

# Real-time-PCR-SNP5

## Инструкция по применению

***Набор реагентов для генотипирования  
однонуклеотидных полиморфизмов в генах  
PPARG, FABP2, ADRB2 и ADRB3 с  
использованием ПЦР в режиме реального  
времени***

Номер каталога: 21901 Набор для 8 реакций по 5 полиморфизмам  
21902 Набор для 24 реакций по 5 полиморфизмам

Только для исследовательского применения

Версия: январь 2020г

Хранить от -15 до -25°C



Введение .....	3
1. Назначение набора .....	3
2. Принцип действия набора.....	3
3. Материал для исследования .....	6
4. Состав набора.....	6
5. Необходимые реактивы и инструменты не входящие в набор .....	6
6. Транспортировка и хранение.....	7
7. Ограничения по использованию .....	7
8. Меры предосторожности .....	7
9. Перед началом работы .....	8
10. Проведение аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.....	8
10.1. Приготовление смесей для ПЦР .....	8
10.2. Программирование амплификатора .....	10
10.3. Анализ результатов .....	10
10.4 Рекомендации по диете. ....	12
11. Автоматизация генотипирования с использованием программного обеспечения «BioLink-SNP5» .....	13
12. Список литературы.....	13
13. Техническая поддержка .....	13

## **Введение**

На сегодняшний день существует множество разнообразных диет, но все они не универсальны. На практике известно, что диета, которая помогла одному человеку далеко не всегда может быть эффективной для другого. Последние исследования в области нутригенетики, связанные с выбором диеты однозначно приводят к выводу – для выбора корректной диеты необходимо учитывать индивидуальные генетические особенности человека.

Ученые Стэнфордского университета исследовали мутации более 100 основных генов, участвующих в процессах метаболизма питательных веществ. В результате было выбрано 4 полиморфных гена (PPARG, FABP2, ADRB2 и ADRB3), которые оказались действительно связаны с реакцией организма на вариант диеты или на физическую активность. В зависимости от наличия и сочетания однонуклеотидных полиморфизмов в этих генах практически все население можно разделить на три категории, каждой из которой будет оптимальна особая диета для похудения: низкоуглеводная диета, диета с пониженным содержанием жира, либо специально сбалансированная низкокалорийная диета с повышенной физической нагрузкой.

Эффективность нового способа выбора диеты подтверждена масштабными клиническими испытаниями, результаты которых были представлены на конференции Американской кардиологической ассоциации в 2010 году.

## **1. Назначение набора**

Набор предназначен для анализа 5 однонуклеотидных полиморфизмов в генах PPARG (rs1801282), FABP2 (rs1799883), ADRB2 (rs1042713, rs1042714) и ADRB3 (rs4994) (Таблица 1), определенные сочетания которых позволяют рекомендовать диету и комплекс физических упражнений для снижения избыточной массы тела. Анализ проводится методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени. Сбор данных происходит в ходе выполнения ПЦР непосредственно в закрытой пробирке, что минимизирует риск контаминации и существенно упрощает процесс анализа.

Набор оптимизирован для использования с амплификаторами для ПЦР в режиме реального времени iQ5 и CFX96 (Bio-Rad, США). Использование других приборов может потребовать изменения параметров ПЦР и повлиять на чувствительность метода.

Набор предназначен только для исследовательского применения.

## **2. Принцип действия набора**

Набор содержит 10 смесей для ПЦР: по две смеси для каждого полиморфизма. Продукты ПЦР исследуемых генов идентифицируются в 5'-нуклеазной реакции с помощью зонда меченного FAM. Помимо реагентов для анализа полиморфизмов, ПЦР смеси содержат реагенты для внутреннего контроля с использованием красителя ROX. Внутренний контроль позволяет выявить наличие ингибиторов ПЦР, которые могут

приводить к ложным результатам. ПЦР смеси состоят из всех необходимых реагентов за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке. Набор также включает гетерозиготный ПКО.

