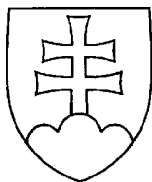


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **28. 6. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/302 077**
60/365 956
60/369 224
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **28. 6. 2001**
19. 3. 2002
29. 3. 2002
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: **US, US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 1. 2005**
Vestník ÚPV SR č.: **1/2005**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/US02/20684**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO03/002753**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1575-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

C12Q 1/68
//C12N 15/53
(C12Q 1/68,
C12R 1:92)

(71) Prihlasovateľ: **CHIRON CORPORATION, Emeryville, CA, US;**

(72) Pôvodca: **Pichuantes Sergio, El Cerrito, CA, US;**
Shyamala Venkatakrishna, Oakland, CA, US;

(74) Zástupca: **Bezák Marián, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Diagnosticke skúšky pre parvovírus B19**

(57) Anotácia:
Opisujú sa priméry a sondy ľudského parvovírusu B19 pre konzervované oblasti genómu parvovírusu B19. Rovnako sa opisujú skúšky s použitím týchto primérov a sond založené na nukleových kyselinách.

SK 1575-2003 A3

DIAGNOSTICKÉ SKÚŠKY PRE PARVOVÍRUS B19

Oblasť techniky

Tento vynález sa všeobecne týka vírusovej diagnostiky. Konkrétne sa tento vynález týka skúšok založených na nukleových kyselinách na presnú diagnostiku infekcie parvovírusom B19 a primérov a sond používaných pri týchto skúškach.

Doterajší stav techniky

Ľudský parvovírus B19 je členom čeľade *Parvoviridae*, rod *Erythrovírus* a je to malý ikozaedrálny vírus bez obálky s lineárnou jednovláknovou molekulou DNA so zhruba 5600 nukleotidmi. Vírusový genóm kóduje tri hlavné proteíny, VP1, VP2 a NS1. Pozri Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986) a obrázok 1 tu. VP1 (83 kDa) a VP2 (58 kDa) sú štruktúrne proteíny kapsidy. Tieto dva proteíny sa kódujú v presahujúcich čítacích rámcoch od nukleotidov zhruba 2444 až 4789 a zhruba 3125 až 4789. VP2 tvorí 95 % kapsidy a väčší proteín VP1 iba 5 % kapsidy. VP1 je potrebný pre zrelú konformáciu vírusov. NS1 (77 kDa) je neštruktúrny proteín a je prítomný len v nukleárnej frakcii infikovaných buniek a chýba v cytoplazme a intaktných viriónoch v sére.

Parvovírus B19 bol prvýkrát objavený v krvnom sére normálnych darcov krvi a je to jediný člen čeľade *Parvoviridae*, ktorý je patogénny pre človeka. Tento vírus súvisí so širokým rozmedzím chorobných prejavov. Ľudský parvovírus B19 normálne spôsobuje asymptomatickú či miernu infekciu u detí, ktorá sa samotná obmedzuje. U dospelých môže parvovírus B19 spôsobiť vyrážku, prechodnú symetrickú polyartralgiiu a artritídu. Parvovírus B19 súvisí s prechodnou aplastickou krízou (TAC) u pacientov, ktorých základným ochorením sú hemolytické poruchy. Chronická infekcia B19 a perzistentná anémia sa uvádzajú u pacientov s akútnou leukémiou a ohrozenou imunitou,

s vrodenými nedostatkami imunity, s AIDS a po transplantácii kostnej drene. Parvovírus B19 rovnako súvisí so smrťou plodu u tehotných žien.

Vo väčšine krajín sa infekcia vírusom B19 vyskytuje všeobecne v detstve, takže zhruba 50 % detí vo veku 15 rokov má protilátky proti B19. Výskyt protilátok proti B19 sa môže ďalej v priebehu života zvyšovať a u starších osôb dosahuje hodnoty vyššie ako 90 %.

Predpokladá sa, že v prípade infekcie ľudským parvovírusom B19 nastáva počiatočná vírusová replikácia v dýchacích cestách. Potom sa vírus zameriava na bunky v kostnej dreni. To vedie k vírusovej replikácii vo veľkom meradle s udávanou virémiou medzi 10^2 až 10^{14} častíc/ml nastávajúcou 7 až 10 dní po infekcii, avšak pred nástupom symptómov. Zmiznutie virémie sa časovo zhoduje s detekciou špecifických protilátok IgM, ktorých hodnota zostáva zvýšená počas 2 až 3 mesiacov. Protilátky IgG proti B19 sa detekujú niekoľko dní po výskyte protilátok IgM a pretrvávajú celý život.

Neprítomnosť lipidovej obálky a obmedzený obsah DNA spôsobí, že parvovírus B19 sa stane mimoriadne odolným voči fyzikálnochemickej inaktivácii. Parvovírus B19, hlavne pri vysokej koncentrácii, dokáže zniesť konvenčné tepelné spracovanie krvných produktov a dokumentoval sa prenos B19 podaním faktora VIII spracovaného rozpúšťadlom s detergentom a faktora VIII a IX spracovaného horúcou parou alebo teplom za sucha.

Ľudský parvovírus B19 nemôže rásť v konvenčných bunkových kultúrach, takže laboratórna detekcia a izolácia tohto vírusu je mimoriadne ťažká. Preto je mnoho rokov jediným zdrojom antigénu sérum od viremických pacientov. V snahe obísť tieto problémy sa vyrábajú rekombinantné antigény na použitie v sérologických skúškach. Pozri napríklad Sisk a Berman, Biotechnology, 5, 1077 - 1080 (1987), US patent č. 6 204 044. Imunoenzymatické skúšky založené na zachytení IgM sa používajú na detekciu IgM proti B19 a na diagnostiku čerstvej infekcie B19. Diagnostická výkonnosť radu komerčne dostupných skúšok však nie je homogénna. Navyše diagnostické skúšky založené na IgM nemôžu detekovať vírus v priebehu viremického štádia infekcie a len čo vzniknú IgM protilátky, môžu zostávať

v krvnom obehu niekoľko mesiacov po skončení virémie.

Vysoký výskyt protilátok proti B19 u normálnej populácie spolu so skutočnosťou, že vysoká virémia zvyčajne pretrváva iba počas jedného týždňa, zapríčiní, že sérologické skúšky sa ťažko vykonávajú. Navyše u pacientov s ohrozenou imunitou môže byť sérologická diagnóza nespoľahlivá.

Hybridizačné skúšky založené na nukleových kyselinách, ako je blotovanie a hybridizácia *in situ*, sa použili na detekciu B19. Tieto skúšky majú všeobecne detekčné medze 1 až 0,1 pg vírusovej DNA (zhruba 10^4 až 10^5 vírusových častíc). PCR má vyššiu citlivosť (zhruba 100 genómových kópií). Avšak DNA hybridizačné spôsoby sú časovo náročné a ich použitie je obmedzené a PCR sa zle prakticky uskutočňuje pre screening veľkých počtov vzoriek.

Preto pretrváva potreba vývoja spoľahlivých diagnostických skúšok na detekciu parvovírusu B19 vo viremických vzorkách, aby sa predišlo prenosu vírusu krvnými a plazmatickými derivátmi alebo tesným osobným stykom.

Podstata vynálezu

Tento vynález sa zakladá na objave jedinečných primérov a sond na použitie v skúškach pomocou nukleových kyselín rovnako tak ako na vývoji citlivej a spoľahlivej diagnostickej skúšky založenej na nukleových kyselinách na detekciu DNA parvovírusu B19 v biologických vzorkách od potenciálne infikovaných osôb. Spôsoby, ktoré sa tu opisujú, používajú DNA extrahovanej vzorky ako templát na amplifikáciu zachovaných genómových oblastí sekvencie B19 s použitím amplifikácie sprostredkovanej transkripciou (TMA) rovnako ako v 5' nukleázovej skúške, ako je spôsob TaqMan™. Tieto spôsoby umožňujú detekciu DNA B19 vo viremických vzorkách majúcich titre vírusov iba 10^3 vírusových častíc/ml. V súlade s tým možno infikované vzorky identifikovať a vylučovať z transfúzie rovnako tak ako z prípravy krvných derivátov. Sondy a priméry, ktoré sa tu opisujú, sú rovnako použiteľné napríklad pri štandardných hybridizačných spôsoboch rovnako tak ako pri spôsoboch založených na PCR,

pri amplifikácii na báze sekvencie nukleových kyselín (NASBA) a pri skúškach používajúcich rozvetvené molekuly DNA.

V súlade s tým sa jedno uskutočnenie tohto vynálezu zameriava na spôsob detekcie ľudského parvovírusu B19 v biologickej vzorke. Tento spôsob zahŕňa:

(a) izoláciu nukleovej kyseliny z biologickej vzorky, u ktorej je podozrenie, že obsahuje DNA ľudského parvovírusu B19, kde táto nukleová kyselina zahŕňa cieľovú sekvenciu RNA,

(b) reakciu izolovanej nukleovej kyseliny parvovírusu B19 s prvým oligonukleotidom, ktorý zahŕňa prvý primér obsahujúci komplexačnú sekvenciu dostatočne komplementárnu k 3'-terminálnej časti cieľovej sekvencie RNA kvôli spojeniu s ňou, kde tento prvý primér ďalej zahŕňa promótor pre DNA-dependentnú RNA polymerázu 5' a je operabilne pripojený ku komplexačnej sekvencii, kde sa reakcia uskutočňuje za podmienok zaistujúcich tvorbu komplexu oligonukleotid/cieľová sekvencia a začatie syntézy DNA,

(c) extenziu prvého priméru reakciou extenzie používajúcej sekvenciu cieľovej RNA ako templát za získania prvého produktu extenzie priméru DNA komplementárneho cieľovej sekvencii RNA,

(d) separáciu prvého produktu extenzie priméru DNA z cieľovej sekvencie RNA s použitím enzýmu, ktorý selektívne degraduje cieľovú sekvenciu RNA,

(e) spracovanie produktu extenzie priméru DNA druhým oligonukleotidom, ktorý zahŕňa druhý primér obsahujúci komplexačnú sekvenciu dostatočne komplementárnu k 3'-terminálnej časti produktu extenzie priméru DNA tak, aby sa vytvoril komplex za podmienok zaistujúcich tvorbu komplexu oligonukleotid/cieľová sekvencia a začatie syntézy DNA,

(f) extenziu konca 3' druhého priméru v reakcii extenzie DNA za získania druhého produktu extenzie priméru DNA, čím sa získa templát pre DNA-dependentnú RNA polymerázu,

(g) použitie templátu na vytvorenie viacerých kópií RNA cieľovej sekvencie s použitím DNA-dependentnej RNA polymerázy, ktorá rozpoznáva promótorovú sekvenciu a

(h) použitie kópií RNA z kroku (g) s autokatalytickým opakovaním krokov (b) až (g) kvôli amplifikácii cieľovej sekvencie.

V určitých uskutočneniach tento spôsob ďalej obsahuje kroky:

(i) pridanie značenej oligonukleotidovej sondy k produktu kroku (h), kde táto oligonukleotidová sonda je komplementárna k časti cieľovej sekvencie za podmienok zaisťujúcich hybridizáciu sondy s cieľovou sekvenciou za získania komplexu sonda/cieľová sekvencia a

(j) detekcia prítomnosti či neprítomnosti značky ukazujúcej na prítomnosť či neprítomnosť cieľovej sekvencie.

V ďalších uskutočneniach je touto značkou akridíniumester.

V ešte ďalších uskutočneniach sa prvý a druhý primér a sonda použité vo vyššie opísaných spôsoboch odvodzujú od oblasti VPI genómu ľudského parvovírusu B19, ako je to od polynukleotidovej sekvencie znázornenej na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U alebo 11A až 11Z.

V ďalšom uskutočnení sa tento vynález zameriava na spôsob detekcie infekcie ľudským parvovírusom B19 v biologickej vzorke. Tento spôsob zahŕňa:

(a) izoláciu nukleovej kyseliny z biologickej vzorky, u ktorej je podozrenie, že obsahuje DNA ľudského parvovírusu B19, kde táto nukleová kyselina obsahuje cieľovú sekvenciu RNA,

(b) reakciu nukleovej kyseliny izolovaného parvovírusu B19 s prvým oligonukleotidom, ktorý obsahuje prvý primér zahrňujúci komplexačnú sekvenciu dostatočne komplementárnu k časti konca 3' cieľovej sekvencie RNA, aby spolu tvorili komplex, kde prvý primér ďalej obsahuje promótor pre DNA-dependentnú RNA polymerázu 5' a operabilne sa pripája ku komplexačnej sekvencii, kde tento prvý primér obsahuje sekvenciu odvodenú

od polynukleotidovej sekvencie znázornenej na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U alebo obrázkov 11A až 11Z a reakcia sa uskutočňuje za podmienok zaistujúcich tvorbu komplexu oligonukleotid/cieľová sekvencia a začatie syntézy DNA,

(c) extenziu prvého priméru reakciou extenzie s použitím sekvencie cieľovej RNA ako templátu za získania prvého produktu extenzie priméru DNA komplementárneho cieľovej sekvencii RNA,

(d) oddelenie prvého produktu extenzie priméru DNA od cieľovej sekvencie RNA s použitím enzýmu, ktorý selektívne degraduje cieľovú sekvenciu RNA,

(e) spracovanie produktu extenzie priméru DNA druhým oligonukleotidom, ktorý zahŕňa druhý primér obsahujúci komplexačnú sekvenciu dostatočne komplementárnu k 3'-terminálnej časti produktu extenzie priméru DNA, aby spolu tvorili komplex, kde sa tento druhý primér odvodzuje od polynukleotidovej sekvencie znázornenej na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U alebo obrázkov 11A až 11Z a spracovanie sa vykoná za podmienok zaistujúcich tvorbu komplexu oligonukleotid/cieľová sekvencia a začatie syntézy DNA,

(f) extenziu konca 3' druhého priméru v reakcii extenzie DNA za získania druhého produktu extenzie priméru DNA, čím sa získa templát pre DNA-dependentnú RNA polymerázu,

(g) použitie templátu na tvorbu viacerých kópií RNA cieľovej sekvencie s použitím DNA-dependentnej RNA polymerázy, ktorá rozpoznáva promótorovú sekvenciu a

(h) použitie kópií RNA z kroku (g) autokatalytickým opakovaním krokov (b) až (g) kvôli amplifikácii cieľovej sekvencie,

(i) pridanie oligonukleotidovej sondy značenej akridíniometerom k produktu z kroku (h), kde táto oligonukleotidová sonda je komplementárna k časti cieľovej sekvencie a táto sonda sa odvodzuje od polynukleotidovej sekvencie znázornenej na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U, kde táto sonda

sa pridáva za podmienok, ktoré zaisťujú hybridizáciu sondy s cieľovou sekvenciou a vytvorením komplexu sonda/cieľová sekvencia a

(j) detekciu prítomnosti či neprítomnosti značky, ktorá ukazuje na prítomnosť či neprítomnosť cieľovej sekvencie.

V ešte ďalšom uskutočnení sa tento vynález zameriava na spôsob amplifikácie cieľovej sekvencie nukleotidu parvovírusu B19. Tento spôsob zahŕňa:

(a) izoláciu nukleovej kyseliny z biologickej vzorky, u ktorej je podozrenie, že obsahuje DNA ľudského parvovírusu B19, kde táto nukleová kyselina zahŕňa cieľovú sekvenciu RNA,

(b) pridanie jedného či viacerých primérov schopných hybridizácie s cieľovou sekvenciou RNA, kde sa tento jeden či viacero primérov odvodzuje od polynukleotidovej sekvencie znázornenej na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U a obrázkov 11A až 11Z,

(c) pridanie oligonukleotidovej sondy schopnej hybridizácie s cieľovou sekvenciou RNA 3' vzhľadom k jednému či viacerým primérom,

(d) extenziu jedného či viacerých primérov s použitím polymerázy.

V určitých uskutočneniach sa cieľová sekvencia RNA z kroku (a) podrobí reverznej transkripcii za získania cDNA a tento spôsob môže ďalej zahŕňať amplifikáciu cDNA s použitím polymerázovej reťazovej reakcie (RT-PCR) alebo ligázovej reťazovej reakcie s asymetrickou medzerou (RT-AGLCR). V ďalších uskutočneniach je touto polymerázou termostabilná polymeráza, ako je, avšak bez obmedzenia, Taq polymeráza alebo Vent polymeráza. V ďalších uskutočneniach je touto polymerázou polymeráza I DNA *E. coli*, Klenow fragment polymerázy I DNA *E. coli* alebo polymeráza DNA T4.

V určitých uskutočneniach rôznych vyššie opísaných spôsobov sa zaisťuje vnútorná kontrola. Túto vnútornú kontrolu možno odvodiť od sekvencie na obrázku 12 (číslo identifikácie sekvencie: 92). V ďalších uskutočneniach táto vnútorná kontrola zahŕňa sekvenciu s identifikačným číslom 90.

V ďalších uskutočneniach sa tento vynález zameriava na spôsob detekcie infekcie ľudským parvovírusom B19 v biologickej vzorke. Tento spôsob zahŕňa:

(a) izoláciu nukleovej kyseliny z biologickej vzorky, u ktorej je podozrenie, že obsahuje DNA ľudského parvovírusu B19, kde táto nukleová kyselina obsahuje cieľovú sekvenciu,

(b) reakciu izolovanej nukleovej kyseliny parvovírusu B19 s detegovateľne značenou sondou dostatočne komplementárnou k cieľovej sekvencii a schopnou hybridizácie s cieľovou sekvenciou, kde sa táto sonda odvodzuje od polynukleotidových sekvencií znázornených na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U alebo obrázkov 11A až 11Z a ďalej, kde sa táto reakcia uskutočňuje za podmienok zaistujúcich vytvorenie komplexu sonda/cieľová sekvencia a

(c) detekciu prítomnosti či neprítomnosti značky, ktorá ukazuje na prítomnosť či neprítomnosť cieľovej sekvencie.

V ďalších uskutočneniach sa tento vynález zameriava na polynukleotid obsahujúci nukleotidovú sekvenciu zahrňujúcu ktorúkoľvek z nukleotidových sekvencií znázornených na obrázkoch 2A až 2U alebo 11A až 11Z.

V ďalších uskutočneniach sa tento vynález zameriava na polynukleotid ako vyššie, v ktorom nukleotidová sekvencia spočíva v nukleotidovej sekvencii znázornenej na obrázkoch 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O, 2P, 2Q, 2R, 2S, 2T, 2U, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G, 11I, 11J, 11K, 11L, 11M, 11N, 11O, 11P, 11Q, 11R, 11S, 11T, 11U, 11V, 11W, 11X, 11Y alebo 11Z.

V ešte ďalších uskutočneniach sa tento vynález zameriava na polynukleotid obsahujúci nukleotidovú sekvenciu zahrňujúcu ktorúkoľvek z nukleotidových sekvencií znázornených na obrázkoch 3A až 3C alebo 4A až 4C.

V ďalších uskutočneniach sa tento vynález zameriava na polynukleotid ako vyššie, v ktorom nukleotidová sekvencia spočíva v nukleotidovej sekvencii znázornenej na obrázkoch 3A až 3C alebo na obrázkoch 4A až 4C.

V ďalšom uskutočnení sa tento vynález zameriava na oligonukleotidový primér obsahujúci promótorovú oblasť rozpoznávanú DNA-dependentnou RNA polymerázou operabilne pripojenou ku komplexačnej sekvencii špecifickej pre ľudský parvovírus B19 so zhruba 10 až zhruba 75 nukleotidmi. V určitých uskutočneniach je touto promótorovou oblasťou promótor T7 a touto polymerázou je RNA polymeráza T7. Navyše môže byť sekvencia špecifická pre ľudský parvovírus B19 z oblasti VP1 genómu ľudského parvovírusu B19, ako napríklad z polynukleotidovej sekvencie znázornenej na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U alebo obrázkov 11A až 11Z.

V ešte ďalších uskutočneniach sa tento vynález zameriava na oligonukleotidový primér obsahujúci promótor T7 operabilne pripojený ku komplexačnej sekvencii špecifickej pre ľudský parvovírus B19 so zhruba 10 až zhruba 75 nukleotidmi, kde sa komplexačná sekvencia špecifická pre ľudský parvovírus B19 odvodzuje od polynukleotidovej sekvencie znázornenej na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U alebo 11A až 11Z.

V ďalšom uskutočnení sa tento vynález zameriava na oligonukleotidovú sondu obsahujúcu hybridizačnú sekvenciu špecifickú pre parvovírus B19 so zhruba 10 až zhruba 50 nukleotidmi pripojenú k akridíniumesterovej značke. V niektorých uskutočneniach je hybridizačná sekvencia špecifická pre ľudský parvovírus B19 z oblasti VP1 genómu ľudského parvovírusu B19, ako napríklad z polynukleotidovej sekvencie znázornenej na ktoromkoľvek z obrázkov 2A až 2U alebo obrázkov 11A až 11Z.

V ešte ďalšom uskutočnení sa tento vynález zameriava na diagnostickú súpravu obsahujúcu jeden či viacero oligonukleotidových primérov, ktoré sa tu opisujú a pokyny na vykonávanie diagnostickej skúšky. V určitých uskutočneniach táto súprava ďalej obsahuje oligonukleotidovú sondu zahrňujúcu hybridizačnú sekvenciu špecifickú pre parvovírus B19 so zhruba 10 až zhruba 50 nukleotidmi pripojenú na akridíniumesterovú značku.

Tieto a ďalšie aspekty tohto vynálezu sú jasné s odkazom na nasledujúci podrobný opis a pripojené výkresy.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 je diagram znázorňujúci genóm ľudského parvovírusu B19, zobrazujúci rôzne kódovacie oblasti vírusu. Zobrazujú sa tri fragmenty PCR, jeden so zhruba 700 bp zodpovedajúci polohám nukleotidu 2936 až 3635 genómu parvovírusu B19 opísanému v Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986), jeden so zhruba 370 bp v rámci fragmentu 700 bp zodpovedajúci polohám nukleotidu 3073 až 3442 genómu parvovírusu B19 opísanému v Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986) a jeden so zhruba 214 bp zodpovedajúci polohám nukleotidu 4728 až 4941 genómu parvovírusu B19 opísanému v Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986).

Obrázky 2A až 2U (čísla identifikácie sekvencie 1 - 21) zobrazujú sekvencie DNA z rôznych izolátov parvovírusu B19 vrátane sekvencií zodpovedajúcich polohám nukleotidu 2936 až 3635 genómu parvovírusu B19 opísanému v Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986) (fragment 700 bp z obrázku 1). Obrázok 2A (číslo identifikácie sekvencie 1) zodpovedá sekvencii z izolátu CH47-26, obrázok 2B (číslo identifikácie sekvencie 2) zodpovedá sekvencii z izolátu CH48-29, obrázok 2C (číslo identifikácie sekvencie 3) zodpovedá sekvencii z izolátu CH33-2, obrázok 2D (číslo identifikácie sekvencie 4) zodpovedá sekvencii z izolátu CH33-3, obrázok 2E (číslo identifikácie sekvencie 5) zodpovedá sekvencii z izolátu CH33-4, obrázok 2F (číslo identifikácie sekvencie 6) zodpovedá sekvencii z izolátu CH42-7, obrázok 2G (číslo identifikácie sekvencie 7) zodpovedá sekvencii z izolátu CH42-18, obrázok 2H (číslo identifikácie sekvencie 8) zodpovedá sekvencii z izolátu CH42-19, obrázok 2I (číslo identifikácie sekvencie 9) zodpovedá sekvencii z izolátu CH46-23, obrázok 2J (číslo identifikácie sekvencie 10) zodpovedá sekvencii z izolátu CH1-1, obrázok 2K (číslo identifikácie sekvencie 11) zodpovedá sekvencii z izolátu CH1-6, obrázok 2L (číslo identifikácie sekvencie 12) zodpovedá sekvencii z izolátu CH2-8, obrázok 2M (číslo identifikácie

sekvencie 13) zodpovedá sekvencii z izolátu CH2-10, obrázok 2N (číslo identifikácie sekvencie 14) zodpovedá sekvencii z izolátu CH2-11, obrázok 2O (číslo identifikácie sekvencie 15) zodpovedá sekvencii z izolátu CH5-13, obrázok 2P (číslo identifikácie sekvencie 16) zodpovedá sekvencii z izolátu CH7-22, obrázok 2Q (číslo identifikácie sekvencie 17) zodpovedá sekvencii z izolátu CH13-27, obrázok 2R (číslo identifikácie sekvencie 18) zodpovedá sekvencii z izolátu CH14-33, obrázok 2S (číslo identifikácie sekvencie 19) zodpovedá sekvencii z izolátu CH62-2, obrázok 2T (číslo identifikácie sekvencie 20) zodpovedá sekvencii z izolátu CH64-2 a obrázok 2U (číslo identifikácie sekvencie 21) zodpovedá sekvencii z izolátu CH67-2.

Obrázky 3A až 3C (číslo identifikácie sekvencie 22) ukazujú sekvenciu pre fragment zhruba 4,7 kbp PCR ukázaný na obrázku 1 z klonu 2-B1 parvovírusu B19. Sekvencia je fragment so 4677 nukleotidmi zodpovedajúci polohám nukleotidu 217 až 4893, ako opisuje Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986). Znázornená sekvencia obsahuje otvorený čítací rámec plnej dĺžky parvovírusu B19, ktorý kóduje NS1, VP1 a VP2 plus ďalšie nepreložené sekvencie 5' a 3'.

Obrázky 4A až 4C (číslo identifikácie sekvencie 23) ukazujú sekvenciu pre fragment PCR zhruba 4,7 kbp ukázaný na obrázku 1 z klonu 2-B6 parvovírusu B19. Sekvencia je fragment so 4677 nukleotidmi zodpovedajúci polohám nukleotidu 217 až 4893, ako opisuje Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986). Znázornená sekvencia obsahuje otvorený čítací rámec plnej dĺžky parvovírusu B19, ktorý kóduje NS1, VP1 a VP2 plus ďalšie nepreložené sekvencie 5' a 3'.

Obrázky 5A (číslo identifikácie sekvencie 24) a 5B (číslo identifikácie sekvencie 25) ukazujú nukleotid NS1, resp. proteínové sekvencie z klonu 2-B1 parvovírusu B19.

Obrázky 6A (číslo identifikácie sekvencie 26) a 6B (číslo identifikácie sekvencie 27) ukazujú nukleotidové, resp. proteínové sekvencie VP1 z klonu 2-B1 parvovírusu B19.

Obrázky 7A (číslo identifikácie sekvencie 28) a 7B (číslo identifikácie sekvencie 29) ukazujú nukleotidové, resp. proteínové sekvencie VP2 z klonu 2-B1 parvovírusu B19.

Obrázky 8A (číslo identifikácie sekvencie 30) a 8B (číslo identifikácie sekvencie 31) ukazujú nukleotidové, resp. proteínové sekvencie NS1 z klonu 2-B6 parvovírusu B19.

Obrázky 9A (číslo identifikácie sekvencie 32) a 9B (číslo identifikácie sekvencie 33) ukazujú nukleotidové, resp. proteínové sekvencie VP1 z klonu 2-B6 parvovírusu B19.

Obrázky 10A (číslo identifikácie sekvencie 34) a 10B (číslo identifikácie sekvencie 35) ukazujú nukleotidové, resp. proteínové sekvencie VP2 z klonu 2-B6 parvovírusu B19.

Obrázky 11A až 11Z (číslo identifikácie sekvencie 62 - 87) znázorňujú sekvencie DNA z rôznych izolátov parvovírusu B19, ktoré zahrňujú sekvencie zodpovedajúce polohám nukleotidu 2936 až 3635 genómu parvovírusu B19, ako opisujú Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986) (fragment 700 bp z obrázku 1).

Obrázok 11A (číslo identifikácie sekvencie 62) zodpovedá sekvencii z izolátu CH80-1, obrázok 11B (číslo identifikácie sekvencie 63) zodpovedá sekvencii z izolátu CH81-3, obrázok 11C (číslo identifikácie sekvencie 64) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL1-4, obrázok 11D (číslo identifikácie sekvencie 65) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL2-1, obrázok 11E (číslo identifikácie sekvencie 66) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL3-1, obrázok 11F (číslo identifikácie sekvencie 67) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL4-3, obrázok 11G (číslo identifikácie sekvencie 68) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL5-2, obrázok 11H (číslo identifikácie sekvencie 69) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL6-2, obrázok 11I (číslo identifikácie sekvencie 70) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL7-3, obrázok 11J (číslo identifikácie sekvencie 71) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL8-2, obrázok 11K (číslo identifikácie sekvencie 72) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL9-1, obrázok

11L (číslo identifikácie sekvencie 73) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL9-9, obrázok 11M (číslo identifikácie sekvencie 74) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL10-2, obrázok 11N (číslo identifikácie sekvencie 75) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL11-1, obrázok 11O (číslo identifikácie sekvencie 76) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL12-1, obrázok 11P (číslo identifikácie sekvencie 77) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL13-3, obrázok 11Q (číslo identifikácie sekvencie 78) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL14-1, obrázok 11R (číslo identifikácie sekvencie 79) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL15-3, obrázok 11S (číslo identifikácie sekvencie 80) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL16-2, obrázok 11T (číslo identifikácie sekvencie 81) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL17-1, obrázok 11U (číslo identifikácie sekvencie 82) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL18-1, obrázok 11V (číslo identifikácie sekvencie 83) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL19-1, obrázok 11W (číslo identifikácie sekvencie 84) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL20-3, obrázok 11X (číslo identifikácie sekvencie 85) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL21-3, obrázok 11Y (číslo identifikácie sekvencie 86) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL122-11, obrázok 11Z (číslo identifikácie sekvencie 87) zodpovedá sekvencii z izolátu B19SCL2-14.

Obrázok 12 (číslo identifikácie sekvencie 92) znázorňuje príklad sekvencie, od ktorej možno odvodiť vnútornú kontrolu (IC) na zachytenie cieľovej sekvencie a amplifikáciu.

Nasleduje podrobný opis vynálezu.

