

肽核酸探针在微生物快速检测中的应用

刘鹏, 刘宁*, 王云霞, 段效辉, 尹伟力

(烟台出入境检验检疫局, 烟台 264000)

摘要: 致病性微生物引起的食源性疾病在突发事件数和患者数方面占比最多。如何对食源性致病微生物进行快速、准确的检测, 已成为食品安全应急处理亟待解决的问题。第3代反义核酸-肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)探针由于不带电荷的结构特点, 其稳定性、特异性、亲和性和膜通透性均优于DNA探针。近年来PNA在微生物快速检测中得到越来越广泛的应用, 如用于荧光原位杂交、PCR扩增、生物传感器、基因芯片以及Southern印迹等。本文介绍了PNA探针的结构和特点、杂交方式以及PNA探针的设计原则, 对其在微生物快速筛选方面的应用进展进行了综述, 在此基础上分析了PNA探针的优缺点, 并对未来发展趋势进行了展望。

关键词: 肽核酸; 探针; 微生物; 快速检测

Application of peptide nucleic acid probe in rapid detection of microorganisms

LIU Peng, LIU Ning*, WANG Yun-Xia, DUAN Xiao-Hui, YIN Wei-Li

(Yantai Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, China)

ABSTRACT: Food borne diseases caused by microorganisms are the maximum in numbers of emergency events or patients. How to detect food borne pathogenic microorganisms rapidly and accurately has become an urgent problem to be solved in the food safety emergency handling. The third generation antisense nucleic acid-peptide nucleic acid (PNA) probe was better than DNA probe in the respects of stability, specificity, compatibility and membrane permeability, owing to its characteristic of no electric charge. PNA was widely applied in the rapid detection of microorganisms recently, for instance in PNA-FISH, PCR, biosensor, gene chip and Southern blotting, etc. In this paper, the structure characteristic, pattern of hybridization and PNA probe design principle were introduced, and application of PNA probe in rapid microbial screening were reviewed, also the advantages and disadvantages were analyzed and the future development trend was prospected.

KEY WORDS: peptide nucleic acid; probe; microorganisms; rapid detection

1 引言

食源性疾病是当今世界上最广泛最突出的卫生问题,

据WHO报道^[1], 全球每年因食品污染引起的急性腹泻病例高达数10亿, 有数百万儿童死亡。食源性疾病包括由致病性微生物、化学物质和物理因素引起的疾病, 其中由致

基金项目: 质检总局科技计划项目(2015IK195, 2015IK200)、山东检验检疫局科技计划项目(SK201419)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2015IK195, 2015IK200) and the Scientific and Technological Project of Shandong Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau(SK201419)

*通讯作者: 刘宁, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: liuning52@126.com

*Corresponding author: LIU Ning, Engineer, Yantai Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, No.59 Xinhaiyang Road, Zhifu Zone, Yantai 264000, China. E-mail: liuning52@126.com

病性微生物引起的暴发事件数和患者数最多。目前我国对致病微生物的检测主要采用传统的检测方法,通过增菌后的平板分离、生化试验及血清学试验进行鉴定,操作繁琐,费时费力,且依赖于经验的判断,检测周期长达 7~14 d 甚至更长,很难做到对疾病暴发的早期发现和预警,很难适应进出口食品检验检疫应急处理快速反应的需要。肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)是继硫代磷酸酯寡核苷酸、杂合性反义核酸之后的第 3 代反义核酸^[2]。由于其独特的结构、理化和生物学特性以及杂交方式, PNA 在微生物检测、分子生物学研究、基因诊断、药物设计、肿瘤治疗以及环境微生物生态研究方面显示出广阔的应用前景。本文重点介绍 PNA 作为探针在微生物快速筛选中的研究进展。

