

采用石墨烯修饰的电化学免疫传感器 检测猪肉中的己二烯雌酚含量

张洁¹, 吴珺², 王传现^{3*}, 邵科峰², 陈昌云², 赵波²

(¹上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ²南京师范大学化学与材料科学学院, 南京 210097;

³上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要 利用石墨烯及己二烯雌酚修饰电极, 研制了一种用于检测己二烯雌酚的高灵敏新型电化学免疫传感器; 通过竞争结合, 以铁氰化钾为探针, 实现了对己二烯雌酚的高灵敏快速检测。结果表明: 研制的石墨烯/己二烯雌酚电化学免疫传感器具有很高的灵敏度, 并且在己二烯雌酚质量浓度为 500~5 000 ng/mL 的范围内具有良好的线性关系, 检测限可达到 0.2 ng/mL。该传感器具有良好的稳定性和重复性, 对猪肉实际样品进行了己二烯雌酚的含量分析, 回收率在 83.8%~97.7% 之间, 结果令人满意。

关键词 石墨烯; 电化学免疫传感器; 间接竞争; 己二烯雌酚; 猪肉; 含量测定

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)06-0683-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150608

Preparation of an electrochemical immunosensor modified with graphene for detection of dienestrol in pork

ZHANG Jie¹, WU Jun², WANG Chuanxian^{3*}, SHAO Kefeng², CHEN Changyun², ZHAO Bo²

¹College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ²College of Chemistry and Material Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; ³Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China

Abstract An ultrasensitive electrochemical immunosensor modified with graphene and dienestrol (DE) was developed for the detection of dienestrol through indirect competition with $K_3Fe(CN)_6$ acting as the redox probes. The results revealed that under optimized conditions a calibration for DE was obtained with a linear range of 500–5 000 ng/mL and the detection limit was up to 0.2 ng/mL, showing that the proposed electrochemical immunosensor had excellent sensitivity and wide detection range. The immunosensor was examined in real samples for the analysis of DE. A good recovery in the range of 83.8%–97.7% was obtained in pork samples.

Key words graphene; electrochemical immunosensor; indirect competition; dienestrol; pork; determination of content

This study was supported by the Technology Support Program of Science and Technology Department of Jiangsu Province (No. BE2014720) and Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund Project (No. CX(14)2127)

己二烯雌酚(dienestrol, DE)是一种人工合成的雌激素类激素, 对动物生长有着明显的促进作用, 被广泛用于动物饲料中。研究表明, 残留于动物源性食品中的己二烯雌酚进入人体后, 会对机体造成生理破坏, 甚至有强致癌作用, 我国以及世界上多

数国家规定在动物源性食品中不得检出, 这对检测方法的灵敏度提出了很高的要求^[1-3]。目前, 己二烯雌酚检测的报道主要采用色谱法^[4-7], 色谱法虽然具有较高的准确性及灵敏度, 但样品前处理复杂、价格昂贵, 且不适合现场快速检测。研发一种

简便快速、高灵敏的己二烯雌酚检测方法具有十分重要的现实意义。

电化学免疫传感器是基于测量传感器表面的抗原-抗体特异性结合引起的电化学信号变化而实现化合物的检测^[8–11],具有速度快、灵敏度高、样品前处理简单等特点,非常适合食品安全领域毒害物的快速检测^[12–15]。石墨烯具有优良的导电性以及较大的比表面积,修饰于电极表面可以大大提高传感器的灵敏度,从而受到广泛关注^[16–20],但石墨烯修饰的己二烯雌酚电化学免疫传感器尚未见报道。免疫分析方法主要包括直接免疫分析法和竞争免疫分析法等,本课题组的前期实验表明,采用直接免疫分析法电化学信号变化小、灵敏度低,并且石墨烯上修饰抗体难度大、固定方式繁琐;而采用在石墨烯上修饰己二烯雌酚小分子的竞争免疫分析法,具有修饰简单、性质稳定、检测灵敏度高的优点。鉴于此,本研究将纳米技术和免疫分析方法有机结合,研制了石墨烯修饰的用于己二烯雌酚高灵敏检测的电化学免疫传感器,并对猪肉实际样品中己二烯雌酚的含量进行了检测。

