DOI:10.19789/j.1004-9398.2015.06.010

石墨烯纳米复合材料在电化学免疫传感器中的应用

袁征南 马占芳* 黄潇楠*
(首都师范大学化学系,北京 100048)

摘 要

石墨烯纳米复合材料由于其优异的电化学性质和生物相容性被广泛的应用于制备超灵敏的电化学免疫传感器. 通过与其他纳米材料复合,石墨烯的良好导电性等优点被放大,而易聚集、堆叠、生物相容性较差等缺点被克服. 因而,对石墨烯的改性工作成为当下研究的热点. 本文综述了石墨烯纳米复合材料在构建电化学免疫传感器中应用,包括石墨烯与金属、金属氧化物、高分子聚合物等的纳米复合材料,并对石墨烯纳米复合材料在电化学免疫传感领域的发展方向和前景做出了展望.

关键词: 石墨烯,复合,纳米材料,电化学,免疫传感器.
中图分类号: TP212, TB383

电化学免疫传感器是将电化学传感技术和免疫技术相结合的一种新型免疫传感器,其既具有电化学传感器的高灵敏度、低成本的特点,又具有免疫技术的高选择性、强专一性、和低检出限等特点[1,2]. 因此,在当下的临床检测、生命分析等领域都得到了广泛的应用. 电化学免疫传感器由免疫识别元件、信号转换元件以及信号检测元件构成,其基于抗原-抗体特异性结合前后产生电化学信号的变化来实现对癌症标记物的监测. 根据输出电化学信号的不同,电化学免疫传感器可分为电流型、电导型、电容型及电位型传感器[3-6]. 目前,电流型免疫传感器的研究工作进展得最为深入.

当下对电化学免疫传感体系的研究内容主要围绕三个目标展开: 第一,有效地固定免疫识别分子从而优化免疫识别元件的识别效果. 第二,采用新颖方式标记免疫分子或利用新型功能材料构建免疫探针完成信号转化过程. 第三,放大输出电信号,完成对目标生物分子的超灵敏检测. 传统的单组分材料由于性能单一而无法构建满足以上三个目标的优良电化学免疫传感界面. 因此,依托新型复合功能材料构建性能优良的电化学免疫传感器成为当下研究的热点.

收稿日期: 2015-03-25
* 通讯作者

单质石墨烯由于具有分子平面大共轭结构而具有优良的导电性,然而单一组分石墨烯存在卷曲、团聚、层间堆积以及没有特征电信号等现象[7,8]. 这些性质都不利于实现电化学传感界面有效固定生物识别分子,信号转换以及输出信号放大等目标. 通过复合纳米材料对石墨烯进行改性是弥补这一缺陷的有效方法. 纳米材料由于具有小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应而具有独特的物理化学性质. 石墨烯纳米复合材料保留了单质石墨烯优良的导电性和纳米材料的多功能性,同时由于二者的协同作用使该复合体系的电化学性能及生物相容性得到了进一步提升[9-11]. 应用该新型复合功能材料构筑的电化学免疫传感界面可以有序地固定大量免疫分子,迅速将生物化学信号转化为电信号,且利用纳米材料的特殊光电性质可完成对输出信号的放大进而得到灵敏度高,检测范围宽、响应时间短的电化学免疫传感器[12-14]. 由于纳米材料形貌、性能的多样化,石墨烯类物质大量的边界点、结构缺陷、以及丰富的功能性基团,该复合材料体系的构建和应用具有广阔的研究前景和较高的研究价值.

本文基于电化学传感及免疫技术的基础上,综述了石墨烯构筑的纳米复合材料在构建电化学免疫传感器中应用.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 石墨烯-贵金属纳米粒子复合材料

贵金属如金(Au)、铂(Pt)、钯(Pd)的纳米颗粒普遍具有较大的比表面积,优良的导电性、反应性和生物相容性,其表面丰富的活性位点可固定大量的生物识别分子[15,16].同时,贵金属纳米粒子还具有特殊的电催化性能,通过催化反应可进一步增强输出电信号从而提高传感器的灵敏度[17,18].石墨烯-贵金属纳米粒子复合材料应用于修饰电化学传感界面都具有相较于单一组分材料更好的性能.