Prax tohto vynálezu používa, pokiaľ sa neopisuje inak, konvenčné spôsoby chémie, biochémie, spôsoby rekombinantnej DNA a virológie, ktoré patria do rámca skúseností v odbore. Tieto spôsoby sa v plnom znení vysvetľujú v literatúre. Pozri napríklad *Fundamental Virology*, 2. vydanie, diel I a II (B. N. Fields a D. M. Knipe, red.), A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., so súčasným dodatkom), Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. vydanie, 1989), *Methods in Enzymology* (S. Colowick a N. Kaplan, red. Academic Press, Inc.), *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, red., 1984), *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

Je potrebné poznamenať, že v tomto opise a v pripojených nárokoch formy jednotného čísla zahrňujú možnosti odkazu na množné číslo, pokiaľ obsah zrejme neprikazuje inak. Tak napríklad odkaz na "antigén" zahrňuje zmes dvoch či viacerých antigénov a podobne.

V celom texte sa používajú nasledujúce skratky aminokyselín:

Alanín: Ala (A)	Arginín: Arg (R)
Asparagín: Asn (N)	Kyselina asparágová: Asp (D)
Cysteín: Cys (C)	Glutamín: Gln (Q)
Kyselina glutamová: Glu (E)	Glycín: Gly (G)
Histidín: His (H)	Izoleucín: Ile (I)
Leucín: Leu (L)	Lyzín: Lys (K)
Metionín: Met (M)	Fenylalanín: Phe (F)
Prolín: Pro (P)	Serín: Ser (S)
Treonín: Thr (T)	Tryptofán: Trp (W)
Tyrozín: Tyr (Y)	Valín: Val (V)

I. Definície

Pri opise tohto vynálezu sa používajú nasledujúce pojmy a uvažujú sa tak, ako sa vysvetľujú nižšie.

Pojmy "polypeptid" a "proteín" sa týkajú polyméru aminokyselinových zvyškov a neobmedzujú sa minimálnou dĺžkou produktu. Preto sa do tejto definície zahrňujú peptidy, oligopeptidy, diméry, multiméry a podobne. Táto definícia zahrňuje proteíny plnej dĺžky a ich fragmenty. Tieto pojmy tiež zahrňujú postexpresné modifikácie polypeptidu, napríklad glykozyláciu, acetyláciu, fosforyláciu a podobne. Ďalej sa pre účely tohto vynálezu "polypeptid" týka proteínu, ktorý zahrňuje modifikácie, ako sú delécie, adície a substitúcie (všeobecne svojou povahou konzervatívne) natívnej sekvencie, pokiaľ proteín uchováva svoju požadovanú aktivitu. Tieto modifikácie môžu byť

úmyselné, ako je mutagenéza zameraná na miesto alebo môžu byť náhodné, ako sú mutácie hostiteľa poskytujúce proteíny či chyby následkom amplifikácie PCR.

Polypeptid parvovírusu B19 je polypeptid, ako sa definuje vyššie, odvodený od proteínu kódovaného genómom B19, ako je to od neštruktúrnych proteínov, NS1 a NS2, rovnako tak ako od proteínov z vírusovej kapsidy, VP1 (zhruba 781 aminokyselín do dĺžky) alebo VP2 (zhruba 554 aminokyselín do dĺžky). Reprezentatívne sekvencie NS1, VP1 a VP2 sa znázorňujú tu na obrázkoch 5 až 10. Polypeptid sa nemusí fyzicky odvodzovať od parvovírusu B19, avšak môže sa získať tiež syntetickým či rekombinantným spôsobom. Navyše sa tento polypeptid môže odvodzovať od rôznych kmeňov a izolátov parvovírusu B19. Medzi týmito kmeňmi a izolátmi sú známe mnohé konzervované a premenné oblasti a všeobecne aminokyselinové sekvencie, napríklad epitopov odvodených od týchto oblastí, budú mať vysoký stupeň sekvenčnej homológie, t.j. aminokyselinovej sekvenčnej homológie vyšší ako 30 %, prednostne vyšší ako 40 % pri priradení dvoch sekvencií. Preto sa napríklad pojem polypeptid "VP1" týka natívneho VP1 z ktoréhokoľvek z rôznych kmeňov a izolátov parvovírusu B19. Sú známe úplné genotypy a sekvencie pre vyššie opísané proteíny mnohých kmeňov a izolátov parvovírusu B19. Pozri napríklad Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986), Gallinella a kol., J. Virol. Methods, 41, 203 - 211 (1993). Navyše sú tiež známe epitopy z parvovírusu B19 odvodené od týchto oblastí. Pozri napríklad US patent č. 5 436 127 a medzinárodná publikácia č. WO 91/12269.

Pojmy "analóg" a "muteín" sa týkajú biologicky aktívnych derivátov referenčnej molekuly alebo fragmentov týchto derivátov, ktoré si uchovávajú požadovanú aktivitu, ako je imunoreaktivita v diagnostických skúškach. Všeobecne sa pojem "analóg" týka zlúčenín majúcich natívnu polypeptidovú sekvenciu a štruktúru s jednou či viacerými aminokyselinovými adíciami, substitúciami (všeobecne konzervatívnymi svojou povahou) a/alebo deléciami vzhľadom k natívnej molekule, pokiaľ tieto modifikácie nenarušujú imunogénnu aktivitu. Pojem "muteín" sa týka peptidov majúcich jedno či viacero peptidových

mimík ("peptoidov") ako sú tie, ktoré sa opisujú v medzinárodnej publikácii č. WO 91/04282. Prednostne má analóg muteínu aspoň rovnakú imunoaktivitu ako natívna molekula. Spôsoby prípravy polypeptidových analógov a muteínov sú známe v odbore a opisujú sa ďalej nižšie.

Zvlášť preferované analógy zahŕňujú substitúcie, ktoré sú svojou povahou konzervatívne, t.j. také substitúcie, ktoré nastávajú v skupine aminokyselín, ktoré sú príbuzné svojimi bočnými reťazcami. Špecificky sa aminokyseliny všeobecne delia do štyroch skupín: (1) kyslé - aspartát a glutamát, (2) bázické - lyzín, arginín, histidín, (3) nepochárne - alanín, valín, leucín, izoleucín, prolín, fenylalanín, metionín, tryptofán a (4) bez elektrického náboja polárne - glycín, asparagín, glutamín, cysteín, serín, treonín, tyrozín. Fenylalanín, tryptofán a tyrozín sa niekedy zaraďujú ako aromatické aminokyseliny. Napríklad možno rozumne očakávať, že jednotlivá náhrada leucínu za izoleucín alebo valín, aspartátu za glutamát a treonínu za serín alebo podobná konzervatívna náhrada aminokyseliny štruktúrne podobnou aminokyselinou, nebude mať veľký vplyv na biologickú aktivitu. Napríklad daný polypeptid môže zahŕňať až zhruba 5 až 10 konzervatívnych alebo nekonzervatívnych aminokyselinových substitúcií alebo dokonca až zhruba 15 až 25 konzervatívnych či nekonzervatívnych aminokyselinových substitúcií alebo ktorékoľvek celé číslo medzi 5 až 25, pokiaľ zostane uchovaná požadovaná funkcia molekuly. Odborník skúsený v odbore môže ľahko určiť oblasti danej molekuly, ktoré môžu tolerovať zmenu, s odkazom na vynesenie Hopp/Woods a Kyte-Doolittle dobre známe v odbore.

Pojem "izolovaný" pri odkaze na polypeptid znamená, že daná molekula je oddelená a diskretná voči celému organizmu, v ktorom sa molekula nachádza v prírode alebo je prítomná v podstate v neprítomnosti ďalších biologických makromolekúl toho istého typu. Pojem "izolovaný" vzhľadom k polynukleotidu znamená molekulu nukleovej kyseliny jednoduchú ako celok alebo časť sekvencií normálne pripojených k tejto molekule v prírode alebo sekvencie existujúcej v prírode, avšak majúcej heterológne sekvencie, ktoré sa k nej pripájajú alebo táto molekula je odpojená od chromozómu.

Polynukleotid "odvodený od" alebo "špecifický pre" určenú sekvenciu sa týka polynukleotidovej sekvencie, ktorá zahrňuje súvislú sekvenciu zhruba aspoň 6 nukleotidov, prednostne aspoň zhruba 8 nukleotidov, lepšie aspoň zhruba 10 až 12 nukleotidov a dokonca ešte lepšie aspoň zhruba 15 až 20 nukleotidov zodpovedajúcich, t.j. identických či komplementárnych, oblasti určenej nukleotidovej sekvencie. Odvodený polynukleotid nemusí byť nevyhnutne odvodený fyzicky od danej nukleotidovej sekvencie, avšak môže sa vytvoriť akýmkoľvek spôsobom vrátane, avšak bez obmedzenia, chemickej syntézy, replikácie, reverznej transkripcie alebo transkripcie, ktorá je založená na informácii poskytnutej sekvenciou báz v oblasti (oblastiach), od ktorých sa polynukleotid odvodzuje. Ako taký môže predstavovať orientáciu rovnakého alebo opačného zmyslu v porovnaní s pôvodným polynukleotidom.

"Homológia" sa týka percenta podobnosti medzi dvoma polynukleotidmi alebo dvoma polypeptidovými zvyškami. Dve DNA alebo dve polypeptidové sekvencie sú "v podstate homológne" navzájom, pokiaľ sekvencie vykazujú aspoň zhruba 50 %, prednostne aspoň zhruba 75 %, lepšie aspoň zhruba 80 % až 85 %, prednostne aspoň zhruba 90 % a najlepšie aspoň zhruba 95 % až 98 % sekvenčnej podobnosti pozdĺž definovanej dĺžky týchto molekúl. Pojem v podstate homológne, ako sa tu používa, sa rovnako týka sekvencií vykazujúcich úplnú identitu so špecifikovanou sekvenciou DNA alebo polypeptidu.

Pojem "identita" sa všeobecne týka presnej korešpondencie nukleotid po nukleotide alebo aminokyselina po aminokyseline v dvoch polynukleotidových, resp. polypeptidových sekvenciách. Percento identity možno určiť priamym porovnaním sekvenčnej informácie medzi dvoma molekulami priradením sekvencií, počítaním presného počtu súhlasu medzi dvoma priradenými sekvenciami, delením dĺžky kratšej sekvencie a násobením výsledku číslom 100.

Pri analýze homológie a identity možno použiť ľahko dostupné počítačové programy, ako je ALIGN, M. O. Dayhoff, v Atlas of Protein Sequence and Structure, M. O. Dayhoff, red., 5. Suppl., 3, 353 - 358, National

Biochemical Research Foundation, Washington, D. C., ktorý prispôsobuje lokálny algoritmus homológie Smitha a Watermana, *Advances in Appl. Math.*, 2, 482 - 489 (1981) analýze peptidov. Programy na stanovenie nukleotidovej sekvenčnej homológie sú k dispozícii vo Wisconsin Sequence Analysis Package, verzia 8 (možno získať od Genetics Computer Group, Madison, WI), napríklad programy BESTFIT, FASTA a GAP, ktoré sa rovnako zakladajú na algoritme Smitha a Watermana. Tieto programy sa ľahko používajú s parametrami štandardného nastavenia odporúčanými výrobcom a opisovanými vo vyššie citovanom Wisconsin Sequence Analysis Package. Napríklad percentuálnu homológiu konkrétnej nukleotidovej sekvencie s referenčnou sekvenciou možno stanoviť pomocou algoritmu homológie Smitha a Watermana so štandardnou skórovacou tabuľkou a trestnými bodmi za medzeru (gap penalty) šiestich nukleotidových polôh.

Ďalším spôsobom určenia percenta homológie v súvislosti s týmto vynálezom je použitie súboru programov MPSRCH s autorským právom University of Edinburgh, ktorý vypracovali John F. Collins a Shane S. Sturrok a distribuuje ho IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Z tohto výberu súborov programov možno použiť Smithov-Watermanov algoritmus, kde sa používajú pre skórovaciu tabuľku parametre štandardného nastavenia (napríklad trestné body otvorenia medzery 12, extenzia medzery 1 a medzery 6). Zo získaných údajov odráža hodnota "Match" (zodpovedajúce priradenie) "sekvenčnej homológii". Ďalšie vhodné programy na výpočet percenta identity či podobnosti medzi sekvenciami sú v odbore dobre známe, napríklad ďalší program priradovania je BLAST používaný s parametrami štandardného nastavenia. Napríklad možno použiť BLASTN a BLASTP s nasledujúcimi parametrami štandardného nastavenia: genetický kód = štandardný, filter = žiaden, vlákna = obe, skrátenie = 60, očakávanie = 10, Matrica = BLOSUM62, opisy = 50 sekvencií, triedenie = vysokým skóre, databáza = neredundantná, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS preklady + proteín Swiss + aktualizácia Sp + PIR. Podrobnosti týchto programov možno nájsť na nasledujúcej internetovej adrese: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Alternatívne možno homológiu stanoviť hybridizáciou polynukleotidov za podmienok vytvárajúcich štandardné duplexy medzi homológnyimi oblasťami s nasledujúcou digesciou jednovláknovo špecifickou nukleázou (nukleázami) a stanovením veľkosti fragmentov po digescii. Sekvencie DNA, ktoré sú v podstate homológne, možno identifikovať Southernovou hybridizáciou, napríklad za prísnych podmienok, ako sa definujú pre daný systém. Definícia príslušných hybridizačných podmienok patrí do rámca skúseností v odbore. Pozri napríklad Sambrook a kol., vyššie, DNA Cloning, vyššie, Nucleic Acid Hybridization, vyššie.

"Operabilne pripojený" sa týka usporiadania elementov, v ktorých sa zložky, ktoré sa takto opisujú, konfigurujú tak, aby plnili svoju požadovanú funkciu. Znamená to, že daný promótor operabilne pripojený na sekvenciu nukleovej kyseliny je schopný vykonať transkripciu a v prípade kódovacej sekvencie expresiu kódovacej sekvencie, pokiaľ sú prítomné vhodné transkripčné faktory, atď. Promótor nemusí nutne priliehať k sekvencii nukleovej kyseliny, pokiaľ pôsobí tak, že riadi jej transkripciu a/alebo expresiu. Napríklad medzi promótorovou sekvenciou a kódovacou sekvenciou môžu byť zasahujúce nepreložené a doteraz neprepísané sekvencie, ako sú transkribované intróny, a promótorovú sekvenciu možno stále pokladať za "operabilne pripojenú" ku kódovacej sekvencii.

Pojem "rekombinantný", ako sa tu používa na opis molekuly nukleovej kyseliny, znamená genómový, cDNA, vírusový, semisyntetický či syntetický pôvod, ktorý vzhľadom k jeho pôvodu manipulácie nesúvisí s celým polynukleotidom alebo jeho časťou, s ktorým súvisí v prírode. Pojem "rekombinantný" pri použití vzhľadom k proteínu alebo polypeptidu znamená polypeptid získaný expresiou rekombinantného polynukleotidu. Všeobecne sa daný gén klonuje a potom exprimuje v transformovaných organizmoch, ako sa opisuje ďalej nižšie. Hostiteľský organizmus exprimuje cudzí gén za získania proteínu za podmienok exprese.

Pojem "kontrolný element" sa týka polynukleotidovej sekvencie, ktorá pomáha pri transkripcii a/alebo translácii nukleotidovej sekvencie, ku ktorej sa

pripája. Tento pojem zahŕňa promótor, transkripčné terminačné sekvencie, vzostupné regulačné domény, polyadenylačné signály, nepreložené oblasti vrátane 5'-UTR a 3'-UTR a, pokiaľ je to vhodné, vedúce sekvencie a enhancery, ktoré spoločne zaisťujú transkripciu a transláciu kódovacej sekvencie v hostiteľskej bunke.

Pojem "promótor", ako sa tu používa, je regulačná oblasť schopná viazať polymerázu a začínať transkripciu nukleotidovej sekvencie v zostupnom smere (smer 3'), ku ktorej sa operabilne pripája. Pre účely tohto vynálezu zahŕňa promótorová sekvencia minimálny počet báz či elementov nevyhnutných na začatie transkripcie danej sekvencie pri hladinách detegovateľných nad pozadím. V rámci promótorovej sekvencie je miesto začatia transkripcie, rovnako tak ako proteínovej väzbovej domény (sekvencia konzensusu), zodpovedné za väzbu RNA alebo DNA polymerázy. Promótorom môže byť napríklad sekvencia nukleovej kyseliny, ktorá sa rozpoznáva DNA-dependentnou RNA polymerázou ("transkriptázou") ako signál pre väzbu s nukleovou kyselinou a zahajuje transkripciu RNA v špecifickom mieste. Pre väzbu tieto transkriptázy všeobecne vyžadujú DNA, ktorá je dvojvláknová v časti obsahujúcej promótorovú sekvenciu a jej komplement. Templátová časť (sekvencia, ktorá sa má prepisovať) nemusí byť dvojvláknová. Jednotlivé DNA-dependentné RNA polymerázy rozpoznávajú rad rôznych promótorových sekvencií, ktoré sa významne menia vo svojej účinnosti ako promótor transkripcie. Ak sa niektorá RNA polymeráza viaže na promótorovú sekvenciu kvôli začatiu transkripcie, nie je promótorová sekvencia časťou prepisovanej sekvencie. Vytvorené RNA transkripty teda nebudú zahŕňať túto sekvenciu.

Riadiace sekvencie "riadia transkripciu" nukleotidovej sekvencie, ak sa RNA alebo DNA polymeráza viaže s promótorovou sekvenciou a prepisuje priliehajúcu sekvenciu.

"DNA-dependentná DNA polymeráza" je enzým, ktorý syntetizuje kópiu komplementárnej DNA z templátu DNA. Príkladmi sú DNA polymeráza I z *E. coli* a bakteriofágová T7 DNA polymeráza. Všetky známe DNA-dependentné DNA polymerázy vyžadujú na začatie syntézy komplementárny primér. Za

vhodných podmienok môže DNA-dependentná DNA polymeráza syntetizovať kópiu komplementárnej DNA z templátu RNA.

"DNA-dependentná RNA polymeráza" alebo "transkriptáza" je enzým, ktorý syntetizuje viacero kópií RNA z dvojvláknovej alebo čiastočne dvojvláknovej molekuly DNA majúcej (zvyčajne dvojvláknovú) promótorovú sekvenciu. Molekuly RNA ("transkripty") sa syntetizujú v smere 5' až 3' začínajúc od špecifickej polohy zostupne od promótora. Príkladmi transkriptáz sú DNA-dependentná RNA polymeráza z *E. coli* a bakteriofágov T7, T3 a SP6.

"RNA-dependentná DNA polymeráza" alebo "reverzná transkriptáza" je enzým, ktorý syntetizuje komplementárnu kópiu DNA z templátu RNA. Všetky známe reverzné transkriptázy sú rovnako schopné vytvárať kópiu komplementárnej DNA z templátu DNA, takže zahrňujú ako RNA- tak DNA-dependentné DNA polymerázy. Na začatie syntézy s oboma templátmi RNA a DNA sa požaduje primér.

"RNAza H" je enzým, ktorý degraduje, časť ribonukleovej kyseliny duplexu RNA : DNA. Tieto enzýmy môžu byť endonukleázy alebo exonukleázy. Väčšina reverzných transkriptázových enzýmov normálne obsahuje aktivitu RNAzy H navyše k svojej polymerázovej aktivite. Avšak k dispozícii sú i iné zdroje RNAzy H bez súvisiacej polymerázovej aktivity. Degradácia môže viesť k oddeleniu RNA z komplexu RNA : DNA. Alternatívne môže RNAza H jednoducho skracovať RNA v rôznych miestach, takže sa časti RNA oddeľujú alebo umožňujú enzýmom odvíjať časti RNA.

Pojmy "polynukleotid", "oligonukleotid", "nukleová kyselina" a "molekula nukleovej kyseliny" sa tu používajú pre polymerizačnú formu nukleotidov akejkoľvek dĺžky, buď ribonukleotidov alebo deoxyribonukleotidov. Tento termín sa týka iba primárnej štruktúry molekuly. Preto tento pojem zahrňuje trojvláknové, dvojvláknové a jednovláknové DNA rovnako tak ako trojvláknové, dvojvláknové a jednovláknové RNA. Rovnako zahrňuje modifikácie napríklad metyláciou a/alebo zakrytím (capping) a nemodifikované formy polynukleotidu. Konkrétnejšie pojmy "polynukleotid", "oligonukleotid", "nukleová kyselina" a "molekula nukleovej kyseliny" zahrňujú polydeoxyribonukleotidy (obsahujúce 2-

deoxy-D-ribózu), polyribonukleotidy (obsahujúce D-ribózu), akýkoľvek iný typ polynukleotidu, ktorý je N- alebo C-glykozid purínovej alebo pyrimidínovej bázy a ďalšie polyméry obsahujúce nenukleotidové základné reťazce, napríklad polyamidové (napríklad peptidové nukleové kyseliny (PNA)) a polymorfolínové (komerčne dostupné od Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregon ako Neugene) polyméry a ďalšie syntetické sekvenčne špecifické polyméry nukleových kyselín s podmienkou, že tieto polyméry obsahujú nukleotidové bázy v konfigurácii, ktorá umožňuje párovanie báz a zostavovanie báz v reťazci, ako je to v DNA a RNA. Nepredpokladá sa tu žiaden rozdiel v dĺžke medzi pojmami "polynukleotid", "oligonukleotid", "nukleová kyselina" a "molekula nukleovej kyseliny" a tieto termíny sa môžu navzájom zamieňať. Tieto pojmy sa týkajú iba primárnej štruktúry molekuly. Preto tieto pojmy zahrňujú napríklad 3'-deoxy-2',5'-DNA, oligodeoxyribonukleotid N3'P5' fosforamidát, 2'-O-alkyl-substituované RNA, dvojvláknové a jednovláknové DNA rovnako tak ako dvojvláknové a jednovláknové RNA, hybridy DNA : RNA a hybridy medzi PNA, DNA alebo RNA a rovnako zahrňujú známe typy modifikácií, napríklad značky, ktoré sú v odbore známe ako metylácia, "caps", substitúcia jedného či viacerých prirodzených nukleotidov analógom, internukleotidové modifikácie, ako sú napríklad modifikácie s väzbami bez náboja (napríklad metyl-fosfonáty, fosfotriestery, fosforamidáty, karbamáty, atď.) so záporne nabitými väzbami (napríklad fosforotioáty, fosforoditioáty, atď.), s pozitívne nabitými väzbami (napríklad aminoalkylfosforoamidáty, aminoalkylfosfotriestery), modifikácie obsahujúce pripojené zvyšky, ako sú napríklad proteíny (vrátane nukleáz, toxínov, protilátok, signálnych peptidov, poly-L-lyzínu, atď.), modifikácie s interkalovanými zložkami (napríklad akridín, psoralén, atď.), modifikácie obsahujúce chelatačné zložky (napríklad kovy, rádioaktívne kovy, bór, oxidatívne kovy, atď.), modifikácie obsahujúce alkylátory, modifikované väzby (napríklad alfa anomerizačné nukleové kyseliny, atď.), rovnako tak ako nemodifikované formy polynukleotidu alebo oligonukleotidu. DNA je najmä deoxyribonukleová kyselina.

Pojem "oblasť cieľovej nukleovej kyseliny" alebo "cieľová nukleová kyselina" označuje molekulu nukleovej kyseliny s "cieľovou sekvenciou", ktorá sa má amplifikovať. Cieľová nukleová kyselina môže byť buď jednovláknová alebo dvojitá a môže zahŕňať ďalšie sekvencie okrem cieľovej sekvencie, ktoré sa nemusia amplifikovať. Pojem "cieľová sekvencia" sa týka konkrétnej nukleotidovej sekvencie cieľovej nukleovej kyseliny, ktorá sa má amplifikovať. Cieľová sekvencia môže zahŕňať oblasť hybridizujúcu sondy obsiahnutú v rámci cieľovej molekuly, s ktorou sonda tvorí za požadovaných podmienok stabilný hybrid. Pojem "cieľová sekvencia" môže tiež zahŕňať komplexačnú sekvenciu, s ktorou oligonukleotidové priméry poskytujú komplex a extenziu s použitím cieľovej sekvencie ako templátu. Ak je cieľová nukleová kyselina pôvodne jednovláknová, týka sa pojem "cieľová sekvencia" tiež sekvencie komplementárnej k "cieľovej sekvencii" prítomnej v cieľovej nukleovej kyseline. Pokiaľ je "cieľová nukleová kyselina" pôvodne dvojitá, týka sa pojem "cieľová sekvencia" oboch vlákien plus (+) a mínus (-).

Pojem "primér" alebo "oligonukleotidový primér", ako sa tu používa, sa týka oligonukleotidu, ktorý zahajuje syntézu komplementárneho vlákna DNA za podmienok, za ktorých sa vyvoláva extenzia priméru, t.j. za prítomnosti nukleotidov a prostriedku indukujúceho polymerizáciu, ako je DNA alebo RNA polymeráza a za vhodnej teploty, pH, koncentrácie kovu a soli. Primér je prednostne jednovláknový kvôli dosiahnutiu maximálnej účinnosti pri amplifikácii, avšak alternatívne môže byť dvojitá. Ak je dvojitá, spracuje sa najprv kvôli rozdeleniu jeho vlákien pred použitím na prípravu produktov extenzie. Denaturačný krok sa zvyčajne uskutoční teplom, avšak alternatívne sa môže vykonávať s použitím alkálií s následnou neutralizáciou. Primér je teda komplementárny k templátu a tvorí komplex vodíkovým mostíkom alebo hybridizáciou s templátom za získania komplexu primér/templát kvôli začatiu syntézy polymerázou, s extenziou adície kovalentne viazaných báz pripojených na konci 3' komplementárnych k templátu v priebehu syntézy DNA.

Pojem "sonda" alebo "oligonukleotidová sonda", ako sa tu používa, sa týka štruktúry obsahujúcej polynukleotid, ako sa definuje vyššie, ktorý obsahuje sekvenciu nukleovej kyseliny komplementárnu k sekvencii nukleovej kyseliny prítomnej v hľadanej cieľovej nukleovej kyseline. Polynukleotidové oblasti sond sa môžu skladať z DNA a/alebo RNA α a/alebo syntetických nukleotidových analógov. Keď sa má použiť oligonukleotidová sonda v 5' nukleázovej skúške, ako je spôsob TaqMamTM, bude sonda obsahovať aspoň jednu fluorescenčnú látku a aspoň jednu zhášajúcu látku, ktorá sa spracuje pôsobením 5' endonukleázovej aktivity polymerázy použitej pri reakcii na detekciu akýchkoľvek amplifikovaných sekvencií cieľového oligonukleotidu. V tejto súvislosti bude mať oligonukleotidová sonda dostatočný počet fosfodiesterových väzieb priliehajúcich k jej koncu 5', takže použitá nukleázová aktivita 5' až 3' môže účinne degradovať viazanú sondu kvôli oddeleniu fluorescenčných a zhášajúcich látok. Keď sa použije oligonukleotidová sonda v spôsobe TMA, bude vhodne značená, ako sa opisuje nižšie.

Je zrejmé, že hybridizačná sekvencia nemusí vykazovať dokonalú komplementaritu kvôli zaisteniu stabilných hybridov. V mnohých situáciách sa tvoria stabilné hybridy, v ktorých menej ako 10 % báz sú nesprávne priradené, ignorujúce slučky štyroch či viacerých nukleotidov. V súlade s tým, ako sa tu používa, týka sa pojem "komplementárny" oligonukleotidu, ktorý tvorí stabilný komplex so svojim "komplementom" za podmienok skúšok, v ktorom je homológia zhruba 90 % alebo vyššia.

Pojmy "hybridizovať" a "hybridizácia" sa týkajú tvorby komplexov medzi nukleotidovými sekvenciami, ktoré sú dostatočne komplementárne na vytvorenie komplexov párovaním báz podľa Watsona - Cricka. Ak sa primér hybridizuje s cieľovým templátom, sú tieto komplexy (či hybridy) dostatočne stabilné, aby slúžili ako priméry, napríklad na to, aby DNA polymeráza začala syntézu k DNA.

Pojem "väzbový pár", ako sa tu používa, sa týka prvých a druhých molekúl, ktoré sa spolu špecificky viažu, ako sú komplementárne polynukleotidové páry schopné tvorby duplexov nukleových kyselín. "Špecifická

väzba" prvého člena väzbového páru k druhému členu väzbového páru vo vzorke sa preukazuje väzbou prvého člena k druhému členu alebo naopak, s väčšou afinitou či špecifičnosťou ako k iným zložkám vo vzorke. Väzba medzi členmi väzbového páru je zvyčajne nekovalentná. Pokiaľ súvislosť neukazuje zrejme inak, sa pojmy "afinitná molekula" a "cieľový analyt" používajú tak, že označujú prvé, resp. druhé členy väzbového páru.

Pojmy "špecifická väzbová molekula" a "afinitná molekula" sa používajú zameniteľným spôsobom a týkajú sa molekuly, ktorá sa selektívne viaže chemicky alebo fyzikálne s detegovateľnou látkou prítomnou vo vzorke. "Selektívnou väzbou" sa chápe, že sa molekula preferovane viaže na daný cieľ alebo že sa viaže s väčšou afinitou na tento cieľ ako na iné molekuly. Napríklad molekula DNA sa viaže k v podstate komplementárnej sekvencii a nie k nepríbuzným sekvenciám.

"Teplota topenia" alebo " T_m " dvojvláknovej DNA sa definuje ako teplota, pri ktorej sa stráca polovica skrutkovnicovej štruktúry DNA následkom zahrievania či inej disociácie vodíkových mostíkov medzi pármí báz, napríklad spracovaním kyselinou či alkáliou alebo podobne. T_m molekuly DNA závisí od jej dĺžky a od zloženia báz. Molekuly DNA bohaté na páry báz GC majú vyššie T_m ako molekuly s pármí báz AT. Oddelené komplementárne vlákna DNA sa spontánne znova spájajú alebo anelujú za vytvorenia komplexnej DNA, ak sa teplota zníži pod hodnotu T_m . Najvyššia hybridizácia nukleových kyselín nastáva zhruba pri 25 °C pod T_m . T_m možno stanoviť s použitím nasledujúceho vzťahu: $T_m = 69,3 + 0,41 (GC) \%$ (Marmur a kol., J. Mol. Biol., 5, 109 - 118 (1962)).

