



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**216 017 B**

- (21) A bejelentés ügyszám: 388/89  
(22) A bejelentés napja: 1988. 11. 18.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
07/161,072 1988. 02. 26. US  
07/263,584 1988. 10. 26. US  
07/191,263 1988. 05. 06. US  
07/139,886 1987. 12. 30. US  
07/122,714 1987. 11. 18. US  
07/271,450 1988. 11. 14. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 88/04125  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 89/04669  
(40) A közzététel napja: 1990. 09. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1999. 04. 28.

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**C 12 N 15/51**  
A 61 K 39/29  
G 01 N 33/53  
C 12 Q 1/70

(72) Feltalálók:

Choo, Qui-Lim, El Cerrito, Kalifornia (US)  
Houghton, Michael, Danville, Kalifornia (US)  
Kuo, George, San Francisco, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

Chiron Corp., Emeryville, Kalifornia (US)

(74) Képvisező:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi  
Iroda, Budapest

(54) **Eljárás HCV-1 polipeptidek, HCV-1 polinukleotidok, rekombináns vektorok és gazdasejtek, valamint immunesszé kit, hepatitis C vírusfertőzés elleni vakcinák, a fertőzés kimutatására szolgáló diagnosztikumok előállítására, és immunvizsgálati és vírustenyésztési eljárás**

### KIVONAT

A találmány egyik tárgyát hepatitis C-1 vírusból (HCV-1) származó cDNS-szekvenciacsald előállítására irányuló eljárás képezi. Ezek a szekvenciák olyan antigéneket kódolnak, amelyek immunológiailag reagálnak a C hepatitisben szenvedő egyénekben jelen lévő antitestekkel.

A HCV-1 cDNS-szekvenciák alkalmasak olyan HCV-1 polinukleotid vizsgálóminták tervezésére és olyan HCV-1 polipeptidek szintézisére, amelyek im-

munesszében alkalmazhatók. Ezek az eljárások ugyan- csak a találmány tárgyát képezik. Ezenkívül ezek a cDNS-szekvenciák alkalmasak olyan immunogén poli- peptidek találmány szerinti szintéziséhez, amelyek HCV-1 fertőzések megelőző és/vagy terápiás kezelésé- hez vakcinaként alkalmazhatók.

A találmány szerint előállított reagensek lehetővé teszik HCV-1 ágensek vagy ágenseknek a szaporítá- sát szövettenyésztő rendszerekben.

A találmány egyik tárgyát hepatitis C-1 vírusból (HCV-1) származó cDNS-szekvenciacsald előállítási irányuló eljárás képezi. Ezek a szekvenciák olyan antigéneket kódolnak, amelyek immunológiailag reagálnak a C hepatitisben szenvedő egyénekben jelen lévő antitestekkel.

A HCV-1 cDNS-szekvenciák alkalmasak olyan HCV-1 polinukleotid vizsgálóminták tervezésére és olyan HCV-1 polipeptidek szintézisére, amelyek immunesszében alkalmazhatók. Ezek az eljárások ugyancsak a találmány tárgyát képezik. Ezenkívül ezek a cDNS-szekvenciák alkalmasak olyan immunogén polipeptidek találmány szerinti szintéziséhez, amelyek HCV-1 fertőzések megelőző és/vagy terápiás kezeléséhez vakcinaként alkalmazhatók.

A találmány szerint előállított reagensek lehetővé teszik HCV-1 ágensek szaporítását szövettényésztő rendszerekben.

A találmány olyan anyagokra és eljárásokra vonatkozik, amelyek a nem A, nem B hepatitisvírus (NANBV) elterjedésének meghatározására és kezelésére alkalmasak. Pontosabban, a találmány diagnosztikus DNS-fragmentumokra, diagnosztikus fehérjékre, diagnosztikus antitestekre, valamint védőantigénre és a NANB-hepatitis etiológiai kialakítója, vagyis a hepatitis C vírus elleni antitestekre vonatkozik.

Az alábbiakban ismertetjük azokat az irodalmi helyeket, amelyekre hivatkozni fogunk.

Barr és munkatársai: *Biotechniques*, 4, 428 (1986);  
Botstein: *Gene*, 8, 17 (1979);

Brinton M. A.: a „THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE” című kiadványban (sorozatszerkesztők: Fraenkel-Conrat és Wagner, kötet szerkesztők: Schlesinger és Schlesinger, kiadó: Plenum Press), 327–374. oldal (1986);

Broach: A „Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*” című kiadványban, 1. kötet, 445. oldal; Cold Spring Harbor Press (1981);

Broach és munkatársai: *Meth. Enz.*, 101, 307 (1983);

Chang és munkatársai: *Nature*, 198, 105 (1977);

Chirgwin és munkatársai: *Biochemistry*, 18, 5294 (1979);

Chomczynski és Sacchi: *Analytical Biochemistry*, 162, 156 (1987);

Clewell és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 62, 1159 (1969);

Clewell: *J. Bacteriol.*, 110, 667 (1972);

Cohen (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 69, 2110 (1972);

Cousens és munkatársai: *Gene*, 61, 265 (1987);

De Boer és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 292, 128 (1983);

Dreesman és munkatársai: *J. Infect. Disease*, 151, 761 (1985);

Feinstone S. M. és Hoofnagle J. H.: *New Engl. J. Med.*, 311, 185 (1984);

Fields és Knipe: *FUNDAMENTAL VIROLOGY* (kiadó: Raven Press, New York) (1986);

Fiers és munkatársai: *Nature*, 273, 113 (1978);

Gerety R. J. és munkatársai: a *VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE* című kiadványban (szerkesztők: Vyas B. N., Dienstag J. L. és Hoofnagle J. M., kiadó: Grune and Stratton Inc. 23–47. oldal (1984);

Goeddel és munkatársai: *Nucleic Acids Res.*, 8, 4057 (1980);

Graham és Van der Eb: *Virology*, 52, 546 (1978);

5 Grunstein és Hogness: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 73, 3961 (1975);

Grych és munkatársai: *Nature*, 316, 74 (1985);

Gubler és Hoffman: *Gene*, 25, 263 (1983);

10 Hammerling és munkatársai: „MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS”;

15 Hess és munkatársai: *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7, 149 (1968);

Hinnen és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 1929 (1978);

20 Hitzeman és munkatársai: *J. Biol. Chem.*, 255, 2073 (1980);

Holland és munkatársai: *Biochemistry*, 17, 4900 (1978);

Holland: *J. Biol. Chem.*, 256, 1385 (1981);

25 Houghton és munkatársai: *Nucleic Acids Res.*, 9, 247 (1981);

Hunyh T. V. és munkatársai: a „DNA CLONING TECHNIQUES; A PRACTICAL APPROACH” című kiadványban (szerkesztő: Glover D., kiadó: IRL Press, Oxford, Egyesült Királyság), 49–78. oldal;

30 *Immun. Rev.*, 62, 185 (1982);

Iwarson: *Brisith Medical J.*, 295, 946 (1987);

Kennett és munkatársai: „MONOCLONAL ANTIBODIES” (1980);

Laemmli: *Nature*, 227, 680 (1970);

35 Lee és munkatársai: *Science*, 239, 1288 (1988);

Maniatis T. és munkatársai: „MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL” (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York) (1982);

40 Mayer és Walker szerkesztésében: „IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY” (Academic Press, London) (1987);

Maxam és munkatársai: *Methods in Enzymology*, 65, 499 (1980);

45 MacNamara és munkatársai: *Science*, 226, 1325 (1984);

Messing és munkatársai: *Nucleic Acids Res.*, 9, 309 (1981);

Messing: *Methods in Enzymology*, 101, 20–37 (1983);

50 *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press);

Michelle és munkatársai: *Int. Symposium on Viral Hepatitis*;

55 Monath: a „THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVOVIRIDAE” című kiadványban (sorozatszerkesztők: Fraenkel-Conrat és Wagner, kötet szerkesztők: Schlesinger és Schlesinger, kiadó: Plenum Press), 375-440. oldal (1986);

Nagahuma és munkatársai: *Anal. Biochem.*, 141, 74 (1984);

60 Neurath és munkatársai: *Science*, 224, 392 (1984);

Nisonoff és munkatársai: *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 21, 397–406 (1981);

Overby L. R.: *Curr. Hepatol.*, 5, 49 (1985);

Overby L. R.: *Curr. Hepatol.*, 6, 65 (1986);

Overby L. R.: *Curr. Hepatol.*, 7, 35 (1987);

Peleg: *Nature*, 221, 193 (1969);

Pfefferkorn és Shapiro: A „COMPREHENSIVE VIROLOGY” című sorozat 2. kötetében (szerkesztők: Fraenkel-Conrat és Wagner, kiadó: Plenum, New York), 171–230. oldal (1974);

Prince A. M.: *Annu. Rev. Microbiol.*, 37, 217 (1983);

Rice és munkatársai: a „THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVOVIRIDAE” című kiadványban (sorozatszerkesztők: Fraenkel-Conrat és Wagner, kötet szerkesztők: Schlesinger és Schlesinger, kiadó: Plenum Press), 279–328. oldal (1986);

Roehrig: a „THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVOVIRIDAE” című kiadványban (sorozatszerkesztők: Fraenkel-Conrat és Wagner, kötet szerkesztők: Schlesinger és Schlesinger, kiadó: Plenum Press) (1986);

Sadler és munkatársai: *Gene*, 8, 279 (1980);

Saiki és munkatársai: *Nature*, 324, 163 (1986);

Sanger és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 5463 (1977);

Schlesinger és munkatársai: *J. Virol.*, 60, 1153 (1986);

Schreier M. és munkatársai: „HYBRIDOMA TECHNIQUES” (1980);

Scopes: „PROTEIN PURIFICATION, PRINCIPLES AND PRACTICE”, II. kiadás (Springer Verlag, New York) (1984);

Shimatake és munkatársai: *Nature*, 292, 128 (1981);

Steimer és munkatársai: *J. Virol.*, 58, 9 (1986);

Stollar: a „TOGAVIRUSES” című kiadványban (szerkesztő: Schlesinger R. W., kiadó: Academic Press, New York), 584–622. oldal (1980);

Taylor és munkatársai: *Biochem. Biophys. Acta*, 442, 324 (1976);

Towbin és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, 4350 (1979);

Tsu és Herzenberg: a „SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY” című kiadványban (kiadó: Freeman W. H. és társa), 373–390. oldal (1980);

Vytdehaag és munkatársai: *J. Immunol.*, 134, 1225 (1985);

Valenzuela P. és munkatársai: *J. Nature*, 298, 344 (1982);

Valenzuela P. és munkatársai: a „HEPATITIS B” című kiadványban (szerkesztők: Millman J. és munkatársai, kiadó: Plenum Press), 225–236. oldal (1984);

Warner: *DNA*, 3, 401 (1984);

Wu és Grossman: *Methods in Enzymology*, 154. kötet, „RECOMBINANT DNA”, „E” rész (1987);

Wu: *Methods in Enzymology*, 155. kötet, „RECOMBINANT DNA”, „F” rész (1987);

Zoller: *Nucleic Acids Res.*, 10, 6487 (1982).

*Idézett szabadalmi leírások:*

4,341,761;

4,399,121;

4,427,783;

4,444,887;

4,466,917;

4,472,500;

5 4,491,632;

4,493,890

lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások.

A C-1 hepatitis átvihető betegség vagy betegségek csoportja, amelyről úgy vélik, hogy vírusok által indukált betegségek, és amelyek megkülönböztethetők a vírusokkal kapcsolatos májbetegségek más formáitól, ide értve az ismert hepatitisvírusok, azaz a hepatitis A vírus (HAV), hepatitis B vírus (HBV) és delta-hepatitisvírus által okozott betegségeket, valamint a citomegalovírus (CMV) vagy Epstein-Barr-vírus (EBV) által indukált hepatitiszt. A HCV-1-t először transzfúziót kapott egyénekben azonosították. Az átvitel emberből csimpánzba és a sorozatos átvitel csimpánzokban bizonyítékokat szolgáltatott arra, hogy a HCV-1 valamilyen átvihető fertőző ágensnek vagy ágenseknek tulajdonítható. A HCV-1-ért felelős átvihető ágens azonban eddig még nem azonosították, és a sok ágens, amely ezt a betegséget okozhatja, ismeretlen.

Járványtani megfigyelések azt sugallják, hogy a HCV-1-nek három típusa van: a víz eredetű járványos típus, a vérrel vagy tüvel társult típus, és a szórványosan előforduló (közösségben szerzett) típus. Az ágensek sokasága azonban, amelyek a HCV-1-t okozhatják, még ismeretlen.

A klinikai diagnózist és azonosítást elsődlegesen más vírusmarkerek kizárásával hajtják végre. Az alkalmazott eljárások között, amelyek a vélt antigének és antitestek kimutatására szolgálnak, találhatjuk az agargél-diffúziót, az ellen-immunoelektroforézist, immunfluoreszcens mikroszkópiát, immunelektron-mikroszkópiát, radioimmunsészét, és az enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálatot. Ezeknek a vizsgálatoknak egyike sem bizonyult azonban kielégítően érzékenynek, fajlagosnak és reprodukálhatónak, hogy diagnosztikus vizsgálatként alkalmazhassuk a HCV-1-hez.

Mindeddig tehát sem teljes tisztázás, sem megegyezés nincs az ágensekkel kapcsolatos antigén-antitest rendszerek azonosítását vagy fajlagosságát illetően. Ez, legalábbis részben, a HBV-vel való előzetes vagy együttes fertőzésnek tulajdonítható az egyénekben, valamint a HBV-vel társult oldható és szilárd antigének ismert komplex voltának, továbbá a HBV DNS integrálásának a májsejtek genomjába. Ezenkívül az is lehetséges, hogy a HCV-1-t egynél több fertőző ágens okozza, és az is lehetséges, hogy rosszul diagnosztizálják. Nem világos az sem, mit mutatnak ki a szerológiai vizsgálatok a HCV-1-ben szenvedő betegek szérumban. Arra a következtetésre jutottak, hogy az agargél-diffúziós és ellen-immunoelektroforézises vizsgálatok kimutatnak olyan autoimmun válaszokat vagy nem fajlagos fehérje-kölcsönhatásokat is, amelyek néha fellépnek szérumminták között, és arra, hogy ezek nem képviselnek fajlagos NANBH antigén-antitest reakciókat.

60 Az immun-fluoreszcenciás, enzimmel kapcsolt immu-

szorbens és radioimmun vizsgálatok, úgy tűnik, kimutatják a reumatoidfaktor-szerű anyagok alacsony szintjét is, amely anyagok gyakran jelen vannak a HCV-1-ben szenvedő betegek szérumban, valamint más máj- és nemmáj-betegségekben szenvedő betegek szérumban. A kimutatott reaktivitások közül néhány képviselhet gazdaszervezet által meghatározott citoplazmás antigének elleni antitesteket is.

Számos jelölt van, amely HCV-1 okozójaként szóba jöhet. Lásd például Prince (1983), Feinstone és Hoofnagle (1984) és Overby (1985, 1986, 1987) összefoglaló közleményeit, és Iwarson (1987) közleményét. Nincs azonban bizonyíték arra, hogy ezeknek a jelölteknek bármelyike képviselné a HCV-1 etiológiai ágensét.

Jelentős az igény arra, hogy legyen érzékeny, fajlagos módszer HCV-1 hordozók és fertőzött vér- vagy vércsizmények átvizsgálására és azonosítására. A transzfúzió utáni hepatitis (PTH) a transzfúziót kapott betegeknek mintegy 10%-ánál fordul elő, és ezeknek az eseteknek 90%-ában is a HCV-1 játssza a szerepet. Ebben a betegségben a fő gond a gyakori továbbfejlődés krónikus májkárosodássá (25–55%).

A betegekről való gondoskodás, valamint az átvitel megelőzése (vérrel és vértermékekkel, vagy szorosabb személyi kontaktussal) megfelelő diagnosztikus és prognosztikus eszközöket igényel HCV-1 nukleinsavak, antigének és antitestek kimutatására. Ezenkívül igény van hatásos vakcinákra és immunterápiás szerekre a betegség megelőzésére és/vagy kezelésére.

Az alábbiakban részletesebben leírjuk a találmányt.

A jelen találmány a hepatitis C-1 vírusnak (HCV-1) az izolálásával és jellemzésével foglalkozik. Pontosabban a találmány HCV-genomrészek cDNS-replikáinak családját szolgáltatja. Ezeket a cDNS-replikákat olyan technikákkal izoláljuk, amelyek magukban foglalják betegekből kapott szérummal fertőzött szövetben lévő, szilárd ágensből alkotott cDNS-könyvtárból való kifejezési termékek átvizsgálásának új lépését, hogy kimutassuk az eddig nem izolált és nem jellemzett víruságens genomjából származó, újonnan szintetizált antigéneket, valamint olyan termékeket termelő klónok kiválasztásának új lépését, amely termék csak a fertőzött egyénekből való szérumokkal reagál immunológiailag a nem fertőzött egyénekhez viszonyítva.

A HCV-1 genomja természetével kapcsolatos tanulmányok, amelyek a HCV-1 cDNS-ből származó vizsgálómintákat, valamint a HCV-1 cDNS-en belül lévő szekvenciainformációt alkalmazzák, azt sugallják, hogy a HCV-1 Flavivirus vagy Flaviszerű vírus.

A HCV-1-ből származó cDNS-szekvenciák részei alkalmasak vizsgálómintaként, hogy diagnosztizáljuk a vírus jelenlétét mintákban, és izoláljuk a vírus természetben előforduló variánsait. Ezek a cDNS-ek a HCV-1 genomon vagy genomokon belül kódolt HCV-1 antigének, polipeptidok szekvenciáját is rendelkezésre bocsátják, és lehetővé teszik olyan polipeptidok termelését, amelyek standardként vagy reagensként alkalmazhatók diagnosztikus vizsgálatokban, és/vagy alkalmazhatók vakcinák komponenseként. Az

ezen a polipeptidszekvencián belül található HCV-1 epitópok ellen irányuló mind monoklonális, mind poliklonális antitestek szintén hasznosak diagnosztikus vizsgálóanyagként, terápiás ágensekként, vírusellenes szerek átvizsgálására, és olyan ágensek izolálására, amelyekből ezek a cDNS-ek származnak. Ezenkívül az ezekből a cDNS-ekből származó vizsgálóminták alkalmazásával lehetséges a HCV-1 genom más részeit izolálni és szekvenciaelemzésnek alávetni, így további vizsgálómintákat és polipeptideket létrehozni, amelyek alkalmazhatók a diagnózisban, és/vagy mind megelőző, mind terápiás kezelésében.

Következésképpen a polinukleotidok előállításával kapcsolatban a találmány tárgya az alábbi:

10 15 20 25

15 tisztított HCV-1 polinukleotid; rekombináns HCV-1 polinukleotid; valamely HCV-1 genomból vagy HCV-1 cDNS-ből származó szekvenciát tartalmazó rekombináns polinukleotid; a HCV-1 valamely epitópját kódoló rekombináns polinukleotid; a fenti rekombináns polinukleotid bármelyikét tartalmazó rekombináns vektor; ezeknek a vektoroknak bármelyikével transzformált gazdasejt előállítására irányuló eljárás.

A találmány további tárgyai: eljárás a rekombináns kifejezőrendszerrel transzformált sejt által termelt polipeptid előállítására.

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás rekombináns HCV-1 polipeptid előállítására.

30 A jelen találmány tárgyát képezi továbbá eljárás valamely HCV-1 antigén epitóp ellen irányuló antitestek előállítására.

A jelen találmány még további tárgya valamely polinukleotidvizsgáló minta HCV-1-hez.

A jelen találmány olyan tárgyai, amelyek lehetővé teszik vizsgálókészletek összeállítását, az alábbiak: analízóminták HCV-1-ből származó polinukleotidok jelenlétének kimutatására; ezek 8 vagy több, a HCV-1-ből származó nukleotidszekvenciából állnak megfelelő tartályban; analízóminták valamely HCV-1 antigén jelenlétének kimutatására, ezek valamely, a kimutatandó HCV-1 antigén ellen irányuló antitestet tartalmaznak megfelelő tartályban; analízóminták valamely HCV-1 antigén ellen irányuló antitestek jelenlétének kimutatására, ezek a HCV-1 antigénben jelen lévő valamely HCV-1 epitópot tartalmazó polipeptidból állnak, megfelelő tartályban.

A jelen találmány további tárgyai: eljárás valamely HCV-1 epitópot tartalmazó polipeptid előállítására valamely szilárd szubsztrátumhoz kötve.

50 A jelen találmány még további tárgyai: eljárás valamely HCV-1 epitópot tartalmazó polipeptid előállítására, amely eljárás egy HCV-1 epitópot tartalmazó polipeptidet kódoló szekvenciát tartalmazó, valamely kifejezővektorral transzformált gazdasejtek inkubálásából áll, olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik az említett polipeptid kifejeződését.

55 60 A jelen találmány magában foglal immunesszéket is. Ezek egyike valamely HCV-antigén kimutatására irányul, és a mintának, amelyről feltételezhető, hogy HCV-1 antigént tartalmaz, inkubálásából áll olyan vizsgáló antitestmintával, amely a kimutatandó HCV-1 an-

tígen ellen irányul, az inkubálást olyan körülmények között végezve, mely lehetővé teszi egy antigén-antitest komplex képződését.

A jelen találmány tárgya HCV-1 fertőzés elleni vakcinák előállítására is, amelyek egy HCV-1 epitópot tartalmazó immunogén peptidből állnak.

A jelen találmány további tárgya HCV-vel fertőzött sejteken növekvő szövettenyészetek előállítása is.

A jelen találmány még további tárgya eljárás HCV-1 elleni antitestek előállítására.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat. A „HCV” jelölés a következőkben a HCV-1-re vonatkozik.

Az 1. ábra a HCV cDNS beiktatás kettős szálú nukleotidszekvenciáját mutatja be az 5-1-1. klónban, valamint az ebben kódolt polipeptid vélt aminosavszekvenciáját.

A 2. ábra az átfedő HCV cDNS-szekvenciák homológiáit mutatja be az 5-1-1., 81., 1-2. és 91. klónokban.

A 3. ábra a 81., 1-2. és 91. átfedőklónokból származó összetett szekvenciát mutatja be, valamint az ebben kódolt aminosavszekvenciát.

A 4. ábra a HCV cDNS-beiktatás kettős szálú nukleotidszekvenciáját mutatja be a 81. klónban, valamint az ebben kódolt polipeptid aminosavszekvenciáját.

Az 5. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 36. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 81. klón NANBV cDNS-ét, és a 36. klónon belül kódolt polipeptidszekvenciát.

A 6. ábra a HCV cDNS-ek kombinált ORF-jét mutatja be a 36. és 81. klónban, valamint az ebben kódolt polipeptidet.

A 7. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 32. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 81. klónt, és az ebben kódolt polipeptidet.

A 8. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 35. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 36. klónt, és az ebben kódolt polipeptidet.

A 9. ábra HCV cDNS-ek kombinált ORF-jét mutatja be a 35., 36., 81. és 32. klónokban, és az ebben kódolt polipeptidet.

A 10. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 37b. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 35. klónt, és az ebben kódolt polipeptidet.

A 11. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 33b. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 32. klónt, és az ebben kódolt polipeptidet.

A 12. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 40b. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 37b. klónt, és az ebben kódolt polipeptidet.

A 13. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 25c. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 33b. klónt, és az ebben kódolt polipeptidet.

A 14. ábra annak az ORF-nek a nukleotidszekvenciáját és a benne lévő polipeptidszekvenciát mutatja be, amely ORF kiterjed a HCV cDNS-ekig a 40b., 37b., 35., 36., 81., 32., 33b. és 25c. klónokban.

A 15. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 33c. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 40b. és 33c. klónokat, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 16. ábra a 8h. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciát mutatja be, a szegmenst, amely átfedi a 33c. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

5 A 17. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 7e. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 8h. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 18. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 14c. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 25c. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

10 A 19. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 8f. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 14c. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 20. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 33f. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 8f. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

15 A 21. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 33g. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 33.f klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 22. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 7f. klónban, a szegmenst, amely átfedi a szekvenciát a 7e. klónban, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 23. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 11b. klónban, a szegmenst, amely átfedi a szekvenciát a 7f. klónban, és az ebben kódolt aminosavakat.

25 A 24. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 11i. klónban, a szegmenst, amely átfedi a szekvenciát a 11b. klónban, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 25. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 39c. klónban, a szegmenst, amely átfedi a szekvenciát a 33g. klónban, és az ebben kódolt aminosavszekvenciát.

30 A 26. ábra egy összetett HCV cDNS-szekvenciát mutat be, amely a 14i., 11b., 7f., 7e., 8h., 33c., 40b., 37b., 35., 36., 81., 32., 33b., 25c., 14c., 8f., 33f. és 33g. klónokban lévő közös cDNS-ekből származik, továbbá bemutatja a származék szekvenciában lévő kiterjesztett ORF-ben kódolt polipeptid aminosavszekvenciáját.

A 27. ábra a HCV cDNS-t mutatja be a 12f. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 14i. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 28. ábra a HCV cDNS-t mutatja be a 35f. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 39c. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

45 A 29. ábra a HCV cDNS-szekvenciát mutatja be a 19g. klónban, a szegmenst, amely átfedi a 35f. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 30. ábra a 26g. klón szekvenciáját mutatja be, a szegmenst, amely átfedi a 19g. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

50 A 31. ábra a 15e. klón szekvenciáját mutatja be, azt a szegmenst, amely átfedi a 26g. klónt, és az ebben kódolt aminosavakat.

A 32. ábra egy összetett cDNS-t mutat be, amely a 12.f–15e. klónok egyesítéséből származik 5'→3' irányban; ez bemutatja a folyamatos ORF-ben kódolt aminosavakat is.

55 A 33. ábra az SOD–NANB<sub>5,1-1</sub> fúziós fehérje BB–NANB-vel, HAV-val és HBV-vel fertőzött csimpánzokból származó csimpánzsérummal végzett Western-foltelemzésének fényképe.

A 34. ábra az SOD–NAB<sub>5,1-1</sub> fúziós fehérje NANBV-vel, HAV-val és HBV-vel fertőzött emberekből és kontrollemberekből származó szérumokkal végzett Western-foltelemzésének fényképe.

A 35. ábra a pAB24 vektor jelentősebb vonásait bemutató térkép.

A 36. ábra a C100–3 fúziós polipeptid karboxiterminális feltételezett aminosavszekvenciáját mutatja be, valamint az ezt kódoló nukleotidszekvenciát.

A 37a. ábra Coomassie kézzel festett poliakrilamid gél fényképe, amely az élesztőben kifejezett C100–3-at azonosítja.

A 37b. ábra a C100–3-nak egy NANBV-vel fertőzött emberből származó szérummal végzett Western-foltelemzését mutatja.

A 38. ábra BB–NANBV-vel fertőzött csimpánz májából izolált RNS Northern-foltjának autoradiogramját mutatja be, ahol ezt a 81. klón BB–NANBV cDNS-sel vizsgáljuk.

A 39. ábra az RN-áz A-val vagy DN-áz I-gyel kezelt, és a 81. klón BB–NANBV cDNS-ével vizsgált NANBV-nukleinsav autoradiogramját mutatja be.

A 40. ábra fertőzött plazmából anti-NANB<sub>5,1-1</sub>-gyel befogott NANBV-részecskékből extrahált, és a 81. klónból való <sup>32</sup>P-jelzett NANBV cDNS-sel vizsgált nukleinsavak autoradiogramját mutatja be.

A 41. ábra NANBV-nukleinsavakból izolált, és a 81. klónban lévő NANBV cDNS-ből származó <sup>32</sup>P-jelzett plusz és mínusz szálú DNS-vizsgálómintákkal vizsgált szűrők autoradiogramját mutatja be.

A 42. ábra a homológiát mutatja be HCV cDNS-ben kódolt polipeptid és a Dengue flavivírusból származó NS-fehérje között.

A 43. ábra a HCV-fertőzés eloszlásának hisztogramja véletlenszerű mintákból, amint ezt ELISA-átvizsgálással határozzuk meg.

A 44. ábra HCV-fertőzés eloszlásának hisztogramja véletlenszerű mintákból, immunoglobulin-enzim konjugátum két konfigurációját alkalmazva ELISA-vizsgálatban.

A 45. ábra Flavivírusok NS1-ében lévő megőrzött szekvenciából származó primer keverék szekvenciáit mutatja be.

A 46. ábra a k9-1 klónban lévő HCV cDNS-szekvenciát mutatja be, a szegmenst, amely átfedi a 26. ábrán lévő cDNS-t, és bemutatja az ebben kódolt aminosavakat.

A 47. ábra annak a HCV cDNS-nek a szekvenciáját mutatja be, amely a k9-1.–15e. klónok egyesítésével keletkezik 5'→3' irányban; ez bemutatja a folyamatos ORF-ben kódolt aminosavakat is.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány kivitelezésének módozatait.

#### Meghatározások

A „hepatitis C vírus” kifejezést a szakterületen dolgozó szakemberek az NANBH (nem A–nem B hepatitis) eddig ismeretlen ágensének tartották fenn. Következésképpen ahogy itt használjuk, a „hepatitis C vírus” (HCV) olyan ágensre utal, amely az NANBH okozója, és amelyet korábban NANBV-nek és/vagy

BB–NANBV-nek neveztek. A HCV, NANBV és BB–NANBV kifejezéseket itt egymásra bármikor kicserélhetően alkalmazzuk. Ennek a terminológiának a kiterjesztéseként a HCV által okozott betegséget, amelyet korábban NANB-hepatitisnek (NANBH) neveztek, hepatitis C-nek nevezünk. Az NANBH és hepatitis C kifejezéseket egymásra bármikor kicserélhetően alkalmazzuk.

A „HCV” kifejezés, amint itt alkalmazzuk, olyan vírusfajt jelent, amely NANBH-t okoz, valamint jelenti ennek legyengített törzsét, vagy az ezekből származó tökéletlen interferáló részecskéket. Amint alább bemutatjuk, a HCV-genom RNS-ből áll. Ismeretes, hogy az RNS-tartalmú vírusok viszonylag magas arányban rendelkeznek spontán mutációval, vagyis az irodalom szerint  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  nagyságrendben nukleotidonként [Fields és Knipe (1986)]. Ennek következtében ezek összetett törzsek az alább leírt HCV-fajon belül. Az itt leírt kompozíciók és eljárások lehetővé teszik a különböző rokon törzsek szaporítását, azonosítását, kimutatását és izolálását. Ezen túl ezek lehetővé teszik diagnosztikumok és vakcinák előállítását különböző törzsekhez, és hasznosítást nyerhetnek farmakológiai alkalmazású vírusellenes ágensekhez szolgáló átvizsgáló módszerekben, amennyiben ezek gátolják a HCV replikációját.

Az itt nyújtott információ, bár a HCV egy törzsből származik, amelyet ezután CDC/HCV1-nek nevezünk, elegendő ahhoz, hogy egy vírustaxonómusnak lehetővé tegye más olyan törzsek azonosítását, amelyek ebbe a fajba esnek. Amint itt leírjuk, felfedeztük, hogy a HCV Flavivírus vagy Flaviszerű vírus. A Flavivírus-részecskének morfológiája és összetétele ismert, ezt Brinton (1986) közleménye tárgyalja. Általában a morfológiát tekintve a Flavivírusok egy központi nukleokapszidot tartalmaznak egy lipid-kettősréteggel körülvéve. A virionok gömb alakúak, és mintegy 40–50 nm átmérőjűek. Belsejük mintegy 25–30 nm átmérőjű. A virionburkolat külső felülete mentén nyúlványok vannak, amelyek mintegy 5–10 nm hosszúak, a végükön mintegy 2 nm átmérőjű gömbökkel.

A HCV olyan epitópot kódol, amely immunológiaiilag azonosítható a HCV-genomban kódolt epitóppal, amely genomból az itt leírt cDNS származik; az epitóp előnyösen egy itt leírt cDNS-ben kódolódik. Az epitóp egyedi HCV-re, amikor már ismert Flavivírusokkal hasonlítjuk össze. Az epitóp egyediségét HCV-vel való immunológiai reaktivitásával és más Flavivírus fajokkal való immunológiai reaktivitás hiányával határozhatjuk meg. Az immunológiai reaktivitás meghatározásához való módszerek a szakterületen ismertek, ilyenek például a radioimmunesszé, az ELISA-vizsgálat, a hemmagglutináció, és itt a vizsgálatokhoz alkalmas technikákra számos példát adunk majd.

A fentiekén kívül az alábbi paraméterek alkalmazhatók együtt vagy külön, hogy egy törzset HCV-nek azonosítsunk. Mivel a HCV-törzsek fejlődéstani szempontból rokonok, várható, hogy a genomok általános homológiája nukleotidszinten 40% vagy nagyobb, előnyösen 60% vagy nagyobb, még előnyösebben 80% vagy nagyobb; ezenkívül vannak legalább mintegy

13 nukleotidból álló megfelelő összefüggő szekvenciák. A megegyezést a vélt HCV-törzs genomszekvencia és a CDC/CH1 HCV cDNS-szekvencia között olyan technikákkal határozhatjuk meg, amelyek a szakterületen ismertek. Így például ezt meg lehet határozni a vélt HCV-szekvenciából való polinukleotidszekvencia információja és az itt leírt HCV cDNS-szekvencia vagy szekvenciák közvetlen összehasonlításával. Ezt például meg lehet határozni a polinukleotidok hibridizálásával is olyan körülmények között, amelyek stabil duplexek képződését teszik lehetővé homológ területek között (például olyan körülmények között, amelyeket S<sub>1</sub> emésztés előtt alkalmazhatunk), ezt követi az emésztés egyedi száakra fajlagos nukleázzal vagy nukleázokkal, ezt pedig az emésztett fragmentumok méretmeghatározása követi.

A HCV törzseinek fejlődéstani rokonsága miatt a vélt HCV-törzsek azonosíthatók homológiájukkal polipeptidszinten. A HCV-törzsek általában több, mint mintegy 40%-ban homológok, előnyösen több, mint mintegy 60%-ban homológok, és még előnyösebben több, mint 80%-ban homológok polipeptidszinten. A technikák az aminosavszekvencia-homológia meghatározására a szakterületen ismertek. Így például az aminosavszekvenciát meghatározhatjuk közvetlenül, és összehasonlíthatjuk az itt szolgáltatott aminosavszekvenciával. Meghatározhatjuk például a feltételezett HCV-genom anyagának nukleotidszekvenciáját is (általában valamely cDNS köztes termék révén); az ebben kódolt aminosavszekvenciát meghatározhatjuk, és a megfelelő területeket összehasonlíthatjuk.

Amint itt használjuk, egy megnevezett szekvenciából „származó” polinukleotidok, például a HCV cDNS-ek, különösen azok, amelyek az 1–32. ábrákon vannak leírva, vagy egy HCV-genomból „származó” polinukleotidok olyan polinukleotidszekvenciákra vonatkoznak, amelyek legalább mintegy 6 nukleotidból, előnyösen legalább mintegy 8 nukleotidból, még előnyösebben 10–12 nukleotidból, és még előnyösebben 15–20 nukleotidból állnak, amelyek megfelelnek a megnevezett nukleotidszekvenciának, vagyis homológok vagy komplementerek azzal. Annak a területnek a szekvenciája, amelyből a polinukleotid származik, előnyösen egy olyan szekvenciával homológ vagy komplementer, amely egyedi HCV-genomban. Ez a szekvencia akár egyedi HCV-genomban, akár nem, olyan technikákkal határozható meg, amelyek ismertek azok számára, akik a szakterületen jártasak. Így például a szekvenciát össze lehet hasonlítani adatbankokban, például a Genebankban lévő szekvenciákkal, hogy meghatározzuk, vajon ez jelen van-e nem fertőzött gazdaszervezetekben vagy más organizmusokban. A szekvenciát összehasonlíthatjuk más víruságensek ismert szekvenciáival is, beleértve azokat a vírusokat, amelyekről ismert, hogy hepatitiszt idéznek elő (például HAV, HBV és HDV) és a Flaviviridae más tagjaival. A származék szekvencia megegyezését vagy meg nem egyezését más szekvenciákkal hibridizálással is meghatározhatjuk, alkalmas szigorúságú körülmények között. A nukleinsavszekvenciák komplementer voltának meghatározására szolgáló hibri-

5 dizációs technikák a szakterületen ismertek, ezeket a későbbiekben tárgyaljuk [lásd még ezzel kapcsolatban Maniatis és munkatársai (1982) munkáját]. Ezenkívül hibridizálással képzett duplex polinukleotidok hibás illesztését is meghatározhatjuk ismert technikákkal, ide értve például valamely nukleázzal, például S1-gyel végzett emésztést, amely nukleáz fajlagosan emészt az egyszálú területeket duplex polinukleotidokban. Azok a területek, amelyekből tipikus DNS-szekvenciák „származhatnak”, lehetnek például olyan területek (de nemcsak ezekre korlátozódnak), amelyek speciális epitópokat, valamint át nem írt és/vagy nem transzlatált területeket kódolnak.

15 A származék polinukleotidok nem szükségszerűen fizikailag származnak a bemutatott nukleotidszekvenciából, hanem keletkezhetnek bármilyen módon, beleértve például a kémiai szintézist, vagy DNS-replikációt, vagy reverz transzkripciót, vagy olyan transzkripciót, amely a bázisok szekvenciája által nyújtott információ alapján, ahol a bázisok abban a területben vannak, amelyből a polinukleotid származik. Ezenkívül a nevezett szekvencia területeinek megfelelő területek kombinációi módosíthatók is úgy, amint ez a szakterületen ismert, hogy ezek egybevégejének a szándékolt alkalmazással.

20 Hasonlóképpen egy megnevezett nukleinsavszekvenciából, például az 1–32. ábrákban lévő szekvenciákból „származó” polipeptid vagy aminosavszekvencia, vagy egy HCV-genomból „származó” szekvencia egy polipeptidre vonatkozik, amelynek olyan aminosavszekvenciája van, amely azonos a nevezett szekvenciában, vagy annak egy részében kódolt polipeptid szekvenciájával, ahol a nevezett rész legalább 3–5 aminosavból, előnyösen 8–10 aminosavból, még előnyösebben 11–15 aminosavból áll, vagy amely immunológiai-  
35 lag azonosítható a nevezett szekvenciában kódolt polipeptiddel.

Egy rekombináns vagy származék polipeptid nem szükségszerűen egy megnevezett nukleinsavból, például az 1–26. ábrákban látható szekvenciákból, vagy egy HCV-genomból fordítódik át; ez kialakítható bármilyen más módon is, ide értve a kémiai szintézist, vagy egy rekombináns kifejezőrendszer kifejezését, vagy az izolálást mutáns HCV-ből.

40 A „rekombináns polinukleotid” kifejezést, amint itt használjuk, genom, cDNS, félszintetikus vagy szintetikus eredetű polinukleotidra szánjuk, amely eredetét vagy a műveleteket tekintve: (1) nincs összekötve annak a polinukleotidnak egészével vagy részével, amellyel ez a természetben össze van kötve vagy könyvtárat képez, és/vagy (2) össze van kapcsolva olyan polinukleotiddal, amely különbözik azoktól, amelyekkel ez a természetben össze van kapcsolva.

45 A „polinukleotid” kifejezés, ahogyan itt használjuk, nukleotidok bármilyen hosszúságú polimer formájára vonatkozik, amely nukleotidok lehetnek ribonukleotidok vagy dezoxi-ribonukleotidok. Ez a meghatározás a molekulának csak a primer szerkezetére utal. Így ez a kifejezés magában foglalja az egyszálú és kettős szálú DNS-eket, valamint az egyszálú és kettős szálú RNS-eket. Ez  
60 magában foglalja a polinukleotidok például metilezéssel

és/vagy helyettesítéssel módosított formáit, és nem módosított formáit.

Az „egy cDNS-nek megfelelő szekvenciát tartalmazó HCV” kifejezés, ahogyan itt használjuk, azt jelenti, hogy a HCV olyan polinukleotidszekvenciát tartalmaz, amely homológ vagy komplementer egy, a nevezett DNS-ben lévő szekvenciához; a homológia vagy komplementer jelleg mértéke a cDNS-hez mintegy 50% vagy nagyobb, előnyösen legalább mintegy 70%, még előnyösebben legalább mintegy 90%. A szekvenciák, amelyek megfelelnek, legalább mintegy 70 nukleotid, előnyösen legalább mintegy 80 nukleotid, még előnyösebben legalább mintegy 90 nukleotid hosszúságúak. A megegyezést a HCV-szekvencia és a cDNS között a szakterületen ismert technikákkal határozhatjuk meg, ide értve például a szekvenciaelemzésnek alávetett anyag közvetlen összehasonlítását a leírt cDNS-ekkel, vagy a hibridizálást és az emésztést egyedi szárla fajlagos nukleázokkal, amelyet az emésztett fragmentumok méret szerinti meghatározása követ.

A „tisztított vírus polinukleotid” kifejezés egy HCV-genomra vagy fragmentumára vonatkozik, amely lényegében idegen anyagoktól mentes, azaz több, mint mintegy 50%-át, előnyösen több, mint mintegy 70%-át, és még előnyösebben több, mint mintegy 90%-át nem tartalmazza azoknak a polipeptideknek, amellyel a vírus polipeptid a természetben társul. A technikák a vírus polinukleotidok tisztítására a többi vírusrészecskétől a szakterületen ismert, ide tartoznak például a részecskék szétzúzása valamely kaotrop szerrel és a polinukleotid vagy polinukleotidok és a polipeptidek elkülönítése ioncserélő kromatográfiával, affinitáskromatográfiával és sűrűség szerinti üleptéssel.

A „tisztított vírus polipeptid” kifejezés olyan HCV-polipeptidre vagy fragmentumára vonatkozik, amely lényegében tiszta, vagyis azoknak a celluláris komponenseknek, amelyekkel a víruspolipeptid a természetben össze van kapcsolva, több, mint mintegy 50%-át, előnyösen több, mint mintegy 70%-át, és még előnyösebben több, mint mintegy 90%-át nem tartalmazza. A vírus polipeptidek tisztítására szolgáló technikák a szakterületen ismertek, és ezekre a technikákra a későbbiekben adunk példákat.

A „rekombináns gazdasejtek”, „gazdasejtek”, „sejtek”, „sejtvonalak”, „sejttenyészetek” és más hasonló kifejezések, amelyeket mikroorganizmusok, magasabb rendű eukarióta sejtvonalak jelölésére alkalmazunk, olyan sejtekre vonatkoznak, amelyek alkalmazhatók, vagy amelyeket már alkalmaztak rekombináns vektorok vagy más transzfer DNS-ek befogadójaként, és magukban foglalják a fertőzött eredeti sejt utódait. Meg lehet érteni, hogy egy egyedi szülősejt utódja nem szükségszerűen tökéletesen azonos morfológiailag vagy a genom- vagy a teljes DNS-kiegészítésben, mint az eredeti szülő, a véletlenszerű vagy szándékos mutáció miatt. A szülősejteknek azok között az utódai között, amelyek megfelelően hasonlóak az adott tulajdonsággal jellemezhető szülőhöz (ilyen tulajdonság például egy kívánt peptidet kódoló nukleotid jelenléte) találjuk azokat

az utódokat, amelyek ennek a definíciónak megfelelnek, és a fenti kifejezéshez illenek.

„Replikon” bármilyen genetikai elem, például plazmid, kromoszóma, vírus, amely polinukleotidreplikáció autonóm egységként viselkedik valamely sejtben belül, vagyis replikációra képes saját szabályozása alatt.

A „vektor” olyan replikon, amelyhez más polinukleotidszegmensek is vannak rögzítve úgy, hogy végrehajthadják a rögzített szegmensek replikációja és kifejeződése.

A „szabályozószekvencia” kifejezés olyan polinukleotidszekvenciákra vonatkozik, amelyek szükségesek azon kódolószekvenciák kifejeződésének véghezviteléhez, amelyekhez ligálva vannak. Az ilyen szabályozószekvenciák természete különbözik a gazdaszervezettől függően; prokariótákban az ilyen szabályozószekvenciák között találjuk általában a promotort, riboszomális kötőhelyet és terminátorokat; eukariótákban az ilyen szabályozószekvenciák között találjuk általában a promotorokat, terminátorokat és bizonyos esetekben a fokozókat. A „szabályozószekvenciák” kifejezés szándékunk szerint magában foglal minimumként minden olyan komponens, amelynek jelenléte szükséges a kifejezéshez, továbbá magában foglalhat további komponenseket is, amelyek jelenléte előnyös, például vezetőszekvenciákat.

A „működőképesen összekapcsolt” kifejezés olyan egymásmellettségre vonatkozik, ahol az így leírt komponensek olyan kapcsolatban vannak, amely lehetővé teszi, hogy ezek kívánt módon működjenek. Egy szabályozószekvencia „működőképesen összekapcsolva” egy kódolószekvenciával úgy van ligálva, hogy a kódolószekvencia kifejeződését érjük el olyan körülmények között, amelyek elősegítik a szabályozószekvencia működését.

A „kódolószekvencia” olyan polinukleotidszekvencia, amely átíródik mRNS-sé és/vagy transzlátálódik valamely polipeptiddé, amikor megfelelő szabályozószekvenciák szabályozása alá helyezzük. A kódolószekvencia határait a translációs start kodon határozza meg az 5'-terminálisnál és a translációs stop kodon a 3'-terminálisnál. Egy kódolószekvencia magában foglalhat mRNS-, cDNS- és rekombináns polinukleotidszekvenciákat, de a lehetőségek nemcsak ezekre korlátozódnak.

Az „immunológiailag azonosítható” valamivel vagy valamiként kifejezés olyan epitóp vagy epitópok és polipeptid vagy polipeptidek jelenlétére utal, amelyek jelen vannak a megnevezett polipeptidben vagy polipeptidekben, általában HCV-fehérjékben, és egyediek abban. Az immunológiai azonosságot antitestkötéssel és/vagy a kötésben való versengéssel határozhatjuk meg; ezek a technikák ismeretesek azok számára, akik a szakterületen átlagosan jártasak; ezeket a későbbiekben be is mutatjuk. Az epitóp egyediségét számítógépes kutatással is meghatározhatjuk ismert adatbankokból, például a Genbankból, a polinukleotidszekvenciákból, amelyek az epitópot kódolják, és az aminosavszekvencia-összehasonlításokból már ismert fehérjékkel.

Ahogyan itt alkalmazzuk, az „epitóp” kifejezés egy polipeptid antigéndeterminánsára utal; egy epitóp állhat

3 aminosavból olyan térbeli konformációban, amely egyedi az epitópra nézve, általában azonban egy epitóp legalább 5 ilyen aminosavból áll, de legáltalánosabban 8–10 ilyen aminosavból áll. Az aminosavak térbeli konformációjának meghatározására szolgáló módszerek ismeretese a szakirodalomban, ezek között találjuk például a röntgensugár-krisztallográfiát és a kétdimenziós magmágneses rezonanciát.

Egy polipeptid akkor „immunológiai reaktív” egy antitesttel, amikor egy antitesthez kötődik amiatt, hogy az antitest felismeri azt a fajlagos epitópot, amelyet a polipeptid tartalmaz. Az immunológiai reaktivitást antitestkötéssel határozhatjuk meg, pontosabban az antitestkötés kinetikájával és/vagy egy kötésben való versengéssel, versengő anyagként valamely ismert polipeptidet alkalmazva, amely tartalmaz egy olyan epitópot, amely ellen az antitest irányul. Az a technika, amely annak meghatározására szolgál, vajon egy polipeptid immunológiai reaktív-e egy antitesttel, a szakterületen ismert.

Ahogy itt használjuk, a „HCV-epitópot tartalmazó immunogén polipeptid” kifejezés természetben előforduló HCV-polipeptideket vagy ezek fragmentumait foglalja magában, valamint más úton, például kémiai szintézissel előállított polipeptideket vagy rekombináns organizmusban kifejezett polipeptideket.

A „polipeptid” kifejezés aminosavmolekula-láncokra vonatkozik, és nem utal a termék adott hosszára; így a polipeptid definícióba beletartoznak a peptidek, oligopeptidek és fehérjék egyaránt. Ez a kifejezés nem utal a polipeptid kifejeződés utáni módosításaira, például a glikozilezésre, acetilezésre, foszforilezésre stb. sem.

A „transzformálás” kifejezés, ahogy itt használjuk, egy exogén polinukleotid beiktatására utal valamely gazdaszervezetbe, tekintet nélkül a beiktatáshoz alkalmazott módszerre; ez a módszer lehet például közvetlen felvétel, transzdukción vagy f-párosodás. Az exogén polinukleotidot fenntarthatjuk nem integrált vektorként, például plazmidként, de lehet integrálódva is a gazdaszervezet genomába.

A „kezelés” kifejezés, amint itt alkalmazzuk, megelőzésre vagy terápiára utal.

Az „egyen” kifejezés, ahogy itt használjuk, gerincesekre, elsősorban az emlősfajok tagjaira vonatkozik; ebbe a kifejezésbe értendők a háziállatok, sportcélú állatok, főemlősök és az ember is, de a kifejezés nemcsak ezekre korlátozódik.

Ahogy itt használjuk, egy nukleinsav „plusz szála” azt a szekvenciát tartalmazza, amely a polipeptidet kódolja.

A „mínusz szál” olyan szekvenciát tartalmaz, amely a „plusz szál” szekvenciával komplementer.

Amint itt alkalmazzuk, egy vírus „pozitív szálú genom”-ja olyan, amelyben a genom, akár RNS, akár DNS, egyszálú, és valamely polipeptidet vagy polipeptideket kódol. Pozitív szálú RNS-vírusokra példák a Togaviridae, Coronaviridae, Retroviridae, Picornaviridae és Caliciviridae. Ide tartozik a Falviviridae is, amelyet korábban a Togaviridae-hoz osztályoztak [lásd Fields és Knipe (1986)].

Ahogy itt használjuk, az „antitestet tartalmazó testkomponens” kifejezés egy egyén testének olyan komponensére utal, amely a szóban forgó antitest forrása. Antitestet tartalmazó testkomponensek ismeretese a szakterületen, ezek között találjuk például a plazmát, gerincfolyadékot, nyirokfolyadékot, a légző-, bél-, húgy- és ivarszervi traktus külső részeit, nyálát, könnyet, tejet, fehérvérsejteket és mielómákat, de nemcsak ezekre korlátozódnak.

Ahogy itt használjuk, a „tisztított HCV” kifejezés olyan készítményre utal, amelyet elkülönítettünk azoktól a sejtalkotórészeketől, amelyekkel a vírus normálisan egyesítve van, és azoktól a más típusú vírusoktól, amelyek jelen lehetnek a fertőzött szövetben. A vírusok izolálására szolgáló technikák ismeretese azok számára, akik a szakterületen jártasak, ilyen például a centrifugálás és affinitáskromatográfia; tisztított HIV előállítására szolgáló eljárásokat ismertetünk a későbbiekben.

A jelen találmány gyakorlati megvalósításához, ha csak másképpen nem jelezzük, a molekuláris biológia, mikrobiológia, rekombináns DNS-technika és immunológia hagyományos technikáit alkalmazzuk, amely technikák közül vannak a szakterületen való általános jártasság keretein. Az ilyen technikákat az irodalomban részletesen elmagyarázzák. Lásd például Maniatis, Fritsch és Sambrook: MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982); DNA CLONING I. és II. kötet (szerkesztő: Glover D. N.) (1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (szerkesztő: Gait M. J.) (1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (szerkesztők: Hames B. D. és Higgins S. J.) (1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (szerkesztők: Hames B. D. és Higgins S. J.) (1984); ANIMAL CELL CULTURE (szerkesztő: Freshney R. I.) (1986); IMMobilized CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); Perbal B.: A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); a „METHODS IN ENZYMOLOGY” című sorozat (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (szerkesztők: Miller J. H. és Calos M. P.) (Cold Spring Harbor Laboratory, 1987); Methods in Enzymology 154. kötet (szerkesztők: Wu és Grossman); Methods in Enzymology 155. kötet (szerkesztő: Wu); IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (szerkesztők: Mayer és Walker (Academic Press, London, 1987); Scopes: PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE 2. kiadás (Springer Verlag, New York, 1987); HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, I–IV. kötet (szerkesztők: Weir D. M. és Blackwell C. C.) (1986).

Minden szabadalmi leírás, közzétett szabadalmi bejelentés és közlemény, amelyet eddig említettünk vagy ezután említünk, referenciaként épül be a jelen bejelentésbe.

A jelen találmány alkalmas anyagai és eljárásai szorosán homológ nukleotidszekvenciák családjának elkészítését teszik lehetővé, amely szekvenciákat HCV-vel fertőzött csimpánzok plazmájában jelen lévő nukleinsavszekvenciákból származó cDNS-könyvtárból izolál-

lunk. A nukleotidszekvenciáknak ez a családja nem emberi és nem csimpánz eredetű, mivel ez nem hibridizál sem humán, sem csimpánz genom DNS-sel nem fertőzött egyének esetében, mivel a szekvenciák ezen családjának nukleotidjai csak HCV-vel fertőzött csimpánzok májában és plazmájában vannak jelen, és mivel ez a szekvencia nincs jelen a Genebankban. Ezenkívül ezeknek a szekvenciáknak a családja nem mutat szignifikáns homológiát azokhoz a szekvenciákhoz, amelyeket a HBV-genom tartalmaz.

A család egyik tagjának a szekvenciája, amely az 5-1-1. klónon belül található, egy folytonos nyitott leolvasókerettel (ORF) bír, amely egy mintegy 50 aminosavas polipeptidet kódol. A HCV-vel fertőzött emberekből kapott szérumok tartalmaznak olyan antitesteket, amelyek ehhez a polipeptidhez kötődnek, míg a nem fertőzött emberekből származó szérumok nem tartalmaznak antitesteket erre a polipeptidre. Végül, bár a nem fertőzött csimpánzokból származó szérum nem tartalmaz antitesteket erre a polipeptidre, az antitestek indukálódnak csimpánzokban akut NANBH-fertőzést követően. Ezenkívül antitestek erre a polipeptidre nem mutathatók ki HAV-val és HBV-vel fertőzött csimpánzokban és emberekben. Ezen kritériumok alapján a szekvencia cDNS egy vírusszekvenciában, ahol a vírus az NANBH okozója, vagy azzal van összekapcsolva; ezt a cDNS-szekvenciát az 1. ábrán mutatjuk be. Amint a későbbiekben majd tárgyaljuk, az 5-1-1.-ben lévő cDNS-szekvencia annyiban különbözik a többi izolált cDNS-szekvenciájától, hogy 28 többlet bázispárt tartalmaz.

A cDNS-család más azonosított tagjainak egy összetett képződményét, amelyet úgy izoláltunk, hogy az 5-1-1. klónban lévő cDNS egy fragmentumával ekvivalens szintetikus szekvenciát alkalmaztunk vizsgálómintaként, a 3. ábrában mutatjuk be. A cDNS-család egyik tagját, amelyet a 81. klónban lévő cDNS-ből származó szintetikus szekvenciát alkalmazva izoláltunk, az 5. ábrán mutatjuk be, és ennek a szekvenciának a 81. klón szekvenciájával való összetett képződményét a 6. ábrán mutatjuk be. A cDNS-család más tagjait, ide értve azokat, amelyek a 12f., 14i., 11b., 7f., 7e., 8h., 33c., 40b., 37b., 35., 36., 81., 32., 33b., 25c., 14c., 8f., 33f., 33g., 39c., 35f., 19g. és 15e. klónokban jelen vannak, egy későbbi fejezetben írjuk le. Az ezekben a klónokban lévő cDNS-ek egy összetett képződményét írjuk le egy későbbi fejezetben, és mutatjuk be a 32. ábrán. Az összetett cDNS azt mutatja, hogy ez egy folyamatos ORF-et tartalmaz, így egy polipeptidre kódol. Ez az adat egybevághat azzal a véleménnyel, amelyet a későbbiekben tárgyalunk, hogy a HCV Flavivírus vagy Flavivírus vírus.

A cDNS ezen családjának, amelyeket az 1–32. ábrákon mutatunk be (ide értve a határértékeket is), hozzáférhetősége lehetővé teszi DNS-vizsgálóminták és polipeptidek előállítását, amelyek alkalmazhatók a HCV-fertőzésnek tulajdonítható NANBH diagnosztizálásában, és a véradók, az adott vér és vérkészítmények átvizsgálására fertőzöttségre. Így például a szekvenciák alapján mintegy 8–10 nukleotidos DNS-oligomereket lehet szintetizálni, vagy nagyobbakat, amelyek alkal-

mazhatók hibridizációs vizsgálómintaként a vírusgenom jelenlétének kimutatására például olyan egyének szérumában, amelyekről feltételezhető, hogy befogadták a vírust, vagy az adott vér átvizsgálására a vírus jelenlétére. A cDNS-szekvenciák családja lehetővé teszi a HCV-fajlagos polipeptidek tervezését és előállítását, amely polipeptidek diagnosztikus reagenseként alkalmazhatók NANBH során kialakuló antitestek jelenlétének kimutatására. A cDNS-ekből származó tisztított polipeptidek elleni antitesteket is alkalmazhatjuk vírusantigének kimutatására fertőzött egyénekben és vérben.

Ezeknek a cDNS-szekvenciáknak az ismerete lehetővé teszi olyan polipeptidek tervezését és előállítását is, amelyek vakcinaként alkalmazhatók HCV ellen, és lehetővé teszi antitestek előállítását is, amelyek viszont a betegség elleni védelemre és/vagy a HCV-vel fertőzött egyének gyógyítására alkalmasak.

Ezenkívül a cDNS-szekvenciák családja lehetővé teszi a HCV-genom további jellemzését.