2 肽核酸的结构和特性

PNA 是一种人工合成的 DNA 类似物,1991 年由 Nielsen 等^[3]借助计算机辅助设计而成,结构上由酰胺键(NH-CO)连接的重复 N-2-氨基乙基甘氨酸骨架取代了核酸原本的磷酸二酯键骨架^[4],碱基(A, T, C, G, U)通过亚甲基键与骨架中的氨基连接(见图 1)。重复的骨架单位含有 6 个键,碱基与骨架之间有 3 个键相隔,因而在形态和空间几何结构上与 DNA 十分相似。PNA 链的两端分别为游离的氨基和羧基,书写时从氨基到羧基,分别对应 DNA 的 5' 端和 3' 端。

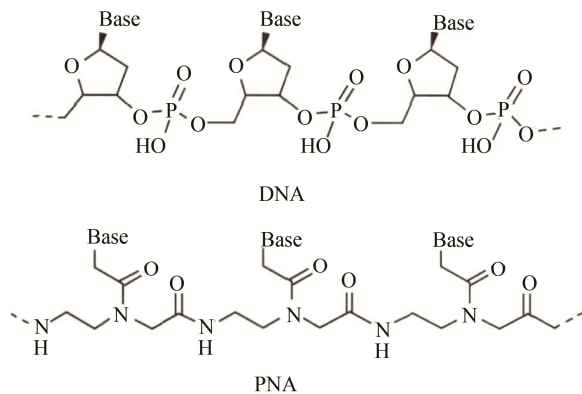


图 1 DNA 和 PNA 结构对比
Fig. 1 Structure contrast of DNA and PNA

2.1 生物学特性

2.1.1 稳定性

与 DNA、RNA 分子相比, PNA 生物学稳定性和热稳定性较高。PNA 没有核酸酶和蛋白酶的识别位点,因此不易被任何已知的核酸酶或蛋白酶降解。据报道, PNA 在血清、细菌提取物、埃氏腹水癌细胞核和细胞质抽提物中均无明显降解^[5]。PNA 与 DNA、RNA 的亲合性也比 DNA

更强,同样条件下,15 个序列相同的碱基, DNA 双链的 T_m 值为 53.3 °C, DNA/RNA 的 T_m 值为 50.6 °C,而相应的 PNA/DNA 的 T_m 值达到 69.5 °C, PNA/RNA 更是高达 72.3 °C。即与同样序列的天然核酸碱基序列相比,每增加 1 个碱基,解链温度 T_m 值提高 1 °C 以上^[6],大大提高了杂交稳定性。

2.1.2 特异性

虽然 PNA 的骨架与 DNA 和 RNA 不同,但与 DNA 或 RNA 的结合仍然严格遵守 Watson-Crick 原则,甚至不能允许 1 个碱基的错配,每出现一个错配, T_m 值平均降低 15 °C,而相应的 DNA 双链仅降低平均 11 °C,如果有 2 个碱基错配则完全不能杂交,因此特异性极高^[7]。同时由于 PNA 的中性骨架不带电荷,因此与 DNA 和 RNA 杂交时不存在静电排斥,稳定性和特异性大大提高。

2.1.3 膜通透性

与天然核酸相比, PNA 水溶性有所增加,且容易被细胞吸收,但其膜通透性仍然较低^[8]。研究表明,通过抗原-抗体、配体-受体、磷脂键连接、核定位信号肽(NLS)连接、直接细胞微注射、电穿孔术以及钙离子等可提高细胞对 PNA 的摄入量^[9]。

2.1.4 细胞毒性

肽核酸几乎没有毒性,为小鼠静脉注射 PNA, 2 h 后观察到 PNA 存在于所有的组织器官中,而 90% 的 PNA 在用后 24 h 内以未经修饰的形式经尿排出^[10]。

2.2 杂交方式

PNA 能够与单链核酸通过 Watson-Crick 碱基互补形式形成双螺旋的稳定复合物(见图 2),也能与双链核酸形成 Watson-Crick-Hoogsteen 碱基配对的 3 螺旋结构,还可以通过一个接头连接形成 bis-PNA 通过“链侵袭”模式直接和双链 DNA($dsDNA$)形成稳定性更高的 4 链复合物^[11-12]。

