



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104655698 B

(45)授权公告日 2017.07.25

(21)申请号 201510080785.2

(22)申请日 2015.02.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104655698 A

(43)申请公布日 2015.05.27

(73)专利权人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市杭州经济开发区白杨街道2号大街928号

(72)发明人 刘爱萍 赵明 徐盼举

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司 33200

代理人 邱启旺

(51)Int.Cl.

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/413(2006.01)

(56)对比文件

CN 102879442 A,2013.01.16,

CN 104039695 A,2014.09.10,

CN 102653454 A,2012.09.05,

CN 102181877 A,2011.09.14,

邵瑞强.石墨烯氧化物的光还原及其器件制备的基础研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2013,(第 S2 期),

张美宁 等.石墨烯微电极阵列的制备及应用.《中国化学会第28届学术年会第9分会场摘要集》.2012,

张美宁 等.石墨烯微电极阵列的制备及应用.《中国化学会第28届学术年会第9分会场摘要集》.2012,

审查员 徐妍妍

权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54)发明名称

石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种石墨烯/氧化石墨烯微阵列的制备方法以及将其作为化学与细胞传感器的应用。本发明主要是将微加工技术与电化学方法结合,在ITO 玻璃基底上制备了石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极。利用本发明制备的微电极对双氧水的电化学催化氧化作用,采用计时安培法实现了对双氧水的体外及活体的定量分析及检测。制备方法简单易行、灵敏度高、响应时间短、生物相容性好,能够快速检测双氧水的浓度。

1. 一种石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极, 由ITO玻璃(1)和沉积于ITO玻璃(1)上的导电层构成, 所述导电层由氧化石墨烯(2)和嵌于氧化石墨烯(2)中有序排列RG0阵列(3)组成; 其特征在于, 通过以下步骤制备得到:

(1) 采用光刻技术在ITO玻璃上构建阵列图案, 具体为: 将正性光刻胶旋涂于ITO玻璃上, 涂胶转速为5000rpm, 旋涂时间10s; 旋涂后, 将ITO玻璃在100℃下烘90s, 得到光刻层; 然后将光刻模板置于光刻层上, 紫外曝光60s; 曝光后在100℃下烘90s, 最后显影24s; 所述光刻模板具有有序排列的图形;

(2) 将浓度为4mg/mL的氧化石墨烯水溶液进一步旋涂于步骤1制备的基底上, 转速3000rpm, 旋涂时间30s;

(3) 以步骤2处理后的基底作为工作电极, 银/氯化银电极为参比电极, 铂片为对电极, 以0.2M的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液和0.2M的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液按照体积比4:1组成的混合溶液为电解液, 在-1.1V恒电位下, 电化学还原7~60s; 电化学还原反应结束后, 将基底用丙酮浸泡2h, 去除光刻胶, 得到石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极。

2. 一种权利要求1所述的石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极的应用, 其特征在于, 该应用为: 将石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极用于检测双氧水溶液的浓度。

3. 根据权利要求2所述的应用, 其特征在于: 将石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极用于检测双氧水溶液的浓度, 具体为: 将权利要求1所述的石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极为工作电极、银/氯化银电极作为参比电极、铂片电极作为对电极, 组成三电极系统, 测定待测双氧水溶液试样的电流响应值J,  $C = (J - 1.5) / 26.7$ ; 其中, J为电流密度响应值, C浓度值。

4. 一种权利要求1所述的石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极的应用, 其特征在于, 该应用为: 将石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极用于检测细胞分泌的双氧水的浓度。

5. 根据权利要求4所述的应用, 其特征在于: 将石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极用于检测细胞分泌的双氧水的浓度, 具体为: 将细胞接种于石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极上, 以接种后的石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极为工作电极、银/氯化银电极作为参比电极、铂片电极作为对电极, 以PBS溶液为电解液; 用12-豆蔻酸-13-乙酸佛波醇(PMA)刺激工作电极上的细胞分泌双氧水, 测定电流响应值J; 根据 $C = (J - 1.5) / 26.7$ , 计算细胞分泌双氧水的浓度; 其中, J为电流密度响应值, C浓度值。

