



УКРАЇНА

(19) UA (11) 77935 (13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 15/09

A61K 39/02

A61K 48/00

A61P 31/12 (2007.01)

C07K 14/005

C07K 14/03 (2007.01)

C07K 14/08 (2007.01)

C12N 15/38 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ СВИНЕЙ, СПОСІБ ТА НАБІР ДЛЯ ВАКЦИНАЦІЇ

1

2

(21) 99020959

(22) 15.07.1997

(24) 15.02.2007

(86) PCT/FR97/01313, 15.07.1997

(31) 96/09338

(32) 19.07.1996

(33) FR

(46) 15.02.2007, Бюл. № 2, 2007 р.

(72) Одонне Жан-Крістоф, FR, Бушардон Анна-белль, FR, Бодю Філіпп, FR, Рів'єр Мішель, FR

(73) МЕРІАЛЬ, FR

(56) WO A1 9606619, 17.03.1996

WO A1 950660, 03.05.1995

(57) 1. Вакцина для свиней, що містить плазмиду(плазмиди), яка (які) включає (ють) і забезпечує(ють) експресію in vivo в клітинах свині-хазяїна послідовності (послідовностей) нуклеїнової кислоти вірусу хвороби Aujeszky, що кодує(ють) білок (білки), вибраний(ні) з групи, що складається з gB, gD та gB і gD, і фармацевтично прийнятний носій.

2. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що плазмиди включає послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує(ють) як gB, так і gD білки.

3. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що плазмиди включає послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує білок gB.

4. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що плазмиди включає послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує білок gD.

5. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що містить першу плазмиду, що включає послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує білок gB, і другу плазмиду, що включає послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує білок gD.

6. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що експресія послідовності (послідовностей) нуклеїнових кислот знаходиться під контролем промотора, вибраного з групи, що складається з промотора CMV-IE, раннього промотора SV40, пізнього промотора SV40, промотора LTR вірусу саркоми Рауса і промотора гена цитоскелета.

7. Вакцина за п. 6, яка **відрізняється** тим, що промотором є промотор CMV-IE.

8. Спосіб вакцинації свиней, що передбачає введення вказаній свині свинячої вакцини, вибраної з групи, що складається з цільної живої вакцини, цільної інактивованої вакцини, субодиничної вакцини і рекомбінантної вакцини; і далі введення вказаній свині вакцини за п. 1.

9. Спосіб вакцинації свиней, що передбачає введення вказаній свині вакцини за п. 1.

10. Набір, що містить (i) вакцину за п. 1 і (ii) свинячу вакцину, вибрану з групи, що складається з цільної живої вакцини, цільної інактивованої вакцини, субодиничної вакцини і рекомбінантної вакцини.

Даний винахід стосується формули вакцини, що дозволяє, зокрема, проводити вакцинацію свиней проти респіраторних патологій і патологій ре-

продукції. Він також стосується відповідної методики вакцинації.

Протягом останніх десятиліть відбулася фундаментальна зміна методів розведення свиней.

(19) UA (11) 77935 (13) C2

Загального поширення набуло інтенсивне розведення в закритому просторі, і як наслідок, драматичний розвиток респіраторних патологій.

Симптоми респіраторних патологій свиней звичайно об'єднують під комплексною назвою респіраторного захворювання свиней, із чого випливає велика різноманітність патогенних агентів, що включають як віруси, так і бактерії і мікоплазми. Головними агентами, що викликають респіраторні порушення, є *Actinobacillus pleuropneumoniae*, вірус безплідності і респіраторного синдрому (PRRS), що також називають вірусом таємничої хвороби, вірус хвороби Аujeszку (PRV) і вірус грипу свиней.

Інші віруси викликають порушення репродуктивної функції, що виявляються у виді викиднів, муміфікації зародків і безплідності. Основними з таких вірусів є PRRS, парвовірус і вірус класичної чуми свиней (HCV). Крім того, такі порушення можуть викликати віруси PRV, грипу свиней і *A. Pleuropneumoniae*. Смертність можлива у випадку *A. Pleuropneumoniae*, HCV і PRV.

Крім цього, у респіраторному комплексі свиней дуже важливе значення мають взаємодії між мікроорганізмами. Дійсно, велика частина патогенних бактерій складає звичайну мікрофлору носоглоткових зон і мигдалини молодшої тварини. Ці патогени виділяються свиноматкою і часто вдихаються поросятами в перші години життя, коли колостральний імунітет ще не ефективний. Організми, що живуть у верхніх відділах дихальних шляхів можуть поширюватися в нижні відділи, якщо захисні механізми дихальної системи ослаблені впливом попереднього агента, такого як *Actinobacillus pleuropneumoniae* або віруси. Інвазія в легені може бути дуже швидкою, зокрема, якщо попередніми патогенами є такі, як *Actinobacillus pleuropneumoniae*, що виділяють сильні цитотоксини, здатні викликати ушкодження війок клітин дихального епітелію і альвеолярних макрофагів.

Важливі вірусні інфекції, такі як грип, респіраторні коронавірусні інфекції і вірус Аujeszку, можуть відігравати роль у патогенезі респіраторного комплексу разом із бактеріями респіраторного тропізму і мікоплазмами.

Нарешті, деякі агенти впливають одночасно на дихальну і на репродуктивну системи. Також можуть відбуватися взаємодії в плані патологій репродукції. Необхідно, отже, подбати про налагодження ефективних превентивних методів проти головних патогенних агентів, що викликають респіраторні патології репродукції свиней.

Сполучення, які розроблені до цього часу, були одержані на основі інактивованих вакцин або живих вакцин і, у деяких випадках, сумішей таких вакцин. При їхньому застосуванні виникають проблем сумісності валентностей і стабільності. Так, потрібно забезпечити одночасно сумісність різних валентностей вакцини, як по відношенню різних антигенів, що використовуються, так і по відношенню самих сумішей, зокрема, якщо використовують разом інактивовані вакцини і живі вакцини. Також виникає проблема зберігання таких комбінованих вакцин і їхньої нешкідливості, зокрема, у присутності добавок. Ці вакцини звичайно досить дорогі. У заявках WO-A-9011092, WO-A-9319183,

WO-A-9421997 і WO-A-9520660 описане використання нещодавно розробленої технології полінуклеотидних вакцин. Відомо, що в цих вакцинах використовують плазмиду, що забезпечує в клітинах хазяїна експресію вбудованого антигена. Були запропоновані всі шляхи введення (внутрішньобрюшинний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, підшкірний, внутрішньошкірний, через слизову і т.д.). Також можуть бути використані різні засоби вакцинації, такі як ДНК, що вміщена на поверхню часток золота і розпорошується таким чином, що вона проникає в шкіру тварини [Tang і ін., Nature 356, 152-154, 1992], і рідиннострумінні упорскувачі, що дозволяють здійснити трансфекцію одночасно в шкіру, у м'язи, у жирові тканини і у тканині молочної залози [Furth і ін., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992].

У полінуклеотидних вакцинах можна використовувати як неодагнені ДНК, так і ДНК, наприклад, у складі ліпосом і катіонних ліпідів.

[M-F Le Potier і ін. (Second International Symposium on the Eradication of Aujeszky's Disease (pseudo rabies) Virus August 6th to 8th 1995 Copenhagen, Denmark) і M. Monteil і ін. (Наукові дні Кафедри Патології тварин. INRA-ENV. Ліонська Державна Ветеринарна школа. 13-14 грудня 1994. Ліон, Франція)] здійснили спробу вакцинації свиней проти вірусу хвороби Аujeszку за допомогою плазмиди, що забезпечує експресію гена gD під контролем сильного промотору, пізнього мажорного промотору аденовірусу типу 2. Незважаючи на хороший рівень антитільної відповіді, не було виявлено встановлення захисту. Однак, гарні результати у відношенні захисту були зафіксовані після зараження свиней рекомбінантним аденовірусом, в який був вбудований ген gD і той же промотор, що доводить, що наявність глікопротеїну gD достатньо для встановлення захисту у свиней.

Практика минулого не дала ніяких результатів у відношенні встановлення захисту у свиней методом полінуклеотидної вакцинації.

Завданням винаходу є розробка формули полівалентної вакцини, що дозволяє здійснити вакцинацію свиней проти певного числа патогенних агентів, що викликають, зокрема, респіраторні патології і/або патології репродукції. Іншою метою винаходу є розробка такої формули вакцини, що сполучить різні валентності, при збереженні всіх необхідних критеріїв сумісності і стабільності валентностей.

Іншою метою винаходу є розробка такої формули вакцини, що дозволяє сполучити різні валентності в одному носії. Іншою метою винаходу є розробка такої формули вакцини, яка була б простір в застосуванні і не була б дорогою.

Ще одною метою винаходу є розробка формули вакцини і методики вакцинації свиней, яка дозволяє домогтися встановлення вискоєфективного довгострокового захисту, у т.ч. полівалентного, при нешкідливості і відсутності відходів. Таким чином, об'єктом винаходу є формула вакцини, зокрема, проти респіраторних патологій і/або патологій репродукції свиней, що включає щонайменше 3 валентності полінуклеотидної вакцини, кожна з яких включає плазмиду, що містить і (забезпечує його експресію *in vivo* в клітинах хазя-

їна) ген однієї валентності патогена свиней, причому ці валентності обирають із групи, представленої вірусом хвороби Ауєсзку (вірус PRV або псевдосказу і вірусом грипу свиней (SIV), вірусом таємничої хвороби свиней (вірус PRRS), вірусом парвовірозу (вірус PRV), вірусом класичної чуми свиней (вірус HCV або Hog Cholera virus) і бактерією, що викликає актинобацильоз (*A. pleuropneumoniae*), а плазмиди містять для кожної валентності один або декілька генів, обраних із групи, поданої gB і gD для вірусу хвороби Ауєсзку, HA, NP, N для вірусу грипу свиней, ORFS (E), ORF3, ORF 6 (M) для вірусу PRRS, VP2 для вірусу парвовірозу, E1, E2 для вірусу класичної чуми свиней і arxI, arxII і arxIII для *A. pleuropneumoniae*.

Під валентністю в рамках цього винаходу розуміють щонайменше один антиген, що забезпечує захист проти вірусу розглянутого патогена, причому валентність може містити в якості підвалентності один або декілька змінених природних генів одного або декількох штамів розглянутого патогена. Під геном патогенного агента розуміють не тільки повний ген, але і різні нуклеотидні послідовності, включаючи фрагменти, що зберігають здатність індукувати захисну відповідь.

У поняття гена входять нуклеотидні послідовності, еквівалентні в точності описаним у прикладах, тобто різні, але не кодуєчі один і той самий протеїн послідовності. У нього також входять нуклеотидні послідовності інших штамів розглянутого патогена, що забезпечують перехресний захист або специфічний захист від штамів або групи штамів. В нього також входять нуклеотидні послідовності, що були змінені для полегшення експресії *in vivo* в організмі тваринного хазяїна, але кодуєчі той же протеїн.

Краще, формула вакцини за винаходом включає валентності Ауєсзку і грипу свиней до яких можуть бути додані інші валентності, обрані, переважно, із валентностей PRRS і *A. pleuropneumoniae* (актинобацильоз). Можна додати інші валентності, обрані і валентностей парвовірозу і класичної чуми свиней.

Можливі, зрозуміло, усі комбінації валентностей. Однак, у рамках винаходу, перевагу віддають валентностям Ауєсзку і грипу свиней, вірусу PRRS і *A. pleuropneumoniae*. Для вакцинації, спрямованої більш конкретно проти респіраторних патологій у свиней, перевагу при виборі валентностей віддають Ауєсзку, грипу свиней, PRRS і актинобацильозу.

Для вакцинації, спрямованої конкретно проти патологій репродукції, валентності вибирають, переважно, із PRRS, парвовірозу, класичної чуми свиней і Ауєсзку. У відношенні валентності Ауєсзку можна використовувати один із генів gB і gD. Краще, використовують обидва гени, які у цьому випадку, вбудовують у різні плазмиди або в одну плазмиду.

У відношенні валентності грипу свиней, використовують, переважно, гени HA і NP. Можна використовувати один із цих двох генів або обидва гени одночасно, вбудовані в різні плазмиди або в одну плазмиду. Переважно, в одній вакцині сполучають послідовності HA більше одного штаму ві-

русу грипу, зокрема, штамів, що зустрічаються в даній місцевості. На відміну від цього, NP забезпечує перехресний захист і, отже, можна обмежитися використанням послідовності одного єдиного штаму вірусу.

У відношенні валентності PRRS використовують, переважно, гени E і ORF3 або, також, M. Можна використовувати ці гени окремо або в комбінації; у випадку комбінації, гени можна вбудовувати в окремі плазмиди або в плазмиди, що комбінують два або три з цих генів. Вигідно використовувати в одній вакцині гени, що походять від принаймні двох штамів, зокрема, від одного європейського штаму і від одного американського штаму.

У відношенні валентності класичної чуми свиней можна використовувати один із генів E1 і E2 або гени E1 і E2 разом. В двох різних плазмидіах або, можливо, в одній плазмиді. У відношенні валентності актинобацильозу, можна використовувати один із трьох вище названих генів або комбінацію 2 або 3 із цих генів, у різних плазмидіах або в складі змішаних плазмід, щоб забезпечити захист проти різних серотипів *A. Pleuropneumoniae*. В антигенах arx I, II і III можна змінити кодуєчі послідовності, щоб одержати нетоксичні антигени, зокрема, як зазначено в прикладах.

Об'єм дози формули вакцини за винаходом може складати, у цілому, від 0,1 до 10мл, і зокрема, від 1 до 5мл для вакцинації при внутрішньом'язовому введенні.

Доза складає від 10нг до 1мг, краще, від 100нг до 500мкг, ще краще - від 1мкг до 250мкг на кожний тип плазмиди.

Використовують, краще, неодягнені плазмиди, просто вміщені у вакцинуючий носій, яким звичайно є фізіологічний розчин (0,9% NaCl), ультрарозведена вода, буфер TE і т.п. Можна використовувати, зрозуміло, будь-які форми полінуклеотидних вакцин, описані в практиці минулого.

Кожна плазмиди містить промотор, здатний забезпечити експресію залежного від нього гена в клітинах хазяїна. Таким промотором є сильний еукаріотичний промотор, і зокрема, ранній промотор цитомегаловірусу CMV-IE, що походить від людини або миші, або, можливо, від іншої тварини, такої як пацюк, свиня, морська свинка.

Загалом, промотор може бути як вірусного, так і клітинного походження. У якості вірусного промотора можна назвати ранній або пізній промотор вірусу SV 40 або промотор LTR вірусу Саркоми Руса. Це може бути також промотор вірусу, від якого походить ген. наприклад, власний промотор гена.

У якості клітинного промотору можна назвати промотор гена цитоскелету, наприклад, промотор десміну [Bolmont і ін., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122; і ZHENLIN і ін., GENE, 1989, 78, 243-254] або промотор актину. Якщо одна плазмиди містить декілька генів, вони можуть знаходитися в одній одиниці транскрипції або в двох різних одиницях. Комбінація різних валентностей вакцини за винаходом може бути отримана, переважно, змішуванням полінуклеотидних плазмід, що забезпечують експресію одного або декількох антигенів кожної ва-

лентності. але можна також здійснити експресію антигенів декількох валентностей за допомогою однієї плазмиди.

