



# 如何防止 PCR 污染

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 片段的方法，在微生物感染的诊断中具有重要的价值。在 PCR 扩增过程中，扩增的 DNA 产量是呈指数上升的，经过  $n$  个循环的扩增，一个 DNA 分子的产量便达到  $2^n$  个拷贝。PCR 产物一般为  $10^{13}$  拷贝/ml，取 0.1ml 即为  $10^9$  拷贝，而 1mg 人基因组 DNA 才含  $1.4 \times 10^6$  拷贝的单拷贝基因片段，因此使得 PCR 扩增反应具有强大的扩增能力，提高了检测的敏感性。此外，利用 PCR 反应，还能够对感染因子实施定量分析，实时监测其在宿主体内的动态变化，有利于指导临床诊疗。正是由于 PCR 反应具有强大的扩增效率，也导致其易污染的缺点，极微量的污染便可导致假阳性结果。PCR 反应中，主要存在三个污染源：1. 标本间的交叉污染；2. 实验室克隆质粒的污染；3. PCR 扩增产物的污染。其中以第三个污染源最主要，通过下面一个例子便可认识到 PCR 产物污染的严重性。在 100ml 的反应管中可产生  $10^{12}$  拷贝个分子，若将这些分子在一个标准奥林匹克游泳池 (50m' 25m' 2m) 内稀释后，0.1 ml 稀释液含有 400 拷贝的扩增分子，远远超过了 PCR 扩增反应检测数个拷贝的极限。因此，PCR 检测微量感染因子时，一定要注意产物残留污染的问题，对临床实验室尤应如此。本文就 PCR 污染的预防、污染源的追踪及污染的处理进行分析。

## 一. 污染的预防

进行 PCR 操作时，操作人员应该严格遵守一些操作规程，最大程度地降低可能出现的 PCR 污染或杜绝污染的出现。

### (一) 划分操作区

目前，普通 PCR 尚不能做到单人单管，实现完全闭管操作，但无论是否能够达到单人单管，均要求实验操作在三个不同的区域内进行，PCR 的前处理和后处理要在不同的隔离区内进行：

1. 标本处理区，包括扩增模板的制备；
2. PCR 扩增区，包括反应液的配制和 PCR 扩增；
3. 产物分析区，凝胶电泳分析，产物拍照及重组克隆的制备。

各工作区要有一定的隔离，操作器材专用，要有一定的方向性。如：标本制备→PCR 扩增→产物分析→产物处理。

切记：产物分析区的产物及器材不要拿到其他两个工作区。

### (二) 分装试剂

PCR 扩增所需要的试剂均应在装有紫外灯的超净工作台或负压工作台配制和分装。所有的加样器和吸头需固定放于其中，不能用来吸取扩增后的 DNA 和其他来源的 DNA。



1. PCR 用水应为高压的双蒸水；
2. 引物和 dNTP 用高压的双蒸水在无 PCR 扩增产物区配制；
3. 引物和 dNTP 应分装储存，分装时应标明时间，以备发生污染时查找原因。

### (三) 实验操作注意事项

尽管扩增序列的残留污染大部分是假阳性反应的原因，样品间的交叉污染也是原因之一。因此，不仅要在进行扩增反应是谨慎认真，在样品的收集、抽提和扩增的所有环节都应该注意。

1. 戴一次性手套，若不小心溅上反应液，立即更换手套；
2. 使用一次性吸头，严禁与 PCR 产物分析室的吸头混用，吸头不要长时间暴露于空气中，避免气溶胶的污染；
3. 避免反应液飞溅，打开反应管时为避免此种情况，开盖前稍离心收集液体于管底。若不小心溅到手套或桌面上，应立刻更换手套并用稀酸擦拭桌面；
4. 操作多份样品时，制备反应混合液，先将 dNTP、缓冲液、引物和酶混合好，然后分装，这样即可以减少操作，避免污染，又可以增加反应的精确度；
5. 最后加入反应模板，加入后盖紧反应管；
6. 操作时设立阴阳性对照和空白对照，即可验证 PCR 反应的可靠性，又可以协助判断扩增系统的可信性；
7. 尽可能用可替换或可高压处理的加样器，由于加样器最容易受产物气溶胶或标本 DNA 的污染，最好使用可替换或高压处理的加样器。如没有这种特殊的加样器，至少 PCR 操作过程中加样器应该专用，不能交叉使用，尤其是 PCR 产物分析所用加样器不能拿到其它两个区；
8. 重复实验，验证结果，慎下结论。

