

PCR 防污染技术的研究进展*

王璐茜¹ 邹秉杰¹ 周国华^{1,2△}

(1 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009 2 华东医学生物技术研究所 江苏 南京 210002)

摘要 聚合酶链式反应(PCR)是一种高灵敏核酸扩增技术,广泛应用于核酸检测中。但在实际应用过程中,扩增产物及其他核酸片段的污染会导致假阳性的结果,制约了 PCR 在临床检测中的应用。为了解决这一问题,建立了许多 PCR 防污染的方法,除了早期建立的并已得到广泛应用的物理隔绝法、光照法及水解法外,近年来还发展了酶消化法、化学修饰法及 DEAE 纤维素法。本文对 PCR 防污染技术的原理、应用及进展进行了综述。

关键词 PCR;防污染;UNG;DNase I;限制性内切酶

中图分类号 R446 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)14-2797-04

Research Progress of PCR Decontamination Methods*

WANG Lu-qian¹, ZOU Bing-jie¹, ZHOU Guo-hua^{1,2△}

(1 College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanning 210009, China;

2 Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanning 210002, China)

ABSTRACT: Polymerase chain reaction (PCR) is a highly sensitive nucleic acid amplification technique, which has been widely used in nucleic acid detection. However, the contamination of amplicons or other nucleic acid fragments, which usually leads to false-positive results, limits its clinical applications. To solve this problem, many approaches were developed to eliminate PCR contamination. Besides early established methods based on physical separation, irradiation and hydrolysis, methods by using enzyme digestion, chemical modification and DEAE cellulose are developed recently. In this paper, the principles, applications and advances of PCR decontamination methods are reviewed.

Key words: PCR; Decontamination; UNG; DNase I; Restriction endonuclease

Chinese Library Classification(CLC): R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2797-04

前言

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 是一种高灵敏的核酸扩增技术,能够将目标核酸片段在数小时内扩增 106 倍以上,因其快速简便、重复性好、特异性高、扩增效率高,而在分子生物学的基础研究、疾病的早期诊断、法医学鉴定、动植物学的溯源分型等方面都有着广泛应用。

但是,PCR 技术过高的灵敏度导致其极易污染,产生假阳性结果,严重干扰 PCR 检测的准确性。PCR 扩增时最主要的污染源是与目标序列相同的扩增产物,高浓度的 PCR 产物在实验操作过程中极易飞溅或形成气溶胶,对空气、试剂、移液器,以及操作人员的手套衣物造成污染^[1,2]。为了解决这一难题,国内外的研究者提出了许多种 PCR 防污染技术,其中物理隔绝法、紫外照射法、水解法等在过去的 PCR 实验中普遍应用,已经成为 PCR 实验操作的规范流程。物理隔绝法^[1]是将 PCR 实验室分为四个区域,实验严格单向进行(试剂准备区 → 样本准备区 → 扩增区 → 产物检测区),防止产物对试剂、样本的污染。紫外照射法操作简便且成本低廉^[4,5],能够消除 10⁸ 拷贝的污染分子^[6,7],现已作为 PCR 实验室日常净化流程之一^[8],与其

类似的伽马照射法^[9]因伽马射线不易得而较为少用。酸水解法中稀酸可以对核酸造成氧化损伤,一般用于实验室设备与工作台面等的常规消毒。引物水解法利用引物引入核糖残基,扩增产物碱性条件下水解来消除污染^[10,11],处理后的污染可以降至十万分之一以下。虽然这些技术已被实践证明能有效控制扩增产物的扩散和污染^[3],但仍然无法完全排除污染。为此,近年来又发展了酶消化法、化学修饰法、DEAE 纤维素法等防污染技术。本文主要对这几种防污染技术的原理、应用以及最新进展进行了述评。

1 酶消化法

1.1 脱氧核糖核酸酶 (DNase) 法

DNase 是一种脱氧核糖核酸酶,能降解双链 DNA,可以用于消除 PCR 反应试剂中的污染产物。Furrer 等^[12]在 PCR 反应前,不加模板与 Taq 酶,用 0.5 U 的 DNase 消化其中可能含有的污染模板。消除污染模板的效率可以通过增加酶量和延长消化时间来提高,消除效率能达到 1000 倍,对引物损伤不明显。