1 材料

1.1 药品与试剂

己二烯雌酚(dienestrol,美国 Sigma-Aldrich 公司);牛血清白蛋白(BSA,北京元亨圣马生物技术研究所);铁氰化钾/亚铁氰化钾($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$,国药集团化学试剂有限公司);其余试剂均为市售分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 仪器

UV1700PC 型紫外可见分光光度计(上海凤凰光学仪器有限公司);JSM-7600F 型高分辨热场发射扫描电子显微镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 石墨烯以及传感器的制备

石墨烯通过采用 Hummers 法制备^[21–22]。玻碳电极首先分别在 0.3 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉上打磨成镜面,超声清洗后,通过循环伏安法扫描,保证氧化还原电势差小于 100 mV,晾干备用。

分别在玻碳电极表面上滴涂 4 μL 石墨烯悬浮液以及 0.2 g/L 己二烯雌酚标准溶液,室温下晾干后,电极表面的活性位点用 5% 的牛血清蛋白进行

封闭。

2.2 己二烯雌酚多克隆抗体的制备

2.2.1 己二烯雌酚免疫抗原的合成 取己二烯雌酚半抗原 97 mg 溶于二氧六环 6.5 mL,加入氯甲酸异丁酯 40 μL 反应 30 min,再与溶于 18 mL 的 50% 二氧六环水溶液的 330 mg 牛血清白蛋白反应,调整 pH 至 8.0 左右,4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜。透析 72 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心,冰冻干燥,得己二烯雌酚免疫抗原。

2.2.2 多克隆抗体的制备 采用雄性大耳兔为免疫动物,以己二烯雌酚抗原为免疫原,免疫剂量为 1.5 mg/kg。首次免疫时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,背部皮下多点注射。间隔 2 周用弗氏不完全佐剂替换弗氏完全佐剂进行加强免疫,剂量、方法同首免。最后一次免疫不加佐剂,7 d 后心脏采血,以间接 ELISA 法测定血清抗体效价,并用硫酸化沉淀法得到纯化的己二烯雌酚多克隆抗体,–20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 样品的前处理

准确称取猪肉肌肉组织(1 ± 0.0050) g 于样品管中,分别在样品管中加入不同浓度的己二烯雌酚标准溶液后,经超声、离心后取上清液,重复提取 1 次后,所得上清液通过氮气吹干,加入 PBS 溶解吹干物后待用。

2.4 检测方法与原理

本实验采用三电极体系(CHI852C 电化学工作站、CHI660E 电化学工作站,上海辰华仪器有限公司),玻碳电极为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为对电极。电化学传感器的电化学表征通过使用循环伏安法(CV)以及交流阻抗法(EIS)进行扫描,检测条件优化以及己二烯雌酚的检测通过使用差分脉冲伏安法(DPV)进行扫描。

己二烯雌酚的检测是基于电极表面固定的半抗原与孵育液中的半抗原、抗体之间的竞争,己二烯雌酚与其多克隆抗体之间有特异性结合,传感器在含有抗体以及游离的己二烯雌酚的 PBS 溶液中进行孵育时,固定在电极表面的己二烯雌酚和溶液中的己二烯雌酚都能与抗体进行结合。己二烯雌酚检测是通过检测半抗原和抗体之间进行竞争结合时产生的电流响应变化而实现的。原理如图 1 所示,其中过程(a)表示固定于电极表面的己二烯雌酚和孵育液中游离的己二烯雌酚与抗体进行竞争结合,过程(b)表示在 2 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 中对竞争

