# A malaria sporozoite surface antigen distinct from the circumsporozoite protein

R.C. Hedstrom,<sup>1,2</sup> J.R. Campbell,<sup>1,3</sup> M.L. Leef,<sup>1</sup> Y. Charoenvit,<sup>1</sup> M. Carter,<sup>4</sup> M. Sedegah,<sup>1</sup> R.L. Beaudoin,<sup>1</sup> & S.L. Hoffman<sup>1</sup>

Monoclonal antibody NYS4 recognizes a single 140 kDa antigen on the surface of Plasmodium yoelii sporozoites, an antigen which is distinct from the extensively characterized circumsporozoite (CS) protein. To more thoroughly characterize this additional surface component, a genomic expression library was screened with NYS4 and an immunoreactive clone (M4) was obtained which expressed part of the antigen gene. The deduced amino acid sequence of the M4 peptide included two unique repetitive sequences of amino acids and a conserved sequence motif which is found in several proteins including the CS protein (region II). The cloned DNA hybridized to a PCR (polymerase chain reaction) amplified sporozoite mRNA demonstrating the sporozoite-stage expression of this gene. A synthetic peptide of one of the repeats, (Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser), was recognized by NYS4 and mice immunized with (Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser)<sub>3</sub> conjugated to KLH (keyhole limpet haemocyanin) produced high levels of antibodies that reacted with the surface of sporozoites and specifically to the 140 kDa antigen. Thus, at least two different proteins are on the surface of the P. yoelii sporozoite indicating that the immunoreactive exterior of the infective stage of malaria parasites is more antigenically complex than previously thought.

# Introduction

The sporozoite of *Plasmodium* is uniformly covered by a proteinaceous membrane coat which is thought to be composed entirely of the circumsporozoite (CS) protein (1, 2). Being the first parasite molecule encountered by the host, the CS protein has been intensively studied and evaluated as a vaccine against malaria. Indeed, experimental immunization with radiation-attenuated sporozoites induces solid protective immunity (3-5) coincident with the stimulation of both cellular and humoral immunological responses to the CS protein (6, 7). An emerging view is that an essential feature of the protective response induced by sporozoites is cellular immunity (4-9). If this is correct, then a multicomponent vaccine containing additional pre-erythrocytic stage antigens may be required to induce sterilizing immunity in all individuals, since those regions of the CS protein that are the immunodominant determinants of T-cell responses are also the most variable in amino acid sequence from parasite to parasite (10-12).

The search for additional antigens by Charoenvit et al. led to the production of several monoclonal

antibodies that recognize sporozoite determinants which are distinct from the CS protein (13). One of these antibodies, designated NYS4 (Navy Yoelii Sporozoite 4), recognizes a sporozoite-specific 140 kDa antigen. This antigen is expressed on the surface of live sporozoites and is secreted along with the CS protein *in vitro* (unpublished results). Wortman et al. used this antibody to isolate an antigen-expressing clone from a *P. yoelii* genomic expression library (14). Here we describe the cloning and characterization of a portion of the gene encoding the 140 kDa antigen and identify a hexapeptide of this protein that is a B-cell epitope on sporozoites.

# Materials and methods

**Parasites and DNA isolation.** P. yoelii 17 X (NL) parasites were obtained by blood passage in Balb/C mice. DNA isolation from parasite infected blood was performed, as described (14).

Genomic expression library and immunoselection. A P. yoelii genomic expression library was constructed using 0.5–2.0 kb fragments generated by partial DNase I digestion and commercial (Promega, Madison, WI) lambda gt11 arms and packaging extracts (15). The library was screened for antigen expressing clones with a 1:20 dilution of NYS4 (13) hybridoma culture supernatant, as described previously (16–18). NYS4 immunoreactive plaques were detected with a commercially prepared antibody detection kit

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Malaria Program, Infectious Diseases Department, Naval Medical Research Institute, Bethesda, MD 20814-5055, USA. Correspondence should be sent to Dr S.L. Hoffman at this address.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> U.S. Naval Medical Research Unit 3, Cairo, Egypt.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Naval Research Laboratory, Washington, DC, USA.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Department of Immunology, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, DC, USA.

Fig. 1 (a). Nucleotide sequence and derived amino acid sequence of a portion of the *P. yoelli* genomic DNA insert in lambda gMSY-4 (M4). The sequences of oligonucleotide primers (+) and (-) used for PCR amplification are indicated.

