



## Amplificación por círculo rodante en el diagnóstico molecular: el poder de la simplicidad

**Andrés Mauricio Rivas González**

Facilitador SENA - Regional Norte de Santander.

Arivas@sena.edu.co

### Resumen

La Amplificación del Círculo Rodante (RCA) es un proceso enzimático isotérmico, mediado por ciertas polimerasas de ADN, en el que se sintetizan moléculas largas de DNA de cadena sencilla (ss) en una plantilla circular corta de ssDNA usando un solo cebador; método que permite estudios de análisis filogenéticos, epidemiológicos y sobre la organización del genoma. Recientemente se ha utilizado el ADN polimerasa del bacteriófago phi29 para la amplificación eficiente de genomas virales de ADN circulares sin la necesidad de cebadores específicos mediante el mecanismo RCA, convirtiéndose este último en una herramienta de amplificación de ADN altamente versátil e importante con amplias aplicaciones en los diversos campos de investigación. Con base en ello, la presente revisión destaca brevemente el modelo teórico en el que se basa esta técnica para aplicaciones en el diagnóstico molecular en los diferentes campos de la investigación.

**Palabras Clave:** genoma, Phi29, RCA, ADN polimerasa.

## Rolling circle amplification in molecular diagnostics: the power of simplicity

### Abstract

Rolling Circle Amplification (RCA) is an isothermal enzymatic process, mediated by certain DNA polymerases, in which long single-stranded (ss) DNA molecules are synthesized on a short circular ssDNA template using a single primer; a method that allows phylogenetic, epidemiological and genome organization analysis studies. Recently, DNA polymerase from bacteriophage phi29 has been used for the efficient amplification of circular viral DNA genomes without the need for specific primers using the RCA mechanism, making the latter a highly versatile and important DNA amplification tool with wide applications in various research fields. Based on this, the present review briefly highlights the theoretical model on which this technique is based for molecular diagnostic applications in different research fields.

**Keywords:** Genome, Phi29, RCA, DNA polymerase, DNA polymerase.

## Introducción

### Amplificación de genomas

En el pasado, el descubrimiento de virus novedosos sólo se podía lograr cuando estos se presentaban de manera abundante o podían propagarse en cultivo celular (Rector *et al.*, 2004). No obstante, el estudio de los genomas, a través de nuevos métodos, ha proporcionado una cantidad de información considerable que contribuye a un mayor entendimiento de los aspectos moleculares de los organismos para el diagnóstico clínico, el análisis filogenético, los estudios epidemiológicos y los estudios sobre la organización y evolución del genoma en diversos microorganismos (Johne *et al.*, 2009).

Así, la disponibilidad de herramientas eficientes para la amplificación e identificación de las secuencias del genoma es un requisito indispensable para el análisis exitoso de los estudios en mención (Vera, *et al.*, 2012). Entre los métodos más utilizados para la detección molecular de dichos organismos se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la microscopía electrónica y los análisis serológicos (Lockhart & Olszewski, 1993). Y aunque la PCR es considerada el patrón de oro para estos análisis de identificación molecular (Tavares *et al.*, 2011), su implementación presenta diversos inconvenientes como los altos costos y la incidencia de errores de amplificación por contaminación cruzada, lo que genera falsos positivos en sus lecturas (Pang *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta lo anterior resulta imperativo el desarrollo e implementación de técnicas comparables a la PCR, sin que sea necesaria la adquisición de equipo adicional (Fakruddin *et al.*, 2013). Razón por la cual, y ante la creciente demanda de ensayos más sensibles en diferentes campos de la investigación, se han aplicado diversos protocolos para la detección de nuevos virus y explorado determinadas técnicas que permitan la amplificación ultrasensible de ADN, ARN y proteínas en genómica diagnóstica y proteómica (Ali *et al.*, 2014). Frente al contexto descrito, la Amplificación de Círculo Rodante (RCA), con el uso del bacteriófago Phi29 ADN polimerasa, emerge como un protocolo independiente de secuencia, utilizado para la amplificación y caracterización de moléculas de ADN circulares, incluyendo plásmidos (Reagin *et al.*, 2003) y varios grupos de virus que infectan a seres humanos, animales y plantas (Johne *et al.*, 2009).

