
Basisprincipes van de PCR

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

Vierde druk

Syntax Media – Amersfoort

Inhoud

1	Algemene inleiding	11
1.1	Wat is DNA?	11
1.2	RNA	16
1.3	DNA-synthese in de cel en in het PCR-apparaat	17
1.4	Toepassingen van de PCR	20
2	Nucleïnezuur-isolatiemethoden	23
2.1	Algemene inleiding	23
2.2	Uitgangsmaterialen voor de isolatie van nucleïnezuuren	24
2.3	Nucleïnezuur-isolatiemethoden	25
2.4	Bepalen van de concentratie en zuiverheid van nucleïnezuuren	33
2.5	Remmende factoren van de PCR	34
3	Wat is PCR?	39
3.1	De basisprincipes van de PCR	39
3.2	De fasen van een PCR-reactie	41
3.3	cDNA-synthese en de reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)	50
3.4	Multiplex-PCR	52
4	PCR-reactiecomponenten	57
4.1	Inleiding PCR-componenten	57
4.2	De functie van desoxyribonucleotiden (dNTP's) in de PCR	57
4.3	De functie van oligonucleotide primers	59
4.4	De functie van DNA-polymerasen in de PCR	61
4.5	De functie van de PCR-buffer	67
4.6	De functie en de optimalisatie van magnesium	67
4.7	Hulpstoffen in de PCR	68
4.8	Functie en optimalisatie van het template-DNA	71
4.9	De invloed van het reactievolume op de PCR	72
5	Basisregels voor primer-design en de werking van primers in de PCR	73
5.1	Algemene kenmerken van een primer	73
5.2	Eisen aan het ontwerp van primers voor de PCR	74
5.3	Eisen aan PCR-producten	77
5.4	Smelttemperatuur (T_m) en annealings-temperatuur (T_a) van primers	78

5.5	Speciale primers	83
5.6	Primers voor speciale toepassingen	89
5.7	Primers en probes in de praktijk	93

6 Principes en detectiemethoden van de real-time PCR (qPCR) 97

6.1	Verschillen tussen qPCR en conventionele PCR	97
6.2	qPCR-detectie is gebaseerd op fluorescentie	98
6.3	Directe qPCR-detectiemethoden	102
6.4	Indirecte probe-gebaseerde qPCR-detectiemethoden	103
6.5	Algemene eisen voor het ontwerpen van probes	111
6.6	Ontwikkelen en optimaliseren van een qPCR-methode met directe detectie	113
6.7	Multiplex-qPCR	115

7 Scheiding en detectie van PCR-producten 121

7.1	Algemene inleiding	121
7.2	Nucleïnezuur-scheidingsmethoden: Agarose Gel-Elektroforese (AGE) en PolyAcrylamide Gel-Elektroforese (PAGE)	122
7.3	Capillaire Elektroforese (CE)	128
7.4	Detectiemethoden	132

8 Detectie, analyse en kwantificering van qPCR-producten 135

8.1	qPCR-productdetectie	135
8.2	qPCR-data-analyse: smeltcurve	139
8.3	Het kwantificeren van qPCR-data	145
8.4	Digitale PCR	151

9 Contaminatiepreventie, kwaliteitsaspecten en PCR-controles 157

9.1	PCR-contaminatiepreventie	157
9.2	PCR-controles	162
9.3	Kwaliteitsaspecten en het ontwikkelen van een PCR-methode	165
9.4	Rapporteren van qPCR-resultaten	171
9.5	Problemen in de PCR-praktijk oplossen	171

Literatuur, naslagwerken en bronnen 177

Afkortingen en begrippen 181

Register 193

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 reactievaatje, 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 aanbevelen.

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

Bij de vierde druk

Het is inmiddels elf jaar geleden dat de eerste druk van Basisprincipes van de PCR verscheen. Bij de eerste druk van dit boek was de PCR-techniek al een populaire, veel toegepaste moleculaire techniek binnen het laboratorium. Sinds de COVID-19 pandemie is de term PCR ook bij het grote publiek bekend geworden. De PCR-techniek was cruciaal voor snelle, accurate diagnostiek van het SARS-CoV-2 virus en heeft daarmee een belangrijke rol vervuld in het tegengaan van

verspreiding van het SARS-CoV-2 virus en voorkomen van veel ernstig zieke patiënten.

In de vierde druk is het boek op verschillende plekken geüpdated en uitgebreid met de Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) PCR en scorpion probes. Voor de maatschappij en ook de laboratoria ligt er een urgente uitdaging om te verduurzamen. Daarom sluiten we deze vierde druk af met een blik op een duurzame toekomst van laboratoria.

