DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.018
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0039-04

论著

链置换扩增技术的影响因素研究

蒋天伦[1],府伟灵[1],张 波[1],陈 鸣[1],张 雪[1],赵树铭[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]检验科;[2]输血科;重庆 400038)

提 要:目的 探索限制酶、聚合酶、缓冲体系和DTT等对链置换扩增(SDA)实验的影响,以期在商品化试剂条件下组建SDA系统。方法 以结核菌IS6110序列为扩增对象设计SDA引物,利用商品化的BsoBI和exo-Bst为实验用酶建立SDA实验系统。对比在不同BsoBI、exo-Bst浓度条件下SDA产物的电泳条带亮度来观察限制酶、聚合酶对SDA效率的影响;对比SDA在pH 7.6的磷酸盐缓冲液和以Tris-HCl为缓冲体系的NE Buffer2、ThermoPol Buffer和EcoPol Buffer中的产物电泳条带的方法来观察不同缓冲体系对SDA效率的影响;对比加入DTT和不加DTT时SDA产物的电泳条带亮度来观察DTT对SDA效率的影响。结果 ①在0.1~0.4U/μl浓度范围内,SDA的扩增率与BsoBI含量正相关,而0.8 U/μl BsoBI反而使SDA受到抑制。②在0.08~0.32U/μl浓度范围内exo-Bst用量对SDA的扩增能力没有显著影响;③SDA可以在pH 7.6的磷酸盐缓冲液和ThermoPol Buffer中进行,而不能在NE Buffer2和EcoPol Buffer中进行;④DTT对SDA的扩增率和特异性都没有显著影响。结论 以上实验结果表明在商品化试剂条件下可以构建SDA系统,并得到良好的扩增效果。

关键词:链置换扩增;等温扩增;核酸;结核菌
中图法分类号:R345;R394-3;R394.2 文献标识码:A

Influential factors of strand displacement amplification system with commercial reagents

JIANG Tian-lun, FU Wei-ling, ZHANG Bo, CHEN Ming, ZHANG Xue, ZHAO Shu-ming (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of the restriction endonuclease, polymerase, buffer system, BSA and DTT on strand displacement amplification (SDA) reaction and establish SDA reaction system with commercial reagents. **Methods** The *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 segment was used as the detecting target and the corresponding primers were designed, experiment SDA system was finally established with commercial *BsoB*Ⅰ and exo-*Bst* (both from New England Biolabs) as SDA enzymes. The influences of the restriction endonuclease and the polymerase on SDA were obtained by comparing the brightness of the electrophoresis bands of SDA products in the systems with different *BsoB*Ⅰ and exo-*Bst* concentrations. The effects of the buffers on SDA were explored through the comparison of the SDA products with electrophoresis in phosphate buffer (pH=7.6) and the Tris-HCl buffers (including NE Buffer2, ThermoPol Buffer and EcoPol Buffer). Electrophoresis was also used to study SDA with DTT or without. **Results** The concentration of *BsoB*Ⅰ had a strong effect to the SDA rate, but in a certain concentration range. While, exo-Bst concentration had no effect in this event. SDA reactions worked well in ThermoPol Buffer. The DTT was observed having no effect on SDA reaction. **Conclusion** The results show that SDA works well with commercial available reagents.

Key words: strand displacement amplification; isothermal amplification; nucleic acid; *Mycobacterium tuberculosis*

随着基因检测与研究的不断升温,各种相应的分子生物学技术不断涌现。这些方法要实现对微量样品的核酸检测与分析,仍然要以核酸扩增作为基础。与PCR这一经典的核酸扩增技术相比,链置换扩增(SDA)作为一种恒温扩增方法,其优点是无需温度循环[1]。这一特性使得SDA能与很多新兴的核酸检测技术如DNA传感器技术实现有机结合。但是,目前文献[2~6]报道的限制酶使用量都远远高于商品化试剂可能获得的浓度,这严重影响了SDA方法的推广使用。本实验以结核菌IS6110序列为扩增对象、以商品化的BsoBI限制酶和exo-Bst聚合酶作为SDA实验用酶,对限制酶、聚合酶、缓冲体系以及二硫苏糖醇(DTT)等对SDA的影响进行了探索。

