

- 2007,2(12):780-783.
- [10] Runge J, Reichert TE, Fritsch A, et al. Evaluation of single-cell biomechanics as potential marker for oral squamous cell carcinomas: a pilot study[J]. Oral Diseases, 2014,20(3):e120-127.
 - [11] Gossett DR, Henry T, Lee SA, et al. Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012,109(20):7630-7635.
 - [12] Rejniak KA. Investigating dynamical deformations of tumor cells in circulation: predictions from a theoretical model[J]. Frontiers in Oncology, 2012,2:111-119.
 - [13] Dobrzyńska I, Skrzydlewska E, Figaszewski ZA. Changes in electric properties of human breast cancer cells[J]. The Journal of Membrane Biology, 2013,246(2):161-166.
 - [14] Qiao G, Wang W, Duan W, et al. Bioimpedance Analysis for the Characterization of Breast Cancer Cells in Suspension[J]. Biomedical Engineering IEEE, 2012,59(8):2321-2329.
 - [15] Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy[J]. Clinical Cancer Research, 2004,10(24):8152-8162.
 - [16] Smerage JB, Budd GT, Doyle GV, et al. Monitoring apoptosis and Bcl-2 on circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer[J]. Molecular Oncology, 2013,7(3):680-692.
 - [17] Pantel K, Denève E, Nocca D, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases[J]. Clinical Chemistry, 2012,58(5):936-940.
 - [18] Liu H, Zhang X, Li J, et al. The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2015,141(2):189-201.
 - [19] Gong C, Liu B, Yao Y, et al. Potentiated DNA damage response in circulating breast tumor cells confers resistance to chemotherapy[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015,290(24):14811-14825.
 - [20] Hou JM, Krebs M, Ward T, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer[J]. American Journal of Pathology, 2011,178(3):989-996.
 - [21] Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2012,30(5):525-532.
 - [22] Lu L, Zeng H, Gu X, et al. Circulating tumor cell clusters-associated gene plakoglobin and breast cancer survival[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2015,151(3):491-500.
 - [23] Wang Z, Cui K, Xue Y, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis[J]. Medical Oncology, 2015,32(5):164-166.
 - [24] Wallwiener M, Hartkopf AD, Riethdorf S, et al. The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients[J]. BMC Cancer, 2015,15(1):403-409.
 - [25] Abdallah EA, Fanelli MF, Buim ME, et al. Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: a new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients[J]. International Journal of Cancer, 2015,137(6):1397-1405.

(收稿日期:2015-10-26 修回日期:2016-01-12)

• 综 述 •

基于石墨烯场效应晶体管免疫传感器医学检测中应用的探讨

蔡冰洁 综述,李 艳[△]审校(武汉大学人民医院检验科 430060)

【关键词】 石墨烯; 场效应晶体管; 免疫传感器; 医学检测

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.054 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)09-1283-03

免疫检测方法种类繁多,在医学检测中有一定应用,然而传统方法存在某些亟待改进的地方。随着纳米技术和电子技术迅猛发展,生物传感器开始被用于医学检测中。其中,基于石墨烯场效应晶体管(FET)免疫传感器由于灵敏性和特异性高、反应快、免标记等优势已开始应用于医学检测中。自第1个生物传感器发明^[1],科学家对于生物传感器研究越发热门,并发表大量相关文献。其中,免疫传感器作为生物传感器引起广泛重视。近年来,随着纳米技术和现代电子技术迅猛发展,基于石墨烯 FET 用于制备免疫传感器吸引了广泛研究,并已

被用于检测各种生物分子。传统免疫检测方法包括放射免疫法、酶标免疫法、化学免疫发光法、荧光免疫法等,上述方法灵敏性和特异性不高,需要荧光或放射性元素标记,操作复杂,耗时长^[2]。基于石墨烯 FET 免疫传感器与传统检测方法相比,在灵敏性和选择性上都占一定优势,且不需要标记,分析速度快,试剂消耗少,非常适用于生物分子检测,可预见其未来将在医学检测中发挥更大作用。

