

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2019006765

化学试剂 2019 41(3) 207~213

聚焦

基于 WO_3 -纳米棒复合石墨烯薄膜 修饰玻碳电极的 DNA 传感平台

郑德论^{*1}, 张锐龙¹, 陈键侨¹, 王呈文¹, 张彩云¹, 陈学武¹, 汪庆祥², 高凤²

(1. 汕头职业技术学院 自然科学系, 广东 汕头 515078; 2. 闽南师范大学 化学与环境科学学院, 福建 漳州 363000)

摘要: 以棒状 WO_3 纳米粒子(rWO_3)、石墨烯(GR)和壳聚糖(CTS)形成的纳米复合材料修饰玻碳电极(GCE)为平台, 制备了一种新型电化学 DNA 生物传感器。电化学实验表明, 复合膜层中棒状 WO_3 纳米粒子和 GR 的协同效应增大了电极表面积, 导致其电化学响应信号明显增强。通过 CTS- rWO_3 -GR 杂化膜层丰富的氨基官能团和引入双功能手臂分子对苯二甲醛(TPA)将探针 ssDNA 稳固组装于传感界面。该 DNA 生物传感器集合了复合膜材料的许多优点, 如: CTS 良好的生物相容性和成膜能力, rWO_3 纳米粒子和 GR 优异的电子转移能力等。在最佳条件下, 以亚甲基蓝(MB)为电化学信号分子, 采用差分脉冲伏安法(DPV)检测特异性 ssDNA 序列的浓度范围为 $1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$, 并获得较低的检测限值 $2.7 \times 10^{-15} \text{ mol/L}$ (3σ)。该生物传感器对单碱基和三碱基错配的 ssDNA 序列也表现出良好的稳定性和识别能力。

关键词: 棒状 WO_3 ; 石墨烯; 复合膜层; 对苯二甲醛; DNA 生物传感器

中图分类号: O621.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2019)03-0207-07

Novel DNA Sensing Platform Based on Glassy Carbon Electrode Modified with WO_3 -Nanorod Composite Graphene Film ZHENG De-lun^{*1}, ZHANG Rui-long¹, CHEN Jian-qiao¹, WANG Cheng-wen¹, ZHANG Cai-yun¹, CHEN Xue-wu¹, WANG Qing-xiang², GAO Feng² (1. Department of Natural Sciences, Shantou Polytechnic, Shantou 515078, China; 2. Department of Chemistry and Environmental Sciences, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China) Huaxue Shiji 2019 41(3) 207~213

Abstract: A new electrochemical DNA biosensor was fabricated by using a rod-like WO_3 (rWO_3), graphene (GR) and chitosan (CTS) nanocomposite materials modified glassy carbon electrode (GCE) as the platform. The basal electrode of CTS- rWO_3 -GR/GCE was applied to the electrochemical experiments and the obtained data indicated that the synergistic effect of nano- WO_3 and GR increased the surface area of the electrode and resulted in the corresponding increase of the electrochemical responses. The CTS- rWO_3 -GR hybrid film with rich amino groups was further employed as functional matrix for probe ssDNA immobilization using terephthalaldehyde (TPA) as a bifunctional arm-linker. The DNA biosensor has the advantages such as the good biocompatibility and film-forming ability of CTS, the excellent electron transfer ability of rWO_3 or GR. Under the optimal conditions, differential pulse voltammetry (DPV) was used to record the electrochemical response of MB and the specific ssDNA sequence could be detected in the concentration range from 1.0×10^{-14} to $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ with a low detection limit of $2.7 \times 10^{-15} \text{ mol/L}$ (3σ). The biosensor also showed good stability and discrimination ability to the one-base and three-base mismatched ssDNA sequence.

Key words: rod-like WO_3 ; graphene (GR); composite film; terephthalaldehyde; DNA biosensor

特定 DNA 分析由于在许多领域的潜在应用: 如药物筛选、分子诊断、环境监测和流行病预防等, 而引起人们越来越多的关注。在各种 DNA 检测方法中, 电化学方法因其简单、快速、灵敏度高、成本低等优点被认为是一项重要且有效的分析技术^[1-4]。构建 DNA 电化学生物传感器, 关键步骤是将探针 ssDNA 有效固定在传感界面上, 这将影响制备传感器的精准度、灵敏度和使用寿命等多重性能^[5]。最近, 许多纳米材料及其制备技术被用于提高探针 DNA 的固定化效率, 因为它们具有较大的表面积效应和良好的生物相容性^[6,7]。此

