

## 1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KE09007

Der Testkit MutaGEL<sup>®</sup> ApoE erlaubt die Detektion der bekannten ApoE-Genotypen e2, e3 und e4. Diese unterscheiden sich durch ihre spezifische DNA-Sequenz an Kodon 112 bzw. 158 im ApoE-Gen, wodurch ein unterschiedliches Verhalten gegenüber einem Restriktionsenzym hervorgerufen wird. Diese RFLP-Methode (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) wurde im vorliegenden Testkit derart optimiert, dass eine reduzierte Anzahl von DNA-Fragmenten entsteht, welche die einfache Ergebnisinterpretation ermöglicht.

## 2. Einleitung

Morbus Alzheimer ist die häufigste Ursache für Gedächtnisverlust und dessen Folgen (verringerte Urteilsfähigkeit und Orientierungsverlust). Das Apolipoprotein E (ApoE) ist entscheidend an der Ausprägung dieser Krankheit beteiligt. Das in drei Isoformen vorkommende Protein ist in den Lipid-Metabolismus involviert und spielt eine Rolle beim Lipid-Transport in verletzten Neuronen. Die bei Alzheimer-Patienten zu beobachtende Plaque-Bildung im Gehirn ist mit dem ApoE4-Allel assoziiert. Die genetische Analyse des individuell vorliegenden ApoE-Genotyps kann daher als Risikomarker für Morbus Alzheimer herangezogen werden. Zusätzlich sind die plasmatischen ApoE-Isoformen unterschiedlich mit der (Typ III) - Hyperlipoproteinämie bzw. mit der Menge an zirkulierendem LDL- Cholesterol assoziiert.

## 3. Testprinzip

Im MutaGEL<sup>®</sup> ApoE-Kit werden in zwei getrennten Reaktionen verschiedene DNA-Regionen des ApoE-Gens amplifiziert, welche einerseits das Kodon 112 und andererseits das Kodon 158 einschließen. Beide Amplifikate werden nach Zusammenführung in ein Reaktionsgefäß durch spezifischen Verdau mit einer Restriktionsendonuklease in charakteristische DNA-Fragmente definierter Größe gespalten. Die gelelektrophoretische Analyse dieser durch den Verdau erzielten DNA-Fragmente erlaubt die korrekte Identifizierung des in der Probe vorliegenden Genotyps. Der PCR Master Mix enthält Additive, welche eine produktive Amplifikation in diesen DNA-Regionen mit ihren hohen GC-Gehalten (73%) erlauben.

## 4. Inhalt der Testpackung (24 Bestimmungen)

|                         |                   |                                                                                                  |
|-------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ▪ Primer ApoE 112       | 1 x 28 µl (grün)  | Lösung mit für die (Kodon 112 beinhaltende) ApoE-Region spezifischen Oligonukleotiden.           |
| ▪ Primer ApoE 158       | 1 x 28 µl (lila)  | Lösung mit für die (Kodon 158 beinhaltende) ApoE-Region spezifischen Oligonukleotiden.           |
| ▪ PCR-Master Mix        | 2 x 580 µl (gelb) | gebrauchsfertige PCR-Reagenzien ( <i>hot start</i> Taq-Enzym, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, Puffer). |
| ▪ Positiv-Kontroll-DNA  | 1 x 30 µl (rot)   | gepufferte Lösung mit (amplifizierter) DNA des ApoE- Gens (Genotyp E3/E4).                       |
| ▪ Enzym ApoE            | 1 x 50 µl (blau)  | Restriktionsendonuklease - Mix                                                                   |
| ▪ Puffer für Enzym ApoE | 1 x 100 µl (weiß) | Puffer für die Restriktionsendonuklease mit BSA (10 x konzentriert)                              |

## 5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z.B. Blood Miniprep, KBR3005)
- H<sub>2</sub>O (Reinstwasser)
- Thermocycler, Heizblock
- Pipetten (0,5 -1000 µl) und sterile Spitzen (mit Filter)
- Sterile Reagenzgefäße
- Reagenzien für die Gelelektrophorese
- Geräte für die Gelelektrophorese

## 6. Stabilität und Aufbewahrung

Die Aufbewahrung erfolgt bei ≤ -18°C. Bei korrekter Lagerung sind die Reagenzien mindestens bis zum Verfallsdatum (auf jeder Einzelverpackung aufgedruckt) stabil. Es empfiehlt sich, die ApoE- Positiv-Kontroll-DNA nicht mehr als 5x aufzutauen und daher bei Bedarf zu aliquotieren.

