

第三章 雙向型轉錄擴增

第一節 概述

RNA易受環境酵素的影響不易保存。但藉由固相存檔之設計與和 one step real-time RT PCR之技術結合。能夠有效的將檢體以固相 cDNA模板保存下來，有效解決問題。

生物素上建置特異性引子探針來抓取目標檢體mRNA，並於進行 RT PCR時完成第一股固相cDNA，之後放入一特殊設計的連接子，此連接子會形成stem loop的結構並設計與T3 promoter互補之序列，因此再延伸第二股cDNA時能夠產生T3 promoter之序列而形成一雙向 cDNA保存模板，以cDNA的型式保存能有效克服RNA不易保存的難題，且可以轉錄出雙向的RNA。

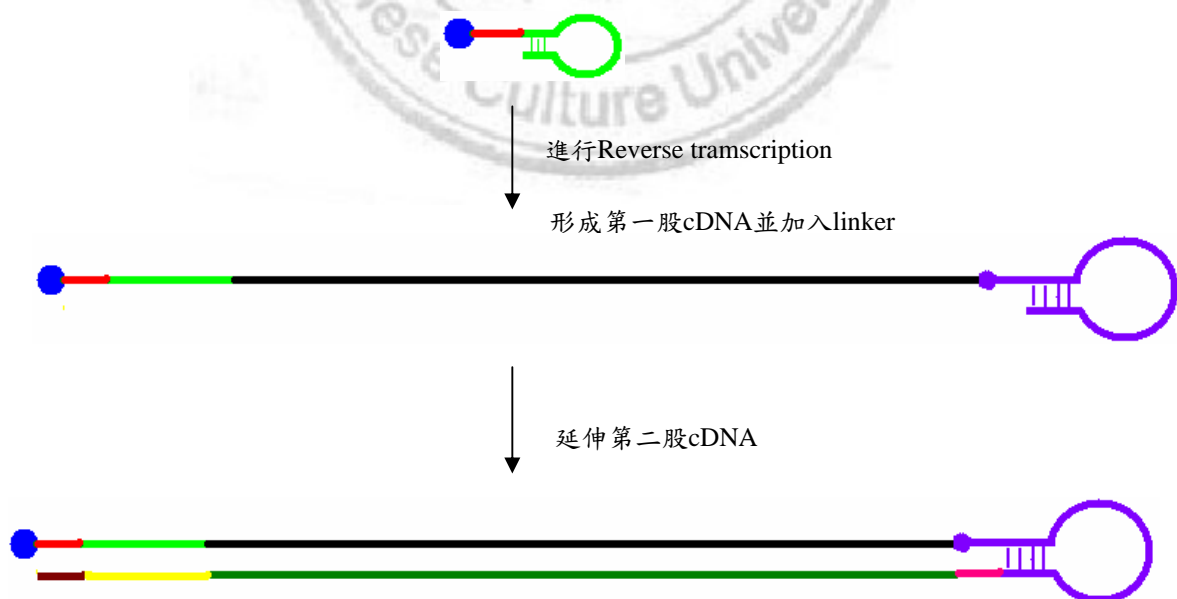



圖3-1 固相模板生成示意圖。固相引子於低溫下會自形成一回圈構造，藉由PCR反應加熱展開並

延伸出cDNA模板，再放入連接子與聚合酶形成雙股存檔模板。

第二節 方法比較

本論文研究檢體存檔技術架構原理來自於轉錄鏈反應 (transcription chain reaction, TCR)，依據美國靈藤科技公司2005年2月8日美國專利案號US 6,852,494 B2技術平台，開發臨床檢體核糖核酸的固相存檔與重複擴增，檢體核糖核酸經由固相存檔轉錄鏈反應(solid phase - TCR)的整體重複擴增產物(RAP,repeat amplify product)



US006852494B2

(12) **United States Patent**
Liao et al.