Az ezekből a szekvenciákból származó polinukleotid vizsgálómintákat alkalmazhatjuk cDNS-könyvtárak átvizsgálására további átfedő cDNS-szekvenciákra, amelyeket viszont további átfedőszekvenciák megszerzésére alkalmazhatunk. Ha csak a genom nincs szegmensre osztva, és a szegmensek nélkülözik a közös szekvenciákat, ezt a technikát alkalmazhatjuk a teljes genom szekvenciájának összegyűjtésére. Ha azonban a genom szegmensekre van osztva, a genom további szegmenseit a lambda-gt11 szerológiai átvizsgálóeljárás ismétlésével kaphatjuk meg, amely eljárást az itt leírt cDNS-klónok izolálására alkalmazzuk vagy egy másik módszer szerint a genom izolálásával kaphatjuk meg tisztított HCV-részecskékből.

A cDNS-szekvenciák családja és az ezekből a szekvenciákból származó polipeptidek, valamint az ezek ellen a polipeptidek ellen irányuló antitestek alkalmazhatók a BB-NANBV-agens vagy -ágensek izolálásában és azonosításában is. Így például a cDNS-ekből származó polipeptidekben lévő HCV-epitópok ellen irányuló antitesteket alkalmazhatjuk olyan folyamatokban, amelyek affinitáskromatográfián alapulnak, hogy a vírust izoláljuk. Egy másik eljárás szerint az antitesteket alkalmazhatjuk más technikákkal izolált vírusrészecskék azonosítására. A vírusantigéneket és a genomanyagot az izolált vírusrészecskéken belül azután tovább jellemezhetjük.

A HCV-genom vagy genomok további szekvenciaelemzéséből, valamint a HCV-antigének további jellemzéséből, és a genom jellemzéséből kapott információk lehetővé teszik további vizsgálóminták, polipeptidek és antitestek tervezését és szintézisét, amelyeket lehet alkalmazni NANBH által indukált HCV diagnózisához, megelőzéséhez és terápiájához, valamint átvizsgáláshoz fertőzött vérre, és vérszármazék jellegű termékekre.

A HCV-hez való vizsgálóminták, beleértve az antigéneket és antitesteket, valamint az abból a genomból, amelyből a cDNS-ek családja származik, származó polinukleotidok hozzáférhetősége lehetővé teszi olyan szövettenyésztő rendszerek kifejlesztését is, amelyek jelentős alkalmazást nyerhetnek a HCV biológiájának tisztázásában. Ez viszont új kezelési menetrend kifejleszté-

séhez vezethet, amely olyan vírusellenes anyagokon alapul, amelyek gátolják a HCV replikációját vagy a HCV által előidézett fertőzést.

Az NANBH-hoz tartozó etiológiai ágens azonosítására és izolálására alkalmazott eljárás új, és alkalmazható olyan, eddig nem jellemzett ágensek azonosítására és/vagy izolálására, amelyek egy genomot tartalmaznak, és amelyek különféle betegségekkel társulnak, beleértve azokat a betegségeket, amelyeket vírusok, viroidok, baktériumok, gombák és paraziták okoznak. Ebben a módszerben cDNS-könyvtárat alakítunk ki egy fertőzött egyénből származó fertőzött szövetben jelenlévő nukleinsavakból. A könyvtárat egy olyan vektorban alkotjuk meg, amely lehetővé teszi a cDNS-ben kódolt polipeptidek kifejeződését. A vektort, amely az etiológiai ágens polipeptidjének immunológiailag reaktív fragmentumát fejezi ki, tartalmazó gazdasejtek klónjait a könyvtár kifejezési termékeinek immunológiai átvizsgálásával választjuk ki, az átvizsgálást a feltételezett ágenssel előzőleg fertőzött másik egyénből vett, antitestet tartalmazó testkomponenssel végezve. Az immunológiai átvizsgálótechnika lépései közt találjuk a cDNS-t tartalmazó vektorok kifejezési termékeinek kölcsönhatásba léptetését egy második fertőzött egyén antitestet tartalmazó testkomponenssel, és a kifejezési termék(ek) és a második fertőzött egyén antitestjei közötti antitest-antigén komplexek keletkezésének kimutatását. Az izolált klónokat további immunológiai átvizsgálásnak vetjük alá kifejezési terméküket kölcsönhatásba hozva más, feltételezett ágenssel fertőzött és a feltételezett ágenssel nem fertőzött kontrollegyének antitestet tartalmazó testkomponenseivel, és a fertőzött egyénekből származó antitestekkel kialakuló antigén-antitest komplexek képződését kimutatva; és izoláljuk azokat a cDNS-tartalmú vektorokat, amelyek olyan polipeptideket kódolnak, amelyek immunológiailag reagálnak fertőzött egyénekből és az ágenssel fertőzésre gyanús egyénekből kapott antitestekkel, de nem reagálnak a kontrollegyénekkel. A cDNS-könyvtár megalkotásához alkalmazott fertőzött egyéneknek és az immunológiai átvizsgáláshoz alkalmazott egyéneknek nem kell azonos fajba tartozniuk.

Az ennek az eljárásnak az eredményeképpen izolált cDNS-ek, ezek kifejezési termékei, és a kifejezési termékek ellen irányuló antitestek hasznosak az etiológiai ágens jellemzésében és/vagy kinyerésében. Amint a későbbiekben részletesen leírjuk, ezt az eljárást sikeresen alkalmazzuk a HCV-genomból származó cDNS-ek családjának izolálására.

#### *A cDNS-szekvencia előállítása*

Krónikus HCV-fertőzésben szenvedő és a vírus magas titerét [vagyis legalább  $10^6$  csimpánz fertőző dózis/ml (CID/ml)] tartalmazó csimpánzból összegyűjtött szérumot alkalmazunk vírusrészecskék izolálására; az ezekből a részecskékből izolált nukleinsavakat alkalmazzuk templátként a vírusgenomra vonatkozó cDNS-könyvtár megalkotásában. A vélt HCV-részecskék izolálására és a lambda-gt11-ben a cDNS-könyvtár megalkotására szolgáló munkameneteket egy későbbi fejezetben tárgyaljuk. A lambda-gt11 olyan vektor, ame-

lyet speciálisan arra fejlesztettek ki, hogy beiktatott cDNS-eket fejessen ki béta-galaktozidázzal képzett fúziós polipeptidként, és nagyszámú rekombináns fágot vizsgáljon át meghatározott antigén ellen kialakított fajlagos antiszérumokkal. A mintegy 200 bázispár átlagos méretű cDNS-t tartalmazó cDNS-készletből kialakított lambda-gt11 cDNS-könyvtárat átvizsgáljuk olyan kódolt epitópokra, amelyek fajlagosan képesek kötődni olyan betegekben eredő szérumokkal, akiknél előzőleg NANB-hepatitist tapasztaltak [Huynh T. V. és munkatársai (1985)]. Mintegy  $10^6$  fágot vizsgálunk át, és 5 pozitív fágot azonosítunk, tisztítunk, majd átvizsgáljuk kötési fajlagosságra olyan szérumokhoz, amelyek más, a HCV-ágenssel előzőleg fertőzött emberekből és csimpánzokból származnak. A fágok egyike, az 5-1-1. kötődik a 8 megvizsgált humán szérum közül 5-höz. Ez a kötés, úgy tűnik, szelektív azokból a betegekben származó szérumokra nézve, akik előzőleg NANB-hepatitisfertőzésben estek át, mivel 7 normális véradó széruma nem mutat ilyen kötést.

Az 5-1-1. rekombináns fágban a cDNS szekvenciáját meghatározzuk, amint ezt az 1. ábrában bemutatjuk. Az ezzel a klónozott cDNS-sel kódolt polipeptidet, amely azonos translációs keretben van, mint a fúziós polipeptid N-terminális béta-galaktozidáz része, a nukleotidszekvencia fölött mutatjuk be. Ez a translációs ORF tehát olyan epitópot kódol, amelyet NANB-hepatitisfertőzésben szenvedő betegekben származó szérumok fajlagosan felismernek.

A cDNS hozzáférhetősége az 5-1-1. rekombináns fágban lehetővé teszi más klónok izolálását, amelyek a cDNS további szegmenseit és/vagy alternatív szegmenseit tartalmazzák a vírusgenomhoz viszonyítva. A fentebb leírt lambda-gt11 cDNS-könyvtárat átvizsgáljuk egy olyan szintetikus polinukleotidot alkalmazva, amely a klónozott 5-1-1. cDNS-szekvenciájából származik. Ez az átvizsgálás három további klónt termel, amelyeket 81., 1-2. és 91. klónként azonosítunk; az ezekben a klónokban lévő cDNS-eket szekvenciaelemzésnek vetjük alá. A homológiákat a négy független klón között a 2. ábrán mutatjuk be, ahol a homológiákat függőleges vonalakkal jelezzük. Azokat a nukleotidszekvenciákat, amelyek egyediként vannak jelen az 5-1-1., 81. és 91. klónokban, kis betűkkel jelöljük.

Az 5-1-1., 81., 1-2. és 91. klónokban lévő rekombináns fágokban jelen lévő klónozott cDNS-ek nagymértékben homológok, és csak két területben különböznek. Először a 67. számú nukleotid az 1-2. klónban timidin-, míg a további három klón citidingyöket tartalmaz ezen a helyen. Ez a helyettesítés azonban nem változtatja meg a kódolt aminosav természetét.

A második különbség a klónok között az, hogy az 5-1-1. klón 28 bázispárt tartalmaz 5'-terminálisán, amely a többi klónban nincs jelen. A többlétszekvencia lehet egy 5'-terminális klónozási „termék”; 5'-terminális klónozási termékek gyakran figyelhetők meg a cDNS-eljárások termékeiben.

A 81. klónban lévő HCV cDNS 5'-területéből és 3'-területéből származó szintetikus szekvenciákat alkalmazunk a lambda-gt11 NANBV cDNS-könyvtárból

való olyan cDNS-ek átvizsgálására és izolálására, amelyek átfedik a 81. klón cDNS-t. Az így létrejövő cDNS-ek szekvenciáit, amely cDNS-ek a 36., illetve 32. klónban vannak, az 5., illetve 7. ábrán mutatjuk be.

Hasonlóképpen a 36. klón 5'-területén alapuló szintetikus polinukleotidot alkalmazunk a lambda-gt11 NANBV cDNS-könyvtárból származó cDNS-ek átvizsgálására és izolálására, amely cDNS-ek átfedik a 36. klón cDNS-t. Egy rekombináns fágot tartalmazó cDNS tisztított klónját, amely hibridizál a szintetikus polinukleotid vizsgálómintához, 35. klónnak nevezzük, és az ezen a klónon belül található NANBV cDNS-szekvenciát a 8. ábrán mutatjuk be.

Átfedő cDNS-szekvenciák izolálásának ezt a technikáját alkalmazva további felfelé és lefelé lévő cDNS-szekvenciákat tartalmazó klónokat kapunk. Ezeknek a klónoknak az izolálását a későbbiekben írjuk le.

Az izolált klónokon belül kódolt HCV cDNS-ek nukleotidszekvenciájának elemzése azt mutatja, hogy az összetett cDNS egy hosszú, folyamatos ORF-et tartalmaz. A 26. ábra mutatja be az ezekből a klónokból összetett cDNS szekvenciáját az ebben kódolt vélt HVC-polipeptiddel együtt.

Az eljárás leírása a cDNS-szekvenciák újrakinyerésére jórészt csak történeti érdekességű. Az így létrejövő szekvenciákat (és komplementereiket) megadjuk itt, és ezeket a szekvenciákat vagy bármely részüket szintetikus módszerekkel állíthatjuk elő, vagy szintetikus eljárásokat kombinálva részleges szekvenciák kinyerésével, hasonló eljárásokat alkalmazva, mint amelyeket leírtunk.

A HCV cDNS-könyvtárból az 5-1-1., 81., 1-2. és 91. klónokból replikált lambda-gt11 törzseket az American Type Culture Collectionnál (ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852) deponáltuk a Budapesti Szerződés feltételei szerint; ezek az alábbi letéti számot kapták:

<i>lambda-gt11</i>	ATCC	A letét napja
HCV cDNS-könyvtár	40394	1987. december 1.
81. klón	40388	1987. november 17.
91. klón	40389	1987. november 17.
1-2. klón	40390	1987. november 17.
5-1-1. klón	40391	1987. november 18.

A jelzett deponált törzseket harminc (30) éves időtartamon át fenn kell tartani a deponálás időtartamától számítva vagy öt (5) évig a deponált törzsre való legutolsó igényléstől számítva, vagy az amerikai egyesült államokbeli szabadalom alkalmazható élettartamáig – attól függően, melyik hosszabb. Ezek a deponált törzsek és más itt említett deponált törzsek csak a könyvebb alkalmazást szolgálják, és nem feltétlenül szükségesek a jelen találmány gyakorlatba vételéhez az itt mellékelt leírás alapján. Az összes deponált anyagban lévő HCV cDNS-szekvenciák referenciaként épülnek be a jelen bejelentésbe.

A fenti leírás, amelyben a genomot „sétáltatjuk” átfedő cDNS-szekvenciákat izolálva a HCV lambda-gt11 könyvtárból, olyan eljárást nyújt, amellyel a teljes HCV-genomnak megfelelő cDNS-ek izolálhatók. Az itt megadott információk alapján más, ezeknek a

cDNS-eknek az izolálására szolgáló eljárások nyilvánvalók azok számára, akik a szakterületen jártasak. Ezek közül a módszerek közül néhányat leírunk a későbbiekben.

#### 5 *Viruspolipeptidek és fragmentumaik előállítás*

A cDNS-szekvenciák hozzáférhetősége, akár azoké, amelyek az 1–32. ábrákon lévő cDNS-szekvenciák alkalmazásával izolálunk, amint ezt később leírjuk, akár az ezeken az ábrákon lévő cDNS-szekvenciáké, lehetővé teszi a bármelyik számban kódolt polipeptid antigénszempontból aktív területét kódoló kifejezővektorok megalkotását. Ezek az antigénszempontból aktív területek származhatnak a burkoló- vagy „burok”-antigénekből, vagy a belső antigénekből, ide értve például a polinukleotidkötő fehérjéket, polinukleotid polimerázt vagy polimerázokat, és más olyan vírusfehérjéket, amelyek szükségesek a vírusrészecskék replikációjához és/vagy összeállításához. A kívánt polipeptideket kódoló fragmentumok a cDNS-klónokból származnak hagyományos restriktív emésztést vagy szintetikus eljárásokat alkalmazva, és olyan vektorokba vannak ligálva, amelyek tartalmazhatják például fúziós szekvenciák részeit; ilyen fúziós szekvenciák lehetnek például a béta-galaktozidáz vagy szuperoxid-diszmutáz (SOD), előnyösebb a SOD. Azok az eljárások és vektorok, amelyek olyan polipeptidek előállítására alkalmasak, amelyek SOD fúziós szekvenciáit tartalmazzák, a 0,196,056 számú európai szabadalmi közzétételi iratban vannak leírva; ez 1986. október 1-jén lett közzétéve. SOD- és HCV-polipeptidek fúziós polipeptidjeit, vagyis az NANB<sub>5-1-1</sub>-et, NANB<sub>81</sub>-et és C100-3-at – amelyek HCV cDNS-ek összetett termékében kódolódnak – kódoló vektorokat a továbbiakban írjuk le. Egy nyitott leolvasókeretet tartalmazó HCV cDNS bármilyen kívánt részét, bármelyik „értelmes” számban, megkaphatjuk rekombináns polipeptidként, úgymint érett vagy fúziós fehérjét; egy másik módszer szerint a cDNS-ben kódolt polipeptidet kémiai szintézissel kaphatjuk meg.

A kívánt polipeptidet kódoló DNS-t, akár fúziós vagy érett formában van, akár tartalmaz egy szignál-szekvenciát a kiválasztás lehetővé tételére, akár nem, ligálhatjuk bármilyen megfelelő gazdaszervezethez alkalmas kifejezővektorba. Mind eukarióta-, mind prokarióta-rendszereket alkalmaznak jelenleg rekombináns polipeptidek képzésére, és több közös szabályozó rendszer és gazdaszervezetre vonatkozó összefoglalása van megadva a későbbiekben. A polipeptidet azután a lizált sejtekből vagy a tenyészközegből izoláljuk, és addig a mértékig tisztítjuk, amely szándékolt felhasználásához szükséges. A tisztítás a szakterületen ismert technikákkal lehetséges, például sófrakcionálással, ioncserélő gyantán végzett kromatográfiával, affinitáskromatográfiával, centrifugálással és hasonlókkal. A Methods in Enzymology című sorozat számos módszert közöl fehérjék tisztítására. Az ilyen polipeptidek alkalmazhatók diagnosztikumként, vagy azokat, amelyek semlegesítőantitesteket idéznek elő, vakcinákká szerelhetjük ki. Az ezek ellen a polipeptidek elleni antitesteket is alkalmazhatjuk diagnosztikumként, vagy passzív immunterápiához. Ezenkívül, amint ezt később leírjuk, az ezen polipepti-

dek elleni antitestek alkalmasak HVC-részecskék izolálására és azonosítására.

A HCV-antigéneket izolálhatjuk HCV-virionokból is. A virionokat növeszthetjük HCV-vel fertőzött sejtekben szövettenyészetben, vagy valamely fertőzött gazdaszervezetben.

*Antigénpolipeptidok előállításának és konjugálásának hordozóval*

Valamely polipeptid antigénterülete általában viszonylag kicsiny – tipikusan 8–10 aminosav hosszúságú, vagy rövidebb. Akár 5 aminosavból álló fragmentumok is jellemezhetnek már egy antigénterületet. Következésképpen a HCV cDNS-ét alkalmazva alapként a HCV-polipeptidok rövid szegmenseit kódoló DNS-eket fejzhetünk ki akár fúziós fehérjeként, akár izolált polipeptidként. Ezenkívül rövid aminosavszekvenciákat könnyen megkaphatunk kémiai szintézissel. Azokban a példákban, ahol a szintetizált polipeptid korrekt konfigurációjú úgy, hogy a korrekt epitópot nyújtja, de túl kicsi ahhoz, hogy immunogén legyen, a polipeptidet megfelelő hordozóhoz kapcsolhatjuk.

Sok olyan technika ismeretes a szakterületen, amellyel ilyen kapcsolások elvégezhetők, ide értve a diszulfidkötések képzését N-szukcinimidil-3-(2-piridil-tio)-propionátot (SPDP) és szukcinimidil-4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karboxilátot (SMCC) alkalmazva, amelyek a Pierce Company (Rockford, Illinois) termékei (ha a peptidben nincs szulfhidrilcsoport, ezt egy ciszteingyök hozzáadásával lehet biztosítani). Ezek a reagensek diszulfidkötést alakítanak ki maguk és a peptid ciszteingyökök között az egyik fehérjén, és amidkötést alakítanak ki egy lizinen lévő epszilon-amino-csoporttal, vagy más szabad aminosocsoporttal a másik fehérjén. Sokféle ilyen diszulfid/amid képző ágens ismeretes. Ezzel kapcsolatban lásd például *Immun. Rev.*, 62, 185 (1982). Más bifunkcionális kapcsolóágensok diszulfidkötések helyett tio-étert képeznek. Ezek közül a tio-éter-képző ágensok közül sok kapható a kereskedelmi forgalomban, ide tartoznak a 6-maleimido-kapronsav, 2-bróm-ecetsav, 2-jód-ecetsav, 4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karbonsav reaktív észterei, és hasonlóak. A karboxilcsoportokat úgy aktiválhatjuk, hogy kombináljuk ezeket szukcinimiddal vagy 1-hidroxi-2-nitro-4-szulfonsav nátrium-sóval. A fentebb leírt lista nem meríti ki az összes lehetőségeket, és természetesen a nevezett vegyületek módosulatait is alkalmazhatjuk.

Bármilyen hordozót alkalmazhatunk, amely önmagában nem váltja ki a gazdaszervezetre káros antitestek képződését. A megfelelő hordozók tipikusan nagy, lassan metabolizáló makromolekulák, például fehérjék, poliszacharidok, például latexfunkcionalizált Sepharose, agaróz, cellulózgyöngyök és hasonlóak; polimer aminosavak, például poliglutaminsav, polilizin és hasonlóak, aminosavkopolimerok és inaktív vírusrészecskék, lásd például a következő fejezetet. Különösen hasznos fehérjeszubsztrátumok a szérumalbuminok, Keyhole-Limpet-hemicianin, immunglobulin-molekulák, tiroglobulin, ovalbumin, tetanusz toxoid és más fehérjék; mindezek jól ismertek azok számára, akik a szakterületen jártasak.

*HCV-epitópokat tartalmazó hibrid részecskeimmunogének előállítása*

A HCV-epitópjainak immunogén voltát fokozhatjuk úgy is, hogy emlős- vagy élesztőrendszerekben állítjuk elő ezeket részecskeképző fehérjékkel fuzionálva vagy összekapcsolva, például hepatitis B felületi antigénnel összekapcsolva. Azok a konstrukciók, ahol az NANBV-epitóp közvetlenül van összekapcsolva a részecskeképző fehérjét kódoló szekvenciával, olyan hibrideket képeznek, amelyek immunogének a HCV-epitóp tekintetében. Ezenkívül az összes előállított vektor olyan epitópokat foglal magában, amelyek HBV-re fajlagosak, és az immunogenicitás különböző fokozataival bírnak, ilyen például a pre-S peptid. Így azok a részecskék, amelyek HCV-szekvenciákat magukban foglaló részecskeképző fehérjékből vannak megalkotva, immunogének a HCV-t és a HBV-t illetően.

A hepatitis felületi antigénről (HBSAg) kimutatták, hogy képezhető, és részecskékbe állítható össze *S. cerevisiae*-ban [Valenzuela és munkatársai (1982)], valamint például emlőssejtekben [Valenzuela P. és munkatársai (1984)]. Az ilyen részecskék keletkezéséről kimutatták, hogy fokozzák a monomer alegység immunogén voltát. A konstrukciók magukban foglalhatják a HBSAg immundomináns epitópját is, ez az előfelületi (pre-S) terület 55 aminosavát foglalja magában [Neurath és munkatársai (1984)]. Az élesztőben kifejezhető pre-S HBSAg-részecskéket a 174,444 számú európai szabadalmi közzétételi irat ismerteti; a heterológ vírusszekvenciákat magában foglaló hibrideket élesztő kifejezéséhez a 175,261 számú európai szabadalmi közzétételi irat ismerteti. Mindkét bejelentést a jelen találmány bejelentői tették, ezek a jelen bejelentésbe referenciaként épülnek be. Ezek a konstrukciók kifejezhetők emlőssejtekben is, például kínaihórcsögpetefészek-(CHO) sejtekben, SV40-dihidrofolát redukáz vektort alkalmazva [Michaelis és munkatársai (1984)].

Ezenkívül a részecskeképző fehérjét kódoló szekvencia részeit helyettesíteni lehet valamely HCV-epitópot kódoló kodonokkal. Ebben a helyettesítésben azok a területek, amelyek nem szükségesek az egységek aggregációjának közvetítésében, hogy immunogén részecskék keletkezzenek élesztőkben vagy emlősökben, kiiktathatók, így kiküszöbölhetők további HBV-antigén helyek a HCV-epitóppal való versengésből.

*Vakcinák előállítása*

Vakcinákat állíthatunk elő HCV cDNS-ből származó, valamint az 1–32. ábrákon lévő cDNS-szekvenciákból származó, vagy olyan HCV-genomból származó immunogén polipeptidből vagy polipeptidekből, amelyek a genomnak megfelelnek. A megfigyelt homológia a HCV és a Flavivírusok között információt nyújt azokat a polipeptideket illetően, amelyek valószínűleg leghatékonyabbak vakcinaként, valamint a genom azon területeit illetően, amelyekben ezek kódolódnak. A Flavivírusgenom általános szerkezetét Rice és munkatársai tárgyalják (1986). A Flavivírusgenom-RNS-ről úgy véljük, hogy csak vírusspecifikus mRNS-fajta, és három vírus szerkezeti fehérjévé, vagyis a C-, M- és E-fehérjékké, valamint két nagy, nem szerkezeti fehérjé

komplex sorozatává transzlatálódik. Ismeretes, hogy a Flavivírushoz tartozó nagyobb semlegesítőepitóp, az E (burkolati) fehérjében tartózkodik [Roehrig (1986)]. A megfelelő HCV E-gén és polipeptidkódoló terület ki-következtethető a Flavivírushoz való homológia alapján. Így a vakcinák olyan rekombináns polipeptidekből állhatnak, amelyek a HCV E-epitópjait tartalmazzák. Ezek a polipeptidok kifejeződhetnek baktériumokban, élesztőben vagy emlőssejtekben, vagy más módszer szerint izolálhatók víruskészítményekből. Az is előre jelezhető, hogy a további szerkezeti fehérjék szintén tartalmazhatnak olyan epitópokat, amelyek védőhatású anti-HCV-antitesteket alakítanak ki. Így az E-, C- és M-epitópokat tartalmazó polipeptidok szintén alkalmazhatók a HCV-vakcinákban, akár egyedül, akár kombinációban.

A fentiekben kívül kimutatták, hogy az immunizálás NS1-gyel (1. számú nem szerkezeti fehérje) védelmet eredményez a sárgaláz ellen [Schlesinger és munkatársai (1986)]. Ez valóban igaz, bár az immunizálás nem alakít ki semlegesítőantitesteket. Így különösen azért, mert ez a fehérje, úgy tűnik, nagymértékben megőrzött a Flavivírusok között, valószínű, hogy a HCV NS1 szintén védőhatású a HCV-fertőzés ellen. Sőt ez azt is mutatja, hogy nem szerkezeti fehérjék is nyújthatnak védelmet víruspatogenitás ellen, még akkor is, ha ezek nem idézik elő semlegesítőantitestek kialakulását.

A fentiekre tekintettel HCV elleni multivalens vakcinák tartalmazhatnak egy vagy több szerkezeti fehérjét és/vagy egy vagy több nem szerkezeti fehérjét. Ezek a vakcinák állhatnak például rekombináns HCV-polipeptidekből és/vagy a virionokból izolált polipeptidekből. Ezenkívül lehetséges inaktivált HCV-t is alkalmazni vakcinákban; az inaktiválás történhet víruszizátumok előállításával vagy más, a szakterületen ismert módon, amely a Flavivírusok inaktiválását idézi elő; ilyen lehet például a kezelés szerves oldószerekkel vagy detergenssekkel, vagy kezelés formalinnal. Ezenkívül vakcinákat készíthetünk gyengített HCV-törzsekből is. A legyengített HCV-törzsek előállítását a későbbiekben írjuk le.

Ismeretes, hogy bizonyos fehérjék a Flavivírusokban nagymértékben megőrzött területeket tartalmaznak, így bizonyos immunológiai keresztreaktivitás várható a HCV- és más Flavivírusok között. Lehetséges, hogy a Flavivírusok és HCV közt osztozó epitópok váltanak ki védőantitesteket az ezen patogén ágensek által okozott egy vagy több rendellenesség ellen. Ezért lehetséges ezen ismeret alapján többcélú vakcinákat tervezni.

Olyan vakcinák előállítása, amely aktív alkotórészként immunogén polipeptidet vagy polipeptideket tartalmaz, ismeretes azok számára, akik a szakterületen jártasak. Az ilyen vakcinák tipikusan injektálható vakcinaként készülnek, vagy folyékony oldatokként, vagy szuszpenziókként; készíthetők olyan szilárd formák is, amelyek injektálás előtt alakíthatók át oldatokká vagy szuszpenziókká. A készítmény lehet emulgeált formában is, vagy a fehérje lehet liposzómákba burkolva. Az aktív immunogén alkotórészek gyakran össze vannak keverve kötőanyagokkal, amelyek gyógyászatilag elfogadhatók, és összeférhetők az aktív alkotórészszel. Meg-

felelő kötőanyagok például a víz, fiziológiás sóoldat, glükóz, glicerin, etanol vagy hasonló, és ezek kombinációi. Ezenkívül, ha szükséges, a vakcina tartalmazhat kis mennyiségben kiegészítő anyagokat, például nedvesítő- vagy emulgeálószerket, pH-pufferoló ágenseket és/vagy olyan adjuvánsokat, amelyek fokozzák a vakcina hatékonyságát. Hatékony adjuvánsokra példák lehetnek (de nemcsak ezekre korlátozódnak) az alumínium-hidroxid, N-acetil-muramil-L-treonil-D-izoglutamin (trh-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-izoglutamin (GGP 11 637, amelyet nor-MDP-nek is neveznek), N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-foszforil-oxi)-etil-amin (CGP 19 835A, amelyet MTP-PE-nek is neveznek) és RIBI, amely három komponensből áll, baktériumokból extrahálva: monofoszforil lipid A-ból, trehalóz dimikoláttól és sejtalfalvázból (MPL+TDM+CWS) 2% szkvalén/Tween 80 emulzióban. Egy adjuváns hatékonyságát úgy határozhatjuk meg, hogy mérjük egy HCV-antigén szekvenciát tartalmazó immunogén polipeptid ellen irányuló antitestek mennyiségét, ahol ez ezen polipeptid olyan vakcinákban való beadásának eredménye, amely a különböző adjuvánsokat is tartalmazza.

A vakcinákat alkalmasan parenterálisan, injekció formájában adjuk be, például szubkután vagy intramuszkulárisan. A további kiszerezések között, amelyek alkalmasak a beadás más módjaihoz, találjuk a végbélkúpokat és bizonyos esetekben az orális kiszerezéseket. A végbélkúpoknál a hagyományos kötőanyagok és hordozók között találjuk például a polialkiénglikolokat vagy a triglicerideket; az ilyen végbélkúpokat olyan keverékből alakíthatjuk ki, amelyben az aktív alkotórész 0,5–10% közti tartományban, előnyösen az 1–2% közötti tartományban van. Az orális kiszerezéseknél alkalmazhatjuk a normálisan használt segédanyagokat, például gyógyászati minőségű mannitot, laktózt, keményítőt, magnézium-sztearátot, szacharin-nátriumot, cellulózt, magnézium-karbonátot és hasonlókat. Ezek a kompozíciók oldatok, szuszpenziók, tabletták, pirulák, kapszulák, hosszan tartó kibocsátású kiszerezések vagy porok formáját vehetik fel, és 10–95%, előnyösen 25–70% aktív alkotórészt tartalmaznak.

A fehérjéket a vakcinákban semleges vagy só formájában szerelhetjük ki. A gyógyszerészetileg elfogadható sók között találjuk a savaddíciós sókat (amelyek a peptid szabad aminosavaival képződnek), azokat, amelyek szerves savakkal képződnek, ilyenek például a sósav vagy foszforsav, és azokat, amelyek szerves savakkal képződnek, ilyenek például az oxálsav, borkősav, maleinsav stb. A szabad karboxilcsoporttal képzett sók származhatnak szerves bázisokból, például nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium- vagy vas(III)-hidroxidokból és szerves bázisokból, például izopropilaminból, trimetilaminból, 2-etil-amino-etanolból, hisztidinből, prokainból stb.

#### *A vakcinák adagolása és beadása*

A vakcinákat olyan módon adjuk be, hogy ez illeszkedjék a dózis kiszerezéséhez, és olyan mennyiségben, amely profilaktikusan és/vagy terápiásan hatékony.

A beadandó mennyiség, amely általában 5 mikrogramm és 250 mikrogramm antigén között van adagonként, függ a kezelendő egyéntől, az egyének immunrendszerének kapacitásától antitestek szintetizálására, és a kívánt védelem mértékétől. A beadandó, szükséges aktív alkotórész pontos mennyisége függ a gyakorló orvos megítélésétől, és egyénenként változó.

A vakcinát be lehet adni egyedi dóziskezelési menetben, vagy előnyösen többszörös dóziskezelési menetben. Egy többszörös dóziskezelési menet például olyan, amelyben a vakcinálás első menete 1–10 külön dózisban történik, ezt követik második dózisként ettől eltérő dózisos az ez utáni időközökben, amelyek az immunválasz fenntartásához vagy újraélesztéséhez szükségesek, például 1–4 hónapon át, és ha szükséges, következhetnek még további dózisos több hónap után is. Az adagolási munkamenetet – legalábbis részben – meghatározhatják az egyéni szükségletek, és függenek a gyakorló orvos megítélésétől.

Ezenkívül az immunogén HCV-antigént vagy -antigéneket tartalmazó vakcinát beadhatjuk más immun szabályozó ágensekkel, például immunoglobulinokkal együtt is.

#### *HCV-epitópok elleni antitestek előállítása*

A fentebb leírtak szerint előállított immunogén polipeptideket alkalmazhatjuk mind poliklonális, mind monoklonális antitestek előállítására. Ha poliklonális antitesteket kívánunk, egy kiválasztott emlőst (például egeret, nyulat, kecskét, lovat stb.) immunizálunk valamely, HCV-epitópot vagy -epitópokat hordozó immunogén polipeptiddel. Az immunizált állatból a szérumokat összegyűjtjük, és ismert eljárások szerint kezeljük. Ha egy HCV-epitóp elleni poliklonális antitesteket tartalmazó szérum más antigén elleni antitesteket tartalmaz, a poliklonális antitesteket immun-affinitáskromatográfiával tisztíthatjuk. A poliklonális antiszérumok tisztítására és feldolgozására szolgáló technikák a szakterületen ismertek, lásd például Mager és Walker munkáját (1987).

Egy másik módszer szerint poliklonális antitesteket izolálhatunk olyan emlősből, amelyet előzőleg HCV-vel fertőztünk. Egy későbbi fejezetben adunk példát HCV-epitópok elleni antitestek tisztítására fertőzött egyénekből származó szérumból, az eljárás affinitáskromatográfián alapul, és SOD-fúziós polipeptidet és egy, az 5-1-1. cDNS-klónon belül kódolt polipeptidet hasznosít.

HCV-epitópok ellen irányuló monoklonális antitesteket bárki, aki a szakterületen járatos, könnyen készíthet. Az általános módszertan monoklonális antitestek előállítására hibridómákkal jól ismert. Nem pusztulóvá tett, antitesttermelő sejtvonalakat alakíthatunk ki sejtfúzióval vagy más technikákkal, például B limfociták közvetlen transzformálásával onkogén DNS-sel, vagy Epstein-Barr-vírussal végzett átfertőzéssel [lásd például Schreier M. és munkatársai (1980); Haemmerling és munkatársai (1981); Kennett és munkatársai (1980); a 4,341,761, 4,399,121, 4,427,783, 4,444,887, 4,466,917, 4,472,500, 4,491,632 és 4,493,890 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások]. HCV-epitópok ellen termelt monoklonális antitestek paneljét

különböző tulajdonságokra vizsgálhatjuk át (például izotípus, epitóppaffinitás stb.).

Mind a monoklonális, mind a poliklonális antitestek, amelyek HCV-epitópok ellen irányulnak, különösen hasznosak a diagnózisban, és azok, amelyek semlegesítenek, hasznosak a passzív immunterápiában is. A monoklonális antitesteket különösen előnyösen alkalmazhatjuk antiidiotípus antitestek kiváltására.

Az antiidiotípusos antitestek olyan immunglobulinok, amelyek a fertőző ágens, amely ellen a védelem irányul, antigénjének „belső kép”-ét hordozzák [lásd például Nisonoff A. és munkatársai (1981) és Dreesman és munkatársai (1985)].

Az antiidiotípusos antitestek kiváltásának technikái jól ismertek a szakterületen [lásd például Grzych (1985); MacNamara és munkatársai (1984) és Uytdehaag és munkatársai (1985)]. Ezek az antiidiotípusos antitestek alkalmasak lehetnek NANBH kezelésére, valamint HCV-antigének immunogén területei megvilágítására.

*Diagnosztikus oligonukleotid vizsgálóminták és készletek*

Alapként az izolált HCV bemutatott részleteit alkalmazva, ide értve azokat, amelyeket az 1–32. ábrán mutatunk be, mintegy 8 vagy több nukleotidból álló oligomereket állítunk elő vagy kimetszéssel, vagy szintézissel, amely oligomerek hibridizálnak a HCV-genommal, és alkalmasak a vírusagens vagy -agens azonosítására, a vírusgenom vagy -genomok további jellemzésére, valamint a vírus vagy vírusok kimutatására beteg egyénekből. Ezek a HCV-polinukleotidokhoz szolgáló vizsgálóminták (természetesek vagy származékok) olyan hosszúságúak, hogy hibridizálással lehetséges legyen egy egyedi vírusszekvencia kimutatása. 6–8 nukleotid már munkába fogható hosszúság, 10–12 nukleotid előnyös, és mintegy 20 nukleotid tűnik optimálisnak. Ezek a szekvenciák előnyösen olyan területekből származnak, amelyek nélkülözik a heterogén jelleget. Ezeket a vizsgálómintákat rutin módszereket alkalmazva állíthatjuk elő, ide értve az automatizált oligonukleotidszintézis eljárásait. Az alkalmas vizsgálóminták között találjuk például az 5-1-1. klónt, valamint több, itt ismertetett klónt, továbbá különböző oligomereket, amelyek cDNS-könyvtárak átvizsgálására alkalmasak, ilyeneket a későbbiekben ismertetünk. A komplementaritás a HCV-genom bármely egyedi részére megfelelő lehet. Vizsgálómintaként való alkalmazáshoz teljes komplementaritás kívánatos, bár ez szükségtelen is lehet, amikor a fragmentum hossza megnövekszik.

Abból a célból, hogy az ilyen vizsgálómintákat diagnosztikumként alkalmazhassuk, az analizálandó biológiai mintát, például vért vagy szérumot kezeljük, ha kívánatos, hogy extraháljuk a bennük lévő nukleinsavakat. A mintából származó nukleinsavakat gélelektroforézisnek vagy más méret szerinti elkülönítésnek vetjük alá; egy másik módszer szerint a nukleinsavakat foltként feljuttathatjuk méret szerinti elkülönítés nélkül. A vizsgálómintákat azután jelzéssel látjuk el. A megfelelő jelzések és az eljárások a vizsgálóminták jelzésére ismeretesek a szakterületen, ezek között találjuk például

a radioaktív jelzést, amelyet hézag- (nick) transzlációval vagy kinázos kezeléssel vezetünk be, a biotint, a fluoreszcens vizsgálómintákat és a kemilumineszcens vizsgálómintákat. A mintából kivont nukleinsavakat azután megfelelő szigorúságú hibridizációs körülmények között kezeljük a jelzett vizsgálómintával.

A vizsgálómintákat teljesen komplementerként készíthetjük el a HCV-genomhoz. Ennek megfelelően általában nagy szigorúsági feltételek kívánatosak abból a célból, hogy kizárjuk a hibás pozitív eredményeket. A nagy szigorúságú feltételeket azonban csak akkor alkalmazzuk, ha a vizsgálóminták a vírusgenomnak azon területeivel komplementerek, amelyből hiányzik a heterogenitás. A hibridizálás szigorúságát egy sor tényező határozza meg a hibridizálás során és a mosási munkafolyamat során, beleértve a hőmérsékletet, ionerősséget, időtartamot és formamidkoncentrációt. Ezeket a tényezőket például Maniatis T. (1982) körvonalazza.

Általában várható, hogy a HCV-genom szekvenciák a fertőzött egyének szérumban viszonylag alacsony szinten vannak jelen; ez mintegy  $10^2$ – $10^3$  szekvenция/ml. Ez a szint szükségessé teheti, hogy sokszorozási technikákat alkalmazzunk a hibridizációs vizsgálatokban. Az ilyen technikák a szakterületen ismertek. Így például az Enzo Biochemical Corporation „Bio-Bridge” rendszere terminális dezoxinukleotid transzferázt alkalmaz, hogy nem módosított 3'-poli-dT-farkakat adjon egy DNS-vizsgálómintához. A poli-dT-farokkal ellátott vizsgálóminta hibridizál a cél-nukleotidszekvenciához, majd egy biotinnal módosított poli-A-hoz. A 124 221 számú közzétett európai szabadalmi bejelentés olyan DNS-hibridizációs vizsgálatot ír le, amelyben: (1) az elemzendő anyagot egy olyan egyszálú DNS-vizsgálómintához kötik, amely komplementer egy enzimmal jelzett oligonukleotiddal; és (2) az így létrejövő, farkkal ellátott duplexet egy enzimmal jelzett oligonukleotidhoz hibridizálják. A 204 510 számú európai szabadalmi bejelentés olyan DNS-hibridizációs vizsgálatot ír le, amelyben a vizsgálandó DNS-t egy olyan vizsgálómintával hozzuk érintkezésbe, amelynek farka, például poli-dT farka és egy sokszorozószála van, amelynek olyan szekvenciája van, amely hibridizál a vizsgálóminta farkához, például poli-A-szekvencia, és amely képes a jelzett szála többségéhez kötődni. Egy különösen alkalmas technika először magában foglalhatja a cél HCV-szekvenciák sokszorozását a szérumban mintegy 10 000-szeresre, vagyis mintegy  $10^6$  szekvenция/ml-re. Ez kivihető például Saiki és munkatársai technikájával (1986). A sokszorozott szekvenciákat azután hibridizálási vizsgálatot alkalmazva mutathatjuk ki. Ez a hibridizációs vizsgálat, amely kimutathatja a szekvenciákat  $10^6$ /ml szinten, olyan nukleinsav-multimereket alkalmaz, amelyek egy egyszálú vizsgálandó nukleinsavhoz kötődnek, és amelyek kötődnek egyszálú jelzett oligonukleotidok sokaságához is. Egy megfelelő oldatfázisú szendvicsvizsgálat, amelyet alkalmazhatunk a jelzett polinukleotid vizsgálómintákkal, és eljárások az ilyen vizsgálóminták előállítására a 225 807 számú európai szabadalmi közzétételi iratban vannak leírva; ezt a bejelentést is a jelen bejelentés

bejelentői nyújtották be, és ez ebbe a bejelentésbe referenciaként épül be.

A vizsgálóminták diagnosztikus készletekbe lehetnek csomagolva. A diagnosztikus készletek tartalmazhatják a vizsgálóminta DNS-t, amely jelezve lehet; egy másik eljárás szerint a vizsgálóminta DNS jelzetlen, és a jelzéshez szükséges alkotórészek a készletben találhatóak. A készlet tartalmazhat más alkalmasan becsomagolt reagenseket és anyagokat is, amelyek a szóban forgó hibridizációs munkamenethez szükségesek, például standardok, valamint útmutatások a vizsgálat kivitelezésére.

#### *Immunszé és diagnosztikus készletek*

Mindkét polipeptid, amely immunológiailag reagál a HCV-antitesteket tartalmazó szérummal, például azokkal az antitestekkel, amelyek a továbbiakban leírt klónokból származnak, vagy azon belül kódolódnak, vagy ezek származékaival és azokkal az antitestekkel, amelyek az ezekben a polipeptidekben lévő HCV-fajlagos epitópok ellen alakulnak ki, alkalmazható immunszékekben HCV-antitestek jelenlétének kimutatására, vagy a vírus és/vagy vírusantigének kimutatására biológiai mintákban is, ide értve a vér- vagy szérummintákat. Az immunszékek tervezésében sokféle változat érvényesülhet, ezek a szakterületen jól ismertek. Így például alkalmazhatunk egy vírusantigént, például egy olyan polipeptidet, amely a későbbiekben leírt HCV cDNS-t tartalmazó klónok bármelyikéből származó polipeptid, vagy abból a HCV-genomból származó polipeptid, amely genomból a cDNS ezekben a klónokban származik; egy másik módszer szerint az immunszé az ezekben a forrásokból származó vírusantigének kombinációját alkalmazhatja. Lehet alkalmazni például olyan monoklonális antitestet, amely egy vírusepitóp vagy -epitópok ellen irányul; egy vírusantigén ellen irányuló monoklonális antitestek kombinációját; azonos vírusantigén ellen irányuló poliklonális antitesteket, vagy eltérő vírusantigének ellen irányuló poliklonális antitesteket. A munkamenet alapulhat például versengésen, vagy közvetlen reakción vagy szendvics típusú vizsgálatokon. A munkamenetek alkalmazhatnak például szilárd rögzítőanyagokat is vagy végezhető a vizsgálat immunkscapással is. A legtöbb vizsgálat magában foglalja jelzett antitest vagy polipeptid alkalmazását; a jelzés lehet például fluoreszcens, kemilumineszcens, radioaktív, vagy festékmolekula. Ismeretesek olyan vizsgálatok is, amelyekben a vizsgálómintából származó szignálok sokszorozva vannak, ilyenekre példák azok a vizsgálatok, amelyek biotint vagy avidint alkalmaznak, valamint az enzimjelzett és enzimközvetített immunszékek, mint például az ELISA-vizsgálatok.

A HCV Flavivírusmodellje lehetővé teszi a becsléseket a diagnosztikus epitópok valószínű elhelyezkedését illetően a virion szerkezeti fehérjéknél. A C-, pre-M- és E-tartományok valószínűleg mind tartalmaznak vírusantigének kimutatására jelentős potenciállal bíró epitópokat, amelyek elsősorban diagnózis céljára szolgálhatnak. Hasonlóképpen a nem szerkezeti fehérjék tartományainál is elvárható, hogy tartalmazzanak fontos diagnosztikus epitópokat (például NS5, amely egy vélt polimerázt kódol, és NS1, amely egy vélt komplement-

kötő antigént kódol). Azok a rekombináns polipeptidek vagy víruspolipeptidek, amelyek epitópokat foglalnak magukban ezekből a fajlagos tartományokból, alkalmassak lehetnek vírusantitestek kimutatására véradoók vagy fertőzött betegek vérében.

Ezenkívül az E- és/vagy M-fehérjék ellen irányuló antitesteket alkalmazhatjuk vírusantigének kimutatására szolgáló immunesszékekben olyan betegeknél, akik HCV által okozott NANBH-ban szenvednek, vagy véradoóknál a fertőzés kimutatására. Ezenkívül ezek az antitestek különösen hasznosak akut fázisban lévő donorok és betegek kimutatására.

Olyan készleteket, amelyek immundiagnózishoz alkalmasak, és tartalmazzák a megfelelő jelzett reagenseket, konstruálhatunk a megfelelő anyagok megfelelő csomagolásával megfelelő tárolóedényekbe, beleértve a jelen találmány szerinti polipeptideket, amelyek HCV-epitópokat tartalmaznak, vagy olyan antitesteket, amelyek HCV-epitópok ellen irányulnak, a további reagensekkel és anyagokkal együtt, amelyek a vizsgálat kivitelezéséhez szükségesek, valamint a vizsgálati instrukciók megfelelő leírásával együtt.

*A HCV-genom, virionok és vírusantigének további jellemzése a vírusgenomhoz tartozó cDNS-ből származó vizsgálómintákat alkalmazva*

A HCV cDNS-szekvencia információkat, amelyek a későbbiekben ismertetett klónokban és az 1–32. ábrákon található, alkalmazhatjuk további információk gyűjtésére a HCV-genom szekvenciájával kapcsolatban, valamint a HCV-agens azonosításához és izolálásához, így ezek segítséget nyújthatnak a jellemzéshez, beleértve a genom természetét, a vírusrészcsekék szerkezetét, és azoknak az antigéneknek a szerkezetét, amelyekből ezek össze vannak állítva. Ezek az információk viszont további polinukleotid vizsgálómintákhoz, HCV-genomból származó polipeptidekhez és HCV-epitópok ellen irányuló olyan antitestekhez vezethetnek, amelyek alkalmasak lehetnek a HCV által okozott NANBH diagnózisához és/vagy kezeléséhez.

A fentebb említett klónokban lévő cDNS-szekvencia információk alkalmasak vizsgálóminták tervezésére további cDNS-szekvenciák izolálására, amelyek annak a HCV-genomnak vagy genomnak még nem definiált területeiből származnak, amelyekből a klónokban lévő cDNS-ek származnak. Így például mintegy 8 vagy több nukleotidot, előnyösen 20 vagy több nukleotidot, amelyek az 1., 3., 6., 9., 14. és 32. ábrákon bemutatott HCV cDNS-szekvenciák családjának 5'-terminálásához vagy 3'-terminálásához közeli területből származnak, tartalmazó szekvenciát tartalmazó jelzett vizsgálómintákat alkalmazhatunk átfedő cDNS-szekvenciák izolálására HCV cDNS-könyvtárakból. Ezek a szekvenciák, amelyek a cDNS-eket átfedik a fentebb említett klónokban, de amelyek olyan szekvenciákat is tartalmaznak, amelyek azokból a genomterületekből erednek, amelyekből cDNS-ek a fentebb említett klónokban nem származnak, alkalmazhatók ezután vizsgálóminták szintéziséhez más, olyan átfedőfragmentumok izolálásához, amelyek nem szükségszerűen fedik át a klónokban lévő cDNS-eket. Hacsak a HCV-genom nincs szegmentálva, és a szeg-

mensekből hiányoznak a közös szekvenciák, lehetséges a teljes vírusgenom vagy -genomok szekvencia-elemzése a vírusgenomból vagy -genomokból származó átfedő cDNS-ek izolálásának technikáját alkalmazva. Bár ez nem valószínű, ha a genom olyan szegmensekből álló genom, amelyekből hiányoznak a közös szekvenciák, a genom szekvenciáját úgy határozhatjuk meg, hogy lambda-gt11 HCV cDNS-könyvtárat szerológiai módszerekkel vizsgáljuk át, amint ezt az 5-1-1. klón izolálásánál alkalmazzuk, a cDNS-izolátumokat szekvenciaelemzésnek vetjük alá, és az izolált cDNS-eket alkalmazzuk átfedőfragmentumok izolálására azt a technikát alkalmazva, amelyet a klónok izolálására és szekvenciaelemzésére írunk le. Az izolált genomsekvenciákat azután klónozzhatjuk, és szekvenciájukat elemezhetjük. Így az itt nyújtott információval lehet a HCV-genomot vagy -genomokat klónozni, és szekvenciájukat elemezni természetüktől függetlenül.

A cDNS-könyvtárak megalkotásának eljárásai ismeretesek a szakterületen, ezeket tárgyaltuk a korábbiakban is, és tárgyaljuk a későbbiekben is (lásd például a HCV cDNS-könyvtárak megalkotására szolgáló egyik eljárást). A cDNS-könyvtárak azonban, amelyek alkalmasak nukleinsav vizsgálóminták átvizsgálására, megalkothatók más, a szakterületen ismert vektorokban is, például lambda-gt10-ben [Huynh és munkatársai (1985)]. Az 1–32. ábrákon lévő cDNS-ekből származó, vizsgálómintákkal kimutatott, és az ezekből a cDNS-ekből származó polinukleotidokból szintetizált vizsgálómintákból eredő HCV-eredetű cDNS-t a klónból izolálhatjuk az izolált polinukleotid emésztésével megfelelő restriktációs enzimmel vagy enzimekkel, majd szekvenciaelemzésnek vethetjük alá. A továbbiakban módszereket ismertetünk azoknak a HCV cDNS-eknek az izolálására és szekvenciaelemzésére alkalmazott technikákkal kapcsolatban, amelyek átfednek HCV cDNS-t az 5-1-1. klónban; azoknak a HCV cDNS-eknek az izolálására és szekvenciaelemzésére alkalmazott technikákkal kapcsolatban, amelyek átfednek HCV cDNS-t a 81. klónban; és egy olyan klón izolálásával és szekvenciaelemzésével kapcsolatban, amely egy másik olyan klónt (36. klón) fed át, amely a 81. klónt fedi át.

Az ezekből az átfedő HCV cDNS-ekből eredő szekvenciainformációk alkalmasak a vírusgenomon vagy -genomokon belül a homológia és heterogenitás területeinek meghatározására, amelyek jelezhetik a genom különböző törzseinek jelenlétét, és/vagy a hiányos részecsek populációjának jelenlétét. Ez alkalmas hibridizációs vizsgálóminták tervezésére is HCV- vagy HCV-antigének, vagy HCV-nukleinsavak kimutatására biológiai mintákban, és a HCV izolálása során (amelyet később tárgyalunk). Ezenkívül az átfedő cDNS-eket alkalmazhatjuk kifejezővektorok megalkotására olyan HCV-genomból vagy -genomokból származó polipeptidekhez, amely genomok az 5-1-1., 36., 81., 91. és 1-2. klónokban, és más klónokban kódolt polipeptideket is kódolnak. Az ezeknek a HCV-epitópokat tartalmazó polipeptideknek megalkotására szolgáló technikák, valamint az ezeken belül található HCV-epitópok ellen irányuló antitestekhez szolgáló technikák, valamint ezek alkalmazá-

sai analógok azzal, amelyet az 5-1-1., 32., 35., 36., 1-2., 81. és 91. klónokon belül található NANBV cDNS-szekvenciákból származó polipeptideknél leírunk, és a korábbiakban tárgyaltunk, vagy a későbbiekben tárgyaltunk.

Az 5-1-1., 32., 35., 36., 81., 91., 1-2. és más klónokban található cDNS-szekvenciáján belül kódolva vannak olyan építőpot tartalmazó antigének, amelyek egyedinek tűnnek HCV-re; vagyis azok az antitestek, amelyek ezek ellen az antigének ellen irányulnak, hiányoznak azokból az egyénekből, amelyek HAV-val vagy HBV-vel vannak fertőzve, valamint azokból az egyénekből, akik nincsenek HCV-vel fertőzve (lásd a szerológiai adatokat). Sőt ezen cDNS-ek szekvencia-információjának összehasonlítása a HAV-, HBV-, HDV-szekvenciákkal és a Genebankban lévő szekvenciákkal azt is jelzi, hogy csak minimális homológia létezik ezek között a cDNS-ek és a fenti forrásokból származó polinukleotidszekvenciák között. Így a jelen klónok cDNS-ein belül kódolt antigének ellen irányuló antitestek alkalmazhatók fertőzött egyénekből izolált BB-NANBV-részecskék izolálására. Ezenkívül ezek alkalmasak az NABH-ágensek izolálására is.

HCV-részecskéket izolálhatunk BB-NANBV-vel fertőzött egyének szérumaiból vagy sejtenyészetekből a szakterületen ismert bármely eljárással, ide számítva például a méretelkülönítésen alapuló technikákat, például az ülepitési vagy kizárásos eljárásokat, vagy a sűrűségeen alapuló technikákat, például az ultracentrifugálást sűrűséggradiensben vagy a kicsapást bizonyos szerekkel, például polietilén-glikollal, vagy a kromatográfiát különböző anyagokon, például anion- vagy kationcserélő anyagokon, és olyan anyagokon, amelyek hidrofobicitás alapján kötnek, valamint affinitásoszlopon. Az izolálási eljárás során a HCV jelenlétét az extrahált genom hibridizációs elemzésével mutathatjuk ki, olyan vizsgálómintákat alkalmazva, amelyek a fentebb leírt HCV cDNS-ekből származnak, vagy immunesszé-vel, vizsgálómintaként olyan antitesteket alkalmazva, amelyek az 1-32. ábrákon bemutatott cDNS-szekvenciák családján belül kódolt HCV-antigének ellen irányulnak, vagy amelyek a fentebb tárgyalt átfedő HCV cDNS-szekvenciákon belül kódolt HCV-antigének ellen irányulnak. Az antitestek lehetnek monoklonálisok vagy poliklonálisok, és kívánatos lehet az antitestek megtisztítása felhasználásuk előtt. Az 5-1-1. klónon belül kódolt antigén vagy antigének ellen irányuló poliklonális antitestek tisztítási munkamenetét a következőkben írjuk le; analóg tisztítási eljárásokat alkalmazhatunk más HCV-antigének ellen irányuló antitestekhez.

Az 1-32. példákban bemutatott, cDNS-ek családján belül kódolt HCV-antigének ellen, valamint az átfedő HCV cDNS-eken belül kódolt antigének ellen irányuló antitestek, amelyek szilárd támasztóanyaghoz vannak rögzítve, alkalmasak a HCV izolálásához immunaffinitás-kromatográfiával. Az immunaffinitás-kromatográfiához szolgáló technikák ismeretesek azok számára, akik a szakterületen jártasak, ide értve az antitestek rögzítését szilárd támasztóanyagra úgy, hogy megtartsák immunselektív aktivitásukat; ezek a technikák lehetnek

olyanok, amelyekben az antitestek adszorbeálva vannak a támasztóanyagra (lásd például Kurstak és munkatársai: ENZYME IMMUNDIAGNOSIS, 31-37. oldal), valamint olyanok, amelyekben az antitestek kovalensen vannak kötve a támasztóanyaghoz. Általában ezek a technikák hasonlóak azokhoz a technikákhoz, amelyeket antigének kovalens kapcsolásához alkalmaznak szilárd támasztóanyaghoz; a bifunkcionális kapcsolóágensekben azonban térközbiztosító (spacer) csoportok is lehetnek jelen, hogy az antitest antigén kötőhelye hozzáférhető maradjon.

A tisztítási munkamenet során a HCV jelenlétét nukleinsavhibridizálással mutathatjuk ki és/vagy igazolhatjuk, vizsgálómintaként az 1-32. ábrákon bemutatott HCV cDNS-szekvenciák családjából származó, valamint a fentebb leírt átfedő HCV cDNS-szekvenciákból származó polinukleotidokat alkalmazva. Ebben az esetben a frakciókat olyan körülmények között kezeljük, amelyek a vírusrészecskék szétzúzását idézik elő, például detergensszel keltaképző szerek jelenlétében, és a vírusnukleinsavak jelenlétét a hibridizációs technikával határozzuk meg. Annak további igazolását, hogy az izolált részecskék azok az ágensek, amelyek HCV-t indukálnak, megkaphatjuk csimpánzok fertőzésével az izolált vírusrészecskékkel, amelyet annak meghatározása követ, vajon az NANBH tünetei a fertőzésből erednek-e.