## 二. 追踪污染源

如果不慎发生污染情况，应从下面几条出发，逐一分析，排除污染。

### (一) 设立阴阳性对照：

有利于监测反应体系各成分的污染情况。选择阳性对照时，应选择扩增弱，且重复性好的样品，因强阳性对照可产生大量不必要的扩增序列，反而可能成为潜在的污染源。如果以含靶序列的重组质粒为对照，100 个拷贝之内的靶序列就足以产生阳性扩增。阴性对照的选择亦要慎重，因为 PCR 敏感性极高，可以从其它方法（Southern 印迹或点杂交等）检测阴性的标本中检测出极微量的靶分子。此外，每次扩增均应包括 PCR 体系中各试剂的时机对照，即包括 PCR 反应所需的全部成分，而不加模板 DNA，这对监测试剂中 PCR 产物残留污染是非常有益的。如果扩增结果中试剂对照为阳性结果，就是某一种或数种试剂被污染了。此时，要全部更换一批新的试剂进行扩增，扩增时设立不同的反应管，每一管含有一种被检测试剂，在检出污染试剂后，应马上处理。

### (二) 环境污染：

在排除试剂污染的可能性外，更换试剂后，若不久又发现试剂被污染了，如果预防措施比较严密，则考虑可能为环境污染。

环境污染中常见的污染源主要有：

1. 模板提取时真空抽干装置；
2. 凝胶电泳加样器；
3. 电泳装置；
4. 紫外分析仪；
5. 切胶用刀或手术刀片；
6. 离心机；
7. 冰箱门把手，冷冻架，门把手或实验台面等；

此时可用擦拭实验来查找可疑污染源。

- 1) 用无菌水浸泡过的灭菌棉签擦拭可疑污染源；
  - 2) 0.1ml 去离子水浸泡；
  - 3) 取 5ml 做 PCR 实验；
  - 4) 电泳检测结果。
8. 气溶胶。

如果经过上述追踪实验，仍不能查找到确切污染源，则污染可能是由空气中 PCR 产物的气溶胶造成的，此时就应该更换实验场所，若条件不允许，则重新设计新的引物（与原引物无相关性）。

### 三. 污染处理

#### （一）环境污染

1. 稀酸处理法：对可疑器具用 1mol/L 盐酸擦拭或浸泡，使残余 DNA 脱嘌呤；
2. 紫外照射（UV）法：紫外波长（nm）一般选择 254/300nm，照射 30min 即可。需要注意的是，选择 UV 作为消除残留 PCR 产物污染时，要考虑 PCR 产物的长度与产物序列中碱基的分布，UV 照射仅对 500bp 以上长片段有效，对短片段效果不大。UV 照射时，PCR 产物中嘧啶碱基会形成二聚体，这些二聚体可使延伸终止，但并不是 DNA 链中所有嘧啶均能形成二聚体，且 UV 照射还可使二聚体断裂。形成二聚体的程度取决于 UV 波长，嘧啶二聚体的类型及与二聚体位点相邻核苷酸的序列。在受照射的长 DNA 链上，形成二聚体缺陷的数量少于 0.065/碱基，其他非二聚体的光照损伤（如环丁烷型嘧啶复合体，胸腺嘧啶乙二醇，DNA 链间与链内的交联和 DNA 断裂等）均可终止 Taq DNA 聚合酶的延伸。这些位点的数量与二聚体位点相当。如果这些位点（0.13/碱基）在 DNA 分子上随机分布，一个 500bp 片段的 DNA 分子链上将有 32 处损伤位点，那么，105 个这样的分子中每个分子中会至少有一处损伤。相反，如果 100bp 的片段，每条链上仅有 6 处损伤，105 个拷贝分子中将有许多分子没有任何损伤。这就是 UV 照射有一定的片段长度限制的原因。