本文简要综述基于石墨烯 FET 免疫传感器制备方法和工作原理,重点综述基于石墨烯 FET 免疫传感器医学检测应用,

[△] 通讯作者, E-mail: yanlitf1120@163.com。

并对该类传感器存在问题以及以后发展前景进行简要分析。

1 基于石墨烯 FET 免疫传感器制备方法

1.1 石墨烯制备

石墨烯是 1 种由碳原子构成单层片状结构二维纳米材料^[3-4],具有大表面积、高电子迁移率、高热电传导性、高机械强度等独特理化性质^[4],可用来提高 FET 免疫传感器检测生物分子灵敏性和选择性。

目前,石墨烯制备方法主要有 4 种。机械剥离法是最早制备石墨烯方法。该方法以石墨为原料,通过胶带层层剥离石墨得到石墨烯单层碳原子结构,可制得高质量晶格完好单层石墨烯片,被广泛用于基础性研究,分析石墨烯的物理、化学性质等。但该方法产量低、不易控制、重复性差,无法进行大规模制备应用^[5]。碳化硅热解外延生长法以碳化硅作为原料,在真空高温条件下使碳化硅中硅升华而留下碳重新排列形成石墨烯。该方法可制备出大面积石墨烯且质量较高,但制备条件较苛刻、碳化硅价格较高、制得石墨烯片不易从碳化硅(SiC)转移^[6]。化学气相沉积法(CVD)以碳氢气体为原料,高温下在金属表面沉积碳原子,生成石墨烯薄膜。该方法简单易行,可以得到大面积质量较好石墨烯,也易于从基体上分离,虽成本较高,需要转移,但应用前景大,是目前比较常用方法^[7]。化学氧化还原法通常采用 Hummers 氧化法得到氧化石墨,然后使用还原剂将氧化石墨还原成石墨烯。通过化学氧化还原法可实现石墨烯大批量制备,易于实现对石墨烯改性及功能化,现阶段使用非常广泛。但该方法制备石墨烯含有较多缺陷,导电性降低,限制其在对石墨烯质量要求较高领域中的应用^[4]。所以,应根据实际情况采取最合适制备方法。

1.2 石墨烯 FET 制备

目前,用于制备 FET 传感器石墨烯多采用 CVD 和化学氧化还原法。因石墨烯电子特性受层数、使用基底、杂质吸附、平整度、缺陷、尺寸、边缘类型和功能化等重要因素影响^[8],上述因素在使用石墨烯制备 FET 时都需要考虑。FET 采用传统半导体和微纳加工技术进行制备^[9],在制备过程中或制备完成后组装上石墨烯,从而得到石墨烯 FET。

1.3 基于石墨烯 FET 免疫传感器制备

在石墨烯 FET 上通过化学反应将抗体组装于石墨烯表面,常用固定方法包括共价结合法、生物素-亲和素结合法。共价结合法是在石墨烯表面使用耦联剂将抗体共价结合而固定在石墨烯表面;该方法较稳定牢固,但容易降低抗体生物活性。生物素-亲和素结合法是先链霉亲和素固定在石墨烯表面,然后加入抗体-生物素复合物,使其与链霉亲和素结合,从而固定抗体检测抗原;该固定方法亲和力高、结合稳定,但成本相对较高。

2 基于石墨烯 FET 免疫传感器工作原理

基于石墨烯 FET 免疫传感器工作原理,见图 1。源极、漏极和栅极 3 个电极以及硅/二氧化硅基底层组成 FET。其中,源极和漏极为金属电极,栅极为参比电极;基底材料可为其他材料,但硅/二氧化硅最常使用。FET 源极和漏极间组装纳米材料石墨烯,形成导电沟道作为 FET 传感元件。利用一定方法将抗体固定在石墨烯表面,然后加入待测物进行检测,当有目标抗原存在时,则会发生抗原抗体特异性结合,引起传感器电信号变化,检测电信号变化可测定目标抗原水平。当待测物中不含目标抗原时,则不会发生电信号变化或变化忽略不计,实现特异性检测目标抗原。

