

综述

连接酶介导的生物分子检测技术

许超^{1,2}, 周亚凤¹, 张先恩¹

1 中国科学院病毒研究所 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 连接酶可以催化寡核苷酸模板上 2 条单链在缺口处形成磷酸二酯键。这种在缺口处需要单核苷酸互补的化学反应特性催生了连接酶介导的生物分子检测技术。在过去 20 年中, 该技术已成功应用于对已知或未知点突变、小片段核酸插入或缺失、DNA 甲基化、大规模单核苷酸多态性 (SNP) 分型, 蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-DNA 相互作用的检测以及分析。同时, 连接反应通过整合进入其它生物技术, 在生物分子检测中取得了更大的进展。这些新的方法经过多重杂交和酶学反应后, 仍能保持很高的检测准确性, 并为整个检测反应提供了内在的质量控制校核。以下综述了基于连接酶的生物分子检测技术。

关键词: 连接酶, 核酸多态性, 生物分子相互作用, 检测

Development in ligase-mediated techniques for bio-molecular analysis

Chao Xu^{1,2}, Yafeng Zhou¹, and Xian'en Zhang¹

1 State Key Laboratory of Virology, Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

2 Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: Two oligonucleotide probes are permitted to anneal to the nucleic acid target of interest so that the ends of two probes immediately become adjacent to each other. The ligase can then efficiently join the two juxtaposed oligonucleotide probes by the formation of a phosphodiester bond if and only if perfectly matched base-pairs at the nick are present. During past 20 years, many ligase-mediated techniques have been developed for analyzing various bio-molecules, such as known/unknown point mutations, small-scale insertions and deletions, CpG islands methylation, large sets of single nucleotide polymorphisms (SNPs), specific proteins and DNA regions with which some other proteins can interact. Since the ligation reaction can be easily integrated into other techniques, certain advances have been already achieved. These novel approaches retain high accuracy through multiple hybridization and enzymatic processing events, and provide inherent quality control checking. In this article, we provide a comprehensive review of the ligase-mediated techniques for bio-molecular analysis.

Keywords: ligase, nucleic acid polymorphic variation, bio-molecular interaction, detection

连接酶是一种封闭 DNA/RNA 链上缺口(Nick)的酶, 借助 NAD⁺ 或 ATP 水解提供的能量催化 2 条核酸单链的 3'端羟基和 5'端磷酸基团反应形成磷酸二酯键。完整的连接酶催化过程包括 3 个步骤: 1)连

接酶腺苷酰化; 2)连接底物腺苷酰化; 3)缺口封闭。连接酶的发现使核酸片段的体外拼接变得十分容易, 因此成为基因工程中基本工具酶之一, 并获得十分广泛应用。

Received: October 31, 2008; **Accepted:** December 24, 2008

Corresponding author: Xian'en Zhang. Tel: +86-27-87199115; Fax: +86-27-87199492; E-mail: x.zhang@wh.iov.cn

20 年前, 连接酶首次被开发利用于生物分子检测。近年来, 基于连接酶的检测技术获得长足发展, 其应用范围也不断拓展。该技术的发展对应着基因组学、表观遗传学以及蛋白质组学的发展。对于物种基因组不断积累的认识可以划分为 2 个范畴: 一是单个个体的全长基因组信息; 二是不同个体基因组之间的差异信息。在基因组学发展的早期, 对于这些差异的认识多数来源于限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析。然而, 越来越多的数据和现象表明, 这种分辨率 (Resolution) 对于认识基因组以及之间的差异是远远不够的。因此 SNP 被引入作为表型差异以及疾病发生的遗传分子标记, 而这种在单个核苷酸层面上进行识别的分辨率对生物检测技术的发展提出了更高的要求。近来, 邻近连接技术的发展将连接酶技术扩展到了蛋白质相互作用检测甚至整个生物分子检测领域。以下将对基于连接酶的生物分子检测技术作一综述。

1 核酸多态性检测

1.1 已知突变的检测

1988 年, Landegren^[1]首先发明了连接酶体外突变检测技术, 原理如图 1 所示, 并利用该技术鉴定了编码导致地中海镰刀型细胞贫血症的 β 球蛋白的突变等位基因 β^S 和野生型等位基因 β^A 之间的单碱基差异。1991 年, Barany^[2]发展了连接酶检测反应 (Ligase detection reaction, LDR) 和连接酶链式反应 (Ligase chain reaction, LCR)。理论上 LCR 的信号扩增较 LDR 高出 2 个数量级, 但实际应用却不如 LDR 广泛, 原因可能在于 LCR 中, 探针之间比较容易形成不依赖于模板的平端连接, 4 条等位基因特异性引物的序列两两互补, 并且造成多重检测过程中混合引物数量过于繁多, 降低了信噪比, 提高了假阴性率。

