

分子诊断实验室去除核酸污染的方法学研究

李云龙¹, 张健³, 魏艳秋¹, 贾晓娟², 李小燕⁴, 谭立明⁵, 刘文军¹, 杨利敏¹

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院微生物研究所 生物安全三级实验室, 北京 100101

3 秦皇岛市第三医院, 河北 秦皇岛 066000

4 南方医科大学第五附属医院, 广东 广州 510900

5 南昌大学第二附属医院检验科 江西省检验医学重点实验室, 江西 南昌 330006

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. 生物工程学报, 2021, 37(2): 673-679.

Li YL, Zhang J, Wei YQ, et al. Methodological study on eliminating nucleic acid contamination in molecular diagnostic laboratory. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 673-679.

摘要: 核酸检测因具有良好的灵敏度和特异性而被广泛应用于体外诊断、动植物商品检疫、法医鉴定等领域。然而操作过程中易受到核酸污染导致的假阳性结果, 严重影响了检测准确性。因此寻找一种有效的防止和清除核酸污染的方案对于实验室正常运转及保障检测结果的可靠性具有重要意义。文中比较了几种不同清除核酸污染的方法, 确认了 84 消毒液和 PCRguard 试剂可有效清除液体中及不同材质表面的核酸污染。另外, 84 消毒液和 PCRguard 试剂配合使用, 可很好地解决核酸气溶胶污染。研究结果对于分子诊断实验室日常预防核酸污染及清除已发生的气溶胶污染提出了解决方案。

关键词: 核酸检测, PCR, 气溶胶, 核酸污染

Received: June 28, 2020; **Accepted:** August 20, 2020

Supported by: National Key Technologies Research and Development Program of China (Nos. 2016ZX10004222-006, 2018ZX10734-404), National Key Research and Development Program of China (Nos. 2018YFC1200602, 2018YFC1200502).

Corresponding author: Limin Yang. Tel: +86-10-64807503; E-mail: lmyang@im.ac.cn

国家科技重大专项 (Nos. 2016ZX10004222-006, 2018ZX10734-404), 国家重点研发计划 (Nos. 2018YFC1200602, 2018YFC1200502) 资助。

网络出版时间: 2020-09-03

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200901.1720.003.html>

Methodological study on eliminating nucleic acid contamination in molecular diagnostic laboratory

Yunlong Li¹, Jian Zhang³, Yanqiu Wei¹, Xiaojuan Jia², Xiaoyan Li⁴, Liming Tan⁵, Wenjun Liu¹, and Limin Yang¹

1 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 The Biological Safety level-3 (BSL-3) Laboratory of Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 The Third Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, Hebei, China

4 The Fifth Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510900, Guangdong, China

5 Jiangxi Province Key Laboratory of Laboratory Medicine, Department of Clinical Laboratory Science, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Abstract: Nucleic acid detection technique has good sensitivity and specificity and is widely used in *in vitro* diagnosis, animal and plant commodity quarantine, forensic identification, and other fields. However, it is susceptible to carryover contamination during the operation and leads to false-positive results, which seriously affects the detection accuracy. Therefore, finding an effective solution to prevent and eliminate nucleic acid carryover contamination has become particularly urgent. This study compared several different methods for removing nucleic acid contamination and confirmed that sodium hypochlorite solution and PCRguard reagent could effectively eliminate nucleic acid carryover in the liquid and on surfaces of different materials. Besides, the combination of sodium hypochlorite solution and PCRguard can solve the nucleic acid aerosol contamination. This study proposes solutions for the routine prevention of carryover contamination and removal of aerosol that has occurred in molecular diagnostic laboratories.

