



Method for Improving Rolling Circle Amplification Sensitivity and Specificity

Yun Wei Zhang¹, Dan Hou², Wei Dong Xiao¹, Jenni Firman³, Lin Shu Liu³, Yong Diao^{1,*}, Zhi Qing Qi^{1,*}

¹School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou, China

²Key Laboratory of Oral Medicine, Guangzhou Institute of Oral Disease, Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, China

³Dairy and Functional Foods Research Units, Eastern Regional Research Center, Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture, Wyndmoor, The United States of America

Email address:

932136251@qq.com (Yun Wei Zhang), diaoyong@hqu.edu.cn (Yong Diao), zqqi@hotmail.com (Zhi Qing Qi)

*Corresponding author

To cite this article:

Yun Wei Zhang, Dan Hou, Wei Dong Xiao, Jenni Firman, Lin Shu Liu, Yong Diao, Zhi Qing Qi. Method for Improving Rolling Circle Amplification Sensitivity and Specificity. *Science Discovery*. Vol. 5, No. 6, 2017, pp. 496-501. doi: 10.11648/j.sd.20170506.28

Received: November 10, 2017; **Accepted:** November 23, 2017; **Published:** December 28, 2017

Abstract: Rolling circle amplification (RCA) of genomic or plasmid DNA has found wide used in technique academic and biotechnology reseach. In this study, we have successfully found what caused the nonspecific product in the reaction, thus designing an improved RCA which overcomes false priming at sites where primer dimers are formed. The results demonstrated that PEG or PEI could interact with the components of the improved RCA system, and help increase the reaction rate and yield of the improved RCA system, and dramatically reduces the nonspecific RCA products. This low-cost and efficient method dramatically overcomes nonspecific product amplification phenomenon in the RCA reaction which is problematic and has existed for a long time.

Keywords: Rolling Circle Amplification, Recombinant Plasmid, Polyetherimide, Polyethylene Glycol

改善滚环扩增灵敏度和特异性的一种方法

张云威¹, 侯丹², 肖卫东¹, Jenni Firman³, Lin Shu Liu³, 刁勇^{1*}, 戚智青^{1*}

¹福建泉州华侨大学生物医学学院, 泉州, 中国

²广州医科大学附属口腔医院广州口腔疾病研究所口腔医学重点实验室, 广州, 中国

³美国农业部东部农业研究服务中心乳制品及食品功能研究部门, 温德穆尔, 美国

邮箱

932136251@qq.com (张云威), diaoyong@hqu.edu.cn (刁勇), zqqi@hotmail.com (戚智青)

摘要: 基因组DNA或质粒DNA的滚环扩增技术(RCA)广泛应用于学术和生物技术研究中。在本文中,我们阐述了RCA非特异性扩增出现拖尾的原因,并设计了一种改良的RCA体系减少引物的错配和引物二聚体的形成。当在改良的RCA中加入不同浓度的聚乙二醇(PEG, 8000)或聚乙烯亚胺(PEI)可以有效的增强扩增的效率和特异性,同时也减弱了RCA在反应中容易出现的非特异性扩增拖尾现象。这种成本低,效率高的方法极大地克服了RCA反应中的非特异性扩增现象。

关键字: RCA, 重组质粒, 聚乙烯亚胺, 聚乙二醇

1. 引言

RCA体系中利用随机的引物六聚体和噬菌体Phi29DNA聚合酶已经越来越多的应用于DNA的扩增[1-2]。它是一种可利用皮克至微克级的环状DNA作为模板在恒温条件下对DNA进行指数扩增的方法[3]。商品化试剂盒Templi Phi (Amersham Biosciences), 它利用了多重引物RCA的方法可直接从克隆, 菌斑, 液体等环境中直接获取模板进行DNA的扩增[4], 其DNA产物以双链和串联重复序列单元为主[5]。

作为一种有效的DNA扩增工具, RCA具有很多的优势。如对设备要求低, 操作简单, 检测所有感染体中环型DNA成分, 不需要知道任何的基因序列信息[6-7]。目前RCA技术已经被广泛的应用于DNA测序[8], 蛋白质表达[3], 生物传感器[9], 诊断[10], 药物发现和纳米技术[11]。

