

肽核酸探针技术在赤潮生物检测中的应用*

侯建军^{1,2}, 黄邦钦¹, 赖红艳²

肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)是一类不带电荷的类似于肽链骨架结构并携带有碱基的新人工信息分子,该分子主链骨体为N-(2-氨基)-甘氨酸间通过酰胺键反复连接而成的长链,侧链则是利用亚甲羰键将碱基与主链骨架相连而形成^[1]。自PNA被发现10余年来,作为一种优良的寡核苷酸取代物而被广泛地应用于分子生物学研究及相关领域,被认为是非常有前景的探针工具。PNA的特点使之能成为一种方便快捷的检测模式,优越性大大超过了DNA探针,它能特异地与目标生物的rRNA特异性靶序列发生结合,广泛地应用于环境监测、工业和临床标本的检测和分析^[2]。这些特性使得其应用于赤潮检测也成为可能。因赤潮生物(藻)形态的相似性和复杂性,传统分类学方法在实际应用中存在困难,对于形态学上非常相近的种类或者变种,或者形态学相似但生理功能不同的种类,利用光学显微镜就很难分辨,它要求使用者具有很高的分类学技能,即便是技术娴熟的分类专家亦很难在光学显微镜下将赤潮藻准确地鉴定到种或亚种水平。因此,目前人们已致力于发展有着广泛应用前景的PNA探针技术来监测赤潮类群,使这些细胞能通过光学或化学的手段检测出来。现将PNA探针技术在赤潮生物检测中的应用做一综述。

1 PNA分子的结构与基本性质

PNA是20世纪90年代初期人工合成的DNA类似物,能够靠碱基堆积力形成Waston Crick碱基对,这种碱基对的形成是由它的4种单体以首尾相连构成的链状结构^[1]。4种单体分别携带有ATGC 4种碱基,且均能与RNA和DNA特异结合形成杂交分子PNA/DNA或PNA/RNA,且这种杂交结合力及特异性比相应的DNA与DNA结合要高^[3]。这为PNA能作为高灵敏度探针的研制提供了重要的理论基础。PNA分子即非蛋白也非核酸,且目前已知的核酸酶和蛋白酶都不能识别携带嘌呤和嘧啶侧链的这种独特的聚酰胺主链,因此不论是在体内还是在体外,PNA在大范围的pH及长时间下都很稳定,不易被酶降解。PNA分子骨架不含戊糖和磷酸基,故呈电中性,这种电中性的特征赋予其许多DNA或DNA探针所不具有的性质,如高灵敏度、高特异性、非盐依赖性、高稳定性^[3]等。从化学动力学角度看,加入上百倍于寡核苷酸探针的力都无法使杂交结合的PNA与DNA之间的双链解离;同时,其结合常数也很高。从热力学角度看,PNA/DNA杂交分子的 T_m 也比相同序列的DNA/DNA双链高^[3]。这就使得PNA在杂交检测过程中的灵敏度较DNA要高得多,中性骨架决定了它在与DNA杂交过程中不仅可以省去改变高盐浓度的操作,还可以运用降低杂交体系离子浓度来抑制非特异性的杂交和靶DNA序列自身复性对灵敏度的影响^[1-3]。这些独特性质为PNA作为更稳定的探针提供了有力

力的保障,PNA分子将成为一种优良的核苷酸取代物而应用于杂交检测领域。

2 PNA探针技术

2.1 常用PNA探针种类及作用原理 目前最常用的PNA探针有3类。其中Light Up探针(生产商:Light Up Technologies, Goteborg, Sweden)和Light Speed探针(生产商:Boston Probes, Bedford, MA)为2种荧光标记的PNA探针。当未与靶序列结合的时候,两者都不发生荧光。当与靶序列发生结合的时候,其荧光基团暴露出来。因此,省去了杂交后除去游离探针的分离和洗涤步骤。Light Up探针是噻唑橙标记的探针,而Light Speed探针是荧光基团和淬灭基团双标记的PNA探针,其标记的位置在线性PNA分子相反的两端。在水溶液中,Light Speed探针的荧光基团和淬灭基团在空间位置上互相靠近并结合在一起,使荧光基团不发生荧光。当与靶序列发生杂交时,荧光基团和淬灭基团在空间上分开,PNA探针便发出了荧光^[4]。相反,噻唑橙标记的Light Up探针在非结合状态本身是不发荧光的,在杂交时,探针标记物和核苷酸靶序列相互作用而产生荧光^[5]。Light Speed和Light Up是适用于实时PCR和荧光原位杂交技术(FISH)的独特探针,因为它们能把探针的自动报告特性和PNA的高敏感性与高特异性有机地结合起来。另外一种称为PNA阻碍探针,比相应的DNA探针有着更高的特异性。但有时其特异性也不足以分辨靶分子的单碱基变化,尤其是在某些情况下,错配序列数量大大高于靶序列。在这种情况下,可以用靶序列和非靶序列的信号差异来区分,即用非标记的PNA阻碍探针来掩盖非靶区序列,从而使靶序列和标记探针发生特异性杂交^[2,4,5]。

