文章编号:1000-5404(2013)11-1093-04

论著

双循环线性滚环扩增检测HBV替诺福韦耐药位点的方法学研究

林钟劝,陈 瑶,韩 梅,夏 宇,姚 远,和昱晨,张 波 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军检验医学专科中心)

[摘要] **目的** 探讨双循环线性滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)检测HBV替诺福韦耐药基因突变位点的可行性。**方法** 以HBV替诺福韦耐药基因突变位点为检测靶点,设计该位点的锁式探针以及包括该位点的HBV野生型、突变性模板。锁式探针与野生型模板特异识别并结合,通过*E. coli*连接酶连接为闭合环形结构,加入引物启动第1轮RCA;扩增产物用*Hpa* Ⅰ酶切游离出检测模板,重复上述过程进行第2轮RCA,琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物;并对该方法的特异性、检测限及连接效率的影响因素进行初步探讨。**结果** 探针与模板的杂交温度为45 ℃时,探针的环化连接效率最高、特异性最好。通过对不同浓度野生型模板的检测,单循环RCA的检测限为50 pmol/L,双循环RCA的检测限为5 pmol/L,检测灵敏度提高了10倍。**结论** 初步建立了检测HBV替诺福韦基因耐药位点突变的双循环RCA方法。

[关键词] 双循环滚环扩增;耐药位点;突变
[中图法分类号] R373.21;R394-33;R446.9 [文献标志码] A

Detection of tenofovir resistance gene of HBV by circular rolling circle amplification

Lin Zhongquan, Chen Yao, Han Mei, Xia Yu, Yao Yuan, He Yuchen, Zhang Bo (Center of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the feasibility of using circular rolling circle amplification (RCA) to detect the resistance gene to tenofovir in hepatitis B virus (HBV). **Methods** The mutation site of resistance gene of HBV to tenofovir was taken as target to design the padlock probe. Wild and mutation templates were also synthesized in this research. The designed padlock probes were linked to closed rings by *E. coli* DNA ligase when they specifically bonded to wild templates. RCA was started when primers annealed to the probes. Then *Hpa* Ⅰ cut off the product drastically, and more templates were released. Then the processes above were repeated to start the RCA for a second time. Finally the product was detected by 1% agarose electrophoresis. The influential factors of ligation efficiency, specificity and sensitivity were also studied. **Results** The ligation efficiency and specificity of the probe were enhanced when the hybridization temperature was set at 45 ℃. Among the different concentrations of wild template detected, the lowest rate of RCA was 50 pmol/L, and it was as lower as 5 pmol/L when the circular RCA was used. **Conclusion** Circular RCA is established successfully to detect resistance gene of HBV to tenofovir.

[**Key words**] circular rolling circle amplification; resistance mutations; mutation

Supported by the Starting Fund for Overseas Returning Scholar of Third Military Medical University (SWH2011LC022). Corresponding author: Zhang Bo, E-mail: zbcq@yahoo.com.cn

病原微生物对抗菌药物的耐受大大降低了抗菌药物的治疗效果,已成为临床感染性疾病治疗面临的棘手问题。病原微生物的基因突变是其产生耐药性的根本原因。细菌、真菌等病原微生物的耐药性可以通过耐药基因检测和体外药敏实验进行监测,但乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)等病毒尚无体外药敏实验,只能进行耐药基因检测。因此,耐药位点检测在各种感染性疾病的治疗中,对于指导抗感染药物的选择和合理应用具有重要临床价值。目前,基因突变位点检测有测序法、芯片杂交法等。基因测序方法繁琐,费用昂贵,耗时长;芯片杂交以PCR技术为基础,易出现假阳性。滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)是一种恒温线性扩增技术,以其快速简易、灵敏度高和特异性强等优点受到广泛关注。锁式探针由5′端模板结合区、中间连接序列区和3′端模板结合区组成。其中3′端末端碱基一般为突变位点识别区。当5′端和3′端与模板完全互补时,探针两端在DNA连接酶的作用下形成磷酸二酯键被连接成环,为RCA提供环形模板,后者与引物杂交并在DNA聚合酶的作用下启动滚环扩增反应,形成1条含大量环形模板互补重复序列的DNA单链。当5′端和3′端与模板不能完