**Таблица 1. Полиморфизмы, определяемые набором Real-time-PCR-SNP5.**

Ген, полиморфизм и кодируемый белок	ПЦР смесь* №	Аллельный вариант		
		№	Аминокислота	Нуклеотиды**
<b>PPARG</b> (rs1801282) Гамма-2 рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом	1.1	1	Pro(P)12	<u>C</u> CC
	1.2	2	Ala(A)12	<u>G</u> CC
<b>FABP2</b> (rs1799883) Белок, связывающий жирные кислоты 2	2.1	1	Thr(T)54	<u>A</u> CT
	2.2	2	Ala(A)54	<u>G</u> CT
<b>ADRB2</b> (rs1042713) Бета-2 адренергический рецептор	3.1	1	Arg(R)16	<u>A</u> GA
	3.2	2	Gly(G)16	<u>G</u> GA
<b>ADRB2</b> (rs1042714) Бета-2 адренергический рецептор	4.1	1	Gln(Q)27	<u>C</u> AA
	4.2	2	Glu(E)27	<u>G</u> AA
<b>ADRB3</b> (rs4994) Бета-3 адренергический рецептор	5.1	1	Trp(W)64	<u>I</u> GG
	5.2	2	Arg(R)64	<u>C</u> GG

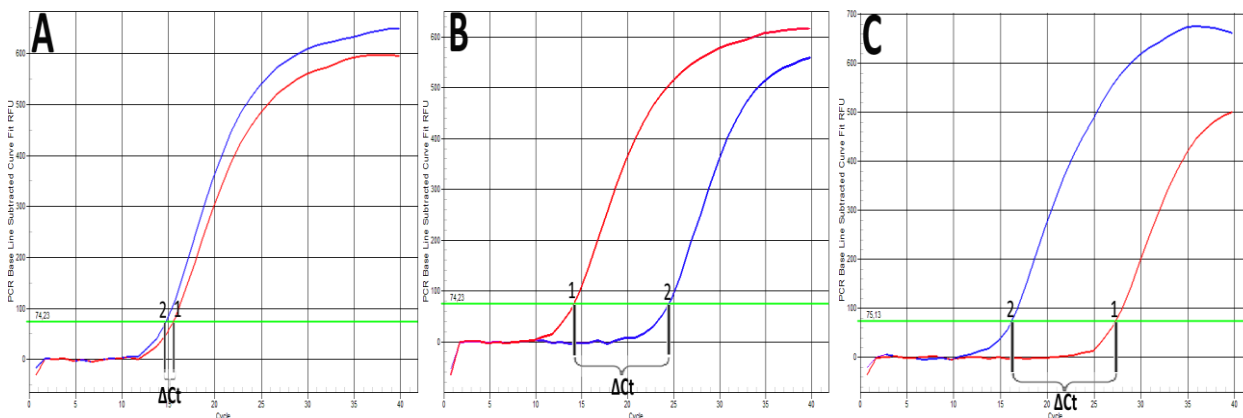
\* ПЦР смесь для определения соответствующего аллельного варианта

\*\* подчеркнут определяемый переменный нуклеотид.

Образец ДНК тестируют в десяти аллель-специфичных ПЦР. Для этого используют 5 пар смесей для ПЦР, по одной паре для каждого полиморфизма. Каждая смесь содержит праймеры, специфичные к соответствующему аллельному варианту в исследуемых генах (Таблица 1). В результате ПЦР получают значение  $C_t$ , которое соответствует количеству циклов, при которых кривая флуоресценции пересекает заданный уровень фона. Наличие того или иного аллельного варианта определяют путем сравнения значений  $C_t$  между реакциями каждой пары. В смеси с праймерами для одного аллельного варианта ДНК с альтернативным аллельным вариантом амплифицируется с увеличением  $C_t$  не менее чем на 5 циклов, что позволяет различать их. *Для корректности результатов в каждый эксперимент необходимо включать ПЦР с гетерозиготным ПКО и контролем без матрицы (водой).*

Для всех образцов ДНК результаты ПЦР для каждого полиморфизма представляют в виде разницы  $\Delta C_t = |C_{t1} - C_{t2}|$ , где  $C_{t1}$  –  $C_t$  образца ДНК в ПЦР специфичной к аллельному варианту 1,  $C_{t2}$  –  $C_t$  того же образца ДНК в ПЦР специфичной к аллельному варианту 2 того же полиморфизма.

