

研究简报

基于石墨烯化学修饰电极的适体传感器

王延平 肖迎红* 吴敏 陆天虹 杨小弟*

(江苏省新型动力电池重点实验室, 南京师范大学化学与材料科学学院, 南京 210097)

摘要 采用石墨烯(RGO)作载体,凝血酶适体(TBA)作探针,凝血酶为目标蛋白,电化学阻抗谱(EIS)为检测技术,建立了检测蛋白质的新方法。由于RGO可增大电极有效表面积并提高电极表面电子传输速率以及TBA的特异性识别能力,此方法具有较高的灵敏度和良好的选择性。采用本方法检测凝血酶的线性范围为0.3 ~ 10 fmol/L,检出限为0.26 fmol/L。本研究将RGO应用于电化学适体传感器,证实了RGO修饰电极在电化学适体传感器领域中潜在的应用价值。

关键词 石墨烯; 适体传感器; 电化学阻抗谱; 凝血酶

1 引言

蛋白质生物分子是组成和维持生命活动的重要物质,因此这类物质的分析检测具有重大意义。生物传感器是简单、快速检测生物分子的重要工具,如免疫检测中的抗体在检测蛋白质的生物传感器中广泛应用。随着体外人工进化程序的出现,提供了能分离识别各种各样目标分子的核酸适体。与抗体相比较,适体具有高特异性、高亲和力、分子量小、与目标分子结合空间位阻小、可重复利用和稳定性良好等优点。适体不仅可以与酶、生长因子等较大的蛋白质分子结合,而且也可以与金属离子、氨基酸等小分子物质结合,甚至可以与完整的病毒颗粒、细菌和细胞等结合^[1~3],在治疗与诊断方面成为与抗体竞争的对手。在适体众多的目标待测物中,蛋白质的研究是一个热点。

石墨烯(RGO)是单层碳原子紧密排列的二维纳米材料,其特殊的二维结构,使其除具有纳米效应外,还具有完美的量子隧道效应、半整数的量子霍尔效应和从不消失的电导率^[4]等一系列优异性质;其内部电子运动速率可达光速的1/300^[5],修饰于电极表面可有效促进电子转移^[6],以上这些性质使RGO成为电化学生物传感器的理想材料。目前RGO可用于检测NO₂^[7]、多巴胺^[8]、葡萄糖^[9]、蛋白质^[12,13]、细胞色素^[14]。以光学为检测信号的RGO适体传感器已有报道^[15,16],但将RGO应用于电化学适体传感器的研究鲜有报道。

本研究将RGO通过一定的方法修饰于电极表面,以高特异性分子识别物质凝血酶适体(TBA)作为探针,凝血酶为目标蛋白,利用高灵敏性的电化学阻抗谱(EIS),建立了检测蛋白质的新方法。将氧化石墨烯(GO)固定在玻碳电极(GCE)表面,利用还原反应获得RGO修饰电极。进一步通过 $\pi-\pi$ 堆积作用,或利用碳二亚胺反应^[17]结合TBA。当TBA与环境中凝血酶结合时会形成四聚体-凝血酶复合物,导致修饰电极表面交流阻抗值发生变化。本研究以氧化还原指示剂 $[\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在电极/电解液界面电子转移电阻(R_{et})发生变化作为检测信号,将RGO应用于电化学适体传感器,为蛋白疾病的诊断和临床治疗提供具有应用价值的分析方法与技术。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI660B 电化学工作站(上海 Chenhua 公司); 2100 型透射电子显微镜(日本电子公司); 数显恒

2011-07-16 收稿; 2011-09-24 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20875047)和江苏高校优势学科建设工程资助项目

