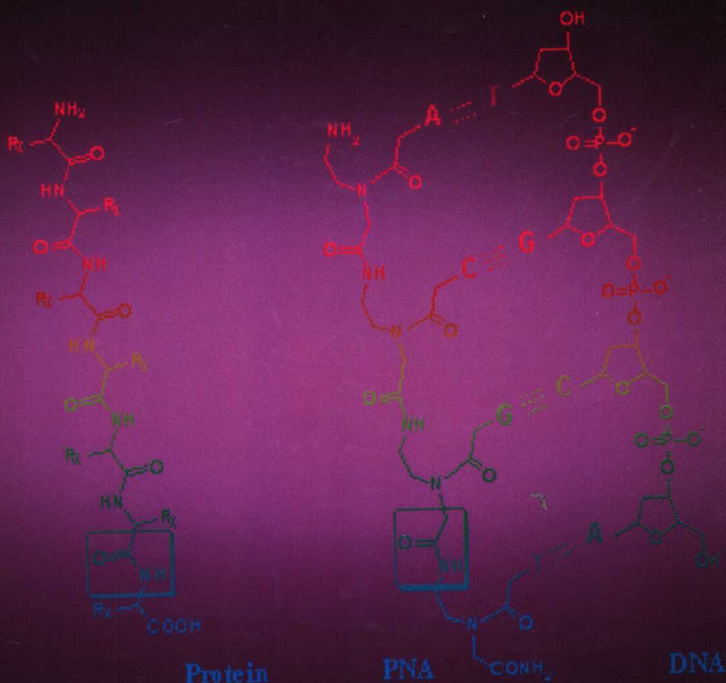


何 为 马立人 主编

肽 核 酸



化学工业出版社

肽 核 酸

何 为 马立人 主编

化 学 工 业 出 版 社

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

肽核酸/何为, 马立人主编. —北京: 化学工业出版社, 2003. 6

ISBN 7-5025-4471-2

I. 肽… II. ①何…②马… III. 核菌酸-肽 IV. Q524

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 042192 号

肽 核 酸

何 为 马立人 主编

责任编辑: 王秀鸾

责任校对: 陈 静

封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市宇新装订厂装订

开本 850 毫米×1168 毫米 1/32 印张 9 $\frac{1}{4}$ 字数 258 千字

2003 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4471-2/TQ·1729

定 价: 30.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

自从1991年关于肽核酸 (peptide nucleic acid, 简称为PNA) 的结构和性质的第一篇论文刊出以来, 这类兼有多肽和核酸性质的独特化合物引起人们的极大兴趣。有关PNA的化学、物理以及生物学方面的性质, 人们已经并正在进行深入的研究, 并发表了500多篇论文。

近年来关于PNA的研究, 尤其是其在分子生物学中作为一种工具的使用、在诊断领域的应用以及作为反义和抗基因制剂在药物开发中的应用, 都取得了很大的进展。为此, 我们收集了截止于2002年12月所发表的有关PNA的文献以及internet上的一些相关资料, 并有选择性地参考了由Nielsen和Egholm主编、1999年出版的PEPTIDE NUCLEIC ACIDS (Protocols and Applications) 一书, 编写了本书。分别从PNA的化学、杂交性质及其分析检测、在分子生物学研究中的应用、在药物开发和诊断领域中的潜在应用、在生物芯片和生物传感器中的应用等几方面进行了阐述。

本书通过一些实例来阐述使用PNA的方案设计及应用, 具有很强的可操作性, 相信对推动我国肽核酸的研究与开发具有非常现实的意义。

本书由何为、马立人主编, 参加编写的人员还有许丹科、蒋中华、刘志红、方怡。

由于肽核酸所涉及的专业面太广, 以及编者的知识、能力和水平有限, 在编写过程中, 可能有所遗漏, 乃至内容上的错误, 敬请读者指正, 不胜感激。

编者

2003年3月于军事医学科学院

内 容 提 要

肽核酸(PNA)是一种以中性酰胺键为骨架并兼有多肽和核酸性质的独特化合物,可以高度亲和并序列特异地与DNA和RNA结合,而且形成的杂交复合物具有相当高的热稳定性以及独特的耐离子强度变化性质。PNA不能被蛋白酶和核酸酶所降解。