We bedanken Bart Appelhof en Kitty Verzijlbergen voor hun waardevolle bijdrage aan de vierde druk van ons boek. We wensen de lezers van het boek veel leesplezier en gebruikers van de PCR-technologie veel succes in het (toekomstbestendige) laboratorium.

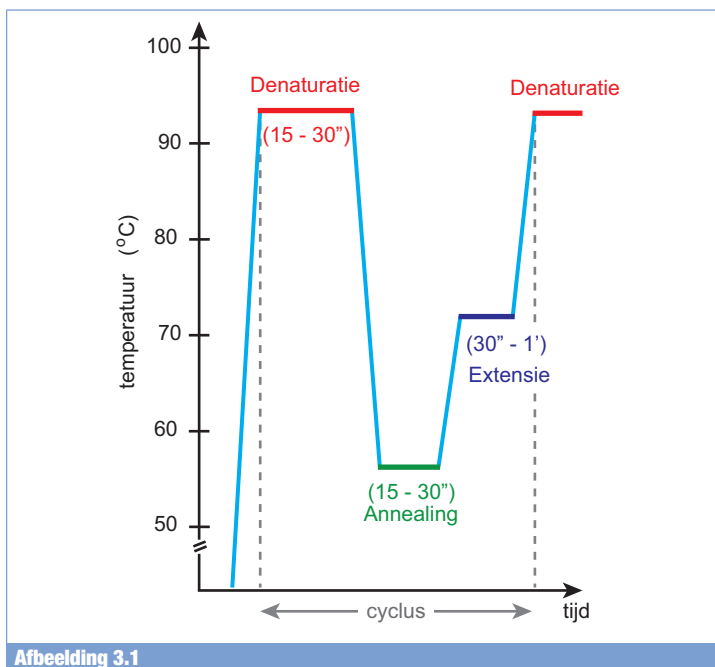
Claudia Orelia en Maria Plug
Utrecht en Leiden, voorjaar 2025



deze verhitting is dat inactieve DNA-polymerasen, zoals *hot-start* DNA-polymerasen, tegelijkertijd geactiveerd worden. Het apparaat wordt vervolgens zo ingesteld dat steeds een cyclus van twee of drie temperaturen een korte tijd wordt gehandhaafd (afb. 3.1).

De cyclus begint met een zeer hoge temperatuur (circa 95 °C), waarbij het DNA uitsmelt en enkelstrengs wordt, de denaturatiefase. Vervolgens wordt de temperatuur verlaagd naar een punt waarbij de primers aan het target kunnen hybridiseren, de annealingsfase (circa 45-60 °C). Tenslotte wordt de temperatuur verhoogd naar de optimale temperatuur van het thermostabiel DNA-polymerase (circa 72 °C), zodat extensie (verlenging van de DNA-keten) kan plaatsvinden (afb. 3.1).

Meestal zijn dertig cycli genoeg om voldoende PCR-product te krijgen. Het gevormde PCR-product noemen we amplimeer. De PCR wordt soms afgesloten met een incubatie van vijf tot tien minuten bij een temperatuur van 72 °C waarbij alle gevormde amplimeren volledig verlengd worden. Deze extra extensiestap wordt steeds minder toegepast. Voor veel *real-time* PCR-methoden worden de annealings- en de extensiefase samengevoegd tot een incubatie bij één temperatuur. De PCR-cyclus bestaat dan uit twee fasen, een denaturatiefase en een gecombineerde annealings/extensiefase.



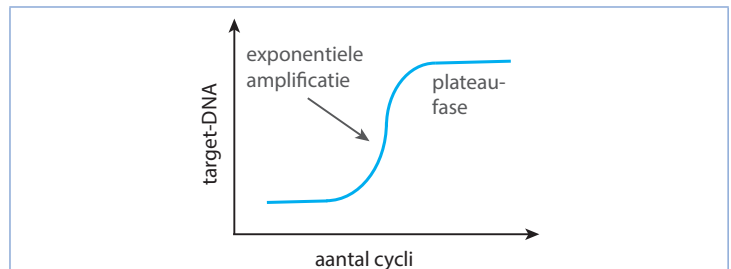
Afbeelding 3.1

Schematische weergave van een PCR-cyclus.

Een PCR-cyclus bestaat uit drie fasen: de denaturatiefase, de annealingsfase en de extensiefase. Tijdens de denaturatiefase smelt het DNA uit. Tijdens de annealingsfase hybridiseren de primers en tijdens de extensiefase vindt DNA-synthese plaats. Meestal wordt bij een PCR 15-30 seconden denaturatie, 15-30 seconden aannealingstijd en een extensietijd van 30-60 seconden aangehouden. Voor fragmenten van groter van 1000 bp gelden langere extensietijden.

