

【小鼠大学问】PCR污染了？不怕，我来给你支支招！

随着 PCR 酶的扩增效率越来越高，灵敏度日益精进，用微量甚至痕量的样本就可以扩增出高浓度的产物。拍手鼓掌的同时，其实也增加了 PCR 过程中污染的风险，即我们经常说的假阳性的风险。最常见的情况就是我们上周提到的 H₂O 对照中也得出了阳性条带。

要解决 PCR 污染的问题，我们就要从污染的原因入手分析。根据污染发生的不同实验阶段，大致有以下几个污染高发点：

鼠尾取样的时候

如果上一只小鼠的血液和体液残留在剪刀上，就会将它的 DNA 带到下一只小鼠的鼠尾上。这种情况如果用鼠尾直接 PCR 试剂盒做基因型鉴定的时候，假阳性的情况会更明显。

解决方法

- 每一次剪鼠尾之前，都必须要用75%酒精擦拭清洁剪刀。或准备两把剪刀轮流使用，用完的剪刀浸泡在75% 酒精溶液中。
- 还是推荐用裂解液和蛋白酶K处理鼠尾后将DNA纯化之后做PCR鉴定，这样可以将污染的概率降低。



配置 PCR 反应体系的时候

PCR体系中的引物、水和 PCR 酶或 buffer 等试剂中任何一管中混入 DNA 样本都会造成污染。所以，每次实验都要小心。

解决方法

- 配置 PCR 反应体系的过程中枪头要及时更换。

- 用完的试剂管要及时盖上盖子。



很多童鞋说我都已经把 PCR 反应体系中的所有试剂都换成新的了，可还是污染？！其实，移液枪也是污染源之一。

解决方法：

- 移液枪外表面要经常用 75% 酒精擦拭。
- 移液枪内部的清洁比较困难。如果在前一次取样的时候，操作不当导致有少量的模板进入移液枪，那么在下一次实验的时候很容易产生污染；还会污染整个 PCR 反应体系。所以如果遇见这种情况，方法一：加样的枪头全部换成带滤芯的枪头，方法二：用一些商品化的分解基因组 DNA 的试剂处理一下移液枪。



如果以上方法还是无法避免污染的问题，那么我们建议：

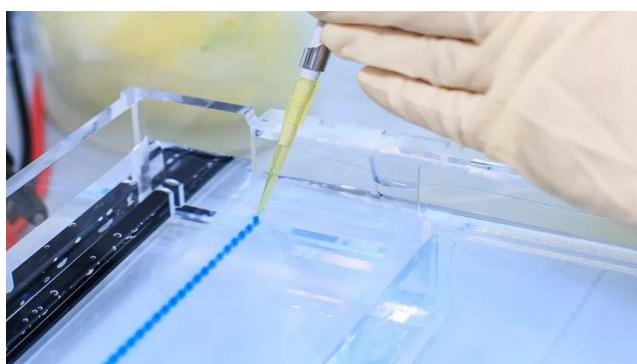
解决方法

- 更换配制 PCR 反应体系的实验室房间，或者去超净台里操作。
- 配制 PCR 反应体系的实验台尽量和 PCR 仪以及电泳槽分开，因为 PCR 仪和电泳槽附近的区域往往是高浓度 DNA 弥散的区域。