Pojem "biologická vzorka", ako sa tu používa, sa týka vzorky tkaniva či tekutiny izolovanej od osoby, ktorá zvyčajne obsahuje protilátky tvorené touto osobou. Bežné vzorky obsahujúce tieto protilátky sú známe v odbore a zahrňujú, avšak bez obmedzenia, krv, krvnú plazmu, krvné sérum, stolicu, moč, kostnú dreň, žlč, spinálnu tekutinu, lymfatickú tekutinu, vzorky kože, sekréty kože, vzorky z respiračného, črevného a urogenitálneho traktu, slzy, sliny, mlieko, krvinky, orgány, bioptické vzorky a tiež vzorky bunkovej kultúry *in vitro*

zahrňujúce, avšak bez obmedzenia, upravované médiá z rastu buniek a tkanív v prostredí kultúry, napríklad rekombinantné bunky a bunkové komponenty.

Pojmy "značka" a "detegovateľná značka", ako sa tu používajú, sa týkajú molekuly schopnej detekcie vrátane, avšak bez obmedzenia, rádioaktívnych izotopov, fluorescenčných látok, chemiluminiscenčných látok, chromofórov, enzýmov, enzýmových substrátov, enzýmových kofaktorov, enzýmových inhibítorov, chromofórov, farbív, kovových iónov, kovových solí, ligandov (napríklad biotínu, avidínu, streptavidínu alebo hapténov) a podobne. Pojem "fluorescenčná látka" sa týka látky alebo jej časti, ktorá je schopná vykazovať fluorescenciu v detegovateľnom rozmedzí.

II. Spôsoby uskutočňovania vynálezu

Pred podrobným opisom tohto vynálezu je potrebné si uvedomiť, že tento vynález sa neobmedzuje na konkrétne formulácie či parametre postupu akýmkoľvek spôsobom. Tiež je potrebné si uvedomiť, že terminológia, ktorá sa tu používa iba na účely opisu jednotlivých uskutočnení tohto vynálezu, nie je obmedzujúca.

I keď možno použiť rad kompozícií a spôsobov podobných či ekvivalentných tým, ktoré sa tu opisujú, preferujú sa látky a spôsoby opisované tu.

Ako sa poznamenáva vyššie, tento vynález sa zakladá na objave nových primérov a sond a diagnostických spôsobov na presné stanovenie infekcie parvovírusom B19 v biologickej vzorke. Tieto spôsoby sa zakladajú na citlivých detekčných technikách na báze nukleových kyselín, ktoré umožňujú identifikáciu cieľových sekvencií nukleovej kyseliny parvovírusu B19 vo vzorkách obsahujúcich malé množstvo vírusu.

Autori tohto vynálezu tu hlavne charakterizujú oblasti genómu parvovírusu B19, ktoré sú vhodnými cieľmi na diagnostické skúšky. Priméry a sondy odvodené od týchto oblastí sú mimoriadne použiteľné na detekciu infekcie parvovírusom B19 v biologických vzorkách.

Priméry a sondy parvovírusu B19 opisované vyššie sa používajú v skúškach založených na nukleových kyselinách na detekciu infekcie ľudským parvovírusom B19 v biologických vzorkách. Konkrétne sa priméry a sondy na použitie v týchto skúškach prednostne odvodzujú od fragmentu zhruba 4,7 kb genómu parvovírusu B19 zodpovedajúceho polohám nukleotidov 217 až 4678 podľa Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986). Nukleotidové sekvencie pre túto oblasť z dvoch rôznych izolátov parvovírusu B19 sú zobrazené na obrázkoch 3A až 3C a 4A až 4C. Ako sa opisuje vyššie, obsahuje tento fragment kódovacie oblasti NS1, VP1 a VP2.

Obzvlášť preferované priméry a sondy na použitie v týchto skúškach sa určujú z vysoko zachovaných oblastí genómu parvovírusu B19, aby sa umožnila detekcia infekcie parvovírusom B19 spôsobená rôznymi izolátmi. Ako sa tu opisuje, nachádza sa jedna vysoko zachovaná oblasť genómu parvovírusu B19 v oblasti 700 bp, ktorá sa rozprestiera medzi polohami 2936 až 3635 číslovanými podľa genómu parvovírusu B19, ako ho opisuje Shade a kol., 58, 921 - 936 (1986). Táto oblasť je vo vnútri oblasti VP1 tohto genómu. Sekvencia tejto oblasti z 21 rôznych izolátov parvovírusu B19 je tu znázornená na obrázkoch 2A až 2U. Sekvencie z ďalších 20 izolátov ukazujú obrázky 11A až 11Z. Porovnanie sekvencií ukazuje, že táto oblasť vykazuje od zhruba 98 % do 99,5 % sekvenčnej homológie od jedného izolátu k druhému, takže je veľmi žiadanou cieľovou sekvenciou. Pre návrh primérov a sond je rovnako vítaná oblasť 370 bp nájdená vo VP1, ktorá preklenuje nukleotidové polohy zhruba 3073 až 3442, číslované podľa Shade a kol., 58, 921 - 936 (1986) rovnako tak ako fragment 214 bp zobrazený na obrázku 1, ktorý je v polohe 3' fragmentu 4,7 bp a rozprestiera sa v polohách nukleotidu 4728 až 4941 číslovaných podľa Shade a kol., 58, 921 - 936 (1986).

Oblasti 4,7 kbp, 700 bp a 370 bp sa ľahko získajú z ďalších izolátov s použitím častí sekvencie parvovírusu B19 prítomných v týchto konkrétnych oblastiach ako primérov v PCR reakciách, ako sú tie, ktoré sa tu opisujú, rovnako tak ako v US patentoch č. 4 683 195, 4 683 202 a 4 889 818, a na základe sekvencií, ktoré sa tu poskytujú. Ďalší spôsob získania nukleotidových

sekvencií s požadovanými sekvenciami je anelovanie komplementárných súborov presahujúcich syntetických oligonukleotidov pripravených v konvenčnom automatickom polynukleotidovom syntetizátore s následnou ligáciou s príslušnou DNA ligázou a amplifikáciou ligovanej nukleotidovej sekvencie prostredníctvom reakcie PCR. Pozri napríklad Jayaraman a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4084 - 4088 (1991). Keď sa sekvencie pripravujú či izolujú, môžu sa klonovať do ktoréhokoľvek vhodného vektoru či replikónu. Skúsený odborník v odbore pozná mnohé vektory a výber príslušného klonovacieho vektoru je otázkou voľby. Vhodné vektory zahŕňujú, avšak bez obmedzenia, plazmidy, fágy, transpozóny, kozmidy, chromozómy alebo vírusy, ktoré sú schopné replikácie pri spojení s vhodnými riadiacimi elementmi. Rekombinantné klony sa ľahko identifikujú restričnou enzymatickou analýzou a polyakrylamidovou či agarózovou gélovou elektroforézou s použitím spôsobov dobre známych v odbore a opisovaných v príkladoch nižšie.

Priméry a sondy na použitie v týchto skúškach sa odvodzujú od týchto sekvencií a ľahko sa pripravujú štandardnými spôsobmi, napríklad syntézou v tuhej fáze fosforoamiditovou chemickou cestou, ako opisujú US patenty č. 4 458 066 a 4 415 732, Beaucage a kol., Tetrahedron, 48, 2223 - 2311 (1992) a Applied Biosystems User Bulletin č. 13 (1. apríl 1987). Ďalšie spôsoby chemickej prípravy zahŕňujú napríklad fosfotriesterový spôsob opísaný Narangom a kol., Meth. Enzymol., 68, 109 (1979) a fosfodiesterový spôsob opísaný Brownom a kol., Meth. Enzymol., 68, 90 (1979). Poly(A) alebo poly(C) alebo ďalšie nekomplementárne nukleotidové extenzie možno zahrnúť do sond rovnakými spôsobmi. Hexaetylénoxidové extenzie možno pripojiť k sondám spôsobmi známymi v odbore, Cload a kol., J. Am. Chem. Soc., 113, 6324 - 6326 (1991), US patent č. 4 914 210, Levenson a kol., Durand a kol., Nucleic Acids Res., 18, 6353 - 6359 (1990) a Horn a kol., Tet. Lett., 27, 4705 - 4708 (1986). Zvyčajne sú sekvencie priméru v rozmedzí medzi 10 až 75 nukleotidmi dĺžky, ako je 15 až 60, 20 až 40, atď., bežnejšie v rozmedzí medzi 18 až 40 nukleotidmi dĺžky a s akoukoľvek dĺžkou medzi udanými hodnotami rozmedzia. Bežná sonda je v rozmedzí medzi 10 a 50 nukleotidmi dĺžky, ako je 15 až 40, 18 až 30, atď. a s akoukoľvek dĺžkou medzi týmito hodnotami rozmedzia.

Navyše, sondy možno pripájať k značkám na detekciu. Existuje niekoľko prostriedkov známych na derivatizáciu oligonukleotidov s reaktívnymi funkčnými skupinami, ktoré umožňujú pridanie značky. Napríklad existuje niekoľko dostupných prístupov pre biotinylačné sondy, takže možno prostredníctvom avidínu pripojiť rádioaktívne, fluorescenčné, chemiluminiscenčné enzymatické alebo elektródenzné značky. Pozri napríklad Broken a kol., *Nucl. Acids Res.*, 5, 363 - 384 (1978), ktoré opisujú použitie značiek feritín-avidín-biotín a Chollet a kol., *Nucl. Acids Res.*, 13, 1529 - 1541 (1985), ktoré opisujú biotinylaciu koncov 5' oligonukleotidov prostredníctvom aminoalkylfosforamidového spojovacieho článku. Tiež je dostupných niekoľko metód prípravy amino-derivatizovaných oligonukleotidov, ktoré sú už značené fluorescenčným typom alebo inými typmi zlúčenín derivatizovaných aminoreaktívnymi skupinami, ako je skupina izotiokyanátu, N-hydroxysukcínimidu či podobne, pozri napríklad Connolly, *Nucl. Acids Res.*, 15, 3131 - 3139 (1987), Gibson a kol., *Nucl. Acids Res.*, 15, 6455 - 6467 (1987) a US patent č. 4 605 735, Miyoshi a kol. Tiež sú k dispozícii spôsoby prípravy sulfhydryl-derivatizovaných oligonukleotidov, ktoré môžu reagovať s tiol-špecifickými značkami, pozri napríklad US patent č. 4 757 141, Fung a kol., Connolly a kol., *Nucl. Acids*, 13, 4485 - 4502 (1985) a Spoot a kol., *Nucl. Acids Res.*, 15, 4837 - 4848 (1987). Súborný referát o spôsoboch značených fragmentov DNA opisujú Matthews a kol., *Anal. Biochem.*, 169, 1 - 25 (1988).

Sondy sa môžu značiť fluorescenčne napríklad spájaním s fluorescenčnou molekulou s neligujúcim koncom sondy. Návod na voľbu príslušných fluorescenčných značiek možno nájsť v Smith a kol., *Meth. Enzymol.*, 155, 260 - 301 (1987), Karger a kol., *Nucl. Acids Res.*, 19, 4955 - 4962 (1991), Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1989) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Preferované fluorescenčné značky zahŕňujú fluoresceín a jeho deriváty, ako sa opisuje v US patente č. 4 318 846 a v Lee a kol., *Cytometry*, 10, 151 - 164 (1989) a 6-FAM, JOE, TAMRA, ROX, HEX-1, HEX-2, ZOE, TET-1 alebo NAN-2 a podobne.

Navyše sondy možno značiť akridíniumesterom (AE) s použitím nižšie opísaných spôsobov. Súčasné technológie umožňujú umiestnenie značky AE v ktoromkoľvek mieste sondy. Pozri napríklad Nelson a kol. (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" v *Nonisotopic, Probing, Blotting and Sequencing*, L. J. Kricka (red.), Academic Press, San Diego, CA, Nelson a kol. (1994) "Application of the Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR" v *The Polymerase Chain Reaction*, Mullis a kol. (red.), Birkhauser, Boston, MA, Weeks a kol., *Clin. Chem.*, 29, 1474 - 1479 (1983), Berry a kol., *Clin. Chem.*, 34, 2087 - 2090 (1988). Molekulu AE možno priamo pripojiť k sonde chemickým spôsobom spojovacieho článku, ktorý nie je založený na nukleotidoch, ktorý umožňuje umiestnenie značky do ktoréhokoľvek miesta v sonde. Pozri napríklad US patenty č. 5 585 481 a 5 185 439.

V určitých uskutočneniach sa pridáva vnútorná kontrola (IC) alebo vnútorný štandard slúžiaci na kontrolu zachytenia a amplifikácie cieľa. Prednostne zahrňuje IC sekvenciu, ktorá sa odlišuje od cieľovej sekvencie, je schopná hybridizácie s použitými sekvenciami sondy na oddelenie nukleotidov špecifických pre organizmus zo vzorky a je schopná amplifikácie. Použitie IC umožňuje kontrolu separačného procesu, amplifikačného procesu a detekčného systému a umožňuje sledovanie výkonu a kvantitatívneho vyjadrenia skúšky pre vzorku (vzorky). Reprezentatívna sekvencia, z ktorej možno získať IC, je znázornená na obrázku 12. IC možno zahrnúť v akejkoľvek vhodnej fáze, napríklad do pufra pre cytolýzu. V jednom uskutočnení obsahuje IC ssDNA M13 s obsahom nukleotidovej sekvencie z parvovírusu B19 a jedinečnú sekvenciu, ktorá hybridizuje so vzorkou, napríklad obsahujúcou sekvencie z oblasti VP1, kde sa cieľová sekvencia modifikuje substitúciou či deléciou 5 až 20 báz či viac, prednostne 5 až 15 báz, ako je 5, 10 alebo 15 báz alebo akýkoľvek počet v týchto rozmedziach. Substituované či vypustené bázy sa prednostne vyskytujú po celej dĺžke cieľovej sekvencie tak, že sa nahradzujú iba 2 alebo 3 po sebe nasledujúce sekvencie. Preto napríklad, ak je cieľová sekvencia CTACTTGCTGCGGGAGAAAAACACCT (číslo identifikácie sekvencie 91), potom sa táto sekvencia môže substituovať napríklad AGCTAGACCTGCATGTCACTG (číslo identifikácie sekvencie 90) v IC.

Tuhý nosič môže ďalej zahrňovať sondy špecifické pre vnútorný štandard (sonda IC), čím sa uľahčuje zachytenie pri použití sondy IC. Sonda IC sa môže prípadne spájať s detegovateľnou značkou, ktorá je odlišná od detegovateľnej značky cieľovej sekvencie. Vo uskutočneniach, v ktorých je detegovateľnou značkou niektorý fluorofór, možno IC kvantifikovať spektrofotometricky a v medziach detekčných štúdií. Zvyčajne sa počet kópií IC, ktoré neinterferujú s cieľovou detekciou, určí titráciou IC s pevnou m.j. cieľa prednostne pri spodnej medzi a štandardná krivka sa získa zriedovaním vzorky medzinárodne prijatých medzinárodných jednotiek. Na kvantifikáciu parvovírusu B19 možno použiť osemčlenný panel 8000 m.j. až 125 m.j.

V ďalšom uskutočnení sa IC, ako sa tu opisuje, spája s RNA izolovanou zo vzorky podľa štandardných spôsobov známych tomu, kto je skúsený v odbore, a opisovaných tu. RNA sa potom podrobí reverznej transkripcii s použitím reverznej transkriptázy kvôli získaniu kópie DNA. Sekvencie cDNA možno prípadne amplifikovať (napríklad reakciou PCR) s použitím značených primérov. Produkty amplifikácie sa oddelia, zvyčajne elektroforézou, a stanoví sa množstvo rádioaktivity (priamo úmerné množstvu amplifikovaného produktu). Množstvo mRNA vo vzorke sa potom vypočíta porovnaním so signálom poskytnutým známymi štandardmi.

Priméry a sondy opisované vyššie možno použiť v polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) na detekciu infekcie parvovírusom B19 v biologických vzorkách. PCR je spôsob amplifikácie požadovanej sekvencie cieľovej nukleovej kyseliny obsiahnutej v molekule nukleovej kyseliny alebo v zmesi molekúl. V priebehu PCR sa používa pár primérov v prebytku na hybridizáciu s komplementárnymi vláknami cieľovej nukleovej kyseliny. Oba priméry sa podrobia extenzii polymerázou s použitím cieľovej nukleovej kyseliny ako templátu. Produkty extenzie sa samotné stávajú cieľovými sekvenciami po disociácii od pôvodného cieľového vlákna. Nové priméry sa potom hybridizujú a podrobia extenzii polymerázou a cyklus sa opakuje s geometrickým nárastom počtu molekúl cieľovej sekvencie. Spôsob PCR na amplifikáciu cieľových sekvencií nukleovej kyseliny vo vzorke je dobre známy v odbore a opisuje sa

napríklad v Innis a kol. (red.), PCR Protocols (Academic Press, NY, 1990), Taylor (1991), Polymerase chain reaction: basic principles and automation, v PCR: A Practical Approach, McPherson a kol. (red.), IRL Press, Oxford, Saiki a kol., Nature, 324, 163 (1986) a v US patentoch č. 4 683 195, 4 683 202 a 4 889 818.

PCR konkrétne používa relatívne krátke oligonukleotidové priméry, ktoré obklopujú cieľovú nukleotidovú sekvenciu, ktorá sa má amplifikovať, orientované takým spôsobom, že ich konce 3' sú obrátené proti sebe a každý z primérov smeruje smerom k druhému. Polynukleotidová vzorka sa extrahuje a denaturuje, prednostne teplom a hybridizuje s prvým a druhým primérom, ktoré sú prítomné v molárnom prebytku. Polymerizácia sa katalyzuje za prítomnosti štyroch deoxyribonukleotid-trifosfátov (dNTP: dATP, dGTP, dCTP a dTTP) s použitím primér- a templát-dependentného polynukleotidového polymerizačného prostriedku, ako je ktorýkoľvek enzým schopný tvorby produktov extenzie primérov, napríklad polymeráza I DNA *E. coli*, polymeráza I DNA Klenowovho fragmentu, polymeráza DNA T4, termostabilné polymerázy DNA izolované z *Thermus aquaticus* (Taq), dostupné z radu zdrojov (napríklad Perkin Elmer), *Thermus thermophilus* (United States Biochemicals), *Bacillus stearothermophilus* (Bio-Rad) alebo *Thermococcus litoralis* ("Vent" polymeráza, New England Biolabs). To vedie k dvom "dlhým produktom", ktoré obsahujú príslušné priméry pripojené svojimi koncami 5' kovalentne k novo syntetizovaným komplementom pôvodných vlákien. Reakčná zmes sa potom vráti do stavu podmienok polymerizácie, napríklad znížením teploty, inaktiváciou denaturačného prostriedku alebo prídavkom ďalšej polymerázy a zaháji sa druhý cyklus. Tento druhý cyklus poskytuje obe pôvodné vlákna, oba dlhé produkty z prvého cyklu, oba nové dlhé produkty replikované z pôvodných vlákien a oba "krátke produkty" replikované z dlhých produktov. Dlhé produkty majú sekvenciu cieľovej sekvencie s primérom pripojeným na každom konci. Pri každom ďalšom cykle sa vytvoria ďalšie dva dlhé produkty a rad krátkych produktov sa rovná počtu dlhých a krátkych produktov zostávajúcich na konci predchádzajúceho cyklu. Tým počet krátkych produktov obsahujúcich cieľovú sekvenciu rastie exponenciálne s každým cyklom. Prednostne sa PCR

uskutočňuje s komerčne dostupným tepelným cyklovačom, napríklad Perkin Elmer.

Ribonukleové kyseliny možno amplifikovať reverznou transkripciou mRNA do cDNA a potom vykonaním reakcie PCR (RT-PCR), ako sa opisuje vyššie. Alternatívne možno použiť jeden enzým pre oba kroky, ako sa opisuje v US patente č. 5 322 770. mRNA sa tiež môže podrobiť reverznej transkripcii do cDNA s nasledujúcou reakciou ligázy s asymetrickou medzerou (RT - AGLCR), ako opisuje Marshall a kol., PCR Meth. Appl., 4, 80 - 84 (1994).

Fluorogénna 5' nukleázová skúška, známa ako skúška TaqManTM (Perkin - Elmer) je vysoko účinný a prispôsobivý detekčný systém na báze PCR pre cieľové nukleové kyseliny. Preto priméry a sondy odvodené od oblastí genómu parvovírusu B19, ktoré sa tu opisujú, možno použiť v analýzach TaqManTM na detekciu prítomnosti infekcie v biologickej vzorke. Analýza sa uskutočňuje v súvislosti s termálnym cyklovaním sledovaním tvorby fluorescenčných signálov. Systém skúšky sa obíde bez analýzy gélovou elektroforézou a je schopný vytvoriť kvantitatívne údaje umožňujúce stanovenie počtu cieľových kópií.

Fluorogénna 5' nukleázová skúška sa vhodným spôsobom uskutočňuje s použitím napríklad DNA polymerázy AmpliTaqGoldTM, ktorá vykazuje endogénnu 5' nukleázovú aktivitu pre digesciu vnútornej oligonukleotidovej sondy značenej fluorescenčným reportérovým farbivom a zhášajúcim prostriedkom (pozri Holland a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 7276 - 7280 (1991) a Lee a kol., Nucl. Acids Res., 21, 3761 - 3766 (1993)). Výsledky skúšky sa detekujú meraním zmien fluorescencie nastávajúcich v priebehu cyklu amplifikácie tak, ako sa fluorescenčná sonda spracováva digesciou, odpojením značiek farbiva a zhášajúceho prostriedku a nárastom fluorescenčného signálu, ktorý je priamo úmerný amplifikácii cieľovej DNA.

Produkty amplifikácie možno detekovať v roztoku alebo s použitím pevných nosičov. V tomto spôsobe sa navrhuje sonda TaqManTM na hybridizáciu s cieľovou sekvenciou v požadovanom produkte PCR. Koniec 5' sondy TaqManTM obsahuje fluorescenčné reportérové farbivo. Koniec 3' sondy

sa blokuje, aby sa zabránilo extenzii sondy a obsahuje farbivo, ktoré bude zhášať fluorescenciu fluorofóru 5'. V priebehu nasledujúcej amplifikácie sa fluorescenčná značka odštiepi, pokiaľ je v reakcii prítomná aktivita 5' exonukleázy. Excízia 5' fluorofóru vedie k nárastu fluorescence, ktorý možno detekovať.

Konkrétne sa oligonukleotidová sonda tvorí takým spôsobom, aby bola v nehybridizovanom stave aspoň v jednej jednovláknovej konformácii, kde zhášajúca molekula je dostatočne blízko k reportérovej molekule na zhášanie fluorescence reportérovej molekuly. Oligonukleotidová sonda je tiež v aspoň jednej konformácii pri hybridizácii s cieľovým polynukleotidom, takže zhášajúca molekula nie je dostatočne blízko k reportérovej molekule, aby zhášala fluorescenciu reportérovej molekuly. Prijatím týchto hybridizovaných a nehybridizovaných konformácií vykazuje reportérová molekula a zhášajúca molekula na sonde rôzne intenzity fluorescenčného signálu v prípadoch, kedy je sonda hybridizovaná a nehybridizovaná. Tým možno stanoviť, či je sonda hybridizovaná či nehybridizovaná na základe zmeny intenzity fluorescence reportérovej molekuly, zhášajúcej molekuly alebo ich kombinácie. Navyše, pretože možno sondu konštruovať tak, aby zhášajúca molekula zhášala reportérovú molekulu, keď sonda nie je hybridizovaná, možno sondu konštruovať tak, aby reportérová molekula vykazovala obmedzenú fluorescenciu, pokiaľ nie je sonda hybridizovaná alebo digerovaná.

V súlade s tým sa tento vynález týka spôsobu amplifikácie cieľovej nukleotidovej sekvencie parvovírusu B19 s použitím polymerázy nukleovej kyseliny majúcej nukleázovú aktivitu 5' až 3', jedného či viacerých primérov schopných hybridizácie s cieľovou frekvenciou B19 a oligonukleotidovej sondy schopnej hybridizácie s cieľovou sekvenciou 3' B19 vzhľadom k priméru. V priebehu amplifikácie polymeráza digestuje oligonukleotidovú sondu, keď je hybridizovaná s cieľovou sekvenciou, čím oddeľuje reportérovú molekulu od zhášajúcej molekuly. Vykoná sa amplifikácia a sleduje sa fluorescencia reportérovej molekuly s fluorescenciou zodpovedajúcou výskytu amplifikácie nukleovej kyseliny. Reportérová molekula je prednostne fluoresceínovým

farbivom a zhášajúca molekula je prednostne rodamínovým farbivom.

I keď dĺžky primérov a sond sa môžu meniť, sekvencia sond sa volí takým spôsobom, aby mali nižšiu teplotu topenia ako sekvencia priméru. Preto sú sekvencie priméru všeobecne dlhšie ako sekvencie sondy. Zvyčajne sú sekvencie priméru v rozmedzí dĺžok medzi 10 a 75 nukleotidmi, bežnejšie v rozmedzí 20 až 45 nukleotidov. Bežná sonda je v rozmedzí dĺžok medzi 10 a 50 nukleotidmi, bežnejšie 15 až 40 nukleotidov dĺžky.

Pokiaľ sa použije pevný nosič, môže sa oligonukleotidová sonda pripojiť k pevnému nosiču rôznymi spôsobmi. Napríklad sa môže sonda pripájať k pevnému nosiču pripojením terminálneho nukleotidu 3' alebo 5' sondy k pevnému nosiču. Prednostnejšie sa sonda pripája k pevnému nosiču spojovacím článkom, ktorý slúži na zaistenie vzdialenosti sondy od pevného nosiča. Tento spojovací článok má dĺžku aspoň 15 až 30 atómov, prednostnejšie aspoň 15 až 50 atómov. Požadovaná dĺžka spojovacieho článku bude závisieť od konkrétneho použitého pevného nosiča. Napríklad spojka so 6 atómami je všeobecne dostatočná, pokiaľ sa ako pevný nosič používa zosieťovaný polystyrén. V odbore je známy rad spojovacích článkov, ktoré možno použiť na pripojenie oligonukleotidovej sondy k pevnému nosiču. Tento spojovací článok môže byť tvorený ktoroukoľvek zlúčeninou, ktorá významne neinterferuje s hybridizáciou cieľovej sekvencie so sondou pripojenou k pevnému nosiču. Tento spojovací článok môže tvoriť homopolymérny oligonukleotid, ktorý možno ľahko pripájať automatizovanou syntézou. Alternatívne možno použiť polyméry, ako je polyetylén glykol opatrený funkčnými skupinami. Tieto polyméry sa preferujú oproti homopolymérnym oligonukleotidom, pretože významne neinterferujú s hybridizáciou sondy s cieľovým oligonukleotidom. Obzvlášť sa preferuje polyetylén glykol.

Preferujú sa také spojenia medzi pevným nosičom, spojovacím článkom a sondou, ktoré sa neštiepia v priebehu odstraňovania chrániacich skupín bázy za bázických podmienok pri vysokej teplote. Príklady preferovaných spojení zahŕňujú karbamátové a amidové spojenia.

Príklady preferovaných typov pevných nosičov na imobilizáciu oligonukleotidovej sondy zahŕňujú sklá s definovanými pórmí, sklenené doštičky, polystyrén, polystyrénové guľôčky poťahované avidínom, celulózu, nylón, akrylamidový gél a aktivovaný dextrans.

Ohľadom podrobného opisu skúšky TaqMan™, chemikálií a podmienok na ich použitie pozri napríklad Holland a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 7276 - 7280 (1991), US patenty č. 5 538 848, 5 723 591 a 5 876 930.

Sekvencie parvovírusu B19, ktoré sa tu opisujú, možno tiež použiť ako bázy pre amplifikačné eseje sprostredkované transkripciou (TMA). TMA poskytuje spôsob identifikácie cieľovej sekvencie nukleovej kyseliny prítomnej vo veľmi malých množstvách v biologickej vzorke. S použitím spôsobov priamych skúšok môže byť ťažké či nemožné tieto sekvencie detekovať. TMA je konkrétne izotermálny, autokatalytický systém amplifikácie cieľovej nukleovej kyseliny, ktorý môže zaistiť viac ako milión kópií RNA cieľovej sekvencie. Skúšky možno vykonávať kvalitatívne kvôli presnému zisteniu prítomnosti či neprítomnosti cieľovej sekvencie v biologickej vzorke. Táto skúška môže tiež poskytnúť kvantitatívne meradlo množstva cieľovej sekvencie v koncentračnom rozmedzí niekoľkých rádov. TMA poskytuje spôsob autokatalytickej syntézy mnohých kópií cieľovej sekvencie nukleovej kyseliny bez opakujúcej sa manipulácie reakčných podmienok, ako je teplota, iónová sila a pH.

Všeobecne TMA zahŕňa nasledujúce kroky: (a) izoláciu nukleovej kyseliny vrátane RNA z danej biologickej vzorky, u ktorej je podozrenie na infekciu parvovírusom B19 a (b) spojenie do jednej reakčnej zmesi (i) izolovanej nukleovej kyseliny, (ii) prvého a druhého oligonukleotidového priméru, kde prvý primér má komplexačnú sekvenciu dostatočne komplementárnu k terminálnej časti 3' cieľovej sekvencie RNA, pokiaľ je prítomná (napríklad vlákno (+)) na vytvorenie komplexu s touto sekvenciou a druhý primér má komplexačnú sekvenciu dostatočne komplementárnu k terminálnej časti 3' cieľovej sekvencie jej komplementu (napríklad vlákno (-)), aby s ňou vytvoril komplex, kde prvý oligonukleotid ďalej obsahuje sekvenciu 5' ku komplexačnej sekvencii zahŕňujúcej promótor, (iii) reverznej transkriptázy alebo RNA- a DNA-

dependentnej DNA polymerázy, (iv) enzymatickej aktivity, ktorá selektívne degraduje vlákno RNA komplexu RNA-DNA (ako je RNAza H) a (v) RNA polymerázy, ktorá rozpoznáva promótor.

