

滚环 DNA 扩增技术及其应用

刘青杰 陈德清

(中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 北京 100088)

摘要 滚环扩增技术是一种等温信号扩增方法, DNA 可在很短时间内实现指数扩增, 因此, 可用于痕量分子的检测。目前, 该技术既可以扩增环状 DNA、RNA, 也可以扩增线性 DNA, 甚至全基因组 DNA。目前, 该技术主要用于全基因组扩增、核酸测序、单核苷酸多态性以及 DNA 芯片、蛋白质芯片分析等广泛领域。

关键词 滚环扩增, 全基因组分析, 单核苷酸多态性, 芯片

中图分类号 R811.5

大多数遗传学分析的最基本要求是具有足够数量的高质量基因组 DNA, 高通量遗传学分析更需大量的 DNA 模板进行检测。但是, 一般能获得的人类样品 DNA 的产量有限, 须在提取 DNA 后对整个基因组进行扩增。目前, 该扩增可用聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR), 有随机引物 PCR, 或简并引物 PCR, 但这些 PCR 方法会产生非特异性扩增、假阳性和假阴性结果, 扩增的 DNA 片段少于 1 kb, 不能用于全基因组扩增。现有的长 PCR 法扩增的 DNA 片段一般也仅 5kb 左右。故需更为简单、稳定的方法进行基因组的扩增和分析。

1998 年建立的滚环扩增 (Rolling circle amplification, RCA) 技术可用于扩增大的环状 DNA 模板, 例如质粒和噬菌体 DNA^[1]。该技术是借鉴自然界中环状病原生物体 DNA 分子滚环式的复制方式建立的核酸扩增技术, 可在室温下进行, 使用两个引物就可实现指数滚环扩增, 具有快速、灵敏、特异的特点。

RCA 体系包括: (1) 噬菌体 phi29 DNA 聚合酶; (2) 单链模板一般为环状, 目前 RCA 扩增的模板可为线性。 (3) 引物为 1 个或 2 个, 也可多个 (多引物扩增体系), 一般具内切酶抗性。目前已有成熟化的 RCA 试剂盒可供选择。其中, 噬菌体 phi29 DNA 聚合酶非常重要。它具有很高的链置换活性, 在无辅助性蛋白的单一连接事件中, 无须模板分离就可进行 70kb 的链置换 DNA 合成。该酶性能稳定, 持续合成能力高, 可连续数小时高效催化 DNA 合成, DNA 链合成速度约为 50bp/s^[2]。另外, phi29 DNA 聚合酶的纠错能力强, 错误率约为 1×10^{-7} — 10×10^{-7} ^[3], 与 pfu 相当 (7×10^{-7}), 显著低于 Taq DNA

聚合酶 (2×10^{-4})。

RCA 是一种等温信号扩增方法, 其线性扩增倍数^[4]为 10^5 , 指数化扩增能力大于 10^9 。该技术是一种痕量的分子检测方法, 可用于极微量的生物大分子和生物标志物的检测与研究。该方法已应用于线性双链 DNA、甚至是全基因组 DNA 的扩增^[5]。本文就 RCA 技术及其在现代分子生物学中的应用作一概述。

1 RCA 技术

RCA 有线性 RCA、指数 RCA、多引物 RCA 和免疫 RCA。目前最常用的是多引物 RCA。

1.1 线性 RCA

线性 RCA 是 1 个引物结合到环状 DNA 上后, 在 DNA 聚合酶作用下被延伸, 产物是具有大量重复序列 (与环状 DNA 完全互补) 的线状单链。DNA 的延伸可不断进行, 产生的 DNA 链长可为亲代 DNA 单位长度的许多倍。线性 RCA 的产物序列在长度上连续分布, 其凝胶电泳图呈一条宽弥散带。线性 RCA 用于靶核苷酸扩增, 仅限于一些具有环状核酸的病毒、质粒和环状染色体, 而且限制在小于 200bp 长度的环。由于其单链扩增特性, 扩增产物一端可始终连接在固相支持物的引物上, 非常适宜于固相形式的微阵列局部特异信号的检测。

