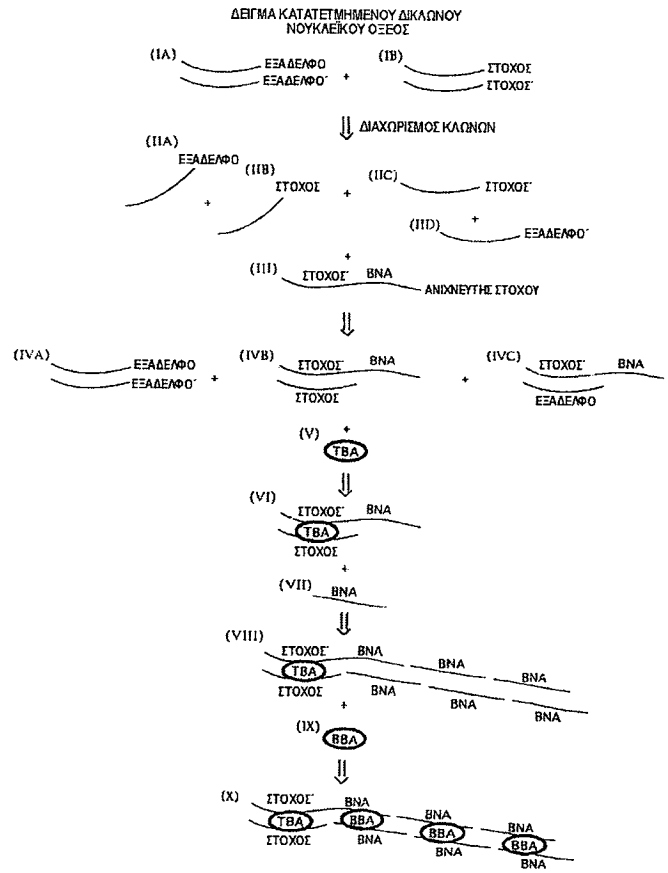


EP/31207

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Περίληψη

Αυτή η εφεύρεση είναι πρωτότυπη μέθοδος ανίχνευσης και εντοπισμού ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε δείγμα με υψηλό βαθμό ευαισθησίας και εξειδίκευσης. Η μέθοδος και οι πρωτότυπες συνθέσεις που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο ενέχουν την χρήση Νουκλεϊκών Οξέων Ανιχνευτών, την παραγωγή περιοχών δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων και την χρήση Συγκροτημάτων Δέσμευσης Στόχων νουκλεϊκών οξέων για την ανίχνευση και ο εντοπισμό Νουκλεϊκών Οξέων Στόχων. Η ανίχνευση και ο εντοπισμός Νουκλεϊκών Οξέων Στόχων επιτυγχάνεται ακόμα και παρουσία νουκλεϊκών οξέων που έχουν παρόμοιες αλληλουχίες. Η μέθοδος παρέχει υψηλό βαθμό ενίσχυσης του σήματος που παράγεται από κάθε συμβάν ειδικής δέσμευσης. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται μέθοδοι και συνθέσεις για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων HIV και HPV σε δείγματα. Αυτές οι μέθοδοι και συνθέσεις χρησιμεύουν σε διάγνωση ασθένειας, γενετική παρακολούθηση, ιατροδικαστική, και ανάλυση μειγμάτων νουκλεϊκών οξέων. Μερικές από τις πρωτότυπες συνθέσεις που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο ανίχνευσης είναι χρήσιμες σε αποτροπή ή θεραπευτική αγωγή παθογόνων καταστάσεων.



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ιστορικό της εφεύρεσης

1. Πεδίο της εφεύρεσης

Αυτή η εφεύρεση παρέχει μέθοδο και συνθέσεις για χρήση σε δέσμευση, ανίχνευση, και ενίσχυση της ανίχνευσης ειδικών αλληλουχιών Νουκλεϊκών Οξέων Στόχων σε δείγμα με πιστότητα και ακρίβεια, ακόμα και παρουσία πολύ συναφών αλλά διαφορετικών νουκλεϊκών οξέων. Η δέσμευση μπορεί να ενέχει την συνοδεία (*chaperoning*) και συγκρότηση ειδικών μορίων σε Συγκροτήματα Δέσμευσης Στόχων τα οποία δεσμεύονται ειδικά με Περιοχές Δέσμευσης Στόχου που σχηματίζονται με την υβριδοποίηση αλληλουχιών Νουκλεϊκών Οξέων Ανιχνευτών και Νουκλεϊκών Οξέων Στόχων. Η ενίσχυση μπορεί να ενέχει την συνοδεία και/ή συγκρότηση ειδικών μορίων σε Ενισχυτικά Συγκροτήματα Δέσμευσης τα οποία δεσμεύονται ειδικά με Ενισχυτικές Περιοχές Δέσμευσης που σχηματίζονται με την υβριδοποίηση Ενισχυτικών Νουκλεϊκών Οξέων με Νουκλεϊκά Οξέα Ανιχνευτών, Νουκλεϊκά Οξέα Στόχων, ή άλλα Ενισχυτικά Νουκλεϊκά Οξέα. Η ανίχνευση ενέχει την παροχή μίας ή περισσότερων ανιχνεύσιμων σημάτων, που περιλαμβάνουν ραδιενεργά, φωταυγή ή φθορίζοντα, ενζυμικά, ή άλλα ανιχνεύσιμα ή παράγοντα σήμα μόρια, σε συνδυασμό με το Νουκλεϊκό Οξύ Ανιχνευτή, το Συγκρότημα Δέσμευσης στόχου, το Ενισχυτικό Νουκλεϊκό Οξύ ή το Ενισχυτικό Συγκρότημα Δέσμευσης.

2. Ιστορικό και περιγραφή συναφούς τεχνολογίας

Υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός περιπτώσεων στις οποίες είναι σημαντική η δυνατότητα ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων που περιέχουν ειδική αλληλουχία, που από εδώ και εις το εξής θα ονομάζονται Νουκλεϊκά Οξέα Στόχων (TNAs: *Target Nucleic Acids*), σε δείγμα. Είναι επιθυμητή η δυνατότητα ανίχνευσης των TNAs με τον μικρότερο αριθμό βημάτων επεξεργασίας, με τα απλούστερα συστατικά και με τον αποκλεισμό άλλων παρόμοιων αλλά διαφορετικών νουκλεϊκών οξέων, που από εδώ και εις το εξής ονομάζονται Εξαδέλφια Νουκλεϊκά Οξέα (CNAs: *Cousin Nucleic Acids*). Είναι επιθυμητή η δυνατότητα ανίχνευσης TNAs με τον αποκλεισμό του οποιουδήποτε και όλων των CNAs στο ανιχνευόμενο δείγμα χωρίς την αναγκαιότητα ενίσχυσης ή άλλης μετα-ανιχνευτικής επεξεργασίας.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούν ακινητοποιημένα ή επισημασμένα (*tagged*) νουκλεϊκά οξέα ως ανιχνευτές για TNAs. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας γνωστές μεθόδους, είναι δύσκολο να διαφοροποιηθεί TNA που δεσμεύεται με Νουκλεϊκό Οξύ Ανιχνευτή (PNA: *Probe Nucleic Acid*) από CNA που δεσμεύεται με το PNA. Για παράδειγμα, μία ή περισσότερες παράταιρες συζεύξεις βάσεων μεταξύ του PNA και CNA μπορούν μολαταύτα να έχουν ως αποτέλεσμα υβριδοποίηση CNA-PNA που είναι σχεδόν ταυτόσημη με υβριδοποίηση TNA-PNA. Επομένως, αυτή και μόνο η υβριδοποίηση δεν είναι ο καλύτερος δείκτης ότι PNA έχει υβριδοποιηθεί με μοναδικό TNA.

Υπάρχουν πολλές περιπτώσεις στις οποίες θα χρησιμοποιηθεί PNA για να καθορίσει εάν TNA ήταν παρόν σε δείγμα που μπορεί να περιέχει CNAs. Η υβριδοποίηση του PNA με το οποιοδήποτε CNA σε αυτήν την περίπτωση θα περιορίσει την διαγνωστική αξία που μπορεί να έχει το PNA για την ανίχνευση TNA, απύσης επιπρόσθετης επαλήθευσης. Επιπλέον, είναι επιθυμητή η δυνατότητα ανίχνευσης και εντοπισμού TNAs με χαμηλούς αριθμούς αντιγράφων σε δείγματα που μπορεί να περιέχουν πολλά αντίγραφα CNAs, χωρίς την ανάγκη δημιουργία επιπρόσθετων αντιγράφων του TNA. Θα είναι επίσης επιθυμητή η

δυνατότητα επιβεβαίωσης της παρουσίας CNAs, ανεξαρτήτως των TNAs, χωρίς την ανάγκη διαχωρισμού των CNAs και TNAs στο δείγμα.

Επιπλέον, θα είναι επιθυμητή η δυνατότητα ενίσχυσης του σήματος ακόμα και χαμηλής συχνότητας υβριδοποίησης συγκεκριμένου TNA-PNA. Γι' αυτόν τον σκοπό, θα είναι επιθυμητή μέθοδος πολυμερισμού πολλαπλών αντιγράφων σήμανσης, που από εδώ και εις το εξής αναφέρεται ως Ενισχυτικό Νουκλεϊκό Οξύ (BNA: *Booster Nucleic Acid*) στο TNA-PNA.

Η παρούσα εφεύρεση παρέχει μεθόδους και συνθέσεις για την επίτευξη των προαναφερόμενων επιθυμητών αντικειμενικών στόχων. Όπως αποκαλύπτεται από την ακόλουθη ανασκόπηση, οι προκείμενες συνθέσεις και μέθοδοι δεν έχουν ανακοινωθεί ή προταθεί στην τεχνολογία. Μία γενική και εκτενής ανασκόπηση της τελευταίας λέξης της τεχνολογίας ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων παρέχεται σε Keller, H., M.M. Manak (1989) *DNA Probes*, Stockton Press.

Έχει ανακοινωθεί μία μέθοδος ανίχνευσης παράταιρων συζεύξεων ζευγών βάσεων με χημικά μέσα για να καθορίζεται εάν PNA έχει υβριδοποιηθεί με CNA παρά με TNA. Σε U.S. Patent (Αμερικανικό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας) No. 4,794,075 σε Ford *et al.*, συζητείται μέθοδος διάκρισης θραυσμάτων DNA που περιέχουν παράταιρες συζεύξεις μοναδικών βάσεων από τα απολύτως σωστά συζευγμένα ομολογά τους. Μονόκλωνες περιοχές σε δίκλωνο θραύσμα τροποποιούνται με καρβοδιμίδιο, το οποίο αντιδρά με μη συζευγμένα υπολείμματα γουανίνης (G) και θυμίνης (T) στο DNA. Γραμμικά διπλά μόρια DNA δεν αντιδρούν, ενώ μόρια DNA με παράταιρες συζεύξεις μοναδικών βάσεων αντιδρούν ποσοτικά. Μετά την αντίδραση με καρβοδιμίδιο, τα μόρια DNA κλασματοποιούνται σε πηκτώματα υψηλού ποσοστού πολυακρυλαμιδίου έτσι ώστε μπορούν να διακριθούν τα τροποποιημένα από τα μη τροποποιημένα θραύσματα. Οι Ford *et al.* εφάρμοσαν αυτήν την τεχνική για να εντοπίσουν και να καθαρίσουν διαφορές αλληλουχιών DNA που ευθύνονται για ποικιλομορφία φαινοτύπου και κληρονομική νόσο. Αν και αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη για παρακολούθηση ποικιλομορφιών σε γενετικό υλικό, έχει μεγάλο αριθμό σταδίων, απαιτεί δαπανηρά συστατικά, και δεν προσφέρει άμεσο τρόπο καθορισμού εάν PNA έχει υβριδοποιηθεί με TNA με αποκλεισμό των CNAs στο δείγμα.

Έχουν γίνει ορισμένες προσπάθειες για να εξασφαλιστεί ότι τουλάχιστον μέρος της υβριδοποίησης μεταξύ του PNA και άλλου νουκλεϊκού οξέος είναι συμπληρωματικό. Μία μέθοδος ενέχει την παρακολούθηση προϊόντων μεταγραφής που παράγονται εάν το PNA υβριδοποιηθεί με νουκλεϊκό οξύ επαρκώς για να μεταγραφθεί από θέση προαγωγή που περιέχεται στον ανιχνευτή. Η U.S. Patent No. 5,215,899 σε Dattagupta αποκαλύπτει πως ειδικές αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων ενισχύονται μέσω της χρήσης ανιχνευτή φουρκέτας ο οποίος, με την υβριδοποίηση και απολίνωση σε αλληλουχία-στόχο, είναι ικανός να μεταγραφθεί. Ο ανιχνευτής περιλαμβάνει μονόκλωνη αυτοσυμπληρωματική αλληλουχία η οποία, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, σχηματίζει δομή φουρκέτας που έχει λειτουργική περιοχή προαγωγή, και επιπλέον περιλαμβάνει μονόκλωνη αλληλουχία ανιχνευτή που εκτείνεται από το άκρο 3' της αλληλουχίας φουρκέτας. Μετά από υβριδοποίηση με αλληλουχία-στόχο συμπληρωματική της αλληλουχίας του ανιχνευτή και απολίνωση του άκρου 3' της υβριδοποιημένης αλληλουχίας-στόχου με το άκρο 5' του ανιχνευτή-φουρκέτα, η αλληλουχία στόχου καθίσταται ικανή να μεταγραφθεί παρουσία κατάλληλης πολυμεράσης RNA και κατάλληλων τριφωσφορικών ριβονουκλεοζιδίων (rNTPs). Η ενίσχυση επιτυγχάνεται υβριδοποιώντας την επιθυμητή αλληλουχία TNA με τον ανιχνευτή, απολινώνοντας το TNA με το PNA, προσθέτοντας την πολυμεράση RNA και τα rNTPs στα διαχωρισμένα υβρίδια, και αφήνοντας την μεταγραφή να συνεχιστεί έως ότου συσσωρευτεί επιθυμητή ποσότητα προϊόντος μεταγραφής RNA. Αυτή η μέθοδος, γενικά και ειδικά, ενέχει την χρήση DNA φουρκέτας που σχηματίζεται με μονόκλωνο μη συζευγμένο άκρο για να υβριδοποιηθεί με αλληλουχία στόχου. Όταν δεσμευτεί η αλληλουχία στόχου, καθίσταται δυνατή η παραγωγή προϊόντων μεταγραφής RNA. Επομένως, η μέθοδος ενέχει την ανίχνευση δευτερογενών προϊόντων μεταγραφής παρά την χρήση συγκροτήματος δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος για να ακινητοποιήσει άμεσα και/ή να εντοπίσει αλληλουχία στόχου. Ένα CNA μπορεί εύκολα να δεσμευθεί με τον ανιχνευτή, και η έλλειψη συμπληρωματικότητας

δεν θα παρεμβληθεί αναγκαστικά στον σχηματισμό υβριδίου CNA-PNA το οποίο μετά θα μπορέσει να υποστηρίξει την παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων μεταγραφής.

CNA δεσμευόμενο με PNA θα μπορέσει να διακριθεί εάν η έλλειψη συμπληρωματικότητας παρεμβάλλεται στην επιδεκτικότητα του υβριδικού ζεύγους CNA-PNA να διασπάται με περιοριστική ενδονουκλεάση. Σε U.S. Patent No. 5,118,605 σε *Urdea* και σε U.S. Patent No. 4,775,619 σε *Urdea*, παρασχέθηκαν πρωτότυπες μέθοδοι προσδιορισμού αναλυόμενου νουκλεϊκού οξέος, που χρησιμοποιούν πολυνουκλεοτίδια που έχουν αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων ουσιωδώς ομόλογες με αλληλουχία ενδιαφέροντος στο αναλυόμενο νουκλεϊκό οξύ, όπου η παρουσία ή απουσία υβριδοποίησης σε προκαθορισμένη αυστηρότητα φροντίζει για την έκλυση σήμανσης από υποστήριγμα. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται για δέσμευση σήμανσης σε υποστήριγμα, οπότε με την διάσπαση μονού ή διπλού κλώνου DNA, μπορεί να εκλυθεί σήμανση από υποστήριγμα και η έκλυση της σήμανσης μπορεί να διακριθεί ως ενδεικτική της παρουσίας συγκεκριμένης αλληλουχίας πολυνουκλεοτιδίου σε δείγμα. Ωστόσο, αυτή η τεχνική έχει το μειονέκτημα ότι ζεύγος CNA-PNA μπορεί να διασπαστεί με την περιοριστική ενδονουκλεάση ακόμα και εάν υπάρχει παράταιρη σύζευξη, όταν η παράταιρη σύζευξη είναι εκτός της περιοχής αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης. Αυτό θα οδηγήσει σε αποτυχία του προσδιορισμού να ταυτοποιήσει υβρίδιο CNA-PNA.

Άλλη μέθοδος χρησιμοποιεί διακλαδισμένο ανιχνευτή DNA για να ανιχνεύσει νουκλεϊκά οξέα. Η U.S. Patent No. 5,124,246 σε *Urdea et al.* αποκαλύπτει γραμμικά ή διακλαδισμένα πολυμερή ολιγονουκλεοτιδίων που είναι χρήσιμα ως ανιχνευτές σε βιοχημικούς προσδιορισμούς που περιλαμβάνουν (1) τουλάχιστον μία πρώτη μονόκλωνη μονάδα ολιγονουκλεοτιδίου (PNA) που είναι συμπληρωματική μονόκλωνης αλληλουχίας ολιγονουκλεοτιδίου ενδιαφέροντος (TNA), και (2) πληθώρα δεύτερων μονόκλωνων μονάδων ολιγονουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικά μονόκλωνου σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου. Μολονότι περιγράφονται υβριδοποιήσεις ενισχυμένων νουκλεϊκών οξέων τύπου σάντουιτς και ανοσοπροσδιορισμοί χρησιμοποιώντας τα πολυμερή, η μέθοδος έχει τον περιορισμό ότι μπορεί να συμβεί υβριδοποίηση PNA-CNA και θα έχει ως αποτέλεσμα παραγωγή ανεπιθύμητου σήματος.

Εκτός των μεθόδων ταυτοποίησης TNA, έχουν αποκαλυφθεί μέθοδοι για την ενίσχυση αυτού του DNA. Σε U.S. Patent No. 5,200,314 σε *Urdea*, κλώνος αναλυόμενου πολυνουκλεοτιδίου που έχει αναλυόμενη αλληλουχία (TNA) ανιχνεύεται σε δείγμα που περιέχει πολυνουκλεοτίδια με επαφή του αναλυόμενου πολυνουκλεοτιδίου με ανιχνευτή σύλληψης (PNA) υπό συνθήκες υβριδοποίησης, όπου ο ανιχνευτής σύλληψης έχει πρώτον εταίρο δέσμευσης ειδικό για το TNA, και δεύτερη αλληλουχία δέσμευσης ειδική για τρίτο εταίρο δέσμευσης στερεάς φάσης. Το διπλό μόριο που προκύπτει ακινητοποιείται μετά με ειδική δέσμευση μεταξύ των εταίρων δέσμευσης, και τα μη δεσμευμένα πολυνουκλεοτίδια διαχωρίζονται από τα δεσμευμένα μόρια. Το αναλυόμενο πολυνουκλεοτίδιο προαιρετικά εκτοπίζεται από την στερεά φάση, και μετά ενισχύεται με PCR. Ο κάθε εκκινητής PCR έχει περιοχή πολυνουκλεοτιδίου ικανή να υβριδοποιείται με περιοχή του αναλυόμενου πολυνουκλεοτιδίου, και τουλάχιστον ένα από τους εκκινητές έχει επιπλέον επιπρόσθετο εταίρο δέσμευσης ικανό να δεσμεύεται με εταίρο δέσμευσης στερεάς φάσης. Το ενισχυμένο προϊόν μετά διαχωρίζεται από το μείγμα αντίδρασης με ειδική δέσμευση μεταξύ των εταίρων δέσμευσης, και το ενισχυμένο προϊόν ανιχνεύεται. Αν και είναι δυνατόν να επιβεβαιωθεί (με PCR) ότι συγκεκριμένο νουκλεϊκό οξύ έχει υβριδοποιηθεί με το PNA, η επιβεβαίωση είναι δαπανηρή και ενέχει πολλαπλά στάδια.

Όσον αφορά ανακοινώσεις που ενέχουν την αλληλεπίδραση δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος και πρωτεΐνης που δεσμεύεται με DNA, έχει περιγραφθεί μέθοδος όπου αλληλουχία ακινητοποιημένου DNA που περιέχει θέσεις δέσμευσης για μία μόνο πρωτεΐνη χρησιμοποιείται για καθαρισμό αυτής της πρωτεΐνης. Η U.S. Patent No. 5,122,600 σε *Kawaguchi et al.* αποκαλύπτει DNA ακινητοποιημένο σε μικρόσφαιρα που περιλαμβάνει αλυσίδες DNA που έχουν αλληλουχίες βάσεων που δεσμεύονται ειδικά με συγκεκριμένη πρωτεΐνη, και όχημα που έχει μέγεθος σωματιδίου όχι περισσότερο από 50 μm και όχι λιγότερο από 0.01 μm το οποίο δεν απορροφά πρωτεΐνη, με αυτό το όχημα και αυτές τις

αλυσίδες DNA να είναι δεσμευμένα μεταξύ τους με χημικό δεσμό, και διαδικασία καθαρισμού πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας αυτή την μικρόσφαιρα. Εφόσον αυτή είναι μέθοδος καθαρισμού πρωτεΐνης, δεν αποκαλύπτει μέθοδο ανίχνευσης TNA ούτε μέθοδο με την οποία περισσότερο από μία πρωτεΐνη δεσμεύεται με δίκλωνο νουκλεϊκό οξύ με σκοπό την ανίχνευση και εντοπισμό ειδικών αλληλουχιών TNA.

Η EP 0 453 301 περιγράφει μέθοδο ανίχνευσης αλληλουχίας πολυνουκλεοτιδίου-στόχου σε δείγμα, όπου αλληλουχίες σε TNA ανιχνεύονται υβριδοποιώντας πρώτα και δεύτερα PNAs με το TNA. Το κάθε ένα PNA περιέχει προσχηματισμένο διπλό μόριο, ή διπλό μόριο που σχηματίζεται μέσω προέκτασης αλυσίδας, ικανό να δεσμεύσει πρωτεΐνη που δεσμεύεται με ειδική αλληλουχία νουκλεοτιδίων.

Η EP 0 147 665 αποκαλύπτει επίσης την χρήση πρωτεϊνών που δεσμεύονται με ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA ως μέσα ανίχνευσης σε προσδιορισμό υβριδοποίησης. Και πάλι, ο δίκλωνος ανιχνευτής είναι προσχηματισμένος.

Η EP 0 450 594 αποκαλύπτει την δυνατότητα σήμανσης των αποκαλούμενων μορίων εμφάνισης (*developer molecules*) με ενώσεις ειδικές για ορισμένες διπλές αλληλουχίες, π.χ., ορισμένοι διαταξινομητές (*intercollators*). Αυτές οι ενώσεις προσκολλούνται στα μόρια εμφάνισης πριν την υβριδοποίηση.

Η US-A-4556643 αποκαλύπτει την μη ραδιενεργή ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών νουκλεοτιδίων σε δείγμα, που ενέχει υβριδοποίηση ανιχνευτή που περιέχει αλληλουχίες ειδικές για πρωτεΐνη που δεσμεύεται με DNA.

Η WO93/00446 αποκαλύπτει μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια που περιλαμβάνουν τμήμα το οποίο, όταν καθίσταται δίκλωνο, δεσμεύεται με την πρωτεΐνη UL9 που προέρχεται από απλό ερπητοϊό, και περαιτέρω τμήμα το οποίο, όταν καθίσταται δίκλωνο, δεσμεύεται με διαταξινομητικές ενώσεις.

Περίληψη της εφεύρεσης

Αυτή η εφεύρεση ορίζεται στις επισυναπτόμενες αξιώσεις. Παρέχει μεθόδους με τις οποίες ειδικές αλληλουχίες Νουκλεϊκών Οξέων Στόχων (TNA: *Target Nucleic Acid*) ανιχνεύονται μέσω της χρήσης Νουκλεϊκών Οξέων Ανιχνευτών (PNAs: *Probe Nucleic Acids*) τα οποία, όταν υβριδοποιούνται με TNAs, είναι ικανά να δεσμεύονται με Συγκροτήματα Δέσμευσης Στόχου (TBAs: *Target Binding Assemblies*). Το κάθε TBA δεσμεύεται με τουλάχιστον μία ειδική περιοχή του υβριδικού ζεύγους PNA-TNA, την Περιοχή Δέσμευσης Στόχου (TBR: *Target Binding Region*). Το TBA αποτελείται από ένα ή περισσότερα μόρια, ένα ή περισσότερα εκ των οποίων μπορεί να δεσμευτεί με αλληλουχίες TBR με ειδικό τρόπο που εξαρτάται από την αλληλουχία ή διαμόρφωση. Το TBA μπορεί να περιλαμβάνει μία ή περισσότερες πιλοτικές αλληλουχίες, που ονομάζονται "PILOTS" (πιλότοι) ή "αλληλουχίες ασυμμετρίας", που συγκροτούν και περιορίζουν τα συστατικά δέσμευσης νουκλεοτιδίων του TBA σε ειδικές γεωμετρικές δομές. Οι PILOTS δρουν για να συγκροτήσουν μονάδες αναγνώρισης ειδικών νουκλεϊκών οξέων ή άλλους "πιλότους" στους οποίους μονάδες αναγνώρισης ειδικών νουκλεϊκών οξέων προσκολλούνται στα TBAs με προκαθορισμένο τρόπο. Το TBA μπορεί επίσης να περιέχει ένα ή περισσότερα μόρια που καθιλώνουν ή εντοπίζουν το TBA.

Τα PNA, σύμφωνα με την εφεύρεση, ορίζονται στην αξίωση 1. Χρήσεις αυτών των νουκλεϊκών οξέων ορίζονται σε άλλες αξιώσεις.

Τα PNAs, εκτός των TNA-ειδικών αλληλουχιών, περιέχουν επίσης μία ή περισσότερες αλληλουχίες, $\frac{1}{2}$ BBRs, ικανές να υβριδοποιούνται με συμπληρωματικές $\frac{1}{2}$ BBRs σε Ενισχυτικά Νουκλεϊκά Οξέα (BNAs: *Booster Nucleic Acids*). Μέσω υβριδοποίησης προσθεμένων BNAs στις αρχικές $\frac{1}{2}$ BBRs που είναι παρούσες σε PNAs, κατασκευάζονται προεκτάσεις των PNAs στην μορφή υβριδίων PNA-BNA και μετά υβριδίων BNA-BNA. Αυτές οι προεκτάσεις περιέχουν μία ή περισσότερες Ενισχυτικές Περιοχές Δέσμευσης (BBRs: *Booster Binding Regions*). Η κάθε BBR είναι ικανή να δεσμεύεται με Ενισχυτικό Συγκρότημα Δέσμευσης (BBA: *Booster Binding Assembly*). Το BBA αποτελείται από μόρια,

ένα ή περισσότερα εκ των οποίων μπορεί να δεσμευτεί με BBR με ειδικό τρόπο εξαρτώμενο από αλληλουχία ή διαμόρφωση. Το BBA μπορεί να περιλαμβάνει μία ή περισσότερες πιλοτικές αλληλουχίες, που ονομάζονται “PILOTS” ή “αλληλουχίες ασυμμετρίας”, που συγκροτούν και περιορίζουν τα συστατικά δέσμευσης νουκλεοτιδίων του TBA σε ειδικές γεωμετρικές δομές. Οι PILOTS δρουν για να συγκροτήσουν μονάδες αναγνώρισης ειδικών νουκλεϊκών οξέων ή άλλους “πιλότους” στους οποίους μονάδες αναγνώρισης ειδικών νουκλεϊκών οξέων προσκολλούνται στα TBA με προκαθορισμένο τρόπο. Το TBA μπορεί να περιέχει μόρια που καθλώνουν ή εντοπίζουν το TBA ή που καθιστούν εφικτή την ανίχνευση των δεσμευμένων BBAs και δι’ αυτού του τρόπου των συμπλεγμάτων TBA-TNA-PNA με τα οποία αυτά, με την σειρά τους, δεσμεύονται. Αποκαλύπτονται μέθοδοι και συνθέσεις για χρησιμοποίηση των ½ BBRs, BNAs, BBRs, BBAs, και BBA PILOTS, συμπεριλαμβανομένης της χρησιμοποίησής τους ως συστατικά διαγνωστικών και ιατροδικαστικών δοκιμαστικών κιτ.

Αποκαλύπτονται μέθοδοι και συνθέσεις για δοκιμαστικές διαδικασίες και την παραγωγή δοκιμαστικού κιτ που περιέχει PNA, TBAs, TBRs, BNAs, BBRs, και BBAs για την ανίχνευση, εντοπισμό και διαφοροποίηση ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων, συμπεριλαμβανομένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων που απαντώνται σε ανθρώπινο ιό ανοσοανεπάρκειας (HIV), ανθρώπινο ιό θηλώματος (HPV), και σε άλλα συστήματα που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα, που περιλαμβάνουν ιούς και βακτήρια.

Κατά συνέπεια, ένα αντικείμενο αυτής της εφεύρεσης είναι να παρέχει μεθόδους και συνθέσεις για χρήση σε δέσμευση, ανίχνευση και ενίσχυση της ανίχνευσης ειδικών αλληλουχιών Νουκλεϊκών Οξέων Στόχων σε δείγμα με πιστότητα και ακρίβεια, ακόμα και παρουσία πολύ συναφών αλλά διαφορετικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων.

Κατά συνέπεια, ένα αντικείμενο αυτής της εφεύρεσης είναι να παρέχει μεθόδους και συνθέσεις για την δημιουργία Συγκροτημάτων Δέσμευσης Στόχων που δεσμεύονται ειδικά με Περιοχές Δέσμευσης Στόχων που σχηματίζονται με την υβριδοποίηση αλληλουχιών Νουκλεϊκών Οξέων Ανιχνευτών και Νουκλεϊκών Οξέων Στόχων.

Άλλο αντικείμενο αυτής της εφεύρεσης είναι να παρέχει μέθοδο και συνθέσεις για την δημιουργία Ενισχυτικών Συγκροτημάτων Δέσμευσης που δεσμεύονται ειδικά με Ενισχυτικές Περιοχές Δέσμευσης που σχηματίζονται με την υβριδοποίηση αλληλουχιών Ενισχυτικών Νουκλεϊκών Οξέων με Νουκλεϊκά Οξέα Ανιχνευτών, Ενισχυτικά Νουκλεϊκά Οξέα και Νουκλεϊκά Οξέα Φουρκετών.

Άλλο αντικείμενο αυτής της εφεύρεσης είναι να παρέχει μέθοδο και συνθέσεις για χρήση σε ενίσχυση ανίχνευσης Συγκροτημάτων Δέσμευσης Στόχου που δεσμεύονται με Περιοχές Δέσμευσης Στόχου χρησιμοποιώντας Ενισχυτικά Συγκροτήματα Δέσμευσης και Ενισχυτικά Νουκλεϊκά Οξέα.

Άλλο αντικείμενο αυτής της εφεύρεσης είναι να παρέχει μέθοδο και συνθέσεις που καθιστούν δυνατή την χρήση μίας ή περισσότερων ανιχνεύσιμων σημάτων, που περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, ραδιενεργές σημάσεις, φωταυγή, φθορίζοντα, ενζυμικά, ή παράγοντα άλλο σήμα, μόρια. Αυτές οι σημάσεις χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με Νουκλεϊκά Οξέα Ανιχνευτών, Συγκροτήματα Δέσμευσης Στόχων, Ενισχυτικά Συγκροτήματα Δέσμευσης, Ενισχυτικά Νουκλεϊκά Οξέα ή Νουκλεϊκά Οξέα Φουρκετών.

Σύντομη περιγραφή των Εικόνων

Οι ακόλουθες απεικονίσεις περιέχονται στην **Εικόνα 1**: Η **Εικόνα 1-I** είναι PNA που περιέχει ½ TBR, που είναι μονόκλωνη αλληλουχία που είναι συμπληρωματική με TNA και ½ BBR αλληλουχία. Η **Εικόνα 1-IIa** είναι TNA στο οποίο προσθέτονται τα συστατικά της Εικόνας 1-I, και, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, δεσμεύεται με το PNA για να σχηματιστούν τα συστατικά της **Εικόνας 1-IIIa**, υβρίδιο PNA-TNA που περιέχει τουλάχιστον μία TBR. Η **Εικόνα 1-IVa** είναι BNA που προσθέτεται στα συστατικά της Εικόνας 1-IIIa και, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, δεσμεύεται με την ½ BBR της Εικόνας 1-IIIa για να σχηματιστεί υβρίδιο PNA-BNA που περιέχει BBR που παρουσιάζεται σε **Εικόνα 1-Va**.

Η **Εικόνα 1-IIIb** είναι BNA που προσθ εται στα συστατικά της Εικόνας 1-I, και, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, δεσμεύεται με το PNA για να σχηματιστούν τα συστατικά της **Εικόνας 1-IIIb**, υβρίδιο PNA-TNA που περιέχει BBR. Η **Εικόνα 1-IVb** είναι TNA στο οποίο προσθ ονται τα συστατικά της Εικόνας 1-IIIb και το οποίο, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, δεσμεύεται με την 1/2 TBR της Εικόνας 1-IIIb για να σχηματιστεί υβρίδιο PNA-BNA που περιέχει TBR που παρουσιάζεται σε **Εικόνα 1-Vb**.

Η **Εικόνα 1-IIIc** είναι HNA που προσθ εται στα συστατικά της Εικόνας 1-I και το οποίο, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, δεσμεύεται με το PNA για να σχηματιστούν τα συστατικά της **Εικόνας 1-IIIc**, υβρίδιο PNA-HNA που περιέχει BBR. Η **Εικόνα 1-IVc** είναι TNA που προσθ εται στα συστατικά της Εικόνας 1-IIIc και το οποίο, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, δεσμεύεται με την 1/2 TBR της Εικόνας 1-IIIc για να σχηματιστεί υβρίδιο PNA-BNA που περιέχει BBR που παρουσιάζεται σε **Εικόνα 1-Vc**.

Τα υβρίδια που σχηματίζουν τις TBRs και BBRs είναι χρήσιμα στην παρούσα εφεύρεση. Τα PNAs και BNAs,  πως υποδεικνύονται στην Εικόνα 1, μπορεί να μην περιέχουν προσκολλημένο υποστήριγμα και/ή δείκτη (OSA), ή προσκολλημένο υποστήριγμα ή άλλο μέσο εντοπισμού, που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, προσκόλληση σε σφαιρίδια, πολυμερή, και επιφάνειες, και/ή δείκτες.

Η **Εικόνα 2a** είναι διάγραμμα στρατηγικών πολυμερισμού των BNAs σε PNAs και επικάλυψη (*capping*) με HNAs.

Η **Εικόνα 2b** είναι διάγραμμα επιπρόσθετων στρατηγικών ενίσχυσης σημάτων PNA-TNA μέσω πολυμερισμού των BNAs και επικάλυψη με HNAs.

Η **Εικόνα 3** είναι διάγραμμα που δείχνει την χρήση BNAs που περιέχουν πολλαπλές 1/2 BBRs ανά BNA.

Η **Εικόνα 4a** είναι διάγραμμα που δείχνει την δέσμευση TBAs και BBAs με TBRs και BBRs, και την ικανότητα του TBA να διακρίνει μεταξύ TNAs και CNAs. Σύμφωνα με αυτήν την υλοποίηση, εάν το TBA είναι ακινητοποιημένο, σε σφαιρίδιο, επιφάνεια τρυβλίου μικροτίτλου, ή σε οποιαδήποτε άλλη επιφάνεια, μόνο συμπλέγματα  πως το σύμπλεγμα X θα συγκρατηθούν και θα ανιχνευτούν, ενώ συμπλέγματα  πως το σύμπλεγμα XI δεν θα ανιχνευτούν.

Η **Εικόνα 4b** είναι διάγραμμα που παραθέτει παράδειγμα συμβάντων παρόμοιων με αυτά που παρουσιάζονται σε Εικόνα 4a αλλά με λίγο διαφορετική σειρά συμβάντων.

Η **Εικόνα 5** είναι διάγραμμα που παραθέτει παράδειγμα PNAs που περιέχουν μεταξύ μίας 1/2 TBR και καθόλου 1/2 BBR  ως PNAs που περιέχουν  ως και πέντε 1/2 TBRs και μία 1/2 BBR. Τα μέλη (a) και (b) του κάθε αριθμού (I, II, III, IV, V) σχηματίζουν σύνολο το οποίο, με υβριδοποίηση σε TNA, παρέχει TBRs είτε με ((a) μέλη) ή χωρίς ((b) μέλη) διαθέσιμη 1/2 BBR για ενίσχυση μέσω υβριδοποίησης σε BNAs που έχουν συμπληρωματικές 1/2 BBRs.

Η **Εικόνα 6a** είναι διάγραμμα που παραθέτει παράδειγμα συγκεκριμένου TNA που έχει δύο 1/2 TBRs το οποίο, όταν δεσμεύεται με κατάλληλο PNA, σχηματίζει δύο στενά συνδεδεμένες TBRs ικανές να δεσμεύσουν δύο TBAs. Επίσης, παρέχεται 1/2 BBR για ενίσχυση.

Η **Εικόνα 6b** είναι διάγραμμα που δείχνει τα ίδια συμβάντα  πως σε Εικόνα 6a με την διαφορά  τι εδώ, χρησιμοποιείται διπλό TBA  τσι  στε να μπορούν να διαφοροποιηθούν μονές TBRs που απαντώνται σε φυσιολογικά κυτταρικά δείγματα,  πό αν μαλες, διπλές TBRs.

Η **Εικόνα 6c** είναι διάγραμμα που δείχνει το ίδιο σενάριο  πως σε Εικόνα 6a με την διαφορά  τι εδώ, ταυτοποιούνται πέντε TBRs στο TNA. Η κάθε TBR μπορεί να δεσμευτεί με TBA, ίδιο ή διαφορετικό, και το κάθε TBA μπορεί να σημανθεί διαφορετικά, καθιστώντας εφικτή την επιβεβαίωση  τι και οι πέντε θέσεις είναι παρούσες στο TNA.

Η **Εικόνα 6d** είναι διάγραμμα των ίδιων συμβάντων  πως σε Εικόνα 6c με την διαφορά  τι εδώ, παρουσιάζεται διπλό TBA, επεκτείνοντας αυτό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 6b στην χρήση του διπλού TBA. Ένα παράδειγμα του TNA που παρουσιάζεται στο αντικείμενο II σε Εικόνες 6a, 6b, 6c και 6d είναι μονόκλωνο DNA ή RNA HIV.

Η **Εικόνα 7** δείχνει την HIV LTR ως TNA, και δύο PNAs, και στρατηγική για ανίχνευση του TNA χρησιμοποιώντας τα PNAs.

Η **Εικόνα 8** είναι σχήμα μίας υλοποίησης της εφεύρεσης όπου συγκρότημα δέσμευσης στόχου χρησιμοποιείται για να δεσμεύσει υβρίδιο TNA-PNA, και ενισχυτικά συγκροτήματα δέσμευσης χρησιμοποιούνται για να δεσμεύσουν πολυμερισμένα BNAs.

Η **Εικόνα 9** είναι σχήμα δομοστοιχειωτού TBA στο οποίο αλληλουχίες συγκρότησης, συνδεδεμένες αλληλουχίες, και αλληλουχίες ασυμμετρίας χρησιμοποιούνται για να συνοδεύσουν μαζί μονάδες αναγνώρισης επιθυμητού νουκλεϊκού οξέος για να σχηματιστεί TBA.

Η **Εικόνα 10** δείχνει δομοστοιχειωτά TBAs χρήσιμα σε ανίχνευση HIV-ειδικών αλληλουχιών.

Η **Εικόνα 11** δείχνει δομοστοιχειωτά TBAs χρήσιμα σε ανίχνευση αλληλουχιών ανθρώπινου ιού θηλώματος. Η κάθε μονάδα του E2 είναι στην πραγματικότητα διμερές του τμήματος δέσμευσης DNA του E2.

Η **Εικόνα 12a** είναι σχήμα κλασμάτωσης TNA και αλλαγής κινητικότητας λόγω δέσμευσης με TBA.

Η **Εικόνα 12b** είναι σχήμα κλασμάτωσης TNA και αυξημένης αλλαγής κινητικότητας λόγω δέσμευσης BBAs εκτός των TBAs.

Η **Εικόνα 13** δείχνει στρατηγική ανίχνευσης για αλληλουχίες εξάλειψης. Ένα παράδειγμα της χρήσης αυτής της στρατηγικής είναι για προσδιορισμό ενσωμάτωσης ανθρώπινου ιού θηλώματος.

Η **Εικόνα 14** δείχνει συγκρότηση TBAs υψηλότερης τάξης μέσω χρήσης μονάδων αναγνώρισης νουκλεϊκών οξέων, συνδεδεμένων αλληλουχιών, αλληλουχιών συγκροτημάτων, και ασυμμετρίας έτσι ώστε σχηματίζονται διάφορα Συγκροτήματα Δέσμευσης Στόχου ειδικά για θέσεις δέσμευσης στην HIV LTR.

Η **Εικόνα 15** δείχνει συγκρότηση TBAs υψηλότερης τάξης μέσω χρήσης μονάδων αναγνώρισης DNA, συνδεδεμένων αλληλουχιών, αλληλουχιών συγκροτημάτων, και ασυμμετρίας έτσι ώστε σχηματίζονται διάφορα Συγκροτήματα Δέσμευσης Στόχου ειδικά για θέσεις δέσμευσης στο γονιδίωμα HPV.

Η **Εικόνα 16** δείχνει την διαφοροποίηση που επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας σύμπλεγμα TBA και την ικανότητα ενδογενών συναγωνιστικών μορίων δέσμευσης στόχου να εξουδετερώνουν δέσμευση του TBA με εξάδελφο νουκλεϊκό οξύ αλλά όχι με το TNA που περιέχει τον κατάλληλο προσανατολισμό σε περισσότερο από μία θέση που αναγνωρίζεται από το TBA.

Η **Εικόνα 17** δείχνει την ικανότητα TBA να στοχεύεται ειδικά για να δεσμεύεται σε θέσεις παράταιρης σύζευξης αλληλουχιών και να δεσμεύεται προτιμησιακά με αυτές τις θέσεις παρά σε εξαδέλφες θέσεις που δεν περιέχουν όλες τις στοχευόμενες παράταιρες συζεύξεις.

Σύντομη περιγραφή των αλληλουχιών

Η **αλληλουχία αρ. 1** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5-Ia-1 και δείχνει την θέση δέσμευσης NF-kB MHC τάξης I.

Η **αλληλουχία αρ. 2** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5 (Ia) και δείχνει την θέση δέσμευσης NF-kB B2-μικροσφαιρίνης.

Η **αλληλουχία αρ. 3** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5 (Ia) και δείχνει την θέση δέσμευσης NF-kB κ ανοσοσφαιρίνης.

Η **αλληλουχία αρ. 4** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5 (Ia) και δείχνει μία από τις θέσεις δέσμευσης HIV NF-kB.

Η **αλληλουχία αρ. 5** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5 (Ia) και δείχνει μία από τις θέσεις δέσμευσης HIV NF-kB.

Η **αλληλουχία αρ. 6** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5 (Ia) και δείχνει την θέση δέσμευσης c-myc NF-kB.

