

基于链置换反应的 DNA 等温扩增技术应用进展

何艳[△](综述), 蒋涛^{*}(审校)

(南华大学生物化学与分子生物学教研室, 湖南 衡阳 421001)

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1006-2084(2010)01-0024-04

摘要: DNA等温扩增是在恒定温度下用非热变性的方法解开 DNA双链的一种扩增技术。链置换反应指某些具有链置换活性的 DNA聚合酶在延伸新链的同时将下游旧链剥离,它已被用于多种体外等温扩增技术,包括链置换扩增、滚环扩增、多重置换扩增、环介导的等温扩增等。其主要应用于 DNA测序、全基因组扩增、基因芯片、微生物病原体检测等领域。

关键词: 等温扩增; 链置换扩增; 滚环扩增; 多重置换扩增; 环介导的等温扩增

Application Progress of DNA Isothermal Amplification Based on Strand Displacement Reaction HE Yan, JIANG Tao (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanhua University, Hengyang 421001, China*)

Abstract Isothermal amplification exploits strategies other than heating denaturation to unwind double stranded DNA. Strand displacement is such a process in which new DNA synthesis starts at a nick by displacing downstream strand while extension. Several strategies of DNA isothermal amplification, including strand displacement amplification, rolling circle amplification, multiple displacement amplification, loop-mediated isothermal amplification, have been developed based on strand displacement reaction. And these methods have been applied in DNA sequencing, whole genome amplification, microarray fabrication and pathogen detection.

Key words Isothermal amplification; Strand displacement amplification; Rolling circle amplification; Multiple displacement amplification; Loop-mediated isothermal amplification

只切割未被修饰的那条链,因而产生单链缺口。在最初的 SDA 设计中, DNA 模板须先经限制性酶切割,而后热变性产生两条单链片段 (T1, T2); 两个含有 Hinc II 识别序列 (5'-GTTGAC-3') 的引物 (P1, P2) 与内切酶切割后的目标片段上下游末端分别退火; 无外切酶活性的大肠埃希菌 DNA 聚合酶 I 大片段 (exo-K lenow) 利用脱

核酸扩增技术是分子生物学领域的常用技术。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是使用最为广泛的 DNA 扩增技术,不仅可以扩增和分离目的基因,在临床诊断、基因突变检测、法医鉴定等方面也有重要用途; 它需要反复的热变性以解开 DNA 双链,在应用上依赖于高质量的热循环仪。自 20 世纪 90 年代初以来很多实验室尝试发展无需热变性的 DNA 等温扩增技术,其中相当一部分是利用链置换反应解开 DNA 双链模板。链置换反应是指某些 DNA 聚合酶在延伸新链的过程中如果遇到下游 DNA 链,可以继续延伸反应并同时下游双链剥离而产生游离的单链。它已被用于包括链置换扩增、滚环扩增、多重置换扩增、环介导的等温扩增等多种体外等温扩增技术。根据其基本原理将它们分为缺口依赖和引物依赖的链置换反应。

1 缺口依赖的链置换反应

缺口依赖的链置换反应是通过某种方法(如限制性内切酶)在双链 DNA 的一条链上产生缺口,无 5'→3' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶从缺口处 3' 端开始延伸反应,同时将下游的旧链剥离,因链延伸而被封闭了的缺口可以重复产生,使得切割-延伸-链置换的过程重复进行。

1.1 双引物链置换扩增 Walker 等^[1]于 1991 年首次提出了 DNA 链置换扩增 (strand displacement amplification, SDA) 方法。其基本原理是当限制性酶切位点处其中一条链含有硫代脱氧核苷酸时,内切酶

