

临床基因扩增

郑怀竞 主编

实验指南



北京医科大学出版社

临床基因扩增实验指南

主 编 郑怀竞

编 委 (依姓氏笔划排列)

王露楠	叶炳桂	冯百芳	李金明
李振勇	何蕴韶	吴庆军	张登海
钟 平	郑怀竞	贺 斌	黄道培
程 刚	瞿史文		

北京医科大学出版社

ZW02/23

LINCHUANG JIYIN KUOZENG SHIYAN ZHINAN

图书在版编目 (CIP) 数据

临床基因诊断实验指南/郑怀竞主编. —北京: 北京医科大学出版社, 1999.9

ISBN 7-81034-980-5

I 临… II. 郑… III. 基因-实验室诊断
IV. R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 46154 号

北京医科大学出版社出版发行

(100083 北京学院路 38 号 北京医科大学院内)

责任编辑: 马康涛 安 林

责任校对: 王怀玲

责任印制: 郭桂兰

山东省莱芜市印刷厂印刷 新华书店经销

* * *

开本: 850×1168 1/32 印张: 4.875 字数: 124 千字

1999 年 8 月第 1 版 1999 年 8 月山东第 1 次印刷 印数: 1—3100 册

定价: 10.50 元

目 录

1. 基因扩增实验室	郑怀竞 (1)
1.1 实验室	(2)
1.2 实验室管理	(6)
2. 基因诊断常用仪器设备的使用、维护及校准 ...	王露楠 (10)
2.1 PCR 热循环仪	(10)
2.2 冷冻离心机	(11)
2.3 电泳仪	(12)
2.4 分析天平	(14)
2.5 数字式酸度计	(16)
2.6 连续可调式移液器	(18)
3. 临床样本的制备、保存及核酸提取	李金明 (20)
3.1 临床样本的处理和保存	(20)
3.2 核酸的提取	(23)
4. 病原微生物核酸检测技术	钟平 (35)
4.1 第三代病原微生物检测方法	(35)
4.2 PCR 扩增反应	(37)
4.3 探针扩增技术	(49)
4.4 信号扩增技术	(55)
5. 基因扩增反应仪—热循环仪	黄道培 (59)
5.1 热循环仪的由来和发展	(59)
5.2 选用热循环仪的标准	(60)
5.3 选用优化的 PCR 程序的重要性	(62)
5.4 如何测定热循环仪孔与孔之间的差别	(63)
5.5 使用热循环仪的几个基本注意要点	(64)

6. HIV-1-RNA 定量 PCR 检测	张登海 贺 斌 叶炳桂 (67)
6.1 概述	(67)
6.2 原理	(69)
6.3 操作	(80)
6.4 结果与质量控制	(87)
6.5 注意事项	(92)
7. HBV-DNA 荧光探针定量检测	何蕴韶 程 刚 (104)
7.1 概述	(104)
7.2 原理	(105)
7.3 操作方法	(106)
7.4 结果判定	(109)
7.5 注意事项	(110)
8. HCV-RNA PCR-ELISA 检测	冯百芳 (111)
8.1 概述	(111)
8.2 实验原理	(112)
8.3 操作	(113)
9. TB-DNA 荧光定量检测	吴庆军 (118)
9.1 概述	(118)
9.2 原理	(118)
9.3 技术特点	(123)
9.4 实验操作	(124)
9.5 注意的几个问题	(127)
10. 沙眼衣原体 CT-DNA PCR-ELISA 检测	李振勇 (129)
10.1 概述	(129)
10.2 基本原理和方法	(132)
10.3 沙眼衣原体杂交 PCR 检测试剂盒	(134)
10.4 操作过程	(136)
10.5 注意事项	(138)
11. HPV-PCR 检测	瞿史文 (139)

11.1	概述	(139)
11.2	实验原理	(140)
11.3	操作步骤	(143)
11.4	结果判断	(146)
11.5	PCR 的防污染措施	(147)
11.6	应用及意义	(147)