*Vor Gebrauch:* Alle Gefäße sollten vor dem Öffnen für einige Sekunden zentrifugiert werden, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln.

## 7. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro-Diagnostik
- Test nur durch geschultes Personal nach GLP (Good Laboratory Practice)- Richtlinien durchführen lassen.
- Testkit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle in der Testpackung enthaltenen Reagenzien/ Reaktionsgefäße können nach ihrer Verwendung im Restmüll entsorgt werden.
- Die PCR-Technologie ist extrem sensitiv. Die Amplifikation eines einzelnen Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Daher in drei räumlich voneinander abgetrennten Bereichen für a) Probenaufbereitung, b) PCR-Reagenz Vorbereitung und c) DNA-Detektion arbeiten.
- Es empfiehlt sich der Einsatz steriler Spitzen mit Filter und von für PCR-Zwecke geeigneten Pipetten (für jeden Bereich sollte ein extra Pipettensatz reserviert werden).
- Für jeden separaten Arbeitsplatz neue Handschuhe und Kittel benutzen.
- Die Laboroberflächen sollten regelmäßig von Nukleinsäuren dekontaminiert werden.
- Aerosolbildung (vor allem beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden.
- Methode nach Dr. M. Eßrich, Denzlingen/ Freiburg (Germany). Die im MutaGEL<sup>®</sup> ApoE-Testkit verwendeten Primer sind durch das Patent Nummer: 198 55 469.9-44 geschützt, welches sich im Besitz der Fa. Immundiagnostik AG, Bensheim (Germany) befindet.

## Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in vier Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung.
2. Amplifikation mit den für das ApoE-Gen (Kodon 112 bzw. 158) spezifischen Primern.
3. Verdau der vereinigten Amplifikate mit einer Restriktionsendonuklease.
4. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsverdau-Fragmente.

## 8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA (z.B. aus ca. 200 µl Vollblut) extrahieren, indem ein handelsüblicher DNA-Extraktionskit entsprechend der jeweiligen Anleitung des Herstellers eingesetzt wird.
- Falls die Amplifikation nicht unverzüglich durchgeführt wird, sollte die DNA bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

## 9. Amplifikation

- Jede Durchführung sollte eine Positiv- und Negativ-Kontrolle beinhalten.
- Für jede einzelne Probe, die Positiv-Kontrolle und die Negativ-Kontrolle sollte folgender Master-Mix hergestellt werden (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl N der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und 10% Volumen addieren). Das Gesamtvolumen ist 50 µl. Für jede Probe werden 2 parallele Ansätze zur Amplifikation von ApoE 112 bzw. ApoE 158 in separaten Reaktionsgefäßen durchgeführt.

| PCR- Reagenzien               | Reaktions- Volumen: 45 µl | Master-Mix- Volumen |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Primer ApoE 112 bzw. ApoE 158 | 1 µl                      | 1 µl x N + 10%      |
| PCR Master-Mix                | 44 µl                     | 44 µl x N + 10%     |

- je 45 µl des Master-Mix in ein steriles PCR-Gefäß aliquotieren.
- Für Proben: 5 µl der **extrahierten DNA** zum jeweiligen Master-Mix zupipettieren.
- Für Positiv-Kontrollen: 5 µl der **ApoE-Positiv-Kontroll-DNA** zum jeweiligen Master-Mix zupipettieren.
- Für die Negativ-Kontrolle: 5 µl **H<sub>2</sub>O** zum jeweiligen Master-Mix zupipettieren.
- Die Gefäße in den Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten).
- Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:

|                      |                                                     |
|----------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Anfangsphase:</b> | 94°C für 15 min                                     |
| <b>35 Zyklen:</b>    | 94°C für 30 sec / 66°C für 30 sec / 72°C für 60 sec |
| <b>Endphase:</b>     | 72°C für 5 min, danach 4°C                          |

## 10. Restriktionsendonukleasen-Verdau

Für jedes Amplifikat, einschließlich der beiden Positiv-Kontroll-Ansätze, wird folgender Restriktionsverdau-Mix angesetzt (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl N der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und 10% Volumen addieren).

