

本文引文格式:农琛,刘德文,赖凤明,等. PNA与引物的连接方法以及探讨潜在的价值[J].  
右江民族医学院学报,2023,45(2):263-270.

【论著与临床报道】

## PNA与引物的连接方法以及探讨潜在的价值

农琛<sup>1</sup>,刘德文<sup>1</sup>,赖凤明<sup>1</sup>,王太重<sup>2</sup>,唐玉莲<sup>2</sup>

(1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院检验学院,广西 百色 533000)

**摘要:**目的 探讨一种基于点击化学反应将PNA和引物进行连接的新方法,挖掘PNA-引物具有选择性扩增cffDNA的潜力。方法 采用点击化学将PNA与引物进行连接,通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、高效液相色谱仪以及质谱分析对PNA-引物进行表征。最后,以DNA短片段和长片段分别模拟cffDNA和母源DNA,将包含相同摩尔质量的长短片段混合溶液通过聚合酶链式反应确定连接后的产物性能。结果 PNA与引物成功连接,且连接物同时具备二者的特性。PNA-引物特异性富集DNA短片段的效率高达83.20%。结论 本研究构建的新方法有望从高母源性DNA背景下,选择性地富集cffDNA,该方法同时具有通量高、成本低的特点,为cffDNA的分离及纯化提供新的思路。

**关键词:**非损伤性产前诊断;肽核酸;胎儿游离DNA;选择性富集;点击化学

中图分类号:R342.3

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)02-0263-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.02.017

## Linking methods of PNA to primers and exploring their potential value

Nong Chen<sup>1</sup>, Liu Dewen<sup>1</sup>, Lai Fengming<sup>1</sup>, Wang Taizhong<sup>2</sup>, Tang Yulian<sup>2</sup>

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,

Guangxi, China; 2. School of Laboratory Science, Youjiang Medical

University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To explore a new method of linking PNA to primers based on click chemical reaction and to explore the potential of PNA-primers for selective amplification of cffDNA. **Methods** Click chemistry was used to link the PNA to the primers, and the PNA-primers were characterized by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, high performance liquid chromatography, and mass spectrometry analysis. Finally, short and long fragments of DNA were used to simulate cffDNA and parental DNA, respectively. A solution containing a mixture of short and long fragments of the same molar mass was subjected to a polymerase chain reaction to determine the properties of the ligated product. **Results** PNA was successfully linked to the primer, and the linker had the properties of both. The PNA-primer specifically enriched short DNA fragments with an efficiency of 83.20%. **Conclusion** The new method constructed in this study is expected to selectively enrich cffDNA from a high maternal DNA background, which is also characterized by high throughput and low cost, and provides new ideas for the isolation and purification of cffDNA.

**Key words:** non-invasive prenatal diagnosis; peptide nucleic acid; fetal free DNA; selective enrichment; click chemistry

基金项目:广西自然科学基金项目(2019XNSFBA245101);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2019KY0575)

第一作者简介:农琛(1995-),男,在读硕士研究生,研究方向:地中海贫血分子生物学诊断,E-mail:948187066@qq.com

通讯作者简介:唐玉莲(1982-),女,硕士,主管检验技师,研究方向:基因表达调控相关研究,E-mail:284118382@qq.com

肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA) 是一种人工合成的类似于 DNA 或 RNA 的聚合物<sup>[1-2]</sup>。由于 PNA 不带负电荷, 与核酸间不存在静电斥力, 因而结合的稳定性和特异性都大有提高。同样的, PNA 既不属于多肽, 也不属于核酸, 所以不易被蛋白酶或核酸酶水解<sup>[3]</sup>。许多研究人员利用 PNA 的这些特性, 成功地筛选出目的基因, 比如 SATO Y 等<sup>[4]</sup> 基于 PNA 开发了用于检测甲型流感 RNA 启动子区域的荧光探针。同年, PETITI J 等<sup>[5]</sup> 基于 PNA-PCR 钳夹效应开发了一种新型、快速且廉价的检测 SF3B1 基因突变方法, 并且该方法通过了高通量测序技术的验证。无独有偶, KAWASAKI A 等<sup>[6]</sup> 使用 PNA 钳夹选择性地与植物基因组的靶区结合, 并在 PCR (polymerase chain reaction, PCR) 过程中抑制其扩增, 成功地提高了植物组织中细菌的 16S rDNA 的扩增产物。由此可见, PNA 无论是用于核酸的扩增还是抑制, 都得到了许多科学家的认可。胎儿遗传疾病的非损伤性产前诊断 (non-invasive prenatal testing, NIPT) 在临床遗传学中起着至关重要的作用<sup>[7]</sup>。因此, 寻找非侵入性产前诊断的方法一直备受关注<sup>[8-10]</sup>。LO Y M 等<sup>[11]</sup> 从母体血浆中成功提取到胎儿游离 DNA (cell-free fetal DNA, cffDNA) 后, 为 NIPT 开辟了新的可能。据相关研究表明, cffDNA 在妊娠第 4 周就可检出, 占总游离 DNA 的 10%~20%。孕早期和孕晚期的 cffDNA 浓度分别为 25.4 和 292.2 基因组当量每毫升 (genome equivalents/ml, GE/ml)<sup>[12]</sup>。cffDNA 的长度比母源 DNA 短许多, 99% 的 cffDNA < 313 bp, 而母源 DNA 则 > 1 kb<sup>[13-14]</sup>。自 2011 年以后, 基于 cffDNA 的非侵入性产前检测已经商业化, 并完成了从传统的侵入性筛查向现代化技术无创诊断的转变<sup>[15]</sup>。然而, 由于仪器成本和检测范围存在差异等问题, 想要引入临床实践仍具有不小的挑战<sup>[16-17]</sup>。

