

# 设计特定序列的引物提高依赖解旋酶恒温扩增效率

张培培<sup>1),2),3)</sup>, 吴洋<sup>1),2),3)</sup>, 王玲<sup>1),2),3)</sup>, 齐浩<sup>1),2),3)</sup>\*

(<sup>1)</sup>天津大学化工学院制药工程系,天津 300072;<sup>2)</sup>系统生物工程教育部重点实验室,  
天津 300072;<sup>3)</sup>天津大学化工协同创新中心合成生物学平台,天津 300072)

**摘要** 依赖解旋酶恒温扩增(helicase-dependent amplification, HDA)是一种新型的恒温DNA体外扩增方法,具有反应原理简单,反应温度恒定等优点,被广泛地应用于核酸分子检测。但是依赖解旋酶恒温扩增仍面临着双链DNA解旋反应效率不高导致的扩增效率不够高、灵敏度低的问题。为了进一步提高依赖解旋酶恒温扩增技术中双链DNA模板的解旋效率,在本研究中,5'端带有不同长度不同序列的寡聚核苷酸引物,被用于依赖解旋酶恒温扩增反应,以研究DNA片段的末端序列对依赖解旋酶的双链DNA解旋反应,乃至整个扩增反应效率的影响。结果表明,只有5'端带有poly(A)序列的核酸引物明显促进了扩增反应效率,其中6个A的长度的5'端组成的引物对恒温扩增的促进作用最好,扩增产物比不带任何特定序列的原引物提高了约5.3倍。相比之下,带有poly(AC)或者poly(C)序列的引物,在一定程度上阻碍依赖解旋酶恒温扩增反应效率。因此,本研究证明了特定设计的末端序列,可以提高依赖解旋酶恒温扩增反应效率。

**关键词** 依赖解旋酶恒温扩增;解旋酶;引物设计

**中图分类号** Q7

## Primers with Designed Terminal Sequence Improved Efficiency of Helicase-dependent DNA Amplification

ZHANG Pei-Pei<sup>1),2),3)</sup>, WU Yang<sup>1),2),3)</sup>, WANG Ling<sup>1),2),3)</sup>, QI Hao<sup>1),2),3)</sup>\*

(<sup>1)</sup> Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072; (<sup>2)</sup> Key Laboratory of System Biotechnology of Ministry of Education, Tianjin 300072; (<sup>3)</sup> Synthetic Biology Platform of Chemical Innovation Center of Tianjin University, Tianjin 300072)

**Abstract** Helicase-dependent amplification (HDA) is a new method of isothermal amplification. It has the advantages of simple reaction principle and constant reaction temperature and has been applied to amplify DNA fragment from DNA source including genomic DNA, plasmid DNA, and cDNA rapidly. However, due to the low activity of DNA helicase mediated amplification, there are still many weaknesses, especially insufficient amplification efficiency. To further enhance the efficiency of the helicase-dependent amplification, primers with different designed sequences at the 5' terminal end were applied. The HDA products were quantified and compared with the amplification from primers without the designed sequence. The results demonstrated that the primer with poly(A) sequence at 5' terminal end improved the amplification effectively, the 6 × A tail resulted a 5.3-fold increasing in amplification. In contrast, sequence of poly(AC) or poly(C) barely helped and instead decreased the amplification. Consequently, poly(A) with optimized length can be designed at the terminus of DNA primers to improve

收稿日期: 2018-03-23; 修回日期: 2018-05-03; 接受日期: 2018-05-11

国家自然科学基金资助项目(No. 21476167)

\* 通讯作者 Tel: 022-27403389; E-mail: haoq@tju.edu.cn

Received: March 23, 2018; Revised: May 3, 2018; Accepted: May 11, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 21476167)

\* Corresponding author Tel: 022-27403389; E-mail: haoq@tju.edu.cn

the efficiency of helicase-dependent amplification reaction.

