CONTAMONATION is loading....

- PCRیک تکنیک بسیار حساس است که به محققان اجازه می دهد میلیون ها نسخه از یک توالی DNAخاص را از چند نسخه اولیه تولید کنند.
- در حالی که این حساسیت بسیار مفید است، یک جنبه منفی دارد.
- اگر قطعات DNAاز محیط آزمایشگاه، مانند الگوی DNAتکثیر شده در آزمایش PCRقبلی، وارد واکنش یا معرف‌های PCR یا حتی در فضا و وسایل مصرفی آزمایش شوند، هر چند در مقادیر کم، می‌تواند آنها را در طول واکنش تکثیر کند.
- این آلودگی و تقویت غیر اختصاصی می تواند نتایج گمراه کننده ای مانند مثبت کاذب ایجاد کند.

- اگر در انجام آزمایش‌های PCRتازه کار هستید، تشخیص مسائل آلودگی و جلوگیری یا کاهش خطرات آلودگی می‌تواند دشوار باشد.
- متأسفانه، حساسیت عالی این تکنیک ها، آنها را در برابر آلودگی آسیب پذیر می کند
- در نتیجه یکی از مهمترین قوانین هنگام انجام PCRجلوگیری از ایجاد آلودگی است.

شناسایی آلودگی

- چگونه می توانید تشخیص دهید که آیا آلودگی در آزمایش PCR دارید یا خیر؟
- یکی از رایج‌ترین روش‌های نظارت بر آلودگی، استفاده از «کنترل بدون الگو» (NTC)است.
- در یک واکنش PCR، چاهک یا چاهک های NTCحاوی تمام اجزای اجزای واکنش PCRمانند آغازگرها، معرف‌ها و غیره هستند، به استثنای الگوی
- اگر چاهک NTCبدون آلودگی باشد، نباید در این چاهک ها بعد از مراحل ترموسایکلینگ هیچ گونه گرافی مشاهده کنید.
- اگر تکثیردر چاهک های NTCمشاهده شود، نشاندهنده آلودگی است
- باید علت آلودگی را در کمترین زمان ممکن تشخیص داد و برطرف کرد تا مشکلات بیشتر و شدیدتری ایجاد نکند.

- برای مثال، اگر یکی از معرف‌های شما آلوده شده باشد، انتظار می‌رود که در چاهک یا چاهک های NTC با یک مقدار Ctمشابه در هر چاهک، تکثیر شود.
- در چنین سناریویی، سعی کنید معرف هایی را که مشکوک به آلودگی هستید جایگزین کنید.
- آلودگی مشاهده شده می تواند تصادفی باشد، به عنوان مثال، یک الگوی DNA آئروسل‌شده در محیط آزمایشگاه می‌تواند قبل از چرخه حرارتی وارد مستر میکس PCR بشود. در این مورد، شما انتظار دارید که تنها در برخی از چاهک ها با مقادیر Ctمتفاوت شاهد تکثیر باشید
- در هر دو مورد، ممکن است لازم باشد رویه‌ها و روش‌های آزمایشگاهی خود را برای کاهش و جلوگیری از آلودگی مرور و بهبود دهید.

- یکی از منابع اصلی آلودگی qPCR، آلودگی انتقالی (محصولات تکثیر شده) است.
- در طول فرآیند تکثیر qPCR، میلیون ها نسخه از الگوی DNAتولید می شود.
- هنگامی که یک لوله یا پلیت حاوی محصول تقویت شده را باز می کنید، مقادیر قابل توجهی از محصول را می توان در هوا ریخته و به راحتی در محیط آزمایشگاه پراکنده کرد. (تولید آئروسل)
- اگر این الگوی DNAآئروسل شده ، Master Mixیا واکنش qPCRرا در آزمایش‌های qPCRبعدی آلوده کند، به راحتی می‌تواند تکثیر شود و به تدریج آلودگی وسیعی را ایجاد کند.