Η **αλληλουχία αρ. 7** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5 (IIa) και δείχνει διπλή θέση δέσμευσης HIV NF-kB.

Η **αλληλουχία αρ. 8** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5 (IIa) και δείχνει διπλή θέση δέσμευσης HIV NF-kB.

Οι **αλληλουχίες αρ. 9-16** αντιστοιχούν σε Εικόνα 5 (IIa) και δείχνουν διπλή θέση δέσμευσης με την μία θέση να είναι θέση δέσμευσης HIV NF-kB, και την άλλη θέση να είναι θέση δέσμευσης HIV SP1.

Οι **αλληλουχίες αρ. 17-18** αντιστοιχούν σε Εικόνα 5 (IIa) και δείχνουν διπλή θέση δέσμευσης HIV SP1.

Οι **αλληλουχίες αρ. 19-31** αντιστοιχούν σε Εικόνα 5 (IIIa) και δείχνουν διπλή θέση δέσμευσης HIV NF-kB και θέση δέσμευσης HIV SP1.

Οι **αλληλουχίες αρ. 32-33** αντιστοιχούν σε Εικόνα 5 (IVa) και δείχνουν τετραπλή θέση δέσμευσης όπου δύο θέσεις είναι θέσεις δέσμευσης HIV NF-kB και δύο θέσεις είναι θέσεις δέσμευσης HIV SP1.

Η **αλληλουχία αρ. 34** αντιστοιχεί σε Εικόνα 5 (VIa) και δείχνει πενταπλή θέση δέσμευσης όπου δύο θέσεις είναι θέσεις δέσμευσης HIV NF-kB και τρεις θέσεις είναι θέσεις δέσμευσης HIV SP1.

Η **αλληλουχία αρ. 35** είναι παράδειγμα $\frac{1}{2}$ BBR, σε αυτήν την περίπτωση τα στοιχεία OL1, OL2 και OL3 του αριστερού χειριστή βακτηριοφάγου λάμδα, συμπεριλαμβανομένων παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών.

Η **αλληλουχία αρ. 36** είναι παράδειγμα $\frac{1}{2}$ BBR, σε αυτήν την περίπτωση τα στοιχεία OR3, OR2 και OR1 του δεξιού χειριστή βακτηριοφάγου λάμδα, συμπεριλαμβανομένων παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών.

Η **αλληλουχία αρ. 37** είναι η HIV LTR.

Η **αλληλουχία αρ. 38** είναι PNA συμπληρωματικό του PNA της HIV LTR.

Η **αλληλουχία αρ. 39** είναι PNA συμπληρωματικό διαφορετικού PNA της HIV LTR από την αλληλουχία αρ. 38.

Η **αλληλουχία αρ. 40** είναι PNA συμπληρωματικό μέρους της HIV LTR και επίσης περιέχει $\frac{1}{2}$ BBR και αλληλουχία πρόβολου για πολυμερισμό BNAs στο PNA.

Η **αλληλουχία αρ. 41** είναι BNA συμπληρωματικό της $\frac{1}{2}$ BBR της αλληλουχίας αρ. 40.

Η **αλληλουχία αρ. 42** είναι BNA που θα πολυμεριστεί στο BNA της αλληλουχίας αρ. 41 και το οποίο, με αλληλουχίες αρ. 40 και 41, δημιουργεί θέση αναγνώρισης *Pst*I.

Η **αλληλουχία αρ. 43** είναι BNA που είναι συμπληρωματικό του BNA της αλληλουχίας αρ. 42 και το οποίο ολοκληρώνει θέση αναγνώρισης *Bam*HI.

Η **αλληλουχία αρ. 44** είναι HNA που έχει θέση αναγνώρισης *Bam*HI που θα υβριδοποιηθεί με την θέση αναγνώρισης *Bam*HI που δημιουργείται από αλληλουχίες αρ. 42 και 43 στο αυξανόμενο πολυμερές.

Η **αλληλουχία αρ. 45** είναι δεύτερο PNA το οποίο, όπως η αλληλουχία αρ. 40, είναι συμπληρωματικό μέρους της HIV LTR, αλλά όχι με την ίδια αλληλουχία όπως η αλληλουχία αρ. 40. Η αλληλουχία αρ. 45 επίσης κωδικοποιεί $\frac{1}{2}$ BBR και πρόβоло που θα καταστήσει εφικτό πολυμερισμό BNAs που αρχίζουν με θέση αναγνώρισης *Sph*I.

Οι **αλληλουχίες αρ. 46-62** είναι PNAs ειδικά για ανθρώπινο ιό θηλώματος (HPV) τα οποία, μετά από υβριδοποίηση με αλληλουχίες HPV, σχηματίζουν TBRs που δεσμεύονται με πρωτεΐνες που δεσμεύονται με HPV DNA.

Οι **αλληλουχίες αρ. 63-71** είναι μονάδες αναγνώρισης NF-kB DNA για ενσωμάτωση σε TBAs.

Η **αλληλουχία αρ. 72** είναι αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού.

Η αλληλουχία αρ. 73 είναι μονάδα αναγνώρισης αλληλουχίας SP1.

Η αλληλουχία αρ. 74 είναι μονάδα αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με TATA.

Οι αλληλουχίες αρ. 75-84 είναι μονάδες αναγνώρισης E2 DNA ιού θηλώματος.

Οι αλληλουχίες αρ. 85-92 είναι αλληλουχίες ασυμμετρίας.

Η αλληλουχία αρ. 93 είναι μονάδα αναγνώρισης πρωτεΐνης *arabidopsis* που δεσμεύεται με TATA.

Η αλληλουχία αρ. 94 είναι μονάδα αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με HPV-16-E2-1 DNA.

Η αλληλουχία αρ. 95 είναι μονάδα αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με HPV-16-E2-2 DNA.

Η αλληλουχία αρ. 96 είναι μονάδα αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με HPV-18-E2 DNA.

Η αλληλουχία αρ. 97 είναι μονάδα αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με HPV-33-E2 DNA.

Η αλληλουχία αρ. 98 είναι μονάδα αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με E2 DNA ιού θηλώματος βοοειδούς.

Οι αλληλουχίες αρ. 99-102 παραδειγματικές συνδετικές αλληλουχίες.

Η αλληλουχία αρ. 103 είναι παραδειγματική αλληλουχία-σηματοδότης πυρηνικού εντοπισμού (NLS: *nuclear localization signal*).

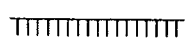
Οι αλληλουχίες αρ. 104-108 είναι παραδειγματικές αλληλουχίες συνοδών.

Οι αλληλουχίες αρ. 109-116 είναι παραδειγματικές αλληλουχίες συγκροτημένων TBA.

Η αλληλουχία αρ. 117 είναι συναινετική θέση δέσμευσης NF-kB.

Η αλληλουχία αρ. 118 είναι αλληλουχία αμινοξέων HIV Tat.

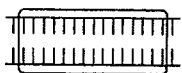
Συντημήσεις



μονόκλωνο νουκλεϊκό οξύ



δίκλωνο νουκλεϊκό οξύ



περιοχή δέσμευσης σε νουκλεϊκό οξύ



απουσία υποστηρίγματος ή δεικτών, ή στερεό υποστήριγμα, ή άλλο μέσο εντοπισμού, που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, προσκόλληση σε σφαιρίδια, πολυμερή, και επιφάνειες, ή δείκτες = OSA

BBA Ενισχυτικό συγκρότημα δέσμευσης

BBR Ενισχυτική περιοχή δέσμευσης

BNA Ενισχυτικό νουκλεϊκό οξύ

CNA Εξάδελφο νουκλεϊκό οξύ

1/2 BBR Μονόκλωνη περιοχή η οποία, όταν υβριδοποιείται με την συμπληρωματική αλληλουχία από HNA ή BNA, μπορεί να δεσμευτεί με BBA

1/2 TBR Μονόκλωνη περιοχή του PNA η οποία, όταν υβριδοποιείται με την συμπληρωματική αλληλουχία από TNA, μπορεί να δεσμευτεί με TBA

OSA	Προαιρετικό υποστήριγμα ή προσκόλληση, κύκλος με πλαίσιο
PNA	Νουκλεϊκό οξύ ανιχνευτή
TBA	Συγκρότημα δέσμευσης στόχου
TBR	Περιοχή δέσμευσης στόχου
TNA	Νουκλεϊκό οξύ στόχου
HNA	Νουκλεϊκό οξύ φουρκέτας

Ορισμοί

Πρέπει επίσης να κατανοηθεί από την αποκάλυψη που ακολουθεί ότι όταν αναφέρονται όροι όπως συγκροτήματα δέσμευσης στόχων (TBAs), ενισχυτικά συγκροτήματα δέσμευσης (BBAs), πρωτεΐνες που δεσμεύονται με DNA, πρωτεΐνες που δεσμεύονται με νουκλεϊκό οξύ ή πρωτεΐνες που δεσμεύονται με RNA, αυτό που εννοείται είναι συνθέσεις που αποτελούνται από μόρια που δεσμεύονται με αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων στόχων, DNA ή RNA (TNAs), ανεξαρτήτως της εξειδίκευσης της κατηγορίας των μορίων δέσμευσης από τα οποία προέρχονται. Επομένως, για παράδειγμα, TBA που είναι προσαρμοσμένο για να δεσμεύεται με αλληλουχίες ανθρώπινου ιού ανοσοανεπάρκειας μπορεί να είναι πολύ παρόμοιο με μεταγραφικό παράγοντα NF-KB που δεσμεύεται χαρακτηριστικά με αλληλουχίες DNA. Ωστόσο, όπως χρησιμοποιείται εδώ, θα είναι αντιληπτό ότι το TBA μπορεί να προσαρμοστεί για βέλτιστη χρήση για να δεσμεύεται με αλληλουχίες RNA συγκεκριμένης σύστασης αλληλουχίας και διαμόρφωσης.

Η πιστότητα της μεθόδου ανίχνευσης που αποκαλύπτεται εδώ εξαρτάται κατά μέγα μέρος από την επιλεκτική δέσμευση TBAs και BBAs με συγκεκριμένα μοτίβα νουκλεϊκών οξέων. Εννοείται σε όλη αυτήν την αποκάλυψη ότι η βάση της διαφοροποίησης TBA και BBA των TNA από συναφείς αλληλουχίες (εξαδέλφια νουκλεϊκά οξέα ή CNA) μπορεί να είναι ο σχηματισμός επακριβών υβριδικών τμημάτων νουκλεϊκού οξέος ανιχνευτή (PNA)-νουκλεϊκού οξέος στόχου (TNA) (υβρίδια PNA-TNA). Ωστόσο, η βάση της διαφοροποίησης μπορεί κάλλιστα να είναι ο σχηματισμός συγκεκριμένης διαμόρφωσης, και μπορεί να μην απαιτεί την πλήρη απουσία παράταιρων συζεύξεων ζευγών βάσεων στο υβρίδιο TNA-PNA. Κατά συνέπεια, η βάση λειτουργίας TBA ή BBA θα πρέπει να κατανοηθεί απολύτως ότι εξαρτάται από οποιαδήποτε ιδιότητα που είναι μοναδική στο υβρίδιο TNA-PNA συγκριτικά με τις οποιοσδήποτε ιδιότητες που επιδεικνύονται από το κάθε υβρίδιο PNA-CNA που μπορεί να σχηματιστεί σε δοκιμαστικό δείγμα με δεδομένο PNA.

Λεπτομερής αποκάλυψη της εφεύρεσης

Η παρούσα εφεύρεση ορίζεται στις επισυναπτόμενες αξιώσεις. Παρέχει μέθοδο για την ειδική ταυτοποίηση νουκλεϊκού οξέος στόχου (TNA) σε δείγμα μέσω της χρήσης συγκροτημάτων δέσμευσης στόχου (TBA) που έχουν ενσωματωμένες ειδικές πρωτεΐνες που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα. Χρησιμοποιώντας νουκλεϊκά οξέα ανιχνευτών (PNA) ειδικά για δεδομένη αλληλουχία TNA, και TBA που είναι ειδικό για την διπλή περιοχή δέσμευσης στόχου (TBR) που σχηματίζεται με τον σχηματισμό υβριδικών αλληλουχιών TNA-PNA, σχηματίζεται σταθερό σύμπλεγμα TBA-TNA-PNA. Με την επιπρόσθετη παροχή ειδικών ενισχυσιμων αλληλουχιών στο PNA, εκτός των αλληλουχιών που συμβάλλουν ειδικά στον σχηματισμό της TBR που αναγνωρίζεται από το TBA, η δέσμευση του PNA στο TNA ανιχνεύεται και η ανίχνευση ενισχύεται. Γι' αυτόν τον σκοπό, το οποιοδήποτε σύστημα ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος, συμπεριλαμβανομένης της αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ή η χρήση διακλαδισμένου DNA, ο κάθε κλάδος του οποίου περιέχει ανιχνεύσιμη σήμανση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Ειδικότερα, μία πρωτότυπη μέθοδος ενίσχυσης περιγράφεται εδώ, όπου το ενισχύσιμο τμήμα του PNA περιέχει αλληλουχίες πάνω στις οποίες ενισχυτικά νουκλεϊκά οξέα (BNA) μπορούν να πολυμεριστούν. Με τον σχηματισμό του κάθε υβριδίου BNA-PNA, σχηματίζεται ενισχυτική περιοχή δέσμευσης (BBR) στην οποία δεσμεύεται

ειδικά ενισχυτικό συγκρότημα δέσμευσης (BBA). Εάν είναι σημασμένα με ανιχνεύσιμη σήμανση, τα BBA ή BNA παρέχουν ουσιαστικά απεριόριστη ενίσχυση του αρχικού συμβάντος δέσμευσης TNA-PNA.

Σύμφωνα με αυτήν την εφεύρεση το TNA εννοείται ότι περιλαμβάνει ειδικές αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων. Το TBA εννοείται ότι είναι το οποιοδήποτε μοριακό συγκρότημα που μπορεί να δεσμευτεί ειδικά και στενά σε σχηματισμένο υβρίδιο TNA-PNA. Το TBA θα περιέχει ένα ή περισσότερα μόρια των οποίων οι αλληλουχίες είναι επαρκείς για να δεσμευθεί με την TBR. Περιοχές δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων που είναι γνωστές μπορούν είτε να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως συστατικά του TBA ή να τροποποιηθούν σύμφωνα με τις διδαχές που παρέχονται εδώ. Τα πλέον ευρέως διαθέσιμα μόρια με τέτοιες αλληλουχίες είναι οι περιοχές δέσμευσης DNA των πρωτεϊνών που δεσμεύονται με DNA. Συγκεκριμένα, πολλές πρωτεΐνες που δεσμεύονται με DNA ή RNA είναι γνωστές που μπορούν είτε να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως γνωστή μη τροποποιημένη πρωτεΐνη, ή το TBA μπορεί να είναι πρωτεΐνη που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ, τροποποιημένη σύμφωνα με τις ειδικές διδαχές που παρέχονται εδώ. Στην δεύτερη περίπτωση, ειδικές τροποποιήσεις που είναι επιθυμητές θα περιλαμβάνουν βελτιστοποίηση των συγγενειών δέσμευσης, αφαίρεση ανεπιθύμητων δραστηριοτήτων (όπως δραστηριότητα νουκλεάσης και αναδιάταξη του TBA παρουσία άλλων μορίων με συγγένεια για συστατικά του TBA), βελτιστοποίηση επιλεκτικότητας αλληλουχίας-στόχου συγκριτικά με πολύ συναφείς αλληλουχίες, και βελτιστοποίηση σταθερότητας.

Παραδείγματα πρωτεϊνών που δεσμεύονται με DNA οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σύμφωνα με την εφεύρεση είναι τα τμήματα που δεσμεύονται με DNA του παράγοντα μεταγραφής NF-kB (p50 και p65), NF-IL6, τα NF-AT, rel, TBP, E2 πρωτεΐνη ιού θηλώματος, sp1, οι καταστολείς *cro* και *CI* από βακτηριοφάγο λ , και παρόμοιες πρωτεΐνες που είναι πολύ γνωστές των οποίων το τμήμα που δεσμεύεται με DNA έχει απομονωθεί, κλωνοποιηθεί, έχει καθοριστεί η αλληλουχία του, και έχει χαρακτηριστεί. Επιπροσθέτως, περιλαμβάνεται η οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη που δεσμεύεται με DNA ή τμήμα πρωτεΐνης που είναι αναγκαίο και επαρκές για να δεσμευτεί με υβρίδιο TBR ή BBR. Αυτό περιλαμβάνει πρωτεΐνες ή τμήματα πρωτεϊνών φυσικού τύπου με αλλαγμένη δραστηριότητα δέσμευσης DNA όπως επίσης και πρωτεΐνη που δημιουργήθηκε με αλλαγμένη εξειδίκευση δέσμευσης DNA, όπως η ανταλλαγή έλικας αναγνώρισης δέσμευσης DNA από μία πρωτεΐνη σε άλλη. Επιπροσθέτως, πρωτεΐνες που παρουσιάζουν δέσμευση νουκλεϊκών οξέων και άλλες λειτουργίες νουκλεϊκών οξέων, όπως περιοριστικές ενδονουκλεάσες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργία δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος. Πρωτεΐνες που δεσμεύονται με περιοχές-στόχους σε υβρίδια DNA-RNA όπως επίσης και σε υβρίδια RNA-RNA περιλαμβάνονται. (Βλέπε, για παράδειγμα, Shi 1995, DeStefano 1993, Zhu 1995, Gonzales 1994, Salazar 1993, Jaishree 1993, Wang 1992, Roberts 1992, Kainz 1992, Salazar 1993(b)). Τα συγκροτήματα δέσμευσης μπορούν να κατασκευαστούν με την χρήση μορίου που συνοδεύει τμήματα του συγκροτήματος δέσμευσης έτσι ώστε μπορούν να επιτευχθούν ειδικοί συνδυασμοί και γεωμετρίες συστατικών. Αυτό το μόριο ορίζεται εδώ ως PILOT (πιλότος). Οι πιλότοι μπορεί να αποτελούνται από πρωτεΐνες ή από τον οποιοδήποτε συνδυασμό οργανικών και ανόργανων υλικών που επιτυγχάνουν την συνδυαστική επιλογή και/ή επάγουν ειδικές γεωμετρίες μεταξύ μελών του TBA ή των BBA. Ένας συνοδός είναι σταθερό ικρίωμα πάνω στο οποίο μπορεί να κατασκευαστεί TBA ή BBA έτσι ώστε να παρέχεται η σωστή διαμόρφωση του TBA ή BBA ενώ ταυτόχρονα εξαφανίζονται οι ανεπιθύμητες ιδιότητες φυσικά απαντώμενης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ. Ως ειδικό παράδειγμα αυτής της υλοποίησης, παρέχεται τροποποιημένη μορφή του πλειοτροπικού παράγοντα μεταγραφής, NF-kB, χρησιμοποιώντας τροποποιημένη πρωτεΐνη *cro* βακτηριοφάγου λ ως συνοδό. Το κάθε διμερές δέσμευσης NF-kB διατηρεί την πικομοριακή συγγένεια δέσμευσης για την θέση δέσμευσης NF-kB ενώ ταυτόχρονα το συγκρότημα δέσμευσης παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτικά χαρακτηριστικά όσον αφορά την κατασκευή του, σταθερότητα, και εξειδίκευση.

Εν όψει των προαναφερομένων, οι διάφορες μορφές και υλοποιήσεις αυτής της εφεύρεσης περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω.

1. Τα νουκλεϊκά οξέα ανιχνευτών (PNA) και η παρασκευή τους. Τα PNA της παρούσας εφεύρεσης περιλαμβάνουν τουλάχιστον τρία κύρια μέρη ενωμένα μεταξύ τους. Με αναφορά στην Εικόνα 1(I) των σχημάτων, το πρώτο μέρος του PNA είναι μία ή περισσότερες αλληλουχίες βάσεων, που ορίζονται ως “ $\frac{1}{2}$ TBR”. Με αναφορά στην Εικόνα 1(I και IIa) των σχημάτων, η $\frac{1}{2}$ TBR στο PNA είναι συμπληρωματική αλληλουχίας ενδιαφέροντος σε δείγμα, το TNA που περιέχει $\frac{1}{2}$ TBR. Με αναφορά στην Εικόνα 1(IIIa) των σχημάτων, το TNA, όταν προστίθεται στο PNA υπό συνθήκες υβριδοποίησης, σχηματίζει υβρίδιο PNA-TNA που περιέχει TBR. Με αναφορά στην Εικόνα 1(I) των σχημάτων, το δεύτερο μέρος του PNA είναι αλληλουχία βάσεων, που ορίζεται ως “ $\frac{1}{2}$ BBR”. Με αναφορά στην Εικόνα 1(I, IIb, IIc, και IVa) των σχημάτων, η $\frac{1}{2}$ BBR στο PNA είναι συμπληρωματική της $\frac{1}{2}$ BBR που περιέχεται σε BNA ή HNA. Με αναφορά στην Εικόνα 1(IIIb, IIIc, και Va) των σχημάτων, το BNA ή HNA, όταν προστίθεται στο PNA υπό συνθήκες υβριδοποίησης, σχηματίζει υβρίδιο PNA-BNA ή υβρίδιο PNA-HNA, αντίστοιχα, που περιέχει BBR. Με αναφορά στην Εικόνα 1(I) των σχημάτων, το τρίτο μέρος του PNA είναι το OSA, που ορίζεται με κύκλο με πλαίσιο γύρω από αυτόν. Το OSA δεν είναι υποστήριγμα και/ή δείκτης, ή στερεό υποστήριγμα, ή άλλο μέσο εντοπισμού, που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, προσκόλληση σε σφαιρίδια, πολυμερή, και επιφάνειες και/ή δείκτες που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι, ή μη ομοιοπολικά, αλλά ειδικά, προσκολλημένοι στο PNA. Το OSA μπορεί να είναι άτομο ή μόριο που βοηθά στον διαχωρισμό και/ή εντοπισμό όπως ομάδα δέσμευσης στερεού υποστηρίγματος ή σήμανση που μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορα φυσικά μέσα που περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, προσρόφηση ή απεικόνιση εκπεμπόμενων σωματιδίων ή φωτός. Μέθοδοι προσκόλλησης δεικτών σε ολιγονουκλεοτίδια ή για ακινητοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων σε στερεά υποστηρίγματα είναι πολύ γνωστές στην τεχνολογία (βλέπε Keller και Manak, *supra*).

Το PNA της παρούσας εφεύρεσης μπορεί να παρασκευαστεί με την οποιαδήποτε κατάλληλη μέθοδο. Αυτές οι μέθοδοι, γενικά, θα περιλαμβάνουν σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων και κλωνοποίηση σε αναπαραγόμενο φορέα. Μέθοδοι σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων είναι πολύ γνωστές στην τεχνολογία. Με την κλωνοποίηση ή σύνθεση, ο καθαρισμός και ο διαχωρισμός των αλυσίδων μπορεί να είναι απαραίτητοι για να χρησιμοποιηθεί το προϊόν ως καθαρό PNA. Μέθοδοι παρασκευής ανιχνευτών RNA είναι πολύ γνωστές (βλέπε για παράδειγμα Blais 1993, Blais 1994, που χρησιμοποιεί μεταγραφή *in vitro* από αντίδραση PCR με ενσωματωμένο προαγωγέα πολυμεράσης RNA T7).

Αυτοί με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα γνωρίζουν ότι το μήκος και η ειδική αλληλουχία του PNA θα εξαρτηθούν από το μήκος και την αλληλουχία που θα ανιχνευθεί σε TNA, και τους περιορισμούς για επίτευξη στενής και ειδικής δέσμευσης του συγκεκριμένου TBA που θα χρησιμοποιηθεί (βλέπε την συζήτηση για TBA παρακάτω). Γενικά, PNA μήκους αλληλουχίας μεταξύ περίπου 10 και περίπου 300 νουκλεοτιδίων είναι επαρκή, με μήκη περίπου 15-100 νουκλεοτιδίων να είναι επιθυμητά για πολλές από τις υλοποιήσεις που παραθέτονται ως παραδείγματα εδώ.

Εννοείται επίσης ότι το PNA μπορεί να κατασκευαστεί έτσι ώστε να περιέχει περισσότερο από μία $\frac{1}{2}$ TBR και να παράγει περισσότερο από μία TBR για ένα ή περισσότερα TBAs, ίδια ή διαφορετικά, όπως επίσης και σύνθετες TBRs που αναγνωρίζονται από πρωτότυπα διπλά και πολλαπλά TBAs (βλέπε περιγραφή παρακάτω που αφορά αυτά τα πρωτότυπα TBAs) μετά την υβριδοποίηση των PNAs και TNAs. Η Εικόνα 5 απεικονίζει ειδικά PNAs που περιέχουν μία ή περισσότερες $\frac{1}{2}$ TBRs. Ειδικές αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ TBR που απεικονίζονται στην Εικόνα 5 (Ia, IIa, IIIa, IVa, και Va) είναι οι αλληλουχίες αρ. 1-34 (βλέπε περιγραφή αλληλουχιών ανωτέρω).

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 2a και 2b, το PNA, που περιέχει $\frac{1}{2}$ TBR, μπορεί να υβριδοποιηθεί με ένα ή περισσότερα BNAs (βλέπε περιγραφή παρακάτω) και η αλυσίδα BNAs να πολυμεριστεί στο οποιοδήποτε επιθυμητό δυνατό μήκος για ενίσχυση του συμβάντος υβριδοποίησης TNA-PNA. Κατά προτίμηση, μεταξύ 1 και 10 $\frac{1}{2}$ BBRs θα είναι παρούσες στο PNA.

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 6a και 6b, το PNA μπορεί να περιέχει αρκετές $\frac{1}{2}$ TBRs, ίδιες ή διαφορετικές, που μπορούν να υβριδοποιηθούν με αρκετές $\frac{1}{2}$ TBRs σε TNA. Κάθε φορά που $\frac{1}{2}$ TBR στο PNA ταιριάζει με $\frac{1}{2}$ TBR σε TNA, σχηματίζεται Περιοχή Δέσμευσης Στόχου, TBR (*Target Binding Region*), η οποία μπορεί να δεσμευθεί με TBA. Επιπλέον, δεν είναι απαραίτητο όλες οι TBRs να είναι σε ένα μόνο, συνεχές PNA. Επομένως, σε μία υλοποίηση της εφεύρεσης, χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά PNA για να ανιχνεύσουν αλληλουχίες σε συγκεκριμένο TNA. Ως παράδειγμα αυτής της μορφής της εφεύρεσης, η Εικόνα 7 δείχνει μία αναπαράσταση της μακράς επαναλαμβανόμενης τερματικής αλληλουχίας (LTR: *long terminal repeat*) του ανθρώπινου ιού ανοσοανεπάρκειας (HIV). Όπως είναι γνωστό στην τεχνολογία, η HIV LTR περιλαμβάνει δύο θέσεις δέσμευσης NF-kB και τρεις θέσεις δέσμευσης SP1, σε στενή εγγύτητα, όπου τα NF-kB και SP1 είναι γνωστές πρωτεΐνες που δεσμεύονται με DNA. Η Εικόνα 7 παρέχει δύο PNAs, PNA1 (αλληλουχία αρ. 38) και PNA2 (αλληλουχία αρ. 39), η κάθε μία εκ των οποίων είναι συμπληρωματική του απέναντι κλώνου που παρουσιάζεται ως TNA (αλληλουχία αρ. 37), που παρουσιάζει τις δύο θέσεις δέσμευσης NF-kB και τις τρεις θέσεις δέσμευσης SP1 της HIV LTR. Σύμφωνα με αυτήν την μορφή της εφεύρεσης, το PNA1 υβριδοποιείται ειδικά με αυτό το τμήμα του TNA που παρουσιάζεται στην Εικόνα 7 με βάσεις υποσημειωμένες με σύμβολο "+", ενώ το PNA2 υβριδοποιείται ειδικά με αυτό το τμήμα του TNA που παρουσιάζεται στην Εικόνα 7 με βάσεις υποσημειωμένες με σύμβολο "=". Το PNA1 ή το PNA2 μπορεί επίσης να περιέχουν αλληλουχίες (υποδεικνύονται με τα σύμβολα "#" ή "*") που θα υβριδοποιηθούν με αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ BBR των BNA (βλέπε παρακάτω). Επιπροσθέτως, το PNA1 και PNA2 μπορεί να είναι διαφορετικά επισημασμένα με OSA, όπως φθορισμοφόρο όπως σήμανση φλουορεσκεΐνης ή ροδαμίνης, το οποίο θα καταστήσει δυνατή την επιβεβαίωση ότι και οι δύο ανιχνευτές έχουν δεσμευθεί με το TNA. Εάν ανιχνευθεί μόνο μία σήμανση, ή καμία σήμανση, συμπεραίνεται ότι το TNA δεν είναι παρόν στο δείγμα που δοκιμάζεται.

Σε περαιτέρω μορφή της υλοποίησης που παρουσιάζεται στην Εικόνα 7, παρουσιάζεται μέθοδος αλλαγής της εξειδίκευσης της προκείμενης μεθόδου προσδιορισμού. Αλλάζοντας το μήκος του χάσματος μεταξύ PNA1 και PNA2, έτσι ώστε η περιοχή του TNA που παραμένει μη υβριδοποιημένη αλλάζεται, αυτός που εφαρμόζει αυτήν την εφεύρεση μπορεί να αλλάξει την διαφοροποίηση του προσδιορισμού.

Για να διευκρινιστεί σαφέστερα αυτή η μορφή της εφεύρεσης, είναι απαραίτητο να τονιστεί ότι η TBR μπορεί να έχει ελικοειδή μορφή. Επομένως, ενώ το PNA1 δημιουργεί TBRs σε μία "επιφάνεια" της έλικας, το PNA2 δημιουργεί TBR είτε στην ίδια ή σε διαφορετική επιφάνεια της έλικας, ανάλογα με την απόσταση μεταξύ των μέσων της κάθε TBR (υπογραμμισμένο στην Εικόνα 7). Εάν το μέσον της κάθε θέσης δέσμευσης είναι ενιαίο προϊόν με ενδιάμεση απόσταση 10.5 βάσεων, οι TBRs θα είναι στην ίδια επιφάνεια της έλικας, ενώ μη ενιαία προϊόντα με ενδιάμεση απόσταση 10.5 βάσεων θα τοποθετήσουν τις TBRs σε αντίθετες πλευρές της έλικας. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να διαμορφωθεί η οποιαδήποτε συνεργατικότητα σε δέσμευση με αναγνώριση της PNA1 TBR από το TBA και με αναγνώριση της PNA2 TBR από το TBA (βλέπε Hochschild, A., M. Ptashne [1986] *Cell* 44:681-687, που παρουσιάζει αυτό το φαινόμενο για την δέσμευση καταστολέα βακτηριοφάγου λ σε δύο διαφορετικές θέσεις χειριστή που βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις η μία από την άλλη σε έλικα DNA). Όπως περιγράφηκε από Perkins *et al.* ([1993] *EMBO J.* 12:3551-3558), απαιτείται συνεργατικότητα μεταξύ θέσεων NF-kB και SP1 για να επιτευχθεί ενεργοποίηση της HIV LTR. Ωστόσο, για τον σκοπό της παρούσας εφεύρεσης, το μοτίβο διπλής θέσης NF-kB-τριπλής θέσης SP1 στην HIV LTR μπορεί να αξιοποιηθεί παρέχοντας μία μόνο, πρωτότυπη πρωτεΐνη δέσμευσης ικανή να δεσμεύεται και με τις δύο θέσεις ταυτόχρονα, αλλά μόνο όταν η απόσταση μεταξύ των θέσεων είναι γεωμετρικά εφικτή. Αυτό ελέγχεται και με την δομή των επιλεγμένων TBA και με το PNA που χρησιμοποιείται. Επομένως, στην υλοποίηση που παραθέτεται στην Εικόνα 7, οι δύο ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν με αρκετά μεγάλο διάστημα μονόκλωνου DNA να παραμένει μεταξύ τους έτσι ώστε, ακόμα και εάν οι θέσεις δέσμευσης NF-kB και SP1 είναι σε αντίθετες θέσεις της έλικας, η μονόκλωνη περιοχή μεταξύ των ανιχνευτών παρέχει μία επαρκώς εύκαμπτη "άρθρωση" έτσι ώστε το DNA μπορεί και να λυγίζει και να

περιστρέφεται για να εξυπηρετήσει την γεωμετρία του TBA. Εναλλακτικά, μπορεί να σχεδιαστεί ένας πιο αυστηρός προσδιορισμός μειώνοντας την απόσταση μεταξύ των δύο ανιχνευτών έτσι ώστε το DNA να μπορεί μόνο να λυγίζει, αλλά όχι να περιστρέφεται. Τέλος, οι ανιχνευτές μπορεί να είναι τόσο κοντά ο ένας με τον άλλον, ή να χρησιμοποιηθεί ένα μόνο PNA, έτσι ώστε το DNA να μπορεί μόνο να λυγίζει αλλά όχι να περιστρέφεται. Επομένως, αυτή η εικόνα διευκρινίζει και καθιστά δυνατή την παραγωγή συστημάτων ανίχνευσης με τον οποιοδήποτε δεδομένο επιθυμητό βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ νουκλεϊκών οξέων στόχων που έχουν παρόμοιες αλληλουχίες, αλλά διαφορετικές αντιπαραθέσεις αυτών των αλληλουχιών.

Όσον αφορά διαγνωστικό ή ιατροδικαστικό kit για HIV, αυτοί με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα κατανοήσουν ότι οι προαναφερόμενες μορφές αυτής της εφεύρεσης καθιστούν εφικτή την προσαρμογή των συστατικών του διαγνωστικού ή ιατροδικαστικού kit για να αντιστοιχεί σε αυτό που είναι γνωστό σε κάθε δεδομένο χρόνο για τα επικρατή στελέχη HIV ή άλλου παθογόνου ή κατάσταση νόσου. Αυτοί με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα αντιλαμβάνονται επίσης ότι, μολονότι η ανίχνευση λοίμωξης HIV δεν είναι η μόνη χρησιμότητα της παρούσας εφεύρεσης, λόγω της μεταλλακτικότητας του γονιδιώματος HIV, είναι ίσως ένα από τα πλέον πολύπλοκα περιβάλλοντα δοκιμασίας για ένα τέτοιο διαγνωστικό. Ωστόσο, ακριβώς σε ένα τέτοιο μεταλλάξιμο περιβάλλον, θα εκτιμηθεί περισσότερο η προσαρμοστικότητα της παρούσας μεθόδου, όπως και η ικανότητά της να διαφοροποιεί μεταξύ πολύ συναφών αλληλουχιών. Σε λιγότερο μεταλλάξιμο περιβάλλοντα, μερικές επιτηδεύσεις στις οποίες είναι επιδεκτική αυτή η εφεύρεση μπορεί να μην χρειαστούν. Έτσι, σε διαγνωστικό kit για λοίμωξη ιού θηλώματος, όλα τα χαρακτηριστικά διαφοροποίησης της αλληλεπίδρασης TBA-TBR είναι διαθέσιμα, μαζί με την δυνατότητα ενίσχυσης του σήματος χρησιμοποιώντας τα BNAs και BBAs, αλλά ένα μόνο, απλό PNA, όπως η οποιαδήποτε από τις αλληλουχίες αρ. 46-62, μπορεί να χρησιμοποιηθεί που ταυτοποιεί μοναδικές αλληλουχίες ιού θηλώματος, που είναι επίσης γνωστό ότι δεσμεύονται με TBA όπως πρωτεΐνη E2 ιού θηλώματος ή τμήματα αυτών που δεσμεύονται με DNA (βλέπε Hegde *et al.* [1992] *Nature* 359:505-512, Monini *et al.* [1991] *J. Virol.* 65:2124-2130).

Στην εφαρμογή της παρούσας μεθόδου στην ανίχνευση συγκεκριμένου TNA με σκοπό την εκτίμηση εάν ορισμένα νουκλεϊκά οξέα είναι παρόντα, τα οποία σχετίζονται με την εξέλιξη μελανώματος, ηπατώματος, καρκίνων μαστού, κόλπου, πνεύμονα, κόλου, προστάτη, παγκρέατος ή ωοθήκης, το TNA μπορεί να αποκτηθεί από υλικά βιοψίας που παίρνονται από όργανα και υγρά που πιθανώς περιέχουν τα καρκινικά κύτταρα. Για την ανίχνευση γενετικών ανεπαρκειών, το TNA μπορεί να αποκτηθεί από δείγματα ασθενών που περιέχουν τα προσβεβλημένα κύτταρα. Για ανίχνευση ρύπων ζυμώσεων και προϊόντων στην παραγωγή τροφίμων, χημικών ή βιοτεχνολογικών προϊόντων ή στην βιολογική αποκατάσταση αποβλήτων, το TNA μπορεί να αποκτηθεί από δείγματα που παίρνονται σε διάφορα στάδια της διαδικασίας ζύμωσης ή επεξεργασίας. Για ανίχνευση παθογόνων ή ρύπων τροφών ή φαρμάκων, το δείγμα TNA μπορεί να αποκτηθεί από τις τροφές ή φάρμακα, δείγματα τροφών ή επιφάνειες σε επαφή με τις τροφές, υγρά σε επαφή με τις τροφές, υλικά επεξεργασίας, υγρά και παρόμοια που συνδέονται με την παραγωγή τροφών, φαρμάκων, ή σε επαφή με αυτά, ή βιολογικά δείγματα από αυτούς που ήρθαν σε επαφή με τις τροφές ή φάρμακα, ή παρόμοια.

2. Τα Ενισχυτικά Νουκλεϊκά Οξέα (BNA), Ενισχυτικές Περιοχές Δέσμευσης (BBR) και η παρασκευή τους. Τα BNA της παρούσας εφεύρεσης αποτελούνται από τουλάχιστον μία ή περισσότερες $\frac{1}{2}$ BBRs συζευγμένες με OSA. Οι $\frac{1}{2}$ BBRs μπορούν να υβριδοποιηθούν με συμπληρωματικές $\frac{1}{2}$ BBRs που περιέχονται στο PNA, άλλα BNAs ή HNA.

Με αναφορά στην Εικόνα 1(I, IIb και IIIb) των σχημάτων, το απλούστερο BNA αποτελείται από δύο μέρη. Με αναφορά στην Εικόνα 1(IIb) των σχημάτων, το πρώτο μέρος του απλούστερου BNA είναι αλληλουχία βάσεων που είναι συμπληρωματική της αλληλουχίας στο PNA που ορίζεται ως " $\frac{1}{2}$ BBR". Με αναφορά στην Εικόνα 1(IIb) των σχημάτων, το δεύτερο μέρος του απλούστερου BNA είναι το OSA, που ορίζεται με κύκλο που περιβάλλεται από πλαίσιο. Το OSA δεν είναι υποστήριγμα και/ή δείκτης, ή στερεό

υποστήριγμα, ή άλλο μέσο εντοπισμού, που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, προσκόλληση σε σφαιρίδια, πολυμερή, και επιφάνειες και/ή δείκτες που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι, ή μη ομοιοπολικά, αλλά ειδικά, προσκολλημένοι στο BNA.

Με αναφορά στην Εικόνα 2a(II και III) των σχημάτων, το BNA μπορεί να περιέχει περισσότερο από μία αλληλουχία $\frac{1}{2}$ BBR. Το BNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(II) περιέχει αλληλουχία που είναι συμπληρωματική του PNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(I) και δύο άλλες αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ BBR. Το BNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(III) περιέχει δύο αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ BBR που είναι συμπληρωματικές δύο εκ των αλληλουχιών $\frac{1}{2}$ BBR στο BNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(II), συν έως και “n” επιπρόσθετων $\frac{1}{2}$ BBR για πολυμερισμό επιπρόσθετων BNA.

Υπό συνθήκες υβριδοποίησης, το BNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(II), όταν συνδυάζεται με το PNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(I), δημιουργεί το υβρίδιο PNA-BNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(IVa) που περιέχει BBR και μία μη υβριδοποιούμενη προέκταση με δύο επιπρόσθετες αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ BBR ή “ενισχυτικές” αλληλουχίες. Οι BBRs που δημιουργούνται με αυτήν την υβριδοποίηση μπορούν να δεσμεύονται με ταυτόσημα, παρόμοια ή ανόμοια BBAs (βλέπε παρακάτω). Τα BNAs μπορούν να παρασκευαστούν κατ’ ανάλογο τρόπο των PNAs.

Υπό συνθήκες υβριδοποίησης, το υβρίδιο BNA-BNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(IVb), όταν συνδυάζεται με το PNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(Vb), δημιουργεί το υβρίδιο PNA-BNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3(VI) που περιέχει BBR, δύο επιπρόσθετα υβρίδια BNA-BNA που περιέχουν BBRs, και μία μη υβριδοποιημένη προέκταση με επιπρόσθετη αλληλουχία $\frac{1}{2}$ BBR, “ενισχυτική” αλληλουχία. Οι BBRs που δημιουργούνται με αυτήν την υβριδοποίηση μπορεί να είναι ταυτόσημα, παρόμοια, ή ανόμοια BBA (βλέπε παρακάτω). Τα BNAs μπορούν να παρασκευαστούν κατ’ ανάλογο τρόπο των PNAs.

3. Τα Νουκλεϊκά Οξέα Στόχων (TNAs) και η παρασκευή τους. Το πρώτο βήμα στην ανίχνευση και ενίσχυση σημάτων που παράγονται κατά την ανίχνευση συγκεκριμένου TNA σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο είναι η υβριδοποίηση αυτού του στόχου με PNA σε κατάλληλο μείγμα. Αυτή η υβριδοποίηση επιτυγχάνεται υπό τις κατάλληλες συνθήκες που είναι πολύ γνωστές στην τεχνολογία.

Το δείγμα που πιθανολογείται ή είναι γνωστό ότι περιέχει το επιδιωκόμενο TNA μπορεί να αποκτηθεί από ποικιλία πηγών. Μπορεί να είναι βιολογικό δείγμα, δείγμα τροφής ή γεωργικό δείγμα, περιβαλλοντικό δείγμα και ούτω καθ’ εξής. Εφαρμόζοντας την παρούσα μέθοδο στην ανίχνευση συγκεκριμένου TNA με σκοπό ιατρική διάγνωση ή ιατροδικαστική, το TNA μπορεί να αποκτηθεί από δείγμα βιοψίας, υγρό σώματος ή έκκριμα όπως ούρα, αίμα, γάλα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πτύελο, σάλιο, κόπρανα, πνευμονικό αναρρόφημα, δείγμα επιθηλίου λαιμού ή γεννητικών οργάνων, και παρόμοια. Επιπροσθέτως, η ανίχνευση μπορεί να γίνει *in situ* (βλέπε για παράδειγμα Embretson 1993, Patterson 1993, Adams 1994).

