

锁核酸分子信标在分子识别与生物分析中的应用*

桂珍¹ 严枫^{1**} 李金昌¹ 葛梦圆¹ 鞠焜先²

(1. 南京医科大学附属肿瘤医院检验科 江苏省恶性肿瘤分子生物学与转化医学重点实验室 南京 210009; 2. 南京大学化学化工学院 生命分析化学国家重点实验室 南京 210093)

摘要 分子信标是一种荧光探针,闭合时呈发夹结构。其5'末端修饰荧光基团,3'末端修饰猝灭基团。当目标存在时,环部与目标结合,发夹打开,发出荧光。锁核酸是一类双环状寡核苷酸衍生物,能够遵循碱基互补配对原则与核酸结合。锁核酸分子信标技术,结合了分子信标无需分离未结合探针而直接检测的优势和锁核酸亲和力强、热稳定性好、抗酶切以及体内无毒等特点,在核酸检测方面具有灵敏度高、特异性好的独特优势,近年来得到广泛关注。本文介绍了锁核酸修饰分子信标的结构、功能、设计要点,及其研究现状和一些重要进展,并讨论了目前锁核酸分子信标在分子识别及生物分析中的应用及存在的问题和发展前景。

关键词 锁核酸 分子信标 核酸 分子识别 生物分析

中图分类号:O657.3 文献标识码:A 文章编号:1005-281X(2015)10-1448-11

Applications of Locked Nucleic Acid Molecular Beacons in Molecular Recognition and Bioanalysis*

Gui Zhen¹ Yan Feng^{1**} Li Jinchang¹ Ge Mengyuan¹ Ju Huangxian²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Molecular and Translational Cancer Research, Department of Clinical Laboratory, Nanjing Medical University Cancer Hospital & Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China; 2. State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Molecular beacons are stem-loop hairpin-structured fluorescence probes with a fluorescent dye at 5' end and a fluorescence quencher at 3' end. When a target complementary sequence is absent, the molecular beacons do not fluoresce, because the formation of the hairpin structure brings the quencher and fluorophore into close proximity, whereby fluorescence is quenched with high efficiency. When a target molecule is present, the hybridization between the target and the loop sequence of the molecular beacon results in the spatial separation of the fluorophore and quencher, which opens the stem-loop structure of molecular beacons to emit fluorescence. Locked nucleic acid is a nucleic acid analogue containing one or more LNA nucleotide monomers with a bicyclic furanose unit locked in an RNA mimicking sugar conformation. It possesses excellent binding affinity to nucleic acid, high biostability and resists to nuclease degradation. Due to the excellent sensitivity and high specificity, the combination of the molecular beacons and locked nucleic acid has aroused wide concern. In this review, we intensively summarize the structure, function, design essentials, current research topics and some important progress. In addition, we also discuss the applications, potential problems and perspective of locked nucleic acid molecular beacons in molecular recognition and bioanalysis.

收稿:2015年4月,收修改稿:2015年6月,网络出版:2015年10月15日

* 国家自然科学基金项目(No. 21475063),江苏省临床医学专项基金项目(No. BL2013036)和江苏省医学领军人才与创新团队基金项目(No. LJ201131)资助

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21475063), the Special Project in Clinic Medicine of Jiangsu Province (No. BL2013036), and the Medicine Leading Talents of Jiangsu Province (No. LJ201131).

** Corresponding author e-mail: yanfeng2007@sohu.com

Key words locked nucleic acid; molecular beacons; nucleic acids; molecular recognition; bioanalysis

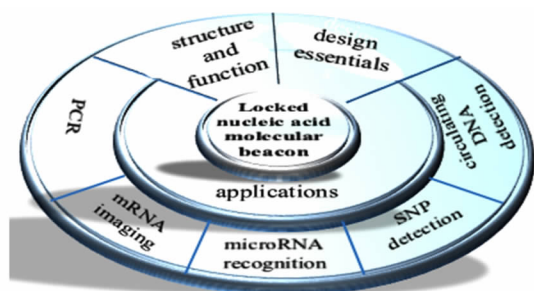
Contents

- 1 Introduction
- 2 Structure and function of molecular beacons
- 3 Structure and properties of locked nucleic acid
- 4 Application of LNA in molecular recognition and biomedicine
 - 4.1 LNA antisense
 - 4.2 LNA-modified siRNA (siLNA)
 - 4.3 LNA-modified DNAzyme (LNAzymes)
- 5 LNA in biotechnology
 - 5.1 LNA primers and PCR
 - 5.2 LNA probes and hybridization
 - 5.3 LNA modification in aptamers
 - 5.4 LNA molecular beacons
- 6 Design of locked nucleic acid molecular beacons
 - 6.1 Selection of the reporter and quencher
 - 6.2 Thermodynamic aspects
 - 6.3 Balance between selectivity and hybridization rate
 - 6.4 Modification of LNA
- 7 Applications of LNA-MB in molecular recognition and bioanalysis
 - 7.1 Real time PCR
 - 7.2 mRNA imaging in living cells
 - 7.3 Targeted recognition of microRNA
 - 7.4 Single nucleotide polymorphisms
 - 7.5 Detection of circulating DNA using LNA-MB
- 8 Conclusion

情况下检测目标序列,为核酸的实时检测提供了可能。但由于核酸酶的分解、蛋白的结合、热力学等原因,分子信标应用于细胞内核酸检测易出现假阳性结果,影响检测的特异性。锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是一种新型的双环状寡核苷酸衍生物,与 DNA 和 RNA 在结构上具有相同的磷酸盐骨架,且遵循碱基配对原则,具有很强的亲和力,热稳定性及抗酶切能力,水溶性好且体内无毒性作用^[5]。锁核酸修饰分子信标(locked nucleic acid molecular beacon, LNA-MB)能较好的弥补分子信标的缺点。在分子生物学检测领域具有广阔的应用前景。本文结合锁核酸分子信标的最新研究进展及其在生物学中的应用作一综述。

2 分子信标的结构和功能

1996年, Tyagi 和 Kramer^[6]首次报道了分子信标。它是一段特殊设计的 DNA 序列,其中环部即目标识别区由 15~30 个碱基组成,茎部即两侧由 5~7 个碱基互补序列组成。当目标 DNA 或 RNA 不存在时,两侧碱基遵循 Watson-Crick 配对形成双螺旋,迫使分子信标形成发夹结构,继而使分别修饰在 5' 末端的荧光基团和 3' 末端的猝灭基团相互接近,荧光猝灭。当目标存在时,目标与分子信标的环部结合,分子间强的杂交作用力打开茎部螺旋,荧光基团和猝灭基团分离,荧光恢复,且荧光强度与目标序列的浓度成正比^[6-8](图 1)。发夹结构的热稳定性和内部信号转移的高效性赋予分子信标优异的灵敏度和选择性,同时使实时检测核酸成为可能。但由于分子信标本质是一段 DNA 序列,它易被核酸酶分解且易与单链 DNA 结合蛋白非特异性结合的性质限制了其在临床生物学中的应用^[9,10]。因此,设计具有生物稳定性的分子信标使其更好地应用于临床生



1 引言

分子信标(molecular beacons, MB)是一类具有特殊发夹结构的荧光探针,广泛应用于基因筛查^[1]、生物传感器的开发^[2]、基因芯片的构建^[3]和单核苷酸多态性的检测^[4]等方面。由于自身的信号发生机制,分子信标可以在不分离未结合探针的

