

doi:10.3969/j.issn.1001-3539.2013.06.003

DNA 在 GO-PANI 复合材料表面上的固定 / 杂交^{*}

冯孝中 时宇 刘顺利 闫福丰 张治红

(河南省表界面重点实验室 郑州轻工业学院材料与化工学院 郑州 450002)

摘要:采用氧化还原法制备氧化石墨烯(GO),通过原位插层聚合法制备出GO与导电聚苯胺(PANI)复合层状纳米材料。采用旋涂法将GO-PANI复合材料旋涂在自组装有十八烷三甲氧基硅烷的硅片上,对核糖核酸(DNA)在复合材料表面上的固定进行电化学性能测试。结果表明,DNA能够很好地固定在GO-PANI复合材料表面上,对将来开发出易于制备的电化学性能优良的DNA芯片提供了实验基础。

关键词:氧化石墨烯-聚苯胺;纳米复合材料;DNA;固定/杂交生物传感器

中图分类号:TB324 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-3539(2013)06-0015-04

DNA Immobilization / Hybridization on GO-PANI Nanocomposite

Feng Xiaozhong, Shi Yu, Liu Shunli, Yan Fufeng, Zhang Zhihong

(Henan Provincial Key Laboratory of Surface & Interface Science, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Graphene oxide(GO) was prepared by method of oxidation reduction process, the nanocomposite of graphene oxide-polyaniline (GO-PANI) via the intercalated polymerization method in situ was constructed. In order to characterize properties of the nanocomposite easily, GO-PANI was spin-coated onto the silicon substrate self-assembled by trimethoxyoctadecylsilane. The electrochemical properties of GO-PANI nanocomposite before and after DNA immobilization/hybridization were detected. It suggests that probe DNA could be immobilized onto the surface of GO-PANI nanocomposite due to the electric static interaction between GO-PANI and DNA in the buffer solution. It could supply the facile method to prepare the electrochemical biosensor with good properties.

Keywords: graphene oxide-polyaniline; nanocomposite; DNA immobilization/hybridization biosensor

由于石墨烯具有良好的物理力学性能、热力学稳定性、弹性和超速电子流动性等诸多优越的性质,在场效应晶体管、纳米器件、电化学芯片、气敏传感器、电池透明电极、超级电容器、生物医药和生物芯片等领域均有潜在用途^[1-4],因此受到了学术界和工业界的极大关注。然而,石墨烯表面不带有任何官能团,生物分子在其表面的固定或吸附不牢,使得它难以作为生物芯片基体使用^[5]。而石墨烯的前驱体——氧化石墨烯(GO)表面带有大量的羟基或羧基^[6-7],因此,采用它与聚合物复合作为生物传感器的敏感膜使用,具有重大的研究意义。聚苯胺(PANI)具有优异的环境稳定性和较高的导电性,易于合成,是最有实际应用前景的导电聚合物之一^[8-9]。但是PANI在一些普通溶剂中的溶解性较差,限制了其工业应用的发展。将GO与PANI进行复合得到的复合材料则同时具有了GO的优良性质和PANI的功能性和导电性,使得生物分子在复合材料表面牢固固定的同时,又具有良好的综合性能,使得GO-PANI复合材料作为电化学生物传感器敏感膜

成为可能^[10],拓宽了其在传感器领域的应用。笔者通过氧化还原法合成出GO,然后采用原位插层聚合法制备出GO-PANI纳米复合材料,采用旋涂法将GO-PANI复合材料旋涂在自组装有十八烷三甲氧基硅烷的硅片上,对核糖核酸(DNA)在复合材料表面上的固定/杂交进行电化学性能测试。

1 实验部分

1.1 主要原材料

石墨、硝酸钠(NaNO₃)、高锰酸钾(KMnO₄)、苯胺(C₆H₅NH₂)、甲醇(CH₃OH):分析纯,天津市风船化学试剂有限公司;

硫酸(H₂SO₄):95%~98%,开封市放晶化学试剂有限公司;

盐酸(HCl):36%~38%,洛阳市化学试剂厂;

高氯酸(HClO₄)、氯化钾(KCl):分析纯,天津

* 国家自然科学基金资助项目(51173172)

