



基于PNA的生物传感技术最新研究进展

向治楚^{1,2}, 李乐乐^{1,3*}, 赵宇亮^{1,3*}

1. 国家纳米科学中心, 中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100190

2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016

3. 中国科学院大学材料科学与光电技术学院, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: lilele@nanoctr.cn; zhaoyl@nanoctr.cn

收稿日期: 2022-04-12; 接受日期: 2022-04-26; 网络版发表日期: 2022-06-10

北京自然科学基金(编号: JQ20005)资助项目

摘要 肽核酸(PNA)是一种人工合成的核酸类似物, 由沿假肽骨架排列的核碱基组成, 能够将核酸编码遗传信息的能力与氨基酸编码蛋白质结构与功能的特性整合起来. PNA具有高生物稳定性和与互补核酸序列结合的高亲和力, 可以通过特异性地与DNA或RNA杂交形成稳定的PNA-DNA或PNA-RNA杂合双链结构, 因此有望克服传统核酸在生物医学领域应用中存在的功能相对单一和体内稳定性较差等缺陷. 本文简要综述了PNA相对于传统核酸的独特性质及其在生物医学领域的应用, 重点讨论了基于PNA与DNA相结合的化学与生物传感技术方面的最新研究进展, 并对其进行了总结和展望.

关键词 肽核酸, 核酸, 多肽, 分子探针, 生物传感

1 引言

核酸(DNA和RNA)是目前已知各种复杂生命形式的遗传物质. 这类生物分子具有强大的分子识别能力, 可以通过复制、转录和翻译的方式实现信息的可靠传递. 此外, DNA分子可作为优良的生物材料用于构筑能够感知外部信号并执行高度复杂任务的分子器件^[1,2]. 基于DNA的纳米器件能够被细胞所内化, 且能与生物体系进行可控相互作用, 因此被广泛用于生物检测、分子成像和药物递送等领域^[3~10]. 而且, 经过精心设计的DNA纳米器件或纳米探针已被用于对活细胞中特定RNA进行原位检测和成像, 从而为生物学研究、医学诊断和治疗提供有价值的参考信息^[11~15]. 然

而, DNA的磷酸骨架带有强负电荷, 在体内环境中易被核酸酶降解, 从而限制了其在生物医学领域的应用.

肽核酸(PNA)是由Nielsen等^[16]开发的一种核酸类似物. 与核酸相比, 负电荷的磷酸骨架被中性假肽骨架所取代, 2-氨基乙基甘氨酸重复单元取代磷酸骨架与核碱基共价连接, 核碱基能够通过沃森-克里克碱基配对与互补的DNA或RNA序列杂交形成双链结构^[16~18]. 将多肽序列整合到PNA中可使其作为多肽与核酸间的“桥梁分子”促进核酸与多肽领域的交叉融合; 同时PNA在一定程度上可以替代核酸, 对传统核酸体系如杂交链式反应、链置换反应等进行优化和改造; 由于PNA骨架呈电中性, 在与DNA或RNA链杂交过程中没有静电排斥作用, 与相同长度的DNA-DNA双链结构

引用格式: Xiang Z, Li L, Zhao Y. Recent progress in PNA-based biosensing technology. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 1592–1600, doi: 10.1360/SSC-2022-0070

相比, PNA-DNA 具有更高的热稳定性^[19~21], 此外, PNA 可以侵入双链 DNA, 用于设计探针和反义核酸, 实现对靶标核酸的特异性检测和编辑. 与 DNA 间的杂交不同, PNA 与 DNA 间的杂合双链结构稳定性受溶液中离子浓度影响更小^[22]. PNA 与 DNA 可以通过平行或反平行两种方式杂交形成双链结构, 但由于 PNA 的骨架呈现非手性特点, 因此反平行杂交模式具有更高的稳定性^[20,23]. PNA 与 DNA 杂交形成双链结构的稳定性对单碱基错配高度敏感^[24]. 因此, 基于 PNA 的探针具有很强的序列特异性, 在单碱基错配识别方面优于 DNA 探针^[25]. 值得注意的是, 由于 PNA 所具有的假肽骨架, 导致核酸酶和蛋白酶均不能对其进行识别, 使得 PNA 具有较强的抗酶切能力和体内稳定性, 因此在生物医学尤其是生物传感领域展示出较大的应用潜力^[20,21,26,27].

本文讨论了 PNA 的独特性质及其在生物医学领域的应用研究进展. 首先介绍了 PNA 相对于核酸所独有的性质, 以及基于 PNA 的这些特性在生物医学领域的相关应用研究; 之后, 重点讨论了 PNA 作为多肽与核酸之间的桥梁分子, 用于对核酸进行多肽工程化以及在生物传感领域的最新研究进展; 最后, 对 PNA 在生物医学领域的应用进行了总结和展望.

