

Istruzioni d'uso

ver. 4 del 05/03/2021

Biologia Molecolare

ApoE Real Time (FRET)

REF

AA1524/25A

CE



25 TEST

CND

W0106010299

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

SEDE LEGALE: Via Cascina Conighetto - UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALIA

Tel.: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

Organizzazione con Sistema di gestione qualità certificata ISO 9001 e Sistema di gestione qualità settore medicale certificato ISO 13485 (organismo di certificazione IMQ - Certificazione CSQ).

UTILIZZO

Il kit **AA1524/25A** fornisce il materiale necessario per l'analisi delle tre isoforme (ApoE2, ApoE3 e ApoE4) della proteina ApoE (Apolipoprotein E) legate ai polimorfismi T334C (rs429358) e C472T (rs7412) mediante amplificazione delle sequenze bersaglio e analisi delle curve di melting.

Per ciascun polimorfismo viene fornita una mix comprensiva di enzima di amplificazione e di Uracil-DNA Glycosylase (UNG) per prevenire la contaminazione da amplificati.

Il presente dispositivo è stato validato con:

- a) il kit di estrazione manuale su colonnina (cod. NLM AA1001), il kit di estrazione automatico OMNIA LH75 (cod. NLM AA1319/48) e con i più comuni sistemi automatici di estrazione degli acidi nucleici (cod. NLM AA1185 estrazione Magcore; cod. NLM AA1038 estrazione Maxwell; cod. NLM AA1439/192 estrazione Qiasymphony).
- b) lo strumento CFX Real Time PCR (BioRad).

INTRODUZIONE

L'Apolipoproteina E (ApoE) è una lipoproteina del plasma sintetizzata principalmente dal fegato e coinvolta nel trasporto del colesterolo e di altri lipidi. La presenza di mutazioni o polimorfismi può determinare la comparsa di disordini nel metabolismo lipoproteico e una maggior predisposizione alle patologie cardiovascolari. ApoE svolge un ruolo determinante anche nel sistema nervoso centrale dove è coinvolta nella mobilitazione e redistribuzione del colesterolo, dei fosfolipidi e degli acidi grassi ed è implicata in diversi meccanismi come ad esempio lo sviluppo neuronale.

Nella popolazione sono state individuate diverse isoforme di questa proteina che differiscono tra loro per la sostituzione di un singolo amminoacido che determina però profonde conseguenze a livello cellulare e molecolare: in particolare gli amminoacidi coinvolti si trovano in posizione 112 (polimorfismo rs429358) e in posizione 158 (polimorfismo rs7412).

| Polimorfismo | Nucleotide | Amminoacido |
|--------------|------------|-------------|
| rs429358 | 334T>C | C112R |
| rs7412 | 472C>T | R158C |

Tabella 1. Corrispondenza tra polimorfismo, mutazione associata e amminoacido coinvolto

L'isoforma più comune è ApoE3 che si distingue per la presenza di una Cys in posizione 112 e una Arg in posizione 158. Le isoforme ApoE2 e ApoE4 differiscono da ApoE3 per la sostituzione di un singolo amminoacido: l'isoforma ApoE2 (Cys¹¹² e Cys¹⁵⁸) è associata all'iperlipoproteinemia di tipo III, un disordine genetico caratterizzato dalla presenza di elevati livelli di colesterolo nel plasma con conseguente incremento delle patologie coronariche; l'isoforma ApoE4 (Arg¹¹² e Arg¹⁵⁸) è invece associata ad aterosclerosi e ad un rischio più elevato di sviluppo dell'Alzheimer.

| APOE | e3/e3 | e3/e4 | e2/e3 | e2/e4 | e2/e2 | e4/e4 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 334T | X | X | X | X | X | |
| 334C | | X | | X | | X |
| 472T | | | X | X | X | |
| 472C | X | X | X | X | | X |

