

文章编号 1004-924X(2018)03-0572-06

过渡金属二硫化物拉曼散射在免疫检测中的应用

楚学影, 沙 雪, 徐铭泽*, 李金华, 金芳军

(长春理工大学 理学院 吉林 长春 130022)

摘要: 为了利用可见光激发下半导体拉曼散射信号实现生物检测, 以窄带隙的 MoS_2 材料构建了拉曼免疫标记探针, 用于实现对人 IgG 分子的高特异性识别。首先, 运用液相剥离法分别获得了 MoS_2 和 WS_2 微米材料, 以加热陈化处理分析了温度对 532 nm 激发下样品拉曼散射信号强度的影响。之后借助 3-巯基丙酸修饰向 MoS_2 材料表面引入羧基, 进而获得了可用于免疫检测的拉曼探针。最后, 以“抗体-待测物-抗体”的三层结构分析了基于 MoS_2 拉曼散射的免疫检测性能。实验发现适当温度下加热陈化处理可增强过渡金属二硫化物的拉曼散射强度(70 °C 下最优)。多组对照实验结果表明, 免疫检测生物芯片的拉曼信号强度随人 IgG 浓度的升高而升高, 最终趋于饱和, 最低浓度的检测限达到 1 fM, 实现了可见光激发下利用半导体拉曼散射信号对目标分子的高灵敏度、高特异性免疫检测。

关键词: 生物检测; 过渡金属二硫化物; 拉曼散射; 温度; 免疫球蛋白

中图分类号: X835 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20182603.0572

Application of Raman scattering properties of transition metal dichalcogenides in immunoassays

CHU Xue-ying, SHA Xue, XU Ming-ze*, LI Jin-hua, JIN Fang-jun

(School of Science, Changchun University of Science and Technology,
Changchun 130022, China)

* Corresponding author, E-mail: chuxy608@163.com

Abstract: To realize biodetection based on Raman scattering of semiconductor under visible light excitation, the Raman probe was constructed by using MoS_2 material, a narrow bandgap semiconductor, to realize high specific recognition of the human IgG molecule. First, MoS_2 and WS_2 micromaterials were obtained by liquid-phase exfoliation method. The effect of temperature on the intensity of the Raman signal excited by a 532 nm laser was analyzed through heating and aging treatment. Second, the carboxyl group was introduced to the surface of the MoS_2 material by 3-mercaptopropionic acid modification, and a Raman probe was obtained. Finally, the performance of the MoS_2 based immunoassay was evaluated by using a sandwich structure of "antibody-analyte-antibody". It was found that the heating and aging treatment at appropriate temperature enhanced the Raman scattering intensity of the transition metal disulfide (70 °C is the optimal). The results of control groups show that the Raman intensity of the immunodetection increased and saturated with the

收稿日期: 2017-07-10; 修订日期: 2017-09-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 61205193); 吉林省科技发展计划资助项目 (No. 20140520107JH, No. 20140204025GX)

concentration of the human IgG. The detection limit is 1 fM. The current procedure realized immunoassays with high sensitivity and high specificity by using the Raman scattering of semiconductor under visible light excitation.

Key words: bioinstrumentation; transition metal dichalcogenides; Raman scattering; temperature; immunoglobulin

1 引言

具有类石墨烯结构的低维过渡金属二硫化物(TMDCs)具有独特的物理化学性质,在电子器件、电池电极、储氢等领域均展现了重要的应用价值,引起了人们极大的研究兴趣^[1-2]。近年来,人们发现 TMDCs 微纳材料具有吸附能力强、反应活性高、生物相容性好等优点,因此在生物医学领域具有良好的应用前景^[3]。

现有报道中,利用 TMDCs 进行生物传感研究主要是基于 MoS₂ 或 WS₂ 的场效应特性、荧光发射性能和电化学性能。2013年,Zhang 的团队首次利用单层 MoS₂ 纳米层的荧光猝灭性能构建了 DNA 传感平台^[4]。之后,多个课题组基于 MoS₂ 或 WS₂ 纳米片构建荧光生物传感器,实现了对 miRNA、核酸酶及其抑制剂、DNA 和癌胚抗原的检测^[5-6]。2014年,Yang 的团队和 Lee 等人分别利用 MoS₂ 场效应晶体管实现了对前列腺特异性抗原(PSA)的传感检测^[7-8]。近年来,也有研究人员利用金属纳米粒子与 MoS₂ 复合用于构建癌胚抗原(CEA)检测的电化学免疫传感器^[9]。