2 PNA 的特性及其应用

2.1 杂交的高稳定性和亲和力

PNA 与 DNA/RNA 序列的互补杂交比相同序列的 DNA-DNA 或 RNA-RNA 具有更高的稳定性和亲和力^[16,17,27,28]. 例如, dA₁₀-dT₁₀ DNA 双链的解链温度(T_m)为 23°C, 而 dA₁₀-dT₁₀ DNA-PNA 杂合双链的 T_m 为 86°C. 这是由于 PNA 骨架呈电中性, 其与 DNA 或 RNA 间的杂交不受静电排斥作用的干扰^[16]. 因此, 基于 PNA 的生物传感器可实现对靶标 DNA 的快速、灵敏、高特异性的检测, 并在检测特定疾病的致病基因方面表现出良好的选择性和可靠性^[20,27,29]. 使用基于双倾斜光纤布拉格光栅(DTFBG)的经 PNA 探针功能化的生物传感器用于直接检测无标记的 DNA, 对于浓度低至 10 nM 的靶标核酸仍然具有良好的灵敏度^[30]. 这种基于 PNA 的电化学生物传感器也可以应用于其他目标分析物, 如蛋白质或污染物等^[20,21]. 其还可用于检测 p53 肿瘤抑制基因中的靶 DNA 序列和单碱基突变. Bellassai 等^[31]

报道了一种基于 PNA 和表面等离子体共振(SPR)成像的生物传感器, 利用其表面固定的 PNA 探针与血液中的循环肿瘤 DNA (ctDNA) 杂交形成 PNA-DNA 双链, 可实现对血液中 ctDNA 的 SPR 成像以及快速检测. 总之, PNA 探针所具有的高重复性、特异性以及较低的检测限使其可以作为一种良好的检测工具用于核酸检测.

此外, 基于 PNA 的探针在病毒以及致病微生物检测方面表现出良好的潜力^[32]. Srisomwat 等^[33] 基于 PNA 的电中性以及与靶标核酸杂交的高特异性开发出了交流电致发光生物传感器, 用于人免疫缺陷病毒(HIV)和丙型肝炎病毒(HCV)的高灵敏检测. 在该方法中, 传感器的 PNA 探针通过与 HIV 或 HCV 特异性 DNA 结合形成杂合双链结构, 从而影响传感器中质子的传导, 进而通过对电致发光信号的检测实现对人血液样本中 HIV 和 HCV 病毒的诊断. Tepper 等^[34] 报道了一种细胞膜渗透型 PNA 探针(FIT-PNAs), 用于对耐药型疟原虫的检测. 该探针通过将含有 8 个 D-赖氨酸的穿膜肽与 PNA 探针结合, 使得 FIT-PNAs 能够穿过细胞膜进入到被恶性疟原虫感染的红细胞中, PNA 通过对野生型(青蒿素敏感型)和突变型(青蒿素耐药型)菌株 K13 基因的 C580Y 区域进行特异性识别, 实现了对耐药型疟原虫的鉴别和区分.

2.2 侵入 DNA 双链

PNA 寡聚体所具有的一个显著特性是能够侵入双链 DNA 从而对其进行基因编辑. PNA 可与双链中的一条 DNA 链形成 PNA/DNA/PNA 三链体结构(图 1a), 并可通过反平行的 Watson-Crick 和平行的 Hoogsteen 碱基互补配对对杂交进一步增强三链体复合物的稳定性^[20,35]. 这种入侵导致一种能被内源性 DNA 修复机制识别的螺旋结构的形成, 并诱导与供体 DNA 的重组. 前期研究报道该技术可用于修复模型细胞系中引起 β -地中海贫血的基因突变^[36], 通过电穿孔技术导入设计好的 PNA 寡核苷酸序列可以实现对约 0.2% 细胞的基因突变进行修复. 在之后的研究中, 通过对 PNA 寡聚体序列进行优化, 其在 THP-1 和原代人 CD34⁺ 造血干细胞(HSC)中的基因编辑成功率提高至 2.8%^[37]. 利用该技术可以在 CCR5 受体序列中引入终止密码子, 致使该受体产生缺陷, 进而引起对 R5 亚型 HIV-1 产生抗性, 将经过以上处理的 HSC 细胞移植到小鼠体内, 可以在移

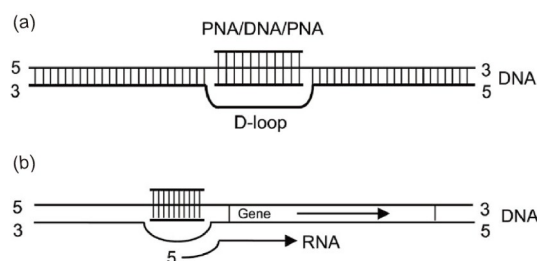


图1 PNA结合产生的PNA/DNA/PNA三链结构和D-环结构(a)以及从D-环位点起始的基因转录过程(b)^[23]

Figure 1 PNA binding-generated PNA/DNA/PNA triplex and single-stranded D-loop structure (a) and the transcription initiated from the D-loop site (b) [23].