有文献将 DNase 应用于 RT-PCR,消除 cDNA 模板中基

* 基金项目:江苏省自然科学基金(No. BK2010111) 国家自然科学基金项目(No. 21005088)

作者简介:王璐茜(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:分子遗传学,Tel:13913824483 E-mail:saber20@126.com

△通讯作者:周国华,E-mail:ghzhou@nju.edu.cn

(收稿日期:2011-03-02 接受日期:2011-03-24)

因组 DNA 的干扰^[13],该方法的缺点是耗时较长(约 2 小时),且 cDNA 经酶消化处理后还需经过纯化步骤,操作较复杂。也有报道在定量 PCR 中先采用 *DNase* 消除污染,后加入二硫苏糖醇使酶完全失活,以免 *DNase* 干扰后续的 PCR 反应。该法可以将污染模板降解到 100 拷贝左右,而不会抑制 PCR 的扩增^[14]。进一步的研究表明,以硫酸锰作为缓冲液来消除 RT-PCR 中基因组 DNA 对 RNA 模板的污染更为有效^[15]。虽然 *DNase* 成本低廉,无需知道污染产物的序列,但是若扩增模板是双链 DNA,酶消化污染物后仍需开管加入其它试剂进行后续的 PCR 反应,因此有再次引入污染的可能,限制了此法的应用。

1.2 核酸内切酶法

限制性核酸内切酶可以识别双链 DNA 中某段特异序列,并在识别位点或其周围切割双链 DNA。一般有三种类型的内切酶,最常用的是 II 型内切酶,能识别专一的回文序列,并在该顺序内的固定位置上切割双链。若 PCR 产物内含有识别位点,则采用核酸内切酶处理扩增试剂后,就能去除产物污染。

Furrur 等^[12]曾采用内切酶 *Msp* 来消除 PCR 反应试剂中的污染产物,但只能将污染程度降低一个数量级以内,且污染模板的序列中需含识别位点,其去除产物污染的效果明显不如 *DNase*。Robert 等^[16]将内切酶 *Sma* 应用于 RT-PCR 中,由于 RT-PCR 的产物是双链的 DNA,模板是单链的 RNA 或单链 cDNA,因此采用能够专一消化双链 DNA 的内切酶就能够消除产物对模板的污染。此方法在 RT-PCR 前,将模板和所有试剂混合,加入 1 U 的 *Sma* 温育 60 min,在 96 °C 灭活 5 min 后进行 PCR,可以将污染降低 10⁷ 倍,而不影响 RT-PCR 的灵敏度。虽然应用范围有局限性,但此方法可以在一管内完成消除污染和 PCR 反应,不会再次引入污染。

John Ashkenas 等^[17]在 RT-PCR 中选用 *Alu*, *Nla*, *Sau96*, *StyD4* 四种常用的工具酶混合消除基因组 DNA 污染方法,在考察消除污染能力时,发现污染较严重(污染模板与目标模板比例为 100:1)时,此方法不能完全消除双链 DNA,但是能够增强 RNA 模板的扩增。而对于基因组 DNA 对 RNA 模板的污染,此方法既能保护好 RNA 模板也可消除 100 pg 的基因组 DNA,消除污染的效果随酶量升高而增强,仅在使用高浓度的酶(20 U/20 μ L)时出现对 RNA 模板的抑制作用,作者也尝试用一种随机切割的限制性内切酶 *CviI* 防污染,该酶可以平均每 64 bp 切割双链 DNA,但效果不明显,只在很窄的酶浓度范围内有效。

酶切位点引物法(amplicon primer site restriction, APSR 法)是上述方法的一种改良^[17]。该法是基于 S 型内切酶特异性地降解双链 DNA 的原理消除产物污染,与一般型内切酶不同,该类酶能在距识别位点下游处切割双链 DNA。此方法在引物中靠近 5' 端设计内切酶 *Hga* 的识别位点,扩增产物可被酶消化,消化后的产物片段缺少与引物结合的部分,不能再次扩增。此方法不仅适用于 RT-PCR,对于双链 DNA 为模板的普通 PCR 也适用。但是模板上不能含有内切酶的酶切位点,引物设计需要复杂的优化步骤,且不同的内切酶要求不同的缓冲液,应用范围有一定的局限性。

