



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104655698 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201510080785. 2

(22) 申请日 2015. 02. 15

(71) 申请人 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 杭州求是专利事务有限公
司 33200

代理人 邱启旺

(51) Int. Cl.

G01N 27/30(2006. 01)

G01N 27/413(2006. 01)

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, 其特征在于, 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 RGO 阵列(3) 组成。

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制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(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 3000 rpm, 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 Na_2HPO_4 溶液和 0.2M 的 NaH_2PO_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。

3. 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。

4. 根据权利要求 3 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。

5. 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。

6. 根据权利要求 5 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。

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(2600m²/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剂活性高。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 RGO 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:

(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 3000 rpm, 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 Na_2HPO_4 溶液和 0.2M 的 NaH_2PO_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。

[0008] 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。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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

[0013] 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 1、2 为氧化石墨烯、3 为 RGO 阵列 ;

图 2 为光刻模板的结构示意图 ;

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。

[0014] 图 4 为实施例 1 制备的 3 个样品的红外 (IR) 光谱图。

[0015] 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 ;

图 6 为本发明石墨烯 / 氧化石墨烯微阵列电极在以 0.1M 的 Na_2HPO_4 溶液和 0.1M 的 NaH_2PO_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 ;

图 7 是双氧水的浓度与电流响应的线性关系图 ;

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；

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 Na_2HPO_4 溶液和 0.1M 的 NaH_2PO_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

[0016] 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 RGO 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。

[0017] 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:

(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。

[0018] (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。

[0019] (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°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°C 下烘 90s; 最后显影 24s; 制备 5 个样品。

[0020] (4) 在步骤 3 处理后的 6 个基底上旋涂 4mg/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)。

[0021] (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 Na_2HPO_4 溶液和 0.2M 的 NaH_2PO_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。

[0022] 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 cm^{-1})、 $\text{C}-\text{OH}$ (1224 cm^{-1}) 以及 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 峰 (1065 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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 Na_2HPO_4 溶液和浓度为 0.1M 的 NaH_2PO_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 μL 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 nAmm^{-2} , C 为浓度, 单位是 mM 。由此可知, $C=(J-1.5)/26.7$ 。

[0026] 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。

[0027] 将还样品 I-4 灭菌后接种神经细胞 PC12, 接种密度 3000 个 / 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 30ml 浓度为 0.2M 的 Na_2HPO_4 溶液和 0.2M 的 NaH_2PO_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 μL 浓度为 100nM 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。

[0028] 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 Na_2HPO_4 溶液和 0.1M 的 NaH_2PO_4 溶液按照体积比 4:1 组成的混合溶液中, 用 10 μL 浓度为 100nM 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 3.9nAmm^{-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 0.15mM。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。