氧鸟苷三磷酸、脱氧胞苷三磷酸、脱氧胸苷三磷酸、脱氧腺苷 α 硫代三磷酸延伸使之成为双链体; α 硫代脱氧腺苷酸的掺入能在 P1• T1 和 P2• T2 上产生半磷酸酰位点, Hinc II 不能切割修饰过的互补链,但可以切割未受保护的引物链; exo-K lenow 从 P1• T1 新产生的缺口处再次延伸 3' 端,同时置换出功能上等同于 T2 的下游链; 同样, P2• T2 缺口的延伸也置换出功能上等同于 T1 的下游链。由于缺口延伸后重新产生了一个 Hinc II 识别位点,并且此识别位点始终处于半修饰状态,所以产生缺口与聚合、置换反应循环进行,新产生的单链又可与引物退火而成为下一轮反应的模板,因而靶 DNA 的扩增是指数性的 (图 1、2)^[1]。

SDA 提供了一种可用于核酸诊断分析的扩增方法,但以上的设计要求 DNA 目标片段的上下游必须先经相应内切酶切开并热变性,才能产生具有游离末端的模板,从而达到在一条链的识别位点中掺入硫代核苷酸的目的。

1.2 4 条引物链置换扩增 1992 年, Walker 等^[2]简化了 SDA 设计,使用 4 条引物 (B1、B2、S1、S2) 与加热变性后的靶 DNA 退火,其中引物 S1 和 S2 含有 HincII 的识别序列 (5'-GTTGAC-3'), 是真正进行 SDA 扩增的引物; B1、B2 分别位于 S1、S2 的上游和下游,作用是将 S1、S2 第一和第二轮延伸后的产物剥离,从而形成带有 Hinc II 识别位点的真正模板。

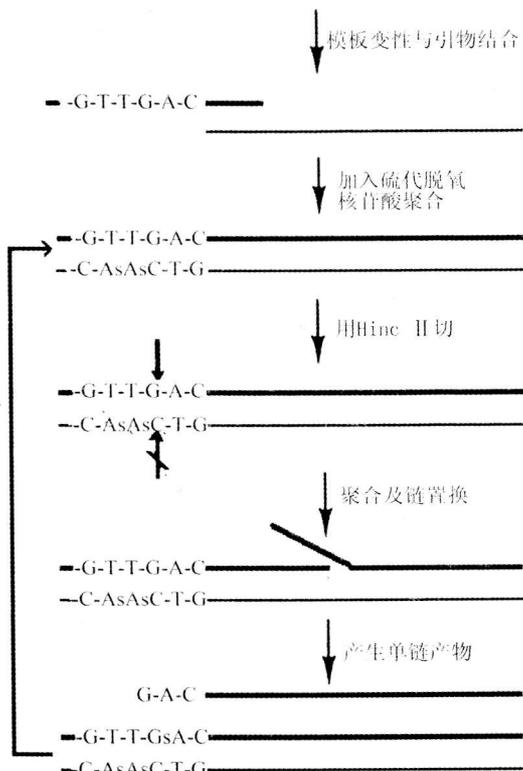


图1 链置换扩增的靶 DNA 的生成

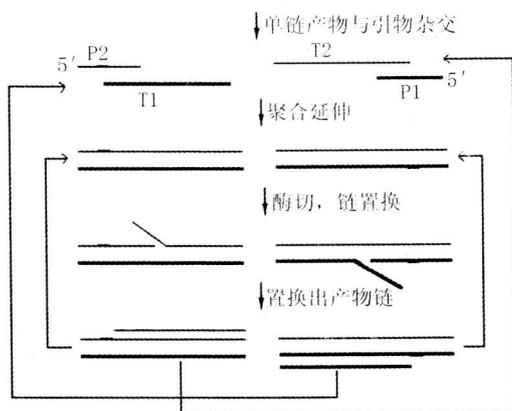


图2 链置换指数扩增

4条引物在 *exo-Klenow* 的聚合作用下进行延伸反应。延伸的 B1 置换出 S1 的延伸产物 S1-ext。同样,延伸的 B2 置换出 S2-ext。B2 和 S2 与被置换的 S1-ext 退火, B1 和 S1 与被置换的 S2-ext 退火。模板 S1-ext 和 S2-ext 上发生的延伸和置换反应产生了两条在两端都有 *Hinc II* 识别位点的 DNA 双链和两条仅在一端有 *Hinc II* 识别位点的双链(图 3)^[2]。*Hinc II* 分别切割 4 条 DNA 双链体, *exo-Klenow* 在缺口处延伸并置换, 产生线性扩增的单链产物链。产物单链又与相应的引物 S1/S2 退火, 使反应达到指数性扩增(图 2)^[1]。改良后的 SDA 设计解除了对模板上酶切位点的限制, 也简化了实验步骤, 扩增效率有所增加^[3]。