通常纯嘧啶碱基序列的 PNA 与互补 DNA 或 RNA 杂交, PNA 插入 DNA 或 RNA 双链中而置换其中的一条链,通过链侵袭(strand invasion)模式,形成三螺旋结构(PNA-DNA-PNA 或 PNA-RNA-PNA 复合物)^[13],这种复合物非常稳定,而且可以有效抑制转录活性,在反义核酸的研究上具有重要的意义。而纯嘌呤碱基序列的 PNA 及嘌呤嘧啶混合碱基序列 PNA 与互补 DNA 结合形成的双螺旋结构与 B 型 DNA 双螺旋类似,为右手螺旋方式。多聚同源嘌呤 PNA 和 $dsDNA$ 的同源嘧啶靶序列之间,还有一种杂交方式,即 PNA 侵入 DNA 双螺旋内部,以 Hoogsteen 氢键的方式与靶序列结合,形成 DNA-PNA-DNA 三体复合物^[11]。研究表明, PNA-DNA 双螺旋的热稳定性低于 PNA-DNA-PNA 三螺旋,但仍比相应的 DNA-DNA 双螺旋稳定,主要原因是 DNA 双螺旋的 2 条链间存在负电荷斥力,此外,杂交不受离子浓度影响,在无 Mg^{2+} 的环境中,也能与 DNA 杂交^[14]。

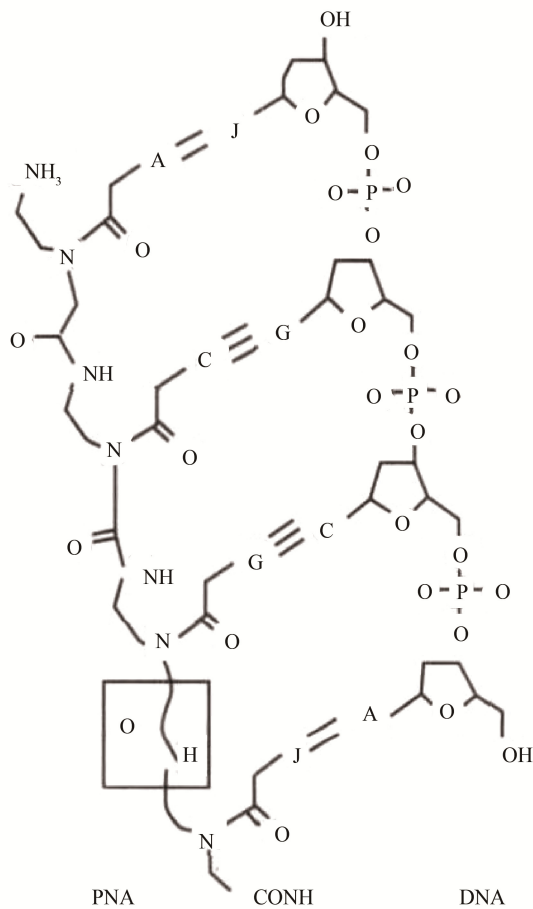


图 2 PNA-DNA-复合物结构图
Fig. 2 Structure of PNA-DNA compound

2.3 PNA 探针设计原则

PNA 探针的设计比常规 DNA 探针限制更多, 相对更难, 除要考虑常规设计原则如二聚体、发夹结构和错配等因素外, 还应注意以下几点: (1)探针长度: 这是首要考虑的问题, 通常 PNA 探针的长度为 12~18 bp 时最好, 过长容易聚集, 难以纯化和鉴定, 杂交效率降低。(2)嘌呤含量: 富含嘌呤的 PNA 寡聚物容易发生自身聚集, 因此在 PNA 探针中嘌呤的含量应不超过 60%, 同时应避免出现 6 个连续的嘌呤及 4 个连续的 G。(3)自身互补: 为了避免产生自我互补, CCGG 不能连续出现, 不要有 6 个连续的碱基互补, 但允许不连续的碱基互补, 不要有 8 个碱基的互补。尽管设计相对复杂, 但 PNA 探针在实际应用中有许多 DNA 探针无法比拟的优点^[15]。

