

应用 PBL 教学法实例讲解如何发现引物污染

王 成^{1,2}, 赵 刚¹, 孔亚林¹, 蒲 猛¹, 戴竞耀¹, 刘承利^{1,2△}

空军特色医学中心;1.肝胆外科;2.外科学教研室,北京 100142

摘要:目的 验证以问题为基础(PBL)教学法在提高学生处理聚合酶链反应(PCR)污染能力方面的作用。方法 以 PCR 假阳性为实例,采用 PBL 教学法引导学员合理设立空白对照,通过重复试验探究污染来源。结果 学员在思维引导帮助下逐步发现 PCR 污染来源于引物污染,并对试验方法及理论有了清晰的认识。结论 以实例讲解为基础的 PBL 教学法可有效提高学生认识和处理 PCR 污染的能力。

关键词:以问题为基础教学法; 实例讲解; 定量聚合酶链反应; 引物污染; 空白对照; 假阳性

中图分类号:G642.421

文献标志码:B

文章编号:1672-9455(2022)13-1861-03

随着生物科技的发展,以聚合酶链反应(PCR)为主的核酸试验应用越来越广泛^[1],实验室质量控制和生物安全是 PCR 技术初学者应掌握的重要内容^[2]。不论是中学、大学实验课的学生还是实验技术方面的初学者对避免核酸污染等质量控制的意识均不强。由于 PCR 耗时较长,注意力不易集中^[3],容易受核酸污染,必须设计空白对照才能及时发现假阳性结果^[4],但枯燥的理论讲解学生不易接受,教学效果不好。以问题为基础(PBL)教学法是一种基于“问题”为中心的教学模式,是目前国际上较为流行的一种教学法。案例选择和问题设计是 PBL 教学法的主要切入点,对初学者理解抽象问题非常有帮助。本文围绕在一次 PCR 教学试验中发现空白对照管中有核酸污染的实例,遂把 PBL 教学法应用于枯燥的对照重复试验,理清了发现和判定核酸污染来源的过程,学生们反映教学效果很好,理解较为深刻。

1 资料与方法

1.1 学生情况及试验事件 小班教学,学生 5 人,教学过程发现空白对照管有核酸扩增,于是采用 PBL 教学法^[5],以实例为引导,设计教学试验,结合实际图表,启发学生分层思维,最终引导学生们找到污染源。

1.2 一般资料 组织来源为 6 份液氮冻存的 SD 大鼠肝脏组织。大鼠来源的 Yes 相关蛋白(YAP)引物两种,分别由美国 Invitrogen 和中国上海生工公司设计合成,均具有较好的特异性。

1.3 仪器与试剂 荧光定量 PCR 仪为 Roche Light Cycle (2.0)系统,软件版本 3.5。采用 Trizol 总 RNA 试剂提取总 RNA,取材器械、冻存管及双蒸水(ddH₂O)均经 1%二乙基焦碳酸酯水处理。反转录试剂盒(DRR03S)及荧光定量 PCR 试剂盒(DRR041S)均购自 TaKaRa 宝生物工程大连有限公司。

1.4 方法 PBL 教学法采用案例选择、问题设计、思维导图、情景教学等,以实例为线索,以学生为主导。

1.5 试验技术方法 RNA 提取应用 Trizol、氯仿、异

丙醇提取,75%乙醇洗涤 RNA 沉淀。应用凝胶电泳法(琼脂糖)鉴定 RNA 未被降解,以紫外分光光度计对 RNA 样品进行纯度分析和定量。反转录合成 cDNA 按试剂盒配制反应体系。

1.6 统计学处理 采用 Light Cycler 数据分析软件对数据进行分析处理。直观比较 Ct 值^[6],Ct 值越大,起始模板数越低。

2 结果

2.1 以实例为引导,使学生直观认识什么是核酸污染 PCR 扩增试验结束后发现“空白对照管”的反应曲线清晰可见,说明该反应体系内有核酸扩增,可推断空白对照管反应体系内存在核酸污染。通过反应曲线图学生们对“假阳性”有了直观认识。

2.2 问题出在哪里? 引导学生自问自答 空白对照管中含有 3 种成分:ddH₂O、引物及 PCR 试剂,其中 ddH₂O 的配制、分装、加样过程操作较多,比较容易污染,而且 ddH₂O 较引物和 PCR 试剂更容易获取,应作为首先排除对象。