- بنابراین، بهترین کار این است که مناطق قبل و بعد از تکثیررا جدا نگه دارید و به طور ایده آل در اتاق های مختلف با تجهیزات آزمایشگاهی کاملاً مستقل مانند پیپت ها، سانتریفیوژ ها و....ازمایش انجام بشود.
- اطمینان حاصل کنید که هر منطقه تجهیزات حفاظتی خاص خود را دارد، مانند دستکش و روپوش آزمایشگاهی، و یک منبع اختصاصی از مواد مصرفی.
- در حالت ایده آل، این اتاق ها نباید توسط یک سیستم تهویه/ کانال کشی یکسان تامین شوند.
- شما همچنین باید یک گردش کار یک طرفه را بین این مناطق مختلف حفظ کنید، بطوری که محققانی که در یک منطقه پس از تکثیر کار کرده اند، در همان روز وارد یک منطقه پیش تکثیر نمی شوند. اگر نیاز به رفتن از یک منطقه قبل از تکثیر به یک منطقه پس از تکثیر دارید، باید دستکش و روپوش آزمایشگاهی خود را تعویض کنید .

- مهم است که هر چیزی را که در ناحیه پس از PCRاستفاده می شود و نیاز هست که به مرحله قبل از PCR، بازگردانده شود، قبل از بازگرداندن آن حتما پاکسازی کنید.
- مراقب باشید که امکان انتقال آلودگی از طریق جواهرات، تلفن همراه و حتی مو وجود دارد و نه فقط از طریق دستکش یا روپوش آزمایشگاهی آلوده.

- تجهیزات حفاظت فردی، حمل و نگهداری مایعات

- مراقب باشید که چه زمانی دستکش های شما ممکن است آلوده شده باشند.
- به عنوان مثال، ممکن است درب لوله خون یا سرم یا هرنمونه دیگری را باز میکنید و با اندکی پاشیدگی نمونه بر روی دستکش مواجه میشوید، تعویض دستکش می تواند از آلوده شدن سطوح کار، ظروف پلاستیکی و تجهیزات اطراف جلوگیری کند.
- لوله ها را با دقت باز کنید تا از پاشیدن یا پاشیدن محتویات آنها جلوگیری شود.

- نمونه‌ها و واکنش‌ها را تا حد امکان درپوش/پوشانده نگه دارید و پس از استفاده در مکانی امن و محفوظ قرار دهید.
- از سر سمپلرهای استریل و فیلتر دار مقاوم در برابر آئروسل استفاده کنید
- در پایان کار هم دقت لازم را دراوت کردن وسایل مصرفی داشته باشید تا چیزی در فضای ازمایشگاه باقی نماند تا تولید ائروسل کند

منبع آلودگی خود را شناسایی کنید

- این آلودگی از کجا می تواند باشد؟
- خوب، واقعاً هر جا.
- این آلودگی می تواند از
- ۱) محیط آزمایشگاهی شما مانند پیپت ها، نوک سمپلر ها، دست ها، روی میز، سانتریفیوژ و غیره باشد،
- یا
- ۲) معرف های شما مانند پلیمراز، بافر، نوکلئوتیدها، آب و دیگر معرف ها.

۱) آلودگی در محیط آزمایشگاهی خود را رد کنید Rule Out Your Laboratory Environment

- اول از همه، هنگام ردیابی آلودگی PCR، تمام منابع محیطی ممکن را حذف کنید. برای انجام این کار باید:
- از محلول سفید کننده ۱۰ درصد برای پاک کردن موارد زیر استفاده کنید:
- سطح بنچ کار، پیپت ها، سانتریفیوژ، وورتکس ، رک ها، درب و دکمه های ترموسایکلر
- جعبه های نوک فیلتر باز نشده و میکروتیوپ های PCRاستریل باز نشده جدید دریافت کنید:

- روپوش مخصوص آزمایشگاه بپوشید.
- شما باید یک پوشش آزمایشگاهی مخصوص pre-PCRبپوشید. این نباید (!) همان پوششی باشد که هنگام نمونه زدن و تجزیه و تحلیل نتایج PCRمی پوشید. این پوشش نباید به لوله های باز محصول PCRنزدیک شود.
- دستکش های خود را مرتباً عوض کنید.
- اگرمرحله pre-PCRو تجهیزات اختصاصی خود را برای انجام هر کاری رها می‌کنید، مثلا: معرف‌های بیشتری آماده کنید، به تلفن خود پاسخ دهید، از قلم استفاده کنید - قبل از بازگشت به کار، دستکش‌های خود را عوض کنید.
- فقط از تجهیزات اختصاصی استفاده کنید.
- پیپت‌ها، سانتریفیوژ ها و وورتکس هایی که هنگام pre-PCRاستفاده می‌کنید باید به رهمان منطقه اختصاص داده شوند. هیچ محصول PCRنباید در نزدیکی آنها باشد.