然而, 该技术在实际操作中, 总是存在很低的扩增效率, 环境的污染以及非特异性扩增严重的问题, 其反应效率也会随着模板DNA大小, 含量, 结构的复杂程度而逐渐降低[12]。基于RCA全基因组扩增的实用性, 已证明用于各种用途, 在纳米技术中, 得到长而有序的基因片段是包裹其他有效成分的关键, 然而实际的操作中, 总是存在大量非特异性的拖尾小片段, 造成对纳米技术的一个干扰。在SNP基因分型应用中, 极低的模板浓度, 极易造成基因组区域的丢失, RCA扩增效率底下, 影响检验的结果等。造成RCA扩增效率低下的原因最有可能是由于引物的错配或引物二聚体的形成。针对这一问题的解决, 已有相关文献报道, 利用一种来源于嗜热菌HB8中突变的单链DNA结合蛋白(TthSSB-255)可有效的提高RCA反应中DNA的合成效率和灵敏度, 同时减弱非特异性扩增拖尾严重的问题[12-13]。但该蛋白生产成本昂贵, 考虑到该蛋白在整个的制作过程中, 需要进行蛋白表达, 纯化, 活性分析等复杂的操作过程, 以及蛋白不利于运输和保存的问题。因此, 发展一种低成本, 简单, 快速有效的方法去取代TthSSB-255这种蛋白在RCA技术方面所具有的功能, 改良RCA反应中的灵敏度低, 特异性差, 非特异性严重的问题依然是具有价值和挑战的。

本文的研究中, 基于对RCA已存在的缺点分析, 发展了一种新的RCA体系, 在不需要加入TthSSB-255蛋白等任何多余物质的情况下可有效的减弱非特异性扩增拖尾的现象。其次通过对TthSSB-255蛋白的功能分析, 本文首次将化合物PEG8000和PEI在RCA体系中进行应用, 可有效提高RCA反应的灵敏度和特异性。不同浓度的PEG(8000)和PEI在改良的RCA体系中, 随着使用浓度的增加可逐渐提高RCA反应的灵敏度和特异性, 当浓度达到一定值以后又会出现抑制RCA反应的现象。

2. 材料和方法

RCA添加剂

PEG(分子量: 8000)和PEI购买于Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), 实验中所用到的水来自于Milli-Q Plus

185水纯化系统, 其电阻值高于18MΩcm。商品化试剂盒Templi Phi (Amersham Biosciences)

2.1. RCA试剂盒体系

RCA反应利用了商品化试剂盒TempliPhi(Amersham Biosciences), 并且严格按照其说明书进行操作, 以1ng重组质粒pUC19-HU- α 为模板(HU- α 的大小为273bp, 基因序列来源于NCBI(Gen Bank: EU891569.1), 以EcoRI和NedI为酶切位点)1 μ l, 添加到5 μ l的sample buffer中, 95 $^{\circ}$ C加热3分钟, 冷却至室温, 再加入5 μ l的reaction buffer和0.2 μ l of enzyme mix(包含phi29聚合酶和引物六聚体), 30 $^{\circ}$ C反应4至18小时, 反应结束后65 $^{\circ}$ C加热10分钟终止反应。

2.2. PCR检测

为了检测RCA产物中是否含有HU- α 的片段, 将RCA的反应产物进行PCR试验。PCR的引物合成订购于Thermo Fisher Scientific, (China)其序列为

primer1:5'AGGATCCATATGACCAAGTCAGAATTG ATAG3'

primer2:5'TACCCGGAATTCTTAACCGTAAATATT G-3'

整个的PCR体系为10 μ l, 其中包含1 μ l的RCA产物, 5 μ l的2 \times Phusion Master Mix (containing buffer, nucleotides, and Phusion DNA polymerase, but not primers or template)和5pmol的引物1和引物2。温度体系: 95 $^{\circ}$ C1分钟, 95 $^{\circ}$ C30秒, 55 $^{\circ}$ C30秒, 72 $^{\circ}$ C30秒, 一共30个循环, 最后72 $^{\circ}$ C5分钟, 保存4 $^{\circ}$ C。该体系借鉴ABI ProFlexTMPCR system (Application Biosystems, USA)。

