

核酸体外扩增技术

陈庆山* 刘春燕 刘迎雪 刘海燕 陈立君 付 尧 单继勋 郭 强 张丽娜
(东北农业大学大豆研究所 哈尔滨 150030)

摘要 核酸体外扩增是分子生物学研究的基础。随着生物技术的发展,出现了越来越多的核酸体外扩增技术。根据其特点可分为两类:一类是靶核酸的直接扩增,如聚合酶链式反应、链替代扩增、连接酶链式反应、核酸依赖的扩增、Q β 复制、转录介导的扩增和滚环扩增等;另一类是信号放大扩增,如支链 DNA、侵染探针等。就现有的核酸扩增技术的原理、特点及应用进行介绍。
关键词 核酸体外扩增 靶核酸直接扩增 信号放大扩增

核酸分子体外扩增技术是开展分子生物学研究的基础。随着生物技术的发展,建立一套灵敏、快速的核酸扩增技术一直是研究工作者探讨的问题。在聚合酶链式反应(PCR)以其灵敏性、特异性和快速性而广泛应用的基础上,新的核酸扩增模式也不断涌现。现有核酸扩增技术根据其特点可分为两类:第一类是靶核酸的直接扩增;包括聚合酶链式反应(PCR)、链替代扩增(SDA)、连接酶链式反应(LCR)和核酸依赖的扩增(NASBA)、Q β 复制、转录介导的扩增(TMA)和滚环扩增(RCA)。另一类

是信号放大扩增;包括支链 DNA(bDNA)、侵染探针(Invader)和滚环扩增(RCA)等^[1]。其中滚环扩增是一种既能直接扩增靶核酸,又能实现信号放大扩增的方法。根据是否需要温度循环也可分为两类:一类是非等温扩增体系,如聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)等。另一类是等温扩增体系,如链替代扩增(SDA)、核酸依赖的扩增(NASBA)、支链 DNA(bDNA)、滚环扩增(RCA)、Q β 复制酶系统。本文根据扩增特点将各种核酸扩增技术进行总结,见表 1。

表 1 核酸扩增技术的特点

核酸扩增分类			特点						
			DNA 扩增	RNA 扩增	DNA 信号放大	RNA 信号放大	蛋白质信号放大	体内扩增	微阵列上扩增
靶核酸直接扩增	非等温扩增	PCR	+	+	-	-	-	+	-
		LCR	+	-	-	-	-	-	-
	等温扩增	SDA	+	+	-	-	-	-	+
		NASBA	+	+	-	-	-	-	-
信号放大扩增	等温扩增	TMA	+	+	-	-	-	-	-
		Q β 复制	-	+	-	-	-	-	-
		RCA	+	+	+	+	+	+	+
	非等温扩增	bDNA	-	-	+	+	-	-	-
		Invader	-	-	+	+	-	-	-
		RCA	+	+	+	+	+	+	+

1 靶核酸直接扩增

1.1 聚合酶链式反应(PCR)

自 1985 年 Mullis 等发明了具有划时代意义的

聚合酶链反应,使体外无限扩增核酸片段得以实现^[2]。PCR 现已广泛用于 DNA 的扩增。随着技术手段的进步,PCR 技术家族也不断涌现出新成员,其中有简并 PCR、复合 PCR、反向 PCR、锚定 PCR 等百余种。

聚合酶链式反应是应用一对寡核苷酸引物结合到正负链上的靶序列两侧,从而酶促合成多个拷

收稿日期: 2004-01-12 修回日期: 2004-03-01
* 电子信箱: qshchen@sohu.com

靶的靶序列 DNA 片段。PCR 的每一循环都包括 DNA 变性,引物复性和由 DNA 聚合酶催化的延伸反应。每次循环新合成的 DNA 片段又可成为下次循环的模板,这就导致靶序列 DNA 的指数扩增。经 20~30 次循环可使靶序列放大百万倍左右。

随着 PCR 种类的增加,PCR 技术也被应用到生物技术的各个方面。例如利用 PCR 技术在靶序列中引起突变,这是由于 PCR 反应可以耐受引物和靶序列间某种程度的错配。现已用 PCR 产生替代、缺失或插入突变,也可以在靶基因中引入一新的限制性酶切位点。利用反向 PCR 扩增已知序列以外的未知序列,现已用该技术扩增已知目的启动子区序列。利用不对称 PCR 产生大量的单链 DNA,用于核酸的序列测定。利用多重 PCR 同时扩增出多个核酸片段,以检测多种病原微生物等等。

1.2 连接酶链式反应 (Ligase Chain Reaction, LCR)

