

## HRCA 技术在转基因植物检测中的应用

陶 震 蔡兴锋 颜志强 胡小波 杨胜利 龚 毅\*

(中国科学院上海生命科学研究院生物工程研究中心,上海 200233)

**摘 要** 超分支滚环扩增技术(Hyperbranched rolling cycle amplification, HRCA)在近几年中逐渐引起人们的注意,并越来越多的用于基础研究和实际检测中。在本文中我们对该技术在转基因植物检测中的应用情况作了较全面的探索,根据 4 种转基因植物中常用的外源基因或 DNA 片段设计了 4 条锁式探针(Padlock probe),利用质粒 pKK232-8 中的一段序列作为锁式探针中的共同连接部分,并根据该共同的连接部分序列设计一对通用的 HRCA 引物,利用同位素标记的锁式探针对 HRCA 反应中的连接一步的特异性研究表明,只有当锁式探针和相应的检测靶 DNA 同时存在于连接体系中时,锁式探针才能被有效地进行连接,从线性分子变为环型分子,在没有相应靶 DNA 存在时锁式探针仅以线性形式存在。连接时间的研究表明,如果所检测的靶 DNA 是质粒或较短的 DNA 片段时,较短的连接时间(5~10min)就可以取得理想的最终检测结果,如果检测的靶 DNA 是复杂的植物基因组 DNA 时,连接时间需要较大程度的延长(30~60min)才能取得理想的最终检测结果,HRCA 的反应时间研究表明,较长的反应时间可以明显增加最终产物的量,对 *Bst* DNA 聚合酶大片段酶用量的研究表明,在其它条件不变的情况下酶的用量可以在较大的范围内变化(0.5u~4u)而不影响最终检测结果,在上述研究的基础上,对转基因烟草进行实际检测,取得了与预期一致的理想结果。为了提高检测效率,仿效复合式 PCR(Multiplex PCR, MPCR)的原理采用复合式 HRCA(Multiplex HRCA, MHRCA)方法对转基因烟草进行检测,并利用反向点杂交进行结果分析,取得同预期完全一致的结果。我们的研究表明 HRCA 方法完全可以用于转基因植物的检测,而且其使用比 MPCR 技术更方便,效率更高。

**关键词** HRCA, 锁式探针, 转基因植物

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0294-07

滚环扩增技术(Rolling cycle amplification, RCA)在近几年中逐渐引起人们的注意,并越来越多的用于基础研究和实际检测中。可以简单的将 RCA 反应分为锁式探针(Padlock probe)<sup>[1]</sup>的连接和连接后的扩增两部分。锁式探针由 5'端和 3'端特异性序列部分和它们之间的连接序列组成;5'端和 3'端特异性序列部分同靶 DNA 上的互补区域结合,并且结合后锁式探针的 5'端和 3'端是紧密相邻的,可以在连接酶的作用下形成环型 DNA 分子;成环后的锁式探针在一个引物和合适的 DNA 聚合酶作用下可以进行滚环复制,对环型探针进行扩增。滚环复制在自然界中是许多质粒和病毒的复制方式<sup>[2-3]</sup>,在实验室的人工体系中,可以模拟这种 DNA 复制方式,对环形 DNA 进行复制<sup>[4]</sup>。超分支滚环扩增(Hyper-

branched rolling cycle amplification, HRCA)也有文献将其称为级联滚环扩增,cascade rolling cycle amplification (CRCA)是在滚环复制的基础上增加一个序列同锁式探针中部分序列相同的引物,即在两个引物存在下产物以超分支形式扩增<sup>[5-6]</sup>,可在 1h 内对 10 个靶分子进行扩增,扩增倍数达 10<sup>7</sup> 倍<sup>[7]</sup>。HRCA 技术可用于单点核苷酸多态性研究、药物基因组研究等方面<sup>[8]</sup>。

在我们以前的研究中开发了一套利用复合式 PCR 对植物进行转基因背景检测的技术<sup>[9-10]</sup>;复合式 PCR 要求在同一个反应管中含有多对引物,在相同的条件下对多个靶位点进行同时检测;多对引物的存在,在实际反应中很可能会相互干扰,而且在引物设计时很难使得各引物的复性动力学完全一致,