金纳米粒子(AuNPs)是金的纳米颗粒,在水溶液中以胶体金的形式存在,根据还原剂种类或者浓度的不同可以制备不同粒径的 AuNPs. AuNPs 可与抗体或酶上的巯基、氨基形成较强共价键或静电吸附将其有效固定,同时其低生物毒性较好地保护了生物分子的活性. 此外,AuNPs 还具有优良的电子传递能力,可以辅助石墨烯将化学信号迅速转换为电信号. 我们课题组用 AuNPs 和离子液体功能化的石墨烯复合制成了一种新型的纳米复合材料. AuNPs 通过离子液体中丰富的氨基可大量固定于石墨烯上,AuNPS 表面的活性位点可固定大量抗体[19]. 同时,AuNPs 作为一种电子媒介体可以加快电子在蛋白质和电极表面之间的传递速率,最终使该传感器的检出限低至 1×10^{-7} ng/mL,检测范围在 1×10^{-6} 至 100 ng/mL 之间. 袁若课题组也利用 AuNPs 和石墨烯的复合材料构建了一种超灵敏的免疫传感器. 该工作先在电极表面修饰了一层壳聚糖/二茂铁/二氧化钛纳米颗粒的复合材料,然后通过活泼的氨基连接石墨烯/AuNPs 的复合材料,最后吸附抗体完成对抗原的非标记超灵敏检测. 该工作指出,掺杂 AuNPs 的复合材料,其稳定性、生物相容性和电子转移速率要明显优于石墨烯或 AuNPs 的单一组分材料[20].

贵金属铂纳米粒子(PtNPs)和石墨烯的复合材料在构筑免疫传感器方面也有广泛的应用. 羧基功能化的 PtNPs 通过丙二醇甲醚醋酸酯(PMA)和单层石墨烯连接,并在其表面均匀分布. 纳米粒子较大的比表面积可以固定较多的生物分子,同时良好的生物相容性可以保持抗体分子的活性. 该电化学传感界面的检出限可低至 4.2 pg/mL,实现目标分子超灵敏检测[21].

2 石墨烯-金属氧化物纳米粒子复合材料

金属氧化物如氧化锌,二氧化钛,四氧化三铁的纳米颗粒生物毒性较低,且都具有独特的物理化学性质[22-25]. 石墨烯-金属氧化物复合体系普遍具有较好的电化学催化活性,用其可实现对电化学免疫传感界面增敏的目的[26-29].

袁若课题组利用氧化锌纳米粒子(ZnONPs)制备出了一种有效放大信号的免疫探针,将输出的电信号进一步转化为了光信号,达到对癌胚抗体(anti-CEA)的灵敏检测. 该工作通过戊二醛将 ZnONPs 与石墨烯连结复合制成复合修饰材料. 在检测过程中,通过 ZnONPs 催化过氧化氢分解产生活泼的中间体自由基进而发光,根据光信号的强弱来检测样品中 CEA 浓度的目的[30]. 相比传统的过氧化氢传感器 ZnONPs 优良的催化能力,使该传感器的相对误差小于 5.10%,表明其具有较好的精确度.

Huang 等通过水热法合成的二氧化钛和石墨烯的纳米复合材料,其可对多巴胺类物质的氧化反应进行电催化,从而放大输出信号提高检测的灵敏度[31]. 结果表明,该材料修饰的免疫传感器对多巴胺类物质检测的检测范围为 0.1 ~ 300 ng/mL,检出限仅为 0.03 ng/mL.

3 石墨烯-高分子复合材料

高分子材料是以高分子化合物为基础的材料. 由于其分子质量较大,化学性质稳定,成膜性好常用于和石墨烯复合构建电化学传感界面[32-35].

壳聚糖(CS)是由自然界广泛存在的壳质(chitin)经过脱乙酰作用得到的一种高分子材料,化学名称为聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基-B-D 葡萄糖. 这种天然高分子由于其生物相容性、安全性、微生物降解性、成膜性等优良性能被各行各业广泛关注. Mao 等将壳聚糖(CS)、亚甲蓝(MB)、石墨烯(GS)制成纳米复合材料用于修饰检测前列腺特异抗原(PSA)的免疫传感器[36]. 该研究指出,特异性抗体(Abs)容易在电极基底无序地固定,这样会降低 Abs 与目标分子之间的特异性识别,从而影响检测效果. 高分子聚合物壳聚糖作为一种分散剂和成膜剂可以使亚甲蓝-石墨烯复合材料趋于均一和稳定,抗体能够在其表面均一有序地固定. 同时,壳聚糖带有丰富的氨基,可以固定较多的抗体以增加其检测范围. 该免

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

疫传感器对 PSA 响应的浓度范围为 0.05 ~ 5.00 ng/mL、最低检出限为 13 pg/mL.

