

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2017.01.019

医学信号处理与医学仪器

基于石墨烯与氧化锆纳米复合材料制成用于肺炎克雷伯菌检测的传感器

吴雪峰, 于秀艳

吉林省肿瘤医院检验科, 吉林 长春 130000

【摘要】目的:用基于石墨烯与氧化锆纳米复合材料所制成的传感器检测肺炎克雷伯菌(KPN),从而实现KPN的快速、精确检测。**方法:**利用电化学传感器,选择差分脉冲伏安法,在初始电位为-0.6 V、终止电位为0.2 V、扫描速率为50 mV/s的实验条件下,完成KPN检测。**结果:**在目的DNA浓度为 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L时,传感器的峰电流变化值(ΔI)与KPN的DNA浓度(C_{ssDNA})的对数呈良好线性关系,其线性回归方程为 $\Delta I = 0.337 \log C_{ssDNA} + 3.9993$,相关系数为0.9917,检出限为 (3.33×10^{-13}) mol/L。**结论:**基于石墨烯与氧化锆纳米复合材料所制成的传感器表现出良好的灵敏度与稳定性,可实现传感器对KPN的快速、稳定检测。

【关键词】肺炎克雷伯菌;石墨烯;氧化锆;纳米复合材料;电化学传感器

【中图分类号】R372

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2017)01-0095-04

A graphene and zirconia nanocomposite-based sensor for detection of *Klebsiella pneumoniae*

WU Xuefeng, YU Xiuyan

Department of Clinical Laboratory, Jilin Tumor Hospital, Changchun 130000, China

Abstract: Objective To fabricate a sensor using graphene and zirconia nanocomposite for rapid and accurate detection of *Klebsiella pneumoniae* (KPN). **Methods** An electrochemical sensor was used for KPN detection using the differential pulse voltammetry method with the initial potential of -0.6 V, termination potential of 0.2 V and scanning rate of 50 mV/s. **Results** The variation of the peak current of the sensor (ΔI) and the logarithmic KPN DNA concentration (C_{ssDNA}) showed a good linear relationship with the target DNA concentration range of $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L. The linear regression equation was $\Delta I = 0.337 \log C_{ssDNA} + 3.9993$ with a correlation coefficient of 0.9917 and a detection limit of 3.33×10^{-13} mol/L. **Conclusion** The sensor based on graphene and zirconia nanocomposite is capable of rapid KPN detection with a good sensitivity and stability.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; graphene; zirconia; nanocomposite; electrochemical sensor

前言

肺炎克雷伯菌(KPN)是临床感染性疾病和医院感染中最常见的、重要的病原菌。我国医院KPN感染中,获得性肺炎发病率较高,占3.33%;重症监护室是肺炎克雷伯肺部感染的高发区,尤其是机械通气的患者,其发病率为9%~45%。现在KPN的检测方

法主要有传统分离鉴定、分子生物学(定性PCR、实时定量PCR)等,但需要复杂的样品预处理过程,分析时间较长,且难以定量测定。作为一种高效、快速的DNA检测方法,DNA传感器广泛地应用于疾病的诊断、传染性病原体的检测^[1]、药物的筛选以及法医学的应用^[2-4]。DNA传感器具有高灵敏度、强选择性以及低成本等优点,逐步被应用于检测DNA序列或与人类疾病相关的细菌感染,其检测原理是将KPN的DNA杂交化学信号转变成电信号,可应用于KPN目的DNA的检测。

石墨烯是一种新型的二维平面纳米材料,具有表面积大,突出的导热和力学性能及促进活性物质

【收稿日期】2016-08-31

【基金项目】国家自然科学基金(81573200)

【作者简介】吴雪峰,硕士,副主任技师,研究方向:生物传感器与代谢组学,E-mail: 22061185@qq.com

【通信作者】于秀艳,硕士,主任技师,研究方向:生物传感器与代谢组学,E-mail: yuxiuyan1968@sohu.com

的电子传递速率的优点,因此石墨烯被广泛应用于电化学传感领域的研究。与碳纳米管相比,石墨烯具有以下两个优点:(1)石墨烯表面不含有金属杂质;(2)用于生产石墨烯的材料容易制备。Shang与其合作者第一次报道了以石墨烯为基础纳米材料的生物传感器,并证明了石墨烯具有快速的电子转移能力,此传感器能同时检测尿酸、多巴胺与抗坏血酸^[5-8]。与此同时,Zhou等^[9]和Kim等^[10]研究了石墨烯的电化学性能,证明了石墨烯具有高效的电子转移速率。

