

# 基于锁核酸探针的传感器用于 BCR/ABL 融合基因检测的研究

汪红梅, 林丽清, 翁少煌, 王丽满, 刘银环, 林新华\*

(福建医科大学药学院, 福建 福州 350004)

**摘要:** 依据慢性粒细胞白血病 BCR/ABL 融合基因的碱基序列, 设计了一种新型发夹结构锁核酸 (locked nucleic acids, LNA) 探针, 将该探针借助 Au—S 键固定在金电极表面构建了特异的生物传感器. LNA 探针与目标链 DNA 杂交, 以本实验室合成的苯甲酸二聚铜配合物 ( $[\text{Cu}_2(\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2)_4(\text{C}_2\text{H}_6\text{O})_2]$ , 简称  $[\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$ ) 为杂交指示剂, 应用差分脉冲伏安法进行检测, 表现出良好的响应信号. 该新型锁核酸传感器能较好的区分完全互补链 DNA、单碱基错配链 DNA. 互补链 DNA 检测的线性范围为  $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 检出限  $2.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**关键词:** 发夹锁核酸探针; 生物传感器; BCR/ABL 融合基因; 苯甲酸二聚铜配合物

**中图分类号:** O646

**文献标识码:** A

慢性粒细胞白血病 (Chronic Myelocytic Leukemia, CML) 是由染色体异常的多能干细胞恶性病变引起的一种疾病, 其临床特征为显著的粒细胞过度生成<sup>[1]</sup>. 现代分子生物学研究表明慢粒白血病乃因 Ph 染色体 t(9;22) 相互易位所致, 其易位产物 BCR/ABL 融合基因出现在 95% 以上的慢性粒细胞白血病中, 是恶性克隆的标志基因, 在 CML 早期诊断和预后监测中具有重要意义<sup>[2-3]</sup>. 目前 BCR/ABL 融合基因检测的方法主要有染色体分析<sup>[4]</sup>、RT-PCR 技术<sup>[5]</sup>等, 但这些方法都存在一定的局限性.

DNA 电化学生物传感器是基因结构分析和检测的重要手段, 它可利用 DNA 分子间的特异性互补配对规律, 实现特定基因序列的快速识别和检测<sup>[6-8]</sup>. 而 DNA 电化学探针的设计在很大程度上影响了电化学 DNA 生物传感器的选择性能, 也是构建电化学 DNA 生物传感器的关键. 目前电化学 DNA 生物传感器一般采用短直链 DNA 作探针, 该探针存在灵敏度低、稳定性差、特异性不高等缺点. 作为一种新型的寡核酸衍生物——锁核酸

(LNA), 其结构中  $\beta$ -D-呋喃核糖的 2'-O, 4'-C 位经过缩水作用后形成环形的氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥, 并将呋喃糖的结构锁定在 C3' 内型的 N 构型上, 降低了核糖结构的柔韧性, 增加了磷酸盐骨架局部结构的稳定性, 形成了刚性的缩合结构<sup>[9-11]</sup>. 由于 LNA 与 DNA/RNA 在结构上具有相同的磷酸盐骨架且具有很好的刚性结构, 故其对 DNA、RNA 有很好的识别能力和强大的亲和力<sup>[12-14]</sup>, 其与互补的 DNA、RNA 杂交后形成的双链具有更强的热稳定性, 因而对存在错配或缺失的碱基序列识别能力更强.

