

---

# **Basisprincipes van de PCR**

Dr. C.C. Orelia  
Dr. M.J. Plug

**Derde druk**

Syntax Media – Utrecht

---

---

# Inhoud

<b>Voorwoord</b>	<b>VII</b>
<b>1 Algemene inleiding</b>	<b>1</b>
1.1 Wat is DNA?	1
1.2 RNA	6
1.3 DNA-synthese in de cel en in het PCR-apparaat	7
1.4 Toepassingen van de PCR	10
<b>2 Nucleïnezuur-isolatiemethoden</b>	<b>13</b>
2.1 Algemene inleiding	13
2.2 Uitgangsmaterialen voor de isolatie van nucleïne- zuren	14
2.3 Nucleïnezuur isolatiemethoden	15
2.4 Bepalen van de concentratie en zuiverheid van nucleïne-zuren	23
2.5 Remmende factoren van de PCR	24
<b>3 Wat is PCR</b>	<b>29</b>
3.1 De basisprincipes van de PCR	29
3.2 De fasen van een PCR-reactie	31
3.3 cDNA-synthese en de reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)	37
3.4 Multiplex-PCR	39
<b>4 PCR-reactiecomponenten</b>	<b>43</b>
4.1 Inleiding PCR-componenten	43
4.2 De functie van desoxyribonucleotiden (dNTP's) in de PCR	43
4.3 De functie van oligonucleotide primers	45
4.4 De functie van DNA-polymerasen in de PCR	47
4.5 De functie van de PCR-buffer	53
4.6 De functie en de optimalisatie van magnesium	53
4.7 Hulpstoffen in de PCR	54
4.8 Functie en optimalisatie van het template-DNA	57
4.9 De invloed van het reactievolume op de PCR	58
<b>5 Basisregels voor primer-design en de werking van primers in de PCR</b>	<b>59</b>
5.1 Algemene kenmerken van een primer	59
5.2 Eisen aan het ontwerp van primers voor de PCR	60
5.3 Eisen aan PCR-producten	63

5.4	Smelttemperatuur ( $T_m$ ) en annealings-temperatuur ( $T_a$ ) van primers	64
5.5	Speciale primers	69
5.6	Primers voor speciale toepassingen	75
5.7	Primers en probes in de praktijk	79

## **6 Principes en detectiemethoden van de real-time PCR (qPCR) 83**

6.1	Verschillen tussen qPCR en conventionele PCR	83
6.2	qPCR-detectie is gebaseerd op fluorescentie	84
6.3	Directe qPCR-detectiemethoden	88
6.4	Indirecte probe-gebaseerde qPCR-detectiemethoden	89
6.5	Algemene eisen voor het ontwerpen van probes	96
6.6	Ontwikkelen en optimaliseren van een qPCR-methode met directe detectie	98
6.7	Multiplex-qPCR	100

## **7 Scheiding en detectie van PCR-producten 105**

7.1	Nucleïnezuur-scheidingsmethoden: Agarose Gel-Elektroforese (AGE) en PolyAcrylamide Gel-Elektroforese (PAGE)	106
7.2	Capillaire Elektroforese (CE)	112
7.3	Detectiemethoden	116

## **8 Detectie, analyse en kwantificering van qPCR-producten 119**

8.1	qPCR-productdetectie	119
8.2	qPCR-data-analyse: smeltcurve	123
8.3	Het kwantificeren van qPCR-data	129
8.4	Digitale PCR	135

## **9 Contaminatiepreventie, kwaliteitsaspecten en PCR-controles 141**

9.1	PCR-contaminatiepreventie	141
9.2	PCR-controles	146
9.3	Kwaliteitsaspecten en het ontwikkelen van een PCR-methode	149
9.4	Problemen in de PCR-praktijk oplossen	155

## **Literatuur, naslagwerken en bronnen 159**

## **Afkortingen en begrippen 163**

## **Register 175**

---

# Voorwoord

De moderne moleculaire biologie begon zestig jaar geleden met de opheldering van de dubbele helixstructuur en samenstelling van DNA, de drager van erfelijk materiaal in cellen. Met de opheldering van deze structuur werd ook inzichtelijk hoe DNA vermeerderd kan worden. In 1983 werd op basis van dit DNA-vermeerderingsprincipe een laboratoriumtechniek ontwikkeld waarbij het DNA buiten een cel vermeerderd kon worden in een reactievatje, de *Polymerase Chain Reaction*. Op dat moment kon nog niet vermoed worden welke revolutie deze PCR-techniek in de moleculaire biologie teweeg zou brengen. De PCR-techniek heeft tegenwoordig in verschillende laboratoria in uiteenlopende vakgebieden een vaste plaats ingenomen.