收稿日期 2002-10-21,修回日期 2003-02-24。

基金项目 国家科技攻关计划基金资助(No. 2001BA707B03)。

\* 通讯作者。Tel 86-21-64700892~369;Fax 86-21-64700244;E-mail yigong@srcb.ac.cn

这些都会增加确定反应条件时的工作量,而且随着引物的增多,工作量呈指数增加;而从理论上讲,HRCA 可以完全避免复合式 PCR 中遇到的麻烦;其一,锁式探针只同相应的靶位点进行互补结合,即便有多个锁式探针同时存在于一个检测体系中也不会相互干扰;其二,探针中的连接段部分对不同的锁式探针可以完全相同,并不影响对靶位点的检测;可以针对这段共同序列设计一对通用引物,用于所有锁式探针的扩增,因此无需考虑多对引物复性动力学一致性问题。本文中我们利用 4 个锁式探针对 HRCA 反应中的一些技术参数进行了研究,并将该技术应用在转基因烟草的检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒及植物材料** 质粒 pBI121、pKK232-8 为本实验室保存,转基因烟草及纯阴性烟草种子样品由中科院遗传研究所朱祯研究员提供,转基因烟草中的外源 DNA 片段及基因有花椰菜花叶病毒 35S RNA 基因的启动子(P35S),农杆菌 Ti 质粒中胭脂碱合成酶基因的启动子(PNOS),农杆菌 Ti 质粒中胭脂碱合成酶基因的终止子(TNOS), $\beta$ -葡糖醛酸酶基因(GUS)和新霉素磷酸转移酶基因(NPT-II),所用的质粒为 pCNPT-IIGUSA。

**1.1.2 酶和主要试剂** [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (10Ci/ $\mu$ L, 5000Ci/mmol) 购自北京亚辉生物医学工程公司;引物及探针由上海生工生物工程技术有限公司合成及修饰,ATP 也购自该公司;*Exo* I (20 u/ $\mu$ L), *Bst* DNA 聚合酶大片断(8u/ $\mu$ L) 购于上海基因有限公司;T4DNA 连接酶(350u/ $\mu$ L), T4 多聚核苷酸激酶(T4PNK) (10u/ $\mu$ L), 碱性磷酸酶(CIAP) (10 ~ 30u/ $\mu$ L), *Taq* I (4 ~ 12 u/ $\mu$ L) 购自上海皓嘉科技发展有限公司;Bio-14-dATP、Bio-14-dCTP、Murashige & Skoog Salt Mixture 植物培养基购于 GIBCOBRL 公司;Biodyne® C Membrane 购于 PALL Gelman Laboratory;EDC [1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐] 购于 Sigma 公司;NBT/BCIP 购于上海华舜生物工程有限公司;链抗碱性磷酸酶(Streptavidin Alkaline Phosphatase, SAP) 购自 Promega 公司;众智牌 84 消毒水(上海利康消毒高科技有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 烟草处理及 DNA 提取** 烟草种子, 37℃ 水浴浸泡 4 ~ 8h, 经 70% 乙醇, 15% ~ 20% 消毒水无菌处理后, 接种到 Murashige & Skoog 固体培养基上, 25 ~

28℃ 暗处放置 48h 后, 在光照下继续培养 1 周左右。此时可以用长出的小芽提取 DNA, 也可以将其转入三角瓶中继续培养。按照 Markus 的方法进行 DNA 提取<sup>[11]</sup>。

**1.2.2 锁式探针设计** 从质粒 pKK232-8 中选取一段序列作为锁式探针的连接段部分, 探针 5' 端及 3' 端各有 15 ~ 20 左右碱基作为锁式探针的特异识别区。每个锁式探针的这部分序列的  $T_m$  值尽量一致, 另外这两部分所检测的靶序列是连续的, 即当锁式探针同靶位点结合时, 探针的 5' 端和 3' 端是紧邻的。

**1.2.3 锁式探针的放射性标记** 锁式探针的放射性标记用 200 $\mu$ L 离心管进行, 体积 50 $\mu$ L, 体系如下<sup>[12]</sup>: 未磷酸化探针(3 pmol/ $\mu$ L) 5 $\mu$ L, 10 × T4PNK 缓冲液 5 $\mu$ L, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 5 $\mu$ L, T4PNK 2 $\mu$ L, 无菌双蒸水 33 $\mu$ L, 37℃ 45min, 标记产物置 -20℃ 保存。

**1.2.4 PAGE 胶电泳及曝光** 采用普通含 8mol/L 脲的 8% PAGE 变性胶电泳<sup>[13]</sup>;电泳结束后取出胶板, 用塑料膜包好, 80℃ 真空干燥 2h, 同 X 光片 -80℃ 曝光过夜, 取出 X 光片用普通显影、定影液处理。