本研究根据 BCR/ABL 融合基因的碱基序列, 设计了一种新型发夹结构 LNA 探针, 并将其固定在金电极表面, 成功构建了用于检测 BCR/ABL 融合基因的电化学生物传感器. 使用循环伏安和电化学阻抗谱扫描对 LNA 探针固定及杂交过程进行表征. 并以本实验室合成的  $[\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  作杂交指示剂, 应用差分脉冲伏安法, 成功实现了对人工合成的 BCR/ABL 融合基因特定序列 DNA 片段快速、灵敏和准确的检测, 为临床慢性粒细胞白血病基

表 1 DNA 合成序列  
Tab. 1 Details of the DNA sequences

Gene types	Sequences
Hairpin LNA probe	5'-SH-CT <sup>L</sup> G C <sup>L</sup> AG A <sup>L</sup> GT T <sup>L</sup> CA A <sup>L</sup> AA G <sup>L</sup> CC C <sup>L</sup> TT C GC AG-3'
Hairpin DNA probe	5'-SH-CTG CAG AGT TCA AAA GCC CTT C GC AG-3'
Complementary	5'-GAA GGG CTT TTG AAC TCT-3'
Single base mismatch	5'-GAA GGG ATT TTG AAC TCT-3'
Non-complementary	5'-ACG TAA TCC CCA GCT CTC-3'

因的早期诊断提供研究基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660B 电化学分析仪(上海辰华),三电极体系,工作电极为金电极,对电极为铂丝电极,Ag/AgCl 电极为参比电极;pHS23B 型精密酸度计(上海雷磁);KQ2250DE 型医用数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);JB21 型搅拌器(上海雷磁新泾);BS110S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司). 人工合成的 DNA 序列见表 1.

锁核酸探针为 DNA 与 LNA 的嵌合体(简称 LNA 探针)<sup>[15-16]</sup>. DNA 储备液冷冻保存. pH 8.0 TE 缓冲液由 1 mL 10 mmol · L<sup>-1</sup> Tris、200 mL 1. 0 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA 和 98. 8 mL 0. 10 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 配制. 1 mmol · L<sup>-1</sup> 巯基乙醇(MCH,美国 Sigma 公司),4 ℃ 冰箱保存;蓝色晶体 [Cu(R)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> 按文献[17]合成. 高纯 N<sub>2</sub>(99. 99%). 以上试剂均为分析纯,实验用水为去离子水.

1.2 实验

1)解链温度的测定

在同一条件下用紫外分光光度法分别绘制 DNA-DNA 和 LNA-DNA 的解链温度曲线. 方法如下:于两个石英比色皿中分别加入一定浓度的 LNA 探针和同型 DNA 探针序列,而后加入同浓度的互补序列,室温杂交 30 min. 以 0. 4 ℃/min 的升温速率,从 10 ℃ 升至 110 ℃,每间隔 2 ℃,测定溶液在 260 nm 处的吸光度,经空白校正,绘制吸光度~温度变化曲线,求出其解链温度.

2)金电极预处理

将直径为 2 mm 的金电极依次用 1. 0、0. 3 和

0. 05 μm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粉末打磨,之后分别用无水乙醇、去离子水超声清洗 30 min,再于 KOH 溶液中经电化学清洗后,将电极置于 0. 5 mol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中循环扫描至稳定,双蒸水清洗,N<sub>2</sub> 吹干,立即进行捕获探针组装.

3)锁核酸探针固定与杂交反应

在预处理好的金电极表面滴加 5 μL 1 μmol · L<sup>-1</sup> LNA 探针溶液,于 4 ℃ 下放置 12 h,用 pH 7. 40 的 PBS 缓冲液清洗 10 s,氮气吹干,得到单链 LNA 修饰电极(LNA/AuE);接着将电极放在 1 mmol · L<sup>-1</sup> MCH 水溶液中封闭 1 h,以封闭未反应的活化位点,即可得到修饰捕获探针和巯基乙醇的金电极. 之后再用 pH 7. 40 的 PBS 缓冲液清洗 10 s,氮气吹干,准备杂交. 在探针修饰电极表面滴加 5 μL 不同浓度互补链,60 ℃ 杂交反应 1 h,依次用 0. 1 mol · L<sup>-1</sup> PBS 缓冲液、去离子水冲洗金电极表面去除未杂交的 DNA,即得异源双链体 LNA-DNA 修饰金电极.