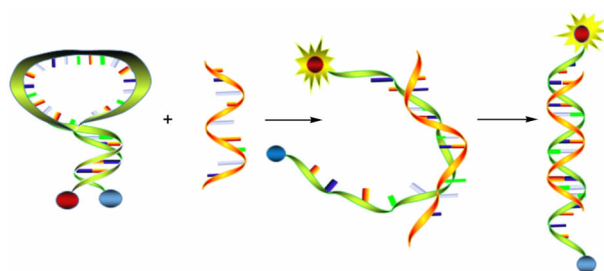


图 1 分子信标杂交示意图

Fig. 1 Hybridization of molecular beacon and nucleic acid

物学具有重要的意义。

3 锁核酸的结构和特性

Imanishi 和 Wengel 课题组^[11,12]分别于 1997 和 1998 年合成了 LNA, 使 LNA 得到广泛关注。LNA 是一种寡核苷酸衍生物, 含有一个或多个 2'-O, 4'-C-亚甲基- β -D-呋喃核糖核酸, 核糖的 2'-O 位和 4'-C 位通过缩水作用形成氧亚甲基桥, 并连接成环形^[13]。这个环形的桥能够降低核糖的柔韧性, 使磷酸盐骨架局部结构的稳定性增强, 赋予 LNA 一些优越的特性, 如高亲合力, 优异的碱基错配识别能力以及抗核酸酶分解的能力。LNA 的特殊构象能够导致核酸骨干的预组装, 在某种程度上增加碱基堆积力, 有利于双链形成^[14,15](图 2)。LNA 对互补的天然核酸具有很强的亲合力, 能够按照 Watson-Crick 法则形成特殊的碱基对^[13,16]。LNA/DNA 杂交双链中, 每增加一个 LNA 单体, T_m 提高 2 ~ 6 °C。相对应地, 在 LNA/RNA 杂交双链中, 每增加一个 LNA 单体, T_m 提高 3 ~ 9 °C^[17]。LNA 的这种特性被广泛应用于多个领域, 如基因沉默^[18]、RNA 拼接调节^[19-22]、RNA 干扰^[23]、分子信标^[24-27]、microRNA 检测^[28]以及 DNA 酶^[29-39]。除此之外, LNA 还有很多优异的化学特性, 如低毒性、抗核酸酶分解、能够与 dsDNA 形成三链结构以及能够按照标准化学法合成^[40,41]。

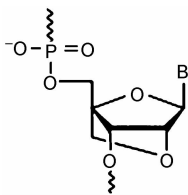


图 2 LNA 的结构示意图

Fig. 2 Structures of LNA

LNA 的杂交亲合性: 对互补序列的高亲合力是 LNA 最重要的特性之一。LNA 碱基与 DNA 或 RNA 具有相同的磷酸盐骨架, 在识别 DNA 或 RNA 上具有明显的优势, 它能够与互补的 LNA、RNA、单链 DNA、双链 DNA 形成高亲合力的杂交物^[42]。此外, LNA 与 DNA 或 RNA 形成的杂交链具有更高的融解温度 (T_m)。LNA/DNA 杂交双链中, 每增加一个 LNA 单体, T_m 提高 2 ~ 6 °C。而在 LNA/RNA 杂交双链中, 每增加一个 LNA 单体, T_m 提高 3 ~ 9 °C, 且随着 LNA 数量的增加, 单个 LNA 所引起的 T_m 变化逐渐降低^[17]。LNA 的高亲合力还表现在碱基错配

识别能力方面。在 LNA/DNA 杂交链中, 含有一个错配碱基 T_m 至少下降 20 °C, 而在相应的 DNA 双链中, T_m 值仅下降 4 ~ 16 °C^[42]。

LNA 的毒性: 注射反义 LNA 后, 大鼠体温和大鼠脑组织学切片未观察到变化^[43]。分别以 1 ~ 2 mg/kg^[44], 5 mg/kg^[45], 25 mg/kg^[46] 的剂量给老鼠服用反义 LNA 聚合物, 肝脏和血液均未查出细胞毒性。Stein 等^[47]将 LNA 介导的基因沉默在细胞培养物中维持了 240 天, 没有发现任何的毒性作用。

LNA 的抗核酸酶切割能力: 正常情况下, siRNA 会被血液中的核糖核酸酶迅速分解, 但在 3' 末端修饰两个 LNA 单体后, siRNA 能在血液中保持 6 个小时以上, 与未修饰的 siRNA 相比, 其稳定性增加了 4 倍^[48]。

LNA 的 RNA 类似物特性: 核磁共振实验可以用来观察 LNA/DNA 嵌合体与 DNA 或 RNA 结合的液体结构, 证实 LNA 的 RNA 类似物特性^[49,50]。将一个或三个 LNA 单体插入到 DNA 寡核苷酸中, 其与互补 RNA 所形成的双链液体结构显示, LNA 可以诱导核酸 3' 端的糖形成 N 型构象。事实上, 9 个碱基的 DNA 链修饰 3 个 LNA 单体可以形成典型的 A 型双链构象^[49]。表明 LNA 稳定性的提高可能与磷酸盐骨架的局部重组导致碱基堆积力增强有关。

LNA 激活 RNase H: RNase H 可以特异性水解 RNA-DNA 杂交链中的 RNA 链。1999 年, Crooke 等发现, DNA 与 mRNA 结合能够激活 RNase H, 继而目标 mRNA 被水解, DNA 得以解放, 与其他 mRNA 结合, 从而扩大了反应效应^[51]。又有研究表明, LNA/RNA 杂交链激活的 RNase H 远远少于相应的 DNA/RNA 杂交链^[43]。而在 DNA-LNA 嵌合链中, LNA 碱基提高结合力, DNA 碱基形成 DNA/RNA 杂交链来促进 RNase H 的激活。由此可见, LNA 可以根据实验条件和目标的不同, 灵活的决定是否激活 RNase H。

LNA 的局限性: 尽管 LNA 有上述优越性, 但由于其价格昂贵, 选择修饰锁核酸的位置和数量过程比较复杂且会随着实验技术和实验条件的不同而有所变化, 目前仅在实验室水平有所应用, 锁核酸真正应用于临床前期还有一段很长的探索期。

4 锁核酸在分子识别与生物学中的应用

4.1 LNA 修饰的反义寡核苷酸

根据目标序列和 RNA 表达的效率, LNA 修饰的反义寡核苷酸的设计有两种方式: 混合式和间隔

式。混合式是指残基分散于整条寡核苷酸上,而间隔式是指两段 LNA 碱基片段分散于寡核苷酸的两端。抑制 microRNA 的表达通常采用混合式设计,而对于抑制 mRNA 的表达来说,间隔式的设计效果最好。这是因为当寡核苷酸与 mRNA 结合时,中间的 DNA 片段能够利用 RNA 酶 H 分解掉杂交双链中的 RNA^[52,53]。

LNA/DNA 混合式可以形成空间位阻抑制目标的表达。RNA 病毒,尤其是 5'-非翻译区,已被多次证实不能使用传统的反义药物^[54]。LNA 的双链稳定性特性为入侵病毒 RNA 结构提供了新思路。比如,丙型肝炎病毒(HCV)的基因组 RNA 在 5'-非翻译区含有内部核糖体进入位点(IRES),LNA 能够侵入 IRES 的二级结构,从而抑制翻译进程^[55]。