外, 纳米粒子的优异电催化性能可以显著提高 DNA 检测的灵敏度和选择性^[8]。

作为一种重要的半导体材料, 氧化钨(WO_3)纳米粒子已广泛用于制备锂电池电极、磁性记录介质、光学器件和电磁器件等^[9-13]。由于其优异

收稿日期: 2018-09-10; 网络首发日期: 2019-01-08

基金项目: 汕头职业技术学院课题资助项目(SZK2016Y18)。

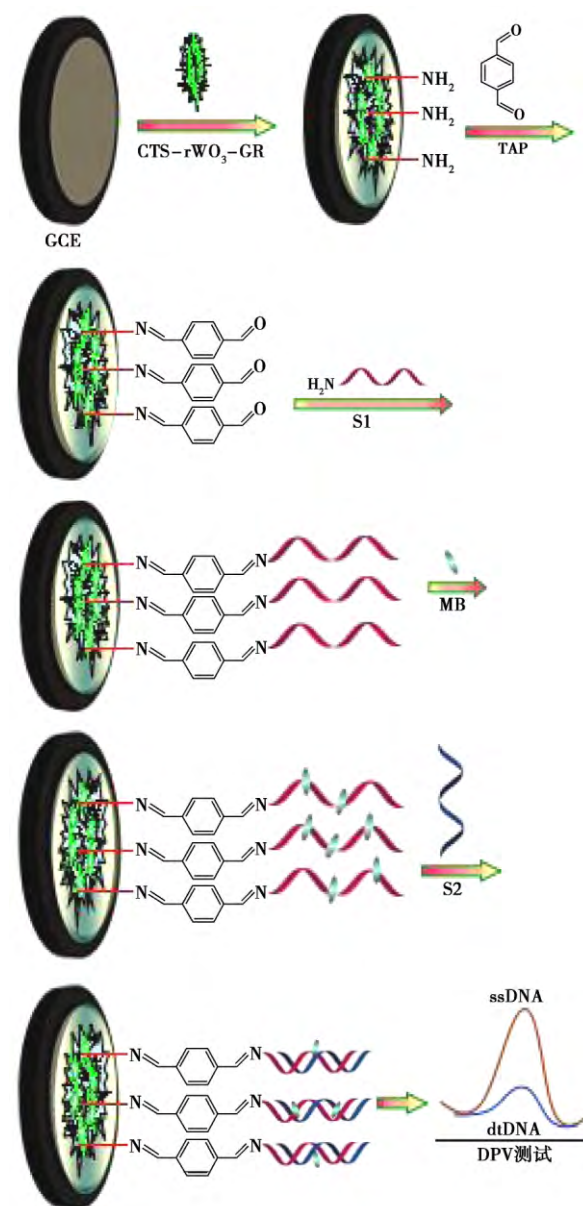
作者简介: 郑德论(1980-), 男, 广东电白人, 硕士, 实验员, 主要从事分析化学、电化学研究, E-mail: 1822339359@qq.com。

的导电性, 纳米级 WO_3 为构建高性能电化学生物传感器提供了电子传导介质。石墨烯(GR) 由于其比表面效应、显著的电子传输性能、优异的生物相容性、大的机械强度和易于加工等性能, 常被用作电化学研究的理想纳米材料^[14-17]。近年来, 纳米颗粒和石墨烯形成的复合纳米材料可以明显提高电子的转移性能受到人们的特别关注^[18-20]。例如, Sun 等^[21]制备了一种金纳米粒子和电化学还原石墨烯(GR) 修饰碳离子液体电极(CILE) 构建的电化学 DNA 生物传感器, 实验结果表明, 该复合材料提高了对特定靶 DNA 的检测能力, 该传感界面对错配的 DNA 序列也具有良好的区分识别能力。Qi 等^[22]报道了一种基于 Co_3O_4 纳米棒(rCo_3O_4)、石墨烯(GR) 和壳聚糖(CTS) 复合膜修饰 CILE 作为基底电极的 DNA 生物传感器, 结果表明该分析方法可实现快速、稳定和高灵敏响应 DNA 序列杂交信号。

共价键合技术是探针 ssDNA(S1) 固载在传感界面上的有效方法之一, 通过共价键合的膜层稳定性得到增强, 防止了核酸分子从电极表面解吸脱落^[23-24]。此外, 探针 ssDNA 通过 3' 或 5' 末端位置的共价连接可以提高电极表面的杂交效率。交联剂分子如二醛由于其高反应效率, 温和的反应条件和无污染的副产物(H_2O), 在生化结合或反应中受到了很大的关注。通过使用多元原子二醛作为交联剂, ssDNA 链可以远离固相电极表面, 这对于提高生物传感器的杂交效率是非常有价值的^[25-26]。戊二醛(GTD) 作为典型的二醛活性试剂, 具有优异的柔韧性, 它已被广泛用于生物传感器的固定剂或交联剂^[27-28]。另一种二醛交联剂对苯二甲醛(TPA) 具有刚性苯基结构, 然而其柔韧性却比 GTD 更低, 这使它具备更好嫁接其他生物分子的条件。