Κατά συνέπεια, PNA που είναι ειδικά σε σπονδυλωτά (που περιλαμβάνουν θηλαστικά και ανθρώπους) ή στον οποιοδήποτε ή σε όλους του ακόλουθους μικροοργανισμούς ενδιαφέροντος μπορούν να εξεταστούν και να χρησιμοποιηθούν σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο:

Corynebacteria (Κορυνοβακτηρίδια)

Corynebacterium diphtheria (διφθερίτιδας)

Bacillus (Βάκιλλος)

Bacillus thuringiensis

Pneumococci (Πνευμονόκοκκοι)

Diplococcus pneumoniae

Streptococci (στρεπτόκοκκοι)

Streptococcus pyogenes

Streptococcus salivarius

Staphylococcus (Σταφυλόκοκκος)

<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus albus</i>	
<u>Pseudomonas (Ψευδομονάδα)</u>	
<i>Pseudomonas stutzen</i>	
<u>Neisseria</u>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	
<u>Enterobacteriaceae (Εντεροβακτηρίδια)</u>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Aerobacteria aerogenes</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Τα κολοβακτηρίδια
<i>Salmonella typhosa</i>	
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Οι σαλμονέλλες
<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Shigellae dysenteriae</i>	
<i>Shigellae schmitzii</i>	
<i>Shigellae arabinotarda</i>	
<i>Shigellae flexneri</i>	Οι Σιγκέλες
<i>Shigellae boydii</i>	
<i>Shigellae sonnei</i>	
<u>Άλλοι εντερικοί βάκιλλοι</u>	
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	Είδη Proteus
<i>Proteus morgani</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	
<i>Vibrio cholerae</i>	
<u>Ομάδα Αιμόφιλου-Bordetella</u>	
<i>Hemophilus influenza, H. ducryi</i>	
<i>Hemophilus hemophilus</i>	
<i>Hemophilus aegypticus</i>	
<i>Hemophilus parainfluenzae</i>	
<i>Bordetella pertussis</i>	
<u>Pasteurellae</u>	
<i>Pasteurella pestis</i>	
<i>Pasteurella tularensi</i>	
<u>Brucellae</u>	
<i>Brucella melitensis</i>	
<i>Brucella abortus</i>	
<i>Brucella suis</i>	
<u>Αερόβιοι σπορογόνοι βάκιλλοι</u>	
<i>Bacillus anthracis</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Bacillus megaterium</i>	

Bacillus cereus

Αναερόβιοι σπορογόνοι βάκιλλοι

Clostridium botulinum

Clostridium tetani

Clostridium perfringens

Clostridium novyi

Clostridium septicum

Clostridium histolyticum

Clostridium tertium

Clostridium bifermentans

Clostridium sporogenes

Μυκοβακτήρια

Mycobacterium tuberculosis hominis

Mycobacterium bovis

Mycobacterium avium

Mycobacterium leprae

Mycobacterium paratuberculosis

Ακτινομύκητες (βακτήρια ομοιάζοντα με μύκητες)

Actinomyces israeli

Actinomyces bovis

Actinomyces naeslundii

Nocardia asteroides

Nocardia brasiliensis

Σπειροχαίτες

Treponema pallidum

Treponema pertenue

Treponema carateum

Spirillum minus

Streptobacillus moniliformis

Borrelia recurrentis

Leptospira icterohemorrhagiae

Leptospira canicola

Τρυπανοσώματα

Μυκοπλάσματα

Mycoplasma pneumoniae

Άλλα παθογόνα

Listeria monocytogenes

Erysipelothrix rhusiopathiae

Streptobacillus moniliformis

Donovania granulomatis

Bartonella bacilliformis

Rickettsiae (παράσιτα ομοιάζοντα με βακτήρια)

Rickettsia prowazekii

Rickettsia mooseri

Rickettsia rickettsii
Rickettsia conori
Rickettsia australis
Rickettsia sibiricus
Rickettsia akari
Rickettsia tsutsugamushi
Rickettsia burnetti
Rickettsia quintana

Chlamydia (μη ταξινομημένα παράσιτα βακτηριακά/ικά)

Παράγοντες Chlamydia (ασαφείς ονομασίες)

Μύκητες

Cryptococcus neoformans
Blastomyces dermatidis
Histoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Candida albicans
Aspergillus fumigatus
Mucor corymbifera (Absidia corymbifera)
Rhizopus oryzae
Rhizopus arrhizus
Rhizopus nigricans
Sporotrichum schenkii
Fonsecaea pedrosoi
Fonsecaea compact
Fonsecaea dermatidis
Cladosporium carrioni
Phialophora verrucosa
Aspergillus nidulans
Madurella mycetomi
Madurella grisea
Allescheria boydii
Phialophora jeanselmei
Microsporum gypsum
Trichophyton mentagrophytes
Keratinomyces ajelloi
Microsporum canis
Trichophyton rubrum
Microsporum adouini

Φυκομύκητες

Ιοί

Αδενοϊοί

Ερπητοϊοί

Herpes simplex
Varicella (Chicken pox)

Herpes zoster (Shingles)

Ιός Β

Cytomegalovirus (κυτταρομεγαλοϊός)

Ιοί ευλογίας

Variola (ευλογιά)

Δαμαλίτιδα

Ιός ευλογίας βοοειδών

Παραδαμαλίτιδα

Molluscum contagiosum

Ιοί Picorna (μικρο-RNA)

Ιός πολιομυελίτιδας

Ιός Coxsackie

Ιοί Echo

Ρινοϊοί

Μυξοϊοί

Γρίπη (Α, Β, και C)

Παραγρίπη (1-4)

Ιός παρωτίτιδας

Ιός νόσου Newcastle

Ιός ιλαράς

Ιός πανώλης βοοειδών

Ιός distemper σκύλου

Συγκυτιακός αναπνευστικός ιός

Ιός ερυθράς

Αρμποϊοί

Ιός εγκεφαλίτιδας ίππων ανατολής

Ιός εγκεφαλίτιδας ίππων δύσης

Ιός Sindbis

Ιός Chikungunya

Ιός δάσους Semliki

Ιός Mayora

Ιός εγκεφαλίτιδας St. Louis

Ιός εγκεφαλίτιδας Καλιφόρνιας

Ιός πυρετού κρότωνα Κολοράντο.

Ιός κίτρινου πυρετού

Ιός Dengue

Ρεοϊοί

Ρεοϊός τύπων 1-3

Ρετροϊοί

Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV)

Ανθρώπινος λεμφοτρόπος ιός Τ-λεμφοκυττάρων I & II (HTLV)

Ηπατίτιδα

Ιός ηπατίτιδας Α

Ιός ηπατίτιδας Β

Ανθρώπινος ιός ηπατίτιδας μη-A μη-B
 Ηπατίτιδα, C, D, E

Ογκοϊοί

Ιός λευχαιμίας Rauscher

Ιός Gross virus

Ιός λευχαιμίας Maloney

Ανθρώπινοι ιοί θηλώματος.

Κάποιος με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα κατανοήσει ότι γενικά απαιτείται τα δείγματα που πιθανώς περιέχουν συγκεκριμένο TNA να υποβληθούν σε αγωγή με τέτοιο τρόπο που να παραχθούν θραύσματα που μπορούν να υβριδοποιηθούν εύκολα με το PNA. Μπορεί να είναι αναγκαίο να υποβληθεί το δοκιμαστικό δείγμα σε αγωγή για να πραγματοποιηθεί έκλυση ή εκχύλιση του TNA για υβριδοποίηση, όπως εκθέτοντας αίμα ή άλλα κύτταρα σε υποτονικό περιβάλλον, διασπώντας κατ' άλλον τρόπο το δείγμα χρησιμοποιώντας ισχυρότερα μέσα. Όταν πιστεύεται ότι το TNA είναι παρόν σε δίκλωνη μορφή, θα είναι φυσικά επιθυμητό να διαχωριστούν οι κλώνοι για να καταστεί το TNA υβριδοποιήσιμο σε μονόκλωνη μορφή με πολύ γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας, που περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, θέρμανση ή σύντομη έκθεση σε αλκαλικές συνθήκες που μπορούν να εξουδετερωθούν με προσθήκη του μονόκλωνου PNA για να καταστεί εφικτό το συμβάν υβριδοποίησης. Οι μέθοδοι παρασκευής στόχων RNA είναι πολύ γνωστές (βλέπε Waterhouse 1993, Mitchell 1992).

Για να μειωθεί το ιξώδες του δείγματος και για να αυξηθεί η προσβασιμότητα των TNA στα PNA συνήθως απαιτείται κατάτμηση των δειγμάτων νουκλεϊκών οξέων. Αυτή η κατάτμηση επιτυγχάνεται με τυχαία ή ειδικά μέσα που είναι γνωστά στην τεχνολογία. Επομένως, για παράδειγμα, ειδικές νουκλεάσες που είναι γνωστό ότι διασπούν με συγκεκριμένη συχνότητα στο συγκεκριμένο γονιδίωμα που αναλύεται, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παράγουν θραύσματα γνωστού μέσου μοριακού μεγέθους. Επιπροσθέτως, άλλες νουκλεάσες, φωσφοδιεστεράσες, εξωνουκλεάσες και ενδονουκλεάσες, φυσική διάτμηση και επεξεργασία με υπερήχους είναι μέθοδοι που ενδείκνυνται γι' αυτόν τον σκοπό. Αυτές οι διεργασίες είναι πολύ γνωστές στην τεχνολογία. Η χρήση περιοριστικών ενζύμων με σκοπό την κατάτμηση DNA γενικά προτιμάται. Ωστόσο, το DNA μπορεί επίσης να κατατμηθεί με ποικιλία χημικών μέσων όπως με την χρήση των ακόλουθων τύπων αντιδραστηρίων: EDTA-Fe(II) (σύμφωνα με Stroebel *et al.* [1988] *J. Am. Chem. Soc.* 110:7927, Dervan [1986] *Science* 232:464), Cu(II)-φαινανθρολίνη (σύμφωνα με Chen and Sigman [1987] *Science* 237:1197), περιοριστικό ένζυμο κατηγορίας IIS (σύμφωνα με Kim *et al.* [1988] *Science* 240:504), υβριδική δεοξυριβονουκλεάση (σύμφωνα με Corey *et al.* [1989] *Biochem.* 28:8277), βλεομυκίνη (σύμφωνα με Umezawa *et al.* [1986] *J. Antibiot.* (Tokyo) Ser. A, 19:200), νεοκαρζινοστατίνη (Goldberg *et al.* [1981] *Second Annual Bristol-Myers Symposium in Cancer Research*, Academic Press, New York, p.163), και μεθιδιοπροπυλο-EDTA-Fe(II) (σύμφωνα με Hertzberg *et al.* [1982] *J. Am. Chem. Soc.* 104:313). Η αφαίρεση πρωτεϊνών, όπως με αγωγή με πρωτεάση, είναι επίσης γενικά επιθυμητή και μέθοδοι πραγματοποίησης αφαίρεσης πρωτεϊνών από δείγματα νουκλεϊκών οξέων, χωρίς υπολογίσιμη απώλεια νουκλεϊκού οξέος, είναι πολύ γνωστές στην τεχνολογία.

Τα TNAs της παρούσας εφεύρεσης πρέπει να έχουν αρκετό μήκος έτσι ώστε να υπάρχει αρκετή ποσότητα δίκλωνου υβριδίου που να κείται εκατέρωθεν της TBR έτσι ώστε TBA να δεσμεύεται ανενόχλητο από τα μη απολινωμένα άκρα του θραύσματος. Χαρακτηριστικά, θραύσματα που κυμαίνονται από περίπου 10 νουκλεοτίδια έως περίπου 10,000 νουκλεοτίδια, και κατά προτίμηση που κυμαίνονται από περίπου 20 νουκλεοτίδια έως περίπου 1000 νουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται ως μέσο μήκος θραυσμάτων TNA. Παραδείγματα ειδικών αλληλουχιών TNA που μπορούν να ανιχνευτούν είναι αλληλουχίες συμπληρωματικές αλληλουχιών PNA που περιγράφονται εδώ για ανίχνευση φυσιολογικών κυτταρικών, ανώμαλων κυτταρικών (όπως σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια, ενσωματωμένα ξένα γονίδια, γενετικά ελαττωματικά γονίδια), και παθογόνο-ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων, για τις οποίες είναι γνωστές ειδικές πρωτεΐνες που δεσμεύονται με

νουκλειϊκό οξύ, ή που μπορούν να παραχθούν σύμφωνα με μεθόδους που περιγράφονται σε αυτήν την αποκάλυψη. Με αναφορά στην Εικόνα 7, ειδικό TNA σχετιζόμενο με HIV παρουσιάζεται ως αλληλουχία αρ. 37.

4. Προεκτάσεις στο PNA χρησιμοποιώντας BNAs, η παρασκευή τους, και ενίσχυση σήματος. Υπό συνθήκες υβριδοποίησης, BNAs μπορούν να προστεθούν και να υβριδοποιηθούν με τα PNAs, υβρίδια PNA-BNA, BNAs και/ή υβρίδια BNA-BNA. Οι προαναφερόμενες προσθήκες μπορούν να γίνουν με μη διανυσματικό πολυμερή τρόπο ή με διανυσματικό τρόπο, με γνωστή σειρά BNAs.

Με αναφορά στην Εικόνα 2a, παρουσιάζεται ένα απλό ενισχυτικό. Ενισχυτικό πολυμερές παράγεται προσθέτοντας δύο BNAs, που απεικονίζονται στην Εικόνα 2a(Ib και Ic), τα οποία όταν συνδυάζονται υπό συνθήκες υβριδοποίησης με το PNA, σχηματίζουν υβρίδια PNA-BNA-BNA, που αποτελούνται από το PNA και “ενισχυτικές” προεκτάσεις, που απεικονίζονται στην Εικόνα 2a(IIa,IIb,IIc και IId) αφήνοντας τουλάχιστον μία μη συζευγμένη αλληλουχία $\frac{1}{2}$ BBR. Η κάθε μη συζευγμένη αλληλουχία $\frac{1}{2}$ BBR, που απεικονίζεται στην Εικόνα 2a(IIa, IIb, IIc, IId) μπορεί να υβριδοποιηθεί με επιπρόσθετα BNAs για να σχηματιστούν επιπρόσθετες “ενισχυτικές” προεκτάσεις. Η κάθε μη συζευγμένη αλληλουχία $\frac{1}{2}$ BBR, που απεικονίζεται στην Εικόνα 2a(IIa,IIb,IIc και IId) μπορεί να υβριδοποιηθεί με προσθεμένα HNAs, που απεικονίζονται στην Εικόνα 2a(IIIa και IIIb). Η υβριδοποίηση των HNAs, που δεν μπορούν να υβριδοποιηθούν με επιπρόσθετα BNAs, δρα “καλύπτοντας/σφραγίζοντας” την προσθήκη των BNAs στο PNA, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2a(IVa, IVb, IVc και IVd).

Με αναφορά στην Εικόνα 2b, είναι δυνατόν να ελεγχθεί και να οριστεί η σειρά και τα συστατικά προεκτάσεων στο PNA. Εάν απαιτείται μία μόνο BBR, HNA που περιέχει την συμπληρωματική αλληλουχία της $\frac{1}{2}$ BBR στο PNA προστίθεται στο PNA για να παράγει μία μόνο BBR και για να “καλύψει” τις οποιοδήποτε “ενισχυτικές” προεκτάσεις στο PNA. Εάν πρόκειται να προστεθούν επιπρόσθετες BBRs στο PNA, μπορεί να επιτευχθεί ελεγχόμενη προέκταση του PNA.

Με αναφορά στην Εικόνα 2b, παρουσιάζεται ένα απλό ενισχυτικό. Διανυσματική προέκταση πολυμερούς επιτυγχάνεται προσθέτοντας BNA που είναι ειδικό για το PNA, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2b(Ia και IIa), που όταν συνδυάζεται υπό συνθήκες υβριδοποίησης με το PNA, σχηματίζονται υβρίδια PNA-BNA-BNA, αποτελούμενα από το PNA και “ενισχυτικές” προεκτάσεις. Αυτές οι προεκτάσεις, εάν σημανθούν με OSA, παρέχουν μέθοδο ενίσχυσης μεγάλου βαθμού του οποιοδήποτε σήματος που παράγεται όταν δεσμεύεται PNA με OSA στο δείγμα. Επιπλέον, με την δέσμευση σημασμένων BBAs στις BBRs στο πολυμερές, επιτυγχάνεται επιπρόσθετη ενίσχυση.

Η οποιαδήποτε σχετική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρασκευαστούν τα BNAs, που περιλαμβάνει, π.χ., σύνθεση μέσω γνωστής χημείας ή μέσω μεθόδων παραγωγής ανασυνδυασμένου DNA. Με την δεύτερη μέθοδο, ουσιαστικά απεριόριστος αριθμός BNA μπορεί να παραχθεί, απλά και φθηνά, για παράδειγμα, με παραγωγή σε προκαρυωτικά (*E. coli* για παράδειγμα) πλασμιδιακού DNA που έχει πολλαπλές επαναλήψεις των ειδικών αλληλουχιών BNA που πλευρίζονται από περιοριστικές θέσεις που έχουν άκρα με προβόλους. Με αυτόν τον τρόπο, για παράδειγμα, οι θέσεις αριστερού ή δεξιού χειριστή βακτηριοφάγου λάμδα, ή οποιαδήποτε άλλη αλληλουχία DNA ή άλλου νουκλειϊκού οξέος που είναι γνωστό ότι δεσμεύεται ειδικά και στενά με συγκεκριμένο BBA, όπως πρωτεΐνη που δεσμεύεται με DNA ή RNA, μπορεί να παραχθεί σε ουσιαστικά απεριόριστο αριθμό αντιγράφων, με το κάθε αντίγραφο να πλευρίζεται από *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, ή από την οποιαδήποτε άλλη κοινή θέση περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Εναλλακτικά, πολυμερές σε επαναλαμβανόμενες θέσεις μπορεί να αποκοπεί με μοναδικές περιοριστικές θέσεις που δεν υπάρχουν μέσα στο πολυμερές. Μεγάλες ποσότητες πλασμιδίου pBR322, pUC ή άλλου πλασμιδίου που έχει πολλαπλά αντίγραφα αυτών των αλληλουχιών παράγεται με πολύ γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας, το πλασμίδιο κόβεται με το περιοριστικό ένζυμο που πλευρίζει την πολυμερισμένη θέση, και τα απελευθερωμένα πολλαπλά αντίγραφα των χειριστών απομονώνονται με χρωματογραφία ή με το οποιοδήποτε άλλο εξυπηρετικό μέσο

που είναι γνωστό στην τεχνολογία. Το BNA, πριν χρησιμοποιηθεί, μετατρέπεται σε μονόκλωνο και μετά είναι επιδεκτικό πολυμερισμού σε PNA που κωδικοποιεί μονόκλωνο συμπληρωματικό αντίγραφο του χειριστή ως ½ BBR. Τα BNAs μπορούν να πολυμεριστούν διανυσματικά στο PNA χρησιμοποιώντας διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα στα άκρα της κάθε επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας του πολυμερούς στο πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για να παράγει πολλαπλά αντίγραφα του BNA. Εναλλακτικά, το πολυμερές BNA μπορεί να υβριδοποιηθεί με το PNA μέσω προβόλων στο ένα ή και στα δύο άκρα του πολυμερούς BNA, χωρίς να χρειαστεί διαχωρισμός και επανασύνδεση των κλώνων που κάθε τμήματος BNA. Παραδείγματα ειδικών αλληλουχιών BNA παρέχονται ανωτέρω στο κεφάλαιο με τίτλο Περιγραφή Αλληλουχιών, ως αλληλουχίες αρ. 35-36. Για να σταθεροποιηθεί το πολυμερές BNA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί λιγάση DNA για να συνδέσει ομοιοπολικά τα υβριδοποιούμενα BNA.

5. Τα νουκλεϊκά οξέα φουρκέτας (HNAs) και η παρασκευή τους. Τα HNAs που περιγράφονται εδώ περιλαμβάνουν τουλάχιστον δύο κύρια μέρη ενωμένα μεταξύ τους: μία μονόκλωνη αλληλουχία, η οποία είναι συμπληρωματική μίας ½ BBR, και δίκλωνη περιοχή νουκλεϊκού οξέος που σχηματίζεται, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, με την αυτοσυνένωση αυτοσυμπληρωματικών αλληλουχιών μέσα στο HNA. Με αναφορά στην Εικόνα 1(IIc) των σχημάτων, η ½ BBR στο HNA μπορεί να κατασκευαστεί έτσι ώστε να είναι συμπληρωματική της αλληλουχίας ½ BBR στο PNA. Με αναφορά στην Εικόνα 1(I, IIc και IIIc) των σχημάτων, το προαναφερόμενο HNA, όταν προστίθεται στο PNA υπό συνθήκες υβριδοποίησης, σχηματίζει υβρίδιο PNA-HNA που περιέχει BBR. Με αναφορά στην Εικόνα 1(IIIc, IVc και Vc) των σχημάτων, υβρίδιο PNA-HNA, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, με την προσθήκη του TNA, μπορεί να σχηματίσει υβρίδιο TNA-PNA-HNA που περιέχει TBR και BBR.

Με αναφορά στην Εικόνα 2a και 2b, τα HNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να “καλύψουν” ή να διακόψουν την προσθήκη προεκτάσεων BNA στο PNA. Τα δύο BNA στην Εικόνα 2a(Ib και Ic) μπορούν να συνενωθούν για να σχηματίσουν το υβρίδιο που παρουσιάζεται στην Εικόνα 3(IVb) ή μπορούν να υβριδοποιηθούν άμεσα και ξεχωριστά με το PNA όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2a(Ia-c, IIa-d). Τα δύο HNAs (που παρουσιάζονται στην Εικόνα 2a(IIIa και IIIb)) μπορούν να διακόψουν την υβριδοποίηση του BNA σε άλλα BNA που προεκτείνονται από το PNA, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2a(IVa-d). Το HNA στην Εικόνα 2a(IIIa) μπορεί να διακόψει τα υβρίδια PNA-BNA που παρουσιάζονται στην Εικόνα 2a(IIb και IIc) και το οποιοδήποτε υβρίδιο PNA-BNA με μονόκλωνη ½ BBR που είναι συμπληρωματική της ½ BBR στο HNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 2a(IIIa). Παρομοίως, το HNA στην Εικόνα 2a(IIIb) μπορεί να διακόψει τα υβρίδια PNA-BNA που παρουσιάζονται στην Εικόνα 2a(IIa και IIc) και το οποιοδήποτε υβρίδιο PNA-BNA με δύο δίκλωνες ½ BBRs που είναι συμπληρωματικές των ½ BBRs στο HNA που απεικονίζεται στην Εικόνα 2a(IIIb).

Κατασκευάζονται HNAs που θα διακόψουν υβρίδια PNA-BNA που κατασκευάζονται από την διαδοχική προσθήκη BNAs στο PNA όπως απεικονίζεται στην Εικόνα (2b). Οι μονόκλωνες αλληλουχίες ½ BBR που απεικονίζονται στην Εικόνα 2b(Ia, IIIa, Va, και VIIa) είναι ειδικά συμπληρωματικές των μονόκλωνων αλληλουχιών ½ BBR που απεικονίζονται στην Εικόνα 2b(Ib, IIIb, Vb και VIIb) και παράγουν τα μοναδικά καλυμμένα (*carped*) υβρίδια PNA-BNA-HNA που απεικονίζονται στην Εικόνα 2b(Ic, IIIc, Vc και VIIc).

Οι αυτοσυμπληρωματικές αλληλουχίες στο HNA και η αλληλουχία βρόχου που συνδέει τις αυτοσυμπληρωματικές αλληλουχίες φουρκέτας μπορεί να είναι της οποιαδήποτε σύνθεσης και οποιουδήποτε μήκους, με την προϋπόθεση ότι δεν παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν ουσιωδώς την παρουσίαση της μονόκλωνης ½ BBR, που αποτελεί μέρος του HNA, από το HNA ή δεσμεύονται επιλεκτικά με το BBA ή το TBA. Οι αλληλουχίες βρόχου πρέπει να επιλεγθούν έτσι ώστε ο σχηματισμός του βρόχου δεν εμποδίζει τον σχηματισμό της φουρκέτας. Ένα παράδειγμα HNA χρήσιμο σε αυτήν την εφαρμογή παρέχεται ως αλληλουχία αρ. 44 (βλέπε Περιγραφή Αλληλουχιών, ανωτέρω).

6. Τα Συγκροτήματα Δέσμευσης Στόχου (TBAs) και η παρασκευή τους. Ένα TBA μπορεί να είναι η οποιαδήποτε ουσία που δεσμεύεται με συγκεκριμένη TBR που σχηματίζεται με υβριδοποίηση συγκεκριμένων TNAs και PNAs, με την προϋπόθεση ότι το TBA πρέπει να έχει τουλάχιστον τα ακόλουθα γνωρίσματα:

- (a) Το TBA πρέπει να δεσμεύεται με την(τις) TBR(s) με τρόπο πολύ ειδικό της(των) TBR(s) ενδιαφέροντος. Δηλαδή, το TBA πρέπει να διαφοροποιεί μεταξύ TBRs που υπάρχουν στο υβρίδιο TNA-PNA και παρόμοιων διπλών αλληλουχιών που σχηματίζονται από υβρίδια PNA-CNA. Το TBA πρέπει να δεσμεύεται με το υβρίδιο με επαρκώς χαμηλή ισχύ έτσι ώστε με πλύση του συμπλέγματος TBA-TNA-PNA, το υβρίδιο PNA-CNA εκτοπίζεται και το υβρίδιο PNA-TNA δεν εκτοπίζεται
- (b) Το TBA πρέπει να δεσμεύεται ισχυρά με την(τις) TBR(s) που δημιουργούνται με την υβριδοποίηση του TNA με το PNA. Συγγένειες δέσμευσης που κυμαίνονται από 10^{-5} έως περίπου 10^{-12} ή περισσότερο γενικά θεωρούνται επαρκείς. Όπως αναφέρεται παρακάτω, σε μερικές περιπτώσεις, μπορεί να είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθεί συγκεκριμένο TBA που έχει πολύ χαμηλή ισχύ δέσμευσης για συγκεκριμένη TBR, αλλά το οποίο έχει κατά πολύ αυξημένη συγγένεια όταν παρέχεται συγκεκριμένη διαμόρφωση πολλαπλών TBRs έτσι ώστε το τετράγωνο της συγγένειας του TBA για κάθε TBR γίνεται η πραγματική συγγένεια σε αυτό το συγκεκριμένο TBA.

Παραδείγματα των συστατικών δέσμευσης DNA που είναι χρήσιμα στον σχηματισμό TBAs περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, NF-kB, πρωτεΐνη E2 ιού θηλώματος, παράγοντα μεταγραφής SP1, αδρανή περιοριστικά ένζυμα, αντισώματα, κτλ. Η κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες έχει αναγνωριστεί στην τεχνολογία ότι περιέχει αλληλουχίες που δεσμεύονται με συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων και οι συγγένειες αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι γνωστές. Φυσικά, η μέθοδος της παρούσας εφεύρεσης δεν περιορίζεται στην χρήση αυτών των γνωστών πρωτεϊνών που δεσμεύονται με DNA ή των θραυσμάτων αυτών. Από την παρούσα αποκάλυψη, θα είναι προφανές σε κάποιον με κοινή τεχνολογία ότι η παρούσα μέθοδος μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί στην χρήση πρωτότυπων TBAs που παρουσιάζουν τουλάχιστον τα απαιτούμενα γνωρίσματα που προαναφέρθηκαν. Έτσι, για παράδειγμα, σε WO 92/20698, περιγράφηκε μόριο που δεσμεύεται με ειδική αλληλουχία DNA το οποίο περιλαμβάνει σύζευγμα ολιγονουκλεοτιδίου που σχηματίζεται με την ομοιοπολική σύνδεση δρόγης που δεσμεύεται με DNA με ολιγονουκλεοτίδιο που σχηματίζει τριπλό μόριο. Η μέθοδος αυτής της αποκάλυψης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή πρωτότυπων TBAs για χρήση σύμφωνα με την παρούσα αποκάλυψη, με την προϋπόθεση ότι τα TBAs που σχηματίζονται με αυτόν τον τρόπο εκπληρούν τα κριτήρια που περιγράφηκαν ανωτέρω. Επιπροσθέτως, οι μέθοδοι των U.S. Patent Nos. 5,096,815, 5,198,346, και WO88/06601, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παράγουν πρωτότυπα TBAs για χρήση σύμφωνα με την μέθοδο αυτής της εφεύρεσης. Ειδικά αντισώματα ή τμήματα αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν (βλέπε για παράδειγμα Blais 1994).

Όταν το TBA είναι πρωτεΐνη, ή σύμπλεγμα πρωτεϊνών, θα είναι αντιληπτό ότι η οποιαδήποτε από τις σχετικές κοινές μεθόδους της τεχνολογίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παραχθεί το TBA. Το TBA μπορεί να απομονωθεί από το φυσικά απαντώμενο περιβάλλον του στην φύση, ή εάν αυτό δεν είναι πρακτικό, να παραχθεί με τις τυπικές μεθόδους μοριακής βιολογίας. Επομένως, χρησιμοποιώντας το NF-kB ως παράδειγμα, χρησιμοποιώντας τα τμήματα δέσμευσης DNA των υπομονάδων p50 ή p65, αυτό το συγκρότημα δέσμευσης μπορεί να παραχθεί σύμφωνα με μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA που είναι γνωστές στην τεχνολογία (βλέπε για παράδειγμα Ghosh [1990] *Cell* 62:1019-1029, που περιγράφει την κλωνοποίηση της υπομονάδας p50 του NF-kB η οποία δεσμεύεται με DNA και την ομολογία αυτής της πρωτεΐνης με *rel* και *dorsal*).

Είναι γνωστές πολλές πρωτεΐνες που δεσμεύονται με DNA και άλλα νουκλεϊκά οξέα οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως, ή σε TBA σύμφωνα με αυτήν την εφεύρεση. Όταν είναι γνωστή η αλληλουχία αμινοξέων της οποιασδήποτε πρωτεΐνης που δεσμεύεται με

DNA, RNA:DNA, RNA ή άλλο νουκλεϊκό οξύ, η κατάλληλη αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μπορεί είτε να παρασκευαστεί με συνθετικά μέσα, ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντίγραφο cDNA του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη από κατάλληλη πηγή ιστού. Επιπλέον, γονιδιωματικά αντίγραφα που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη μπορούν να αποκτηθούν και να αποκοπούν τα ενδόνια σύμφωνα με γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας. Επιπλέον, τα TBAs μπορούν να συντεθούν χημικά.

Όταν αποκτηθεί η κατάλληλη κωδικεύουσα αλληλουχία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση για να αλλαχθεί η κωδικοποιούμενη αλληλουχία αμινοξέων για να παραχθούν μεταλλάγματα πρωτεϊνών που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα που να παρουσιάζουν πιο επιθυμητά χαρακτηριστικά δέσμευσης από αυτά της αρχικής πρωτεΐνης που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ. Ως παράδειγμα αυτής της διαδικασίας, η αλληλουχία αμινοξέων των τμημάτων που δεσμεύονται με DNA του NF-kB μπορεί να αλλαχθεί έτσι ώστε να παραχθεί μόριο NF-kB' που δεσμεύεται ισχυρότερα με την θέση δέσμευσης NF-kB (βλέπε παραδείγματα παρακάτω – HIV-Detect (Ανιχνευτής HIV) και HIV-Lock (“κλειθρο” HIV)).

Για να διευκρινισθεί καλύτερα αυτή η μορφή της εφεύρεσης, πρέπει να επισημανθούν οι ακόλουθοι παράγοντες. Χρησιμοποιώντας το NF-kB ως παράδειγμα, μπορεί να κατασκευαστεί TBA χρησιμοποιώντας το φυσικά απαντώμενο μόριο NF-kB. Ωστόσο, επειδή αυτό το μόριο είναι παρόν σε υπερβολικά μικρές ποσότητες σε κύτταρα, και επειδή οι υπομονάδες ατής της πρωτεΐνης που δεσμεύεται με DNA έχουν κλωνοποιηθεί, είναι λογικότερο να παρασκευαστούν μεγάλες ποσότητες του συμπλέγματος μέσω τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA όπως έχει ήδη επιτευχθεί γι' αυτήν την πρωτεΐνη (βλέπε για παράδειγμα Ghosh [1990] *Cell* 62:1019-1029). Το NF-kB είναι πλειοτροπικός επαγωγέας γονιδίων που εμπλέκονται σε ανοσιακές, φλεγμονώδεις και αυξητικές ρυθμιστικές αποκρίσεις σε πρωτογενείς παθογόνες (υικές, βακτηριακές ή στρες) προκλήσεις ή σε δευτερογενείς (φλεγμονώδους κυτοκίνης) προκλήσεις. Το NF-kB είναι διμερής πρωτεΐνη που δεσμεύεται με DNA που περιλαμβάνει υπομονάδες p50 και p65, και οι δύο εκ των οποίων έρχονται σε επαφή και δεσμεύονται με ειδικές αλληλουχίες DNA. Σε ανενεργή κατάσταση, το NF-kB παραμένει στο κυτταρόπλασμα, συμπλεγμένο με ειδικό αναστολέα, I-kB, σχηματίζοντας κυτταροπλασματικό ετεροτριμερές. Με την ενεργοποίηση, ο αναστολέας αποσυμπλέκεται, και το διμερές p50-p65 μετατοπίζεται μέσω ειδικού σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS: *nuclear localization signal*) στον πυρήνα του κυττάρου όπου μπορεί να δεσμευτεί με DNA και να πραγματοποιήσει τον ρόλο του ως μεταγραφικός ενεργοποιητής πολλών γονιδίων (βλέπε Grimm and Baeuerle [1993] *Biochem. J.* 290:297-308, για ανασκόπηση πρόσφατων δεδομένων αναφορικά με NF-kB).

Το διμερές p50-p65 δεσμεύεται με πικομοριακή συγγένεια με αλληλουχίες που ταιριάζουν με την συναινετική αλληλουχία GGGAMTNYCC (αλληλουχία αρ. 117), με λίγο διαφορετικές συγγένειες ανάλογα με την ακριβή αλληλουχία. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχει παρατηρηθεί επίσης ότι απαντώνται και ομοδιμερή p50 και p65. Αυτά τα ομοδιμερή παρουσιάζουν διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες όπως επίσης και λίγο διαφορετικές συγγένειες για δεσμευόμενες αλληλουχίες από την ανωτέρω συναινετική αλληλουχία, ή παρόμοιες με αυτήν. Επομένως, ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά δέσμευσης του TBA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ετεροδιμερές p50-p65, ομοδιμερές p50-p50, ή ομοδιμερές p65-p65 ή θραύσματα των προαναφερόμενων διμερών.

Ένας τρόπος με τον οποίο μπορούν να παραχθούν διάφορα πρωτότυπα TBA παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 9. Οι μονάδες αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος του TBA μπορούν να συγκροτηθούν και να συνδεθούν με παρόμοιες ή ανόμοιες μονάδες TBA αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος μέσω ενός “συνοδού” (“*chaperone*”). Ο συνοδός είναι δομή στην οποία κατασκευάζονται τα διάφορα στοιχεία αναγνώρισης TBA και η οποία εκχωρεί επιθυμητές ιδιότητες στις μονάδες αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος. Ο συνοδός αποτελείται από την οποιαδήποτε αλληλουχία που παρέχει αλληλουχίες συγκρότησης, έτσι ώστε ίδιες ή διαφορετικές μονάδες αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος έρχονται σε στενή και σταθερή σύνδεση η μία με την άλλη. Κατ' αυτόν τον τρόπο, για παράδειγμα, στην περίπτωση TBA που σχεδιάζεται για στενή δέσμευση NF-kB TBAs, συγκροτείται TBA παρέχοντας

αλληλουχίες λάμδα *cro* ως αλληλουχίες συγκρότησης, συνδεδεμένες με τις αλληλουχίες δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος για το p50 ή p65 του NF-kB. Οι αλληλουχίες p50 ή p65 δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος συνδέονται με τις αλληλουχίες *cro* στο καρβοξυτελικό ή στο αμινοτελικό άκρο του *cro* και στο καρβοξυτελικό ή στο αμινοτελικό άκρο της μονάδας αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος του p50 ή p65. Προαιρετικά παρέχονται συνδεδεμένες αλληλουχίες για να παράσχουν κατάλληλα διαχωριστικά διαστήματα των μονάδων αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος για την καλύτερη δέσμευση TBR.

Οι αλληλουχίες συγκρότησης, που παραδειγματίζονται ανωτέρω με αλληλουχίες *cro* και CI (αλληλουχίες αρ. 104-108), περιλαμβάνουν τα οποιαδήποτε σταθερά ολιγοπεπτίδια που δεσμεύονται φυσικά και ισχυρά με παρόμοιες αλληλουχίες. Έτσι, στην περίπτωση του *cro*, είναι πολύ γνωστό ότι διμερές του *cro* δεσμεύεται με τις θέσεις χειριστή βακτηριοφάγου λ (Anderson *et al.* [1981] *Nature* 290:754-758, Harrison and Aggarwal [1990] *Ann. Rev. Biochem.* 59:933-969). Οι μονομερείς μονάδες του *cro* συνδέονται στενά και ειδικά μεταξύ τους. Επομένως, συνδέοντας αλληλουχίες μονάδων αναγνώρισης DNA με τις αλληλουχίες *cro*, επιτυγχάνεται στενή και ισχυρή σύνδεση.

Οι προαιρετικές συνδεδεμένες αλληλουχίες περιλαμβάνουν την οποιαδήποτε αλληλουχία αμινοξέων που δεν παρεμβάλλεται στην συγκρότηση TBA ή δέσμευση νουκλεϊκού οξέος, και η οποία δεν είναι ασταθής έτσι ώστε να απελευθερώνει την μονάδα αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος από το πλήρες TBA. Είναι επιθυμητό αλλά όχι αναγκαίο οι συνδεδεμένες αλληλουχίες να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με άλλα συστατικά δέσμευσης του συγκροτήματος. Η σύνδεση πρέπει να είναι ειδική έτσι ώστε να βοηθά την συγκρότηση και κατασκευή των δεσμευτικών συγκροτημάτων. Παραδείγματα τέτοιων αλληλουχιών περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, αυτές τις πολύ γνωστές αλληλουχίες όπως απαντώνται να συνδέουν διάφορες περιοχές σε δομικές πρωτεΐνες. Έτσι για παράδειγμα, στην πρωτεΐνη καταστολέα λ, υπάρχει μία συνδεδεμένη αλληλουχία μεταξύ της περιοχής δέσμευσης DNA και της περιοχής διμερισμού που είναι χρήσιμη γι' αυτόν τον σκοπό. Πολλές άλλες τέτοιες αλληλουχίες είναι γνωστές και η επακριβής αλληλουχία αυτών δεν είναι κρίσιμη γι' αυτήν την εφεύρεση, με την προϋπόθεση ότι εκτελούνται πειραματισμοί ρουτίνας για να εξασφαλιστεί η σταθερότητα και η μη παρεμβολή στην δέσμευση νουκλεϊκού οξέος στόχου. Παραδείγματα αυτών των αλληλουχιών παρέχονται εδώ ως Met Ser και αλληλουχίες αρ. 99-102. Η ένθεση ειδικών, γνωστών θέσεων πρωτεόλυσης σε αυτές τις συνδεδεμένες αλληλουχίες αποτελεί επίσης αναπόσπαστο μέρος αυτής της εφεύρεσης. Η παρουσία αυτών των θέσεων στις συνδεδεμένες αλληλουχίες θα παρέχει πλεονεκτήματα στην κατασκευή, επιτρέποντας την συγκρότηση διαφορετικών μορίων στον σκελετό του συνοδού.

Εκτός των μονάδων αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος, προαιρετικών συνδεδεμένων αλληλουχιών, και αλληλουχιών συγκρότησης, τα πρωτότυπα TBA αυτής της εφεύρεσης προαιρετικά έχουν αλληλουχίες ασυμμετρίας ή PILOT TNA και μία ή περισσότερες μονάδες OSA. Οι αλληλουχίες ασυμμετρίας παρέχονται για να ενθαρρύνουν ή να αποτρέψουν ορισμένες επιθυμητές ή ανεπιθύμητες συνδέσεις. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που επιθυμείται το TBA να έχει ομοδιμερείς μονάδες p50 αναγνώρισης DNA, οι αλληλουχίες ασυμμετρίας παρέχονται για να διασπούν την φυσικά ισχυρότερη σύνδεση υπομονάδων p50 και p65 του NF-kB, ενώ δεν εμποδίζουν τις αλληλουχίες συγκρότησης από το να ενώνουν υπομονάδες p50. Παραδείγματα τέτοιων αλληλουχιών παρέχονται εδώ ως αλληλουχίες αρ. 85-92 και αλληλουχίες αρ. 105 και 106.

Σε διαφορετική διαμόρφωση, αλληλουχίες υπομονάδας p50 του NF-kB έρχονται σε στενή σύνδεση με αλληλουχίες αναγνώρισης DNA του παράγοντα μεταγραφής SP1. Αυτό είναι επιθυμητό στην περίπτωση που μοτίβο δέσμευσης NF-kB/SP1 είναι σημαντικό, όπως στην HIV LTR όπου είναι γνωστό ότι υπάρχει μοτίβο τουλάχιστον έξι θέσεων αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με DNA, δύο θέσεων NF-kB, τριών θέσεων SP1, και θέσης TATA. Εφόσον είναι επίσης γνωστό ότι η δεύτερη θέση NF-kB και η πρώτη θέση SP1 είναι σημαντικές στην ρύθμιση μεταγραφής του HIV (Perkins *et al.* [1993] *Embo J.* 12:3551-3558), αυτή η συγκεκριμένη διαμόρφωση του TBA είναι χρήσιμη όχι μόνο στην ανίχνευση HIV, αλλά και ως θεραπευτικός ή προφυλακτικός παράγοντας εναντίον λοίμωξης HIV (βλέπε παρακάτω). Παρομοίως, η μακρά ελεγκτική περιοχή (LCR: *long control region*) ανθρώπινου

ιού θηλώματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ελεγκτική αλληλουχία-κλειδί για ανίχνευση σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο.

Εν όψει των διαφορετικών στοιχείων που μπορούν να συνδεθούν, με τρόπο κασέτας, σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο σχηματισμού TBA, παράγεται μία ουσιαστικά απεριόριστη ποικιλία TBAs. Στην Εικόνα 10, παραθέτεται ως παράδειγμα σειρά διαφορετικών μορίων, που αναφέρονται ως “ανιχνευτές-HIV I-IV”/ “HIV-detect I-IV” όπου “Συνοδός”/“CHAP” δηλώνει τον συνοδό (*chaperone*), “nfkb” δηλώνει τις υπομονάδες NF-kB, “sp1” δηλώνει την μονάδα αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος του παράγοντα μεταγραφής SP1, και “TATA” δηλώνει διμερές της μονάδας αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με αλληλουχία TATA DNA (TBP: *TATA sequence DNA binding protein*), γνωστή επίσης και ως πρωτεΐνη που δεσμεύεται με TATA, ή TBP. Αυτές οι διαμορφώσεις διευκρινίζονται περαιτέρω παρακάτω και αποτελούν αναπόσπαστα μέρη της παρούσας εφεύρεσης.

Σε άλλη ακόμα διαμόρφωση η δομοστοιχειωτή δομή που παρουσιάζεται στην Εικόνα 9 προσαρμόζεται σε ανίχνευση και/ή θεραπεία ή προφύλαξη εντελώς διαφορετικού παθογόνου. Στην Εικόνα 11, με παρόμοιο τρόπο των ανωτέρω περιγραφέντων μορίων “ανιχνευτών-HIV I-IV”, παράγεται σειρά μορίων “ανιχνευτών-HPV I-IV”. Σε αυτήν την υλοποίηση, αξιοποιούνται οι ιδιότητες δέσμευσης DNA της πρωτεΐνης E2 ανθρώπινου ιού θηλώματος (HPV). Επιπροσθέτως, αξιοποιούνται οι ρόλοι των SP1 και TBP παρέχοντας ειδικές μονάδες αναγνώρισης DNA προσαρμοσμένες για να δεσμεύονται με αυτές τις αλληλουχίες στο γονιδίωμα HPV. Στον σχηματισμό E2-ειδικών TBAs για χρήση στην ανίχνευση λοίμωξης HPV, μπορεί να είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθεί η οποιαδήποτε από τις αλληλουχίες αρ. 75-84 ή 93-98 ως μονάδα αναγνώρισης E2 DNA. TBA που περιέχει περιοχή δέσμευσης DNA διμερούς E2 βοοειδούς και διμερούς E2 ανθρώπου μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο.