2.3. PCR和RCA产物检测

DNA用ExRed染色在1%琼脂糖凝胶进行电泳, 用GelX 1650凝胶图像分析系统(上海奥祥科学仪器有限公司, 中国上海)进行可视化和记录。基于琼脂糖凝胶电泳图像, 测定了PEG和PEI提高RCA效率的能力。这是通过比较在给定浓度的PEG或PEI存在下RCA之后的目标DNA条带的光密度值及其他条带的比例来实现的。使用UV/可见蛋白质核酸分析仪(Thermo Fisher Scientific的BioMate3)测定RCA产物的光密度。用各种添加剂的连续浓度添加到RCA反应中进行比较, 选择凝胶上最厚和最亮目标条带(最大效率)的RCA反应的添加剂的浓度作为该添加剂的最佳浓度。还根据上述方法评价了从限制性内切核酸酶分析获得的靶DNA的含量比例以及RCA产物的PCR检测。

2.4. RCA改良体系

整个体系10 μ l, 包括1 μ l的1ng pUC19-HU- α , 2 μ l的2.5mM dNTP, 2 μ l的10 \times BSA, 1 μ l的phi29DNA聚合酶buffer, 0.2 μ l of Templi Phi (Amersham Biosciences)中的酶混合液, 1 μ l的PEG8000或PEI, 其余部分用水补齐。

3. 结果

3.1. PEI和PEG对RCA试剂盒的影响

验证PEI和PEG是否可以增强RCA的灵敏度和特异性。将PEI和PEG进行了不同比例的稀释,分别在体系中加入1 μ l,以1ng重组质粒pUC19-HU- α 为模板,其余操作同试剂盒RCA体系。发现在试剂盒RCA体系下加入适当浓度的PEI和PEG可逐渐的增强RCA的灵敏度和特异性,但RCA的非特异性扩增拖尾现象也逐渐增强如图1 (a,c)。而且RCA极容易受到环境或操作的污染,造成在非模板状态下也容易出现扩增现象干扰实验结果,因此以不加模板的状态下验证了PEI和PEG对试剂盒RCA的影响,发现当加入一定量的PEI或PEG可以有效的消除非特异性扩增现象如图1 (b,d)。

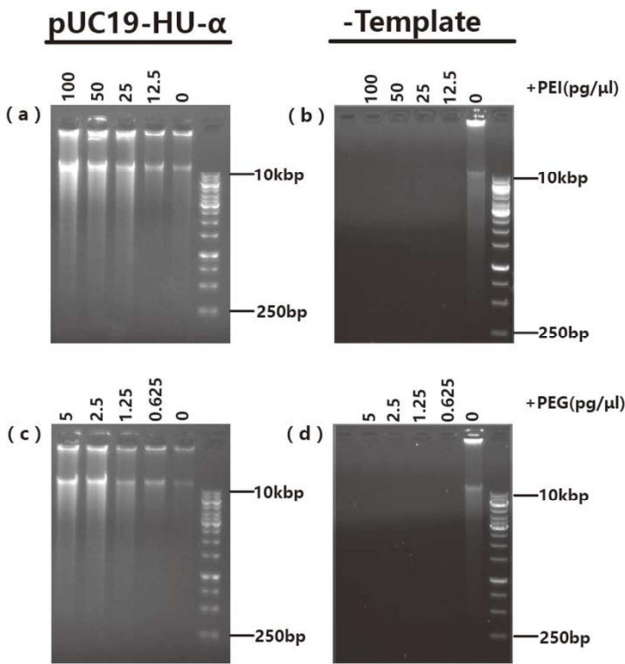


图1 PEI和PEG对试剂盒RCA体系在有模板和无模板情况下的影响。(a) 重组质粒pUC19-HU- α 为模板加入了不同浓度的PEI; (b) 同(a) 差别在于不加模板; (c) 重组质粒pUC19-HU- α 为模板加入了不同浓度的PEG; (d) 同(c) 差别在于不加模板; 泳道M的markers范围(250bp到10kbp)。

3.2. PEI和PEG对改良RCA体系的影响

为了验证改良RCA与添加PEI和PEG后是否可以增强RCA的灵敏度和特异性,同时减弱非特异性扩增产生的拖尾现象。将PEI和PEG按不同比例进行稀释,分别在体系中加入1 μ l,以1ng重组质粒pUC19-HU- α 为模板,其余操作同改良RCA体系。发现在改良RCA的体系中加入适当浓度的PEI和PEG可以逐渐增强RCA的灵敏度和特异性,同时减少非特异性扩增产生的拖尾现象如图2 (a,c)。为了进一步验证该方法下RCA产物的品质,以EcoRI分别酶切不同的RCA产物,产生了一条大小符合模板pUC19-HU- α 且趋势逐渐增强的条带如图2 (b,d)。该实验从RCA产物和酶切产物两方面验证了PEI和PEG对改良的RCA体系灵敏度和特异性的增强效果。