Nafion(全氟代磺酸酯)作为一种高分子聚合物近年来也备受关注. Nafion 内部有憎水基和亲水基. 若在水溶剂中,亲水基上会聚集着极化了的溶剂分子,它在 Nafion 中可以起到阳离子交换的作用. 同时,Nafion 的化学稳定性十分优良,耐热性,成膜性较好,可以固定大量电活性物质[37]. Sun 等将 Nafion 和石墨烯制成复合材料滴涂在电极表面修饰为基底. Nafion 使该免疫传感器具有较好的稳定性: 在 4 ℃的条件下保存 20 d 后,检测峰电流仅降低了 3.05%.

聚苯胺(PANI)作为一种导电高分子在电子工业、信息工程等各个领域都有所应用. Li 等就基于石墨烯 - 聚苯胺纳米复合材料制备出了一种检测雌二醇含量的标记型电化学免疫传感器[38]. 以石墨烯 - 聚苯胺复合材料为基底修饰电极可以提高电极的电化学活性和稳定性,同时,由于两者的协同作用使该传感器的峰电流值显著提高,检出限为 0.02 ng/mL,检测范围为 0.04 ~ 7.0 ng/mL. 同时,该传感器在重复性方面也有较好的表现: 在用 5 根电极进行重复实验中,对同一浓度样品检测结果的标准偏差为 3.5%.

4　石墨烯 - 染料分子复合材料

染料是能使其他材料着色的一种物质. 很多染料分子都含有氧化还原基团,因此表现出良好的电化学活性[39]. 例如,普鲁士蓝(铁氰化物)类化合物,二茂铁及其衍生物、硫瑾等.

Wei 等将还原后的氧化石墨烯与硫瑾经过搅拌混合,离心、水洗等步骤制成具有管状形貌的纳米复合材料[40]. 其在磷酸缓冲溶液体系内中可以产生特征电化学信号峰,通过监测传感器界面抗体 - 抗原特异性识别后电信号的变化可得到未知体系中抗原的浓度. 我组也曾报道过一种室温下一步法合成氧化石墨烯 - 硫堇 - 金(GO-Thi-Au)纳米复合材料的方法,染料分子硫瑾通过 π - π 作用力和静电作用力与氧化石墨烯表面发生强烈反应形成了稳定的交联,将该新型纳米材料滴涂于电极表面形成稳定薄膜,并通过吸附 AuNPs 从而连接 anti-CEA[41]. 该传感器表现出对 CEA 的超灵敏响应,其检测范围及检出限分别为 0.05 ~ 2.00 ng/mL 和 5.77 pg/mL.

亚甲蓝作为一种生物染料分子,由于其氧化态和还原态的颜色不同,故经常作为氧化还原滴定的指示剂. 有研究指出,亚甲蓝 - 石墨烯的纳米复合材料在电化学表现和导电性方面要明显优于单一组分材料[36]. 两者形成的纳米复合材料可构建性能稳定的电化学传感界面.

5　结论与展望

石墨烯纳米材料制成的电化学传感器在免疫检测中展现了优异的灵敏度和选择性. 通过石墨烯与贵金属纳米颗粒、金属氧化物纳米颗粒等无机材料的复合,或者与高分子聚合物、染料分子等有机材料的复合,提高了传感器灵敏度,以及检测限,增强其在电化学领域应用的功能性.

然而,对石墨烯纳米复合材料的研究依旧处于较为基础的阶段,未来还需要继续拓展这种复合材料在电化学免疫检测中的应用. 首先,石墨烯作为当下材料学领域的明星,对其的改性研究依然具有很重要的价值. 同时,将免疫传感器推向大规模生产和应用,还应该简化其制备工序,优化检测重复性等. 这些研究可以使我们更深入的了解石墨烯纳米复合材料的电化学性质,也可以将电分析技术应用于医学检测,重大疾病的早期诊断等领域,从而实现学科之间的融合创新.

参　考　文　献

[1] Zhang L, Yuan R, Huang X, et al. Potentiometric immunosensor based on antiserum of Japanese B encephalitis immobilized in nano-Au/polymerized o-phenylenediamine film [J]. Electrochem Commun, 2004, 6: 1222 - 1226.