Ще одним об'єктом винаходу є формули одновалентної вакцини, що включають одну або декілька плазмід, що кодують один або декілька генів одного з вірусів, обраних із групи, поданої PRV, PRRS, PPV, HCV і A. Pleuropneumoniae, причому гени такі, як описано вище. За винятком одновалентного характеру, ці формули можуть мати вище перераховані характеристики в тому, що стосується вибору генів, їхніх комбінацій, композицій плазмід, об'ємів доз, доз і т.д. Формули одновалентної вакцини можуть бути використані (i) для одержання формули полівалентної вакцини, як вона описана вище, (ii) в індивідуальному порядку, проти конкретної патології, (iii) в сполученні з вакциною іншого типу (суцільною живою або інактивованою, рекомбінантною, субодиночній), проти іншої патології або (iv) у якості вторинної вакцини після вакцини, описаної нижче. Дійсно, ще одним об'єктом цього винаходу є використання однієї або декількох плазмід за винаходом для одержання вакцини, призначеної для вакцинації свиней, первинновакцинованих за допомогою першої, звичайної, вакцини з числа тих, що використовувалися в практиці минулого, а саме, обраної з групи, представленої цілісною живою вакциною, цілісною інактивованою вакциною, субодиночною вакциною рекомбінантною вакциною, причому ця перша вакцина (одновалентна або полівалентна) несе (тобто містить або забезпечує його експресію) один або декілька антигенів, що кодуються однією або декількома використовуваними плазмідами, або антигенів, що забезпечують перехресний захист. Заслуговує на увагу той факт, що полінуклеотидна вакцина спричиняє сильну дію в якості вторинної вакцини, що виявляється в посиленні імунної відповіді і у встановленні довгострокового імунітету.

В цілому, вакцини для первинної вакцинації можуть бути обрані з числа вакцин, запропонованих для продажу різними виробниками ветеринарних вакцин. Ще одним об'єктом винаходу є набір для вакцинації, у який входять вакцина для первинної вакцинації, як вона описана вище, і формула вакцини за винаходом для використання в якості вторинної вакцини. Винахід також стосується формули вакцини за винаходом з прикладеною до неї інструкцією, у якій зазначене використання цієї формули для вторинної вакцинації після первинної вакцинації як вона описана вище.

Також об'єктом цього винаходу є методика вакцинації свиней проти респіраторних патологій і/або репродукції свиней, що включає введення ефективної дози формули вакцини як вона описана вище. Ця методика вакцинації включає введення однієї або декількох доз формули вакцини, причому ці дози можуть бути введені послідовно через короткі проміжки часу і/або послідовно через тривалі проміжки часу.

Формули вакцини за винаходом можуть бути введені, у рамках даної методики вакцинації, різними шляхами введення, запропонованими в практиці минулого для полінуклеотидної вакцинації, і за допомогою будь-якої відомої техніки введення. Зокрема, можна використовувати вакцина-

цію внутрішньошкірним шляхом за допомогою рідкострумінного, краще, багатострумінного упорскувача, і зокрема, упорскувача 5 упорскуючою насадкою, що має декілька отворів, зокрема, від 5 до 6 отворів, як в апарат і Pigjet що випускається компанією Endoscopic, Laons, Франція. Об'єм дози при використанні такого апарату складає, переважно, від 0,1 до 0,9мл, зокрема, від 0,2 до 0,6мл, краще, від 0,4 до 0,5мл, причому даний об'єм може бути введений за один або декілька разів, переважно, за два рази.

Нарешті, об'єктом винаходу є методика вакцинації, що полягає в тому, що проводять первинну вакцинацію, як вона описана вище і вторинну вакцинацію формулою вакцини за винаходом. Відповідно до кращої форми здійснення способу за винаходом, спочатку тварині вводять ефективну дозу вакцини класичного типу, зокрема, інактивовану, живу, ослаблену або рекомбінантну, або субодиночну вакцину таким чином, щоб забезпечити первинну вакцинацію, і, через, переважно, 2-6 тижнів, вводять полівалентну або одновалентну вакцину за винаходом.

Винахід також стосується методики одержання формул вакцини, а саме, до одержання валентностей і їхніх сумішей, як випливає з даного опису.

Далі іде більш детальний опис винаходу за допомогою способів здійснення винаходу з посиланням на малюнки додатку.

Фігура №1: Плазміда pVR1012

Фігура №2: Послідовність гена PRV gB (штам NIA3)

Фігура №3: Конструкція плазмиди pAB090

Фігура №4: Послідовність гена PRV g (штам NIA3)

Фігура №5: Конструкція плазмиди pPB098

Фігура №6: Послідовність гена грип свиней HA (штам H1 N1)

Фігура №7: Конструкція плазмиди pPB143

Фігура №8: Послідовність гена грип свиней NP (штам H1 N1)

Фігура №9: Конструкція плазмиди pPB142

Фігура №10: Послідовність гена грип свиней HA (штам H3 N2)

Фігура №11: Конструкція плазмиди pPB144

Фігура №12: Послідовність гена грип свиней NP (штам H3 N2)

Фігура №13: Конструкція плазмиди pPB132

Фігура №14: Плазміда pAB025

Фігура №15: Плазміда pAB001

Фігура №16: Плазміда pAB091

Фігура №17: Плазміда pAB092

Фігура №18: Плазміда pAB004

Фігура №19: Плазміда pAB069

Фігура №20: Плазміда pAB061

Фігура №21: Плазміда pPB162

Фігура №22: Плазміда pPB163

Фігура №23: Плазміда pPB174

Фігура №24: Плазміда pPB189

Фігура №25: Плазміда pPB190

Список послідовностей SEQ ID No

SEQ ID №1: Послідовність гена PRV gB (штам NIA3)

SEQ ID №2: Олігонуклеотид AB166

SEQ ID №3: Олігонуклеотид AB167

SEQ ID №4: Олігонуклеотид AB168

- SEQ ID №5: Олігонуклеотид AB169
 SEQ ID №6: Послідовність гена PRV gD (штам NIA3)
 SEQ ID №7: Олігонуклеотид PB101
 SEQ ID №8: Олігонуклеотид PB102
 SEQ ID №9: Олігонуклеотид pB107
 SEQ ID №10: Олігонуклеотид PB108
 SEQ ID №11: Послідовність гена грип свиней HA (штам H1N1)
 SEQ ID №12: Олігонуклеотид PB097
 SEQ ID №13: Олігонуклеотид PB098
 SEQ ID №14: Послідовність гена грип свиней NP (штам H1N1)
 SEQ ID №15: Олігонуклеотид PB095
 SEQ ID №16: Олігонуклеотид PB096
 SEQ ID №17: Послідовність гена грип свиней HA (штам H3N2)
 SEQ ID №18: Послідовність гена грип свиней NP (штам H3N2)
 SEQ ID №19: Олігонуклеотид AB055
 SEQ ID №20: Олігонуклеотид AB056
 SEQ ID №21: Олігонуклеотид AB001
 SEQ ID №22: Олігонуклеотид AB002
 SEQ ID №23: Олігонуклеотид AB170
 SEQ ID №24: Олігонуклеотид AB171
 SEQ ID №25: Олігонуклеотид AB172
 SEQ ID №26: Олігонуклеотид AB173
 SEQ ID №27: Олігонуклеотид AB007
 SEQ ID №28: Олігонуклеотид ABO10
 SEQ ID №29: Олігонуклеотид AB126
 SEQ ID №30: Олігонуклеотид AB127
 SEQ ID №31: Олігонуклеотид AB118
 SEQ ID №32: Олігонуклеотид AB119
 SEQ ID №33: Олігонуклеотид PB174
 SEQ ID №34: Олігонуклеотид PB189
 SEQ ID №35: Олігонуклеотид PB190
 SEQ ID №36: Олігонуклеотид PB175
 SEQ ID №37: Олігонуклеотид PB176
 SEQ ID №38: Олігонуклеотид PB191
 SEQ ID №39: Олігонуклеотид PB192
 SEQ ID №40: Олігонуклеотид PB177
 SEQ ID №41: Олігонуклеотид PB278
 SEQ ID №42: Олігонуклеотид PB279
 SEQ ID №43: Олігонуклеотид PB280
 SEQ ID №44: Олігонуклеотид PB307
 SEQ ID №45: Олігонуклеотид PB303
 SEQ ID №46: Олігонуклеотид PB306
 SEQ ID №47: Олігонуклеотид PB304
 SEQ ID №48: Олігонуклеотид PB305

Приклади

Приклад 1: Культура вірусів

Віруси культивують на відповідній системі клітин до прояву цитопатичного ефекту. Системи клітин, що використовуються для кожного вірусу, добре відомі фахівцям. Коротко кажучи, клітини, чутливі до використаного вірусу, що культивуються в мінімальному необхідному середовищі Ігла (середовище «MEM») або в іншому відповідному середовищі, заражають досліджуваним вірусним штамом, використовуючи множинність зараження 1. Інфіковані клітини інкубують при 37°C протягом часу, що необхідний для прояву повного цитопатичного ефекту (у середньому 36 годин).

Приклад 2: Культура бактерій і екстракція бактеріальної ДНК

Штами *Actinobacillus pleuropneumoniae* культи-

вують як описано ARycroft і ін. [J. Gen. Microbiol. 1991, 137, 561-568]. ДНК із великою молекулярною масою (хромосомна ДНК) була отримана за стандартними технологіями, описаними J.Sambrook і ін. [Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2 видання. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor .New York. 1989].

Приклад 3: Екстракція геномних вірусних ДНК

Після культивування, збирають зруйновані клітки і їхні плаваючі на поверхні уламки, вірусну суспензію центрифугують при 1000g і +4°C протягом 10 хвилин, щоб видалити уламки клітин. Вірусні частинки осаджують ультрацентрифугуванням при 400000g і +4°C протягом 1 години. Осад збирають у мінімальному об'ємі буферу (Tris 10mM, EDTA 1mM; pH 8,0). Цю концентровану вірусну суспензію обробляють протеїназою K (100мкг/мл кінц.) в присутності натрійдодецилсульфату (SDS) (0,5% кінц.) протягом 2 годин при 37°C. Потім вірусну ДНК екстрагують сумішшю фенол/ хлороформ, потім преципітують 2 об'ємами абсолютного етанолу. Через ніч при -20°C, ДНК центрифугують при 10000g і +4°C протягом 15 хвилин. Осаджену ДНК висушують, потім збирають у мінімальному об'ємі стерильної ультрачистої води. Після цього вона може бути розщеплена рестрикційними ферментами.

Приклад 4: Ізолювання геномних вірусних РНК

Віруси, що містять РНК, очищали за добре відомими фахівцям технологіями. Потім ізолювали РНК геному кожного вірусу, використовуючи техніку екстракції «тіоціонат гуанідію/фенолхлороформ», що описана [P.Chomczynski і N.Sacchi (Anal.Biochem. 1987, 162, 156-159)].

Приклад 5: Технології молекулярної біології

Всі плазмідні конструкції були отримані з використанням стандартних технологій молекулярної біології, описаних [J. Sambrook і ін. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2 видання. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor New York. 1989)]. Усі рестрикційні фрагменти, що були використані в цьому винаході, ізолювали, використовуючи набір Gene-clean (BIO 101 Inc. La Jolla. CA).

Приклад 6: Технологія RT-PCR

Специфічні олігонуклеотиди (що містять на своїх 5'кінцях сайти рестрикції для полегшення клонування розширених фрагментів) були синтезовані таким чином, що вони цілком охоплюють кодуючі ділянки генів, які повинні бути розширені (див. Специфічні приклади). Реакцію зворотної транскрипції (RT) і розширення в ланцюзі полімераза (PCR) проводили за стандартними технологіями [J. Sambrook (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2 видання. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor . New York. 1989)]. Кожну реакцію RT-PCR проводили з парою специфічних амплімерів, використовуючи в якості матриці екстраговану геномну вірусну РНК. Розширену комплементарну ДНК екстрагували сумішшю фенол/хлороформ/ізоаміловий спирт (25:24:1) перед розщепленням рестрикційними ферментами.

Приклад 7: Плазміда pVR1012

Плазміда pVR1012 (Фігура №1) була отримана при Vical Inc. San Diedo, CA. USA. Її конструкція була описана в [J.Hartikka і ін. (Human Gene

Therapy. 1996, 7, 1205-1217)].

Приклад 8: Конструювання плазмиди pAB090 (ген PRV gB)

Плазмиду pPR 2.15 [M.Riviere і ін. J.Virol. 1992. 66. 3424-3434] розщепили за допомогою AраI і NaeI, щоб визволити фрагмент AраI-NaeI (2665 pb) (фрагмент А), що містить ген, кодуючий глікопротеїн gB вірусу хвороби Ауїєзку (Штам NIA3) (Фігура №2 і SEQ ID No 1).

Гібридизацією наступних 2 олігонуклеотидів:

AB166 (33 mer) (SEQ ID №2)

5'GATGCCCGCTGGTGGCGGTCTTTGGCGCG GGCC 3'

AB167 (33 mer) (SEQ ID №3)

5'ACGTCTACGGGCGACACCGCCAGAAACC GCGC 3'

фрагмент (33 pb), що містить послідовність гена gD, від ініціального кодону ATG до сайту AраI, був перетворений з утворенням сайту PstI на 5' (фрагмент В).

Гібридизацією наступних 2 олігонуклеотидів:

AB168 (45 mer) (SEQ ID №4)

5'GGCACTACCAGCGCCTCGAGAGCGAGGAC CCCGACGCCCTGTAGG 3'

AB169 (49 mer) (SEQ ID №5)

5'GATCCCTACAGGCGCTCGGGGTCCTCGCT CTCGAGGCGCTGGTAGTGCC 3'

фрагмент (45 pb), що містить послідовність гена gD, від сайту NaeI до стопуючого кодона TAG був перетворений з утворенням сайту BamHI на 3' (фрагмент С). Фрагменти А, В і С разом зшили з вектором pVR1012 (приклад 7, попередньо розщепленим за допомогою PstI і BamHI, і одержали плазмиду pAB090 (7603 pb) (Фігура №3).

Приклад 9: Конструювання плазмиди pPB098 (ген PRV gD)

Плазмиду pPR29 [M.Riviere і ін. J.Virol. 1992, 66, 3424-3434] розщепили за допомогою SalI і BglII, щоб визволити фрагмент SalI-BglII (711 pb) (фрагмент А), що містить 3'-кінець гена, що кодує глікопротеїн gD вірусу хвороби Ауїєзку (Штам NIA3) (Фігура №4 і SEQ ID No 6).

Плазмиду pPR29 розщепили за допомогою Eco47III і SalI, щоб визволити фрагмент Eco47III-SalI (498 pb), що містить 5'-кінець гена, що кодує глікопротеїн gD вірусу хвороби Ауїєзку (Штам NIA3) (фрагмент В).

Гібридизацією наступних 2 олігонуклеотидів:

PB101 (15 mer) (SEQ ID №7)

5'GATGCTGCTCGCAGC 3'

PB102 (19 mer) (SEQ ID №8)

5'GCTGCGAGCAGCATCTGCA 3'

фрагмент (55 pb), що містить послідовність 5' гена gD, від ініціального кодону ATG до сайту Eco47III, був перетворений з утворенням сайту PstI на 5' (фрагмент С). Після очищення, фрагменти А, В і С разом були зшиті з вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою PstI і BglII, і одержали плазмиду pPB098 (6076 pb) (Фігура №5).

