

## Locked Nucleic Acid (LNA) —— 锁核酸

- 提高热稳定性和杂交特异性
- 改进 qPCR 检测的信噪比
- 增强对单个核苷酸的识别

### 背景

锁核酸 (LNA) 是一种含有桥接双环糖基 (bridged, bicyclic sugar moiety) 的合成核酸类似物。在 2'-O-和 4'-位之间添加的亚甲基基团将呋喃核糖环“锁定”为 3'-内构象 (3' -endo conformation, 见图 2)。这种构象形成了 A 型 RNA 的特征结构。由于这种双环糖骨架的限制, LNA 只会形成 A 型双链体。此外, LNA 完全遵守 Watson-Crick 的碱基配对原则。因此 LNA: DNA 杂交双链体可以由序列互补的 DNA 和 LNA 自发形成, 并且研究发现, LNA: DNA 杂交体与其对应的 DNA: DNA 相比, 其退火温度会大幅度升高 [1]。由于 LNA 的合成与标准寡核苷酸合成相容, 因此可以直接将单个或多个 LNA 核苷酸位点选择性地掺入 DNA 序列中。这些含有 LNA 的寡核苷酸与它们的互补的 DNA 序列退火后形成嵌合 LNA: DNA 杂交体。这些杂交体也均为 A 型构象, 并且与相应的 DNA: DNA 双链相比,  $T_m$  值也会显著升高。粗略估算, 每个掺入短 DNA 引物 (<30 nt) 的 LNA 核苷酸可使  $T_m$  值增加 3-8° C [2]。总而言之, LNA 的主要优点在于其可对所需寡核苷酸的  $T_m$  值进行微调, 从而成为引物和探针设计时的选择。由于结合亲和力更强, 所以可以合成更短的探针, 同时其对目的 DNA 的结合特异性也更强。因此, 推荐将 LNA 用于需要高特异性和/或可重复性的任何杂交检测, 例如 PCR 引物、双标记探针、原位杂交探针和分子信标。此外, 由于相同的原因, LNA 修饰的寡核苷酸也可以成为反义药物开发的一种有趣的候选物 [3]。

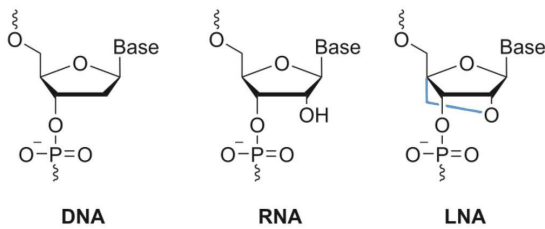


Figure 1: Structural drawings of DNA, RNA and LNA nucleotides

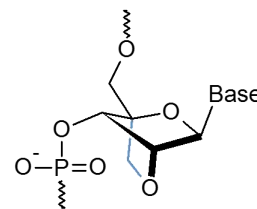


Figure 2: LNA 3' -endo conformation

### 提高 qPCR 探针的热稳定性

LNA 优异的杂交特性使其可在 qPCR 探针的设计中被用来微调  $T_m$  值 [4]。这一特点显著拓宽了检测条件的范围, 令 qPCR 实验更成功。当探针由 LNA 核苷酸组成时, 能够改善其对靶序列杂交的亲合力和特异性。这反过来减少了虚假结合的背景荧光, 并且有更好的信噪比。

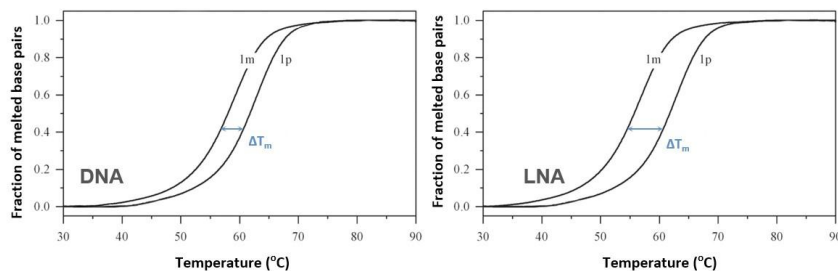
### 多重 qPCR 系统

由于可以使用 LNA 调整 qPCR 探针的  $T_m$  值, 因此可以获得具有不同 GC 含量的几个短序列的标准化  $T_m$  值。例如, 富含 AT 的天然状态 DNA qPCR 探针通常需要超过 30 个碱基长 (有时需要超过 40 个) 以满足扩增子设计指南, 但仍有可能表现不佳。使用 LNA qPCR 探针, 通过选择性定位 LNA 核苷酸, 有助于产生最佳的、具有高度特异性的短探针。较窄的  $T_m$  值范围对于微阵列和多重 PCR 应用特别有

益，特别是当探针必须在相同条件下与许多不同靶标的同时结合时。

### 增强对单核苷酸的识别

掺入 LNA 核苷酸后，由于 LNA 在错配形成 Watson-Crick 碱基对时具有强烈倾向，因此 qPCR 探针通过单核苷酸多态性 (SNP) 区分等位基因的能力会大大增强[5]。热变性研究表明，当 LNA 掺入在寡核苷酸的特定位置时，完美匹配和错配之间的  $T_m$  值存在显著差异 (见图 3)。因此，在 SNP 测定中，与天然状态 DNA 探针相比，LNA qPCR 探针杂交具有更强的不稳定性因此能够更好地区分出错配。



**Figure 3:** Influence of LNA on the melting temperature ( $T_m$ ) and the resulting larger difference between specific (1p) and non-specific (1m) signals

### 反义技术 (Antisense Technology)

由于对互补核酸的结合亲和力增强，LNA 很有可能被用于反义技术，与此同时 LNA 的高核酸酶抗性是其体内和体外应用的重要优势。大量研究证实了 LNA 作为反义试剂的优越性，常规技术即可用于转染 LNA 寡核苷酸。对于 knockdown microRNA 或其他小 RNA 等实验目的，可以通过设计 LNA 反义寡核苷酸以通过碱基配对与其靶序列杂交。另外，还可以通过引入硫代磷酸酯骨架以获得更强的核酸酶抗性。

### 参考文献

1. Vester, B.; Wengel, J. LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 2004, 43 (42), 13233-13241.
2. Singh, S.; Nielsen, P.; Koshkin, A.; Wengel, J. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications* 1998, No. 4, 455-456.
3. Veedu, R. N.; Wengel, J. Locked nucleic acids: promising nucleic acid analogs for therapeutic applications. *Chemistry & biodiversity* 2010, 7 (3), 536-42.
4. Letertre, C.; Perelle, S.; Dilasser, F.; Arar, K.; Fach, P. Evaluation of the performance of LNA and MGB probes in 5'-nuclease PCR assays. *Molecular and cellular probes* 2003, 17 (6), 307-11.
5. Johnson, M. P.; Haupt, L. M.; Griffiths, L. R. Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic acids research* 2004, 32 (6), e55.

北京赛百盛基因技术有限公司

全国统一热线：400 666 3029

地址：北京市海淀区上地四街1号院2号楼202室 邮编：100085

电话：010-62969345/46，010-82784296/92 传真：010-82784290

Email：info@sbsbio.com

Http：//www.sbsbio.com