

2011-05-28

## Detection of Acute Promyelocytic Leukemia PML/RAR $\alpha$ Fusion Gene Using Graphene Modified Glassy Carbon Electrode

Zhi-xian LIAN

Guang-xian ZHONG

Kun WANG

Ai-lin LIU

1. Department of Pharmaceutical Analysis of the Fujian Meidical University, Fuzhou 350004,China; ; 2. Fujian Institute of Hematology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; ; ailinliu@mail.fjmu.edu.cn

Xin-hua LIN

1. Department of Pharmaceutical Analysis of the Fujian Meidical University, Fuzhou 350004,China; ; xhl1963@sina.com

Yuan-zhong CHEN

---

### Recommended Citation

Zhi-xian LIAN, Guang-xian ZHONG, Kun WANG, Ai-lin LIU, Xin-hua LIN, Yuan-zhong CHEN. Detection of Acute Promyelocytic Leukemia PML/RAR $\alpha$  Fusion Gene Using Graphene Modified Glassy Carbon Electrode[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2011 , 17(2): 195-198.

DOI: 10.61558/2993-074X.2089

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol17/iss2/9>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

# 石墨烯修饰玻碳电极用于急性早幼粒细胞白血病 PML/RAR $\alpha$ 融合基因的检测

连志贤<sup>1</sup>, 钟光贤<sup>1</sup>, 王 昆<sup>1,3</sup>, 刘爱林<sup>1,2\*</sup>, 林新华<sup>1\*</sup>, 陈元仲<sup>2</sup>

(1. 福建医科大学药学院 药物分析系, 福建 福州 350004; 2. 福建医科大学附属协和医院 福建省血研所, 福建 福州 350001; 3. 厦门大学附属第一医院药剂科, 福建 厦门 361003)

**摘要:** 应用电化学还原法将固定在玻碳电极表面的氧化石墨还原为石墨烯, 然后利用偶联活化剂将经过氨基修饰的急性早幼粒细胞白血病 (APL) PML/RAR $\alpha$  融合基因序列探针固定到石墨烯修饰电极表面, 以亚甲基蓝 (MB) 为电化学杂交指示剂, 并由差分脉冲伏安法检测人工合成 APL 的 PML/RAR $\alpha$  融合基因. 结果表明, 石墨烯对 MB 的检测信号起到了很好的增敏作用, 杂交前后 MB 还原峰电流差值与靶标链 DNA 浓度在  $5 \times 10^{-10} \sim 2.5 \times 10^{-9}$  mol/L 范围内呈线性关系, 检出限为  $8 \times 10^{-11}$  mol/L. 该方法简单、特异性好, 有望用于实际样品的检测.

**关键词:** 石墨烯; 电化学 DNA 传感器; PML/RAR $\alpha$  融合基因

**中图分类号:** O657.1

**文献标识码:** A

2010年, Andre Geim 和 Konstantin Novoselov 因石墨烯 (graphene) 的研究成果获得诺贝尔物理学奖, 使得石墨烯这种新型材料成为研究的热点. 石墨烯是由单层碳原子紧密堆积成二维蜂窝状晶格结构的一种碳质新材料, 具有大的机械强度, 优良的导热性以及特殊的电子性质<sup>[1]</sup>. 特别是在室温下, 单体石墨烯的电子传递速率比已知的导体都快, 因此在生物传感器中得到应用<sup>[2-3]</sup>. 电化学 DNA 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, 已成为当今生物传感器领域的前沿性课题.

急性早幼粒白血病 (APL) 是一种时常伴发严重出血的急性白血病. PML/RAR $\alpha$  融合基因是 APL 的标志性基因, 在 APL 早期诊断和预后监测中具有重要意义<sup>[4]</sup>. 目前 PML/RAR $\alpha$  融合基因检测的方法主要有染色体分析<sup>[5]</sup>、实时定量 RT-PCR<sup>[6]</sup>等, 但这些方法均存在特异性不高、敏感性

低、操作繁琐、检测费用高等问题, 限制了它在临床中的应用<sup>[7]</sup>. 本文依据石墨烯良好的导电性能, 构建了一种新型的电化学 DNA 传感器, 借助电化学还原氧化石墨烯 (Graphene Oxide, GO)<sup>[8]</sup> 制备了石墨烯修饰玻碳电极, 以期能够快速、简便、高特异性检测 APL 相关基因.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