A tisztított készítményekből való vírusrészecskéket azután tovább jellemezhetjük. A genom nukleinsavat tisztítjuk. RN-ázra való érzékenysége és DN-áz I-re való érzéketlensége alapján úgy tűnik, hogy a vírus RNS genomából áll. Az összefonódottságot és kör alakba szervezethez vagy kör alakba nem szervezethez olyan technikákkal határozhatjuk meg, amelyek a szakterületen ismertek, ilyenek például ennek megjelenítése elektronmikroszkópiával, ennek vándorlása sűrűséggradiensben, és ennek ülepedési jellemzői. A befogott HCV-genom hibridizálása alapján a HCV cDNS-ek negatív számaihoz úgy tűnik, hogy a HCV egy pozitív szálú RNS genomából állhat. Ezek olyan technikák, amelyeket például a METHODS IN ENZYMOLOGY című sorozatban ismertetnek. Ezenkívül a tisztított nukleinsavakat klónozzhatjuk, és szekvenciájukat elemezhetjük ismert technikákkal, ide értve a reverz transzkripciót, mivel a genomanyag RNS [lásd például Maniatis (1982) és Glover (1985)]. A vírusrészecskékből származó nukleinsavakat alkalmazva lehetséges a teljes genom szekvenálása, akár szegmentálva van, akár nincs.

A 14i.-39c. kombinált klónok (lásd 26. ábra) folyamatos ORF-jein belül kódolt polipeptid homológiájának vizsgálata azt mutatja, hogy a HCV-polipeptid homológiaterületeket tartalmaz a Flavivírusok megőrzött területeiben lévő megfelelő fehérjékkel. Ez a felfedezés nagyon fontos következményekkel jár. Először ez a bizonyíték azokkal az eredményekkel együtt, amelyek azt mutatják, hogy a HCV pozitív szálú genomot tartalmaz, amelynek mérete mintegy 10000 nukleotid, egybevégezve azzal a sejtéssel, hogy a HCV Flavivírus vagy Flavivirális vírus. A Flavivírus-virionok és genomjaik viszonylag következetes szerkezettel és szerveződéssel bírnak, amelyek ismertek [lásd Rice és munkatársai (1980) és

Brinton M. A. (1988)]. Így a C-, pre-M/M és E-poli-peptideket kódoló struktúrgének a genom 5'-terminálisában helyezkedhetnek el a 14i. klóntól fölfelé. Ezenkívül az összehasonlítást alkalmazva más Flavivírusokkal, előre jelezhetjük az ezeket a fehérjéket kódoló szekvenciák pontos elhelyezkedését.

A 14i. klónban lévő szekvenciáktól fölfelé lévő szekvenciák izolálását sokféle módon végezhetjük, amelyek az itt megadott információk alapján nyilvánvalóak azok számára, akik a szakterületen jártasak. Így például a genom-„sétáltatási” technikát alkalmazhatjuk további szekvenciák izolálására, amelyek 5'-irányban vannak a 14i. klónban lévő szekvenciáktól, de amelyek átfedik ezt a klónt; ez viszont további szekvenciák izolálásához vezet. Ezt a technikát a későbbiekben bőségesen demonstráljuk. Ismeretes például az is, hogy a Flavivírusoknak vannak megőrzött építőpajuk, és megőrzött nukleinsavszekvenciák területeivel is rendelkeznek. A megőrzött szekvenciákat tartalmazó polinukleotidokat olyan vizsgálómintaként alkalmazhatjuk, amelyek a HCV-genomhoz kötődnek, így lehetővé válik izolálása. Ezenkívül ezeket a megőrzött szekvenciákat azokkal együtt, amelyek a 22. ábrán bemutatott HCV cDNS-ből származnak, alkalmazhatjuk primerek tervezésére olyan rendszerekben való felhasználásra, amelyek sokszorozzák a 14i. klónban lévő szekvenciáktól fölfelé lévő genomszekvenciákat, a polimerázláncreakció-technológiát alkalmazva. Erre a későbbiekben adunk példát.

A HCV szerkezetét is meghatározhatjuk, és komponenseiket izolálhatjuk. A morfológiát és méretét meghatározhatjuk például elektronmikroszkópiával. A fajlagos víruspolipeptid-antigének, például a burkolati vagy „boríték”-antigének vagy belül lévő antigének, mint például nukleinsavkötő fehérjék, belső (mag) antigének és polinukleotid polimerázok azonosítása és elhelyezkedése szintén meghatározható például azt meghatározva, vajon az antigének nagyobb vagy kisebb víruskomponensekként vannak-e jelen, vagy olyan antitesteket alkalmazva vizsgálómintaként, amelyek az izolált cDNS-eken belül kódolt fajlagos antigének ellen irányulnak. Ez az információ hasznos vakcinák tervezésében, így például előnyös, ha külső antigén található egy vakcinakészítményben. Multivalens vakcinák tartalmazhatnak egy szerkezeti fehérjét, például E-fehérjét kódoló genomból származó polipeptidet, valamint a genom egy másik részéből való polipeptidet, például valamely szerkezeti vagy nem szerkezeti polipeptidet.

#### *Sejttenyésztő rendszerek és állatimodell-rendszerek HCV replikációjához*

Az a feltételezés, hogy a HCV Flavivírus vagy Flaviszzerű vírus információkat nyújt a HCV növesztésének eljárásaira is. A „Flaviszzerű” kifejezés azt jelenti, hogy a vírus jelentős mennyiségű homológiát mutat a Flavivírusok ismert megőrzött területeivel, és hogy a genomok többsége egy egyedi ORF. A Flavivírusok tenyésztésére szolgáló eljárások ismertek azok számára, akik a szakterületen jártasak [lásd például Brinton (1986) és Stollar V. (1980) összefoglaló munkáit]. Általában a HCV tenyésztéséhez megfelelő sejtek és sejtvonalak között találjuk azokat, amelyekről ismert,

hogy elősegítik a Flavivírusok replikációját, ilyenek például az alábbiak: majomvese-sejtvonalak (például MK<sub>2</sub>, VERO), sertésvese-sejtvonalak (például PS), hörcsögújszülöttvese-sejtvonalak (például BHK), rágcsáló makrofág sejtvonalak (például P388D1, MK1, Mm1), humán makrofág sejtvonalak (például U-397), humán perifériás vérleukociták, humán tapadó monociták, hepatociták vagy hepatocita-sejtvonalak (például HUH7, HEPG2), embriók vagy embrionális sejtek (például csirkeembrió-fibroblasztok), vagy gerinctelenekből származó sejtvonalak, elsősorban rovarokból származó sejtvonalak (például *Drosophila* sejtvonalak), vagy még előnyösebben izeltlábúakból származó sejtvonalak, például szúnyog (*A. albopictus*, *Aedes aegypti*, *Cutex tritaeniorhynchus*) sejtvonalak, vagy kullancs- (például RML-14 *Dermacentor parumaper-tus*) sejtvonalak.

Lehetséges primer hepatocitákat tenyésztetni, majd HCV-vel fertőzni, vagy egy másik módszer szerint a hepatocitatenyésztetek származhatnak a fertőzött egyének (például emberek vagy csimpánzok) májából. Az utóbbi eset olyan sejtekre példa, amelyek *in vivo* vannak fertőzve, és *in vitro* passzálva. Ezenkívül különböző nem pusztulóvá tételi eljárásokat is alkalmazhatunk, hogy olyan sejtvonalakat kapjunk, amelyek hepatocitatenyésztetekből származnak. Így például primer májtenyészteteket (a hepatocita populáció dúsítása előtt és után) fuzionálhatunk különféle sejtekkel, hogy fenntartsuk a stabilitást. Így például tenyészteteket fertőzhetünk transzformáló vírusokkal, vagy fertőzhetünk transzformáló génekkel abból a célból, hogy állandó vagy félig állandó sejtvonalakat kapjunk. Ezenkívül például májtenyésztetekben lévő sejteket fuzionálhatunk, hogy megalapozott sejtvonalakat kapjunk (például HepG2). A sejtfúzió eljárásai ismeretesek azok számára, akik a szakterületen jártasak, ezek között találjuk például fúziós ágensek, például polietilénlikol, Sendai-vírus és Epstein-Barr-vírus alkalmazását.

Amint fentebb tárgyaltuk, a HCV Flavivírus vagy Flaviszzerű vírus. Ennek megfelelően valószínű, hogy a sejtvonalak HCV-fertőzését olyan technikákkal valósíthatjuk meg, amelyek a szakterületen ismertek Flavivírusokkal való sejtfertőzésre. Ezek között találjuk például a sejtek inkubálását víruskészítményekkel olyan körülmények között, amely lehetővé teszi a vírus belépését a sejtbe. Ezenkívül lehet vírustermelést előidézni a sejtek transzformálásával izolált víruspolinukleotidokkal. Ismeretes, hogy a Togavírus és Flavivírus RNS-ek fertőzőek sokféle gerinces sejtvonalban [Pfefferkorn és Shapiro (1974)], és szúnyogsejtvonalban [Peleg (1969)]. Az eljárások szövettanészet sejteinek fertőzésére RNS-duplexekkel, pozitív szálú RNS-ekkel és DNS-ekkel (ide értve a cDNS-eket is) ismeretesek a szakterületen, ezek között találjuk például azokat a technikákat, amelyek elektroporációt alkalmaznak, vagy azokat, amelyek kicsapást tartalmaznak DEAE-dextránnal vagy kalcium-foszfáttal. A HCV RNS bőséges forrását kaphatjuk meg a komplett genomnak megfelelő HCV cDNS *in vitro* átírásainak kivitelezésével. Az átfertőzés ezzel az anyaggal vagy klónozott HCV

cDNS-sel virális replikációt és a vírus in vitro szaporítását eredményezheti.

A tenyésztett sejteken kívül állatimodell-rendszereket is alkalmazhatunk vírusreplikációhoz; azok az állati rendszerek, amelyekben a Flavivírusok tenyésznek, ismeretesek azok számára, akik a szakterületen jártasak [lásd például Monath összefoglaló munkáját (1986)]. Így a HCV-replikáció nem csupán csimpánzokban lehet végbe, hanem például selyemmajomban és szopós egerekben is.

#### *Vírusellenes ágensek átvizsgálása HCV-re*

A sejtenyészetek és állatimodell-rendszerek hozzáférhetősége HCV-re lehetővé teszi olyan vírusellenes szerek átvizsgálását is, amelyek gátolják a HCV-replikációt, és főleg olyan szerek átvizsgálását, amelyek előnyösen lehetővé teszik a sejtnövekedést és -sokszorozódást, miközben gátolják a vírusreplikációt. Ezek az átvizsgálási módszerek ismeretesek azok számára, akik a szakterületen járatosak. Általában a vírusellenes szereket különböző koncentrációkban vizsgáljuk egyrészt a vírusreplikáció megelőzésére kifejtett hatásukra sejtenyésztes rendszerekben, amelyek elősegítik a vírusreplikációt, majd a fertőzőképesség és a víruspatogenitás (és az alacsony szintű toxicitás) gátlására állatimodell-rendszerekben.

Az itt HCV-antigének és HCV-polinukleotidok kimutatására nyújtott eljárások és kompozíciók alkalmasak vírusellenes szerek átvizsgálására is, amennyiben ezek egy másik és talán érzékenyebb eszközt nyújtanak az ágens hatásának kimutatására a vírusreplikációra, mint a sejttartóvizsgálat és az ID<sub>50</sub>-vizsgálat. Így például az itt leírt HCV-polinukleotid vizsgálóminták alkalmazhatók egy sejtenyésztesben termelt vírus nukleinsav mennyiségének mérésére. Ezt például a fertőzött sejt nukleinsavak hibridizálásával vagy versengő hibridizálásával hajthatjuk végre egy jelzett HCV-polinukleotid vizsgálómintával. Így például anti-HCV-antitesteket alkalmazhatunk HCV-antigén vagy -antigének azonosítására sejtenyésztesekben az itt leírt immunesszét alkalmazva. Ezenkívül, mivel kívánatos lehet HCV-antigének mennyiségének mérése fertőzött sejtekben versengő vizsgálattal, az itt leírt HCV cDNS-eken belül kódolt polipeptidek alkalmasak ezekben a versengő vizsgálatokban. Általában a HCV cDNS-ből származó rekombináns HCV-polipeptid jelezve lehet, és ezen jelzett polipeptid egy HCV-polipeptidhez való kötésének gátlását, amely a sejtenyésztes rendszerben termelt antigénnek tulajdonítható, követhetjük. Ezenkívül ezek a technikák különösen hasznosak azokban az esetekben, ahol a HCV-képes lehet replikálódni egy sejtvonalban anélkül, hogy a sejt pusztulását okozná.

#### *Általános módszerek*

A genomnak a vírustól való kivonásában, egy cDNS-könyvtár előállításában és átvizsgálásában, klónok szekvenciaelemzésében, kifejezővektorok megalkotásában, sejtek transzformálásában, immunológiai vizsgálatok, például radioimmunszé és ELISA-vizsgálatok kivitelezésében, sejtek tenyésztésében való növesztésében stb. alkalmazott általános technikák ismeretesek a szakterületen, és számos laboratóriumi kézikönyv áll rendelkezésre, amely ezeket a technikákat leírja. Általános vezérfonalként azonban az alábbiakban ismertetünk néhány forrást, amely az ilyen munkamenetekhez rendelkezésre áll, és bizonyos anyagokat, amelyek ezek kivitelezéséhez alkalmazhatók.

5

#### *Gazdaszervezetek és kifejező szabályozószekvenciák*

Mind prokarióta, mind eukarióta gazdasejteket alkalmazhatunk kívánt kódolószekvenciák kifejeződéséhez, amikor megfelelő szabályozószekvenciákat, amelyek összeférhetők a tervezett gazdaszervezettel, alkalmazunk. A prokarióta gazdaszervezetek közül az *E. coli*-t alkalmazzuk a leggyakrabban. A prokariótákhoz alkalmazott kifejezést szabályozószekvenciák között találjuk a promotorkat, amelyek kívánt esetben operátorrészeket tartalmaznak, és riboszómakötő helyeket. A prokarióta gazdaszervezetekkel összeférhető transzfer vektorok általában például a pBR322-ből származnak, amely ampicillin- és tetraciklinrezisztenciát átadó operonokat tartalmazó plazmid, vagy a pUC-vektorokból származnak, amelyek szintén tartalmaznak antibiotikum rezisztencia markereket átadó szekvenciákat. Ezeket a markereket alkalmazhatjuk a sikeres transzformánsok kinyerésére szelekció révén. Az általánosan alkalmazott prokarióta szabályozószekvenciák között 25 találjuk a béta-laktamáz (penicillináz) és laktózpromotor-rendszereket [Chang és munkatársai (1977)], a triptofán (*trp*) promotor rendszert [Goeddel és munkatársai (1980)], a lambda eredetű P<sub>L</sub>-promotort és N-gén riboszómakötő helyet [Shimatake és munkatársai (1981)] és a hibrid *tac* promotort [De Boer és munkatársai (1983)], amely a *trp* és *lac* UVS-promotorok szekvenciáiból származik. A felsorolt rendszerek különösen összeférhetők *E. coli*-val; ha szükséges, más prokarióta gazdaszervezeteket is alkalmazhatunk, például *Bacillus* vagy *Pseudomonas* törzseket, megfelelő szabályozószekvenciákkal.

Az eukarióta gazdaszervezetek magukban foglalják az élesztőket és emlőssejteket tenyésztőrendszerekben. A *Saccharomyces cerevisiae* és a *Saccharomyces carlsbergensis* a leggyakrabban alkalmazott élesztő-gazdaszervezetek és alkalmas gomba-gazdaszervezetek. Az élesztővel összeférhető vektorok alkalmazhatják a 2 mikronos replikációs origót [Broach és munkatársai (1983)], a CEN3 és ARS1 kombinációját, vagy más olyan eszközöket, amelyek replikációt biztosítanak, például olyan szekvenciákat, amelyek egy megfelelő fragmentum beépülését eredményezik a gazdasejt genomba. Az élesztővektorokhoz való szabályozóvektorok ismeretesek a szakterületen, ezek közé tartoznak a glikolitikus enzimek szintéziséhez tartozó promotorkat [Hess és munkatársai (1968); Holland és munkatársai (1978)], közöttük a 3-foszfoglicerát kináz [Hitzeman (1980)]. Terminátorok is értendők ide, például azok, amelyek az enolázgénből származnak [Holland (1981)]. Különösen alkalmas kontrollrendszerek azok, amelyek a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) promotort vagy alkohol dehidrogenáz (ADH) szabályozható promotort tartalmaznak; terminátorokat, amelyek szintén a GAPDH-ből származnak, és ha kiválasztás kívánatos, vezetőszekvenciákat 60 élesztő alfa-faktorból. Ezenkívül az átírásszabályozó te-

ület és az átírás-beindító terület, amelyek működőképesen kapcsolódnak, olyanok lehetnek, amelyek a természetben nem kapcsolódnak össze vad típusú mikroorganizmusokban. Ilyen rendszereket ír le részletesen a 120,511 számú európai szabadalmi közzétételi irat, az EPO 116,201 számú európai szabadalmi közzétételi irat és az EPO 164,556 számú európai szabadalmi közzétételi irat; ezeket mind a jelen találmány bejelentői jelentették be, és a jelen bejelentésbe referenciaként épülnek be.

A kifejezéshez gazdaszervezetként rendelkezésre álló emlőssejtvonalak ismeretese a szakterületen, ezek között találunk sok nem pusztulóvá tett sejtvonalat, amelyek az American Type Culture Collectionnál (ATCC) rendelkezésre állnak, ilyenek a HeLa sejtek, kínaihörcsögpetefészek- (CHO) sejtek, újszülöthörcsögvese- (BHK) sejtek, és egy sor más sejtvonal. Az emlőssejtekhez való alkalmas promotorkok a szakterületen szintén ismeretese, ezek között találunk víruspromotorokat, például a Simian Vírus 40-ből (SV40) [Fiers (1978)], Rous-szarkómavírusból (RSV), adenovírusból (ADV) és szarvasmarhapapillómavírusból (BPV) való promotorkokat. Az emlőssejtek igényelhetnek terminátorszekvenciákat és poli-A hozzátett szekvenciákat; fokozószekvenciák, amelyek növelik a kifejeződést, szintén lehetnek bennük, továbbá kívánatosak lehetnek olyan szekvenciák is, amelyek a gén sokszorozását idézik elő. Ezek a szekvenciák a szakterületen ismeretese. Az emlőssejtekben való replikációhoz alkalmas vektorok között lehetnek vírusreplikonok vagy olyan szekvenciák, amelyek biztosítják az NANBV-epitópokat kódoló megfelelő szekvenciák integrálását a gazdaszervezet genomába.

#### *Transzformálások*

A transzformálás történhet bármely ismert eljárással, amely polinukleotidok bevezetésére szolgál valamely gazdasejtbe; ilyen eljárások például a polinukleotid „becsomagolása” valamely vírusba és valamely gazdasejt átfertőzése a vírussal, vagy a polinukleotid közvetlen felvétele. Az alkalmazott transzformálási munkamenet függ a transzformálandó gazdaszervezettől. Így például az E. coli gazdasejtek transzformálását a BB–NANBV-szekvenciákat tartalmazó lambda–gt11-gyel a példák között tárgyaljuk. A baktériumok transzformálása közvetlen felvétellel általában kalcium- vagy rubídium-kloriddal végzett kezelést tartalmaz [Cohen (1972); Maniatis (1982)]. Az élesztők transzformálása közvetlen felvétellel kivitelezhető Hinnen és munkatársai (1978) eljárásával.

Az emlőssejtek transzformálását közvetlen felvétellel Graham és Van der Eb (1978) kalcium-foszfátos kicsapási eljárásával végezhetjük, vagy ennek különböző ismert módosításaival.

#### *Vektoralkotás*

A vektorok megalkotása olyan technikákat alkalmaz, amelyek a szakterületen ismertek. A helyspecifikus DNS-hasítást a megfelelő restrikciós enzimekkel végzett kezeléssel hajtjuk végre olyan körülmények között, amelyet ezen kereskedelmi forgalomban kapható enzimek gyártói általában előírnak. Általában mintegy 1 mikrogramm plazmidot vagy DNS-szekvenciát hasítunk 1 egység enzimmel mintegy 20 mikroliter pufferoldatban 1–2 órás inkubálási idő alatt 37 °C hőmérsék-

leten. A restrikciós enzimmel végzett inkubálás után a fehérjét fenol/kloroformos extrahálással eltávolítjuk, és a kinyert DNS-t etanollal kicsapjuk. A hasított fragmentumokat poliakrilamid- vagy agarózgél-elektroforézist alkalmazva elkülönítjük, az alábbi irodalmi helyen található általános eljárás szerint: *Methods in Enzymology*, 65, 499–560 (1980).

A tapadós végű hasítási fragmentumokat tompa végűvé tehetjük E. coli DNS polimeráz I-et (Klenow) alkalmazva a keverékben lévő megfelelő dezoxinukleotid-trifoszfátok (dNTP-k) jelenlétében. Alkalmazhatjuk a kezelést S1 nukleázzal, amely mindenféle egyszálú DNS-rész hidrolízisét eredményezi.

A ligálást standard puffereket és hőmérsékleti körülményeket használva és T4 DNS-ligázt, valamint ATP-t alkalmazva hajtjuk végre; a tapadósvég-ligálások kevesebb ATP-t és kevesebb ligázt igényelnek, mint a tompavég-ligálások. Amikor a ligálási keverék részeként vektorfragmentumokat alkalmazunk, a vektorfragmentumot gyakran kezeljük bakteriális alkálikus foszfátázzal (BAP) vagy borjúbél alkálikus foszfátázzal, hogy eltávolítsuk az 5'-foszfátot, és így megakadályozzuk a vektor újraligálását; egy másik eljárás szerint a nem kívánt fragmentumok restrikciós enzim emésztését alkalmazhatjuk a ligálás megakadályozására.

A ligálási keveréket megfelelő klónozó gazdaszervezetbe, például E. coliba transzformáljuk, és sikeres transzformánsokat szelektálunk például antibiotikumrezisztencia alapján, és ezeket a korrekt konstrukcióra át-vizsgáljuk.

#### *Kívánt DNS-szekvenciák megalkotása*

Szintetikus oligonukleotidokat állíthatunk elő automatizált oligonukleotidszintetizáló berendezést alkalmazva, amint ezt Warner (1984) leírja. Ha szükséges, a szintetikus szálakat jelezhetjük <sup>32</sup>P-vel polinukleotid kinázzal végzett kezeléssel <sup>32</sup>P–ATP jelenlétében, a reakcióhoz standard körülményeket alkalmazva

A DNS-szekvenciákat, beleértve a cDNS-könyvtárból izolált szekvenciákat is, ismert technikákkal módosíthatjuk, beleértve például a helyre irányuló mutagenézist, amint ezt Zoller leírja (1982). Röviden: a módosítandó DNS-t fágba burkoljuk egyszálú szekvenciaként, és kettős szálú DNS-sé alakítjuk DNS polimerázzal, primerként olyan szintetikus oligonukleotidot alkalmazva, amely a DNS módosítandó részével komplementer, és rendelkezik a kívánt módosítással saját szekvenciájába beépítve. Az így létrejövő kettős szálú DNS-t fágsegítő gazdabaktériumba transzformáljuk. A transzformált baktériumok tenyészeit, amelyek a fág egyes szálainak replikáit tartalmazzák, agarat szélesztjük, hogy tarfoltokat kapjunk. Elméletileg az új tarfoltok 50%-a olyan fagot tartalmaz, amely a mutált szekvenciával bír, és a további 50% az eredeti szekvenciával bír. A tarfoltok replikáit jelzett szintetikus vizsgálómintákhoz hibridizáljuk olyan hőmérsékleten és olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik a hibridizálást a korrekt szállal, de nem teszik lehetővé a nem módosított szekvenciával. Azokat a szekvenciákat, amelyeket hibridizálással azonosítunk, kinyerjük, és klónozzuk.

### Hibridizálás vizsgálmintával

A DNS-könyvtárakat átvizsgálhatjuk Gruenstein és Hogness (1975) munkamenetét alkalmazva. Röviden ismertette, ebben az eljárásban az átvizsgálendő DNS-t nitro-cellulóz-szűrőkön immobilizáljuk, denaturáljuk, és előhibridizáljuk olyan pufferrel, amely 0–50% formamidot, 0,75 mol/l NaCl-t, 75 mmol/l Na-citrátot, 0,02–0,02% (tömeg/térfogat) szarvasmarha-szérumalbumint, polivinil-pirrolidont és Ficollt, 50 mmol/l Na-foszfátot (pH 6,5), 0,1% SDS-t (nátrium-lauril-szulfát) és 100 mikrogramm/ml hordozó denaturált DNS-t tartalmaz. A formamid százaléka a pufferben, valamint az előhibridizálási, majd hibridizálási lépések időbeli és hőmérsékleti feltételei a kívánt szigorúságtól függenek. Azoknál az oligomer vizsgálmintáknál, amelyek alacsonyabb szigorúsági feltételeket igényelnek, általában kisebb százalékból alkalmazunk formamidot, és rövidebb hibridizációs időt és alacsonyabb hőmérsékletet alkalmazunk. Azoknál a hibridizációs mintáknál, amelyek több, mint 30 vagy 40 nukleotidot tartalmaznak, például azoknál, amelyek cDNS- vagy genomszekvenciákból származnak, általában magasabb hőmérsékletet, például mintegy 40–42 °C-t alkalmazunk, és magasabb arányban alkalmazunk formamidot, például 50%-ban. Az előhibridizálást követően 5'–<sup>32</sup>P-vel jelzett oligonukleotid vizsgálmintát adunk a pufferhez, és a szűrőket ebben a keverékben inkubáljuk hibridizációs körülmények között. Mosás után a kezelt szűrőket autoradiográfiának vetjük alá, hogy kimutassuk a hibridizált vizsgálminta elhelyezkedését; az eredeti agarlemezen megfelelő elhelyezkedésben lévő DNS-t alkalmazzuk a kívánt DNS forrásaként.

### A konstrukció igazolása és szekvenciaelemzés

Rutinszerűen készített vektorkonstrukcióknál a ligációs keveréket *E. coli* HB101 törzsbe vagy más alkalmas gazdaszervezetbe transzformáljuk, és antibiotikumrezisztenciával vagy más markerekkel a sikeres transzformánsokat szelektáljuk. A transzformánsokból azután plazmidokat állítunk elő Clewell és munkatársai eljárásával (1969), általában klóramfenikolos sokszorozást követően [Clewell (1972)]. A DNS-t izoláljuk, és elemezzük általában restriktions enzim elemzéssel és/vagy szekvenciaelemzéssel. A szekvenciaelemzés történhet Sanger és munkatársai didezoxieljárásával (1977), amint ezt Messing is leírta (1981) vagy Maxam és munkatársai eljárásával (1980). A kötőösszezással kapcsolatos gondokat, amelyek néha megfigyelhetők GC-ben gazdag területekben, T-dézoxi-guanozin alkalmazásával küszöböljük ki Barr és munkatársai szerint (1986).

### Enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálatok

Az enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálatot (ELISA) alkalmazhatjuk vagy az antigén vagy az antitest koncentrációjának meghatározására. Ez az eljárás egy enzim hozzákapcsolásától függ vagy egy antigénhez, vagy egy antitesthez, és a kötött enzim aktivitását alkalmazza mennyiségi jelként. Abból a célból, hogy az antitestet mérjük, az ismert antigént szilárd fázishoz rögzítjük (például mikrolemmezhez vagy műanyag edényhez), inkubáljuk a vizsgált szérum hígításaival, mossuk, inkubáljuk egy enzimmel jelzett antiimmunglobulinnal, és ismét mossuk. Azok az enzimek, amelyek a jelzéshez alkalma-

sak, a szakterületen ismertek, ide tartozik például a torna peroxidáz. A szilárd fázishoz kötött enzimaktivitást a fajlagos szubsztrátum hozzáadásával és a termékképződés vagy szubsztrátumfelhasználás kolorimetriás meghatározásával mérjük. A kötött enzimaktivitást a kötött antitest mennyiségének közvetlen függvénye.

Abból a célból, hogy antigént mérjünk, egy ismert, fajlagos antitestet rögzítünk szilárd fázishoz, az antigént tartalmazó vizsgálandó anyagot hozzáadjuk, inkubálás után a szilárd fázist mossuk, és egy második, enzimmel jelzett antitestet adunk hozzá. Mosás után szubsztrátumot adunk hozzá, és az enzimaktivitást kolorimetriásan megbecsüljük, majd az antigénkoncentrációra vonatkoztatjuk.

### Példák

Az alábbiakban példákat adunk meg a jelen találmányra, amelyek csak a bemutatás célját szolgálják, és nem korlátozzák a találmány oltalmi körét. A jelen leírás fényében számos kiviteli mód születhet az igénypontok oltalmi körén belül, amelyek nyilvánvalóak azok számára, akik a szakterületen jártasak. Meg lehet ismételni például a következőkben leírt eljárásokat, ha így kívánatos, de nem feltétlenül szükséges, mivel számos technika áll rendelkezésre kívánt nukleotidszekvenciák megalkotásához a jelen találmányban nyújtott információk alapján. A kifejezést a példákban *E. coli*-ban valósítjuk meg, azonban más rendszerek is állnak rendelkezésre, amint ezt az előbbieken részletesebben leírtuk. A genomszerkezetből származó további építők is előállíthatók és felhasználhatók antitestek kialakítására, amint ezt a későbbiekben ismertetjük.

*HCV cDNS előállítása, izolálása és szekvenciaelemzése*

### HCV cDNS előállítása

Az NANB-agens forrása krónikus NANBH-ban szenvedő csimpánzból származó plazmagyűjtemény. A csimpánzokat előzőleg kísérleti úton fertőztük másik, krónikus NANBH-ban szenvedő csimpánzból származó vérrel, ahol viszont ez a másik csimpánz összegyűjtött humán szérumból származó, 8. koncentrációjú faktorú fertőzött törzstenyészetben lévő HCV-vel végzett fertőzés következtében fertőzött. A csimpánzplazma-gyűjteményt több plazmaminta egyesítésével kapjuk, amely minták magas alanin-aminotranszferáz-aktivitás szintekkel bírnak; ez az aktivitás májkárosodás eredménye, amely a HCV-fertőzés során alakul ki. Mivel 1 ml ennek az összegyűjtött szérumnak a 10<sup>-6</sup> hígításából i. v. beadva NANBH-t okoz egy másik csimpánzban, ennek CID-értéke legalább 10<sup>6</sup>/ml, azaz ennek igen magas a vírustitere.

A magas titerű plazmagyűjteményből a cDNS-könyvtárat az alábbi módon alakítjuk ki. Először a vírusrészecskéket izoláljuk a plazmából; egy 90 ml-es alikvotot hígítunk 310 ml oldattal, amely 50 mmol/l trisz.HCl-t (pH 8,0), 1 mmol/l EDTA-t és 100 mmol/l NaCl-t tartalmaz. A törmeléket 20 percen át 20 °C hőmérsékleten 150 000 xg-nél végzett centrifugálással távolítjuk el. Az így létrejövő felülúszóban a vírusrészecskéket centrifugálással üledékbe visszük Beckman SW28 rotorban 28 000 fordulat/percnel 5 órán át 20 °C hőmérsékleten. Abból a célból, hogy a vírusgenomot kiszaba-

dítsuk, a részecskéket összeüzük olyan módon, hogy az üledéket 15 ml oldatban, amely 1% nátrium-dodecilsulfátot (SDS), 10 mmol/l EDTA-t, 10 mmol/l trisz.HCl-t (pH 7,5), valamint 2 mg/ml proteinázt tartalmaz, szuszpendáljuk, majd 45 °C hőmérsékleten 90 percen át inkubáljuk. A nukleinsavakat úgy izoláljuk, hogy hordozóként 0,8 mikrogramm MS2 bakteriofág RNS-t (ATCC No. 15 597–B1) adunk hozzá, és a keveréket négyszer extraháljuk fenol:kloroform 1:1 elegyével [ahol a fenol 0,5 mol/l trisz.HCl-t (pH 7,5), 0,1% (térfogat/térfogat) béta-merkaptó-etanol és 0,1% (tömeg/térfogat) hidroxikínolont tartalmazó oldattal van telítve], majd kétszer extraháljuk kloroformmal. A vizes fázist 1-butanollal koncentrálnak, majd 2,5 térfogat abszolút etanollal kicsapjuk egy éjszakán át –20 °C hőmérsékleten. A nukleinsavakat centrifugálással nyerjük ki Beckman SW41 rotorban 40 000 fordulat/percnel 90 percig 4 °C hőmérsékleten, és olyan vízben oldjuk fel, amelyet előzőleg 0,05% (tömeg/térfogat) dietil-pirokarbonáttal kezeltünk, és autoklavoztunk.

A fenti munkamenettel kapott nukleinsavat (~2 mikrogramm) 17,5 mmol/l CH<sub>3</sub>HgOH-val denaturáljuk; cDNS-t szintetizálunk, templátként ezt a denaturált nukleinsavat alkalmazva, és lambda-gt11 fág EcoRI helyébe klónozzuk a Huynh (1985) által leírt eljárásokkal, azzal a kivétellel, hogy random primerek helyettesítik az oligo(dT)12–18-at az első cDNS-szál szintézise során reverz transzkriptázzal [Taylor és munkatársai (1976)]. Az így létrejövő kettős szálú cDNS-eket méret szerint frakcionáljuk Sepharose CL–4B oszlopra; a mintegy 400, 300, 200 és 100 bázispár átlagméretű eluált anyagot az 1., 2., 3., illetve 4. cDNS-gyűjteményekbe gyűjtjük. A lambda-gt11 cDNS-könyvtárat a 3. gyűjteményben lévő cDNS-ből alakítjuk ki.

A 3. gyűjteményből kialakított lambda-gt11 cDNS-könyvtárat olyan epitópokra vizsgáljuk át, amelyek fajlagosan kötődnek olyan betegből származó szérumokkal, akik korábban már átestek NANBH-n. Mintegy 10<sup>6</sup> fágot vizsgálunk át betegszérummal Huynh és munkatársai (1985) eljárását alkalmazva, azzal a különbséggel, hogy kötött humán antitestet olyan juh-anti-humán Ig antiszérumokkal mutatunk ki, amelyet előzőleg radioaktívan jeleztünk <sup>125</sup>I-vel. Öt pozitív fágot azonosítunk és

5'–TCC CTT GCT CGA TGT ACG GTA AGT GCT GAG AGC  
ACT CTT CCA TCT CAT CGA ACT CTC GGT AGA GGA CTT CCC TGT  
CAG GT–3'

A lambda-gt11 könyvtárat ezzel a vizsgálómintával átvizsgáljuk, a Huynh (1985) által leírt eljárást alkalmazva. 50 000 klónként mintegy 1 hibridizál a vizsgálómintával. Azt a három klónt, amely olyan cDNS-eket tartalmaz, amelyek hibridizálnak a szintetikus vizsgálómintával, 81., 1-2. és 91. névvel látjuk el.

*Az 5-1-1. klónban lévő cDNS-sel átfedő HCV cDNS-ek nukleotidszekvencia-elemzése*

A 81., 1-2. és 91. klónokban jelen lévő három cDNS nukleotidszekvenciáit lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt az előzőekben leírtuk. Ezeknek a klónoknak a szekvenciáját az 5-1-1. fágban lévő HCV

tisztítunk. Az öt pozitív fágot azután átvizsgáljuk kötési fajlagosságra 8 különböző emberből származó szérumhoz, akik előzőleg fertőzve voltak NANBH-ágenssel; az átvizsgáláshoz ugyanazt az eljárást alkalmazzuk. A fágok közül négy olyan polipeptidet kódol, amely immunológiailag csak egy humán szérummal reagál, vagyis csak egy olyan szérummal, amelyet a fágkönyvtár primer átvizsgálásához alkalmazunk. Az ötödik fág (5-1-1.) olyan polipeptidet kódol, amely a vizsgált 8 szérum közül öttel reagál. Ezenkívül ez a polipeptid nem reagál immunológiailag 7 normális véradó szérumával. Ennélfogva úgy tűnik, hogy az 5-1-1. klón olyan polipeptidet kódol, amelyet fajlagosan immunológiailag felismernek az NANBH-betegekből való szérumok.

15 *A HCV cDNS-szekvenciái a rekombináns 5-1-1. fágban, és az ezen a szekvencián belül kódolt polipeptid-szekvenciák*

Az 5-1-1. rekombináns fágban lévő cDNS-t szekvenciaelemzésnek vetjük alá Sanger és munkatársai (1977) eljárásával. Az eljárás lényegét ismertette, a cDNS-t EcoRI-lyel kimetsszük, és méret szerinti frakcionálással, gélelektroforézissel izoláljuk. Az EcoRI restrikciós fragmentumokat az mp18 és mp19 M13 vektorokba szubklónozzuk, és szekvenciaelemzésnek vetjük alá Sanger és munkatársai (1977) didezoxi-lánctermincációs eljárását alkalmazva. A kapott szekvenciát az 1. ábrán mutatjuk be.

Az 1. ábrán kódolt polipeptid, amely a HCV cDNS-ben kódolódik, ugyanabban a translációs keretben van, mint az N-terminális béta-galaktosidáz-rész, amelyhez fuzionálva van. Amint a korábbi fejezetben bemutattuk, az 5-1-1. translációs nyitott leolvasókerete (ORF) olyan epitópot vagy epitópokat kódol, amelyeket az NANBH-fertőzésben szenvedő betegekből és csimpánzokból való szérumok fajlagosan felismerik.

35 *Az 5-1-1. klónban lévő cDNS-sel átfedő HCV cDNS izolálása*

Az 5-1-1. klónban lévő cDNS-sel átfedő HCV cDNS-eket kapunk olyan módon, hogy ugyanazt a lambda-gt11 könyvtárat, amelyet az előzőekben leírtak szerint alkottunk meg, az 5-1-1. klónban lévő, az 1. ábrán bemutatott HCV cDNS-szekvenciából származó szintetikus polinukleotiddal átvizsgáljuk. Az átvizsgáláshoz alkalmazott polinukleotid szekvenciája az alábbi:

50 cDNS-szekvenciához viszonyítva a 2. ábrán mutatjuk be, amely bemutatja a kimutatott HCV-epitópot kódoló szálát, és ahol a homológiákat a nukleotidszekvenciában függőleges vonallal jelöljük a szekvenciák között.

A klónozott HCV cDNS-ek szekvenciái nagymértékben homológok az átfedőterületekben (lásd a 2. ábrát). A két területben azonban vannak különbségek. A 67. nukleotid az 1-2. klónban timidin-, míg a másik három klón citidingyöket tartalmaz ezen a helyen. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy azonos aminosav kódolódik, akár C, akár T foglalja el ezt a helyet.

A második különbség az, hogy az 5-1-1. klón 28 olyan bázispárt is tartalmaz, amely nincs jelen a másik három klónban. Ezek a bázispárok az 5-1-1.-ben lévő cDNS-szekvencia rajtjánál fordulnak elő, és ezeket kisbetűkkel jelöljük. A radioimmunszé- adatok alapján, amelyet később tárgyalunk, lehetséges, hogy egy HCV-epitóp kódolódik ebben a 28 bp-s területben.

Az 5-1-1. 28 bázispárjának hiánya a 81., 1-2. és 91. klónokból azt is jelentheti, hogy a cDNS ezekben a klónokban hiányos HCV-genomokból származik; egy másik változat szerint a 28 bp-s terület egy mesterséges terminális képződmény lehet az 5-1-1. klónban.

A kisbetűs szekvenciák a 81. és 91. klónok nukleotidszekvenciájában egyszerűen azt jelzik, hogy ezeket a szekvenciákat nem találjuk meg más cDNS-ekben, mivel az ezeket a területeket átfedő cDNS-eket még nem izoláltuk.

5'-CTG TCA GGT ATG ATT GCC GGC TTC CCG GAC -3'

Az eljárás lényegében azonos azzal, amelyet Huynh leírt (1985), azzal a különbséggel, hogy a könyvtárhoz alkalmazott szűrőknek két mosást adunk szigorú körülmények között, vagyis a mosásokat 5×SSC-t és 0,1% SDS-t tartalmazó oldattal végezzük 30-30 percig. 50 000 klónból mintegy 1 hibridizálódik ezzel a vizsgálómintával. Egy pozitív rekombináns fagot, amely tartalmazza azt a cDNS-t, amely a szekvenciával hibridizál, izolálunk és tisztítunk. Ezt a fagot 36. klónnak nevezzük el.

5'-TTT GGC TAG TGG TTA GTG GGC TGG TGA CAG-3'

Egy pozitív rekombináns fagot, amely olyan cDNS-t tartalmaz, amely hibridizál ez utóbbi szekvenciával, izolálunk és tisztítunk, ezt nevezzük 32. klónnak.

*A 36. klónban lévő HCV cDNS nukleotidszekvenciája*

A 36. klónban lévő cDNS nukleotidszekvenciáját lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt az előzőekben leírtuk. Ennek a cDNS-nek a kettős szálú szekvenciáit, ennek a 81. klónban lévő HCV cDNS-sel átfedő területeit és az ORF által kódolt polipeptidet az 5. ábrán mutatjuk be.

A 36. klónban lévő ORF azonos translációs keretben van, mint a 81. klónban kódolt HCV-antigén. Így kombinálva a 36. és 81. klónokban lévő ORF-ek olyan polipeptidet kódolnak, amelyet egy nagy HCV-antigén részét képviselik. Ennek a vélt HCV-polipeptidnek és az ezt kódoló kettős szálú DNS-nek, amely a 36. és 81. klónokban lévő HCV cDNS-ek kombinált ORF-jeiből származik, a szekvenciáját a 6. ábrán mutatjuk be.

*A 32. klónban lévő HCV cDNS nukleotidszekvenciája*

A 32. klónban lévő cDNS nukleotidszekvenciáját lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt a korábbiakban leírtuk az 5-1-1. szekvenciánál. A szekvenciaadatok azt jelzik, hogy a 32. rekombináns fagban lévő cDNS két

5'-AAG CCA CCG TGT GCG CTA GGG CTC AAG CCC-3'

50 000 klónból mintegy 1 hibridizálódik a vizsgálómintával. Azt az izolált, tisztított rekombinánsfag-

Az 5-1-1., 81., 1-2. és 91. klónokban lévő átfedő cDNS-ekből származó összetett HCV cDNS-szekvenciát a 3. ábrán mutatjuk be. Ezen az ábrán azonban az 5-1-1. klón egyedi 26 bázispárját elhagyjuk. Az ábra bemutatja az összetett HCV cDNS ORF-jén belül kódolt polipeptid szekvenciáját is.

*A 81. klónban lévő cDNS-sel átfedő HCV cDNS-ek izolálása*

A 81. klónban lévő cDNS-től felfelé lévő, és azzal átfedő HCV cDNS-szekvenciák izolálását az alábbi módon végezzük. A lambda-gt11 cDNS-könyvtárat, amelyet úgy állítottunk elő, amint ezt az előzőekben leírtuk, átvizsgáljuk olyan szintetikus polinukleotid vizsgálómintával, amely a 81. klón 5'-terminális szekvenciájával homológ. A 81. klón szekvenciáját a 4. ábrán mutatjuk be. Az átvizsgáláshoz alkalmazott szintetikus polinukleotid szekvenciája az alábbi:

Lefelé lévő cDNS-szekvenciákat, amelyek átfedik a 81. klónban lévő karboxilvég-szekvenciákat, izolálunk olyan munkamenetet alkalmazva, amely hasonló a felfelé lévő cDNS-szekvenciák izolálásának munkamenetéhez, azzal a különbséggel, hogy olyan szintetikus vizsgálómintát állítunk elő, amely a 81. klón 3'-terminális szekvenciájához homológ. Az átvizsgáláshoz alkalmazott szintetikus polinukleotid szekvenciája az alábbi:

különböző forrásból származik. A cDNS egyik fragmentuma a HCV-genomból származó 418 nukleotidból áll; a másik fragmentum az MS2 bakteriofág-genomból származó 172 nukleotidból áll, amelyet előzőleg hordozóként alkalmaztunk a lambda-gt11-plazmid cDNS-könyvtár elkészítése során.

A 32. klónban lévő cDNS szekvenciáját, amely megfelel a HCV-genom szekvenciájának, a 7. ábrán mutatjuk be. Azoknak a szekvenciáknak a tartományát, amelyek átfedik a 81. klón szekvenciáját és az ORF által kódolt polipeptid szekvenciáját, szintén jelöljük az ábrán. Ez a szekvencia egy folyamatos ORF-et tartalmaz, amely azonos translációs keretben van, mint a 81. klón által kódolt HCV-antigén.

*A 36. klónban lévő cDNS-sel átfedő HCV cDNS-ek izolálása*

A 36. klónban lévő cDNS-től felfelé lévő, és azzal átfedő HCV cDNS-szekvenciák izolálását úgy végezzük, amint ezt már leírtuk azoknál a szekvenciáknál, amelyek átfedik a 81. klón cDNS-t, azzal a kivétellel, hogy a szintetikus polinukleotid a 36. klón 5'-területén alapul. Az átvizsgáláshoz alkalmazott szintetikus polinukleotid szekvenciája az alábbi:

klónt, amely tartalmazza azt a cDNS-t, amely ehhez a szekvenciához hibridizál, 35. klónnak nevezzük.

*A 35. klónban lévő HCV cDNS nukleotidszekvenciája*

A 35. klónban lévő cDNS nukleotidszekvenciáját lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt már leírtuk. A szekvenciát, ennek átfedő területét a 36. klónban lévő szekvenciával és az ebben kódolt vélt polipeptidet a 8. ábrán mutatjuk be.

A 35. klón láthatóan egy egyedi, folyamatos ORF-et tartalmaz, amely egy polipeptidet kódol ugyanabban a translációs keretben, mint a 36. klón, 81. klón és 32. klón által kódolt polipeptidek. A 9. ábra mutatja be a hosszú, folyamatos ORF-et, amely végigterjed a 35., 36., 81. és 32. klónokon, és bemutatja az ebben kódolt

5'–CAG GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT–3'

50 000 klónból mintegy 1 klón hibridizál a vizsgálómintával. A rekombináns fág izolált, tisztított klónját, amely tartalmazza azt a cDNS-t, amely ehhez a szekvenciához hibridizál, 37. klónnak nevezzük.

*A 37b. klónban lévő HCV nukleotidszekvenciája*

A 37b. klónban lévő cDNS nukleotidszekvenciáját lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt a megfelelő fejezetben leírtuk. A szekvenciát, ennek átfedő területét a 35. klónban jelen lévő cDNS-sel és az ebben kódolt vélt polipeptidet a 10. ábrán mutatjuk be.

A 35. klón 5'-terminális nukleotidja T, míg a 37b. klónban az ennek megfelelő nukleotid A. A három független klónt, amelyeket ennek az eljárásnak a során izoláltunk, amelyben a 37b. klónt izoláljuk, és amelyet az előző fejezetben írtunk le, szintén szekvenCIAelemzésnek vetjük alá. Az ezekből a klónokból való cDNS-ek szintén A-t tartalmaznak ezen a helyen. Így a T 5'-terminális a klónozási munkamenet mester-

5'–AGT GCA GTG GAT GAA CCG GCT GAT AGC CTT–3'

A cla klónból való nukleotidszekvenciát alkalmazva egy másik szintetikus nukleotidot szintetizálunk, amely az alábbi szekvenciával bír:

5'–TTC TGA GGC GAC TGC ACC AGT GGA TAA GCT–3'

A cla klón eredetű szekvenciát alkalmazva vizsgálómintaként a lambda–gt11 átvizsgálása mintegy 1 pozitív telepet szolgáltat 50 000-ból. Egy izolált, tisztított klónt, amely ezzel a vizsgálómintával hibridizál, 33b. klónnak nevezünk.

*A 33b. klónban lévő HCV cDNS nukleotidszekvenciája*

A 33b. klónban lévő cDNS nukleotidszekvenciáját lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt az előzőekben leírtuk. A szekvenciát, ennek átfedő területét a 32. klónban lévő cDNS szekvenciájával, és az ebben kódolt polipeptid vélt szerkezetét a 11. ábrán mutatjuk be.

A 33b. klón láthatóan egy folyamatos ORF-et tartalmaz, amely a 37b., 35., 36., 81. és 82. átfedőkló-

5'–CAG GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT C–3' és  
5'–TCC TGA GGC GAC TGC ACC AGT GGA TAA GCT–3'

vált HCV-polipeptidet. A kombinált szekvenciát azonos lambda–gt11 cDNS-könyvtárból származó más, független cDNS-eket alkalmazva igazoljuk.

*A 35. klónban lévő cDNS-sel átfedő HCV cDNS-ek izolálása*

A 35. klónban lévő cDNS-től felfelé lévő, és azzal átfedő HCV cDNS-szekvenciák izolálását úgy végezzük, amint ezt a korábbi fejezetben azoknál a szekvenciáknál leírtuk, amelyek átfedik a 36. klón cDNS-t, azzal a kivétellel, hogy a szintetikus polinukleotid a 35. klón 5'-területén alapul. Az átvizsgáláshoz alkalmazott szintetikus polinukleotid szekvenciája az alábbi:

séges terméke lehet. Ismeretes, hogy mesterséges termékek gyakran felbukkannak a cDNS-molekulák 5'-terminálisánál.

A 37b. klón láthatóan egy folyamatos ORF-et tartalmaz, amely olyan polipeptidet kódol, amely abban az ORF-ben kódolt polipeptid folytatása, amely ORF végigterjed a 35., 36., 81. és 32. átfedőklónokon.

*A 32. klónban lévő cDNS-sel átfedő HCV cDNS izolálása*

A 32. klóntól lefelé lévő HCV cDNS-szekvenciák izolálását az alábbiak szerint végezzük. Először a cla klónt izoláljuk olyan szintetikus hibridizáló vizsgálómintát alkalmazva, amely a 32. klónban lévő cDNS-szekvencia nukleotidszekvenciáján alapul. Az eljárás lényegében az, amelyet a korábbiakban leírtunk, azzal a különbséggel, hogy a szintetikus vizsgálóminta szekvenciája az alábbi:

40

45

50

55

nokban lévő ORF-ek kiterjesztése. A 33b. klónban kódolt polipeptid azonos translációs keretben van, mint ezeknek az átfedőklónoknak a kiterjesztett ORF-jében kódolt polipeptid.

*A 33b. klónban lévő cDNS-sel és a 37b. klónban lévő cDNS-sel átfedő HCV cDNS-ek izolálása*

Abból a célból, hogy olyan HCV cDNS-eket izoláljunk, amelyek átfedik a 37b. és 33b. klónokban lévő cDNS-eket, az alábbi szintetikus oligonukleotidvizsgáló mintákat, melyek az ezekben a klónokban lévő cDNS-ekből származnak, alkalmazzuk a lambda–gt11 könyvtár átvizsgálására, lényegében a korábbiakban leírt eljárást alkalmazva. Az alkalmazott vizsgálóminták:

ezekkel mutatunk ki olyan telepeket, amelyek a 37b., illetve 33b. klónokban lévő cDNS-eket átfedő HCV cDNS-szekvenciákat tartalmaznak. Mintegy 1 telepet mutatunk ki 50 000 telepből az egyes vizsgálómintákkal. Egy olyan klónt, amely a 37b. klónban lévő cDNS-től felfelé lévő, és ezt átfedő cDNS-t tartalmaz, 40b. klónnak nevezünk. Egy olyan klónt, amely a 33b. klónban lévő cDNS-től lefelé lévő, és ezt átfedő cDNS-t tartalmaz, 25c. klónnak nevezünk.

*A 41b. klónban és 25c. klónban lévő HCV cDNS nukleotidszekvenciái*

A 40b. klónban és 25c. klónban lévő cDNS-ek nukleotidszekvenciáit lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt az előzőekben leírtuk. A 41b. és 25c. szekvenciáit, az átfedőterületeiket a 37b. és 33b. klónokban lévő cDNS-ekkel és a bennük kódolt vélt polipeptideket a 12. ábrán (40b. klón), illetve a 13. ábrán (25c. klón) mutatjuk be.

A 40b. klón 5'-terminális nukleotidja G. Öt másik független klónból, amelyeket annak a munkamenetnek a során izoláltunk, amellyel a 40b. klónt izoláltuk, amint ezt az előzőekben leírtuk, származó cDNS-eket szintén szekvenálva elemzésnek vetünk alá. Az ezekből a klónokból való cDNS-ek T-t tartalmaznak ezen a helyen. Így a G valószínűleg mesterséges klónozási terméket képvisel.

A 25c. klónban az 5'-terminális ACT, de a 41a klónban (a szekvenciát nem mutatjuk be) és a 33b. klónban ennek a területnek a szekvenciája TCA. Ez a különbség szintén képviselhet mesterséges klónozási terméket, akárcsak a 28 többlet 5'-terminális nukleotid az 5-1-1. klónban.

A 40b. és 25c. klónok egyaránt nyilvánvalóan olyan ORF-et tartalmaznak, amely az előzőekben szekvenálva elemzett klónokban lévő folyamatos ORF kiterjesztése. A 40b., 37b., 35., 36., 81., 32., 33b. és 25c. klónokon keresztül terjedő ORF nukleotidszekvenciáját, és az ebben kódolt vélt polipeptid aminosavszekvenciáját a 14. ábrán mutatjuk be. Az ábrán a lehetséges mesterséges termékeket elhagyjuk a szekvenciából, helyette a többszörösen átfedő klónok nem 5'-terminális területeinek megfelelő szekvenciáit mutatjuk be.

*Összetett HCV cDNS előállítás a 36., 81. és 32. klónokban lévő cDNS-ekből*

A C100 összetett HCV cDNS-t az alábbiak szerint alkotjuk meg. Először a 36., 81. és 32. klónokból a cDNS-eket EcoRI-gyel kimetesszük. Az egyes klónokból a cDNS EcoRI fragmentumát egyenként klónozzuk a pGEM3-blue vektor (Promega Biotec) EcoRI helyébe. Az így létrejövő rekombináns vektorokat, amelyek a 36.,

81. és 32. klónokból való cDNS-eket tartalmaznak, pGEM3-blue/36-nak, pGEM3-blue/81-nek, illetve pGEM3-blue/32-nek nevezzük. A pGEM3-blue/81 megfelelően orientált rekombinánsát NaeI-gyel és NarI-gyel emésztjük, és a nagy (~2850 bp) fragmentumot tisztítjuk, és ligáljuk a pGEM3-blue/36-ból való tisztított kis (~570 bp) NaeI/NarI restriktív fragmentumhoz. A 36. és 81. klónokból való cDNS-eknek ezt az összetett termékét alkalmazzuk további pGEM-blue vektor kialakítására, amely az ezeken a klónokon belül lévő átfedő cDNS-eken belül lévő folyamatos HCV ORF-et tartalmazza. Ezt az új plazmidot azután PvuII-vel és EcoRI-gyel emésztjük, hogy egy mintegy 680 bp-s fragmentumot szabadítsunk ki, amelyet azután a megfelelően orientált pGEM3-blue/32-plazmidból izolált kis (580 bp) PvuII/EcoRI fragmentummal ligálunk, és a 36., 81. és 32. klónokból való összetett cDNS-t az EcoRI-gyel linearizált pSODcfl vektorba ligáljuk, amelyet egy későbbi fejezetben írunk le, és amelyet az 5-1-1. klón kifejezésére alkalmazunk baktériumokban. Olyan rekombinánsokat szelektálunk, amelyek az összetett HCV cDNS (C100) ~1270 bp-s EcoRI fragmentumát tartalmaznak, és ezekből a plazmidokból a cDNS-t EcoRI-gyel kiasítjuk, és tisztítjuk.

*A 14i., 11b., 7f., 7e., 8h., 33c., 14c., 8f., 33f., 33g. és 39c. klónokban lévő HCV cDNS-szekvenciák izolálása és nukleotidszekvenciái*

A 14i., 11b., 7f., 7e., 8h., 33c., 14c., 8f., 33f., 33g. és 39c. klónokban lévő HCV cDNS-eket az átfedő cDNS-ek HCV cDNS-ek lambda-gt11 könyvtárából való izolálásának technikájával izoláljuk, amint ezt már leírtuk. Az alkalmazott technika lényegében az, amelyet az előzőekben leírtunk, azzal a különbséggel, hogy az alkalmazott vizsgálómintákat a kombinált HCV-szekvenciák 5'- és 3'-végéből való utolsó izolált klónok nukleotidszekvenciájából tervezzük. Azoknak a klónoknak a gyakorisága, amelyek az alább leírt vizsgálómintákkal hibridizálnak, mintegy 1 az 50 000-ben mindegyik esetben.

A 14i., 7f., 7e., 8h., 33c., 14c., 8f., 33f., 33g. és 39c. klónokban lévő HCV cDNS-ek nukleotidszekvenciáit lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt az előbbiekben leírtuk, azzal a kivétellel, hogy az ezekből a fágokból kímetszett cDNS-ek helyettesítik az 5-1-1. fágból izolált cDNS-t.

A 33c. klónt olyan hibridizáló vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 40b. klónban lévő nukleotid szekvenciáján alapul. A 40b. klón nukleotidszekvenciáját a 12. ábrán mutatjuk be. A 33c. izolálásához alkalmazott vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

5'-ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT-3'

A 33c. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját és a 40b. klónban lévő szekvenciával való átfedést a 15. ábrán mutatjuk be, amely bemutatja az ezen belül kódolt aminosavakat is.

5'-AGA GAC AAC CAT GAG GTC CCC GGT GTT C-3'

A 84. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 33c. klónban lévő nukleotidszekvencián alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 8h. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciát és a 33c. klónban lévő szekvenciával való átfedést, valamint az ebben kódolt aminosavakat a 16. ábrán mutatjuk be.

5'-TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC-3

A 7e. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 8h. klónnal való átfedést és az ebben kódolt aminosavakat a 17. ábrán mutatjuk be.

A 14c. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 25c. klónban lévő nukleotidok szekven-

5'-ACC TTC CCC ATT AAT GCC TAC ACC ACG GGC-3'

A 14c. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 25c. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 18. ábrán mutatjuk be.

5'-TCC ATC TCT CAA GGC AAC TTG CAC CGC TAA-3'

A 8f. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 14c. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 19. ábrán mutatjuk be.

5'-TCC ATG GCT CGC TTC CAC CTC CAA AGT-3'

A 33f. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 8f. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 20. ábrán mutatjuk be.

5'-GCG ACA ATA CGA CAA CAT CCT CTG AGC CCG-3'

A 33g. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 33f. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 21. ábrán mutatjuk be.

