

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 31420101150123

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

氧化石墨烯/DNA 水凝胶生物传感器的制备及在卵巢癌
线粒体 DNA 突变检测中的应用

Fabrication of Graphene Oxide/DNA Hydrogel Biosensor and Its
Application in the Detection of Mitochondrion DNA Mutation in
Ovarian Cancer

胡 楠

指导教师姓名: 孙莉萍 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2013 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

卵巢癌在临床上缺乏有效的早期诊断手段。线粒体 DNA 的高突变率以及在癌细胞中的高拷贝数使其成为肿瘤非侵入性诊断的有效分子标记。然而，目前相应的研究手段均存在不同程度的缺陷与不足，难以真正得到推广应用。电化学方法具有成本低、灵敏度高和操作简便等其他众多方法无法比拟的优势。氧化石墨烯/DNA 水凝胶尺寸和形状可调控以及电学性质和生物相容性出色等优势，其作为电极能够为线粒体 DNA 等生物分子提供比表面积巨大的生物仿生界面，且能够通过改变厚度或引入聚合物等方式调节其导电性，因而适宜用于卵巢癌线粒体 DNA 的电化学检测。本论文研究了氧化石墨烯/DNA 水凝胶作为工作电极用于卵巢癌线粒体 DNA 突变的检测，并探讨了相应的检测机理。主要研究结果如下：

1. 氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极的制备：以化学氧化法制备的氧化石墨烯为基本结构单元，以鱼精 DNA 为交联剂，制备了性质稳定的水凝胶。所得水凝胶孔径大小为 10 μm 左右；以氧化石墨烯/DNA 水凝胶为主体在 2 mL 离心管中制备了水凝胶电极；
2. 卵巢癌线粒体 DNA 突变的检测：将氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极经聚乙烯亚胺和寡核苷酸探针修饰后用于卵巢癌线粒体 DNA 突变的检测；经电化学交流阻抗法检测，氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极能够灵敏性和特异性识别互补序列，检测下限达到 10^{-21} M；所制备的水凝胶电极具有良好的稳定性和一定的可再生性，且能用于实际样品的检测；
3. 水凝胶电极灵敏性检测的机理研究：Zeta 电位检测结果表明，氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极检测体系中各组分的电负性使得寡核苷酸探针能够充分地固定于电极表面，并与靶序列特异性结合引起阻抗变化；研究表明，适宜的电极厚度能够为探针和靶序列提供数量和环境适宜的结合位点；电化学检测结果和荧光显微照片证实了靶序列在电极表面的吸附和杂交过程。

关键词： 石墨烯；水凝胶；电化学；DNA 突变

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Ovarian cancer is one of the most common malignant tumors, which lacks effective clinical diagnosis. Mitochondrion DNA (mtDNA), with high intracellular mutation rate and copy number, usually serves as an active molecular label for noninvasive diagnosis. However, the present research methods aiming at mtDNA in ovarian cancer with various defects and shortages are difficult for generalization. Electrochemistry technique possesses low cost, high sensitivity, convenient operation and many other incomparable advantages. Graphene oxide (GO)/DNA hydrogel with tunable size and shape, unique electronic properties and outstanding biocompatibility can provide in vivo-like interface with huge surface area. Additionally, its conductivity can be tuned by changing its thickness or inducing some polymers, which makes it qualified to be used in electrochemical detection of mtDNA in ovarian cancer. In this thesis, GO/DNA hydrogel was employed as working electrode in detection of mtDNA mutation in ovarian cancer, and the corresponding mechanism was also discussed. The primary results of the thesis are outlined as follows:

1. Fabrication of GO/DNA hydrogel electrode: the chemically oxidized graphene and fish sperm DNA were used as fundamental construction block and crosslinker to assemble into hydrogel with stability. The aperture size was around 10 μm . The GO/DNA hydrogel was prepared in a centrifuge tube of 2 mL and served as the electrode.
2. Detection of mtDNA mutation in ovarian cancer: the GO/DNA hydrogel electrode modified with PEI and oligonucleotide probe was used in mtDNA mutation detection. Being investigated through electrochemical impedance spectrum, the optimal electrode volume and probe incubation time were 500 μL and 30 min, respectively. GO/DNA hydrogel electrode was capable to sensitively and selectively discriminate the complementary target sequence, and the detection limit was low to 10^{-21} M. The hydrogel electrode possessed excellent stability and

renewability, and could be applied in detection of practical samples.