**1.2.5 锁式探针的连接反应** 磷酸化的探针(不包括放射性标记探针)用下面的方法进行连接反应, 反应在 500 $\mu$ L 离心管中进行, 体积 20 $\mu$ L: 10 × T4 DNA 连接酶缓冲液 2 $\mu$ L, 磷酸化探针 8 $\mu$ L, DNA 模板 2 $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 2 $\mu$ L, 无菌双蒸水 6 $\mu$ L, 94℃ 2min, 37℃ 30min (温度降至 37℃ 时加酶, 具体反应时间在不同反应中会有所不同, 可以看结果中所述), 70℃ 10min。

**1.2.6 HRCA 反应** 根据锁式探针中共同的连接段序列设计一对引物, 称为 HRCA 通用引物。通用引物序列为: HRCA-S: 5' CTG GTG CTA CGC CTG AAT AAG TGA 3' 和 HRCA-A: 5' GGT GAA TCC GTT AGC GAG CTG 3'。用下面的方法进行 HRCA 反应, 反应在 500 $\mu$ L 离心管中进行, 体积 25 $\mu$ L: 10 × *Bst* 缓冲液 2.5 $\mu$ L, 连接反应产物 4 $\mu$ L, HRCA 通用引物(2.5 pmol/ $\mu$ L each) 6 $\mu$ L, dNTP (10mmol/L each) 1 $\mu$ L, *Bst* DNA 聚合酶 1 $\mu$ L, 无菌双蒸水 10.5 $\mu$ L, 如果进行生物素标记则在上述体系中加入 1 $\mu$ L Bio-14-dATP 或 Bio-14-dCTP, 无菌水量相应减少。94℃ 2min, 61℃ 90min (温度降至 61℃ 时加酶)。

**1.2.7 HRCA 反应产物的 *Taq* I 酶切** 15 $\mu$ L HRCA 反应产物中加 1 $\mu$ L *Taq* I, 65℃ 1h, 取 5 $\mu$ L 电泳检查。

**1.2.8 杂交探针的设计、固定、杂交及显色** 在杂交

探针设计时使探针自身二聚体的自由能  $\triangle G \geq -33.44\text{kJ/mol}$  ,3'端发夹结构  $\triangle G \geq -12.54\text{kJ/mol}$  ,最重要的是各探针间的  $T_m$  值应尽可能相近 ,71 ~ 75℃ ;可以通过调整探针的长度来达到此目的 ;另外普通探针的序列同相应锁式探针的序列特异性部分是互补的 ,探针设计是用引物及探针设计软件Primer Premier 5 进行的。

膜处理及探针固定依照 Zhang 的方法<sup>[14]</sup> :切成合适大小的 Biodyne® C 膜在 0.1mol/L HCl 中浸湿 ,用滤纸将表面吸干 ;在 20% EDC 中浸 15min ;无菌双蒸水漂洗 ,并用滤纸吸干表面水分 ;用适量经 NaH-CO<sub>3</sub> 稀释的氨基标记的探针点膜 ,室温放置 15min ; 0.1mol/L NaOH 洗 10min ;无菌双蒸水洗 4 ~ 5 次 ,风干后装入合适大小的杂交袋中室温保存待用。

生物素标记的 HRCA 产物沸水浴 30s ,冰浴 2min 使其彻底变性 ;15 ~ 20μL 上述产物同适量预热至 55℃ 的杂交液( 2 × SSC 0.1% SDS )混合 ,杂交液用量

为 80 ~ 100μL/cm<sup>2</sup> 膜 ;混合液加入杂交带中 ,封口机封口 ;55℃ 杂交 30min。

取出杂交膜 ,在 0.5 × SSC 0.1% SDS 中 55℃ 洗 10min ,倒掉洗液 ,并用相同洗液室温继续洗膜 10min ;膜在缓冲液 A( 0.1mol/L Tris pH 7.5 ,0.15 mol/L NaCl )中浸片刻 ,链抗碱性磷酸酶( SAP )用缓冲液 A 以 1/5000 稀释 ,并将膜置于其中 ,室温 10min ;取出膜 ,并用缓冲液 A 洗 2 次 ,每次 5min ;膜在缓冲液 C( 100 mmol/L Tris pH 9.5 , 100 mmol/L NaCl , 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> )中浸一下 ,然后转入显色溶液中( 10 mL 缓冲液 C 中含 66μL NBT 和 33μL BCIP ) ,室温显色。