2.2 PNA探针的技术内容及方案

2.2.1 基本技术方案 PNA探针的基本技术方案是:(1)从环境样品获得赤潮藻,提取DNA后,设计特异性引物进行PCR扩增或进行原位PCR扩增,对获得的PCR产物进行克隆和测序,以获得特异性的探针序列;或利用核苷酸序列排列软件Clustal X对从各大核酸数据库得到目标生物的5S RNA,18S RNA,28S RNA以及转录间隔区ITS1,ITS2序列分别进行排序;(2)根据排序结果,选择出目标种的保守序列,并选择合适的长度,一般在18~25 bp;(3)利用BLAST(Basic local alignment search tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)接口将上述得到的特异性序列在已发表的核酸数据库进行匹配性搜索,以筛选出在已知所有序列中保守属与种的特异性序列。(4)探针的设计。可利用Oligo 6.0程序或Primer Select软件(DNASTAR, Madison, WI)等检测探针序列的各项参数指标(PNA和DNA),计算其鸟嘌呤和胞嘧啶(GC)含量、结构特点、 T_m 值。剔除易形成二聚体、发夹结构、自环化以及 T_m 值偏低等性质不佳序列^[1,2,6]。PNA探针与DNA探针一样,可通过荧光原位杂交(FISH)的方法(如全细胞杂交和膜杂交),通过显微镜、肉眼观察进行定性检测或用分光仪器进行定量检测^[2]。

2.2.2 探针的靶序列及特点 核糖体RNA及相关基因(rrm)广泛地适用于生物进化和生物分子标记等领域,它具有如下优点:(1)在生物细胞中大量存在,对蛋白质合成是必需

* 基金项目: 国家重点基础研究发展项目 973(2001CB409704); 863计划(2003AA635060); 2004年度厦门市科技创新新基金项目(3502Z20041059); 福建省海洋与渔业局科技项目
作者单位: 1. 厦门大学环境科学国家重点实验室, 厦门 361005;
2. 湖北民族学院医学院生物化学与分子生物学教研室
作者简介: 侯建军(1967-), 男, 土家族, 湖北恩施人, 教授, 博士, 主要从事环境科学和分子生态学研究。

的,其生物合成量正比于细胞生长速度;(2) 这些基因容易分离和鉴定;(3) 在初级结构和次级结构中同时具有高度保守区和可变区域;(4) 目前已建立了大量 rRNA 的基因序列数据库,这对基因序列的比较分析十分有用;(5) 与已发现的其他基因比较,不会表现出水平基因的转移^[7]。在藻类中,18S 和 28 SrRNA 编码区的序列比较分析已用于分类学和系统发生等方面的研究。因为 rRNA 基因序列含有可变区和保守区域,能为设计 PCR 引物或探针提供不同的途径,来区分分类物种之间的亲缘关系,如属、种或地理株系等问题^[8]。核糖体 18SrRNA 和 28 SrRNA 基因的 ITS(转录间隔区 Internal Transcribed Spacer)是国际上公认的生物各类群属下种间水平比较研究的一个很好的分子指标,已经在动物、被子植物、绿藻等方面得到广泛的应用^[7]。目前有很多工作针对 rRNA 开发了不同的探针,研究各种不同分类水平的问题,包括许多有害赤潮。针对真核藻类和蓝细菌的 rRNA 探针(含已经或正在开发中的探针)目前达到 149 种之多,如 2002 年欧洲建立的 PICODIV 项目探针数据库(Roscoff, France)。PNA 探针技术主要的过程也是将带标记的特异性核苷酸探针结合于目标 DNA 或 RNA 的同源互补片段。因此探针的目标序列通常位于小核糖体 RNA(SSU)、大核糖体 RNA(LSN)、间隔区(LTSs)^[7,8]。