联系人:张治红,主要从事生物传感器材料研究工作

收稿日期:2013-03-25

市恒兴化学试剂有限公司；

十八烷基三甲基硅氧烷 :分析纯 ,上海晶纯实业有限公司；

磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) :分析纯 ,洛阳昊华化学试剂有限公司；

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) :分析纯 ,天津永大化学试剂开发中心；

氯化钠 (NaCl) :分析纯 ,天津市化学试剂三厂；

去离子水 :自制。

1.2 仪器及设备

扫描电子显微镜 (SEM) :JSM-6490LV 型 ,日本电子株式会社；

傅里叶转换红外光谱 (FTIR) 仪 :TENSOR27 型 ,德国 Bruker 公司；

X 射线衍射仪 (XRD) :D8 Advance 型 ,德国 Bruker 公司；

拉曼光谱仪 :RenishawRM1000 型 ,英国 Renishaw 公司。

1.3 试样制备

(1) GO 的制备^[11]。

称取石墨 2 g , NaNO_3 1.6 g ,量取 100 mL 浓硫酸加入 250 mL 三颈瓶中 ,冰浴搅拌 ,称取 9 g KMnO_4 缓慢加入上述混合液中 ,反应 120 h ;将反应产物转移到 1000 mL 烧杯中 ,用 5% 的 HCl 洗涤 ,静止分层 ,洗 3~5 次 ;接着离心 ,水洗 ,直至没有硫酸根离子 ,用氨水调节 pH 到中性或偏碱性 ,将产物放在 1 L 的烧杯中 ,加水至 900 mL ,超声 5 h ,得 GO ;将 GO 用 5% 的 HCl 离心至接近中性 ,60 干燥得固体 ,研磨过 75 μm 的筛 ,得到 GO 粉末。

(2) GO-PANI 复合材料的制备。

称取 GO 9 mg 放入 50 mL 的烧杯中 ,加入 15 mL (1 mol/L) HClO_4 ,再加入 1 mL 乙醇超声 30 min 使 GO 均匀分散 ,然后加入 4 mL 乙醇 (防止结冰) 和 0.114 mL 苯胺 ,在冰浴条件下磁力搅拌 30 min。将 0.19 g 过硫酸铵溶解在 5 mL HClO_4 溶液中 ,放在冰浴中冷却 ,磁力搅拌 30 min 后 ,将 GO 分散液和苯胺溶液混合 ,在冰浴的条件下 ,磁力搅拌反应 24 h。反应完毕后得到墨绿色絮凝状沉淀 ,离心后用大量的 0.1 mol/L 的 HClO_4 溶液、甲醇和醚洗涤。将产品在 45 条件下干燥 24 h ,得到 GO-PANI 纳米复合材料。

(3) DNA 在 GO-PANI 复合材料薄膜上的固定杂交。

首先用稀释后的十八烷基三甲基硅氧烷浸泡纯净的 Si 片 24 h ,用吸耳球吹干后采用旋涂法将用超纯水超声分散的 GO-PANI 溶液涂在 Si 片上 ,然后用 100 nm 的 DNA 探针磷酸盐缓冲溶液 [PBS , 1 / 15 (mol/L) 的 Na_2HPO_4 溶液和 KH_2PO_4 溶液以体积比 4 : 1 混合 ,pH=7.4] 浸泡 48 h ,然后再用完全匹配的 DNA 溶液浸泡 48 h。

1.4 性能测试

电化学测试 :采用 CHI660D 电化学工作站对复合材料薄膜的电化学性质进行测试 ,采用三电极体系 ,实验样品为工作电极 ,铂电极为对电极 , Ag/AgCl 电极为参比电极 ,实验所用电解质为 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液；

SEM 分析 :分辨率 3.0 nm ;加速电压 0.5~30 kV ,放大倍数 20~300000 倍；

FTIR 分析 :分辨率 4 cm^{-1} ,扫描光谱范围 4000~500 cm^{-1} ,KBr 压片；

XRD 分析 :CuK α 射线作为辐射源 ,KBr 为滤波片 ,波长 $\lambda=0.1542$ nm ,管电压 40 kV ,扫面范围 $10^\circ\sim 80^\circ$,步长 $0.04^\circ/\text{s}$,扫描速度 $4^\circ/\text{min}$ 。