氧化锆是一种无机氧化物,具有热稳定性、化学惰性、无毒性等,此外,其对于含氧的官能团也具有极强的亲和力^[11-14]。氧化锆是一种用来固定含氧的生物分子的理想材料,张娜等^[15]制造了氧化锆/聚中性红电化学DNA传感器,用于转基因植物CaMV35S启动子基因序列的测定。本研究中,采用氧化锆/石墨烯(ZrO₂/Gr)复合材料所制成的传感器,检测KPN目的DNA,此传感器结合了氧化锆与石墨烯的优点(石墨烯具有较大的表面体积比和良好的生物传导性,氧化锆具有良好的生物相容性和富集含氧官能团的能力),同时利用了氧化锆与石墨烯复合的协同效应,利用氧化锆/石墨烯复合材料所制成的DNA传感器具有非常大的应用前景。

1 实验部分

1.1 材料与方法

实验材料包括:CHI660A电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)、扫描电子显微镜(FEI Quanta 200)(荷兰FEI公司)、超声波清洗器(KQ-100)(昆山超声仪器有限公司)、DNA分子杂交箱(Model 136400)(美国Boeckel scientific公司)、pH计(pH700型)(美国Eutech仪表公司)、数显电热恒温水浴锅(H·S21-6-S)(上海市跃进医疗器械厂)、电子天平(JJ200)(美国G&G仪器公司)、Mill-Q纯水机(美国Millipore公司)、尼龙电极抛光布(上海辰华仪器有限公司)、变速涡旋器(Vortex.Genie5)(美国Scientific Industries公司)、石墨烯粉末(南京先锋纳米科技有限公司)、N-N二甲基甲酰胺(DMF)(分析纯)(Sigma-Aldrich公司)、氧氯化锆(分析纯)(Sigma-Aldrich公司)、乙二胺四乙酸钠(分析纯)(Sigma-Aldrich公司)、十二烷基苯磺酸钠(分析纯)(Sigma-Aldrich公司)、铁氰化钾(分析纯)(天津市福晨化学试剂厂公司)。

人工合成DNA探针序列和目的DNA序列分别为:

(1)5'端修饰磷酸基的DNA探针序列(记为

ssDNA):

5'-PO₄-TCT GGA CCG CTG GGA GCT GG-3'

(2)目的DNA序列(记为cDNA):

5'-CCAGCTCCCAGCGGTCCAGA-3'。

1.2 氧化锆/石墨烯修饰电极的制备

石墨烯粉末2 mg分散于DMF(1.0 mL)中,并通过超声波2 h剥离,制造Gr均匀溶液。在经过预处理的玻碳电极(Glassy Carbon Electrode, GCE)表面,滴加5 μ L石墨烯,然后红外线烤箱烘干,命名为Cr/GCE。通过循环伏安法,将氧化锆固定在Cr/GCE表面:Cr/GCE浸在20 mmol/L的ZrOCl₂和0.1 mol/L的KCl的水溶液电解质中,在-1.1~+0.7 V中,以20 mV/s,连续扫描10个周期。

1.3 DNA的固定和杂交

ssDNA固定在电极表面的步骤如下:将5 μ L的浓度为(1.0 \times 10⁻⁶)mol/L的ssDNA溶液抛在ZrO₂/Cr电极表面,然后ssDNA/ZrO₂/Cr电极在室温干燥。这个电极在室温中用十二烷基磺酸钠(SDS)和超纯水清洗这个电极,洗掉未固定的ssDNA。然后,将这个ssDNA/ZrO₂/Cr/GCE准备下一步使用。

双链DNA(dsDNA)杂交步骤如下:将5 μ L的(1.0 \times 10⁻⁶) mol/L目的DNA滴加在ssDNA/ZrO₂/Cr/GCE表面,杂交时间30 min,杂交温度40℃,然后dsDNA/ZrO₂/Cr/GCE表面用SDS溶液与双蒸水冲洗掉未固定的DNA。

1.4 电化学信号检测

以ssDNA/ZrO₂/Gr/GCE、dsDNA/ZrO₂/Gr/GCE为工作电极,铂柱电极为对电极,Ag/AgCl电极为参比电极,差分脉冲伏安法扫描,参数如下:初始电位为-0.6 V,终止电位为0.2 V,扫描速度为50 mV/s。