De hoeveelheid DNA in de PCR-reactie neemt exponentieel toe. In theorie kan de hoeveelheid materiaal tijdens elke cyclus verdubbelen en na dertig cycli is het input-materiaal, binnen één tot enkele uren, met zo'n 1000 miljoen keer toegenomen (2^{30}). In de praktijk wordt deze verdubbeling per cyclus niet gehaald.

Als alles goed gaat, worden vooral gewenste, specifieke sequenties gekopieerd. Tijdens de eerste cycli zal nog relatief weinig amplimeer gevormd worden en blijft de hoeveelheid DNA beneden de detectiegrens. Na een aantal cycli, afhankelijk van de hoeveelheid startmateriaal, zal de hoeveelheid amplimeer sterk toenemen. Tijdens de laatste cycli van de PCR zal de reactie niet meer exponentieel verlopen, de toename van amplimeervorming neemt af door uitputting van de reactiecomponenten en door remming van de reactie door de hoge concentratie van het amplimeer. Dit wordt de plateaufase van de PCR-reactie genoemd. Het verloop van de vorming van amplimeren levert dus een grafiek in de vorm van een S-curve op (afb. 3.2).



Afbeelding 3.2

De vermeerdering van PCR-producten verloopt volgens een S (sigmoïde)-curve.

Tijdens de eerste PCR-cycli zal de hoeveelheid gevormd amplimeer beneden de detectiegrens blijven. Na een aantal cycli, afhankelijk van de hoeveelheid startmateriaal, zal de hoeveelheid amplimeer sterk toenemen. Dit wordt de exponentiële fase genoemd. Tijdens de laatste cycli van de PCR zal de reactie niet meer exponentieel verlopen. Dit wordt de plateaufase van de PCR-reactie genoemd.

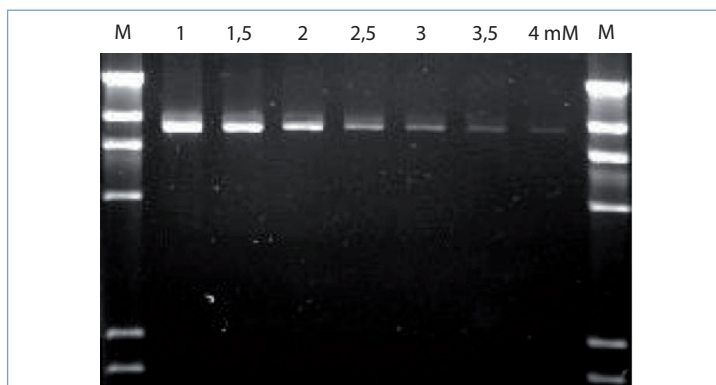
3.2 De fasen van een PCR-reactie

3.2.1 Denaturatiefase

Iedere PCR-cyclus start met een denaturatiefase. In 15-30 seconden wordt de dubbelstrengs helix bij 94-95 °C gedenatureerd tot twee enkelstrengs DNA-moleculen (afb. 3.3). Deze enkelstrengs moleculen zijn nodig als matrijs (*template*) voor de synthese van nieuw DNA door het thermostabiele DNA-polymerase. Het dubbelstrengs DNA moet volledig gedenatureerd worden zonder dat het DNA-polymerase door overbodige hitte-denaturatie wordt beschadigd. Het temperatuuroptimum voor de denaturatie van ruw ongezuiverd DNA ligt gemiddeld hoger dan bij kaal, fenol/chloroform gezuiverd DNA. Voor de meeste targets is 15 tot 30 seconden verhitten bij 94 °C voldoende om het DNA

Zowel bij een te hoge als een te lage Mg^{2+} -concentratie is het polymerase enzym minder actief. Daarnaast zal bij een te hoge Mg^{2+} -concentratie het *Taq*-DNA-polymerase vaker een verkeerde nucleotide inbouwen in het PCR-product, omdat Mg^{2+} -de binding van nucleotiden aan DNA stabiliseert.

De vrij-beschikbare Mg^{2+} -concentratie is afhankelijk van de hoeveelheid nucleotiden in de reactiemix. De vrije dNTP's, het aanwezige *template*-DNA en de gevormde PCR producten binden Mg^{2+} -ionen. Hierdoor zal de vrij beschikbare Mg^{2+} -concentratie afnemen. Daarnaast kunnen hulpstoffen in de PCR-buffer de vrij-beschikbare Mg^{2+} -ionconcentratie beïnvloeden. In qPCR-toepassingen kan bijvoorbeeld de fluorescerende kleurstof LCGreen Mg^{2+} -ionen binden, waardoor de Mg^{2+} -concentratie in de reactie verlaagd wordt. Tenslotte kunnen chelerende moleculen, zoals EDTA en citraat die aanwezig zijn in het inputmateriaal tweewaardige ionen zoals Mg^{2+} -ionen wegvangen en daarmee de PCR remmen.