本文采用水热法合成了棒状 WO_3 纳米粒子, 采用扫描电子显微镜(SEM) 方法对其进行了表征。然后将 rWO_3 、GR 和 CTS 超声混合均一形成新型纳米复合材料, 并进一步将其修饰在 GCE 电极表面上。电化学分析结果表明, 纳米复合薄膜具有非常大的表面积和良好的导电性, 这归因于 WO_3 纳米颗粒和 GR 的协同放大效应。CTS 膜层由于其优异的成膜能力和生物相容性能, 增强了复合制备材料在电极表面的稳定存在^[29]。CTS 上丰富的氨基与 TPA 的醛基通过共价偶联, 而 TPA 余下的醛基与探针 ssDNA 上的修饰氨基进

一步反应, 成功实现了 S1 的固定化。该修饰电极制备 DNA 生物传感器过程如下图所示。在最优条件下, 利用亚甲基蓝(MB) 作为差示脉冲伏安法(DPV) 表征的电化学指示剂, 制备电极与目标 ssDNA 序列发生高效的杂交反应, 并获得了较宽的检测线性范围。进一步研究制备 DNA 生物传感器的选择性, 发现它对特定的错配 ssDNA 序列具有良好的识别能力。



基于 CTS- rWO_3 -GR 复合膜的 DNA 生物传感器的制备过程

Fabrication procedures of the CTS- rWO_3 -GR composite film based DNA biosensor

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

S-4800 型扫描电子显微镜(日本 Hitachi Lim-

ited 仪器有限公司); CHI 650D 电化学站、 $\Phi 2$ mm 玻碳电极(GCE)、Ag/AgCl 参比电极、铂丝辅助电极(上海辰华仪器有限公司)。

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、壳聚糖(CTS)、对苯二甲醛(TPA)(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);钨酸钠、亚甲基蓝(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、 Na_2SO_4 、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (分析纯,西陇科学股份有限公司);石墨烯根据改性的 Hummer's 方法制备^[30];其他化学试剂均为市售分析纯;所用水均为二次蒸馏水(DDW)。

18-碱基 DNA 序列(上海生工生物工程技术股份有限公司): 探针序列 S1: 5'-NH₂-TCT TTG CGA CCA CTG TCG-3'; 互补序列 S2: 5'-CGA CAG TGG TCC CAA AGA-3'; 单碱基错配序列 S3: 5'-CGA CAG TGG TCC CAA CGA-3'; 三碱基错配序列 S4: 5'-CGA CAA TGG CCC CAA CGA-3'。用 TE 缓冲溶液(10 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCl、1.0 mmol/L EDTA pH 8.0)配制所有寡核苷酸底液(10 $\mu\text{mol/L}$)并保持冷冻。

1.2 棒状 WO_3 纳米颗粒的制备

向含有 0.8 g Na_2WO_4 的 30 mL DDW 中,在剧烈搅拌下缓慢加入 3 mol/L HCl,充分反应产生黄色 Na_2WO_4 沉淀。随后将沉淀物离心并用 DDW 洗涤,将 42 g Na_2SO_4 与清洁的沉淀物在 50 mL DDW 中混合并继续搅拌 1 h 以形成糊状混合物。然后将所得混合溶液转移到 100 mL 不锈钢高压釜中,维持容量总体积的 50%,密封并在 170 $^\circ\text{C}$ 保持 24 h 反应后,使高压釜冷却至室温。收集制备的沉淀物并用乙醇和 DDW 洗涤数次。在 60 $^\circ\text{C}$ 下真空干燥后,得到 rWO_3 的纯净物。

1.3 电化学 DNA 生物传感器的制备

首先将 0.003 g CTS 溶解在 1 mL 乙酸中制备 CTS 溶液(0.3% $\mu\text{m/V}$),再把 1.0 mg rWO_3 和 1.0 mg GR 加入到 1 mL DDW 中,超声分散 1 h 后,制备得到 rWO_3/GR 纳米复合材料。然后,加入 1 mL CTS 溶液并继续超声处理 1 h 以获得均相混合溶液($\text{CTS-rWO}_3\text{-GR}$)。此外,采用上述方法还制备了 CTS-rWO_3 复合材料。

将 GCE 电极依次用粒径为 0.3 μm 及 0.05 μm 的 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 抛光粉打磨成镜面并洗去表面污物,然后在 DDW、乙醇、DDW 中各超声约 5 min,并用氮气吹干,采用滴涂法将 10 μL $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR}$ 混合液修饰到清洁的 GCE 表面,并在室温下

将其晾干,得到制备电极 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 。用 DDW 淋洗电极表面以除去额外的 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR}$ 后,将电极浸入 2% 的 TPA(0.02 g TPA 溶于 1 mL DDW)溶液中 0.5 h,得到 TPA 修饰电极($\text{TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$),再将 $\text{TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ S1 中孵育 2 h 后固定探针 ssDNA。然后,用 TE 缓冲液冲洗后,获得探针 ssDNA 修饰电极($\text{S1/TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$)。

最后,将 $\text{S1/TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 浸入 180 μL 不同浓度的分析物溶液(S2、S3 和 S4, 42 $^\circ\text{C}$)进行杂交反应 20 min,然后用 TE 缓冲液冲洗除去非特异性吸附的 DNA。