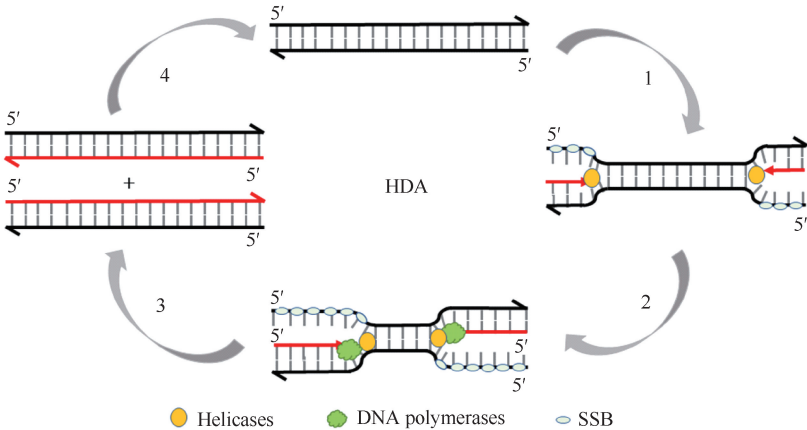
**Key words** helicase-dependent amplification; helicase; primer design

核酸体外扩增技术在分子生物学、基因组学和生物技术研究中具有十分重要的意义。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是目前应用最广泛的一种 DNA 扩增体外方法,它被发明并应用于 20 世纪 80 年代,主要利用温度的循环打开 DNA 双链进行 DNA 的体外扩增<sup>[14]</sup>。PCR 的发明彻底改变了传统的分子生物学研究、疾病诊断和司法鉴定领域<sup>[5]</sup>。特别是临床微生物学领域以及基础科学,受益于 PCR 技术能够检测和鉴定许多病原体<sup>[6-13]</sup>。然而,由于 PCR 精细的温度循环需要复杂的仪器设备和大量的能源损耗,这导致其在许多资源有限的地区的推广受到阻碍<sup>[14]</sup>。为了提高 DNA 体外扩增的灵敏性和实用性,许多生物实验室开始探索更加简单的 DNA 体外扩增方法,并用于 DNA 快速检测和制作便携的 DNA 诊断装置<sup>[15-20]</sup>。

2004 年, New England BioLabs 通过模拟 DNA 体内扩增机制设计了一种新的 DNA 体外扩增技术—依赖解旋酶恒温扩增技术 (helicase-dependent amplification, HDA)<sup>[21]</sup>。HDA 的反应过程非常简单,反应原理见 Fig. 1。在扩增过程中, DNA 解旋酶在 ATP 水解释放能量的驱动下解开 DNA 双链,游离出来的单链 DNA 被单链结合蛋白 (single-strand binding protein, SSB) 结合 (Fig. 1, Step 1)。随后,两个与 DNA 模板相互补的特异性引物退火结合到单链 DNA 模板的 3' 端,无核酸外切酶活性的 DNA 聚

合酶开始沿着引物延伸形成新的双链 DNA (Fig. 1, Step 2),直到完成整个 DNA 片段的合成产生双链 DNA 模板的另一拷贝 (Fig. 1, Step 3),紧接着新合成的双链 DNA 又作为 DNA 解旋酶的底物进入下一轮扩增反应 (Fig. 1, Step 4)。因此,通过同时连锁反应,目标 DNA 序列可以进行指数扩增<sup>[22]</sup>。HDA 是等温核酸体外扩增最简单的方法之一<sup>[23]</sup>,它与 PCR 的原理十分相似,最大的不同是利用解旋酶而非温度循环来打开 DNA 双链进行扩增。由于扩增是在 DNA 解旋酶的酶促作用下进行的,PCR 反应需要开始的热变性和随后的热循环都可以在这个过程中忽略掉,整个扩增过程在一个酶适宜的恒定温度下完成。

解旋酶催化的 DNA 双链的解旋反应是 HDA 体系中的限速步骤<sup>[23]</sup>,如果能提高解旋酶的解链速度,HDA 的扩增效率将在很大程度上获得提高。在 HDA 反应中,作为解旋酶底物的双链 DNA 在解链过程中同时也在不停地产生。由于解旋酶不能在双链 DNA 片段的中间部位打开双链,只能从双链的末端开始解链,所以双链 DNA 的末端结构对于解旋酶解链来说就显得非常重要。在扩增过程中扩增子的末端结构是由依照模板所设计的引物决定的,因而引物设计对解旋酶的动力学和整体的 HDA 反应的成功,均发挥了非常重要的作用。基于这些原因,本文尝试设计更加适合 HDA 的引物来进一步提高