1. 基因扩增实验室

郑怀竞

基因扩增实验室与其它类型的实验室最主要的区别，是防止分子水平上的扩增产物的污染。PCR 试验成功的关键是反应的模板（DNA）必须是操作者所加入的模板，而绝对不应该被环境中其它核酸污染，所以应该在一个没有 DNA 污染的干净环境中进行。如何建立一个不被污染的实验室是值得仔细考虑的问题，建立标准试验室的目的是为了防止样品之间的污染和避免旧的 PCR 产物污染新的 PCR 体系。防止污染除了建立标准的 PCR 试验室，还需要有良好的实验室操作，如果将微生物实验室操作的无菌技术应用到 PCR 试验上，污染的风险会大大减少。重视紫外线消毒及采用 dUTP/UNG 技术都是极为重要的防污染措施。在这里我们主要讨论试验室建设，其他的防污染技术将在其它章节介绍。

建立基因扩增实验室，要围绕防污染进行。各单位建立的基因扩增实验室不会一模一样，依据标准结合自身条件严格按照“防污染”的原则来设置，就可以建立一个合格的实验室。下面就临床病原微生物基因扩增（PCR）检测实验室如何进行防污染建设，从以下几个方面来介绍：

1.1 实验室

1.1.1 实验室设置

理想的 PCR 实验室应包括四个独立的工作室，每个工作室应该是独立的、有间隔的。这四个工作室依次为：

(1) 扩增前区

试剂准备室

样品处理室

(2) 扩增后区

PCR 扩增室

产物分析室

有的实验室将试剂准备室和样品处理室放在一个实验室内，样品处理放在防护罩内进行操作，这样的设计也是可以的。

如果采用全自动分析扩增仪，或试验处于全封闭状况下进行产物检测分析，可以将扩增后区合并为一个实验室，否则不能将产物分析室与基因扩增室合在一起。

防止扩增产物的污染，避免旧的 PCR 产物污染新的 PCR 体系，是将扩增前区和扩增后区分隔开的原因。有人认为建立 PCR 实验室，就应该将四个试验室连接在一起，才可以挂上一个牌子，算是一个“真正的”实验室。其实不然，扩增前区与扩增后区应该远远的隔开，至少应该相距 10-20 米远，才能称作安全。应当建立这一新概念。

扩增前区与扩增后区不仅应该隔开一个走廊，最好分别放在两层楼中，甚至放在两座楼内。分隔扩增后区和前区，目的是为了防止样品被扩增后的核酸分子污染。扩增后区的核酸分子污染扩增前区，会造成被检测的样品出现假阳性。污染一旦形成，试验将被迫停止，直至污染被清除为止。这将是十分困难的事，甚

至可能只有用实验室搬家的方法才能解决。

PCR 试验的污染，主要是前一次反应的核酸产物。这产生于操作过程中，样品所产生的气溶胶。如果产物的气溶胶，仅限于 PCR 扩增后区，这些气溶胶就不会产生问题。随着样品离心管盖的开启，手套、衣服、帽子、头发、鞋、及其它用品上均会被气溶胶污染。如果不能严格分开实验前区和后区，及严格控制流向，防止人和物将污染的气溶胶带回到扩增前区，污染就形成了。

产物分析室，是基因扩增后对产物进行分析的试验室，核酸污染最为严重。有的实验室造成污染，在这座楼的任何地方进行试验，试验的结果均为阳性（假阳性），使这个实验室长久不能使用。因此认真重视产物污染的问题，就应该加强认识，让产物分析室远离样品处理室。有的专家甚至认为，在操场上进行扩增试验，可能效果更好，由于扩散出来的产物气溶胶，被流通的大气带走，而不会造成对样品的污染。因此，经常让产物分析室内空气流通是尤为重要的事，建议在窗户上安装一个排风扇，让它整天排风，以减少室内核酸产物气溶胶聚集的浓度。有的产物分析室的门窗气流，流向样品处理室，这也是极危险的，应该让产物分析室的气流通过气道直接导出户外。如果是中央空调，也要注意产物分析室内污染的气流通过中央空调的回流，进入样品处理室，造成意想不到的污染。总之，了解造成污染原因是扩增后的产物，以气溶胶的形式扩散形成污染，因此要结合本实验室的实际情况建设合格的实验室。