3 基于石墨烯 FET 免疫传感器医学检测应用

3.1 检测前列腺肿瘤标志物

Kim 等^[10]采用基于石墨烯 FET 免疫传感器检测前列腺特异性抗原-抗糜蛋白酶复合物(PSA-ACT)。循环过程中,前列腺特异性抗原(PSA)与主要与 $\alpha 1$ -抗糜蛋白酶(ACT)结合形成复合物 PSA-ACT。PSA-ACT 作为前列腺肿瘤标志物之一,可用于前列腺肿瘤诊断^[11-12]。Kim 等^[10]采用化学氧化还原法制备石墨烯,将石墨烯化学共价在玻璃基底上,采用传统微纳加工技术在石墨烯两端制备源漏电极形成石墨烯 FET,利用共价结合法将前列腺抗原单克隆抗体固定在石墨烯表面,封闭多余位点后加入待测物,通过电信号变化进行 PSA-ACT 特异性检测。该方法得到 PSA-ACT 检测限为 100 fg/mL(1.1 fmol/L)。

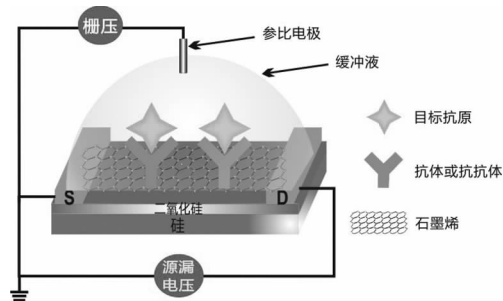


图 1 基于石墨烯 FET 免疫传感器工作原理示意图

3.2 检测阿尔茨海默病相关抗原

β -淀粉样蛋白在脑组织中沉积,引起阿尔茨海默病患者脑内神经退行性变。因此,检测 β -淀粉样蛋白有助于阿尔茨海默病早期诊断和治疗^[13]。Kurkina 等^[14]利用基于石墨烯 FET 免疫传感器实现对 β -淀粉样蛋白检测。利用微纳加工技术将源漏电极制备在硅/二氧化硅基底上,通过化学方法将石墨烯固定在源漏电极间组装成石墨烯 FET,然后利用共价结合法将抗 β -淀粉样蛋白抗体固定在石墨烯表面,加入待测物进行检测,通过检测抗原抗体特异性结合前后电信号变化,实现对 β -淀粉样蛋白定量检测,检测灵敏性低至 1 fmol/L。

3.3 检测艾滋病相关抗体

艾滋病是人体感染人类免疫缺陷病毒(HIV)导致获得性免疫缺陷综合征。通过检测 HIV 则可确诊艾滋病。HIV 分为 1 型(HIV-1)和 2 型(HIV-2),2 种型流行区域不同,HIV-1 是世界范围内主要流行的 1 种,HIV-2 主要流行于西非、欧洲、印度西南部等地^[15]。Kwon 等^[16]制备基于石墨烯 FET 免疫传感器检测 HIV-2。利用 CVD 法制备石墨烯,将石墨烯转移至聚合物薄膜上,采用光刻技术将石墨烯刻蚀成规则条状,然后在石墨烯两端组装源漏电极得到石墨烯 FET,接着在石墨烯表面共价结合组装 HIV-2 抗原来检测相应抗体。该免疫传感器测定 HIV-2 抗体检测限为 1 pmol/L,具有较好特异性。

3.4 检测乳腺肿瘤相关抗原

Myung 等^[17]报道利用基于石墨烯 FET 免疫传感器来检测乳腺肿瘤相关抗原人表皮生长因子受体-2(HER-2)和表皮生长因子受体(EGFR)。研究表明,HER-2、EGFR 在乳腺肿瘤患者体内会过度表达,对其检测有一定指导意义^[18-19]。首先在硅/二氧化硅基底上制备源漏电极,接着将石墨烯制备在相应位置使源漏电极导通构成石墨烯 FET,然后用共价结合法分别将相应抗体(抗 HER-2 单克隆抗体或抗 EGFR 单克隆抗体)修饰在石墨烯表面,封闭多余位点

后加入待测物进行实时检测。该免疫传感器检测 HER-2、EGFR 检测限分别为 1 pmol/L、100 pmol/L, 具有较好选择性。

3.5 检测免疫球蛋白 G(IgG) Mao 等^[20]用基于石墨烯 FET 免疫传感器实现对免疫球蛋白 G 检测。其在硅/二氧化硅基底上制备源漏电极, 将化学氧化还原法制备石墨烯组装在源漏电极间起连接作用, 通过静电组装作用将金纳米颗粒修饰 IgG 抗体固定在石墨烯表面进行检测^[21], 该免疫传感器灵敏性为 2 ng/mL, 具有较高特异性, 可区分 IgG 与 IgM、HRP。