Приклад 10: Конструювання плазмиди pPB143 (ген Грипу свиней НА штам H1N1)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з РНК геному вірусу грипу свиней (штам SIV HINI «SW»), отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотида-

ми:

PB107 (32mer) (SEQ ID №9)

5'GTTCTGCAGCACCCGGGAGCAAAAGCAGGGGA 3'

PB108 (33 mer) (SEQ ID №10)

5'ATTGCGGCCGCTAGTAGAAACAAGGGTGT TTTT 3'

щоб точно ізолювати ген, який кодує протеїн НА вірусу SIV HINI (фігура №6 і SEQ ID N 11), у формі фрагменту PCR (1803 pb). Після очищення, цей фрагмент зшили з вектором PCRII-прямої (Інвітроген №K2000-01), щоб одержати вектор pPB137 (5755 pb). Вектор pPB137 розщепили за допомогою EcoRV і NotI, щоб визволити фрагмент EcoRV-NotI (1820 pb), що містить ген НА. Потім цей фрагмент зшили з вектором PVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою EcoRVh NotI, і одержали плазмиду pPB 143 (6726 pb) (фігура №7).

Приклад 11: Конструювання плазмиди pPB142 (ген Грипу свиней NP штам H1N1)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR із РНК геному вірусу грипу свиней (штам S1Y HIM «SW»), отриманої за технологією, описаною в прикладі 4, і такими олігонуклеотидами:

PS097 (36 mer) (SEQ ID №12)

5'CCGGTCGACCGGGATAATCACTCACTGAGTGA CATC 3'

PB098 (33 mer) (SEQ ID №13)

5'TTGCGGCCGCTGTAGAAACAAGGGTATTTTCT 3'

щоб точно ізолювати ген, який кодує протеїн NP SIV HINI (фігура №8 SEQ ID №14), у формі фрагменту SalI-NotI. Після очищення, продукт RT-PCR (1566 pb) зшили з вектором PCRII-прямої (Інвітроген №K2000-01), щоб одержати вектор pPB127 (5519 pb). Вектор pPB127 розщепили за допомогою SalI і NotI, щоб визволити фрагмент SalI-Notf (1560 pb), що містить ген NP.

Потім цей фрагмент зшили з вектором pVB.1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою SalI і NotI, і одержали плазмиду pPB142 (6451 pb) (фігура №9).

Приклад 12: Конструювання плазмиди pPB144 (ген грипу свиней НА штам H3N2)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з РНК геному вірусу грипу свиней (штам SIV H3N2 Cotes du Nord 1987), отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

P9095 (31 mer) (SEQ ID №15)

5'GTTCTGCAGGCAGGGGATAATCTATCAACC 3'

PB096 (36 mer) (SEQ ID №16)

5'TTGCGGCCGCAAGGGTGT TTTTAATTACTAATAT AC 3'

щоб точно ізолювати ген, який кодує протеїн НА вірусу SIV H3N2 (Фігура №10 і SEQ ID №17), у формі фрагменту PstI-NotI. Після очищення, продукт RT-PCR (1765 pb) зшили з вектором PCRII-прямої (Інвітроген №K2000-01), щоб одержати вектор pPB120 (5716 pb).

Вектор pPB120 розщепили за допомогою NotI, щоб визволити фрагмент NotI-NotI (1797 pb), що містить ген НА. Потім цей фрагмент зшили з вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою NotI, і одержали плазмиду

pPB144 (6712pb), що містить ген HA H3N2 у нормальній орієнтації в порівнянні з промотором (Фіг. №11).

Приклад 13: Конструювання плазмиди pPB132 (ген грипу свиней NP штам H3N2)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з PHK геному вірусу грипу свиней (штам SIV H3N2 Cotes du Nord 1987), що отримана за технологією, описаною в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

PB097 (36 mer) (SEQ ID №12)
5'CCGGTCGACCGGGATAATCACTCACTGAGTGA
CATC 3'

PB098 (33 mer) (SEQ ID №13)
5'TTGCGGCGCGCTGTAGAAACAGGGTATTTTCT
3'

щоб точно ізолювати ген, що кодує протеїн NP вірусу SIV H3N2 (Фігура №12 і SEQ ID №18), в формі фрагменту Sall-NotI. Після очищення, продукт RT-PCR (1564 pb) зшили з вектором PCRII-прямої (Інвітроген №K2000-01), щоб одержати вектор pPB123 (5485 pb). Вектор pPB123 розщепили за допомогою Sall і NotI, щоб визволити фрагмент Sall і NotI (1558 pb), що містить ген NP. Потім цей фрагмент зшили з вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою Sall і NotI, і одержали плазмиду pPB132 (6449 pb) (фігура №13).

Приклад 14: Конструювання плазмиди pAB025 (ген PRRSV ORF5) штам Leiystad

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з PHK геному вірусу PRRSV (штам Leiystad) [J.Meulenberg і ін. Virology. 1993, 19, 62-72], отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

AB055 (34 mer) (SEQ ID №19)
5'ACGCGTCGACAATATGAGATGTTCTCACAAATT
G 3'

AB056 (33 mer) (SEQ ID №20)
5'CGCGGATCCCGTCTAGGCCTCCCATTTGCTCAG
C 3'

щоб точно ізолювати ген «ORF5», що кодує глікопротеїн оболонки E (gp25) вірусу PRRS штаму Leiystad. Після очищення, продукт RT-PCR (630 pb) розщепили за допомогою Sall і BamHI, щоб ізолювати фрагмент Sall-BamHI (617 pb). Цей фрагмент зшили з вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою Sall і BamHI, і одержали плазмиду pDB025 (5486 pb) (фігура №14).

Приклад 15: Конструювання плазмиди pAB001 PRRSV ORF5 штам USA

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з PHK геному вірусу PRRSV (штам ATCC-VR2332) [M.Murtaugh і ін. Arch. Virol. 1995, 140, 1451-1460], отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

AB001 (30 mer) (SEQ ID №21)
5'AAGTGCAGATGTTGGAGAAATGCTTGACCG 3'

AB002 (30 mer) (SEQ ID №22)

5'CGGGATCCCTAAGGACGACCCCATTTGTTCC 3'

щоб точно ізолювати ген, що кодує оболонковий глікопротеїн E (gp25) вірусу PRRS штаму ATCC-VR2332. Після очищення, продукт RT-PCR (620 pb) розщепили за допомогою PstI і BamHI,

щоб ізолювати фрагмент PstI-BamHI (606 pb). Цей фрагмент зшили з вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою PstI і BamHI, і одержали плазмиду pAB001 (5463 pb) (фігура №15).

Приклад 16: Конструювання плазмиди pAB091 (ген PRRSV ORF3 штам Leiystad)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з PHK геному вірусу PRRSV (штам Leiystad) [J. Meulenberg і ін. Virology, 1993, 19, 62-72], отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

AB170 (32 mer) (SEQ ID №23)
5'AAACTGCAGCAATGGCTCATCAGTGTGCACGC
3'

AB171 (30 mer) (SEQ ID №24)
5'CGCGGATCCTTATCGTGATGTACTGGGGA 3'

щоб точно ізолювати ген «ORF3», що кодує оболонковий глікопротеїн (gp45) вірусу PRRS штаму Leiystad. Після очищення, продукт RT-PCR (818 pb) розщепили за допомогою PstI і BamHI, щоб ізолювати фрагмент PstI-BamHI (802 pb). Цей фрагмент зшили з вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою PstI і BamHI, і одержали плазмиду pAB091 (5660 pb) (фігура №16).

Приклад 17: Конструювання плазмиди pAB092 (ген PRRSV ORF3 штам USA)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з PHK геному вірусу PRRSV (штам ATCC-VR2332) [M.Murtaugh і ін. Arch. Virol. 1995, 140, 1451-1460], отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

AB172 (32 mer) (SEQ ID №25)
5AAACTGCAGCAATGGTTAATAGCTGTACATTC 3'

AB173 (32 mer) (SEQ ID №26)
5'CGCGGATCCCTATCGCCGTACGGCACTGAGGG
3'

щоб точно ізолювати ген ORF3, що кодує оболонковий глікопротеїн (gp45) вірусу PRRS штаму ATCC-VR2332. Після очищення, продукт RT-PCR (785 pb) розщепили за допомогою PstI і BamHI, щоб ізолювати фрагмент PstI-BamHI (769 pb). Цей фрагмент зшили з вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою PstI і BamHI, і одержали плазмиду pAB092 (5627 pb) (фігура №17).

Приклад 18: Конструювання плазмиди pAB004 (ген парвовірусу свиней VP2)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з PHK геному парвовірусу свиней (штам NADL2) [J. Vasudevacharya і ін. Virology. 1995, 178, 611-616], отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

AB007 (33 mer) (SEQ ID №27)
5'AAACTGCAGCAATGAGTGAAATGTGGAAC
AAC 3'

ABO 10 (33 mer) (SEQ ID №28)
5'CGCGGATCCCTAGTATAATTTTCTTGGTATA
AG 3'

щоб розширити фрагмент (1757 pb), що містить ген, що кодує протеїн VP2 парвовірусу свиней. Після очищення, продукт RT-PCR розщепили за допомогою PstI і BamHI, щоб ізолювати фрагмент PstI-BamHI (1740 pb). Цей фрагмент зшили з вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо роз-

щепленим за допомогою PstI і BamHI, і одержали плазмиду pAB004 (6601 pb) (фігура №18).

Приклад 19: Конструювання плазмиди pAB069 (ген Чуми свиней HCVE1)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з РНК геному вірусу чуми свиней (Hog Cholera Virus) (HCV) (Штам Alfort) [G. Meyers і ін. Virology. 1989, 171, 18-27], отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

A3126 (36 mer) (SEQ ID №29)

5'ACGCGTCGACATGAACTAGAAAAAGCCCTGTTGGC 3'

AB127 (34 mer) (SEQ ID №30)

5'CGCGGATCCTCATAGCCGCCCTTGTGCCCCGGTC 3'

щоб ізолювати послідовність, що кодує протеїн E1 вірусу HCV, у формі фрагмента RT-PCR (1364 pb). Після очищення, цей фрагмент розщепили за допомогою BamHI і Sall, щоб одержати фрагмент Sall-BamHI (1349 pb). Цей фрагмент зшили з вектором pVR.1012 (приклад 7), попередньо за допомогою BamHI і Sall, і одержали плазмиду pAB069 (6218 pb) (фігура №19).

Приклад 20: Конструювання плазмиди pAB061 (ген Чуми свиней HCVE2)

За технологією з прикладу 6 провели реакцію RT-PCR з РНК геному вірусу чуми свиней (Hog Cholera Virus) (HCV) (Штам Alfort) [G. Meyers і ін. Virology. 1989. 171. 18-27], отриманої за технологією, що описана в прикладі 4, і з такими олігонуклеотидами:

A3118 (36 mer) (SEQ ID №31)

5'ACGCGTCGACATGTCAACTACTGCGTTTCTCATTTG 3'

AB119 (33 mer) (SEQ ID №32)

5'CGCGGATCCTCACTGTAGACCAGCAGCGAGCTG 3'

щоб ізолювати послідовність, що кодує протеїн E2 вірусу HCV, у формі фрагмента RT-PCR (1246 pb). Після очищення, цей фрагмент розщепили за допомогою BamHI і Sall, щоб одержати фрагмент Sall-BamHI (1232 pb). Цей фрагмент зшили з вектором pVR.1012 (приклад 7), попередньо розщеплений за допомогою BamHI і Sall, і одержали плазмиду pAB061 (6101 pb) (фігура №20).

Приклад 21: Конструювання плазмиди pPB162 (ген *Actinobacillus pleuropneumoniae* архI делеційований)

Ген архI (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) був клонований таким чином, щоб мала місце делеція ділянки амінокислот з великим вмістом гліцину (що бере участь у фіксації іона кальцію), який знаходиться між амінокислотами 719 і 846.

Провели реакцію PCR із ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 1) [J. Frey і ін. Infect. Immun. 1991, 59, 3026-3032], отриманої за технологією, що описана в прикладах 2 і 3, і з такими олігонуклеотидами:

PB174 (32 mer) (SEQ ID №33)

5'TTGTCGACGTAAATAGCTAAGGAGACAACATG 3'

PB189 (29 mer) (SEQ ID №34)

5'TTGAATCTTCTTCAACAGAATGTAATTC 3'

щоб розширити частину 5' гена архI, що кодує протеїн гемолізін I (*Actinobacillus*

pleuropneumoniae), у формі фрагменту Sall-EcoRI. Після очищення, продукт PCR (2193 pb) розщепили за допомогою Sall і EcoRI, щоб ізолювати фрагмент Sall-EcoRI (2183 pb) (фрагмент А). Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 1) [J. Frey і ін. Infect. Immun. 1991, 59, 3026-3032] і з наступними олігонуклеотидами:

PB190 (31 mer) (SEQ ID №35)

5'TTGAATCTATCGCTACAGTAAGGAGTACGG 3'

PB175 (31 mer) (SEQ ID №36)

5'TTGGATCCGCTATTTA7CATCTAAAAATAAC 3'

щоб розширити частину 3' гена архI, що кодує протеїн гемолізін I (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), у формі фрагменту EcoRI-BamHI. Після очищення, продукт PCR (576 pb) розщепили за допомогою EcoRI і BaitiHI, щоб ізолювати фрагмент EcoRI-BamHI (566 pb) (фрагмент У). Фрагменти А і В зшили разом із вектором pVR.1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою Sall і BamHI, і одержали плазмиду pPB3162 (7619 pb) (фігура №21).

Приклад 22: Конструювання плазмиди pPB163 (ген *Actinobacillus pleuropneumoniae* архII делеційований)

Ген архII (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) був клонований таким чином, щоб мала місце делеція ділянки амінокислот з великим вмістом гліцину (що бере участь у фіксації іона кальцію), який знаходиться між амінокислотами 716 і 813.

Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 9) [M. Smits і ін. Infection and Immunity. 1991, 59, 4497-4504], отриманої за технологією, що описана в прикладах 2 і 3, і з такими олігонуклеотидами:

PB176 (31 mer) (SEQ ID №37)

5'TTGTGCGACGATCAATTATATAAAGGAGACTC 3'

PB191 (30 mer) (SEQ ID №38)

5'TTGAATTCCTCTTCAACTGATTTGAGTGAG 3'

щоб розширити частину 5' гена архII, що кодує протеїн гемолізін II (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), у формі фрагменту Sall-EcoRI. Після очищення, продукт PCR (2190 pb) розщепили за допомогою Sall і EcoRI, щоб ізолювати фрагмент Sall-EcoRI (2180 pb) (фрагмент А).

Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 9) [M. Smits і ін. Infection and Immunity. 1991, 59, 4497-4504] і з такими олігонуклеотидами:

PB192 (29 mer) (SEQ ID №39)

5'TTGAATTCGTAAATCTTAAAGACCTCACC 3'

PB177 (30 mer) (SEQ ID №40)

5'TTGGATCCACCATAGGATTGCTATGATTTG 3'

щоб розширити частину 3' гена архII, що кодує протеїн гемолізін II (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) у формі фрагменту EcoRI-BamHI. Після очищення, продукт PCR (473 pb) розщепили за допомогою EcoRI і BamHI, щоб ізолювати фрагмент EcoRI-BamHI (463 pb) (фрагмент В). Фрагменти А і В зшили разом із вектором pVR.1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою Sall і BamHI, і одержали плазмиду pPB163 (7513 pb) (фігура №22).

