

基于二维纳米材料的电化学疾病传感器

李素芹, 王晓珊, 杨凯, 赵丽, 吴琮*, 黄晓*, 黄维*

南京工业大学先进材料研究院, 先进生物与化学制造协同创新中心, 柔性电子重点实验室, 南京 211816

* 联系人, E-mail: iamqw@njtech.edu.cn; iamxhuang@njtech.edu.cn; iamwhuang@njtech.edu.cn

2015-12-13 收稿, 2016-01-15 修回, 2016-01-18 接受, 2016-03-02 网络版发表

国家自然科学基金(51322202)和江苏省自然科学基金(BK20130927)资助

摘要 疾病的早期诊断对人类健康具有重要意义, 通过监测与疾病相对应的生物标志物的浓度异常是实现疾病检测的重要手段之一. 近年来, 由于具有独特的物理、化学、电催化等特性, 以石墨烯为代表的二维纳米材料受到广泛关注. 基于二维纳米材料的疾病传感器具有微型化、响应速度快、灵敏度高优点, 有望使传感器的开发和早期疾病检测进入一个新阶段. 本文概括介绍了近几年基于二维纳米材料的电化学生物传感器的研究进展, 并对基于二维纳米材料的疾病传感器的发展前景进行展望.

关键词 二维纳米材料, 疾病检测, 生物标志物, 电化学传感器, 场效应晶体管传感器

随着现代医学技术的不断发展和进步, 人类对疾病的研究水平已经达到了前所未有的高度, 但是仍有一些疾病(如癌症、糖尿病等)目前没有有效的根治方法. 若能及时发现并对这些疾病进行医学干预, 病情的可控性将显著提高. 人体患病是一个机体发生病变引起器官功能变化的过程. 在此过程中, 大多数疾病都有与之相对应的一类生物标志物, 通过检测生物标志物的异常浓度即可进行疾病的检测^[1,2]. 目前医疗机构主要采用大型分析仪器对各种疾病标志物进行检测, 然而这些仪器笨重、操作复杂、需要专业人员操作且花费较高, 因此, 近年来研究者致力于研发各种可用于检测疾病的微/小型传感器. 其中, 基于纳米材料的疾病传感器由于具有便捷、操作简单、可实时检测、检测灵敏度高优点, 成为目前生化分析领域的热点.

以石墨烯为代表的二维纳米材料具有独特的电学、光学、机械等性能, 因而受到研究者的广泛关注. 二维纳米材料不仅在结构方面具有可设计性、可控性, 而且其巨大比表面积和易于功能化等特点使其

在作为生物传感器材料方面显示出广阔的应用前景^[3]. 通过对二维纳米材料功能化复合, 例如将二维纳米材料与贵金属纳米粒子、有机材料复合, 可提高二维纳米材料的电化学活性和生物相容性, 同时有助于传感材料表面固定生物识别分子从而提高选择性与灵敏度^[4,5].

目前用于制备传感器的二维纳米材料主要包括石墨烯及其化学衍生物^[6]、过渡金属硫化物^[7-9]等. 疏水性的石墨烯在溶剂中容易发生不可逆的团聚^[10,11], 限制了其在传感中的广泛应用. 将疏水性石墨烯进行氧化可得到带有大量含氧官能团的亲水性氧化石墨烯(graphene oxide, GO), 极大地改善了材料在极性溶剂中的分散性. 经过化学、水热或电化学还原等方法可以将GO还原成还原氧化石墨烯(reduced graphene oxide, rGO). 虽然rGO表面有大量残留的含氧官能团, 破坏了石墨烯的共轭结构, 使得rGO的导电性远不如机械剥离或化学气相沉积(CVD)的石墨烯, 但作为电化学反应的活性位点, 含氧官能团有利于提高传感器性能^[11]. 石墨烯衍生物可以与其他功能

引用格式: 李素芹, 王晓珊, 杨凯, 等. 基于二维纳米材料的电化学疾病传感器. 科学通报, 2016, 61: 1222-1232

Li S Q, Wang X S, Yang K, et al. Electrochemical biosensors based on two dimensional nano-materials for disease diagnosis (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 1222-1232, doi: 10.1360/N972015-01387

材料复合,达到进一步优化材料性能,扩展其应用范围的目的.如rGO与贵金属纳米粒子(如金、铂)复合,提高了材料的导电性,增强了电催化活性,增加了比表面积,使得这类复合材料已被广泛应用于生物传感器中^[12].二硫化钼(MoS₂)是一种二维过渡金属硫化物(transition metal dichalcogenide, TMD)^[13,14],是继石墨烯之后又一发展迅速的二维材料.值得一提的是,相比于石墨烯的零能带隙^[15],MoS₂具有可调控的带隙,因而逐渐成为传感器研发领域的热点材料^[16-19].

基于二维纳米材料的疾病传感装置,与大部分纳米材料生物传感器一样,主要由生物识别元件和信号转换器组成,将与疾病相关的生物标志物的浓度信号转换成可识别的信号,最终实现疾病检测的目的^[20,21].生物传感器按换能方式可分为:电化学生物传感器、压电生物传感器、热敏生物传感器、光学生物传感器等.其中,电化学生物传感器应用尤为广泛,按照转换元件可分为传统多电极电化学生物传感器和场效应晶体管生物传感器,本文将概括论述基于二维材料的这两种传感器.

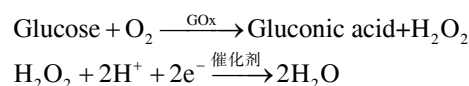
1 多电极电化学生物传感器

多电极电化学生物传感器的原理是将探针分子固定在电极表面,探针分子与目标分子作用产生的信号,经识别元件到转换元件转换成可测量的电化学信号,以电势或电流为特征检测信号的生物传感器^[20],其中,识别元件可以是抗体/抗原、酶、细胞、DNA、细菌等.作为转换元件的基底电极可分为汞电极和固体电极.汞电极主要是悬汞电极,由于汞有毒不适用于生物传感器,所以固体电极的使用较为广泛.固体电极中常用的有玻碳电极(glassy carbon electrode, GCE)和碳糊电极(carbon paste electrode, CPE).电化学生物传感器具有设备简单、轻便、稳定、快速、特异性强、灵敏度高优点,在分析检测领域得到广泛应用^[22],因而电化学生物传感器是目前发展最为成熟的一类传感器.电化学生物传感器正朝着功能多样化、微型化、智能化、集成化的方向发展,传感器的灵敏度、选择性、稳定性也得到进一步提高.

