

(19)



(10) **LT 3808 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **3808**

(51) Int. Cl.⁵: **G01N 33/576**
C07K 15/00

(21) Paraiškos numeris: **IP1747**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 03 25**

(60) SU duomenys: **PCT/US 91/02225, 1991 03 29**

(31, 32, 33) Prioritetas: **504352, 1990 03 29, US**

(72) Išradėjas:

Michael Houghton, US
Qui-Lim Choo, US
George Kuo, US

(73) Patento savininkas:

CHIRON CORPORATION, 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A. Baltic Service Company,
Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

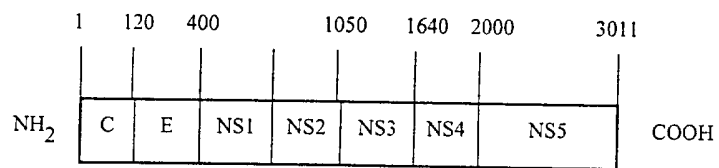
Hepatito C viruso (HCV) antigenų kombinacijos anti-HCV antikūnų
nustatymui imunologiniuose mėginiuose

(57) Referatas:

Hepatito C viruso (HCV) antigenų kombinacijos pasižymi didesniu imuniniu reaktyvumu, negu kuris nors atskiras HCV antigenas. Kombinacijų sudėtyje yra antigenas iš HCV poliproteino C domeno ir dar bent vienas HCV antigenas arba iš NS3, arba iš NS4, arba iš S, arba iš NS5 domeno, ir šios kombinacijos turi suldyto

LT 3808 B

proteino, paprasto fizinio mišinio arba atskirų antigenų, paprastai surištų kietoje matricoje, pavidalą



Šis išradimas priklauso imunologinių mėginių, skirtų HCV (vadinamų nei A, nei B hepatito virusais) sričiai. Tiksliau, išradimas yra apie HCV antigenų įgalinančius plataus spektro imunologiniuose mėginiuose aptikti anti-HCV antikūnus.

Manoma, kad liga, vadinama nei A, nei B hepatitu (NANBH), yra užkrečiama liga arba grupė ligų, sukeliama virusais, kuri skiriasi nuo kitų virusinių kepenų ligų formų, tame tarpe sukeltų žinomais hepatito virusais, t.y. hepatito A viruso (HAV), hepatito B viruso (HBV) ir hepatito delta viruso (HDV), o taip pat hepatitų, sukeltų citomegaloviruso (CMV) ar Epstein-Barr viruso (EBV). Pirmą kartą NANBH buvo nustatytas individams po kraujo perpylimo. Užkrato pernešimas nuo žmogaus šimpanzei ir nuoseklus perskiepijimas šimpanzėms parodė, kad NANBH kilo dėl perneštojo užkrečiančio agento ar agentų. Iš epidemiologinių duomenų galima buvo spręsti apie tris NANBH tipus: epideminį per vandenį užkrečiamo, per kraują ar parenteraliai pernešamo, ir atsitiktinio (bendruomenėje įgyjamo) hepatito tipą. Dar visai neseniai pernešantis agentas nebuvo nustatomas, todėl klinikinė diagnozė ir NANBH nustatymas buvo atliekamas, visų pirma, išskiriant kitus virusinius markerius. Spėjamų NANBH antigenų ir antikūnų aptikimui buvo taikomi šie metodai: difuzijos agar-gelyje, imunoelektroforezės, imuno fluorescencinės mikroskopijos, imuninės elektroninės mikroskopijos, radioimuninių ir kietafazė imunofermentinė analizė. Tačiau nė vienas šių analizės būdų nėra pakankamai jautrus, specifinis ir atsikartojantis, kad galėtų būti taikomas kaip NANBH diagnostinis testas.

1987 m. Chiron'o korporacijos (šios paraiškos savininkės) mokslininkai nustatė pirmąją nukleino rūgštį, tikrai susietą su per kraują pernešamu NANBH. Žr., pvz., EPO publikacijos Nr.318216; Houghton et al., Science 244:359 (1989). Šiose publikacijose yra aprašytas naujos virusų klasės, hepatito C viruso (HCV), izoliato klonavimas. Ten aprašyto izoliato prototipas buvo pavadintas "HCV1". HCV yra Flavi-tipo virusas, turintis RNR genomą.

JAV patento paraiškoje Nr. 456637 (Houghton et al.), įtrauktoje čia cituojant, aprašytas įvairių rekombinantinių HCV polipeptidų gavimas HCV cDNR ekspresijos metu ir šių polipeptidų atranka pagal imuninį reaktyvumą pacientų su HCV serumui. Tokia ribota atranka parodė, kad stipriu imunogeniškumu pasižymi bent penki testuoti polipeptidai; būtent, identifiukuoti kaip 5-1-1, C100, C33c, CA279a ir CA290a. Iš šių penkių polipeptidų 5-1-1 yra spėjamame NS4 domene, C100 jungia spėjamus NS3 ir NS4 domenų, C33c yra spėjamame NS3 domene, o CA279a ir CA290a esti spėjamame C domene. Atranka taip pat parodė, kad nei vienas atskirai testuotas polipeptidas nebuvo imunologiškai reaktyvus visiems serumams. Tuo būdu, būtų pageidautina turėti patobulintus testus, kurių metu sąveika vykėtų su visais arba daugeliu pavyzdžių, paimtų iš individų su teigiama HCV reakcija.

Pareiškėjai atliko papildomus serologinius tyrimus su HCV antigenais, kurie patvirtino, kad atskirai nė vienas iki šiol identifiukuotas HCV polipeptidas nepasižymi imunologiniu reaktyvumu visiems serumams. Atskiro polipeptido reaktyvumo nebuvimas visiems individų su HCV serumams yra galimas, be kitų priežasčių, dėl kamienų skirtingumo HCV epitopuose, dėl humoralinio individų atsako skirtingumo ir/ar ligos stadija sąlygotos, skirtingos, serologinės reakcijos.

Šių papildomų tyrimų dėka taip pat buvo nustatytos HCV antigenų kombinacijos, kurios įgalino aptikti daugiau HCV antikūnų, negu tuo atveju, kai naudojamas vienas HCV polipeptidas.

Taigi, pagal vieną šio išradimo aspektą yra siūloma HCV antigenų kombinacija, kurią sudaro:

- (a) pirmasis HCV antigenas iš C domeno; ir
- (b) bent vienas papildomas HCV antigenas, atrinktas iš grupės, kurioje yra
 - (I) HCV antigenas iš NS3 domeno;
 - (II) HCV antigenas iš NS4 domeno;
 - (III) HCV antigenas iš S domeno;

ir

(IV) HCV antigenas iš NS5 domeno.

Vienu atveju, HCV antigenų kombinacija turi suldyto proteino, susidedančio iš antigenų, pavidalą. Kitu atveju, antigenų kombinacija esti atskirų antigenų, surištų bendroje kietoje matricoje, pavidalo. Dar vienu atveju, antigenų kombinaciją sudaro atskirų antigenų mišinys.

Pagal kitą išradimo aspektą yra siūlomas būdas HCV antikūnams aptikti žinduolių kūno komponente, įtarus jame esant minėtų antikūnų, apimantis minėto kūno komponento ir aukščiau aprašyto HCV antigenų kombinacijos sąveiką sąlygose, užtikrinančiose antikūno ir antigeno reakciją, ir susidariusio imuninio komplekso iš minėtų antikūnų ir minėtų antigenų aptikimą.

Pagal kitą išradimo aspektą yra siūlomas būdas HCV antikūnams aptikti žinduolių kūno komponente, įtarus jame esant minėtų antikūnų, apimantis minėto kūno komponento sąveiką, vienu metu ar paeiliui, su HCV antigenų rinkiniu, kurį sudaro

(a) pirmasis HCV antigenas iš C domeno; ir

(b) bent vienas papildomas HCV antigenas, atrinktas iš grupės, kurioje yra

(I) HCV antigenas iš NS3 domeno;

(II) HCV antigenas iš NS4 domeno;

(III) HCV antigenas iš S domeno;

ir

(IV) HCV antigenas iš NS5 domeno,

esant sąlygoms, užtikrinančioms antikūno ir antigeno reakciją, ir susidariusio imuninio komplekso iš minėtų antikūnų ir minėtų antigenų nustatymą.

Pagal dar vieną išradimo aspektą yra siūlomas komplektas atlikimui mėginio, skirto HCV antikūnams aptikti žinduolių kūno komponente, įtarus jame esant minėtų antikūnų, ir kurį įpakuotoje formoje sudaro

(a) minėtų HCV antigenų kombinacija;

- (b) standartinės kontrolinės medžiagos; ir
- (c) analizės atlikimo instrukcija.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1 parodyta HCV poliproteiną koduojanti nukleotidų seka cDNR matricinėje ir nematricinėje grandinėje bei aminorūgščių seka, koduojama matricinės grandinės.

Fig.2 yra aminorūgščių sekos, užrašytos Fig.1, schema, rodanti spėjamus HCV polipeptido domenų.

Apibrėžimai

"HCV" antigenų yra laikomas polipeptidas, turintis mažiausiai 5 aminorūgštis, dažniau - mažiausiai nuo 8 iki 10 aminorūgščių, kurios apibrėžia epitopą, randamą HCV izoliatai. Dažniausia, HCV turi unikalų epitopą. Kai antigenas yra pažymėtas alfa-numeracijos kodu, epitopas prasideda nuo HCV domeno, pažymėtu alfa-numeracijos ženklu.

"Sintetinis", kuomet vartojamas apibūdinti HCV antigeną, reiškia, kad HCV antigenas buvo išskirtas iš natūralių šaltinių arba dirbtinai gautas cheminės ar rekombinantinės sintezės metu.

"Domenais" yra laikomi tie Fig.2 parodyti HCV poliproteinų segmentai, kurie paprastai priklauso spėjamiems HCV struktūriniais ir nestruktūriniais proteinams. Žymint domenų yra laikomasi susitarimo, pagal kurį yra pažymimi Flavi-virusų proteinai. Fig.2 parodytos domenų vietos yra tik apytikslės. Pažymėjimai "NS" reiškia "nestruktūrinius" domenų, "S" reiškia apvalkalo domeną, o "C" reiškia nukleokapsidės ar nukleotido domeną.

"Sulydytas polipeptidas" reiškia polipeptidą, kuriame HCV antigenas(ai) yra atskiros vientisos aminorūgščių grandinės, neegzistuojančios gamtoje, dalis. HCV antigenai gali būti tiesiogiai vienas su kitu sujungti

peptidinėmis jungtimis arba atskirti įsiterpusių aminorūgščių sekų. Sulydyti polipeptidai taip pat gali turėti egzogeninių HCV aminorūgščių sekų.

"Bendra kieta matrica" reiškia kietą kūną, su kuriuo kovalentiškai ar nekovalentiškai, pvz. hidrofobinės adsorbcijos būdu, yra susirišę atskiri HCV antigenai arba sulydyti polipeptidai, susidedantys iš HCV antigenų.

"Žinduolio kūno komponentu" yra laikomas individo, priklausančio žinduoliams (pvz., žmogaus) skystis ar audinys, turintis antikūnų, gaminamų to individo. Tokie, prieinami praktikoje be apribojimų komponentai, yra kraujas, plazma, serumas, stuburo smegenų skystis, limfa, kvėpavimo takų, žarnyno, lytinių ir šlapimo takų išskyros, seilės, pienas, baltieji kraujo kūneliai ir mielomos.

"Imunologiškai reaktyvus" reiškia, kad tiriamasis antigenas specifiškai reaguos su anti-HCV antikūnu, kuris paprastai sudaro didelę užkrėsto HCV individo serumo dalį.

"Imuninis kompleksas" reiškia junginį arba agregatą, kuris susidaro antikūnui susirišus su antigeno epitopu.

HCV antigenų kombinacijos

Fig.2 yra parodyti spėjami HCV poliproteinų domenai. Domenai, nulemiantys antigenus, naudojamus kombinacijose, yra šie: C, S (ar E), NS3, NS4 ir NS5. Manoma, kad C domenai nulemia HCV nukleokapsidės proteiną. Jis tęsiasi nuo poliproteino N-terminalinio galo iki maždaug 120 aminorūgšties (Fig.1). Manoma, kad S domenai apibrėžia viriono apvalkalo proteiną ir, galbūt, matriksą (M) proteiną, ir kad jis tęsiasi nuo maždaug 120 aminorūgšties iki 400 (Fig.1). NS3 domenai tęsiasi nuo maždaug 1050 aminorūgšties iki 1640 ir turėtų sudaryti virusinę proteazę. NS4 domenai tęsiasi nuo NS3 terminalinio galo iki maždaug 2000 aminorūgšties. Iki šiol nėra žinoma NS4 proteino funkcija. Pagaliau, NS5 domenai tęsiasi maždaug nuo 2000 aminorūgšties iki proteino galo ir manoma, kad jis apibrėžia virusinę polimerazę.