Приклад 23: Конструювання плазмид pPB174', pPB189 і pPB190 (ген *Actinobacillus pleuropneumoniae* архIII делеційований). Перший приклад де-

леції в АрхIII (плазмід рPB174):

Ген архIII (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) був клонований таким чином, щоб мала місце делеція ділянки амінокислот з великим вмістом гліцину (що бере участь у фіксації іона кальцію), який знаходиться між амінокислотами 733 і 860.

Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 8) [M. Smits 1992. № доступу послідовності в Genbank=X68815], отриманої за технологією, що описана в прикладах 2 і 3. і з такими олігонуклеотидами:

PB278 (30 mer) (SEQ ID №41)

5'TTTGTGCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB279 (29 mer) (SEQ ID №42)

5'TTTATCGATTCTTCTACTGAATGTAATTC 3'

щоб розширити частину 5' гена архIII, що кодує протеїн гемолізін III (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), у формі фрагменту Sall-Clal. Після очищення, продукт PCR (2216 pb) розщепили за допомогою Sall і Clal, щоб ізолювати фрагмент Sall-Clal (2205 pb) (фрагмент А). Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 8) [M. Smits 1992. № доступу послідовності в Genbank=X68815], і з такими олігонуклеотидами:

PB280 (33 mer) (SEQ ID №43)

5'TTTATCGATTTATGTTTATCGTTCCACTTCAGG 3'

PS307 (32 mer) (SEQ ID №44)

5'TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

щоб розширити частину 3' гена архIII, що кодує протеїн гемолізін III (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), у формі фрагменту Clal-BamHI. Після очищення, продукт PCR (596 pb) розщепили за допомогою Clal і BamHI, щоб ізолювати фрагмент Clal-BamHI (583 pb) (фрагмент В). Фрагменти А і В зшили разом із вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою Sall і BamHI, і одержали плазмиду РPB174' (7658 pb) (Фігура №23).

Другий приклад делеції в АрхIII (плазмід рPB189):

Ген архIII (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) був клонований таким чином, щоб мала місце делеція ділянки амінокислот із великим вмістом гліцину (що бере участь у фіксації іона кальцію), який знаходиться між амінокислотами 705 і 886.

Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 8) [M. Smits 1992. № доступу послідовності в Genbank=X68815], отриманої за технологією, описаної в прикладах 2 і 3, і з такими олігонуклеотидами:

PB278 (30 mer) (SEQ ID №41)

5'TTTGTGCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB303 (32 mer) (SEQ ID №45)

5'TTTATCGATTTCTTCACGTTTACCAACAGCA 3'

щоб розширити частину 5' гена архIII, що кодує протеїн гемолізін III (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), у формі фрагменту Sall-Clal. Після очищення, продукт PCR (2133 pb) розщепили за допомогою Sall і Clal, щоб ізолювати фрагмент Sall-Clal (2122 pb) (фрагмент А).

Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 8) [M. Smits 1992. № доступу послідовності в

Genbank=X68815], і з такими олігонуклеотидами:

PB306 (31 mer) (SEQ ID №46)

5'TTTATCGATTCTGATT77TCCTTCGATCGTC 3'

PB307 (32 mer) (SEQ ID №44)

5'TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

щоб розширити частину 3' гена архIII, що кодує протеїн гемолізін III (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), у формі фрагменту Clal-BamHI. Після очищення, продукт PCR (518 pb) розщепили за допомогою Clal і BamHI, щоб ізолювати фрагмент Clal-BamHI (506 pb) (фрагмент В). Фрагменти А і В зшили разом із вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою Sall і BamHI, і одержали плазмиду рPB189 (7496 pb) (Фігура №24).

Третій приклад делеції в АрхIII (плазмід рPB190):

Ген архIII (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) був клонований таким чином, щоб мала місце делеція ділянки амінокислот з великим вмістом гліцину (що бере участь у фіксації іона кальцію), який знаходиться між амінокислотами 718 і 876.

Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 8) [M. Smits 1992. № доступу послідовності в Genbank=X68815], отриманої за технологією, що описана в прикладах 2 і 3. і з такими олігонуклеотидами:

PB278 (30 mer) (SEQ ID №41)

5'TTTGTGCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB304 (33 mer) (SEQ ID №47)

5'TTTATCGATACCTGATTGCGTTAATTCATAATC 3'

щоб розширити частину 5' гена архIII, що кодує протеїн гемолізін III (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), у формі фрагменту Sall-Clal. Після очищення, продукт PCR (2172 pb) розщепили за допомогою Sall і Clal, щоб ізолювати фрагмент Sall-Clal (2161 pb) (фрагмент А).

Провели реакцію PCR з ДНК геному *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Серотип 8) [M. Smits 1992. № доступу послідовності в Genbank=X68815], і з такими олігонуклеотидами:

PB305 (31 mer) (SEQ ID №48)

5'TTTATCGATAAATCTAGTGATTTAGATAAAC 3'

PB307 (32 mer) (SEQ ID №44)

5'TTGA7CCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

щоб розширити частину 3' гена архIII, що кодує протеїн гемолізін III (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), у формі фрагменту Clal і BamHI. Після очищення, продукт PCR (548 pb) розщепили за допомогою Clal і BamHI, щоб ізолювати фрагмент Clal-BamHI (536 pb) (фрагмент В). Фрагменти А і В зшили разом із вектором pVR1012 (приклад 7), попередньо розщепленим за допомогою Sall і BamHI, і одержали плазмиду рPB190 (7565 pb). (Фігура №25).

Приклад 24: Одержання і очищення плазмід

Для одержання плазмід, призначених для вакцинації тварин, можна використовувати будь-яку технологію, що дозволяє одержати суспензію очищених плазмід, у більшій мірі, у надскрученій формі. Ці технології добре відомі фахівцям. Можна назвати, зокрема техніку лужного лізису з наступним дворазовим центрифугуванням у градієнті хлориду цезію і в присутності бромиду етидію, як описано J.Sambrook і ін. [Molecular Cloning: A

Приклад 25: Одержання асоційованих вакцин

Різні плазмиди, необхідні для одержання асоційованої вакцини, змішують у їхніх концентрованих розчинах (приклад 16). Суміші готують таким чином, щоб кінцева концентрація кожної плазмиди відповідала ефективній дозі кожної плазмиди. У якості розчинів для доведення кінцевої концентрації вакцини можна використовувати або розчин 0,9% NaCl або буфер PBS.

Різні плазміди, необхідні для одержання асо-

Різні плазмідні, необхідні для одержання асоційованої вакцини, змішують у їхніх концентрованих розчинах (приклад 16). Суміші готують таким чином, щоб кінцева концентрація кожної плазміді відповідала ефективній дозі кожної плазміді. У якості розчинів для доведення кінцевої концентрації вакцини можна використовувати або розчин 0.9% NaCl, або буфер PBS.

Ін'єкції можна проводити внутрішньошкірно, використовуючи рідиннострумінник (без голки) ін'єкційний апарат і вводячи дози 0,2мл в 5 точках (0,04мл у кожній точці і (наприклад, апарат «PIGJET»). У цьому випадку, вакцини вводять в об'ємах 0,2 або 0,4мл, що відповідає, одному або двом введенням. Якщо два послідовних введення здійснюють за допомогою апарата PIGJET, ці введення здійснюють таким чином, щоб обидві ін'єкційні зони були віддалені одна від другої на відстань біля 1-2 сантиметрів.

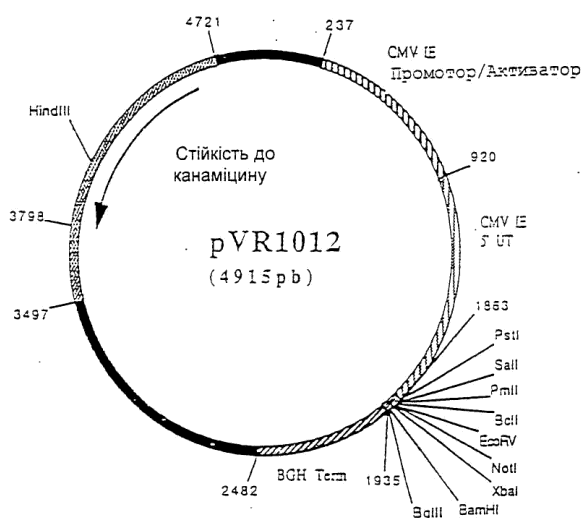


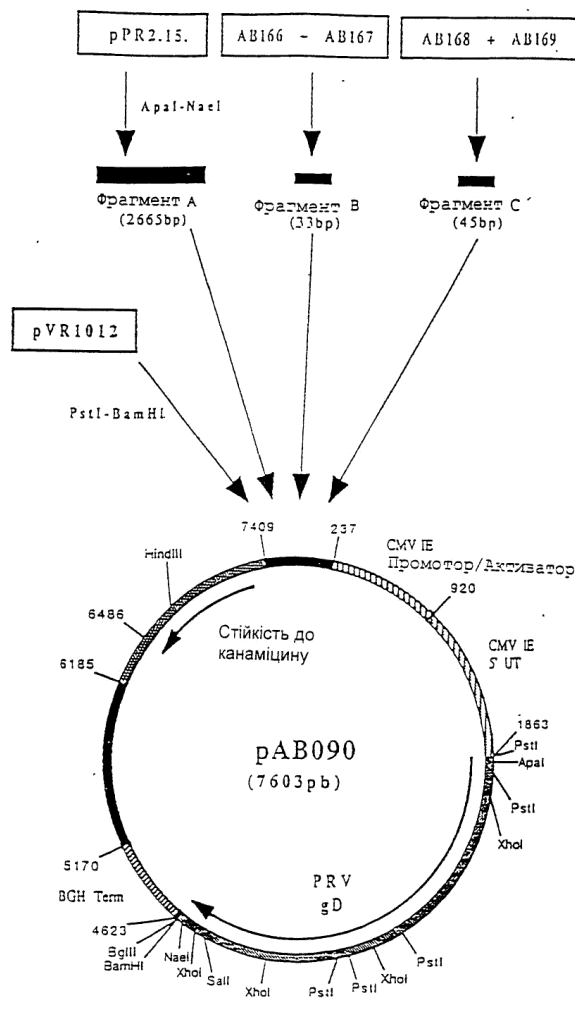
Fig. 1

1 ATGCCCCCGTGGTGGGCTTTGGCCGGGCCCCGGGGGACATCGGCCCGGACACCGCGGT
2 MetProAlaGlyGlyGlyLeuThrPheArgGlyPheArgGlyHisArgProGlyHisHisGlyGly
3 PstII
4 GTGGCGCTCGGACGCTTTGGCTCTGCACACACCGCTGACGTGCGCGGGGCGCGCTCGCG
5 62 AGCTGAGGCTGlyArgLeuThrProAlaProHisHisLeuAlaGlyArgAlaValAla
6 27 TAGCGCTCTGCTCTGCTCGGCTCGCCGGCGGCGCGCGCTCGCGCGCGCGCTCGACGGG
7 41 LeuAlaLeuLeuLeuAlaAlaAlaAlaAlaProCysGlyAlaAlaAlaValThrArg
8 90 GCGCGCTCGGCTCGCCGACGCCCGGGACGGGCGGACCCCAACGAGCTCTCCGCGGAGGG
9 64 AlaAlaSerAlaSerProThrProGlyThrGlyAlaThrProAsnAspValSerAlaGluAla
10 XhoI
11 TCCTCGGAGGATCGAGCGCTTCTCCCGCGCCCTCGGAGGCCCCGAGCGCGGATACGGC
12 253 SerLeuGluGluGluAlaPheSerProGlyProSerGluAlaGlyGlyGlyGlyGly
13 616 GACGTGACCGCGCGGACGCGCGCTCGCGCGGCGCGACCGACGGGACCGCTTACTGCTCG
14 AspLeuAspAlaArgThrAlaValArgAlaAlaAlaThrGluArgAspArgPheThrValCys
15 379 CCGCGCGCGCTCGGCTCCACGGTGTCGCGCTGGAGCCCGAGCAGGCCCTACGCCGAGTACTCG
16 427 ProGProGlySerGluThrValValArgLeuAlaGluProGluGlnAlaCysProGlySerThr
17 CAGGGGCGCAACTCACGAGGGGATCGCCCTGCTCTTCAAGGAAACATCGCCCGCCACAG
18 GlnArgGlyAsnPheThrGluGlyAlaLeuAlaLeuPheGlyGluGlnLeuAlaProHisLys
19 505 TTCAAGGCCCACTACTACTACAAGACGTCATCGTCAGCAGCTGCTGGTTCGGGACGATAC
20 568 PheLeuAlaHisLleTyrTyrTyrAsnAlaValLeuValLeuThrGluGlySerThrTyr
21 1569 GCGCGCTACAGACCGCTTTCAGACCGCGGCGCCGTCGCGTGCAGAGATCACCGACGTG
22 190 AlaAlaIleThrAsnArgPheThrAspArgValProValProValGlnGluIleThrAspVal
23 231 ATTCAGCGCGCGCGCAAGTCGCTCTCAAGCGCGAGTACGTGCGCAACAACCAAGGTGAC
24 IleAspArgArgGlyTyrGlyValSerLysAlaGluAlaThrGluArgAsnHisLysValThr
25 629 GCCTTCAGCGCGGACGAGCAACCCCTCGAGGTGACCTCGGCCCTCGGCCCTGAACCGGCTC
26 694 AlaPheAspArgAspGluAsnProValGluAlaLeuAspLeuArgProSerGlyArgAlaAlaLeu
27 756 GCGACCGCGCGCTGACACCAACCAACGACACTACACAGATCGCGCGCGCGGCTCTTAC
28 1253 GlyThrArgAlaThrPheIleThrAsnAspTyrThrTyrIleGluAlaAlaGlyPheTyr
29 820 CAGACGGGACCTTCGTCAACTGCATCTCGAGGAGGTGGAGCGCGCTCCGTGATACCCCTAC
30 1271 GlnThrGlyThrSerValAsnGluIleValGluGluAlaGluAlaArgSerValTyrProTyr
31 883 CACTCTCGCCCTCGCCAGGCGGACATGTGATCATCTGCTCCCTTCTACGCTCGCGGAG
32 AspSerPheAlaLeuSerThrGlyAlaSerIleValTyrMetSerProPheGlyTyrAsnGluGlu
33 1945 GCGGCCCGCGGGAGAGATCGGTACGCGCGCGCGCGCTTCAGCAGGTGGAGCACTACTAC
34 3163 GluAlaHisGlyGluGlnIleGlyTyrAlaArgProArgPheGlnValGluIleTyrTyr
35 4009 CCGATCGACCTGCACTCGGCTCGCGCGCTCGAGAGCGTACGCCCACTTCTACGACAG
36 3377 ProIleAspLeuAspSerArgLeuArgAlaSerGluSerValThrArgAsnPheLeuArgThr
37 CGCATCTACCGGTGCTGGGACTGGGCCCTGGCCCAAGACGGCGCGCTGTGCAGCTTGGCCAC
38 3578 ProHisPheThrValAlaThrAspThrAlaProCysThrArgValArgCysSerLeuAlaLys
39 135 TGCGCGGAGCGGAGGATACGCCGAGAGGACGCGGACGGCTCTTCGCTTCACGTCTG
40 3797 ThrArgGluAlaGluGluMetThrGlyArgGluAlaGluArgAspGlySerPheArgPheValVal
41 PstII
42 CGGGCCCTGGCGGCTCTCTCGTCAGCAGCTCAGCAGCTGCAGCTGCAGCGCTGCACCTG
43 4009 ArgAlaLeuLysIleAlaSerPheValSerAspValThrGlnLeuAspLeuGlnArgValHisLeu
44 616 GCGACTCGCTCTCCGAGGCGCTCGGAGGCTACGAGCCATCTACGCGCGCGCTACAG
45 621 GlyAspCysValLeuArgGluAlaSerAlaAlaPheAlaIleTyrArgArgArgTyrAsn
46 321 AGCAGCCAGCTGCTCGCGCGGACAGCGCCGGAGTGATCTCGCCCGCGCGGCTCTCGTGTG
47 4429 SerThrHisValGluAlaGlyAspArgProGluValTyrLeuAlaArgGlyGlyPheValVal
48 1357

