

# 玻碳电极上的自组装APMDES制备电化学生物传感器

何农跃, 许利剑, 杜晶晶

(湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室, 湖南 株洲 412008)

**摘要:** 在玻碳电极表面自组装氨基丙基甲基二乙氧基硅烷 (APMDES) 单分子膜, 从而使玻碳电极上修饰了  $-NH_2$  基团, 用于检测低浓度小牛血清蛋白, 采用金标银染的方法, 对修饰电极检测蛋白的能力和自组装膜的致密性进行了研究。试验结果表明: 自组装膜的致密性主要受组装液浓度、组装时间和温度的影响。当 APMDES 在乙醇溶液中的体积分数为 3%, 组装时间为 4 h、温度为 30 °C 时, 组装膜成膜状况较为理想。在最佳试验条件下, 修饰上氨基的玻碳电极对检测质量浓度为 0.5 ~ 0.05 ng/mL 的小牛血清蛋白有良好的响应, 回归线性方程为:  $I(\mu A) = 0.8254 + 1.4319 \times C(\text{ng/mL})$ ,  $R = 0.958$ , 检测极限为 0.02 ng/mL, 背景电流信号小于  $2.0 \times 10^{-7}$  A, 检测的信噪比达到最佳。

**关键词:** 自组装单分子膜; 阳极溶出伏安法; 金标银染

中图分类号: V231.91; O344.2

文献标识码: A

文章编号: 1673-9833(2008)02-0059-04

## Preparation of Electrochemical Biosensor by Self-Assembly APMDES on Glassy Carbon Electrode

He Nongyue, Xu Lijian, Du Jingjing

(Hunan Key Laboratory of Green Packaging and Application of Biological Nanotechnology,  
Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

**Abstract:** Self-assembled monolayer (SAM) of 3-Aminopropylmethyldiethoxysilane (APMDES) absorbed on the surface of glassy carbon electrode is constructed, and the electrode is modified with  $-NH_2$  group. Then low concentration of bovine serum albumin is detected by the modified electrode and compactness of the monolayer and the sensitivity to detecting bovine serum albumin are studied by gold-label promoted silver-staining. The result indicates that the compact monolayer can be obtained when the concentration of APMDES reaches 3-vol. % in alcohol solution, the assembling time is 4 hours and the assembling temperature is 30 °C. Under the above conditions, the peak currents are linear to the concentration of albumin over the wide range from 0.5 to 0.05 ng/mL, and the detection limit is 0.02 ng/mL, the regress linear equation is  $I(\mu A) = 0.8254 + 1.4319 \times C(\text{ng/mL})$ ,  $R = 0.958$ , and the background current signals are less than  $2.0 \times 10^{-7}$  (A).

**Key words:** self-assembled monolayer; anodic stripping voltammetry; gold-label promoted silver-staining

自组装单分子膜 (Self-Assembled Monolayers, SAMs) 是固液界面通过化学或物理吸附形成的有序超薄膜, 是构膜分子通过分子间及其与基体材料间的物理化学作用而自发形成的, 是一种热力学稳定、排

列规则的单 (或多) 层分子膜。它具有均匀一致, 高密堆积和低缺陷等特性, 并可按预先设计和通过精确的化学控制而获得特定功能, 具有超分子的结构及界面性质。人们对自组装膜的制备技术以及自组装膜成

收稿日期: 2008-02-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (60571032, 90606027), 国家 863 计划基金资助项目 (2007AA022006), 湖南省科技厅基金资助项目 (06JJ4012, 2007FJ4050)

