



DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00301

多壁碳纳米管/纳米 Ag-TiO₂ 膜 DNA 电化学生物传感器

周娜 杨涛 焦奎 宋彩霞

(青岛科技大学化学与分子工程学院, 青岛 266042)

摘要 基于多壁碳纳米管/纳米 Ag-TiO₂ 复合膜制备了高灵敏度的 DNA 电化学生物传感器。将 Ag-TiO₂ 复合物与适量分散于 N,N'-二甲基甲酰胺中的多壁碳纳米管 (MWNT) 相混合, 形成均匀稳定的混合溶液, 将其涂于裸碳糊电极表面, 制得 MWNT/Ag-TiO₂ 修饰碳糊电极。碳纳米管大的比表面积和良好的电子传递性能与 Ag-TiO₂ 纳米复合物良好的生物相容性和对 DNA 极好的吸附能力的协同作用, 显著提高了 DNA 探针的固载和 DNA 杂交的检测灵敏度。应用循环伏安法和电化学交流阻抗谱分别对传感膜的制备和 DNA 的固定与杂交进行了表征。以电化学交流阻抗谱法对转基因植物外源草丁膦乙酰转移酶基因片段进行了检测, 线性范围为 0.1~1000 μg/L, 检出限为 0.01 μg/L。

关键词 DNA 电化学传感器; 多壁碳纳米管; Ag-TiO₂ 复合物; 草丁膦乙酰转移酶基因; 交流阻抗谱

1 引言

自 1991 年 [1] 发现了碳纳米管 (CNT) 以来, 因其具有电化学窗口宽、电子转移速率快、生物相容性好、机械性能高等优点而被广泛应用于传感器领域 [2]。近年来, CNT 相关的纳米复合膜因为表现出了各组分协同作用的特性而备受关注 [3-5]。本课题组在应用 CNT 相关纳米复合膜制备 DNA 电化学生物传感器方面开展了一些研究工作 [6-8]。

纳米 Ag-TiO₂ 是一种在光化学和生物化学领域中非常有发展前途的纳米材料, 其优良的生物相容性、易于吸附生物分子的特性及良好的化学反应活性已在生物传感领域得到广泛应用 [9-11]。Ag-TiO₂ (纳米粒子是材料合成中重要的组成部分, 并且生物标记的 Ag-TiO₂ (纳米粒子表面的消光系数大约是同等条件下金纳米粒子的 10 倍 [12])。Ag-TiO₂ 复合物结合了纳米 Ag-TiO₂ 和 Ag-TiO₂ (纳米粒子两者的优点而引起广泛关注 [13-15]。此外, Ag-TiO₂ 和 Ag-TiO₂ 之间的电子转移也极大地提高了 Ag-TiO₂ 复合物的化学反应活性 [16-18]。

本研究基于多壁碳纳米管 (MWNT) 和 Ag-TiO₂ 纳米复合膜的高灵敏度, 制备了 DNA 电化学生物传感器, 并以电化学交流阻抗法对转基因玉米外源草丁膦乙酰转移酶 (PAT) 基因片段进行检测。此传感器具有良好的选择性、稳定性和再生性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

TX115 T 电化学工作站 (上海辰华仪器公司), 工作电极为碳糊电极或其修饰电极, 对电极为铂丝电极, 参比电极为饱和甘汞电极 (SCE); 0X-100 型 0X 计 (上海雷磁仪器厂); 2000 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); E-1000 扫描电镜 (日本 E-1000 公司); 艾科浦超纯水系统 (重庆颐洋企业发展有限公司)。

石墨粉 (上海胶体化工厂, 粒度 ≤ 1 μm); 高效切片石蜡 (上海华灵康器械厂); Ag-TiO₂ 复合物根据文献 [19] 方法制备; MWNT (深圳纳米港有限公司, 纯度 98%, 直径 100 nm, 长度: 8000 μm);