## 2 结果

### 2.1 锁式探针序列

表 1 中列出的是 4 种锁式探针的序列及其相关参数。

表 1 锁式探针序列  
Table 1 Sequences of padlock probes

Name	Sequenc( 5' - 3' )	Target	Length
TPBGUS-HRCA	CCGTTGACTGCCTCTTC <b>ctggagtggtgaatccgttagcgaggtgcc</b> gcctcgacgaattctgccattcatccgttattatcacttattcag gcgtagcaccagCGCTTGCTGAGTTTCC	GUS	121bp
TPBNPT-HRCA	CTGCTATTGGGGCAAGT <b>tgagtggtgaatccgttagcgaggtgccgcctcgacgaattctgccattcatccgttattatcacttattc</b> aggcgtagcaccagCCGGGAAGGGACTGG	NPT-II	120bp
TPBCM-HRCA	CTTTGAAGACGTGGTITGG <b>tgagtggtgaatccgttagcgaggtgccgcctcgacgaattctgccattcatccgttattatcacttatt</b> caggcgtagcaccagAGATATCACATCAATCCACTTG	P35S	128bp
TPBNT-HRCA	GCTTAACGTAATTCAACAGAA <b>tgagtggtgaatccgttagcgaggtgccgcctcgacgaattctgccattcatccgttattatca</b> cttattcaggcgtagcaccagTGCATTACATGTTAATTATTACAT	TNOS	133bp

Capital bold are specific sequence of probes and small letters are common sequences of probes . “ tcga ” is the recognizing site of Taq I.

### 2.2 锁式探针连接反应研究

2.2.1 连接效率和专一性研究 连接反应是 HRCA 中关键的一步 ,为了验证连接反应的特异性及有效性 ,对全合成的锁式探针进行同位素标记 ,并对连接反应进行研究 ,图 1 是以锁式探针 TPBNPT - HRCA 为例的结果。未经任何处理的探针为线性( 图 1-1 ) ,线性探针经 CIAP 处理后所带放射性标记被除去 ,电泳无信号( 图 1-2 ) ;当 TPBNPT 作为模板存在时 ,探针经连接酶作用变成环型 ,电泳速度较线性探针慢( 图 1-3 ) ;由于环型 DNA 不是 CIAP 及 Exo-I 的作用底物 ,因此相应产物的电泳条带依然为环型探针( 图

1-4 ~ 5 ) 。当 pBI121 作为靶 DNA 存在时 ,探针经连接酶处理后成为环型 ,并且如同套在一个大环上的小环一样同质粒结合在一起 ,由于 pBI121 分子量较大( 13kb )而无法进入 8% 的胶中 ,聚集在点样孔处 ,同它结合的环型探针就在点样孔处产生信号 ,另外那些没有同 pBI121 结合的线性探针进入胶中 ,产生线性探针信号( 图 1-6 ) ;经过 CIAP 或 Exo-I 处理后 ,线性探针的放射性标记被去除或者整个线性探针被降解 ,而使其相应信号从胶中消失 ,但是环型探针因为不是它们的底物 ,从而依然因同 pBI121 结合而在点样孔产生信号( 图 1-7 ~ 8 ) 。