4)循环伏安曲线和电化学阻抗检测

以修饰或未修饰的金电极为工作电极,Ag/AgCl(3 mol/L KCl) 电极为参比电极,铂丝为对电极. 电解质溶液为含 10 mmol · L<sup>-1</sup> [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> (1: 1)电对的 0. 1 mol · L<sup>-1</sup> PBS(pH 7. 4)缓冲液,循环伏安测试扫描电位 0 ~0. 6 V,扫速 100 mV/s;电化学阻抗测试初始电平 0. 02 V,频率范围 0. 05 ~105 Hz,幅值 0. 005 V,静置时间 2 s.

5)杂交前后电化学信号检测

将经修饰的金电极浸入浓度为 2. 0 × 10<sup>-5</sup> mol · L<sup>-1</sup> [Cu(R)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> 的 0. 1 mol · L<sup>-1</sup> PBS (pH 7. 4) 缓冲液中,搅拌富集 5 min 后记录差示脉冲伏安曲线. 扫描电位: -0. 2 ~0. 7 V,振幅 0. 01 V,脉冲宽

表2 LNA 和 DNA 探针与互补链及单碱基错配链杂交后的解链温度  
Tab. 2 Melting temperatures of the LNA and DNA capture probes against complementary and single-base-mismatched DNA targets

Probe type	$T_m/^\circ\text{C}$		$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
	Complementary target	Single-base mismatch	
LNA	78.8	38.1	40.7
DNA	50.3	44.7	5.6

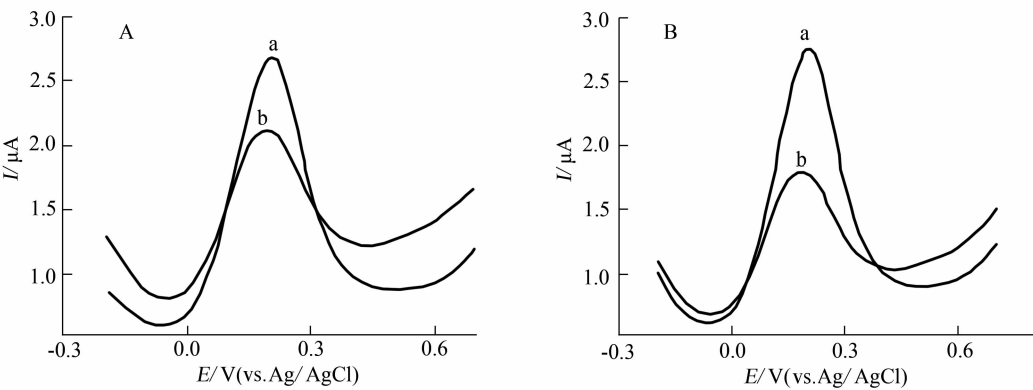


图1  $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  在探针 DNA(A)和探针 LNA(B)上与完全互补链(a)或单碱基错配链(b)杂交后的差示脉冲伏安图

Fig. 1 Differential pulse voltammograms of the  $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  hybridization with complementary target (a) or single-base mismatch (b) at DNA/AuE (A) and LNA/AuE (B)

度 0.05 s.