Οι διάφορες αλληλουχίες που περιγράφονται ανωτέρω μπορούν να συνδεθούν είτε χημικά χρησιμοποιώντας αρχικά υλικά αμιγών ολιγοπεπτιδίων, ή μπορούν να συνδεθούν μέσω παροχής ανασυνδυασμένων νουκλεϊκών οξέων που κωδικοποιούν, μέσω του πολύ γνωστού γενετικού κώδικα, τα διάφορα υποστοιχεία. Στην περίπτωση ανασυνδυασμένης παραγωγής, η σύνδεση αλληλουχιών που κωδικοποιούν *cro* με αλληλουχίες μονάδων αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος για να σχηματιστούν TBA είναι πλεονεκτική, επειδή το *cro* όχι μόνο δρα ως αλληλουχία συγκρότησης στο συνοδό, αλλά επίσης διευθύνει την σωστή πτύχωση των στοιχείων αναγνώρισης νουκλεϊκού οξέος. Παραδειγματικές αλληλουχίες για συνοδούς παρέχονται εδώ ως αλληλουχίες αρ. 104-108. Επιπλέον, στην περίπτωση όπου επιθυμούνται δομές ανώτερης τάξης που περιλαμβάνουν πολλαπλές θέσεις δέσμευσης, όπως σε πενταμερές TBA NF-kB/NF-kB/SP1/SP1/SP1, η σωστή σχεδίαση των ασύμμετρων αλληλουχιών καθιστά δυνατή την κατασκευή αυτών των δομών.

Με τον προαναφερόμενο τρόπο, κατασκευάζονται TBAs που δεσμεύονται με τις σχετικές τους θέσεις δέσμευσης με υψηλή συγγένεια. Για παράδειγμα, τα συστατικά δέσμευσης NF-kB DNA των TBAs της Εικόνας 10 αναμένεται να δεσμεύονται με την HIV-LTR με συγγένεια περίπου μεταξύ 10^{-8} και 10^{-12} M. Αλληλουχίες που είναι χρήσιμες ως μονάδες αναγνώρισης DNA παρέχονται ως αλληλουχίες αρ. 63-71, 73-84, 93-98, και 104-108 και διευκρινίζονται περαιτέρω παρακάτω.

Εν όψει της ανωτέρω περιγραφής κατευθυνόμενης συγκρότησης πρωτεϊνών που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα χρησιμοποιώντας αλληλουχίες συγκρότησης και ασυμμετρίας (ή αλληλουχίες-πιλότους), αυτοί με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα αντιλαμβάνονται ότι η εφεύρεση παρέχει μία γενικά εφαρμόσιμη μέθοδο συγκρότησης πρωτεϊνικών δομών. Η γενικότητα αυτής της μεθόδου επιδεικνύεται περαιτέρω με θεώρηση, ως περαιτέρω παράδειγμα, της χρήσης αλληλεπίδρασης αντισώματος-επιτόπου στην συγκρότηση επιθυμητών δομών. Εν είδει εξειδίκευσης, δομή πρωτεΐνης που δεσμεύεται με DNA μπορεί να συγκροτηθεί συνδέοντας υπομονάδα p50 NF-kB με αντιγόνο, όπως κυκλοποιημένη (μέσω δεσμών δισουλφιδίων) ορμόνη διέγερσης μελανοκυττάρων (MSH: *melanocyte stimulating hormone*). Αυτό το μόριο προ-MSH μπορεί να δεσμευτεί με

αντίσωμα αντι-MSH για να παρέχει πρωτότυπο συγκρότημα δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος, με το αντιγόνο και αντίσωμα να δρουν ως αλληλουχίες συγκρότησης.

Η δομοστοιχειωτή δομή που παρέχεται στην Εικόνα 9 αποκαλύπτει ότι μεγάλη ποικιλία από TBAs μπορεί να συγκροτηθεί χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς συστατικών. Έτσι, αντιπροσωπευτικές υλοποιήσεις αυτής της γενικής δομής παρέχονται ως αλληλουχίες αρ. 109-116.

7. Τα Ενισχυτικά Συγκροτήματα Δέσμευσης (BBAs: *Booster Binding Assemblies*) και η παρασκευή τους. Το BBA μπορεί να είναι οποιαδήποτε ουσία που δεσμεύεται με συγκεκριμένη BBR που σχηματίζεται με υβριδοποίηση συγκεκριμένων PNAs και BNAs, συμπεριλαμβανομένων και αυτών όταν πολλαπλά BNAs (έως και “n” BNAs, δηλαδή, BNA_n, όπου το “n” είναι θεωρητικά 0-4, αλλά στην πράξη είναι περίπου μεταξύ 0 και 100) πολυμερίζονται στο PNA για ενίσχυση σήματος, με την προϋπόθεση ότι το BBA πρέπει να έχει τουλάχιστον τα ακόλουθα γνωρίσματα:

- (a) Το BBA πρέπει να δεσμεύεται με τις BBRs με τρόπο που είναι άκρως ειδικό για την BBR ενδιαφέροντος. Δηλαδή, το BBA πρέπει να διαφοροποιεί μεταξύ BBRs που υπάρχουν στο υβρίδιο PNA-BNA και παρόμοιων διπλών αλληλουχιών στα υβρίδια BNA-CNA ή άλλα CNAs. Έτσι, ακόμα και όταν μία μόνο παράταιρη σύζευξη βάσεων ή διαμορφωτικές διαφορές με ή χωρίς παράταιρες συζεύξεις βάσεων συμβαίνουν στην παραγωγή του υβριδίου PNA-BNA_n ή PNA-BNA_n-HNA, το BBA πρέπει να δεσμεύεται με το υβρίδιο με επαρκώς χαμηλή ισχύ έτσι ώστε με την πλύση του συμπλέγματος TBA-TNA-PNA-BNA_n, το BBA εκτοπίζεται από τις αλληλουχίες CNA αλλά όχι από τις αλληλουχίες BBR.
- (b) Το BBA πρέπει να δεσμεύεται ισχυρά με την/τις BBR(s). Συγγένειες δέσμευσης εύρους 10^{-5} έως περίπου 10^{-9} ή περισσότερο γενικά θεωρούνται επαρκείς.

Παραδείγματα των BBAs περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, *cro*, και την πρωτεΐνη-καταστολέα βακτηριοφάγου λάμδα, CI. Επιπροσθέτως, βλέπε U.S. Patent No. 4,556,643, που προτείνει άλλες αλληλουχίες DNA και ειδικές πρωτεΐνες δέσμευσης όπως καταστολείς, ιστόνες, ένζυμα τροποποίησης DNA, και καταβολική πρωτεΐνη ενεργοποίησης γονιδίου. Βλέπε also EP 0 453 301, που προτείνει πληθώρα πρωτεϊνών που δεσμεύονται με ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (NSSBPs: *nucleotide sequence specific binding proteins*) όπως ο καταστολέας τετρακυκλίνης, ο καταστολέας *Iac*, και ο καταστολέας τρυπτοφάνης. Το κάθε ένα από αυτά τα BBAs έχει αναγνωριστεί στην τεχνολογία ότι δεσμεύεται με συγκεκριμένες, γνωστές αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων και οι συγγένειες αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι γνωστές. Φυσικά, η μέθοδος της παρούσας εφεύρεσης δεν περιορίζεται στην χρήση αυτών των γνωστών BBAs. Από την παρούσα αποκάλυψη, κάποιος με κοινή τεχνογνωσία θα μπορούσε εύκολα να εφαρμόσει την χρήση πρωτότυπων BBAs που παρουσιάζουν τουλάχιστον τα απαιτούμενα γνωρίσματα που προαναφέρθηκαν στην παρούσα μέθοδο.

Παραδείγματα πρωτότυπων BBAs σύμφωνα με αυτήν την μορφή της εφεύρεσης περιλαμβάνουν πρωτότυπες πρωτεΐνες βασιζόμενες στο μοτίβο γνωστής πρωτεΐνης που δεσμεύεται με DNA ή RNA ή DNA:RNA όπως *cro* ή πρωτεΐνη-καταστολέας λ CI. Κατά προτίμηση, αυτές οι τροποποιήσεις γίνονται για να βελτιωθούν οι χειρισμοί αυτών των συστατικών της εφεύρεσης. Έτσι, μπορεί να είναι επιθυμητό να προστεθεί υψηλή συγκέντρωση του *cro* στον προσδιορισμό. Μία από τις αρνητικές ιδιότητες του *cro* είναι ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις, η δέσμευση του *cro* με το DNA-στόχο του αντιμετωπίζει συναγωνισμό με αλληλεπιδράσεις *cro-cro*. Έτσι, για παράδειγμα, μπορεί να παραχθεί συνοδευόμενο (*chaperoned*) ή μεταλλαγμένο *cro* το οποίο δεν έχει αυτό το μειονέκτημα. Παραδείγματα τέτοιων αλλαγμένων συνοδών είναι οι αλληλουχίες αρ. 105-106 και 108. Γνωστές μέθοδοι της τεχνολογίας, όπως παραγωγή πρωτότυπων πρωτεϊνών που δεσμεύονται με στόχους χρησιμοποιώντας ποικιλόμορφους πληθυσμούς νουκλεϊκών οξέων και επιλογή δέσμευσης βακτηριοφάγου σε συγκεκριμένους, προεπιλεγμένους στόχους (δηλαδή, η αποκαλούμενη τεχνολογία έκθεσης φάγων (*phage-display*)), βλέπε συζήτηση ανωτέρω για

παραγωγή πρωτότυπων TBAs), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παράγουν αυτά τα πρωτότυπα BBAs όπως επίσης και τα προαναφερόμενα πρωτότυπα TBAs.

Όταν το BBA είναι πρωτεΐνη ή σύμπλεγμα πρωτεϊνών, εννοείται ότι η οποιαδήποτε από τις σχετικές κοινές μεθόδους της τεχνολογίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παράγει το BBA. Το BBA μπορεί να απομονωθεί από το φυσικό περιβάλλον του, ή εάν αυτό δεν είναι πρακτικό, να παραχθεί με τις τυπικές μεθόδους μοριακής βιολογίας. Έτσι, για παράδειγμα, η αλληλουχία της πρωτεΐνης *cro* είναι γνωστή και ο οποιοσδήποτε μοριακός κλώνος βακτηριοφάγου λ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποκτηθούν κατάλληλα νουκλεϊκά οξέα που κωδικοποιούν *cro* για ανασυνδυασμένη παραγωγή αυτού. Επιπροσθέτως, τα TBAs που περιγράφονται εδώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως BBAs, με την προϋπόθεση ότι διαφορετικά TBAs χρησιμοποιούνται για δέσμευση TBRs και BBRs.

8. Η χρήση BBAs και BBRs για εντοπισμό και ενίσχυση του εντοπισμού των συμπλεγμάτων PNA-TNA-TBA (βλέπε Εικόνα 8). Σε μία υλοποίηση της εφεύρεσης, η άκρως ειδική και ισχυρή δέσμευση TBAs που αποτελούνται από συστατικά δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται για να παράγει προσδιορισμό τύπου σάντουιτς ενισχύσιμου νουκλεϊκού οξέος. Σύμφωνα με μία μορφή της εφεύρεσης, στερεό υποστήριγμα επιστρώνεται με πρώτο TBA δημιουργώντας ακινητοποιημένο TBA. Σε διάλυμα, PNA και TNA έρχονται σε επαφή υπό συνθήκες υβριδοποίησης και μετά έρχονται σε επαφή με το ακινητοποιημένο TBA. Μόνο αυτές οι αλληλεπιδράσεις PNA-TNA που σχηματίζουν την ειδική TBR που αναγνωρίζεται από το ακινητοποιημένο TBA συγκρατούνται με έκπλυση της στερεάς επιφάνειας που δεσμεύει το σύμπλεγμα TBA-TBR.

Η ανίχνευση της δεσμευμένης TBR επιτυγχάνεται μέσω δέσμευσης Ενισχυτικών Νουκλεϊκών Οξέων, BNAs, με τις $\frac{1}{2}$ BBRs που υπάρχουν στα PNAs υπό συνθήκες υβριδοποίησης. Με αυτόν τον τρόπο, ακόμα και όταν ένα μόνο σύμπλεγμα TBA-TBR είναι δεσμευμένο στο ακινητοποιημένο TBA, μεγάλο, ενισχυμένο σήμα μπορεί να παραχθεί πολυμερίζοντας πολλαπλά BNAs στο ακινητοποιημένο TNA. Το κάθε BNA που δεσμεύεται με το TNA σχηματίζει BBR που μπορεί να δεσμευτεί με BBAs τα οποία, όπως τα TBAs που είναι ακινητοποιημένα στην στερεά επιφάνεια, μπορούν να επιλεγθούν για την πολύ ισχυρή και ειδική δέσμευση σε συγκεκριμένες δομές νουκλεϊκών οξέων. Έτσι, σύμφωνα με αυτήν την υλοποίηση, το ακινητοποιημένο TBA μπορεί να περιέχει το τμήμα του NF-kB που δεσμεύεται με DNA, το οποίο δεσμεύεται πολύ ειδικά και ισχυρά με θέσεις δέσμευσης NF-kB που σχηματίζονται με την υβριδοποίηση του TNA και PNA για να σχηματιστεί τέτοια θέση.

Επειδή είναι πολύ γνωστό ότι υπάρχουν θέσεις δέσμευσης και στο φυσιολογικό ανθρώπινο γονιδίωμα και στις μακρές τερματικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του ανθρώπινου ιού ανοσοανεπάρκειας (HIV), αυτή η εφεύρεση παρέχει μέθοδο διαφοροποίησης μεταξύ των “φυσιολογικών” ανθρώπινων θέσεων και των θέσεων που υπάρχουν σε κύτταρα λόγω λοίμωξης HIV. Επομένως, σε δοκιμασία που σχεδιάζεται για να καθοριστεί ή παρούσα ή απουσία HIV DNA σε δείγμα ανθρώπινου DNA, οι θέσεις δέσμευσης HIV NF-kB μπορούν να θεωρηθούν ως το TNA, και οι φυσιολογικές ανθρώπινες θέσεις δέσμευσης NF-kB μπορούν να θεωρηθούν ως CNAs. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτής της εφεύρεσης, η διαφοροποίηση μεταξύ αυτών των TNAs και CNAs επιτυγχάνεται αξιοποιώντας το γεγονός ότι στην HIV LTR, υπάρχουν δύο θέσεις δέσμευσης NF-kB, ακολουθούμενες από τρεις θέσεις SPI (βλέπε, για παράδειγμα, Koken *et al.* [1992] *Virology* 191:968-972), ενώ οι κυτταρικές θέσεις NF-kB με τις ίδιες αλληλουχίες δεν απαντώνται διαδοχικά.

Σε περιπτώσεις όπου το TNA περιέχει περισσότερο από μία $\frac{1}{2}$ TBR και είναι επιθυμητό να επιδιωχθούν οι θεραπευτικές και προφυλακτικές εφαρμογές των TBAs, μπορεί να είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθεί περισσότερο από ένα TBA, το καθένα με δυνατότητα να δεσμεύεται με TBR στο σύμπλεγμα TNA-PNA. Σε αυτήν την περίπτωση, μπορεί να είναι πλεονεκτικό να επιλεγθούν, ως συστατικά των TBAs, περιοχές δέσμευσης DNA ή περιοχές δέσμευσης RNA με μικρότερη συγγένεια για την αντίστοιχη TBR από την περιοχή δέσμευσης DNA ή περιοχή δέσμευσης RNA φυσικού τύπου. Δεδομένου ότι τα TBAs που εμπλέκονται στην δέσμευση με τις πολλαπλές TBRs μπορούν είτε να συγκροτούνται μαζί

πριν να δεσμευθούν με τις αντίστοιχες TBRs ή να συγκροτηθούν μαζί αφού δεσμευθούν με τις αντίστοιχες TBRs, τα ξεχωριστά TBAs δεν θα μπλοκάρουν τις αντίστοιχες TBRs στα άλλα γονιδιώματα από το γονιδίωμα-στόχο εκτός εάν οι TBRs είναι τοπολογικά ικανές να δεσμευθούν με το συγκροτημένο σύμπλεγμα TBA. Ένα χαρακτηριστικό της πολυμερούς συγκρότησης των TBAs που αξιόνεται εδώ ειδικά ως μέρος αυτής της εφεύρεσης είναι ότι ένα τέτοιο πολυμερές συγκρότημα αναμένεται να έχει μία πολύ μειωμένη συγγένεια για μία μόνο θέση μέσα στο TNA. Ωστόσο, εφόσον η δέσμευση αυξάνεται εντυπωσιακά συγκριτικά με το οποιοδήποτε TBA, το σύμπλεγμα TBA θα αναμένεται να μην συναγωνίζεται για δέσμευση της οποιασδήποτε ξεχωριστής TBR με τις αντίστοιχες φυσικές πρωτεΐνες *in situ* αλλά να δεσμεύεται στενά με αλληλουχίες στο υβρίδιο PNA-TNA που περιέχει τις TBRs για το κάθε ένα από τα συστατικά που δεσμεύονται με νουκλεϊκό οξύ τα οποία είναι συγκροτημένα στο TBA. Το σύμπλεγμα TBA θα πρέπει να συγκροτηθεί και οι συνδετικές αλληλουχίες να ρυθμιστούν στα ξεχωριστά TBAs έτσι ώστε να είναι δυνατόν οι περιοχές δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος που περιέχονται στο σύμπλεγμα TBA να εκταθούν ταυτόχρονα και να δεσμευθούν με αυτούς τους στόχους.

Αφού σχηματιστούν τα υβρίδια TNA-PNA, και έρθουν σε επαφή με το ακινητοποιημένο TBA, το μη δεσμευμένο νουκλεϊκό οξύ εκπλένεται από την ακινητοποιημένη επιφάνεια και τα ακινητοποιημένα υβρίδια ανιχνεύονται. Αυτό επιτυγχάνεται με τον οποιοδήποτε από τους σχετικούς τρόπους. Σε μία μορφή αυτής της εφεύρεσης, το PNA σημαίνεται με OSA όπως ραδιονουκλίδιο, χρωματισμένα σφαιρίδια, ή ένζυμο ικανό να σχηματίζει χρωματισμένο προϊόν αντίδρασης. Επιπλέον, εκτός του ότι έχει μία ή περισσότερες $\frac{1}{2}$ TBRs, το PNA μπορεί επίσης να περιέχει τουλάχιστον μία $\frac{1}{2}$ BBR. Οι αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ BBR επιλέγονται έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικές μοναδικών αλληλουχιών $\frac{1}{2}$ BBR σε BNAs. Στην υλοποίηση που περιγράφεται ανωτέρω, για παράδειγμα, όταν το TBA είναι NF-kB και η TBR που σχηματίζεται με υβριδοποίηση TNA-PNA είναι μία ή περισσότερες θέσεις δέσμευσης NF-kB, οι $\frac{1}{2}$ BBRs μπορεί να παρέχουν υβριδοποιήσιμες (δηλαδή, μονόκλωνες, συμπληρωματικές) αλληλουχίες των αριστερών ή δεξιών χειριστών βακτηριοφάγου λάμδα (βλέπε, για παράδειγμα, Ptashne [1982] *Scientific American* 247:128-140, και παραπομπές που μνημονεύονται εκεί για αλληλουχίες αυτών των χειριστών). Αυτές μπορούν να πολυμεριστούν στις PNA $\frac{1}{2}$ BBRs με διανυσματικό τρόπο (βλέπε Εικόνες 2 και 3) παρέχοντας έως και “n” BBRs, και η κάθε BBR σχηματίζει θέση δέσμευσης *cro*. Ενζυμικά, ραδιενεργά, ή κατ’ άλλο τρόπο σημασμένο *cro*, έρχεται σε επαφή με το σύμπλεγμα TBA-TNA-PNA-(BNA)_n. Με αυτόν τον τρόπο, παράγεται ένα άκρως επιλεκτικό και ενισχυμένο σήμα. Σήμα που παράγεται χρησιμοποιώντας PNA που έχει μία μόνο $\frac{1}{2}$ TBR υποδεικνύει επιτυχία του προσδιορισμού στο ότι επιτυγχάνει δέσμευση TBA-TBR και πολυμερισμό των BNAs για να παραχθεί σήμα από κυτταρικές θέσεις (δηλαδή από CNAs). Απουσία σήματος όταν χρησιμοποιείται διμερισμένο TBA υποδεικνύει ότι στο TNA δεν υπήρχαν HIV LTRs εφόσον δεν υπήρχαν διπλές θέσεις δέσμευσης NF-kB. Αφ’ ετέρου, παρουσία σήματος χρησιμοποιώντας το διμερές NF-kB υποδεικνύει λοίμωξη HIV. Ως ειδικό παράδειγμα της ανωτέρω περιγραφής αυτής της υλοποίησης της εφεύρεσης, βλέπε το Παράδειγμα 6 που περιγράφει kit δοκιμασίας.

Φυσικά, αυτοί με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα αντιλαμβάνονται ότι η ανωτέρω περιγραφή υπόκειται σε αρκετές τροποποιήσεις στην επιλογή PNAs, TNAs, TBAs, BNAs, και BBAs. Επιπλέον, σε συστήματα εκτός HIV, αυτοί με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα αντιλαμβάνονται ότι η γενική μέθοδος που περιγράφεται εδώ μπορεί να εφαρμοστεί με παρόμοιο τρόπο. Ωστόσο, αυτές οι άλλες εφαρμογές μπορεί να είναι απλούστερες από την ανωτέρω περιγραφόμενη μέθοδο εφόσον τα TBAs που χρησιμοποιούνται μπορεί να μην αναγνωρίζουν κάποιες φυσιολογικές κυτταρικές θέσεις και επομένως η προσφυγή σε διμερισμό ή σε άλλες μεθόδους διαφοροποίησης TNAs και CNAs μπορεί να είναι λιγότερο κρίσιμη. Στην σχεδίαση ανιχνευτών και συγκροτημάτων δέσμευσης γι’ αυτά τα άλλα συστήματα, ο έμπειρος επιστήμονας θα οδηγηθεί από τις ακόλουθες αρχές και παράγοντες.

Στην ανωτέρω περιγραφόμενη υλοποίηση, η ελκυστικότητα της χρήσης τμημάτων δεσμευόμενων με DNA της πρωτεΐνης NF-kB ως το TBA και των δεσμευτικών στοιχείων αναγνώρισης NF-kB ως τις TBRs είναι ότι αυτά τα στοιχεία σχηματίζουν σημαντικό “σημείο

ελέγχου” για την αναπαραγωγή του HIV. Δηλαδή, είναι γνωστό ότι ο HIV χρειάζεται να χρησιμοποιήσει το NF-kB ως κρίσιμο στοιχείο στον αναπαραγωγικό κύκλο ζωής του. Παρόμοια σημεία ελέγχου για άλλα παθογόνα επιλέγονται και χρησιμοποιούνται ως βάση για ανίχνευση σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται εδώ.

Από την ανωτέρω περιγραφή των γενικών στοιχείων αυτής της εφεύρεσης και του τρόπου της λειτουργίας της, κάποιος με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα αντιληφθεί ότι υπάρχει πληθώρα χρήσιμων τρόπων για την εφαρμογή της εφεύρεσης. Εν είδει παραδείγματος, η μέθοδος αυτής της εφεύρεσης είναι προσαρμόσιμη σε μέθοδο και συσκευές χρησιμοποιώντας κιτ χρωματογραφικής δοκιμασίας που περιγράφονται σε U.S. Patent Nos. 4,690,691 και 5,310,650 (τα διπλώματα ευρεσιτεχνίας (πατέντες) '691 και '650). Σε αυτές τις πατέντες, χρησιμοποιήθηκε ένα πορώδες μέσο για να ακινητοποιήσει είτε TNA ή ανιχνευτή σύλληψης, και χρησιμοποιήθηκε διαλύτης για να μεταφέρει κινητή φάση που περιείχε είτε σημασμένο PNA, εάν το TNA ήταν ακινητοποιημένο, ή το TNA, εάν ο ανιχνευτής σύλληψης ήταν ακινητοποιημένος, στην “ζώνη σύλληψης”. Όταν το TNA δεσμεύτηκε στην ζώνη σύλληψης, είτε με άμεση ακινητοποίηση ή με σύλληψη, σημασμένο PNA χρωματογραφήθηκε μέσω της ζώνης σύλληψης και η οποιαδήποτε δεσμευμένη σήμανση ανιχνεύθηκε.

Η προσαρμογή της παρούσας εφεύρεσης σε ένα τέτοιο σύστημα παρέχει την βελτίωση της χρήσης Συγκροτήματος Δέσμευσης Στόχου στην ζώνη σύλληψης και επομένως, την σύλληψη μόνο απόλυτα ταιριασμένων αλληλουχιών TBR ή άλλων TBRs που αντιπροσωπεύουν διαμορφώσεις νουκλεϊκών οξέων δεσμευμένων ειδικά με το TBA στα διπλά μόρια TNA-PNA χάριν της προηγουμένως περιγραφηθείσας ευαίσθητης διαφοροποίησης από το TBA μεταξύ TNAs και CNAs.

Όταν τα υβρίδια TNA-PNA δεσμεύονται στο ακινητοποιημένο TBA, το σήμα ενισχύεται προσθέτοντας BNAs ή με χρωματογραφία BNAs μέσω της ζώνης σύλληψης. Τέλος, το σήμα μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω προσθέτοντας BBAs ή με χρωματογραφία σημασμένων BBAs μέσω της ζώνης σύλληψης. Με αυτόν τον τρόπο, η ευκολία εκτέλεσης των σταδίων ανάλυσης που περιγράφονται στις πατέντες '691 και '650 βελτιώνεται εδώ παρέχοντας την επιπρόσθετη δυνατότητα αύξησης εξειδίκευσης και, μέσω ενίσχυσης, της ευαισθησίας της μεθόδου που περιγράφεται σε αυτές τις πατέντες.

Αυτοί με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα αντιληφθούν επίσης ότι η μέθοδος της παρούσας εφεύρεσης είναι επιδεκτική σε εφαρμογή σε τρυβλία μικροτίτλου ή σε αυτοματοποίηση. Επομένως, η χρήση μηχανημάτων με συγχωνευμένη την μέθοδο αυτής της εφεύρεσης εμπίπτει φυσικά στο πλαίσιο της παρούσας αποκάλυψης και των επισυναπτόμενων σε αυτήν αξιώσεων. Έτσι, για παράδειγμα, αυτή η εφεύρεση μπορεί να προσαρμοστεί για χρήση σε όργανα όπως ο επιτραπέζιος αναλυτής IMx από Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). Το IMx είναι προς το παρόν σχεδιασμένο για να τρέχει και ανοσοπροσδιορισμό φθορίζουσας πόλωσης (FPZA: *fluorescent polarization immunoassay*, βλέπε Kier [1983] *KCLA* 3:13-15) και ενζυμικό ανοσοπροσδιορισμό μικροσωματίων (MEZA: *microparticle enzyme immunoassay*, βλέπε *Laboratory Medicine*, Vol. 20, No. 1, Ιανουάριος 1989, σελίδες 47-49). Η μέθοδος MEZA μετατρέπεται εύκολα σε μέθοδο ανίχνευσης νουκλεϊκού οξέος χρησιμοποιώντας την παρούσα εφεύρεση χρησιμοποιώντας TBA ως μόριο σύλληψης επιστρωμένο σε μικροσωματίδια μεγέθους λιγότερο από 1 μm (<0.5 μm κατά μέσο όρο) εναιωρούμενα σε διάλυμα. Τα επιστρωμένα με TBA μικροσωματίδια μεταφέρονται με πιπέττα σε κυψελίδα αντίδρασης. Το IMx μετά διοχετεύει το δείγμα (υβριδοποιημένο PNA-TNA) στην κυψελίδα αντίδρασης, σχηματίζοντας σύμπλεγμα με το TBA. Μετά την κατάλληλη περίοδο επώασης, το διάλυμα μεταφέρεται σε αδρανή μήτρα γυάλινων ινών για την οποία τα σωματίδια έχουν ισχυρή συγγένεια και στην οποία προσκολλούνται. Πριν ή μετά την διήθηση του μείγματος αντίδρασης μέσω της μήτρας γυάλινων ινών, προσθέτονται BNAs και BBAs, ή χρησιμοποιείται άλλο μέσο ενίσχυσης και ανίχνευσης σήματος που εξαρτάται από τον ειδικό σχηματισμό υβριδίων TNA-PNA. Το ακινητοποιημένο σύμπλεγμα πλένεται και το μη δεσμευμένο υλικό ρέει μέσω της μήτρας γυάλινων ινών.

Τα δεσμευμένα συμπλέγματα ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας BBAs σημασμένα με αλκαλική φωσφατάση ή BBAs σημασμένα με άλλο τρόπο (με ραδιενέργεια, ένζυμα, φθορισμό). Στην περίπτωση BBAs σημασμένων με αλκαλική φωσφατάση, μπορεί να προστεθεί το φθορίζον υπόστρωμα 4-μεθυλο-σκιαδοφόρο φωσφορικό ή παρόμοιο αντιδραστήριο. Εναλλακτικά, το ένζυμο μπορεί να παρακαμφθεί σημαίνοντας άμεσα τα BBAs με αυτό ή με παρόμοιο αντιδραστήριο. Σε κάθε περίπτωση, ο φθορισμός ή άλλο σήμα είναι ανάλογο της ποσότητας των παρόντων υβριδίων PNA-TNA.

Ο φθορισμός ανιχνεύεται στην επιφάνεια της μήτρας με φθορισμόμετρο εμπρόσθιας επιφάνειας όπως περιγράφεται από τον κατασκευαστή του IMx. Με μικρές ρυθμίσεις που μπορούν να γίνουν μέσω πειραματισμών ρουτίνας για να βελτιστοποιηθεί όργανο όπως το Imx για υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων και για αλληλεπιδράσεις νουκλεϊκών οξέων TBA, η παρούσα εφεύρεση είναι πλήρως προσαρμόσιμη σε αυτοματοποιημένες αναλύσεις δειγμάτων TNA.

9. Άλλες διαγνωστικές εφαρμογές της εφεύρεσης. Ενώ η ανωτέρω περιγραφή καθιστά δυνατή την χρήση της παρούσας εφεύρεσης σύμφωνα με ορισμένους διαφορετικούς τρόπους, πολλές επιπρόσθετες χρησιμότητες αυτής της εφεύρεσης είναι εύκολα κατανοητές για παράδειγμα, σε σύστημα καθυστέρησης κινητικότητας.

Σε αυτήν την υλοποίηση της εφεύρεσης, βελτίωση του πολύ γνωστού ηλεκτροφορητικού προσδιορισμού μεταβολής κινητικότητας (EMSA: *electrophoretic mobility shift assay*) εκτελείται ως έπεται (Βλέπε Εικόνες 12a και 12b):

Δείγμα DNA κατατέμνεται, είτε μέσω τυχαίας διάσπασης ή μέσω ειδικής αγωγής με περιοριστικά ένζυμα. Το DNA στο δείγμα μετά χωρίζεται σε δύο ίσα τμήματα και ειδικό TNA προστίθεται στο πρώτο τμήμα αλλά όχι στο δεύτερο. Το πρώτο και δεύτερο τμήμα μετά υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου ή αγαρόζης, και η διάταξη των ζωνών DNA (που καθίστανται ορατές είτε μέσω δέσμευσης με βρωμιούχο αιθίδιο ή με ραδιενεργή σήμανση πριν την ηλεκτροφόρηση) συγκρίνεται μετά μεταξύ των δύο τμημάτων. Θραύσματα DNA που έχουν θέσεις δέσμευσης για τις οποίες είναι ειδικό το TBA επιβραδύνονται στην μετακίνησή τους μέσω του μέσου ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιώντας το κατάλληλο TBA, ο οποιοσδήποτε αριθμός αλληλουχιών DNA ή άλλου νουκλεϊκού οξέος μπορεί να παρακολουθηθεί με αυτόν τον τρόπο.

Σε τροποποίηση του EMSA που περιγράφεται ανωτέρω, κατατετμημένο TNA υβριδοποιείται με PNA και κλασματοποιείται σε πρώτη διάσταση. Το κατατετμημένο DNA μετά έρχεται σε αντίδραση με κατάλληλο TBA και παρατηρείται η αλλαγή σε κινητικότητα των θραυσμάτων DNA. Ενίσχυση της καθυστέρησης είναι δυνατή προσθέτοντας BBAs όπως περιγράφεται ανωτέρω. (Βλέπε, για παράδειγμα, Vijg και παραπομπές που μνημονεύονται εκεί για γνωστές τεχνικές διαδιάστατης ηλεκτροφόρησης, στην οποία μπορεί να εφαρμοστεί η παρούσα εφεύρεση).

Τα ακόλουθα παραδείγματα παρέχονται για να καθοδηγήσουν περαιτέρω αυτούς με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία σε μεθόδους εφαρμογής αυτής της εφεύρεσης. Τυπικές τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA όπως αποκαλύπτονται σε Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, και πιο πρόσφατα κείμενα δεν αποκαλύπτονται εφόσον αυτά εμπίπτουν τώρα στην τεχνολογία κοινού επιστήμονα.

Παράδειγμα 1 – Παρασκευή των PNAs και σήμανση των PNAs

Τα νουκλεϊκά οξέα ανιχνευτών, PNAs, μπορούν να παρασκευαστούν με πολύ γνωστά μέσα της τεχνολογίας. Έτσι, μονόκλιωνα πολυνουκλεοτιδικά PNAs καθορισμένης αλληλουχίας μπορούν να παρασκευαστούν με χημική σύνθεση στερεάς φάσης σύμφωνα με Merrifield. PNAs μπορούν να παρασκευαστούν με αυτοματοποιημένη σύνθεση χρησιμοποιώντας τεχνολογία διαθέσιμη στο εμπόριο, όπως ρητίνες και μηχανήματα που παράγονται ή διαθέτονται στο εμπόριο από Applied Biosystems, ABI, ή άλλους κατασκευαστές. Εναλλακτικά, μέσω γνωστών μεθόδων ανασυνδυασμένου DNA,

συγκεκριμένες αλληλουχίες PNA συνθέτονται *in vivo*, για παράδειγμα, κλωνοποιώντας διπλό PNA σε φορέα που μπορεί να αναπαραχθεί σε *E. coli*, μπορούν να παρασκευαστούν μεγάλες ποσότητες του διπλού PNA. Πολυμερή του PNA μπορούν να κλωνοποιηθούν στον φορέα έτσι ώστε για κάθε γραμμομόριο φορέα, αρκετά γραμμομόρια PNA απελευθερώνονται με την πέψη του φορέα με περιοριστικό θραύσμα που πλευρίζει την αλληλουχία PNA. Μετά την σύνθεση ή παραγωγή με ανασυνδυασμένη τεχνική, τα PNAs καθαρίζονται με πολύ γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας όπως με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ή με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC: *high pressure liquid chromatography*). Εάν το PNA παράγεται ως διπλό μόριο, πριν την χρήση του σε προσδιορισμό υβριδοποίησης για ανίχνευση αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων στόχων, οι κλώνοι του PNA διαχωρίζονται με θέρμανση ή άλλες μεθόδους που είναι γνωστές στην τεχνολογία.

Η ειδική αλληλουχία βάσεων στο PNA επιλέγεται έτσι ώστε να ανακλά την αλληλουχία που θα ανιχνευθεί σε TNA, με τον όρο ότι, σύμφωνα με την εφεύρεση, το PNA περιέχει αλληλουχία

$\frac{1}{2}$ TBR, η οποία είναι αλληλουχία έτσι ώστε μετά από υβριδοποίηση του PNA και TNA, σχηματίζεται TBR. Εφόσον υπάρχει ουσιαστικά απεριόριστος αριθμός τέτοιων αλληλουχιών που είναι γνωστές στην τεχνολογία, η επιλογή της αλληλουχίας PNA είναι επιδεκτική διαλογής από τον έμπειρο ερευνητή για κάθε δεδομένη εφαρμογή. Η αλληλουχία της HIV LTR είναι μία τέτοια αλληλουχία, η οποία, με υβριδοποίηση PNA που κωδικοποιεί τμήματα της LTR με TNAs που κωδικοποιούν την HIV LTR, σχηματίζονται TBRs ικανά να δεσμευθούν με τις πρωτεΐνες που δεσμεύονται με NF-kB ή SP1 DNA.

Εκτός των αλληλουχιών που θα σχηματίσουν TBR με υβριδοποίηση, το PNA μπορεί επίσης να περιέχει $\frac{1}{2}$ BBR. Αυτή η αλληλουχία είναι αλληλουχία η οποία, με υβριδοποίηση με ενισχυτικό νουκλεϊκό οξύ, BNA, σχηματίζει BBR που είναι ικανή να δεσμευθεί με BBA. Το BBA είναι κατά προτίμηση πρωτεΐνη που δεσμεύεται με DNA που έχει υψηλή συγγένεια για την αλληλουχία BBR.

Σε αυτό το συγκεκριμένο παράδειγμα, η υβριδοποίηση μεταξύ PNA που έχει ως $\frac{1}{2}$ TBR, αλληλουχία αρ. 4 και, στο άκρο 3' αυτής της αλληλουχίας, αλληλουχία $\frac{1}{2}$ BBR που παρουσιάζεται ως αλληλουχία αρ. 35. Το PNA που κωδικοποιεί αυτές τις αλληλουχίες χρησιμοποιείται είτε χωρίς σήμανση ή είναι σημασμένο με ραδιενεργό ισότοπο όπως P^{32} , S^{35} , ή παρόμοιο ισότοπο, σύμφωνα με γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας. Εναλλακτικά, το PNA είναι δεσμευμένο σε σφαιρίδιο μεταξύ 0.01 to 10 μm , το οποίο μπορεί να είναι χρωματισμένο για εύκολη οπτική ανίχνευση. Αυτή η σήμανση σχηματίζει το OSA όπως περιγράφεται στην προδιαγραφή. Αυτός ο ανιχνευτής υβριδοποιείται με αλληλουχίες HIV LTR για να σχηματιστεί TBR που δεσμεύεται με NF-kB. Επιπροσθέτως, το PNA υβριδοποιείται με BNAs που έχουν συμπληρωματική $\frac{1}{2}$ BBR για να σχηματιστεί αριστερός χειριστής βακτηριοφάγου λάμδα που δεσμεύεται είτε με *cro* ή με πρωτεΐνες-καταστολείς λάμδα.

Με τρόπο παρόμοιο αυτού που περιγράφεται ανωτέρω, χρησιμοποιούνται PNAs όπου η

$\frac{1}{2}$ TBR είναι η οποιαδήποτε από αλληλουχία αρ. 5 ή αλληλουχίες αρ. 7-34, και $\frac{1}{2}$ BBR, όπως αλληλουχία αρ. 35 ή αλληλουχία αρ. 36 βρίσκεται είτε στο άκρο 3' ή στο άκρο 5' της $\frac{1}{2}$ TBR.

Παράδειγμα 2 – Παρασκευή και σήμανση των BNAs

Παρομοίως με τις μεθόδους που περιγράφονται στο Παράδειγμα 1 για παρασκευή και σήμανση των PNAs, τα BNAs παρασκευάζονται και σημαίνονται σύμφωνα με γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας. Όπως περιγράφεται σε U.S. Patent No. 4,556,643, (βλέπε ιδίως Παράδειγμα 1), αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων που κωδικοποιούν συγκεκριμένες αλληλουχίες που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα μπορούν να παραχθούν μαζικά με κλωνοποίηση σε αναπαραγόμενο φορέα. Επιπλέον, παρομοίως με αυτήν την αποκάλυψη, οι αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ TBR και $\frac{1}{2}$ BBR μπορούν να παραχθούν συγγραμικά με αυτόν τον τρόπο, με την διάκριση ωστόσο ότι, σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση, η ίδια η αλληλουχία $\frac{1}{2}$ TBR σχηματίζει θέση αναγνώρισης συστατικού δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος και η $\frac{1}{2}$ BBR, ενώ

σχηματίζει θέση αναγνώρισης συστατικού δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος, παρέχει επίσης μέσον ενίσχυσης του σήματος που παράγεται με την δέσμευση της 1/2 TBR σε συμπληρωματικές αλληλουχίες στο TNA φροντίζοντας για πολυμερισμό των BNAs στο PNA που έχει δεσμευθεί με TNA. Για να καταστεί δυνατόν αυτό, αλληλουχία όπως η αλληλουχία αρ. 35, που κωδικοποιεί τον αριστερό χειριστή βακτηριοφάγου λάμδα, παρέχεται με επιπρόσθετες αλληλουχίες έτσι ώστε σχηματίζεται αλληλουχία προβόλου στο ένα άκρο ή και στα δύο άκρα του BNA με υβριδοποίηση με το PNA.

Ως συγκεκριμένο παράδειγμα, διανυσματικός πολυμερισμός BNAs σε TNA παρέχεται από αλληλουχίες αρ. 40-43. Σε αυτό το παράδειγμα, η αλληλουχία αρ. 40 κωδικοποιεί δύο 1/2 TBRs που θα υβριδοποιηθούν με δύο 1/2 TBRs σε TNA για να σχηματίσουν δύο θέσεις δέσμευσης NF-kB, παρέχοντας ταυτόχρονα 1/2 BBR αριστερού χειριστή βακτηριοφάγου λάμδα, που επιπροσθέτως καταλήγει στο άκρο 3' με θέση αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο *PstI*. Η προσθήκη του BNA, αλληλουχία αρ. 41, με την 1/2 BBR συμπληρωματική της 1/2 BBR στο PNA, αλληλουχία αρ. 40, ολοκληρώνει την BBR ολοκληρώνοντας ταυτόχρονα την θέση αναγνώρισης *PstI*, αφήνοντας πρόβολο τεσσάρων βάσεων για υβριδοποίηση με επιπρόσθετα BNAs. Έτσι, προσθέεται η αλληλουχία αρ. 42 που έχει αλληλουχία τεσσάρων ζευγών βάσεων στο άκρο 3' που είναι συμπληρωματική του προβόλου τεσσάρων βάσεων που παραμένει από την υβριδοποίηση των αλληλουχιών αρ. 40 και 41. Επιπροσθέτως, η αλληλουχία αρ. 42 παρέχεται με αλληλουχία πέντε βάσεων στο άκρο 5' που σχηματίζει μέρος θέσης αναγνώρισης *BamHI*. Το αυξανόμενο πολυμερές των BNAs προεκτείνεται περισσότερο με την προσθήκη του BNA αλληλουχίας αρ. 43, που είναι συμπληρωματική της αλληλουχίας αρ. 42, ολοκληρώνοντας την BBR, ενώ ταυτόχρονα ολοκληρώνεται η θέση αναγνώρισης *BamHI*, αφήνοντας πρόβολο τεσσάρων βάσεων που μπορεί να υβριδοποιηθεί περαιτέρω με BNAs που έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες. Με αυτόν τον τρόπο, τα BNAs μπορούν να υβριδοποιηθούν εκτεταμένα έτσι ώστε να ενισχύσουν κατά πολύ το σήμα ενός μόνο συμβάντος υβριδοποίησης PNA-TNA.

