

Genotypowanie APOE metodą MSSCP

Dr Radosław Kaczanowski,
Kucharczyk T. E.,
Dzieci Warszawy 31/20, Warszawa

Wstęp

Apolipoproteina E (apoE) odgrywa centralną rolę w metabolizmie cholesterolu i triglicerydów. Gen dla ApoE zlokalizowany jest na chromosomie 19, ma 3,7 kb długości i składa się z 4 egzonów. Występuje najczęściej w trzech allelach APOE2 (arg158cys), APOE3 i APOE4 (cys112arg). U osób zdrowych ponad 10% między osobniczej zmienności w poziomie cholesterolu we krwi związane jest z posiadaniem allelem genu APOE. Wpływ genotypu APOE na poziom lipidów we krwi ma duże znaczenie dla ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca i miażdżycy tętnic szyjnych. Genotyp APOE2/2 występujący z częstością (1:100) skorelowany jest z hiperlipoproteinemią typu III, której leczenie (przy potwierdzonym genotypie APOE2/APOE2) możliwe jest przy pomocy odpowiedniej diety.

APOE4 jest głównym czynnikiem genetycznym związanym z występowaniem sporadycznej i rodzinnej formy choroby Alzheimer'a (AD). Istnieje dobrze udokumentowany związek późno ujawniającej się rodzinnej formy AD z genotypem APOE4. Posiadanie tego allelu obniża statystycznie wiek w którym może pojawić się choroba [Meyer et al, *Nat Genet* 1998,19:321-2].

Genotypowanie APOE które może być zastosowane jako dodatkowy test w diagnozowaniu AD, nie powinno być jednak jedynym testem na którym opiera się diagnoza.

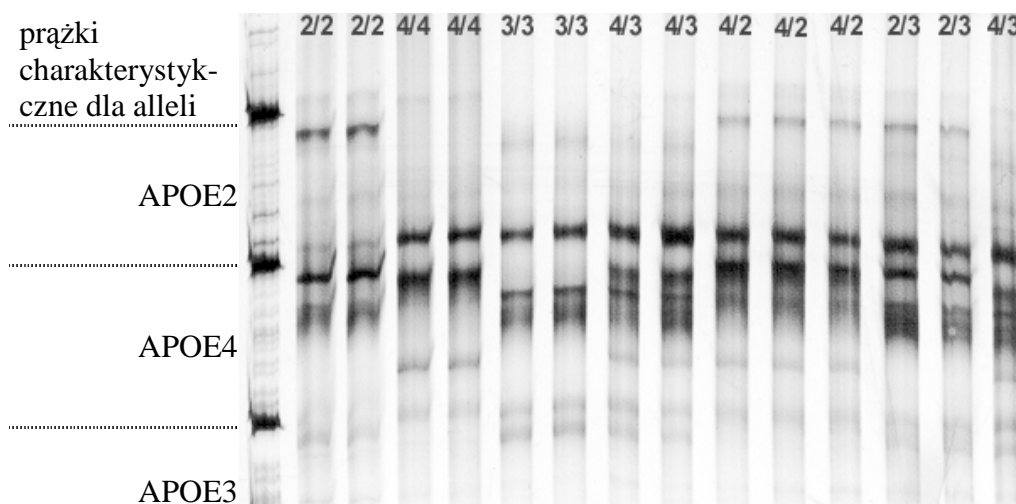
Forma genu APOE ma także wpływ na reakcję na leki podawane w leczeniu AD [Poirier et al, *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:12260-4].

Materiały i Metody

DNA izolowano z krwi przy użyciu kitu do izolacji DNA (Nr kat: 400-050). Region kodujący izoformy ApoE powielono przy użyciu reakcji PCR. Do analizy metodą SSCP produkty PCR zmieszano w stosunku 1:1 z buforem denaturującym (Nr kat: 200-141), inkubowano w 95° C przez 3 minuty i schłodzono w łaźni lodowej. Fragmenty DNA naniesiono na żel poliakrylamidowy (9%T, 2%C) z 5% glicerolem (Nr kat: 200-131) w buforze 1 x TBE (Nr kat: 200-150). Żel został przygotowany w aparacie Multipol DNA Pointer (Nr kat. 104-160). Elektroforeza była prowadzona w temperaturze 5° C z mocą 40 W przez 100 minut. Żel wybarwiono srebrem przy użyciu kitu Silver Stain (Nr kat. 200-101), wysuszono w folii (Nr kat. 100-150) i skanowano.

Wyniki i dyskusja

Analiza SSCP alleli APOE przy użyciu systemu do wykrywania mutacji DNA Pointer z precyzyjną kontrolą temperatury jest szybką, tanią i powtarzalną metodą służącą do wykrywania i identyfikacji homo i heterozygot częstych form genu APOE.



Łączny czas analizy (włączając barwienie srebrem) wynosi 6 minut/próbkę, całkowity koszt odczynników wynosi 2,5 zł/próbkę (nie wliczając reakcji PCR). Analiza polimorfizmów APOE metodą SSCP w systemie DNA Pointer charakteryzuje się krótszym czasem oraz niższymi kosztami w porównaniu do obecnie stosowanych metod takich jak sekwencjonowanie lub analiza restrykcyjna przy użyciu enzymu HhaI. Dodatkową zaletą w porównaniu do analizy restrykcyjnej enzymem HhaI jest możliwość wykrycia nowych rzadkich mutacji w genie APOE. Szczególnie korzystne wydaje się użycie systemu DNA Pointer do preselekcji próbek przed sekwencjonowaniem, tym bardziej że jednoniciowe fragmenty DNA mogą zostać szybko i efektywnie wyeluowane z żelu poliakrylamidowego przy użyciu systemu do elektroelucji z jednorazowymi wkładami Blue Gene Mashine (Nr kat: 133-150), a następnie użyte jako jednoniciowa matryca do reakcji sekwencjonowania, co pozwoli uzyskać jednoznaczny obraz sekwencji nukleotydowej.

Literatura:

1. Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JC. , Nat Genet 1998;19:321-2
2. Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, et al. Proc Natl Acad Sci 1995;92:12260-4