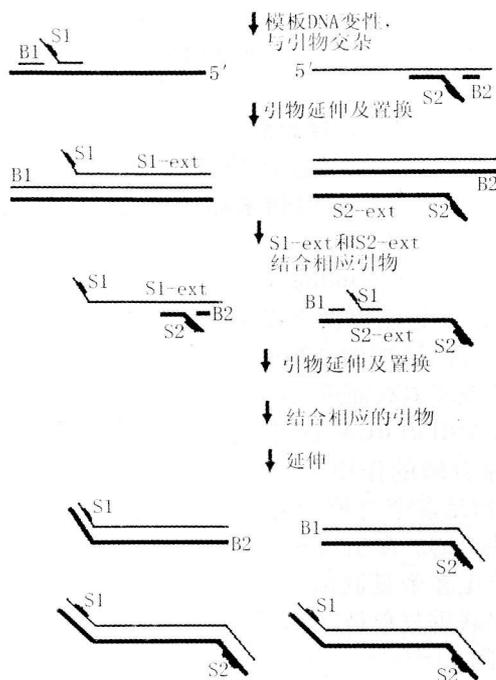


图3 简化的链置换扩增的靶 DNA 的生成

尽管简化后的扩增效率得到改进, 但是仍然有很多因素影响了 SDA 的实际应用。首先, 在 SDA 中为了建立一个可用于扩增的缺口就必须在反应混合物中加入非标准核苷酸, 这样不仅增加反应的成本, 而且使扩增效率降低^[4], 得到的产物片段较短, 产物也不适合直接用于克隆。其次, SDA 在等温扩增之前需要一个加热变性打开双链的步骤。由于 *exo-Klenow* 无热稳定性, 必须在靶 DNA 变性后才能加入到体系中, 容易引起污染。

1.3 缺口酶依赖的链置换扩增 20世纪90年代末期, 美国 NEB 公司开发出一系列的缺口酶, 许多学者相继提出了缺口酶依赖的链置换扩增 (nickase-dependent amplification, NDA) 方法。缺口酶是一种限制性内切酶, 能够识别 DNA 特异序列, 并且在序列内部或附近产生单链缺口, 而底物 DNA 不需要有任何修饰。

在 NDA 的扩增反应中, 缺口酶在目标 DNA 两侧的识别位点处或其附近切割 DNA, 产生缺口, DNA 聚合酶从缺口处进行延伸-置换反应, 最终得到相应的 DNA 单链^[5]。其后续反应过程与普通 SDA 大致相同(图 1、2)^[11]。

NDA 通过聚合酶和缺口酶的协同作用, 以天然 DNA 为模板扩增目的 DNA, 它不需要 α 硫代脱氧核苷酸, 不仅降低了反应成本, 并有可能产生较长的目的片段; 另外, 当目的片段上下游具有相应的缺口酶识别位点时, 模板无须变性即可得到扩增, 简化了操作步骤, 也减少了污染的可能性。但是到目前为止,

尚无用 NDA 扩增特异目的片段的报道;原因之一可能是缺口酶刺激了不依赖模板的 DNA 合成^[6],使非特异性扩增背景较高。

2 引物依赖的链置换反应

引物依赖的链置换反应是引物与 DNA 模板退火后, DNA 聚合酶自引物末端进行链延伸并置换出与模板互补的旧链。

2.1 滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA)

