

# MutaREAL<sup>®</sup> ApoE

## Real-Time-PCR-Kit

*Für die Analyse des Aminosäureaustauschs  
Cys130Arg und Cys176Arg im ApoE Gen*

*For the analysis of the amino acid substitution  
Cys130Arg and Cys176Arg in the ApoE gene*

Gültig ab / Valid from 2023-09-07



**KF290732**  
**KF290796**



32/96



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1</b>	<b>VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>TESTPRINZIP</b>	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT</b>	<b>3</b>
<b>7</b>	<b>WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>4</b>
<b>8</b>	<b>PROBENMATERIAL</b>	<b>5</b>
<b>9</b>	<b>REAL-TIME-PCR</b>	<b>5</b>
	9.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	5
	9.2 <i>Durchführung</i>	5
	9.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	7
<b>10</b>	<b>ANALYSE DER ERGEBNISSE</b>	<b>7</b>
	10.1 <i>Auswertung und Einteilung in ApoE Isoformen</i>	9
<b>11</b>	<b>PROBLEMBEHANDLUNG</b>	<b>9</b>
<b>12</b>	<b>LEISTUNG DES KITS</b>	<b>10</b>
	12.1 <i>Analytische Sensitivität</i>	10
	12.2 <i>Präzision</i>	10
	12.3 <i>Diagnostische Sensitivität</i>	10
<b>13</b>	<b>GRENZEN DES TESTS</b>	<b>11</b>
<b>14</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>12</b>
<b>15</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>12</b>

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaREAL® ApoE Real-Time-PCR-Kit ist ein FRET-basierter molekularbiologischer Test für die Untersuchung der Punktmutationen im ApoE Gen, welche verantwortlich für den Austausch der Aminosäuren Cys130Arg (früher Pos. 112) und Cys176Arg (früher Pos. 158) sind.

## 2 EINLEITUNG

ApolipoproteinE (ApoE) gehört zu der Familie der Apolipoproteine, welche eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus spielen und beeinflusst die Bildung von „Very-Low-Density“ Lipoproteinen (VLDL). Die häufigsten ApoE Allele sind ApoE2 (E2), ApoE3 (E3) und ApoE4 (E4). Diese werden durch die Variationen Cys130Arg und Cys176Arg definiert. E3 trägt Cystein an Position 130 und Arginin an 176, E2 trägt an beiden Positionen Cystein, E4 dagegen an beiden Positionen Arginin. Die verschiedenen ApoE Isoformen haben einen Einfluss auf den Cholesterolspiegel. [1]

## 3 TESTPRINZIP

Der sequenzspezifische MutaREAL® ApoE Real-Time-PCR-Kit basiert auf dem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Der Assay beinhaltet zwei spezifische Primer, die die Zielsequenz flankieren und zwei Hybridisierungs sonden, die benachbart an die Zielsequenz binden. Eine der Hybridisierungssonden ist mit einem Donor-Fluorophor markiert und überträgt nach entsprechender Anregung seine Energie auf das Akzeptor-Fluorophor, mit welchem die andere Hybridisierungssonde markiert ist, wenn diese sich in unmittelbarer Nähe befinden. Nach dem Energietransfer emittiert der Akzeptor-Farbstoff Licht mit einer längeren Wellenlänge. Ein Energietransfer kann nur stattfinden, wenn beide Hybridisierungssonden an die Zielsequenz gebunden haben. Die Menge hybridisierter Sondenpaare und damit das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge des amplifizierten PCR Produktes. Hierbei ist das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des PCR Produktes.

Die Genotypisierung wird nach Abschluss der Amplifikation durch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierfür wird nach einem Denaturierungsschritt die Temperatur langsam erhöht und unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz das Dissoziationsverhalten der Hybridisierungssonden erfasst. Eine der Hybridisierungssonden bindet an einen Teil der Zielsequenz, der bei Wildtyp und der Mutation vorliegt. Die zweite Hybridisierungssonde überspannt die Mutationsstelle. Bei steigender Temperatur dissoziieren die fehlgepaarten und damit weniger stabilen Sonden zuerst und die Fluoreszenz nimmt ab. Die perfekt gepaarten Hybridisierungssonden dissoziieren aufgrund ihrer höheren Bindungsenergie erst später und somit nimmt das Fluoreszenzsignal erst bei einer höheren Temperatur ab.

