



**imegen**

Bringing  
genomics  
to health



## Instrucciones de Uso

### imegen<sup>®</sup> APOE

Genotipado de los cambios *p.Cys112Arg* y *p.Arg158Cys* del gen *APOE* mediante PCR a tiempo real con sondas TaqMan

**REF** IMG-220

Fabricado por:

Instituto de Medicina Genómica SL  
Agustín Escardino 9,  
Parc Científic de la Universitat de València  
46980 Paterna (Valencia, España)  
+34 963 212 340 - info@imegen.es

[imegen.es](http://imegen.es)

Rev. 3. 24/01/2019





# imegen

Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación.

Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

**Nuestros productos están diseñados para uso en diagnóstico *in vitro*.** Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit **imegen<sup>®</sup> APOE** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

**Teléfono:** 963 212 340

**e-Mail:** [tech.support@imegen.es](mailto:tech.support@imegen.es)

**imegen<sup>®</sup>** es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

Modificaciones de las Instrucciones de Uso [IFU]	
Versión 03	Cambio introducido: Adaptación a los requisitos del Reglamento [UE] 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i> .



**imegen**

## Índice

<b>1. Información general</b>	<b>4</b>
<b>2. Uso previsto</b>	<b>5</b>
<b>3. Características técnicas</b>	<b>5</b>
<b>4. Advertencias y precauciones de seguridad</b>	<b>6</b>
<b>5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit</b>	<b>7</b>
<b>6. Equipos y materiales necesarios que no se suministran</b>	<b>8</b>
<b>7. Protocolo de ensayo</b>	<b>9</b>
7.1 Preparación de las reacciones de amplificación	9
7.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real	9
<b>8. Análisis de los resultados</b>	<b>11</b>
<b>9. Troubleshooting</b>	<b>13</b>
<b>10. Limitaciones</b>	<b>14</b>
10.1 Equipos	14
10.2 Reactivos	14
10.3 Estabilidad del producto	14



## 1. Información general

El gen *APOE*, localizado en la región cromosómica 19q13.32, codifica la apolipoproteína E, una proteína que transporta lipoproteínas, vitaminas liposolubles y colesterol hacia el sistema linfático y la sangre. Esta proteína se sintetiza en hígado, cerebro, riñón y bazo. En el sistema nervioso, los tipos de células que no son neuronas, principalmente, los astrocitos y la microglía, son los productores de APOE, mientras que muchas neuronas tienden a expresar los receptores de APOE.

Se han descrito 3 isoformas principales de la apolipoproteína E (apoE2, apoE3 y apoE4), codificadas, respectivamente por los alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ . Estas isoformas difieren en la secuencia de aminoácidos en dos posiciones llamadas A [p.Cys112Arg] y B [p. Arg158Cys]. En A/B, la isoforma apoE2 presenta: cisteína/cisteína; la isoforma apoE3: cisteína/arginina; la isoforma apoE4: arginina/arginina.

Se ha descrito una asociación entre los alelos que posee un individuo y la predisposición a padecer Alzheimer. El alelo  $\epsilon 3$  se considera el alelo más frecuente y el que no presenta riesgo aumentado de padecer la enfermedad de Alzheimer, mientras que la presencia del alelo  $\epsilon 4$  se asocia con un incremento en el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer; y el alelo  $\epsilon 2$  se presenta un efecto protector respecto al riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer.

### Referencias

- Corder et al [1994]. Nat Genet 7: 180-184
- Scarmeas et al [2002]. Neurology 58: 1182-1188.



**imegen**

## 2. Uso previsto

El kit **imegen-APOE** emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un ensayo de PCR a tiempo real validado para detectar los cambios p.Cys112Arg [rs429358] y p. Arg158Cys [rs7412] del gen *APOE* asociados a la predisposición a padecer Alzheimer.