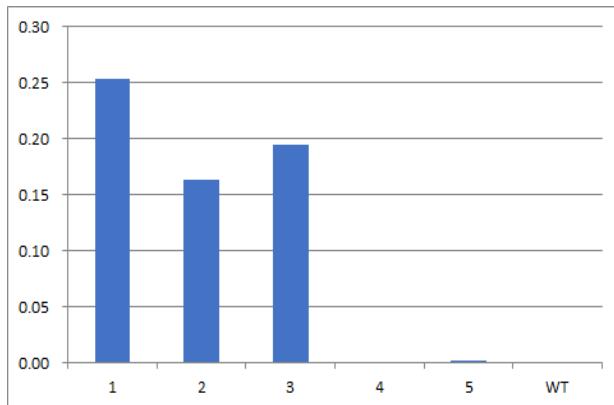
跑电泳的时候

跑电泳过程中，上样的枪头是否更换呢？如果没有更换，那么每次上完一个样都要在电泳 buffer 中吹打洗干净。防止枪头上带有前一个样品的产物，造成点样的污染。



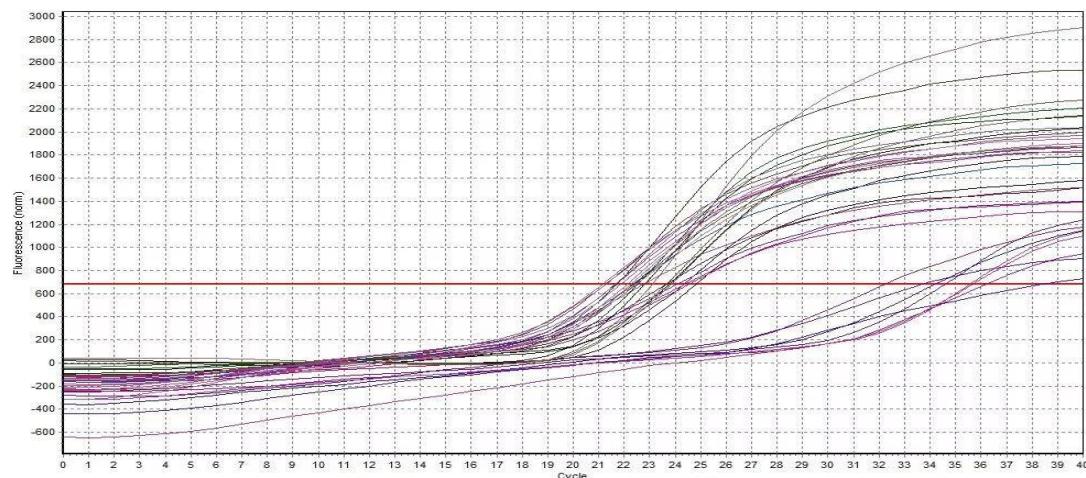
荧光定量 PCR

另外，在鉴定 Cre 和 Flp 这些转基因小鼠的时候，可以尝试通过荧光定量 PCR 做相对定量的方法来避免假阳性的问题。具体是指在荧光定量PCR的时候，同时鉴定目的基因和内参基因，通过 ΔCt 的方法来确定阳性产物，可以有效避免少量因为污染造成的假阳性问题。

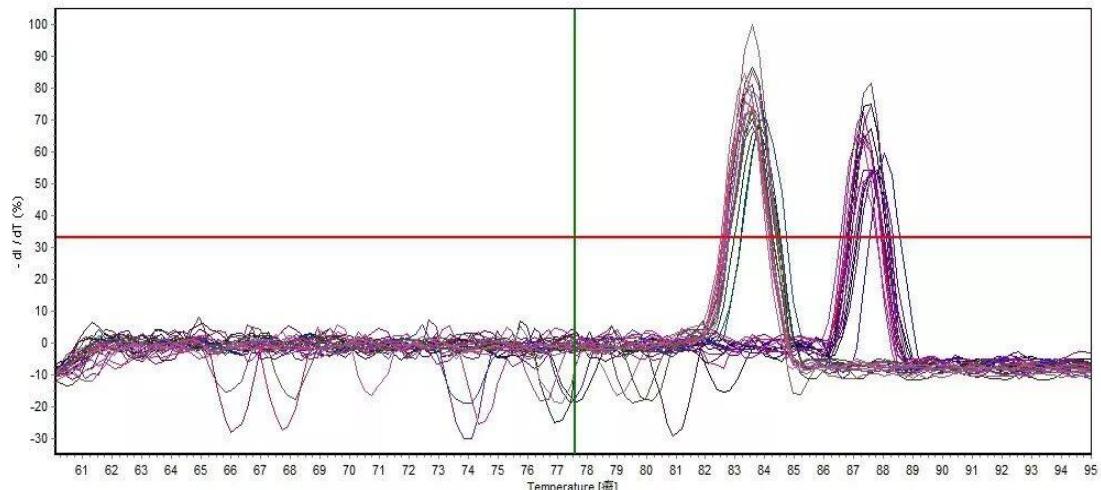


No.	Ct-Cre	Ct-IPC	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Genotype
1	24.83	22.85	0.25	+
2	24.36	21.75	0.16	+
3	23.67	21.31	0.19	+
4	34.63	22.49	0.00	-
5	32.24	22.80	0.00	-
WT	35.73	22.54	0.00	-

相对定量结果



ct值图



Threshold: 33%

溶解曲线图

南模生物可提供小鼠基因型鉴定服务