Tabella 2. Combinazioni nucleotidiche che determinano i 6 genotipi d'interesse

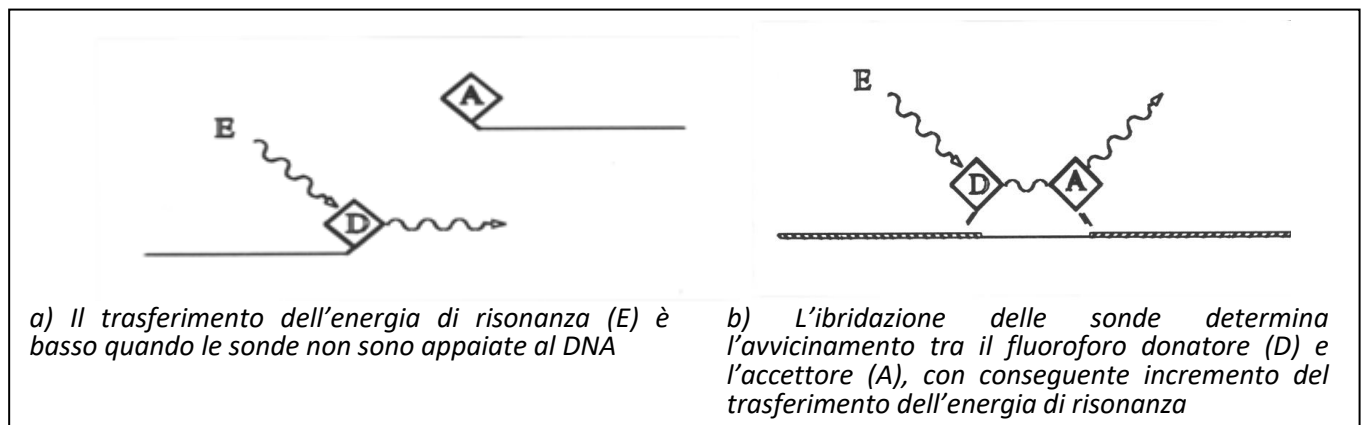
BIBLIOGRAFIA

- Lenzen *et al.* "Association of apolipoproteinE polymorphism, low-density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease". ClinChem 1986 (32): 778–781
- Mahley and Rall "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein". Annu Rev Genomics Hum Genet 2000 (1): 507–537
- Deary *et al.* "Cognitive change and the APOE epsilon 4 allele". Nature 2002 (418): 932
- Huang and Mahley, "Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases". Neurobiol Dis. 2014 (72): 3-12
- Mahley "Apolipoprotein E: Remarkable Protein Sheds Light on Cardiovascular and Neurological Diseases". Clin Chem 2017 (63): 1-20

PRINCIPIO DEL TEST



Il test si basa sull'amplificazione del DNA e sul Trasferimento di Energia di Risonanza Fluorescente (FRET) che avviene tra due sonde adiacenti e complementari alla regione che comprende la mutazione: una sonda, posizionata in 5', comprende la mutazione di interesse ed è marcata con un fluoroforo donatore; una sonda in 3' porta invece il fluoroforo accettore. Se le due sonde si appaiano alla loro sequenza bersaglio, i due fluorofori vengono a trovarsi in prossimità e, in presenza di una fonte luminosa, si ha quindi il trasferimento di energia dal donatore all'accettore; in assenza del bersaglio invece il trasferimento di energia non avviene.

Le sonde permettono di identificare varianti della sequenza bersaglio mediante la curva di dissociazione (melting curve), in cui l'amplificato viene sottoposto ad una rampa crescente di temperatura con conseguente distacco delle sonde dal DNA. Se la sonda in 5' è complementare al filamento mutato di DNA, l'ibridazione tra i due sarà più stabile rispetto al duplex tra la sonda medesima ed il filamento che non porta la mutazione (single point mismatch), con conseguente picco di dissociazione ad una temperatura più elevata. Mediante l'analisi della curva di melting si possono pertanto distinguere i tre genotipi in base alla posizione dei picchi: singoli a due diverse temperature per i campioni omozigoti e doppio picco per l'eterozigote.



COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

Conservazione a -25/-15°C

| Reagenti | N° vial | Volume/vial | Precauzioni |
|---|---------|-------------|---|
| Master Mix 334 , tappo blu Soluzione contenente oligonucleotidi, sonde fluorescenti ed enzimi | 1 | 370 µl |  |
| Master Mix 472 , tappo rosso Soluzione contenente oligonucleotidi, sonde fluorescenti ed enzimi | 1 | 370 µl |  |
| Acqua DNase, RNase, Protease free | 1 | 400 µl | |

I volumi dei componenti indicati precedentemente sono riferiti alla pezzatura standard del kit. Confezionamenti ridotti del kit sono disponibili su richiesta per valutazione e/o dimostrazione del prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Tutti i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati alla temperatura indicata (-25/-15°C)
- Scongellare le Master Mix in ghiaccio o a +2/+8°C
- Le sonde contenute nelle Master Mix sono fotosensibili: evitare l'esposizione prolungata alla luce
- Al termine di ogni seduta riporre i reagenti alla corretta temperatura di conservazione

PRECAUZIONI

- La procedura va eseguita da personale competente, utilizzando le buone pratiche di laboratorio ed i comuni dispositivi di protezione individuale
- Eliminare il materiale monouso utilizzato, i guanti indossati e tutti i reattivi come rifiuti speciali
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree preposte all'esecuzione del test
- Se vi è esposizione di occhi, cute o mucose alle sostanze utilizzate, lavare abbondantemente con acqua e contattare al più presto un medico
- Non utilizzare reagenti scaduti
- Non mischiare reagenti di lotti diversi
- Tenere i reagenti separati da possibili acidi nucleici contaminanti (campioni e prodotti di amplificazione)
- Evitare ripetuti scongelamenti delle mix
- Si consiglia di eseguire l'analisi in tre zone separate:
 - Zona 1: manipolazione dei campioni ed estrazione; preparazione PCR in automatico
 - Zona 2: preparazione PCR in manuale
 - Zona 3: post PCR (Real Time PCR)
- Non utilizzare il kit se la scatola è danneggiata e contattare il fornitore
- E' opportuno assicurare una temperatura il più possibile costante ed uniforme in laboratorio ed evitare di posizionare gli strumenti in prossimità di fonti di calore/raffreddamento che possano comprometterne il corretto funzionamento

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Estrattore/Preparatore PCR, kit di estrazione del DNA in automatico e relativi consumabili
- Kit di estrazione del DNA in manuale
- Strumento per amplificazione in Real Time e relativi consumabili
- Controllo positivo eterozigote, monouso (cod. NLM FA134/10).



Per la compatibilità con strumentazione diversa da quella indicata, contattare la Nuclear Laser Medicine srl.

