Laboratory Medicine and Quality Assurance

pISSN 2950-9114 • eISSN 2950-9122

ORIGINAL ARTICLE

https://doi.org/10.15263/jlmqa.2022.44.2.105

Apolipoprotein E Genotyping Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism with General-Purpose Agarose and Lithium Borate Buffer

Kyujin Oh and Geon Park

Department of Laboratory Medicine, Chosun University Hospital, Gwangju, Korea

Corresponding author:
Geon Park
Department of Laboratory Medicine, Chosun University College of Medicine, 365 Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju 61453, Korea
Tel +82-62-220-3272
E-mail creatgeon@chosun.ac.kr

Received: March 25, 2022
Revised: May 4, 2022
Accepted: May 9, 2022

Background: Apolipoprotein E (*APOE*) genotyping is an important test for predicting the risk of Alzheimer's and cardiovascular disease. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique for *APOE* genotyping is not widely used due to the need for special gels. Thus, this study aimed to develop an PCR-RFLP technique to overcome this problem.
Methods: For high-resolution agarose gel electrophoresis of PCR-RFLP, a general-purpose agarose gel, lithium borate buffer (LBB), and high voltage were used. After electrophoresis, the change in the temperature of electrophoresis buffer was measured. We performed PCR-direct sequencing to confirm the results of the PCR-RFLP of genomic DNA extracted from 103 K_2EDTA-treated venous blood samples.
Results: When a small gel 6 cm in length was run at 300 V for 50 minutes in an electrophoresis chamber with a distance of 20 cm between electrodes, the target bands could be easily discriminated and only slight deformities of the bands were observed. The change in the temperature of the buffer was 14°C. The results obtained with PCR-RFLP were in complete agreement with those of PCR-direct sequencing.
Conclusions: PCR-RFLP with electrophoresis using a general-purpose agarose gel, LBB, and high voltage is an accurate and reliable assay for *APOE* genotyping. Additionally, general-purpose agarose gel with LBB can be used in place of polyacrylamide or MetaPhor agarose gel for resolving small DNA fragments.
(Lab Med Qual Assur 2022;44:105-10)

Key Words Apolipoprotein E genotyping, Restriction fragment length polymorphism, Lithium borate buffer, Electrophoresis, Agarose

서론

아포지단백 E (apolipoprotein E, APOE)는 지질의 대사와 이송에 중요한 역할을 하는 34 kD 크기의 당단백질이다[1]. *APOE* 유전형은 알츠하이머병과 심혈관질환의 위험도를 예측하는 데 중요한 분자 표지자이다[2]. *APOE* 유전자의 여러 유전형 표적이 보고되고 있으나, 두 개의 과오 변이(코돈 112의 rs429358 및 코돈 158의 rs7412)가 가장 중요하다[3,4]. 이 두 개 변이의 조합으로 세 개의 대립유전자(E2, E3 및 E4)와 여섯 개의 유전형(E2/E2, E3/E3, E4/E4, E2/E3, E2/E4, 및 E3/E4)이 발생한다[5].

APOE 유전형 검사를 위한 DNA을 기반으로 한 기법에는 염기서열분석법[6], polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) [7], single-strand conformation polymorphism [8], allele-specific PCR [9,10], fluorescence resonance energy transfer-based melting curve analysis [11], real-time Taqman PCR [12], real-time SYBR Green PCR [13], high-resolution melting curve analysis [14], denaturing high-performance liquid chromatography [15], SNaP-shot mini-sequencing [16], MALDI-TOP mass spectrometry [17], PCR-GoldMag lateral flow assay [18] 등이 보고되었다. PCR-RFLP 기법을 이용한 *APOE* 유전형 검사는 1990년 Hixson과 Vernier [7]에 의해 개발된 오래된 기법이나, PCR-RFLP 기법의 장점[19]으로 인해 여전히 이용되고 있다[20]. 하지만 HhaI 제한효소를 이용한 PCR-RFLP 기법에서는 100 bp 이하의 작은 크기의 표적 밴드를 구분할 수 있어야 하는데, 범용 아가로스의 낮은 해상도로 인해 일반적인 아가로스 전기영동으로는 구분할 수 없으므로 polyacrylamide 겔 또는 MetaPhor 아가로스 겔(Lonza, Rockland, ME, USA)과 같은 고해상도 겔을 이용해야 한다[7,21].