5'-AGC AGA CAA GGG GCC TCC TAG GGT GCA TAA T-3'

A 7f. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 7e. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 22. ábrán mutatjuk be.

5'-CAC CTA TGT TTA TAA CCA TCT CAC TCC TCT-3'

A 11b. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 7f. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 23. ábrán mutatjuk be.

5'-CTC TGT CAC CAT ATT ACA AGC GCT ATA TCA-3'

A 14i. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 11b. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 24. ábrán mutatjuk be.

5'-CTC GTT GCT ACG TCA CCA CAA TTT GGT GTA-3'

A 7e. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 8h. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 25c. klón szekvenciáját a 13. ábrán mutatjuk be. A 14c. klón izolálásában alkalmazott vizsgálati minta az alábbi szekvenciával bír:

A 8f. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 14c. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 33f. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 8f. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 33g. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 33f. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 7f. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 7e. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 11b. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 7f. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 14i. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 11b. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 39c. klónt olyan vizsgálómintát alkalmazva izoláljuk, amely a 33g. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 39c. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáját, a 33g. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 25. ábrán mutatjuk be.

*HCV cDNS-t tartalmazó izolált klónokból származó összetett HCV cDNS-szekvenciák*

A fentebb leírt izolált klónokban lévő HCV cDNS-szekvenciákat felsorakoztatjuk, hogy egy összetett HCV cDNS-szekvenciát alkossunk meg. Az izolált klónok, amelyek 5'→3' irányban felsorakoznak, az alábbiak: 14i., 7f., 7e., 8h., 33c., 40b., 37b., 35., 36., 81., 32., 33b., 25c., 14c., 8f., 33f., 33g. és 39c.

Egy, az izolált klónokból származó HCV cDNS összetett szekvenciát és az ebben kódolt aminosavakat a 26. ábrán mutatunk be.

Az összetett szekvencia megalkotásában az alábbi szekvenciaheterogenitásokat vesszük figyelembe. A 33c. egy 800 bázispáros HCV cDNS-t tartalmaz, amely átfedi a 40b. és 37c. klónokban lévő cDNS-eket. A 33c. klónban, valamint 5 másik átfedőklónban a 789. nukleotid G. A 37b. klónban azonban a megfelelő nukleotid A. Ez a szekvenciakülönbség nyilvánvaló heterogenitást alakít ki az ebben kódolt aminosavakban, amely vagy CYS vagy TYR lehet a G, illetve az A esetében. Ez a heterogenitás fontos eltérést jelenthet a fehérje összehajtogatása szempontjából.

A 8h. HCV cDNS-ben lévő 2. nukleotidgyök T. Amint azonban fentebb bemutattuk, a 7e. klónban a megfelelő gyök A, és A-t találunk 3 másik izolált átfedőklónban. Így a T gyök a 8h. klónban egy mesterséges klónozási terméket képviselhet. Ennek megfelelően a 26. ábrán a gyököt ebben a helyben A-nak jelöljük.

A 8f. klón HCV cDNS-ében a 3'-terminális nukleotid G. A 33f. klónban azonban – és még 2 másik átfedőklónban – a megfelelő szekvencia T. Ennek megfelelően a 26. ábrán a gyököt ebben a helyben T-nek jelöljük.

5'–TGC TTG TGG ATG ATG CTA CTC ATA TCC CAA–3'

A 12f. klón HCV cDNS-szekvenciáját, a 14i. klónnal való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 27. ábrán mutatjuk be.

A 35f. klón, amely a 26. ábrán lévő HCV cDNS-től lefelé lévő cDNS-t tartalmazza, izolálását a 39c. klón-

5'–AGC AGC GGC GTC AAA AGT GAA GGC TAA CTT–3'

A 35f. klón HCV cDNS-szekvenciáját, a 39c. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 28. ábrán mutatjuk be.

5'–TTC TCG TAT GAT ACC CGC TGC TTT GAC TCC–3'

A 19g. klón HCV cDNS-szekvenciáját, a 35f. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 29. ábrán mutatjuk be.

5'–TGT GTG GCG ACG ACT TAG TCG TTA TCT GTG–3'

A 33f. klónban a HCV cDNS 3'-terminális szekvenciája TTGC. A 33g. klónban és még két másik átfedőklónban azonban ez ATTC. Ennek megfelelően a 26. ábrán a megfelelő területeket ATTC képviseli.

5 A 33g. klónban a HCV cDNS 4. nukleotidgyöke T. A 33f. klónban és még 2 másik átfedőklónban azonban a megfelelő gyök A. Ennek megfelelően a 26. ábrán a megfelelő gyököt A-nak jelöljük.

10 A 14i. klónban lévő 3'-terminális AA, míg a 11b.-ben és három másik klónban a megfelelő dinukleotid TA. Ennek megfelelően a 26. ábrán a TA-gyököt tüntetjük fel.

A további szekvenciaheterogenitások megoldását fentebb tárgyaltuk.

15 Az összetett HCV cDNS vizsgálata azt jelzi, hogy ez egy nagy ORF-et tartalmaz. Ez azt sugallja, hogy a vírusgenom egy nagy polipeptiddé transzlatálódik, amely feldolgozódik a transzlációval együtt vagy azt követően.

20 *A 12f., 35f., 19g., 26g. és 15e. klónokban lévő HCV cDNS-ek izolálása és nukleotidszekvenciái*

A 12f., 35f., 19g., 26g. és 15e. klónokban lévő HCV cDNS-eket lényegében azzal a technikával izoláljuk, amelyet a megfelelő fejezetben leírtunk, azzal a különbséggel, hogy a vizsgálóminták az alább leírtak. A klónok, amelyek a vizsgálómintákkal hibridizálnak, gyakorisága mintegy 1 az 50 000-ben, mindegyik esetben. A HCV cDNS-ek nukleotidszekvenciáját ezekben a klónokban lényegében úgy határozzuk meg, amint ezt az előzőekben leírtuk, azzal a kivétellel, hogy a jelzett klónokból való cDNS-ek helyettesítik az 5-1-1. klónból izolált cDNS-eket.

35 A 12f. klón, amely a 26. ábrán lévő HCV cDNS-től felfelé lévő cDNS-t tartalmazza, izolálását olyan hibridizáló vizsgálómintát alkalmazva végezzük, amely a 14i. klónban lévő nukleotidok szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta szekvenciája az alábbi:

40 ban lévő nukleotidok szekvenciáján alapuló hibridizáló vizsgálómintát alkalmazva hajtjuk végre. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

50 A 19g. klón izolálását olyan hibridizáló vizsgálómintát alkalmazva hajtjuk végre, amely a 35f. klón 3'-szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

55 A 26g. klón izolálását olyan hibridizáló vizsgálómintát alkalmazva hajtjuk végre, amely a 19g. klón 3'-szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

A 26g. klón HCV cDNS-szekvenciáját, a 19g. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 30. ábrán mutatjuk be.

5'-CAC ACT CCA GTC AAT TCC TGG CTA GGC AAC-3'

A 15e. klón HCV cDNS-szekvenciáját, a 26g. klónban lévő szekvenciával való átfedését és a benne kódolt aminosavakat a 31. ábrán mutatjuk be.

Az ebben a fejezetben leírt klónokat az ATCC-nél deponáltuk; ezek az alábbi deponálási számot kapták:

lambda-gt11	ATTC-szám	A deponálás dátuma
12f. klón	40 514	1988. november 10.
35f. klón	40 511	1988. november 10.
15e. klón	40 513	1988. november 10.
k9-1. klón	40 512	1988. november 10.

A fentebb leírt, izolált klónokban lévő HCV cDNS-szekvenciákat egymás mellé sorakoztatjuk fel, hogy összetett HCV cDNS-szekvenciát alkossunk meg. Az izolált klónok, amelyek 5'→3' irányban egymás mellett sorakoznak, az alábbiak: 12f., 14i., 7f., 7e., 8h., 33c., 40b., 37b., 35., 36., 81., 32., 33b., 25c., 14c., 8f., 33f., 33g., 39c., 35f., 19g., 26g. és 15e.

Az izolált klónokból származó összetett HCV cDNS-szekvenciát és a benne kódolt aminosavakat a 32. ábrán mutatjuk be.

*Másik eljárás a 12f. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciától felfelé lévő cDNS-szekvenciák izolálására*

A 32. ábrán lévő legtöbb 5' HCV-szekvenciára alapozva, amely a 12f. klónban lévő HCV cDNS-ből származik, reverz transzkriptáz kis szintetikus oligonukleotid primerjeit szintetizáljuk, és alkalmazzuk a HCV-genom RNS-ben lévő megfelelő szekvencia kötésére, hogy beindítsuk a felfelé lévő szekvenciák reverz transzkripcióját. A primer szekvenciák proximálisak a 12f. klón ismert 5'-terminális szekvenciájához, de megfelelően lefelé vannak ahhoz, hogy lehetővé tegyék a primer szekvenciáktól lefelé lévő vizsgálóminta-szekvenciák tervezését. A beindítás és klónozás ismert, standard eljárásait alkalmazzuk. Az így létrejövő cDNS-könyvtárat olyan szekvenciákkal vizsgáljuk át, amelyek a beindítóhelyektől lefelé vannak (amint ez a 12f. klónban lévő megvilágított szekvenciából következik). A HCV-genom RNS-t NANBH-ban szenvedő csimánzok plazma- vagy májmintáiból nyerjük, vagy NANBH-ban szenvedő emberek hasonló mintáiból.

*Másik eljárás farokképzést alkalmazva a HCV-genom 5'-terminális területéből való szekvenciák izolálására*

Abból a célból, hogy a HCV RNS-genom többsét 5'-terminális szekvenciáit izoláljuk, a reverz transzkripció első menetének cDNS-termékét, amely a templát RNS-sel képez duplexet, oligo C farokkal látjuk el. Ezt úgy hajtjuk végre, hogy a terméket terminális transzferázzal inkubáljuk CTP jelenlétében. A cDNS-szintézis menetét, amely a cDNS első szálának kiegészítését adja, a reverztranszkriptáz-reakcióhoz primerként oligo G-t

A 15e. klón izolálását olyan hibridizáló vizsgálómintát alkalmazva hajtjuk végre, amely a 26g. klón 3'-szekvenciáján alapul. A vizsgálóminta nukleotidszekvenciája az alábbi:

hasznosítva hajtjuk végre. A genom HCV RNS forrásai azok, amelyeket már az előzőekben leírtunk. A farokképzési eljárást terminális transzferázzal és a reverz transzkriptázos reakciót úgy végezzük, amint azt Maniatis és munkatársai leírták (1982). A cDNS-terméket azután klónozzuk, átvizsgáljuk, és szekvenciájukat elemezzük.

*Másik eljárás farokképzést alkalmazva a HCV-genom 3'-terminális területéből való szekvenciák izolálására*

Ez az eljárás Flavivírus RNS cDNS-einek klónozásához korábban alkalmazott eljárásokon alapul. Ebben az eljárásban az RNS-t denaturálókörülményeknek vetjük alá, hogy eltávolítsuk a szekunder szerkezeteket a 3'-terminálisnál, majd farokkal látjuk el poli-A polimerázzal, szubsztátumként rATP-t alkalmazva. A poli-A farokkal ellátott RNS reverz transzkripcióját reverz transzkriptázzal katalizáljuk, primerként oligo dT-t alkalmazva. A cDNS második szálait szintetizáljuk, a cDNS termékeket klónozzuk, átvizsgáljuk, és szekvenciájukat meghatározzuk.

*Nagyobb cDNS-beiktatásokat tartalmazó lambda-gt11 HCV cDNS-könyvtárak megalkotása*

A lambda-gt11 könyvtárak megalkotására és átvizsgálására alkalmazott eljárások lényegében azok, amelyeket az előbbiekben leírtunk, azzal a különbséggel, hogy a könyvtárat a Sepharose CL-4B oszlopról eluált, nagyobb méretű cDNS-ek gyűjteményéből alakítjuk ki.

*HCV cDNS-könyvtárak megalkotása, primerként szintetikus oligomereket alkalmazva*

Új HCV cDNS-könyvtárakat állítunk elő az előzőekben leírt fertőző csimánzplazma-gyűjteményből származó RNS-ből, és ennek a fertőzött állatnak a májából származó poli-A<sup>+</sup> RNS-frakcióból. A cDNS-t lényegében úgy alkotjuk meg, amint ezt Gubler és Hoffman (1983) leírták, azzal a kivétellel, hogy az első cDNS-szál szintéziséhez való primerek szintetikus oligomerek, amelyek a fentebb leírt HCV-genom szekvenciáján alapulnak. A 11b., illetve 7e. klón szekvenciáján alapuló primerek az alábbiak:

5'-CTG GCT TGA AGA ATC-3'  
és

5'-AGT TAG GCT GGT GAT TAT GC-3'.

Az így létrejövő cDNS-eket lambda-bakteriofág vektorokba klónozzuk, és különböző más szintetikus oligomerekkel vizsgáljuk át, amelyek szekvenciái a 32. ábrán lévő HCV-szekvencián alapulnak.

*A HCV cDNS-eken belül kódolt polipeptidek kifejezése és a kifejezett termék azonosítása HCV-indukált antigénként*

*Az 5-1-1. klónban kódolt polipeptid kifejezése*

Az 5-1-1. klónon belül kódolt HCV-polipeptidet szuperoxid-diszmutázzal (SOD) képzett fúziós polipeptidként fejezzük ki. Ezt az 5-1-1. klón cDNS-beiktatás

szubklonozásával hajtjuk végre a pSODcfl kifejezővektorba [Steimer és munkatársai (1986)] az alábbiak szerint.

Először a pSODcfl-ből izolált DNS-t BamHI-gyel és EcoRI-gyel kezeljük. Ennek során egy nagy lineáris DNS-fragmentumot és egy kisméretű, körülbelül 10 nukleotidból álló fragmentumot kapunk. Ezután az alábbi kapcsolót ligáljuk a restriktációs enzimek által létrehozott nagy lineáris DNS-fragmentumba:

5'–GAT CCT GGA ATT CTG ATA A 3'  
3' GA CCT TAA GAC TAT TTT AA–5'

A klonozás után a beiktatást tartalmazó plazmidot izoláljuk.

A beiktatást tartalmazó plazmidot EcoRI-gyel hasítjuk. Az 5-1-1. klónban lévő HCV cDNS-beiktatást EcoRI-gyel kimetesszük, és ebbe az EcoRI-gyel linearizált plazmid DNS-be ligáljuk. A DNS keverékét alkalmazzuk *E. coli* D1210 törzs [Sadler és munkatársai, *Gene*, 8, p. 279 (1980)] transzformálására. Azokat a rekombinánsokat, amelyek az 1. ábrán bemutatott ORF-kifejeződésre nézve korrekt orientációban tartalmazzák az 5-1-1. cDNS-t, restriktációs térképezéssel és nukleotidszekvencia-elemzéssel azonosítjuk.

Az egyik klónból való rekombináns baktériumokat indukálunk, hogy fejessenek ki SOD–NANB<sub>5,1,1</sub>-polipeptidet a baktériumok növesztésével, IPTG jelenlétében.

#### *A 81. klónban kódolt polipeptid kifejezése*

A 81. klónon belül lévő HCV cDNS-t SOD–NANB<sub>81</sub> fúziós polipeptidként fejezzük ki. Az eljárás ezt fúziós polipeptidet kódoló vektor előállítására analóg azzal, amelyet az SOD–NANB<sub>5,1,1</sub>-et kódoló vektor megalkotásánál alkalmazunk, azzal a különbséggel, hogy a HCV cDNS forrása a 81. klón, amelyet a leírt módon izolálunk, és amelynél a cDNS-szekvenciát a leírt módon határozzuk meg. A 81. klónban lévő HCV cDNS nukleotidszekvenciáját és az ebben kódolt polipeptid vélt aminosavszekvenciáját a 4. ábrán mutatjuk be.

A 81. klónban lévő HCV cDNS-beiktatást EcoRI-gyel kimetesszük, és a pSODcfl-be ligáljuk, amely tartalmazza a kapcsolót, és amely EcoRI-gyel végzett kezeléssel linearizálva van. A DNS-keveréket alkalmazzuk az *E. coli* D1210 törzs transzformálására. A 4. ábrán bemutatott ORF kifejeződéséhez megfelelő orientációban lévő 81. HCV cDNS-klónnal bíró rekombinánsokat restriktációs térképezéssel és nukleotidszekvencia-elemzéssel azonosítjuk.

Az egyik klónból való rekombináns baktériumokat indukáljuk úgy, hogy SOD–NANB<sub>81</sub>-polipeptid fejeződjék ki, amikor a baktériumokat IPTG jelenlétében növesztjük.

#### *Az 5-1-1. klónon belül kódolt polipeptid, mint HCV-vel és NANBH-val társult antigén azonosítása*

Az 5-1-1. klón HCV cDNS-én belül kódolt polipeptidet úgy azonosítjuk NANBH-hez társult antigénként, hogy bemutatjuk: az NANBH-val fertőzött csimpánzok és emberek szérumai immunológiailag reagálnak a SOD–NANB<sub>5,1,1</sub> fúziós polipeptiddel, amely polipeptid szuperoxid-dismutázt tartalmaz N-terminálisánál és

keretben lévő 5-1-1. antigén C-terminálisánál. Ezt Western-foltképzéssel hajtjuk végre [Towbin és munkatársai (1979)] az alábbiak szerint.

A SOD–NANB<sub>5,1,1</sub>-polipeptidet kódoló kifejezővektorral transzformált baktériumok egy rekombináns törzsét, amelyet az előzőekben írtunk le, indukáljuk fúziós polipeptid kifejezésére olyan módon, hogy IPTG jelenlétében növesztjük. A teljes baktériumlizátumot elektroforézisnek vetjük alá poliakrilamid géleken SDS jelenlétében Laemmli (1970) szerint. Az elkülönített polipeptideket nitro-cellulóz-szűrőkre viszszük át [Towbin és munkatársai (1979)]. A szűrőket azután vékony csíkokra hasítjuk, és a csíkokat egyenként inkubáljuk különböző csimpánz- és humán szérumokkal. A kötött antitesteket <sup>125</sup>I-vel jelzett juh-anti-humán Ig-vel végzett további inkubálással mutatjuk ki, amint ezt az előzőekben leírtuk.

A Western-foltképzéshez alkalmazott csimpánzsérumok jellemzését és az eredményeket, amelyeket az autoradiográfiának alávetett csíkok fényképeiben mutatunk be, a 33. ábra szemlélteti. A polipeptideket tartalmazó nitro-cellulóz-csíkokat csimpánzokból származó szérumokkal inkubáljuk, ahol a szérumok akut NANBH- (Hutchinson-törzs) fertőzéseknek (1–16. csíkok), hepatitis A fertőzésnek (17–24. és 26–33. csíkok) és hepatitis B fertőzéseknek (34–44. csíkok) kitett állapotokból, különböző időpontokból származnak. A 25. és 45. csíkok pozitív kontrollok, amelyekben az immunfoltokat abból a betegből származó szérummal inkubáljuk, amelyet az 5-1-1. rekombináns klón azonosítására alkalmaztunk a lambda-gt11 cDNS-könyvtár eredeti átvizsgálásában.

A 33. ábrán a 25. és 45. kontrollcsíkokban látható csík a SOD fúziós polipeptid NANB<sub>5,1,1</sub>-része elleni antitestek kötését tükrözi. Ezek az antitestek nem mutatnak kötést SOD-ra önmagában, mivel ez negatív kontrollt is jelent ezekben a mintákban, és olyan módon tűnik fel, mint a SOD–NANB<sub>5,1,1</sub> fúziós polipeptidnél jelentősen gyorsabban vándorló csík.

A 33. ábra 1–16. csíkjai antitestek kötését mutatják be 4 csimpánz szérummintáiban; a szérumokat közvetlenül az NANBH-val végzett fertőzés előtt vesszük, majd egymás után az akut fertőzés során. Amint az ábrából látható, míg azok az antitestek, amelyek immunológiailag reagálnak a SOD–NANB<sub>5,1,1</sub>-polipeptiddel, hiányoznak a fertőző HCV-inokulum beadása előtt vett és a fertőzés korai akut fázisa során vett szérummintákból, addig mind a 4 állat végül is indukál ezen polipeptid elleni cirkuláló antitesteket az akut fázis utolsó részében és az akut fázist követően. A 3. és 4. számú csimpánzok esetében az immunfoltokon megfigyelt további csíkok a gazda-bakteriálisfehérjékhez való háttérkötésnek tulajdoníthatók.

Az NANBH-vel fertőzött csimpánzokból való szérumokkal kapott eredményekkel ellentétben a fúziós polipeptid NANB<sub>5,1,1</sub> része elleni antitestek kifejlődését nem figyeltük meg 4 olyan csimpánznál, amelyek HAV-vel voltak fertőzve vagy 3 olyan csimpánznál, amelyek HBV-vel voltak fertőzve. Ezekben az esetekben az egyetlen kötés a háttérkötés a gazdabakteriális-

fehérjéhez, amely a HCV-vel fertőzött mintákban is előfordul.

A Western-foltképzéshez alkalmazott humán szérumok jellemzését és az eredményeket, amelyek autoradiográfiának alávetett csíkok fényképein láthatók, a 34. ábrán szemléltetjük. A polipeptideket tartalmazó nitrocellulóz-csíkokat emberekből származó szérumokkal inkubáljuk, ahol szérumok különböző időpontokból származnak a NANBH-val (1–21. csíkok), HAV-val (33–40. csíkok) és HBV-vel (41–49. csíkok) végzett fertőzés során. A 25. és 50. csíkok pozitív kontrollokat jelentenek, amelyekben az immunfoltokat olyan betegből származó szérummal inkubáljuk, akit a lambda-gt11 könyvtár eredeti átvizsgálásánál alkalmaztunk, amint ezt fentebb leírtuk. A 22–24. és 26–32. csíkok olyan „nem fertőzött” kontrollokat mutatnak, amelyekben a szérum „normális” vérérdőktől ered.

Amint a 34. ábrán látható, kilenc NANBH-betegből származó szérum, ide értve a lambda-gt11 könyvtár átvizsgálásához alkalmazott szérumot, tartalmazza a fúziós polipeptid NANB<sub>5.1-1</sub>-része elleni antitesteket. Hárrom, NANBH-ban szenvedő betegből származó szérum nem tartalmazza ezeket az antitesteket. Lehetséges, hogy az anti-NANB<sub>5.1-1</sub>-antitestek későbbi időpontban fejlődnek csak ki ezekben a betegekben. Az is lehetséges, hogy a reakció hiánya egy, a betegséget előidéző, de eltérő NANBV-ágens következménye, és a nem válaszoló szérumok ilyen ágenszt tartalmaznak.

A 34. ábra azt is megmutatja, hogy a HAV-val és HBV-vel fertőzött betegekben származó szérumok nem tartalmaznak anti-NANB<sub>5.1-1</sub>-antitesteket, és hogy ezek az antitestek nincsenek jelen a „normális” kontrollokból származó szérumokban sem. Bár az egyik HAV-beteg (36. csík), úgy tűnik, tartalmaz anti-NANB<sub>5.1-1</sub>-antitesteket, lehetséges, hogy ez a beteg előzőleg HCV-vel is volt fertőzve, mivel az egybeesés NANBH-val nagyon nagy, és mivel ez gyakran csak szubklinikai jellegű.

Ezek a szerológiai tanulmányok azt jelzik, hogy az 5-1-1. klónban lévő cDNS olyan epitópokat kódol, amelyeket BB-NANBV-vel fertőzött betegekben és állatok-

ból kapott szérumok fajlagosan felismernek. Ezenkívül, úgy tűnik, a cDNS nem a főemlősgenomból származik. Egy, az 5-1-1. klónból vagy 81. klónból készített hibridizáló vizsgálminta nem hibridizál nem fertőzött egyénekből származó kontroll humán és csimpánzgenom DNS Southern-foltjaival olyan körülmények között, ahol egyedi, egymásolatú gének kimutathatók. Ezek a vizsgálminták nem hibridizálnak kontroll szarvasmarhagenom DNS Southern-foltjaihoz sem.

5 *A 36., 81. és 32. klónokban lévő HCV cDNS-ek összetett termékeiben kódolt polipeptidek kifejezése*

A HCV-polipeptidet, amely a 36., 81. és 32. klónokon keresztül terjedő ORF-ben kódolódik, SOD-zal képzett fúziós polipeptidként fejezzük ki. Ezt a C100 összetett cDNS beiktatásával hajtjuk végre a humán szuperoxid-diszmutáz-gént tartalmazó kifejezőkazettában, majd a kifejezőkazetta beiktatásával valamely kifejezővektorba, és a polipeptid kifejezésével élesztőben.

15 *A 36., 81. és 32. klónokból származó összetett C100 cDNS-t tartalmazó kifejezőkazettát úgy alkotjuk meg, hogy a ~1270 bp-s EcoRI fragmentumot beiktatjuk a pS3-56 (vagy más néven pS356) vektor EcoRI helyébe, így alakítva ki a pS3-56<sub>C100</sub> plazmidot. A C100 megalkotását az előbbieken írtuk le.*

20 *A pS3-56 vektor, amely pBR322 származék, olyan kifejezőkazettát tartalmaz, amely az ADH2/GAPDH hibrid élesztőpromotorból áll a humán szuperoxid-diszmutáz-géntől fölfelé, és egy GAPDH transzkripció terminátorból lefelé. Egy hasonló kazettát, amely ezeket a szabályozóelemeket tartalmazza, valamint a szuperoxid-diszmutáz-gént írnak le Cousens és munkatársai (1987) és a 196,056 számú európai szabadalmi közzétételi irat, amelynek bejelentői közösek a jelen találmány bejelentőivel. A pS3-56 kazetta azonban különbözik Cousens és munkatársai (1987) kazettájától, amennyiben a heterológ proinzulingén és az immunglobulin-, illesztés” ki van iktatva, és annyiban, hogy a szuperoxid-diszmutáz glu<sub>154</sub>-ét olyan adaptorszekvencia követi, amely egy EcoRI helyet tartalmaz. Az adaptor szekvenciája az alábbi:*

5'-AAT TTG GGA ATT CCA TAA TGA G  
AC CCT TAA GGT ATT ACT CAG CT-3'

Az EcoRI hely lehetővé teszi olyan heterológ szekvenciák beiktatását, amely – amikor a kazettát tartalmazó vektorból kifejeződik – olyan polipeptidet termel, amely szuperoxid-diszmutázhoz van fuzionálva az alábbi aminosavszekvenciát tartalmazó oligopeptid kapcsoló útján:

–asn–leu–gly–ile–arg–.

A pS356 egyik mintáját 1988. április 29-én deponáltuk a Budapesti Szerződés feltételei között az American Type Culture Collection-nál (ATCC 12301, Rockville, Maryland 20853), ahol ez az ATCC 67683 deponálási számot kapta. Ez a deponált törzs kizárólag a kényelmesebb megoldást szolgálja, és nem feltétlenül szükséges a jelen találmány gyakorlati megvalósításában a jelen leírás alapján. A deponált törzsek a jelen bejelentésbe referenciaként épülnek be.

45 *Miután olyan rekombinánsokat izoláltunk, amelyek korrekt orientációban tartalmazzák a C100 cDNS-t, a C100 cDNS-t tartalmazó kifejezőkazettát kimetsszük BamHI-gyel a pS3-56<sub>C100</sub>-ból, és egy ~3400 bp-s fragmentumot, amely a kazettát tartalmazza, izolálunk és tisztítunk. Ezt a fragmentumot azután a pAB24 élesztővektor BamHI helyébe iktatjuk.*

50 *A pAB24, amelynek jelentősebb vonásait a 35. ábrán mutatjuk be, élesztő „ingázó” vektor, amely tartalmazza a replikációhoz a teljes 2 mikronos szekvenciát [Broach (1981)], és tartalmaz pBR322 szekvenciákat. Ez tartalmazza az Yep24 plazmidból [Botstein és munkatársai (1979)] származó élesztő URA3 gént, és a pC1/1 plazmidból származó élesztő LEU<sup>2d</sup> gént (116,201 számú európai szabadalmi közzétételi irat). A pAB24 plazmidot úgy alkotjuk meg, hogy az Yep24-et EcoRI-gyel*

emésztjük, és a vektort újraligáljuk, hogy eltávolítsuk a részleges 2 mikronos szekvenciákat. Az így létrejött plazmidot, az YEP24deltaRI-t ClaI-lyel végzett emésztéssel linearizáljuk, és ligáljuk a komplett 2 mikronos plazmiddal, amelyet előzőleg ClaI-lyel linearizáltunk. Az így létrejött plazmidot, a pCBou-t azután XbaI-lyel emésztjük, és a 8605 bp-s vektorfragmentumot gélen izoláljuk. Ezt az izolált XbaI fragmentumot a pC1/1-ből izolált LEU<sup>2d</sup> gént tartalmazó 4460 bp-s XbaI fragmentummal ligáljuk; a LEU<sup>2d</sup> gén orientációja ugyanabban az irányban van, mint az URA3 gén. A kifejeződés baiktatása a pBR322 szekvencia egyedi BamHI helyén van, így megszakítva a tetraciklin iránti baktérium rezisztenciát szolgáló gént.

A pAB24C100-3 rekombináns plazmidot, amely tartalmazza az SOD-C100 kifejező kazettát, JSC 308 élesztőtörzsbbe, valamint más élesztőtörzsekbe transzformáljuk. A sejteket úgy transzformáljuk, amint ezt Hinnen és munkatársai (1978) leírták; és ureaszelektív lemezekre szélesztjük. Egyedi telepeket izolálunk leuszelektív tápközegekre, és telítettségig növesztjük. A tenyészetet SOD-C100 polipeptid (amelyet C100-3-nak is neveznek) kifejezésére indukáljuk, 1% glükózt tartalmazó YEP-ben növesztve.

A JSC 308 törzs MAT<sup>+</sup>, leu2, ura3(del), DM15(GAP/ADR1) genotípusú, az ADR1 lókusznál integrálva. A JSC 308-ban a pozitív aktivátorgén-termék, az ADR1, túlkifejezése hiperderepressziót eredményez (az ADR1 vad típusú kontrollhoz viszonyítva), és a kifejezett heterológ fehérjék jelentősen magasabb kitermeléseit eredményezi, amikor az ilyen fehérjéket ADH2 U AS szabályozórendszer révén szintetizáljuk. A JSC 308 egyik mintáját az ATCC-nél a Budapesti Szerződés feltételei szerint helyeztük letétbe, ahol ez az ATCC 20 879 számot kapta.

A pAB24C100-3-ban kódolt komplett C100-3 fúziós polipeptid tartalmazza a humán SOD 154 aminosavat az aminoterminalisnál, az EcoRI helyet tartalmazó szintetikus adaptorból származó 5 aminosavat, a C100 cDNS-ből származó 363 aminosavgyököt és az MS2 nukleotidszekvenciából származó 5 karboxiterminális aminosavat a 32. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciával érintkezve. Ezen polipeptid karboxiterminálisának vélt aminosavszekvenciáját, amely az SOD utolsó előtti Ala gyökénél kezdődik, a 36. ábrán mutatjuk be; a polipeptidnek ezt a részét kódoló nukleotidszekvenciát szintén bemutatjuk.

*A C100-on belül kódolt polipeptid azonosítása NANBH-val társult antigénként*

A pAB24100-3 plazmidból a JSC 308 élesztőtörzsbbe kifejezett C100-3 fúziós polipeptid jellemző méret szerint, és a C100-on belül kódolt polipeptid NANBH-val társult antigénként azonosítjuk immunológiai reaktivitásuk alapján krónikus NANBH-ban szenvedő ember szérumával.

A C100-3 polipeptid, amelyet úgy fejezünk ki, amint ezt a korábbiakban leírtuk, az alábbiak szerint elemezzük. Élesztő JSC 308 sejteket transzformálunk pAB24-lyel vagy pAB24C100-3-mal, és úgy indukáljuk, hogy a heterológ plazmid kifejezze a kódolt

polipeptidet. Az 1 ml tenyészetben (OD<sub>650 nm</sub> ~20) lévő indukált élesztősejteket 10 000 fordulat/perccel 1 percen át végzett centrifugálással üledékbe visszük, és lizáljuk élenken forgatva Vortex készüléken 2 térfogat oldat és 1 térfogat üvegyöngy (0,2 millimikron átmérő) jelenlétében. Az oldat 50 mmol/l trisz.HCl-t (ph 8,0), 1 mmol/l EDTA-t, 1 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) és 1 mikrogramm/ml pepsztatint tartalmaz. A lizátumban lévő oldhatatlan anyagot, amely magában foglalja a C100-3 polipeptidet, centrifugálással (10 000 fordulat/perc, 5 perc) összegyűjtjük, és feloldjuk 5 percig forralva Laemmli SDS mintapufferrel [lásd Laemmli (1970)]. Az indukált élesztőtenyészet 0,3 ml-nyi mennyiségével ekvivalens mennyiségű polipeptidet elektroforézisnek vetünk alá 10%-os poliakrilamid gélen SDS jelenlétében [Laemmli (1970)]. Fehérjéstandardokat elektroforetizálunk a géleken ezekkel együtt. A kifejezett polipeptideket tartalmazó géleket vagy Coomassie brilliantkékkel festjük, vagy „Western”-foltképzésnek vetjük alá, krónikus NANBH-ban szenvedő betegből kapott szérumot alkalmazva, hogy meghatározzuk a pAB24-ből és pAB24C100-3-ból kifejezett polipeptidek immunológiai reaktivitását.

Az eredményeket a 37. ábrán mutatjuk be. A 37a. ábrán a polipeptideket Coomassie brilliantkékkel festjük. A pAB24-lyel transzformált JSC 308-ból és a pAB24C100-3-mal transzformált JSC két különböző telepéből való oldhatatlan polipeptideket az 1. csikban (pAB24), illetve a 2. és 3. csikban mutatjuk be. A 2. és 3. csikok összehasonlítása az 1. vonallal egy ~54 000 dalton molekulatömegnek megfelelő indukált polipeptidet mutat, amely a pAB24C100-3-mal transzformált JSC 308-ból származik; ez a pAB24-lyel transzformált JSC 308-ban nem indukálódik. Ezt a polipeptidet nyíllal jelöljük.

A 37b. ábra a pAB24-lyel (1. csík) vagy pAB24C100-3-mal (2. csík) transzformált JSC 308-ban kifejezett oldhatatlan polipeptidek Western-foltjainak eredményeit mutatja be. A pAB24-ből kifejezett polipeptidek immunológiailag nem reaktívak egy NANBH-ban szenvedő emberből való szérummal. Amint a nyíl jelzi, a pABC24100-3-mal transzformált JSC 308 egy olyan ~54 000 dalton molekulatömegű polipeptidet fejez ki, amely viszont immunológiailag reagál a humán NANBH-szérummal. A további immunológiailag reaktív polipeptidek a 2. vonalban lehetnek ennek a ~54 000 daltonos polipeptidnek bomlási vagy aggregálódási termékei.

*A C100-3 fúziós polipeptid tisztítása*

A C100-3 fúziós polipeptid, amely az N-terminálisánál SOD-t tartalmaz és C-terminálisánál azonos keretben C100 HCV-polipeptid, tisztítjuk az extrahált gazda-élesztősejtek, amelyekben a polipeptid kifejeződik, oldhatatlan frakciójának differenciálextrakciójával.

A C100-3 fúziós polipeptid a pAB24C100-3-mal transzformált JSC 308 élesztőtörzsbbe fejezzük ki, amint ezt a IV.B.4. fejezetben kifejtjük. Az élesztősejteket azután homogenizálással lizáljuk, a lizátumban lévő oldhatatlan anyagot pH 12,0-nál extraháljuk, és a maradék oldhatatlan frakcióban lévő C100-3-at SDS-t tartalmazó pufferben szolubilizáljuk.

Az élesztőlizátumot lényegében úgy állítjuk elő, amint ezt Nagahuma és munkatársai (1984) leírják. Olyan élesztősejt-szuszpenziót állítunk elő, amelyben 33% (térfogat/térfogat) sejtet szuszpendálunk olyan oldatban („A” puffer), amely 20 mmol/l trisz.HCl-t (pH 8,0), 1 mmol/l ditiotreitolt és 1 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) tartalmaz. A szuszpenzió (15 ml) egy alikvotját összekeverjük azonos térfogatú üvegyönggyel (0,45–0,50 mm átmérő), és a keveréket Vortex berendezésben [Super Mixer (Lab Line Instruments, Inc.)] csúcssebességnél 8 percig forgatjuk. A homogenizátumokat és az üvegyöngyöket elkülönítjük, és az üvegyöngyöket háromszor mossuk azonos térfogat „A” pufferben, mint az eredeti betöltött sejtek térfogata. A mosóoldatok és a homogenizátum egyesítése után a lizátumban lévő oldhatatlan anyagot a homogenizátum 7000xg-nél, 15 percen át 4 °C hőmérsékleten végzett centrifugálásával, az üledéknek az eredetileg betöltött sejtek kétszeres térfogatával azonos térfogatú „A” pufferben való újraszuszpendálásával, és az így kapott anyagnak 7000xg-nél 15 percen át végzett centrifugálásával kapjuk meg. Ezt a mosási munkamenetet háromszor ismételjük.

A lizátumból az oldhatatlan anyagot pH 12,0-nál extraháljuk az alábbiak szerint. Az üledéket olyan pufferben szuszpendáljuk amely 0,5 mol/l NaCl-t és 1 mmol/l EDTA-t tartalmaz, ahol a szuszpendáló térfogat az eredetileg betöltött sejtek 1,8-szorosa. A szuszpenzió pH-ját beállítjuk 0,2 térfogat 0,4 mol/l-es Na-foszfát-puffer (pH 12,0) hozzáadásával. Összekeverés után a szuszpenziót 7000xg-nél centrifugáljuk 15 percig 4 °C hőmérsékleten, és a felülúszót eltávolítjuk. Az extrahálást kétszer megismételjük. Az extrahált üledéket mossuk olyan módon, hogy szuszpendáljuk ezeket 0,5 mol/l NaCl-t és 1 mmol/l EDTA-t tartalmazó oldatban az eredeti betöltött sejtek kétszeres térfogatának megfelelő szuszpendáló térfogatot alkalmazva, ezt pedig centrifugálás követi 7000xg-nél 15 percen át 4 °C hőmérsékleten.

Az extrahált üledékben lévő C100–3 polipeptidet SDS-sel végzett kezeléssel szolubilizáljuk. Az üledéket az eredeti betöltött térfogat 0,9-szeres térfogatával azonos mennyiségű „A” pufferben szuszpendáljuk, és 0,1 térfogat 2%-os SDS-t adunk hozzá. Miután a szuszpenziót összekevertük, 7000xg-nél centrifugáljuk 15 percen át 4 °C hőmérsékleten. Az így létrejött üledéket még háromszor extraháljuk SDS-sel. Az így létrejövő felülúszókat, amelyek C100–3-at tartalmaznak, összegyűjtjük.

Ez a munkamenet a C100–3-at több, mint tízszeresen tisztítja az élesztőhomogenizátum oldhatatlan frakciójából, és a polipeptid kinyerése 50%-nál több.

A fúziós polipeptid tisztított készítményét poliakrilamidgél-elektroforézissel elemezzük Laemmli (1970) szerint. E szerint az elemzés szerint a polipeptid 80%-nál nagyobb tisztaságú, és látszólagos molekulatömege ~54 000 dalton.

*RNS kimutatása fertőzött egyénekben, amely RNS hibridizál a HCV cDNS-hez*

*NANBH-ban szenvedő csimpánz májában lévő RNS azonosítása, amely RNS HCV cDNS-sel hibridizál*

NANBH-ban szenvedő csimpánz májából származó RNS-ben az alábbiak szerint mutatunk ki olyan RNS-fajtát, amely Northern-foltképzéssel hibridizál a 81. klónon belül lévő HCV cDNS-hez.

Annak a csimpánznak, amelyből a nagy titerű plazma származik, a májából biopsziával mintát veszünk, és ebből RNS-t izolálunk azt a technikát alkalmazva, amelyet Maniatis és munkatársai (1982) írtak le a teljes RNS izolálására emulsiósejtekből, és ezek elkülönítésére poli-A<sup>+</sup> és poli-A<sup>-</sup> frakciókra. Ezeket az RNS-frakciókat elektroforézisnek vetjük alá formaldehid/agaróz gélen [1% (tömeg/térfogat)], és nitro-cellulózra visszük át [Maniatis és munkatársai (1982)]. A nitro-cellulózszűrőket a 81. klónból való radioaktívan jelzett HCV cDNS-sel hibridizáljuk (lásd a 4. ábrát a beiktatás nukleotidszekvenciájával kapcsolatban). Abból a célból, hogy radioaktív vizsgálómintát állítsunk elő, a 81. klónból izolált HCV cDNS-beiktatást radioaktívan jelezzük <sup>32</sup>P-vel hézag- (nick) transzláció segítségével DNS-polimeráz I-et alkalmazva [Maniatis és munkatársai (1982)]. A hibridizálást 18 órán át végezzük 42 °C hőmérsékleten olyan oldatban, amely 10% (tömeg/térfogat) dextranszulfátot, 50% (tömeg/térfogat) ionmentesített formamidot, 750 mmol/l NaCl-t, 75 mmol/l Na-citrátot, 20 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-et (pH 6,5) 0,1% SDS-t, 0,02% (tömeg/térfogat) szarvasmarha-szérumalbumint (BSA), 0,02% (tömeg/térfogat) Ficoll-400-at, 0,02% (tömeg/térfogat) poli(vinil-pirrolidon)-t, 100 mikrogramm/ml lazacsperma DNS-t (amelyet előzőleg ultrahangos kezeléssel nyírtunk és denaturáltunk) és 10<sup>6</sup> CPM/ml hézag- (nick) transzlált cDNS-vizsgálómintát tartalmaz.

Az átvizsgált szűrő autoradiogramját a 38. ábrán mutatjuk be. Az 1. csík tartalmazza a <sup>32</sup>P-vel jelzett restrikciósfragmentum-markereket. A 2–4. csíkok tartalmazzák a csimpánzmáj RNS-eket az alábbiak szerint: a 2. csík 30 mikrogramm teljes RNS-t tartalmaz; a 3. csík 30 mikrogramm poli-A<sup>-</sup> RNS-t tartalmaz; és a 4. csík 20 mikrogramm poli-A<sup>+</sup> RNS-t tartalmaz. Amint a 38. ábrán látható, az NANBH-ban szenvedő csimpánz mája rokon poli-A<sup>+</sup> RNS-molekulák heterogén populációját tartalmazza, amelyek a HCV cDNS-vizsgálómintához hibridizálnak, és amelyek, úgy tűnik, mintegy 5000 nukleotid és mintegy 11 000 nukleotid közti méretűek. Ez az RNS, amely a HCV cDNS-sel hibridizál, a vírusgenomokat és/vagy a vírusgenom fajlagos átiratait képviselheti.

Az alábbiakban leírt kísérlet egybevág azzal a feltételezéssel, hogy a HCV egy RNS-genomot tartalmaz.

*HCV eredetű RNS azonosítása fertőzött egyedek szérumában*

Nagy titerű csimpánz NANBH-plazmából izolált részecskékből nukleinsavakat extrahálunk, amint ezt az előzőekben leírtuk. Az izolált nukleinsavakból alikvotokat (1 ml eredeti plazmának megfelelőket) újraszuszpendálunk 20 mikroliter olyan oldatban, amely 50 mmol/l Hepes-t (pH 7,5), 1 mmol/l EDTA-t és 16 mikrogramm/ml oldható élesztő RNS-t tartalmaz. A mintákat denaturáljuk 5 perces forralással, amelyet

azonnal fagyasztás követ, majd RN-áz A-val [5 mikroliter, amely 0,1 mg/ml RN-áz A-t, 25 mmol/l EDTA-t és 40 mmol/l Hepes-t (pH 7,5) tartalmaz] vagy DN-áz I-geyel [5 mikroliter, amely 10 mmol/l  $MgCl_2$ -t és 25 mmol/l Hepes-t (pH 7,5) tartalmazó oldatban 1 egység DN-áz I-et tartalmaz] kezeljük; a kontrollmintákat enzim nélkül inkubáljuk. Az inkubálást követően 230 mikroliter jéghideg  $2 \times SSC$ -t, amely még 2 mikrogramm oldható élesztő RNS-t is tartalmaz, adunk hozzá, és a mintákat nitro-cellulózszűrőn szűrjük. A szűrőket a 81. klónból való cDNS vizsgálómintákkal hibridizáljuk, amely vizsgálómintákat előzőleg  $^{32}P$ -vel jeleztünk hézag- (nick) transzláció segítségével. A 39. ábra a szűrő autoradiogramját mutatja be. A hibridizációs jelzéssel kimutathatók a DN-ázzal kezelt és kontrollmintákban (2., illetve 1. csíkok), de nem mutathatók ki az RN-ázzal kezelt mintában (3. csík). Így mivel az RN-áz kezelés elroncsolja a részecskékből izolált nukleinsavakat, és a DN-áz I kezelésnek nincs hatása, ez a bizonyíték erősen sugallja, hogy a HCV-genom RNS-ből áll.

*HCV nukleinsavszekvenciákból származó amplifikált HCV nukleinsavszekvenciák kimutatása NANBH-ban szenvedő csimpánzokból való máj- és plazmamintákban*

NANBH-ban szenvedő csimpánzok és kontrollcsimpánzok májában és plazmájában jelen lévő HCV-nukleinsavakat amplifikálunk, lényegében azt a polimeráz láncreakciós technikát (PCR) alkalmazva, amelyet Saihi és munkatársai (1986) leírtak. A primer oligonukleotidok a 81. klónban vagy 36. és 37. klónban lévő HCV cDNS-ből származnak. Az amplifikált szekvenciákat gélelektroforézissel és Southern-foltképzéssel mutatjuk ki, vizsgálómintaként a megfelelő cDNS oligomert alkalmazva abból a területből való szekvenciával, amely a két primer között van, de a két primer nem foglalja magában.

Az amplifikációs módszerrel vizsgálandó HCV-szekvenciákat tartalmazó RNS-mintákat három, NANBH-ban szenvedő csimpánz és két kontrollcsimpánz májbiopsziás mintájából izoláljuk. Az RNS-frakció izolálását az előbbiekből leírt guanidium-tiocianátos eljárással végezzük.

Az RNS mintáit, amelyet az amplifikációs módszerek amplifikálni szándékozunk, izoláljuk két, NANBH-ban szenvedő csimpánz plazmájából, és egy kontrollcsimpánz plazmájából, valamint kontrollcsimpánzokból származó plazmák gyűjteményéből. Az egyik fertőzött csimpánznak  $10^6$ , vagy nagyobb a CID/ml értéke, és a másinak  $10^5$ , vagy nagyobb a CID/ml értéke.

A nukleinsavakat a plazmából az alábbiak szerint vonjuk ki. Vagy 0,1 ml vagy 0,01 ml plazmát hígítunk 1,0 ml végső térfogatra TENB/K proteináz/SDS oldattal [0,05 mol/l trisz.HCl (pH 8,0), 0,001 mol/l EDTA, 0,1 mol/l NaCl, 1 mg/ml K-proteináz és 0,5% SDS], amely még 10 mikrogramm/ml poliadenilsavat is tartalmaz, és inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten 60 percig. Ez után a K-proteináz emésztés után az így létrejövő plazmafrakciókat fehérjementesítjük TE-vel [10,0 mmol/l trisz.HCl (pH 8,0), 1 mmol/l EDTA] te-

lített fenollal végzett extrahálással. A fenolos fázist centrifugálással elkülönítjük, és újból extraháljuk 0,1% SDS-t is tartalmazó TENB-vel. Az egyes extrakciókból így kapott vizes fázisokat egyesítjük, és kétszer extraháljuk azonos térfogatú keverékkel, amely fenolt, kloroformot és izoamil-alkoholt tartalmaz (1:1, illetve 99:2 arányban), majd kétszer extraháljuk azonos térfogatú másik keverékkel, amely kloroformot és izoamil-alkoholt tartalmaz (99:1 térfogatarányban). A centrifugálással végzett fáziselkülönítést követően a vizes fázist végső koncentrációként 0,2 mólossá tesszük Na-acetátra, és a nukleinsavakat két térfogat etanol hozzáadásával kicsapjuk. A kicsapott nukleinsavakat SW 41 rotorban 38K-nál 60 percen át 4 °C hőmérsékleten végzett ultracentrifugálással kinyerjük.

A fentiekén kívül a magas titerű csimpánzplazmát és az összegyűjtött kontrollplazmát egy másik eljárás szerint 5 mikrogramm poli-A hordozóval extraháljuk Chomczycki és Sacchi (1987) eljárása szerint. Ez az eljárás savas guanidium-tiocianátos extrahálást alkalmaz. Az RNS-t 10 000 fordulat/percnél, Eppendorf mikrocentrifugában 10 percig 4 °C hőmérsékleten végzett centrifugálással nyerjük ki.

Két esetben a cDNS szintézise előtt a PCR-reakcióban a K-proteináz (SDS) fenolos eljárással plazmából extrahált nukleinsavakat tovább tisztítjuk „S és S” Elutip-R oszlopokhoz való kötéssel, és erről leoldással. Az eljárást a gyártók előírásait követve hajtjuk végre („S és S”: Schleicher & Schüll GmbH, Einbeut, Németország).

A PCR-reakcióban templátként alkalmazott cDNS-ek a fentebb leírtak szerint készített nukleinsavakból készülnek (vagy teljes nukleinsavak, vagy RNS-ek). Az etanolos kicsapást követően a kicsapott nukleinsavakat szárítjuk, és újból szuszpendáljuk DEPC-vel kezelt desztillált vízben. A nukleinsavakban lévő szekunder szerkezeteket 65 °C hőmérsékleten 10 percen át végzett kezeléssel szétzúzzuk, és a mintákat jégen azonnal lehűtjük. CDNS-t szintetizálunk 1–3 mikrogramm, májból eredő teljes csimpánz RNS-t alkalmazva, májból 10–100 mikroliter plazmából extrahált nukleinsavakból (vagy RNS-ből). A szintézis reverz transzkriptázt alkalmaz, és 25 mikroliter reakció-térfogatban megy végbe, a gyártó (BRL) által pontosított munkamenetet alkalmazva. A cDNS-szintézisben szolgáló primerek azok, amelyeket a fentebb leírt PCR-reakcióban is alkalmazunk. A cDNS-szintézishez alkalmazott összes reakciókeverék 23 egység RN-áz inhibitorot tartalmaz [RNASIN (Fisher/Promega)]. A cDNS-szintézist követően a reakciókeverékeket vízzel hígítjuk, 10 percig forraljuk, és jégen gyorsan lehűtjük.

A PCR-reakciókat lényegében úgy hajtjuk végre, ahogyan ezt a gyártók (Cetus, Perkin-Elmer) útmutatói leírják, azzal a különbséggel, hogy 1 mikrogramm RN-áz A-t adunk hozzá. A reakciót 100 mikroliter végső térfogatban hajtjuk végre. A PCR-t 35 ciklusban hajtjuk végre, 37 °C, 72 °C és 94 °C menetrendet alkalmazva.

A primerek a cDNS-szintézishez és a PCR-reakciókhoz vagy a 81., vagy a 36., vagy a 37b. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciákból származnak. (A 81., 36. és 37b. klónok HCV cDNS-szekvenciáit a 4., 5., illetve 10. ábrán mutatjuk be). A 81. klónból származó két 16-mer primer szekvenciája az alábbi:

5'-CAA TCA TAC CTG ACA G-3'  
és

5'-GAT AAC CTC TGC CTG A-3'

A 36. klónból származó primer szekvenciája az alábbi:

5'-GCA TGT CAT GAT GTA T-3'

A 37b. klónból származó primer szekvenciája az alábbi:

5'-ACA ATA CGT GTG TCA C-3'

A PCR-reakciókban a primer párok vagy a 81. klónból származó két 16-merből, vagy a 36. klónból származó 16-merből és a 37b. klónból származó 16-merből állnak.

A PCR-reakciótermékeket a termékek alkálikus gélelektroforézissel végzett elkülönítésével elemezzük, ahol az elkülönítést Southern-foltképzés követi, majd az amplifikált HCV cDNS-szekvenciákat kimutatjuk HCV cDNS olyan területéből származó, <sup>32</sup>P jelzett belső oligonukleotidvizsgáló mintával, amely terület nem fedi át a primert. A PCR-reakciókeverékeket fenol/kloroformmal extraháljuk, és a nukleinsavakat a vizes fázisból sóval és etanollal kicsapjuk. A kicsapott nukleinsavakat centrifugálással összegyűjtjük, és desztillált vízben feloldjuk. A minták alikvotjait elektroforézisnek vetjük alá 1,8%-os agarózgéleken. 60, 108 és 161 nukleotid hosszúságú DNS-eket molekulatömeg-markerként együtt elektroforezizálunk a géleken. Elektroforézis után a gélen lévő DNS-eket átvisszük „Biorad Zeta Probe” papírra. Az előhibridizálást, hibridizálást és a mosási körülményeket a gyártó (Biorad) útmutatásai szerint alakíthatjuk ki.

Az amplifikált HCV cDNS-szekvenciák hibridizációs kimutatásához alkalmazott vizsgálóminták az alábbiak. Amikor a PCR-primerek párja a 81. klónból származik, a vizsgálóminta olyan szekvenciának megfelelő 108-mer, amely szekvencia a két primer szekvenciája közti területen helyezkedik el. Amikor a PCR-primerek párja a 36. és 37b. klónokból származik, a vizsgálóminta a 35. klónból származó, hézag(nick) transzlatált HCV cDNS-beiktatás. A primerek a 37b. klón beiktatás 155–170. nukleotidjaiból és a 36. klón beiktatás 206–268. nukleotidjaiból származnak. A 35. klónban lévő HCV cDNS-beiktatás 3'-vége átfedi a 37b. klónban lévő 207–269. nukleotidokat (vesd össze az 5., 8. és 10. ábrákat). Így a 35. klónban lévő cDNS-beiktatás átfogja a 36. és 37b. eredetű primerek szekvenciája közti terület egy részét, és alkalmas vizsgálómintaként azokhoz az amplifikált szekvenciákhoz, amelyek ezeket a primereket magukban foglalják.

A májmintákból származó RNS elemzését a fenti munkamenet szerint végezzük mind a primerek, mind a vizsgálóminták készletét alkalmazva. Az NANBH-ban szenvedő három csimpánz májából való RNS pozitív

hibridizációs eredményeket mutat a várt méretű (161 és 586 nukleotid a 81.-nél, illetve 36. és 37b.-nél) amplifikált szekvenciákra, míg a kontrollcsimpánzok negatív hibridizációs eredményeket mutatnak. Ugyanezeket az eredményeket érjük el akkor is, amikor a kísérletet háromszor megismételjük.

A plazmából való nukleinsavak és RNS elemzéséhez szintén a fenti munkamenetet alkalmazzuk, a 81. klónból származó primereket és vizsgálómintát alkalmazva. A plazmák az alábbiak: két, NANBH-ban szenvedő csimpánzból való plazma, egy kontrollcsimpánzból való plazma, és kontrollcsimpánzból összegyűjtött plazma. Mindkét NANBH-plazma olyan nukleinsavakat/RNS-eket tartalmaz, amelyek pozitív eredményeket adnak a PCR-amplifikációs vizsgálatban, míg mindkét kontrollplazma negatív eredményeket nyújt.

*Radioimmunszé HCV-antitestek kimutatására fertőzött egyénekből való szérumokban*

Szilárd fázisú radioimmunszéjét fejlesztünk ki HCV-antigének ellen antitestek kimutatására, Tsu és Herzenberg (1980) közleménye alapján. Mikrotitrálólemezeket (Immulon 2, Removawell csikok) burkolunk be HCV-epitópokat tartalmazó tisztított polipeptidokkal. A burkolt lemezeket vagy humánszérummintákkal inkubáljuk, amelyekről feltételezhető, hogy HCV-epitópok elleni antitesteket tartalmaznak, vagy megfelelő kontrollokkal inkubáljuk. Az inkubálás során az antitest, ha van jelen, immunológiai kötődik a szilárd fázisú antigénhez. A nem kötött anyag eltávolítása és a mikrotitrálólemezek mosása után humán antitest-NANBV-antigén komplexeket mutatunk ki <sup>125</sup>I-vel jelzett jun-anti-humán immunglobulinnal végzett inkubálással. A nem kötött jelzett antitestet leszívással eltávolítjuk, és a lemezeket mossuk. A radioaktivitást az egyes üregekben mérjük; a kötött humán anti-HCV-antitest mennyisége arányos az üregekben lévő radioaktivitással.

*A SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> fúziós polipeptid tisztítása*

A SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> fúziós polipeptidet, amelyet rekombináns baktériumokban fejezünk ki, amint ezt az előbbiekből leírtuk, a rekombináns E. coliból a sejtextaktumok karbamiddal végzett differenciál-extrakciójával tisztítjuk, amelyet anion- vagy kationcserélő oszlopon végzett kromatográfia követ az alábbiak szerint.

