



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
*C12N 15/09* (2006.01)  
*C12N 9/24* (2006.01)  
*C12N 9/38* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*C12N 15/55* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21), (22) Заявка: **2004107086/15, 09.08.2002**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**09.08.2002**(30) Конвенционный приоритет:  
**10.08.2001 EP 01119377.8**  
**14.08.2001 EP 01119528.6**  
**31.08.2001 US 60/315,955**(43) Дата публикации заявки: **10.04.2005**(45) Опубликовано: **10.06.2010** Бюл. № 16(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **DATEBASE EMBL Online! 18 October 1999 (1999-10-18) SULTON J.E. et al. "Homo sapiens DAC clone RP11-34L23 from 2, complete sequence". Database accession no. ACO11893 XP002244247. DATEBASE EMBL Online! 5 May 1999 (1999-05-05) MAHAIRAS G.G. et al. "HS\_5237\_A1 G08\_SPC1-11 Human malt BAC Library Homo sapiens genomic clone" Database accession no. (см. прод.)**(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **10.03.2004**(86) Заявка РСТ:  
**EP 02/08963 (09.08.2002)**(87) Публикация РСТ:  
**WO 03/014342 (20.02.2003)**Адрес для переписки:  
**103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", пат.пов. А.П.Агурееву**

(72) Автор(ы):

**ПЕЛЬТОНЕН Лена (FI),**  
**ЭНАТТАХ Набиль (FI),**  
**ЯРВЕЛЯ Ирма (FI),**  
**САХИ Тимо (FI),**  
**САВИЛАХТИ Эрки (FI),**  
**ТЕРВИЛЛИГЕР Джозеф (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**НЭШНЛ ПАБЛИК ХЕЛС**  
**ИНСТИТЬЮТ (FI)****(54) ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВАРИАНТА ДНК, СВЯЗАННОГО С ГИПОЛАКТАЗИЕЙ ВЗРОСЛОГО ТИПА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и касается варианта ДНК, связанного с гиполактазией взрослого типа. Сущность изобретения включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей 5'-концевую часть гена кишечной лактазы-

флоризингидролазы (LPH), принимающего участие в или служащего индикатором гиполактазии взрослого типа, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из: (а) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO:1 или

включающей ее, причем последовательность SEQ ID NO:1 и (b) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO:2 или включающей ее, (c) молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей, по меньшей мере, из 20 нуклеотидов, комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту (a) или (b), причем указанный полинуклеотид/ молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток цитозина в положении, соответствующем положению -13910 в 5'-направлении от гена LPH; и (d) молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей, по меньшей мере, из 20 нуклеотидов,

комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту (a) или (b), причем указанный полинуклеотид/ молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток гуанина в положении, соответствующем положению -22018 в 5'-направлении от гена LPH. Настоящее изобретение также касается способов тестирования на наличие или предрасположенность к гиполактазии взрослого типа, которые основываются на анализе SNP, содержащегося в вышеуказанной молекуле нуклеиновой кислоты. 16 н. и 49 з.п. ф-лы, 8 табл., 9 ил.

(56) (продолжение):

**AQ515834 XP002244248. BOLL W. et al. Structure of the chromosomal gene and complementary DNAs coding for lactase phlorisin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase, Am. J. of Human Genetics, 1991, v.48, №5, p.889-902.**

R U 2 3 9 1 4 0 4 C 2

R U 2 3 9 1 4 0 4 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C12N 15/09* (2006.01)*C12N 9/24* (2006.01)*C12N 9/38* (2006.01)*A61K 31/7088* (2006.01)*C12N 15/55* (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)*A61P 43/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004107086/15, 09.08.2002**(24) Effective date for property rights:  
**09.08.2002**(30) Priority:  
**10.08.2001 EP 01119377.8**  
**14.08.2001 EP 01119528.6**  
**31.08.2001 US 60/315,955**(43) Application published: **10.04.2005**(45) Date of publication: **10.06.2010 Bull. 16**(85) Commencement of national phase: **10.03.2004**(86) PCT application:  
**EP 02/08963 (09.08.2002)**(87) PCT publication:  
**WO 03/014342 (20.02.2003)**Mail address:  
**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO**  
**"Sojuzpatent", pat.pov. A.P.Agureevu**

(72) Inventor(s):

**PEL'TONEN Lena (FI),**  
**EhNATTAKh Nabil' (FI),**  
**JaRVELJa Irma (FI),**  
**SAKHi Timo (FI),**  
**SAVILAKhTI Ehrki (FI),**  
**TERVILLIGER Dzhozef (US)**

(73) Proprietor(s):

**NEhShNL PABLIK KhELS INSTIT'JuT (FI)**(54) **IDENTIFICATION OF DNA VERSION RELATED TO ADULT HYPOLACTASIA**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and the DNA version related to adult hypolactasia. The substance of invention includes a nucleic acid molecule containing the 5'-end part of the intestinal digestive lactase-phlorizin hydrolase (LPH) gene which participates or serves as an indicator of adult hypolactasia. The said nucleic acid molecule is selected from a group consisting of: (a) nucleic acid molecules having the SEQ ID NO:1 sequence or containing it, where the SEQ ID NO:1 sequence and (b) nucleic acid molecules having the SEQ ID NO:2 sequence or containing it, (c) nucleic acid molecules consisting of at least 20 nucleotides whose complementary strand is hybridised in strict conditions with the nucleic acid molecule at point

(a) or (b), where the said polynucleotide/or nucleic acid molecule contains a cytosine residue in a position corresponding to position -13910 in the 5'-direction from the LPH gene; and (d) nucleic acid molecules consisting of at least 20 nucleotides whose complementary strand is hybridised in strict conditions with the nucleic acid molecule at point (a) or (b), where the said polynucleotide/nucleic acid molecule contains a guanine residue in a position corresponding to position -22018 in the 5'-direction from the LPH gene.

EFFECT: design of a method of testing presence or predisposition to adult hypolactasia, which is based on SNP analysis, contained in the said nucleic acid molecule.

65 cl, 7 ex, 8 tbl, 9 dwg

Текст описания приведен в факсимильном виде.

**Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение касается молекулы нуклеиновой кислоты, включающей 5'-  
5 концевую часть гена кишечной лактазы–флоризингидролазы (LPH), принимающей  
участие в служащего индикатором гиполактазии взрослого типа, при этом указанная  
молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из: (а) молекулы  
10 нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или  
включающей ее, причем последовательность SEQ ID NO:1 также приведена на фиг. 4 и  
содержится в последовательности, приведенной на фиг. 8; (b) молекулы нуклеиновой  
кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2 или включающей ее,  
15 причем последовательность SEQ ID NO:2 также приведена на фиг. 5 и содержится в  
последовательности, приведенной на фиг. 9; (с) молекулы нуклеиновой кислоты,  
состоящей, по меньшей мере, из 20 нуклеотидов, комплементарная цепь которой  
20 гибридизуется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по (а) или (b); при  
этом указанный полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток  
цитозина в положении, соответствующем положению –13910 в 5'-направлении от гена  
LPH; и (d) молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей, по меньшей мере, из 20  
25 нуклеотидов, комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с  
молекулой нуклеиновой кислоты по (а) или (b), при этом указанный полинуклеотид/  
молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток гуанина в положении,  
30 соответствующем положению –22018 в 5'-направлении от гена LPH. Настоящее  
изобретение также касается способов тестирования на наличие или предрасположенность  
к гиполактазии взрослого типа на основании анализа SNP, содержащегося в указанной  
35 выше молекуле нуклеиновой кислоты. Кроме того, настоящее изобретение касается  
диагностической композиции и набора, применимого при выявлении наличия или  
предрасположенности к гиполактазии взрослого типа.

**Уровень техники**

40 В данном описании процитирован целый ряд документов. Содержание этих  
документов, включая инструкции и каталоги фирм-производителей, включаются в  
настоящее изобретение путем отсылки.

45 Фермент лактаза–флоризингидролаза (LPH), которая экспрессируется  
исключительно в клетках кишечного эпителия, гидролизует лактозу (молочный сахар) до

50

глюкозы и галактозы [1]. Экспрессия фермента LPH резко уменьшается до очень низкого уровня в период отъема у млекопитающих, когда лактоза перестает составлять неотъемлемую часть рациона. У человека состояние, известное как гиполактазия  
5 взрослого типа или неперсистентность лактазы, затрагивает большинство населения и сильно ограничивает употребление свежего молока среди взрослых вследствие непереносимости лактозы. Возраст, в котором возникает неперсистентность лактазы,  
10 колеблется от популяции к популяции, составляя от 1-2 лет у тайцев до 10-20 лет у финнов [2-3]. Однако у жителей Северной Европы и некоторых других этнических групп активность LPH сохраняется на протяжении всей жизни у большинства взрослого населения, и такое состояние известно как персистентность лактазы. Как оказалось,  
15 фенотип персистентность/неперсистентность лактазы определяется генетически, причем персистентность доминантна по отношению к неперсистентности [4-6].

Современная диагностика гиполактазии взрослого типа основывается на тесте  
20 толерантности к лактозе (ЛТТ). После голодания в течение ночи (10 часов) дают лактозу в дозе 1 г/кг в виде 12,5% раствора, причем максимальная доза составляет 50 г. Отбирают пробы капиллярной крови перед потреблением лактозы и через 20 и 30 минут после этого. Определяют концентрацию глюкозы с помощью глюкозооксидазы (Hjelm and de Verdier,  
25 1963). Отмечают симптоматику брюшной полости в день проведения ЛТТ. Максимальное повышение концентрации глюкозы в крови на 1,1 ммоль/л и выше считается признаком нарушения всасывания лактозы (Gudman-Hoyer and Harnum 1968; Jussila 1070; Sahi 1972).  
30 При ЛТТ риск получения ложноположительных и ложноотрицательных диагнозов составляет 10%, то есть чувствительность и специфичность ЛТТ составляет около 90% (Isokoski et al. 1972; Sahi 1983). Достоверность ЛТТ можно повысить приемом этанола в  
35 дозе 0,3 г/кг, который ингибирует метаболизм галактозы в печени (Tygstrup and Lundquist 1962), а через 15 мин – лактозы в дозе 1 г/кг в виде 12,5% раствора.

Детей с максимальным повышением менее 0,2 мг/100 мл при первом или  
40 повторном ЛТТ направляют на биопсию тонкого кишечника, которая проводится путем гастроскопии. Это инвазивная процедура, требующая опыта, и обычно она выполняется в университетских госпиталях только специалистами по гастроэнтерологии. Образцы биопсии исследуют под препаровальной лупой и гистологически, и определяют  
45 активность мальтазы, сахаразы и лактазы (Launiala et al. 1964). Диагноз гиполактазии у детей считается подтвержденным, если гистология биопсии кишечника оказывается нормальной и активность лактазы составляет менее 200 ед./г белка, а соотношение  
50 лактаза/сахараза меньше 0,30, либо при ЛТТ с приемом этанола максимальное повышение концентрации глюкозы в крови составляет менее 20 мг/100 мл и повышение концентрации

5 галактозы составляет 5 мг/100 мл или меньше (Sahi et al. 1972). Как описано выше, действующие методы диагностики гиполактазии взрослого типа являются трудоемкими. Тест ЛТТ неточен, поэтому требуется инвазивная процедура – гастроскопия для  
5 подтверждения диагноза. Поскольку гиполактазия взрослого типа встречается очень часто и является главной причиной неспецифических симптомов брюшной полости (у трети пациентов с жалобами на боли в животе), то существует явная потребность в улучшении  
10 диагностики этого распространенного недуга.

Однако пока не разработаны биохимические тесты, легко выполнимые и в то же время дающие быстрые и точные результаты. Выяснение причины заболевания на уровне геномной ДНК/экспрессии оказалось в равной мере безуспешным. Так, секвенирование  
15 кодирующих и промоторных участков гена LPH у взрослых не выявило изменчивости ДНК, коррелирующей с персистенцией/неперсистенцией лактазы, и не появилось данных о сплайсинг-вариантах или вариантах по редактированию мРНК, связанных с  
20 этим признаком [7-8]. Предшествующие исследования показали, что признак персистенции/неперсистенции, возможно, контролируется *цис*-элементами, находящимися в или примыкающими к гену лактазы, и наблюдалась сильная неустойчивость сцепления по гаплотипу в 70 т.п.о., охватывающему ген лактазы [9-10]. В  
25 некоторых исследованиях приводятся данные о том, что основной контроль экспрессии гена LPH осуществляется на уровне регуляции транскрипции [11-13]. Однако высказывалось и предположение, что в этиологии гиполактазии взрослого типа участвуют  
30 изменения, влияющие как на транскрипционный, так и на посттранскрипционный контроль экспрессии гена LPH [14-15].

Ввиду вышесказанного техническая проблема, лежащая в основе настоящего  
35 изобретения, состоит в обеспечении средств и способов, способствующих точной и удобной диагностике гиполактазии взрослого типа или предрасположенности к этому заболеванию.

40 Решение указанной технической проблемы достигается посредством воплощений, охарактеризованных в формуле изобретения.

#### **Раскрытие изобретения**

Итак, настоящее изобретение касается молекулы нуклеиновой кислоты,  
45 включающей 5'-концевую часть гена кишечной лактазы–флоризингидролазы (LPH), принимающей участие в или служащего индикатором гиполактазии взрослого типа, при этом молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из: (а) молекулы  
50 нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или включающей ее, причем последовательность SEQ ID NO:1 также приведена на фиг. 4 и

содержится в последовательности, приведенной на фиг. 8; (b) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2 или включающей ее, причем последовательность SEQ ID NO:2 также приведена на фиг. 5 и содержится в последовательности, приведенной на фиг. 9; (c) молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей, по меньшей мере, из 20 нуклеотидов, комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по (a) или (b), при этом указанный полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток цитозина в положении, соответствующем положению -13910 в 5'-направлении от гена LPH; и (d) молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей, по меньшей мере, из 20 нуклеотидов, комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по (a) или (b), при этом указанный полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток гуанина в положении, соответствующем положению -22018 в 5'-направлении от гена LPH.

В соответствии с изобретением термин “ген кишечной лактазы-флоризин-гидролазы (LPH)” означает ген, кодирующий фермент, обладающий активностью гидролиза лактозы на составные части – глюкозу и галактозу. Этот фермент классифицируется как E.C. 3.2.1.23.62.

Термин “гиполактазия взрослого типа” относится к состоянию, известному как непереносимость лактозы, которое является аутомным рецессивным состоянием, происходящим от “физиологического” спада активности фермента лактазы-флоризин-гидролазы (LPH) в клетках кишечника у значительной части населения мира.

Термин “принимающего участие в или служащего индикатором гиполактазии взрослого типа” относится к тому, что SNP и соответствующие им найденные молекулы нуклеиновых кислот служат индикатором этого состояния, а возможно и его причиной. Соответственно, этот термин безусловно означает, что указанная 5'-концевая часть служит индикатором этого состояния. С другой стороны, этот термин не обязательно означает, что 5'-концевая часть является причиной этого состояния или принимает в нем участие. Тем не менее, данный термин не исключает роли одного из или обоих SNPs как причины или участника.

Термин “гибридуется в строгих условиях” относится к условиям гибридизации, которые хорошо известны или могут быть установлены специалистом в этой области в соответствии со стандартными методами. Этот термин наиболее предпочтительно относится к условиям высокой строгости. Соответствующие условия строгости для каждой последовательности могут быть установлены на основании хорошо известных параметров, таких как температура, состав молекул нуклеиновой кислоты, солевые

условия и т.д., к примеру, см. Sambrook et al., “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989, или Higgins and Hames (eds.), “Nucleic acid hybridization, a practical approach”, IRL Press, Oxford, 1985 (ссылка 54), в частности, см. главу “Hybridization Strategy” by Britten & Davidson, 3-15. Типичные условия (высокой строгости) включают гибридизацию при 65°C в 0,5×SSC и 0,1% SDS или гибридизацию при 42°C в 50% формамиде, 4×SSC и 0,1% SDS. За гибридизацией обычно следует отмывка для удаления неспецифического сигнала. Условия отмывки включают такие условия, как 65°C, 0,2×SSC и 0,1% SDS или 2×SSC и 0,1% SDS, либо 0,3×SSC и 0,1% SDS при 25°C–65°C.

Как раскрыто выше, настоящее изобретение также касается гибридизации молекул нуклеиновых кислот, состоящих, по меньшей мере, из 20 нуклеотидов, см. выше пункты (с) и (d). Вместе с тем, настоящее изобретение также касается молекул нуклеиновых кислот, состоящих, по меньшей мере, из 50 нуклеотидов, по меньшей мере, 100, по меньшей мере, 150 или, по меньшей мере, 200 нуклеотидов. Предпочтительно гибридизирующиеся фрагменты включают, по меньшей мере, 25, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 75 или, по меньшей мере, 100 нуклеотидов в 5'- и 3'-направлении от положения –13910 согласно п. (с) или положения –22018 согласно п. (d), как указано выше.

Термин “молекула нуклеиновой кислоты” относится и к природным, и к не встречающимся в природе молекулам нуклеиновых кислот. Не встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот включают кДНК и такие производные, как PNA.

Термин “молекула нуклеиновой кислоты, [...] включающая последовательность SEQ ID NO:” во всем описании относится к молекулам нуклеиновых кислот, длина которых, по меньшей мере, на 1 нуклеотид превышает длину нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO:. В то же время такие молекулы нуклеиновых кислот могут максимально простираться на 30000 нуклеотидов от 5'- и/или 3'-конца молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, приведенной, к примеру, в SEQ ID NO:2 или 1, 3 или 4.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1. Изученные финские семьи с гиполактазией взрослого типа. Черными значками обозначены лица с гиполактазией, звездочка (\*) означает, что не было образцов, знак вопроса (?) означает, что наличие заболевания неизвестно. Стрелкой ↑ обозначены лица, послужившие для секвенирования для идентификации SNP (табл. 2).