2 结果与讨论

2.1 扫描电子显微镜表征修饰电极

图1是不同材料修饰GCE的扫描式电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)图像。其中图1a是石墨烯修饰的GCE表面的SEM图像,由图中可以看出,石墨烯能够均匀地分散、固定在GCE表面;图1b是利用循环伏安法在Cr/GCE表面修饰氧化锆纳米材料的SEM图像,由图中可以看出,GCE表面的氧化锆纳米颗粒大小均匀,分布规则,呈颗粒状。

2.2 不同电极的循环伏安表征

图2a为裸电极的循环伏安(CV)图,当修饰了石墨烯之后(图2b),CV图电流明显增大,表明石墨烯有提高电流导电性的作用,随之,修饰氧化锆纳米材

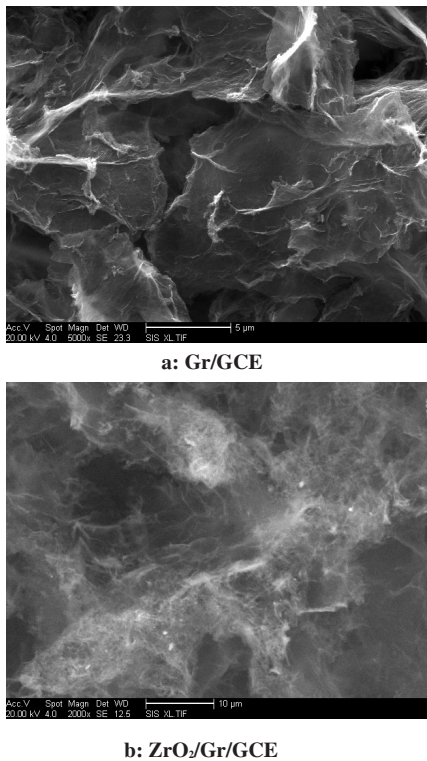
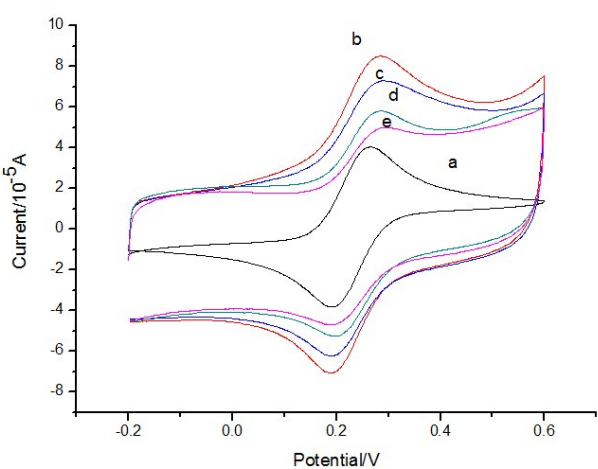


图1 不同材料修饰GCE的SEM图像
Fig.1 Scanning electron microscopic (SEM) image of glassy carbon electrode (GCE) modified by different materials

料(图 2c),从图中可以看出,修饰氧化锆之后,电流减小,表明氧化锆有一定的阻碍电子转移的作用;当裸电极表面修饰了 ZrO_2/Cr 纳米复合材料之后,与裸电极(图 2a)进行对比,其电流明显增大,因此,传感器灵敏度明显增强。同时,由于氧化锆对于含氧的官能团具有极强的亲和力,利用氧化锆此特性所制造的传感器,具有极好的稳定性;当在 ZrO_2/Cr 复合修饰电极表面固定 ssDNA 之后,CV 图的峰电流下降(图 2d),其原因是修饰的 ssDNA 带有负电荷,与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液存在静电排斥,阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在电极表面的电子转移。而当在电极表面与目的 DNA 进行杂交之后(图 2e),电极的峰电流进一步减小,这是由于与 ssDNA 相比,dsDNA 带有更多的负电荷,对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液的静电排斥作用更强。