收稿日期: 2010-10-20; 接受日期: 2011-01-10

本文系国家自然科学基金 (41071181) 项目, 教育部博士点基金 (41071181) 和青岛市基础研究项目 (10-1-0-1-0-1) 资助

通信作者: 焦奎, E-mail: jiaokui@qut.edu.cn

检测转基因玉米外源 9' * 基因片段材料(北京 : ' : 基因技术有限公司合成,各 -.' 序列如文献 [10]); -.' 固定液用 80\$ 6648&G OX 00\$ 的 *L5)XTB 缓冲溶液(含 8\$0\$ 6648&G . ;TB OX 00\$) 配制,于 C j 下保存。 -.' 杂交液用 # d : :T 溶液(\$0!\$ 648&G . ;TB k \$0\$! 648&G 柠檬酸钠) 配制。所有试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 碳糊电极和 MWNT/Ag-TiO₂ 修饰碳糊电极的制备 称取石墨粉 0.8 g (固体石蜡 0.8 g (,"\$ j 下加热并搅拌使其混合均匀,然后装入洁净的玻璃管(直径 0.66 cm)中,插入铜丝作为导线,在均衡压力下压紧冷却即制得碳糊电极,记为 T92,电极表面用前在称量纸上打磨至光滑。

将 6 (I K. * 悬浮分散在 C\$ 6G 的 % # 648&G XTB) % 1 648&G X. , _1 (1% , V/V) 混合溶液中,在水浴中超声 8 h,过滤并且用超纯水洗涤直到滤出液成中性,在真空中干燥成粉末备用。取 6 (经上述方法处理过的 I K. * 将其分散到 % 6G N, N) 二甲基甲酰胺 (-1 _) 中。将 % 6G I K. *) -1 _ 溶液和 % 6 (' () *+, # 复合物加入到 8\$ 6G -1 _ 中后超声 8 h,使其均匀分散。取 8 μg 滴涂在裸碳糊电极表面,自然晾干,即制得 I K. * &' () *+, # 修饰碳糊电极。其它修饰电极的制备方法类似。

2.2.2 DNA 探针在 MWNT/Ag-TiO₂/CPE 电极上的固定及杂交 将 I K. * &' () *+, # T92 电极浸入含 % μ 648&G 55-. ' 探针的 #0\$ 6G *L5)XTB 缓冲溶液中,于室温吸附 # h,取出后用 \$0 # h 十二烷基硫酸钠(: - :) 溶液冲洗,再用超纯水清洗以除去未固定的 55-. ' ,得到 55-. ' & I K. * &' () *+, # T92 电极。将此电极置于含 %0\$ μ 648&G 互补目标 -.' (M-. ') 的杂交液中,于 C8 j 杂交 1\$ 6 h,取出后用 \$0 # h : - : 溶液冲洗,再用超纯水清洗以除去未杂交的 M-. ' ,即得双链 -.' (R5-. ') 修饰电极,记为 R5-. ' & I K. * &' () *+, # T92。

2.2.3 电化学测量 以各修饰电极为工作电极,在 %0\$ 6648&G \c_7(T.) _1 & _1_7(T.) _1 (1% , V/V) 的 %0\$ 648&G \TB 溶液中,于 TX[11\$T 上记录其循环伏安曲线,扫速为 %\$ 6U&5。

电化学交流阻抗谱曲线也在 TX[11\$T 上记录,在室温条件下进行,检测溶液为含 %0\$ 6648&G \c_7(T.) _1 & _1_7(T.) _1 (1% , V/V) 的 %0\$ 648&G \TB 溶液。外加恒电位为 %0\$0# U(vs0 : T2),频率为 %0\$ e%0\$ d%\$ X>。

3 结果与讨论

3.1 Ag-TiO₂ 凹球体的表面形态

由 ' () *+, # 纳米复合物的扫描电子显微镜图像(图 1) 可以看出, ' () *+, # 纳米复合物由许多明显的凹球体组成的,这些球体大小一致,表面光滑,壁厚约为 C\$ e "\$ F6。这种结构有利于提高化学传感器灵敏度 [10, 11]。