植后长达四个月内持续检测到该抗性。

此外, PNA与双链靶标DNA结合可以诱导细胞内源性基因的表达。与双链DNA结合时, PNA通过链置换作用取代其中一条DNA, 与另一条DNA链杂交形成双链结构, 被取代的DNA链在PNA结合位点形成稳定的D-环结构(图1b)^[17,22,23,38]。研究表明, 该D-环结构能够在体外启动靶标DNA的转录, 从而使得人工诱导基因特异性表达成为可能。镰状细胞性贫血症和 β -地中海贫血等类 β -珠蛋白异常疾病是由 β -珠蛋白基因突变引起的非常常见的遗传疾病^[22,38]。当 γ -珠蛋白基因在镰状细胞患者中高表达时, 高水平的胎血红蛋白(HbF, $\alpha 2\gamma 2$)可以替代缺陷型 β -珠蛋白基因产物, 因此此类患者的症状较轻甚至没有症状。然而, γ -珠蛋白基因的表达受发育水平的调节, 通常在成人血细胞中的表达水平非常低。基于上述问题, Shokolenko等^[22]设计了能与人类 γ -珠蛋白基因5'-末端区域特异结合并可用作基因激活剂特异性诱导基因表达的PNA序列。通过利用绿色荧光蛋白(GFP)启动子报告基因作为模型, 在体外转录系统证明了在没有哺乳动物启动子的情况下, 该PNA寡聚物与基因结合成功诱导了GFP报告基因的转录。将含有PNA结合区域的相同基因载体通过显微注射至CV1猴肾细胞中, 通过荧光显微镜能检测到GFP的显著表达。以上结果表明, PNA与靶标基因序列结合不仅能在体外启动基因转录, 而且也能在活细胞中诱导基因表达。

2.3 杂交高特异性用于单核苷酸多态性检测

单核苷酸多态性(SNP)检测为疾病相关基因的诊断和基因分型等提供了重要依据^[39,40]。由于PNA与核

酸互补杂交的高特异性和亲和力, 使得含有相同碱基错配数目的PNA-DNA双链结构比DNA-DNA双链结构更不稳定, 因此可利用其检测和区分SNP。Sun等^[41]将PNA探针固定在金电极表面, 通过基于电化学介导的可逆加成裂解链转移(cRAFT)策略实现了对SNP的高灵敏检测。Xu等^[42]报道了一种基于比色法的纳米生物传感器, 利用PNA对突变DNA与正常DNA具有不同的保护作用导致的被过氧化物酶切割效率不同, 通过比较切割前后的颜色变化, 实现了对SNP的高灵敏区分。值得注意的是, 通过利用PNA微阵列芯片检测基因片段中SNP的同时, 还可以简单、快速和高效地进行基因分型^[43,44]。Song等^[45]分析比较了PNA微阵列芯片PANArray™人乳头瘤病毒(HPV)试剂盒与市售DNA芯片试剂盒在HPV基因分型方面的性能差异, 结果表明这两种芯片的总体HPV阳性率无统计学差异, 但PNA芯片在所有类型的特异性测序分析中对HPV基因分型结果的准确率(99.7%)高于DNA芯片(91.0%)。以上结果也表明, 基于PNA的探针在与靶标基因序列原位杂交中具有更高的灵敏度和准确度。

3 PNA在生物传感方面的最新研究进展

3.1 功能核酸的多肽工程化

近年来, 功能核酸在分子传感及成像方面展现出独特优势^[46,47]。在前期工作中, 本课题组通过引入上转换发光技术与功能核酸相结合构建远程可控的化学与生物传感器, 以提高分子成像的时空选择性^[48-51]。然而, 由于光控在组织穿透深度上的局限性, 迫切需要扩展用于调控功能核酸活性的内源性因素。

蛋白酶(肽酶)是一类具有蛋白或多肽水解功能的酶^[52]。由于很多蛋白酶如基质金属蛋白酶、组织蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶等在肿瘤细胞中高表达, 因此其可作为肿瘤标志物并广泛应用于肿瘤诊疗研究^[53,54]。然而, 由于多肽与核酸间迥异的分子结构和生物活性, 使得构建蛋白酶调控的功能核酸传感器仍然是一个难题。最近, 本课题组利用PNA作为多肽与核酸间的“桥梁”分子, 在PNA的介导下对功能核酸进行多肽工程化, 实现了利用蛋白酶对功能核酸的识别活性进行调控(图2)^[55]。我们选择ATP适体和组织蛋白酶B (CaB)作为模型验证该设计的可行性。通过结合理论计算合理设计合成了整合有CaB特异性多肽序列的PNA-多

肽-PNA三嵌段共聚物(PpP). 将Cy5标记的核酸适体(F-Ap)与猝灭基团BHQ2标记的互补DNA链(Q-cS)杂交, 从而得到传统核酸适体传感器C-SP. 进一步利用PpP的PNA碱基序列与C-SP中的核酸适体序列互补杂交, 获得稳定的杂合结构PA-SP. 由于PpP与核酸适体之间具有较强的亲和力, 使得其对ATP的特异性识别功能被抑制; 在经CaB激活后, 多肽序列被蛋白酶水解, 使得被切割的PpP与核酸适体的亲和力和稳定性降低. 在ATP存在条件下, 核酸适体识别ATP并发生构象改变, 导致双链解离以及Cy5荧光信号增强(图2). 该成果通过PNA介导的功能核酸的多肽工程化, 展示了一种蛋白酶调控功能核酸传感器的新策略.

