

2015-02-28

Novel DNA Electrochemical Biosensor for K-Ras Point Mutation Detection Based on DNA Polymerase I

Li-qing LIN

Cheng-fei ZHAO

Zhou-qian JIANG

Shao-huang WENG

Xiao-lan XIE

Xin-hua Lin

Faculty of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; xinhua63@163.com

Recommended Citation

Li-qing LIN, Cheng-fei ZHAO, Zhou-qian JIANG, Shao-huang WENG, Xiao-lan XIE, Xin-hua Lin. Novel DNA Electrochemical Biosensor for K-Ras Point Mutation Detection Based on DNA Polymerase I[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2015, 21(1): 72-77.

DOI: 10.13208/j.electrochem.140725

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol21/iss1/11>

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.

DOI: 10.13208/j.electrochem.140725

Artical ID:1006-3471(2015)01-0072-06

Cite this: *J. Electrochem.* 2015, 21(1): 72-77

Http://electrochem.xmu.edu.cn

基于 DNA 聚合酶 I 的新型电化学传感器 及其胰腺癌 K-ras 基因点突变检测

林丽清, 赵成飞, 蒋周倩, 翁少煌, 谢晓兰, 林新华*

(福建医科大学药学院, 福建 福州 350004)

摘要: 本文构建 DNA 聚合酶 I 的新型 DNA 电化学传感器, 将捕获探针通过 Au-S 键固定于 Au 基底表面, 与互补靶序列杂交至点突变前一个碱基, 通过 DNA 聚合酶 I 将 dUTP-biotin 连接在目标 DNA 的检测位点, 再与 avidin-HRP 反应, 而后测定在 TMB 溶液中的电化学特性. 结果表明, DNA 电化学传感电极的检测电流值与 K-ras 突变型基因浓度 ($1.0 \times 10^{-15} \sim 1.0 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对数呈良好的线性关系, 且灵敏度高, 特异性较佳.

关键词: DNA 聚合酶 I; K-ras 基因点突变; DNA 电化学传感器; 电流时间曲线

中图分类号: O646

文献标识码: A

胰腺癌 (Pancreatic cancer, PC) 临床表现隐匿, 发病迅速, 预后不良^[1]. 据报道胰腺癌患者的 K-ras 突变发生率可达 90%~100%^[2], 野生型 K-ras 基因的第 12 个密码子为 GGT, 可突变为 GAT、GTT、GCT、GGT, 其中 GAT 为常见的突变类型. 该 K-ras 突变型基因可作为胰腺癌存在的标志. 胰腺癌的 K-ras 突变基因处于 PanIN.1 一级 (早期阶段)^[3], 因此, K-ras 突变基因进行分子水平检测有助于早期胰腺癌的筛查. 目前, 临床上常用 PCR 技术检测 K-ras 突变基因, 该技术检测周期长、定量分析成本高及特异性差. 研发灵敏、快速和准确的基因检测技术, 检测胰腺癌患者血液中低拷贝基因, 有助于胰腺癌早期诊断.

DNA 电化学传感电极是基因结构分析和检测的重要手段, 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^[4-6]. 高选择性对电化学 DNA 生物传感电极极为重要. DNA 聚合酶 I 的专一性较好^[7-8], 只有当新进入的脱氧核苷酸与模板 DNA 配对时才起催化作用, 以促进 3'-OH 与 5'-PO₄ 结合生成磷酸二酯键, 若是错误的核苷酸进入结合位点, 则不能与模板配对, 无法生成磷酸二酯键.

本文利用 DNA 聚合酶 I 的专一性以期提高

测定的特异性. 以 DNA 为复制模板, DNA 聚合酶 I 通过核苷酸聚合反应, 使 DNA 链沿 5'→3' 方向延长. 当 dNTP-biotin 与 K-ras 突变型配对结合时, 可由 DNA 聚合酶 I 催化生成磷酸二酯键. 该配对结合物与 avidin-HRP 通过生物素-亲和素作用相连^[9], 可在 TMB 溶液体系中测定其电流-时间曲线. 作者根据 K-ras 点突变基因检测的实际需要, 构建了基于 DNA 聚合酶 I 的新型 DNA 电化学传感器以精确地测定 K-ras 基因点突变. 该传感器制作过程和工作原理如图 1 所示.