Фиг. 2. Физическая карта локуса гиполактазии взрослого типа. ВАС-клоны указаны над горизонтальной линией. Три гена – LPH, MCM6 и DARS указаны толстыми черными

стрелками, концы которых показывают на 3'-конец гена над черной рамкой. Показано положение 10 полиморфных микросателлитных маркеров, использованных для подробного картирования локуса. Косые черточки на горизонтальной линии обозначают брешу в последовательности контига. Положение маркера D2S2169 было подтверждено путем заполнения брешу клоном PAC 106O20, выделенным из библиотеки PAC, как описано ранее [40]. Представлена организация гена MCM6, включая положение вариантов, связанных с фенотипом персистенции лактазы, в интронах 9 и 13, находящихся на расстоянии 13,9 т.п.о. и 22 т.п.о. в 5'-направлении от первого ATG гена LPH.

Фиг. 3. Расширенный анализ гаплотипов несущих персистенность хромосом, полученных от финских семей с гиполактазией взрослого типа, по 7 тесно сцепленным микросателлитным маркерам. Гаплотипы, представляющие персистентную хромосому предка-основателя, выделены затенением. Представлены только те гаплотипы хромосом, несущих персистенность, которые также представлены в хромосомах, несущих неперсистенность. На основании предковых рекомбинаций локус гиполактазии взрослого типа был сужен до отрезка в 47 т.п.о. между маркерами LPH1 и AC3.

Фиг. 4. Последовательность, входящая в последовательность интрона 13 гена MCM6 (3220 п.о.), содержащая SNP в положении -13910, в котором остаток Т, специфичный для персистенции лактазы, заменен остатком С. Данное положение указано маленькой буквой. Эта последовательность обозначена как SEQ ID NO:1.

Фиг. 5. Последовательность, входящая в последовательность интрона 9 гена MCM6 (1295 п.о.), содержащая SNP в положении -22018, в котором остаток А, специфичный для последовательности типа персистенции лактазы, заменен остатком G. Данное положение указано маленькой буквой. Эта последовательность обозначена как SEQ ID NO:2.

Фиг. 6. Последовательность интрона 13 гена MCM6 (3220 п.о.) типа персистенции лактазы, содержащая Т в положении -13910. Данное положение указано маленькой буквой. Эта последовательность обозначена как SEQ ID NO:3.

Фиг. 7. Последовательность интрона 9 гена MCM6 (1295 п.о.) типа персистенции лактазы, содержащая А в положении -22018. Данное положение указано маленькой буквой. Эта последовательность обозначена как SEQ ID NO:4.

Фиг. 8. Последовательность интрона 13 гена MCM6 (3220 п.о.), содержащая SNP в положении -13910, в котором остаток Т, специфичный для последовательности типа персистенции лактазы, заменен остатком С. Данное положение указано маленькой буквой. Эта последовательность обозначена как SEQ ID NO:5.

Фиг. 9. Последовательность интрона 9 гена MCM6 (1295 п.о.), содержащая SNP в положении -22018, в котором остаток А, специфичный для последовательности типа персистенности лактазы, заменен остатком G. Данное положение указано маленькой буквой. Эта последовательность обозначена как SEQ ID NO:6.

### Осуществление изобретения

Неожиданно было обнаружено, в соответствии с настоящим изобретением, что два связанных с гиполактазией варианта располагаются на значительном расстоянии от гена LPH и находятся в различных интронах гена MCM6. Ген MCM6 входит в семейство генов (MCM2-7), необходимых для инициации репликации ДНК, которые обеспечивают, что она происходит только один раз за время клеточного цикла [31]. В отличие от LPH MCM6 не имеет ограничений в распределении по тканям и не наблюдается корреляции в уровнях транскриптов MCM6 и LPH [18]. Эти данные свидетельствуют, что эти два гена не имеют никаких общих функционально значимых *цис*-действующих элементов, обеспечивающих тканевую специфичность или регуляцию в онтогенезе [18]. Скорее всего указанные варианты имеют различное функциональное значение для экспрессии генов LPH и MCM6. Еще более неожиданно оказалось, на основании полной ассоциации с гиполактазией, что они (или один из них) связаны с возрастным подавлением уровня транскрипции гена LPH в кишечном эпителии, но не влияют или почти не влияют на транскрипцию MCM6.

Экспериментальным путем, с помощью анализа сцепления, аллельных связей и расширенного анализа гаплотипов, проведенного на 9 разветвленных финских семьях, локус гиполактазии взрослого типа был сужен до отрезка в 47 т.п.о. на 2q21. Анализ последовательности этого участка выявил точечный полиморфизм (однонуклеотидный полиморфизм, SNP) – С/Т-13910, который полностью косегрегировал вместе с признаком гиполактазии взрослого типа во всех финских семьях и в выборке из 236 человек из 4 разных популяций. Другой SNP, G/A-22018, отстоящий на 8 т.п.о. в теломерном направлении от С/Т-13910, был связан с этим признаком во всех случаях, кроме 7. Преобладание SNP С/Т-13910 в 1047 образцах ДНК отражает известную распространенность гиполактазии взрослого типа в 3 различных популяциях, что служит дополнительным подтверждением важности этого признака.

Неожиданное открытие, отмеченное выше, впервые дает возможность создания тест-систем, основанных на молекулярном анализе указанных однонуклеотидных полиморфизмов против направления транскрипции (upstream) гена LPH. Хотя оба SNP создают прочную основу для диагностики гиполактазии взрослого типа или предрасположенности к ней, предпочтительно следует анализировать нуклеотид в положении -13910 либо в одиночку, либо в сочетании с нуклеотидом в положении

–22018. Это вызвано тем, что SNP в положении –13910 ассоциирован с заболеванием в 100% случаев, тогда как SNP в положении –22018 ассоциирован с заболеванием только в 98% случаев гиполактазии взрослого типа. Тем не менее, анализ одного лишь нуклеотида в положении –22018 также обычно дает прочную основу для диагностики предрасположенности к гиполактазии взрослого типа.

Вследствие многообразия принятых методов оценки присутствия SNP теперь появилась возможность удобно, в короткое время, недорого, с большой точностью и не причиняя особых затруднений подвергаемому анализу лицу проводить диагностику генетической предрасположенности к гиполактазии взрослого типа.

Изобретение также касается молекулы нуклеиновой кислоты, включающей 5'-концевую часть гена кишечной лактазы–флоризингидролазы (LPH), при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из: (а) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:3 или включающей ее, причем последовательность SEQ ID NO:3 также приведена на фиг. 6; (b) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:4 или включающей ее, причем последовательность SEQ ID NO:4 также приведена на фиг. 7; (с) молекулы нуклеиновой кислоты, комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по (а) или (b); при этом указанный полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток тимидина в положении, соответствующем положению –13910 гена LPH; и (d) молекулы нуклеиновой кислоты, комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по (а) или (b), при этом указанный полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток аденозина в положении, соответствующем положению –22018 гена LPH.

Данное воплощение настоящего изобретения удобно для того, чтобы показать, что данное лицо не страдает гиполактазией взрослого типа и не имеет предрасположенности к ней. Кроме того, эту молекулу нуклеиновой кислоты, отражающую ситуацию “дикого типа” в положении –13910 или –22018 против направления транскрипции от гена LPH, можно использовать как средство контроля в тех опытах, в которых тестируется предрасположенность к гиполактазии взрослого типа. При тестировании можно применять методы, описанные в тексте настоящего описания.

В предпочтительном воплощении изобретения молекула нуклеиновой кислоты представляет собой геномную ДНК.

Это предпочтительное воплощение изобретения отражает тот факт, что анализ обычно проводится на основе геномной ДНК из внутренней среды организма, клеток или

тканей, выделенных из обследуемого лица.

В следующем предпочтительном воплощении молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению указанная геномная ДНК является частью гена.

5 В соответствии с изобретением, предпочтительно подвергают анализу, по меньшей мере, один из интронов гена MCM6, несущих положение -13910 или -22018 относительно гена LPH.

10 Кроме того, изобретение касается фрагмента молекулы нуклеиновой кислоты, описанной выше, имеющего, по меньшей мере, 14 нуклеотидов, причем данный фрагмент включает нуклеотидное положение -13910 или нуклеотидное положение -22018 против

15 направления транскрипции (upstream) гена LPH.  
Фрагмент по изобретению может быть как природного, так и (полу)синтетического происхождения. Так, этот фрагмент, к примеру, может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, синтезированную в соответствии со стандартными методами  
20 органической химии. Важно, чтобы этот фрагмент нуклеиновой кислоты по изобретению включал нуклеотидное положение -13910 или нуклеотидное положение -22018 против направления транскрипции гена LPH. В этих положениях фрагмент может содержать либо  
25 нуклеотид дикого типа, либо нуклеотид, принимающий участие в или служащий индикатором гиполактазии взрослого типа (что также обозначается как "мутантная" последовательность). Вследствие этого фрагмент по изобретению может применяться, к примеру, при проведении анализов, направленных на различение последовательности  
30 дикого типа и мутантной последовательности.

Более того, предпочтительно, чтобы фрагмент по изобретению состоял, по меньшей мере, из 17 нуклеотидов, более предпочтительно, по меньшей мере, 21  
35 нуклеотида и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 25 нуклеотидов, например, 30 нуклеотидов.

Кроме того, изобретение также касается молекулы нуклеиновой кислоты, которая  
40 комплементарна молекуле нуклеиновой кислоты, описанной выше.

45 Воплощение изобретения, включающее, по меньшей мере, 14 нуклеотидов и охватывающее, по меньшей мере, положение -13910 или -22018 из последовательности, расположенной против хода транскрипции относительно гена LPH, особенно полезно при анализе генетической структуры в указанных положениях методами гибридизации. Так, например, можно использовать 15-мер, в точности комплементарный либо  
50 последовательности дикого типа (то есть Т в положении -13910 или А в положении -22018), либо вариантам, принимающим участие в или служащим индикатором гиполактазии взрослого типа (то есть С в положении -13910 или G в положении -22018),

для различения полиморфных вариантов. Это вызвано тем, что молекула нуклеиновой кислоты, помеченная удобной для детектирования меткой, если она не в точности комплементарна ДНК в анализируемом образце, не будет давать различимого сигнала, если выбраны надлежащие условия гибридизации и отмывки.

В этом отношении важно отметить, что молекула нуклеиновой кислоты по изобретению, ее фрагмент или же комплементарная молекула нуклеиновой кислоты может быть помечена удобной для детектирования меткой. К таким детектируемым меткам относятся радиоактивные метки типа  $^3\text{H}$  или  $^{32}\text{P}$  либо флуоресцентные метки. Мечение нуклеиновых кислот хорошо известно в данной области, и оно описано, к примеру, в Sambrook et al., loc. cit.

Кроме того, изобретение касается вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше. Вектор по изобретению может содержать либо молекулу нуклеиновой кислоты, включающую последовательность дикого типа, либо он может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность.

В частности, векторы могут представлять собой плазмиды, космиды, вирусы или бактериофаги, обычно применяемые в генной инженерии, включающие молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. Предпочтительно такой вектор является экспрессионным вектором и/или вектором для переноса или тиргетинга генов. Экспрессионные векторы, происходящие из таких вирусов, как ретровирусы, вирус осповакцины, адено-ассоциированные вирусы, герпесвирусы или вирус бычьей папилломы, могут быть использованы для доставки молекул нуклеиновой кислоты по изобретению в выбранные в качестве мишени популяции клеток. Для конструирования рекомбинантных вирусных векторов можно воспользоваться методами, хорошо известными специалистам в этой области, например, см. методы, описанные в Sambrook et al., loc. cit. и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). В качестве альтернативы молекулы нуклеиновых кислот и векторы по изобретению могут быть встроены в липосомы для доставки в клетки-мишени. Векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот по изобретению, могут быть введены в клетки-хозяева хорошо известными методами, которые зависят от типа клеток-хозяев. Например, трансфекция с помощью хлористого кальция обычно применяется для прокариотических клеток, тогда как, скажем, трансфекция с помощью фосфата кальция или DEAE-декстрана либо электропорация может применяться для других клеток-хозяев, см. Sambrook, supra.

Такие векторы могут включать и другие гены, например, маркерные гены, дающие возможность селекции вектора в соответствующих клетках-хозяевах и в соответствующих

условиях. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты по изобретению функционально связана с контролирующими экспрессию последовательностями, позволяющими экспрессию в прокариотических или эукариотических клетках. Экспрессия такого полинуклеотида включает его транскрипцию в транслируемую мРНК. Регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотических клетках, предпочтительно в клетках млекопитающих, хорошо известны специалистам в этой области. Обычно они включают регуляторные последовательности, обеспечивающие инициацию транскрипции и, необязательно, сигнал поли-А, обеспечивающий терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта, и/или интрон, дополнительно повышающий экспрессию данного полинуклеотида. Дополнительные регуляторные элементы могут включать энхансеры транскрипции или трансляции и/или естественно ассоциированные или гетерологичные промоторные участки. Возможные регуляторные элементы, позволяющие экспрессию в прокариотических клетках хозяина, включают, к примеру, промоторы PL, lac, trp или tac в *E. coli*, а примеры регуляторных элементов, позволяющих экспрессию в эукариотических клетках хозяина, – промоторы AOX1 или GAL1 в дрожжах или промоторы CMV, SV40, RSV (вируса саркомы Рауса), энхансер CMV, энхансер SV40 или интрон глобина в клетках млекопитающих или других животных. Помимо элементов, ответственных за инициацию транскрипции, такие регуляторные элементы могут включать и сигналы терминации транскрипции, такие как сайт поли-А из SV40 или сайт поли-А из tk, по ходу транскрипции (down stream) от полинуклеотида. При необходимости гетерологичная последовательность может кодировать слитый белок, включающий С- или N-концевой идентификационный пептид, придающий требуемые свойства, напр., стабилизацию или упрощение очистки экспрессированного рекомбинантного продукта. В этой связи подходящие экспрессионные векторы известны в данной области, к примеру, вектор pCDV1 для экспрессии кДНК типа Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pCDNA1, pCDNA3, система клонирования Echo™ (Invitrogen), pSPORT1 (Gibco BRL), pRevTet-On/pRevTet-Off или pCI (Promega). Предпочтительно контролирующие экспрессию последовательности представлены эукариотическими промоторными системами в векторах, способных к трансформации или трансфекции эукариотических клеток-хозяев, однако можно использовать и контрольные последовательности для прокариотических хозяев.

Как указано выше, вектор по настоящему изобретению также может являться вектором для переноса или таргетинга генов. Генная терапия, которая основывается на введении терапевтических генов в клетки методами *ex vivo* или *in vivo*, является одним из самых важных применений переноса генов. Подходящие векторы и методы генной

терапии *in vitro* или *in vivo* описаны в литературе и известны специалистам в этой области, например, см. Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; 5 Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640 или Kay et al. (2001) *Nature Medicine* 7, 3-40, и приведенные в них ссылки. Могут быть 10 сконструированы полинуклеотиды и векторы по изобретению для прямого введения или для введения в клетки через липосомы, или вирусные векторы (аденовирусные, ретровирусные). Предпочтительно указанные клетки представляют собой клетки зародышевой линии, эмбриональные клетки или яйцеклетки либо происходят из них, наиболее 15 предпочтительно указанные клетки представляют собой стволовые клетки. Генная терапия предусмотрена только при помощи молекул нуклеиновой кислоты дикого типа.

Изобретение также касается праймера или пары праймеров, при этом праймер или 20 пара праймеров гибридизуется в (очень) строгих условиях с нуклеиновой кислотой, описанной выше, включающей нуклеотид в положении -13910 или -22018 относительно гена LPH, либо с комплементарной ей цепью.

Предпочтительно длина праймеров по изобретению составляет, по меньшей мере, 25 14 нуклеотидов, например, 17 или 21 нуклеотид. Также предпочтительно максимальная длина праймеров составляет 24 нуклеотида. Гибридизация или отсутствие гибридизации праймера в соответствующих условиях с геномной последовательностью, включающей 30 положение -13910 либо положение -22018, вместе с подходящим методом детекции типа реакции элонгации или реакции амплификации может применяться для различения полиморфных вариантов, а затем составления выводов в отношении, к примеру, предрасположенности анализируемого лица к гиполактазии взрослого типа. Настоящее 35 изобретение предусматривает два типа праймеров/пар праймеров. Один тип гибридизуется с последовательностью, содержащей мутантную последовательность. Иными словами, праймер в точности комплементарен последовательности, содержащей С в 40 положении -13910 или G в положении -22018, либо комплементарной ей цепи. Другой тип праймера в точности комплементарен последовательности, содержащей T в положении -13910 или A в положении -22018, либо комплементарной ей цепи. 45 Поскольку предпочтительно выбирают достаточно строгие условия гибридизации, то контактирование, к примеру, праймера, который в точности комплементарен мутантной последовательности, с аллелем дикого типа не приведет к эффективной гибридизации 50 вследствие образования мисматча. После отмывки не будет обнаружено никакого сигнала вследствие удаления праймера.

Кроме того, изобретение касается хозяина - не человека, трансформированного вектором по изобретению, как описано выше. Хозяин может нести мутантную последовательность или последовательность дикого типа. При скрещивании и т.д. хозяин может стать гетерозиготным или гомозиготным по одному или обоим SNP.

Хозяин по изобретению может нести вектор по изобретению либо временно, либо стабильно интегрированным в геном. Методы получения хозяина - не человека по изобретению хорошо известны в данной области. Например, можно применить стандартные методики трансфекции, описанные в Sambrook et al., loc. cit., для получения трансформированных бактерий (типа *E. coli*) или трансформированных дрожжей. Хозяин - не человек по изобретению может быть использован, к примеру, для выяснения начала гиполактазии взрослого типа.

В предпочтительном воплощении изобретения хозяином - не человеком являются бактерии, дрожжевые клетки, клетки насекомых, клетки грибов, клетки млекопитающих, клетки растений, трансгенные животные или трансгенные растения.

Предпочтительными бактериями являются *E. coli*, тогда как предпочтительными дрожжевыми клетками являются *S. cerevisiae* или *Pichia pastoris*. Предпочтительными клетками грибов являются клетки *Aspergillus*, а к предпочтительным клеткам насекомых относятся клетки *Spodoptera frugiperda*. Предпочтительными клетками млекопитающих являются клеточные линии карциномы толстого кишечника, демонстрирующие экспрессию фермента LPH, и к ним относятся клетки CaCo2.