结合后的电极进行电化学检测,通过监测电信号的变化检测己二烯雌酚的质量浓度。

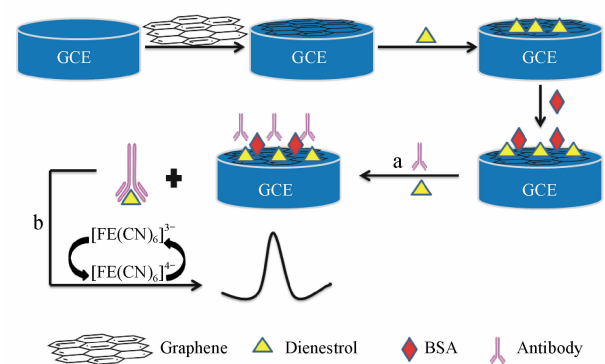


Figure 1 Principle of the modified immunosensor for detection
GCE:Glassy carbon electrode

3 结果与分析

3.1 修饰电极的表征

3.1.1 扫描电镜分析 由 Hummers 法制备的石墨烯复合物的表面形态由扫描电镜进行表征。图 2 展示了石墨烯的很薄片层结构,造成石墨烯表面形成褶皱,石墨烯是单层 sp^2 杂化碳原子构成的蜂窝状结构,具有优良的导电性,很高的比表面积,优良的可修饰性,是构建高灵敏电化学免疫传感器的优异材料。

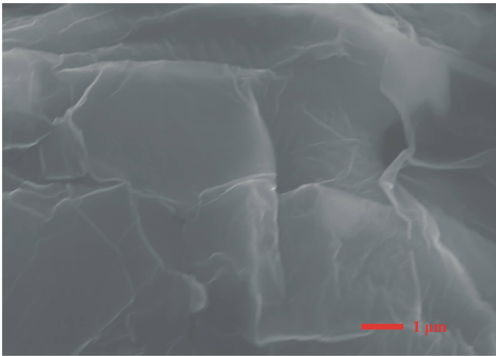


Figure 2 Scanning electron microscope (SEM) of graphene
($\times 10\,000$)

3.1.2 紫外可见吸收光谱 己二烯雌酚是否修饰在电极表面是传感器构建的关键,为了了解己二烯雌酚在电极表面的修饰情况,通过紫外可见光谱进行了验证。将石墨烯悬浮液及其与己二烯雌酚的混合液分别滴涂于两玻璃片上,晾干后分散于蒸馏水中测其紫外可见光谱(图 3),所用溶液中石墨烯与己二烯雌酚的比例与修饰电极的相同。由图 3

可以看出,己二烯雌酚标准溶液在 228.5 nm 处有明显的吸收峰,石墨烯如图中所示没有明显的吸收峰,石墨烯/己二烯雌酚混合物的紫外吸收峰则在 226.5 nm 处,与己二烯雌酚标准溶液的吸收峰相差 2 nm,这是由于修饰在石墨烯表面的己二烯雌酚与石墨烯之间的相互作用引起的,紫外可见光谱结果同时也表明了己二烯雌酚修在了石墨烯表面。己二烯雌酚与石墨烯之间的相互作用是分子间作用力,因此己二烯雌酚是通过物理吸附方式修饰在石墨烯上。它们之间的作用力可能包括两个方面:一方面,石墨烯具有电子富集性的大 π 共轭体系,与己二烯雌酚的羟基之间容易形成氢键;另一方面,己二烯雌酚的苯环也是大 π 共轭结构,与石墨烯的大 π 共轭体系能形成 $\pi\cdots\pi$ 作用。这种分子间作用力影响了己二烯雌酚分子的电子性质,从而使其电子光谱发生变化。

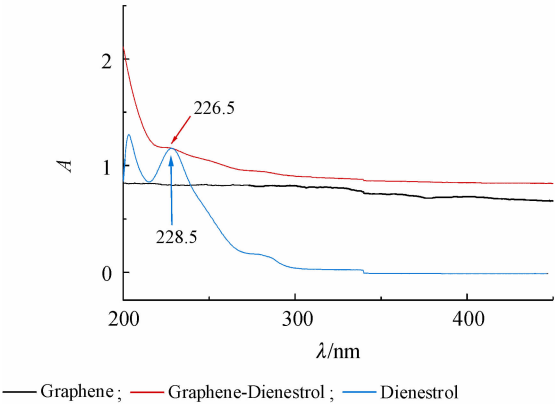


Figure 3 Ultraviolet-visible (UV) pectrophotometer of graphene/
dienestrol (DE)