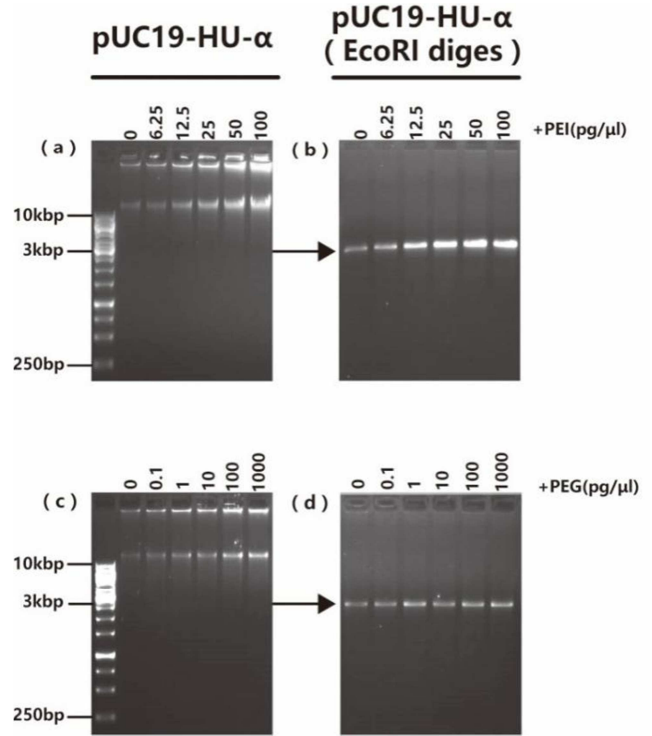


图2 PEI和PEG对改良RCA体系在有模板情况下的影响。(a) 重组质粒pUC19-HU- α 为模板加入了不同浓度的PEI; (b) EcoRI酶对图(a) RCA产物酶切处理; (c) 重组质粒pUC19-HU- α 为模板加入了不同浓度的PEG; (d) EcoRI酶对图(c) RCA产物酶切处理; 泳道M的markers范围(250bp到10kbp)。

3.3. 模板浓度的影响

为了进一步验证PEI和PEG对改良RCA灵敏度和特异性的影响,选择了不同的模板浓度下进行了RCA的比较,观察在改良RCA的体系中加入PEI或PEG是否可以增强RCA的灵敏度和特异性。模板(重组质粒pUC19-HU- α)以1ng为基准值,依次稀释10倍直至 10^{-5} 。发现加入PEI或PEG后可以在模板浓度只有0.1~0.01pg的情况下依然会出现少量的扩增现象,这一点说明从模板浓度方面考虑,该方法同样可以有效增强RCA的灵敏度和特异性,实现了在低模板浓度下的RCA反应,同时减少非特异性扩增产生的拖尾现象如图3 (a,b,c)。

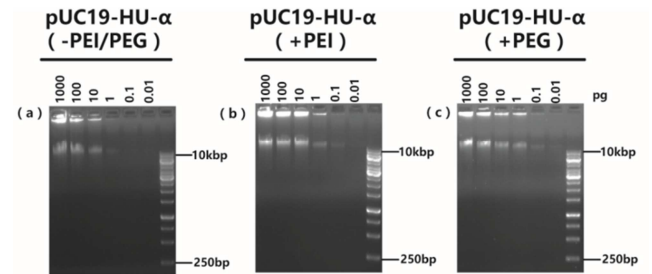


图3 PEI和PEG对改良RCA体系在不同浓度模板情况下的影响。(a) 重组质粒pUC19-HU- α 为模板不加入任何辅助剂; (b) 重组质粒pUC19-HU- α 为模板加入了一定量的PEI; (c) 重组质粒pUC19-HU- α 为模板加入了一定量的PEG; 泳道M的markers范围(250bp到10kbp)。