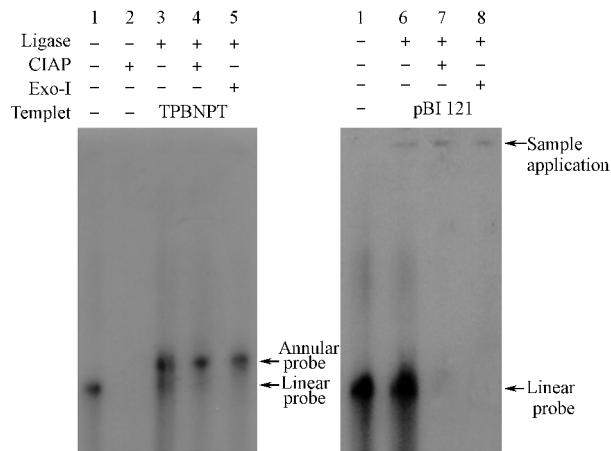


图 1 TPBNPT-HRCA 同位素标记及修饰酶处理结果

Fig.1 Results of isotope labeled and enzymes treated TPBNPT-HRCA

1. <sup>32</sup>P labeled TPBNPT-HRCA without treatment ;2. 3μL <sup>32</sup>P labeled TPBNPT-HRCA ,1μL 10 × CIAP buffer ,0.5μL CIAP ,5.5μL ddH<sub>2</sub>O ,37℃ 1hr ;3. 3μL <sup>32</sup>P labeled TPBNPT-HRCA ,1μL 10 × ligase buffer ,1μL TPBNPT ,0.5μL T4 ligase ,5.5μL ddH<sub>2</sub>O ;4. 3μL <sup>32</sup>P labeled TPBNPT-HRCA ,1μL 10 × ligase buffer ,1μL TPBNPT ,0.5μL T4 ligase ,4.5μL ddH<sub>2</sub>O ;5. 3μL <sup>32</sup>P labeled TPBNPT-HRCA ,1μL 10 × ligase buffer ,1μL TPBNPT ,0.5μL T4 ligase ,4.5μL ddH<sub>2</sub>O ;6~8. The same as 3~5 except that the template is pBI121. Ligation reaction :94℃ 2min ,37℃ 1h ;70℃ 10min ;For 4 5 7 8 add 0.5μL CIAP or Exo-I after ligation reaction ,37℃ 1h ;CIAP reaction 37℃ 1h

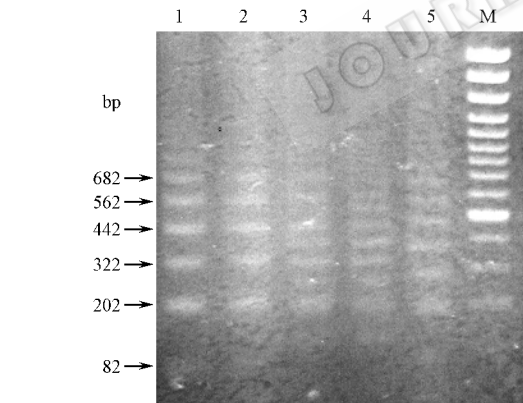


图 2 以转基因烟草为模板 , TPBNPT-HRCA 不同连接时间结果

Fig.2 TPBNPT-HRCA was ligated with different time under the existing of transgenic tobacco DNA ,then HRCA were done and 8μL products were detected by agrose gel electrophoresis.

1. 90min ;2. 60min ;3. 30min ;4. 20min ;5. 10min ;M. Marker

2.2.2 连接时间的研究 :以转基因烟草作为模板对线性锁式探针作连接反应 ,分别在连接 10min、20min、30min、1h 和 1.5h 时取出连接反应管 ,并 70℃

10min 使酶失活 ;从以上各反应管中取 4μL 做 HRCA ,反应结束后取 8μL 电泳检查。图 2 是以 TPBNPT-HRCA 做的连接时间研究结果。从电泳结果中可以看出 ,较长的连接时间效果要比短时间连接效果好 ,1h 和 1.5h 的连接产物作 HRCA 所得到的条带清晰而符合预期——长度最小的带为 82bp ,这是 HRCA 通用引物之间的距离 ,其它带的长度是 82 bp + N × 探针长度(对于 TPBNPT-HRCA 来说探针长度是 120bp ) ,比如带 202 = 82 + 120 ,322 = 82 + 2 × 120 ,其它带依此类推。

2.3 HRCA 反应时间、酶用量及不同连接产物量 HRCA 研究

用 1.2.6 中所述方法同时作 6 个 HRCA 反应 ,并分别在反应的 2.5min、5min、10min、15min、20min 和 30min 时取出一个反应管 ,置冰浴保存 ,全部反应结束后各取 10μL 电泳检查 ,当 HRCA 进行到 30min 时已经可以用肉眼看到清晰的扩增条带(结果未示)。