| Reagenzien für den Verdau       | Volumen des Verdau: 30 µl | Volumen des Verdau -Mix |
|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| H <sub>2</sub> O (Reinstwasser) | 4,9 µl                    | 4,9 µl x N + 10%        |
| Enzym ApoE                      | 1,8 µl                    | 1,8 µl x N + 10%        |
| Puffer für Enzym ApoE           | 3,3 µl                    | 3,3 µl x N + 10%        |

- 10 µl des Verdau-Mix in sterile Reaktionsgefäße (geeignet für Heizblock) aliquotieren (bzw. in PCR-Gefäße bei Inkubation im Thermocycler).
- 2 x 10 µl der Amplifikate zum Verdau-Mix zugeben (dies vereinigt je 10 µl des „112“er – bzw. „158“er-Amplifikats im gleichen Restriktionsmix).
- Reaktionsgefäße in einen Heizblock einstellen (alternativ PCR-Gefäße in Thermocycler) und **bei 37°C für 2 h** inkubieren.

## 11. Detektion der DNA-Fragmente und Interpretation der Resultate (Genotyp)

- Gelelektrophorese durchführen (3% Agarose oder 20% Polyacrylamid: 4 µl Ladepuffer (z.B. KAN01070) zu jedem Verdau-Mix zugeben und ca. 20 µl von jedem Verdauansatz (Probe) in die Geltaschen (5 mm) laden. Die Größe der DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard (z.B. KDGC-015001) abgeglichen werden. Nach der Elektrophorese wird die im Gel aufgetrennte DNA mit Ethidiumbromid (1-5 µg/ml) oder SybrGreen für 5-10 min angefärbt und unter UV-Licht (312 nm) visualisiert/ fotodokumentiert.
- Die PCR liefert für alle Proben DNA-Fragmente von **191 bp** mit den „**Primer ApoE 112**“ und **118 bp** mit den „**Primer ApoE 158**“. Die Amplifikation der Negativkontrolle darf keinesfalls ein DNA-Fragment der angegebenen Länge ergeben.
- Durch Sequenzierung der ApoE-Allele wurden folgende Polymorphismen für die Kodons 112 und 158 identifiziert:

|        | Kodon 112      | Enzym ApoE      | Kodon 158      | Enzym ApoE      |
|--------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| ApoE2: | TGC – cysteine | cut (142+49 bp) | TGC – cysteine | no cut (118 bp) |
| ApoE3: | TGC – cysteine | cut (142+49 bp) | CGC – arginine | cut (93+25 bp)  |
| ApoE4: | CGC – arginine | no cut (191 bp) | CGC – arginine | cut (93+25 bp)  |

Es existieren 6 Kombinationen:

ApoE2/ApoE2    ApoE2/ApoE3    ApoE2/ApoE4    ApoE3/ApoE3    ApoE3/ApoE4    ApoE4/ApoE4

Diese Kombinationen führen zu folgenden RFLP-Mustern (**Amplikon 112** behandelt mit Enzym ApoE / **Amplikon 158** behandelt mit Enzym ApoE); die diagnostisch relevanten DNA-Fragmentlängen sind unterstrichen:

| ApoE2/ApoE2                | ApoE2/ApoE3                      | ApoE2/ApoE4                          | ApoE3/ApoE3                  | ApoE3/ApoE4                      | ApoE4/ApoE4               |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| <u>142+49</u> / <u>118</u> | <u>142+49</u> / <u>118+93+25</u> | <u>191+142+49</u> / <u>118+93+25</u> | <u>142+49</u> / <u>93+25</u> | <u>191+142+49</u> / <u>93+25</u> | <u>191</u> / <u>93+25</u> |

- Die Primer erlauben den Nachweis des seltenen Genotyps **apo E rare Leiden** (Arg112/ Duplikation 121-127/ Arg158).
- Das Vorhandensein dieser Allele führt zu einem 212 bp großen Amplikon mit den „**Primers ApoE 112**“:

| Leiden/Leiden             | Leiden/ApoE2                         | Leiden/ApoE3                     | Leiden/ApoE4                  |
|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <u>212</u> / <u>93+25</u> | <u>212+142+49</u> / <u>118+93+25</u> | <u>212+142+49</u> / <u>93+25</u> | <u>212+191</u> / <u>93+25</u> |

## 12. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrollen die angegebenen DNA-Fragmente und für die Proben DNA zumindest die entsprechenden Amplifikate. Falls dies nicht der Fall ist, muss die Proben-DNA erneut getestet bzw. die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden. Bei fehlenden Positivkontroll-Spaltprodukten erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation und die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft/ korrigiert werden.

