

PCR-kontamination

– når styrken er svagheden

Det er umuligt helt at undgå PCR-kontamination, men med ensrettede arbejdsgange, generelle retningslinjer og en implementeret metode til inaktivering af carry-over-kontamination kan man nedsætte risikoen betydeligt. Et andet alternativ er real-time PCR, hvor risikoen for carry-over-kontamination er begrænset

Af forskningsassistent cand.technol. Mathilde Hartmann-Josefsen, forskningslaborant Stefan Jensen og seniorforsker Ph.D. Jeffrey Hoorfar, Danmarks Veterinærinstitut (DVI)

Påvisning og eftersporning af patogener vha. kvalitetssikrede DNA-amplifikationsteknikker anvendes i stigende grad i akkrediterede laboratorier. En meget anvendt metode er polymerase kædereaktion (PCR), som bruges i vid udstrækning inden for mikrobiologi, molekylærbiologi, retsmedicin, medicinsk diagnostik og screening m.m. En af metodens fordele er den høje sensitivitet. Ironisk nok er det netop den ekstreme amplifikations-sensitivitet, der er metodens achilleshæl, idet den er meget følsom over for kontamination.

Regionale mikrobiologiske laboratorier og mange private laboratorier har etableret, eller overvejer at etablere, PCR-metoder til rutinebrug, og det stiller store krav til kvalitetssikring og efteruddannelse af personale. Selv om udviklingen går mod at bruge lukkede analyseapparater (real-time PCR), der ikke kræver separate lokaler med særlige ventilationsforhold, er det vigtigt at forstå kritiske punkter og tage højde for dem i indretning og kvalitetssikringsinstrukser.

På EU-plan er der udarbejdet udkast til fire standarddokumenter, der beskriver de generelle forhold omkring implementering og kvalitetssikring af PCR i diagnostik [1]. Især i dokumentet om amplifikation og detektion af PCR-produkter lægges der stor vægt på de forholdsregler, man bør tage for at undgå PCR-kontamination.

Kontaminationskilder

Kort fortalt er PCR en enzymatisk mangfoldiggørelse af en bestemt DNA-sekvens (målsekvens) bestående af tre trin:

1. Denaturering (spaltning) af det dobbeltstrengede DNA (~94°C).
2. Annealing (binding) af to korte stykker DNA, såkaldte primere, til komplementære sekvenser specifikke for primerne (30-60°C).
3. Extension (forlængelse) af primerne med de komplementære sekvenser vha. en varmestabil DNA-polymerase og nukleotider (72°C). De dannede amplifikationsprodukter detekteres herefter hyppigst vha. gelelektroforese, og visualiseres efter farvning med ethidiumbromid under UV-lys.

Den væsentligste kilde til kontamination i PCR er såkaldt produkt »carry-over« [2,3]. Carry-over betyder overførsel af tidligere amplificeret DNA til nye prøver, hvilket f.eks. kan ske via pipetter, reagenser, omgivende miljø eller personale. Eftersom det amplificerede produkt vil fungere som mål-DNA i dannelsen af nyt produkt, vil der dukke PCR-produkter op, som ikke skyldes tilstedeværelse af målsekvens i den oprindelige

prøve. Denne form for kontamination er velkendt fra andre laboratorieteknikker, også traditionel mikrobiologi, men når den fremhæves som et særligt problem i forbindelse med PCR, er det pga. metodens meget høje amplifikations-sensitivitet. PCR-teknikken kan forøge selv få kopier af DNA millioner af gange, og ved utilsigtet overførsel af selv det mindste smule PCR-produkt (amplikon), kan der genereres millioner af kopier, hvilket giver falsk-positive resultater. Problemet med carry-over-kontamination er særlig stort, når den samme PCR-test gentages jævnligt, som f.eks. i et diagnostisk laboratorium, hvor prøver screenes for tilstedeværelsen af få bestemte gener.