3 肽核酸在微生物快速筛选中的应用

肽核酸以其独特的分子结构和生物学特点得到了越来越多的应用, 尤其在疾病诊疗、抗肿瘤研究^[16]和分子生

物学研究中具有广泛的应用前景, 在很多领域大有取代寡核苷酸的趋势, 如作为反义药物和探针。现将 PNA 作为探针在微生物快速筛选中的应用介绍如下。

3.1 PNA 荧光原位杂交(PNA-FISH)技术

肽核酸荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes, PNA-FISH)技术是以 PNA 探针取代 DNA 探针检测微生物的一种新兴 FISH 技术, 也是目前为止 PNA 作为探针发展最为成熟的技术。与 DNA 探针相比, PNA 探针序列更短、所需浓度更低、杂交速度更快, 并且 PNA 探针不带电荷, 生物稳定性极高, 特异性、亲和力和细胞通透性均比 DNA 更高, PNA 在杂交中的高度稳定性和对错配的高度分辨力使其具有作为探针的明显优势^[17]。PNA-FISH 技术既具有 PNA 探针的高度专一性, 又具备传统染色技术的简便性, 可为致病菌的鉴定提供快速、准确的诊断信息。美国 FDA 推荐该技术用于快速检测血液中的某些致病菌, 检测过程仅需 1.5~2.5 h。

PNA-FISH 包括固相和液相 2 种杂交方式, 丹麦 DAKO 公司于 1999 年首次研制出基于玻片的固相 PNA-FISH 技术, 用于检测抗酸染色为阳性的结核分枝杆菌和非分枝杆菌, Perry-O'Keefe 等^[18]在此基础上建立了可用于流式细胞仪的液相 PNA-FISH 方法。PNA-FISH 的基本流程包括涂片、固定、杂交、洗脱和观测(见图 3)。菌体不需要经过任何消化处理, 并且杂交后的细菌仍可保持完整的细胞形态, 可进一步提供细菌鉴定的辅助信息。由于 PNA-FISH 技术操作简单, 类似于革兰氏染色或抗酸染色技术, 因此亦被称为快速诊断的智能染色技术^[19]。

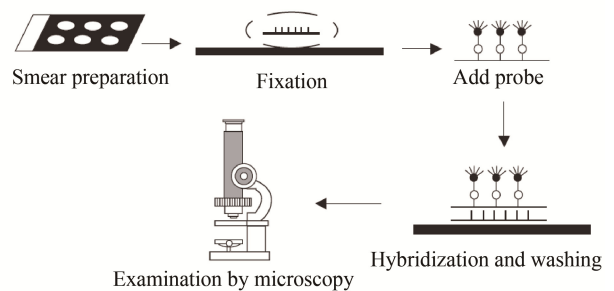


图 3 PNA-FISH 技术流程图^[19]
Fig. 3 Technique flowchart of PNA-FISH

目前通用的对无乳链球菌检测的平板培养法, 假阴性率高达 50%, 而 Peltroche-Llacsahuanga 等^[20]应用 PNA-FISH 技术对棉拭子中无乳链球菌进行检测, 表现出高度的特异性和敏感性, 最重要的是适用于无乳链球菌的所有血清型(包括溶血株和非溶血株)。Oliveira 等^[21]设计金黄色葡萄球菌特异性探针, 对 564 例来自 ESP、BACTEC、BacT/Alert 3 种全自动血培养仪报警阳性、革兰染色成簇排列的阳性球菌标本进行检测, 在 2.5 h 内可提供准确的鉴定