3. Investigation on sensitive detection mechanism of hydrogel electrode: the Zeta potentials of the two hydrogel components, probe and target DNA demonstrated that it was the electrostatic interaction that enabled enough probes stably immobilize onto the surface of electrode and specifically hybridize with target, stimulating the impedance change. The comparison of electrode sizes suggested that hydrogel of intermediate thickness provides enough binding sites and mild in vivo-like circumstances of probes and targets, as well as signal amplification of impedance. The electrochemical measurement and fluorescence images proved the adsorption and hybridization process of target on the surface of electrode.

Key Words: Graphene; Hydrogel; Electrochemistry; DNA mutation

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 石墨烯概述.....	1
1.1.1 石墨烯的结构与性能.....	1
1.1.2 石墨烯修饰电极在 DNA 检测中的应用.....	3
1.2 水凝胶概述.....	6
1.2.1 水凝胶的定义与性质.....	6
1.2.2 水凝胶在电化学检测中的应用.....	7
1.2.3 基于石墨烯的水凝胶研究.....	8
1.3 卵巢癌线粒体 DNA 突变概述.....	10
1.3.1 卵巢癌的诊断标志物.....	10
1.3.2 现有诊断和检测方法概述.....	12
1.4 本课题的研究目的和研究思路.....	13
参考文献.....	15
第二章 氧化石墨烯/DNA 水凝胶的制备及表征.....	21
2.1 引言.....	21
2.2 实验部分.....	23
2.2.1 实验试剂.....	23
2.2.2 实验仪器.....	24
2.2.3 样品制备.....	25
2.2.4 样品表征.....	26
2.3 结果与讨论.....	27
2.3.1 石墨烯的表征.....	27
2.3.2 氧化石墨烯/DNA 水凝胶的表征.....	36
2.4 本章小结.....	40
参考文献.....	42
第三章 氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极的制备及其在卵巢癌线粒体 DNA 突变检测中的应用.....	47
3.1 引言.....	47
3.2 实验部分.....	48
3.2.1 实验试剂.....	48
3.2.2 实验仪器.....	48
3.2.3 实验试剂配制.....	50
3.2.4 实验方法.....	53
3.3 结果与讨论.....	59

3.3.1 氧化石墨烯/DNA 水凝胶的电化学表征	59
3.3.2 氧化石墨烯/DNA 水凝胶厚度对电极的影响	61
3.3.3 寡核苷酸探针固定时间对氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极的影响 ...	64
3.3.4 氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极灵敏性和选择性的研究	65
3.3.5 氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极稳定性和可再生性的研究	68
3.3.6 氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极在实际样品检测中的应用	70
3.4 本章小结.....	73
参考文献.....	75
第四章 氧化石墨烯/DNA 水凝胶电极检测机理的研究.....	79
4.1 引言.....	79
4.2 实验部分.....	80
4.2.1 实验试剂.....	80
4.2.2 实验仪器.....	80
4.2.3 实验方法.....	80
4.3 结果与讨论.....	83
4.3.1 Zeta 电位	83
4.3.2 聚乙烯亚胺在电极构建中的作用	85
4.3.3 水凝胶组分对电极灵敏性的影响	86
4.3.4 水凝胶电极制备方法对灵敏性的影响.....	89
4.3.5 吸附和杂交过程的动力学研究.....	89
4.3.6 互补序列在水凝胶电极中发生杂交的验证.....	90
4.3.7 拉曼光谱.....	93
4.3.8 水凝胶电极的识别机理.....	94
4.4 本章小结.....	94
参考文献.....	96
第五章 总结与展望.....	99
5.1 主要结论.....	99
5.2 展望.....	100
硕士期间发表论文.....	103
致 谢	105