PROCEDIMENTO

E' possibile utilizzare sangue fresco o conservato a +2/+8°C (per non più di due giorni) oppure conservato a -25/-15°C. Usare solo EDTA o citrato come anticoagulanti (non utilizzare eparina).

ISOLAMENTO DEL DNA

Estrazioni compatibili:

- estrazione manuale (cod. NLM AA1001)
- estrazione con il sistema automatico OMNIA LH75 (cod. NLM AA1319/48) e con i più comuni sistemi automatici di estrazione degli acidi nucleici (cod. NLM AA1185 estrazione MagCore; cod. NLM AA1038 estrazione Maxwell; cod. NLM AA1439/192 estrazione Qiasymphony).

Per l'uso del sistema automatico OMNIA LH75 seguire le indicazioni fornite da Nuclear Laser Medicine srl; per l'estrazione con gli altri sistemi automatici seguire invece le indicazioni del fornitore del sistema.

AMPLIFICAZIONE

Attenzione

- L'utilizzo di campioni di sangue o di estratti che abbiano subito ripetuti scongelamenti o un'impropria conservazione può pregiudicare l'esito positivo del test
 - Agitare delicatamente le Master Mix prima dell'uso e controllare che non ci siano residui nel tappo
 - La concentrazione del DNA estratto da analizzare deve essere di circa 15-60 ng/μl.
- ⇒ • Il Controllo positivo è monouso. Eliminare il materiale rimanente nella provetta.

PCR set-up in manuale

Mix 334

| Reagenti | Volume per campione |
|-----------------------------------|---------------------|
| Master Mix 334 (tappo blu) | 11,5 μl |
| Acqua DNase, RNase, Protease-free | 4,5 μl |
| DNA | 4 μl |


Mix 472

| Reagenti | Volume per campione |
|-----------------------------------|---------------------|
| Master Mix 472 (tappo rosso) | 11,5 μl |
| Acqua DNase, RNase, Protease-free | 4,5 μl |
| DNA | 4 μl |

PCR set-up con sistema automatico

Per la preparazione della PCR con il sistema automatico OMNIA LH75 utilizzare il protocollo fornito dalla Nuclear Laser Medicine srl.

IMPOSTAZIONE DEL PROFILO TERMICO E ANALISI DEI RISULTATI

 Per l'utilizzo dello strumento **CFX96 (Biorad)**, scaricare il manuale d'uso cod. NLM **DX007** dal sito www.nlm.it. Per la compatibilità con altri strumenti per Real Time PCR, contattare *Nuclear Laser Medicine srl*.

IMPOSTAZIONE DEL PROFILO TERMICO

Impostare *Sample Volume*: 20 µl

Inserire il seguente profilo termico:

- 1 45,0° C for 5:00
 - 2 97,0° C for 2:00
 - 3 97,0° C for 0:15
 - 4 60,0° C for 0:20
 - 5 72,0° C for 0:10
 - 6 **GOTO 3, 39 more times**
 - 7 35,0° C for 2:00
 - 8 97,0° C for 5:00
 - 9 35,0° C for 10:00
 - 10 Melt Curve 35,0 to 75,0° C, increment 0,5° C for 0:03 + Plate Read
- END

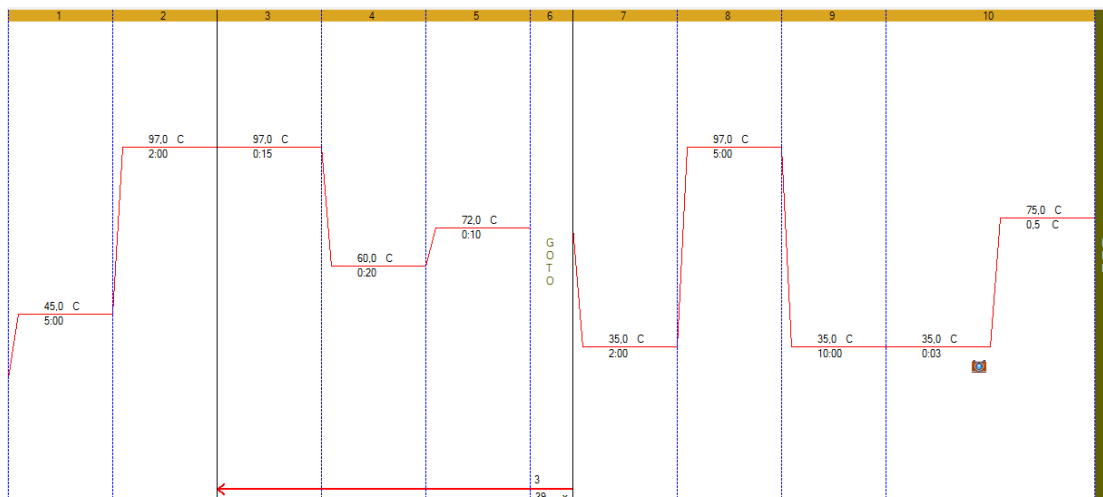


Figura 1. Riproduzione del profilo termico, così come visualizzato nel programma dello strumento.