1 实验

1.1 仪器与试剂

Autolab PGSTAT302F 系统电化学分析仪 (荷兰 Eco Chemie), pHs-3B 型精密 pH 计, KQ-218 型超声波清洗器, 三电极体系由 Au 基底修饰工作电极、铂丝对电极和 Ag/AgCl 参比电极组成.

捕获探针 DNA: 5'-(SHC6)AAAAAAGGCAC TCTTGCTACGCCA-3'; 野生型目标 DNA: 5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGAGGCAA GAGTGCCT-3'; 突变型目标 DNA: 5'-CTTGTGGT AGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGTGCC T-3'. DNA 聚合酶 I (大连宝生物工程), dUTP-biotin (德国 Roche diagnostics GmbH), avidin-HRP

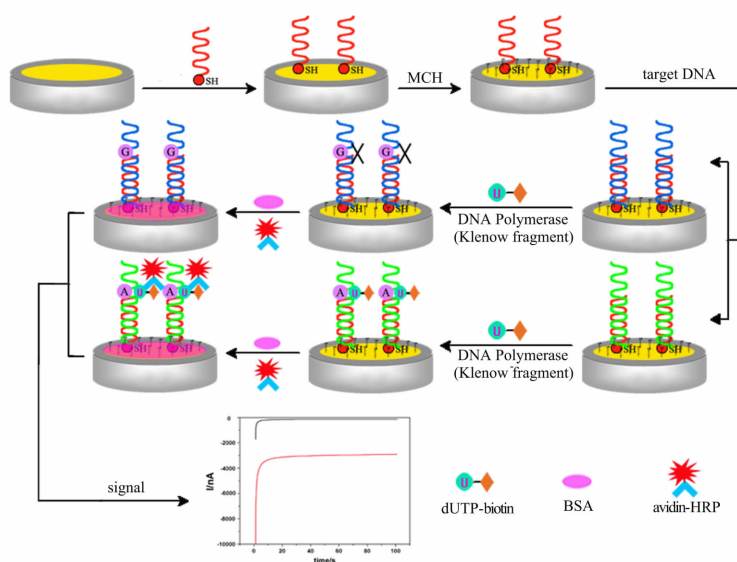


图 1 DNA 电化学传感器 K-ras 点突变测定的工作原理图

Fig. 1 Schematic diagram of DNA electrochemical biosensor for K-ras point mutation detection

(北京博奥森)。

TE 缓冲液: 由 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris、 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 配制,用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调节 pH 值至 8.0。捕获探针溶液: 将分装的 $2 \mu\text{L}$ 储备液离心 3 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),加入 $198 \mu\text{L}$ TE 缓冲液,混匀,配制成 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。DNA 储备液:将装有 DNA 的离心管进行离心 10 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),据说明书加入 pH 8.0 的 TE 缓冲液配制成 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,为避免反复冻融,储备液分装,冷冻保存。目标 DNA 溶液:将分装 $2 \mu\text{L}$ 储备液离心 3 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),加入 $198 \mu\text{L}$ PBS ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 缓冲液,混匀,以 PBS 缓冲液稀释至不同浓度, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。实验用水均为去离子水。

1.2 金基底预处理与捕获探针

将 Au 基底用 $0.3 \mu\text{m}$ Al_2O_3 粉末打磨 3 min ,依次用 1:1 (by volume) 的硝酸溶液、无水乙醇、去离子水超声清洗 5 min 。再用 $0.05 \mu\text{m}$ Al_2O_3 粉末打磨 3 min ,硝酸溶液、无水乙醇、去离子水超声清洗 5 min ,氮气吹干。将金基底置于 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液循环扫描直至曲线稳定,二次蒸馏水清洗,氮气吹干即可。