3.4. RCA产物定量分析

为了定量分析PEG或PEI的添加是否能够使改良的RCA体系的效率增加。利用了定量分析紫外/可见蛋白核酸分析仪对RCA产物的核酸含量定量测定。如图4(a,b)所示,发现不同浓度的PEI和PEG在一定浓度范围内可逐渐增强RCA的扩增效率,但过量的添加剂在一定程度上降低了RCA的扩增效率。

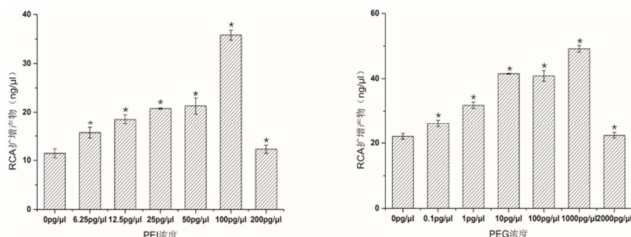


图4 定量分析PEI和PEG对RCA扩增效率的影响。(a)改良RCA体系中加入不同浓度的PEI;(b)改良RCA体系中加入不同浓度的PEG。(n=3, $\bar{x} \pm s$; *P<0.05 vs PEI或PEG未处理组)。

3.5. PCR验证RCA扩增的HU- α DNA

评估RCA扩增的重组质粒pUC19-HU- α 中HU- α DNA的质量,使用连续稀释的重组质粒pUC19-HU- α 或RCA产物进行PCR检测。2%凝胶电泳显示对HU- α DNA (273bp)片段的PCR结果。实验发现以同浓度的RCA扩增产物比以重组质粒pUC19-HU- α 作为模板的PCR效果更好如图5(a,b)。当在RCA产物作为模板的PCR中加入PEI或PEG,在一定成度上也增强了PCR的扩增效率,即使当模板浓度由1ng/µl降低至1/1000同样能获得较高的扩增效率如图5(c,d)。在PEI和PEG存在的情况下,尽管PCR扩增的非特异性效率增强,但仍然获得大量的PCR目的产物。很明显,PEI和PEG极大地刺激聚合,特别是在RCA和PCR反应中模板浓度较低时。

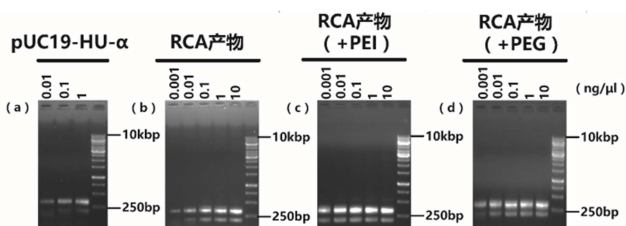


图5 PCR验证RCA扩增产物HU- α 。(a)重组质粒pUC19-HU- α 为模板稀释成不同的浓度进行PCR;(b) RCA扩增产物为模板稀释成不同的浓度进行PCR;(c)重组质粒pUC19-HU- α 为模板稀释成不同的浓度同时加入PEI进行PCR;(d)与图(c)不同处在于PEG作为辅助剂;泳道M的markers范围(250bp到10kbp)。

4. 结论

本文首先通过对TthSSB-255蛋白在改良RCA反应中所具有的现象,分析了现有的RCA存在的缺点,设计了一种新的RCA操作体系,同时为了进一步完善改良的RCA体系,首次利用了PEI和PEG这两种化合物作为对RCA反应的辅助催化剂,并通过大量的浓度筛选,测定了PEI和PEG的有效浓度范围,以上的研究结果已表明,