1.1 酶传感器

电化学酶传感器是由固定化酶与电化学传感器组合而成的生物传感器,以固定化酶为识别元件,酶

与目标分子作用产生的信号经转换元件转换成电信号,从而测定目标分子^[23,24].酶具有高效催化性和高度专一性,例如葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)对葡萄糖有较高的选择性,被广泛用于电化学方法检测血糖浓度.由于rGO较大的比表面积有利于固定GOx、壳聚糖可保持酶的活性、rGO和普鲁士蓝的协同作用可增强电化学催化活性,因此,结合了rGO、壳聚糖、普鲁士蓝3种材料的电化学生物传感器可用于高灵敏度的血糖浓度检测^[23].在检测过程中,葡萄糖在GOx的作用下分解生成葡萄糖酸和H₂O₂;普鲁士蓝催化还原H₂O₂,促进了电极表面与分析底物之间的电子转移.具体反应过程表达如下:



除了石墨烯,过渡金属硫化物也被用于制备免疫电化学传感器.类似上述提到的石墨烯基葡萄糖传感器的制备^[23,24],Su等人^[4]将GOx固定在MoS₂和金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)复合物修饰过的GCE上制备了葡萄糖传感器.由于MoS₂纳米片与AuNPs的协同作用加速了电极与GOx之间的电子转移,因而提高了电催化效率,使制备的传感器具有良好的重现性、稳定性和较低的检测限(2.80×10⁻⁶ mol/L).

虽然酶生物传感器的专一性高、灵敏度强,但是也存在寿命短、保存条件苛刻等缺点,因此,进一步探索可减少酶失活的基底材料和固定方法,以及其他可以代替天然酶的人造酶,是酶生物传感器研发的重点.

1.2 免疫传感器

免疫电化学传感是一种将电化学检测与免疫技术相结合的传感技术,以抗体或抗原作为分子识别元件,与电化学传感元件直接接触,通过转换器把检测到的物质浓度信号转变成相应的电信号,从而测定抗原或抗体的浓度^[25].以下将以败血症和癌症为例,概括介绍免疫电化学传感的工作原理.

败血症是由致病菌侵入血液循环中生长繁殖而引起的急性感染病症,早期诊断对治疗该疾病具有重要意义.降钙素原(PCT)是诊断败血症的生物标志物,它在正常人体中的浓度很低(<0.25 ng/mL),但是在败血症病人体中,PCT的浓度可达到1.00 ng/mL^[26].Liu等人^[26]采用双抗体夹心结构电化学免疫传感器检

测PCT. 一方面, 用rGO-AuNPs纳米复合膜对GCE进行修饰, 其较大的比表面积和优异的生物相容性有利于PCT抗体1(Ab1)的固定, 同时, 具有良好导电性的AuNPs可进一步放大传感器的电信号. 另一方面, PCT抗体2(Ab2)用单壁碳纳米管(single-walled carbon nanohorns, SWCNHs)、空心铂链(hollow Pt chains, HPtCs)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)、硫堇(thionine, Thi)形成的复合物SWCNHs/HPtCs/HRP/Thi进行标记作为信号标签. 当溶液中存在目标物PCT时, 通过形成双抗体结构Ab1-PCT-Ab2, rGO-AuNPs电极与复合物SWCNHs/HPtCs/HRP/Thi连接在一起形成电子通路, 同时, 溶液中引入的 H_2O_2 被HPtCs和HRP的协同催化作用还原产生电子, 电子再传输到电极, 从而实现放大PCT信号的作用.

与传统的金标记方法相比, 上述提到的双抗体夹心结构的电化学免疫传感器有特异性强、灵敏度高、重现性好的优点, 因此这种夹心结构的传感器设计方案应用广泛, 可被用于不同疾病标志物的检测中. 如癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是一种检测肿瘤的生物标志物, 最近Wang等人^[27]用 MoS_2 纳米片与AuNPs的复合物修饰GCE, 作为CEA抗体1(Ab1)的载体; 在Ag纳米球上固定GOx和CEA抗体2(Ab2)作为信号放大探针. 当溶液中存在目标物CEA时, Ag纳米球-GOx复合物通过双抗体夹心结构Ab2-CEA-Ab1连接在 MoS_2 -AuNP电极上, 因此, 溶液中引入的葡萄糖经GOx催化氧化产生的 H_2O_2 可以有效地接触复合催化剂 MoS_2 -AuNPs并被还原, 从而在微分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)的检测模式下起到增大电化学传感信号的目的. 所制备的传感器的检测范围为0.001~50 ng/mL, 检测限低至 2.70×10^{-4} ng/mL. 值得强调的是, 研究表明免疫传感器中抗原键合能力与抗体的表面性能密切相关, 因此选择合适的抗体固定方法对器件性能的提升具有重要意义^[28].

1.3 DNA传感器

DNA对遗传病、传染病等疾病具有重要影响, 研究如何高效准确地检测DNA对生物学具有重要意义^[29,30]. DNA传感器的工作原理是将单链DNA作为识别元件固定在电极上, 单链DNA与目标DNA杂化产生的生物信号, 经转换元件转换成可识别信号^[18]. DNA电化学传感器具有选择性强、制备简单、反

应快速等优点. 如Zhu等人^[5]构建了基于Thi和石墨烯的纳米复合物DNA电化学传感器, Thi的芳香烃结构使其可通过 π 堆积作用固定在石墨烯纳米片表面, 同时根据碱基互补配对原则, 检测互补目标寡核苷酸, 检测限低至 1.26×10^{-13} mol/L.

近年来, 除了石墨烯, 过渡金属硫化物二维纳米片也被用于DNA传感器的制备. 如用掺有AuNPs的 WS_2 纳米片和石墨烯的复合物对GCE进行修饰, 将硫醇化的单链DNA通过金-硫键固定在电极上, 可检测目标DNA^[30]. WS_2 纳米片与石墨烯的复合不仅提高了石墨烯的分散性, 减少了团聚, 而且增加了电极的比表面积, 提高了电催化活性, 有利于探针分子的固定和信号的放大. Wang等人^[16]巧妙地制备了基于 MoS_2 纳米片的非标记DNA电化学传感器. 用 MoS_2 纳米片修饰CPE, 单链DNA探针的碱基通过范德华力被固定在 MoS_2 纳米片上. 当目标单链DNA与探针DNA杂化脱离 MoS_2 纳米片表面, 所产生的电信号的变化可以作为检测目标DNA的依据. 由于 MoS_2 纳米片比表面积大、电化学活性高, 所制得的传感器检测限低(1.90×10^{-17} mol/L). 该传感器制备简单, 还可以用于检测碱基分子如鸟嘌呤和腺嘌呤. 与石墨烯和 MoS_2 相比, 尽管硫化铜(CuS)导电率较低, 但其价格低廉, 在传感器制备中有一定优势, 尤其适用于即用即抛型疾病传感器. Huang等人^[31]利用 CuS 比表面积大的优点和乙炔黑的强导电性, 将二者复合后修饰GCE, 并在复合膜上生长AuNPs, 通过金-硫键固定单链DNA探针, 实现与目标DNA的杂交. 该体系中, AuNPs既可用于固定单链DNA, 又可增强复合膜的导电性, 提高了传感器的灵敏度, 检测限可达 2.00×10^{-14} mol/L.