1.3 核酸外切酶法

核酸外切酶能够从 DNA 双链的 3' 端顺次水解磷酸二

酯键而生成 5'-单核苷酸, Yu Sheng Zhu 等人利用这一特性,消除扩增产物对基因组模板的污染^[18]。

由于污染的产物片段和基因组的大小不同,较小的产物片段更易被核酸外切酶完全消化。温育一段时间后高温灭活外切酶,再扩增。污染产物被消化,而基因组 DNA 大部分保持完整,可以正常扩增。此方法是一管消除污染并扩增,不会再次引入污染,可以消除 10⁵ 拷贝的污染,还能消除引物二聚体,但反应条件较难控制,且扩增片段位置不能靠近基因组 DNA 末端。

1.4 尿嘧啶糖基化酶(UNG/UDG)法

尿嘧啶糖基化酶(UNG/UDG)是一种 DNA 修复酶,能识别并去除 DNA 中的尿嘧啶,将试剂中 dNTP 替换成 dUTP。扩增产物中含有大量尿嘧啶,被 UNG 消化后,在高温条件下发生断裂,而模板不含尿嘧啶不受影响^[19]。一般在 PCR 混合试剂中加入 UNG,每次扩增前室温下温育消化可能存在的污染产物,然后进行 PCR,整个过程也是无需开管,不会再次引入污染。

UNG 法是应用最广泛的一种防污染方法,消除污染稳定高效,并被很多文献报道验证。Longo 等^[19]验证该方法可以消除 10¹⁰ 拷贝以上的 PCR 产物,且消化时间仅需 10 min。Kolk^[20]和 Wang 等^[21]也在用 PCR 检测麻风分枝杆菌、HIV、莱姆病、衣原体中采用此方法防污染。Mélanie Pruvost 等^[22]将 UNG 法应用于古代化石 DNA 的实时 PCR 检测中,由于古代 DNA 样本破损严重,扩增产物的片段很短(103 bp),UNG 法一般对 240 bp 以上的片段有效,所以作者将 UNG 法的温育时间从 5 min 延长到 45 min,污染可以降低两个数量级。

Tetzner 等^[28,29]将 UNG 法用于亚硫酸氢钠处理的 DNA 检测,亚硫酸氢钠处理的 DNA 是研究甲基化常用的方法,亚硫酸氢钠可以将胞嘧啶转化为尿嘧啶,处理后的 DNA 产物也可被 UNG 消化,此方法可以消除 10⁴ 拷贝的污染。

Taggart^[25]等将不耐热的 UNG 法用于控制 RT-PCR 分析肠道病毒时可能出现的污染。一般 UNG 在逆转录反应的温度下有活性,会降解逆转录酶合成的 cDNA 链。而不耐热的 UNG 最适温度为 20 °C,在 37 °C 失活,远低于逆转录酶最适反应温度的 50 °C。因此利用不耐热的 UNG 不会干扰 RT-PCR 的进行,可以消除高于检测限三个数量级的污染,对于一般的临床实验室检测 RNA 病毒已经足够。

UNG 主要消除的是替代胸腺嘧啶的尿嘧啶,所以对富含胸腺嘧啶的 DNA 作用明显,对 GC 含量高的模板效果不好,引入 dUTP 会降低 PCR 扩增效率,提高镁离子浓度能够改善这一现象,因此需要对酶的用量和 dUTP 的浓度等条件进行优化^[26,27]。虽然该方法的去污染效果较好,但也存在一些缺点,主要是含尿嘧啶的扩增产物对下游操作有一定影响,如无法用于克隆,在 Southern blot 中可能不易与模板杂交^[28],一些限制性内切酶对含尿嘧啶的扩增产物切割效率降低甚至不切割^[29]。此外,UNG 对核酸与探针杂交的 T_m 值也有浓度依赖性的影响^[30]。

2 化学修饰法

2.1 异补骨脂素法

呋喃并香豆素类化合物如补骨脂素和异补骨脂素,能够嵌入核酸的碱基对中。当长波长的 UV(300 nm - 400 nm)照射时,与嘧啶碱基生成环丁烷类加合物阻碍 Taq 酶延伸,使这种修饰