## 1. Intended Use

Code: KE09007

The kit MutaGEL<sup>®</sup> ApoE allows to detect the famous Apo E genotypes **e2**, **e3** and **e4**. Each genotype is characterised by its DNA sequence in amino acid **codons 112 and 158**, which leads to a different behaviour in incubation with a specific restriction enzyme. This method is called RFLP (restriction fragment length polymorphism) and has been used widely for detection of gene variations. The diagnostic ApoE-RFLP method was optimized under practical aspects for this kit to obtain a reduced number of fragments, which should allow an easier interpretation of the results.

## 2. Introduction

Morbus Alzheimer is one of the most common causes of dementia (leading to loss of orientation and judgment capacity). The apolipoprotein E (ApoE) is involved in the development of this disease. The enzyme exists in three different isoforms and functions as regulator in lipid metabolism. Due to its role in lipid transport of injured neurones, ApoE causes plaques in the brain of Alzheimer patients. Only carriage of the phenotypes of ApoE4 (heterozygously and homozygously) is associated with the development of these plaques and a genetical analysis of the ApoE-genotype present can be used as prediction factor for an individual's risk to be taken ill with Morbus Alzheimer. Additionally the isoforms functions in plasma are differentially associated to Type III Hyperlipoproteinemia (e2) and LDL Cholesterol (e4).

## 3. Principle of the Test

The kit MutaGEL<sup>®</sup> ApoE amplifies in 2 separate reactions two different regions of the ApoE gene (one with "PCR Mix ApoE 112" includes codon 112, and the other with "PCR Mix ApoE 158" includes codon 158). Digestion of both amplicons with their (in one tube unified) specific restriction enzymes (used in 2 separate reactions with **optimized buffers** for each enzyme) leads to genotype-specific DNA fragments. Analysis of the restriction fragments obtained allows the correct identification of the samples genotype. The annealing temperature is elevated for a productive amplification in the ApoE-DNA region with its 73% GC content.

## 4. Material Supplied (24 determinations)

|                                                 |                             |                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ▪ PCR Mix (ApoE <b>112</b> )                    | 1 x 550 µl ( <b>green</b> ) | ready to use PCR reagent ( <i>hot start</i> Taq enzyme, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, buffer) with oligonucleotide primers specific for the human ApoE gene ( <b>codon 112</b> ). |
| ▪ PCR Mix (ApoE <b>158</b> )                    | 1 x 550 µl ( <b>lilac</b> ) | ready to use PCR reagent ( <i>hot start</i> Taq enzyme, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, buffer) with oligonucleotide primers specific for the human ApoE gene ( <b>codon 158</b> ). |
| ▪ Positive control DNA                          | 1 x 30 µl ( <b>red</b> )    | buffered solution with DNA of the ApoE alleles <b>e2 + e3 + e4</b> .                                                                                                          |
| ▪ Restriction enzyme ApoE <b>1 and 2</b>        | 1 x 75 µl ( <b>blue</b> )   | restriction enzyme mix for <b>both</b> digestions 112 + 158.                                                                                                                  |
| ▪ Buffer restriction enzyme ApoE <b>1 (112)</b> | 1 x 550 µl (transparent)    | ready to use restriction mix codon <b>112</b> without enzyme.                                                                                                                 |
| ▪ Buffer restriction enzyme ApoE <b>2 (158)</b> | 1 x 550 µl (white)          | ready to use restriction mix codon <b>158</b> without enzyme.                                                                                                                 |

## 5. Materials Required but not Supplied

Reagents and Instruments:

- DNA extraction kit (e. g. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- H<sub>2</sub>O (deionized)
- Thermal cycler and sterile microtubes suitable for the thermal cycler in use (and optional mineral oil for thermocycler without heated lid)
- Pipettes (0.5 - 200 µl) and sterile pipette tips
- Thermoblock and instruments for gel electrophoresis

## 6. Storage and Stability

Store at ≤ -18°C. The reagents are stable in the unopened microtubes until the expiration date indicated (see print on the package). Do not thaw out the content of the "ApoE positive control DNA" for more than five times. If necessary, make suitable aliquots.