2.2.3 特异性 PNA 探针的设计 PNA 探针的设计和 DNA 探针的设计有明显不同,主要表现如下:(1) rRNA 的结构。PNA 是与具有高级结构的核酸如 rRNA 结合的理想探针,因为 PNA 杂交能在低盐浓度下有效完成。这些条件改变了 rRNA 的二级结构,导致探针和靶序列发生有效结合,并能获得高度灵敏的结合,生产强的 PNA FISH 荧光分析信号。所以在设计 PNA 探针时无需考虑靶 rRNA 序列的二级结构^[5]。这是 PNA 探针的重要特性,因为特异性结合的靶序列往往位于 rRNA 高级结构区域,这个区域通常难以和 DNA 探针发生结合。(2) PNA 探针的高亲和性。PNA 探针及其靶序列均相应地短于 DNA 探针,15 个碱基往往是理想的 PNA 探针大小。这种相对短的探针具有高特异性的原因是因为碱基错配对短探针比对长探针有更大的影响。研究表明,PNA 探针比 DNA 探针更能有效地分辨单碱基差异^[1,2]。PNA 和 DNA 探针的设计通常把潜在的错配位置设计在探针的中间,以获得高的分辨率。(3) PNA 探针的 T_m 值在探针设计中也是一个重要的参数。有关探针设计和 T_m 值的问题可以在波士顿探针网站获得技术支持(<http://www.bostonprobes.com/cgi-bin/pnacalc/pnacalc.cgi>)。一般来说,15 个碱基的 PNA 探针其 T_m 值范围在 60~70 °C 之间。如果同时使用多个 PNA 探针,无论是多探针分析还是平行杂交反应^[2,6],每个探针的 T_m 值应该是相似的。延伸或缩短探针 1~2 个碱基,通常可以在一定范围内均衡地调整其 T_m 值,而不会显著改变探针的特异性。

在设计探针时,检查探针之间是否形成互补配对或二级结构非常重要,因为在互补探针之间会形成强烈的杂交。这个工作可以通过商业化软件进行完成。如 Primer Select (DNASTAR, Madison, WI) 或通过美国应用生物系统提供的在线软件进行计算(http://www.appliedbiosystems.com/products/productdetail.cfm?prod_id=424)。自身互补和内部二级结构的出现情况也依赖于所使用的杂交条件,如杂交缓冲液中含有的变性剂(甲酰胺)。实际应用的 PNA 探针内或探针间的互补碱基应少于 4 个。了解 PNA 探针和 DNA 探针的差异非常重要。由于 PNA 是中性的骨架,其水溶性比 DNA 相对要低,因此推荐把冻干的 PNA 探针悬浮保存于 50% 的 N,N-二甲基甲酰胺水溶液中,或者在 PNA 探针序列

上连接能促进溶解的基团(如 E 连接器),可以增加探针的水溶性,而不会影响探针的杂交特性。E 连接器可以加在 PNA 探针的两端。但 E 连接器并不适合加在任何 PNA 探针上,研究发现 E-linkers 在全细胞杂交中,会降低 PNA 探针穿透细胞壁的能力^[2]。

2.2.4 探针的合成 PNA 的结构单元是修饰氨基酸,因此可用多肽合成法进行大量的制备,还可用化学合成法在 N 端或 C 端连接官能团来制备。寡聚 PNA 通常是由 PNA 单体通过固相合成法制备。其保护策略、缩合条件、脱保护法及纯化法都与多肽合成法相似^[4]。Wailer 等通过一种四肽做连接臂,直接在高分子膜上合成 PNA 寡聚体即探针,并可把它从膜上切割下来。用一种四肽 Lys [Boc]-Glu[OtBu]-[epsilon] Ahx-[epsilon] Ahx 处理膜,以减少 PNA 探针在合成时遇到的空间阻力,并提供可与 PNA 单体结合的氨基^[9]。目前,由于合成 PNA 的试剂生产量小,价格昂贵,使得 PNA 虽具有许多优点,却不能充分地使用。很多实验室在不断探寻 PNA 的作用机制,改进其结构,随着组合化学等合成手段的出现,PNA 将逐步实现自动合成,从而进行快速大量地生产^[2]。