**Fig. 1 Schematic of Helicase-dependent amplification** In step 1, the DNA helicase unwinds the double-stranded DNA under the energy of ATP hydrolysis, and the freed single-stranded DNA is bound by the single-stranded binding protein (SSB). Subsequently, two specific primers are annealed to the 3' end of the single-stranded DNA template in Step 2, and DNA polymerase begins to extend along the primer to form a new double-stranded DNA. In step 3, the completion of the synthesis of the entire DNA fragment results in another copy of the double-stranded DNA template, followed by the newly synthesized double-stranded DNA as a substrate for the DNA helicase into the next round of expansion in step 4

HDA 体系中依赖解旋酶的 DNA 解链效率。通过在 HDA 引物的 5'端添加特定序列,对比带有不同 poly (A)、poly (C) 或者 poly (AC) 的寡聚核苷酸引物进行的 HDA 扩增,我们发现末端序列极大地影响了 HDA 的扩增反应,并最终选择出了最适组分和长度的引物。使用其中 5'端携带 6 个 A 的引物,HDA 的扩增效率被提高了 5.3 倍。

1 材料与方法

1.1 模板和引物

本实验中所用的模板是大肠杆菌 MG1655 上的编码 UvrD 蛋白的一段基因序列,进行 HDA 扩增前使用重组质粒 pGSUMO-UvrD 和通用引物 T7, T7-

term 进行 PCR 反应,获得一段长度为 3 468 bp 的产物片段,将此 PCR 产物用 DNA 回收纯化试剂盒进行回收,回收产物应用到 HDA 反应中作为反应模板。本文中所用的原引物 F-0, R-0 扩增片段长度为 146 bp,以此引物为基础,在引物的 5'端添加了 11 种不同的寡聚核苷酸。这些添加在原引物 5'端的寡聚核苷酸分别为含有 2、4、6、8、10 个 A 的寡聚腺嘌呤核苷酸 (Poly (A)), 含有 2、6、10 个 C 的寡聚胞嘧啶核苷酸 (Poly (C)), 以及含有 1、3、5 个 AC 的寡聚腺嘌呤胞嘧啶核苷酸 (Poly (AC)), 观察不同的 5'端组成的引物对 HDA 扩增的影响。实验中所有的引物均合成自苏州金唯智生物科技有限公司,所用引物序列见 Table 1。

Table 1 Primer sequences

Primers	Sequences
F-0	5'-AACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-0	5'-TCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-2A	5'-AAAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-2A	5'-AATCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-4A	5'-AAAAAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-4A	5'-AAAATCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-6A	5'-AAAAAAAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-6A	5'-AAAAAATCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-8A	5'-AAAAAAAAAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-8A	5'-AAAAAAAATCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-10A	5'-AAAAAAAAAAAAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-10A	5'-AAAAAAAAAATCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-2C	5'-CCAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-2C	5'-CCTCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-6C	5'-CCCCCAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-6C	5'-CCCCCTCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-10C	5'-CCCCCCCCCAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-10C	5'-CCCCCCCCCTCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-AC	5'-ACAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-AC	5'-ACTCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-3AC	5'-ACACACAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-3AC	5'-ACACACTCCTGATACGCCTGATACAC-3'
F-5AC	5'-ACACACACACAACCTCGACGAGAAGCAGTG-3'
R-5AC	5'-ACACACACACTCCTGATACGCCTGATACAC-3'

1.2 试剂和仪器

本文中用到的 HDA 试剂盒 IsoAmp II tHDA kit 购自 New England BioLabs (北京);质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司;DNA 回收纯化试剂盒购自捷恩麦克生物科技有限公司。实验中用到的多功能分子成像仪 (型号 C300) 生产自 Azure Biosystems;PCR 仪 (型号 TC-XP-D) 生产自杭州博日科技有限公司,HDA 反应进行恒温加热也是在相同

