



论文

用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸

吕蓓^①, 程海荣^②, 严庆丰^④, 黄震巨^③, 沈桂芳^①, 张志芳^①, 李轶女^①, 邓子新^②, 林敏^①, 程奇^{①*}

① 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081;

② 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢教育部重点实验室, 上海 200240;

③ 宁波华越生物技术有限公司, 宁波 315100;

④ 浙江大学生命科学技术学院, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: chengqi@caas.net.cn

收稿日期: 2010-08-09; 接受日期: 2010-08-22

摘要 体外核酸快速扩增技术是一种可使微量核酸在体外高效快速扩增的技术, 自问世以来, 被广泛应用于分子生物学、医学和法理鉴定等领域, 并被不断改进, 以使其功能和适应性更为广泛. 重组酶介导扩增法是在现有体外核酸扩增原理的基础上发展起来的恒温体外快速扩增核酸技术. RAA 法利用重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶代替了传统 PCR 的热循环解链过程, 实现了在 37°C 恒温下的核酸快速扩增, 无需特殊的辅助仪器, 对操作人员的要求也不高, 具备简单、节能、便携、快速等特点, 有望在不远的将来取代传统的热循环 PCR 反应.

关键词

重组酶

细菌

体外核酸扩增

常温快速扩增

自核酸体外扩增技术出现以后, 就以惊人的速度被应用到与核酸研究相关的领域. 目前, 传统的聚合酶链式反应, 简称 PCR 技术, 已成为诸多生物学、医学实验室、检测机构和生物医药公司的常规实验方法. 传统的 PCR 技术是一个热循环的过程, 包括高温变性、退火和延伸 3 个环节. 通常在 35 个循环之后, 微量的 DNA 模板即被特异性地扩增到可以被仪器检测到的数量. 因常规 PCR 反应需要核酸扩增仪作为辅助工具, 因此反应始终受到电力、成本以及空间等因素的制约, 从而限制了该技术在实验室之外的应用.

早在 20 世纪 90 年代初, 就出现了关于恒温核酸体外扩增技术的报道^[1]. 恒温核酸体外扩增技术, 是在恒定温度下, 通过一些特殊的蛋白(酶)使 DNA 双

链解旋, 并促使特异性 DNA 片段扩增, 以达到核酸体外扩增的效果^[2]. 恒温核酸体外扩增技术的出现, 再次扩大了 PCR 技术的应用范围, 并使其操作更加便捷. 相对于传统的热循环核酸体外扩增技术, 恒温技术的应用是一次全面升级.

在现有的几种恒温核酸体外扩增方法中, 环介导基因恒温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[3]和重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)^[4]是两种相对比较成熟的新技术.

LAMP 扩增方法的核心是使用链置换型 DNA 聚合酶, 当 DNA 双链在 65°C 处于动平衡状态时, 反应中的引物可通过类似于滚环复制的链置换反应, 在同一条链上产生互补序列, 周而复始形成大小不一

的扩增产物. LAMP 扩增方法的特点是需使用 4~6 个引物, 在一个蛋白的作用下, 并在 65℃ 的恒温条件下进行 DNA 扩增反应. 其反应灵敏度高于巢式 PCR, 并且特异性高. 若使用荧光燃料, 还可以直接用肉眼观察到反应的扩增产物^[5]. 但是, 因其引物较复杂, 必须用特殊的软件设计. 另外, 用 LAMP 方法得到的扩增产物是一些大小不等的片段, 无法直接克隆和测序, 只能用于判断目的基因的存在. 这也是 LAMP 方法最大的局限性.

目前最接近所谓常温核酸扩增技术的, 是重组酶聚合酶扩增法(RPA), 该方法是以 T4 噬菌体 DNA 复制机理系统为蓝本, 系统中除了需要一种常温下能工作的 DNA 聚合酶外, 还包含一个噬菌体 *uvsX* 重组酶和一个单链 DNA 结合酶(gp32), 以及另外一个辅助 *uvsX* 重组酶的 *uvsY* 蛋白. 如果效仿 RT-PCR 利用简易荧光仪, 还需另一个蛋白的帮助. 该系统的显著优点在于, 它在常温下就能实现 DNA 解链并可在 15~30 min 内完成目的 DNA 的快速扩增. 所以 RPA 扩增技术就不需要使用贵重的核酸扩增仪, 因而也不受样品槽孔多少和空间的限制.