In het curriculum van de opleiding Biologie en medisch laboratoriumonderzoek en van het post-hbo nascholingsonderwijs van de Hogeschool Leiden neemt de moleculaire biologie een belangrijke plaats in. In de loop der jaren hebben veel collega's studiemateriaal geschreven en/of samengesteld over de PCR-techniek, aanverwante technieken en praktische toepassingen. In het najaar van 2012 is besloten dit materiaal samen te voegen en aan te passen aan de laatste ontwikkelingen, met als resultaat dit boek dat alles samenvat wat je over de moderne PCR-praktijk moet weten.

Niet alleen de fasen van de PCR-reactie, de functie van de PCR-componenten en de ontwikkeling van de PCR-primers, maar ook de nucleïnezuur-isolatie en de analyse van PCR-producten worden besproken. Daarnaast komen de *real-time* PCR en enkele basisbegrippen van kwaliteitszorg op het PCR-laboratorium aan de orde. Dit boek is een ideaal uitgangspunt voor HLO-studenten en laboratoriummedewerkers met geen of beperkte voorkennis van de PCR.

Zonder onze collega's die de afgelopen jaren studiemateriaal gemaakt hebben en die hebben meegelezen en meegedacht, zou dit boek niet zijn ontstaan. Wij zijn daarom veel dank verschuldigd aan onze collega's Sigrid Beiboer, Rob van Gijlswijk, Dennis Hoogervorst, Ivo Horn, Ken Kraaijeveld, Bep van Pelt-Verkuil, Anke Tiggelman en John van der Willik. Ook bedanken we uitgeverij Syntax Media voor de prettige samenwerking bij het tot stand komen van dit boek.

Tenslotte wensen we alle lezers en PCR-gebruikers veel leesplezier en veel succes met de PCR-toepassing op het laboratorium toe.

Voor kritische opmerkingen en suggesties houden wij ons aanbevolen.

Claudia Orelia en Maria Plug  
Leiden, april 2013

### ***Bij de tweede druk***

Drie jaar na het verschijnen van de eerste druk van Basisprincipes van de PCR was het tijd voor een kritische blik. Na grondige inspectie van het boek bleek dat de PCR-techniek als zodanig in de afgelopen paar jaar niet veel veranderd is. Tegelijkertijd hebben de ontwikkelingen niet stil gestaan: betere, snellere polymerase enzymen, verbeterde probes voor de real-time PCR. Waar nodig hebben we het boek aan de laatste ontwikkelingen aangepast. We wensen de lezers veel leesplezier en veel succes toe met de PCR-techniek op het laboratorium.

Claudia Orelia en Maria Plug  
Utrecht en Leiden, juni 2016

### ***Bij de derde druk***

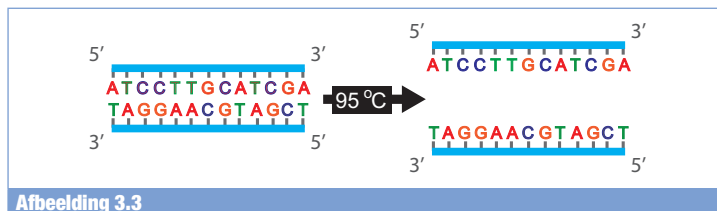
Zes jaar na het verschijnen van de eerste druk van Basisprincipes van de PCR is de laboratoriumtechniek nog steeds ongekend populair en veelvuldig toegepast. Het boek is uitgebreid met het kwantificeren met behulp van de tweede afgeleide methode en de digital droplet PCR-methode. Tevens is de informatie in het boek daar waar nodig aangepast aan de laatste ontwikkelingen en zijn suggesties ter verbetering van het boek afkomstig van kritische lezers verwerkt.