本书是在收集了截止于2002年12月所发表的有关PNA的文献以及internet上的一些相关资料,编写而成的。详细地阐述了有关PNA的化学、PNA的杂交性质、作为分子生物学工具的应用、作为反义的和抗基因制剂的潜在应用、在诊断领域的应用以及在生物芯片和生物传感器中的应用。

本书的实用性很强,对有些实验的方案设计和操作均有详细的描述,适合于从事分子生物学、生命科学、药物研究、临床诊断、环境检测等领域的人员参考。

目 录

1 概述	1
1.1 基本概念	1
1.2 PNA 的化学	2
1.3 PNA 的物理化学性质	3
1.4 PNA 作为分子生物学工具	6
1.4.1 增强的 PCR 扩增	6
1.4.2 PNA 的预凝胶杂交	7
1.4.3 PNA 辅助的稀有切割	8
1.4.4 人工限制性酶系统	8
1.4.5 测定端粒的大小	8
1.4.6 核酸的纯化	9
1.5 PNA 作为诊断的工具	9
1.6 PNA 在基因靶向药物研究中的应用	10
1.6.1 反义应用	10
1.6.2 抗基因性质	10
1.6.3 PNA 的细胞内导入	11
1.6.4 抗微生物 PNA	12
1.6.5 PNA 在癌症基因治疗中的应用	12
1.6.6 抗病毒 PNA	12
1.7 研制 PNA 的公司及其产品	13
参考文献	13
2 PNA 的化学	22
2.1 用 BOC 化学合成 PNA 寡聚物	22
2.1.1 PNA 合成	23
2.1.2 合成方案	28
2.1.3 讨论	35
参考文献	37

2.2	用 Fmoc 化学合成 PNA 寡聚物	39
2.2.1	PNA 合成	41
2.2.2	小结	50
	参考文献	51
2.3	PNA/DNA 嵌合体	51
2.3.1	合成策略和单体 PNA 构成单元	53
2.3.2	Mmt/乙酰基保护的单体构成单元的合成循环	54
2.3.3	PNA 和 DNA 之间连接剂的选择	58
2.3.4	实验方案	59
2.3.5	举例	61
2.3.6	讨论	66
	参考文献	69
2.4	用 MMT 化学合成 PNA-DNA 嵌合体	71
2.4.1	讨论	73
2.4.2	材料	75
2.4.3	方法	76
2.4.4	结论	79
	参考文献	80
2.5	PNA 的标记	81
2.5.1	实验方案	82
2.5.2	举例	83
2.5.3	小结	86
	参考文献	87
2.6	手性 PNA 的合成	89
2.6.1	手性肽核酸单体的合成	89
2.6.2	以 <i>N</i> -氨乙基-D-脯氨酸为骨架的手性肽核酸的合成	90
2.6.3	用 Fmoc 工艺合成手性 PNA (<i>l</i> -或 <i>d</i> -Ala) 单体及寡聚物	91
	参考文献	99
3	PNA 的杂交性质和分析、检测	100
3.1	PNA-NA 作用的热力学	100
3.1.1	样品制备的概况	101
3.1.2	吸收溶解曲线	102
3.1.3	等温滴定量热法	106

3.1.4 结论	108
参考文献	109
3.2 PNA 的性质	110
3.2.1 杂交亲和性	110
3.2.2 杂交条件	111
3.2.3 特异性识别能力	111
3.3 PNA-双链 DNA 链顶替复合物及其鉴定技术	111
3.3.1 链顶替复合物的形成	111
3.3.2 PNA-双链 DNA 链顶替复合物的鉴定技术	113
3.3.3 结语和前瞻	127
参考文献	127
3.4 PNA 与 DNA 修饰酶的相互作用	129
3.4.1 PNA 对端粒酶活性的抑制	129
3.4.2 PNA 检测解旋酶活性	134
参考文献	139
3.5 基质辅助解吸飞行时间质谱检测 PNA 杂交物用于基因分析	140
3.5.1 实验方案	142
3.5.2 实验结果	145
3.5.3 讨论	147
参考文献	151
4 PNA 在分子生物学研究中的应用	154
4.1 PNA 导向的基因组 DNA 特异切割	154
4.1.1 操作程序	156
4.1.2 实例	157
4.1.3 讨论	159
参考文献	162
4.2 双链 DNA 的捕获	165
4.2.1 操作规程	166
4.2.2 实例	168
4.2.3 讨论	169
参考文献	172
4.3 PNA 亲和标记探针杂交、纯化核酸	174
4.3.1 操作规程	176