ΦΙΓ. 2

1387 GCCTTCGCGCCGCTGATCTCGAACGAGCTGGCCAGCTGTACGCGCGGAGCTCGAGCGCCCTC
 463 ▶ **AlaPheArgProLeuIleSerAsnGluLeuAlaGlnLeuTyrAlaArgGluLeuGluArgLeu**
 1450 GGCCTCGCGCCGCTGCTGGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCGCTGGCGCCGCGCTCCCTCC
 484 ▶ **GlyLeuAlaGlyValValGlyProAlaAlaProAlaAlaAlaArgArgAlaArgArgSerPro**
 1513 GGCCCGCGGGGACGCCCGAGCCGCGCGCTCAACGGCACGGGGCACCTGGCGATCACCACG
 505 ▶ **GlyProAlaGlyThrProGluProProAlaValAsnGlyThrGlyHisLeuArgTleThrThr**
 PstII
 1576 GGCTCGCGGAGTTTGGCGGCTGACGTTTACCTACGACCACATCCAGGCGCACGTGAACGAC
 526 ▶ **GlySerAlaGluPheAlaArgLeuGlnPheThrTyrAspHisTleGlnAlaHisValAsnAsp**
 PstII
 1639 ATGCTGGGCGCATCGCGCGCCCTGGTGCAGCTGCAGAACAGGACCGCACCTGTGGAGC
 547 ▶ **MetLeuGlyArgTleAlaAlaAlaTyrCysGluLeuGlnAsnLysAspArgThrLeuTyrSer**
 1702 GAGATGTGCGGCTGAACCCAGCGCGCTGGCCACGGCCGCTCGGCCAGCGCGCTCGCGCG
 568 ▶ **GluMetSerArgLeuAsnProSerAlaValAlaThrAlaAlaLeuGlyGlnArgValCysAla**
 1765 CGCATGCTCGCGGAGCTGATGGCCATCTCGCGGTGCTGGAGTGGCGCGCGCGGTACGTG
 589 ▶ **ArgMetLeuGlyAspValMetAlaIleSerArgCysValGluValArgGlyGlyValTyrVal**
 1828 CAGAACTCCATCGCGGTGCCCGGAGCGCGGCACGTGCTACAGCGCGCGCTGGTCACTTC
 610 ▶ **GlnAsnSerMetArgValProGlyGluArgGlyThrCystyrSerArgProLeuValThrPhe**
 1891 GAGCACACGGCACGGCGGTGATCGAGGGCCAGCTCGGCGAGCACACGAGCTCTCATCTCG
 631 ▶ **GluHisAsnGlyThrGlyValIleGluGlyGlnLeuGlyAspAspAsnGluLeuLeuIleSer**
 1954 CGCGACCTCATCGAGCCCTGCACCGGCAACCGCGGCTACTTTAAGCTGGGAGCGGTAC
 652 ▶ **ArgAspLeuIleGluProCysThrGlyAsnHisArgArgTyrPheLysLeuGlySerGlyTyr**
 2017 GTGTACTACGAGGACTACAATCTAGCTGGCATGTTGGAGTGGCGGAGAGATCAGCAGCGG
 673 ▶ **ValTyrTyrGluAspTyrAsnTyrValArgMetValGluValProGluThrIleSerThrArg**
 XhoI
 2080 GTTACCCTGAACCTGACGCTGCTGGAGGACCGCGAGTCTTCCCTCGAGGTGTACACGGCG
 694 ▶ **ValThrLeuAsnLeuThrLeuLeuGluAspArgGluPheLeuProLeuGluValTyrThrArg**
 2143 GAGGAGCTGCGCGACACGGCCCTCTGGACTACAGGAGATCCAGCGCCGCAACCACTGCAC
 715 ▶ **GluGluLeuAlaAspThrGlyLeuLeuAspTyrSerGluIleGlnArgArgAsnGlnLeuHis**
 2206 CGCCTCAAGTTCTACGACATCGACCGCGCTGGTCAAGGTGGACACACGTGGTGTCTGCGC
 736 ▶ **AlaLeuLysPheTyrAspIleAspArgValValLysValAspHisAsnValValLeuLeuArg**
 2269 GGCATCGCCAATCTTCCAGGGCTCGCGGACGTGGCGCGCGCTCGGCAAGGTGGTCTG
 757 ▶ **GlyIleAlaAsnPhePheGlnGlyLeuGlyAspValGlyAlaAlaValGlyLysValValLeu**
 2332 GGTGCCACGGGGCGGTGATCTCGCGCGCTCGCGGATGTTGCTTCTGTGTCCAAACCTTC
 778 ▶ **GlyAlaThrGlyAlaValIleSerAlaValGlyGlyMetValSerPheLeuSerAsnProPhe**
 2395 GGGCGCTCGCATCGGCTGCTGTGCTGGCGGCTGCTCGCGGCTTCTGTGCTTACCGG
 799 ▶ **GlyAlaLeuAlaIleGlyLeuLeuValLeuAlaGlyLeuValAlaAlaPheLeuAlaTyrArg**
 2458 CACATCTCGCGCTGCGCGCAACCCATGAAGGCGCTGTACCCGTCACGACGAAGCGCTC
 820 ▶ **HisIleSerArgLeuArgArgAsnProMetLysAlaLeuTyrProValThrThrLysThrLeu**
 SalI
 2521 AAGGAGGACGGCGTGCAGCAAGGCGACGTGGACGAGGCCAAGCTGGACAGGCCCGGACATG
 841 ▶ **LysGluAspGlyValAspGluGlyAspValAspGluAlaLysLeuAspGlnAlaArgAspMet**
 XhoI
 2584 ATCCGGTACATGTCCATGCTGTGCGCCCTCGAGCAGCAGGAGCACAAAGCCCGCAAGAAGAAC
 862 ▶ **TleArgTyrMetSerIleValSerAlaLeuGluGlnGlnGluHisLysAlaArgLysLysAsn**
 2647 ACCGGGCGCGCTGCTGGCCAGCGCGCTCGGGCGATGGCCACGGCGCGCGGCACTACCAG
 883 ▶ **SerGlyProAlaLeuLeuAlaSerArgValGlyAlaMetAlaThrArgArgArgHisTyrGln**
 XhoI
 2710 CGCCTCGAGAGCGAGGACCCCGACGCGCTGTAG
 904 ▶ **ArgLeuGluSerGluAspProAspAlaLeu...**

ФІГ. 2 (продовження)



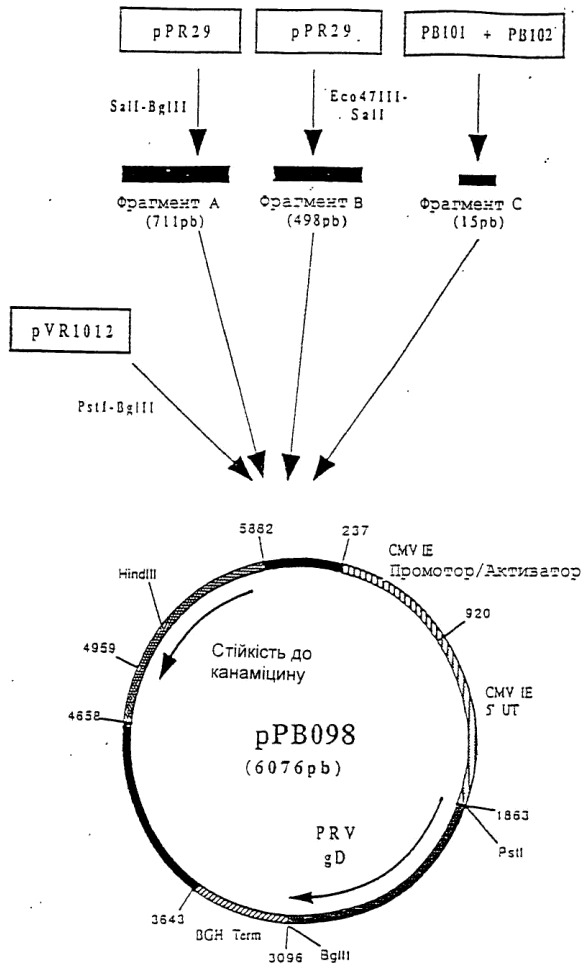
Фіг. 3

1 ATGCTGCTCGCAGCGCTATTGGCGGGCGCTGGTCGCCCCGACGACGCTCGGTCCGGACGTGGAC
 1 ▶ MetLeuLeuAlaAlaLeuLeuAlaAlaLeuValAlaArgThrThrLeuGlyAlaAspValAsp
 64 GCCGTGCCCGCGCGACCTTCCCCCGCGCGCTACCGGTACACCGAGTCTGGCAGCTGACG
 22 ▶ AlaValProAlaProThrPheProProAlaTyrProTyrThrGluSerTrpGlnLeuThr
 127 CTGACGACGGTCCCCCTCGCCCTTCGTGGGCGCGGACGCTACACACGCGCCGCTGGAG
 43 ▶ LeuThrThrValProSerProPheValGlyProAlaAspValTyrHisThrArgProLeuGlu
 190 GACCCGTGCGGGTGGTGGCGCTGATCTCCGACCGCAGGTGGACCGGCTGCTGAACGAGCG
 64 ▶ AspProCysGlyValValAlaLeuIleSerAspProGlnValAspArgLeuLeuAsnGluAla
 253 GTGCCCCACCGCGCGCCACGTACCGCGCCACGTGGCCTGGTACCGCATCGCGGACGGGTG
 85 ▶ ValAlaHisArgArgProThrTyrArgAlaHisValAlaTrpTyrArgIleAlaAspGlyCys
 316 GCACACCTGCTGACTTTATCGAGTACGCGGACTCGGACCCAGGCGAGCATCTTTGGCGG
 106 ▶ AlaHisLeuLeuTyrPheIleGluTyrAlaAspCysAspProArgGlnAlaAspLeuTrpAla
 379 CTGCGGCGCGCGCACCCGCGATGTGGTGACCCGTCGCGGACTACATGTTCCCGACGGA
 127 ▶ LeuProAlaProHisHisAlaAspValValAspProValArgGlyLeuHisValProHisGly
 442 GCACGAGCTGGGCTGCTCATGGTGGCCCCGGCGGTTCAACGAGGGCCAGTACCGCGCCT
 148 ▶ GlyArgAlaGlyAlaAlaHisGlyGlyProArgAlaValGlnArgGlyProValProAlaPro
 505 GGTCTCCGTGACCGCGTGAACATCTCACCGACTTCATGTCGCGCTCCCCGAGGGCAAGA
 169 ▶ GlyValArgArgArgArgGluHisProHisArgLeuHisGlyGlyAlaProArgGlyAlaArg
 568 GTGCGCGTTCCCGCGCTGGACACGACCGCACGTACAAGTTCGGCGCGTCTGGAGCGACGA
 190 ▶ ValProValArgProArgGlyProAlaProHisValGlnValArgArgValLeuGluArgArg
 631 CAGCTTCAAGCGGGCGCTGGACGTGATGCGATTCTTGACCGCGTTCTACACGACGCCCCGCA
 211 ▶ GlnLeuGlnAlaGlyArgGlyArgAspAlaIleProAspAlaValLeuProAlaAlaProAla
 694 CCGGAGGTGCTGAACCTACTGTACCGCAAGAACGCGCGACGCTCCCGCGGCGCCACGCGG
 232 ▶ ProGlyGlyGlyGluLeuLeuValProGlnGluArgProAspAlaProAlaGlyProArgArg
 757 CGCCACGCGGTACGCCATCGACCCCGCGCGGCTCGCGGGCTCGCCGAGGCGCGCGCGCG
 253 ▶ ArgHisAlaValArgHisArgProArgAlaAlaLeuGlyGlyLeuAlaGluAlaProAlaPro
 820 GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 274 ▶ AlaProAlaProAlaProAlaGluAlaArgAlaArgProGlyAspAlaArgAlaProArgPro
 883 CCTGCCCCAGCGCGGACGCGCGGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGAG
 295 ▶ ProAlaArgAlaGlyAspAlaGlyProArgArgArgGlyProProHisAlaAlaThrProGlu
 946 GCGCGAGACGCGCACCGCGCTTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 316 ▶ AlaArgAspAlaAlaProProLeuArgProAlaGlyArgArgAlaGlnArgValAlaAlaAla
 1009 CGCGGAGCGCTTCAGCGCGGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGAT
 337 ▶ ArgGlyAlaValProAlaAlaAspProArgArgAlaGlyArgLeuAlaProProLeuGlyAsp

Фиг. 4

1072 COTCGGCACGGGACCGCGATGGGCGCGCTCCTGTTGGCGTGTGCGTCTACATCTTCTTCG
 358 ▶ ArgArgHisGlyHisArgAspGlyArgAlaProGlyGlyArgValArgLeuHisLeuLeuPro
 1135 CCTGAGGGGGCGAAGGGTATCGCCTCTGGGCGTCCCGGACGCGCGAGAGCTAAAGC
 379 ▶ ProGluGlyGlyGluGlyValSerProProGlyArgSerArgGlyArgArgArgAlaLysSer
 1198 GCAGCCCGTCCGTAG
 400 ▶ AlaAlaArgSerVal

Фиг. 4 (продовження)