基于上述策略, 本课题组进一步设计了肽核酸-多肽共聚物并结合核酸适体技术, 构建了一种智能型多门控DNA纳米器件, 实现了对肿瘤胞外微环境中MMP2/9和ATP这两种促转移生物标志分子的逻辑型检测(图3)^[56]. 首先将Cy5标记的3'-末端整合AS1411核酸适体的DNA链(CAs)与猝灭基团BHQ2标记的ATP适体链AtQ杂交, 得到At-As探针. 由于Cy5与BHQ2之间的Föster共振能量转移(FRET), 使得At-As的荧光处于猝灭状态. 随后, 基于上述多肽工程化策略, 我们将设计的PNA-多肽共聚物PmP与At-As中的ATP核酸适体通过PNA杂交, 构建了杂合型DNA纳米器件At-MAs. 其中, AS1411适体模块能与肿瘤细胞表面高表达的核仁素(NCL)特异性结合, 使At-Mas特异性地锚定在肿瘤细胞膜表面^[57]. 对于胞外微环境中同时高表达MMP2/9和ATP的侵袭性肿瘤, 纳米器件中的多肽片段将被MMP2/9蛋白酶水解, 从而致使PmP与AtQ的杂交稳定性和亲和力降低, 纳米器件恢复对ATP的特异性识别和检测功能. 该杂合型纳米器件的分子传感功能在无靶标或仅有一种靶标存在条件下处于关闭状态, 只有当MMP2/9和ATP同时存在条件下才会被开启, 从而实现肿瘤微环境中这两种促转移生物标志物的关联成像分析, 达到辨别肿瘤转移程度的目的.

3.2 DNAzyme介导的双链DNA编辑

DNAzyme是一类在辅因子作用下能对核酸序列进行编辑的功能核酸分子^[58-61]. 与核酸酶和蛋白质酶相比, DNAzyme具有更稳定、更经济的优势, 因此已被广泛应用于环境监测、医学诊断和生物成像等领域^[62-65]. 虽然对DNAzyme的研究已取得了许多进展,

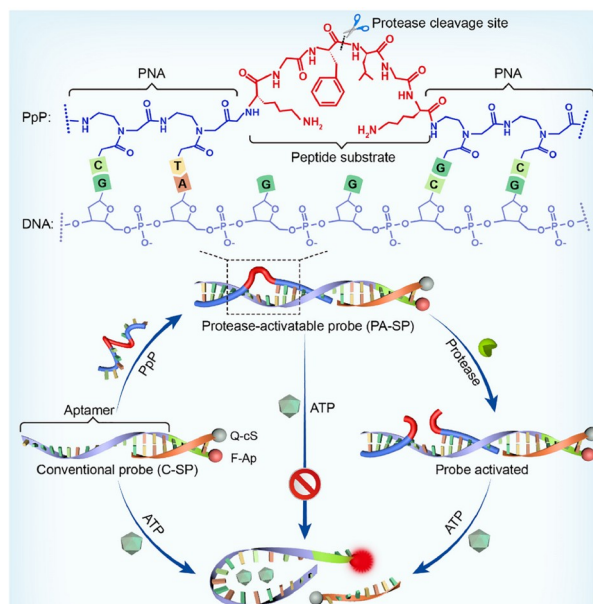


图2 PNA介导的核酸适体多肽工程化策略用于构建蛋白酶激活的ATP分子成像方法^[55] (网络版彩图)

Figure 2 Schematic showing PNA-guided engineering of a DNA aptamer sensor with peptide for protease-activatable ATP imaging^[55] (color online).

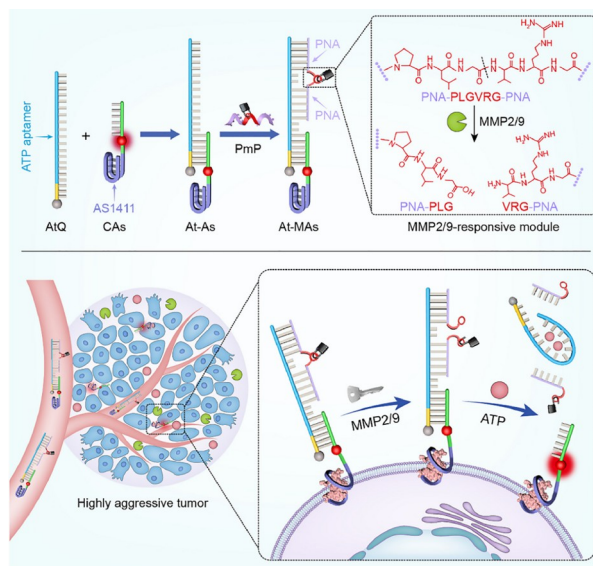


图3 多门控DNA纳米器件的可控构筑用于肿瘤胞外微环境MMP2/9和ATP的空间选择性成像分析^[56] (网络版彩图)

Figure 3 Engineering of multivariate-gated DNA nanodevice for spatially selective, correlated imaging of MMP2/9 and ATP in extracellular tumor microenvironment^[56] (color online).