事实上, 将DNA传感器、免疫传感器和酶传感器有效地结合在一起, 可以达到提高传感灵敏度和选择性的目的. 如Cao^[18]用 MoS_2 纳米片、石墨烯、AuNPs对GCE进行修饰, 然后将探针DNA连接在AuNPs上. 探针DNA链进一步与生物素(Biotin)标记的目标DNA链杂交. 这样, 用链霉亲和素(Streptavidin)和HRP功能化的AuNPs作为信号标签, 可以通过Biotin与Streptavidin之间的特异性结合, 被连接在目标DNA的另一端, 并有效地催化溶液中 H_2O_2 的还原, 所给出的电化学信号起到了放大DNA信号的作用, 其检测限可达 2.20×10^{-15} mol/L.

从上述例子可以看出, 信号标签是通过蛋白质

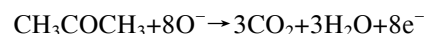
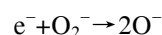
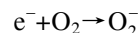
间的特异性结合连接在电极上的,此外,信号标签上的生物识别分子也可以是单链DNA.最近Li等人^[32]制备了一种双DNA探针传感器,在Thi修饰过的GO上固定Au@SiO₂复合物,并将信号探针DNA(S2)和G四联体固定在Au@SiO₂表面,G四联体进一步与卟啉铁(hemin)复合构成模拟酶体系,避免了天然酶的不稳定性,得到的GO-Thi-Au@SiO₂-hemin复合物可以作为信号标签.另一方面,用AuNPs-GO修饰的GCE固定捕获探针DNA链(S1)作为检测平台.检测时,目标DNA链(S)与S1和S2杂交,将信号标签成功连接在电极上,模拟酶体系催化还原H₂O₂并产生电信号,从而有效地成为DNA检测的信号放大器.这种基于双DNA探针的传感器对病原体大肠杆菌O157:H7具有高度选择性,检测限为1×10⁻⁸ mol/L.

随着电化学生物传感器应用范围的延伸,用于检测癌症、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)等重大疾病的商用传感器也将在未来得以实现.以中枢神经疾病的诊断为例.多巴胺(dopamine, DA)是由脑内分泌,在人的中枢神经、肾脏等系统中起着重要作用的一类物质,它的分泌水平与精神分裂症、帕金森综合症等疾病有关,因此研究人体中DA的含量对相关疾病的检测具有重要意义^[10,11,33].Gao等人^[10]用GO对GCE进行修饰,制备了检测DA的电化学生物传感器.由于GO有未被氧化的芳香环,富含离域π电子,同时DA分子含有带正电的芳香环,所以DA分子可以通过π-π堆积作用吸附在GO表面,从而产生大的电化学信号;而干扰物抗坏血酸(ascorbic acid, AA)没有芳香环,且与GO存在静电排斥作用而不产生电化学信号,使电极能在有干扰物存在的检测液体中准确测出DA的含量.

除了π-π作用,对石墨烯进行表面共价修饰也能够提高石墨烯与被检测分子的相互作用.Li等人^[11]用磺化后的石墨烯对GCE进行修饰,用于检测DA.磺酸根所带的负电荷和石墨烯的表面官能团都增强了DA分子与电极之间的作用力,加速了电子转移,同时也降低了抗坏血酸和尿酸的氧化,从而减弱了这2种干扰物的氧化峰对DA氧化峰的影响,提高了检测的选择性和灵敏度.

此外,电化学生物传感器除了用于检测液态物质,还可以检测气体组分.人类呼出气体中含有和疾病相关的微量挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs),通过对呼出气体成分和浓度的检测

可以实现疾病的无创检测.例如,糖尿病患者呼出的丙酮气体含量比正常人高,检测丙酮气体可预测患糖尿病的潜在风险^[34,35].Liu等人^[35]用石墨烯-铁酸锌复合物制备丙酮气体传感器,丙酮气体与金属氧化物表面的O⁻反应,生成CO₂和H₂O,所释放的电子降低了电极表面的电阻,如下式所示.然而,丙酮和其他挥发性气体(如乙酸)的信号难以区分,因此该传感器的专一性有待进一步提高.



硫化氢(H₂S)是口腔异味的生物标志物^[36].研究表明, rGO可与三氧化钼(MoO₃)^[37]或二氧化锡(SnO₂)^[38]复合,形成的纳米复合物均可用于H₂S分子的检测.检测过程中,金属氧化物上的O⁻与H₂S相互作用释放电子,电子回到氧化物上,导致电阻降低,通过数据采集系统可检测传感器的电阻变化.检测限测试结果分别为110℃下40 ppm(ppm,百万分之一)和200℃下1 ppm.在提及的复合传感器中, rGO大的比表面积提高了复合材料的互联性,促进了气体分子的吸附,增强了纳米复合材料之间载流子的快速传输,提高了传感器的灵敏度.不足的是,这些传感器的工作温度过高(>100℃),因此,实现室温下的高灵敏度气体检测将是未来研发氧化物基传感器亟待解决的问题.

最近,过渡金属硫化物二维纳米片作为常温下的气敏传感材料表现出潜在的应用价值.如韩国科学技术院的Jung课题组^[39]报道了基于MoS₂二维纳米片的电子传感器用于丙酮检测,将MoS₂进行超声,形成硫空缺,然后通过简单的溶液搅拌法将具有硫缺陷的MoS₂与巯基烷酸(MUA)进行配体结合. MoS₂膜和被MUA修饰后的MoS₂膜通过真空抽滤得到,再将膜转移到电极上,电极置于气敏室中即可进行目标气体的检测(图1). MUA修饰后的MoS₂对含氧官能团的气体具有降低电极表面电阻的作用,从而产生负响应,而未经修饰的MoS₂产生正响应,根据这一特性制备出响应可调的高性能传感器.该传感器在室温条件下的检测限可达~1 ppm,相比于人体呼出的丙酮浓度(<1.8 ppm),展现出可观的应用前景.然而,其检测结果均是在干燥环境下获得,湿度和呼出气体中其他的VOCs对丙酮气体测试结果的干扰还有待研究,传感器的选择性有待提高.