(10) **Patent No.:** US 6,852,494 B2
(45) **Date of Patent:** Feb. 8, 2005

(54) **NUCLEIC ACID AMPLIFICATION**

(75) Inventors: **Haisun Liao**, Sharon, MA (US); **Amy Anderson Deik**, Wakefield, MA (US); **Natalia Mamaeva**, West Roxbury, MA (US); **Caroline Ngaara Woodward**, Boston, MA (US); **Shin-Yih Chen**, Wellesley, MA (US); **Yih Huang**, Lexington, MA (US); **Ming Shen**, Guilford, CT (US); **Simon W. Law**, Lexington, MA (US); **Tai-Nang Huang**, Lexington, MA (US)

(73) Assignee: **Linden Technologies, Inc.**, Woburn, MA (US)

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

EP	0 368 906 B1	5/1990
WO	WO 88/10315	12/1988
WO	WO 89/01050	2/1989
WO	WO 89/07149	8/1989

OTHER PUBLICATIONS

Abbott et al., "Enzymatic Gene Amplification: Qualitative and Quantitative Methods for Detecting Proviral DNA Amplified in Vitro", *Journal of Infectious Diseases* 158(6):1158-1169 (1988).

Baugh et al., "Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription", *Nucleic Acids Research* 29(5):1-9 (2001).

a.

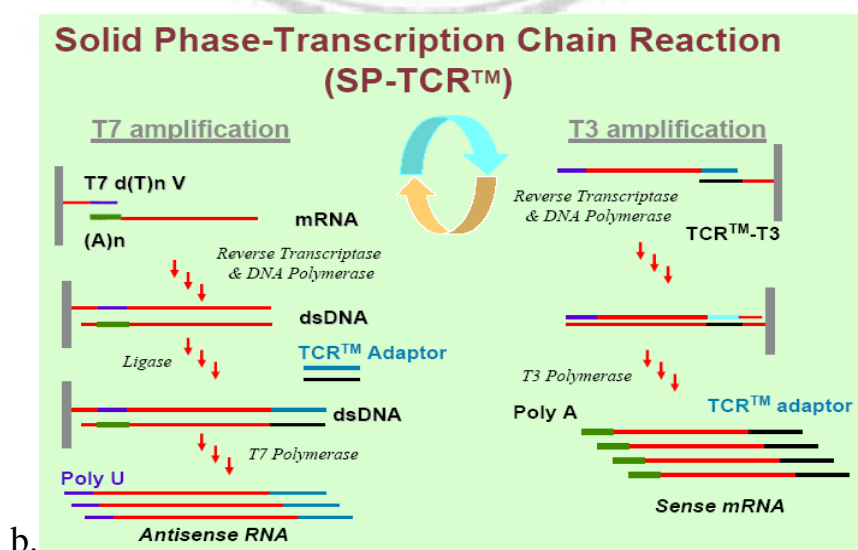


圖3-2 Transcription Chain Reaction 示意圖。a.TCR專利編號；b. TCR擴增原理。

固相存檔轉錄鏈反應(sp-TCR，圖3-2b)為核糖核酸mRNA模板的轉錄倍增反應，藉反轉錄與聚合反應合成第一股與雙股互補核酸cDNA，進行新合成cDNA轉錄反應增量對應目標的反義(anti-sense)股RNA，故可檢測極低濃度序列。其次，真義(sense)股RNA的轉錄增量則藉由雙股cDNA附接連結子存於轉錄產物(anti-sense)股RNA，再以固相互補序列連結子捕捉，進行反轉錄與聚合反應合成初股與雙股cDNA，即可進行新合成cDNA轉錄反應增量對應目標之真義(sense)股RNA。

循環TCR方法分別製造共同記錄保存兩種不同系列的模板(sense與antisense)。更可將RNA產物可利用特定或逢機引子反轉錄為DNA。或將其擴增產物RNA純化後應用於晶片檢驗。

本論文研究套組與TCR不同之處在於：固相支撐物的選擇與連接子結構設計。以生物素來當作固相支撐物，不但能有效保存模板並重複使用擴增(Wirta *et al.* 2005)，並搭配所設計之回圈結構連接子，完成一固相物質可進行雙股RNA的擴增模板cDNA：相較之下，TCR系統必須要藉由兩個固相支撐物才能達到雙向擴增的目的。於保存冰凍時較大的空間資源。