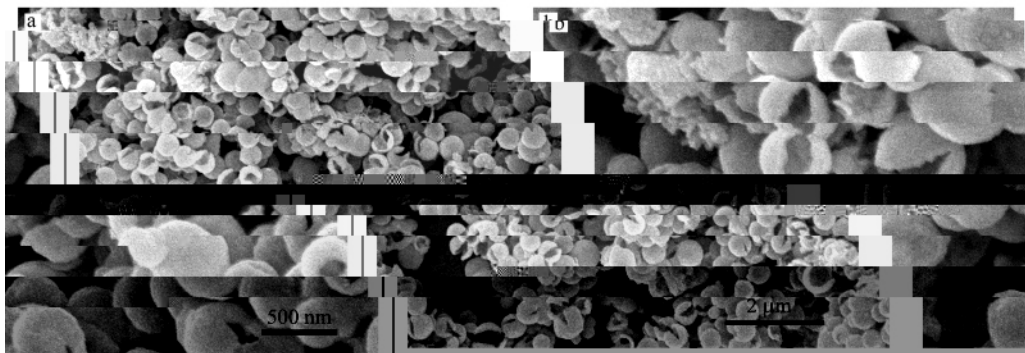


图 1 ' () *+, # 纳米复合物的扫描电镜图

_+(0% : 21 +6; (75 4b ' () *+, # N4884P 50N7L75 ; = R:bb7L7F= 6; (F+b+m; =4F

3.2 MWNT 和 Ag-TiO₂ 对 [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 电子传递协同增强作用的循环伏安法研究

分别以 T92, I K. * &' () *+, # T92, I K. * & T92、' () *+, # T92 电极为工作电极,在 %0\$ 6648&G

$[_7(T.)_1]^{V\&C V} k \$0\% 64B\&G \backslash TB$ 混合溶液中进行循环伏安法表征,结果如图#。曲线;为
 $[_7(T.)_1]^{V\&C V}$ 在裸 T92 电极上的循环伏安曲线。在%0# e V\$0" U 范围有一对相对较小的氧化还原
 峰。在 I K. * &' (*)_{+,#} T92 电极上得到一对比曲线;峰高显著增大、氧化还原峰电位差显著减小的良
 好的氧还峰(曲线 J),说明 I K. * &' (*)_{+,#} 修饰后的电极有更大的表面积和更优良的电子传导性能。
 在 I K. * &T92 电极(曲线 M)及 ' (*)_{+,#} T92 电极(曲线 R)上均得到一对氧化还原峰,但是它们的峰高
 均明显小于曲线 J、峰电位差明显大于曲线 J。I K. * 与纳米 ' (*)_{+,#} 对于改善电极表面电子传导性能
 具有很强的协同效应,其原因可能是: I K. * 与纳米 ' (*)_{+,#} 复合可增加活性表面积; I K. * 可作为
 ' (*)_{+,#} 和电极表面之间的超微连接器^[#5],从而显著提高界面电子传递能力。

3.3 DNA 固定与杂交的交流阻抗表征

图!为不同工作电极的电化学交流阻抗. @CH+5= 谱图。在有 I K. * &' (*)_{+,#} 修饰膜层的电极上,界
 面电子传递电阻(R_{T_e})为 8#\$ \Omega(曲线 J),与曲线;相比较, J 的 R_{T_e} 明显减小。这与循环伏安法的结果一
 致。' (*)_{+,#} 复合物结合了纳米 *_{+,#} 和 ' (纳米粒子两者的优点,表现出优良的生物相容性和易于吸附生
 物分子的特性。I K. * 表面存在大量缺陷和悬键,易于化学修饰,经过修饰的 I K. * 能够与纳米复合物
 之间形成较强的相互作用。由于 I K. * 良好的导电能力以及 ' (*)_{+,#} 纳米复合物大的比表面积