连接酶反应是 Backman 于 1987 年为检出靶基因序列中的点突变而设计发明的。Barany 于 1991 年报道了耐热连接酶——Taq 连接酶的发现及其在 LCR 中的应用,为 LCR 的实用化奠定了基础^[3]。LCR 识别点突变的特异性高于 PCR,这是由耐热连接酶的特异性决定的^[4]。若靶序列有点突变,引物不能与靶序列精确结合,缺口附近的核苷酸空间结构发生变化,连接反应不能进行,也就不能产生扩增产物。

LCR 技术是利用 DNA 连接酶连接预先形成的 DNA 片段,经变性、退火和连接三个步骤的反应温度循环,从而使目标 DNA 大量扩增。LCR 首先利用两对分别互补的寡核苷酸引物与变性的靶序列结合,然后 DNA 连接酶补平缺口,完成一个反应循环,连接产生的两个模板,都在下次循环中再作为连接模板,这样,经 20~30 次循环的反应就可产生百万拷贝的目的序列。

目前该方法主要用于点突变的研究与检测,微生物病原体的检测及定向诱导等,还可用于单碱基遗传病多态性及单碱基遗传病的产物诊断,微生物的种型鉴定和癌基因的点突变研究等。

1.3 链替代扩增 (Strand displacement amplification, SDA)

链替代扩增是恒温扩增 DNA 的一种新型方法,主要是依赖于限制性内切酶和 DNA 聚合酶两

种酶的共同协作来完成^[5]。由于链替代扩增所需的靶分子为单链 DNA,同时靶分子还要与引物结合形成两端均为 5' 悬端的结构,所以在进行 SDA 反应前应先对靶分子进行处理。链替代扩增的原理是首先用含有 HincII 识别位点的 SDA 引物与单链靶分子结合,在 5' - 3' 外切酶活性的 DNA 聚合酶的作用下,以 dCTP、dGTP、dTTP、dATP [α S] (α 磷酸硫酸化三磷酸腺苷)为底物聚合形成具有半磷酸硫酸化位点的 DNA 双链。用 HincII 切割未保护的引物链,而被修饰的靶片段则保持不动。这时再由 DNA 聚合酶在切口处启动延伸并取代下游部分,这种聚合过程又重新产生了一条新的可以被 HincII 打开切口的 DNA 单链,而靶 DNA 分子仍保持不动。这种打切口、聚合、取代的步骤不断循环反复,产生大量靶分子的互补链。

SDA 的优点是灵敏性高,可快速扩增获得单链 DNA 分子,但 SDA 由于其靶序列准备的复杂性限制了其应用范围。最早采用 SDA 方法检测结核杆菌 IS6110 基因,首先将全染色体或含有该基因的重组质粒进行一次 RsaI 酶切,得到的片段可用作 SDA 反应的靶分子。现已有研究工作者改进了靶分子准备程序,使其更有效。目前该方法已应用于细菌的检测、建立体外进化模型、核酸定量及芯片杂交等多个方面。

1.4 核酸依赖的扩增 (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)

1990 年首次提出的由一对引物指导的连续均一的体外特异核苷酸序列等温扩增酶促过程。反应在 42℃ 进行,扩增速度与 PCR 一样快,在 3 小时内可扩增 1000 万倍^[6]。

NASBA 反应是由 AMV 反转录酶、RNA 酶 H、T₇RNA 聚合酶 3 种酶共同协作完成的,标准的 NASBA 反应体系除以上 3 种酶外,还应有脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)、核糖核苷三磷酸 (NTP)、2 个特殊的引物和适宜的缓冲液。其中引物 I 3' 端与靶序列互补,5' 端具有被 T₇RNA 聚合酶识别的启动子序列,引物 II 的 5' 端序列与靶 RNA 序列相同^[7]。NASBA 整个反应分为两相:非循环相和循环相。如开始用 RNA 靶序列,反应将如此进行:首先,5' 端含有 RNA 聚合酶启动子序列的引物 I 与靶序列复性,并由反转录酶催化产生一 cDNA 链,以 RNaseH 降解新生成的双链螺旋中的 RNA,这样

生成了带有启动子序列的 cDNA, 以上称为非循环相。然后, 引物 II 与裸露的 cDNA 复性, 进行第二链的合成, 启动子序列变为双链。这时, RNA 聚合酶可以合成一反义原靶序列的多个拷贝启动子序列。反过来, 它们又可作为反应循环相中 cDNA 合成模板, 继续合成反义原靶序列 RNA。