- ۲) آلودگی در معرف های خود را رد کنید **Rule Out Your Reagents**

- اکنون که ورود هر گونه آلودگی جدید PCRبه مجموعه PCRخود را به حداقل رسانده اید، زمان آن رسیده است که مواد و معرف های خود را بررسی کنید. این بدان معناست که به طور سیستماتیک هر یک از معرف های قدیمی خود را با یک معرف جدید (که قبلاً باز نشده) جایگزین کنید و کنترل منفی خود را مجدداً اجرا کنید.

از آلودگی آینده اجتناب کنید

- برای جلوگیری از آلودگی در آینده، باید تمام کارهای بالا و چند کار دیگر را انجام دهید:

- در فضای اختصاصی کار کنید.
- PCRخود را دور از محل تجزیه و تحلیل نتایج PCRتنظیم کنید.
- این کار بهتر است در یک هود یا حداقل بنچ هایی دور از جایی که نمونه میزنید و همچنین دور از محل ژل الکتروفورز انجام شود.
- معرف های PCRو محصولات PCRرا جداگانه نگهداری کنید. همانطور که نمی خواهید آنالیز PCRشما نزدیک محل pre-PCRباشد، هرگز نباید محصول و معرف های PCRرا با هم نگهداری کنید. در صورت امکان از یخچال های جداگانه استفاده کنید.

- تقسیم بندی کنید **Aliquot**. مهم نیست چقدر مراقب باشید، آلودگی همچنان ممکن است رخ دهد. آلودگی نه تنها زمان، بلکه هزینه نیز دارد، زیرا باید هر معرف آلوده را دور بریزید. اگر آن معرف جدید است که هزینه و بهای بالایی را دارید پرداخت میکنید.

- بنابراین، هر زمان که ممکن است، معرف‌های خود را به لوله‌های کوچک‌تر تقسیم کنید و هر بار فقط از یک قسمت کار کنید. این نه تنها به شما در مقابله با آلودگی کمک می کند، بلکه با کاهش تعداد چرخه های انجماد/ذوب، عمر معرف های شما را نیز افزایش می دهد.

- PCR tubes/tips/racksرا جداگانه نگهداری کنید.
- تمام تجهیزات PCRرا به این عنوان برچسب بزنید و به سایر اعضای آزمایشگاه بگویید که به این کاراحترام بگذارند و جابجا نکنند
- میکروتیوپ های خود را با یک دست و با انگشت شست باز نکنید، هر چند که این کار بسیار راحت و سریع است اما سبب آئروسل کردن نمونه میشود و سبب آلودگی بنچ و هود می گردد.
- در عوض بهتر است وقت بگذارید و از دو دست خود برای باز کردن تمام لوله های حاوی نمونه استفاده کنید.

- از یک مستر میکس کلی استفاده کنید و الگو را در آخر اضافه کنید.
- هرچه زمان کمتری با الگو کار کنید، فرصت کمتری برای آلودگی وجود دارد.
- بنابراین، همیشه باید PCRهای خود را با استفاده از مخلوط های اصلی ساخته شده با (به ترتیب): آب، بافر، نوکلئوتیدها، پرایمرها، پلیمراز، و در نهایت، الگو تنظیم کنید.

- دیگران را آموزش دهید.
- دیگران را در مورد آلودگی PCRو اقدامات لازم برای جلوگیری از آن آگاه کنید.