当前 MoS₂ 和 WS₂ 的相关研究中,拉曼光谱主要用于分析样品的层数及结晶质量等物理参数^[10]。实际上,拉曼光谱也可用于生物传感。首先,拉曼信号的半峰宽非常窄,其峰位由所测材料决定,特征峰变化范围小,容易识别;其次,拉曼信号不易受到衬底荧光干扰,也不像红外信号容易受到水的影响,因此可运用拉曼特性进行水相物质样品的检测^[11]。如果采用无机材料的拉曼信号进行免疫检测,材料结构稳定,不容易受到光漂白,拉曼信号更加稳定,可实现对待测物的高灵敏识别。但现有报道只局限于利用 ZnO 等宽禁带半导体的拉曼特性进行 DNA 识别或免疫检测^[12]。如果能够采用禁带宽度在可见光区的 TMDCs 材料,则可能在可见激光的激发下实现对生物分子的高灵敏识别与检测。这将极大地降

低检测成本,提高操作安全性,促进拉曼检测技术的实用化。然而,目前尚未见到利用 TMDCs 的拉曼散射信号进行生物检测的相关报道。

本文采用液相剥离法制备 MoS₂ 和 WS₂ 微米颗粒,并以加热陈化的方法优化两种样品的拉曼特性。以 3-巯基丙酸(MPA)对 MoS₂ 材料进行表面生物功能化,构建了拉曼标记探针,并讨论了 532 nm 激发下借助 TMDCs 的拉曼特性进行免疫检测的性能。

2 实验

2.1 试剂和仪器

WS₂、MoS₂、N-甲基吡咯烷酮(NMP),N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)和 3-巯基丙酸(MPA)购于阿拉丁试剂公司;硫辛酸购于成都艾科化学技术有限公司;无水乙醇购于北京化工厂;牛血清白蛋白(BSA)、人免疫球蛋白(人 IgG)、羊抗人 IgG、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和磷酸盐(PBS)缓冲液均购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

样品晶体结构通过 X 射线衍射仪(XRD, Rigaku D/max2500)进行分析验证;形貌通过扫描电子显微镜(SEM, JSM-6010LA)进行观察。样品的拉曼光谱通过 HORRIBA 公司的 LabRam HR Evolution 型光谱仪获得,532 nm 激光为激发光源。

2.2 WS₂(或 MoS₂)微米粒子的制备及热处理

1 g WS₂(或 MoS₂)粉末加入到 20 mL NMP 中,放入到超声破碎仪中超声破碎 4 h,拿出后离心 5 min,分别用无水乙醇和去离子水清洗沉淀。分别取 7 份 0.02 g WS₂(或 MoS₂)粉末溶于排氧后的 2 mL 水中。1 份为室温未处理的对照样品,其余 6 个样品分别用高纯氮气除氧后密闭并置于 30,40,50,60,70,90 °C 的温度下恒温 15 min 完成对 WS₂(或 MoS₂)的陈化。

2.3 免疫检测实验

2.3.1 拉曼探针的制备

将 1 mL MoS₂ 水溶液样品加入到 10 mL 含

0.2 mol/L(0.2M) MPA 的 PBS 缓冲液中,放入摇床中 37 °C 下轻摇 2 h 后室温下放置 24 h。2 mL 样品离心并以 PBS 缓冲液清洗去除多余的 MPA 后重新分散到 0.5 mL 的 PBS 缓冲液中。之后加入 0.5 mL 的 EDC/NHS(0.1 M /0.02 M)的 PBS 溶液,室温下轻摇 15 min。加入 0.5 mL 的 660 nM 羊抗人 IgG,37 °C 下轻摇 1 h,再加入 1.5 mL (0.2 mg/mL)BSA 的 PBS 溶液对未反应的活性位点进行封闭,37 °C 下轻摇 1 h,最后离心以 PBS 缓冲液清洗重新分散至 2 mL PBS 中,可获得拉曼探针。