1.2 指数 RCA

原理同线性 RCA, 采用与环状 DNA 序列完全一致的第二种引物。该引物与第一次线性 RCA 产

国家自然科学基金 (30570551)、北京市自然科学基金 (7053073) 资助

第一作者: 刘青杰, 男, 1971 年 4 月出生, 2001 年在中国军事医学科学院获博士学位, 副研究员, 放射医学专业

收稿日期: 初稿 2006-09-26, 修回 2006-10-25

物结合并酶促延伸, 置换下游杂交到扩增产物上其它拷贝段的引物, 其产物又作为第一种引物的模板。这样在很短的时间内, 产物呈指数扩增。其产物序列在长度上分布不连续, 凝胶电泳图呈阶梯状分布。

指数 RCA 可用于非环状 DNA 的扩增。设计一引物, 其两端可结合到一段连续的序列上, 并形成缺口, 在连接酶作用下, 引物被连接成环状。此环状引物可作 RCA 的模板, 进行指数扩增。此法特异性高, 可用于突变与单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 的检测。若与荧光

实时检测系统结合, 应用前景更广。

1.3 多引物 RCA

利用 phi29 DNA 聚合酶和随机引物产生多个复制叉 (见图 1), 提高合成速度和产量, 产物为双链 DNA, 可用于测序、酶切、或其他克隆、标记和检测的方法, 可扩增人工细菌染色体 (Bacteria artificial chromosome, BAC)、粘粒等大的环状 DNA。对于无法克隆的环状模板, 可用此法进行体外增殖。

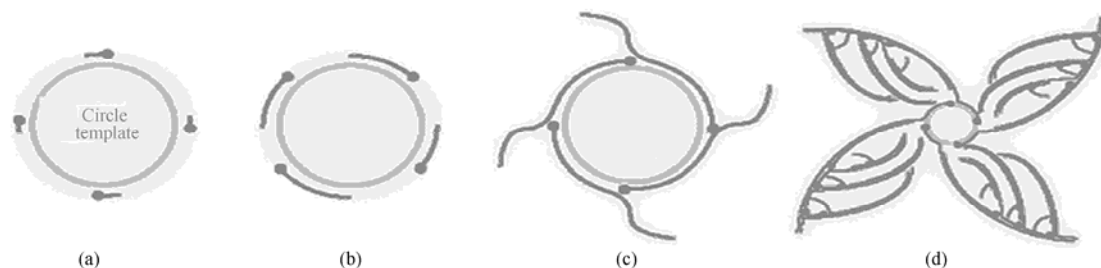


Fig.1 The ideogram of multiple-primed rolling circle amplification of circular DNA template

(a) Annealing of random hexamer primer with single-stranded circular template at multiple loci, (b) Extension of each primer by phi29 DNA polymerase, (c) The new synthesized strand extended the downstream primer, and the strand displacement was occurred, (d) The displacement strand is single strand and can bind to more primers. Continuous strand displacement results in the exponentially increasing release of double strand DNA

1.4 免疫 RCA

Schweitzer 等^[6]建立了免疫 RCA, 引物的 5'端标记有抗体, 抗原抗体反应后, 加入 RCA 反应组分与环状 DNA 模板进行 RCA, 然后标记有荧光素的探针与 RCA 产物原位杂交, 最后对荧光信号进行检测。该方法的灵敏度可达 0.1pg/mL。产生的扩增产物连接在固相支持物 (如玻片、微孔板等) 表面的 DNA 引物或抗体上。免疫 RCA 是一种适合在芯片上进行信号扩增的新技术, 其所要求的核酸量低 (有时数个拷贝即可), 分析灵敏度高; 由于抗原抗体反应和特异性探针的应用, 分析的特异性高, 又能同时分析多个目标核酸, 保持立体分析的多元性。

2 RCA 的应用

利用 RCA 检测靶序列一般有两种途径: 一种直接扩增环形单链模板, 然后检测扩增信号, 例如测序模板的制备, 测序的起始物可来源于菌落、培养物、甘油储存的细菌或噬斑等的环形模板; 另一种首先通过连接反应环化与模板链杂交的探针, 再扩增已环化的探针, 然后检测扩增信号, 此种探针常称为锁式探针 (Padlock probe)。锁式探针的两端与靶核酸序列特异性互补, 当有错配存在时, 探针

的连接反应就无法完成, 因此确保了 DNA 和 RNA 检测中的高特异性。同时, 锁式探针和靶序列的杂交会产生较稳定的拓扑结构, 确保了杂交连接产物的稳定性。

RCA 不仅能直接扩增特定的 DNA、RNA 分子, 还能实现这些靶核酸的信号放大。除能在管内扩增外, 还能在微阵列上扩增, 灵敏度可达到 1 个拷贝的核酸分子。这些特点, 都是 PCR 技术无法企及的。RCA 技术在核酸测序、SNP 及细胞原位检测分析、DNA 芯片、蛋白质芯片分析等方面有广泛的应用前景。

