

面向穿戴或植入式临床应用的 ssDNA-GFET 纳米生物传感器发展现状

郝壮^{1,2}, 刘绍琴², 潘昀路^{1*}

1. 哈尔滨工业大学机电工程学院, 哈尔滨 150000

2. 哈尔滨工业大学化工与化学学院, 哈尔滨 150000

摘要 单链 DNA 探针-石墨烯场效应管(ssDNA-GFET)纳米生物传感器在可穿戴或可植入式临床应用领域有着广泛前景。介绍了现有 ssDNA-GFET 的应用、标志物检测性能提升方法、真实人体样本溶液中标志物检测, 以及面向可穿戴或可植入式临床应用的柔性化研发现状, 总结了 ssDNA-GFET 在投入实际可穿戴或可植入式临床应用前有待解决的问题。

关键词 单链 DNA 探针; 石墨烯; 场效应管; 生物传感器; 柔性电子

近年来广受关注的石墨烯是一种单原子厚(0.34 nm)的二维纳米材料, 机械与电学性能优异, 具有独特的双极性和零能隙特性^[1], 使石墨烯场效应晶体管(graphene field effect transistor, GFET)具有响应快速和灵敏度高等优势^[2-3]。由一定数量的碱基以特定序列形式排布构成的单链脱氧核糖核酸(single-stranded deoxyribonucleic acid, ssDNA)探针, 具有体积小(长度约 15 nm)、稳定性高(90°C 高温不变性)、保质期长且能够人工合成等优势^[4-6]。相比于传统的抗体-抗原结合, ssDNA 探针

还能够识别分子间结构的细微差别, 从而与目标标志物产生高特异性和高选择性结合^[7]。因此, 结合 ssDNA 探针高选择性与 GFET 高灵敏度等优点的 ssDNA-GFET 纳米生物传感器在疾病标志物检测的可穿戴或可植入临床应用设备开发领域具有重要应用价值^[8-10]。

1 ssDNA-GFET 的出现及应用发展

ssDNA-GFET 由日本学者 Ohno 等^[11]在 2010 年

收稿日期: 2021-04-26; 修回日期: 2021-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(52005137)

作者简介: 郝壮, 讲师, 研究方向为基于低维材料的柔性可穿戴或可植入式电子器件, 电子信箱: haozhuang@hit.edu.cn; 潘昀路(通信作者), 教授, 研究方向为基于低维材料的柔性可穿戴或可植入式电子器件, 电子信箱: yunlupan@hit.edu.cn

引用格式: 郝壮, 刘绍琴, 潘昀路. 面向穿戴或植入式临床应用的 ssDNA-GFET 纳米生物传感器发展现状[J]. 科技导报, 2022, 40(13): 50-56; doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2022.13.005

提出,他们利用机械剥离的单层石墨烯加工 GFET 器件,通过含有芳香环结构的 1-芘丁酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(1-pyrenebutyric acid N-hydroxysuccinimide ester, PASE)作为链接分子将 ssDNA 探针修饰于石墨烯表面,对人体免疫球蛋白分子 E(immune globulin E, Ig E)进行了检测(图 1(a)),并对检测原理进行了描述: Ig E 在溶液中会由于自身等电势点与溶液 pH 值不同而处于带电状态,当 Ig E 被 ssDNA 探针捕获时,松散、线状的 ssDNA 探针会产生形态变化并蜷缩成稳定、紧凑的二级结构,将 Ig E 携带到距离石墨烯表面仅几个纳米的区间内,使得石墨烯的固-液接触界面电荷分布数量产生变化。对应地,石墨烯内部单位面积的可移动载流子数量也会随之改变,捕获的 Ig E 越多,单位面积内可移动载流子数量变化越明显,对 GFET 漏-源电流的扰动也越强,通过电流的变化量便可以确定 Ig E 浓度的变化。此外,该团队还利用未经 ssDNA 探针修饰的 GFET 和 ssDNA-GFET 分别对牛血清蛋白、链霉亲和素和 Ig E 等蛋白质分子进行检测。实验结果表明:只有在 ssDNA 探针的帮助下,

GFET 才能对 Ig E 产生高特异性响应。但由于机械剥离法操作烦琐、成功率低,得到的单层石墨烯面积有限(长度最大为几十微米),导致后续的 ssDNA-GFET 纳米生物传感器的深入研究几乎停滞。