PCR 仪中进行。

1.3 HDA 反应和产物验证

HDA 反应采用的是两步法扩增,反应总体系为 15 μL,分为 A 和 B 两个部分。其中,A 体系共 7.5 μL 包含 0.75 μL 缓冲液 10 × 退火缓冲液 II,DNA 模板 100 ng,正向引物和反向引物 (10 μmol/L) 各 0.23 μL,再加入去离子水至 7.5 μL。B 体系共 7.5 μL 包含 0.75 μL 缓冲液 10 × 退火缓冲液 II,0.6 μL

浓度为 8 mmol/L 的  $\text{MgSO}_4$  溶液, 1.2  $\mu\text{L}$  浓度为 80 mmol/L 的 NaCl 溶液, 1.05  $\mu\text{L}$  的 IsoAmp dNTP 溶液和 1.05  $\mu\text{L}$  的 IsoAmp enzyme mix 溶液, 再加去离子水至 7.5  $\mu\text{L}$ 。两步法进行反应时先在 0.2 mL 离心管中配置好 7.5  $\mu\text{L}$  反应混合液 A, 并混合均匀, 将 A 置于 98℃ 加热 2 min 立即置于冰上; 再在 0.2 mL 离心管中配置好 7.5  $\mu\text{L}$  反应混合液 B 置于冰上, 之后取 A 混合液和 B 混合液混合后轻轻离心混匀, 将 A、B 混合液置于 65℃ 反应 90 min。取反应完成后的混合液加入相同体积的 2 × DNA 上样缓冲液 (2.4 mL 去离子水, 2.4 mL 甘油, 200  $\mu\text{L}$  浓度为 0.5 mol/L 的 EDTA, 0.025 g 溴酚蓝, 25  $\mu\text{L}$  浓度为 1 mol/L 的 Tris-HCl (pH7.0)) 终止反应, 并将样品用浓度为 15% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (Native-PAGE) 在 150 V 电压下进行跑胶分析。Native-PAGE 胶在正式上样前用 300 V 电压预电泳 60 min, 电泳完成后用溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 核酸染料对凝胶进行 60 min 染色处理。

#### 1.4 数据处理

将染色完成的 Native-PAGE 胶用多功能分子成像仪进行紫外成像, 所得胶图用 AzureSpot 软件进行灰度分析获得灰度值, 将不同 5' 端组成的引物扩增产物的灰度值与原引物扩增产物的灰度值相比即可获得不同 5' 端组成的引物相对于原引物扩增产物量提高的倍数。

#### 1.5 统计学分析

文中所有实验均重复 3 次以上, 所有数据均用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析, 实验结果用 “均数 ± 标准误 (Mean ± SD)” 表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义的标准。

## 2 结果

### 2.1 引物 5' 端带不同 Poly (A) 促进 HDA 反应进行

在 DNA 复制过程中, 脱氧核糖核苷酸 A 与 T 配对时有两个氢键作用力, G 与 C 之间配对有 3 个氢键作用力, 如果将 HDA 引物 5' 末端设计成富含 A 的 Poly (A) 序列, 那么由引物聚合而成的底物末端应该更加有利于解旋酶的 DNA 解链作用。但是最适宜的 Poly (A) 序列长度是未知的, 因而本文首先在一对基础引物 F-0、R-0 的 5' 端, 设计了序列长度分别为 2、4、6、8、10 个 A 的 Poly (A) 序列, 对应引物名称为 F-2A、R-2A, F-4A、R-4A, F-6A、R-6A, F-8A、R-8A, F-10A、R-10A。同时设计了 5' 端带有 10 个 C