作者简介: 何农跃 (1958-), 男, 云南石屏人, 湖南工业大学教授, 博士, 东南大学博士生导师, 主要研究方向为生物分析和功能纳米材料。

膜机制进行了大量的研究和探索。结果表明,成膜过程中的浓度、温度、自组装时间等对 SAMs 质量有重要的影响<sup>[1,2]</sup>。在基底表面自组装的 SAMs, 由于具有良好的稳定性及有序性, 受到基础研究及应用技术等方面的广泛重视, 成为近年来界面化学与材料科学等领域的研究热点<sup>[3-5]</sup>, 而且 SAMs 具有广泛的仿生及生物亲和特性, 又在化学及生物化学传感器方面有广泛的应用前景<sup>[6-10]</sup>。氨基丙基甲基二乙氧基硅烷作为自组装单分子膜的一种也得到了广泛的应用, 但通常是采用硅片、石英和玻璃等为基材, 而采用玻碳电极为基材, 结合电化学的研究方法, 将其制作为生物传感器的研究报道很少, 此研究对研制简单实用型的生物传感器具有重要的实用价值。本试验采用自组装的方法, 在玻碳电极上自组装 APMDDES 单分子膜, 使电极上修饰  $-NH_2$  基团, 成功地制作出检测微量蛋白的新型传感器, 并采用阳极溶出法对自组装膜致密性的工艺参数进行了考察, 对所获得的新型传感器的检测能力进行了表征。

## 1 试验部分

### 1.1 试验仪器与试剂

试验采用的氨基丙基二乙氧基硅烷 (APMDDES) 纯度为 99.9%, 小牛血清蛋白纯度大于 98% (南京阳光生物有限公司),  $H AuCl_4 \cdot 3H_2O$  (上海试剂厂); 硝酸银、对苯二酚、浓硝酸、浓硫酸均为分析纯 (上海试剂厂), 13 nm 胶体金根据 Frens 法<sup>[11]</sup>自制。

本试验阳极溶出极化曲线测量采用三电极体系, 以玻碳电极 (直径 4 mm) 为工作电极, 铂电极为辅助电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极; 曲线测量使用 CHI660B 电化学工作站 (上海辰华仪器有限公司), 扫描速率为 5 mV/s, 温度 20 °C, 测量出银的溶出电位为 0.27 V。

### 1.2 试验方法

本试验首先将预处理好的玻碳电极浸入氨水溶液中, 使电极表面带羟基基团, 然后将电极浸入 APMDDES (体积分数为 3%) 的乙醇溶液中进行自组装, 再将电极浸入小牛血清蛋白和胶体金混合溶液中, 使修饰了氨基的电极结合上标有金纳米颗粒的蛋白 (温度: 20 °C, 时间 30 min)。为进一步放大电化学信号, 将电极进行银染 (银染显色液: 浓度为  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的  $AgNO_3$  和浓度为  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 对苯二酚, 温度: 20 °C, 时间 10 min), 然后以去离子水终止银染反应, 并洗去沾附在电极上的银染液, 最后将电极浸入到浓度为 0.10 mol/L 的硝酸中, 进行阳极溶出伏安扫描, 记录阳极溶出伏安曲线。试验具体步骤如图 1 所示。

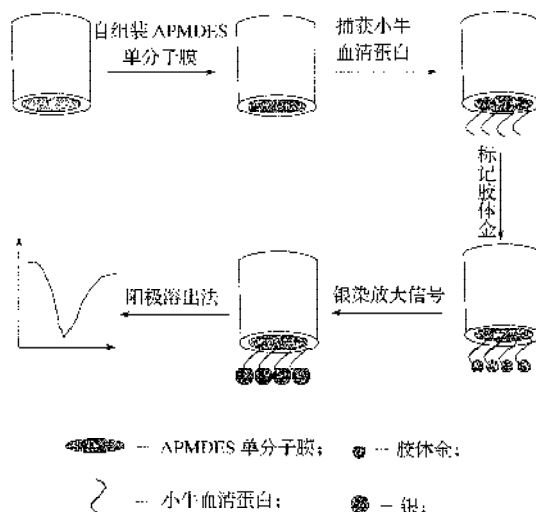


图 1 试验方案示意图

Fig. 1 The protocol scheme of analytical procedure

## 2 试验结果与讨论

### 2.1 硅烷体积分数的确定

在试验温度为 30 °C, 自组装时间为 60 min 的条件下, 改变乙醇溶液中硅烷体积分数, 确定硅烷体积分数对硅烷自组装膜致密性的影响如图 2 所示。图 2 中 a, b, c, d 分别是玻碳电极在体积分数为 1%, 2%, 3%, 4% APMDDES 的乙醇溶液中浸泡, 然后进行金标银染后检测银的阳极溶出电流信号。