在这里, 本研究报道了一种新型 cffDNA 富集的方法, 理论上在混有 DNA 长短片段的溶液中, 该方法

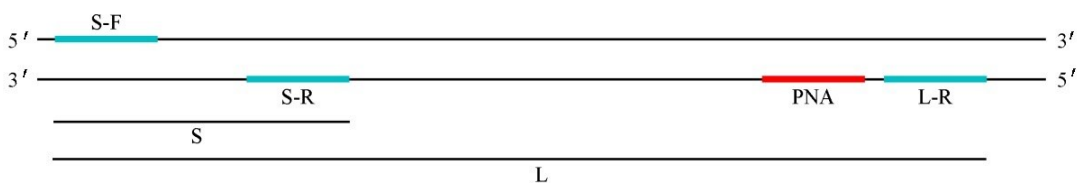
可以选择性地扩增短片段 (cffDNA) 而不扩增长片段 (母源 DNA)。支撑该方法的理论依据主要有三点, 第一点是在孕妇外周血中, cffDNA 与母源 DNA 大小不同<sup>[14]</sup>; 第二点则是在 PCR 反应中, PNA 会优先于引物与 DNA 模板结合, 且不会受各种酶的影响<sup>[18-20]</sup>; 第三点, 点击化学具有可选择性、结构稳定性强、易纯化和操作等优点<sup>[21-22]</sup>。基于以上三点, 本研究设计两对引物, 其一用于扩增 SRY 基因上长度小于 313 bp 的 DNA 短片段, 模拟 cffDNA。其二用于扩增部分包含上述短片段的 DNA 长片段, 模拟母源 DNA。将 DNA 长短片段混合后构建 SRY 基因模型。最后, 通过 SRY 基因模型中展示 PNA-引物富集 cffDNA 的潜力。

## 1 材料和方法

1.1 化学药品和试剂 无水硫酸铜 (CuSO<sub>4</sub>)、(R)-2-((S)-1,2-二羟基乙基)-4-羟基-5-氧代-2,5-二氢咪喃-3-醇钠、乙二醇四乙酸四钠、三(3-羟基丙基)三唑基甲基胺 (THPTA)、乙醇、醋酸三乙胺均从上海比得医药科技股份有限公司购买; PBS 缓冲液 0.01 M (pH = 7.3 ± 0.1)、无酶无菌水均从北京索莱宝科技有限公司购买; 引物由 Primer 5.0 软件设计完成后外送上海生工生物工程有限公司合成; PNA 从杭州泰禾生物技术有限公司购买。引物序列以及 PNA 序列如表 1 所示, 部分相对位置示意图如图 1 所示。

表 1 PNA-引物反应体系中涉及到的引物以及 PNA 相关信息

基因名称	引物	序列
S-F	上游引物	5'-TGTCAGTTGCACTTCGCTG-3'
S-R	下游引物	5'-ACAGGCCATGCACAGAGAGA-3'
L-R	下游引物	5'-AAATGTTAGCCATCCTAGAAAGTTGGG-3'
33-F	上游引物	5'-CTGCTCTACTGCTGCTCCTGA-3'
33-R	下游引物	5'-TCTGATACTTAATGCCTGTGAA-3'
PNA	下游 PNA	5'-TCTGATACTTAATGCCTGTGAA-3'



注: S 表示扩增 SRY 基因上的 DNA 短片段, 长度为 134 bp; L 表示扩增部分包含 SRY 基因的 DNA 长片段, 长度为 1088 bp; S-F 表示扩增 S 和 L 通用的上游引物; S-R 为扩增 S 的下游引物; L-R 为扩增 L 的下游引物; 红色条带表示 PNA 结合位点。

图 1 PNA 以及部分引物的相对位置示意图

1.2 PNA-引物的连接步骤和层析条件 将 50 nmol 的 PNA (含叠氮) 和 50 nmol 的下游引物 (S-R, 含炔基) 溶解在含有 10 nmol NaCl 的 10 mL PBS 缓冲溶液

(10 mM) 中, 然后将以上溶液加入到溶解有 THPTA (0.5 μmol)、CuSO<sub>4</sub> (0.5 μmol)、抗坏血酸钠 (2.5 μmol) 的 PBS 缓冲溶液 (10 mM) 中, 总体积为 20 mL。

在室温下反应 3 h 后,往以上混合物中加入 2 mL 的  $\text{NH}_4\text{OAc}$ (5M)和 50 mL 乙醇,过滤后得到的固体粉末使用 SCIENTZ-10ND 多歧管压盖型冷冻干燥机(SCIENTZ)在  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冷冻干燥 120 min。冷冻干燥后的固体溶于无菌无酶水,使用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Denaturing Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Urea-PAGE)进行脱盐,同时将疑似连接产物的片

段进行回收。粗产物在通过 Supfex HP-C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Zafex)进一步纯化,在使用 Agilent 1100 series 液相色谱仪(Agilent)分析过程中,流动相 A 为 0.1 M 醋酸三乙胺溶液;流动相 B 为 80% 的 0.1 M 醋酸三乙胺和 20% 的乙腈。该连接反应的化学方程式如图 2 所示。