计算杂交前后的 ΔR_{ct} 。结果表明,在 18 eCj 之间, ΔR_{ct} 随着杂交温度的升高而增加;当杂交温度继续升高时 ΔR_{ct} 值略微减小。在 C8 j 下,探针 -.' 与 M-.' 杂交 % e%\$ 6+f, 计算每个杂交时间的 ΔR_{ct} 值。在 % e1\$ 6+f 之间, ΔR_{ct} 随着时间的延长而增加;当杂交时间继续延长 ΔR_{ct} 值不再增加。因此最佳杂交条件为 C8 j 温度下杂交 1\$ 6+f。

3.5 PAT 基因片段的检测

将探针 -.' 与不同 -.' 序列杂交后形成的 R5-.' & l K. * & ' () * , # & T92 在 % 0 \$ 664B&G \c_7(T.) _1 \& _7(T.) _1 (% l % , V/V) 的 \$ 0 % 64B&G \TB 溶液中的阻抗谱图中电子传递电阻值之差 ΔR_{ct} 作为测定信号,对 # \$ 碱基 9' * 基因片段进行检测。图 C 为 ΔR_{ct} 对不同 -.' 序列的直方图。探针 -.' 与非互补 -.' (FM-.') 杂交所测得的 ΔR_{ct} 非常小。探针 -.' 与 # 和 % 个碱基错配 -.' 序列杂交后的 ΔR_{ct} 均有不同程度的增大。探针 -.' 与 M-.' 杂交所得 ΔR_{ct} 最大。因此,此传感器不但可以很好地识别目标 M-.' 与 FM-.' ,而且可以识别 # 个碱基错配甚至 % 个碱基错配的 -.' 序列。

以与目标 -.' 杂交后测得的 ΔR_{ct} 为检测信号,对 # \$ 碱基 9' * 基因片段进行检测,结果如图 8。以 ! 次平行测量的平均值对 9' * 基因片段的浓度的对数作图,结果表明 ΔR_{ct} 平均值与 9' * 基因片段的浓度 % 0 \$ d % \$ V % e % 0 \$ d % \$ V ^ 1 64B&G 的对数值呈良好的线性关系,线性回归方程为 $\Delta R_{ct} (\Omega) m ! C \# 0 C B (C k ! D 1 D , \gamma m \# 0 D D 0 $$ 。平行测定空白溶液 % 次的标准偏差为 σ , 根据 ! σ 法计算此 -.' 电化学传感器以电化学阻抗谱法测得 9' * 基因片段的检出限为 ! 0 % # d % \$ V % # 64B&G。可见在固定、杂交的最优化条件下构建的 -.' 电化学传感器对目标 -.' 的序列有着较强的识别能力。

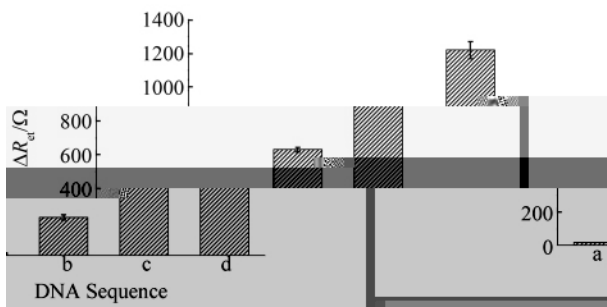


图 C 探针 -.' 与不同 -.' 序列杂交后所得电极在 % 0 \$ 664B&G [_7(T.) _1] ^ V i C V k \$ 0 % 64B&G \TB 溶液中所测得的界面电子传递电阻差值 ΔR_{ct} 的直方图
 +(0 C X +5=4(L ; 65 4b ΔR{ct} (ΔR_{ct} m $R_{R5-.'}$, $V R_{55-.'}$) M4LL7) 504FR+f(=4 =N7 N@JL+r+; =>4F P+=N R+bb7L7F= -.' 57cH7FM75 ; = % \$ V ^ 64B&G B7<7B (;) F4F)M460B767F=;L@ 57cH7FM7; (J) =P4)6+56;=MN7R 57cH7FM7; (M) 4F7)6+56;=MN7R 57cH7FM7; (R) M460B767F=;L@ 57cH7FM7(n m !) ; 应用电压 (' 00B+7R 04=7F=>;B) : \$ 0 % 0 # U (vs. : T2) ; 频率范围 (_17cH7FM@ L ; F (7) : \$ 0 % e % \$ C X > .

