



电化学发光化学与生物传感方法

漆红兰¹, 李延², 张成孝^{1*}

1. 陕西省生命分析化学重点实验室; 陕西师范大学化学化工学院, 西安 710062

2. 合成与天然功能分子化学教育部重点实验室; 西北大学化学与材料科学学院, 西安 710069

*通讯作者, E-mail: cxzhang@snnu.edu.cn

收稿日期: 2024-06-20; 接受日期: 2024-07-24; 网络版发表日期: 2024-09-27

国家自然科学基金(编号: 22274093, 22374094)和中央高校基础研究经费项目(编号: GK202202002)资助项目

摘要 本文重点介绍了本实验室在电化学发光(ECL)化学与生物传感方法方面的研究工作, 简要介绍了ECL化学传感方法(流动注射法、能量转移法和偶合化学反应法), 重点介绍了ECL生物传感方法(均相免疫、DNA杂交、适配体、凝集素、DNA酶、寡肽等)测定生物标志物的基本原理(包括ECL信号探针的设计、生物传感界面构筑和信号放大策略等), 最后探讨了ECL化学与生物传感方法的挑战和发展前景。

关键词 电化学发光, 生物传感, 生物标志物, 分子识别物质

1 引言

生物标志物(biomarker)是生物体内发生且与发病机制有关联关键事件的指示物, 具有客观测量并用于评估正常生物学过程、致病过程或药物干预效果的指标特征^[1]。它是一种或多种体液(包括血液、尿液、唾液、汗液、精液、乳液、眼泪、间质液和脑脊液等)中的DNA、miRNA、酶、蛋白质(抗体或抗原)、生物小分子和细胞表面受体等^[2]。因此, 生物标志物的准确测定对某些疾病的诊断、分类和治疗效果评价具有极其重要的意义^[3]。

生物标志物的分析方法可分为基于分离的方法(如色谱法和毛细管电泳法等)和基于特定化学反应或生物化学反应的传感(识别)方法。化学传感方法(chemical sensing)是基于待测物质与信号探针之间的特定化学反应识别待测物质, 并将其转换成光、电、质量

等信号来实现待测物质测定的方法。生物传感方法(biosensing)通常以生物分子(核酸、酶、抗体、适配体、多肽、受体等)为分子识别物质, 基于分子识别物质特异性识别待测物质并将其转换成光、电、质量等信号来实现待测物质测定的方法。对于生物标志物的测定, 化学传感方法具有简单、快速的优点, 但选择性较差; 生物传感方法具有选择性好、准确度高、快速等优点^[4]。根据测量信号的不同, 化学或生物传感方法可分为电化学(电导、电位、电流等)传感法、光(吸收、荧光、化学发光、电化学发光等)传感法、压电传感法等。

电化学发光, 又称电致化学发光(electrochemiluminescence, electrogenerated chemiluminescence, ECL)是在电极表面发生电化学反应, 电极反应产物之间或电极反应产物与溶液中物质之间发生化学发光反应而产生一种激发态物质, 激发态物质回到基态产生的一种

引用格式: Qi H, Li Y, Zhang C. Electrochemiluminescence chemical and biosensing methods. *Sci Sin Chim*, 2024, 54: 1670–1688, doi: 10.1360/SSC-2024-0129

光辐射. 基于电化学发光反应而建立的分析方法称为电化学发光分析法(或电化学发光法)^[5]. 与化学发光法相比, ECL法可通过控制电位启动反应, 并不依赖试剂的加入而启动化学发光反应; 与荧光法相比, ECL法不需要光源; 与伏安法相比, ECL法受充电电流和电极表面状态的影响比较小. 与荧光法和电化学法相比, ECL法的检出限要低得多^[6]. ECL法结合了伏安法电位可控性强和化学发光法高灵敏度两方面优点. 然而, 这三类方法也有自身的一些限制. 电化学法需要基础电极或修饰电极以及溶液必须具有导电性, 荧光法和化学发光法需要基板和溶液必须具有透光性; 而ECL法则同时需要电极材料和溶液的导电性和透光性.

近年来, 关于ECL反应的机理^[5~9]、ECL纳米材料^[10~12]、ECL生物传感策略^[13~16]和ECL生物传感分析应用^[6,17~22]已发表许多综述和专题文章. 本专题文章拟以时间为序重点介绍本实验室在电化学发光化学与生物传感方法方面的研究工作, 侧重介绍ECL化学传感方法(流动注射法、能量转移法和偶合化学反应法)和ECL生物传感方法(均相免疫、DNA杂交、适配体、凝集素、DNA酶、寡肽等)测定生物标志物的基本原理(包括ECL信号探针的设计、生物传感界面构筑和信号放大策略等), 并探讨ECL化学与生物传感方法的挑战和发展前景.