2.3.2 实验过程

免疫检测用 Au 基底的制备沿用我们前期工作的方法^[12],通过 EDC/NHS(0.1 M/0.02 M)对 Au 基底表面羧基活化,进而实现羊抗人 IgG 的固定。之后将 Au 基底分别放入人 IgG (10 nM、1 nM、1 pM、10 fM、1 fM 及 0 nM)中,在 37 °C 下轻摇 1 h。取出基底漂洗后放入探针溶液中同样在 37 °C 下轻摇 1 h。

3 实验结果与讨论

3.1 样品的结构及表征

首先为了确定样品的晶体结构,本文对样品进行了 XRD 测试,结果如图 1 所示。

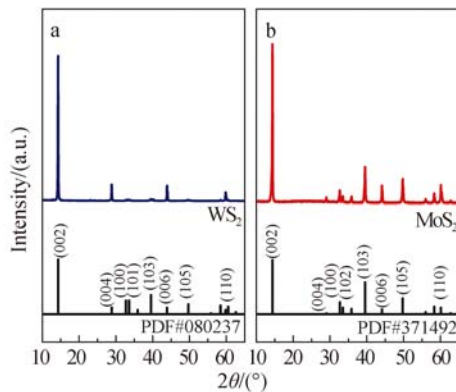


图 1 液相剥离法制备的 WS₂ (a) 和 MoS₂ (b) 的 XRD 谱

Fig. 1 XRD patterns of WS₂ (a) and MoS₂ (b) prepared by liquid-phase exfoliation method

图 1(a)是实验制备的 WS₂ 样品的 XRD 谱。可以发现样品在 14.2°, 28.9°, 43.9°, 49.6° 的位置分别出现明显的衍射峰。与标准卡数据(PDF

#08-0237)比对,可知这些衍射峰分别对应于六方晶系(2H)WS₂的(002)、(004)、(006)、(105)晶面。样品所呈现的其他 WS₂ 的衍射峰较弱,但并未出现其它杂质的衍射峰。{002}晶面族所对应的衍射峰强度明显高于其他晶面,可以推断所得到的 WS₂ 晶体具有沿[002]方向择优取向生长的特点。对于相同方法制备的 MoS₂ 来说,虽然也表现出(002)面衍射信号明显高于其他晶面的择优取向特点,但除{002}晶面族,其他晶面也具有较强的衍射信号。这表明 WS₂ 材料的形貌与 MoS₂ 的形貌应该有明显的差别。

本文利用 SEM 对两种样品的形貌进行了观察,结果如图 2 所示。可以发现,WS₂ 呈片状堆积在一起,尺寸大约在(5.6±0.5) μm,见图 2(a);而 MoS₂ 则为尺寸约为 500 nm 的粒子。经文献调研,WS₂ 比 MoS₂ 的层间距大^[13],导致 WS₂ 的层间范德华力小于 MoS₂,这是造成相同实验超声破碎的条件下获得不同形貌样品的原因。

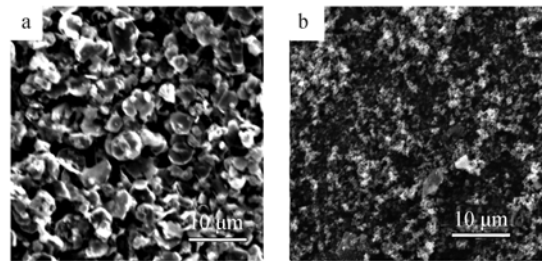


图 2 液相剥离法制备的 WS₂ (a) 和 MoS₂ (b) 的 SEM 图

Fig. 2 SEM images of WS₂ (a) and MoS₂ (b) prepared by liquid-phase exfoliation method

3.2 样品的拉曼特性分析

3.2.1 理论分析

从对称性上看,六方晶系的 WS₂ 及 MoS₂ 均属于 D_{6h}¹(P6₃/mmc)空间群,有 A_{1g}, E_{1g}, E_{2g}¹ 和 E_{2g}² 四种拉曼活性的振动模式。其中, A_{1g} 为层间振动模式, E_{1g}, E_{2g}¹ 和 E_{2g}² 是面内振动模式。E_{2g}² 模式频移很小(约 30 cm⁻¹ 处),而 E_{1g} 在背散射模式下垂直于 c 轴的表面是禁忌的,无法从实验上观察到。因此,人们通常只探讨 E_{2g}¹ 和 A_{1g} 两个振动模式^[14]。这两个振动模式中原子的振动特点如图 3 所示。

