

## Artikelen

### ApoE genotypering van formaline-gefixeerd paraffine-ingebed hersenweefsel

L. A. P. BALLERING<sup>1</sup>, H. M. STEFFENS-NAKKEN<sup>1</sup>, R. A. J. ESSELINK<sup>2</sup>, R. A. I. de VOS<sup>3</sup>, E. N. H. JANSEN STEUR<sup>2</sup>  
en I. VERMES<sup>1</sup>

Er is een groeiende belangstelling om apolipoproteïne E (ApoE) genotyperingen uit te voeren op neuropathologisch archiefmateriaal. Eén van de moeilijkheden met dit materiaal is de lange fixatietijd waardoor DNA onbruikbaar wordt voor een normale ApoE-genotypering (PCR gevolgd door restrictie). In dit artikel wordt een ApoE-genotypering beschreven voor formaline-gefixeerd paraffine-ingebed hersenweefsel, gebruik makend van een "semi-nested" PCR en hybridisatie met biotine-gelabelde allelspecifieke oligonucleotiden en chemiluminescente detectie. Met deze techniek kan 76% (67/88) van de monsters getypeerd worden. De cruciale stap is de "semi-nested" PCR; van alle monsters waarbij een PCR-product werd verkregen kan het ApoE-genotype zonder interpretatiemoeilijkheden bepaald worden. Zestien van de eenentwintig (76%) monsters die niet getypeerd konden worden, waren gefixeerd in ongebufferde formaline, hetgeen DNA meer degradeert dan gebufferde formaline. DNA geïsoleerd uit temporale schors en hippocampus waren significant slechtere bronnen voor de PCR (uitvalspercentages: 64% en 87%, resp.) dan frontale schors en cerebellum (uitvalspercentages: 16% en 11%, resp.). Deze techniek lijkt een goede mogelijkheid te bieden voor de ApoE-genotypering van neuropathologisch archiefmateriaal ter ondersteuning van klinische studies.

*Trefwoorden: apolipoproteïne E; genotypering; formaline-gefixeerd; paraffine; archiefmateriaal; "nested" PCR; hybridisatie*

Naar aanleiding van de ontdekking van een correlatie tussen het apolipoproteïne E (ApoE)-e4-genotype en de sporadische en familiale vorm van "late onset" ziekte van Alzheimer (AD)(1-3) is er een hausse ontstaan in de ApoE-genotypering van klinische AD-patiënten. Naast AD is er voor verschillende andere neurodegeneratieve aandoeningen (ziekte van Parkinson (4), Lewy Body disease (5), vasculaire

dementie (6), amyotrofe lateraal sclerose/parkinsonisme-dementie complex (7), ziekte van Creutzfeldt-Jakob (8)) en/of atherosclerotische aandoeningen (9) een relatie gevonden met een ApoE-genotype, maar de relatie is zwak of wordt tegengesproken en de bestudeerde patiëntengroepen zijn vaak klein. Zelfs voor de meest duidelijke relatie tussen het ApoE-genotype en een ziektebeeld (AD) is er een overeenstemming dat de genotypering niet als routine klinische diagnose of voorspellende test voor AD gebruikt mag worden (10-12). De moleculaire basis van het ApoE-polymorfisme bestaat uit twee puntmutaties: een CG-TA transitie die codon 158 verandert van arginine (allel e3) in cysteine (allel e2) en een TA-CG transitie die codon 112 verandert van cysteine (allel e3) in arginine (allel e4). Er zijn verschillende methoden voor genotypering bekend waarvan de meeste uitgaan van amplificatie van een gedeelte van het ApoE-gen, dat de polymorfe plaatsen bevat, met de polymerase chain reaction (PCR). Restrictie met het *HhaI/CfoI* (13,14) is de meest gangbare en meest eenvoudig uit te voeren methode, maar ook hybridisatie met radioactief gelabelde allelspecifieke oligonucleotiden (ASO hybridisatie (15)), "single strand conformational polymorphism" (SSCP) (16), "amplification refractory mutation system" (ARMS) (17) en direct sequencen van het PCR-amplificaat (18) is mogelijk. Al deze genotyperingen zijn in principe goed bruikbaar op DNA uit bloedmonsters en vers ingevroren weefsel. Maar om een duidelijke correlatie te kunnen leggen tussen een ApoE-genotype en een neuropathologische aandoening is het van belang dat er grote hoeveelheden archiefmateriaal onderzocht worden voor retrospectief onderzoek. Afhankelijk van het fixatief en het te fixeren weefsel is het goed mogelijk om DNA te extraheren uit gefixeerd paraffine-ingebed weefsel en dit te gebruiken voor een PCR-reactie (19,20). De moeilijkheid met neuropathologisch archiefmateriaal, meestal formaline gefixeerd paraffine-ingebed hersenweefsel, is de lange fixatietijd ( $\geq 3$  weken) waardoor het DNA wordt afgebroken en niet meer is te gebruiken voor de boven beschreven ApoE genotyperingen (21-23). In dit artikel wordt een genotypering beschreven om in formaline-gefixeerd paraffine-ingebed hersenweefsel de drie meest voorkomende allelen van het ApoE-gen te typeren, gebruik makend van een "semi-nested" PCR in combinatie met ASO-hybridisatie en chemiluminescente detectie.

*Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Afdeling Neurologie<sup>2</sup>, Medisch Spectrum Twente en Stichting Laboratorium Pathologie Oost Nederland<sup>3</sup>, Enschede.*

Correspondentie: Dr. I. Vermes, Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Postbus 50 000, 7500 KA Enschede.

Ingekomen: 14.06.96

## MATERIAAL en METHODEN

### Patiëntengroepen

Formaline-gefixeerd paraffine-ingebied hersenmateriaal van drie verschillende patiëntengroepen met neurodegeneratieve afwijkingen (ziekte van Alzheimer (n=30)), Lewy Body disease (klinisch: dementie; n=6) en Lewy Body disease (klinisch: ziekte van Parkinson (n=33)) en van een patiëntengroep zonder neuropathologische afwijking en/of atherosclerose (n=19) is onderzocht. In totaal werd er dus van 88 paraffine monsters DNA geïsoleerd. Het protocol voldoet aan de lokale ethische standaarden en de verklaring van Helsinki van 1957, zoals gewijzigd in 1983. Coupes van vier verschillende hersendelen waren beschikbaar voor DNA-isolatie: cerebellum (n=38), frontale schors (n=31), temporale schors (n=11) en hippocampus (n=8).

### Materiaal

Het hersenweefsel werd maximaal 21 dagen gefixeerd in gebufferde formaline (10,0% formaline (Chemproha, Zwijndrecht); 0,037% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,16% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O). De monsters van voor 1990 zijn gefixeerd in 10,0% ongebufferde formaline. Het gefixeerde hersenweefsel werd routinematig ingebied in paraffine (Sherwood Medical Co., St. Louis, USA) bij 62°C.

### DNA-isolatie

Van elk monster (van het paraffine-ingebied hersenweefsel) worden zeven coupes à 10 µm per reactievaatje ontdaan van paraffine door twee maal 20 min te incuberen met 1 ml meta-xyleen. Vervolgens wordt de pellet gewassen met 96% ethanol. Uit de droge pellet wordt DNA geïsoleerd met behulp van de QIAamp tissue kit (QIAGEN, Leusden) in overeenstemming met de aanwijzingen van de fabrikant.

### PCR

De "semi-nested" PCR: voor de buitenste PCR werd gebruik gemaakt van de volgende primers P1 (5'-AAC AAC TGA CCC CGG TGG CG-3') (13) en JP3 (5'-CTC GCG GAT GGC GCT GAG G-3') (14). Het reactiemengsel bestond uit 10 µl (±100 ng) genomisch DNA, 1x PCR Buffer (50 mM KCl, 100 mM Tris.HCl, 0,1% (w/v) gelatine, pH 8,3), 5% DMSO, 200 µmol dNTP, 25 pmol van elke primer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U Taq polymerase (Perkin Elmer, Gouda) in een totaal volume van 50 µl. Het mengsel werd 5 min verhit bij 95°C gevolgd door 40 cycli van 1 min 95°C, 1 min 64°C en 2 min 72°C. Om alle strengen volledig te verlengen werd afgesloten met 10 min 72°C. Deze PCR geeft een product van 298 bp.