Способ получения трансгенных животных (кроме человека), к примеру, трансгенных мышей, включает введение вышеуказанного полинуклеотида или вектора для таргетинга в зародышевые клетки, эмбриональные клетки, стволовые клетки или яйцеклетки, либо происходящие из них клетки. Данное животное - не человек может быть использовано в соответствии со способом скрининга, описанным в настоящем изобретении. Получение трансгенных эмбрионов и их скрининг может проводиться, к примеру, как описано в A.L. Joyner Ed., *Gene Targeting, A Practical Approach* (1993), Oxford University Press. ДНК из зародышевых оболочек эмбрионов можно анализировать, к примеру, методом Southern-гибридизации с помощью соответствующей комплементарной молекулы нуклеиновой кислоты, см. выше. Общеупотребительный метод получения трансгенных животных (кроме человека) описан в данной области, например, см. WO 94/24274. Для получения трансгенных организмов (в том числе животных (кроме человека), полученных путем гомологичного таргетинга предпочтительны эмбриональные стволовые клетки (ES-клетки). Для гомологичного таргетинга генов можно использовать мышинные ES-клетки типа линии AB-1, культивируемой на питающем слое митотически

неактивных клеток SNL76/7 (McMahon and Bradley, Cell 62: 1073-1085 (1990), в основном как описано Robertson E.J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), p. 71-112. Другие подходящие линии ES-клеток включают линию E14 (Hooper et al., Nature 326: 292-295 (1987), линию D3 (Doetschman et al., J. Embryol. Exp. Morph. 87: 27-45 (1985), линию CCE (Robertson et al., Nature 323: 445-448 (1986), линию AK-7 (Zhuang et al., Cell 77: 875-884 (1994), но не ограничиваются ими. Успех в создании линии мышей из ES-клеток, несущих специфическую направленную мутацию, зависит от плюрипотентности ES-клеток (то есть их способности, после инъекции в развивающийся эмбрион хозяина типа бластоциста или морулы, к участию в эмбриогенезе и внесению вклада в зародышевые клетки получающегося животного). Бластоцисты, содержащие введенные ES-клетки, помещаются для развития в матку ложно-беременных самок и рождаются как химерные мыши. Полученных трансгенных мышей, химерных по клеткам, содержащим требуемые молекулы нуклеиновой кислоты, подвергают обратному скрещиванию и скринингу на присутствие правильно таргетированного трансгена путем анализа методом ПЦР или Southern-гибридизации ДНК, полученной из хвостовой биопсии потомства с тем, чтобы идентифицировать трансгенных мышей, гетерозиготных по молекуле нуклеиновой кислоты по изобретению.

Трансгенными животными (кроме человека) могут быть, к примеру, трансгенные мыши, крысы, хомяки, собаки, обезьяны, кролики, свиньи или коровы. Предпочтительно указанным трансгенным животным – не человеком является мышь. Трансгенные животные по изобретению, среди прочего, полезны для изучения фенотипической экспрессии/последствий нуклеиновых кислот и векторов настоящего изобретения. Кроме того, трансгенные животные настоящего изобретения полезны для изучения экспрессии фермента LPH в онтогенезе, например, в кишечнике грызунов. Более того, предусматривается, что трансгенные животные по изобретению могут применяться для тестирования терапевтических средств/композиций или других возможных способов лечения, полезных для облегчения гиполактазии взрослого типа.

Кроме того, изобретение касается антител, аптамеров или фагов, специфически связывающихся с мутантной молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению, но не с соответствующей молекулой нуклеиновой кислоты дикого типа.

Антитело можно проверить на связывание и использовать в любом серологическом методе, хорошо известном в этой области, например, методе агглютинации в пробирках, гелях, твердой фазе и в методах улавливания с помощью вторичных антител или без них, либо в проточной цитометрии с усилением иммунофлуоресценции или без нее (например,

см. методы, описанные в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, USA, 1988 (см. ссылку 53).

В соответствии с изобретением антитело специфически распознает эпитоп, включающий положение -13910 (в котором находится нуклеотид С) или положение -22018 (в котором находится нуклеотид G). Оно не реагирует или практически не реагирует перекрестно ни с эпитопом, включающим положение -13910, если в нем находится Т, ни с эпитопом, включающим положение -22018, если в нем находится G. Специфичность антитела, которое может быть получено стандартными методами, можно проверить путем контактирования с молекулами ДНК, несущими последовательность дикого типа и мутантную последовательность, к примеру, методом ELISA. Следует отбирать только те антитела, которые дают сигнал выше фона с мутантной последовательностью, но не с последовательностью дикого типа.

Антитело по изобретению может быть моноклональным антителом или антителом, происходящим из или содержащимся в поликлональной антисыворотке. Термин "антитело" в применении к настоящему изобретению также включает фрагменты указанного антитела, например, фрагменты Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv или scFv; см., к примеру, Harlow and Lane [53], loc. cit. Антитело или его фрагмент может иметь природное происхождение или может быть получено (полу)синтетическим путем. К таким синтетическим препаратам относятся и небелковые и полубелковые материалы, обладающие такой же или по существу такой же специфичностью связывания, как антитело по изобретению. Такие препараты, к примеру, могут быть получены при помощи пептидомиметиков.

Термин "аптамер" хорошо известен в данной области и определен, к примеру, в Osborn et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 1 (1997), 5-9 (см. ссылку 51) или в Stall and Szoka, Pharm. Res. 12 (1995), 465-483 (см. ссылку 52).

Кроме того, изобретение касается антитела, аптамера или фага, специфически связывающегося с молекулой нуклеиновой кислоты дикого типа, описанной выше, но не с соответствующей мутантной последовательностью, принимающей участие или служащей индикатором гиполактазии взрослого типа. Все сказанное по поводу специфичности и т.п. в отношении антител, специфичных к мутантной последовательности, применимо и в данном случае, с соответствующими изменениями.

Далее, изобретение также касается фармацевтической композиции, включающей молекулы нуклеиновой кислоты дикого типа, описанной выше.

Фармацевтическая композиция по изобретению может применяться в генной терапии, особенно в соматической генной терапии.

Молекулы нуклеиновой кислоты дикого типа, указанные выше и содержащиеся в фармацевтической композиции изобретения, можно комбинировать с фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50

Примеры соответствующих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области и включают фосфатно-солевые буферы, воду, эмульсии типа эмульсий масло/вода, смачивающие вещества различного типа, стерильные растворы и т.д. Содержащие такие носители композиции можно составлять хорошо известными стандартными методами. Эти фармацевтические композиции можно вводить пациентам в соответствующих дозах. Введение соответствующих композиций может осуществляться различными способами: внутривенно, внутривентриально, подкожно, внутримышечно, местно, интрадермально, интраназально или интрабронхиально. Дозовая схема определяется лечащим врачом и клиническими факторами. В области медицины хорошо известно, что дозировка для любого пациента зависит от многих факторов, включая габариты пациента, площадь поверхности тела, возраст, применяемое соединение, пол, время и способ применения, общее состояние здоровья и сочетанное применение других лекарств. Типичная доза, к примеру, может находиться в пределах от 0,001 до 1000 мкг нуклеиновой кислоты для экспрессии или для подавления экспрессии; однако предусмотрены и дозы ниже или выше этого типичного диапазона, особенно с учетом вышеуказанных факторов. Дозировка варьирует, однако предпочтительная дозировка для внутривенного введения ДНК составляет примерно от  $10^6$  до  $10^{12}$  копий молекулы ДНК. За развитием процесса можно следить путем периодической оценки. Композиции по изобретению могут применяться локально или системно. Обычно они вводятся парентерально, напр., внутривенно; ДНК можно также вводить непосредственно в область-мишень, к примеру, путем библистической доставки в область-мишень внутри организма или снаружи, либо через катетер в местную артерию. К препаратам для парентерального введения относятся стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей: пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло типа оливкового масла и пригодные для инъекции сложные органические эфиры типа этилолеата. К водным растворителям относятся вода, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физраствор и буферные среды. К носителям для парентерального введения относятся раствор хлористого натрия, раствор Рингера с глюкозой (декстрозой), раствор с глюкозой и хлористым натрием, раствор Рингера с лактатом, а также жирные масла. К носителям для внутривенного введения относятся восполнители жидкости и питательных веществ, восполнители электролитов (к примеру, на основе раствора Рингера с глюкозой) и т.п.

Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, например, антимикробные средства, антиоксиданты, хелаторы, инертные газы и т.п.

5 Кроме того, изобретение касается диагностической композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше, вектор, описанный выше, праймер или пару праймеров, описанных выше, и/или антитело, аптамер и/или фаг, описанные выше.

10 Диагностическая композиция применима для оценки генетического статуса человека в отношении предрасположенности к возникновению гиполактазии взрослого типа или в отношении диагностики острого состояния. Различные возможные компоненты диагностической композиции могут быть расфасованы в один или несколько флаконов, в растворителе или в ином виде, к примеру, в лиофилизованном виде. Если диагностическая  
15 композиция растворена в растворителе, то ее предпочтительно охлаждают, по меньшей мере, до  $+8^{\circ}\text{C}$  –  $+4^{\circ}\text{C}$ . В других случаях замораживание может быть предпочтительней.

Изобретение также касается способа тестирования на наличие или  
20 предрасположенность к гиполактазии взрослого типа или связанный с этим признак, что включает тестирование образца, полученного от предполагаемого пациента или лица, предположительно несущего такую предрасположенность, на присутствие молекулы  
25 нуклеиновой кислоты, описанной выше, в гомозиготном или гетерозиготном состоянии. В различных воплощениях образец может быть протестирован на наличие последовательности (ей) дикого типа или мутантной последовательности (ей).

30 Способ по изобретению применим для выявления генетической структуры данного лица/пациента и достижения соответствующих выводов о том, представляет ли состояние, которым страдает пациент, гиполактазию взрослого типа. В качестве альтернативы можно определить, несет ли лицо, не страдающее каким-либо заболеванием,  
35 предрасположенность к гиполактазии взрослого типа. Что касается положения  $-13910$  против направления транскрипции от гена LPH, то лишь когда обнаруживается цитозин в гомозиготном состоянии, будет поставлен диагноз гиполактазии взрослого типа или будет проявляться соответствующая предрасположенность. С другой стороны, если  
40 обнаруживается тимидин в гомозиготном состоянии или если человек гетерозиготен (С/Т), то можно заключить, что заболевание, которым страдает пациент, не связано с гиполактазией взрослого типа, а также пациент не несет предрасположенности к  
45 возникновению этого заболевания. Однако можно сделать вывод, что у детей от лиц, несущих гетерозиготный генотип, может возникнуть заболевание, если хромосома, несущая остаток С, совпадет с соответствующей хромосомой от другого родителя.

50 Такая же ситуация и, по существу, такие же выводы применимы при анализе SNP в положении  $-22018$ . Остаток G в гомозиготном состоянии является признаком

предрасположенности к или наличия острой гиполактазии взрослого типа. Гетерозиготное состояние G/A коррелирует с высокой вероятностью того, что заболевание не возникнет. От лиц, несущих A в гомозиготном состоянии, не следует ожидать возникновения заболевания. Аналогичным образом пациентам, страдающим каким-либо заболеванием, будет ставиться диагноз отсутствия гиполактазии взрослого типа.

В предпочтительном воплощении способа по изобретению тестирование включает проведение гибридизации комплементарной молекулы нуклеиновой кислоты, описанной выше, которая комплементарна молекуле нуклеиновой кислоты, принимающей участие в или служащей индикатором гиполактазии взрослого типа, либо молекулы нуклеиновой кислоты, описанной выше, которая комплементарна последовательности дикого типа, в качестве зонда в (очень) строгих условиях с молекулами нуклеиновых кислот, содержащихся в образце, и детектирование указанной гибридизации.

Опять же, в зависимости от используемого зонда из нуклеиновой кислоты, будут детектироваться либо последовательности дикого типа, либо мутантные последовательности (то есть последовательности, принимающие участие в или служащие индикатором гиполактазии взрослого типа). Подразумевается, что условия гибридизации выбираются таким образом, что молекулы нуклеиновой кислоты, комплементарные последовательностям дикого типа, не будут или, по существу, не будут гибридизоваться с мутантной последовательностью. Аналогичным образом молекулы нуклеиновой кислоты, комплементарные мутантной последовательности, не будут или, по существу, не будут гибридизоваться с последовательностью дикого типа. Для того, чтобы различить результаты, полученные от гомозиготных и гетерозиготных генотипов в способах гибридизации по изобретению, можно, к примеру, регистрировать/детектировать силу/интенсивность соответствующего сигнала детекции после гибридизации. Для различения гомозиготных аллелей дикого типа, гетерозиготных и/или гомозиготных мутантных аллелей в способах гибридизации по изобретению, при анализе следует включать внутренние контрольные образцы соответствующих генотипов.

В следующем предпочтительном воплощении способ изобретения дополнительно включает расщепление продукта гибридизации с помощью рестрикционной эндонуклеазы или подвергание продукта гибридизации расщеплению рестрикционной эндонуклеазой и анализ продукта указанного расщепления.

Данное предпочтительное воплощение изобретения позволяет удобным способом отличить эффективную гибридизацию от неэффективной гибридизации. Например, если последовательность ДНК, примыкающая к положению -13910 или к положению -22018, содержит сайт рестрикции эндонуклеазы, то гибридизованный продукт будет подвержен

расщеплению соответствующим рестрикционным ферментом при эффективной  
гибридизации, тогда как в отсутствие гибридизации не образуется двухцепочечный  
продукт либо он не содержит распознаваемого сайта рестрикции, а поэтому не будет  
5 расщепляться. В частности, рестрикционным ферментом, специфичным к  
последовательности ДНК варианта С/Т<sub>-13910</sub>, является CviII, а для варианта G/A<sub>-22018</sub> –  
NhaI и AciI. Эти рестрикционные ферменты, расщепляющие rg/cy, были найдены с  
10 помощью программы Webcutter. Анализ продукта расщепления осуществляется  
стандартными способами, к примеру, методом гель-электрофореза, который  
необязательно может сочетаться с окрашиванием нуклеиновых кислот, к примеру, с  
15 помощью бромистого этидия. Также предусматривается сочетание с другими методами,  
такими как Southern-гибридизация.

Детектирование указанной гибридизации может осуществляться, к примеру, с  
помощью антитела против двухцепочечной ДНК или с применением меченого  
20 олигонуклеотида. Удобно, когда способ изобретения применяется вместе с такими  
методами гибридизации, как Southern- или Northern-блоттинг, и родственными методами.  
Мечение может осуществляться, к примеру, по стандартной методике, и включает  
25 мечение радиоактивными маркерами, флуоресцентными, фосфоресцентными,  
хемилюминесцентными, ферментными метками и т.п. (также см. выше).

В соответствии с вышесказанным в следующем предпочтительном воплощении  
способа изобретения указанный зонд несет удобную для детектирования метку, например,  
30 при помощи методов и с помощью меток, описанных выше.

В следующем предпочтительном воплощении способа изобретения указанное  
тестирование включает определение нуклеотидной последовательности, по меньшей мере,  
35 части молекулы нуклеиновой кислоты, описанной выше, причем указанная часть  
включает положение -13910 и/или положение -22018 относительно гена LPH.  
Определение этой молекулы нуклеиновой кислоты может осуществляться в соответствии  
40 со стандартными методами, например, методом Сэнджера или методом Максама-  
Гилберта (дополнительные рекомендации см. в Sambrook et al., loc. cit.).

В следующем предпочтительном воплощении способа изобретения определение  
нуклеотидной последовательности осуществляется методом твердофазного  
45 минисеквенирования. Твердофазное минисеквенирование основывается на  
количественном анализе нуклеотидов дикого типа и мутантного в растворе. Сначала  
методом ПЦР амплифицируют участок генома, содержащий мутацию, с помощью одного  
50 биотинилированного и небитинилированного праймера, причем биотинилированный  
праймер фиксирован на покрытом стрептавидином (SA) планшете. Продукт ПЦР

подвергают денатурации до одноцепочной формы, чтобы праймер для минисеквенирования мог связываться с этой цепью перед самым сайтом мутации. В реакционную смесь вносят меченные тритием ( $^3\text{H}$ ) или флуоресцентной меткой мутантные нуклеотиды и нуклеотиды дикого типа вместе с немеченными dNTP и проводят секвенирование с помощью Taq-полимеразы. Результат определяется количеством нуклеотидов дикого типа и мутантных нуклеотидов в среде реакции при измерении на бета-счетчике или флуориметре и выражается в виде R-отношения. См. также Syvänen AC, Sajantila A, Lukka M. *Am J Hum Genet* 1993: 52, 46-59 и Suomalainen A and Syvänen AC. *Methods Mol Biol* 1996: 65, 73-79.

Предпочтительное воплощение способа изобретения также включает, перед определением указанной нуклеотидной последовательности, амплификацию, по меньшей мере, указанной части указанной молекулы нуклеиновой кислоты. Предпочтительно амплификация осуществляется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Также можно применять и другие методы амплификации, такие как лигазная цепная реакция.

В предпочтительном воплощении способа изобретения тестирование включает проведение реакции амплификации, при этом, по меньшей мере, один из праймеров, используемых в этой реакции амплификации, представляет собой праймер, описанный выше, или принадлежит к паре праймеров, описанной выше, а также оно включает определение продукта амплификации. В этом воплощении и в зависимости от информации, которую исследователь или врач желает получить, могут использоваться праймеры, гибридизующиеся либо с последовательностью дикого типа, либо с мутантной последовательностью.

Способ изобретения приводит к амплификации последовательности-мишени, только если указанная последовательность-мишень несет последовательность, в точности комплементарную праймеру, используемому для гибридизации. Это вызвано тем, что олигонуклеотидный праймер в предпочтительных (очень) строгих условиях гибридизации не будет гибридизоваться с последовательностью дикого типа/мутантной – в зависимости от того, какой используется праймер – (с тем результатом, что не образуется продукт гибридизации), а только с точно совпадающей последовательностью. Естественно, могут использоваться комбинации пар праймеров, гибридизующихся с обеими SNP. В этом случае анализ ожидаемых продуктов амплификации (которых может быть ноль, один, два, три или четыре, если второй, недифференцирующий праймер будет одним и тем же для каждого локуса) даст информацию о генетическом статусе по обоим положениям, -13910 и -22018.