کنترل های منفی را اجرا کنید

- همه ما می دانیم که همیشه باید در انواع تستهای PCR کنترل منفی داشته باشیم.
- با این حال، گاهی اوقات انجام ندادن آن را توجیه می کنیم.
- به دلایلی مانند "این آزمایش همیشه جواب می دهد!«
- "من می توانم در معرف ها صرفه جویی کنم«
- "من زمان ندارم"
- **اما** فراموش نکنید که همیشه کنترل منفی خود را اجرا کنید!
- بدون کنترل منفی، آلودگی PCRمی‌تواند برای مدتی در کمین باشد، آزمایش‌ها را مخدوش کند، وقت شما را با عیب‌یابی تلف کند و به آرامی در آزمایشگاه شما پخش شود.
- بنابراین، بیش از حد اعتماد به نفس نداشته باشید و تنبلی خود را توجیه نکنید، فقط کنترل های منفی خود را اجرا کنید، زیرا به این ترتیب متوجه خواهید شد که آیا آلودگی دارید یا خیر.....

- یک کنترل منفی PCRمعمولاً فقط مخلوط اصلی PCRمعمولی است (پلیمراز، پرایمرها، بافر، نوکلئوتیدها) اما به جای اضافه کردن الگو، آب اضافه می کنید.
- این ویال باید منجر به یک PCRبدون محصول و در نتیجه یک چاهک خالی در ژل بعد از PCR و یک خط صاف بدون گراف در واکنش Real Time PCR می شود.
- بنابراین، اگر یک باند یا گراف دریافت کنید، می دانید که آلودگی دارید... جایی.

dreamstime.com

تنظیم آزمایشگاه برای گردش کار بهینه PCR

- ایجاد یک محیط آزمایشگاهی مناسب و ایجاد گردش کار یک طرفه، دو روش برای جلوگیری از آلودگی PCRاست.

- برای اطمینان از کنترل مناسب، پرسنل آزمایشگاه، باید برای تضمین کیفیت، یک پروتکل استاندارد و مستند به اندازه فضای آزمایشگاه و تجهیزات موجود را ایجاد کنند

- این گردش کار یکطرفه شامل ۵ روش زیر است:
- برای هر مرحله واکنش PCRمناطق کار یا اتاق های جداگانه ایجاد کنید.
- هرگز لوله های آزمایش قبلاً استفاده شده در PCRرا به اتاق کار بعدی برنگردانید.
- مستر میکس باید در اتاق مخصوص آماده و تقسیم شود و به یک منطقه مجاور و تفکیک شده منتقل شود.
- الگوی DNAهرگز نباید در ناحیه ای که مسترمیکس تهیه می شود، وجود داشته باشد.
- لوله های واکنش حاصل از تکثیرهای قبلی هرگز نباید با نمونه های تکثیر نشده یا معرف های استفاده نشده، نگهداری شوند.

- عمومی ترین منشاء های آلودگی به شرح ذیل است:

- الگوی DNAاصلی
- مولکولهای کلون شده که ژن هدف را حمل می کنند
- مولکولهای تکثیر شده از PCRقبلی

- در کل برای جلوگیری از انواع آلودگی ها قوانین یکسانی بکار برده می شود. هر چند که برای جلوگیری از نوع سوم آلودگی که معمولاً بنام آلودگی انتقالی carry over شناخته می شود، مراحل اضافه تری میتوان اتخاذ کرد.

- شاید باقی مانده های PCR پیشین مهمترین منبع اصلی آلودگی باشد.

نور فرابنفش

- اولین تکنیک استریل‌سازی بود که برای از بین بردن آلودگی ناشی از محصولات تکثیر شده استفاده شد.
- این تکنیک مبتنی بر خاصیت اشعه ماوراء بنفش برای القای دیمرهای تیمیدین و سایر تغییرات کووالانسی DNAاست که اسید نوکلئیک آلوده کننده را غیرفعال می کند.
- تکنیک ساده و ارزان است اما در استریل کردن توالی های کوتاه (کمتر از ۳۰۰ نوکلئوتید) و غنی از G+C، کارایی کمتری از خود نشان می‌دهد.

- علاوه بر این، کارایی تابش UVبه فاصله اسیدهای نوکلئیک از منبع نور بستگی دارد.