Setup della piastra

- Per i campioni da analizzare selezionare in *Sample Type* → *Unknown*
- *Select Fluorophores* → FAM
- Selezionare *Target Name* ed inserire la descrizione riportata nella tabella sottostante:

| target | fluoroforo |
|--------|------------|
| T334C | FAM |
| C472T | FAM |

- In caso di inserimento di Controlli positivi selezionare in *Sample Type* → *Positive Control*
Per i controlli utilizzare come *Sample Name*: Etz ApoE T334C (Controllo associato alla Mix 334)
Etz ApoE C472T (Controllo associato alla Mix 472)
- In caso di inserimento di Controlli negativi (No Template Control) selezionare in *Sample Type* → *NTC* (in questo caso può essere utilizzato un *Sample name* a piacere)

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Al termine della seduta di lavoro, si apre automaticamente la finestra *Data Analysis*.

- Selezionare la finestra *Melt Curve* in cui vengono visualizzati i grafici della seduta: il grafico a sinistra mostra il dato grezzo della curva di melting mentre il grafico a destra mostra i picchi delle curve di melting (analisi $-d(\text{RFU})/dT$)
- Selezionare *Peak Type* → Negative

Lo strumento seleziona automaticamente la threshold (linea blu) che però può essere spostata a piacimento per eliminare il rumore di fondo e/o segnali aspecifici.

Analizzare i picchi di melting per ogni campione, selezionando i singoli pozzetti della piastra.

Attenzione: non considerare i picchi che cadono al di fuori del range indicato.

Mix 334

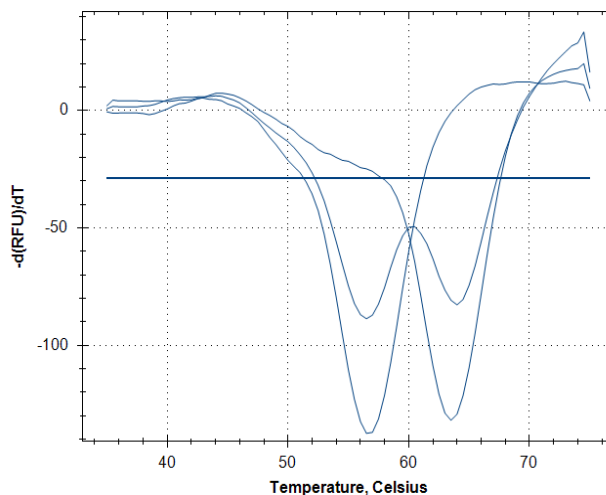
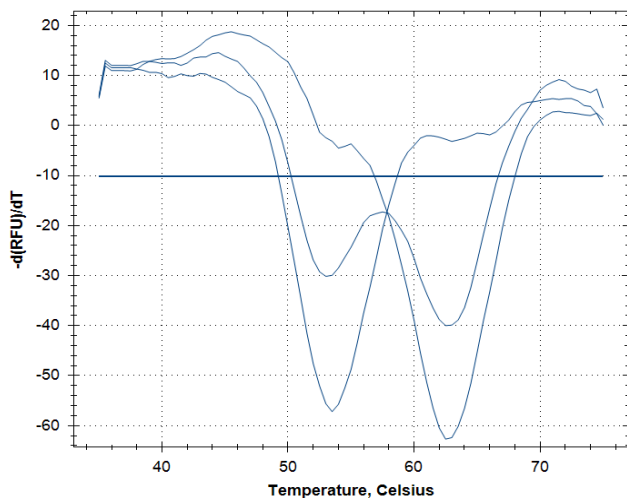
Ogni campione può avere:

- un singolo picco a $63 \pm 3^\circ\text{C}$ (campioni omozigoti TT)
- un singolo picco a $53 \pm 3^\circ\text{C}$ (campioni omozigoti CC)
- un doppio picco (campioni eterozigoti TC)

Mix 472

Ogni campione può avere:

- un singolo picco a $64 \pm 3^\circ\text{C}$ (campioni omozigoti TT)
- un singolo picco a $57 \pm 3^\circ\text{C}$ (campioni omozigoti CC)
- un doppio picco (campioni eterozigoti CT)



*Esempio di campioni (omozigoti TT, CC ed eterozigote) analizzati con la **Mix 334***

*Esempio di campioni (omozigoti CC, TT ed eterozigote) analizzati con la **Mix 472***



Per l'interpretazione automatica dei risultati e la generazione del report, utilizzare il programma **Real Gene** seguendo il manuale cod. NLM **DO022**.



L'inserimento del Controllo Positivo nella seduta è facoltativo. La seduta non viene invalidata da un suo risultato non conforme.

ATTENZIONE

Come per ogni sistema basato su amplificazione e rilevazione degli acidi nucleici, è possibile che la presenza di varianti ignote nelle sequenze geniche della regione in cui sono stati disegnati i primer e/o le sonde specifiche possa dare risultati inattesi.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit “ApoE Real Time (FRET)”, espressa come la quantità minima di marcatore bersaglio che può essere esattamente rilevata, è pari a 1 ng/μl di DNA (equivalente a 4 ng per reazione). La valutazione è stata effettuata con entrambe le Mix con diluizioni seriali di DNA estratto da campioni a diverso genotipo e operando come descritto in metodica.

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit “ApoE Real Time (FRET)” è stata valutata analizzando 126 campioni a genotipo noto (comprendenti tutti i genotipi rilevati dal kit).

Il kit ha permesso di discriminarli tutti in maniera corretta, pertanto la sensibilità diagnostica del dispositivo è pari al 100%.

Specificità diagnostica

La specificità del kit “ApoE Real Time (FRET)” è stata determinata testando 126 campioni a genotipo noto (comprendenti tutti i genotipi rilevati dal kit).

Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi, pertanto la specificità del kit è pari al 100%.

Riproducibilità

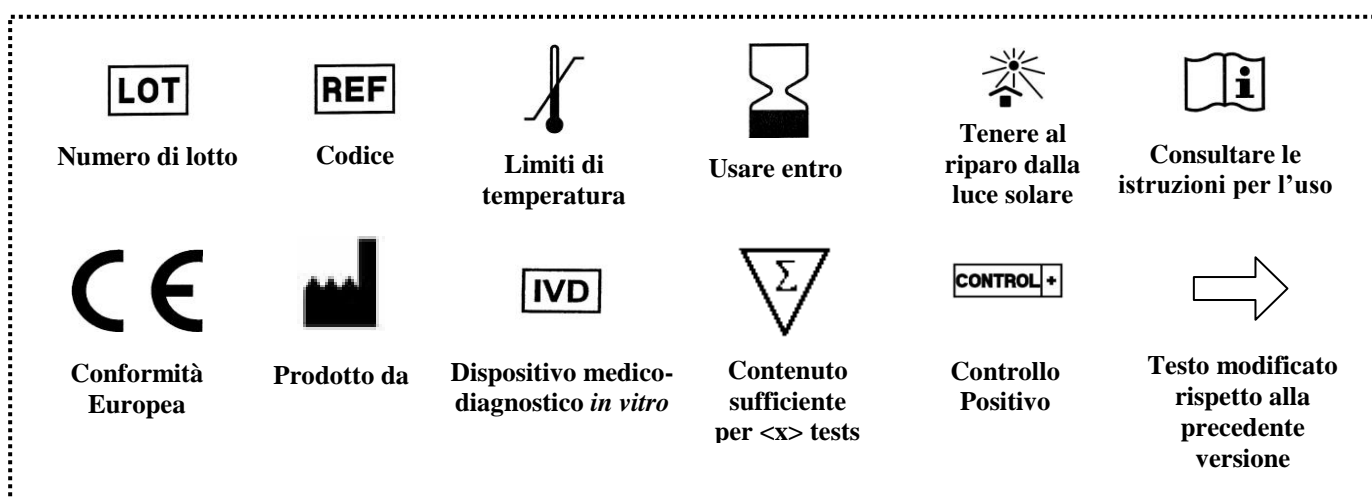
Riproducibilità intrasaggio

La riproducibilità intrasaggio è stata valutata testando 3 campioni a diverso genotipo in 4 replicati nella stessa seduta su diversi strumenti.

Riproducibilità intersaggio

La riproducibilità intersaggio è stata valutata analizzando 3 campioni a diverso genotipo in 4 replicati in diverse sedute e su diversi strumenti.

In base ai risultati ottenuti la riproducibilità è del 100%.



Instructions for Use

ver. 4 - 05/03/2021

Molecular Biology

ApoE Real Time (FRET)

| | | |
|---|------------|---|
|  | AA1524/25A |  |
|  | 25 TEST | |
| GMDN | 30259 |  |



 **NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.**

HEADQUARTER: Via Cascina Conighetto – BUSINESS OFFICES: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALY

Phone: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

ISO 9001 Quality Management System Organization certified and ISO 13485 Medical Sector Quality Management System certified (IMQ certification body - CSQ certification).

INTENDED USE

The **AA1524/25A** device provides the material for the analysis of the three ApoE (Apolipoprotein E) isoforms (ApoE2, ApoE3 e ApoE4) linked to the polymorphisms T334C (rs429358) and C472T (rs7412) by amplification of the target sequences and analysis of melting curves.

A mix, including amplification enzyme and Uracil-DNA Glycosylase (UNG) to prevent amplified contamination, is provided for each polymorphism.

This device has been validated with:

- c) manual column based kit (NLM code AA1001), automatic OMNIA LH75 kit (NLM code AA1319/48) and with the most common automatic nucleic acid extraction systems (NLM code AA1185 Magcore; NLM code AA1038 Maxwell, NLM code AA1439/192 Qiasymphony).
- d) CFX Real Time PCR (BioRad) instrument.

INTRODUCTION

Apolipoprotein E (ApoE) is a plasma lipoprotein synthesized primarily in the liver and it is involved in the transport of cholesterol and other lipids. The presence of mutations or polymorphisms can determine the appearance of disorders in lipoprotein metabolism and a greater predisposition to cardiovascular diseases. ApoE also plays a decisive role in the central nervous system where it is involved in the mobilization and redistribution of cholesterol, phospholipids and fatty acids and it is implicated in various mechanisms such as neuronal development.

In the population, different isoforms of this protein have been identified. These differ from each other for the substitution of a single amino acid that determines however profound consequences at cellular and molecular level: in particular are involved the amino acids in position 112 (rs429358 polymorphism) and in position 158 (rs7412 polymorphism).

| Polymorphism | Nucleotide | Aminoacid |
|--------------|------------|-----------|
| rs429358 | 334T>C | C112R |
| rs7412 | 472C>T | R158C |

Table 1. Correspondence between polymorphism, associated mutation and involved amino acid

ApoE3 is the most common isoform. It is distinguished by the presence of a Cys at position 112 and an Arg at position 158. The ApoE2 and ApoE4 isoforms differ from ApoE3 for the replacement of a single amino acid: the ApoE2 isoform (Cys₁₁₂ and Cys₁₅₈) is associated with type III hyperlipoproteinemia, a genetic disorder characterized by the presence of high levels of cholesterol in the plasma with a consequent increase in coronary heart disease; instead the apoE4 isoform (Arg₁₁₂ and Arg₁₅₈) is associated with atherosclerosis and higher risk of developing Alzheimer's disease.