최근 고전압으로 전기영동으로 하여 고해상도로 작은 크기의 DNA 절편을 구분할 수 있는 lithium borate buffer (LBB)가 소개되었다[22]. 본 연구에서 LBB와 범용 아가로스 겔을 이용한 고해상도 아가로스 겔 전기영동으로 *APOE* 유전형 검사를 위한 PCR-RFLP 기법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 검체 및 DNA 추출

2021년 1월부터 2021년 11월까지 수집된 103개의 K_2EDTA 처리된 혈액 검체에서 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 회사 지침에 따라 DNA를 추출하였다.

2. PCR 및 제한효소 처리

PCR 반응액은 2X EmeraldAMP GT PCR Master Mix (Takara, Shiga, Japan) 10 μL, DNA 1 μL, 전방(5’-GGCACGGCTGTCCAAGGA-3’) 및 후방(5’-CTCGCGGATGGCGCTGAG-3’) 시발체[23] 각 0.5 μM 및 증류수를 첨가하여 총 20 μL가 되도록 하였다. Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 다음 조건으로 PCR을 진행하였다. 98°C에서 3분간 처리한 후에 98°C 15초, 68°C 30초, 72°C 30초씩 45회 증폭하였다. 정제하지 않은 PCR 산물에 HhaI (NEB, Ipswich, MA, USA) 1 μL을 첨가하고 37°C에서 3시간 처리하였다. PCR 산물 내 HhaI 제한효소 인식부위의 개수는 rs429358 변이와 rs7412 변이에 따라 다양하여 E2 대립형질은 91 bp와 83 bp의 특이적인 절편이 관찰되고, E3 대립형질은 91 bp와 48 bp 및 35 bp의 특이적인 절편이 관찰되며, E4 대립형질은 72 bp와 19 bp 그리고 48 bp와 35 bp의 특이적인 절편이 관찰된다. 위 대립형질별 절편 길이 다형성을 이용하여 *APOE* 유전형을 판정하였다(Fig. 1).

3. Lithium borate buffer 및 3.5% 아가로스 겔 제조

붕소리튬산화물(lithium tetraborate, anhydrous; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 3.38 g을 증류수 800 mL에 녹이고 1 L가 되도록 증류수를 첨가하여 20× (20 mM) LBB를 만들었다. 이 용액의 pH를 조정하지 않았으며 1× (1 mM) LBB는 4°C 냉장보관을 하였다[22]. 3.5% 아가로스 겔을 만들기 위해 범용 아가로스인 SeaKem LE Agarose (Lonza, Rockland, ME, USA) 3.5 g을 1× LBB 100 mL에 넣고 전자레인지를 이용하여 녹인 후 60°C로 실온에서 식히고, 10 mg/mL 농도의 ethidium bromide (EtBr; Sigma-Aldrich) 10 μL를 넣고 잘 섞었다. 이 아가로스 용액을 mini-gel tray (109 mm×60 mm; Takara)에 분주하고 17-well comb (Takara)를 각각 꽂았다. 겔을 굳힌 후 4°C 냉장보관을 하였다.

4. 전기영동

전극간 길이가 20 cm인 전기영동 챔버(Solgent, Daejeon, Korea)와 Elite 300 (Wealtec, Taipei, Taiwan) 전원공급장치 그리고 전기영동 버퍼로 1× LBB를 이용하였다. 제한효소 처리된 PCR 산물 10 μL를 아가로스 겔 각 well에 분주하고 300 V 전압을 걸어 전기영동을 하였다. 전기영동이 완료된 후 양극(anode) 챔버의 버퍼온도를 측정하였다. DNA 분자량 마커로 20 bp DNA

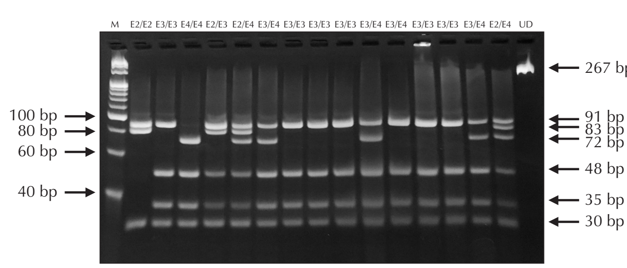

Fig. 1. *APOE* genotyping by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism using high-voltage agarose gel electrophoresis with lithium borate buffer at 300 V for 50 minutes. Abbreviations: M, 20 bp DNA Ladder (Takara, Shiga, Japan); UD, undigested PCR product.