- Образец является гетерозиготным по соответствующему полиморфизму, если  $\Delta Ct$  меньше 4 (Рисунок 1).
- Образец является гомозиготным по аллельному варианту 1 соответствующего полиморфизма, если  $\Delta Ct$  больше 5 и  $Ct_1 < Ct_2$ .
- Образец является гомозиготным по аллельному варианту 2 соответствующего полиморфизма, если  $\Delta Ct$  больше 5 и  $Ct_1 > Ct_2$ . (Пример в Таблице 2)



**Рисунок 1. Пример кривых флуоресценции в ПЦР со смесями для аллельного варианта 1 (красные линии) и для аллельного варианта 2 (синие линии) для трех возможных вариантов генотипа по однонуклеотидному полиморфизму.**

1 –  $Ct$  продукта реакции со смесью для аллельного варианта 1. 2 -  $Ct$  продукта реакции со смесью для аллельного варианта 2.

**A** - Образец гетерозиготный. **B** - Образец гомозиготный по аллельному варианту 1. **C** - Образец гомозиготный по аллельному варианту 2.

**Таблица 2. Анализ полиморфизма rs1801282 в гене PPARG в образцах ДНК.**

Образец	$Ct_1$	$Ct_2$	$\Delta Ct^*$	Генотип
<b>A</b>	15.53	14.77	0.76	Гетерозигота C/G (Pro12Ala)
<b>B</b>	14.2	24.46	10.26	Гомозигота 1 C/C (Pro12Pro)
<b>C</b>	26.35	15.26	11.09	Гомозигота 2 G/G (Ala12Ala)
<b>Гетерозиготный ПКО</b>	14.95	14.63	0.32	-

\*  $\Delta Ct = |Ct_1 - Ct_2|$ .  $Ct_1$  –  $Ct$  со смесью № 1.1 (P12),  $Ct_2$  –  $Ct$  со смесью № 1.2 (A12)

### **3. Материал для исследования**

В качестве материала для анализа может использоваться ДНК, выделенная из клеток буккального эпителия или периферической крови.

Для ПЦР достаточно 3-6 нг геномной ДНК (30-60 нг на 10 реакций для определения 5 полиморфизмов).

Набор не содержит реактивов для выделения ДНК.

### **4. Состав набора**

Набор содержит реактивы достаточные для проведения 8 (Кат. №21901) или 24 (Кат. №21902), реакций по каждому полиморфизму с образцами ДНК и контролями. Набор состоит из пробирок с реагентами с цветными крышками (Таблица 3) и инструкции по применению.

*Таблица 3. Состав набора.*

№ пробирки	Цвет крышки	Содержимое	Набор x 8 Кат.№21901	Набор x 24 Кат.№21902
1.1	Зеленый	ПЦР смесь PPARG P12*	220 мкл	660 мкл
1.2	Желтый	ПЦР смесь PPARG A12*	220 мкл	660 мкл
2.1	Зеленый	ПЦР смесь FABP2 T54*	220 мкл	660 мкл
2.2	Желтый	ПЦР смесь FABP2 A54*	220 мкл	660 мкл
3.1	Зеленый	ПЦР смесь ADRB2 R16*	220 мкл	660 мкл
3.2	Желтый	ПЦР смесь ADRB2 G16*	220 мкл	660 мкл
4.1	Зеленый	ПЦР смесь ADRB2 Q27*	220 мкл	660 мкл
4.2	Желтый	ПЦР смесь ADRB2 E27*	220 мкл	660 мкл
5.1	Зеленый	ПЦР смесь ADRB3 W64*	220 мкл	660 мкл
5.2	Желтый	ПЦР смесь ADRB3 R64*	220 мкл	660 мкл
6	Синий	Тақ ДНК-полимераза	30 мкл	90 мкл
7	Бесцветный	ПКО**	25 мкл	75 мкл
8	Белый	Вода для ПЦР	100 мкл	300 мкл