## 石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微加工及生物检测领域,涉及一种石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 双氧水是细胞中普遍存在且最稳定的反应活性氧(ROS),对细胞DNA损伤、细胞凋亡、蛋白质合成等方面起着重要作用。研究表明,细胞内双氧水浓度的异常与老年痴呆症、帕金森综合症、动脉硬化、癌症等疾病存在一定的联系。检测细胞分泌双氧水的浓度,对于疾病病理、疾病的诊断与预防等的研究有重要的意义。目前,针对双氧水的电化学传感器主要分为有酶和非酶两种。酶传感器价格昂贵,使用条件严格;非酶传感器多基于金属纳米催化剂为催化中心,金属离子的释放对细胞产生一定的毒性。因此无负载、自催化的电化学传感器,因其较好的稳定性、成本低、生物相容性好等优点,受到极大的关注。

[0003] 石墨烯是2004年英国曼彻斯特大学的A.Gaim等发现的一种二维碳原子晶体,为单层或多层的片状结构,是迄今发现的最薄也最坚硬的材料。由于其独特的性质,包括:高强度(130GPa),室温下高速的电子迁移率(20000cm/Vs),高透光率(95%),高比表面积(2600m<sup>2</sup>/g),同时具备良好的电催化活性及生物相容性。科学家认为,石墨烯有望彻底变革材料科学领域,未来有望取代硅成为电子元件材料,广泛应用于超级计算机、柔性触摸屏、环保和医疗设备、光子传感器以及有机太阳能电池等诸多领域。实验室石墨烯的制备一般采用成本低廉、制备工艺简单的氧化还原法,通过制备氧化石墨烯,再经过还原氧化石墨烯作为石墨烯的廉价替代品。

[0004] 研究表明石墨烯对双氧水具有一定的电催化氧化作用,但催化活性没有金属催化活性高。而微阵列传感器具有较高的灵敏度、信噪比,响应时间低等优点,因此开发石墨烯/氧化石墨烯微阵列生物传感器,不仅提高了催化活性,同时保持电极的生物相容性,对于细胞检测具有重要意义,而目前这一设计还未见报道。

### 发明内容

[0005] 本设计的目的在于针对现有应用的不足,提供一种石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极及其制备方法与应用,该微阵列电极在保持细胞活性的同时,能够快速、灵敏、稳定地检测细胞分泌的双氧水。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:由ITO玻璃和沉积于ITO玻璃上的导电层构成,所述导电层由氧化石墨烯和嵌于氧化石墨烯中有序排列RG0阵列组成。

[0007] 一种石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极的制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1)采用光刻技术在ITO玻璃上构建阵列图案,具体为:将正性光刻胶旋涂于ITO玻璃上,涂胶转速为5000rpm,旋涂时间10s;旋涂后,将ITO玻璃在100℃下烘90s,得到光刻层;然后将光刻模板置于光刻层上,紫外曝光60s;曝光后在100℃下烘90s,最后显影24s;所述光刻模板具有有序排列的图形;

[0009] (2)将浓度为4mg/mL的氧化石墨烯水溶液进一步旋涂于步骤1制备的基底上,转速3000 rpm,旋涂时间30s;

[0010] (3)以步骤2处理后的基底作为工作电极,银/氯化银电极为参比电极,铂片为对电极,以0.2M的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液和0.2M的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液按照体积比4:1组成的混合溶液为电解液,在-1.1V恒电位下,电化学还原7~60s;电化学还原反应结束后,将基底用丙酮浸泡2h,去除光刻胶,得到石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极。

[0011] 一种石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极的应用,该应用为:将石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极用于检测双氧水溶液的浓度。

[0012] 将石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极用于检测双氧水溶液的浓度,具体为:将权利要求1所述的石墨烯/氧化石墨烯微阵列为工作电极、银/氯化银电极作为参比电极、铂片电极作为对电极,组成三电极系统,测定待测双氧水溶液试样的电流响应值J,  $C = (J-1.5) / 26.7$ ;其中,J为电流密度响应值,C浓度值。

[0013] 一种石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极的应用,该应用为:将石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极用于检测细胞分泌的双氧水的浓度。

[0014] 将石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极用于检测细胞分泌的双氧水的浓度,具体为:将细胞接种于的石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极上,以接种后的石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极为工作电极、银/氯化银电极作为参比电极、铂片电极作为对电极,以PBS溶液为电解液;用PMA刺激工作电极上的细胞产生分泌双氧水,测定电流响应值J;根据 $C = (J-1.5) / 26.7$ ,计算细胞分泌双氧水的浓度;其中,J为电流密度响应值,C浓度值。