Ladder (Takara)를 이용하였다.

5. DNA 염기서열분석

PCR-RFLP 결과를 확인하기 위하여 염기서열분석을 실시하였다. PCR 반응액은 2X EmeraldAMP GT PCR Master Mix (Takara) 10 μL, DNA 2 μL, 전방(5’-ACTGACCCCGGTGGCGGAGGA-3’) 및 후방(5’-CAGGCGTATCTGCTGGGCCTGCTC-3’) 시발체[10] 각 0.5 μM 및 증류수를 첨가하여 총 20 μL가 되도록 하였다. Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 다음 조건으로 PCR을 진행하였다. 98°C에서 3분간 처리한 후에 98°C 15초, 65°C 30초, 72°C 30초씩 35회 증폭하였다. ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific)로 정제 후 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)와 ABI 3730XL (Thermo Fisher Scientific)으로 상기 각 PCR 시발체를 이용하여 분석하였다. rs429358 변이와 rs7412 변이를 종합하여 E2/E2는 T/T, E3/E3는 T/C, E4/E4는 C/C, E2/E3는 T/Y, E2/E4는 Y/Y, E3/E4형은 Y/C를 해석 기준으로 삼아 *APOE* 유전형을 결정하였다.

6. PCR-RFLP와 염기서열분석법 결과 비교

PCR-RFLP 결과와 염기서열분석 결과를 비교평가하기 위해 일치율, 정확도 및 정밀도를 이용하였다.

결과

1. 전기영동 시간 및 밴드 변형

300 V로 전기영동을 하였을 때 표적 DNA 밴드 중 91 bp와 83 bp를 비교적 쉽게 구분할 수 있는 전기영동 시간은 50분이었으며, 해석에 영향을 미치지 않는 약한 밴드 변형이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 버퍼온도 변화와 겔 변형

300 V로 50분 동안 전기영동한 후 양극 버퍼의 온도는 18°C였다. 전기영동 시작 전 버퍼의 온도는 4°C였으므로, 양극 버퍼온도 변화는 14°C였다. 또한 상기 전기영동 조건에서 아가로스 겔의 변형은 관찰되지 않았다.

3. PCR-RFLP와 염기서열분석법 결과 비교

PCR-RFLP 결과와 염기서열분석 결과의 일치율, 정확도 및 정밀도는 각각 100%, 100% 및 100%였다(Table 1).

Table 1. Results of PCR-RFLP and sequencing for *APOE* genotyping

Genotypes	No. of PCR-RFLP (%)	No. of sequencing (%)	Concordance %
E2/E2	1 (0.97)	1 (0.97)	100
E2/E3	8 (7.77)	8 (7.77)	100
E2/E4	1 (0.97)	1 (0.97)	100
E3/E3	78 (75.73)	78 (75.73)	100
E3/E4	14 (13.59)	14 (13.59)	100
E4/E4	1 (0.97)	1 (0.97)	100
Total	103 (100.00)	103 (100.00)	