第三節 方法確效

一、生物素與streptavidin結合，分離出第一股模板

將做完RT-PCR的biotin-cDNA模板以invitrogen Dynabeads M-280 streptavidin磁珠系統來分離出來。此磁珠在其表面建置streptavidin，藉由streptavidin與biotin的鍵結，之後再利用磁鐵來分離出biotin-cDNA模板。所用的M-280磁珠系統，每毫克的磁珠針對不同的檢體，分別可鍵結700pmole free biotin、200pmole biotinylated oligonucleotides、5~10uG biotinylated antibody、或5pmole 2~4kb double stranded DNA fragment。

因此先將RT-PCR完的產物總共20uL，加熱至95°C，5分鐘。使其DNA結構打開成單股，並將其放置在冰上10min，迅速降溫使DNA結構維持在單股。取10uL的M-280磁珠(5ug/uL)至新的ependorf tube中，放置於磁台上5分鐘，將buffer吸出丟棄。將PCR產物與磁珠混合，並加入等體積的2X B&W buffer(10mM Tris-HCl ph=7.5、1mM EDTA、2.0M NaCl)，使buffer最終鹽濃度為1.0M。將此混合物放置室溫下反應30分鐘，並每5分鐘用手輕彈管壁，使其呈現均質狀態。

反應完後的tube，將其放置在磁台上5分鐘，將B&W buffer與磁珠分離。並用200uL ddH₂O清險磁珠兩次。Streptavidin與biotin的鍵結，可以藉由一固定速率的升溫與降溫來破壞。(Holmberg *et*

al.,2005)，因此參考文獻中的作法，利用 PCR 機器來達到此需求。以每 2 秒上升 1°C 的速率加熱到 80°C，並在 80°C 停滯 1 秒，在以每 2 秒下降 1°C 的速率降溫至室溫，來打斷 streptavidin-biotin 的鍵結。將 eluted 的溶液利用 Micrcon YM-100 來加以濃縮純化。純化後的溶液來進行 PCR 測試或連接子接合反應。

二、連接子磷酸化

廠商客制的連接子核苷酸序的 5' 端缺乏一磷酸鍵，那要讓連接子能夠連接到第一股 cDNA 模板後面位置，就必須先將連接子的 5' 端磷酸化。做法為取連接子 (100 pmole/uL) 5 uL 加入 10X kinase buffer 4 uL、0.1 mM ATP 3.0 uL、T4-PNKase (5U/uL) 3 uL 加水至總體積 40 uL。放在 37°C incubator 一小時。加熱到 72°C 放置 10 分鐘以停止酵素反應。使用 spin-column 置換 buffer 系統濃縮。最後加入 100 uL 的 1X ligation buffer 混合。讓 linker 恢復到 loop 的結構，加熱到 72°C 再慢慢降溫到 4°C，停在 4°C，最後拿去 -20°C 冰箱保存待用。

三、連接子與第一股 cDNA 模板連接反應

將做完 RT-PCR 的 biotin-cDNA 模板以 invitrogen Dynabeads M-280 Streptavidin 磁珠系統來分離出來。此磁珠在其表面建置 streptavidin，藉由 streptavidin 與 biotin 的建結，之後再利用磁鐵來分離出

biotin-cDNA模板。再進行接上linker的反應。加入磷酸化的 linker(25pmole/uL)5uL、10X ligation buffer 2uL、0.1M ATP 1uL、Rap3blc(2pmole/uL)1uL、Rap3brg(20pmole/uL)3uL、加水至18uL。放在90°C熱水中使其慢慢降溫至室溫。目的是讓沒作用的biotin-dT和 linker慢慢形成self-loop結構。當冷卻到室溫再加入T4 ligase (3U/uL) 2uL。利用PCR機器，從25°C~16°C，每個溫度都反應2小時，目的在於能讓Rap3brg(20pmole/uL)3uL找到其最適溫度來將連接子帶到正確位置。最後加熱到70°C 5分鐘終止反應。

四、第二股cDNA模板延伸

在確定連接子有接上第一股cDNA模板後，進行第二股的延伸。將上步驟的溶液加入DNA polmerase I (8U/uL)1uL、10X buffer 8uL、加水至80uL。在37°C下incubate 2小時。加熱到70°C 5分鐘以終止反應。反應終止後，利用Microcon YM-100來加以純化，並最後加水使其最終體積為20ul。

五、雙向RNA擴增

完成雙股固相cDNA模板後，加入nuclease free water 6uL、5X transcription buffer 4uL、NTP Mix 8uL、T7 or T3 polymerase(18U/uL & 17U/uL)、加水至20uL。溫和震盪Incubate 37°C 16~18小時。取3uL產