RCA^[7]是于恒定温度下以单链环状 DNA 为模板,在有强链置换活性的 Φ 29DNA 聚合酶作用下,通过引物与模板环退火而进行的滚环式 DNA 合成。

在单引物 RCA 中,引物结合到环状 DNA 上,在 DNA 聚合酶的作用下延伸并将合成产物自模板剥离,产物是多个与模板链互补的重复序列串联而成的线性单链。多引物 RCA 是多个引物退火到环状模板上产生多个复制起点,同样通过置换非模板链产生出串联重复单链,并在其他引物作用下成为双链 DNA (图 4)^[8]。

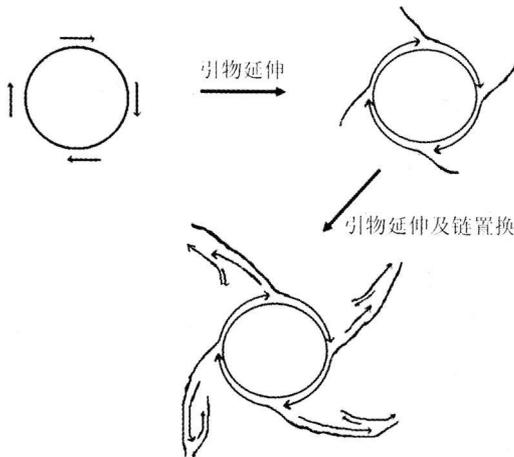


图 4 多引物流环扩增

RCA 极高的扩增效率使其可成为信号放大的手段。在免疫 RCA^[9]中,引物 5'端共价结合在抗体上,抗原抗体反应后,加入环状 DNA 模板及其他 RCA 反应组分进行扩增,产生高分子量的串联重复线性长链,这条 DNA 长链的 5'端通过抗体与连接在固相支持物(如玻片、微孔板等)表面的抗原相耦连; RCA 产物链的高度重复性使微量抗原的检测成为可能。该方法的灵敏度可达 0.1 ng/L。

2.2 多重置换扩增 (multiple displacement amplification, MDA) 随机引物和 Φ 29DNA 聚合酶可用于环状 DNA 的恒温滚环扩增,这些组分也可被用来扩增线性 DNA,称为多重置换扩增^[10]。它是近年迅速发展起来的一种全基因组扩增 (whole genome amplification, WGA) 技术。

随机引物在多个位点与变性后的单链基因组模

板退火,在 Φ 29DNA 聚合酶作用下进行延伸;合成出的 DNA 新链可置换下游的模板互补链,被置换的单链又作为新的模板与随机引物退火进行 DNA 合成。反应产物为呈分支状的网络样 DNA,包含模板 DNA 的数千乃至数百万拷贝^[11] (图 5)^[12]。

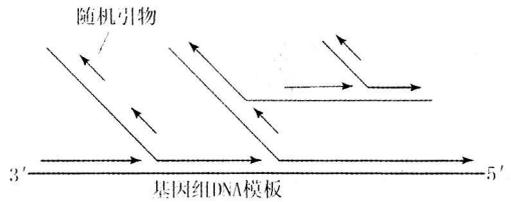


图 5 多重置换扩增

MDA 扩增全基因组具有高度的敏感性、重现性和保真性,可从微量样本中获得充足的 DNA,并能够较准确地反映模板中不同序列的拷贝数差异^[13]。但 MDA 对 DNA 质量有一定的要求,对经过石蜡固定的组织 DNA 或是已降解的 DNA 扩增效果较差。

2.3 环介导的恒温扩增 (loop mediated isothermal amplification, LAMP) LAMP^[14]是用 4 条特异性引物分别识别目标 DNA 的 6 个特定区域,通过 2 个环状结构和链置换反应实现 DNA 的快速等温扩增。