CHI660C 电化学分析仪 (上海辰华), 三电极体系: 工作电极为玻碳电极, 对电极为铂丝电极, 参比电极为 Ag/AgCl 电极. KQ-218 型超声波清洗器, pH S-3B 精密 pH 计. 5' 端带有氨基标记的 DNA 探针: 5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GGT CTC AAT GGC TGC CTC CCC G-3'; 互补链: 5'-CGG GGA GGC AGC CATTGA GACC-3'; 单碱基错配链: 5'-CGGG GAGGCACCCATTGAGACC-3'; PML: 5'-CGG GGA GGC AGA GGA ACG CGTT -3'; RAR $\alpha$ : 5'-ATC CCCAGCCACCATT GAGACC-3'. DNA 储备液冷冻

收稿日期: 2011-01-14, 修订日期: 2011-02-25 \* 通讯作者, Tel: (86-591) 22862016, E-mail: ailinliu@mail.fjmu.edu.cn; xhl1963@sina.com

国家 863 计划 (2008AA02Z433), 国家自然科学基金 (20805006, 20975021), 福建省高校产学研科技重点项目 (2010Y4003), 福建省自然科学基金 (2010J06011), 福建省血液病学重点实验室项目 (2009J1004), 福建医科大学校重大项目 (09ZD013), 福建省高校杰出青年科研人才计划 (JA10126) 资助

保存. 0.10 mmol/L pH8.0 TE 缓冲液由 Tris、EDTA 和 NaCl 配制. 10 mmol/L pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液由 Tris 和 HCl 配制. pH 7.4 磷酸盐 (PBS) 缓冲液由  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  配制. 偶联活化剂由 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) 和羟基丁二酰亚胺 (NHS) 的 pH 7.4 磷酸盐 (PBS) 缓冲液配制. 10 mmol/L pH 5.0 磷酸钾缓冲液由  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  配制. 石墨粉 (国药集团化学试剂有限公司, 光谱纯); 氧化石墨烯由 Hummers 法<sup>[9-10]</sup> 氧化合成, 并配置浓度为 0.5% (by mass) 溶液. 配置亚甲基蓝 (MB) 溶液浓度 20  $\mu\text{mol/L}$  溶液, 避光保存. 以上试剂均为分析纯, 实验用水为去离子水, 溶液均用二次蒸馏水配制.

## 1.2 方法

### 1) 探针修饰电极的制备

玻碳电极依次用金相砂纸、0.05  $\mu\text{m}$  氧化铝粉末和水的混合物抛光至镜面, 再依次经  $\text{HNO}_3$ 、乙醇和蒸馏水超声清洗, 用氮气吹干预处理过的玻碳电极, 之后于表面滴加 5  $\mu\text{L}$  氧化石墨烯, 真空干燥后, 按文献[8]制备石墨烯/玻碳电极; 另于修饰电极表面滴加 20  $\mu\text{L}$  偶联活化剂, 空气中干燥, 再于电极表面滴加 10  $\mu\text{L}$  探针 DNA 溶液, 空气中干燥, 即成探针/石墨烯/玻碳电极.

### 2) 杂交前后电化学信号检测

将固定探针的石墨烯修饰玻碳电极浸入一定浓度的 MB, 搅拌富集 5 min 后, 记录差分脉冲伏安 (DPV) 曲线. 扫描电位:  $-0.6 \sim 0.4$  V, 振幅 0.01 V, 脉冲宽度 0.05 s, 采样宽度 0.0167 s, 脉冲周期 0.2 s. 按上述步骤制备不同结构的探针修饰电极, 而后将修饰电极置于 10 mL 不同浓度互补链的 Tris-HCl 缓冲液中, 45  $^{\circ}\text{C}$  杂交反应 60 min, 于 MB 溶液中搅拌富集 5 min 后记录 DPV 曲线.

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 在修饰石墨烯玻碳电极表面的固定与杂交

图 1 示出玻碳电极及不同结构的探针修饰电极与 MB (20 mmol/L) 作用后在 pH = 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液中的 DPV 曲线.