结果, 敏感度、特异度、阳性预测值及阴性预测值分别为 100%、99.1%、98.0%与 99.7%, 获得令人满意的效果。Almeida 等^[22]将 PNA-FISH 技术用于检测细胞悬液、血液、粪便、水以及婴儿奶粉中的沙门氏菌, 结果表明, 该技术对血液和婴儿奶粉中沙门氏菌的检测限量可达到 1 CFU/10 mL(g), 即使在目标菌为非优势菌的情况下, 也能保持较高的灵敏度, 整个检测过程仅需不到 20 h。Zhang 等^[23]应用固相 PNA-FISH 技术检测李斯特菌, 分别针对李斯特菌属、单核细胞增生李斯特菌和伊氏李斯特菌设计了 PNA 探针(Lis-16S-1, Lm-16S-2, Liv-16S-5), 3 个探针均只能检出目标菌而未与非目标菌杂交, 特异性和敏感度均达到 100%; 同时对食品样品的检测结果与 API 方法符合率达到 100%。1995 年以前, 由于传统的表型分析无法区分, 柏林假丝酵母菌一直被误认为与白色念珠菌是同一种真菌, Oliveira 等^[24]设计了 2 条作用于种特异 rRNA 序列的 PNA 探针, 迅速准确地将这 2 种致病性真菌成功区分开, 敏感度、特异性均达到 100%。Reller 等^[25]采用针对血培养中 5 种常见的念珠菌设计 5 条特异性 PNA 探针, 2.5 h 内可鉴定出 5 种念珠菌, 敏感度、特异度均为 99.0%。

PNA-FISH 技术除用于检测细菌、真菌外, 还可确定生物膜中的细菌种类以及立体分布情况。Fazli 等^[26]对 22 例疑似铜绿假单胞菌感染患者的慢性伤口感染细菌生物膜样本进行分析, 用传统的培养法检出结果多数为金黄色葡萄球菌, 少量为铜绿假单胞菌; 而利用 PNA-FISH 法检出的结果多数为铜绿假单胞菌, 少量为金黄色葡萄球菌, 并且可显示感染菌在组织标本中的分布。此外据报道, PNA-FISH 方法还被运用于寄生虫感染疾病的检测, 如设计针对 18S rRNA 的靶序列诊断非洲锥虫病^[27]。

3.2 PNA-PCR 钳制技术

PNA-PCR 钳制技术(PNA-directed PCR clamping, PNA 指引下的 PCR 夹子法)可用来检测 DNA 中的点突变。分别合成与野生型序列互补的 PNA 探针和与突变型序列互补的 DNA 探针, 由于 PNA 不能被 DNA 聚合酶识别, 因此不能引发 PCR 扩增, 但其与 DNA 的结合可阻止 PCR 反应。如果靶序列不存在基因突变, PNA 探针与靶序列优先结合, PCR 扩增终止; 如果靶序列存在基因突变, 则 DNA 探针与靶序列优先结合, PCR 扩增得以进行。该技术的优势在于无需对 PCR 产物进行序列测定即可确定点突变的存在。Ohishi 等^[28]利用 PNA-PCR 法发现了乙肝病毒 YMDD 序列突变的准种。PNA 探针还可结合实时荧光技术, 对扩增产物进行实时检测, 已有利用 LightUp 探针、LightSpeed 探针结合 Q-PNA PCR 方法对扩增产物进行实时检测的报道^[18]。利用 Q-PNA PCR 还可同时对沙眼衣原体和淋球菌进行双色检验^[29]。

3.3 PNA 基因芯片

基因芯片(gene chip)技术作为一种快速、准确、高通

量的核酸分析技术, 近年来应用日益广泛。由于 DNA 探针和待检基因均带负电荷, 其链间斥力不利于探针结合, 只有在一定浓度的盐离子存在时, DNA 探针与靶序列链间斥力降低, 形成稳定的二聚体, 但在此条件下, 靶序列的二、三级结构又会增加, 阻碍其与 DNA 探针结合。PNA 探针具有天然的优势, 由于其不带电荷的中性骨架结构, 不仅避免了与 DNA 或 RNA 靶序列结合时的链间斥力, 而且在低盐环境中靶序列的二、三级结构降低, 变性更充分, 能显著增强芯片杂交信号, 从而很好地解决了长期以来基因芯片技术中, 由于靶序列与 DNA 探针的竞争性杂交而难于接近探针、杂交效率不高的问题。有研究表明^[30], 在盐离子浓度为 10 mmol/L 左右时, PNA 探针能够与双链 DNA 序列直接杂交, 而 DNA 探针则必须变性成单链后才能进行杂交。王传玺等^[31]和张效萌等^[32]分别针对乙肝病毒构建了基于 PNA 探针的基因芯片, 研究均证实与 DNA 探针相比, PNA 探针的杂交信号更强, 单碱基突变的识别能力更强。同时, PNA 芯片的检测方法也更灵活, 除可用荧光标记法进行检测外, 还可根据 PNA 不含磷原子这一特点, 利用质谱技术进行检测^[33]。