物進行電泳分析。

六、RAP & TCR 比較

以TCR的方式是將核苷酸建置在微孔(well)上，而本研究將其改良將核苷酸建置在生物素上，生物素具有較高的方便性並容易保存且不影響反應的動力學。TCR方式是利用一雙股adaptor方式來產生第二股模板，而用本研究保存方式能有效的將兩股模板保存在同一固相物質上(biotin)。本研究biotin RAP與TCR微孔方式針對total RNA進行RNA擴增的結果比較分為AB兩部分：

(A)操作流程比較：為連接子的比較，本論文研究所使用的為一會形成stem-loop的構造，而TCR否。

(B)固相物質比較：為固相支撐物的比較。本論文研究為生物素系統，而TCR則是利用微孔(well)的方式。

第四節 結果

RAP & TCR 比較

(A)部分操作流程比較

比較本研究所設計之linker與TCR所使用的adaptor，延伸出第二股模板的差異性與轉錄出RNA的品質比較。

表3-1、 SOP比較轉錄出RNA品質比較

第一道	Marker	ug/ul	Ug	第一道	Marker	ug/ul	ug
第二道	T7-RAP2 (-)RNA	0.54	11.9	第二道	T3-RAP2 (+)RNA	0.58	13.34
第三道	T7-TCR2 (-)RNA	0.6	13.2	第三道	T3-TCR2 (+)RNA	0.8	17.6

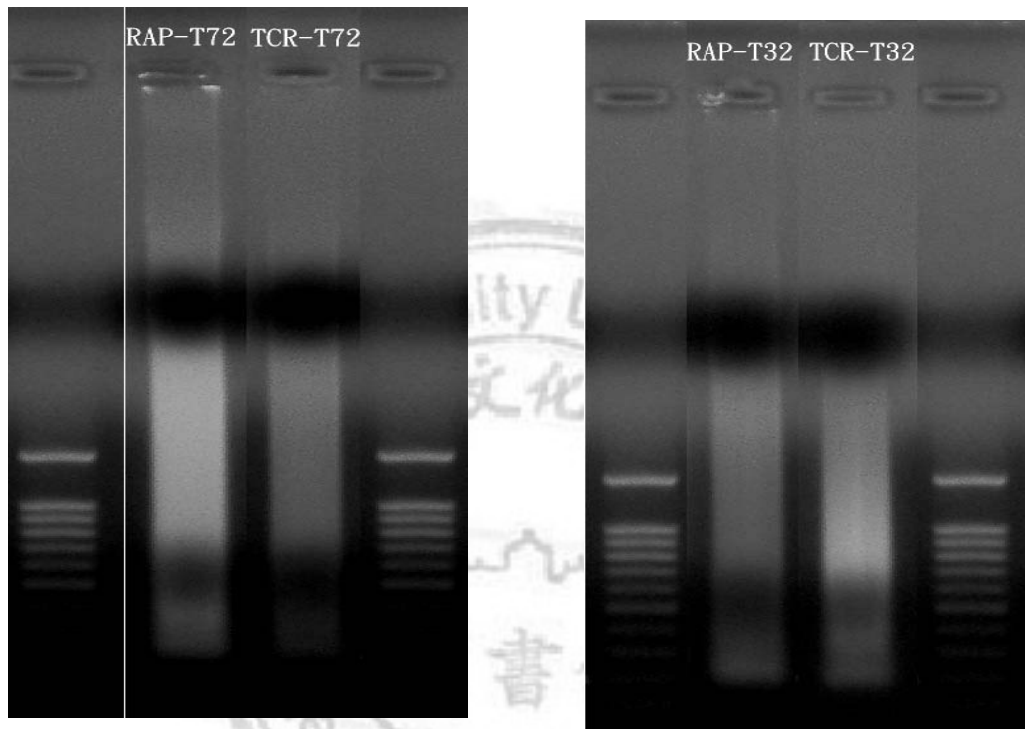


圖3-3 SOP比較: linker 與 TCR adaptor與轉錄出之RNA品質比較。左圖為以T7 pol.轉錄出的RNA; 右為不同連接子T3 pol.轉錄 RNA。