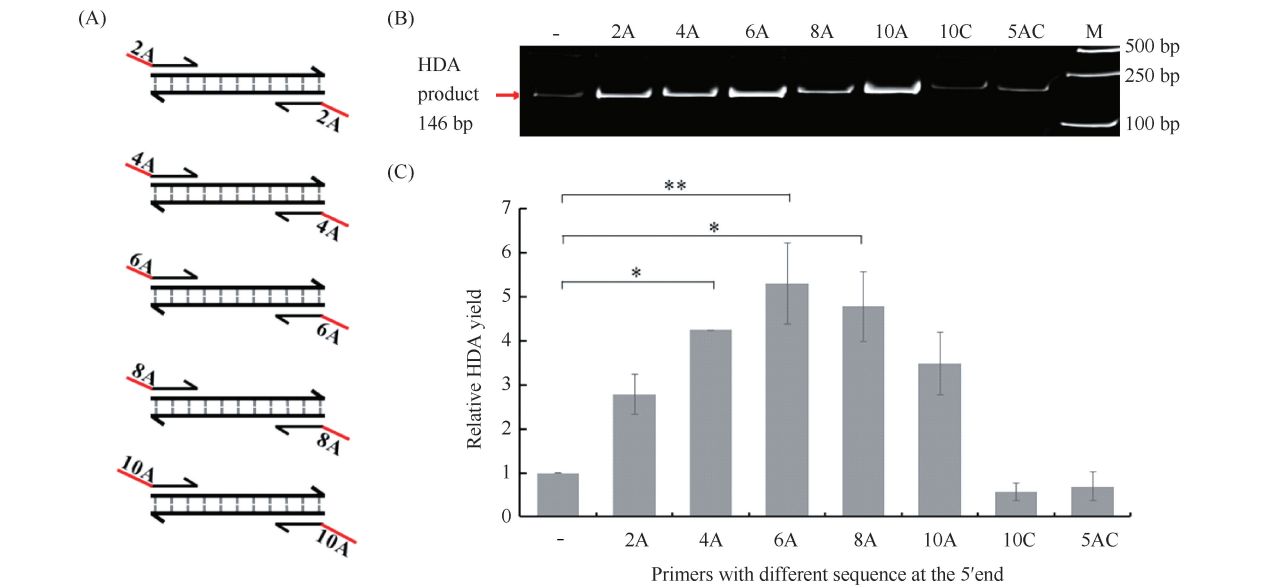
的引物 F-10C、R-10C 和 5 个 AC 的引物 F-5AC、R-5AC, 以便对照观察, 不同引物的 5' 端设计示意图见 Fig. 2A。将带有不同 5' 端组成的引物应用到 HDA 反应中进行扩增反应, 为了减少误差, 所有样品在同一凝胶上进行分析和染色处理, 凝胶分析结果如图 Fig. 2B 所示。泳道 1 ~ 8 分别对应原引物 F-0、R-0 的扩增产物, 以及引物 F-2A、R-2A, F-4A、R-4A, F-6A、R-6A, F-8A、R-8A, F-10A、R-10A, F-10C、R-10C, F-5AC、R-5AC 的扩增产物。从胶图中可以看到, 5' 端带有 Poly (A) 序列的引物扩增条带比带 10 个 C 以及 5 个 AC 序列的引物扩增产物的条带要亮, 而带不同长度 Poly (A) 序列的引物, 扩增产物的条带亮度也不尽相同, 呈现一定梯度。重复相同实验 5 次, 将凝胶成像胶图用软件进行灰度分析处理, 用不同 5' 端组成的引物扩增产物条带灰度值与原引物扩增产物条带的灰度值的比值作图, 结果如图 Fig. 2C 所示。5' 端带有不同长度的 Poly (A) 的引物, 在 6 个 A 的长度处显现出了一个明显的峰值, 这说明 6 个 A 的 5' 端 Poly (A) 长度比其他长度的引物的扩增效果要好, 扩增产物的量相较于原引物高出约 5.3 倍。

在 Fig. 2B 和 Fig. 2C 中都可以看到, 带有 10 个 C 和 5 个 AC 的 5' 端组成序列的引物, 也是可以正常扩增出目的条带的, 只是扩增产物的量比 5' 端未带特定寡聚核苷酸引物的扩增产物量要少。在 5' 端带不同长度 Poly (A) 序列引物的扩增结果显示, 最佳 Poly (A) 序列的长度并不是在 10 个 A 的长度, 所以 10 个 C 和 5 个 AC 的序列长度, 可能也并非 5' 端带 Poly (C) 序列和 Poly (AC) 序列的引物恒温扩增的最佳长度, 减少 Poly (C) 和 Poly (AC) 序列的长度, 也许会有更好的 HDA 反应结果。