但其大多数应用仅限于切割单链DNA (ssDNA)或RNA, 而对双链DNA (dsDNA)的编辑鲜有报道. 这是

因为DNAzyme难以与dsDNA形成沃森-克里克杂交碱基对, 因此限制了其在基因工程中的应用。

近日, 陆艺课题组^[66]受CRISPR/Cas体系的启发, 设计了一种PNA辅助的DNAzyme基因编辑系统PANDA, 该系统在PNA的辅助作用下可对dsDNA进行可控编辑(图4)。PANDA体系由13PD1-1 DNAzyme、PNA1和PNA2组成。为了验证设计的可行性, 首先利用PNA1和PNA2处理质粒, 使得PNA侵入DNA双链打开并暴露出ssDNA区域, 然后用13PD1-1 DNAzyme在质粒特定位点催化暴露的ssDNA磷酸二酯键的水解。结果表明, 只有三者均存在时, DNAzyme才能在特定位点切割质粒。在此基础上, 研究者进一步对该体系进行了优化, 利用 γ PNA在沃森-克里克碱基配对中较高的DNA亲和力和直接侵入dsDNA。与上述PANDA体系相比, 基于 γ PNA和13PB2 DNAzyme的PANDA系统不会受限于富含嘌呤碱基的目标DNA序列, 可以对靶标dsDNA从CG二核苷酸间进行特异性切割, 因此极大地拓展了该体系的应用范围。PANDA系统利用PNA对dsDNA的入侵特性, 将DNAzyme的可编辑底物范围从ssDNA扩大到dsDNA。与限制性内切酶和CRISPR/Cas体系相比, PANDA具有更小、更稳定、更经济的优势。

3.3 HCR体系的优化及改造

杂交链式反应(HCR)是由Dirks和Pierce^[67,68]在2004年开发的一种简单高效的等温扩增策略。在典型的HCR体系中, 引发链会触发两个发夹DNA之间的级联杂交反应, 从而形成数十至数百个带切口的重复DNA螺旋单位, 直到发夹耗尽^[67]。鉴于其无需酶触发、等温扩增、超高灵敏度和结构灵活性的优势, HCR已被广泛应用于生物传感、生物成像和生物医学等领域^[69-71]。然而, 为了确保HCR产物具有良好的稳定性, 反应体系通常需要使用长达48个碱基序列的DNA发夹, 严重限制了反应速度和产物密度, 同时也增加了成本。

基于此, Winssinger课题组^[72]报道了一个基于PNA的迷你HCR体系, 该体系由含有5个碱基的茎、环以及toehold的 γ -peg发夹PNA组成, 能在2 h内实现对靶标的10倍快速放大(图5)。首先, 研究者尝试了含有不同长度茎和环而且在 γ 位置具有不同修饰(包括L-丝氨酸和peg修饰)的发夹PNA。筛选发现, 经 γ -peg修饰的含有5个碱基的茎、环以及toehold的发夹PNA的

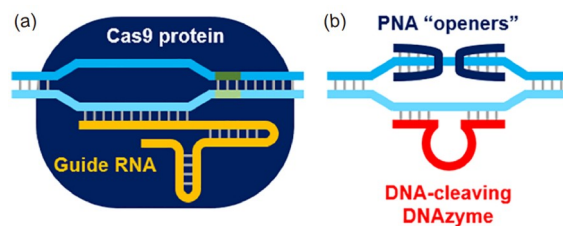


图4 CRISPR/Cas9 (a)和PANDA (b)的基因编辑示意图^[66] (网络版彩图)

Figure 4 Schematic representations of CRISPR/Cas9 (a) and PANDA (b) [66] (color online).

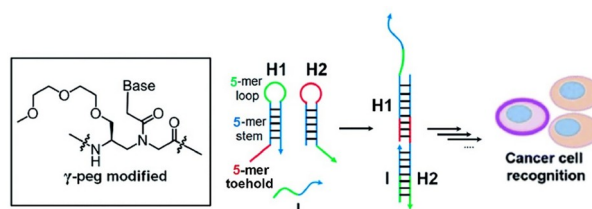


图5 基于PNA的迷你HCR体系示意图^[72] (网络版彩图)

Figure 5 Schematic representation of minimal PNA-based HCR system [72] (color online).

HCR性能、稳定性以及反应速度($1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)更好。由于经 γ -peg修饰后基于发夹PNA的反应产物水溶性增加, 因此HCR的延伸效率提高了10余倍。该体系经优化后被用于在活细胞中对CA IX癌症生物标志物进行区分和信号放大检测。结果表明, 基于PNA的HCR体系更经济高效, 同时也更稳定, 因此适用于在生理环境中对生物分子进行高灵敏检测。

4 总结与展望

本文简要综述了PNA的特性及其在生物医学领域的应用, 着重介绍了PNA在生物传感方面的最新研究进展。自从Nielsen等于1991年首次合成PNA并将其描述为“具有双重身份分子”, 便吸引了很多研究者的兴趣。首先, PNA是一种核酸类似物, 其与DNA/RNA具有更高的杂交稳定性和亲和力, 同时其与核酸的杂交不受环境中离子浓度的影响, 因此, 基于PNA的生物传感器可实现对靶标核酸的快速、灵敏、高特异性检测, 这类生物传感器在检测特定疾病的致病基因方面表现出良好的选择性和可靠性; 其次, PNA能够侵入DNA双链从而形成PNA-DNA-PNA三链体结构, 因

此可以借助PNA对双链DNA进行基因编辑或起始双链DNA的转录过程;最后,PNA与靶标核酸杂交的高特异性,使其对靶标核酸碱基错配更敏感,因此被应用于单核苷酸多态性的检测.由于PNA所具有的上述独特性质以及在核酸与多肽间起到的“桥梁”作用,其可以用于对功能核酸进行多肽工程化或对传统DNA反应体系进行优化改造,实现多肽与核酸领域间的交叉融合,从而拓展其在生物传感、分子成像和药物递

送等生物医学领域的应用.