4.3.2	实例	178
4.3.3	应用和局限性	179
	参考文献	180
4.4	运用 PNA 进行质粒的标记	182
4.4.1	操作规程	183
4.4.2	实例结果	187
4.4.3	讨论	190
	参考文献	191
4.5	PNA 封闭探针——增强探针分析的特异性	191
4.5.1	材料和方法	192
4.5.2	结果与讨论	196
4.5.3	结论	203
	参考文献	203
4.6	PCR 锁止技术 (PCR Clamping)	204
4.6.1	PCR 锁止技术简介	204
4.6.2	操作规程	206
4.6.3	实例	207
4.6.4	展望	211
	参考文献	211
4.7	PNA 预凝胶杂交	212
	参考文献	214
5	肽核酸在药物开发中的潜在应用	215
5.1	药物开发中的 PNA 技术	216
5.1.1	PNA 的细胞内导入	216
5.1.2	PNA 的反义作用	218
5.1.3	PNA 的抗基因作用	219
5.1.4	PNA 作为调节基因表达的工具	223
	参考文献	224
5.2	PNA 作为抗菌剂	227
	参考文献	232
5.3	PNA 在癌症基因治疗中的应用	232
	参考文献	234
5.4	PNA 作为抗病毒药物	235

参考文献	236
5.5 PNA 药物的前景	236
参考文献	238
6 PNA 在诊断领域的应用	239
6.1 PNA 技术	239
6.1.1 PNA 探针	239
6.1.2 自身报告的 PNA 探针和 Q-PNA PCR	240
6.1.3 PNA 探针的设计	243
参考文献	245
6.2 PNA 探针的应用	247
6.2.1 PNA 探针在组织化学的原位杂交中的应用	247
6.2.2 PNA 荧光原位杂交 (FISH) 在细胞遗传学分析中的应用 ...	252
6.2.3 PNA 探针在微生物分析中的应用	254
参考文献	262
6.3 PNA 在流式细胞仪中应用	265
参考文献	267
6.4 PNA 探针应用前景展望	267
参考文献	268
7 PNA 在生物芯片和生物传感器中的应用	270
7.1 PNA 阵列用于核酸检测	271
7.1.1 实验方案	271
7.1.2 结果	277
7.1.3 讨论	279
参考文献	280
7.2 PNA 生物传感器用于核酸检测	281
7.2.1 实验方案	282
7.2.2 举例	284
7.2.3 讨论和展望	288
参考文献	290
附录	291

1 概 述

1.1 基本概念

肽核酸 (peptide nucleic acid, 简称为 PNA) 是 1991 年由丹麦科学家 Nielsen 等设计的一种以中性酰胺键为骨架的全新的 DNA 类似物, 可序列特异地靶向作用于 DNA 的大沟槽, 其骨架的结构单元为 (2-氨基乙基) 甘氨酸, 碱基部分通过亚甲基羰基连接于主骨架的氨基 N 上, 见图 1.1 所示^[1]。