															14	L)		~		
ССТ	TTT	CTT	ACT	222	GTT	TGT	CAG	GAA	GTA	GAA	AGA	ATT	GCT	CAT	TGT	GGA	222	TGG	GAA	60
P	F	L	T	K	v	C	Q	E	V	E	R	I	λ	H	С	G	K	W	E	
							-													
GAA	TGG	AGT	GAA	TGT	TCT	ACT	ACT	TGT	GAT	GAA	GGA	λGλ	λλλ	ATT	λgλ	λgλ	λgλ	CYY	XTX	120
E	W	8	E	С	8	T	T	С	D	E	G	R	K	I	R	R	R	Q	I	
								_	_	_										
TTA	CAT	CCT	GGA	TGT	GTT	AGT	GYC	ATG	ACT	ACT	CCY	TGT	AAG	GTT	CGT	GAT	TGC	CCY	CAA	180
L	H	P	G	С	V	8	E	M	T	T	P	С	ĸ	v	R	D	С	P	Q	
																		~ ~ ~		
ATA	CCA	ATA	CCT	CCT	GTC	ATC	CCT	AAT	~~~	ATT	CCA	GAA	AAG	CCA	TCA	AAC	CCA	GAA	GAA	240
I	P	I	P	P	v	I	P	N	K	I		E.	N N N		8	M	*	Б	6	
003	073	330	003	330	<b>63T</b>	003	110	() T		330	330	CC)	X5PI	SATO-	CC3	337	330	CC3	220	300
207	U GIN	N	D	N	GAT D	P	N	571	D	N	N	D	N	N	P	N	N	P	N N	500
•	•		-		2	-		2	-		••	•	-	••	•			-	-	
220	CCA	AAC	AAC	CCA	AAT	AAC	CCA	AAC	AAC	CCA	AAC	AAC	CCA	AAC	AAC	CCA	AAC	AAC	CCA	360
N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	
	-			-			-													
AAC	: AAT	CCA	AAT	AAC	CCA	AAT	AAC	CCA	AAC	AAC	CCA	λλτ	AAC	CCA	AAT	AAC	CCA	AAC	АЛС	420
N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	
											>3	-MER	REP	EATS-						
CCI	AAT	AAC	CCA	AAC	AAC	CCA	λλт	<b>AAC</b>	CCA	AAT	AAC	CCA	λλτ	AAC	CCA	AAT	AAC	CCA	AAC	480
P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	P	N	
GAT	CCA	TCA	AAC	CCA	ЛЛC	AAC	CYC	CCA	λγγ	λgg	CGA	<b>XXC</b>	CCY	хуу	λgg	CGA	AAC	CCY	AAC	540
D	P	8	N	P	N	N	H	P	K	R	R	N	P	K	R	R	N	P	N	
														6-MEI	R REI	PEAT	REG	ION-	>	
XXC	CCY		CCY	AAC	λλG	CCA	AAC	CCY	AAC	AAG	CCY	AAC	CCA	AAC	GAA	CCY	TCA	AAC	CCY	600
K	P	K	P	N	K	P	N	P	N	K	P	N	P	N	E	P	8	N	P	
<b>XX</b>	. YYG	CCA	AAC	CCN	AAC	GAA	CCA	TCA	AAC	CCY	AAC	AAG	CCA	AAC	CCA	AAC	GAA	CCA	TCA	660
N	K	P	N	P	N	E	P	8	N	P	N	K	P	N	P	N	E	Р	8	
															~~~		~~~		~~~	
<b>XX</b>	CCA	AAC	AAG	CCA	330	~~.		~ ~ ~ ~				CCA	AAC	A A (;	CCA	AAC	CCA	<b>VUL</b>	GAG	/20
	_				AAC	CCA	~~	GAG	CCA	TCA	AAC						-			
N	P	N	K	P	N	P	N	E	P	8	N	P	N	ĸ	P	N	P	N	E	
N	P	N	K	P	N	P	N	E	P	8	N	P	N	K	P	N	P	N	E	780
N CC1	Р • <b>ТТ</b> А	N AAC	K	P AAC	N GAG	P	N TCA	E AAT	P	S AAC	N GAG	P	N TCA	K AAC	P	N AAT	P GCG	N CCA	E TCA	780
N CCI P	P A TTA L	N AAC N	K CCA P	P AAC N	N GAG E	P CCA P	N TCA 8	E AAT N	P CCA P	ANC N	N GAG E	P CCA P	N TCA 8	K AAC N	P CCA P	N AAT N	P GCG A	N CCA P	E TCA S	780
N CCI P	P TTA L	N AAC N	K CCA P	P AAC N	N GAG E	P CCA P	N TCA 8	E AAT N	P CCA P	S AAC N	N GAG E	P CCA P	N TCA B	K AAC N	P CCA P	N AAT N	P GCG A	N CCA P	E TCA S	780
N CCI P AA	P TTA L C CCA	N AAC N AAC	к Ссл Р Слл	P AAC N CCA	N GAG E TCA	ССА Р ССА Р ААС	N TCA B CCA	E AAT N AAT	CCA P CCA P GAA	ANC N CCA	N GAG E TCA	Р ССА Р ААС	N TCA B CCA	K AAC N AAT	P CCA P GAG	N AAT N CCA	P GCG A TCA	N CCA P AAC	E TCA S CCA	780 840
N CCI P AAG N	P TTA L C CCA P	N AAC N AAC N	K CCA P GAA E	P AAC N CCA P	N GAG E TCA 8	P CCA P AAC N	N TCA B CCA P	E AAT N AAT N	CCA P CCA P GAA E	B AAC N CCA P	N GAG E TCA 8	P CCA P AAC N	N TCA 8 CCA P	K AAC N AAT N	P CCA P GAG E	N AAT N CCA P	P GCG A TCA B	N CCA P AAC N	E TCA S CCA P	780 840
N CCI P AAG N	P TTA L CCA P	N AAC N AAC N	K CCA P GAA E	P AAC N CCA P	N GAG E TCA B	P CCA P AAC N	N TCA B CCA P	E AAT N AAT N	CCA P CCA P GAA E	B AAC N CCA P	N GAG E TCA S	P CCA P AAC N	N TCA B CCA P	K AAC N AAT	P CCA P GAG E	N AAT N CCA P	P GCG A TCA 8	N CCA P AAC N	E TCA S CCA P	780 840
N CCJ P AA( N AA(	P TTA L C CCA P C GAA	N AAC N AAC N CCA	K CCA P GAA E TCA	Р ААС N ССА Р ААС	N GAG E TCA B CCA	P CCA P AAC N AAT	N TCA 8 CCA P GAA	E AAT N AAT N CCA	CCA P CCA P GAA E TCA	1СА 8 ААС N ССА P ААС	N GAG E TCA 8 CCA	Р ССА Р ААС N ААА	N TCA B CCA P AAG	K AAC N AAT N CCA	P CCA P GAG E TCA	N AAT N CCA P AAC	P GCG A TCA 8 CCA	N CCA P AAC N AAT	E TCA S CCA P GAG E	780 840 900
N CCJ P AAC N AAC	P TTA L C CCA P C GAA E	N AAC N AAC N CCA P	K CCA P GAA E TCA 8	P AAC N CCA P AAC N	RAC N GAG E TCA 8 CCA P	P CCA P AAC N AAT N	N TCA 8 CCA P GAA E	AAT N AAT N CCA P	CCA P CCA P GAA E TCA 8	AAC N CCA P AAC N	ARC N GAG E TCA 8 CCA P	Р ССА Р ААС N ААА К	N TCA B CCA P AAG K	K AAC N AAT N CCA P	P CCA P GAG E TCA S	N AAT N CCA P AAC N	P GCG A TCA B CCA P	N CCA P AAC N AAT N	E TCA S CCA P GAG E	780 840 900
N CCI P AA( N AA( N	P TTA L CCA P C GAA E	N AAC N AAC N CCA P	К ССА Р дал е тса 8	P AAC N CCA P AAC N	RAC N GAG E TCA B CCA P	P CCA P AAC N AAT	N TCA B CCA P GAA E	AAT N AAT N CCA P	CCA P CCA P GAA E TCA 8	AAC N CCA P AAC N	GAG E TCA 8 CCA P	Р ССА Р ААС N ААА К	N TCA B CCA P AAG K	K AAC N AAT N CCA P	P CCA P GAG E TCA S	N AAT N CCA P AAC N	P GCG A TCA 8 CCA P	N CCA P AAC N AAT N	E TCA 8 CCA P GAG E	780 840 900
N CCJ AAC N AAC N CCJ	P TTA L CCA P C GAA E S TCA	N AAC N AAC N CCA P AAC	K CCA P GAA E TCA 8 CCA	P AAC N CCA P AAC N AAC	RAC N GAG E TCA B CCA P GAG	P CCA P AAC N AAT N CCA	N TCA 8 CCA P GAA E TTA	AAT N AAT N CCA P AAC	CCA P GAA E TCA 8 CCA	AAC N CCA P AAC N	GAG E TCA B CCA P GAG	P CCA P AAC N AAA K CCA	N TCA B CCA P AAG K TCA	K AAC N AAT N CCA P AAC	P CCA P GAG E TCA S CCA	N AAT N CCA P AAC N AAC	P GCG A TCA B CCA P GAA	N CCA P AAC N AAT N CCA	E TCA 8 CCA P GAG E TCA	780 840 900 960
N CCJ P AA( N AA( N CCJ P	P TTA L C CCA P C GAA E S TCA S	N AAC N AAC N CCA P AAC N	K CCA P GAA E TCA S CCA P	P AAC N CCA P AAC N AAC	ARC N GAG E TCA 8 CCA P GAG E	CCA P AAC N AAT N CCA P	N TCA 8 CCA P GAA E TTA L	AAT N AAT N CCA P AAC N	CCA P GAA E TCA S CCA P	AAC N CCA P AAC N AAC	GAG E TCA B CCA P GAG E	P CCA P AAC N AAA K CCA P	N TCA B CCA P AAG K TCA B	K AAC N AAT N CCA P AAC N	P CCA P GAG E TCA S CCA P	N AAT N CCA P AAC N AAC	P GCG A TCA S CCA P GAA E	N CCA P AAC N AAT N CCA P	E TCA S CCA P GAG E TCA S	780 840 900 960
N CCJ P AA( N AA( N CCJ P	P TTA L CCA P C GAA E C GAA E TCA	N AAC N AAC N CCA P AAC N	K CCA P GAA E TCA 8 CCA P	P AAC N CCA P AAC N AAT N	ARC N GAG E TCA 8 CCA P GAG E	CCA P AAC N AAT N CCA P	N TCA B CCA P GAA E TTA L	AAT N AAT N CCA P AAC N	CCA P GAA E TCA B CCA P	AAC N CCA P AAC N AAC N	GAG E TCA B CCA P GAG E	р ССА Р ААС N ААА К ССА Р	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8	K AAC N AAT N CCA P AAC N	P CCA P GAG E TCA S CCA P	N AAT N CCA P AAC N AAC	P GCG A TCA B CCA P GAA E	N CCA P AAC N AAT N CCA P	E TCA S CCA P GAG E TCA S	780 840 900 960
N CCJ P AA( N CCJ P AA(	P TTA L C CCA P C GAA E C GAA E TCA S CCA	N AAC N AAC N CCA P AAC N AAC	K CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA	RAC N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC	N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA	CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA	AAC N CCA P AAC N AAT N CCA	ARC N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA	P CCA P AAC N AAA K CCA P AAC	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT	К АДС N АДТ N ССА Р АДС N АДД	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA	P GCG A TCA B CCA P GAA E TCA	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA	780 840 900 960 1020
N CCJ P N N N CCJ P NAC N	P TTA L CCA P C GAA E CA S CCA P	N AACN AACN CCA P AACN AACN	K CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA E	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P	RAC N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA 8	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N	N TCA 8 CCA P GAA E TTA L CCA P	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E	CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA E	AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P	GAG E CCA P GAG E TCA 8	P CCA P AAC N AAA K CCA P AAC N	N TCA B CCA P AAG K TCA B CCT P	K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E	N AAT N CCA P AAC N AAC N AAC N CCA P	P GCG A TCA B CCA P GAA E TCA B	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P	780 840 900 960 1020
N CCI P AAG N AAG N CCJ P AAG N	P TTA L CCA P CGAA E TCA S CCA P	N AAC N AAC N CCA P AAC N AAC N	K CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA E	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P	RAC N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N	N TCA 8 CCA P GAA E TTA L CCA P	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E	CCA P GAA E TCA S CCA P GAA E	AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P	ARC N GAG E TCA B GAG E TCA B	P CCA P AAC N AAA K CCA P AAC N	N TCA B CCA P AAG K TCA B CCT P	K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P	P GCG A TCA S CCA P GAA E TCA S	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P	780 840 900 960 1020