Cada sistema de PCR a tiempo real multiplexado, ofrece un ensayo que analiza la presencia del alelo  $\epsilon 3$  y la presencia del alelo  $\epsilon 2$  o del alelo  $\epsilon 4$ . Además, utiliza como control positivo una mezcla de ADN que simulan una muestra heterocigota para cada uno de los dos sistemas, para el análisis cualitativo.

**Imegen-APOE** es sólo para uso diagnóstico in vitro y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

## 3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras previamente analizadas por la Unidad de Genética Médica de imegen mediante secuenciación Sanger, confirmando la robustez y especificidad del ensayo genético.

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario es 250 ng.

Este producto cumple con los requisitos de calidad especificados por la ISO 13845 en lo referente a los materiales empleados en su proceso de fabricación.



**imegen**

## 4. Advertencias y precauciones

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.



imegen

## 5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 48 determinaciones. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- APOE-M1 Master Mix: Contienen oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes para la detección específica de los alelos  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 3$ .
- APOE-M2 Master Mix: Contienen oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes para la detección específica de los alelos  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 3$ .
- General Master Mix: Master Mix de PCR con los nucleótidos,  $MgCl_2$ , polimerasa de ADN y buffer necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- Positive Control: Control positivo para la amplificación simultánea de los alelos objeto de análisis. El control positivo simula una muestra heterocigota para los polimorfismos analizados.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
APOE-M1 Master Mix	Disco verde	2 x 180 $\mu$ l	-20°C
APOE-M2 Master Mix	Disco morado	2 x 180 $\mu$ l	-20°C
General Master Mix	Disco blanco	1320 $\mu$ l	4°C
Positive Control	Tapa verde	1 x 200 $\mu$ l	-20°C

Tabla 1. Componentes del kit imegen-APOE



**imegen**

## 6. Equipos y materiales no suministrados

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canales FAM y VIC)
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L
- Vortex
- Centrífuga

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Guantes de látex



## 7. Protocolo de ensayo

### 7.1 Preparación de las reacciones de amplificación

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Para llevar a cabo el análisis cualitativo, se deben preparar dos reacciones de amplificación por muestra (con los mixes APOE M1 y APOE M2) incluir un control negativo de PCR por cada master mix preparada, para descartar contaminación de los reactivos, y un control positivo para garantizar el buen funcionamiento del programa de amplificación.

**IMPORTANTE:** Si en el análisis de resultados se quiere utilizar la herramienta “*auto-calling*” para obtener el genotipado de una muestra automáticamente con el software de análisis, se debe incluir un control positivo y un control negativo en el ensayo.

A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

1. Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras. Agitar cada uno de los reactivos en vortex y mantener en frío.
2. En un tubos de 1.5 mL preparar los mixes de PCR añadiendo los siguientes reactivos por muestra:

Reactivos	Cantidad por reacción	
	Mix APOE M1	Mix APOE M2
General Master Mix	12.5 µL	12.5 µL
APOE M1 Master Mix	7.5 µL	-
APOE M2 Master Mix	-	7.5 µL

3. Agitar en vortex y dar spin al mix de PCR y dispensar 20 µL en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.
4. Añadir 5 µL de las muestras diluidas a una concentración de 25 ng/µL y 5 µL del control positivo, o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los pocillos correspondientes.
5. Colocar los tubos o placas en el termociclador de PCR a tiempo real y configurar el programa de amplificación tal y como se indica en el siguiente apartado.