1.1.2 试验室的功能

扩增前区：

1.1.2.1 试剂准备室

试剂存放、配置：

试剂准备室是存放试剂和配制试剂的地方，是绝对干净的。

完全没有任何核酸污染的地方。

1.1.2.2 样品处理室

样品收集、登记；

样品存放；

样品的处理：核酸分离、抽提；

试剂加入；

样品处理室用于分离和抽提病原体中的核酸，为防止对样品的污染，样品处理应该在防污染罩、或超净台内进行。这样便于紫外灯消毒，防污染罩的作用是采用紫外灯消毒，形成一个无核酸污染的无菌区，在其中操作防止外来的污染，操作结束后也便于消毒，防止样品间的污染。

扩增后区：

1.1.2.3 基因扩增室

DNA、RNA 扩增；

有的方法在扩增一定阶段后，需要加入试剂。要注意，将样品和要加入的试剂同时拿到基因扩增室内进行，不可以将试管拿回样品处理室里进行加入试剂的步骤。也就是说，要注意养成一种习惯，进入扩增后区，任何人在试验的当天，不得再返回扩增前区去取东西，如果一定要返回扩增前区，必须经过淋浴和更衣。

1.1.2.4 基因分析室

用于扩增后各种杂交反应，酶处理和电泳等步骤，对产物进行分析，及检测结果的填写、登记、报告的发出。

这里是核酸污染最严重的区域，要持续的通风、换气。

1.1.3 实验室设备和仪器

1.1.3.1 试剂准备室

试剂准备室内配置的设备：

紫外灯

洁净台（或防污染罩）

0.1%天平

台式离心机

振荡器

一套移液器和一次性带过滤芯的移液器枪头

冰箱

无菌备用的离心管和玻璃器皿

实验台及本室专用的文具、纸张

可控式上、下水设备

一次性手套、鞋、本室专用隔离服

1.1.3.2 样品处理室

样品处理室内配置的设备：

紫外灯

洁净台（或防污染罩）

0.1%天平

台式离心机

振荡器

抽吸器、水浴箱

一套移液器和一次性带过滤芯的移液器枪头

冰箱

无菌备用的离心管和玻璃器皿

实验台及本室专用的文具

可控式上下水设备

一次性手套、鞋、本室专用隔离服

1.1.3.3 基因扩增室

紫外灯

PCR 扩增仪

一套移液器和一次性带过滤芯的移液器枪头

无菌备用的离心管和玻璃器皿

实验台及本室专用的文具

可控式上下水设备

一次性手套、鞋、本室专用隔离服；

1.1.3.4 基因分析室

紫外灯

振荡器

酶标仪、洗板机（采用 ELISA—PCR 时使用）

台式离心机

油吸器、水浴箱

一套移液器和一次性带过滤芯的移液器枪头

水箱

实验台及本室专用的文具

可控式上下水设备

一次性手套、鞋、隔离服

电泳仪（采用限制性内切酶技术等科研时使用）

紫外透射仪

照相设备（科研用）

1.2 实验室管理

基因扩增实验室除了有硬件设备，还应该严格的管理制度。制定严格的各室使用、进入、及唯一流向制度，任何一个工作人员必须严格遵守。非本室的工作人员未经允许不得进入，以免造成不应有的污染。实验室应有专人负责，依照实验室管理规范实施全面质量管理，有关实验室质量管理的内容在‘基因扩增临床检验指南’一书中已有详细的介绍，在此不再重复。

在这里强调以下几点：

(1) 专用 PCR 实验室的四个室应该是各室有专用的实验设备、仪器（实验台、加样器、枪头、工作服、文具纸张）。应该有明显的标识、或颜色标识，以防误入，绝对不得混用。