2.3 与学生一道设计验证试验 选用新的 ddH₂O 作为对照,重复试验,同时原 ddH₂O 同步参与重复试验,试验反应条件不变,引物不变,挑选扩增曲线较好的 7 号样品作为 cDNA 模板,观察在含新 ddH₂O 的反应体系中是否有核酸扩增,结果见表 1。通过比较 PCR 结束后的 Ct 值可比较反应体系的起始模板核酸量,Ct 值越大,核酸量越小。

2.4 ddH₂O 污染的可能性很小 学生们一致认为,B 管和 D 管均无模板,但均有核酸扩增,Ct 值差别不大(即起始模板数差别不大),所以 2 个反应体系均有核酸污染,且污染程度相近。因 B、D 这 2 管分别为不同的 ddH₂O,2 次配制的 ddH₂O 均有污染的可能性较小。特别是 B、D 这 2 管的 Ct 值相近,污染程度相同,故暂不考虑污染源是 ddH₂O。另外,学生们认为,A 管和 C 管有相等数量模板,ddH₂O 不同,因 Ct 值差别不大,说明起始模板数差别不大,同样说明 2 次

△ 通信作者,E-mail:liuchengli@tom.com。

配制的 ddH₂O 无明显差别。因此,前、后 2 次 ddH₂O 均被污染的可能性均很小,综合分析后考虑为 ddH₂O 以外的试剂有污染。

表 1 重复试验 1		
样品	反应体系组成	Ct 值
A 管	标准模板+引物+原 ddH ₂ O	23.08
B 管	无模板+引物+原 ddH ₂ O	27.92
C 管	标准模板+引物+新 ddH ₂ O	22.85
D 管	无模板+引物+新 ddH ₂ O	27.55

注:标准模板为第一步试验中扩增曲线较好的 7 号样品的 cDNA 模板;无模板为试验反应液中不加入 cDNA 模板。

2.5 教员思维引导,学生制订方案 教员提示:试验所用引物一般来自 2 家公司,每次所用引物是经过分装的。学生们思考后认为,分装引物过程存在污染的可能,如需验证引物污染,可以选取未开封、未分装的原引物。另外,可选用另一家公司的引物同时做对照,发现原引物出厂时已被污染。进一步重复试验,试验条件不变,目的是验证原分装引物中是否有核酸污染。见表 2。Ct 值很大说明起始模板的核酸量很小,Ct 值为 0.00,说明反应体系内不含核酸模板。

表 2 重复试验 2		
样品	反应体系组成	Ct 值
E 管	无模板+引物 1+ddH ₂ O	>26.00
F 管	无模板+引物 1'+ddH ₂ O	0.00
G 管	无模板+引物 2+ddH ₂ O	0.00
H 管	标准模板+引物 2+ddH ₂ O	16.75

注:无模板为试验反应液中不加入 cDNA 模板;引物 1 为首次试验分装后的引物;引物 1'为新开封的引物 1 原装液;引物 2 为另一家引物公司设计及制备的引物;标准模板为第一步试验中扩增曲线较好的 7 号样品的 cDNA 模板。

2.6 引物 1(首次试验分装后的引物)为污染源 学生们逐条分析:H 管含标准模板,扩增同前,提示引物 2 可用。F 管、G 管无扩增,说明 ddH₂O、PCR 试剂、引物 1'(新开封的引物 1 原装液)及引物 2(另一家引物公司设计及制备的引物)均无核酸污染。E 管反应体系未加入 cDNA 模板但仍有核酸扩增,考虑引物 1 有污染,结合 E 管扩增曲线 Ct 值远远大于有标准模板扩增的 H 管,说明起始模板数很小,这符合试验中引物加样量较小的实际情况。全体学生一致认为,分装引物 1 内的核酸污染是污染源,推测是引物分装或加样过程中污染。

3 讨 论

在分子生物学教学实践中,有关 PCR 中核酸污染的内容是一个难点。在理论层面,学生们基本掌握核酸污染方式中最重要的是气溶胶污染^[7],因此,包括 PCR 在内的核酸试验被要求在生物安全柜内进行操作。在污染源分型上亦不难理解,常见污染类型包括:(1)标本污染,包括收集标本的容器污染,标本密

封不严造成交叉污染及核酸提取过程中吸样枪污染。(2)PCR 试剂污染^[8],包括加样枪、容器、ddH₂O 等溶液被 PCR 核酸模板污染。(3)PCR 产物污染,有报道 PCR 产物污染离心机,导致气溶胶颗粒在离心机气流作用下进入到未盖严的离心管中^[9-10]。本文通过激发学生的逆向思维分析,主动了解污染类型及污染可能来源,使孤立的试验方法变得系统,使试验教学更生动、高效,增强了学生的主动性,提高了学习效率。