We bedanken dr. R. van Gijlswijk en dr. I. Horn hartelijk voor hun waardevolle bijdrage aan de derde druk van ons boek. Opnieuw wensen we de lezers van dit boek veel leesplezier en gebruikers van de PCR-technologie veel succes op het laboratorium.

Claudia Orelia en Maria Plug  
Utrecht en Leiden, januari 2019



DNA volledig te denatureren. Andere targets, bijvoorbeeld gefixeerd DNA in weefselcoupes of GC-rijk DNA, kunnen moeilijk bereikbaar of afgeschermd zijn. Het verlengen van de eerste denaturatiestap tot 10 minuten, voorafgaand aan de PCR-cycli, of een extra hoge denaturatietemperatuur (100 °C) kan de bereikbaarheid van deze targets voor het *Taq*-DNA-polymerase sterk verbeteren.



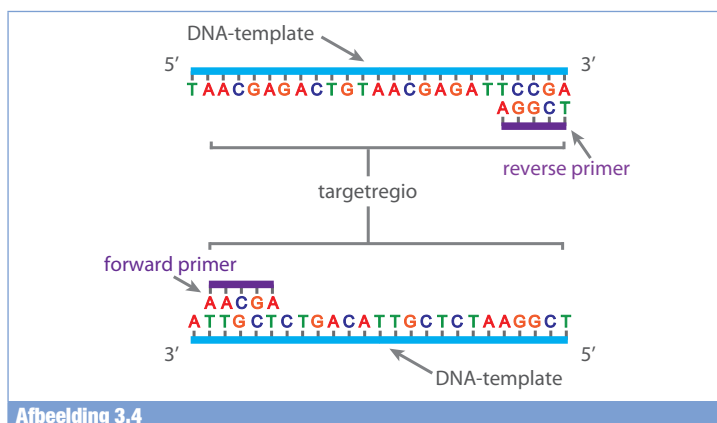
Afbeelding 3.3

Fase 1 van de PCR-cyclus, denaturatie van het target-DNA.

Door de hoge temperatuur in deze fase worden de waterstofbruggen verbroken die het dsDNA bijeenhouden.

### 3.2.2 Annealingsfase

Na de denaturatie volgt de annealingsfase. De temperatuur wordt verlaagd tot 45-60 °C. Bij deze temperatuur zullen de specifieke primers, een *forward* en *reverse* primer die de targetsequentie precies omvatten, hybridiseren aan complementaire sequenties op het gedenuatureerde *template*-DNA (afb. 3.4). Dit duurt gemiddeld slechts enkele seconden. De 3'-OH-uiteinden van de primers vormen het startpunt van de DNA-synthese. De DNA-synthese zal al tijdens de annealingsfase beginnen. Meestal worden annealingstijden van 15 tot 45 seconden aangehouden. Primers hybridiseren tijdens de eerste vijftien cycli snel en gemakkelijk. Hierna neemt de kans op onvoldoende annealing toe. De overmaat aan primers neemt immers af en er kan competitie voor de annealingsplaatsen ontstaan tussen de primers en de geamplificeerde complementaire strengen van het amplimeer.



Afbeelding 3.4

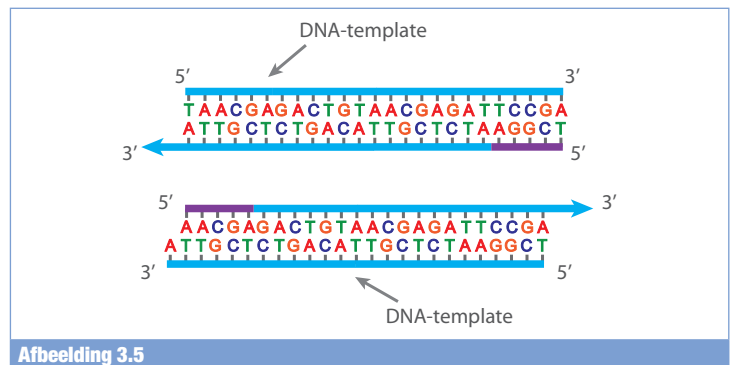
Fase 2 van de PCR-cyclus, annealing van de primers.

Tijdens de annealingsfase vindt binding van de primers aan het gedenuatureerde DNA plaats.