Afbeelding 4.2

Mg^{2+} -optimalisatie van een PCR-reactie.

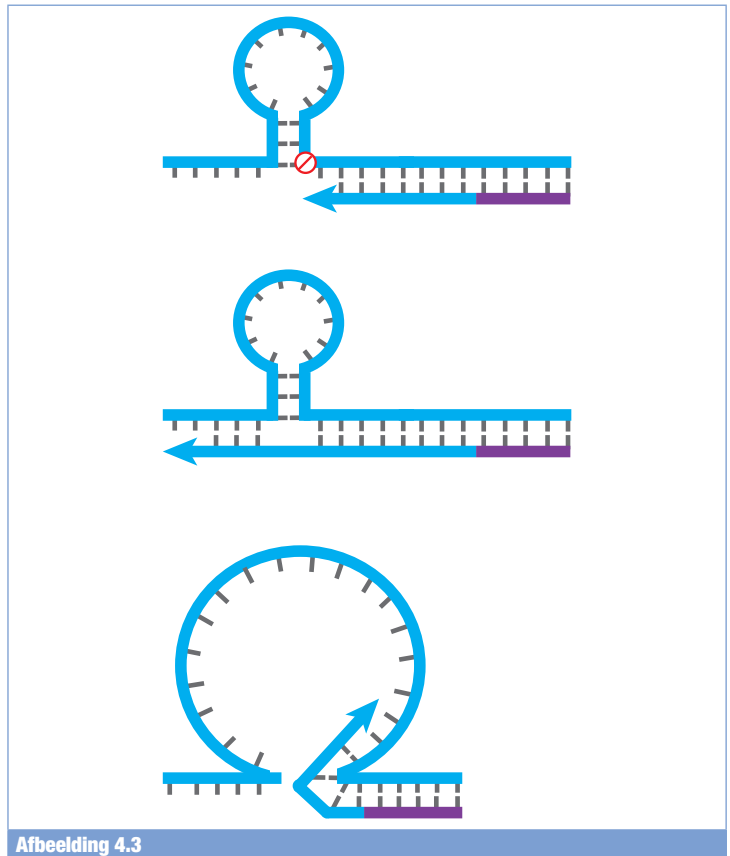
Amplificatiereacties werden uitgevoerd bij verschillende Mg^{2+} -concentraties. De reactie-producten werden geanalyseerd op een agarosegel. Boven ieder laantje is de Mg^{2+} -concentratie in het reactiemengsel weergegeven, van 1 t/m 4 mM. Links en rechts op de gel is een basenparenladder opgebracht, die aangegeven is met de letter M. (foto: Hogeschool Leiden)

4.7 Hulpstoffen in de PCR

Er zijn diverse hulpstoffen (additieven) die de specificiteit en de opbrengst van een PCR verhogen. Sommige hulpstoffen verminderen secundaire structuren in het DNA, waardoor de PCR-efficiëntie verhoogd wordt. Andere hulpstoffen stabiliseren de activiteit van het DNA-polymerase en verbeteren daarmee de PCR-opbrengst. Voor elke specifieke PCR-toepassing zullen nut en noodzaak van hulpstoffen proefondervindelijk vastgesteld moeten worden.

GC-rijke DNA-sequenties zullen veel en stabiele twee- en driedimensionale structuren, zoals haarspeldstructuren, vormen. Als gevolg hiervan kan de primer niet (goed) hybridiseren aan het target-DNA of zal het polymerase enzym van het *template* dissociëren tijdens de DNA-synthese. Het komt ook voor dat het polymerase de haarspeldstructuur zal overslaan tijdens de synthese van het PCR-product (afb. 4.3). In de hierboven genoemde situaties zal er geen of een te kort PCR-product ontstaan. Daarnaast zal de PCR-efficiëntie sterk verminderd zijn. Een aantal hulpstoffen kan uitkomst bieden:

