 DOI: https://doi.org/10.12349/tie.v2i1.5814

Removal methods of nucleic acid contamination in PCR laboratory

Danhong Yang[1] Mingdeng Liu[1] Shihao Wang[2] Xiaohong Xie[1]

1. Jiangxi Environmental Engineering Vocational College, Ganzhou, Jiangxi, 341000, China
2. Shandong Kehong Medical Technology Co, Ltd., Dezhou, Shandong, 253011, China

Abstract

Nucleic acid contamination is a common problem in PCR laboratories. Finding an effective method to prevent and remove nucleic acid contamination is very significant for the normal operation of PCR laboratories and the reliability of detection results. In this paper, the effects of several different scavenger on the removal of nucleic acid contamination in PCR laboratory were compared and analyzed. The results showed that: compared with 75% alcohol and 3% hydrogen peroxide disinfectant, nucleic acid scavenger has obvious inhibitory effect on PCR reaction and can effectively degrade nucleic acid. After nucleic acid scavenger treatment, the amount of nucleic acid remaining on the surface of the instrument and the experimental bench is obviously reduced. Under the premise of maintaining the cleaning effect, 84 disinfectant has corrosion effect on the surface of stainless steel, carbon steel, copper and aluminum, and nucleic acid scavenger has almost no corrosion on the surface of the above materials.

Keywords

nucleic acid detection; PCR; nucleic acid contamination; nucleic acid scavenger

PCR 实验室核酸污染清除方法

杨丹红[1] 刘明灯[1] 王世豪[2] 谢小红[1]

1. 江西环境工程职业学院，中国·江西 赣州 341000
2. 山东科宏医疗科技有限公司，中国·山东 德州 253011

摘 要

核酸污染是PCR实验室中的常见问题，寻找一种有效的防止和清除核酸污染的方法对于PCR实验室正常运转及保障检测结果的可靠性具有重要意义。本文对比了几种不同清除剂对PCR实验室核酸污染的清除效果，并对其作用机理进行了分析。研究发现：与75%酒精、3%过氧化氢消毒剂相比，核酸清除剂对 PCR 反应具有明显的抑制作用，能有效降解核酸；仪器、实验台等表面经核酸清除剂处理后，表面残留的核酸量明显降低。在保持清除效果的前提下，84消毒液对不锈钢、碳钢、铜和铝表面均有腐蚀作用，而核酸清除剂对上述材质表面几乎无腐蚀。

关键词

核酸检测；PCR；核酸污染；核酸清除剂

1 引言

随着分子生物学的发展，核酸编辑、扩增、测序、鉴定等核酸技术应用越来越广泛，以核酸检测为中心的技术变得越来越先进，灵敏度也越来越高[1-3]。聚合酶链式反应（PCR）是目前应用最广泛的核酸检测技术，由于其可以在短时间内令靶核酸放大几百万倍，具有极高的灵敏度，有利于对靶核酸进行深入研究，因此在分子生物学领域大放异彩[4-7]。

尽管 PCR 反应有诸多优点，但由于其超高的灵敏度，一旦实验室出现核酸污染，很容易导致假阳性结果，从而影响检测的准确性。因此，如何避免核酸污染一直是影响 PCR 实验成功的关键问题[8,9]。PCR 实验室核酸污染清除常用方法有物理方法和化学方法，物理方法采用紫外线消毒，该方法对小的扩增子效果不明显，并且紫外线穿透能力弱，仅作用于物体表面，清除效果有限。化学方法主要通过化学物质氧化、变性核酸的方式来降解 DNA，从而使留在实验室的扩增产物被破坏掉[10-12]。本文比较了不同清除剂在 PCR 实验室防污染上的应用效果，研究对于核酸实验室日常防护和清除核酸污染提出了一个有效解决方案。

【基金名称】江西省教育厅科学技术研究项目（项目编号：GJJ214412）；山东省科技型中小企业创新能力提升项目（项目编号：2021TSGC1193）。

【作者简介】杨丹红（1979–），女，中国辽宁锦州人，博士，高级工程师，从事环境污染防控与治理研究。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

TB Green® Premix EX Taq Ⅱ (2X)、PCR Forward Primer(20μM)、PCR Reverse Primer(20μM)、λ DNA 模板 (1 μg/mL) 均购自宝日医生物技术（北京）有限公司；Genezap 核酸清除剂购自武汉君诺德生物技术有限公司；HSK 核酸清除剂购自山东科宏医疗科技有限公司；75% 酒精、84 消毒液、3% 过氧化氢消毒液购自山东利尔康消毒科技有限公司。核酸检测使用 LightCycler®480 Ⅱ实时荧光定量 PCR 仪及 DYCP-31DN 型琼脂糖水平电泳仪。