Andre kilder til kontamination er den indledende prøveforberedelse, hvor DNA fra inficerede prøver eller den positive testkontrol utilsigtet kan overføres til negative prøver. Det stiller krav til indretning af PCR-lokaler og -personale. Automatisering af prøveforberedelse kan nedsætte kontaminationsrisikoen, men der er lange udsigter til, at sådanne lukkede apparater kan erhverves til overkommelige priser og i et format, der egner sig til diagnostisk materiale og fødevarerprøver.

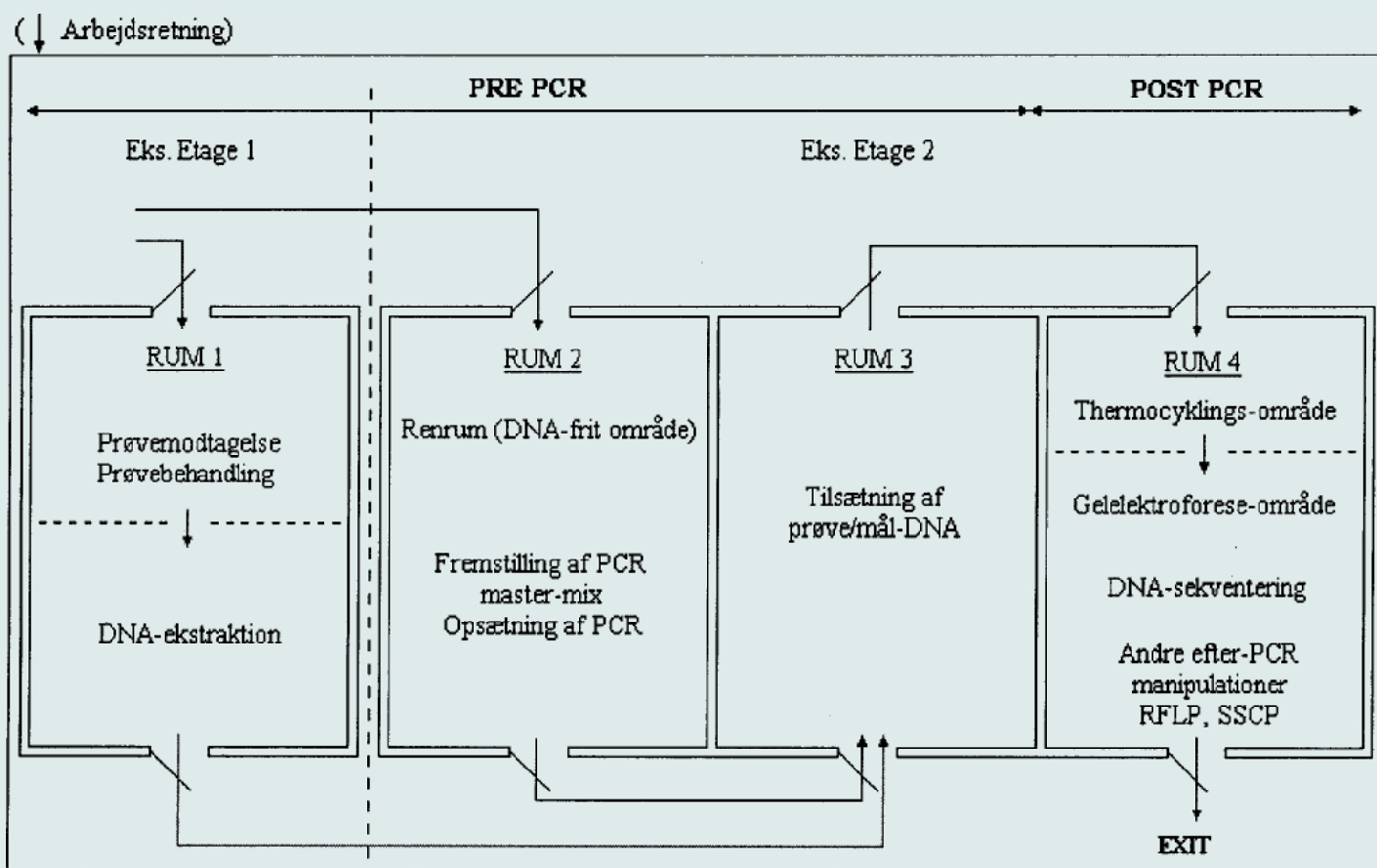
Kontamination – hvordan kan det undgås?