3.1.3 循环伏安法表征 以 $K_3[Fe(CN)_6]$ 为标记物对传感器进行 CV 图谱扫描,来研究电极不同修饰过程中界面性质的变化,其结果如图 4 所示。曲线 a 为裸电极在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 中经过氧化还原反应显示出的一对可逆的氧化还原峰。当电极表面修饰石墨烯后,由于优良的导电性以及较大比较面积,作为修饰电极上的电子转移介质,电极的氧化还原峰电流出现明显的增强(曲线 b)。将修饰好的石墨烯/己二烯雌酚电化学免疫传感器置于含有己二烯雌酚多克隆抗体的孵育液中孵育后再进行 CV 的测定,峰电流有所下降(曲线 c),孵育液中的抗体与电极表面修饰的半抗原发生竞争结合,形成的抗体-半抗原复合物附着在电极上,阻碍电子传递导致峰电流下降。说明己二烯雌酚已被修

饰在电极表面。

3.1.4 电化学阻抗表征 电化学阻抗(EIS)也是用于探测修饰电极界面特性的强有力的工具之一^[23-24]。对不同电极修饰的过程的 EIS 图谱如图 5 所示,图中半圆直径代表电荷转移电阻(R_{et})。曲线 a 与图中插入图代表裸电极的 EIS。在裸电极上修饰石墨烯后,石墨烯作为电子转移介质,加速了电极的电子转移, R_{et} 减小(曲线 b)。由于己二烯雌酚不具有电化学活性, R_{et} 并无明显变化(曲线 c)。BSA 封闭活性位点后,在含有己二烯雌酚抗体孵育液中孵育,己二烯雌酚多克隆抗体与电极表面固定的己二烯雌酚发生竞争结合,形成了半抗原-抗体复合物,复合物具有不导电性阻碍了回路中电子的传递,导致 R_{et} 增大(曲线 d)。这表明己二烯雌酚已固定在电极表面。这与循环伏安法结果一致。

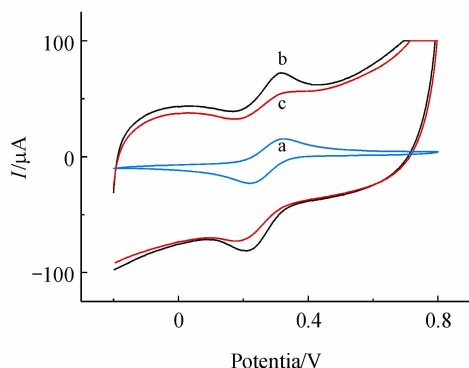


Figure 4 Cyclic voltammetry (CV) of bare GCE (a); graphene/DE modified GCE (b); graphene/DE modified GCE incubated in PBS containing antibody (c). CV conditions: pH 7.4 PBS solution containing 2 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$

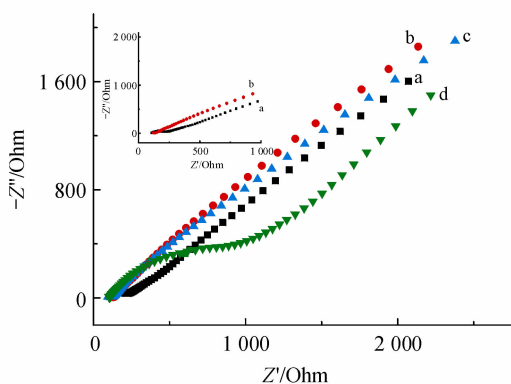


Figure 5 Electrochemical impedance spectra (EIS) of bare GCE (a); graphene modified GCE (b); graphene/DE modified GCE (c); graphene/DE modified GCE incubated in PBS containing antibody (d). CV conditions: pH 7.4 PBS solution containing 0.1 mol/L KCl and 5 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$. Inset: Bare GCE (a) and Graphene modified GCE (b)