将捕获探针溶液 $2 \mu\text{L}$ 滴于预处理过的 Au 基底表面,室温搁置 1 h ,PBS (pH 7.4) 缓冲液冲洗 10 s ,氮气吹干,接着将固定捕获探针的 Au 电极浸泡于 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-巯基乙醇 (MCH) 水溶液中封闭 1 h ,再

用 PBS (pH 7.4) 缓冲液冲洗 10 s ,氮气吹干,即得 ssDNA/MCH/Au 电极。MCH 可将电极表面未固定捕获探针的空白位点封闭,减少电极界面的目标 DNA 的非特异性吸附、降低背景信号。

1.3 目标 DNA 杂交、dUTP-biotin 聚合及 avidin-HRP 结合

将 ssDNA/MCH/Au 电极浸泡于不同浓度的 K-ras 目标 DNA 溶液中反应 1 h ,PBS (pH 7.4) 缓冲液冲洗 10 s ,氮气吹干,即得 dsDNA/MCH/Au 电极。又将 $3 \mu\text{L}$ dUTP-biotin 和 DNA 聚合酶 I 混合溶液滴加于上述修饰电极表面, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h ,PBS (pH 7.4) 缓冲液冲洗 10 s ,氮气吹干,即得 dUTP/dsDNA/MCH/Au 电极。将该电极浸泡于 0.5% BSA 溶液再次封闭,室温反应 1 h ,用 PBS (pH 7.4) 缓冲液冲洗 10 s ,氮气吹干,将 $5 \mu\text{L}$ avidin-HRP (1:1000) 溶液滴加于修饰电极表面反应 15 min ,PBS (pH 7.4) 缓冲液和去离子水分别冲洗 10 s ,即得固定 HRP 的修饰电极。 0.5% BSA 封闭以减少修饰电极界面对 HRP 的非特异性吸附,降低背景信号。

1.4 检测

将 HRP/BSA/dUTP/dsDNA/MCH/Au 电极在 $500 \mu\text{L}$ TMB 溶液测定循环伏安曲线 (CV),电压范围 $-0.1 \sim 0.9 \text{ V}$,扫描速率 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$,采样间隔 0.001 ,静置时间 2 s ;电流-时间曲线 ($i-t$) 参数:初始电位 100 mV ,实验时间 100 s 。在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) + $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶

液中测定电化学交流阻抗(EIS),高频 100000 Hz,低频 0.05 Hz.

2 结果与讨论

2.1 Au 基底修饰过程的电化学阻抗

图 2 示出 Au、ssDNA/Au、ssDNA/MCH/Au、dsDNA/MCH/Au、dUTP/dsDNA/MCH/Au 和 BSA/dUTP/dsDNA/MCH/Au 电极在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1, 含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl) 溶液的交流阻抗谱图. 从图可知, 阻抗谱图由低频半圆部分和低频直线部分组成, 半圆直径为 R_{ct} 值. Au 电极的阻抗谱图几乎成一条直线(曲线 a), 电子在 Au 电极表面传递速率快, 电解质溶液扩散为控制步骤. Au 基底表面固定捕获探针后其 R_{ct} 值迅速增大(ssDNA/Au, 曲线 b), 这是因为固定于 Au 基底表面的捕获探针的磷酸骨架带负电荷, 可排斥 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 到达电极表面发生氧化还原反应, 从而阻碍电极表面的电子传递. MCH 封闭 ssDNA/Au 电极后, R_{ct} 值略微增大(ssDNA/MCH/Au, 曲线 c), MCH 占据电极表面的空位点进一步阻碍了电极表面的电子传递. 当 ssDNA/MCH/Au 电极与 K-ras 突变型目标 DNA 杂交, 其 R_{ct} 值明显增大(dsDNA/MCH/Au, 曲线 d), 电极表面形成的双链 DNA 带大量负电荷, 增加了对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的排斥, 阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在电极表面的氧化还原反应. 与 dUTP 反应后, 由于电极表面的 dUTP-biotin 带负电荷, 也可阻碍电极表面的电子传递, 其 R_{ct} 值略微增加(dUTP/dsDNA/MCH/Au, 曲线 e). 0.5% BSA 封闭后, 电极表面吸附的 BSA 蛋白质大分子阻碍了电子传递, 其 R_{ct} 值再次增大(BSA/dUTP/dsDNA/MCH/Au, 曲线 f). 上述实验结果表明 Au 基底的修饰过程已逐步顺利构筑.