## （二）反应液污染

可采用下列方法之一处理：

1. DNase I 法：PCR 混合液（未加模板和 Taq 聚合酶）加入 0.5U DNase I，室温反应 30 min 后加热灭活，然后加入模板和 Taq 聚合酶进行正常 PCR 扩增。该方法的优点是不需要知道污染 DNA 的序列；
2. 内切酶法：选择识别 4 个碱基的内切酶（如 Msp I 和 Taq I 等），可同时选择几种，以克服用一种酶只能识别特定序列的缺陷，室温作用 1h 后加热灭活进行 PCR；
3. 紫外照射法：未加模板和 Taq 聚合酶的 PCR 混合液进行紫外照射，注意事项与方法同上述 UV 照射法；
4.  $\gamma$  射线辐射法：1.5kGy 的辐射可完全破坏 0.1ng 基因组 DNA，2.0 kGy 可破坏 104 拷贝的质粒分子，4.0 kGy 仍不影响 PCR，但高于此限度会使 PCR 扩增效率下降。引物可受照射而不影响 PCR， $\gamma$  射线是通过水的离子化产生自由基来破坏 DNA 的。

## （三）尿嘧啶糖苷酶（UNG）法

由于 UV 照射的去污染作用对 500bp 以下的片段效果不好，而临床用于检测的 PCR 扩增片段通常为 300bp 左右，因此 UNG 的预防作用日益受到重视和肯定。

1. 原理：在 PCR 产物或引物中用 dU 代替 dT。这种 dU 化的 PCR 产物与 UNG 一起孵育，因 UNG 可裂解尿嘧啶碱基和糖磷酸骨架间的 N-糖基键，可除去 dU 而阻止 TaqDNA 聚合酶的延伸，从而失去被再扩增的能力。UNG 对不含 dU 的模板无任何影响。UNG 可从单或双链 DNA 中消除尿嘧啶，而对 RNA 中的尿嘧啶和单一尿嘧啶分子则无任何作用。
2. dUTP 法：用 dUTP 代替 dTTP，使产物中掺入大量 dU。在再次进行 PCR 扩增前，用 UNG 处理 PCR 混合液即可消除 PCR 产物的残留污染。由于 UNG 在 PCR 循环中的变性一步便可被灭活，因此不会影响含 dU 的新的 PCR 产物。
3. dU 引物法：合成引物时以 dU 代 dT，这样 PCR 产物中仅 5' 端带 dU。UNG 处理后，引物失去了结合位点而不能扩增。对长片段（1-2kb 以上）的扩增用 dUTP 法效率较用 dTTP 低，而用 dU 法就可克服这一缺点。dU 引物最好将 dU 设计在 3' 端或近 3' 端。该法仅能用于引物以外试剂的处理。
4. 优点：可以去除任何来源的污染；UNG 处理可以和 PCR 扩增在同一个反应管内进行；由于扩增产物中有大量 dU 存在，可彻底消除污染源。
5. 需注意的是掺入 dUTP 的 DNA 不应对产物的任何操作有影响，在进行 PCR 产物克隆时，应该转化 UNG<sup>-</sup>（UNG 缺陷）大肠杆菌受体菌，否则转化产物会被受体菌 UNG 消化掉。

## （四）固相捕获法

用于去除标本中污染的核酸和杂质，原理如下：1) 用一生物素标记的单链 RNA 探针与待扩核酸

杂交，杂交区域是非扩增区；2) 用包被链霉亲和素的固相载体来捕获带有生物素探针的杂交核酸，通过漂洗可去除污染的扩增产物和杂质；3) 洗脱靶分子后用特异引物扩增非 RNA 探针杂交区域。第 2) 步的漂洗后可用 PCR 检测以确定标本是否被扩增产物或重组质粒污染。