2.1 全基因组 DNA 检测和核酸测序中的应用

RCA 方法已用于扩增大环型 DNA 模板, 例如质粒^[7]和噬菌体 DNA。最近已扩展到全基因组 DNA 扩增, 用核酸酶抗性引物和 phi29 DNA 聚合酶进行^[8]。该方法能用 10 个以下的人类细胞实施精确扩增 DNA, 产物平均长度超过 10kb。全基因组 DNA 通过 RCA 在 30℃ 扩增 4—6h 达到平台期, 尽管其起始物差异大于五个量级 (100fg—10ng), 但 100μL 反应体系中 DNA 产量恒定范围为 20—30μg; 即不同浓度或量的标本可以为随后的遗传分析提供一致的产物, 无须测量或调整 DNA 浓度。另外,

此法也能直接从全血中均匀地扩增人类基因组 DNA, 无须进一步纯化^[8]。目前 RCA 可扩增质粒、M13、BAC DNA、全基因组 DNA 和线粒体 DNA。

限制性环化 RCA^[9]是一种改进的全基因组 RCA 方法。该法先用限制性内切酶把 DNA 消化成短片段, 然后环化成环状 DNA 单链, 再进行 RCA。可用于从福尔马林液浸泡的石蜡包埋组织中提取的 DNA 扩增, 再用于基于芯片的比较基因组杂交、微卫星稳定性以及定量 PCR 等分析。

这种创新方法的产品有 GE 公司(原 Amersham Pharmacia 公司)的 GenomiPhi™ DNA Amplification Kit, 已被世界各国的癌症、群体遗传学、环境研究、植物基因组学和分子克隆学研究者的肯定结果所验证。该产品可从粗制血液裂解物和颊细胞中扩增全基因组 DNA, 扩增出的 DNA 可进行定量 PCR 分析和短串联重复序列(Short tandem repeat, STR)分析。Qiagen 公司和 Sigma-Aldrich 公司(GenomePlex WGA kit)也在致力于基于 RCA 的全基因组的扩增研究。

在 RCA 技术建立之前, 一般的测序方法须准备测序模板, 由过夜培养增菌、传统碱裂解法提取 DNA。应用 RCA 技术生产的 TempliPhi™ DNA 测序模板扩增试剂盒, 是一种新产品, 无须增菌、离心^[10], 直接从克隆、菌斑或几微升菌液或甘油保存液中扩增 DNA, 扩增的产物直接测序, 无须纯化。该试剂盒基于噬菌体 phi29 DNA 聚合酶和六碱基随机引物的多引物 RCA, 最终产生双链 DNA。该双链 DNA 可由限制性酶消化并克隆^[11]。该试剂盒可在 4h 内将 1pg 的 DNA 扩增到 5μg。减少试剂消耗, 降低成本。通过对产物进行磷酸化作用灭活未掺入的碱基, 可对产物直接测序, 省却了传统方法中的许多步骤^[10]。

应用 RCA 得到的高质量 DNA 产物还可应用于体外克隆、探针合成^[12]、文库构建、RFLP 等分子生物学实验, 还可进行比较基因组杂交和药物基因组研究。

2.2 在 SNP 检测中的应用

结合 RCA 技术后, SNP 的检测可用锁式探针与靶核酸序列的连接与否来区分碱基多态性位点情况, 再利用 RCA 放大信号。可从 1ng (300 拷贝) 的基因组 DNA 中实现对 SNP 的检测, 并在合适的探针设计和反应环境条件下同时检测多个位点和基因, 是一种低成本、高通量方法。

人工合成一段寡核苷酸探针, 其两端各有 20bp 序列与检测的模板互补, 多态性位点设计在 3'端, 中间序列为引入的无关序列, 不同等位基因型对应的寡核苷酸探针引入不同的无关序列。把这段寡核苷酸探针与检测的模板进行连接酶反应, 与模板匹配的探针则会连接成环。该环状产物可作为滚环扩增的模板, 滚环扩增的引物设计在探针的无关序列中, 引物 5'端设计成类似分子信标的结构, 引物结合到模板后发出特定的荧光信号, 检测相应引物发出的荧光信号就可以判断原始模板的多态性位点的基因型。该方法在大量野生型等位基因中对突变型的区分率可达 1:10000。实验证明: 该方法用于检测人类 DNA 的 SNP 有很高的检测效率。近来, 综合荧光标记引物和多引物滚环扩增的方法, 通过 RCA 第二条扩增引物的发夹结构设计(引物两端分别标记荧光基团和淬灭基团), 可准确检测出 SNP 基因型, 数据准确率达 100%^[13]。