## 4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KF290732) oder 96 (KF290796) Reaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaREAL® ApoE Real-Time-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Enzymmix	blau	1 x 876 µl	2 x 1313 µl
Detektionsmix 1 (Cys130Arg)	gelb	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Detektionsmix 2 (Cys176Arg)	braun	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Positive Kontrolle	rot	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Negative Kontrolle	grün	1 x 150 µl	1 x 150 µl

## 5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Roche LightCycler® 1.5 oder 2.0 Real-Time-PCR-System
  - \* Die CE Konformität besteht nur, wenn eins der genannten Gerät verwendet wird.
- Roche LightCycler® Kapillaren
- Roche LightCycler® Cooling Block
- Sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Pipetten (variable Volumina) und sterile Einweg-Spitzen mit Filter
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

## 6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der MutaREAL® ApoE Real-Time-PCR-Kits wird gefroren auf Trockeneis oder Kühlakkus transportiert. Alle Komponenten sind unmittelbar nach Erhalt lichtgeschützt bei mindestens -20°C zu lagern. Vermeiden Sie mehr als drei Gefrier-Auftau-Zyklen des Detektionsmixes (ggf. aliquotieren). Die Positiv- und Negativkontrolle sowie der Detektionsmix können nach dem ersten Auftauen bis zu drei Monate bei 4-8°C gelagert werden. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Verfallsdatums dürfen sie nicht mehr verwendet werden.

Schützen Sie die Nachweismischungen während des gesamten Testzeitraums vor direktem Sonnenlicht.

## 7 WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.

- Alle Proben müssen als potentiell infektiös und/oder biogefährdend betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- Die Real-Time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Bei Verwendung der Kitkomponenten sind stets puderfreie Einmal-schutzhandschuhe zu tragen.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Kontaminationen der Eluate und Kitkomponenten mit Mikroben oder Nukleasen (RNAsen und DNAsen) sind zu vermeiden.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.
- Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um Verunreinigungen zu vermeiden.
- Gemäß Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher oder bundesstaatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierten Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet, den Laborbereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheitsvorschriften.

- Alle PCR-Reagenzien während des Arbeitens kühlen.
- Die Reinheit (A260/A280) der genomischen DNA sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen

## 8 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für den MutaREAL® ApoE Real-Time-PCR-Kit ist genomische DNA, die mittels eines geeigneten Extraktionskits aus klinischen Proben (Blut) isoliert wurde.

## 9 REAL-TIME-PCR

### 9.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-Time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf alle Positivkontrollen sowie eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Vor jedem Gebrauch müssen alle Reagenzien schonend aufgetaut, gründlich gemischt (nicht vortexen) und kurz anzentrifugiert werden.
- Die Detektionsmische vor Lichteinwirkung schützen.
- Wir empfehlen, die Reagenzien und den Ansatz während des Arbeiten stets in einem Kühlblock (+4 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

### 9.2 Durchführung

Für die Amplifikation werden zwei Reaktionsgefäße (LightCycler® Kapillare) pro Probe und zwei zusätzliche Reaktionsgefäße pro Mastermix für die negative und die positive Kontrolle benötigt. Die folgende Tabelle zeigt die zu pipettierenden Volumen pro Probe. Für die Analyse wird empfohlen ein Mastermix für die Anzahl an Proben (inkl. negativer und positiver Kontrollen) (N) plus 10 % herzustellen, um Ungenauigkeiten auszugleichen. Der Master Mix wird wie in Tabelle 2 und 3 beschrieben pipettiert:

## Master Mix 1 (Cys130Arg)

Tabelle 2: Herstellung des Master Mix 1 (Cys130Arg)

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 1 ( <b>gelb</b> )	10,5 µl	10,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzym / Puffer-Mix ( <b>blau</b> )	12,5 µl	12,5 µl * (N + (N * 0,1))

- Den Master Mix vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jede Kapillare **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten Negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

## Master Mix 2 (Cys176Arg)

Tabelle 3: Herstellung des Master Mix 2 (Cys176Arg)

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 2 ( <b>braun</b> )	10,5 µl	10,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzym / Puffer-Mix ( <b>blau</b> )	12,5 µl	12,5 µl * (N + (N * 0,1))

- Den Master Mix vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jede Kapillare **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten Negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.



Die Kapillaren mit den Deckeln verschließen, in das LightCycler® Karussell überführen und in der LightCycler® Zentrifuge abzentrifugieren (sollte eine Tischzentrifuge verwendet werden, die Kapillaren in den Einsätzen des Cooling Blocks bei 3000 rpm für 15 s zentrifugieren). Anschließend das Karussell in den LightCycler® überführen und das unter 9.3 beschriebene PCR Programm starten.