(2) 流向进入 PCR 实验室的任何工作人员 (含卫生员), 都必须遵守实验室的规则, 尤其严格遵守进入 PCR 实验室的唯一流向问题。万不可进入 PCR 扩增后区打扫卫生, 又返回扩增前区做事。防止非本室工作人员串岗, 进入本室。尤其不得为找人, 而逆向误入 PCR 实验室。采用不同颜色的工作服和文具纸张, 就是提醒注意, 防止误人和逆进入 PCR 实验室。

下面我们引用卫生部临床检验中心 PCR 实验室管理制度, 仅供参考。

PCR 实验室管理制度

1. 总则

- 1.1 PCR 实验室分试剂准备、样品制备、扩增和产物检测四个室, 各室的实验物品 (含加样器、试管架、吸头、记录纸、笔等), 不得混用, 须贴上不同颜色标签予以区别, 试剂准备室为白色标识, 样品制备室为兰色标识, 扩增室为黄色标识, 产物检测室为红色标识。
- 1.2 PCR 实验室工作人员应具备医学检验、微生物学检验基本知识、大中专以上学历、并受过 PCR 实验的基本知识和技能培训。
- 1.3 实验室技术人员必须严格按照 PCR 实验操作程序进行, 包括实验室擦洗、台面消毒, 离心管、吸头的无菌灭活准备, 仪器使用和废弃物处理等。
- 1.4 进入 PCR 实验室后区的物品不许带进 PCR 实验室前区。
- 1.5 每天实验开始前, 必须清洁地面和消毒实验台面。
- 1.6 定期校准和维修 PCR 仪、酶标仪及离心机、水浴箱、冰箱等仪器、设备。
- 1.7 进入实验室的工作人员必须遵守实验室的唯一流向的规定, 严禁反向流动。
- 1.8 进入实验室, 必须更换本室有颜色标识的工作服 (含帽和鞋)。勤换洗工作服。

- 1.9 实验室内不得饮食、吸烟。
- 1.10 实验结束后应紫外线消毒实验台面，产物分析室紫外灯最好彻夜开启、排风扇应昼夜工作。
- 1.11 每天下班前处理好废弃物品应关好水、电、煤气和门窗。

2. 试剂准备室

- 2.1 实验人员进入该室须穿本室专用白色工作服。实验中须戴手套。
- 2.2 每天实验开始前，清洁实验台并应打开紫外灯消毒 30 分钟。
- 2.3 取出当天实验需配制和使用的试剂，其余试剂要立即收好，放回冰箱内。
- 2.4 试验中使用的离心管、吸头等应经过灭活无菌处理，（应在消毒的有效期内）。
- 2.5 PCR 其它室的用品不得带入本室。
- 2.6 每次试验记录，应使用本室专用的、带有本室标识的记录本、纸和笔。
- 2.7 实验开始后，当天不得再返回本室。

3. 样品处理室

- 3.1 实验人员进入该室须穿本室专用兰色工作服。实验中须戴手套，手套需常更换。
- 3.2 每天实验开始前，清洁实验室和实验台，并应打开紫外灯消毒 30 分钟。
- 3.3 样品的接受、登记、保存和提取按试剂盒要求进行。
- 3.4 使用本室专用的、经灭菌处理的加样器和带滤心的吸头。
- 3.5 实验记录使用本室专用的记录本和笔。
- 3.6 使用过的离心管、吸头须置于 1N HCL 溶液中浸泡、消毒后方可丢弃。
- 3.7 患者样品应按有生物传染危险品对待，应高压灭活后弃之。
- 3.8 PCR 扩增后区的物品不得带入本室。