Indretning af PCR-lokaler

Et af de mest fundamentale krav til et PCR-laboratorium er fysisk adskillelse af de forskellige arbejdsområder. Som et minimum skal alle præ- og post-PCR-arbejder foregå i to separate rum placeret »langt« fra hinanden. Til præ-PCR-manipulationer hører alle trin op til termocykling, og til post-PCR alle trin efter, og inkl. termocykling (figur 1). På figur 1 er fire separate rum dedikeret til de forskellige PCR-trin [4,5]. Al prøvebehandling sker i rum 1, herunder ekstraktion af DNA fra prøver. Det kan foregå i et hjørne af prøvemodtagelsesrummet. I »renrummet« (rum 2), der er et DNA-frit område, fremstilles master-mix og PCR'en sættes op. Prøver og positiv kontrol-DNA tilsættes separat i rum 3. Endelig forgår selve termocyklingen i rum 4, hvor efterfølgende påvisning af PCR-produkter, og eventuelt andre post-PCR-processer ligeledes finder sted. Som pilene på figur 1 indikerer, er der en ensrettet arbejdsgang mellem de fire rum. Det er med til at sikre, at der ikke forekommer carry-over af PCR-produkter til renrummet.

En yderligere sikkerhedsforanstaltning for at undgå kontamination er at holde et svagt overtryk i de rene rum og et svagt undertryk i de rum, hvor der arbejdes med PCR-produkter.

En anden mulighed, hvis laboratoriepladsen er begrænset, er



Figur 1. Ideel indretning af et PCR-laboratorium

at oprette særskilte arbejdszoner i to rum. Her er det nødvendigt at dedikere udstyr og reagenser til de enkelte zoner og at ensrette arbejdsgangene, så der ikke forekommer kontamination mellem zonerne. Der kan bruges dedikerede sikkerhedskabinetter med indlagt UV-lys til prøvebehandling, DNA-ekstraktion og opsætning af PCR. Det kan være Laminar Air Flow (LAF) -bænke, »dead-air«-bokse eller biologiske sikkerhedskabinetter udstyret med HEPA-filtre [5-7]. Disse anbefalinger møder dog kritik, fordi de menes at være overflødige og kun bidrager til at øge omkostningerne ved PCR.

Personale

Individuelle arbejdsvaner har direkte indflydelse på alle i PCR-laboratoriet, især i store laboratorier, hvor mange forskellige funktioner er i de samme lokaler. Det ville være ideelt, men ikke realistisk, at have særskilt personale dedikeret til hhv. præ- og post-PCR-rummene.

For at reducere kontaminationsrisikoen er det nødvendigt at bære engangshandsker og kittel. Handskerne skal skiftes tit, og altid når man forlader en arbejdszone eller træder ind i en ny [4,5,6]. Arbejdes der med en meget følsom PCR eller humant prøvemateriale, kan det også være nødvendigt at afskærme hoved og ansigt.

Reagenser

For at nedsætte risikoen for kontamination via reagenser og primere, og for at reducere omkostningerne, er det vigtigt ved åbning at dele dem i mindre portioner. Hvis kontamination forekommer, er det oftest nødvendigt at kassere samtlige reagenser, da arbejdet med at spore kilden vil være omfattende [2,8].

Rutinemæssig UV-bestråling af reagenser kan være medvirkende til at forebygge kontamination. DNA-polymerase og primere bør ikke bestråles, da metodens sensitivitet kan forringes.

Udstyr

For at minimere risikoen for kontamination er det god laboratoriepraksis at dedikere alt anvendt PCR-udstyr til de forskellige arbejdszoner. Er der flere zoner i samme rum, kan det f.eks. gøres ved at bruge farvekoder.

