UNG (Uracil-DNA-Glycosidase)

J. Arnemann

Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln,
Deutschland

Synonym(e) Uracil-DNA Glykosidase

Englischer Begriff UNG; uracil DNA glycosylase

Definition Das Enzym Uracil-DNA-Glykosidase (UNG), ein Bestandteil des Basenexzisionsreparatursystems (BER), kann vor der PCR-Reaktion gezielt zur Entfernung möglicher Kreuzkontaminationen mit bereits vorhandenen DNA-Fragmenten eingesetzt werden.

Beschreibung Es gibt mehrere Typen von Glykosidasen, die jeweils spezifisch definierte Basen durch Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen der eigentlichen Base und dem Zucker-Phosphat-Rest herausschneiden, am Beispiel des UNG-Enzyms ist es die Base Uracil.

Bei routinemäßigem Einsatz zwecks Dekontamination wird der allgemeine PCR-Reaktionsansatz dahingehend modifiziert, dass neben einer HotStart-DNA-Polymerase (ohne Proofreading-Aktivität) dUTP statt dTTP oder auch als dUTP/dTTP-Mix bei der Amplifikation eingesetzt wird.

Dabei wird dUTP mit vergleichbarer Effizienz wie dTTP in das PCR-Fragment eingebaut.

Insbesondere in der Erregerdiagnostik, wie z. B. HCV-Diagnostik, muss sichergestellt sein, dass die z. T. geringen Nachweisraten auch vom untersuchten Patienten und nicht von einer Kreuzkontamination aus vorherigen Ansätzen stammen. Aus diesem Grund wird der PCR-Reaktion das Enzym UNG zugesetzt und das PCR-Reaktionsgemisch anfangs zunächst für 2 Minuten bei 50 °C inkubiert, um bei möglicherweise kontaminierten DNA-Fragmenten aus einem früheren PCR-Ansatz (sog. Carry-over-Kontamination) die Uracilbausteine herausszuschneiden. Die eigentliche PCR-Amplifikation wird anschließend als HotStart-Schritt von 10–15 Minuten bei 95 °C gestartet, wobei das UNG-Enzym irreversibel inaktiviert und der Zucker-Phosphat-Rest der kontaminierten DNA abgebaut wird. Die potenziell kontaminierten DNA-Fragmente sind hierdurch fragmentiert und können nicht amplifiziert werden, während die eigentliche Patienten-DNA unbehandelt und stabil ist und so selektiv amplifiziert wird. Das Fehlen einer Proofreading-Aktivität der eingesetzten HotStart-DNA-Polymerase verhindert zusätzlich eine mögliche Reparatur der herausgelösten dUTPs.

Literatur

Tetzner R (2009) Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment of bisulfite-treated DNA. *Methods Mol Biol* 507:357–370