3.9 实验完毕要打开紫外灯消毒。

4. PCR 扩增室

4.1 实验人员进入该室须穿本室专用黄色工作服。实验中须戴手套，手套需常更换。

4.2 每天实验开始前，清洁实验室和实验台，并应打开紫外灯消毒 30 分钟。

4.3 使用本室专用的、经灭菌处理的加样器和带滤心的吸头。

4.4 需在此进行操作的，如巢式扩增，第一次扩增的模板必须在本室内从反应管中取出，并加入另一只反应管中，此操作不可返回扩增前区进行。

4.5 实验记录使用本室专用的记录本和笔。

4.6 使用过的离心管、吸头须置于 1N HCL 溶液中浸泡、消毒后方可丢弃。

4.7 PCR 扩增室的物品不得带入扩增前区。

4.8 实验完毕要打开紫外灯消毒。

5. 产物分析室

5.1 实验人员进入该室须穿本室专用红色工作服。实验中须戴手套，手套需常更换。

5.2 每天实验开始前，清洁实验室和实验台，并应打开紫外灯消毒 30 分钟。如果紫外灯已开通夜，进入实验室时应关闭紫外灯。

5.3 使用本室专用的、经灭菌处理的加样器和带滤心的吸头。

5.4 使用过的离心管、吸头须置于 1N HCL 溶液中浸泡、消毒后方可丢弃。

5.5 实验记录使用本室专用的记录本和笔。

5.6 PCR 产物分析室的物品不得带出本室，严防污染携带至扩增前区。

5.7 实验完毕要打开紫外灯消毒，最好通夜消毒。

5.8 排风扇 24 小时排气，保持室内负压状态。

2. 基因诊断常用仪器设备的使用、维护及校准

王露楠

聚合酶链反应（PCR）的问世大大加快了各种生物基因组结构研究的进展，同时也为临床医学检验带来了发展活力。PCR 基因诊断作为第四代检验方法的代表技术，正广泛应用于临床检验，为临床治疗提供可靠的依据，因此，建立一个合理配套的实验室是至关重要的。基因诊断实验室常规应配备：PCR 热循环仪、台式高速离心机、紫外透射分析仪、电泳仪及相应配件、水浴锅、lianxu 连续可调移液器、冰箱或冰柜、pH 计、漩涡混匀器、天平、定时钟等。这些仪器设备的正确使用及维护直接关系到检测结果的可靠性。

2.1 PCR 热循环仪（DNA 扩增仪）

随着分子生物学的创立与发展，PCR 扩增作为一门崭新的技术已经在遗传疾病的诊断、临床标本中病原体核酸序列的检测、激活癌基因中突变情况的分析、法医学上的遗传学鉴定以及分子克隆诸方面得以越来越广泛的应用，实现这项技术的工具—PCR 扩增仪也应运而生，而且随着分子生物学的不断发展，PCR 扩增仪将在基层单位中得到普及推广应用，因此了解 PCR 扩增仪的性能，熟练掌握仪器的正确使用方法及使用过程中的注意事项，将会给工作带来一定的帮助。有关 PCR 扩增仪的原理、发展状

况及使用在后面有专门的章节介绍，这里就不详细叙述了。

2.2 冷冻离心机

低温分离技术是分子生物学研究中必不可少的手段。基因片段的分离、酶蛋白的沉淀和回收以及其它生物样品的分离制备实验中都离不开低温离心技术，因此低温冷冻离心机已成为分子生物学研究中必备的重要工具。

2.2.1 使用方法

1. 离心机应放置在水平坚固的地板或平台上，并力求使机器处于水平位置以免离心时造成机器震动。

2. 打开电源开关，按要求装上所需的转头，将预先平衡好的样品放置于转头样品架上（离心套管须与样品同时平衡），关闭机盖。

3. 按功能选择键，设置各项要求：温度、速度、时间、加速度及减速度，带电脑控制的机器还需按储存键，以便记忆输入的各项信息。

4. 按启动键，离心机将执行上述参数进行运作，到预定时间自动关机。

5. 待离心机完全停止转动时打开机盖，取出离心样品，用柔软干净的布擦净转头和机腔内壁，待离心机腔内温度与室温平衡后方可盖上机盖。

2.2.2 注意事项

1. 机体应始终处于水平位置，外接电源系统的电压要匹配，并要求有良好的接地线。

2. 开机前应检查转头安装是否牢固，机腔有无异物掉入。

3. 样品应预先平衡，使用离心机微离心时离心套筒与样品