Da autoklaving ikke fjerner DNA, bør der altid bruges ikke-håndterede engangsmaterialer, når det er muligt. Termocyklere skal også efterses og rengøres regelmæssigt [9]. Knækkede PCR-rør kan lække i PCR-blokken. Positive fortrængningspipetter (f.eks. Microman, Gilson) med filter forhindrer kontamination via aerosoler.

Rengøring

Speciel rengøring i forbindelse med PCR er baseret på nedbrydelse af DNA. Dette gøres mest effektivt med syre eller hypochlorit. En 0,1 M saltsyre eller en 10-20% klorinopløsning ødelægger eventuelt tilstedeværende DNA, så det ikke kan fungere som mål-DNA i en ny PCR-reaktion. Igen er det vigtigt at være opmærksom på at opretholde en ensrettet arbejdsgang og overholde de forskellige arbejdszoner [7].

Kontroller

Mht. kontamination er både den positive og den blanke kontrol vigtig. Den blanke kontrol, der indeholder alle PCR-reagenser undtagen mål-DNA, fungerer som en kontrol af opsætningen af reagenserne [2,4,6]. Mængden af DNA i den positive kontrol er vigtig. Den skal helst begrænses til under 100 kopier for ikke at danne for store mængder produkt og dermed øge risikoen for carry-over-kontamination.

Inaktivering af carry-over-kontamination

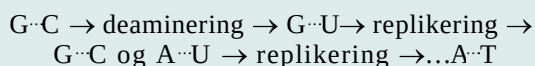
Brugen af inaktiveringsteknikker er et supplement til og ikke en erstatning for god laboratoriepraksis. Der findes adskillige fotokemiske, enzymatiske og kemiske teknikker til at inakti-

vere PCR-produkter. De bygger alle på samme princip: at ødelægge eller forandre DNA-strengene i PCR-produktet, så de ikke kan fungere som mål-DNA i nye PCR-reaktioner [10]. Inaktivering kan enten ske før amplificeringen (præ-PCR-sterilisering), hvor eventuelt tilstedeværende carry-over-kontamination inaktiveres, eller efter (post-PCR-sterilisering) hvor alle nukleinsyrer, inkl. de dannede PCR-produkter, inaktiveres. Ulempen ved præ-PCR-sterilisering er, at de »følsomme« PCR-reagenser (DNA-polymerase, primere, mål-DNA) først kan tilsættes efterfølgende, og dermed introduceres endnu en kontaminationskilde [11].

To kriterier skal opfyldes for vellykket inaktivering af carry-over-kontamination. For det første må amplikon ikke eksponeres for det omgivende miljø før inaktiveringen, dvs. den skal ske, før PCR-rørene åbnes i detektionsfasen (gel-elektroforese). For det andet er det vigtigt, at inaktiveringen ikke hindrer amplifikation, detektion eller eventuel post-PCR-manipulation.

Uracil-N-Glycosylase-teknikken

Cytosin i DNA deaminerer spontant til uracil, hvilket resulterer i at cytosin omdannes til thymidin.



Uracil-N-glycosylase (UNG) er et DNA-reparationsenzym, der genkender uracil som fremmed for DNA og derfor fraspalter det. I forbindelse med inaktivering af carry-over-kontamination udnyttes UNG's funktion til at nedbryde de dannede PCR-produkter, så de ikke længere kan fungere som mål-DNA i nye PCR-reaktioner (figur 2, side 34).

Under amplifikationen erstattes dTTP med dUTP. De amplificerede produkter indeholder dermed deoxyuracil, hvorfor man kemisk kan skelne mellem amplificeret produkt og nyt mål-DNA. Ved at tilsætte UNG til master-mixet fraspaltes uracil i eventuelt tilstedeværende produkter. Fraspaltningen resulterer i, at produkt-DNA-strengen brydes ved de moderat alkaliske forhold og den høje temperatur under PCR-amplificeringen, og den kan ikke fungere som mål-DNA i en ny amplificering [10]. UNG inaktiveres af varme under det første denatureringstrin i PCR, så nye dUTP-holdige PCR-produkter ikke spaltes [12].