В предпочтительном воплощении способа изобретения указанная амплификация

осуществляется при помощи или представляет собой полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Метод ПЦР хорошо известен в данной области. Типичные условия для применения в соответствии с настоящим изобретением включают, к примеру, всего 35 циклов в общем  
5 объеме 50 мкл со стадией денатурации при 93°C в течение 3 минут, стадией отжига при 55°C в течение 30 секунд, стадией достраивания при 72°C в течение 75 секунд и заключительной стадией достраивания при 72°C в течение 10 минут.

10 Изобретение, кроме того, касается способа тестирования на наличие или предрасположенность к гиполактазии взрослого типа, включающего проведение анализа образца, полученного от человека, на специфическое связывание с антителом, аптамером или  
15 фагом, описанным выше. В этом контексте более слабое окрашивание на присутствие антигена по изобретению в сравнении с гомозиготными контрольными образцами дикого типа (содержащими два аллеля персистенности) служит признаком гетерозиготности по  
20 дикому типу (один аллель персистенности и один аллель гиполактазии), тогда как у гомозиготных по гиполактазии лиц не ожидается никакого окрашивания, если применяется надлежащее антитело. Предпочтительно способ изобретения выполняется в  
25 присутствии контрольных образцов, соответствующих всем трем возможным комбинациям аллелей, в качестве внутренних контролей. Тестирование может проводиться с помощью антитела и т.п., специфичного к последовательности дикого типа или специфичного к мутантной последовательности. Тестирование на связывание, опять же, может включать применение стандартных методов, таких как ELISA; например, см.  
30 Harlow and Lane [53], loc. cit.

В предпочтительном воплощении способа изобретения антитело, аптамер или фаг несет удобную для детектирования метку. Тогда как аптамеры предпочтительно метят  
35 радиоактивными метками  $^3\text{H}$  или  $^{32}\text{P}$  либо флуоресцентным маркером, как описано выше, фаг или антитело можно либо пометить соответствующим образом (предпочтительно  $^{131}\text{I}$  в качестве радиоактивной метки), либо присоединить такую метку, как His-tag, FLAG-tag или myc-tag.

40 В следующем предпочтительном воплощении способа изобретения тестирование представляет собой иммуноанализ.

В следующем предпочтительном воплощении способа изобретения образец  
45 представляет собой кровь, сыворотку, плазму, зародышевую ткань, слюну, мочу, слизистую оболочку, слизь, вагинальную ткань, эмбриональную ткань, полученную из влагиалища, кожу, волосы, волосяной фолликул или иную ткань человека.

50 В дополнительном предпочтительном воплощении способа изобретения молекулы нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксированы на твердой подложке.

Фиксирование молекул нуклеиновой кислоты на твердой подложке позволяет легко управлять с выполнением анализа, кроме того, по крайней мере, некоторые подложки, такие как чипы, кварцевые пластины или микротитровальные планшеты, позволяют  
5 одновременно анализировать большое число образцов. В идеале твердая подложка позволяет проводить автоматизированное тестирование с применением, к примеру, роботизированных устройств.

10 В особенно предпочтительном воплощении способа изобретения твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

Кроме того, изобретение касается применения молекул нуклеиновой кислоты, описанных выше, для анализа на наличие или предрасположенность к гиполактазии  
15 взрослого типа. Эти молекулы нуклеиновой кислоты одновременно позволяют проводить анализ на отсутствие состояния или на предрасположенность к нему, как было описано подробно выше.

20 Кроме того, изобретение касается набора, включающего молекулы нуклеиновой кислоты, описанные выше, праймер или пару праймеров, описанных выше, вектор, описанный выше, и/или антитело, аптамер и/или фаг, описанный выше, в одном или нескольких контейнерах.

25 Изобретение также касается применения молекул нуклеиновой кислоты, описанных выше, или вектора, описанного выше, в генной терапии. Подходы генной терапии обсуждались выше в связи с вектором изобретения и они одинаково применимы и  
30 в данном случае. Следует отметить, что в соответствии с изобретением также и фрагменты молекул нуклеиновой кислоты, согласно приведенному выше определению и, в частности, представленные в SEQ ID NO:3 и 4, могут применяться в методах генной  
35 терапии. Данные фрагменты включают нуклеотид в положении -13910 согласно приведенному выше пункту (c) (также представлен в SEQ ID NO:3) или в положении -22018 согласно приведенному выше пункту (d) (также представлен в SEQ ID NO:4). Предпочтительно указанные фрагменты включают, по меньшей мере, 200, по меньшей  
40 мере, 250, по меньшей мере, 300, по меньшей мере, 400 нуклеотидов, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 500 нуклеотидов.

45 В предпочтительном воплощении применения изобретения генная терапия служит для лечения или предупреждения гиполактазии взрослого типа.

## **ПРИМЕРЫ**

Примеры иллюстрируют изобретение.

### **Пример 1. Анализ сцепления и неустойчивости сцепления**

50 Проанализировали 7 полиморфных микросателлитных маркеров между D2S114 и

D2S2385, флапкирующих ген LPH на 2q21, у 9 разветвленных финских семей с гиполактазией (фиг. 1). Обнаружены значительные признаки сцепления по маркерам D2S314, D2S442, D2S2196 и D2S1334, при этом максимальное значение показателя lod составило 7,67 при  $\theta = 0$  по маркеру D2S2196 (табл. 1). Выявлены облигатные рекомбинационные события по маркеру D2S114 (семья В, IV3), который определяет центромерную границу локуса персистентности/неперсистентности лактазы, и по маркеру D2S2385 (семья В, IV17) (фиг. 1, табл. 1), который определяет теломерную границу локуса. Для подробного картирования критической области проанализировали еще 9 полиморфных маркеров (табл. 1). Наблюдалась неустойчивость сцепления (linkage disequilibrium, LD) по всей этой области в зависимости от обнаруженного сцепления, принимая за мешающие параметры [16, 17] частоту аллелей и долю рекомбинации. Шесть из 9 маркеров (LPH13, LPH2, LPH1, AC3, AC4 и AC10), охватывающие отрезок длиной свыше ~200 т.п.о., проявляли в высокой степени значимые признаки LD ( $p < 10^{-4}$ ), тогда как маркеры в 3'-направлении от гена LPH не проявляли признаков LD (табл. 1). Два маркера, LPH2 и AC3, проявляли наиболее значимую неустойчивость сцепления по аллелям персистентности лактазы ( $p < 10^{-7}$ ).

Семейный материал состоял из 9 разветвленных финских родословных, первоначально исследованных Sahi [5]. Весь семейный материал был протестирован на гиполактазию взрослого типа в 1970-е годы. Для данного исследования семейный материал был расширен путем получения ДНК от членов семей из более молодых поколений. В данном исследовании семейный материал в целом состоял из 194 лиц (фиг. 1). Фенотипический статус всех членов семей подтверждали тестированием на толерантность к лактозе с этанолом (LTTE) [4, 5] у всех, кроме 49 лиц. Клейковинная энтеропатия была исключена у всех пациентов с нарушением путем измерения IgA против тканевой трансглутаминазы в сыворотке крови [45]. ДНК экстрагировали из образцов крови, взятых у всех участвующих членов семей, в соответствии со стандартными методами [46], после получения информированного согласия. В контрольном исследовании просеквенировали 196 выбранных случайным образом образцов ДНК, выделенных из биопсий тощей кишки, в которых дисахаридазная активность была измерена [47] в Госпитале Университета Хельсинки. Из биопсий кишечника выделяли ДНК в соответствии со стандартным методом [46]. Эти серии включали 137 персистентных по лактазе и 59 неперсистентных образцов. Кроме того, анализировали ДНК из 9 итальянских образцов, любезно предоставленных М. Rossi, Университет Неаполя, 9 немецких образцов, любезно предоставленных М. Lentze, Университет Бонна, и 22 южнокорейских образцов биопсий кишечника, любезно предоставленных J.K. Seo,

Сеульский Национальный Университет (в таблице: 23 корейских, 9 итальянских и 7 немецких, так как один из образцов из Германии происходил из Южной Кореи). Диагноз основывался на измерении дисахаридазной активности. Наконец, для определения частоты варианта C/T<sub>-13910</sub> у финского населения анализировали ДНК от 938 анонимных финских доноров крови из небольших общин Восточной и Западной Финляндии, а также ДНК от 109 родителей, принадлежащих к семьям из коллекции Центра по изучению полиморфизма человека (СЕРН) [19]. Кроме того, анализировали геномную ДНК бабуина (*Papio hamedryas ussinus*), выделенную из биопсии печени стандартными методами [48]. Исследование было одобрено Комитетами по этике Госпиталя Университета Хельсинки и Службы переливания крови Финского Красного Креста.

### Пример 2. Расширенный анализ гаплотипов

На первой стадии анализировали 10 высоко полиморфных микросателлитных маркеров, фланкирующих ген LPH на 2q21, как описано в других работах [40, 55]. Вкратце, 10 высоко полиморфных микросателлитных маркеров на 2q в окрестности гена лактазы из The Généthon Resource Center [55] анализировали по генетическим расстояниям следующим образом: cen – D2S114 – 1cM – D2S1334 – 0cM – D2S2196 – 0cM – D2S442 – 2cM – D2S314 – 2cM – D2S2385 – 1 cM – D2S2288 – 1 cM – D2S397 – 1cM – D2S150 – 1cM – D2S132. Порядок следования маркеров был получен главным образом на основании физической карты контигов YAC хромосомы 2 (Chumakov et al. 1995) [56], дополненной картой Généthon. ПЦР проводили в общем объеме 15 мкл, содержащем 12 нг матричной ДНК, 5 пмоль праймеров, по 0,2 мМ каждого нуклеотида, 20 мМ трис-HCl (pH 8,8), 15 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20, 0,01% желатина и 0,25 ед. Taq-полимеразы (DynaZyme, Finnzymes). Один из праймеров был радиоактивно помечен на 5'-конце с помощью <sup>32</sup>P-γАТФ. Реакции проводили в многоруночном микротитровальном планшете на протяжении 35 циклов с денатурацией при 94°C в течение 30 сек, отжигом при различных температурах в зависимости от праймеров в течение 30 сек и достраиванием при 72°C в течение 30 сек; денатурацию проводили в течение 3 мин, а заключительное достраивание в течение 5 мин. Амплифицированные фрагменты разделяли в 6% полиакриламидном геле и проводили ауторадиографию.

На второй стадии идентифицировали еще 9 микросателлитных маркеров в пределах контига, сконструированного по гену LPH, исходя из опубликованных геномных последовательностей ВАС-клонов (NH034L23, NH0318L13, NH0218L22 и RP11-32911), с помощью программы Repeat Masker (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>). Были синтезированы праймеры, фланкирующие повторы. Условия ПЦР описаны в другой работе [40]. Амплифицированные фрагменты разделяли в 6%

полиакриламидном геле и проводили ауторадиографию.

Попарные показатели  $\text{lod}$  рассчитывали с помощью опции MLINK из пакета программ LINKAGE [49]. Предполагалось аутосомное рецессивное наследование гиполактазии взрослого типа с полной пенетрантностью, без половых различий в долях рекомбинации, при частоте аллеля заболевания в 0,4. В исследование включали только лиц старше 20 лет, так как заболевание проявляется к этому возрасту у финского населения [5, 6]. Если состояние данного лица не было подтверждено тестом LTTE, его считали неизвестным. Частоты аллелей и гетерозиготность по маркерам оценивали из семейного материала с помощью программы Downfreq в целях параметрического анализа сцепления [49]. Кроме того, проводили анализ сцепления псевдомаркеров и анализ неустойчивости сцепления, предполагая аутосомный рецессивный тип наследования [16]. Проводили тест на LD в зависимости от обнаруженного сцепления, принимая частоту аллелей и дома рекомбинации в качестве мешающих параметров [16, 49]. Значения  $p$  из этих анализов приведены в табл. 1. Гаплотипы для микросателлитных маркеров составляли вручную в следующем порядке: LPH1-LPH2-LPH13-AC7-AC3-AC4AC5 (фиг. 3). В целом для анализа гаплотипов в данном семейном материале были доступны 54 хромосомы, несущие неперсистентность, и 33 хромосомы, несущие персистентность.

Порядок следования тесно сцепленных маркеров подтверждали путем состыковки 4 ВАС-клонов NH034L23, NH0218L22, NH0318L13 и 329I10 в критической области в один непрерывный отрезок последовательности. Этот контиг простирается от маркера AC8 до экзона 10 гена аспартил-тРНК-синтетазы (DARS) и охватывает 222,5 т.п.о. (фиг. 2). На основе этой физической карты сцепленной области составляли расширенные гаплотипы по 7 маркерам, охватывающим отрезок в 150 т.п.о. (cen-LPH13-LPH2-LPH1-AC7-AC3-AC4-AC5-tel) (фиг. 3). Один основной гаплотип присутствовал в 20 аллелях персистентности (60%) против 3 аллелей неперсистентности (5%), тогда как в аллелях неперсистентности наблюдалось большое разнообразие гаплотипов. Остальные 40% гаплотипов в аллелях персистентности отличались от предкового гаплотипа таким образом, который соответствовал расщеплению гаплотипа в результате исторических рекомбинационных событий. На основании анализа консервативных гаплотипов locus персистентности лактазы может быть сужен до отрезка в 47 т.п.о. между маркерами LPH1 и AC3 (фиг. 3).

### **Пример 3. Анализ последовательности локуса гиполактазии взрослого типа**

Участок в 47 т.п.о. между маркерами LPH1 и AC3 амплифицировали в виде перекрывающихся ПЦР-фрагментов из геномной ДНК нескольких членов 9 семей с гиполактазией и секвенировали. Этот участок содержит ген поддержки минихромосом

(MCM6) [18], который охватывает 36 т.п.о. из критического участка в 47 т.п.о. (фиг. 2). Никаких вариаций не обнаружили в кодирующей области гена MCM6, но было выявлено 52 варианта – 43 SNP и 9 полиморфизмов типа делеции/вставки в критическом участке в 47 т.п.о. (табл. 2). Только два из этих вариантов (C/T<sub>-13910</sub>, G/A<sub>-22018</sub>) были связаны с признаком персистентности/неперсистентности лактазы в финских семьях (табл. 2 и 3). Первый такой связанный вариант, C/T<sub>-13910</sub>, находится в интроне 13 гена MCM6 в положении –13910 п.о. от первого кодона ATG гена LPH. Второй связанный вариант, G/A<sub>-22018</sub>, находится в интроне 9 гена MCM6 в положении –22018 от первого кодона ATG гена LPH (фиг. 2). Эти два варианта, находящиеся на расстоянии 8 т.п.о. друг от друга, полностью косегрегировали с признаком гиполактазии взрослого типа в 9 разветвленных финских семьях. Все члены семей с гиполактазией (неперсистентные) были гомозиготны как по C<sub>-13910</sub>, так и G<sub>-22018</sub> (табл. 3). Интересно, что оба эти варианта располагаются в повторяющихся элементах: C/T<sub>-13910</sub> в элементе, производном от L2, а G/A<sub>-22018</sub> в элементе Alu.

В экспериментах использовали 3 неперсистентных, 2 гомозиготных персистентных и 2 гетерозиготных персистентных представителей из семейного материала, обладающих одинаковым гаплотипом по критическому участку, для секвенирования на первой стадии (фиг. 1). Используя опубликованный черновой вариант геномной последовательности ВАС-клонов NH0034L23, NH0218L22, NH0318L23 и RP-329I10, охватывающих критический участок гиполактазии взрослого типа, был составлен контиг с помощью программы Sequencher 4 (Gene Codes Corporation). Были разработаны олигонуклеотидные праймеры, охватывающие критический участок между маркерами LPH1 и AC3 (список олигонуклеотидных праймеров представлен ниже). ПЦР-амплификации проводились в объеме 50 мкл, содержащем геномную ДНК (100 нг), праймеры (по 20 нг), dNTP (по 200 мкМ), 0,5 ед. Taq-полимеразы (Dynazyme, Finnzymes) в стандартном буфере. В большинстве случаев при амплификации использовали следующие условия ПЦР: начальный раунд денатурации при 94°C в течение 3 мин, затем 35 циклов при 94°C в течение 30 сек, 55°C в течение 30 сек и 72°C в течение 1,25 мин, а затем заключительное достраивание при 72°C в течение 10 мин, за исключением тех случаев, когда размер продуктов ПЦР составлял более 1 т.п.о., тогда использовали набор Dynazyme extend kit (условия описаны ниже). Очищенные продукты ПЦР (15-40 нг) подвергали циклическому секвенированию по технологии BigDye terminator chemistry (PE Biosystems). Анализ данных проводили с помощью ABI Sequencing Analysis 3.3 (PE Biosystems) и Sequencher 4.1 (Gene Codes).

**Выявление вариантов лактазы при помощи секвенирования**

ПЦР-амплификации проводились в объеме 50 мкл, содержащем геномную ДНК (100 нг), праймеры (по 20 нг), dNTP (по 200 мкМ), 0,5 ед. Taq-полимеразы (DynaZyme, Finnzymes) в стандартном буфере. В обоих случаях при амплификации использовали следующие условия ПЦР: начальная денатурация при 94°C в течение 3 мин, затем 35 циклов при 94°C в течение 30 сек, 55°C в течение 30 сек и 72°C в течение 1,25 мин, а затем заключительное достраивание при 72°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР очищали при помощи энзиматической реакции. Очищенные продукты ПЦР (15-40 нг) подвергали циклическому секвенированию по технологии BigDye terminator chemistry (PE Biosystems). Анализ данных проводили с помощью ABI Sequencing Analysis 3.3 (PE Biosystems) и Sequencher 4.1 (Gene Codes).