[基金项目] 第三军医大学海外归国学者启动基金(SWH2011LC022)
[通信作者] 张 波,E-mail:zbcq@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0919.015.html(2013-03-25)

全配对时,探针无法连接成环而保持线状,也就不会发生RCA反应[1]。本研究基于上述工作原理,把锁式探针和RCA有机结合,建立检测HBV替诺福韦耐药基因突变位点的双循环RCA方法,并对该方法的特异性、检测限及扩增效率的影响因素进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验器材和主要试剂

高速离心机(ST16R,德国Thermoscientific);PCR仪(MG96$^+$,杭州朗基科学仪器有限公司);多功能读数仪(VARIOSKAN FLASH,美国热电);凝胶电泳仪(DYY-6D,北京六一仪器厂);凝胶成像仪(VILBERLOURMAT,法国)。纳米金颗粒溶液(15 nm粒径,浓度1.24 mg/mL)购自上海杰一生物有限公司;限制性核酸内切酶*Hpa* Ⅰ(10 U/μL)、*E. coli* DNA连接酶、*Exon* Ⅰ核酸外切酶、Wide Range DNA标准、20 bp DNA梯度标准购自大连宝生物有限公司;dNTPs混合液(各10 mmol/L)、phi29 DNA聚合酶购自上海生工生物有限公司。

1.2 探针、引物的设计

在GenBank上获取HBV替诺福韦耐药位点所在区域的基因序列。以其为模板设计野生型锁式探针。使用Primer Premier 5.0预测探针的5′端、3′端及引物的二级结构和T_m值。最后在Mfold网站预测探针成环后的二级结构,力求二级结构最小。

为实现双循环RCA,在锁式探针中间序列加入限制性内切酶*Hpa* Ⅰ的酶切位点-GTTAAC-。同时设计合成野生型模板、突变型模板、引物、巯基化引物、FITC标记探针(表1)。

表1 野生型模板、突变型模板、引物、巯基标记引物、FITC标记探针序列

基因	核酸序列(5′→3′)
锁式探针(野生型)	PO4-CCTACGAACCACTGAACTGCTTCTTCGGTGCCCATACAT-CAAATGCCACGTTAACAGTCAGGCCTAGTGGGGGAAAGC
野生型模板	ACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCG-TAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTT
突变型模板	ACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAG-GACTTTCCCCCACTGTTTGGCTT
引物	ATGGGCACCGAAGAAGCA
巯基标记引物	HS-AAAAAAAAAAAAATGGGCACCGAAGAAGCA
荧光素标记探针	FITC-CCTACGAACCACTGAACTGC

下划线处为*Hpa* Ⅰ酶切位点

上述模板及引物的合成与修饰由上海生工生物有限公司完成,ULTRAPAGE方法纯化。

1.3 实验方法

1.3.1 纳米金颗粒表面的RCA反应

1.3.1.1 引物的纳米金修饰 485 μL纳米金溶液与100 μmol/L巯基化引物15 μL混匀,室温放置16 h;加入1 mL缓冲液A[0.1 mol/L NaCl,10 mol/L NaH_2PO_4(pH 7.0)],混匀,室温放置40 h;14 000 r/min离心25 min,弃上清;再加入1 mL缓冲液A清洗。离心,弃上清后用150 μL pH 7.0缓冲液B(0.3 mol/L NaCl,10 mol/L NaH_2PO_4)重悬,4 ℃保存备用[2]。