利用连接酶技术的基本原理, 结合生物芯片和生物传感器, 衍生出了一系列新的技术。在连接酶催化两段探针连接过程中, 连接酶识别位点 3'端 5

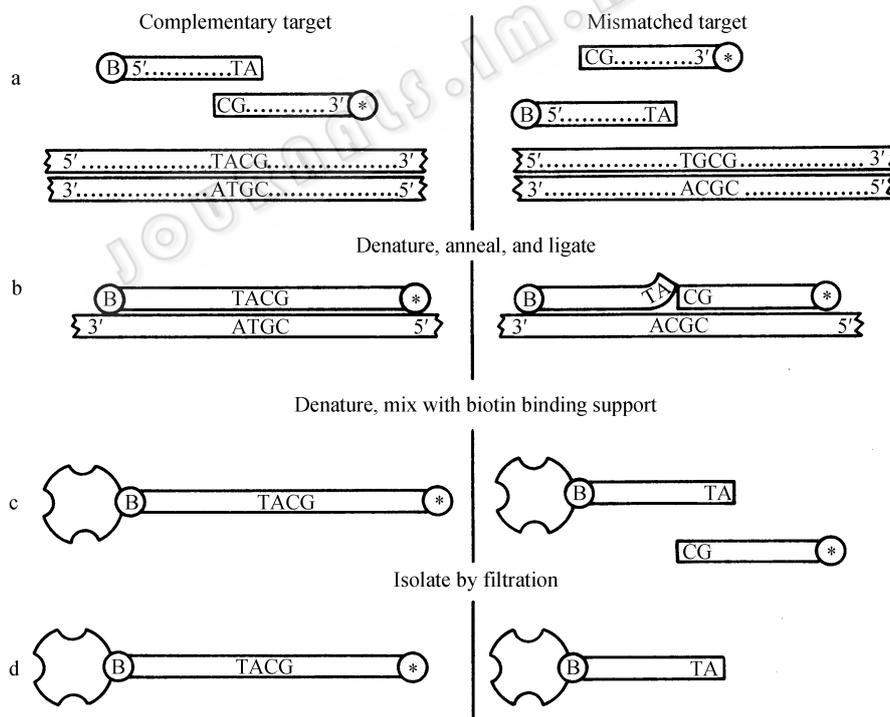


图 1 连接酶突变检测技术原理图^[1]

Fig. 1 Schematic diagram of mutation detection using ligase-mediated technique^[1]. (a) Target DNA of wild type and mutant are denatured and mixed with probes and ligase, respectively. (b) The pairs of probes are joined if and only if they are correctly base-paired at the junction. (c) Denaturation and separation. (d) Radioactively labeled oligonucleotides (*) are immobilized and detected by autoradiography only if ligated to biotinylated oligonucleotides (B) that can be bound to streptavidin on a solid support.

个碱基之内任何一个位置的碱基发生错配都会导致连接酶不能正常连接。利用这一原理,本实验室 Deng 等^[3]提出了一种称为芯片连接短寡核苷酸的多重检测方法(Short oligonucleotide ligation assay on chip, SOLAC)。该方法只需一条通用探针即可检测 5 个碱基范围内所有 20 个突变类型。Hashimoto 等^[4]利用聚碳酸酯(Polycarbonate)作为表面材料构建了基于 LDR 突变检测的微流芯片,将整个 PCR/LDR 反应时间缩短为 22.8 min。Zhang 等^[5]利用单微流通道(Single microfluidic channel)阵列结合连接酶技术,对 p53 基因第 175 位密码子中的突变进行了分析,在突变-野生型比例为 1:1000 的情况下取得了大于 2 的信噪比,不依赖探针扩增实现了高野生型背景下的突变型检测。针对高通量突变检测过程液相中大量探针相互干扰的问题,本实验室 Xu 等^[6]设计了一

种基于多重探针对(Multiplexing probe-pair, MPP)的连接酶介导检测方法(图 2)。传统的连接酶方法在识别突变后,再对所有连接产物进行分型(电泳或是 zip-code 序列^[7]),而 MPP 则利用 zip-code 的特异性相互识别先对所有突变进行分型,再对突变进行检测。应用该策略,将针对每个目的突变的所有检测反应都固定在 DNA 芯片上相应的小孔中,从而达到了将一个多重反应分隔为多个单独反应的目的。