本文介绍的重组酶介导扩增(recombinase-aid amplification, RAA)技术也是一种在恒温下可以使核酸快速扩增的方法. 与 RPA 不同的是, RAA 扩增法使用的是从细菌或真菌中获得的重组酶, 在 37℃ 恒温下, 该重组酶可与引物 DNA 紧密结合, 形成酶和引物的聚合体, 当引物在模板 DNA 上搜索到与之完全互补的序列时, 在单链 DNA 结合蛋白(single-stranded DNA binding, SSB)的帮助下, 使模板 DNA 解链, 并在 DNA 聚合酶的作用下, 形成新的 DNA 互补链(图 1). 反应产物也是以指数级增长, 通常在 1 h 内即能得到可以用琼脂糖凝胶电泳检测到的扩增片段. 整个反应简单快速, 因为不需要高温循环, 所以特别适合在有大量样品的非实验室检测场所使用.

1 材料与方法

1.1 蛋白和 DNA

天蓝色链霉菌重组酶蛋白(SC-recA)、枯草芽孢杆菌重组酶蛋白(BS-recA)和啤酒酵母重组酶(Rad51)分别来自天蓝色链霉菌、枯草芽孢杆菌和啤酒酵母. 将天蓝色链霉菌、枯草芽孢杆菌和 *Rad51* 重组酶基因分别克隆至 pET21a(购自 Merck 公司)表达载体中, 过

量表达后用 Ni-NTA 亲和层析(Ni-NTA agarose, 购自 GE Health Care 公司)纯化, 并用 Bradford 法定量. λ DNA 购自 Promega 公司. 重组 DNA 是 *rnd* 基因编码区的一部分(310 bp), 将此片段连接到载体上, 转化大肠杆菌获得含重组 DNA 的菌株(Top10).

1.2 重组酶与 DNA 结合实验

取纯化的 SC-recA 重组酶蛋白(5 μ L)、BS-recA 重组酶蛋白(5 和 10 μ L)和 Rad51 蛋白(5 和 10 μ L), 加入 400 ng λ DNA, 反应体系为 20 μ L, 在 37℃ 温育 1 h, 取 10 μ L 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳. 余下 10 μ L 反应体系继续在 37℃ 温育 2 h, 取全部反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳. 对照用 100 μ L 小牛血清白蛋白, 加入 400 ng λ DNA, 反应体系为 20 μ L, 反应条件同上.

1.3 RAA 扩增

将含有目的片段的大肠杆菌 Top10 菌株过夜培养, 从中取出 1 mL 菌液, 100℃ 加热 10 min. 冷却至室温, 从中取出 1 μ L 作为扩增模板. 引物 A, B 大小分别为 34 和 32 nt. 反应体系如下: 50 pmol 引物 A; 50 pmol 引物 B; 1 mmol/L dNTP; 90 ng/ μ L SSB 蛋白; 120 ng/ μ L recA 重组酶蛋白(SC-recA/BS-recA)或 30 ng/ μ L Rad51 蛋白; 30 ng/ μ L Bsu DNA 聚合酶; 反应缓冲液(100 mmol/L Tricine, pH 8.0; 100 mmol/L 醋酸镁; 5 mmol/L 二硫苏糖醇; 5% PEG 20K; 2.5 mmol/L ATP; 100 ng/ μ L 肌酸激酶). 摇匀后放置于 37℃ 培养箱温浴 1 h. 取 10 μ L 反应产物经酚/氯仿提纯后, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳.

2 结果与分析

2.1 重组酶与 DNA 结合实验

在本实验中, 重组酶的活性非常重要, 为了证明重组酶和 DNA 的结合特性, 将 400 ng λ DNA 分别加入纯化后的 SC-recA 重组酶(10 μ L)和 BS-recA 重组酶(5 和 10 μ L), 温浴 1 h 后电泳结果显示, 两种重组酶均可与 DNA 结合, 并使 DNA 的迁移率明显变慢(图 2, 泳道 1~3). 而加入 100 μ L 小牛血清白蛋白(BSA)无明显的结合, 其迁移率与对照 λ DNA 迁移率一致(图 2, 泳道 4~8). 另外在电泳孔中加入两种重组酶进行电泳, 未观察到 DNA 条带, 说明纯化的两种重组酶

均不含 DNA(图 2, 泳道 9 和 10).