Zložky reakčnej zmesi možno kombinovať postupne alebo naraz. Reakčná zmes sa inkubuje za podmienok, kedy sa vytvára oligonukleotid/cieľová frekvencia vrátane podmienok primingu DNA a syntézy nukleovej kyseliny (vrátane ribonukleotid - trifosfátov a deoxyribonukleotid - trifosfátov) po dobu dostatočnú na zaistenie mnohých kópií cieľovej sekvencie. Reakcia sa výhodne uskutoční za podmienok vhodných na udržiavanie stability reakčných zložiek, ako sú enzymatické zložky a bez požiadavky na modifikáciu či manipuláciu reakčných podmienok v priebehu amplifikačnej reakcie. V súlade s tým môže reakcia nastávať za podmienok, ktoré sú v podstate izotermálne a zahŕňujú v podstate konštantnú iónovú silu a pH. Reakcia vo vhodných prípadoch nevyžaduje denaturačný krok na separáciu komplexu RNA - DNA poskytnutého prvou reakciou extenzie DNA.

Vhodné DNA polymerázy zahŕňujú reverzné transkriptázy, ako je reverzná transkriptáza vírusu vtáčej myeloblastózy (AMV) (dodáva napríklad Seikagaku America, Inc.) a reverzná transkriptáza Moloneyovho vírusu myšej leukémie (MMLV) (dodáva napríklad Bethesda Research Laboratories).

Promótory či promótorové sekvencie vhodné na inkorporáciu v priméroch sú sekvencie nukleových kyselín (buď prirodzených, produkovaných synteticky alebo produkovaných restričnou digesciou), ktoré sa špecificky rozpoznávajú RNA polymerázou, ktorá ich rozpoznáva a viaže sa na tieto sekvencie a zahajuje proces transkripcie za získania RNA transkriptov. Sekvencia môže prípadne obsahovať nukleotidové bázy prechádzajúce mimo skutočné rozpoznávacie miesto pre RNA polymerázu, ktoré môžu zaistiť väčšiu stabilitu či citlivosť voči degradačným procesom alebo zvýšenú transkripčnú účinnosť. Príklady použiteľných promótorov zahŕňujú tie, ktoré sa rozpoznávajú určitými bakteriofágovými polymerázami, ako sú polymerázy od bakteriofágov T3, T7 alebo SP6 alebo promótor *E. coli*. Tieto RNA polymerázy sú ľahko dostupné z komerčných zdrojov, ako sú New England Biolabs a Epicentre.

Niektoré z reverzných transkriptáz vhodné na použitie v týchto spôsoboch vykazujú aktivitu RNAzy H, ako je AMV reverzná transkriptáza. Môže sa však preferovať prídanie exogénnej RNAzy H, ako je RNAza H *E. coli*, dokonca i pri použití reverznej transkriptázy AMV. RNAzu H možno ľahko získať od Bethesda Research Laboratories.

Transkripty RNA získané týmito spôsobmi môžu slúžiť ako templáty na získanie ďalších kópií cieľovej sekvencie vyššie opísanými mechanizmami. Systém je autokatalytický a amplifikácia nastáva autokatalyticky bez nutnosti opakovanej modifikácie či zmeny reakčných podmienok, ako je teplota, pH, iónová sila či podobne.

Detekciu možno vykonávať s použitím radu rôznych spôsobov, vrátane priameho sekvencovania, hybridizácie sekvenčne špecifických oligomérov, gélovej elektroforézy a hmotnostnej spektrometrie. Tieto spôsoby môžu využívať heterogénne či homogénne formáty, izotopické či neizotopické značky, rovnako tak ako použitie bez značiek.

Jedným preferovaným spôsobom detekcie je použitie oligonukleotidových sond špecifických pre cieľové sekvencie, odvodených od vyššie opísaných fragmentov 4,7 kbp, 700 bp, 370 bp a 214 bp. Tieto sondy možno použiť v skúškach ochrany hybridizácie (HPA). V tomto uskutočnení sa sondy vhodným spôsobom značia akridíniumesterom (AE), vysoko chemiluminiscenčnou molekulou. Pozri napríklad Nelson a kol. (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" v Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing, Kricka L. J. (red.), Academic Press (HPA) to PCR" v The Polymerase Chain Reaction, Mullis a kol. (red.), Birkhauser, Boston, MA, Weeks a kol., Clin. Chem., 29, 1474 - 1479 (1983), Berry a kol., Clin. Chem., 34, 2087 - 2090 (1988). Jedna molekula AE sa priamo pripája k sonde s použitím chemického spojovacieho článku, ktorý nie je založený na nukleotidoch a umožňuje umiestnenie značky do akéhokoľvek miesta sondy. Pozri napríklad US patenty č. 5 585 481 a 5 185 439. Chemiluminiscencia sa spúšťa reakciou s alkalickým peroxidom vodíka za získania excitovaného N-metylakridónu, ktorý následne prechádza do základného stavu s emisiou

fotónu. Navyše AE spôsobuje hydrolýzu esteru, ktorá poskytuje nechemiluminiscenčnú metylakridíniovú karboxylovú kyselinu.

Keď sa molekula AE viaže kovalentne na sondu nukleovej kyseliny, prebieha hydrolýza rýchlo za mierne alkalických podmienok. Keď je sonda značená AE presne komplementárna cieľovej nukleovej kyseline, rýchlosť hydrolýzy AE sa značne zníži. Preto možno detekovať hybridizované a nehybridizované sondy značené AE priamo v roztoku bez nutnosti fyzického oddelenia.

HPA všeobecne zahŕňa nasledujúce kroky: (a) sonda značená AE sa hybridizuje s cieľovou nukleovou kyselinou v roztoku počas zhruba 15 až 30 minút. Potom sa pridá mierne alkalický roztok a AE pripojený na nehybridizovanú sondu sa hydrolyzuje. Táto reakcia trvá zhruba 5 až 10 minút. Zvyšný hybridne pripojený AE sa detekuje ako miera množstva prítomnej cieľovej látky. Tento krok trvá zhruba 2 až 5 sekúnd. Prednostne sa uskutočňuje diferenciálny krok hydrolýzy pri tej istej teplote ako hybridizačný krok, zvyčajne pri 50 až 70°C. Alternatívne možno vykonávať druhý diferenciálny krok hydrolýzy pri teplote miestnosti. To umožňuje použitie zvýšených pH, napríklad v rozmedziach 10 až 11, za získania väčších rozdielov v rýchlosti hydrolýzy medzi hybridizovanou a nehybridizovanou sondou značenou AE. HPA sa opisuje podrobne napríklad v US patentoch č. 6 004 745, 5 948 899 a 5 283 174.

TMA sa opisuje podrobne napríklad v US patente č. 5 399 491. V jednom príklade typickej skúšky sa izolovaná vzorka nukleovej kyseliny, u ktorej je podozrenie, že obsahuje cieľovú sekvenciu parvovírusu B19, zmieša s koncentrátom pufru obsahujúcim pufor, soli, horečnaté ióny, nukleotid-trifosfáty, priméry, ditiotritol a spermidín. Reakčná zmes sa prípadne inkubuje pri teplote zhruba 100 °C počas zhruba 2 minút kvôli denaturácii akejkoľvek sekundárnej štruktúry. Po ochladení na teplotu miestnosti sa pridá reverzná transkriptáza, RNA polymeráza a RNAza H a zmes sa inkubuje počas 2 až 4 hodín pri teplote 37 °C. Výsledok reakcie možno potom vyhodnotiť denaturáciou proteínu prídavkom roztoku sondy, inkubáciou počas 20 minút pri

teplote 60 °C, pridaním roztoku na selektívnu hydrolýzu nehybridizovanej sondy inkubáciou reakcie počas 6 minút pri teplote 60 °C a meraním zvyšnej chemiluminiscencie v luminometre.

Oligonukleotidové molekuly podľa tohto vynálezu možno tiež použiť pri amplifikácii na báze sekvencie nukleových kyselín (NASBA). Tento spôsob je enzymatickým procesom zameraným na promótor, ktorý indukuje *in vitro* nepretržitú homogénnu a izotermálnu amplifikáciu špecifickej nukleovej kyseliny za získania RNA kópií tejto nukleovej kyseliny. Reakčné prostriedky na vykonanie NASBA zahŕňujú prvý primér DNA s koncom 5' obsahujúcim promótor, druhý primér DNA, reverznú transkriptázu, RNAzu H, T7 RNA polymerázu, NTP a dNTP. S použitím NASBA sa vytvoria veľké množstvá jednovláknovej RNA z buď jednovláknovej RNA alebo DNA alebo dvojvláknovej DNA. Keď sa má amplifikovať RNA, slúži ssRNA ako templát na syntézu prvého vlákna DNA predĺžením prvého priméru obsahujúceho rozpoznávacie miesto RNA polymerázy. Toto vlákno DNA ďalej slúži ako templát na syntézu druhého, komplementárneho DNA vlákna predĺžením druhého priméru za získania dvojvláknového aktívneho RNA polymerázového promótorového miesta a druhé vlákno DNA slúži ako templát na syntézu veľkých množstiev prvého templátu, ssRNA, s pomocou RNA polymerázy. Spôsob NASBA je známy v odbore a opisuje sa napríklad v európskom patente 329 822, medzinárodnej patentovej prihláške č. WO 91/02814 a US patentoch č. 6 063 603, 5 554 517 a 5 409 818.

Sekvencie parvovírusu B19, ktoré sa tu opisujú, sú rovnako použiteľné pre spôsoby hybridizácie a amplifikácie nukleových kyselín využívajúcich rozvetvené molekuly DNA. Pri skúške s bázičkou hybridizáciou nukleových kyselín sa stanovovaná jednovláknová zložka nukleovej kyseliny hybridizuje s jednovláknovou sondou nukleovej kyseliny a detekujú sa výsledné duplexy. Pozmenenie tejto základnej schémy umožňuje oddelenie duplexov kvôli detekcii z cudzorodých materiálov a/alebo kvôli amplifikácii signálu, ktorý sa detekuje. Jedným spôsobom amplifikácie signálu je amplifikácia multimérov, čo sú polynukleotidy s prvým segmentom hybridizujúcim špecificky na

stanovovanú nukleovú kyselinu alebo vlákno nukleovej kyseliny viazanej na stanovovanú zložku a iterácia druhého segmentu, ktorý špecificky hybridizuje so značenou sondou. Amplifikácia je teoreticky priamo úmerná počtu iterácií druhého segmentu. Multiméry môžu byť lineárne či rozvetvené. V týchto spôsoboch sú použiteľné dva všeobecné typy rozvetvených multimérov: v tvare vidličky a v tvare hrebienka. Spôsoby prípravy a použitia rozvetvených molekúl nukleových kyselín sú známe v odbore a opisujú sa napríklad v US patente č. 5 849 481.

V ďalšom aspekte tohto vynálezu sa vykonajú dve či viac vyššie opísaných skúšok kvôli overeniu prítomnosti organizmov. Napríklad, ak prvá skúška používa transkripciou sprostredkovanú amplifikáciu (TMA) na amplifikáciu nukleových kyselín kvôli detekcii, potom sa vykoná alternatívna skúška testovania nukleovej kyseliny (NAT), napríklad s použitím amplifikácie PCR, RT PCR a podobne, ako sa tu opisuje. Týmto spôsobom možno parvovírus B19 špecificky a selektívne detekovať, dokonca i keď vzorka obsahuje iné organizmy, ako je napríklad vírus HIV a vírus hepatitídy B.

Možno si ľahko uvedomiť, že návrhy skúšok, ktoré sa tu opisujú, sú predmetom značnej variácie a v odbore je známy rad formátov. Opisy vyššie sa udávajú iba ako vodidlo a skúsený odborník môže ľahko modifikovať opísané protokoly s použitím spôsobov dobre známych v odbore.

Vyššie opísané reakčné prostriedky na skúšku vrátane primérov, sond, nosičov s naviazanými sondami rovnako tak ako ďalších detekčných prostriedkov možno dodávať v súpravách s vhodnými návodmi a ďalšími nevyhnutnými reakčnými zložkami na vykonávanie skúšok, ako sa opisujú vyššie. Súprava bude bežne obsahovať v jednotlivých nádobkách kombináciu primérov a sond (bud' už naviazaných na pevnú maticu alebo oddelene s reakčnými prostriedkami na ich väzbu s maticou), kontrolné formulácie (pozitívne a/alebo negatívne), značené činidlá, pokiaľ formát skúšky niektoré vyžaduje a činidlá na vytvorenie signálu (napríklad substrát enzýmu), pokiaľ značka nevytvára signál priamo. Inštrukcie (napríklad písomné, na páske, VCR, CD-ROM a podobne) na vykonanie skúšky sa zvyčajne zahrňujú do súpravy.

Súprava môže tiež obsahovať v závislosti od konkrétnej použitej skúšky ďalšie balené reakčné prostriedky a materiály (t.j. premývacie pufry a podobne). Štandardné skúšky, ako sú tie, ktoré sa opisujú vyššie, možno vykonávať s použitím týchto súprav.

III. Spôsoby uskutočňovania experimentov

Nižšie sa opisujú príklady špecifických uskutočnení na vykonávanie tohto vynálezu. Príklady sa ponúkajú iba na ilustračné účely a nemyslia sa v tom zmysle, aby obmedzovali akýmkoľvek spôsobom rozsah tohto vynálezu.

Je snaha o zaistenie presnosti vzhľadom k hodnotám (napríklad množstvo, teplota, atď.), avšak je potrebné pripustiť určitú experimentálnu chybu a odchýlku.

Enzýmy v nasledujúcich prípadoch pochádzajú z komerčných zdrojov a používajú sa podľa návodov výrobcu. Nitrocelulóзовé filtre a podobne boli rovnako zakúpené z komerčných zdrojov.

Pri izolácii DNA fragmentov sa vykonávajú všetky manipulácie s DNA podľa štandardných spôsobov, pokiaľ sa neopisuje inak. Pozri Sambrook a kol., vyššie. Restričné enzýmy, T4 DNA ligáza, *E. coli*, DNA polymeráza I, Klenowov fragment a ďalšie biologické prostriedky možno získať od komerčných dodávateľov a použiť podľa návodov výrobcu. Fragменты dvojvláknovej DNA sa oddeľujú na agarózových géloch.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Extrakcia nukleovej kyseliny parvovírusu B19 pre PCR

Vzorky ľudského séra prv pozitívne testované na ľudský parvovírus B19 buď skúškou IgM alebo skúškou PCR sa získajú z komerčných zdrojov a použijú na izoláciu DNA kvôli následným experimentom PCR. Vzorky sa ukladajú do použitia pri teplote 80 °C.

DNA sa extrahuje z 0,2 ml séra s použitím súboru QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) podľa špecifikácií výrobcu s nasledujúcimi úvahami. Nosič DNA sa pridá k pufru kvôli rozpusteniu štruktúr pre zvýšenie väzby a výťažku nukleovej kyseliny. Konkrétne sa pridá množstvo 5,6 µg na vzorku polyadenylovej kyseliny 5' (Sigma, St. Louis, MO) alebo poly-dA (Roche, Indianapolis, IN). Ďalej sa DNA parvovírus B19 eluuje 200 µl pufru A (Qiagen) namiesto vodou.

Príklad 2

Detekcia vzoriek pozitívnych na nukleovú kyselinu parvovírusu B19 pomocou PCR

Používajú sa dva rôzne spôsoby PCR na amplifikáciu fragmentov parvovírusu B19. Jeden spôsob, opísaný podrobne nižšie, sa používa na amplifikáciu fragmentov zhruba 700 bp, 370 bp a 214 bp (pozri obrázok 1). Spôsob High Fidelity Expand PCR (Roche) sa používa na amplifikáciu fragmentov zhruba 4,7 kb. Fragment zhruba 700 bp zodpovedá polohám nukleotidu 2936 až 3635 genómu parvovírusu B19, ako opisujú Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986). Zhruba 370 bp sa vyskytuje vo fragmente 700 bp v polohách nukleotidu 3073 až 3442. Fragment zhruba 4,7 kb je fragment nukleotidu 4677 zodpovedajúci polohám nukleotidu 217 až 4893 podľa Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986).

Na amplifikáciu fragmentov B19 zhruba 700 bp, 370 bp a 214 bp sa používajú priméry udané v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Oblasť priméru	Sekvencia	Produkt PCR	Genómová
VP-5	AGGAAGTTTGCCGGAAGTTC (č. id. sekvencie: 36)	370 bp	VP1
VP-3	GTGCTGAAACTCTAAAGGTG (č. id. sekvencie: 37)	370 bp	VP1
VP2-5	GACATGGATATGAAAAGCCTGAAG (č. id. sekvencie: 38)	214 bp	
VP1/VP2			
VP2-3	GTTGTTTCATATCTGGTTAAGTACT (č. id. sekvencie: 39)	214 bp	
VP1/VP2			
K-1sp	ATAAATCCATATACTCATT (č. id. sekvencie: 40)	700 bp	
VP1/VP2			
K-2sp	CTAAAGTATCCTGACCTTG (č. id. sekvencie: 41)	700 bp	
VP1/VP2			

Pre tento experiment sa PCR uskutočňuje v konečnom objeme 100 μ l s použitím 2 μ l purifikovanej DNA parvovírusu B19 (purifikácia podľa opisu vyššie), po 0,2 mM každého deoxynukleotid-trifosfátu a 1,25 jednotiek Pfu DNA polymerázy (Stratagene, La Jolla, CA). Amplifikačný profil zahrňuje denaturáciu pri teplote 94 °C počas 2 minút, anelovanie priméru pri 37 °C počas 3 minút a extenziu pri 72 °C počas 3 minút po 35 cyklov. Predbežná inkubácia 3 minúty pri 94 °C kvôli zaisteniu počiatočnej denaturácie a konečná počas 7 minút pri teplote 72 °C kvôli zaisteniu plnej extenzie fragmentov predchádza pred týmito 35 PCR cyklami, resp. nasleduje po nich. PCR produkty sa podrobia elektroforéze na 7 % polyakrylamidových géloch, zafarbia etídium-bromidom a vizualizujú pod zdrojom ultrafialového svetla. Purifikácia amplifikovaných fragmentov sa uskutočňuje pomocou súpravy QiaQuick PCR (QIAGEN).

PCR na amplifikáciu fragmentu 370 bp B19 sa uskutočňuje, keď sa pás 700 bp na polyakrylamidových géloch nezobrazuje. Materiál 700 bp sa použije pre PCR s použitím primérov ukázaných v tabuľke 1.

Súprava High Fidelity Expand PCR (Roche) sa používa na amplifikáciu fragmentu 4,7 kb parvovírusu B19 nasledujúcim spôsobom. Použije sa súprava High Fidelity Expand PCR (Roche) a priméry Hicks-5 (5' CCCGCCTTATGCAATGCAAAT-GGGCAG3') (číslo identifikácie sekvencie 42) a Hicks 3 (5' TTGTGTTAGGCTGT-CTTATAGG3') (číslo identifikácie sekvencie 43) podľa odporúčení dodávateľa. Podmienky amplifikácie sú 94 °C počas 1 minútu, 50 °C počas 2 minút a 68 °C počas 4 minút pre 35 alebo 45 cyklov. Uskutočňuje sa tiež predbežná inkubácia pri 94 °C počas 2 minút a dodatočná inkubácia pri 75 °C počas 7 minút. Produkty PCR sa separujú na 1 % agarových géloch a purifikujú purifikačnou súpravou PCR Purification (Promega, Madison, WI).

Príklad 3

Klonovanie fragmentov DNA parvovírusu B19

Fragmenty PCR sa klonujú do vektorov TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Klonovanie do týchto vektorov sa značne uľahčí, ak amplifikovaná DNA obsahuje pri svojom konci 3' jeden deoxyadenozín (A). V súlade s tým sa používa katalytická reakcia na pridanie koncového 3' (A). Reakčná zmes obsahuje 1,25 mM dATP, 0,5 jednotiek Taq polymerázy (Perkin Elmer, Boston, MA) a reakcia pokračuje pri teplote 72 °C počas 15 minút.

Fragmenty PCR sa klonujú do vektoru pCR2.1-TOPO s použitím klonovacej súpravy Invitrogen TA (TOPOTM TA Cloning^R Kit s One Shot TOP10 Electrocompetent Cells) podľa špecifikácií výrobcu. Bakteriálne bunky sa inkubujú pri teplote 37 °C na doštičkách Luria Broth obsahujúcich ampicilín s koncentráciou 100 µg/ml, 0,66 mM IPTG a 0,033 % X-Gal. Niekoľko bielych kolónií sa naočkuje do 4 ml ampicilínu Luria - Broth (100 µg/ml) a inkubuje cez noc pri teplote 37 °C za trepania. 3 ml týchto kultúr sa použijú na prípravu DNA plazmidu pomocou súpravy QIAprep Miniprep (QIAGEN). Rekombinantné klony sa identifikujú restričnou enzýmovou analýzou s EcoRI (New England a Biolabs) a vykoná sa elektroforéza na 7 % polyakrylamidovom alebo 1 %

agarózovom géli, ako sa opisuje vyššie.

Na stanovenie sekvencií DNA klonov sa pripraví veľké množstvo plazmidov z rekombinantných klonov ako vyššie a DNA sa suspenduje v TE (10 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) s koncentráciou 0,2 mg/ml. Stanovenie nukleotidovej sekvencie fragmentu parvovírusu B19 sa uskutočňuje s použitím systému Applied Biosystems Model 373 (alebo Model 377) DNA Sequencer.

Obrázky 2A až 2U (čísla identifikácie sekvencie 1 až 21) zobrazujú sekvencie DNA z 21 izolátov parvovírusu B19, purifikované, amplifikované a sekvencované, ako sa opisuje vyššie, zodpovedajúce polohám nukleotidu 2936 až 3635 genómu parvovírusu B19 opísanému v Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986) (fragment 700 bp znázornený na obrázku 1 a opísaný vyššie). Obrázok 2A (číslo identifikácie sekvencie 1) je sekvencia z izolátu CH47-26, obrázok 2B (číslo identifikácie sekvencie 2) je sekvencia z izolátu CH48-29, obrázok 2C (číslo identifikácie sekvencie 3) je sekvencia z izolátu CH33-2, obrázok 2D (číslo identifikácie sekvencie 4) je sekvencia z izolátu CH33-3, obrázok 2E (číslo identifikácie sekvencie 5) je sekvencia z izolátu CH33-4, obrázok 2F (číslo identifikácie sekvencie 6) je sekvencia z izolátu CH42-7, obrázok 2G (číslo identifikácie sekvencie 7) je sekvencia z izolátu CH42-18, obrázok 2H (číslo identifikácie sekvencie 8) je sekvencia z izolátu CH42-19, obrázok 2I (číslo identifikácie sekvencie 9) je sekvencia z izolátu CH46-23, obrázok 2J (číslo identifikácie sekvencie 10) je sekvencia z izolátu CHI-1, obrázok 2K (číslo identifikácie sekvencie 11) je sekvencia z izolátu CH1-6, obrázok 2L (číslo identifikácie sekvencie 12) je sekvencia z izolátu CH2-8, obrázok 2M (číslo identifikácie sekvencie 13) je sekvencia z izolátu CH2-10, obrázok 2N (číslo identifikácie sekvencie 14) je sekvencia z izolátu CH2-11C, obrázok 2O (číslo identifikácie sekvencie 15) je sekvencia z izolátu CH5-13, obrázok 2P (číslo identifikácie sekvencie 16) je sekvencia z izolátu CH7-22, obrázok 2Q (číslo identifikácie sekvencie 17) je sekvencia z izolátu CH13-27, obrázok 2R (číslo identifikácie sekvencie 18) je sekvencia z izolátu CH4-33, obrázok 2S (číslo identifikácie sekvencie 19) je sekvencia z izolátu CH62-2, obrázok 2T (číslo identifikácie sekvencie 20) je sekvencia z izolátu CH64-2 a

obrázok 2U (číslo identifikácie sekvencie 21) je sekvencia z izolátu CH67-2.

Obrázky 11A až 11Z (čísla identifikácie sekvencie 62 až 87) znázorňujú sekvencie DNA z ďalších 26 izolátov parvovírusu B19, purifikované, amplifikované a sekvencované, ako sa opisuje vyššie, zodpovedajúce polohám nukleotidov 2936 až 3635 genómu parvovírusu B19 ako opisujú Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986) (fragment 700 bp znázornený na obrázku 1 a opísaný vyššie). Obrázok 11A (číslo identifikácie sekvencie 62) je sekvencia z izolátu CH80-1, obrázok 11B (číslo identifikácie sekvencie 63) je sekvencia z izolátu CH81-3, obrázok 11C (číslo identifikácie sekvencie 64) je sekvencia z izolátu B19SCL1-4, obrázok 11D (číslo identifikácie sekvencie 65) je sekvencia z izolátu B19SCL2-1, obrázok 11E (číslo identifikácie sekvencie 66) je sekvencia z izolátu B19SCL3-1, obrázok 11F (číslo identifikácie sekvencie 67) je sekvencia z izolátu B19SCL3-1, obrázok 11G (číslo identifikácie sekvencie 68) je sekvencia z izolátu B19SCL5-2, obrázok 11H (číslo identifikácie sekvencie 69) je sekvencia z izolátu B19SCL6-2, obrázok 11I (číslo identifikácie sekvencie 70) je sekvencia z izolátu B19SCL7-3, obrázok 11J (číslo identifikácie sekvencie 71) je sekvencia z izolátu B19SCL8-2, obrázok 11K (číslo identifikácie sekvencie 72) je sekvencia z izolátu B19SCL9-1, obrázok 11L (číslo identifikácie sekvencie 73) je sekvencia z izolátu B19SCL9-9, obrázok 11M (číslo identifikácie sekvencie 74) je sekvencia z izolátu B19SCL10-2, obrázok 11N (číslo identifikácie sekvencie 75) je sekvencia z izolátu B19SCL11-1, obrázok 11O (číslo identifikácie sekvencie 76) je sekvencia z izolátu B19SCL12-1, obrázok 11P (číslo identifikácie sekvencie 77) je sekvencia z izolátu B19SCL13-3, obrázok 11Q (číslo identifikácie sekvencie 78) je sekvencia z izolátu B19SCL14-1, obrázok 11R (číslo identifikácie sekvencie 79) je sekvencia z izolátu B19SCL15-3, obrázok 11S (číslo identifikácie sekvencie 80) je sekvencia z izolátu B19SCL16-2, obrázok 11T (číslo identifikácie sekvencie 81) je sekvencia z izolátu B19SCL17-1, obrázok 11U (číslo identifikácie sekvencie 82) je sekvencia z izolátu B19SCL18-1, obrázok 11V (číslo identifikácie sekvencie 83) je sekvencia z izolátu B19SCL19-1, obrázok 11W (číslo identifikácie sekvencie 84) je sekvencia z izolátu B19SCL20-3, obrázok 11X (číslo identifikácie sekvencie 85) je

sekvencia z izolátu B19SCL21-3, obrázok 11Y (číslo identifikácie sekvencie 86) je sekvencia z izolátu B19SCL22-11, obrázok 11Z (číslo identifikácie sekvencie 87) je sekvencia z izolátu B19SCL2-14.

Porovnanie sekvencií ukazuje zhruba 98 % až 99,5 % sekvenčnej homológie tejto sekvencie 700 bp medzi rôznymi izolátmi.

Obrázky 3A až 3C (číslo identifikácie sekvencie 22) ukazujú sekvenciu pre fragment zhruba 4,7 kbp PCR znázornený na obrázku 1 a opísaný vyššie pre klon 2-B1 parvovírusu B19. Sekvencia znázornená na obrázkoch je nukleotidový fragment 4677 zodpovedajúci polohám nukleotidu 217 až 4893 podľa Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986). Znázornená sekvencia obsahuje otvorený čítací rámec plnej dĺžky parvovírusu B19 kódujúci NS1, VP1 a VP2, plus ďalšie nepreložené sekvencie 5' a 3'. Sekvencovaný fragment obsahuje ďalší nukleotid nekódovacej oblasti 5' medzi nukleotidovými polohami 367 a 368 sekvencie B19, ako opisuje Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986).

Obrázky 4A až 4C (číslo identifikácie sekvencie 23) ukazujú sekvenciu pre fragment zhruba 4,7 kbp PCR znázornený na obrázku 1 z klonu 2-B6 parvovírusu B19. Sekvencia predstavuje fragment nukleotidu 4677 zodpovedajúci polohám nukleotidu 217 až 4893, ako opisuje Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986). Znázornená sekvencia obsahuje otvorený čítací rámec plnej dĺžky parvovírusu B19 kódujúci NS1, VP1 a VP2 plus ďalšie nepreložené sekvencie 5' a 3'. Sekvencovaný fragment obsahuje ďalší nukleotid v nekódovacej oblasti 5' medzi polohami nukleotidu 367 a 368 sekvencie B19, ako opisuje Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986).

Príklad 4

Klonovanie a expresia rekombinantných proteínov NS1, VP1 a VP2 parvovírusu B19

Fragmenty kódujúce NS1, VP1 a VP2 (pozri obrázok 1) sa amplifikujú s použitím fragmentu 4,7 kb parvovírusu B19 klonovaného do pCR2.1-TOPO

(opísaného vyššie). Konkrétne sa priméry PCR (pozri nižšie) vyberajú pre PCR z oblastí NS1, VP1 a VP2 parvovírusu B19. Kvôli uľahčeniu klonovania týchto oblastí sa do restričných miest expresných vektorov kvasiniek XbaI, HindIII a Sall zavádzajú priméry podľa požiadaviek.