## 7.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real

- Tipo de experimento: Quantitations
- Velocidad de rampa: Standard
- Volumen de reacción: 25 µL
- Referencia basal ROX™: incluida
- Fluoróforos de las sondas TaqMan®:

Mix de PCR	Sonda	Receptor	Genotipado	Quencher
APOE-M1	APOE-M1-ε4	VIC®	ε4	MGB
	APOE-M1-ε3	FAM™	ε3	MGB
APOE-M2	APOE-M2-ε3	VIC®	ε3	MGB
	APOE-M2-ε2	FAM™	ε2	MGB

Tabla 2. Información de las sondas

- Programa óptimo:

Campos	Etapa 1	Etapa 2		
	Activación enzimática	PCR		
Nº de Ciclos	1 ciclo	50 ciclos		
		Desnaturalización	Unión de oligonucleótidos	Extensión
Temperatura	95 °C	95 °C	55 °C	68 °C
Tiempo	10 minutos	15 segundos	30 segundos *	30 segundos

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne (Thermo Scientific)

\*Detección de la fluorescencia

## 8. Análisis de resultados

Para un correcto análisis de los resultados se recomienda seguir las siguientes indicaciones:

- Comprobar que en los controles negativos no hay amplificación, ni en el canal FAM ni en el canal VIC. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el ensayo para descartar que se haya producido una contaminación accidental.
- Comprobar que para el control positivo, tanto para el sistema M1 como para el sistema M2, hay señal de amplificación en los canales FAM y VIC.
- Para analizar las muestras hay que emplear un software específico del termociclador de PCR a tiempo real utilizado.

A continuación se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit **imegen-APOE**.

### SISTEMA APOE-M1:

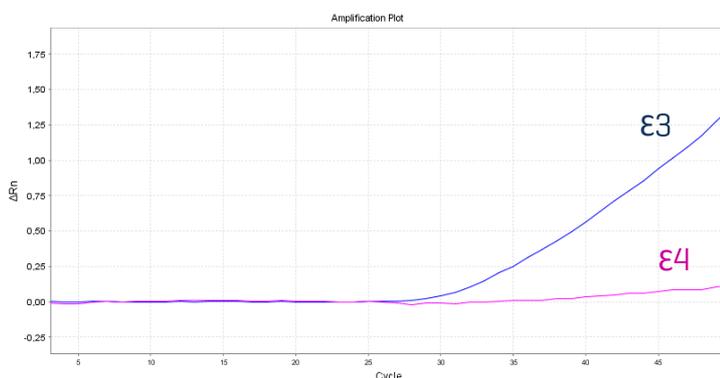


Figura 1. Resultado obtenido a partir de una muestra con genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Se observa amplificación en el canal FAM [en azul] y una leve señal residual en el canal VIC.

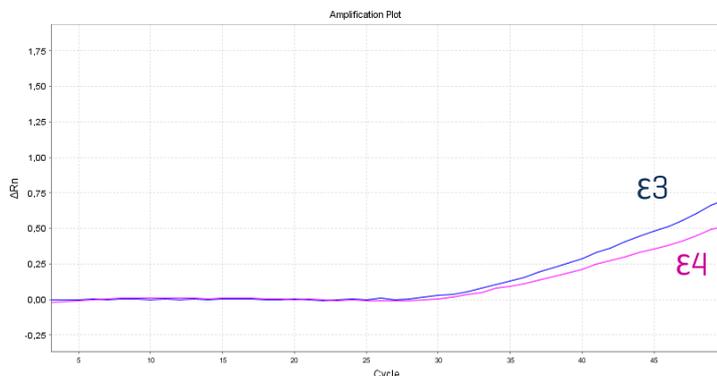


Figura 2. Resultado obtenido a partir de una muestra con genotipo  $\epsilon 4/\epsilon 3$  o del control positivo. Se observa amplificación en ambos canales, siendo mayor en el canal FAM que en el canal VIC.

El genotipo  $\epsilon 4/\epsilon 4$  resultaría en una señal de amplificación en el canal de VIC.