\* ПЦР смеси **НЕ СОДЕРЖАТ** Тақ ДНК полимеразы;

\*\* Смесь ДНК с гетерозиготным генотипом по каждому полиморфизму;

### **5. Необходимые реактивы и инструменты, не входящие в набор**

- Одноразовые перчатки;
- Прибор для ПЦР в режиме реального времени с блоком на 96 лунок, iQ5 iCycler или CFX96 (Bio-Rad);
- 8-луночные стрипы с плоскими крышками или 96-луночные планшеты с пленкой для ПЦР в режиме реального времени;
- Пипетки-дозаторы переменного объема на 0.5-10, 2-20, 10-100, 200-1000мкл типа Ленпипет (Россия) и одноразовые наконечники с фильтрами для ПЦР;

- Стерильные микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл;
- Микроцентрифуга на 10.000 об/мин;
- Вортекс;
- Холодильник +2-+8°C с морозильной камерой -18...- 24°C;
- Твердотельный минитермостат с терморегулятором на 37-95°C;
- Реактивы для выделения ДНК из крови, например, Blood DNA Kit (Кат. №31601, БиоЛинк, Россия) или буккального эпителия BE DNA Kit (Кат. №32601, БиоЛинк, Россия).

## **6. Транспортировка и хранение**

Набор поставляется с охлаждающими блоками. Немедленно по получении поместить набор в морозильную камеру и хранить при температуре не выше -18°C.

Время нахождения набора на свету должно быть минимальным.

Избегать размораживания/замораживания более 4-5 раз.

При правильном использовании срок хранения – 12 месяцев.

**Внимание!** Если реагенты прибыли не замороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел Техническая поддержка, стр. 22).

## **7. Ограничения по использованию**

- Набор предназначен только для исследовательского применения;
- Для получения корректных результатов необходимо строго следовать настоящей инструкции;
- Следует использовать только Taq ДНК полимеразу, входящую в состав набора;
- Не использовать компоненты наборов разных партий;
- Не использовать по истечении срока хранения.

## **8. Меры предосторожности**

- Все компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны;
- Во избежание риска контаминации ПЦР необходимо следовать основным правилам работы в ПЦР лаборатории:
  - Пользоваться отдельными помещениями (ПЦР-боксами) для выделения образцов ДНК и постановки ПЦР;
  - Использовать лабораторную одежду и одноразовые перчатки;
  - В каждом помещении (ПЦР-боксе) пользоваться отдельным комплектом автоматических пипеток-дозаторов;
  - Всегда использовать только одноразовый пластик (наконечники с фильтрами, пробирки и т.п.);
  - Хранить контрольные образцы и образцы ДНК в специальном холодильнике отдельно от других компонентов набора;
- Использованные реагенты утилизировать как клинические отходы.

## **9. Перед началом работы**

- Помимо образцов в каждый эксперимент должен быть включен контроль без матрицы (вода для ПЦР);
- ПЦР смеси и контрольные ДНК следует размораживать при комнатной температуре, проверяя, чтобы раствор полностью растаял. Перед открытием пробирки необходимо перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне;
- Не использовать вортекс для Taq ДНК полимеразы и смесей, содержащих ее, это может привести к инаktivации фермента;
- После приготовления смесей для ПЦР важно сразу убирать оставшиеся реагенты на -20°C.