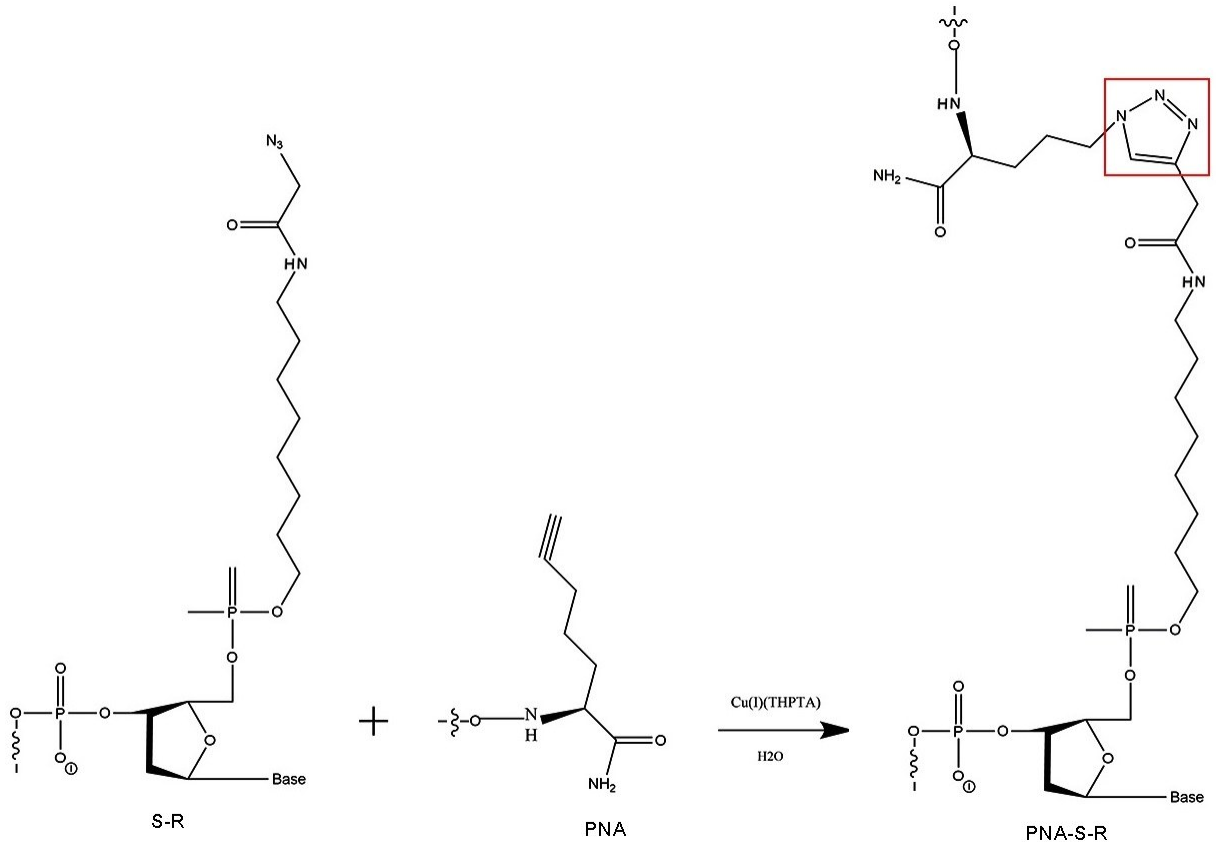


图 2 PNA 和引物基于点击化学反应连接的方程式

**1.3 PNA-引物的表征** 为了明确 PNA-引物是否合成成功,本研究通过质谱分析对合成的 PNA-引物进行表征。利用 Thermo Scientific<sup>TM</sup> LTQ XL<sup>TM</sup> 线性离子阱质谱仪对已分离纯化后的 PNA-引物进行鉴定,加样条件为电喷雾电离源(ESI),采集模式:电喷雾正离子或负离子模式,雾化气:氮气,离子源电压为 4500 V,碰撞能量扩增(CES)为 15 V,样品进样流速为 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。质谱扫描范围为  $M/Z$  500~20 000。使用 Peakview 1.2 软件(美国 AB SCIEX 公司)对获得的结果数据进行可视化分析。

**1.4 SRY 基因模型的构建** 本次实验已经获得右江民族医学院附属医院医学伦理委员会同意(YZY-LL-2022-89),以下实验均严格按照说明书进行。当女性怀有男性胎儿时,血浆中的 SRY 基因只来源于胎儿,因此以 SRY 基因代表 cfDNA 对 PNA-引物的功能进行初步探讨。具体方法:取 5 名未妊娠的健康女

性外周血,离心后收集血浆贮存于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  备用。取 1 名健康男性的外周血进行核酸提取(Ezup Column Blood Genomic DNA Purification Kit,上海生工生物工程股份有限公司),使用两对引物分别扩增 SRY 基因的 DNA 短片段和部分包含 SRY 基因的 DNA 长片段(Taq PCR Master Mix,上海生工生物工程股份有限公司)。经过 0.1% 的琼脂糖电泳后(Agarose,西班牙 Biowest 公司),采用切胶回收试剂盒实现 DNA 长片段和短片段的回收(GeneJET Gel Extraction Kit,赛默飞世尔科技公司),成功回收后再取 5  $\mu\text{L}$  DNA 溶液进行电泳鉴定。最后使用女性血浆将 DNA 短片段和长片段调整至相同的摩尔质量并混匀,模拟孕妇外周血中 cfDNA 具有与母体 DNA 相同的基因片段环境,构建 SRY 基因模型,记为 Y0 溶液。