2.2 实验方法

2.2.1 清除剂对 DNA 破坏效果检测

取浓度 0.1ng/μL 待测试液 10μL 于 1.5mL EP 管内，向 EP 管内先加入 5μL 清除剂，震荡混匀 2min，琼脂糖凝胶电泳测定核酸残留。

2.2.2 清除剂对 PCR 抑制效果检测

向 PCR 反应体系中加入清除剂 5μL，将体系补足至 20μL。与 DNA 模板进行等体积混合，取 5μL 作为模板进行 PCR 扩增，实时荧光定量 PCR 仪进行检测。

2.2.3 不同材质表面核酸残留的清除效果检测

为验证清除剂对于塑料、玻璃、金属表面及实验台面核酸残留的清除效果，将阳性 PCR 产物滴在不同材质上晾干模拟核酸残留，用清除剂对 4 种材质表面的核酸残留进行去除操作，然后采集处理点的残留核酸进行荧光 PCR 鉴定。

2.2.4 清除剂对金属腐蚀性检测

参照文献 [13] 进行金属腐蚀性实验。分别将碳钢（GB 700-65）、不锈钢（GB 1220-75）、铜（GB 2060-80）、铝（GB 1173- 74）圆形薄片（直径 24.0mm，厚 1.0mm，表面积总值约 9.8cm^2）浸泡在 1000mL 装有不同清除剂的玻璃容器中，测定其对不同金属的腐蚀速率。

3 结果与讨论

3.1 清除剂对 DNA 破坏效果

为验证不同清除剂对溶液中核酸的破坏效果，将 5 种不同清除剂分别与 DNA 溶液混合，琼脂糖凝胶电泳测定核酸残留，结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出，阳性对照组有明显的条带，Genezap 核酸清除剂、84 消毒液和 HSK 核酸清除剂均未见到核酸条带，说明溶液中 DNA 被完全清除，75% 酒精、3% 过氧化氢的清除效果则较差。这是因为 84 消毒液和核酸清除剂可以破坏 DNA 结构，使 NDA 被完全降解；而酒精和 DNA 之间的极性差异使两者无法互溶，酒精不能起到破坏 DNA 的作用。

3.2 清除剂对 PCR 抑制效果

不同清除剂对 PCR 抑制效果如图 2 所示。

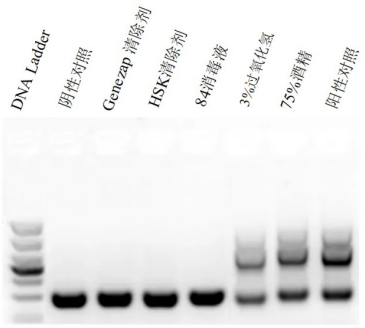

图 1 不同清除剂对溶液中 DNA 的清除效果

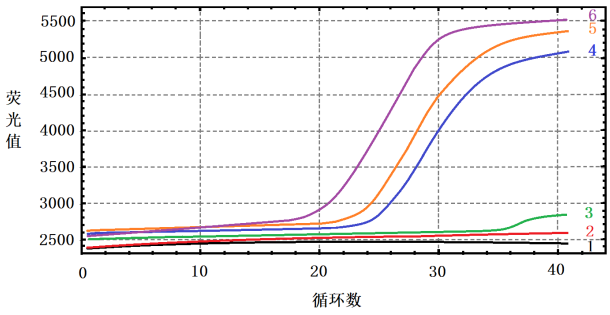

图 2 不同清除剂对 PCR 抑制效果

1. 84 消毒液 2. HSK 核酸清除剂 3. Genezap 核酸清除剂 4. 3% 过氧化氢 5. 75% 酒精 6. 纯净水

由上图可以看出，84 消毒液和核酸清除剂对 PCR 反应具有明显的抑制作用，而 3% 过氧化氢和 75% 酒精在 20 次循环后出现明显的扩增现象，这与如图 1 所示结果一致，也进一步说明 84 消毒液和核酸清除剂破坏了 DNA 结构，使 DNA 无法实现扩增。

3.3 不同材质表面核酸残留的清除效果

表 1 列出了清除剂对四种不同材质表面核酸残留的清除效果。

显而易见，四种材质表面，金属表面的核酸残留最容易被清除干净，玻璃次之，塑料表面的核酸残留最不易被清除干净。核酸清除剂、84 消毒液均能较好地清除掉不同材质表面的残留核酸，3% 过氧化氢和 75% 酒精的清除效果要稍逊于核酸清除剂，这可能是由于其作用原理不同造成的。通过分析各种清除剂的作用原理发现，Genezap 核酸清除剂主要通过改变核酸表面电荷分布，并结合物理擦拭和非酶水解作用达到清除核酸污染的效果。HSK 核酸清除剂通过螯合剂中和，氧化分解作用破坏核酸碱基对的氢键，导致 DNA 结构的变形达到去除的目的。84 消毒液主要是利用次氯酸的强氧化作用将核酸直接裂解 [11]。过氧化氢主要通过活性氧移除核苷酸分子中的电子，达到核酸清除的效果 [12]。75% 酒精通过使蛋白质变性达到清除效果，当作用一段时间后，表面会形成一层荚膜来阻止乙醇进一步破坏其内部结构，也会因为乙醇的挥发作用等导致清除效果不理想。