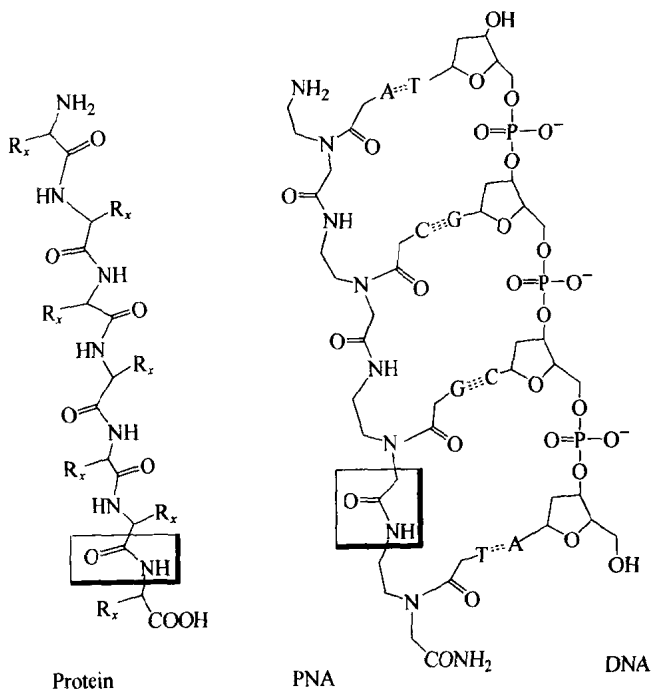


图 1.1 PNA 的化学结构与蛋白质和 DNA 的比较

PNA 是非离子的、非手性的分子，不易水解或酶切。尽管与天然的核酸存在着差异，但 PNA 仍能够序列特异地与 DNA 和 RNA 结合，并遵从 Watson-Crick 氢键结合的准则^[2,3]。PNA 与 DNA 或 RNA 的杂交复合物具有相当的热稳定性并表现出独特的耐离子强度变化性质。

目前，PNA 已经在基因治疗药物开发、基因诊断、生物传感器以及作为分子生物学和生物技术的分子工具等方面得到广泛应用。

1.2 PNA 的化学

由于 PNA 是非手性的，所以不必经过立体选择性的途径就可被合成。PNA 寡聚物可按照标准的肽固相合成方案进行合成^[4,5]，如可采用二苯甲基胺聚苯乙烯树脂作为固相载体^[6~10]，采用 Boc 或 Fmoc 化学来保护 PNA 单体的氨基团^[6~8]，其中 4 种天然的核碱基都有商品供应。Bis-PNA 可以采用连续合成的步骤制备，两个 PNA 片段通过一柔性的连接剂相连^[11]。

研究发现，通过对核碱基进行修饰，如把 Hoogsteen 链中的胞嘧啶改为伪异胞嘧啶，可以消除 DNA·PNA-DNA 三链体对 pH 值的依赖性，而不影响三链体的稳定性^[11]；也可将腺嘌呤替换成二氨基嘌呤，这样会使 PNA 的结合亲和性得到增强；设计了一种新的核碱基“E-碱基”，来识别胸腺嘧啶。利用硫尿嘧啶/二氨基嘌呤碱基配对，得到伪互补的 PNA 寡聚物，并通过双重双链体侵入机制与双链 DNA 结合，但这种结合方式要求靶标中至少含 50% 的 AT。PNA 骨架的甘氨酸亚单元也可被 α -氨基酸所代替，而不影响 PNA 寡聚物的杂交性质，这些修饰可用于改变 PNA 的物理-化学性质。通过对骨架构象的设计，可进一步改善 PNA 的结合亲和性。骨架修饰的 PNA 的合成可按照类似的方法进行，由氨乙基甘氨酸和氨基脯氨酸组块构成的 PNA 杂合寡聚物可采用 Boc 策略合成^[12]。PNA/DNA 嵌合物的合成有两种主要的策略：预先合成的 PNA 和 DNA 寡聚物在溶液中进行缩合；用合适的保护单体组块

进行在线固相合成，这种策略已成功用于嵌合物的合成。

PNA-肽偶联物可通过连续合成或采用标准的肽偶联技术（如马来酰亚胺半胱氨酸偶合或硫酯缩合）得到。Koch 等采用 Boc 肽合成策略，已经合成了一个在氨基端连有一个七肽的 15-mer PNA^[13]，肽的存在并不显著地影响 PNA-DNA 双链体的结构。Betts 等报告了 PNA-肽-PNA 嵌合物的合成，其中两个 9-mer 的嘧啶序列的 PNA 通过 his-gly-ser-ser-gly-his 肽连接在一起^[14]，这种结构能够形成一个具有寡嘌呤复合物的稳定的三螺旋复合物^[14]。