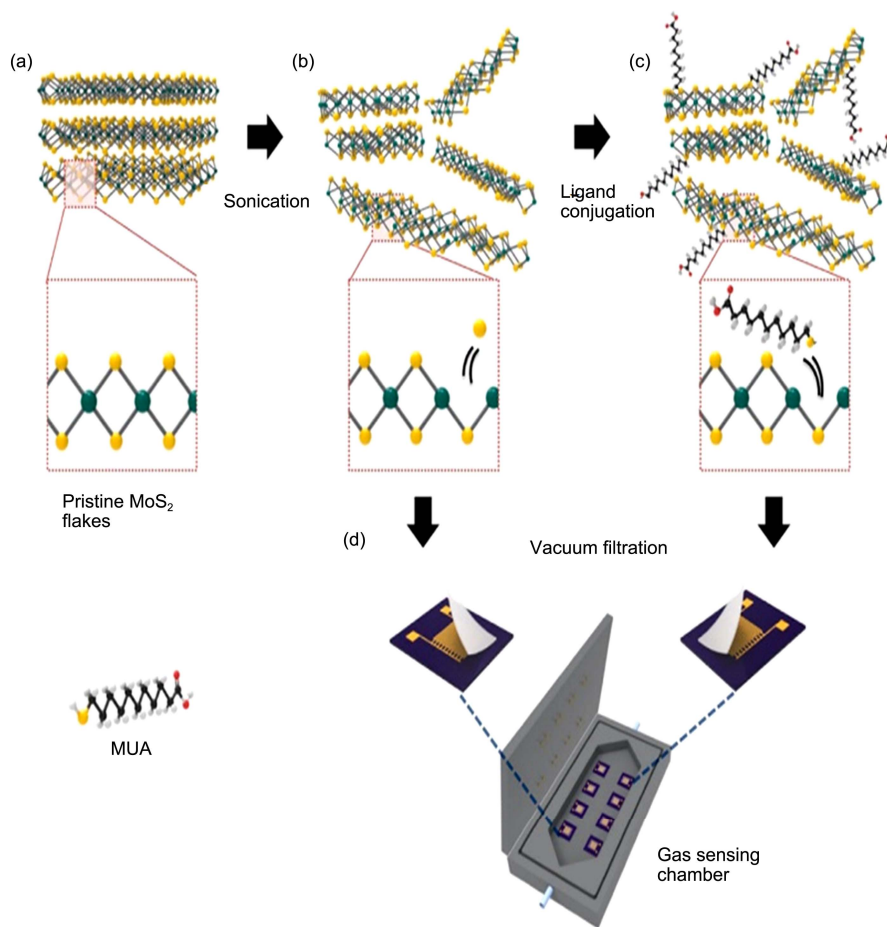


图1 (网络版彩色)(a) 层状MoS₂. (b) 超声之后产生硫空缺的MoS₂. (c) 混合之后MUA结合在MoS₂上. (d) 通过真空抽滤法形成的MoS₂薄膜和MUA-MoS₂薄膜置于气敏室中的微电极上. Reprinted with permission from ref. [39], Copyright © 2014 American Chemical Society

Figure 1 (Color online) (a) Pristine MoS₂ flakes. (b) MoS₂ flakes was ultrasonicated to produce sulfur vacancie. (c) MUA conjugated MoS₂ flakes after solution based mixing process. (d) Loading the primitive and MUA-conjugated MoS₂ films on the microelectrode through vacuum filtration, then mounted on the gas sensing chamber. Reprinted with permission from ref. [39], Copyright © 2014 American Chemical Society

气体传感器的生物相容性和稳定性在Mannoor等人^[40]的工作中也得以体现,将石墨烯沉积在水溶性丝蛋白底物上制成杂化膜,并在膜上镀金形成电极,形成无线线圈.所制得的传感器被转移到牙釉质表面,当呼出气体中的生物标志物吸附在石墨烯上时,石墨烯电阻的变化可被电感耦合射频系统获取.该技术展示出二维纳米材料传感器在可植入/远程医疗设备中的潜在应用前景.

2 场效应晶体管生物传感器

场效应晶体管(field effect transistor, FET)传感器是生物传感器中的另一个重要分支,近年来发展十分迅速,这类传感器采用集成电路工艺,适合批量生产和微型化. FET生物传感器是由源极(source)、漏极

(drain)、栅极(gate)组成,在源极和漏极之间覆盖半导体材料形成导电沟道的同时也作为分子识别元件的载体.和电化学传感器一样,可以用于FET传感器的识别元件包括抗体/抗原、酶、细胞、DNA、细菌等.由于二维纳米材料具有较大的活性比表面积,可增加目标分子的吸附,有效提高传感器的灵敏度.同时FET具有可集成、可微型化、多功能的优点,结合二者的优点使二维材料基FET生物传感器在疾病检测方面有更好的发展优势.在过去报道的二维材料基FET生物传感器中,根据栅极的位置不同,主要分为底栅型(图2(a))和顶栅型(图2(b))传感器^[41].底栅型FET传感器的栅极在传感器的背面,主要用于检测气体分子,被检测的气体分子吸附在二维纳米材料上,会引起FET传感器的电导变化,通过检测该信号的变

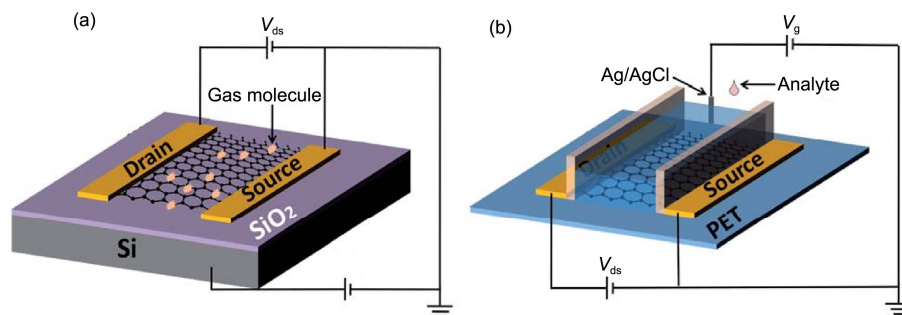


图2 (网络版彩色)背栅型(a)和顶栅型(b)FET生物传感. V_{ds} , 漏极-源极电压; V_g , 栅极电压^[41]. Reprinted with permission from ref. [41], Copyright © 2012 The Royal Society of Chemistry

Figure 2 (Color online) Schematic of back-gate (a) and top-gate (b) FET biosensor. V_{ds} , drain-source voltage; V_g , gate voltage. Reprinted with permission from ref. [41], Copyright © 2012 The Royal Society of Chemistry

化即可检测出目标物的浓度. 顶栅型FET传感器又称为液栅型FET传感器, 直接将栅极浸入源极和漏极之间的液体中, 二维纳米材料上固定的识别分子与液体中的目标分子作用, 检测该信号变化可检测目标物的浓度.