Priméry používané na klonovanie a amplifikáciu fragmentov parvovírusu B19 pre expresiu rekombinantných proteínov NS1, VP1 a VP2 kvasiniek sa zakladajú na sekvenciách získaných vyššie a sú to nasledujúce priméry:

NS1-5 (primér toho istého zmyslu)

5'

ATACTCTCTAGACAAAACAAAATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAAGTT
TCT-3'

(číslo identifikácie sekvencie 44)

NS1-3 (primér opačného zmyslu)

5' GAGTATGTCTGACTTACTCATAATCTACAAAGCTTTGCAATCCAGACAG3'

(číslo identifikácie sekvencie 45)

VP1-5SN (primér tohto istého zmyslu)

5'

ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGAGTAAAGAAAGTGGCAAATGGTGGGA
AAGT3'

(číslo identifikácie sekvencie 46)

VPALL-3 (primér opačného zmyslu)

5'

GAGTATGTCTGACTTACAATGGGTGCACACGGCTTTTGGCTGTCCACAATT
C3'

(číslo identifikácie sekvencie 47)

VP2-5SN (primér toho istého zmyslu)

5'

ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAG
C ACT 3'

(číslo identifikácie sekvencie 48)

PCR sa syntetizujú, purifikujú a suspendujú v 300 μ l dH₂O a stanovia sa ich optické hustoty pri 260 nm. Reakčná zmes obsahuje 0,25 ng templátu, 100 pmól každého priméru, po 10 μ l 1,25 mM každého dNTP a 1 jednotku Taq polymerázy (Perkin Elmer, Boston, MA) v konečnom objeme 50 μ l. Podmienky amplifikácie sú 94 °C počas 1 minúty, 50 °C počas 2 minút a 68 °C počas 4 minút po 35 cyklov. Kvôli zaisteniu plnej extenzie fragmentov sa pridáva dodatočná inkubácia 7 minút pri teplote 75 °C. Na overenie PCR syntézy elektroforézou na 1 % agarovom géli sa používajú alikvóty 5 μ l. Celkový produkt PCR sa potom podrobí elektroforéze a fragmenty vykazujúce očakávané rozmery sa purifikujú z gélov s použitím purifikačnej súpravy PCR Purification (Promega) podľa návodov dodávateľa. Zhruba 0,8 μ g purifikovanej PCR DNA sa digestuje s príslušnými restriktónymi enzýmami (Roche) počas 3 hodín a 37 °C a produkty sa ďalej purifikujú použitím purifikačnej súpravy Promega PCR Purification.

Plazmid pBS24.1 sa používa na heterológnu expresiu rekombinantných proteínov parvovírusu B19. Tento kvasinkový expresný vektor obsahuje sekvencie 2 μ a invertované opakované motívy (IR) na autonómnú replikáciu v kvasinkách, terminátor alfa-faktoru na zaistenie ukončenia transkripcie a leu2-d a URA3 kvasiniek na selekciu. Pôvod replikácie Co1E1 a beta-laktamázový gén sú rovnako prítomné kvôli šíreniu a selekcii v *E. coli* (Pichuanter a kol. (1996) "Expression of Heterologous Gene Products in Yeast". V: Protein Engineering: A Guide to Design and Production, kapitola 5. J. L. Cleland a C. Craik, red., Wiley - Liss, Inc., New York, N. Y., str. 129 - 161). Plazmid pBS24.1 sa digestuje BamHI/Sall a defosforyluje s 10 jednotkami alkalické fosfatázy telacieho čreva (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) za podmienok

odporučených dodávateľom. Digerované a purifikované fragmenty PCR sa zmiešajú s pB524.1 digestovaným BamHI/Sall a s fragmentom DNA obsahujúcim hybridný promótor kvasiniek ADH2/GAPDH (Cousens a kol., Gene, 61, 265 - 275 (1987) digestovaný buď BamHI/SfuI alebo BamHI/HindIII v závislosti od restričných miest prítomných vo fragmentoch PCR, ktoré sa majú klonovať. Ligácia sa vykoná súpravou Roche Rapid Ligation podľa návodu v tejto súprave. Ligačná zmes sa potom použije na transformáciu HB101 kompetentných buniek *E. coli* a transformanty sa selektujú na mištičkách Luria - Broth obsahujúcich ampicilín s koncentráciou 100 µg/ml po inkubácii cez noc pri teplote 37 °C. Na každú transformáciu sa vyberie niekoľko kolónií a očkuje do 3 ml Luria - Broth s ampicilínom s koncentráciou 100 µg/ml a inkubuje za trepania pri teplote 37 °C cez noc.

DNA plazmidu sa pripraví s použitím 1,5 ml kultúr a súpravy QIAprep Miniprep (QIAGEN). Rekombinačné klony sa identifikujú analytickou restričnou enzýmovou analýzou s BamHI-Sall. Prípravy rekombinantných plazmidov vo veľkom meradle sa vykonávajú kvôli sekvencovaniu overenia nukleotidovej sekvencie fragmentov klonovaného parvovírusu B19.

Expresné plazmidy kvasiniek vykazujúce očakávanú sekvenciu pre NS1, VP1 a VP2 sa použijú na transformáciu kvasiniek nasledujúcim spôsobom. Kompetentné bunky AD3 *Saccharomyces cerevisiae* (Mat a, trp1+, ura3-52, prb1-1122, pep4-3, prc1-407, [cir⁰], ::pDM15(pGAP/ADR1::G418^R), leu2 (ΔAD)) sa transformujú plazmidovými DNA kódujúcimi NS1, VP1 alebo VP2 klonovanými, ako sa opisuje vyššie. Voľba kvasinkových rekombinantných zložiek sa dosiahne dvoma priebehmi na uracil-deficientných mištičkách s nasledujúcim jedným priebehom na leucín-deficientných mištičkách po inkubácii pri teplote 30 °C počas 48 až 72 hodín. Kultúry potom rastú v leucín-deficientnom médiu a potom v YEP obohatenom 2 % glukózy (Pichuanes a kol., Proteins: Struc. Funct. Genet., 6, 324 - 337, (1989)) počas 48 hodín pred overením exprese rekombinantných proteínov.

Sekvencie pre rôzne proteíny z dvoch rôznych izolátov ukazujú obrázky 5 až 10. Konkrétne obrázky 5A (číslo identifikácie sekvencie 24) a 5B (číslo identifikácie sekvencie 25) ukazujú NS1 nukleotidové, resp. proteínové sekvencie z klonu 2-B1 parvovírusu B19. Obrázky 6A (číslo identifikácie sekvencie 26) a 6B (číslo identifikácie sekvencie 27) ukazujú nukleotidové, resp. proteínové sekvencie VP1 z klonu 2-B1 parvovírusu B19. Obrázky 7A (číslo identifikácie sekvencie 28) a 7B (číslo identifikácie sekvencie 29) ukazujú sekvencie nukleotidu, resp. proteínu VP2 z klonu 2-B1 parvovírusu B19. Obrázky 8A (číslo identifikácie sekvencie 30) a 8B (číslo identifikácie sekvencie 31) ukazujú sekvencie nukleotidu, resp. proteínu NS1 z klonu 2-B1 parvovírusu B19. Obrázky 9A (číslo identifikácie sekvencie 32) a 9B (číslo identifikácie sekvencie 33) ukazujú sekvencie nukleotidu, resp. proteínu VP1 z klonu 2-B6 parvovírusu B19. Obrázky 10A (číslo identifikácie sekvencie 34) a 10B (číslo identifikácie sekvencie 35) ukazujú sekvencie nukleotidu, resp. proteínu VP2 z klonu 2-B6 parvovírusu B19.

Príklad 5

Detekcia a kvantitatívne vyhodnotenie DNA parvovírusu B19 pomocou TaqMan™

Selektívny diagnostický spôsob detekcie infekcie parvovírusom B19 sa navrhuje nasledujúcim spôsobom. Konkrétne sa použije spôsob PCR TaqMan™ na detekciu a kvantitatívne vyhodnotenie DNA parvovírusu B19. Kvantitatívna PCR vyžaduje účinnú extrakciu nukleovej kyseliny. Objem krvnej plazmy/krvného séra použitého na extrakciu DNA rovnako ovplyvňuje citlivosť detekcie. Používajú sa dva spôsoby na izoláciu nukleovej kyseliny z 0,5 ml plazmy/séra. Konkrétne sa DNA extrahuje (a) väzbou na silikagél a (b) anelovaním na cieľovo špecifické oligonukleotidy.

(a) Izolácia nukleovej kyseliny väzbou na silikagél

Za prítomnosti vysokých koncentrácií chaotropnej soli, ako je guanidínium-izotiokyanát, sa nukleové kyseliny viažu na silikagél. Nukleové kyseliny s malou veľkosťou molekuly sa viažu na silikagél účinnejšie za podmienok kyslého pH. Viazané nukleové kyseliny sa účinne eluujú v alkalickom pufre s nízkym obsahom solí pri vysokých teplotách. Použitie magnetizovaných guliek namiesto bežného silikagélu značne uľahčuje premývacie a eluačné kroky izolácie nukleových kyselín. Magnetická fáza sa používa na zachytenie častíc silikagélu s naviazanou nukleovou kyselinou, čím sa eliminuje centrifugácia požadovaná na sedimentáciu bežných častíc silikagélu. Pufo na rozrušenie štruktúr pochádza od Organon-Teknika (Durham, NC). Tento pufo obsahuje guanidínium - izotiokyanát na solubilizáciu proteínov a inaktívnej RNAzy a DNAzy. Detergent Triton X-100 ďalej uľahčuje solubilizáciu a rozbitie bunkových štruktúr a nukleárnych proteínov, čím sa uvoľňuje nukleová kyselina. Činidlo na rozrušenie štruktúr sa okyslí kvôli zvýšeniu väzby nukleovej kyseliny a použije sa 50 µl alkalického eluačného pufru na eluáciu viazanej nukleovej kyseliny. Po izolácii nukleovej kyseliny sa stanoví prítomnosť DNA parvovírusu vykonaním spôsobu TaqManTM PCR, ako sa opisuje nižšie.

(b) Izolácia nukleovej kyseliny anelovaním cieľovo špecifických oligonukleotidov

I keď použitie magnetizovaných silikagélových guliek značne uľahčuje rýchle a ľahké spracovanie v priebehu premývacích a eluačných krokov, je izolácia nukleovej kyseliny stále prácna a časovo náročná. Preto sa používa jednostupňové zachytenie špecifickej cieľovej nukleovej kyseliny z krvnej plazmy alebo krvného séra pomocou magnetických guliek. Aby sa mohol tento krok použiť na široké rozmedzie skúšok zachytenia vírusových nukleových kyselín, používajú sa generické magnetické guľôčky spojené s oligo dT. Magnetické oligo (dT) guľôčky Sera-Mag (Seradyn, Indianapolis, IN) s oligo dT dĺžky 14 mérov sa používajú v kombinácii so zachytávajúcimi oligonukleotidmi obsahujúcimi 20 poly A' pri konci 3' priliehajúcom k použitej sekvencii špecifickej pre parvovírus (určenej na konci nižšie opísanej sekvencie).

Zachytávajúce oligonukleotidy opačného zmyslu sa odvodzujú od fragmentu 700 bp a sú to nasledujúce oligonukleotidy:

VSPC1 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCTTAACAGCAATTTCTGATA (nt 3492 až 3514) (*)

(číslo identifikácie sekvencie 49)

VSPC2 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCCCTGTAGTGCTGTCAG (nt 3549 až 3568)

(číslo identifikácie sekvencie 50)

VSPC3 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATACCCAAATAGGAAGTTCTG (nt 3639 až 3660)

(číslo identifikácie sekvencie 51)

VSPC4 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAATGCTGATTCTTCACTTGC (nt 3737 až 3759)

(číslo identifikácie sekvencie 52)

VSPC5 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCTGTACCTCCTGTACCTA (nt 3789 až 3808)

(číslo identifikácie sekvencie 53)

VSPC6 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCTCTAAATTTTCTGGG (nt 3838 až 3857)

(číslo identifikácie sekvencie 54)

VSPC7 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCTAATGTGTCAGGAACC (nt 3910 až 3929)

(číslo identifikácie sekvencie 55)

(*) Číslovanie nukleotidov je podľa Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986).

Magnetické guľôčky sa suspendujú v pufri kvôli rozpusteniu štruktúr Novagen (Madison, WI) a rad siedmich zachytávajúcich oligonukleotidov (VSPC1 až VSPC7, opísaných vyššie) sa testuje individuálne alebo v kombinácii kvôli zachyteniu parvovírusu B19 DNA z panelu FDA Center for Biologic Evaluation and Research, U. S. Department of Health and Human Services (FDA - CBER).

(c) Premývanie guliek premývacím pufrom

Po zachytení sa guľôčky premyjú s pufrom obsahujúcim 10 mM Hepes, pH 7,5 v 0,3 M NaCl a 0,5 % NP-40. Po spracovaní séra pufrom kvôli rozpusteniu štruktúr, hybridizácii, magnetickej adsorpcii guliek a odstránení pufru kvôli zachyteniu štruktúr sa ku guľôčkam pridá 1,5 ml premývacieho pufru. Po bežnom miešaní vírivým pohybom, magnetickej adsorpcii a odstránení premývacieho pufru sa guľôčky premyjú druhýkrát 0,5 ml toho istého pufru, takže sa môžu zhustiť kvôli ľahkej suspenzii v 100 ml univerzálneho pufru PCR obsahujúceho všetky zložky pre Taqmanovu skúšku. Guľôčky so zachytenou DNA sa prevedú na doštičku TaqMan™ kvôli detekcii PCR TaqMan™, ako sa opisuje nižšie. Niekoľko oligonukleotidových kombinácií je účinných pri zachytení B19, ako detekuje skúška TaqMan™.

Spôsob TaqMan™ menovite zachytáva značenú cieľovú nukleovú kyselinu ako amplikóny DNA. Alternatívou je amplifikácia zachytenej cieľovej látky ako RNA. Na tento účel oligonukleotidy amplifikácie obsahujú primér špecifický pre parvovírus B19 s promótorovou sekvenciou T7 na tvorbu amplikónu RNA RNA polymerázou T7. Amplifikačné priméry (VSA1 - A3 opisované nižšie) odvodené od sekvencie 700 bp zodpovedajúcej nukleotidom

2936 až 3635 genómu parvovírusu B19 opisované v Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986) sa testujú na ich schopnosti amplifikácie. Používajú sa nasledujúce priméry:

Priméry amplifikácie vlákna rovnakého zmyslu

VSA1 -

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCATATACTCATTGGACTGT
(nt 2942 až 2961) (číslo identifikácie sekvencie 56)

VSA2 -

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCAGAGCACCATTATAA (nt
3272 až 3288) (číslo identifikácie sekvencie 57)

VSA3 -

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGGCACAATGCCAGTGT-
GGAAA (nt 3317 až 3333) (číslo identifikácie sekvencie 58)

VSP2 - GTGCTGAACTCTAAAGGT (primér opačného zmyslu - nt 3424 až
3442) (číslo identifikácie sekvencie 59)

Reakčné zložky súpravy RNAamplifire (Qiagen) sa používajú na zisťovanie účinnosti amplifikácie s použitím 50 kópií parvovírusu DNA ako cieľa v konečnom objeme 20 ml. Amplifikačné priméry sa testujú jednotlivo alebo v kombinácii s použitím VSP2 ako druhého priméru. Po 1 hodine inkubácie pri teplote 42 °C podľa odporučení výrobcu sa alikvót amplifikovaného materiálu zriedi 100 krát kvôli detekcii skúškou TaqManTM kvôli vyhodnoteniu účinnosti amplifikačných primérov. Kombinácia dvoch amplifikačných primérov VSA2 a VSA3 s VSP2 je vysoko účinná pri tvorbe amplikónov RNA.

Citlivosť skúšky TaqManTM, vhodnosť PCR primérov a optimálne reakčné podmienky sa stanovia použitím DNA plazmidu s obsahom vyššie opísaného

fragmentu 4,7 kb. Tento fragment zahŕňa oblasť VP1 rovnako tak ako oblasti NS1 a VP2 (pozri obrázok 1). Používajú sa amplifikačné priméry odvodené od oblasti VP1, ako sa opisuje podrobne nižšie. Číslovanie je podľa autorov Shade a kol., J. Virol., 58, 921 - 936 (1986). X znázorňuje 5'-fluoresceín- fosforamidit a Z DABCYL-dT, obe látky možno získať od Glen Research Corporation, Sterling, VA. Číslo na pravej strane sekvencie udávajú nukleotidy v priméroch zo sekvencie parvovírusu B19.

VSP1 - GGAGGCAAAGGTTTGCA (primér toho istého zmyslu - nt 3334 až 3350) (číslo identifikácie sekvencie 60)

VSP2 - GTGCTGAAACTCTAAAGGT (primér opačného zmyslu - nt 3424 až 3442) (číslo identifikácie sekvencie 59)

VSPPR1 - XCCCATGGAGATATTTAGATTZ (sonda - nt 3379 až 3398) (číslo identifikácie sekvencie 61)

Vpara 8: TCCATATGACCCAGAGCACCA (nt 3262 až 3460) (číslo identifikácie sekvencie 88)

Vpara 9: TTTCCACTGGCATTGTGGC (primér opačného zmyslu - nt 3313 až 3331) (číslo identifikácie sekvencie 89)

Vpara10: X AGCTAGACCTGCATGTCACTG Z, kde X je Fam a Z je Tamra (nt 3286 až 3310) (číslo identifikácie sekvencie 90)

Koncentrácia DNA plazmidu sa určí spektrofotometricky a vykoná sa sériové zriedenie za získania 5000 až 10 kópií/20 µl. Reakčná zmes v konečnom objeme 50 µl obsahuje 20 µl vzorky, 1 x Gold Taq amplifikačný

pufor (Perkin Elmer) s 3,2 mM chloridu horečnatého, po 300 μ M každého dNTP, 1 pmól každého z amplifikačných primérov, 0,4 pmól sondy a 1 jednotku enzýmu AmpliTaq. Reakčné podmienky sú 10 minút pri teplote 90 °C kvôli aktivácii enzýmov s nasledujúcimi 45 cyklami 30 sekúnd pri 95 °C striedavo so 60 °C v sekvenčnom detektore ABI 7700.

Pri použití páru primérov VSP1 a VSP2 generujúcich produkt PCR 109 bp a sondy VSPPR1 možno detekovať len 10 kópií/skúška. Pretože objem vzorky je 20 μ l, v konečnom objeme 50 μ l, ukazuje sa, že spôsobom TaqManTM možno extrahovať a detekovať vzorky krvnej plazmy obsahujúce iba 50 kópií/ml DNA parvovírusu B19. Keďže parvovírus je vírus s vysokým titrom, možno extrahovať a používať na analýzu objemy krvnej plazmy/séra 50 μ l.

Pri použití vzorky pozitívnej na DNA parvovírusu B19 FDA-CBER (106 kópií/ml) detekuje spôsob TaqManTM už 50 kópií na skúšku. S cieľom korelovať nukleovú kyselinu s imunitným titrom sa množstvo DNA vyjadruje kvantitatívne v niekoľkých vzorkách pozitívnych na protilátku.

Opisujú sa teda nové sekvencie parvovírusu B19 a detekčné skúšky s použitím týchto sekvencií. Z opisu vyššie si možno uvedomiť, že i keď sa tu kvôli ilustrácii opisujú rôzne špecifické vyhotovenia tohto vynálezu, možno vykonávať rôzne modifikácie bez odchýlky od ducha a obsahu vynálezu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob detekcie ľudského parvovírusu B19 v biologickej vzorke, **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa:

izoláciu nukleových kyselín z biologickej vzorky, u ktorej je podozrenie, že obsahuje ľudský parvovírus, kontaktovaním pevného nosiča obsahujúceho zachytené nukleové kyseliny asociované s biologickou vzorkou za podmienok hydrolýzy, v ktorej vlákna cieľových nukleových kyselín, pokiaľ sú prítomné v biologickej vzorke, hybridizujú so zachytenými nukleovými kyselinami, a oddelenie tohto pevného nosiča od vzorky,

amplifikáciu izolovaných nukleových kyselín za použitia priméru rovnakého a opačného zmyslu, kde každý z primérov má dĺžku nie viac ako 60 nukleotidov a je dostatočne komplementárny k časti vlákna rovnakého a opačného zmyslu cieľových nukleových kyselín kvôli hybridizácii s nimi, a

detekciu prítomnosti amplifikovaných nukleových kyselín ako indikáciu prítomnosti ľudského parvovírusu B19 vo vzorke.

2. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že pevný nosič zahŕňa guľôčky.

3. Spôsob podľa nároku 2, **vyznačujúci sa tým**, že guľôčkami sú magnetické guľôčky.

4. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3, **vyznačujúci sa tým**, že zachytené nukleové kyseliny ďalej obsahujú homopolymérny reťazec pre naviazanie zachytených nukleových kyselín na pevný nosič.

5. Spôsob podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým**, že homopolymérnym nosičom je polyA reťazec.

6. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 5, **vyznačujúci sa tým**, že zachytené nukleové kyseliny obsahujú jeden alebo viacero oligonukleotidov vybraných zo súboru obsahujúceho oligonukleotid obsahujúci sekvenciu TCCTTAACAGCAATTTCTGATA, oligonukleotid obsahujúci sekvenciu CGCCCTGTAGTGCTGTCAG, oligonukleotid obsahujúci sekvenciu TATACCCAAATAGGAAGTTCTG, oligonukleotid obsahujúci sekvenciu TGCTGATTCTTCACTTGC, oligonukleotid obsahujúci sekvenciu TGCTGTACCTCCTGTACCTA, oligonukleotid obsahujúci sekvenciu GCCCTCTAAATTTTCTGGG, oligonukleotid obsahujúci sekvenciu CTCCTAATGTGTCAGGAACC, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k oligonukleotidu obsahujúcemu sekvenciu TCCTTAACAGCAATTTCTGATA, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k oligonukleotidu obsahujúcemu sekvenciu CGCCCTGTAGTGCTGTCAG, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k oligonukleotidu obsahujúcemu sekvenciu TATACCCAAATAGGAAGTTCTG, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k oligonukleotidu obsahujúcemu sekvenciu TGCTGATTCTTCACTTGC, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k oligonukleotidu obsahujúcemu sekvenciu TGCTGTACCTCCTGTACCTA, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k oligonukleotidu obsahujúcemu sekvenciu GCCCTCTAAATTTTCTGGG a oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k oligonukleotidu obsahujúcemu sekvenciu CTCCTAATGTGTCAGGAACC.

7. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 5, **vyznačujúci sa tým**, že zachytené nukleové kyseliny obsahujú jeden alebo viacero oligonukleotidov vybraných zo súboru obsahujúceho oligonukleotid majúci číslo identifikácie sekvencie alebo SEQ ID NO: 49, oligonukleotid majúci SEQ ID NO: 50, oligonukleotid majúci SEQ ID NO: 51, oligonukleotid majúci SEQ ID NO: 52, oligonukleotid majúci SEQ ID NO: 53, oligonukleotid majúci SEQ ID NO: 54, oligonukleotid majúci SEQ ID NO: 55, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k SEQ ID NO: 49, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k SEQ ID NO: 50, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k SEQ ID NO: 51, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k SEQ ID NO: 52, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k SEQ ID NO: 53, oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k SEQ ID NO: 54 a oligonukleotid majúci aspoň 90 % identitu sekvencie k SEQ ID NO: 55.

8. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 7, **vyznačujúci sa tým**, že:

a) primér toho istého zmyslu obsahuje (i) SEQ ID NO: 60 alebo nukleotidovú sekvenciu majúcu aspoň 90 % identitu tejto sekvencie alebo (ii) SEQ ID NO: 88 alebo nukleotidovú sekvenciu majúcu aspoň 90 % identitu tejto sekvencie a

b) primér opačného zmyslu obsahuje (i) SEQ ID NO: 59 alebo nukleotidovú sekvenciu majúcu aspoň 90 % identitu tejto sekvencie, keď primér toho istého zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 60 alebo nukleotidovú sekvenciu majúcu aspoň 90 % identitu tejto sekvencie alebo (ii) SEQ ID NO: 89 alebo nukleotidovú sekvenciu majúcu aspoň 90 % identitu tejto sekvencie, keď primér toho istého zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 88 alebo nukleotidovú sekvenciu majúcu aspoň 90 % identitu tejto sekvencie.

9. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 8, **vyznačujúci sa tým**, že amplifikácia zahŕňa polymerázovú reťazovú reakciu alebo RT-PCR,

amplifikáciu sprostredkovanú transkripciou, fluorogénnu 5' nukleázovú skúšku alebo ich kombinácie.

10. Spôsob podľa nároku 9, **vyznačujúci sa tým**, že amplifikácia zahŕňa fluorogénnu 5' nukleázovú skúšku používajúcu primér rovnakého zmyslu a primér opačného zmyslu a detekcia sa uskutočňuje s použitím aspoň jednej sondy obsahujúcej detegovateľnú značku.

11. Spôsob podľa nároku 10, **vyznačujúci sa tým**, že detegovateľnou značkou je fluorescentná značka zvolená zo súboru obsahujúceho 6-karboxyfluoresceín alebo 6-FAM, tetrametylrodamín alebo TAMRA a 2',4',5',7'-tetrachlór-4,7-dichlórfluoresceín alebo TET.

12. Spôsob podľa nároku 11, **vyznačujúci sa tým**, že sonda ďalej obsahuje detegovateľné značky na konci 5' a konci 3'.

13. Spôsob podľa nároku 12, **vyznačujúci sa tým**, že aspoň jedna sonda nie je dlhšia ako 50 nukleotidov a obsahuje (i) SEQ ID NO: 61, pokiaľ primér rovnakého zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 60 alebo nukleotidovú sekvenciu majúcu aspoň 90 % identitu tejto sekvencie alebo (ii) SEQ ID NO: 90, pokiaľ primér rovnakého zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 88 alebo nukleotidovú sekvenciu majúcu aspoň 90 % identitu tejto sekvencie.

14. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 13, **vyznačujúci sa tým**, že je prítomná vnútorná kontrolná sekvencia.

15. Spôsob podľa nároku 14, **vyznačujúci sa tým**, že vnútorná kontrolná sekvencia je odvodená od nukleotidovej sekvencie SEQ ID NO: 92.

16. Spôsob podľa nároku 15, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje ďalej detegovateľne značenú sekvenčnú sondu pre vnútornú kontrolnú sekvenciu.

17. Spôsob detekcie ľudského parvovírusu B19 v biologickej vzorke, používajúci fluorogénnu 5' nukleázovú skúšku, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje:

(a) izoláciu nukleových kyselín z biologickej vzorky, u ktorej je podozrenie, že obsahuje ľudský parvovírus B19, kontaktovaním magnetických guľôčok obsahujúcich zachytené nukleové kyseliny asociované s biologickou vzorkou za podmienok hydrolýzy, v ktorej vlákna cieľových nukleových kyselín, pokiaľ sú prítomné v biologickej vzorke, hybridizujú so zachytenými nukleovými kyselinami, pričom zachytené nukleové kyseliny obsahujú jeden alebo viacero oligonukleotidov vybraných zo súboru obsahujúceho SEQ ID NO: 49 až SEQ ID NO: 55 a oddelenie týchto magnetických guľôčok od vzorky,

(b) amplifikáciu nukleových kyselín s použitím priméru rovnakého a opačného zmyslu, kde každý z primérov má dĺžku nie viac ako 60 nukleotidov a je dostatočne komplementárny k časti vlákien rovnakého a opačného zmyslu izolovanej nukleovej kyseliny kvôli hybridizácii s nimi, pričom (i) primér rovnakého zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 60 a primér opačného zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 59 alebo (ii) primér rovnakého zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 88 a primér opačného zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 89, a

(c) detekciu prítomnosti amplifikovaných nukleových kyselín s použitím sondy, ktorá nie je dlhšia ako 50 nukleotidov a ktorá obsahuje (i) nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO: 61, pokiaľ primér rovnakého zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 60 alebo (ii) nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO: 90, pokiaľ primér rovnakého zmyslu obsahuje SEQ ID NO: 88, ako indikáciu prítomnosti ľudského parvovírusu B19 vo vzorke.

18. Spôsob podľa nároku 17, **vyznačujúci sa tým**, že je prítomná vnútorná kontrolná sonda.

19. Spôsob podľa nároku 18, **vyznačujúci sa tým**, že vnútorná kontrolná sekvencia je odvodená od nukleotidovej sekvencie SEQ ID NO: 92.

20. Spôsob podľa nároku 19, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje ďalej detegovateľne značenú sekvenčnú sondu pre vnútornú kontrolnú sekvenciu.

21. Súprava na detekciu ľudského parvovírusu B19 v biologickej vzorke, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje:

zachytené nukleové kyseliny obsahujúce jeden alebo viacero oligonukleotidov vybraných zo súboru obsahujúceho SEQ ID NO: 49 až SEQ ID NO: 55;

dvojicu oligonukleotidových primérov, kde každý z oligonukleotidových primérov má dĺžku nie väčšiu ako 60 nukleotidov a (i) jeden z oligonukleotidových primérov obsahuje SEQ ID NO: 60 a druhý z oligonukleotidových primérov obsahuje SEQ ID NO: 59 alebo (ii) jeden z oligonukleotidových primérov obsahuje SEQ ID NO: 88 a druhý z oligonukleotidových primérov obsahuje SEQ ID NO: 89, a

písomné inštrukcie na identifikáciu prítomnosti ľudského parvovírusu B19.

22. Súprava podľa nároku 21, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje ďalej polymerázu a pufry.

23. Súprava podľa nároku 21, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje ďalej oligonukleotidové sondy obsahujúce detegovateľnú značku.

24. Súprava podľa nároku 23, **vyznačujúca sa tým**, že detegovateľnou značkou je fluorescentná značka zvolená zo súboru obsahujúceho 6-karboxyfluoresceín alebo 6-FAM, tetrametylrodamín alebo TAMRA a 2',4',5',7'-tetrachlór-4,7-dichlórfluoresceín alebo TET.

25. Súprava podľa nároku 24, **vyznačujúca sa tým**, že sonda ďalej obsahuje detegovateľné značky na konci 5' a konci 3'.

26. Súprava podľa nároku 25, **vyznačujúca sa tým**, že aspoň jedna sonda nemá dĺžku väčšiu ako 50 nukleotidov a obsahuje (i) nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO: 61, pokiaľ jeden z oligonukleotidových primérov obsahuje SEQ ID NO: 60 alebo (ii) nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO: 90, pokiaľ jeden z oligonukleotidových primérov obsahuje SEQ ID NO: 88.

27. Súprava podľa nároku 21, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje ďalej vnútornú kontrolu, ktorá je odvodená od nukleotidovej sekvencie SEQ ID NO: 92.

28. Izolovaný polynukleotid, ktorý obsahuje nukleotidovú sekvenciu obsahujúcu akúkoľvek z nukleotidových sekvencií znázornených na obrázkoch 3A až 3C alebo obrázkoch 4A až 4C.