*Before use:* Spin tubes briefly before opening (contents may become dispersed during shipment).

## 7. Warning and Precautions

- For **in vitro diagnostic** use only.
- Test should be performed only by skilled persons considering **GLP** (Good Laboratory Practice) guidelines.
- It's recommended to store enzyme mixes **on ice** during pipetting – especially if room temperature is more than 25°C (e.g. during summer time).
- Don't use the kit after its expiration date.
- After usage, dispose all reagents and test components included in the kit in conventional garbage.
- PCR technology is extremely sensitive. The amplification of a single DNA molecule generates million identical copies. Therefore set up three **separate working areas** for a) sample preparation, b) PCR reagent preparation and c) DNA detection. For each working area a different set of pipettes should be reserved.
- Wear separate coats and gloves in each working area and avoid aerosols.
- Use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes for aerosol free pipetting.
- Routinely **decontaminate** your pipettes and the laboratory benches.
- Copyright: the intellectual property for this method owns to Dr.M.Eßrich, Denzlingen/Freiburg (Germany). The primer used in this MutaGEL<sup>®</sup> ApoE testkit are covered by **patent** N° 198 55 469.9-44 **owned by Immundiagnostik AG** (Bensheim, Germany).

## Procedure

The complete procedure is divided into **four** steps:

1. Sample preparation.
2. Amplification with primers appropriate for the ApoE gene codons **112** and **158** (in two tubes parallel).
3. Digestion of the two amplification products with the (unified) restriction enzymes preparation using separate (optimized) buffer systems (in two tubes parallel).
4. Detection of the amplified and digested DNA by gel electrophoresis (size resolution).

## 8. Sample Preparation

- Extract total genomic DNA e.g. from 200 µl whole blood using a commercial available DNA extraction kit according to the manufacturers' manual.
- Start immediately with the amplification procedure or store the extracted DNA at < -18°C.

## 9. Amplification

- Every set of amplifications should include a positive and a negative control.
- Prepare for each sample, positive controls and negative control the following Master Mix (multiply volumes necessary for each reaction with number **N** of reactions and add 10% more volume). Two amplifications in parallel are performed for **ApoE 112** respectively **158** for each sample.

| PCR reagents (2x in parallel)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Reaction Volume: 25 µl                              | Master Mix Volume |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------|
| PCR Mix (ApoE <b>112</b> respectively ApoE <b>158</b> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 20 µl                                               | 20 µl x N + 10 %  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>For each reaction aliquot <b>20 µl</b> of the PCR Mix into a sterile microtube suitable for the thermal cycler.</li> <li>Samples: add <b>5 µl</b> of the <b>extracted DNA</b> to the PCR Mix in the tube.</li> <li>Positive controls: add <b>5 µl</b> of the <b>ApoE positive control DNA</b> to the PCR Mix in the tube.</li> <li>Negative control: add <b>5 µl</b> of <b>H<sub>2</sub>O</b> (deionized) to the PCR Mix in the tube.</li> <li>Transfer the microtubes into the thermal cycler (if necessary overlay the mix with 60 µl of mineral oil).</li> <li>Perform the following amplification protocol:</li> </ul> |                                                     |                   |
| <b>Initial Hold:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 95°C for 5 min                                      |                   |
| <b>38 cycles:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 95°C for 30 sec / 62°C for 30 sec / 72°C for 60 sec |                   |
| <b>Final Hold:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 72°C for 5 min, 4°C follow up                       |                   |

## 10. Digestion of the Amplified DNA

Prepare for each sample, and the both positive controls the following Digestion Mix (multiply the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions, and add 10% more volume). The total volume for each Digestion Mix is **30 µl**.

| Reagents for DIGESTION (2x in parallel)                 | Volume DIGESTION each reaction: 20 µl | Volume DIGESTION Master Mix (plus reserve) |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| buffer for enzyme ApoE <b>112</b> resp. ApoE <b>158</b> | 18.7 µl                               | 18.7 µl x N + 10 %                         |
| enzyme ApoE                                             | 1.3 µl                                | 1.3 µl x N + 10 %                          |

- For each sample aliquot **2x 20 µl** of the Digestion Mix (in parallel for codon **112** and codon **158** in separate tubes) into PCR tubes suitable for the incubator (a thermal cycler may be used for the incubation too).
- add **10 µl** of the amplification products to the Digestion Mixes for codon **112** and codon **158**.
- transfer the tubes to the thermoblock and incubate at **37°C for 4 hours** (optional over night).