继续温育 2 h 后将余下 10 μ L 反应样品进行琼脂糖凝胶电泳, 发现 DNA 仍然滞留在电泳孔中不能迁移出, 而加入 BSA 的 DNA 样品则能迁移出电泳孔, 与不加蛋白的 λ DNA 迁移率一致(结果未显示). 说明 SC-recA 重组酶和 BS-recA 重组酶与 DNA 的结合紧密, 形成比 λ DNA 分子量更大的紧密结构使之不能迁移出电泳槽, 进一步说明 SC-recA 和 BS-recA 重组酶是 DNA 结合蛋白.

Rad51 与 DNA 结合实验也证明来源于酵母啤酒的重组酶(Rad51)亦可以与 DNA 分子紧密结合(结果未显示).

2.2 RAA 扩增

在细菌或真菌 DNA 复制过程中, 重组酶蛋白起着重要的作用. 重组酶蛋白可与单链 DNA 结合而阻止细胞核内核酸酶对单链 DNA 的降解, 在 DNA 重组过程中, 重组酶还负责基本的碱基配对^[6]. 当然, 在体内, 还会有其他辅助性蛋白, 如 recB, recC 和单链 DNA 结合蛋白等, 共同参与到 DNA 的重组中. 因此, 在进行核酸体外扩增时, 重组酶蛋白无疑是起着决定性作用的反应催化剂. 为了验证重组酶的作用, 设计了有针对性的 RAA 扩增体系, 除了 SC-recA, BS-recA 和 Rad51 重组酶外, 还加入了 DNA 聚合酶和