[0015] 本发明具有以下有益效果:采用光刻技术与电化学相结合制备石墨烯/氧化石墨烯微阵列作为工作电极,在无负载任何催化剂的条件下实现了对双氧水的电催化氧化作用,不仅避免了酶易失活不稳定、成本高以及金属离子的细胞毒性等缺点,而且大大提高了检测双氧水的灵敏度,能够快速、灵敏、准确地测定环境中以及活体中的双氧水。所用的电极材料成本低、有一定的理论和实用价值;制备方法简单易行、重复性高。

## 附图说明

[0016] 图1为本发明的石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极的结构示意图;图中,1为ITO玻璃,2为氧化石墨烯、3为RG0阵列;

[0017] 图2为光刻模板的结构示意图;

[0018] 图3为实施例1制备的6个样品的形貌图;其中能看出颜色较深的是石墨烯,周围区域是氧化石墨烯。

[0019] 图4为实施例1制备的3个样品的红外(IR)光谱图。

[0020] 图5为不同还原时间的石墨烯/氧化石墨烯阵列在催化电压0.6V,10mM双氧水水溶液中催化电流密度曲线图;

[0021] 图6为本发明石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极在以0.1M的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液和0.1M的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液按照体积比4:1组成的混合溶液为电解液,在搅拌条件下依次加入不同浓度双氧水溶液,得到的电流-时间曲线;

[0022] 图7是双氧水的浓度与电流响应的线性关系图;

[0023] 图8是本发明制备的石墨烯/氧化石墨烯阵列接种神经细胞的荧光显微镜图片,包

括细胞F-actin蛋白和细胞核；

[0024] 图9本发明石墨烯/氧化石墨烯阵列接种细胞后在以0.1M的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液和0.1M的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液按照体积比4:1组成的混合溶液中,三电极体系下,用药物PMA刺激细胞分泌双氧水,得到的计时安培曲线。其中a曲线为对照组,药物PMA刺激未接种细胞的阵列电极;b曲线为实验组,药物PMA刺激接种细胞的阵列电极。

### 具体实施方式

[0025] 如图1所示,一种石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极,由ITO玻璃1和沉积于ITO玻璃上的石墨烯层构成,所述石墨烯层由氧化石墨烯2和嵌于氧化石墨烯2中有序排列RG0阵列3组成。下面结合具体实施例进一步说明本发明的技术解决方案,这些实施例不能理解为是对技术解决方案的限制。

[0026] 实施例1:本实施例制备石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极,包括以下步骤:

[0027] (1) ITO玻璃的清洗:将 $6\text{mm} \times 9\text{mm}$ 的ITO玻璃放置烧杯中,依次分别用丙酮、无水乙醇、去离子水超声10min,再氮气吹干待用。

[0028] (2) 设计光刻模板,模板中设置有有序排列的图形,这些图形可以为圆形,如图2所示,也可以为正方形、三角形、六边形等,本实施例中采用常用的圆形图案,且该模板由北京中科院微电子所制备得到。

[0029] (3) 采用光刻技术在ITO玻璃上刻出阵列图案:具体为:将正性光刻胶旋涂于ITO玻璃上,涂胶转速为5000rpm,旋涂时间10s;旋涂后,将ITO玻璃在 $100^\circ\text{C}$ 下烘90s,得到光刻层;然后将步骤2所述的光刻模板置于光刻层上,紫外曝光60s;曝光后在 $100^\circ\text{C}$ 下烘90s;最后显影24s;制备5个样品。

[0030] (4) 在步骤3处理后的6个基底上旋涂 $4\text{mg/mL}$ 氧化石墨烯(GO),转速3000 rpm,旋涂时间30s,旋转三次,得到6个基底(I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、I-6)。

[0031] (5) 分别以上述基底工作电极,银/氯化银电极为参比电极,铂片为对电极,以0.2M的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液和0.2M的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液按照体积比4:1组成的混合溶液为电解液,在-1.1V恒电位下,电化学还原7s(I-1)、15s(I-2)、22s(I-3)、30s(I-4)、45s(I-5)、60s(I-6);电化学还原反应结束后,将基底用丙酮浸泡2h,去除光刻胶,得到石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极。

[0032] 用显微镜观察步骤5得到的I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、I-6样品,如图3所示,由图可知,当还原时间为7s时,石墨烯阵列为 $20\mu\text{m}$ 的圆盘,间距 $60\mu\text{m}$ ,阵列尺寸均一完整,随着还原时间的增加,石墨烯半径不断增大。图4为步骤5得到的II-1、II-4样品的红外光谱曲线,数据显示氧化石墨烯上的 $\text{C}=\text{O}$  ( $1731\text{ cm}^{-1}$ )、 $\text{C}-\text{OH}$  ( $1224\text{ cm}^{-1}$ )以及 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 峰 ( $1065\text{ cm}^{-1}$ ) 在还原7s后消失,说明氧化石墨烯被还原。然后随着还原时间的增加,基团峰变化不明显,说明还原7s时就可以得到石墨烯。