**Скрининг вариантов лактазы методом твердофазного минисеквенирования**

Фрагмент ДНК, охватывающий вариант C/T<sub>-13910</sub>, подвергали амплификации с помощью одного биотинилированного (5'-Bio-CCTCGTTAATACCCACTGACCTA-3') праймера и одного небитинилированного (5'-GTCACSTTTGATATGATGAGAGCA-3') праймера. Для G/A<sub>-22018</sub> использовали один биотинилированный праймер (5'-Bio-TGCTCAGGACATGCTGATCAA-3') и один небитинилированный праймер (5'-CTACCSTATCAGTAAAGGCCTA-3') в условиях, описанных выше. Фиксировали 10 мкл продукта ПЦР в покрытых стрептавидином лунках микропланшета (Lab systems, Финляндия). Лунки отмывали и фиксированную ДНК денатурировали, как описано Syvänen et al. (Am J Hum Genet. 1993, 52, 46-59) и Syvänen and Landegren (Hum Mutat. 1994, 3, 172-9). Реакционная смесь для минисеквенирования в 50 мкл содержала 10 пмоль праймеров для минисеквенирования C/T<sub>-13910</sub> (5'-GGCAATACAGATAAGATAATGTAG-3') и G/A<sub>-22018</sub> (5'-AAAAACAGCATTCTCAGCTGGGC-3'), и в каждую лунку вносили либо 0,1 мкл H-dCTP, H-dGTP, что соответствует аллелю неперсистентности лактазы (115 Ки/ммоль, Amersham, UK), либо 0,1 мкл H-dTTP, H-dATP, что соответствует аллелю персистентности лактазы, и 0,05 единиц ДНК-полимеразы (DynaZyme II, Finnzymes) в собственном буфере. Микротитровальные планшеты инкубировали в течение 20 мин при 50°C, затем лунки промывали. Детектирующий праймер элюировали и измеряли радиоактивность элюата на жидкостном сцинтилляционном счетчике (Rackbeta 1209, Wallac, Финляндия). Проводили по две параллельные реакции минисеквенирования для каждого продукта ПЦР.

ПЦР-праймеры и детектирующий праймер для варианта C/T<sub>-13910</sub>:

прямой ПЦР-праймер: GTCACSTTTGATATGATGAGAGCA Tm 58 SEQ ID NO:8

детектирующий праймер: GGCAATACAGATAAGATAATGTAG Tm 58 SEQ ID NO:10

биот. обратный праймер: Bio-CCTCGTTAATACCCACTGACCTA Tm 62 SEQ ID NO:9  
 или Bio-TAGGTCAGTGGGTATTAACGAGGT SEQ ID NO:7

ПЦР-праймеры и детектирующий праймер для варианта G/A<sub>-22018</sub>:

5 прямой ПЦР-праймер: CTACCSTATCAGTAAAGGCCTA Tm 58 SEQ ID NO:12  
 детектирующий праймер: AAAAACAGCATTTCTCAGCTGGGCTm 62 SEQ ID NO:14

биот. обратный праймер: Bio-TGCTCAGGACATGCTGATCAA Tm 62 SEQ ID NO:13  
 10 или Bio-TTGATCAGCATGTCCTGAGCA SEQ ID NO:11

#### Пример 4. Проверка ДНК вариантов в контрольном исследовании

Анализировали частоту вариантов C/T<sub>-13910</sub> и G/A<sub>-22018</sub> в образцах ДНК, выделенных из 196 образцов биопсии кишечника, прошедших анализ на дисахаридазную активностью в качестве диагностического теста на гиполактазию. Всего 59 образцов проявляли первичную недостаточность лактазы. Шесть из 59 случаев (табл. 3) представляли собой гетерозиготы GA варианта G/A<sub>-22018</sub>, а остальные 53 были гомозиготны по аллелю G. Все 59 образцов представляли собой гомозиготы по аллелю C варианта C/T<sub>-13910</sub>. Из 137 случаев персистенции лактазы 74 оказались гомозиготными по аллелям T и A, 63 оказались гетерозиготами CT и GA, и совсем не было гомозигот по аллелям C и G вариантов C/T<sub>-13910</sub> и G/A<sub>-22018</sub>, соответственно (табл. 3).

Чтобы проанализировать эти варианты в других популяциях, секвенировали образцы ДНК, выделенные из биопсий кишечника 40 нефинских пациентов с подтвержденной дисахаридазной недостаточностью: 23 образца происходили из Южной Кореи, 9 из Италии и 8 из Германии. Один итальянский пациент представлял собой гетерозиготу GA варианта G/A<sub>-22018</sub>, а все остальные 39 представляли собой гомозиготы CC и GG вариантов C/T<sub>-13910</sub> и G/A<sub>-22018</sub>, соответственно (табл. 3). Расширенное исследование дало данные, приведенные в табл. 7, свидетельствующие о полной ассоциации варианта C/T<sub>-13910</sub> с биохимически подтвержденной гиполактазией (неперсистенцией лактазы) у 400 представителей из 6 различных популяций. Вариант G/A<sub>-22018</sub> был связан с неперсистенцией лактазы в 400 случаях из 401.

#### Пример 5. Молекулярная эпидемиология персистентного по лактазе варианта C/T<sub>-13910</sub>

Для проверки распространенности связанного с гиполактазией варианта у финского населения использовали метод твердофазного минисеквенирования [19, 20], чтобы провести скрининг образцов ДНК от 938 анонимных финских доноров крови, происходящих либо из области раннего заселения в Западной Финляндии, либо из области позднего заселения в Восточной Финляндии (табл. 4). В экспериментах фрагмент ДНК, охватывающий вариант C/T<sub>-13910</sub>, подвергали амплификации с помощью одного

биотинилированного (5'-CCTCGTTAATACCCCTGACCTA-3') праймера и одного  
небиотинилированного (5'-GTCACCTTTGATATGATGAGAGCA-3') праймера. Для  
G/A-22018 использовали один биотинилированный (5'-AGTCTGTGGCATGTGTCTTCATG-  
3') и один небитинилированный праймер (5'-TGCTCAGGACATGCTGATCAACT-3') в  
условиях, описанных выше. Фиксировали 10 мкл продукта ПЦР в покрытых  
стрептавидином лунках микропланшета (Lab systems, Финляндия). Лунки отмывали, и  
фиксированную ДНК денатурировали, как описано ранее [19, 20]. Реакционная смесь для  
минисеквенирования в 50 мкл содержала 10 пмоль праймеров для минисеквенирования  
G/A-22005 (5'-GACAAAGGTGTGAGCCACCG-3') и G/A-13915 (5'-  
GGCAATACAGATAAGATAATGTAG-3'), и в каждую лунку вносили либо 0,1 мкл H-  
dCTP, что соответствует аллелю непersistентности лактазы (115 Ки/ммоль, Amersham,  
UK), либо 0,1 мкл H-dTTP, что соответствует аллелю персистентности лактазы, и 0,05  
единиц ДНК-полимеразы (Dуnаzyme II, Finnzymes) в собственном буфере.  
Микропланшеты инкубировали в течение 20 мин при 50°C, затем лунки промывали.  
Детектирующий праймер элюировали и измеряли радиоактивность элюата на жидкостном  
сцинтилляционном счетчике (Rackbeta 1209, Wallac, Финляндия). Проводили по две  
параллельные реакции минисеквенирования для каждого продукта ПЦР. В целом  
распространенность предполагаемого генотипа гиполактазии CC-13910 (170 случаев)  
составила 18,1% и была выше (16,8% против 18,9%) в западной, чем в восточной выборке  
(табл. 4). Эти данные хорошо согласуются с эпидемиологическим исследованием, в  
котором распространенность составила 17% среди говорящих по-фински финнов и ее  
градиент возрастал с запада на восток [2]. Тот же набор образцов подвергали  
генотипированию и по полиморфизму G/A-22018, при этом величину LD между этими  
двумя SNP проверяли при помощи D'-статистики [21]. Оказалось, что у них почти полная  
LD ( $D' = 0,98$ ,  $p = 7,62 \times 10^{-11}$ , табл. 5).

Известно, что распространенность гиполактазии в различных популяциях сильно  
варьирует от менее 5% до почти 100% [3, 6]. Чтобы определить, как эти колебания в  
распространенности гиполактазии коррелируют с распределением генотипа CC-13910,  
подвергали анализу ДНК родителей семейств из CEPH [22]. Образцы из этих семейств  
собирали главным образом во Франции, причем распространенность гиполактазии у них  
составляет около 37% [23], и в штате Юта, причем население Юты происходит из  
Северной Европы, и распространенность гиполактазии у них составляет менее 5% [24].  
Генотипирование родителей семейств из CEPH показало, что 41,2% (7 образцов из 17)  
французских семей имеют генотип CC, тогда как только 7,6% (7 образцов из 92) семей из  
Юты имеют генотип CC (табл. 4). Опять же, несмотря на небольшое число

проанализированных образцов, эти цифры согласуются с данными, полученными в эпидемиологических исследованиях гиполактазии в этих популяциях [23, 24].

Таблица 8 показывает, что наблюдаемая распространенность этих вариантов хорошо согласуется с описанной частотой непереносимости лактозы среди населения.

#### **Пример 6. Генеалогия персистентного по лактазе варианта С/Т<sub>-13910</sub>**

Анализ гаплотипов финских семей наводит на мысль, что если не все, то большинство аллелей персистентности лактазы в Финляндии произошли от одного общего предка. Использовали неустойчивость сцепления для оценки времени появления аллеля персистентности в финской популяции [25]. Принимая 20 лет за одно поколение, такая оценка показывает, что мутация-основатель была внедрена в финскую популяцию около 9000-11400 лет назад (табл. 6). Это хорошо согласуется с самыми ранними признаками заселения материковой Финляндии около 8000-9000 лет назад [26] и удовлетворительно совпадает с началом молочного животноводства в 8000-10000 г. до н.э. [27]. Еще более важно то, что наличие одного и того же варианта ДНК в аллелях персистентности в различных популяциях предполагает, что этот вариант еще более древний, а мутация произошла перед расхождением проанализированных популяций.

Чтобы получить некоторое представление о филогенетическом происхождении аллелей лактазы, просеквенировали интрон 9 и часть интрона 13 гена MCM6 бабуина (*Papio hamadryas*). Генотип GG и CC отмечен в ДНК бабуина в обоих вариантах G/A<sub>-22018</sub> и C/T<sub>-13910</sub>. Это может свидетельствовать о том, что аллели G и C, соответственно, отражают появление предкового аллеля, представляющего неперсистентный тип, а мутация трансформировала этот аллель, создав аллель персистентности. Такое предположение подтверждается выявлением LD и общего гаплотипа в аллелях персистентности в отличие от большого разнообразия аллелей, отмеченного в аллелях неперсистентности.

#### **Пример 7. Парная LD вариантов С/Т и G/A**

Попарные значения LD между C/T<sub>-13910</sub> и G/A<sub>-22018</sub> оценивали при помощи D'-статистики [21]. Частоту гаплотипов определяли методом максимального подобия с помощью программы EH [50]. Значения D' рассчитывали как  $\max(D/D_{\max}, D/D_{\min})$ , при этом мера неустойчивости  $D = h_{pq} - p \cdot q$ , где  $h_{pq}$  – частота гаплотипа с редким аллелем в каждом локусе, p и q – частота редких аллелей в локусах 1 и 2, а  $D_{\max} = \min p(1-p), q(1-q)$ , если  $D > 0$ , и  $D_{\min} = -\min pq, (1-p)(1-q)$ , если  $D < 0$ . Значимость отличия D' от 0 определяли с помощью критерия  $D^2$  который имеет распределение  $\chi^2$  с 1 степенью свободы [21].

Номера доступа генов. Для ВАС-клонов NH0218L22, NH0034L34, NH0318L13 и RP11-329I10 – номера AC012551, AC011893, AC011999 и AC016516, соответственно. Номера доступа для полиморфизмов человека в GenBank – AF395607-AF395615.

5

### БИБЛИОГРАФИЯ

1. Flatz, G. & Rotthauwe, H. The human lactase polymorphism: physiology and genetics of lactose absorption and malabsorption. *Prog. Med. Genet.* 2, 205, 249 (1977).  
10
2. Sahi, T., Isokoski, M., Jussila, J. & Launiala, K. Lactose malabsorption in Finnish children of school age. *Acta Paediatr Scand.* 61, 11-16 (1972).
3. Wang, Y. et al. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology.* 114: 1230-1236 (1998).  
15
4. Sahi, T., Isokoski, M., Jussila, J., Launiala, K. & Pyörälä, K. Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. *Lancet.* 823-826 (1973).
5. Sahi, T. The inheritance of selective adult-type lactose malabsorption. *Scand. J. Gastroenterol. suppl.* 30, 1-73 (1994).  
20
6. Sahi, T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 202, 7-20 (1994).  
25
7. Boll, W., Wagner, P. & Mantei, N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in human with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 889-902 (1991).
8. Mantei, N. et al. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J.* 7, 2705-2713 (1988).  
30
9. Wang, Y. et al. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum. Mol. Genet.* 4, 657-662 (1995).  
35
10. Harvey, C.B., Pratt, W.S., Islam, I., Whitehouse, D.B. & Swallow, D.M. DNA polymorphisms in lactase gene: linkage disequilibrium across the 70 kb region. *Eur. J. Hum. Genet.* 3, 27-41 (1995).  
40
11. Escher, J.C. et al. Molecular basis of lactase levels in adult humans. *J. Clin. Invest.* 89, 480-483 (1992).
12. Lloyd, M. et al. Regulation of intestinal lactase in adult hypolactasia. *J. Clin. Invest.* 89, 524-529 (1992).  
45
13. Fajardo, O., Naim, H.Y. & Lacey, S.W. The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. *Gastroenterology* 106, 1233-1241 (1994).  
50

14. Maturi L. et al. Mosaic regulation of lactase in human adult-type hypolactasra. *Gastroenterology* 107, 54-60 (1994).
15. Rossi, M. et al. Lactase persistence versus decline in human adults: Multifactorial events are involved in down-regulation after weaning. *Gastroenterology* 112, 1506-1614 (1997).
16. Goring, H.H.H. & Terwilliger, J.D. Linkage analysis in the presence of errors IV: Joint pseudomarker analysis of linkage and/or linkage disequilibrium on a mixture of pedigrees and singletons when mode of inheritance cannot be accurately specified. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1310-1327 (2000).
17. Terwilliger, J.D. & Goring, H.H.H. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: Statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum. Biol.* 72, 63-132 (2000).
18. Harvey, C.B. et al. Regional localization of lactase-phlorizin hydrolase, LCT, to chromosome 2q21. *Ann. Hum. Genet.* 57, 179-185 (1993).
19. Syvänen, A.C., Sajantila, A., Lukka, M. Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 46-59 (1993).
20. Syvänen, A.C. & Landegren, U. Detection of point mutations by solid-phase methods. *Hum. Mutat.* 3, 46-59 (1994).
21. Thompson, E. A., Deeb, S., Walker, D. & Motulsky, A.G. The detection of linkage disequilibrium between closely linked markers: RFLPs at the AI-CIII Apolipoprotein genes. *Am. J. Hum. Genet.* 42, 113-124 (1998).
22. Dausset, J. et al. Centre d'étude du polymorphisme humain (CEPH): Collaborative genetic mapping of human genome. *Genomics* 6, 575-577 (1990).
23. Cuddenec, Y., Delbrück, H. & Flatz, G. Distribution of the adult lactase phenotypes – lactose absorber and malabsorber – in a group of 131 army recruit. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 6, 776-779 (1982).
24. McLellan, T., Jorde, L.B. & Skolnick, M.H. Genetic distance between the Utah Mormons and related populations. *Am. J. Hum. Genet.* 36, 836-857 (1984).
25. Terwilliger, J.D. A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 777-787 (1995).
26. Nunez, M.G. A model of the early settlement of Finland. *Fennoscandia archaeologica* IV, 3-18 (1997).
27. Simoons, F.J. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: a problem in biological and cultural interrelations. II. A cultural historical hypothesis. *Am. J. Dig. Dis.* 16, 695-710 (1970).

28. Varilo, T. et al. The age of human mutation: genealogical and linkage disequilibrium analysis of the CLN5 mutation in the Finnish population. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 506-512 (1996).

5 29. Hastbacka, J. et al. Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: diastrophic dysplasia in Finland. *Nature Genet.* 2: 204-211 (1992).

10 30. Harvey, C.B. et al. Lactase haplotype frequencies in Caucasians: association with lactase persistence/non persistence polymorphism. *Ann. Hum. Genet.* 62, 215-223 (1998).

31. Ohtani, K. et al. Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* 18, 2299-2309 (1999).

15 32. Smith, A.F.A. The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 743-748 (1998).

33. Kazazian, H.H. & Moran, J.V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nature Genet.* 19, 19-24 (1998).

20 34. Moran, J.V., DeBerardinis, R.J. & Kazazian, H.H. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283, 1530-1534 (1999).

25 35. Wei, W. et al. Human L1 retrotransposition: *cis* preference versus *trans* complementation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1429-1439 (2001).

36. Donnelly, S.R., Hawkins, T.E. & Moss, S.E. A conserved nuclear element with a role in mammalian gene regulation. *Hum. Mol. Genet.* vol. 8, 9, 1723-1728 (1999).

30 37. Boeke, J.D. LINEs and Alus – the polyA connection. *Nature Genet.* 16, 6-7 (1997).

38. Jurka, J. Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1872-1877 (1977).

35 39. Savilahti E, Launiala K, Kuitunen P. Congenital lactase deficiency. *Arch. Dis. Child.* 58, 246-252 (1983).

40 40. Järvelä, I. et al. Assignment of the congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Am. J. Genet.* 63, 1078-1085 (1998).

41. Simoons. F.J. The geographic hypothesis and lactose malabsorption. A weighing of the evidence. *Am. J. Dig. Dis.* 23, 963-980 (1978).

45 42. Flatz, G. & Rotthauwe, H.W. The human lactase polymorphism: physiology and genetics of lactose absorption and malabsorption. *Prog. Med. Genet.* 2, 205-249 (1977).

50 43. McCracken, R.D. Lactase deficiency: an example of dietary evolution. *Curr. Anthropol.* 12, 479-517 (1971).