Фиг. 5

1 ATGGAAGCAAACTATTCGTATTATTCGTACATTCAGCTGCGCTGAAAGCTGACACCATCTGT
 1 MetGluAlaLysLeuPheValLeuPheCysThrPheThrAlaLeuLysAlaAspThrIleCys
 64 GTAGGATACCATGCTAACAAATCCACAGATACCTGCGACACAATCTGGAGAAGAATGTGACT
 22 ValGlyTyrHisAlaAsnAsnSerThrAspThrValAspThrIleLeuGluLysAsnValThr
 127 GTGACTCATTCACTTAATTTACTAGAAAACAGTCATAATGGAAAACCTCGACGCTGAATGGA
 43 ValThrHisSerValAsnLeuLeuGluAsnSerHisAsnGlyLysLeuCysSerLeuAsnGly
 190 GTAGCCCCCTTGCAACTAGGGAAGTGCAACGTAGCAGGTGGATCCTTGGCAACCCAGAATGT
 64 ValAlaProLeuGlnLeuGlyLysCysAsnValAlaGlyTrpIleLeuGlyAsnProGluCys
 253 GACCTGTGTCTCAGCGCAATTCATGGTCTTACATAATAGAGACTTCAAAATCAGAAAATGGA
 85 AspLeuLeuLeuThrAlaAsnSerTrpSerTyrIleIleGluThrSerAsnSerLeuAsnGly
 316 ACATGCTACCCCGAGAATTCATTGATTATGAGGAATTAAGGAGCAGCTGAGTTCAGTGTCT
 106 ThrCysTyrProGlyGluPheIleAspTyrGluGluLeuArgGluGlnLeuSerSerValSer
 379 TCATTGAAAGGTTGAAATTTCCCAAGCAAACTCATGCCAAATCATGAGACAAACAAA
 127 SerPheGluArgPheGluIlePheProLysAlaAsnSerTrpProAsnHisGluThrThrLys
 442 GGTATTACAGCTGCATGCTCTACTCTGGAACCCCACTTTTATCGGAATTTGCTATGGATA
 148 GlyIleThrAlaAlaCysSerTyrSerGlyThrProSerPheTyrArgAsnLeuLeuTrpIle
 505 GTAGAGAGGGAATTCCTATCTTAACTCAGCAATCATACAAACAACAAAGGGAAGAA
 169 ValGluArgGluAsnSerTyrProLysLeuSerLysSerTyrThrAsnAsnLysGlyLysGlu
 568 GTGCTTATAATCTGGGAGTGACACCCCTCCAACTACCAATGACCAACAAAGCCCTCTATCAG
 190 ValLeuIleIleTrpGlyValHisHisProProThrThrAsnAspGlnGlnSerLeuTyrGln
 631 AATGCTGATGCATATGTTTCACTGGGTCAATAACAACCAAGGTTACACACGAAATA
 211 AsnAlaAspAlaTyrValSerValGlySerSerLysTyrAsnArgArgPheThrProGluIle
 694 GCAGCTAGACCTAAAGTCAAGGACAAGCAGGAGAAATGAAATTTATGGACATTGTTAGAT
 232 AlaAlaArgProLysValLysGlyGlnAlaGlyArgMetAsnTyrTyrTrpThrLeuLeuAsp
 757 CAAGGAGACACCATAACGTTGAAGCCACTGGGAACCTAATAGCACCATGGTACGCCCTTCGA
 253 GlnGlyAspThrIleThrPheGluAlaThrGlyAsnLeuIleAlaProTrpTyrAlaPheAla
 820 TTGAATAAGGGCTCTGGTCTGGAATTATAACCTCGGACTCCGGTTCACAATTGTGATACA
 274 LeuAsnLysGlySerGlySerGlyIleIleThrSerAspThrProValHisAsnCysAspThr
 883 AAGTGCCAAACCCCTCATGGGCCCTTGAACAGTAGTCTTCTTTTCAGAACGTACATCCCATC
 295 LysCysGlnThrProHisGlyAlaLeuAsnSerSerLeuProPheGlnAsnValHisProIle
 946 ACTATTGGAGAATGCCCAATATGTTAAAGCACCAAACTGAGAAATGCCAACAGGACTAAGG
 316 ThrIleGlyGluCysProLysTyrValLysSerThrLysLeuArgMetAlaThrGlyLeuArg
 1009 AACGTCCTCTTATTCAATCCAGGAGACTTTTCGGAGCAATTCCTGGAATCATTGAAGGAGGA
 337 AsnValProSerIleGlnSerArgGlyLeuPheGlyAlaIleAlaGlyPheIleGluGlyGly

Фиг. 6

1072 TGCACAGGAATGATAGATGGGTGGTATGGGTATCACCATCAGAATGAGCAGGGATCTGGTTAC
 358 TrpThrGlyMetIleAspGlyTrpTyrGlyTyrHisHisGlnAsnGluGlnGlySerGlyTyr

1135 GCAGCTGATCAGAAAAGCACACAAATTGCAATTGACGGGATCAGCAACAAAGTGAATCAGTA
 379 AlaAlaAspGlnIysSerThrGlnIleAlaIleAspGlyIleSerAsnIysValAsnSerVal

1198 ATTGAGAAAATGAACACTCAATTCAGTCAGTGGGCAAGGAATTCATGATCTAGAAAAAAGG
 400 IleGluIysMetAsnThrGlnPheThrAlaValGlyIysGluPheAsnAspLeuGluIysArg

1261 ATTGAGAAATTGAATAAGAAATCGATGATGGGTTTTGGATGTTTGGACATATAATGCTGAG
 421 IleGluAsnLeuAsnIysIysValAspAspGlyPheLeuAspValTrpThrTyrAsnAlaGlu

1324 TTGCTCGTTTTGCTCGAGAACGAAAGGACTCTAGATTTCATGACTTTAACGTAAGAAATTTA
 442 LeuLeuValLeuLeuGluAsnGluArgThrLeuAspPheHisAspPheAsnValArgAsnLeu

1387 TATGAAAAGGTCAGTCACAATTGAGAAACAATGCCAAAGAAATCGGGAATGGTTGTTTTGAG
 463 TyrGluIysValIysSerGlnLeuArgAsnAlaIysGluIleGlyAsnGlyCysPheGlu

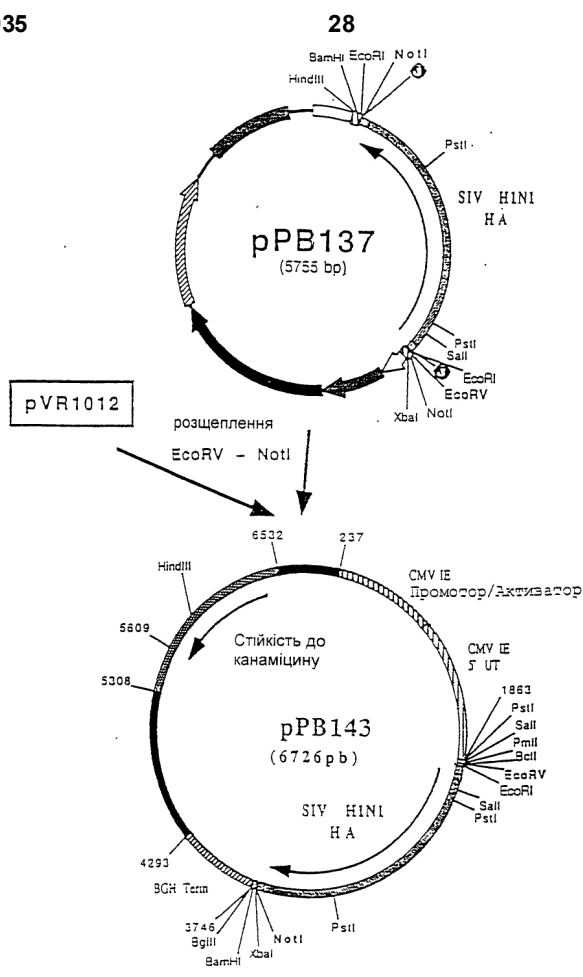
1450 TTCTATCACAATGTGATGACGAATGCATGAAGAGCGTAAAGAATGGCACATATAACTACCCC
 484 PheTyrHisIysCysAspAspGluCysMetIysSerValIysAsnGlyThrTyrAsnTyrPro

1513 AAATATTCAGAAGATCCAAATTGAATAGAGAGGAAATAGACGGTGTGAAACTAGAATCAATG
 505 LysTyrSerGluGluSerIysLeuAsnArgGluGluIleAspGlyValIysLeuGluSerMet

1576 GGAGTTTACCAGATTTTGGCGATCTACTCCACAGTCGCCAGTTCCTGGTCTTGTGTAGTCTCC
 526 GlyValTyrGlnIleLeuAlaIleTyrSerThrValAlaSerSerLeuValLeuValSer

1639 CTGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTTCTAATGGGTCATTGCAATGCAGAATATGCATTAA
 547 LeuGlyAlaIleSerPheTrpMetCysSerAsnGlySerLeuGlnCysArgIleCysIle...

ФІГ. 6 (продовження)



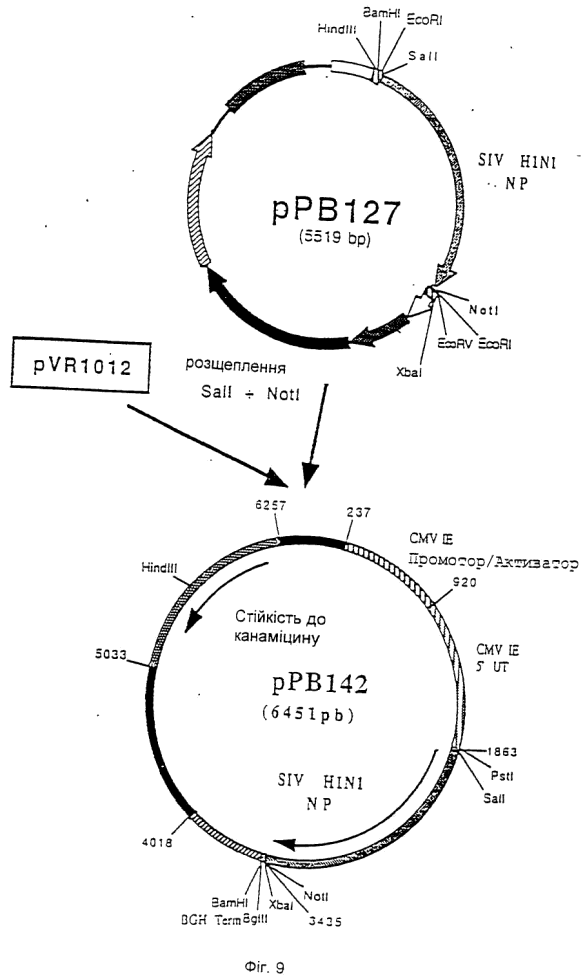
Фиг. 7

1 ATGGCGTCTCAAGGCACCAACGATCTTATGAGCAGATGGAAACCGGTGGAGAACCAGCAAT
 1 ▶ MetAlaSerGlnGlyThrIysArgSerTyrGluGlnMetGluThrGlyGlyGluArgGlnAsn
 64 GCTACTGAAATCAGAGCATCTGTTGGGGAATGGTTGGTGAATTGGAAGATTCTACATACAG
 22 ▶ AlaThrGluIleArgAlaSerValGlyGlyMetValGlyGlyIleGlyArgPheTyrIleGln
 127 ATGTGCACTGAACCTCAACTCAGTGACTATGAAGGAGGCTGATCCAGAACAGCATAACAATA
 43 ▶ MetCysThrGluLeuLysLeuSerAspTyrGluGlyArgLeuIleGlnAsnSerIleThrIle
 190 GAGAGAATGGTTCTCTCTGCAATTTGATGAGAGGAGGAACAATACCTGGAAGAATCCAGT
 64 ▶ GluArgMetValLeuSerAlaPheAspGluArgArgAsnLysTyrLeuGluGluHisProSer
 253 GCGGGGAAGGACCAAGAAACCTGGAGGTCCAATCTACAGAAAGAGAGACGGAATGGATG
 85 ▶ AlaGlyLysAspProLysIysThrGlyGlyProIleTyrArgLysArgAspGlyIysTrpMet
 316 AGAGAGCTGATTCTATATGACAAAGAGAGATCAGGAGGATTGGCGTCAAGCAACAATGGT
 106 ▶ ArgGluLeuIleLeuTyrAspLysGluGluIleArgArgIleTrpArgGlnAlaAsnAsnGly
 379 GAAGATGCTACTGCTGCTCTCACTCATCTGATGATTGGCATTCCAACCTGAATGATGCCACA
 127 ▶ GluAspAlaThrAlaGlyLeuThrHisLeuMetIleTrpHisSerAsnLeuAsnAspAlaThr
 442 TATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGGTACTGGATGGACCCAGAAATGCTCTCTGATGCAA
 148 ▶ TyrGlnArgThrArgAlaLeuValArgThrGlyMetAspProArgMetCysSerLeuMetGln
 505 GGATCAACTCTCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGGTGGCAGTAAAGGAGTTGGGACGATG
 169 ▶ GlySerThrLeuProArgArgSerGlyAlaAlaGlyAlaAlaValLysGlyValGlyThrMet
 568 GTAATGGAACGTATTCGGATGATAAAGCGGGATCAATGATCGGAATCTCGAGAGCGGAA
 190 ▶ ValMetGluLeuIleArgMetIleLysAlaGlyIleAsnAspArgAsnPheTrpArgGlyGlu
 631 AATGGACGAAGAACAAGATTGCATATGAGAGAATGTCAACATCTCAAAGGAAATTTTCAG
 211 ▶ AsnGlyArgArgThrArgIleAlaTyrGluArgMetCysAsnIleLeuLysGlyLysPheGln
 694 ACAGCAGCGCAACAAGCAATGATGGACAGGTGGGAGAAATGACAAATCTGGGAATGCTGAG
 232 ▶ ThrAlaAlaGlnGlnAlaMetMetAspGlnValArgGluMetThrAsnProGlyAsnAlaGlu
 757 ACTGAAGACCTTATCTTTCTGGCAGATCTGCACTCATCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAA
 253 ▶ ThrGluAspLeuIlePheLeuAlaArgSerAlaLeuIleLeuArgGlySerValAlaHisLys
 820 TCCTGCCTGCCTGCTTGTATATGACTTGTTCGGCAAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAA
 274 ▶ SerCysLeuProAlaCysValTyrGlyLeuValValAlaSerGlyTyrAspPheGluArgGlu
 883 GGGTACTCTCTAGTCGGAATAGATCCTTTCCGTCCTGCCAAAACAGCCAGGTGTTACGCCTC
 295 ▶ GlyTyrSerLeuValGlyIleAspProPheArgLeuLeuGlnAsnSerGlnValPheSerLeu
 946 ATTAGACCAATGAGAATCCAGCACATAAGAGTCAGCTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCA
 316 ▶ IleArgProAsnGluAsnProAlaHisLysSerGlnLeuValTrpMetAlaCysHisSerAla
 1009 GCATTTGAAGATCTGAGAGTGTCAAGTTTCATCAGAGGACAAAGAGTGCTCCCAAGAGGACAA
 337 ▶ AlaPheGluAspLeuArgValSerSerPheIleArgGlyThrArgValValProArgGlyGln