1.2 核酸片段插入及缺失检测

核酸片段的插入或缺失常导致染色体异常,而染色体异常又往往引起各种遗传病和癌症。因此,及早地确定染色体异常的发生有利于选择合适的治疗方法。

Barany 实验室发展了一种称为双重 PCR/LDR/通用阵列的技术,该技术成功地检测出了 *BRCA1* 和

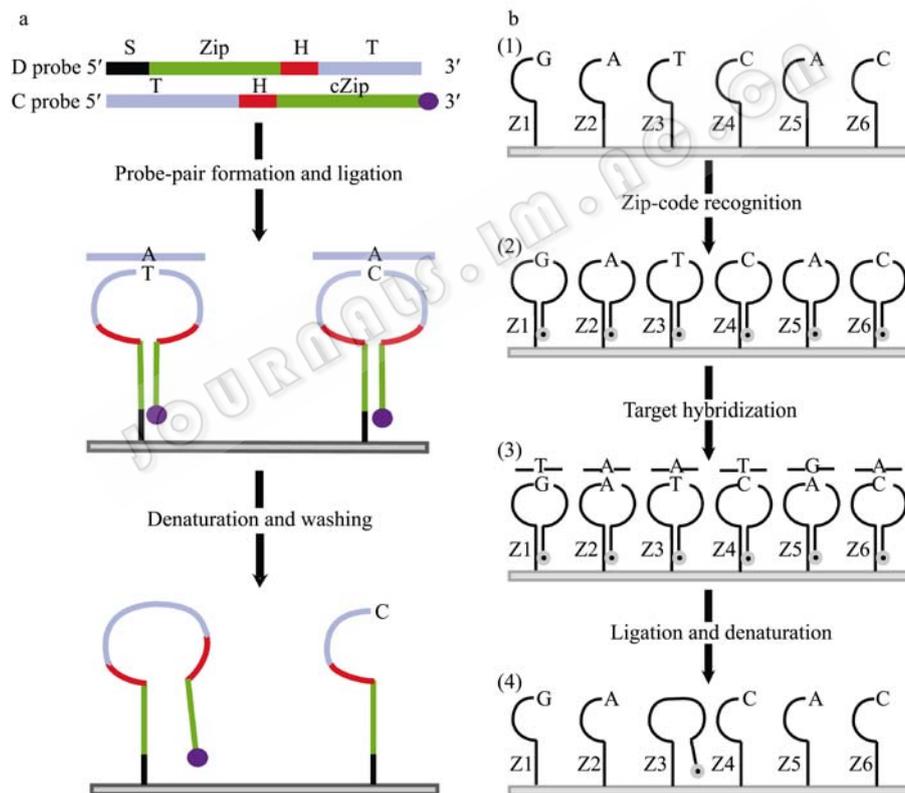


图 2 探针对以及多重检测

Fig. 2 Schematic diagram of probe-pair and related multiplex mutation detection. (a) Each probe-pair includes a common probe (C probe) and a discriminating probe (D probe). The C probe contains target-specific region (pale blue) and complementary zip-code region (green), which is labeled with biotin (purple dot). Target-specific region and zip-code are connected by a $T_{(8)}$ hinge arm (red). The D probe is analogous to C probe, but with an extra $T_{(10)}$ space linker (black) at the 5' end. Only target-specific regions perfectly hybridized to a target sequence (pale blue line) are efficiently ligase-reactive. As a result, the biotin is preserved on chip. (b) Identification of point mutations using MPPs is performed by (1) Immobilizing D probes into each well; (2) hybridizing a set of C probes to corresponding D probes through specific zip-code recognitions; (3) recognition of target mutation and (4) enzymatic visualization on chip after ligation and denaturation. The probe-pair containing perfect match is ligated and then preserved with biotin, indicating the presence and the nature of the mutation.

BRCA2 基因中所有核酸片段插入和缺失^[8]。此外, 应用多重连接酶依赖性探针扩增技术 (Multiplex ligase-dependent probe amplification, MLPA), De Luca 等^[9]对 201 位 I 型神经纤维瘤病患者的 *NF1* 基因插入及缺失情况作了分析, 检测出 14 个病人的 *NF1* 基因缺失。Cavalieri 等^[10]利用 MLPA 对共济失调性毛细血管扩张症突变体基因中的未知点突变、插入和缺失情况进行了分析。结果表明, 在该基因中发生了长度达 41 kb 的大片段重复拷贝、发现了 31 号内含子缺失、在未发生缺失的 31 号内含子中发现了新的点突变。

1.3 未知突变的检测

常规连接酶介导的突变检测具有一定的局限性, 因为连接反应只能在已知突变位点以及突变类型的设计针对突变位点两侧序列的连接探针, 但难以针对未知突变位点的检测。

一种解决方案是通过人工方法建立含有杂合特异性位点的双链探针^[11], 利用核酸内切酶 *endo-V* 切割某一个错配碱基的 3' 端, 形成一个缺口。由于 *endo-V* 的切割活性并非特异性, 使得在一些正常配对碱基的 3' 端也形成了缺口。随后加入连接酶, 连接酶通过连接正常配对的 3' 末端碱基, 从而识别出未知突变。最后用凝胶电泳分析荧光标记的片段, 近似地确定突变的位置。利用该方法, 在 *p53*、*VHL*、*K-ras*、*APC*、*BRCA1*、*BRCA2* 基因中鉴定出了 31/35 个未知点突变, 以及 8/8 个未知插入和/或缺失。该方法具有较好的灵敏度和特异性。据估计, 基于 *endo-V* 和连接酶的突变检测方法可以检测大约 98% 的人类基因组中的点突变、插入、缺失等多态性。造成剩余 2% 多态性类型难以鉴定的主要原因是这些突变位于 CG 富集区, 这些区域可能导致形成阻碍 *endo-V* 切割的二级结构。