Keywords: nucleic acid detection, PCR, aerosol, nucleic acid contamination

自 20 世纪 90 年代诞生了荧光 PCR 技术, 核酸扩增开始被应用于动植物及微生物的检测。相比于传统的免疫学和分离培养技术, 核酸检测可以在短时间实现模板百万倍的扩增, 从而具有更好的灵敏度和特异性^[1-2]。PCR 是目前应用最广泛的核酸检测技术, 近些年还出现了一些基于等温扩增的新型核酸检测技术, 相比 PCR 技术检测时间更短且更适合现场化检测, 从而丰富了核酸检测的应用场景^[3-5]。由于研发周期短且准确性高, 获得目标序列后仅需几天时间即可建立检测方法, 因此核酸检测往往在新发突发传染病时被首先应用。2018 年出现非洲猪瘟疫情后, 我国生猪屠宰、加工企业普遍建立了核酸检测实验室。2019 年底暴发的新冠疫情, 国家卫健委要求所有县区级以上疾控机构、二级以上综合医院形成核酸检测能力, 因此核酸检测实验室数量在我国呈现快速增长势头。

尽管核酸检测技术有诸多优点, 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^[6]。样本处理环节抽提核酸和检测环节扩增产物泄露均会导致核酸污染, 飞溅的扩增产物会形成气溶胶漂浮在空气中, 粘附到物体表面及检测人员身体上, 随着人员及物料流动而污染整个实验室。实验室一旦发生核酸污染极难清除, 会造成实验室短期内无法开展工作, 因此防范和清除核酸污染是分子检测实验室的工作重点。目前主要通过严格分区物理隔绝的方法防止核酸污染, 但这样做仅能减缓污染而不能清除已发生的污染, 而且实际操作过程中核酸污染往往防不胜防, 因此我们需要建立一种行之有效的防止和清除核酸污染的策略。

本研究比较了不同方案对于溶液中、固体表面以及气溶胶核酸污染的清除效果, 证明了 84 消

毒液和商品化核酸去除剂 PCRguard 能够很好地清除液体中和不同材质表面的核酸残留,两种试剂配合使用还能够彻底清除封闭环境中的气溶胶污染。本研究对于核酸实验室日常防止和清除核酸污染提出了一个有效解决方案,为我国快速发展的核酸检测行业奠定了理论基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix 购自大连宝生物工程有限公司; TRIzol 总 RNA 提取试剂、DNA AWAY 均购自 ThermoFisher 公司; 84 消毒液、洗涤剂均购自蓝月亮公司; PCRguard 购自国为生物科技泰州有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 对 RNA 溶液的影响

参照 TRIzol 说明书提取大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α RNA, 紫外分光光度计确认 RNA 浓度和纯度。将 5 μ L RNA 溶液分别与 15 μ L 纯水、50 倍稀释 84 消毒液 (约 1%次氯酸)、100 倍稀释洗涤剂、PCRguard 或 DNA AWAY 混合, 分为两组, 其中一组 12 000 \times g 离心 2 min, 另一组不做离心处理。1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定不同试剂对于溶液中 RNA 的影响。

1.2.2 对 DNA 溶液的影响

将 5 μ L 扩增子为 300 bp 的 PCR 产物分别与 15 μ L 纯水、50 倍稀释 84 消毒液、100 倍稀释洗涤剂、PCRguard 或 DNA AWAY 混合, 分为两组, 其中一组 12 000 \times g 离心 2 min, 另一组不做离心处理。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定不同试剂对于溶液中 DNA 的影响。

1.2.3 对不同材质表面核酸残留的清除

采用已报道的甲型流感病毒通用引物探针扩增病毒核酸, 获得阳性 PCR 产物^[7]。取同一批次 PCR 产物, 分别在塑料、玻璃或金属 3 种材质表面滴加 20 μ L, 每种材质 6 组, 室温晾干。然后

分别在 PCR 产物印迹上滴加 200 μ L 纯水、50 倍稀释 84 消毒液、75%乙醇、PCRguard 或 DNA AWAY, 用洁净纸巾擦拭干净, 每组均设一个不做任何清洁处理的对照组。用棉拭子涂拭污染区, 浸泡入 0.5 mL 蒸馏水, 以其为模板进行荧光 PCR, 鉴定不同试剂对于固体表面核酸残留的清除效果。

1.2.4 对模拟核酸气溶胶的清除

分别在 5 个封闭超净工作台内用雾化器将 20 mL 100 倍稀释流感病毒阳性 PCR 产物溶液进行雾化, 模拟气溶胶污染。分别采用不同方式对核酸污染的超净工作台进行处理, 包括: 50 倍稀释 84 消毒液喷涂后擦拭处理; PCRguard 表面及空气喷雾后静置 1 h 擦拭处理; 75%乙醇表面及空气喷雾后静置 1 h, 50 倍稀释 84 消毒液喷涂后擦拭处理; PCRguard 表面及空气喷雾后静置 1 h, 50 倍稀释 84 消毒液喷涂表面后擦拭处理, 另设立一组未做任何处理的对照组。处理完成后, 分别在不同工作台配制流感病毒 PCR 体系, 不加入阳性模板, 荧光 PCR 鉴定不同处理方式对模拟气溶胶的清除效果。