**1.5 分析方法的验证** 在确保 PNA 与引物成功连接后,为了防止过量的回收 DNA 产物抑制 PCR 反

应<sup>[23]</sup>,同时更好地体现出 PNA 的阻断作用,本研究对回收的 DNA 片段进行 50 倍的等比倍比稀释,通过比较 PCR 的结果进行初步验证。PCR 反应体系的配置为:Taq PCR Master Mix 取 25  $\mu\text{L}$ ,2  $\mu\text{L}$  的上游引物(S-F),2  $\mu\text{L}$  的 PNA-引物,1  $\mu\text{L}$  的 Y0 溶液,20  $\mu\text{L}$  的无酶无菌水,总体积为 50  $\mu\text{L}$ 。在其它的配置都相同的情况下,本研究将 Y0 溶液更换成只有 DNA 长片段的溶液作为对照组。聚合酶链式反应包括 30 个循环:94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s。经过 0.1% 的琼脂糖电泳后,使用 UVP ChemStudio 515 (Analytik-Jena,德国耶拿分析仪器股份公司)进行成像以及分析电泳条带的浓度。以 marker 条带的浓度作为参照物进行相对定量分析(DNA Marker,上海生工生物工程有限公司),选择性扩增短片段的富集效率计算公式如下:

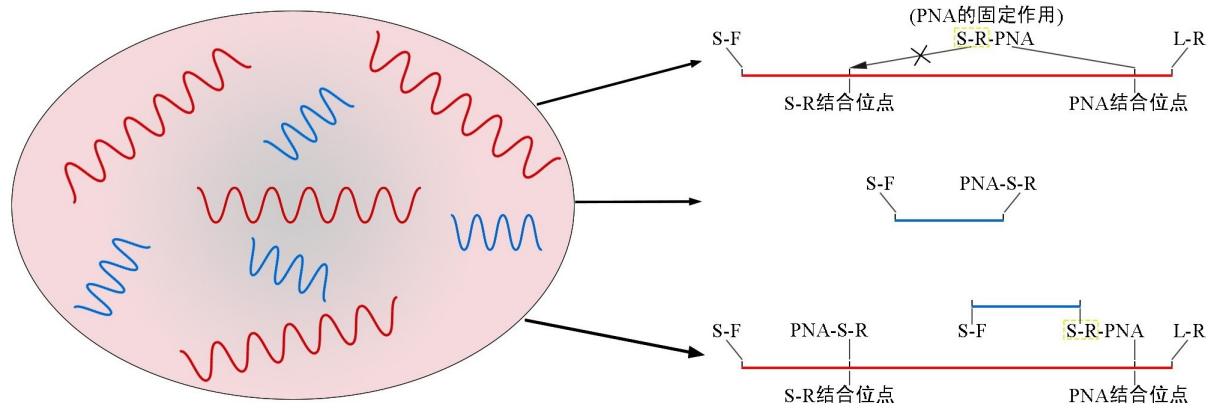
DNA 短片段扩增产物的富集效率(%) =  $[(x-y)/x] \times 100\%$

$\times 100\%$

其中 x 表示使用 PNA-引物对 DNA 长片段混合物进行聚合酶链式反应获得的扩增片段浓度;y 表示使用 PNA-引物对只含有 DNA 长片段的模板进行聚合酶链式反应获得的扩增片段浓度。

## 2 结果

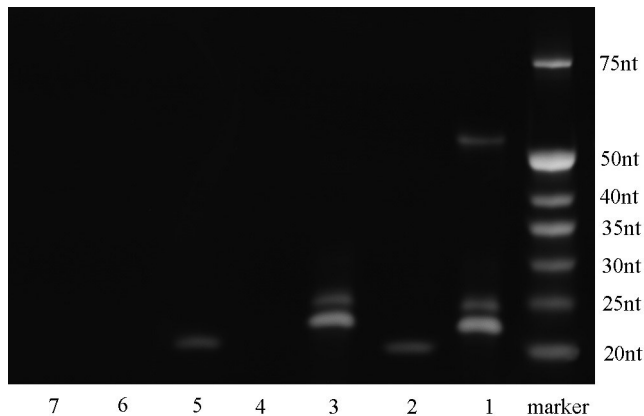
在本研究中,基于 DNA 片段的物理特性,首次尝试对 PNA 与引物进行连接,在不破坏每个试剂功能的前提下,通过点击化学将二者成功的连接起来,利用 PNA 的固定作用,极大可能地阻止了引物与相应位点的结合,从而阻断长片段自身的扩增,基于此原理(如图 3 所示),本次研究将 DNA 长片段和短片段混合,使用 PNA-引物反应体系进行 PCR 扩增以检测选择性扩增 DNA 短片段的效率。本次研究对所有参与反应的些参数都进行了优化。从另一方面来说,这种新方法可以为 cfDNA 的分离以及纯化提供新的思路。



注:红色表示 DNA 长片段,蓝色表示 DNA 短片段;理论上,Y0 溶液中存在以上 3 种扩增反应的可能。当 PNA-S-R 的量远远超过 DNA 长片段的量时,则存在第三种可能性。