如图可见, 在玻碳电极表面修饰石墨烯的 ssDNA/石墨烯/GCE 上 MB 的 DPV 还原电流 (曲线 a) 比未修饰石墨烯的 ssDNA/GCE (曲线 c) 增大了约 19 倍. 而在与互补 ssDNA 杂交后的 dsDNA/石

墨烯/GCE 上, 其 DPV 还原电流 (曲线 b) 也比 dsDNA/GCE 的 (曲线 d) 显著增加. 更为重要的是电极修饰石墨烯后, 同时增大了 MB 杂交前后电化学检测信号的差值. 实验表明 MB 在 ssDNA (dsDNA)/GO/GCE 两电极上还原峰的信号差 ( $\Delta I = I_a - I_b$ ) 比在 ssDNA (dsDNA)/GCE 两电极上的 ( $\Delta I = I_c - I_d$ ) 增加了近 125 倍. 显然, 把石墨烯组装到玻碳电极表面, 即可大大提高对互补 ssDNA 的检测灵敏度.

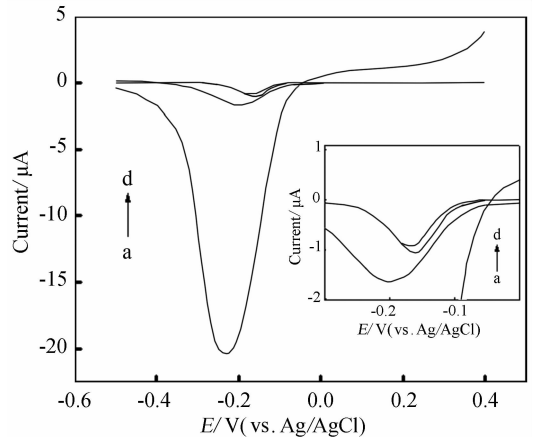


图 1 4 种修饰电极在 pH = 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液中的 DPV 曲线 (插图为局部放大)

Fig. 1 Differential pulse voltammograms of four electrodes in pH = 7.0 Tris-HCl buffer solutions, the inset shows the enlarged region in  $-0.3 \sim 0$  V.

a. ssDNA/graphene/GCE; b. dsDNA/graphene/GCE; c. ssDNA/GCE; d. dsDNA/GCE

### 2.2 石墨烯修饰电化学 DNA 传感器之特异性测定

以 MB 作杂交指示剂, 由 DPV 测定石墨烯修饰的电化学 DNA 生物传感器的特异性. Eredm A<sup>[11]</sup> 认为当石墨烯/GCE 固定探针后, 探针 DNA 的磷酸骨架因带负电荷而对 MB 的阳离子具有更好的静电吸附作用. 同时, 由于探针在电极上固定之后, 呈自由伸展状态, 并使自由碱基 G 充分暴露在外, 碱基 G 与 MB 有很强的亲和力, 从而更有助于 MB 在电极表面富集<sup>[11]</sup>, 因此产生了更大的电化学响应. 即如图 2 所示, 在本实验条件下, 该石墨烯修饰传感器能够较好地地区分探针序列和互补链序列. 对比曲线 a 和 e, 后者电流强度明显下降, 说明电极表面发生了杂交反应. 图中同时给出 ssDNA/石墨烯/GCE 对单碱基错配序列 (d)、PML 序

列(b)和 RAR $\alpha$  序列(c)的识别,其中 a、b 和 c 三者的峰电流都没有明显差异,d 示明对含有一个碱基错配的寡核苷酸片段,其电流信号相对于互补链的电流信号均有所下降,意味着该探针与单碱基错配序列之间没有发生完全杂交.图 2 对比了 a~e 各条曲线峰电流的变化(见插图).由此说明,利用石墨烯修饰玻碳电极制备的电化学 DNA 生物传感器具有良好的特异性,在一定浓度范围内,该传感器能够较好地地区分互补链序列,单碱基错配序列,PML 序列,RAR $\alpha$  序列和探针序列.