Όπως και με τα PNAs που περιγράφονται στο Παράδειγμα 1, τα BNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μη σημασμένη μορφή ή μπορούν να σημασθούν σύμφωνα με γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας και περιγράφονται στο Παράδειγμα 1. Θα είναι επίσης κατανοητό ότι, αντί να παραχθεί το πολυμερές BNA με διαδοχική προσθήκη BNAs στο σύμπλεγμα PNA-TNA, το πολυμερές BNA μπορεί να προσχηματιστεί και να προστεθεί άμεσα στο σύμπλεγμα PNA-TNA. Μία απλή μέθοδος προσχηματισμού τέτοιου πολυμερούς BNA περιλαμβάνει την ανασυνδυασμένη παραγωγή φορέα στον οποίο πολυμερή του BNA παρέχονται με μοναδική περιοριστική θέση σε εκάτερο άκρο του πολυμερούς. Αυτό το πολυμερές των BNAs που περιέχει πολλαπλές BBRs αποκόπτεται από τον φορέα και υβριδοποιείται με μονόκλωνη 1/2 BBR που παραμένει στο PNA μετά την υβριδοποίηση του PNA και του TNA. Αυτό επιτυγχάνεται παρέχοντας μονόκλωνη αλληλουχία στο PNA συμπληρωματική προβόλου που παράγεται στο πολυμερές BNA όταν αποκόπτεται από τον φορέα παραγωγής.

Παράδειγμα 3 – Παραγωγή των HNAs και η χρήση τους για επικάλυψη πολυμερών BNA

Τα HNAs αυτής της εφεύρεσης παράγονται σύμφωνα με γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας για παραγωγή πολυνουκλεοτιδίων όπως περιγράφεται στα Παραδείγματα 1 και 2 για PNAs και BNAs. Ωστόσο, στην παραγωγή των HNAs, η αλληλουχία του HNA σχεδιάζεται ειδικά έτσι ώστε μεγάλο τμήμα του HNA να σχηματίζει αυτοσυμπληρωματικό παλίνδρομο για να σχηματιστεί φουρκέτα, ενώ ταυτόχρονα, αφήνονται σε μονόκλωνη μορφή αρκετές βάσεις για να μπορούν να υβριδοποιούνται με μονόκλωνες αλληλουχίες στην αυξανόμενη αλυσίδα των BNAs που περιγράφονται στο Παράδειγμα 2.

Σε αυτό το Παράδειγμα, παρέχεται HNA αλληλουχίας αρ. 44 για να επικαλύψει την προέκταση των BNAs στο PNA στο Παράδειγμα 2 μετά την προσθήκη του BNA, αλληλουχία αρ. 43. Αυτό επιτυγχάνεται επειδή η αλληλουχία αρ. 44, ενώ έχει παλίνδρομη αλληλουχία και σχηματίζει σταθερή φουρκέτα, έχει επίσης αλληλουχία στο άκρο 5' του HNA

που ολοκληρώνει την αλληλουχία *Bam*HI που σχηματίζεται με την υβριδοποίηση της αλληλουχίας αρ. 42 και αλληλουχίας αρ. 43. Φυσικά, ο τερματισμός του πολυμερούς μετά την προσθήκη μόνον 3 BNAs είναι χάριν απλότητας στην επίδειξη της εφεύρεσης. Όπως περιγράφεται ανωτέρω, αυτός ο πολυμερισμός μπορεί να συνεχιστεί ουσιαστικά επ' αόριστον για να ενισχυθεί το σήμα του συμβάντος υβριδοποίησης PNA-TNA. Όταν το HNA υβριδοποιηθεί με την αυξανόμενη αλυσίδα των BNAs, το πολυμερές επικαλύπτεται και δεν είναι δυνατή η περαιτέρω επέκταση του πολυμερούς.

Παράδειγμα 4 – Παρασκευή TBAs και BBAs, σήμανση και ακινητοποίηση αυτών

Τα TBAs και BBAs που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνουν την οποιαδήποτε ουσία που μπορεί να δεσμευθεί ειδικά με τις TBRs και BBRs που σχηματίζονται με την υβριδοποίηση των PNAs, TNAs και BNAs. Η χρήση πρωτεϊνών που δεσμεύονται με DNA αποτελεί ένα παράδειγμα αυτών των ουσιών.

Γι' αυτό το παράδειγμα, το TBA είναι το διμερές του τμήματος δέσμευσης DNA του p50, και το BBA είναι η πρωτεΐνη *cro* λάμδα. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να παραχθούν σύμφωνα με γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας. Τα γονίδια για αμφότερες αυτές τις πρωτεΐνες έχουν κλωνοποιηθεί. Επομένως, αυτές οι πρωτεΐνες παράγονται με ανασυνδυασμένο τρόπο και καθαρίζονται σύμφωνα με γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας. Επιπλέον, αυτές οι πρωτεΐνες σημαίνονται είτε με ραδιοϊσότοπο, όπως ραδιενεργό ιώδιο, ή με ένζυμο, όπως β-γαλακτοζιτάση ή υπεροξειδάση αρμορακίας, ή με φθορίζουσα χρωστική όπως φλουορεσκεΐνη ή ροδαμίνη, σύμφωνα με πολύ γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας. Επιπροσθέτως, το ένα από τα δύο, ή αμφότερα τα TBA και BBA, μπορούν να ακινητοποιηθούν σε στερεά επιφάνεια όπως η επιφάνεια τρυβλίου μικροτίτλου ή η επιφάνεια σφαιριδίου, όπως χρωματισμένο σφαιρίδιο διαμέτρου από 0.01 έως 10 μm. Οι σημάνσεις στα TBAs και BBAs μπορεί να είναι οι ίδιες ή διαφορετικές.

Σε αυτό το παράδειγμα, το TBA που περιέχει την περιοχή δέσμευσης DNA διμερούς p50 σημαίνεται με ροδαμίνη, ενώ το BBA, *cro*, σημαίνεται με φλουορεσκεΐνη. Κατά συνέπεια, μετά την υβριδοποίηση των PNAs, TNAs, BNAs και HNAs όπως περιγράφεται σε αυτήν την αποκάλυψη πατέντας και στα ανωτέρω και ακόλουθα παραδείγματα, τα υβρίδια νουκλεϊκών οξέων, εάν σχηματιστούν, έρχονται σε επαφή με πλεόνασμα σημασμένων TBA και *cro*. Η φθορισμός αυτών των σημάνσεων μετράται σύμφωνα με γνωστές μεθόδους και η ανίχνευση αμφοτέρων των σημάτων είναι ενδεικτική της παρουσίας αλληλουχιών 1/2 TBR στο TNA. Το διαφορετικό σήμα που παράγεται από τον φθορισμό του NF-kB και *cro* είναι ενδεικτικό του βαθμού στον οποίο ο πολυμερισμός BNAs στο υβρίδιο PNA-TBA είχε ως αποτέλεσμα ενίσχυση του σήματος. Διαλογίζεται ενίσχυση από μία έως πάνω από 1000 φορές σύμφωνα με την μέθοδο αυτής της εφεύρεσης.

Παράδειγμα 5 – Υβριδοποίηση δύο PNAs με TNA και διαφοροποίηση μεταξύ TNA και CNA

Τα PNAs, PNA1, αλληλουχία αρ. 40 και PNA2, αλληλουχία αρ. 45, χρησιμοποιούνται με περίπου δεκαπλάσιο μοριακό πλεόνασμα συγκριτικά με την συγκέντρωση των TNAs σε δοκιμαστικό δείγμα. Γι' αυτό το παράδειγμα, απομονωμένη διπλή HIV LTR, όπου ένα κλώνος της οποίας έχει την αλληλουχία της αλληλουχίας αρ. 37, που παρουσιάζεται σε Εικόνα 7, και ο άλλος κλώνος της οποίας είναι συμπληρωματικός της αλληλουχίας που παρουσιάζεται σε Εικόνα 7, χρησιμοποιείται ως το TNA. Διπλό απομονωμένο CNA χρησιμοποιείται επίσης σε αυτό το δείγμα, ο ένας κλώνος του οποίου έχει την ίδια αλληλουχία όπως η αλληλουχία αρ. 37, με την διαφορά ότι, στην πρώτη θέση δέσμευσης NF-kB που παρουσιάζεται στην Εικόνα 7, στο κέντρο της θέσης δέσμευσης, η θέση 1 στην Εικόνα 7, αντι για "T", υπάρχει "A", και επομένως ο συμπληρωματικός κλώνος δεν ταιριάζει με την αλληλουχία αρ. 40 PNA σε αυτήν την θέση.

Η αλληλουχία αρ. 40 και η αλληλουχία αρ. 45 προσθέτονται αμφότερες σε ξεχωριστές αντιδράσεις, με την πρώτη να περιέχει το ανωτέρω περιγραφόμενο TNA και την

δεύτερη να περιέχει το ανωτέρω περιγραφόμενο CNA. Τα δείγματα διαλυτοποιούνται στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης, όπως 10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA. Τα δείγματα θερμαίνονται έως περίπου 90° C για περίπου πέντε λεπτά για να διαχωριστούν οι κλώνοι των δίκλωνων TNAs και CNAs στα δείγματα, και μετά τα δείγματα αφήνονται να ψυχθούν για να επιτραπεί η ανασύνδεση των κλώνων PNAs, TNAs και CNAs.

Όταν ολοκληρωθεί η υβριδοποίηση, που μπορεί να καθοριστεί σύμφωνα με γνωστές μεθόδους όπως με υπολογισμό του t1/2 με βάση την σύσταση βάσεων και θερμοκρασία ανασύνδεσης σύμφωνα με γνωστές μεθόδους, η αλληλουχία αρ. 40 PNA πολυμερίζεται με προσθήκη BNAs όπως στο Παράδειγμα 2 και η αλληλουχία αρ. 45 ανιχνευτή PNA2 πολυμερίζεται με BNAs αρχίζοντας με τον πρόβλο θέση αναγνώρισης SphI. Μετά την προσθήκη των BNAs και σύντομη περίοδο υβριδοποίησης, τα ξεχωριστά δείγματα προσθέτονται σε σφαιρίδια επιστρωμένα με ομοιοπολικά ακινητοποιημένο NF-kB, και το NF-kB αφήνεται να δεσμευθεί με τις οποιεσδήποτε TBRs που σχηματίζονται στα δείγματα TNA και CAN. Μετά από περίπου 15 λεπτά δέσμευσης, τα δείγματα πλένονται δύο φορές με περίπου τρεις όγκους κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης, όπως 10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, ή άλλου ρυθμιστικού διαλύματος που έχει προκαθοριστεί ότι δεν παρεμβάλλεται στην δραστηριότητα δέσμευσης NF-kB, ή πρωτεΐνης-καταστολέα CI βακτηριοφάγου λάμδα. Μετά την κάθε πλύση, τα σφαιρίδια αφήνονται να κατακαθίσουν με βαρύτητα ή με σύντομη φυγοκέντρηση. Αυτό αφαιρεί τα οποιαδήποτε νουκλεϊκά οξέα που δεν έχουν τέλεια θέση δέσμευσης NF-kB που σχηματίζεται με υβριδοποίηση αλληλουχιών PNA1 και TNA.

Μετά την τελική πλύση, η πρωτεΐνη-καταστολέας CI βακτηριοφάγου λάμδα που είναι σημασμένη με ραδιενεργό ισότοπο, όπως ραδιενεργό ιώδιο, ή είναι σημασμένη με ένζυμο, όπως υπεροξειδάση αρμορακίας, με χρωματιστά σφαιρίδια, ή με φθορίζουσα χρωστική, προστίθεται σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα μετά πλένονται αρκετές φορές (περίπου 3) με αρκετούς όγκους (περίπου 2) κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης, όπως 10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, ή άλλου ρυθμιστικού διαλύματος που έχει προκαθοριστεί ότι δεν παρεμβάλλεται στην δραστηριότητα δέσμευσης NF-kB, ή πρωτεΐνης-καταστολέα CI βακτηριοφάγου λάμδα. Μετά την κάθε πλύση, τα σφαιρίδια αφήνονται να κατακαθίσουν με βαρύτητα ή με σύντομη φυγοκέντρηση. Μετά την τελευταία κατακάθιση ή φυγοκέντρηση, η δεσμευμένη σήμανση ποσοτικοποιείται ανιχνεύοντας την δεσμευμένη ραδιενέργεια, απελευθερωμένο χρώμα σε ενζυμικό προσδιορισμό, χρώμα δεσμευμένων σφαιριδίων, ή ανιχνεύοντας φθορισμό. Εναλλακτικά, μπορεί να προστεθεί αντίσωμα αντι-CI και να εκτελεστεί τυπικός ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός τύπου σάντουιτς ή ραδιοανοσοπροσδιορισμός για να ανιχνευθεί ο δεσμευμένος καταστολέας. Επιπροσθέτως, ως αρνητικός έλεγχος (υπόβαθρο), όλοι οι ανωτέρω χειρισμοί εκτελούνται διαδοχικά με δείγμα στο οποίο χρησιμοποιούνται σφαιρίδια που δεν έχουν ακινητοποιημένο NF-kB.

Ως αποτέλεσμα του ανωτέρω προσδιορισμού, τα δείγματα ελέγχου και τα δείγματα που περιέχουν CNA έχουν παρόμοια χαμηλά σήματα ενώ το δείγμα που περιέχει TNA έχει σήμα κατά πολύ ανώτερο του υποβάθρου.

Παράδειγμα 6 – Κιτ δοκιμασίας για την ανίχνευση HIV

A. Το κιτ περιέχει:

1. Τρυβλίο μικροτίτλου.
2. Διάλυμα 1 mg/mL NF-kB, που παράχθηκε με ανασυνδυασμένο τρόπο, σε ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα tris.
3. Δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει μονόκλιωνα HIV PNAs (μείγμα προαναμεμιγμένων ολιγονουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν δύο θέσεις δέσμευσης ½ NF-kB, δηλαδή μείγμα αλληλουχιών αρ. 7 και 8).
4. Δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει μονόκλιωνα ανθρώπινο γονιδιωματικό PNA, αλληλουχία αρ. 1.

5. Δοκιμαστικό σωλήνα νουκλεάσης (*PstI*).
6. Δοκιμαστικό σωλήνα πρωτεάσης.
7. Δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει προ-πολυμερισμένα BNAs, 100 επαναλαμβανόμενες μονάδες O_R βακτηριοφάγου λάμδα, επικαλυμμένα με HNA αλλά με ελεύθερες $\frac{1}{2}$ BBRs διαθέσιμες για δέσμευση με υβρίδια PNA-TNA.
8. Δοκιμαστικό σωλήνα *cro* συζευγμένου με υπεροξειδάση αρμορακίας (*hrp*).
9. Δοκιμαστικό σωλήνα χρωματιστού υποστρώματος *hrp*.
10. Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris, 100 mL.
11. Νυστέρι.
12. Δοκιμαστικούς σωλήνες αντίδρασης A, B, C, με τον καθένα να περιέχει 250 μ L αποσταγμένου νερού.
13. Σταγονόμετρο.

B. Μέθοδος προσδιορισμού:

- (a) Το τρυβλίο μικροτίτλου (αντικείμενο 1) επιστρώνεται με το διάλυμα ανασυνδυασμένου NF-kB (αντικείμενο 2) με συγκέντρωση 1 mg/mL σε ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris για μία νύχτα σε 4° C με ανακίνηση.
- (b) Παίρνονται τρεις σταγόνες αίμα από το άτομο υπό εξέταση τρυπώντας ένα δάκτυλο με το νυστέρι (αντικείμενο 11), και μία σταγόνα αίματος διανέμεται στον κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες A, B, και C (αντιδραστήριο 12).
- (c) Στον κάθε δοκιμαστικό σωλήνα διανέμεται μία σταγόνα διαλύματος πρωτεάσης (αντιδραστήριο 6) με το σταγονόμετρο (αντικείμενο 12) και ο σωλήνας ανακινείται και αφήνεται ακίνητος για 5 λεπτά.
- (d) Στον κάθε δοκιμαστικό σωλήνα A-C διανέμεται μία σταγόνα νουκλεάσης (αντικείμενο 5) χρησιμοποιώντας το σταγονόμετρο και οι σωλήνες ανακινούνται και αφήνονται ακίνητοι για 10 λεπτά.
- (e) Μία σταγόνα του αντικειμένου 3 προστίθεται στον σωλήνα A (δοκιμαστικό δείγμα), μία σταγόνα του αντικειμένου 4 προστίθεται στον σωλήνα B (θετικός έλεγχος), και μία σταγόνα φυσιολογικού ορού προστίθεται στον σωλήνα C (αντικείμενο 12) ως αρνητικός έλεγχος. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες θερμαίνονται έως 50° C σε ζεστό νερό και αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου για περισσότερο από μία ώρα.
- (f) Ενώ αφήνεται να συμβεί η υβριδοποίηση στο στάδιο (d), το πλεόνασμα πρωτεΐνης αποστραγγίζεται από την επιφάνεια του τρυβλίου μικροτίτλου από το στάδιο (a), και το τρυβλίο πλένεται με ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris (σωλήνας 10).
- (g) Τα περιεχόμενα των σωλήνων A-C από το στάδιο (e) μεταφέρονται σε τρία φρεάτια του τρυβλίου μικροτίτλου και αφήνονται να παραμείνουν για μία ώρα με ανακίνηση.
- (h) Τα φρεάτια μικροτίτλου που περιέχουν τα περιεχόμενα των σωλήνων A-C πλένονται με ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris και αποστραγγίζονται.
- (i) Μία σταγόνα του αντικειμένου 7 προστίθεται σε κάθε φρεάτιο και αφήνεται να υβριδοποιηθεί με τις οποιεσδήποτε θέσεις $\frac{1}{2}$ BBR που δεσμεύτηκαν στο τρυβλίο, για περισσότερο από μία ώρα, και ακολουθούν τρεις πλύσεις με ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris.
- (j) Μία σταγόνα του αντικειμένου 8 προστίθεται σε κάθε φρεάτιο και το *cro* αφήνεται να δεσμευθεί με τα οποιαδήποτε δεσμευμένα BNAs για

περισσότερο από 10 λεπτά, και ακολουθούν πέντε πλύσεις με 1 mL ισοτονικού ρυθμιστικού διαλύματος.

- (k) Μία σταγόνα υποστρώματος hgr προστίθεται σε κάθε φρεάτιο και το χρώμα αφήνεται να εμφανιστεί.

C. Αποτελέσματα:

Εάν και τα δύο φρεάτια A και B παρουσιάζουν εμφάνιση χρώματος, και όχι το φρεάτιο C, ο προσδιορισμός είναι έγκυρος και το άτομο έχει μολυνθεί με HIV. Εάν μόνο το φρεάτιο A παρουσιάζει εμφάνιση χρώματος, ή εάν το φρεάτιο C παρουσιάζει εμφάνιση χρώματος, η δοκιμασία εκτελέστηκε λανθασμένα, και είναι άκυρη. Εάν τα φρεάτια A και C δεν παρουσιάζουν εμφάνιση χρώματος αλλά το φρεάτιο B παρουσιάζει εμφάνιση χρώματος, η δοκιμασία είναι έγκυρη και το άτομο δεν έχει μολυνθεί με HIV.

Παράδειγμα 7 – Παραγωγή διαφόρων πρωτότυπων TBAs

Πρωτότυπα TBAs για χρήση σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση παρασκευάζονται ως έπεται:

(a) NFκB/NF-kB (Ανιχνευτής HIV I). Νουκλεϊκό οξύ που κωδικοποιεί την οποιαδήποτε από τις αλληλουχίες αρ. 63-71 ή παρόμοια πρωτεϊνή δέσμευσης NF-kB DNA, συντήκεται, ενός πλαισίου, με αλληλουχία νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί αλληλουχία συγκρότησης, όπως *cro*, έτσι ώστε η αλληλουχία αναγνώρισης NF-kB DNA κωδικοποιείται στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο της αλληλουχίας *cro*. Προαιρετικά, παρέχεται συνδετική αλληλουχία μεταξύ της αλληλουχίας NF-kB και της αλληλουχίας *cro*. Στο άλλο άκρο του *cro*, προαιρετικά παρέχεται αλληλουχία-σηματοδότης πυρηνικού εντοπισμού, όπως η αλληλουχία αρ. 72. Επιπλέον, προαιρετικά παρέχονται αλληλουχίες ασυμμετρίας στο άκρο του *cro* που δεν χρησιμοποιείται από την αλληλουχία αναγνώρισης NF-kB. Παραδείγματα ολοκληρωμένων TBAs παρουσιάζονται παρακάτω.

(b) NF-kB/SP1 (Ανιχνευτής HIV II). Με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιγράφεται σε (a) ανωτέρω, παρασκευάζεται ανασυνδυασμένη κωδικεύουσα αλληλουχία που κωδικοποιεί περιοχή αναγνώρισης NF-kB. Σε ξεχωριστό κατασκεύασμα, αντί για αλληλουχίες αρ. 63-72, περιλαμβάνεται η κωδικεύουσα αλληλουχία για το τμήμα αναγνώρισης DNA του SP1. Αυτή η αλληλουχία θα κωδικοποιεί όλη την αλληλουχία αρ. 73, ή λειτουργικό τμήμα αυτής, που είναι αυτό το τμήμα του παράγοντα μεταγραφής SP1 που παρουσιάζει δέσμευση DNA (βλέπε Kadonaga *et al.* [1987] *Cell* 51:1079-1090). Ο φορέας που κωδικοποιεί NF-kB και ο φορέας που κωδικοποιεί SP1 μετά συνδιαμολύνονται στο κατάλληλο σύστημα έκφρασης όπως είναι πολύ γνωστό στην τεχνολογία. Μονομερής μονάδα αναγνώρισης NF-kB προστίθεται για να ολοκληρώσει το διμερές αναγνώρισης NF-kB μετά την συγκρότηση των μονάδων αναγνώρισης SP1 και NF-kB από τον συνοδό. Οι αλληλουχίες ασυμμετρίας αποτρέπουν τον σχηματισμό διμερών NF-kB ή SP1 και αντί γι' αυτό οδηγούν σε σχηματισμό ετεροδιμερών NFκB-SP1 (δηλαδή, ανιχνευτή HIV II), που μετά απομονώνονται από το σύστημα έκφρασης (κύτταρα θηλαστικού ή βακτηρίου) με γνωστές μεθόδους.

(c) SP1/SP1 TBAs (Ανιχνευτής HIV III). Όπως περιγράφεται σε (b) ανωτέρω, παρασκευάζεται κατασκεύασμα TBA που κωδικοποιεί SP1. Ωστόσο, μόνο αυτό το κατασκεύασμα διαμολύνεται στο σύστημα έκφρασης, και περιλαμβάνονται αλληλουχίες ασυμμετρίας που επιτρέπουν τον σχηματισμό διμερών SP1-SP1.

(d) SP1-TATA (HIV-Detect IV). Όπως περιγράφεται σε (b) ανωτέρω, παρασκευάζεται κατασκεύασμα TBA που κωδικοποιεί SP1. Επιπροσθέτως, παρασκευάζεται ανασυνδυασμένο κατασκεύασμα που κωδικοποιεί TBA που έχει την αλληλουχία δέσμευσης, αλληλουχία αρ. 74, ή παρόμοια αλληλουχία που κωδικοποιεί μονάδα αναγνώρισης TATA με αλληλουχίες ασυμμετρίας συμπληρωματικές αυτών που περιλαμβάνονται στο κατασκεύασμα που κωδικοποιεί SP1 TBA. Αυτά τα κατασκευάσματα συνδιαμολύνονται και τα ετεροδιμερή

απομονώνονται με τις τυπικές μεθόδους, που περιλαμβάνουν καθαρισμό συγγένειας σε στήλη DNA που έχει τις κατάλληλες περιοχές δέσμευσης στόχων SP1-TATA.

(e) **SP1-E2 (Ανιχνευτής HPV I)**. Κατασκευάσμα που κωδικοποιεί SP1 παρασκευάζεται όπως στο (b) ανωτέρω. Κατασκευάσμα που κωδικοποιεί E2 TBA παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας αλληλουχία που κωδικοποιεί την οποιαδήποτε από τις αλληλουχίες αρ. 75-84 και 94-98 που είναι μονάδες αναγνώρισης E2 DNA ιού θηλώματος (βλέπε Hegde *et al.* [1992] *Nature* 359:505-512) ή παρόμοιες μονάδες αναγνώρισης, και συμμετασηματίζεται ή συνδιαμολύνεται με το κατασκευάσμα που κωδικοποιεί SP1 TBA. Μονομερής μονάδα αναγνώρισης E2 προστίθεται στο ολοκληρωμένο διμερές αναγνώρισης E2 μετά την συγκρότηση της μονάδας αναγνώρισης E2-SP1 από τον συνοδό. Το ετεροδιμερές Ανιχνευτή HPV I απομονώνεται σύμφωνα με γνωστές μεθόδους.

(f) **E2-E2 (Ανιχνευτής HPV II)**. Όπως περιγράφεται ανωτέρω σε (e), παρασκευάζεται κατασκευάσμα που κωδικοποιεί E2 TBA, με την διαφορά ότι περιλαμβάνονται αλληλουχίες ασυμμετρίας που επιτρέπουν τον σχηματισμό διμερών E2. Τα εκφραζόμενα διμερή μετά απομονώνονται με γνωστές μεθόδους που περιλαμβάνουν συγγένεια για διμερή θέση δέσμευσης E2 σε στήλη συγγένειας DNA.

(g) **E2-TATA (Ανιχνευτής HPV III)**. Όπως περιγράφεται ανωτέρω σε (e) και (d), παρασκευάζονται TBAs που δεσμεύονται με E2 και TATA, με την διαφορά ότι περιλαμβάνονται αλληλουχίες ασυμμετρίας που ενισχύουν τον σχηματισμό ετεροδιμερών παρά ομοδιμερών. Αυτά τα κατασκευάσματα μετά συνεκφράζονται και απομονώνονται τα ετεροδιμερή.

(h) **TATA-TATA (Ανιχνευτής HPV IV)**. Όπως περιγράφεται ανωτέρω σε (a) και (d), παρασκευάζεται κατασκευάσμα που κωδικοποιεί TBA που δεσμεύεται με TATA χρησιμοποιώντας αλληλουχίες ασυμμετρίας που προτρέπουν τον σχηματισμό αυτού του ομοδιμερούς και το ομοδιμερές απομονώνεται.

(i) **Other TBAs**. Όπως περιγράφεται ανωτέρω για HIV και HPV TBAs, μπορούν να παραχθούν TBAs για το κάθε δεδομένο παθογόνο ή κατάσταση νόσου ταυτοποιώντας ειδικές πρωτεΐνες που δεσμεύονται με DNA και σχηματίζοντας ένα κατασκευάσμα έκφρασης χρησιμοποιώντας κατάλληλες αλληλουχίες σύνδεσης, συγκρότησης και ασυμμετρίας.

Παράδειγμα 8

Με παρόμοιο τρόπο του προσδιορισμού που περιγράφεται στο Παράδειγμα 5, ένας αυστηρότερος προσδιορισμός παράγεται χρησιμοποιώντας την διπλή πρωτεΐνη δέσμευσης NF-kB-SP1 που παρασκευάζεται σύμφωνα με το Παράδειγμα 6. Έτσι, οι ανιχνευτές που παρουσιάζονται στην Εικόνα 7 και χρησιμοποιούνται στο Παράδειγμα 5 μπορούν να επιμηκυνθούν για να μειωθεί η ενδιάμεση απόσταση μεταξύ των ανιχνευτών και κατ' αυτόν τον τρόπο να μειωθεί η ευκαμψία του DNA στο TNA.

Παράδειγμα 9 – Παραγωγή TBAs “υψηλής τάξης”

Με την κατάλληλη χρήση αλληλουχιών ασυμμετρίας, παράγονται TBAs που είναι διμερή, τριμερή, τετραμερή, πενταμερή, ή εξαμερή συγκεκριμένων μονάδων αναγνώρισης DNA. Με αυτόν τον τρόπο, εξαμερές TBA παράγεται κατασκευάζοντας ένα πρώτο διμερές NF-kB p50 TBA χρησιμοποιώντας αλληλουχίες ασυμμετρίας που καθιστούν δυνατό τον σχηματισμό διμερών. Επιπροσθέτως, οι αλληλουχίες ασυμμετρίας καθιστούν δυνατόν τον τετραμερισμό του διμερούς p50 με διμερές SP1-SP1. Τέλος, επιπρόσθετες αλληλουχίες ασυμμετρίας οδηγούν τον εξαμερισμό με διμερές που παρουσιάζει αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού. Αυτό επιτυγχάνεται ενσωματώνοντας, για παράδειγμα, αλληλουχίες ασυμμετρίας από ινσουλίνη, η οποία στην φύση σχηματίζει εξαμερή. Αυτός ο σχηματισμός εξαμερούς κατευθύνεται από τις αλληλουχίες, αλληλουχίες αρ. 85 (A) και 86 (B), 87 (A) και 88 (B), 89 (A) και 90 (B), και 91 (A) και 92 (B) (βλέπε Εικόνες 13 και 14).

Λόγω της εξαιρετικά υψηλής συγγένειας για την HIV-LTR που μπορεί να παραχθεί χρησιμοποιώντας πολυμερές TBA, οι ενώσεις που έχουν αυτήν την δομή και που μπορούν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτόν τον σκοπό αναφέρονται εδώ "HIV-Lock"/ "HIV-κλείθρο".

Ένα βέλτιστο HIV-Lock καθορίζεται με καθορισμό αποτυπώματος (*footprinting*: καθορισμός αλληλουχίας DNA στην οποία δεσμεύεται πρωτεΐνη που δεσμεύεται με DNA) (σύμφωνα με πολύ γνωστές μεθόδους της τεχνολογίας) TBAs που δεσμεύονται σε TBRs στην HIV LTR για να επιβεβαιωθεί ότι η συγγένεια δέσμευσης της κάθε πρωτεΐνης που δεσμεύεται με DNA η οποία συμβάλλει στον σχηματισμό του πολυμερούς συμπλέγματος TBA μειώνεται συγκριτικά με την συγγένεια για την οποιαδήποτε φυσική αλληλουχία-στόχο (δηλαδή, CNAs) από την οποία προέρχεται η μονάδα αναγνώρισης δέσμευσης DNA. Η οποιαδήποτε συνακόλουθη απώλεια σε συγγένεια δέσμευσης για τις HIV TBRs υπεραντισταθμίζεται με τον σχηματισμό του πολυμερούς όπως περιγράφεται παρακάτω.

Μπορεί να υπάρχει συναγωνισμός για την δέσμευση του κάθε συστατικού TBA για την TBR και συγκρότησή του, μέσω αλληλουχιών ασυμμετρίας για να σχηματιστεί το πολυμερές. Αυτό αποτρέπεται ρυθμίζοντας τις συνδετικές αλληλουχίες μεταξύ του συνόδου και αλληλουχιών ασυμμετρίας σε κάθε συστατικό TBA έτσι ώστε αυτά τα συναγωνιζόμενα συμβάντα αποσυνδέονται. Η προκύπτουσα μείωση στην διάσταση διάχυσης (ουσιαστική αύξηση συγκέντρωσης) για τα συστατικά ασυμμετρίας και συγκρότησης TBA έχει ως αποτέλεσμα αποτελεσματικό σχηματισμό του πολυμερούς συμπλέγματος.

Με βάση τον καθορισμό αποτυπώματος (*footprinting*), το μήκος και η σύνθεση των συνδετικών αλληλουχιών ρυθμίζεται για να επιτευχθεί η καλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ αλληλουχιών-στόχων HIV και φυσικών αλληλουχιών. Με αυτόν τον τρόπο, αν και το κάθε συστατικό TBA θα έχει χαμηλή συγγένεια για αλληλουχίες CAN και TBR, το πολυμερές σύμπλεγμα θα έχει πολύ υψηλή συγγένεια για την τώρα επεκταμένη TBR που αναγνωρίζεται από το πολυμερές σύμπλεγμα (το τετράγωνο της συγγένειας της κάθε TBR που αναγνωρίζεται από κάθε συστατικό TBA του πολυμερούς TBA), ενώ θα έχει ακόμα χαμηλή συγγένεια για CNAs. Με τον ίδιο τρόπο, παρασκευάζονται άλλα πολυμερή συμπλέγματα TBA, εκτός του HIV-Lock.

TBAs που μπορούν να σχηματιστούν με αυτόν τον τρόπο περιλαμβάνουν τις ακόλουθες αλληλουχίες, που συγκροτούνται συνδέοντας είτε τις υπομονάδες πρωτεϊνών ή τις αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων που κωδικοποιούν αυτές τις υπομονάδες, ως έπεται:

<u>Σύνολο</u>	<u>Συνδετικές αλληλουχίες από ομάδες</u>
A	I + II + III
B	IV + V + III
C	IV + III

όπου οι ομάδες I-V αποτελούνται από αλληλουχίες που επιλέγονται από:

Ομάδα Επιλέγεται από αλληλουχίες

I	Η οποιαδήποτε αλληλουχία από τις αλληλουχίες αρ. 85-92
II	Met Ser, συνδεδεμένη με την οποιαδήποτε αλληλουχία από τις αλληλουχίες αρ. 104-106, η κάθε μία από τις οποίες είναι συνδεδεμένη με αλληλουχία αρ. 99.
III	αλληλουχία αρ. 100 συνδεδεμένη με την οποιαδήποτε αλληλουχία από τις αλληλουχίες αρ. 75-84 or 94-98, αλληλουχία αρ. 101 συνδεδεμένη είτε με αλληλουχία αρ. 74 ή με αλληλουχία αρ. 93, ή αλληλουχία αρ. 102 συνδεδεμένη με αλληλουχία αρ. 74 ή αλληλουχία αρ. 93, ή η οποιαδήποτε αλληλουχία από αλληλουχία αρ. 72, 103, 73, or 63-71.
IV	Η οποιαδήποτε αλληλουχία από αλληλουχίες αρ. 104-106.
V	Αλληλουχία αρ. 99.

Ειδικά παραδείγματα αυτών των TBAs είναι οι αλληλουχίες αρ. 109-116, που συγκροτούνται ως έπεται:

<u>Σύνολο</u>	<u>Αλληλουγία αρ.</u>	<u>Αριθμός συνδετικής αλληλουγίας</u>
A	109	85 + Met Ser + 104 + 99 + 100 + 94
A	110	85 + Met Ser + 104 + 99 + 72
A	111	86 + Met Ser + 105 + 99 + 102 + 74
A	112	86 + Met Ser + 106 + 99 + 73
A	113	89 + Met Ser + 106 + 99 + 63
C	114	106 + 64
C	115	105 + 64
B	116	106 + 99 + 73

Με αυτόν τον τρόπο, με επιλογή από κατάλληλες αλληλουχίες ασυμμετρίας, αλληλουχίες συγκρότησης, και μονάδες αναγνώρισης DNA, μπορεί να σχηματιστούν πολλά διαφορετικά TBAs. Επιπλέον, σύνολα από αυτές, όπως αλληλουχίες αρ. 114 και 115, θα συνδεθούν μεταξύ τους, αλλά διμερή αλληλουχίας αρ. 114 ή 115 δεν θα σχηματιστούν λόγω απώθησης φορτίων στις μεταλλαγμένες αλληλουχίες συγκρότησης (η αλληλουχία αρ. 104 είναι *cro*, η αλληλουχία αρ. 105 είναι πρωτότυπο μεταλλαγμένο, αρνητικά φορτισμένο *cro*, και η αλληλουχία αρ. 106 είναι πρωτότυπο μεταλλαγμένο, θετικά φορτισμένο *cro*).

Φυσικά, δεδομένης της αλληλουχίας αμινοξέων αυτών των TBAs, κάποιος με κοινή τεχνογνωσία θα μπορέσει να παράγει ανασυνδυασμένους κλώνους νουκλεϊκών οξέων που τα κωδικοποιούν, και αυτοί οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι φυσικά σχηματίζουν αναπόσπαστο μέρος αυτής της εφεύρεσης.

Παράδειγμα 10 – Δοκιμασία HIV χρησιμοποιώντας “HIV-LOCK”

Με πολύ παρόμοια μέθοδο όπως χρησιμοποιήθηκε στο Παράδειγμα 6, το “HIV-LOCK” που παράχθηκε σύμφωνα με το Παράδειγμα 9 χρησιμοποιείται ως το TBA, αντιδραστήριο 2, με παρόμοια αποτελέσματα.

Παράδειγμα 11 – Δοκιμασία HIV χρησιμοποιώντας “HIV-LOCK” για εξέταση αίματος αιμοδοσίας

Όταν η ποσότητα του αίματος που θα εξεταστεί δεν είναι περιορισμένη, όπως όταν αίμα αιμοδοσίας πρόκειται να εξεταστεί για μόλυνση με HIV, εκτελούνται δοκιμασίες παρόμοιες με το Παράδειγμα 6, αλλά για τον κάθε δοκιμαστικό σωλήνα A-C, περίπου 5 mL αίματος κατακρημνίζεται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο. Η ποσότητες άλλων αντιδραστηρίων αυξάνονται όπως χρειάζεται για να προσαρμοστούν στην μεγαλύτερη ποσότητα TNA που υπάρχει στο δείγμα.

Παράδειγμα 12 – “HIV-LOCK” ως θεραπευτικός παράγοντας αντι-HIV

Το “HIV-LOCK” που παράγεται σύμφωνα με το Παράδειγμα 9 σκευάζεται ως διάλυμα 1 mg/mL σε λιπώματα και ενίεται ενδοφλεβίως σε άτομο που έχει δοκιμαστεί και επιβεβαιωθεί ότι είναι μολυσμένο με HIV. Δόση περίπου 0.1 mg έως 100 mg “HIV-LOCK”/kg μάζας σώματος εγχύεται σε περίοδο 24 ωρών και η συγκέντρωση HIV p24 στον ορό του ασθενούς παρακολουθείται. Η αγωγή επαναλαμβάνεται όσο συχνά χρειάζεται, όπως όταν συμβαίνουν αυξήσεις στο p24 ορού.

Παράδειγμα 13 – Χρήση κατασκευάσματος HIV-TBA ως θεραπευτικό

Ανασυνδυασμένος ρετροϊικός ή παρόμοιος φορέας χρησιμοποιείται για να παραδώσει κατασκευάσμα που κωδικοποιεί TBA που δεσμεύεται με HIV-LTR σε μολυσμένο ασθενή. Ο φορέας κωδικοποιεί συνοδό, όπως *cro*, και αλληλουχίες DNA για δέσμευση τμημάτων p50. Ο ίδιος φορέας κωδικοποιεί επίσης συνοδό στον οποίο πτυχώνεται SP1 TBA. Παρέχονται αλληλουχίες ασυμμετρίας έτσι ώστε με συνέκφραση του p50-TBA και του SP1-TBA στο ίδιο, μολυσμένο με HIV, κύτταρο *in vivo*, συμβαίνει άμεση σύνδεση μεταξύ αυτών των TBAs, ενώ ταυτόχρονα αποτρέπεται η σύνδεση μεταξύ του τμήματος p50 που

δεσμεύεται με DNA και ενδογενών μονομερών p50 ή p65. Παρέχονται επίσης αλληλουχίες NLS στα TBAs έτσι ώστε, με τον σχηματισμό διμερούς, το TBA μετακινείται αμέσως στον πυρήνα του κυττάρου και δεσμεύεται ειδικά με ενσωματωμένες αλληλουχίες HIV, αποτρέποντας έτσι την οποιαδήποτε μεταγραφή από αυτόν τον γενετικό τόπο.

Γι' αυτόν τον σκοπό, είναι επιθυμητό να επιλεγούν αλληλουχίες που κωδικοποιούν περιοχές που δεσμεύονται με DNA έτσι ώστε τα εκφραζόμενα μονομερή να συγκροτούνται σε TBA που δεν δεσμεύεται με φυσικές ανθρώπινες αλληλουχίες. Έτσι, μόνο με την δέσμευση των συστατικών TBA με τις αλληλουχίες-στόχους τους συμβαίνει σύνδεση μεταξύ όλων των συστατικών του TBA για να σχηματιστεί σύμπλεγμα που δεσμεύεται στενά και ειδικά με την HIV LTR.

Παράδειγμα 14 – Διαγνωστικό κιτ δοκιμασίας για ανθρώπινο ιό θηλώματος

Αυτό το διαγνωστικό κιτ αξιοποιεί τις γνωστές διαφορές μεταξύ καλοήθους και καρκινογόνου HPV για να παρέχει δοκιμασία που υποδεικνύει την ευπάθεια σε κακοήθεια σε ασθενή. Οι ιοί θηλώματος είναι ομάδα μικρών ιών DNA που σχετίζονται με καλοήθεις όγκους πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων σε ανώτερα σπονδυλωτά. Τουλάχιστον 27 διαφορετικοί ανθρώπινοι τύποι ιών θηλώματος (HPVs: *papillomaviruses*) έχουν βρεθεί. Πολλοί από αυτούς έχουν συσχετιστεί με ειδικές κλινικές αλλοιώσεις. Τέσσερις από αυτούς, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, και HPV-33 έχουν συσχετιστεί με ανθρώπινες αλλοιώσεις γεννητικού συστήματος. Γενικά, έχει βρεθεί ότι τα DNA των HPV-6 και HPV-11 σχετίζονται με καλοήθεις αλλοιώσεις του γεννητικού συστήματος. Οι HPV-16, HPV-18, και HPV-33 έχουν επίσης βρεθεί ότι σχετίζονται με προκακοήθεις και κακοήθεις αλλοιώσεις και μεταγράφονται στις περισσότερες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από κολπικά καρκινώματα. Οι HPV-16, HPV-18, και HPV-33 είναι πιθανώς μόνο δύο μέλη ενός μεγάλου συνόλου HPV DNAs που σχετίζονται με κακοήγη ανθρώπινα κολπικά καρκινώματα.

Ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι οι καλοήθεις αλλοιώσεις ιού θηλώματος μπορούν να εξελιχθούν σε κακοήθεις αλλοιώσεις παρουσία συγκαρκινογόνου. Το HPV DNA έχει βρεθεί σε μεταστάσεις κολπικών καρκινωμάτων. Σε κακοήθεις κολπικές αλλοιώσεις, το HPV DNA είναι συνήθως ενσωματωμένο στο ανθρώπινο γονιδίωμα, αλλά μπορεί επίσης να υπάρχει και εξωχρωμοσωμικό HPV DNA. Η ενσωμάτωση HPV για να σχηματίσει τον προϊό συνήθως έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση του ιικού ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF: *open reading frame*) E2. Παρά την διάσπαση του E2 ORF, η εξέταση κυτταρικών σειρών από αρκετά κολπικά καρκινώματα έχει δείξει μεταγραφικά ενεργό και ενσωματωμένο HPV-16 και HPV-18. Όταν εξετάστηκαν γονιδιώματα HPV-16 που είναι παρόντα στις κυτταρικές σειρές SiHa και CaSki ανθρώπινου κολπικού καρκινώματος, βρέθηκαν διαφορές στην ενσωμάτωση του HPV-16. Στην σειρά SiHa, η μοναδική ενσωμάτωση γονιδιώματος HPV-16 συνέβη σε βάσεις 3132 και 3384, διασπώντας τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) E1 και E2 με εξάλειψη 0.3 kb. Μία επιπρόσθετη εξάλειψη 50 ζευγών βάσεων του DNA HPV-16 είχε ως αποτέλεσμα την σύντηξη των ORFs E2 και E4. Το τμήμα 5' του HPV-16 DNA, που αποτελείται από το διασπασμένο E2 ORF, είναι απολινωμένο σε συνεχείς ανθρώπινες δεξιές πλευρικές αλληλουχίες. Επιπροσθέτως μία μοναδική γουανίνη εντοπίζεται στο νουκλεοτίδιο 1138 στο μέσον του E1 ORF. Αυτή η προσθήκη ζεύγους βάσεων έχει ως αποτέλεσμα την σύντηξη των ORFs E1a και E1b σε μοναδικό E1 ORF.