1.4 电化学测量

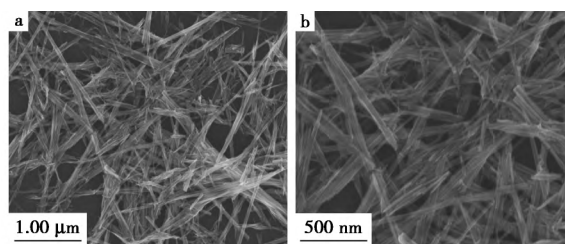
采用循环伏安法(CV)和电化学阻抗谱法(EIS)在含 1.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 和 0.1 mol/L KCl 的混合物中表征修饰的电极: CV 扫描速率为 100 mV/s,电位窗口 +0.6 ~ -0.2 V; EIS 频率范围 $10^4 \sim 0.1$ Hz,电位 +0.172 V,电压振幅 5 mV。

使用 MB 作为 DNA 固定和杂交的氧化还原指示剂。首先,将 $\text{S1/TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 浸入 50 $\mu\text{mol/L}$ MB 溶液中 20 min,然后用 PBS 洗涤 3 min。采用差分脉冲伏安法(DPV)在 PBS 溶液中进行电化学测量: 电位范围 -0.6 ~ 0 V,脉冲幅度 0.05 V,脉冲宽度 0.05 s,脉冲周期 0.2 s。

2 结果与讨论

2.1 形貌表征

由较低放大倍率的 SEM 表征 WO_3 的形貌(图 1a)发现,大量分散性良好的 WO_3 颗粒呈棒状(rWO_3)形态,从图 1b 高放大倍率的 SEM 图像,可进一步观察到 WO_3 纳米颗粒具有典型的棒状结构,并且其长度为 0.7 ~ 1.3 μm ,直径约为 50 nm。



a.低放大倍率; b.高放大倍率

图 1 rWO_3 的 SEM 形貌

Fig.1 SEM images of the synthesized rWO_3

2.2 修饰电极的电化学表征和 DNA 固定

使用 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 作为 CV 和 EIS 表征的

氧化还原指示剂,研究了制备电极的电化学性能及其作为 DNA 固载平台的应用。在 CV 实验(图 2a)中, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在裸 GCE 上有一对氧化还原峰(曲线 1)。当在裸 GCE 修饰上 CTS-rWO_3 后, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的电化学响应明显增强(曲线 2),这可归因于纳米形态的 rWO_3 所具有的半导体电催化性能。当将 CTS-rWO_3 复合膜层中引入 GR 材料, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 指示剂的电化学响应信号得到最大增强(曲线 3),这是由于复合薄膜中 rWO_3 和 GR 存在的协同放大杂化效应,使修饰电极表面的电子转移速率显著提高。此外,根据 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 的还原峰值电流和以下 Randles-Sevcik 方程式^[31]:

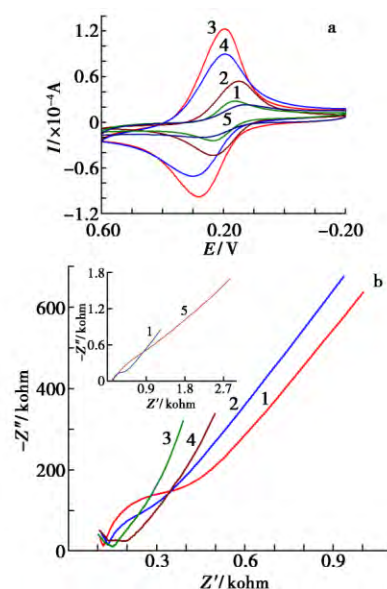
$$I_{\text{pc}} = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} c v^{1/2} \quad (1)$$

其中 I_{pc} 为还原峰电流, A; n 为电子转移数; D 为扩散系数, cm^2/s ; c 为浓度, mol/L ; v 为扫描速率, V/s ; A 为裸 GCE 表面积。

通过上式计算得到 $\text{CTS-rWO}_3/\text{GCE}$ 、 GTS-GR/GCE 、 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 的有效面积分别为 0.13、0.25 和 0.57 cm^2 ,这表明 GCE 上的 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR}$ 杂化复合材料的尺寸效应,显著增大了传感界面的电活性表面积。当 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 修饰上交联剂分子 TPA 时, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的氧化还原信号明显减弱(曲线 4),这可以认为通过容易的醛-氨基缩合反应,导致电极表面膜层厚度的增加,阻碍或抑制了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的电子转移,同时也证明 TPA 分子已经被嫁接到 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 上。当在 $\text{TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 固载上 S1 时,其氧化还原峰电流明显降低(曲线 5),这是由于 DNA 的静电排斥作用,进一步妨碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 发生电子迁移,这也表明探针 ssDNA 已成功锚定在 TPA 表面上。