[0033] 实施例2:将实施例1制备的石墨烯/氧化石墨烯阵列电极用于双氧水浓度的测定。

[0034] 图5为不同还原时间的石墨烯/氧化石墨烯阵列(如图3所示)在10mM双氧水中催化电流密度曲线,从图中可以看出,还原30s的样品I-4的电催化双氧水分解的能力最强,因此本实施例采用样品I-4来测定未知双氧水的浓度。

[0035] 以样品I-4为工作电极、银/氯化银电极作为参比电极、铂片电极作为对电极,组成三电极系统;测定双氧水浓度时,将三电极系统置于盛有30ml浓度为0.1M的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液和

浓度为0.1M的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液按照体积比4:1组成的混合溶液的烧杯中,然后在工作电极上施加0.6V恒电压,记录电流—时间曲线,当背景电流达到稳定后,每隔50s往溶液中加入34 $\mu\text{L}$ 双氧水溶液(浓度如图6所示),通过测定不同浓度的双氧水的响应电流,得到电流—时间曲线,如图6所示。根据图6的数据,可进一步得到图7所示的电流—溶度曲线。由图7可知,响应电流与双氧水浓度符合线性回归方程 $J=1.5+26.7C$ ,方差为0.990;其中J为响应电流密度值,单位是 $\text{nAmm}^{-2}$ ,C为浓度,单位是 $\text{mM}$ 。由此可知, $C=(J-1.5)/26.7$ 。

[0036] 实施例3:将实施例1制备的石墨烯/氧化石墨烯微阵列电极I-4用于神经细胞的培养以及细胞分泌双氧水的测定。

[0037] 将还样品I-4灭菌后接种神经细胞PC12,接种密度3000个/ $\text{mL}$ ,在含有10%胎牛血清、1%双抗的培养基中培养24h。通过免疫荧光双染细胞的肌动蛋白与细胞核观察细胞的生长状态,其中,采用Acti-Stain Phalloidin染细胞的F-actin蛋白,DAPI染细胞核。在细胞分泌双氧水检测时,石墨烯/氧化石墨烯阵列接种细胞培养24h后作为工作电极、银/氯化银电极作为参比电极、铂片电极作为对电极,组成三电极系统置于盛有30 $\text{mL}$ 浓度为0.2M的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液和0.2M的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液按照体积比4:1组成的混合溶液的烧杯中,然后在工作电极上施加0.6V恒电压,当背景电流达到稳定后,向工作电极注射10 $\mu\text{L}$ 浓度为100 $\text{nM}$ 的12-豆蔻酸-13-乙酸佛波醇(PMA),记录电流—时间曲线。对照组未接种细胞,其他操作与实验组相同。

[0038] 按照上述方法,将石墨烯/氧化石墨烯微阵列用于神经细胞的培养以及细胞分泌双氧水的测定。图8是本发明制备的石墨烯/氧化石墨烯微阵列接种神经细胞的荧光显微镜图片。可以看出细胞多数分布在氧化石墨烯上,生长状态良好,细胞触角多固定在石墨烯与氧化石墨烯的界面上,有利于细胞分泌的双氧水扩散到石墨烯上。由于细胞接种在阵列电极上,细胞分泌的双氧水直接被催化分解,可以根据 $J=1.5+26.7C$ ,直接计算细胞分泌的双氧水浓度,不需要进一步计算。图9是本发明石墨烯/氧化石墨烯微阵列接种神经细胞PC12后在0.1M的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液和0.1M的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液按照体积比4:1组成的混合溶液中,用10 $\mu\text{L}$ 浓度为100 $\text{nM}$ 的PMA刺激细胞分泌双氧水,得到的计时安培曲线。其中a曲线为对照组,药物PMA刺激未接种细胞的阵列电极;b曲线为实验组,药物PMA刺激接种细胞的阵列电极。图中看出,PMA刺激实验组时,瞬间产生响应电流,而且很快电流很快恢复初始位置,说明分泌的双氧水很快被催化分解。第一次PMA刺激的响应电流密度为 $3.9\text{nAmm}^{-2}$ ,根据实施例2得到的线性回归方程,计算得到细胞分泌的双氧水的浓度大小为0.15 $\text{mM}$ 。由此可知,本发明方法制备的石墨烯/氧化石墨烯微阵列制备方法简单、重复性高、成本较低。用于双氧水传感器能够稳定、准确、快速、灵敏地检测双氧水的浓度,其检测限达 $\sim 200\text{nM}$ ,与大多数报道的贵金属催化剂的双氧水传感器相当。尤其在用于细胞传感器方面,表现出良好的生物活性以及较高的灵敏度,具有很大的开发价值。