Fig.1 yra parodyta HCV1 izoliato seka. Galvojama, kad ir kitų, iš kraujo kilusių, HCV grandinių sekos gali skirtis nuo sekų, pavaizduotų Fig.1, ypač apvalkalo (S) ir nukleokapsidės (C) domenuose. Tokių HCV antigenų su besiskiriančiomis sekomis panaudojimas ir būtų šio išradimo tikslas, pastebint, beje, kad dėl skirtingumo neturėtų žymiai pakisti antigeno imunologinis reaktyvumas serumui asmenų, užkrėstų HCV.

Apskritai, HCV antigenus sudaro ištisiniai ar apkarpyti domenai; domenų fragmentai pagal reakciją į antigeną yra lengvai atrenkami įgudusių šioje srityje darbuotojų. Geriau, kad atskiri HCV antigenai, naudojami kombinacijoje, apimtų imunodominantinę pasirinktojo domeno dalį (t.y. dalį, kuri pirmiausia sąlygoja polipeptido imunologinį reaktyvumą). C domeno atveju geriau, kad C domeno antigenas apimtų domeno didžiąją ištisos sekos dalį. Ypač tiktų antigenas, pažymėtas C22 (žr. 4 pavyzdžio aprašymą). Geriau, kai S domenas apima hidrofobinį subdomeną N-terminaliniame domeno gale. Šis hidrofobinis subdomenas esti maždaug nuo 199 aminorūgštis iki 328 (Fig.1). Ypač tinkamas HCV antigenas, pažymėtas S2 (3 pavyzdžio aprašymas). Jei norima, į S domeno antigeną gali būti įjungta seka, einanti žemyn po hidrofobinio subdomeno.

Labiau tinkamas NS3 domeno antigenui yra C33c antigenas. Šis antigenas apima aminorūgštis nuo 1192 iki 1457 (Fig.1). Geresnis NS4 domeno antigenas yra C100, kuris apima aminorūgštis nuo 1569 iki 1931 (Fig.1). Geresnis NS5 domeno antigenas apima aminorūgštis nuo 2054 iki 2464 (Fig.1).

HCV antigenas gali būti polipeptidas, sudarytas tik iš HCV aminorūgščių sekos arba iš egzogeninės HCV-ui sekos (t.y. jis gali būti sulydytas proteinas, turintis egzogeninę seką). Gaminant HCV antigeną rekombinantiškai, antigenas, būdamas sulydyto proteino pavidalu, pvz., su SOD, alfa-faktoriumi ar ubikvitinu (žr. JAV patentus Nr. 4751180, 4870008 ir 1989 m. rugpjūčio 7-os d. JAV patentinę paraišką Nr. 390599, kurių dalys, aprašančios SOD, alfa-faktoriaus ir ubikvitino ekspresiją, čia yra pateikiamos), gali padidinti ekspresijos lygį ir/ar padidinti antigeno tirpumą vandenyje. Sulydytų proteinų, tokių kaip alfa-faktoriaus ir ubikvitino, sulydymas yra vykdomas ekspresijos šeimininko, siekiant

pašalinti heterologines sekas. Alfa-faktorius yra sekretuojanti sistema, o sulydyti su ubikvitinu kompleksai lieka citoplazmoje.

Toliau, antigenų kombinacija gali būti gauta kaip sulydytas proteinas. Kaip antai, vientisas DNR fragmentas, koduojantis C22 ir C33c gali būti sukonstruotas, klonuotas į ekspresijos vektorių ir panaudotas C22 ir C33c sulydyto proteino ekspresijai. Panašiu būdu gali būti gauti C22 ir C100; C22 ir S2; C22 ir NS5 antigeno; C22, C33c ir S2; C22, C100 ir S2 bei C22, C33c, C100 ir S2 sulydyti proteinai. Taip pat gali būti panaudoti ir alternatyvūs fragmentai iš aprašytų pavyzdžiuose domenų.

HCV antigenų gavimas

HCV antigenai, minimi išradime, dažniausiai yra gaminami rekombinantiniu ar žinomu cheminės sintezės kietoje fazėje būdais. Tačiau juos taip pat galima izoliuoti iš disocijavusių HCV ar HCV dalelių, panaudojus afininės chromatografijos metodiką, leidžiančią sujungti antikūnus su antigenais.

Kai gaminama rekombinantinės technikos pagalba, gali būti taikomos standartinės antigeną koduojančios DNR konstravimo, tokios DNR klonavimo ekspresijos vektoriuose, ląstelių-šeimininkių, kaip antai, bakterijų, mielių, vabzdžių ar žinduolių ląstelių transformavimo, ir antigeno gamybos, sukeliant DNR ekspresiją, procedūros. Kaip pažymėta aukščiau, siekiant padidinti ekspresiją, palengvinti valymą ar padidinti tirpumą, gali būti naudinga ekspresuoti antigeną sulydyto proteino pavidalu. Specifinės parodomųjų HCV antigenų gavimo procedūros yra aprašytos pavyzdžiuose, o taipgi pirminėje paraiškoje Nr. 456637.

Antigenų kompozicijos panaudojimui imunologinėje analizėje

HCV antigenai gali būti sujungti gaminant juos sulydyto proteino pavidalu, sudaryto iš dviejų ar daugiau antigenų, imobilizuojant juos atskirai ant bendros kietos matricos, arba fiziškai juos sumaišant. Antigeno sulydytieji

proteinai taip pat gali būti imobilizuoti (surišti) ant kietos matricos. Kovalentinio ar nekovalentinio proteinų surišimo matricoje metodai ir metodikos yra žinomi šioje tyrimų srityje. Kietojo paviršiaus savybės kinta priklausomai nuo analizės pobūdžio. Kietuoju paviršiumi analizėje, atliekamoje mikrotitravimo duobutėse, yra duobutės ar indelio sienelė. Analizei vartojant rutuliukus, kietuoju paviršiumi esti rutuliuko paviršius. Analizei naudojant giliamačio lazdelę (t.y. kietą daiktą, padarytą iš porėtos arba pluoštinės medžiagos, tokios kaip audinys ar popierius) kietuoju paviršiumi bus medžiagos, iš kurios padaryta lazdelė, paviršius. Analizėje, pagrįstoje agliutinacija, kietuoju paviršiumi gali būti latekso ar želatinos dalelių paviršius. Kai atskiri antigenai yra surišami matricoje, jie pasiskirsto paviršiuje tolygiai arba pasiskirsto jame pagal šabloną, pavyzdžiui ruožais, taip kad tas antigenų surišimo šablonas galėtų būti atpažintas.

Paprasti antigenų mišiniai yra sudaryti iš antigenų, esančių bet kuriame tinkamame tirpiklyje ar dispersinėje terpėje.

Analizių, naudojančių antigenų kombinacijas, tipai

HCV antigenai gali būti taikomi iš esmės bet kurio tipo analitinėse sistemose, kuriose siekiama žinomų antigenų aptikti antikūnus. Bendras šių analitinių sistemų bruožas yra tas, kad antigenas kontaktuoja su kūno komponentu, įtarus esant HCV antikūnų, sąlygose, kuriose antigenas gali susirišti su tokiu, komponente esančiu antikūnu. Tokios sąlygos yra fiziologinė temperatūra, pH ir joninė tirpalo jėga, kai naudojamas antigenų perteklius. Po antigeno inkubacijos su tiriamuoju pavyzdžiu nustatomi imuniniai kompleksai, turintys antigenų.

Imuninės analizės atlikimo tvarka gali stipriai skirtis, ir šioje srityje yra žinoma daug jų tipų. Darbo eigoje, pavyzdžiui, galima naudoti kietus padėklus arba vykdyti imuninę precipitacijos reakciją. Daugelyje analizės būdų yra naudojama žymėtieji antikūnai ar polipeptidai; žymėmis gali būti, pavyzdžiui, fermentų, fluorescuojančios, chemiluminescuojančios, radioaktyvios ar dažų molekulės. Taip pat žinomi analizės būdai, kuriuose yra sustiprinami imuninio

komplekso signalai; jų pavyzdžiais yra analitinės sistemos, kuriose naudojama biotinas ir avidinas, ir imuninė analizė su žymėtaisiais fermentais bei fermentams atliekant tarpininko vaidmenį, kaip antai, ELISA sistemose.

Apskritai, imuninė analitinė sistema gali būti heterogeninio ar homogeninio tipo, standartinė ar konkurentinė. Heterogeninio tipo analitinėje sistemoje polipeptidas yra dažniausiai surišamas kietoje matricoje ar padėkle, tuo palengvinant pavyzdžio atskyrimą nuo polipeptido po inkubacijos. Vartojamais kietųjų padėklų pavyzdžiais gali būti nitroceliuliozė (pvz., membranos ar mikrotitravimo plokštelės pavidalo), polivinilo chloridas (pvz., plokštelių ar mikrotitravimo plokštelės pavidalo), polistireno lateksas (pvz., rutuliukų ar mikrotitravimo plokštelės pavidalo), polivinilidino fluoridas (žinomas kaip ImmulonTM), diazotintas popierius, neilono membranos, aktyvuoti rutuliukai ir A-proteino rutuliukai. Pavyzdžiui, heterogeninio tipo analitinėje sistemoje galima naudoti Dynatech ImmulonTM 1 ar ImmulonTM 2 mikrotitravimo plokšteles arba 0,25 colių rutuliukus (Precision Plastic Ball). Antigeninių polipeptidų turintis pagrindas paprastai yra praplaunamas atskyrus jį nuo testuojamojo pavyzdžio ir prieš nustatant surištus antikūnus. Naudojama standartinė ir konkurentinė analizė.

Homogeninio tipo analizėje testuojamasis pavyzdys inkubuojamas su antigenų kombinacija tirpale. Pavyzdžiui, sąlygose, kai iškrenta į nuosėdas bet kurie susidarę antigeno ir antikūno kompleksai. Homogeninėse analitinėse sistemose taikomi abu, standartinis ir konkurentinis, tipai.

Standartinio tipo analizėje antikūno ir antigeno kompleksą sudarantis HCV antikūnų kiekis yra tiesiogiai reguliuojamas. Tai gali būti atlikta įvertinus, ar žymėtieji antiksenogeniniai (pvz., ne-žmogaus) antikūnai, kurie atpažįsta anti-HCV antikūnus, yra surišti susidarius kompleksui. Konkurentinio tipo mėginiuose HCV antikūnų kiekis pavyzdyje yra sumažinamas reguliuojant konkurentinį žinomo kiekio žymėtų antikūnų (arba kitų konkuruojančių ligandų) surišimo komplekse efektą.

Priklausomai nuo tipo susidarę kompleksai, turintys anti-HCV antikūnus (ar konkurentinių mėginių atveju tam tikrą konkuruojančio antikūno

kieki), yra nustatomi kuria nors iš žinomų metodikų. Pavyzdžiui, komplekso nežymėti HCV antikūnai gali būti nustatyti naudojant antiksenogenetinį Ig konjugatą, surištą su žyme (pvz., fermentine žyme).

Imunoprecipitatinio ar sukibimo tipo analizėje reakcijos metu tarp HCV antigenų ir antikūnų susidaro struktūra, kuri iš tirpalo ar suspensijos iškrenta į nuosėdas, suformuodama matomą nuosėdų sluoksnį ar plėvelę. Jei testuojamajame pavyzdyje nėra anti-HCV antikūno, tuomet matomos nuosėdos nesusidaro.

HCV antigenai paprastai bus pakuojami į komplektą, skirtą minėtai imuninei analizei. Komplektas paprastai talpina atskirose talpose antigenų kombinaciją (arba jau surištą su kietu pagrindu, arba atskirą, su reagentu, rišančiu juos prie pagrindo), kontrolinius antikūnų preparatus (teigiamus ir/ar neigiamus), žymėtą antikūną, kai šio tipo mėginiui reikia tokių pačių ir signalą skleidžiančių reagentų (pvz., fermentinių substratų, jei žymė tiesiogiai neskleidžia signalo). Paprastai komplekte bus pridėtos instrukcijos (pvz., ant popieriaus, magnetofono juostoje, VCR, CD-ROM ir pan.).

Toliau pateikti pavyzdžiai iliustruoja išradimą ir joku būdu jo nesiaurina.

1 pavyzdys: HCV antigeno C33c sintezė

HCV antigenas C33c turi NS3 domeno seką. Konkrečiai, ją sudaro aminorūgštys 1192-1457 (Fig. 1). Šis antigenas buvo gaminamas bakterijose, kaip sulydytas proteinas kartu su žmogaus superoksido dismutaze (SOD), žemiau aprašyta tvarka. Kad būtų gautas pcf1EF, vektorius pSODcf1 (Steiner et al. (1986), J.Virol. 58:9) buvo pilnai suskaidytas su EcoRI bei BamHI ir, gautasis EcoRI, BamHI fragmentas buvo prijungtas prie šio linkerio:

GATC CTG GAA TTC TGA TAA

GAC CTT AAG ACT ATT TTA A.

Kad būtų sudarytas pcf1EF/C33c, cDNR klonas, koduojantis aminorūgštis 1192-1457 ir turintis EcoRI galus, buvo įterptas į pcf1EF. Ši ekspresinė konstrukcija buvo transformuota į D1210 *E.coli* ląstelėse.