### 9.3 Geräteeinstellungen

Nutzen Sie für die Real-Time-PCR das in Tabelle 4 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 4: Real-Time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Heizrate	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	120 s	94 °C	20 °C/s	1	keine
Denaturierung	10 s	94 °C	20 °C/s	45	keine
Primer Anlagerung	25 s	60 °C	20 °C/s		<b>Single</b>
Elongation	25 s	72 °C	20 °C/s		keine
Schmelzkurve	20 s	94 °C	20 °C/s	1	keine
	20 s	40 °C	20 °C/s	1	keine
	0 s	80 °C	0,2 °C/s	1	<b>Konstant</b>
Kühlen	30 s	40 °C	20 °C/s	1	-

## 10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Schmelzkurven eine Analyse des Typs „Genotypisierung“ hinzufügen. Hierdurch wird die Ableitung der Fluoreszenzkurve gebildet. Die Detektionswellenlänge liegt bei 640 nm.

### ApoE Cys130Arg

Temperatur Wildtyp-Allel (Cys): 51,5 °C (+/-2 °C)

Temperatur Mutations-Allel (Arg): 61,0 °C (+/-2 °C)

Die folgende Grafik zeigt die typischen Ergebnisse für die möglichen Genotypen: **grüne Kurve** - negative Kontrolle, **rote Kurve** - homozygot **Arg / Arg**, **blaue Kurve** - heterozygot **Cys / Arg**.

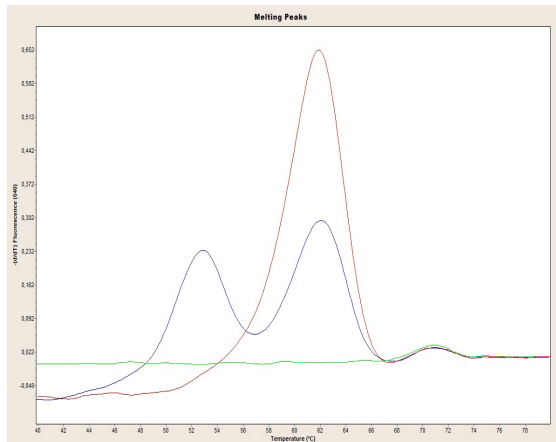


Abb. 1: Auswertung zu Master Mix 1 - Cys130Arg.

### ApoE Cys176Arg

Temperatur Wildtyp-Allel (Cys): 52,5°C (+/-2°C)

Temperatur Mutations-Allel (Arg): 61,5°C (+/-2°C)

Die folgende Grafik zeigt die typischen Ergebnisse für die möglichen Genotypen:

**pinke Kurve** - negative Kontrolle, **schwarze Kurve** - heterozygot **Cys / Arg**, **blaue Kurve** - homozygot **Cys / Cys**.

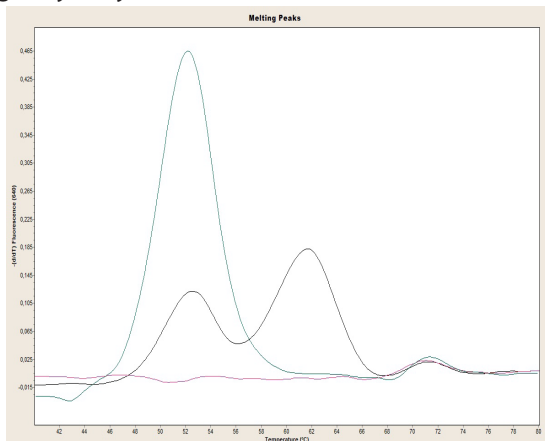


Abb. 2: Auswertung zu Master Mix 2 - Cys176Arg.

Die mitgelieferte Positive Kontrolle enthält ein Template, welches für beide Mutationen **heterozygot** ist (ApoE E2/E4).

## 10.1 Auswertung und Einteilung in ApoE Isoformen

Tabelle 5: Auswertung und Einteilung in ApoE Isoformen

Allel	Cys130Arg	Cys176Arg
E2	Cys	Cys
E3	Cys	Arg
E4	Arg	Arg

Ergebnis		Allelkombination
Cys130Arg	Cys176Arg	
Cys / Cys	Cys / Cys	E2/E2
Cys / Cys	Cys / Arg	E2/E3
Cys / Arg	Cys / Arg	E2/E4
Cys / Cys	Arg / Arg	E3/E3
Cys / Arg	Arg / Arg	E3/E4
Arg / Arg	Arg / Arg	E4/E4

## 11 PROBLEMBEHANDLUNG

Folgende Problembeschreibung soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-Time-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik AG.

