纳米花状超微金电极的构筑及其电化学生物传感应用

朱丹, 左小磊, 樊春海*

中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800

*通讯作者, E-mail: fchh@sinap.ac.cn

收稿日期: 2015-03-19; 接受日期: 2015-04-28; 网络版发表日期: 2015-06-30

doi: 10.1360/N032015-00039

摘要 本文提出了一种制备纳米花状超微金电极的新方法: 将微米级碳纤维进行火焰刻蚀至纳米级, 在其表面进行电化学沉积电泳漆, 加热烘烤处理后, 通过电化学沉积纳米金得到纳米花状超微金电极. 扫描电子显微镜结果表明, 该方法可以得到尺寸在 100 μm 左右、表面花刺在纳米级别的纳米花状超微金电极. 通过将纳米花状超微金电极与核酸适体技术及电化学检测技术相结合, 开发了一种基于核酸适体构象变化的超微电极传感器. 将其应用于生物分子(如可卡因)的检测中, 响应速度快、特异性好. 该体系有望应用于单细胞及其他微环境中生物活性分子的检测.

关键词

超微电极
纳米花
电化学
生物传感器
可卡因检测

1 引言

微电极是现代电化学学科的重要分支之一, 在痕量检测、单细胞检测、生物传感中具有很高的优越性^[1-3]. 超微电极具有极小的尺寸, 直径可达微米级甚至纳米级, 可用于微观物质特性的探索, 也可用于神经递质信息的实时检测^[4-6]. 此外, 超微电极具有高的电流密度、低的时间常数, 以及快的传质速率, 这些优良的特性使超微电极具有很快的响应速度和高的信噪比. 基于以上优点, 科学研究者一直致力于开发更方便有效地制备超微电极的方法.

在电化学研究领域, 金电极由于优良的电化学性能及易于修饰的特点成为电化学研究与应用中最常用的电极之一^[7-10]. 随着电化学研究的深入, 近年来研究者致力于开发各种制备金超微电极的方法. 胡效亚等^[11]在塑封膜包封的碳纤维纳米圆盘上还原沉积金制得金超微电极, 但这种方法对打磨工艺要

求较高, 且制得的电极体积较大而有效面积较小(约几十至几百纳米). 本课题组^[12]之前通过对金丝进行电化学刻蚀后包封电泳漆, 制得了末端尺寸在 100 nm 以下的金纳米电极; 施国跃等^[13]在拉制后的石英尖端催化还原金, 再用电泳漆进行包封后可以制备尺寸可控的金超微电极. 然而, 这两种制备方法为了获得较小的金面积, 在后期对金表面进行了电泳漆包封, 从而给金的表面带来杂质, 可能会对后期研究产生影响. Kelley 等^[14,15]通过在光刻的硅片上沉积金得到纳米金花微电极, 并将其应用于 DNA 及各种小分子的超灵敏检测中. 然而, 由于基底体积较大, 这种微电极可能在实际应用中有所局限. Lai 等^[16]对机械拉制的铂纳米电极进行化学刻蚀后沉积金, 制得了纳米金花电极, 但该方法对仪器设备和成本要求较高. 本文对金超微电极的制备方法进行了探索, 通过对火焰刻蚀后的碳纤维表面进行包封, 之后沉积金, 得到了尺寸可控的纳米花状超微金电极. 制备方法

简单、成本低、易于操作. 通过在表面修饰生物探针分子, 该电极可以成功应用于生物分子(如可卡因)的检测中, 反应快速、特异性好.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

碳纤维(直径约 7 μm , Toray 公司, 日本), 玻璃毛细管(直径 1 mm, 国药集团化学试剂有限公司, 中国), 铜线(直径 0.5 mm, 国药集团化学试剂有限公司, 中国), 可卡因(cocaine)、盐酸爱康宁甲基酯(ecgonine methylester, EME)、苯甲酰爱康宁(benzoyl ecgonine, BE)购于中国药品生物制品检定所; 氯金酸等其他必需试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司(中国). 石墨粉导电胶(Ted Pella, 美国), 环氧树脂(南京中镜科仪有限公司, 中国), 阴极电泳漆(EC-1900, 上海敖美化学有限公司, 中国). 实验所用 DNA 序列(P1)为: 5'-SH-(CH₂)₆GACAAGGAAAATCCTTCAA-TGAAGTGGGTC-MB-3' (上海生物工程有限公司, 中国). 所有溶液均用超纯水配制.