Transformantai buvo naudojami ekspresijai sulydyto proteino, sudaryto iš SOD N-terminaliniame gale ir rėmelio C33c HCV antigeno C-terminaliniame gale. Ekspresija buvo užbaigta užkrėtus 1500 ml Luria buljono, turinčio ampicilino (100 mikrogramų/ml), su 15 ml iš vakaro užsėtų transformantų. Ląstelės buvo auginamos iki jų optinis tankis bus 0,3, po to įdėta IPTG, kad būtų gauta galutinė 2 mM koncentracija, vėliau, ląstelėms užaugus iki optinio tankio 1, jos buvo 20 min. centrifuguojamos, esant 3.000 x g, 4°C temperatūroje. Taip supakuotas ląsteles galima laikyti keletą mėnesių -80°C temperatūroje.

Norint išvalyti SOD-C33c polipeptidą, bakterinės ląstelės, kuriose šis polipeptidas buvo ekspresuotas yra paveikiamos osmotiniu šoku ir mechaniniu skaldymu, tada netirpi dalis, kurioje yra SOD-C33c, atskiriama ir veikiama išskiriamąja ekstrakcija, naudojant bazės-NaCl tirpalą. Šiame ekstrakto esantis sulydytas polipeptidas išvalomas chromatografijos būdu, kolonėlėse su S-Sefaroze ir Q-Sefaroze.

Nevalytas ekstraktas, gautas po osmotinio šoko ir mechaninio skaldymo, toliau buvo ruošiamas taip. Vienas gramas supakuotų ląstelių buvo

suspenduota 10 ml tirpalo, kurio sudėtyje yra 0,02 M Tris HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 20% sacharozės, ir laikoma 10 min. ant ledo. Po to, ląstelės buvo nusodintos, 15 min. centrifuguojant 4.000 x g, 4°C temperatūroje. Pašalinus supernatantą, ląstelių nuosėdos perdėtos į 10 ml A1 buferį (0,01 M Tris HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 14 mM beta-merkaptioetanolio [BME]) ir 10 min. laikoma, pridėjus ledo. Ląstelės vėl buvo nusodinamos 15 min. centrifuguojant 4.000 x g, 4°C temperatūroje. Pašalinus skaidrą supernatantą (periplazminę frakciją I), ląstelių nuosėdos buvo resuspenduotos A1 buferyje, 10 min. laikoma lede, ir vėl 15 min. centrifuguojama 4.000 x g, 4°C temperatūroje. Skaidrus supernatantas (periplazminė frakcija II) pašalintas, ląstelių nuosėdos resuspenduotos 5 ml buferio A2 (0,02 M Tris HCl, pH 7,5, 14 mM BME, 1mM EDTA, 1mM PMSF). Kad būtų suardytos ląstelės, suspensija (5 ml) ir 7,5 ml "Dyno-mill" stiklo rutuliukų (0,10- 0,15 mm diametro), praplautų rūgštimi be švino (gauta iš Glen-Mills, Inc.), buvo patalpinta į Falcon'o vamzdelį ir sukama didžiausiu greičiu 2 min., po to mažiausiai 2 min. šaldoma ant ledo; ši sukimo-šaldymo procedūra kartojama 4 kartus. Po sukimo, skysta masė buvo perfiltruota pro smulkaus stiklo filtrą, esant silpnam siurbimui; stiklo rutuliukai du kartus plaunami buferiu A2, sujungiant filtratą ir praplovimo skystį.

Neištirpusi nevalyto ekstrakto dalis buvo surinkta ir centrifuguota 15 min. 20.000xg, 4°C temperatūroje, du kartus praplauta 10 ml buferiu A2 ir resuspenduota 5 ml MILLI-Q vandens.

Frakcija, kurioje buvo SOD-C33c, atskirta nuo netirpių medžiagų tokiu būdu: į suspensiją įdėta NaOH (2M) ir NaCl (2M) iki galutinės 20 mM koncentracijos, tada mišinys 1 min. buvo kratomas, 20 min. centrifuguojamas 20.000xg, 4°C temperatūroje. Taip gautas reikalingas supernantas.

Norint švariai išgryninti SOD-C33c S-Sefarozėje, į supernanto frakciją įdėta (iki galutinių koncentracijų) 6M karbamido, 0,05 M Tris HCl, pH 7,5, 14 mM BME, 1mM EDTA. Tada ši frakcija supilta į kolonėlę, kuri buvo užpildyta S-Sefarozė Fast Flow (1,5x10 cm) ir išbalansuota buferiu B (0,05M Tris HCl, pH

7,5, 14 mM BME, 1mM EDTA). Supylus tiriamą tirpalą į kolonėlę, ji buvo praplauta buferiu B, kurio tūris lygus dviejų kolonėlių tūriui. Buvo surinktos pratekėjusio skysčio ir išplautos frakcijos. Tiriamo tirpalo ir praplovimo srovės tekėjimo greitis buvo 1 ml/min.; frakcijos surinktos po 1 ml. Frakcijos iš eilės patikrintos, ieškant SOD-C33c. Frakcijų mėginiai buvo analizuojami elektroforezės būdu 10% poliakrilamidiniame gelyje, kuriame buvo SDS, po to dažant Coomassie mėliu. Frakcijas galima analizuoti ir Western blot, naudojant antikūną, veikiantį prieš SOD. Buvo atrinktos frakcijos, turinčios SOD-C33c.

Toliau, SOD-C33c buvo gryninamos Q-Sefarozės kolonėlėje (1,5x5 cm), išbalansuotoje buferiu B. Atrinktos frakcijos su SOD-C33c, gautos po chromatografijos S-Sefarozėje, buvo supiltos į kolonėlę. Po to kolonėlė buvo praplauta buferiu B, ir išplauta eliuentu, pilant 60 ml buferio B, su NaCl gradientu nuo 0,0 iki 0,4 M. Tiriamo tirpalo, praplovimo ir eliuento pratekėjimo greitis buvo 1 ml/min.; frakcijos surinktos po 1 ml. Visos frakcijos gautos po chromatografijos Q-Sefarozės kolonėlėje, buvo analizuojamos taip pat, kaip ir chromatografijos S-Sefarozės kolonėje atveju. Didžiausia SOD-C33c koncentracija rasta frakcijoje, gautoje po išplovimo su 0,2 M NaCl.

Išanalizavus poliakrilamidiniame SDS gelyje ir imuno-blot būdu, naudojant monokloninį antikūną, kuris veikia prieš žmogaus SOD, buvo nustatyta, kad SOD-C33c, gauto po chromatografijos per Q-Sefarozės kolonėlę, grynumas yra didesnis nei 90%.

2 pavyzdys: HCV antigeno C100 sintezė

HCV antigenas C100 apima sekas iš NS3 ir NS4 domenų. Konkrečiai, jo sudėtyje yra aminorūgštys 1569-1931 (Fig.1). Šis antigenas pagamintas mielėse. Buvo paruoštas cDNR 1270 bp fragmentas, koduojantis anksčiau minėtas aminorūgštys ir turintis EcoRI galus.

Mielių ekspresijos vektorius, kuriame minėtas cDNR fragmentas tiesiai suldytas su *C.cerevisiae* ADH2/GAP promotoriumi, gautas pagal protokolą, numatantį, kad vyktų C100 sekos dauginimas pagal PCR metodą, o padaugintos sekos būtų įjungiamos į klonuojamą vektorių. Po klonavimo C100 seka iškirpta ir kartu su seka, kurioje buvo ADH2/GAP promotorius, prijungta prie didelio mielių vektoriaus fragmento. Tokiu būdu gautas ekspresijos vektorius.

C100 dauginimas PCR būdu vyko, naudojant matrica vektorių pS3-56_{C100m}, kuris buvo ištiesintas suskaidant SalI pagalba. pS3-56 yra išvestas iš pBR322 ir turi ekspresijos kasetę, kurios sudėtyje yra hibridinių mielių ADH2/GAPDH promotorius, esantis sekoje prieš žmogaus superoksido dismutazės geną ir po alfa-faktoriaus transkripcijos terminatoriaus.

Oligonukleotidų praimeriai, naudojami dauginime, buvo skirti palengvinti klonavimą ir įjungti transliacijos terminacinį kodoną. Konkrečiai, kartu su PCR oligonukleotidais buvo generuojami nauji 5'-HindIII ir 3'-SalI saitai. Oligonukleotide, kuriame buvo SalI saitas, buvo užkoduoti dvigubos terminacijos kodonai TAA ir TGA. Oligonukleotide, kuriame buvo HindIII saitas, taipgi buvo netransliuojama lyderinė seka, nuskaityta nuo pgap63 geno, esanti iškart prieš AUG kodoną. Genas pEco63GAPDH aprašytas Holland ir Holland (1980) ir Kniskern et al. (1986). PCR praimerio, naudojamo C100m ekspresijai, sekos:

5' GAG TGC TCA AGC TTC AAA ACA AAA TGG CTC

ACT TTC TAT CCC AGA CAA AGC AGA GT 3'

ir

5' GAG TGC TCG TCG ACT CAT TAG GGG GAA

ACA TGG TTC CCC CGG GAG GCG AA 3'.

Dauginimas PCR būdu, naudojant praimerius ir matricas, buvo atliekamas su Cetus-Perkin-Elmer PCR komplektu, pagal visus gamintojo reikalavimus. PCR metodo sąlygos tokios: 29 ciklai 94°C temperatūroje 1 minutę, 37°C temperatūroje 2 min., 72°C temperatūroje 3 min. ir galutinė inkubacija 72°C temperatūroje 10 min. DNR gali būti laikoma per naktį 4°C ar -20°C temperatūroje.

Padauginus, PCR produktai suskaidyti su HindIII ir Sall. Pagrindinis 1,1 kb produktas valytas elektroforezės ant gelio būdu, o po eliacijos išvalytas produktas buvo prijungtas prie didelio pBR322 Sall-HindIII fragmento. Norint atskirti teisingus rekombinantus, sveikos HB101 ląstelės buvo transformuotos rekombinantiniais vektoriais, ir po klonavimo ieškomi rekombinantai buvo identifikuoti remiantis HindIII-Sall fragmentų, iškirptų iš klonų, dydžiu. Vienas iš klonų, kuriame buvo tinkamo dydžio HindIII-Sall fragmentas, pavadintas pBR322/C100⁺d. Išanalizavus HindIII-Sall fragmento seką, pasitvirtino, kad šiame klone yra pasidauginusio C100.

Ekspresijos vektorius, kuriame yra C100, buvo sukonstruotas, surišus HindIII-Sall fragmentą iš pBR322/C100⁺d su 13,1 kb BamHI-Sall fragmentu iš pBS24.1, ir 1369 bp BamHI-Sall fragmentu, kuriame yra ADH2/GAP promotorius. (Pastarasis fragmentas aprašytas EPO Nr. 164556). pBS24.1 vektorius yra aprašytas U.S.S.N. 382805, 1989 birželio 19. ADH2/GAP promotoriaus fragmentas buvo aptiktas suliejus vektorių pPGAP/AG/HindIII su HindIII ir BamHI, vėliau 1369 bp fragmentas buvo išgrynintas gelio pagalba.

Sveikos HB101 ląstelės buvo transformuotos rekombinantinių vektorių, o teisingi rekombinantai buvo identifikuoti pagal gaunamą 2464 fragmentą ir 13.1 kb fragmentą, gautą suliejus klonuotų vektorių BamHI ir Sall. Vienas iš klonuotų teisingų rekombinantinių vektorių buvo pavadintas pc100⁺d#3.

Kad vyktų C100 ekspresija, sveikos genties *Saccharomyces cerevisiae* AB122 štamo (MATa leu2 ura3-53 prb 1-1122 pep4-3 prcl-407[cir-0]) ląstelės buvo transformuotos pernešimo vektorių pC100⁻d#3. Transformuotos ląstelės buvo patalpintos ant plokštelių su URA-sorbitolio, o po to atskirais transformantais padengtos Leu⁻ plokštelės.

Atskiri klonai buvo auginami Leu⁻, ura⁻ terpėje, į kurią įdėta 2% gliukozės, 24-36 val. 30°C temperatūroje. Vienas litras Mielių Ekstrakto Peptono Terpėje (YEP), kuriame yra 2% gliukozės, buvo sumaišytas su 10 ml kultūros, pastovėjusios per nakt. Taip gauta kultūra buvo auginama 48 val. 30°C temperatūroje, maišant 400 aps/min greičiu ir vėdinant (1L oro pučiamas pro 1L tirpalo/min., t.y., lvvm) greičiu. Tirpalo pH nebuvo reguliuojamas. Kultūra buvo auginama BioFlo II fermentatoriuje, pagaminto New Brunswick Science Corp. Po fermentacijos ląstelės buvo atskirtos ir analizuojamos pagal C100 pasireiškimą.