Фиг. 8

1072 CTGTCCACCAGAGGAGTTCAAATTTGCTTCAAATGAAACATGGAACAATGGAGTCCAGTACT
 358 ▶ LeuSerThrArgGlyValGlnIleAlaSerAsnGluAsnMetGluThrMetGluSerSerThr
 1135 CTTGAAC TGAGAAGCAATACTGGGCTATAAGAACCAGGACGGAGGAAACCAACCAACAG
 379 ▶ LeuGluLeuArgSerLysTyrTrpAlaIleArgThrArgSerGlyGlyAsnThrAsnGlnGln
 1198 AGAGCATCTCGAGGGCAATCAGTGTACAACCTTACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCTTTTC
 400 ▶ ArgAlaSerAlaGlyGlnIleSerValGlnLeuThrPheSerValGlnArgAsnLeuProPhe
 1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCAGCATTTACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGACATGAGG
 421 ▶ GluArgAlaThrIleMetAlaAlaPheThrGlyAsnThrGluGlyArgThrSerAspMetArg
 1324 ACTGAAATTATAAGAATGATGGAAGTCCAGACCAGCAAGATGTGCTCTTCCAGGGGCGGGGA
 442 ▶ ThrGluIleIleArgMetMetGluSerAlaArgProGluAspValSerPheGlnGlyArgGly
 1387 GTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCTTTGACATGAGTAAT
 463 ▶ ValPheGluLeuSerAspGluLysAlaThrAsnProIleValProSerPheAspMetSerAsn
 1450 GAGGGATCTTATTCTTCGGAGACAATGCCAGGAGTATGACAATTAA
 484 ▶ GluGlySerTyrPhePheGlyAspAsnAlaGluGluTyrAspAsn***

Фиг. 8 (продовження)

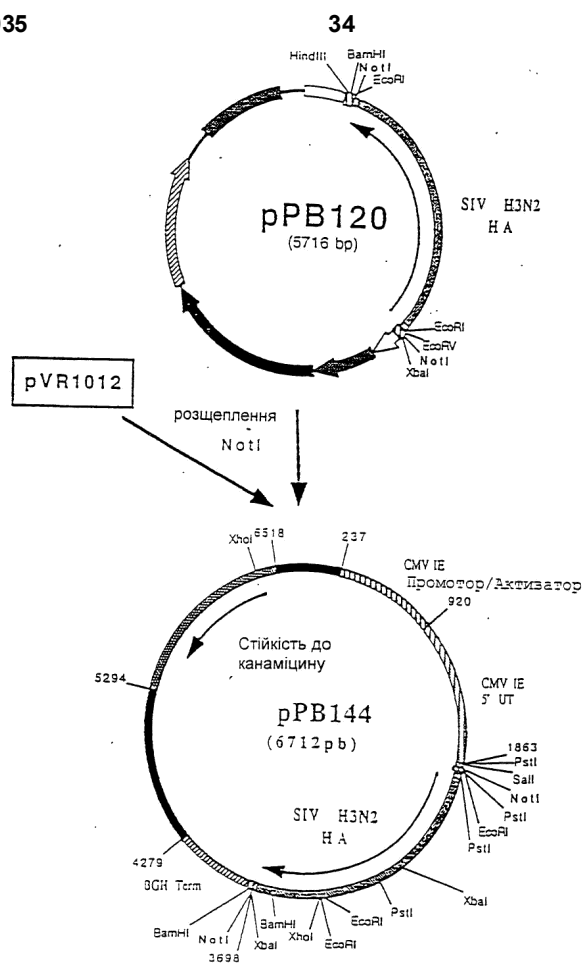


1 ATGAAGACTGTCATTGCTTGGCTTGGAGCTACATTTCTGTCTGCTTCTTGGCCAGACCTTCCAGAA
 1 MetLysThrValIleAlaLeuSerTyrIlePheCysLeuValLeuGlyGlnAspLeuProGlu
 64 AATGGCAGCAGCAGCAGCAAGCCTGGTCTGGGACATCATGCGGTGCCAAACGGAACGTTAGTG
 22 AsnGlySerSerThrAlaLysProGlyLeuGlyHisHisAlaValProAsnGlyThrLeuVal
 127 AAAACAATCAGCAATGATCAGATCGAAGTACTAATGCTACTGAGCTGGTCCAGAGTTTCTCA
 43 LysThrIleThrAsnAspGlnIleGluValThrAsnAlaThrGluLeuValGlnSerPheSer
 190 ATGGGTAAAAATGCAACAATCCTCATCGAGTTCTGATGGAGCAAACTGTACTGATAGAT
 64 MetGlyLysIleCysAsnAsnProHisArgValLeuAspGlyAlaAsnCysThrLeuIleAsp
 253 GCTCTATTGGGGACCTCAATTGTGATGGCTTCAAAATGAGAAATGGGACCTTTTCTGTTGAA
 85 AlaLeuLeuGlyAspProHisCysAspGlyPheGlnAsnGluLysTrpAspLeuPheValGlu
 316 CGCAGCAAAATGCTTCAGCAACTGTTACCTTTATGATGTCAGATTTATGCTCCCTTAGGTCA
 106 ArgSerLysCysPheSerAsnCysTyrProTyrAspValProAspTyrAlaSerLeuArgSer
 379 CTAATTGCTCTCTGGGCACTTTGGAGTTTCAATGAAGGTTTCAATGGAGTGGGCTACT
 127 LeuIleAlaSerSerGlyThrLeuGluPheIleAsnGluGlyPheAsnTrpThrGlyValThr
 442 CAGAACGGAGGAAGCAATGCTTGCAGAGGGGGCTGATAGCGGTTTCTTCAGTAGGCTGAAC
 148 GlnAsnGlyGlySerAsnAlaCysLysArgGlyProAspSerGlyPhePheSerArgLeuAsn
 505 TGGTTGTACAAATCAGGAAACACATACCCGATGCTGAACGTGACTATGCCAAACAGTGATAAT
 169 TrpLeuTyrLysSerGlyAsnThrTyrProMetLeuAsnValThrMetProAsnSerAspAsn
 568 TTTCAGCAAAATATACATTTGGGGGTTTACCATTCCGAGCAGCAGGGAACAAACCACTTA
 190 PheAspLysLeuTyrIleTrpGlyValHisHisProSerThrAspArgGluGlnThrAsnLeu
 631 TATGTTCAAGTATCAGGGAAGCAACGGTTTTCACCAAGAGAAGCCAGCAGACATAATCCCG
 211 TyrValGlnValSerGlyLysAlaThrValPheThrLysArgSerGlnGlnThrIleIlePro
 694 AACAGTCGGTCTAGACCTTGGGTAAGGGTCTGTCTAGTAGAATAAGCATCCATTGGACAATA
 232 AsnSerArgSerArgProTrpValArgGlyLeuSerSerArgIleSerIleHisTrpThrIle
 757 GTTAAACCGGGGACATTCGTATAATTAAGTAATGGGAACCTAATTGCTCTCGGGGTTAC
 253 ValLysProGlyAspIleLeuIleIleAsnSerAsnGlyAsnLeuIleAlaProArgGlyTyr
 820 TTCAAAATGCACAATGGGAGAAGCTCAATAATGAGGTGAGATGCACCTATTGGCACCTGCAGT
 274 PheLysMetHisAsnGlyArgSerSerIleMetArgSerAspAlaProIleGlyThrCysSer
 883 TCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATCCCAATGACAAACCTTTCAAAACGTAAACAG
 295 SerGluCysIleThrProAsnGlySerIleProAsnAspLysProPheGlnAsnValAsnLys
 946 ATCACATATGGGCATGTCTTAAGTATGTTTAAACAAACACTCTGAAGTTGGCAACAGGATG
 316 IleThrTyrGlyAlaCysProLysTyrValLysGlnAsnThrLeuLysLeuAlaThrGlyMet
 1009 CGGAATATACCGAAAAACAACTAGAGGCATATTCGGCGCAATAGCAGGTTTTCATAGAGAAT
 337 ArgAsnIleProGluLysGlnThrArgGlyIlePheGlyAlaIleAlaGlyPheIleGluAsn

Фиг. 10

1072 GGTGGGAAGGAATGGTAGACGGCTGGTACGGTTTCAGACATCAAAATCTGAGGGCACAGGA
 358 GlyTrpGluGlyMetValAspGlyTrpTyrGlyPheArgHisGlnAsnSerGluGlyThrGly
 1135 CAAGCAGCAGACCTTAAAGCACCCAAAGCAGCATCGACCAATCAACGGGAACTGAATAGA
 379 GlnAlaAlaAspLeuLysSerThrGlnAlaAlaIleAspGlnIleAsnGlyLysLeuAsnArg
 1198 CTAATCGAGAAGACGAACGGGAAATTCATCAAAATCGAAAAGSAATCTCAATAGTAGAAGGG
 400 LeuIleGluLysThrAsnGlyLysPheHisGlnIleGluLysGluPheSerIleValGluGly
 1261 AGAATTCAGGACCTCGAGAAATACGTTGAAGACACTAAATAGATCTCTGCTCTTACAATCGG
 421 ArgIleGlnAspLeuGluLysTyrValGluAspThrLysIleAspLeuTrpSerTyrAsnAla
 1324 GAATTCCTTGTGGCTCTGGAGAACCAACATACAAATGATCTGACTGACTCGGAAATGAGCAAA
 442 GluLeuLeuValAlaLeuGluAsnGlnHisThrIleAspLeuThrAspSerGluMetSerLys
 1387 CTGTTTGAAAAACAAGGAGGCAACTGAGGGAAAAATGCTGAGGACATGGGAAACGGTTGCCTT
 463 LeuPheGluLysThrArgArgGlnLeuArgGluAsnAlaGluAspMetGlyAsnGlyCysLeu
 1450 CAAATATACCACAAATGTGACAAATGCTTGATAGAGTCAATCAGAAATGGGACTTATGACCAT
 484 GlnIleTyrHisLysCysAspAsnAlaCysIleGluSerIleArgAsnGlyThrTyrAspHis
 1513 AATGAATACAGAGACGAAGCATTAAACAACCGATTTCAGATCAAAGGTGTTGAGCTGAAGTCG
 505 AsnGluTyrArgAspGluAlaLeuAsnAsnArgPheGlnIleLysGlyValGluLeuLysSer
 1576 GGATACAAAGACTGGATCCCTGTGGATTTCCTCTGCCATATCATGCTTTTGGCTTTGTGTGTT
 526 GlyTyrLysAspTrpIleLeuTrpIleSerSerAlaIleSerCysPheLeuLeuCysValVal
 1639 TTGCTAGGATTTATCATCTGGGCTGCCAGAAAGCAACATTAGGTGCAACATTGCACTCTGA
 547 LeuLeuGlyPheIleMetTrpAlaCysGlnLysGlyAsnIleArgCysAsnIleCysIle...

ФІГ. 10 (продовження)



Фіг. 11

1 ATGGCGTCTCAAGGCACTAAACGATCTTATGAGCAGATGGAAACCGGTGGAGAACGCCGGAAT
 17 MetAlaSerGlnGlyThrLysArgSerTyrGluGlnMetGluThrGlyGlyGluArgArgAsn
 64 GCTACTGAAATCAGAGCATCTGTGGGGGAATGGTGGTGAATTGGAAGATTCTACATACAG
 22 AlaThrGluIleArgAlaSerValGlyGlyMetValGlyGlyIleGlyArgPheTyrIleGln
 127 ATGTCCACTAAACTCAAATCAGTGACTATGAAGGAGGCTGATCCAGAACAGCATACAATA
 43 MetCysThrLysLeuLysLeuSerAspTyrGluGlyArgLeuIleGlnAsnSerIleThrIle
 190 GAGAGAAATGGTCTCTCTGCAATTTGATGAGAGGAGGAACAAATACCTGGAAGAATCCCCAGT
 64 GluArgMetValLeuSerAlaPheAspGluArgArgAsnLysTyrLeuGluGluHisProSer
 253 GCGGGGAAGGCCCAAGAACTGGAGGTCCAATATACAGAAAGAGAGACGGAAATGGATG
 85 AlaGlyLysAspProLysLysThrGlyGlyProIleTyrArgLysArgAspGlyLysTrpMet
 316 AGAGAGCTGATTATGTATGCAAGAGGAGATCAGGAGGATTGGCGTCAAGCAACAATGGT
 106 ArgGluLeuIleMetTyrAspLysGluGluIleArgArgIleTrpArgGluAlaAsnAsnGly
 379 GAGATGCTACTGCTGGTCTCACTCATCTGATGATTGGCATTCACCTGAATGATGCCACA
 127 GluAspAlaThrAlaGlyLeuThrHisLeuMetIleTrpHisSerAsnLeuAsnAspAlaThr
 442 TATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGGTACTGGGATGACCCAGAAATGCTCTCTGATGCAA
 148 TyrGlnArgThrArgAlaLeuValArgThrGlyMetAspProArgMetCysSerLeuMetGln
 505 GGATCAACTCTCCCGAGAGATCTGGAGCTGCTGGTCAGCAGTAAGGGAGTTGGGACGATG
 169 GlySerThrLeuProArgArgSerGlyAlaAlaGlyAlaAlaValLysGlyValGlyThrMet
 568 GTAATGGAACTGATTGGATGATAAAGCGGGGATCAATGATCGGAACCTCTGGAGAGCGAA
 190 ValMetGluLeuIleArgMetIleLysArgGlyIleAsnAspArgAsnPheTrpArgGlyGlu
 631 AATGGACGAAGAACAAGATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAATTTAG
 211 AsnGlyArgArgThrArgIleAlaTyrGluArgMetCysAsnIleLeuLysGlyLysPheGln
 694 ACAGCAGCGCAACGAGCAACGATGGACAGGTCCGAGAAAGCAGAAATCCTGGGAATGCTGAG
 232 ThrAlaAlaGlnArgAlaThrMetAspGlnValArgGluSerArgAsnProGlyAsnAlaGlu
 757 ATTGAAGACCTTATCTTTTAGCAGGATCTGCACTCATTCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAA
 253 IleGluAspLeuIlePheLeuAlaArgSerAlaLeuIleLeuArgGlySerValAlaHisLys
 820 TCCTGCTGCTGCTGTGTATATGGACTTGTCTGGCAAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAA
 274 SerCysLeuProAlaCysValTyrGlyLeuValValAlaSerGlyTyrAspPheGluArgGlu
 883 GGGTACTCTCTAGTCGGAATAGATCCTTTCCGCTGCTCCAGAACAGCCAGGTGTTCAAGCTC
 295 GlyTyrSerLeuValGlyIleAspProPheArgLeuLeuGlnAsnSerGlnValPheSerLeu
 946 ATTAGACCAATGAGAATCCAGACATAAGAGTCACTTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCA
 316 IleArgProAsnGluAsnProAlaHisLysSerGlnLeuValTrpMetAlaCysHisSerAla
 1009 GCATTGGAAGATCTGAGAGTGTCAAGTTTCATCAGAGGACAAAAGTGGTCCCAAGAGGACAA
 337 AlaPheGluAspLeuArgValSerSerPheIleArgGlyThrLysValValProArgGlyGln