#### (五) RS-PCR 法 (RNA-specific PCR)

也称为链特异性 PCR，主要指用于 RNA 模板的特异性 PCR 法，该法可明显降低假阳性而不影响 PCR 的敏感性。其关键在于设计引物，逆转录引物的 3' 端 (A 区) 有 20 个核苷酸左右为模板的特异性互不序列，5' 端 20 个核苷酸 (C 区) 为附加修饰碱基。与 mRNA 逆转录后，经超速离心使 cDNA 与多余引物分开，再用和第二引物 (C) 以第一链 cDNA 为模板合成第二链 cDNA，以后的 PCR 循环中用逆转录引物的 B 区和引物 C 进行扩增加尾 cDNA，而污染的 DNA 或质粒 DNA 才不会被扩增。

#### (六) 抗污染引物法

该对引物扩增时通过病毒 DNA 克隆如入质粒的位点。这一区域只存在完整的原病毒中，在重组质粒中，这一区域分成两个区域与克隆位点被。如果重组质粒污染了标本，也不能扩增出任何条带，即使出现了扩增带，其大小也与预期的不同。只有原病毒 DNA 才能被引物扩增，因此只要出现预期大小的扩增带就可以证明标本是阳性的，该法适用于环状靶分子系列。

### 四. 其它 PCR 检测方法:

(一) **两步法:** 是指在用套式 PCR 方法扩增某些含量低微的标本时，两对引物在同一个管中以简化步骤，减少污染。通常第一步进行 20-25 个循环，扩增外引物片段；第二步再进行 10 个循环，扩增内引物片段。两步法对内外引物的  $T_m$  值有特殊要求，即内外引物的退火温度高 (如 68°C)，在此温度下内引物不与模板退火，然后降低退火温度 (至 55°C) 再扩增内引物片段，这样，在操作过程中，仅打开 PCR 反应管一次，大大减少了污染的可能性。

(二) **荧光法:** 亦称荧光 PCR 技术 (fluorescence PCR, F-PCR)，是 1995 年由美国 PE 公司首先研制成功的，它融汇了 PCR 的灵敏性、DNA 杂交的特异性和光谱技术精确定量的优点，电脑同步跟踪，数据自动化处理，直接探测 PCR 过程中的变化以获得定量的结果，不需要做 PCR 后处理或检测，完全闭管操作。探针标记除用 TET 和 FAM 外，还可用 HEX、JOE 作为报告荧光，3' 端的淬灭基团常用 TAMRA。在探针保持完整时，荧光报告基团的荧光被荧光抑制基团淬灭，而在探针被切断后，荧光报告基团才发出报告荧光，且荧光的强度与 PCR 产物的数量呈正比。荧光检测仪器透过 PCR 管壁能直接检测到荧光信号的波长和长度变化。

主要有以下优点:

1. 探针特异性强，假阳性率低；
2. 操作快速，不需要 PCR 后处理；
3. 定量范围宽，HBV 0.4fg-4000fg/ml (10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> Dane' s particle/ml)；
4. 闭管操作，PCR 产物污染少；

5. 灵敏度高。

主要方法有：

1. 荧光探针法：进行荧光 PCR 检测时，要求荧光探针必须完全与靶基因互补，长度以 20-30 个碱基为宜，必要时 3' 端磷酸化封闭，以防在扩增时作为引物延伸。该方法利用 Taq 酶的 3' → 5' 聚合酶活性及 5' → 3' 外切酶活性，可以在链延伸过程中实现链替换，并将被替换的探针切断，故可进行定性与定量检测。

荧光探针 3' 端标记的 TAMRA，在 480nm 激发下产生 530nm 的红色荧光；5' 端标记的 FAM，激发后产生绿色荧光。PE 公司推出的 TaqMan 系统，即采用双荧光探针，如配合使用 PCR 扩增与荧光检测合二为一的仪器，可进行实时 (real-time) 定量检测。

2. 分子信标法：分子信标 (molecular beacon) 是一个发夹样结构的特异探针，其环状部分与靶序列互补。在室温时，分子信标的发夹紧闭，荧光淬灭。PCR 扩增时，随着温度升高，发夹松开，与单链模板特异结合，发出荧光。荧光强度与模板呈正比，故可用于 PCR 产物的定性及定量。



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