2012 年, Lee 等^[12]利用化学气相沉积法(chemical vapor deposition, CVD)在铜箔上生长出大面积连续的单层石墨烯。随后大量有关利用 CVD 石墨烯加工 ssDNA-GFET 应用于 DNA(图 1(b))^[13]、生物小分子^[9,14]、重金属离子^[10]和蛋白分子^[4,15]等标志物检测的研究成果开始被频繁展示,其中绝大多数研究都采用了结构简单、加工方便的液栅型 GFET 作为研究对象。液栅型 GFET 工作时需要一根外置的 Ag/AgCl 电极插入石墨烯表面的待测溶液中,利用浸润在溶液中石墨烯的固-液接触界面形成的一定厚度的电子屏蔽层,即双电层(electrical double layer, EDL)当作栅介质,但 Ag/AgCl 电极位置容易受到外界扰动,使得与栅电容有紧密联系的双电层厚度产生波动,导致传感器响应信号噪声增大、灵敏度降低^[16-17]。2016 年, Li 等利用 30 nm 厚的 HfO₂ 作为栅介质研发了埋栅型 ssDNA-GFET 并分

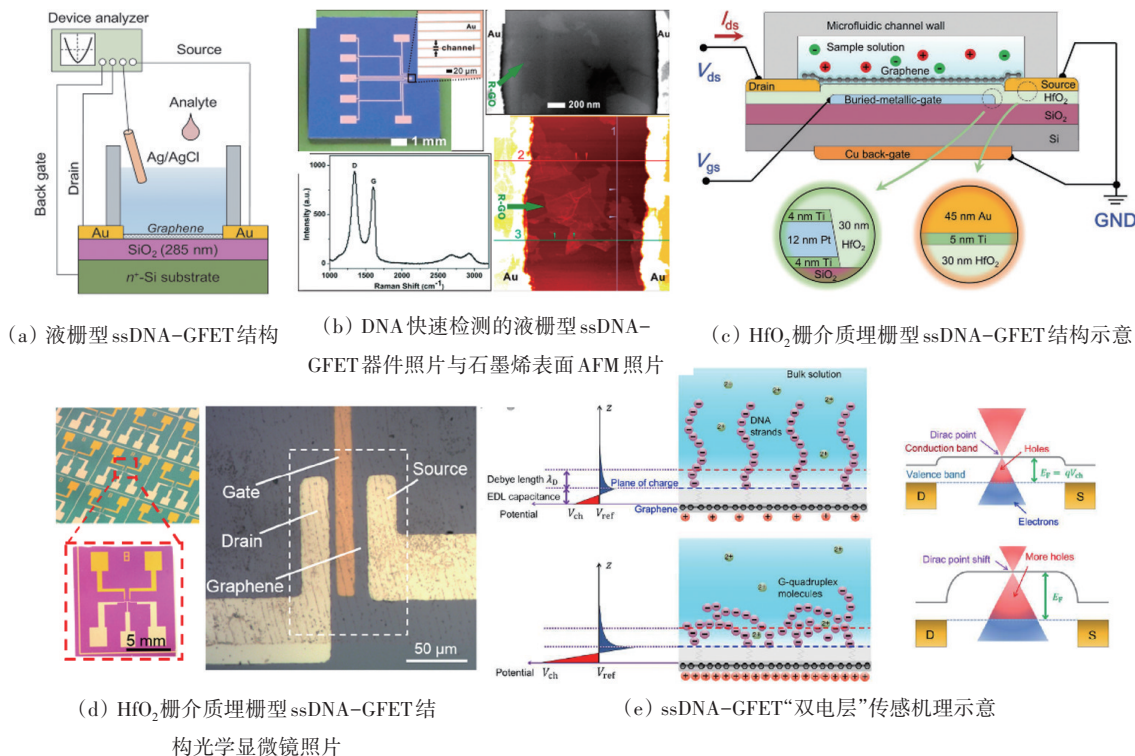


图 1 ssDNA-GFET 结构示意图及工作原理

别用于 Pb^{2+} ^[10] 和卡那霉素 A^[5] 等的检测(图 1(c)、(d)), 实验结果表明: 固态栅介质不但能提供稳定的栅极电容且 HfO_2 的高介电常数($\kappa=16$) 可以将栅极工作电压从 50 V 降低至 2 V 左右的人体安全电压范围(<36 V) 内, 这一成果为 ssDNA-GFET 的可穿戴与可植入式集成化应用打下基础。2017—2019 年, 哥伦比亚大学 Hao 和 Li 等将漏、源、栅 3 个电极加工在同一平面上, 制成平板液栅型 ssDNA-GFET, 得益于固定的栅电极位置, 胰岛素^[4]、肿瘤坏死因子- α ^[8] 和 17β -雌二醇^[9] 的稳定检测得以实现。