2.2 基于 DNA 聚合酶 I 的 DNA 电化学传感电极的电化学特性

将 ssDNA/MCH/Au 电极分别浸泡于 PBS 溶液和目标 DNA ($10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 40°C 反应 1 h, 再与 dUTP 反应 1 h, 0.5% BSA 封闭 1 h, 最后滴加 HRP 溶液反应 15 min, PBS (pH 7.4) 缓冲液和去离子水充分清洗电极. 该电极在 $500 \mu\text{L}$ TMB 溶液中的循环伏安曲线和电流-时间曲线如图 3 所示.

从图 3A 看出, 浸泡于 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K-ras 突变型目标 DNA 溶液的电极的循环伏安曲线出现明显的催化还原峰(A, 曲线 b), 而浸泡于 PBS 溶液中的电极的循环伏安曲线催化还原峰较小

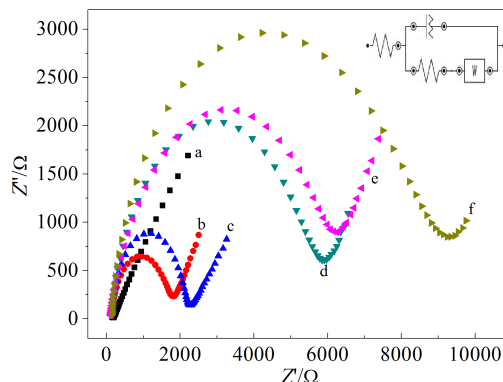


图 2 裸 Au(a)、ssDNA/Au(b)、ssDNA/MCH/Au(c)、dsDNA/MCH/Au(d)、dUTP/dsDNA/MCH/Au(e) 和 BSA/dUTP/dsDNA/MCH/Au(f) 电极的电化学交流阻抗谱图

Fig. 2 EIS of bare Au (a), ssDNA/Au (b), ssDNA/MCH/Au (c), dsDNA/MCH/Au (d), dUTP/dsDNA/MCH/Au (e) and BSA/dUTP/dsDNA/MCH/Au (f) electrodes in $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl from 0.05 Hz to 100 kHz

(A, 曲线 a). 浸泡于 K-ras 突变型目标 DNA 溶液的 ssDNA/MCH/Au 电极, 在 DNA 聚合酶 I 的作用下, 与 dUTP-biotin 聚合反应, 而后又与 avidin-HRP 反应并修饰于电极表面, 在 HRP 的催化作用下, TMB 被 H_2O_2 氧化为双偶氮联苯胺蓝色化合物, 大量的 H_2O_2 被催化氧化还原而产生了明显的电流放大信号^[10], 而浸泡于 PBS 溶液的 ssDNA/MCH/Au 电极没与目标 DNA 杂交, HRP 不能结合于电极表面, 不能催化 TMB, 故电流信号较弱.

图 3B 示出相应电极的电流-时间曲线. 浸泡于目标 DNA 溶液的 ssDNA/MCH/Au 电极在 TMB 溶液有较强的还原电流信号(2916 nA, 曲线 b), 而浸泡于 PBS 溶液电极的还原电流信号较弱(145 nA, 曲线 a), 说明 DNA 电化学传感电极已结合 HRP 催化 TMB 溶液反应.

2.3 条件优化

1) dUTP-biotin 聚合反应温度

dUTP 在电极表面的反应温度会影响 DNA 聚合酶 I 的活性, 进而影响 dUTP 在电极上与碱基 A 的结合. 如图 4 所示, 在 $25^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ 范围内, 其电流先随着温度的增加而增加. 37°C 时, 其电流值达到最大. 当反应温度继续增大时, 其电流值反而减小. 因 DNA 聚合酶 I 为蛋白质, 在 37°C 时活性最高, 超过 37°C 其活性降低, 故反应温度选取 37°C 为宜.

