

PCR 实验室的污染与控制

雷小念¹ 尹前盛²

(1. 重庆市巴南区疾病预防控制中心 重庆 401320)
(2. 重庆市梁平区疾病预防控制中心 重庆 405200)

【摘要】聚合酶链式反应(PCR)的灵敏性、扩增能力均较强,但易于被环境因素所污染,只要有微量污染,就可诱发假阳性现象。有鉴于此,很有必要对 PCR 实验室的污染物进行控制,以此来让检验结果趋于科学、可靠。本文首先分析了 PCR 实验室的常见污染途径,其次,深入探讨了 PCR 实验室污染的控制措施。

【关键词】PCR 实验室; 污染; 控制

1 前言

聚合酶链式反应(PCR)是一种具有代表性的分子生物学技术,可将特定 DNA 片段进行放大扩增,无论是灵敏性,还是扩增能力均较强,即便是微量 DNA,也可在短时间扩大数百万倍。即便是数千年前的历史人物残骸与化石古生物,只要能够在其中提取出部分 DNA,也可通过 PCR 技术来持续放大,继而为精准对比打下基础。PCR 的概念最早是由美国 Mullis 教授在 1983 年提出,并且在 2 年后提出了简易 DNA 扩增法,这也标志着 PCR 技术得以诞生,中国的钱嘉韵教授也在其中发挥了极为重要的作用。但是聚合酶链式反应(PCR)也有一个较为明显的特点——易于被环境因素所污染,只要有微量污染,就可诱发假阳性现象。有鉴于此,很有必要对 PCR 实验室的污染物进行控制,以此来让检验结果趋于科学、可靠,本文就 PCR 实验室的污染与控制进行探讨。

2 PCR 实验室的常见污染途径

PCR 技术具有较高的敏感性,也会有许多因素对其进行一项(影响),从最开始的样本采用(采集),再到最后的 PCR 检测结果报告,只要有细微失误,均会导致最终的检测结果出现偏差;即便是微量污染,就可诱发(出现)假阳性现象(结果)。究其根本,主要有 4 个途径易于造成污染:(1)PCR 试剂制备过程污染。在配制 PCR 试剂时,PCR 核酸模板在一定程度上污染了水(洁净工作台)、容器(八连排管)、加样器等。(2)标本间交叉污染。第一,有污物污染了用来收集(采集)标本的容器;第二,在放置标本的过程中,由于没有做好严密(严格)密封措施,导致有部分标本流在(出)了容器之外;第三,有标本粘附在容器外面,没有及时清理,导致出现交叉污染的现象。第四,在提取标本 DNA 模板(核酸)时,所使用的吸样器(加样器、深孔板)存在着污染,这样一来,就会造成出现标本之间污染的现象。第五,随着标本气溶胶的移动(产生),有部分病毒污染了标本,进而出现污染现象。(3)PCR 扩增产物污染。众所周知,PCR 产物往往会有海量的拷贝量,只要有 1 个拷贝出现污染问题,就会导致出现假阳性现象;PCR 扩增产物污染已经成为了 PCR 实验室最常见的污染问题。(4)克隆质粒的污染。克隆质粒的污染较易出现在分子生物学实验室,主要原因在于:单位容积内的克隆质粒往往会有较高的浓度值,且在其纯化环节需采用大量的试剂与用具;克隆质粒是存活于活细胞内,会随着活细胞的生长繁殖而迅猛发展,必然也会出现较大的污染可能性。(试剂盒阳性对照物污染:随着实验频次的累加,试剂盒阳性对照物的使用,不可避免的会产生阳性对照物气溶胶,一旦有污染的气溶胶附着在 PCR 检测体系上,必然会出现假阳性结果。)若 PCR 实验室出现污染现象,务必要在第一时间内停止所有实验,只有将污染源找准并清除之后才可重做实验,原来的检测报告结果不予生效,全部作废,待后续重新实验之后再得出精准结果。

3 PCR 实验室污染的控制措施

3.1 合理划分 PCR 实验室的工作区域

3.1.1 实验区域科学设置

要严格按照法规准则的要求来对 PCR 实验室的工作区域进行合理分隔,分别将 PCR 反应液(体系)配制、标本处理、PCR 检测、PCR 产物分析等置于不同区域来开展,尤其是要将标本处理、PCR 检测、PCR 产物分析与其它工序分别开来,建议 PCR 实验室专门划分出 PCR 反应液(体系)配制区域、标本处理区域、PCR 检测区域、PCR 产物分析区域等。与此同时,PCR 实验室内的吸(加)样枪与实验用品均要做到“专用”,并且在每次实验之前,均需通过紫外线消毒的方式来将吸(加)样枪与实验用品残留的 DNA 进行破坏。

3.1.2 实验区域内的设备与物品要有颜色标记

实验区域内的设备与物品要有颜色标记,绝对不能出现不同实验区域混用的情况,每个实验区域要有本区域专用的抹布、工作服、拖把、水壶等,以此来最大限度地避免出现 PCR 实验室污染。值得注意的是,在实验过程中所采用的口罩、离心管、手套、防护服、吸头均要做到一次性使用。

3.2 空调通风系统要合理设置

PCR 实验室的空调通风系统要合理设置,最好能够让所安装的空调通风系统做到全送全排,且单一流向,不能出现逆行的情况。其流向为:首先,流向到 PCR 实验室的贮存区与试剂准备区,其次,流向到 PCR 实验室的标本制备区,再次,流向到 PCR 实验室的扩增区,最后,流向到 PCR 实验室的扩增产物分析区。

3.3 污染监测

PCR 实验室需要进一步加大污染监测力度,要专门开展多次性的阴性对照与阳性对照,并且还要多去不同实验区域采集引物来开展 PCR 扩增,确保污染监测有效到位。

3.4 规范操作

第一,PCR 实验室的全体工作人员都要严格执行上岗培训制度,只有培训合格之后,才能够参与到 PCR 扩增检验工作。第二,PCR 实验室的工作人员在日常检测时要做到勤换手套,切忌直接用手去接触管盖内面。第三,务必要严格按照规则制度来对设备、仪器进行操作,最大限度地防止出现气溶胶污染。第四,无论是取样,还是加液,均要做到动作轻快,绝对不可出现标本或试剂飞溅现象,同时还不能出现较远距离移样的情况。第五,若在检测过程中,工作人员出现衣物被污染的情况,那么要在第一时间内脱掉,并且及时消毒处理,待更换已消毒好的衣物之后,才可继续开展工作。

4 结语

总之,PCR 技术已经成为了当前医学界用于预防控制与疾病诊断的有效“利刃”,为了防止污染现象出现 PCR 实验室,需要 PCR 实验室全体工作人员群策群力,逐渐增强自身检测能力,科学应对、避免出现污染蔓延的情况。

参考文献:

- [1] 南文龙,张悦勇,陈义平.PCR 假阳性的原因分析及控制措施[J].中国动物检疫,2015,32(8):56-58.
- [2] 石浩宇,刘毅,范鹏程.PCR 实验室核酸污染监测及排除[J].中国医疗器械信息,2018,24(7):25-26,36.