另一种相似的策略是利用糖基化酶切割特定位点^[12], 例如 MutY 特异性切割 AG 错配, 胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶 (TDG) 特异性切割 TG 错配, 随后利用 T4 连接酶连接切割产物。或者, 引入特异性的上游和下游引物, 切割片段可以形成双链 DNA, 在 T4 连接酶的作用下, 与双链平端接头 (Blunt-end double-stranded linker) 连接, 再利用特异性引物对信号进行扩增。联合应用 MutY 和 TDG 的错配切割特异性, 可以识别 70% 与肿瘤发生相关联的 cSNPs

(Common SNPs)。

1.4 RNA 多态性检测

Tyagi 等^[13]首先实现利用 T4 DNA 连接酶连接 RNA 探针并检测 RNA 模板中的突变。Nilsson 等^[14]进一步研究了其反应条件对连接效率的影响, 发现环境中较低钠离子和 ATP 浓度、较高 T4 DNA 连接酶浓度适合于 RNA 为模板的突变检测, 并进一步鉴定了正确配对与所有可能的 12 种错配的连接产物的比例, 证实了在该环境中 T4 DNA 连接酶介导的 RNA 突变检测具有相当高的准确性。有 2 个值得注意的现象, 一是反应产物中存在大量 5' 端腺苷化的未连接探针, 原因还不清楚; 二是反应过程中 GT 之间容易产生错配, 这种现象在检测 DNA 突变时也时有发生。

RNA 模板介导的连接反应已经被应用于选择性剪接的检测^[15]。首先, 通过退火, 使末端 polyA 标记的 mRNA 与带有生物素标记的 polyT 特异性的外显子检测引物相结合, 然后与链霉亲和素包被的 PCR 管壁相结合, 未结合的 mRNA 以及引物则被洗去。通过特异性连接 mRNA 模板上探针, 以及连接产物的 PCR, 选择性剪接外显子被检测并实现光纤阵列上的定量分析。该技术可以检测大约 10 pg 的 RNA, 或是 10 个细胞总 mRNA。

1.5 甲基化检测

CpG 岛位于基因 5' 端转录调控区域的启动子内, 能与转录启动蛋白复合体结合。DNA 甲基化主要发生于 CpG 岛的胞嘧啶中, 与转录沉默密切相关。对 CpG 二聚体甲基化程度的精确分析, 有助于癌症等一些疾病的早期诊断。

双重 PCR/LDR/通用阵列也可以应用于甲基化的检测^[16], 其基本原理与检测点突变相同。首先利用重亚硫酸钠处理待检样品, 在重亚硫酸钠的作用下, CpG 二聚体中未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶。这个转变使得基因组 DNA 成为 2 条不对称、不完全互补的单链, 同时将甲基化的信息转化成为突变信息, 随后进行双重 PCR/LDR。不同的是, 第一步 PCR 为不对称多重 PCR, 只扩增其中一条单链。LDR 引物中的等位特异性探针 5' 末端只需设置 C/T 为识别位点, 末端为 C 的探针能识别甲基化位点, 末端为 T 的探针则识别非甲基化位点。最后通过通用阵列分离连接产物。Dahl 等^[17]利用类似的方法构

建了多重 CpG 甲基化检测系统, 对 7 个乳腺癌相关基因中的 CpG 超甲基化进行了分析。

1.6 大规模基因分型

相对于常规连接反应中一个突变位点的检测需要 2 条探针, 锁式探针(Padlock probe, PLP)和单链分子反转探针(Molecular inversion probes, MIP)通过将分子间连接反应转化成分子内连接反应, 大大提高了连接反应的效率。因此, 这种探针设计原理可以降低反应体系中探针的浓度, 缓解高通量多重检测中大量探针的交叉反应。

PLP 由两段连接探针、两段通用 PCR 引物和一段通用序列组成^[18]。Szemes 等^[19]研究了影响 PLP 特异性和灵敏度的各种因素。通过滚环复制的方式, PLP 还可以用于大规模基因克隆和多重 PCR。首先通过多重 PCR 扩增, 获得随机扩增片段, 随后利用相同引物对组成的连接模板, 将正确的扩增产物通过末段引物连接, 最后利用滚环扩增获得各种包含有大量单一目的编码序列库。斯坦福基因组技术中心的研究人员利用这种方法克隆了癌症相关基因中的大部分编码序列^[20,21]。