44. Arola, H. et al. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 202, 26-35 (1994).
- 5 45. Sulkanen, S. et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115 (6), 1322-1328 (1998).
46. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
- 10 47. Messer, M. & Dahlqvist, A. A one-step ultramicro method for the assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 14(3), 376-92 (1966).
48. Gottingham, Jr. R.W., Idury, R.M. & Schaffer, A.A. Faster sequential genetic linkage computations. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 252-263 (1993).
- 15 49. Goring, H.H.H. & Terwilliger, J.D. Linkage analysis in the presence of errors III: Marker loci and their map as nuisance parameters. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1298-1309 (2000).
50. Terwilliger, J.D. & Ott, J. *Handbook of human genetic analysis*. Johns Hopkins University Press, Baltimore (1994).
- 20 51. Osborne et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* I (1997), 5-9.
52. Stall and Szoka, *Pharm. Res.* 12 (1995), 465-483.
- 25 53. Harlow and Lane "Antibodies, A laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, USA, 1988.
54. Higgins and Hames (eds.), "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford 1985.
- 30 55. Dib C., Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature.* 1996 Mar 14: 380(6570): 152-4.
- 35 56. Chumakov IM, Rigault P, Le Gall I, Bellanne-Chantelot C, Billault A, Guillou S, Soularue P, Guasconi G, Poullier E, Gros I, et al. A YAC contig map of the human genome. *Nature.* 1995 Sep 28: 377(6547 Suppl): 175-297.
- 40
- 45
- 50

Таблица 1. Анализ сцепления и неустойчивости сцепления в семьях с гиполактазией взрослого типа (маркеры для подробного картирования выделены жирным шрифтом)

Маркер	Показатель lod (Z) при данном $\theta$					Значение $p^a$
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	
<b>D2S114</b>	$-\infty$	2,44	1,92	1,13	<b>0,41</b>	0,87195
<b>P6112</b>	2,76	2,20	1,45	0,75	<b>0,22</b>	0,66207
<b>D2S1334</b>	3,15	2,45	<b>1,61</b>	0,84	0,25	0,91039
AC8	<b>2,26</b>	1,99	1,36	0,71	0,21	0,53670
LPH13	3,67	2,94	1,96	1,03	0,31	$4 \times 10^{-6}$
LPH2	4,09	3,07	2,00	1,00	0,26	$5,7 \times 10^{-7}$
<b>LPH1</b>	5,91	4,52	2,96	1,53	0,46	$5 \times 10^{-6}$
<b>AC7</b>	3,63	2,60	1,66	0,83	0,23	0,03471
<b>AC3</b>	6,63	4,88	3,16	1,61	0,44	$3,2 \times 10^{-8}$
<b>AC4</b>	3,07	2,22	1,42	0,71	0,19	$4 \times 10^{-5}$
<b>AC5</b>	5,33	4,10	2,72	1,39	0,39	0,02166
<b>AC10</b>	6,60	4,99	3,25	1,65	0,46	$1 \times 10^{-5}$
D2S2196	7,67	5,62	3,62	1,85	0,54	0,00010
D2S442	3,81	3,08	2,08	1,03	0,27	0,22805
D2S314	4,22	3,61	2,50	1,37	0,45	0,27535
D2S2385	$-\infty$	2,79	1,92	1,01	0,28	0,46457

a: значения  $p$  получены с помощью теста на неустойчивость сцепления при наличии сцепления [16, 49]

**Таблица 2. Вариации, выявленные в локусе гиполактазии взрослого типа в финских семьях**

5	Положение а	Вариант	Персистентность		Персистентность		Неперсистентность		
			лактазы		лактазы		лактазы		
			(гомозиготы)		(гетерозиготы)				
		BIV4	AIV3	BIV8	CIV3	BIV9	DIV9	ЕШ2 <sup>b</sup>	
10	-694	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	N <sup>c</sup>	AA
	-1640/50	T <sub>13</sub> →T <sub>12</sub>	T <sub>13/13</sub>	T <sub>13/13</sub>	T <sub>13/13</sub>	T <sub>13/13</sub>	T <sub>13/13</sub>	T <sub>12/12</sub>	T <sub>12/12</sub>
	-2131	C→T	CC	CC	CT	CC	TT	CT*	TT
15	-3058/72	T <sub>15</sub> →T <sub>16</sub>	T <sub>15/15</sub>	T <sub>15/15</sub>	T <sub>15/15</sub>	T <sub>15/15</sub>	T <sub>15/15</sub>	T <sub>16/16</sub>	T <sub>16/16</sub>
	-3075	G→T	GG	GG	GG	GG	GG	GG	TT
	-4480	T→A	TT	TT	TA	TT	AA	TT	TT
	-5440	C→T	CC	CC	CT	CC	TT	CC	CC
20	-5926	A→T	AA	AA	AA	AA	AA	TA	TT
	-8540	G→A	GG	GG	GA	GA	AA	AG	AA
	-8630	C→G	CC	CC	CG	CG	GG	GC	GG
25	-13495	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	CT	CC
	-13910	T→C	TT	TT	TC	TC	CC	CC	CC
	-15239	G→A	GG	GG	GA	GG	AA	AG	AA
	-15862	T→C	CC	CC	CT	CC	TT	TC	TT
30	-16568/79	T <sub>11</sub> →T <sub>12</sub>	T <sub>11/11</sub>	T <sub>11/11</sub>	T <sub>11/12</sub>	T <sub>11/11</sub>	T <sub>12/12</sub>	T <sub>11/11</sub>	T <sub>12/12</sub>
	-16888	A→G	AA	AA	GA	AA	GG	GA	GG
	-17300	C→T	CC	CC	CC	CC	CC	CT	TT
35	-19044	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	CT	CC
	-19519	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	TT	TT
	-20077	C→G	CC	CC	CG	CC	GG	GC	GG
40	-20486	G→A	GG	GG	GA	GG	AA	GG	GG
	-21721/28	A <sub>7</sub> →A <sub>6</sub>	A <sub>7/7</sub>	A <sub>7/7</sub>	A <sub>7/7</sub>	A <sub>7/7</sub>	A <sub>7/7</sub>	A <sub>7/6</sub>	A <sub>7/7</sub>
	-21731	A→C	AA	AA	AA	AA	AA	CC	AA
	-21736/43	A <sub>9</sub> →A <sub>8</sub>	A <sub>9/9</sub>	A <sub>9/9</sub>	A <sub>9/8</sub>	A <sub>9/9</sub>	A <sub>8/8</sub>	A <sub>8/8</sub>	A <sub>8/8</sub>
45	-22018	G→A	AA	AA	AG	AG	GG	GG	GG
	-22741	C→T	CC	CC	CC	CC	CC	N	TT
	-22788	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	N	GG
50	-23069	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	N	GG
	-23442	A→G	AA	AA	AA	AA	AA	N	GG

	-23771	T→C	TT	TT	TT	TT	TT	N	CC
	-25093/23	Δ30bp	Δ Δ	Δ Δ	Δ Δ	Δ Δ	Δ Δ	N	II
	-27310	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	GA	GG
5	-27480	G→A	GG	GG	GA	GG	AA	AG	AA
	-27807	A→C	AA	AA	AA	AA	AA	AC	CC
	-30183	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	AA	AA
10	-31268	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	AA	AA
	-31342	T→C	TT	TT	TT	TT	TT	CT	CC
	-33645	C→T	CC	CC	CT	CC	TT	CC	CC
	-35176	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	CT	CC
15	-36254	C→T	CC	CC	CT	CC	TT	TC	TT
	-36296	G→T	TT	TT	TG	TT	GG	TG	N
	-36501	A→T	AA	AA	AT	AA	TT	AT	N
20	-36506/14	Δ9bp	Δ Δ	Δ Δ	Δ I	Δ Δ	II	Δ I	N
	-36671/77	T7→T6	T <sub>777</sub>	T <sub>777</sub>	T <sub>716</sub>	T <sub>777</sub>	T <sub>616</sub>	T <sub>777</sub>	T <sub>777</sub>
	-37565	T→G	TT	TT	TG	TT	GG	GG	TG
25	-38276	G→C	GG	GG	GC	GG	CC	GG	GG
	-39036	G→C	GG	N	GC	N	CC	N	N
	-40608	G→C	GG	GG	GG	GG	GG	GC	CC
	-41590	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	CT	CC
30	-42081/82	ΔAG	AG	AG	AG/Δ	AG	Δ Δ	AG	AG
	-42618	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	TT	TT
	-42893	G→A	GG	GG	GA	GG	AA	GG	GG

35 а: Отсчет проводился от кодона инициации трансляции (ATG) гена LPH по геномной последовательности, скомпилированной на основании ВАС-клонов NH034L23, NH0218L22, NH0318L13 и RP11-329110

40 б: Представители, просеквенированные среди исследованных финских семей и показанные стрелками на фиг. 1

с: Определение не проводилось.

45

50

**Таблица 3. Распределение генотипов C/T<sub>-13910</sub> и G/A<sub>-22018</sub> в аллелях персистентности/ неперсистентности лактазы**

5	Генотип	C/T <sub>-13910</sub>			G/A <sub>-22018</sub>			Всего	
		CC	CT	TT	GG	GA	AA		
	Члены семей	неперсистентность лактазы	45	0	0	45	0	0	45
10		персистентность лактазы	0	32	13	0	32	13	45
	Контрольные образцы:								
15	финские	неперсистентность лактазы	59	0	0	53	6	0	59
		персистентность лактазы	0	63	74	0	63	74	137
20	нефинские <sup>a</sup>	неперсистентность лактазы	40	0	0	39	1	0	40
		персистентность лактазы	0	5	0	0	5	0	5
25	Всего	неперсистентность лактазы							144
		персистентность лактазы							187
30									

а: Нефинские образцы включают 23 индивидуума из Южной Кореи, 9 из Италии и 7 из Германии.

35

40

45

50

Таблица 4. Распространенность варианта C/T<sub>-13910</sub> в выборках из популяций

Образцы ДНК	Генотип			Всего	Частота аллеля (%)		Генотип СС (%)
	СС	СТ	ТТ		С	Т	
I. Финское население:							
1. Восточные области	108	287	176	571	0,440	0,560	18,9%
2. Западные области	62	159	146	367	0,385	0,615	16,8%
Всего	170	446	322	938	0,418	0,582	18,1%
II. Родители из СЕРН:							
1. Семьи из Юты	7	33	52	92	0,255	0,745	7,6%
2. Французские семьи	7	9	1	17	0,676	0,324	41,2%

Всего исследовали 938 образцов ДНК анонимных финских доноров крови из небольших общин восточной и западной частей Финляндии, а также 109 образцов ДНК родителей из СЕРН. Распространенность гиполактазии в популяциях отражает частота аллелей СС в генотипе.

Таблица 5. Неустойчивость сцепления (LD) между вариантами C/T<sub>-13910</sub> и G/A<sub>-22018</sub> в рандомизированных финских выборках

Генотип по G/A <sub>-22018</sub>	Генотип по C/T <sub>-13910</sub>			Всего	D'	$\chi^2(1)$ степень свободы)	p
	СС	СТ	ТТ				
GG	162	2	1	165			
GA	6	440	3	449			
AA	2	4	318	324			
Всего	170	446	322	938	0,984	42,41	$7,62 \times 10^{-11}$

Величину LD рассчитывали при помощи D'-статистики [18], а величина p означает значимость отличия D' от 0, как описано в методах [18].

Таблица 6. Расчет появления варианта C/T<sub>-13910</sub> в финской популяции с помощью программы DISLAMB

Маркер	AC3		LPH2	
Аллель	персистент- ность лактазы	неперсистент- ность лактазы	персистент- ность лактазы	неперсистент- ность лактазы
1	0	1	0	1
2	31	10	0	20
3	0	1	0	14
4	2	9	32	15
5	0	31	0	2
$\lambda^a$	0,838		0,999	
$\theta^b$	0,00031 (0,000038–0,00099)		0,0000 (0,00000–0,00052)	
$n^c$	570		450	

а:  $\lambda$  – это относительное превышение определенного аллеля в хромосомах больных (аллель персистентности лактазы) относительно его частоты в популяции (0,60)

б:  $\theta$  – это доля рекомбинации, выраженная как расстояние мутации от ближайшего маркера, принимая 1 cM = 1 м.п.о.

с:  $n$  – это число поколений после появления мутации-основателя в популяции по формуле  $\lambda = \infty(1-\theta)^n$

д: гипотетический аллель, используемый в расчетах, когда  $\theta = 0$  и  $\infty = 1$ .

**Таблица 7. Распространенность вариантов непереносимости лактозы в проверенных биохимически выборках**

5	Популяция	Генотип	Всего	C/T-13910			G/A-22018		
				CC	CT	TT	GG	GA	AA
	1. Финны								
		персистентность	182	0	95	87	0	95	87
10		лактазы							
		неперсистентность	116	116	0	0	110	6	0
		лактазы							
	2. Итальянцы								
15		персистентность	7	0	7	0	0	7	0
		лактазы							
		неперсистентность	23	23	0	0	22	1	0
20		лактазы							
	3. Немцы								
		персистентность	0	0	0	0	0	0	0
25		лактазы							
		неперсистентность	8	8	0	0	8	0	0
		лактазы							
	4. Сомалийцы								
30		персистентность	0	0	0	0	0	0	0
		лактазы							
		неперсистентность	42	42	0	0	42	0	0
35		лактазы							
	5. Южнокорейцы								
		персистентность	0	0	0	0	0	0	0
40		лактазы							
		неперсистентность	23	23	0	0	23	0	0
		лактазы							
45		Итого:	401	212	102	87	205	109	87

50

Таблица 8. Распространенность вариантов непереносимости лактозы в выборках из различных популяций

5	Популяция	Всего	Генотип						Распространенность (%) аллеля персистентности лактазы	
			C/T <sub>-13910</sub>			G/A <sub>-22018</sub>				
			CC	CT	TT	GG	GA	AA		
10	Южнокорейцы	23	23	0	0	23	0	0	0	*
	Французы	17	7	9	1	6	10	1	59	*
	Баски	85	7	44	34	13	35	37	92	*
15	Южные итальянцы	100	89	11	0	88	12	0	11	*
	Сомалийцы	79	74	5	0	78	1	0	6	
	Штат Юта	92	7	33	52	7	30	55	92	*
	Афро-американцы	96	76	15	5	78	12	5	21	*
20	Марокканцы	90	62	25	3	65	22	3	31	*
	Сарави (Африка)	57	29	26	2	28	26	3	49	*
	Саамы	30	20	10	0	21	9	0	33	*
25	Тибетцы	23	23	0	0	23	0	0	0	
	Вост. финны	571	108	287	176	107	288	176	81	*
	Зап. Финны	367	62	159	146	58	161	148	83	*
	Финно-угорские народы									
30	Хан	20	19	1	0	19	1	0	5	
	Хт	20	19	1	0	19	1	0	5	
	Манси	22	20	2	0	20	2	0	9	
35	Коми	10	7	3	0	7	3	0	30	
	Эрзя	30	17	10	3	19	9	2	43	
	Мокша	30	13	17	0	14	16	0	57	*
40	Удмурты	30	12	16	2	11	15	4	60	*
	Племена Пакистана									
	Калашы	30	30	0	0	28	2	0	0	
	Буруши	30	29	1	0	27	3	0	3	
45	Хазарейцы	14	13	1	0	11	3	0	7	
	Кашмирцы	20	15	5	0	14	6	0	25	
	Белуджи Мекрана	29	19	10	0	19	8	1	34	
50	Брагуи	30	17	10	3	16	11	3	43	
	Мекрани	29	16	10	3	16	10	3	45	

(негроиды)

Пуштуны	29	12	16	1	13	14	2	59	*
Индийцы	29	11	13	5	10	12	5	62	*

5

**Итого: 2032**

10

\* Распространенность аллеля персистенности лактазы очень хорошо коррелирует с опубликованными данными по распространенности аллеля персистенности лактазы (Simoons Fj. The geographic hypothesis and lactose malabsorption. Am J Dig Dis 1978 23(11): 963-80)

15

#### Формула изобретения

1. Молекула нуклеиновой кислоты, включающая 5'-концевую часть гена кишечной лактазы-флоризингидролазы (LPH), принимающая участие в или служащая индикатором гиполактазии взрослого типа, причем указанную молекулу нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из:

20

(а) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO:1 или включающей ее;

(b) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO:2 или включающей ее;

25

(с) молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей, по меньшей мере, из 20 нуклеотидов, комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с последовательностью SEQ ID NO:1 подпункта (а), причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток цитозина в положении, соответствующем положению -13910 в 5'-направлении от первого ATG кодона гена LPH; и

30

(d) молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей, по меньшей мере, из 20 нуклеотидов, комплементарная цепь которой гибридизуется в строгих условиях с последовательностью SEQ ID NO:2 подпункта (b), причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток гуанина в положении, соответствующем положению -22018 в 5'-направлении от первого ATG кодона гена LPH;

35

причем указанная молекула нуклеиновой кислоты максимально простирается на 30000 нуклеотидов от 5'- и/или 3'-конца молекулы нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:1 или 2, соответственно.

40

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, которая представляет собой геномную ДНК.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.2, в которой указанная геномная ДНК является частью гена.

45

4. Молекула нуклеиновой кислоты, являющаяся индикатором персистенности лактазы взрослого типа, включающая 5'-концевую часть гена кишечной лактазы-флоризингидролазы (LPH), причем указанную молекулу нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из:

(а) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO:3 или включающей ее;

50

(b) молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO:4 или включающей ее;

(с) молекулы нуклеиновой кислоты, комплементарная цепь которой

гибридируется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту (а) или (b), причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток тимидина в положении, соответствующем положению -13910 от первого ATG кодона гена LPH, и причем указанная гибридизирующаяся молекула нуклеиновой кислоты  
5 включает, по меньшей мере, 100 нуклеотидов в 5'- и 3'-направлении от положения -13910 от первого ATG кодона гена LPH; и

(d) молекулы нуклеиновой кислоты, комплементарная цепь которой гибридируется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту (а) или (b), причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит остаток аденозина в положении, соответствующем положению - 22018 от первого ATG кодона гена LPH, и причем указанная гибридизирующаяся молекула нуклеиновой  
10 кислоты включает, по меньшей мере, 100 нуклеотидов в 5'- и 3'-направлении от положения -22018 от первого ATG кодона гена LPH.

15 5. Молекула нуклеиновой кислоты по п.4, которая представляет собой геномную ДНК.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.5, в которой указанная геномная ДНК является частью гена.