电化学实验在 CHI 760E 电化学工作站(上海辰华仪器公司, 中国)上进行, 工作电极为碳纤维超微电极或纳米花状超微金电极, 参比电极为 Ag/AgCl (3 mol/L KCl)电极, 对电极为铂丝电极. 光学成像系统: 倒置荧光显微镜(DFC450C, Leica 公司, 德国), 扫描电子显微镜(SEM; JEOL, 日本).

2.2 实验方法

2.2.1 碳纤维超微电极的制备

碳纤维超微电极的制备方法参考 Huang 等^[17]发展的方法. 如图 1(a)所示, 将碳纤维依次用丙酮、乙醇和超纯水分别超声清洗后在 37 °C 恒温箱中烘干. 截取长度约 10 cm 的铜丝, 用石墨粉导电胶将其与清洗烘干后的碳纤维相粘连. 将玻璃毛细管控制至尖端内径约 20 μm , 用粘连有碳纤维的铜丝从玻璃毛细管较粗的一端穿入, 露出尖端约 0.5 mm. 用酒精灯将毛细管尖端烧融后继续在酒精灯上对裸露的碳纤维进行火焰刻蚀为长度约 200 mm, 尖端直径约 500 nm 的碳纤维超微电极.

2.2.2 纳米花状超微金电极的制备

纳米花状超微金电极的制备方法如图 1(b)所示.

碳纤维超微电极制备完成后, 利用阴极电泳漆(electrophoresis paint, EP)对裸露的电极表面进行绝缘包封. 包封前将碳纤维超微电极在低频率下超声清洗. 将电极尖端浸入 1:5 的电泳漆溶液(电泳漆与超纯水质量比为 1:5)中, 浸入深度为 1 cm 左右, 为使电泳漆均匀附着在碳纤维表面, 将铂丝弯成环状(直径为 1.5 cm 左右), 电极浸入位置位于铂丝环中心处. 将碳纤维超微电极作为工作电极, 铂丝作为对电极, 施加 -8 V 电压, 沉积 100 s 后, 取出电极, 用超纯水冲洗掉残留在电极尖端表面的残留物, 竖直向上放置于 80 °C 烘箱中烘烤 5 min, 使电泳漆固化收缩, 露出一定尺寸的碳纤维表面. 在 10 mmol/L K₃[Fe(CN)₆] (含 0.5 mol/L KCl)溶液中检测电极的稳态伏安电流, 计算电极的表观面积. 筛选相近尺寸的碳纤维超微电极(本次实验中所用电极有效半径约 250 nm), 将电极浸于金沉积液(20 mmol/L HAuCl₄, 0.5 mol/L HCl)中, 采用三电极系统对电极进行电沉积. 沉积电压为 0 V, 时间 300 s. 沉积完成后将电极取出, 用超纯水清洗.

2.2.3 纳米花状超微金电极的表面修饰及电化学检测

将所制备的超微金电极置于 100 nmol/L P1 的组装溶液(含 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L PB)中, 室温避光过夜组装. 为利于后续 DNA 反应, 组装后将电极置于 2 mmol/L 巯基乙醇(MCH)溶液中反应 2 h, 调控表面探针组装密度. 电化学检测使用三电极体系, 采用交流伏安法(ACV)进行测定.

3 结果与讨论

3.1 超微电极的扫描电子显微镜表征

碳纤维超微电极及纳米花状超微金电极的制备方法如图 1 所示, 详细步骤见实验部分. 超微电极的扫描电子显微镜(SEM)照片如图 2 所示. 图 2(a)是通过火焰刻蚀制备的碳纤维超微电极的纤维尖端部分, 电极呈锥状, 表面光滑; 图 2(b)为纳米花状超微金电极尖端部分的全貌, 可以看出, 碳纤维被电泳漆包封的地方未长出金花, 经过烘烤后露出的碳纤维尖端部分长出花状结构; 如图 2(c)所示, 花状结构直径约 100 μm ; 图 2(d)为花状超微金电极表面放大图, 可以看出, 表面花状结构的尺寸为纳米级别. 通过这种方

图1 (a) 碳纤维超微电极制备示意图; (b) 纳米花状超微金电极制备示意图

图2 超微电极的扫描电子显微镜照片。(a) 碳纤维超微电极尖端; (b) 纳米花状超微金电极尖端全貌; (c) 纳米花状超微金电极金花部分; (d) 纳米花状超微金电极金花表面