Tien µl van het eerste/buitenste PCR-product werd gebruikt voor de tweede PCR, die dezelfde is als de hierboven beschreven PCR maar met de primer JP5 (5'-CGG CCA CGG CTG TCC AAG C-3') (14) in plaats van primer P1. Het product dat uiteindelijk gevormd wordt is 270 bp lang en wordt gecontroleerd via elektroforese op een 2% agarosegel (Agarose High-m, Bio-Rad, Veenendaal). De PCR-reacties

vonden plaats in een 480 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer). Als negatieve controle voor de PCR-reactie werd bij de buitenste PCR een "watercontrole" meegenomen. Tien µl van dit mengsel ná de PCR werd, naast een normale "watercontrole", gebruikt als negatieve controle in de binnenste PCR. Indien deze beide "watercontroles" van de binnenste PCR negatief zijn, kan men ervan uitgaan dat er geen contaminatie is opgetreden.

### Restrictie met *Cfol*

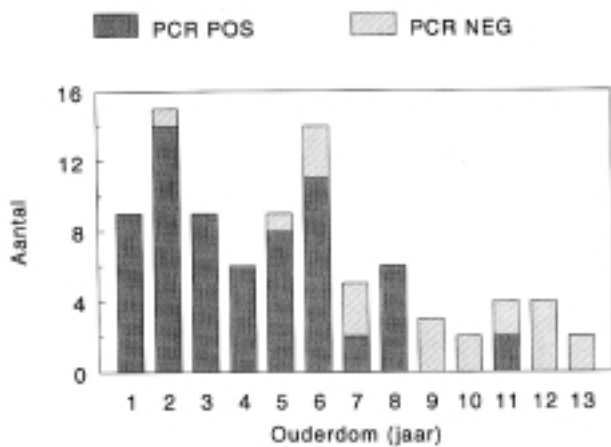
Voor de restrictie met *Cfol* werd 40 µl PCR-product gemengd met 2 µl restrictiebuffer "L" (Boehringer Mannheim, Almere), 2 µl gedestilleerd water en 1 µl (10 U) *Cfol* (Boehringer Mannheim) en 4 uur geïncubeerd bij 37°C (12). Het restrictie-patroon werd afgelezen na elektroforese van 40 µl restrictie-product op een 10% polyacrylamide gel (mono:bis 19:1, Bio Rad) en nakleuring met ethidiumbromide.

### ASO-hybridisatie met chemiluminescente detectie van biotine-gelabelde probes

Twee µl "semi-nested" PCR-product (in 0,4 M NaOH, 10 mM EDTA) werd gedenateerd bij 95°C gedurende 10 min en geblot op een nylon<sup>+</sup> membraan (Boehringer Mannheim) gevolgd door "crosslinking" met UV (254 nm) gedurende 3 min. De blot wordt geprehybriseerd (1 uur bij 55°C) in hybridisatiebuffer (1 mM EDTA; 70 g/L SDS natrium dodecyl sulfaat; 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; pH 7,2).

Hybridisatie werd uitgevoerd met allel-specifieke oligonucleotides (13) Arg112: (5'-GAG GAC GTG CGC GGC CGC-3') voor de detectie van allel e4, Cys112 (5'-GCG GCC GCA CAC GTC CTC-3') en Arg158 (5'-CTG CAG AAG CGC CTG GCA G-3') voor de detectie van allel e3 en Cys158 (5'-CTG CCA GGC ACT TCT GCA G-3') voor de detectie van allel e2. Deze oligonucleotides werden allen 3'-gebiotinyleerd met "terminal deoxynucleotide transferase" (Gibco BRL, Breda), BIO-16-2'dUTP (Boehringer Mannheim) en 2'dATP (Pharmacia, Woerden) in een molaire ratio van 1:10 bij 37°C gedurende 4 uur. Voor de incubatie met de hybridisatiebuffer, werd de probe (0,5 pmol/ml) gedenateerd gedurende 5 min bij 95°C. Hybridisatie vond plaats gedurende 2 uur bij 55°C. De blots werden gewassen met 2xSSC (17,5 g/l NaCl, 8,8 g/l natriumcitraat, pH 7,0), 1,0% (w/v) SDS, 2 keer 5 min bij kamertemperatuur (KT), twee keer 15 min bij 62°C (voor Arg112 en Cys112) of 60°C (voor Arg 158 en Cys158) met 1xSSC, 1,0% (w/v) SDS, twee keer 5 min met 1xSSC bij KT en 1 keer 1 min bij KT met 100 ml wasbuffer (0,1 M maleaat zuur, 0,15 M NaCl) en 3 ml/l Tween-20.