MIP^[22]是建立在锁式探针基础上发展起来的一项技术。它在大规模基因分型方面显现出更突出的优势以及更广阔的前景。两者的主要区别在于 PLP

没有内切酶位点(图 3), 这意味着 PLP 的突变检测后信号扩增必须进行滚环扩增, 但环状 PLP 与靶 DNA 形成的部分双链拓扑结构对信号扩增有一定的抑制, 而 MIP 通过切割探针上的尿嘧啶使探针线性化并与靶 DNA 分离, 使得扩增效率提高^[23], 因而更适合大规模高通量基因分型。MIP 在基因组研究中已经实现了同时检测超过 12 000 个 SNP 位点^[24], 准确率大于 99%, 灵敏度为 0.2 ng 靶 DNA/SNP 位点。考虑到该方法介导的 SNP 分型通量, 以及单个反应中所含探针的数量, 这一灵敏度已经相当高。利用 MIP, 在临床病原诊断中也建立了完善的多重突变检测平台 PathogenMIP^[25]。

2 连接酶介导的生物分子相互作用分析

2.1 体外蛋白质相互作用分析

近年来, 核酸与蛋白质的相互作用得到广泛研究, 已经报道了大量针对靶蛋白的寡核酸适配体(Aptamer)。Fredriksson 等^[26]建立了邻近式连接方法(Proximity ligation assay, PLA), 该方法采用的 2 条或多条 DNA 链包括 3 个部分: 用于识别抗原决定部位的适配体、PCR 引物区域和连接探针区域。反应的基本原理如图 4 所示。连接反应过程只进行极短的时间 (30 s), 目的是为了尽量避免由于非依赖性蛋

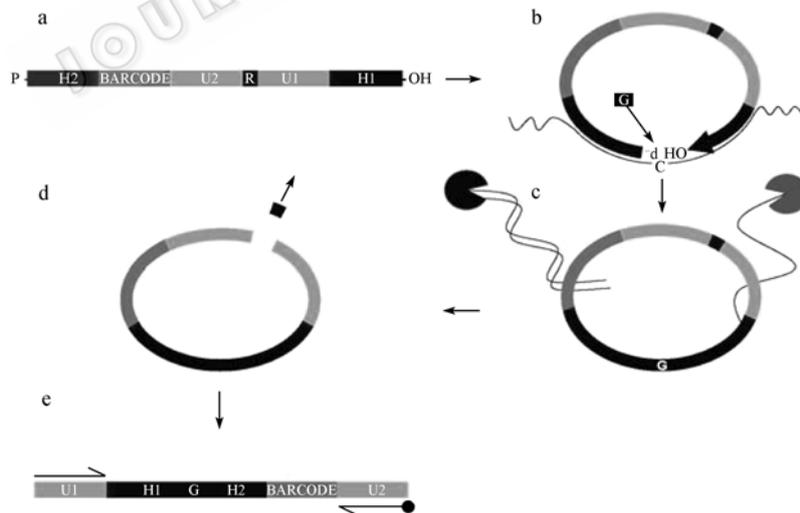


图 3 分子反转探针原理图^[25]

Fig. 3 Schematic diagram of molecular inversion probe^[25]. (a) Molecular inversion probe is composed of three sequence parts, that is, two ligation probes (H1, H2), two universal PCR primers (U1, U2), one universal barcode which is used for product screening. R between U1 and U2 represents the restriction site for probe linearization. (b) Upon target recognition, a DNA polymerase fills the missing gap in. (c) Circular DNA enrichment through DNA degeneration by exonuclease. (d) Probe linearization restriction site cleavage. (e) All inverted probes are amplified by universal primers.

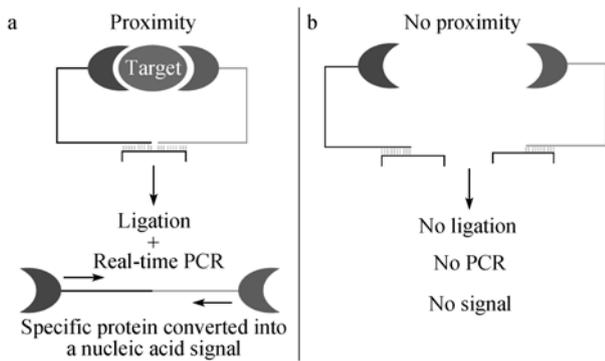


图 4 邻近连接原理图^[30]

Fig. 4 Schematic diagram of proximity ligation assay^[30]. (a) Two probes, which are bound to different antibodies directed against one particular protein at one end, are brought so close that the ligation reaction realizes. (b) There is no interaction between antibodies and the particular proteins, and therefore no amplified DNA products.

