

核苷酸衍生物相关技术在分子诊断中的应用与展望

欧启水 曾勇彬

基金项目:国家自然科学基金和福建省社会发展高校产学研合作科技重大专项资助(2013Y4002)

作者单位:350005 福州市,福建医科大学附属第一医院检验科,福建医科大学基因诊断研究室、医学技术与工程学院医学检验系

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.03.001

近年来,一些人工合成的核苷酸衍生物,包括肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)、锁核酸(locked nucleic acid, LNA)、己糖醇核酸(hexitol nucleic acid, HNA)等开始在分子诊断领域中得以应用^[1]。与普通的核苷酸(DNA、RNA)一样,这些衍生物由 A、T、C、G 四种碱基组成,可通过碱基配对原则与互补的核酸序列结合。这些人工合成的核苷酸衍生物有诸多自身优势,如较高的热稳定性、酶抵抗性等。籍此,其可以明显改善普通分子生物学技术的性能特点,包括灵敏度、特异性、重复性等。譬如,利用 3' 端 LNA 修饰的引物可显著提高单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测的特异性,利用 PNA 夹止技术的抑制作用,可选择性扩增高野生背景中的少量突变^[2,3]。

目前,人工合成的核苷酸衍生物修饰技术在病原微生物鉴定、药物相关基因突变检测、遗传性疾病诊断、无创性产前诊断、循环 DNA 检测、肿瘤个体化诊疗等领域的应用研究十分活跃,其中以 PNA 和 LNA 为代表的分子诊断技术发展较为成熟,已陆续有相关商品化诊断试剂盒问世并且应用于临床。本文以 PNA 和 LNA 技术为重点,介绍核苷酸衍生物在分子诊断中的应用。

1 核苷酸衍生物相关技术

1.1 PNA 检测技术 PNA 由哥本哈根大学 Nielsen 等^[4]首先设计合成,其为重复性的 N-(2-氨基乙基)甘氨酸单元通过酰胺键相连并取代 DNA 分子中的磷酸二酯键骨架所形成的一种非手性、不带电荷的 DNA 分子类似物。由于 PNA 不带电荷,与互补杂交的 DNA 序列不存在静电排斥力,故其结合的牢固程度显著高于同序列的 DNA/DNA 双链。研究^[5,6]表明,PNA/DNA 杂交分子热稳定性高,每增加一个碱基,Tm 值约提高 1℃;但错配容忍程度低(即其识别序列的特异性高),一个碱基错配可使 Tm 值下降约 9~16℃,两个碱基错配则完全不能杂交。PNA 的杂交反应不依赖高盐离子浓度,不被蛋白酶、核酸酶等降解,不被 Taq 酶识别,不作为 PCR 引物。

根据 PNA 的上述特点,许多研究利用 PNA 夹止技术(也称“PNA 指引的 PCR 夹技术”,图 1),设计出针对易突变位点的野生型 PNA 探针,该野生型探针专门牢固结合野生型 DNA 模板,以特异阻止野生型序列的扩增;相反,因该野生型 PNA 探针与突变型 DNA 模板不能结合,不会阻止突变型 DNA 的扩增,从而使突变型 DNA 得以扩增和检测^[3]。目前,已将 PNA 与质谱技术、生物传感器、荧光原位杂交、生物芯片、分子信标等联合应用于疾病诊断和生物医学研究。

1.2 LNA 检测技术 LNA 是一种特殊的核苷酸衍生物,其核糖结构中的 2'-O、4'-C 通过缩水作用形成的氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或氮亚甲基桥,可形成类似“锁”的刚性环状结构,锁住呋喃糖 C3 内部的 N 结构,从而降低核糖结构的柔韧性,增加磷酸盐骨架的稳定性。与普通 DNA 相比,LNA 修饰的寡核苷酸杂交亲和力强,每增加一个 LNA 碱基可使 Tm 值提高 1~8℃^[2]。在 LNA 引物/探针的设计方面,可经专门的在线 LNA 设计网站^[7],通过调整 LNA 的个数以及在引物/探针中的不同位置寻找最适 Tm 值。