图 3 PNA-引物反应体系在加入 Y0 后的反应原理示意图

2.1 PNA-引物的分离以及纯化 为了判断点击化学反应能否将含有叠氮基团的 PNA 与含有含炔基的引物进行连接,本次研究将具有不同反应条件的溶液进行初步的处理后,通过 Urea-PAGE 电泳可以得知(见图 4),在电泳道 1 中接近 50 nt 位置的条带极大可能就是 PNA 与引物的连接物,而在 25 nt 附近的两条条带通过与电泳道 3 相比,可以判断出是引物与催化剂反应所生成的副产物。随后,本次研究通过切胶回收,将疑似连接产物的电泳条带通过高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化后,在与单独的 PNA 和引物进行比较(见图 5,补充图 1),结果发现三者的出峰时间均不相同。



注:泳道 1 为 PNA 与引物在催化剂存在下反应 3 h;泳道 2 为 PNA 与引物在没有催化剂的情况下反应 3 h;泳道 3 为引物单独与催化剂反应 3 h;泳道 4 为 PNA 单独与催化剂反应 3 h;泳道 5 为仅有引物;泳道 6 为仅有 PNA;泳道 7 为含有催化剂的反应溶液。

图 4 不同样品的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图像

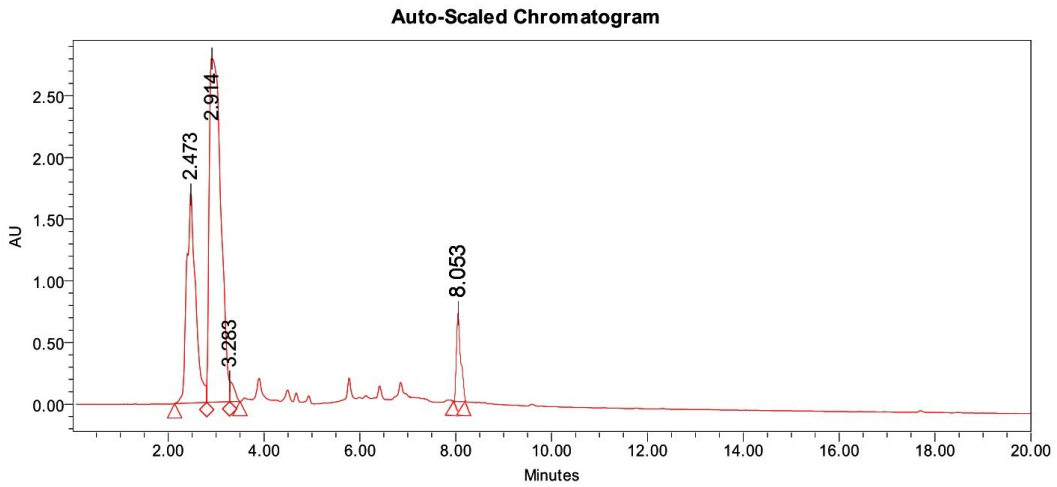
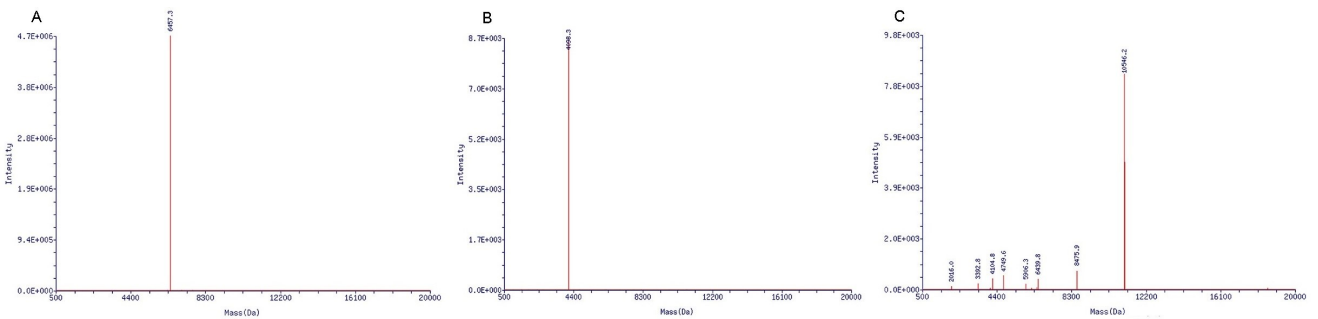


图 5 PNA-引物、引物和 PNA 依次在 HPLC 中的峰值时间

2.2 质谱的表征分析 为了判断生成的连接物是否就是由 PNA 与引物连接而成的,本次研究使用 Thermo Scientific™ LTQ XL™ 线性离子阱质谱仪对已经分离纯化后的 PNA-引物进行表征。在质谱分析中,如图 6A~图 6C 所示,PNA-引物的分子量理论值应该

等于 PNA 的分子量加上引物的分子量,在误差允许的范围内,质谱仪器得出的分子量结果为 10546.2 Da,其结果符合预期的理论值范围。综上所述,本次研究通过 Urea-PAGE 电泳实验分析、HPLC 分析以及质谱分析,成功地确定了 PNA-引物已经连接成功。