2 结果与讨论

2.1 LNA 探针的解链稳定性

解链温度 ( $T_m$ ) 是评价 DNA 序列热力学稳定性的一个主要参数, 定义为在给定的范围内 DNA 热变过程紫外光吸收达到最大值之 1/2 时的温度. 表 2 列出根据紫外分光光度法测定的探针解链温度. 如表, DNA 探针序列与其互补链杂交后的解链温度为 50.3  $^\circ\text{C}$ , 而与单碱基错配序列杂交后的解链温度为 44.7  $^\circ\text{C}$ , 两者温度接近, 特异性低. 对 LNA 探针, 其与杂交互补链的解链温度为 78.8  $^\circ\text{C}$ , 与双链 DNA 的解链温度 (50.3  $^\circ\text{C}$ ) 相比, 提高了 28.5  $^\circ\text{C}$ , 相当于每个 LNA 提高 4.1  $^\circ\text{C}$  [18]. LNA 探针与单碱基错配序列杂交后的解链温度为 38.1  $^\circ\text{C}$ , 两者温度差距明显增大, 特异性高. 理论上讲, 最佳杂交温度应比  $T_m$  约低 20  $^\circ\text{C}$ . 以此而言, 本研究 LNA 信号探针与完全互补链和单碱基错配链最佳杂交温度当分别为 58.8  $^\circ\text{C}$  和

18.1  $^\circ\text{C}$ . 经优化, 发现在其他条件相同情况下, 60  $^\circ\text{C}$  时杂交速率最快, 1 h 后已达到反应平衡. 而且可以保证 LNA 探针仅与完全互补链杂交, 而不出现与单碱基错配链的反应, 从而提高了探针的特异性.

2.2 发夹 LNA 探针与 DNA 探针的比较

目前大多数 DNA 电化学传感器采用的均是普通的 DNA 探针, 该探针不能很好地选择区分单个碱基错配, 即检测与疾病有关的点突变. 相对而言, LNA 探针则具有很好的序列选择性和特异性, 能够实现 DNA 链单碱基突变的识别和检测, 更好地检测 CML 的 BCR/ABL 融合基因的点突变. 即如图 1 所示, 分别将 DNA/MCH/AuE 和 LNA/MCH/AuE 在优化条件下与同一浓度的完全互补链 DNA 或单碱基错配链 DNA 经充分杂交反应后, 二者的差示脉冲伏安曲线表现出明显的不同. 如图, 使用 DNA 探针, 其单碱基错配链的信号达到互补链的 80% (A); 而对 LNA 探针电极, 显示的单碱基错配响应信号约为互补链 DNA 溶液的 61%

(B). 由此可见, 后者的特异性、选择性大有提高. 原因即是锁核酸的解链温度高于一般的 DNA, 从而使 LNA 探针热稳定性增强. 此外, 其特殊的核苷酸结构也增加了探针的刚性及特异性<sup>[14]</sup>.

2.3 电极表面电化学性能表征

图 2 给出在含有  $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  的  $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$  溶液中, 裸金电极和 3 种修饰电极的电化学阻抗图谱. 如图, 对裸 AuE (a), 谱线半圆直径很小, 而线性部分的频率范围很宽, 表明此时电子在 AuE 表面能够快速传输, 电解质溶液向电极表面扩散为电极过程的控制步骤. 而在 LNA 修饰的 AuE 上 (b), 其表面电阻值迅速增大到  $881\ \Omega$ , 主要因为在 AuE 表面, LNA 探针含有带负电荷的磷酸骨架, 必将排斥负电荷的  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  到达电极表面氧化还原, 从而阻碍了电子传递. 但在经过巯基己醇封闭的电极表面, 此时, 由于大量非特异性吸附的探针已从电极表面移除, 电极上除了含有以 Au—S 键为主的捕获探针, 同时还存在较稀疏的巯基己醇单分子膜层, 该结构有助于溶液中负电性的  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  渗透到电极表面进行电子交换<sup>[19]</sup>, 从而降低电极的表面电阻 ( $765\ \Omega$ ). 又如, 当探针与其互补的 DNA 杂交反应后形成的 LNA-DNA/MCH/AuE (d), 则因表面磷酸骨架负电荷数量之增加而进一步阻碍电极表面的电子转移, 导致电阻值增大 ( $1541\ \Omega$ ), 这可解释为金电极表面具有良好的 LNA 固定和杂交性能.