29. Polynukleotid podľa nároku 28, ktorý obsahuje nukleotidovú sekvenciu znázornenú na obrázkoch 3A až 3C alebo obrázkoch 4A až 4C.

30. Izolovaný polynukleotid, ktorý obsahuje nukleotidovú sekvenciu obsahujúcu akúkoľvek z nukleotidových sekvencií znázornených na obrázkoch 2A až 2U alebo obrázkoch 11A až 11Z.

ZOZNAM SEKVENCII

<110> CHIRON CORPORATION

<120> Diagnostické skúšky pre parvovírus B19

<130> 2301-17194.40

<140>

<141>

<160> 92

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH47-26

<400> 1

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

<210> 2

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH48-29

<400> 2

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaacaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgcaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag ctgtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggc ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gattttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggc cgcctatgcc tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtagc gatactttag 700
```

<210> 3

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH33-2

<400> 3

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaacaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggtggc 240
agtaatcctg ccaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttactgcca ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcag ctagttagct ccacaatgcc agtggaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gatttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgct tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 4

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH33-3

<400> 4

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

<210> 5

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH33-4

<400> 5

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

<210> 6
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH42-7

<400> 6

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccaggcagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggctag gatactttag 700
```

<210> 7
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH42-18

<400> 7

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggctag gatactttag 700
```

<210> 8
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH42-19

<400> 8

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctccgcgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
```

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

<210> 9
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH46-23

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

<210> 10
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH1-1

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

<210> 11
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH1-6

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

```

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

```

<210> 12

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH2-8

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH2-10

<400> 13

```

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

```

<210> 14

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH2-11C

<400> 14

```

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

```

```

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtggag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atgggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 15

<211> 699

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH5-13

<400> 15

```

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

```

<210> 16

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH7-22

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH13-27

<400> 17

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

```



```

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

```

<210> 18

<211> 699

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH14-33

<400> 18

```

ataaatccat atactcattg gactgtggca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
gtaatcctgt taaaagcatg tggagttagg ggggccactt tagtgccaac tctgtaactt 300
gtacattttc cagacagttt ttaattccat atgaccagca gcaccattat aagggtgttt 360
ctccgcagc aagtagctgc cacaatgccg gtggaaaaga ggcaaagggt tgcaccatta 420
gtcccataat gggatactca accccatgga gatatttaga ttttaatgct ttaaatttat 480
ttttttcac ttttagagtt cagcacttaa ttgaaaatta tggtagtata gctcctgatg 540
ctttaactgt aaccatatca gaaattgctg ttaaatgatg tacagacaaa actggagggg 600
gggtacaggt tactgacagc actacagggc gcctatgcat gttagtggac catgaatac 660
agtaccataa tgtgttaggg caaggtcagg atacttttag 699

```

<210> 19

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH62-2

<400> 19

```

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

```

<210> 20

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH64-2

```

<400> 20
ataaatccat atactcattg gactgttagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tcgcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatatc agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 21

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát CH67-2

```

<400> 21
ataaatccat atactcattg gactgtggca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggg 240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatatc agaaattgct gttaaagatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtgga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 22

<211> 4678

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: fragment 4,7 kbp PCR z klonu 2-B1 parvovirusu B19

```

<400> 22
cccgccttat gcaaattggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt 60
ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact 120
gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttcttgact tacttgctgt tttttgtgag 180
ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt 240
gcttcaagtt tcttctaagt ttctggactg tgctaacgat aactggtggt gctctttact 300
ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata 360
cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta 420
cttttttcaa gtagaatgta acaaatttga agaaggctat catattcatg tggttatttg 480
ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt 540
actttatcac cttgtaactg aaaatctgaa gctaaaaatt ttgccaggaa tgactacaaa 600
aggcaaatac tttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc 660
tttaaatggt gtatggtgtg ttactaata ttagtgacat atagatacct gtatttctgc 720
tactttttaga aaggagcctt gccatgccaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga 780
tactagtact gatgctggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgctg catttaatgg 840
gaagggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactggttgt gtgaaaacag 900
agtgtttaca gaggataagt ggaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag 960
tagtcacagt ggaagttttc aaattcaaa tgcaactaaa ctagcaattt ataaagcaac 1020

```

taatttagtg	cctactagca	cattttttatt	gcatacagac	tttgagcaag	ttatgtgtat	1080
taaaaacaat	aaaattgtta	aattgttact	ttgtcaaaac	tatgaccccc	tattagtggg	1140
gcagcatgtg	ttaaagtggg	ttgataaaaa	atgtggcaag	aaaaacacac	tgtggtttta	1200
tgggcccggca	agtacaggga	aaacaaactt	ggcaatggcc	attgctaata	gtgttccagt	1260
atatggcatg	gttaactgga	ataatgaaa	ctttccattt	aatgatgtag	caggaaaaag	1320
cttgggtggc	tgggatgaag	gtattattaa	gtctacaatt	gtagaagctg	caaaagccat	1380
tttaggcggg	caacccacca	gggtagatca	aaaaatgcgt	ggaagtgtag	ctgtgcctgg	1440
agtacctgtg	gttataacca	gcaatggtga	cattactttt	gttgtaagcg	ggaacactac	1500
aacaactgta	catgctaaag	ccttaaaaga	gcgcattgta	aagttaaaact	ttactgttaag	1560
atgcagccct	gacatggggg	tactaacaga	ggctgatgta	caacagtggc	ttacatgggt	1620
taatgcacaa	agctggggacc	actatgaaaa	ctgggcaata	aactacactt	ttgatttccc	1680
tggaattaat	gcagatgccc	tccaccaga	cctccaaacc	accccaattg	tcacagacac	1740
cagtatcagc	agcagtgggt	gtgaaagctc	tgaagaactc	agtgaagca	gcttttttaa	1800
cctcatcacc	ccaggcgccct	ggaacactga	aaccccgccg	tctagtacgc	ccatccccgg	1860
gaccagttca	ggagaatcat	ctgtcgggag	cccagtttcc	tccgaagtgt	tagctgcac	1920
gtgggaagaa	gccttctaca	cacctttggc	agaccagttt	cgtgaactgt	tagttggggg	1980
tgattatgtg	tgggacgggt	taaggggttt	acctgtctgt	tgtgtgcaac	atattaacaa	2040
tagtggggga	ggcttggggc	tttgtcccca	ttgcattaat	gtaggggctt	ggataaatgg	2100
atggaaattt	cgagaattta	ccccagattt	gggtgcgatgt	agctgccatg	tgggagcttc	2160
taatcccttt	tctgtgctaa	cctgcaaaaa	atgtgcttac	ctgtctggat	tgcaaaagctt	2220
tgtagattat	gagtaaagaa	agtggcaaat	gggtgggaaag	tgatgataaa	tttgcataag	2280
ctgtgtatca	gcaatttgtg	gaattttatg	aaaaggttac	tggaacagac	ttagagctta	2340
ttcaaatatt	aaaagatcat	tataatattt	ctttagataa	tcccctagaa	aacctatcct	2400
ctttgtttga	ccttagttgt	cgtattaaaa	ataaccttaa	aaactctcca	gacttatata	2460
gtcatcattt	tcaaagtcac	ggacagttat	ctgaccaccc	ccatgcctta	tcacccagta	2520
gcagtcacgc	agaacctaga	ggagaagatg	cagtattatc	tagtgaagac	ttacacaagc	2580
ctgggcaagt	tagcgtacaa	ctacccggta	ctaactatgt	tgggcctggc	aatgagctac	2640
aagctggggc	cccgcacagt	gctgttgaca	gtgtgcaag	gattcatgac	tttaggtata	2700
gccaactggc	taagttggga	ataaatccat	atactcattg	gactgtagca	gatgaagagc	2760
ttttaaaaaa	tataaaaaat	gaaactgggt	ttcaagcaca	agtagtaaaa	gactacttta	2820
ctttaaaagg	tcagactgcc	cctgtggccc	attttcaagg	aagtttgcg	gaagtccccg	2880
cttacaacgc	ctcagaaaaa	tacccaagca	tgacttcagt	taattctgca	gaagccagca	2940
ctgtgacag	aggggggggc	agtaatcctg	tgaagaagcat	gtggagtggg	ggggccactt	3000
ttagtgcac	ctctgtgaact	tgtacatttt	ccagacaatt	tttaattcca	tatgaccacg	3060
agcaccatta	taaggtgttt	tctcccgcat	caagtagctg	ccacaatgcc	agtggaaagg	3120
aggcaaaagg	ttgcaccatt	agtcaccata	tgggatactc	aacccccatg	agatattttg	3180
attttatgac	tttaaattta	ttttttcac	ctttagagtt	tcagcactta	attgaaaatt	3240
attggaagtat	agctcctgat	gctttaactg	taaccatata	agaaattgct	gttaaggatg	3300
ttacggacaa	aactggaggg	ggggtgcagg	ttactgacag	cactacaggg	cgccatgca	3360
tgttagtaga	ccatgaatat	aagtacccat	atgtgttagg	gcaaggtcaa	gatactttag	3420
cccagaact	tcctatttgg	gtatactttc	ccctcaata	cgcttactta	acagtaggag	3480
atgttaacac	acaaggaatt	tctggagaca	gcaaaaaatt	ggcaagtga	gaatcagcat	3540
tttatgtttt	ggaacacagt	tcttttcagc	ttttaggtac	aggaggtaca	gcaactatgt	3600
cttataagtt	tcttccagtg	ccccagaaa	attttagagg	ctgcagtcaa	cacttttatg	3660
aaatgtacaa	ccccttatat	ggatcccgt	taggggttcc	tgacacatta	ggaggtgacc	3720
caaaatttag	atctttaaca	catgaagacc	atgcaattca	gccccaaaac	ttcatgccag	3780
ggccactagt	aaactcagtg	tctacaaagg	aggagacag	ctctagtact	ggagctggaa	3840
aagccttaac	aggccttagc	acaggtacct	ctcaaaacac	tagaatatcc	ttacgcccctg	3900
ggccagtgtc	tcagccgtac	caccactggg	acacagataa	atatgtcaca	ggaataaatg	3960
ccattttctca	tggtcagacc	acttatggta	acgtgaaga	caaagagtat	cagcaaggag	4020
tgggtgatatt	tccaaatgaa	aaagaacagc	taaaacagtt	acagggttta	aacatgcaca	4080
cctactttcc	caataaagga	accagcaat	atacagatca	aattgagcgc	cccctaattg	4140
tgggttctgt	atggaacaga	agagcccttc	actatgaaag	ccagctgtgg	agtaaaattc	4200
caaatcttag	tgacagtttt	aaaactcagt	ttgcagcctt	aggaggatgg	ggtttgcac	4260
agccactctc	tcaaatattt	ttaaaaat	taccacaaag	tgggccaatt	ggaggtatta	4320
aatcaatggg	aattactacc	ttagttcagt	atgccgtggg	aattatgaca	gtaacctatg	4380
catttaaat	ggggccccgt	aaagctacgg	gacggtggaa	tcctcaacct	ggagtgtatc	4440
ccccgcacgc	agcaggtcat	ttaccatag	tactatatga	ccccacagct	acagatgcaa	4500
aacaacacca	cagacatgga	tatgaaaagc	ctgaagaatt	gtggacagcc	aaaagccgtg	4560
tgacccattt	gtaaaacact	cccacgtgc	cctcagccag	gatgtgtaac	taaacgcccc	4620
ccagtaccac	ccagactgta	cctgccccct	cctataccta	taagacagcc	taacacaa	4678

<210> 23

<211> 4678
 <212> DNA
 <213> Umeľá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: fragment 4,7 kbp PCR z klonu 2-B6
 parvovirusu B19

```
<400> 23
cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtggtttac tataatttta ttggtcagtt 60
ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact 120
gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttcctggact tacttgctgt tttttgtgag 180
ctaactaaca ggtatttata ctacttggtt acatactaac atggagctat ttagaggggt 240
gcttcaagtt tcttctaag ttctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctctttact 300
ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata 360
cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta 420
cttttttcaa gtagaatgta acaaatgtga agaaggctat catattcatg tggttattgg 480
ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtggtgtga gaggggttat ttaataatgt 540
actttatcac cttgtaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa 600
aggcaaatac tttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc 660
tttaaatgtt gtatgggtgt ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc 720
tactttttaga aagggagctt gccatgccaa gaaacccgcg atcaccacag ccataaatga 780
tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgtgc catttaatgg 840
gaagggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactgggtgt gtgaaaacag 900
agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag 960
tagtcacagt ggaagttttc aaattcaag tgactaaaa ctagcaattt ataaagcaac 1020
taatttagtg cctactagca cttttttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat 1080
taaagacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaaac tatgaccccc tattagtggg 1140
gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtgttttta 1200
tggaccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt 1260
atatggcatg gttaaactga ataataaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag 1320
cttggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat 1380
tttaggcggg caaccaccca gggtagatca aaaaatgctg ggaagtgtag ctgtgcctgg 1440
agtacccgtg gttataacca gcaatggtga cattactttt gttgtaagcg ggaacactac 1500
aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcagtgta aagttaaact ttactgtaag 1560
atgcagccct gacatggggg tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatgggt 1620
taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc 1680
tggaaattaat gcagatgccc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac 1740
cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gcttttttaa 1800
cctcatcacc ccaggcgccct ggaacactga aaccgcgcgc tctagtacgc ccaccccggt 1860
gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag ccagtttcc tccgaagttg tagctgcac 1920
gtgggaagaa gccttctaca cacctttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttgggg 1980
tgattatgtg tgggacgggt taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa 2040
tagtggggga ggcttgggac tttgtcccca ttgcattaat gtaggggcctt ggtataatgg 2100
atggaaaatt cgagaattta cccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc 2160
taatcccttt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaaagctt 2220
tgtagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa tttgtctaaag 2280
ctgtgtatca gcaatttgtg gaattttatg aaaaggttac tggaaacagac ttagagctta 2340
ttcaaatatt aaaagatcat tataatatct ctttagataa tcccctagaa aacccatcct 2400
ctttgtttga cttagtgtct cgtattaaaa ataaccttaa aaactctcca gacttatata 2460
gtcatcatct tcaaagtcac ggacagttat ctgaccaccc ccattgcctt tcatccagta 2520
gcagtcatgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc 2580
ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccgggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac 2640
aagctgggcc cccgcaaagt gctgttgaca gtgtgcaag gattcatgac tttaggtata 2700
gccaactggc taagttggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc 2760
ttttaaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta 2820
ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg 2880
cttacaacgc ctcagaaaaa taccgaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca 2940
ctggtgcagg aggggggggc agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag gggggcactt 3000
ttagtgccaa ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccag 3060
agcaccatta taaggtgttt tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaagag 3120
aggcaagggt ttgcaccatt agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag 3180
attttaatgc ttttaattta tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt 3240
```

atggaagtat	agctcctgat	gctttaactg	taaccatatac	agaaattgct	gttaaggatg	3300
ttacaaacaa	aactggaggg	ggggtgcagg	ttactgacag	cactacaggg	cgcctatgca	3360
tgtagtaga	ccatgaatat	aagtacccat	atgtgttagg	gcaaggtcaa	gatactttag	3420
ccccagaact	tcctatttgg	gtatactttc	ccctcaata	cgcttactta	acagtaggag	3480
atgttaacac	acaaggaatt	tctggagaca	gcaaaaaatt	ggcaagtga	gaatcagcat	3540
tttatgtttt	ggaacacagt	tcttttcagc	ttttagggtac	aggaggtaca	gcaactatgt	3600
cttataagtt	tcctccagtg	ccccagaaa	atttagaggg	ctgcagtcaa	cacttttatg	3660
aaatgtacaa	ccccttatac	ggatcccgct	taggggttcc	tgacacatta	ggaggtgacc	3720
caaaatttag	atctttaaca	catgaagacc	atgcaattca	gccccaaaac	ttcatgccag	3780
ggccactagt	aaactcagtg	tctacaagg	aggagacag	ctctagtact	ggagctggaa	3840
aagccttaac	aggccttagc	acaggtacct	ctcaaaacac	tagaatatcc	ttacgcccctg	3900
ggccagtgtc	tcagccgtac	caccactggg	acacagataa	atatgtcaca	ggaataaatg	3960
ccattttctca	tggtcagacc	acttatggta	acgctgaaga	caaagagtat	cagcaaggag	4020
tgggtagatt	tccaaatgaa	aaagaacagc	taaaacagtt	acaggggtta	aacatgcaca	4080
cctactttcc	caataaagga	acccagcaat	atacagatca	aattgagcgc	cccctaattg	4140
tgggttctgt	atggaacaga	agagcccttc	actatgaaag	ccagctgtgg	agtaaaattc	4200
caaaatttaga	tgacagtttt	aaaactcagt	ttgcagcctt	aggaggtatg	ggtttgcatc	4260
agccacctcc	tcaaatatgt	ttaaaaatat	taccacaaag	tgggccaatt	ggaggtatta	4320
aatcaatggg	aattactacc	ttagttcagt	atgccgtggg	aattatgaca	gtaaccatga	4380
cattttaaatt	ggggccccgt	aaagctacgg	gacgggtggaa	tcctcaacct	ggagtgtatc	4440
ccccgcacgc	agcaggtcat	ttaccatatg	tactatatga	ccccacagct	acagatgcaa	4500
aacaacacca	cagacatgga	tatgaaaagc	ctgaagaatt	gtggacagcc	aaaagccgtg	4560
tgcacccatt	gtaaacactc	cccaccgtgc	cctcagccag	gatgtgtaac	taaacgcccc	4620
ccagtaccac	ccagactgta	cctgccccct	cctataccta	taagacagcc	taacacaa	4678

<210> 24

<211> 2049

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: NS11 z klonu 2-B1 parvovirusu B19

<400> 24

atactcttcg	aacaaaacaa	aatggagcta	tttagagggg	tgcttcaagt	ttcttcta	60
gttctggact	gtgctaacga	taactgggtg	tgctctttac	tggatttaga	cacttctgac	120
tgggaaccac	taactcatac	taacagacta	atggcaatat	acttaagcag	tgtggcttct	180
aagcttgact	ttactggggg	gccactagca	gggtgcttgt	acttttttca	agtagaatgt	240
aacaaatttg	aagaaggcta	tcatattcat	gtgggttattg	gggggccagg	gttaaaccac	300
agaaacctca	cagtgtgtgt	agaggggtta	tttaataatg	tactttatca	ccttgtaact	360
gaaaatctga	agctaaaatt	tttgccagga	atgactacaa	aaggcaaata	cttttagagat	420
ggagagcagt	ttatagaaaa	ctatttaattg	aaaaaaatac	ctttaaatgt	tgtatgggtg	480
gttactaata	ttgatggaca	tatagatacc	tgtattttctg	ctacttttag	aaagggagct	540
tgccatgccca	agaaaccccg	catcaccaca	gccataaatg	atactagtac	tgatgctggg	600
gagtctagcg	gcacaggggc	agaggttgtg	ccatttaattg	ggaaggggaa	taaggctagc	660
ataaaagtctc	aaactatggt	aaactgggtg	tgtgaaaaca	gagtgtttac	agaggataag	720
tggaaactag	ttgactttta	ccagtacact	ttactaagca	gtagtacacg	tggaggtttt	780
caaatttcaaa	gtgcactaaa	actagcaatt	tataaagcaa	ctaatttagt	gcctactagc	840
acattttttat	tgcatacaga	ctttgagcaa	gttatgtgta	ttaaaaacaa	taaaattggt	900
aaattgtttac	tttgtcaaaa	ctatgacccc	ctattagtgg	ggcagcatgt	gttaaagtgg	960
attgataaaa	aatgtggcaa	gaaaaacaca	ctgtgggttt	atgggcccgc	aagtacaggg	1020
aaaacaaact	tggcaatggc	cattgctaaa	agtgttccag	tatatggcat	ggttaactgg	1080
aataatgaaa	actttccatt	taatgatgta	gcaggaaaaa	gcttgggtgg	ctgggatgaa	1140
ggtagtagta	agtctacaat	tgtagaagct	gcaaaagcca	tttttagcgg	gcaacccacc	1200
aggggtagatc	aaaaaatgcg	tggaaagtgt	gctgtgcctg	gagtacctgt	ggttataacc	1260
agcaatgggtg	acattacttt	tgttgaagc	gggaacacta	caacaactgt	acatgctaaa	1320
gccttaaaaag	agcgcatggt	aaagttaaac	tttactgtaa	gatgcagccc	tgacatgggg	1380
ttactaacag	aggctgatgt	acaacagtg	cttacatggt	gtaatgcaca	aagctgggac	1440
cactatgaaa	actgggcaat	aaactacact	tttgatttcc	ctggaattaa	tgcagatgcc	1500
ctccacccag	acctccaac	cacccaatt	gtcacagaca	ccagtatcag	cagcagtggt	1560
ggtgaaagct	ctgaagaact	cagtgaagc	agctttttta	acctcatcac	cccaggcgcc	1620
tggaaactcg	aaaccccgcg	ctctagtacg	cccatccccg	ggaccagttc	aggagaatca	1680

tctgtcggaa gccagtttc ctccgaagtt gtagctgcat cgtgggaaga agccttctac 1740
 acaccttttg cagaccagtt tcgtgaactg ttagttgggg ttgattatgt gtgggacgg 1800
 gtaaggggtt tacctgtctg ttgtgtgcaa catattaaca atagtggggg aggccttgga 1860
 ctttgcctcc attgcattaa tgtaggggct tggataatg gatggaaatt tcgagaattt 1920
 accccagatt tgggtcgatg tagctgccat gtgggagctt ctaatccctt ttctgtgcta 1980
 acctgcaaaa aatgtgctta cctgtctgga ttgcaaagct ttgtagatta tgagtaagtc 2040
 gacatactc 2049

<210> 25

<211> 671

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia :

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: aminokyseliny NS1 z klonu 2-B1
 parvovirusu B19

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 2380

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: VP1 z klonu 2-B1 parvovirusu B19

<400> 26

atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatggtggg aaagtgatga 60
taaatTTgct aaagctgtgt atcagcaatt tgtggaattt tatgaaaagg ttactggaac 120
agacttagag cttattcaaa tattaaaaga tcattataat atttcttttag ataatccctt 180
agaaaaccca tcctctttgt ttgacttagt tgctcgtatt aaaaataacc ttaaaaactc 240
tccagactta tatagtcac attttcaaag tcatggacag ttatctgacc acccccatgc 300
cttatcatcc agtagcagtc atgcagaacc tagaggagaa gatgcagtat tatctagtga 360
agacttacac aagcctgggc aagttagcgt acaactaccc ggtactaact atgttgggcc 420
tggcaatgag ctacaagctg gggccccgca aagtgtcgtt gacagtgtctg caaggattca 480
tgacttttagg tatagccaac tggctaagtt gggaataaat ccatatactc attggactgt 540
agcagatgaa gagcttttaa aaaatataaa aaatgaaact ggggtttcaag cacaagtagt 600
aaaagactac ttacttttaa aaggtgcagc tgccccctgtg gcccatTTTc aaggaaagttt 660
gccggaagtt cccgcttaca acgcctcaga aaaataccca agcatgactt cagttaattc 720
tgcagaagcc agcactgggtg caggaggggg gggcagtaat cctgtgaaaa gcatgtggag 780
tgaggggggcc acttttagtg ccaactctgt aacttgtaca ttttccagac aatttttaat 840
tccatatgac ccagagcacc attataaggt gttttctccc gcagcaagta gctgccacaa 900
tgccagtgga aaggaggcaa aggtttgcac cattagtccc ataatgggat actcaacccc 960
atggagatat ttagatttta atgcttttaa tttatttttt tcaccttttag agtttcagca 1020
cttaattgaa aattatggaa gtatagctcc tgatgcttta actgtaacca tatcagaaat 1080
tgctgttaag gatgttacgg acaaaactgg aggggggggtg caggttactg acagcactac 1140
agggcgcccta tgcatgttag tagaccatga atataagtag ccatatgtgt tagggcaagg 1200
tcaagatact ttagccccag aacttcctat ttgggtatac tttccccctc aatacgctta 1260
cttaacagta ggagatgtta acacacaagg aattttctgga gacagcaaaa aattggcaag 1320
tgaagaatca gcattttatg ttttggaaaca cagttctttt cagcttttag gtacaggagg 1380
tacagcaact atgtcttata agtttctccc agtgccccca gaaaatttag agggctgcag 1440
tcaacacttt tatgaaatgt acaaccctt atacggatcc cgcttagggg ttcctgacac 1500
attaggagggt gacccaaaat ttagatcttt aacacatgaa gacctgcaa ttcagcccca 1560
aaacttcatg ccagggccac tagtaaacct agtgtctaca aaggaggagg acagctctag 1620
tactggagct ggaagcct taacaggcct tagcacagg acctctcaaa acactagaat 1680
atccttacgc cctgggccag tgtctcagcc gtaccaccac tgggacacag ataaatatgt 1740
cacaggaata aatgccattt ctcatggtca gaccacttat ggtaacgctg aagacaaaga 1800
gtatcagcaa ggagtgggta gatttccaaa tgaaaaagaa cagctaaaac agttacaggg 1860
tttaaacatg cacacctact ttcccaataa aggaaccag caatatacag atcaaattga 1920
gcgcccccta atggtgggtt ctgtatggaa cagaagagcc cttcactatg aaagccagct 1980
gtggagtaaa attccaatt tagatgacag ttttaaaact cagtttgcag ccttaggagg 2040

atgggggttg catcagccac ctctcaaat atttttaaaa atattaccac aaagtggggcc 2100
aattggaggt attaaatcaa tgggaattac taccttagtt cagtatgccg tgggaattat 2160
gacagtaacc atgacattta aattggggcc ccgtaaagct acgggacggt ggaatcctca 2220
acctggagtg tatccccgc acgcagcagc tcatttacca tatgtactat atgacccac 2280
agctacagat gcaaaacaac accacagaca tggatatgaa aagcctgaag aattgtggac 2340
agccaaaagc cgtgtgcacc cattgtaagt cgacatactc 2380

<210> 27

<211> 781

<212> PRT

<213> Umeľá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: aminokyseliny VP1 z klonu 2-B1
parvovirusu B19

<400> 27

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

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

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

<210> 28

<211> 1699

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: VP2 z klonu 2-B1 parvovirusu B19

<400> 28

```

atactcaagc ttacaaaaca aaatgacttc agttaattct gcagaagcca gcactggtgc 60
aggagggggg ggcagtaatc ctgtgaaaag catgtggagt gagggggcca ctttttagtgc 120
caactctgta acttgtagat tttccagaca atttttaatt ccatatgacc cagagcacca 180
ttataagggtg ttttctcccg cagcaagtag ctgccacaat gccagtggaa aggaggcaaa 240
ggtttgcacc attagtccca taatgggata ctcaacccca tggagatatt tagattttaa 300
tgctttaaat ttattttttt cacctttaga gtttcagcac ttaattgaa attatggaag 360
tatagctcct gatgctttta ctgtaaccat atcagaaatt gctgttaagg atgttacgga 420
caaaactgga ggggggggtgc aggttactga cagcactaca gggcgccctat gcatgttagt 480
agaccatgaa tataagtacc catatgtgtt agggcaaggt caagatactt tagccccaga 540
acttcttatt tgggtatact ttccccctca atacgcttac ttaacagtag gagatgttaa 600
cacacaagga atttctggag acagcaaaaa attggcaagt gaagaatcag cattttatgt 660
tttggaacac agttcttttc agcttttagg tacaggaggt acagcaacta tgtcttataa 720
gtttcctcca gtgccccag aaaatttaga gggctgcagt caacactttt atgaaatgta 780
caacccttta tacggatccc gcttaggggt tcctgacaca ttaggaggtg acccaaaatt 840

```

```

tagatcttta acacatgaag accatgcaat tcagccccc aacttcatgc cagggccact 900
agtaaaactca gtgtctacaa aggaggggaga cagctctagt actggagctg gaaaagcctt 960
aacaggcctt agcacaggta cctctcaaaa cactagaata tccttacgcc ctggggccagt 1020
gtctcagccg taccaccact gggacacaga taaatatgtc acaggaataa atgccatttc 1080
tcattggtcag accacttatg gtaacgctga agacaaagag tatcagcaag gattgggtag 1140
atttccaaat gaaaaagaac agctaaaaca gttacagggt ttaaactatgc acacctactt 1200
tcccataaaa ggaacccagc aatatacaga tcaaattgag cgccccctaa tgggtgggttc 1260
tgtatggaac agaagagccc ttactatga aagccagctg tggagtaaaa ttccaaattt 1320
agatgacagt tttaaaactc agtttgcagc cttaggagga tggggtttgc atcagccacc 1380
tcctcaaata tttttaaaaa tattaccaca aagtgggcca attggaggta ttaaatacat 1440
gggaattact accttagttc agtatgccgt gggaattatg acagtaacca tgacatttaa 1500
attggggccc cgtaaaagcta cgggacggtg gaatcctcaa cctggagtgt atcccccgca 1560
cgcagcaggt catttaccat atgtactata tgacccca gctacagatg caaaacaaca 1620
ccacagacat ggatatgaaa agcctgaaga attgtggaca gccaaaagcc gtgtgcaccc 1680
attgtaagtc gacatactc                                     1699

```

<210> 29

<211> 554

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: aminokyseliny VP2 z klonu 2-B1
parvovirusu B19

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

530

535

540

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

<210> 30
<211> 2049
<212> DNA
<213> Umeľá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: NS1 z klonu 2-B6 parvovirusu B19