3.6 DNA 传感器的再生性及重现性

将杂交后制备的 R5-.' & l K. * & ' () * , # & T92 电极置于沸水中

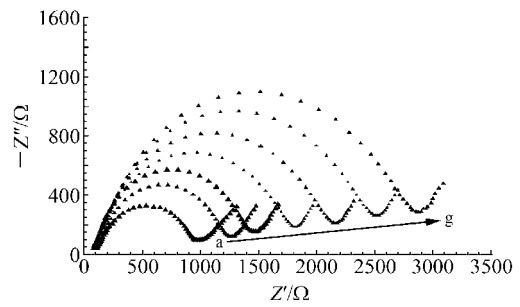


图 8 55-.' & l K. * & ' () * , # & T92 用于检测不同浓度 9' * 基因片段的 . @CH+5= 谱
 _+(0 8 . @CH+5= 0B4=5 L7M4LR7R ; = 55-.' & l K. * & ' () * , # & T92 (;) ; FR ; b=7L N@JL+r+; =>4F L7; M=4F P+=N +5 M460B767F=;L@ =; L(7= HFR7L <; L+4H5 M4FM7F=L; =>4F5: (J) % 0 \$ d % \$ V % # 64B&G , (M) % 0 \$ d % \$ V % \$ 64B&G , (R) % 0 \$ d % \$ V ^ 0 64B&G , (7) % 0 \$ d % \$ V ^ 1 64B&G 0 : H004L=F(7B7M=L4B@=7 54BH=4F +5 % 0 \$ 664B&G [_7(T.) _1] ^ V i C V M4F=; +F+f(\$ 0 % 64B&G \TB 应用电压 (' 00B+7R 04=7F=>;B) : \$ 0 % 0 # U (vs. : T2) ; 频率范围 (_17cH7FM@ L ; F (7) : \$ 0 % e % \$ C X > .

648&G 目标 - . ' 进行测定 8 次测定的相对标准偏差为 C0!#h。说明此传感器的重现性良好。此传感器在 C j 下储存 # \$ R ,性能无明显变化。

与文献[#% ##]报道的基于金属氧化物复合纳米材料制备 - . ' 电化学生物传感器相比(表%) ,本方法制备生物传感器具有更低的检出限、更好的再生性与重现性。

表% 基于复合纳米材料的 - . ' 电化学生物传感器性能对比

*;JB7 % T460;L+54F 4b 07Lb4L6;FM7 4b 5467 7B7M-L4MN76+M;B - . ' J+457F54L5 J;57R 4F 67=;B 43+R7 F;F4M46045=75

| | 本工作 *N+5 P4L? | a7b0 [#%] | a7b0 [##] |
|---|-----------------------------|--------------------------|---|
| - . ' 固定膜 _#65 b4L - . ' +664J+>;=4F | I K. * &' () * + , # & T92 | I K. * &F;F4)WL, # & AT2 | WL, # & . A & AT2 (. A m A4BR F;F40;L=MB75) |
| 检出限 -7=7M=4F B+6+= (648&G) | !Q%# d%\$ V%# | 008 d%\$ V%# | !Q% d%\$ V%# |

4 结 论

以 I K. * &' () * + , # 纳米复合物膜制得了 - . ' 电化学生物传感器。该复合物膜结合 I K. *、纳米 * + , # 和 ' (纳米粒子三者的优点 纳米粒子间的协同效应极大地提高了 - . ' 探针的固定量 ,从而可以高灵敏地检测 - . ' 杂交。采用循环伏安法跟踪了 I K. * &' () * + , # 纳米复合膜的制备并以电化学交流阻抗谱对 - . ' 在修饰电极上的固定和杂交进行了表征。以电化学交流阻抗谱法对转基因玉米外源 9' * 基因片段进行了检测。该传感器具有良好的稳定性、重现性和再生能力。