2.3 细胞原位检测分析中的应用

原位 RCA 技术可用来分析细胞间期和细胞中期的染色体情况。分析细胞染色体情况的最初方法, 是直接检测与靶核酸序列特异性互补结合的锁式探针, 借助于一些报告分子如荧光素、生物素或地高辛等, 用光学显微镜就可观察到和染色体结合的锁式探针。引入 RCA 技术就可大大提高检测灵敏度, 锁式探针和靶核酸序列特异性互补结合后, 采用 RCA 进一步扩增已成环的探针, 最后检测扩增信号结果^[14]。

原位 RCA 技术通过锁式探针和模板链的杂交以及之后的连接扩增反应, 大量的扩增产物(长度大于 8kb)在细胞内靶目标上生成, 克服了原位 PCR 中扩增产物会扩散出细胞的缺点。RCA 技术在等温条件下进行, 能完整地保持组织的形态学特征。此外, 由于锁式探针的杂交只针对靶目标的 50bp 特定序列, 无须在靶目标上进行直接的引物延伸, 因此靶目标序列之间的交联及一些特殊结构对 RCA 过程的影响非常小。采用该技术可检测到细胞中特定基因的一个拷贝, 且信号集中到靶目标上。同时, 该技术可用在同一细胞的多条 RNA 上, mRNA 的表达水平最终通过图像系统定量显示^[15]。

利用 RCA 还能够对单个细胞进行点突变检测。实验证明利用 RCA 对固定的细胞在原位进行基因拷贝数目的检测和单碱基突变的检测, 效率达到 90%以上^[16,17]。

2.4 在 DNA 芯片中的应用

将检测模板与不同位点标记有不同寡核苷酸探针的微阵列杂交后, 只有与模板匹配的探针才在连接酶的作用下连接成环, 对环状产物进行 RCA, 通过检测放大的特定探针的信息, 就可以知道模板的系列信息。RCA 技术使一个样品池中的 100 多个位点中的 1 个突变位点的检测成为可能, 使难以检测到的低丰度突变的检测得以实现。因此, 在肿瘤的早期核酸检测和监测分析方面, RCA 技术是一个很有潜力的分析工具。DNA 芯片技术结合 RCA 技术可进行多个热点突变位点的多重检测, 具有高分辨率、特异、高通量的特点, 且可与自动化技术相结合。RCA 技术还允许同时对多种标记物进行参数分析, 可扩展到对复杂标记样品进行疾病的诊断和预后疗效评价。通过使用特异性的表皮生长因子受体基因 mRNA 和 DNA 靶序列同时进行检测, 应用 RCA 技术可使灵敏度提高 10 倍以上^[18]。

2.5 在蛋白质芯片中的应用

传统的免疫微阵列信号扩增技术的限制, 无法实现高灵敏度和高通量检测。Schweitzer 等^[6]建立了免疫 RCA 方法提高了芯片的灵敏度。

RCA 用于蛋白质芯片的原理是: 将样本加入到不同位置标记有不同特定抗体的蛋白质芯片上后, 样本中的特定抗原和相应某一位点的抗体 a 发生特异的抗原抗体反应而被捕获, 该抗原又可与加入的抗体 b 继续反应 (即双抗体夹心反应), 标记有引物的抗体 c (抗抗体) 进一步结合到抗体 b 上, 此引物引发的滚环扩增反应显著放大了发生一系列反应的位点信号, 而达检测要求。间接免疫 RCA 检测步骤通常包括: (1) 通过特殊的抗体捕捉样本蛋白质, 并固定在芯片上, (2) 加入标记了生物素的二抗与已捕捉的蛋白质结合, (3) 加入通用抗体与二抗结合, (4) 通用抗体上的 RCA 信号扩增。RCA 主要发生在通过共价键结合了寡核苷酸单链因物的通用抗体上。引物与锁式探针杂交后, 就在 DNA 聚合酶的作用下不断延伸, 产生理想的扩增信号。其等温的扩增过程不仅保证了抗原抗体结合体的整合性, 也保证了芯片上各靶点之间的空间独立性。该技术可进行大规模的反应, 从而解决了对数百个分析物同时进行检测的问题^[19]。