2.3 实验条件的优化

实验过程中,我们延长杂交时间,峰电流在杂交前后的变化量 (ΔI) 也随之增加,当杂交时间达到 30 min 时, ΔI 达到最大,之后随着杂交时间进一步延长, ΔI 趋于稳定(图 3)。此外,温度也对 DNA 杂交产生影响。实验结果发现,当杂交温度为 25~40 $^{\circ}\text{C}$,随着杂交温度的升高, ΔI 随之变大;当温度大于 40 $^{\circ}\text{C}$ 后, ΔI 开始减小(图 4)。可以确定 40 $^{\circ}\text{C}$ 是 KPN 的



a: GCE; b: Gr/GCE; c: $\text{ZrO}_2/\text{Gr}/\text{GCE}$; d: ssDNA/ $\text{ZrO}_2/\text{Gr}/\text{GCE}$; e: dsDNA/ $\text{ZrO}_2/\text{Gr}/\text{GCE}$

图2 修饰电极表面的循环伏安图.
Fig.2 Cyclic voltammogram of modified electrode surface

DNA 序列的最佳杂交温度,当高于最佳温度时,极易发生 DNA 链的解链、变性,从而减小 ΔI 。由此可确定此传感器的最佳 DNA 杂交条件为:温度 40 $^{\circ}\text{C}$,时间 30 min。

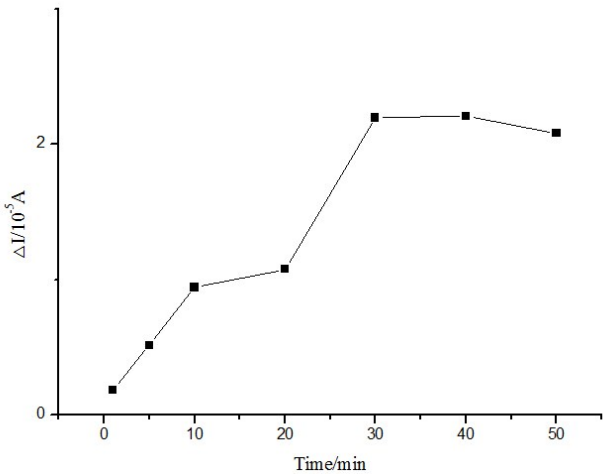


图3 杂交时间与峰电流在杂交前后的变化量 (ΔI) 的关系
Fig.3 Relationship between hybridization time and variation of peak current (ΔI)

2.4 干扰实验

图 5 分别为金黄色葡萄球菌目的 DNA、大肠埃希菌目的 DNA、KPN 目的 DNA。此传感器能较好地鉴定出 KPN 目的 DNA,表现出良好的抗干扰能力。

2.5 DNA 传感器稳定性

取 8 支规格相同的 GCE,利用相同的方法制备电化学 DNA 传感器,检测同一目的 DNA 溶液,目的 DNA 浓度为 $(1.0 \times 10^{-6}) \text{mol/L}$,通过测定 ΔI ,考察传感器的稳定性,测定结果的相对标准差 (RSD) 为 4.1%,

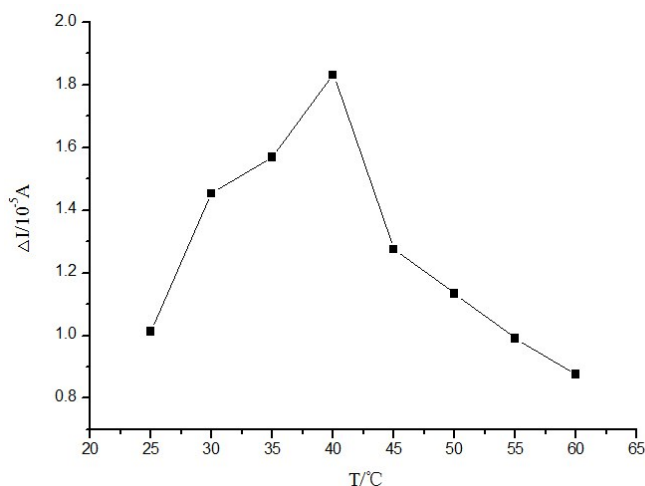
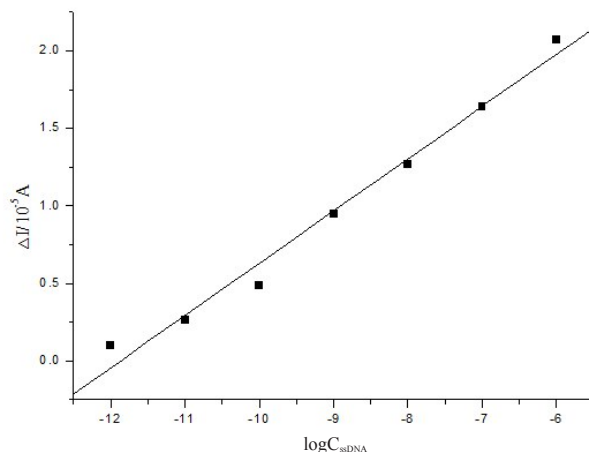