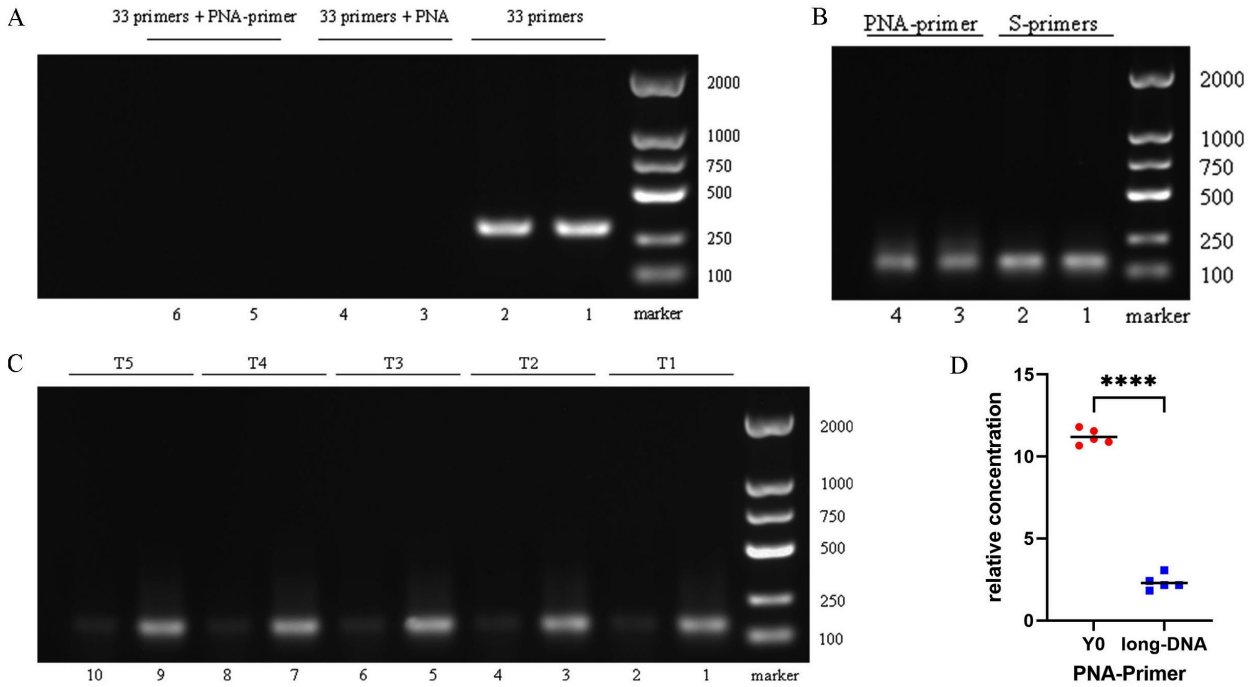


注:A为引物质谱分析的结果;B为PNA的质谱分析结果;C为PNA-引物的质谱分析结果。

图 6 引物、PNA 和 PNA-引物的质谱分析比较

2.3 PNA-引物的富集效率检测结果 在确保 PNA-引物连接成功后,本次研究首先要保证 PNA 和引物各自的功能都不受到影响,为此,基于前期的实验研究,使用包含了 PNA 碱基序列的引物(33 号引物对)进行测试,如图 7A 所示,在电泳条带 1、2 号中,33 号引物对能够正常扩增出产物,而加入 PNA 后的 3、4 号电泳条带却无法扩增出产物,则说明 PNA 阻断了引物与 DNA 模板的结合,同样的,在加入 PNA-引物后(5、6 号电泳条带),电泳的结果同样能够说明连接后的 PNA 功能没有改变。接下来是对引物的功能进行判定,为了防止 PNA 的阻断效应出现,本次研究使用短片段作为 DNA 模板进行扩增,结果如图 7B 所示,在相同的条件下,二者都能扩增出模板 DNA,则说明引物的功能没有改变。最后是对 PNA-引物的特异性扩增 DNA 短片段进行测试,等比倍比稀释后的 DNA 长片段经过相同浓度的引物和 PNA-引物扩增后,其扩

增出来的条带亮度以及扩增阈值均不相同(补充图 2)。通过对 Y0 溶液的扩增以及电泳条带的分析,基于相对定量的方法进行浓度判断,以点对点的方法创建浓度曲线,最终结果如图 4C 所示,具体浓度可以从表 2 获得。通过两独立样本 *t* 检验(见图 4D)可以得知,PNA-引物反应体系在两种不同的溶液中扩增出的产物相对浓度不同,差异具有统计学意义( $P < 0.0001$ ),基于上述选择性扩增 DNA 短片段的富集效率计算公式,可以算出 5 组 PNA-引物反应体系在 Y0 溶液中选择性扩增 DNA 短片段的效率分别为:72.27%、81.21%、79.51%、83.20%、79.66%。因此,虽然该新方法目前还不能做到百分之百的只扩增 DNA 短片段而不扩增 DNA 长片段,但从目前的结果来看,这依然是一个非常具有潜力的新方法,可以为 cffDNA 的富集提供新的视角和研究方向。



注:A 为 PNA 性能的测试;B 为引物的性能测试;C~D 为 PNA-引物在 5 组 Y0 溶液和 DNA 长片段溶液中的扩增效率比较;\*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 7 检测 PNA-引物在 DNA 长片段和短片段混合物中的富集效率

表 2 每条电泳带的相对浓度值

电泳道	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度/ $(\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	11.07	3.07	11.55	2.17	11.81	2.42	10.89	1.83	10.67	2.17

### 3 讨论

肽核酸因其高度的灵活性,可以通过广泛的构象来结合其它生物分子,并且被认为在未来的纳米生物技术中会具有至关重要的作用<sup>[24]</sup>。使用 PNA 来代替探针中的 DNA,可以提高探针的亲合力、靶标特异性和抗生物降解性<sup>[25-26]</sup>。与传统的 northern 印迹杂交、微阵列和逆转录聚合酶链式反应等技术相比,使用 PNA 探针技术不需要核酸的提取和扩增,可以直接检测细胞中的核酸成分<sup>[27-28]</sup>。因此,通过点击化学反应,将 PNA 与引物进行连接,并且保留各自的性能不被破坏,生成的 PNA-引物在未来的纳米生物技术具有非常大的潜力。