2 电致化学发光分析法

电致化学发光分析法是基于待测物质直接或间接电化学发光反应而建立的分析方法. 在我们早期的研究中, 侧重研究了基于电化学与化学发光反应偶合的电致化学发光分析法, 主要包括流动注射、能量转移和偶合化学反应电致化学发光分析法.

2.1 流动注射电致化学发光分析法

鲁米诺(5-氨基-2,3-二氢-1,4-酞嗪二酮, MW=177.16)是一种经典的化学发光试剂. 在含有 H_2O_2 和催化剂(如 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{2+} 、血红素等)的碱性水溶液中, 鲁米诺被氧化产生激发态的3-氨基邻苯二甲酸, 激发态回到基态时产生波长为425 nm蓝光辐射. 在20世纪90年代, 我们曾将电化学富集溶出与流动注射化学发光结合提出了电化学溶出化学发光

法^[23]. 在流通体系的金电极上将样品中 Cu^{2+} 电化学还原单质铜沉积在金电极上; 当含KCN和鲁米诺的溶液流过电极时, 施加正电压使沉积在金电极上单质铜氧化溶出产生 Cu^{2+} , Cu^{2+} 与 CN^- 形成配合物, 该配合物氧化鲁米诺产生化学发光, 建立了测定污水中 Cu^{2+} 的溶出电化学发光方法. 该方法的检出限(LOD)为0.02 ng/mL (电沉积时间120 s). 该法由于电解富集方法极大地降低了方法的检出限, 提高了方法的选择性^[23].

我们提出了电生不稳定试剂流动注射化学发光法. 例如, 流动注射电生次氯酸根化学发光法. 当含KCl碱性溶液流过铂电极时, Cl^- 被氧化为 ClO^- , ClO^- 能氧化鲁米诺产生化学发光. 基于药物对 ClO^- 氧化鲁米诺产生化学发光的淬灭或增强实现药物儿茶酚胺(多巴胺、肾上腺素、异丙基肾上腺素)^[24,25]、酚磺乙胺^[26]、异烟肼^[27]和L-多巴^[28]的测定. 所建立方法的检出限在~ng/mL数量级, 发展的方法可用于药物制剂中上述药物的测定.

我们还提出了流动注射电生不稳定 Mn(II) *化学发光法. 当含 MnSO_4 强酸性溶液流过铂电极时, Mn^{2+} 被氧化为 Mn(III) , Mn(III) 与还原性药物反应直接产生化学发光. 基于此, 建立了测定药物制剂中肾上腺色素^[29]和地塞米松^[30]的新方法. 该法无需常规的化学发光试剂, Mn(III) 是氧化剂也是发光前体.

上述电生不稳定试剂流动注射化学发光法, 既不同于电致化学发光法(化学发光在电极表面), 也不同于常规的化学发光法(化学发光由加入试剂引发). 该法具有以下优点: (1) 在线电解产生的初生态试剂反应活性高, 因而测定的灵敏度高; (2) 在线产生的试剂在线使用, 克服了化学发光分析中氧化剂不稳定问题, 如 H_2O_2 、 Br_2 、 ClO^- 、 O_2^- 等; (3) 试剂浓度大小可由电解电流大小控制, 使发生反应的可控制性大大提高; (4) 可建立一些新的化学发光体系, 扩大了化学发光法的应用范围. 然而, 这些方法的反应均是基于氧化还原反应. 因此, 所建立方法的选择比较差. 流动注射电致化学发光分析法的优点是可实现自动化分析. 但是, 消耗发光试剂或样品量比较大.

2.2 能量转移和偶合化学反应电致化学发光分析法

特定条件下某些测定物质发生电极反应后产生弱发光, 而该弱发光能被一些荧光或化学发光等物质通

过能量转移或偶合化学反应所增强, 基于此发展了一系列电致化学发光分析新方法. 我们提出了能量转移电致化学发光分析法. 在碱性溶液中, 硫胺素在铂电极上氧化产生弱ECL信号, 加入罗丹明B和阳离子表面活性剂十六烷基三甲胺, ECL信号强烈增强, 即产生能量转移电化学发光; 基于此建立了测定硫胺素能量转移电致化学发光方法, 方法的检出限可达8 ng/mL^[31].

中性水溶液中铂电极上氧化亚硫酸盐产生弱ECL信号, 罗丹明B作为能量受体强烈增强了信号, 中性表面活性剂吐温(Tween) 80进一步增强了该信号. 基于此, 建立了测定亚硫酸根的能量转移电致化学发光方法. 该方法的检出限可达到50 ng/mL, 已应用于药物注射剂和白糖样品中亚硫酸根的测定^[32].