### Keine oder schwache Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben

Überprüfung des PCR Programms des Real-Time-PCR Systems und Wiederholung der Analyse mit dem korrigierten Protokoll.

Die Detektions Mixe wurden mehr als drei Gefrierzyklen unterzogen oder wurde länger als drei Monate bei 2-8 °C gelagert. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuem Detektions Mix.

Die Qualität der Ausgangs-DNA ist nicht ausreichend. Nutzen Sie frisch extrahierte DNA und bestimmen Sie die Konzentration/Reinheit vor der Nutzung.

Die Detektions Mixe wurden nicht vor Lichteinwirkung geschützt. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuen PCR Reagenzien.

## 12 LEISTUNG DES KITS

### 12.1 Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze (LoD) des MutaREAL ApoE Real-Time PCR-Kits wurde mit seriellen Verdünnungen von DNA-Fragmenten, die die Mutationszielsequenzen enthalten, in einem Roche LightCycler® 2.0 Real-Time PCR-Gerät bestimmt. Die LoD des MutaREAL ApoE Real-Time PCR-Kits beträgt jeweils 1000 Genomkopien pro Reaktion.

### 12.2 Präzision

Die Präzision des MutaREAL ApoE Real-Time PCR-Kits wurde als Intra-Assay-Variabilität und Inter-Assay-Variabilität bestimmt.

Die Variabilitätsdaten werden durch Standardabweichung und Variationskoeffizient ausgedrückt. Die Daten basieren auf  $T_m$ -Berechnungsanalysen von definierten Konzentrationen der ApoE-Mutationszielsequenzen.

<b>ApoE Cys130Arg</b>	<b>Kopien/ µl</b>	<b>Standard- abweichung</b>	<b>Variations- koeffizient [%]</b>
Intra-Assay Variabilität	3000	1,65	2,19
Inter-Assay Variabilität	3000	2,97	3,78

<b>ApoE Cys176Arg</b>	<b>Kopien/ µl</b>	<b>Standard- abweichung</b>	<b>Variations- koeffizient [%]</b>
Intra-Assay Variabilität	3000	2,54	4,49
Inter-Assay Variabilität	3000	2,37	5,89

### 12.3 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität von Real-Time-PCR-Assays hängt hauptsächlich von der DNA-Extraktionsmethode ab, die zur Isolierung der DNA aus verschiedenen biologischen Proben verwendet wird. DNA-Extraktionsreagenzien sind nicht Bestandteil der Real-Time-PCR-Kits der Immundiagnostik AG. Die Real-Time-PCR-Kits der Immundiagnostik AG enthalten eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Daher garantiert die Immundiagnostik AG die analytische Sensitivität und Spezifität der Real-Time-PCR-Kits, die mit eluierter DNA aus Referenzmaterialien und Ringversuchsproben sowie mit synthetischen Nukleinsäurefragmenten durchgeführt werden. Immundiagnostik AG übernimmt keine Garantie für diagnostische Sensitivitäten. Soweit in den Handbüchern der Real-Time-PCR-Kits der Immundiagnostik AG diagnostische Sensitivitäten angegeben sind, beziehen sich diese Daten ausschließlich auf eine bestimmte Nukleinsäure-Extraktionsmethode, die bei der Validierung der jeweiligen

Kits verwendet wurde und sind nicht auf andere Extraktionsmethoden übertragbar. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die für die DNA-Isolierung verwendeten Extraktionsmethoden zu qualifizieren.











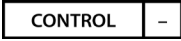




### **13 GRENZEN DES TESTS**

Das Ergebnis wird dem behandelnden Arzt als unterstützendes Material zur Verfügung gestellt und sollte niemals ausschließlich zur Diagnostik oder zu Behandlungsempfehlungen herangezogen werden. Die Diagnose sowie die einzuleitenden Behandlungsentscheidungen bleiben in der vollen Verantwortung des Arztes.

Die Genauigkeit von genetischen Tests beträgt nicht 100 %. Es wurde jedoch eine Genauigkeit von über 98 % basierend auf den Validierungsdaten für diesen Test festgestellt. Weiterhin müssen Ergebnisse von genetischen Tests im Kontext der klinischen Repräsentation des Patienten sowie bekannten familiären Risiken im Umfeld des Patienten betrachtet werden.