法制备纳米花状超微金电极, 操作简单、成本低。金的表面洁净, 无需进行后续处理。

3.2 碳纤维及纳米花状超微金电极的电化学表征

将碳纤维超微电极在 10 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ (含 0.5 mol/L KCl) 中进行循环伏安扫描, 得到典型的“S”型超微电极稳态伏安曲线(图 3(a)黑线)。图 3(a)红线所示为经过电泳漆包封后的碳纤维超微电极, 由图可见, 包封后的超微电极稳态伏安电流值有着很明

显的降低。将包封后的碳纤维超微电极近似看作半球状电极, 使用式(1)对电极半径进行计算:

$$i_0 = 2\pi n F D c r_0 \quad (1)$$

其中 i_0 为稳态伏安电流, n 为每摩尔氧化还原物质对应的电子转移数, F 为法拉第常数, D 为氧化还原物质的扩散系数 ($7.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$), c 为电活性物质的溶液浓度, r_0 为微电极的有效半径。通过计算, 筛选出包封后有效半径约为 250 nm 的碳纤维超微电极, 用于沉积金制备纳米花状超微金电极。我们对制得的纳米花状超微金电极进行了电化学表征。将电极置于 0.05 mol/L 硫酸溶液中, 在 $-0.35 \sim 1.5 \text{ V}$ 范围内进行循环伏安扫描, 得到图 3(b)所示结果。实验结果表明, 所得循环伏安曲线为金电极在硫酸中的特征伏安曲线, 在 0.863 V 处出现了金在硫酸中的特征还原峰, 说明金被沉积在电极尖端。此外, 所得特征还原峰面积较大, 与普通圆盘电极(直径约 2 mm)在硫酸中得到的还原峰面积大小相当, 而扫描电子显微镜图显示, 所沉积的金花尺寸仅 100 μm , 说明该超微电极具有很大的比表面积。

图3 (a) 阴极电泳漆绝缘包封前、后的碳纤维超微电极在 10 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ (含 0.5 mol/L KCl) 溶液中的稳态伏安曲线, 扫描速度为 10 mV/s; (b) 纳米花状超微金电极在 0.05 mol/L 硫酸中的循环伏安曲线(4 个扫描片段)

3.3 基于核酸适体构象变化的纳米花状超微金电极传感器的设计及应用

可卡因是当今世界主要毒品之一, 具有强烈的神经中枢兴奋作用, 其滥用不仅危害机体健康, 也带来了一系列的生物医学问题和社会问题, 发展简单而又快速的检测可卡因的方法仍是科学研究者所密切关注的问题^[18,19]. 结合核酸适体与电化学检测手段, 我们在此纳米花状超微金电极的基础上发展了一种检测可卡因的核酸适体超微传感器. 如图 4 所示, 将 5'端修饰巯基, 3'端修饰亚甲基蓝(methylene, MB)的可卡因核酸适体 P1 通过金硫键的作用组装在纳米花状超微金电极表面. 当体系中没有可卡因存在时, 由于单链 DNA 的存在, 亚甲基蓝分子距离电极表面较远, 电子传递到电极表面较为困难. 对体系进行电化学检测, 在 -0.28 V 处出现亚甲基蓝的特征还原峰, 所测得的交流伏安电流信号较低(图 5(a)). 当有可卡因存在的情况下, 可卡因与核酸适体结合, 形成二级结构, 该结构的产生将亚甲基蓝分子拉近至电极表面, 使电子可以直接传递到电极表面, 导致电化学信号增加(图 5(a)), 根据此原理可以实现对可

图 4 基于核酸适体构象变化的纳米花状超微金电极传感器检测可卡因的原理示意图

卡因的检测.