利用孕妇外周血中胎儿游离 DNA 进行无创性产前诊断已成为产前诊断的目标,NIPT 既可以获得完整的胎儿遗传信息,同时又能避免对母婴的风险。因此,为了从母体循环中获取稀有的胎儿细胞,开发高效的分离技术是必要的<sup>[29-30]</sup>。然而从母亲血浆中有效地分离 cffDNA 是一个至今没有解决的技术难题,现有的 cffDNA 分离技术主要有大规模并行测序(MPS)<sup>[31-32]</sup>,液滴数字 PCR(ddPCR)<sup>[33-34]</sup>和物理分离法<sup>[35-36]</sup>。其中 MPS 的全基因组测序或靶向测序方法

被认为是准金标准,ddPCR 是一种新颖的技术,同样具有稳健、灵敏、高效和可靠的技术<sup>[37]</sup>,但这两种方法所涉及的仪器成本高昂,距离常规临床应用,有较大的距离。物理分离法是目前已被公认的可以从母体血浆中得到高比例 cffDNA 的可靠方法<sup>[38]</sup>,但该法的缺点是通量低,且可能产生样品污染,不是一个理想的临床常规方法。总的来说,在过去的十年里,有关 cffDNA 富集的方法,或通量低,或成本高,或程序复杂难以满足临床常规应用的要求。

在本次研究中,通过构建 SRY 基因模型,简单模拟孕妇外周血环境,其研究目的就是使用一种新方法可以选择性地将混合溶液中的 DNA 短片段(cffDNA)进行选择性扩增。在该实验中详细地讲解了基于点击化学将 PNA 与引物进行连接方法,这是一种创新的方法。然后分别通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、高效液相色谱仪以及质谱仪对 PNA-引物进行表征,进一步确定了 PNA-引物的成功合成。最后,通过 PCR 反应结合电泳条带的浓度分析,初步对该反应体系的富集效率进行评估,在特定的浓度条件下,DNA 短片的富集效率可以高达 83.20%,这是一项令人振奋的消息。

综上所述,基于 DNA 片段的大小,开发了一套利

用“PNA-引物”进行选择富集 DNA 短片段的方法,这种新方法同时具有通量高、成本低的特点,为 cffDNA 的分离以及纯化提供了新的思路。然而,本研究仍然存在一些不足之处:①本研究中对于 DNA 长片段与 PNA-引物的浓度比例选择比较苛刻,理想状态下,二者 1:1 的比例是 PNA 能够阻断引物与 DNA 模板结合的最高阈值比例,若 PNA-引物的量越是高于 DNA 长片段的量,则扩增的假阳性比例就会越多。理论上,PNA-引物的量越是低于 DNA 长片段的量,则特异性扩增出 DNA 短片段(cffDNA)的比例也就越大;②本研究仍然存在可以改进以提高扩增 DNA 短片段效率的空间,比如说将短片段的上游引物与另一个 PNA 进行连接,以增强引物对 DNA 短片段结合的特异性,进而降低母源 DNA 的干扰;③为了能够更好地验证该方法的实用性,后续的实验应构建孕妇具体的外周血模型或者在临床上使用不同孕期的孕妇进行验证,同时与 MPS 金标准进行比较,但受限于许多因素的影响,很遗憾,本次研究未能完成这一步的验证。