2.1 酶场效应管传感器

酶场效应管是在FET的敏感栅表面固定一层酶物质, 酶与目标分子作用产生的信号经转换元件转换成电信号, 从而测定目标分子. Kwak等人^[42]利用CVD法制备石墨烯, 并用交联剂(1-苄基羧基琥珀酰亚胺酯)将GOx固定在石墨烯上, 形成液栅型FET生物传感器. 根据GOx对葡萄糖进行催化反应生成的 H_2O_2 来检测葡萄糖浓度, 其检测范围为3.3~10.9 mmol/L. 事实上, 用于固定酶的交联剂既可以是上述提到的化学材料, 也可以是生物材料. 例如, You等人^[43]发现蚕丝蛋白有优越的生物相容性, 既可作基底又可作交联剂, 并且能长时间保留酶的活性. 采用蚕丝蛋白在石墨烯上固定GOx, 构建出高灵敏度、高选择性且寿命长的FET生物传感器, 可用于血糖的连续监测.

2.2 免疫场效应管传感器

免疫场效应管传感器由FET和免疫反应中具有分子识别功能的敏感膜组成. Mao等人^[44]采用垂直取向石墨烯(vertically-oriented graphene, VG)作为传感沟道材料研发了新型抗体FET生物传感器. 基于垂直取向石墨烯的沟道有效暴露出石墨烯的2个表面, 增加了被固定抗体的量, 从而提高了检测的灵敏度. 其制作工艺包括利用直流等离子体增强化学气相沉积

法在源极和漏极之间直接合成VG, 将AuNPs与抗体(anti-IgG)的偶联物沉积在VG表面作为分子识别系统. 免疫球蛋白(IgG)与其抗体的结合引起石墨烯的电导率变化, 以实现IgG有选择性的高灵敏度检测(图3). 和CVD的石墨烯相比, rGO有着可大量制备、液相可分散、表面含含氧官能团等优点, 有利于通过静电作用^[45]、交联反应^[46]等物理/化学方法大量固定生物识别分子. 基于rGO的FET免疫传感器已被成功地应用于检测大肠杆菌^[45]、轮状病毒^[46]、HIV^[47]等.

和零带隙的石墨烯相比, 半导体 MoS_2 纳米片在FET器件中有更高的开关比(On-Off ratio)^[48], 使 MoS_2 纳米片在近几年FET生物传感器研发中受到广泛关注. Sarkar等人^[8]通过硅烷偶联剂将Biotin修饰在 MoS_2 表面制备了FET生物传感器, 其中Biotin作为受体, Avidin作为目标分子, 两者通过特异性作用结合起来改变 MoS_2 沟道性质, 从而实现有选择性地检测

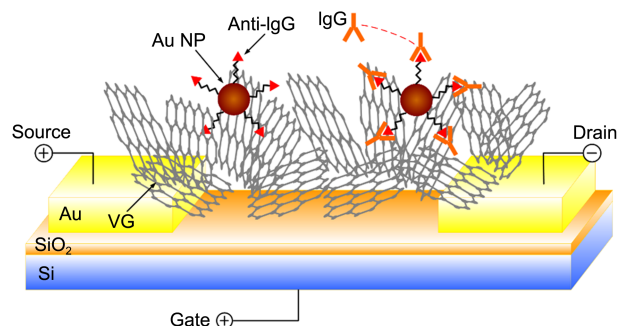


图3 (网络版彩色)在源极和漏极之间直接生长VG的FET生物传感器示意图, AuNPs-抗体偶联物吸附在VG表面. Reprinted with permission from ref. [44], Copyright © 2013 Nature Publishing Group

Figure 3 (Color online) Schematic of the VG FET sensor by direct growth of VG between the drain and the source electrodes. Probe antibody is labeled to the VG surface through AuNPs. Reprinted with permission from ref. [44], Copyright © 2013 Nature Publishing Group

Avidin. 对于前列腺癌而言, 前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)是检测该疾病的生物标志物, 因此准确检测PSA对前列腺疾病的诊断和治疗尤为重要. Wang等人^[48]和Lee等人^[3]各自独立研发了基于MoS₂纳米片的FET生物传感器, 用于检测蛋白质PSA. Wang等人^[48]采用流体传感装置, 在MoS₂纳米片的表面均匀覆盖1层二氧化铪. 二氧化铪不仅可以作为栅极介电层, 还可以在液体环境下保护金属电极. 硅烷偶联剂共价连接二氧化铪和抗体, 使传感生物功能化, 在流体传感中可以稳定化抗体结合点、延长传感器的寿命. Lee等人^[3]则采用了背栅式FET生物传感器(图4), PSA抗体固定在MoS₂上, 可有效检测PSA抗原. MoS₂纳米片的疏水性使其能更好地吸附具有识别能力的PSA抗体分子, 加上其良好的信号转换能力, 使得传感器具有较高的灵敏度, 检测限低至1 pg/mL.

2.3 DNA场效应管传感器

DNA场效应管传感器通过在FET的沟道表面固定一层核酸物质(如单链DNA), 目标DNA链与沟道表面修饰的核酸之间通过杂化作用改变沟道电学性质, 经转换元件转换成可识别信号, 从而测得相对应的核酸. 比如, Yin等人^[49]通过光化还原将铂纳米粒子(platinum nanoparticles, PtNPs)直接合成在rGO纳米片上, 从而增强载流子在rGO沟道中的传输能力. 同时, 硫醇化的单链DNA探针通过铂-硫键结合在rGO上, 与目标DNA杂交后引起漏电流的降低, 通过检测漏电流的变化进而测得目标DNA. 这种液栅型

场效应管可进行实时DNA检测, 检测限达到 2.40×10^{-9} mol/L.

肽核酸由中性肽骨架构成, 该中性特征可以消除杂化链之间的静电排斥, 因此肽核酸也可以作为捕获探针和DNA序列特异性结合. Cai等人^[50]通过交联剂(1-苊丁酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯)将肽核酸固定在rGO上, 利用肽核酸和DNA的杂交特性检测目标DNA, 展现出较高的灵敏度和专一性.

同样, FET传感器也可用于气体的检测. 相比于传统电阻式传感器, FET气敏传感器展示出更高的灵敏度和选择性. FET传感器也可用于监测人体呼气中特定成分的含量, 最终起到对相应疾病预警的作用. 一氧化氮(NO)是哮喘病的生物标志物之一^[51,52]. Li等人^[53]研发了基于MoS₂的FET传感器用于检测NO气体, 检测限低至0.8 ppm. 基于MoS₂的传感器还可以检测NO₂气体^[7,54-56], 事实上, 由于NO气体在空气中很容易被氧化成NO₂气体, 因此这些NO₂传感器在哮喘的无创和早期检测上有很大的发展潜力.