Om specifieke binding van het streptavidine-alkalische fosfatase complex (AVIDx-AP; Tropix, Leusden) te voorkomen, werd de membraan geblokt gedurende 30 min bij KT met blokkbuffer I (1 g caseïne (Sigma, Meppel) in 100 ml wasbuffer) en gedurende 15 min bij KT met blokkbuffer II (3 g caseïne, 1 g PVP (polyvinylpyrrolidone, Sigma) in 100 ml wasbuffer). De blot werd geïncubeerd gedurende 15 min bij KT met AVIDx-AP 0,05% (v/v) in blokkbuffer I.



**Figuur 1.** Succes van de “semi-nested”-PCR in relatie tot de ouderdom van de monsters.

De blot werd vier keer 5 min gewassen in 3% (v/v) PBS (fosfaat gebufferde saline)/Tween 20 en vervolgens twee keer bij KT in assaybuffer (0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1% (w/v) diethanolamine (DEA, Tropix), pH 10). Daarna werd de blot geïncubeerd gedurende 5 min bij KT met chemiluminescent substraat CSPD (Tropix); 1% (v/v) in assaybuffer en blootgesteld aan een standaard röntgenfilm gedurende 30 min. De genotypering m.b.v. ASO-hybridisatie werd tijdens de kalibratie en (later) routinematig gecontroleerd met alle verschillende ApoE-genotypes waarvan de restrictie-genotypering geverifieerd was door verschillende klinisch-chemische laboratoria.

## RESULTATEN

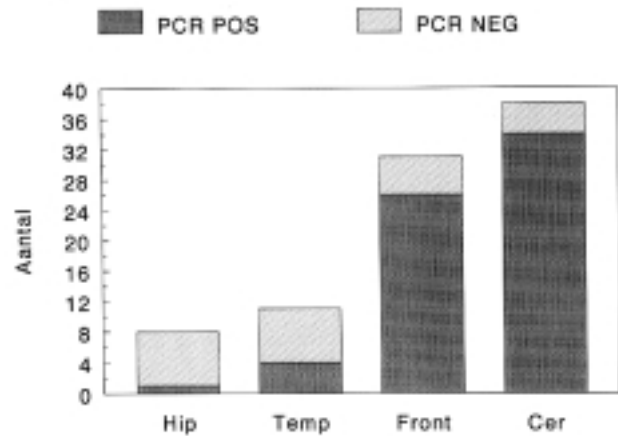
### PCR

De ApoE-PCR, zoals die routinematig door ons wordt gebruikt op DNA uit bloed en vers ingevroren weefsel (14), gaf in geen van de 88 formaline-gefixeerde paraffine-ingebede monsters een PCR-product. Naar aanleiding van suggesties uit de literatuur (24,25) werd er besloten tot een “nested”-PCR met als buitenste primers P1 en P2 (13). Door de grote mate van overlap met de “nested primers” JP3 en JP5 (14) gaf deze opzet echter slechtere resultaten dan de “semi-nested” benadering zoals beschreven in Materiaal en Methoden (resultaten niet getoond). In 21 van de 88 monsters (24%) werd geen PCR-product verkregen met de “semi-nested”-PCR. Van de overige 67 monsters werd wel het verwachte PCR-product verkregen van de juiste lengte (270 bp). Tussen de

**Tabel 1.** DNA-zuiverheid en opbrengstvergelijking tussen DNA, dat wel en geen ApoE-PCR-product geeft met de semi-nested PCR.