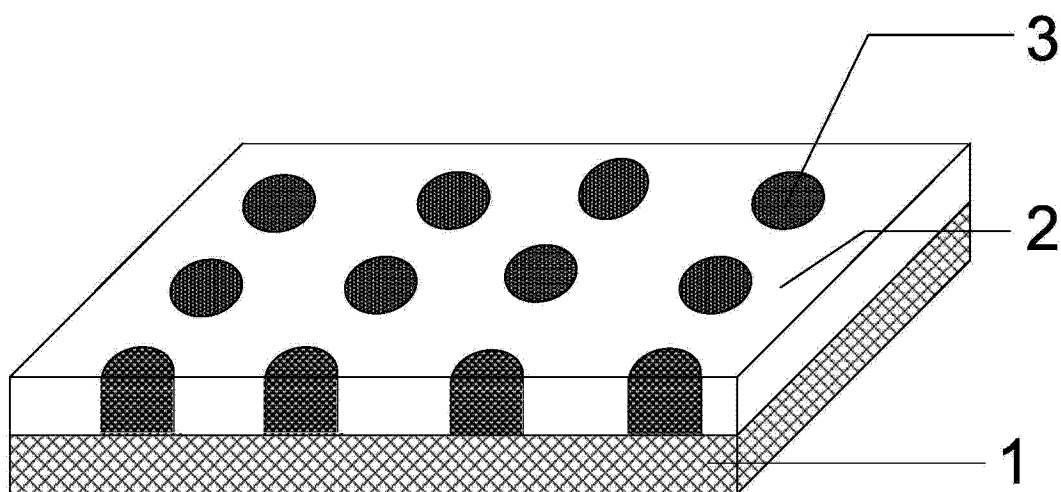


图 1

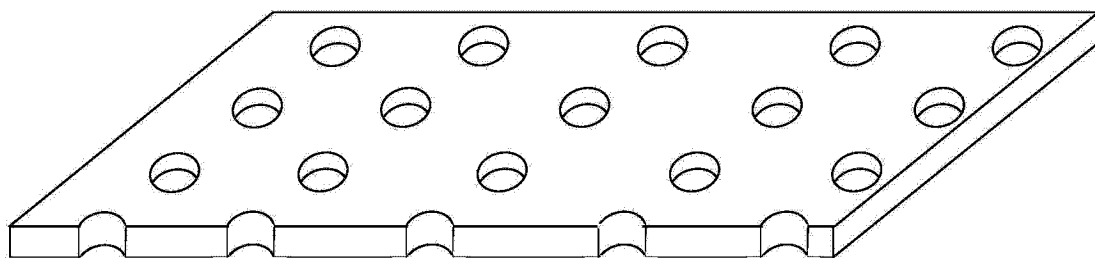


图 2