1.3.1.2 锁式探针的环化连接 灭菌水12 μL、1 μmol/L探针2 μL、模板2 μL和10×*E. coli* Buffer 2 μL混匀,45 ℃孵育40 min后,加入10×BSA 2 μL和0.2 μL *E. coli*连接酶,混匀,37 ℃进行环化连接反应40 min。继续加入10×*Exon* Ⅰ Buffer 2 μL和*Exon* Ⅰ核酸外切酶2 μL,混匀,37 ℃反应1 h,消除未环化的探针,最后在95 ℃条件下灭活外切酶。

1.3.1.3 RCA反应和荧光探针杂交检测 总反应体积20 μL,纳米金修饰的引物3 μL、探针环化连接产物10 μL和10×phi29 Buffer 2 μL,95 ℃孵育5 min,冰浴1 min。再加入phi29 DNA聚合酶1 μL、dNTP液2 μL和100 μmol/L FITC-探针2 μL,混匀后在37 ℃避光条件下进行RCA反应2 h。

1.3.1.4 RCA产物检测 将RCA产物溶入1 mL PBS液中,14 000 r/min离心25 min,弃上清,重复上述操作2次。最后用100 μL PBS液重悬,多功能读数仪检测荧光强度(吸收光波长492 nm,发射光波长520 nm)。

1.3.2 双循环RCA

1.3.2.1 锁式探针的环化连接与酶切 方法同1.3.1.2。

1.3.2.2 第1轮RCA 总反应体积30 μL,探针环化连接产物24 μL、100 μmol/L引物1 μL和10×phi29 Buffer 3 μL,95 ℃ 5 min,冰浴1 min。加入phi29 DNA聚合酶1 μL、dNTP液1 μL,混匀后37 ℃进行RCA反应2 h。

1.3.2.3 RCA产物的酶切 总反应体积35 μL,第1轮RCA扩增产物30 μL、10×*Hpa* Ⅰ Buffer 3.5 μL和*Hpa* Ⅰ核酸内切酶1.5 μL,混匀后37 ℃酶切12 h。酶切产物95 ℃孵育5 min,冰浴1 min后备用。

1.3.2.4 锁式探针的连接 酶切的RCA产物35 μL、1 μmol/L探针1 μL和10×*E. coli* Buffer 4.5 μL,混匀,45 ℃孵育40 min。加入10×BSA 4.5 μL和0.4 μL *E. coli*连接酶,混匀,37 ℃进行环化连接反应40 min。加入10×*Exon* Ⅰ Buffer 5 μL和*Exon* Ⅰ核酸外切酶2 μL,消除未环化的探针,反应条件同1.3.1.2。

1.3.2.5 第2轮RCA 反应总体积60 μL,环化连接产物50 μL、100 μmol/L引物1 μL和10×phi29 Buffer 6 μL。95 ℃孵育5 min,冰浴1 min。加入phi29 DNA聚合酶2 μL和dNTP液1 μL,混匀,37 ℃进行RCA反应2 h。扩增产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察电泳结果。

2 结果

2.1 杂交温度对锁式探针环化连接效率的影响

由于琼脂糖凝胶电泳电泳条带之间微弱的信号差异肉眼难以区分,我们将引物修饰在纳米金颗粒上进行RCA并用荧光素标记的探针检测扩增产物,以荧光强度数值的形式对扩增产物的变化进行比较,以探讨杂交温度对连接效率的影响。我们将锁式探针分别在35、40、45、50、55 ℃条件下与终浓度为10 pmol/L的HBV野生型模板进行杂交,连接成环后与纳米金颗粒修饰的引物进行RCA反应。利用荧光探针检测RCA产物,以荧光强度表示扩增产物的浓度(图1)。结果表明锁式探针与模板在45 ℃杂交时,探针环化连接的产物最多,后续RCA的扩增效率最高。