氨气、乙醇分别是检测肾衰竭、肺癌的生物标志物^[36]. Huo等人^[57]用基于WS₂的FET生物传感器检测氨气和乙醇. 氨气和乙醇作为电子给体, 与WS₂纳米片之间会产生电荷转移, 提高了WS₂的导电性, 实现了WS₂ FET对氨气和乙醇常温下的高灵敏度传感. 然而, FET气敏传感器也面临在复杂气体环境中选择性不高的问题. 另外, 探索新型可实现同时检测几种不同挥发性小分子的传感装置对疾病的无创、早期检测具有重要的意义.

3 展望

近年来, 以石墨烯等二维纳米材料为基础, 研究人员制备了许多具有高灵敏度、强选择性的生物传感器用于检测与疾病相关的生物标志物. 本文介绍了基于二维纳米材料电化学生物传感器和场效应管生物传感器的工作原理、制备方法以及在疾病检测中的初步应用.

基于二维纳米材料的生物传感器有望成为传统生化分析的重要补充, 为临床及急救医疗等提供帮助. 但是基于现阶段的研究, 二维纳米材料的电化学生物传感器和FET生物传感器都存在一些不足, 亟待解决, 如: 传感器难于规模化制备, 生产成本低, 不能满足经济环保要求; 样品检测单一, 未能实现多组份同时检测; 二维纳米材料的生物相容性不高、导电

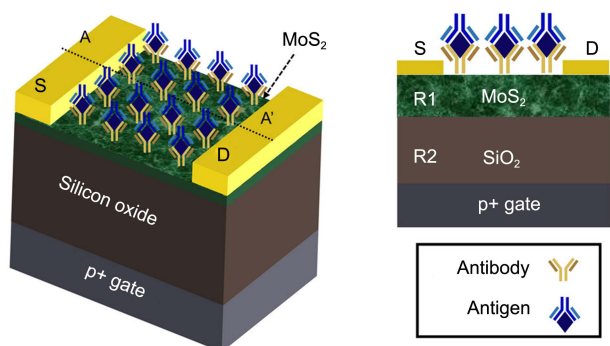


图4 (网络版彩色)基于MoS₂纳米片的FET生物传感器的示意图. Reprinted with permission from ref. [3], Copyright © 2014 Nature Publishing Group
Figure 4 (Color online) Schematic of the immuno FET biosensor based on MoS₂ nanosheets. Reprinted with permission from ref. [3], Copyright © 2014 Nature Publishing Group

率较差等问题。

目前基于二维纳米材料生物传感器的研究仍以石墨烯和 MoS_2 纳米片等材料为主,随着二维纳米材料合成方法、材料类型的不断更新,更多的二维纳米材料将被用于传感器的制备,如黑磷^[58-60]、过渡金属碳化物^[61]、氮化硼^[62]、氮化碳^[63]等。同时,二维纳米

材料生物传感器的制备将会结合纳米技术、微加工技术,进一步提升柔性化、微型化和集成化的程度。制备便捷式、实用化、产品化的二维纳米材料生物传感器,从而实现灵敏、快速、准确的临床及家庭式疾病检测,为实现具有高致病风险的疾病(肿瘤、心脑血管疾病、传染病等)的早期诊断提供有效方法。

参考文献

- 1 Arakawa T, Wang X, Kajiro T, et al. A direct gaseous ethanol imaging system for analysis of alcohol metabolism from exhaled breath. *Sensor Actuat B Chem*, 2013, 186: 27-33
- 2 Gouma P, Kalyanasundaram K, Yun X. Nanosensor and breath analyzer for ammonia detection in exhaled human breath. *IEEE Sens J*, 2010, 10: 49-53
- 3 Lee J, Dak P, Lee Y, et al. Two-dimensional layered MoS_2 biosensors enable highly sensitive detection of biomolecules. *Sci Rep*, 2014, 4: 7352
- 4 Su S, Sun H F, Xu F, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase and a biosensor for glucose based on a glass carbon electrode modified with MoS_2 nanosheets decorated with gold nanoparticles. *Microchim Acta*, 2014, 181: 1497-1503
- 5 Zhu L M, Luo L Q, Wang Z X. DNA electrochemical biosensor based on thionine-graphene nanocomposite. *Biosens Bioelectron*, 2012, 35: 507-511
- 6 Guo Y L, Wu B, Liu H T, et al. Electrical assembly and reduction of graphene oxide in a single solution step for use in flexible sensors. *Adv Mater*, 2011, 23: 4626-4630
- 7 He Q Y, Zeng Z Y, Yin Z Y, et al. Fabrication of flexible MoS_2 thin-film transistor arrays for practical gas-sensing applications. *Small*, 2012, 8: 2994-2999
- 8 Sarkar D, Liu W, Xie X J, et al. MoS_2 field-effect transistor for next generation label-free biosensors. *ACS Nano*, 2014, 8: 3992-4003
- 9 Huang J W, Dong Z P, Li Y R, et al. MoS_2 nanosheet functionalized with Cu nanoparticles and its application for glucose detection. *Mater Res Bull*, 2013, 48: 4544-4547
- 10 Gao F, Cai X L, Wang X, et al. Highly sensitive and selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at graphene oxide modified electrode. *Sensor Actuat B Chem*, 2013, 186: 380-387
- 11 Li S J, He J Z, Zhang M J, et al. Electrochemical detection of dopamine using water-soluble sulfonated graphene. *Electrochim Acta*, 2013, 2: 58-65
- 12 Yu X W, Sheng K X, Chen J, et al. Electrochemical biosensing based on graphene modified electrodes (in Chinese). *Acta Chim Sin*, 2014, 72: 319-332 [于小雯, 盛凯旋, 陈骥, 等. 基于石墨烯修饰电极的电化学生物传感. *化学学报*, 2014, 72: 319-332]
- 13 Jariwala D, Sangwan V K, Lauhon L J, et al. Emerging device applications for semiconducting two-dimensional transition metal dichalcogenides. *ACS Nano*, 2014, 8: 1102-1120
- 14 Huang X, Zeng Z Y, Zhang H. Metal dichalcogenide nanosheets: Preparation, properties and applications. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 1934-1946
- 15 Wu S X, He Q Y, Tan C L, et al. Graphene-based electrochemical sensors. *Small*, 2013, 9: 1160-1172
- 16 Wang X X, Nan F X, Zhao J L, et al. A label-free ultrasensitive electrochemical DNA sensor based on thin-layer MoS_2 nanosheets with high electrochemical activity. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 386-391
- 17 Liu B L, Chen L, Liu G, et al. High-performance chemical sensing using schottky-contacted chemical vapor deposition grown monolayer MoS_2 transistors. *ACS Nano*, 2014, 8: 5304-5314
- 18 Cao X Y. Ultra-sensitive electrochemical DNA biosensor based on signal amplification using gold nanoparticles modified with molybdenum disulfide, graphene and horseradish peroxidase. *Microchim Acta*, 2014, 181: 1133-1141
- 19 Wang T Y, Zhu R Z, Zhuo J Q, et al. Direct detection of DNA below ppb level based on thionin-functionalized layered MoS_2 electrochemical sensors. *Anal Chem*, 2014, 86: 12064-12069
- 20 Zhang Y H, Xu W J, Yang K. Progress in electrochemical biosensors (in Chinese). *J Integr Technol*, 2014, (3): 19-27 [张义红, 许文静, 杨坤. 电化学生物传感器的研究进展. *集成技术*, 2014, (3): 19-27]
- 21 Luo X L, Xu J J, Chen H Y. Biosensors based on field-effect transistors (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2004, 32: 1395-1400 [罗细亮, 徐静娟, 陈洪渊. 场效应晶体管生物传感器. *分析化学*, 2004, 32: 1395-1400]