4 小 结

目前, 基于石墨烯 FET 免疫传感器引起广泛关注。由于该传感器具有不需标记、耗时短、反应灵敏度高、选择性好等独特性质, 使得该传感器适用于医学检验领域生物分子检测。然而该传感器仍存在问题亟待完善, 如石墨烯质量不好控制、传感器上石墨烯层数无法固定、均一传感器不能大规模批量制备、传感器无法微型化、传感器重复使用性和稳定性仍需加强、传感器临床实际应用还未实现等。相信随着研究不断进步, 上述问题有望得到解决, 此类高灵敏性、特异性免疫传感器就能真正应用于临床实际检测, 实现对临床样品高通量、实时、快速检测。

参考文献

- [1] Su J, Shu H, Chang G, et al. The development of new non-enzymatic glucose biosensors using nanomaterials [J]. *Current Nanoscience*, 2015, 11(6): 736-747.
- [2] 曾莉. 石墨烯修饰的电化学免疫传感器在肿瘤标志物检测中的应用 [J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(9): 1314-1316.
- [3] Lin YM, Avouris P. Strong suppression of electrical noise in bilayer graphene nanodevices [J]. *Nano Letters*, 2008, 8(8): 2119-2125.
- [4] Dong X, Shi Y, Huang W, et al. Electrical detection of DNA hybridization with single-base specificity using transistors based on CVD-grown graphene sheets [J]. *Advanced Materials*, 2010, 22(14): 1649-1653.
- [5] 肖淑娟, 于守武, 谭小耀. 石墨烯的制备方法及其性能研究 [J]. *化学世界*, 2015, 56(6): 378-382.
- [6] Li D, Zeng X, Yang Y, et al. Freestanding graphene in large quantity prepared by nickel catalyzed decomposition of SiC powder [J]. *Materials Letters*, 2012, 74: 19-21.
- [7] Tian JB, Hu Z, Wei Y, et al. Surface structure deduced differences of copper foil and film for graphene CVD growth [J]. *Applied Surface Science*, 2014, 300(1): 73-79.
- [8] Pérez-López B, Merkoci A. Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences [J]. *Microchim Acta*, 2012, 179(1): 1-16.
- [9] Huang L, Zhang Z, Chen B, et al. Ultra-sensitive graphene hall elements [J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 104(183106): 1-4.

- [10] Kim DJ, Sohn IY, Jung JH, et al. Reduced graphene oxide field-effect transistor for label-free femtomolar protein detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 41: 621-626.
- [11] Zhu L, Jaamaa S, Hallstrom TM, et al. PSA forms complexes with α 1-antichymotrypsin in prostate [J]. *The Prostate*, 2013, 73(2): 219-226.
- [12] Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, et al. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer; assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer [J]. *Cancer Research*, 1991, 51(1): 222-226.
- [13] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease; progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.
- [14] Kurkina T, Sundaram S, Sundaram RS, et al. Self-assembled electrical biodetector based on reduced graphene oxide [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(6): 5514-5520.
- [15] Rawson JM, Landman SR, Reilly CS, et al. HIV-1 and HIV-2 exhibit similar mutation frequencies and spectra in the absence of G-to-A hypermutation [J]. *Retrovirology*, 2015, 12(1): 1-17.
- [16] Kwon OS, Lee SH, Park SJ, et al. Large-scale graphene micropattern nano-biohybrids: high-performance transducers for FET-type flexible fluidic HIV immunoassays [J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(30): 4177-4185.
- [17] Myung S, Solanki A, Kim C, et al. Graphene-encapsulated nanoparticle-based biosensor for the selective detection of cancer biomarkers [J]. *Advanced Materials*, 2011, 23(19): 2221-2225.
- [18] Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling; towards the systems level [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(7): 505-516.
- [19] Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer; the complexity of targeted inhibitors [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2005, 5(5): 341-354.
- [20] Mao S, Lu G, Yu K, et al. Specific protein detection using thermally reduced graphene oxide sheet decorated with gold nanoparticle-antibody conjugates [J]. *Advanced Materials*, 2010, 22(32): 3521-3526.
- [21] Lu GH, Zhu LY, Wang PX, et al. Electrostatic-force-directed assembly of Ag nanocrystals onto vertically aligned carbon nanotubes [J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111(48): 17919-17922.