虽然非 RNA 酶 H 的机制也有报道,但反义 LNA 的实验还是集中在利用 RNA 酶 H 抑制 mRNA 的表达,这表明 LNA 寡核苷酸是介导体内外基因沉默潜在有效的药物。2007 年, Jacobsen 等^[33]证明 LNA 修饰的反义寡核苷酸是 HIV-1 表达的有效抑制因子。同年, Swayze 等^[56]指出,注射过反义 LNA 的小鼠血清中氨基转移酶(aminotransferase, ALT)和天冬氨酸转移酶(aspartate aminotransferase, AST)显著升高,进而认为 LNA 修饰是促进肝坏死和细胞凋亡的主要因素。为了更好地了解核苷酸序列和肝细胞毒性之间的关系, Burdick 等^[57]于 2014 年进行了两周重复试剂耐受性研究,对注射反义 LNA 的小鼠进行结构-毒性分析。该反义 LNA 靶向结合载脂蛋白 C3 (apolipoprotein C3, Apoc3), cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP Response Element Binding Protein, CREB), 转录调控辅助激活因子 2 (regulated transcription coactivator 2, crt2) 以及糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)。结果表明,可以通过电脑模拟建立结构-毒性关系图,在设计阶段剔除具有肝毒素的反义 LNA,改进体外筛选模型,避免大规模的动物实验。

4.2 LNA 修饰小干扰 RNA

小干扰 RNAs (siRNAs) 是哺乳动物细胞 RNA 干扰试验中基因敲除的强有力工具^[58]。siRNA 可以通过结合 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)靶向配对互补 mRNA 并致其分解。用 LNA 修饰的 siRNA, 即 siLNA, 稳定性和选择性均有提高。Braasch 等^[59]率先用 LNA 修饰 siRNA 进行哺乳动物细胞实验,发现在不影响 RNA 干扰效果的前提下, LNA 大大提高了 siRNA 的热稳定性。2005 年, Elmén 等^[60]通过

实验指出,与未修饰的 siRNA 相比, LNA 修饰的 siRNA 在血清中的半衰期显著延长。随后, Mook 等^[61]系统评估了 LNA 修饰的 siRNA 即 siLNA 在体内和体外实验中的效用。结果表明,在 siRNA 3' 末端少量修饰 LNA 能够稳定 siRNA, 但 LNA 修饰过多会影响实验的效果。2012 年, Harada-Shiba 等^[62]将 LNA 修饰到 siRNA 的有义链上,大幅度延长了 siRNA 的作用时间,改善免疫应答的副作用,为研发血脂异常症的新药提供了新思路。

4.3 LNA 修饰脱氧核酶

脱氧核酶(DNAzyme)是具有催化活性的 DNA 分子,是一种特殊的 RNA 核酸内切酶^[63]。Vester 等^[64]用两个 LNA 单体分别修饰 DNAzyme 结合区的两端,合成 LNAzyme,使 RNA 切割效率得到显著提升。2003 年, Schubert^[38]课题组做了相似的试验,结果表明将 3~4 个 LNA 单体修饰在 DNAzyme 结合区两端能够提高 RNA 切割效率。在此基础上进一步的研究表明,该 LNAzyme 能够切割抗水解的病毒 RNA^[35]。

5 锁核酸在锁核酸在生物技术中的应用

5.1 LNA 引物与 PCR

2003 年, Latorra 等^[65]用锁核酸修饰引物大大提高了 PCR 的效率。与普通的 DNA 引物相比, LNA 引物所用聚合酶用量少,成本效率高。除此之外, LNA 引物还可以减少模板用量。研究发现,在引物中间修饰一个或三个锁核酸效果最佳。后来, Levin 等^[66]将锁核酸修饰在引物的 3' 端或 5' 端或其他位点, PCR 结果显示,锁核酸修饰在引物 5' 端优势更明显。Ballantyne 等^[67]用 LNA 设计引物增加了 PCR 反应中模板的结合力和 DNA 扩增的特异性。最近, Asari 等^[68]用含有 LNA 的荧光通用引物对日本人口 25 个常染色体的短串联重复序列进行快速基因分型。结果显示,含有 LNA 的引物所产生的荧光信号是普通 DNA 引物的 1.5~9.0 倍。

5.2 LNA 探针杂交检测

LNA 探针多用于定性荧光多重检测试验^[69]。与 DNA 探针相比, LNA 探针可以在序列更短的情况下维持高融解温度增加探针特异性。总体来说, LNA 探针优异的杂交能力使其能够用于检测非编码 RNAs^[28]。我们可以根据对应的目标 miRNA 设计出融解温度相同的 LNA 探针,进而设计微阵列芯片,其中 LNA 探针作为 miRNA 的捕获探针,用来区分序列相近的 miRNAs^[70]。此外, Meng 等^[71]将

LNA 探针运用到 PCR 反应中,定量检测胚胎干细胞标志基因 OCT4A mRNA 的表达,鉴于 LNA 优异的单碱基错配识别能力,能够将 OCT4A 与 OCT4B、假基因、基因污染物区分开来,避免了假阳性的发生。2013 年,Wong 等^[72]巧妙的用双链 LNA 探针检测活细胞内 mRNA。通过优化稳定性和特异性,选择了 DNA/LNA 相间的方式设计探针。实验发现,该探针可以在活细胞内稳定表达 72 h,并且能够检测到外部刺激导致的基因表达的变化。由于其出色的性能,LNA 双链探针开辟了大规模分析单细胞基因表达的新方法。同年,Azevedo 等^[73]借鉴荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 的方法,运用 LNA 探针,创新性的发明了体内荧光杂交法 (fluorescence in vivo hybridization, FIVH),用来检测幽门螺杆菌。该方法快速简单准确,开辟了体内检测的新道路。此外,LNA 探针的成功应用也表明,传统用于 FISH 的有毒复合物可以被无毒代替物所取代。

5.3 LNA 适配体合成

核酸适配体是指单链 DNA 或者 RNA 分子折叠成三维结构,能够以高亲合力和高特异性结合多肽、蛋白、小分子和活细胞等^[74~77]。将 LNA 用于适配

体中有两种方式。一种是用传统的方法合成适配体,用化学方法将 LNA 修饰上去;另一种就是直接用 LNA 修饰的核酸序列合成 LNA 适配体。早年,Darfeuille 等^[78,79]将 LNA 引入 RNA 适配体,该适配体能够与 HIV-1 中反式激活应答 (TAR) RNA 特异性结合。表面等离子共振实验表明,LNA/DNA 混合式寡核苷酸与 TAR RNA 的结合物在低纳摩尔级别范围内,其解离是恒定的。Schmidt 等^[80]阐明了 LNA 修饰的适配体在体内的稳定性及其功能。LNA 修饰的适配体能够与病毒蛋白 Tat 竞争性结合 TAR^[81]。2014 年,Wang 等^[82]为了解决常规 DNA 适配体血清不稳定性 and 成像短暂等问题,以作用于淋巴瘤 Ramos 细胞的 DNA 适配体 TD05 为模型,设计了一系列 LNA 修饰策略,对 LNA 修饰的位置和数量进行优化,设计出新型 TD05.6 适配体。在茎部区域增加 LNA 的数量可以在保持 TD05 亲合性和特异性的情况下,增强其血清稳定性。将 TD05 修饰上 7 个 LNA 合成 TD05.6,能将其在血清中半衰期从 0.5 小时提高到 5~6 个小时。将形成 Ramos 肿瘤的裸鼠分别注射 Cy5-TD05 和 Cy5-TD05.6,肿瘤成像维持时间也从原来的 < 150 min 延长到 > 600 min (图 3)。