生物检测中,信号强度是影响检测灵敏度的重要因素。根据相关理论,拉曼散射强度正比于

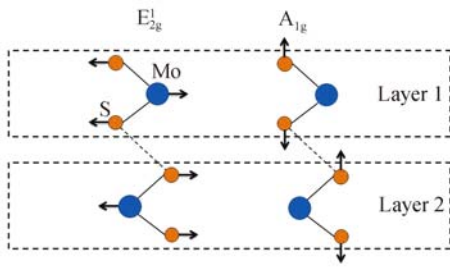


图 3 六方晶系 TMDCs 的 E_{2g}^1 和 A_{1g} 模式示意图

Fig. 3 Schematic of E_{2g}^1 and A_{1g} modes of hexagonal crystal system TMDCs

分子极化率的平方, 各向平均后拉曼谱线的强度可表示为^[15]:

$$I_{mn} = \frac{2^3 \pi}{3^2 c^4} I_0 \omega_n^4 \sum_{\rho\sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}|^2, \quad (1)$$

其中: I_0 是入射光强度, ω_n 是散射光频率, $\alpha_{\rho\sigma}$ 是拉曼散射极化率张量的 ρ, σ 分量。可以看出, 拉曼散射强度取决于极化率, 即拉曼极化张量越大, 拉曼散射强度也会越高。现有研究表明, 材料的结晶质量越好, 晶格无序度越低, 拉曼散射的极化率越大^[16]。因此, 为提高样品的拉曼散射强度, 可以从优化样品结晶质量方面入手开展相关实验研究。

3.2.2 拉曼散射强度优化实验论证

对于微纳米材料来说, 适当的对样品进行热处理可以优化材料的结晶质量^[17]。图 4(a) 为实验制备的 WS_2 在不同温度下进行陈化处理的拉曼散射

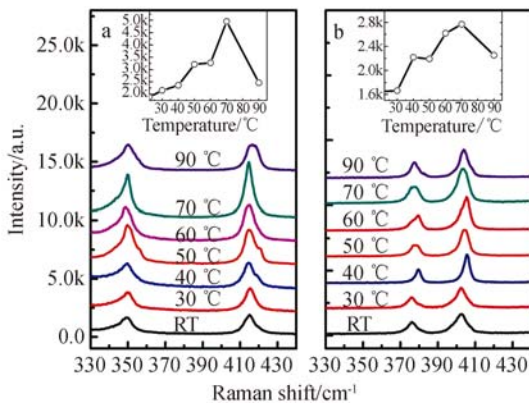


图 4 不同温度下处理的 WS_2 (a) 和 MoS_2 (b) 的拉曼光谱图, 插图分别为两个样品 A_{1g} 振动峰强度随温度的变化曲线

Fig. 4 Raman spectra of WS_2 (a) and MoS_2 (b) aging under different temperatures. Insets are plots of intensities of A_{1g} peaks vs. aging temperature for two samples

光谱图。可以发现, 所有 WS_2 样品均在 350 cm^{-1} 及 415 cm^{-1} 附近有明显的拉曼特征峰。调研可知, 这两个特征峰分别是 WS_2 的层内光学模式 (E_{2g}^1) 和层间 S 原子振动 (A_{1g}) 的拉曼模式。实验结果表明, WS_2 样品的拉曼散射强度随陈化温度的变化而改变。图 4(a) 中插图为 A_{1g} 振动峰强度随着温度的变化曲线。可以发现, 对于室温到 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 之间陈化的 WS_2 样品, 其拉曼散射峰强度随温度的升高而增大, 但继续升高陈化温度, 样品的拉曼强度反倒减弱。这可归因于过高的陈化温度导致样品表面形成了新的缺陷。 MoS_2 材料也表现出同样的变化规律, 如图 4(b) 所示。只是 MoS_2 的 E_{2g}^1 和 A_{1g} 振动模式分别在 376 cm^{-1} 和 402 cm^{-1} 附近。由此表明, 对过渡金属二硫化物样品进行适当的加热陈化处理可以有效地提高拉曼散射强度。