* E-mail: yangxiaodi@njnu.edu.cn; yhxiao@njnu.edu.cn

温水浴锅(常州 Guahua 公司);傅里叶变换红外光谱仪(美国 Varian 公司)。

TBA 为 5'-NH₂-GGT TGG TGT GGT TGG-3',由上海柏业贸易有限公司合成;GO 为实验室自行合成;人体 α -凝血酶(Sigma 公司);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自 Sigma-Aldrich 公司;牛血清白蛋白(BSA)和胰蛋白酶(TYP)购自上海瑞鼎化学技术有限公司;其它化学试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水(18.25 M Ω ·cm)。

2.2 实验方法

2.2.1 GO 电极的制备 GCE 依次用 0.3 和 0.05 μm 的 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 抛光至呈镜面,依次用水和无水乙醇清洗、超声 2 min,最后用水冲洗干净,室温下干燥。将 2 μL 壳聚糖(CS)和 GO 混合溶液(1:4, V/V, 0.6 g/L GO)滴涂在 GCE 表面,室温干燥 6 h,得 GO 电极。

2.2.2 RGO 电极的制备 GO 修饰电极浸于 85% 的水合肼中,在恒温 60 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 6 h,停止加热后,继续浸泡 18 h,取出电极后依次用水、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗干净,得 RGO 电极。

2.2.3 TBA 在 RGO 电极上的固定 将 RGO 电极于 1.5 V 电位下活化 5 min,然后将其浸于 0.5 mL 含有 10 mmol/L NHS 和 10 mmol/L EDC 的 0.1 mol/L PBS 中 16 h,电极室温晾干后,用水多次冲洗,再将电极浸于 1.0 mL 含有 1.0 $\mu\text{mol/L}$ TBA、0.1 mol/L NaCl 和 4 mmol/L EDTA 的 PBS 中 24 h。取出电极后用水冲洗,以除去电极表面未结合的 TBA,得 TBA 修饰的 RGO 电极。

2.2.4 电化学检测 将 TBA 修饰的 RGO 电极浸入含不同浓度凝血酶的 1.0 mL 0.1 mol/L PBS 中,于室温下作用 20 min 后,用 PBS 和水先后冲洗电极,以除去未发生反应的凝血酶,然后置于含 10 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 和 0.1 mol/L KCl 的 0.1 mol/L PBS 电解液中进行 EIS 检测。

3 结果与讨论

3.1 实验原理

实验原理图参见图 1。在处理好的 GCE 表面自组装一层 GO 膜,以 CS 为粘合剂,室温晾干后,得 GO 电极。将它浸于水合肼中还原,获得 RGO 电极。再将 RGO 电极功能化,使 RGO 的表面形成 NHS 酯键,通过 NHS 酯与 $-\text{NH}_2$ 之间的酰胺反应和 RGO 与 TBA 之间的 $\pi-\pi$ 堆积作用结合 $-\text{NH}_2$ 标记的 TBA,得到 TBA 修饰的 RGO 电极,最后用 EIS 中 R_{et} 的变化对凝血酶进行定量检测。

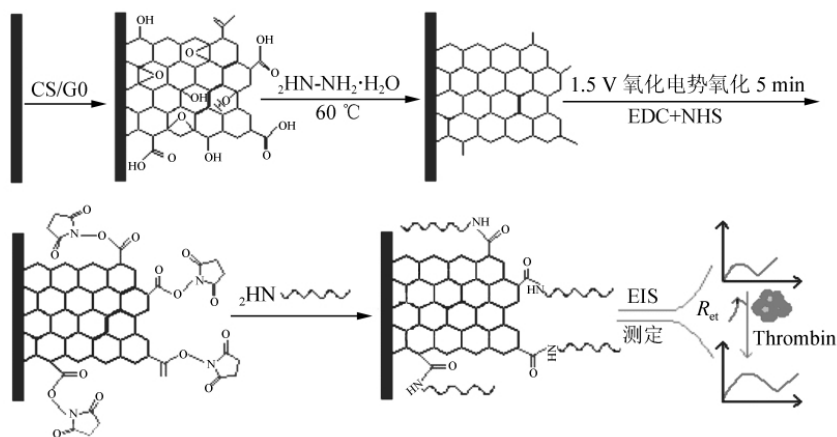


图 1 石墨烯适体传感器的构建和性能示意图

Fig. 1 Schematic diagram of construction and performance of graphene (RGO)-based aptasensor