白质相互作用而产生的连接反应,从而保证了邻近式连接技术的高度特异性。在此基础上发展了一种 3PLA 方法^[27],同时检测 3 个蛋白质的相互作用。3 条邻近式探针分别连上血管内皮生长因子、肌钙蛋白和抗前列腺特异性抗原抗体。连接抗体的 3 条探针中的 2 条连接探针被竞争性寡核苷酸适配体的自身二级结构封阻,而另一条则作为前 2 条连接探针的连接模板。当 3 个待检测蛋白发生相互作用形成复合体后,标记 3 个抗体的探针靠近。由于连接模板与 2 条连接探针的互补序列比较长,即竞争性比较强,所以连接模板取代竞争性寡核苷酸片段与连接探针互补配对。随后添加连接酶体系以及一条盒式寡核苷酸链,后者填补了 2 条连接模板之间形成的缺口,并进行连接,之后再行实时 PCR 对连接产物进行分析,从而实现对 3 个蛋白质相互作用的实时检测。该设计的另一巧妙之处在于,竞争性寡核苷酸适配体形成的二级结构能介导自身与连接模板之间的连接反应,对没有参与邻近连接的探针进行了封阻。这个过程保证了在混合蛋白中蛋白质相互作用检测的特异性,并且能实现对蛋白质的多重检测。目前,邻近连接技术已经成功应用于癌症生物标志分子的检测,细胞因子表达水平的分析,细小病毒的早期诊断^[28,29]。

2.2 蛋白质相互作用原位分析

细胞代谢过程可以认为是动态的分子相互作用过程。原位技术可以用来实时监控细胞或组织的内源蛋白的相互作用,从而揭示细胞内结构以及细胞

的各种应激反应。原位邻近式连接(Proximity ligation in situ assay, P-LISA)可以直接检测和鉴定亚细胞结构中的 2 个或 3 个蛋白质的相互作用。

Soderberg 等^[31]在 2 条邻近式探针一端分别连上能识别内源 Max/Myc 原癌转录因子的抗体,当 Max 和 c-Myc 2 个原癌蛋白相互识别形成复合体,邻近式探针相互靠近。与传统邻近式连接方法不同的是,相互靠近的邻近式探针并不是作为连接探针,而是分别作为连接模板。而传统的邻近连接模板在 P-LISA 中连接后成为单链环状模板,其中一条邻近式探针作为滚环复制的引物。由于单链环状模板中含有标签序列,滚环复制产物能被添加的标记探针通过杂交得以迅速检测,从而实现对蛋白质相互作用的原位分析。该方法已经应用于分析 Max/Myc 复合体与 RNA 聚合酶 II 3 个蛋白质之间的相互作用^[32]、血小板衍生生长因子 B 作用下其受体磷酸化的过程,以及检测血管内皮生长因子 A 与其受体相互作用的抑制蛋白^[33]。

2.3 蛋白质-DNA 相互作用分析

基因的某些转录调控区域以及 mRNA 翻译调控区域常常具有蛋白质结合活性,从而调控着基因功能。为了分析 DNA 蛋白质结合区域,Gustafsdottir 等^[34]发展了一种体外研究 DNA 和蛋白质相互作用方法(图 5)。与邻近式连接方法不同,研究 DNA-蛋白质相互作用所需要的其中一条核酸探针是部分双链的,双链部分即为特异性的蛋白质结合区域,探针的 3'单链部分用于随后的连接过程。另一条连接探针标记一个能直接识别上述 DNA 结合蛋白的抗体。或者结合一种抗体,这种抗体能与 DNA 结合蛋白同时识别另一种蛋白。最后,抗体直接识别 DNA 结合蛋白,或同时识别另一种蛋白后相互靠近,整个检测过程得以进行。如果 DNA 双链部分不能被 DNA 结合蛋白识别,连接反应不能进行,最后检测不到 DNA 扩增信号。该方法的灵敏度能达到识别 1~10 个细胞提取物中 DNA 结合蛋白。

3 展望

20 年来,连接酶介导的生物分子检测技术已获得长足发展,并在核酸多态性检测、大规模 SNP 分型、癌症病原发生和微生物耐药性相关突变检测等方面得到实际应用。由于连接反应很容易与其他技

术相结合, 连接酶介导的生物分子检测技术还有巨大的发展空间。首先, DNA 检测技术的发展需要结合生物传感器以及生物芯片等技术, 同时提高多态性检测的通量和准确性。例如, 本实验室对芯片连接酶突变检测技术做了详细的研究^[3,6]。作者认为, 通过在生物芯片上创造性地设计和构建 DNA 纳米元件, 并利用连接、延伸以及切割等基因工程操作, 能极大地促进 DNA 检测技术的发展。其次, 无论在