- 22 Chen A, Chatterjee S. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 5425–5438
- 23 Zhao H Y, Wang B B, Li X R, et al. Study of high sensitive glucose biosensor based on reduced graphene oxide/Prussian blue-chitosan nanocomposite (in Chinese). *J Hebei Univ Sci Technol*, 2014, 35: 237–241 [赵海艳, 王贝贝, 李献锐, 等. 基于还原氧化石墨烯/普鲁士蓝-壳聚糖纳米复合物的高灵敏葡萄糖生物传感器研究. *河北科技大学学报*, 2014, 35: 237–241]
- 24 Liao C Z, Mak C, Zhang M, et al. Flexible organic electrochemical transistors for highly selective enzyme biosensors and used for saliva testing. *Adv Mater*, 2015, 27: 676–681
- 25 Wang Z H, Guo X M, Xia J F, et al. Development of electrochemical biosensors based on nanomaterials (in Chinese). *J Instrum Anal*, 2011, 30: 1216–1223 [王宗花, 郭新美, 夏建飞, 等. 基于纳米材料电化学生物传感器的研究进展. *分析测试学报*, 2011, 30: 1216–1223]
- 26 Liu F, Xiang G M, Yuan R, et al. Procalcitonin sensitive detection based on graphene-gold nanocomposite film sensor platform and single-walled carbon nanohorns/hollow Pt chains complex as signal tags. *Biosens Bioelectron*, 2014, 60: 210–217
- 27 Wang X, Chu C C, Shen L, et al. An ultrasensitive electrochemical immunosensor based on the catalytical activity of MoS_2 -Au composite using Ag nanospheres as labels. *Sensor Actuat B Chem*, 2015, 206: 30–36
- 28 Burcu B E, Kemal S M. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta*, 2015, 132: 162–174
- 29 Lin P, Luo X T, Hsing I M, et al. Organic electrochemical transistors integrated in flexible microfluidic systems and used for label-free DNA sensing. *Adv Mater*, 2011, 23: 4035–4040
- 30 Huang K J, Liu Y J, Wang H B, et al. Signal amplification for electrochemical DNA biosensor based on two-dimensional graphene analogue tungsten sulfide-graphene composites and gold nanoparticles. *Sensor Actuat B Chem*, 2014, 191: 828–836
- 31 Huang K J, Liu Y J, Zhang J Z, et al. A sequence-specific DNA electrochemical sensor based on acetylene black incorporated two-dimensional CuS nanosheets and gold nanoparticles. *Sensor Actuat B Chem*, 2015, 209: 570–578
- 32 Li Y, Deng J, Fang L C, et al. A novel electrochemical DNA biosensor based on HRP-mimicking hemin/G-quadruplex wrapped GOx nanocomposites as tag for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 1–6
- 33 Reyes S, Fu Y H, Double K L, et al. Trophic factors differentiate dopamine neurons vulnerable to Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 2013, 34: 873–886
- 34 Xiao T, Wang X Y, Zhao Z H, et al. Highly sensitive and selective acetone sensor based on C-doped WO_3 for potential diagnosis of diabetes mellitus. *Sensor Actuat B Chem*, 2014, 199: 210–219
- 35 Liu F, Chu X F, Dong Y P, et al. Acetone gas sensors based on graphene- ZnFe_2O_4 composite prepared by solvothermal method. *Sensor Actuat B Chem*, 2013, 188: 469–474
- 36 Konvalina G, Haick H. Sensors for breath testing: From nanomaterials to comprehensive disease detection. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 66–76
- 37 Bai S L, Chen C, Luo R X, et al. Synthesis of MoO_3 /reduced graphene oxide hybrids and mechanism of enhancing H_2S sensing performances. *Sensor Actuat B Chem*, 2015, 216: 113–120
- 38 Choi S J, Jang B H, Lee S J, et al. Selective detection of acetone and hydrogen sulfide for the diagnosis of diabetes and halitosis using SnO_2 nanofibers functionalized with reduced graphene oxide nanosheets. *ACS Appl Mater Inter*, 2014, 6: 2588–2597
- 39 Kim J S, Yoo H W, Choi H O, et al. Tunable volatile organic compounds sensor by using thiolated ligand conjugation on MoS_2 . *Nano Lett*, 2014, 14: 5941–5947
- 40 Mannoor M S, Tao H, Clayton J D, et al. Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. *Nat Commun*, 2012, 3: 763
- 41 He Q Y, Wu S X, Yin Z Y, et al. Graphene-based electronic sensors. *Chem Sci*, 2012, 3: 1764–1772
- 42 Kwak Y H, Choi D S, Kim Y N, et al. Flexible glucose sensor using CVD-grown graphene-based field effect transistor. *Biosens Bioelectron*, 2012, 37: 82–87
- 43 You X Q, Pak J J. Graphene-based field effect transistor enzymatic glucose biosensor using silk protein for enzyme immobilization and device substrate. *Sensor Actuat B Chem*, 2014, 202: 1357–1365
- 44 Mao S, Yu K H, Chang J B, et al. Direct growth of vertically-oriented graphene for field-effect transistor biosensor. *Sci Rep*, 2013, 3: 1696
- 45 Chang J B, Mao S, Zhang Y, et al. Ultrasonic-assisted self-assembly of monolayer graphene oxide for rapid detection of *Escherichia coli* bacteria. *Nanoscale*, 2013, 5: 3620–3626
- 46 Liu F, Kim Y H, Cheon D S, et al. Micropatterned reduced graphene oxide based field-effect transistor for real-time virus detection. *Sensor Actuat B Chem*, 2013, 186: 252–257
- 47 Kwon O S, Lee S H, Park S J, et al. Large-scale graphene micropattern nano-biohybrids: High-performance transducers for FET-type flexible fluidic HIV immunoassays. *Adv Mater*, 2013, 25: 4177–4185
- 48 Wang L, Wang Y, Wong J I, et al. Functionalized MoS_2 nanosheet-based field-effect biosensor for label-free sensitive detection of cancer marker proteins in solution. *Small*, 2014, 10: 1101–1105