NASBA 的特点是操作简便, 不需特殊仪器, 不需温度循环, 整个反应过程由 3 种酶控制, 循环次数少, 忠实性高。由于反应不需高温变性步骤, 所以 NASBA 不会受到双链 DNA 的污染。同时由于外来双链 DNA 无 T₇ 启动子序列, 不可能被扩增, 这就大大提高了 NASBA 反应的特异性。NASBA 均一地等温扩增特性扩大了它的应用范围, 技术适于检测和定量特异 RNA, 并且用 NASBA 也可以应用于扩增双链 DNA。

1.5 Q β 复制

Q β 复制是依赖于 Q β 复制酶(Q β beta replicase)可以指数式放大重组 DNA 分子。Kacian 等于 1972 年首次报道了 Q β 复制酶催化 RNA 模板的自我复制功能^[8]。它能在常温 30min, 将其天然模板 MDV-1 RNA 扩增至 10⁹。Q β 复制酶是噬菌体 Q β 中 RNA 指导的 rRNA 聚合酶, MDV-1 RNA 是 Q β 复制酶的天然模板。该酶是异源多聚体, 由自身编码的亚基及 3 个宿主蛋白构成, 这 3 个宿主蛋白为核糖体蛋白 S₁ 和延长因子 Tu(EF-Tu) 和 Ts^[9,10]。

Q β 复制酶有以下 4 个特点: (1) 不需寡核苷酸引物的引导就可启动 RNA 的合成^[11]。(2) 能特异地识别 RNA 基因中由于分子内碱基配对而形成的特有的 RNA 折叠结构。(3) 在大量寄主 RNA 存在的情况下, 仍特异地复制病毒 RNA。(4) 在 Q β 复制酶天然模板 MDV-1 RNA 的非折叠结构区插入一段短的核酸序列不影响该酶的复制, 因而, 如在此区插入待测序列, 则其序列同样可被 Q β 复制酶扩增。

有的研究通过构建含有 MDV-1 RNA 序列的重组体, 在其特定位置插入待测序列, 这样重组体的 RNA 分子被用作探针与互补的 cDNA 杂交, 或作为 RNA 合成的模板得到大量扩增。该技术已应用在增加探针检测敏感性上。

1.6 转录介导的扩增 (Transcription mediated amplification, TMA)

转录介导的扩增是利用 RNA 聚合酶和反转录酶在等温条件下扩增目的 DNA 或 RNA 的扩增方

法。转录介导的扩增是 Kolhe 于 1986 年研究报道的^[12]。

TMA 系统由样本的制备、扩增和检测 3 部分组成。TMA 扩增需要 2 个引物和 2 种酶: RNA 聚合酶和反转录酶。一个引物带有 RNA 聚合酶的启动子序列。首先, 5' 端有启动子的引物与目标片段结合, 反转录酶催化合成 cDNA 链, 形成 RNA: DNA 杂交体。由于反转录酶同时具有 Rnase H 的功用, 水解掉杂交体中的 RNA。另一引物与 DNA 单链杂交合成具有启动子序列的双链 DNA 模板, RNA 聚合酶以此双链 DNA 为模板转录出与待检 RNA 互补的 RNA 链, 这些 RNA 又进入下轮循环。

TMA 操作简便, 因不需要温度循环, 只需在恒温器或水浴锅中进行就可以。TMA 的主要特点是扩增效率高, 在 1 小时内可将目的基因扩增百万倍以上。另一个特点是特异性高。最近研究表明, 该方法用于 HIV 的定量检测, 灵敏度高于 RT-PCR 和 bDNA 方法^[13]。TMA 主要用于 RNA 扩增。

1.7 滚环复制 (Rolling circle amplification, RCA)

滚环复制是一种新的扩增方法, 既可以进行靶基因的扩增又可以用于信号放大扩增^[14]。RCA 分线性和指数扩增两种形式。线性 RCA 是引物结合到环状 DNA 上后, 在 DNA 聚合酶的作用下被延伸, 产物是具有大量与环状 DNA 互补的重复序列的 DNA 单链。线性 RCA 只适用于环状核酸的扩增。例如环状病毒、质粒和环状染色体。线性 RCA 是产生与原始引物相连的单链扩增产物的唯一方法。

指数 RCA 与线性 RCA 相似, 它采用了第二种引物。该引物序列与环状 DNA 序列完全一致。在 RCA 循环中, 此引物与第一次线性 RCA 产物结合并在聚合酶的作用下延伸, 其产物又作为第一种探针的模板, 这样一来产物呈指数递增。指数 RCA 也可用于非环状 DNA 的扩增。设计一个引物, 其两端可结合到一段连续的序列上, 并形成缺口, 在连接酶的作用下, 引物被连接成环状, 此环状引物作为 RCA 的模板进行指数扩增。Thomas 等^[15]实验证实其灵敏度可达到 10 拷贝, 在 1h 内可扩增 10⁷ 倍。该方法可直接应用于突变检测和 SNP 的检测。