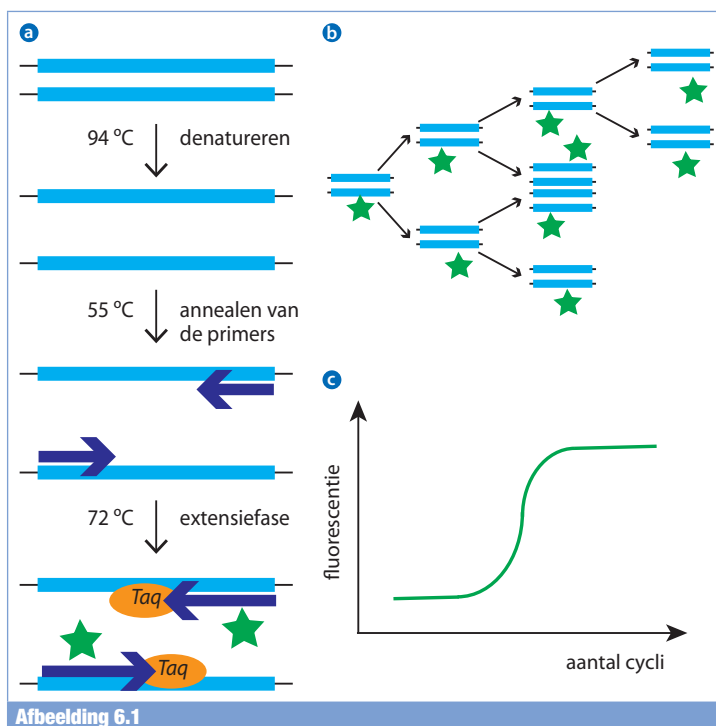
- DMSO (2-10%), formamide (1-5%) of glycerol (5-10%) verbeteren de processiviteit van het (*Taq*-)DNA-polymerase doordat deze stoffen de waterstofbruggen van het DNA destabiliseren. Hierdoor kan het enzym de dubbelstrengs structuren beter ontwinden en gebruiken als matrijs voor de DNA-synthese (afb. 4.4). In de praktijk wordt de toevoeging van DMSO aan de reactiemix vaak gebruikt voor GC-rijke PCR-targets.



Afbeelding 4.3

Haarspeld structuren in het *template*-DNA.

Het effect van een stabiele haarspeldstructuur in het *template*-DNA op de PCR-reactie is in de figuur schematisch weergegeven. Het polymerase kan de haarspeld niet aflezen en dissocieert van het *template* of slaat de sequentie binnen de haarspeldstructuur over. In beide gevallen is het PCR-product te kort. Pas als de haarspeld wordt opgebroken kan de synthese van het PCR-fragment volledig plaatsvinden.



Afbeelding 6.1

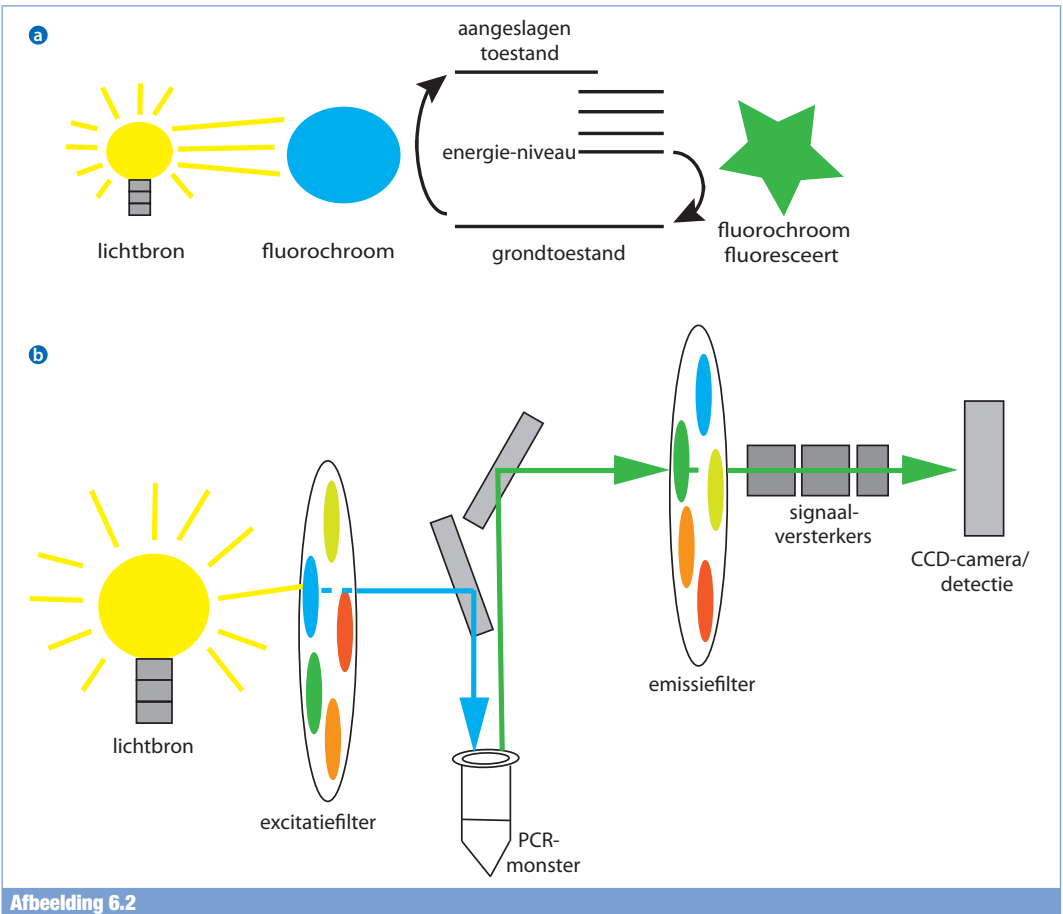
Algemeen principe van de qPCR.