- 49 Yin Z Y, He Q Y, Huang X, et al. Real-time DNA detection using Pt nanoparticle-decorated reduced graphene oxide field-effect transistors. *Nanoscale*, 2012, 4: 293–297
- 50 Cai B J, Wang S T, Huang L, et al. Ultrasensitive label-free detection of PNA-DNA hybridization by reduced graphene oxide field-effect transistor biosensor. *ACS Nano*, 2014, 8: 2632–2638
- 51 Munakata M. Exhaled nitric oxide (FeNO) as a non-invasive marker of airway inflammation. *Allergol Int*, 2012, 61: 365–372
- 52 Obermeier J, Trefz P, Wex K, et al. Electrochemical sensor system for breath analysis of aldehydes, CO and NO. *J Breath Res*, 2015, 9: 016008
- 53 Li H, Yin Z Y, He Q Y, et al. Fabrication of single- and multilayer MoS₂ film-based field-effect transistors for sensing NO at room temperature. *Small*, 2012, 8: 63–67
- 54 Late D J, Huang Y K, Liu B, et al. Sensing behavior of atomically thin-layered MoS₂ transistors. *ACS Nano*, 2013, 7: 4879–4891
- 55 Cho B, Hahm M G, Choi M, et al. Charge-transfer-based gas sensing using atomic-layer MoS₂. *Sci Rep*, 2015, 5: 8052
- 56 Donarelli M, Prezioso S, Perrozzi F, et al. Response to NO₂ and other gases of resistive chemically exfoliated MoS₂-based gas sensors. *Sensor Actuat B Chem*, 2015, 207: 602–613
- 57 Huo N, Yang S, Wei Z, et al. Photoresponsive and gas sensing field-effect transistors based on multilayer WS₂ nanoflakes. *Sci Rep*, 2014, 4: 5209
- 58 Cai Y Q, Ke Q Q, Zhang G, et al. Energetics, charge transfer, and magnetism of small molecules physisorbed on phosphorene. *J Phys Chem C*, 2015, 119: 3102–3110
- 59 Kou L Z, Frauenheim T, Chen C F. Phosphorene as a superior gas sensor: selective adsorption and distinct *I-V* response. *J Phys Chem Lett*, 2014, 5: 2675–2681
- 60 Li L K, Yu Y J, Ye G J, et al. Black phosphorus field-effect transistors. *Nat Nanotechnol*, 2014, 9: 372–377
- 61 Halim J, Lukatskaya M R, Cook K M, et al. Transparent conductive two-dimensional titanium carbide epitaxial thin films. *Chem Mater*, 2014, 26: 2374–2381
- 62 Zhang K, Yap F L, Li K, et al. Large scale graphene/hexagonal boron nitride heterostructure for tunable plasmonics. *Adv Funct Mater*, 2014, 24: 731–738
- 63 Zhou Z X, Wang J H, Yu J C, et al. Dissolution and liquid crystals phase of 2D polymeric carbon nitride. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 2179–2182

Electrochemical biosensors based on two dimensional nano-materials for disease diagnosis

LI SuQin, WANG XiaoShan, YANG Kai, ZHAO Li, WU Qiong, HUANG Xiao & HUANG Wei

Key Laboratory of Flexible Electronics (KLOFE) & Institute of Advanced Materials (IAM), Jiangsu National Synergistic Innovation Center for Advanced Materials (SICAM), Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China

Development of techniques for early and effective diagnosis of diseases is of paramount importance to people and society. It is known that many diseases can be directly detected by monitoring trace amount of the disease-related biomarkers in one's blood, urine, saliva or even breath. So far, large analytical instruments are mainly used to test the various disease-related biomarkers, however, their large size, complex operation and high price have restricted their wider application for disease diagnosis. To overcome this problem, the development of a variety of miniaturized sensors for biomarker detection plays a key role in the health care industry. The recent advance in nanomaterials and nanotechnology has enabled biosensors with high sensitivity, good selectivity and fast response.

Over the last decade, graphene, which is the thinnest and most representative two dimensional (2D) material, has aroused great research interest because of its exceptional electronic, optical and mechanical properties. Other kinds of 2D materials, such as hexagonal BN (h-BN) and transition metal dichalcogenides (TMDs) derived from their layered bulk crystals, have also been intensively investigated in recent years due to their promising properties and a broad range of applications such as electronics, optoelectronics, catalysis, energy storage devices and so on. Especially, these 2D materials have been extensively used to fabricate sensors in recent years. For example, due to its excellent electrical conductivity, large surface area and rapid electron transfer rate, reduced graphene oxide (rGO) is suitable to detect biological materials with the ability to greatly amplify the electrochemical sensing signals. The typical graphene analogue, molybdenum disulfide (MoS_2), also can be used to fabricate biosensors. These 2D materials which have shown attractive physical, chemical and catalytic properties are expected to offer more opportunities for developing biosensors with improved sensitivity, flexibility and wearability.

This mini-review summarizes the preparation and application of graphene and MoS_2 -based electrochemical sensors that can be potentially used for disease detection, such as diabetes, lung cancer and prostate cancer. Especially those sensors based on rGO or MoS_2 hybridized with metal nanoparticles or organic materials will be discussed. These sensors can be classified based on the surface recognition molecules used, such as enzymes, DNAs, anti-body and so on. High-yield preparation of 2D materials at low cost remains challenge, and the development of efficient techniques for sensor fabrication is urgent needed. With more and more 2D materials being prepared and investigated, such as black phosphate, metal carbides, metal nitrides and so on, developing of novel sensing systems requires continuous efforts to achieve enhanced sensitivity and selectivity. More importantly, sensor arrays for simultaneous multi-target detection will be one of the main challenges for future development.

two dimensional nanomaterials, disease detection, biosensors, electrochemical sensors, field effect transistor sensors

doi: 10.1360/N972015-01387