Furocoumariner

Furocoumariner, som psoralen, isopsoralen og derivater heraf, kan indskyde sig mellem to DNA-strenger og danne krydsbindinger mellem thymidin og cytosin, når de exciteres. Tilsættes de til PCR-reaktionen, vil en kort bestråling (ca. 15 minutter) ved 320-400 nm af PCR-rørene efter amplifikation medføre, at produkterne ikke kan fungere som mål-DNA igen [10]. Inaktivering skyldes, at DNA-polymerasen blokeres, når den møder en fotokemisk modificeret base i DNA-strengen. Derivater af psoralen og isopsoralen kan inaktivere PCR-produkter, men efterfølgende hybridisering er kun mulig ved brug af isopsoralenderivater, hvorfor disse ofte foretrækkes.

Primerhydrolyse

Primerhydrolyse blev beskrevet første gang i 1993. Metoden virker umiddelbart meget let tilgængelig, men er ikke ret brugt. I metoden anvendes specielle primere, der indeholder en eller flere ribosebindinger i 3'-enden. Ekstension af primererne skaber et PCR-produkt med to eller flere spaltbare ribonukleotidbindinger. Fraspaltning af primererne fra produktet forhindrer det i at fungere som mål-DNA i en ny PCR og sker ved tilsætning af base (NaOH) efter amplifikation [10,13].

UV-bestråling

UV-bestråling er den ældste af inaktiveringsmetoderne. Ved kortbølget UV-bestråling af DNA dannes thymidindimerer og andre kovalente modifikationer i molekylet, hvilket resulterer i, at det ikke længere kan fungere som mål-DNA [10]. Inaktiveringen foregår præ-PCR ved bestråling af de enkelte PCR-rør med master-mix, men ikke tilsat mål-DNA.

Restriktionsenzym

Brugen af restriktionsenzym til inaktivering af carry-over-kontamination er ikke udbredt. Det skyldes muligvis den begrænsede mængde litteratur om metoden og dens effektivitet. Restriktionsenzym som AluI, RsaI og MseI kan inaktivere carry-over-kontamination. Ved at tilsætte et eller flere af enzymerne til PCR-mixet (dog uden DNA-polymerase og mål-DNA) vil tilstedeværende PCR-produkter blive klippet ved disses genkendelsessekvenser. PCR-mixet inkuberes en given periode med enzymerne, hvorefter de inaktiveres ved kogning [14].

Real-time PCR

Udbredelsen af real-time PCR er stigende, og i kontaminations-sammenhæng har det flere fordele. I real-time PCR måles forøgelsen af PCR-produktet under selve amplifikationen i samme lukkede analyseapparat, hvilket betyder, at det ikke er nødvendigt at åbne PCR-røret for at påvise PCR-produktet. Det nedsætter kontaminationsrisikoen betydeligt. Samtidig er der ikke længere behov for separate detektionsrum med særlige ventilationsforhold.

Real-time PCR har andre fordele sammenlignet med konventionel PCR. I real-time PCR bruges en DNA-probe, der binder til et bestemt DNA-område mellem de to primere. Nedbrydningen af denne probe resulterer i udsendelsen af et fluorescens-signal, der er proportionelt med mængden af dannet produkt. Det betyder, at man kan bestemme antallet af mikroorganismer i udgangsmaterialet (kvantificering). Binding af proben verificerer samtidig, at det er den korrekte målsekvens, der er blevet amplificeret. Endelig nedsættes arbejdsbyrden og analysen tiden betydeligt.

Hvilken metode er bedst?