- با وجود چنین محدودیت هایی، تابش اشعه ماوراء بنفش باید یکی از ویژگی های جدایی ناپذیر هر آزمایشگاه PCRباشد.
- پس از باز شدن رک ها، تمام نوک پیپت ها و سایر وسایل یکبار مصرف باید در هود یا کابینت حاوی نور UVنگهداری شوند.

- آماده سازی مخلوط اصلی واکنش (مسترمیکس) نیز باید در هود یا کابینت حاوی نور UVانجام شود.
- همچنین افزودن نمونه به مسترمیکس هم باید در زیر هود های دارای لامپ UV باشد.

هودهای PCRو لامپ UV

- هودهای PCR باید به یک لامپ UV ضد میکروبی مجهز شوند که در فواصل زمانی مشخص برای استریل سازی محیط کار استفاده شوند.
- قرار گرفتن در معرض اشعه ماورا بنفش می تواند مضر باشد. بنابراین باید در حالی که لامپ ماورا بنفش روشن است، از اتاق خارج شوید. اگرچه این امکان وجود ندارد، پرسنل آزمایشگاه باید همیشه هنگام کار در زیر این لامپ ها از تجهیزات محافظتی مناسب استفاده کنند.
- مهم است که هودهای مجهز به لامپ UV از مواد مناسب در برابر اشعه ماورا UV بنفش ساخته شده باشند.

- هر هود واکنش PCR باید شامل تجهیزات اختصاصی شامل پیپت، سانتریفیوژ و ظروف پلاستیکی باشد و نباید به هود دیگری منتقل شوند.

- هر مرحله از واکنش های PCRباید در یک هود جداگانه انجام شود.
- کل سطح کارهود و همچنین پیپت ها باید با سفید کننده با رقت ۱:۱۰ یا ۱:۲۰ شستشو و سپس با اتانول ٪۷۰ استریل شوند.

سمپلرها و سرسمپلرها

- اگر فقط یکسری سمپلر دارید که هم برای تهیه مستر میکس و هم برای نمونه زدن در PCRاز آنها استفاده می کنید مشکل عمده شما آلودگی سمپلرها خواهند بود بنابراین یک سری سمپلر اختصاصی برای انجام PCRضروری می باشد.
- استفاده از سرسپلرهای مخصوص حاوی فیلتر
- سرسپلر نباید در اتانل غوطه ور شود یا اتانل داخل آنها کشیده شود بلکه بایستی با یک دستمال آغشته به اتانل آنها را پاک کنیم.

- کالیبر بودن پیپت ها و انجام پیپتینگ مناسب برای عملکرد و کیفیت نتایج بسیار مهم است.
- علاوه بر این، روش صحیح پیپتینگ می تواند آلودگی بین نمونه ها را به حداقل برساند که می تواند منجر به نتایج مثبت کاذب شود.
- درب تمام لوله های نمونه، میکروتبوپ ها و پلیت های واکنش را با دقت باز و بسته کنید تا نمونه ها پاشیده نشوند.
- اسپین کردن ویال ها/ پلیت ها قبل از باز کردن می تواند از تولید آئروسل ها هنگام باز کردن آنها جلوگیری کند که خود بزرگ ترین منبع آلودگی است.

محلول ها

- برای انجام کار بهتر است همه محلولها را در صورت امکان در حجم های کمتر ذخیره نمایید.
- با این عمل فقط لازم است که یک لوله را برای PCRاز فریزر خارج کنید در حالی که مابقی بصورت دست نخورده یخ زده باقی می ماند.
- بهتر است آب مقطر استریل تزریقی هم در ویال های کوچکتر و به مقدار نیاز روزانه تقسیم شده و هر روز یک ویال استفاده و باقیمانده اوت شود.

ضد عفونی برای جلوگیری از آلودگی

- میز کار یا داخل هود باید با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (سفید کننده) تمیز شوند و سپس سفید کننده با اتانول ۷۰٪ حذف شود.

- سفید کننده باعث آسیب اکسیداتیو اسید نوکلئیک می شود و از تکثیر مجدد آن در واکنش های بعدی PCRجلوگیری می کند.