此外, 哈尔滨工业大学 Hao 等^[15] 通过实验结果分析, 基于对前期研究成果^[6] 提出的“电荷转移”理论与哥伦比亚大学 Zhu 等^[18] 提出的“双电层”理论(图 1(e)) 的比较研究, 提出了“静电感应”理论来解释的 ssDNA-GFET 的响应机理。2021 年, Wang 等^[19] 研制出了一种以 Nafion 聚合物作为隔离层的 N-ssDNA-GFET 传感器, 并在隔离层上修饰 ssDNA。由于 Nafion 聚合物可以被化学溶解, 因此在使用后通过去除 Nafion 隔离层及其上的 ssDNA-蛋白结合体, 可以将传感器还原至初始状态, 从而重复利用。实验证明: 在反复重建隔离层 80 次后传感器仍然

可以对干扰素- γ 准确检测, 检测极限可达 880 fmol/L。2021 年, 哈尔滨工业大学 Hao 与中国科学院沈阳自动化所 Luo 等^[20] 研制了一种基于 ssDNA-GFET 的便携式传感设备, 可以对细胞因子如白细胞介素-6、干扰素- γ 和肿瘤坏死因子- α 进行有效的快速检测, 并通过外围配套的电子设备将检测信息与初步诊断结果无线传送到手机 App 上。

2 ssDNA-GFET 的检测性能优化

为使 ssDNA-GFET 能够适用于更多种类的标志物检测, 近年来许多学者致力于探究新颖的器件结构与石墨烯表面化学修饰方法等来提升 ssDNA-GFET 的检测极限和检测量程等性能指标。例如在 2017 年, 加州大学洛杉矶分校 Yang 等^[21] 对石墨烯进行了打孔处理, 制作出了石墨烯纳米网(graphene nanomesh, GNM) 型场效应管。如图 2(a) 所示, 打孔处理对石墨烯实现了较强的量子限制作用, 使石墨烯的开关比从 100 提升到了 1000, 将 ssDNA-GFET 对人表皮生长因子受体-2 的检测极限提升到了 0.1 pg/mL。随后几年, 利用金纳米层代