在相同的熔链温度下,LNA 修饰探针可比普通探针短,设计较灵活;LNA 具有序列结合的特异性,研究^[8,9]表明在引物错配位点旁边(即 3' 端第一、二或第三个碱基)经 LNA 修饰 1~2 个碱基(如等位基因特异性 LNA 荧光定量 PCR:AS-LNA-qPCR,图 2),可显著提高其错配识别能力,很好地区分与其匹配和错配的序列;LNA 具有抵抗 3'DNA 酶降解的能力,稳定性较好;LNA 的合成相对简单,可在普通的 DNA 自动合成仪上完成,成本较低。

1.3 HNA 检测技术 HNA 是由天然的碱基和磷酸化的 1,5 脱水己糖醇骨架形成的另一种核苷酸类似物^[10]。HNA 可与 DNA、RNA 或自身杂交,几种核酸杂交的稳定性顺序为:HNA/HNA>HNA/RNA>HNA/DNA,这与其 2' 位置的碱基基团有关,允许寡聚体形成类似双链 DNA α 螺旋结构^[1,10,11]。和 PNA、LNA 相似,HNA 不被核酶降解,稳定性好。

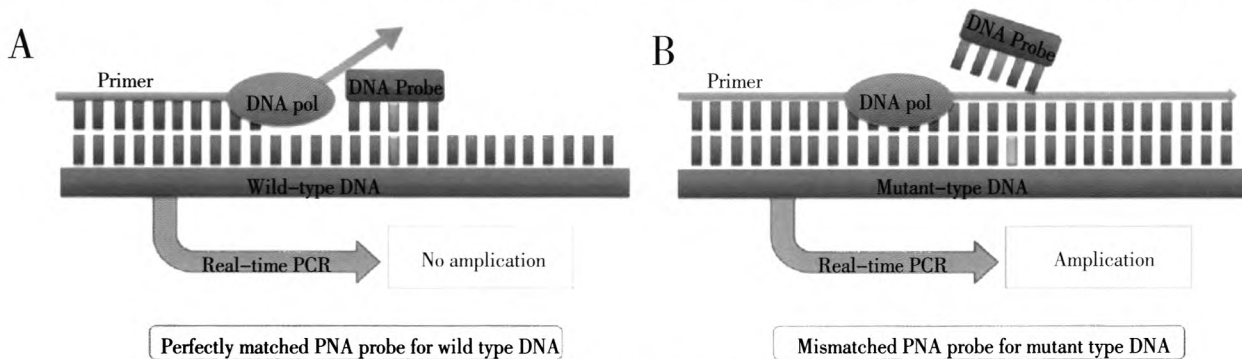


图 1 PNA 夹止技术检测突变型 DNA 原理示意图

注:图 A 为 PNA 探针与野生型 DNA 完全互补,野生型 DNA 不能扩增;图 B 为 PNA 探针与突变型 DNA 错配,突变型 DNA 可以扩增

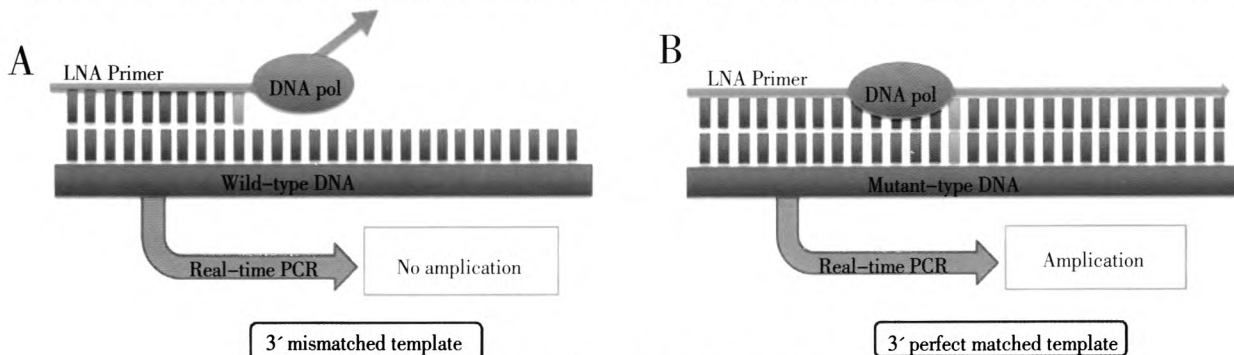


图 2 AS-LNA-qPCR 检测突变示意图

注:图 A 为 LNA 引物与野生型 DNA 错配,野生型 DNA 不能扩增;图 B 为 LNA 引物与突变型 DNA 匹配,突变型 DNA 可以扩增

HNA 探针可弥补 DNA 作为寡核苷酸杂交探针制备生物芯片存在对单碱基错配识别能力差、亲和力不高等缺点。Abramov 等^[11]利用 HNA 杂交的高亲和力和稳定性,用 Cy-5 标记的 HNA 探针制备芯片,以 HIV-1 逆转录酶和蛋白酶基因序列单个核苷酸突变作为检测对象,结果提示 HNA 芯片有更强的杂交信号:与 DNA 芯片相比,其与 DNA、RNA 杂交时,检测信号强度分别提高了 5 倍和 3~3.5 倍,故可证明 HNA 探针对于单碱基的识别能力比 DNA 强。