N CCI P AAG N AAG N AAG N AAG	P TTA L C CCA P C GAA E TCA S C CCA P C GAA	N AAC N AAC N CCA N AAC N AAC	K CCA P GAA E TCA CCA P GAA E TCA	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC	ARC N GAG E TCA B CCA B GAG E TCA B CCA	CCA P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA	N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E CCA	CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA E AAC	AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA	GAG GAG CCA P GAG E TCA S GAA	Р ССА Р ААС N АЛА К ССА Р АЛС N GAA	N TCA B CCA P AAG K TCA S CCT P CCA	K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K TCA	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E AAC	N AAT N CCA P AAC N AAC N AAC N CCA P CCT	P GCG A TCA S CCA P GAA E TCA S AAA	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA	780 840 900 960 1020 1080
N CCI P AAG N AAG N AAG N AAG	P TTA L C CCA P C GAA E CCA P C CCA P C GAA E	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N P	K CCA P GAA E TCA S CCA P GAA E TCA	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N	RAC N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA B	N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG E	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E CCA	CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA E AAC	AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA	GAG GAG CCA P GAG E TCA S GAA GAA	Р ССА Р ААС N ААА К ССА Р ААС N GAA GAA	N TCA B CCA P AAG K TCA B CCT P CCA	K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K TCA	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E AAC	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCT P	P GCG A TCA S CCA P GAA E TCA S AAA K	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG E	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P	780 840 900 960 1020 1080
N CCJ P AAG N AAG N CCJ P AAG N AAG	P TTA L CCA P C GAA E CCA P C CA E CCA E CCA	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N CCA P	K CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA E TCA 8	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N	RAC N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA B	N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA B CCA P	ССА Р ССА Р GAA E ТСА В ССА Р GAA E GAA E AAC N	B AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA P	GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B GAA B E KER	P CCA P AAC N AAA K CCA P AAC N AAA K CCA P AAC S AAC N B B B B B B B B B B B B B B B B B B	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P CCA	K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K TCA B BGIOD	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E AAC N	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCT P	P GCG A TCA S CCA P GAA E TCA S AAA K	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA	780 840 900 960 1020 1080
N CCJ P NAG N N N N CCJ P NAG N N CCJ TCJ CJ C C C C C C C C C C C C C C	P A TTA L C CCA P C GAA E CCA P C CCA P C GAA E A AAC	N AAC N AAC N CCA N AAC N AAC N CCA P	К ССА Р САЛ Е ТСА 8 ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ТСА 8 ССА Р	Р ААС N ССА Р ААС N ААТ Р ААС Л ССА Р ААС М ССА Р ААС АС АС АС АС АС АС АС АС А	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P	ССА Р ССА Р ААС N ААТ А АТА Т	П. П	ССА ССА В ССА В ССА В ССА В ССА В	ССА Р ССА Р GAA E ССА Р GAA E AAC N GAA	S AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA P CCA P CCA	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 GAA E I CTA I I	Р ССА Р ААС N АААС N АААС N ССА Р АААС N GAA E EPEI AAC	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P AT RI CCA B	K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K TCA BGIOD AAA	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E AAC N GAG	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 AAA K TCA 8	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC SAG B AAC	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA	780 840 900 960 1020 1080 1140
N CCJ P AA( N N CCJ P AA( N N CCJ P AA( N S CCJ S	P TTA L CCA P CA E CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA N	N AAC N AAC N CCA P AAC N AAC N AAC N CCA P	К ССА Р (дал е ТСА 8 ССА Р (дал е ТСА 8 ССА Р (дал е ССА Р (дал е ССА Р (дал) е ССА Р (дал) е Сал Сал Сал Сал Сал Сал Сал Сал Сал Сал	Р ААС N ССА Р ААС N ААТ Р ААС Р ААС Р ААС Р ААС Р	N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA B ATA I	N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B AAC N	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA B CCA P CCA	ССА Р ССА Р GAA E ССА Р ССА Р ССА Р ССА В ССА В ССА В ССА Р СА А Р СА Р С	S AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA P CCA P CCA B	N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA S GAA E MER I CTA L	Р ССА Р ААС N ААА К ССА Р ААС N GAA E REPEJ AAC N	N TCA B CCA P AAG K TCA B CCT P CCA P T RI CCA P	K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K TCA B GIOP AAA K	P CCA P GAG E TCA 8 CCA P GAG E AAC N GAG E	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P	P GCG A TCA S CCA P GAA E TCA S AAA K TCA S	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B AAC N	E TCA S GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P	780 840 900 960 1020 1080 1140
N CCJ P AA( N AA( N CCJ P AA( N AA( N CCJ P AA( N CCJ P AA( N CCJ S CJ CJ CJ CJ CJ CJ P AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA( N AA N AA N AA N AA N AA AA N A AA N A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	P TTA L CCA P GAA E CCA P CCA P CCA P CCA P CCA D CCA	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P	к       к       ссл       р       блл       г       сл       в       блл       в       сл       сл <td>P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG E</td> <td>N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P</td> <td>P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA E ATA I GAG</td> <td>N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG E AAC N</td> <td>E AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E CCA P CCA P</td> <td>ССА Р ССА Р GAA В ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА СА Р СА СА СА СА СА СА СА СА СА СА</td> <td>S AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA P CCA B CCA</td> <td>N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 GAA 8 GAA L CTA L GAA</td> <td>Р ССА Р ААС N ААА К ССА Р ААС N GAA GAA GAA</td> <td>N TCA B CCA P AAG K TCA B CCT P CCA P CCA P TCA TCA</td> <td>K K N AAT N CCA P AAC N AAA K SGIOD AAA K AAC</td> <td>P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E AAC N GAG E</td> <td>N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P</td> <td>P GCG A TCA B CCA P GAA E TCA B AAA K TCA B GAG</td> <td>N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B AAC N CCA</td> <td>E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P</td> <td>780 840 900 960 1020 1080 1140</td>	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG E	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA E ATA I GAG	N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG E AAC N	E AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E CCA P CCA P	ССА Р ССА Р GAA В ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА СА Р СА СА СА СА СА СА СА СА СА СА	S AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA P CCA B CCA	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 GAA 8 GAA L CTA L GAA	Р ССА Р ААС N ААА К ССА Р ААС N GAA GAA GAA	N TCA B CCA P AAG K TCA B CCT P CCA P CCA P TCA TCA	K K N AAT N CCA P AAC N AAA K SGIOD AAA K AAC	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E AAC N GAG E	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P	P GCG A TCA B CCA P GAA E TCA B AAA K TCA B GAG	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B AAC N CCA	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P	780 840 900 960 1020 1080 1140