3.4 PNA 生物传感器

DNA 传感器(biosensor)往往存在诸如杂交障碍、重复性差和特异性差等缺点, 并且对盐离子浓度的要求也存在差异, PNA 用于生物传感器可明显提高序列识别和结合能力, 降低对杂交条件的要求, 提高杂交效率。

Hejazi 等^[34]针对丙型肝炎病毒(HCV)基因组构建了 14-mer 长的 PNA 探针, 组装到一个电化学生物传感器的电极表面, 检测限达到 1.8×10^{-12} mol/L。用此方法检测 SNP 突变位点, 检测限也可达到 4.8×10^{-12} mol/L, 但杂交时间需延长至 15 h^[35]。Yao 等^[36]在石英晶体微平衡传感器(QCM)中构建了检测乙型肝炎病毒(HBV)的 PNA 探针, 可不经 PCR 扩增对 HBV 基因组进行实时检测, 检测限为 8.6×10^{-12} mol/L。Hyou 等^[37]将 PNA 探针与表面等离子共振感受器(SPR)相结合, 运用 PNA-SPR 法对大肠杆菌的 16s rRNAs 进行测定, 杂交后经 Au 阳离子将杂交信号放大后检测, 实验结果的灵敏度为 58.2 ± 1.37 pg/mL, 克服了 DNA 探针直接检测 16s rRNA 灵敏度较低的问题^[38]。

3.5 PNA-Southern 杂交

用标记的 PNA 探针对 Southern 杂交法进行改良, 将标记的 PNA 探针直接与变性的 DNA 靶序列杂交, 杂交产物经毛细管电泳分离后, 转移到尼龙膜上进行荧光检测即可。杂交时应注意, 为了抑制靶序列的自身退火, 提高杂交特异性, 杂交体系的条件应保持较低的盐浓度, 与传统 Southern 印迹技术相比, PNA-Southern 法不需要在电泳之后进行繁琐的转印、变性、杂交标记和洗脱程序, 尤其是不需要再对过量探针进行洗脱, 大大简化了操作步骤, 提高了检测的特异性和敏感性^[39]。

4 展 望

作为新一代反义检测技术, PNA 以其生物稳定性高、与核酸亲和力强、具有较强的抗核酸酶和蛋白水解酶降解等特性而成为分子生物学的新型有力武器。与 DNA 探针相比具有很多独特的优势, 有取代 DNA 探针进行原位杂交、PCR 扩增和生物传感器成为探针首选之势, 也得到了愈加广泛的应用和重视。但同时, PNA 探针在微生物诊断的实际应用中也存在一定的局限性。如 PNA 探针一般只有 12~18 个碱基, 尽管能识别到一个碱基的差异, 但以如此短的核酸序列区分不同种属间的细菌, 难度显然更大, 对探针设计的要求也更高, 探针合成的价格也较高。另外, 某些细菌的自发荧光现象对结果判定也有一定干扰。

未来的发展趋势主要是通过通过对肽核酸的骨架修饰、穿膜性、理化及生物特性进行进一步的深入研究, 以开发结构更加稳定、特异性更高、亲和力更强的肽核酸。与其他技术相结合, 建立更简便、快捷灵敏、准确的检测技术, 充分挖掘 PNA 作为诊断工具的潜力, 为将来开发独特的微生物诊断试剂盒、设计靶向性更强的药物及快速诊断肿瘤等方面奠定基础, 使其更广泛地应用在食品安全、环境监测、临床诊断等方面。