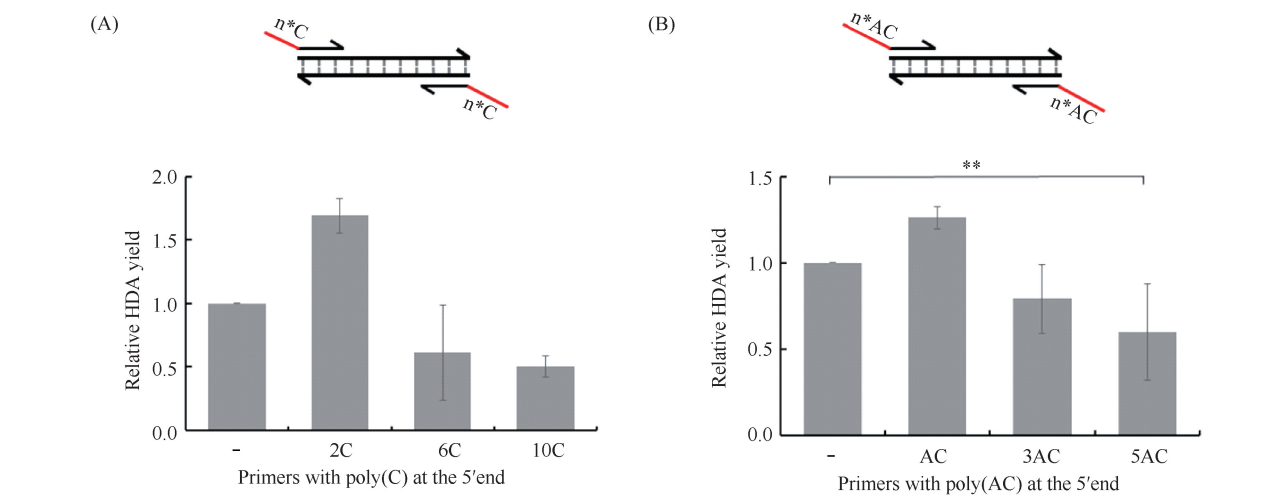
### 2.2 引物 5' 端带不同 Poly (C) 和 Poly (AC) 对 HDA 反应无促进作用

5' 端带有 Poly (C) 序列的引物对 HDA 反应的影响与 5' 端带有 Poly (A) 序列的引物类似, 首先是设计了 5' 端带有长度分别为 2、6、10 个 C 的引物 F-2C、R-2C, F-6C、R-6C, F-10C、R-10C, 引物序列见 Table 1。之后将 5' 端带不同长度的 Poly (C) 序列的引物以长度为 3 468 bp 的双链 DNA 片段为模板进行 HDA 反应。取相同体积 HDA 扩增产物样品进行 Native-PAGE 胶分析, 各引物在扩增完成后均获得了正确的目的条带。将胶图用软件进行灰度分析, 并重复 3 次实验后, 以 5' 端带有不同长度的 Poly (C) 的引物为横坐标, 以带有不同长度 Poly (C) 引





**Fig. 2 Effect of primer with different lengths of Poly(A) at the 5' end** (A) Schematic of HDA primers with different lengths of Poly(A) at the 5' end. (B) The reaction was preformed at 98℃ for 2 minutes and then 65℃ for 120 minutes, HDA product of primers with different lengths of Poly(A) at the 5' end were analyzed by 15% Native-PAGE. Lane labeled with “-” represents the HDA product with normal primer. (C) Quantified relative HDA yield of primers with different lengths of Poly(A) at the 5' end. The HDA product was quantified by Grayscale analysis. Data represent mean ± SD (n = 5), Statistical significances were measured using one-way ANOVE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$



**Fig. 3 Effect of primers with different lengths of Poly(C) and Poly(AC) on HDA** (A) Quantified relative HDA yield of primers with different lengths of Poly(C) at the 5' end. HDA yield was quantized by grayscale analysis, Lane labeled with “-” represents the HDA product with normal primer. (B) Quantified relative HDA yield of primers with different lengths of Poly(AC) at the 5' end. The HDA product was quantified by grayscale analysis. Data represent mean ± SD (n = 3), Statistical significances were measured using one-way ANOVE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