| APOE | e3/e3 | e3/e4 | e2/e3 | e2/e4 | e2/e2 | e4/e4 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 334T | X | X | X | X | X | |
| 334C | | X | | X | | X |
| 472T | | | X | X | X | |
| 472C | X | X | X | X | | X |

Table 2. Nucleotide combinations that determine the 6 genotypes of interest

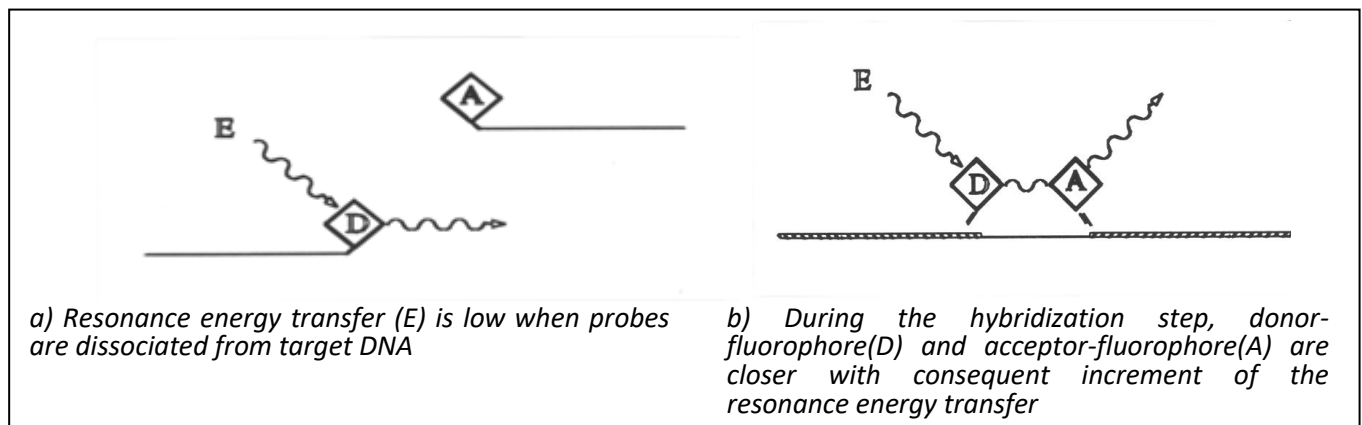
REFERENCES

- Lenzen *et al.* "Association of apolipoproteinE polymorphism, low-density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease". ClinChem 1986 (32): 778–781
- Mahley and Rall "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein". Annu Rev Genomics Hum Genet 2000 (1): 507–537
- Deary *et al.* "Cognitive change and the APOE epsilon 4 allele". Nature 2002 (418): 932
- Huang and Mahley, "Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases". Neurobiol Dis. 2014 (72): 3-12
- Mahley "Apolipoprotein E: Remarkable Protein Sheds Light on Cardiovascular and Neurological Diseases". Clin Chem 2017 (63): 1-20

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE



The assay is based on DNA amplification and Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) that occurs between two adjacent probes complementary to the region that includes the mutation: a 5' probe includes the mutation of interest and it is labeled with a donor fluorophore; instead a 3' probe carries the acceptor fluorophore. If the two probes appear in their target sequence, the two fluorophores come to be in proximity and, in the presence of a light source, energy is therefore transferred from the donor to the acceptor; in the absence of the target, energy transfer does not take place.

The probes allow to identify variants of the target sequence by means of the dissociation curve (melting curve); the amplicon is subjected to a rising temperature ramp with consequent detachment of the probes from the DNA. If the 5' probe is complementary to the mutated DNA strand, the hybridization between the two sequence will be more stable than the duplex between the probe itself and the strand that is not mutated (single point mismatch), with consequent peak of dissociation to an higher temperature. Therefore, through the melting curve analysis it is possible to distinguish the three genotypes based on the peak positions: two single peak with different temperatures for the homozygous samples and double peak for the heterozygote.



PRODUCT COMPOSITION

Store at -25/-15°C

| Reagents | N° of vials | Volume/vial | Precautions |
|--|-------------|-------------|---|
| Master Mix 334 , blue cap Solution containing oligonucleotides, fluorescent probes and enzymes | 1 | 370 µl |  |
| Master Mix 472 , red cap Solution containing oligonucleotides, fluorescent probes and enzymes | 1 | 370 µl |  |
| free DNase, RNase, Protease Water | 1 | 400 µl | |

The amount of reagents indicated in the table is referred to the standard size of the kit. Reduced packaging is available on request for evaluation and/or demonstration of the product.