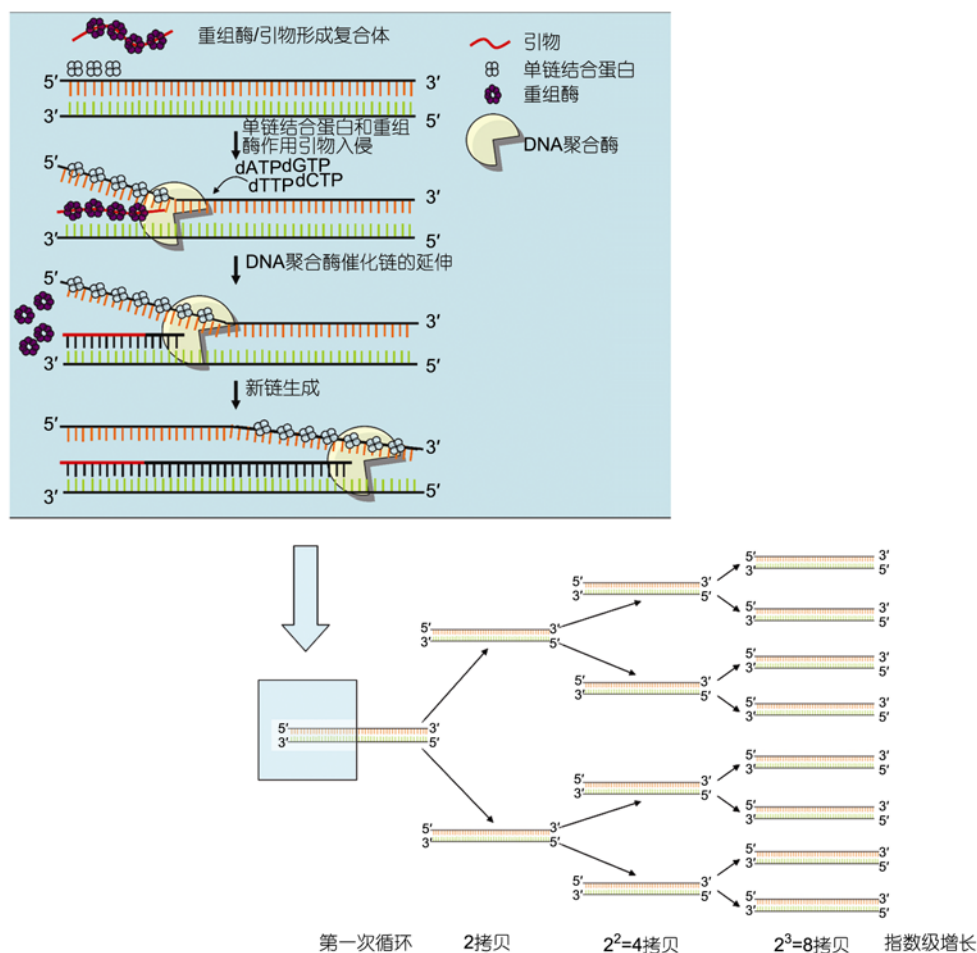


图 1 重组酶介导扩增法的原理示意图

RAA 法中主要使用了 3 种酶: 重组酶、单链 DNA 结合蛋白和 DNA 聚合酶. 首先, 重组酶与引物结合形成复合体, 在单链 DNA 结合蛋白的辅助下, 模板 DNA 解链并使引物与模板配对, 然后在 DNA 聚合酶的作用下, 生成新的 DNA 链. 经过几十个循环后, DNA 新链的数量以指数级增长. RAA 法用酶的作用使双链 DNA 解链, 因此反应条件较温和, 不需要高温使模板 DNA 变性. RAA 反应的时间也较短, 在 15~30 min 就可以得到能检测到的扩增片段

辅助蛋白 Bsu 等, 扩增的目的片段长 310 bp, 是之前克隆到载体里的 *rnd* 基因编码区的一部分. 实验结果表明, 在目前的反应体系中, 含有 SC-recA 和 BS-recA 重组酶的反应体系都可以正确扩增出目的片段(图 3), 说明 SC-recA 和 BS-recA 重组酶均具有催化功能, 而且反应的特异性很高.

3 讨论

3.1 重组酶蛋白在 RAA 反应中的作用

在体外核酸扩增体系中, 重组酶蛋白的作用是

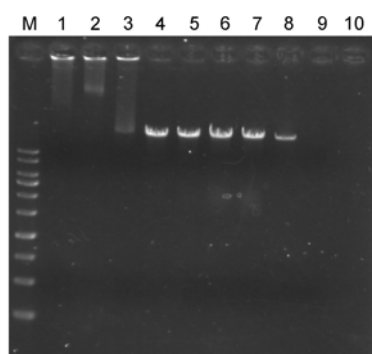


图2 SC-recA, BS-recA 重组酶与 λ DNA 结合 1 h 后琼脂糖凝胶电泳

泳道 1~3: 采用 400 ng λ DNA 为模板, 分别加入 5 μ L SC-recA, 5 μ L BS-recA 及 10 μ L BS-recA; 泳道 4~7: 400 ng λ DNA 加入 100 μ L BSA; 泳道 8: 对照 λ DNA(400 ng); 泳道 9 和 10: 未加 λ DNA 的 SC-recA 和 BS-recA. DNA marker 从上到下依次为: 10 K, 8 K, 7 K, 6 K, 5 K, 4 K, 3 K, 2 K, 1 K 和 0.1 K

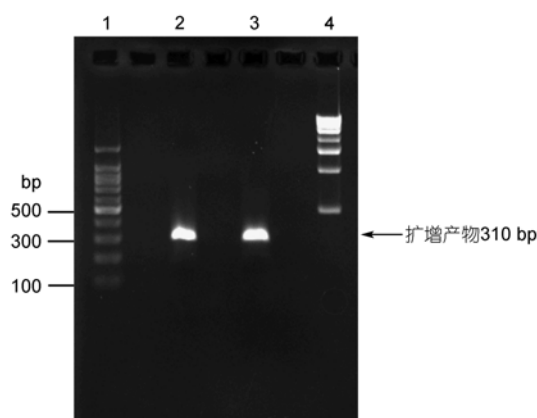


图3 RAA 扩增片段琼脂糖凝胶电泳结果

泳道 1: 100 bp DNA ladder; 泳道 2 和 3: 分别加入 SC-recA 和 BS-recA 重组酶的反应体系; 泳道 4: 1 kb DNA ladder

帮助 DNA 模板的解链和促使模板与引物之间发生链替换, 这一替换过程需要 ATP 来提供能量. 然后在单链结合蛋白的辅助下, Bsu DNA 聚合酶可以对链替换后的目的 DNA 进行特异地延伸. 由于 ATP 在 CK 激酶催化下可以利用磷酸肌酸(phosphocreatine)实现再生, 使这一反应过程中的化学平衡倾向于产物的合成, 并且这一过程可以被不断地重复, 从而最终实现核酸的高效扩增.