物的扩增产物条带灰度值,与原引物扩增产物条带的灰度值的比值为纵坐标作图,结果见 Fig. 3A。5'端带有不同长度的 Poly(C) 序列的引物对 HDA 反应的影响,并无 Poly(A) 序列引物的影响那么大,当 5'端带有 6 和 10 个 C 长度的特定寡聚核苷酸时, HDA 反应的产物量相对于原引物甚至会有所下降。

通过对 5'端带有不同长度的 Poly(A) 和 Poly(C) 序列引物的扩增效果进行分析后发现, Poly(A) 序列会对 HDA 扩增效果产生有利影响,而 Poly(C) 序列对 HDA 扩增在一定程度上具有不利影响,但是 AC 结合起来是否依然会对 HDA 扩增产生促进作用仍是未知的。为了探讨这个问题,5'端带有不同长

度 Poly(AC)的引物也被应用到了 HDA 反应中。将原引物 F-0、R-0 的 5'端分别设计添加了 1、3、5 个 AC 的特定寡聚核苷酸,获得了引物 F-AC、R-AC、F-3AC、R-3AC、F-5AC、R-5AC,序列如 Table 1 所示。将不同长度 5'端组成的引物分别应用到 HDA 反应中,在相同条件下进行反应扩增,基础引物 F-0、R-0 作为对照也做相同的处理。反应 90 min,取相同体积的各扩增产物样品进行 Native-PAGE 胶分析,5'端带有不同长度的 Poly(AC)的引物和原引物均扩增出了正确大小的目的条带。重复实验 3 次,并对电泳的条带进行分析对比后获得了 Fig. 3B 的结果。从图可知,5'端带有不同长度 Poly(AC)的引物,在 3 个和 5 个 AC 序列长度时会明显使 HDA 扩增产物的量相对于原引物有所下降。

3 讨论

通过对 HDA 引物的 5'端组成进行研究后发现,在相同条件下反应相同时间的 HDA 的恒温扩增效果在特定的引物 5'端组成时得到了提升,这表明 HDA 反应对底物末端组成有一定的偏好性。用 5'端带有不同长度的 Poly(A)序列的引物进行 HDA 反应的结果表明,10 个 A 以内的引物 5'端组成均能够提高 HDA 的扩增效果。其中,6 个 A 的 Poly(A)序列长度时,HDA 扩增效果获得了最大程度的促进,产量提升了约 5.3 倍。产生这样的结果主要有两方面原因,一方面在引物的 5'端添加的 Poly(A)序列在底物的末端产生 A 的重复序列,A 与 T 碱基之间的配对氢键相较于 G 与 C 弱一些,底物末端相对更容易被打开,这促进了解旋酶的解链效果。另一方面,从 Fig. 2C 发现,当 Poly(A)的长度增加到 8 或者 10 的时候,扩增产物量开始降低,所以过长的 5'端重复序列,使底物的长度变得更长反而扩增效率会下降,由此确认,6 个 A 为最优化的促进 HDA 扩增效率引物 5'末端序列。5'端带有不同长度的 Poly(C)序列的引物和 5'端带有不同长度的 Poly(AC)序列的引物,对 HDA 扩增反应无明显的促进作用,反而在引物 5'端带有较长的 Poly(C)序列和 Poly(AC)序列时,使 HDA 反应的产物量降低。此结果与预想相符,5'端富含 C 序列使依赖解旋酶的 DNA 解链作用进行的更为困难,进而体现在相同反应条件和相同反应时间时,HDA 的产量有所下降。因此,可以得出的结论是,在 HDA 引物 5'端添加富含 A 碱基的特定寡聚核苷酸时,能够促使 HDA 扩增效率有所提高,5'端添加 6 个 A 碱基的序列长度

时,促进效果最为明显。由于 A 与 T 之间的氢键结合力相同,C 与 G 之间的氢键结合力相同,5'端带有不同长度的 T 和 G 的引物对 HDA 的影响作用未在本文中进行研究。