	DNA-Zuiverheid*		DNA-inhoud (µg/ml)	
	Gem. ± SD	range	Gem. ± SD	range
Wel PCR-product	1,80	1,38-1,94	55,9	11-98
Geen PCR-product	1,87	1,65-2,07	43,8	29-76

\*: DNA-zuiverheid berekend uit de ratio van de absorbtie bij 260 nm resp. 280 nm



**Figuur 2.** Succes van de “semi-nested”-PCR in relatie tot de herkomst van de monsters Hip: Hippocampus; Temp: temporale schors; Front: frontale schors; Cer: cerebellum.

groepen met wel of geen PCR-resultaat bleek geen verschil in opbrengst en zuiverheid van het geëxtraheerde DNA, zoals getest met de A260/A280 ratio, meetbaar (tabel 1). Op het DNA waarvan geen ApoE-PCR-product werd verkregen zijn, zonder resultaat, controle PCR-reacties uitgevoerd op het Factor-V-gen en het β-globine-gen (data niet getoond); het geëxtraheerde DNA is waarschijnlijk te zeer afgebroken om er een PCR-reactie op uit te voeren. Zoals getoond in figuur 1 is een groot deel (62%) van de monsters, waarbij geen DNA werd geamplificeerd, ouder dan 8 jaar. De lokalisatie van de gebruikte hersendelen lijkt enige invloed te hebben op het welslagen van de gebruikte PCR (figuur 2). Formaline-gefixeerde hippocampus en temporale schors blijken slechte DNA-bronnen te zijn voor de “semi-nested”-PCR. In resp. 88% en 64% van deze monsters was het niet mogelijk een PCR-product te verkrijgen. Frontale schors en cerebellum, daarentegen, gaven significant ( $p < 0,05$ ) betere resultaten; het percentage zonder opbrengst bij deze monsters was 16% en 11%, respectievelijk.

### Restrictie

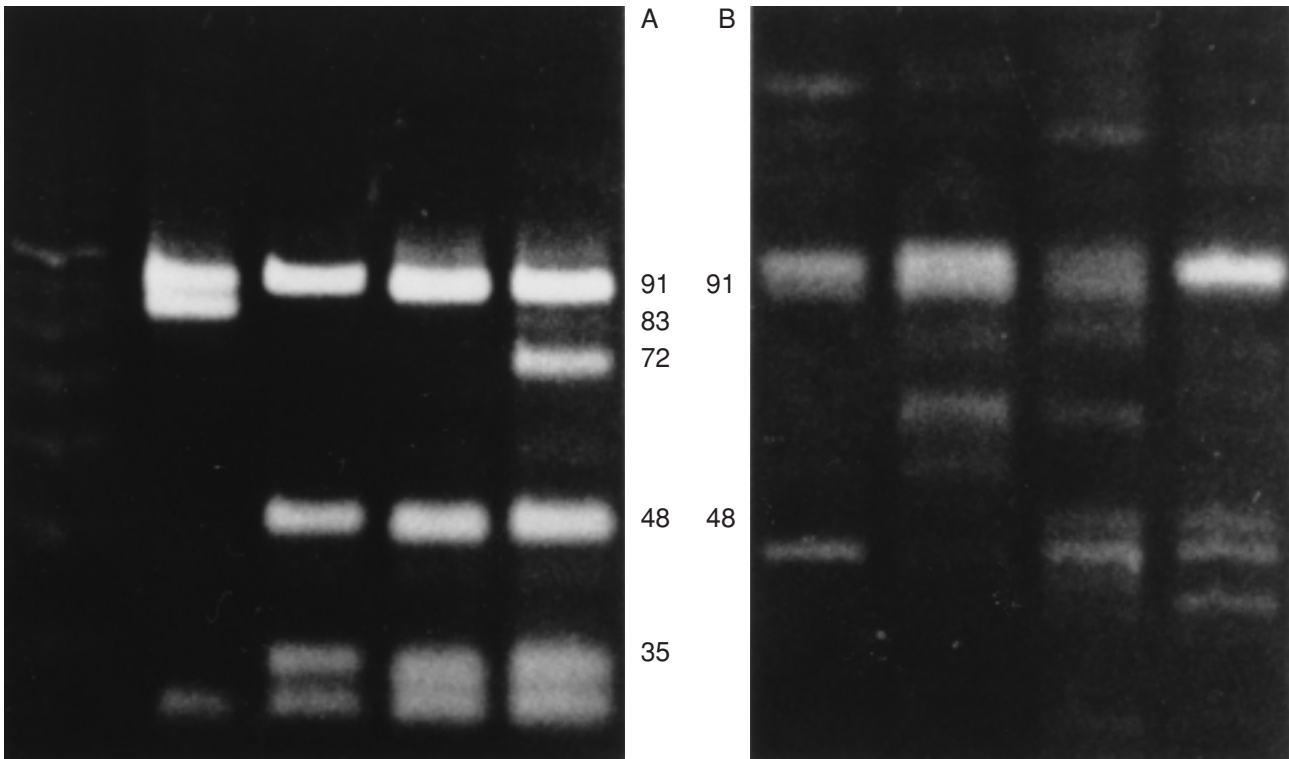
Bij een normale (zie Materialen en Methoden) restrictie-analyse met *Cfol* geven de verkregen PCR-producten van DNA uit formaline-gefixeerd paraffine-ingebede hersenweefsel geen interpreteerbare resultaten (zie figuur 3).