表 1 清除剂对不同表面核酸残留的清除效果

清除剂	作用 10min 的 Ct 值			
	金属表面	玻璃表面	塑料表面	实验台面
Genezap 核酸清除剂	—	35.16 ± 1.24	34.36 ± 1.70	35.37 ± 2.11
HSK 核酸清除剂	—	35.65 ± 1.53	34.45 ± 1.38	35.54 ± 1.30
84 消毒液	—	35.73 ± 1.65	34.61 ± 1.26	—
3% 过氧化氢	25.59 ± 1.40	25.36 ± 1.74	25.51 ± 1.33	25.49 ± 1.62
75% 酒精	21.76 ± 1.23	21.37 ± 1.91	21.32 ± 1.66	21.65 ± 1.22
阳性对照	19.98 ± 1.32	20.22 ± 1.88	20.30 ± 1.51	20.14 ± 1.35
阴性对照	—	—	—	—

注：荧光信号值低于基线为“未检出”，以“—”表示。试验结果为 3 次测试的平均值 ± 标准差 ($\overline{X}$ ± s)。

3.4 不同清除剂的金属腐蚀性

鉴于 3% 过氧化氢和 75% 酒精对核酸的清除效果有限，选择 84 消毒液和核酸清除剂进行金属腐蚀性实验，结果如表 2 所示。

实验条件：温度 20℃，时间 72h，相对湿度 60%，均为原液作用。实验结果为三次测试平均值。

由表 2 可以看出，核酸清除剂对不锈钢基本无腐蚀，对铜和铝有轻度腐蚀作用，对碳钢的平均腐蚀速率为 0.4539mm/a 和 0.4428mm/a，属于中度腐蚀。而 84 消毒液除对不锈钢有轻微腐蚀外，对碳钢、铜和铝均会产生中度腐蚀。因此对于仪器金属部件和一些精密设备的清洁可考虑选用无腐蚀性的核酸清除剂。

表 2 金属腐蚀性测定结果

清除剂	材质	实验前质量（g)	实验后质量（g)	腐蚀速率（mm/a)
Genezap 核酸清除剂	碳钢	3.2451	3.2164	0.4539
	不锈钢	3.5268	3.5268	0.0000
	铜	3.7174	3.7141	0.0488
	铝	1.2095	1.2080	0.0690
HSK 核酸清除剂	碳钢	3.2556	3.2276	0.4428
	不锈钢	3.5152	3.5151	0.0000
	铜	3.7214	3.7181	0.0492
	铝	1.2075	1.2060	0.0689
84 消毒液	碳钢	3.2035	3.1519	0.8162
	不锈钢	3.5055	3.5048	0.0106
	铜	3.7079	3.6959	0.1762
	铝	1.2122	1.2080	0.1936

4 结论

84 消毒液和核酸清除剂能够有效清除 PCR 实验室核酸污染。对于塑料、玻璃、金属表面及实验台面核酸残留，金属表面最易清除，实验台面和玻璃次之，塑料表面的核酸残留最难清除，需多次清理才能达到预期效果。与 84 消毒液相比，核酸清除剂的腐蚀性小，对不锈钢几乎无腐蚀，可用于仪器金属部件和一些精密设备的清洁。

参考文献

[1] Noonan JP, Rubin EM. Genomic sequencing of pleistocene cave bears[J]. Science, 2005, 309(5734): 597-599.

[2] 庞宏兵, 丁鑫泽, 王万旭. 不同消毒方式对现场DNA检出影响研究[J]. 中国法医学杂志, 2021, 36(1): 78-81.

[3] 闫彩虹, 金文杰, 羊扬等. 第三方检验检测机构PCR检测室防核酸污染措施[J]. 科技视界, 2019, 2(28): 49-50.

[4] 李云龙, 张健, 魏艳秋等.分子诊断实验室去除核酸污染的方法学研究[J]. 生物工程学报，2021, 37(2): 673-679.

[5] X. Li, Q. Duan, Mashooq Khan, et al. Development of the viscosity biosensor for the detection of DNase I based on the ffow distance on the paper with DNA mucus[J] . Talanta , 2024, 6(266): 124994-125001.

[6] Daher RK, Stewart G, Boissinot M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications[J]. Clin. Chem., 2016, 62(7): 947-958.

[7] 陈昌海, 开妍, 邱冬等. 非洲猪瘟病毒荧光PCR检测假阳性的原因与预防措施[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(2): 49-53.

[8] Aslanzadeh J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. Ann. Clin. Lab. Sci., 2004, 34(4): 389-396.

[9] 毕承恩, 瞿文金, 郑丽娟等. 核酸实验室污染原因及处理[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2017, 30(1): 135-137.

[10] Hartley JL, Rashtchian A. Dealing with Contamination: Enzymatic Control of Carryover Contamination in PCR[J]. Genome Res., 2023, 10(9): 10-14.