## 11. Detection of the Amplified/ Digested DNA and Interpretation of the Results

- Carry out gel electrophoresis in **≥ 3,5%** agarose (or polyacrylamide 20%) for **at least 150 Vh** (e.g. 90 min at 100 volt) in 1x TBE-buffer: mix up to **15 µl** of each digestion mix with **4 µl** loading buffer (e.g. KAN01070) and load the gel. The length of the amplified DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard (e.g. KBR311005). For the ApoE electrophoresis a gel with **fine quality** and high separation is preferable (e.g. Invitrogen Agarose 1000 or similar).
- The separated DNA is coloured by ethidium bromide (**5 µg/ ml**) or SybrGreen for **5 - 10 min** and visualised under UV-light (**312 nm**).
- The PCR amplifications leads to a fragment of **191 bp** length with "PCR Mix ApoE **112**" and **118 bp** length with "PCR Mix ApoE **158**". In any case the negative controls must be negative for any amplification product.
- Sequencing of the alleles has shown the following polymorphism for ApoE codons **112** and **158**:

|        | <u>codon 112</u> | <u>enzyme ApoE</u>       | <u>codon 158</u> | <u>enzyme ApoE</u>       |
|--------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| ApoE2: | TGC – cysteine   | cut ( <b>142+49 bp</b> ) | TGC – cysteine   | no cut ( <b>118 bp</b> ) |
| ApoE3: | TGC – cysteine   | cut ( <b>142+49 bp</b> ) | CGC – arginine   | cut ( <b>93+25 bp</b> )  |
| ApoE4: | CGC – arginine   | no cut ( <b>191 bp</b> ) | CGC – arginine   | cut ( <b>93+25 bp</b> )  |

6 combinations exist:

|             |             |             |             |             |             |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ApoE2/ApoE2 | ApoE2/ApoE3 | ApoE2/ApoE4 | ApoE3/ApoE3 | ApoE3/ApoE4 | ApoE4/ApoE4 |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|

These combinations lead to the following RFLP patterns (**amplicon 112** treated with enzyme ApoE / **amplicon 158** treated with enzyme ApoE), **diagnostically conclusive fragments are underlined**:

| ApoE2/ApoE2                | ApoE2/ApoE3                      | ApoE2/ApoE4                          | ApoE3/ApoE3                  | ApoE3/ApoE4                      | ApoE4/ApoE4               |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| <b>142+49</b> / <b>118</b> | <b>142+49</b> / <b>118+93+25</b> | <b>191+142+49</b> / <b>118+93+25</b> | <b>142+49</b> / <b>93+25</b> | <b>191+142+49</b> / <b>93+25</b> | <b>191</b> / <b>93+25</b> |

- Primers have been selected to additionally enable the detection of the rare genotype **apoE Leiden** (Arg112/ duplication 121-127/ Arg158).
- The presence of this allele leads to a 212 bp amplicon with "Primers ApoE **112**":

| Leiden/Leiden             | Leiden/ApoE2                         | Leiden/ApoE3                     | Leiden/ApoE4                  |
|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <b>212</b> / <b>93+25</b> | <b>212+142+49</b> / <b>118+93+25</b> | <b>212+142+49</b> / <b>93+25</b> | <b>212+191</b> / <b>93+25</b> |

The positive control is an **artificial mixture** which contains **all three** alleles e2, e3 and e4.

## 12. Restrictions

The PCR results for all positive controls in DNA fragments of indicated length and for samples at least in the amplification product of indicated length. If this is not the case, the sample must be tested a second time or the complete analysis must be repeated with freshly isolated DNA. If there are no positive control DNA fragments present, the amplification was incorrect and the chosen PCR conditions have to be proven/ corrected.