3.2 电镜表征

图 2 为 GO 电极的透射电镜(TEM)图,电极表面有皱褶的片状结构,能明显观察到双层甚至单层的 GO,说明 GO 被修饰在 GCE 上。进一步还原 GO 电极获得 RGO 电极,对 RGO 电极进行扫描电镜(SEM)测试,并与文献[8]中的电极 SEM 图对照,结果基本一致。

3.3 EIS 表征

不同修饰电极的电化学阻抗谱图如图3所示,半圆曲线的半径越大,修饰电极的 R_{et} 越大。由图3可见,裸电极的 R_{et} 为2826 Ω (图3a);修饰GO后Nyquist图显示为一条直线(图3b),这是由于GO的膜电阻很大,电子的迁移过程受到极大的抑制。而还原后得到的RGO修饰电极, R_{et} 为658 Ω (图3c),可解释为还原反应可去除GO的含氧基团^[19],如羧基和羟基,使RGO具有良好的导电性。将TBA修饰到RGO改性电极上后, R_{et} 显著增长到1308 Ω (图3d),有机分子的存在使得电极 R_{et} 大幅增加,该现象说明通过这种方法将TBA有效固定到RGO改性电极上。

3.4 红外光谱表征

为进一步验证TBA在RGO电极上的固定,用红外光谱分别对TBA、RGO电极和TBA修饰的RGO电极进行表征。由图4可见,与RGO电极(图4b)相比,TBA修饰的RGO电极(图4c)上出现一些特征吸收峰:3360 cm^{-1} 处为TBA中N-H和O-H键的伸缩振动峰,同时在1648和1587 cm^{-1} 处的振动为—CO—NH—的特征振动。在1289 cm^{-1} 处为—CH₂的剪式弯曲振动。在1199和1128 cm^{-1} 处的两个峰为P=O特征吸收峰,两个峰强度的增加是由于磷酸盐溶剂中含有—P=O。967 cm^{-1} 处的强振动为C—O—C的伸缩振动。这些吸收峰和TBA固有的吸收峰(图4a)相类似,说明TBA已经被有效固定在RGO修饰电极上。而且,TBA修饰的RGO电极的特征吸收峰较TBA的吸收峰位置向低频方向移动,这是由于TBA与RGO之间的 π - π 堆积使体系的电子云密度平均化的结果。

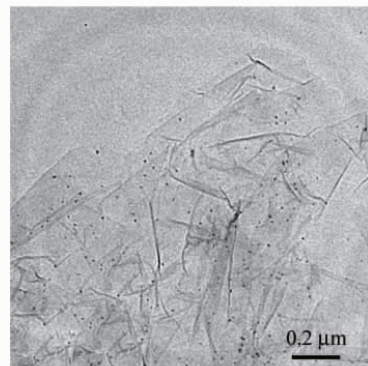


图2 GO电极的TEM图

Fig. 2 TEM of graphene oxide (GO) electrode

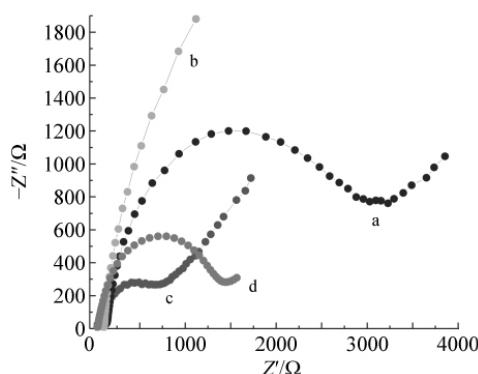


图3 不同电极的交流阻抗图

Fig. 3 Nyquist plot of Faradic impedance

(a) 裸电极, (b) 氧化石墨烯电极, (c) 石墨烯电极, (d) 适体修饰的石墨烯电极。(a) bare GCE, (b) GO, (c) reduced graphene oxide (RGO) and (d) throb-in-binding aptamer (TBA) modified RGO electrodes).