(B) 部分固相支撐物比較

本論文研究技術平台使用的固相支撐物為生物素，TCR則是在微孔 (well)建置寡核苷酸。同樣用本研究論文技術平台的linker來比較不同固相支撐物的差別。

表3-2 SOP比較轉錄出RNA品質比較

第一道	Marker	ug/ul	ug	第一道	Marker	ug/ul	ug
第二道	T7-RAP3 (-)RNA	0.52	12.50	第二道	T7-TCR3 (-)RNA	0.62	13.0
第三道	T3-RAP3 (+)RNA	0.32	7.04	第三道	T3-TCR3 (+)RNA	0.38	7.6

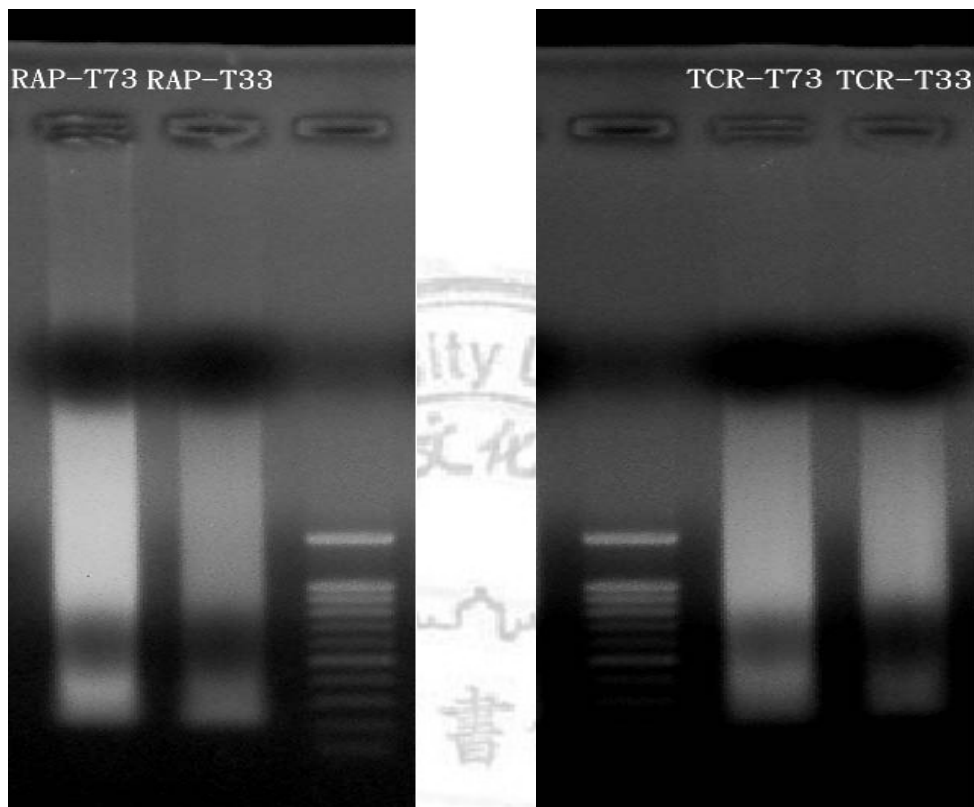


圖3-4、固相支撐物與轉錄RNA的品質的比較。左圖為使用磁珠系統，右圖為well系統。

根據比較結果看來，以TCR well與RAP-biotin的方式都能成功製造雙向RNA，證明本研究方法流程能有效產生RNA。

第五節 討論

根據比較結果，本論文研究的固相系統能夠有效的將 RNA 反轉錄成 cDNA，以固相存檔的方式保存下來。有效解決 RNA 易受環境酵素分解不易保存的問題。且與 TCR 方法比較，TCR 固相保存方式需要兩邊的固相支撐物才能將 RNA 檢體 sense & anti-sense 的序列保存下來。而本研究論文只需一邊的固相支撐物就能夠完成雙向的轉錄擴增，具有較高的方便性。且同時以生物素為固相支撐物的模板，具有較多元化的使用，可以將其應用於即時轉錄擴增上而 TCR 微孔則沒辦法因為其模板已固定在微孔上，無法像生物素藉由微量吸管將模板取出反應。所以本研究套組較 TCR 系統為多元與方便。