N CCJ P AAG N AAG N AAG N AAG N CCJ P AAG N N AAG S A I CCJ P AAG N N A A CCJ P P AAG N A A A A A A A A A A A A A A A A A	Р А ТТА С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА В С ССА Р С ССА Л С С С ССА Л С ССА Л С ССА С ССА С ССА Л С С С А Л С С С А Л С С С А Л С С С А Л С С С А С С Л С С С А С С С А С С С А С С С А С С С С	N AAC N AAC N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P	к       к       ссл       р       блл       г       ссл       р       блл       г       сала       г       сала	P AAC N CCA P AAC N AAC N AAT N CCA P AAC N GAG E CCC P	N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P	ССА Р ССА Р АЛС N АЛТ N ССА Р АЛС N GAA E АТА I GAG E	TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG E AAC N CCA P	ССА В АЛТ N АЛТ N ССА Р АЛС В ССА Р АЛС Р АЛС Р АЛС Р АЛС Л АЛТ Л АЛТ Р АЛС Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ АЛТ Р АЛТ АЛТ Р АЛТ Р АЛТ Р АЛТ АЛТ Р АЛТ Р АЛТ АЛТ Р АЛТ АЛТ Р АЛТ АЛТ Р АЛТ АЛТ Р АЛТ АЛТ АЛТ АЛТ АЛТ АЛТ АЛТ АЛТ	ССА Р ССА Р GAA В ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА СА Р ССА Р СА СА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С С С С С С С С С С С С С	S AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA B CCA B CCA	N GAG E TCA S CCA P GAG E TCA S GAA E CTA L GAA E CTA L GAA E	Р ССА Р ААС N ААА Р АААС Р АААС В ССА Р АААС В ССА Р АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В АААС В ААС В АААС В АААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В ААС В АС В АС В АС АС В АС В АС АС В АС В АС АС В АС В АС В АС АС В АС В АС В АС АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В АС В В АС В В АС В В АС В В В В В В В В В В В В В	N TCA B CCA P AAG K TCA B CCT P CCA P CCA P TCG 8	K K N AAC N CCA P AAC N AAA K TCA B GOOD AAA K AAC N	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E AAC N CCCC P	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 XAA K TCA 8 GAG E	N CCA P AAC N AAC N CCA P AAC SAG B AAC SAG CCA P	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P	780 840 900 960 1020 1080 1140
N CCJ P NA N N CCJ P N N CCJ P N N CCJ P N N CCJ B S C CJ D C C D D N N N N N N N N N N N N N N N	Р А ТТА С ССА Р С ССА Р С САА В С ССА Р С ССА С С С С	N AAC N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P TCG 8	K CCA P GAA E TCA B CCA P GAA E TCA B GAA E AAC N	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC B AAC D CCC P	RAC N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P AAA K	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAC P AAT A GAA B GAG B	TTA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B AAC N CCA P	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E CCA P CCA P ATA I	ССА Р ССА Р GAA В ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С СА Р С С СА Р С С С Р С С С С С С С С С С С С С	S AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA B CCA P	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 GAA E GAA E GAA E	ССА Р АЛС Р АЛС N АЛА Р ССА Р АЛС N GAA В GAA В	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCG 8	K K N AAC N CCA P AAC N K TCA B BGIOD AAA K K AAC N	P CCA P GAG E TCA 8 CCA P GAG E AAC N GAG E CCC P	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA R	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 AAA K TCA 8 AAA K GAG E	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC D AAC SAG E AAC SAC P CCA P	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200
N CCJ P AAG N AAG N AAG N AAG S GAJ	P       A     TTA       L     CCA       P     CA       C     GAA       C     CCA       P     CA       C     CA       C     CA       C     CA       C     CAA       C     CCA       P     CAA       C     CCA	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA S	к       к       ссл       р       блл       г       ссл       р       блл       в       блл       в       лас       м       блл	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG E CCC P AAT	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P CCA R GAA	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAC P AAC P AAT I GAG B AAT	TTA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B AAC P CCA	AAT AAT N AAT N CCA P AAC N GAA B CCA P ATA I TTG	ССА Р ССА Р GAA E GAA E GAA E AAC N ATA	S AAC N CCA P AAT N CCA P CCA P CCA B CCA P	N GAG E TCA S CCA P GAG E TCA S GAA E CTA E CAA	P P AAC N AAA P AAC P AAC N GAA B GAA B GAT	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCG 8 GAA	K K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K BEGIOP AAA K AAC N CCT	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E GAG E CCC P ATA	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA R GAA	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 AAA K TCA 8 GAG E CCCC	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B CCA P AGA	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P CCA TA I	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200
N CCJ P AAG N AAG N CCJ P AAG N CCJ P AAG N CCJ P CJ CJ C C C A A C CJ N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A A A A	P A TTA L C CCA P C GAA C GAA C CCA P C GAA C GAA C AAC N A GAA E C CCA P	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC S A AC N AAC S A AC N A AC N A C A A C A S C A C A C A C A C A C A C	К ССА Р GAA E TCA 8 CCA Р GAA E TCA 8 GAA E AAC N GAT D	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAC N CCA P AAC N AAC	N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA B CCA CA C CA C	Р ССА Р АЛС N АЛТ N ССА Р АЛС N GЛA В АЛТ А I GAG В В АЛТ М	NTCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B AAC P CCA P	CCA P AAC P AAC P CCA P CCA P CCA P CCA TTG L	ССА Р ССА Р GAA E TCA 8 ССА Р GAA E AAC N GAA E AAC N AAC N AAC N I	RCA B AAC N CCA P AAT N CCA P CCA P CCA CCA P CCA CCA	N GAG E TCA B GAG E GAG E TCA B CAA CAA O	P P AAC N AAA K CCA P AAC N GAA E EPEJ AAC N GAA E GAT D	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P CCA P TCG 8 GAA E	K K AAC N AAT N CCA P AAC N AAAC N AAAC N AAAC N AAAC N AAC N AAT N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N AAT N CCA P AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT AAT	P CCA P GAG E TCA 8 CCA P GAG E GAG E CCC P ATA I	N AAT N CCA P AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 ANA K TCA 8 GAG E CCCC P	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B AGA R	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P ATA I AAT	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200
N CCJ P AAG N AAG N CCJ P AAG N CCJ P AAG N CCJ P AAG N AAG N N	Р А ТТА С ССА Р С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р С ССА С ССА Р С ССА С ССА Р С ССА С ССА С ССА С ССА Р С ССА В С ССА В С ССА В С ССА В С ССА В С ССА В С ССА В С ССА В С ССА Р С ССА В С ССА Р С ССА В С ССА Р С ССА С С С С	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC AAC	К ССА Р СДА Е ТСА 8 ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА 8 ССА 8 ССА 8 ССА 8 ССА 8 ССА 8 ССА 8 ССА 8 ССА 8 С СА 8 С СА 8 С СА 8 С СА 8 С СА 8 С СА 8 С СА 8 С С С 8 С С С 8 С С С С	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAC P AAC N CCA P AAC N AAT	N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P CCA P CCA P CCA P CCA B CCA B CCA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N AAC N GAA B ATA I GAG B AAT	N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B AAC P CCA P CCA P	CCA B AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E CCA P CCA P ATA I TTG L	ССА Р ССА Р GAA E ССА Р GAA E GAA E AAC N ATA I	S AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P ATA I	N GAG E TCA 8 GAG E GAG E TCA 8 GAA E GAA E CAA Q	P P AAC P AAC N AAA R CCA P AAC N GAA B GAA B GAA B GAA D	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P R TCG 8 GAA E	K K AAC N AAT N CCA P AAAC N CCA B GOOD AAA K CCT P	P CCA P GAG E TCA 8 CCA P GAG E AAC N GAG E CCC P ATA I	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA CA AA C AA C AA C A C	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 ANA K TCA 8 GAG E CCC P	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC SAG P AAC N CCA P AAC N AGA R	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P CCA S ATA I AAT N	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260
N CCI P NA N N CCJ P AAC N AAC M TCI 8 GAJ 8 GAJ 6 A N GA	Р А ТТА L C ССА Р C ССА Р C ССА Р C ССА Р C ССА Р C ССА Р C ССА Р C ССА Р С С СА Р С С С С С Р С С С С С Р С С С С С С С С С С С С С	N AAC N CCA P AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA CA A CCA A CCA A CCA A CA CA CA A CA C	K CCA P GAA E TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 GAA E AAC N GAT	P AAC N CCA P AAC P AAC N AAT N GAG E CCC P AAT N	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P AAA K GAA E CCA	P CCA P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAT S ATA S AAT N ATT	TTA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B CCA P CCA P CCA P TTA	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA B CCA P CCA P ATA I TTG L CCT	ССА Р ССА Р GAA E CCA Р GAA E GAA E AAC N ATA I ATC	S AAC N CCA P AAC P AAT B CCA P CCA P CCA B CCA B CCA P ATA I ATC	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E CCA E GAA E CCA Q CCA	P CCA P AAC N AAA R CCA R CCA R CCA B GAA B GAT D CAA	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCG 8 GAA E AAG	K K N AAT N CCA P AAC N K SGIOD SAA K SGIOD SAA K N CCT P GGT	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E CCCA N GAG E CCC P ATA I AAT	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P AAA K K AAT	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 AAA K TCA 8 GAG E CCC P ATC	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B CCA P AGA R CCA	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P CCA N S CCA N D CCA D S CCA S S CCA S CCA S CCA S S CCA S CCA S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S C CCA S S C CCA S S C CCA S S C C C S S C C C S S C C C S S C C C S S C C C S S C C C S S C C C S S C C C S S C S C S S C C S C C S S C C S C S C C S S C C S C S C S C S S C S S C C S C S S C S S C S S C C S S C S S C S S C S S C S S C S S S S S C S S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320