教学中常常强调 PCR 污染的监测可通过对照试验来实现,阴性对照尤为重要,每次 PCR 务必做阴性对照,包括不加模板的空白对照、不加引物的空白对照及模板和引物均不加仅有试验试剂的空白对照等。但学生们没有切身感受,常有侥幸心理,为了减少试验步骤、节省时间会省略部分甚至全部阴性对照的配制。本研究就是没有设置无引物的对照,所以导致无法在发现假阳性的第一时间判断污染的来源。

本教学试验中发现空白对照有 DNA 扩增,污染来源不明,当无法准确判断污染源时需进一步设计对照试验,以找出污染源。进一步的试验仍需要设立空白对照,根据下一步试验结果确定或排除某类污染源,最后通过试验验证污染源。引物污染较隐蔽,对试验结果的影响容易被忽视,只有设立良好的空白对照,才能及时发现假阳性和判定假阳性的来源。引物污染具有不易被发现的特殊性^[11-12],由于担心原装引物内有污染,试验中学生们拓展思维,应用了 2 个不同的引物进行 PCR 扩增,一个是新开封的引物原装液,另一个是另一家引物公司设计及制备的引物,从 2 个层级搜寻污染源,最终发现是分装的引物内有核酸污染,可能是在分装过程或使用过程中被污染。这期间,学生参与了试验设计方案,对设计过程及试验过程均透彻理解。

教学中教员进一步强调,鉴于核酸污染的发生率较高,并且所导致的后果严重,PCR 实验室内应采取相应的措施防范污染。一些单位参照美国 PDCA[P 策划(P)、实施(D)、检查(C)、处置(A)]质量管理循环体系,在控制实验室污染方面已经取得明显效果^[13]。另外,通过加强 PCR 分析前的质量控制^[14]、对实验室进行环境监测,均有利于提高检测结果的准确性^[15]。以上诸多措施均是避免 PCR 污染的有效方法,但如果 不 设 空 白 对 照 却 无 法 发 现 污 染 源,如 果 空 白 对 照 不 够 全 面,亦 无 法 判 定 污 染 来 源。空 白 对 照 的 设 立 是 PCR 发 现 和 判 定 假 阳 性 的 关 键,是 避 免 试 验 结 果 受 核 酸 污 染 影 响 的 重 要 手 段。

PBL 教学法的目的是提高学生发现问题、解决问题的能力,因此,设计问题要紧紧密结合 PCR 的实际,由浅入深、层层推进,让学生能够思路清晰、逻辑清楚地完成实验流程,从而解决试验中的问题。本文应用 PBL 教学法加实例教学,把复杂的(下转第 1872 页)

强度反映细胞内核酸物质水平,能准确区分含有少量核酸的血小板和不含核酸的成熟红细胞及红细胞碎片,也能识别大血小板。PLT-F 是利用血小板特异荧光染料针对核糖体 RNA 和线粒体 DNA 进行染色,根据荧光强度和前向散射光强度不同准确计算血小板,能正确区分非血小板物质^[10-12]。由于马尔尼菲篮状菌大小为 2~8 μm,与血小板大小相近,同时菌体内也含有核酸物质,由此推测 PLT-I 和 PLT-O 不能正确区分二者,误把马尔尼菲篮状菌当作血小板而计数。而 PLT-F 只针对血小板核酸染色,对马尔尼菲篮状菌核酸难以染色,因而此法能正确区分二者。PLT-F 散点图左下区域散点分为两群,触发仪器报警,所得 PLT 结果比 PLT-I 和 PLT-O 更准确。

因此,当发现外周血存在大量游离于细胞外的马尔尼菲篮状菌时,对血小板的检测应进行血涂片镜检估算和手工 PLT,有条件者可采用 PLT-F 检测,以获得准确的 PLT 结果。

参考文献

[1] 田麦,李卉.血细胞分析仪测定血小板假性升高的原因及探讨[J].中国医疗前沿,2012,7(20):54.
[2] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4版.北京:人民卫生出版社,2015:3-15.
[3] 王霄霞.外周血细胞形态学检查技术[M].北京:人民卫生出版社,2014:98.
[4] 周萍,刘娜,焦瑞宝,等.XN-3000 血液分析仪三种方法检测低值血小板结果比较[J].安徽医药,2018,22(9):1694-

1696.