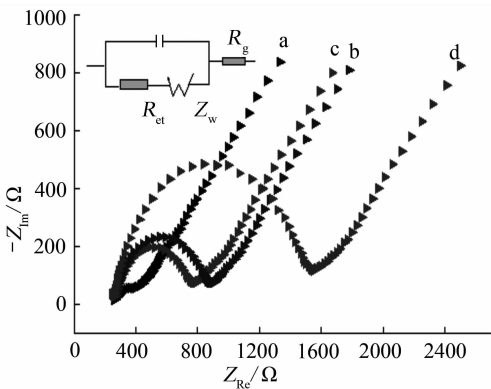


图 2 裸金电极 (a)、LNA/AuE (b)、LNA/MCH/AuE (c) 和 LNA-DNA/MCH/AuE (d) 的交流阻抗图谱

Fig. 2 Impedance plots of the bare AuE (a), LNA/AuE (b), LNA/MCH/AuE (c) and LNA-DNA/MCH/AuE (d) in  $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  solution

2.4 发夹结构 LNA 探针特异性

为考察本文研制的传感器的特异性, 此处即以  $[\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  为杂交指示剂, 把发夹锁核酸探针固定在金电极表面制备了电化学生物传感器. 利用 LNA 修饰金电极分别与 BCR/ABL 融合基因完全互补的 DNA 序列、单碱基错配序列、完全错配序列杂交, 测定杂交前后各电极的差示脉冲伏安信号, 结果如图 3 所示. 表明在单碱基错配链溶液与完全互补链溶液同一浓度情况下, 得到的修饰电极响应信号, 前者约为后者的 61%, 而完全错配链和 LNA 修饰电极的响应信号则分别为互补 DNA 溶液的 39% 和 37%. 由此可见, 在本文实验范围内, 该 DNA 电化学传感器能较好地区分互补 DNA 序列 (a)、单碱基错配 DNA 序列 (b)、完全错配链 (c) 和探针序列 (d). 同时说明, 以  $[\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  为指示剂, 由发夹结构 LNA 探针组装的电化学生物传感器具有很好的特异性.

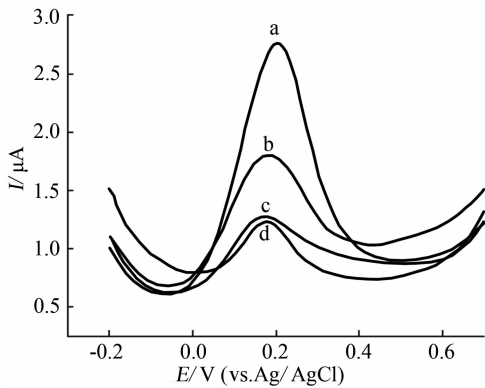


图 3  $2.0 \times 10^{-5}\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  在 LNA 修饰的金电极 (d) 及其与互补链 (a)、单碱基错配链 (b) 和完全错配链 (c) 杂交后电极的差示脉冲伏安图

Fig. 3 Differential pulse voltammograms of  $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  at LNA/AuE (d) and after hybridization with complementary target (a), single-base mismatch (b) and non-complementary (c) electrode

2.5 靶标链线性范围及检出限

在选定的最适条件下, 于固定了发夹 LNA 探针的电极上滴加  $5\ \mu\text{L}$  给定浓度的互补杂交链溶液,  $60\text{ }^\circ\text{C}$  下杂交 1 h, 然后测定其差示脉冲伏安曲线. 实验表明, 杂交信号 (即峰电流) 随着互补链浓度增加而逐渐增加 (图 4). 在  $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,  $\Delta I_p$  与互补链浓度的对数呈

良好的线性关系, 回归方程为  $\Delta I_p (\mu A) = 0.6669 (\log C / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 5.5817$ ,  $r = 0.9932$ , 检出限 ( $S/N = 3$ ) 为  $2.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