参考文献

- [1] 赵春艳. 影响食品安全的食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 西藏科技, 2010, 208(7): 36-38.
Zhao CY. Research progress on rapid detection technology of food borne pathogens affecting food safety [J]. Tibet Sci Technol, 2010, 208(7): 36-38.
- [2] 谢勇恩. 第三代反义核酸技术-肽核酸[J]. 川北医学院学报, 2007, 22(4): 309-312.
Xie YE. Third antisense nucleic acid technology[J]. J North Sichuan Med Coll, 2007, 22(4): 309-312.
- [3] Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, *et al.* Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide [J]. Science, 1991, 254: 1497-1500.
- [4] 曾芳, 王建华, 刘春冬. 修饰性肽核酸的合成研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(22): 1936-1945.
Zeng F, Wang JH, Liu CD. Progress of synthesis of modified peptide nucleic acid [J]. Chin J Pharm Sci, 2015, 50(22): 1936-1945.
- [5] Demidov VV. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts [J]. Bio Chem Pharm, 1994, 48(6): 1310-1313.
- [6] 陈鸣, 府伟灵. 肽核酸与核酸分子杂交的模式及其在基因诊断领域中的应用[J]. 生命的化学, 2003, 23(5): 353-355.
Chen M, Fu WL. Pattern of peptide nucleic acid and nucleic acid molecular hybridization and its application in the field of gene diagnosis [J]. Chem Life, 2003, 23(5): 353-355.
- [7] Demers DB. Enhanced PCR amplify cation of VNTR locus DIS80 using peptide nucleic acid(PNA) [J]. Nucl Acid Res, 1995, 25(5): 3050-3055.
- [8] Pende M, Kozma SC, Jaquet M, *et al.* Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice [J]. Nature, 2000, 408: 994-997.
- [9] Berggren PO, Yang SN, Murakami M, *et al.* Removal of Ca²⁺ channel β_3 Subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis [J]. Cell, 2004, 119: 273-284.
- [10] 黄秋蝉, 韦友欢, 李耀燕. 肽核酸的研究进展[J]. 中国酿造, 2008, 193(16): 12-14.
Huang QC, Wei YH, Li YY. Research progress of peptide nucleic acid [J]. China Brew, 2008, 193(16): 12-14.
- [11] 陈鸣, 府伟灵, 蔡国儒, 等. 肽核酸生物传感器直接检测临床标本中提取的病毒基因组 DNA[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(7): 616-619.
Chen M, Fu WL, Cai GR, *et al.* Direct detection of viral genomic DNA extracted from clinical samples using peptide nucleic acid biosensor [J]. Chin J Nosocomiol, 2003, 13(7): 616-619.
- [12] Egholm M, Chritensen L, Dueholm L, *et al.* Efficient PH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine containing bis-PNA [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 217-222.
- [13] Griffith MC, Risen LM, Greig MJ, *et al.* Single and bis peptide nucleic acids as triplexing agents: binding and stoichiometry [J]. J Am Chem Soc, 1995, 117: 831-832.
- [14] Zhao XH, Li ZG. The properties and applying prospects of peptides [J]. J Pract Oncol, 2003, 17(4): 320-322.
- [15] 王云霞, 陈鸣, 丁毅, 等. 肽核酸探针在生物传感器检测中的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 448-450.
Wang YX, Chen M, Ding Y, *et al.* Research progress of peptide nucleic acid probes in the detection of biosensor [J]. Chin J Nosocomiol, 2008, 18(3): 448-450.
- [16] 涂小云, 叶小群. 肽核酸在抗肿瘤作用的研究进展[J]. 生命的化学, 2015, 35(2): 214-218.
Tu XY, Ye XQ. Research progress in anti tumor effects of peptide nucleic acid [J]. Chem Life, 2015, 35(2): 214-218.
- [17] Almeida C, Azevedo N F, Santos S, *et al.* Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization(PNA FISH) [J]. PLOS ONE, 2011, 6(3): 14786-14798.
- [18] 李可, 张晓峰, 王忠才. 肽核酸探针在微生物诊断领域的应用进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 1000-1006.
Li K, Zhang XF, Wang ZC. Application of peptide nucleic acid probes in the filed of microbial diagnosis [J]. Microbiol, 2012, 39(7): 1000-1006.
- [19] Stender H. PNA FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3: 649-655.
- [20] Peltroche-Llacsahuanga H, Fiandaca MJ, Von Oy S, *et al.* Rapid detection of *Streptococcus agalactiae* from swabs by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(2): 179-184.
- [21] Oliveira K, Brecher SM, Durbin A, *et al.* Direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 889-891.
- [22] Almeida C, Azevedo NF, Fernandes RM, *et al.* Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(13): 4476-4485.
- [23] Zhang XF, Wu S, Li K, *et al.* Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for identification of *Listeria* genus, *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* [J]. J Food Microbiol, 2012, 157: 309-313.