基础研究或是临床诊断中, 对 RNA 的快速检测始终是一个十分重要的目标。例如, 在食品安全工程中, RNA 的检测比 DNA 检测显得更为重要。因为目标 DNA 片段极有可能存在于死亡的病原微生物中, 而对于死亡微生物污染的检测在食品安全工程中并不是很重要。RNA 由于其表达受到时序性地调控, 并且容易降解, 因此很适合作为病原微生物检测的目标片段。目前一般的观点认为, RNA 检测技术的发展关键在于筛选出稳定且特异性高的 RNA 连接酶。最后, 连接酶介导的分子相互作用检测技术的发展则取决于能否筛选得到更多能与生物大分子特异性结合的寡核酸适配体。邻近连接技术的基本原理是利用扩增核酸信号表征蛋白质相互作用, 因此该技术自然也能利用核酸信号表征其他分子的相互作用, 只要能够筛选出合适的寡核酸适配体。例如, 利用 2 条末端连接二恶英及其受体 (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 的寡核苷酸链进行邻近连接反应, 也是一种对环境中二恶英含量进行分析的思路。

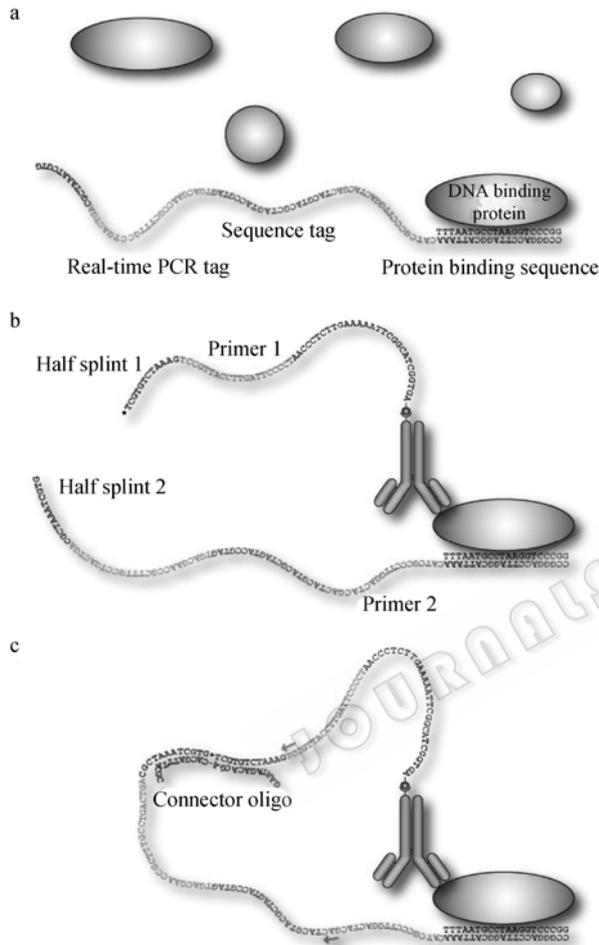


图 5 利用邻近连接检测 DNA-蛋白质相互作用^[37]

Fig. 5 Schematic diagram of analysis of DNA-protein interaction by proximity ligation^[37]. (a) DNA binding protein can be investigated by using two affinity probes. One of the probes carries an antibody against a particular DNA-binding protein, whereas the other would consist of a partially double-stranded DNA sequence potentially recognized by the same DNA-binding protein. (b) If the protein were simultaneously bound by both affinity probes, the ends of their appended oligonucleotides would be brought sufficiently into each other for ligation. (c) The ligated DNA sequence, which would serve as a specific DNA representation of the binding event between the protein and the investigated recognition sequence, would be subsequently amplified and detected by real-time PCR.

REFERENCES

- [1] Landegren U, Kaiser R, Sanders J, *et al.* A ligase-mediated gene detection technique. *Science*, 1988, **241**(4869): 1077-1080.
- [2] Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(1): 189-193.
- [3] Deng JY, Zhang XE, Mang Y, *et al.* Oligonucleotide ligation assay-based DNA chip for multiplex detection of single nucleotide polymorphism. *Biosens Bioelectron*, 2004, **19**(10): 1277-1283.
- [4] Hashimoto M, Barany F, Soper SA. Polymerase chain reaction/ligase detection reaction/hybridization assays using flow-through microfluidic devices for the detection of low-abundant DNA point mutations. *Biosens Bioelectron*, 2006, **21**(10): 1915-1923.
- [5] Zhang H, Yang X, Wang K, *et al.* On-chip oligonucleotide ligation assay using one-dimensional microfluidic beads array for the detection of low-abundant DNA point mutations. *Biosens Bioelectron*, 2008, **23**(7): 945-951.
- [6] Xu C, Zhou YF, Deng JY, *et al.* On-chip ligation of multiplexing probe-pairs for identifying point mutations out of dense SNP loci. *Biosens Bioelectron*, 2008, **24**(12): 818-824.
- [7] Gerry NP, Witowski NE, Day J, *et al.* Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol*, 1999, **292**(2): 251-262.