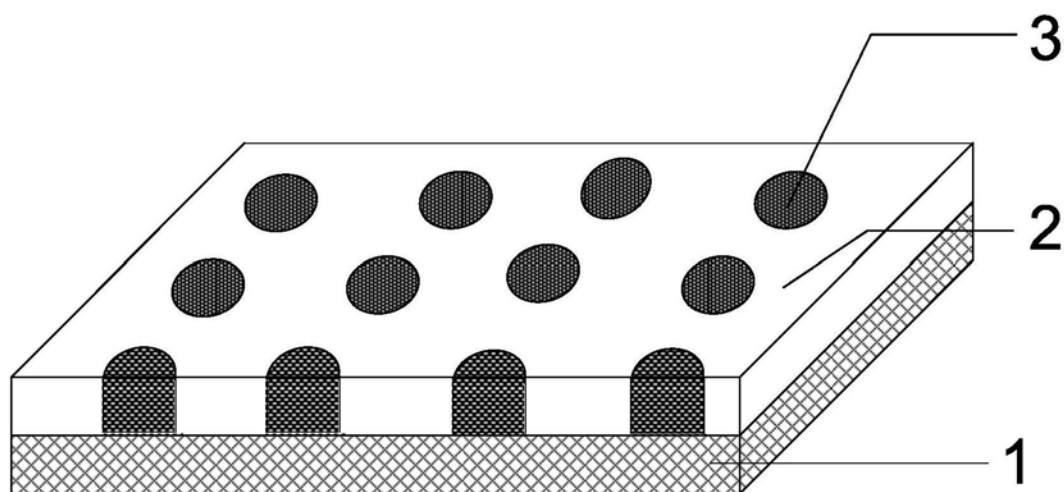


图1

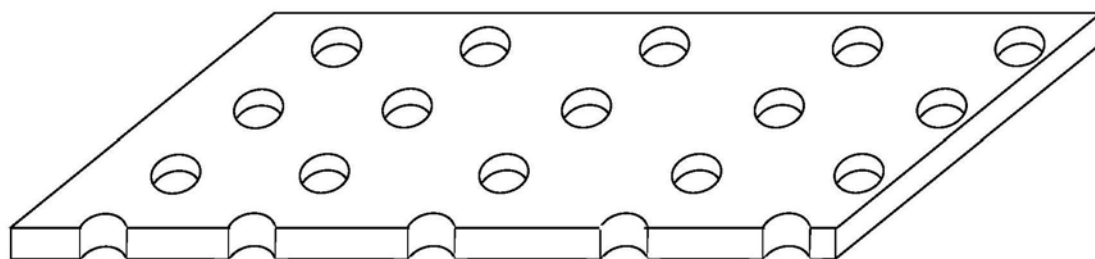


图2