LAMP 反应过程包括哑铃状模板合成阶段、循环扩增阶段、伸长和再循环阶段。其特别之处在于引物的设计,它包括 2 条内引物 FIP (forward inner primer)、BIP (backward inner primer) 及 2 条外引物 F3、B3 (图 6a)^[14]。靶 DNA 变性后,内、外引物在具有链置换作用的 Bst DNA 聚合酶作用下延伸,外引物的延伸产物将内引物的延伸产物置换出来,最终形成一个哑铃状的 DNA (图 6b-1)^[14]。此哑铃结构由引物自我延伸机制合成一种双链的茎环结构 DNA (图 6b-2)^[14],这种茎环结构的双链 DNA 是循环反应的原料。循环反应中, FIB 与双链茎环结构 DNA 杂交,然后与 F1 同时启动 BIP 引物合成链的互补链的合成。通过置换反应,置换以 F1 引物合成 BIP 引物合成链的互补链,形成环状结构。在随后的引物置换延伸过程中,在内引物作用下,开始循环作用,最终形成茎环结构和多环花椰菜样结构的 DNA 片段混合物 (图 6c)^[14]。

LAMP 敏感度及特异性均较高,同时扩增快速、高效,其鉴别也很简便,只要用肉眼观察或浊度仪检测沉淀浊度就能判断扩增与否^[15]。但是它的不足之处是其反应结果只有两种:扩增与不扩增,如产生非特异性扩增,则不易鉴别。另外, LAMP 对靶序列长度有一定限制,一般 < 300 bp。

3 等温扩增技术的实际应用

3.1 模板 DNA 的扩增用于测序^[16, 17] 链置换作用可以产生出直接用于测序的单链;目前已经用 Φ 29

DNA聚合酶和滚环扩增发展了TemplPhiM DNA测序模板扩增试剂盒^[18],可以产生高质量的模板用于DNA测序。

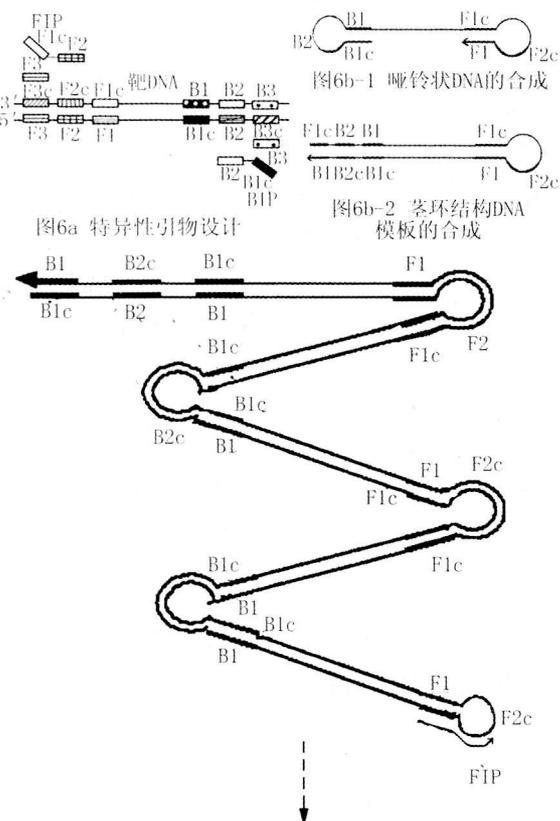


图6c 循环扩增阶段

3.2 全基因组 DNA 的扩增 MDA能从全血中扩增人类基因组,而无须纯化DNA模板^[12],也用于扩增微生物全基因组^[19]。

3.3 基因芯片的应用 RCA应用于芯片技术上,能产生大量基因组微阵列^[20],用于信号扩增大大提高了检测核酸的敏感性。它也可用于检测单核苷酸多态性^[21]。

3.4 微生物病原体的检测 LAMP主要应用于微生物病原体的检测,如禽流感病毒^[22]、分枝杆菌^[23]、巴西类孢子菌^[24]、寄生虫等。它也可用于转基因食品的检测及动物胚胎性别鉴别等。美国BD公司开发出BD ProbeTec ET系统,将SDA与荧光共振能量转移技术相结合,用来检测沙眼衣原体、淋球菌等^[25]。

核酸分子体外扩增是生物技术研究的重要手段。随着科学发展和研究目的的不同,出现了越来越多的核酸分子扩增技术。而链置换扩增反应被用于多种核酸等温扩增技术中,具有高敏感度、高特异性以及操作简便等特性,已逐渐被人们所接受。随着链置换扩增反应的不断完善,它将会有更广泛的临床和科研应用前景。