- [8] Favis R, Day JP, Gerry NP, *et al.* Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(5): 561–564.
- [9] De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, *et al.* Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet*, 2007, **44**(12): 800–808.
- [10] Cavalieri S, Funaro A, Pappi P, *et al.* Large genomic mutations within the ATM gene detected by MLPA, including a duplication of 41 kb from exon 4 to 20. *Ann Hum Genet*, 2008, **72**(1): 10–18.
- [11] Pincas H, Pingle MR, Huang J, *et al.* High sensitivity EndoV mutation scanning through real-time ligase proofreading. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(19): e148.
- [12] Zhang Y, Kaur M, Price BD, *et al.* An amplification and ligation-based method to scan for unknown mutations in DNA. *Hum Mutat*, 2002, **20**(2): 139–147.
- [13] Tyagi S, Landegren U, Tazi M, *et al.* Extremely sensitive, background-free gene detection using binary probes and beta replicase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(11): 5395–5400.
- [14] Nilsson M, Barbany G, Antson DO, *et al.* Enhanced detection and distinction of RNA by enzymatic probe ligation. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(7): 791–793.
- [15] Nilsson M, Antson DO, Barbany G, *et al.* RNA-templated DNA ligation for transcript analysis. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(2): 578–581.
- [16] Cheng YW, Shawber C, Notterman D, *et al.* Multiplexed profiling of candidate genes for CpG island methylation status using a flexible PCR/LDR/Universal Array assay. *Genome Res*, 2006, **16**(2): 282–289.
- [17] Dahl C, Guldberg P. A ligation assay for multiplex analysis of CpG methylation using bisulfite-treated DNA. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(21): e144.
- [18] Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, *et al.* Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science*, 1994, **265**(5181): 2085–2088.
- [19] Szemes M, Bonants P, de Weerd M, *et al.* Diagnostic application of padlock probes--multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(8): e70.
- [20] Akhras MS, Unemo M, Thiyagarajan S, *et al.* Connector inversion probe technology: a powerful one-primer multiplex DNA amplification system for numerous scientific applications. *PLoS ONE*, 2007, **2**(9): e915.
- [21] Dahl F, Stenberg J, Fredriksson S, *et al.* Multigene amplification and massively parallel sequencing for cancer mutation discovery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(22): 9387–9392.
- [22] Hardenbol P, Baner J, Jain M, *et al.* Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(6): 673–678.
- [23] Baner J, Isaksson A, Waldenstrom E, *et al.* Parallel gene analysis with allele-specific padlock probes and tag microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(17): e103.
- [24] Hardenbol P, Yu F, Belmont J, *et al.* Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: over 10 000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay. *Genome Res*, 2005, **15**(2): 269–275.
- [25] Akhras MS, Thiyagarajan S, Villablanca AC, *et al.* PathogenMip assay: a multiplex pathogen detection assay. *PLoS ONE*, 2007, **2**(2): e223.
- [26] Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, *et al.* Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(5): 473–477.
- [27] Schallmeiner E, Oksanen E, Ericsson O, *et al.* Sensitive protein detection via triple-binder proximity ligation assays. *Nat Methods*, 2007, **4**(2): 135–137.
- [28] Ericsson O, Jarvius J, Schallmeiner E, *et al.* A dual-tag microarray platform for high-performance nucleic acid and protein analyses. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(8): e45.
- [29] Gustafsdottir SM, Nordengrahn A, Fredriksson S, *et al.* Detection of individual microbial pathogens by proximity ligation. *Clin Chem*, 2006, **52**(6): 1152–1160.
- [30] Gullberg M, Fredriksson S, Taussig M, *et al.* A sense of closeness: protein detection by proximity ligation. *Curr Opin Biotech*, 2003, **14**(1): 82–86.
- [31] Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, *et al.* Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*, 2006, **3**(12): 995–1000.
- [32] Jarvius M, Paulsson J, Weibrecht I, *et al.* In situ detection of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor beta using a generalized proximity ligation method. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(9): 1500–1509.
- [33] Gustafsdottir SM, Wennstrom S, Fredriksson S, *et al.* Use of proximity ligation to screen for inhibitors of interactions between vascular endothelial growth factor A and its receptors. *Clin Chem*, 2008, **54**(7): 1218–1225.
- [34] Gustafsdottir SM, Schlingemann J, Rada-Iglesias A, *et al.* In vitro analysis of DNA-protein interactions by proximity ligation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(9): 3067–3072.