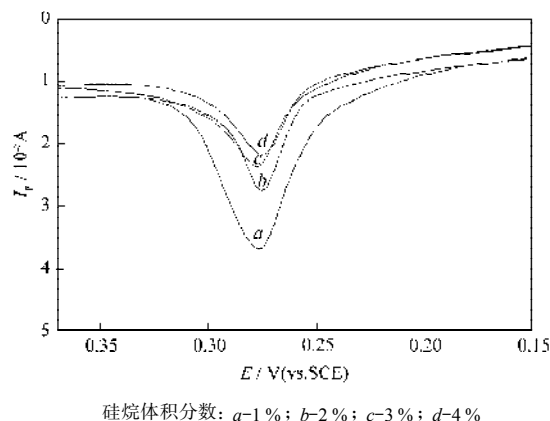


图 2 硅烷体积分数对自组装膜致密性的影响

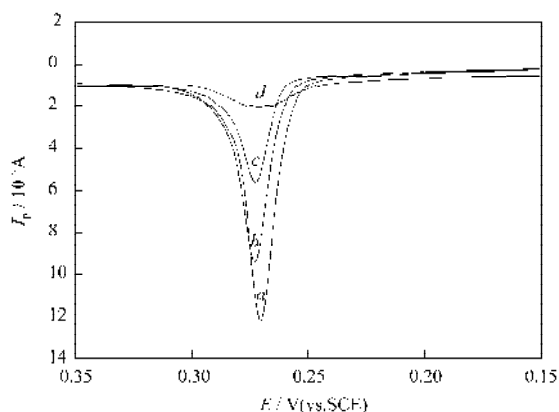
Fig. 2 The influence of APMDDES concentration on the compact of SAM at different APMDDES concentrations

结果表明: 随着乙醇溶液中硅烷体积分数的增大, 银的溶出电流信号越来越小, 说明增大乙醇溶液中硅烷体积分数, APMDDES 在玻碳电极上自组装成膜速度增大, 膜层越来越致密。膜层一方面抑制了玻碳电极吸附胶体金, 由于纳米胶体金对  $Ag^+$  的还原有催化作用, 没有纳米金参加时, 对苯二酚对  $Ag^+$  的还原作用进行得非常缓慢, 使在银染过程中被还原的  $Ag^+$  量相对减少, 另一方面, 自组装形成的绝缘膜层阻碍了电子的传输, 故而使银的溶出电流减小。但当硅烷

体积分数超过3%时, 银的溶出电流变化较小, 说明当硅烷体积分数超过3%时, 继续增大乙醇溶液中硅烷体积分数, 对硅烷自组装成膜速度和致密性的影响不明显, 所以, 应控制硅烷体积分数在3%为宜。

## 2.2 自组装时间的确定

在试验温度为15℃, APMDES的乙醇溶液体积分数为3%的条件下, 改变自组装时间, 确定自组装时间对硅烷自组装膜致密性的影响如图3所示。图3中a、b、c、d分别是电极在APMDES的乙醇溶液中浸泡10 min、30 min、60 min和120 min, 然后进行金标银染后银的溶出信号。