## **10. Проведение аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени**

### ***10.1. Приготовление смесей для ПЦР***

10.1.1. Рассчитать необходимое количество ПЦР смесей и Taq ДНК полимеразы для тестирования образцов, ПКО и контроля воды без матрицы с учетом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в Таблице 4, для тестирования N образцов это количество необходимо умножить на  **$(N + 2) \times 1.1$** .

*Таблица 4. Количество реагентов на 1 реакцию:*

Реагент	Количество, мкл
ПЦР смесь (без полимеразы)	22.8
Taq ДНК полимеразы	0.2

*Пример расчета необходимого количества реагентов для тестирования 6 образцов ДНК:*

***ПЦР смесь = 22.8 мкл  $\times (6 + 2) \times 1.1 = 200,64$  мкл,***

***Taq ДНК полимеразы = 0.2 мкл  $\times (6 + 2) \times 1.1 = 1,76$  мкл***

10.1.2. Быстро разморозить при комнатной температуре или при 37°C все ПЦР смеси (пробирки №1.1 - 5.2, зеленые и желтые крышки) до полного растворения. Перемешать ПЦР смеси на вортексе или переворачивая пробирки 4-5 раз, центрифугировать закрытые пробирки на мини-центрифуге в течение 5 сек, чтобы собрать капли на дно.

*Использовать немедленно, время нахождения ПЦР смесей при комнатной температуре должно быть минимальным.*

10.1.3. Промаркировать десять чистых пробирок на 1.5 мл для реакционных смесей (использовать номер смеси и/или ее обозначение). Внести в пробирку 1.1 (P12) ПЦР смесь №1.1 PPARG P12, в пробирку 1.2 (A12) – ПЦР смесь №1.2 PPARG A12 и т.д.



Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК полимеразу (пробирка №6, синяя крышка). Перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс!) и центрифугировать в течение 5 сек на 1000 об/мин, чтобы собрать капли со стенок. Реакционные смеси готовы.

Не использованные остатки исходных ПЦР смесей и Taq ДНК полимеразу немедленно поместить на -20°C.

10.1.4. Промаркируйте необходимое количество пробирок в стрипах или 96-луночную планшету для ПЦР.

**Важно!** ВО ИЗБЕЖАНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОПТИКИ АМПЛИФИКАТОРА НЕ МАРКИРОВАТЬ НА КРЫШКАХ

Добавить в лунки стрипов или планшеты по 23 мкл реакционных смесей с Taq ДНК-полимеразой. Для удобства постановки и дальнейшего анализа рекомендуется вносить каждую смесь в отдельный столбец: смесь 1.1 (P12) вносится в лунки столбца 1, смесь 1.2 (A12) - в лунки столбца 2, смесь 2.1 (T54) - в лунки столбца 3 и т.д. Рекомендуемая схема расположения бти образцов приведена на Рис.2.

10.1.5. Добавить по 2 мкл соответствующей ДНК в каждую лунку согласно схеме (Рис. 2). Образец 1 вносится во все 10 лунок ряда С, образец 2 вносится во все 10 лунок ряда D и т.д.

10.1.6. Добавить по 2 мкл гетерозиготного ПКО (пробирка №7, бесцветная крышка) во все 10 лунок ряда В и по 2 мкл воды для ПЦР (пробирка №8, белая крышка) во все 10 лунок ряда А (Рис. 2).