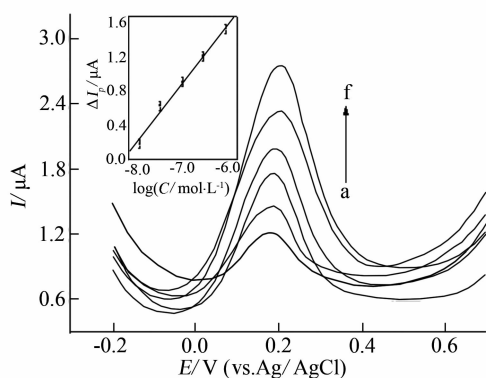


图 4 LNA/AuE 与不同浓度的互补链杂交后的差示脉冲伏安图

Fig. 4 DPV of  $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  accumulated on the probe after hybridization with different concentrations of the target sequence, the insert shows the linear relationship between difference of peak currents of  $[\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  and the logarithm of target DNA concentration

a ~ f /  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : probe;  $1.0 \times 10^{-8}$ ;  $3.0 \times 10^{-8}$ ;  $1.0 \times 10^{-7}$ ;  $3.0 \times 10^{-7}$ ;  $1.0 \times 10^{-6}$ , error bars =  $\pm$  relative standard deviation

## 2.6 重现性

用浓度为  $3.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的互补链 DNA 溶液, 按上述差示脉冲伏安实验步骤, 重复测定 5 次. 结果给出, 对应的 RSD 为 4.3%, 重现性好.

## 3 结 论

以锁核酸作探针,  $[\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  为杂交指示剂构成的新型锁核酸传感器, 对慢性粒细胞白血病基因片段表现出良好的差示脉冲响应信号, 而且对错配碱基序列的识别能力也更强, 具有较高的灵敏度, 有望在临床慢性粒细胞白血病基因的早期诊断中得到应用.

## 参考文献 (References):

[1] Zhang Li-Jun (张丽君), Zhang Rui (张蕊), Yu Jin-Xiang (于锦香), et al. Analysis of BCR/ABL gene rearrangements and complex chromosomal aberrations in patients with chronic granulocytic leukemia[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine (中国实用内科

杂志), 2008, 28(2): 130-132.

- [2] Wei Na (魏娜), Chen Jinghua (陈敬华), Wang Kun (王昆), et al. Study on the electrochemical biosensor for detection of PML/RARA fusion gene in leukemia based on hairpin DNA structure probe[J]. Journal of Instrumental Analysis (分析测试学报), 2008, 27(9): 907-910, 915.
- [3] Zhong Zhi-Hong (钟志宏), Yuan Li-Ya (袁利亚), Chen Guo-An (陈国安). Effect of BCR-ABL persistent expression in chronic myelogenous leukemia blast crisis [J]. Journal of Oncology (肿瘤学杂志), 2006, 12(3): 245-247.
- [4] Deng Meng-Feng (邓明凤), Wang Chang-Fu (王昌富), Zhang Wan-Sheng (张万胜), et al. Chromosome analysis and quantification of bcr-abl fusion gene transcripts in patients with chronic myeloid leukemia: value of clinical application[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science (临床检验杂志), 2006, 24(3): 179-181.
- [5] Moravcová J, Rulcová J, Machová Poláková K, et al. Control genes in international standardization of real-time RT-PCR for BCR-AB[J]. Leukemia Research, 2009, 33(4): 582-584.
- [6] Xu Kai (许凯), Ye Zun-Zhong (叶尊忠), Ying Yi-Bin (应义斌). Electrochemical deoxyribonucleic acid biosensor for quantitative detection of NOS gene sequence [J]. Chinese J Anal Chem (分析化学), 2008, 36(8): 1113-1116.
- [7] Lin L Q, Chen J, Lin Q H, et al. Electrochemical biosensor based on nanogold-modified poly-eriochrome black T film for BCR/ABL fusion gene assay by using hairpin LNA probe[J]. Talanta, 2010, 80(5): 2113-2119.
- [8] Wang Mao-Qing (王茂清), Du Xiao-Yan (杜晓燕), Liu Li-Yan (刘丽燕). Electrodeposited Pt-nanoparticles DNA biosensor for the detection of specific deoxyribonucleic acid in genetically modified soybean[J]. Chinese J Anal Chem (分析化学), 2008, 36(7): 890-894.
- [9] Obika S, Nanbu D, Hari Y, et al. Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O, 4'-C-methylenribonucleosides[J]. Tetrahedron Lett, 1998, 39(30): 5401-5404.
- [10] James Yang C Y, Wang L, Wu Y R, et al. Synthesis and investigation of deoxyribonucleic acid/locked nucleic acid chimeric molecular beacons [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(12): 4030-4041.
- [11] Koshkin A A, Rajwanshi V K, Wengel. Novel conven-