合成后的步骤包括：用无水氟化氢或三氟甲磺酸将 PNA 寡聚物从固相载体上切割下来，然后通过高效液相色谱（HPLC）进行纯化^[6,11,15,16]。PNA 的粗产物也可用三氟乙酸/间甲酚（4：1）的混合物从固相载体上切割下来，然后用冰冷的乙醚沉淀，并溶于 0.1% 的三氟乙酸溶液中^[6,15,16]。最后，用反相 HPLC 进行纯化、用 MALDI-TOF 质谱进行定性^[5,11,15,16]。

PNA 寡聚物可进行荧光（如荧光素、罗丹明）或生物素标记；而放射性同位素标记，则要求嵌入一酪氨酸进行¹²⁵I-碘化或偶联—可被³²P 磷酸化的肽基序。

目前，已经合成了大量的 PNA 类似物^[17]，包括引入了非天然核碱基的 PNA^[11,18~20]。

1.3 PNA 的物理化学性质

由于肽核酸和 DNA 除了核碱基外，没有共同的功能团，所以 PNA 的化学稳定性与 DNA 存在明显差异。DNA 用强酸处理，可引起脱嘌呤，而肽核酸对酸则相当稳定。不过，在氨基端的游离氨基可能是化学不稳定的，特别是在碱性条件下，通过环闭合可发生核碱基乙酸的 N-酰化转移或氨基端 PNA 的切割^[21]。PNA 是电中性的化合物，因此，水溶性较差（与 DNA 相比）。根据 PNA 寡聚物的序列不同，中性的 PNA 分子有发生不同程度聚集的趋势。PNA 的溶解度也与寡聚物的长度以及嘌呤/嘧啶的比例有关^[22]。一些修饰，包括嵌入带正电荷的赖氨酸残基（羧基端或骨架修饰），

可以改善 PNA 的溶解度。也可引入负电荷，尤其是对 PNA-DNA 嵌合物，会增加其水溶解度。PNA 单体的消光系数与 DNA 或 RNA 单体的不同，这是因为不同的骨架结构会对核碱基的 π 体系产生不同的影响。由于不同的 PNA 单体的消光系数还没有确定，而且肽骨架对核碱基 π 体系的影响大小还是未知的，这样，在实际应用当中，PNA 寡聚物的浓度是通过测定在 80°C 、 260nm 处的吸收来进行测定的^[23,24]。在该温度下，核碱基的堆积得到完全解除，而且来自有序骨架的贡献可以忽略。

PNA 以一种序列依赖的方式与互补的 DNA 和 RNA 序列杂交，遵从 Watson-Crick 氢键结合准则，也可形成既包含 Watson-Crick 又包含 Hoogsteen 碱基配对的三链体结构^[25~28]。PNA 靶向作用于双链 DNA 时有以下 4 种结合方式，见图 1.2^[29]。

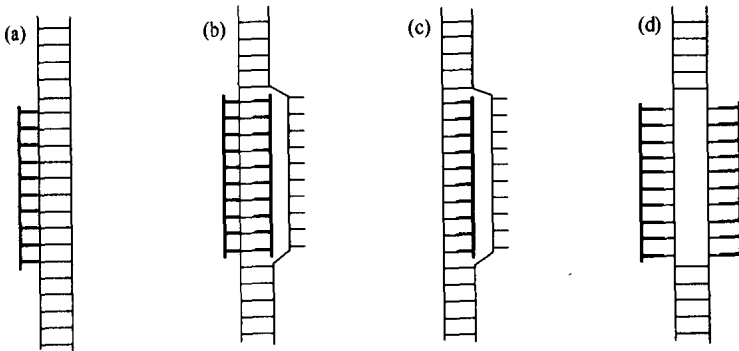


图 1.2 PNA 靶向作用于双链 DNA 时的结合方式

(a) 三链体；(b) 三链体侵入；(c) 双链体侵入；(d) 双重双链体侵入

其中，一条全嘌呤的 DNA 或 RNA 链与两条序列互补的 PNA 链间形成的三链体是特别稳定的，这是因为当全嘧啶的 PNA 寡聚物与互补的双链 DNA 靶标结合时，不是形成常规的 PNA-DNA₂ 三链体，而是形成一种三链侵入复合物（其中 DNA 双链体被一内部的 PNA₂-DNA 三链体所侵入）^[25,26]，见图 1.3，这种结合类型仅限于全嘌呤/全嘧啶的 DNA 靶标。