### ASO-Hybridisatie

In tegenstelling tot de restrictie geeft de hybridisatie met biotine-gelabelde allelspecifieke oligonucleotide (ASO) probes, gericht tegen de polymorfe plaatsen op het ApoE-gen, wel goed interpreteerbare resultaten. In alle gevallen waar een “semi-nested” PCR-product werd verkregen, kon het ApoE-gen getypeerd worden. In geen van de gevallen is er aspecificiteit (kruishybridisatie) waargenomen en altijd waren de “watercontroles” van de PCR negatief. De genotypering via de ASO-hybridisatie is niet afhankelijk van de hoeveelheid gevormd PCR-product (resultaten niet getoond). In tegenstelling tot Eggertsen et al. (26) hebben wij in geen van de 88 monsters interpretatiemoelijkheden gekend.

MOL  
 MARKER E2/E2 E3/E3 E3/E3 E3/E4

? ? ? ?



**Figuur 3.** Resultaat van een restrictie met *Cfol* op A: vers ingevroren hersenmateriaal en B: formaline-gefixeerd paraffine-ingebed hersenmateriaal.

Met de ASO-hybridisatie werden in de patiëntengroepen en de controles alle genotypes gevonden, behalve e4/e4, (data niet getoond). Tijdens de genotypering m.b.v. ASO-hybridisatie worden telkens alle verschillende ApoE-genotypes als in-run controle meegenomen.

### DISCUSSIE

Van de 88 monsters werd bij 67 (76%) een PCR-product van de juiste lengte verkregen met de “semi-nested”-PCR. Uit de literatuur (19-21) is bekend dat het fixatief en de fixatietijd van het monster van groot belang zijn voor het welslagen van een PCR-reactie. Gebufferde formaline (10%) verdient de voorkeur boven fixatieven als Zamboni’s, Clarke’s of paraformaldehyde. Weefsels gefixeerd met Zenker’s-, Carnoy’s- of Bouin’s fixatief zijn praktisch onbruikbaar voor DNA-isolatie (19). Vóór 1990 werd het hier gebruikte hersenmateriaal gefixeerd in niet-gebufferde formaline, wat een verklaring kan zijn voor het feit dat bij maar 38% van de monsters van voor 1990 een PCR-product werd verkregen. In een studie naar het gebruik van neuropathologisch materiaal voor de PCR lieten Kösel en Graeber (21) zien dat het mogelijk is om DNA te extraheren uit een 26 jaar oud monster gefixeerd in 3,7% ongebufferde “low-grade” formaline, maar dat de DNA-opbrengst exponentieel afneemt met de fixatietijd. Gall et al. (23) lieten zien dat formaline-gefixeerd hersenweefsel van 39 jaar oud gebruikt kan worden voor DNA-isolatie en PCR. Als de monsters, die gefixeerd werden met

gebufferde formaline, worden vergeleken met die gefixeerd in ongebufferde formaline dan stijgt het percentage monsters waarbij een PCR-product verkregen werd van 38% naar 92%. Een ouderdomsafhangelijk effect is echter niet uit te sluiten. Van alle monsters waarvan een PCR-product werd verkregen kon een ApoE-genotype worden bepaald met de ASO-hybridisatie methode. In overeenstemming met de literatuur (21) werd er geen correlatie gevonden tussen het wel of niet slagen van de PCR-reactie en de DNA-opbrengst uit de isolatie. Dit onderzoek toont ook aan dat de zuiverheid van het geëxtraheerde DNA geen rol speelt bij het welslagen van de PCR (tabel 1).