在本实验中, 重组酶蛋白来自于链霉菌、芽孢杆菌和啤酒酵母. DNA 结合实验表明, 来自于细菌和真菌的重组酶都能够与 DNA 紧密结合, 这是使核酸体外扩增反应顺利进行的关键一步. 正是在重组酶蛋白的作用下, 模板 DNA 能够解链并且使引物能够结合到与之同源的序列上, 随后在 DNA 聚合酶的催化下, 扩增出新的 DNA 片段.

3.2 重组酶介导扩增法反应的建立和优化

在 RAA 反应中, 酶无疑是最重要的成分, 酶的纯度直接决定了反应能否顺利进行, 因为反应仅在 37 $^{\circ}$ C 下进行, 任何不必要的杂质都会影响到反应的结果, 特别是核酸酶的污染, 而核酸酶在传统的高温 PCR 中几乎可以被忽略. 因此, 在进行酶的纯化时, 特别强调核酸酶的去除, 以及保持酶的活性. 通过 Ni-NTA 亲和层析(Ni-NTA agarose)可以去掉大部分杂质, 获得高纯度的酶.

每个反应中酶的定量也很重要, 除了重组酶, 还有 3~4 个酶参与扩增反应, 它们之间需要合理的比例, 才能够得到预期的扩增结果. 在实际应用中发现, 对不同的模板和引物, 反应的体系需要有针对性地优化, 并非一套体系适用于所有的反应. 而一旦调整好反应体系, 就能够基本达到百分之百的重复性. 这也是常温核酸扩增的一个特点, 即经过优化的体系的灵敏度和稳定性较好, 不会因环境或操作人员的改变而产生不同的结果. 此外, 本研究组新近创立了某种优化的 RAA 体系, 该体系还可以进行类似于滚环复制的大尺寸 DNA 的扩增(结果未发表).

RAA 常温核酸扩增法对模板是不挑剔的, 可以是质粒 DNA, 也可以是含有质粒的菌液, 动植物 DNA 均可以作为模板, 甚至可以使用 RNA 直接作为模板, 而无需额外的逆转录过程. 但是为了提高扩增片段的准确性, RAA 对引物的要求比较严格. 通常 1 对引物

需要由 30~34 个核苷酸组成, 且引物的序列要与扩增片段严格互补, 只有这样, 才能获得理想的扩增条带. 本实验所用的一对引物分别长 34 和 32 nt, 可以看到, 用这对引物扩增出来的产物特异性非常高(图 3). RAA 方法中引物与模板严格互补的特点, 使其可以用于 SNP 和甲基化的检测, 只要与引物配对的模板 DNA 上有一个碱基的差异, 就可以用 RAA 方法检测出来.

在 RAA 反应体系的优化中, 缓冲液也是关键的部分. 因重组酶催化的反应是一个耗能的反应, 需要 ATP 的参与, 所以在缓冲液中, ATP 和促使 ATP 再生的肌酸激酶(creatine kinase)都是必不可少的成分. 同时, 加入了有稳定和提高酶活性作用的聚乙二醇(PEG20000)和二硫苏糖醇(DTT)等. 整个反应在一个弱碱的环境下进行, Tris 缓冲液的 pH 为 8.0.

经过优化的反应体系在简单的反应条件下(37℃ 反应 1 h)已经基本上能够稳定地扩增大小为 310 bp 的目的片段, 而且具有很高的特异性.

3.3 RAA 常温扩增的应用前景

传统的高温 PCR 自 1983 年发明至今, 已经在生物学、医学和农学等领域发挥了重要的作用. 在 PCR 的基础上, 近年来还发展了很多技术, 如 RT-PCR, 定时定量 PCR(real-time quantitative PCR)和免疫-PCR 等^[7~9]. 但应用这些技术的前提都是需要购买昂贵的仪器和对操作人员进行专业培训. 因此, 极大地限制了这些技术在实验室之外的应用. 恒温核酸扩增的出现恰好弥补了高温 PCR 的这个缺点, 特别是重组酶介导扩增法仅需要在 37℃ 反应 1 h, 即能得到与高温 PCR 相同的结果, 用时少、操作简单, 而且只需要一个恒温装置(如水浴、金属浴, 甚至是恒温培养

箱). 由于不受仪器的限制, RAA 法可以用做大量样品的快速检测. 如果样品需要定时定量, 还可以在 RAA 反应中添加探针, 只需要另外补充一个蛋白就可以在 5~30 min 检测到扩增片段; 如果环境温度低于室温(25℃), 则仅需要增加一个恒温装置.