Der Test analysiert nur eine Auswahl an Markern. Daher schließt ein negatives Testergebnis des Patienten ein Risiko jedweder Art nicht vollständig aus.

## 14 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

DNA	Desoxyribonukleinsäure		Katalognummer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Zu verwenden mit
	Enzymmix		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Detektionsmix 1		Obere Temperaturgrenze
	Detektionsmix 2		Hersteller
	Positive Kontrolle		Chargennummer
	Negative Kontrolle		Arbeitsanleitung beachten
	<i>In-vitro</i> Diagnostikum		Inhalt
	Verwendbar bis JJJJ-MM-TT		

## 15 LITERATUR

1. Eichner et al., Am J Epidemiol, 2002, 155(6):487-95







# MutaREAL<sup>®</sup> ApoE

## Real-Time-PCR Kit

*For the analysis of the amino acid substitution  
Cys130Arg and Cys176Arg in the ApoE gene*

Valid from 2023-09-07



**KF290732**  
**KF290796**



32/96



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1</b>	<b>INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>PACKAGE CONTENTS</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER</b>	<b>18</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY</b>	<b>18</b>
<b>7</b>	<b>WARNINGS AND PRECAUTIONS</b>	<b>18</b>
<b>8</b>	<b>SAMPLE MATERIAL</b>	<b>19</b>
<b>9</b>	<b>REAL-TIME-PCR</b>	<b>19</b>
	9.1 <i>Important points before starting</i>	19
	9.2 <i>Procedure</i>	20
	9.3 <i>Instrument settings</i>	21
<b>10</b>	<b>DATA ANALYSIS</b>	<b>22</b>
	10.1 <i>Evaluation and classification in ApoE isoforms</i>	23
<b>11</b>	<b>TROUBLESHOOTING</b>	<b>24</b>
<b>12</b>	<b>KIT PERFORMANCE</b>	<b>24</b>
	12.1 <i>Analytical Sensitivity</i>	24
	12.2 <i>Precision</i>	24
	12.3 <i>Diagnostic Sensitivity</i>	25
<b>13</b>	<b>LIMITATIONS OF THE METHOD</b>	<b>25</b>
<b>14</b>	<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>26</b>
<b>15</b>	<b>LITERATURE</b>	<b>26</b>

## 1 INTENDED USE

The MutaREAL® ApoE Real-Time PCR Kit is a FRET-based molecular biology test for the investigation of point mutations in the ApoE gene, which are responsible for the exchange of the amino acids Cys130Arg (formerly pos. 112) and Cys176Arg (formerly pos. 158).

## 2 INTRODUCTION

ApolipoproteinE (ApoE) belongs to the family of apolipoproteins, which play an important role in lipid metabolism and influences the formation of very-low-density lipoproteins (VLDL). The most common ApoE alleles are ApoE2 (E2), ApoE3 (E3) and ApoE4 (E4). These are defined by the variations Cys130Arg and Cys176Arg. E3 carries cysteine at position 130 and arginine at 176, E2 carries cysteine at both positions, whereas E4 carries arginine at both positions. The different ApoE isoforms have an influence on cholesterol levels. [1]

## 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The sequence-specific MutaREAL® ApoE real-time PCR kit is based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). The assay includes two specific primers flanking the target sequence and two hybridisation probes that bind adjacent to the target sequence. One of the hybridisation probes is labelled with a donor fluorophore and, after appropriate excitation, transfers its energy to the acceptor fluorophore with which the other hybridisation probe is labelled when they are in close proximity. After the energy transfer, the acceptor dye emits light with a longer wavelength. Energy transfer can only occur when both hybridisation probes have bound to the target sequence. The amount of hybridised probe pairs and thus the fluorescence signal increases with the amount of amplified PCR product. Here, the fluorescence signal is proportional to the amount of PCR product.

Genotyping is carried out after completion of amplification by melting curve analysis. For this purpose, the temperature is slowly increased after a denaturation step and the dissociation behaviour of the hybridisation probes is recorded while continuously measuring the fluorescence. One of the hybridisation probes binds to a part of the target sequence that is present in the wild type and the mutation. The second hybridisation probe spans the mutation site. As the temperature rises, the mismatched and thus less stable probes dissociate first and the fluorescence decreases. The perfectly paired hybridisation probes dissociate later due to their higher binding energy and thus the fluorescence signal decreases only at a higher temperature.