2 结果与讨论

2.1 GO-PANI 复合材料的化学结构分析

图 1 为 GO ,PANI 和 GO-PANI 复合材料的 FTIR 谱图。由图 1 可见 ,对于 GO 3140 ,1740 ,1610 和 1400~1030 cm^{-1} 附近的峰分别属于 O—H , —COOH 中的 C=O ,插层水和 C—OH / C—O—C 功能基团的 C—O 的峰^[12]。与 GO 相比 ,GO-PANI 中出现属于 PANI 的几个新峰。在 1559 ,1477 ,1293 ,796 cm^{-1} 位置出现的新峰分别属于 C=N ,C=C ,C—N 和 C—H 的振动峰^[13]。由 PANI 与 GO-PANI 的 FTIR 谱图比较可以看出峰的位置基本相同 ,只是强度稍有差异 ,由此可以推断在复合过程中 PANI 是在石墨烯层的表面生长并且将其覆盖。

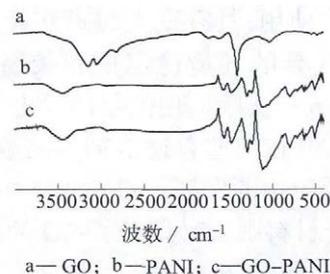


图 1 GO ,PANI 和 GO-PANI 复合材料的 FTIR 谱图

图 2 为 GO ,PANI 和 GO-PANI 复合材料的

XRD 图。由图 2 可见, 在 GO 的 XRD 图中, 在 $2\theta=10.89^\circ$ 处有一个强的尖峰, 此峰为 GO 的堆叠特征峰^[14]。而在 GO-PANI 复合材料的 XRD 图中, GO 的堆叠峰消失, 表明 GO 层与层的堆叠结构被破坏, 此外还在 $2\theta=20.04^\circ$ 和 $2\theta=25.44^\circ$ 处, 出现两个比较宽的峰, 并且与 PANI 纳米线的布拉格衍射特征峰位置几乎相同^[15]。由此结合 FTIR 可以得出, 在复合过程中苯胺是插入 GO 层之间后以 GO 为基底再聚合成 PANI。

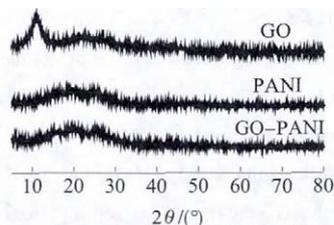


图 2 GO, PANI 和 GO-PANI 复合材料的 XRD 图

图 3 是 GO 和 GO-PANI 复合材料的拉曼光谱图。由图 3 可见, GO 和 GO-PANI 的 D 峰分别位于 1350 和 1342 cm^{-1} 处, G 峰位于 1592 和 1583 cm^{-1} 处, 复合后峰的位置稍微左移。另外, PANI 在该波长范围内不会出现明显的特征峰^[15], 那么根据这个原理, GO-PANI 中的 D 和 G 峰为 GO 的特征峰, 即复合物中存在 GO, 说明 GO 与 PANI 的复合中, GO 只是作为基底, 而 PANI 是在 GO 片层上进行增长。同时可以看出 GO, GO-PANI 的拉曼图谱中两个峰强度的变化, GO-PANI 中 ID/IG 强度比要比 GO 中的强度比大, 这是因为相对于 GO 来说, 引入 PANI 后, 层间距变大, 边缘、缺陷和 sp^3 杂化 C 缺陷增加了。

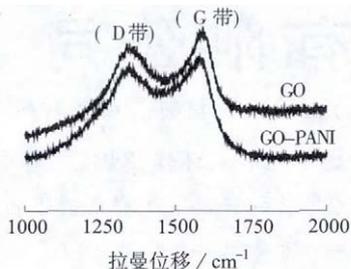


图 3 GO 和 GO-PANI 复合材料的拉曼光谱图

2.2 GO-PANI 复合材料的形貌分析

图 4 是不同放大倍数的 GO 和 GO-PANI 的 SEM 照片。由图 4a 可以看出, GO 表面光滑, 呈二维碳纳米结构, 边缘处有褶皱, 存在一定的缺陷。而由图 4b 可以看出, 在 GO 片层上长出了大面积均匀的 PANI 纳米线阵列, 阵列生长方向垂直于薄膜表面, PANI 纳米线直径约为 50 nm 。