1 liter tenyészetből való fagyasztott sejteket újraszuszpendálunk 10 ml 20%-os (tömeg/térfogat) szacharózoldatban, amely 0,01 mol/l trisz.HCl-t (pH 8,0) tartalmaz, és 0,4 ml 0,5 mol/l-es EDTA-oldatot (pH 8,0) adunk hozzá. 5 perces állás után 0 °C hőmérsékleten a keveréket 4000xg-nél 10 percig centrifugáljuk. Az így létrejövő üledéket 10 ml 25%-os (tömeg/térfogat) szacharózban szuszpendáljuk, amely 0,05 mol/l trisz.HCl-t (pH 8,0), 1 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) és 1 mikrogramm/ml pepsztatin A-t is tartalmaz, majd 0,5 ml lizozimot (10 mg/ml) adunk hozzá, és 0 °C hőmérsékleten 10 percig inkubáljuk. 10 ml 1% (térfogat/térfogat) Triton X-100 hozzáadása után, amely 0,05 mol/l trisz.HCl-t (pH 8,0) és 1 mmol/l

EDTA-t tartalmazó oldatban van, a keveréket további 10 percen át inkubáljuk 0 °C hőmérsékleten, alkalmanként rázogatva. Az így létrejövő viszkózus oldatot homogenizáljuk olyan módon, hogy hatszor átnyomjuk steril, 20. kaliberű injekciós fecskendőn, és centrifugáljuk 13 000xg-nél 25 percen át. Az üledékbe vitt anyagot 5 ml 0,01 mol/literes trisz.HCl-ben (pH 8,0) szuszpendáljuk, és a szuszpenziót 4000xg-nél centrifugáljuk 10 percen át. Az üledéket, amely SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> fúziós fehérjét tartalmaz, feloldjuk 5 ml 6 mol/l-es karbamidban, amely 0,02 mol/l trisz.HCl-t (pH 8,0) és 1 mmol/l ditiotreitolt tartalmazó oldatban („A” puffer) van, és ezt „A” pufferrel kiegyensúlyozott Q-Sepharose Fast Flow oszlopra tápláljuk. A polipeptideket „A” pufferben lévő 0,0–0,3 mol/l NaCl lineáris gradienssel eluáljuk. Az eluálás után a frakciókat poliakrilamidgél-elektroforézissel elemezzük SDS jelenlétében, hogy meghatározzuk SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-tartalmukat. Az ezt a polipeptidet tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, és dializáljuk 0,02 mol/l nátrium-foszfát-puffert (pH 6,0) és 1 mmol ditiotreitolt tartalmazó oldatban („B” puffer) lévő 6 mmol/l karbamiddal szemben. A dializált mintát „B” pufferrel kiegyensúlyozott S-Sepharose Fast Flow oszlopra tápláljuk, és a polipeptideket „B” pufferben lévő 0,0–0,3 mol/l NaCl lineáris gradienssel eluáljuk. A frakciókat poliakrilamidgél-elektroforézissel elemezzük SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> jelenlétére, és a megfelelő frakciókat összegyűjtjük.

A SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-polipeptid végső készítményét elektroforézissel megvizsgáljuk poliakrilamid gélen SDS jelenlétében. E szerint az elemzés szerint a készítmény tisztasága 80%-nál több.

#### *A SOD-NANB<sub>81</sub> fúziós polipeptid tisztítása*

A SOD-NANB<sub>81</sub> fúziós polipeptidet, amelyet rekombináns baktériumokban fejezünk ki, amint ezt az előbbieken leírtuk, a rekombináns E. coliból a sejtext-raktumok karbamiddal végzett differenciálextrakciójával tisztítjuk, amelyet anion- vagy kationcserélő oszlopon végzett kromatográfia követ, azt a munkamenetet alkalmazva, amelyet a SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> fúziós polipeptid izolálásánál leírtunk.

A SOD-NANB<sub>81</sub>-polipeptid végső készítményét elektroforézissel megvizsgáljuk poliakrilamid gélen SDS jelenlétében. E szerint az elemzés szerint a készítmény tisztasága 50%-nál több.

#### *HCV-epitópok elleni antitestek kimutatása szilárd fázisú radioimmunszéssel*

32 betegből, akikről azt diagnosztizálták, hogy NANBH-ban szenvednek, származó szérumsintát

elemzünk radioimmunszéssel (RIA), hogy meghatározzuk, a SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> és SOD-NANB<sub>81</sub> fúziós polipeptidekben jelen lévő HCV-epitópok elleni antitestek kimutathatók-e.

5 Mikrotitrálólemezeket burkolunk be olyan SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-gyel vagy SOD-NANB<sub>81</sub>-gyel, amelyet részlegesen megtisztítottunk az előző fejezetekben leírtak szerint. A vizsgálatokat az alábbiak szerint hajtjuk végre.

10 0,1–0,5 mikrogramm SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-et vagy SOD-NANB<sub>81</sub>-et tartalmazó 100 mikroliteres alikvotokat, amelyek 0,125 mol/l-es Na-borát-puffert (pH 8,3) és 0,075 mol/l NaCl-t tartalmazó oldatban (BBS) vannak, adunk egy mikrotitrálólemez (Dynatech Immulon 2, Removawell csíkok) egyes üregeihez. A lemezt 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy éjszakán át nedves kamrában, amely után a fehérjeoldatot eltávolítjuk, és az üreget háromszor mossuk 0,02% Triton X-100-at tartalmazó BBS-sel (BBST). Abból a célból, hogy megelőzzük a nem fajlagos kötéseket, az üregeket szarvasmarha-szérumalbuminnal (BSA) burkoljuk BBS-ben lévő BSA 5 mg/ml-es oldatából 100 µl hozzáadásával, amelyet 1 órás inkubálás követ szobahőmérsékleten; ez után az inkubálás után a BSA-oldatot eltávolítjuk. A burkolt üregekben lévő polipeptideket reagáltatjuk szérummal olyan módon, hogy 1:100 arányban 0,01 mol/l Na-foszfát-puffert (pH 7,2) és 0,15 mol/l NaCl-t tartalmazó oldattal (PBS) – amely még 10 mg/ml BSA-t is tartalmaz – hígított szérumsintából 100 mikrolitert adunk hozzá, és a szérumot tartalmazó üregeket 1 órán át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten. Inkubálás után a szérumsintákat leszívással eltávolítjuk, és az üregeket ötször mossuk BBST-vel. A fúziós polipeptidekhez kötött anti-NANB<sub>5-1-1</sub> és anti-NANB<sub>81</sub>-et a <sup>125</sup>I-vel jelzett F<sup>2</sup>(ab)<sub>2</sub> juh-anti-humán IgG kötésével határozzuk meg a beburkolt üregekhez. A jelzett vizsgálóminta 100 mikroliteres alikvotjait (fajlagos aktivitás 5–20 mikrocurie/mikrogramm) hozzáadjuk az egyes üregekhez, és a lemezeket 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk, ezt követi a fölösleges vizsgálóminta eltávolítása leszívással, és 5 mosás BBST-vel. Az egyes üregekben kötött radioaktivitás mennyiségét olyan számlálóban (counter) mérjük, amely gammaszórást mutat ki.

45 Az anti-NANB<sub>5-1-1</sub> és anti-NANB<sub>81</sub> kimutatásának eredményeit NANBH-ban szenvedő egyénekben az 1. táblázatban mutatjuk be.

#### *1. táblázat*

Anti-5-1-1. és anti-81. kimutatása NANB, HAV és HBV hepatitiszes betegek szérumaiban

Beteg-referenciaszám	Diagnózis	S/N Anti-5-1-1.	Anti-81.
1.28 <sup>1</sup>	Krónikus NANB, IVD <sup>2</sup>	0,77	4,20
	Krónikus NANB, IVD	1,14	5,14
	Krónikus NANB, IVD	2,11	4,05

1. táblázat (folytatás)

Beteg-referenciaszám	Diagnózis	S/N Anti-5-1-1.	Anti-81.
2.29 <sup>1</sup>	AVH <sup>3</sup> , NANB, szórványos	1,09	1,05
	Krónikus, NANB	33,09	11,39
	Krónikus, NANB	36,22	13,67
3.30 <sup>1</sup>	AVH, NANB, IVD	1,90	1,54
	Krónikus NANB, IVD	34,17	30,28
	Krónikus NANB, IVD	32,45	30,84
4.31 <sup>1</sup>	Krónikus NANB, PT <sup>4</sup>	16,09	8,05
5.32 <sup>1</sup>	Késői AVH NANB, IVD	0,69	0,94
	Késői AVH NANB, IVD	0,73	0,68
6.33 <sup>1</sup>	AVH, NANB, IVD	1,66	1,96
	AVH, NANB, IVD	1,53	0,56
7.34 <sup>1</sup>	Krónikus NANB, PT	34,40	7,55
	Krónikus NANB, PT	45,55	13,11
	Krónikus NANB, PT	41,58	13,45
	Krónikus NANB, PT	44,20	15,48
8.35 <sup>1</sup>	AVH, NANB, IVD	31,92	31,95
	Most „gyógyult” NANB, AVH	6,87	4,45
9.36	Késői AVH NANB PT	11,84	5,79
10.37	AVH NANB, IVD	6,52	1,33
11.38	Késői AVN NANB, PT	39,44	39,18
12.39	Krónikus NANB, PT	42,22	37,54
13.40	AVH, NANB, PT	1,35	1,17
14.41	Krónikus NANB, PT	0,35	0,28
15.42	AVH, NANB, IVD	6,25	2,34
16.43	Krónikus NANB, PT	0,74	0,61
17.44	AVH, NANB, PT	5,40	1,83
18.45	Krónikus, NANB, PT	0,52	0,32
19.46	AVH, NANB	23,35	4,45
20.47	AVH, „A” típus	1,60	1,35
21.48	AVH, „A” típus	1,30	0,66
22.49	AVH, „A” típus	1,44	0,74
23.50	Jelenleg gyógyult AVH, „A” típus	0,48	0,56
24.51	AVH, „A” típus	0,68	0,64
	Gyógyult AVH, „A” típus	0,80	0,65
25.52	Most gyógyult AVH, „A” típus	1,38	1,04
	Most gyógyult AVH, „A” típus	0,80	0,65
26.53	AVH, „A” típus	1,85	1,16
	Most gyógyult AVH, „A” típus	1,02	0,88
27.54	AVH, „A” típus	1,35	0,74
28.55	Késői AVH, HBV	0,58	0,55

1. táblázat (folytatás)

Beteg-referenciaszám	Diagnózis	S/N Anti-5-1-1.	Anti-81.
29.56	Krónikus HBV	0,84	1,06
30.57	Késői AVH, HBV	3,20	1,60
31.58	Krónikus HBV	0,47	0,46
32.59 <sup>1</sup>	AVH, HBV	0,73	0,60
	Gyógyult AVH, HBV	0,43	0,44
33.60 <sup>1</sup>	AVH, HBV	1,06	0,92
	Gyógyult AVH, HBV	0,75	0,68
34.61 <sup>1</sup>	AVH, HBV	1,66	0,61
	Gyógyult AVH, HBV	0,63	0,36
35.62 <sup>1</sup>	AVH, HBV	1,02	0,73
	Gyógyult AVH, HBV	0,41	0,42
36.63 <sup>1</sup>	AVH, HBV	1,24	1,31
	Gyógyult AVH, HBV	1,55	0,45
37.64 <sup>1</sup>	AVH, HBV	0,82	0,79
	Gyógyult AVH, HBV	0,53	0,37
38.65 <sup>1</sup>	AVH, HBV	0,95	0,92
	Gyógyult AVH, HBV	0,70	0,50
39.66 <sup>1</sup>	AVH, HBV	1,03	0,68
	Gyógyult AVH, HBV	1,71	1,39

<sup>1</sup> Szérum-sorozatminták, amelyek ezekből a betegekből rendelkezésre állnak

<sup>2</sup> IVD=Intravénás gyógyszeralkalmazók

<sup>3</sup> AVH=Akut vírushepatitis

<sup>4</sup> PT=Transzfúzió után

Amint az 1. táblázatból látható, a 32 szérum közül, amelyek NANBH-ban szenvedő betegnek diagnosztizált betegekből származnak, 19 pozitív a SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-ben és SOD-NANB<sub>81</sub>-ben jelen lévő HCV-epitópok ellen irányuló antitestek szempontjából.

Azok a szérumminták azonban, amelyek pozitívak, immunológiailag nem egyformán reaktívak SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-gyel és SOD-NANB<sub>81</sub>-gyel. Az 1. számú betegből való szérumminták pozitívak SOD-NANB<sub>81</sub>-re, de SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-re nem. A 10., 15. és 17. számú betegekből származó szérumminták pozitívak SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-re, de SOD-NANB<sub>81</sub>-re nem. A 3., 8., 11. és 12. betegekből származó szérumminták egyformán reagálnak mindkét fúziós polipeptiddel, míg a 2., 4., 7. és 9. betegekből származó szérumminták 2-3-szor erősebb reakciót mutatnak SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-hez, mint SOD-NANB<sub>81</sub>-hez. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az NANB<sub>5-1-1</sub> és NANB<sub>81</sub> legalább 3 különböző epitópot tartalmaznak, azaz lehetséges, hogy az egyes polipeptidek legalább 1 egyedi epitópot tartalmaznak, és hogy a két polipeptid legalább 1 polipeptiden osztozik.

*A szilárd fázisú RIA fajlagosságát NANBH-ra*

A szilárd fázisú RIA-vizsgálatok fajlagosságát NANBH-ra úgy vizsgáljuk, hogy a vizsgálatot elvégez-

zük HAV-val vagy HBV-vel fertőzött egyének szérumán, és kontrollegyének szérumán. A részlegesen tisztított SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-et és SOD-NANB<sub>81</sub>-et alkalmazó vizsgálatokat lényegében úgy hajtjuk végre, amint ezt egy korábbi fejezetben leírtuk, azzal a kivétellel, hogy a szérum olyan betegekből való, akiről előzőleg diagnosztizáltak, hogy HAV-ban vagy HBV-ben szenvednek vagy olyan egyénekből való, akik vérbankban véradók. A HAV-val és HBV-vel fertőzött betegekből való szérumokhoz tartozó eredményeket az 1. táblázatban adjuk meg. A RIA-vizsgálatot 11 HAV-val fertőzött betegszérummintát és 20 HBV-vel fertőzött betegszérummintát alkalmazva hajtjuk végre. Amint az 1. táblázatban bemutatjuk, ezeknek a szérumoknak egyike sem alakít ki pozitív immunológiai reakciót a BB-NANBV-epitópot tartalmazó fúziós polipeptidekkel.

Az NANB<sub>5-1-1</sub>-antigént tartalmazó RIA-vizsgálatokat kontrollegyénekből való szérum immunológiai reaktivitásának meghatározására alkalmazzuk. A normális véradó-populációból kapott 230 szérummintából csak 2 adott pozitív eredményt a RIA-vizsgálatban (adatokat nem mutatunk be). Lehetséges, hogy az a két véradó, akikből ezek a szérumminták származnak, korábban ki volt téve HCV-nek.

*Az NANB<sub>5-1-1</sub> reaktivitása az NANBH-fertőzés során*

Az anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-antitestek jelenlétét 2 beteg és 4 csimpánz NANBH-fertőzésének menete során követjük RIA-vizsgálatot alkalmazva. Ezenkívül a RIA-vizsgálatot arra is alkalmazzuk, hogy meghatározzuk az anti-NANB<sub>5-1-1</sub> jelenlétét vagy hiányát a HAV- és HBV-fertőzés menete során fertőzött csimpánzokban.

Az eredmények, amelyeket a 2. táblázatban mutatunk be, azt mutatják, hogy csimpánzoknál és emberekénél anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-antitesteket mutatunk ki az NANBH-fertőzés akut fázisának beindulását követően.

5 Nem mutatunk ki anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-antitesteket HAV-val vagy HBV-vel fertőzött csimpánzokból való szérumbintákban. Így ezek az anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-antitestek szolgálnak markerként a HCV-vel fertőzött egyénekhez.

*2. táblázat*

Szérumkonverzió hepatitisbetegekből és csimpánzokból való egymás utáni szérumbintákban, 5-1-1. antigént alkalmazva

Beteg/csimpánz	A minta dátuma (nap) (0=az inokulálás napja)	Hepatitisvírus	Anti-5-1-1. (S/N)	Alt (mu/ml)
29. beteg	T*	NANB	1,09	1180
	T+180		33,89	425
	T+280		36,22	–
30. beteg	T	NANB	1,90	1830
	T+307		34,17	290
	T+799		32,45	276
1. csimpánz	0	NANB	0,87	9
	76		0,93	71
	118		23,67	19
	154		32,41	–
2. csimpánz	0	NANB	1,00	5
	21		1,08	52
	73		4,64	13
	138		25,01	–
3. csimpánz	0	NANB	1,08	8
	43		1,44	205
	53		1,82	14
	159		11,87	6
4. csimpánz	–3	NANB	1,12	11
	55		1,25	132
	83		6,60	–
	140		17,51	–
5. csimpánz	0	HAV	1,12	4
	25		1,25	147
	40		6,60	18
	268		17,51	5
6. csimpánz	–8	HAV	0,85	–
	15		–	106
	41		0,81	10
	129		1,33	–
7. csimpánz	0	HAV	1,17	7
	22		1,60	83
	115		1,55	5
	139		1,60	–

2. táblázat (folytatás)

Bcteg/csimpánz	A minta dátuma (nap) (0=az inokulálás napja)	Hepatitisvírus	Anti-5-1-1. (S/N)	Alt (mu/ml)
8. csimpánz	0	HAV	0,77	15
	26		1,98	130
	74		1,77	8
	205		1,27	5
9. csimpánz	-290	HBV	1,74	-
	379		9,29	9
	435		2,77	6
10. csimpánz	0	HBV	2,35	8
	111-118 (gyűjtemény)		2,74	96-155 (gyűjtemény)
	205		2,05	9
	240		1,78	13
11. csimpánz	0	HBV	1,82	11
	28-56 (gyűjtemény)		1,26	8-100 (gyűjtemény)
	169		-	9
	223		0,52	10

\*=a kezdeti mintavétel napja

#### *NANB<sub>5-1-1</sub> elleni poliklonális szérumentestek tisztítása*

A SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-polipeptid fajlagos immunológiai reaktivitása alapján az NANBH-ban szenvedő betegekben való szérummintákban lévő antitestekkel eljárást fejlesztünk ki olyan szérum-antitestek tisztítására, amelyek immunológiailag reagálnak az NANB<sub>5-1-1</sub>-ben lévő epitóppal vagy epitópokkal. Ez az eljárás affinitáskromatográfiát használ. Tisztított SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> polipeptidet oldhatatlan hordozóanyaghoz rögzítünk; a rögzítés olyan, hogy az immobilizált polipeptid megőrzi affinitását az NANB<sub>5-1-1</sub> elleni antitesthez. A szérummintában lévő antitestek adszorbeálódnak a mátrixhoz kötött polipeptidhez. A mosás után, amelynek az a célja, hogy eltávolítsuk a nem fajlagosan kötött anyagokat és nem kötött anyagokat, a kötött antitesteket kiszabadítjuk a kötött SOD-HCV-polipeptidből a pH megváltoztatásával és/vagy kaotrop reagensekkel, például karbamiddal.

Kötött SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-et tartalmazó membránokat készítünk az alábbiak szerint. Nitro-cellulóz-membránt (2,1 cm-es Sartorius, 0,2 mikron pórusmérettel) mosunk háromszor 3 percig BBS-sel. A SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> a membránhoz kötődik a tisztított készítmény inkubálásával BBS-ben szobahőmérsékleten 2 órán át; egy másik eljárás szerint ezt 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy éjszakán át. A nem kötött antigént tartalmazó oldatot eltávolítjuk, és a szűrőt háromszor mossuk BBS-sel, mosásonként 3 percig. A membránon megmaradó aktív helyeket BSA-val blokkoljuk 5 mg/ml BSA-oldattal 30 percen át végzett inkubálással. A fölösleges BSA-t a membrán mosásával távolítjuk el, BBS-sel ötször és desztillált vízzel háromszor mosva. A vírusantigént és BSA-t tartalmazó membránt azután 0,05 mol/l glicin-

hidrokloridot (pH 2,5) és 0,10 mol/l NaCl-t tartalmazó oldattal (GlyHCl) 15 percig kezeljük, majd három percig mossuk PBS-sel.

Poliklonális anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-antitesteket izolálunk olyan módon, hogy a fúziós polipeptidet tartalmazó membránokat inkubáljuk NANB-vel fertőzött egyénekből származó szérummal 2 órán át. Az inkubálás után a szűrőket mossuk ötször BBS-sel és kétszer desztillált vízzel. A kötött antitesteket azután az egyes szűrőkről eluáljuk ötször GlyHCl-lel, elucióként 3-3 percig. Az eluátumok pH-ját 8-ra állítjuk be, az egyes eluátumokat 2,0 mol/l-es trisz.HCl-t (pH 8,0) tartalmazó kémcsőben gyűjtve. Az anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-antitest kinyerése affinitáskromatográfia után mintegy 50%.

A kötött vírusantigént tartalmazó nitro-cellulóz-membránokat többször felhasználhatjuk észrevehető csökkenés nélkül a kötési kapacitásában. Abból a célból, hogy a membránt újból alkalmazzuk, miután az antitesteket eluáltuk, a membránokat háromszor három percig mossuk BBS-sel. Ezeket azután BBS-ben tároljuk 4 °C hőmérsékleten.

*HCV-részecskék befogása fertőzött plazmából, tisztított humán poliklonális anti-HCV-antitesteket alkalmazva; a befogott részecskékben lévő nukleinsavak hibrizálása HCV cDNS-hez*

*A HCV-részecskék befogása fertőzött plazmából, humán poliklonális anti-HCV-antitesteket alkalmazva*

Egy NANBH-ban szenvedő csimpánz fertőzött plazmájában jelen lévő fehérje-nukleinsav komplexeket izolálunk, olyan tisztított humán poliklonális anti-HCV-antitesteket alkalmazva, amelyek polisztirolgyöngyökhöz vannak kötve.

Poliklonális anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitesteket tisztítunk egy NANBH-ban szenvedő ember szérumból, az 5-1-1. klónban kódolt SOD-HCV-polipeptidet alkalmazva. A tisztítási eljárást a korábbiakban leírtuk.

A tisztított anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitesteket polisztirol-gyöngyökhöz [ $\frac{1}{4}$ ] (~0,64 cm) átmérő, tükörfényes felület, Precision Plastic Ball Co., Chicago, Illinois] kötjük szobahőmérsékleten inkubálva egy éjszakán át 1 ml antitesttel [1 mikrogramm/ml boráttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldatban (pH 8,5)]. Az egy éjszakán át végzett inkubálást követően a gyöngyöket mossuk egyszer TBST-vel [50 mmol/l trisz.HCl (pH 8,0), 150 mmol/l NaCl, 0,05% (térfogat/térfogat) Tween 20], majd olyan, foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldattal (PBS), amely 10 mg/ml BSA-t is tartalmaz.

Kontrollgyöngyöket készítünk azonos módon, azzal a kivétellel, hogy a tisztított anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitesteket teljes humán immunglobulinnal helyettesítjük.

A HCV befogását NANBH-val fertőzött csimpánz-plazmából a gyöngyökhöz kötött anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-et alkalmazva a következőképpen hajtjuk végre. Egy NANBH-val fertőzött csimpánzból való plazmát alkalmazunk, amelyet az előzőekben már leírtunk. Az NANBV-val fertőzött csimpánzplazma egy alikvotját (1 ml) inkubáljuk 3 órán át 37 °C hőmérsékleten 5-5 gyönggyel, amelyek vagy anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitestekkel, vagy kontroll-immunglobulinokkal vannak bevonva. A gyöngyöket háromszor mossuk TBST-vel.

*Nukleinsavak hibridizálása a befogott részecskékben NANBV-cDNS-hez*

Az anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-gyel befogott részecskékből kibocsátott nukleinsavkomponenseket a 81. klónból származó HCV cDNS-hez hibridizáljuk.

HCV-részecskéket fogunk be NANBH-val fertőzött csimpánzplazmából, amint ezt az előzőekben leírtuk. Abból a célból, hogy a részecskékből a nukleinsavakat kiszabadítsuk, a mosott gyöngyöket 60 percig inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten 0,2 ml/gyöngy oldattal, amely 1 mg/ml K-proteinázt, 10 mmol/l trisz.HCl-t (pH 7,5), 10 mmol/l EDTA-t, 0,25% (tömeg/térfogat) SDS-t, 10 mikrogramm/ml oldható élesztő RNS-t tartalmaz, és a felülúszó oldatot eltávolítjuk. A felülúszót fenolal és kloroformmal extraháljuk, és a nukleinsavakat etanolal kicsapjuk egy éjszakán át -20 °C hőmérsékleten. A nukleinsavcsapadékot centrifugálással összegyűjtjük, szárítjuk, és feloldjuk 50 mmol/l Hepes-ben (pH 7,5). Az oldható nukleinsavak párhuzamos alikvotjait az anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitestekkel burkolt gyöngyökből kapott mintákból és a teljes humán immunglobulint tartalmazó kontrollgyöngyökből kapott mintákból nitro-cellulóz-szűrőkre szűrjük. A szűrőket <sup>32</sup>P-vel jelzett, hézag-(nick) transzlatált, a 81. klónban lévő tisztított HCV cDNS-fragmentumból készített vizsgálómintával hibridizáljuk. Az eljárást a vizsgálóminta előállítására és a hibridizálásra az előzőekben leírtuk.

Egy vizsgálómintával vizsgált, az anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitesteket tartalmazó gyöngyökkel befogott részecskékből származó nukleinsavakat tartalmazó szűrő autoradiogramját a 40. ábrán mutatjuk be. Az anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitestek (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) alkalmazásával kapott kivonat tiszta hibri-

dizálójeleket ad a kontroll-antitestkivonathoz (A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>) és a kontroll élesztő RNS-hez (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) viszonyítva. 1 pg, 5 pg és 10 pg tisztított 81. klón cDNS-fragmentumot tartalmazó standardokat is mutatunk be a C1-3-ban.

5 Ezek az eredmények azt demonstrálják, hogy az NANBH-plazmából anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitestekkel befogott részecskék olyan nukleinsavakat tartalmaznak, amelyek hibridizálnak a 81. klónban lévő HCV cDNS-sel, és így további bizonyítékot mutatnak arra nézve, hogy az ezekben a klónokban lévő cDNS-ek az NANBH-hoz tartozó etiológiai ágensből származnak.

*C100-3 immunológiai reaktivitása tisztított anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitestekkel*

15 A C100-3 fúziós polipeptid immunológiai reaktivitását anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitestekkel radioimmunszéssel határozzuk meg, amelyben az antigéneket, amelyek szilárd fázishoz vannak kötve, tisztított anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-gyel hozzuk össze, és az antigén-antitest komplexet <sup>125</sup>I-vel jelzett juh-anti-humán antitestekkel mutatjuk ki.

20 A C100-3 polipeptid immunológiai reaktivitását összehasonlítjuk a SOD-NANB<sub>5.1.1</sub>-antigén reaktivitásával.

A C100-3 fúziós polipeptidet úgy szintetizáljuk és tisztítjuk, amint ezt az előzőekben leírtuk. A SOD-NANB<sub>5.1.1</sub> fúziós polipeptidet úgy szintetizáljuk és tisztítjuk, amint ezt az előzőekben leírtuk. A tisztított anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitesteket úgy kapjuk meg, amint ezt az előbbieken leírtuk.

Különböző mennyiségű tisztított antigén 0,125 mol/l Na-borát-puffert (pH 8,3) és 0,075 mol/l NaCl-t tartalmazó oldatban (BBS) lévő 100 mikroliteres alikvotjait adjuk egy mikrotitrálólemez (Dynatech Immulon 2, Removawell csíkok) egyes üregeibe. A lemezeket egy éjszakán át inkubáljuk nedves kamrában, amely után a fehérjeoldatot eltávolítjuk, és az üregeket háromszor mossuk 0,02% Triton X-100-at tartalmazó BBS-sel (BBST). Abból a célból, hogy megakadályozzuk a nem fajlagos kötést, az üregeket BSA-val burkoljuk BSA 5 mg/ml-es, BBS-ben lévő 100 mikroliteres oldatának hozzáadásával, amelyet inkubálás követ szobahőmérsékleten 1 órán át, amely után a BSA-oldat főlöleségét eltávolítjuk. A burkolt üregekben lévő polipeptideket tisztított anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-antitestekkel reagáltatjuk 1 mikrogramm antitest/üreg hozzáadásával, és a minták 1 órán át 37 °C hőmérsékleten végzett inkubálásával. Inkubálás után a főlöleseges oldatot leszívással eltávolítjuk, és az üregeket ötször mossuk BBST-vel. A fúziós polipeptidekhez kötött anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-et a <sup>125</sup>I-vel jelzett F<sup>7</sup>(ab)<sub>2</sub> juh-anti-humán IgG kötésével határozzuk meg a burkolt üregekhez. A jelzett vizsgálóminta (fajlagos aktivitás: 5-20 mikrocurie/mikrogramm) 100 mikroliteres alikvotjait adjuk az egyes üregekhez, és a lemezeket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 1 órán át, ezt követi a főlöleseges vizsgálóminta eltávolítása leszívással és 5 mosás BBST-vel. Az egyes üregekben kötött radioaktivitás mennyiségét olyan számlálóban (counter) számláljuk, amely gammasugárzást mutat ki.

60 A C100 immunológiai reaktivitásának eredményeit, tisztított anti-NANB<sub>5.1.1</sub>-gyel összehasonlítva az NANB<sub>5.1.1</sub> reaktivitásával, a tisztított antitestekkel, a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat

C100–3 immunológiai reaktivitása összehasonlítva NANB<sub>5-1-1</sub>-reaktivitással, immunesszével mérve

AG (ng)	RIA (cpm/esszé)					
	400	320	240	160	60	0
NANB <sub>5-1-1</sub>	7332	6732	4954	4050	3051	57
C100–3	7450	6985	5920	5593	4096	67

A 3. táblázat eredményei azt mutatják, hogy az anti-NANB<sub>5-1-1</sub> felismer egy epitópot a C100–3 polipeptid C100 részében. Így az NANB<sub>5-1-1</sub> és a C100 osztozik közös epitópon vagy epitópokon. Az eredmények azt sugallják, hogy az ezt az NANBV-epitópot vagy epitópokat kódoló cDNS-szekvencia olyan, amely jelen van mind az 5-1-1., mind a 81. klónban.

#### A HCV jellemzése

#### A HCV-genom elágazottságának jellemzése

A HCV-genomot elágazottságát illetően úgy jellemezzük, hogy izoláljuk az anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-antitesttel burkolt polisztirolgyöngyökön befogott részecskékből a nukleinsavfrakciót, és meghatározzuk, vajon az izolált nukleinsav a HCV cDNS plusz és/vagy mínusz szálával hibridizál.

A részecskéket HCV-vel fertőzött csimpánzplazmából fogjuk be immun-tisztított anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-antitesttel burkolt polisztirolgyöngyöket alkalmazva. A részecskék nukleinsavkomponensét kiszabadítjuk, és 3 ml nagy titerű plazmával ekvivalens izolált genom nukleinsav alikvotokat viszünk fel foltként nitro-cellulóz-szűrőkre. Kontrollként 81. klónból (2 pikogramm) származó denaturált HCV cDNS alikvotjait is felvisszük ugyanazokra a szűrőkre. A szűrőket HCV cDNS-ből klónozott egyszálú DNS plusz vagy mínusz szálainak <sup>32</sup>P-vel jelzett keverékével vizsgáljuk át; a cDNS-eket a 40b., 81. és 25c. klónokból metsszük ki.

Az egyszálú vizsgálómintákat a HCV cDNS-ek EcoRI-gyel végzett kimetszésével kapjuk meg a 91., 40b. és 25c. klónokból, majd a cDNS-fragmentumok M13 vektorokba, pontosabban mp18 és mp19 vektorokba [Messing (1983)] való klónozásával. Az M13 klónokat szekvenciaelemzésnek vetjük alá, hogy meghatározzuk, vajon ez a HCV cDNS-ekből származó DNS plusz vagy mínusz szálát tartalmazza. A szekvenciaelemzést Sanger és munkatársai didezoxi-láncterminációs eljárásával (1977) végezzük.

A befogott részecskékből izolált HCV-genom alikvotjait tartalmazó párhuzamos szűrők egyes készleteit a HCV cDNS-ekből származó plusz vagy mínusz szálú vizsgálómintákkal hibridizáljuk. A 41. ábra mutatja be a NANBV genomnak a 81., 40b. és 25c. klónokból származó vizsgálóminták keverékével végzett átvizsgálásával kapott autoradiogramokat. Ezt a keveréket használjuk arra a célra, hogy növeljük a hibridizációs vizsgálat érzékenységét. Az I. panelban lévő mintákat a pluszszálú vizsgálóminta keverékével hibridizáljuk. A II. panelban lévő mintákat a mínuszszálú vizsgálóminta keverékével hibridizáljuk. A minták összeállítását az immunfoltvizsgálat paneljeiben a 4. táblázatban mutatjuk be.

4. táblázat

sor	A	B
1	HCV-genom	*
2	–	*
3	*	81. cDNS
4	*	81. cDNS

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

\* le nem írt minta

Amint a 41. ábra eredményeiből látható, csak a mínusz szál DNS-vizsgálóminta hibridizál az izolált HCV-genommal. Ez az eredmény, azzal az eredménnyel együtt, amely azt mutatja, hogy a genom érzékeny RN-ázra, de nem érzékeny DN-ázra, azt sugallja, hogy az NANBV genomja pozitív szálú RNS.

Ezek az adatok és más laboratóriumok adatai a feltételezett NANBV-k fizikokémiai tulajdonságait illetően egybevágóan azzal a lehetőséggel, hogy a HCV a Flaviviridae tagja. Az a lehetőség sincs azonban kizárva, hogy a HCV a víruságensek új családját képviseli.

*Szekvenciák kimutatása befogott részecskékből, amelyek PCR-rel amplifikálva a 81. klónból származó HCV cDNS-hez hibridizálnak*

A befogott részecskékből lévő RNS-t úgy kapjuk meg, amint ezt az előzőekben leírtuk. Azokhoz a szekvenciákhoz, amelyek a 81. klónból származó HCV cDNS-hez hibridizálnak, az elemzést a PCR-amplifikációs eljárást alkalmazva hajtjuk végre, amint ezt a korábbiakban leírtuk, azzal a különbséggel, hogy a hibridizációs vizsgálóminta a 81. klón cDNS-szekvenciából származó, kinázzal kezelt oligonukleotid. Az eredmények azt mutatják, hogy az amplifikált szekvenciák hibridizálnak a 81. klón eredetű HCV cDNS-vizsgálómintával.

*Homológia a Dengue Flavivírus (MNWWVD1) nem szerkezeti fehérjéje és a 14i.–39c. klónok egyesített ORF-je által kódolt HCV-polipeptidek között*

A 14i.–39c. klónok kombinált HCV cDNS-ei egy folyamatos ORF-et tartalmaznak, amint ezt a 26. ábrán bemutatjuk. Az ebben kódolt polipeptidet szekvencia-homológiára elemezzük a Dengue Flavivírusban (MNWWVD1) lévő nem szerkezeti polipeptid vagy polipeptidek területével. Az elemzés a Daghoff-fehérje adatbázisokat alkalmazza, és számítógéppel végezzük. Ezeket az eredményeket a 42. ábrán mutatjuk be, ahol a (:) jel pontos homológiát jelent, és a (.) jel konzervatív helyettesítést jelez a szekvenciákban; a szaggatott vonalak a szekvenciába beiktatott térközöket jelzik, hogy a legnagyobb homológiát érzük el. Amint az ábrából látha-

tó, jelentős homológia van a HCV cDNS-ben kódolt szekvencia és a Dengue-vírus nem szerkezeti polipeptidje vagy polipeptidjei között. A 42. ábrán bemutatott homológián kívül a cDNS 3'-vége felé lévő területben kódolt polipeptidszegmens elemzése szintén mutat olyan szekvenciákat, amelyek homológok a Dengue-polymerázban lévő szekvenciákhoz. Ennek következménye az a felfedezés, hogy a hiteles Gly-Asp-Asp (GDD) szekvencia, amelyről úgy gondoljuk, hogy nélkülözhetetlen az RNS-függő RNS-polymerázokban, megtalálható a HCV cDNS-ben kódolt polipeptidben, olyan elhelyezkedésben, amely egybevág a Dengue 2 vírusban lévő elhelyezkedéssel (adatokat nem mutatunk be).

*A HCV-DNS nem mutatható ki az NANBH-val fertőzött szövetekben*

Kétféle tanulmány nyújt olyan eredményeket, amelyek azt sugallják, hogy HCV-DNS nem mutatható ki NANBH-ban szenvedő egyének szöveteiben. Ezek az eredmények azokkal az eredményekkel együtt, amelyeket a megfelelő korábbi fejezetekben leírtunk, annak bizonyítékát adják, hogy a HCV nem DNS-tartalmú vírus, és ennek replikálódása nem foglal magában cDNS-t.

*Southern-foltképzési munkamenet*

Abból a célból, hogy meghatározzuk, vajon az NANBH-val fertőzött csimpánzmáj tartalmaz-e HCV-DNS-t (vagy HCV cDNS-t), az ebből a forrásból izolált DNS restrikciós enzimes fragmentumait Southern-foltképzésnek vetjük alá, és a foltokat <sup>32</sup>P-vel jelzett HCV cDNS-sel vizsgáljuk át. Az eredmények azt mutatják, hogy a jelzett HCV cDNS nem hibridizál a fertőzött csimpánzmájból való, foltra vitt DNS-sel. Ezzel ellentétben egy pozitív kontrollban a béta-interferon jelzett vizsgálómintája erősen hibridizál restrikciós enzimmel emésztett humán méhlepény eredetű DNS Southern-foltjaihoz. Ezeket a rendszereket arra tervezzük, hogy kimutassuk annak a génnek egyedi másolatát, amely a jelzett vizsgálómintával kimutatandó.

DNS-t izolálunk két, NANBH-ban szenvedő csimpánz májából. Kontroll DNS-eket izolálunk nem fertőzött csimpánz májából és humán méhlepényből. Ez az eljárás DNS kivonásához lényegében azonos azzal, amelyet Maniatis és munkatársai leírtak (1982), és a DNS-mintákat RN-ázzal kezeljük az izolálási munkamenet során.

Az egyes DNS-mintákat vagy EcoRI-gyel, MboI-gyel vagy HincII-vel (12 mikrogramm) kezeljük, a gyártók útmutatásai szerint. Az emésztett DNS-t elektroforézisnek vetjük alá 1%-os semleges agarózgéleken, Southern-foltokat képezünk nitrocellulózon, és a foltra vitt anyagot hibridizáljuk a megfelelő hézag- (nick) transzlatált vizsgálóminta cDNS-sel ( $3 \cdot 10^6$  cpm/ml hibridizációs keverék). A fertőzött csimpánzmájából és normál májból való DNS hibridizál a 36. és 81. klónokból való, <sup>32</sup>P-vel jelzett HCV cDNS-sel; a humán méhlepényből származó DNS hibridizál a béta-interferon-génből való, <sup>32</sup>P-vel jelzett DNS-sel. A hibridizálás után a foltokat szigorú körülmények között mossuk, azaz olyan oldattal, amely 0,1xSSC-t és 0,1% SDS-t tartalmaz, 65 °C hőmérsékleten.

A béta-interferon-gén DNS-t úgy állítjuk elő, amint ezt Houghton és munkatársai leírják (1981).

*Amplifikáció a PCR-technikával*

Abból a célból, hogy meghatározzuk, vajon a HCV-DNS kimutatható-e NANBH-ban szenvedő csimpánzok májában, a szövetekből DNS-t izolálunk, és a PCR-amplifikációs kimutatási technikának vetjük alá a 81. klónból való HCV cDNS-ből származó primereket és vizsgáló polinukleotidmintákat alkalmazva. A negatív kontrollok nem fertőzött HepG2 szövettenyésztéssel és valószínűleg nem fertőzött humán méhlepényből izolált DNS-minták. A pozitív kontrollok negatív kontroll DNS-ek olyan mintái, amelyekhez a 81. klónból való HCV cDNS-beiktatás ismert, viszonylag kis mennyiségét adjuk hozzá.

Ezenkívül abból a célból, hogy igazoljuk: az azonos, NANBH-ban szenvedő csimpánzok májából izolált RNS-frakciók tartalmaznak a HCV-cDNS vizsgálómintával komplementer szekvenciákat, a PCR-amplifikációs kimutatási rendszert alkalmazzuk az izolált RNS-mintákra is.

Ezekben a tanulmányokban a DNS-t azzal a munkamenettel izoláljuk, amelyet a korábbiakban leírtunk, és az RNS-t lényegében úgy extraháljuk, amint ezt Chirgwin és munkatársai (1981) leírtak.

A DNS mintáit két fertőzött csimpánz májából, nem fertőzött HepG2 sejtekből és humán méhlepényből izoláljuk. 1-1 mikrogrammot emésztünk az egyes DNS-ekből HindIII-mal a gyártó útmutatója szerint. Az emésztett mintákat PCR-amplifikációnak vetjük alá, és az amplifikált HCV cDNS-t lényegében úgy mutatjuk ki, amint ezt az előzőekben leírtuk, azzal a kivétellel, hogy a reverz transzkriptázos lépést elhagyjuk. A PCR-vizsgálóminták és primerek a 81. klón HCV cDNS-ből való, ezeket a IV.C.3. fejezetben írjuk le. A kibővítés előtt a pozitív kontrollokat, az egyes DNS-ek 1 mikrogrammos mintáit „kihegyezzük”, a 81. klónból izolált HCV cDNS-beiktatás 250 molekulájának hozzáadásával.

Abból a célból, hogy meghatározzuk, vajon vannak-e jelen HCV-szekvenciák az NANBH-ban szenvedő csimpánzok májából izolált RNS-ben, 0,4 mikrogramm teljes RNS-t tartalmazó mintákat amplifikációs munkamenetnek vetjük alá lényegében úgy, ahogyan ezt a korábbiakban leírtuk, azzal a kivétellel, hogy a fordított transzkriptázt elhagyjuk néhány negatív kontrollként szolgáló mintából. A PCR-primerek és vizsgálóminták azok, amelyek a 81. klón HCV cDNS-ből való, amint ezt korábban leírtuk.

Az eredmények azt mutatják, hogy a HCV cDNS vizsgálómintákkal komplementer amplifikált szekvenciák nem mutathatók ki a fertőzött csimpánzmájából való DNS-ekben, és nem mutathatók ki a negatív kontrollokban sem. Ezzel ellentétben, amikor azokat a mintákat, amelyek magukban foglalják a fertőzött csimpánzmájából való DNS-t, a sokszorozás előtt a HCV cDNS-sel „rögzítjük”, a 81. klón szekvenciákat az összes pozitívkontroll-mintában kimutatjuk. Ezenkívül az RNS-tanulmányokban az amplifikált 81. klón HCV cDNS-szekvenciákat csak akkor mutatjuk ki, amikor reverz transzkriptázt alkalmazunk, erősen sugallva, hogy az eredmények nem valamilyen DNS-szennyeződéskövetkezményei.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az NANBH-ban szenvedő csimpánzokból való hepatociták nem tartalmaznak HCV DNS-t, vagy csak ki nem mutatható szinten tartalmaznak. A „rögítési” tanulmány alapján, ha HCV DNS egyáltalán van jelen, ez sokkal alacsonyabb szinten van, mint 0,06 kópia/hepatocita. Ezzel ellentétben HCV-szekvenciák az ugyanabból a májmin-tából való teljes RNS-ben könnyen kimutathatók a PCR-technikával.

*ELISA-meghatározás HCV-fertőzésre, vizsgálóanti-génként HCV C100–3-at alkalmazva*

Az összes mintát a HCV C100–3 ELISA-t alkalmazva vizsgáljuk meg. Ez a vizsgálat a HCV C100–3 anti-gént (amelyet úgy szintetizálunk és tisztítunk, amint ezt az előzőekben leírtuk), és az egér monoklonális anti-hu-mán IgG torna-peroxidáz (HRP) konjugátumát alkalmazza (gyártó: Ortho Co., Raritan, N. Y. AEÁ).

A HCV C100–3 antigénnel burkolt lemezeket az alábbiak szerint állítjuk elő. Burkolópuffert [50 mmol/l nátrium-borát (pH 9,0), 21 ml/lemez, BSA-t (25 mikrogramm/ml) és C100–3-at (2,50 mikrogramm/ml)] tartalmazó oldatot készítünk közvetlenül a Removawell Immulon I lemezekhez (Dynatech Corp.) való hozzáadás előtt. 5 perces keverés után 0,2 ml/üreg oldatot adunk a lemezekhez, lefedjük, és 2 órán át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, amely után az oldatot leszívással eltávolítjuk. Az üregeket egyszer mossuk 400 mikroliter mosópufferrel [100 mmol/l nátrium-foszfát (pH 7,4), 140 mmol/l nátrium-klorid, 0,1% (tömeg/térfogat) kazein, 1% (tömeg/térfogat) Triton X–100, 0,01% (tömeg/térfogat) timerozál]. A mosóoldat eltávolítása után 200 mikroliter/üreg „burkolás utáni” oldatot [10 mmol/l nátrium-foszfát (pH 7,2), 150 mmol/l nátrium-klorid, 0,1% (tömeg/térfogat) kazein és 2 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF)] adunk hozzá, a lemezeket szorosán lezárjuk, hogy az elpárolgást megakadályozzuk, és szobahőmérsékleten állni hagyjuk 30 percig. Az üregeket azután leszívjuk, hogy az oldatot eltávolítsuk, és szárazra liofilezzük egy éjszakán át anélkül, hogy az közben felmelegedne. Az így készített lemezeket 2–8 °C hőmérsékleten leforrasztott alumíniumdobozban tárolhatjuk.

Abból a célból, hogy az ELISA-meghatározást végrehajtsuk, 20 mikroliter szérumsintát vagy kontrollmintát adunk egy olyan üreghöz, amely 200 mikroliter mintahígítót [100 mmol/l nátrium-foszfát (pH 7,4), 500 mmol/l nátrium-klorid, 1 mmol/l EDTA, 0,1% (tömeg/térfogat) kazein, 0,015% (tömeg/térfogat) timerozál, 1% (tömeg/térfogat) Triton X–100, 100 mikrogramm/ml élesztő-kivonat] tartalmaz. A lemezeket leforrasztjuk, és 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 2 órán át, ezután az oldatot leszívással eltávolítjuk, és az üregeket 400 mikroliter mosópufferrel [foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldat (PBS), amely 0,05% Tween 20-at tartalmaz] mossuk. A mosott üregeket 200 mikroliter egér-antihumán IgG–HRP konjugátummal kezeljük, amely „Ortho” konjugátum hígítóban van [10 mmol/l nátrium-foszfát (pH 7,2), 150 mmol/l nátrium-klorid, 50% (térfogat/térfogat) borjúembrió-szérum, 1% (térfogat/térfogat) hővel kezelt lószérum, 1 mmol/l K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,05% (tömeg/tér-

fogat) Tween 20, 0,02% (tömeg/térfogat) timerozál]. A kezelést 1 órán át végezzük 37 °C hőmérsékleten, az oldatot leszívással eltávolítjuk, az üregeket mosópufferrel mossuk, amelyet szintén leszívással távolítunk el. Abból a célból, hogy meghatározzuk a kötött enzimkonjugátum mennyiségét, 200 mikroliter szubsztrátumoldatot (10 mg o-fenilén-diamin-dihidroklorid, 5 ml kifejlesztőoldatban) adunk hozzá. A kifejlesztőoldat 50 mmol/l nátrium-citrátot (pH 5,1-re beállítva foszforsavval) és 0,6 mikroliter/ml 30%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmaz. A szubsztrátumoldatot tartalmazó lemezeket sötétben inkubáljuk 30 percig szobahőmérsékleten, a reakciót 50 mikroliter/ml 4 n kénsav hozzáadásával leállítjuk, és az optikai sűrűségeket mérjük.

5 A későbbiekben bemutatott példák azt mutatják, hogy az ELISA-átvizsgálásra szolgáló mikrotitrálóle-mezek, amelyek a HCV C100–3 antigént alkalmazzák, nagyfokú fajlagossággal bírnak, amint ezt a reaktivitás mintegy 1%-os kiindulási sebessége bizonyítja, míg a véletlenszerűen kiválasztott donoroknál ez a sebesség ismételtlen is csak 0,5%. Ez a vizsgálat képes immunvá-lasz felismerésére mind a fertőzés akut fázisa után, mind a betegség krónikus fázisa során. Ezenkívül a vizsgálat képes kimutatni néhány mintát, amelyek az NANBH-ra vonatkozó más, kiegészítő vizsgálatokban pontszám szerint negatívak; ezek a minták vagy olyan egyénekből származnak, akik kórelőzményében NANBH szerepel-hetett, vagy olyan donorokból, akik valamilyen módon NANBH-átvitelben érintettek.

30 A példákban az alábbi rövidítéseket alkalmazzuk:

ALT	alanin-aminotranszferáz
Anti-HBc	antitest HBc ellen
Anti-HBsAg	antitest HBsAg ellen
HBc	hepatitis B belső antigén
35 ABsAg	hepatitis B felületi antigén
IgG	immunglobulin G
IgM	immunglobulin M
NE/l	nemzetközi egység/liter
NA	nem áll rendelkezésre
40 NT	nem vizsgáltuk
N	mintaméret
Neg	negatív
OD	optikai sűrűség
Pos	pozitív
45 S/CO	szignál/határérték
SD	standard eltérés
x	átlag
WNL	normális határokon belül

50 *HCV-fertőzés véletlenszerű véradók populációjában*  
1056 mintából (friss szérumok) álló csoportot, amely véletlenszerűen kiválasztott véradóktól származik, kapunk az Irwin Memorial Blood Banktól (San Francisco, Kalifornia). Az ezekből a mintákból kapott vizsgálati eredményeket hisztogramban összegezzük, amely be-mutatja az OD-értékek eloszlását (43. ábra). Amint a 43. ábrából látható, 4 mintaleolvasás >3 értéket mutat, 1 mintaleolvasás 1 és 3 értékek között van, 5 mintaleolvasás 0,4 és 1 értékek között van, stb. 1046 mintaleolvasás <0,4 értéket mutat, amelyen belül ezek több, mint 60 90%-a <0,1 leolvasást mutat.

A reaktív véletlenszerű minták eredményeit az 5. táblázat mutatja be. Az átlag+5 standarddeviáció-értékkel egyenértékű határértéket alkalmazva az 1056 mintából 10 (0,95%) az, amely kezdetben reaktív. Ezek közül 5 minta (0,47) mutatkozik ismétléskor reaktívnak, amikor ezeket másodszer is megvizsgáljuk ELISA-t alkal-

mazva. Az 5. táblázat bemutatja az ALT és anti-HBd-státust is az egyes ismételt reaktív mintáknál. Különösen érdekes az a tény, hogy mind az öt ismételt reaktív minta negatív mindkét, NANBH-ra vonatkozó 5 kiegészítő vizsgálat szerint, míg a HCV ELISA-vizsgálatban pontszám szerint pozitív.

5. táblázat  
Reaktív véletlenszerű minták eredménye

N=1015

$\bar{x}=0,049^*$

SD=±0,074

Határérték:  $X+5SD=0,419$  (0,400+negatív kontroll)

Minták	Kezdetben reaktív minták, OD	Ismételt reaktív minták, OD	ALT** (NE/L)	Anti-HBc*** (OD)
4227	0,462	0,084	NA	NA
6292	0,569	0,294	NA	NA
6188	0,699	0,326	NA	NA
6157	0,735	0,187	NA	NA
6277	0,883	0,152	NA	NA
6397	1,567	1,392	30,14	1,433
6019	>3,000	>3,000	46,48	1,057
6651	>3,000	>3,000	48,53	1,343
6669	>3,000	>3,000	60,53	1,165
4003	>3,000	3,000	WNL****	negatív
	10/1056=0,95%	5/1056=0,47%		

\* Azokat a mintákat, amelyek leolvasása >1,5 értéket képvisel, nem számítjuk be az átlagba és az SD-be

\*\* ALT ≥68 NE/L a normális határok felett van

\*\*\* Anti-HBc ≤0,535 (versengő vizsgálat) értéket tekintjük pozitívnak

\*\*\*\* WNL: a normális határokon belül

Csimpánzsérumminták

11 csimpánzból szérummintákat vizsgálunk át a HCV C100–3 ELISA-val. Ezek közül a csimpánzok közül 4 NANBH-val van fertőzve a VIII. faktor szennyezett tételével (valószínűleg Hutchinson-törzs). Kontrollként négy másik csimpánzt megfertőzünk HAV-val, és három másikat HBV-vel. A fertőzés után különböző időpontokban szérummintákat veszünk.

Az eredmények, amelyeket a 6. táblázatban foglalunk össze, kimutatható antitest-szerokonverzióra utalnak mindegyik csimpánzban, amely az NANBH Hutchinson-

törzsével van fertőzve. A fertőzés akut fázisát követően (amelyet az ALT szintén jelentős növekedésével, majd ezt követően normál szintre visszaesésével bizonyítunk) a HCV C100–3 elleni antitestek kimutathatóvá válnak a 4 NANBH-val fertőzött csimpánz közül 4-nek a szérumában. Ezekről a mintákról előzőleg kimutattuk, hogy Western-elemzés alapján pozitívak, és RIA alapján is pozitívak. Ezzel ellentétben a kontrollcsimpánzok, amelyeket előzőleg HAV-val vagy HBV-vel fertőztünk, egyike sem mutatja reaktivitás bizonyítékát ELISA-val.

45

6. táblázat  
Csimpánzsérumminták

	OD	S/CO	Inokulálás dátuma	Vérvétel dátuma	ALT (NE/L)	Transzfúzió
Negatív kontroll	0,001					
Pozitív kontroll	1,504					
Határérték	0,401					
1. csimpánz	-0,007	0,00	05/24/84	05/24/84	9	NANB
	0,003	0,01		08/07/84	71	
	>3,000	>7,48		09/18/84	19	
	>3,000	>7,48			10/24/84	-

6. táblázat (folytatás)

	OD	S/CO	Inokulálás dátuma	Vérvétel dátuma	ALT (NE/L)	Transzfúzió
2. csimpánz	–	–	06/07/84	–	–	NANB
	–0,003	0,00		05/31/84	5	
	–0,005	0,00		06/28/84	52	
	0,945	2,36		08/20/84	13	
	>3,000	>7,48		10/24/84	–	
3. csimpánz	0,005	0,01	03/14/85	03/14/85	8	NANB
	0,017	0,04		04/26/85	205	
	0,006	0,01		05/06/85	14	
	1,010	2,52		08/20/85	6	
4. csimpánz	–0,006	0,00	03/11/85	03/11/85	11	NANB
	0,003	0,01		05/09/85	132	
	0,523	1,31		06/06/85	–	
	1,574	3,93		08/01/85	–	
5. csimpánz	–0,006	0,00	11/21/80	11/21/80	4	HAV
	0,001	0,00		12/16/80	147	
	0,003	0,01		12/30/80	18	
	0,006	0,01		07/29–08/21/81	5	
6. csimpánz	–	–	05/25/82	–	–	HAV
	–0,005	0,00		05/17/82	–	
	0,001	0,00		06/10/82	106	
	–0,004	0,00		07/06/82	10	
	0,290	0,77		10/01/82	–	
7. csimpánz	–0,008	0,00	05/25/82	05/25/82	7	HAV
	–0,004	0,00		06/17/82	83	
	–0,006	0,00		09/16/82	5	
	0,005	0,01		10/09/82	–	
8. csimpánz	–0,007	0,00	11/21/80	11/21/80	15	HAV
	0,000	0,00		12/16/80	130	
	0,004	0,01		02/03/81	8	
	0,000	0,00		06/03–06/10/81	4,5	
9. csimpánz	–	–	07/24/80	–	–	HBV
	0,019	0,05		08/22–10/10/79	–	
	–	–		03/11/81	37	
	0,015	0,04		07/01–08/05/81	9	
	0,008	0,02		10/01/81	6	
10. csimpánz	–	–	05/12/82	–	–	HBV
	0,011	0,03		04/21–05/12/82	9	
	0,015	0,04		09/01–09/08/82	126	
	0,008	0,02		12/02/82	9	
	0,010	0,02		01/06/83	13	

6. táblázat (folytatás)

	OD	S/CO	Inokulálás dátuma	Vérvétel dátuma	ALT (NE/L)	Transzfúzió
11. csimpánz	–	–	05/12/82	–	–	HBV
	0,000	0,00		01/06–05/12/82	11	
	–	–		06/23/82	100	
	–0,003	0,00		06/09–07/07/82	–	
	–0,003	0,00		10/28/82	9	
	–0,003	0,00		12/20/82	10	

1. panel: Bizonyítottan fertőzött szérumok krónikus humán NANBH-hordozókból

Egy kódolt panel 22 egyedi mintából áll, mindegyik párhuzamosan, összesen 44 mintával. A minták krónikus NANBH-hordozókból, véradók fertőző szérumaiból és akut fázisú NANBH-betegek fertőző szérumaiból való bizonyítottan fertőzött szérumok. Ezenkívül a minták között vannak nagymértékben bizonyítottan negatív kontrollok és más betegség eredetű kontrollok. A panel minősítőpanelként alkalmazható feltételezett NANBH kimutatására.

A teljes panelt kétszer vizsgáljuk át ELISA-vizsgálattal. A pontozásos értékelés eredményeit a 7. táblázatban mutatjuk be. Bár ez a táblázat a párhuzamos eredmények csak egyik sorozatának eredményeiről számol be, ugyanezeket az eredményeket kapjuk a párhuzamos minták mindegyikénél.

Amint a 7. táblázatban látható, 6 szérum, amely csimpánzmodellben fertőzőnek bizonyult, erősen pozitív. A hetedik fertőző szérum egy akut NANBH-esethez tartozó mintának felel meg, és nem reaktív ELISA-vizsgálatban. Egy vizsgálatba bevont véradó normális ALT-szintekkel és vitatható eredményekkel a csimpánztanulmányokban nem reaktív ebben a vizsgálatban. Három másik sorozatminta egy akut NANBH-ban szenvedő egyénből szintén nem reaktív. Az összes minta, amely a nagymértékben bizonyítottan negatív kontrollokból ered, és amelyeket olyan véradókból kaptunk, akik legalább 10 véradáson mentek át hepatitiszgyanú nélkül, szintén nem reaktívak ELISA-ban. Végül négy olyan mintát vizsgálunk, amelyet korábban pozitívnak ítélt meg mások által kifejlesztett NANBH-pontozásos vizsgálatban, de ezek az eredmények nem bizonyíthatók. Ezt a négy mintát a HCV ELISA-vizsgálattal negatívnak ítéljük.