3.2 己二烯雌酚含量测定的影响因素优化

3.2.1 孵育时间的优化 在实验过程中,半抗原和抗体能够完全竞争结合,控制孵育时间尤为重要。首先对传感器孵育的时间进行优化。将制备好的传感器分别在含有相同浓度的己二烯雌酚多克隆抗体的 PBS 溶液中进行孵育 5, 10, 15, 20 以及 25 min, 用 PBS 冲洗后进行 DPV 扫描。如图 6-A 所示, 在 0 ~ 20 min 之间, 由于己二烯雌酚与己二烯雌酚多克隆抗体发生了竞争结合, 形成的半抗原-抗体复合物, 阻碍了电极表面电子的传递, 导致了 DPV 响应电流值的下降。在 20 ~ 25 min 时, 传感器表面的半抗原与孵育液中的半抗原跟抗体的竞争结合几乎达到平衡, 响应电流值不在变化。延长孵育时间对 DPV 峰电流值降低影响不大, 故选取 20 min 作为竞争结合的最优时间。

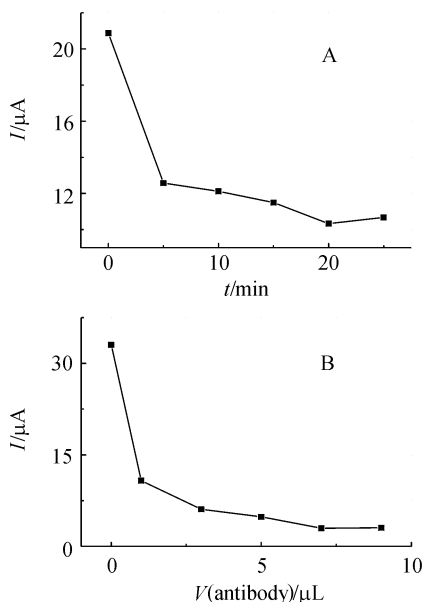


Figure 6 Effect of incubation time (A) and concentration of antibody (B) in incubation solution on DPV peak current in pH 7.4 PBS solution containing 2 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$

3.2.2 孵育液中抗体量的优化 半抗原与抗体的竞争结合时所需抗体量也是影响本实验的重要因素。将传感器分别在含有 1, 3, 5, 7, 9 μ L 己二烯雌酚多克隆抗体的 PBS 溶液中进行孵育 20 min, 用 PBS 冲洗后进行 DPV 扫描。如图 6-B 所示, 在 0 ~ 7 μ L 时, 由于竞争结合形成的半抗原-抗体复合物, 导致 DPV 响应电流值的下降。在 7 ~ 9 μ L 时, 传感器表面的半抗原与孵育液中的半抗原跟抗体的结合几乎达到平衡, 响应电流值几乎不变。增加

孵育液中抗体量对 DPV 峰电流值降低影响不大,故选取 $7\ \mu\text{L}$ 作为竞争结合的最优抗体量。

3.2.3 己二烯雌酚的检测 利用抗体-半抗原的竞争,通过 DPV 扫描实现对己二烯雌酚的检测。将传感器置入含有不同浓度的游离己二烯雌酚以及其抗体的孵育液中孵育 20 min 后, PBS 清洗后进行 DPV 扫描。结果如图 7 所示,与游离己二烯雌酚浓度为 $0\ \text{ng/mL}$ 时的 DPV 响应电流值相比,随着己二烯雌酚浓度的增加响应电流值也随之增大。定义在孵育液中己二烯雌酚浓度为 $0\ \text{ng/mL}$ 时响应电流为 I_0 , I_x 为孵育液中含有不同浓度己二烯雌酚时所测得的响应电流,响应电流变化值 ΔI ($\Delta I = I_x - I_0$) 与质量浓度在 $500 \sim 5\ 000\ \text{ng/mL}$ 范围内的己二烯雌酚有良好的线性关系 ($r = 0.993$),最低检测限可达到 $0.2\ \text{ng/mL}$ 。