1 材料与方法

1.1 试剂

结核菌标准菌株(由重庆市肺科医院钟敏女士惠赠);BsoBI、exo-Bst(购自 *New England Biolabs*);dNTP(购自华美生物工程公司);SDA引物:B1(5′-CAGCCGCCGCGAGC-3′)、B2(5′-AGGGTTAGCCACAC-3′)、S1(5′-CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGTCGATGGCGAACTCA-3′)、S2(5′-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGTGGGCACCGTAAACA-3′);低熔点琼脂糖(购自Promega公司);血液DNA(小量)抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公

基金项目:国家"九五"科技攻关项目(96-A23-04-04);国家自然科学基金资助面上项目(39870831);国家高技术计划生物技术领域青年基金资助项目("863"项目);全军"九五"医学科研计划资助面上项目(98MO94);全军"十五"医学科研计划资助面上项目(01MA180);全军"十五"医学科研计划指令性课题(01LO65);重庆市科委风险投资基金资助项目
作者简介:蒋天伦(1972—),男,四川省犍为县人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事基因传感器方面的研究。电话:(023)68753687
通信作者:赵树铭(E-mail:shumingzhao@yahoo.com)
收稿日期:2001-10-30;修回日期:2001-12-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

司)；DTT(购自 SIGMA)。

1.2 仪器

BIO-RAD SartSpec™ 3000；PE-2400 PCR 扩增仪；电泳仪。

1.3 研究内容与方法

1.3.1 提取结核菌基因组 DNA 用血液 DNA(小量)抽提试剂盒提取结核菌基因组 DNA(按试剂盒说明操作)；用 BIO-RAD SartSpec™ 3000 定量后以 2 mmol/L Tris 稀释为 1 mg/L，1 μg/L，1 ng/L，1 pg/L 和 1 fg/L。

1.3.2 BsoBI 用量与 SDA 扩增效率关系实验 SDA 反应在 35 mmol/L K_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液(pH= 7.6，25 ℃)中进行。采用固定 exo-Bst 的用量为 0.16 U/μl，改变 BsoBI 的用量为：0.1、0.2、0.4 和 0.8 U/μl，观察 BsoBI 的用量对 SDA 扩增率的影响。采用电泳方法分析结果，方法见“1.3.6”。

1.3.3 exo-Bst 用量与 SDA 扩增率关系实验 SDA 反应在 35 mmol/L K_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液(pH= 7.6，25 ℃)中进行。采用固定 BsoBI 的用量为 0.2 U/μl，改变 exo-Bst 的用量为：0.08、0.16 和 0.32 U/μl，观察 exo-Bst 的用量对 SDA 扩增率的影响。采用电泳方法分析结果，方法见“1.3.6”。

1.3.4 缓冲体系对 SDA 的影响实验 固定 BsoBI 的用量为 0.2 U/μl，exo-Bst 的用量为 0.16 U/μl。观察 SDA 在 35 mmol/L K_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液(pH= 7.6，25 ℃)、NE Buffer2、ThermoPol Buffer 和 EcoPol Buffer 中的扩增情况。采用电泳方法分析结果，方法见“1.3.6”。

1.3.5 DTT 对 SDA 的影响实验 SDA 反应在 35 mmol/L K_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液(pH= 7.6，25 ℃)中进行。固定 *BsoB* I 的用量为 0.2 U/μl，exo-Bst 的用量为 0.16 U/μl。观察加入 DTT 至终浓度为 1 mmol/L 和不加 DTT 时，SDA 的扩增情况。采用电泳方法分析结果，方法见“1.3.6”。

1.3.6 电泳检测

1.3.6.1 电泳条件 1× TAE，2.5% 筛分型琼脂糖凝胶，5V/cm DC 电泳 60 min。

1.3.6.2 上样 SDA 产物各取 10 μl 加 6× 上样缓冲液 2 μl，全酶切 pBR322 DNA marker 的上样量为 1.5 μl。上样顺序如下：①BsoBI 用量与 SDA 扩增效率关系的实验：BsoBI 用量为 0.8、0.4、0.2、0.1 U/μl 时的 SDA 产物与全酶切 pBR322 DNA marker；②Bst 用量与 SDA 扩增效率关系的实验：exo-Bst 用量为 0.32、0.16 和 0.08 U/μl 时的 SDA 产物与全酶切 pBR322 DNA marker；③缓冲体系对 SDA 的影响实验：全酶切 pBR322 DNA marker、EcoPol Buffer、ThermoPol Buffer、NE Buffer2、35 mmol·L^{-1} K_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液(pH= 7.6，25 ℃)中的 SDA 产物；④DTT 对 SDA 的影响实验：加入 DTT、不加入 DTT 时的 SDA 扩增产物。