7. táblázat  
1. panel

Panel	1. eredmény	2. eredmény
1. Bizonyított fertőzés csimpánzátvitellel		
A. Krónikus NANB: Tx után		
JF	+	+

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Panel	1. eredmény	2. eredmény
EB	+	+
PEG	+	+
B. Fertőzésre gyanús véradók emelt ALT-vel		
BC	+	+
JJ	+	+
BB	+	+
C. Akut NANB, Tx után		
WH	–	–
2. Bizonytalan fertőzés csimpánzátvitellel		
A. Fertőzésre gyanús véradó normál ALT-vel		
CC	–	–
3. Akut NANB, Tx után		
JL 1 hét	–	–
JL 2 hét	–	–
JL 3 hét	–	–
4. Más betegségkontrollok		
A. Primer epecirrhózis		
EK	–	–
B. Alkoholos hepatitis gyógyulás közben		
HB	–	–
5. Bizonyítottan negatív kontrollok		
DH	–	–
DC	–	–
LV	–	–
ML	–	–
AH	–	–
6. Lehetségesnek vélt NANB-„antigének”		
JS-80-OIT-O (Ishida)	–	–
Asterix (Trepo)	–	–
Zurtz (Arnold)	–	–
Becassdine (Trepo)	–	–

### 2. panel, donor/befogadó NABH

A kódolt panel NANBH-val társult transzfúzió 10 bizonyított donorrecipiens esetéből áll, összesen 188 mintából. Az egyes esetek néhány vagy az összes véradó mintáiból állnak a befogadó számára, és sorozatmintákból állnak a befogadóból (3., 6. és 12. hónap múlva, kivéve a transzfúziótól számítva). Ide értendők olyan minták is, amelyeket elővérvétellel a befogadótól a transzfúzió előtt kapunk.

Az eredmények, amelyeket a 8. táblázatban mutatunk be, azt mutatják, hogy az ELISA kimutatja az antitest-szerokonverziót a transzfúzióval társult NANBH 10 esetéből 9-ben. A 4. esetből a minták (ahol szerokonverzió nem mutatható ki) következetesen gyengén reagálnak az ELISA-vizsgálatban. A 10 befogadóminta közül kettő reaktív 3 hónappal a transzfúzió után. 6 hónap múlva 8 befogadóminta reaktív, és a 12. hónapban, a 4. eset kivételével az ösz-

szes minták reaktívak. Ezenkívül legalább egy antitest pozitív donort találunk a 10 eset közül 7-ben, és a 10. esetben két pozitív donor van. A 10. esetben a befogadó elővérvételi mintája is pozitív HCV-antitestekre.

5 Az ebből a befogadóból vett egyhónapos vér lecsökken a reaktivitási szint határértékére, míg a 4. és 10. hónapos vérmintákban ez már pozitív szintre emelkedik. Általában a 0,4 S/CO értéket tekintjük pozitívnak. Így ez az eset az egyén korábbi fertőzöttségét képviseli HCV-vel.

10 Az ALT- és HBc-státuszt az összes reaktív, vagyis pozitív mintáknál a 9. táblázatban foglaljuk össze. Amint a táblázatban látható, a 8 donormintából 1 negatív a kiegészítő markerek alapján és reaktív a HCV-antitest ELISA-ban. Másrészt a befogadóminták (amelyeket 15 12 hónapig követünk a transzfúzió után) vagy emelt ALT-szinttel, vagy pozitív anti-HBc-vel, vagy mindkettővel bírnak.

8. táblázat  
Donor/befogadó NANB-panel  
Alter H. donor/befogadó NANB-panelja

BEFOGADÓ										
Eset	Donor		Elővérvétel		3 hónap		6 hónap		12 hónap	
	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
1.	-	-	0,032	0,07	0,112	0,26	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
2.	-	-	0,059	0,14	0,050	0,12	1,681	3,90	>3,000	>6,96
3.	0,403	0,94	0,049	0,11	0,057	0,13	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
4.	-	-	0,065	0,15	0,073	0,17	0,067	0,16	0,217	0,50
5.	>3,000	>6,96	0,034	0,08	0,096	0,22	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
6.	>3,000	>6,96	0,056	0,13	1,475	3,44	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
7.	>3,000	>6,96	0,034	0,08	0,056	0,13	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
8.	>3,000	>6,96	0,061	0,14	0,078	0,10	2,262	5,28	>3,000	>6,96
9.	>3,000	>6,96	0,080	0,19	0,127	0,37	0,065	0,13	>3,000	>6,96
10.	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96	0,317*	0,74	3,000**	>6,96	>3,000***	>6,96
	>3,000	>6,96								

\* 1 hónap, \*\* 4 hónap, \*\*\* 10 hónap

9. táblázat  
ALT- és HBc-státusz a reaktív mintáknál az 1. panelban

Minták	Anti-ALT*	HBc**
Véradók		
3. eset	normál	negatív
5. eset	emelt	pozitív
6. eset	emelt	pozitív
7. eset	nem áll rendelkezésre	negatív
8. eset	normál	pozitív
9. eset	emelt	nem áll rendelkezésre
10. eset	normál	pozitív
10. eset	normál	pozitív

9. táblázat (folytatás)

Minták		Anti-ALT*	HBc**
Befogadók			
1. eset	6 hónap	emelt	pozitív
	12 hónap	emelt	nem vizsgáltuk
2. eset	6 hónap	emelt	negatív
	12 hónap	emelt	nem vizsgáltuk
3. eset	6 hónap	normál	nem vizsgáltuk***
	12 hónap	emelt	nem vizsgáltuk***
5. eset	6 hónap	emelt	nem vizsgáltuk
	12 hónap	emelt	nem vizsgáltuk
6. eset	3 hónap	emelt	negatív
	6 hónap	emelt	negatív
	12 hónap	emelt	nem vizsgáltuk
7. eset	6 hónap	emelt	negatív
	12 hónap	emelt	negatív
8. eset	6 hónap	normál	pozitív
	12 hónap	emelt	nem vizsgáltuk
9. eset	12 hónap	emelt	nem vizsgáltuk
10. eset	4 hónap	emelt	
	10 hónap	emelt	nem vizsgáltuk

\* ALT  $\geq$ 45 NE L van a normális határok felett

\*\* Anti-HBc  $\leq$ 50% (versengő vizsgálat) értéket tekintjük pozitívnak

\*\*\* Az elő-véreztetési és 3 hónapos minták negatívak HBc-re

*HCV-fertőzés megállapítása nagy kockázati csoportból való mintákból*

Nagy kockázati csoportból való mintákat vizsgálunk ELISA-t alkalmazva, hogy meghatározzuk a reaktivitást HCV C100–3 antigénnél. Az eredményeket a 10. táblázatban mutatjuk be.

Amint a táblázatban látható, a legnagyobb reaktivitású mintákat a hemofiliásoktól kapjuk (76%). Ezenkívül az emelt ALT-szintű és anti-HBc-re pozitív egyénekből származó minták 51%-át reaktívnak ítélik, ez

olyan érték, amely egybevág ebben a csoportban a klinikai adatokból és NANBH-gyakoriságból várt adatokkal. A HCV elleni antitest előfordulása nagyobb azoknál a véradóknál is, akik csak emelt ALT-szinttel bírnak, azoknál a véradóknál is, akik csak hepatitis B belső antigén elleni antitestekre pozitívak, és azoknál a véradóknál is, akiket a magas ALT-szinttől vagy anti-belső antigén antitesttől eltérő okokból utasítottak vissza, ha ezeket a véletlenszerű önkéntes véradókkal hasonlítjuk össze.

10. táblázat  
NANBH nagykockázaticsoport-minták

Csoport	Eloszlás			% reaktív
	N	N	OD	
Emelt ALT	35	3	>3,000	11,4%
	1	0,728		
Anti-HBc	24	5	>3,000	20,8%
Emelt ALT, Anti-HBc	33	12	>3,000	51,5%
	1	2,768		
	1	2,234		
	1	0,939		
	1	0,951		
	1	0,906		

10. táblázat (folytatás)

Csoport	Eloszlás			% reaktív
	N	N	OD	
Elutasított véradók	25	5	>3,000	20,0%
Véradók valamilyen hepatitiselőzmménnyel	150	19	>3,000	14,7%
1	0,837			
1	0,837			
1	0,469			
Hemofiliások	30			
1	2,568	31	>3,000	76,0%
1	2,483			
1	2,000			
1	1,979			
1	1,495			
1	1,209			
1	0,819			

Összehasonlító tanulmányok anti-IgG vagy anti-IgM monoklonális antitesteket alkalmazva, vagy másod-  
25 dik antitestként poliklonális antitesteket alkalmazva a HCV C100-3 ELISA-ban

Az ELISA-meghatározás, amely anti-IgG mono-  
klonális konjugátumot alkalmaz, érzékenységét össze-  
hasonlítjuk azzal, amelyet vagy anti-IgM monoklonális  
konjugátumot alkalmazva kapunk, vagy mindkettőt  
olyan poliklonális antiszérummal helyettesítve ka-  
punk, amelyről leírták, hogy fajlagos mind nehéz,  
mind könnyű láncokra. Az alábbi tanulmányokat vé-  
gezzük el.

#### Sorozatminták szerokonvertálóktól

NANB-szerokonvertálók három esetéből származó  
sorozatmintákat tanulmányozunk az Ortho Co., Rariton,  
N. Y. AEÁ cég által gyártott reagensek alkalmazásával a  
HCV C100-3 ELISA-vizsgálatban az enzimkonjugá-  
tumban, vagy csak az anti-IgG monoklonális antitestet  
alkalmazva, vagy ezt anti-IgM monoklonális antitesttel  
kombinálva alkalmazva, vagy poliklonális antiszérumot  
alkalmazva (lásd a 11. táblázatot). Az IgG- és az IgM-  
konjugátumok koncentrációja körülbelül 0,5–1,0 mg/ml  
vizsgálatonként 200 µl térfogatban.

Az anti-IgG monoklonális antitest-enzim konjugá-  
tumot alkalmazva kapott eredményeket a 12. táblázat-  
ban mutatjuk be. Az adatok azt mutatják, hogy kezdet-  
ben erős reaktivitás mutatkozik az 1., 2. és 3. esetek  
1-4., illetve 2-8., illetve 3-5. mintáiban.

Az anti-IgG monoklonális konjugátum és anti-IgM-  
konjugátum kombinációját alkalmazva kapott eredmé-  
nyeket a 13. táblázatban mutatjuk be. Anti-IgG és anti-  
IgM három különböző arányát vizsgáljuk; az anti-IgG  
1:10 000 hígítása végig konstans. Az anti-IgM mono-  
klonális konjugátum vizsgált hígítása: 1:80 000. Az  
adatok azt mutatják, hogy – egyezésben a csak anti-  
IgG-vel végzett tanulmányokkal – erős kezdeti reakti-  
vitas mutatható ki az 1-4., 2-8. és 3-5. mintákban.

Az ELISA-val kapott eredményeket, anti-IgG  
monoklonális konjugátumot (1:10 000 hígítás) vagy  
Tago poliklonális konjugátumot (1:80 000 hígítás) vagy  
35 Jackson poliklonális konjugátumot (1:80 000 hígítás) al-  
kalmazva a 14. táblázatban mutatjuk be. A poliklonális  
konjugátumokat a Jackson Immunoresearch Co. (West  
Grove, Pe, AEÁ) gyártja. Az adatok azt jelzik, hogy a  
kezdeti erős reaktivitás az 1-4., 2-8. és 3-5. mintákban  
mutatkozik mind a három felállásban; a Tago poliklo-  
nális antitestek alakítják ki a legkisebb jeleket.

A fentebb megadott eredmények megmutatják,  
hogy mind a három felállás mutat ki reaktív mintákat  
azonos időben a betegség akut fázisa után (amelyet az  
emelt ALT-szinttel igazolunk). Ezenkívül az eredmé-  
nyek azt is jelzik, hogy a HCV C100-3 ELISA-érzé-  
kenysége anti-IgG monoklonális antitest-enzim konju-  
gátumot alkalmazva azonos vagy jobb, mint azok az  
eredmények, amelyeket az enzimkonjugátumhoz tarto-  
zó más vizsgált felállásokat alkalmazva kapunk.

11. táblázat  
Minták leírása

	Dátum	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	ALT	Bilirubin
1. eset						
1-1	8/5/81	1,0	91,7	12,9	40,0	-1,0
1-2	9/2/81	1,0	121,0	15,1	274,0	1,4

11. táblázat (folytatás)

	Dátum	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	ALT	Bilirubin
1-3	10/7/81	1,0	64,0	23,8	261,0	0,9
1-4	11/19/81	1,0	67,3	33,8	75,0	0,9
1-5	12/15/81	1,0	50,5	27,6	71,0	1,0
2. eset						
2-1	10/19/81	1,0	1,0	116,2	17,0	-1,0
2-2	11/17/81	1,0	0,8	89,5	46,0	1,1
2-3	12/02/81	1,0	1,2	78,3	63,0	1,4
2-4	12/14/81	1,0	0,9	90,6	152,0	1,4
2-5	12/23/81	1,0	0,8	93,6	624,0	1,7
2-6	1/20/82	1,0	0,8	92,9	66,0	1,5
2-7	2/15/82	1,0	0,8	86,7	70,0	1,3
2-8	3/17/82	1,0	0,9	69,8	24,0	-1,0
2-9	4/21/82	1,0	0,9	67,1	53,0	1,5
2-10	5/19/82	1,0	0,5	74,8	93,0	1,4
2-11	6/14/82	1,0	0,8	82,9	37,0	-1,0
3. eset						
3-1	4/7/81	1,0	1,2	88,4	13,0	-1,0
3-2	5/12/81	1,0	1,1	126,2	236,0	0,4
3-3	5/30/81	1,0	0,7	99,9	471,0	0,2
3-4	6/9/81	1,0	1,2	110,8	315,0	0,4
3-5	7/6/81	1,0	1,1	89,9	273,0	0,4
3-6	8/10/81	1,0	1,0	118,2	158,0	0,4
3-7	9/8/81	1,0	1,0	112,3	84,0	0,3
3-8	10/14/81	1,0	0,9	102,5	180,0	0,5
3-9	11/11/81	1,0	1,0	84,6	154,0	0,3

12. táblázat

Anti-IgG monoklonális konjugátumot alkalmazva kapott ELISA-eredmények

Minta	Dátum	ALT	OD	S/CD
Negatív kontroll			0,076	
Határérték			0,476	
PC (1 : 128)			1,390	
1. eset				
1-1	08/05/81	40,0	0,178	0,37
1-2	09/02/81	274,0	0,154	0,32
1-3	10/07/81	261,0	0,129	0,27
1-4	11/19/81	75,0	0,937	1,97
1-5	12/15/81	71,0	>3,000	>6,30
2. eset				
2-1	10/19/81	17,0	0,058	0,12
2-2	11/17/81	46,0	0,050	0,11
2-3	12/02/81	63,0	0,047	0,10
2-4	12/14/81	152,0	0,059	0,12

12. táblázat (folytatás)

Minta	Dátum	ALT	OD	S/CD
2-5	12/25/81	624,0	0,070	0,15
2-6	01/20/82	66,0	0,051	0,11
2-7	02/15/82	70,0	0,139	0,29
2-8	13/17/82	24,0	1,867	3,92
2-9	04/21/82	53,0	>3,000	>6,30
2-10	05/19/82	95,0	>3,000	>6,30
2-11	06/14/82	37,0	>3,000	>6,30
3. eset				
3/1	04/07/81	13,0	0,090	0,19
3/2	05/12/81	236,0	0,064	0,13
3/3	05/30/81	471,0	0,079	0,17
3/4	06/09/81	315,0	0,211	0,44
3/5	07/06/81	273,0	1,707	3,59
3/6	08/10/81	158,0	>3,000	>6,30
3/7	09/08/81	84,0	>3,000	>6,30
3-8	10/14/81	180,0	>3,000	>6,30
3-9	11/11/81	154,0	>3,000	>6,30

13. táblázat

Anti-IgG és anti-IgM monoklonális konjugátumot alkalmazva kapott eredmények

Minta	Dátum	ALT	NANB ELISA-k					
			Monoklonális antitestek IgG 1:10K IgM 1:30K		Monoklonális antitestek IgG 1:10K IgM 1:60K		Monoklonális antitestek IgG 1:10K IgM 1:20K	
			OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
Negatív kontroll			0,100		0,080		0,079	
Határérték PC (1:128)			1,083		1,328		1,197	
1. eset								
1-1	08/05/81	40	0,173		0,162		0,070	
1-2	09/02/81	274	0,194		0,141		0,079	
1-3	10/07/81	261	0,162		0,129		0,063	
1-4	11/19/81	75	0,812		0,85		0,709	
1-5	12/15/81	71	>3,000		>3,000		>3,000	
2. eset								
2-1	10/19/81	17	0,442		0,045		0,085	
2-2	11/17/81	46	0,102		0,029		0,030	
2-3	12/02/81	63	0,059		0,036		0,027	
2-4	12/14/81	152	0,065		0,041		0,025	
2-5	12/23/81	624	0,082		0,033		0,032	
2-6	01/20/82	66	0,102		0,042		0,027	
2-7	02/15/82	70	0,188		0,068		0,096	
2-8	03/17/82	24	1,728		1,668		1,541	

13. táblázat (folytatás)

Minta	Dátum	ALT	NANB ELISA-k					
			Monoklonális antitestek IgG 1:10K IgM 1:30K	Monoklonális antitestek IgG 1:10 K IgM 1:60K	Monoklonális antitestek IgG 1:10K IgM 1:60K		Monoklonális antitestek IgG 1:10 K IgM 1:20K	
			OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
2-9	04/21/82	53	>3,000		2,443		>3,000	
2-10	05/19/82	95	>3,000		>3,000		>3,000	
2-11	06/14/82	37	>3,000		>3,000		>3,000	
3. eset								
3-1	04/07/81	13	0,193		0,076		0,049	
3-2	05/12/81	236	0,201		0,051		0,038	
3-3	05/30/81	471	0,132		0,067		0,052	
3-4	06/09/81	315	0,175		0,155		0,140	
3-5	07/06/81	275	1,335		1,238		1,260	
3-6	08/10/81	158	>3,00		>3,000		>3,00	
3-7	09/08/81	84	>3,00		>3,000		>3,00	
3-8	10/14/81	180	>3,00		>3,000		>3,00	
3-9	11/11/81	154	>3,00		>3,000		>3,00	

14. táblázat

Minta	Dátum	ALT	NANB-ELISA-k					
			Monoklonális antitestek		TAGO		JACKSON	
			1:1K		1:80K		1:80K	
			OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
Negatív kontroll			0,076		0,045		0,154	
Határérték			0,476		0,545		0,654	
PC (1:128)			1,390		0,727		2,154	
1. eset								
1/1	08/05/81	40	0,178	0,37	0,067	0,12	0,153	0,23
1/2	09/02/81	274	0,154	0,32	0,097	0,18	0,225	0,34
1/3	10/07/81	261	0,129	0,27	0,026	0,05	0,167	0,26
1/4	11/19/81	75	0,937	1,97	0,324	0,60	0,793	1,21
1/5	12/15/81	71	>3,00	>6,30	1,778	3,27	>3,000	>4,59
2. eset								
2/1	10/19/81	17	0,058	0,12	0,023	0,04	0,052	0,08
2/2	11/17/81	46	0,050	0,11	0,018	0,03	0,058	0,09
2/3	12/02/81	63	0,047	0,10	0,020	0,04	0,060	0,09
2/4	12/14/81	152	0,059	0,12	0,025	0,05	0,054	0,08
2/5	12/23/81	624	0,070	0,15	0,026	0,05	0,074	0,11
2/6	01/20/82	66	0,051	0,11	0,018	0,03	0,058	0,09
2/7	02/15/82	70	0,139	0,29	0,037	0,07	0,146	0,22

14. táblázat (folytatás)

Minta	Dátum	ALT	NANB-ELISA-k					
			Monoklonális antitestek		TAGO		JACKSON	
			1:1K		1:80K		1:80K	
			OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
2/8	03/17/82	24	1,867	3,92	0,355	0,65	1,429	2,19
2/9	04/21/82	53	>3,00	>6,3	0,748	1,37	>3,00	>4,59
2/10	05/19/82	95	>3,00	>6,30	1,025	1,88	>3,00	>4,59
2/11	06/14/82	37	>3,00	>6,30	0,917	1,68	>3,00	>4,59
3. eset								
3/1	04/07/81	13	0,090	0,19	0,049	0,09	0,138	0,21
3/2	05/12/81	256	0,064	0,13	0,040	0,07	0,094	0,14
3/3	05/30/81	471	0,079	0,17	0,045	0,08	0,144	0,22
3/4	06/09/81	315	0,211	0,44	0,085	0,16	0,275	0,42
3/5	07/06/81	273	1,707	3,59	0,272	0,50	1,773	2,71
3/6	08/10/81	158	>3,00	>6,30	1,347	2,47	>3,00	>4,59
3/7	09/08/81	84	>3,00	>6,30	2,294	4,21	>3,00	>4,59
3/8	10/14/81	180	>3,00	>6,30	>3,00	>5,50	>3,00	>4,59
3/9	11/11/81	154	>3,00	>6,30	>3,00	>5,50	>3,00	>4,59

#### Minták véletlenszerűen kiválasztott véradókból

Véletlenszerűen kiválasztott véradókból való mintákat vizsgálunk át HCV-fertőzésre HCV C100–3 ELISA-t alkalmazva, amelyben az antitest-enzim konjugátum vagy anti-IgG monoklonális konjugátum, vagy valamilyen poliklonális konjugátum. Az átvizsgált minták teljes száma 1077, illetve 1056 a poliklonális konjugátummal, illetve a monoklonális konjugátummal. Az átvizsgálás eredményeinek összefoglalását a 15. táblázatban mutatjuk be, és a mintaeloszlást hisztogramban mutatjuk be a 44. ábrán.

Az átlag- és a standard eltérés kiszámításánál kizárjuk azokat a mintákat, amelyek 1,5 fölötti jelet adnak, vagyis 1073 OD-értéket alkalmaznak a poliklonális konjugátumot hasznosító kalkulációkban és 1051 OD-értéket az anti-IgG monoklonális konjugátum esetében. Amint a 15. táblázatban látható, amikor poliklonális konjugátumot alkalmazunk, az átlag 0,0493-ról 0,0931-re csúszik fel, és a standard eltérés 0,074-ről 0,0933-ra növekszik. Ezenkívül az eredmények azt is megmutatják, hogy ha az  $x+5.SD$  kritériumot alkalmazzuk abból a célból, hogy meghatározzuk a vizsgálat határértékét, a poliklonális antitest-enzim konjugátum összeállítás az ELISA-vizsgálatban magasabb határértéket igényel. Ez csökkentett vizsgálati fajlagosságot jelez a monoklonális rendszerrel összehasonlítva. Ezenkívül, amint ezt a 44. ábrán lévő hisztogramban ábrázoljuk, az eredmények nagyobb elkülönülése következik be a negatív és pozitív eloszlások között, amikor véletlenszerűen kivá-

lasztott véradókat vizsgálunk át ELISA-val az anti-IgG monoklonális konjugátumot alkalmazva, ha a kereskedelmi forgalomban lévő poliklonális jelzést alkalmazó vizsgálattal hasonlítjuk össze.

#### 15. táblázat

Két ELISA-összehasonlítás összehasonlítása véletlenszerűen kiválasztott véradókból vett minták vizsgálatában

Konjugátum	Poliklonális (Jackson)	Anti-IgG monoklonális
A minták száma	1073	1051
Átlag (x)	0,0931	0,04926
Standard eltérés (SD)	0,0933	0,07427
5.SD	0,4666	0,3714
Határérték (5.SD+x)	0,5501	0,4206

HCV-szerokonverzió NANBH-ban szenvedő betegekben, akik különböző földrajzi helyeken találhatóak

Olyan betegekben való szérumokat, akik emelt ALT-szintjük alapján NANBH-ra gyanúsak, és akik HAV- és HBV-vizsgálatokban negatívak, vizsgálunk RIA-t alkalmazva, lényegében úgy, hogy a HCV C100–3 antigént alkalmazzuk átvizsgálóantigénként a mikrotitrálólemezekben. Amint a 16. táblázatban bemutatott eredményekben látható, a RIA-vizsgálat pozitív mintákat mutat ki az esetek nagy százalékában.

16. táblázat

Szerokonverzió-gyakoriságok anti-C100–3-ra különböző országokból származó NABH-betegek között

Ország	Hollandia	Olaszország	Japán
Vizsgáltak száma	5	36	26
Pozitívák száma	3	29	19
Pozitívák %-a	60	80	73

*HCVB-szerokonverzió kimutatás „közösségben szerzett” NANBH-ban szenvedő betegekben*

A szérumokat, amelyeket 100 NANBH-ban szenvedő betegből kaptak, akiknél az átvitel útja nem nyilvánvaló (például transzfúziót, intravénás gyógyszerhasználatot, promiszkuitást stb. nem lehet kockázati tényezőként azonosítani) RIA-vizsgálatot alkalmazva vizsgáljuk át, amint ezt az előbbiekből leírtuk, azzal a kivétellel, hogy a HCV C100–3 antigént alkalmazzuk a mikrotitrálólemezekhez rögzített vizsgálóantigénként. Az eredmények azt mutatják, hogy 100 szérummintából 55 tartalmaz olyan antitesteket, amely immunológiailag reagál a HCV C100–3 antigénnel.

A fentebb leírt eredmények azt sugallják, hogy a „közösségben szerzett” NANBH-t is előidézi a HCV. Sőt mivel itt kimutatjuk, hogy a HCV a Flavivírussal rokon, amelyek többségét izeltlábúak viszik át, nagyon valószínű, hogy a HCV-átvitel a „közösségben szerzett” esetekben szintén izeltlábú-átvitel eredménye.

*HCV-antitestek és kiegészítő markerek gyakoriságának összehasonlítása NANBH-átvitelben érintett véradókban*

Egy kutatási tanulmányt végzünk, hogy meghatározzuk, vajon az NANBH-pozitivitásra gyanús véradóktól kapott vér befogadói, akikben NANBH fejlődött ki, szerokonvertálódnak-e anti-HCV-antitest pozitívra. A véradókat átvizsgáljuk a kisegítő marker rendellenességekre, amelyeket jelenleg használnak NANBH-fertőzés markereiként; ezek az emelt ALT-szintek és anti-belső antigén antitest jelenléte. Ezenkívül a véradókat átvizsgáljuk anti-HCV-antitestek jelenlétére is. Az anti-HCV-antitestek jelenlétének meghatározását radioimmunesszé alkalmazva végezzük. A tanulmány eredményeit a 17. táblázatban ábrázoljuk, amely az alábbiakat tartalmazza: a beteg száma (1. oszlop); anti-HCV-antitestek jelenléte a beteg szérumában (2. oszlop); a beteg által befogadott véradók száma, ahol az egyes befogadások különböző véradóktól vannak (3. oszlop); anti-HCV-antitestek jelenléte a véradó szérumában (4. oszlop); és a véradó kiegészítő rendellenességei (5. oszlop) (NT, vagy azt jelenti, hogy nem vizsgáltuk) (ALT emelt transzaminázt és anti-HBc anti-belső antigén elleni antitestet jelent).

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- A 17. táblázat eredményei azt demonstrálják, hogy a HCV-antitest vizsgálat pontosabb a fertőzött véradók kimutatásában, mint a kiegészítő marker vizsgálatok. 10 olyan beteg közül, akik NANBH-tüneteket mutatnak, 9-et vizsgálunk pozitívnak az anti-HCV-antitest szerokonverzióval. 11 gyanús donor (a 6. beteg két véradásban részesült két különböző egyéntől, akikről fennáll a gyanú, hogy NANBH-hordozók) közül 9 pozitív anti-HCV-antitestekre és egynek a pozitivitása határértéken van, ennek következtében bizonytalan (az 1. beteg donorja). Ezzel ellentétben az emelt ALT-vizsgálatot alkalmazva a 10 véradóból 6-ot negatívnak vizsgálunk, és az anti-belső antigén antitest vizsgálatot alkalmazva a 10 véradóból 5-öt negatívnak vizsgálunk. A legfontosabb következmény azonban az, hogy három esetben (a 8., 9. és 10. betegeknek vért adó véradók) az ALT-vizsgálat és az anti-HBc-vizsgálat következtelen eredményeket ad.

17. táblázat

Anti-HCV-antitestek kifejlődése olyan betegekben, akik feltételezett NANBH-hordozóktól kaptak vért

Beteg	Anti-HCV szerokonverzió a betegben	A véradások/véradók száma	Anti-HCV pozitív véradó	Kiegészítő rendellenességek	
				ALT	Anti-HB
1	igen	18	bizonytalan	nem	nem
2	igen	18	igen	NT	igen
3	igen	13	igen	nem	nem
4	nem	18	nem	–	–
5	igen	16	igen	igen	igen
6	igen	11	igen (2)	nem igen	nem igen
7	igen	15	igen	NT	nem
8	igen	20	igen	nem	igen
9	igen	5	igen	igen	nem
10	igen	15	igen	nem	igen

\* Ugyanaz a donor, mint az anti-NANBV pozitív

*Amplifikáció HCV cDNS-szekvenciák klónozásához a Flavivirusgenom-szekvenciák megőrzött területeiből származó primereket és PCR-technikát alkalmazva*

A fentebb bemutatott eredmények, amelyek azt sugallják, hogy a HCV Flavivirus vagy Flavivirus vírus, lehetővé tesznek egy stratégiát nem jellemzett HCV cDNS klónozásához a PCR-technikát alkalmazva, és olyan primereket alkalmazva, amelyek Flavivirusokban lévő megőrzött aminosavszekvenciákat kódoló területekből származnak. A primerek egyike általában meghatározott HCV-genom szekvenciából származik, és a másik primer, amely egy szekvencaelemzésnek alá nem vetett HCV-polinukleotid területét szegélyezi, a Flavivirusgenom egy megőrzött területéből származik. A Flavivirusgenomról ismert, hogy megőrzött szekvenciákat tartalmaznak az NS1-en és az E-polipeptideken belül, amelyek a Flavivirusgenom 5'-területén belül kódolódnak. Az ezeket a területeket kódoló megfelelő szekvenciák a 26. ábrán bemutatott HCV cDNS-szekvenciától fölfelé fekszenek. Így abból a célból, hogy a HCV-genom ebből a területéből származó szekvenciákat izoláljunk, felfelé lévő primereket tervezünk, amelyek az ezeken a Flavivirus-polipeptideken belül lévő megőrzött szekvenciákból származnak. A lefelé lévő primerek a HCV cDNS ismert részének felfelé lévő végéből származnak.

A kód degenerációja következtében valószínű, hogy lesznek hibás illesztések a Flavivirus vizsgálminták és a megfelelő HCV-genom szekvenciák között. Ennek megfelelően olyan stratégiát alkalmazunk, amelyet Lee írt le (1988). A Lee-féle munkamenet olyan kevert oligonukleotid primereket alkalmaz, amelyek komplementerek egy aminosavszekvencia reverz translációs termékéhez; a szekvenciák a kevert primerekben számításba vesznek minden kodondegenerációt a megőrzött aminosavszekvenciánál.

5'-GAT CTC TAG AGA AAT CAA TAT GGT GAC AGA GTC A-3'

A PCR-reakciót, amelyet eredetileg Saiki és munkatársai írtak le (1986), lényegében úgy hajtjuk végre, amint ezt Lee és munkatársai leírták (1988), azzal a kivétellel, hogy a cDNS-hez szolgáló templát olyan RNS, amelyet HCV-vel fertőzött csimpánz májából izoláltunk, vagy HCV-vel fertőzött csimpánzsérumból izolált vírusrészecskékből izoláltunk. Ezenkívül az összeforrasztási körülmények kevésbé szigorúak az amplifikáció első menetében (0,6 mol/l NaCl és 25 °C hőmérséklet), mivel a primernek az a része, amely a HCV-szekvenciához forr, csak 9 nukleotid, és nem lehetnek hibás illesztések. Ezenkívül, ha ssc5h34A-t használunk, a további szekvenciák, amelyek nem a HCV-genomból származnak, hajlamosak a primer templáthibrid destabilizálására. Az amplifikáció első menete után az összeforrasztási körülmények szigorúbbak lehetnek (0,066 mol/l NaCl és 32–37 °C), mivel az

5'-CCC AGC GGC GTA CGC GCT GGA CAC GGA GGT GGC CGC GTC  
GTG TGG CGG TGT TGT TCT CGT CGG GTT GAT GGC GC 3'

Primer keverékek három készletét alakítjuk ki számos Flavivirusban talált aminosavhomológia alapján, a Flavivirusok közé értve a trópusi náthaláz-2,4 (D-2,4), Japán encefalitiszvírus (JEV), sárgaláz (YF) és nyugat-nílusi vírus (WN) vírusait. A legtöbb fölfelé lévő megőrzött szekvenciából származó primer keverék (5'-1) a gly-trp-gly aminosavszekvencián alapul, amely része a D-2, JEV, YF és WN E-fehérjében megtalálható asp-arg-gly-trp-gly-asp-N megőrzött szekvenciának. A következő primer keverék (5'-2) az E-fehérjében lefelé lévő konzervált szekvencián, a phe-asp-gly-asp-ser-tyr-leu-phe-gly-asp-ser-tyr-leu szekvencián alapul, és a phe-gly-asp-ból ered; a megőrzött szekvencia a D-2-ben, JEV-ben és WN-ben van jelen. A harmadik primer keverék (5'-3) az arg-ser-cys aminosavszekvencián alapul, amely a D-2, D-4, JEV, YF és WN NS1 fehérjében lévő cys-cys-arg-ser-cys megőrzött szekvencia része. Az egyes primereket, amelyek az 5'-3 keveréket képezik, a 45. ábrán mutatjuk be. A megőrzött területekből származó különböző szekvenciákon kívül az egyes keverékekben lévő egyes primerek egy konstans területet is tartalmaznak az 5'-végnél, amely a HindIII, MboI és EcoRI restrikciós enzimekhez szolgáló helyeket kódoló szekvenciát tartalmaz.

A lefelé lévő primer, az ssc5h20A, az 5h. klónban lévő nukleotidszekvenciát tartalmazza, amely olyan szekvenciákkal bíró HCV cDNS-t tartalmaz, amelyek átfedik a 14i. és 11b. klónokban lévő szekvenciákat. Az ssc5h20A szekvenciája az alábbi:

5'-GTA ATA TGG TGA CAG AGT CA-3'

Egy másik primert is alkalmazhatunk, az ssc5h34A-t. Ez a primer az 5h. klónban lévő szekvenciából származik, és ezenkívül olyan nukleotidokat tartalmaz az 5'-végnél, amely restrikciósenzim-helyet alkot, így megkönnyíti a klónozást. Az ssc5h34A szekvenciája az alábbi:

amplifikált szekvenciák most olyan területeket tartalmaznak, amelyek komplementerek a primerekkel, vagy másolatai a primereknek. Ezenkívül az amplifikáció első 10 ciklusa a Klenow-enzim I-gyel fut, az ehhez az enzimhez alkalmas PCR-körülmények között. Ezeknek a ciklusoknak a teljessé válása után a mintákat extraháljuk, és Taq polimerázzal futtatjuk a készletben leírt útmutatások szerint, amely útmutatások a Cetus/Perkin-Elmer készlethez tartoznak.

A kibővítés után az amplifikált HCV cDNS-szekvenciákat hibridizálással mutatjuk ki az 5h. klónból származó vizsgálmintát alkalmazva. Ez a vizsgálminta azokból a szekvenciákból származik, amelyek fölfelé vannak azoktól, amelyeket a primer kinyeréséhez alkalmazunk, és nem fedik át az 5h. klón eredetű primerek szekvenciáit. A vizsgálminta szekvenciája az alábbi:

*HCV cDNS-könyvtár megalkotása egy fertőző NANBH-ban szenvedő csimpánz májából*

HCV cDNS-könyvtárat alkotunk meg annak a csimpánznak a májából, amelyből az előbbieket szerint a HCV cDNS-könyvtárat megalkottuk. A technika a könyvtár megalkotásához hasonló ahhoz, amelyet leírtunk, azzal a különbséggel, hogy az RNS forrása eltérő, és hogy olyan primert alkalmazunk, amely a 11b. klónban lévő HCV cDNS-szekvenciáján alapul. A primer szekvenciája a következő:

5'-CTG GCT TGA AGA ATC-3'.

*A k9-1. klónban lévő HCV cDNS-t és a 11b. klónban lévő cDNS-t átfedő nukleotidszekvencia izolálása*

A k9-1. klónt egy NANBH-val fertőzött csimpánz májából létrehozott HCV cDNS-könyvtárból izoláljuk, amint ezt már leírtuk. A könyvtárat olyan klónokra vizsgáljuk át, amelyek átfedik a 11b. klónban lévő szekvenciákat, egy olyan klónt alkalmazva, amely a 11b. klónt az 5'-terminálisnál fedi át (11e. klón). A 11b. klón szekvenciáját a 23. ábrán mutatjuk be. Pozitív klónokat izolálunk 1:500 000 gyakorisággal. Az egyik izolált klónt, a k9-1-et további tanulmányozásnak vetjük alá. A k9-1. klónban lévő HCV cDNS átfedő természetét a 26. ábrán lévő HCV cDNS-szekvencia 5'-végével a klón átvizsgálásával igazoljuk az Alex46 klónnal; ez utóbbi klón olyan 30 bázispáros HCV cDNS-szekvenciát tartalmaz, amely a fentebb leírt 14i. klónban lévő HCV cDNS 5'-terminálisánál lévő bázispároknak felel meg.

A k9-1. klónból izolált HCV cDNS nukleotidszekvenciáját a fentebb ismertetett technikákat alkalmazva határozzuk meg. A k9-1. klónban lévő HCV cDNS szekvenciáját, az átfedést a 26. ábrán lévő HCV cDNS-sel, és az ebben kódolt aminosavakat a 46. ábrán mutatjuk be.

A k9-1. klónban lévő HCV cDNS-szekvencia össze van dolgozva azoknak a klónoknak a szekvenciáival, amelyeket az előzőekben leírtunk, hogy összetett HCV cDNS-szekvenciát alkossanak meg, ahol a k9-1. szekvencia a 32. ábrán bemutatott szekvenciától fölfelé van elhelyezve. Az összetett HCV cDNS-szekvenciát, amely magában foglalja a k9-1. szekvenciát és a benne kódolt aminosavakat, a 47. ábrán mutatjuk be.

A 47. ábrán bemutatott HCV cDNS 5'-területében kódolt aminosavak szekvenciáját összehasonlítjuk a trópusi náthaláz (Dengue) vírus fentebb leírt törzseinek megfelelő területeivel, a hidrofobitás és hidrofilitás területeinek profilját illetően. Ez az összeállítás azt mutatja, hogy a HCV-ből és Dengue-ből származó polipeptidek, amelyek az NS1-et (vagy egy részét) kódoló területnek felelnek meg, hasonló hidrofób/hidrofil profilnak felelnek meg.

A fentebb nyújtott információ lehetővé teszi a HCV-törzsek azonosítását. A többi HCV-törzsek izolálását és jellemzését úgy hajthatjuk végre, hogy olyan testkomponensekből, amelyek vírusrészcskéket tartalmaznak, a nukleinsavakat izoláljuk, cDNS-könyvtárat alkotunk meg a fentebb leírt HCV cDNS-vizsgálómintákon alapuló polinukleotidvizsgálómintákat alkalmazva, a könyvtárat a fentebb leírt HCV cDNS-szekvenciákat

tartalmazó klónokra átvizsgálva, és az új izolátumokból a HCV cDNS-t összehasonlítva a fentebb leírt cDNS-ekkel. Az ebben vagy a vírusgenomban kódolt polipeptideket immunológiai keresztreaktivitással követhetjük a fentebb leírt polipeptideket és antitesteket alkalmazva. Azok a törzsek, amelyek a HCV paramétereikhez illeszkednek, könnyen azonosíthatók. HCV-törzsek azonosítására más eljárások is nyilvánvalóvá válnak a szakember számára, az itt megadott információk alapján.

A találmány az itt leírt különféle kiviteli módjaival számos ipari alkalmazással bír, ezek közül néhányat az alábbiakban ismertetünk. A HCV cDNS-eket alkalmazhatjuk vizsgálóminták tervezéséhez, HCV-nukleinsavak mintákban való kimutatásához. A cDNS-ekből származó mintákat alkalmazhatjuk HCV-nukleinsavak kimutatására például kémiai szintetikus reakciókban. Ezeket alkalmazhatjuk átvizsgálási programokban vírusellenes ágensekhez, hogy meghatározzuk az ágensek hatását vírusreplikáció gátlásában sejtenyészti rendszerekben és állatmodell-rendszerekben. A HCV-polinukleotid vizsgálóminták alkalmas vírusnukleinsavak kimutatásában is emberekben, és így alapul szolgálhatnak HCV-fertőzés diagnózisához emberekben.

A fentiekén kívül az itt ismertetett cDNS-ek információkat és eszközöket nyújtanak HCV epitópjait tartalmazó polipeptidek szintéziséhez. Ezek a polipeptidek alkalmasak HCV-antigének elleni antitestek kimutatására. Egy sor immunesszét írunk le itt HCV-fertőzésre, amelyek HCV-epitópokat tartalmazó rekombináns polipeptideken alapulnak; ezek kereskedelmi alkalmazást nyerhetnek HCV által indukált NANBH diagnózisában, vérbankdonorok átvizsgálásában HCV által előidézett fertőző hepatitisre, és fertőző véradóktól való fertőzött vér kimutatására. A vírusantigének hasznosíthatók vírusellenes szerek hatékonyságának követésére is állatmodell-rendszerekben. Ezenkívül az itt ismertetett HCV cDNS-ekből származó polipeptidek vakcinaként is hasznosíthatók HCV-fertőzések kezelésében.

A HCV cDNS-ekből származó polipeptidek a fentebb ismertetett alkalmazásokon kívül alkalmasak anti-HCV-antitestek előidézésére is. Így ezeket alkalmazhatjuk anti-HCV-vakcinaként. A HCV-polipeptidekkel való immunizálás eredményeként kialakított antitestek alkalmasak vírusantigének jelenlétének kimutatására is mintákban. Így ezeket alkalmazhatjuk HCV-polipeptidek termelésének vizsgálására kémiai rendszerekben. Az anti-HCV-antitesteket alkalmazhatjuk vírusellenes ágensek hatékonyságának követésére is olyan átvizsgálóprogramban, ahol ezeket az ágenseket szövettenyészti rendszerekben alkalmazhatjuk. Ezeket alkalmazhatjuk passzív immunterápiában is, és a NANBH által okozott HCV diagnosztizálására, lehetővé téve a vírusantigén vagy -antigének kimutatását mind a véradókban, mind a vérbefogadóknak. Egy másik fontos alkalmazási terület az anti-HCV-antitestek számára az affinitáskromatográfia vírusok és víruspolipeptidek tisztításához. A tisztított vírus- és víruspolipeptid-készítményeket vakcinákban alkalmazhatjuk. A tisztított vírus azonban alkalmas lehet olyan sejtte-

nyésztő rendszerek kifejlesztésében is, amelyben a HCV-replikálódik.

HCV-vel fertőzött sejteket tartalmazó sejtenyésző rendszerek sokféle alkalmazást nyerhetnek. Ezeket alkalmazhatjuk HCV viszonylag nagy léptékű termeléséhez, amely normálisan alacsony titerű vírus. Ezek a rendszerek alkalmasak lehetnek a vírus molekuláris biológiájának a tisztázására is, és vírusellenes ágensek kifejlesztéséhez vezethetnek. A sejtenyésző rendszerek alkalmasak vírusellenes szerek hatékonyságának az átvizsgálására is. Ezenkívül a HCV-t tűrő sejtenyésző rendszerek alkalmasak HCV legyengített törzseinek előállítására.

Kényelmi szempontokból az anti-HCV-antitesteket és HCV-poli-peptideket, akár természetesek, akár rekombináns eredetűek, készletekbe csomagolhatjuk.

A HCV cDNS izolálásához alkalmazott eljárás – amely egy egyén fertőzött szöveteiből származó cDNS-könyvtár előállításából áll egy kifejezővektorban, majd olyan klónok szelektálásából áll, amelyek más fertőzött egyénekből és nem fertőzött egyénekből való antitest-tartalmú testkomponensekben lévő antitestekkel immunológiailag reagáló kifejezési termékeket termelnek – alkalmazható más, eddig nem jellemzett, betegséggel társult ágensből származó cDNS-ek izolálására, amelyek genomkomponensből állnak. Ez viszont ezeknek az izolálásához és jellemzéséhez vezet, és diagnosztikus reagensekhez és vakcinákhoz ezekhez a más betegséggel társult ágensekhez.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás HCV-1 polinukleotid előállítására, amely HCV-1 polinukleotid olyan egybefüggő nukleotid-szekvenciát tartalmaz, amely képes szelektíven hibridizálódni egy HCV-polinukleotidhoz vagy annak komplementeréhez, *azzal jellemezve*, hogy

(a) egy polimerizáló ágenssel nukleotidszubsztrátokat polimerizálunk egy HCV-1 polinukleotid előállítására, és

(b) izoláljuk a HCV-1 polinukleotidot.

(Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia az ATCC No. 40 394 szám alatt letétbe helyezett HCV cDNS által kódolt.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia a 47. ábra szerinti HCV cDNS-szekvencia által kódolt.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő szekvencia legalább 10 nukleotidból áll.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

5. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő szekvencia legalább 15 nukleotidból áll.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

6. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő szekvencia legalább 20 nukleotidból áll.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

5 7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polinukleotid egy DNS-polinukleotid.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

10 8. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polinukleotid egy RNS-polinukleotid.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

15 9. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egy szintetikus kémiai eljárás.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

10. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy polimerizálóágensként egy polimerázt alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

20 11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polimerizációt katalízis mellett egy rekombináns gazdasejtben végezzük.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

25 12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy gazdasejtként egy prokariótasejtet alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy gazdasejtként egy eukariótasejtet alkalmazunk.

30 (Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

14. Eljárás egy HCV-1 polinukleotidot tartalmazó rekombináns vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1–13. igénypontok bármelyike szerint előállított polinukleotidot egy olyan polinukleotidhoz ligálunk, amely egy kontrollszekvenciát tartalmaz, és a ligálás következtében a kontrollszekvencia és a HCV-polinukleotid működésképesen egymáshoz kapcsolódik.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

40 15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vektorként egy expressziós vektort állítunk elő.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

16. Eljárás egy HCV-1 polinukleotiddal transzformált rekombináns gazdasejt előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1–13. igénypontok bármelyike szerint előállított polinukleotidot vagy egy, a 14. vagy 15. igénypont szerint előállított vektort egy gazdasejtbe juttatunk be.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

50 17. Eljárás HCV-1 polinukleotid vagy vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 16. igénypont szerint előállított gazdasejtet inkubálunk, a belé épített HCV-1 polinukleotid vagy vektor replikálására.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

55 18. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia egy, az ATCC 40 511, 40 512, 40 513 és 40 514 számon letétbe helyezett cDNS-ek csoportjába tartozó HCV cDNS valamelyike által kódolt.

60 (Elsőbbsége: 1988. 11. 14.)

19. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia a 7. vagy 8. ábra szerinti HCV cDNS-szekvencia által kódolt. (Elsőbbsége: 1988. 02. 26.)

20. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia a 26. ábra szerinti HCV cDNS-szekvencia által kódolt. (Elsőbbsége: 1988. 10. 26.)

21. Eljárás HCV-1 polipeptid előállítására, amely tartalmaz egy HCV-antigén determinánst és egy, legalább 10 aminosavból álló egybefüggő szekvenciát, amelyet egy, az 1. igénypont szerint előállított polinukleotid kódol, *azzal jellemezve*, hogy

(a) aminosavsusztrátokat polimerizálunk egy polimerizálóagenssel egy olyan polipeptid előállítására, amely tartalmaz egy HCV-1 antigén determinánst és egy, legalább 10 aminosavból álló egybefüggő szekvenciát, amelyet egy HCV-1 polinukleotid kódol, és

(b) izoláljuk a polipeptidet. (Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő HCV-1 nukleotidszekvencia az ATCC 40394 letéti számú HCV cDNS valamelyik szálában található.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

23. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia a 47. ábra szerinti HCV cDNS-szekvencia által kódolt.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

24. A 21–23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás egy polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy szintetikus kémiai módszert alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

25. A 21–23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás egy polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy polimerizáló ágensként riboszómát alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

26. A 25. igénypont szerinti eljárás egy polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a polimerizációt katalízis mellett egy rekombináns gazdasejtben végezzük.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

27. A 21–26. igénypontok bármelyike szerinti eljárás egy polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a legalább 10 aminosavból álló egybefüggő szekvenciát egy nem HCV-aminosavszekvenciához fuzionáltatjuk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

28. A 21–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HCV-antigén determinánst egy, a C100 klón által kódolt HCV-aminosavszekvencia tartalmazza, és ez a klón az alábbi HCV-aminosavszekvenciát kódolja:

Asp–Ala–His–Phe–Leu–Ser–Gln–Thr–Lys–Gln–Ser–Gly–Glu–Asn–Leu–Pro–Tyr–Leu–Val–Ala–Tyr–Gln–Ala–Thr–Val–Cys–Ala–Arg–Ala–Gln–Ala–Pro–Pro–Pro–Ser–Trp–Asp–Gln–Met–Trp–Lys–Cys–Leu–Ile–Arg–Leu–Lys–Pro–Thr–Leu–His–Gly–Pro–Thr–Pro–Leu–Leu–Tyr–Arg–Leu–Gly–Ala–Val–Gln–Asn–Glu–Ile–Thr–Leu–Thr–His–Pro–Val–Thr–Lys–Tyr–Ile–Met–Thr–Cys–

Met–Ser–Ala–Asp–Leu–Glu–Ile–Thr–Leu–Thr–His–Pro–Val–Thr–Lys–Tyr–Ile–Met–Thr–Cys–Met–Ser–Ala–Asp–Leu–Glu–Val–Val–Thr–Ser–Thr–Trp–Val–Leu–Val–Gly–Gly–Val–Leu–Ala–Ala–Leu–Ala–Ala–Tyr–Cys–Leu–Ser–Thr–Gly–Cys–Val–Val–Ile–Val–Gly–Arg–Val–Val–Leu–Ser–Gly–Lys–Pro–Ala–Ile–Ile–Pro–Asp–Arg–Glu–Val–Leu–Tyr–Arg–Glu–Phe–Asp–Glu–Met–Glu–Glu–Cys–Ser–Gln–His–Leu–Pro–Tyr–Ile–Glu–Gln–Gly–Met–Met–Leu–Ala–Glu–Gln–Phe–Lys–Gln–Lys–Ala–Leu–Gly–Leu–Leu–Gln–Thr–Ala–Ser–Arg–Gln–Ala–Glu–Val–Ile–Ala–Pro–Ala–Val–Gln–Thr–Asn–Trp–Gln–Lys–Leu–Glu–Thr–Phe–Trp–Ala–Lys–His–Met–Trp–Asn–Phe–Ile–Ser–Gly–Ile–Gln–Tyr–Leu–Ala–Gly–Leu–Ser–Thr–Leu–Pro–Gly–Asn–Pro–Ala–Ile–Ala–Ser–Leu–Met–Ala–Phe–Thr–Ala–Ala–Val–Thr–Ser–Pro–Leu–Thr–Thr–Ser–Gln–Thr–Leu–Leu–Phe–Asn–Ile–Leu–Gly–Gly–Trp–Val–Ala–Ala–Gln–Leu–Ala–Ala–Pro–Gly–Ala–Ala–Thr–Ala–Phe–Val–Gly–Ala–Gly–Leu–Ala–Gly–Ala–Ala–Ile–Gly–Ser–Val–Gly–Leu–Gly–Lys–Val–Leu–Ile–Asp–Ile–Leu–Ala–Gly–Tyr–Gly–Ala–Gly–Val–Ala–Gly–Ala–Leu–Val–Ala–Phe–Lys–Ile–Met–Ser–Gly–Glu–Val–Pro–Ser–Thr–Glu–Asp–Leu–Val–Asn–Leu–Leu–Pro–Ala–Ile–Leu–Ser–Pro–Gly–Ala–Leu–Val–Val–Gly–Val–Val–Cys–Ala–Ala–Ile–Leu–Arg–Arg–His–Val–Gly–Pro–Gly–Glu–Gly–Ala–Val–Gln–Trp–Met–Asn–Arg–Leu–Ile–Ala–Phe–Ala–Ser–Arg–Glu–Asn–His–Val–Ser–Pro–Val–His–His–Lys–Arg.

(Elsőbbsége: 1988. 05. 06.)

29. A 21–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia az ATCC 40511, 40512, 40513 és 40514 szám alatt letétbe helyezett cDNS-csoportba tartozó HCV cDNS valamelyik szálában található.

(Elsőbbsége: 1988. 11. 14.)

30. A 21–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia a 7. vagy 8. ábra szerinti HCV cDNS-szekvencia által kódolt.

(Elsőbbsége: 1988. 02. 26.)

31. A 21–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia a 26. ábra szerinti HCV cDNS-szekvencia által kódolt.

(Elsőbbsége: 1988. 10. 26.)

32. Eljárás szilárd hordozóhoz rögzített HCV-1 polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 21–31. igénypontok bármelyike szerint előállított polipeptidet szilárd hordozóra viszünk fel.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

33. Eljárás immunesszé kit előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 21–27. vagy 29–32. igénypontok bármelyike szerint előállított polipeptidet egy megfelelő tartályba viszünk be.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HCV-1 antigén determinánst a C100 klón által

kódolt HCV-aminosavszekvencia tartalmazza, és ez a klón az alábbi HCV-aminosavszekvenciát kódolja:

Asp-Ala-His-Phe-Leu-Ser-Gln-Thr-Lys-Gln-Ser-Gly-Glu-Asn-Leu-Pro-Tyr-Leu-Val-Ala-Tyr-Gln-Ala-Thr-Val-Cys-Ala-Arg-Ala-Gln-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Trp-Asp-Gln-Met-Trp-Lys-Cys-Leu-Ile-Arg-Leu-Lys-Pro-Thr-Leu-His-Gly-Pro-Thr-Pro-Leu-Leu-Tyr-Arg-Leu-Gly-Ala-Val-Gln-Asn-Glu-Ile-Thr-Leu-Thr-His-Pro-Val-Thr-Lys-Tyr-Ile-Met-Thr-Cys-Met-Ser-Ala-Asp-Leu-Glu-Ile-Thr-Leu-Thr-His-Pro-Val-Thr-Lys-Tyr-Ile-Met-Thr-Cys-Met-Ser-Ala-Asp-Leu-Glu-Val-Val-Thr-Ser-Thr-Trp-Val-Leu-Val-Gly-Gly-Val-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Tyr-Cys-Leu-Ser-Thr-Gly-Cys-Val-Val-Ile-Val-Gly-Arg-Val-Val-Leu-Ser-Gly-Lys-Pro-Ala-Ile-Ile-Pro-Asp-Arg-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Glu-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ser-Gln-His-Leu-Pro-Tyr-Ile-Glu-Gln-Gly-Met-Met-Leu-Ala-Glu-Gln-Phe-Lys-Gln-Lys-Ala-Leu-Gly-Leu-Leu-Gln-Thr-Ala-Ser-Arg-Gln-Ala-Glu-Val-Ile-Ala-Pro-Ala-Val-Gln-Thr-Asn-Trp-Gln-Lys-Leu-Glu-Thr-Phe-Trp-Ala-Lys-His-Met-Trp-Asn-Phe-Ile-Ser-Gly-Ile-Gln-Tyr-Leu-Ala-Gly-Leu-Ser-Thr-Leu-Pro-Gly-Asn-Pro-Ala-Ile-Ala-Ser-Leu-Met-Ala-Phe-Thr-Ala-Ala-Val-Thr-Ser-Pro-Leu-Thr-Thr-Ser-Gln-Thr-Leu-Leu-Phe-Asn-Ile-Leu-Gly-Gly-Trp-Val-Ala-Ala-Gln-Leu-Ala-Ala-Pro-Gly-Ala-Ala-Thr-Ala-Phe-Val-Gly-Ala-Gly-Leu-Ala-Gly-Ala-Ala-Ile-Gly-Ser-Val-Gly-Leu-Gly-Lys-Val-Leu-Ile-Asp-Ile-Leu-Ala-Gly-Tyr-Gly-Ala-Gly-Val-Ala-Gly-Ala-Leu-Val-Ala-Phe-Lys-Ile-Met-Ser-Gly-Glu-Val-Pro-Ser-Thr-Glu-Asp-Leu-Val-Asn-Leu-Leu-Pro-Ala-Ile-Leu-Ser-Pro-Gly-Ala-Leu-Val-Val-Gly-Val-Val-Cys-Ala-Ala-Ile-Leu-Arg-Arg-His-Val-Gly-Pro-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Gln-Trp-Met-Asn-Arg-Leu-Ile-Ala-Phe-Ala-Ser-Arg-Glu-Asn-His-Val-Ser-Pro-Val-His-His-Lys-Arg.

(Elsőbbsége: 1988. 05. 06.)

35. Immunesszé HCV-1 elleni antitestek (anti-HCV-antitestek) kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy

(a) veszünk egy polipeptidet, amely az anti-HCV-1 antitest által megköthető antigéndeterminánst tartalmaz, ahol az antigéndetermináns egy, legalább 8 aminosavból álló egybefüggő aminosavszekvenciát tartalmaz, amelyet a HCV-1 kódol, és a polipeptid egy, a 21. igénypont szerint előállított polipeptiddel azonos;

(b) egy biológiai mintát in vitro inkubálunk a polipeptiddel, olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik egy antitest-antigén komplex kialakulását; és

(c) meghatározzuk, hogy kialakult-e a polipeptidet tartalmazó antitest-antigén komplex.

(Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

36. A 35. igénypont szerinti immunesszé, *azzal jellemezve*, hogy az antigén determináns az ATCC

40 394 számon letétbe helyezett lambda-gt11 könyvtárban kódolódik.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

37. A 35. igénypont szerinti immunesszé, *azzal jellemezve*, hogy az antigéndetermináns a 47. ábra szerinti szekvenciában kódolódik.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

38. A 35–37. igénypontok bármelyike szerinti immunesszé, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptidet kémiai szintézissel állítjuk elő.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

39. A 35–37. igénypontok bármelyike szerinti immunesszé, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptidet rekombináns polinukleotidexpresszióval állítjuk elő.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

40. A 35–39. igénypontok bármelyike szerinti immunesszé, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptidet egy szilárd hordozóhoz rögzítjük.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

41. A 35–40. igénypontok bármelyike szerinti immunesszé, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptid tartalmaz még egy nem HCV-aminosavszekvenciát is, egy, a HCV-1 által kódolt, legalább 8 aminosav hosszúságú, egybefüggő aminosavszekvenciával fuzionáltatva.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

42. A 35–41. igénypontok bármelyike szerinti immunesszé, *azzal jellemezve*, hogy az antigéndetermináns a C100 klónban kódolt.

(Elsőbbsége: 1988. 05. 06.)

43. Eljárás HCV-1 elleni vakcina előállítására, amely egy, a 21–23. igénypontok bármelyike szerint előállított immunogén polipeptidet tartalmaz, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 21–23. igénypontok bármelyike szerint előállított immunogén polipeptidet egy gyógyászatiilag elfogadható segédanyaggal keverünk össze.

(Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

44. Eljárás HCV-1 polinukleotidok egy mintában való jelenlétének vagy hiányának kimutatására in vitro polinukleotidhibridizációs módszerrel, *azzal jellemezve*, hogy

(a) a polinukleotidokat tartalmazó mintát egy próbapolinukleotiddal hozzuk érintkezésbe, amely olyan egybefüggő nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely képes egy HCV-polinukleotidhoz vagy annak komplementeréhez szelektíven hibridizálódni, amely próbapolinukleotidot az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti eljárással állítottuk elő; és

(b) meghatározzuk, hogy létrejöttek-e a próbapolinukleotidot tartalmazó polinukleotidduplexek.

(Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

45. A 44. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia az ATCC 40 394 szám alatt letétbe helyezett HCV cDNS egyik szálában található.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

46. A 44. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia a 47. ábra szerinti szekvenciában van kódolva.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

47. A 44–46. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy még amplifikációt is végzünk, polimeráz láncreakciós eljárás (PCR) segítségével. (Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

48. Eljárás HCV–1 polinukleotidok PCR-rel való amplifikálására, *azzal jellemezve*, hogy egy, HCV-polinukleotidokat tartalmazó mintát egy, az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított polinukleotidprimerrel hozunk érintkezésbe nukleinsav polimeráz enzim és nukleotidmonomerek jelenlétében a polinukleotidprimer kiterjesztését elősegítő körülmények között.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

49. Eljárás HCV–1 polinukleotidok PCR-rel való amplifikálására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidprimert alkalmazunk, amely egy HCV-polinukleotidhoz vagy komplementeréhez szelektíven hibridizálódó egybefüggő nukleotidszekvenciát tartalmaz, és az eljárást nukleinsav polimeráz enzim és nukleotidmonomerek jelenlétében végezzük a polinukleotidprimer kiterjesztését elősegítő körülmények között.

(Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

50. A 49. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia az ATCC 40394 szám alatt letétbe helyezett HCV cDNS valamelyik szálában található.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

51. A 49. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia a 47. ábra szerinti szekvenciában kódolt.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

52. A 49–51. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia legalább 10 nukleotidból áll.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

53. A 49–51. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egybefüggő nukleotidszekvencia legalább 15 nukleotidból áll.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

54. Eljárás anti-HCV–1 antitestek előállítására, amelynek során egy nem humán egyed egy olyan készítménnyel immunizálunk, amely egy HCV–1 antigént tartalmaz egy gyógyászatilag elfogadható segédanyaggal összekeverve, *azzal jellemezve*, hogy az immunizálást egy, a 21. igénypont szerinti eljárással előállított polipeptiddel végezzük.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

55. Az 54. igénypont szerinti eljárás anti-HCV-antitestek előállítására, amelynek során egy nem humán egyed egy olyan készítménnyel immunizálunk, amely egy HCV–1 antigént tartalmaz egy gyógyászatilag elfogadható segédanyaggal összekeverve, *azzal jellemezve*,

hogy az immunizálást egy, a 22–31. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított polipeptiddel végezzük.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

56. Eljárás HCV–1 antigének jelenlétének vagy hiányának egy mintában immunesszé-módszerrel való kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy

(a) a mintát egy, az 54. igénypont szerinti eljárással előállított anti-HCV–1 antitesttel inkubáljuk olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik egy antitest-antigén komplex kialakulását; és

(b) meghatározzuk, hogy az anti-HCV–1 antitestet tartalmazó antitest-antigén komplex kialakult-e.

(Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

57. Eljárás HCV–1 antigén jelenlétének vagy hiányának egy mintában immunesszé-módszerrel való kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy

(a) a mintát egy, az 55. igénypont szerinti eljárással előállított anti-HCV–1 antitesttel inkubáljuk, olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik egy antitest-antigén komplex kialakulását; és

(b) meghatározzuk, hogy az anti-HCV–1 antitestet tartalmazó antitest-antigén komplex kialakult-e.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

58. Eljárás immunesszé kit előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 54. igénypont szerinti eljárással előállított anti-HCV–1 antitesteket megfelelő tartályba csomagoljuk.

(Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

59. Eljárás immunesszé kit előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 55. igénypont szerinti eljárással előállított anti-HCV–1 antitesteket megfelelő tartályba csomagoljuk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

60. Eljárás egy HCV–1 polipeptidet tartalmazó rekombináns polipeptid szintetizálására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidot tartalmazó terméket használunk.

(Elsőbbsége: 1987. 11. 18.)

61. Az 59. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 14. igénypont szerinti eljárással előállított polinukleotidot használunk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

62. Eljárás HCV–1 tenyésztésére, *azzal jellemezve*, hogy HCV–1-gyel fertőzött hepatocitákat veszünk, majd a hepatocitákat in vitro szaporítjuk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

63. A 62. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hepatocitaként primer sejteket alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

64. A 62. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hepatocitaként sejtvonalat alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 12. 30.)

1. ÁBRA Az 5-1-1. DNS transzlációja

AlaSerCysLeuAsnCysSerAlaSerIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGlu  
1 GCCTCCTGCTTGAAGTCTCGGCGAGCATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGA  
CCGGAGGACGAACCTTGACGAGCCGCTCGTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCT

PheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeu  
61 GTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCT  
CAAGCTACTCTACCTTCTCAGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCTACTACGA

AlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeu  
121 CGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCC  
CGGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGG

3. ÁBRA Az 5-1-1., 81., 91. és 1-2. DNS transzlációja

GlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAsp  
1 CTGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTG  
GACCGACGCACCAGTATCACCCGTCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGAC

T  
ArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyr  
61 ACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGT  
TGTCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCAGAGAGTCGTGAATGGCA

A  
IleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGln  
121 ACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGC  
TGTAGCTCGTTCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACG

ThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeu  
181 AGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAC  
TCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTG

GluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGly  
241 TCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGATAACAATACTTGGCGG  
AGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTACCCTATGTTATGAACCGCC

LeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaVal  
301 GCTTGTAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTG  
CGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACACCGAAAATGTCGACGAC

ThrSerProLeuThrThrSerGln  
361 TCACCAGCCCACTAACCCTAGCCAAA  
AGTGGTCCGGTGATTGGTGATCGGTTT

5-1-1 1 [ggcctcctgcttgaactgetcggcgagc] ATCATACCTGACAGGGAAG  
81 1 GTCCGGGAAGCCGGCAATCATACTGACAGGGAAG  
91 1 ctggctgcgtGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCGGGAAGCCGGCAATCATACTGACAGGGAAG  
1-2 1 GGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCGGGAAGCCGGCAATCATACTGACAGGGAAG

5-1-1 48 TCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGC  
81 36 TCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGC  
91 70 TCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGC  
1-2 60 TCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGC

5-1-1 120 TCGCCGAGCAGTTC AAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCC  
81 108 TCGCCGAGCAGTTC AAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGCGTCCCCTCAGGCAGAGGTTATCGCCC  
91 142 TCGCCGAGCAGTTC AAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGCGTCCCCTCAGGCAGAGGTTATCGCCC  
1-2 132 TCGCCGAGCAGTTC AAGCAGAAGGCCCTCGGC

81 180 CTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGA  
91 214 CTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGA  
81 252 TACAATACTTGGCGGGCTTGTC AACGCTGCCTGGTaaaccccgccattgcttcattgatggcttttacagctg  
91 286 TACAATACTTGGCGGGCTTGTC AACGCTGCCTGG

2. ÁBRA

81 324 ctgtcaccagcccactaaccactagccaaa

4. ÁBRA A 81. DNS transzlációja

1 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet  
GTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTTCGATGAGAT  
CAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTA

61 GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe  
GGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTT  
CCTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCTACTACGAGCGGCTCGTCAA

121 LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro  
CAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCC  
GTTCTGCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGG

181 AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhe  
TGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACCTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCT  
ACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTGAGCTCTGGAAGACCCGTTCTGTATACACCTGAA

241 IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAla  
CATCAGTGGGATAACAATACTTGGCGGGCTTGTCACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGC  
GTAGTCACCCTATGTTATGAACCGCCCAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACG

301 SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln  
TTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCACTAACCCTAGCCAAA  
AAGTAACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCCGGTGATTGGTGATCGGTTT

5. ÁBRA A 36. DNS transzlációja

1 AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAla  
GATGCCCACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTTCCTTACCTGGTAGCG  
CTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGC

61 TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrp  
TACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGG  
ATGGTTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGTAGCACCTGGTCTACACC

121 LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu  
AAGTGTTTGATTGCGCTCAAGCCACCCTCCATGGGCCAACCCCTGCTATACAGACTG  
TTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGACGATATGTCTGAC

181 GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys  
GGCGCTGTTTCAAGATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGC  
CCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACG

241 MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla  
ATGTCGGCCGACCTGGAGTCTGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCTGGCT  
TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTCTGCTGGACCCACGAGCAACCGCCGACGACCGA

301 AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeu  
GCTTTGGCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGCTTG  
CGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGTCCAGCAGAAC

----- átfedés a 81.-gyel-----

361 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArg  
TCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAG  
AGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTC

6. ÁBRA A 36. és 81. DNS-ek kombinált ORF-je

1 AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAla  
GATGCCCACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCG  
CTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTGGAAGGAATGGACCATCGC

61 TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrp  
TACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGG  
ATGTTTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGTAGCACCTGGTCTACACC

121 LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu  
AAGTGTTCGATTCGCCTCAAGCCCACCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTG  
TTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGAC

181 GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys  
GGCGCTGTTGAGAATGAAATCACCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGC  
CCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACC

241 MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla  
ATGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCCTGGCT  
TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGAGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGA

301 AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeu  
GCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTG  
CGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGTCCCAGCAGAAC

361 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet  
TCCGGGAAGCCGGCAATCATACTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATG  
AGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTAC

421 GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe  
GAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTC  
CTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAG

481 LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro  
AAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCTGCAGACCGCTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCT  
TTCGTCTTCGGGAGCCGGAGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGA

541 AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhe  
GCTGTCCAGACCAACTGGCAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTC  
CGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAG

601 IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAla  
ATCAGTGGGATAACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCGCCATTGCT  
TAGTCACCCTATGTTATGAACCGCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGA

661 SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln  
TCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTACCAGCCCCTAACCCTAGCCAAA  
AGTAACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTT

7. ÁBRA A 32. DNS transzlációja

----- átfedés a 81.-gyel-----  
PheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeu  
1 CTTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCCACTAACCCTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATAT  
GAAAATGTCGACGACAGTGGTTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATA  
  
GlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAla  
61 TGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCG  
ACCCCCCACCACCCGACGGTTCGAGCGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCCG  
  
GlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeu  
121 CTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCTCATAGACATCC  
GACCGAATCGACCCGCGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCAGGAGTATCTGTAGG  
  
AlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGlu  
181 TTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTG  
AACGTCCCATAACCGCGCCCGCACCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCAC  
  
ValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeu  
241 AGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCC  
TCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGG  
  
ValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAla  
301 TCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGG  
AGCATCAGCCGCACCAGACACGTCGTTATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCCGCTCCCC  
  
ValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer  
361 CAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCC  
GTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGG

8. ÁBRA A 35. DNS transzlációja

1 SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg  
TCCATTGAGACAATCACGCTCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGG  
AGGTAACCTCTGTTAGTGCAGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCC

61 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly  
ACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGAGCGCCCCCTCCGGC  
TGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCG

121 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu  
ATGTTGACTCGTCCGTCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTC  
TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAG

181 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal  
ACGCCCCGCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTG  
TGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCAC

-----

241 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla  
TGCCAGGACCATCTTGAATTTGGGAGGGCGTCTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCC  
ACGGTCTGGTAGAACTTAAACCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG

-----

301 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln  
CACTTTCTATCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAA  
GTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGCATGGTT

-----

361 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys  
GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGT  
CGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTCACA

-----

421 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla  
TTGATTGCGCTCAAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCT  
AACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCCGGA

9-1. ÁBRA A 35., 36., 81. és 32. DNS-ek kombinált ORF-je

1 SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg  
TCCATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCCGGGGCAGG  
AGGTAACCTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCC

61 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly  
ACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGAGCGCCCCCTCCGGC  
TGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCG

121 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu  
ATGTTGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTC  
TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAG

181 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal  
ACGCCCCCGGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTG  
TGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCAC

241 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla  
TGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCC  
ACGGTCTGGTAGAACTTAAACCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG

301 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln  
CACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAA  
GTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGGGAAGGAATGACCATCGCATGTTT

361 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys  
GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGT  
CGGTGGCACACCGGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTCACA

421 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla  
TTGATTGCGCTCAAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCT  
AACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGA

481 ValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSer  
GTTGAGAAATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCG  
CAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGC

541 AlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeu  
GCCGACCTGGAGTTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGGCGTCCCTGGCTGCTTTG  
CGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGACGAAAC

601 AlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGly  
GCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGCTTGTCCGGG  
CGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGTCCAGCAGAACAGGGCCC

661 LysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGlu  
AAGCCGGCAATCATACTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAG  
TTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTC

721 CysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGln  
TGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAGCAG  
ACGAGAGTTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTC

781 LysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaVal  
AAGGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCCTGCTGTC  
TTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAG

841 GlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSer  
CAGACCAACTGGCAAAAACCTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGT  
GTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTGAAGTAGTCA

901 GlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeu  
GGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTG  
CCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAAC

961 MetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsn  
ATGGCTTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCCACTAACCCTAGCCAAACCCCTCCTCTTCAAC  
TACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGACAAGTTG

1021 IleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheVal  
ATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTG  
TATAACCCCCCACCACCGACGGGTGAGCGGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACAC

1081 GlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAsp  
GGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCTCATAGAC  
CCGCGACCGAATCGACCGCGGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTG

1141 IleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSer  
ATCCTTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGC  
TAGGAACGTCCCATAACCGCGCCCGCACCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCG

1201 GlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGly  
GGTGAGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGA  
CCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCT

1261 AlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlu  
GCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAG  
CGGGAGCATCAGCCGCACCAGACACGTGCTTATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTC

1321 GlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer  
GGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCC  
CCCCGTCACGTACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGG

9-2. ÁBRA

10. ÁBRA A 37b. DNS translációja

1 LeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAsp  
CTCGCCGCAAAGCTGGTTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGTCTTGAC  
GAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACC GGATGATGGCGCCAGA ACTG

61 ValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThr  
GTGTCCGTCATCCCCGACCAGCGGCGATGTTGTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACC  
CACAGGCAGTAGGGCTGGTTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGG

121 GlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrVal  
GGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTGTCACCCAGACAGTC  
CCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGATGTTATGCACACAGTGGGTCTGTCAG

----- átfedés a  
181 AspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaVal  
GATTTTCAGCCTTGACCCTACCTTACCATTGAGACAATCAGCTCCCCAGGATGCTGTC  
CTAAAGTCGGA ACTGGGATGGAAGTGGTAACTCTGTTAGTGCAGAGGGGGTCTACGACAG

clone 35 klónnal-----  
241 SerArgThrGlnArgArgGlyArgThr  
TCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTG  
AGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGAC

11. ÁBRA A 33b. DNS translációja

----- átfedés a 32.-vel -----  
1 MetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrVal  
GATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCCACGCACTACGT  
CTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCGTGATGCA

61 ProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGln  
GCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCA  
CGGCCTCTCGCTACGTCGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGGGT

121 LeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySer  
GCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTC  
CGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACTATTCGAGCCTCATGTTGAGGTACGAGGCCAAG

181 TrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeu  
CTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCT  
GACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACA ACTCGCTGAAATCTGGACCGA

241 LysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyr  
AAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGGGGTA  
TTTTCGATTGAGTACGGTGTGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTTCGCGCCCAT

301 LysGlyValTrpArgVal  
TAAGGGGGTCTGGCGAGTG  
ATTCCCCCAGACCGCTCAC

12. ÁBRA A 40b. DNS translációja

AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle  
1 GGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAT  
CCGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTTA

ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys  
61 TACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTG  
ATGGTGACCGTCCGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCAC

SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer  
121 CTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATC  
GAGCCCCCGCGAATACTGTATTATTAAACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAG

IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal  
181 CATCTTGGGCATCGGCACTGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGT  
GTAGAACCCTAGCCGTGACAGGAAGTGGTTCGTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAACA

LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal  
241 GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCCTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGT  
CGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCA

AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle  
301 TGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAAT  
ACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTA

-----  
LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla  
361 CAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGGACGAACTCGCCGC  
GTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGCG

----- átfedés a 37b.-vel -----  
LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal  
421 AAAGCTGGTGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGT  
TTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCA

-----  
IleProThr  
481 CATCCCGACCAG  
GTAGGGCTGGTC

13. ÁBRA A 25c. DNS transzlációja

-----  
CysSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCys  
1 ACTGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGT  
TGACGTCCGAGTGACATTGGGTTCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTCGAGCCTCA  
-----  
ThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeu  
61 GTACCACTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGT  
CATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACA  
----- átfedés a 33b.-vel -----  
SerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPhe  
121 TGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCT  
ACTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTTCGATTTCGAGTACGGTGTTCGACGGACCCTAGGGGA  
-----  
ValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgGlyAspGlyIleMetHisThrArg  
181 TTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGTCTGGCGAGGGGACGGCATCATGCACACTC  
AACACAGGACGGTCGCGCCCATATTCCCCAGACCGCTCCCCTGCCGTAGTACGTGTGAG  
-----  
CysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGly  
241 GCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTTCG  
CGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGGCCCTGTACTCCTAGCAGC  
-----  
ProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGly  
301 GTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCATTAAATGCCTACACCACGG  
CAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTACCCTGGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGCC  
-----  
ProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGlu  
361 GCCCCTGTACCCCTTCCTGCGCCGAACACTACACGTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAG  
CGGGGACATGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGGATACTCCCACAGACGTC  
-----  
GluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAsp  
421 AGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTG  
TCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATACTGATGAC  
-----  
AsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGlu  
481 ACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCGAATTTTTTCACAGAAT  
TGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTA

14-1. ÁBRA

a 40b., 37b., 35., 36., 81., 32., 33b. és 25c. DNS-ek kombinált ORF-je

AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle  
1 TGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAAT  
ACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTTA

ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys  
61 TACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTG  
ATGGTGACCGTCCGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCAC

SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer  
121 CTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATC  
GAGCCCCCGCAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCTACGGTGTAG

IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal  
181 CATCTTGGGCATCGGCCTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGT  
GTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAAGTGGTTCGTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAACA

LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal  
241 GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGT  
CGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCA

AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle  
301 TGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAAT  
ACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTA

LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla  
361 CAAGGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGGCAGCAACTCGCCGC  
GTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTCACGCTGCTTGAGCGGGC

LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal  
421 AAAGCTGGTTCGATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGT  
TTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCA

IleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThr  
481 CATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGTGCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATAC  
GTAGGGCTGGTCCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATG

GlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSer  
541 CGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTGTACCCAGACAGTCCGATTCAG  
GCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGATGTTATGCACACAGTGGGTCTGTCAGCTAAAGTC

LeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThr  
601 CCTTGACCCTACCTTCACCATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCAC  
GGAAGTGGGATGGAAGTGGTAACTCTGTTAGTGGCAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTG

GlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGly  
661 TCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCAGGG  
AGTTGCAGCCCCGTCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCC

GluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCys  
721 GGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTG  
CCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGAC

AlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThr  
781 TGCTTGGTATGAGCTCACGCCCCCGGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACAC  
ACGAACCATACTCGAGTGGGGGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGACTTGTG

ProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeu  
841 CCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCT  
GGGCCCCAAGGGCACACGGTCTCTGGTAGAACTTAAAACCTCCCGCAGAAATGTCGGGA

ThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyr  
901 CACTCATATAGATGCCCACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTA  
GTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAAT

961 LeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAsp  
CCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGGA  
GGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACCGGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCT

1021 GlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeu  
CCAGATGTGGAAGTGTGTTGATTGCGCTCAAGCCCACCCTCCATGGGCCAACCCCCCTGCT  
GGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGA

1081 TyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIle  
ATACAGACTGGGCGCTGTTTCCAGAATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACAT  
TATGCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTATTATGTA

1141 MetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGly  
CATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTGCTCAGCAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGG  
GTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTTGGACCCACGAGCAACCGCC

1201 ValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArg  
CGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCGAG  
GCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGTC

1261 ValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPhe  
GGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTT  
CCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAA

1321 AspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAla  
CGATGAGATGGAAGAGTGTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGC  
GCTACTCTACCTTCTCAGAGAGTGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCG

1381 GluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluVal  
CGAGCAGTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGT  
GCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCA

1441 IleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMet  
TATCGCCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACCTCGAGACCTTCTGGGCCAAGCATAT  
ATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATA

1501 TrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnPro  
GTGGAACCTTCATCAGTGGGATAACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCC  
CACCTTGAAGTAGTCACCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGG

1561 AlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln  
CGCCATGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACAGCCCACTAACCCTAGCCA  
GCGGTAACGAAGTAACACCGAAAATGTGCGACGACAGTGGTTCGGGTGATTGGTGATCGGT

1621 ThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAla  
AACCCTCCTTCAACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCGGTGC  
TTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACCACCGACGGGTGAGCGGGGGGGGCCAGG

1681 AlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGly  
CGTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGG  
GCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAATCGACCGGGCGGTAGCCGTCAACCTGACCC

1741 LysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAla  
GAAGGTCCCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGC  
CTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCG

1801 PheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAla  
ATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGC  
TAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCG

1861 IleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHis  
CATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCGAGCAATACTTCGCGGGCA  
GTAGGAGAGCGGGCTCGGGAGCATCAGCCGACCCAGACACGTGCTTATGACGCGGCCGT

14-2. ÁBRA ValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArg

1921 CGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCG  
GCAACCGGGCCCCGCTCCCCCGTCACGTACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGC

GlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThr  
1981 GGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCAC  
CCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCCTGATGCACGGCCTCTCGCTACGTGACGGGCGCAGTG

AlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSer  
2041 TGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAG  
ACGGTATGAGTCGTCCGAGTGACATTGGGTGCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTC

SerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCys  
2101 CTCGGAGTGTACCCTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATG  
GAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCTGACCTATAC

GluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGly  
2161 CGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGG  
GCTCCACAACCTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTTCGATTTCGAGTACGGTGTGACGGACC

IleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMet  
2221 GATCCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCAT  
CTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCGCCATATTCCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTA

HisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArg  
2281 GCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAG  
CGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCTGCTACTC

IleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyr  
2341 GATCGTCCGGTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTA  
CTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCTTGTACACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGAT

ThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgVal  
2401 CACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCTGCGCCGAACACTACAGTTTCGCGCTATGGAGGGT  
GTGGTGCCCGGGGACATGGGGGAAGGACCGGGCTTGATGTGCAAGCGGATACCTCCCA

SerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMet  
2461 GTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTAT  
CAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATA

ThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGlu  
2521 GACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAAT  
CTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTA

14-3. ÁBRA

15. ÁBRA A 33c. translációja

1 AlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThr  
GGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCAC  
CCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTG

61 AspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaPro  
GGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCC  
CCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCAGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGG

121 ThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysVal  
CACAGGCAGCGGCAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGT  
GTGTCCGTCGCCGTTTTCGTGGTTCAGGGCCGACGTATACGTCGAGTCCCAGATATTCCA

181 LeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAla  
GCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGC  
CGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCCG

----- átfedés a 40b.-vel -----

241 HisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIle  
TCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAAACAATTACCCTGGCAGCCCCAT  
AGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCCGGGGTA

301 ThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAsp  
CACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTGTCTCGGGGGGCGCTTATGA  
GTGCATGAGGTGGATGCEGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGGAATACT

361 IleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThr  
CATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATTGGCAC  
GTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAACCGTG

421 ValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrPro  
TGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCC  
ACAGGAACTGGTTCGTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGG

481 ProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGly  
TCCGGGCTCCGTCCTGTCCTCCCAACATCGAGGAGGTGCTCTGTCCACCACCGG  
AGGCCCGAGGCAGTGACACGGGTAGGGTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGCC

541 GluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeu  
AGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGACATCT  
TCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCTCCCTCTGTAGA

601 IlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGly  
CATCTTCTGTCAATCAAGAAGAAGTGGCAGCAACTCGCCGCAAGCTGGTCGCATTGGG  
GTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTCAGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCC

661 IleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAsp  
CATCAATGCCGTGGCCTACTACCGGGTCTTGACGTGTCGGTCATCCCGACCAGCGGGCA  
GTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAAGTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCCGT

721 ValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerVal  
TGTTGTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGT  
ACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCA

781 IleAspCysAsnThrCys  
GATAGACTGCAATACGTGTG  
CTATCTGACGTTATGCACAC

16. ÁBRA A 8h. DNS transzlációja

ProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIlePro  
1 CTCCTGCACTTGC GGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCATT  
GAGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAAG

ValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeu  
61 CCGTGC CGCCGGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTGCGCCCCGGCCATTTCTACT  
GGCACGCGGCCGCCACTATCGTCCCCGTGCGACGACAGCGGGGCCGGTAAAGGATGA

LysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArg  
121 TGAAAGGCTCCTCGGGGGTCCGCTGTGTGCCCCGCGGGGCACGCCGTGGGCATATTTA  
ACTTCCGAGGAGCCCCCAGGCGACAACCGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAAT

átfedés a  
AlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeu  
181 GGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACC  
CCCCGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGG

33c.-vel  
GluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSer  
241 TAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTC  
ATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAG

17. ÁBRA A 7e. DNS transzlációja

GlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGly  
1 GGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCAGCAGACAAGGGCCTCCTAGG  
CCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCTGTCTGTCCCCGGAGGATCC

CysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIle  
61 GTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGAT  
CACGTATTAGTGGTCCGATTGACCGGCCCTGTTTTGGTTCACCTCCACTCCAGGTCTA

ValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrVal  
121 TGTGTCAACTGCTGCCAAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGT  
ACACAGTTGACGACGGGTTTGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACCTGACA

TyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyr  
181 CTACCAGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTCTGTTCATCCAGATGTA  
GATGGTGC CCGGCCCTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTCCAGGACAGTAGGTCTACAT

ThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThr  
241 TACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTGAC  
ATGGTTACATCTGGTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAACTG

átfedés a 8h.-val  
ProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHis  
301 ACCCTGCACTTGC GGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACG  
TGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGC

18. ÁBRA

A 14c. DNS translációja

AsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeu  
1 GPACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCTGTACCCCCCT  
CTGTACACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGACATGGGGGA

----- átfedés a 25c.-vel -----  
ProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIle  
61 TCCTGCGCCGAACCTACACGTTGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATACGTGGAGAT  
AGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGGATACTCCACAGACGTCTCCTTATGCACCTCTA

ArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysPro  
121 AAGGCAGGTGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTTAAATGCC  
TTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATACTGATGACTGTAGAAATTTACGG

CysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPhe  
181 GTGCCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTACAGAATTGGACGGGGTGCCTACATAGGTT  
CACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGGATGTATCAA

AlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGlu  
241 TGCGCCCCCTGCAAGCCCTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTAGAGTAGGACTCCACGA  
ACGCGGGGGGACGTTGCGGAACGACGCCCTCTCCATAGTAAGTCTCATCTGAGGTGCT

TyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSer  
301 ATACCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTC  
TATGGGCCATCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACCTGCAG

MetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGly  
361 CATGCTCACTGATCCCTCCATATAACAGCAGAGGGCGGCCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGG  
GTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCTCTCCCGCGGCCGCTTCCAACCGCTCCCC

SerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAla  
421 ATCACCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGC  
TAGTGGGGGGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCG

ThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAsp  
481 AACTTGCACCGCTAACCATGACTCCCCTGAT  
TTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTA

19. ábra A 8f. DNS transzlációja

----- átfedés a 14c.-vel -----  
1 SerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHis  
AGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCAT  
TCGAGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTA  
-----  
61 AspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGly  
GACTCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGC  
CTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCTCTACCCGCGC  
-----  
121 AsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeu  
AACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTT  
TTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAA  
-----  
181 ValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArg  
GTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGG  
CACCGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCC  
-----  
241 ArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGlu  
AGATTGCGCCAGGCCCTGCCCCTTTGGGCGCGGCCGACTATAACCCCGCTAGTGGAG  
TCTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCGCCGCCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTC  
-----  
301 ThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProPro  
ACGTGGAAAAAGCCCCGACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCA  
TGCACCTTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGT  
-----  
361 LysSerProProValPro  
AAGTCCCCTCCTGTGCCG  
TTCAGGGGAGGACACGGC

20. ÁBRA A 33f. DNS transzlációja

-----  
1 ValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAspTyr  
CGTTTGGGCGCGGCCGACTATAACCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAACCCGACTA  
GCAAACCCGCGCCGCCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTTGGGCTGAT  
----- átfedés a 8f.-nél -----  
61 GluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValProPro  
CGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGCCCCGCTTCCACCTCAAAGTCCCCTCCTGTGCCTCC  
GCTTGGTGGACACCAGGTACCGACGGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGG  
-----  
121 ProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGlu  
GCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCCCTCACTGAATCAACCTATCTACTGCCTTGGCCGA  
CGGAGCCTTCTTCGCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACCGGCT  
-----  
181 LeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThr  
GCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTCCGGCATTACGGGCGACAATACGAC  
CGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTG  
-----  
241 ThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerPhe  
AACATCCTCTGAGCCCCCCCCTTCTGGCTGCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCTTTGC  
TTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAC GAAACG

21. ÁBRA A 33. g. DNS translációja

AlaSerArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThr  
1 GCCTCCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACA  
CGGAGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTGTTGT

----- átfedés a 33f.-fel -----

SerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSer  
61 TCCTCTGAGCCCGCCCTTCTGGCTGCCCGCCGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCTCC  
AGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCAGCGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGG

MetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThr  
121 ATGCCCCCCTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTATGGTCAACG  
TACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGATCGCTGCCAGTACCAGTTGC

ValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThr  
181 GTCAGTAGTGAGGCCA<sup>2</sup>CGCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGACA  
CAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCTGT

GlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSer  
241 GGCGCACTCGTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATGCACTAAGC  
CCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGGCGCCTTCTTGCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTCC

AsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSer  
301 AACTCGTTGCTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTG  
TTGAGCAACGATGCAGTGGTGTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCCTCAC

22. ÁBRA A 7f. DNS translációja

GlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArg  
1 GGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAAACGGCTTGCGA  
CCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTTCGCGAACGCT

AspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThr  
61 GATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCAGG  
CTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGC

TrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArg  
121 TGGGGGGCAGATACCGCCGCTGCGGTGACATCATCAACGGCTTGCCCTGTTCCGCCCGC  
ACCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGCGGGCGC

ArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeu  
181 AGGGGCCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGTTGGAGGTTG  
TCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGTTCGGCTACCTTACCAGAGGTTCACCACTCCAAC

LeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThr  
241 CTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCATAATCACC  
GACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCTGTTCCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGG

----- átfedés 7e.-vel -----

SerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAla  
301 AGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCT  
TCGGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTTACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGA

AlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrp  
361 GCCCAAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGG  
CGGTTTTGGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACC

23. ÁBRA A 11b. DNS transzlációja

1 GlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyr  
GGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATATTACAAGCGCTAT  
CCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTTCGCGATA

61 IleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHis  
ATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTCTGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCAC  
TAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTG

121 ValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCys  
GTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGCGACGCCGTCATCTTACTCATGTGT  
CACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACA

181 AlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyPro  
GCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCC  
CGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGG

241 LeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeu  
CTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCCTT  
GAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAA

301 LeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIle  
CTCCGGTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATC  
GAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAG

-----  
361 IleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAsp  
ATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTTTCGGGAC  
TAATTCATCCCCGCGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTG

-----  
421 TrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGln  
TGGGCGCACAACGGCTTGGGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAA  
ACCCGCGTGTGCGGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTT

-----  
481 MetGluThrLysLeuIleThrTrpGly  
ATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGC  
TACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCC

24. ÁBRA A 14i. DNS transzlációja

GluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrp  
1 GGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCTTCTGCTTGCGAGACGCGCGCTGCTCCTGCTTGT  
CCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACA

MetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAla  
61 GGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATG  
CCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTCCGCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTAC

AlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrp  
121 CAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTCTTCTGCTTTGCAT  
GTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTA

TyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeu  
181 GGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTC  
CCATAAACTTCCATTACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAG

LeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAla  
241 TCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCGAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCG  
AGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCCGCGCATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGC

----- átfedés a 11b.-vel-----

SerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLys  
301 CGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTGATGGCGCTGACTCTGTCCACATATTACA  
GCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGGACTGAGACAGTGGTATAATGT

-----

ArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGln  
361 AGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGAA  
TCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCTT

25. ÁBRA A 39c. DNS transzlációja

ProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProPro  
1 CCAGCCCCTTCTGGCTGCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCTATTCTCCATGCCCCC  
GGTCGGGGGAAGACCGACGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGG

LeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSer  
61 CTGGAGGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTTCATGGTCAACAGTCAGTAGT  
GACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTACCAGTTGTCAGTCATCA

----- átfedés a 33g.-vel-----

GluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeu  
121 GAGGCCAACCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCCTACTCTTGGACAGGCGCACTC  
CTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGGATGAGAACCCTGTCCGCGTGAG

ValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeu  
181 GTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAAGAACTGCCCATCAATGCAC TGAGCAACTCGTTG  
CAGTGGGGCACGCGGCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGACTCGTTGAGCAAC

LeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLys  
241 CTACGTACCACAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAG  
GATGCAGTGGTGTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCCTCACGAACGGTTTCCGTCTTC

LysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGlu  
301 AAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAG  
TTTCAGTGTAACCTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCGGTAATGGTCTGCATGAGTTCTCT

ValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnPhe  
361 GTTAAAGCAGCGCGCTCAAAGTGAAGGCTAACTTC  
CAATTTGTCGCGCGAGTTTTCACTTCCGATTGAAG

26-1. ÁBRA

A 14i., 11b., 7f., 7e., 8h., 33c., 40b., 37b., 35., 36.,  
81., 32., 33b., 25c., 14c., 8f., 33f., 33g. és 39c. DNS-ek  
kombinált ORF-je

GluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrp  
1 GGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCTCTGCTTGCAGACGCGCGGTCTGCTCCTGCTGTG  
CCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACA

MetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAla  
61 GGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCCTCGTAATACTTAATG  
CCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTAC

AlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrp  
121 CAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCTCGTGTCTTCTGCTTTCAT  
GTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTA

TyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeu  
181 GGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTC  
CCATAAATTCCATTACCCACGGGCCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAG

LeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAla  
241 TCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCGGAGCGGTACGCGCTGGACACGGAGTGGCCG  
AGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCCGCCGATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGC

SerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLys  
301 CGTCGTGTGGCGGTGTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATATTACA  
GCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGT

ArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGln  
361 AGCGTATATCAGCTGGTGTGTTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGAAGCGC  
TCGCGATATAGTCGACCAGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCG

LeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeu  
421 AACTGCACGTGTGGATTCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGCGCGACGCCGTCATCTTAC  
TTGACGTGCACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATG

MetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPhe  
481 TCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGTGGCCGTCT  
AGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAAACGACGACCGGCAGA

GlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGln  
541 TCGGACCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCC  
AGCCTGGGGAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTTCATGGGATGAAACACCGCCAGG

GlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMet  
601 AAGGCCTTCTCCGGTTCGCGGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAA  
TTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTT

ValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeu  
661 TGGTCATCATTAAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTC  
ACCAGTAGTAATTCATCCCGGGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAG

ArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPhe  
721 TTCGGGACTGGGCGCACACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCT  
AAGCCCTGACCCGCGTGTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGA

SerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIle  
781 TCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGGGTGACA  
AGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCGCTCTATGGCGGCGCACGCCACTGT

IleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAsp  
841 TCATCAACGGCTTGCTGTTTCCGCCCCGAGGGGCGGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCG  
AGTAGTTGCCGAACGGACAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTCCGC

GlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThr

901 ATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCACAGCAGA  
TACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCGTCT

ArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGlu  
961 CAAGGGGCCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAAGTGG  
GTTCCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGGTTCGGATTGACCGGCCCTGTTTTGGTTCCACC

GlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGly  
1021 AGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATG  
TCCCACCTCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGGGAAGGACCGTTGCACGTAGTTAC

ValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyPro  
1081 GGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTC  
CCCACACGACCTGACAGATGGTGTCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCCAG

ValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGly  
1141 CTGTCACTCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCCGCTCCGCAAG  
GACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTC

SerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHis  
1201 GTAGCCGCTCATGACACCCTGCACTTGCCTCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGC  
CATCGCGGAGTAACTGTGGGACGTGAACCGCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGTCTCCG

AlaAspValIleProValArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArg  
1261 ACGCCGATGTCATTCCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGTGTGCGCCC  
TGCGGCTACAGTAAGGGCACGCGGCCCGCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGACAGCGGGG

ProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAla  
1321 GGCCCATTTCTACTTGAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCGCGGGGCACG  
CCGGTAAAGGATGAACTTCCGAGGAGCCCCCAGGGCACAACACGGGGCGCCCCGTGC

ValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIle  
1381 CCGTGGGCATATTTAGGGCCCGGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTA  
GGCACCCGTATAAATCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAAT

ProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerPro  
1441 TCCCTGTGGAGAACCCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTC  
AGGGACACCTCTTGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAGAG

ProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLys  
1501 CACCAGTAGTCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGCGGCA  
GTGGTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTGCGCGT

SerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnPro  
1561 AAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACC  
TTTCGTGGTTCCAGGGCCGACGTATACGTGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAGTTGG

SerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspPro  
1621 CCTCTGTTGTGCAACACTGGGCTTTGGTGTCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATC  
GGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAG

AsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyr  
1681 CTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCAGTACTCCACCT  
GATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCCGGGTAGTGATGAGGTGGA

GlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleCysAsp  
1741 ACGGCAAGTTCTTGCCGACGGCGGGTGTCTCGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTG  
TGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGGAATACTGTATTATTAACAC

GluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAla  
1801 ACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACTGTCTTGACCAAG  
TGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACCTGGTTC

GluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThr  
1861 CAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTGTGTCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCIGTCA  
GTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCGAGJCAGT

1921 ValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyr  
CTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTT  
GACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAA

1981 GlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSer  
ACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAAT  
TGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTATTAGTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAA

2041 LysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAla  
CAAAGAAGAAGTGCACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGG  
GTTTCTTCTTACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACC

2101 TyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValAla  
CCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTCATCCCAGCAGCGGCGATGTTGTCGTCGTGG  
GGATGATGGCGCCAGAAGTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTTCGCCGCTACAACAGCAGCACC

2161 ThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThr  
CAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATAACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATA  
GTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTAT

2221 CysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThr  
CGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTACAGCCTTGACCCTACCTTACCATTGAGACAATCA  
GCACACAGTGGGTCTGTTCAGCTAAAGTCGGAAGTGGGATGGAAGTGGTAACCTCTGTTAGT

2281 LeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysPro  
CGTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGC  
GCGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGCTCTGACCGTCCCCCTTCG

2341 GlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerVal  
CAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCAGGGGAGCGCCCTCCGGCATGTTTCGACTCGTCCG  
GTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCGGTACAAGCTGAGCAGGC

2401 LeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThr  
TCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCCGAGACTA  
AGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTCTGAT

2461 ValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGlu  
CAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTG  
GTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTGGTAGAAC

2521 PheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThr  
AATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCCAGA  
TTAAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCT

2581 LysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArg  
CAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTA  
GTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACGCGAT

2641 AlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysPro  
GGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTGTTGATTGCGCTCAAGC  
CCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCAAACTAAGCGGAGTTCCG

2701 ThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThr  
CCACCCCTCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTTCAAGTAAATCA  
GGTGGGAGGTACCCGTTGTGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGT

2761 LeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValVal  
CCCTGACGCACCCAGTACCAAATACATCA'GACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTCG  
GGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGC

2821 ThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSer  
TCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGT  
AGTGCTCGTGGACCCAGGCAACCCCGCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACA

ThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIlePro

2881 CAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACT  
GTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGTCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATG  
AspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuPro  
2941 CTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTAC  
GACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTCTGTGAATG  
TyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeu  
3001 CGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTTCGGCCCTCC  
GCATGTAGCTCGTTCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGG  
GlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLys  
3061 TGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGTTATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAA  
ACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTT  
LeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAla  
3121 AACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAAGTTCATCAGTGGGATACAATACTTGG  
TTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTACCCTATGTTATGAACC  
GlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAla  
3181 CGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTG  
GCCGGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACACTACCGAAAATGTGAC  
ValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpVal  
3241 CTGTCCAGCCCACTAACCCTAGCCAAACCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGGTGGG  
GACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACC  
AlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGly  
3301 TGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCCGGTCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTG  
ACCGACGGGTGAGCGGGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAATCGAC  
AlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGly  
3361 GCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGTTCCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATG  
CGCGGGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATAC  
AlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThr  
3421 GCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCTCCA  
CGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACCCGTAAGTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGT  
GluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyVal  
3481 CGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCCGGG  
GCCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAGCCG  
ValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMet  
3541 TGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCAGTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGG  
ACCAGACACGTGCTTATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTACGTCACCT  
AsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValPro  
3601 TGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCCCAGCACTACGTGC  
ACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGTGCGTGATGCAGC  
GluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeu  
3661 CGGAGAGCGATGCAGCTGCCCCGCTACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGC  
GCCTCTCGCTACGTGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCTGCGGAGTGACATTGGGTGCG  
LeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrp  
3721 TCCTGAGGCGACTGCACCACTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCCT  
AGGACTCCGCTGACGTGGTACCTATTTCGAGCCTCACATGTTGAGGTACGAGGCCAAGGA  
LeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLys  
3781 GGCTAAGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTAAAGACCTGGCTAA  
CCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACAACCTCGCTGAAATTCCTGGACCGATT  
AlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLys  
3841 AAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCCTTGTGTCTGCCAGCGGGGTATA  
TTCGATTGAGTACGGTGTGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTTCGCGCCCATAT

26-4. ÁBRA

3901 GlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThr  
AGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCA  
TCCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGT

3961 GlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrp  
CTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCTAGGACCTGCAGGAACATGT  
GACCTGTACAGTTTTTGCCTGTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCTTGTACA

4021 SerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaPro  
GGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCTGTACCCCCCTTCTGCGC  
CCTCACCTTGAAGGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGACATGGGGGAAGGACGGC

4081 AsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnVal  
CGAACTACACGTTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGG  
GCTTGATGTGCAAGCGGATACCTCCACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCC

4141 GlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnVal  
TGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGG  
ACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCC

4201 ProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProPro  
TCCCATCGCCCGAATTTTTACAGAATTGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTTTGCGCCCC  
AGGGTAGCGGGCTTAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGGGATGTATCCAACGCGGGG

4261 CysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProVal  
CCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGG  
GGACGTTGCGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCC

4321 GlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThr  
TAGGGTCGCAATTACCTTGCAGCCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCA  
ATCCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACCTGCAGGTACGAGT

4381 AspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProPro  
CTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGCGCGCCGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCC  
GACTAGGGAGGGTATATGTCGTCTCCGCCCGCCGCTTCCAACCGCTCCCTTAGTGGGG

4441 SerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThr  
CCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTGCA  
GGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGT

4501 AlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGlu  
CCGCTAACCATGACTCCCTGTATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGG  
GGCGATTGTTACTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCC

4561 MetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPhe  
AGATGGGCGGCAACATCACCCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCT  
TCTACCCGCCGTTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGA

4621 AspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArg  
TCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGAGAAATCCTGC  
AGCTAGGCGAACACCGCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACG

4681 LysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProPro  
GGAAGTCTCGGAGATTGCCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCCGGACTATAACCCCC  
CCTTACAGACCTCTAAGCGGTCCGGACGGGCAAACCCGCGCCGGCCTGATATTGGGGG

4741 LeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeu  
CGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGC  
GCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGGC

4801 ProProProLysSerProProValProProProArgLysLysArgThrValValLeuThr  
TTCCACCTCCAAAGTCCCCTCCTGTGCCTCCGCCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCTCA  
AAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGCGGAGCCTTCTTCGCTGCCACCAGGAGT

GluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSer

4861 CTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCT  
GACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGA

ThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCys  
4921 CAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCTTCTGGCT  
GTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGA

ProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGly  
4981 GCCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCTCCATGCCCCCCTGGAGGGGGAGCCTG  
CGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGACCTCCCCCTCGGAC

AspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAsp  
5041 GGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCGGAGG  
CCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCC

ValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAla  
5101 ATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGCGCCG  
TACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGGC

GluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeu  
5161 CGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCACAATT  
GCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTGTTGAGCAACGATGCAGTGGTGTAA

ValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArg  
5221 TGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTTGACA  
ACCACATAAGGTGGTGGAGTGCCTCACGAACGGTTTCCGTCTTCTTTCAGTGTAACCTGT

LeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSer  
5281 GACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGGCGT  
CTGACGTTCAAGACCTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTTCTTCCAATTCGTCGCCGCA

LysValLysAlaAsnLeu  
5341 CAAAAGTGAAGGCTAACTTG  
GTTTTCACTTCGATTGAAC

26-6. ÁBRA

27. ÁBRA A 12f. DNS transzlációja

IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn  
1 CCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCTGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA  
GGTATAAAATTTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT

TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu  
61 ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCGGAGCTCAGCCCGT  
TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA

LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu  
121 TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCCTCCCGTGTTCCCTCACAACCCTACCAGCCT  
ATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCGGA

SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal  
181 TGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG  
ACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTATGAACATGCCCC

-----  
GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu  
241 TGGGGTCAAGCATCGCGTCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCTCCTC  
ACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG

-----  
LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu  
301 TGCTTGACAGACGCGCGGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG  
ACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCC

----- átfedés a 14i.-vel-----  
AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu  
361 AGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTC  
TCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTGCTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG

-----  
Val  
421 TTGTATC  
AACATAG

28. ÁBRA A 35f. DNS transzlációja

----- átfedés a 39c.-vel -----  
LeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGlu  
1 TGCTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGGCGTCAAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGG  
ACGAGTTCCTCCAATTCGTGCGCCGAGTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCC  
  
AlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAsp  
61 AAGCTTGCAGCCTGACGCCCCACACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAG  
TTCGAACGTCCGACTGCGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCCGTTTC  
  
ValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeu  
121 ACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTC  
TGCAGGCAACGGTACGGTCTTCCGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTCTGGAAG  
  
GluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysVal  
181 TGGAAACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCG  
ACCTTCTGTTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAAGACGC  
  
GlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyVal  
241 TTCAGCCTGAGAAGGGGGGTCGTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTCCCCGATCTGGGCG  
AAGTCGGACTCTTCCCCCAGCATTCCGGTCGAGCAGAGTAGCACAAGGGGCTAGACCCGC  
  
ArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMet  
301 TGC GCGTGTGCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCTTGCCGTGA  
ACGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACT  
  
GlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAla  
361 TGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCTCGTGCAAG  
ACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTGTCGCCCACTTAAGGAGCACGTTT  
  
TrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThr  
421 CGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCA  
GCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAAACTGAGGT  
  
ValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAla  
481 CAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCA  
GTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGT

29. ábra A 19g. DNS transzlációja

-----  
1 GluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThr  
GAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTCTCGTATGATACC  
CTTAAGGAGCACGTTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGG  
----- átfedés a 35f.-fel-----  
61 ArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGln  
CGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAA  
GCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATGGTT  
121 CysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyr  
TGTTGTGACCTCGACCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCAGAGGCTTTAT  
ACAACACTGGAGCTGGGGTTCGGGCGCACCGGTAGTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAAATA  
181 ValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAla  
GTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGCG  
CAACCCCGGGGAGAATGGTTAAGTTCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGC  
241 SerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAla  
AGCGGCGTACTGACAACCTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGGCA  
TCGCCGATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCGGGGCCCGT  
301 AlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuVal  
GCCTGTCGAGCCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTC  
CGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAG  
361 ValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAla  
GTTATCTGTGAAAGCGCGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAG  
CAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCTCCTGCGCCGCTC

30. ÁBRA A 26g. DNS transzlációja

-----  
1 GlyGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCys  
GGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGCAAGCGGCGTACTGACAACCTAGCTGT  
CCCCCTCTTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGTTCCGCCATGACTGTTGATCGACA  
-----  
61 GlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGln  
GGTAACACCCTCACTTGTTACATCAAGGCCCCGAGCAGCCTGTCGAGCCCGAGGGCTCCAG  
CCATTGTGGGAGTGAACAATGTAGTTCCGGGCTCGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTC  
-----  
121 ----- átfedés a 19g.-vel -----  
AspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyVal  
GACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTTC  
CTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAG  
-----  
181 GlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaPro  
CAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCC  
GTCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGG  
-----  
241 ProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsn  
CCTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAAC  
GGACCCCTGGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTG  
-----  
301 ValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThr  
GTGTCACTCGCCACGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACA  
CACAGTCAGCGGGTGTGCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGT  
-----  
361 ThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeu  
ACCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTA  
TGGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCCTCTGTCGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGAT  
-----  
421 GlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAla  
GGCAACATAATCATGTTTGGCCCCACACTGTGGGCG  
CCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACCCGC

31. ÁBRA A 15e. DNS transzlációja

-----  
1 GlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAla  
CGGCGCTGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCTCGCGAGAGC  
GCCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGAGCGCTCTCG  
-----  
61 ----- átfedés a 26g.-vel -----  
AlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPhe  
TGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTT  
ACGCACCCTCTGTCGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAA  
-----  
121 AlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAla  
TGCCCCCACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCTTATAGC  
ACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCG  
-----  
181 ArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGlu  
CAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCTGCTACTCCATAGA  
GTCCCTGGTCAACTTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCGGACGATGAGGTATCT  
-----  
241 ProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu  
ACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC  
TGGTGAAC TAGATGGAGGTTAGTAAGTTCTGAG

32-1. ÁBRA A 12f.-től 15e.-ig a DNS-ek kombinált ORF-je

IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn  
1 CCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTGCAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA  
GGTATAAAATTTTAGTCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT

TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu  
61 ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT  
TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA

LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu  
121 TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCTACCAGCCT  
ATGACGACTGGTGTGTGTACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTTCGGA

SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal  
181 TGCCACCGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG  
ACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTATGAACATGCCCC

GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu  
241 TGGGGTCAAGCATCGCGTCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTTCCTGTTCCTTC  
ACCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG

LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu  
301 TGCTTGACAGCGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG  
ACGAACGCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCC

AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu  
361 AGCGCGCTTGGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTC  
TCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG

ValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGly  
421 TTGTATCCTTCCTCGTGTCTTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCG  
AACATAGGAAGGAGCACAGAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCCATTACCCACGGGC

AlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGln  
481 GAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTGGCGTTGCCCC  
CTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACCCGGAGAGGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGG

ArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGly  
541 AGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCGCGTGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCCG  
TCGCCCCATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGC

LeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrp  
601 GGTGATGGCGCTGACTCTGTACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGTCTGTGGT  
CCAACTACCGGACTGAGACAGTGGTATAATGTTTCGGGATATAGTCGACCACGAACACCA

LeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsn  
661 GGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCA  
CCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGT

ValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuVal  
721 ACGTCCGAGGGGGGCGCGACCGCTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGG  
TGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACAGCATGTGGGCTGAGACC

PheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSer  
781 TATTTGACATACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCA  
ATAAACTGTAGTGGTTTAAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGT

LeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAla  
841 GTTGTCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGGTCTGCGCGTTAG  
CAAACGAATTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATC

ArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThr  
901 CGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAATGGTCAATTAAGTTAGGGGGCGCTTA  
GCCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTCATCCCGCGAAT

961 GlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArg  
CTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAAACGGCTTGC  
GACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTTCGCGAACG

1021 AspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThr  
GAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCA  
CTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTGAGCAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGT

1081 TrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArg  
CGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCCTGACATCATCAACGGCTTGCCTGTTTCCGCCC  
GCACCCCGCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGG

1141 ArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeu  
GCAGGGGCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGT  
CGTCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTGCGGTACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCA

1201 LeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThr  
TGCTGGCGCCATCACGGCGTACGCCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCATAATCA  
ACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCTGTTCCCGGAGGATCCCACGTATTAGT

1261 SerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAla  
CCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGGAGTCCAGATTGTGTCAACTG  
GGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTTGGTTCACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGAC

1321 AlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAla  
CTGCCCAAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGG  
GACGGGTTTGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACCTGACAGATGGTGCACC

1381 GlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAsp  
CCGGAACGAGGACCATCGCGTACCCCAAGGGTCTGTTCATCCAGATGTATACCAATGTAG  
GGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCACAGGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATC

1441 GlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCys  
ACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCTGCACTT  
TGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTCCATCGGCGAGTAACTGTGGGACGTGAA

1501 GlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIleProValArgArgArg  
GCGGCTCCTCGGACCTTTACTGTCACGAGGCACGCCGATGTCATTCCCGTGCGCCGGC  
CGCCGAGGAGCCTGGAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAAGGGCACGCGGGCCG

1561 GlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSer  
GGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTCGCCCCGGCCCCATTTCTACTTGAAAGGCTCCT  
CCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGACAGCGGGCCGGGTAAAGGATGAACTTTCCGAGGA

1621 GlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCys  
CGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGCACGCCGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGT  
GCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAATCCCGGCGCCACA

1681 ThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMet  
GCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGACTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCA  
CGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGATCTCTGTTGGT

1741 ArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnVal  
TGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTCCCCAGAGCTTCCAGG  
ACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCC

1801 AlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAla  
TGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATG  
ACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTCCCGTTTTCTGTTGTTCCAGGGCCGACGTATAC

1861 AlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGly  
CAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTG  
GTGCGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAAC

AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle

- 1921 GTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACA  
CACGAATGTACAGGTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTCTTGTT
- ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys  
1981 TTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCCTGCCGACGGCGGGT  
AATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCA
- SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer  
2041 GCTCGGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACAT  
CGAGCCCCCGCAATACTGTATTATTAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGT
- IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal  
2101 CCATCTTGGGCATCGGCCTGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCCGGGGCGAGACTGGTTG  
GGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACGGTTCGTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAAC
- LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal  
2161 TGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCCTGTCGCCCCATCCCAACATCGAGGAGG  
ACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCC
- AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle  
2221 TTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAA  
AACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATT
- LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla  
2281 TCAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGCAGCAACTCGCCG  
AGTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTACGCTGCTTGAGCGGC
- LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal  
2341 CAAAGCTGGTTCGATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCG  
GTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAAGTGCACAGGC
- IleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThr  
2401 TCATCCCGACCGCGGATGTTGTGTCGTGTCGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATA  
AGTAGGGCTGGTCCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATAT
- GlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSer  
2461 CCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTCAACCCAGACAGTCGATTTCA  
GGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTCTGTCTAGCTAAAGT
- LeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThr  
2521 GCCTTGACCCTACCTTACCATTGAGACAATCACGCTCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCA  
CGGAAGTGGGATGGAAGTGGTAACTCTGTTAGTGGGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGT
- GlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGly  
2581 CTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGG  
GAGTTGCAGCCCCGTCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCC
- GluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCys  
2641 GGGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTGACTCGTCCGTCCTCTGTGAGTGCTATGACGAGGCT  
CCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGA
- AlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThr  
2701 GTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACA  
CACGAACCATACTCGAGTGGGGGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGT
- ProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeu  
2761 CCCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCC  
GGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTGGTAGAACTTAAAACCTCCCGCAGAAATGTCCGG
- ThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyr  
2821 TCACTCATATAGATGCCCACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTTCTT  
AGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAA
- LeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAsp  
2881 ACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGG  
TGGACCATCGCATGTTCCGGTGGCACACCGGATCCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCC

2941 GlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeu  
ACCAGATGTGGAAGTGTTTGATTTCGCCCTCAAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCTGC  
TGGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACG

3001 TyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIle  
TATACAGACTGGGCGCTGTTTTCAGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACA  
ATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTTCAGTGGTTTATGT

3061 MetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGly  
TCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCG  
AGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTTGGACCCACGAGCAACCCG

3121 ValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArg  
GCGTCCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCA  
CGCAGGACCGACGAAACCGGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGT

3181 ValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPhe  
GGGTCTGTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGT  
CCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCA

3241 AspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAla  
TCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCG  
AGTACTCTACCTTCTCAGAGAGTCTGTAATGGCATGTAGCTCGTTCCTACTACGAGC

3301 GluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluVal  
CCGAGCAGTTCAGCAGAAGGCCCTCGCCCTCTGCAGACCCGCTCCCGTCAGGCAGAGG  
GGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCC

3361 IleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMet  
TTATCGCCCCTGCTGTCCAGACCACTGGCAAAAACCTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATA  
AATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTAT

3421 TrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnPro  
TGTGGAACCTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTGTCAACGCTGCCTGGTAACC  
ACACCTTGAAGTAGTCACCCATGTTATGAACCCGCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGG

3481 AlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln  
CCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACAGCCCACTAACCCTAGCC  
GGCGGTAACGAAGTAACCTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCCGGGTGATTGGTGATCGG

3541 ThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAla  
AAACCCTCCTCTCAACATATTGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCGGTG  
TTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACCACCGACGGGTGAGCGGGGGGGCCAC

3601 AlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGly  
CCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCATCGGCAGTGTGGACTGG  
GGCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAATCGACCGCGGGTAGCCGTCACAACCTGACC

3661 LysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAla  
GGAAGGTCCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGG  
CCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCCGCCCCGACCCGCCCTCGAGAACC

3721 PheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAla  
CATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCG  
GTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCTTCTGGACCAGTTAGATGACGGGG

3781 IleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHis  
CCATCCTCTCGCCGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGC  
GGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAGCCGCACCAGACACGTCTGTTATGACGCGGCCG

3841 ValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArg  
ACGTTGGCCCCGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCC  
TGCAACCGGGCCCCGCTCCCCGTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGG

GlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThr

3901 GGGGGAACCATGTTTCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCA  
CCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCCTGATGCACGGCCTCTCGCTACGTCGACGGGGCGCAGT

AlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSer  
3961 CTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAA  
GACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGGGTGCGAGGACTCCGCTGACGTGGTACCTATT

SerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCys  
4021 GCTCGGAGTGTACCCTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATAT  
CGAGCCTCACATGGTGGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCTGACCTATA

GluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGly  
4081 GCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTG  
CGCTCCACAACCTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTTCGATTGAGTACGGTGTGACGGAC

IleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMet  
4141 GGATCCCCTTTGTGTCTCGCCAGCGCGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCA  
CCTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCCCATATTCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGT

HisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArg  
4201 TGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGTCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGA  
ACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCCTGCTACT

IleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyr  
4261 GGATCGTCCGGTCTTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCATAATGCCT  
CCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGA

ThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgVal  
4321 ACACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCTGCGCCGAACACACGTTCCGCTATGGAGGG  
TGTGGTGCCTGGGACATGGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGGATACCTCCC

SerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMet  
4381 TGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTA  
ACAGACGCTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCCTGAAGGTGATGCACTGCCAT

ThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeu  
4441 TGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTCCAGGTCCCATCGCCGAATTTTCACAGAAT  
ACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTCTTA

AspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluVal  
4501 TGGACGGGGTGCCTACATAGGTTTGCGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCCGGAGGAGG  
ACCTGCCCCACGCGGATGTATCCAACGCGGGGGGACGTTCCGGAACGACGCCCTCTCC

SerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGlu  
4561 TATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGGAGCCCCG  
ATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCCATCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGC

ProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAla  
4621 AACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGG  
TTGGCCTGCACCGGCACAACCTGCAGGTACGAGTACTAGGGAGGGTATATTGTCGTCTCC

AlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGln  
4681 CGGCCGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCC  
GCCGGCCGCTTCCAACCGCTCCCCTAGTGGGGGAGACACCGGTGAGGAGCCGATCGG

LeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGlu  
4741 AGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTGCACCGCTAACCATGACTCCCCTGATGCTG  
TCGATAGCGGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGAC

LeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGlu  
4801 AGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAACATCACCAGGGTTG  
TCGAGTATCTCCGGTGGAGGATACCTCCGTCTTACCCGCGTGTAGTGGTCCCAAC

SerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGlu  
4861 AGTCAGAAAACAAGTGGTATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACG  
TCAGTCTTTGTTTACCACCTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACACCGCCTCTCTCGC

4921 ArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeu  
AGCGGGAGATCTCCGTACCCGACAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGATTCGCCAGGCC  
TCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCCTCTAAGCGGGTCCGGG

4981 ProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAsp  
TGCCCGTTTGGGCGCGGCCGACTATAACCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCG  
ACGGGCAAACCCGCGCCGGCCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGC

5041 TyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValPro  
ACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCCCTCCTGTGC  
TGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACAG

5101 ProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAla  
CTCCGCCCTCGAAGAAGCGGACGGTGGTCTCCTACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGG  
GAGGCGGAGCCTTCTTCGCCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACC

5161 GluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThr  
CCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTGGCAGCTCCTCAACTCCGGCATTACGGGCGACAATA  
GGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTAT

5221 ThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyr  
CGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCTTCTGGCTGCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCCT  
GCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGA

5281 SerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrp  
ATTCTCCATGCCCCCCCTGGAGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCAT  
TAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTA

5341 SerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSer  
GGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACT  
CCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGA

5401 TrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAla  
CTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATG  
GAACCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGGCCCTTCTTGCTTTGACGGGTAGTTAC

5461 LeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAla  
CACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTG  
GTGATTCTGTTGAGCAACGATGCAGTGGTGTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTAC

5521 CysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGln  
CTTGCCAAAGGCAGAAGAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACC  
GAACGGTTTCCGTCTTCTTTTCAGTGTAACCTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCCGTAATGG

5581 AspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerVal  
AGGACGTAAGGAGGTTAAAGCAGCGGCGTCAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCG  
TCCTGCATGAGTTCTCCAATTTGTCGCGCCAGTTTTCCTTCCGATTGAACGATAGGC

5641 GluGluAlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAla  
TAGAGGAAGCTTGCAGCCTGACGCCCCACACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGG  
ATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGTGTGAGTGGTTCAGTTTAAACCAATACCCC

5701 LysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAsp  
CAAAAGACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAG  
GTTTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTTCCGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTTC

5761 LeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPhe  
ACCTTCTGGAAGACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTT  
TGGAAGACCTTCTGTTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAA

5821 CysValGlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeu  
TCTGCGTTCAGCCTGAGAAGGGGGTTCGTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTCCCCGATC  
AGACGCAAGTCGGACTCTTCCCCCAGCATTCCGGTCGAGCAGAGTAGACAAGGGGCTAG

GlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAla

5881 TGGGCGTGCGCGTGTGCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCCTTGG  
ACCCGCACGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACC

ValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuVal  
5941 CCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCCTCG  
GGCACTACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTGTGCGCCAACTTAAGGAGC

GlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAsp  
6001 TGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTG  
ACGTTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAAAC

SerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeu  
6061 ACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACC  
TGAGGTGTCAGTCACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATGGTTACAACACTGG

AspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyPro  
6121 TCGACCCCCAAGCCCGGTGGCCATCAAGTCCCTCACCAGAGAGGCTTTATGTTGGGGGGCC  
AGCTGGGGGTTCCGGGCGACCGGTAGTTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCGG

LeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeu  
6181 CTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGGAGCGGCGTAC  
GAGAATGGTTAAGTTCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCGCATG

ThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAla  
6241 TGACAACACTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGTGCGAG  
ACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCCCGTCGGACAGCTC

AlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGlu  
6301 CCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTG  
GGCGTCCCAGGTCCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACAC

SerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArg  
6361 AAAGCGCGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTACGGAGGCTATGACCA  
TTTCGCGCCCCCAGGTCCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCCCTCCGATACTGGT

TyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSer  
6421 GGTACTCCGCCCCCTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACAT  
CCATGAGGCGGGGGGACCCCTGGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTA

CysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThr  
6481 CATGCTCCTCCAACGTGTCAGTGCAGCCACGACGGCGCTGGAAAAGAGGGTCTACTACCTCA  
GTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTGTGCGCGACCTTTCTCCAGATGATGGAGT

ArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProVal  
6541 CCCGTGACCCTACAACCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAG  
GGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCTCTGTGCTTCTGTGTGAGGTC

AsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeu  
6601 TCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTTTGGCCCCCACTGTGGGCGAGGATGATAC  
AGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATG

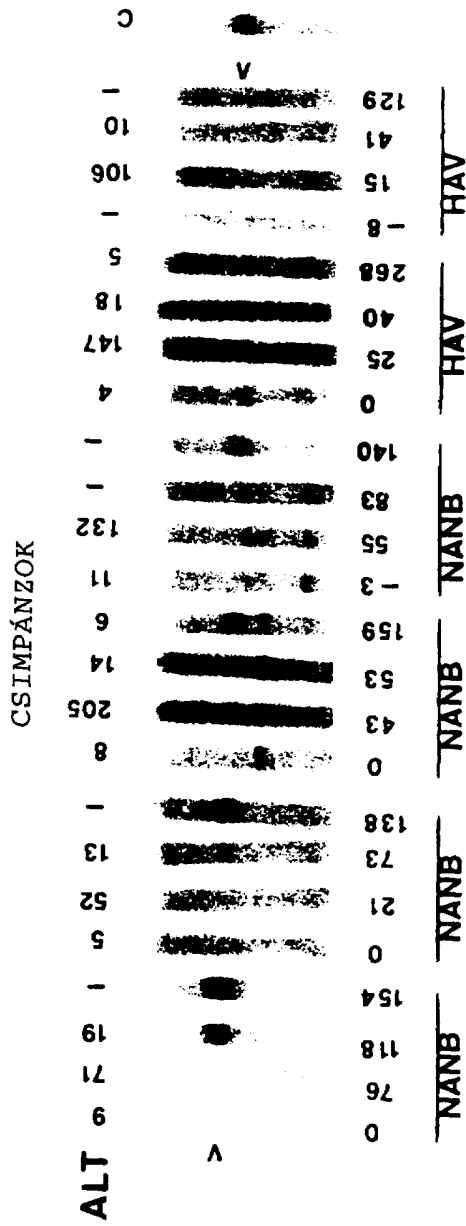
MetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCys  
6661 TGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGCCAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATT  
ACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCCAACCTGTCCGGGAGCTAA

GluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArg  
6721 GCGAGATCTACGGGGCTGCTACTCCATAGAACCCTTGATCTACCTCCAATCATTCAA  
CGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGAACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTT

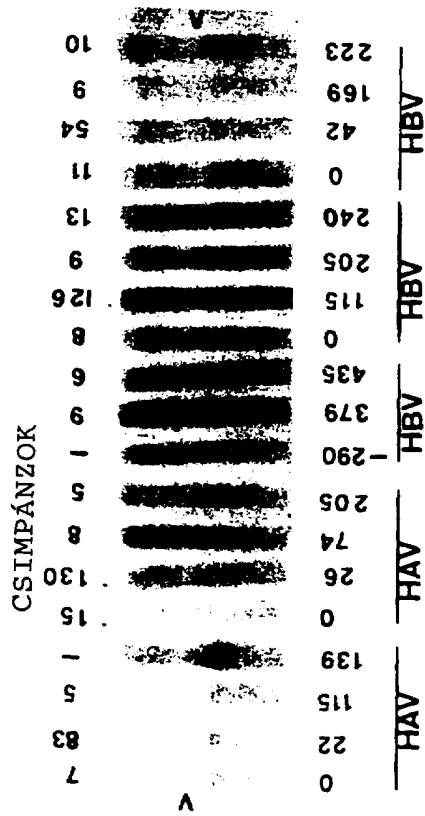
Leu  
6781 GACTC  
CTGAG

33. ÁBRA MAGYARÁZAT

Sorszám	Csimpánz a fertőzés referenciája	referen- ciaszám	a fertő- zés tí- pusa	A minta időpontja (nap) (0 = az inokulá- lás napja)	ALT (alanin amino- transzferáz szint a szérumokban ( $\mu$ /ml)
1	1		NANB	0	9
2	1		NANB	76	71
3	1		NANB	118	19
4	1		NANB	154	N/A
5	2		NANB	0	5
6	2		NANB	21	52
7	2		NANB	73	13
8	2		NANB	138	N/A
9	3		NANB	0	8
10	3		NANB	43	205
11	3		NANB	53	14
12	3		NANB	159	6
13	4		NANB	-3	11
14	4		NANB	55	132
15	4		NANB	83	N/A
16	4		NANB	140	N/A
17	5		HAV	0	4
18	5		HAV	25	147
19	5		HAV	40	18
20	5		HAV	268	5
21	6		HAV	-8	N/A
22	6		HAV	15	106
23	6		HAV	41	10
24	6		HAV	129	N/A
26	7		HAV	0	7
27	7		HAV	22	83
28	7		HAV	115	5
29	7		HAV	139	N/A
30	8		HAV	0	15
31	8		HAV	26	130
32	8		HAV	74	8
33	8		HAV	205	5
34	9		HBV	-290	N/A
35	9		HBV	379	9
36	9		HBV	435	6
37	10		HBV	0	8
38	10		HBV	111-118 gyűjtemény	96-156 gyűjtemény
39	10		HBV	205	9
40	10		HBV	240	13
41	11		HBV	0	11
42	11		HBV	28-56 gyűjtemény	8-100 gyűjtemény
43	11		HBV	169	9
44	11		HBV	223	10



33-1. ÁBRA

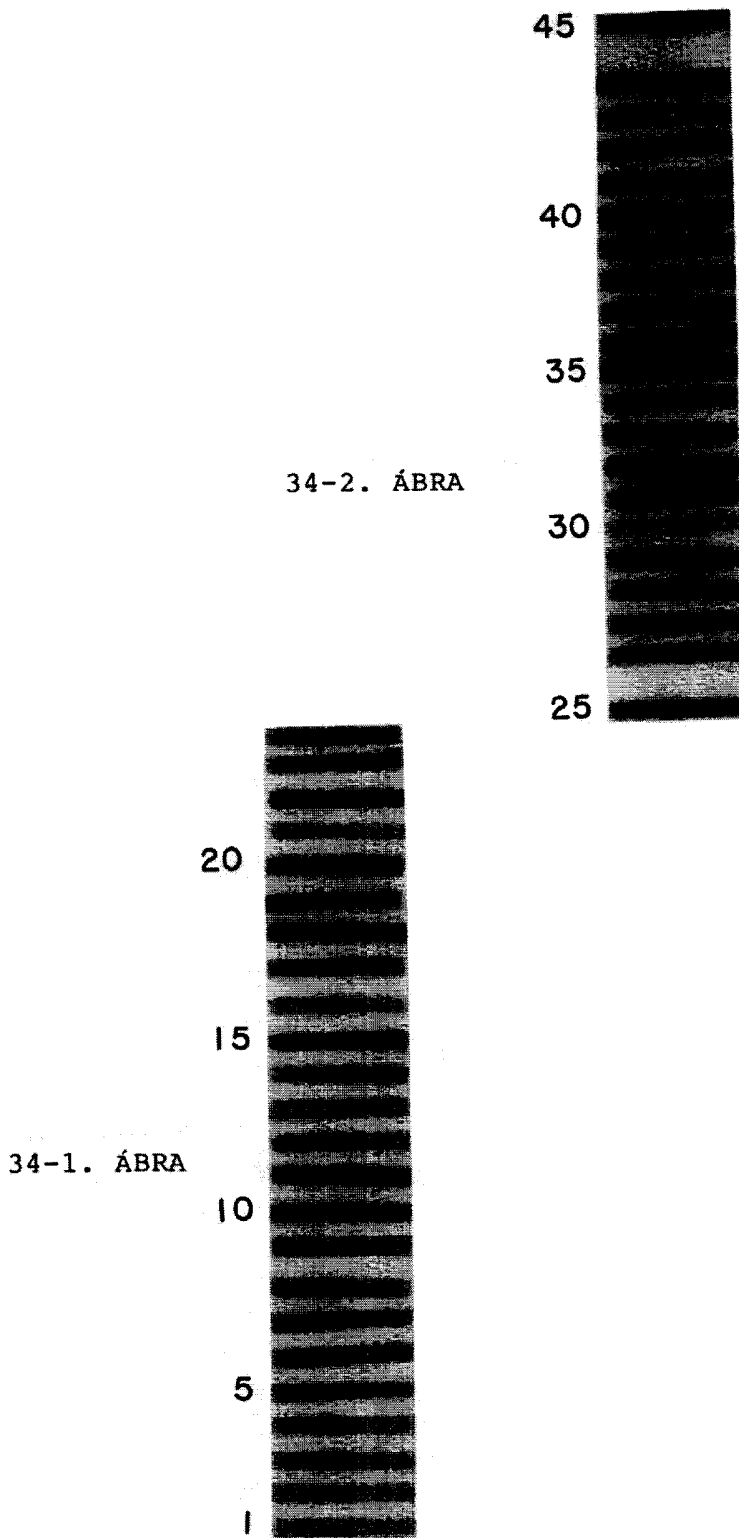


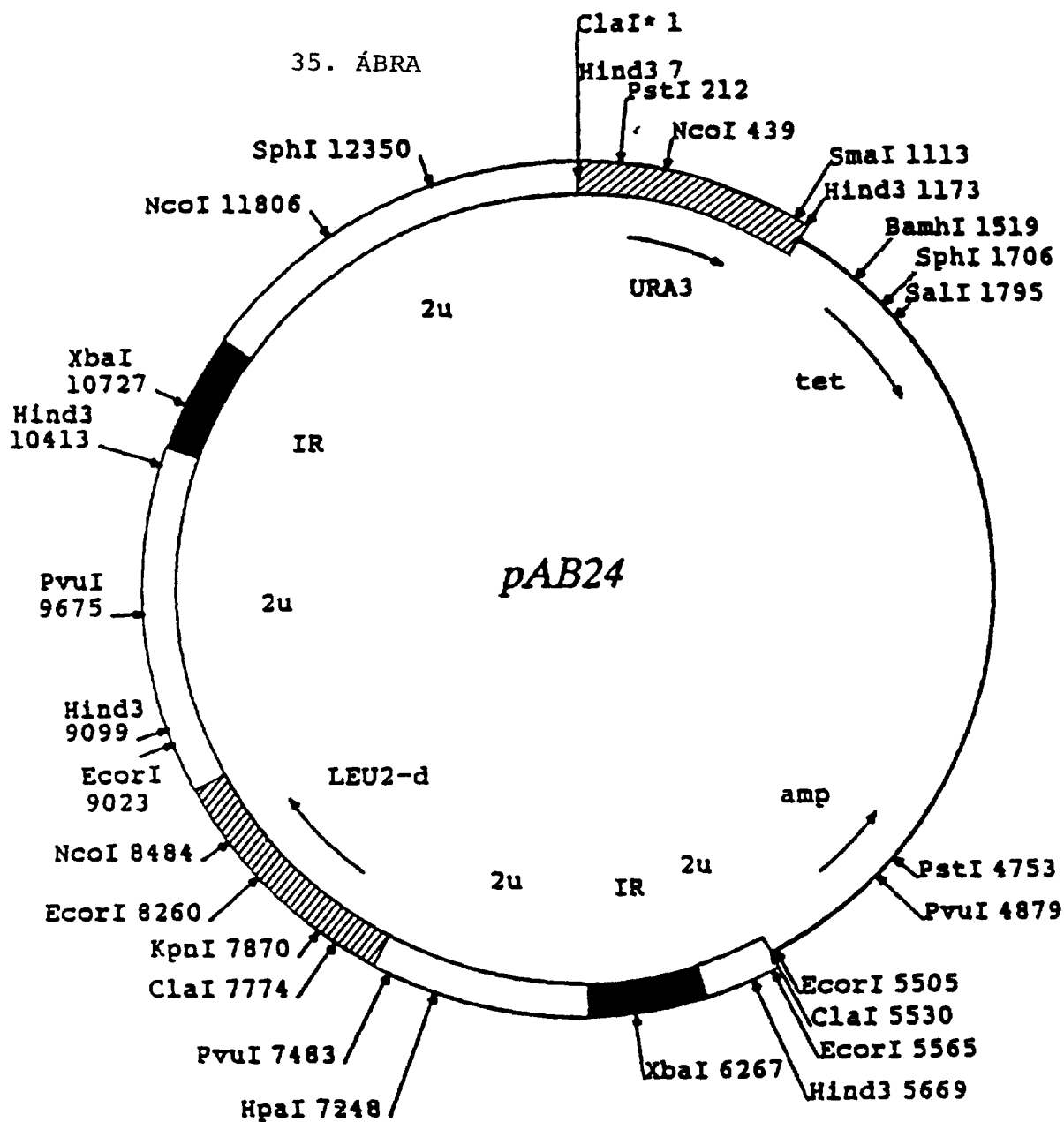
33-2. ábra

34. ÁBRA MAGYARÁZAT

Sorszám	A beteg referenciaszáma	diagnózis	ALT szint (mu/ml)
1	1 <sup>1</sup>	NANB	1354
2	1 <sup>1</sup>	NANB	31
3	2 <sup>1</sup>	NANB	14
4	2 <sup>1</sup>	NANB	79
5	2 <sup>1</sup>	NANB	26
6	3 <sup>1</sup>	NANB	78
7	3 <sup>1</sup>	NANB	87
8	3 <sup>1</sup>	NANB	25
9	4 <sup>1</sup>	NANB	60
10	4 <sup>1</sup>	NANB	13
11	5 <sup>1</sup>	NANB	298
12	5 <sup>1</sup>	NANB	101
13	6 <sup>1</sup>	NANB	474
14	6 <sup>1</sup>	NANB	318
15	7 <sup>1</sup>	NANB	20
16	7 <sup>1</sup>	NANB	163
17	8 <sup>1</sup>	NANB	44
18	8 <sup>1</sup>	NANB	50
19	9	NANB	N/A
20	10	NANB	N/A
21	11	NANB	N/A
22	12	normál	N/A
23	13	normál	N/A
24	14	normál	N/A
26	3017 <sup>4</sup>	normál	N/A
27	30105	normál	N/A
28	30072	normál	N/A
29	30026	normál	N/A
30	30146	normál	N/A
31	30250	normál	N/A
32	30071	normál	N/A
33	15	akutHAV	N/A
34	16	akutHAV	N/A
35	17	akutHAV	N/A
36	18	akutHAV	N/A
37	48088	akutHAV	N/A
38	47288	akutHAV	N/A
39	47050	akutHAV	N/A
40	46997	akutHAV	N/A
41	19	konvaleszcens HBV	N/A
42	20	(anti-HBSag+ve;	N/A
43	21	anti-HBCag+ve)	N/A
44	22	(anti-HBSag+ve;	N/A
45	23	anti-HBCag+ve)	N/A
46	24	(anti-HBSag+ve;	N/A
47	25	anti-HBCag+ve)	N/A
48	26	(anti-HBSag+ve;	N/A
49	27	anti-HBSag+ve)	N/A

<sup>1</sup>Egymás után vett szérum mintákat vizsgáltunk ezekből a betegekből



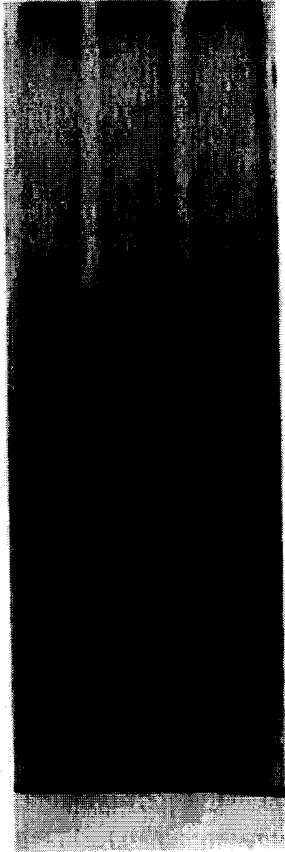






37a. ÁBRA

1 2 3

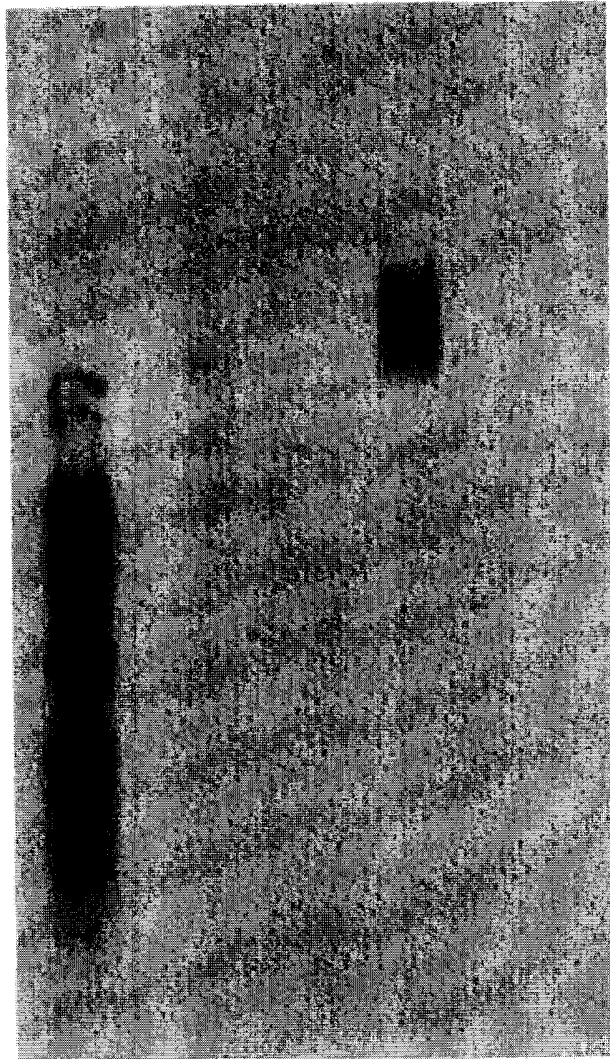


37b. ÁBRA

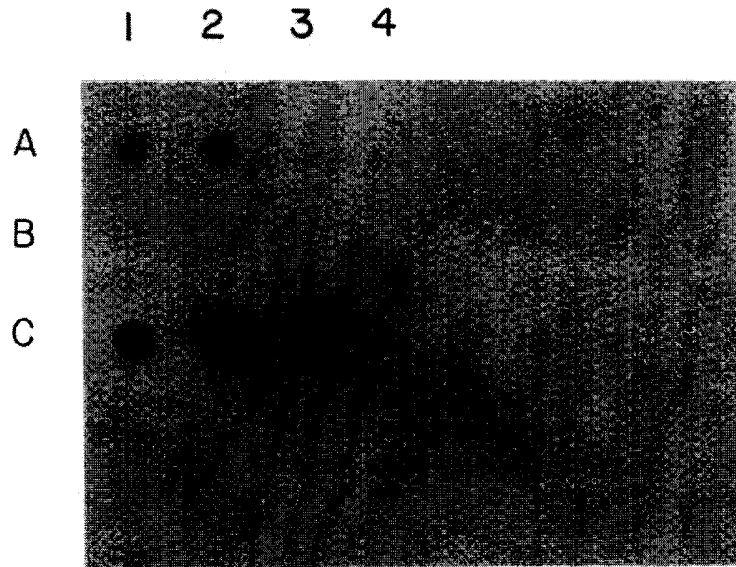
1 2



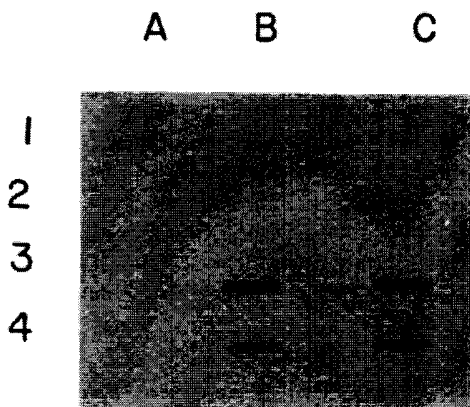
1      2   3      4



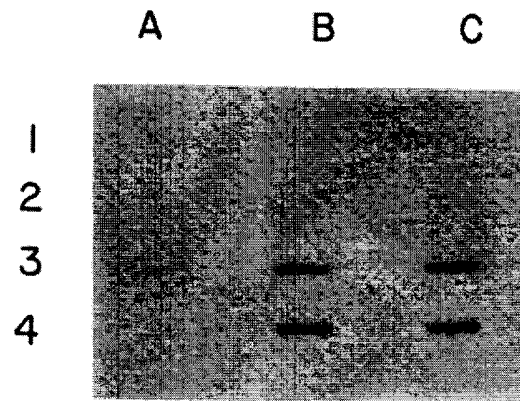
38. ÁBRA



40. ÁBRA



41a. ÁBRA



41b. ÁBRA

42-1. ÁBRA

Homológia a 14i. - 39c. kolónok kombinált ORF-je által kódolt

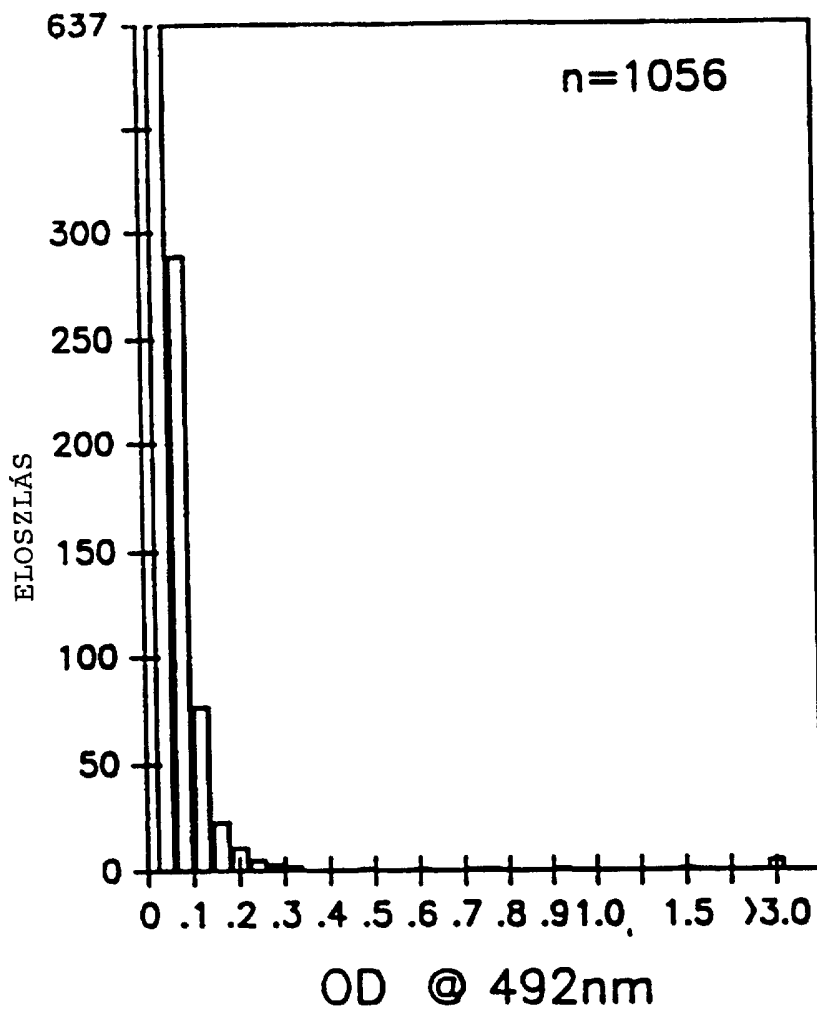
HCV polipeptid és Denque flavivírus (MNWVD1) nem-szerkezeti

fehérjéje között

	10	20	30	40	50	
HCV	EYVLLFLLADARVCSCLWMMLLISQAEAALENLVILNAASLAGTHGLVSLVFFCFA					
MNWVD1	AVSFVTLITGNMSFRDLGRVMVMVGATMTDDIGMGVTYLALLAAFKVRPTFAAGLLLRKL					
	130	140	150	160	180	
HCV	60	70	80	90	100	110
	WYLGKQWVPGAVYTFYGMWPLLLLLLALPQRAYALDTEVAASCGGVVLVGLMALTLSPYY					
MNWVD1	TSKELMMTTIGIVLLSQSTIPETILELTDALALGMMVLKMVRKMEKYQLAVTIMAILCVP					
	190	200	210	220	230	240
HCV	120	130	140	150	160	170
	KRYISWCLWWLQYFLTRVEAQLHWIPPLNVRGGRDAVILLCAVHPTLVFDITKLLAV					
MNWVD1	NAVILQNAWKVSCITILAVVSVSPLFLTSSQOKADWIPLALTIKGLNPTAIF-LTTLSTRN					
	250	260	270	280	290	
HCV	180	190	200	210	220	230
	FGPLWILQASLLKVPYF-VRVQGLLRF-CALARKMIGGHYVQMVIIKLGALTGTYVYNHL					
MNWVD1	KKRSWPLNEAIMAVGMVSIASSLLKNDIPMTGPLVAGGLLTVCYV-LTGRSADLELERA					
	300	310	320	340	350	
HCV	240	250	260	270	280	290
	TPLRDWAHNGLRDLAVAVEPVVFSQMETKLITWGADTAACGDIINGLPVSARRGREILLG					
MNWVD1	ADVK-WEDQAEISGSSPILSITISE-DGSMSEIKNEEQTLTILIRTGLLVISG---LFP					
	360	370	380	390	400	410
HCV	300	310	320	330	340	350
	PADGMVSKGWRLAPITAYAQQTRGLLGCIIITSLTGRDKNQVEGEVQIVSTAAQTFLATC					
MNWVD1	VSIPITAAAWYLWEVKKQRAGVLWDVPSPPVPGKAELEDGAYRIKQKQKILGYSQIGAGVY					
	420	430	440	450	460	470
HCV	360	370	380	390	400	410
	INGVCWTVYHAGTRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLV----GWPAPQGSRLTPCTCGSSD					
MNWVD1	KEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLVSCGGGWKLEGEWKEGEEVQVLALE					
	480	490	500	510	520	530
HCV	420	430	440	450	460	470
	LYLVTRHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRPISYLKGSGLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGV					
MNWVD1	PGKNPRAVQTKPGLFKN--AGTIGAVSLDFSPGTSGPSIIDKKGKVVGLYNGVVTRSG					
	540	550	560	570	580	590
HCV	480	490	500	510	520	530
	AKAVDFIPVENLETTMRSVFVTDNSSPPVVPQSFQVAHLHAPTGSQK--TKVPAAYAAQ					
MNWVD1	AYVSAIAQTEK--SIEDNPEIEDDIFRK---RKLTIMDLHPGAGKTKRYLPAIVRGAIKR					
	600	610	620	630	640	
	540	550	560	570	580	



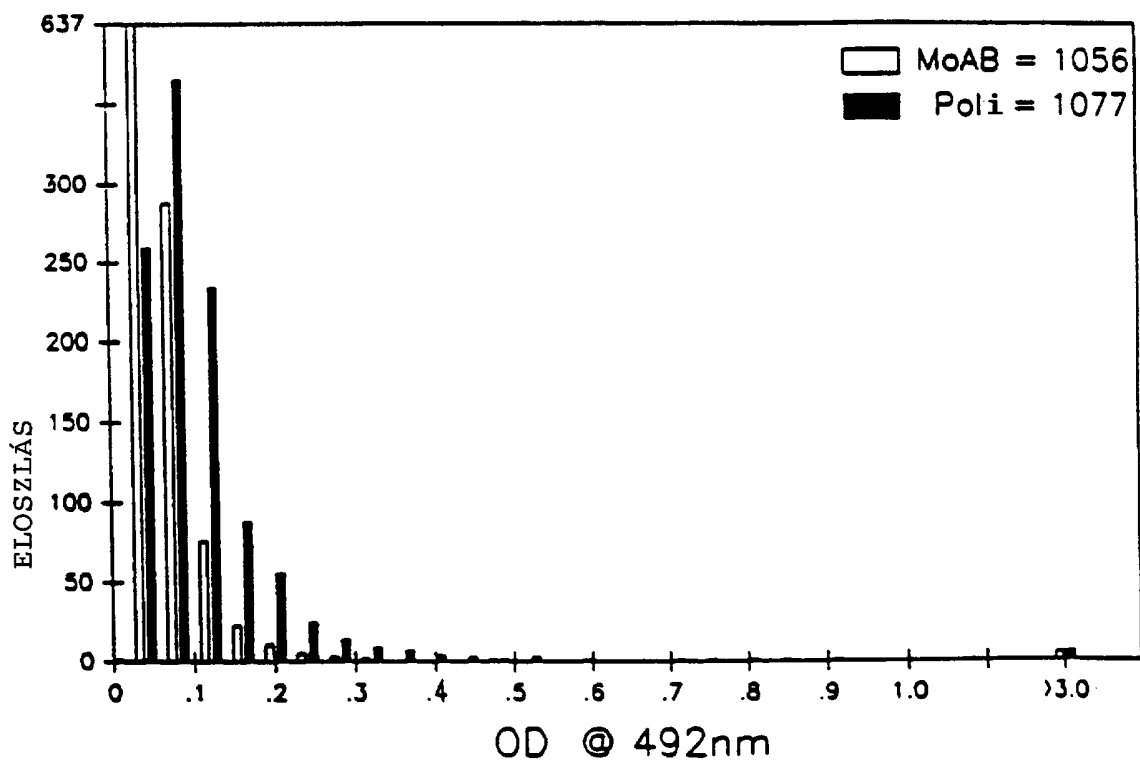
43. ÁBRA -  
VÉLETLENSZERŰ MINTÁK ELOSZLÁSA  
C100-3Ag ELISA preklinikai készlet  
416 ng C100/ÜREG, 2 ÓRA 37°C, 20 µl MINTA



44. ÁBRA

O.D. értékek eloszlása véletlenszerűen vett vérado  
mintákból, amelyeket két ELISA összeállítással  
vizsgáltunk

C100-3Ag ELISA MoAB poliklonálissal szemben



45. ÁBRA

<u>név</u>	<u>közös szekvencia</u>	<u>változó szekvencia</u>
5'-3-1	AAGCTTGATCGAATTC	CGATCTTGC
-2		CGATCCTGC
-3		CGATCATGC
-4		CGATCGTGC
-5		CGAAGTTGC
-6		CGAAGCTGC
-7		AGATCTTGC
-8		AGATCCTGC
-9		AGATCATGC
-10		AGATCGTGC
-11		AGAAGTTGC
-12		AGAAGCTGC
-13		CGATCTTGT
-14		CGATCCTGT
-15		CGATCATGT
-16		CGATCGTGT
-17		CGAAGTTGT
-18		CGAAGCTGT
-19		AGATCTTGT
-20		AGATCCTGT
-21		AGATCATGT
-22		AGATCGTGT
-23		AGAAGTTGT
-24		AGAAGCTGT
-25		CGCTCTTGC
-26		CGCTCCTGC
-27		CGCTCATGC
-28		CGCTCGTGC
-29		CGCAGTTGC
-30		CGCAGCTGC
-31		CGCTCTTGT
-32		CGCTCCTGT
-33		CGCTCATGT
-34		CGCTCGTGT
-35		CGCAGTTGT
-36		CGCAGCTGT

46-1. ÁBRA A k9-1 DNS transzlációja

GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly  
1 CAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG  
GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAACTGGTCCCAGACC

ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro  
61 GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGCCCCGACCAGCGCCCCCTACTGCTGGCACTACC  
CGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTTCGCGGGGATGACGACCGTGATGG

ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr  
121 CCCCCAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA  
GGGGTTTTTGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGT

ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly  
181 CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCACCTACAGCTGGG  
GAGGGTCCGGGACACCACCACCCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGGGTGGATGTCGACCC

GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe  
241 GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCCTAACAAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT  
CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal  
301 TCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTG  
AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACAC

IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro  
361 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC  
AGTAGCCTCCCCGCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTTCGTAG

AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp  
421 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTTCG  
GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

-----

TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg  
481 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACTATATTTAAAATCA  
TGATGGGCATATCCGAAACCCTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGATATAAATTTTAGT

-----

MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu  
541 GGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCG  
CCTACATGCACCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGC

-----

ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr  
601 AACGTTGCGATCTGGAAGATAGGGACAGGTCGAGCTCAGCCGTTACTGCTGACCACTA  
TTGCAACGCTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

-----

GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle  
661 CACAGTGGCAGGTCCTCCCCGTTCCTTCAACCCCTGCCAGCCTTGCCACCGGCTCA  
GTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGACGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGT

-----

-----átfedés a 12f.-15e.DNS-ek kombinált ORF-jével-----

HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla  
721 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG  
AGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCAGTCAATGAACATGCCCCACCCAGTTTCGTAGC

-----

SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArg  
781 CGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTGCTCCTCCTGTTCCCTTCTGCTTGACAGCGCGC  
GCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAGGAGGACAAGGAAGACGAACGCTCTGCGCG

-----

ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn  
841 GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAAGCGGCTTTGGAGA  
CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTTCGCCGAAACCTCT

-----

LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal  
901 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCG  
TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

-----

PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe  
961 TGTTCCTCTGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCT  
ACAAGAAGACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGA

-----

TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu  
1021 TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCCG  
AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCCGCCGATGCGCG

-----

AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr  
1081 TGGACACGGAGGTGGCCCGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTGATGGCGCTAA  
ACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGATT

-----

LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu  
1141 CTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTC  
GAGACAGTGGTATAATGTTCCGCATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG

-----

ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg  
1201 TGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGC  
ACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCG

-----

AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys  
1261 GCGACGCTGTCATCTTACTCATGTGTGTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATACCA  
CGCTGCGACAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGT

-----

LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAla  
1321 AATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTGGATTCTTCAAGCCAG  
TTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTC

47-1. ÁBRA A k9-1.-15e. DNS-ek kombinált ORF-je

GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly  
1 CAGGCTGTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG  
GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAACCTGGTCCCAGCC

ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro  
61 GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCGACCAGCGCCCCCTACTGCTGGCACTACC  
CGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTCCGGGGATGACGACCGTGATGG

ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr  
121 CCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA  
GGGTTTTTGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGT

ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly  
181 CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCCGGGCGGCCACCTACAGCTGGG  
GAGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCCGCGGGGTGGATGTCCAGCC

GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe  
241 GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT  
CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal  
301 TCGGTTGTACCTGGATGAACCTCAACTGGATTACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTG  
AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACAC

IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro  
361 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC  
AGTAGCCTCCCCGCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAG

AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp  
421 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCCG  
GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg  
481 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACCCATATTTAAAATCA  
TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGT

MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu  
541 GGATGTACGTGGGAGGGGTGCAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCG  
CCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGC

ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr  
601 AACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA  
TTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle  
661 CACAGTGGCAGGTCCCTCCCGTGTTCCTTCAACAACCCTACCAGCCTTGTCCACCGGCCTCA  
GTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCCGAACAGGTGGCCGGAGT

HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla  
721 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG  
AGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCAGTTCGTAGC

SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArg  
781 CGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCTGTTCTCTTCTGCTTGACAGACGCGC  
GCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCGCGCG

ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn  
841 GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGA  
CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTCCGCCGAACCTCT

LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal  
901 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCCTCG  
TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

961 PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe  
TGTTCTTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCT  
ACAAGAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCATTACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGA

1021 TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu  
TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGC  
AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTTCGCCCGCATGCGCG

1081 AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr  
TGGACACGGAGGTGGCCGCGTCTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCCGGTTGATGGCGCTGA  
ACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCAACTACCGCGACT

1141 LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu  
CTCTGTCAACATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTC  
GAGACAGTGGTATAATGTTTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG

1201 ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg  
TGACCAGAGTGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGC  
ACTGGTCTACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGC

1261 AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys  
GCGACGCCGTACTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCA  
CGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGT

1321 LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValPro  
AATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGTCTAAAGTAC  
TTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTCATG

1381 TyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGly  
CCTACTTTGTGCGGTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCGCGGTTAGCGCGGAAGATGATCG  
GGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGC

1441 GlyHisTyrValGlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyr  
GAGGCCATTACGTGCAAAATGGTCAATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTT  
CTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTCAATCCCCGGAATGACCGTGGATACAAA

1501 AsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAla  
ATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGG  
TATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTGCGGAACGCTCTAGACCGGCACC

1561 ValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThr  
CTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATA  
GACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCGCTAT

1621 AlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIle  
CCGCCGCGTCCGGTGACATCATCAACGGCTTGCCGTGTTCCGCCCCAGGGGCCGGGAGA  
GGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGGCCTCCCCGGCCCTCT

1681 LeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThr  
TACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGTGGAGGTGCTGGCGCCCATCA  
ATGACGAGCCCGGTCCGGTACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCAACGACCGCGGTAGT

1741 AlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArg  
CGGCGTACGCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAAGTGGCC  
GCCCATGCGGGTCTGTTCCCGGAGGATCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGG

1801 AspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeu  
GGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGGAGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCAAACCTTCC  
CCCTGTTTTTGGTTACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGAAGG

1861 AlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIle  
TGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCA  
ACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACCTGACAGATGGTGGCCCGGCCTTGCTCCTGGT

AlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGly

1921 TCGCGTCAACCAAGGGTCCTGTTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGG  
AGCGCAGTGGGTTCCAGGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACC

TrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeu  
1981 GCTGGCCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCCTGCACTTGC GGCTCCTCGGACC  
CGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAAGTGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGG

TyrLeuValThrArgHisAlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGly  
2041 TTTACCTGGTCAAGGACGCGCGATGTTCATCCCGTGC GCCGGGGGTGATAGCAGGG  
AAATGGACCAGTGTCCGTGCGGCTACAGTAAGGGCACGCGGCCGCCACTATCGTCCC

SerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeu  
2101 GCAGCCTGCTGTGCCCCGGCCATTTCTACTTGAAAGGCTCCTCGGGGGTCCGCTGT  
CGTCGGACGACAGCGGGGCCGGTAAAGGATGAACTTCCGAGGAGCCCCCAGGCGACA

CysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAla  
2161 TGTGCCCCGCGGGCACGCGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGG  
ACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAATCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACC

LysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPhe  
2221 CTAAGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGT  
GATTCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACA

ThrAspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAla  
2281 TCACGGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGC CCGAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATG  
AGTGCCATTGAGGAGAGGTGGTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTAC

ProThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLys  
2341 CTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATA  
GAGGGTGTCCGTGCGCCGTTTTCTGTTCCAGGGCCGACGTATACGTCGAGTCCCGATAT

ValLeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLys  
2401 AGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGTCTACATGTCCA  
TCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGT

AlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerPro  
2461 AGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCC  
TCCGAGTACCCTAGCTAGGATGTAGTCTTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCCG

IleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyr  
2521 CCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGGCGACGGCGGGTGTCCGGGGGGCGCTT  
GGTAGTGATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGCGAA

AspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGly  
2581 ATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCG  
TACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGC

ThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThr  
2641 GCACTGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCA  
CGTGACAGGAAC TGGTTCGTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGT

ProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThr  
2701 CCCCTCCGGGCTCCGTCCTGTCGCCCATCCCAACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCA  
GGGGAGGCCCCGAGGACGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGT

GlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHis  
2761 CCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGAC  
GGCCTCTCTAGGGAAAATGCCGTTCCGATAGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCTCTG

LeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeu  
2821 ATCTCATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGGCAGCAACTCGCCGCAAAGCTGGTTCGCAT  
TAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTA

GlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGly  
2881 TGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGTCTTGACGTGTCGGTCATCCCCACAGCG  
ACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAAGTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCCG

2941 AspValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSer  
GCGATGTTGTCGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGGGACTTCGACT  
CGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGA

3001 ValIleAspCysAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPhe  
CGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTCACCCAGACAGTTCGATTTCAGCCTTGACCCTACCT  
GCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTCTGTCAGCTAAAGTCGGAACCTGGGATGGA

3061 ThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg  
TCACCATTGAGACAATCACGCTCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCA  
AGTGGTAACTCTGTTAGTGCAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGT

3121 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly  
GGACTGGCAGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCAGGGGGAGCGCCCTCCG  
CCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGC

3181 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu  
GCATGTTGACTCGTCCGTCCTCTGTGAGTGTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGC  
CGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCG

3241 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal  
TCACGCCCCGCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCG  
AGTGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGC

3301 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla  
TGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATG  
ACACGGTCTGGTAGAACTTAAACCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTAC

3361 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln  
CCCCTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACC  
GGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGCATGG

3421 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys  
AAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGT  
TTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCA

3481 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla  
GTTTGATTGCGCTCAAGCCCACCTCCATGGGCCAACCCCTGCTATACAGACTGGGCG  
CAAATAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGATAGTCTGACCCGC

3541 ValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSer  
CTGTTCAGAATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGT  
GACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACA

3601 AlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeu  
CGGCCGACCTGGAGGTGCTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGCGTCTGGCTGCTT  
GCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTTGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGACGAA

3661 AlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGly  
TGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGCTTGTCCG  
ACCGGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCACTATCACCCGTCACGAGAACAGGC

3721 LysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGlu  
GGAAGCCGGCAATCATACTGACAGGGAAGTCCCTTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAG  
CCTTCCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGTACTCTACCTTC

3781 CysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGln  
AGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGC  
TCACGAGAGTCTGTAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGCTCGTCAAGTTCG

3841 LysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaVal  
AGAAGGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGGCTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCTGCTG  
TCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGAC

GlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSer

3901 TCCAGACCAACTGGCAAAAACCTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCA  
AGGTCTGGT1GACCGTTTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGT  
GlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeu  
3961 GTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCATTGCTTCAT  
CACCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTA  
MetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsn  
4021 TGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACGACCCACTAACCCTAGCCAAACCCCTCTCTTCA  
ACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGT  
IleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheVal  
4081 ACATATTGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTG  
TGATAACCCCCCACCACCGACGGTTCGAGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAAC  
GlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAsp  
4141 TGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAG  
ACCCGCGACCGAATCGACCGCGGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATC  
IleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSer  
4201 ACATCCTTGCAGGGTATGGCGGGGCTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGA  
TGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCCTAGTACT  
GlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGly  
4261 GCGGTGAGGTCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCG  
CGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGC  
AlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlu  
4321 GAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCG  
CTCGGGAGCATCAGCCGCACCAGACGTCGTTATGACCGGGCCGTGCAACCGGGCCCCG  
GlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer  
4381 AGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGAACCATGTTT  
TCCCCGTACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAA  
ProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSer  
4441 CCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGGATGCAGCTGCCCGGCTCACTGCCATACTCAGCA  
GGGGGTGCGTGATGCACGGCCTCTCGCTACGTCGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCTG  
LeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThr  
4501 GCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCA  
CGGAGTGACATTGGGTTCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTTCGAGCCTCACATGGT  
ProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAsp  
4561 CTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCG  
GAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACAACCTCGC  
PheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSer  
4621 ACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGT  
TGAAATTCGGACCGATTTTCGATTTCGAGTACGGTGTGACGGACCCCTAGGGGAAACACA  
CysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHis  
4681 CCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCC  
GGACGGTTCGCGCCATATTCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGG  
CysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArg  
4741 ACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTTCGGTCTTA  
TGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGAT  
ThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCys  
4801 GGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCCCT  
CCTGGACGTCTTGTACACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGGA  
ThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyr  
4861 GTACCCCTTCTCTGCGCCGAACCTACACGTTCCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAAT  
CATGGGGGAAGGACCGGGCTTGATGTGCAAGCGGATACCTCCACAGACGTCTCCTTA

4921 ValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeu  
ATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATC  
TACACCTCTATTCCGTCCACCCCCTGAAGGTGATGCACCTGCCATACTGATGACTGTTAG

4981 LysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeu  
TCAAATGCCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCC  
AGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGG

5041 HisArgPheAlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGly  
TACATAGGTTTGGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTGAGAGTAG  
ATGATCCAAACGCGGGGGACGTTTCGGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATC

5101 LeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaVal  
GACTCCACGAATACCCGGTAGGGTTCGCAATTACCTTGCAGCCCGAACCGGACGTGGCCG  
CTGAGGTGCTTATGGGCCATCCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGC

5161 LeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeu  
TGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGGCGGGCGAAGGT  
ACAACCTGCAGGTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCGTCTCCGCCGGCCGCTTCCA

5221 AlaArgGlySerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSer  
TGGCGAGGGGATCACCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCAT  
ACCGCTCCCCTAGTGGGGGGAGACACCGGTTCGAGGAGCCGATCGGTTCGATAGGCGAGGTA

5281 LeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsn  
CTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGACTCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCA  
GAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGT

5341 LeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysVal  
ACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAG  
TGGAGGATACCTCCGTCTCTACCCGCCGTTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTC

5401 ValIleLeuAspSerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerVal  
TGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCG  
ACCACCTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACACCGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGC

5461 ProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArg  
TACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGATTGCCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGC  
ATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCCTTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCCGC

5521 ProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProVal  
GGCCGACTATAACCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTG  
CCGCCTGATATTGGGGGGGATCACCTCTGCACCTTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGAC

5581 ValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValProProProArgLysLys  
TGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCCTCCTGTGCCTCCGCCTCGGAAGA  
ACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCT

5641 ArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArg  
AGCGGACGGTGGTCTCACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCA  
TCGCCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGT

5701 SerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGlu  
GAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTG  
CTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGAC

5761 ProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProPro  
AGCCCGCCCTTCTGGCTGCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCTCCATGCCCC  
TCGGGCGGGGAGACCAGCGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGG

5821 LeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSer  
CCCTGGAGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTA  
GGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTACCAGTTGCCAGTCAT

GluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeu

5881 GTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGGGCGCAC  
CACTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTG

ValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeu  
5941 TCGTACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAAGTGCATCAATGACTAAGCAACTCGT  
AGCAGTGGGGCACGCGGCCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTGTTGAGCA

LeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLys  
6001 TGCTACGTACACCACAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGA  
ACGATGCAGTGGTGTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCCTCACGAACGGTTTCCGTCT

LysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGlu  
6061 AGAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGG  
TCTTTCAGTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCGGTAAATGGTCTGCATGAGTTCC

ValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSer  
6121 AGTAAAGCAGCGCGTCAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCA  
TCCAATTCGTGCGCCGAGTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGT

LeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCys  
6181 GCCTGACGCCCCCACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAGACGTCCGTT  
CGGACTGCGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCCGTTTTCTGCAGGCAA

HisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsn  
6241 GCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACA  
CGGTACGGTCTTTCGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTCTGGAAGACCTTCTGT

ValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysValGlnProGlu  
6301 ATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCGTTCAGCCTG  
TACATTTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAAGACGCAAGTCGGAC

LysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyValArgValCys  
6361 AGAAGGGGGTTCGTAAGCCAGCTCGTCTCA'CGTGTTC'CCCGATCTGGGCGTGC'CGTGT'  
TCTTCC'CC'AGCATT'CGGT'CGAGCAGAGTAGCACAAGGGGCTAGACCCGCACGCGCACA

GluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMetGlySerSer  
6421 GCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCC'CC'CTTGGCCGTGATGGGAAGCT  
CGTTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACTACCCTTCGA

TyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSer  
6481 CCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAAGT  
GGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTGTGCGCCAACTTAAGGAGCACGTTTCGCACCTTCA

LysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThrValThrGlu  
6541 CCAAGAAAACCCCAATGGGGTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTG  
GGTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGAC

SerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArg  
6601 AGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTCGACCCCAAGCCC  
TCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATGGTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCCGG

ValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArg  
6661 GCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCAGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAA  
CGCACCGGTAGTTTACGGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCGGGAGAATGGTTAAGTT

GlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGly  
6721 GGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGGAGCGGCTACTGACAAGTACTGTTG  
CCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCGATGACTGTTGATCGACAC

AsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAsp  
6781 GTAACCCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGTCGAGCCGAGGGCTCCAGG  
CATGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCCCGTCCGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCC

CysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyValGln  
6841 ACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCC  
TGACGTGGTACGAGCACACCCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGG

6901 GluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaProPro  
AGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCC  
TCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGG

6961 GlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsnVal  
CTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACG  
GACCCCTGGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTGC

7021 SerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThr  
TGTCAGTCGCCCACGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAA  
ACAGTCAGCGGGTGTGCCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTT

7081 ProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGly  
CCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCTGGCTAG  
GGGGGAGCGCTCTCGACGCACCTCTGTGCTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATC

7141 AsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePhe  
GCAACATAATCATGTTTGGCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCT  
CGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGA

7201 SerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAla  
TTAGCGTCCTTATAGCCAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGG  
AATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCCAACCTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCC

7261 CysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu  
CCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC  
GGACGATGAGGTATCTTGGTGAACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG

47-8. ÁBRA