1.4 拉链核酸 (zipper nucleic acid, ZNA) 检测技术 ZNA 本质是经过阳离子修饰的 DNA,虽然不属于严格意义上的寡核苷酸衍生物,但其功能与人工合成核苷酸衍生物大同小异,也是增加 DNA/DNA、DNA/RNA 杂交的稳定性,提高检测的灵敏度、特异性,故在此一并概述。

具体地说,ZNA 是一种新型的经阳离子精胺衍生物单元 (简称 Z 单元) 修饰的寡核苷酸 (图 3),这种寡核苷酸能以拉链般的方式同与之互补的核苷酸链紧密结合在一起,因此形象地被称为“拉链核酸”。Z 单元通过减少核苷酸链之间的负电荷排斥力增加引物和探针的退火温度,以此提高双链杂交的稳定性及错配识别能力,ZNA 与其互补的寡核苷酸的反应过程包括识别、杂交、双螺旋形成三个步骤^[12-14]。ZNA 的 T_m 值与 Z 单元的数量及寡核苷酸链的长短有关,并且不受碱基序列和修饰位点影响,其计算公式如下

$$T_m(\text{ZNA}) = T_m(\text{DNA}) + 36Z / (N - 3.2)$$

Z 代表 Z 单元个数,N 代表寡核苷酸个数;Z 单元修饰位

置没有特殊限定,可位于寡核苷酸链的 5' 端、3' 端或中间,因此设计 ZNA 较为简单、灵活。Z 单元修饰的引物和探针可在低 Mg^{2+} 、低引物浓度及高退火温度下保持高扩增效率并且具有很高的错配识别能力和检测信噪比,被认为是小沟结合物探针 (minor groove binder, MGB) 和 LNA 的有效替代品。

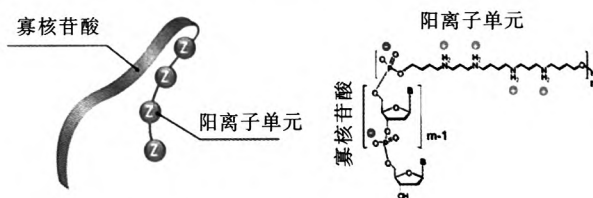


图 3 ZNA 分子结构示意图

注:引自 Sigma-Aldrich. ZNA™ a modified oligonucleotide for improved hybridization properties of nucleic acids

