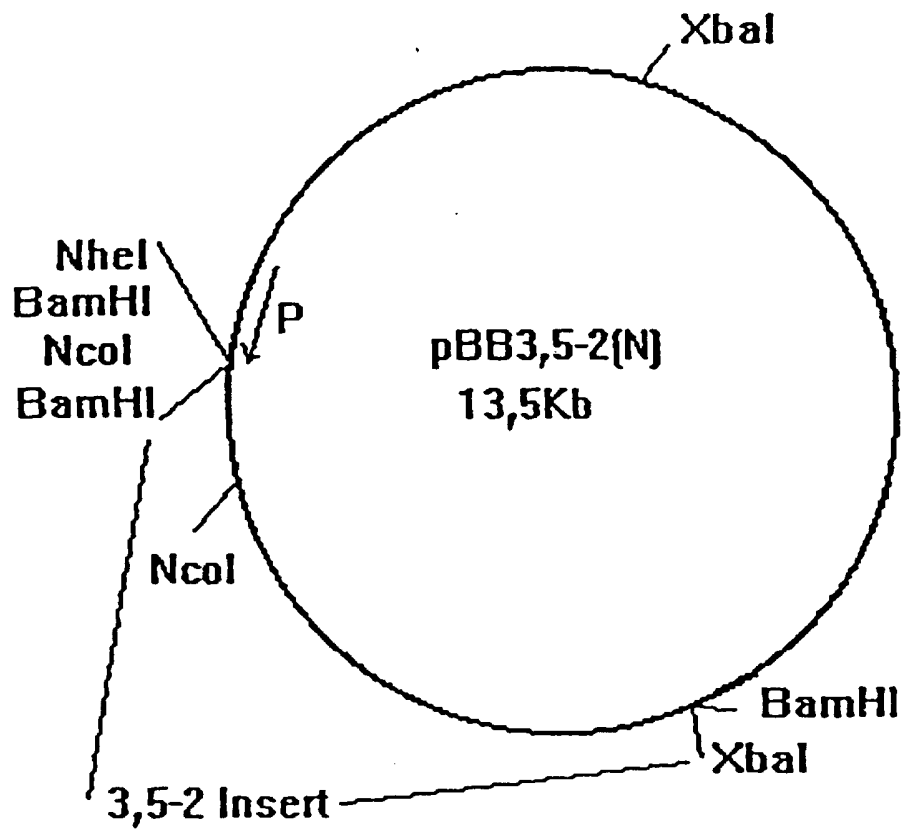
18b.ii. ábra



19a. ábra

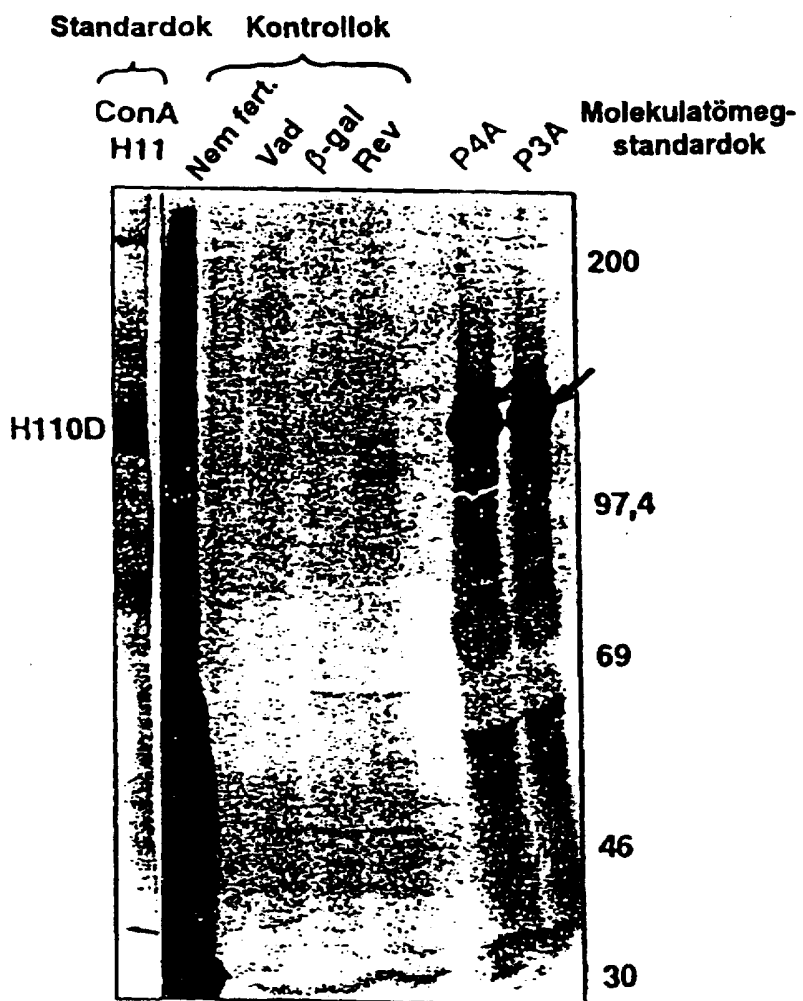


19b. ábra



P = poli hedrin promoter

20. ábra



21. ábra