Transformuotų ląstelių analizė, tiriant C100 polipeptidą, buvo atlikta bendruose ląstelių lizatuose ir nevalytuose ekstraktuose, paruoštuose iš vienintelės mielių kolonijos, išaugusios Leu⁻ plokštelėse. Ląstelių lizatai ir tiriami ekstraktai buvo analizuojami elektroforezės SDS poliakrilamidiniame gelyje būdu, ir Western bloto būdu. Western blotu buvo tirta su triušių polikloniniais antikūnais, nukreiptais prieš SOD-C100 polipeptidą, ekspresuotą mielėse. Manoma, kad C100 polipeptidas turi 364 aminorūgštis. Po gelio analizės paaiškėjo, kad tiriamojo polipeptido MW_r yra 399,9K.

Abu analizės metodai parodė, kad tiriamas C100 polipeptidas buvo bendruose ląstelių lizatuose, bet jo nebuvo nevalytuose ekstraktuose. Šie rezultatai leidžia teigti, kad ekspresuotas C100 polipeptidas gali būti netirpus.

3 pavyzdys: HCV antigeno S2 ekspresija

HCV antigeno S2 seka priklauso S domeno hidrofobiniam N-terminaliniam galui. Sekoje yra aminorūgštys 199-328 (Fig 1.).

Ekspresijos vektoriaus, koduojančio S2 polipeptidą, konstravimo tvarka ir vektoriaus ekspresija mielėse buvo analogiška aprašytajai Pvz.2, C100 polipeptido atveju.

Matrica PCR reakcijoms buvo pBR322/Pil4a vektorius, kuris buvo ištiesintas jį suskaidžius su HindIII. Pil4a yra cDNR klonas, kuris koduoja aminorūgštis 199-328.

Oligonukleotidų, naudojamų kaip praimerių dauginant PCR būdu S2 koduojamas sekas, sekos yra tokios.

S2 sekos 5'-sričiai:

5' GAG TGC TCA AGC TTC AAA ACA AAA TGG GGC TCT

ACC ACG TCA CCA ATG ATT GCC CTA AC 3';

ir

S2 sekos 3'-sričiai:

5' GAG TGC TCG TCG ACT CAT TAA GGG GAC CAG TTC

ATC ATC ATA TCC CAT GCC AT 3'.

Praimeris 5'-srityje įterpia HindIII saitą ir ATG start- kodoną į dauginamą produktą. Praimeris 3'-srityje įterpia translacijos stop-kodonus ir SalI saitą į dauginamą produktą.

PCR metodo sąlygos tokios: 29 ciklai per minutę 94°C temperatūroje, 2 minutes 37°C temperatūroje, 3 min. 72°C temperatūroje, ir pabaigoje inkubacija truko 10 min. 72°C temperatūroje.

PCR reakcijos pagrindinis produktas buvo 413 bp fragmentas, kuris išvalytas gelyje. Išvalytas fragmentas buvo prijungtas prie didelio fragmento, gauto paveikus pBR322 su HindIII ir SalI fragmentu, ir taip gauta pBR322/S2d plazmidė.

Sulipinus 413 bp HindIII-SalI S2 fragmentą su 1.36 kb BamHI-HindIII fragmentu, kuriame yra ADH2/GAR promotorius, ir su dideliu mielių vektoriaus

pBS24,1 BamHI-SalI fragmentu, gauti rekombinantiniai vektoriai, kurie buvo klonuojami. Teisingi rekombinantiniai vektoriai buvo identifikuoti pagal 1.77 kb fragmentą, po suliejimo su BamHI ir SalI. Ekspresijos vektorius, sukonstruotas iš dauginamos sekos, ir turintis koduojančią S2 seką, prisijungtą tiesiogiai prie ADH2/GAP promotoriaus, buvo identifikuotas kaip pS2d#9.

4 pavyzdys: HCV C antigeno sintezė

HCV antigenas C22 priklauso C domenui. Jis turi aminorūgštis 1-122, (Fig.1).

Ekspresijos vektoriaus, koduojančio C polipeptidą, konstravimo tvarka ir vektoriaus ekspresija mielėse vyko analogiškai C100 polipeptido ekspresijos atvejui ir yra aprašyta, išskyrus tai, kas nurodoma toliau.

Matrica PCR reakcijoms buvo pBR322/Ag30a, kuris buvo ištiesintas su HindIII. Ag30 yra cDNR klonas, koduojantis aminorūgštis 1-122. Oligonukleotidų, kurie buvo praimeriai dauginant C koduojančias sekas PCR būdu, sekos buvo tokios.

C sekos 5'-sričiai:

5' GAG TGC AGC TTC AAA ACA AAA TGA GCA CGA
ATC CTA AAC CTC AAA AAA AAA AC 3'

ir

C sekos 3'-sričiai:

5' GAG TGC TCG TCG ACT CAT TAA CCC AAA TTG CGC
GAC CTA CGC CGG GGG TCT GT 3'.

Praimeris 5'-sričiai įterpia HindIII saitą į dauginamą produktą, o praimeris 3'-sričiai įterpia transliacijos stop-kodonus ir SalI saitą. PCR reakcija vyko taip: 29 ciklai per minutę 94°C temperatūroje, 2 min. 37°C temperatūroje, 3 min. 72°C temperatūroje, ir pabaigoje inkubacija truko 10 min. 72°C temperatūroje.

Pagrindinis PCR gamybos produktas yra 381 bp polinukleotidas. Sulipinus šį fragmentą su pBR322 dideliu SalI-HindIII fragmentu, gavosi plazmidė pBR322/C2.

Surišus 381 bp HindIII-SalI C koduojantį fragmentą, iškirptą iš pBR322/C2 su 1.36 kb BamHI-HindIII fragmentu, kuriame yra ADH2/GAP promotorius, ir su dideliu mielių vektoriaus pBS24.1 fragmentu BamHI-SalI, gauti rekombinantiniai vektoriai, kurie buvo klonuojami. Teisingi rekombinantiniai vektoriai buvo identifikuoti pagal 1.74 kb fragmentą, po to kai buvo suskaldyti su BamHI ir SalI. Iš dauginamos sekos sukonstruotas ekspresijos vektorius, kurio seka koduoja C, prijungtą tiesiogiai prie ADH2/GAP promotoriaus, buvo identifikuotas kaip pC22.

Transformuotų ląstelių analizė, tiriant C polipeptido pasireiškimą, buvo atlikta visų ląstelių lizatuose ir nevalytuose ekstraktuose, gautuose iš vienintelės mielių kolonijos, išaugintos Leu^- plokštelėse. Ląstelių lizatai ir nevalyti ekstraktai buvo analizuojami, atliekant elektroforezę SDS poliakrilamidiniame gelyje. C polipeptidas, manoma, turi 122 aminorūgštis, o atlikus gelio analizę paaiškėjo, kad ekspresuoto polipeptido MW_r yra maždaug 13.6 Kd.

5 pavyzdys: NS5 polipeptido sintezė

Šis polipeptidas turi N-terminalinio galo seką NS5 domene. Konkrečiai jo sudėtyje yra aminorūgštys nuo 2054 iki 2464 (Fig. 1.). Ekspresijos vektoriaus, kuriame užkoduotas NS5 polipeptidas, konstravimo ir vektoriaus ekspresijos tvarka yra panaši į tą, kurios laikomasi C33c ekspresijos atveju (žr. Pvz.1).

6 pavyzdys : Antikūnų prieš HCV radioimunologinė analizė (RIA)

HCV antigenai (pavyzdžiai 1-5) buvo patikrinti RIA metodu, norint įvertinti jų gebėjimą aptikti antikūnus prieš HCV serume individų, kurie pagal

klinikines diagnozes, turėjo HCV (nei-A, nei-B), arba serume, gautame iš apmokamų donorų kraujo.

RIA metodo pagrindas yra procedūra, aprašyta Tsu ir Herzenberg (1980), SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY (W.H. Freeman & Co.), pp. 373-391. Apskritai, mikrotitravimo plokštelės (Immulon 2, Removawell juostelės) yra padengtos švriu HCV antigenu. Padengtosios plokštelės yra inkubuojamos kartu su serumo pavyzdžiais arba su atitinkamais kontroliniais pavyzdžiais. Inkubacijos metu, antikūnas, jei yra, imunologiškai susiriša su kietoje fazėje esančiu antigenu. Pašalinus neprisijungusias medžiagas ir praplovus mikrotitravimo plokšteles, žmogaus antikūnų-NANBV ir antigenų kompleksai yra nustatomi inkubuojant su ^{125}I -pažymėtu avies antikūnu prieš žmogaus imunoglobulinus. Neprisijungęs pažymėtas antikūnas pašalinamas išsiurbiant, o plokštelės išplaunamos. Išmatuojamas individualių duobučių radioaktyvumas; prisijungusių žmogaus anti-HCV antikūnų kiekis yra proporcingas radioaktyvumui duobutėje.

Konkrečiai, į kiekvieną mikrotitravimo plokštelės duobutę (Dynatech Immulon 2 Removawell Strips) pridėta šimtas mikrolitrų tirpalo, kurio sudėtyje yra 0,1-0,5 mikrogramų HCV antigenų, ištirpintų 0,125 M Na borato buferyje, pH 8,3, ir 0,075 M NaCl (BBC). Plokštelė buvo laikoma per naktį drėgnoje patalpoje 4°C temperatūroje, po to antigenų tirpalas buvo pašalintas, o duobutės praplautos BBS, kurio sudėtyje yra 0,02% Triton X-100 (BBST), tirpalu 3 kartus. Norint išvengti nespecifinių ryšių susidarymo duobutės buvo padengtos jaučio serumo albuminu (BSA), pridėdant 100 mikrolitrų BSA, ištirpinto BBS, tirpalo (5 mg/ml); po to inkubuojam 1 val. kambario temperatūroje; po inkubacijos BSA tirpalas buvo pašalintas. Padengtose duobutėse antigenai reagavo su serumu, pridėjus 100 mikrolitrų tūrio serumo pavyzdžius, praskiestus santykiu 1:100 su 0,01 M Na fosfato buferiu, pH 7,2, 0,15 M NaCl (PBS), į kurio sudėtį įeina 10 mg/ml BSA, ir inkubavus duobutes su serumu 1 val. 37°C temperatūroje. Po inkubacijos serumo pavyzdžiai buvo pašalinti išsiurbiant, o duobutės 5 kartus buvo praplautos su BBST. Antikūno susijungimas su antigenu buvo nustatomas pagal ^{125}I -pažymėtą

$F'(ab)_2$ avies antikūniu prieš žmogaus IgG prisijungimą prie padengtųjų duobučių. Į kiekvieną duobutę buvo pridėta po 100 mikrolitrų žymėtųjų zondu (specifinis aktyvumas 5-20 mikrokiuri/mikrogramą), tada plokštelės laikytos 1 val. 37°C temperatūroje, po to zondu perteklius buvo pašalintas išsiurbiant, o plokštelės 5 kartus praplautos su BBST. Liekamasis radioaktyvumas kiekvienoje duobutėje buvo nustatytas gama spindulių skaitikliu.

Lentelėje 1 parodyti rezultatai, gauti testuojant serumą individų, kuriems diagnozuotas HCV.

Lentelė 1

<u>INDIVIDAS</u>	<u>ANTIGENAS</u>				
	<u>S2</u>	<u>C22</u>	<u>C100</u>	<u>C33c</u>	<u>NS5</u>
CVH IVDA	P	P	P(+++)	P	P
CVH IVDA	P	P	P(+)	P	P
CVH IVDA	P	P	P(+)	P	P
CVH NOS	P	P	P	P	P
AVH NOS HS	N	N	N	N	N
AVH NOS HS	P	N	N	N	N
AVH NOS HS	P	N	N	N	N
AVH NOS HS	P/N	N	N	N	N
AVH PTVH	N	N	N	P/N	N
AVH NOS HS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	N	N	N	P
AVH PTVH	N	N	N	N	N
AVH IVDA	N	P	N	P	P
AVH PTVH	P	P/N	N	N	P
AVH NOS	N	P	N	N	N
AVH IVDA	N	P	N	P	P
AVH NOS HS	P/N	N	N	N	N
AVH PTVH	N	N	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH NOS HS	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	N	N	N
AVH PTVH	P	N	P(+)	P(+++)	N
CVH PTVH	N	P	P	P	P
CVH NOS HS	P	P	P	P	N
AVH NOS	N	P	P/N	P	P
CVH IVDA	N	N	N	P	N
AVH IVDA	P	P	P	P	P

<u>INDIVIDUAS</u>	<u>ANTIGENAS</u>				
	<u>S2</u>	<u>C22</u>	<u>C100</u>	<u>C33c</u>	<u>NS5</u>
AVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH IVDA	P/N	P	N	P	P
AVH IVDA	N	P	P	P	N
CVH PTVH	P	P/N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH PTVH?	N	P	P	P	P
AVH IVDA	N	P	N	P	N
AVH NOS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	N	P	N	N	P
CVH NOS	P	P	N	N	N
CVH NOS HS	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	N	P	P
AVH nurse	P	P	N	N	N
AVH IVDA	P	P	P	P	N
AVH IVDA	N	P	P(+)	P(+++)	N
AVH nurse	P/N	P	N	N	N
AVH PTVH	P/N	P	P	N	P
AVH NOS	N	P/N	N	N	P
AVH NOS	N	P	N	P	N
AVH PTVH	P	P/N	N	N	N
AVH PTVH	N	P	N	P	P
AVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH PTVH	N	P	N	N	P
CVH PTVH	P/N	P	P(+)	P(+++)	N
AVH PTVH	N	P/N	P(+)	P(+++)	P
AVH PTVH	P	(?)	P	N	P