Abbreviation: PCR-RFLP, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

고찰

겔 전기영동은 PCR-RFLP의 필수적인 과정이다. 그러나 표적 DNA 절편을 구분하기 위해서 적절한 겔 성분, 겔 농도 및 전기영동 버퍼를 이용해야 한다[24]. HhaI 제한효소를 이용한 *APOE* 유전형 검사에서는 작은 크기(91 bp, 83 bp, 72 bp, 48 bp, 35 bp 및 30 bp)의 표적 밴드를 구분해야 하므로 높은 농도의 특별한 겔 유형(8% polyacrylamide 겔 또는 4% MetaPhor 아가로스 겔)을 이용해 왔다[7,21]. 일반적인 범용 아가로스 겔의 해상도 범위는 100 bp–23 kb로, 100 bp 이하 작은 DNA 절편을 구분하기는 어렵다. Polyacrylamide 겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)은 높은 해상도를 가져서 HhaI을 이용한 *APOE* 유전형 검사에 적합하나, acrylamide가 신경독성을 일으키고 polyacrylamide 겔을 제조하는 데 불편한 단점이 있다[19]. 이 단점을 극복하고자 MetaPhor 아가로스 겔 전기영동(MetaPhor agarose gel electrophoresis, MAGE)이 개발되어 이용되고 있다[21]. MetaPhor 아가로스 겔은 20–800 bp 크기의 작은 DNA 절편을 2% 차이를 구분할 수 있을 정도로 고해상도 겔이다[25]. 하지만 MetaPhor 아가로스는 본 연구에 이용한 범용 아가로스인 SeaKem LE 아가로스보다 약 6배 정도 더 비싼 단점이 있다.

APOE 유전형 검사를 위한 PCR-RFLP에서 PAGE와 MAGE 모두 Tris-borate-ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) (TBE) 버퍼를 이용한다. TBE 버퍼는 Tris-acetate-EDTA (TAE) 버퍼와 함께 가장 널리 쓰이는 버퍼이며, TAE 버퍼보다 작은 DNA 절편을 구분하는 데 더 유리하다[19]. 일반적으로 TBE 버퍼를 이용한 전기영동에서 약 5–10 V/cm 전기장 세기를 이용하여 전기영동을 실시하는데 10 V/cm을 초과하는 전압을 걸면 버퍼의 온도가 상승하고 밴드의 모양이 변형되며, 겔이 녹을 수도 있다[24].

본 연구에 이용한 LBB는 낮은 몰농도(molarity)를 가지는 전도매질(conductive media)이다. LBB와 TBE의 차이는 TBE의 Tris 양이온 대신 리튬이온인 것과 리튬이온의 농도가 Tris 이온 농도보다 낮으며, EDTA가 없다는 것이다. 리튬은 알칼리 금속류 중 상대적으로 더 큰 수화 껍질(shell of hydration)을 가진다. 따라서 알칼리 금속류 중에서 가장 낮은 전류를 발생시킨다. 그리고 TBE의 Tris 양이온의 농도는 40–90 mM 정도인데 비해 LBB의 리튬 농도는 1 mM이다[22]. EDTA를 첨가하는 이유는 DNA 핵산분해효소를 억제하여 DNA를 보존하는 것인데, 핵산분해효소에 오염되지 않은 버퍼라면 EDTA를 꼭 넣어야 하는 것은 아니다[24]. 버퍼에 EDTA를 넣으면 전도도에 영향을 끼쳐 DNA 절편의 이동 속도가 느려질 수 있다[22]. 이와 같은 리튬의 전기적 특성과 낮은 리튬 농도 그리고 EDTA를 사용하지 않음으로 인해 LBB에 고전압을 걸어도 온도의 상승을 억제할 수 있다[22]. 본 연구에서 15 V/cm을 50분 동안 적용한 후 14°C 정도의 온도 상승이 있었으며 약한 밴드 변형이 관찰되었으나 해석에 영향을 미치지 않았다. 또한 아가로스 겔의 변형은 관찰되지 않았다.

EtBr은 DNA 절편을 염색하는 데 널리 이용되고 있다. EtBr은 양이온이므로, DNA와 반대 방향으로 이동한다[26]. EtBr과 결합한 DNA는 양극으로 이동속도가 느려진다[26]. 본 연구에서 전기영동 전에 겔을 EtBr로 염색을 하였는데, 충분히 빠른 전기영동 속도와 높은 해상도를 보였다. 이를 통해 30분 정도의 전기영동 후 염색과정을 실시하지 않을 수 있었다.