De enige andere ApoE-genotypering op formaline-gefixeerd paraffine-ingebed hersenweefsel (27) maakt gebruik van een enkele PCR (43 cycli) die elk, rond een van de twee polymorfe plaatsen van het ApoE-gen, een klein PCR-product (115 en 119 bp) oplevert. De analyse van de verschillende allelen vindt plaats m.b.v. *Cfol*-restrictie. In onze handen was de restrictie-analyse op fragmenten van 270 bp, verkregen na “(semi)nested”-PCR (totaal 80 cycli) geen succes (zie figuur 3). De combinatie van “semi-nested”-PCR met ASO-hybridisatie op DNA uit formaline-gefixeerd paraffine-ingebed hersenmateriaal levert eenduidige en betrouwbare resultaten op. Het is bekend, dat door te proberen kleinere fragmenten te amplificeren, de kans groter is een PCR-product te krijgen (21). Een combinatie van de twee methoden (kleine PCR-fragmenten en ASO-hybridisatie) zou de kans op een (goede) ApoE-genotypering verder verhogen.

## Dankwoord

Hierbij willen wij Drs. J. Prins, Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Utrecht en Mw. L. Walter, Afd. Moleculaire Biologie van het Laboratorium, Slotervaart Ziekenhuis, Amsterdam bedanken voor de verifiëring van de verschillende ApoE-genotypes. Tevens danken wij H. Begthel, L. Stokkink en O. Slotman van de Stichting Laboratorium Pathologie Oost Nederland voor het bewerken van de weefsels. De auteurs zijn Dr. F.A.J.T.M. van den Bergh zeer erkentelijk voor het commentaar en kritisch doorlezen van het manuscript.