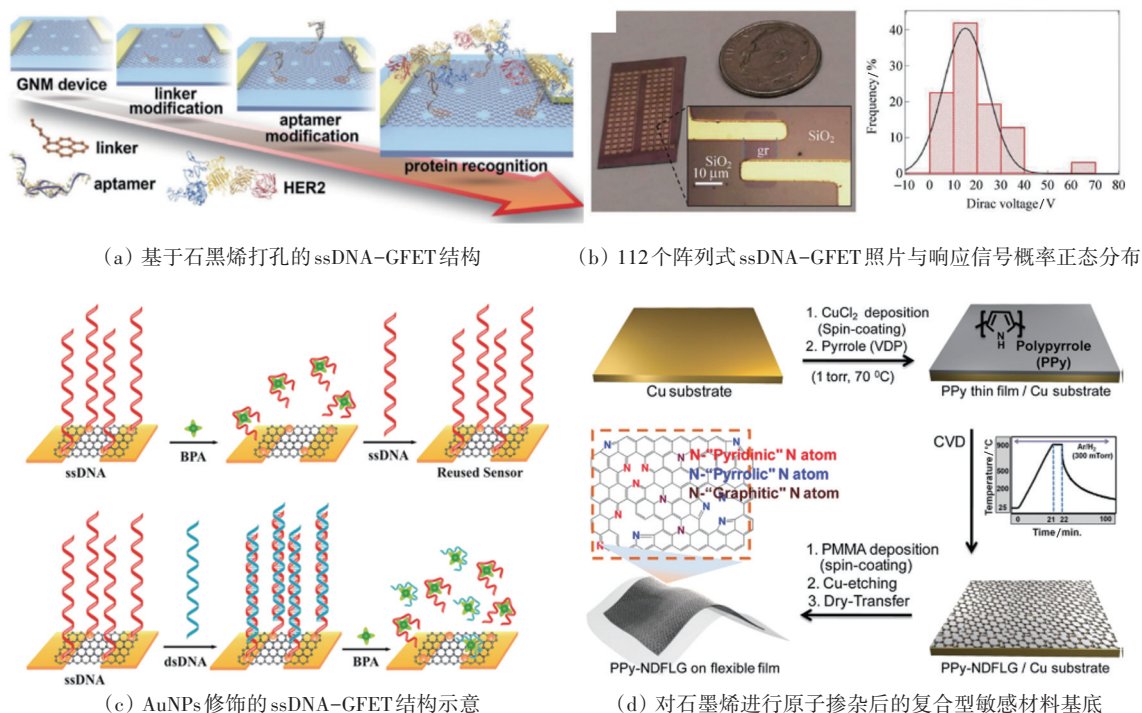


图 2 提升 ssDNA-GFET 性能的方法

替聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)作为载体层转移CVD石墨烯^[22]、阵列式ssDNA-GFET加工(图2(b))^[23-24]、金纳米颗粒(Au nanoparticles, AuNPs)“竞争结合”修饰(图2(c))^[25-26]、对石墨烯进行原子掺杂(图2(d))^[27]等方法相继提出用于提高GFET响应信号强度与检测准确度,但普遍存在加工烦琐,测量信号一致性较差、无法进行标定,不适合批量化的生产应用等问题。2020年, Hao等^[28]提出了一种可以增加PASE与ssDNA探针修饰密度的“电场修饰法”,实验结果表明:ssDNA探针密度的增加使ssDNA-GFET对胰岛素的检测极限最高提升了441%。

3 ssDNA-GFET在真实生物样本中的应用尝试

实现ssDNA-GFET在真实的人体血液、泪液和汗液等检测环境中对目标分子的检测也一直是一个热门研究方向。清华大学Li^[9]提出利用信号“差分法”消除真实环境中的非特异性分子吸附等对ssDNA-GFET响应信号造成的干扰。该团队分别

在不同酸碱度和离子浓度的超纯水、自来水中对17 β -雌二醇进行浓度检测,检测结果较为理想,验证了该方法的有效性(图3(a))。此外,ssDNA-GFET还被用于稀释唾液中白介素-6^[29]、稀释血浆中Pb²⁺^[30]、牡蛎分泌液中Hg²⁺^[31](图3(b))和稀释血清中IgE^[6]等的检测,但过分裸露的石墨烯表面造成的生物小分子非特异性吸附使得传感器的灵敏度较低,如图3(b)所示,当牡蛎分泌液向石墨烯表面滴入,随着时间推移,传感器的电流实时响应信号会随之增大。2016年,哈佛大学Gao等^[32-33]提出在石墨烯表面修饰一层相对分子量为10 kDa的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)防护层,可以有效地提高石墨烯固-液接触表面双电层的厚度,在削弱小分子非特异性吸附的同时,增强目标分子对石墨烯电学性能产生的影响,继而提高传感器的灵敏度(图3(c)、图3(d))。2020年, Hao等^[28]利用同样的构建PEG隔离层方法对石墨烯表面进行了保护,从而实现了从未稀释的尿液中胰岛素的有效检测,检测极限可达1.95 pmol/L,从而验证了该方法的可行性。