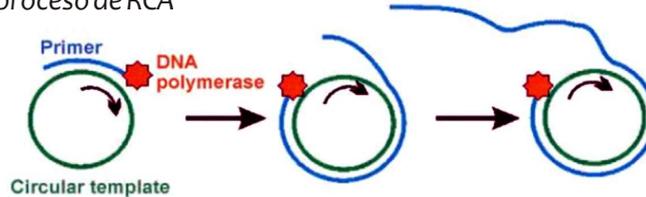
La RCA, así las cosas, se ha constituido como una alternativa eficaz y rápida para los estudios de diversidad biológica en diversos virus (Haible *et al.*, 2008). El empleo de esta tecnología permite obtener amplificaciones de moléculas de ADN de formas circulares y lineales, sin tener en consideración las posibles variaciones secuenciales; además, presenta una alta fidelidad de copia y la cantidad de ADN molde empleada para la amplificación es poca (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). Con base en ello, el presente trabajo describirá, de manera detallada, los fundamentos y utilidades de la técnica RCA en los diferentes campos de la investigación.

### Método de Amplificación de Circuito Rodante (RCA)

En la década pasada se descubrió que algunas ADN polimerasas tienen la capacidad de prolongar continuamente una cadena corta de ADN (cebador) recocida a una plantilla de ADNbc circular pequeña (ver Figura 1), en un proceso que ahora se conoce como amplificación de círculo rodante (Mohsen & Kool, 2016). En un proceso RCA típico la ADN polimerasa replica la plantilla circular de cientos a miles de veces. Por lo tanto, los productos finales de una reacción RCA son moléculas de ssDNA extremadamente largas, con unidades de secuencia repetitivas complementarias a la plantilla de ADN circular (Zhao *et al.*, 2008).

## Figura 1

Ilustración esquemática del proceso de RCA



Nota. Tomado de Goo & Kim (2016)

Poco después de su descubrimiento, RCA fue ganando considerable atención como herramienta de amplificación de ADN, siendo explorada como una técnica importante para detección ultrasensible de ADN, ARN y proteínas en genómica diagnóstica y proteómica. En general, RCA ha sido ampliamente aplicado en el análisis de ADN con el llamado candado Sondas (Zhang *et al.*, 2006). El método utiliza una sonda de ADN lineal en la que ambos extremos están yuxtapuestos por la hibridación específica a una secuencia de ADN diana (o ARN). Los dos extremos del ADN sonda se unen por ADNc ligasa, y el ADN resultante sirve como molde para una reacción RCA con un DNA polimerasa (por ejemplo, Phi29 ADN polimerasa) y dNTPs (Zhao *et al.*, 2008). El producto RCA puede visualizarse microscópicamente con focal después de la hibridación con oligonucleótidos de ADN marcados con un fluoróforo (Blab *et al.*, 2004).

Adicionalmente, el proceso RCA puede ser monitoreado en tiempo real mediante el uso de beacons moleculares, cremalleras moleculares o colorantes fluorogénicos (Yi *et al.*, 2006). La RCA también se ha utilizado como herramienta de amplificación de señal en microanálisis de inmunoensayos, en sándwich, para aplicaciones proteómicas (Di Giusto *et al.*, 2005). Con el acoplamiento del cebador RCA al anticuerpo de detección, la unión del anticuerpo da como resultado la inmovilización del cebador en la superficie de microarrays. El cebador se utiliza para iniciar una reacción de RCA, que da como resultado una molécula larga de ssDNA, la cual se puede visualizar directamente por hibridación con una sonda de ADN fluorescente (Zhao *et al.*, 2008). En ese contexto, una reacción típica de RCA requiere cuatro componentes principales: (1) ADN polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Phi29) que incluye un tampón adecuado (normalmente suministrado por el fabricante junto con la polimerasa). (2) un cebador corto de ADN o ARN. (3) una plantilla de ADN circular. (4) trifosfatos de desoxinucleótido (dNTP) (monómeros o bloques de construcción del producto RCA) (Ali *et al.*, 2014).