2 信号放大扩增

随着生物学研究领域的不断拓展, 常常会遇到对待检分子不能直接扩增, 但又由于其浓度较低而

无法检测的情况, 因此信号放大扩增对检测前不能进行直接扩增的低浓度分子的检测显得尤为重要。例如对蛋白质、脂类和糖类物质的检测。通过比较, 信号放大扩增产生假阳性的频率要低于目标片段直接扩增。这就使信号放大扩增应用到更多的研究领域。

2.1 支链 DNA 信号放大系统 (Branched DNA, bDNA)

支链 DNA 信号放大系统的信号扩增是依据许多带有碱性磷酸酶标记的探针杂交结合到树枝状的 DNA 枝状体上实现的。bDNA 技术首先采用带有特定寡核苷酸片段的固体平台, 待测分子与这些寡核苷酸片段结合, 然后再加入与待测片段杂交的探针。该探针结合有 60~300 分枝不等的寡核苷酸枝状体, 最后碱性磷酸酶标记的探针杂交结合到这些树枝状核酸枝状体上, 在碱性磷酸酶的发光底物 1, 2-二恶二酮的诱导下使其化学发光, 通过对发光强度的检测对待测分子进行定量检测。

支链 DNA 信号放大系统的主要优点是高灵敏度、检测范围大和准确定量三方面^[19]。如果体系构建正确, 甚至可以对单分子进行有效检测。支链 DNA 信号放大系统已广泛应用于 HIV、HCV 和 HBV 等人类疾病的检测。

2.2 侵染探针技术 (Invader)

Invader 分析是美国三波技术公司开发出来的, 该技术使用一个耐热的、结构特异的内切核酸酶, 它根据结构而不是序列在特殊位点上切割核酸分子。是一种等温非“PCR”的 DNA 和 RNA 定性和定量检测方法^[17]。可简单、快速、准确检测基因突变和单核苷酸多态性 (SNPs)。

Invader 体系包括两个特定的寡核苷酸片段作为探针, 侵染探针和信号探针^[18]。信号探针 3' 端序列与目标片段完全结合杂交, 其 5' 端带有荧光标记并因不能与目标片段结合呈翼状突出。侵染探针和信号探针与目标 DNA 杂交重叠的部分 (重叠至少一个碱基) 产生特定结构。这种特定结构将被内切核酸酶识别并将信号探针突出的 5' 端翼剪切, 剪切后的信号探针与目标 DNA 解离。并有新的信号探针重新与目标 DNA 杂交结合, 随后也被剪切解离。而在含荧光共振能量传递的通用报告系统 (FRET) 的寡核苷酸探针上发生的第二次侵入裂解反应中, 释放的 5' 翼又充当了另一个侵入寡核苷酸, 再次形成侵入结构。第二个侵入切割反应进

一步放大靶特异性产物。FRET 探针的 5' 端标有染料 Q 着色的淬灭基因 F。切割下来的 5'-荧光素标记产物用荧光板读取器检测, 其荧光强度与靶分子量成正比。

Invader 体系可以直接从基因组 DNA 中检测目的基因, 而无需进行 PCR 扩增。Invader 方法方便快捷同时具有很高的灵敏度, 经常用于实时监测。此外, 该体系适用于大范围检测基因组单核苷酸多态性, 因为碱基错配可抑制内切核酸酶的识别与剪切, 用于基因突变的研究报道结果与等位基因特异性 PCR 一致^[19]。

2.3 滚环复制 (Rolling circle amplification, RCA)

线性滚环复制可以用于信号放大。当线性 RCA 被用于信号放大扩增时, 可以做到固体状态下直接扩增, 并可给产物准确定位^[15]。Schweitzer 等^[1]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 0.1 pg/ml。最近研究表明, 线性 RCA 信号放大扩增已在微阵列方面得以应用。对于 2D 或 3D 的 DNA 阵列, RCA 可将杂交信号或荧光标记探针信号放大 10⁴ 倍。实验证明, 采用 RCA 的蛋白芯片对血清中 IgE 进行检测要优于传统的免疫阵列。