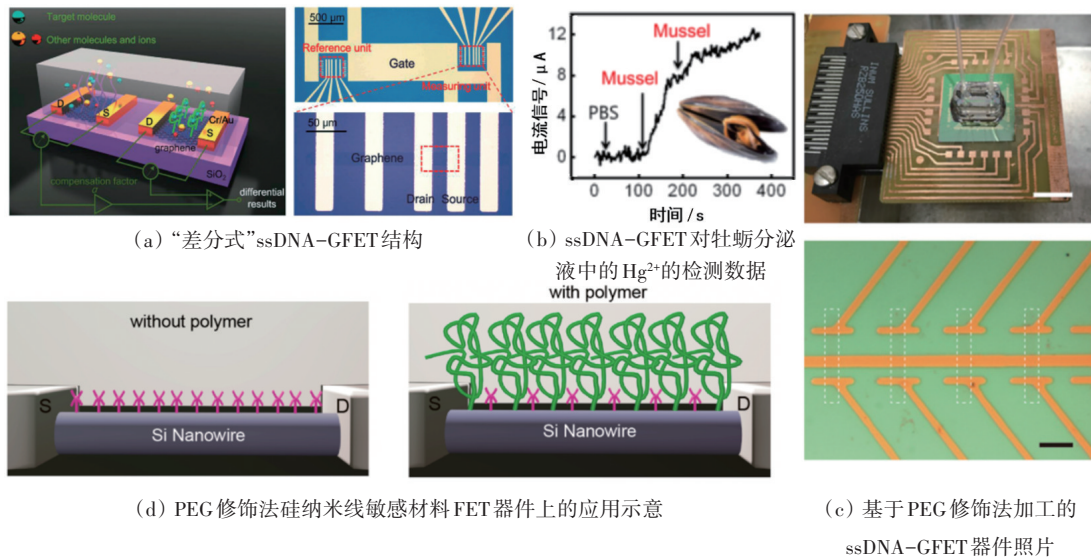


图3 真实样本溶液中标志物的检测

4 ssDNA-GFET的柔性化开发

由于可穿戴式和可植入式纳米电子机械系统(nano electro-mechanical systems, NEMS)生物传感

器对柔性化的需求,领域内许多学者开始尝试将ssDNA-GFET进行柔性化处理。如图4所示,2012年至今已有多项研究报道了ssDNA-GFET加工在柔性的聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene tere-

phthalate, PET)^[19,34]、聚萘二甲酸乙二醇酯(polyethylene naphthalate, PEN)^[8,25,28]和聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)^[35]等聚合物材料上用于生理盐溶液中的干扰素- γ 、 Hg^{2+} 和血管内皮生长因子等标志物检测的可行性,但超过 125 μm 的基底厚度使得传感器的可变形性较差。2019年,哥伦比亚大学 Wang 等^[36]利用厚度不足 3 μm 的超柔性基底研制 ssDNA-GFET 用于磷酸盐溶液中肿瘤

坏死因子- α 的检测,并在研究中发现:基底中的有机物杂质和粗糙表面在与石墨烯直接接触时会造成石墨烯内部产生电荷陷阱与电子散射,从而降低石墨烯的电学性能。此外,弯曲等机械形变也会对石墨烯的电学性能指标如电阻和电中性点位置等产生较为明显的影响。因此,研究如何消除上述影响,提升 ssDNA-GFET 电学稳定性对柔性器件的开发具有重要的指导意义^[12, 37-39]。

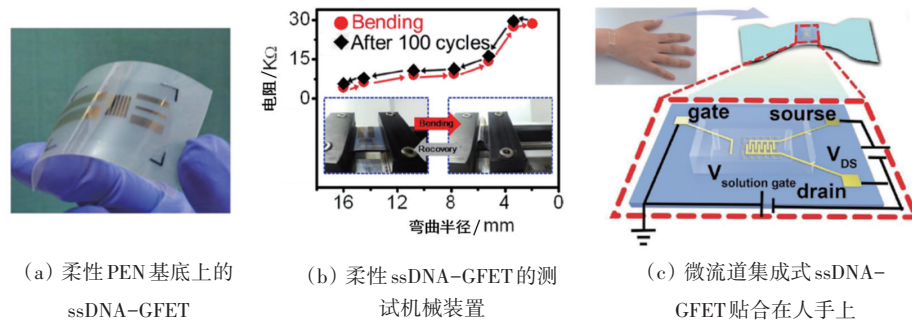


图4 柔性化 ssDNA-GFET

5 结论

目前国内外对于 ssDNA-GFET 的研究方兴未艾,在投入实际的可穿戴或可植入式临床应用前,仍有许多问题有待解决:(1) 对于 ssDNA 探针与蛋白质等目标标志物结合并导致石墨烯内部电子迁移率变化的作用机制还缺乏直接的理论分析与实验验证;(2) 石墨烯表面暴露在真实人体体液或分泌液环境中时,极易被非目标小分子或杂质吸附导致灵敏度降低,现有的隔离层保护法虽然可以减弱非特异性吸附带来的影响,但并不能完全消除影响,缺乏深入的系统研究;(3) 经前期研究证实机械形变会造成石墨烯的内部晶格结构畸变从而导致其电阻率的变化,影响传感器的稳定性,而对于机械形变对石墨烯传感器电信号影响的理论与实验验证目前还尚未见报道。如果能将上述问题解决,相信会极大程度上推动 ssDNA-GFET 在临床应用的发展进程。

参考文献(References)

[1] 汪天书. 石墨烯衍生材料用于高性能电化学生物传感器

的构建[D]. 长春: 吉林大学, 2015.