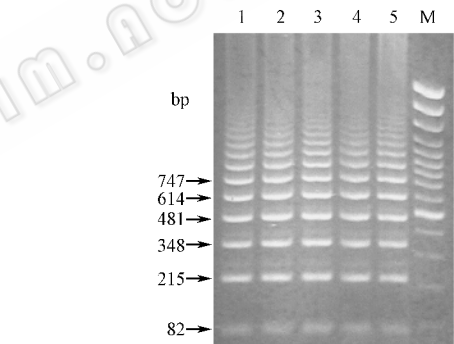


图 3 不同酶量的 HRCA 结果

Fig.3 HRCA with different units of enzyme

1. 4units ;2. 3units ;3. 2units ;4. 1units ;5. 0.5unit ;M. Marker

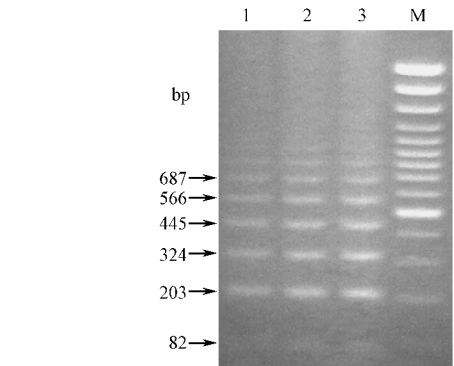


图 4 TPBGUS-HRCA 稀释后的 HRCA 结果

Fig.4 HRCA results with different diluted TPBGUS-HRCA

1. Diluted 1/100 after ligation ;2. Diluted 1/10 after ligation ;3. No diluted ;M. Marker

分别用 0.5u、1u、2u、3u 和 4u 酶量作 HRCA 反应 ,其它条件同 1.2.6 中所述一样 ;反应结束后各取 10 $\mu$ L 电泳检查 ,结果显示 ,不同酶量产生的结果差别不大。图 3 是用 TPBNT - HRCA 连接物所作 HRCA 结果 ,由图中可以看出 0.5u 的酶量已足以产生清晰明确的结果。

连接产物以 1/10 连续稀释 2 次 ,从中各取 1 $\mu$ L 做 HRCA ,酶量 0.5u ,反应结束后各取 10 $\mu$ L 电泳检查 ,图 4 是对 TPBGUS-HRCA 所做的结果 ,随着探针稀释程度的增加 ,HRCA 产物的量也相应减少。对其它锁式探针的研究也取得相似结果。

2.4 HRCA 检测及杂交结果

图 5 是利用 TPBCM-HRCA ,TPBNT-HRCA ,TPBNPT-HRCA 和 TPBGUS-HRCA 4 个探针对转基因烟草分别进行 HRCA 检测的结果。图 6A-D 是利用上述 4 个锁式探针分别对转基因烟草进行连接、HRCA 后杂交的结果 ,图 6E 是 4 个探针在同一反应管中对转基因烟草同时进行连接并 HRCA(复合式 HRCA)后杂交的结果。表 2 中列出了用于杂交检测的 4 个杂交探针的序列。

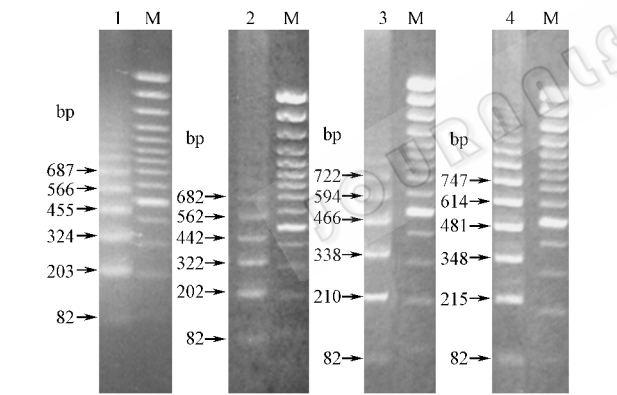


图 5 用 4 种锁式探针对转基因烟草的检测结果  
Fig.5 Detection results with tobacco GUS as template  
1~4. HRCA results obtained by TPBGUS-HRCA ,TPBNPT-HRCA , TPBCM-HRCA AND TPBNT-HRCA , respectively ; M. Marker.

表 2 杂交探针序列

Table 2 Sequences of probes for hybridization				
Name	Sequence( 5' - 3' )	Tm	GC%	
XTPBGUS	NH4-GAGGCAGTCAACGGGAAACTCAGCAA	74.8	55.6	
XTPBNPT	NH4-ACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTC	75.0	57.1	
XTPBCM	NH4-AATCCACTTGCTTTGAAGACGTGGTTGG	72.1	46.4	
XTPBNT	NH4-TTCTGTGAATTACGTTAAGCATGTAAT AATTAACATGTAATGCA	74.6	26.7	