3 PNA 探针的应用现状及特点

在赤潮检测中使用 PNA 探针的报道还不多见。目前已有的工作是美国缅因州立大学的 Laurie Connell 等以有毒赤潮生物 *Alexandrium* 藻作为目标藻,采用半自动的三明治杂交方式,研究比较了双标记的 PNA 探针和相应的双标记 DNA 探针以及三标记 DNA 探针的检测效果,结果表明,PNA 探针的检测效果明显高于 DNA 探针。在其他相关研究方面,Litaker 等采用 PNA 探针结合原位杂交的方法研究了异养甲藻(幽灵藻) *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) 的细胞周期,表明其周期是一种典型的自由生活的海洋甲藻,缺乏任何变形虫阶段或其他类似的阶段^[10]。Worden 等^[11]通过全细胞原位杂交法,使用 PNA 探针检测未固定的海洋蓝细菌,发现能大大提高检测信号,是 DNA 探针的 5 倍。这是由于 PNA 的特性,使得杂交能在低盐和较高温度的条件下进行,而这些条件明显地降低了 rRNA 和 DNA 的 2 级结构的稳定性,因此使 PNA 探针能有效地和比较难到达的靶位点发生高效结合。这是使用 PNA 探针的优势,从而提高了蓝细菌的杂交效果^[6,11,12]。本实验室曾使用过 3 种 *A. Tamarensis* 的 DNA 种特异性探针,同时也设计和使用了辅助探针,结果表明,可明显的促进探针特异性杂交效果。无标记的辅助探针靶序列通常是位于荧光探针靶序列的上游或下游序列,加入后有助于 rRNA 的 2 级结构变性,将空间结构上不利于荧光探针杂交的靶位点暴露出来,或使 rRNA 中茎环结构变性,增加特异靶位点与荧光探针的接触机会,从而提高了杂交率。如果使用 PNA 探针就无需使用辅助探针。因此在下一步工作中,我们拟使用 PNA 探针与 DNA 探针进行比较研究,来验证所设计探针的特异性和优越性,为现场检测赤潮打下基础。

一直以来,PNA 探针广泛地应用于医学、环境检测领域。在环境微生物的监测中,除了要求快速检测和识别,精确计数也十分必要。PNA FISH 比 PNA 化学发光原位杂交(CISH)更有显著的优势。首先,PNA FISH 的分析步骤较少,并且可直接检测 PNA 探针,因此省去了化学发光底物。其次,PNA FISH 为使用多重分析手段提供了可能性,如可使用不同标记的 PNA 探针,或 PNA 探针结合其它的核酸染色法进行检测^[13]。PNA 探针的使用开辟出许多新颖的传统 DNA 探针从来没有使用过的方法。在一些全细胞杂交方法中,可以使用 PNA 探针有效地穿透赤潮藻疏水的细胞壁,这归因于 PNA 探针的疏水特性^[6]。自 PNA 的 Light Up 和 Light Speed 探针出现以来,其被誉为又一种分子信标。但是,PNA 探针

相对昂贵, 以前发表的寡核苷酸探针序列不能简单地转变为 PNA 探针的序列。PNA 探针和靶核苷酸序列的高亲和力要求使用的 PNA 探针的长度 (14~15) 要短于大多数发表的 DNA 探针 (18~30)。长 PNA 探针的 T_d 值会很高, 在低于 60~70 °C 的条件下, 不能发生紧密的杂交, 高的杂交温度又会损害固定的细胞。因而, 如果要应用 PNA 探针, 则需要根据已发表的寡核苷酸探针序列进行重新修正和改造, 并对每一条 PNA 探针的杂交条件进行重新优化^[2,14]。应用 PNA 分子探针来检测赤潮有着重要的前景, 但目前大部分工作还处在实验室的探针设计和开发之中, 这些技术应用于现场监测还处于初始阶段, 应用的例子也非常有限。但 PNA 探针技术具有快速、准确、专一性强等特点, 使其很快受到科学家们的青睐, 并在近 10 年内得到迅速发展, 成为微生物系统分类、生理学和生态学研究的重要工具。特别是目标生物在复杂生物群落中不占优势或者有大量背景噪音干扰的情况下, PNA 探针技术的优势尤显突出。

4 结 语

PNA 探针自 10 年前被发明以来, 这项技术从基本的 PNA 合成和理化特性研究逐步发展到目前 PNA 探针的综合开发应用研究。PNA 探针首先是作为对微生物的快速和高特异性的检测及功能种群的鉴定, 后来, 结合多种特异性和快速敏感的检测方法, 把 PNA 作为联系靶目标和信号放大技术的纽带, 用于直接检测和鉴定目标生物。除此以外, 基于 PNA 的探针技术和 PNA 的独特性质, 能开发新颖的使用 DNA 探针所不能实现的简单分析模式, 这对目标生物具有高级结构的靶序列如 rRNA 更有意义, 其接近靶序列时容易穿透细胞膜和细胞壁, 如 ISH, FISH, CISH 等方面, 从而适用于大样品量的分析平台, 如微阵列扫描仪和实时 PCR 设备等, 实现对目标赤潮生物进行检测、鉴定和计数。PNA 以其强的专一性、灵敏性和操作简单的特点, 将越来越多地应用于实验室或现场来对赤潮生物进行快速、准确的检测和定量测定。可以预言, PNA 在未来将发展成为赤潮检测和新型技术。