N CCJ P AA( N AA CCF P AA( N AA CM AA CM AA CA B CA C CF P AA C M CCJ N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C N AA C C N AA C N A C C N AA C N A C C N A C C N A C C N A C C N C N	P A TTA L C CCA P C GAA E C CCA P C CCA P C CCA P C CCA N A GAA E C CCA P C C CCA C C C C	N AAC N AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA N CCA N CCA N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N N AAC N N N AAC N N N N	K CCA P GAA E TCA B GAA E TCA B GAA E TCA B GAA E AAC D GAA S JAC D JAC CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P GAA S CCA P CCA S CCA P CCA S CCA S CCA P CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S C C C C	P AAC N CCA P AAC P AAC N AAT M GAG E CCC P AAT M ATA I	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P AAA K GAA S CCA P	P CCA P CCA P AAC N AAT N CCA P AAT B AAT I GAG B AAT I I	TTA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B AAC P CCA P CCA P CCA P TTA L	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E CCA P ATA I TTG L CCT P	ССА Р ССА Р GAA E GAA E GAA E AAC N ATA I ATC I	S AAC N CCA P AAT N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P ATA I I ATC I	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 GAA E TCA 8 GAA E CTA E CTA E CAA Q CCA P	P CCA P AAC N AAA CCA P AAC N GAA E GAA CAA Q	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCG 8 GAA E K	K K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K AAA K AAA K AAA K CCA F CCA CCA CCA CCA CCA CCA	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E CCC P ATA I N	N AAT N CCA P AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P AAA K GAA K AAT	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 AAA K TCA 8 GAG E CCC P ATC I	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC SAG A R CCA P	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P CCA P CCA S S	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320
N CCJ P AAG N AAG N CCJJ P AAG N CCJJ P AAG N GAA GAA D	P     A     TTA     L     CCA     P     C     CA     P     C     CA     TCA     TCA     C     CCA     P     C     CA     TCA     S	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC AAC	К ССА Р GAA E TCA 8 GAA E TCA 8 GAA E TCA 8 GAA E TCA 8 GAA CCA Р 0 GAA E TCA 8 GAA E TCA 8 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 CCA 9 C CCA 9 CCA 9 CCA 9 C CCA 9 C CCA 9 C CCA 9 C CCA 9 C CCA 9 C CCA 9 C CCA 9 C CCA 9 C C CCA 9 C CCA 9 C C CCA 9 C CCA 9 C C CCA 9 C C C C	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAT M GAG E CCC P AAT N AAT N CCA P AAC N N AAT N CA P AAC N AAC N N AAC N N CA N P AAC N N CA N P AAC N N CA N P AAC N N CA N P AAC N N CA N P AAC N N CA N P AAC N N CA N P AAC N N CA N P AAC N N CA N P AAC N N CA N N CA N N CA N N CA N P AAC N N CA N N CA N N CA N N CA N N CA N N CA N CA N N CA N N CA N CA N C N C	N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P CCA P CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA B ATA I GAG B AAT N I I AAT I	ITTA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG E AAC P CCA P TTA L CCA TTA	AAT N AAT N CCA P AAC P AAC P CCA P CCA P CCA TTG L CCT	ССА Р ССА Р GAA E ТСА В ССА Р GAA E ААС N GAA E ААС N ААС N ААС А ААС А А А А А А А А А А А А А	S AAC N CCA P AAT N CCA P CCA P CCA CCA CCA CCA P CCA S CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA	N GAG E TCA B GAG E TCA P GAG E GAA CTA L GAA CTA CAA Q CCA P	P CCA P AAC N AAA K CCA P AAC N GAA E GAA GAA Q CAA Q	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCA 8 CCT P CCA P TCA 8 CCA P AAG K AAG K	K AAC N AAT N CCA P AAC N AAA K AAC N CCT P GGT G	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E GAG E CCC N GAG E CCC N I AAT N	N AAT N CCA P AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P AAA K GAA E AAT	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 ANA K TCA 8 GAG E CCC P ATC I	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B AAC N CCA P AGA R CCA P	E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P CCA P CCA P ATA I AAT N N AGC 8	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320
N CCJ P AAG N AAG N CCJ P AAG N AAG S GAJ E GAJ E AAG N D AAS	P     A     TTA     L     C     C     C     C     C     C     C     C     C     TCA     S     C     CA     S     C     CA     S     C     CA     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     A     B     C     CA     B     C     CA     A     A     B     C     CA     B     C     CA     B <tr< td=""><td>N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC AAC</td><td>К ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА 8 ССА 8 ССА Р СА А. В ССА Р СА А. В С СА А. В С СА Р СА А. В С СА Р С А. В С СА В С С А. В С С А. В С С С А. В С С С А. В С С С А. В С С С С С С С С С С С С С С С С С С</td><td>P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAT SAT ATA I AAT</td><td>N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P CCA E CCA E CCA CCA CCA</td><td>P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N CCA P AAC N GAA B ATA I GAG B AAT I TCT</td><td>NAL N TCA 8 CCA P GAA E TTA L CCA P GAG CCA P CCA P TTA L (GAC</td><td>E AAT N AAT N CCA P AAC P AAC N GAA E CCA P CCA P TTG L CCT P TCA</td><td>ССА Р ССА Р GAA E TCA 8 CCA Р GAA E AAC N GAA ATA I ATC I GAA</td><td>S AAC N CCA P AAT N CCA P CCA P CCA P CCA CCA P AAT N CCA P AAT N AAT N CCA P AAC N AAT N CCA AAC AAC AAC AAC AAC AAC</td><td>N GAG E TCA 8 GAG E TCA 8 GAA E CTA E CTA E CTA E CTA CTA E CAA Q CCA P GAA</td><td>P P AAC P AAC P AAC P AAC P AAC N GAA E E B AAC N GAA E GAA E GAA C A Q CAA Q TAT</td><td>N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCA 8 CCT P CCA P TCG 8 GAA E AAG K CCA</td><td>K K AAC N AAT N CCA P AAAC N AAAC N AAAC N AAAC N CCA P AAAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA CCA</td><td>P CCA P GAG E TCA 8 CCA P GAG E CCC P GAG E CCC P ATA I N CCA</td><td>N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P AAA K GAA K AAT</td><td>P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 ANA K TCA 8 ANA K TCA 8 GAG E CCCC P ATC I GAT</td><td>N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAC N CCA P AGA R CCA P AAT</td><td>E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P ATA I AAT S S GGT</td><td>780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320</td></tr<>	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC AAC	К ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА 8 ССА 8 ССА Р СА А. В ССА Р СА А. В С СА А. В С СА Р СА А. В С СА Р С А. В С СА В С С А. В С С А. В С С С А. В С С С А. В С С С А. В С С С С С С С С С С С С С С С С С С	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAT SAT ATA I AAT	N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P CCA E CCA E CCA CCA CCA	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N CCA P AAC N GAA B ATA I GAG B AAT I TCT	NAL N TCA 8 CCA P GAA E TTA L CCA P GAG CCA P CCA P TTA L (GAC	E AAT N AAT N CCA P AAC P AAC N GAA E CCA P CCA P TTG L CCT P TCA	ССА Р ССА Р GAA E TCA 8 CCA Р GAA E AAC N GAA ATA I ATC I GAA	S AAC N CCA P AAT N CCA P CCA P CCA P CCA CCA P AAT N CCA P AAT N AAT N CCA P AAC N AAT N CCA AAC AAC AAC AAC AAC AAC	N GAG E TCA 8 GAG E TCA 8 GAA E CTA E CTA E CTA E CTA CTA E CAA Q CCA P GAA	P P AAC P AAC P AAC P AAC P AAC N GAA E E B AAC N GAA E GAA E GAA C A Q CAA Q TAT	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCA 8 CCT P CCA P TCG 8 GAA E AAG K CCA	K K AAC N AAT N CCA P AAAC N AAAC N AAAC N AAAC N CCA P AAAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA CCA	P CCA P GAG E TCA 8 CCA P GAG E CCC P GAG E CCC P ATA I N CCA	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P AAA K GAA K AAT	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 ANA K TCA 8 ANA K TCA 8 GAG E CCCC P ATC I GAT	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAC N CCA P AGA R CCA P AAT	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P ATA I AAT S S GGT	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320