### 3.2.3 Extensiefase

Hoewel de DNA-synthese al tijdens de annealingsfase start, wordt de temperatuur verhoogd tot 72 °C, de optimumtemperatuur voor de meeste thermostabiele DNA-polymerasen. Bij deze temperatuur verloopt de DNA-synthese het meest efficiënt (afb. 3.5). Tijdens de extensie wordt de primer verlengd in de 5'-3'-richting. De extensietijd is afhankelijk van de lengte van het te synthetiseren PCR-fragment. Als vuistregel wordt vaak aangehouden dat het polymerase bij de optimum temperatuur duizend basen per minuut synthetiseert. Voor veel hitte-stabiele DNA-polymerasen ligt deze vuistregel in de juiste orde van grootte. Er zijn echter ook *ultra fast* PCR-enzymen op de markt die een synthesesnelheid van ongeveer duizend basen per seconde halen. De leveranciers van enzymen geven vaak aanbevelingen over de beste extensietijd en -temperatuur. Bij een multiplex-PCR, een PCR-techniek waarbij meerdere fragmenten tegelijkertijd geamplificeerd worden, is uiteraard de lengte van het grootste amplimeer bepalend voor de extensietijd.

Na de extensiestap volgt de denaturatiestap van de volgende cyclus en stijgt de temperatuur weer naar 94°C voor de denaturatie van het DNA-*template* en de gesynthetiseerde PCR-producten.



Afbeelding 3.5

Fase 3 van de PCR-cyclus, extensie.

Tijdens de extensiefase wordt nieuw DNA gesynthetiseerd in de 5'- naar 3'-richting. De nucleotidevolgorde van de complementaire streng dient hierbij als matris voor de DNA-synthese.

### 3.2.4 Beëindiging van de PCR

Zoals beschreven bij afbeelding 3.2 verloopt de vorming van PCR-producten volgens een S-curve. Na dertig tot veertig cycli wordt een situatie bereikt waarin nauwelijks verdere DNA-synthese meer optreedt. Dit noemen we de plateaufase van de reactie. Tijdens de overgang van exponentiële vermeerdering naar de plateaufase neemt de DNA-synthesesnelheid sterk af. Meer PCR-cycli dragen dan niet meer bij aan de vermeerdering van het gewenste amplimeer, er ontstaan juist meer ongewenste PCR-producten, zoals primer-dimeren. Reden genoeg om de PCR tijdig af te breken.

- Betaïne (monohydraat) zorgt er bij een concentratie van 5,2 M voor dat GC-baseparing gelijk wordt aan AT-baseparing in een DNA-sequentie. GC-rijke dubbelstrengs DNA-fragmenten kunnen hierdoor beter dissociëren. In de praktijk worden lagere betaïne-concentraties in de PCR (0,8-1,6M) gebruikt.
- Daarnaast zijn er verschillende commerciële oplossingen om GC-baseparing te verminderen. Deze oplossingen bevatten meestal één of een combinatie van bovengenoemde hulpstoffen. Bekende oplossingen om GC-baseparing te verminderen zijn: Q-solution (Qiagen), GC-melt™ (Clontech), Enhancer solution (Life Technologies/ Invitrogen), GC-RICH Resolution Solution (Roche Applied Science). Deze hulpstoffen kunnen ook gebruikt worden bij de ontwikkeling van multiplex-PCR-toepassingen en PCR-methoden met gedegeneerde primers, omdat de verschillen in  $T_m$  van de (verschillende) primer-paren verminderd worden.

Het verbeteren van de activiteit van het DNA-polymerase vergroot de efficiëntie van de PCR-reactie en daarmee de opbrengst van het PCR-product. Niet-ionische detergentia, zoals Triton X-100, Tween-20 of NP-40 (0.1-1%), stabiliseren *Taq*-DNA-polymerase. Ook gaan deze stoffen de vorming van secundaire structuren in het DNA tegen. Daarnaast wordt dithiotreitol (DTT) in een concentratie van 1-10 mM toegevoegd aan de PCR-buffer om *Taq*-DNA-polymerase te stabiliseren.