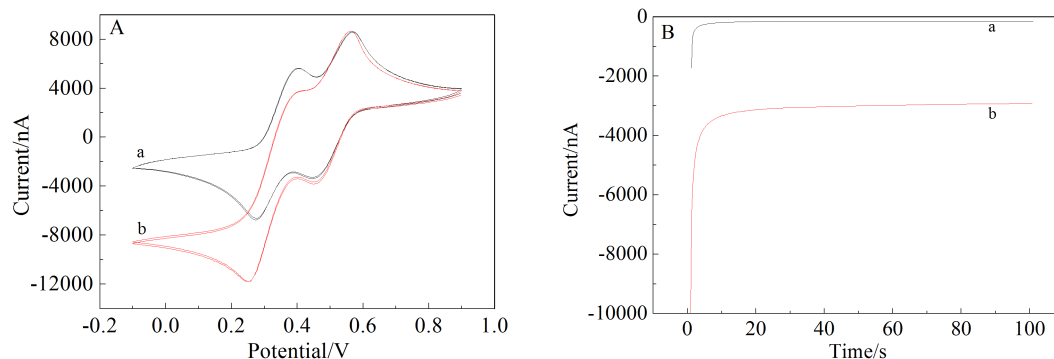


图 3 ssDNA/MCH/Au 电极分别浸泡于 PBS(a)和 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 目标 DNA 溶液(b)并与 dUTP 反应 HRP 结合后在 TMB 溶液中的循环伏安曲线(A)和电流-时间曲线(B)

Fig. 3 CV (A) and *i-t* (B) curves of ssDNA/MCH/Au electrode immersed in PBS blank solution (a) and hybridized with $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K-ras target DNA solution (b)

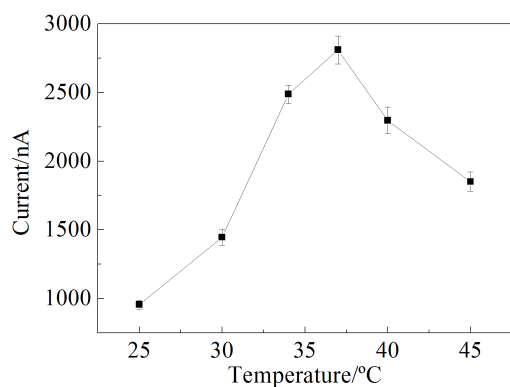


图 4 dUTP-biotin 聚合反应温度-电流曲线

反应温度/°C: 25、30、35、37、40 和 45, 目标 DNA 浓度 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 4 Impact of reaction temperature of dUTP-biotin in current Reaction temperature/°C: 25, 30, 35, 37, 40, 45; Target DNA concentration was $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; The error bars were relative standard deviation of three parallel experiments

2) dUTP-biotin 聚合反应时间

dUTP 的反应时间直接影响修饰电极表面 dUTP 的结合. 图 5 示出 dUTP-biotin 聚合反应时间-电流曲线, 初始电流值呈增加趋势, 1 h 后其电流值已无明显变化. 这时电极上与其结合的碱基 A 达到饱和, dUTP 的数量不再增加, 故 dUTP 在电极表面反应的最佳时间为 1 h.