另外，双重双链体侵入方式也被认为是非常重要的，因为，对

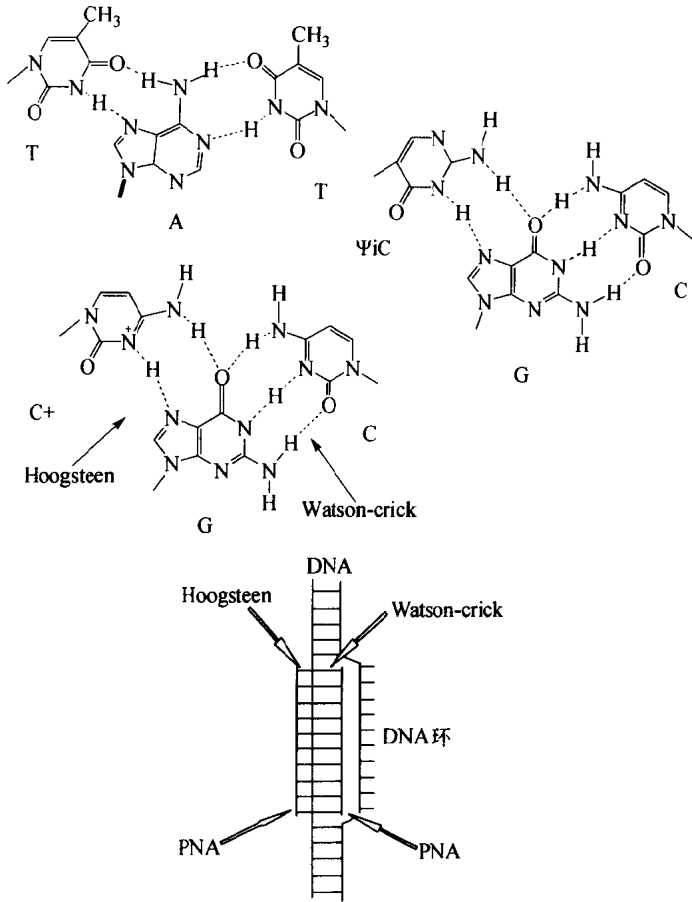


图 1.3 全嘧啶 PNA 寡聚物的三链体侵入

一条 PNA 链通过 Watson-Crick 碱基配对方式结合（倾向于反平行衍向），另一条 PNA 链通过 Hoogsteen 碱基配对方式结合（倾向于平行衍向）。两条 PNA 链通过一灵活的连接剂，连接在一起形成双 PNA (bis-PNA)，如果 Hoogsteen 链中的胞嘧啶用伪异胞嘧啶 (Ψ iC) 替代，则 N3 “质子化”就不需要有较低 pH 值的限制