Фиг. 12

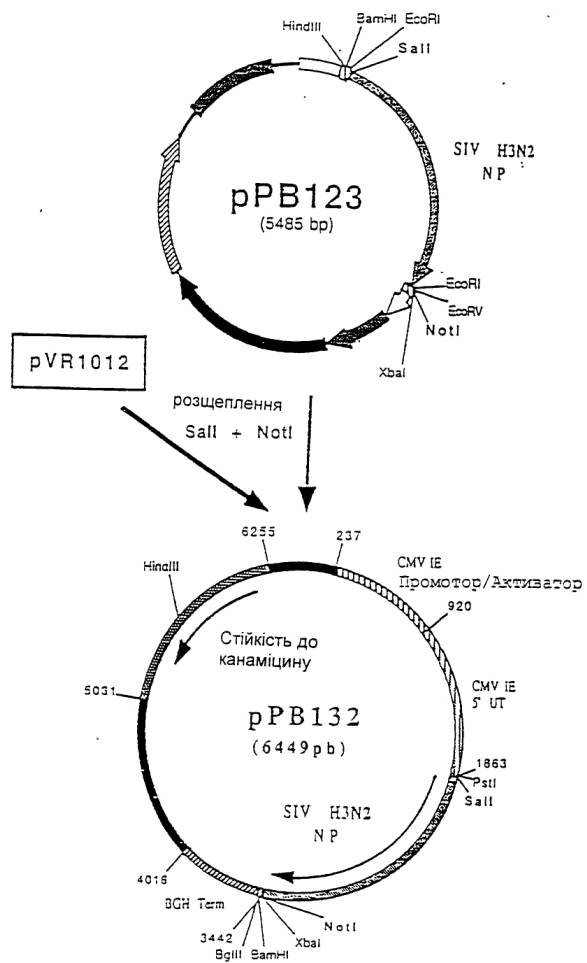
1072 CTGTCCACTAGAGGAGTCAAATTGCTTCAAATGAAACATGGAACAAATGGACTCCATTACT
 358 LeuSerThrArgGlyValGlnIleAlaSerAsnGluAsnMetGluThrMetAspSerIleThr
 1135 CTTGAAGTGAAGCAAACTACTGGGCTATAAGAACAGGAGCGGAGGAACACCAACCAACAG
 379 LeuGluLeuArgSerLysTyrTrpAlaIleArgThrArgSerGlyGlyAsnThrAsnGlnGln
 1198 AGGGCATCTGCAGGGCAAAATCAGTGTACAACTACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCTTTC
 400 ArgAlaSerAlaGlyGlnIleSerValGlnProThrPheSerValGlnArgAsnLeuProPhe
 1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCAGCATTTACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGACATGAGG
 421 GluArgAlaThrIleMetAlaAlaPheThrGlyAsnThrGluGlyArgThrSerAspMetArg
 1324 ACTGAAATTATAAGAATGATGGAAGTGCAGACCAAGATGTGCTCTCCAGGGCGGGGA
 442 ThrGluIleIleArgMetMetGluSerAlaArgProGluAspValSerPheGlnGlyArgGly
 1387 GTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGCAACGAAACCGATCGTGCCTTCTTTGACGTGAGTAAT
 463 ValPheGluLeuSerAspGluLysAlaThrAsnProIleValProSerPheAspValSerAsn
 1450 GAGGGATCTTATTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATAACAATTAA
 484 GluGlySerTyrPhePheGlyAspAsnAlaGluGluTyrAsnAsn...

Фиг. 12 (продовження)

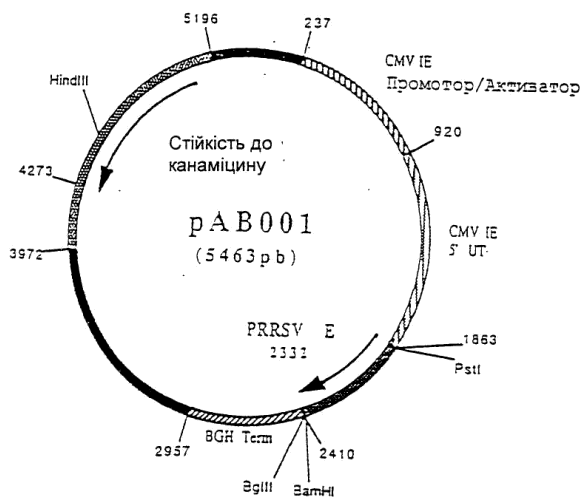
37

77935

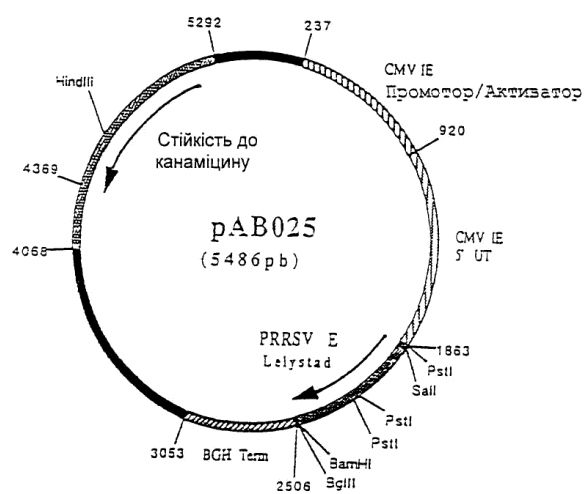
38



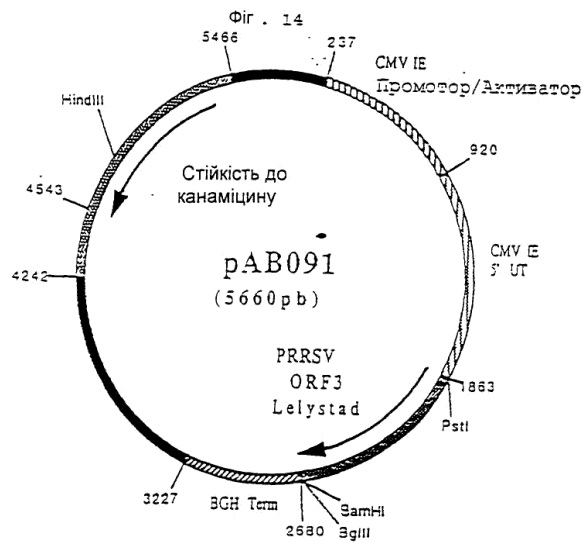
Фиг. 13



Фиг. 15



Фиг. 14



Фиг. 16

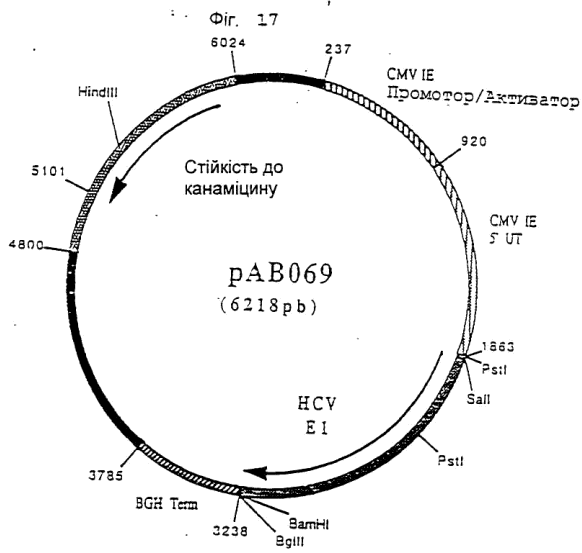
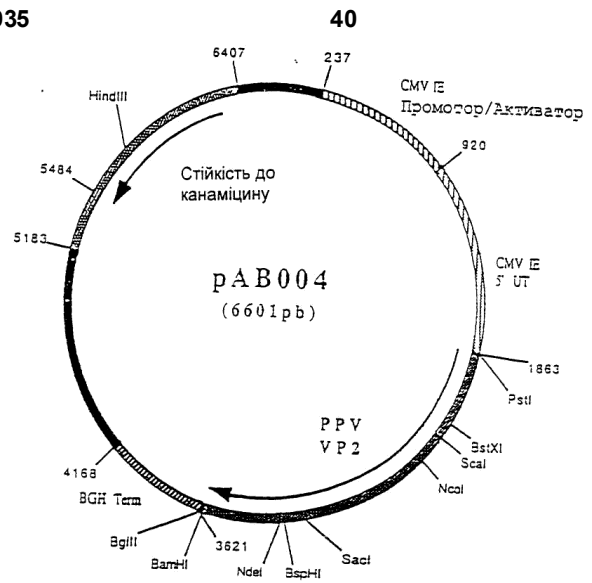
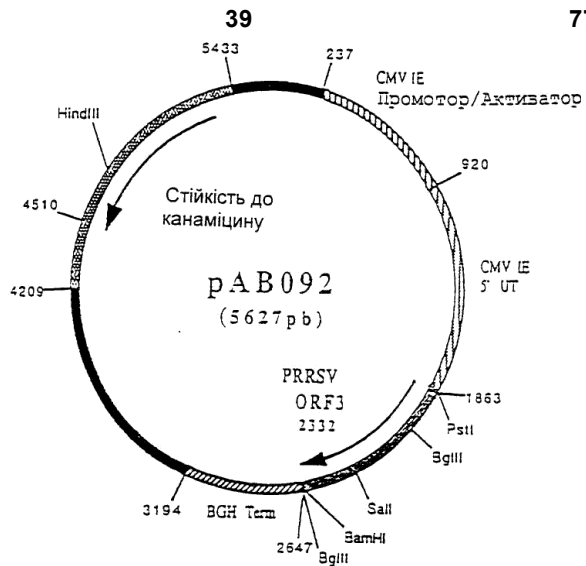


Fig. 19

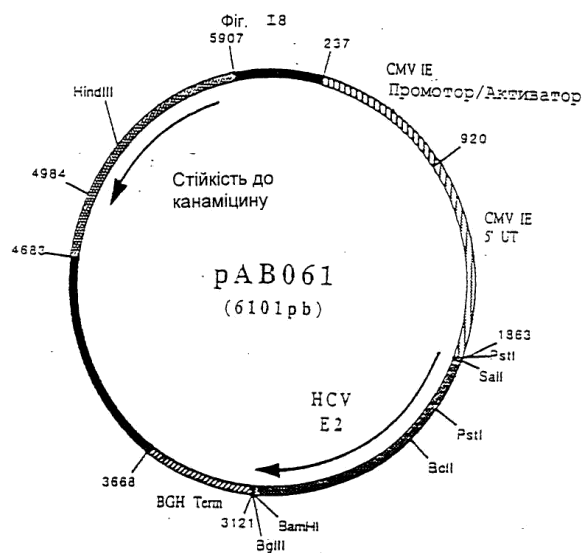
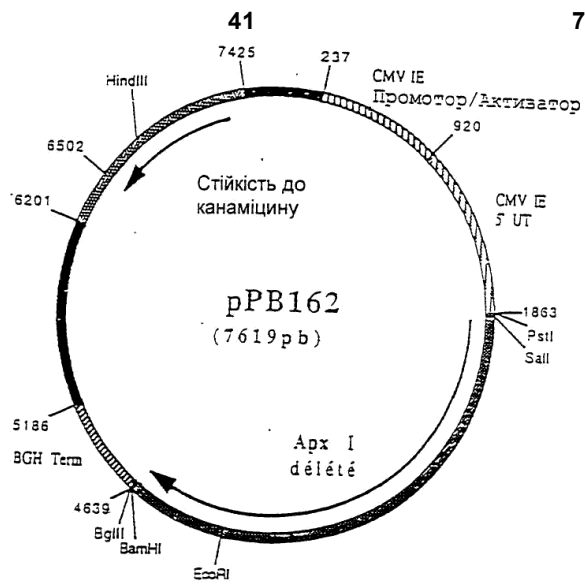
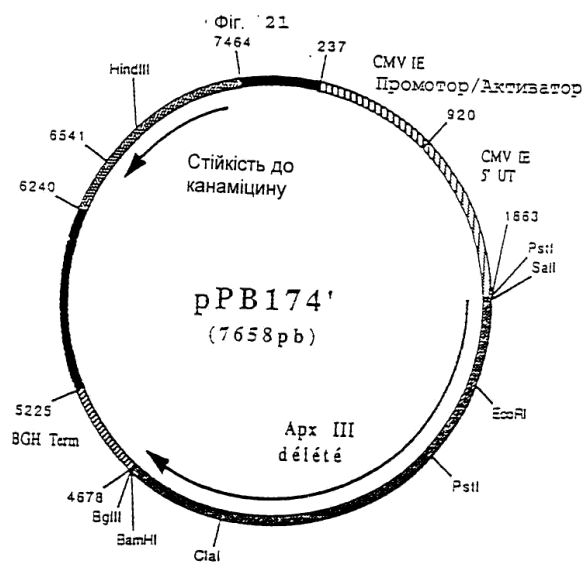
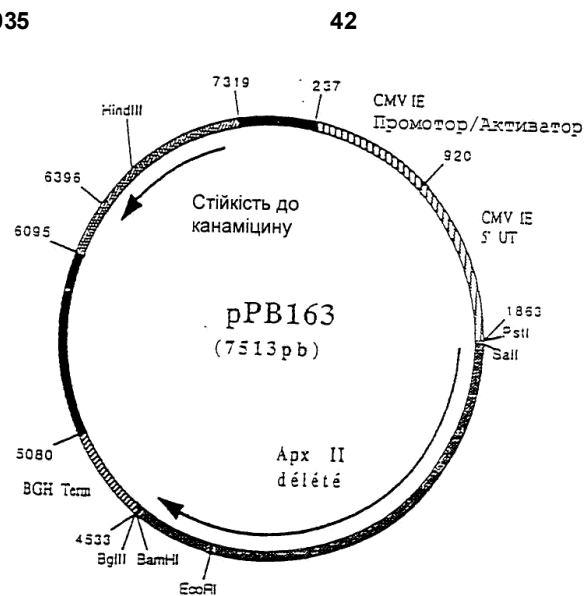


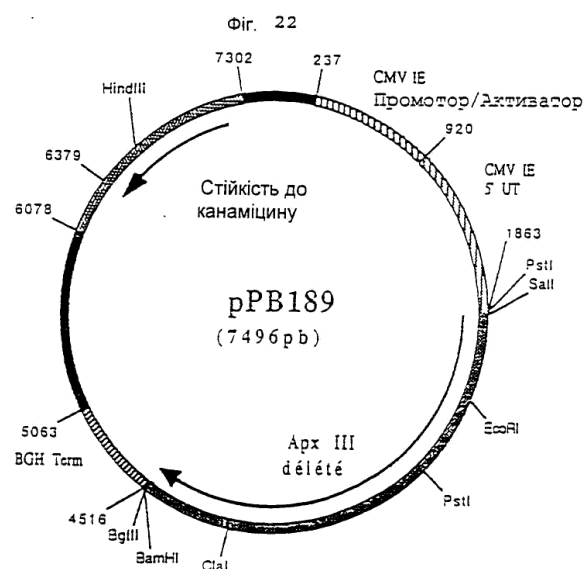
Fig. 20



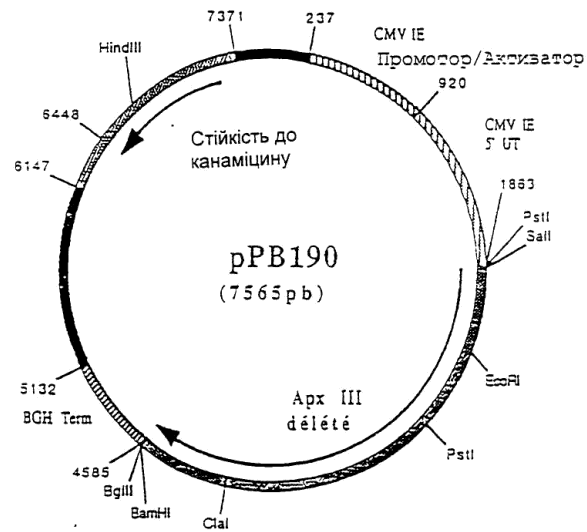
77935



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25