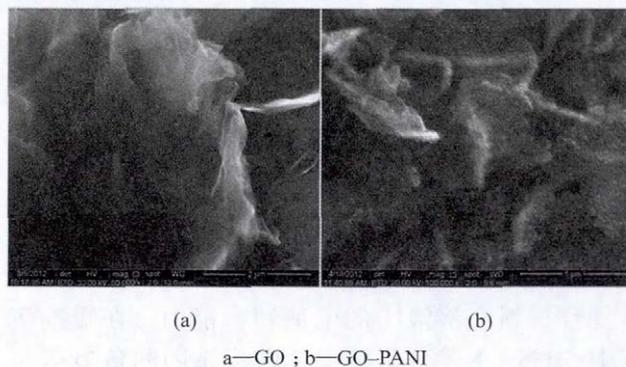


图 4 GO 和 GO-PANI 在乙醇中分散后的 SEM 照片

2.3 DNA 在 GO-PANI 纳米复合材料表面上的固定

图 5 为硅片、自组装有十八烷基三甲硅氧烷的硅片、GO-PANI 复合材料和 DNA 在 GO-PANI 复合材料固定 / 杂交后的电化学交流阻抗图 (EIS)。从图 5 可以看出, 当十八烷基三甲硅氧烷在 Si 片表面自组装后, 由于覆盖作用, 造成电子转移困难, 其界面电荷转移电阻 (R_{ct}) 增大。接着在自组装膜表面旋涂上 GO-PANI 复合材料后, 由于聚苯胺是导电聚合物, 有利于表面电荷的转移, 复合材料的导电性也将会增强, 其 R_{ct} 降低。在缓冲溶液中, 通过 DNA 分子链上磷酸根基团的负电荷与 GO-PANI 上的氨基基团的正电荷之间的静电吸附, 探针 DNA 能够固定在复合材料的表面。

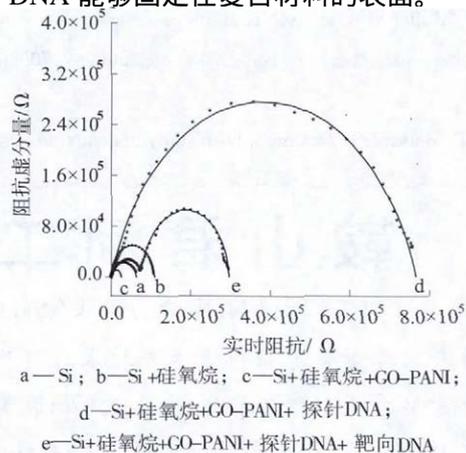


图 5 硅片、自组装有十八烷基三甲硅氧烷的硅片、GO-PANI 复合材料和 DNA 在 GO-PANI 复合材料固定 / 杂交后的电化学交流阻抗

探针 DNA 在 GO-PANI 复合材料表面上固定后, 造成了导电聚合物薄膜中电子流动变得困难, R_{ct} 变大。当靶向 DNA 与探针 DNA 杂交后, EIS 图圆弧半径减小, R_{ct} 降低, 复合材料的电化学活性随之增加, 这是因为靶向 DNA 链和探针 DNA 进行杂交成双链, 双链 DNA 的导电性促使复合电极的电化学活性增加, 界面电荷转移相对容易, 造成 R_{ct}

降低。

3 结论

通过氧化还原法合成出 GO,然后采用原位插层聚合法制备出 GO-PANI 纳米复合材料。其中苯胺插入 GO 层之间进行聚合,所形成的 PANI 纳米线阵列沿着垂直于 GO 表面方向生长。由于 PANI 具有良好的导电性,大大增强了 GO-PANI 纳米复合材料在溶液中的电荷转移能力。在缓冲溶液中,通过 DNA 分子链上磷酸根基团的负电荷与 GO-PANI 上的氨基基团的正电荷之间的静电吸附,探针 DNA 可以成功地固定在复合材料的表面。其覆盖作用导致电化学传感器的电荷转移困难,而当靶向 DNA 与探针 DNA 杂交后,双链 DNA 的导电性促使复合电极的电化学活性增加,界面电荷转移相对容易。