参考文献

1 Nielsen P E, Egholm M, Berg R H, et al. Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine substituted polyamide[J]. Science, 1991, 254(5037): 1491-1500

- 2 Wagner M, Horny M, Damsz H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6: 302-309.
- 3 Kim S K, Nielsen P E, Egholm M, et al. Right handed trip lex formed between Peptide Nucleic Acids PNA-T8 and Poly (dA) shown by linear and circular dichroism spectroscopy[J]. J Am Chem Soc, 1993, 115: 6477-6481.
- 4 Seitz O. Solid phase synthesis of double labeled peptide nucleic acids as probes for the real time detection of hybridization[J]. Angew Chem Int Ed, 2000, 39: 3249-3252.
- 5 Svanvik N, Westman G, Wang D, et al. Light Up Probes: thiazole orange conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution[J]. Anal Biochem, 2001, 281: 26-35.
- 6 Stender H, Fiandaca M, Nielsen H J J, et al. PNA for rapid microbiology[J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 48: 1-17.
- 7 Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8 S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae) [J]. J Phycol, 1994, 30: 857-863.
- 8 Anderson D M, Anderson P, Brice J V M, et al. Red tide Monitoring and Management Strategies [R]. Technical Report No. 2 prepared for the Agriculture and Fisheries Department, Hong Kong, 1999, 240-25.
- 9 Weiler J, Gausepohl H, Hauser N, et al. Hybridisation based DNA screening on peptidic nucleic acid (PNA) oligomer arrays[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(14): 2792-2799.
- 10 Litaker R W, Vandersea M W, Kibler S R, et al. Life cycle of the heterotrophic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) [J]. J Phycol, 2002, 38(3): 442-463.
- 11 Worden A Z, Chisholm S W, Binder B J. In situ hybridization of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (marine cyanobacteria) spp. with rRNA targeted peptide nucleic acid probes[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 284-289.
- 12 Oliveira K, Procop G W, Wilson D, et al. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40: 247-251.
- 13 Stender H, Sage A, Oliveira K, et al. Combination of ATP bioluminescence and PNA probes allows rapid total counts and identification of specific microorganisms in mixed populations[J]. J Microbiol Methods, 2001, 46: 69-75.
- 14 Kim J, Hirose T, Sugiyama S, et al. Visualizing a hybridized PNA probe on a DNA molecule with near field optical microscopy [J]. NANO Letters, 2004, 4(11): 2091-2097.

收稿日期: 2005-03-10

(宋艳萍编辑 孔繁学校对)

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学会主办, 安徽医科大学编辑出版的全国性学术性杂志。本刊主要刊登药理学研究论文, 辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外医药学动态、研究简报、快报等专栏。

本刊荣获 2003、2005 年两届国家期刊奖百种重点期刊奖, 第 1、第 2 届全国国家科委、中共中央宣传部、国家新闻出版署优秀科技期刊二等奖, 第 1、第 2、第 3 届中国科学技术协会优秀期刊二等奖, 第 1 届华东地区优秀期刊一等奖, 第 2 届华东地区最佳期刊奖。本刊 1999、2002、2004 年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项资金资助。

本刊已被中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库确定为医学类核心期刊; 被北京大学图书馆主编《中文核心期刊要目总览》第 1、第 2 版及 2000 版, 2004 版选定为药理学类核心期刊; 被国际核心期刊研究会确定为核心期刊; 被国家科委科技信息研究所确定为《中国科技论文统计源期刊》即中国科技核心期刊。

本刊已被国内几乎所有相关检索期刊及国际著名检索期刊 Chemical Abstract (美国)、《PЖ》(俄罗斯)、Biochemical Abstract (美国)、Index Medicus (美国)、EMBASE/ Excerpta Medica (荷兰)、Kunst and Wissen (德国)、Centre for Agriculture and Biosciences international (CAB International, 英国) 等收录利用。连续 9 年进入《CA 千种表》。

医师用药要懂药理, 药师药研人员更要懂药理。中国药理学通报, 医师药师都需要

本刊为月刊, 大 16 开 128 页, 彩色铜版纸印刷, 每期定价 15.00 元 (零售: 20 元/期), 全年 180.00 元。邮发代号: 26-52, 请及时向当地邮局订阅, 漏订读者请直接汇款至我刊编辑部 (零售价: 每期 20 元), 免收邮寄费。地址: 安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部, 邮编: 230032; 联系人: 吴慧、程西望、武明静。电话: 0551-5161221, 5161222, 电子信箱: cpb@ahmu.edu.cn