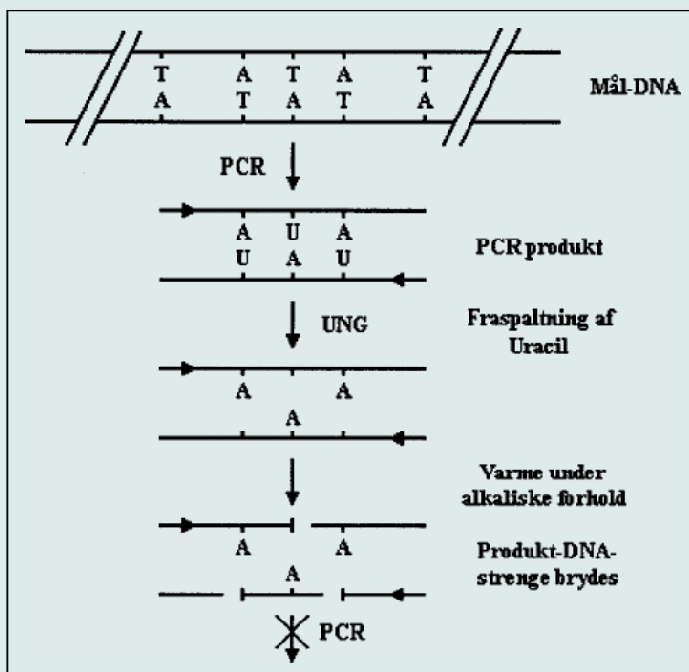
Alle de ovennævnte metoder har fordele og ulemper, og der er stor forskel på omkostningerne. Derfor er det nødvendigt at vurdere det enkelte laboratoriums behov og økonomiske formåen, før den mest egnede metode vælges.

Betingelserne for den valgte metode skal derefter etableres og evalueres [15]. Hvor god er metoden til at inaktivere carry-over-kontamination? Har den valgte inaktiveringsmetode indflydelse på PCR-metodens sensitivitet? Kan de nødvendige post-PCR-manipulationer udføres på trods af inaktiveringen? Anvendes isopsoralen f.eks. skal reagenskoncentration og belysningstid bestemmes.

Det er også muligt, at tilsætning af isopsoralen har en hæmmende effekt på PCR-metodens følsomhed. Det kan eventuelt afhjælpes ved at tilsætte hjælpestoffer som glycerol eller bovin serumalbumin (BSA) [11,13]. Anvendes UV-bestråling skal belysningstid og -afstand fastlægges [16].

Konklusion

På trods af de nævnte forholdsregler, retningslinjer og inaktiveringsmetoder er det umuligt helt at undgå PCR-kontamination. Men det er muligt at reducere omfanget og risikoen betydeligt. Ved at indrette PCR-laboratorier med ensrettede arbejdsgange, holde sig til nogle generelle retningslinjer og implementere en metode til inaktivering af carry-over-kontamination kan man nedsætte forekomsten af falsk-positive



Figur 2. Inaktivering af carry-over-kontamination vha. UNG. UNG tilsættes til master-mixet før amplificering. Uracil spaltes fra i alle tidligere amplificerede produkter, hvorved de ikke længere kan fungere som mål-DNA.

resultater. En anden mulighed er real-time PCR, hvor risikoen for carry-over-kontamination er meget begrænset.

E-mail-adresser:

Mathilde Hartmann-Josefsen: mjo@vetinst.dk

Stefan Jensen: sje@vetinst.dk

Jeffrey Hoorfar: jho@vetinst.dk

Referencer

1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens:
 - Performance criteria for thermal cyclers. European Committee for standardization (CEN), CEN/TC 275/WG 6/TAG 3 N 46. DIN, Berlin, Germany.
 - General method specific requirements. International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland.
 - Requirements for sample preparation for qualitative detection. European Committee for standardization (CEN), CEN/TC 275/WG 6 TAG 3 N 45. DIN, Berlin, Germany.
 - Requirements for amplification and detection for qualitative

methods. European Committee for standardization (CEN), CEN/TC 275/WG 6/TAG 3 N 47. DIN, Berlin, Germany.