- Net als bij een conventionele PCR wordt het target gedeneureerd en kunnen tijdens de annealingsfase de primers binden. Tijdens de extensie-fase wordt het PCR-product gemaakt en ontstaat het fluorescentiesignaal door binding van fluorescerende DNA-bindende kleurstoffen of door afbraak van de hydrolysatie-probe. Bij sommige qPCR-methoden wordt de fluorescentie gemeten in de annealingsfase, maar ook hier is de hoeveelheid fluorescentie proportioneel met de hoeveelheid PCR-product.
- Elke cyclus zal er meer PCR-product en dus meer fluorescentie waarneembaar zijn.
- De toename in fluorescentie verloopt volgens een S-vormige curve. Tijdens de eerste cycli is er nauwelijks PCR-product gemaakt en is er weinig fluorescentie waarneembaar. Na een aantal cycli zal de hoeveelheid PCR-product en de fluorescentie sterk toenemen. Na 20-40 cycli zullen de reactiecomponenten uitgeput raken en zullen de gevormde PCR-producten de reactie gaan remmen. Er is nauwelijks een toename in de hoeveelheid gevormde PCR-producten en fluorescentie. De plateau fase van de qPCR is bereikt.

6.2 qPCR-detectie is gebaseerd op fluorescentie

Detectie van PCR-producten bij de qPCR is gebaseerd op een optisch, natuurkundig verschijnsel genaamd fluorescentie. Fluorochromen zijn moleculen die energie in de vorm van licht kunnen opnemen. In de uitgangspositie bevindt het fluorochroom zich in de grondtoestand, dit is de toestand waarbij de energie van het molecuul het laagst is. Het opnemen van licht-energie door het fluorochroom noemen we excitatie (in een aangeslagen toestand brengen) van het molecuul. Soms wordt er van 'aanstralen van het fluorochroom' gesproken. De opname van de lichtenergie zorgt ervoor dat het fluorochroom in een hogere energietoestand

terecht komt. Dit noemen we ‘aangeslagen toestand’. Het molecuul zal terugkeren naar het oorspronkelijke energieniveau of terugvallen naar de grondtoestand waarbij de opgenomen energie zal vrijkomen. De vrijgekomen energie zal als licht worden afgegeven door het fluorochroom, dit noemen we emissie of uitstralen (afb.6.2). In het proces van excitatie en emissie van het fluorochroom gaat een gedeelte van de energie verloren. Hierdoor zal de kleur (golflengte) van het licht dat het fluorochroom exciteert anders zijn dan de kleur (golflengte) van het licht dat wordt gemitteerd.



Afbeelding 6.2

Principe van fluorescentie en detectie in een qPCR-apparaat.

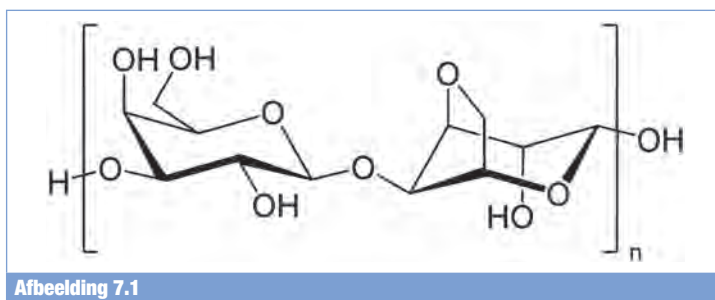
- Een lichtbron zorgt dat de energie uit het licht een fluorochroom van een laag energieniveau (grondtoestand) naar een hoger energieniveau (aangeslagen toestand) brengt. Dit noemen we exciteren van het fluorochroom. Het fluorochroom zal terugvallen naar de grondtoestand, waarbij een gedeelte van de geabsorbeerde energie verloren gaat en tegelijk fluorescentie van een lagere energie en hogere golflengte wordt uitgezonden. Het uitstralen van fluorescentie noemen we emissie.
- Voorbeeld van het aanstralen van de fluorochromen en de detectie van het fluorescente licht in een qPCR-apparaat. In het qPCR-apparaat wordt het licht vanuit de lichtbron gefilterd door een excitatiefilter. Een bepaalde kleur licht valt (in dit voorbeeld via spiegels) op het PCR-monster en exciteert de fluorescente kleurstoffen als er PCR-product is aangemaakt. Via het emissiefilter komt de fluorescentie afkomstig uit het PCR-monster (in dit voorbeeld via spiegels) terecht op signaalversterkers en de detector (CCD-camera), die het signaal detecteren en doorsturen naar data-analyse software.