Naast het verbeteren van de DNA-polymerase activiteit is het verminderen van remming in de PCR een belangrijk middel om de PCR-efficiëntie te verhogen. Het verwijderen van remmers tijdens de nucleïnezuur-isolatie is een goede strategie. Het toevoegen van 1-10 µg/µl bovine serum albumine (BSA) kan de remmers binden en de remming van de PCR verminderen. Daarnaast stabiliseert BSA ook het polymerase enzym.



Afbeelding 4.4

Het effect van DMSO op de PCR reactie van een GC-rijk *template*.

Een 2,0-kb fragment van het Apo E-gen (GC-gehalte is 74%) werd geamplificeerd van 200 ng humaan genomisch DNA met een variërende hoeveelheid DMSO van 0 tot 10%. De PCR-producten zijn geanalyseerd op een agarosegel. Het DMSO verbreekt de secundaire structuren en verhoogt daardoor de efficiëntie van de PCR-reactie. (bron: Roche Applied Science ([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)))



## 4.8 Functie en optimalisatie van het template-DNA

Het (c)DNA in de PCR is de *template* ofwel matrijs die gebruikt wordt in het DNA-replicatieproces. Zonder (c)DNA kan het DNA-polymerase niets kopiëren en vermeerderen in de PCR. Het is van belang dat het (c)DNA dat als uitgangsmateriaal in de PCR wordt gebruikt van goede kwaliteit is. Het uitgangsmateriaal mag niet afgebroken zijn, omdat dan vooral heel kleine fragmenten geamplificeerd kunnen worden. Verder kan de PCR geremd worden door verontreinigingen die afkomstig zijn uit het oorspronkelijke monster of die door de nucleïnezuur-isolatie geïntroduceerd zijn. In het algemeen werkt de PCR het beste met schone en zuivere DNA-monsters. Verontreinigende en/of remmende stoffen benadelen de PCR-efficiëntie en reproduceerbaarheid. Verdunnen van het monster met remming zal vaak resulteren in minder PCR-remming omdat de remmende stof ook verdund wordt. In paragraaf 2.4 zijn remmers van de PCR besproken. Als *template* in de PCR kan een grote verscheidenheid aan nucleïnezuren gebruikt worden, zoals genomisch DNA uit zowel eukaryote als prokaryote cellen, cDNA (in geval van RNA-monsters) en plasmide-DNA uit bacteriën. Voorafgaand aan de PCR kan op het laboratorium het nucleïnezuur gezuiverd worden, maar er zijn ook verschillende *templates* commercieel verkrijgbaar. Voorbeelden hiervan zijn genomische DNAs, genomische en cDNA-bibliotheken, totaal RNAs en poly(A)+ RNAs.

De starthoeveelheid nucleïnezuur in de PCR ligt meestal tussen de  $10^2$  en  $10^5$  kopieën, maar er zijn ook toepassingen waarbij van minder startmateriaal wordt uitgegaan zoals de *single cell* PCR's. De specificiteit en de efficiëntie van de PCR nemen toe wanneer het aantal kopieën *template* toeneemt. Daarnaast neemt de PCR-efficiëntie toe als het target-DNA minder complex is en als de PCR-producten kleiner zijn. De aanbevolen hoeveelheden startmateriaal zijn 100-500 ng humaan genomisch DNA, 1-10 ng bacterieel genomisch DNA, 0,1-1 ng plasmide DNA en cDNA afkomstig van 0,1-0,5 µg totaal RNA of 5-50 ng polyA+ RNA. Een grote overmaat aan *template*-(c)DNA remt de PCR, omdat  $Mg^{2+}$ , dNTP's en ook *Taq*-DNA-polymerase aan het *template* zullen binden zonder bij te dragen aan de DNA-amplificatie. Daarnaast zal een te hoge DNA-concentratie leiden tot *mispri-ming* en het ontstaan van ongewenste PCR-producten. De PCR-efficiëntie en specificiteit zullen dus afnemen bij een te hoge *template*-concentratie.

Een heel lage hoeveelheid *template*, bijvoorbeeld minder dan 10 ng humaan genomisch DNA, vraagt vaak om extra optimalisatie van de PCR, omdat een heel kleine hoeveelheid DNA tot een verhoogd risico van degradatie van het DNA door nucleasen leidt. Ook kan het weinige DNA voor de PCR verloren gaan door adsorptie aan het plastic.