3.5 凝血酶的定量检测

将制备好TBA修饰的RGO电极对不同浓度的凝血酶进行了检测,结果如图5A所示。随着凝血酶浓度的增加, R_{et} 值逐渐增大,这是因为随着凝血酶浓度增大,电极表面就会有越多的TBA与之结合,导致 $[\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 电子传递的空间位阻增大,从而 R_{et} 增大,所对应的 R_{et} 与凝血酶浓度的关系曲线如图5B所示。电极 R_{et} 随凝血酶浓度的增加而增大,当凝血酶浓度增大到一定值时, R_{et} 值达到平台。插图为线性范围内 R_{et} 和凝血酶浓度的关系曲线,其浓度线性范围为0.3~10 fmol/L,回归方程为 $R_{et} = 3.875C + 296.1$,线性相关系数 $R^2 = 0.9932$ 。检出限为0.26 fmol/L。比文献^[6,17]所报道的基于石墨烯的荧光共振能量转移适体传感器或基于碳纳米管的阻抗适体传感器的检出限低。

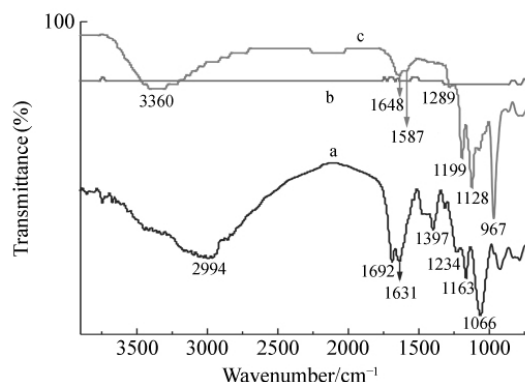


图4 (a) 适体, (b) 石墨烯电极和 (c) 适体修饰的石墨烯电极的红外光谱图

Fig. 4 Attenuated total reflection (ATR)-FTIR spectra of (a) TBA, (b) RGO electrode and (c) TBA modified RGO electrode

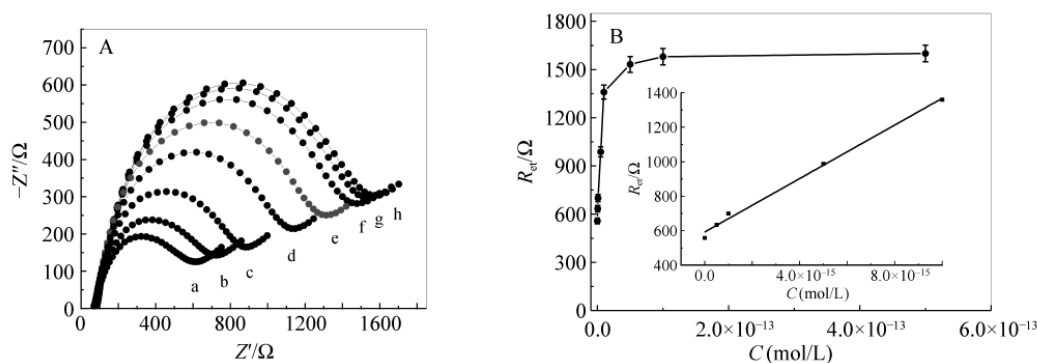


图 5 适体传感器在不同浓度凝血酶中的交流阻抗图 (A) 及其线性关系图 (B)