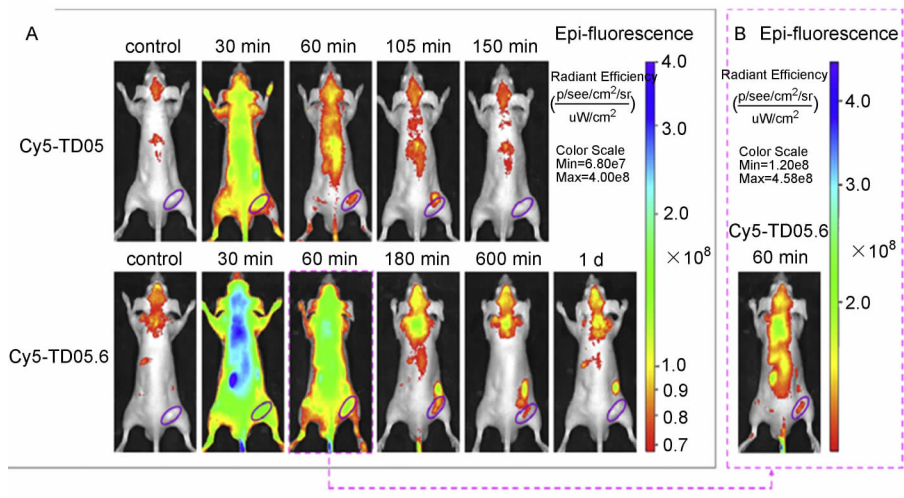


图 3 (A) Ramos 肿瘤的体内时间依赖性荧光成像图, (B) A 中带有 Ramos 肿瘤的裸鼠在注射 Cy5-TD05.6 60min 后的荧光图像 (扣除多余背景)^[82]

Fig. 3 (A) In vivo time-dependent fluorescence imaging of Ramos tumors. (B) Fluorescence image of the Ramos tumor-bearing mouse injected with Cy5-TD05.6 for 60 min in (A), readjusted by deducting more background signals to reveal a clear tumor figure^[82]

5.4 LNA 设计合成分子信标

目前,LNA 已被用于分子信标中以克服一些传统的局限性。Tan 等^[24]用 LNA 设计合成了一种新型的分子信标,与常规的 DNA 分子信标相比,LNA-

MB 在 95 °C 仍能发挥作用,表现出优异的热稳定性 (图 4);单碱基错配识别能力强,与错配碱基几乎不结合 (图 5A);抗酶切能力强,在不同细胞内均能维持其稳定性 (图 5B),为检测活细胞内核酸提供了新

思路。与此同时, LNA-MB 也表现出一定的劣势, 比如杂交动力学慢, 这可能与其茎部碱基强的分子间作用力有关^[24]。因此, 通过调整茎部的长度, 确定锁核酸修饰的数量以及分子信标的序列组成来提高其杂交动力学就显得至关重要。

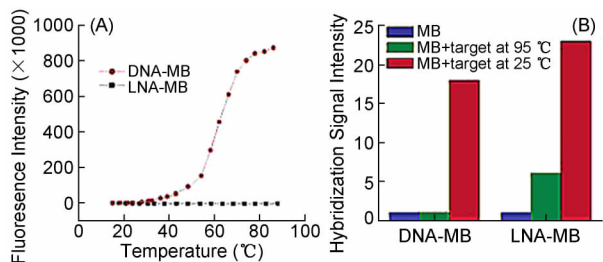


图 4 (A) LNA-MB 的融解曲线, (B) LNA-MB 在 25 °C 和 95 °C 时与目标杂交的示意图^[24]

Fig. 4 (A) Melting curves for both MBs; (B) signal enhancement of both MBs after hybridizing with the target at 25 °C and 95 °C^[24]

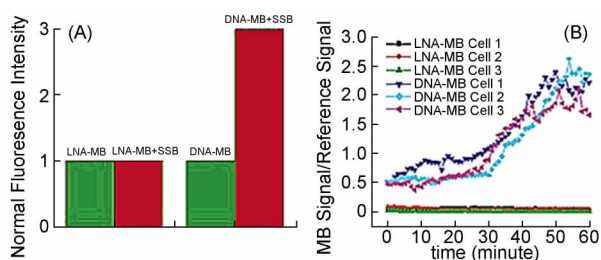


图 5 (A) LNA-MB 抗单链 DNA 结合蛋白的识别能力, (B) LNA-MB 在不同细胞内的稳定性^[24]

Fig. 5 (A) Response of both MBs to single-stranded DNA binding protein SSB. (B) Background signal of both MBs as a function of time after being injected into cells^[24]

6 锁核酸分子信标的设计要点

锁核酸分子信标的设计对于成功检测 DNA 和 RNA 来说是一个重要的环节。设计要点包括: 荧光基团和猝灭基团的选择、分子信标二级结构的组成、锁核酸的修饰位置以及茎部 GC 含量。

6.1 荧光基团和猝灭基团的选择

当目标不存在时, 分子信标的背景信号强度是其应用中的一个实际问题。这是因为背景荧光, 甚至激发的散射光都会通过斯托克斯位移影响分子信标的灵敏度^[83]。分子信标是由一对荧光基团和猝灭基团组成的信号转导系统^[84], 因此, 选择合适的猝灭基团降低分子信标闭合时的背景荧光是分子信标设计时的首要问题。

分子信标有两种能量转移机制, 即动态和静态

荧光淬灭。动态猝灭包括能量共振转移 (FRET) 和 Dexter 转移。在动态猝灭中, 由于供体和受体之间长距离的分子间电偶极的相互耦合作用, 来自供体的光子并不释放到周围环境中, 其能量转移效率取决于供体的发射光谱和受体的吸收光谱之间的光谱重叠程度^[85], 供体的量子产率, 供体和受体的相对定向以及它们之间的距离^[86]。对于采用动态猝灭机制的分子信标来说, 应该采用光谱重叠的荧光基团和猝灭基团。荧光基团的发射波长在 500 ~ 550 nm 之间, 如 FAM, TET 和 HEX, 能够被吸收峰在 450 ~ 550 nm 处的猝灭基团如 Dabcyl 和 BHQ-1 最大化猝灭。发射波长大于 550 nm 的荧光基团, 如若丹明和花青染料, 最好选用吸收峰大于 550 nm 的猝灭基团, 如 BHQ-2 和 BQ-650^[87]。

静态猝灭又称碰撞猝灭, 即在荧光基团和猝灭基团靠的很近, 发生物理碰撞的情况下, 大部分转移的能量以热能而非光能的形式发散出去^[88]。将这种现象应用到含非荧光猝灭基团的分子信标中, 可以提高其猝灭效率, 降低背景荧光, 从而使检测更加灵敏。对于静态猝灭机制的分子信标来说, 所有的非荧光猝灭基团效果都很好。但通常来说, Cy3 和 Cy5 与 BHQ-1 和 BHQ-2 配对, 猝灭效果最好^[89]。如今, 应用最频繁的非荧光猝灭基团是 Dabcyl, BHQ1 和 BHQ2。这些猝灭基团可以跟许多荧光基团配对^[90] (表 1)。在所有的猝灭基团中, 最常用来与近红外基团配对的是 Dabcyl, 尽管它的吸收峰在 475 nm 左右。此外, 这也是所有常见猝灭基团中最便宜的。

6.2 锁核酸分子信标的热力学与动力学

大量的实验数据表明, 完全互补配对的 DNA/DNA 的双螺旋融解温度 (T_m) 比单碱基错配的高 13 ± 3 °C^[91]。由于锁核酸优越的生化特性, 修饰有锁核酸的分子信标单碱基错配识别能力更强。Kurita 等^[17]通过理论计算证实, 在 LNA/DNA 双螺旋中一个单碱基错配可以使 T_m 值下降 26 °C, 而在相应的 DNA/DNA 中, T_m 值下降 10 °C。