Το πλήρες γονιδίωμα του HPV-16 είναι διαθέσιμο από GenBank ως αύξων αριθμός (*accession number*) K02718. Το πλήρες γονιδίωμα του HPV-33 είναι διαθέσιμο από GenBank ως αύξων αριθμός M12732. Το πλήρες γονιδίωμα του HPV-18 είναι διαθέσιμο από GenBank ως αύξων αριθμός X05015.

Ως προκαταρκτική διαλογή, το γεγονός λοίμωξης HPV κατοχυρώνεται σε δεδομένη βιοψία κολπικού δείγματος με απλή ανάλυση τύπου “να/όχι” χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, το οποιοδήποτε ή όλα τα PNAs των αλληλουχιών αρ. 46-53 και E2 TBA όπως περιγράφεται ανωτέρω (δηλαδή, κατάτμηση DNA, δέσμευση του PNA, ακινητοποίηση με το TBA, και ανίχνευση σήματος με BNAs και BBAs).

Όταν βρεθεί ότι δείγμα βιοψίας είναι θετικό για HPV, αποκτώνται επιπρόσθετες πληροφορίες που αφορούν το δυναμικό κακοήθειας του HPV αναλύοντας την κατάσταση ενσωμάτωσης του ιού στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

1. Κατάτμηση του DNA στο δείγμα κολπικής βιοψίας και υβριδοποίηση με αναστέλλοντα ανιχνευτή που έχει την αλληλουχία της αλληλουχίας αρ. 60. Αυτός ο ανιχνευτής θα δεσμευθεί με όλα τα θραύσματα στο DNA από τα οποία δεν έχει αποκοπεί το θραύσμα 0.3 kb.
2. Έκθεση του DNA του δείγματος βιοψίας σε PNA που έχει την αλληλουχία της αλληλουχίας αρ. 61. Αυτός ο ανιχνευτής θα δεσμευθεί μόνο με θραύσματα που έχουν εξαλειμμένο το θραύσμα 0.3 kb (ο ανιχνευτής αναστολής θα αποτρέψει τον σχηματισμό βρόχου από τα μεγάλα τμήματα εξάλειψης όταν είναι παρών).
3. PNA που έχει την αλληλουχία αρ. 62 υβριδοποιείται με αλληλουχία αρ. 41 για να σχηματίσει BBR που θα δεσμευθεί με *cro* ή καταστολέα λ CI ως BBA, αφήνοντας μονόκλωνο τμήμα ικανό να υβριδοποιηθεί με την θέση TATA στην αλληλουχία αρ. 61. Αυτό προστέθηκε για να σχηματίσει TBR στο άκρο 5' της μεγάλης εξάλειψης.
4. Η TBR ακινητοποιείται με TBA που έχει μονάδα αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με DNA TATA.
5. Τα δεσμευμένα θραύσματα ανιχνεύονται προσθέτοντας BNAs και BBAs όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Η ανίχνευση σήματος σε αυτόν τον προσδιορισμό υποδεικνύει ότι το μεγάλο θραύσμα εξαλείφεται σε HPV που υπάρχει στο TNA. Εφόσον αυτή η εξάλειψη σχετίζεται με κακοήθεια, αυτός ο προσδιορισμός διαλευκαίνει το δυναμικό κακοήθειας της λοίμωξης HPV. Αυτό το συμπέρασμα μπορεί να επιβεβαιωθεί εκτελώντας έναν ανάλογο προσδιορισμό βασισμένο στην εξάλειψη του θραύσματος των 52 ζευγών βάσεων που σχετίζεται επίσης με HPV-επαγόμενη κακοήθεια.

Η μονάδα αναγνώρισης TBP που χρησιμοποιείται στο TBA γι' αυτόν τον προσδιορισμό μπορεί να επιλεγεί, για παράδειγμα, από αλληλουχία όπως αλληλουχία αρ. 70 ή αλληλουχία αρ. 93.

Παράδειγμα 15 – Παραγωγή ανασυνδυασμένου HIV-LOCK™

Πρώτη φάση – Παρασκευή DNA για παραγωγή HIV-Lock™. *In vitro* μεταλλαξογένεση των περιοχών κωδικοποίησης των φυσικά απαντώμενων, κλωνοποιημένων συστατικών του HIV-Lock™ που χρειάζεται να τροποποιηθούν εκτελείται με kit MutaGene Phagemid. Το τροποποιημένο πρωτόκολλο περιλαμβάνει την χρήση πλασμιδίου Blue-script που περιέχει το καθένα από τα συστατικά δέσμευσης του HIV-Lock™. Αυτά μετασχηματίζονται σε ικανά κύτταρα και αυξάνονται φαγομίδια περιέχοντα ουρακίλη. Εκχυλίζεται μονόκλωνο DNA και χρησιμοποιείται ως μήτρα για τον μεταλλαξογόνο κλώνο. Ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις, που περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση πρωτότυπης περιοριστικής θέσης, συνθέτονται και υποβάλλονται σε αγωγή με κινάση πολυνουκλεοτιδίων και ATP. Τα ολιγονουκλεοτίδια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με κινάση υβριδοποιούνται με την μονόκλωνη μήτρα, και μεταλλαξογόνος κλώνος συνθέεται και απολινώνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο MutaGene, με την διαφορά ότι Sequenase 2.0 παρέχεται ως πολυμεράση. Βιβλιοθήκες υποβάλλονται σε διαλογή χρησιμοποιώντας και γ -³²P ακραίως σημασμένα νουκλεοτίδια που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές των εισαγμένων μεταλλάξεων και απομονώνοντας το πλασμιδιακό DNA και ταυτοποιώντας τα μεταλλάγματα με την παρουσία της εισαγμένης περιοριστικής θέσης. Οι μεταλλάξεις επιβεβαιώνονται επίσης καθορίζοντας την αλληλουχία με kit Sequenase. Το HIV-Lock™ DNA κλωνοποιείται στο σύστημα έκφρασης βακουλοϊού με πολυεδρικό προαγωγέα (*polyhedron promoter*).

Δεύτερη φάση – Παραγωγή πρωτεϊνών HIV-Lock™ χρησιμοποιώντας βακουλοϊό. Κύτταρα Sf-9 καλλιεργούνται έως προκαθορισμένη πυκνότητα (περίπου 1×10^6 κύτταρα/ml, λογαριθμική φάση), μολύνονται με τον βακουλοϊό που περιέχει τις οδηγίες HIV-Lock™ και συλλέγονται για να ανακτηθούν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν το HIV-Lock™. Στην διαδικασία κλιμάκωσης, καλλιέργειες επεκτείνονται από φιάλες (*flasks*) σε αναδευόμενες μεγαλύτερες φιάλες (*spinners*) και στην συνέχεια σε βιοαντιδραστήρες. Μετά την μόλυνση τα κύτταρα συλλέγονται σε 12, 24, 36 και 48 ώρες για την πρωτεΐνη. Οι δείκτες βιωσιμότητας παρακολουθούνται καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας.

Τρίτη φάση – καθαρισμός των πρωτεϊνών HIV-Lock™. Οι συλλεγμένες πρωτεΐνες πρώτα διαχωρίζονται από σωματιδιακά υλικά με υπερφυγοκέντρηση διαρροής για να διευκολυνθεί ο μετέπειτα καθαρισμός. Το υπερκείμενο μετά διηθείται ασηπτικά. Τα εκχυλίσματα μετά υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση σε 40,000 rpm σε 4° C για 30 λεπτά και κλάσματα κατακρημνίζονται με πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού εναντίον ενός συστατικού του HIV-Lock™. Οι ανοσοκατακρημνισμένες πρωτεΐνες υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου με 10% SDS.

Τετάρτη φάση - Δοκιμασία πρωτεϊνών HIV-Lock™ εναντίον HIV DNA. Εκτελούνται προσδιορισμοί μεταβολής κινητικότητας χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή που περιλαμβάνει στοιχεία της μακράς επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας HIV και θραύσματα που περιέχουν DNA δέσμευσης NFκB συνδεδεμένο με στοιχεία ρύθμισης ελαφριάς αλυσίδας κ και μικροσφαιρίνης. Το ολιγονουκλεοτίδιο υβριδοποιείται με τον συμπληρωματικό του κλώνο και σημαίνεται στα άκρα με γ -³²P ATP.

Καθορισμός αποτυπώματος (footprinting) επιτυγχάνεται συνδυάζοντας μικρές ποσότητες (10^{-15} M) ραδιοσημασμένου HIV LTR DNA με λίγο μεγαλύτερη ποσότητα HIV-Lock™ σε ρυθμιστικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Προστίθεται διθειοθρεϊτόλη πριν την προσθήκη της πρωτεΐνης. Προστίθεται σίδηρος (II), EDTA, υπεροξείδιο υδρογόνου και ασκορβικό νάτριο και το μείγμα αντίδρασης επωάζεται. Προστίθεται παράγοντας απόσβεσης και τα προϊόντα αναλύονται χρησιμοποιώντας αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πήκτωματος. Αυτό γίνεται με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Το προκύπτον πήκτωμα παρατηρείται χρησιμοποιώντας σαρωτή απεικόνισης φωσφόρου (*phosphoimager scanner*) και το προκύπτον αρχείο εικόνας υψηλής ανάλυσης αναλύεται για να διαφοροποιηθεί η συγγένεια δέσμευσης του HIV-Lock™ για το HIV DNA συγκριτικά με κυτταρικό DNA.

Πολλαπλές επαναλήψεις σχεδιασμού και δοκιμασίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιωθεί η δέσμευση HIV-Lock™ και άλλων TBAs για HIV και άλλους οργανισμούς. Αυτή η διαδικασία καθιστά δυνατόν να σχεδιαστούν συγκροτήματα δέσμευσης έτσι ώστε το συγκρότημα δέσμευσης δεν συναγωνίζεται τις πρωτεΐνες φυσικού τύπου για ξεχωριστές θέσεις δέσμευσης στα δείγματα γονιδιώματος. Η δημιουργία TBAs για άλλους οργανισμούς και TNAs για αλληλουχίες σε αυτούς τους οργανισμούς μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας την προαναφερόμενη μέθοδο. Αυτή η μέθοδος είναι έγκυρη όταν παράγονται συγκροτήματα δέσμευσης για όλες τις TBRs νουκλεϊκών οξέων, που περιλαμβάνουν υβρίδια DNA-DNA, DNA-RNA και RNA-RNA και συνδυασμούς αυτών των υβριδίων.

Παράδειγμα 16 – Μέθοδος ταυτοποίησης μορίων που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα για παραγωγή TBAs και BBAs της εφεύρεσης

Στην μέθοδο αυτής της εφεύρεσης, συγκροτήματα δέσμευσης στόχων και ενισχυτικά συγκροτήματα δέσμευσης συγκροτούνται ταυτοποιώντας μόρια που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα, και συνδέοντας τα τμήματα δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων των μορίων με τέτοιο τρόπο που να επιτευχθούν TBAs που διαφοροποιούν μεταξύ συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων και πολύ συγγενών αλληλουχιών. Μία μέθοδος ταυτοποίησης των μορίων που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα ενέχει τα ακόλουθα στάδια:

1. Απόκτηση βιολογικού δείγματος που περιέχει το νουκλεϊκό οξύ-στόχο. Αυτό μπορεί να είναι, για παράδειγμα, οργανισμός ή εκχύλισμα ιστού μολυσμένο με παθογόνο.
2. Κατάτμηση του δείγματος έτσι ώστε να εκτεθούν τα νουκλεϊκά οξέα και να μειωθεί η πολυπλοκότητα μεγέθους των νουκλεϊκών οξέων που περιέχονται στο δείγμα.
3. Επαφή ενός πρώτου κλάσματος των κατατετημημένων νουκλεϊκών οξέων με μέσον ρυθμιστικού διαλύματος-ελέγχου και δεύτερου κλάσματος των κατατετημημένων νουκλεϊκών οξέων με το μέσον ρυθμιστικού διαλύματος-ελέγχου που περιέχει γνωστό προφίλ μορίων που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα.
4. Ανάλυση των δύο κλασμάτων για να ταυτοποιηθούν θραύσματα που έχουν αλλαγμένη συμπεριφορά στο κλάσμα που έχει έρθει σε επαφή με τα δεσμευτικά μόρια-στόχους συγκριτικά με το κλάσμα ελέγχου. Αυτό επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος μίας διάστασης, με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτώματος, με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, χρωματογραφία χαρτιού ή με το οποιοδήποτε άλλο μέσο που αποκαλύπτει διαφορετική συμπεριφορά των θραυσμάτων νουκλεϊκών οξέων όταν δεσμεύονται με μόριο που δεσμεύεται με νουκλεϊκά οξέα συγκριτικά με όταν το θραύσμα νουκλεϊκού οξέος είναι αδέσμευτο.
5. Ταυτοποίηση και απομόνωση θραυσμάτων που παρουσιάζουν όντως αλλαγμένη συμπεριφορά όταν έρχονται σε επαφή με το μόριο που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ και είτε καθορισμός της αλληλουχίας του θραύσματος νουκλεϊκού οξέος για να καθοριστεί εάν είναι παρόντα γνωστά μοτίβα μορίου που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ, ή άμεση ταυτοποίηση του μορίου που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ, το οποίο έχει δεσμευθεί με το νουκλεϊκό οξύ. Το δεύτερο μπορεί να επιτευχθεί, για παράδειγμα, φέροντας σε επαφή δισδιάστατο δικτύωμα των ηλεκτροφορημένων νουκλεϊκών οξέων με διαφορεικά σημασμένα αντισώματα που δεσμεύονται με τα διάφορα μόρια που δεσμεύονται με νουκλεϊκό οξύ.

Σε αυτήν την μέθοδο, κατά προτίμηση χρησιμοποιούνται μοτίβα νουκλεϊκών οξέων για διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς όπου το νουκλεϊκό οξύ στόχου έχει περισσότερο από έναν χρησιμοποιήσιμο στόχο μορίου που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να παραχθεί σύνθετο συγκρότημα δέσμευσης στόχου το οποίο αξιοποιεί την εγγύτητα διαφορετικών μοριακών μοτίβων δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος για να ενισχύσει την εξειδίκευση του TBA που συγκροτείται από τα ξεχωριστά συστατικά δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος που ταυτοποιούνται. Τα διάφορα τμήματα δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος των μορίων που δεσμεύονται με νουκλεϊκά οξέα μετά συγκροτούνται στα ολοκληρωμένα TBAs όπως περιγράφεται ανωτέρω, για παράδειγμα, για HIV-LOCK™.

Παράδειγμα 17 - Μέθοδος ταυτοποίησης ειδικών αλληλουχιών RNA σε δείγμα

Σύμφωνα με τις μεθόδους και συνθέσεις που διδάσκονται σε αυτήν την εφεύρεση, η οποιαδήποτε αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος μπορεί να ταυτοποιηθεί ειδικά. Η ταυτοποίηση στόχου HIV RNA σε δείγμα επιτυγχάνεται αποκτώντας δείγμα σε αίμα ασθενούς ή σε άλλο βιολογικό υγρό ή εκχύλισμα που μπορεί να περιέχει το HIV RNA, και εξετάζοντας την παρουσία θέσεων δέσμευσης TAR. Το Tat είναι θετικός ρυθμιστής αναπαραγωγής HIV που δεσμεύεται με την περιοχή TAR του HIV RNA. Η μικρότερη φυσικά απαντώμενη, πλήρως ενεργή μορφή HIV-Tat έχει μήκος 72 αμινοξέων, αλληλουχία αρ. 118 εδώ. Το Tat περιέχει τουλάχιστον δύο λειτουργικές περιοχές, και διενεργοποιεί γονιδιακή έκφραση από την μακρά τερματική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία του HIV (HIV LTR). Το Tat δεσμεύεται με δομή κορμού-βρόχου RNA που σχηματίζεται από την αυτοϋβριδοποίηση αλληλουχιών σε TAR, που είναι μόλις 5' της HIV LTR. Το HIV TAR RNA σχηματίζει δινουκλεοτιδική διόγκωση και δύο δομές κορμού-βρόχου (Rhim *et al.* 1994 *Virology*: 202, 202-211). Το Tat (αλληλουχία αρ. 118) δεσμεύεται με αυτήν την δομή με χαμηλότερη ισχύ από παραλλαγές Tat όπου η Ala58 είναι θρεονίνη ή όπου η His65 είναι υπόλειμμα Asp. (Derse *et al.*, 1993 *Virology*: 194,530-536). Η αξιοποίηση αυτών των γεγονότων στην παρούσα εφεύρεση επιτυγχάνεται με:

1. Κατάτμηση βιολογικού δείγματος έτσι ώστε να εκτεθούν τα νουκλεϊκά οξέα και να μειωθεί η πολυπλοκότητα μεγέθους των νουκλεϊκών οξέων.
2. Επαφή TBA με το δείγμα το οποίο ταυτοποιεί υβριδική αλληλουχία πρωτεΐνης που δεσμεύεται με TAR και εγγύτερη πλευρική αλληλουχία στο γονιδίωμα HIV. Το TBA που χρησιμοποιείται γι' αυτόν τον σκοπό συγκροτείται σε *cro* ως συνοδό χρησιμοποιώντας Tat ως ειδικό μόριο δέσμευσης HIV RNA. Για να παρέχεται εξειδίκευση, όπως αποφυγή διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ της θέσης HIV TAR και πολύ συναφών θέσεων TAR που μπορεί να υπάρχουν λόγω παθογόνων όπως κυτταρομεγαλοϊός, το TBA έχει επίσης συστατικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την περιοχή δέσμευσης στόχου υβριδίου DNA-RNA που σχηματίζεται όταν νουκλεϊκό οξύ ανιχνευτή δεσμεύεται με το HIV LTR RNA.
3. Εξάλειψη της οποιασδήποτε διασταυρούμενης αντιδραστικότητας (“*cross-talk*”) που παράγεται με δέσμευση του Tat στην περιοχή TAR του HIV RNA λόγω ρύπων (εξαδέλφια RNAs) όπως η αλληλουχία CMV TAR φέροντας σε επαφή την αντίδραση με πλεόνασμα παραλλαγής Tat (παραλλαγές είτε της Ala58 σε Thr ή της His65 σε Asp) που δεσμεύονται ισχυρότερα. Με αυτόν τον τρόπο, ξεχωριστά συμβάντα δέσμευσης λόγω της δέσμευσης TBA με εξαδέλφια RNAs παρεμποδίζονται με συναγωνισμό από το δείγμα νουκλεϊκού οξέος με την παραλλαγή Tat. Αφ' ετέρου, επιλέγοντας καταλλήλως την συγγένεια της διπλής δέσμευσης που επιτυγχάνεται ως αποτέλεσμα του αντισώματος και Tat, το TBA δεν εκτοπίζεται από αληθινούς στόχους. Αυτή η διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 16. Σε άλλη μορφή αυτής της ίδιας μεθόδου, το TBA μπορεί να είναι κάποιο το οποίο, αντί να χρησιμοποιεί παραλλαγή Tat, χρησιμοποιεί αντίσωμα που αναγνωρίζει το τμήμα νουκλεϊκού οξέος, και το TBA που χρησιμοποιείται είναι TBA διπλού αντισώματος.

Σε εναλλακτική διασκευή αυτής της μεθόδου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί νουκλεϊκό οξύ ανιχνευτή που υβριδοποιείται με το HIV LTR RNA. Κατά συνέπεια, μπορεί να δημιουργηθεί διπλό τμήμα των θέσεων LTR sp1 ως μέρος της περιοχής δέσμευσης στόχου. Αυτή η περιοχή του HIV RNA πλευρίζει την περιοχή TAR που είναι 5' της LTR αλλά είναι σε στενή εγγύτητα με αυτήν. TBA που περιέχει Tat και δύο θέσεις δέσμευσης Sp1 συνοδεύεται (*chaperoned*) για να παρέχει δέσμευση Tat σε TAR και δέσμευση Sp1 στις θέσεις δέσμευσης Sp1. Μετά εκτελείται ενίσχυση και ανίχνευση προσθέτοντας κατάλληλα BNAs, BBAs και HNAs. Σε άλλη ακόμα εναλλακτική διασκευή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν PNAs που έχουν αλληλουχία αρ. 38 και αλληλουχία αρ. 39 (βλέπε Εικόνα 7). Χρησιμοποιείται TBA που περιέχει μία ή περισσότερες μονάδες δέσμευσης Sp1 και μονάδα αντισώματος που δεσμεύεται με το υβρίδιο DNA-RNA που παράγεται από το RNA του δείγματος και το PNA αλληλουχίας αρ. 38. Μετά προσθέτονται κατάλληλα BNAs, BBAs και HNAs για να ενισχύσουν το σήμα.

Φυσικά, αυτοί με πείρα σε αυτήν την τεχνολογία θα αντιλαμβάνονται ότι και άλλοι συνδυασμοί TBA και TNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιστοποιηθούν οι μέθοδοι παραδείγματα των οποίων παραθέτονται εδώ.

Εννοείται ότι οι αλληλουχίες που παρέχονται εδώ είναι μόνο παραδειγματικές και ότι άλλες παρόμοιες αλληλουχίες που υποδεικνύονται από αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μεθόδους αυτής της εφεύρεσης. Εννοείται επίσης ότι μολονότι η οποιαδήποτε αλληλουχία που παρέχεται εδώ μπορεί να οριστεί ως γραμμική, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κυκλοποιημένη ή αλλιώς αλλαγμένη μορφή και μολονότι ορίζεται ότι δεν είναι αντιπληροφοριακή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κωδικεύουσα ή μη κωδικεύουσα μορφή ή για να δεσμεύεται σε κωδικεύουσες ή μη κωδικεύουσες συμπληρωματικές αλληλουχίες.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

(1) ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ:

- (i) ΑΙΤΩΝ:
 - (A) ΟΝΟΜΑ: THE GENE POOL, INC.
 - (B) ΟΔΟΣ: 300 Queen Anne Ave. N., Suite 392
 - (C) ΠΟΛΗΣ: Seattle
 - (D) ΠΟΛΙΤΕΙΑ: Washington
 - (E) ΧΩΡΑ: US
 - (F) TAX. ΤΟΜΕΑΣ (ZIP): 98109-4599
 - (G) ΤΗΛ.: (206) 526-8617
- (ii) ΤΙΤΛΟΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ: **ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ**
- (iii) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ: 118
- (iv) ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑΣ:
 - (A) ΠΑΡΑΛΗΠΤΗΣ: Saliwanchik & Saliwanchik
 - (B) ΟΔΟΣ: 2421 N.W. 41st St., Suite A-1
 - (C) ΠΟΛΗΣ: Gainesville
 - (D) ΠΟΛΙΤΕΙΑ: Florida
 - (E) ΧΩΡΑ: USA
 - (F) TAX. ΚΩΔΙΚΑΣ (zip): 32606
- (v) ΑΝΑΓΝΩΣΙΜΟΣ ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ
 - (A) ΜΕΣΟΝ: Floppy disk
 - (B) ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ: συμβατό IBM PC
 - (C) ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: PC-DOS/MS_DOS
 - (D) ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ: Patentin Release #1.0, version #1.25
- (vi) ΤΡΕΧΟΝΤΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΙΤΗΣΗΣ
 - (A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΙΤΗΣΗΣ:
 - (B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΥΠΟΒΟΛΗΣ:
 - (C) ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ:
- (viii) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΔΙΚΗΓΟΠΟΥ/ΠΡΑΚΤΟΡΑ
 - (A) ΟΝΟΜΑ: Bencen, Gerard H
 - (B) ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΓΓΡΑΦΗΣ: 35,746
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ/ΔΙΚΑΣΤΗΡΙΟΥ GP-100.C1:
- (ix) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΤΗΛΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ
 - (A) ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (904) 375-8100
 - (B) TELEFAX: (904) 372-5800

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.1:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 13 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.1:

TGGGGATTCC CCA

13

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.2:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 13 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.2:

AAGGGACTTT CCC 13

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.3:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 13 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 - (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 - (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.3:

AGGGGACTTT CCG 13

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.4:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 15 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 - (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 - (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.4:

GCTGGGGACT TTCCA 15

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.5:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 15 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 - (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 - (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.5:

ACAAGGGACT TTCCG 15

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.6:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 13 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 - (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 - (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.6:

CCGGGTTTTC CCC 13

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.7:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 27 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.7:

AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCA

27

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.8:
 - (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 27 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 - (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 - (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.8:

AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCG

27

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.9:
 - (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 26 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 - (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 - (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.9:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG

26

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.10:
 - (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 26 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 - (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 - (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.10:

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGTGTG

26

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.11:
 - (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 26 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 - (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 - (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 - (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 - (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.11:

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG CGTGCC

26

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.12:
 - (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 26 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.12:

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG GCGCGG

26

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.13:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 26 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.13:

GCTGGGGACT TTCCAGAGAG GCGTGG

26

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.14:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 26 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.14:

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGCCTG

26

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.15:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 26 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.15:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG

26

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.16:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 26 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.16:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCTGCC

26

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.17:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 33 ζεύγη βάσεων

- (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
- (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
- (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.17:

TTTCCAGGGA GCGGTGGCCT GGGCGGGACT GGG

33

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.18:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 33 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.18:

CGTGGCCTGG GCGGGACTGG GGAGTGGCGT CCC

33

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.19:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 45 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.19:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCT

45

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.20:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 46 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.20:

CAGCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT

46

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.21:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 46 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.21:

CATCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT

46

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.22:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 46 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.22:

CAACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT

46

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.23:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 45 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.23:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCAT

45

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.24:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 44 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.24:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGCGTG GCCT

44

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.25:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 44 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.25:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGGCGC GGCT

44

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.26:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 45 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.26:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGAGAGGCGT GGACT

45

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.27:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 46 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.27:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGCG TGGACT

46

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.28:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 46 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.28:

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGGGAG

46

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.29:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 43 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.29:

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCTG CCT

43

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.30:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 48 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.30:

C TTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGG

48

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.31:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 45 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.31:

TTTCCAGGGA GCGTGGCCT GGGCGGGACT GGGGAGTGGC GTCCC 45

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.32:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 59 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.32:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGG 59

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.33:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 59 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.33:

TTTCCGCTGG GGACTTTCCA GGGAGGCGTG GCCTGGGCGG GACTGGGGAG TGGCGTCCC 59

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.34:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 70 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.34:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60

GTGGCGTCCC 70

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.35:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 61 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 - (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 - (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.35:

TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT AATTTATCAC CGCAGATGGT 60

T 61

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP.36:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 - (A) ΜΗΚΟΣ: 64 ζεύγη βάσεων
 - (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ

- (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.36:
- TATCACCGCA AGGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT 60
 GATA 64
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.37:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 70 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.37:
- CTACAAGGGA CTTTCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGA CTGGGGA 60
 GTGGCGTCCC 70
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.38:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 37 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.38:
- CTACAAGGGA CTTTCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGG 37
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.39:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 22 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.39:
- CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CC 22
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.40:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 103 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ.40:
- CTACAAGGGA CTTTCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGTAT CACCGCCAGT GGTATTTATG 60

TCAACACCGC CAGAGATAAT TTATCACCGC AGATGGTTCT GCA 103

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 41:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 62 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 41:
 GAACCATCTG CGGTGATAAA TTATCTCTGG CGGTGTTGAC ATAAATACCA CTGGCGGTGA 60
 TA 62

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 42:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 71 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 42:
 GATCSAACCA TCTGCGGTGA TAAATTATCT CTGGCGGTGT TGACATAAAT ACCACTGGCG 60
 GTGATACTGC A 71

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 43:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 63 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 43:
 GATCACCGC CAGTGGTATT TATGTCAACA CCGCCAGAGA TAATTTATCA CCGCAGATGG 60
 TTG 63

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 44:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 21 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 44:
 GATCCGGGG GATACCCCC G 21

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 45:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 91 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 45:
 CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CCTATCACCG CAAGGGATAA ATATCTAACA CCGTGCCTGT 60
 TGACTATTTT ACCTCTGGCG GTGATAGCAT G 91

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 46:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 53 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 46:
 STAAGGGCGT AACCGAAATC GGTGGAACCG AAACCGGTTA GTATAAAAGC AGA 53
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 47:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 54 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 47:
 AAAAGGGAGT AACCGAAAAC GGTCCGGGACC GAAAACGGTG TATATAAAAG ATGT 54
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 48:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 54 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 48:
 AGTAGGGTGT AACCGAAAGC GGTTC AACCG AAAACGGTGC ATATATAAAG CAAA 54
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 49:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 24 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 49:
 GCTTCAACCG AATTCGGTTG CATG 24
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 50:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 24 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 50:
 TGTGCAACCG AATTCGGTTG CCTT 24
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 51:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 24 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA

- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 51:
 TATGCAACCG AAATAGGTTG GGCA 24
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 52:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 24 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 52:
 TGCCTAACCG TTTTCGGTTA CTTG 24
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 53:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 24 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 53:
 GGACTAACCG TTTTAGGTCA TATT 24
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 54:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 52 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 54:
 GACGACTATC CAGCGACCAA GATCAGAGCC AGACACCGGA AACCCCTGCC AC 52
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 55:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 53 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 55:
 GACGACACGG TATCCGCTAC TCAGCTTGTT AAACAGCTAC AGCACACCCC CTC 53
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 56:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 60 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 56:
 GACGACGACC TGCAGACACC ACAGACACCG CCCAGCCCT TACAAAGCTG TTCTGTGCAG 60
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 57:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 68 ζεύγη βάσεων

- (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 57:
 CATACCAAAG CCGTCGCCTT GGGCACCGAA GAAACACAAC CACTAAGTTG TTGCACAGAG 60
 ACTCAGTG 68
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 58:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 77 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 58:
 TAAATGTAATT GATTGTAATG ACTCTATGTG CAGTACCAGT ACCGTAATCC AGCACCCGTGT 60
 CCGTGGGCAC CGCAAAG 77
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 59:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 80 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 59:
 ACAGACAACG ATAACCGACC ACCACAAGCA GCGGCCAAAC ACCCCGCCTT GGACAATAGA 60
 ACAGCACGTA CTGCAACTAA 80
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 60:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 266 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 60:
 CATATGCAAT ACAATGCATT ATACAAACTG GACACATATA TATATTTGTG AAGAAGCATC 60
 AGTAACTGTG GTAGAGGGTC AAGTTGACTA TTATGGTTTA TATTATGTTC ATGAAGGAAT 120
 ACGAACATAT TTTGTGCAGT TTAAGATGA TGCAGAAAAA TATAGTAAA AATAAGTATG 180
 GGAAGTTCAT GCGGGTGGTC AGGTAATATT ATGTCTACA TCTGTGTTTA GCAGCAACGA 240
 AGTATCCTCT CCTGAAATTA TTAGGC 266
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 61:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 95 ζεύγη βάσεων
 (B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 61:
 AGGATGTATA AAAAAACATG GATATACAGT GGAAGTGCAG TTTGATGGAG ACATATGCTA 60
 TTAGGCAGCA CTTGGCCAAC CACCCCGCCG CGACC 95
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 62:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 81 ζεύγη βάσεων

(B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
 (C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΔΥΣΙΔΩΝ: 1/2
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 62:
 CATGTTTTTT TATACATCCA TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT
 AATTTATCAC CGCAGATGGT T

60

81

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 63:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 322 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 63:
 Met Ala Asp Asp Asp Pro Tyr Gly Thr Gly Gln Met Phe His Leu Asn
 1 5 10 15
 Thr Ala Leu Thr His Ser Ile Phe Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Pro Glu
 20 25 30
 Ile Pro Leu Ser Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu Glu Gln Pro
 35 40 45
 Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly Pro Ser His
 50 55 60
 Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys Ser Tyr Pro
 65 70 75 80
 Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val Ile Val Gln
 85 90 95
 Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His Ser Leu Val
 100 105 110
 Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Val Cys Thr Val Thr Ala Gly Pro Lys
 115 120 125
 Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His Val Thr Lys
 130 135 140
 Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu Ala Cys Ile
 145 150 155 160
 Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Ser Asp Leu Ala Tyr Leu
 165 170 175
 Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Thr Asp Arg Glu Lys Glu
 180 185 190
 Ile Ile Arg Gln Ala Ala Val Gln Gln Thr Lys Glu Met Asp Leu Ser
 195 200 205
 Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser Thr Gly Ser
 210 215 220
 Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile Tyr Asp Ser
 225 230 235 240
 Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met Asp Arg Thr
 245 250 255
 Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu Cys Asp Lys
 260 265 270
 Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu Glu Glu Asn
 275 280 285
 Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr Asp Val His
 290 295 300
 Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Thr

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 64:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 325 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 64:

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

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 65:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 268 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 65:

Met Glu Pro Ala Asp Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Gln Pro Glu Trp Gly
 1 5 10 15
 Glu Gln Glu Pro Gly Gly Ala Thr Pro Phe Val Glu Ile Leu Glu Gln
 20 25 30
 Pro Lys Gln Arg Gly Met Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser
 35 40 45
 Ala Gly Ser Ile Pro Gly Glu His Ser Thr Asp Ser Ala Arg Thr His
 50 55 60
 Pro Thr Ile Arg Val Asn His Tyr Arg Gly Pro Gly Arg Val Arg Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Val Thr Lys Asp Pro Pro His Gly Pro His Pro His Glu Leu

				85						90					95				
Val	Gly	Arg	His	Cys	Gln	His	Gly	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Glu	Leu	Ser	Pro				
			100					105					110						
Asp	Arg	Ser	Ile	His	Ser	Phe	Gln	Asn	Leu	Gly	Ile	Gln	Cys	Val	Lys				
		115					120					125							
Lys	Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Arg	Thr	Asn	Asn				
	130				135						140								
Asn	Pro	Phe	Asn	Val	Pro	Met	Glu	Glu	Arg	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu				
145					150					155					160				
Ser	Ala	Val	Arg	Leu	Cys	Phe	Gln	Val	Trp	Val	Asn	Gly	Pro	Gly	Gly				
			165						170					175					
Leu	Cys	Pro	Leu	Pro	Pro	Val	Leu	Ser	Gln	Pro	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg				
			180						185				190						
Ala	Pro	Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	Arg	Ile	Leu	Pro	Gly	Asp	Arg	Asn	Ser				
		195					200					205							
Gly	Ser	Cys	Gln	Gly	Gly	Asp	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Val				
	210					215					220								
Gln	Lys	Glu	Asp	Ile	Glu	Val	Arg	Phe	Trp	Ala	Glu	Gly	Trp	Glu	Ala				
225					230					235					240				
Lys	Gly	Ser	Phe	Ala	Ala	Ala	Asp	Val	His	Arg	Gln	Val	Ala	Ile	Val				
				245					250					255					
Phe	Arg	Thr	Pro	Pro	Phe	Arg	Glu	Arg	Ser	Leu	Arg								
			260					265											

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 66:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 263 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτιδίο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 66:

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

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 67:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 263 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 67:

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

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 68:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 299 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 68:

Met	Phe	Pro	Asn	Gln	Asn	Asn	Gly	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Pro	Ala
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	Gln	Gln	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Gly	Leu	Pro	Ala	Gln	Gln
			20					25					30		
Gln	Gln	Gln	Leu	Ala	Gln	Ser	Thr	Lys	Asn	Val	Arg	Lys	Lys	Pro	Tyr
			35				40					45			
Val	Lys	Ile	Thr	Glu	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Tyr
	50					55					60				
Glu	Cys	Glu	Gly	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ile	Pro	Gly	Val	Asn	Ser	Thr
65					70					75					80
Pro	Glu	Asn	Lys	Thr	Tyr	Pro	Thr	Ile	Glu	Ile	Val	Gly	Tyr	Lys	Gly
				85					90					95	

Arg Ala Val Val Val Val Ser Cys Val Thr Lys Asp Thr Pro Tyr Arg
 100 105 110
 Pro His Pro His Asn Leu Val Gly Lys Glu Gly Cys Lys Lys Gly Val
 115 120 125
 Cys Thr Leu Glu Ile Asn Ser Glu Thr Met Arg Ala Val Phe Ser Asn
 130 135 140
 Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Ile Glu Ala Ala Leu Lys
 145 150 155 160
 Ala Arg Glu Glu Ile Arg Val Asp Pro Phe Lys Thr Gly Phe Ser His
 165 170 175
 Arg Phe Gln Pro Ser Ser Ile Asp Leu Asn Ser Val Arg Leu Cys Phe
 180 185 190
 Gln Val Phe Met Glu Ser Glu Gln Lys Gly Arg Phe Thr Ser Pro Leu
 195 200 205
 Pro Pro Val Val Ser Glu Pro Ile Phe Asp Lys Lys Ala Met Ser Asp
 210 215 220
 Leu Val Ile Cys Arg Leu Cys Ser Cys Ser Ala Thr Val Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Thr Gln Ile Ile Leu Leu Cys Glu Lys Val Ala Lys Glu Asp Ile Ser
 245 250 255
 Val Arg Phe Phe Glu Glu Lys Asn Gly Gln Ser Val Trp Glu Ala Phe
 260 265 270
 Gly Asp Phe Gln His Thr Asp Val His Lys Gln Thr Ala Ile Thr Phe
 275 280 285
 Lys Thr Pro Arg Tyr His Thr Leu Asp Ile Thr
 290 295

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 69:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 261 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτιδίο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 69:

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

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

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 72:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 17 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 72:

Cys	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	His	Arg	Ile	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys
1				5					10					15	
Thr															

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 73:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 168 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 73:

Gly	Asp	Pro	Gly	Lys	Lys	Lys	Gln	His	Ile	Cys	His	Ile	Gln	Gly	Cys
1				5					10					15	
Gly	Lys	Val	Tyr	Gly	Lys	Thr	Ser	His	Leu	Arg	Ala	His	Leu	Arg	Trp
			20					25					30		
His	Thr	Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Met	Cys	Thr	Trp	Ser	Tyr	Cys	Gly	Lys
		35					40					45			
Arg	Phe	Thr	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Gln	Arg	His	Lys	Arg	Thr	His	Thr
		50				55					60				
Gly	Glu	Lys	Lys	Phe	Ala	Cys	Pro	Glu	Cys	Pro	Lys	Arg	Phe	Met	Arg
65				70						75				80	
Ser	Asp	His	Leu	Ser	Lys	His	Ile	Lys	Thr	His	Gln	Asn	Lys	Lys	Gly
				85					90					95	

Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly
 100 105 110
 Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr
 115 120 125
 Thr Asn Met Val Ala Met Glu Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg
 130 135 140
 Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly Phe
 165

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 74:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 181 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 74:

Ser Gly Ile Val Pro Gln Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu
 1 5 10 15
 Gly Cys Lys Leu Asp Leu Lys Thr Ile Ala Leu Arg Ala Arg Asn Ala
 20 25 30
 Glu Tyr Asn Pro Lys Arg Phe Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu
 35 40 45
 Pro Arg Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ser Ser Gly Lys Met Val Cys Thr
 50 55 60
 Gly Ala Lys Ser Glu Glu Gln Ser Arg Leu Ala Ala Arg Lys Tyr Ala
 65 70 75 80
 Arg Val Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Leu Asp Phe Lys
 85 90 95
 Ile Gln Asn Met Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu
 100 105 110
 Glu Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu
 115 120 125
 Leu Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu
 130 135 140
 Leu Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly
 165 170 175
 Phe Arg Lys Thr Thr
 180

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 75:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 85 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 75:

Ser Cys Phe Ala Leu Ile Ser Gly Thr Ala Asn Gln Val Lys Cys Tyr
 1 5 10 15
 Arg Phe Arg Val Lys Lys Asn His Arg His Arg Tyr Glu Asn Cys Thr
 20 25 30
 Thr Thr Trp Phe Thr Val Ala Asp Asn Gly Ala Glu Arg Gln Gly Gln
 35 40 45
 Ala Gln Ile Leu Ile Thr Phe Gly Ser Pro Ser Gln Arg Gln Asp Phe
 50 55 60
 Leu Lys His Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Asn Ile Ser Gly Phe Thr
 65 70 75 80
 Ala Ser Leu Asp Phe
 85

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 76:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 87 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 76:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Pro | Cys | Leu | Leu | Ile | Gly | Thr | Ser | Gly | Asn | Gly | Asn | Gln | Val | Lys |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Cys | Tyr | Ser | Phe | Arg | Val | Lys | Arg | Trp | His | Asp | Arg | Asp | Lys | Tyr | His |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| His | Thr | Thr | Thr | Trp | Trp | Ala | Val | Gly | Gly | Gln | Gly | Ser | Glu | Arg | Pro |
| | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | | |
| Gly | Asp | Ala | Thr | Val | Ile | Val | Thr | Phe | Lys | Asp | Gln | Ser | Gln | Arg | Ser |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| His | Phe | Leu | Gln | Gln | Val | Pro | Leu | Pro | Pro | Gly | Met | Ser | Ala | His | Gly |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Val | Thr | Met | Thr | Val | Asp | Phe | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 85 |

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 77:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 84 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 77:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Pro | Val | Ile | Cys | Leu | Lys | Gly | Gly | His | Asn | Gln | Leu | Lys | Cys | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Arg | Tyr | Arg | Leu | Lys | Ser | Lys | His | Ser | Ser | Leu | Phe | Asp | Cys | Ile | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Thr | Thr | Trp | Ser | Trp | Val | Asp | Thr | Thr | Ser | Thr | Cys | Arg | Leu | Gly | Ser |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Arg | Met | Leu | Ile | Lys | Phe | Ala | Asp | Ser | Glu | Gln | Arg | Asp | Lys | Phe |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Leu | Ser | Arg | Val | Pro | Leu | Pro | Ser | Thr | Thr | Gln | Val | Phe | Leu | Gly | Asn |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Phe | Tyr | Gly | Leu | | | | | | | | | | | | |

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 78:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 84 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 78:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Pro | Val | Ile | Leu | Val | Arg | Gly | Gly | Ala | Asn | Thr | Leu | Lys | Cys | Phe |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Arg | Asn | Arg | Ala | Arg | Val | Arg | Tyr | Arg | Gly | Leu | Phe | Lys | Tyr | Phe | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Thr | Thr | Trp | Ser | Trp | Val | Ala | Gly | Asp | Ser | Thr | Glu | Arg | Leu | Gly | Arg |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ser | Arg | Met | Leu | Ile | Leu | Phe | Thr | Ser | Ala | Cys | Gln | Arg | Glu | Lys | Pro |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Asp | Glu | Thr | Val | Lys | Tyr | Pro | Lys | Gly | Val | Asp | Thr | Ser | Tyr | Gly | Asn |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Leu | Asp | Ser | Leu | | | | | | | | | | | | |

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 79:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 84 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 79:

Pro	Pro	Val	Val	Cys	Val	Lys	Gly	Gly	Ala	Asn	Gln	Leu	Lys	Cys	Leu
1				5					10					15	
Arg	Tyr	Arg	Leu	Lys	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Asp	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser
			20					25					30		
Thr	Thr	Trp	His	Trp	Thr	Asp	Arg	Lys	Asn	Thr	Glu	Arg	Ile	Gly	Ser
			35				40					45			
Ala	Arg	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Ile	Asp	Glu	Ala	Gln	Arg	Glu	Lys	Phe
			50			55					60				
Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Leu	Pro	Arg	Ser	Val	Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Gln
65					70					75					80
Phe	Asn	Gly	Ser												

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 80:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 84 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 80:

Thr	Pro	Ile	Val	Gln	Leu	Gln	Gly	Asp	Ser	Asn	Cys	Leu	Lys	Cys	Phe
1				5						10				15	
Arg	Tyr	Arg	Leu	Asn	Asp	Lys	Tyr	Lys	His	Leu	Phe	Glu	Leu	Ala	Ser
			20					25					30		
Ser	Thr	Trp	His	Trp	Ala	Ser	Pro	Glu	Ala	Pro	His	Lys	Asn	Ala	Ile
			35				40					45			
Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Arg	Gln	Gln	Phe	Leu	Asn
			50			55					60				
Ser	Val	Lys	Ile	Pro	Pro	Thr	Ile	Arg	His	Lys	Val	Gly	Phe	Met	Ser
65					70					75					80
Leu	His	Leu	Leu												

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 81:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 84 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 81:

Thr	Pro	Ile	Val	Gln	Phe	Gln	Gly	Glu	Ser	Asn	Cys	Leu	Lys	Cys	Phe
1				5						10				15	
Arg	Tyr	Arg	Leu	Asn	Arg	Asp	His	Arg	His	Leu	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser
			20					25					30		
Ser	Thr	Trp	His	Trp	Ala	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	His	Lys	His	Ala	Ile
			35				40					45			
Val	Thr	Val	Thr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Glu	Gln	Arg	Gln	Gln	Phe	Leu	Asp
			50			55					60				
Val	Val	Lys	Ile	Pro	Pro	Thr	Ile	Ser	His	Lys	Leu	Gly	Phe	Met	Ser
65					70					75					80
Leu	His	Leu	Leu												

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 82:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

- (A) ΜΗΚΟΣ: 80 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 82:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Pro | Ile | Ile | His | Leu | Lys | Gly | Asp | Arg | Asn | Ser | Leu | Lys | Cys | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Arg | Tyr | Arg | Leu | Arg | Lys | His | Ser | Asp | His | Tyr | Arg | Asp | Ile | Ser | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Thr | Trp | His | Trp | Thr | Gly | Ala | Gly | Asn | Glu | Lys | Thr | Gly | Ile | Leu | Thr |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Val | Thr | Tyr | His | Ser | Glu | Thr | Gln | Arg | Thr | Lys | Phe | Leu | Asn | Thr | Val |
| | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | |
| Ala | Ile | Pro | Asp | Ser | Val | Gln | Ile | Leu | Val | Gly | Tyr | Asn | Thr | Met | Tyr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 83:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 80 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 83:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Pro | Ile | Val | His | Leu | Lys | Gly | Asp | Ala | Asn | Thr | Leu | Lys | Cys | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Arg | Tyr | Arg | Phe | Lys | Lys | His | Cys | Thr | Leu | Tyr | Thr | Ala | Val | Ser | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Thr | Trp | His | Trp | Thr | Gly | His | Asn | Tyr | Lys | His | Lys | Ser | Ala | Ile | Val |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Thr | Leu | Thr | Tyr | Asp | Ser | Glu | Trp | Gln | Arg | Asp | Gln | Phe | Leu | Ser | Gln |
| | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | |
| Val | Lys | Ile | Pro | Lys | Thr | Ile | Thr | Val | Ser | Thr | Gly | Phe | Met | Ser | Ile |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 84:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 81 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 84:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Pro | Ile | Val | His | Leu | Lys | Gly | Glu | Ser | Asn | Ser | Leu | Lys | Cys | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Arg | Tyr | Arg | Leu | Lys | Pro | Tyr | Asn | Glu | Leu | Tyr | Ser | Ser | Met | Ser | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Thr | Trp | His | Trp | Thr | Ser | Asp | Asn | Lys | Asn | Ser | Lys | Asn | Gly | Ile | Val |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Thr | Val | Thr | Phe | Val | Thr | Gly | Gln | Gln | Gln | Gln | Met | Phe | Leu | Gly | Thr |
| | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | |
| Val | Lys | Ile | Pro | Pro | Thr | Val | Gln | Ile | Ser | Thr | Gly | Phe | Met | Thr | Leu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Val | | | | | | | | | | | | | | | |
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 85:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 21 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 85:
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 86:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 30 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 86:
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 87:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 21 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 87:
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 88:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 30 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 88:
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 89:
 (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 24 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 89:
 Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Ile
 1 5 10 15
 Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 20

- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 90:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
- (A) ΜΗΚΟΣ: 33 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 90:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Trp | Met | Glu | Glu | Val | Ile | Lys | Ile | Cys | Gly | Arg | Glu | Leu | Val |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Arg | Ala | Gln | Ile | Ala | Ile | Cys | Gly | Met | Ser | Thr | Trp | Ser | Lys | Arg | Ser |
| | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
| Leu | | | | | | | | | | | | | | | |
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 91:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
- (A) ΜΗΚΟΣ: 24 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 91:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Glu | Lys | Met | Gly | Thr | Ala | Lys | Lys | Cys | Cys | Ala | Ile | Gly | Cys | Ser |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Thr | Glu | Asp | Phe | Arg | Met | Val | Cys | | | | | | | | |
| | | | 20 | | | | | | | | | | | | |
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 92:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
- (A) ΜΗΚΟΣ: 40 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 92:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Pro | Asn | Trp | Glu | Glu | Arg | Ser | Arg | Leu | Cys | Gly | Arg | Asp | Leu | Ile |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Arg | Ala | Phe | Ile | Tyr | Leu | Cys | Gly | Gly | Thr | Arg | Trp | Thr | Arg | Leu | Pro |
| | | | 20 | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
| Asn | Phe | Gly | Asn | Tyr | Pro | Ile | Met | | | | | | | | |
| | | 35 | | | | 40 | | | | | | | | | |
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 93:
- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
- (A) ΜΗΚΟΣ: 182 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 93:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ile | Val | Pro | Thr | Leu | Gln | Asn | Ile | Val | Ser | Thr | Val | Asn | Leu |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Asp | Cys | Lys | Leu | Asp | Leu | Lys | Ala | Ile | Ala | Leu | Gln | Ala | Arg | Asn | Ala |
| | | | 20 | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
| Glu | Tyr | Asn | Pro | Lys | Arg | Phe | Ala | Ala | Val | Ile | Met | Arg | Ile | Arg | Glu |
| | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| Pro | Lys | Thr | Thr | Ala | Leu | Ile | Phe | Ala | Ser | Gly | Lys | Met | Val | Cys | Thr |
| | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| Gly | Ala | Lys | Ser | Glu | Asp | Phe | Ser | Lys | Met | Ala | Ala | Arg | Lys | Tyr | Ala |

65 70 75 80
Arg Ile Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Lys Asp Phe Lys
85 90 95
Ile Gln Asn Ile Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu
100 105 110
Glu Gly Leu Ala Tyr Ser His Ala Ala Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu
115 120 125
Leu Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Lys Val Pro Lys Ile Val Leu
130 135 140
Leu Ile Phe Val Ser Gly Lys Ile Val Ile Thr Gly Ala Lys Met Arg
145 150 155 160
Asp Glu Thr Tyr Lys Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Val Leu Ser Glu
165 170 175
Phe Arg Lys Ile Gln Gln
180

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 94:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 84 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 94:

Asn Ser Asn Ser Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr
1 5 10 15
Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr
20 25 30
Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys
35 40 45
Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln
50 55 60
Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly
65 70 75 80
Phe Met Ser Ile

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 95:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 84 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 95:

Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr
1 5 10 15
Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr
20 25 30
Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys
35 40 45
Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln
50 55 60
Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly
65 70 75 80
Phe Met Ser Ile

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 96:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 83 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 96:
 Ser Gly Asn Thr Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser
 1 5 10 15
 Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg
 20 25 30
 Asp Ile Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr
 35 40 45
 Gly Ile Leu Thr Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe
 50 55 60
 Leu Asn Thr Val Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr
 65 70 75 80
 Met Thr Met

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 97:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 84 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 97:
 Ser Gly Asn Thr Ala Pro Ile Val His Leu Lys Gly Glu Ser Asn Ser
 1 5 10 15
 Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Lys Glu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Met Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys Asn Ser Lys
 35 40 45
 Asn Gly Ile Val Thr Val Thr Phe Val Thr Glu Gln Gln Gln Met
 50 55 60
 Phe Leu Gly Thr Val Lys Ile Pro Pro Thr Val Gln Ile Ser Thr Gly
 65 70 75 80
 Phe Met Thr Leu

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 98:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 89 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 98:
 Ser Gly Asn Thr Ser Cys Phe Ala Leu Ile Ser Gly Thr Ala Asn Gln
 1 5 10 15
 Val Lys Cys Tyr Arg Phe Arg Val Lys Lys Asn His Arg His Arg Tyr
 20 25 30
 Glu Asn Cys Thr Thr Thr Trp Phe Thr Val Ala Asp Asn Gly Ala Glu
 35 40 45
 Arg Gln Gly Gln Ala Gln Ile Leu Ile Thr Phe Gly Ser Pro Ser Gln
 50 55 60
 Arg Gln Asp Phe Leu Lys His Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Asn Ile
 65 70 75 80
 Ser Gly Phe Thr Ala Ser Leu Asp Phe
 85

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 99:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 7 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: καρβοξυτελικό

- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 99:
Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala
1 5
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 100:
(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 4 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 100:
Asn Ser Asn Thr
1
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 101:
(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 4 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 101:
Ser Gly Asn Thr
1
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 102:
(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 6 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 102:
Ser Ser Gly Ser Ser Gly
1 5
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 103:
(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 15 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: εσωτερικό
(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 103:
Cys Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Lys Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg
1 5 10 15
- (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 104:
(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 66 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 104:
Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
 20 25 30
 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
 35 40 45
 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
 50 55 60
 Thr Ala
 65

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 105:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 66 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 105:

Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
 20 25 30
 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
 35 40 45
 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
 50 55 60
 Thr Ala
 65

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 106:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 66 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 106:

Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
 20 25 30
 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
 35 40 45
 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
 50 55 60
 Thr Ala
 65

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 107:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 96 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
 (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτιδίο
 (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
 (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
 (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
 (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 107:

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg
 1 5 10 15
 Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser
 20 25 30
 Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly
 35 40 45
 Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu

	50				55						60						
	Leu	Ala	Lys	Ile	Leu	Lys	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Phe	Ser	Pro	Ser	Ile	
65						70					75					80	
	Ala	Arg	Glu	Ile	Tyr	Glu	Met	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Met	Glu	Pro	Ser	
					85					90					95		

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 108:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 96 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πεπτίδιο
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 108:
- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Ser | Thr | Lys | Lys | Lys | Pro | Leu | Thr | Gln | Glu | Gln | Leu | Glu | Asp | Ala | Arg | | |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| Arg | Leu | Lys | Ala | Ile | Tyr | Glu | Lys | Lys | Lys | Asn | Glu | Leu | Gly | Leu | Ser | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | |
| Gln | Glu | Ser | Val | Ala | Asp | Lys | Met | Gly | Met | Gly | Gln | Ser | Gly | Val | Gly | | |
| | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | | | | |
| Ala | Leu | Phe | Asn | Gly | Ile | Asn | Ala | Leu | Asn | Ala | Tyr | Asn | Ala | Ala | Leu | | |
| 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | |
| Leu | Ala | Lys | Ile | Leu | Lys | Val | Ser | Val | Glu | Glu | Phe | Ser | Pro | Ser | Ile | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | |
| Ala | Arg | Glu | Ile | Tyr | Glu | Met | Cys | Glu | Ala | Val | Ser | Met | Glu | Pro | Ser | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | |

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 109:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 180 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
 (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 109:
- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|-----|
| Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys | Thr | Ser | Ile | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| Glu | Asn | Tyr | Cys | Asn | Met | Ser | Met | Glu | Gln | Arg | Ile | Thr | Leu | Lys | Asp | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | |
| Tyr | Ala | Met | Arg | Phe | Gly | Gln | Thr | Lys | Thr | Ala | Lys | Asp | Leu | Gly | Val | | |
| | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | | | | |
| Tyr | Gln | Ser | Ala | Ile | Asn | Lys | Ala | Ile | His | Ala | Gly | Arg | Lys | Ile | Phe | | |
| 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | |
| Leu | Thr | Ile | Asn | Ala | Asp | Gly | Ser | Val | Tyr | Ala | Glu | Glu | Val | Lys | Pro | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | | |
| Phe | Pro | Ser | Asn | Lys | Lys | Thr | Thr | Ala | Ser | Asn | Lys | Lys | Thr | Thr | Ala | | |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | | | 95 | | | |
| Asn | Ser | Asn | Thr | Thr | Pro | Ile | Val | His | Leu | Lys | Gly | Asp | Ala | Asn | Thr | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | 110 | | | | | |
| Leu | Lys | Cys | Leu | Arg | Tyr | Arg | Phe | Lys | Lys | His | Cys | Thr | Leu | Tyr | Thr | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | |
| Ala | Val | Ser | Ser | Thr | Trp | His | Trp | Thr | Gly | His | Asn | Val | Lys | His | Lys | | |
| | | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | |
| Ser | Ala | Ile | Val | Thr | Leu | Thr | Tyr | Asp | Ser | Glu | Trp | Gln | Arg | Asp | Gln | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | |
| Phe | Leu | Ser | Gln | Val | Lys | Ile | Pro | Lys | Thr | Ile | Thr | Val | Ser | Thr | Gly | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| Phe | Met | Ser | Ile | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | 180 |

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 110:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
 (A) ΜΗΚΟΣ: 113 αμινοξέα
 (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΑΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 110:

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu
1			5					10						15	
Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ser	Met	Glu	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp
			20					25					30		
Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val
		35					40					45			
Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe
		50				55					60				
Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro
65					70					75					80
Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala
				85					90						95
Cys	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	His	Arg	Ile	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys
			100					105							110
Thr															

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 111:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 292 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
(iv) ΑΝΤΙΠΑΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 111:

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

Arg Lys Thr Thr
290

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 112:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 273 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 112:
- Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Met Ser
20 25 30
Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
35 40 45
Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
50 55 60
Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
65 70 75 80
Ser Val Tyr Ala Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
85 90 95
Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys
100 105 110
Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr
115 120 125
Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe
130 135 140
Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu
145 150 155 160
Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys
165 170 175
Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg Ser Asp His Leu Ser Lys His
180 185 190
Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser
195 200 205
Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly
210 215 220
Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr Thr Asn Met Val Ala Met Glu
225 230 235 240
Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn
245 250 255
Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly
260 265 270
Phe

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 113:

- (i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 421 αμινοξέα
(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
- (ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein
- (iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ
- (iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ
- (v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό
- (xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 113:
- Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Ile
1 5 10 15
Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Met Ser Met Arg Gln Arg Ile Thr
20 25 30
Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln Thr Lys Thr Ala Lys Asp
35 40 45
Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys Ala Ile His Ala Gly Arg
50 55 60
Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly Ser Val Tyr Ala Glu Glu

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

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 114:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 391 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 114:

Met	Arg	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln
1				5					10					15	
Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys
			20					25					30		
Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly
		35				40						45			
Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro	Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr
		50				55					60				
Thr	Ala	Met	Ala	Glu	Asp	Pro	Tyr	Leu	Gly	Arg	Pro	Glu	Gln	Met	
65					70					75				80	
Phe	His	Leu	Asp	Pro	Ser	Leu	Thr	His	Thr	Ile	Phe	Asn	Pro	Glu	Val
				85					90					95	

Phe Gln Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln
 100 105 110
 Ile Leu Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys
 115 120 125
 Glu Gly Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Lys Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala
 145 150 155 160
 Lys Val Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His
 165 170 175
 Ala His Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val
 180 185 190
 Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile
 195 200 205
 Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met
 210 215 220
 Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro
 225 230 235 240
 Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly
 245 250 255
 Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys
 260 265 270
 Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro
 275 280 285
 Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp
 290 295 300
 Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val
 305 310 315 320
 Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr
 325 330 335
 Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser
 355 360 365
 Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys
 370 375 380
 Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 385 390

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 115:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 391 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ AP. 115:

Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
 20 25 30
 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
 35 40 45
 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
 50 55 60
 Thr Ala Met Ala Glu Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met
 65 70 75 80
 Phe His Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val
 85 90 95
 Phe Gln Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln
 100 105 110
 Ile Leu Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys
 115 120 125
 Glu Gly Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Lys Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala

```

145              150              155              160
Lys Val Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His
              165              170              175
Ala His Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val
              180              185              190
Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile
              195              200              205
Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met
              210              215              220
Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro
              225              230              235
Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly
              245              250              255
Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys
              260              265              270
Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro
              275              280              285
Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp
              290              295              300
Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val
              305              310              315
Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr
              325              330              335
Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr
              340              345              350
Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser
              355              360              365
Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys
              370              375              380
Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
              385              390

```

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 116:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 241 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 116:

```

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

```

Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn
 210 215 220
 Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly
 225 230 235 240
 Phe

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 117:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 10 ζεύγη βάσεων

(B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ

(C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ: 1/2

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: cDNA

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 117:

GGGAMTNYCC

10

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 118:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 72 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: protein

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΗ: ΟΧΙ

(v) ΤΥΠΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ: αμινοτελικό

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΡ. 118:

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr
 50 55 60
 His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln
 65 70

ΑΞΙΩΣΕΙΣ

1. Νουκλεϊκό οξύ ανιχνευτή (PNA) που περιλαμβάνει δύο διαφορετικές αλληλουχίες που είναι:
 - 5 (a) μονόκλωνη αλληλουχία ($\frac{1}{2}$ TBR) που είναι ικανή να σχηματίσει, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, υβρίδιο (TBP) με νουκλεϊκό οξύ στόχου (TNA), και
 - (b) μονόκλωνη αλληλουχία ($\frac{1}{2}$ TBR) που είναι ικανή να σχηματίσει, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, υβρίδιο (BBR) με μονόκλωνη αλληλουχία που υπάρχει σε ενισχυτικό νουκλεϊκό οξύ (BNA), όπου, αυτή η TBR είναι ικανή να δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια με ουσία (TBA) ικανή να διαφοροποιεί μεταξύ συζευγμένου υβριδίου (TBR) και υβριδίου που έχει ασύζευκτα νουκλεοτίδια, και όπου αυτή η BBR είναι ικανή να δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια με ουσία (BBA) ικανή να διαφοροποιεί μεταξύ συζευγμένου υβριδίου (BBR) και υβριδίου που έχει ασύζευκτα νουκλεοτίδια.
- 10 2. Το PNA της αξίωσης 1 όπου η TBR αποτελείται από μία ή περισσότερες θέσεις αναγνώρισης για πρωτεΐνη που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ, πρωτεΐνη που δεσμεύεται με DNA, πρωτεΐνη που δεσμεύεται με υβρίδιο DNA-RNA ή πρωτεΐνη που δεσμεύεται με RNA.
- 15 3. Το PNA της αξίωσης 2 όπου η TBR είναι θέση αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ που υπάρχει στο γονιδίωμα παθογόνου ή είναι θέση δέσμευσης που σχετίζεται με παθογόνο κατάσταση σε γονιδίωμα σπονδυλωτού ή είναι θέση αναγνώρισης πρωτεΐνης που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ που υπάρχει στο γονιδίωμα οργανισμού που μολύνει διαδικασία ζύμωσης.
- 20 4. Το PNA της αξίωσης 2 όπου η TBR είναι η HIV-LTR ή τμήμα αυτής.
- 25 5. Μέθοδος ανίχνευσης ή εντοπισμού ειδικής αλληλουχίας TNA, που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:
 - (a) υβριδοποίηση αυτού του TNA με το PNA της αξίωσης 1,
 - (b) υβριδοποίηση αυτού του PNA με BNA που περιέχει $\frac{1}{2}$ BBR της οποίας η αλληλουχία είναι συμπληρωματική αλληλουχίας $\frac{1}{2}$ BBR στο PNA,
 - (c) προσθήκη των προϊόντων σταδίων (a) και (b) που περιέχουν TBR και BBR σε επιφάνεια, υγρό ή άλλο μέσο που περιέχει TBA,
 - 30 (d) προσθήκη BBAs στο μείγμα του σταδίου (c) όπου αυτό το BBA περιλαμβάνει:
 - (i) μόριο ή τμήμα μορίου που είναι ικανό να δεσμεύεται επιλεκτικά με BBR,
 - (ii) ανιχνεύσιμο δείκτη, και
 - (e) ανίχνευση σήματος που παράγεται από τον δείκτη που είναι προσκολλημένος στο BBA.
- 35 6. Η μέθοδος της αξίωσης 5 όπου αυτός ο δείκτης είναι πρωτεΐνη, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων ικανών να καταλύουν αντιδράσεις που οδηγούν σε παραγωγή χρωματισμένων προϊόντων αντίδρασης, ραδιονουκλιδίου, χρωματιστών σφαιριδίων.
- 40 7. Μέθοδος *in vitro* ενίσχυσης του σήματος που αποκτάται μέσω δέσμευσης του PNA της αξίωσης 1 με TNA, που περιλαμβάνει δέσμευση BNAs στο υβρίδιο PNA-TNA, και δέσμευση σημασμένων BBAs στα BNAs.
- 45 8. Μέθοδος για ανίχνευση ή εντοπισμό ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων με υψηλό βαθμό ευαισθησίας και εξειδίκευσης που περιλαμβάνει:
 - (a) προσθήκη PNAs όπως ορίζονται στην αξίωση 1 που περιέχουν $\frac{1}{2}$ BBR και $\frac{1}{2}$ TBR, σε δείγμα που περιέχει ή πιθανολογείται ότι περιέχει TNAs που περιέχουν αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ TBR, για να σχηματιστεί σύμπλεγμα που έχει περιοχές δέσμευσης στόχου, TBRs, που σχηματίζονται με την υβριδοποίηση συμπληρωματικών $\frac{1}{2}$ TBRs που υπάρχουν στα PNAs και TNAs αντίστοιχα,

- (b) δέσμευση των TBRs που σχηματίζονται στο στάδιο (a) σε ακινητοποιημένο TBA για να σχηματιστεί σύμπλεγμα TBA-TNA-PNA,
- (c) προσθήκη Ενισχυτικών Νουκλεϊκών Οξέων, BNAs, που περιέχουν ενισχυτικές περιοχές δέσμευσης, $\frac{1}{2}$ BBRs, στο σύμπλεγμα που σχηματίζεται στο στάδιο (b) έτσι ώστε οι $\frac{1}{2}$ BBRs στα BNAs υβριδοποιούνται με τις αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ BBR που υπάρχουν στα PNAs ή με τις $\frac{1}{2}$ BBRs που υπάρχουν στα BNAs ήδη δεσμευμένα με το PNA, για να σχηματιστούν BBRs, έτσι ώστε σχηματίζονται συμπλέγματα TBA-TNA-PNA-(BNA)_n,
- (d) προσθήκη νουκλεϊκών οξέων φουρκετών, HNAs, που περιέχουν αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ BBR, στο σύμπλεγμα που σχηματίζεται στο στάδιο (c) έτσι ώστε οι $\frac{1}{2}$ BBRs στα HNAs υβριδοποιούνται με τις οποιοσδήποτε διαθέσιμες αλληλουχίες $\frac{1}{2}$ BBR που υπάρχουν στα BNAs του συμπλέγματος του σταδίου (c), καλύπτοντας (*capping*) κατ' αυτόν τον τρόπο την προέκταση των BNAs στα συμπλέγματα TBA-TNA-PNA-(BNA)_n του σταδίου (c) για να σχηματιστούν συμπλέγματα TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA,
- (e) Προσθήκη Ενισχυτικών Συγκροτημάτων Δέσμευσης, BBAs, συνδεδεμένων με τμήματα δείκτη, στα συμπλέγματα TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA που σχηματίζονται στο στάδιο (d) για να σχηματιστούν συμπλέγματα TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA, και
- (f) Ανίχνευση των σημάτων που παράγονται από τα τμήματα δείκτη συνδεδεμένα με τα TBAs, PNAs, BNAs, BBAs ή HNAs στα συμπλέγματα TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA του σταδίου (e),

όπου το TNA περιλαμβάνει:

- (i) μία ή περισσότερες ειδικές αλληλουχίες νουκλεϊκού οξέος $\frac{1}{2}$ TBR, η παρουσία ή απουσία των οποίων σε συγκεκριμένο δείγμα πρόκειται να επιβεβαιωθεί,

το BNA περιλαμβάνει:

- (i) $\frac{1}{2}$ BBR, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1(IIb), που έχει αλληλουχία που είναι συμπληρωματική αλληλουχίας $\frac{1}{2}$ BBR σε PNA και η οποία είναι ικανή να σχηματίζει, υπό συνθήκες υβριδοποίησης, υβρίδιο, BBR, με το PNA,
- (ii) OSA, που δεν είναι προσκολλημένο υποστήριγμα ή δείκτης ή προσκολλημένο υποστήριγμα ή άλλο μέσο εντοπισμού, που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, προσκόλληση σε σφαιρίδια, πολυμερή, και επιφάνειες, και/ή δείκτες,
- (iii) επιπρόσθετες θέσεις υβριδοποίησης, $\frac{1}{2}$ BBRs, για άλλα BNAs, και
- (iv) αλληλουχίες, $\frac{1}{2}$ BBRs, που μπορούν να υβριδοποιηθούν με BNAs ήδη υβριδοποιημένα με το PNA,

το BBA περιλαμβάνει:

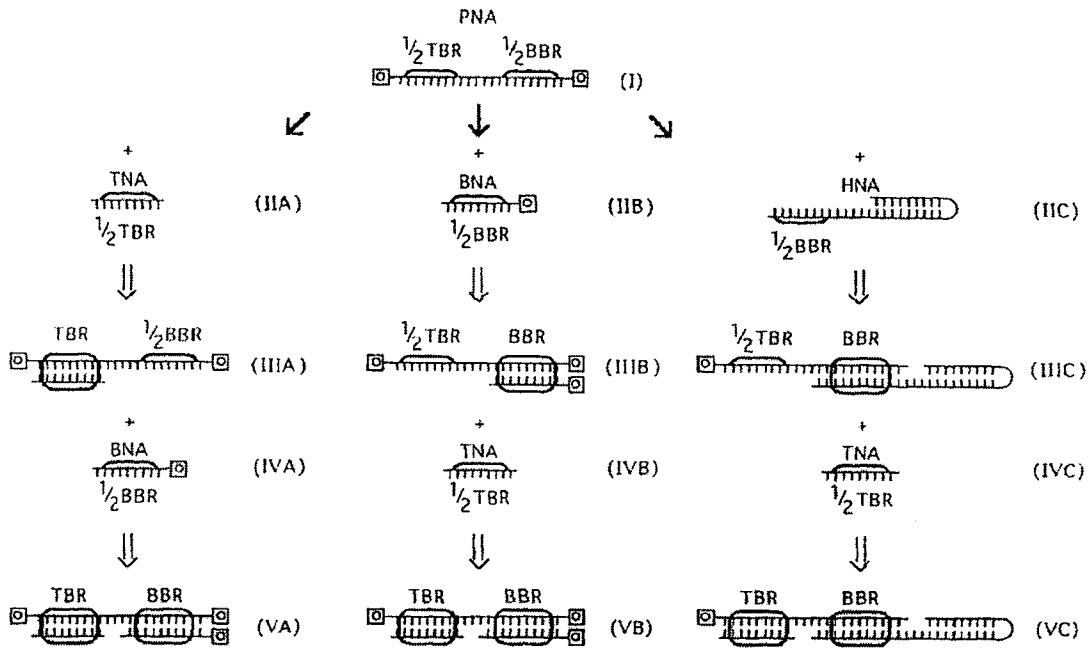
- (i) μόριο ή τμήμα μορίου που είναι ικανό να δεσμεύεται επιλεκτικά με BBR, και
- (ii) OSA, που δεν είναι προσκολλημένο υποστήριγμα και/ή δείκτης, ή προσκολλημένο υποστήριγμα ή άλλο μέσο εντοπισμού, που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, προσκόλληση σε σφαιρίδια, πολυμερή, και επιφάνειες, και/ή δείκτες,

και το TBA περιλαμβάνει:

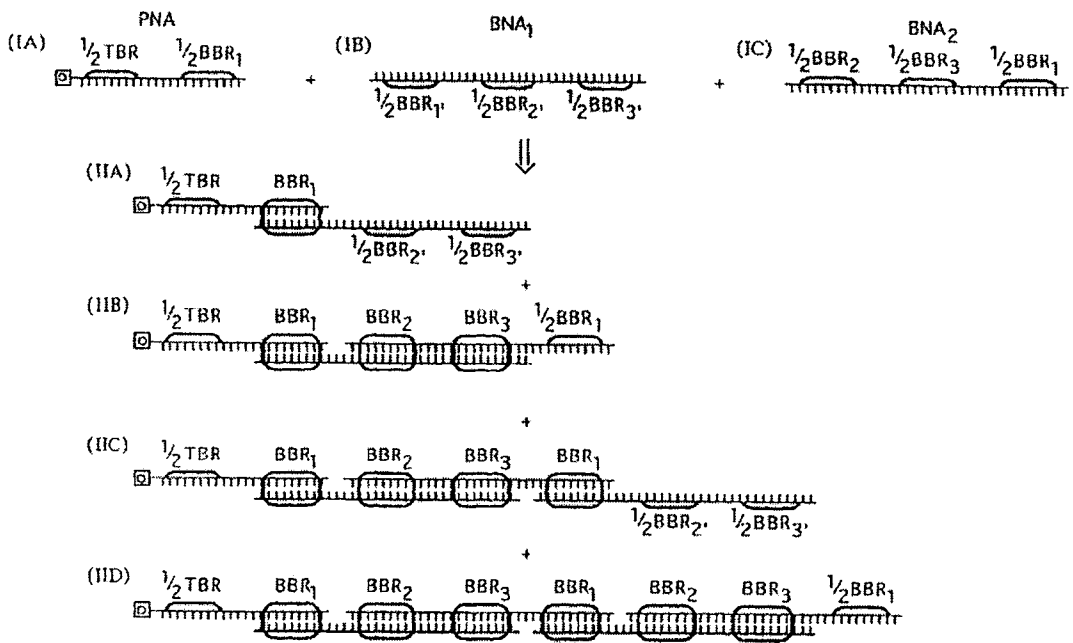
- (i) μόριο ή τμήμα μορίου που είναι ικανό να δεσμεύεται επιλεκτικά με TBR, και
- (ii) όχι προσκολλημένο υποστήριγμα και/ή δείκτη, ή προσκολλημένο υποστήριγμα ή άλλο μέσο εντοπισμού, που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, προσκόλληση σε σφαιρίδια, πολυμερή, και επιφάνειες, και/ή δείκτες.

9. Μέθοδος υβριδοποίησης στερεάς φάσης για ανίχνευση της παρουσίας πολυνουκλεοτιδίου-στόχου χρησιμοποιώντας PNA όπως ορίζεται στην αξίωση 1 που ενέχει: ακινητοποίηση πολυνουκλεοτιδίου-στόχου, εάν είναι παρόν σε δοκιμαστικό δείγμα, άμεσα ή μέσω ενδιάμεσης δομής σύλληψης, σε στερεά φάση σε θέση σύλληψης, προσκόλληση ανιχνεύσιμης σήμανσης σε αυτό το πολυνουκλεοτιδιο-στόχο, εάν είναι παρόν, πριν, κατά την διάρκεια ή μετά από αυτήν την ακινητοποίηση, και ανίχνευση αυτής της σήμανσης, εάν υπάρχει, σε αυτήν την θέση σύλληψης, όπου η ακινητοποίηση περιλαμβάνει χρήση συγκροτήματος δέσμευσης στόχου (TBA) που δεσμεύεται μόνο με μοναδικό υβρίδιο του νουκλεϊκού οξέος στόχου και νουκλεϊκού οξέος ανιχνευτή (PNA) που περιλαμβάνει ½ BBR ικανή να δεσμεύεται με ενισχυτικό νουκλεϊκό οξύ (BNA) που περιέχει μονόκλωνη συμπληρωματική ½ BBR η οποία, μετά από υβριδοποίηση με την ½ BBR στο PNA, σχηματίζει BBR ικανή να δεσμεύεται με σημασμένα ενισχυτικά συγκροτήματα δέσμευσης (BBAs), όπου οι όροι TBA, BNA, BBR και PNA είναι όπως ορίζονται στην αξίωση 1.
10. Διαγνωστικό ή ιατροδικαστικό κιτ δοκιμασίας για την ανίχνευση αλληλουχίας νουκλεϊκού οξέος στόχου σε δείγμα νουκλεϊκού οξέος, που περιλαμβάνει πρώτο και δεύτερο ανιχνευτή νουκλεϊκού οξέος και πρώτη και δεύτερη πρωτεΐνη που δεσμεύεται με νουκλεϊκό οξύ,
- όπου ο πρώτος ανιχνευτής έχει αλληλουχία συμπληρωματική της αλληλουχίας στόχου και επιπρόσθετη αλληλουχία,
- η πρώτη πρωτεΐνη δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος είναι ειδική για το πρώτο διπλό μόριο ανιχνευτή-στόχου,
- ο δεύτερος ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός της επιπρόσθετης αλληλουχίας στον πρώτο ανιχνευτή, και
- η δεύτερη πρωτεΐνη δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος δεσμεύεται ειδικά με το διπλό μόριο πρώτου ανιχνευτή-δεύτερου ανιχνευτή, και είναι σημασμένη με ανιχνεύσιμη σήμανση.
11. Το κιτ της αξίωσης 10, όπου ο πρώτος ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός της HIV LTR και, με την υβριδοποίηση του πρώτου ανιχνευτή με HIV LTR, σχηματίζεται θέση δέσμευσης για NF-kB ή υπομονάδα αυτού, για SP1, πρωτεΐνη που δεσμεύεται με TATA, Ανιχνευτή HIV I, II, III ή IV, ή HIV-Lock.
12. Το κιτ της αξίωσης 11, όπου η πρώτη δεσμευτική πρωτεΐνη είναι NF-kB ή υπομονάδα αυτής, SP1, πρωτεΐνη που δεσμεύεται με TATA, Ανιχνευτής HIV I, II, III ή IV, ή HIV-Lock.
13. Το κιτ της οποιασδήποτε αξίωσης από 10 έως 12, όπου ο πρώτος ανιχνευτής, εκτός του ότι είναι συμπληρωματικός της HIV LTR, περιλαμβάνει αλληλουχία που κωδικοποιεί τον αριστερό ή δεξιό χειριστή βακτηριοφάγου λάμδα, και ο δεύτερος ανιχνευτής περιλαμβάνει αλληλουχία συμπληρωματική αυτής της αλληλουχίας αριστερού ή δεξιού χειριστή βακτηριοφάγου λάμδα, έτσι ώστε, με υβριδοποίηση του πρώτου και δεύτερου ανιχνευτή, σχηματίζεται θέση δέσμευσης για την πρωτεΐνη-καταστολέα CI βακτηριοφάγου λάμδα, την πρωτεΐνη *cro* βακτηριοφάγου λάμδα ή παράγωγο ή ομόλογο αυτών.
14. Το κιτ της αξίωσης 13, όπου η δεύτερη δεσμευτική πρωτεΐνη είναι η πρωτεΐνη-καταστολέας CI βακτηριοφάγου λάμδα, η πρωτεΐνη *cro* βακτηριοφάγου λάμδα ή παράγωγο ή ομόλογο αυτών.