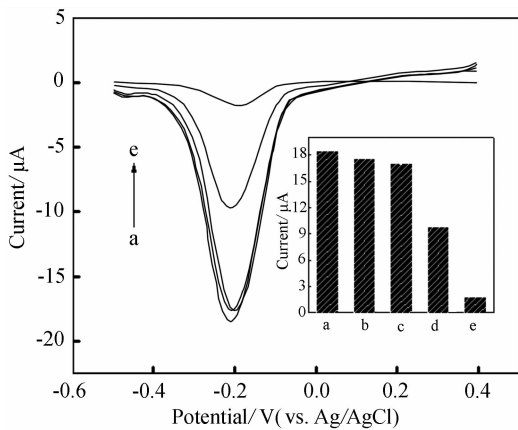


图 2 不同 DNA 序列杂交后的差示脉冲伏安曲线及其脉冲伏安响应峰电流变化对比直方图(插图)

a. 空白; b. PML 补序; c. RAR $\alpha$  补序; d. 单碱基错配补序; e. 完全互补序

Fig. 2 DPV responses of the hybridization with different sequences DNA, the inset is variation of peak current with different sequences a. blank; b. PML sequence; c. RAR $\alpha$  sequence; d. one-base mismatch sequence; e. complementary sequence

### 2.3 不同浓度的靶标 DNA 序列检测

在选定的最佳条件下,测定 ssDNA/石墨烯/GCE 电化学 DNA 传感器在不同互补链浓度下的峰电流变化.图 3 表明,其 DPV 还原峰电流随着完全互补链浓度的增加而下降,且在  $5 \times 10^{-10} \sim 2.5 \times 10^{-9}$  mol/L 范围内,电流( $I$ )与探针浓度( $C$ )呈良好的线性关系,回归方程  $I(\mu A) = -0.0565 C_{\text{dsDNA}} (10^{-12} \text{ mol/L}) + 19.4873$ ,相关系数  $R = -0.9908$ ,检测限( $S/N = 3$ )为  $8 \times 10^{-11}$  mol/L.由此可知,石墨烯修饰的玻碳电极与 MB 指示剂构成的 ssDNA/石墨烯/GCE 电化学 DNA 传感器具有较高的灵敏度.本课题组曾报道过使用 EDC/NHS 固定方法固

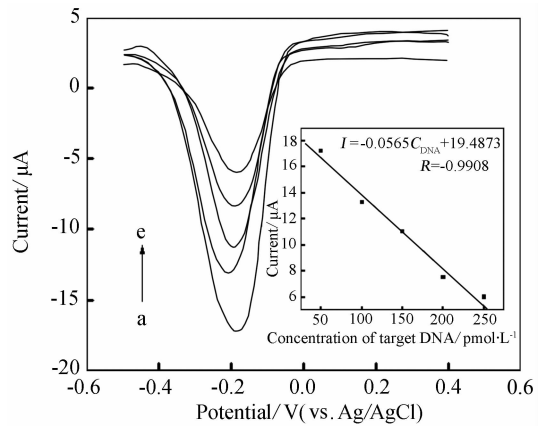


图 3 ssDNA/石墨烯/GCE 与不同浓度 DNA 杂交后的差示脉冲伏安曲线和杂交前后指示剂峰电流差随互补链 DNA 浓度的变化关系(插图)

Fig. 3 Differential pulse voltammograms of the ssDNA/PAM-AM modified electrode hybridized with different concentrations of DNA and the linear relationship between indicator's peak current differences and concentrations of target DNA before and after hybridization (inset) target concentrations/nmol · L<sup>-1</sup>: a. 0.5; b. 1.0; c. 1.5; d. 2.0; e. 2.5

定直链探针检测 CML 相关融合基因片断的方法<sup>[12]</sup>,在最佳条件下其检测限为  $5.9 \times 10^{-8}$  mol/L.就本文而言,之所以能明显提高其检测限和灵敏度,原因即在经石墨烯修饰的电极能有效提高探针 DNA 在电极表面的固定量及其稳定性,而且该修饰电极对 MB 同时也具有明显的电催化作用.

### 2.4 石墨烯修饰 DNA 传感器的稳定性

制备 ssDNA/石墨烯/玻碳电极和 dsDNA/石墨烯/玻碳电极各 5 支,作平行实验.放在 20 mmol/L MB 杂交指示剂溶液中富集 5 min 后,按上述实验方法(1.2)测定其电化学响应的相对标准偏差(RSD),分别为 3.8% 和 4.2%,即该石墨烯修饰 DNA 传感器具有较好的稳定性.