## 4 PACKAGE CONTENTS

The components supplied are sufficient for the preparation of 32 (KF290732) or 96 (KF290796) reactions.

Table 1: Components of the MutaREAL® ApoE Real-Time-PCR Kit.

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Enzyme mix	blue	1 x 876 µl	2 x 1313 µl
Detection mix 1 (Cys130Arg)	yellow	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Detection mix 2 (Cys176Arg)	brown	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Positive control	red	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Negative control	green	1 x 150 µl	1 x 150 µl

## 5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA extraction kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Roche LightCycler® 1.5 or 2.0 real-time PCR system
  - \* CE conformity only exists if one of the mentioned devices is used.
- Roche LightCycler® capillaries
- Roche LightCycler® Cooling Block
- Sterile reaction tubes
- Calibrated pipettes (variable volumes) and sterile disposable tips with filter
- Optional: Liquid handling system for automation

## 6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaREAL® ApoE real-time PCR kit is transported frozen on dry ice or cold packs. All components are to be stored protected from light at a minimum of -20 °C immediately after receipt. Avoid more than three freeze-thaw cycles of the detection mixes (make aliquots if necessary). The positive and negative control and the detection mix can be stored at 4–8 °C after initial thawing for up to three months. Do not use after the expiry date indicated on the package.

Be sure to protect the detection mixes from direct sunlight during the entire test period.

## 7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

Read the instructions for use carefully before using the product.

- All samples must be considered potentially infectious and/or biohazardous and all items that come into contact with the specimens must be considered potentially contaminated.
- Real-time PCR must be performed in laboratories suitable for this purpose and by specially trained personnel.
- The assay must always be carried out according to the instructions supplied with the kit.
- Areas for sample preparation and preparation of the PCR master mix should be strictly separated.
- Pipettes, tubes and other working materials must not circulate from one area to the other.
- Always use pipette tips with filters.
- Always wear powder-free disposable gloves when using the kit
- Clean pipettes and work surfaces regularly with suitable decontamination solution (no ethanol-containing agents).
- Contamination of eluates and kit components with microbes or nucleases (RNAs and DNAses) should be avoided.
- Positive and potentially positive material must be kept separate from all other kit components at all times.
- Do not open reaction tubes/plates after amplification in order to avoid contamination.
- In accordance with guidelines or requirements of local, state or federal regulations or authorised organisations, additional controls may be tested.
- Do not autoclave reaction tubes after PCR as this will not degrade the amplified nucleic acid and risks contaminating the laboratory area.
- Dispose of samples and test waste according to your local safety regulations.
- Refrigerate all PCR reagents while working.
- The purity (A260/A280) of the genomic DNA should be between 1.8 and 2.0.

## 8 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaREAL® ApoE real-time PCR kit is genomic DNA isolated from clinical samples (blood) using a suitable extraction kit.

## 9 REAL-TIME-PCR

### 9.1 *Important points before starting*

- Please pay attention to chapter 7 “Warnings and precautions”.

- Before setting up the Real-Time-PCR familiarise yourself with the Real-Time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run all Positive Controls and one Negative Control should be included.
- Before each use, all reagents must be gently thawed, thoroughly mixed (do not vortex) and briefly centrifuged.
- Protect the detection mixes from exposure to light.
- We recommend always cooling the reagents and the preparation in a cooling block (+4 to +8°C) or on ice while working.

## 9.2 Procedure

For amplification, two reaction tubes (LightCycler® capillaries) are needed per sample plus two additional reaction tubes per master mix for the negative and the positive controls. The following table shows the volumes to be pipetted per sample. For the analysis it is recommended to prepare a master mix for the number of samples (incl. negative and positive controls) (N) plus 10 % to compensate for inaccuracies. The master mix is pipetted as described in tables 3 and 4:

### Master mix 1 (Cys130Arg)

Table 2: Preparation of master mix 1 (Cys130Arg)

Reagent	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix 1 ( <b>yellow</b> )	10.5 µl	10.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme mix ( <b>blue</b> )	12.5 µl	12.5 µl * (N + (N * 0.1))

- Mix the Master Mix carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Master Mix to each capillary.
- For the negative control add **2 µl** of the supplied negative control (**green**).
- For the positive control add **2 µl** of the supplied positive control (**red**).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding capillary.