后的扩增产物不能作为模板被扩增^[31]。异补骨脂素与扩增产物的加合物能够与探针杂交,所以比补骨脂素应用更广泛^[32]。

Cimino 等^[32]将异补骨脂素在 PCR 前加入反应体系,扩增结束后,用 UV 光照射 15 min。结果发现异补骨脂素对于 500 bp 长度以上的片段能有效消除,可将污染降低 108 倍。高浓度(>100 mg/ml)的异补骨脂素会阻碍 PCR 效率^[33],部分反应中可以通过加入 10%甘油和 1%BSA 作为共溶剂来降低这种阻碍效应。对于不同反应体系,加入异补骨脂素的量需要优化。

De la Viuda M 等^[33]优化此法,在 PCR 中利用微粒蜡防止气溶胶形成,PCR 反应后室温下几分钟使微粒蜡固化形成屏障,开管加入异补骨脂素。加热几分钟使异补骨脂素与融化的蜡及 PCR 产物混合,然后用 UV 照射 15 min 消除污染。这种方法降低了一管反应中异补骨脂素对 PCR 的阻碍效应。异补骨脂素法的缺点是它对于 GC 含量高的消除效果不好。这类物质具有致癌性,需小心使用^[31]。

2.2 羟胺法

盐酸羟胺能与核酸胞嘧啶中的氧原子反应产生加合物,阻碍其与鸟嘌呤形成碱基对。这种修饰后的产物不能作为 PCR 的模板再次扩增^[39,40],避免产物成为污染源。Aslanzadeh^[36]在 92 bp 的 HSV 和 156 bp 的螺旋体扩增产物中加入羟胺,250 mmol/L 浓度下温育 30 min,扩增后电泳检测结果证明羟胺法可以消除产物的污染。该方法突出的优点是对短片断(<100bp)和 GC 含量较高的扩增产物效果较好,羟胺与核酸的结合随羟胺浓度增加而增加。但该方法需要扩增后开管加入羟胺,可能会产生气溶胶污染。

2.3 EMA 染料法

EMA(ethidium monoazide)是一种 DNA 染料,可以嵌入 DNA 双链中,是具有光敏性的溴化乙锭类似物,在长波长(>400nm)的光可以激活 EMA 上的叠氮基与核酸形成交联产物,使其不能继续扩增。Andreas Rueckert^[37]在扩增 16S rRNA 基因时应用此法,加入 EMA 后避光冰上放置 5 min 后再在 500 W 的卤素灯下照射 5 min,EMA 的最佳浓度范围为 14.9 到 19 μ mol/L,浓度过低时消除污染的效果不佳,浓度过高时会降低 PCR 的灵敏度。此方法对于模板扩增影响较小,消除污染后灵敏度可以达到 100 fg,快速简便,而其缺陷类似羟胺法,也并非一管内操作,开管加入 EMA 时容易再次引入污染源。

3 二乙氨基乙基(DEAE)纤维素法

DEAE-纤维素是一种广泛应用于离子交换色谱的材料,对核酸有结合作用,因此这一特性可被用来消除扩增产物对试剂造成的污染。Glushkov^[38]对一个 146 bp 的小片段产物污染进行了实验,将试剂与 DEAE 纤维素混合,室温下温育几分钟,充分结合污染的核酸片段,然后利用离心,将 DEAE 纤维素从试剂中分离。试剂包括 PCR 的预混液,还有 Taq 酶和逆转录酶等蛋白。最适条件下(pH 为 7.0,盐离子浓度为 200 mmol/L),能将污染降低 106 倍。该方法对蛋白活性略有影响,但对 PCR 体系整体的扩增效率不造成干扰,但分离 DEAE 纤维素的操作过程比较繁琐,实际应用意义不大。