## 3 结论

利用石墨烯纳米材料构建的新型电化学 DNA 传感器,以亚甲基蓝做杂交指示剂,对 ssDNA 探针电信号检测表现出很明显的增敏作用,该传感器具有良好的特异性和较高的灵敏度.随着本研究的继续深入,有望在 APL 基因检测方面展现广阔的应用前景.

### 参考文献(References):

[1] Geim A K, Novoselov K S. The rise of graphene[J]. Na-

- ture Mater, 2007, 6(3):183-191.
- [2] Shan C S, Yang H F, Han D X, et al. Water-soluble graphene covalently functionalized by biocompatible poly-L-lysine[J]. Langmuir, 2009, 25(20):12030-12033.
- [3] Fu C L, Yang W S, Chen X, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase on a graphite nanosheet-Nafion composite film modified electrode [J]. Electrochem Commun, 2009, 11(5):997-1000.
- [4] Zhang J Y (张建瑜), Tang J M (唐加明). Clinic study about 21 cases of acute promyelocytic leukemia[J]. International Medicine & Health Guidance News (国际医药卫生导报), 2007, 13(12):28-31.
- [5] Yoo S J, Seo E J, Lee J H, et al. A complex, four-way variant t(15;17) in acute promyelocytic leukemia [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2006, 167(2):168-171.
- [6] Han J Y, Kim K E, Kim K H, et al. Identification of PML-RARA rearrangement by RT-PCR and sequencing in an acute promyelocytic leukemia without t(15;17) on G-banding and FISH[J]. Leukemia Research, 2007, 31(2):239-243.
- [7] Wei N, Chen J H, Zhang J, et al. An electrochemical biosensor for detection of PML/RARA fusion gene using capture probe covalently immobilized onto poly-calcon carboxylic acid modified glassy carbon electrode[J]. Talanta, 2009, 78(4/5):1227-1234.
- [8] Guo H L, Wang X F, Qian Q Y, et al. A Green approach to the synthesis of graphene nanosheets[J]. ACS Nano, 2009, 3(9):2653-2659.
- [9] Hummers W S, Offeman R E. Preparation of graphite oxide[J]. J Am Chem Soc, 1958, 80(6):1339-1339.
- [10] Nethravathi C, Viswanath B, Shivakumara C, et al. The production of semectite clay/graphene composites through delamination and co-stacking [J]. Carbon, 2008, 46(13):1773-1781.
- [11] Erdem A, Kerman K, Meric B, et al. Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator[J]. Electroanalysis, 2001, 13(3):219-223.
- [12] Lin X H, Wu P, Chen W, et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of chronic myelogenous leukemia by using methylene blue [J]. Talanta, 2007, 72(3):468-471.

## Detection of Acute Promyelocytic Leukemia PML/RAR $\alpha$ Fusion Gene Using Graphene Modified Glassy Carbon Electrode

LIAN Zhi-xian<sup>1</sup>, ZHONG Guang-xian<sup>1</sup>, WANG Kun<sup>1,3</sup>, LIU Ai-lin<sup>1,2\*</sup>,  
LIN Xin-hua<sup>1\*</sup>, CHEN Yuan-zhong<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Analysis of the Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China;  
2. Fujian Institute of Hematology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;  
3. Department of Pharmacy, the First Hospital of Xiamen Affiliated to the Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian, China)

**Abstract:** A graphene modified glassy carbon electrode (GCE) was prepared by electrochemical reduction of graphite oxide fixed on the surface of GCE. Then, the amino-group modified probe of acute promyelocytic leukemia (APL) PML/RAR $\alpha$  fusion gene fragment was immobilized onto surface of the graphene modified GCE by coupling activating agent. With methylene blue (MB) as a novel electrochemical indicator, artificial APL PML/RAR $\alpha$  fusion gene fragment was measured by differential pulse voltammetry (DPV). The results indicated that graphene nanomaterials showed good sensitivity to the signal of MB. The relationship between the reduction peak current of MB and the concentration of complementary strand was linear in the range of  $5 \times 10^{-10} \sim 2.5 \times 10^{-9}$  mol/L. The detection limit had been estimated to be  $8 \times 10^{-11}$  mol/L. The method is simple and has good specificity and high sensitivity. This approach is promising to the detection of APL in the real sample for medical diagnostics.

**Key words:** graphene; electrochemical DNA biosensor; PML/RAR $\alpha$  fusion gene