2.2 杂交温度对锁式探针环化特异性的影响

采用同样方法将锁式探针分别在35、40、45、50、55 ℃条件下与高浓度突变型模板(终浓度1 μmol/L)杂交,检测RCA非特异性扩增产物,产物浓度以荧光强度表示(图2)。结果表明,锁式探针与模板杂交温度为45 ℃时,RCA的非特异性扩增产物最少,RCA扩增反应的特异性最高。

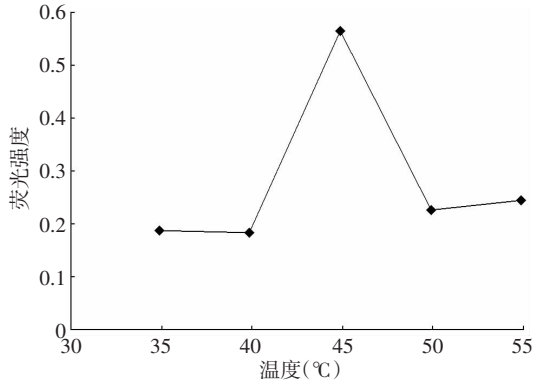


图1 杂交温度对锁式探针环化连接效率的影响

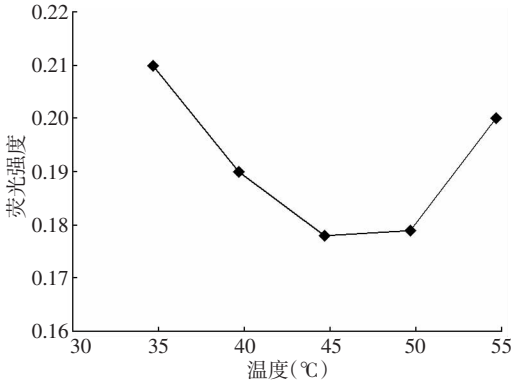
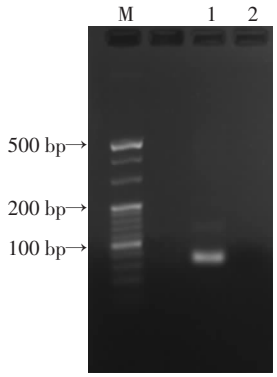


图2 杂交温度对锁式探针环化连接特异性的影响

2.3 锁式探针的特异性验证

实验设计的锁式探针分别与高浓度的HBV野生型和突变型模板(终浓度1 μmol/L)在上述建立的条件下进行环化连接反应,反应结束后用核酸外切酶*Exon* Ⅰ切除未连接的探针,连接反应产物电泳结果如图3所示。结果显示探针与野生型模板特异识别,杂交结合后被连接成环,从而不被核酸外切酶切除,电泳条带明亮。突变型模板中由于基因位点突变,不存在探针结合的特异序列,探针不能与模板结合,因此探针未能连接成环,仍保持线状而被*Exon* Ⅰ消化,电泳结果无条带出现,证明本实验针对HBV的替诺福韦耐药位点设计的锁式探针具有较强的特异识别能力。



M:标准;1:野生型模板连接产物;2:突变型模板连接产物

图3 锁式探针环化连接产物电泳结果

2.4 RCA反应的特异性验证

用双循环RCA检测终浓度分别为500 fmol/L、5 pmol/L、50 pmol/L、500 pmol/L的突变型模板,探讨RCA反应的特异性。电泳结果显示各浓度的突变型模板均未见明显扩增产物条带(图4),证明本实验所建立的RCA反应特异性强。