<400> 30
atactcttcg aacaaaacaa aatggagcta ttttagagggg tgcttcaagt ttcttctaata 60
gttctggact gtgctaacga taactggtgg tgctctttac tggatttaga cacttctgac 120
tgggaaccac taactcatac taacagacta atggcaatat acttaagcag tgtggcttct 180
aagcttgact ttactggggg gccactagca ggggtgcttg acttttttca agtagaatgt 240
aacaaatttg aagaaggcta tcatattcat gtggttattg gggggccagg gttaaaccac 300
agaaacctca cagtgtgtgt agaggggtta tttaataatg tactttatca ccttgaact 360
gaaaatctga agctaaaatt ttgcccagga atgactacaa aaggcaaata ctttagagat 420
ggagagcagt ttatagaaaa ctatttaatt aaaaaatac ctttaaatgt tgtatgggtg 480
gttactaata ttgatggaca tatagatacc tgtatttctg ctacttttag aaaggagct 540
tgccatgccca agaaaccccg catcaccaca gccataatg atactagtac tgatgctggg 600
gagtctagcg gcacaggggc agaggttgtg ccatttaatg ggaaggggaa taaggctagc 660
ataaagtttc aaactatggt aaactggttg tgtgaaaaca gagtgtttac agaggataag 720
tggaactag ttgactttta ccagtacact ttactaagca gtagtcacag tggaagtttt 780
caaattcaaa gtgcactaaa actagcaatt tataaagcaa ctaatttagt gcctactagc 840
acatttttat tgcatacaga ctttgagcaa gttatgtgta ttaaagacaa taaaattgtt 900
aaattgttac ttgtcaaaa ctatgacccc ctattagtgg ggcagcatgt gttaaagtgg 960
attgataaaa aatgtggcaa gaaaaacaca ctgtggtttt atggaccgcc aagtacaggg 1020
aaaacaaact tggcaatggc cattgctaaa agtgttccag tatatggcat ggttaactgg 1080
aataatgaaa actttccatt taatgatgta gcaggaaaaa gcttggtggt ctgggatgaa 1140
ggtattatta agtctacaat tgtagaagct gcaaaagcca ttttaggcgg gcaaccacc 1200
agggtagatc aaaaaatgctg tggaaagtga gctgtgctg gtagtaccgt ggttataacc 1260
agcaatggtg acattacttt tgttgaagc gggaacacta caacaactgt acatgctaaa 1320
gccttaaaag agcgcatggt aaagttaaac ttactgtaa gatgcagccc tgacatggg 1380
ttactaacag aggtgatgt acaacagtgg cttacatggt gtaatgcaca aagctgggac 1440
cactatgaaa actgggcaat aaactacact tttgatttcc ctggaattaa tgcagatgcc 1500
ctccaccag acctccaaac caccccaatt gtcacagaca ccagtatcag cagcagtgg 1560
ggtgaaagct ctgaagaact cagtgaagc agctttttta acctcatcac cccaggcgcc 1620
tggaacactg aaaccccgcg ctctagtacg cccatccccg ggaccagttc aggagaatca 1680
tctgtcggaa gccagtttc ctccgaagtt gtagctgcat cgtgggaaga agccttctac 1740
acacctttg cagaccagtt tctggaactg ttagttggg ttgattatgt gtgggacgg 1800
gtaaggggtt tacctgtctg ttgtgtgcaa catattaaca atagtggggg aggccttggg 1860
ctttgtcccc attgcattaa ttaggggct tggataatg gatggaaatt tgcagaattt 1920
acccagatt tgggtcgatg tagctgccat gtgggagctt ctaatccctt ttctgtgcta 1980
acctgcaaaa aatgtgctta cctgtctgga ttgcaaagct ttgtagatta tgagtaagtc 2040
gacatactc 2049

<210> 31
<211> 671
<212> PRT
<213> Umeľá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: aminokyseliny NS1 z klonu 2-B6 parvovirusu B19

<400> 31
Met Glu Leu Phe Arg Gly Val Leu Gln Val Ser Ser Asn Val Leu Asp

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

<210> 32
 <211> 2380
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: VP1 z klonu 2-B6 parvovirusu B19

<400> 32
 atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatgggtggg aaagtgatga 60
 taaatttgct aaagctgtgt atcagcaatt tgtggaattt tatgaaaagg ttactggaac 120
 agacttagag cttattcaaa tattaaaaga tcattataat atttcttttag ataatcccct 180
 agaaaaccca tcctctttgt ttgacttagt tgctcgtatt aaaaataacc ttaaaaaactc 240
 tccagactta tatagtcac attttcaaag tcatggacag ttatctgacc acccccatgc 300
 cttatcatcc agtagcagtc atgcagaacc tagaggagaa gatgcagtat tatctagtga 360
 agacttacac aagcctgggc aagttagcgt acaactaccc ggtactaact atgttgggcc 420
 tggcaatgag ctacaagctg ggccccgcga aagtgtgtt gacagtgtgt caaggattca 480
 tgacttttagg tatagccaac tggctaagtt gggaataaat ccatatactc attggactgt 540
 agcagatgaa gagcttttaa aaaatataaa aaatgaaact ggggttcaag cacaagtagt 600
 aaaagactac tttactttta aaggtgcagc tgccccctgt gcccattttc aaggaagttt 660
 gccggaagtt cccgcttaca acgcctcaga aaaataccga agcatgactt cagttaattc 720
 tgcagaagcc agcactgggt caggaggggg gggcagtaat cctgtgaaaa gcatgtggag 780
 tgagggggcc acttttagtg ccaactctgt aacttgtaaa ttttccagac aatttttaat 840
 tccatatgac ccagagcacc attataaggt gttttctccc gcagcaagta gctgccacaa 900
 tgccagtggg aaggaggcaa aggtttgcac cattagtccc ataattgggat actcaacccc 960
 atggagatat ttagatttta atgcttttaa tttatttttt tcaccttttag agtttcagca 1020
 cttaattgaa aattatggaa gtatagctcc tgatgcttta actgtaacca tatcagaaat 1080
 tgctgttaag gatgttaca acaaaactgg aggggggggt cagggtactg acagcactac 1140
 agggcgccct tgcagtgttag tagaccatga atataagtac ccatatgtgt tagggcaagg 1200
 tcaagatact ttagcccccag aacttctcat ttgggtatac tttccccctc aatacgctta 1260
 cttaacagta ggagatgtta acacacaagg aatttctgga gacagcaaaa aattggcaag 1320
 tgaagaatca gcattttatg ttttggaaca cagttctttt cagcttttag gtacaggagg 1380
 tacagcaact atgtcttata agtttctctc agtgccccca gaaaatttag agggctgcag 1440
 tcaacacttt tatgaaatgt acaacccctt atacggatcc cgcttagggg ttcctgacac 1500
 attaggaggt gacccaaaat ttagatcttt aacacatgaa gaccatgcaa ttcagcccca 1560
 aaacttcatg ccagggccac tagtaaacct agtgtctaca aaggaggagg acagctctag 1620
 tactggagct ggaaaagcct taacaggcct tagcacaggt acctctcaaa acactagaat 1680
 atccttacgc cctgggcccag tgtctcagcc gtaccaccac tgggacacag ataaatatgt 1740
 cacaggaata aatgccattt ctcatggtca gaccatttat ggtaacgctg aagacaaaga 1800
 gtatcagcaa ggagtgggta gatttccaaa tgaaaaagaa cagctaaaac agttacaggg 1860
 tttaaacatg cacacctact ttcccaataa aggaacccag caatatacag atcaaatgga 1920
 ggcgccctta atgggtgggt ctgtatggaa cagaagagcc cttcactatg aaagccagct 1980
 gtggagtaaa attccaaatt tagatgacag tttttaaact cagtttgagc ctttaggagg 2040
 atgggggttg catcagccac ctcttcaaat attcttaaaa atattaccac aaagtgggcc 2100
 aattggaggt attaaatcaa tgggaattac taccttagtt cagtatgccg tgggaattat 2160
 gacagtaacc atgacattta aattggggcc ccgtaaagct acgggacggt ggaatcctca 2220
 acctggagtg tatccccgc acgcagcagg tcatttacca tatgtactat atgacccac 2280
 agctacagat gcaaaacaac accacagaca tggatatgaa aagcctgaag aattgtggac 2340
 agccaaaagc cgtgtgcacc cattgtaagt cgacatactc 2380

<210> 33
 <211> 781
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: aminokyseliny VP1 z klonu 2-B6 parvovirusu B19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 1699

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: VP2 z klonu 2-B6 parvovirusu B19

<400> 34

```
ataactcaagc ttacaaaaca aaatgacttc agttaattct gcagaagcca gcactgggtgc 60
aggagggggg ggcagtaatc ctgtgaaaag catgtggagt gagggggcca ctttttagtgc 120
caactctgta acttgtacat tttccagaca atttttaatt ccatatgacc cagagcacca 180
ttataagggtg ttttctcccg cagcaagtag ctgccacaat gccagtggaa aggaggcaaa 240
ggtttgcacc attagtccca taatgggata ctcaacccca tggagatatt tagattttaa 300
tgctttaaat ttattttttt cacctttaga gtttcagcac ttaattgaaa attatggaag 360
tatagctcct ctgcttttaa ctgtaacctat atcagaaaatt gctgttaagg atgttacaaa 420
caaaactgga ggggggggtgc aggttactga cagcactaca gggcgccctat gcatgttagt 480
agaccatgaa tataagtacc catatgtgtt agggcaaggt caagatactt tagccccaga 540
acttcttatt tgggtatact ttccccctca atacgcttac ttaacagtag gagatgttaa 600
cacacaagga atttctggag acagcaaaaa attggcaagt gaagaatcag cattttatgt 660
tttggaaacac agttcttttc agcttttagg tacaggaggt acagcaacta tgtcttataa 720
gtttctccca gtgccccccag aaaatttaga gggctgcagt caacactttt atgaaatgta 780
caacccttta tacggatccc gcttaggggt tcctgacaca ttaggaggtg acccaaaatt 840
tagatcttta acacatgaag accatgcaat tcagcccca aacttcatgc cagggccact 900
agtaaaactca gtgtctacaa aggagggaga cagctctagt actggagctg gaaaagcctt 960
aacaggcctt agcacaggta cctctcaaaa cactagaata tccttacgcc ctggggccagt 1020
gtctcagccg taccaccact gggacacaga taaatatgtc acaggaataa atgccatttc 1080
tcatggtcag accacttatg gtaacgctga agacaaagag tatcagcaag gagtgggtag 1140
atttccaaat gaaaaagaac agctaaaaca gttacagggt ttaaactatgc acacctactt 1200
tcccaataaa ggaacccagc aatatacaga tcaaattgag cgccccctaa tgggtgggttc 1260
tgtatggaac agaagagccc ttactatga aagccagctg tggagtataa ttccaaattt 1320
agatgacagt tttaaaactc agtttgcagc cttaggagga tggggtttgc atcagccacc 1380
tcctcaataa tttttaaaaa tattaccaca aagtgggcca attggaggta ttaaatcaat 1440
gggaattact accttagttc agtatgccgt ggggaattatg acagtaacca tgacatttaa 1500
attggggccc cgtaaagcta cgggacgggt gaatcctcaa cctggagtgt atcccccgca 1560
cgcagcaggt catttaccat atgtactata tgacccca gctacagatg caaaacaaca 1620
ccacagacat ggatatgaaa agcctgaaga attgtggaca gccaaaagcc gtgtgcaccc 1680
attgtaagtc gacatactc 1699
```

<210> 35

<211> 554

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: aminokyseliny VP2 z klonu 2-B6
parvovirusu B19

<400> 35

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

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

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primér VP-5

<400> 36

aggaagtttg ccggaagttc

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VP-3

 <400> 37
 gtgctgaaac tctaaaggtg 20

 <210> 38
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VP2-5

 <400> 38
 gacatggata tgaaaagcct gaag 24

 <210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VP2-3

 <400> 39
 gttgttcata tctggttaag tact 24

 <210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér K-1sp

 <400> 40
 ataaatccat atactcatt 19

 <210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia :

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér K-2sp

 <400> 41
 ctaaagtatc ctgaccttg 19

 <210> 42
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér Hicks-5

 <400> 42
 cccgccttat gcaaattgggc ag 22

 <210> 43
 <211> 22

<212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér Hicks-3

 <400> 43
 ttgtgttagg ctgtcttata gg 22

 <210> 44
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér NS1-5

 <400> 44
 atactctcta gacaaaacaa aatggagcta ttttagagggg tgcttcaagt ttct 54

 <210> 45
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér NS1-3

 <400> 45
 gagtatgtcg acttactcat aatctacaaa gctttgcaat ccagacag 48

 <210> 46
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VP1-5SN

 <400> 46
 atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatgggtggg aaagt 55

 <210> 47
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VPALL-3

 <400> 47
 gagtatgtcg acttacaatg ggtgcacacg gcttttggct gtccacaatt c 51

 <210> 48
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VP2-5SN

 <400> 48
 atactcaagc ttacaaaaca aaatgacttc agttaattct gcagaagcca gcact 55

<210> 49
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VS PV1

 <400> 49
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atccttaaca gcaatttctg ata 43

 <210> 50
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSPC2

 <400> 50
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cgccctgtag tgctgtcag 39

 <210> 51
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSPC3

 <400> 51
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa tatacccaaa taggaagttc tg 42

 <210> 52
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSPC4

 <400> 52
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa taaaatgctg attcttcact tgc 43

 <210> 53
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSPC5

 <400> 53
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa tgctgtacct cctgtaccta 40

 <210> 54
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSPC6

<400> 54
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agccctctaa attttctggg 40

 <210> 55
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSPC7

 <400> 55
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctccctaatgt gtcaggaacc 40

 <210> 56
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSA1

 <400> 56
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccatatact cattggactg t 51

 <210> 57
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSA2

 <400> 57
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccagagcac cattataa 48

 <210> 58
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSA3

 <400> 58
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcacaatgcc agtggaaa 48

 <210> 59
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSP2

 <400> 59
 gtgctgaaac tctaaaggt 19

 <210> 60
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSP1

<400> 60
 ggaggcaaag gtttgca 17

<210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <221> rôzne vlastnosti
 <222> (1)
 <223> kde "c" je modifikovaný 5's fluoresceinfosforamiditom

<220>
 <221> rôzne vlastnosti
 <222> (20)
 <223> kde "t" je modifikovaný 3'pomocou DABCYL

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér VSPPR1

<400> 61
 cccatggaga tathtagatt 20

<210> 62
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: izolát CH80-1

<400> 62
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 taccacaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
 tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagg ttcgaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaatttg 480
 tttttttcac cttagagtt tcagcattta attgaaaact atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
 ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 63
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: izolát CH81-3

<400> 63
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 taccacaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

```

agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
tcgcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggagggt 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatacttttag 700

```

<210> 64

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL1-4

<400> 64

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggagggt 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatacttttag 700

```

<210> 65

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL2-1

<400> 65

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgttt 360
tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggagggt 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcag gatacttttag 700

```

<210> 66

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL3-1

<400> 66

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

```

```

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

```

<210> 67

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL4-3

<400> 67

```

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

```

<210> 68

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL5-2

<400> 68

```

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

```

<210> 69

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL6-2

```

<400> 69
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagg agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 70

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL7-3

```

<400> 70
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagg agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 71

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL8-2

```

<400> 71
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaagagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagg agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag gttttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 72

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL9-1

<400> 72

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgagc ccagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggagggt 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 73

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL9-9

<400> 73

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgagc caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggagggt 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 74

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL10-2

<400> 74

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag gggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgagc caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggagggt 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgccatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 75

<211> 700

<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL11-1

<400> 75

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

<210> 76

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL12-1

<400> 76

```
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggggc 240
agtaatcctg tcaaaagcat tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tgtacatttt ccagacagtt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgtag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtccgataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac cttagaggtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcaag ttactgacag cagtacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700
```

<210> 77

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL13-3

<400> 77

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


<210> 78
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL14-1

<400> 78

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

<210> 79
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL15-3

<400> 79

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

<210> 80
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL16-2

<400> 80

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

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

<210> 81
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL17-1

<400> 81
ataaatccat atacttattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttat 700

<210> 82
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL18-1

<400> 82
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttat 700

<210> 83
<211> 700
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL19-1

<400> 83
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagggt ttgcaccatt 420

```

agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agtcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

```

<210> 84

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL20-3

<400> 84

```

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

```

<210> 85

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL21-3

<400> 85

```

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

```

<210> 86

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL22-11

<400> 86

```

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

```

```

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtgtt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtag gatactttag 700

```

<210> 87

<211> 700

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: izolát B19SCL2-14

<400> 87

```

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

```

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primér Vpara 8

<400> 88

tccatattgac ccagagcacc a

21

<210> 89

<211> 19

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primér Vpara 9

<400> 89

tttccactgg cattgtggc

19

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<221> rôzne vlastnosti

<222> (1)

<223> 'kde "a" je modifikovaný 5' pomocou Fam

<220>
 <221> rôzne vlastnosti
 <222> (21)
 <223> kde "g" je modifikovaný 3' pomocou Tamra

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér Vpara 10

<400> 90
 agctagacct gcatgtcact g 21

<210> 91
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: cieľová sekvencia

<400> 91
 ctacttgctg cgggagaaaa acacct 26

<210> 92
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: sekvencia vnútornej kontroly

<400> 92
 gaattcactt gtacattttc cagacaattt ttaattccat atgacccaga gcaccattat 60
 acagtgacat gcaggtctag ctctgccaca atgccagtgg aaaggaggca aagggttgca 120
 ccattagtcc cataatggga tactcaacct catggagata tttagatttt aatgctttaa 180
 atttattttt ttcaccttta gagtttcagc acttaattga aaattatgga agtatagctc 240
 ctgatgcttt aactgtaacc atatcagaaa ttgctgttaa ggatgttacg gacaaaactg 300
 gagggggggg gcaggttact gacagcacta cagggcgccct atgcatgtta gtagaccatg 360
 aatataagta cccatatgtg ttagggcaag gtcaagatac tttagcccca gaacttccta 420
 tttgggtata ctttccccct caatacgctt acttaacagt aggagatgtt aacacacaag 480
 gaatttctgg agacagcaaa aaattggcaa gtgaagaatc agcattttat gttttggaac 540
 acagttcttt tcagctttta ggtacaggag gtacagcaac tatgtcttat aagtttcctc 600
 cagtgcctcc agaaaattta gagggctgca gtcaacactt ttatgaaatg tacaaccctc 660
 tatacggatc ccgctgtcga c 681

L'UDSKÝ PARVOVÍRUS B19

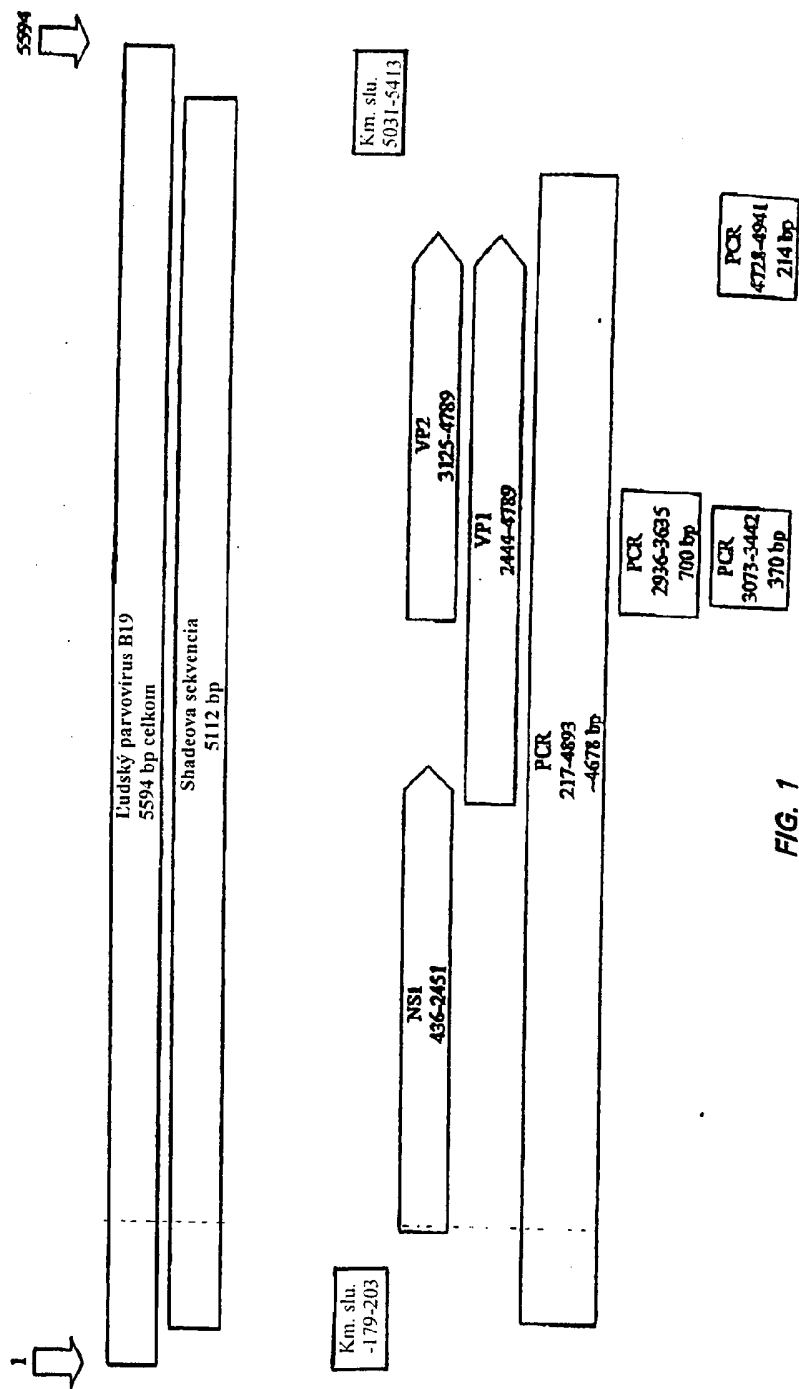


FIG. 1

CH47-26

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtgccataatgggatactc
aaccatggagatatttagattttaatgctttaaatgtttttcaccttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtacaagttactgacagcactaccgggcctatgcatgttagtagacatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2A**CH48-29**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaacaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctcccga
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtgccataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaatgtttttcaccttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacaggggcctatgcctgttagtagacatgaatacaagtagc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2B

CH33-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttggc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaacaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggtggcagtaacctgcaaaaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaattattttttcaccttttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaatgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccatgcttgttagtagacatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2C**CH33-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttggc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaacatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggtggcagtaacctgcaaaaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaattattttttcaccttttagagtttcagcacctaattgaaaattat
-----ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaatgctgttaaggatgttacagacaaaactgg-----
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccatgcttgttagtagacatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2D

CH33-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggagcaggaggggggtggcagtaatcctgcaaaaagcatgtggagtgaagggggccacttttactgccaact
ctgtaacttgtagctttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgcga
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacctaatgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 2E**CH42-7**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggagcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaaagcatgtggagtgaagggggccacttttagtccaac
tctgtaacttgtagctttccaggcagtttttaattccataigaccagagcaccattataaggtgtttctccgcg
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 2F

CH42-18

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggcgcaggaggggggggagcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagttagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtgaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2G**CH42-19**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggcgcaggaggggggggagcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagttagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2H

CH46-23

attaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
 ncacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccccgttgcccattttcaaggaagtttgcc
 ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
 tgggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaac
 tctgtaactgtacattttccaggcagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtgcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
 ggaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 2I**CH1-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaatataaaaaatgaaactgggttcaa
 gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccccgttgcccattttcaaggaagtttgcc
 ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
 tgggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtgccaac
 tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtgcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
 ggaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 2J

CH1-6

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccccgtggccatttcaaggaaagtttgc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
caaccccatggagataatttagatttaaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggagggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2K**CH2-8**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccccgtggccatttcaaggaaagtttgc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgc
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtcataatgggatact
aaccccatggagataatttagatttaaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
atggaagtatagtcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaataaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2L

CH2-10

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttacittaaaaggtgcagctgccccgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcacataatgggatactc
aaccatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacagaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgtagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2M**H2-11C**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttacittaaaaggtgcagctgccccgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcacataatgggatactc
aaccatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgtagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2N

CH5-13

ctaaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaagaggcaaaggttgcactattagtgccataatgggatactca
accccatggagatatttagattttaatgctttaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaattat
ggcagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtacc
caatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 2O**CH7-22**

ataaatccatgtactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaagaggcaaaggttgcaccattagtgccataatgggatactc
aaccatggagatatttagattttaatgctttaattgtttttttcaccttttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtacaagttactgacagcactaccggggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 2P

CH13-27

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggcagtaattctgtcaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgctaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctcccga
gcgagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccatcagtcaccataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaaatgctttaattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2Q**CH14-33**

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagtaactctgttaaaagcatgtggagttagggggccacttttagtgccaactc
tgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctcccgcag
caagtagctgccacaatgccagtggaaaagggaagggttgcaccattagtcaccataatgggatactcaa
cccatggagatatttagatttaaatgctttaattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaattatg
gtagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaagatgttacagacaaaactggag
gggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtggaaccatgaatacaagtaccca
tatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2R

CH62-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagcact
ggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaacttgtacaktttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagataatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggggtacaggttactgacagcactacaggccgcctatgcatgttagtagacatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2S**CH64-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatacttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgaggttactgacagcactacaggccgcctatgcatgttagtagacatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2T

CH67-2

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagctttaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggcccatittcaaggaagttgccc
ggaagtcccgttacaacgccicagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggagggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaagaggcaaaggttgcaccattagtcacataatgggatactc
aaccatggagatatttagattttaatgctttaaatttattttttcaccttttagagttcagcacittaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaagatgttacagacaaaactg
gaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtgaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2U

Parvovirus B19, klon č. 2-B1

1 cccgecttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
 61 ttgtaacggg taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagetc tttctttctg ggetgctttt ttectggact tacttgetgt tttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt tcttetaatg tctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctctttact
 301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata
 361 ctaagcagt gtggettcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta
 421 ctttttcaa gtagaatgta acaaattga agaaggctat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacecca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
 541 actttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcaaatac tttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 tttaaatgtt gtatgggtgt ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aaggagctt gccatgccaa gaaacecegc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggtgtgca catttaattg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagttca aactatggta aactggtgtg gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttc aaattcaaag tgcactaaaa ctagecaatt ataaagcaac
 1021 taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat
 1081 taaaaacaat aaaattgta aattgttact ttgcaaac tatgaccccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta
 1201 tgggccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgetaaaa gtgttccagt
 1261 atatggeatg gttactgga ataataaaaa cttccattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 cttgggtgtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttaggcggg caaccaccca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgctggt
 1441 agtacctgtg gttataacca gcaatggta cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgatggta aagttaaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatggggt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatgggt
 1621 taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc
 1681 tggaattaat gcagatggcc tccaccaga cctccaaacc acccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gcttttttaa
 1801 cctcatcacc ccaggcgccg ggaacactga aacecegegc tctagtacgc ccatccccgg
 -----1861 gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttcc tccgaagttg tagctgcac-----
 1921 gtgggaagaa gcctttctaca cacttttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttggggt
 1981 tgattatgtg tgggacgggt taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa

FIG. 3A

2041 tagtggggga ggcttgggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg
 2101 atggaaattt cgagaattta cccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taateccctt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt
 2221 tgtagattat gagtaangaa agtggcfaat ggtgggaaag tgatgataaa ttgtctaaag
 2281 ctgtgtatca gcaatttggt gaattttatg aaaagggtac tggaacagac ttagagctta
 2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aacccatcct
 2401 ctttgtttga cttagtgtct cgtattaaaa ataacctaa aaactctcca gacttatata
 2461 gtcatcattt tcaaagtcac ggacagttat ctgaccaccc ccatgcctta tcatcagta
 2521 gcagtcacgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac
 2641 aagctgggccc ccgcgaaagt gctgttgaca gtgtgcgaag gattcatgac tttaggtata
 2701 gccaaactggc taagtgggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaaa tataaaaaat gaaactgggt tcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
 2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc atttcaagg aagtttgcg gaagttcccg
 2881 cttacaagc ctcagaaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt
 3001 ttagtgccaa ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taagggtgtt tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg
 3121 aggcgaagg tgcaccatt agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag
 3181 attttaatgc tttaaattta ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agctcctgat gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaggatg
 3301 ttacggacaa aactggaggg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca
 3361 tgttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaagggtcaa gatactttag
 3421 cccagaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagtaggag
 3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 ttatgtttt ggaacacagt tctttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtg ccccagaaa atttagaggg ctgcagtcaa cacttttatg
 3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatcccgct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gccccaanaa ttcattgcag
 3781 ggccactagt aaactcagt tctacaaagg agggagacag ctctagtaact ggagctggaa
 3841 aagccttaac aggccttagc acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgcctg
 3901 ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggtcagacc acttatggtg acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 -----4021 tgggtagatt teaanatgaa aaagaacagc taaaacagtt acaggggtta aaatgcaca-----
 4081 cctactttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aatigagcgc cccctaatgg
 4141 tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaatc
 4201 caaatttaga tgacagtttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcac

FIG. 3B

4261 agccacctcc tcaaatattt ttaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta
4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaacctga
4381 catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacggtggaa tectcaacct ggagtgtatc
4441 cccgcacgc agcaggatc taccatatg tactatatga cccacagct acagatgcaa
4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaage ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
4561 tgcacccatt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgcca
4621 ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa

FIG. 3C

Parvovirus B19, klon č. 2-B6

1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
 61 ttgtaacggg taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc tttctttctg ggcgtctttt ttctggact tacttgctgt tttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt ttttctaag ttctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctctttact
 301 ggatttagac actttgact gggaaccact aactcatact aacagaactaa tggcaatata
 361 ctttaagcagt gtggetteta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta
 421 cttttttcaa gtagaatgta acaaattga agaaggetat cataatcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacecca gaaacctcac agtgtgtgta ggggggttat ttaataatgt
 541 actttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcataaac ttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 ttttaaatgt gtatgggtgt ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aaggagcctt gccatgccaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttggtc catttaatgg
 841 gaagggaact aaggetagca taaagttica aactatggta aactgggtgt gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac
 1021 taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat
 1081 taaagacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaac tatgaccccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta
 1201 tggaccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt
 1261 atatggcatg gttactgga ataataaaaa cttccattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 cttgggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttaggcggt caaccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgcctgg
 1441 agtaccggtg gttataacca gcaatgggtga cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatggggt tactaacaga ggcgtatgta caacagtggc ttacatgggtg
 1621 taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgattccc
 1681 tggaaattaat gcagatgcc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaacte agtgaagca gcttttttaa
 1801 cctcatcacc ccaggecct ggaacactga aacccgcgc tctagtacgc ccatccccgg
 -----1861-gaccagtcca ggagaatcat ctgtcggaag-ccagttcc-ccgaagtgt tagctgcac
 1921 gtgggaagaa gcctctaca caccttgge agaccagttt cgtgaactgt tagttgggt
 1981 tgattatgtg tgggacgggt taagggtttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa
 2041 tagtggggga ggctggggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg

FIG. 4A

2101 atggaaattt cgagaattta ccccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taatcccttt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt
 2221 tgtagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa ttgctaaag
 2281 ctgtgtatca gcaattgtg gaattttatg aaaaggttac tggaacagac ttagagctta
 2341 ttc aaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aaccatect
 2401 ctttgtttga cttagtgtct cgtattaaaa ataacctaa aaactctcca gacttatata
 2461 gtcatcattt tcaaagtcac ggacagttat ctgaccacce ccatgctta tcatcagta
 2521 gcagtcacgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccgggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac
 2641 aagctgggcc cccgcaaagt gctgttgaca gtgctgcaag gattcatgac ttaggtata
 2701 gccaaactggc taagttggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
 2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc atttcaagg aagtttgcg gaagtcccg
 2881 cttacaagc ctcagaaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctga gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaatctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt
 3001 ttagtgcaa ctctgtaact tgaacattt ccagacaatt ttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taaggtgtt tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg
 3121 aggc aaagg tgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaccctatgg agatatttag
 3181 attttaatgc ttaaaattt ttttttcac ctttagagt tgcactta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agctcctgat gctttaaactg taaccatac agaaattgct gtaaggatg
 3301 ttacaaacaa aactggaggg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca
 3361 tgttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggtaaa gatacttag
 3421 cccagaaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagtaggag
 3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 tttatgtttt ggaacacagt tctttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtg ccccagaaa atttagaggg ctgcagtaaa cacttttatg
 3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatcccgct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gcccaaaac tcatgccag
 3781 ggccactagt aaactcagtg tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
 3841 aagcctaac aggccttagc acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgcctg
 3901 ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtaca ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggtcagacc acttatggta acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 4021 tgggtagatt tccaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acaggggtta aacatgcaca
 4081 cctacttcc caataaagga acceageaat atacagataa aattgagcgc cccetaatgg
 4141 tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaattc
 4201 caaatttaga tgacagttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcatc
 4261 agccacctec tcaaatattt ttaaaaaat taccacaag tgggccaatt ggaggtatta

FIG. 4B

4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaaccatga
4381 catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacggtggaa tctcaacct ggagtgtatc
4441 cccgcacgc agcaggatcat ttaccatatg tactatatga cccacagct acagatgcaa
4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
4561 tgcaccatt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgcca
4621 ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa

FIG. 4C

Jednovláknová sekvencia DNA klonu B1-NS1

atactcttgaacaaaacaaaatggagctatttagaggggtgcttcaagtttcttaatgttctggactgtgctaacgataactgggtggtgctctt
tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactcatactaacagactaatggcaatatacttaagcagtggtgcttctaagcttgacttta
ctggggggccactagcaggggtgcttgaactttttcaagtagaatgtaacaaattgaagaaggctatcatattcatgttggttattggggggcca
gggttaaaccacagaacccacacagtggtgtagaggggtatttaataatgtactttatcaccttgaactgaaaatcgaagctaaaattttgc
caggaatgactacaaaaggcaatactttagagatggagagcagttatagaaaactatttaataaaaaaacctttaaattgttgatggtgt
gttactaatattgatggacatagatactgtatttctgctacttttagaaaggagcgttgccatgccaagaaccccgcatcaccacagccat
aaatgatactagtagctgatgctggggagtciagcggcacaggggcagagggtgtgccatttaagggaagggaactaaggctagcataaag
tttcaaaactatggtaaactgggtgtgtgaaaacagagtggttacagaggataagtggaactagtgtactttaaccagtacactttactaagcagt
agtcacagtggaagttttcaaaatgcaactaaaactagcaattataaagcaactaatttagtgcctactagcacattttattgcatacag
actttgagcaagttatgtgtattaaaaacaataaaattgttaaattgtactttgtcaaaactatgacccctatttagtgggcagcatgtgttaaag
tggattgataaaaaatgtggcaagaaaaacacactgtggtttatgggcccgaagtacagggaaaacaaactggcaatggccattgctaa
aagtgttcagtatatggcatggttaactggaataatgaaaactttccatttaatgatgtagcaggaaaaagcttggtgtgtgggatgaag
gtattattaagtctacaattgtagaagctgcaaaagccatttagcgggcgaaccaccagggtagatcaaaaaatgcgtggaagtgtagctg
tgctggagtacctgtggttataaccagcaatggtgacattactttgtgtgaagcggaacactacaacagtgtacatgctaagccctaaaa
gagcgcatggtaaagttaaactttactgtaagatgcagccctgacatggggttactaacagaggctgafgtacaacagtggttaccatggtgt
aatgcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacacttttgattccctggaattaatgcagatgccctccaccagacctcc
aaaccaccccaattgtcacagacaccagtatcagcagcagtggtgtgaaagctctgaagaactcagtgaaagcagcttttttaacctcatca
ccccaggcgccctggaacactgaaaccccgctctagtagcaccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgtcgggaagcccagtttc
ctccgaagtgttagctgcatcgtgggaagaagcctctacacacctttggcagaccagtttcgtgaactgttagttgggttgattatgtgtggg
acggtgtaagggttacctgtctgtgtgtgcaacatattaacaatagtgggggaggcttgggactttgccccattgcattaatgtaggggct
tggtataatgtaggaatttcgagaatttaccacagatttggtgcgagttagctgccatgtgggagcttctaaccctttctgtgctaacctgca
aaaaatgtgcttacctgtctgattgcaagctttgtagattatgagtaagtcgacatactc

FIG. 5A

Aminokyselinová sekvencia klonu B1 NS1

MBLFRGVLQVSSNVLDcANDNWWCSLLDLTSDWEPLTHTNRLMAIYLSSVAS
KLDFTGGPLAGCLYFFQVECNKFEEGYHIHVIGGPGNLNPRNLTVCEGLFNNVLYHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKGA
CHAKKPRITTAINDTSTDAGESSGTGAEVVPFNGKGTAKSIKFQTMVNWLCENRVFTEDK
WKLVDENQYTLSSSHSGSFQISALKLAIYKATNLVPTSTFLLHTDFEQVMCIKNKIV
KLLLCQNYDPLLVGQHVWKIDKKCGKKNLWFGPPSTGKTNLAMAIAKSVPVYGMVNW
NNENFPFNDVAGKSLVWDEGIIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSVAVPGVPVVT
SNGDITEFVYSGNTTTTTHAKALKERMVKNFTVRCSPDMGLLLEADYQQWLTWCNAQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVTDTSISSGGESSEELSESSFFNLITPGA
WNTETPRSSSTPIPGTSSGESSVGSPTSSEVVAASWEEAFYTPLADQFRELIVGVDYVWDG
VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTPDVLRCSCHVGASNPFSVL
TCKKCAYLSQLQSFVDYB

FIG. 5B

Sekvencia jednovláknovej DNA B1 VP1

atactcaagcttcaaaacaaaatgagtaaaagaggcaaatggtgggaaagtgatgataaattgclaaagctgtgtatcagcaatttgggaatttta
 tgaaaagggtactggaacagacttagagcttaftcaaatattaaaagatcatataatatttcttagataatcccctag
 aaaacccatcctcttggttgacttagttgctctgtattaaaataacctaataaaactctccagacttatatagtcacat
 ttcaaaagtcagtgacagttatctgaccacccccatgcttatcatccagtagcagtcagcagaacctagaggagaaga
 tgcagtaattcttagtaagacttacacaagcctgggcaagtgagctacaactaccgggtactaactatgttggccctg
 gcaatgagctacaagctgggcccccgcaaatgctgtgacagtgctgcaaggattcatgacttaggtatagccaactg
 gctaagttgggaataatccataactcatgtgactgtgacagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgg
 gtttcaagcacaagtagtaaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccccgtggcccaitttcaagggaatttgc
 cgggaagtccccgttacaaacgctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttatctgcagaagccagcactgg!gca
 ggaggggggggcagtaactctgtaaaagcatgtggagtgagggggcccatttttagtccaactctgtaactgtacatt
 ttccagacaaattttaattccatatgacccagagcaccattataagggtgttttccccgcagcaagtagctgcccaatg
 ccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagtcacataatgggatactcaaccccatggagatatittagattttaat
 gcttaaatattatttttacccttagagtttcagcacittaattgaaaattatggaagtatagctcctgagctttaac
 tgaacctatcagaatttgcgttaaggatgttacggacaaaactggagggggg!gcaggttacgacagcactacag
 ggccctatgcatgttagtagacatgaatataagtagcccatatgtgttagggcaagggtcaagatactttagccccgaa
 ctctcatattgggtatcttcccccaataacgcttacttaacagtaggagatgtaacacacaaggaaatttctggaga
 cagcaaaaaattggcaagtgaagaatcagcatttattgttttgaacacagttctttcagcttttaggtacaggaggla
 cagcaactatgtcttataagtttctccagtgccccagaaaaatttagagggtcagctcaacactttatgaatgtac
 aaccccttatcggatccgcttaggggttctgacacattaggaggtgacccaaaatttagatcttaacacatgaaga
 ccatgcaatcagccccaaaactcatgccaggccactagtaaacctcagtgcttcaaaaggaggagacagctctagta
 ctggagcttgaaaagccttaacaggcccttagcacaggtacctctcaaaaactagaaatcttaccgcccgtggccagtg
 tctcagcctgaccaccactgggacacagataaatgtcacaggaaataatgccatttctcatgttcagaccactatgg
 taacgctgaagacaaaagatcagcaaggagtggttagatttcaaatgaaaaagaacagctaaaacagttacagggt
 taacatgcacacctactttcccaataaaggaaacccagcaatatacagatcaaatgagcgcgccctaatgttgggttct
 gtatggaacagaagagccctcactatgaaagccagctgtgagtaaaattccaaatttagatgacagttttaaactca
 gtttcagcccttaggaggtgttgcacagccacctctcaaatatttttaaaaattaccacaaagtgggccaa
 ttggagggtataaatcaatgggaattactaccttagttcagatgcccgtgggaattatgacagtaacctgacatttaa
 ttggggccccgtaagctacgggacgttggaatctcaacctgagtgatccccgcacgcagcaggtcatttaccata
 tgtactatgacccccagctacagatgcaaaacaacaccacagacatgatatgaaaagccctgaagaattgtggacag
 ccaaaagccgtgtgacccatgttaagtcgacatact

FIG. 6A

Aminokyselinová sekvencia B1 VP1

MSKBSGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYKVTGTDLELIQLKDHYNISLDNPL
 ENPSSILFDLVARIKNNLNKSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPGRBDAVLSSSE
 DLHKPGQVSVQLPGTINYVGPGNELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTY
 ADEELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEPVPAYNASEKYPSMTSVNS
 ABASTGAGGGGSNPVKSMWSEGAIFSAANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
 ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRVYLDNFNALNLFSPLEFQHLENIYGSIAPDALTVTISEI
 AVKDVTDKTTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGGQDTLAPELPIWVYFPPQYAY
 LTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKPPVPENLEBGS
 QHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMFGPLVNSVSTKEGDSSS
 TGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGFVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
 YQQGVGRFPNEKEQLKQLQLNMHTYFPNKGTQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQL
 WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTIVQYAVGIM
 TVTMTIFKLGP RKATGRWNPQGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHRHGYEKPEELWT
 AKSRVHPL

FIG. 6B

Sekvencia jednovláknovej DNA B1 VP2

atactcaagcttcaaaaacaaatgacttcagtttaattctgcagaagccagcactgggtgcaggagggggggcagtaacctgtgaaaagcatgtggagtgagggggc
 cacttttagtgccaactctgtaactgtacatttccagacaatttttaattccataigaccagagcaccatt
 ataagggtgttttcccgagcaagtagctgccacaatgccagtgaaaaggaggcaagggttgcaccattagtcccata
 atgggatactcaaccccatggagatatttagattttaalgctttaaatttatttttccactttaagatttcagcactt
 aattgaaaaattatggaagtatagtctctgatgctttaactgtaaccatcagaaaattgctgttaaggatgttacggaca
 aaactggagggggggtgcagggtactgacagcactacaggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagtaccca
 tatgtgttaggggcaaggtaacatactttagccccagaacttctatttgggtatacttccccctaatacgcttactt
 aacagtaggagatgttaacacacaaggaaatttctggagacagcaaaaaattggcaagtgaagaatcagcattttatgttt
 tggaaacacagttctttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttaagtctctcagtgccccagaa
 aatttagagggtgcagtcacacattttatgaaatgacaaccccttatacggatccccgttaggggttcctgacacatt
 agggaggtgacccaaaatttagatctttaacacatgaagaccatgcaattcagccccaaacttcagccaggggccactag
 taaactcagtgctcaaaaggaggagacagctctagtactgagctggaaaagccitaacaggccitagcaagggtacc
 tctaaanaactagaatactctacgcccgtggccagtgctcagccgtaccaccactgggacacagataaatgtctac
 aggaataaatgccatttctatgttcagaccattatggtaacgctgaagacaagagtagcaaggagtggttagat
 ttccaaatgaaaaagacagctaaacagttacagggttaaacatgcacacctacttcccaataaaggaaaccagcaa
 tatacagatcaaaatgagcggccctaatgggtggtctgtatggaacagaagagcccttcactatgaagccagctgtg
 gaggtaaaatccaaattagatgacagttttaaaactagtttgcagcccttaggaaggatgggtttgcatcagccaccic
 ctcaaatatttttaaaaataaccacaagtgggccaattggaggtatataatcaatgggaattactaccttagttcag
 tatgcccgtgggaattatgacagtaacctgacatttaattggggcccgtaaagctacgggacgggtggaatcccaacc
 tggagtgatccccgcacgcagcaggtcatttaccatgtactatatgacccacagctcagatgcaaaacacacc
 acagacatggatgaaaaagccgaagaattgtggacagccaaaagccgtgtgcacccattgtaagtcgacatactc

FIG. 7A

Aminokyselinová sekvencia B1 VP2

MTSVNSAEASTGAGGGGNSPVKSMWSEGA TFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
 YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGS
 IAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPPYVLGQGQDITLAP
 LPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGGTATMSYK
 FPPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVDPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPL
 VNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
 HGQTTYGNAEDKBHYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGS
 VWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSM
 GITTLVQYAVGIMTVMTTFKLGRKATGRWNPQPGVYPPHAAAGHLPPVLYDPTATDAKQH
 HRHGYEKPBEELWTA KSRVHPL

FIG. 7B

Sekvencia jednovláknovej DNA B6 NS1

atactcttcgaacaaaacaaaatggagctatttagaggggtgctcaagttcttctaattgttctggactgtgctaacgataactgggtgctctt
tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactcatactaacagactaatggcaatatacttaagcagttggcttctaagcttgacttta
ctggggggccactagcaggggtgcttcttttcaagtagaatgtaacaaattgaagaaggctatcattcatgtggttattggggggcca
gggttaaacccagaaacctcacagtgtgttagaggggtatttaataatgtactttatcaccttgtaactgaaaatctgaagctaaaattttgc
caggaatgactacaaaaggcaaatacttttagagatggagagcagtttatagaaaactatttaalgaaaaaatacctttaantgttattgtgtg
gttactaatattgatggacatatagatacctgtattctgctacttttagaaagggagcttgccatgccaagaaccccgcatcaccacagccat
aaatgatactagtgactgatgctggggagtctagcggcacaggggcagaggttgccatttaalggaagggaactaaggctagcataaag
tttcaactatggtaaactggttgtgtgaaacagagtggttacagaggataagtggaactagttgactttaaccagtagactttactaagcagt
agtcacagtgggaagtttcaattcaaatgtgcactaaaactgaactttataaagcaactaatttagtcctactagcacattttattgcatacag
actttgagcaagttatgtgtattaaagacaataaaattgtaattgttactttgtcaaaactatgaccccttatttagtggggcagcatgtgttaaag
tggaattgataaaaaatgtggcaagaaaaacacactgtggtttatggacggccaagtacagggaaaacaaactggcaatggccattgctaa
aagtgtccagtatatggcatggttaactggaataatgaaaacttccatttaatgatgtagcaggaagaaactgtgtgtctgggatgaagta
ttattaagtctacaattgtagaagctgcaaaagccatttttagcggggcaaccaccagggtagatcaaaaaatgcgtggaagtgtagctgtgc
ctggagtacccgtggttataaccagcaatgtgacattactttgtgtgaagcgggaacactacaacactgtacatgctaaagccttaaaaga
gcgcatggtataaagttaacttactgtaatgtcagccctgacatgggggttactaacagaggctgatgtacaacagtggttacatggtgta
gcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacacttttgattccctggaattaatgcagatgccctccaccagacctcaa
accacccaactgtcacagacaccagatcagcagcagtggtgtggaagctctgaagaactcagtgaagcagctttttaacctcatcacc
ccaggcgccctggaacactgaaccccgcgctctagtagccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgtcggagcccagtttcc
tccgaagtgtagctgcatcgtgggaagaagccttctacacacctttggcagaccagtttctgtaactgttagttggggttgattatgtgtgga
cgggtgaaggggtttacctgtctgtgtgtgcaacataataacatagtgggggaggttgggactttgtccccattgcattaatgtaggggctt
ggataatggatggaatttcgagaatttaccagatttggcgtgatgtgcatgtggagcttctaactcccttttctgtgtaacctgca
aaaaatgtgcttacctgtctgattgcaagctttagattatgagtaagtcgacatactc

FIG. 8A

Aminokyselinová sekvencia B6 NS1

MELFRGVLQVSSNVLD C ANDNWWCSLLDLTSDWEPLTHNRLMAIYLSSVAS
KLDFTGGPLAGCLYFFQVECNKFEEGYHHV VIGGPGLNPRNLTV C VEGLFNNVLYHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKGA
CHAKKPRITTAINDTSTDA GESSGTGA BVVPFNGKGT KASIKFQIMVNWLCENRVFTEDK
WKLVDNFNQYTLSSSHSGSFQISALKLAIYKATNLVPTSTFLHIDFBQVMCIKDNKIV
KLLLCQNYDPLLVGQHV LKWIDKKCGKKNLW FYGPPSTGKTNLAMAIAKSVFVYGMVNW
NNENFPFNDVAGKSLV V WDEGIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSAVPGVPVVT
SNGDITFVVSNTTTTVHAKALKERMVKLNFTVRCSPDMGLL TEADVQQLTWCAQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVDTTSISSGGESSEELSESSFFNLITPGA
WNTETPRSTPIPGTSSGESSVGSVSEVVAASWEEAFYTPLADQFRELLVGVDYVWDG
VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTD LVRCSCHVGASNPFSVL
TCKKCA YLSGLQSFVDYE

FIG. 8B

Sekvencia jednovláknovej DNA B6 VP1

atactcaagcttcaaaaacaaatgagtaaagaaagtggaatggtgggaagtgatgataaatttgctaaagctgtgtatcagcaatttgtg
gaattttatgaaaaggttactggaacagacttagagcttattcaaatattaaagatcattataatatttcttagataatcccttagaaaacccatc
cttttgttacttagtctgtatataaaataacccataaaacttccagacttatalagtcattttcaaaagctatggacagttatctgaccac
cccatgacctatcatccagtagcagtcagcaaacctagaggagaagatgagctattatctagtgaagacttacacaagcctgggcaagtt
agcgtacaactacccggactaactatgttggccctggcaatgagctacaagctgggccccgcaaagtctgttgacagtgctgcaaggat
tcatgacttttaggtatagccaactggctaagttgggaataatccatatacttggactgtgagatgaagacttttaaaaaataaaaaa
tgaactgggttcaagcacaagtagtaaaagactactttacttttaaaaggtgcagctgccccgtggccccatttcaaggaagttgccggaa
gttccccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcagacttcaagttatctgcagaagccagcactggtgcaggagggggggcagta
atcctgtgaaaagcagtggtgagtgagggggccacttttagtgcacaactctgaactgtacatttccagacaattttaattccatagaccag
agcaccattataaggtgttttcccgagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgg
gatactcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttacccttagagtttcagcacttaattgaaaattatggaagtatagct
cctgatgctttaaactgtaacatcagaaaattgctgtaaggatgttaacaaacaaactggaggggggtgaggttactgacagcactaca
ggggcgctatgcatgttagtagacatgaatataagtagccatattgtttagggcaaggtcaagatactttagccccagaacttctatttgggt
atactttccccctcaatacgttacttaacagtaggagatgttaacacacaaggaatttctggagacagcaaaaaattggcaagtgaagaatca
gcattttatgtttggaacacagttctttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgcttataagtttccctcagtgccccagaaaattt
agagggtcagctcaacacttttgaatgtacaaccccttatacggatcccgcttaggggttctgacacattaggaggtgacccaaaattt
agatctttaacacatgaagaccatgcaattcagccccaaactcagccaggccactagtaaaactcagtgctacaaaggaggagagacag
ctctagtagtgagctggaaaagccttaacagccttagcacaggtacctctcaaaacactagaatattcctacgccccgtggccaggtgtc
gccgtaccaccactgggacacagataaatatgtcacaggataaatgccatttctcagtgacagcactatggtaacgctgaagacaaag
agtatcagcaaggagtggttagatttccaaatgaaaaagacagctaaacaggttacagggtttaaacatgcacacctacttcccaalaag
gaaccagcaatatacagatcaaatgagcgccccctaatgttggtggttctgtatggaacagaagagcccttactatgaagccagctgtg
agtaaaattccaaatttagatgacagttttaaactcagtttgcagccttaggaggtgggttgcacagccacctctcaaatattCtataaa
atattaccacaaagtgggccaatggaggtattaaatcaatgggaattactaccttagtgcagtagccgtgggaattatgacagtaaccatga
cattttaaattggggccccgtaaagctacgggacggtggaatcccaacctggagtgtatccccgcacgcagcaggtcattaccatatgta
ctatatgacccacagctacagatgcaaaacacaccacagacatgatatgaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgtgtg
caccattgttaagtcacatactc

FIG. 9A

Aminokyselinová sekvencia B6 VP1

MSKESGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYEKVTGTDLBLIQLKDHYNISLDNPL
ENPSSLFDLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPREGEDAVLSSE
DLHKPGQVSQVLPGTNYVGPONELQAGPPQSAVDSAAIHDFRYSQAKLGINPYTHWTV
ADEBLLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYPSMTSVNS
AEASTGAGGGGSGNPVKSMWSEGATFSANSVTCFTRQFLPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAFDALTVTISET
AVKDVNTKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHBYKYPYVLGQGQDILAPELPIWVYFPPQYAY
LTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLGTGGTATMSYKFPVPVPENLEGCS
QHIFYEMYNPLYGSRLGVPDILGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPOPLVNSVSTKEGDS
TGAGKALTGLSTGTSQNTIRISLRPGPVSPYHHWDIDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
YQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQL
WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMOITTLVQYAVGIM
TVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPHAAGHLPPVLYDPTATDAKQHHRHGYEKPEELWT
AKSRVHPL

FIG. 9B

Sekvencia jednovláknovej DNA B6 VP2

atacicaagcttacaacaaatgacttcagtttaattctgcagaagccagcactgggtaggagggggggcagtaacctgtgaaaagcatgtggagtgagggggc
 cacttttagtgccaactctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatagaccagagcaccatt
 ataagggtgttttccccgcagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcaccata
 atgggatactcaaccccatggagataittagattttaatgcttaaaatttttttacccttagagtttcagcactt
 aattgaaaattaaggagtagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaatgtctgtaaggatgttacaaca
 aaactggaggggggggtagggtactgacagcactacaggggcctatgcatgtagaccatgaataaagtaccca
 tatgtgttagggcaaggtaacatacttagccccagaacttctatttgggtatacttccctcaatcagcttactt
 aacagtaggagatgttaacacacaaggaaatttctggagacagcaaaaattggcaagtgaagaatcagcaattttatgtt
 tggaaacacagttctttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttataaatttctccagtgccccagaa
 aatttagagggtcagtcacacattttatgaattgtaaccccttacggatcccgcttaggggttccctgacacatt
 agggaggtgacccaaaatttagatctttaacacatgaagaccatgcaattcagccccaaacitcatgccaggggccactag
 taaactcagtgcttacaaggaggggagacagctctagtactggagctggaaaggccttaacaggccttagcacagggtacc
 tctcaaaacactagaataatccttacgccctgggccaagtgtctcagccgtaccaccactgggacacagataaataatgttac
 aggaataatgccaatttctcatgtgtcagacacacttatggtacgtgaagacaagagatcagcaaggagtggtatgat
 ttccaaatgaaaaagacagctaaaacagttacagggttaaacatgcacacctatttcccaataaaggaaacccagcaa
 tatacagatcaaatgtgagcgccccctaattggtgggttctgtatggaacagaagagcccttcatatgaagccagctgtg
 gagtataatccaaatttagatgacagttttaaactcagtttgagccttaggaggtgggtttgcatcagccacctc
 ctcaaatatttttaaaaatttaccacaaagtggccaattggaggtatgaataatgggaattactaccttagttcag
 tatgccgtgggaattatgacagtaacctgacattaaattggggccccgtaagctacgggaggtggaaacctcaacc
 tggagtgatccccgcacgcagcagggtcattaccatagtactatagacccacagctacagatgcaaaaacacacc
 acagacatggaatgaaaagcctgaagaaattgtggacagccaaaagccgtgtgacccattgtaagtcgacatactc

FIG. 10A

Aminokyselinová sekvencia B6 VP2

MTSVNSAEASTGAGGGGSNPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
 YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLENYGS
 IAPDALTVTISBIAVKDVTNKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYYPVVLGGQDTLAPE
 LPIWVYFPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASSESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYK
 FPPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLLGVPDITLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPL
 VNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTIRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
 HGQTTYGNABDKBYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQYTDQIERPLMVGS
 VWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIFLKILPQSGPIGGIKSM
 GITTLVQYAVGIMTVMTIFKLGPBKATGRWNPQPGVYPHAAAGHLPYVLYDPTATDAKQH
 HRHGYEKFPEELWTAKS RVHPL

FIG. 10B

CH80-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaagggaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtttaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaatgctttaaattgtttttcaccttttagagttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtagacaagttactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtag
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11A**CH81-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaagggaagtttgcc
ggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtttaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatacttagatttaatgctttaaattatgtttttcaccttttagagttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtag
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11B

B19SCL1-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaagggaagtttgc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccctatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcagggtactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtag
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11C**B19SCL2-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaagggaagtttgc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tgggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccctatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcagggtactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagtag
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11D

B19SCL3-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11E**B19SCL4-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcataatgggatactc
aaccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11F

B19SCL5-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggcccatttcaaggaagtttgcc
ggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11G**B19SCL6-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggcccatttcaaggaagtttgcc
cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11H

B19SCL7-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaaatgctttaaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 11I**B19SCL8-2**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataagggttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
 caaccccatggagatatttaggttttaaatgctttaaattttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttttag

FIG. 11J

B19SCL9-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccccgtggcccatttcaaggaagtttgc
cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttcagacagttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccg
cagccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatac
tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaatttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaa
ttatggaaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaac
tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagt
acccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11K**B19SCL9-9**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccccgtggcccatttcaaggaagtttgc
cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttcagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccg
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcacataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaatttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11L

B19SCL10-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataagggttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11M**B19SCL11-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataagggttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtcataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

FIG. 11N

B19SCL12-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgcgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtgacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccg
 cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcgataatgggatac
 tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaa
 ttatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
 ggaggggggggtgcaagttactgacagcagtagcaggcgccctatgcatgtagtagaccatgaatacaagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 110**B19SCL13-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgcgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgttaacttgtgcattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccg
 cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaggtttgcaccattagtcacataatgggatac
 tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaa
 ttatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaac
 tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggcgccctatgcatgtagtagaccatgaataaagt
 acccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11P

B19SCL14-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaatttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

FIG. 11Q**B19SCL15-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgccttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaacttgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataagggtgtttctcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaatttatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagacatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

FIG. 11R

B19SCL16-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cgggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

FIG. 11S**B19SCL17-1**

ataaatccatatacttattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cgggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11T

B19SCL18-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccatittcaaggaagtttgc
 cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtgccataatgggatact
 caaccccatggagataatttagattttaatgctttaaatttattttttcacctttagagttagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatacttttag

FIG. 11U**B19SCL19-1**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccatittcaaggaagtttgc
 cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgcaccattagtgccataatgggatact
 caaccccatggagataatttagattttaatgctttaaatttattttttcaccttttagagttagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgcttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaagggtcaggatacttttag

FIG. 11V

B19SCL20-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatgatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaagggttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11W**B19SCL21-3**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatgatgaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaagggttgcaccattagtcccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatattttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11X

B19SCL22-11

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcgggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtgccataatgggatact
 caaccccatggagatattagattttaatgctttaaatattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11Y**B19SCL2-14**

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
 cggaagtccccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaatttttaattccatatgaccagagcaccattataaggtgttttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaagggttgaccattagtgccataatgggatact
 caaccccatggagatatctagattttaatgctttaaatattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11Z

FIGURE 12

5 GAATTCACCTGTACATTTTCCAGACAATTTTAAATTCATATGACCCAGAGCACCATTAT
ACAGTGACATGCAGGTCTAGCTCTGCCACAATGCCAGTGGAAAGGAGGCAAAGGTTTGCA
CCATTAGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATGCTTTAA
ATTTATTTTTTTCACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTC
CTGATGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACGGACAAAAC TG
10 GAGGGGGGGTGCAGGTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATG
AATATAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCAAGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCTA
TTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATACGCTTACTTAACAGTAGGAGATGTTAACACACAAG
GAATTTCTGGAGACAGCAAAAAAATTGGCAAGTGAAGAATCAGCATTTTATGTTTTGGAAC
ACAGTTCTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCCTC
15 CAGTGCCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAACCCCT
TATACGGATCCCGCTGTCGAC (SEQ ID NO.:92)