STABILITY AND STORAGE

- All the reagents are stable up to the expiry date indicated on the label when stored at the correct temperature (-25/-15°C).
- Thaw Amplification Mix on ice or at +2/+8°C
- Probes in the Mix are photosensitive: avoid prolonged exposure to light
- At the end of each assay, store reagents at their correct storage temperature

PRECAUTIONS

- Only professional and opportunely trained personnel should use this kit. Handle this product according to established Good Laboratory Practices and universal precautions; wear personal protective apparel
- Discard the used disposable material, worn gloves and all reagents as special waste
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where reagents or specimens are handled
- If eyes, skin or mucous membrane exposure occurs, immediately wash the area with copious amount of water. Seek medical advice
- Don't use components beyond the expiration date
- Don't mix reagents from different lots
- Keep reagents separated to avoid possible contamination (samples and amplification products)
- Avoid repeated freezing and thawing of the mixes
- It is recommended to make analysis in three different areas:
 - Area 1: samples handling and extraction; automatic PCR setup
 - Area 2: manual PCR setup
 - Area 3: post PCR (Real Time PCR)
- Don't use the device if the box is damaged; contact the supplier
- It is advisable to have constant and uniform laboratory temperature, avoid to place the instruments near heating/cooling sources that may compromise the correct work.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Extractor/PCR setuper workstation, automatic DNA isolation kit and disposables
- Manual DNA isolation kit
- Real Time PCR instruments and disposables
- Heterozygous positive control, single use (cod. NLM FA134/10).



For compatibility with instruments other than that indicated, contact Nuclear Laser Medicine srl.

PROCEDURE

Use fresh or correctly stored (+2/+8°C for up to 2 days or -25/-15°C for longer periods) blood samples. Use only EDTA or Citrate as anticoagulants (do not use heparin).

DNA EXTRACTION

- Manual isolation kit (NLM code AA1001)
- OMNIA LH75 automatic system extraction kit (NLM code AA1319/48) and the most common automatic nucleic acid extraction systems (NLM code AA1185, MagCore extraction; NLM code AA1038, Maxwell extraction; NLM code AA1439/192 Qiasymphony extraction).

For the use of OMNIA LH75 automatic system, follow the instructions provided by Nuclear Laser Medicine srl; for the extraction with other automatic systems, follow the supplier indications.

AMPLIFICATION

Warning

- Avoid using blood samples after repeated freeze/thaw cycles or not correctly stored in order to prevent bad assay results
 - Before use, gently shake the Master Mix and check the absence of residues in the cap
 - Extracted DNA concentration must be about 15-60 ng/μl.
- ⇒ • The Positive Control is for single use only. Discard the remaining material in the tube.

PCR setup in manual

Mix 334

| Reagents | Volume/sample |
|-----------------------------------|---------------|
| Master Mix 334 (blue cap) | 11,5 μl |
| Free DNase, RNase, Protease Water | 4,5 μl |
| DNA | 4 μl |


Mix 472

| Reagents | Volume/sample |
|-----------------------------------|---------------|
| Master Mix 472 (red cap) | 11,5 μl |
| Free DNase, RNase, Protease Water | 4,5 μl |
| DNA | 4 μl |

PCR setup with automatic system

To prepare the PCR with the automatic OMNIA LH75 system, use the protocol provided by Nuclear Laser Medicine srl.

THERMAL PROFILE SETTING AND RESULTS ANALISYS

 For **CFX96 (Biorad)** instrument use, download the Instructions for Use (NLM code **DX007**) from the www.nlm.it. For compatibility with other Real Time PCR instruments, contact *Nuclear Laser Medicine srl*.

THERMAL PROFILE

Setting up *Sample Volume*: 20 µl
Enter the following thermal profile:

- 1 45,0° C for 5:00
 - 2 97,0° C for 2:00
 - 3 97,0° C for 0:15
 - 4 60,0° C for 0:20
 - 5 72,0° C for 0:10
 - 6 **GOTO 3, 39 more times**
 - 7 35,0° C for 2:00
 - 8 97,0° C for 5:00
 - 9 35,0° C for 10:00
 - 10 Melt Curve 35,0 to 75,0° C, increment 0,5° C for 0:03 + Plate Read
- END

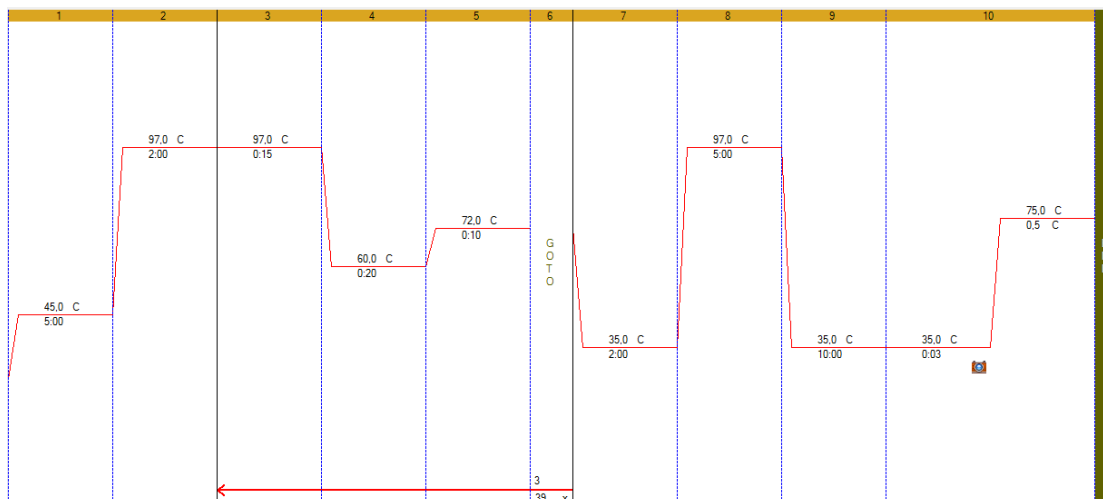


Figure 1. Reproduction of the thermal profile, as displayed in the instrument program.