Content

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Overview of Graphene	1
1.1.1 Structure and properties of graphene	1
1.1.2 Application of graphene-modified electrode in DNA detection	3
1.2 Overview of hydrogel	6
1.2.1 Definition and properties of hydrogel.....	6
1.2.2 Application of hydrogel in electrochemical detection	7
1.2.3 Research on graphene-based hydrogel.....	8
1.3 Overview of mitochondrial DNA mutation in ovarian cancer	10
1.3.1 Diagnosis marker of ovarian cancer	10
1.3.2 Overview of existing diagnosis and detection methods	12
1.4 Objectives and mentality of this dissertation	13
References	15
Chapter 2 Synthesis and characterization of GO/DNA hydrogel	21
2.1 Introduction	21
2.2 Experimental section	23
2.2.1 Reagents	23
2.2.2 Instruments.....	24
2.2.3 Synthesis of samples	25
2.2.4 Characterization of samples	26
2.3 Results and discussion	27
2.3.1 Characterization of graphene	27
2.3.2 Characterization of GO/DNA hydrogel	36
2.4 Conclusions	40
References	42
Chapter 3 GO/DNA hydrogel electrode synthesis and application in detection of mitochondrial DNA mutation in ovarian cancer	47
3.1 Introduction	47
3.2 Experimental section	48
3.2.1 Reagents	48
3.2.2 Instruments.....	48
3.2.3 Preparation of reagents.....	50
3.2.4 Methods.....	53
3.3 Results and discussion	59

3.3.1 Electrochemical characterization of GO/DNA hydrogel	59
3.3.2 Effect of GO/DNA hydrogel thickness on electrode	61
3.3.3 Effect of probe immobilization duration on electrode	64
3.3.4 Sensitivity and selectivity of GO/DNA hydrogel electrode	65
3.3.5 Stability and renewability of GO/DNA hydrogel electrode.....	68
3.3.6 Application of GO/DNA hydrogel electrode in practical samples	70
3.4 Conclusions	73
References	75
Chapter 4 Detection mechanisms of GO/DNA hydrogel electrode ...	79
4.1 Introduction.....	79
4.2 Experimental section	80
4.2.1 Reagents	80
4.2.2 Instruments.....	80
4.2.3 Methods.....	80
4.3 Results and discussion	83
4.3.1 Zeta potentials	83
4.3.2 Function of PEI in electrode fabrication.....	85
4.3.3 Effect of hydrogel compositions on sensitivity of electrode.....	86
4.3.4 Effect of hydrogel preparation on sensitivity of electrode	89
4.3.5 Kinetics of adsorption and hybridization process	89
4.3.6 Confirmation of hybridization in electrode	90
4.3.7 Raman spectra	93
4.3.8 Detection mechanisms of hydrogel electrode	94
4.4 Conclusions	94
References	96
Chapter 5 Conclusions and prospect.....	99
5.1 Main conclusions	99
5.2 Prospect.....	100
Research achievements.....	103
Acknowledgements.....	105

第一章 绪论

1.1 石墨烯概述

2004 年，英国曼彻斯特大学的 Andre Geim 和 Konstantin Novoselov 等通过简单胶带粘撕法得到高品质石墨片之后^[1,2]，该研究组^[3]、美国哥伦比亚大学的 Philips Kim 研究组^[4]等展开了大量的工作，先后发现了石墨烯的众多独特性质。这些突破性的发现和研究进展在当前先进的微纳米实验技术支撑下掀起了前所未有的研究热潮，在材料、物理、化学、力学等学科引起了强烈的关注和讨论，且已被广泛地应用于半导体、新能源等新材料和器件的开发中。

1.1.1 石墨烯的结构与性能

石墨烯是指单层石墨片，仅有一个原子尺寸厚，是由 sp^2 杂化的碳原子紧密排列而成的蜂窝状晶体结构。石墨烯中的 C-C 键长约为 0.142 nm。每个晶格内三个 σ 键，连接十分牢固，形成了稳定的六边形形状。完美的石墨烯仅包含六边形单元，如果引入五边形和七边形，就会在平面结构中形成缺陷。如果只有一个单独的五边形存在，石墨烯平面会形成圆锥形；如果有 12 个五边形，则会形成