- دقت کنیدکه DNA هدف استخراج شده با سفید کننده و سایر محلول های ضد عفونی تماس پیدا نکند که دیگر قبل استفاده نیستند و نتایج منفی کاذب میدهند.

- در موارد نادری که یک آیتم باید از یک منطقه آلوده به یک منطقه تمیز منتقل شود، آن مورد باید یک شب در محلول سفید کننده ۲٪ تا ۱۰٪ قرار داده شود و قبل از انتقال شسته شود.

آلودگی از طریق محصولات قبلی (carry over)

یک PCRمعمولی تا $۱۰^{۹}$ کپی از توالی هدف تولید می کند و در صورت آئروسل سازی، حتی کوچکترین آئروسل حاوی $۱۰^{۶}$ از محصول خواهد بود.

در صورت کنترل نشدن، در مدت زمان نسبتاً کوتاهی، تجمع محصولات، معرف‌های آزمایشگاهی، تجهیزات و سیستم‌های تهویه را آلوده می کند.

جلوگیری از آلودگی

- مخلوط واکنش را قبل از PCRبا اوراسیل Nگلیکوزیلاز مجاور می کنیم تا محصولات قبلی PCRتخریب گردند.
- این آنزیم موجب آزادسازی اوراسیل می شود و هنگامی که DNAدر طول PCRحرارت می بیند، شکسته می شود.
- چنین عملی خصوصاً در آزمایشگاههای تشخیصی که روزانه نمونه های مشابه تکثیر می شوند و احتمال آلودگی متقابل زیاد می باشد حیاتی است و از نتایج مثبت کاذب جلوگیری می نماید.

Uracil-N-glycosylase (UNG)

- یک آنزیم ترمیم کننده DNAاست که در طیف گسترده ای از گونه های باکتریایی یافت می شود.
- عملکرد اصلی این آنزیم شناسایی و حذف بقایای اوراسیل است که توسط دآمیناسیون خود به خودی باقیمانده‌های سیتوزین در DNAدو رشته‌ای به‌عنوان جزئی از فرآیندهای برش-ترمیم (excision repair) ایجاد می‌شوند.

- در سال ۱۹۹۰، Longoو همکاران کاربرد UNGرا در HPV گزارش کردند.
- بندریج مورد توجه سایر دانشمندان قرار گرفت بطوریکه UNGدر تمام کیت های PCRکه در حال حاضر توسط Roche Diagnostics Corpتولید می شوند گنجانده شده است.
- و همچنین در برخی کیت های تشخیصی سایر شرکت ها