7.2 Nucleïnezuur-scheidingsmethoden: Agarose Gel-Elektroforese (AGE) en PolyAcrylamide Gel-Elektroforese (PAGE)

Agarosegel-elektroforese, en in mindere mate polyacrylamidegel-elektroforese, is een veel gebruikte methode om nucleïnezuurfragmenten en dus ook PCR-producten van elkaar te scheiden en te detecteren. Zowel een agarose- als een polyacrylamidegel kan in vele concentraties en verschillende formaten gegoten worden. De agarosegel- en polyacrylamidegel-elektroforese, maar ook capillaire elektroforese, zijn gebaseerd op vergelijkbare principes. De negatief geladen nucleïnezuren worden met behulp van elektrische stroom in een matrix (agarose, polyacrylamide of polyacrylamideachtig polymeer) gescheiden op fragmentgrootte/molecuulgewicht. De dichtheid van de matrix, en daarmee de grootte van de poriën in de matrix, kan gevarieerd worden, zodat ook het scheidend vermogen gevarieerd kan worden.

7.2.1 Matrix en benodigde apparatuur

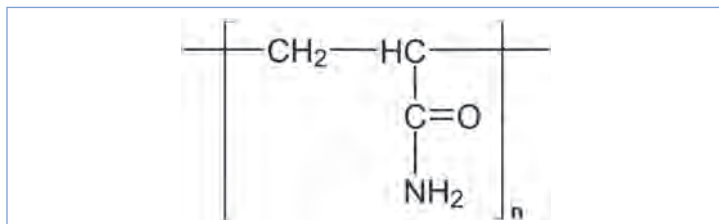
De agarose- of polyacrylamidegel bestaat uit een matrix die voor de fragmentscheiding zorgt. De agarosegel bestaat uit een matrix gevormd door agarose polymeer dat een netwerk vormt. Agarose is een disaccharide (suiker); het wordt geëxtraheerd uit zeewier (afb. 7.1). Er zijn verschillende kwaliteiten agarose commercieel verkrijgbaar. Hoe hoger de kwaliteit (*quality grade*), des te minder verontreiniging (andere polysachariden, zouten en eiwitten) er in de agarose aanwezig is.



Afbeelding 7.1
Structuurformule van agarose.

De polyacrylamidegel bestaat uit een netwerk van acrylamide en bisacrylamide polymeren en dwarsverbindingen. Acrylamide is een chemische stof met de chemische formule C_3H_5NO (afb. 7.2).

De agarosegel-elektroforesetechniek is relatief eenvoudig, goedkoop en snel uit te voeren. Bij agarosegel-elektroforesesystemen vindt de scheiding horizontaal plaats. Na het verhitten van de agarose in de elektroforesebuffer lost de agarose op en wordt de gelvloeistof in een kunststof bak gegoten waarin de gel kan uitharden.

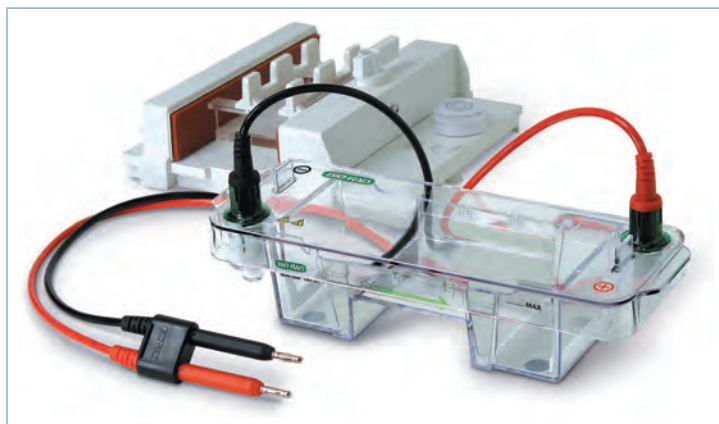


Afbeelding 7.2

Structuurformule van een polyacrylamide.