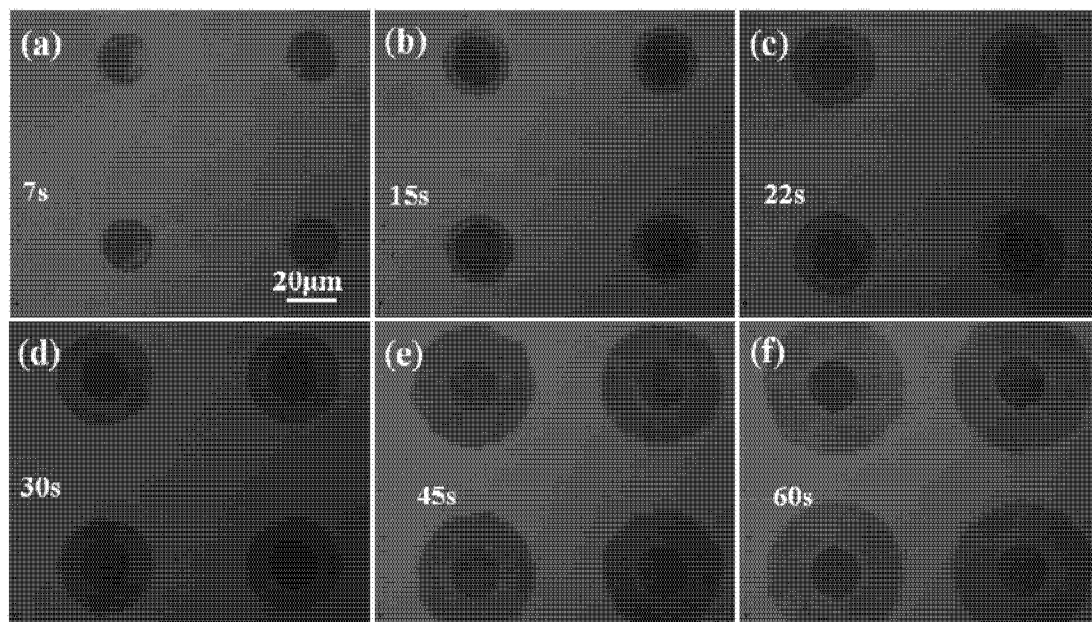


图 3

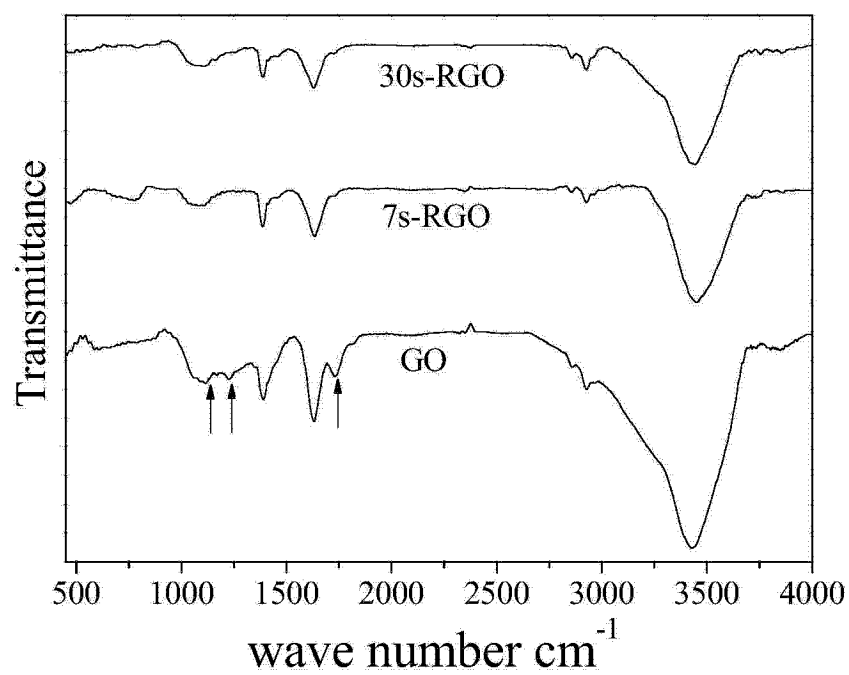


图 4

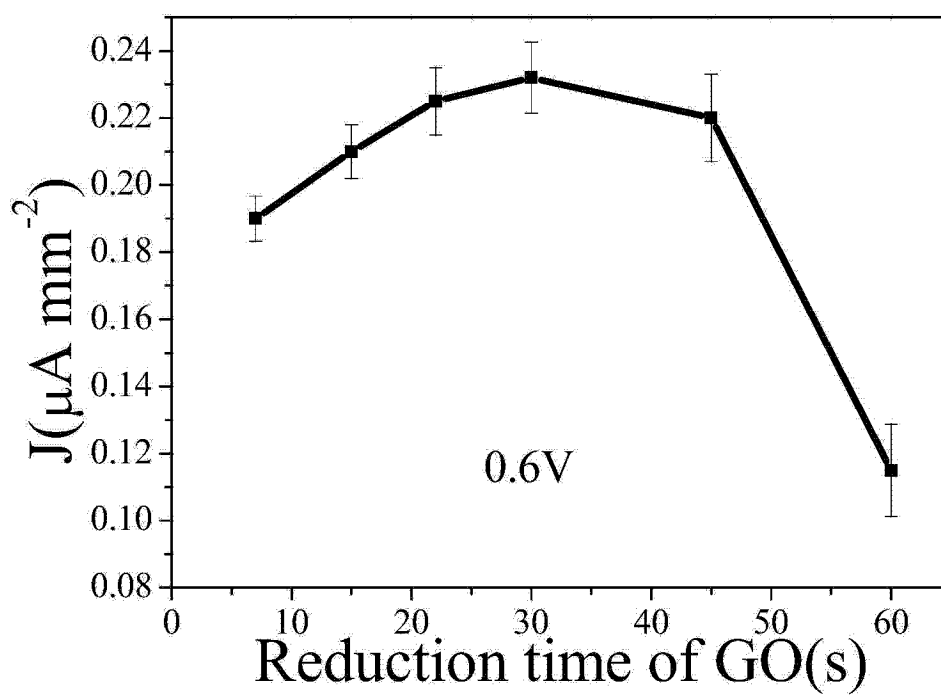