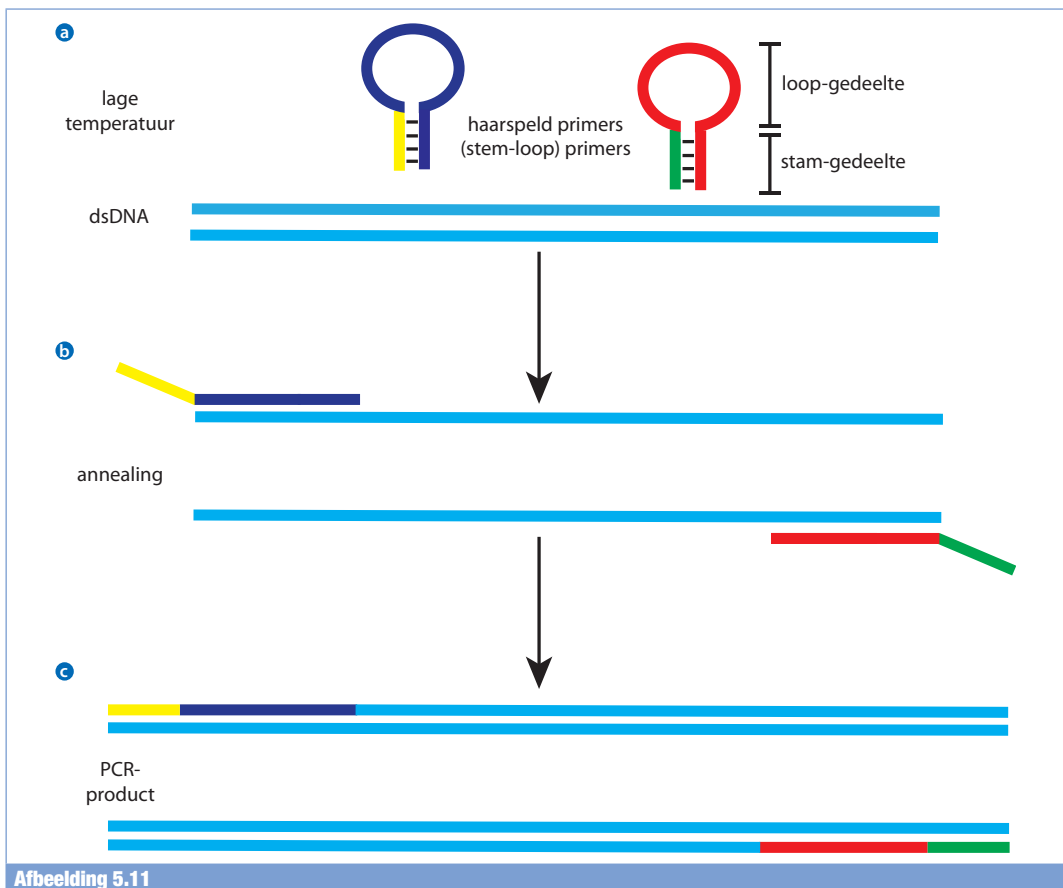
Door het gebruik van LNA-nucleotiden kunnen kortere primers gebruikt worden en kan de  $T_a$ -optimalisatie van verschillende primers vereenvoudigd worden. Een ander voordeel is dat LNA-nucleotiden minder gevoelig zijn voor afbraak door exo- en endonucleasen.

Toepassingen waarvoor primers met LNA-nucleotiden gebruikt worden:

- Ontwerp van kortere primers.
- Mutatie-onderzoek, zoals *single nucleotide polymorphism* (SNP)-genotypering.

#### 5.5.4 Haarspeld (stem-loop) primers

Haarspeld primers zijn er in diverse vormen, maar de meest karakteristieke vorm is de cirkel (ofwel loop)-structuur met een dubbelstrengs stamstructuur (afb. 5.11). In 2000 zijn deze primers



Afbeelding 5.11

Werking van haarspeld(stem-loop)-primers.