본 연구에 이용한 SeaKem LE 아가로스는 범용 아가로스로서 회사 지침에 따르면 100 bp–23 kb 정도의 해상도, 높은 겔 강도(>1,200 g/cm^2), 낮은 전기삼투(electroendosmosis)와 높은 용융온도(>90°C)를 가진다. 범용 아가로스와 함께 LBB를 이용하여 LBB의 우수한 장점을 그대로 가지면서 고전압을 걸 수 있으므로 용이한 아가로스 겔 제작, 빠른 전기영동 속도와 고해상도의 결과를 얻을 수 있었다. 또한 20× LBB 1 L 가격은 약 3,500원 정도로 68,000원인 10× TBE 버퍼(Thermo Scientific) 1 L보다 저렴하고 SeaKem LE의 가격도 MetaPhor보다 저렴한 장점이 있다.

본 연구의 제한점으로는 첫째, 다양한 전기영동 장비에 대한 평가를 하지 않았다는 것이다. 따라서 검사실 또는 연구실에서 본 기법을 적용할 때는 가지고 있는 전기영동 장비로 평가한 후 검사 또는 연구에 적용해야 할 것이다. 둘째, DNA 염색을 위해 EtBr를 사용하였는데, EtBr은 발암물질이므로 취급에 주의를 해야 한다. 따라서 최근에는 EtBr를 대신할 수 있는 안전한 DNA 염색시약이 시판되고 있다[26]. 하지만 이러한 염색시약에 대한 평가를 하지 않아 초고속 전기영동에 적합한지 알 수 없다. EtBr 대신 다른 염색시약을 사용하고자 하는 검사실 또는 연구실에서는 평가 후 사용해야 할 것이다. 셋째, PCR-RFLP 기법은 여러 단계를 거쳐야 하므로 검사시간이 상대적으로 길고 노동집약적인 단점이 있다[14,19].

최근 *APOE* 유전형 검사를 위한 real-time PCR 기법이 널리 이용되고 있다[11-14]. Real-time PCR 기법은 PCR 후 검체 처리를 위해 PCR 튜브 뚜껑을 열 필요가 없어 신속하며 대용량 검사에 적합하다[14,27]. 그러나 LBB와 범용 아가로스를 이용하여 *APOE* 유전형 검사를 실시하면 검사 세팅과정이 단순하고 비싼 장비가 필요 없으며 검사시약이 비교적 저렴하므로 real-time PCR 장비가 없거나 *APOE* 유전자 검사량이 적은 검사실의 경우 비싼 real-tiem PCR 장비와 고가의 시약이 필요한 real-time PCR 기법보다 본 검사기법이 더 유리할 것으로 생각된다.

결론으로, 본 연구에서 LBB와 범용 아가로스를 이용한 고전압 및 고해상도 전기영동을 실시하여 HhaI 제한효소를 이용한 *APOE* 유전형 검사를 성공적으로 실시할 수 있었다. 또한 작은 DNA 절편을 고해상도로 구분하기 위해 사용되는 polyacrylamide 겔 또는 MetaPhor 아가로스 겔을 LBB와 범용 아가로스 겔로 대체할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 조선대학교 연구비(2015)를 받아 수행되었다.

ORCID

Kyujin Oh https://orcid.org/0000-0001-7569-3671
Geon Park https://orcid.org/0000-0002-1414-7877

REFERENCES

1. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. Pathology 2019;51:165-76.
2. Villeneuve S, Brisson D, Marchant NL, Gaudet D. The potential applications of Apolipoprotein E in personalized medicine. Front Aging Neurosci 2014;6:154.
3. Lambert JC, Brousseau T, Defosse V, Evans A, Arveiler D, Ruidavets JB, et al. Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma

concentrations-the ECTIM study. Hum Mol Genet 2000;9:57-61.
4. Bratosiewicz-Wasik J, Liberski PP, Peplonska B, Styczynska M, Smolen-Dzirba J, Cycon M, et al. Regulatory region single nucleotide polymorphisms of the apolipoprotein E gene as risk factors for Alzheimer's disease. Neurosci Lett 2018;684:86-90.
5. Babenko VN, Afonnikov DA, Ignatieva EV, Klimov AV, Gusev FE, Rogaev EI. Haplotype analysis of APOE intragenic SNPs. BMC Neurosci 2018;19(Suppl 1):16.
6. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. Genomics 1988;3:373-9.
7. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. J Lipid Res 1990;31:545-8.
8. Tsai MY, Suess P, Schwichtenberg K, Eckfeldt JH, Yuan J, Tuchman M, et al. Determination of apolipoprotein E genotypes by single-strand conformational polymorphism. Clin Chem 1993;39:2121-4.
9. Donohoe GG, Salomaki A, Lehtimaki T, Pulkki K, Kairisto V. Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by multiplex amplification refractory mutation system PCR and capillary gel electrophoresis. Clin Chem 1999;45:143-6.
10. Yang YG, Kim JY, Park SJ, Kim SW, Jeon OH, Kim DS. Apolipoprotein E genotyping by multiplex tetra-primer amplification refractory mutation system PCR in single reaction tube. J Biotechnol 2007;131:106-10.
11. Nauck M, Hoffmann MM, Wieland H, Marz W. Evaluation of the apo E genotyping kit on the LightCycler. Clin Chem 2000;46:722-4.
12. Koch W, Ehrenhaft A, Griesser K, Pfeufer A, Muller J, Schomig A, et al. TaqMan systems for genotyping of disease-related polymorphisms present in the gene encoding apolipoprotein E. Clin Chem Lab Med 2002;40:1123-31.
13. Calero O, Hortiguela R, Bullido MJ, Calero M. Apolipoprotein E genotyping method by real time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays. J Neurosci Methods 2009;183:238-40.
14. Zhan XH, Zha GC, Jiao JW, Yang LY, Zhan XF, Chen JT, et al. Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by high-resolution melting analysis in Chinese Han and African Fang populations. Exp Ther Med 2015;9:469-75.
15. Poli M, Gatta LB, Dominici R, Lovati C, Mariani C, Albertini A, et al. Apolipoprotein E haplotyping by denaturing high-performance liquid chromatography. Clin Chem Lab Med 2005;43:512-8.
16. Ben-Avi L, Durst R, Shpitzen S, Leitersdorf E, Meiner V. Apolipoprotein E genotyping: accurate, simple, high throughput method using ABI Prism SNaPshot Multiplex System. J Alzheimers Dis 2004;6:497-501.
17. Srinivasan JR, Kachman MT, Killeen AA, Akel N, Siemieniak D, Lubman DM. Genotyping of apolipoprotein E by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1998;12:1045-50.
18. Lian T, Hui W, Li X, Zhang C, Zhu J, Li R, et al. Apolipoprotein E genotyping using PCR-GoldMag lateral flow assay and its clinical applications. Mol Med Rep 2016;14:4153-61.
19. Rasmussen HB. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis: valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In: Magdeldin S, editor. Gel electrophoresis: principles and basics. London: IntechOpen, 2012;315-34.
20. Halla SB, Tazzite A, Gazzaz B, El Moutawakil B, Dehbi H. Involvement of APOE polymorphism in Alzheimer's disease susceptibility and Donepezil response in Moroccan patients. Gene Reports 2022;26:101484.
21. Dallinga-Thie GM, van Linde-Sibenius Trip M, Kock LA, De Bruin TW. Apolipoprotein E2/E3/E4 genotyping with agarose gels. Clin Chem 1995;41:73-5.
22. Brody JR, Calhoun ES, Gallmeier E, Creavalle TD, Kern SE. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media. Biotechniques 2004;37:598, 600, 602.

23. Wu YY, Delgado R, Costello R, Sunderland T, Dukoff R, Csako G. Quantitative assessment of apolipoprotein E genotypes by image analysis of PCR-RFLP fragments. Clin Chim Acta 2000;293:213-21.

24. Sanderson BA, Araki N, Lilley JL, Guerrero G, Lewis LK. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. Anal Biochem 2014;454:44-52.

25. Boopathi NM. Genotyping of mapping population. In: Boopathi NM, editor. Genetic mapping and marker assisted selection: basics, practice and benefits. Coimbatore: Springer, 2013;39-80.

26. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp 2012;(62):3923.

27. Zhong L, Xie YZ, Cao TT, Wang Z, Wang T, Li X, et al. A rapid and cost-effective method for genotyping apolipoprotein E gene polymorphism. Mol Neurodegener 2016;11:2.