## Literatuur

1. Corder EH, Saunders AM, Schmechel D, Gaskell PC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, et al. Gene dose of apolipoprotein-E type-4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-923.
2. Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4725-4727.
3. Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau M-A, Visvikis S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995; 41: 1068-1086.
4. Arai H, Muramatsu T, Higuchi S, Sasaki H, Trojanowski JQ. Apolipoprotein E gene in Parkinson's disease with or without dementia. *Lancet* 1994; 344: 889.
5. Lippa CF, Smith TW, Saunders AM, Crook R, Pulaski-Salo D, Davies P, Hardy J, et al. Apolipoprotein E genotype and Lewy body disease. *Neurology* 1995; 45: 97-103.
6. Frisoni GB, Calabresi L, Geroldi C, Bianchetti A, d'Acquarica AL, Govoni S, Sirtori C, et al. Apolipoprotein E e4 allele in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dementia* 1994; 5: 240-242.
7. Warring SC, O'Brien PC, Kurland LT, Thibodeau SN, Tsai M-S, Petersen RC, Esteban-Santillan CE. Apolipoprotein E allele in Chamorros with amyotrophic lateral sclerosis / parkinsonism-dementia complex. *Lancet* 1994; 343: 611.
8. Amouyel P, Vidal O, Laplanche JL. The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1994; 344: 1315-1318.
9. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
10. ACMG / ASHG working group on ApoE and Alzheimer disease. Statement on the use of apolipoprotein E testing for Alzheimer disease. *JAMA* 1995; 274: 1627-1629.
11. Kakulas BA, Vanbockxmeer FM. Apolipoprotein E genotyping in the diagnosis of Alzheimer's disease: A cautionary view. *Ann Neurol* 1995; 38: 966-967.
12. Roses AD. Apolipoprotein E genotyping in the differential diagnosis, not prediction of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995; 38: 6-14.
13. Richard P, Thomas G, Pascual de Zulueta M, De Gennes J-L, Thomas M, Cassaigne A, Béréziat G, et al. Common and rare genotypes of human apolipoprotein E determined by specific restriction profiles of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Clin Chem* 1994; 40: 24-29.
14. Prins J, Tilanus MGJ, van Rijn HJM. Apolipoproteïne E genotyping. *Tijdschr NVKC* 1994; 19: 308-312.
15. Weisgraber KH, Newhouse YM, Mahley RW. Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes. *Biochem Biophys Res Comm* 1988; 157: 1212-1217.
16. Tsai MY, Suess P, Schwichtenberg K, Eckfeldt JH, Yuan J, Tuchman M, Hunninghake D. Determination of apolipoprotein E genotypes by single strand conformational polymorphism. *Clin Chem* 1993; 39: 2121-2124.
17. Wenham PR, Newton CR, Price WH. Analysis of Apolipoprotein E genotypes by the amplification refractory mutation system. *Clin Chem* 1991; 37: 241-244.
18. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 1988; 3: 373-379.
19. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 117-124.
20. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 351-354.
21. Kösel S, Graeber MB. Use of neuropathological tissue for molecular genetic studies: parameters affecting DNA extraction and polymerase chain reaction. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 19-25.
22. Rogers BB, Alpert LC, Hine EAS, Buffone GJ. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1990; 136: 541-548.
23. Gall K, Pavelic J, Jadro-Santel D, Poljak M, Pavelic K. DNA amplification by polymerase chain reaction from brain tissues embedded in paraffin. *Int J Exp Pathol* 1993; 74: 333-337.
24. Gass P, Kiessling M, Schafer P, Mester-C, Schmitt HP, Kuhn JE. Detection of human cytomegalovirus DNA in paraffin sections of human brain by polymerase chain reaction and the occurrence of false negative results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56: 211-214.
25. Gruber AD, Moennig V, Hewicker-Trautwein M, Trautwein G. Effect of formalin fixation and long-term storage on the detectability of bovine viral diarrhoea-virus (BVDV) RNA in archival brain tissue using polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed B* 1994; 41: 654-661.
26. Eggertsen G, Tegelman R, Ericsson S, Angelin B, Berglund L. Apolipoprotein E polymorphism in a healthy Swedish population: variation of allele frequency with age and relation to serum lipid concentrations. *Clin Chem* 1993; 39: 2125-2129.
27. Egensperger R, Kösel S, Schnabel R, Mehraein P, Graeber MB. Apolipoprotein E genotype and neuropathological phenotype in two members of a German family with chromosome 14-linked early onset Alzheimer's disease. *Acta neuropathol* 1995; 90: 257-265.

## Summary

*Apolipoprotein E genotyping in paraffin sections of human brain tissues fixed by formalin. Ballering LAP, Steffens-Nakken HM, Esselink RAJ, Vos RAI de, Jansen Steur ENH and Vermes I. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 15-19.*

There is a growing demand to perform apolipoprotein E (ApoE) genotyping on neuropathologic archive material. One of the difficulties with this material is the extreme long fixation time, which makes the material unsuitable for ApoE-genotyping. An ApoE genotyping method is described for the use on formalin-fixed paraffin-embedded brain tissue, using semi-nested PCR followed by hybridisation with biotin-labeled allele-specific oligonucleotides and chemiluminescent detection. With this technique 67% (67/88) of the samples could be typed correctly. The crucial step in the method is the semi-nested PCR; of all the samples from which a PCR product can be obtained, the ApoE-gene can be genotyped without difficulties of interpretation. Sixteen of the twenty (76%) samples which could not be genotyped, were fixed in unbuffered formalin, which degrades the DNA more than buffered formalin. DNA isolated from temporal cortex and hippocampus were significant worse sources for the PCR (percentages unsuccessful PCR: 64% and 87%, resp.) than frontal cortex and cerebellum (percentages unsuccessful PCR: 16% and 11%, resp.). The technique presented here seems to offer a good possibility for ApoE-genotyping neuropathological archive material to support clinical studies.

*Key words: apolipoprotein E; genotyping; formalin-fixed; paraffin; archive material; nested PCR; hybridisation*