**Смеси для ПЦР**

	P12	A12	T54	A54	R16	G16	Q27	E27	W64	R64			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Образцы
A	H <sub>2</sub> O P12	H <sub>2</sub> O A12	H <sub>2</sub> O T54	H <sub>2</sub> O A54	H <sub>2</sub> O R16	H <sub>2</sub> O G16	H <sub>2</sub> O Q27	H <sub>2</sub> O E27	H <sub>2</sub> O W64	H <sub>2</sub> O R64			H <sub>2</sub> O
B	ДНК ст P12	ДНК ст A12	ДНК ст T54	ДНК ст A54	ДНК ст R16	ДНК ст G16	ДНК ст Q27	ДНК ст E27	ДНК ст W64	ДНК ст R64			ДНК стандарт
C	ДНК 1 P12	ДНК 1 A12	ДНК 1 T54	ДНК 1 A54	ДНК 1 R16	ДНК 1 G16	ДНК 1 Q27	ДНК 1 E27	ДНК 1 W64	ДНК 1 R64			ДНК 1
D	ДНК 2 P12	ДНК 2 A12	ДНК 2 T54	ДНК 2 A54	ДНК 2 R16	ДНК 2 G16	ДНК 2 Q27	ДНК 2 E27	ДНК 2 W64	ДНК 2 R64			ДНК 2
E	ДНК 3 P12	ДНК 3 A12	ДНК 3 T54	ДНК 3 A54	ДНК 3 R16	ДНК 3 G16	ДНК 3 Q27	ДНК 3 E27	ДНК 3 W64	ДНК 3 R64			ДНК 3
F	ДНК 4 P12	ДНК 4 A12	ДНК 4 T54	ДНК 4 A54	ДНК 4 R16	ДНК 4 G16	ДНК 4 Q27	ДНК 4 E27	ДНК 4 W64	ДНК 4 R64			ДНК 4
G	ДНК 5 P12	ДНК 5 A12	ДНК 5 T54	ДНК 5 A54	ДНК 5 R16	ДНК 5 G16	ДНК 5 Q27	ДНК 5 E27	ДНК 5 W64	ДНК 5 R64			ДНК 5
H	ДНК 6 P12	ДНК 6 A12	ДНК 6 T54	ДНК 6 A54	ДНК 6 R16	ДНК 6 G16	ДНК 6 Q27	ДНК 6 E27	ДНК 6 W64	ДНК 6 R64			ДНК 6

**Рисунок 2. Рекомендуемая схема заполнения лунок для проверки 6 образцов ДНК. По вертикали: смеси для ПЦР, по горизонтали образцы ДНК, гетерозиготный ПКО, контроль воды без матрицы – «H<sub>2</sub>O».**

10.1.7. Закрывать стрипы крышками или запечатать лунки пленкой, легко перемешать, похлопывая по стенке штатива, и центрифугировать в течение 2 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать капли на дно.

10.1.8. Установить стрипы/планшету в блок амплификатора.

## 10.2. Программирование амплификатора

Для детального описания как задать параметры для ПЦР в реальном времени см. инструкцию к программному обеспечению амплификатора.

10.2.1 Задать объем реакции 25 мкл.

10.2.2 Задать протокол в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Протокол ПЦР в реальном времени для набора SNP5.

Количество циклов		Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
15	1	Денатурация	95°C	20 сек	
	2	Отжиг праймеров	66°C	30 сек	
	3	Удлинение цепи	72°C	20 сек	Нет
35	1	Денатурация	95°C	20 сек	
	2	Оптическое измерение	66°C	50 сек	Да

10.2.3 Задать расположение образцов в соответствии с подготовленной планшетой и каналы для оптического измерения: **FAM** и **ROX**.

10.2.4 Запустить реакцию.

## 10.3. Анализ результатов

10.3.1. Открыть окно с результатами ПЦР.

10.3.2. Проверить во всех лунках величину Ct для флуорофоров ROX и FAM (Таблица 6). Результаты аллель-специфичной ПЦР могут быть использованы для генотипирования только если значения Ct соответствуют успешной ПЦР.