这样的RCA改良方法可以显著的减少RCA非特异性扩增产生的拖尾现象,同时增强特异性扩增。众所周知,phi29DNA聚合酶具有多重置换和连续复制的功能,它可以与模板和引物同时结合,引导着DNA的合成。非特异性RCA产物的形成,可能源自引物与模板的错配或者引物二聚体的形成[12]。所以,在本文的研究中,如果可以让引物不形成引物二聚体或引物与模板正确有序的结合或者使phi29DNA聚合酶更好的指挥DNA的合成,是否可以减少非特异性扩增产物以及增加特异性扩增。首先,分析RCA试剂盒的操作步骤,它要求首先将模板加入到sample buffer(含有引物六聚体)中,进行变性处理。那么引物将会与解链的模板互补配对,然而这种互补配对是随机的,没有秩序的,因此会出现大量的错配情况。之后加入reaction buffer和酶MIX(含有phi29DNA聚合酶和引物六聚体)进行反应。虽然,新加入phi29DNA聚合酶可以有效指挥之后的引物与模板正确的结合与合成,但是不能指挥之前已经与模板随机结合的引物,这就造成了大量的非特异性扩增产物。所以引物需要与phi29DNA聚合酶同时加入RCA反应体系,保证引物与模板在phi29DNA聚合酶的指挥下正确的结合与合成。因此本文设计了这种RCA改良方法,这种方法的操作要求,首先将模板进行变性处理,之后同时加入引物和phi29DNA聚合酶。从图2a和2b可以证实这一猜想。另外,这个RCA试剂盒,在没有模板的情况下,同样会出现非特异性扩增现象,这可能是受到环境中的生物气溶胶污染或引物二聚体造成的,在sample buffer中含有大量的引物,经过变性处理以后,这一部分引物会相互分开,与之后加入的酶MIX中的引物会形成大量的引物二聚体,造成非模板状态下的非特异性扩增。而改良的RCA操作中,没有二次加入的引物,同时加入PEI或PEG作为辅助剂,所以在没有模板的情况下不会出现非特异性扩增现象,如图1b和1d证实了这一猜想。

最近的报道证明单链DNA结合蛋白有利于RCA的反应, Jin Inoue et al证明了一种突变的单链DNA结合蛋白可以改善RCA反应,这些蛋白对RCA反应的效应是基于他们特殊的DNA结合特点。而PEI是一种带正点的聚合物,它可以有效的与DNA进行结合,有研究表明PEI是一种最有效的非病毒基因载体[14-15],因此在RCA试剂盒操作过程的第一步加入PEI,可以辅助引物与模板结合的更紧密,类似与单链DNA结合蛋白的功能,将有利于RCA的扩增,如图1a所示。但是这种增强的效应是没有特异性的。而在没有模板的情况下,PEI会结合大量的引物二聚体,使引物大量聚集,从而干扰DNA的合成,克服非模板状态下,试剂盒出现的非特异性扩增现象,正如如图1b证实了这一猜想。单链DNA结合蛋白的另一功能就是可以有效的维持DNA单链的状态,PEG具有良好的分散性特点[16-19],引起水活度的降低而改变稳定性[19-20],还具有加速T4 DNA连接酶的连接活动,和TaqDNA聚合酶活性[21-24]。在RCA试剂盒操作过程的第一步加入PEG,可以使模板解链后分散得更充分,有利于引物与模板的结合,从而有利于RCA的反应,正如图1c所示,但是这种增强的效应也是没有特异性的。而在没有模板的情况下,因为引物二聚体本身的结合力非常弱,而且PEG对小分子的核酸分散效果

更显著，所以会阻碍二聚体的形成，克服非模板状态下，试剂盒出现的非特异性扩增现象，干扰DNA的合成，正如如图1d证实了这一猜想。无论是PEI或者PEG，过度的结合和分散都会阻碍DNA的合成，造成对RCA反应的抑制作用，这种现象类似于PCR添加剂[25]，正如图5所示。

证实了以上的猜测以后，考虑将PEI和PEG应用到改良的RCA方法中，在变性的这一步中，PEI会与单链DNA结合，当加入了引物和phi29DNA聚合酶后，PEI将作为单链DNA与引物和phi29DNA聚合酶之间的媒介，更有利于RCA的反应。同样的，在变性的这一步中，PEG可以辅助变性，使模板的单链化程度更充分，从而提高RCA的反应效率。而且这种方法，产生非特异性扩增拖尾现象较弱，正如图4证实了这一猜想。但是过多的PEI和PEG在改良的这种方法中，也会造成抑制现象，如图5所示。

致谢

作者感谢刘楠幸，杨会勇的宝贵建议，郑晨娜，蔡飞和李梦琳在技术上的帮助。本研究由华侨大学科学基金项目（13Y0412*），福建省农业高等学校合作项目（Z1625059）和华侨大学研究生科研创新培育计划项目资助。