虽然PNA在生物传感领域展现出了较大优势,但是高昂的合成成本限制了其广泛应用,如何降低商业化合成成本是拓展其应用的关键之一.另外,整合有氨基酸的PNA与DNA的杂交较复杂,往往需要综合考虑氨基酸以及PNA相关特性,如静电相互作用和亲疏水性等,目前缺乏比较成熟的计算方法对其退火温度和稳定性进行可靠预测.

参考文献

- Seeman NC. *Nature*, 2003, 421: 427–431
- Ramezani H, Dietz H. *Nat Rev Genet*, 2020, 21: 5–26
- Chen YJ, Groves B, Muscat RA, Seelig G. *Nat Nanotech*, 2015, 10: 748–760
- Amir Y, Ben-Ishay E, Levner D, Ittah S, Abu-Horowitz A, Bachelet I. *Nat Nanotech*, 2014, 9: 353–357
- Chen TT, Tian X, Liu CL, Ge J, Chu X, Li Y. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 982–989
- Rudchenko M, Taylor S, Pallavi P, Dechkovskaia A, Khan S, Butler Vincent P. J, Rudchenko S, Stojanovic MN. *Nat Nanotech*, 2013, 8: 580–586
- Hu Q, Li H, Wang L, Gu H, Fan C. *Chem Rev*, 2019, 119: 6459–6506
- Burns JR, Seifert A, Fertig N, Howorka S. *Nat Nanotech*, 2016, 11: 152–156
- Wang W, Yu S, Huang S, Bi S, Han H, Zhang JR, Lu Y, Zhu JJ. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 4892–4920
- Douglas SM, Bachelet I, Church GM. *Science*, 2012, 335: 831–834
- Zhang H, Li F, Dever B, Li XF, Le XC. *Chem Rev*, 2013, 113: 2812–2841
- Wu Z, Liu GQ, Yang XL, Jiang JH. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 6829–6836
- Li S, Xu L, Ma W, Wu X, Sun M, Kuang H, Wang L, Kotov NA, Xu C. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 306–312
- Xue C, Zhang SX, Ouyang CH, Chang D, Salena BJ, Li Y, Wu ZS. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 9739–9743
- Peng H, Li XF, Zhang H, Le XC. *Nat Commun*, 2017, 8: 14378
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. *Science*, 1991, 254: 1497–1500
- Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE. *Nature*, 1993, 365: 566–568
- Uhlmann E, Peyman A, Breipohl G, Will DW. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37: 2796–2823
- Nielsen PE. *Acc Chem Res*, 1999, 32: 624–630
- Saarebach J, Sabale PM, Winssinger N. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 52: 112–124
- Jolly P, Rainbow J, Regoutz A, Estrela P, Moschou D. *Biosens Bioelectron*, 2019, 123: 244–250
- Wang G, Xu X, Pace B, Dean DA, Glazer PM, Chan P, Goodman SR, Shokolenko I. *Nucl Acids Res*, 1999, 27: 2806–2813
- Wang G, Xu XS. *Cell Res*, 2004, 14: 111–116
- Kumar VA, Ganesh KN. *Acc Chem Res*, 2005, 38: 404–412
- Vilaivan T. *Beilstein J Org Chem*, 2018, 14: 253–281
- Xiao PP, Wan QQ, Liao T, Tu JY, Zhang GJ, Sun ZY. *Anal Chem*, 2021, 93: 10966–10973
- Moccia M, Caratelli V, Cinti S, Pedè B, Avitabile C, Saviano M, Imbriani AL, Moscone D, Arduini F. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112371
- Chakrabarti MC, Schwarz FP. *Nucl Acids Res*, 1999, 27: 4801–4806
- Zhang B, Chen M, Cao J, Liang Y, Tu T, Hu J, Li T, Cai Y, Li S, Liu B, Xu J, Liang B, Ye X, Cai X. *Biosens Bioelectron*, 2021, 192: 113500
- Bertucci A, Manicardi A, Candiani A, Giannetti S, Cucinotta A, Spoto G, Konstantaki M, Pissadakis S, Sella S, Corradini R. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 248–254
- Bellassai N, D'Agata R, Marti A, Rozzi A, Volpi S, Allegretti M, Corradini R, Giacomini P, Huskens J, Spoto G. *ACS Sens*, 2021, 6: 2307–2319

