

IDENTIFICAZIONE DEI POLIMORFISMI T334C e C472T DEL GENE CODIFICANTE PER L'APOPROTEINA-E (APOE)

AMPLI-ApoE T334C e C472T

Cat. n. 1.333RT

Le apolipoproteine, quali componenti proteici delle lipoproteine plasmatiche, svolgono una funzione fondamentale nel metabolismo lipidico. L'apolipoproteina E (apoE) è uno dei principali costituenti proteici delle VLDL, si trova anche in quantità minori nei chilomicroni, LDL e HDL. Quantità elevate di apoE sono presenti nella sottoclasse HDL1 delle HDL. L'apoE svolge inoltre un ruolo essenziale nel trasporto del colesterolo dalla periferia verso il fegato. Il gene APOE, localizzato in 19q13.2, codifica per una proteina di 299 aminoacidi sintetizzata principalmente a livello degli epatociti. Il gene presenta tre alleli comuni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ che producono tre isoforme proteiche che differiscono nella sequenza aminoacidica (Cisteina/Arginina) alle posizioni 112 e 158: isoforma E2 (Cis112, Cis158), isoforma E3 (Cis112, Arg158) ed isoforma E4 (Arg112, Arg158). La variabilità degli amminoacidi 112 e 158 è dovuta a polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) presenti nel gene in posizione 334 (T/C) e 472 (C/T).

L'APOE è stato uno dei primi marcatori genetici ad essere studiato come fattore di rischio per l'infarto del miocardio. I portatori dell'allele $\epsilon 4$ presentano infatti livelli più elevati di colesterolo totale e LDL, e quindi hanno un rischio maggiore di patologie cardiovascolari. Inoltre, l'allele $\epsilon 4$ è stato associato con la malattia di Alzheimer ad insorgenza tardiva familiare ed alle forme sporadiche. La presenza in eterozigosi dell'allele $\epsilon 4$ determinerebbe un incremento del fattore di rischio di sviluppare la malattia circa tre volte maggiore rispetto alla sua assenza, mentre la sua presenza in omozigosi determinerebbe un rischio ancora maggiore. Il kit **AMPLI-ApoE T334C e C472T** permette di individuare la presenza dei polimorfismi 334T/C e 472C/T responsabili a livello proteico delle varianti aminoacidiche C112R e R158C. La ricerca di tali polimorfismi viene eseguita previa amplificazione con primers specifici ed ibridazione con un probe che riconosce una sequenza interna. Il probe è marcato con due fluorofori diversi (reporter dye e quencher dye). Durante la reazione di amplificazione, il rilascio del quencher dal probe provoca un incremento della fluorescenza causata dal reporter che è, quindi, direttamente proporzionale al quantitativo di prodotto amplificato riconosciuto (real-time quantitative PCR). In questo kit per la rivelazione dei polimorfismi 334 e 472 vengono utilizzati probes marcati con i fluorocromi FAM e JOE.

Principio del metodo: a) estrazione del DNA genomico; b) amplificazione; c) rivelazione mediante l'utilizzo dell'apparecchio real-time PCR.

Applicabilità: su DNA genomico estratto e purificato da campioni di sangue intero.

Numero di test: 100.

CONTENUTO DEL KIT E SUA CONSERVAZIONE

AMPLIFICAZIONE	
PCR Mix 2X	+4°C
H ₂ O DNase/RNase-free	-20°C
Mix 20X Primer-probe T334C	-20°C
Mix 20X Primer-probe C472T	-20°C
Controllo Eterozigote T334C	+4°C
Controllo Eterozigote C472T	+4°C
Controllo WT TT/CC	+4°C

Stabilità: superiore a 18 mesi se correttamente conservato.

Bibliografia:

Rall SC Jr et al. J Biol Chem 1982; 257:4171-8.
Strittmatter WJ et al. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:4725-7.
Roses AD. Annu Rev Med 1996; 47:387-400.
Corder EH et al. Nat Genet 1994; 7:180-4.
Bickeböllner H et al. Am J Hum Genet 1997; 60:439-46.
Paik YK et al. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:3445-9.
Das HK et al. J Biol Chem 1985; 260:6240-7.
Song Y et al. Ann Intern Med 2004; 141 : 137-47.
Ganguli M et al. Arch Neurol 2000; 57 : 824-30.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'analisi dei risultati sarà effettuata dal programma specifico (ALLELIC DISCRIMINATION) della strumentazione precedentemente impostato. In ogni caso, comunque, risulta utile analizzare anche i grafici dell'AMPLIFICATION PLOT, per accertarsi che la reazione sia avvenuta in modo corretto.

Gli alleli ϵ saranno identificati secondo lo schema riportato in tabella in modo da definire i 6 possibili genotipi: $\epsilon 2\epsilon 2$, $\epsilon 2\epsilon 3$, $\epsilon 2\epsilon 4$, $\epsilon 3\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$.

allele apoE	combinazione nucleotidi	combinazione amminoacidi
$\epsilon 2$	334T/472T	112Cisteina/158Cisteina
$\epsilon 3$	334T/472C	112Cisteina/158Arginina
$\epsilon 4$	334C/472C	112Arginina/158Arginina