参考文献

- [1] Walker GT, Little MC, Nadeau JG, et al. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system [J]. *Biol Sci* 1992, 89(1): 392-396
- [2] Walker GT, Fraiser MS, Scham JL, et al. Strand displacement amplification an isothermal in vitro DNA amplification technique [J]. *Nucleic Acids Res* 1992, 20(7): 1691-1696
- [3] Walker GT. Empirical aspects of strand displacement amplification [J]. *PCR Methods Appl* 1993, 3(1): 1-6
- [4] Yao Z, Lidgard GP. Methods for rapid single-step strand displacement amplification of nucleic acids [P]. Patent Cooperation Treaty, Patent No. PCT/US2007/075964, 2008
- [5] Kucera R. Genome amplification [P]. Patent Cooperation Treaty, Patent No. PCT/US2006/043014, 2007
- [6] Zyrina NV, Zheleznyaya LA, Dvoretzky EV. N. BspD61 DNA nickase strongly stimulates template independent synthesis of non-palindromic repetitive DNA by Bst DNA polymerase [J]. *Biol Chem*, 2007, 388(4): 367-372
- [7] Demidov VV. Rolling circle amplification (RCA). *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* [M]. Boston: Boston University, 2005: 1175-1179
- [8] Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiplexed rolling circle amplification [J]. *Genome Res* 2001, 11(6): 1095-1099
- [9] Schweitzer B, Roberts S, Grimwade B, et al. Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling circle amplification [J]. *Nat Biotechnol* 2002, 20(4): 359-365
- [10] Zhang D, Wu J, Ye F, et al. Amplification of circularizable probes for the detection of target nucleic acids and proteins [J]. *Clin Chim Acta* 2005, 363(1/2): 61-70
- [11] Lage M, Leamon JH, Pejovic T. Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH [J]. *Genome Res* 2003, 13(2): 294-307
- [12] Dean FB, Hosono S, Fang L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification [J]. *PNAS* 2002, 99(8): 5261-5266
- [13] Lasken RS, Egholm M. Whole genome amplification abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens [J]. *Trends Biotechnol* 2003, 21(12): 531-535
- [14] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(12): e63
- [15] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1): 150-154
- [16] Dettler JC, Jett JM, Lucas SM, et al. Isothermal strand-displacement amplification applications for high-throughput genomics [J]. *Genomics* 2002, 80(6): 691-698
- [17] Fu DJ, Köster H, Smith CL, et al. Sequencing double strand DNA by strand displacement [J]. *Nucleic Acids Res* 1997, 25(3): 677-679
- [18] Nelson JR, Cai YC, Giesler TL, et al. TemplPhiPhi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing [J]. *Biotechniques* 2002 (Suppl): 44-47
- [19] Hawkins TL, Dettler JC, Richardson IM. Whole genome amplification applications and advances [J]. *Anal Biochem* 2002, 13(1): 65-67
- [20] Smimov DA, Burdick JJ, Morley M, et al. Method for manufacturing whole genome microarrays by rolling circle amplification [J]. *Gen Chromosom Cancer* 2004, 40(1): 72-77
- [21] Judith P, Anona B, Varsha G, et al. Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous end-point detection of single nucleotide polymorphisms [J]. *Nucleic Acids Res* 2002, 30(12): e60
- [22] Poon LL, Leung CS, Chan KH, et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Clin Microbiol* 2005, 43(1): 427-430
- [23] Iwanoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of mycobacterium tuberculosis complex M. avium, and M. intracellulare in sputum samples [J]. *J Clin Microbiol* 2003, 41(6): 2616-2622
- [24] Endo S, Kamori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of Paracoccillioides brasiliensis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. *FEMS Microbiol Lett* 2004, 234(1): 93-97
- [25] Zimbro MJ. BD ProbeTecTM ET + BD ViperTM = a winning combination [J]. *BD Lab* 2007, 18: 3

收稿日期: 2009-08-14 修回日期: 2009-12-14