N CCJ P N N N N N N CCJ P N N N N CCJ P N N N CCJ P N N N N N N N N N N N N N N N N N N	Р А ТТА С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА В С ССА Р С ССА Р Г С ССА Р Г С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р Г С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р Г С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р Р С ССА Р С ССА Р Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА Р С ССА С ССА Р С С С С С С Р С ССА Р С ССА Р С С С ССА Р С ССА Р С ССА С ССА Р С С С С С С С С С С С С С С	N AAC N CCA P AAC N AAC N AAC N AAC N ACCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA N CCA P AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N C AAC N N C AAC N N C CA N N C CA N N C CA N N C CA N N C CA N N C N N C CA N N C CA N C N N C CA N C N N C CA N C N N C CA N C N N C CA N C N N C CA N C N C	к       к       сса       р       бал       г       сса       р       бал       сса       р       бал       сса       р       бал       са       бал       са       бал       са	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAT N GAG E CCC P AAT N ATA I N M	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P AAA K GAA E CCA P CCA P	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA E AAT I GAG E AAT I I TCT B	ITTA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B CCA P CCA P CCA P TTA L CCA D	E AAT N AAT N CCA P AAC N GAA B CCA P CCA P ATA I TTG L CCT P -) TCA B	ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р ССА Р С СА Р С СА Р С С С С С С С С С С С С С	S AAC N CCA P AAC P AAC N AAT N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA CCA	N GAG E TCA 8 GAG E TCA 8 GAA E CTA E GAA E CAA Q CCA P GAA E	P P AAC P AAC N AAA R CCA P AAC N GAA B GAA B GAA B GAA C AAC N CAA Q TAT Y	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCG 8 GAA E AAG K CCA P	K K N AAC N CCA P AAA K CCA R CCT P GGT G GGT G AGA R	P CCA P GAG E TCA 8 CCA P GAG E AAC N GAG E AAC N I ATA I AAT N CCA	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P AAA C N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAT N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAA N AAC N AAA N AAC N AAA N AAC N AA N AAC N AAA N AAC N AAA N AAC N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AAA N AA N AAA N AA N AAA N AAA N AAA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N AA N A AA N A N AA N AA N AA N A N A A N A A N A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E CCA P GAA K TCA 8 GAG E CCC P ATC I GAT D	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC SAC SAC P AAC N CCA P AGA R CCA P AAT N	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P CCA S S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S S CCA S CCA S CCA S S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S CCA S C CCA S C CCA S C CCA S C CCA S C C C C	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380
N CCJ P AA( N AA CCF P AA( N AA CCF P AA( N CCF P AA( N CCF P AA( N CCF P AA( N A CCJ N AA ( N N AA ( N N AA ( N N AA ( N N AA ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N AA) ( N N ( N N AA) ( N N AA) ( N N ( N N AA) ( N N AA) ( N N ( N N AA) ( N N AA) ( N N ( N N AA) ( N N AA) ( N N ( N N AA) ( N N ( N N AA) ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N N ( N N ( N N ( N N ( N N ( N) ( N N N) ( N) ( N N ( N) ( N) ( N N ( N N ( N N ( N N ( N N N) ( N N ( N N ( N N N ( N) ( N N ( N N N ( N N N N	P A TTA L C CCA P C GAA E C CCA P C CCA P C CCA P C CCA N C CCA P C CCA C CCA P C CCA C CCA P C CCA C CCA P C CCA C C C CCA P C C CCA C C C CCA C C C CCA C C CCA C C CCA C C C C	N AAC N AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N AAC N N N C AAC N N N C AAC N P N AAC N P N AAC N P N AAC N P N C AAC N P N AAC N P N AAC N P N AAC N P N C AAC N P N C AAC N P N AAC N P N AAC N P N AAC N P N AAC N P N AAC N P N C CA N P N C CA N P N C CA N P N C CA N P N C CA N P N C CA P N C CA N P N C CA P N C C A P N C C A P N P N C C A P N P C C A P N C C A P C A P C C A P C A C C A C A C C A C A	K CCA P GAA E TCA B CCA P GAA E TCA B GAA E AAC D GTA V GAA E	P AAC N CCA P AAC N AAT N GAG E CCC P AAT N AAT N AAT	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E TCA 8 CCA P CCA P CCA P CCA P	P CCA P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N AAT I GAA B ATA I GAA B ATT I TCT 8	TTA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B CCA P CCA P CCA P CCA CA CA C CA CA CA CA CA CA CA CA CA	AAT N AAT N CCA P AAC N GAA E CCA P CCA P ATA I TTG L CCT P TCA 8	ССА Р ССА Р GAA E TCA В ССА Р GAA E AAC N ATA I GAA E AAC N ATA I GAA	S AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CCA TA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA	N GAG E TCA 8 CCA P GAG E CCA 8 GAA E CCA CCA P GAA E GAA E	ССА Р АЛС Р АЛС Р АЛС Р АЛС Р АЛС Р АЛС В АЛС В В САЛ В СЛА В СЛА СЛА С АЛС В С СЛ Р ССА Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р АЛС Р Р С СА Р Р АЛС Р Р С АЛС Р Р С АЛС Р Р С АЛС Р Р С АЛС Р Р С АЛС Р Р С АЛС Р С Р С АЛС Р С Р С Р С АЛС Р С Р С АЛС Р С Р С АЛС Р С Р С АЛС Р С Р С АЛС Р С Р С АЛС Р С Р С АЛС Р С Р С АЛС Р С Р С Р С С Р Р С Р Р С Р С Р С Р С	N TCA 8 CCA P AAG R TCA 8 CCT P CCA P TCG 8 GAA E AAG 8 CCA P	K K AAC N AAT N CCA P AAC N CCA R AAA K AAA K CCA R AAA K CCA P AAC N AAC N AAT N CCA P AAC N AAC N AAC AAC AAC AAC AA	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E AAC N AAT N N CCA P	N AAT N CCA P AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P AAA K GAA K AAT	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 AAA K TCA 8 GAG E CCC P ATC I D	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B AAC N CCA P AGA R CCA P AGA R CCA P	E TCA S CCA P GAG E TCA S CCA P CCA P CCA P CCA P CCA S GGT G GGT	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380
N CCJ P AAG N AAG N CCJ P P AAG N CCJ P P AAG N CCJ P P AAG N CCJ P P AAG N CCJ N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N AAG N A AAG N AAG N AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A AAG N A A A A	P A TTA L C CCA P C GAA C GAA C CCA P C CCA P C CCA P C CCA P C CCA P C CTA C CTA C CTA C CTA C CTA C CTA C CTA C CTA C CCA C CA C	N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC AAC	К       ССА       Р       GAA       E       TCA       B       CCA       P       GAA       CCA       P       GAA       B       CCA       P       GAA       B       GAA       GAT       D       GTA       GAA       E       AAT	P AAC N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC P AAT N GAG GAG CCC P AAT N AAT N AAT N AAT	N GAG E TCA B CCA P GAG E TCA B CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA	P CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAA B ATA I GAG B AAT N TTT B ATG	NTCA N TCA B CCA P GAA E TTA L CCA P GAG B AAC P TTA L CCA P GAA CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA A CCA P GAA CCA P GAA CCA P GAA CCA P GAA CCA P CCA P CCA P CCA P CCA A CCA P CCA A P CCA A D CCA A D CCA A D CCA A D CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A A CCA A CCA A A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA A CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA	E AAT N AAT N CCA P AAC P AAC N GAA E CCA P CCA P TTG L CCT TCA B	ССА Р ССА Р GAA E TCA 8 CCA Р GAA E AAC N GAA E AAC N ATA I GAA A ATC A AAC AAC AAC AAC AAC	S AAC N CCA P AAT N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P CCA CCA	N GAG E TCA B GAG E GAG E CCA B CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA C	P P AAC P AAC P AAC P AAC N GAA E E B B AAC N GAA E GAT CAA Q TAT Y ATA	N TCA 8 CCA P AAG K TCA 8 CCT P CCA P TCG 8 GAA E GAA E CCA P CCA CCA CCA CCA CCA P CCA CCA CCA	K K AAC N AAT N CCA P AAC N AAAC N AAAC N AAAC N CCA P AAAC N AAAC N AAC P AAC N AAT N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAC N AAA R AAC N AAA R AAAC N AAC N AAA R AAAC N AAA R AAAC N AAA R AAAC N AAA R AAAC N AAAC N AAA R AAAC N AAA R AAAC N AAA R AAAC N AAA R AAA R AAA A AAC A AAA A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC A AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC AAC A	P CCA P GAG E TCA S CCA P GAG E CCC P ATA I N CCA P GAG	N AAT N CCA P AAC N AAC N AAC N CCA P CCA P CCA P CCA P CCA P AAA K GAA K AAT N CGG	P GCG A TCA 8 CCA P GAA E TCA 8 ANA K TCA 8 GAG E CCC P ATC I GAT D	N CCA P AAC N AAT N CCA P AAC N GAG B AAC N CCA P AGA R CCA P AGA R AT N	E TCA 8 GAG E TCA 8 CCA P CCA P CCA P CCA P ATA I AAT N N AGC 8 GGT G	780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380 1431