Las ventajas que tiene la técnica RCA sobre la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método de amplificación de ADN más utilizado, es: La naturaleza isotérmica de la polimerasa de ADN Phi29, que cataliza la polimerización del ADN a una temperatura constante (a 308 °C o, incluso, temperatura ambiente). Por lo tanto, no se requiere una polimerasa de ADN térmicamente estable ni instrumentación sofisticada (López *et al.*, 2005). Las pruebas basadas en RCA, ofrecen alta sensibilidad y especificidad, como método para la amplificación de la señal, mediante amplificación lineal o crecimiento exponencial; proporcionado típicamente un aumento de aproximadamente de 1000 (para la amplificación lineal) a 10.000 veces en la intensidad de la señal (Dahl *et al.*, 2004). Asimismo, el recuento de una sola molécula es posible, ya que la señal (miles de fluoróforos) se localiza en una sola molécula o como una sola mancha en el sustrato sólido (Ali *et al.*, 2007).

Un ensayo basado en RCA es altamente específico, puesto que la reacción RCA sólo puede iniciarse después de una hibridación específica entre un cebador y la plantilla de ADN circular correspondiente. Aunado a ello, la alta especificidad del ensayo basado en RCA hace que el método sea particularmente útil para el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Zhong *et al.*, 2001). Otra de las ventajas importantes de la RCA es que puede adaptarse fácilmente a numerosas plataformas de detección, tales como microarrays (Zhou *et al.*, 2004). De hecho, numerosos estudios sobre el uso de RCA como herramienta de amplificación, particularmente para el diagnóstico de ácidos nucleicos, se han realizado en la última década con gran éxito.

## PHI29 DNA Polimerasa

Como se mencionó anteriormente, la RCA es un método isotérmico que utiliza la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 ( $\Phi$ 29) de *Bacillus subtilis*. Es una enzima monomérica con una masa molecular de aproximadamente 66 kDa, que posee una actividad polimerasa (Berman *et al.*, 2007). El genoma del bacteriófago phi29 (que infecta *Bacillus subtilis*) codifica la ADN polimerasa phi29, que se utiliza para la replicación de su ADN. Esta enzima posee varias características notables que la hacen adecuada para una eficiente amplificación *in vitro* del ADN (Silander & Saarela, 2008). Una de esas características es que cataliza dos reacciones sintéticas (polimerización de 50 a 30 y desoxinucleotidil de la proteína terminal phi29) y tres reacciones de degradación (pyrophosphorolytic, 30-a-50 ssDNA exonucleolytic y 30-50 ssRNA exonucleolytic actividades) (Lagunavicius *et al.*, 2008). La enzima, asimismo, tiene otras dos propiedades intrínsecas, a saber: alta procesividad (70 kb) y capacidad de desplazamiento de la hebra, haciendo innecesaria la participación de proteínas accesorias y helicasas de ADN que permiten a la enzima desplazar la cadena complementaria en las regiones bicatenarias de una molécula plantilla durante la síntesis de ADN (Kamtekar *et al.*, 2004).

En el bacteriófago phi29 la polimerización del ADN se inicia por una proteína terminal, que es el primer enlace covalentemente a un nucleótido y luego se utiliza como cebador para la replicación del genoma de ADN lineal de doble hélice (Blanco & Salas, 1996). Sin embargo, los sistemas de amplificación *in vitro* utilizan cebadores de ADN (aleatorios) unidos a una plantilla de ADN de una sola hebra para el inicio de la síntesis de ADN. Los cebadores que contienen enlaces trifosfato se utilizan generalmente para evitar su degradación por la actividad exonucleolítica de la polimerasa phi29 (Dean *et al.*, 2001).

Después de la iniciación el ADN es sintetizado continuamente por la polimerasa phi29, dando lugar a productos con una longitud superior a 70 kbp en 20 minutos (Blanco *et al.*, 1989). Además, la larga vida media de la enzima permite reacciones prolongadas; bajo ciertas condiciones, su velocidad de síntesis promedio es de aproximadamente 1,500 nucleótidos por minuto, lo que conduce a productos con longitudes estimadas de 900 kb en una reacción de 10 h (Dahl, *et al.*, 2004). Si las regiones bicatenarias están presentes en la molécula plantilla, la hebra complementaria se desplaza y la síntesis de ADN se procede (Blanco *et al.*, 1989). Esta actividad de desplazamiento de hebra se utiliza en muchas técnicas de amplificación debido a que la misma desplazada es una plantilla monocatenaria adecuada para la síntesis de ADN adicional, sin necesidad de una etapa de desnaturalización adicional (Spits *et al.*, 2006). Cuando se utilizan moléculas de ADN circular como plantillas, grandes moléculas concatémicas se producen por desplazamiento de la nueva cadena sintetizada después de una ronda de replicación de moléculas y síntesis continua de copias adicionales de la plantilla de secuencia (Dean *et al.*, 2001). Este mecanismo resulta en una amplificación predominante de pequeñas moléculas de ADN circular en comparación con las moléculas lineales (Nelson, *et al.*, 2002).