CVH PTVH	N	P	N	P	P
CVH PTVH	N	P	P	P	P
CVH PTVH	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	N	N	N	N
AVH nurse	P	P	N	N	N
CVH PTVH	N	P	N	N	P
AVH IVDA	N	P	N	P/N	N
CVH PTVH	P	P	P(+)	P(+++) P	
AVH NOS	P	P	N	N	N
AVH NOS	P/N	P	N	N	P
AVH PTVH	P/N	P	P	P	P
AVH NOS	N	P	P	P	P/N
AVH IVDA	N	P	N	N	P
AVH NOS	N	P/N	N	N	N
AVH NOS	P	P	N	N	P
AVH PTVH	N	P	P	P	P
crypto	P	P	P	P	P
CVH NOS	N	P	P	P	P
CVH NOS	N	N	N	N	N
AVH PTVH	N	P	P(+)	P(++)	N
AVH PTVH	N	P/N	P(+)	P(++)	P
AVH PTVH	N	P/N	P(+)	P(++)	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P

INDIVIDAS

ANTIGENAS

	<u>S2</u>	<u>C22</u>	<u>C100</u>	<u>C33c</u>	<u>NS5</u>
CVH IVDA	P	P	P	P	P
AVH NOS	N	P	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P/N
AVH IVDA	P	P	P	P	N
AVH NOS	P	P	N	N	N
AVH NOS	P	P	N	N	N

CVH PTVH	P	P	N	N	P/N
AVH PTVH	N	P	N	P	P
AVH NOS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	P	N	N	N
AVH NOS	P	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	P/N	N	N	N
AVH IVDA	N	P	P	P	P
crypto	N	P	N	N	P/N
crypto	P	P	P/N	P	P
AVH IVDA	N	N	P	P	N
AVH IVDA	N	P	P	P	N
AVH NOS	N	N	N	N	N
AVH NOS	N	N	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH PTVH	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	P(+)	P(+++) P	
CVH PTVH	P	P	P(+)	P(+++) P	
CVH NOS	P/N	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH IVDA	N	P	P	P	P
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH NOS	P	P	N	N	P/N
AVH NOS	N	P/N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	N	N	P
CVH NOS	N	P/N	N	N	N
AVH NOS	N	P	N	N	N
AVH NOS	N	P	N	N	N
CVH PTVH	N	P	N	N	N

AVH IVDA	N	P	N	P	P
AVH NOS	P	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P/N	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P
CVH IVDA	N	P	P	P	P
AVH NOS	N	P	N	N	N
CVH IVDA	N	P	N	N	P
CVH IVDA	N	P	N	N	P
AVH PTVH	P	P	N	P	P
AVH PTVH	P	P	N	P	P
CVH NOS	N	P/N	N	N	P/N
CVH NOS	N	P	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P

<u>INDIVIDAS</u>	<u>ANTIGENAS</u>				
<u>S2</u>	<u>C22</u>	<u>C100</u>	<u>C33c</u>	<u>NS5</u>	
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH IVDA	N	P	N	N	P
AVH IVDA	N	P	P(++)	P(+)	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
AVH PTVH	N	P	P	P	P
CVH PTVH?	N	P	P	P	P
CVH PTVH?	P/N	P	P	P	P
CVH NOS HS	P	P	N	N	N
CVH IVDA	P	P	P	P	N
CVH PTVH	N	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P/N
CVH NOS	P	P	P	P	P
CVH IVDA	P	P	P	P	P

CVH PTVH	P	P	P	P	N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH NOS	N	N	N	N	P/N
CVH NOS	N	P/N	N	N	P/N
CVH PTVH	P	P	P	P	P
CVH NOS	N	P	N	N	N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS	P	P	N	N	P/N
CVH NOS	N	N	N	N	N
CVH NOS HS	P	P	P	P	P
CVH NOS HS	P	P	P	P	P
CVH PTVH	N	N	N	N	N
AVH PTVH	N	P	P	P	P
AVH NOS			-	-	
CVH PTVH	N	P	P/N	P(+++) N	
crypto	P	P	P	P	P
crypto	P	P	P	P	P
crypto	N	P	N	N	N
crypto	N	P	P	P	P
CVH PTVH	P	P	P	P	P
crypto	N	N	N	N	N
crypto	N	P	N	N	P/N
crypto	N	P	N	N	P
crypto	P	P	P	P	P
crypto	N	P	N	P	N
crypto			-	-	
crypto			-	-	
CVH NOS			-	-	
AVH-IVDA	N	P	N	P(+)	P
AVH-IVDA	N	P/N	N	P(++)	N

- AVH - ūmus virusinis hepatitas,
CVH - lėtinis virusinis hepatitas,
PTVH - virusinis hepatitas, įgytas po kraujo perpylimo,
IVDA - virusinis hepatitas, įgytas švirkščiant vaistus į veną,
crypto - latentinis hepatitas,
NOS - šaltinis nenustatytas,
P - teigiamas;
N - neigiamas.

Iš šių duomenų aišku, kad nei vienas antigenas nereagavo su visais serumais. C22 ir C33c buvo labiausiai reaktyvūs, o S2 reagavo su keliais serumais tų individų, kuriems buvo diagnozuoti ūmūs HCV, ir su kurių serumais nereagavo joks kitas antigenas. Remiantis pateiktais duomenimis, didžiausiu nustatymo intervalu pasižymi dviejų antigenų, C22 ir C33c, kombinacija. Jei norima aptikti didžiausią skaičių ūmių infekcijų, reikia į junginį įtraukti ir S2.

Žemiau, Lentelėje 2 pateikti rezultatai, gauti testuojant apmokamų donorų kraują.

Lentelė 2

Antigenas

<u>Donoras</u>	<u>C100</u>	<u>C33c</u>	<u>C22</u>	<u>S2</u>	<u>NS5</u>
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	P	P	P	P	P
4	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N
18	P	P	P	P	P
19	P	P	N	P	P
20	P	P	N	P	P
21	N	N	N	N	N
22	N	P	P	N	P
23	P	P	P	P	P
24	N	N	N	N	N
25	N	N	N	N	N
26	N	N	N	N	N
27	N	N	N	N	N
28	N	N	N	N	N
29	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N
31	P	P	P	N	P

32	N	N	N	N	N
33	N	N	N	N	N
34	N	N	N	N	P
35	N	N	P	N	P
36	N	N	N	N	N
37	N	N	N	N	N
38	N	N	N	N	N
39	N	N	N	N	N
40	N	N	N	N	N
41	N	N	N	N	P
42	N	N	N	N	N
43	N	N	N	N	N
44	N	N	N	N	N
45	N	N	N	N	N
46	N	N	N	N	N
47	P	P	N	N	P
48	N	N	N	N	N
49	N	N	N	N	N
50	N	N	N	N	N
51	N	P	P	N	P
52	N	N	N	N	N

Antigenas

<u>Donoras</u>	<u>C100</u>	<u>C33c</u>	<u>C22</u>	<u>S2</u>	<u>NS5</u>
53	N	P	P	N	P
54	P	P	P	P	N
55	N	N	N	N	N
56	N	N	N	N	N
57	N	N	N	N	N
58	N	N	N	N	N
59	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N
61	N	N	N	N	N
62	N	N	N	N	N
63	N	N	N	N	N

64	N	N	N	N	N
65	N	N	N	N	N
66	N	N	N	N	N
67	N	N	N	N	N
68	N	N	N	N	N
69	N	N	N	N	N
70	P	P	P	P	P
71	N	N	N	N	N
72	N	N	N	N	N
73	P	P	P	P	N
74	N	N	N	N	N
75	N	N	N	N	N
76	N	N	N	N	P
77	N	N	N	N	N
78	N	N	N	N	N
79	N	N	N	N	N
80	N	N	N	N	N
81	N	N	N	N	N
82	N	N	N	N	N
83	P	P	N	N	N
84	N	N	P	N	N
85	N	N	N	N	N
86	P	P	P	P	N
87	N	N	N	N	N
88	N	N	N	N	N
89	P	P	P	P	P
90	P	P	P	P	N
91	N	N	N	N	P
92	P	P	P	N	N
93	N	N	N	N	N
94	N	N	N	N	N
95	N	N	N	N	N
96	N	N	N	N	N
97	N	N	N	N	N

98	N	P	P	P	P
99	P	P	P	P	P
100	N	N	N	N	N
101	P	P	P	P	P
102	N	N	N	N	N
103	N	N	N	N	N
104		N	N	N	N
105	P	P	P	P	N
106	N	N	N	N	N
107	N	N	N	N	N
108	N	N	N	N	N
109	P	P	P	P	P
110	P	P	P	N	P

Antigenas

<u>Donoras</u>	<u>C100</u>	<u>C33c</u>	<u>C22</u>	<u>S2</u>	<u>NS5</u>
111	P	P	P	N	P
112	N	N	N	N	N
113	P	P	P	P	P
114	N	N	N	N	N
115	N	N	N	N	N
116	P	P	P	P	P
117	N	N	N	N	N
118	N	N	N	N	N
119	N	N	N	N	N
120	P	P	P	P	P
121	N	N	N	N	N
122	N	P	P	N	P
123	N	N	N	N	N
124	N	N	N	N	N
125	N	N	N	N	N
126	P	N	N	N	N
127	N	N	N	N	N
128	N	N	N	N	N
129	N	N	N	N	N

130	P	P	P	P	N
131	N	N	N	N	P
132	N	N	N	N	N
133	N	N	N	N	N
134	N	N	N	N	N
135	N	N	N	N	N
136	N	N	N	N	N
137	N	N	N	N	N
138	N	N	N	N	N
139	N	N	N	N	N
140	P	N	N	N	N
141	P	N	P	P	P
142	N	N	N	N	N
143	N	N	N	N	N
144	N	N	N	N	N
145	N	N	N	N	N
146	N	N	N	N	N
147	N	N	N	N	N
148	N	N	N	N	N
149	N	N	N	N	N
150	N	N	N	N	N
151	N	N	N	N	N
152	N	N	N	N	N
153	N	N	N	N	N
154	P	P	P	P	P
155	N	N	N	N	N
156	N	N	N	N	N
157	N	N	N	N	N
158	N	N	N	N	N
159	N	N	N	N	N
160	N	N	N	N	N
161	P	P	P	P	P
162	N	N	N	N	N
163	N	N	N	N	N

164	P	P	P	N	P
165	N	N	N	N	N
166	P	P	P	N	P
167	N	N	N	N	N
168	N	N	N	N	N

Antigenas

<u>Donoras</u>	<u>C100</u>	<u>C33c</u>	<u>C22</u>	<u>S2</u>	<u>NS5</u>
169	N	N	N	N	N
170	N	N	N	N	N
171	N	N	N	N	N
172	N	N	N	N	N
173	N	N	N	N	N
174	N	N	N	N	N
175	N	N	N	N	N
176	N	N	N	N	N
177	N	N	N	N	P
178	N	N	N	N	N
179	N	N	N	N	N
180	N	N	N	N	N
181	N	N	N	N	N
182	N	N	N	N	N
183	P	P	P	P	P
184	N	N	N	N	N
185	N	N	N	N	N
186	N	N	N	N	N
187	N	N	N	N	N
188	N	P	P	N	N
189	N	N	N	N	N
190	N	N	N	N	N
191	N	N	N	N	N
192	N	N	N	N	N
193	N	N	N	N	N
194	N	N	N	N	N
195	N	N	N	N	N

196	N	N	N	N	N
197	N	N	N	N	P
198	P	P	P	N	N
199	N	N	N	N	P
200	P	P	P	P	N

Iš esmės duomenys, gauti tiriant apmokamus donorus, sutampa su duomenimis, gautais tiriant užsikrėtusių individų serumą.

7 pavyzdys: HCV antikūnų nustatymas ELISA metodu, naudojant HCV antigenų kombinaciją

Plokštelės, padengtos kombinacijos iš C22 ir C33c antigenų yra paruošiamos taip. Tirpalas, sudarytas iš padengimo buferio (50 mM natrio borato, pH 9,0), 21 ml/plokštei, BSA (25 mikrogramai/ml), C22 ir C33c (kiekvieno po 2,5 mikrogramus/ml), yra ruošiamas prieš pat pridedant į "Removeawell Immulon 1" plokšteles (Dynatech Corp.). Pamašius 5 min., į plokštelę pridedama po 0,2 ml/duobutei, plokštelės uždengiamos ir laikomos 2 val. 37°C temperatūroje, po to skystis pašalinamas ištraukiant. Plokštelės vieną kartą praplaunamos 400 mikrolitrų plovimo buferiu (100 mM natrio fosfato, pH 7,4, 140 mM natrio chlorido, 0,1 % (tūris/svoris) kazeino, 1 % (tūris/svoris) Triton X-100, 0,01% (tūris/svoris) Thimerosal). Pašalinus praplovimo tirpalą, yra pridedama po 200 mikrolitrų/duobutei, tirpalo, vartojamo po padengimo (10 mM natrio fosfato, pH 7,2, 150 mM natrio chlorido, 0,1 % (tūris/svoris) kazeino, 3 % sacharozės ir 2 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF)), plokštelės nesandariai pridengiamos, kad negaruotų ir paliekamos kambario temperatūroje 30 min. Iš duobučių ištraukiamas skystis, sausai liofilizuojama per nakt, nekaitinant stovo. Taip paruoštos plokštelės saugomos 2-8°C temperatūroje užrištuose aliuminio maišeliuose su desikantais (3 g Sorb-itTM paketėliai).