1.3.6.3 电泳结果检测 紫外凝胶分析仪下观察扩增条带情况并分别照相。

2 结果

2.1 BsoBI 浓度对 SDA 扩增影响

第 1 泳道为 BsoBI 用量为 0.8 U/μl 的 SDA 产物，第 2 泳道为 BsoBI 用量为 0.4 U/μl 的 SDA 产物，第 3 泳道为 BsoBI 用量为 0.2 U/μl 的 SDA 产物，第 4 泳道为 BsoBI 用量为 0.1 U/μl 的 SDA 产物，第 5 泳道为全酶切 pBR322 DNA marker，见图 1。可见 SDA 的主产物条带在 90 bp 左右，各泳道条带亮度从亮到暗依次为第 2 泳道、第 1 泳道、第 3 泳道、第 4 泳道；第 1 泳道的非特异产物条带的亮度强于第 2 泳道，而第 3、第 4 泳道只有 1 条主产物条带。显示出 SDA 的扩增率在 BsoBI 浓度 0.1～0.4 U/μl 范围内随 BsoBI 用量增加而增加，但 0.8 U/μl 的 BsoBI 将导致多条扩增带的出现。用量为 0.4 U/μl 时 SDA 的扩增效率达到最佳。

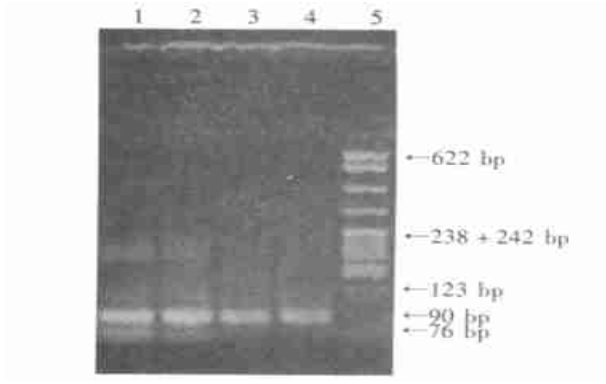


图 1 不同 **BsoBI** 浓度的 **SDA** 产物电泳

Fig 1 Electrophoresis of SDA products with *BsoB* I at different concentrations

1：0.8 U/μl；2：0.4 U/μl；3：0.2 U/μl；4：0.1 U/μl；5：pBR322 DNA marker

2.2 exo-Bst 浓度对 SDA 扩增的影响

第 1 泳道是 exo-Bst 为 0.32 U/μl 的 SDA 产物，第 2 泳道是 exo-Bst 为 0.16 U/μl 的 SDA 产物，第 3 泳道是 exo-Bst 为 0.08 U/μl 时 SDA 的产物，第 4 泳道为全酶切 pBR322 DNA marker，见图 2。可见第 1、2、3 泳道的主产物亮度等都没有明显差异。说明只改变聚合酶 exo-Bst 的用量对 SDA 的扩增率几乎没有影响，0.08 U/μl 就可以获得良好的效果。