### R.C. Hedstrom et al.

(Protoblot, Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's specifications.

**DNA sequencing.** Phage DNA of lambda gt11 immunoreactive clones was prepared from liquid lysates by standard methods (19). Plasmodial DNA insert fragments released by EcoR1 digestion were cloned into M13mp18 (20). Overlapping clones spanning the inserts were generated using the M13 RF recombinant plasmid by exonuclease III resection (21). Singlestranded templates were sequenced by using Sequenase (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a sporzoite mRNA. RNA from 14-day P. yoelii infected mosquitos was purified by the guanidine thiocyanate CsCl gradient technique (22) and reverse-transcribed (50  $\mu$ g whole RNA) by using a commercially available cDNA synthesis kit (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) which uses oligo(dT) as primer. One-tenth, onehundredth, and one-thousandth of the resulting cDNA was subjected to 35 cycles of PCR (23) with 2.5 U Taq polymerase (GeneAmp kit, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) and 5  $\mu$ mol each of the following oligonucleotides (Synthecell, Gaithersburg, MD):

(+), 5'-GGGAATTCGCTCATTGTGGAAAATGG-3'; (-), 5'-GGGAATTCTACTTCTGAGTCAGATGG-3'. Each cycle included denaturation at 94 °C, reannealing at 51 °C, and primer extension at 72 °C.

**Peptide synthesis.** The peptide (Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser)<sub>3</sub> was synthesized using a solid-phase method (24) on an Applied Biosystems model 430A synthesizer with single coupling of each amino acid. Cleavage and deblocking were performed with 10% trifluoromethanesulfonic acid in trifluoroacetic acid, followed by precipitation in diethyl ether. The peptide was finally redissolved and lyophilized. Analytical HPLC and quantitative amino acid analyses confirmed the identity and purity of the peptide product.

**Production of antisera.** Six to twelve week old BALB/C mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were immunized at two-week intervals with 4 doses of 100  $\mu$ g of (Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser)<sub>3</sub> conjugated to keyhole limpet haemocyanin. The first dose was emulsified in complete Freund's adjuvant, and subsequent doses in incomplete Freund's adjuvant. Sera were obtained 2 weeks after the fourth dose.

*Immunofluorescence and Western blotting.* Immunofluorescence and Western blotting were carried out, as previously described (13).



protein from P. yoelli (CSP, residues 282–329 (29)),

the CS

Fig. 1 (b). Amino acid sequence comparisons between the M4 peptide (M4, residues 1-48),

## Results

Sequence analysis of the 140 kDa antigen gene. A clone designated lambda gMSY-4 (M4) was selected based on its recognition by NYS4. The primary DNA and deduced amino acid sequences of a portion of the genomic DNA insert from clone M4 are shown in Fig. 1(a). Like most other plasmodial antigens, the M4 peptide contains regions of repeating amino acid sequences. One region consists of a repeating trimer Pro-Asn-Asn and the other is composed of, principally, the hexamer Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser. The first 48 amino acids are compared in Fig. 1(b) to several proteins that share a remarkable sequence similarity to this region of the M4 peptide. The similarity between region II of the CS protein (301-315) and thrombospondin is well known (25). In addition, mouse properdin was recently shown to contain a similar sequence (26). The M4 peptide shares this conserved motif but contains a more extensive region

#### Malaria sporozoite surface antigen

of sequence similarity with the recently described TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) from *P. falciparum (27)*. A search of the PIR protein sequence databank, conducted on 12 February 1990, revealed no additional significant similarity to previously described protein sequences.