**Таблица 6. Анализ данных ПЦР.**

Этап	Лунка	Ct <sub>ROX</sub>	Ct <sub>FAM</sub>	Объяснение	Рекомендации
1	H <sub>2</sub> O	≤QC <sub>ROX</sub> *	>30	<b>Внутренний контроль пройден</b>	Перейти к этапу 2 таблицы 6
			≤30	Контаминация ПЦР	Повторить реакцию**
		>QC <sub>ROX</sub>	любое	ПЦР неэффективна	Повторить реакцию**
2	Гетерозиготный ПКО	≤QC <sub>ROX</sub>	≤QC <sub>FAM</sub> *	<b>ПЦР прошла успешно</b>	Перейти к этапу 3 таблицы 6
			>QC <sub>FAM</sub>	ПЦР неэффективна	Повторить реакцию**
		>QC <sub>ROX</sub>	любое	ПЦР неэффективна	Повторить реакцию**
3	Образцы ДНК	≤QC <sub>ROX</sub>	Ct <sub>N.1</sub> <25 или Ct <sub>N.2</sub> <25 <sup>†</sup>	<b>ПЦР прошла успешно</b>	Перейти к этапу 10.3.3
			Ct <sub>N.1</sub> >25 и Ct <sub>N.2</sub> >25	ДНК некачественная	Повторить выделение ДНК
		>QC <sub>ROX</sub>	любой	ПЦР не эффективна	Повторить реакцию**

\* Величины QC<sub>ROX</sub> и QC<sub>FAM</sub> зависят от партии и указаны в паспорте контроля качества, который прилагается к набору.

\*\* Данные не следует анализировать дальше, поскольку это может привести к ложным результатам. Повторить ПЦР и если значения Ct останутся в том же диапазоне, ПЦР смесь необходимо заменить на новую.

† Ct<sub>N.1</sub> и Ct<sub>N.2</sub> – Ct реакций со смесями одной пары

### 10.3.3. Генотипирование образцов ДНК

Используя Ct по каналу FAM, для каждого полиморфизма (пары реакций) рассчитать  $\Delta Ct = |Ct_1 - Ct_2|$ , где Ct<sub>1</sub> – Ct образца ДНК в ПЦР специфичной к аллельному варианту 1 (со смесью N.1), Ct<sub>2</sub> – Ct того же образца ДНК в ПЦР специфичной к аллельному варианту 2 (со смесью N.2) того же полиморфизма. Если значение Ct равно N/A (продукт отсутствует, кривая не превышает уровень фона) приравнять его 35.

- Образец является гетерозиготным по соответствующему полиморфизму, если  $\Delta Ct$  меньше 4 (Рисунок 1).
- Образец является гомозиготным по аллельному варианту 1 соответствующего полиморфизма, если  $\Delta Ct$  больше 5 и Ct<sub>1</sub> < Ct<sub>2</sub>.
- Образец является гомозиготным по аллельному варианту 2 соответствующего полиморфизма, если  $\Delta Ct$  больше 5 и Ct<sub>1</sub> > Ct<sub>2</sub> (Таблица 7)

Если  $4 < \Delta Ct < 5$  результат не достоверен, рекомендуется повторить реакцию.

**Таблица 7. Расчет и интерпретация результатов ПЦР.**

Ген, полиморфизм и кодируемый белок	$\Delta Ct^*$		Генотип
<b>PPARG</b> (rs1801282) Гамма-2 рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом	$ Ct_{1.1} - Ct_{1.2}  < 4$		Гетерозигота Pro 12 Ala
	$ Ct_{1.1} - Ct_{1.2}  > 5$	$Ct_{1.1} < Ct_{1.2}$	Гомозигота 1 Pro 12 Pro
		$Ct_{1.1} > Ct_{1.2}$	Гомозигота 2 Ala 12 Ala
<b>FABP2</b> (rs1799883) Белок, связывающий жирные кислоты 2	$ Ct_{2.1} - Ct_{2.2}  < 4$		Гетерозигота Trh 54 Ala
	$ Ct_{2.1} - Ct_{2.2}  > 5$	$Ct_{2.1} < Ct_{2.2}$	Гомозигота 1 Trh 54 Trh
		$Ct_{2.1} > Ct_{2.2}$	Гомозигота 2 Ala 54 Ala
<b>ADRB2</b> (rs1042713) Бета-2 адренергический рецептор	$ Ct_{3.1} - Ct_{3.2}  < 4$		Гетерозигота Arg 16 Gly
	$ Ct_{3.1} - Ct_{3.2}  > 5$	$Ct_{3.1} < Ct_{3.2}$	Гомозигота 1 Arg 16 Arg
		$Ct_{3.1} > Ct_{3.2}$	Гомозигота 2 Gly 16 Gly
<b>ADRB2</b> (rs1042714) Бета-2 адренергический рецептор	$ Ct_{4.1} - Ct_{4.2}  < 4$		Гетерозигота Gln 27 Glu
	$ Ct_{4.1} - Ct_{4.2}  > 5$	$Ct_{4.1} < Ct_{4.2}$	Гомозигота 1 Gln 27 Gln
		$Ct_{4.1} > Ct_{4.2}$	Гомозигота 2 Glu 27 Glu
<b>ADRB3</b> (rs4994) Бета-3 адренергический рецептор	$ Ct_{5.1} - Ct_{5.2}  < 4$		Гетерозигота Trp 64 Arg
	$ Ct_{5.1} - Ct_{5.2}  > 5$	$Ct_{5.1} < Ct_{5.2}$	Гомозигота 1 Trp 64 Trp
		$Ct_{5.1} > Ct_{5.2}$	Гомозигота 2 Arg 64 Arg