自组装时间/min: a-10; b-30; c-60; d-120

图3 自组装时间对自组装膜致密性的影响

Fig. 3 The influence of self-assembling time on the compactness of monolayer

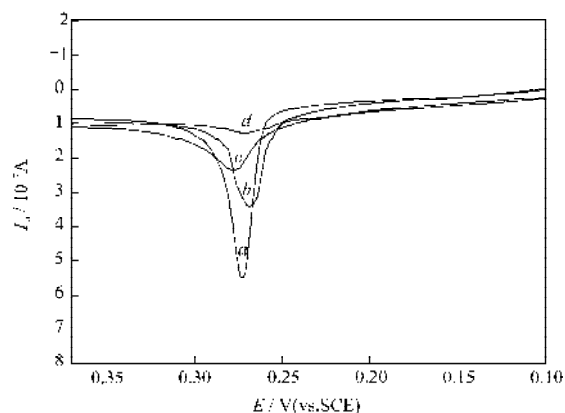
试验结果表明: 自组装时间对硅烷自组装膜致密性的影响较大。随着自组装时间的增加, 银的溶出电流迅速减小, 这是由于APMDES自组装膜表面类似小岛状<sup>[12]</sup>, 随着成膜时间的延长, 岛状结构逐渐被填平, 形成致密的APMDES自组装膜, 使玻碳电极吸附胶体金的量减少, 阻碍电子的传输, 故而使银的溶出电流迅速减小。当自组装时间达到120 min时, 银的溶出氧化峰电流很小, 因此要在玻碳电极上得到致密的硅烷膜, 在温度为15℃, 硅烷体积分数为3%时, 自组装时间应大于120 min。

## 2.3 自组装温度的确定

在自组装时间为60 min, APMDES的乙醇溶液体积分数为3%的条件下, 改变试验温度, 确定试验温度对硅烷自组装膜致密性的影响如图4所示。图4中a、b、c、d分别是试验温度为15℃、25℃、35℃和45℃, 然后进行金标银染后银的溶出信号。

试验结果表明: 试验温度对硅烷自组装膜成膜速度和致密性的影响较大。随着试验温度的增加, 银的溶出电流逐渐减小, 说明试验温度的增加, 加快了硅烷自组装成膜的速度, 大大提高了膜层的致密性, 使银的溶出电流迅速减小。但当试验温度过高时, 将会

使乙醇挥发较快, 硅烷体积分数不断升高, 破坏自组装膜层, 所以, 要得到致密的硅烷膜, 温度在30℃左右为佳。



试验温度/℃: a-15; b-25; c-35; d-45

图4 自组装温度对自组装膜致密性的影响

Fig. 4 The influence of self-assembling temperature on the monolayer compact

在硅烷体积分数为3%, 试验温度为30℃, 浸泡时间大于120 min的工艺条件下, 在玻碳电极上自组装APMDES膜, 经金标银染后, 作阳极溶出伏安曲线, 仍然有银的氧化峰, 这可能是由于氨基与少量的纳米金通过配位键结合, 使自组装APMDES膜上有少量纳米金, 促进了银的还原, 但背景信号电流很小, 在 $2.0 \times 10^{-7}$  A以内, 说明所得到的自组装APMDES膜均匀致密。

## 2.4 检测蛋白能力的表征

在玻碳电极上自组装致密的APMDES膜, 由于氨基丙基甲基二氧基硅烷上带有 $-NH_2$ 基团, 在玻碳电极自组装后使电极被修饰上了 $-NH_2$ 基团, 裸露的 $-NH_2$ 基团可以与小牛血清蛋白上残余醛基结合, 形成共价键, 从而实现检测溶液中微量小牛血清蛋白的目的。在上述工艺条件下得到均匀致密的APMDES自组装膜后, 将电极分别浸入质量浓度为0.5 μg/L、0.1 μg/L和0.05 μg/L标有胶体金的小牛血清蛋白溶液中, 然后进行银染, 检测银的阳极溶出信号, 如图5所示。