3 展望

RCA 的信号扩增敏感性、特异性和与各种核酸

序列检测方法的相容性, 使其成为生物芯片研究的新方法。操作简单、敏感性极佳、产物始终连接在靶物质或固相支持物上, 可分析检测基因组、蛋白质组并用于疾病诊断 (产前诊断和癌症的病理学诊断) 的新工具。然而, RCA 的检测也有一些不足之处, 主要是信号检测的背景问题和锁式探针的成本问题。在尽量降低信号背景的基础上, RCA 技术应能成为基因组学、蛋白质组学等热点领域的重要研究工具, 并延伸到生物医学的各个领域。

随着基因组学、蛋白质组学的兴起, 放射生物学领域的研究也由于这些研究技术的应用而逐步深入。最近, 国际放射医学领域开始关注线粒体基因组在辐射生物效应研究中的作用, 低水平线粒体基因组的改变可由 RCA 技术扩增样品后进行定量。因此有理由相信 RCA 将是探索辐射生物效应重要且应用广泛的工具之一。

参考文献

- 1 Lizardi P M, Huang X, Zhu Z, *et al.* Nat Genet, 1998, **19**(3): 225-232
- 2 Blanco L, Bernad A, Lazaro J M, *et al.* J Biol Chem, 1989, **264**(15): 8935-8940
- 3 Esteban J, Salas M, Blanco L, *et al.* J Bio Chem, 1993, **268**(4): 2719-2726
- 4 Qian X, Lloyd R V. Diagn Mol Pathol, 2003, **12**(1): 1-13
- 5 Simison W B, Lindberg D R, Boore J L. Mol Phylogenet Evol, 2006, **39**(2): 562-567
- 6 Schweitzer B, Roberts S, Grimwade B, *et al.* Nat Biotechnol, 2002, **20**(4): 359-365
- 7 Mizuta R, Mizuta M, Kitamura D. Arch Hitol Cytol, 2003, **66**(2): 175-181
- 8 Dean F B, Hosono S, Fang L, *et al.* Pro Natl Acad Sci USA, 2002, **99**(8): 5261-5266
- 9 Wang G, Maher E, Brennan C, *et al.* Genome Res, 2004, **14**(11): 2357-2366
- 10 Reagin M J, Giesler T L, Resetar-Gerke J M, *et al.* J Biomol Tech, 2003, **14**(2): 143-148
- 11 Dean F B, Nelson J R, Giesler T L, *et al.* Genome Res, 2001, **11**(6): 1095-1099
- 12 Berr A, Schubert I. Plant J, 2006, **45**(5): 857-862
- 13 Pickering J, Bamford A, Godbole V, *et al.* Nucl Acid Res, 2002, **30**(12): e60
- 14 Li J, Young C S, Lizardi P M, *et al.* Cell Cycle, 2005, **4**(12): 1767-1773
- 15 Christian A T, Pattee M S, Attix C M, *et al.* Pro Natl Acad Sci USA, 2001, **98**(25): 14238-14243

- 16 Alsmadi O A, Bornarth C J, Song W, *et al.* BMC Genomics, 2003, **4**(1): 21
- 17 Koch J. Methods Mol Biol. 2006, **334**(1): 41-48
- 18 Ladner D P, Leamon J H, Hamann S, *et al.* Lab Invest, 2001, **81**(8):1079-1086
- 19 Haab B B, Lizardi P M. Methods Mol Biol, 2006, **328**(1): 15-29

Rolling circle amplification and its application in biomedicine

LIU Qingjie CHEN Deqing

(National Institute for Radiological Protection, China Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 100088)

ABSTRACT Rolling circle amplification (RCA) is an isothermal amplification method. The DNA can be amplified exponentially in a short time period. It can be used in detection of rare molecular. RCA is used to amplify not only the circular DNA or RNA, but also linear DNA and even whole genome DNA. At present, RCA is mainly used in fields of whole genome amplification, sequencing, single nucleotide polymorphism, DNA microarray, and protein microarray analysis etc.

KEYWORDS Rolling circle amplification, Whole genome analysis, Single nucleotide polymorphism, Microarray

CLC R811.5