参考文献

- [1] Kroto H W, Heath J R, O'Brien S C, et al. C₆₀:Buckminsterfullerene[J]. Nature, 1985, 318:162-163.
- [2] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon[J]. Nature, 1991, 354:56-58.
- [3] Meyer J C, Geim A K, Katsnelson M I, et al. The structure of suspended graphene sheets[J]. Nature, 2007, 446(7131):60-63.
- [4] Stankovich S, Dikin D A, Dommett G H B, et al. Graphene based composite materials[J]. Nature, 2006, 442(7100):282-286.
- [5] Li Dan, Muller M B, Gilje S, et al. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets[J]. Nature Nanotechnology, 2008(3):101-105.
- [6] Szabo T, Berkesi O, Dekany I. Drift study of deuterium-exchanged graphite oxide[J]. Carbon, 2005, 43(15):3186-3189.
- [7] Dikin D A, Stankovich S, Zimney E J, et al. Preparation and characterization of graphene oxide Paper[J]. Nature, 2007, 448:457-460.
- [8] Wang Hualan, Hao Qingli, Yang Xujie, et al. Effect of graphene oxide on the properties of its composite with polyaniline[J]. Appl Mater Inter, 2010, 2(3):821-828.
- [9] Xu Jingjing, Wang Kai, Zu Shenzhen, et al. Hierarchical Nanocomposites of polyaniline nanowire arrays on graphene oxide sheets with synergistic effect for energy storage[J]. ACS Nano, 2010, 4(9):5019-5026.
- [10] Xu Liqun, Liu Yiliang, Neoh K G, et al. Reduction of graphene oxide by aniline with its concomitant oxidative polymerization [J]. Macromol Rapid Commun, 2011, 32:684-688.
- [11] Stankovich S, Dikin D A, Piner R D, et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide[J]. Carbon, 2007, 45:1558-1565.
- [12] Wan Meixiang, Li Ming, Li Junchao, et al. Structure and electrical-properties of the oriented polyaniline films[J]. J Appl Polym Sci, 1994, 53:131-139.
- [13] Monkman A P, Adams P. Optical and electronic properties of stretch-oriented solution-cast polyaniline films[J]. Synth Met, 1991, 40:87-96.
- [14] Kotov N A, Dekany I, Fendler J H. Ultrathin graphite oxide polyelectrolyte composites prepared by self-assembly: transition between conductive and non-conductive states[J]. Adv Mater, 1996, 8:637-641.
- [15] Yang Yongsheng, Wan Meixiang. Chiral nanotubes of polyaniline synthesized by a template-free method[J]. Mater Chem, 2002, 12:897-901.

鞍山君利工程塑料有限公司

鞍山君利工程塑料有限公司是股份制企业,生产以工程塑料为主的改性材料。由教授级高工、中国塑协专家委员会专家负责生产技术。可为用户提供增强、增韧、复合、阻燃、环保阻燃、抗静电、耐磨、塑料合金类系列改性工程塑料。公司竭诚为用户“量身订做个性化需求的产品,为客户创造价值”。公司通过 ISO9001:2000 国际质量管理体系认证。公司宗旨:信誉第一;质量第一。

欢迎新老客户前来指导、合作!

改性品种:PA66、PA6、PP、PE、ABS、AS、HIPS、POM、PC、PC/ABS、PBT、PET、PVC 等系列改性塑料。

适用行业:家电、汽车、机械、铁路、纺织、石油化工、煤矿、农业等。

经理:徐长旭 13604228259, xuchangxu315@163.com

总工程师:赵文聘 13804910274, zhaowenpin315@163.com

地址:辽宁省鞍山市旧堡 邮编:114041 电话:0412-8935903 传真:0412-8935803 网址:www.asjls.com