**mRNA** for the 140 kDa antigen is present in sporozoites. To demonstrate sporozoite expression of the mRNA for the 140 kDa antigen we utilized the polymerase chain reaction (PCR) specifically primed with M4 clone sequence-based primers (Fig. 1(b)). An amplification product of the predicted size (the distance between the two primers is 1.3 kB) was clearly visible in reaction mixtures which contained, as templates, sporozoite cDNA or DNA from clone M4 (positive control) (Fig. 2, left). In Fig. 2, right, the identity of the amplified cDNA subfragment was confirmed with the M4 probe. A faint signal at 1.3 kB

Fig. 2. Expression of the 140 kDa antigen mRNA in sporozoites as determined by PCR amplification of a cDNA subfragment from reverse-transcribed RNA isolated from infected mosquitos. Primers used in the amplification are shown in Fig. 1. *Left*: agarose gel stained with ethidium bromide. *Right*: Southern blot of the stained agarose gel probed with <sup>32</sup>P-labelled M4 clone DNA. Lanes 1, DNA molecular weight markers; lanes 2, M4 clone DNA (15 pg); lanes 3, M4 clone DNA (1.5 pg); lanes 4, cDNA (50  $\mu$ g); lanes 5, cDNA (5  $\mu$ g); lanes 6, cDNA (0.5  $\mu$ g); lanes 7, RNA (50  $\mu$ g); lanes 8, RNA (5  $\mu$ g); lanes 9, RNA (0.5  $\mu$ g).



### R.C. Hedstrom et al.

was detected in control reactions of RNA that were not reverse transcribed prior to PCR. We believe this is due to amplification of the genomic sequence which resulted from DNA contamination of the RNA preparation.

Antibodies to Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser recognize the surface of sporozoites and the 140 kDa antigen. The overall hydrophilicity of the repeating amino acid sequence Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser suggested it as a potential antigenic determinant (28). A synthetic peptide containing 3 copies of Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser (18mer) was strongly recognized by NYS4 in an ELISA (data not shown) and mice immunized with the peptide produced antibodies that reacted with sporozoites in an IFAT and with the 140 kDa antigen on Western blots of sporozoite extracts (Fig. 3). These results together with those of Fig. 2 indicate that the M4 peptide sequence corresponds to at least a portion of the 140 kDa antigen and that the antigenic determinant of NYS4 is contained within the repeating hexamer Asn-Pro-Asn-Glu-Pro-Ser. It is notable that this repetitive sequence bears no similarity to the major repeats of the P. voelii CS protein, in which the consensus repeating elements are Gln-Gly-Pro-Gly-Ala-Pro and Gln-Gln-Pro-Pro (29).

# Discussion

In this paper we report the molecular characterization of a portion of the gene encoding what we now call sporozoite surface protein 2 (SSP 2). Like the CS protein, SSP 2 contains an immunogenic sequence of repeating amino acids and the conserved region II domain which is found in a number of other well-characterized proteins. These include thrombospondin, properdin, von Willebrand factor, beta<sub>2</sub>glycoprotein I, collagen type IV alphal & 2 chains, glycoprotein E from human (alpha) herpesvirus 1, and antistasin, all of them proteins which are thought to play roles in adhesion (30). The sequence similarity between SSP 2 and TRAP, an erythrocytic-stage specific protein of P. falciparum, extends beyond the "adhesion motif" of the CS protein in both the amino terminal and carboxyl terminal directions suggesting a more expansive functional domain in these malarial proteins. Nevertheless the conservation of this sequence among proteins from different malarial species underscores its importance to the survival of the parasite. Perhaps sporozoite entry into host cells is facilitated by SSP 2 adherence to extracellular matrices.

Immunization with irradiation-attenuated sporozoites confers sterile immunity against challenge with large numbers of sporozoites. It has long been thought that this protective immunity is directed Fig. 3. Antibodies to (NPNEPS)<sub>3</sub> recognize the 140 kDa sporozoite surface protein. Western blot of *P. yoelli* sporozoite extract probed with serum from mice immunized with (NPNEPS)<sub>3</sub> conjugated to KLH (lane 1), NYS4 (lane 2), and sera from mice immunized with KLH (lane 3).



entirely against the CS protein. Our findings demonstrate the existence of another protein, SSP 2, on sporozoites that may be an additional target for protective cellular or humoral immune responses.

### References

- Nussenzweig, V. & Nussenzweig, R.S. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell*, 42: 401–403 (1985).
- Cochrane, A.H. et al. Antibody-induced ultrastructural changes of malarial sporozoites. *J. immunol.*, 116: 859–867 (1976).
- 3. Nussenzweig, R.S. et al. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei. Nature*, 216: 160 (1967).

#### Malaria sporozoite surface antigen

- Weiss, W.R. et al. CD8<sup>+</sup> cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 85: 573 (1988).
- Hoffman, S.L. et al. Immune response gene regulation of immunity to *Plasmodium berghei* sporozoites and circumsporozoite protein vaccines: overcoming genetic restriction with whole organism and subunit vaccines. *J. immunol.*, 142: 3581–3584 (1989).
- Sedegah, M. et al. Use of a vaccinia construct expressing the circumsporozoite protein in the analysis of protective immunity to *Plasmodium yoelii*. In: Lasky, L., ed. *Technological advances in vaccine development*. New York, Alan R. Liss Inc., 1988, pp. 295–309. (UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 84).
- Egan, J.E. et al. Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines: implications for human vaccine development. *Science*, 236: 453 (1987).
- Sadoff, J.C. et al. Oral Salmonella typhimurium vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. Science, 240: 336–338 (1988).
- Hoffman, S.L. et al. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T-cell elimination of malaria from hepatocytes. *Science*, 244: 1078–1080 (1989).
- de la Cruz, V.F. et al. Sequence variation in putative functional domains of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: implications for vaccine development. J. biol. chem., 262: 11935–11939 (1987).
- 11. Good, M.F. et al. Human T-cell recognition of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: immunodominant T-cell domains map to the polymorphic regions of the molecule. *Proc. Natl Acad. Sci.*, *USA*, 85: 1199–1203 (1988).
- Lockyer, M.J. et al. Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T-cell epitopes of the circumsporozoite protein. *Mol. biochem. parasitol.*, 37: 275–280 (1989).
- Charoenvit, Y. et al. Characterization of *Plasmodium* yoelii monoclonal antibodies directed against stagespecific sporozoite antigens. *Infect. immun.*, 55: 604–608 (1987).
- Wortman, A. et al. Cloning of *Plasmodium yoelii* genes expressing three different sporozoite-specific antigens. *Micro. path.*, 6: 227–231 (1989).
- Stephens, R.S. et al. Molecular cloning and expression of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein antigens in *Escherichia coli*. *Infect. immun.*, 47: 713–718 (1985).
- 16. Young, R.A. & Davis, R.W. Efficient isolation of genes

by using antibody probes. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **80**: 1194–1198 (1983).

- Young, R.A. & Davis, R.W. Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science*, 222: 778–782 (1983).
- Johnson, D.A. et al. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene anal. techn.*, 1: 3–4 (1984).
- Maniatis, T. et al. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Messing, J. New M13 vectors for cloning. *Methods* enzymol., 101: 20–78 (1983).
- Henikoff, S. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Methods enzymol.*, 155: 156–165 (1987).
- Chirgwin, J.M. et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18: 5294–5299 (1979).
- Salki, R.K. et al. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350–1354 (1985).
- Merrifield, B. Peptide synthesis, I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149–2154 (1963).
- Lawler, J. & Hynes, R.O. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. cell biol.*, 103: 1635–1648 (1986).
- Goundis, D. & Reid K.B. Properdin, the terminal complement components, thrombospondin and the circumsporozoite protein of malaria parasites contain similar sequence motifs. *Nature*, 335: 82–85 (1988).
- Robson, K.J.H., et al. A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature*, 335: 79–82 (1988).
- Hopp, T.P. & Woods, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl Acad. Sci.*, USA, 78: 3824–3828 (1981).
- Lal, A.A. et al. Structure of the gene encoding the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*, *J. biol. chem.*, 262: 2937–2940 (1987).
- 30. Holt, G.D. et al. Antistasin, an inhibitor of coagulation and metastasis, binds to sulfatide (Gal(3-SO<sub>4</sub>) $\beta$ 1-1Cer) and has sequence homology with other proteins that bind sulfated glycoconjugates. *J. biol. chem.*, **264**: 12138–12140 (1989).