[5] 陈玲娟,李珊珊,潘瑞琪,等.严重血小板减少症患者血小板计数结果准确性评价[J].国际检验医学杂志,2018,39(20):2484-2487.
[6] SAMSON R A, YILMAZ N, HOUBRAKEN J, et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *talaromyces* and taxa accommodated in *penicillium* subgenus *biverticillium*[J]. *Stud Mycol*, 2011, 70(1):159-183.
[7] 梁欣,柳明波,李春玫.获得性免疫缺陷综合征合并血流感染 143 例临床及病原菌分析[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(3):252-256.
[8] 谭鹤听,高丽,张米,等.艾滋病合并马尔尼菲篮状菌病的研究进展[J].中国真菌学杂志,2018,13(6):371-375.
[9] 莫武宁,邓卓霖,甘宝文,等.用糖原染色鉴别骨髓涂片中马尔尼菲青霉菌、荚膜组织胞浆菌及黑热病杜利小体[J].临床检验杂志,2002,20(4):228-229.
[10] HONG K H, KIM M J, LEE K W, et al. Platelet count evaluation using three automated haematology analysers compared with the immunoplatelet reference method, and estimation of possible inadequate platelet transfusion[J]. *Int J Lab Hematol*, 2009, 31(3):298-306.
[11] 梁玉珊,李婉媚,胡晖. Sysmex XN-2000 血液分析仪检测低值血小板 3 种方法的比较[J].医学检验与临床,2020,31(8):15-18.
[12] 李果,高兵,彭政,等.光学法计数在低值血小板检测中的研究应用[J].临床血液学杂志(输血与检验版),2009,22(4):189-190.

(收稿日期:2021-12-18 修回日期:2022-04-10)

(上接第 1862 页)

PCR 污染问题逐步转化为层次分明、逻辑清楚的科学问题,突破传统教学模式。在试验教学过程中,教师由知识的传授者转变为逻辑分析的引导者,通过学生自主学习和理解解决疑难问题。

参考文献

[1] 杨德平,刘维薇.数字 PCR 技术在临床诊断中的应用进展[J].临床检验杂志,2016,34(10):785-787.
[2] 秦琴,孙懿,李闻捷,等.医学检验专业本科实习全程质量控制带教模式探讨[J].基础医学教育,2014,16(1):47-49.
[3] 李江滨,巫媛,李育超,等.RNA 提取、定量及 RT-PCR 综合性实验在分子生物学检验技术教学中的实施[J].科教导刊,2016,9(12):90-91.
[4] 丁飞,周静,武红权. TB-DNAPCR 室内质控方法初探[J].贵州医药,2002,27(2):118-119.
[5] 姜春明,彭梓月,韩钢. PBL 教学法在儿科住院医师规范化培训中的应用[J].中国毕业后医学教育,2019,3(4):316-318.
[6] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nat Pro-*

toc, 2008, 3(6):1101-1108.

[7] 陈亚丽,赵斌,周建云.实时荧光 PCR 实验过程污染的监测与防范[J].诊断病理学杂志,2018,25(12):857-858.
[8] 杨晓芳,张英. PCR 检测过程中假阴性、假阳性原因分析[J].世界最新医学信息文摘,2013,13(29):104-105.
[9] 毛源,夏玲芝,王晶.聚合酶链反应实验室污染的发现及处理[J].检验医学与临床,2012,9(21):2781-2782.
[10] 姜文灿,岳素文,何赏,等.实时荧光定量 PCR 非特异性分析[J].临床检验杂志,2017,35(5):370-372.
[11] 王颖. PCR 试验污染问题分析与对策[J].实用医技杂志,2003,10(5):454-455.
[12] 郭利华. PCR 实验室的污染及控制措施[J].国际检验医学杂志,2016,37(16):2354-2355.
[13] 吴秀娟,张大军,张萍. PDCA 法在检验科 PCR 室防止操作污染中的应用[J].国际检验医学杂志,2014,35(6):793-795.
[14] 刘林. 荧光定量 PCR 检测乙肝 DNA 分析前质量控制[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(61):34-35.
[15] 石浩宇,刘毅,范鹏程. PCR 实验室核酸污染监测及排除[J].中国医疗器械信息,2018,24(7):25-26.

(收稿日期:2021-11-28 修回日期:2022-04-15)