线性的探针只有两种状态, 结合或未结合目标, 而分子信标有三种状态, 与目标结合的杂交螺旋态, 发夹结构态或无规卷曲状态^[92]。大量的热力学研究表明, 分子信标发夹结构的自由能低于无规卷曲状态, 因此, MB/DNA 螺旋态转变为无规卷曲状态之前要经历一个发夹结构态^[93]。这个现象很好的解释了分子信标信噪比高的原因, 同时也说明了茎部越稳定, 信噪比越高, 选择性越好。因为只有当分

子信标与目标之间的相互作用力足以克服茎部螺旋才能打开发夹结构。锁核酸修饰的分子信标因为其亲和力更强,因此茎部更稳定,选择性更好,但也降

低了杂交动力学。因此,平衡探针的选择性和杂交速率之间的关系,使分子信标能够成功应用到体液及细胞水平显得至关重要。

表 1 荧光基团-猝灭基团对以及荧光基团的激发峰和发射峰^[90]

Table 1 Reporter-quencher pairs. For every one reporter is showed the peak of excitation, emission^[90].

reporter	excitation peak (nm)	emission peak (nm)	compatible quencher
Cy3	550	570	BHQ-2 and Dabey1
Cy5	640	675	BHQ-3 and Dabey1
CR-6G	505	570	Dabey1
6-FAM	484	525	Low Black-FQ, BHQ-1 and Dabey1
HEX	525	554	Low Black-FQ, BHQ-1 and Dabey1
TAMRA	555	605	Dabey1
TET	490	535	Low Black-FQ, BHQ-1 and Dabey1
FITC	494	518	BHQ-1, TAMRA and Dabey1

6.3 选择性与杂交动力学

与线性探针相比,分子信标的选择性更强,这是因为在没有目标杂交的情况下,分子信标呈发夹结构。增强茎部的稳定性可保证发夹结构的稳定性,比如增加 C-G 含量或者茎部长度。但这些措施同时也降低了杂交速率。研究表明,每增加 2~4 个碱基,分子信标的杂交速率降低 1~2 个数量级^[94]。茎部越短,发夹结构越不稳定,分子信标的信噪比和选择性越低。因此在设计分子信标的时候,平衡好选择性和杂交速率之间的关系成为关键问题^[94]。一个典型的分子信标茎部有 5~7 个碱基,环部有 15~25 个碱基,目标与环部结合。增长分子信标与目标结合的区域,即增加环部的长度可在保证茎部稳定的情况下提高杂交速率^[95]。除此之外,还可以将茎部序列作为互补区域的一部分与目标结合,不仅能提高杂交速率,而且能够防止黏末端结合,提高信噪比^[95]。作为互补区域的茎部序列可以是 3'端或者 5'端,也可以是两端的部分序列。

6.4 锁核酸修饰的位置与数量

设计分子信标时,温度应该作为一个重要因素列入考虑范畴。对于普通分子信标而言,当温度升高时,探针会从发夹结构转变为无规卷曲状态,从而释放出一部分能量,导致背景荧光过高^[94]。用锁核酸修饰分子信标就可以很好地解决这个问题。融解温度实验表明,在温度高达 95 °C 时,DNA 和 RNA 已经变性,LNA-MB 仍然能够保持稳定^[24](图 3B)。LNA-MB 的稳定性导致其杂交速率极低,1400 min 以后,荧光强度仍有上升趋势^[24]。为了更好的利用 LNA-MB, Yang 等系统的合成了一系列嵌合 DNA/LNA 的分子信标,分别从热力学,杂交动力学,蛋白

结合能力,抗酶切能力等方面对含有不同比例 DNA/LNA 的分子信标进行研究。结果表明,茎部的 LNA 碱基对分子信标维持发夹结构稳定性具有重要意义。降低探针中 DNA/LNA 的比率可以有效的提高杂交速率。同时,分子信标的一端茎部区域与目标序列互补可以有效避免黏末端结合。只有全部或者每隔一个碱基修饰锁核酸的分子信标可以抵抗非特异性蛋白的结合和 DNase I 的分解^[94]。

7 锁核酸分子信标在分子识别与生物分析中应用

7.1 PCR 过程的实时监测

分子信标常用于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和基因检测实验^[96]。将与上游或者下游 PCR 产物互补的分子信标加入到 PCR 反应体系可监测 PCR 过程中目标序列的放大过程。PCR 反应每增加一个循环,所得的产物即在退火阶段与分子信标结合,分子信标所携带的荧光得以释放,实现了 PCR 过程的实时监测。Warshawsky 等^[96]用锁核酸探针 PCR 检测含有 FLT3 D835/I836 TKD, JAK2 V617F 和 NPM1 突变的 DNA,简单有效的提高了检测效率。Morandi 等^[97]报道了一种新型 PCR 方法,即等位基因特异性锁核酸定量 PCR (Allele Specific Locked Nucleic Acid quantitative PCR, ASLNAqPCR)。该方法用锁核酸分别修饰了等位基因特异性引物和信标探针,以此来提高检测的灵敏度,特异性以及准确性。他们用这种方法检测了 300 例不同来源的常规标本的 KRAS 和 BRAF 基因突变,并与 sanger 测序进行比较。结果表明,ASLNAqPCR 绝对拥有更好的准确性以及阳性阴性预测值,分析敏感性为 0.1%。除此之外,ASLNAqPCR

操作简单,价格低廉,具有潜在的应用前景。

7.2 检测活细胞内 mRNA

检测活细胞内 mRNA 首先要考虑探针的稳定性以及如何将探针运输到细胞内。锁核酸分子信标在活细胞内能够长期保持稳定,因此探针的运载就成了首要问题。长期以来,人们发展了一系列的技术来运载探针穿过细胞膜进入细胞内。包括微注射、阳离子脂质体转染、电穿孔以及利用细胞渗透性多肽、链球菌溶血素 O 等^[98]。但一种单一的方法并不适用于所有实验条件,因此需要根据所用的样本类型,选择合适的传送方法。其次要考虑的就是序列选择的问题。在室温条件下,mRNA 的二级结构过于稳定会阻止目标与分子信标的结合,或者使杂交动力学降低。同时需要注意的是,目标的二级结构是通过电脑预测出来的,有可能并不能反映所选区域在体内的真实结构。除此之外,我们必须通过序列比对软件如 Blast 来保证所选的序列的唯一性^[90,99]。2008 年,Wu 等^[100]用锁核酸分子信标实现了细胞内 mRNA 的长时间监测。由于 MDA-MB-231 细胞中 MnSOD mRNA 的含量极低,故用脂多糖(LPS)激活 MnSOD mRNA 的表达,用细胞中不含有互补序列的分子信标作为对照,结果表明对照组荧光维持恒定,而 MnSOD 分子信标注入细胞后,经共聚焦显微镜观察可知,荧光强度有轻度升高。在加入 LPS 后,荧光强度大幅升高,且经过 5.5 h 仍然没有进入平台期的趋势(图 6)。

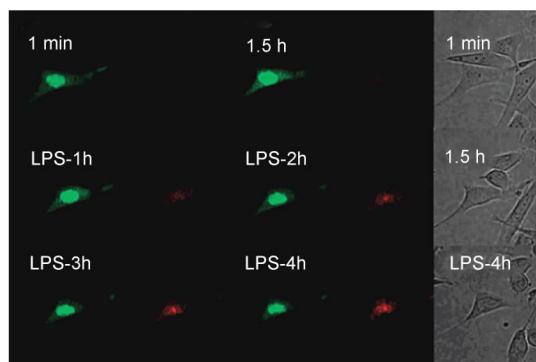


图 6 MDA-MB-231 细胞中对照 MB (绿色) 和 MnSOD MB (红色) 的间隔拍摄图^[100]