- [2] Kim J, Kim M, Lee M S, et al. Wearable smart sensor systems integrated on soft contact lenses for wireless ocular diagnostics[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14997.
- [3] Park J, Kim J, Kim S Y, et al. Soft, smart contact lenses with integrations of wireless circuits, glucose sensors, and displays[J]. *Science Advances*, 2018, 4(1): eaap9841.
- [4] Hao Z, Zhu Y B, Wang X J, et al. Real-time monitoring of insulin using a graphene field-effect transistor aptameric nanosensor[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(33): 27504-27511.
- [5] Wang C, Li Y, Zhu Y, et al. High- κ solid-gate transistor configured graphene biosensor with fully integrated structure and enhanced sensitivity[J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(47): 8575.
- [6] Wang X J, Zhu Y B, Olsen T R, et al. A graphene aptasensor for biomarker detection in human serum[J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 290: 356-363.
- [7] 张崇华. 基于核酸放大技术和纳米材料的生物传感新方法的研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2016.
- [8] Hao Z, Wang Z R, Li Y J, et al. Measurement of cytokine biomarkers using an aptamer-based affinity graphene nanosensor on a flexible substrate toward wearable applications[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(46): 21681-21688.
- [9] Li Y J, Zhu Y B, Wang C, et al. Selective detection of wa-