Fig. 5 (A) Nyquist plot of Faradic impedance for RGO-based aptasensor in the presence of (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, (d) 5, (e) 10, (f) 50, (g) 100 and (h) 500 fmol/L α -thrombin in 0.10 mol/L PBS containing 10 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and 0.1 mol/L KCl (pH 7.4). (B) Relationship between electron-transfer resistance (R_{et}) and thrombin concentration. Inset: linear relationship between R_{et} and thrombin concentration

3.6 传感器的选择性

为证实所研究的电化学适体传感器对凝血酶蛋白的特异性识别能力,选择了可保护蛋白活性的 BSA、与凝血酶同属丝氨酸蛋白酶家族的 TYP 作为对照蛋白进行测定,结果如图 6 所示。当传感器与 BSA、TYP 作用后, R_{et} 基本保持不变;而与含凝血酶的混合溶液作用后, R_{et} 显著增大,并且 R_{et} 随着所含凝血酶浓度的增加进一步增大。表明 R_{et} 的增长仅取决于溶液中凝血酶浓度的大小而与干扰蛋白质无关,证明此适体传感器对凝血酶的检测具有高度的选择性。

综上所述,基于先进碳材料石墨烯的阻抗型适体传感器具有无须标记、灵敏度高、选择性好、检出限低等优异性能。如果选用其它合适的适体,此传感器有望拓展至其它生物分子的检测。

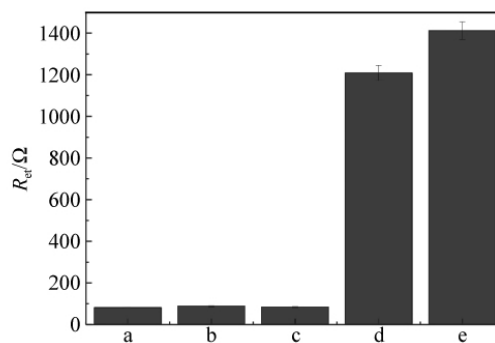


图 6 适体传感器的特异性分析

Fig. 6 Specificity analysis of aptasensor tested in (a) blank and in the presence of (b) 25 nmol/L BSA; (c) 25 nmol/L trypsin (TYP); (d) 25 nmol/L BSA, 25 nmol/L TYP and 5 fmol/L thrombin and (e) 25 nmol/L BSA, 25 nmol/L TYP and 50 fmol/L thrombin

References

- Düzgün A, Maroto A, Mairal T, O'Sullivan C, Rius F X. *Analyst*, **2010**, 135(5): 1037 ~ 1041
- Degefa T H, Kwak J. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 613(2): 163 ~ 168
- Rajendran M, Ellington A D. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390(4): 1067 ~ 1075
- Vianini E, Palumbo M, Gatto B. *Bioor. Med. Chem.*, **2001**, 9(10): 2543 ~ 2548
- Tang J J, Yu T, Guo L, Xie J W, Shao N S, He Z K. *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22(11): 2456 ~ 2463
- Chen D, Tang L H, Li J H. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(8): 3157 ~ 3180
- Kane C L. *Nature*, **2005**, 438: 168 ~ 170
- Zhou M, Zhai Y M, Dong S J. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(14): 5603 ~ 5613
- Lu G H, Ocola L E, Chen J H. *Appl. Phys. Lett.*, **2009**, 94(8): 083111 ~ 083113
- Wang Y, Li Y M, Tang L H, Lu J, Li J H. *Electrochem. Commun.*, **2009**, 11(4): 889 ~ 892
- Shan C S, Yang H F, Song J F, Han D X, Ivaska A, Niu L. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(6): 2378 ~ 2382
- Ohno Y, Maehashi K, Yamashiro Y, Matsumoto K. *Nano Lett.*, **2009**, 9(9): 3318 ~ 3322
- Wang Y, Li Z H, Wang J, Li J H, Lin Y H. *Trends Biotechnol.*, **2011**, 29(5): 205 ~ 212