2. Kwok, S., and Higuchi, R., 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238.
3. Kitchin, P.A., Szotyori, Z., Fromholz, C., and Almond, N., 1990. Avoidance of false positives. *Nature* 344, 201.
4. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens – General method specific requirements, Draft International Standard ISO/DIS 22174.
5. Millar, B.C., Xu, J., and Moore, J.E., 2002. Risk assessment models and contamination management: Implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1575-1580.
6. Jackson, D.P., Hayden, J.D., and Quirke, P., 1991. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material In: McPherson, M.J., Quirke, P., Taylor, G.R. (Eds.), *PCR - A practical approach*. Oxford University Press, New York, pp. 29-50.
7. Dragon, E.A., Spadaro, J.P., and Madej, R., 1993. Quality control of polymerase chain reaction In: Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J., (Eds.), *Diagnostic molecular microbiology – Principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 160-168.
8. Clackson, T., Güssow, D., and Jones, P.T., 1991. General applications of PCR to gene cloning and manipulation In: McPherson, M.J., Quirke, P., Taylor, G.R. (Eds.), *PCR - A practical approach*. Oxford University Press, New York, pp. 187-214.
9. Hoorfar, J., Jensen, S., and Josefsen, M.H., 2002. Tør du stole på din PCR termocykler? *Dansk Veterinærtidsskrift* 23, 14-15.
10. Persing, D.H., & Cimino, G.D., 1993. Amplification product inactivation methods In: Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J., (Eds.), *Diagnostic molecular microbiology – Principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 105-121.
11. Cimino, G.D., Metchette, K.C., Tessman, J.W., Hearst, J.E., and Isaacs, S.T., 1990. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 19, 99-107.
12. Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L., 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. *Gene* 93, 125-128.
13. Walder, R.Y., Hayes, J.R., and Walder, J.A., 1993. Use of PCR primers containing a 3'-terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences. *Nucleic Acids Research* 21, 4339-4343.
14. Furrer, B., Candrian, U., Wieland, P., and Lüthy, J., 1990. Improving PCR efficiency. *Nature* 326, 324.
15. Rys, P.N., and Persing, D.H., 1993. Preventing false positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2356-2360.
16. Padua, R.A., Parrado, A., Larghero, J., and Chomienne, C., 1999. UV and clean air result in contamination-free PCR. *Leukemia* 13, 1898-1899.

Ph.d.-projekt

Elektroforetiske separationer på mikrochips: Ydeevne og muligheder

I projektet evalueres miniaturiserede systemer til elektroforetiske separationer. Både følsomheden ved UV-absorptionsmålinger og separationseffektiviteten af systemerne blev undersøgt. Desuden blev der afprøvet en ny metode til DNA-separation. Metoden er baseret på hydrodynamisk chromatografi i nanometerdybe kanaler.

Systemer med integrerede bølgeledere fremstillet på siliciumsubstrater blev vist at være kompatible med elektroforetiske separationer ved høj spænding. Brugen af bølgeledere gør det muligt at anvende lange optiske vejlængder og derved forøge systemernes følsomhed. Spredt lys, der går uden om detektionscellen, har en stor indflydelse på den aktuelle følsomhed og på det lineære område for absorptionsmålingerne.

Indflydelsen af den afsatte varme (Joule heating) på separationsgenskaberne blev undersøgt teoretisk og eksperimentelt

for at finde den optimale opnåelige feltstyrke og effektivitet, og for at undersøge om termostating af systemerne er fordelagtigt.

De miniaturiserede systemer kunne anvendes ved meget højere feltstyrker end konventionelle systemer til kapillær elektroforese. Miniaturiserede systemer, der ikke var temperaturkontrollerede, var lige så effektive til at fjerne den afsatte varme som et væskekølet silica-kapillar.

DNA-separationer blev demonstreret i kanaler med dybder på 100-300 nm. Disse separationer menes at være opnået med en parabolisk profil af det elektroosmotiske flow, som i teorien er forventet i smalle kanaler, hvor et overlap af det elektriske dobbeltlag er til stede. Separationerne vist i denne afhandling giver de første eksperimentelle beviser til at bekræfte denne teori.

Nickolaj J. Petersen, Mikroelektronik Centret, DTU