HDA 作为新的恒温扩增方法,具有原理简单,反应温度恒定的优点,被广泛应用于特定序列的核酸分子检测。扩增效率决定了使用此种恒温扩增方法的灵敏度,因此对 HDA 进行优化以增强依赖解旋酶的 DNA 解链能力,进而促进 HDA 的扩增效率,会对 HDA 的发展和在分子检测上的应用产生非常重要的作用。本文中建立的引物设计方法,经检验能够在很大程度上提高 HDA 的扩增效果,在 HDA 引物设计之初就能够通过在 5'端添加特定的寡聚核苷酸的方法提高目的片段的扩增产量,相较于其它方法更加经济简便。这对于改进 HDA 方法的设计进行致病菌基因快速检测有很大帮助,能提高临床样品即时检测的速度和效率,对推动便携式基因检测仪器的制作具有非常大的助益,为修饰引物以减少 HDA 非特异性扩增的研究提供新的思维方向,在进一步促进 HDA 方法推广应用中具有非常大的潜力。

参考文献 (References)

[ 1 ] Mullis K B, Faloona F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. [ J ]. Methods Enzymol, 1987, **155**(155):335-350

[ 2 ] Mullis K B. The unusual origin of the polymerase chain reaction [ J ]. Sci Am, 1990, **262**(4): 56-65

[ 3 ] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [ J ]. Science, 1988, **239**(4839): 487-491

[ 4 ] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia [ J ]. Science, 1985, **230**(4732): 1350-1354

[ 5 ] Moore P. PCR: replicating success [ J ]. Nature, 2005, **435**(7039): 235-238

[ 6 ] Hermans P W, Schuitema A R, Van Soolingen D, *et al.* Specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex strains by polymerase chain reaction [ J ]. J Clin Microbiol, 1990, **28**(6): 1204-1213

[ 7 ] Lishy G, Dessau R. Construction of a DNA amplification assay for detection of Legionella species in clinical samples [ J ]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1994, **13**(3): 225-231

[ 8 ] Bernet C, Garret M, de Barbeyrac B, *et al.* Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction [ J ]. J Clin Microbiol, 1989, **27**(11): 2492-2496

[ 9 ] Holland S M, Gaydos C A, Quinn T C. Detection and differentiation of Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci, and Chlamydia pneumoniae by DNA amplification [ J ]. J Infect Dis, 1990, **162**(4): 984-987

[ 10 ] Victor T, du Toit R, van Zyl J, *et al.* Improved method for the routine identification of toxigenic Escherichia coli by DNA amplification of a conserved region of the heat-labile toxin A subunit [ J ]. J Clin Microbiol. 1991, **29**(1):158-161

[ 11 ] Hoshina S, Kahn S M, Jian W, *et al.* Direct detection and

- amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1990, **13**(6): 473-479
- [12] Duggan D B, Ehrlich G D, Davey F P, *et al.* HTLV-I-induced lymphoma mimicking Hodgkin's disease. Diagnosis by polymerase chain reaction amplification of specific HTLV-I sequences in tumor DNA[J]. *Blood*, 1988, **71**(4): 1027-1032
- [13] Holodniy M, Katzenstein D A, Sengupta S, *et al.* Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction[J]. *J Infect Dis*, 1991, **163**(4): 862-866
- [14] Barreda-García S, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, *et al.* Comparison of isothermal helicase-dependent amplification and PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by an electrochemical genomagnetic assay[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, **408**(30): 8603-8610
- [15] 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 U S A*, 1992, **89**(1): 392-396
- [16] Fire A, Xu S Q. Rolling replication of short DNA circles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**(10): 4641-4645
- [17] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12): E63
- [18] Fahy E, Kwok D Y, Gingeras T R. Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR[J]. *PCR Methods Appl*, 1991, **1**(1): 25-33
- [19] Chen G, Dong J, Yuan Y, *et al.* A general solution for opening double-stranded DNA for isothermal amplification[J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 34582
- [20] Fischbach J, Frohme M, Glökler J. Hinge-initiated Primer-dependent Amplification of Nucleic Acids (HIP)-A New Versatile Isothermal Amplification Method[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 7683
- [21] Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase - dependent isothermal DNA amplification[J]. *EMBO Rep*, 2004, **5**(8): 795-800
- [22] Jeong Y J, Park K, Kim D E. Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(20): 3325-3336
- [23] Barreda-García S, Miranda-Castro R, de-Los-Santos-Álvarez N, *et al.* Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection. [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**(3): 679-693