电化学阻抗谱法(EIS)已被证明是研究界面电子转移电阻值(R_{et})的灵敏方法。在 EIS 中,高频下观察到的半圆直径等于其电子转移电阻值(R_{et}),这反映了氧化还原探针的电子转移动力学参数^[32]。不同电极的 EIS 表征图谱如图 2b 所示, $\text{CTS-rWO}_3/\text{GCE}$ 的 R_{et} 为 $2.9 \times 10^2 \Omega$,明显小于裸 GCE 的 $4.6 \times 10^2 \Omega$,表明 rWO_3 能促进 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的电子转移过程。在 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 中,其 R_{et} 值降低至 $1.5 \times 10^2 \Omega$,这说明形成的杂化膜层中的 rWO_3 和 GR 对电极表面具有更高的电催化性能。 $\text{TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 与 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 相比,其 R_{et} 值有所增加,为

$2.0 \times 10^2 \Omega$,表明 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的电子转移过程受到 TPA 膜抑制。当 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 固定上 S1 后(曲线 5),其 R_{et} 值又增加至 $8.1 \times 10^2 \Omega$,这可归因于负电荷的 DNA 与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 发生静电排斥作用。EIS 表征与上述 CV 实验讨论非常吻合,EIS 和 CV 的实验结果均证明 DNA 生物传感器已成功制备。



1.裸 GCE; 2. $\text{CTS-rWO}_3/\text{GCE}$; 3. $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$;

4. $\text{TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$; 5. $\text{S1/TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$

a. CV; b. EIS 曲线

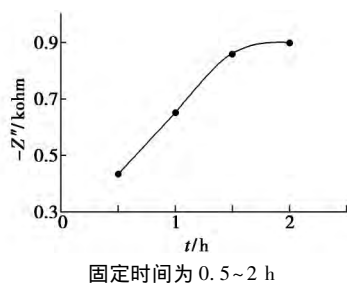
图 2 含 0.1 mol/L KCl 的 1.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在不同修饰电极上的 CV 和 EIS 曲线

Fig.2 CV and EIS of 1.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ with 0.1 mol/L KCl on different modified electrode

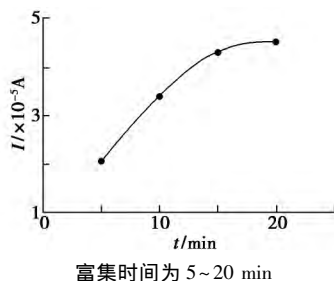
2.3 生物传感器的条件优化

为了进一步提高传感器的传感性能,探究了 TPA 与 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 的反应时间。实验结果表明,随着 $\text{CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 在 TPA 溶液中孵育时间的延长,修饰电极的 R_{et} 值增加。当孵育至 0.5 h 后, R_{et} 恒为常数,表明电极表面上形成了饱和的 TPA 膜。因此,选择 0.5 h 作为 TPA 修饰的最佳时间。

此外,还探究了 S1 在 $\text{TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 上的固定时间。图 3 显示组装电极的 R_{et} 值随着 $\text{TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 在探针溶液中反应时间的增加而变大,当时间达到 2 h,其 R_{et} 值达到最大,表明 $\text{TPA/CTS-rWO}_3\text{-GR/GCE}$ 上所有的活性位点都与 S1 反应。因此,选用 2 h 作为探针 ssDNA 固定的最佳时间。

图 3 S1 在 TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE 上的 R_{ct} 值Fig.3 R_{ct} values of S1 incubation time on TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE

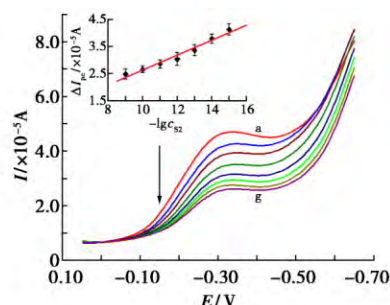
MB 是一种吩噻嗪染料, 基于其与未配对的鸟嘌呤碱基的特异性亲和力, 经常被用作电化学 DNA 生物传感器的指示剂^[4]。DPV 表征方法探究了 MB 在 S1/TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE 上的富集时间, 得到的结果如图 4 所示。随着累积时间的增加, MB 的 DPV 峰电流逐渐增加, 这意味着通过与探针 ssDNA 的相互作用, 越来越多的 MB 与电极表面结合。当时间达到 20 min 时, MB 的 DPV 值变为恒定, 表明电极表面的 MB 富集已经饱和。因此, 选择 20 min 作为 MB 富集的最佳时间。

图 4 MB 在 S1/TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE 上的 DPV 值Fig.4 DPV values of MB assembled time on S1/TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE

2.4 生物传感器的分析性能

在最优实验条件下, 考察了制备生物传感器的分析性能。如图 5 所示, 随着靶目标 ssDNA (S2) 浓度的增加, MB 在 DPV 中的还原峰电流逐渐减小, 这表明生物传感器上已形成越来越多的双螺旋结构 DNA (dtDNA)。用杂交前后的 I_{pc} 差值 (ΔI_{pc}) 作为传感检测信号, 发现 ΔI_{pc} 与 c_{S2} 的负对数值 ($-\lg c_{S2}$) 在 $1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 的浓度范围内具有线性比例关系, 相关系数为 0.989, 线性回归方程为 $\Delta I_{pc} / \times 10^{-5} \text{ A} = -0.2753 \lg(c_{S2} / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})) - 0.1101$ 。根据 3σ 信噪比关系 (S/N) 获得 S2 的低检测限值为 $2.7 \times 10^{-15} \text{ mol/L}$ 。与此前报道的基于纳米粒子的 DNA 生物传感器 (表 1) 相比, 所制备的生物传感器应用于靶

ssDNA 检测, 显示出更低的检测限和较宽的检测线性范围, 这可归因于 CTS- WO_3 -GR 复合薄膜大的比表面积及其导电性能的协同效应。

a ~ g 浓度依次为: 1.0×10^{-14} 、 1.0×10^{-13} 、 1.0×10^{-12} 、 1.0×10^{-11} 、 1.0×10^{-10} 、 1.0×10^{-9} 、 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$

插图为 c_{S2} 的负对数值 ($-\lg c_{S2}$) 与 ΔI_{pc} 的线性关系图

图 5 S1/TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE 与不同浓度的 S2 杂交时 MB 的 DPV 曲线Fig.5 DPV curves of MB at S1/TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE upon hybridization with different amounts of S2表 1 制备生物传感器与另一种基于纳米颗粒的 DNA 生物传感器的分析性能对比^注

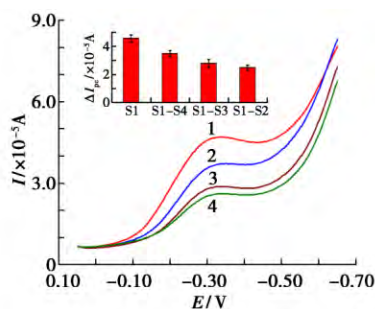
Tab.1 Comparison of the analytical performance of the proposed biosensor with other nanoparticles-based

DNA biosensors					
电极材料	方法	指示剂	线性范围 / (mol•L ⁻¹)	检测限 / (mol•L ⁻¹)	参考文献
MAA/Au/GR	DPV	MB	1.0×10 ⁻¹² ~ 1.0×10 ⁻⁶	2.9×10 ⁻¹³	[19]
CTS/Co ₃ O ₄ /GR	DPV	MB	1.0×10 ⁻¹² ~ 1.0×10 ⁻⁶	4.3×10 ⁻¹³	[20]
CTS/V ₂ O ₅ / MWCNTs	DPV	MB	1.0×10 ⁻¹¹ ~ 1.0×10 ⁻⁶	1.76×10 ⁻¹²	[27]
Au-GO	DPV	MB	1.0×10 ⁻¹⁴ ~ 1.0×10 ⁻⁹	3.5×10 ⁻¹⁵	[33]
CTS-τWO ₃ -GR	DPV	MB	1.0×10 ⁻¹⁴ ~ 1.0×10 ⁻⁸	2.7×10 ⁻¹⁵	本文

注: MWCNTs: 多壁碳纳米管; GR: 石墨烯; MAA: 巯基乙酸; Au: 金纳米粒子; GO: 氧化石墨烯片。

S1/TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE 修饰电极与不同的 ssDNA 序列杂交来研究该 DNA 生物传感器的选择性, 图 6 显示了 S1/TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE 分别与互补 S2, 单碱基错配 S3 和三碱基错配 S4 序列杂交后的 MB 的 DPV 曲线。由图可观察到在 S1/TPA/CTS- WO_3 -GR/GCE 上, MB 的还原峰电流最大, 表明 MB 对探针 ssDNA 的鸟嘌呤碱基具有强亲和力。然而, 在生物传感器与 S2 杂交后, MB 的峰电流值大幅降低, 表明在电极表面实现了杂交反应。当生物传感器与 S3 和 S4 杂交时, DPV 上还原峰电流值较之与 S2 杂交时有所

增大,表明这两种 ssDNA 序列仅发生部分杂交反应。因此,通过比较这两个电极的 ΔI_{pc} 差异值,可以很好地识别 S3 和 S4 错配碱基序列。以上结果表明,所制备的 DNA 生物传感器具有高选择性。



1.制备传感器;2.三碱基错配;3.单碱基错配;4.互补碱基
插图为对应的直方图

图 6 制备生物传感器与不同序列杂交后 MB 的 DPV 曲线

Fig.6 DPV curves of MB at the biosensor before and after hybridization with the different sequences

3 生物传感器的重现性和稳定性

通过探究 DNA 传感器的重现性和稳定性,发现 S1/TPA/CTS- r WO₃-GR/GCE 平行测定 6 次 1.0×10^{-9} mol/L 靶目标 ssDNA 的相对标准偏差 (RSD) 为 8.89%,如图 7 所示。这表明制备生物传感器具有优异的重现性。当 S1/TPA/CTS- r WO₃-GR/GCE 修饰电极在 4 °C 下储存两周后,其 R_{et} 响应信号仅有 4.3% 的下降,表明该生物传感器具有良好的稳定性。