- ient syntheses of LNA [2. 2. 1] bicyclo nucleosides [J]. Tetrahedron Let, 1998, 39(24): 4381-4384.
- [12] Braasch D A, Corey D R. Locked nucleic acid (LNA): Fine-tuning the recognition of DNA and RNA [J]. Chem Biol, 2001, 8(1): 1-7.
- [13] Wang J. DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layers [J]. Biosens Bioelectron, 1998, 13(7/8): 757-762.
- [14] Koshkin A A, Nielsen P, Meldgaard M, et al. LNA (locked nucleic acid): An RNA mimic forming exceedingly stable LNA: LNA duplexes [J]. J Am Chem Soc, 1998, 120(50): 13252-13253.
- [15] Fang S, Lee H J, Wark A W, et al. Attomole microarray detection of micro RNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions [J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(43): 14044-14046.
- [16] Lin L Q, Lin X H, Chen J H, et al. Electrochemical biosensor for detection of BCR/ABL fusion gene based on hairpin locked nucleic acids probe [J]. Electrochem Commun, 2009, 11(8): 1650-1653.
- [17] Kang J, Huang X H, Xu J H, et al. Synthesis, crystal structure and antitumor activity in vitro of a new benzoate binuclear copper (II) Complex [J]. Chinese J Struct Chem, 2009, 28(1): 15-18.
- [18] Owczarzy R. Melting temperatures of nucleic acids: Discrepancies in analysis [J]. Biophys Chem, 2005, 117(3): 207-215.
- [19] Dharuman V, Hahn J H. Effect of short chain alkane diluents on the label free electrochemical DNA hybridization discrimination at the HS-ssDNA/diluent binary mixed monolayer in presence of cationic intercalators [J]. Sens Actuators, B, 2007, 127(2): 536-544.

## Hairpin Locked Nucleic Acids Probe Based Electrochemical Biosensor for Detection of BCR/ABL Fusion Gene

WANG Hong-mei, LIN Li-qing, WENG Shao-huang, WANG Li-man,  
LIU Yin-huan, LIN Xin-hua\*

(College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

**Abstract:** In this article, a new type of structure hairpin locked nucleic acids (LNA) probe was designed to detect BCR/ABL fusion gene in Chronic Myelocytic Leukemia. The LNA probe was immobilized on the gold electrode (AuE) through sulfur-Au interaction to construct specific electrochemical biosensor. The electrochemical response of the sensor to hybridization of the LNA probe with the target DNA was studied using  $[\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  as an electrochemical indicator. The optimal condition was discussed. The experimental results indicated that in pH 7.4 PBS buffer solution, this new method has excellent selectivity for single base mismatch and complementary after hybridization. The linear relationship between the increased oxidation peak current of  $[\text{Cu}(\text{R})_2]^{2+}$  and the concentration of complementary strand was observed in the range of  $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$  mol/L. The detection limit was  $2.0 \times 10^{-9}$  mol/L.

**Key words:** hairpin LNA probe; electrochemical biosensor; BCR/ABL fusion gene;  $[\text{Cu}_2(\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2)_4(\text{C}_2\text{H}_6\text{O})_2]$