由于构型改变产生信号变化的生物传感器的灵敏性与探针组装密度直接相关, 我们对纳米花状超微金电极的探针组装浓度进行了优化. 若组装密度过高, 探针之间没有足够的空间发生折叠, 背景信号较大; 若组装密度过低, 捕获目标的探针分子过少, 产生的信号变化不明显. 我们定义 -0.28 V 处电流值增加的幅度为:

$$\text{Signal increase (\%)} = (I_t - I_0) / I_0 \times 100\% \quad (2)$$

其中 I_t 、 I_0 分别为体系中有无可卡因时测得的 -0.28 V 处的峰电流值. 我们使用不同浓度(1~1000 nmol/L)的核酸适体探针组装电极后, 检测传感器对 1 mmol/L 可

图 5 (a) 纳米花状超微金电极核酸适体传感器在缓冲溶液中及在 1 mmol/L 可卡因溶液中的交流伏安曲线; (b) 超微电极传感器检测不同浓度可卡因的峰电流增加值; (c) 超微电极传感器对可卡因、可卡因类似物 EME 和 BE 响应的峰电流增加值, 三种物质浓度均为 1 mmol/L; (d) 超微电极传感器对体系中可卡因浓度的实时响应

卡因分子的信号响应. 结果发现, 核酸适体探针的组装浓度在 10~50 nmol/L 时可以获得最佳的信号增强效果, 因此我们在实验中选择核酸适体的组装浓度为 10 nmol/L. 接下来, 我们对不同浓度的可卡因进行了定量检测, 结果如图 5(b)所示. 在 0.01~1 mmol/L 的浓度区间内, 电流增加的程度随着可卡因浓度的增加而增大. 检测限为 10 μ mol/L, 与文献中相似策略的普通圆盘电极的检测灵敏度相当^[20].

我们进一步考察了这种核酸适体超微电极传感器对可卡因检测的特异性和选择性. 如图 5(c)所示, 我们分别检测了传感器对两种可卡因类似物 EME 和 BE (浓度均为 1 mmol/L)的响应. 结果发现, 电流信号增加十分微弱(~0.1%), 仅略高于空白时的电流信号变化. 而检测 1 mmol/L 可卡因时电流信号增加高于约 34%, 远远高于类似物引起的信号变化, 说明此传感器对可卡因具有良好的特异性.

我们进一步研究了这种超微电极传感器对目标分子的响应速度与实时监测能力. 改变溶液中可卡因分子的浓度, 每 30 s 检测体系的电信号变化, 结果

如图 5(d)所示. 我们发现, 当体系中没有可卡因存在时, 电极所测得的电信号较低. 向体系中添加 100 μ mol/L 可卡因后, 电流信号增加约 10%. 该体系响应速度非常快, 在 30 s 内即达到峰电流的饱和. 当向体系中添加缓冲溶液使可卡因浓度下降时, 电化学信号也随之下降, 因此本体系可以实现对可卡因浓度的实时监测.

4 结论

通过对碳纤维进行火焰刻蚀、电泳漆包封后沉积金, 制备了一种纳米级尺寸可控的纳米花状超微金电极. 制备方法简单、成本低、易于操作. 将该电极与核酸适体及电化学检测技术相结合, 我们发展了一种基于核酸适体构象变化的纳米花状超微金电极传感器, 并将其应用于可卡因的检测中. 该传感器对可卡因响应灵敏, 性能优良. 鉴于其具有微小的尺寸, 该电极有望应用于单细胞或其他微环境的分析检测中.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(21422508, 31470960)和中国科学院百人计划项目支持, 特比一并致谢. 此外, 本工作得到黄庆研究员的支持和帮助, 特表示感谢.

参考文献

- 1 Arrigan DWM. Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications. *Analyst*, 2004, 129: 1157–1165
- 2 Wang Y, Noel JM, Velmurugan J, Nogala W, Mirkin MV, Lu C, Guille CM, Lemaître F, Amatore C. Nanoelectrodes for determination of reactive oxygen and nitrogen species inside murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11534–11539
- 3 Wu WZ, Huang WH, Wang W, Wang ZL, Cheng JK, Xu T, Zhang RY, Chen Y, Liu J. Monitoring dopamine release from single living vesicles with nanoelectrodes. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 8914–8915
- 4 Makos MA, Han KA, Heien ML, Ewing AG. Using *in vivo* electrochemistry to study the physiological effects of cocaine and other stimulants on the drosophila melanogaster dopamine transporter. *ACS Chem Neurosci*, 2010, 1: 74–83
- 5 Takahashi Y, Shevchuk AI, Novak P, Zhang Y, Ebejer N, Macpherson JV, Unwin PR, Pollard AJ, Roy D, Clifford CA, Shiku H, Matsue T, Klenerman D, Korchev YE. Multifunctional nanoprobe for nanoscale chemical imaging and localized chemical delivery at surfaces and interfaces. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 9638–9642
- 6 徐颖, 朱婧, 张小燕, 张仁毅, 何品刚, 方禹之. 直立碳纳米管微电极对神经递质 5-羟色胺的电化学检测. *科学通报*, 2011, 56: 1790–1793
- 7 Fan CH, Plaxco KW, Heeger AJ. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 9134–9137
- 8 Pei H, Lu N, Wen Y, Song S, Liu Y, Yan H, Fan CH. A DNA nanostructure-based biomolecular probe carrier platform for electrochemical biosensing. *Adv Mater*, 2010, 22: 4754–4757
- 9 葛志磊, 裴昊, 王丽华, 宋世平, 樊春海. 基于三维 DNA 纳米结构的电化学 SNP 检测. *中国科学: 化学*, 2011, 41: 1666
- 10 廖晓磊, 张旋, 杭乐, 高凤, 高飞, 汪庆祥. 基于分子信标末端现场标记三聚氰胺-Cu²⁺电话性分子的高灵敏电化学传感器. *中国科学: 化学*, 2014, 44: 381–388
- 11 王赓胤, 刘清秀, 邵晓秋, 胡效亚. 碳纤维纳米圆盘电极和金超微电极的制备. *扬州大学学报(自然科学版)*, 2006, 9: 21–25