References

- % ' B737@7<; . , G;;?547F7 * , \4F=HL+ \ , I +L?N;B;b _ , :MN+bbL+F - E , * ;667<75?+ \Q *Electrochem. Commun.* , **2006** , "(D) : %C08 e%C"\$
- # E;F(\ X , 2+;F ' , :MN;R87L G : , ' S;@;F 9 I , :+7(7B a KQ *Nano. Lett* , **2003** , !(!) : #08 e#00
- ! An67> _ E , TN7F a E , K;F(- K , K;@64H-N a I , - ;+ X EQ *Chem. Commun.* , **2003** , #: %D\$ e %D%
- C G+ E , ^H E - ,] H E E , TN7F X Z ,] + ;] XQ *Adv. Funct. Mater.* , **2007** , %O(D) : %80C e%8"\$
- 8 Z' . A TNHF)X;(杨春海) , ^Y K;F)ZHF(瞿万云) , : ' . A ^H)WN;F((桑秋章) , XY TN7F(AH4(胡成国) , XY : N7F() : NH+(胡胜水) Q *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2007** , !8(%) : %1#D e%1!#
- 1 WN;F(] W , E;4 \ , G+H : _ , XH Z KQ *Anal. Chem.* , **2009** , "(%8) : 1\$1 e1\$%#
- 0 WN;F(K , Z;F(* , WN;F(] I , AH4 W Z , E;4 \Q *Biosens. Bioelectron.* , **2009** , #C(") : #C%0 e#C##
- " WN;F(] W , G+H : _ , E;4 \ , A;4 X K , : N+ Z EQ *Analyst* , **2008** , %!(! #) : %0#D e%0!8
- D -+6+L+57<+M . I , :;04FS+M W U , a;J;=M ' I , a;SN *Q *J. Am. Chem. Soc* , **2005** , %#O(8) : %!CC e%!C8
- %\$ WN;F(Z T , Z;F(* , WN4H . , WN;F(K , E;4 \Q *Sci. China(Ser. B)* , **2008** , 8(%) : %\$11 e%\$0!
- %% T;4 Z K , E+F a T , I +L?+F T ' Q *J. Am. Chem. Soc.* , **2001** , %#!(! #) : OD1% eOD1#
- %# WN7F(E , ZH X , G+] , WN;F(: Q *Appl. Surf. Sci* , **2008** , #8C(1) : %1!\$ e%1!8
- %! X7] , WN;4] E , G+H ' : Q *Appl. Surf. Sci* , **2008** , #8C(1) : %O\$8 e%O\$D
- %C T4>>4B+ 9 - , T460;L7BB+ a , _;F+>>; 2 , THLL+ I G , ' (45+;F4 ' , G;HJ -Q *J. Am. Chem. Soc.* , **2004** , %#1(% #) : ! " 1 " e ! " OD
- %8 \ ;6;= 9 U , X+L;?;P; *Q *J. Am. Chem. Soc.* , **2005** , %#O(%) : !D#" e!D!C
- %1 : 4F(T] , K;F(- ' , AH A X , G+F Z : , Z;F(E Z , TN7F G , _H] , XH W : Q *J. Colloid Interf. Sci.* , **2004** , #O#(#) : !C\$ e!CC
- %0 E;F(T , Z;F(* , E;4 \ , A;4 X KQ *Electrochim. Acta* , **2008** , 8!(1) : #D%0 e#D#C
- %" K7F - , AH4 : E , WN;+E _ , -7F(G , a7F K , -4F(: EQ *J. Phys. Chem. C* , **2009** , %#!(! \$) : %!\$#! e%!\$#"
- %D GH] ' , WN;F(X E , . + Z K , WN;F(^ , TN7F E 9Q *Biosens. Bioelectron.* , **2008** , #C(%) : D! eD"
- # \$ XL;04<

Electroch