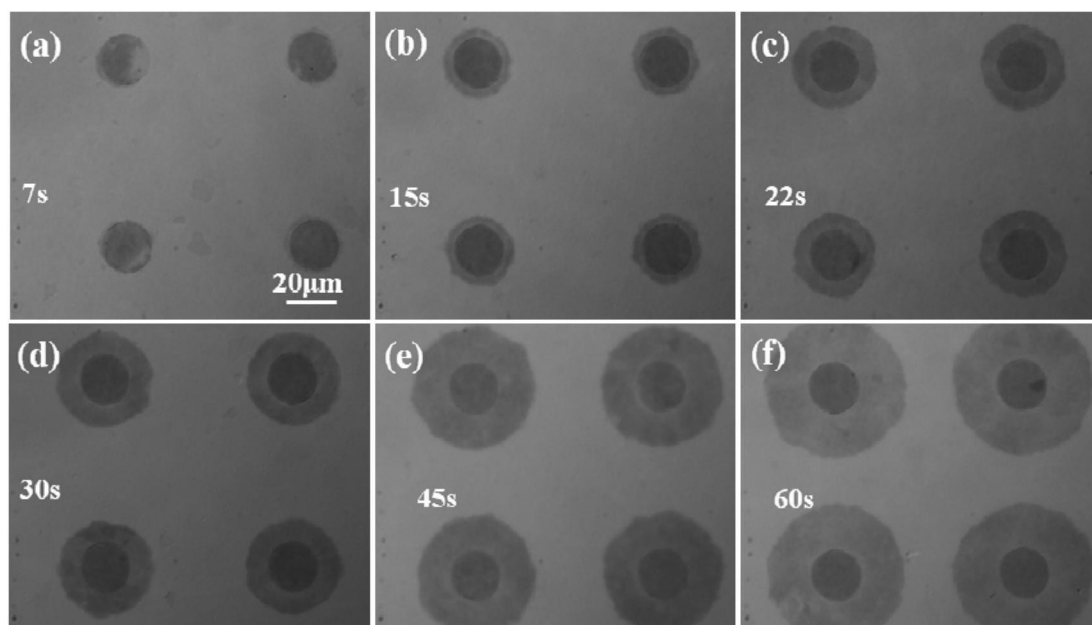


图3

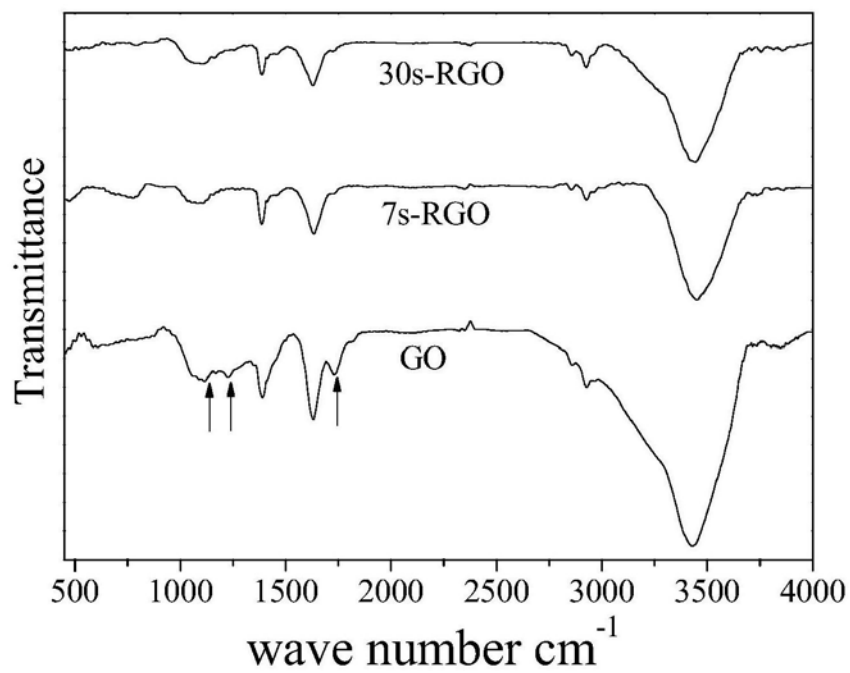


图4

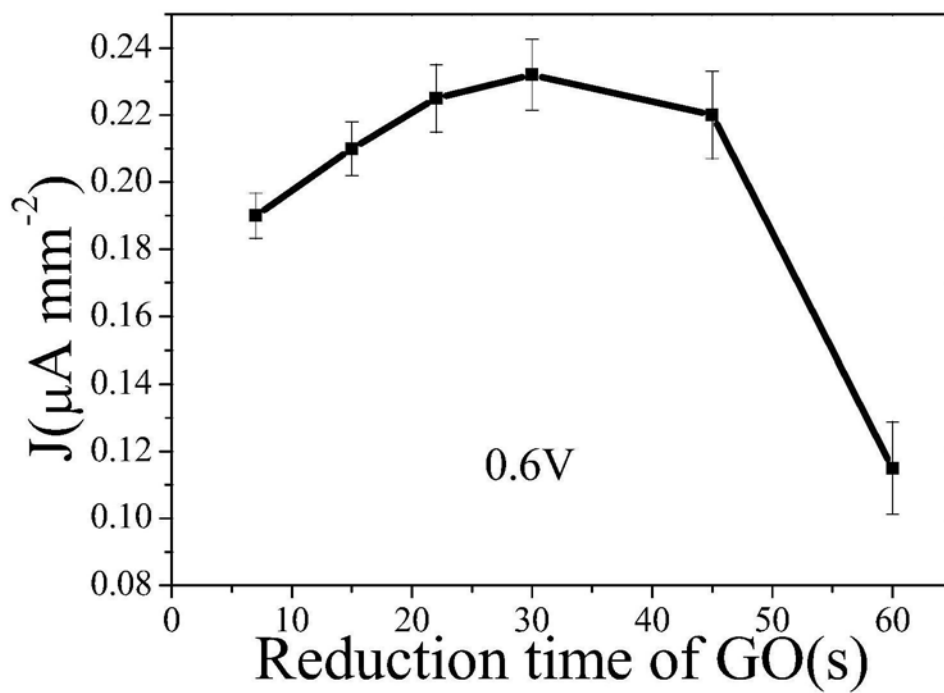