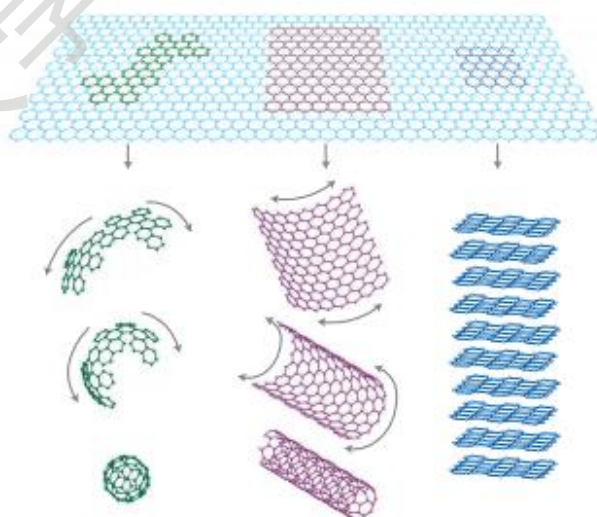


图 1-1 石墨烯及其衍生物的示意图^[1]

Figure 1-1 Schematic diagram of graphene and its derivatives

C₆₀；相反，如果只有一个单独的七边形存在，石墨烯平面会形成马鞍形。因此，添加不同数目的五边形和七边形会形成各种不同的复杂形状。如图 1-1 所示，从一个石墨烯上“裁”出不同形状(layer)的片，可以进一步团聚形成零维的富勒烯，或卷曲形成一维的碳纳米管，或堆叠形成三维的石墨，因此，石墨烯是构建其他维度碳材料的基本单元^[1]。

石墨烯的结构非常稳定，碳原子之间的连接及其柔韧。受到外力时，碳原子面发生弯曲变形，使碳原子不必重新排列来适应外力，从而保证了自身结构的稳定性。石墨烯是有限结构，能够以纳米级条带的形式存在。纳米条带中电荷在横向移动时会在中性点附近产生一个能量势垒，势垒随条带宽度的减小而增大^[5]。因此，通过控制石墨烯条带的宽度便可以进一步得到需要的势垒。这一特性是开发以石墨烯为基础的电子器件的基础。

石墨烯完美的二维结构决定了它独特的光学、电学、力学和热学性质。石墨烯是单层原子厚度的二维结构，理论厚度仅为 0.334 nm，是目前已知最薄的二维材料，理论比表面积可达 2630 m²/g^[6]，面密度为 0.77 mg/m²。石墨烯具有优异的光学性能。理论和实验结果表明，单层石墨烯的可见光透过率为 97.7%^[7]。石墨烯的每个碳原子均为 sp² 杂化，并贡献剩余一个 p 轨道电子形成大 π 键，π 电子可以自由移动，赋予石墨烯优异的导电性。电子在其中的迁移率可达 2×10⁵ cm²/(V s)^[8]，电导率可达 10⁶ S/m^[9]，面电阻约为 31 Ω/sq，是室温下导电性最佳的材料。作为已知材料中强度和硬度最高的晶体结构，石墨烯的抗拉强度和弹性模量分别为 125 GPa 和 1.1 TPa^[10]，强度极限（抗拉强度）为 42 N/m²。石墨烯的室温导热率约为 5×10³ W/m·K^[11]。高于碳纳米管和金刚石，是室温下铜的热导率（401 W/m·K）的 10 倍多。

在化学氧化还原法制备石墨烯的过程中，由于氧化和超声震动等过程在破坏石墨层间的范德华力的同时，向片层表面引入了大量的含氧基团，由此形成的氧化石墨烯具有相对无规的晶体结构，从而导致物理性质的显著改变。首先，环氧基中的 C-O-C 键角发生弯曲，而氧原子向石墨烯面内方向运动，因此，氧化石墨烯的杨氏弹性模量为 610 GPa，低于石墨烯的 1060 GPa；其次，在高载荷下氧原子与石墨烯中的碳原子共平面，而后材料的断裂从 C-C 键处开始，于是其拉伸强度与石墨烯相比并无太大变化；此外，含氧基团的引入破坏了石墨烯的电子

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库