参考文献

- Chen N, Feng Z. Interconnect Delay Performance Evaluation for Non-Crossing Level and Row Operands Parallel RCA [J]. *Tianjin Daxue Xuebao*, 2017, 50(4):429-436.
- Annabel Rector, Ruth Tachezy, Marc Van Ranst. A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *J Virol*, 2004, 78(10): 4993-4998.
- Seok Y, Joung H A, Jeon H S, et al. Loop-mediated isothermal amplification on the paper-based device for simultaneous and time-dependent detection of bacterial meningitis DNA[J]. *Korean Biotechnology Conference*, 2016.
- Mikawa T, Inoue J, Shigemori Y. Single-stranded DNA binding protein facilitates specific enrichment of circular DNA molecules using rolling circle amplification. *Anal Biochem*, 2009, 391(2):81-84.
- Yoshimura T, Nishida K, Uchibayashi K, Ohuchi S. Microwave assisted rolling circle amplification. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2006, (50):305-306.
- Hamidi S V, Ghourchian H. Colorimetric monitoring of rolling circle amplification for detection of H5N1 influenza virus using metal indicator.[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 72:121-126.
- Seok Y, Joung H A, Byun J Y, et al. A Paper-Based Device for Performing Loop-Mediated Isothermal Amplification with Real-Time Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets.[J]. *Theranostics*, 2017, 7(8):2220-2230.
- Geng Y, Wu J, Shao L, et al. Sensitive colorimetric biosensing for methylation analysis of p16/CDKN2 promoter with hyperbranched rolling circle amplification [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 61(20):593-597.
- Kobori T, Takahashi H. Expanding possibilities of rolling circle amplification as a biosensing platform. *Anal Sci*, 2014, 30(1):59-64.
- Xing Y, Wang P, Zang Y, et al. A colorimetric method for H1N1 DNA detection using rolling circle amplification. [J]. *Analyst*, 2013, 138(12):3457-62.
- Zhao W, Ali MM, Brook MA, Li Y. Rolling circle amplification: applications in nanotechnology and biodetection with functional nucleic acids. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(34):6330-6337.
- Inoue J, Shigemori Y, Mikawa T. Improvements of rolling circle amplification (RCA) efficiency and accuracy using *Thermus thermophilus* SSB mutant protein. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(9):e69-e69.
- Dabrowski S, Olszewski M, Piatek R, Brillowska-Dabrowska A, Konopa G, Kur J. Identification and characterization of single-stranded-DNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus*-new arrangement of binding domains. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 10):3307-3315.
- Ewe A, Höbel S, Heine C, et al. Optimized polyethylenimine (PEI)-based nanoparticles for siRNA delivery, analyzed in vitro and in an ex vivo tumor tissue slice culture model. [J]. *Drug Delivery & Translational Research*, 2017, 7(2):206-216.
- Wang H, Li Q, Yang J, et al. Comb-shaped polymer grafted with REDV peptide, PEG and PEI as targeting gene carrier for selective transfection of human endothelial cells [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(7).
- Muhuri S, Mimura K, Miyoshi D, Sugimoto N. Stabilization of three-way junctions of DNA under molecular crowding conditions. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(26):9268-9280.
- Alalaiwe A, Roberts G, Carpinone P, et al. Influence of PEG coating on the oral bioavailability of gold nanoparticles in rats.[J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1):591.
- Gonçalves C, Akhter S, Pichon C, et al. Intra-cellular availability of pDNA and mRNA after transfection: A comparative study in between polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2016, 13(9).
- Miyoshi D, Sugimoto N. Molecular crowding effects on structure and stability of DNA. *Biochimie*, 2008, 90(7): 1040-1051.
- Feng B, Frykholm K, Nordén B, Westerlund F. DNA strand exchange catalyzed by molecular crowding in PEG solutions. *Chem Commun (Camb)*, 2010, 46(43): 8231-8233.
- Hayashi K, Nakazawa M, Ishizaki Y, Hiraoka N, Obayashi A. Stimulation of intermolecular ligation with *E. coli* DNA ligase by high concentrations of monovalent cations in polyethylene glycol solutions. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(22):7979-7992.
- Zimmerman SB, Harrison B. Macromolecular crowding increases binding of DNA polymerase to DNA: an adaptive effect. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(7): 1871-1875.

- [23] Pfeiffer BH, Zimmerman SB. Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11(22):7853-7871.
- [24] Sasaki Y, Miyoshi D, Sugimoto N. Effect of molecular crowding on DNA polymerase activity. *Biotechnol J*, 2006, 1(4):440-446.
- [25] Samarakoon T, Wang S Y, Alford M H. Enhancing PCR amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive. [J]. *Applications in Plant Sciences*, 2013, 1(1):38-51.