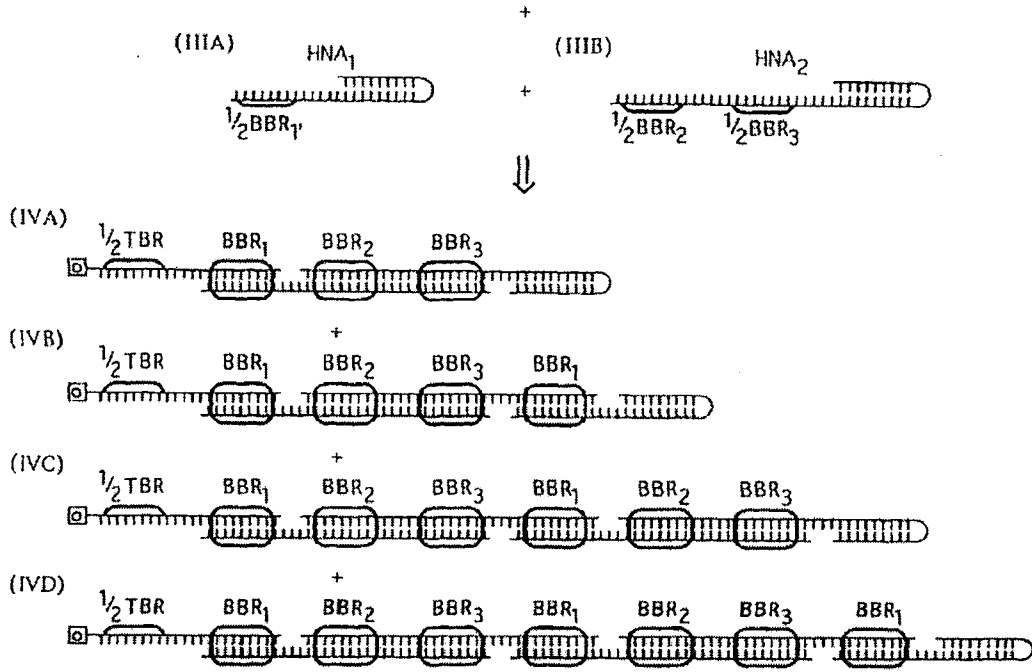
EIKONA 1



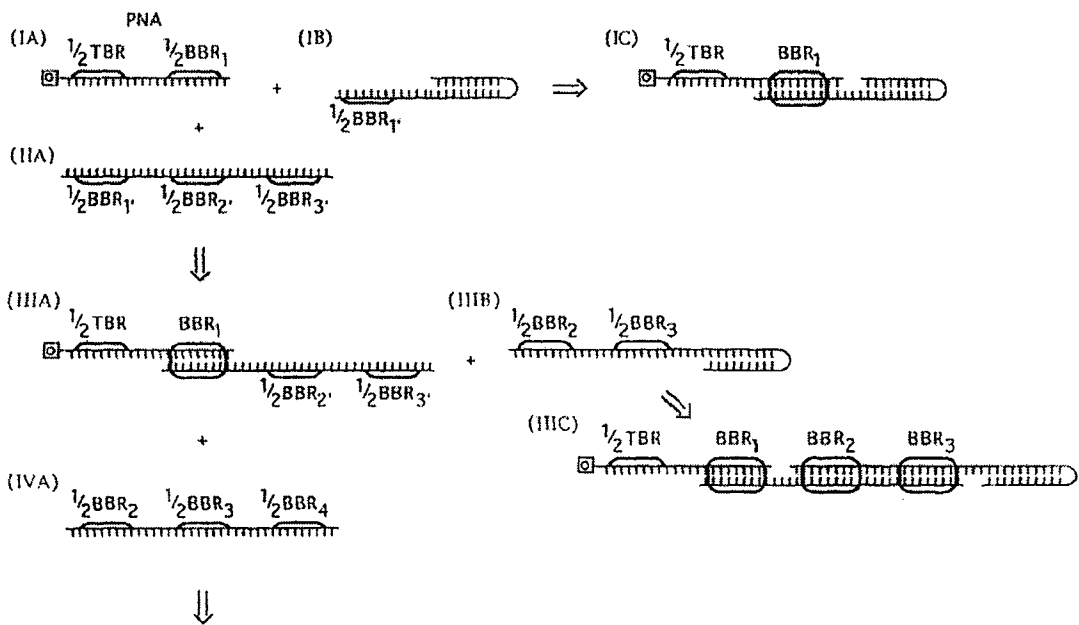
EIKONA 2A



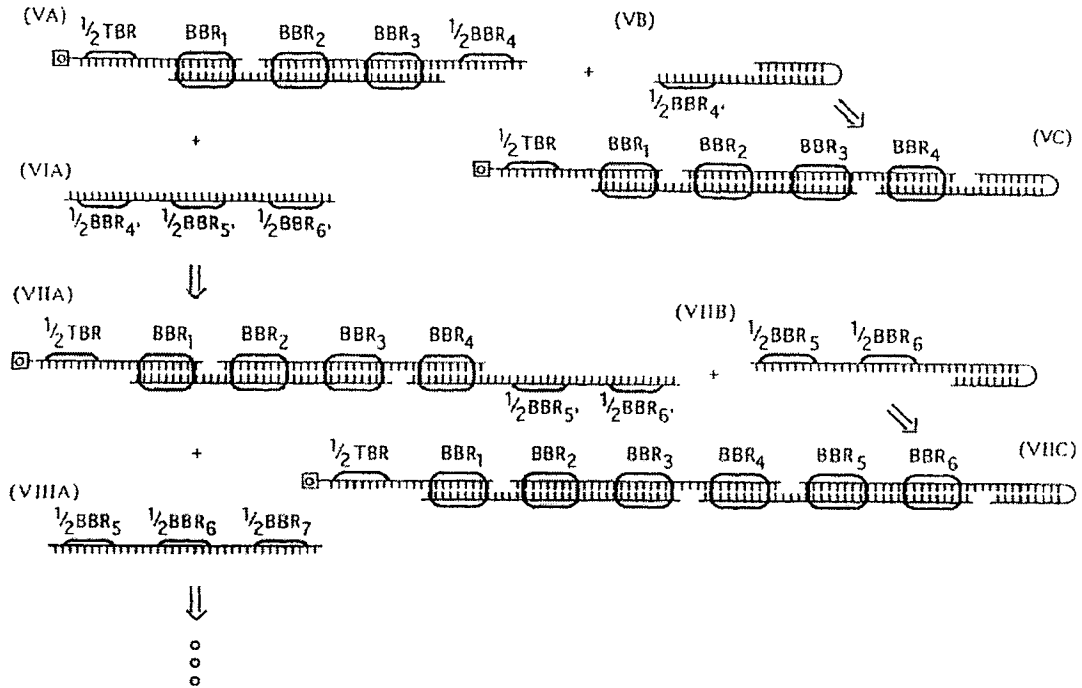
EIKONA 2B



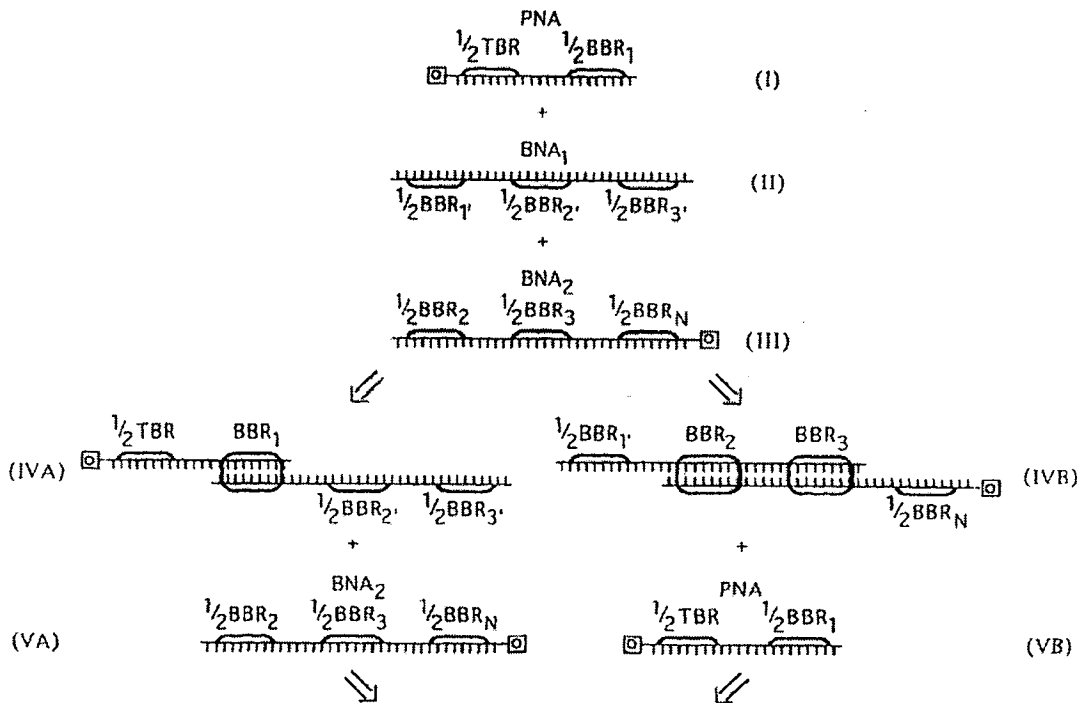
EIKONA 2C



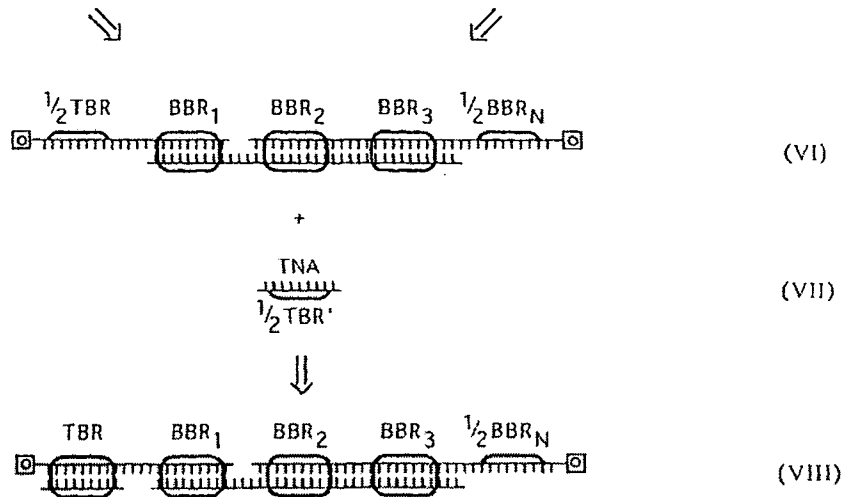
EIKONA 2D



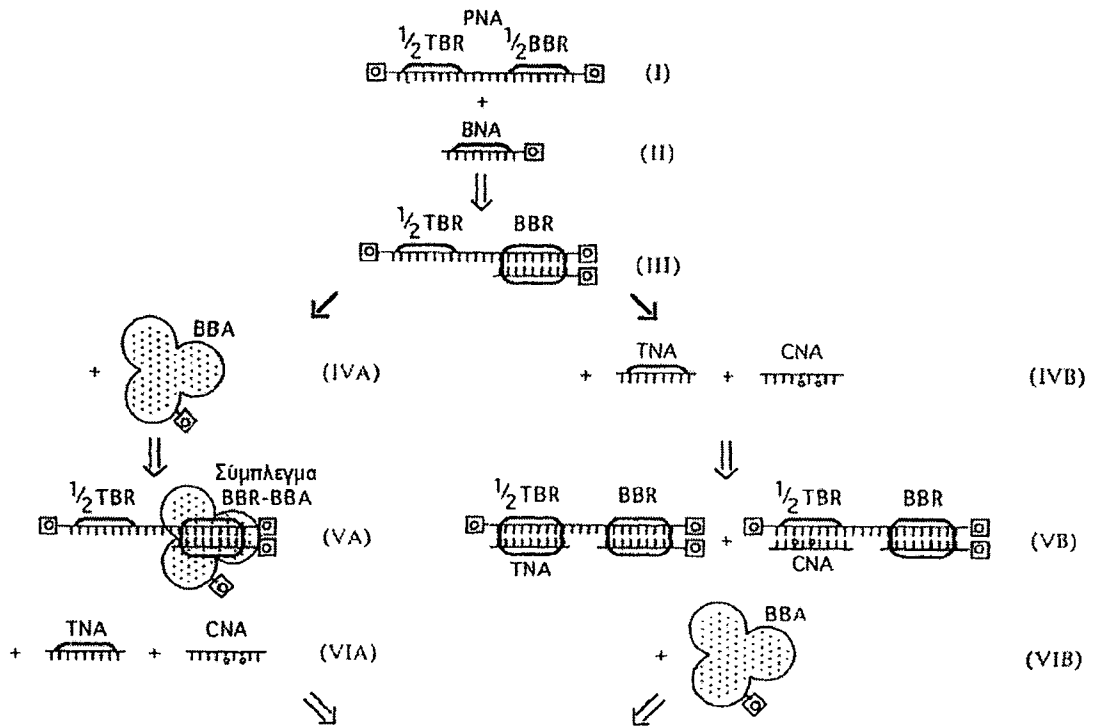
EIKONA 3A



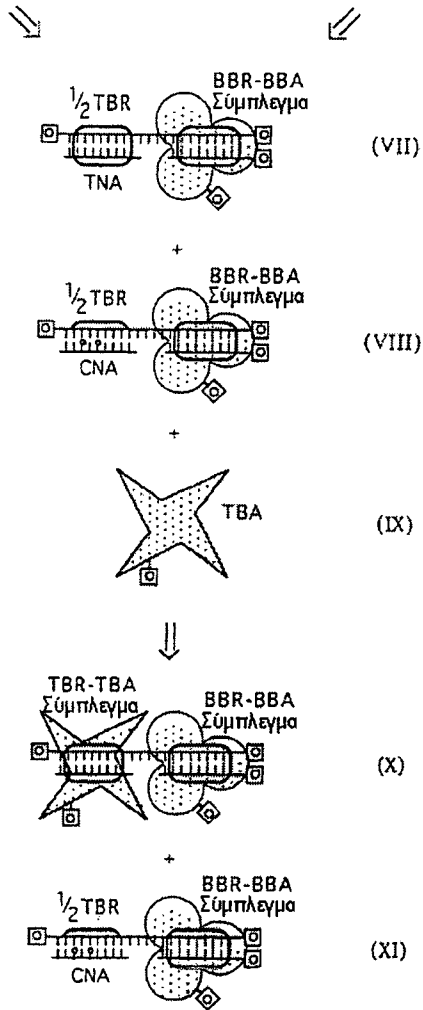
EIKONA 3B



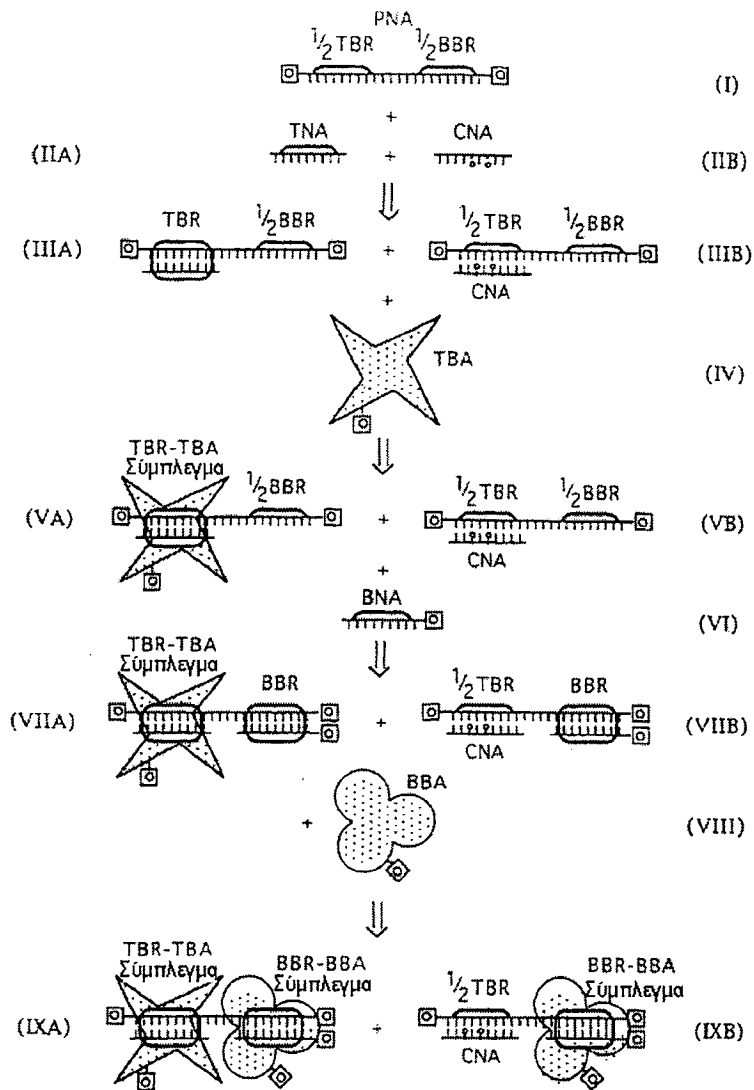
EIKONA 4A



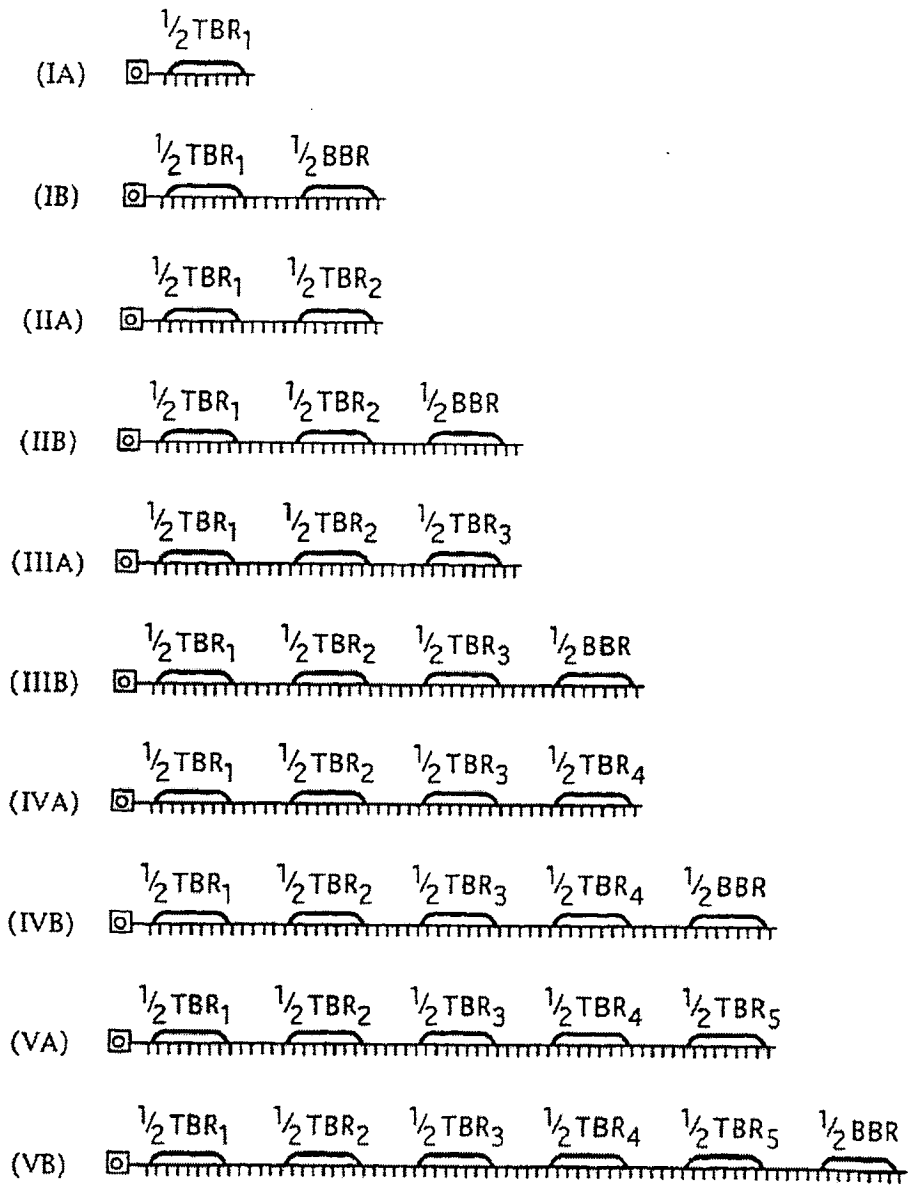
EIKONA 4B



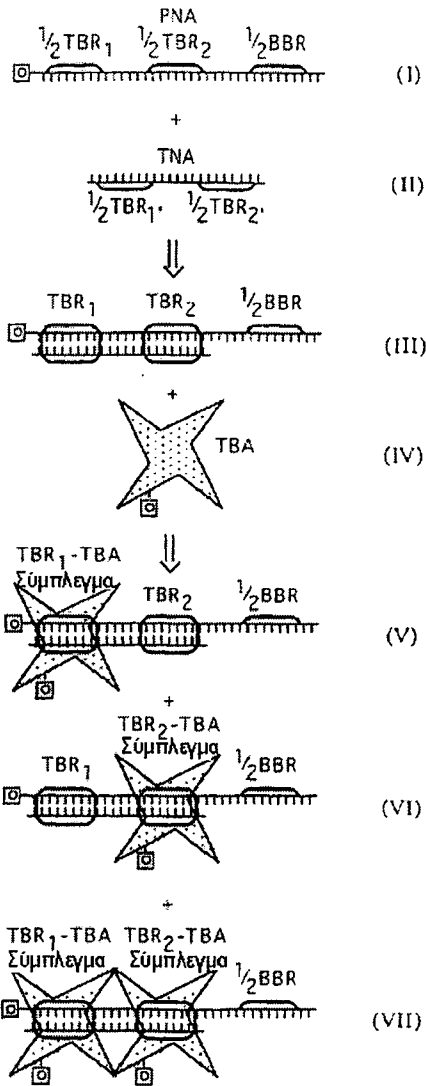
EIKONA4C



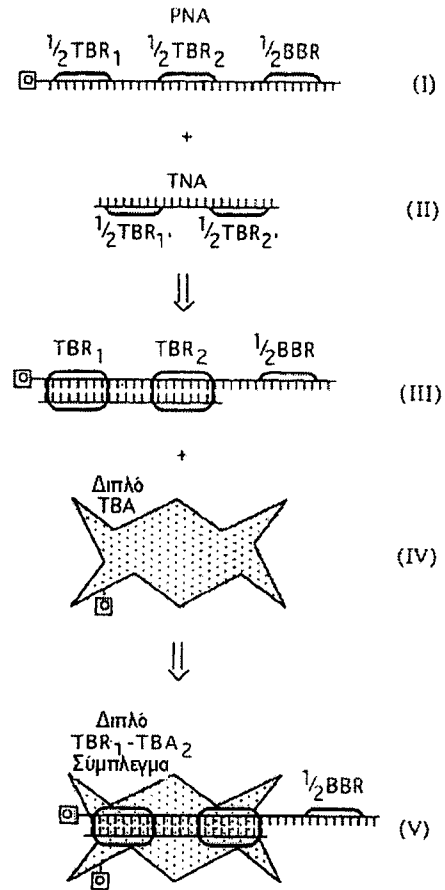
EIKONA 5



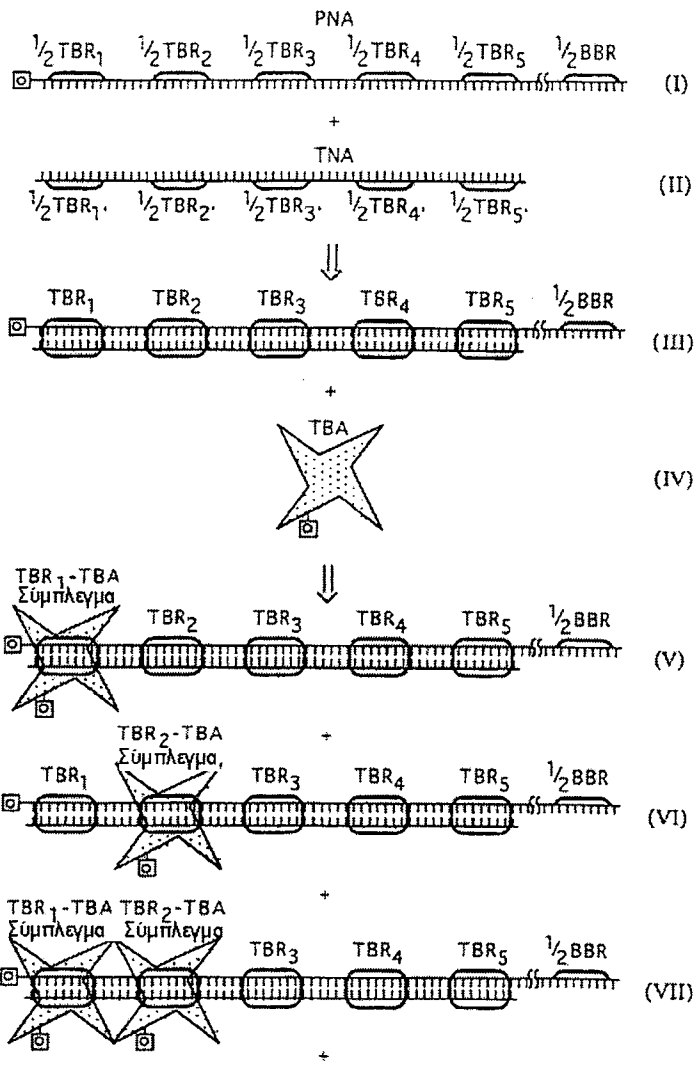
EIKONA 6A



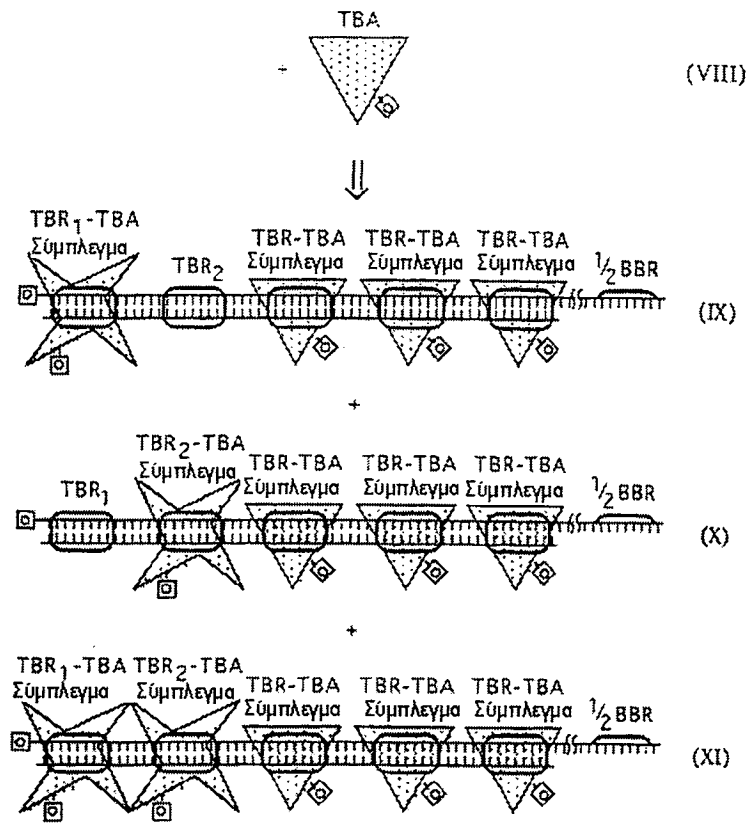
EIKONA 6B



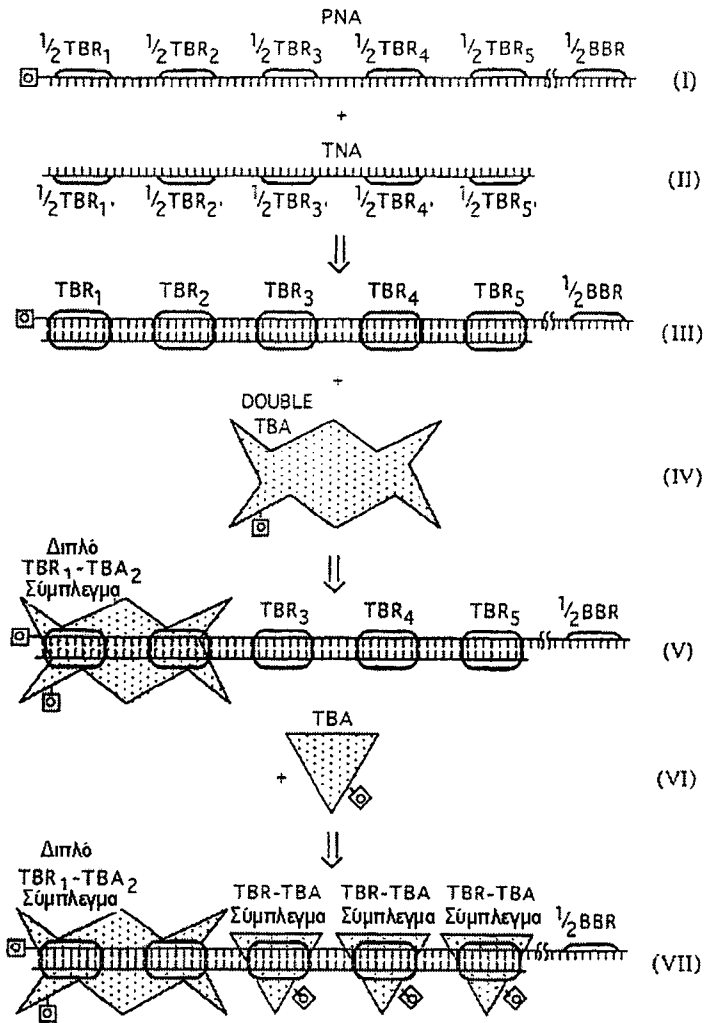
EIKONA 6C



EIKONA 6D



EIKONA 6E



EIKONA 7

Αλληλουχία αρ. 37:

```

12345678901234567890123456789012345678901234567890
CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGGCTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC
+++++=====
NF-kB      NF-kB      SP1      SP1      SP1

```

Κιτ τεστ HIV PNA1 (+++ από ανωτέρω), αλληλουχία αρ. 38:

CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGG

Κιτ τεστ HIV PNA2 (=== από ανωτέρω), αλληλουχία αρ. 39:

###CGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC###

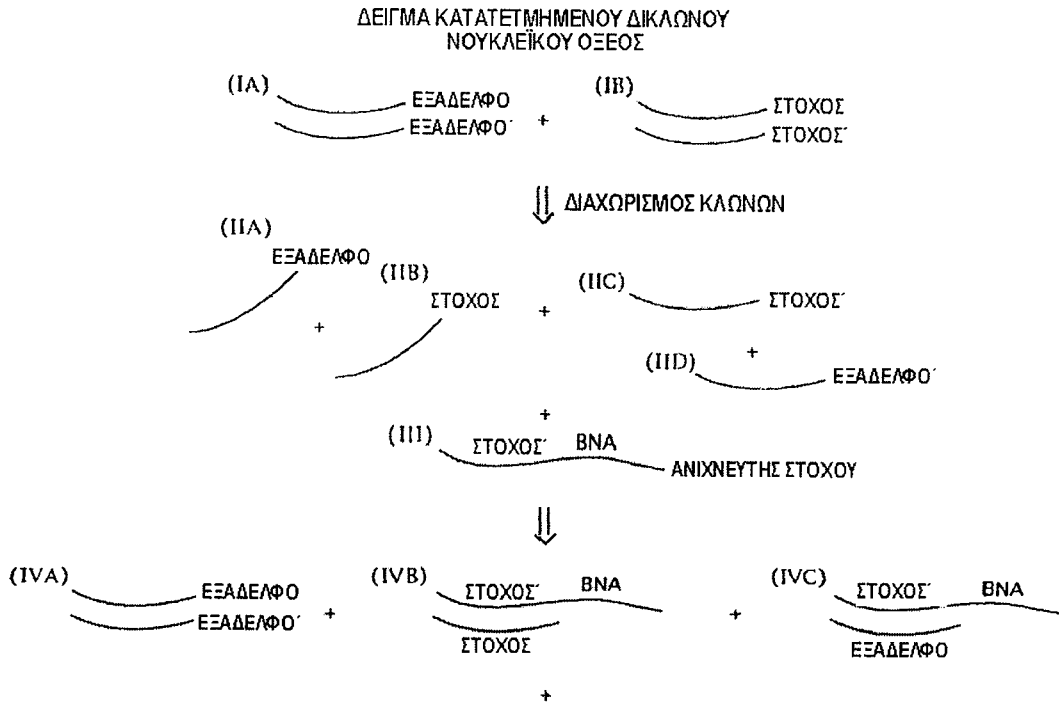
Η αλληλουχία με κολλώδες άκρο σε PNA2 είναι συμπληρωματική ενός άκρου του χαριστή DNA που σχηματίζεται από:

###0L1-0L2-0L3
0L1'-0L2'-0L3'***

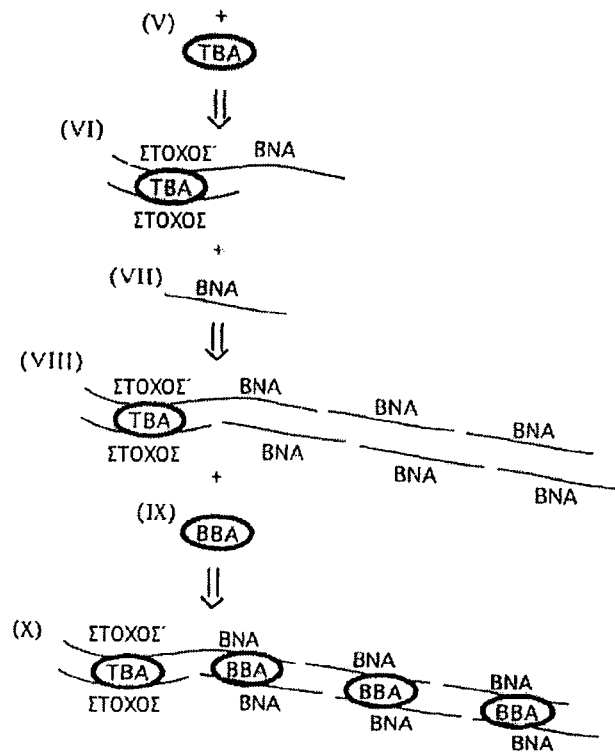
ή

###OR3-OR2-OR1
OR3'-OR2'-OR1'***

ΕΙΚΟΝΑ 8Α

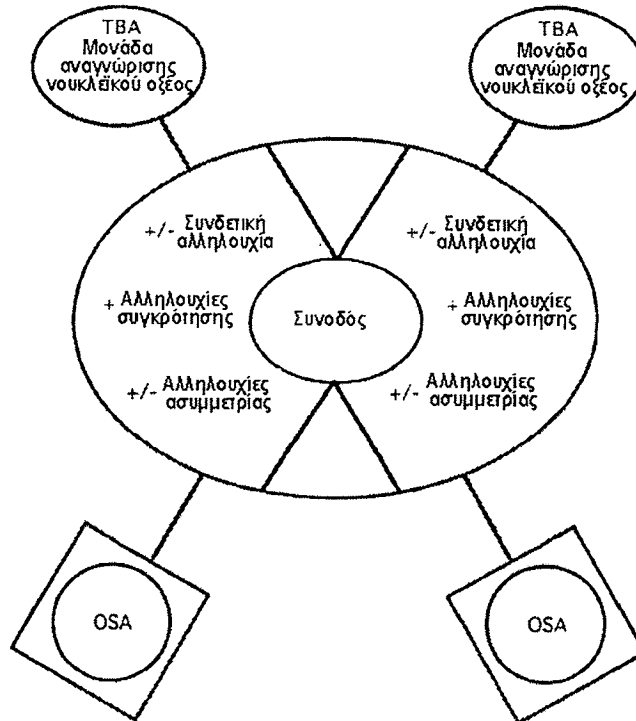


ΕΙΚΟΝΑ 8Β

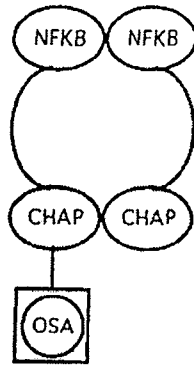


ΕΙΚΟΝΑ 9

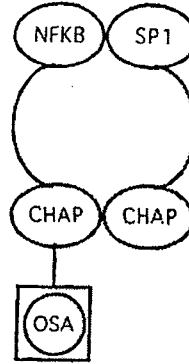
ΤΒΑ: ΣΥΓΚΡΟΤΗΜΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΣΤΟΧΟΥ



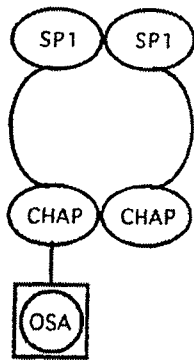
EIKONA 10



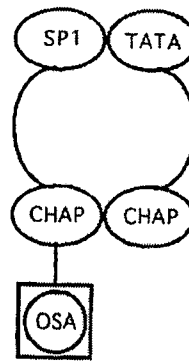
HIV-DETECT I
(Ανιχνευτής HIV I)



HIV-DETECT II
(Ανιχνευτής HIV II)

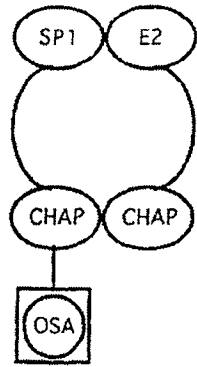


HIV-DETECT III
(Ανιχνευτής HIV III)

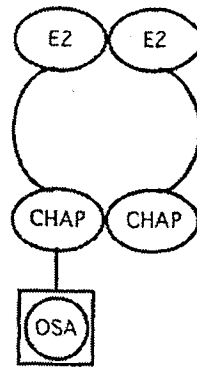


HIV-DETECT IV
(Ανιχνευτής HIV IV)

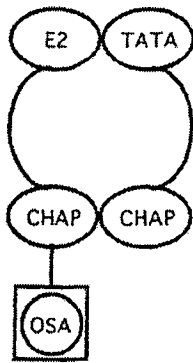
EIKONA 11



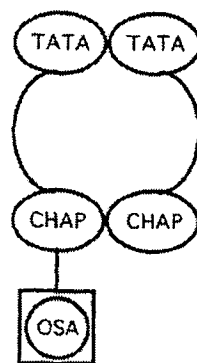
HPV-DETECT I
(Ανιχνευτής HPV I)



HPV-DETECT II
(Ανιχνευτής HPV II)

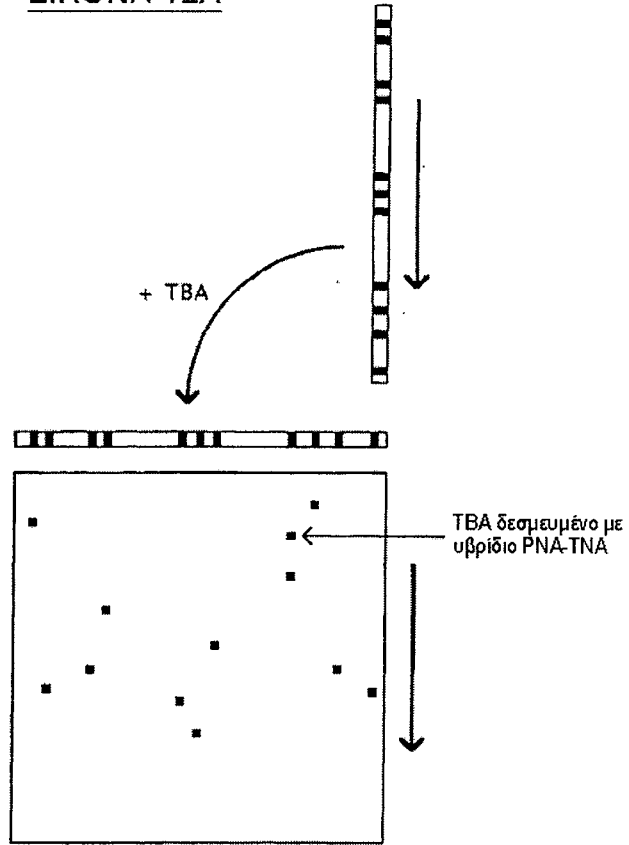


HPV-DETECT III
(Ανιχνευτής HPV III)

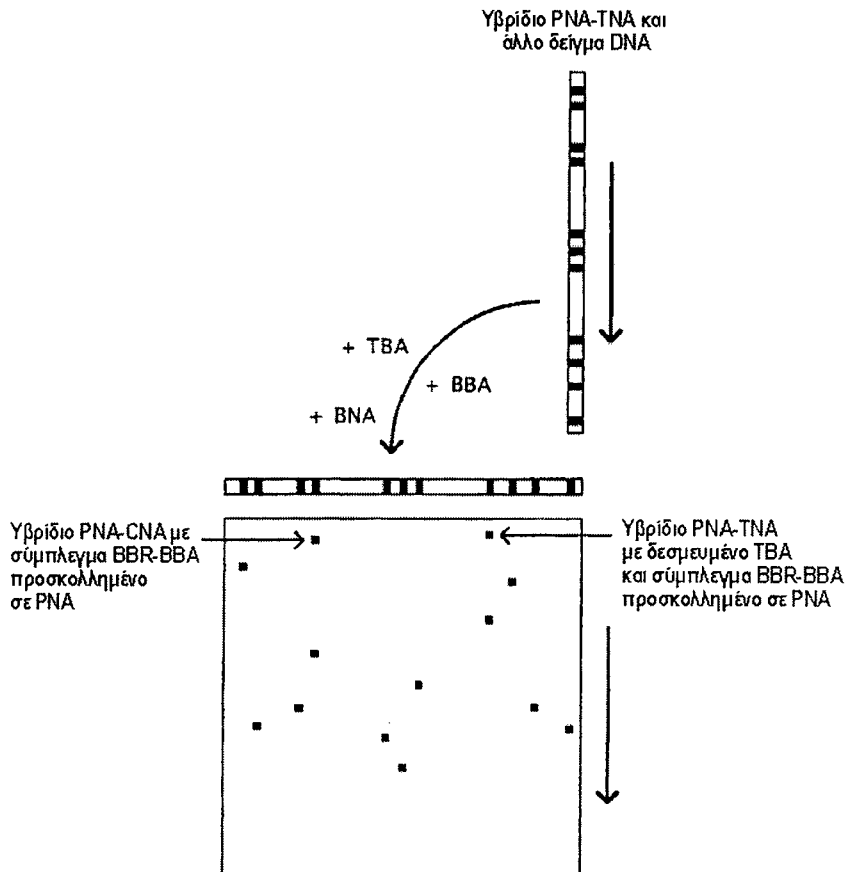


HPV-DETECT IV
(Ανιχνευτής HPV IV)

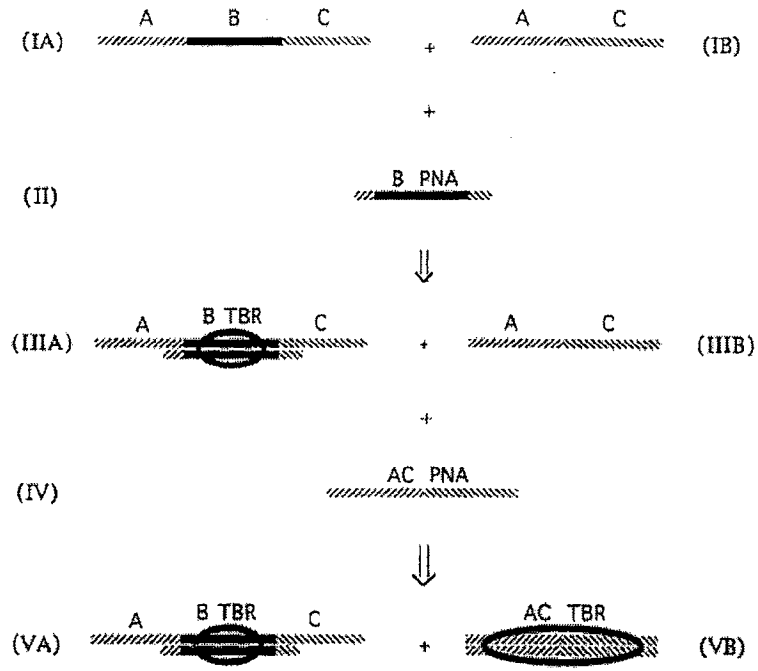
ΕΙΚΟΝΑ 12Α

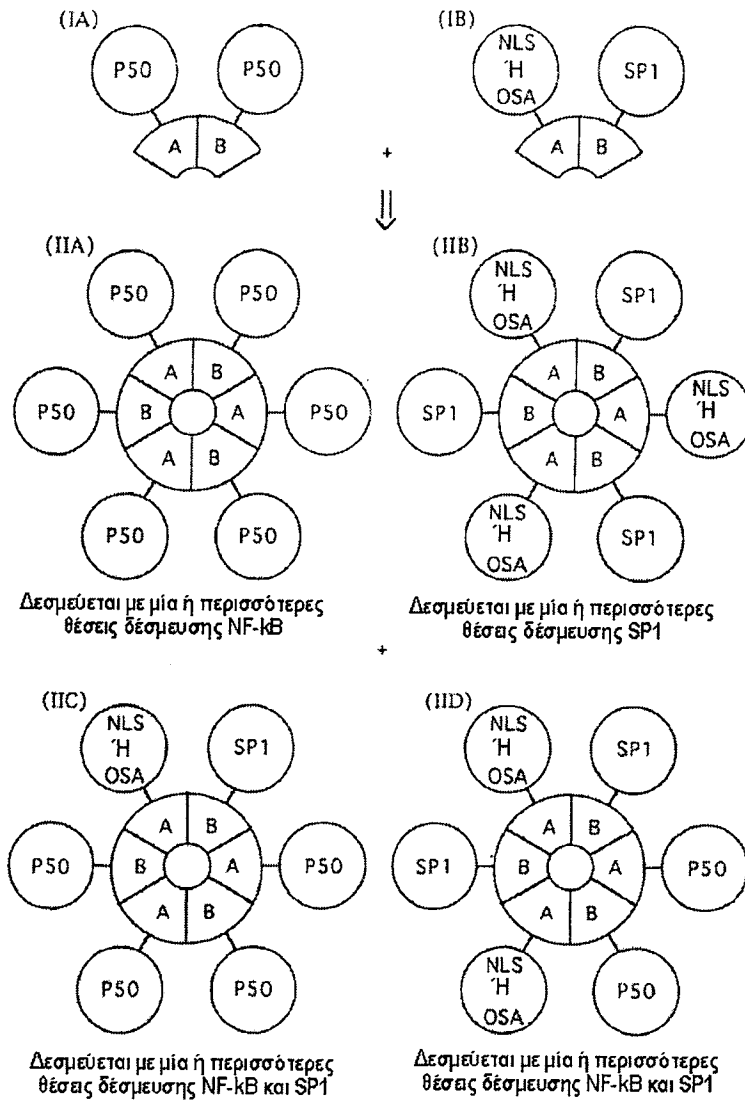


ΕΙΚΟΝΑ 12Β

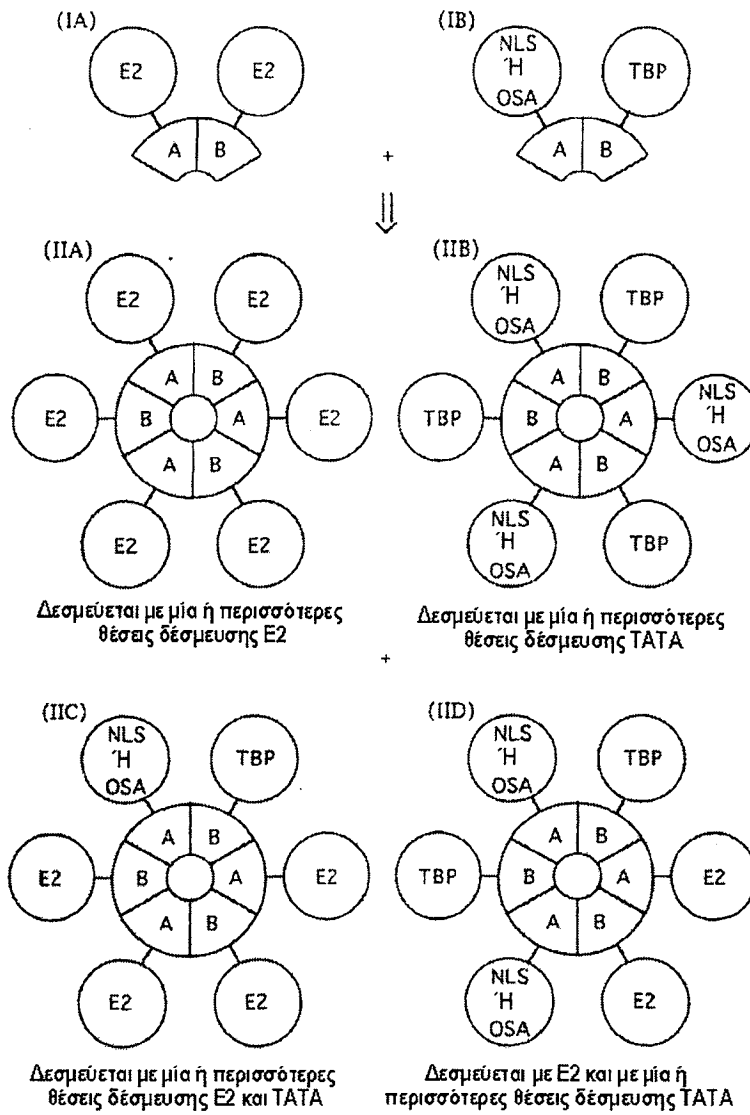


EIKONA 13

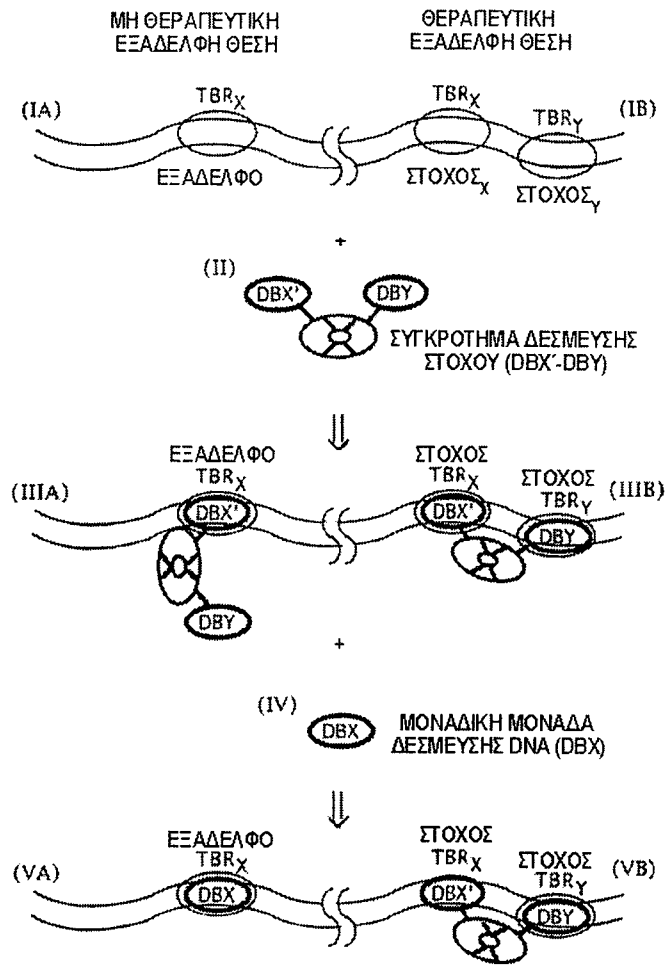


EIKONA 14

EIKONA 15



ΕΙΚΟΝΑ 16



ΕΙΚΟΝΑ 17