4 结论

上述防污染技术各有优势及缺陷,有很多文献对其中应用较多的技术也进行了验证和比较。Espy 等^[39]将 UNG 法与异补骨脂素法应用于病毒检测并进行了比较,两种方法都能很好地控制 240 bp 的扩增产物造成的污染,但是对于 92 bp 的短片断和 GC 含量高的 HSV 扩增产物来说效果不佳。Rys 等^[41]比较了 UNG 法、异补骨脂素法和引物水解法,这三种方法对于 156 bp 的产物都能够很好的消除污染,异补骨脂素和 UNG 可以消除 10⁹ 拷贝的扩增产物,而引物水解法消除污染的效率变化范围较大。他们还提出联合 UNG 法、异补骨脂素法,首先应用异补骨脂素法来控制污染产生,如果确证污染存在再辅以 UNG 法消除污染。Niederhauser 等^[40]验证了紫外照射法和 UNG 法对污染的消除效果,发现两种方法均能将污染降低 10⁸ 倍以上,但是 UNG 法对于 PCR 灵敏度降低了 1 个数量级,且引物二聚体条带较明显。但是他们应用异补骨脂素法和羟胺法对污染的消除不明显,并且有抑制 PCR 造成假阴性的现象。Sebastian Philipp^[41]结合了限制性内切酶法和微孔过滤法,来消除细菌 DNA 对 Taq 酶的污染,但是效果均不理想。可以看出,不同的防污染技术在应用于同一条件下的 PCR 时,存在着明显的差异,而同一种防污染技术对于不同条件下的 PCR,效果也是不同的。

消除 PCR 的污染会使 PCR 在临床分子诊断领域发挥更重要的作用。虽然目前已经有更多关于 PCR 防污染技术的报道,但是发展一种成本低、简便快速、效果稳定、不影响 PCR 扩增效率及产物下游操作的方法仍然是研究者致力达到的目标,相信随着分子生物学及生物化学的发展,面对 PCR 的假阳性问题会有更好的设想与解决方案。

参考文献(References)

- [1] Kitchin P A, Szotyori Z, Fromholz C, et al. Avoidance of PCR false positives [corrected][J]. Nature, 1990, 344(6263): 201
- [2] Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR [J]. Nature, 1989, 339(6221): 237-238
- [3] Urban C, Gruber F, Kundi M, et al. A systematic and quantitative analysis of PCR template contamination [J]. J Forensic Sci, 2000, 45(6): 1307-1311
- [4] Sarkar G, Sommer S. More light on PCR contamination [J]. Nature, 1990, 347(6291): 340-341
- [5] Sarkar G, Sommer S S. Shedding light on PCR contamination [J]. Nature, 1990, 343(6253): 27
- [6] Sarkar G, Sommer S S. Parameters affecting susceptibility of PCR contamination to UV inactivation [J]. Biotechniques, 1991, 10(5): 590-594
- [7] Isaacs S T, Tessman J W, Metchette K C, et al. Post-PCR sterilization: development and application to an HIV-1 diagnostic assay[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(1): 109-116
- [8] Millar B C, Xu J, Moore J E. Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(5): 1575-1580
- [9] Deragon J M, Sinnett D, Mitchell G, et al. Use of gamma irradiation to eliminate DNA contamination for PCR [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(20): 6149