2 结果与分析

2.1 84 消毒液和 PCRguard 可有效清除溶液中核酸

为验证不同试剂对于溶液中核酸的清除效果, 将 5 种不同试剂分别与 RNA 或 DNA 溶液混合, 琼脂糖凝胶电泳鉴定核酸残留。结果显示, 84 消毒液和 PCRguard 能够将溶液中的 RNA (图 1A) 或 DNA (图 1B) 完全清除干净, DNA AWAY 只能部分清除, 洗涤剂对于核酸无影响。另外, PCRguard 处理的样本电泳时在点样孔中可见核酸条带, 离心处理后核酸条带消失。提示 PCRguard 与溶液中的核酸形成了不溶物, 与该产品的核酸清除原理符合。84 消毒液处理的样本不管离心与否均未见到核酸条带, 提示溶液中核酸已降解。

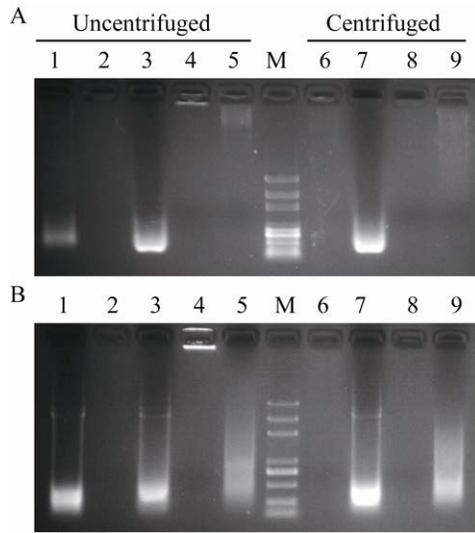


图 1 琼脂糖电泳鉴定不同试剂对溶液中 RNA 和 DNA 的清除效果

Fig. 1 Identification of the removal effect of different reagents on RNA and DNA in solution. Mix the RNA (A) or DNA (B) solution with pure water (lane 1), 1% sodium hypochlorite solution (lane 2, 6), 100-fold diluted detergent (lane 3, 7), PCRguard (lane 4, 8) or DNA AWAY (lane 5, 9), sodium hypochlorite solution and PCR guard can effectively remove RNA and DNA in the solution.

2.2 84 消毒液和 PCRguard 可清除固体表面核酸

为验证不同试剂对于塑料、玻璃和金属表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,分别用 5 种不同试剂对 3 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。结果显示,84 消毒液和 PCRguard 能够较好地清除掉不同材质表面的核酸残留,DNA AWAY 也对核酸残留具有一定清除效果,但稍逊于前两种试剂,而水和乙醇结果相似,均不能明显去除核酸残留,仅比对照组 Ct 值略高。另外,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(图 2)。提示塑料材质实验台表面的核酸残留要多次清理才能达到预期,可考虑将两种试剂交替使用以达到最好的处