Plate Setup

- Select *Sample Type* → *Unknown* for the samples to be run
- Select *Fluorophores* → FAM
- Select *Target Name* and enter the description shown in the table below:

| target | fluorophore |
|--------|-------------|
| T334C | FAM |
| C472T | FAM |

- For Positive controls, select: - *Sample Type* → *Positive Control*
- *Sample Name*: Etz ApoE T334C (Positive control for Mix 334)
Etz ApoE C472T (Positive control for Mix 472)
- For Negative controls (No Template Control), select *Sample Type* → *NTC* (*Sample name* of your choosing)

INTERPRETATION OF RESULTS

At the end of the run, the *Data Analysis* window opens automatically.

- Select the *Melt Curve* window: the graph on the left shows the raw data of the melting curve while the graph on the right shows the peaks of the melting curves (analysis -d (RFU)/dT)
- Set up *Peak Type* → Negative

The instrument automatically selects the threshold (blue line): move it at will to eliminate background noise and/or non-specific signals

For each sample, analyze the melting peaks selecting the individual wells on the plate.

Warning: Do not consider peaks out of the temperature range.

Mix 334

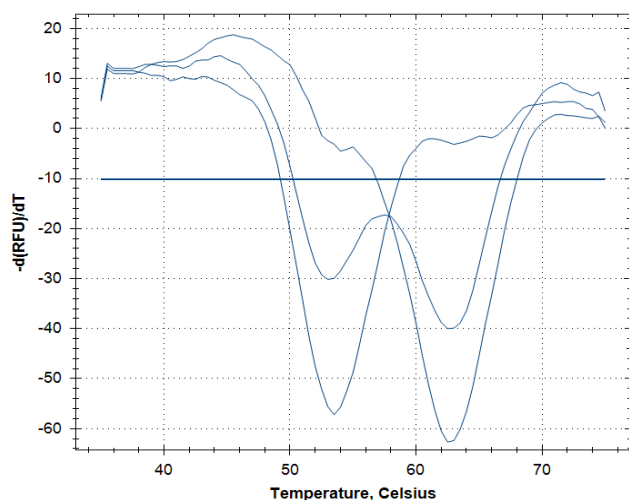
Each sample could have:

- a single peak at $63 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (TT homozygous samples)
- a single peak at $53 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (CC homozygous samples)
- a double peak (TC heterozygous samples)

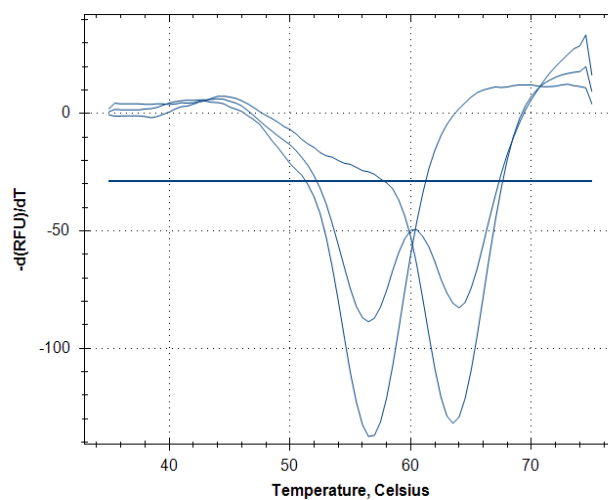
Mix 472

Each sample could have:

- a single peak at $64 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (TT homozygous samples)
- a single peak at $57 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (CC homozygous samples)
- a double peak (TC heterozygous samples)



Example of samples (TT, CC and heterozygous homozygotes) analyzed with **Mix 334**



Example of samples (TT, CC and heterozygous homozygotes) analyzed with **Mix 472**



For automatic interpretation of results and report generation, use the **Real Gene** program following the NLM code **DO022** user manual.



The Positive Control inclusion in the run is optional. Non-compliant CP results do not invalidate the run.

WARNING

As every system based on amplification and detection of nucleic acids, it is possible to have unexpected results in the presence of unknown genetic mutation in the primer and/or probe specific target regions.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of "ApoE Real time (FRET)" kit, expressed as the minimum quantity of the target that can be detected, is 1 ng/μl of DNA (equivalent to 4 ng/reaction). Both Mix were evaluated by testing serial dilutions of DNA corresponding to different genotypes and run following instructions for use.

Diagnostic Sensitivity

Diagnostic sensitivity of "ApoE Real Time (FRET)" kit was assessed by analyzing 126 DNA samples corresponding to the six different genotypes analyzed from this device.

All samples were correctly genotyped, resulting in a diagnostic sensitivity of 100%.

Diagnostic Specificity

The specificity "ApoE Real Time (FRET)" kit was determined by analyzing 126 DNA samples corresponding to the six different genotypes. No false positive results were obtained.

In agreement with these data the specificity of the kit is 100%.

Reproducibility

Intra-assay reproducibility

Intra-assay reproducibility was assessed by analyzing 3 samples of different genotype in 4 replicates in the same run and on different instruments.

Inter-assay reproducibility

Inter-assay reproducibility was assessed by analyzing 3 samples of different genotype in 4 replicates in different run and on different instruments.

On the basis of the results obtained the reproducibility is 100%.