3 结 语

核酸分子体外扩增是生物技术研究的重要手段。随着科学的发展和研究目的的不同, 出现了越来越多的核酸分子体外扩增技术。但目前看来, 聚合酶链式反应 (PCR) 还是主导技术, 在各类实验中起着重要的作用, 大多数生物技术分析和研究还将使用 PCR 技术。在病毒检测和遗传病点突变检测方面, 连接酶链式反应 (LCR)、支链 DNA 信号放大系统 (bDNA) 和侵染探针技术 (Invader) 有独到之处, 可以弥补 PCR 技术的缺陷。核酸依赖的扩增 (NASBA) 和转录介导的扩增 (TMA) 可以用于快速准确检测和定量分析 RNA, Q β 复制可以用于检测目的 DNA 片段。总之, 这些技术各有所长, 可以满足不同研究的要求。因而在研究中要根据实验目的和现有条件, 选择适当的扩增技术。

参考文献

- [1] Barry Schweitzer, Stephen Kingsmore. Combining nucleic acid

- amplification and detection. *Biotechnology*, 2001, 12(1): 21~ 27
- [2] Mullis K B, Falcón F A, Scharf S. Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Biol*, 1986, 51: 263~ 273
- [3] Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(1): 189~ 193
- [4] Tong J, Cao W, Barany F. Biochemical properties of a high fidelity DNA ligase from *Thermus* species AK16D. *Nucleic Acid Research*, 1999, 27(3): 788~ 794
- [5] Walker G T, Fraiser M S, Schram J L, et al. Strand displacement amplification: an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*, 1992, 11, 20(7): 1691~ 1694
- [6] Compton J. Nucleic acid sequence based amplification. *Nature*, 1991, 350(6313): 91~ 92
- [7] Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, et al. NASBA isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for HIV-1 diagnosis. *Journal of Virological Methods*, 1991, 35(3): 273~ 286
- [8] Kacian D L, Mills D R, Kramer F R, et al. A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 3038~ 3042
- [9] Wahba A, Miller M, Niveleau A, et al. Subunit I of G beta replicase and 30 S ribosomal protein S1 of *Escherichia coli*. Evidence for the identity of the two proteins. *J Biol Chem*, 1974, 249(10): 3314~ 3316
- [10] Blumenthal T, Landers T A, Weber K P. Bacteriophage Q replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF Tu and EF Ts. *Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(5): 1313~ 1317
- [11] David B, Larry G. RNA replication by Q β replicase: A working model. *Biochemistry*, 1996, 93(11): 558~ 562
- [12] Kohne D E. Application of DNA probe tests to the diagnosis of infectious disease. *Am Clin Prod Rev*, 1986, 11: 20~ 29
- [13] Emery S, Bodrug S, Richardson B, et al. Evaluation of performance of the Gen Probe human immunodeficiency virus type 1 viral load assay using primary subtype A, C and D isolates from Kenya. *J Clin Microbiology*, 2000, 38(7): 2688~ 2695
- [14] Lizardi P, Huang X, Zhu Z, et al. Mutation detection and single molecule counting using isothermal rolling circle amplification. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 225~ 232
- [15] Thomas D, Nardone G, Randall S. Amplification of padlock probes for DNA diagnostics by cascade rolling circle amplification or the polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med*, 1999, 123(12): 1170~ 1176
- [16] Mark Collins, Bruce Irvine, Diana Tyner, et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(15): 2979~ 2984
- [17] Wilkerson D A. Third wave technologies' invader assays for nucleic acid detection. *The Scientist*, 1993, 13(22): 16~ 18
- [18] Lyamichev V, Mast A L, Hall J G, et al. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnology*, 1999, 17(3): 292~ 296
- [19] Hessner M, Budish M, Friedman K. Genotyping of Factor V G1691A(Leiden) without the use of PCR by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Clinic Chem*, 2000, 46(8): 1051~ 1056

Progress of Nucleic Acid Amplification Technologies

CHEN Qing-shan LIU Chun-yan LIU Ying-xue LIU Hai-yan CHEN Li-jun

FU Rao SHAN Ji-xun GUO Qiang ZHANG Li-na

(Institute of soybean research, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Nucleic acid amplification is the base of the study of molecular biology. With the development of biotechnology, more and more technology of nucleic acid amplification has been emerged. There are two kinds of nucleic acid amplification based on the amplification characteristic of these technologies. One is the target amplification, including Polymerase Chain Reaction (PCR), Strand displacement amplification (SDA), Ligase Chain Reaction (LCR), Nucleic acid sequence based amplification (NASBA), Q β replicase, Transcription-mediated amplification (TMA) and Rolling circle amplification (RCA); the other is the signal amplification, including Branched DNA (bDNA) and Invader et al. The theories, characteristics and applications of these amplification technologies were introduced.

Key words Nucleic Acid Amplification Target Amplification Signal Amplification