- [10] Walder R Y, Hayes J R, Walder J A. Use of PCR primers containing a 3'-terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(18): 4339-4343
- [11] Rys P N, Persing D H. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(9): 2356-2360
- [12] Furrer B, Candrian U, Wieland P, et al. Improving PCR efficiency[J]. *Nature*, 1990, 346(6282): 324
- [13] Flohr A M, Hackenbeck T, Schlueter C, et al. DNase I treatment of cDNA first strands prevents RT-PCR amplification of contaminating DNA sequences[J]. *Biotechniques*, 2003, 35(5): 920-922, 924, 926
- [14] Silkie S S, Tolcher M P, Nelson K L. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR [J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 72(3): 275-282
- [15] Wang G, Barton C, Rodgers F G. Bacterial DNA decontamination for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)[J]. *J Microbiol Methods*, 2002, 51(1): 119-121
- [16] Dougherty R M, Phillips P E, Gibson S, et al. Restriction endonuclease digestion eliminates product contamination in reverse transcribed polymerase chain reaction[J]. *J Virol Methods*, 1993, 41(2): 235-238
- [17] Ashkenas J, Dennis J W, Ho C Y. Simple enzymatic means to neutralize DNA contamination in nucleic acid amplification [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(1): 69-73
- [18] Zhu Y S, Isaacs S T, Cimino C D, et al. The use of exonuclease III for polymerase chain reaction sterilization [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(9): 2511
- [19] Longo M C, Berninger M S, Hartley J L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions[J]. *Gene*, 1990, 93(1): 125-128
- [20] Kolk A H, Schuitema A R, Kuijper S, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(10): 2567-2575
- [21] Wang X, Chen T, Kim D, et al. Prevention of carryover contamination in the detection of beta S and beta C genes by polymerase chain reaction[J]. *Am J Hematol*, 1992, 40(2): 146-148
- [22] Pruvost M, Grange T, Geigl E M. Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies[J]. *Biotechniques*, 2005, 38(4): 569-575
- [23] Tetzner R. Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment of bisulfite-treated DNA[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 507: 357-370
- [24] Tetzner R, Dietrich D, Distler J. Control of carry-over contamination for PCR-based DNA methylation quantification using bisulfite treated DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(1): 4
- [25] Taggart E W, Carroll K C, Byington C L, et al. Use of heat labile UNG in an RT-PCR assay for enterovirus detection [J]. *J Virol Methods*, 2002, 105(1): 57-65
- [26] Ritzler M, Perschil I, Altwegg M. Influence of residual uracil-DNA glycosylase activity on the electrophoretic migration of dUTP-containing PCR products[J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 35(1): 73-76
- [27] Thornton C G, Hartley J L, Rashtchian A. Utilizing uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR: characterization of residual UDG activity following thermal cycling[J]. *Biotechniques*, 1992, 13(2): 180-184
- [28] Wang Z, Mosbaugh D W. Uracil-DNA glycosylase inhibitor of bacteriophage PBS2: cloning and effects of expression of the inhibitor gene in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1988, 170(3): 1082-1091
- [29] Bodnar J W, Zempsky W, Warder D, et al. Effect of nucleotide analogs on the cleavage of DNA by the restriction enzymes *AluI*, *DdeI*, *HinfI*, *RsaI*, and *TaqI* [J]. *J Biol Chem*, 1983, 258 (24): 15206-15213
- [30] Leblanc J J, Pettipas J, Campbell S J, et al. Uracil-DNA glycosylase (UNG) influences the melting temperature (T_m) of herpes simplex virus (HSV) hybridization probes[J]. *J Virol Methods*, 2008, 151(1): 158-160
- [31] Cimino G D, Gamper H B, Isaacs S T, et al. Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry [J]. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54: 1151-1193
- [32] Cimino G D, Metchette K C, Tessman J W, et al. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(1): 99-107
- [33] De La Viuda M, Fille M, Ruiz J, et al. Use of AmpliWax to optimize amplicon sterilization by isopsoralen [J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34 (12): 3115-3119
- [34] Freese E, Strack H B. Induction of mutations in transforming DNA by hydroxylamine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1962, 48: 1796-1803
- [35] Brown D M, Schell P. The reaction of hydroxylamine with cytosine and related compounds[J]. *J Mol Biol*, 1961, 3: 709-710
- [36] Aslanzadeh J. Application of hydroxylamine hydrochloride for post-PCR sterilization[J]. *Mol Cell Probes*, 1993, 7(2): 145-150
- [37] Rueckert A, Morgan H W. Removal of contaminating DNA from polymerase chain reaction using ethidium monoazide [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 68(3): 596-600
- [38] Glushkov S A, Bragin A G, Dymshits G M. Decontamination of polymerase chain reaction reagents using DEAE-cellulose [J]. *Anal Biochem*, 2009, 393(1): 135-137
- [39] Espy M J, Smith T F, Persing D H. Dependence of polymerase chain reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(9): 2361-2365
- [40] Niederhauser C, Hofelein C, Wegmuller B, et al. Reliability of PCR decontamination systems[J]. *PCR Methods Appl*, 1994, 4(2): 117-123
- [41] Philipp S, Huemer H P, Irschick E U, et al. Obstacles of Multiplex Real-Time PCR for Bacterial 16S rDNA: Primer Specificity and DNA Decontamination of *Taq* Polymerase [J]. *Transfus Med Hemother*, 2010, 37(1): 21-28