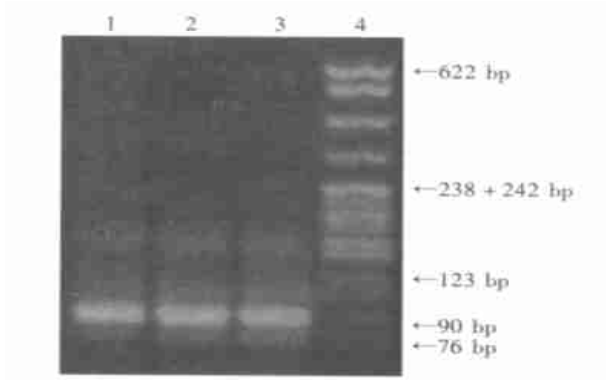


图 2 **exo-Bst** 用量与 **SDA** 效率实验电泳

Fig 2 Electrophoresis of SDA products with exo-*Bst* at different concentrations

1：0.32 U/μl；2：0.16 U/μl；3：0.08 U/μl；4：pBR322 DNA marker

2.3 缓冲体系对 SDA 的影响

第 1 泳道为全酶切 pBR322 DNA marker，第 2 泳道为以 EcoPol Buffer 为缓冲系统的 SDA 的产物，第 3 泳道为以 ThermoPhol Buffer 为缓冲系统的 SDA 的产物，第 4 泳道为 SDA 在 NEBuffer2 中的扩增情况，第 5 泳道为以磷酸盐缓冲液为缓冲体系的 SDA 的产物。第 5 泳道有很强的扩增，但同时 smear 现象也最严重；第 3 泳道也有很好的扩增，产物的 smear 现象在主产物附近也不是很严重；第 2、4 泳道的扩增很差，也未见 smear 现象，见图

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3。 说明SDA 在 ThermoPhol Buffer 也可以进行。

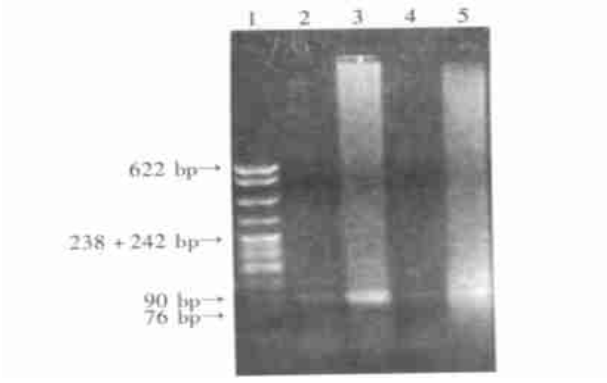


图 3　在不同缓冲液中的 SDA 产物电泳

Fig 3　Electrophoresis of SDA products in different buffers

1: pBR322 DNA marker; 2: EcoPol Buffer; 3: ThermoPol Buffer; 4: NE Buffer; 5: phosphate buffer at pH 7.6

2.4　DTT 对SDA 的影响

第 1、第 2 泳道的扩增率与 smear 现象都没有明显区别, 见图4。 说明 DTT 不是 SDA 实验的重要影响因子, 对 SDA 扩增实验的扩增率和特异性都没有太大的影响。

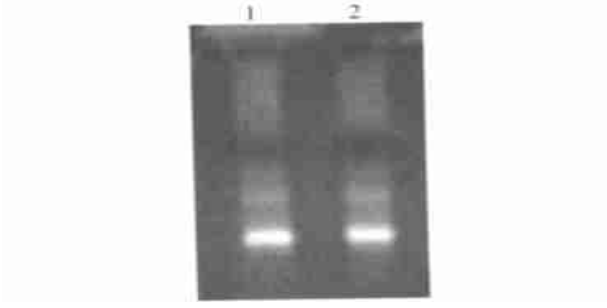


图 4　加入和不加 DTT 时 SDA 产物的电泳

Fig 4　Electrophoresis of SDA products with or without DTT

1: With DTT; 2: Without DTT

3　讨论

3.1　SDA 及其基本原理

链置换扩增(链替换扩增)技术利用某些限制酶能在其半修饰位点形成单链切口的特性、某些聚合酶的链置换能力和特殊设计的引物的有序引导来实现核酸的恒温扩增。

SDA 的过程可以分为从待扩核酸形成 SDA 扩增子(amplicon)与 SDA 扩增子的链置换扩增两个阶段。在第一阶段, 由于 B 引物被设计为结合于模板上紧邻 S 引物的 5′侧, B 引物引导的扩增能将 S 引物引导的新合成链置换下来, 被置换下来的单链又与另一 B、S 引物结合并再次由 B 引物引导的扩增置换下 S 引物引导的新合成链, 该链与其互补的 S 引物结合并被延伸得到一端为 S1 另一端为 S2 的双链 DNA 片段, 即 SDA 扩增子[5], 进入下一阶段的反应(B 引物延伸模板得到的双链不再参与反应)。 在第二阶段, 首先是限制酶在其半修饰位点形成单链切口, 然后聚合酶延伸切口将 SDA 扩增子复原, 同时置换下一条单链片段。该片段被一条 S 引物引导形成另一种形式的 SDA 扩增子继续参与反应。这个过程不断重复, 使得靶核酸片段在同一温度下被快速扩增。