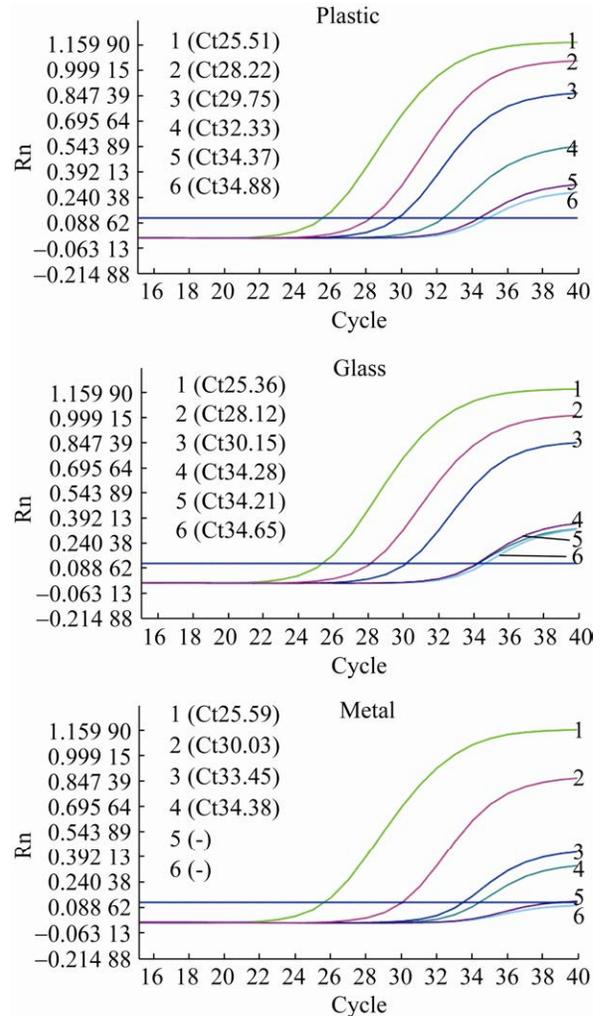


图 2 荧光 PCR 鉴定不同材质表面核酸残留去除效果

Fig. 2 Identification of the removal effect of nucleic acid carryover on surfaces of different materials. Five different solutions (2: water; 3: 75% ethanol solution; 4: DNA AWAY; 5: sodium hypochlorite solution; 6: PCRguard) were used to remove nucleic acids from plastic, glass, or metal surfaces, as well as an untreated control group (1). The amount of nucleic acid carryover after cleaning is detected by real-time PCR.

理效果,另外建议在金属台面进行核酸检测相关操作。

2.3 PCRguard 配合 84 消毒液可清除模拟核酸气溶胶污染

实验室的核酸气溶胶极难清除干净,为了获得一种有效的清除气溶胶污染的方案,本研究在

密闭超净工作台内雾化阳性 PCR 产品,模拟了核酸气溶胶污染。然后分别测试了单独使用 84 消毒液或 PCRguard, 以及 75%乙醇/84 消毒液或 PCRguard/84 消毒液的复合处理方案。结果显示,未处理组荧光 PCR Ct 值为 27.21,说明密闭工作台内模拟气溶胶污染已经非常严重,超过了一般实验室核酸污染的程度 (Ct 值 ≥ 33)。单独使用 84 消毒液处理一次,PCR Ct 值仅提高到 29.72,提示其仅能部分去除气溶胶污染;单独使用 PCRguard 处理一次能明显去除气溶胶污染,PCR Ct 值提高至 34.78,但仍有微量残留;75%乙醇/84 消毒液复合方案也能明显地除气溶胶污染,PCR Ct 值提高至 32.86,还有少量残留,且去除效果略逊于单独使用 PCRguard;PCRguard/84 消毒液复合方案仅处理一次就完全将超净工作台内的高浓度气溶胶污染清除干净,提示该方案可用于实验室核酸气溶胶污染的清除 (图 3)。

3 讨论

近两年核酸检测在我国快速普及,新增核酸检测实验室超 4 000 家,随着我国核酸检测能力

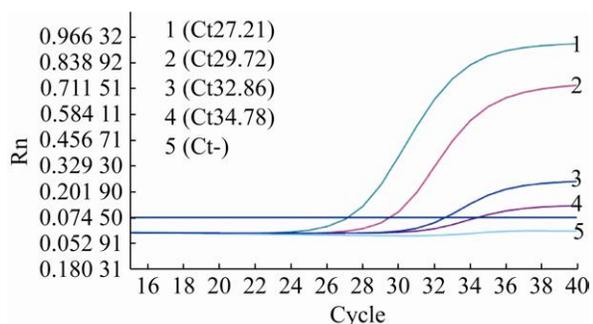


图 3 荧光 PCR 鉴定不同策略去除气溶胶的效果

Fig. 3 Identification of the effects of different aerosol removal strategies. Four different schemes were used to eliminate nucleic acid aerosol contamination, including sodium hypochlorite solution (2) or PCRguard treatment alone (4), 75% ethanol+sodium hypochlorite solution (3) or PCRguard+sodium hypochlorite solution (5) combined treatment, and an untreated control group (1). The amount of nucleic acid carryover after cleaning is detected by real-time PCR.