- 32 Zhan X, Deng L, Chen G. *Biopolymers*, 2022, 113: e23476
- 33 Srisomwat C, Yakoh A, Avihingsanon A, Chuaypen N, Tangkijvanich P, Vilaivan T, Chailapakul O. *Biosens Bioelectron*, 2022, 196: 113719
- 34 Tepper O, Peled I, Fastman Y, Heinberg A, Mitesser V, Dzikowski R, Yavin E. *ACS Sens*, 2022, 7: 50–59
- 35 Zhou W, Hu L, Ying L, Zhao Z, Chu PK, Yu XF. *Nat Commun*, 2018, 9: 5012
- 36 Chin JY, Kuan JY, Lonkar PS, Krause DS, Seidman MM, Peterson KR, Nielsen PE, Kole R, Glazer PM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13514–13519
- 37 Schleifman EB, Bindra R, Leif J, del Campo J, Rogers FA, Uchil P, Kutsch O, Shultz LD, Kumar P, Greiner DL, Glazer PM. *Chem Biol*, 2011, 18: 1189–1198
- 38 Møllegaard NE, Buchardt O, Egholm M, Nielsen PE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3892–3895
- 39 Bahreini F, Rayzan E, Rezaei N. *J Cell Physiol*, 2021, 236: 1593–1605
- 40 Okbay A, Wu Y, Wang N, Jayashankar H, Bennett M, Nehzati SM, Sidorenko J, Kweon H, Goldman G, Gjorgjieva T, Jiang Y, Hicks B, Tian C, Hinds DA, Ahlskog R, Magnusson PKE, Oskarsson S, Hayward C, Campbell A, Porteous DJ, Freese J, Herd P, Agee M, Alipanahi B, Auton A, Bell RK, Bryc K, Elson SL, Fontanillas P, Furlotte NA, Hinds DA, Huber KE, Kleinman A, Litterman NK, McCreight JC, McIntyre MH, Mountain JL, Northover CAM, Pitts SJ, Sathirapongsasuti JF, Sazonova OV, Shelton JF, Shringarpure S, Tung JY, Vacic V, Wilson CH, Fontana MA, Pers TH, Rietveld CA, Chen GB, Emilsson V, Meddens SFW, Pickrell JK, Thom K, Timshel P, de Vlaming R, Abdellaoui A, Ahluwalia TS, Bacelis J, Baumbach C, Bjornsdottir G, Brandsma JH, Concas MP, Derringer J, Galesloot TE, Girotto G, Gupta R, Hall LM, Harris SE, Hofer E, Horikoshi M, Huffman JE, Kaasik K, Kalafati IP, Karlsson R, Lahti J, van der Lee SJ, de Leeuw C, Lind PA, Lindgren KO, Liu T, Mangino M, Marten J, Mihailov E, Miller MB, van der Most PJ, Oldmeadow C, Payton A, Pervjakova N, Peyrot WJ, Qian Y, Raitakari O, Rueedi R, Salvi E, Schmidt B, Schraut KE, Shi J, Smith AV, Poot RA, Pourcain BS, Teumer A, Thorleifsson G, Verweij N, Vuckovic D, Wellmann J, Westra HJ, Yang J, Zhao W, Zhu Z, Alizadeh BZ, Amin N, Bakshi A, Baumeister SE, Biino G, Bonnelykke K, Boyle PA, Campbell H, Cappuccio FP, Davies G, De Neve JE, Deloukas P, Demuth I, Ding J, Eibich P, Eisele L, Eklund N, Evans DM, Faul JD, Feitosa MF, Forstner AJ, Gandin I, Gunnarsson B, Halldórsson BV, Harris TB, Heath AC, Hocking LJ, Holliday EG, Homuth G, Horan MA, Hottenga JJ, de Jager PL, Joshi PK, Jugessur A, Kaakinen MA, Kähönen M, Kanoni S, Keltigangas-Järvinen L, Kiemeny LALM, Kolcic I, Koskinen S, Kraja AT, Kroh M, Kutalik Z, Latvala A, Launer LJ, Lebreton MP, Levinson DF, Lichtenstein P, Lichtner P, Liewald DCM, Loukola A, Madden PA, Mägi R, Mäki-Opas T, Marioni RE, Marques-Vidal P, Meddens GA, McMahon G, Meisinger C, Meitinger T, Milaneschi Y, Milani L, Montgomery GW, Myhre R, Nelson CP, Nyholt DR, Ollier WER, Palotie A, Paternoster L, Pedersen NL, Petrovic KE, Rääkkönen K, Ring SM, Robino A, Rostapshova O, Rudan I, Rustichini A, Salomaa V, Sanders AR, Sarin AP, Schmidt H, Scott RJ, Smith BH, Smith JA, Staessen JA, Steinhagen-Thiessen E, Strauch K, Terracciano A, Tobin MD, Ulivi S, Vaccargiu S, Quaye L, van Rooij FJA, Venturini C, Vinkhuyzen AAE, Völker U, Völzke H, Vonk JM, Vozzi D, Waage J, Ware EB, Willemsen G, Attia JR, Bennett DA, Berger K, Bertram L, Bisgaard H, Boomsma DI, Borecki IB, Bültmann U, Chabris CF, Cucca F, Cusi D, Deary IJ, Dedoussis GV, van Duijn CM, Eriksson JG, Franke B, Franke L, Gasparini P, Gejman PV, Gieger C, Grabe HJ, Gratten J, Groenen PJF, Gudnason V, van der Harst P, Hoffmann W, Hyppönen E, Iacono WG, Jacobsson B, Järvelin MR, Jöckel KH, Kaprio J, Kardia SLR, Lehtimäki T, Lehrer SF, Martin NG, McGue M, Metspalu A, Pendleton N, Penninx BWJH, Perola M, Pirastu N, Pirastu M, Polasek O, Posthuma D, Power C, Province MA, Samani NJ, Schlessinger D, Schmidt R, Sørensen TIA, Spector TD, Stefansson K, Thorsteinsdottir U, Thurik AR, Timpson NJ, Tiemeier H, Uitterlinden AG, Vitart V, Vollenweider P, Weir DR, Wilson JF, Wright AF, Conley DC, Krueger RF, Smith GD, Hofman A, Laibson DI, Medland SE, Yang J, Esko T, Watson C, Jala J, Conley D, Koellinger PD, Johannesson M, Laibson D, Meyer MN, Lee JJ, Kong A, Yengo L, Cesarini D, Turley P, Visscher PM, Beauchamp JP, Benjamin DJ, Young AI. *Nat Genet*, 2022, 54: 437–449
- 41 Sun H, Xu W, Liu B, Liu Q, Wang Q, Li L, Kong J, Zhang X. *Anal Chem*, 2019, 91: 9198–9205
- 42 Xu M, Xing S, Zhao Y, Zhao C. *Talanta*, 2021, 232: 122420
- 43 Hur JY, Lee JS, Kim IA, Kim HJ, Kim WS, Lee KY. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8: 1051–1060
- 44 Adebawale OO, Goh S, Good L. *Heliyon*, 2020, 6: e04110
- 45 Song HJ, Lee JW, Kim BG, Song SY, Bae DS, Kim DS. *Biochip J*, 2010, 4: 167–172
- 46 Ebrahimi SB, Samanta D, Mirkin CA. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 11343–11356
- 47 Tan W, Donovan MJ, Jiang J. *Chem Rev*, 2013, 113: 2842–2862
- 48 Zhao J, Chu H, Zhao Y, Lu Y, Li L. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 7056–7062
- 49 Mi Y, Zhao J, Chu H, Li Z, Yu M, Li L. *Anal Chem*, 2021, 93: 2500–2509