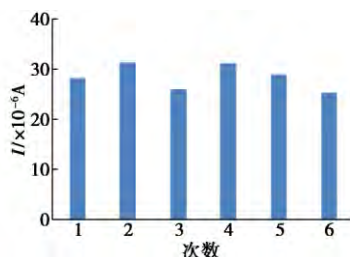


图 7 S1/TPA/CTS- r WO₃-GR/GCE 平行测定 6 次靶目标 ssDNA 的 MB 峰电流值

Fig.7 The MB peak current values of six parallel determination the target ssDNA on S1/TPA/CTS- r WO₃-GR/GCE

4 结论

制备了一种基于 CTS- r WO₃-GR 的纳米复合膜修饰 GCE,并通过电化学方法对其进行表征。由于在电极表面上存在 WO₃ 纳米颗粒和 GR 材料,修饰电极的有效表面积和电子传导性能均显

著提高。这种纳米复合杂化薄膜通过使用易于嫁接的手臂分子交联剂 TPA,为探针 ssDNA 的固定提供了更多的活性位点。当与靶 ssDNA 序列杂交后,可实现较宽的浓度线性范围检测 ($1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-8}$ mol/L),并具有低的检测限值 2.7×10^{-15} mol/L。此外,传感器的选择性实验结果也较好。制备的 DNA 生物传感器具有简便、灵敏度高、选择性好、稳定性佳等优点,这为构建其他类型的电化学生物传感器提供了潜在的应用平台。

参考文献:

- [1]ZHANG W,YANG T,HUANG D M,et al.Synergistic effects of nano-ZnO/multi-walled carbon nanotubes/chitosan nanocomposite membrane for the sensitive detection of sequence-specific of PAT gene and PCR amplification of NOS gene[J].*J.Memb.Sci.* 2008 **325**(1): 245-251.
- [2]ZHANG W,YANG T,LI X,et al.Conductive architecture of Fe₂O₃ microspheres/self-doped polyaniline nanofibers on carbon ionic liquid electrode for impedance sensing of DNA hybridization [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**(2): 428-434.
- [3]LOU X H,ZHAO T,LIU R,et al.Self-assembled DNA monolayer buffered dynamic ranges of mercuric electrochemical sensor[J].*Anal. Chem.* 2013 **85**(15): 7574-7580.
- [4]邱玮玮,王庆华,林海彬,等.乳酸-钴(II)-1,10-菲啉三元配合物与 DNA 结合的光谱与电化学研究[J].*化学试剂* 2017 **39**(6): 573-577.
- [5]ZHENG D L,WANG Q X,GAO F,et al.Development of a novel electrochemical DNA biosensor based on elongated hexagonal-pyramid CdS and poly-isonicotinic acid composite film[J].*Biosens. Bioelectron.* 2014 **60**(15): 167-174.
- [6]WALCARIUS A,MINTEER S,WANG J,et al.Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends[J].*J. Mater. Chem.B* 2013 **1**: 4878-4908.
- [7]ZHANG W,YANG T,JIAO K.Ultrasensitive indicator-free and enhanced self-signal nanohybrid DNA sensing platform based on electrochemically grown poly-xanthurenic acid/Fe₂O₃ membranes[J].*Biosens.Bioelectron.* 2012 **31**(1): 182-189.
- [8]XU Y H,WANG E K.Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles [J].*Electrochim. Acta*, 2012 **84**: 62-73.
- [9]WANG C,LI X,FENG C H,et al.Nanosheets assembled hierarchical flower-like WO₃ nanostructures: synthesis, characterization, and their gas sensing properties [J].*Sens.Actuators B: Chem.* 2015 **210**: 75-81.
- [10]LEE S,LEE Y,KWAK D,et al.Improved pseudocapaci-