- Bij een lage temperatuur zal deze primer in de karakteristieke haarspeldstructuur vouwen, omdat dit energetisch gunstig is.
- Tijdens de annealingsfase in de eerste cyclus zal een gedeelte van de primer met het target hybridiseren; een klein gedeelte van de stamstructuur hybridiseert niet aan het target.
- In latere PCR-cycli zal de stamstructuur worden mee-geamplificeerd in het PCR-product.

voor het eerst ontwikkeld voor qPCR-toepassingen, maar dit type primers is ook succesvol gebruikt voor het aantonen van microRNA (miRNA). De primers bevatten een unieke sequentie die aan het target zal hybridiseren en een gedeelte dat de dubbelstrengs structuur zal vormen. Een gedeelte van de primer zal dus niet aan het target hybridiseren, maar zorgt enkel voor het ontstaan van de dubbelstrengs stamstructuur. De primer zal alleen aan het target binden als het target complementair is aan de primer. Bij onvoldoende complementariteit tussen primer en target zal het energetisch gunstiger zijn als de primer in de dichtgevouwen structuur blijft; hierdoor zal dit type primer niet snel aan andere targets hybridiseren. Het voordeel van het gebruik van dit soort primers is dan ook de hoge specificiteit voor hun target.

### 5.5.5 Primers voor het aantonen van repeterende sequenties (repeat primers)

Het genoom van zowel prokaryote als eukaryote cellen bevat korte, repeterende sequenties, ook wel *short-sequence repeats* (SSR's) genoemd (o.a. (CACA)<sub>n</sub>). Bekende repeterende sequenties die veel in het humane genoom voorkomen zijn microsateliet markers. Als de primer complementair is aan een repeterende sequentie in het DNA, zal deze primer op meerdere plekken aan het DNA kunnen hybridiseren. In de PCR zullen dan verschillende PCR-producten gevormd worden. Het patroon van de PCR-producten is genoom-specifiek en levert een vingerafdruk (*fingerprint*) van het genoom op. Dit type primers wordt gebruikt voor genotyperings-doeleinden, maar ook voor het karakteriseren van onbekende genomen (o.a. van micro-organismen).

### 5.5.6 Random primers

Deze korte primers van zes tot twaalf nucleotiden bestaan uit willekeurige nucleotiden. De primerfabrikant zal een mix met verschillende primers leveren. Deze primers kunnen op verschillende posities op het DNA hybridiseren, waardoor een mix van PCR-producten zal ontstaan. *Random* primers worden gebruikt voor cDNA-synthese (bijv. *random hexamers*) en voor toepassingen waarbij willekeurig stukken van het genoom vermeerderd worden (o.a. DOP PCR; zie paragraaf 5.6.1).

### 5.5.7 Primers voor cDNA-amplificatie

De genen in het genoom coderen voor eiwitten. Door middel van mRNA kan de genetische boodschap van het genoom vertaald worden. In eukaryote cellen bestaan genen uit intronen en exonen. De exonen bevatten informatie die codeert voor eiwitten; de intronen bevatten niet-coderende, regulatoire informatie. Het mRNA bevat enkel de informatie afkomstig van de exonen en niet van de intronen.

van monstermateriaal en geïsoleerde nucleïnezuren naar andere PCR-ruimtes te voorkomen.

In de PCR-amplificatie- en analyseruimte, ook wel post-PCR-laboratorium genoemd, worden de PCR-amplificatiereacties uitgevoerd en staan dus de (q)PCR-apparaten. De analyse-apparatuur (o.a. gel-elektroforese apparatuur) kan in deze ruimte of een aparte ruimte geplaatst worden. Het is in ieder geval van belang dat de PCR-producten deze ruimte(s) niet verlaten en zo een bron van contaminatie kunnen zijn in de andere PCR-laboratoria. Daarom wordt bij voorkeur in deze ruimte ook met onderdruk gewerkt.



**Afbeelding 9.2**

PCR-kabinet.