Kad įvertinimas būtų atliktas pagal ELISA metodiką, reikia 20 mikrolitrų serumo pavyzdžio ar kontrolinio pavyzdžio pridėti į duobutę, kurioje esama 200 mikrolitrų pavyzdžio skiediklio (100 mM natrio fosfato, pH 7,4, 500 mM natrio chlorido, 1 mM EDTA, 0,1 % (tūris/svoris) kazeino, 1 % (tūris/svoris) Triton X-100, 0,01% (tūris/svoris) Thimerosal, 100 mikrogramų/ml mielių ekstrakto). Plokštelės yra sandariai užspaudžiamos ir 2 val. laikoma 37°C temperatūroje, po to tirpalas išsiurbiamas ir plokštelės tris kartus praplaunamos 400 mikrolitrų plaunančiojo buferio tirpalu (fosfatinio buferio druska (PBS), turinti 0,05 % Tween 20). Praplautos duobutės yra paveikiamos 200 mikrolitrų pelių antikūnų prieš žmogaus IgG-krienų peroksidazės (HRP) konjugato, ištirpinto Ortho konjugato skiediklyje (10 mM natrio fosfato, pH 7,2, 150 mM natrio chlorido, 50 % (tūris/svoris) fetalinio jaučio serumo, 1 % (tūris/svoris) termiškai apdoroto arklio serumo, 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,05 % (tūris/svoris) Tween 20, 0,02 % (tūris/ svoris) Thimerosal). Veikiama 1 val. 37°C, tirpalas išsiurbiamas, duobutės tris kartus praplaunamos 400 ml plaunančiojo buferio, kuris taip pat pašalinamas išsiurbiant. Nustatant surišto fermentinio konjugato kiekį, pridedama 200 mikrolitrų substrato tirpalo (10 mg O-fenilenediamino dihidrochlorido 5 ml tiriančiojo tirpalo. Šį tirpalą sudaro 50 mM natrio citrato, pH 5,1 (pH koreguojamas fosforo rūgštimi) ir 0,6 mikrolitrai/ml 30 % H_2O_2 . Plokštelės su substrato tirpalu laikomos tamsoje 30 min. kambario temperatūroje, reakcijos sustabdomos pridėjus 50 mikrolitrų/ml 4N sieros rūgšties, ir nustatomi optiniai tankiai.

Panašiai ELISA metodika taikoma suldytų proteinų C22 ir C33c, ir C22, C33c, ir S2 ir junginių, sudarytų iš C22 ir C100, C22 ir S2, C22 bei NS5 antigeno, C22, C33c, ir S2, ir C22, C100, ir S2, atvejais.

Aukščiau aprašyti procedūrų, kurių pagalba realizuojamas išradimas, pakeitimai yra akivaizdūs patyrusiems molekulinės biologijos, imunologijos ir gretimų sričių specialistams, ir yra įtraukti išradimo apibrėžtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Hepatito C viruso (HCV) epitopo sekų kombinacija viename ar daugiau polipeptidų, gautame cheminės sintezės arba rekombinantinės ekspresijos būdu, imobilizuotame kietos matricos, tinkamos HCV nustatymui imunoanalizės metodu, paviršiuje, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad susideda iš:

- a) pirmos epitopo sekos iš HCV poliproteino C domeno;
- b) antros epitopo sekos iš HCV poliproteino antro domeno, kuris yra:
 - (i) HCV poliproteino NS3 domenas;
 - (ii) HCV poliproteino NS4 domenas; arba
 - (iii) HCV poliproteino NS5 domenas; ir
- c) trečios epitopo sekos iš HCV poliproteino trečio domeno, kuris yra:
 - (i) HCV poliproteino NS3 domenas;
 - (ii) HCV poliproteino NS4 domenas; arba
 - (iii) HCV poliproteino NS5 domenas,

kurioje trečias domenas yra skirtingas nuo antro domeno.

2. Kombinacija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antras domenas yra NS3.

3. Kombinacija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antras domenas yra NS4.

4. Kombinacija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad susideda iš:

- (a) pirmos epitopo sekos iš HCV poliproteino C domeno;
- (b) antros epitopo sekos iš HCV poliproteino NS3 domeno;
- (c) trečios epitopo sekos iš HCV poliproteino NS4 domeno.

5. Kombinacija pagal bet kurį iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kieta matrica yra mikrotitravimo plokštelės duobutės, lazdelės arba rutuliuko paviršius.

6. Kombinacija pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pirma, antra ir trečia epitopo seka yra atitinkamai pirmame, antrame ir trečiame polipeptide, atskirai prijungtuose prie kietos matricos.

7. Kombinacija pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kieta matrica yra lazdelė, o polipeptidai yra atskirai pasiskirstę tokiu būdu, kad gali būti įmanomas prisijungimas prie pirmo, antro ir trečio polipeptido.

8. Kombinacija pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra suldyto polipeptido pavidale.

9. Antikūnų hepatito C virusui (HCV) nustatymo žinduolių kūno komponente, įtarus jų buvimą, būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas kūno komponentas sąveikauja su kombinacija pagal bet kurį iš 1-8 punktų sąlygose, užtikrinančiose antikūno-antigeno reakciją ir imuninio komplekso iš minėto antikūno ir minėtų epitopų sekas turinčio polipeptido, nustatymą.

10. Komplektas analizei atlikti, skirtas antikūnų hepatito C virusui žinduolių kūno komponente, įtarus jame esant minėtus antikūnus, nustatymui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš įpakuoto rinkinio

- a) HCV epitopų sekų kombinacijos pagal vieną iš 1-9 punktų;
- b) standartinių kontrolinių reagentų;
- c) analizės atlikimo instrukcijos.

Fig. 1A

-341 GCCAGCCCCCTGATGGGGCGA
CGTCTGGGGGACTACCCCGCT

-319 CACTCCACCATGAATCACTCCCCCTGTGAGGAATACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAG
GTGAGGTGCTACTTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAAGTGCGTCTTTTCGCAGATC

-259 CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATA
GGTACCGCAATCATATACTACAGCACGTGCGAGGTCTGGGGGGAGGCCCTCTCGGTAT

-199 GTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTCTTGGA
CACAGACGCCCTTGCCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCTGTGCCCCAGGAAGAACCT

-139 TCAACCCCGCTCAATGCCCTGGAGATTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGT
AGTTGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGCGTTCTGACGATCGGCTCATCA

- 79 GTTGGTCTGCGGAAGGCCCTTGTTGTTACTGCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAG
CAACCCAGCGCTTTCGGGAACACCATGACGGACTATCCCACGGAACGCTACGGGGCCCTC

- 19 GTCTCGTAGACCGTGCAAC
CAGAGCATCTGGCACGTGG

Arg Thr

MetSerThrAsnProLysProGlnLysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGln
1 ATGAGCACGGAATCCTAAACCTCAAAATAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCACAG
TACTCGTGTCTAGGATTGGAGTTTTTTTTTTTGTGTCATTGTGTTGGCAGCGGGTGTCTC

AspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArg
61 GACGTCAAGTTCGCCGGTGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGG
CTGCAGTTCAGGGGCCACCGCCAGTCTAGCAACCACTCAAAATGAACAACGGCGCGTCC

121 GlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGly
GGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCCGAACCTCGAGGT
CCGGGATCTAACCCACACGCGCGTGTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCA

181 ArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGly
AGACGTACGCCCTATCCCCAAGGCTCGTGGCCCGAGGCGAGACCTGGGCTCAGCCCCGG
TCTGCAGTCGGATAGGGGTTCCGAGCAGCCGGGCTCCCGTCTGGACCCGAGTCGGGCCC

241 TyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerPro
TACCCTTGGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGCTCGGGTGGCGGATGGCTCCTGTCTCCC
ATGGGAACCGGGGAGATACCGTTACTCCCGACGCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGG

301 ArgGlySerArgProSerTrpGlyProThrAspProArgArgSerArgAsnLeuGly
CGTGGCTCTCGGCCCTAGCTGGGCCCCACAGACCCCCGGCGTAGGTCCGCCAATTGGGT
GCACCGAGCCGGATCGACCCCCGGGTGTCTGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCA

361 LysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuVal
AAGGTCATCGATACCCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTC
TTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAG

421 GlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAsp
GGCGCCCCCTTTGGAGGCGCTGCCAGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGGAAGAC
CCGGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCCGGACCGCGTACCCGAGGCCCAAGACCTTCTG

Fig. 1B

Fig. 1C

Thr

481 GlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAla
GGCGTGAACTATGCAACAGGAACTTCCTGGTTGCTCTTCTCTATCTTCTCTGGCC
CCGCACTGATACGTTGTCCCTTGGAAGGACCAACGAGAGATAGAAAGAACCCGG

541 LeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerThrGlyLeu
CTGCTCTCTTGCTTGAAGTGTGCCGCTTCGGCTACCAAGTGCACAACCTCCACGGGCTT
GACGAGAGAACGAACTGACACGGGGCGAAGCCGGATGTTCAACGGTTGAGGTGCCCCGAA

601 TyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspAlaIle
TACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTACGAGCGCGCATGCCATC
ATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATGCTCCCGGCTACGGTAG

661 LeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSerArgCysTrpVal
CTGCACACTCCGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAACGCCCTCGAGGTGTGGGTG
GACGTGTAGGCCCCACGACGAGGAACGCAAGCACTCCCGTTGCGGAGCTCCACAACCCAC

721 AlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGlnLeuArgArg
GCGATGACCCCTACGGTGGCCACCCAGGATGGCAAACCTCCCGCGACGCAGCTTCGACGT
CGCTACTGGGGATGCCACCGGTGTCCTACCGTTTGAGGGGCGCTCGAAGCTGCA

781 HisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeu
CACATCGATCTGCTTGTGCGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCCCTCTACGTGGGGACCTA
GTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGAGATGCACCCCTGGAT

841 CysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgHisTrpThr
TGCGGGTCTGTCTTCTGTGCGGCCAACTGTTACCTTCTCTCCAGCGGCCACTGGACG
ACGCCCCAGACAGAAAGACAGCCGGTTGACAAGTGGAAGAGAGGGTCCGGGTGACCTGC

901	ThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrp ACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGCCATATAACGGGTACCGCATGGCATGG TGGGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCCCAGTGCGGTACCGTACC
961	Val AspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIle GATATGATGATGAACCTGCTCCCTACGACGGGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATC CTATACTACTACTGACCAAGGGATGCTGCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGGCCCTAG
1021	ProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAla CCACAAGCCATCTTGGACATGATCGTGGTGCTCACTGGGAGTCCTGGCGGCATAGCG GGTGTTCCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCAACGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGC
1081	TyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuPheAlaGly TATTTCTCCATGGTGGGAACCTGGCGGAAGTCCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTGCGCGC ATAAAGAGGTACCAACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCACGACGACGATAAACGGCCG
1141	ValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHisThrValSerGlyPheVal GTCGACGCGGAACCCACGTCACCGGGGAAGTGCCGGCCACACTGTGCTCTGGATTGTT CAGCTGCCCTTTGGGTGCAGTGCGCCCTTCACGGCCGGTGTGACACAGACCTAAACAA
1201	SerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrp AGCCTCCTCGCACCCAGGCGCCAAAGCAGAACGTCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGG TCGGAGGAGCGTGTCCGCGGTTCGTCTTGCAGGTCGACTAGTTGTGTTGCCGTCAACC

Fig. 1D

Fig. 1E

1261	HisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGly CACCTCAATAGCAGGCCCTGAACCTGCAATGATAGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGG GTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCC
1321	LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg CTTTTCTATCACCAAGTCAACTCTTCAGGCTGTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGA GAAAAGATAGTGTGTTCAGTTGAGAACTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTGACGGCT
1381	ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro CCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGCCCC GGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGATAGTCAATACGGTTGCCCTTCGCCGGGG
1441	AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys GACCAGCGCCCTACTGCTGGCACTACCCCCAAACCTTGCGGTATTGTGCCCCGGAAG CTGGTCGCGGGGATGACCGGTGATGGGGGTTTGGAAACGCCATAACACGGGCGCTTC
1501	SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValGlyThrThrAsp AGTGTGTGTGTCGGTATATTGCTTCACTCCAGCCCCGTGGTGGTGGAAACGACCGAC TCACACACACAGGCCATATAACGAAGTGAGGTCGGGGCACCAACCCTTGCTGGCTG
1561	ArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThrAspValPheValLeuAsn AGGTCGGCGCGCCACCTACAGCTGGGGTGAAATGATACGAGCGTCTTCGTCCTTAAC TCCAGCCCGCGGGTGATGTCGACCCCACTTTTACTATGCTGCAGAGCAGGAATTG
1621	AsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPhe AATACCAGGCCACCGCTGGCAATTGGTTGCTGTTGTACCTGGATGAACCTCAACTGGATTTC TTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAG

1681 ThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHis
 ACCAAAGTGTGCGAGCGCCTCCTTGTCATCGGAGGGCGGCAACAACACCCCTGCAC
 TGGTTTCACACGCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCCGTGTGTGGGACGTG

 1741 CysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGly
 TGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATACTCTCGTGCGGCTCCGGT
 ACGGGTGACTAACGAAGCGCTTCGTAGGCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCA

 1801 Ile
 ProTrpLeuThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCys
 CCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCGTATAGGCTTTGGCATATATCCTTGT
 GGGACCTAGTGTGGTCCACGGACCAAGCTGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACA

 1861 ThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeu
 ACCATCAACTACACCATATTTAAATCAGGATGTACGTGGAGGGGTCTGAAACACACAGGCTG
 TGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCTCCCCAGCTTGTGTCCGAC

 1921 GluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSer
 GAAGCTGCCCTGCAACTGGACGGGGCGAACCCTTGGGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCC
 CTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGG

 1981 GluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThr
 GAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGTCTCCCGTGTTCCTTCACA
 CTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTACCGTCCAGGAGGGCACAAAGGAAGTGT

Fig. 1F

Fig. 1G

2041	ThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGln ACCCTACCAGCCTTGTCCACCGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTTGTGGACGTGCAG TGGGATGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAAACACCTGCACGTC
2101	TyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValVal TACTTGTAACGGGTGGGTCAAGCATCGGTCCTGGGCCATTAAAGTGGAGTACGTCTGTT ATGAACATGCCCCACCCAGTTCTGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCAACCTCATGCAGCAA
2161	LeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeu CTCCTGTTCTTCTGTGCAGACGCGCGTCTGCTCCTGCTCTGTGGATGATGCTACTC GAGGACAAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAG
2221	IleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAla ATATCCCAAGCGGAGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTAATGCAGCATCCCTGGCC TATAGGGTTCCGCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGACCCGG
2281	GlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGly GGGACGCACGGTCTTGATCCTTCCTCGTGTCTTCTCTGCTTTGCATGGTATTGAAGGGT CCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCCA
2341	LysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeu AAGTGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTCCTG TTCACCCACGGGCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGACGAGGAC
2401	LeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGly TTGGCGTTGCCCCAGCGGCGTACGCGCTGGACACGAGGTGGCCGCGTCTGTGGCGGT AACCGCAACGGGTCGCCCGCATGCGGACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCA

2461 ValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSer
GTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCAACCATATACAAAGCGCTATATCAGC
CAACAAGAGCAGCCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCCGGATATAGTCCG
(Asn)
2521 TrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrp
TGGTGCTTGTGGTGCTTCAGTATTTCTGACCAGAGTGGAAAGCGCAACTGCACGTGTGG
ACCACGAACACCAACCGAAGTCATAAAAGACTGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACC
2581 IleProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaVal
ATTCCCCCTCAACGTCGAGGGGGCGGACGCCGTCACTTACTCATGTGTGCTGTA
TAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACAT
2641 HisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrp
CACCCGACTCTGGTATTGTACATCACCAAATTGCTGTGCGCGTCTTCGGACCCCTTGG
GTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAAACGACCGCGCAGAACGCTGGGGAAACC
2701 IleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArg
ATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTGTGCGCGTCCAAAGGCCCTTCTCCGG
TAAGAAGTTCGGTCAAACGAAATTTCATGGGATGAACACGCGCAGGTTCCGGAAAGGCC
2761 PheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLys
TTCTGCGCGTTAGCGCGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCATTAAG
AAGACCGGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTC

Fig. 1H

Fig. 11

2821 LeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAla
 TTAGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCG
 AATCCCCCGGAATGACCGTGTGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGC

 2881 HisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGlu
 CACAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAG
 GTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAGAAGGGTTTACCTC

 2941 ThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeu
 ACCAAGCTCATCAGTGGGGGCGAGATACCGCCGCGTGGGTGACATCATCAACGGCTTG
 TGGTTCGAGTAGTGACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAAC

 3001 ProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSer
 CCTGTTCCGCCCGAGGGCGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCC
 GGACAAAGGGCGGCTCCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTCGGCTACCTTACCAGAGG

 3061 LysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeu
 AAGGGGTGGAGGTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCCAGCAGACAAAGGGCCTCCTA
 TTCCCCACCTCCAAACGACCGGGGTAGTGCCCGCATGCGGGTCGTCTGTTCCTCCCGGAGGAT

 3121 GlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGln
 GGGTGCAATAATCACAGCCTAAGTGGCCGGACAAACCAAGTGGAGGTGAGGTCCAG
 CCCACGTATTAGTGTGGATTGACCGGCCCTGTTTTGGTTTCACTCCCACTCCAGGTC

 3181 IleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThr
 ATTGTCAACTGCTGCCCAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATGGGTGTGCTGGACT
 TAACACAGTTGACGACGGGTTTGGAGGACCGTTGCAACGTAGTTACCCCAACACGACCTGA

3241 ValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMet
 GTCTACCACGGGGCCGGAACGAGACCATCGCGTCACCCAAAGGTCTCTGTATCCAGATG
 CAGATGGTGGCCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCCCAAGGACAGTAGGTCTAC

3301 TyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeu
 TATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTTGGGTGGCCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTG
 ATATGGTTACATCTGGTTCTGGAAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCATCGGGCGAGTAAC

3361 ThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIle
 ACACCCCTGCACTTGGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCAAT
 TGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAA

3421 ProValArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyr
 CCCGTGCGCCCGGGGTGATAGCAGGGCAGCCTGTGTGCCCCGCCCATTTCTCTAC
 GGGACGCGGGCCCCCACTATCGTCCCCGTCCGACGACAGCGGGCGGGTAAAGGATG

3481 LeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePhe
 TTGAAAGGCTCCTCGGGGGTCCGCTGTGTGCCCCCGGGGCACGCCGTGGCATATTT
 AACTTTCGAGAGCCCCCAGCGGACAAACACGGGGCCCCCGTGCGGCACCCGTATATAA

3541 ArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsn
 AGGGCCCGGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAAC
 TCCCCGGGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTG

Fig. 1J

Fig. 1K

3601 LeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValPro
CTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGCCC
GATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCACGGG

3661 GlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysVal
CAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGCGCAAAAGCACCAAGGTC
GTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGTGTCCTCGCCGTTTTCGTGGTTCACG

3721 ProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAla
CCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTGCTGCA
GGCCGACGTATACGTGCGAGTCCCGATATTCACGATCATGAGTTGGGGAGACACGACGT

Leu

3781 ThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThr
ACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCCTAACATCAGGACC
TGTGACCCCGAAACCAACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCCTAGCTAGGATTGTAGTCCCTGG

3841 GlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeu
GGGGTGAGAAACAATTACCACCTGGCAGCCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTT
CCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCCGGGTAGTGCAATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAA

3901 AlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleCysAspGluCysHisSer
GCCGACGGCGGTGCTCGGGGGCGCTTATGACATAATAATTGTGACGAGTGCCACTCC
CGGCTGCCCCCACCAGAGCCCCCGGGAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGG

(Val)

3961 ThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGly
ACGGATGCCACATCCATCTTGGCATCGGCACTGCTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGG
TGCCTACGGTGTAGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACTGGTTCTCTGACGCCCC

4021 AlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisPro
GCGAGACTGGTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGCTCCGTCACTGTGCCCATCCC
CGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGAGGCCCGAGGAGTGACACGGGGTAGGG

4081 AsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIle
AACATCGAGAGGTTGCTCTGTCTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGCTATC
TTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCTCTCTAGGGAATAATGCCGTTCGGATAG

4141 ProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysCys
CCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATCAAGAAGAAGTGC
GGGAGCTTCATTAGTTCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACG

4201 AspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGly
GACGAACCTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGT
CTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGGCCA

4261 LeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeu
CTTGACGTGTCCGTCAATCCCGACCGCGGCGATGTTGTCTCGTGGCAACCGATGCCCTC
GAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGTGTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAG

Tyr

4321 MetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGln
ATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTCACCCAG
TACTGGCCGATATGGCCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTC

Fig. 1L

Fig. 1M

(Ser)

ThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAsp
 4381 ACAGTCGATTTCAGCCCTTGACCCCTACCTTCACCATTGAGACAAATCACGCTCCCCCAGGAT
 TGTCACTAAAGTCGAACTGGGATGGAGTGGTAACTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCTCCTA

 AlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArg
 4441 GCTGTCTCCGCACTCAACGTCGGGCGAGGACTGGCAGGGGAAGCCAGGCATCTACAGA
 CGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCCGTCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCT

 PheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCys
 4501 TTTGTGGACCGGGGAGCGCCCTCCGGCATGTTTCGACTCGTCCGTCCCTCTGTGAGTGC
 AAACACCGTGGCCCCCTCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGACGAGACACTCACC

 TyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArg
 4561 TATGACGCAGGCTGTGCTTGATAGCTCACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGA
 ATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCT

 AlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGly
 4621 GCGTACATGAACACCCCGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGC
 CGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGACACACGGTCCCTGGTAGAACTTAAACCCCTCCCG

 ValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGly
 4681 GTCTTTACAGGCCCTCACTCATATAGATGCCCACTTCTATCCCCAGACAAAGCAGAGTGGG
 CAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCC

 GluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaPro
 4741 GAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAGCCACCCTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCT
 CTCTTGGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTTCGGTGGCACACGCGATCCCCGAGTTCGGGGA

4801 ProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGly
CCCCCATCGTGGACACAGATGTGGAAGTGTGATTCCCTCAAGCCCACCCCTCCATGGG
GGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCAACAATAAGCGAGTTCGGGTGGAGGTACCC

4861 ProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisPro
CCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTTCAGAAATGAAATCACCCCTGACGCACCCA
GGTTGTGGGACGATATGTCTGACCCCGACAAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGT

4921 ValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValThrSerThrTrp
GTCACCAATAACATCATGACATGCATGTGCGCCGACCTGGAGTCTGTACGAGCACCTGG
CAGTGGTTTATGTAGTACTGTACTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTCGTGGACC

4981 ValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysVal
GTGCTCGTTGGCGCGTCCCTGGCTGCTTGGCCCGTATTGCCCTGTCAACAGGCTGCGTG
CACGAGCAACCGCCGACGACCGAAACCGCGGCATAAACGGACAGTTGTCCGACGCAC

5041 ValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluVal
GTCATAGTGGCAGGTCGTCTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTC
CAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAG

5101 LeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGln
CTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAA
GAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTT

Fig. 1N

Fig. 10

GlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSer
 5161 GGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAAGCCCTCGGCCCTCCTGCAGACCGCGTCC
 CCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGAGGACGTCTGGCGCAGG

 ArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPhe
 5221 CGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAACTCGAGACCTTC
 GCAGTCCGCTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTGTAGCTCTGGAAG

 TrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThr
 5281 TGGCGGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTC AACG
 ACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGC

 LeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerPro
 5341 CTGCCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTACCCAGCCCA
 GACGGACCAATTGGGGCGGTAAACGAAGTAACCTACCGAAATGTGACGACAGTGGTCGGGT

 LeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeu
 5401 CTAACCACTAGCCAAACCCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGGTGGTGGCTGCCCAGCTC
 GATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAAGTTGTATAACCCCCCCCCACCGACGGGTCGAG

 AlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGly
 5461 GCCGCCCCGGTGCCGCTACTGCCCTTGTGGCGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCCATCGGC
 CGGCGGGGCCACGGCGATGACGGAACACCCCGCAGCCGAAATCGACCCGGCGGTAGCCG

 SerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAla
 5521 AGTGTGGACTGGGGAAGGTCCCTCATAGACATCCTTGCAAGGTATGGCGCGGTGGCG
 TCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCCG

5581 GlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuVal
 (Gly)
 GGAGCTCTTGTTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTAGGTCCCTCCACGGAGGACCTGGTC
 CCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGAGGTGCCTCCTGGACCCAG

5641 AsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValcysAlaAla
 AATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCA
 TTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGCCCTCGGGAGCATCAGCCGACACACGTCGT