2.5 DNA 电化学传感电极的特异性

特异性是 DNA 电化学传感器在实际应用的关键问题. 图 6 考察最佳条件下 DNA 电化学传感器的特异性. 将 ssDNA/MCH/Au 电极分别浸泡于

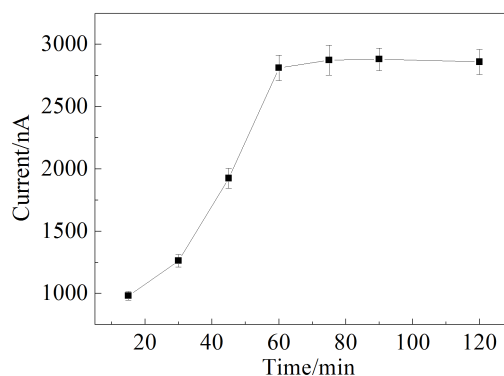


图 5 dUTP-biotin 聚合反应时间-电流曲线

反应时间 /min: 15、30、45、75、90、120; 目标 DNA 浓度 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 5 Impact of reaction time of dUTP-biotin in current Reaction time/min: 15, 30, 45, 75, 90, 120; Target DNA concentration was $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$10^{-9} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K-ras 突变型目标 DNA 溶液和野生型目标 DNA 溶液中, 40°C 反应后又与 dUTP 反应, 0.5% BSA 封闭, 最后再滴加 avidin-HRP 溶液, 用 pH 7.4 PBS 缓冲液和去离子水充分清洗电极表面, 放在 $500 \mu\text{L}$ TMB 溶液中检测其电化学信号. K-ras 突变型目标 DNA 溶液(曲线 c)的电流明显大于野生型目标 DNA 溶液(曲线 b)和 PBS 溶液(曲线 a)中的电流. 由此可见, 本文设计的 DNA 电化学传感器具有较好的特异性, 可选择性地检测 K-ras 基因点突变.

2.6 目标 DNA 线性范围

图 7 绘出最佳条件下 K-ras 突变型目标 DNA 的电流-时间曲线. 在 $1.0 \times 10^{-15} \sim 1.0 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓

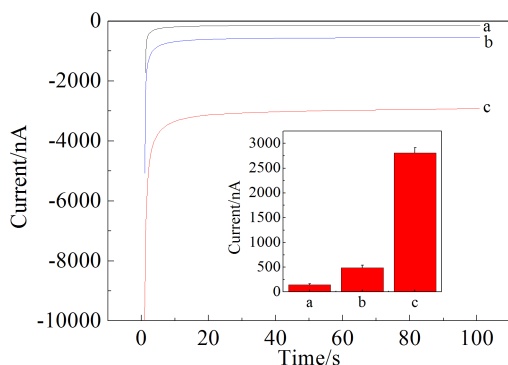


图 6 ssDNA/MCH/Au 电极与 K-ras 野生型目标 DNA (b)、突变型目标 DNA (c) 和 PBS 空白液 (a) 杂交, 与 dUTP-biotin 反应, HRP 结合后, 在 TMB 溶液中测定的电流-时间曲线图 (插图为对应电流的条形图)

Fig. 6 The *i-t* curves of ssDNA/MCH/AuE hybridized with K-ras wild DNA (b), mutant target DNA (c) and PBS blank solution (a), respectively, in TMB solution determination (inset shows the corresponding histograms of current value)

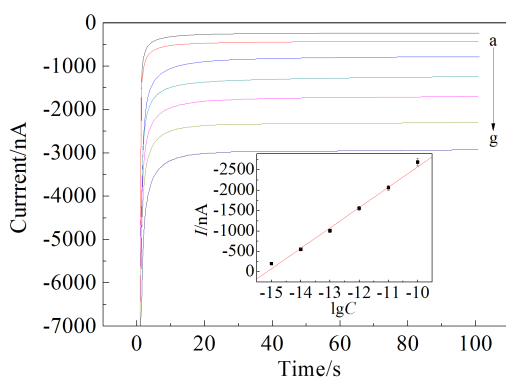


图 7 最佳条件下, 不同浓度 K-ras 突变型电流-时间曲线, 从 a → g 浓度/($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100; 插图为电流信号-目标 DNA 浓度对数的标准曲线, 误差棒为 3 次平行实验的相对标准偏差。

Fig. 7 The *i-t* curves of K-ras mutant DNA with different concentrations (from a to g: 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the TMB solution, the inset shows the linear relation between the current and the logarithm of mutant K-ras gene concentration, the error bars were relative standard deviation of three parallel experiments

度范围, 电流信号随目标 DNA 浓度对数呈较好的线性关系, 检测限 (LOD) 可达 $0.5 \times 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 本实验所构建的基于 DNA 聚合酶 I 的新型 DNA 电化学传感器对检测 K-ras 突变型基因有较高的灵

敏度. 不同浓度突变型 K-ras 基因电流信号 ($n \geq 3$) 的 RSD 小于 5.4%, 重现性较好.