In een PCR-kabinet kan de PCR-reactiemix gemaakt worden met minimaal gevaar op contaminatie. Het kabinet kan na afloop gedecontamineerd worden met een chlooroplossing (1M HCl) en/of met UV-licht. (foto: [www.mystaire.com](http://www.mystaire.com))

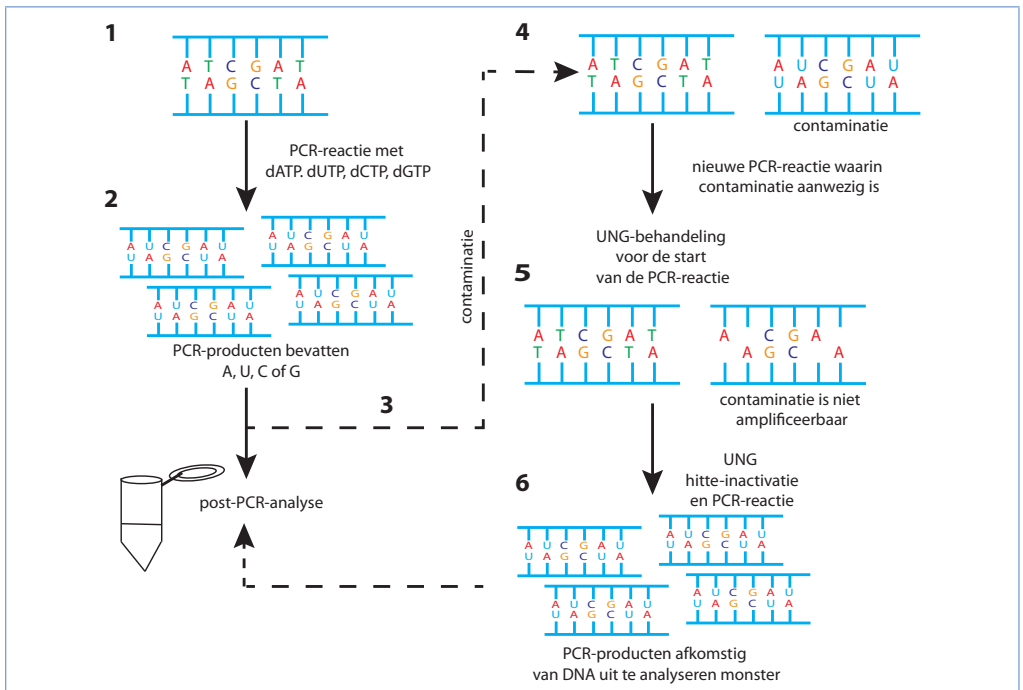
## Contaminatiepreventie door gebruik van UNG PCR-technologie

Een belangrijke bron van contaminatie op het PCR-laboratorium zijn PCR-producten uit eerdere amplificatiereacties. Een methode die wordt toegepast voor het verwijderen van deze contaminerende PCR-producten uit voorgaande reacties is de UNG PCR-technologie. Deze methode maakt gebruik van het enzym Uracil N-Glycosylase (UNG).

De methode werkt als volgt:

- 1 Een (c)DNA-*template* bevat de nucleotiden A, T, C en G.
- 2 In de PCR-reactiemix is het nucleotide dUTP in plaats van dTTP aanwezig. De gevormde PCR-producten zullen 'U' als nucleotide bevatten.
- 3 Tijdens de post-PCR-analyse vindt een besmetting plaats en enkele PCR-producten komen in de pre-PCR-ruimte of de nucleïnezuur-isolatiaruimte terecht.
- 4 De daaropvolgende PCR wordt besmet met het PCR-product. Het (c)DNA in het te analyseren monster bevat 'T'-nucleotiden (links) en het contaminerende PCR-product bevat 'U'-nucleotiden (rechts).
- 5 Aan het begin van de PCR wordt het UNG enzym geactiveerd en zal het DNA-moleculen afbreken waarin een 'U' als nucleotide aanwezig is. Het contaminerende PCR-product wordt dus afgebroken en kan geen *template* zijn in de PCR. Het (c)DNA in het te analyseren monster bevat 'T'-nucleotiden en geen 'U'-nucleotiden en zal dus niet afgebroken worden door het UNG enzym.
- 6 Het (c)DNA uit het monster zal vermeerderd worden in de PCR en het contaminerende, afgebroken PCR-product niet.

Verschillende fabrikanten van PCR-reagentia verkopen PCR-reactiemixen met toegevoegd het UNG-enzym. Er kan voorafgaand aan elke PCR een UNG-enzymincubatie en hitte-inactivatie plaatsvinden, waardoor wordt uitgesloten dat PCR-producten uit voorgaande reacties de huidige PCR besmetten.



UNG-technologie.