La actividad de 30 a 50 de la exonucleasa de ADN de la phi29 permite que la enzima realice la corrección, lo que la hace adecuada para estudios genéticos. Sus tasas de error se han calculado para estar entre  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en ensayos bioquímicos (Esteban *et al.*, 1993), o  $9,5 \times 10^{-6}$  mediante secuenciación directa de 500.000 pb después de la amplificación mediada por polimerasa phi29 (Paez *et al.*, 2004).

## Aplicaciones de RCA en el diagnóstico

Así las cosas, la técnica RCA proporciona una poderosa herramienta para una identificación rápida y específica de microorganismos a nivel humano (laboratorio clínico) y de plantas (fitomejoramiento) (Sun *et al.*, 2011). Esta tecnología es, entonces, prometedora para el diagnóstico molecular y para el uso armacogenómico (Kuhn *et al.*, 2002). Hasta la fecha, la técnica RCA se ha utilizado principalmente para la detección de virus (Schubert *et al.*, 2007), bacterias (Tong *et al.*, 2007) y diferentes especies de hongos. A mediados de 2004, la

RCA utilizando ADN polimerasa phi29 se aplicó por primera vez a los genomas virales. Rector *et al.*, (2004) demostró que el genoma del papiloma virus, que está compuesto de ADN de doble cadena circular, podría amplificarse eficientemente a partir de muestras de tejido utilizando esta técnica. Al mismo tiempo, Inoue-Nagata *et al.*, (2004) utilizó este método para la clonación de un segmento de ADN de una sola cadena del genoma de un geminivirus.

La RCA se ha aplicado a una gran variedad de virus de ADN que llevan genomas circulares, según el comité internacional sobre la taxonomía de los virus, un total de ocho familias de virus con genomas circulares de ADN contienen virus que infectan humanos, animales vertebrados y plantas (Fauquet & Fargette, 2005). Estos genomas virales son monocatenarios o bicatenarios, con una longitud entre 2 a 9 kb (p), y están compuestos de una única molécula o múltiples segmentos circulares. Además, algunos virus tales como los virus adenoasociados (AAVs) poseen un genoma lineal, que se circulariza en un punto temporal específico en el ciclo infeccioso, permitiendo la aplicación de RCA. Del mismo modo, recientemente se ha demostrado el potencial de RCA para identificar objetivos de ácidos nucleicos, anticuerpos y antígenos en muestras clínicas de varios estudios de factibilidad (Demidov, 2005). La RCA puede ser utilizada para la visualización del ADN mitocondrial en células inmobilizadas sobre un sustrato de vidrio (Kobori & Takahashi, 2014). La RCA también se puede utilizar para la detección precisa y sensible de alérgenos en los alimentos, que es imprescindible para eliminar los riesgos potenciales en la salud, provocados por alergias a los alimentos (Kobori & Takahashi, 2014).

La RCA podría mejorar el uso de marcadores de interés actual, así como posibilitar la integración de la información emergente de la genómica y la proteómica en los análisis basados en células y tejidos (Gusev *et al.*, 2001). Esta técnica también se ha empleado para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) dentro de los fragmentos de ADN, parece que los diagnósticos de ADN basados en la ligadura dependientes de RCA tienen la especificidad de base única requerida para ser una valiosa herramienta en la detección de mutaciones puntuales (Pang *et al.*, 2007). RCA también se ha combinado con perlas magnéticas y sondas de ADN reportero en un ensayo en sándwich para detectar el ADN viral (Asiello & Baeumner, 2011).