- 12 Liu G, Sun CF, Li D, Song SP, Mao BW, Fan CH, Tian ZQ. Gating of redox currents at gold nanoelectrodes via DNA hybridization. *Adv Mater*, 2010, 22: 2148–2150
- 13 Liu Y, Yao Q, Zhang X, Li M, Zhu A, Shi G. Development of gold nanoparticle-sheathed glass capillary nanoelectrodes for sensitive detection of cerebral dopamine. *Biosens Bioelectro*, 2015: 262–268
- 14 Soleymani L, Fang Z, Lam B, Bin X, Vasilyeva E, Ross AJ, Sargent EH, Kelley SO. Hierarchical nanotextured microelectrodes overcome the molecular transport barrier to achieve rapid, direct bacterial detection. *ACS Nano*, 2011, 5: 3360–3366
- 15 Das J, Cederquist KB, Zaragoza AA, Lee PE, Sargent EH, Kelley SO. An ultrasensitive universal detector based on neutralizer displacement. *Nat Chem*, 2012, 4: 642–648
- 16 Salamifar SE, Lai RY. Fabrication of electrochemical DNA sensors on gold-modified recessed platinum nanoelectrodes. *Anal Chem*, 2014, 86: 2849–2852
- 17 Huang WH, Pang DW, Tong H, Wang ZL, Cheng JK. A method for the fabrication of low-noise carbon fiber nanoelectrodes. *Anal Chem*, 2001, 73: 1048–1052
- 18 Roncancio D, Yu H, Xu X, Wu S, Liu R, Debord J, Lou XH, Xiao Y. A label-free aptamer-fluorophore assembly for rapid and specific detection of cocaine in biofluids. *Anal Chem*, 2014, 86: 11100–11106
- 19 Wen Y, Pei H, Wan Y, Su Y, Huang Q, Song S, Fan CH. DNA Nanostructure-decorated surfaces for enhanced aptamer-target binding and electrochemical cocaine sensors. *Anal Chem*, 2011, 83: 7418–7423
- 20 Baker BR, Lai RY, Wood MS, Doctor EH, Heeger AJ, Plaxco KW. An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 3138–3139

Fabrication of nanometer-sized gold flower microelectrodes for electrochemical biosensing applications

Dan Zhu, Xiaolei Zuo, Chunhai Fan*

Division of Physical Biology & Bioimaging Center, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

*Corresponding author (email: fchh@sinap.ac.cn)

Abstract: In this work, we present a new method to prepare nanometer-sized gold flower microelectrodes. The carbon fiber electrode was etched with flame to nanometer size in diameter. Then, the surface of carbon fiber was encapsulated by electrophoretic paint. After being heated and baked, the prepared carbon fiber electrode was deposited by gold. The size of prepared gold flower microelectrode was about 100 μm and the dimensions of thorns of the electrode were in nanometers. Thus prepared electrode exhibited excellent performance and the surface of the electrode can be immobilized with specific bioprobes. By combining it with aptamers, we developed an electrochemical biosensor for the detection of cocaine. This sensor was rapid, label-free, selective and sensitive. This electrode is expected to be useful for the detection of molecules in single cells and other microenvironment.

Keywords: microelectrode, gold nanoflower, electrochemistry, biosensor, cocaine detection