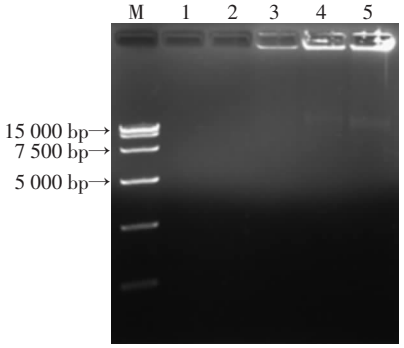


M:标准;1:空白对照;2~5:分别为500 fmol/L、5 pmol/L、50 pmol/L和500 pmol/L突变型模板扩增产物

图4 双循环RCA检测不同浓度的HBV替诺福韦耐药突变位点

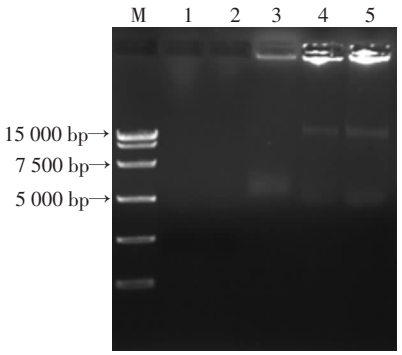
2.5 RCA反应的最低检测浓度

采用单循环RCA和双循环RCA反应检测不同浓度野生型模板,RCA产物电泳结果显示,单循环RCA在模板终浓度5 pmol/L以下均未见扩增产物,模板终浓度50 pmol/L以上均可见明亮条带,表明单循环RCA的最低检测浓度为50 pmol/L(图5)。双循环RCA在模板终浓度500 fmol/L以下均未见明显条带,模板终浓度5 pmol/L以上均可见明亮条带(图6),并且条带亮度明显强于单循环RCA。结果提示,双循环RCA的最低检测浓度为5 pmol/L,其检测灵敏度较单循环RCA反应提高了10倍,能较好地满足低病毒载量标本的检测。



M:标准;1:空白对照;2~5:分别为5、50、500 pmol/L和5 nmol/L的模板扩增产物

图5 不同浓度HBV替诺福韦耐药位点野生型模板的RCA产物检测



M:标准;1:空白对照;2~5:分别为500 fmol/L、5 pmol/L、50 pmol/L和500 pmol/L模板扩增产物

图6 不同浓度HBV替诺福韦耐药位点野生型模板的双循环RCA产物检测

3 讨论

目前,HBV等病毒耐药性监测需先用PCR技术对

病毒靶基因进行扩增,再通过测序技术分析基因的突变位点。该方法耗时,且费用较高,不能满足高通量、快速临床监测的需要。锁式探针结合 RCA 技术是一种检测基因位点突变的新方法,通过锁式探针特异识别靶基因的点突变位点,RCA 放大检测信号。该方法不需特殊设备、操作简单、特异性好、灵敏度高,在病原体耐药位点突变检测方面具有独特优势[3-5]。

不同种类的连接酶会影响探针识别和环化连接的特异性。有研究者发现用 T_4 连接酶时,探针会发生自成环连接的现象,而 *E. coli* 连接酶则不存在这种问题[6]。探针自成环连接会导致后续 RCA 反应的背景条带干扰,严重影响检测的特异性[7]。本实验采用 *E. coli* 连接酶,在高浓度(终浓度 1 μmol/L)的突变型模板的环化连接实验和空白对照实验中均未见产物生成,而野生型模板的环化产物条带清晰、明亮。结果证明采用 *E. coli* 连接酶,探针不会发生自成环连接,同时也提示我们设计的锁式探针特异性强,可准确识别检测模板中的单个碱基突变,能够用于 HBV 耐药基因的检测。