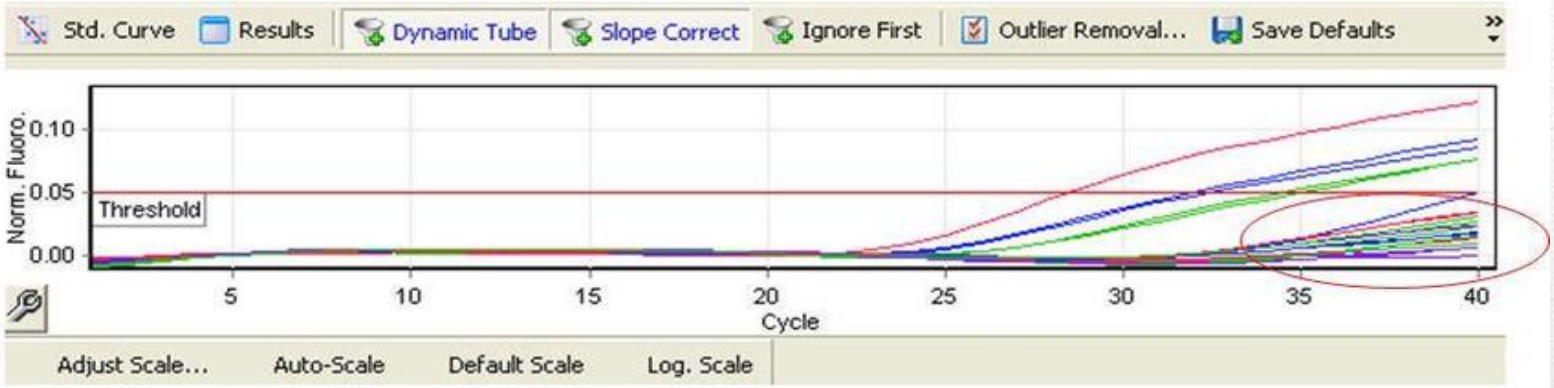
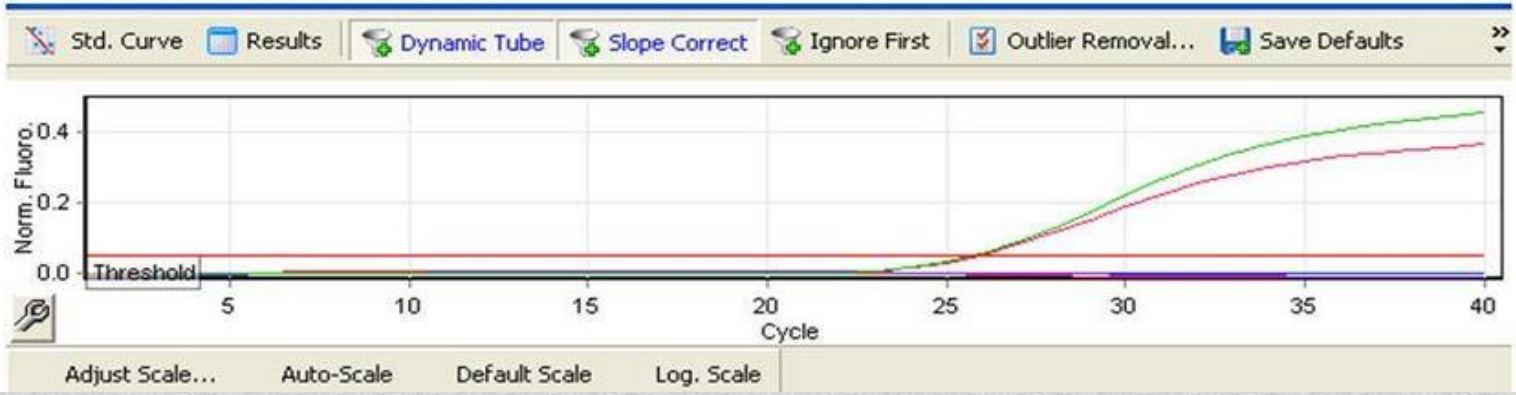
- در طی PCR، دئوکسی‌اوریدین تری فسفات (dUTP)می‌تواند جایگزین دئوکسی‌تیمیدین تری فسفات (dTTP)در سنتز DNAمحصول شود.

- بنابراین برای کاهش فراوانی نتایج مثبت کاذب به دلیل آلودگی آمپلیکون، توصیه رایج جایگزینی dUTPبه جای dTTPبه عنوان منبع نوکلئوتید برای واکنش PCR می باشد.
- از آنجایی که آمپلیکون‌های تازه سنتز شده حاوی dUTPهستند، به هیدرولیز توسط آنزیم باکتریایی UNGحساس هستند.

- DNAآمپلیکونی که دارای dUTPاست می‌تواند قبل از واکنش‌های تکثیری بعدی با یوراسیل- DNAگلیکوزیلاز تجزیه شود، بنابراین از تولید نتایج مثبت کاذب جلوگیری می کند.

- این آنزیم در دمای اتاق بیشترین فعالیت را دارد. بنابراین، پس از تلقیح لوله واکنش با نمونه های هدف، لوله های تقویت در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه می شوند و یا در اولین مرحله در دستگاه ترموسایکلر این دما وارد میگردد.
- در طول این مدت، UNGهر گونه محصولات تکثیری آلوده کننده را که ممکن است در لوله واکنش PCRوجود داشته باشد، هیدرولیز و حذف می کند.
- انکوباسیون بعدی لوله های واکنش در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به طور موثر UNGرا غیرفعال می کند و به واکنش PCRاجازه می دهد تا ادامه یابد و محصولات جدید تولید کند.

Virus X assay



Virus Y assay