Fig. 6 Time-lapse of control MB (green) and MnSOD MB (red) inside of a MDA-MB-231 cell^[100]

7.3 靶向检测 microRNA

MicroRNAs (miRNAs) 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个碱基的非编码 RNA,在发育、分化以及代谢过程中调控转录后基因表达^[101,102]。众所

周知,反义寡核苷酸可以用来抑制编码 RNAs,在此基础上合成特异性寡核苷酸 (antimiRNA) 来抑制 miRNAs 就显得合情合理,而且有可能开发新型药物。由于 miRNAs 序列短,灵敏而特异地检测成熟 miRNAs 比较困难。2004 年,Havelda 等^[103]用锁核酸修饰的寡核苷酸探针进行 Northern blot 印迹实验高效检测 miRNAs。与传统的 DNA 探针相比,灵敏度提高了至少 10 倍,成为 miRNA 检测领域的一个重大突破。该文提出,除用于 Northern blot,锁核酸探针还可用于 miRNA 的原位杂交和 miRNA 表达谱的检测。2010 年,Nielsen 等^[104]用锁核酸为基础的微阵列芯片整体分析了拟南芥中的 miRNAs 表达谱。由于锁核酸优异的单碱基错配识别能力,该微阵列芯片能够特异性的区分 miRNAs 家族相关成员。考虑到锁核酸分子信标高效的亲和性,2011 年,Ju 等^[105]将锁核酸分子信标的应用拓展到检测细胞内 miRNA。用聚乙烯酰胺连接石墨烯纳米带 (PEI-g-GNR) 将 LNA-MB 导入海拉细胞成功检测到活细胞中的 miRNA-21 (图 7)。

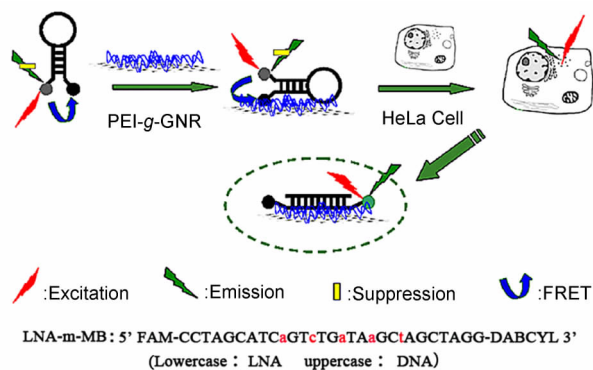


图 7 用 PEI-g-GNR 为载体将 LNA-MB 导入海拉细胞检测 miRNA^[105]

Fig. 7 Transfection of LNA-m-MB probes into HeLa cells via PEI-g-GNR as nanocarrier for detection of target miRNA^[105]

7.4 单核苷酸多态性检测

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 占人类基因突变的 90%,被认为是潜在的基因标志物,是生物医学研究^[106],药品开发^[107],临床诊断^[108]以及疾病治疗^[109]的有效指标。锁核酸分子信标因其自身的信号转导机制和高效的选择性,能够简便快速灵敏的检测 SNPs^[110]。通常分子信标的环部碱基融解温度要稍微高于 PCR 退火温度,而茎部互补碱基分离的温度要比 PCR 退火温度高 7 ~ 10 °C^[111]。为了得到最佳信号,设计的 PCR 引物所

得到的 PCR 产物要小于 250 个碱基^[112]。2004, Griffiths 等^[110]结合 PCR 和锁核酸探针,特异性检测目标 SNP,同时对 PCR 的效率进行数学验证,观察所得到的基因型。实现了 SNP 的大规模检测。2006 年, Gieffers 等^[113]利用锁核酸为基础的 PCR 技术定量检测 SNP 并区分了肺炎衣原体的基因型。至此,虽然锁核酸优异的化学性质得到利用,但 SNP 的检测仍局限于 PCR 等传统方法。2014 年, Li 等^[114]用锁核酸修饰合成 ON-OFF 再生生物传感器,结合链置换反应,建立了一个省时,特异,可再生的电化学感应平台(图 8)。捕获探针 a 可以开启整个感应系统。突变型 DNA 探针与捕获探针完全互补,二者结合后可以激发链置换反应,感应系统关闭;而当单碱基错配的野生型 DNA 探针存在时,链置换反应不能进行,感应系统仍将处于开的状态。该 DNA 传感器重复使用 5 次以后仍然保持很好的稳定性。进一步的实验表明,相比于 DNA 整合序列, LNA 整合序列 SNP 识别能力更强。

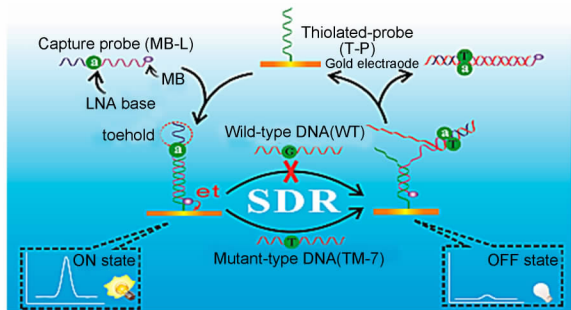


图 8 可再生 DNA 生物传感器构建示意图以及用 ON-OFF 信号转换原则检测单核苷酸多态性^[114]

Fig. 8 Schematic Representation of Regenerated DNA Biosensor Architecture and ON-OFF Switching Signaling Principle for SNPs Detection^[114]

7.5 循环 DNA 检测

1948 年, Mandel 和 Metais 首次报道了循环 DNA^[115],但这并未引起科学界的广泛关注,直到 1994 年,一篇报道指出结肠直肠癌患者血浆中存在致癌基因 K-ras^[116],循环 DNA 才得到了重视。循环 DNA 是指存在于血液(血浆或血清)、脑脊液以及滑膜液等体液中的细胞外 DNA。由于其并不是单独存在的,而是以复合物或者与蛋白结合的形式存在于体液中^[117]以及 DNA 双链的特性和体液中其他复杂成分的干扰等原因使得循环 DNA 的直接检测成为瓶颈问题。本课题组希望通过锁核酸分子信标能与双链 DNA 结合的特性,用标准加入法排除干扰,同时对血

清进行一系列处理后,发展直接检测循环 DNA 的方法,让无需分离,直接检测成为一种可能。

8 总结

目前锁核酸分子信标技术用于临床医学的研究还处于实验探索阶段,离真正的临床应用尚有一段距离。迄今为止,实验室水平的研究已经证实锁核酸分子信标技术在灵敏度,特异性等方面的优异表现,同时细胞水平和体液水平的实验结果也肯定其用于临床的可行性。然而,考虑到临床个体的特殊性和复杂性,临床初步实验摸索中仍存在一些问题:(1)信号放大反应:由于体液中特定核酸的含量极低,锁核酸分子信标的检测限不足以准确检测到,信号放大反应是锁核酸分子信标用于临床的必经之路。但由于目前信号放大技术几乎均采用酶来介导,局限于实验室水平,因此,寻找应用于体液中简单有效的信号放大技术是如今工作的重中之重。(2)个体的不可知性:以血清为例,除去已知的各种酶、蛋白质、离子、核酸等,还有很多未知的因素可能会导致荧光的恢复。因此,在实验之初,巧妙地设计锁核酸分子信标使其不受这些因素的干扰或者让干扰成为一个定值也是一个重要问题。