**SISTEMA APOE-M2:**

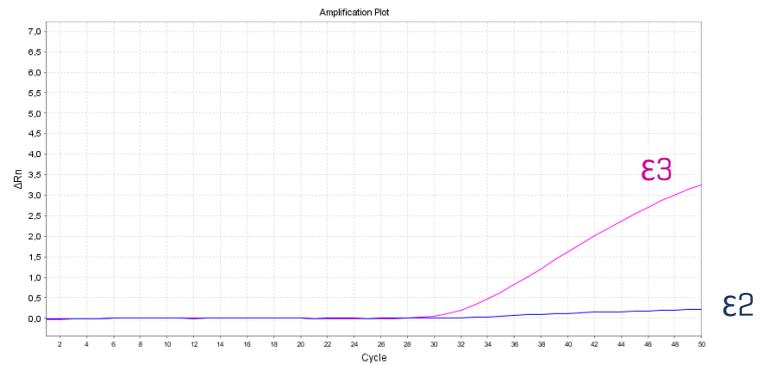


Figura 3. Resultado obtenido a partir de una muestra con genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Se observa amplificación en el canal VIC (en rosa) y una leve señal residual en el canal FAM (en azul).

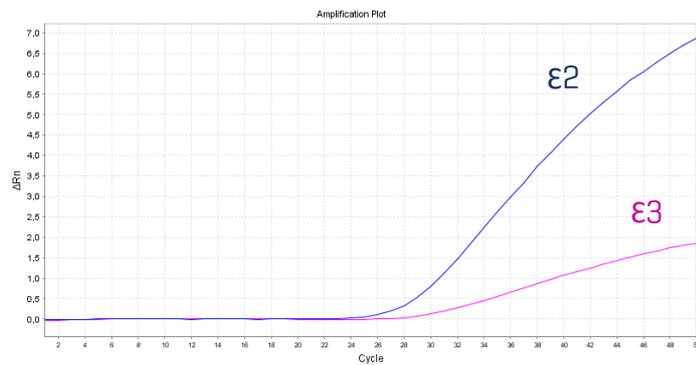


Figura 4. Resultado obtenido a partir de una muestra con genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 3$  o del control positivo. Se observa amplificación en ambos canales, siendo mayor en el canal FAM (en azul) que en el canal VIC (en rosa).

El genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$  resultaría en una señal de amplificación en el canal FAM.



## 9. Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación presenta gráficamente los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles y una muestra en un ensayo, así como su interpretación:

Controles o muestras	Resultado		Causa
	FAM	VIC	
Control positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo de amplificación en la PCR <sup>1</sup>
Muestra ADN	+	+	Resultado esperado
	+	-	
	-	+	Fallo de amplificación de la muestra <sup>2</sup>
Control negativo de PCR	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano <sup>3</sup>
	+	-	
	-	+	

Tabla 4. Interpretación de los posibles resultados

- <sup>1</sup> **Fallo de amplificación en la PCR:** Compruebe el programa de amplificación y la configuración de captura de la fluorescencia. Un fallo en la amplificación puede deberse a un problema técnico en la configuración del programa de PCR.
- <sup>2</sup> **Fallo de amplificación de la muestra:** Compruebe que la cuantificación de la muestra es la recomendada, si fuese así el resultado especificado puede deberse a que la muestra se encuentre altamente degradada.
- <sup>3</sup> **Contaminación de la PCR con ADN de humano:** La contaminación de la PCR puede deberse a un manejo equivocado de la muestra, al uso de reactivos contaminados o a contaminación de origen ambiental. Limpie minuciosamente el laboratorio donde se ha preparado la PCR, así como los equipos y el material utilizados. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR. Prepare en último lugar la reacción de PCR que contiene el control positivo, con el fin de evitar la contaminación cruzada. En este caso se recomienda repetir el ensayo.



**imegen**

## 10. Limitaciones

### 10.1 Equipos

**imegen-APOE** ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- 7500 FAST Real-Time PCR System [ThermoFisher Scientific]
- StepOne Real-Time PCR System [ThermoFisher Scientific]
- StepOne Plus Real-Time PCR System [ThermoFisher Scientific]

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

### 10.2 Reactivos

**imegen-APOE** se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual [Equipos y materiales necesarios que no se suministran].

### 10.3 Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.