混合嘌呤-嘧啶序列的靶标来说，只要其含有适当的 A/T 含量（约 50%），就能形成十分稳定的复合物，见图 1.4。

PNA-DNA 杂交严重地受碱基错配的影响，PNA 具有对单个

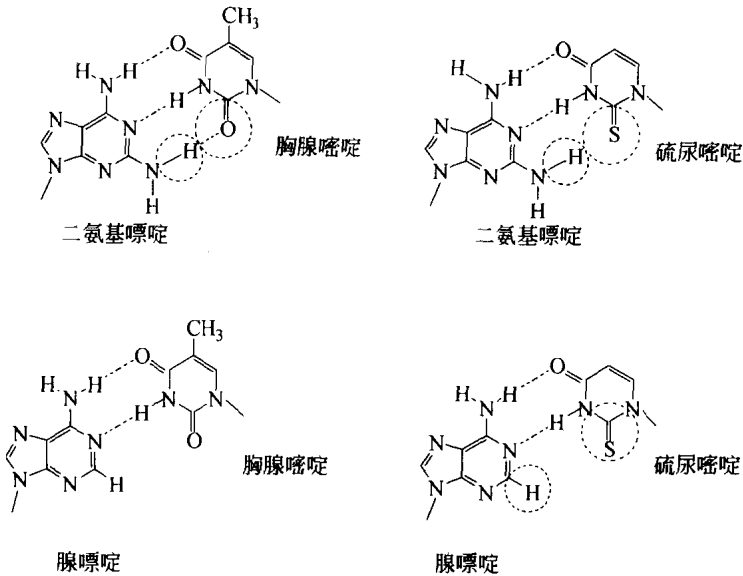


图 1.4 伪互补 PNA 的双重双链侵入

为了获得有效的结合，靶标及 PNA 应至少含 50% 的 AT（没有其他的序列限制），而且 PNA 寡聚物中所有的 A/T 碱基对应被 2, 6-二氨基嘌呤/2-硫尿嘧啶“碱基对”替代，由于空间障碍，这种碱基对是很不稳定的。

碱基错配的分辨能力。相反，碱基错配对相应的 DNA-DNA 杂交的影响则没有这样严重。

PNA 对 DNA/RNA 的识别特性，以及非常好的化学和生物稳定性、化学合成的灵活性，使得 PNA 在有机化学、分子生物学、医学等学科方面引起了人们极大的兴趣^[17,30~36]。

1.4 PNA 作为分子生物学工具

1.4.1 增强的 PCR 扩增

PCR 已经广泛地用于各种分子遗传学应用中（包括以基因分型为目的的 VNTR 扩增），然而在某些情况下，对于小的等位基因

产物的优先扩增中存在问题，会导致对杂合样品的不正确分型^[37]。PNA 已经用于使 VNTR locus D1S80 的扩增增强中^[38]。小的 PNA 寡聚物用于封闭模板，在后来的结合过程中，就没有链间的相互作用了。相反，引物的延伸不被阻断；在延伸过程中，聚合酶顶替了模板的 PNA 分子，而引物向着反应完成的方向延伸。这种方法显示出了 PNA 用于 PCR 扩增的潜力，可对不同大小片段进行更准确、均匀的扩增。

Misra 等^[39]证实，PNA-DNA 嵌合体^[40]可以作为引物进行由 DNA 聚合酶催化的聚合酶反应。嵌合体 $(\text{PNA})_{19}\text{-T}_p\text{G-OH}$ ，由连接到一单个磷酸盐的一个含 19 碱基的 PNA 部分以及有一游离 3'-OH 的二核苷酸 ($\text{T}_p\text{G-OH}$) 组成，当用一互补的 RNA 或 DNA 模板链退火时，可起到一种有效的引物作用，来催化核苷酸的加入（通过聚合酶）。引物也可被逆转录酶以及 *E. coli* DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段所识别。

1.4.2 PNA 的预凝胶杂交

Southern 杂交也许是分子生物学中使用最广泛的一种技术，尽管它在大小和序列信息的预测方面具有很大潜力，但仍有一定的缺点。如需要烦琐的多步洗涤、有时对十分相关的序列分辨较差。PNA 的预凝胶杂交^[41]可简化 Southern 杂交过程，而且所需时间也减少，消除了麻烦的后分离、探测和洗涤步骤。（荧光素）标记的 PNA 寡聚物可作为探针并在低离子强度下与变性的 DNA 样品杂交，随后，混合物直接进行电泳分析，基于片段的长度将单链 DNA 片段分离开来。电中性的 PNA 使得杂交可在低离子强度下进行，并使复合物具有较高的迁移率（与过量的未键合 PNA 相比）。DNA-PNA 杂交体被转移到尼龙膜上，晾干、UV 交联，然后用标准的化学发光技术检测。另外，键合的 PNA 也可用毛细管电泳进行检测（采用直接荧光检测法）。在同样的条件下，DNA-DNA 双链体趋向于破裂，而 PNA-DNA 双链体则仍保持完好（由于 PNA 与 DNA 的较强结合）。经简单的方案，可使靶标 DNA 在按大小分离的同时，也可进行特异的序列检测。因此，与传统的