5701 IleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIle
 ATACTGCGCGGCACGTTGGCCCGGCGAGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATA
 TATGACGCGGCGCGTGCAACCGGGCCGCTCCCGTCACGTACCTACTTGGCCGACTAT

5761 AlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAla
 GCCTTCGCCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCA
 CGGAAGCGGAGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGTGCGTGATGCACGGCCTCTCGCTACGT

5821 AlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeu
 (HisCys)
 GCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAAACCCAGCTCCTGAGCGACTG
 CGACGGCGCAGTGACCGGTATGAGTCGTGAGTGACATTGGGTCCGAGGACTCCGCTGAC

5881 HisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIle
 CACCACTGGATAAGCTCGGAGTGTAACCACTCCATGCTCCGGTTCTTGCTAAGGGACATC
 GTGGTCACCTATTTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAG

Fig. 1P

Fig. 1Q

5941 TrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMet
 TGGGACTGGATATCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAGCTAAGCTCATG
 ACCCTGACCTATACGCTCCACAACCTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTCGATTCCGAGTAC

 6001 ProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArg
 CCACAGCTGCCCTGGGATCCCCCTTTGTGTCTGCCAGCGGGTATAAGGGGTCTGGCGA
 GGTGTCGACGGACCCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCCGCCCATATATCCCCCAGACCGCT

 6061 (Val)
 GlyAspGlyIleMethIleThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLys
 GTGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAA
 CACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTT

 6121 AsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPhe
 AACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGACCTTC
 TTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTAACCTCACCCCTGGAAAG

 6181 ProIleAsnAlaTyrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPhe
 CCCATTAAATGCCCTACACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCCTGCGCCGAACCTACACGTTT
 GGTAAATTACGGATGTGGTGCCCGGGACATGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAG

 6241 AlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHis
 GCGCTATGGAGGTGTCCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGACTTCCAC
 CGCGATACCTCCCCACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCCCTGAAGGTG

 6301 TyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGlu
 TACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCCGAA
 ATGCCACTGCCCATACTGATGACTGTTAGAGTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTT

6361 PhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeu
TTTTTTCACAGAAATTGGACGGGTGCGCCTACATAGTTTGGCGCCCTTGCAAGCCCTTG
AAAAAGTGCTCTTAACCTGCCCCACGGGATGTATCCAACGCGGGGACGTTCCGGGAAC

6421 LeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeu
CTGCGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTA
GACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCTGAGGTGCTTATGGGCCATCCCAGCGTTAAT

6481 ProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHis
CCTTGCGAGCCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCAT
GGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACTGCAGGTACGAGTACTAGGAGGTA

6541 IleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSer
ATAACACAGCAGGCGCGCGGCGAAGGTGGCGAGGGATCACCCCCCTCTGTGGCCAGC
TATTGTCGTCTCCGCGCGCCGCTTCCAACCGCTCCCTAGTGGGGGAGACACCGGTCC

6601 SerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAsp
TCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGAC
AGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGTCCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTG

6661 SerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsn
TCCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGCGGCAAC
AGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCCTCTACCCGCCGTTG

Fig. 1R

Fig. 1S

6721 IleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuVal
 ATCACCAAGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTTCTGGACTCCTTCGATCCGCTGTG
 TAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGAGCTAGGCCAACAC

6781 AlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArg
 GCGGAGGAGGACGAGCGGAGATCTCCGTACCCGAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGA
 CGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGCGCTCTTTAGGACGCCCTTCAGAGCCTCT

6841 PheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThr
 TTCGCCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGCGCGCGGACTATAACCCCCGCTAGTGAGACG
 AAGCGGTCCGGACGGGCAAAACCCGCCCGCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGC

6901 TrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProLys
 TGGAAAAGCCCCGACTACGAACCACTGTGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAG
 ACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAAGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGTTTC

6961 SerProProValProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeu
 TCCCCCTCCTGTGCTCCGCCCTCGGAAGCGGACGGTGTCTCCTCACTGAATCAACCCCTA
 AGGGAGGACACGGAGCGGAGCCTTCTTCGCCCTGCCACCGAGTACTTAGTTGGGAT

7021 SerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerThrSerGlyIle
 TCTACTGCCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAAGAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCAT
 AGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAA

7081 ThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSer
 ACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCCCCCCCTTCTGGCTGCCCCCCGACTCC
 TGCCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGCGGGGGCTGAGG

(PheAla)

7141 AspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeu
GACGCTGAGTCCCTATTCCTCCATGCCCCCTGGAGGGGAGCCTGGGATCCGGATCTT
CTGGGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCCTAGAA

7201 SerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCys
AGCGACGGGTCAATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACCGGAGGATGTCGTGCTGC
TCGCTGCCCCAGTACCAAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCCCTCCTACAGCACACGACG

7261 SerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLys
TCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGCGCGCGGAACAGAAA
AGTTACAGAAATGAGAACCTGTCCGGTGAGCAGTGCGGCACGCGCGCCTTCTTGTCTTT

7321 LeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThr
CTGCCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCAACCACAAATTTGGTGTATTCACCC
GACGGGTAGTTACGTGATTTCGTTGAGCAACGATGCAGTGTGTTAAACCACATAAGGTGG

7381 ThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeu
ACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAAGTAAGTCACATTTGACACAGACTGCAAGTCTG
TGGAGTGGCTCACGAACGGTTTCCGCTCTTCTTCAGTGTAACCTGTCTGACGTTCAAGAC

7441 AspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaSerLysValLysAla
GACAGCCATTACGACGACGTACTCAAGAGGTTAAAGCAGCGCGGTCAAAAGTGAAGGCT
CTGTCGGTAATGGTCCCTGCATGAGTTCCTCCAATTTTCGTGCGCGCAGTTTTCACACTTCCGA

Fig. 1T

Fig. 1U

(Phe)

7501 AsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSerLeuThrProHisSerAlaLysSerLys
 AACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGACGCTGACGCCCCACACTCAGCCAAATCCAAG
 TTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGTGTGAGTCGGTTAGGTTT

 7561 PheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsn
 TTTGGTTATGGGGCAAAGACGTCCTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAAACCCACATCAAC
 AAACCAATACCCCGTTTTCTGTCAGGCAACGGTACGGTCTTCCGGCATTTGGGTGAGTTG

 7621 SerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAla
 TCCGTGTGGAAGACCTTCTGGAAGACAATGTAAACACCAATAGACACTACCATCATGGCT
 AGGCACACCTTTCTGGAAGACCTTCTGTACATTGTGTTATCTGTGATGGTAGTACCGA

 7681 LysAsnGluValPheCysValGlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIle
 AAGAACGAGGTTTTCTGCGTTCAGCCTGAGAAAGGGGTCGTAAAGCCAGCTCGTCTCATC
 TTCTTGCTCCAAAGACGCAAGTCGGAATCTTCCCCCAGCATTCGGTCGAGCAGAGTAG

 7741 ValPheProAspLeuGlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThr
 GTGTTCCCCGATCTGGGCGTGGCGGTGTCGGAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACA
 CACAAGGGGCTAGACCCCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCCACCAATGT

 7801 LysLeuProLeuAlaValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArg
 AAGCTCCCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTACACGAGACAGCGG
 TTCGAGGGGAACCGGCACTACCCCTTCGAGGATGCCCTAAGGTTATGAGTGTCTGTCTGCC

 7861 ValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAsp
 GTTGAATTCCCTCGTGAAGCGTGGAAAGTCCAAAGAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGAT
 CAACTTAAGGAGCACGTTCCGACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTA

7921	ThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyr ACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGCAATCTAC TGGCGACGAAACTGAGGTGTCACTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCCTCCCTTAGATG
7981	GlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeu CAATGTTGTGACCTCGACCCCAAGCCCGCTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTT GTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTTCGGGGCCACCGGTAGTTACGGGAGTGCTCTCCGAA
8041	(Gly) TyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArg TATGTTGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGAGAACTCGGCTATCGCAGGTGCCGC ATACAACCCCGGAGAAATGGTTAAGTTCCTCCCTCTTGACGCCGATAGCTCCACGGCG
8101	AlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArg GCGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGG CGCTCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTTGTGGGAGTGAAACGATGTAGTTCCGGGCC
8161	AlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeu GCAGCCTGTCGAGCCGCGAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTA CGTCGGACAGCTCGGGCTCCCGAGGTCTGTACGTGTACGAGCACACCGCTGCTGAAT
8221	ValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThr GTCGTTATCTGTGAAGCGCGGGGTCCAGGAGGACGCGCGGAGCCCTGAGAGCCTTCACG CAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCTCTCGCGCGCTCGGACTCTCGGAAGTGC

Fig. 1V

Fig. 1W

8281	GluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeu GAGGCTATGACCAAGTACTCGCCCCCTGGGACCCCCCAACCAACGAAATACGACTTG CTCCGATACTGGTCCATGAGCGGGGACCCCTGGGGGTGTGCTTATGCTGAAC
8341	GluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArg GAGCTCATAACATCATGCTCTCCAACGTGTCAAGTCCGCCACGACGGCGCTGAAAGAGG CTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTGCACAGTCAGCGGGTGTGCCGACCTTCTCC
8401	ValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAla GTCTACTACCTCACCCGTGACCTACAAACCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCA CAGATGATGGAGTGGCACTGGGATGTGGGGGGAGCGCTCTCGACGCCCTCTGTCGT
8461	ArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrp AGACACACTCCAGTCAATTCTCTGGCTAGGCAACATAATCATGTGTGCCCCCACACTGTGG TCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAAACGGGGTGTGACACC
8521	AlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGlu GCGAGGATGATACTGATGACCCATTCTTTAGCGTCTTATAGCCAGGACCCAGCTTGAA CGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCGAACTT
8581	GlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuPro CAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCTGTACTCTCATAGAACCACTTGATCTACCT GTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGAACTAGATGGA
8641	ProIleIleGlnArgLeuHisGlyLeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGly CCAATCATTCAAAGACTCCATGGCCTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGT GGTAGTAAGTTTCTGAGGTACCGGAGTCGGGTAAAGTGAGGTGTCAATGAGAGGTCCA

8701 GluIleAsnArgValAlaAlaCysLeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrp
 GAAATTAAATAGGTGGCCGCATGCCCTCAGAAAACCTGGGGGTACCGCCCTTGCGAGCTTGG
 CTTTAAATTATCCCAACCGCGGTACGGAGTCTTTGAACCCCATGGCGGGAACGCTCGAACC

Gly

8761 ArgHisArgAlaArgSerValArgAlaArgLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIle
 AGACACCGGGCCCGAGCGTCCGCGCTAGGCTTCTGGCCAGAGGAGCGGCTGCCATA
 TCTGTGGCCCGGCTCGCAGGCGGATCCGAAGACCGGTCTCCTCCGTCCCGACGGTAT

8821 CysGlyLysTyrLeuPheAsnTrpAlaValArgThrLysLeuLysLeuThrProIleAla
 TGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGCAGTAAGAAACAAGCTCAAACTCACTCCAATAGCG
 ACACCGTTCATGAGAAAGTTGACCCCGTCATTCTTGTTCGAGTTTGAGTGAGGTATCGC

8881 AlaAlaGlyGlnLeuAspLeuSerGlyTrpPheThrAlaGlyTyrSerGlyGlyAspIle
 GCCGCTGGCCAGCTGGACTTGTCGGCTGCTTACCGCTGGCTACAGCGGGGAGACATT
 CGGCGACCGGTCGACCTGAACAGCGCGACCAAGTGCCGACCGATGTGCGCCCCCTCTGTAA

(Pro)

8941 TyrHisSerValSerHisAlaArgProArgTrpIleTrpPheCysLeuLeuLeuAla
 TATCACAGCGTGCTCTCATGCCCCGCGCTGGATCTGGTTTTGCCCTACTCCTGCTTGCT
 ATAGTGTGCGCACAGAGTACGGCGCGGCGACCTAGACCAAAACGGATGAGGACGAACGA

Fig. 1X

Fig. 1Y

9001 AlaGlyValGlyIleTyrLeuLeuProAsnArgOP
 GCAGGGTAGGCATCTACCTCCTCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAACACTCCGGCCT
 CGTCCCCATCCGTAGATGGAGGAGGGTTGGCTACTTCCAACCCCATTTGTGAGGCCCGGA

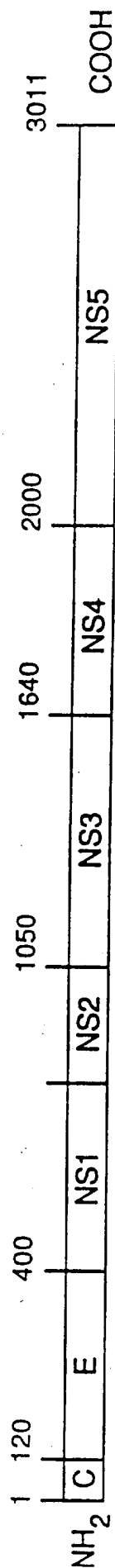


Fig. 2