- [24] Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, *et al.* Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(11): 4138–4141.
- [25] Reller ME, Mallonee AB, Kwiatkowski NP, *et al.* Use of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for definitive, rapid identification of five common *Candida* species [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 3802–3803.
- [26] Fazli M, Kirketerp MK, Pedersen J, *et al.* Distribution, organization and ecology of bacteria in chronic wounds [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(9): 2717–2722.
- [27] Radwandka M, Magez S, Perry-O'Keefe H, *et al.* Direct detection and identification of African trypanosomes by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(11): 4295–4297.
- [28] Ohishi W, Chayama K. Rare quasispecies in the YMDD motif of hepatitis B virus detected by polymerase chain reaction with peptide nucleic acid champing [J]. *Intervirology*, 2003, 46(6): 355–361.
- [29] Fiandaca MJ, Hyldig-Nielsen JJ, Gildae BD, *et al.* Self-reporting PNA/DNA primers for PCR analysis [J]. *Genome Res*, 2001, 11(4): 609–613.
- [30] Albert G, Ane L, Jorg K, *et al.* PNA array technology in molecular diagnostics [J]. *Nucleosides Nucleotides*, 1998, 17(9–11): 1717–1724.
- [31] 王传玺, 韩金祥, 鲁艳芹. 肽核酸在分子生物学方面的应用研究进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 2004, 25(5): 320–322.
Wang CX, Han JX, Lu YQ. Progress in application of peptide nucleic acid in molecular biology [J]. *Chi J Biochem Drugs*, 2004, 25(5): 320–322.
- [32] 张效萌, 韩金祥, 鲁艳芹. 肽核酸芯片技术初探 [J]. *临床检验杂志*, 2002, 20(3): 148–150.
Zhang XM, Han JX, Lu YQ. Technology of peptide nucleic acid chip [J]. *J Clin Lab*, 2002, 20(3): 148–150.
- [33] 赵旭海, 李志高. 肽核酸性质及应用前景 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2003, 17(4): 320–322.
Zhan XH, Li ZG. The nature and application prospect of peptide nucleic acid [J]. *J Pract Oncol*, 2003, 17(4): 320–322.
- [34] Hejazi MS, Pourmaghi-Azar MH, Ahour F. Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 399(1): 118–124.
- [35] Hejazi MS, Pourmaghi-Azar MH, Alipour E, *et al.* Development of a novel electrochemical biosensor for detection and discrimination of DNA sequence and single base mutation in dsDNA samples based on PNA-dsDNA hybridization—a new platform technology [J]. *Electroanalysis*, 2011, 23(2): 503–511.
- [36] Yao C, Zhu T, Tang J, *et al.* Hybridization assay of hepatitis B virus by QCM peptide nucleic acid biosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23(6): 879–885.
- [37] Kima MG, Joung HA, Leea NR, *et al.* High sensitivity detection of 16s rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 630: 168–173.
- [38] Nelson BP, Liles MR, Frederick KB, *et al.* Label-free detection of 16S ribosomal RNA hybridization on reusable DNA arrays using surface plasmon resonance imaging [J]. *Environ Microbiol*, 2002, 4(11): 735–743.
- [39] 王建华, 郭泽琴. 肽核酸在分子生物学技术中的应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(1): 90–94.
Wang JH, Guo ZQ. Application of peptide nucleic acid in molecular biology [J]. *Chin J Bio Eng*, 2013, 33(1): 90–94.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



刘鹏, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: lp15165747530@163.com



刘宁, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: liuning52@126.com