3.2　限制酶对SDA 的影响

在本实验中, SDA 的扩增率在 BsoBI 浓度 0.1 ~ 0.4 U/μl 范围内随 BsoBI 浓度的升高而增加, 在 BsoBI 为0.8 U/μl 时反而不如 BsoBI 为 0.4 U/μl 时的效率。这可以说明限制酶是 SDA 反应的限速因子, 但用量不能太高。国外文献报道也认为限制酶是 SDA 反应的限速因子, 本实验证实了这种观点; 但文献[5] 报道的限制酶的用量都非常高, 而我们的实验结果却显示过高的限制酶浓度会抑制 SDA 反应。这可能与我们采用的 BsoBI 为商品化试剂, 浓度较低, 在提高 BsoBI 浓度的同时增加了 SDA 系统甘油含量所致, 但还需要进行实验验证。不过, 本实验说明商品化的 BsoBI 能够满足 SDA 的实验需要。

3.3　聚合酶用量对SDA 扩增率的影响

国外文献报道的 SDA 系统一般采用 0.16 U/μl 的 exo-Bst。本实验发现把 exo-Bst 的用量从 0.08 U/μl 提高到 0.32 U/μl SDA 的扩增效率没有明显变化, 说明聚合酶不是 SDA 的限速酶。因为 0.08 U/μl 的 exo-Bst 就能满足 SDA 的实验需要, 所以商品化的聚合酶足以满足SDA 的需要。

3.4　缓冲液对SDA 的影响

目前已经报道的文献都是采用 pH 7.6 的磷酸盐缓冲液。由于磷酸盐缓冲液中的磷酸根离子与镁离子容易形成沉淀, 使得镁离子必须在临用前加入, 因而以磷酸盐为缓冲液时的 SDA 试剂准备和实验操作都比较复杂。考虑到 BsoBI 和 exo-Bst 酶的厂商推荐缓冲液采用的是 Tris-HCl 缓冲对, 说明磷酸盐缓冲液并不是 BsoBI 和 exo-Bst 酶活性所必须。因此本实验探索了 SDA 在以非磷酸盐为缓冲对的 NEBuffer 2、EcoPol Buffer 和 ThermoPol Buffer 中的扩增情况。实验显示, SDA 在 ThermoPol Buffer(exo-Bst 酶的推荐缓冲液)中能很好工作, 说明 Tris-HCl 缓冲液也可以作为 SDA 实验的缓冲体系。对比 ThermoPol Buffer 与 NEBuffer 2 和 EcoPol Buffer, 他们最大的差别是缓冲液的 pH 值: ThermoPol Buffer 的 pH 为 8.8, NEBuffer 2 的 pH 值为 7.9, EcoPol Buffer 的 pH 值为 7.5。这提示缓冲液的 pH 值是导致 SDA 在 NEBuffer 2 和 EcoPol Buffer 中扩增不良的原因。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由于 Tris-HCl 缓冲液的 pH 值随温度变化很大[7](温度每升高 1 ℃, 缓冲液的 pH 值约降低 0.028), 在 SDA 的反应温度下, 只有 ThermoPol Buffer 的 pH 接近 7.6, 而 NEBuffer 2 和 EcoPol Buffer 的 pH 则已经低于 7.0, 所以在 ThermoPol Buffer 中能进行 SDA 而在 NEBuffer 2 和 EcoPol Buffer 则几乎不行。因此, 如果选用 Tris-HCl 缓冲液为 SDA 缓冲体系, 则要考虑配制试剂温度与 SDA 反应温度之差对 pH 值的影响。

3.5 DTT 对 SDA 的影响

国外文献报道的 SDA 系统一般都采用了 DTT, 原因不太清楚。由于本实验中未发现 DTT 对 SDA 的扩增率和特异性有影响, 因而我们认为没有必要使用 DTT。

本研究旨在探索利用商品化试剂来建立 SDA 实验系统的可能性。经对限制酶用量、聚合酶用量对 SDA 的影响实验, 证实商品化试剂能够满足 SDA 实验的需要。另外, 实验还证实 Tris-HCl 缓冲液也可以用作 SDA 的缓冲系统, 这使得 SDA 的试剂准备和实验操作可以得到大大简化。

参考文献:

[1] Walker G T, Little M C, Nadeau J G, *et al*. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(1): 392—396.