## Ventajas de RCA

La RCA tiene varias ventajas sustanciales sobre otras técnicas de amplificación, ya que: (1) No requiere equipo altamente especializado (Davari *et al.*, 2012). (2) Es altamente reproducible, reduciendo así la probabilidad de falsos positivos (Najafzadeh *et al.*, 2013). (3) Se puede realizar en condiciones isotérmicas y no requiere ciclos térmicos (Kobori & Takahashi, 2014). (4) Puede realizarse con una mayor variedad de ADN polimerasas comparadas a la PCR, que sólo se basa en enzimas termoestables (Demidov, 2005). (5) La interpretación de los resultados es sencilla y se basa en un positivo o negativo (Tsui *et al.*, 2010). Además, proporciona una opción más rápida, más sensible y económica a los métodos actualmente basados en la PCR (Wang *et al.*, 2005). Todas estas propiedades únicas de RCA facilitan su aplicación en diferentes áreas de la investigación. (Li *et al.*, 2008). Debido a tales características, únicas de robustez y simplicidad, las pruebas basadas en RCA brindan una mirada diferente en el área de diagnóstico molecular comparado, con otras técnicas de amplificación de temperatura única (Demidov, 2005). Por tanto, se aconseja utilizarla como un método sencillo y práctico, con una postura diferente entre las técnicas isotérmicas, para el diagnóstico de ADN como un método de identificación muy práctico (Najafzadeh *et al.*, 2011).

## Conclusiones

Los métodos convencionales para la identificación y el diagnóstico de microorganismos implican, principalmente, técnicas relativamente costosas y que demandan mucho tiempo. Contrario a ello, emerge una técnica atractiva para la identificación fiable de especies patógenas hermanas y otros microorganismos estrechamente relacionados: la RCA, método rápido, crítico y económico para la identificación y el diagnóstico de

diferentes microorganismos que, a pesar de su alta velocidad, es muy sensible y ha sido ampliamente utilizado para la detección de patógenos. Así las cosas, con su implementación la cantidad de especímenes biológicos y la cantidad de ADN no será un factor limitante en la realización del análisis genético molecular avanzado.

## Referencias

- Ali, M. M., Li, F. Z., Zhang, K., Kang, D.K., Ankrum, J. A., Le, X. C., & Zhao, W. (2014). Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem Soc Rev*, 43(10), 3324-3341. doi:10.1039/c3cs60439j
- Ali, M. M., Su, S., Filipe, C. D., Pelton, R., & Li, Y. (2007). Enzymatic manipulations of DNA oligonucleotides on microgel: towards development of DNA-microgel bioassays. *Chemical Communications*(43), 4459-4461. doi:https://doi.org/10.1039/B709817K
- Asiello, P. J., & Baeumner, A. J. (2011). Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab on Chip*, 11, 1420-1430. doi:https://doi.org/10.1039/CoLc00666A
- Berman, A. J., Kamtekar, S., Goodman, J. L., Lázaro, J. M., De Vega, M., Blanco, L., . . . Steitz, T. A. (2007). Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *Embo J*, 26(14), 3494 - 3505. doi:10.1038/sj.emboj.7601780
- Blab, G. A., Schmidt, T., & Nilsson, M. (2004). Homogeneous detection of single rolling circle replication products. *Anal Chem*, 76(2), 495-498. doi:10.1021/ac034987+
- Blanco, L., & Salas, M. (1996). Relating structure to function in phi29 DNA polymerase. *J Biol Chem*, 271(15), 8509-8512. doi:10.1074/jbc.271.15.8509
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M., Martín, G., Garmendia, C., & Salas, M. (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*, 264(15), 8935-8940. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2498321/