[2] Lad U, Khokhar S, Kale G. Electrochemical creatinine biosensors [J]. Anal Chem, 2008, 80: 7910 - 7917.

[3] Pumera M, Snchez S, Ichinose I, et al. Electrochemical nanobiosensors [J]. Sens Actuators B, 2007, 123: 1195.

[4] Snchez S, Roldn M, Prez S, et al. Toward a fast, easy, and versatile immobilization of biomolecules into carbon nanotube/polysulfone-based biosensors for the detection of hCG hormone [J]. Anal Chem, 2008, 80: 6508

[5] Yang H C, Yuan R, Chai Y Q, et al. Electrochemical immunosensor for human chorionic gonadotropin based on horseradish peroxidase-functionalized Prussian blue-carbon nanotubes/gold nanocomposites as labels for signal

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

amplification [J]. Electrochim Acta, 2011, 56: 1973.
[6] Zhang H, Zhao Q, Li X, et al. Ultrasensitive assays for proteins [J]. Analyst, 2007, 132: 724 – 737.
[7] Matthew J Allen, Vincent C Tung, Richard B Kaner. Honeycomb carbon: a review of graphene [J]. Chem Rev, 2010, 110: 132 – 145.
[8] Kauffman C A, Malani A N, Easley C, et al. The rise of graphene [J]. Nat Mater, 2007, 6: 183 – 191.
[9] Wu J F, Xu M Q, Zhao G C. Graphene-based modified electrode for the direct electron transfer of Cytochrome c and biosensing [J]. Electrochem Commun, 2010, 12: 175 – 177.
[10] Lin W J, Liao C S, Zhang J H, et al. Graphene modified basal and edge plane pyrolytic graphite electrodes for electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide and β-nicotinamide adenine dinucleotide [J]. Electrochem Commun, 2009, 11: 2153 – 2156.
[11] Liu C, Alwarappan S, Chen Z F, et al. Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets [J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25: 1829 – 1833.
[12] Shan C S, Yang H F, Song J F, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on grapheme [J]. Anal Chem, 2009, 81: 2378 – 2382.
[13] Wang Y, Lu J, Tang L H, et al. Graphene oxide amplified electrogenerated chemiluminescence of quantum dots and its selective sensing for glutathione from thiol-containing compounds [J]. Anal Chem, 2009, 81: 9710 – 9715.
[14] Babya T T, Aravinda S S J, Arockiadossa T, et al. Metal decorated graphene nanosheets as immobilization matrix for amperometric glucose biosensor [J]. Sens Actuators B: Chem, 2010, 145: 71 – 77.
[15] Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity [J]. Chem Soc Rev, 2009, 38: 1759 – 1782.
[16] Perez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzan L M, et al. Gold nanorods: synthesis, characterization and applications [J]. Coord Chem Rev, 2005, 249: 1870 – 1901.
[17] Penn S G, He L, Natan M J. Nanoparticles for bioanalysis [J]. Curr Opin Chem Biol, 2003, 7: 609 – 615.
[18] Lu G H, Ocola L E, Chen J H. Gas detection using low-temperature reduced graphene oxide sheets [J]. Appl Phys Lett, 2009, 94: 83111.
[19] Liu N, Chen X, Ma Z F. Ionic liquid functionalized graphene/Au nanocompositesand its application for electrochemical immunosensor [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 48: 33 – 38.
[20] Han J, Zhuo Y, Chai Y Q, et al. Highly conducting gold nanoparticles-graphene nanohybrid films forultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen [J]. Talanta, 2011, 85: 130 – 135.
[21] Shobhita Singal, Avanish K Srivastava, Ashok M Biradar, et al. Pt nanoparticles-chemical vapor deposited graphene composite based immunosensor for the detection of human cardiac troponin I [J]. Sensors and Actuators B, 2014, 205: 363 – 370.
[22] Wang J, Xu M Z, Zhao R R, et al. A highly sensitive H_2O_2 sensor based on zinc oxide nanorod arrays film sensing interface [J]. Analyst, 2010, 135: 1992 – 1996.
[23] Solanki P R, Kaushik A, Ansari A A, et al. Appl Phys Lett, 2009, 94: 143901.
[24] Khan R, Kaushik A, Solanki P R, et al. Anal Chim Acta, 2009, 616: 207 – 213.
[25] Bai H P, Lu X X, Yang G M, et al. Hydrogen peroxide biosensor based on electrodeposition of zinc oxide nanoflowers onto carbon nanotubes film electrode [J]. Chin Chem Lett, 2008, 19: 314 – 318.
[26] Luo Y, Liu H, Rui Q, Tian Y. Detection of extracellular H_2O_2 released from human liver cancer cells based on TiO_2 nanoneedles with enhanced electron Transfer of cytochrome c [J]. Anal Chem, 2009, 81: 3035 – 3041.
[27] Sasha Stankovich, Dmitriy A Dikin, Geoffrey H B Dommett, et al. Graphene-based composite materials [J]. Nature, 2006, 442: 282 – 286.
[28] Chen D, Tang L, Li J. Graphene-based materials in electrochemistr [J]. Chem Soc Rev, 2010, 39: 3157 – 3180.
[29] Pumera M. Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry [J]. Chem Soc Rev, 2010, 39: 4146 – 4157.
[30] Cheng Y F, Yuan R, Chai Y Q, et al. Highly sensitive luminol electrochemiluminescence immunosensor based on ZnO nanoparticles and glucose oxidase decorated graphene for cancerbiomarker detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 745: 137 – 142.
[31] Huang K J, Li J, Wu Y Y, et al. Amperometric immunobiosensor for α -fetoprotein using Au nanoparticles/chitosan/