- 50 Zhao J, Gao J, Xue W, Di Z, Xing H, Lu Y, Li L. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 578–581
- 51 Chu H, Zhao J, Mi Y, Zhao Y, Li L. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 14877–14881
- 52 Drag M, Salvesen GS. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 690–701
- 53 Turk B. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 785–799
- 54 Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. *Cell*, 2010, 141: 52–67
- 55 Xiang Z, Zhao J, Yi D, Di Z, Li L. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 22659–22663
- 56 Xiang Z, Zhao J, Qu J, Song J, Li L. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61
- 57 Soundararajan S, Chen W, Spicer EK, Courtenay-Luck N, Fernandes DJ. *Cancer Res*, 2008, 68: 2358–2365
- 58 Breaker RR, Joyce GF. *Chem Biol*, 1994, 1: 223–229
- 59 Cuenoud B, Szostak JW. *Nature*, 1995, 375: 611–614
- 60 Sheppard TL, Ordoukhanian P, Joyce GF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7802–7807
- 61 Sreedhara A, Li Y, Breaker RR. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 3454–3460
- 62 Liu J, Lu Y. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6642–6643
- 63 Liu J, Cao Z, Lu Y. *Chem Rev*, 2009, 109: 1948–1998
- 64 Schlosser K, Li Y. *Chem Biol*, 2009, 16: 311–322
- 65 Zhou W, Saran R, Liu J. *Chem Rev*, 2017, 117: 8272–8325
- 66 Lyu M, Kong L, Yang Z, Wu Y, McGhee CE, Lu Y. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 9724–9728
- 67 Dirks RM, Pierce NA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 15275–15278
- 68 Choi HMT, Beck VA, Pierce NA. *ACS Nano*, 2014, 8: 4284–4294
- 69 Choi HMT, Chang JY, Trinh LA, Padilla JE, Fraser SE, Pierce NA. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 1208–1212
- 70 Bi S, Yue S, Zhang S. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 4281–4298
- 71 Cheglakov Z, Cronin TM, He C, Weizmann Y. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 6116–6119
- 72 Kim KT, Angerani S, Winssinger N. *Chem Sci*, 2021, 12: 8218–8223

Recent progress in PNA-based biosensing technology

Zhichu Xiang^{1,2}, Lele Li^{1,3*}, Yuliang Zhao^{1,3*}

¹ CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China

² College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

³ College of Materials Science and Optoelectronic Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding authors (email: lilele@nanoctr.cn; zhaoyl@nanoctr.cn)

Abstract: Peptide nucleic acid (PNA) is a synthetic oligonucleotide analog composed of nucleobases arrayed along a pseudopeptide backbone. It can integrate the power of nucleic acids to encode information with the versatility of amino acids to encode structure and function. PNA has high affinity and specificity for hybridizing with complementary nucleic acid sequences, leading to stable PNA-DNA or PNA-RNA duplex structures. PNA is expected to overcome the limitations of nucleic acids including low stability and specificity in biomedical applications. In this review, we firstly give a brief introduction to the unique properties of PNA and its biomedical applications. Next, we describe and highlight the recent progress in biosensing applications of PNA and DNA integration. Lastly, the future prospects and challenges are discussed.

Keywords: PNA, nucleic acid, peptide, molecular probe, biosensing

doi: [10.1360/SSC-2022-0070](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0070)