图5



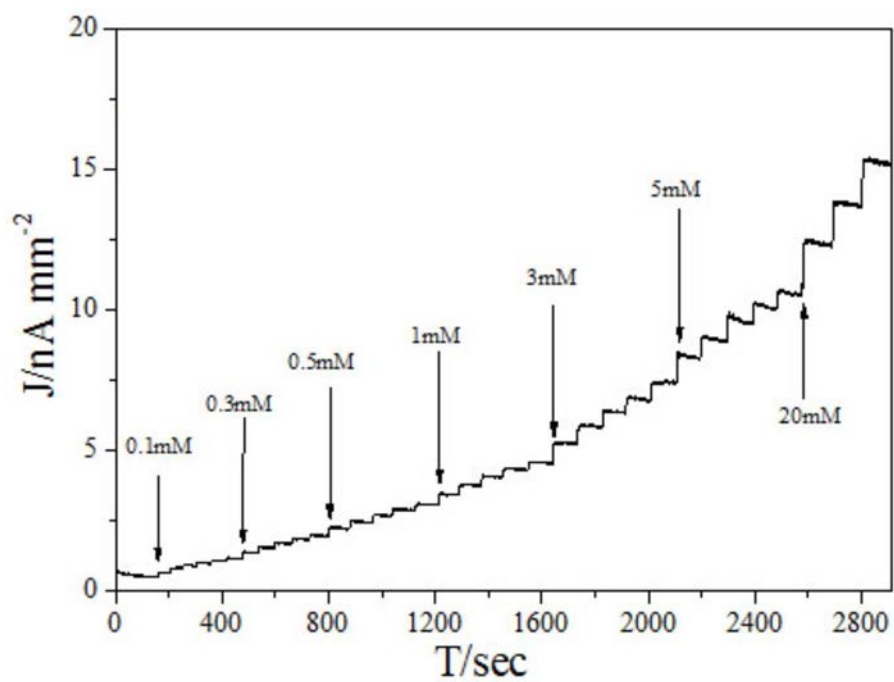


图6

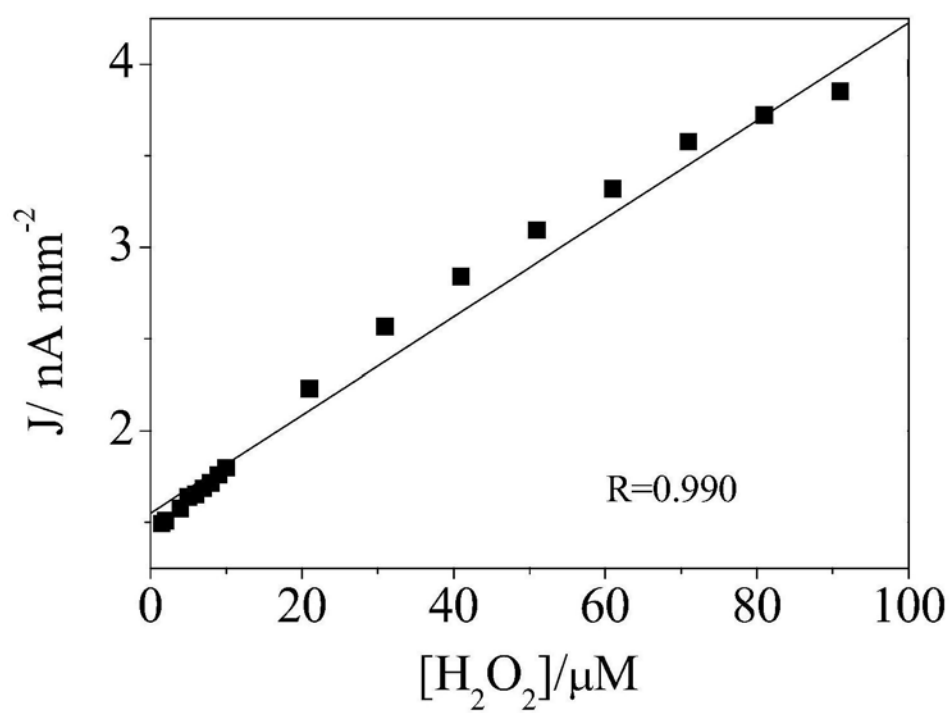