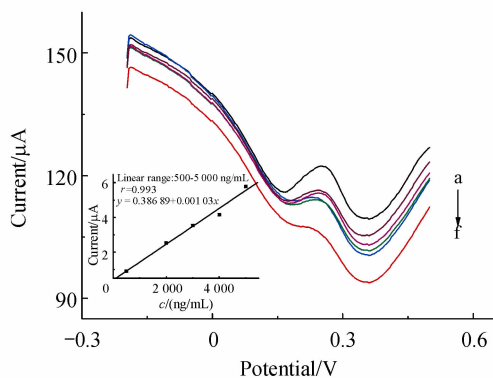


Figure 7 Differential pulse voltammetry (DPVs) of the immunosensor after incubated in PBS buffer containing antibody and (a) $5\ 000\ \text{ng/mL}$, (b) $4\ 000\ \text{ng/mL}$, (c) $3\ 000\ \text{ng/mL}$, (d) $2\ 000\ \text{ng/mL}$, (e) $500\ \text{ng/mL}$, (f) $0\ \text{ng/mL}$ clebuterol. Inset: The calibration curve of free dienestrol

3.2.4 实际样品的分析 对猪肉实际样品进行了己二烯雌酚检测的分析。经过前处理的样品在高、中、低 3 个的浓度梯度下使用标准加入法进行检测,通过线性关系计算得到回收率。结果表明,猪肉实际样品的回收率在 $83.8\% \sim 97.7\%$ 之间。本研究研制的用于检测己二烯雌酚的电化学免疫传感器具有很好的实用性,完全适用于动物源性食品中己二烯雌酚的检测。

3.3 石墨烯/己二烯雌酚电化学免疫传感器的重复性以及稳定性

电化学免疫传感器的重复性以及稳定性对该传感器是很重要的衡量指标。利用差分脉冲伏安法,对传感器的稳定性进行了测试。将制备的电化

学免疫传感器重复在 $2\ \text{mmol/L}\ \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中进行扫描 5 次,该传感器的响应电流值的相对偏差小于 10% ,结果表明该传感器的稳定性较好。对该传感器的重复性进行了研究,将电化学免疫传感器放置在空气中,经过 6 d 每天对该传感器进行 DPV 扫描,测得该传感器的响应电流变化值相对标准偏差小于 10% ,结果表明该传感器的重复性是可以接受的。

4 结论

本实验通过研制的己二烯雌酚多克隆抗体,以及己二烯雌酚小分子和己二烯雌酚多克隆抗体抗体之间的竞争结合模式,利用石墨烯作为电子转移介质修饰于电极表面,构建了一种创新型电化学免疫传感器用于检测己二烯雌酚,取得了良好的结果 ($r = 0.993$,最低检测限为 $0.2\ \text{ng/mL}$)。动物源性食品中己二烯雌酚的残留严重影响着食品安全以及人们的身体健康,必须要对该问题加强监管和检测。本研究构建的电化学免疫传感器可实现对残留己二烯雌酚的检测,并且操作简便、成本低、灵敏度高、样品处理简单,可作为快速检测食品中己二烯雌酚的有力工具。

参考文献

- [1] Hu WY, Kang XJ, Zhang C, *et al.* Packed-fiber solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of diethylstilbestrol, hexestrol, and dienestrol residues in milk products[J]. *J Chromatogr B*, 2014, **957**: 7–13.
- [2] Li P, Yu H, Yang S. Advances in research on dienestrol residue analytical technique[J]. *Chin J Veterinary Drug* (中国兽药杂志), 2010, **44**(2): 41–45.
- [3] Zhong HY, Chai LY, Yang JF, *et al.* The determination of diethylstilbestrol, dienestrol and bisphenol A in muscular tissues of animals[J]. *Chin J Anal Lab* (分析实验室), 2013, **32**(12): 116–121.
- [4] Vanhaecke L, Bussche JV, Wille K, *et al.* Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high-throughput confirmation and quantification of 34 anabolic steroids in bovine muscle[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, **700**(1): 70–77.
- [5] D'Orazio G, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, *et al.* Evaluation of the combination of a dispersive liquid-liquid microextraction method with micellar electrokinetic chromatography coupled to mass-spectrometry for the determination of estrogenic compounds in milk and yogurt[J]. *Electrophoresis*, 2015, **36**(4): 615