RAA 法的特点使其在病毒检测方面颇具竞争力. 目前, 常用传统 PCR 法检测乙型肝炎病毒(HBV)、人乳头状瘤病毒(HPV)和艾滋病病毒(HIV)等^[10~12]. RAA 法获得的引物特异性高, 而且操作简便、省时, 将来完全可以替代传统 PCR 进行病毒的检测, 甚至可以在一个反应中使用多对引物, 在同一时间进行不同病毒的检测鉴定.

相对于传统 PCR 和其他恒温核酸扩增方法(如 LAMP 法), RAA 扩增法的优势显而易见. 因 RAA 法的反应简单, 还有可能制作出类似于血糖仪的便携式检测设备, 定时定量地检测特定疾病, 这将在很大程度上改变现有医学检测的程序, 不仅可使广大医护人员从繁重的劳动中解脱出来, 还能够随时随地获得检查结果.

核酸扩增技术发展至今, 一直离不开昂贵的仪器和专业的培训, 因此, RAA 法的出现具有革命性意义. 目前, RAA 法还处于初期阶段, 但是对于一个刚出现的新技术而言, 能够在体外较低的温度下(最适温度 37℃)快速扩增出目的片段, 已经是很好的成绩, 并有望研发出家用分子诊断试剂盒. 此外, RAA 技术也是目前唯一可能研究出体内核酸扩增技术的后备技术. 相信随着反应体系和反应条件的不断优化, RAA 法能够利用它的优势, 在医药、农业等领域, 特别是在检测(医学检测、动植物检疫和野外微生物检测)等方面广泛发挥作用.

参考文献

- Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2008, 27: 224—243
- 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用. 北京: 科学出版社, 2009. 98
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: E63
- Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*, 2006, 4, e204
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 59: 145—157
- Kuzminov A. DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8461—8468
- Gibson U E, Heid C A, Williams P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 1996, 6: 995—1001
- Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996, 6: 986—994
- Widjoatmodjo M N, Fluit A C, Torensma R, et al. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of

- salmonellae in fecal samples. J Clin Microbiol, 1992, 30: 3195—3199
- 10 Kaneko S, Feinstone S M, Miller R H. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J Clin Microbiol, 1989, 27: 1930—1933
- 11 Bauer H M, Ting Y, Greer C E, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. JAMA, 1991, 265: 472—477
- 12 Steketee R W, Abrams E J, Thea D M, et al. Early detection of perinatal human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection using HIV RNA amplification and detection. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study. J Infect Dis, 1997, 175: 707—711

Recombinase-Aid Amplification: a Novel Technology of *in vitro* Rapid Nucleic Acid Amplification

LÜ Bei¹, CHENG HaiRong², YAN QingFeng³, HUANG ZhenJu⁴, SHEN GuiFang¹,
ZHANG ZhiFang¹, LI YiNv¹, DENG ZiXin², LIN Min¹, CHENG Qi¹

¹ Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

² Key Laboratory of Microbial of Metabolism, Ministry of Education, School of Life Sciences and Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

³ College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

⁴ Ningbo Huayue Biotechnology Limited, Ningbo 315100, China

Nucleic acid amplification is a biotechnology that trace nucleic acid can be rapidly amplified *in vitro*. The technology has been applied widely in molecular biology, medical and forensic test etc. Such methodology has been continuously improved in its functionality and wideness of utilization. Recombinase-aid amplification (RAA) is the most recent isothermal amplification technology, in which the classical thermal stable enzyme has been replaced by recombinase, single-stranded DNA binding (SSB) and DNA polymerase. Therefore, the RAA reaction can be carried out at optimized 37°C or under the room temperatures without any heating assistance. The entire RAA reaction is very rapid, specific, power-saving and portable. These merits could largely facilitate RAA more applicable than PCR in the near future.

recombinase, bacteria, *in vitro* nucle acid amplification, rapid isothermal amplification

doi: 10.1360/052010-508