图7

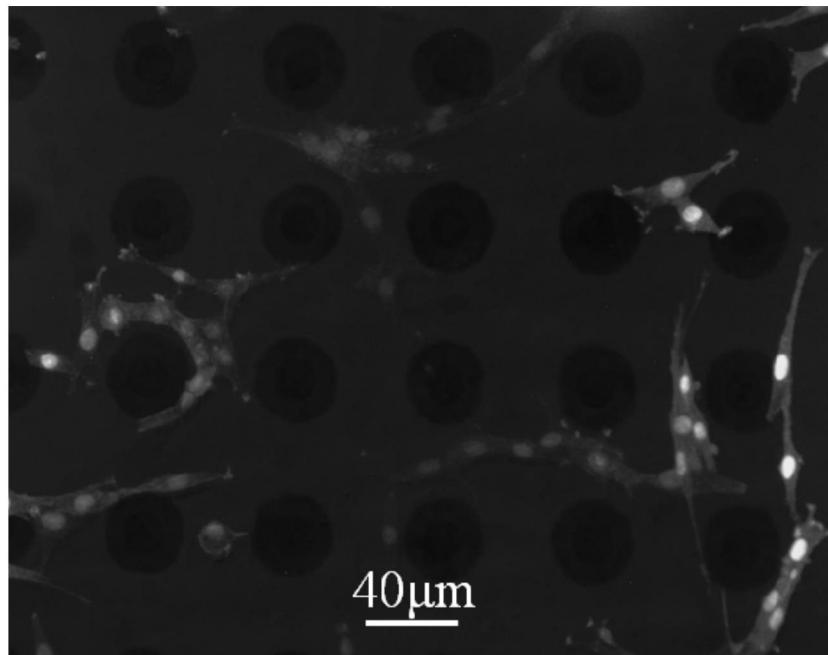


图8

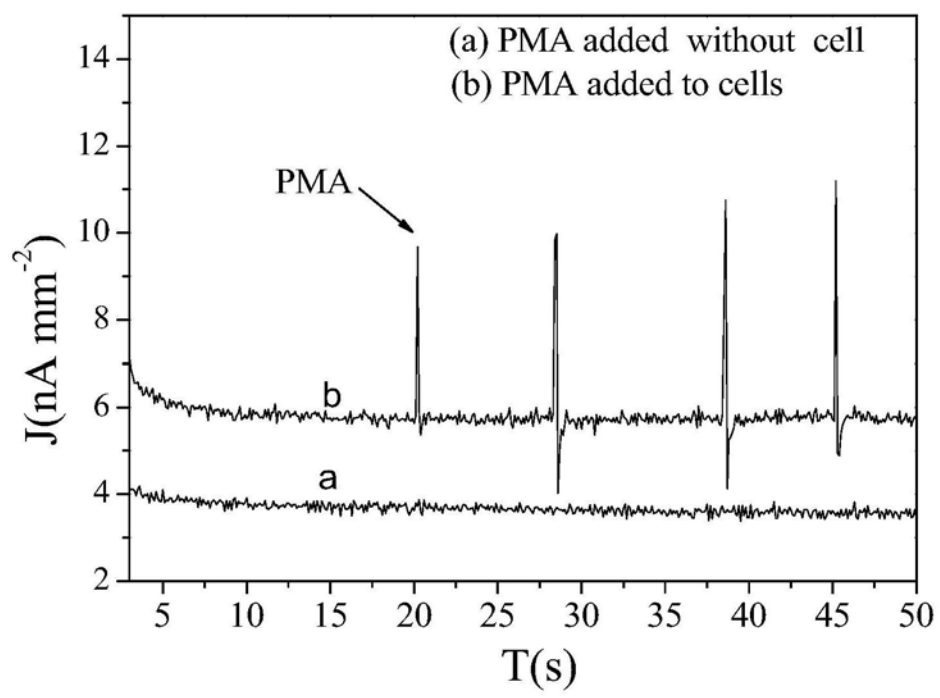


图9