3 结 论

本文快速简便地构建了 DNA 聚合酶 I 的新型 DNA 电化学传感器, 应用碱基之间严格配对 (A 与 U) 原则和 DNA 聚合酶 I 的 5'-3' 聚合酶活性, 将 dUTP-biotin 特异地结合至 K-ras 基因的突变位点, 再利用生物素-亲和素高亲和力的牢固结合, 使电极表面结合的 HRP 催化 TMB 溶液产生灵敏的电化学信号. 其检测电流值与 K-ras 突变型目标 DNA 浓度 ($1.0 \times 10^{-15} \sim 1.0 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对数值呈良好的线性关系, LOD 可达 $0.5 \times 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 该传感器具有较宽的线性范围、较低检测限和较好的特异性, 可识别 K-ras 野生型和突变型基因, 检测结果令人满意, 有望为胰腺癌早期诊断提供新方法.

参考文献 (References):

- [1] Däbritz J, Hänfler J, Preston R, et al. Detection of K-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes[J]. *British Journal of Cancer*, 2005, 92 (2): 405-412.
- [2] Uemura T, Hibi K J, Kaneko T, et al. Detection of K-ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients [J]. *Journal of Gastroenterology*, 2004, 39(1): 56-60.
- [3] Swartz M J, Hsu C C, Pawlik T M, et al. Adjuvant chemoradiotherapy after pancreatic resection for invasive carcinoma associated with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas[J]. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2010, 76(3): 839-844.
- [4] Liu L, Xia N, Liu H P, et al. Highly sensitive and label-free electrochemical detection of microRNAs based on triple signal amplification of multifunctional gold nanoparticles, enzymes and redox-cycling reaction[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 53(15): 399-405.
- [5] Cai S, Lau C W, Lu J Z. Sequence-specific detection of short-length DNA via template-dependent surface-hybridization events[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(17): 7178-7184.
- [6] Gao W C, Dong H F, Lei J P, et al. Signal amplification of streptavidin-horseradish peroxidase functionalized carbon nanotubes for amperometric detection of attomolar DNA [J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(18): 5220-5222.
- [7] Zhang P, Chu X, Xu X M, et al. Electrochemical detection of point mutation based on surface ligation reaction and biometallization[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008, 23

- (10): 1435-1441.
- [8] Fan, C, Plaxco K W, Heeger A J. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100 (16): 9134-9137.
- [9] Hu C M, Dou W C, Zhao G Y. Enzyme immunosensor based on gold nanoparticles electroposition and streptavidin-biotin system for detection of *S. pullorum* & *S. gallinarum* [J]. Electrochimica Acta, 2014, 117(20): 239-245.
- [10] Volpe G, Compagnone D, Draisci R, et al. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study[J]. Analyst, 1998, 123(6): 1303-1307.

Novel DNA Electrochemical Biosensor for K-Ras Point Mutation Detection Based on DNA Polymerase I

LIN Li-qing, ZHAO Cheng-fei, JIANG Zhou-qian, WENG Shao-huang,
XIE Xiao-lan, Lin Xin-hua*

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

Abstract: In this article, we developed a novel DNA electrochemical sensor for obtaining a current-time curve based on DNA polymerase I. The capture probes were fixed on the Au electrode by Au interacting with -SH, and then hybridized with the K-ras mutant target DNA as far as one base before the mutation site. After hybridizing the K-ras mutant or wild target DNA, the resulting assembly reacted with the dUTP-biotin in the presence of DNA polymerase I. Then avidin-HRP combined the dUTP-biotin on the electrode. The proposed electrode was applied for detection in TMB solution by electrochemical technology. The experimental results showed that the detection current of the proposed DNA electrochemical sensor is proportional to the logarithmic K-ras mutant DNA concentration (1.0×10^{-15} to 1.0×10^{-10} mol·L⁻¹). It had high sensitivity and good selectivity.

Key words: DNA polymerase I; K-ras point mutant gene; DNA electrochemical sensor; current-time curve