20 7. Фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-6, имеющий, по меньшей мере, 14 нуклеотидов, причем указанный фрагмент включает нуклеотидное положение -13910 или нуклеотидное положение -22018 от первого ATG кодона гена LPH.

25 8. Молекула нуклеиновой кислоты, которая комплементарна молекуле нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3 и 7.

9. Молекула нуклеиновой кислоты, которая комплементарна молекуле нуклеиновой кислоты по любому из пп.4-7.

30 10. Экспрессирующий вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3 и 7.

11. Экспрессирующий вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.4-6.

35 12. Праймер или пара праймеров, причем праймер или пара праймеров гибридируется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3 и 7, включающей нуклеотидное положение -13910 или -22018 от первого ATG кодона гена LPH, либо с комплементарной ей цепью.

40 13. Праймер или пара праймеров, причем праймер или пара праймеров гибридируется в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.4-7, включающей нуклеотидное положение -13910 или -22018 от первого ATG кодона гена LPH, либо с комплементарной ей цепью.

14. Хозяин - не человек, трансформированный вектором по п.10.

45 15. Хозяин - не человек по п.14, который является бактерией, дрожжевой клеткой, клеткой насекомого, клеткой гриба, клеткой млекопитающего, клеткой растения, трансгенным животным или трансгенным растением.

16. Хозяин - не человек, трансформированный вектором по п.11.

50 17. Хозяин - не человек по п.16, который является бактерией, дрожжевой клеткой, клеткой насекомого, клеткой гриба, клеткой млекопитающего, клеткой растения, трансгенным животным или трансгенным растением.

18. Диагностическая композиция для оценки наличия или предрасположенности к гиполактазии взрослого типа, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9, вектор по п.10 или 11, праймер или пару праймеров по п.12 или 13.

19. Способ тестирования на наличие или предрасположенность к гиполактазии взрослого типа или связанный с этим признак, включающий тестирование образца, полученного от вероятного пациента или лица, предположительно несущего такую предрасположенность, на присутствие молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3, 7 и 8 в гомозиготном или гетерозиготном состоянии.

20. Способ по п.19, в котором указанное тестирование включает гибридизацию комплементарной молекулы нуклеиновой кислоты по п.8, которая комплементарна молекуле нуклеиновой кислоты, принимающей участие в или служащей индикатором гиполактазии взрослого типа, либо молекулы нуклеиновой кислоты по п.9, которая комплементарна последовательности дикого типа, в качестве зонда в строгих условиях с молекулами нуклеиновых кислот, содержащихся в указанном образце, и детектирование указанной гибридизации, причем молекула нуклеиновой кислоты дикого типа содержит тимидин в положении, соответствующем положению -13910 от первого ATG кодона гена LPH, и/или аденозин в положении, соответствующем положению -22018, а мутантная молекула нуклеиновой кислоты содержит цитозин в положении, соответствующем положению -13910, и/или гуанин в положении, соответствующем положению -22018.

21. Способ по любому из пп.19 или 20, дополнительно включающий расщепление продукта указанной гибридизации с помощью рестрикционной эндонуклеазы или подвергание продукта гибридизации расщеплению рестрикционной эндонуклеазой и анализ продукта указанного расщепления.

22. Способ по п.21, в котором образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму, зародышевую ткань, слюну, мочу, слизистую оболочку, слизь, вагинальную ткань, эмбриональную ткань, полученную из влагалища, кожу, волосы, волосяной фолликул или иную ткань человека.

23. Способ по п.22, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

24. Способ по п.23, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

25. Способ по п.21, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

26. Способ по п.25, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

27. Способ по п.20, в котором зонд помечен детектируемой меткой.

28. Способ по п.19, в котором указанное тестирование включает определение нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, части молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9, причем указанная часть включает нуклеотидное положение -13910 и/или нуклеотидное положение -22018 от первого ATG кодона гена LPH.

29. Способ по п.28, в котором определение нуклеотидной последовательности осуществляют при помощи твердофазного минисеквенирования.

30. Способ по п.28, дополнительно включающий перед определением указанной нуклеотидной последовательности амплификацию, по крайней мере, указанной части указанной молекулы нуклеиновой кислоты.

31. Способ по п.19, в котором указанное тестирование включает проведение реакции амплификации, при этом, по меньшей мере, один из праймеров, используемых в этой реакции амплификации, представляет собой праймер по п.12 или принадлежит к паре праймеров по п.12, включая определение продукта

амплификации.

32. Способ по п.19, в котором указанное тестирование включает проведение реакции амплификации, при этом, по меньшей мере, один из праймеров, используемых в этой реакции амплификации, представляет собой праймер по п.13 или принадлежит к паре праймеров по п.13, включая определение продукта амплификации.

33. Способ по любому из пп.19, 20 и 27-32, в котором образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму, зародышевую ткань, слюну, мочу, слизистую оболочку, слизь, вагинальную ткань, эмбриональную ткань, полученную из влагалища, кожу, волосы, волосяной фолликул или иную ткань человека.

34. Способ по п.33, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

35. Способ по п.34, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

36. Способ по любому из пп.19, 20, 27-32, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

37. Способ по п.36, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

38. Способ по любому из пп.30-32, в котором указанная амплификация осуществляется при помощи или представляет собой полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

39. Способ по п.38, в котором образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму, зародышевую ткань, слюну, мочу, слизистую оболочку, слизь, вагинальную ткань, эмбриональную ткань, полученную из влагалища, кожу, волосы, волосяной фолликул или иную ткань человека.

40. Способ по п.39, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

41. Способ по п.40, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

42. Способ по п.38, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

43. Способ по п.42, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

44. Способ тестирования на наличие или предрасположенность к гиполактазии взрослого типа или связанный с этим признак, включающий тестирование образца, полученного от вероятного пациента или лица, предположительно несущего такую предрасположенность, на присутствие молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.4-7 и 9 в гомозиготном или гетерозиготном состоянии.

45. Способ по п.44, в котором указанное тестирование включает гибридизацию комплементарной молекулы нуклеиновой кислоты по п.8, которая комплементарна молекуле нуклеиновой кислоты, принимающей участие в или служащей индикатором гиполактазии взрослого типа, либо молекулы нуклеиновой кислоты по п.9, которая комплементарна последовательности дикого типа, в качестве зонда в строгих условиях с молекулами нуклеиновых кислот, содержащихся в указанном образце, и детектирование указанной гибридизации, причем молекула нуклеиновой кислоты дикого типа содержит тимидин в положении, соответствующем положению -13910 от первого ATG кодона гена LPH, и/или аденозин в положении, соответствующем положению -22018, а мутантная молекула нуклеиновой кислоты содержит цитозин в

положении, соответствующем положению -13910, и/или гуанин в положении, соответствующем положению -22018.

46. Способ по п.45, дополнительно включающий расщепление продукта указанной гибридизации с помощью рестрикционной эндонуклеазы или подвергание продукта гибридизации расщеплению рестрикционной эндонуклеазой и анализ продукта указанного расщепления.

47. Способ по п.45, в котором зонд помечен детектируемой меткой.

48. Способ по п.44, в котором указанное тестирование включает определение нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, части молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9, причем указанная часть включает нуклеотидное положение -13910 и/или нуклеотидное положение -22018 от первого ATG кодона гена LPH.

49. Способ по п.48, в котором определение нуклеотидной последовательности осуществляют при помощи твердофазного минисеквенирования.

50. Способ по п.48, дополнительно включающий, перед определением указанной нуклеотидной последовательности, амплификацию, по крайней мере, указанной части указанной молекулы нуклеиновой кислоты.

51. Способ по п.44, в котором указанное тестирование включает проведение реакции амплификации, при этом, по меньшей мере, один из праймеров, используемых в этой реакции амплификации, представляет собой праймер по п.12 или принадлежит к паре праймеров по п.12, включая определение продукта амплификации.

52. Способ по п.44, в котором указанное тестирование включает проведение реакции амплификации, при этом, по меньшей мере, один из праймеров, используемых в этой реакции амплификации, представляет собой праймер по п.13 или принадлежит к паре праймеров по п.13, включая определение продукта амплификации.

53. Способ по любому из пп.44-52, в котором образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму, зародышевую ткань, слюну, мочу, слизистую оболочку, слизь, вагинальную ткань, эмбриональную ткань, полученную из влагалища, кожу, волосы, волосяной фолликул или иную ткань человека.

54. Способ по п.53, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

55. Способ по п.54, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

56. Способ по любому из пп.44-52, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

57. Способ по п.56, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

58. Способ по любому из пп.50-52, в котором указанная амплификация осуществляется при помощи или представляет собой полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

59. Способ по п.58, в котором образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму, зародышевую ткань, слюну, мочу, слизистую оболочку, слизь, вагинальную ткань, эмбриональную ткань, полученную из влагалища, кожу, волосы, волосяной фолликул или иную ткань человека.

60. Способ по п.59, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

61. Способ по п.60, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

62. Способ по п.58, в котором указанная молекула нуклеиновой кислоты из указанного образца фиксирована на твердой подложке.

5

63. Способ по п.62, в котором твердая подложка представляет собой чип, кварцевую пластину, бусины или микротитровальный планшет.

64. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9 для анализа на наличие или предрасположенность к гиполактазии взрослого типа.

10

65. Набор для анализа на наличие или предрасположенность к гиполактазии взрослого типа, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9, праймер или пару праймеров по п.12 или 13, или вектор по п.10 или 11 в одном или нескольких контейнерах.

15

20

25

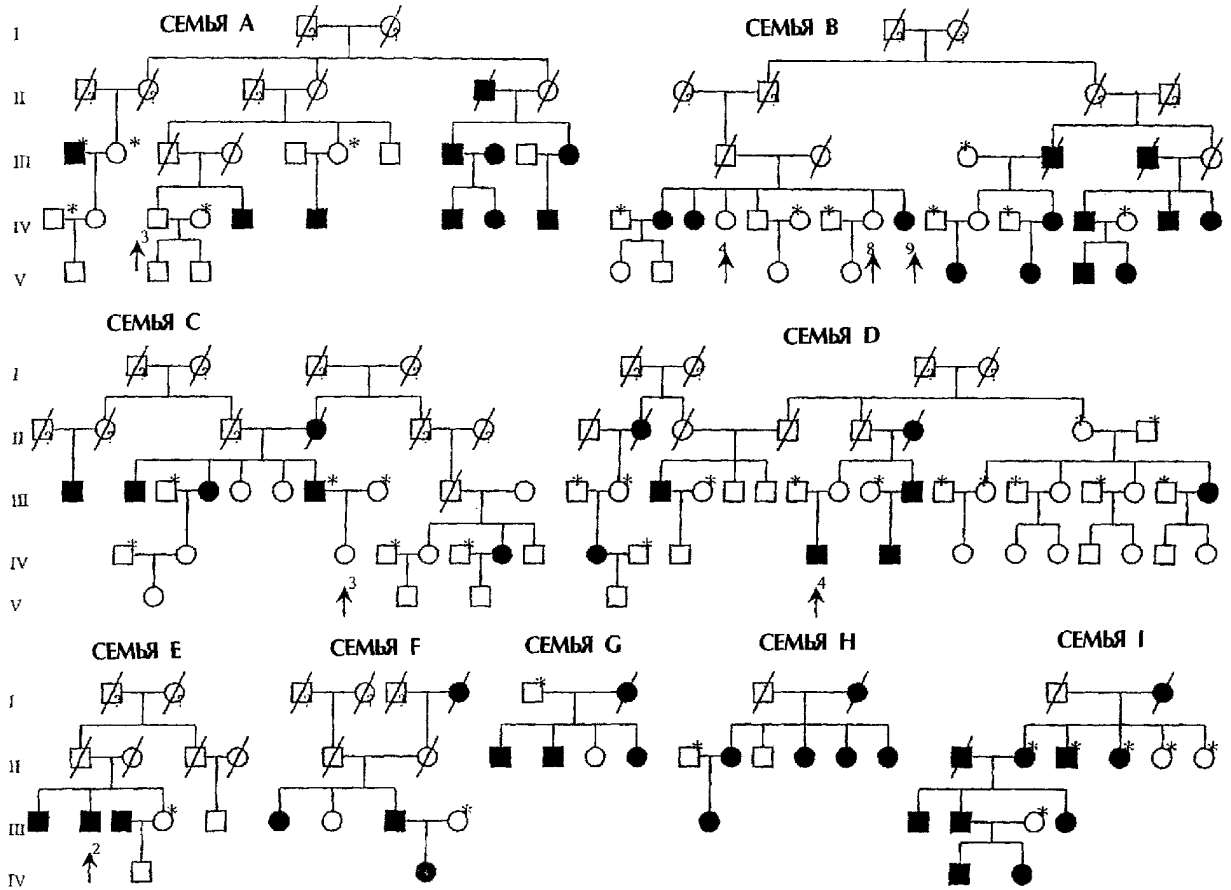
30

35

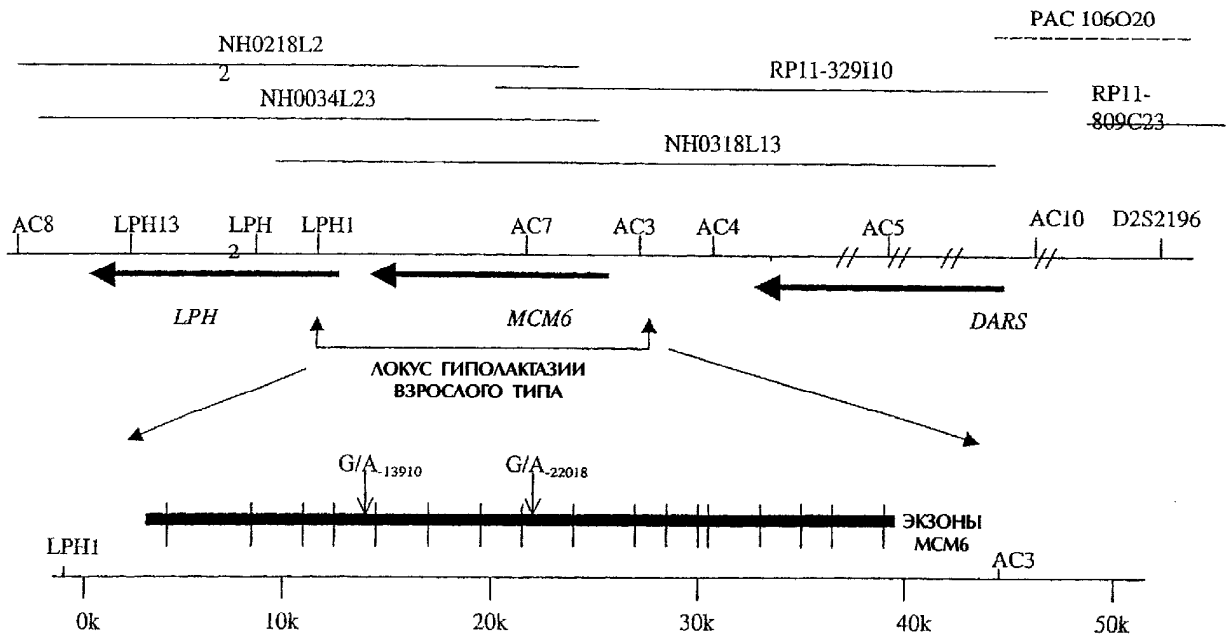
40

45

50



ФИГ. 1



ФИГ. 2

МАРКЕР	ГАПЛОТИП									ИТОГО
LRH13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
LRH2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
LRH1	3	2	2	2	1	1	4	4	4	
AC7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
AC3	2	2	2	4	2	2	2	2	2	
AC4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
AC5	6	6	5	6	6	3	6	5	3	
АЛЛЕЛИ ПЕРСИСТЕНТНОСТИ ЛАКТАЗЫ	20	4	1	2	2	1	1	1	1	33
АЛЛЕЛИ НЕПЕРСИСТЕНТНОСТИ ЛАКТАЗЫ	3	2	0	0	0	0	2	0	2	54

ФИГ. 3  
**SEQ ID NO:1**

ACCTTTCATTCAGGAAAAATGTAСТТАGACCCTACAATGTAСТTAGTAGGCCTCTGCGCTG  
GCAATACAGATAAGATAATGTAGCCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCCTCCTTAGGTTGCA  
TTTGTATAATGTTTGATTTTТAGATTGTTCTTTGAGCCCTGCATTCCACGAGGATAGGTC

ФИГ. 4  
**SEQ ID NO:2**

TAAGAACATTTTACACTCTTCAGTATAAAGAAGTCAGAATACCCCTACCCTATCAGTAAA  
GGCCTATAAGTTACCATTA AAAAGATGTCCTTAAAAACAGCATTCTCAGCTGGGCgCGGT  
GGCTCACACCTTTGTCCCAGTACTTTGGGAAGCCGAGGTGGGTGGATCACCTGAGGTCAG