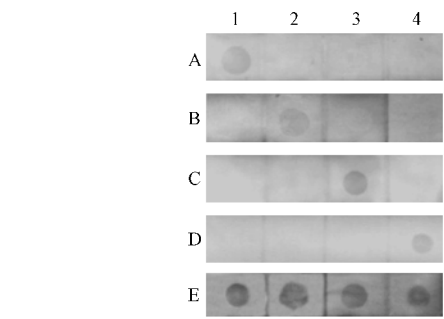


图 6 转基因烟草经 HRCA 后的杂交结果  
Fig.6 Hybridization results  
Hybridization probes immobilized on membrane from 1 to 4 are TPBNT , TPBCM , TPBNPT and TPBGUS , respectively . A ~ D. Transgenic tobacco DNA detected with TPBNT-HRCA , TPBCM-HRCA , TPBNPT-HRCA and TPBGUS-HRCA , respectively and then hybridized with membrane immobilized with four hybridization probes described above. E. Transgenic tobacco DNA detected with four padlock probes described above at the same time and then hybridized with a membrane immobilized with four hybridization probes

3 讨 论

HRCA 反应的有效进行有赖于锁式探针对靶位点的精确检测和随后的正确连接 ,因此锁式探针的正确设计是至关重要的。在对样品进行检测时 ,需要探针的两端特异序列部分同时与靶位点结合 ,因此设计时主要考虑其 5'端和 3'端特异部分的复性温度要基本一致 ;对所设计的全部锁式探针 ,其 5'端和 3'端的复性温度均在 50 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C 之间。探针的连接段部分由于并不直接参与靶位点的检测 ,对它的序列也没有特别要求 ,我们是从质粒 pKK232-8 中选了一段 ;不过选择时力求所选序列的二级结构较少 ,这样可以允许探针同靶位点结合过程中其结构较为自由 ,有利于同目标序列的结合。

锁式探针的同位素研究清楚地表明锁式探针只有在靶 DNA 存在时才能在连接酶的作用下连接成环 ,而当反应体系中没有模板 DNA 或 DNA 中没有相应的靶位点时 ,连接酶无法使其成为环型 ,而依然保持线性 ,此时在 CIAP 或 Exo-I 作用下就可将其所带标记去除或将整个探针降解。

HRCA 在对环型锁式探针扩增时形成超分支结构 ,具有极高的扩增效率 ,大约 30min 的扩增就可以用肉眼看到 ,这是 PCR 所无法达到的。另外 ,理论上讲 ,锁式探针同其靶位点的结合是具有序列特异性的 ,因此多个锁式探针共存于一个体系中是不会相互干扰的 ,这在对多个靶位点进行同时检测时是很有优势的 ,不必像 MPCR 中一样要考虑引物之间

的干扰问题。还有 ,不同锁式探针虽然两端的特异序列不同 ,但两端之间的连接序列可以完全相同 ,因此可以用一对根据连接序列设计的通用引物对所有环型锁式探针进行扩增 ,这也是 MPCRC 方法无法达到的。比如利用所设计的 4 个锁式探针对转基因烟草进行检测(图 6) ,普通 HRCA 和复合式 HRCA 的结果一致 ;反应中只是简单的将 4 种探针按相同量加入反应体系 ,连接后用同一对引物进行扩增即可。

Hafner<sup>[15]</sup>等在其文章中曾报道 ,在 HRCA 反应条件下 ,*Bst* DNA 聚合酶以线性 DNA 为模板可以进行扩增反应 ,并将其称为线性靶同温多聚体化扩增 (Linear target isothermal multimerization and amplification ,LIMA) 。在我们的实验中也曾碰到类似情况 ,不过仅限于 PCR 合成经磁珠分离后的探针 ,这很可能是磁珠分离一步中未能将所有生物素标记链结合到磁珠上 ,使得部分生物素标记链仍与探针一同以双链形式存在于溶液中 ,并进行自连 ;当然还有一种可能是在相应生物素标记引物合成时未能将所有的引物都标上生物素 ,这更容易导致以上结果 ,LIMA 现象有待进一步研究。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Nilsson M , Malmgren H , Samiotaki M *et al* . Padlock Probes : Circularizing Oligonucleotides for Localized DNA Detection . *Science* , 1994 **265** :2085 – 2088

[ 2 ] Gilbert W , Dressler D . *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* . , 1968 , **33** : 473 – 484

[ 3 ] Baker T A , Kornberg A . DNA Replication ( Freeman , New York ) , 1992

[ 4 ] Fire A , Xu S Q . Rolling replication of short DNA circles . *Proc Natl*

*Acad Sci USA* ,1995 **92** : 4641 – 4645

[ 5 ] Baner J , Nilsson M , Hartvig M M , Landegren U . Signal amplification of padlock probes by rolling cycling replication . *Nucl Acids Res* , 1998 **26** ( 22 ) : 5073 – 5078