- tive performance of well-defined WO₃-nanoplates [J]. *Ceram.Int.* 2015 **41**(3): 4 989-4 995.
- [11]ZHONG M L,ZHANG G Q,YANG X Q.Preparation of Ti mesh supported WO₃/TiO₂ nanotubes composite and its application for photocatalytic degradation under visible light[J].*Mater.Lett.* 2015 **145**: 216-218.
- [12]CHU X F,HUA T,GAO F,et al.Gas sensing properties of graphene-WO₃ composites prepared by hydrothermal method [J].*Mater.Sci.Eng.* 2015 **193**: 97-104.
- [13]UMAIR M M,YAHYA A K,HALIMAH M K,et al. Effects of increasing tungsten on structural,elastic and optical properties of $x\text{WO}_3-(40-x)\text{Ag}_2\text{O}-60\text{Te}_2\text{O}$ glass system[J].*J.Mater.Sci.Technol.* 2015 **31**(1): 83-90.
- [14]CHOI B G,PARK H,PARK T J,et al.Solution chemistry of self-assembled graphene nanohybrids for high-performance flexible biosensors [J]. *ACS Nano*, 2010, **4**(5): 2 910-2 918.
- [15]LI S J,QIAN C,WANG K,et al.Application of thermally reduced graphene oxide modified electrode in simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers[J].*Sens. Actuators B: Chem.* 2012 **174**: 441-448.
- [16]HU F,LI W H,ZHANG J,et al.Effect of graphene oxide as a dopant on the electrochemical performance of graphene oxide/polyaniline composite [J]. *J. Mater. Sci. Technol.* 2014 **30**(4): 321-327.
- [17]李荣强,张军丽,闫永康.GO-CMWNTs-CS-GCE 电极检测腐败小白菜中亚硝酸盐的含量[J].*化学试剂*, 2018 **40**(3): 235-238.
- [18]GAO F,ZHENG D L,TANAKA H,et al. An electrochemical sensor for gallic acid based on Fe₂O₃/electro-reduced graphene oxide composite: estimation for the antioxidant capacity index of wines [J].*Mater. Sci. Eng. C*, 2015 **57**: 279-287.
- [19]HUANG H Y,BAI W Q,DONG C X,et al.An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection [J].*Biosens. Bioelectron.*, 2015 **68**: 442-446.
- [20]SALAMON J,SATHISKUMAR Y,RAMACHANDRAN K,et al. One-pot synthesis of magnetite nanorods/graphene composites and its catalytic activity toward electrochemical detection of dopamine [J].*Biosens. Bioelectron.* 2015 **64**: 269-276.
- [21]SUN W,QI X W,ZHANG Y Y,et al.Electrochemical DNA biosensor for the detection of *Listeria monocytogenes* with dendritic nanogold and electrochemical reduced graphene modified carbon ionic liquid electrode [J].*Electrochim.Acta* 2012 **85**: 145-151.
- [22]QI X W,GAO H W,ZHANG Y Y,et al.Electrochemical DNA biosensor with chitosan-Co₃O₄ nanorod-graphene composite for the sensitive detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene sequence [J]. *Bioelectrochemistry*, 2012 **88**: 42-47.
- [23]LIGAJ M,JASNOWSKA J,MUSIAL W G,et al.Covalent attachment of single-stranded DNA to carbon paste electrode modified by activated carboxyl groups [J].*Electrochim.Acta* 2006 **51**(24): 5 193-5 198.
- [24]HUANG Q T,LIN X F,ZHU J J,et al.Pd-Au@ carbon dots nanocomposite: facile synthesis and application as an ultrasensitive electrochemical biosensor for determination of colitoxin DNA in human serum [J].*Biosens. Bioelectron.* 2017 **94**: 507-512.
- [25]WANG Q X,ZHANG B,LIN X Q,et al. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan-mutualised carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker [J]. *Sens.Actuators B: Chem* 2011 **156**(2): 599-605.
- [26]XU B Y,ZHENG D L,QIU W W,et al.An ultrasensitive DNA biosensor based on covalent immobilization of probe DNA on fern leaf-like $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and chitosan Hybrid film using terephthalaldehyde as arm-linker [J].*Biosens. Bioelectron.* 2015 **75**: 175-181.
- [27]TEMBE S,KUBAL B S,KARVE M,et al. Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus campanulatus*: application in construction of electrochemical biosensor for dopamine [J].*Anal. Chim. Acta* 2008 **612**(2): 212-217.
- [28]YILDIRIM N, LONG F,GAO C E,et al. Aptamer-based optical biosensor for rapid and sensitive detection of 17 β -estradiol in water samples [J]. *Environ. Sci. Technol.* 2012 **46**(6): 3 288-3 294.
- [29]SUN W,QIN P,GAO H W,et al.Electrochemical DNA biosensor based on chitosan/nano-V₂O₅/MWCNTs composite film modified carbon ionic liquid electrode and its application to the LAMP product of *Yersinia enterocolitica* gene sequence [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**(6): 1 264-1 270.
- [30]LIU Z,ROBINSON JOSHUA T,SUN X M,et al.PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008 **130**(33): 10 876-10 877.
- [31]XIAO F,ZHAO F Q,LI J W,et al.Characterization of hydrophobic ionic liquid-carbon nanotubes-gold nanoparticles composite film coated electrode and the simultaneous voltammetric determination of guanine and adenine [J].*Electrochim.Acta* 2008 **53**(26): 7 781-7 788.
- [32]GAO H W,QI X W,CHEN Y,et al.Electrochemical deoxyribonucleic acid biosensor based on the self-assembly film with nanogold decorated on ionic liquid modified carbon paste electrode [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2011, **704**(1/2): 133-138.
- [33]HAN X W,FANG X,SHI A Q,et al.An electrochemical DNA biosensor based on gold nanorods decorated graphene oxide sheets for sensing platform [J].*Anal. Biochem.* 2013 **443**(2): 117-123.