RCA 扩增反应首先取决于锁式探针的环化连接反应,而探针与模板的杂交温度是影响连接效率的关键因素[8]。本实验结果显示,当杂交温度为 45 ℃时,探针环化连接的效率最高、连接反应的特异性最好,结果与 Su 等[8]的研究相似。目前,杂交温度影响探针连接效率的具体原因尚不清楚。我们推测可能是:温度越高,探针与模板越易处于解离状态,不利于两者的杂交;温度过低,探针与模板会发生部分非特异性配对,最终可能导致探针的 5′端末端与 3′端末端未能处在相邻位置,连接反应无法进行。Su 等[8]报道了利用电化学发光法检测 RCA 产物,检测限可达10 fmol/L。本实验中使用琼脂糖凝胶电泳方法检测扩增产物,单次 RCA 扩增的检测限仅为 50 pmol/L。为了提高该方法的检测灵敏度,我们特意在设计的锁式探针的中间序列加入了限制性核酸内切酶 *Hpa* Ⅰ的酶切位点-GTTAAC-,在双循环 RCA 时,可用 *Hpa* Ⅰ酶切第 1 次 RCA 的扩增产物,从而游离出更多的模板(扩增产物为含大量模板重复单位的 DNA 长链),有利于新一轮的 RCA。结果显示,双循环 RCA 方法可将检测限提升至 5 pmol/L,检测灵敏度提高了 10 倍。有研究报道 RCA 产物的生成主要在反应的前 100 min,在 30 min 内将模板复制1 000 倍以上,100 min 后扩增速度将逐渐减缓[6,8]。为了合成更多模板产物,我们将扩增时间延长至 2 h。另外,本研究使用的 phi29 DNA 聚合酶 DNA 链置换能力强,理论上可合成长度超过 70 000 bp 的单链[9]。本实验证实单次扩增的检测限为 50 pmol/L,而我们设计的探针长度为 78 bp,按理论值计算双循环 RCA 检测限可提高至 50 fmol/L,但研究结果显示双循环 RCA 的检测限仅为 5 pmol/L。原因可能为:①第 1 次RCA 产物酶切不够彻底。扩增产物为长度约 70 000 bp 的 DNA 单链。单链间或单链自身相互缠绕,导致 *Hpa* Ⅰ酶切位点无法充分暴露,酶切不彻底。②实验发现,终浓度 10 pmol/L 的模板2 h 内单次 RCA 的产物长度大部分约为 5 000 bp,即仅仅复制了60 倍,其原因尚不清楚,可能是环化探针量少,其与 DNA 聚合酶、引物结合形成扩增复合体所需时间更长。

本研究利用锁式探针对单碱基突变的特异识别作用,建立了检测 HBV 替诺福韦耐药位点的 RCA 技术,不仅方法检测特异性高,而且使用了双循环 RCA,成功将检测限提高到 5 pmol/L,具有较高的检测灵敏度,有望作为一种 HBV 替诺福韦耐药位点检测的新方法。

参考文献:

[1] Conze T, Shetye A, Tanaka Y, *et al*. Analysis of genes, transcripts, and proteins *via* DNA ligation[J]. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2009, 2: 215-39.

[2] Huang Y Y, Hsu H Y, Huang C J. A protein detection technique by using surface plasmon resonance (SPR) with rolling circle amplification (RCA) and nanogold-modified tags[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(6): 980-985.

[3] Wang B, Potter S J, Lin Y, *et al*. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2339-2344.

[4] Cheng Y, Li Z, Zhang X, *et al*. Homogeneous and label-free fluorescence detection of single-nucleotide polymorphism using target-primed branched rolling circle amplification[J]. Anal Biochem, 2008, 378(2): 123-126.

[5] Lizardi P M, Huang X H, Zhu Z, *et al*. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification[J]. Nat Genet, 1998, 19(3): 225-232.

[6] Kuhn H, Frank-Kamenetskii M D. Template-independent ligation of single-stranded DNA by T4 DNA ligase[J]. FEBS J, 2005, 272(23): 5991-6000.

[7] Nallur G, Luo C, Fang L, *et al*. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(23): E118.

[8] Su Q, Xing D, Zhou X. Magnetic beads based rolling circle amplification-electrochemiluminescence assay for highly sensitive detection of point mutation[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(7): 1615-1621.

[9] Blanco L, Bernad A, Lazaro J M, *et al*. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication[J]. J Biol Chem, 1989, 264(15): 8935-8940.

(**收稿**:2013-02-06;**修回**:2013-03-01)

(编辑 邓强庭)