突飞猛进,一些问题同样也快速呈现。最为突出的就是核酸污染导致的假阳性结果,严重影响了核酸检测的可信度。尽管目前的核酸检测均采用闭管检测以防止开盖形成气溶胶,同时采取严格的物理隔绝法,检测依次分为试剂准备区-样本准备区-扩增区-产物检测区,且逐级负压^[8],这些策略都最大程度地防止了气溶胶污染,但核酸污染事故依然时有发生。由于核酸检测步骤较多,且多个环节样本直接暴露于空气中,任何一个环节出现一点小纰漏就容易导致整个实验室的污染。即使严格按照规程操作,核酸污染依然无法彻底避免,美国疾控中心实验室由于在新冠疫情初期出现核酸污染,直接导致了延期为本国提供核酸检测试剂。可见防止和去除核酸污染已经是当前核酸检测实验室需要着重考虑的问题。

核酸污染主要体现在样本核酸或扩增产物在台面、设备、检测人员表面的核酸残留,以及扩增产物形成的气溶胶。气溶胶由于颗粒较小,若不做处理可长期漂浮在空气中持续影响实验室的检测。针对固体表面的核酸残留,很多实验室采用 75%乙醇或 84 消毒液进行擦拭处理^[9]。美国疾控中心给出的指导意见是采用商品化去核酸试剂 (DNAzap 或 DNA AWAY) 或次氯酸溶液处理固体表面^[10]。针对空气中的气溶胶污染,很多实验室选择乙醇喷雾使核酸沉降然后配合 84 消毒液处理地面^[11]。为了能够找到一种行之有效的去除核酸污染的策略,本研究系统比较了不同试剂对于液体中、固体表面和空气中核酸残留的去除效果。研究发现 84 消毒液和商品化去核酸试剂 PCRguard 均能够有效地去除液体中的 DNA 和 RNA,但是两者去除核酸的原理不同。84 消毒液主要成分为次氯酸,利用其强氧化性可直接将核酸降解,但是 PCRguard 是与核酸形成不溶复合物沉淀以消除核酸残留造成的影响。考虑到两者清除核酸的原理不同,将两者配合使用有望更好地发挥彼此优势。针对不同材质表面的核酸残留,

84 消毒液和 PCRguard 也表现出了不错的清洁能力,但是 75%乙醇的清洁能力未到达预期。而且,不同材质表面的清洁效果差异较大,金属表面清洁效果最好,塑料和玻璃表面效果较差。提示对于实验台、墙面、地面的清洁最好要反复多次处理,尽可能减少核酸残留,推荐在金属台面进行核酸操作以便于清除操作过程中洒落的核酸污染。由于 84 消毒液的有效成分为次氯酸溶液,采用终浓度为 1‰的次氯酸溶液可以达到同样的效果。考虑到 84 消毒液有一定腐蚀性,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商品化核酸去除剂。本研究对美国疾控中心推荐的商品化去核酸试剂 DNA AWAY 也做了评测,但其清除核酸效果并不够彻底。另外,还对其他多个国内外同类清除核酸产品进行了评测,其有效成分包括次氯酸、强碱和生物大分子几个种类,清除核酸的原理不尽相同,且效果参差不齐,本文未做过多赘述。

气溶胶是所有实验室核酸污染中最难清除的,可长期漂浮在空气中并随空气流动污染整个实验环境。不少专业实验室一旦出现严重气溶胶污染,轻则数天,重则数月无法继续开展工作,是所有核酸检测人员都无法回避的问题。为了解决已出现的气溶胶污染,不少实验室选择臭氧熏蒸、乙醇沉降/84 消毒、双氧水雾化^[12]、紫外照射法^[13]或实验室通风。这些策略对于轻微气溶胶污染能够起到一定的清除效果,但对于较为严重的污染依然无法很好地解决,有些实验室甚至不得不通过更换楼层以继续开展工作。为了探索一种能够有效清除气溶胶污染的方法,我们首先在密闭工作台内模拟形成了气溶胶污染,然后测试了不同处理方法对气溶胶的清除效果。不同策略均展现了一定的对气溶胶污染清除效果,较为常用的乙醇沉降/84 消毒策略能够将绝大部分核酸清除掉,但还有少量残留未能清除干净。令人惊喜的是,采用 PCRguard 喷雾将空气中气溶胶捕