ФИГ. 5

## SEQ ID NO:3

ATCAGAGTCACTTTGATATGATGAGAGCAGAGATAAACAGATTTGTTGCATGTTTTTAAT  
CTTTGGTATGGGACATACTAGAATTCAGTGCAAATACATTTTTATGTAAGTGTGAATGC  
TCATACGACCATGGAATTCTTCCCTTTAAAGAGCTTGGTAAGCATTTGAGTGTAGTTGTT  
AGACGGAGACGATCACGTCATAGTTTATAGAGTGCATAAAGACGTAAGTTACCATTTAAT  
ACCTTTCATTCAGGAAAAATGTAAGTACTTAGACCCTACAATGTAAGTACTAGTGGCCTCTGCGCTG  
GCAATACAGATAAGATAATGTAGTCCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCCTCCTTAGGTTGCA  
TTTGTATAATGTTTGATTTTTAGATTGTTCTTTGAGCCCTGCATTCCACGAGGATAGGTC  
AGTGGGTATTAACGAGGTAAAAGGGGAGTAGTACGAAAGGGCATTCAGCGTCCCATCTT  
CGCTTCAACCAAAGCAGCCCTGCGTTTTCCCTAGTTTTTATTAATAGGTTTGATGTAAGGTC  
GTCTTTGAAAAGGGGTTTTGGCTTTTTTTTTACAGTGTGACTGAGGTATAATTTATAAAA  
GGGAAATGTATGGCATGGTGTAGTTTTTTCACATACATCCTTGTGAATACCCAGCTCAAGA  
TCCAAAACATTTCCATAATTTCCAGAAAGTTCCAAACCCCTGCCTCTTTTCAGTCTTAGCC  
CTCTTCCCCTGAAGTAACCACTGTTCCGACTTCAATCACTACTTTTATCCCACAGGTAA  
TTTTTTGGCTTTTTTCCACTAAATTTTCAAATCTTTGATATGGTACTTTACTATTGACG  
AAGTACTTTCACACTAGGTTATTTAATATCTTTGATTCACCCAATATTTAGGGAACACC  
TGTAGGGGACAAAAATGAATGAGAGCCCCTGCCTTCCATTGCTGCTAATCTGGTGGGAA  
CGAGACATGTATTTAATTAAGCATGTAATAAATAGAGTGGGTGATGAAATAATCTATATA  
CTAAATCCCCTATGACACACAGTTTACCTATGTAACAACCTGCATGTGTACCCCCGAACC  
TAAAAATAAGTTGGAAATTAATAAAAAACGAGAGGGGAGAATAGAGCATCACAACCAGAG  
TGCTGAGATGAATTACTTTATTACCAAAGAAGGAGGAGGACTCAGGGAGGTGCCGACGTT  
TAAACCAGTCACTGAAGGGTGTGAGAAATTTGGATAGGCAAGATACCCTGGGACAAGGT  
CATTTCAAACCATGCTAACATTTGTACTTTTTTTTTTCATTGTGATAGTTCTGAAATGA  
GTTGCATAAACTGGTACATGTCTTAGGGCAGTCTCTAATTTGATTTTTATTTGTTCTAT  
TTTTAAAAATTAGTCTTCAAATAGCAGATTCACATGATATTAATAATATATGCACATAAAT  
TATATACACAAATATATTTTCTGAATGAAATTTAGTATCTGCATATATTTAAGAGCTATT  
TCTGTCTCATATGTTTATAATCTTTCATCCATTAATAAACTTTTTGTTAGGCCTTTCTCAC  
TCTAAGATTATAAAAAATTTCTCCCATTTATTTACCTAGCTAGTTTTCTAGTTGTTCCAAA  
CCATTTATTGAACAATCCATCTTTTTGACACTGGTTTGGCATGCCTTAATTTATATATTCT  
TGTGTGTGTAGGATCTCCTTTTGGACTTTCCATTCTGTTTCATTGAGTCTTATCAGCTCC  
TCTTACATTGGTACCATGATGTTTTAATCTATGGGGCTTTGTAGTTTAAATGTAGGGCTA  
GTTCCAGCGCATTGTTCTCTATCAGCTGTTAGGAACTTAGAAATCAGCTTGCTCTGTTTTT  
AAAGAAAAACCTGGTATTTTTTTTATCAGTATAACATTTCTATTTATAATTAAGTGAAGAAT  
TGAAAACATCTATGATTTTTTCTTATTCAGTAACGTATCACTTAGAATAGGTTAGGTTGTA  
CTACTATAAAATCTCAGCTGCATAAAACAATTTTTTTTTGCTTGTGCTACACATCCATTA  
GGTCATCAAGGGACTCACCTTGTCAAGTACTCAGAGATTCAGGCTGATATAAAGGTTTG  
ATCTTGACATACGCTTTCATGATGACAGAAAGCAGGGAAGAGAAGGTGGTGTAGCCATGTG  
CTTTCTCCCCCTTCTATCCAGAAATGACACATACTCACATTTTCATTGCGCCAGAGAAATTA  
ACATGGCCCCCTCCTAAGTTCAAATGGATAGAGAAATGCCTTCCCTACCAGGTGCCCAGAAT  
TAGAAGAGCAAACATTTGTGAACAGTCTGAGTACCACAAATACCGTTATCTTTCCACTT  
AAGTCTTCTGTTTCACTCAGTAGTGCTTTAACTTTTCTTTCATATGTTTTTTCAGTGTTC  
TTGTTGAATTTCTTGATATTTTATCATGTTTGTTCGTAAGTGGGAGTAGCCTTTTTTTTCCA

ФИГ. 6

TTTCATTTTCTGGCTGGTTTCATTGCTGGTTGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGAT  
 GGAGTCTCACTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGTACAATCTCGGCTCACTGCAACC  
 TCTGCCTCCCAGGTTCAAGCGATTCTTCTTTCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAG  
 GCATGTGCCACCATGCCAGCTAATTTTTTATATTTTATAGTAGAGATGGGGTTTCTCCAT  
 GTTGGTCAGGCTGGTCTCAAACCTCCAATCTCAGGTGATCCGCCTGCCTCTGCCTTCCAA  
 AGTGCTGGGATTATAGACATGAGCCACCGTGCCTGGCCTAGTTCTTATGGGATGTATATG  
 TCTTTGGATTATATGATATGATATATGTTTATATTTCTACAAGTACATACCTAGGAGT  
 GGAATTGTTGGGTCATAGGTTAATGCATGTTTTTCTGCCAAACAGTTGTGTCAATTTCTG  
 TTTTCACCGCTGTGAATGAGAGTTGTTCTACCTTCTTGACAACACTTGATATTGTCAGTC  
 ATTTTAGCCATTCTGGTGAATTTATAGTGCTATTTCTGTGTGTGTAAGAGAGAGAATGAG  
 AGAGGGTGTGTGAGAAAACCAAAGCAACACTGTGAGAGTGTGTGTGTGTGTGAGAAAA  
 CCAAAATACATACTACTGTGATTTCAATGGGAGAAAATCTGTTTGGTATATCAAAAAAAG  
 TAGCTTAATTACTTCATCATTATTGGTTTAGGT

ФИГ. 6 (продолжение)

**SEQ ID NO:4**

TAAGAACATTTTACACTCTTCAGTATAAAGAAGTCAGAATACCCCTACCSTATCAGTAAA  
 GGCTATAAGTTACCATTAAAAAGATGTCCTTAAAAACAGCATTCTCAGCTGGGCaCGGT  
 GGCTCACACCTTTGTCCCAGTACTTTGGGAAGCCGAGGTGGGTGGATCACCTGAGGTCAG  
 GAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGCGAAAACCCATTTTCTCTACTAAAAATACAAA  
 AATTAGCCGGGCATGGTGGCGGGTGCTTGTGGTCCCAGCTACTCAAGAGGCTGAGGTGGG  
 AGGATCACTGAGCCCAGGAGGTGGAGGCTGCATTGAGCCAAGATTGTGCCACTGCACTCC  
 AGCCTGGGTGACAGAGCGAGACTCTGTCTCAAAAAAACCAAAACAAAAAAACCCAGCAT  
 TCTTTAGTAAATAAATTCATAGTTTTCTTCATCTAGAATTTAAAATTGTGATAGTTGATCA  
 GCATGTCCTGAGCACGTGTGTTTGTCTTACTAGTTTAGATCGGTAGATGTGTATATAAG  
 TTATAGGTATAAAATCAATCCTGAGTTGACACAAGGTTTTGATGTTGAGTACAAGTACAG  
 TAAGTGTATATTTTATAGTTATGCTCTTAGTTTTAAGTCAATTGTGTGGTTCTTTCTAGCT  
 TTAGGATCTGTTGAATTATCTTCCTTAGAAAAGGGAGTTAAGAATCTTCACTTACCTATC  
 TTCTACTTGTGTTGGAGAATAGAAGAGTCCCTGTGGTAGCAGACTTTGTGAGTTTACTTGT  
 AATTTTCCATCTGAAAGACTGTTCTTGTTTTTTCGTGATGAAGTCTTGCTCTGTCGCCCAG  
 GCTGGAGTGCAGTGGTGC AACCTTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCGGGTTCAAGCAA  
 TTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTATCTGGGATTACAGGTGCACACCACCACACCTGGCT  
 AATTTTGTATTTTTCAGTAGAGACGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACT  
 CTTGACCTCATGATCAGCCCACCTCAGCCTTCCAAAGTCTGGGATTACAGGTGTGAGCC  
 CCCACACTCGGCCGTTGTTGTTTTTAAAGAGACAGGGTCTCACTCTGTCACCTAACCTGG  
 AGTACAGTGGCAATCATGGCTCACTGTAACCTCAAATGCCCGGCCTTAGTGAAGCGTTCT  
 TCCTGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGTGTGAGCCATGCATCCAGCTTGAA  
 AGACAGCTTCTTAGGCTTGATTTGTTTGGTTACAGG

ФИГ. 7

## SEQ ID NO:5

ATCAGAGTCACTTTGATATGATGAGAGCAGAGATAAACAGATTTGTTGCATGTTTTTAAT  
CTTTGGTATGGGACATACTAGAATTCAGTGC AAAATACATTTTTATGTAAGTGTGAAATGC  
TCATACGACCATGGAATTCCTCCCTTTAAAGAGCTTGGTAAGCATTGAGTGTAGTTGTT  
AGACGGAGACGATCACGTCATAGTTTATAGAGTGCATAAAGACGTAAGTTACCATTTAAT  
ACCTTTCATTCAGGAAAAATGTACTTAGACCCTACAATGTACTAGTAGGCCTCTGCGCTG  
GCAATACAGATAAGATAATGTAGCCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCCTCCTTAGGTTGCA  
TTTGTATAATGTTTGATTTTTAGATTGTTCTTTGAGCCCTGCATTCACGAGGATAGGTC  
AGTGGGTATTAACGAGGTAAAAGGGGAGTAGTACGAAAGGGCATTCAAGCGTCCCATCTT  
CGCTTCAACCAAAGCAGCCCTGCGTTTTCTAGTTTTTATTAATAGGTTTGATGTAAGGTC  
GTCTTTGAAAAGGGGTTTGGCTTTTTTTTACAGTGTGACTGAGGTATAATTTATAAAAA  
GGGAAATGTATGGCATGGTGAGTTTTTTCACATACATCCTTGTAATACCCAGCTCAAGA  
TCCAAAACATTTCCATAATTTAGAAAGTTCCAAACCCCTGCCTCTTTTCAGTCTTAGCC  
CTCTTCCCTGAAGTAACCACTGTTCCGACTTCAATCACTACTTTTATCCACAGGTTAA  
TTTTTTGGCTTTTTTCCACTAAATTTTCAAATTCCTTGATATGGTACTTTACTATTGACG  
AAGTACTTTCACACTAGGTTATTTAATATTCCTTGATTCACCCAATATTTAGGGAAACACC  
TGTAGGGGACAAAAATGAATGAGAGCCCCTGCCTCCATTGCTGCTAATCTGGTGGGAA  
CGAGACATGTATTTAATTAAGCATGTAAAAAATAGAGTGGGTGATGAAATAATCTATATA  
CTAAATCCCCATGACACACAGTTTACCTATGTAACAAACCTGCATGTGTACCCCCGAACC  
TAAAATATAAGTTGGAAATTAAAAAAAAACGAGAGGGAGAATAGAGCATCACAAACCAGAG  
TGCTGAGATGAATTACTTTATTACCAAAGAAGGAGGAGGACTCAGGGAGGTGCCGACGTT  
TAAACCCAGTCACTGAAGGGTGTGCAGAATTTGGATAGGCAAGATACCCTGGGACAAGGT  
CATTCTAAAACCATGCTAACATTTGTAATTTTTTTTTTCATTGTGATAGTTCTGAAATGA  
GTTGCATAAACTGGTACATGTCTTAGGGCAGTCTCTAATTGATTTTTATTTGTTCTAT  
TTTTAAAAATTAGTCTTCAAATAGCAGATTCACATGATATTAATAATATATGCACATAAAT  
TATATACACAAATATATTTTCTGAATGAAATTTAGTATCTGCATATATTTAAGAGCTATT  
TCTGTCTCATATGTTCAATAATCTTCATCCATTAAAAAAATTTTGTAGGCCTTTCTCAC  
TCTAAGATTATAAAAAAATCTCCCATTTATTTACCTAGCTAGTTTTCTAGTTGTTCCAAAA  
CCATTTATTGAACAATCCATCTTTTTGACACTGGTTTGGCATGCCTTAATTATATATCT  
TGTGTGTGTTAGGATCTCCTTTTGGACTTCCATCTGTTCATTGAGTCTTATCAGCTCC  
TCTTACATTGGTACCATGATGTTTTAATCTATGGGGCTTTGTAGTTTAAATGTAGGGCTA  
GTTCCAGCGCATTGTTCTCTATCAGCTGTTAGGAACTTAGAAATCAGCTTGCTCTGTTTT  
AAAGAAAAACCTGGTATTTTTTTATCAGTATAACATTCATTTATATTAACTTGAAGAAT  
TGAAAACATCTATGATTTTTCTATTCAGTAACGTATCACTTAGAATAGGTTAGGTTGTA  
CTACTATAAAATCTCAGCTGCATAAAACAATTTTTTTTTGCTTGTGCTACACATCCATTA  
GGTCATCAAGGGACTCACCTTGTCAAGTACTCAGAGATTCAGGCTGATATAAAGGTTTG  
ATCTTGACATACGCTTTCATGATGACAGAAAGCAGGGAAGAGAAGGTGGTGAGCCATGTG  
CTTTCTCCCCCTTCTATCCAGAAATGACACATACTCACATTTCAATTCGCCAGAGAAATTA  
ACATGGCCCCCTCCTAAGTTCAAATGGATAGAGAAATGCCTTCCACCAGGTGCCCAGAAT  
TAGAAGAGCAAACATTTGTGAACAGTCTGAGTACCACAAATACCGTTATCTTTCCACTT  
AAGTCTTCTGTTCACTCAGTAGTGCTTTAAACTTTTCTTCATATGTTTTTCAGTGTTC  
TTGTTGAATTTCTTGATATTTTATCATGTTTGTTCGTAAGTGGGAGTAGCCTTTTTTTTCCA

ФИГ. 8

TTTCATTTTCTGGCTGGTTTCATTGCTGGTTGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGAT  
GGAGTCTCACTCTGTCCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGTACAATCTCGGCTCACTGCAACC  
TCTGCCTCCCAGGTTCAAGCGATTCTTCTTTCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAG  
GCATGTGCCACCATGCCAGCTAATTTTTTATATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTTCTCCAT  
GTTGGTCAGGCTGGTCTCAAACCTCCAATCTCAGGTGATCCGCCTGCCTCTGCCTTCCAA  
AGTGCTGGGATTATAGACATGAGCCACCGTGCCTGGCCTAGTTCTTATGGGATGTATATG  
TCTTTGGATTTCATATGATATGTATATATGTTTATATTTCTACAAGTACATACTAGGAGT  
GGAATTGTTGGGTCATAGGTTAATGCATGTTTTTCTGCCAAACAGTTGTGTCAATTTCTG  
TTTTACCGCTGTGAATGAGAGTTGTTCTACCTTCTTGACAACACTTGATATTTGTCAGTC  
ATTTTAGCCATTCTGGTGAATTTATAGTGCTATTTCTGTGTGTGTAAGAGAGAGAATGAG  
AGAGGGTGTGTTGTGAGAAAACCAAAGCAACACTGTGAGAGTGTGTGTGTTGTGAGAAAA  
CCAAAATACATACTACTGTGATTTCAATGGGAGAAAATCTGTTTGGTATATCAAAAAAAG  
TAGCTTAATTACTTCATCATTTATTGGTTTAGGT

ФИГ. 8 (продолжение)

### SEQ ID NO:6

ТААГААСАТТТТАСАСТСТСАГАТАААГААГТСАГААТАССССТАСССТАТСАГАТААА  
GGCCTATAAGTTACCATTA AAAAGATGTCSTTAAAAACAGCATTTCTCAGCTGGGCgCGGT  
GGCTCACACCTTTGTCCCAGTACTTTGGGAAGCCGAGGTGGGTGGATCACCTGAGGTCAG  
GAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGCGAAAACCCATTTTCTCTACTAAAAATACAAA  
AATTAGCCGGGCATGGTGGCGGGTGCTTGTGGTCCCAGCTACTCAAGAGGCTGAGGTGGG  
AGGATCACTGAGCCCAGGAGGTGGAGGCTGCATTTGAGCCAAGATTGTGCCACTGCACTCC  
AGCCTGGGTGACAGAGCGAGACTCTGTCTCAAAAAAACCAAACAAAAAAACCCAGCAT  
TCTTTAGTAAATAATTTCATAGTTTCTTTCATCTAGAATTTAAAATTGTGATAGTTGATCA  
GCATGTCCTGAGCACGTGTGTTTGCTGTTACTAGTTTAGATCGGTAGATGTGTATATAAG  
TTATAGGTATAAAATCAATCCTGAGTTGACACAAGGTTTTGATGTTGAGTACAAGTACAG  
TAAGTGTATATTTTTAGTTATGCTCTTAGTTTTAAGTCAATTGTGTGGTTCTTTCTAGCT  
TTAGGATCTGTTGAATTAATCTTCCCTTAGAAAAGGGAGTTAAGAATCTTCACTTACCTATC  
TTCTACTTGTGTTGGAGAATAGAAGAGTCCCTGTGGTAGCAGACTTTGTGAGTTTACTTGT  
AATTTCCATCTGAAAGACTGTTCTTGTTTTTTCGTGATGAAGTCTTGCTCTGTCGCCAG  
GCTGGAGTGCAGTGGTGC AACCTTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCGGGTTCAAGCAA  
TTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAGATATCTGGGATTACAGGTGCACACCACCACACCTGGCT  
AATTTTTGTATTTTCAGTAGAGACGGGGTTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACT  
CTTGACCTCATGATCAGCCCACCTCAGCCTTCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCC  
CCCACACTCGGCCGTTGTTGTTTTTTAAGAGACAGGGTCTCACTCTGTCACTAACCTGG  
AGTACAGTGGCAATCATGGCTCACTGTAACCTCAAATGCCCGGCCTTAGTGAAGCGTTCT  
TCCTGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGTGTGAGCCATGCATCCAGCTTGAA  
AGACAGCTTCTTAGGCTTGATTTGTTTGGTTACAGG

ФИГ. 9