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

TiO_2-graphene composite based platform [J]. Bioelectrochemistry, 2013, 90: 18 - 23

[32] Pauliukaite R, Ghica M E, Fatibello-Filho O, Brett C M A. Electrochemical impedance studies of chitosan-modified electrodes for application in electrochemical sensors and biosensors [J]. Electrochim Acta, 2010, 55: 6239.

[33] Zhang Y C. Electro-induced covalent cross-linking of chitosan and formation of chitosan hydrogel films: its application as an enzyme immobilization matrix for use in a phenol sensor [J]. Anal Chem, 2010, 82: 5275.

[34] Zhuo Y, Yuan R, Chai Y Q, et al. An amperometric immunosensor based on immobilization of hepatitis B surface antibody on gold electrode modified gold nanoparticles and horseradish peroxidase [J]. Anal Chim Acta, 2005, 548: 205.

[35] Yang B C, Wang F, Guo S J, et al. Electrochemical behavior and voltammetric determination of 2, 4, 6-triaminopyrimidine at glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes/nafion [J]. Anal Sci, 2010, 26: 1071.

[36] Mao K X, Wu D, Li Y, et al. Label-free electrochemical immunosensor based on graphene/methylene bluenanocomposite [J]. Analytical Biochemistry, 2012, 422: 22 - 27.

[37] Sun T, Wang L, Li N, et al. Label-free electrochemical aptasensor for thrombin detection based on the nafion@ graphene as platform [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2011, 34: 1081 - 1085

[38] Li J, Liu S, Yu J H, et al. Electrochemical immunosensor based on graphene-polyanilinecomposites and carboxylated graphene oxide for estradiol detection [J]. Sensors and Actuators B, 2013, 188: 99 - 105.

[39] Wang Z J, Li M Y, Zhang Y J, et al. Thionine-interlinked multi-walled carbon nanotube/gold nanoparticle composites [J]. Carbon, 2007, 45: 2111 - 2115.

[40] Wei Q, Mao K X, Wu D, et al. A novel label-free electrochemical immunosensor based on graphene and thionine nanocomposite [J]. Sensors and Actuators B, 2010, 149: 314 - 318.

[41] Han J M, Ma J, Ma Z F. One-step synthesis of graphene oxide-thionine-Au nanocomposites and its application for electrochemical immunosensing [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 47: 243 - 247.

Application of Graphene Nanocomposites in Electrochemical Immunosensors

Yuan Zhengnan　Ma Zhanfang*　Huang Xiaonan*

(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing　100048)

Abstract

The graphene nanocomposites are widely used for fabrication of ultrasensitive electrochemical immunosensors for its remarkable electrochemical properties and biocompatibility. The graphene's good conductivity is be amplified, respectively, the bad biocompatibility, the easily aggregation are be narrowed. This paper reviews the progress of the graphene nanocomposites applying in the electrochemical immunosensors, including the nanocomposites of graphene with metal, metal oxide, polymer and so on. The future development and application prospect of nanocomposites graphene in electrochemical immune sensors are also discussed.

Key words: graphene, composite, nanomaterials, electrochemistry, immunosensors.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net