- Dahl, F., Banér, J., Gullberg, M., Mendel-Harving, M., Landegren, U., & Nilsson, M. (2004). Circle-to-circle amplification for precise and sensitive DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(13), 4548-4553. doi:10.1073/pnas.0400834101
- Davari, M., Van Diepeningen, A. D., Babai-Ahari, A., Arzanlou, M., Najafzadeh, M. J., Van der Lee, T. A., & De Hoog, G. S. (2012). Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). *J Microbiol Methods*, 89(1), 63-70. doi:10.1016/j.mimet.2012.01.017
- Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., & Lasken, R. S. (2001). Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS. 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. *Genome Res*, 11(6), 1095-1099. doi:10.1101/gr.180501
- Demidov, V. V. (2005). Rolling-circle amplification (RCA). *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, 1175-1179.
- Di Giusto, D. A., Wlassoff, W. A., Gooding, J. J., Messerle, B. A., & King, G. C. (2005). Proximity extension of circular DNA aptamers with real-time protein detection. *Nucleic Acids Research*, 33(6), 1-7. doi:10.1093/nar/gni063
- Esteban, J. A., M, S., & Blanco, L. (1993). Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J Biol Chem*, 268(4), 2719-2726. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8428945/
- Fakruddin, M., Mannan, K. S., Chowdhury, A., Mazumdar, R. M., Hossain, N., Islam, S., & Chowdhury, A. (2013). Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 5(4), 245-252. doi:10.4103/0975-7406.120066
- Fauquet, C. M., & Fargette, D. (2005). International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology Journal*, 2(64), 1-10. doi:https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-64
- Goo, N.-I., & Kim, D.-E. (2016). Rolling circle amplification as isothermal gene amplification in molecular diagnostics. *Biochip J*, 10(4), 262-271. doi:10.1007/s13206-016-0402-6
- Gusev, Y., Sparkowski, J., Raghunathan, A., Ferguson, H., Montano, J., Bogdan, N., . . . Wheeler, V. (2001). Rolling circle amplification: a new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry. *Am J Pathol*, 159(1), 63-69. doi:10.1016/S0002-9440(10)61674-4
- Haible, D., Kober, S., & Jeske, H. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J Virol Methods*, 135(1), 9-16. doi:10.1016/j.jviromet.2006.01.017
- Inoue-Nagata, A. K., Albuquerque, L. C., Rocha, W. B., & Nagata, T. (2004). A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *J Virol Methods*, 116(2), 209-211. doi:10.1016/j.jviromet.2003.11.015
- Johne, R., Müller, H., Rector, A., Van, R. M., & Stevens, H. (2009). Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends in Microbiology*, 17(5), 205-211. doi:https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.02.004
- Kamtekar, S., Berman, A. J., Wang, J., Lázaro, J. M., De Vega, M., Blanco, L., . . . Steitz, T. A. (2004). Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage phi29. *Mol Cell*, 16(4), 609-618. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.019
- Kobori, T., & Takahashi, H. (2014). Expanding possibilities of Rolling Circle Amplification as a biosensing platform. *Analytical Sciences*, 30, 59-64. Obtenido de https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/30/1/30\_59/pdf
- Kuhn, H., Demidov, V. V., & Frank-Kamenetskii, M. D. (2002). Rolling-circle amplification under topological constraints. *Nucleic Acids Research*, 30(2), 574-580. doi:https://doi.org/10.1093/nar/30.2.574