- ter pollutants using a differential aptamer-based graphene biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 126: 59–67.
- [10] Li Y J, Wang C, Zhu Y B, et al. Fully integrated graphene electronic biosensor for label-free detection of lead (II) ion based on G-quadruplex structure-switching [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 89: 758–763.
- [11] Ohno Y, Maehashi K, Matsumoto K. Label-free biosensors based on aptamer-modified graphene field-effect transistors[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(51): 18012–18013.
- [12] Lee Y J, Kim J, Jang B, et al. Graphene-based stretchable/wearable self-powered touch sensor[J]. *Nano Energy*, 2019, 62: 259–267.
- [13] Cai B J, Wang S T, Huang L, et al. Ultrasensitive label-free detection of PNA - DNA hybridization by reduced graphene oxide field-effect transistor biosensor[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(3): 2632–2638.
- [14] 王程. 基于 SPR 和石墨烯 FET 的无标记亲和型生物医学传感器研究[D]. 天津: 南开大学, 2014.
- [15] Hao Z, Pan Y L, Huang C, et al. Sensitive detection of lung cancer biomarkers using an aptameric graphene-based nanosensor with enhanced stability[J]. *Biomedical Microdevices*, 2019, 21(3): 65.
- [16] Zhu Y B, Wang C, Petrone N, et al. A solid dielectric gated graphene nanosensor in electrolyte solutions[J]. *Applied Physics Letters*, 2015, 106(12): 123503.
- [17] 冯婷婷. 石墨烯场效应晶体管的制备及其特性研究 [D]. 北京: 清华大学, 2014.
- [18] Zhu Y B, Hao Y F, Adogla E A, et al. A graphene-based affinity nanosensor for detection of low-charge and low-molecular-weight molecules[J]. *Nanoscale*, 2016, 8(11): 5815–5819.
- [19] Wang Z R, Hao Z, Wang X J, et al. A flexible and regenerative aptameric graphene-nafion biosensor for cytokine storm biomarker monitoring in undiluted biofluids toward wearable applications[J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(4): 2005958.
- [20] Hao Z, Luo Y, Huang C, et al. An intelligent graphene-based biosensing device for cytokine storm syndrome biomarkers detection in human biofluids[J]. *Small*, 2021, 17(29): 2101508.
- [21] Yang Y B, Yang X D, Zou X M, et al. Ultrafine graphene nanomesh with large on/off ratio for high-performance flexible biosensors[J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27(19): 1604096.
- [22] Chen T Y, Loan P T K, Hsu C L, et al. Label-free detection of DNA hybridization using transistors based on CVD grown graphene[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 41: 103–109.
- [23] Ping J L, Vishnubhotla R, Vrudhula A, et al. Scalable production of high-sensitivity, label-free DNA biosensors based on back-gated graphene field effect transistors[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(9): 8700–8704.
- [24] Kybert N J, Han G H, Lerner M B, et al. Scalable arrays of chemical vapor sensors based on DNA-decorated graphene[J]. *Nano Research*, 2014, 7(1): 95–103.
- [25] Liu S H, Fu Y, Xiong C, et al. Detection of bisphenol A using DNA-functionalized graphene field effect transistors integrated in microfluidic systems[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(28): 23522–23528.
- [26] Zhan B B, Li C, Yang J, et al. Graphene field-effect transistor and its application for electronic sensing[J]. *Small*, 2014, 10(20): 4042–4065.
- [27] Kwon O S, Park S J, Hong J Y, et al. Flexible FET-type VEGF aptasensor based on nitrogen-doped graphene converted from conducting polymer[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(2): 1486–1493.
- [28] Hao Z, Pan Y L, Huang C, et al. Modulating the linker immobilization density on aptameric graphene field effect transistors using an electric field[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(8): 2503–2513.
- [29] Hao Z, Pan Y L, Shao W W, et al. Graphene-based fully integrated portable nanosensing system for on-line detection of cytokine biomarkers in saliva[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 134: 16–23.
- [30] Wang C Y, Cui X Y, Li Y, et al. A label-free and portable graphene FET aptasensor for children blood lead detection[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21711.
- [31] An J H, Park S J, Kwon O S, et al. High-performance flexible graphene aptasensor for mercury detection in mussels[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(12): 10563–10571.
- [32] Gao N, Zhou W, Jiang X C, et al. General strategy for biodetection in high ionic strength solutions using transistor-based nanoelectronic sensors[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(3): 2143–2148.
- [33] Gao N, Gao T, Yang X, et al. Specific detection of biomolecules in physiological solutions using graphene transistor biosensors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(51): 14633–14638.
- [34] Kwak Y H, Choi D S, Kim Y N, et al. Flexible glucose

- sensor using CVD-grown graphene-based field effect transistor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 37(1): 82–87.
- [35] Farid S, Meshik X, Choi M, et al. Detection of interferon gamma using graphene and aptamer based FET-like electrochemical biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 71: 294–299.
- [36] Wang Z R, Hao Z, Yu S F, et al. An ultraflexible and stretchable aptameric graphene nanosensor for biomarker detection and monitoring[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(44): 1905202.
- [37] Kwak B W, Choi Y C, Lee B S. Small variations in the sheet resistance of graphene layers with compressive and tensile bending[J]. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 2015, 68: 33–37.
- [38] Trung T Q, Tien N T, Kim D, et al. A flexible reduced graphene oxide field-effect transistor for ultrasensitive strain sensing[J]. *Advanced Functional Materials*, 2014, 24(1): 117–124.
- [39] Trung T Q, Ramasundaram S, Lee N E. Infrared detection using transparent and flexible field-effect transistor array with solution processable nanocomposite channel of reduced graphene oxide and P(VDF-TrFE) [J]. *Advanced Functional Materials*, 2015, 25(11): 1745–1754.

Development status of ssDNA-GFET nano-biosensors toward wearable or implantable clinical applications

HAO Zhuang^{1,2}, LIU Shaoqin², PAN Yunlu^{1*}

1. School of Mechatronics Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150000, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150000, China

Abstract Single strand DNA probe-graphene field effect transistor (ssDNA-GFET) nano-biosensor holds great potential in wearable or implantable clinic applications. This paper reviews the development status of ssDNA-GFET, methods on optimizing biomarker sensing performance, detection of biomarkers in human biofluids, and the development status of flexible ssDNA-GFET toward wearable or implantable clinic applications. In the end, the paper demonstrates current limitations of the sensor that hampers its real clinic applications.

Keywords single strand DNA probe; graphene; FET; biosensor; flexible electronics ●



(责任编辑 刘志远)