#### 参考文献:

- [1] SAARBACH J, SABALE P M, WINSSINGER N. Peptide nucleic acid (PNA) and its applications in chemical biology, diagnostics, and therapeutics[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 52: 112-124.
- [2] KUWAYAMA H. Peptide nucleic acid as a template for *Taq* DNA polymerase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 579: 76-80.
- [3] MONTAZERSAHEB S, HEJAZI M S, NOZAD CHAROUDEH H. Potential of peptide nucleic acids in future therapeutic applications[J]. *Adv Pharm Bull*, 2018, 8(4): 551-563.
- [4] SATO Y, MIURA H, TANABE T, et al. Fluorescence sensing of the panhandle structure of the influenza A virus RNA promoter by thiazole orange base surrogate-carrying peptide nucleic acid conjugated with small molecule[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(22): 7814-7822.
- [5] PETITI J, ITRI F, SIGNORINO E, et al. Detection of SF3B1 p. Lys700Glu mutation by PNA-PCR clamping in myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(5): 1267.
- [6] KAWASAKI A, RYAN P R. Peptide nucleic acid (PNA) clamps to reduce co-amplification of plant DNA during PCR amplification of 16S rRNA genes from endophytic bacteria[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2232: 123-134.
- [7] 张秀群, 关海兰. 产前诊断对预防围生儿出生缺陷的效果分析[J]. *右江民族医学院学报*, 2015, 37(3): 426-427.
- [8] TABOR A, ALFIREVIC Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2010, 27(1): 1-7.
- [9] AKOLEKAR R, BETA J, PICCIARELLI G, et al. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(1): 16-26.
- [10] JEPPESEN L D, HJORTSHØJ T D, HINDKJAER J, et al. Cell-based NIPT detects 47, XXY genotype in a twin pregnancy[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 842092.
- [11] LO Y M, CORBETTA N, CHAMBERLAIN P F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350(9076): 485-487.
- [12] LO Y M, ZHANG J, LEUNG T N, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(1): 218-224.
- [13] LI Y, ZIMMERMANN B, RUSTERHOLZ C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(6): 1002-1011.
- [14] SANCHEZ C, ROCH B, MAZARD T, et al. Circulating nuclear DNA structural features, origins, and complete size profile revealed by fragmentomics[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(7): e144561.
- [15] SABBATINELLI G, FANTASIA D, PALKA C, et al. Isolation and enrichment of circulating fetal cells for NIPD: an overview[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(12): 2239.
- [16] CUCKLE H, BENN P, PERGAMENT E. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy as a clinical service[J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(15): 932-941.
- [17] CHITTY L S, WRIGHT D, HILL M, et al. Uptake, outcomes, and costs of implementing non-invasive prenatal testing for Down's syndrome into NHS maternity care: prospective cohort study in eight diverse maternity units[J]. *BMJ*, 2016, 354: i3426.
- [18] FAIRWEATHER S, ROGERS M, STOULIG P, et al. Nuclease resistance and protein recognition properties of DNA and hybrid PNA-DNA four-way junctions[J]. *Bioophys Chem*, 2022, 289: 106863.
- [19] SUPARPPROM C, VILAIVAN T. Perspectives on conformationally constrained peptide nucleic acid (PNA): insights into the structural design, properties and applications[J]. *RSC Chem Biol*, 2022, 3(6): 648-697.
- [20] HOMMA C, INOKUCHI D, NAKAMURA Y, et al. Effectiveness of blocking primers and a peptide nucleic acid (PNA) clamp for 18S metabarcoding dietary analysis of herbivorous fish[J]. *PLoS One*, 2022, 17(4): e0266268.
- [21] HUANG C H, PALANI A, YANG Z Q, et al. Discovery of insulin/GLP-1/glucagon triagonists for the treatment of diabetes and obesity[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2022, 13(8): 1255-1261.
- [22] ALKHZEM A H, WOODMAN T J, BLAGBROUGH I

- S. Design and synthesis of hybrid compounds as novel drugs and medicines[J]. *RSC Adv*, 2022, 12(30):19470-19484.
- [23] KRAMER M F, COEN D M. Enzymatic amplification of DNA by PCR; standard procedures and optimization[J]. *Curr Protoc Cytom*, 2006, Appendix 3: Appendix3K.
- [24] CHHETRI K B, SHARMA A, NASKAR S, et al. Nanoscale structures and mechanics of peptide nucleic acids [J]. *Nanoscale*, 2022, 14(17):6620-6635.
- [25] VILAIVAN T. Fluorogenic PNA probes[J]. *Beilstein J Org Chem*, 2018, 14:253-281.
- [26] TABARA K, WATANABE K, SHIGETO H, et al. Fluorophore-PNA-Quencher/Quencher-DNA probe for miRNA detection [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 51: 128359.
- [27] WANG Z, ZHANG K, WOOLEY K L, et al. Imaging mRNA expression in live cells via PNA • DNA strand displacement-activated probes [J]. *J Nucleic Acids*, 2012, 2012:962652.
- [28] KUHN H, DEMIDOV V V, COULL J M, et al. Hybridization of DNA and PNA molecular beacons to single-stranded and double-stranded DNA targets [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(6):1097-1103.
- [29] JENKINS L A, DEANS Z C, LEWIS C, et al. Delivering an accredited non-invasive prenatal diagnosis service for monogenic disorders and recommendations for best practice[J]. *Prenat Diagn*, 2018, 38(1):44-51.
- [30] RABINOWITZ T, SHOMRON N. Genome-wide noninvasive prenatal diagnosis of monogenic disorders; current and future trends[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18:2463-2470.
- [31] SHEN X F, LI R, LI H X, et al. Noninvasive prenatal paternity testing with a combination of well-established SNP and STR markers using massively parallel sequencing[J]. *Genes*, 2021, 12(3):454.
- [32] SONG W Q, XIAO N, ZHOU S H, et al. Non-invasive prenatal paternity testing by analysis of Y-chromosome mini-STR haplotype using next-generation sequencing [J]. *PLoS One*, 2022, 17(4):e266332.
- [33] CONSTANTINOU C G, KARITZI E, BYROU S, et al. Optimized droplet digital PCR assay on cell-free DNA samples for non-invasive prenatal diagnosis; application to beta-thalassemia[J]. *Clin Chem*, 2022, 68(8):1053-1063.
- [34] PEDINI P, GRAIET H, LAGET L, et al. Qualitative and quantitative comparison of cell-free DNA and cell-free fetal DNA isolation by four (semi-)automated extraction methods; impact in two clinical applications: chimerism quantification and noninvasive prenatal diagnosis [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):15.
- [35] LIANG B, LI H, HE Q Z, et al. Enrichment of the fetal fraction in non-invasive prenatal screening reduces maternal background interference[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):17675.
- [36] YANG Q W, DU Z W, SONG Y, et al. Size-selective separation and overall-amplification of cell-free fetal DNA fragments using PCR-based enrichment [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:40936.
- [37] SHEKHAWAT D S, SHARMA C, SINGH K, et al. Critical appraisal of droplet digital polymerase chain reaction application for noninvasive prenatal testing[J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2022, 62(5):188-197.
- [38] LI Y, ZIMMERMANN B, RUSTERHOLZ C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(6):1002-1011.

收稿日期:2023-01-10;修回日期:2023-02-28