- Lagunavicius, A., Kiveryte, Z., Zimbaite-Ruskulienė, V., Radzvilavicius, & Janulaitis, A. (2008). Duality of polynucleotide substrates for Phi29 DNA polymerase: 3'→5' RNase activity of the enzyme. *RNA*, 14(3), 503-513. doi:10.1261/rna.622108
- Li, N., Li, J., & Zhong, W. (2008). CE combined with rolling circle amplification for sensitive DNA detection. *Electrophoresis*, 29(2), 424-432. doi:10.1002/elps.200700410
- Lockhart, B., & Olszewski, N. (1993). Serological and genomic heterogeneity of banana streak badnavirus: Implications for virus detection in Musa germplasm. *International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests* (págs. 105-113). Montpellier: CIRAD-FLHOR.
- López, M., Mayorquín, P. y Vega, M. (2005). *Aplicación de los microarrays y biochips en salud humana*. Madrid: Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica.
- Mohsen, M. G., & Kool, E. T. (2016). The Discovery of Rolling Circle Amplification and Rolling Circle Transcription. *Accounts of Chemical Research*, 49(11), 2540-2550. doi:https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00417
- Najafzadeh, M. J., Dolatabadi, S., Saradeghi, K. M., Naseri, A., Feng, P., & De Hoog, G. S. (2013). Detection and identification of opportunistic *Exophiala* species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers. *J Microbiol Methods*, 94(3), 338-342. doi:10.1016/j.mimet.2013.06.026
- Nelson, J. R., Cai, Y. C., Giesler, T. L., Farchaus, J. W., Sundaram, S. T., Ortiz-Rivera, M., . . . Fuller, C. W. (2002). TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *Biotechniques*, 44-47. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12083397/
- Paez, J. G., Lin, M., Beroukhi, R., Lee, J. C., Zhao, X., Richter, D. J., . . . Sellers, W. R. (2004). Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification. *Nucleic Acids Res*, 32(9). doi:10.1093/nar/gnh069
- Pang, S., Qureshi, F., Shanahan, D., & Harris, N. (2007). Investigation of the use of rolling circle amplification for the detection of GM food. *Eur Food Res Technol*, 225(59), 59-66. doi:10.1007/s00217-006-0382-1
- Reagin, M. J., Giesler, T. L., Merla, A. L., Resetar-Gerke, J. M., Kapolka, K. M., & Mamone, J. A. (2003). TempliPhi: A Sequencing Template Preparation Procedure That Eliminates Overnight Cultures and DNA Purification. *J Biomol Tech*, 14(2), 143-148. https://acortar.link/RXNzUb
- Rector, A., Tachezy, R., & Van, R. M. (2004). A Sequence-Independent Strategy for Detection and Cloning of Circular DNA Virus Genomes by Using Multiply Primed Rolling-Circle Amplification. *Journal of Virology*, 78(10), 4993-4998. doi:10.1128/JVI.78.10.4993-4998.2004
- Schubert, J., Habekuss, A., Kazmaier, K., & Jeske, H. (2007). Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany—diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. *Virus Res*, 127(1), 61-70. doi:10.1016/j.virusres.2007.03.018
- Silander, K., & Saarela, J. (2008). Whole genome amplification with Phi29 DNA polymerase to enable genetic or genomic analysis of samples of low DNA yield. *Methods Mol Biol*, 439, 1-18. doi:10.1007/978-1-59745-188-8\_1
- Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., & Sermon, K. (2006). Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nat Protoc*, 1(4), 1965-1970. doi:10.1038/nprot.2006.326
- Sun, J., Najafzadeh, M. J., Zhang, J., Vicente, V. A., Xi, L., & De Hoog, G. S. (2011). Molecular identification of *Penicillium marneffei* using rolling circle amplification. *Mycoses*, 54(6), 751-759. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02017.x
- Tavares, R. G., Staggemeier, R. P., B. A., Rodrigues, M. T., Castelan, L. A., Vasconcelos, J., . . . Spalding, S. M. (2011). Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17(3), 239-248. doi:https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000300003
- Tong, Z., Kong, F., Wang, B., Zeng, X., & Gilbert, G. L. (2007). A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III, of human origin, using rolling circle amplification. *J Microbiol Methods*, 70(1), 39-44. doi:10.1016/j.mimet.2007.03.010
- Tsui, C. K., Wang, B., Khadempour, L., Alamouti, S. M., Bohlmann, J., Murray, B. W., & Hamelin, R. C. (2010). Rapid identification and detection of pine pathogenic fungi associated with mountain pine beetles by padlock probes. *J Microbiol Methods*, 1, 26-33. doi:10.1016/j.mimet.2010.07.016
- Vera, M. S., Jiménez, M. P., & Franco-Lara, L. (2012). Uso de herramientas bioinformáticas en la evaluación de secuencias "DNA barcode" para la identificación a nivel de especie. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 8: 196-209. *Facultad de Ciencias Básicas*, 196-209. doi:https://doi.org/10.18359/rfcb.2035
- Wang, B., Potter, S. J., Lin, Y., Cunningham, A. L., Dwyer, D. E., Su, . . . Saksena, N. K. (2005). Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. *J Clin Microbiol*, 43(5), 2339-2344. doi:10.1128/JCM.43.5.2339-2344.2005
- Yi, J., Zhang, W., & Zhang, D. Y. (2006). Molecular Zipper: a fluorescent probe for real-time isothermal DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 34(11), 1-5. doi:10.1093/nar/gkl261
- Zhang, D., Wu, J., Ye, F., Feng, T., Lee, I., & Yin, B. (2006). Amplification of circularizable probes for the detection of target nucleic acids and proteins. *Clin Chim Acta*, 363(1-2), 61-70. doi:10.1016/j.cccn.2005.05.039
- Zhao, W., Ali, M. M., Brook, M. A., & Li, Y. (2008). Rolling circle amplification: applications in nanotechnology and biodetection with functional nucleic acids. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(34), 6330-6337. doi:10.1002/anie.200705982
- Zhong, X. B., Lizardi, P. M., Huang, X. H.-W., & Ward, D. C. (2001). Visualization of oligonucleotide probes and point mutations in interphase nuclei and DNA fibers using rolling circle DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7), 3940-3945. doi:10.1073/pnas.061026198
- Zhou, H., Bouwman, K., Schotanus, M., Verweij, C., Marrero, J. A., Dillon, D., . . . Haab, B. B. (2004). Two-color, rolling-circle amplification on antibody microarrays for sensitive, multiplexed serum-protein measurements. *Genome Biology*, 5(R28), 1-12. doi:https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-4-r28