图 5

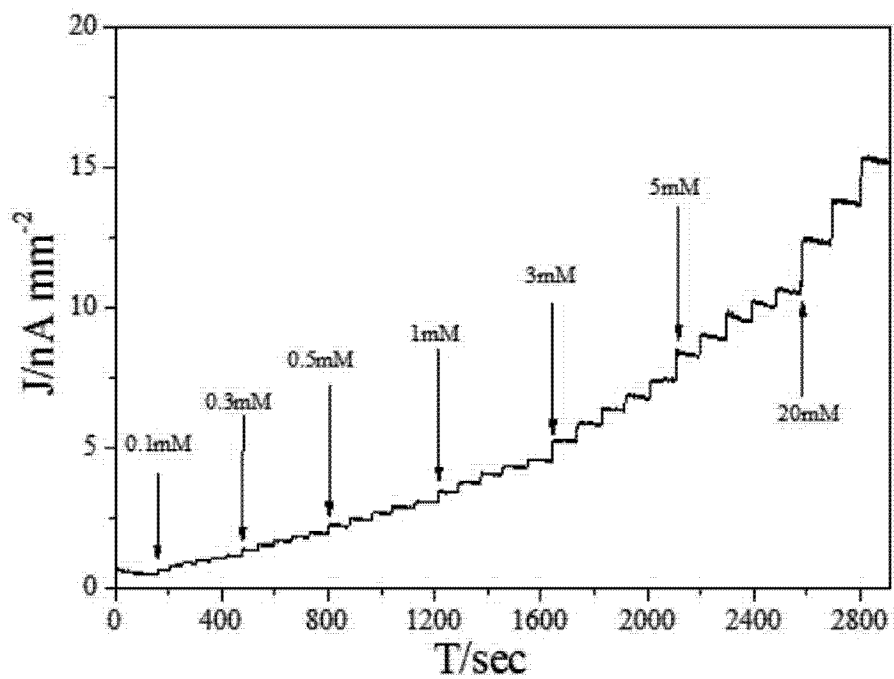


图 6

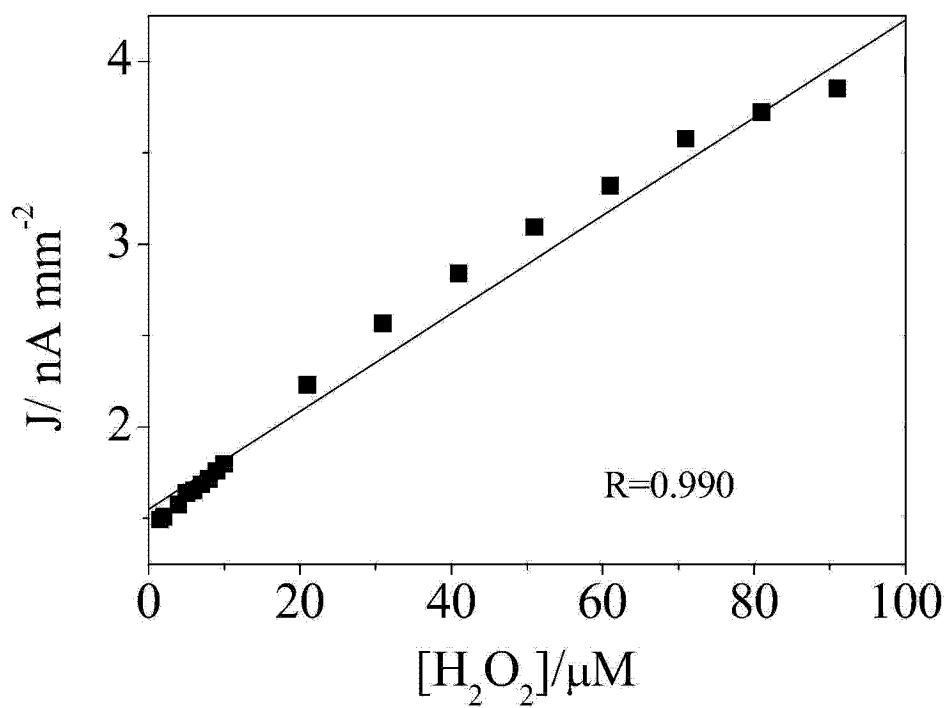


