B-DNA Apo E Genotyp, C112R och R158C
Taqman alleldiskriminering, 7900 HT, Malmö

Bakgrund, indikation och tolkning

Apolipoprotein E (apoE) förekommer på ytan av triglyceridrika lipoproteiner som VLDL och chylomikroner och har betydelse för partiklarnas upptag via receptorer. Proteinet ApoE förekommer i tre vanliga isoformer (apo E2, apo E3 resp. apo E4, se tabell 1).

Tabell 1. Isoformer för ApoE

	p.Cys112Arg	p.Arg158Cys
APO E2	Cys	Cys
APO E3	Cys	Arg
APO E4	Arg	Arg

De olika isoformerna skiljer sig åt till laddning och även till receptorbindningsförmåga. Apo E2 och Apo E3 förekommer i cirkulationen i form av homodimerer, medan Apo E4 cirkulerar som monomer. Genotypen Apo E2/E2 är starkt associerad till familjär hyperlipidemi typ III (hypertriglyceridemi), xantomatos och tidig hjärt- kärlsjukdom, och Apo E4 är starkt korrelerad till risk för Alzheimers sjukdom. Apo E2-genotyp verkar skydda mot Alzheimers sjukdom, och många individer med genotyp E4/E4 utvecklar aldrig Alzheimer demens. Denna analys screenar för de vanligast förekommande mutationerna som ger upphov till de elektroforetiska varianterna Apo E2, E3 och E4. Många fler, fast var för sig sällsynta mutationer har rapporterats, och upptäcks ej vid denna analys. Apo E4-proteinet har en Cys112Arg substitution orsakad av en c.388 T>C mutation, ApoE2-proteinet har en Arg158Cys substitution sekundärt till en c.526 C>T mutation (tabell 2).

Tabell 2. Aminosyra-numrering utan signalpeptid medräknad.

Protein-variant	Gen	Traditionell Nomenklatur, ej HGVS	HGVS nomenklatur	dbSNP rs-nr		Traditionell Nomenklatur, ej HGVS	HGVS-nomenklatur	dbSNP rs-nr	Refseq
Apo E3	APOE	p.Cys112Cys	p.Cys130Cys	429358		p.Arg158Arg	p.Arg176Arg	7412	NP_000032.1
			c.388T/T				c.526C/C		NM_000041.2
									NG_007084.2
Apo E2	APOE	p.Cys112Cys	p.Cys130Cys	429358		p.Arg158Cys	p.Arg176Cys	7412	NP_000032.1
			c.388T/T				c.526C>T		NM_000041.2
									NG_0070

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

DNA-Apo E genotyp, Taqman alleldiskriminering, Lund

Gäller för
Klinisk kemi

LU

									84.2
Apo E4	APO E	p.Cys112Arg	p.Cys130 Arg	429358		p.Arg158Arg	p.Arg176Arg	7412	NP_000032.1
			c.388T>C				c.526C/C		NM_000041.2
									NG_007084.2

Analysprincip

Metoden bygger på en PCR-reaktion där en specifik del av det genomiska DNA:t amplifieras. Dessutom ingår en hybridisering med en TaqMan®-probe som är komplementär till det sekvensavsnitt där den aktuella punktmutationen finns. Två olika prober finns – en för WT-allelen och en för den muterade allellen. Proberna binder mellan inbindningsställena för forward- och revers-primer - på DNA-templatet och är märkta med olika fluorescerande ”reporter”- färg för respektive allel (ex. VIC™ eller FAM™) och en quencher som släcker fluorescensen hos en intakt probe. Under PCR-reaktionen i extensionssteget, degraderar Taq DNA-polymeraset proben, vilket gör att reporterfärgen frigörs och en ökad fluorescens kan mätas.

Referensintervall

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Metodkarakteristika

Interferenser och felkällor

Om DNA provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer ger detta förändrad signal och ett omprov får göras. Principiellt kan andra homologa DNA sekvenser hybridisera med primers och ge felaktig information. Detta har eliminerats i den initiala optimeringen av metoden och sedermera validerats. I valideringen har potentiella primerinterferenser värderats med hjälp av bioinformatik. Ospecifik priming ger upphov till låg eller felaktig genotypclustring i mjukvaran.

Mätområde

Metoden påvisar homozygoti för wild type (wt) genotyp, heterozygoti, samt homozygoti för variant genotyp. Amplikonet begränsas av primers F och R samt detekteras med reporter 1 respektive 2 enligt nedan under rubrik Reagens.

Detektionsgräns

10 ng patient-DNA används i reaktionen. Nedre detektionsgräns har ej fastställts.

Mätosäkerhet

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.

DNA-Apo E genotyp, Taqman alleldiskriminering, Lund

Gäller för
Klinisk kemi

LU

Spårbarhet

Samtliga primers och prober är spårbara till dessa sekvenser.

Gen	NCBI RefSeq
APOE	NM_000041.2
	NG_007084.2
	NP_000032.1

Imprecision

Se separat metodvalidering.

Ackrediterings-CV är ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Riktighet

Metodens riktighet är säkerställd mot referenssekvens, genom jämförelse mot annan validerad metod samt genom deltagande i Equalis externa kontrollprogram.

Se separat metodvalidering. 284 prov analyserades parallellt med RFLP- metoden under perioden dec 2004 -maj 2005 med samstämmiga resultat, se pärm Validering av analyser på 7900HT.

Ackreditering

Metoden är ackrediterad.

Referenser

1. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. J. Lipid Res. 1990;31:545-8.
2. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

Original lagras elektroniskt! Användaren ansvarar för att gällande revision används.