1.5 其他 其他人工合成的核苷酸衍生物有苏糖核酸 (threose nucleic acid, TNA)、阿卓糖醇核酸 (altritol nucleic acid, ANA)、环己烯核酸 (cyclohexene nucleic acid, CeNA) 等^[1]。虽然这几种人工合成的核苷酸衍生物在临床分子诊断中的应用还不广泛,仅有个别应用于生物传感器的研究报道,但其独特的结构、序列杂交的特异性、稳定性,提示可能具有良好的应用前景。

2 核苷酸衍生物相关技术的应用

2.1 病原微生物的快速鉴定 核苷酸衍生物相关技术对于快速、准确地鉴定病原微生物有十分重要的意义。近年来,基于分子生物学技术的病原微生物的快速检测方法有了迅猛

的发展,在人工合成的核苷酸衍生物修饰技术基础上的检测技术研究更是其中的热点之一。Tang 等^[15]建立三重 Taqman-LNA PCR,在一次反应中同时鉴定沙眼衣原体、细小豚原体以及解脲支原体,灵敏度达 10^2 copies/mL,特异性 100%,同时建立 6 个双重 LNA PCR,用于沙眼衣原体 8 个血清型(D-K)和细小豚原体 4 个血清型(1、3、6、14)的鉴定。Do 等^[16]也利用类似技术用于呼吸道合胞病毒 A、B 的检测。

肽核酸荧光原位杂交 (PNA fluorescent in-situ hybridization, PNA-FISH) 是食品药品监督管理局批准用于快速检测血液中的致病菌(细菌、酵母菌)的技术。该技术通过设计针对病原微生物的特异性 rRNA 的荧光标记 PNA 探针,结合 FISH 技术,不需培养,直接用于病原微生物的快速检测与鉴定。Harris 等^[17]在一回顾性临床研究中,将 PNA-FISH 技术用于血液和腹膜液中细菌和酵母菌的检测,与培养法相比,细菌测定的准确率为 100.0%(80/80),酵母菌检测的准确率为 94.1%(16/17),整体准确率为 98.9%(96/97),特别值得一提的是,平均检测时间缩短了 72.4 h。

2.2 肿瘤治疗药物相关基因的检测 K-ras 基因的检测在肿瘤个体化诊疗中具有重要意义。临床上检测 K-ras 基因的标本主要取自于手术切除或穿刺活检组织,这些标本中常混有大量的正常组织,且并非所有的肿瘤细胞均带有突变,少量耐药相关突变 DNA 往往存在于大量的野生型 DNA 中,形成较大的干扰背景,普通检测技术由于灵敏度的限制很难将之检测出来^[18]。Nordgard 等^[19]用 PNA 夹止技术和放大受阻突变体系(amplification refractory mutation system/scorpion, ARMS/S)PCR 对福尔马林固定石蜡包埋结直肠组织中的 K-ras 基因进行了平行测定,结果显示两种方法一致率为 92%(Kap-pa=0.82, $P < 0.001$),PNA 夹止法灵敏度高于 ARMS/S PCR,可检测出 ARMS/S PCR 无法检测的突变。Lin 等^[20]设计新型发夹结构 LNA 修饰探针,将之固定于金电极表面,成功构建用于 K-ras 基因突变检测的电化学传感器,该法稳定性、重现性、响应信号好,检测线性范围达 1 fM~10 pM,检测限低至 0.5 fM。

2.3 循环 DNA 的检测 循环 DNA (circulating cell-free DNA, ccfDNA)是指存在于细胞外呈游离状态的 DNA,其在肿瘤诊断和无创性产前诊断中具有重要的价值。通常,突变型 DNA 或者胎儿来源的 DNA 混杂在大量野生型 DNA 或者母体 DNA 中,需要灵敏度很高的检测技术才可以检测出来。此外,这些基因突变一般只涉及单个碱基的差异,若引物或探针设计不合理,上述方法易出现碱基错配引起假阳性结果,因此,提高检测的灵敏度和特异性很重要。