De gel wordt vervolgens in een elektroforesebak met buffer geplaatst, zodat de monsters geladen en gescheiden kunnen worden (afb. 7.3). Een spanningsverschil van 1-5 V per cm kathode-anode-afstand is voor agarosegel-elektroforese gebruikelijk.

Een polyacrylamidegel is lastiger te gieten en te bewerken, omdat de dunne gel tussen glasplaten wordt gegoten. De scheiding vindt meestal in verticale richting plaats. De glasplaten worden met behulp van *spacers* op de juiste afstand van elkaar gebracht, waarna de vloeibare gel tussen de glasplaten gegoten kan worden en vervolgens kan polymeriseren. De glasplaten worden in een elektroforese-unit gezet waarin zich de elektroforesebuffer bevindt. De unit kan na het laden van de monsters aangesloten worden op een spanningsbron, zodat de scheiding kan plaatsvinden. Het spanningsverschil dat voor de fragmentscheiding wordt toegepast is afhankelijk van de afstand tussen de kathode en de anode.



Afbeelding 7.3

Agarosegel-elektroforeseapparatuur.

Deze foto laat de apparatuur zien die nodig is voor agarosegel-elektroforese. Op de achtergrond is een onderdeel zichtbaar waar de gel gegoten kan worden. In een plastic bak (*tray*) kan de agarose gegoten worden. Vervolgens wordt er een kam in de vloeibare agarose geplaatst. De tanden van de kam zullen uitsparingen (*slots*) in de gel vormen als de gel gestold is. In de *slots* kunnen de monsters geladen worden. Op de voorgrond is de buffertank zichtbaar die aangesloten kan worden op een spanningsbron. De buffertank wordt gevuld met elektroforesebuffer en daarna wordt de gel in de tank geplaatst. Nu kunnen de monsters in de *slots* geladen worden. Vervolgens zorgt het spanningsverschil voor de scheiding van de nucleïnezuuren. (foto: Bio-Rad Laboratories, Inc. (www.bio-rad.com))

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)

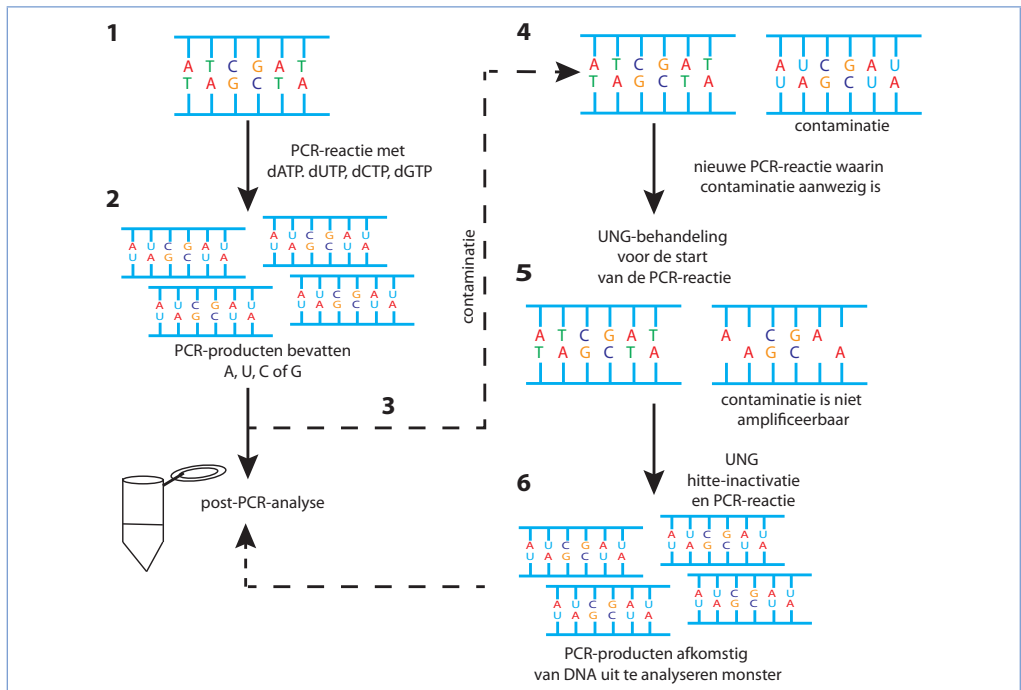
Contaminatiepreventie door gebruik van UNG PCR-technologie

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-isolatierruimte 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.