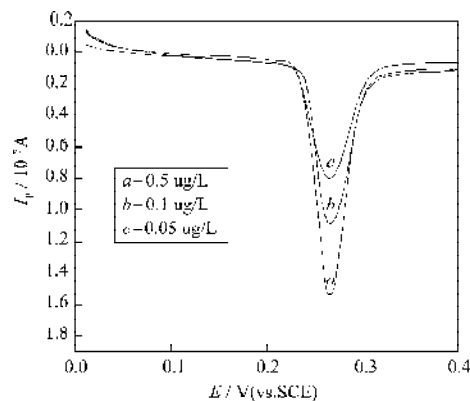


图5 不同质量浓度BSA的阳极溶出峰电流

Fig. 5 The anodic peak current of different concentration of BSA

由图5可看出:修饰上氨基的玻碳电极对检测质量浓度为0.5~0.05  $\mu\text{g/L}$ 的小牛血清蛋白有良好的响应,回归线性方程为:  $I(\mu\text{A}) = 0.8254 + 1.4319 \times C(\mu\text{g/L})$ ,  $R=0.958$ ,检测极限为0.02  $\mu\text{g/L}$ ,背景电流信号小于  $2.0 \times 10^{-7}\text{A}$ ,检测的信噪比达到最佳。

### 3 结论

本文在玻碳电极表面自组装氨基甲基二乙氧基硅烷(APMDES)单分子膜,得到了检测微量蛋白的电化学生物传感器,确定出自组装单分子膜的最佳工艺条件:APMDES的体积分数为3%,组装时间为4h、温度为30 $^{\circ}\text{C}$ ,在工艺条件下,采用金标银染法对检测浓度为0.5~0.05  $\text{ng/mL}$ 的小牛血清蛋白有良好的响应,回归线性方程为:  $I(\mu\text{A}) = 0.8254 + 1.4319 \times C(\text{ng/mL})$ ,  $R=0.958$ ,检测极限为0.02  $\text{ng/mL}$ ,背景电流信号小于  $2.0 \times 10^{-7}\text{A}$ ,检测的信噪比达到最佳。

#### 参考文献:

- [1] Frank Schreiber. Structure and growth of self-assembling monolayers[J]. Progress in Surface Science, 2000, 65: 151-156.
- [2] 崔晓丽, 蒋殿录, 刁鹏, 等. 硫醇在金电极上的SA单分子膜的电化学研究[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20(5): 80-84.
- [3] 徐伟平, 李光宪. 分子自组装研究进展[J]. 化学通报, 1999, 2: 21-25.
- [4] Taton K S, Guire P E. Photoreactive self-assembling polyethers for biomedical coatings[J]. Bio-interfaces, 2002, 24 (2): 123-132.
- [5] Cordas C M, Viana A S, Leupold S, et al. Self-assembled monolayer of an iron (III) porphyrin disulphide derivative on gold[J]. Electrochemistry Communications, 2003, 5(1): 36-41.
- [6] Chang H J, Ha N Y, Kim A, et al. Characterization of electro-properties of self-assembled mono-layer by attenuated total reflection[J]. Optical Materials, 2003, 21(3): 413-416.
- [7] 孙乔玉, 张校刚, 李小红, 等. 溶剂对自组装单分子膜的电化学行为的影响[J]. 高等学校化学学报, 2001, 10: 1693-1696.
- [8] Diao P, Jiang D L, Cui X L, et al. Study of structural disorder of self-assembled thiolmonolayers on gold by cyclic voltammetry and impedance[J]. J Electroanalytical chemistry, 1999, 464: 61-67.
- [9] 赵健伟, 于化忠, 王永强, 等. 自组装膜结构与电化学生物行为的关系[J]. 物理化学学报, 1997, 1: 42-46.
- [10] Bunker B C, Carpick R W, Assink R A. The Impact of Solution Agglomeration on the Deposition of Self-Assembled Mono-layers[J]. Langmuir, 2000, 16: 7742-7751.
- [11] Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L, et al. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes[J]. Science, 2000, 289: 1757-1760.
- [12] 彭倚天, 胡元中, 王慧. 氨基表面自组装膜成膜及摩擦性能研究[J]. 润滑与密封, 2006, 179 (7): 28-30.

(责任编辑: 张亦静)