\* Индекс  $N$  у  $Ct_N$  соответствует номеру смеси для ПЦР

#### 10.4 Рекомендации по диете.

На основании генотипа (сочетания аллельных вариантов) может быть выбран один из трех вариантов диеты:

1. Низкоуглеводная - 45% Углеводы 20% Белки 35% Жиры
2. Низкожировая - 65% Углеводы 15% Белки 20% Жиры
3. Сбалансированная - 55% Углеводы 20% Белки 25% Жиры

и один из двух вариантов физических нагрузок:

1. Стандартные
2. Усиленные

Для автоматизации расчетов и генотипирования индивидуальных образцов ДНК человека по пяти однонуклеотидным полиморфизмам и выдачи рекомендации по определенной диете и интенсивности физических упражнений для снижения избыточной

массы тела создана специальная компьютерная программа (см. Раздел 11).

## **11. Автоматизация генотипирования с использованием программного обеспечения «BioLink-SNP5»**

Программа работает на основе вышеописанного метода. Позволяет производить расчеты в короткое время, сохранять и печатать полученные результаты в виде отчета с рекомендациями по персональной диете и физическим нагрузкам.

Для генотипирования индивидуальных образцов ДНК по пяти однонуклеотидным полиморфизмам программа использует файл Excel. Файл создается по окончании ПЦР с использованием программного обеспечения амплификатора iQ5 iCycler (Bio-Rad). Анализ данных включает этап оценки пригодности результатов, этап расчетов  $\Delta C_t$  для каждого образца и полиморфизма и этап определения генотипа. После заполнения информации об образце выдается результат с указанием генотипа и подробными рекомендациями по диете и интенсивности физических нагрузок, который может быть сохранен в формате pdf и распечатан.

## **12. Список литературы**

1. Deeb, S.S., Fajas, L., Nemoto, M. et al. (1998) A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genetics* 20: 284-287.
2. Baier, L.J., Sacchettini, J.C., Knowler, W.C. et al. (1995) An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 1281-1287.
3. Green, S.A., Turki, J., Innis, M., Liggett, S.B. (1994) Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2 - adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 33: 9414-9419.
4. Umekawa, T., Yoshida, T., Sakane, N. et al. (1999) Trp64Arg mutation of beta 3 - adrenoreceptor gene deteriorates lipolysis induced by beta 3 - adrenoreceptor agonist in human omental adipocytes. *Diabetes* 48: 117-120.
5. Robitaille, J., Despres, J.P., Perusse, L., Vohl, M.C. (2003) The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study. *Clin Genet* 63: 109-116.

## **13. Техническая поддержка**

С техническими вопросами обращаться в ООО «БиоЛинк»: 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40. E-mail: [info@biolinklab.ru](mailto:info@biolinklab.ru)