- 14 Wu J F, Xu M Q, Zhao G C. *Electrochem. Commun.*, **2010**, 12(1): 175 ~ 177
- 15 Lu C H, Yang H H, Zhu C L, Chen X, Chen G N. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48(26): 4785 ~ 4787
- 16 Chang H X, Tang L H, Wang Y, Jiang J H, Li J H. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(6): 2341 ~ 2346
- 17 Kara P, Escosura-Muñiz A de la, Costa M Maltez-da, Guix M, Ozsoz M, Merkoçi A. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26(4): 1715 ~ 1718
- 18 Kang X H, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay I A, Lin Y H. *Talanta*, **2010**, 81(3): 754 ~ 759
- 19 Robinson J T, Perkins F K, Snow E S, Wei Z Q, Sheehan P E. *Nano Lett.*, **2008**, 8(10): 3137 ~ 3140

Aptasensor Based on Graphene Chemically Modified Electrode

WANG Yan-Ping, XIAO Ying-Hong^{*}, WU Min, LU Tian-Hong, YANG Xiao-Di^{*}

(Jiangsu Key Laboratory of new power batteries, College of Chemistry and Materials Science,
Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract By using graphene(RGO) as supporter, molecular recognition substance TBA as probe, thrombin as objective protein, electrochemical impedance spectroscopy(EIS) as determination technique, a method for the determination of proteins was developed. Because RGO can improve effective surface area of electrodes and accelerate electron transfer rate at electrode/electrolyte interface as well as TBA has the molecular recognition ability with the high specificity, this determination method possesses the high sensitivity and good specificity. In the linear range from 0.3 to 10 fmol/L for thrombin determination, the detection limit is 0.26 fmol/L. In this study, RGO was applied to the electrochemical aptasensor for the first time, demonstrating that RGO-modified electrode has the great potential for the application in the electrochemical aptasensor.

Keywords Graphene; Aptasensor; Electrochemical impedance spectroscopy; Thrombin

(Received 16 July 2011; accepted 24 September 2011)

2012 年全国有机质谱学术会议 (第一轮通知)

由中国分析测试协会主办,清华大学分析中心承办的 2012 年全国有机质谱学术会议,将于 2012 年 10 月 11 ~ 16 日在云南省西双版纳召开。会议设有大会报告、专题报告、质谱公司技术新发展和应用报告、优秀论文评选。热诚邀请广大学者、相关单位代表及相关仪器厂商参会。

本届学术会论文将在《分析实验室》增刊刊登,有意参会代表请在网上在线投稿、注册。有关会议注册、投稿要求、论文格式等,请登录会议网址查阅: <http://www.ms-china.org/>

一、会议主题和征文内容

(1) 有机质谱在生命科学、生物技术中的应用; (2) 有机质谱在药物分析研究中的应用; (3) 有机质谱在环境分析研究中的应用; (4) 有机质谱在食品安全分析研究中的应用; (5) 有机质谱在石油化工分析研究中的应用; (6) 有机质谱在疾病预防控制中的应用; (7) 有机质谱在法庭科学中的应用; (8) 有机质谱基础与新技术研究。

二、来稿要求:

凡未在刊物上发表和未在学术会议上宣读过的反映近期有机质谱基础研究,新技术、新方法的发展,以及在各个领域的分析应用论文或综述均可投稿。论文请务必提供稿件联系人电话、通讯地址和 Email,并于 2012 年 6 月 30 日前在线投稿(网址: <http://www.ms-china.org/>)

三、联系人:

梁建华,电话: 010 - 62771139, Email: jhliang@mail.tsinghua.edu.cn

张炜奋,电话: 010 - 62792607, Email: zhangweifen@mail.tsinghua.edu.cn

张颖,电话: 010 - 59202133, Email: zhangy.bjhy@sinopec.com

有关会议的详细介绍、组织机构、征文格式、日程安排、宾馆住宿等相关信息,请登录会议网址(<http://www.ms-china.org/>) 查询。敬请关注!