提高检测灵敏度、特异性的方法可使用经化学修饰的引物或探针,如 PNA、LNA。Yu 等^[6]以 SYBR Green I 为荧光染料,将实时荧光 PCR 与 PNA 夹止技术结合,成功用于胰腺癌

患者血浆 ccfDNA 中微量 K-ras 基因第 12、13 密码子突变的检测,此法灵敏度可达到从 5000 个野生背景中检测出 1 个突变。最低可检测的突变 K-ras DNA 含量为 20 pg。同样的原理也应用于无创性产前诊断:母体的血浆中存在胎儿游离 DNA,但含量极少,检测也需高灵敏度和高特异性的方法。Huang 等^[21]利用 PNA 夹止技术提高孕妇血浆胎儿父源性 β 珠蛋白突变基因的检出率,灵敏度为 90.5%、准确度为 92.1%。

外周血 ccfDNA 的研究在最近几年进展很快,在肿瘤防治、无创性产前诊断中的应用价值不断被认识,相信随着诸如 PNA、LNA 等高灵敏度、高特异性检测技术的应用,未来这一领域将会成为无创性诊断的热点。

2.4 乙型肝炎耐药突变的早期检测 乙型肝炎需长期接受核苷(酸)类抗病毒药物治疗,而耐药突变是治疗过程中难以避免的现象。耐药突变的早期检测将有助于临床医生及时调整治疗方案、提高疗效,使慢性乙型肝炎治疗更加规范、合理、科学。但传统的测序法灵敏度只有 20%,无法做到早期发现耐药。Kirishima 等^[22]利用 PNA 夹止技术结合限制性片段长度多态体 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 可在 $10^5 \sim 10^9$ 拷贝的野生型背景下检出 0.01%~0.001% 的突变,并且可在患者发生临床突破前 7 个月检测出变异,较传统的 RFLP 提早 6 个月。韩国 Panagene 公司^[23]开发的 PNA 阵列技术能实现多基因联合检测,可同时检测拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦等耐药相关突变位点,涵盖 HBV 逆转录酶区 11 个突变热点,灵敏度 5%,同测序法相比,符合率为 98.3%。Afshar 等^[14]针对 YMDD、YVDD、YSDD、YIDD 序列分别设计不同荧光标记的 ZNA-Taqman 探针,结果显示该法最低可检测 35 copies/mL 的病毒载量。Bhattacharya 等^[24]报道的利用 LNA 修饰的引物结合 Taqman MGB 探针同时检测 HBV V173L+L180M+M204V 联合突变,灵敏度 $10^2 \sim 10^6$ 。

3 展望

人工合成的核苷酸衍生物以其独特的性质在分子诊断领域发挥着普通核苷酸无法比拟的优势,其可灵活地整合于各种类型的检测平台,实践证明,将之与其他分子诊断技术联用,构建如 PNA-FISH、PNA/LNA 芯片、HNA 微阵列、AS-LNA-qPCR、PNA 夹止技术、LNA/ANA 传感器等检测技术,可显著提高这些平台的检测性能。目前,这些技术已在病原微生物、药物相关基因突变、遗传性疾病、无创性产前诊断、循环 DNA 的检测、肿瘤个体化诊疗等领域成功应用。

虽然其他的核苷酸衍生物,如 TNA、ANA、CeNA 等在分子诊断中的应用研究刚刚起步,但相信随着人工合成核苷酸衍生物研究的不断深入,其应用价值将不断地被开发和展示出来。可以预见,在不久的将来,核苷酸衍生物修饰技术将成为分子诊断的利器“飞入”寻常实验室,促进检验医学和转化