## Master mix 2 (Cys176Arg)

Table 3 Preparation of master mix 2 (Cys176Arg)

Reagenz	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix 2 ( <b>brown</b> )	10.5 µl	10.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme mix ( <b>blue</b> )	12.5 µl	12.5 µl * (N + (N * 0.1))

- Mix the Master Mix carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Master Mix to each capillary.
- For the negative control add **2 µl** of the supplied negative control (**green**).
- For the positive control add **2 µl** of the supplied positive control (**red**).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding capillary.

Close the capillaries with the lids, transfer them into the LightCycler® carousel and centrifuge them in the LightCycler® centrifuge (if a tabletop centrifuge is used, centrifuge the capillaries in the inserts of the cooling block at 3000 rpm for 15 s). Then transfer the carousel to the LightCycler® and start the PCR programme described in 9.3.

### 9.3 Instrument settings

For the Real-Time-PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 4: Real-Time-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	Heating rate	Cycles	Acquisition
Initial Denaturation	120 s	94 °C	20 °C/s	1	none
Denaturation	10 s	94 °C	20 °C/s	45	none
Primer annealing	25 s	60 °C	20 °C/s		<b>single</b>
Elongation	25 s	72 °C	20 °C/s		none
Melting curve	20 s	94 °C	20 °C/s	1	none
	20 s	40 °C	20 °C/s	1	none
	0 s	80 °C	0.2 °C/s	1	<b>constant</b>
Cooling	30 s	40 °C	20 °C/s	1	-

## 10 DATA ANALYSIS

Add an analysis of the type „genotyping“ for the evaluation of the melting curves. This forms the derivation of the fluorescence curve. The detection wavelength is 640 nm.

### ApoE Cys130Arg

Temperature wild type allele (Cys): 51.5 °C (+/-2 °C)

Temperature mutation allele (Arg): 61.0 °C (+/-2 °C)

The following graph shows the typical results for the possible genotypes: **green curve** - negative control, **red curve** - homozygous **Arg / Arg**, **blue curve** - heterozygous **Cys / Arg**.

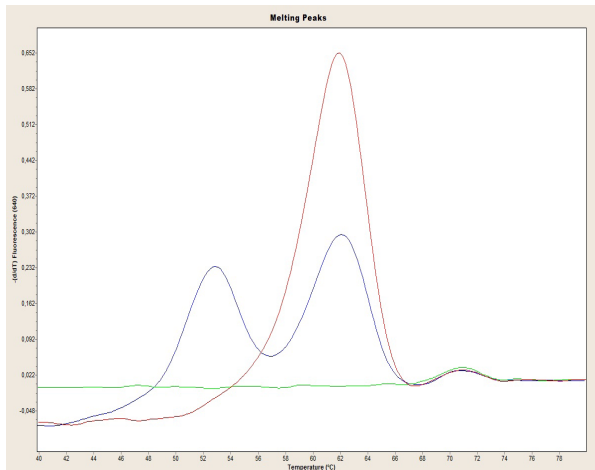


Fig. 1: Evaluation of master mix 1 - Cys130Arg.

### ApoE Cys176Arg

Temperature wild type allele (Cys): 52.5 °C (+/-2 °C)

Temperature mutation allele (Arg): 61.5 °C (+/-2 °C)

The following graph shows the typical results for the possible genotypes: **pink curve** - negative control, **black curve** - heterozygous **Cys / Arg**, **blue curve** - homozygous **Cys / Cys**.



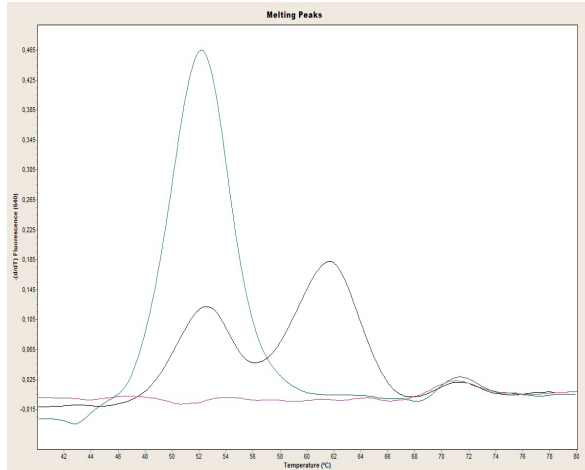


Fig. 2: Evaluation of master mix 2 - Cys176Arg.