[2] Walker G T, Fraiser M S, Schram J L, *et al*. Strand displacement amplification--an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(7): 1 691—1 696.

[3] Spargo C A, Haaland P D, Jurgensen S R, *et al*. Chemiluminescent detection of strand displacement amplified DNA from species comprising the Mycobacterium tuberculosis complex[J]. Mol Cell Probes, 1993, 7(5): 395—404.

[4] Little M C, Spears P A, Shank D D. Nucleotide sequence and strand displacement amplification of the 70K protein gene from mycobacteria[J]. Mol Cell Probes, 1994, 8(5): 375—384.

[5] Spargo C A, Fraiser M S, Van Cleve M, *et al*. Detection of M. tuberculosis DNA using thermophilic strand displacement amplification[J]. Mol Cell Probes, 1996, 10(4): 247—256.

[6] Walker G T. Empirical aspects of strand displacement amplification[J]. PCR Methods Appl, 1993, 3(1): 1—6.

[7] 姜 泊, 张亚历, 周殿元 主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 193.

(编辑 王 红)

消息

第二次缺氧和呼吸病理生理国际学术会议 暨第七次全国缺氧和呼吸病理生理学术会议征文通知

由中国病理生理学会缺氧和呼吸专业委员会、中华医学会高原医学分会及第三军医大学联合主办的第二次缺氧和呼吸病理生理国际会议将于 2002 年 10 月 15 至 17 日在重庆举行。由中国病理生理学会缺氧和呼吸专业委员会举办的第七次全国缺氧和呼吸病理生理学术会议同时召开。

会议将邀请国内外知名专家主讲专题报告, 介绍有关领域的最新研究进展和前沿。会议交流(包括论文口头报告和论文张贴)以英语进行。

征文内容: ①高原医学及缺氧病理生理学: 对高原缺氧的习服—适应机制及促进习服的措施; 急性高原病的发病机制和防治原则; 慢性高原病的发病机制及防治原则; 间歇性缺氧的生物学效应及机制; 氧感受; 其他有关内容。②呼吸疾病的病理生理学: 呼吸窘迫综合征的发病机制及防治原则; 肺心病的发病机制及防治原则; 全身性炎症反应综合征与肺损伤; 支气管哮喘的发病机制及防治原则; 肺水肿的发病机制; 过氧亚硝基阴离子与肺损伤; 睡眠呼吸暂停综合征; 其他有关内容。

征文要求: ①提交的论文应包括中文摘要(字数限 800 字以内)和英文摘要(限 2000 字符以内, 不计空格)各一式两份。中英文摘要均应以 Microsoft Word 编辑打印。提交论文的同时还应提交计算机软盘, 文件应以"***.doc"格式保存。也可以电子邮件方式投稿, 稿件应以附件形式(Word 文档)发送至 ichrp@yahoo.com.cn。②中英文摘要均应加盖作者单位公章, 注意不可泄密, 文责自负。③摘要格式: 论文题目、作者、单位(包括所在城市、邮政编码)。内容应列出目的、方法、结果、结论。不符合要求者, 恕不接受。④论文应为未在国外刊物公开发表或未在国际会议交流者。⑤每篇论文中、英文摘要共需交纳审稿费人民币 50 元, 由邮局汇寄不可经银行汇款。⑥入选之中文论文摘要将由《中国病理生理杂志》刊登, 另付版面费(另行通知), 入选的英文摘要纳入《会议论文摘要汇编》。会议对英文摘要文有修改权。⑦征文截止日期: 2002 年 4 月 31 日。

来稿及汇款请寄: 重庆市(400038)高滩岩第三军医大学高原医学研究室 马红英 收

联系电话: (023)68753335; E-mail: ichrp@yahoo.com.cn

第二次缺氧和呼吸病理生理国际学术会议
暨第七次全国缺氧和呼吸病理生理学术会议筹备委员会

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net