鉴于锁核酸分子信标技术的简便易行,一旦技术成熟设计出相应的试剂盒,将是临床检测的一大福音。

参考文献

- [1] Culha M, Stokes D L, Griffin G D, Vo-Dinh T. J. Biomed. Opt., 2004, 9(3): 439.
- [2] Li J, Tan W H, Wang K, Xiao D, Yang X, He X, Tang Z. Anal. Sci., 2001, 17: 1149.
- [3] Yao G, Tan W H. Anal. Biochem., 2004, 331: 216.
- [4] Lin Y W, Ho H T, Huang C C, Chang H T. Nucleic Acids Res., 2008, 36(19): e123.
- [5] Singh S K, Koshkin A A, Wengel J, Nielsen P. Chem. Commun., 1998, 455.
- [6] Tyagi S, Kramer F R. Nat. Biotechnol., 1996, 14: 303.
- [7] Fang X H, Li J W J, Perlette J, Tan W H, Wang K M. Anal. Chem., 2000, 72: 747.
- [8] Tan W H, Wang K M, Drake T J. Curr. Opin. Chem. Biol., 2004, 8: 547.
- [9] Li J W J, Fang X H, Schuster S M, Tan W H. Angew. Chem. Int. Ed., 2000, 39: 1049.
- [10] Tan W H, Fang X H, Li J, Liu X J. Chem. Eur. J., 2000, 6: 1107.
- [11] Obika S, Nanbu D, Hari Y, Morio K I, In Y, Ishida T, Imanishi T. Tetrahedron Lett., 1997, 38(50):8735.
- [12] Koshkin A A, Rajwanshi V K, Wengel J. Tetrahedron Lett., 1998, 39(24):4381.

- [13] Koshkin A A, Singh S, Nielsen P, Rajwanshi V K, Kumar R, Meldgaard M, Olsen C E, Wengel J. *Tetrahedron*, 1998, 14: 3607.
- [14] Kaur H, Babu B R, Maiti S. *Chem. Rev.*, 2007, 107(11): 4672.
- [15] Petersen M, Nielsen C B, Nielsen K E, Jensen G A, Bondensgaard K, Singh S K. *J. Mol. Recognit.*, 2000, 13: 44.
- [16] Obika S, Nanbu D, Hari Y, Andoh J, Morio K, Doi T, Imanishi T. *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39(30): 5401.
- [17] Natsume T, Ishikawa Y, Dedachi K, Tsukamoto T, Kurita N. *Chem. Phys. Lett.*, 2007, 446(1/3): 151.
- [18] Jepsen J S, Wengel J. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 2004, 7: 188.
- [19] Roberts J, Palma E, Sazani P, Orum H, Cho M, Kole R. *Mol. Ther.*, 2006, 14: 471.
- [20] Gzaziewicz M A, Tarrant T K, Buckley B, Roberts J, Fulton L, Hansen H, Orum H, Kole R, Sazani P. *Mol. Ther.*, 2008, 16: 1316.
- [21] Guterstam P, Lindgren M, Johansson H, Tedebark U, Wengel J, El Andaloussi S, Langel U. *Biochem. J.*, 2008, 412: 307.
- [22] Childs J L, Disney M D, Turner D H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2002, 99: 11091.
- [23] Fluiter K, Mook O R, Baas F. *Methods Mol. Biol.*, 2009, 487: 189.
- [24] Wang L, Yang C J, Medley C D, Benner S A, Tan W H. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 15664.
- [25] Buh Gasparic M, Tengs T, La Paz J L, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, Zel J, Gruden K. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396: 2023.
- [26] Martinez K, Estevez M C, Wu Y, Phillips J A, Medley C D, Tan W H. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 3448.
- [27] Morandi L, Ferrari D, Lombardo C, Pession A, Tallini G. *J. Virol. Methods.*, 2007, 140: 148.
- [28] Stenvang J, Silahatoglu A N, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S. *Semin. Cancer Biol.*, 2008, 18: 89.
- [29] Vester B, Lundberg L B, Sorensen M D, Babu B R, Douthwaite S, Wengel J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 13682.
- [30] Donini S, Clerici M, Wengel J, Vester B, Peracchi A. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282: 35510.
- [31] Fluiter K, Frieden M, Vreijling J, Koch T, Baas F. *Oligonucleotides.*, 2005, 15: 246.
- [32] Fahmy R G, Khachigian L M. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32: 2281.
- [33] Jakobsen M R, Haasnoot J, Wengel J, Berkhout B, Kjems J. *Retrovirology*, 2007, 4: 29.
- [34] Kaur H, Scaria V, Maiti S. *Biochemistry*, 2010, 49: 9449.
- [35] Schubert S, Furste J P, Werk D, Grunert H P, Zeichhardt H, Erdmann V A, Kurreck J. *J. Mol. Biol.*, 2004, 339: 355.
- [36] Vester B, Hansen L H, Lundberg L B, Babu B R, Sorensen M D, Wengel J, Douthwaite S. *BMC Mol. Biol.*, 2006, 7: 19.
- [37] Vester B, Lundberg L B, Sorensen M D, Babu B R, Douthwaite S, Wengel J. *Biochem. Soc. Trans.*, 2004, 32: 37.
- [38] Schubert S, Gul D C, Grunert H P, Zeichhardt H, Erdmann V A, Kurreck J. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31: 5982.
- [39] Abdelgany A, Uddin M K, Wood M, Taira K, Beeson D. *J. RNAi Gene Silencing*, 2005, 1: 88.
- [40] Braasch D A, Corey D R. *Chem. Biol.*, 2001, 8(1): 1.
- [41] Vester B, Wengel J. *Biochemistry*, 2004, 43(42): 13233.
- [42] 李晓平 (Li X P). 湖南大学硕士论文 (Master Dissertation of HuNan University of Bioscience and Technology), 2010.
- [43] Wahlestedt C, Salmi P, Good L, Kela J, Johnsson T, Hökfelt T, Broberger C, Porreca F, Lai J, Ren K, Ossipov M, Koshkin A, Jakobsen N, Skouv J, Oerum H, Jacobsen M H, Wengel J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, 97(10): 5633.
- [44] Straarup E M, Fisker N, Hedtjarn M, Lindholm M W, Rosenbohm C, Aarup V, Hansen H F, Orum H, Hansen J B, Koch T. *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38: 7100.
- [45] Fluiter K, ten Asbroek A L, de Wissel M B, Jakobs M E, Wissenbach M, Olsson H, Olsen O, Oerum H, Baas F. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31: 953.
- [46] Elmén J, Lindow M, Silahatoglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, Hedtjarn M, Hansen J B, Hansen H F, Straarup E M, McCullagh K, Kearney P, Kauppinen S. *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36(4): 1153.
- [47] Stein C A, Hansen J B, Lai J, Wu S, Voskresenskiy A, Høg A, Worm J, Hedtjarn M, Souleimanian N, Miller P, Soifer H S, Castanotto D, Benimetskaya L, Ørum H, Koch T. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38(1): e3.
- [48] Gao S, Dagnaes-Hansen F, Nielsen E J, Wengel J, Besenbacher F, Howard K A, Kjems J. *Mol. Ther.*, 2009, 17: 1225.
- [49] Nielsen K E, Rasmussen J, Kumar R, Wengel J, Jacobsen J P, Petersen M. *Bioconjugate Chem.*, 2004, 15: 449.
- [50] Petersen M, Bondensgaard K, Wengel J, Jacobsen J P. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 5974.
- [51] Crooke ST. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1998, 8(2): 133.
- [52] Davis S, Lollo B, Freier S, Esau C. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34: 2294.
- [53] Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. *Nature*, 2008, 452(7189): 896.
- [54] Schubert S, Kurreck J. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2006, 173: 261.
- [55] Nulf C J, Corey D. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(13): 3792.
- [56] Swayze E E, Siwkowski A M, Wancewicz E V, Migawa M T, Wyrzykiewicz T K, Hung G, Monia B P, Bennett C F. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35: 687.
- [57] Burdick A D, Scialola S, Mantena S R, Hollingshead B D, Stanton R, Warneke J A, Zeng M, Martsen E, Medvedev A, Makarov S S, Reed L A, Davis II J W, Whiteley L O. *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42(8): 4882.
- [58] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. *Nature*, 2001, 411: 494.
- [59] Braasch D A, Jensen S, Liu Y, Kaur K, Arar K, White M A, Corey D R. *Biochemistry*, 2003, 42: 7967.
- [60] Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Ørum H, Koch T, Wahlestedt