图4 杂交温度与 ΔI 的关系

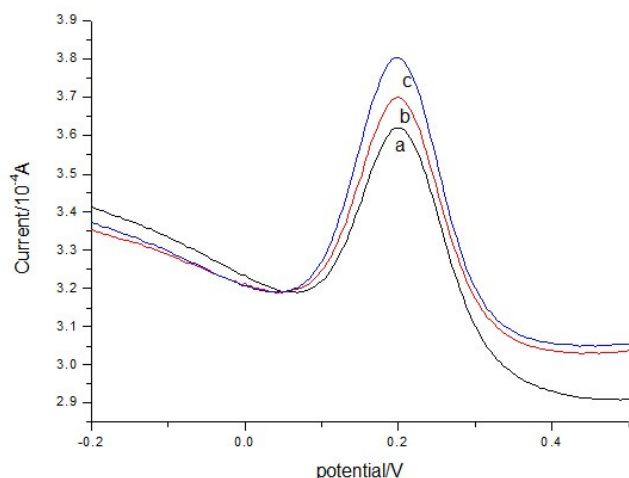
Fig.4 Relationship between hybridization temperature and ΔI



$$\Delta I = 0.337 \log C_{ssDNA} + 3.9993, R = 0.9917$$

图6 线性回归方程

Fig.6 Linear regression equation



a: *Staphylococcus aureus* DNA; b: *Escherichia coli* DNA;
c: *Klebsiella pneumoniae* DNA

图5 差分脉冲伏安法伏安图

Fig.5 Voltammogram of differential pulse voltammetry

说明该电化学DNA生物传感器具有良好的稳定性。

2.6 DNA传感器的线性范围、检出限

实验过程中,配制不同浓度的完全互补目的DNA溶液,按照上述实验方法用DNA探针与cDNA杂交,检测杂交后峰电流信号。在目的DNA浓度为 $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L时, ΔI 与DNA浓度对数之间呈现出良好的线性关系,经计算其回归方程为: $\Delta I = 0.337 \log C_{ssDNA} + 3.9993$,相关系数为0.9917,检出限为 (3.33×10^{-13}) mol/L(图6)。

3 结论

本研究所制备的基于石墨烯与氧化锆纳米复合材料的DNA传感器,能实现对KPN快速敏感的检测。该传感器对KPN的检测时间为30 min,检测限

达到 (3.33×10^{-13}) mol/L,具备良好的干扰实验。利用此传感器检测KPN能满足临床上对KPN快速、精确诊断的要求。

【参考文献】

- [1] TIAN K, PRESTGARD M, TIWARI A. A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014, 41: 100-118.
- [2] GAO W, TJIU W W, WEI J, et al. Highly sensitive nonenzymatic glucose and H_2O_2 sensor based on $Ni(OH)_2$ /electroreduced graphene oxide--multiwalled Carbon nanotube film modified glass Carbon electrode [J]. Talanta, 2014, 120: 484-490.
- [3] 张从晓. DNA生物传感器及其在微流控芯片实验室中的应用研究[D]. 北京: 北京理工大学, 2015.
- [4] 万广财, 张泽, 于洪伟, 等. 纳米材料在传感器中的进展及临床应用[J]. 医学综述, 2016, 22(13): 2512-2516.
- [5] SHANG N, PAKONSTANTINO P, MCMULLAN M, et al. Catalyst-free efficient growth, orientation and biosensing properties of multilayer graphene nanoflake films with sharp edge planes [J]. Adv Funct Mater, 2008, 18: 3506-3511.
- [6] 朱琼花. 以石墨烯为信号增强媒介的过氧化氢和DNA电化学传感器[D]. 漳州: 闽南师范大学, 2015.
- [7] GIOVANNI M, BONANNI A, PUMERA M. Detection of DNA hybridization on chemically modified graphene platforms [J]. Analyst, 2012, 137(3): 580-583.
- [8] WANG L, XU M, HAN L, et al. Graphene enhanced electron transfer at aptamer modified electrode and its application in biosensing [J]. Anal Chem, 2012, 84(17): 7301-7307.

(下转第104页)