图 7

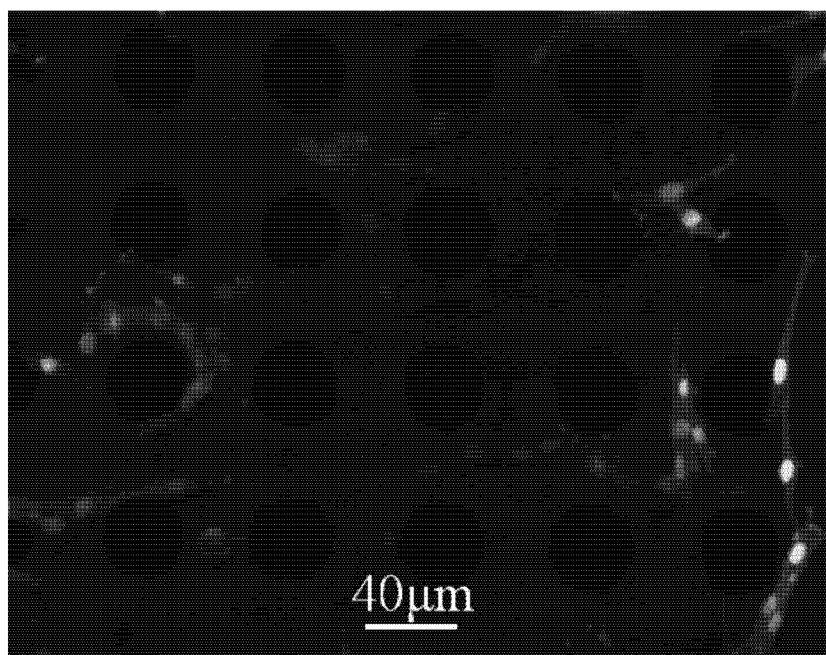


图 8

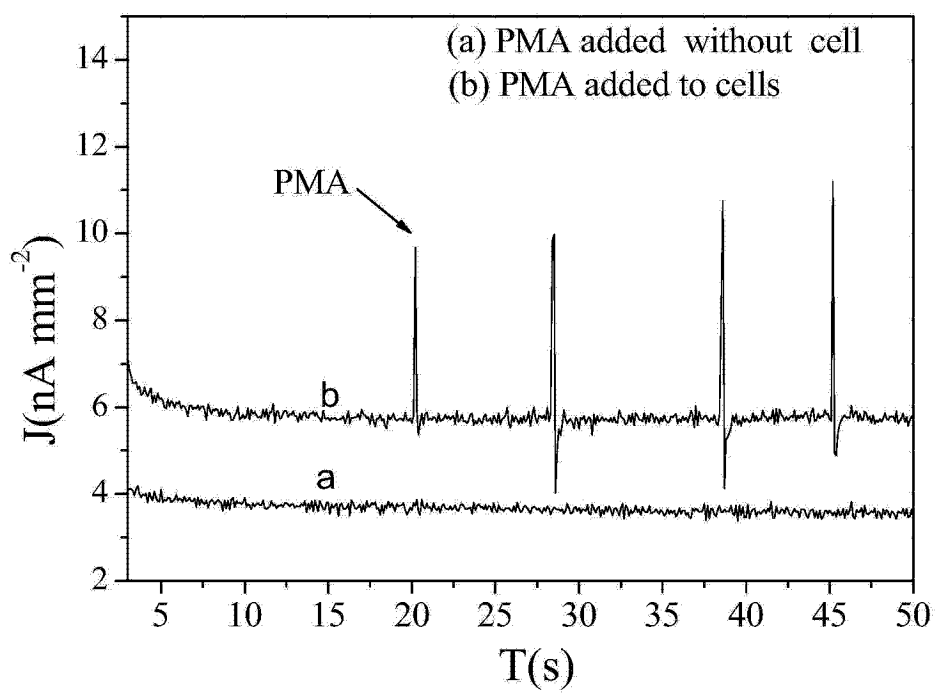


图 9