3.3 基于 MoS_2 样品的拉曼特性进行免疫检测

本文利用所获得的 MoS_2 粒子构建了可用于免疫标记及检测的拉曼探针 (具体过程参见 2.3.1)。以人 IgG 作为目标待测物, 利用羊抗人 IgG 与人 IgG 之间的特异性识别进行了检测实验。图 5 是人 IgG 浓度分别为 10 nM 、 1 nM 、 1 pM 、 10 fM 、 1 fM 及不加待测物的空白对照组 (0 fM) 中免疫组装后基底的拉曼光谱。在免疫检测中设立空白对照组对避免假阳性信号出现非常重要。由图 5 可知, 空白对照组的检测中没有

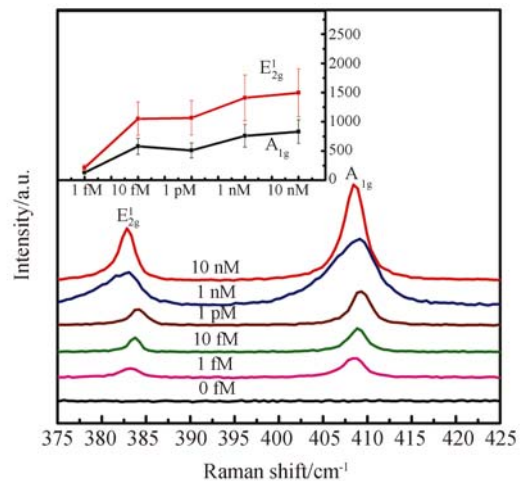


图 5 免疫组装后基底在 532 nm 激光激发下的拉曼光谱和误差分析曲线 (插图)

Fig. 5 Raman spectra and error analysis (inset) of substrates after immune assembly under 532 nm excitation

发现 MoS₂ 微米材料的拉曼特征散射信号。但当人 IgG 浓度分别为 10 nM、1 nM、1 pM、10 fM 和 1 fM 时,可以观测到 MoS₂ 的 E_{2g} (376 cm⁻¹) 和 A_{1g} (402 cm⁻¹) 振动模式的拉曼特征峰。多次重复实验结果表明,免疫检测实验的拉曼强度随着浓度的增大而增大(如图 5 中插图所示)。以上结果说明,利用 MoS₂ 微纳材料的拉曼特性可以实现对人 IgG 分子高特异性的检测。当待测物浓度低至 1 fM 时,免疫组装基底的拉曼信号已经较弱,表明免疫检测的检测限约为 1 fM。

4 结 论

本文通过液相剥离法制备了 WS₂、MoS₂ 材料,并且在不同温度下对样品进行陈化处理以

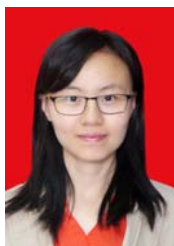
探究温度对样品拉曼特性的影响,发现在 532 nm 激光激发下可以观察到 WS₂、MoS₂ 材料的拉曼特征峰。在陈化实验中,在 70 °C 之前随着温度升高 WS₂、MoS₂ 材料的拉曼强度最大,而超过 70 °C 之后物质的拉曼强度明显下降。运用 MPA 作为表面配体对 MoS₂ 进行表面生物功能化,验证了应用 WS₂、MoS₂ 材料的拉曼特性进行高特异性免疫检测的可行性。发现免疫组装基底的拉曼散射强度随着人 IgG 浓度的增大而增大,检测限为 1 fM。基于 MoS₂ 的免疫检测可以推广至 WS₂ 材料体系,实验中也得到了类似的检测结果。也就是说,利用过渡金属二硫化物微纳材料的拉曼特性,可以在 532 nm 的可见激光激发下实现高灵敏的生物分子检测。

参考文献:

- [1] PIERUCCI D, HENCK H, NAYLOR C H, *et al.*. Large area molybdenum disulphide-epitaxial graphene vertical Van der Waals, heterostructures[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26656.
- [2] XU Y Z, WANG L L, LIU X, *et al.*. Monolayer MoS₂ with S vacancies from interlayer spacing expanded counterparts for highly efficient electrochemical hydrogen production[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2016, 4(42): 16524-16530.
- [3] LUO G, ZHANG Z Z, LI H O, *et al.*. Quantum dot behavior in transition metal dichalcogenides nanostructures[J]. *Frontiers of Physics*, 2017, 12(4): 128502.
- [4] ZHU C F, ZENG Z Y, LI H, *et al.*. Single-layer MoS₂-based nanoprobe for homogeneous detection of biomolecules. [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(16): 5998-6001.
- [5] WANG X X, NAN F X, ZHAO J L, *et al.*. A label-free ultrasensitive electrochemical DNA sensor based on thin-layer MoS₂ nanosheets with high electrochemical activity[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 64: 386-391.
- [6] XI Q, ZHOU D M, KAN Y Y, *et al.*. Highly sensitive and selective strategy for MicroRNA detection based on WS₂ nanosheet mediated fluorescence quenching and duplex-specific nuclease signal amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(3): 1361-1365.
- [7] WANG L, WANG Y, WONG J I, *et al.*. Functionalized MoS₂ nanosheet-based field-effect biosensor for label-free sensitive detection of cancer marker proteins in solution[J]. *Small*, 2014, 10(6): 1101-1105.
- [8] LEE J, DAK P, LEE Y, *et al.*. Two-dimensional layered MoS₂ biosensors enable highly sensitive detection of biomolecules [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7352.
- [9] SU S, ZOU M, ZHAO H, *et al.*. Shape-controlled gold nanoparticles supported on MoS₂ nanosheets: synergistic effect of thionine and MoS₂ and their application for electrochemical label-free immunosensing[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(45): 19129-19135.
- [10] CARVALHO B R, WANG Y X, MIGNUZZI S, *et al.*. Intervalley scattering by acoustic phonons in two-dimensional MoS₂ revealed by double-resonance Raman spectroscopy[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14670.
- [11] 周明辉, 廖春艳, 任兆玉, 等. 表面增强拉曼光谱生物成像技术及其应用[J]. *中国光学*, 2013, 6(5): 633-642.
ZHOU M H, LIAO CH Y, REN ZH Y, *et al.*. Bioimaging technologies based on surface-enhanced Raman spectroscopy and their applications [J]. *Chinese Journal of Optics*, 2013, 6(5): 633-642. (in Chinese)
- [12] LIU Y C, ZHONG M Y, SHAN G Y, *et al.*. Biocompatible ZnO/Au nanocomposites for ultrasensitive DNA detection using resonance Raman

- scattering[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(20): 6484-6489.
- [13] 朱雅君, 张学斌, 冀翼, 等. 纳米二硫化钨和二硫化钼的制备方法及应用[J]. *广州化工*, 2012, 40(3): 4-6.
- ZHU Y J, ZHANG X B, JI Y, *et al.*. Preparation technology and applications of nanoscaled WS₂ and MoS₂ [J]. *Guangzhou Chemical Industry and Technology*, 2012, 40(3): 4-6. (in Chinese)
- [14] FREY G L, TENNE R, MATTHEWS M J, *et al.*. Raman and resonance Raman investigation of MoS₂ nanoparticles [J]. *Physical Review B*, 1999, 60(4): 2882-2892.
- [15] 王海龙. 电荷转移复合物与分子反对称极化率的理论研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2008.
- WANG H L. *Theoretical Investigation of Charge Transfer Complex and Molecular Antisymmetric Polarizability* [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2008. (in Chinese)
- [16] 黄丽. 中子辐照 6H-SiC 的缺陷回复及其拉曼光谱研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- HUANG L. *The Defects Recovery and Raman Spectroscopy Study of Neutron Irradiated 6H-SiC* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2012. (in Chinese)
- [17] 张晓松, 李岚, 王达健. 热处理对 ZnO: Zn 荧光薄膜结晶性能的影响[J]. *发光学报*, 2006, 27(2): 206-210.
- ZHANG X S, LI L, WANG D J. Crystal property of ZnO: Zn thin film improved by post-deposition heat treatment[J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2006, 27(2): 206-210. (in Chinese)

作者简介:



楚学影(1982-),女,吉林长春人,博士,副教授,2006年、2011年于东北师范大学分别获得学士、博士学位,主要从事纳米材料光学性质及生物应用方面的研究。E-mail: chuxy608@163.com

通讯作者:



徐铭泽(1988-),女,吉林长春人,博士,讲师,2009年、2014年于吉林大学分别获得学士、博士学位,主要从事半导体纳米材料的制备、物性及应用方面的研究。E-mail:llmingze@foxmail.com

(本栏目编辑:曹 金)