医学的发展。

4 参考文献

- 1 Wang Q, Chen L, Long Y, et al. Molecular beacons of xeno-nucleic Acid for detecting nucleic Acid. *Theranostics*, 2013, 3:395-408.
- 2 Latorra D, Campbell K, Wolter A, et al. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum Mutat*, 2003, 22:79-85.
- 3 王炜, 欧启水. 基于 PCR 的少量突变检测技术的应用. *中华检验医学杂志*, 2013, 36:40-45.
- 4 Nielsen PE, Egholm M. An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol*, 1999, 1:89-104.
- 5 Nielsen PE. Peptide nucleic acids: protocols and applications. Taylor Francis, 2004.
- 6 Yu S, Wu J, Xu S, et al. Modified PNA-PCR method: a convenient and accurate method to screen plasma KRAS mutations of cancer patients. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13:314-320.
- 7 Exiqon. LNA™ Oligo Tools and Design Guidelines. 2012
- 8 Morandi L, de Biase D, Visani M, et al. Allele specific locked nucleic acid quantitative PCR (ASLNAqPCR): an accurate and cost-effective assay to diagnose and quantify KRAS and BRAF mutation. *PLoS One*, 2012, 7:e36084.
- 9 Di Giusto DA, King GC. Strong positional preference in the interaction of LNA oligonucleotides with DNA polymerase and proofreading exonuclease activities: implications for genotyping assays. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32:e32.
- 10 Winter HD, Lescrinier E, Aerschot AV, et al. Molecular dynamics simulation to investigate differences in minor groove hydration of HNA/RNA hybrids as compared to HNA/DNA complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120:5381-5394.
- 11 Abramov M, Schepers G, Van Aerschot A, et al. HNA and ANA high-affinity arrays for detections of DNA and RNA single-base mismatches. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23:1728-1732.
- 12 Moreau V, Voirin E, Paris C, et al. Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37:e130.
- 13 Paris C, Moreau V, Deglane G, et al. Zip nucleic acids are potent hydrolysis probes for quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38:e95.
- 14 Afshar RM, Mollaie HR. Detection of HBV resistance to lamivudine in patients with chronic hepatitis B using Zip nucleic acid probes in Kerman, southeast of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13:3657-3661.
- 15 Tang J, Zhou L, Liu X, et al. Novel multiplex real-time PCR system using the SNP technology for the simultaneous diagnosis of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum and genetic typing of serovars of C. trachomatis and U. parvum in NGU. *Mol Cell Probes*, 2011, 25:55-59.
- 16 Do LA, van Doorn HR, Bryant JE, et al. A sensitive real-time PCR for detection and subgrouping of human respiratory syncytial virus. *J Virol Methods*, 2012, 179:250-255.
- 17 Harris DM, Hata DJ. Rapid identification of bacteria and Candida using PNA-FISH from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2013, 12:2.
- 18 Shuga J, Zeng Y, Novak R, et al. Selected technologies for measuring acquired genetic damage in humans. *Environ Mol Mutagen*, 2010, 51:851-870.
- 19 Nordgard O, Oltedal S, Janssen EA, et al. Comparison of a PNA clamp PCR and an ARMS/Scorpion PCR assay for the detection of K-ras mutations. *Diagn Mol Pathol*, 2012, 21:9-13.
- 20 Lin L, Liu A, Zhao C, et al. A chronocoulometric LNA sensor for amplified detection of K-ras mutation based on site-specific DNA cleavage of restriction endonuclease. *Biosens Bioelectron*, 2013, 42:409-414.
- 21 Huang K, Pan HF. Improvement of detection of paternally inherited fetal mutant genes for beta-globin in maternal plasma by PNA clamp. *Zhong Hua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2013, 34:233-236.
- 22 Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, et al. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol*, 2002, 37:259-265.
- 23 Jang H, Kim J, Choi JJ, et al. Peptide nucleic acid array for detection of point mutations in hepatitis B virus associated with antiviral resistance. *J Clin Microbiol*, 2010, 48:3127-3131.
- 24 Bhattacharya D, Lewis MJ, Lassmann B, et al. Combination of allele-specific detection techniques to quantify minority resistance variants in hepatitis B infection: a novel approach. *J Virol Methods*, 2013, 190:34-40.

(收稿日期:2013-07-26)

(本文编辑:杨军)