- 625.
- [6] Kaklamanos G, Theodoridis G, Dabalís T. Determination of anabolic steroids in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2009, **877**(23): 2330–2336.
- [7] Chen B, Huang Y, He M, *et al.* Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples[J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1305**: 17–26.
- [8] Ricci F, Adornetto G, Palleschi G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors[J]. *Electrochim Acta*, 2012, **84**: 74–83.
- [9] Zhou J, Du L, Zou L, *et al.* An ultrasensitive electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection based on staphylococcal protein A-Au nanoparticle modified gold electrode[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, **197**: 220–227.
- [10] Liu G, Iyengar SG, Gooding JJ. An Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticle-modified electrodes for the detection of HbA1c in human blood[J]. *Electroanalysis*, 2012, **24**(7): 1509–1516.
- [11] Shankaran DR, Gobi KV, Miura N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, **121**(1): 158–177.
- [12] Salimi A, Kavosi B, Fathi F, *et al.* Highly sensitive immunosensing of prostate-specific antigen based on ionic liquid-carbon nanotubes modified electrode; application as cancer biomarker for prostate biopsies[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, **42**: 439–446.
- [13] Dong J, Zhao H, Xu M, *et al.* A label-free electrochemical impedance immunosensor based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-Chi nanocomposite modified glassy carbon electrode for detection of *Salmonella typhimurium* in milk[J]. *Food Chem*, 2013, **141**(3): 1980–1986.
- [14] Viswanathan S, Rani C, Ho J A. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode[J]. *Talanta*, 2012, **94**: 315–319.
- [15] Huang KJ, Niu DJ, Xie WZ, *et al.* A disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on nano-Au/multi-walled carbon nanotubes-chitosans nanocomposite film modified glassy carbon electrode[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, **659**(1): 102–108.
- [16] Lin J, Wei Z, Zhang H, *et al.* Sensitive immunosensor for the label-free determination of tumor marker based on carbon nanotubes/mesoporous silica and graphene modified electrode[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, **41**: 342–347.
- [17] Yu XW, Sheng KX, Chen J, *et al.* Electrochemical biosensing based on graphene modified electrodes[J]. *Acta Chim Sinica* (化学学报), 2013, **72**(3): 319–332.
- [18] Mao K, Wu D, Li Y, *et al.* Label-free electrochemical immunosensor based on graphene/methylene blue nanocomposite[J]. *Anal Biochem*, 2012, **422**(1): 22–27.
- [19] Liu S, Yan J, He G, *et al.* Layer-by-layer assembled multilayer films of reduced graphene oxide/gold nanoparticles for the electrochemical detection of dopamine[J]. *J Electroanal Chem*, 2012, **672**: 40–44.
- [20] Yang YY. Recent developments of graphene in electrochemical biosensor[J]. *Guangdong Chem Ind* (广东化工), 2014, **41**(19): 87–88.
- [21] Xu Y, Zhao L, Bai H, *et al.* Chemically converted graphene induced molecular flattening of 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio) porphyrin and its application for optical detection of cadmium(II) ions[J]. *J Amer Chem Soc*, 2009, **131**(37): 13490–13497.
- [22] Kovtyukhova NI, Ollivier PJ, Martin BR, *et al.* Layer-by-layer assembly of ultrathin composite films from micron-sized graphite oxide sheets and polycations[J]. *Chem Mater*, 1999, **11**(3): 771–778.
- [23] Wang GL, Yu PP, Xu JJ, *et al.* A label-free photoelectrochemical immunosensor based on water-soluble CdS quantum dots[J]. *J Physical Chem C*, 2009, **113**(25): 11142–11148.
- [24] Giroud F, Gorgy K, Gondran C, *et al.* Impedimetric immunosensor based on a polypyrrole-antibiotic model film for the label-free picomolar detection of ciprofloxacin[J]. *Anal Chem*, 2009, **81**(20): 8405–8409.