[ 6 ] Lizardi P M , Huang X H , Zhu Z G *et al* . Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification . *Nature Genetics* ,1998 **19** : 225 – 232

[ 7 ] 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** : 1170 – 1176

[ 8 ] Baner J , Nilsson M , Isaksson A *et al* . More keys to padlock probes : mechanisms for high-throughput nucleic acid analysis . *Current Opinion in Biotechnology* 2001 **12** :11 – 15

[ 9 ] TAO 震 ,YANG S I(杨胜利) ,GONG Y(龚毅) . Rapid detection of genetically modified plant with MPCRC . *Biotechnology Information*( 生物技术通报 ) 2000 **6** :37 – 41

[ 10 ] TAO Z , CAI X F , YANG S L , GONG Y . Detection of exogenous genes in genetically modified plants with multiplex polymerase chain reaction . *Plant Molecular Biology Reporter* 2001 **19** :289 – 298

[ 11 ] Markus L , Brodmann P , Pietsch K *et al* . IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder . *Food Composition and Additives* , 1999 , **82** ( 4 ) :923 – 928

[ 12 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T *et al* . Molecular cloning , a laboratory manual , Beijing Science Press 1996 ,pp.530 – 532

[ 13 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T *et al* . Molecular cloning , a laboratory manual , Beijing Science Press 1996 ,pp.551 – 555

[ 14 ] Zhang Y , Coyne M Y , Will S G *et al* . Single-base mutational analysis of cancer and genetic disease using membrane bound modified oligonucleotides . *Nucleic Acids Res* . , 1991 **19** ( 14 ) : 3929 – 3933

[ 15 ] Hafner G J , Yang L C , Stafford W M R *et al* . Isothermal Amplification and Multimerization of DNA by *Bst* DNA Polymerase . *BioTechniques* , 2001 **30** ( 4 ) : 852 – 86

HRCA and Application in Detection of Genetically Modified Plant

TAO Zhen CAI Xing-Feng YAN Zhi-Qiang HU Xiao-Bo YANG Sheng-Li GONG Yi\*

( Shanghai Research Center of Biotechnology , Shanghai Institutes for Biological Sciences , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200233 , China )

**Abstract** In this article primary studies of the application of hyperbranched rolling cycle amplification( HRCA ) in exogenous genes detection of transgenic plants were done . Four padlock probes were designed according to the sequences of four genes/DNA fragments that are used widely in transgenic plants ; part of the sequence of pKK233 was chosen as the linking part of padlock probes and a pair of HRCA primers was designed according to the sequence of linking part . Study of the specificity of ligation in HRCA with isotope labeled padlock probes indicated padlock probes could be ringed effectively only when corresponding target DNA existed in the same reaction system and could not be ringed when there was no corresponding target DNA existed . Ligation time is very different according to the characteristic of target DNA being used . 5 min to 10 min is enough if the target DNA is plasmid ; 30 min to 60 min is needed if the target is genome DNA of plant because it 's sequence is more complex than that of plasmid 's . HRCA time was analyzed which indicated longer reaction time can obviously increase the amount of products . (Quantitative analysis of the amount of products was done by gel electrophoresis and densitometry . )

tity of enzyme in HRCA was also analyzed. Different amount of enzyme ( from 0.5 unit to 4 units ) can give similar result when other conditions are not changed. On the basis of the research , transgenic tobacco was detected with these four padlock probes and the results were just as prospective. In order to increase the efficiency of detection , multiplex HRCA ( MHRCA ) was used. In MHRCA more than one padlock probes are used at the same time in the same reaction system to detect more than one targets. Because the amplification products of MHRCA will be complex and it is almost impossible to analyze with electrophoresis , so reverse-blot is used. Detection results of transgenic tobacco with this method are the same with anticipation. Compare to MPCR method we established before MHRCA is more convenient to operate and more effective in detecting exogenous genes in transgenic plants.

**Key words** HRCA , padlock probe , transgenic plant

Received : 10-21-2002

This work was supported by Grant from National Key Technologies R&D Programme ( No. 2001BA707B03 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-21-64700892 ~ 369 ; Fax : 86-21-64700244 ; E-mail : yigong@srcb.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>