The provided positive control contains a template which is **heterozygous** for both mutations (ApoE E2/E4).

### 10.1 Evaluation and classification in ApoE isoforms

Table 5: Evaluation and classification in ApoE isoforms

Allele	Cys130Arg	Cys176Arg
E2	Cys	Cys
E3	Cys	Arg
E4	Arg	Arg

Result		Allele combination
Cys130Arg	Cys176Arg	
Cys / Cys	Cys / Cys	E2/E2
Cys / Cys	Cys / Arg	E2/E3
Cys / Arg	Cys / Arg	E2/E4
Cys / Cys	Arg / Arg	E3/E3
Cys / Arg	Arg / Arg	E3/E4
Arg / Arg	Arg / Arg	E4/E4

## 11 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a Real-Time-PCR. If you have further questions, please do not hesitate to contact our scientists on [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com).

### No or weak fluorescence in the positive control or samples.

Check the PCR programme of the real-time PCR system and repeat the analysis with the corrected protocol.

Detection mixes have been subjected to more than three freeze cycles or have been stored at 2-8 °C for more than three month. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new detection mix.

The quality of the starting DNA is not sufficient. Use freshly extracted DNA and determine the concentration/purity before use.

The detection mixes were not protected from light exposure. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new PCR reagents.

## 12 KIT PERFORMANCE

### 12.1 Analytical Sensitivity

The limit of detection (LoD) of the MutaREAL® ApoE Real-Time PCR kit was determined using serial dilutions of DNA-fragments containing the mutation target sequences in a Roche LightCycler® 2.0 real time PCR instrument. The LoD of the MutaREAL® ApoE Real-Time PCR kit is 1000 genome copies per reaction each.

### 12.2 Precision

The precision of the MutaREAL® ApoE Real-Time PCR kit was determined as intra-assay variability and inter-assay variability.

Variability data are expressed by standard deviation and coefficient of variation. The data are based on  $T_m$  calculation analyses of defined concentrations of the ApoE mutation target sequences.

ApoE Cys130Arg	copies/ µl	Standard deviation	Coefficient of variation [%]
Intra-Assay Variability	3000	1.65	2.19
Inter-Assay Variability	3000	2.97	3.78

<b>ApoE Cys176Arg</b>	<b>copies/ µl</b>	<b>Standard deviation</b>	<b>Coefficient of variation [%]</b>
Intra-Assay Variability	3000	2.54	4.49
Inter-Assay Variability	3000	2.37	5.89

### 12.3 *Diagnostic Sensitivity*

The diagnostic sensitivity of Real-Time-PCR assays is mainly dependent on the DNA extraction method used to isolate DNA from various biological specimens. DNA extraction reagents are not part of the Immundiagnostik AG Real-Time-PCR kits. Immundiagnostik AG Real-Time-PCR kits include a positive and negative control. Therefore, Immundiagnostik AG guarantees the analytical sensitivities and specificities of the Real-Time PCR kits, performed with eluted DNA from reference materials and ring trial samples and with synthetic nucleic acid fragments. Immundiagnostik AG does not guarantee diagnostic sensitivities. If diagnostic sensitivities are mentioned in manuals of Immundiagnostik AG Real-Time-PCR kits, the data are strictly correlated to a specific nucleic acid extraction method that has been used during the validation of the respective kits and cannot be transferred to other extraction methods. It is the responsibility of the user to qualify the extraction methods used for DNA isolation.











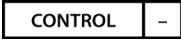




## 13 LIMITATIONS OF THE METHOD

The result is provided to the treating physician as supporting material and should never be used exclusively for diagnosis or treatment recommendations. The diagnosis as well as the treatment decisions to be taken remain the full responsibility of the physician.

The accuracy of genetic tests is not 100%. However, it has been found to be over 98% accurate based on validation data for this test. Furthermore, genetic test results must be considered in the context of the patient's clinical representation and known familial risks in the patient's environment.

The test only analyses a selection of markers. Therefore, a negative test result of the patient does not completely exclude a risk of any kind.

## 14 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleic acid		Catalog number
PCR	Polymerase chain reaction		To be used with
	Enzyme mix		Contains sufficient for <n> test
	Detection mix 1		Upper limit of temperature
	Detection mix 2		Manufacturer
	Positive control		Lot number
	Negative control		Consult instructions for use
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device		Content
	Use by YYYY-MM-DD		

## 15 LITERATURE

1. Eichner et al., Am J Epidemiol, 2002, 155(6):487-95



## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