- C. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33: 439.
- [61] Mook O R, Baas F, de Wissel M B, Fluiter K. *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6: 833.
- [62] Wada S, Obika S, Shibata M A, Yamamoto T, Nakatani M, Yamaoka T, Torigoe H, Harada-Shiba M. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2012, 1:e45.
- [63] Santoro S W, Joyce G F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, 94: 4262.
- [64] Vester B, Lundberg L B, Sørensen M D, Babu B R, Douthwaite S, Wengel J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 13682.
- [65] Latorra D, Arar K, Hurley J M. *Mol. Cell. Probes*, 2003, 17: 253.
- [66] Levin J D, Fiala D, Samala M F, Kahn J D, Peterson R J. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34: e142.
- [67] Ballantyne K N, van Oorschot R A, Mitchell R J. *Genomics.*, 2008, 91: 301.
- [68] Asari M, Okuda K, Yajima D, Maseda C, Hoshina C, Omura T, Shiono H, Matsubara K, Shimizu K. *J. Forensic Leg. Med.*, 2015, 31:36.
- [69] Ugozzoli L A, Latorra D, Puckett R, Arar K, Hamby K. *Anal. Biochem.*, 2004, 324: 143.
- [70] Castoldi M, Benes V, Hentze M W, Muckenthaler M U. *Methods*, 2007, 43, 146.
- [71] Ren J J, Meng X K. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2011, 12(2): 149.
- [72] Riahi R, Dean Z, Wu T H, Teitell M A, Chiou P Y, Zhang D D, Wong P K. *Analyst*, 2013, 138(17): 4777.
- [73] Fontenete S, Guimarães N, Leite M, Figueiredo C, Wengel J, Filipe Azevedo N. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81230.
- [74] Syed M A, Pervaiz S. *Oligonucleotides*, 2010, 20: 215.
- [75] Mayer G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48: 2672.
- [76] Thiel K W. *Oligonucleotides*, 2009, 19: 209.
- [77] Keefe A D, Pai S, and Ellington A. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2010, 9: 537.
- [78] Darfeuille F, Hansen J B, Orum H, Di Primo C, Tolumé J J. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32: 3101.
- [79] Darfeuille F, Reigadas S, Hansen J B, Orum H, Di Primo C, Toulmé J J. *Biochemistry.*, 2006, 45: 12076.
- [80] Schmidt K S, Borkowski S, Kurreck J, Stephens A W, Bald R, Hecht M, Friebe M, Dinkelborg L, Erdmann V A. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32: 5757.
- [81] Lebars I, Richard T, Di Primo C, Tolumé J J. *Mol. Dis.*, 2007, 38: 204.
- [82] Shi H, He X, Cui W, Wang K, Deng K, Li D, Xu F. *Anal. Chim. Acta*, 2014, 812: 138.
- [83] Marras S A E. *Mol. Biotechnol.*, 2008, 38: 247.
- [84] Fang X H, Li J J, Perlette J, Tan W H. *Anal. Chem.*, 2000, 72(23): 747A.
- [85] Marras S A E, Kramer F R, Tyagi S. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(21): e122.
- [86] Parkhurst K M., Parkhurst L J. *Biochemistry.*, 1995, 34(1): 293.
- [87] Marras S A. *Mol. Biotechnol.*, 2008, 38(3):247.
- [88] Tsourkas A, Behlke M A, Bao G. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(19):4208.
- [89] Vargas, D Y, Raj A., Marras, S A, Kramer, F R., Tyagi S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2005, 102(47):17008.
- [90] Monroy-Contreras R, Vaca L. *J. nucleic acids*, 2011: 741723.
- [91] Tsourkas A, Behlke M A, Rose S D, Bao G. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31(4): 1319.
- [92] Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A, Kramer F R. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96: 6171.
- [93] Tan L, Li Y, Drake T J, Moroz L, Wang K, Li J, Munteanu A, Yang C Y J, Martinez K, Tan W H. *Analyst*, 2005, 130: 1002.
- [94] Yang C Y J, Wang L, Wu Y R, Kim Y G, Medley C D. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35: 4030.
- [95] Li J, Tan W. *Anal. Biochem.*, 2003, 312: 251.
- [96] Warshawsky I, Mularo F. *J. Clin. Pathol.*, 2011, 64(10):905.
- [97] Morandi L, Biase D E, Visani M, Cesari V, Maglio G D, Pizzolitto S, Pession A, Tallini G. *PLoS One*, 2012,7(4): p1.
- [98] Wang K, Huang J, Yang X, He X, Liu J. *Analyst*, 2013, 138(1): 62.
- [99] Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W, Lipman D J. *J. Mol. Biol.*, 1990, 215: 403.
- [100] Wu Y R, Yang C Y J, Moroz L L., Tan W H. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 3025.
- [101] Ambros V. *Cell*, 2001, 107: 823.
- [102] Bartel D P. *Cell*, 2004, 116: 281.
- [103] Válócei A, Hornyik C, Varga N, Burgyán J, Kauppinen S, Havelda Z. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(22): e175.
- [104] Lundmark M, Kørner C J, Nielsen T H. *Physiol. Plant.*, 2010, 140(1): 57.
- [105] Dong H F, Ding L, Yan F, Ji H X, Ju H X. *Biomaterials*, 2011, 32: 3875.
- [106] Cerra C, Oliver J, Roberts S A., Horne G, Newman W G., Mohiyiddeen L. *Human Reproduction*, 2014, 29(12): 2832.
- [107] Kamau E, Alemayehu A, Feghali K C, Tolbert L S, Ogutu B, Ockenhouse C F. *Malar J.*, 2012, 11:23.
- [108] Caseley E A, Muench S P, Roger S, Mao H J, Baldwin S A, Jiang L H. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, 15(8): 13344.
- [109] Motzer R J, Hutson T E, Hudes G R, Figlin R A, Martini J F, English P A, Huang X, Valota O, Williams J A. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2014, 74(4): 739.
- [110] Johnson M P, Haupt L M, Griffiths L R. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(6): e55.
- [111] Wang K, Tang Z, Yang C J, Kim Y, Fang X, Li W, Wu Y, Medley C D, Cao Z, Li J, Colon P, Lin H, Tan W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48(5): 856.
- [112] Mhlanga M M, Malmberg L. *Methods.*, 2001, 25(4): 463.
- [113] Rupp J, Solbach W, Gieffers J. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006,72(5): 3785.
- [114] Gao Z F, Ling Y, Lu L, Chen N Y, Luo H Q, Li N B. *Anal. Chem.*, 2014,86(5): 2543.
- [115] Mandel P, Metais P. *C R Seances Soc. Biol. Fil*, 1948, 142: 241.
- [116] Sorenson G D, Pribish D M, Valone F H., Memoli V A., Bzik D J., Yao S L. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 1994, 3: 67.
- [117] Fleischhacker M, Schmidt B. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 2007, 1775: 181.