获沉降,然后用 84 消毒液擦拭的方法将工作台内的气溶胶完全清除干净。提示 PCRguard 相对于 75%乙醇,能够更好地清除空气中漂浮的气溶胶颗粒。由于 PCRguard 可主动吸附空气中的核酸分子,而乙醇只能通过被动接触核酸使其沉淀,因此前者表现出了更好的清除气溶胶的能力。同时结果显示单纯靠 PCRguard 并没有将气溶胶污染完全清除,提示其尽管对于空气中的气溶胶有较好的沉降效果,但对于沉降后落于台面的核酸复合物并不能实现完全降解,需配合 84 消毒液对台面进行进一步消杀,以彻底清除核酸残留。

综上,本研究对于液体中、固体表面和空气中气溶胶的核酸污染清除进行了一个系统比较研究,确认了不同方法对于核酸清除效力的差异,对于核酸检测实验室防止和清除核酸污染提出了建议。而且找到一种能够较好清除气溶胶污染的方案,但考虑到实验室面积远大于本研究中模拟气溶胶污染的密闭超净工作台,因此在实际操作过程中建议雾化或喷淋 PCRguard 以捕获空气中的气溶胶,对沉降到地面的核酸聚集物进行清除,用 84 消毒液进行处理以彻底清除表面残留,并考虑配合紫外照射进行物理清除,对于较为严重的污染建议多次处理并监测清除效果。另外,对于核酸检测实验室,核酸污染防治大于治,一次污染事故造成的损失远大于防治污染的投入,只有严格规范操作,剔除潜在风险,杜绝污染隐患,才能保证实验室的长期稳定运行。

REFERENCES

- [1] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1): 165-256.
- [2] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996, 6(10): 986-994.
- [3] Daher RK, Stewart G, Boissinot M, et al. Recombinase polymerase amplification for

- diagnostic applications. *Clin Chem*, 2016, 62(7): 947-958.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63.
- [5] Wang X, Yin FG, Bi YH, et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*, 2016, 238: 86-93.
- [6] Aslanzadeh J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Ann Clin Lab Sci*, 2004, 34(4): 389-396.
- [7] Klungthong C, Chinnawirotpisan P, Hussem K, et al. The impact of primer and probe-template mismatches on the sensitivity of pandemic influenza A/H1N1/2009 virus detection by real-time RT-PCR. *J Clin Virol*, 2010, 48(2): 91-95.
- [8] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2015年修订版). *中国病毒病杂志*, 2016, 6(6): 401-427.
Chinese Center for Disease Control and Prevention. National Guideline for Detection of HIV/AIDS. *Chin J Viral Dis*, 2016, 6(6): 401-427 (in Chinese).
- [9] Park K, Lee J. Dealing with carryover contamination in PCR: an enzymatic strategy. *CSH Protoc*, 2006(1), DOI: 10.1101/pdb.prot4092.
- [10] CDC USA. Real-time RT-PCR panel for detection 2019-Novel coronavirus. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdert-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf?sfvrsn=3aa07934_2.
- [11] 毕承恩, 瞿文金, 郑丽娟, 等. 核酸实验室污染原因及处理. *临床血液学杂志(输血与检验)*, 2017, 30(1): 135-137.
Bi CE, Zhai WJ, Zhen LJ, et al. Cause and treatment of pollution in nucleic acid laboratory. *J Clin Hematol (China)*, 2017, 30(1): 135-137 (in Chinese).
- [12] 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. *科技视界*, 2019(28): 49-50.
Yan CH, Jin WJ, Yang Y, et al. Prevention of nucleic acid pollution in PCR testing rooms of the third party inspection and testing institutions. *Sci Technol Vis*, 2019(28): 49-50 (in Chinese).
- [13] 郭灵安, 雷绍荣, 宋君. 紫外线清除实验室转基因物质污染的效果研究. *中国消毒学杂志*, 2015, 32(5): 437-439.
Guo LA, Lei SR, Song J. Study on clearance effect of contaminants sourced from genetically modified organism by ultraviolet light radiation. *Chin J Disinfect*, 2015, 32(5): 437-439 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)