在中性含氧气水溶液中, 铂电极上光泽精(lucigenin)在-0.65 V (vs. Ag/AgCl)产生弱ECL信号. 维生素B2能显著增强光泽精的ECL信号, 基于此, 建立了测定维生素B2的电致化学发光分析法, 检出限可达到8.2 ng/mL. 该方法应用于药物注射剂和片剂中维生素B2测定^[33]. 同理, 2,3-吡啶二酮也能显著增强光泽精在-0.65 V的电化学发光(约50倍). 基于此, 建立了测定2,3-吡啶二酮的偶合化学反应的电致化学发光分析方法, 检出限为33 ng/mL^[34]. 维生素B2和2,3-吡啶二酮在电极上还原, 还原态产物与氧气反应产生超氧自由基, 产生的超氧自由基与还原态光泽精发生化学反应, 产生激发态的N-甲基吡啶酮, 激发态的N-甲基吡啶酮回到基态时产生光辐射.

受实验仪器条件所限没有测量相关体系的电致化学发光光谱, 上述电致化学发光体系所涉及的反应机理还有待深入研究. 基于能量转移和偶合化学反应的电致化学发光分析方法, 与吸光光度分析方法和荧光分析方法相比, 其优点是检出限较低, 扩大了ECL测定物质的范围; 相对于下节将介绍的电化学发光生物传感方法, 试剂廉价, 分析成本较小. 但是, 这类分析方法的线性范围比较窄. 另外, 由于受到化学反应选择性的限制, 上述介绍的流动注射电致化学发光分析方法和基于能量转移和偶合化学反应的电致化学发光分析方法的选择性比较差, 多应用于药物制剂中特定物质的测定. 为了发展能应用于临床样品如血样中生物标志物的高灵敏度、高选择性的ECL方法, 后续我们主要研究电化学发光生物传感的新方法.

3 电化学发光生物传感法

电化学发光生物传感法是将电化学发光方法与生物分子识别传感方法相结合的一类方法. ECL生物传感法发展中, 涉及4个关键要素: 待测物质、信号物质、分子识别物质和电极^[5]. 本文中介绍的待测物质主要为生物标志物, 如特定DNA、miRNA、酶、蛋白质(抗体或抗原)、生物小分子、病毒、癌细胞、细胞表面受体等. 信号物质是能产生ECL信号的物质, 目前已报道的电化学发光信号物质或材料主要有小分子有机化合物如鲁米诺及其衍生物等、金属配合物如钌联吡啶配合物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 及其衍生物等和纳米材料如CdSe量子点等^[5]. 我们在电化学发光信号物质的设计合成及其性质方面开展了一系列的研究^[35~38]. 关于ECL信号物质的共反应体系以及各体系的ECL发光机制, 在我们前期的一些综述^[5,6,10,11,19]中已经详细介绍, 在此不再赘述. 分子识别物质主要包括DNA、DNA酶、适配体、凝集素、寡肽、抗体等. 通常将信号物质标记(labeling)在分子识别物质如抗体上或标签(tagging)到分子识别物质如单链DNA或寡肽上所制成的复合物称为ECL探针.

我们认为电化学发光生物传感分析方法主要涉及两类. 其一, 电化学发光生物传感器(ECL biosensor)法, 将ECL探针固定到电极表面则制成ECL传感器, 该传感器能在共反应试剂存在下直接对检测物产生ECL信号响应. 例如, 将钌联吡啶配合物衍生物标签的发卡式单链DNA固定到电极表面制备成电化学发光DNA传感器, 该传感器能直接对检测的互补单链DNA杂交反应直接产生信号变化, 从而对互补单链DNA进行定量分析. 其二, 电化学发光生物传感(ECL biosensing)法, 某种意义上讲, 该法是一种间接对检测物产生ECL响应的一类方法. 例如, 在电极上固定化俘获探针, 俘获探针结合检测物和信号探针形成夹心复合物, 该复合物能在共反应试剂存在下产生ECL信号响应从而对检测物进行定量分析. 在许多文献中, 将俘获探针固定在电极上制作的电极称为电化学发光生物传感器. 然而, 与电化学发光生物传感法相比, 电化学发光生物传感器法测定原理并不同, 数量较少, 且考虑到对测定原理的描述容易理解, 因此, 本论文在题目和本节标题中采用了电化学发光生物传感方法.

本节主要从分子识别物质的角度来介绍我们在

ECL生物传感方法方面的研究工作, 侧重介绍为发展测定特定生物标志物的ECL生物传感方法所涉及的ECL信号探针设计、生物传感界面构筑和信号放大策略等(图1).

3.1 均相电化学发光免疫分析法

电化学发光免疫分析法是基于抗原-抗体亲合作用发展的电化学发光生物传感分析法. 根据是否需要分离, 免疫分析法分为无需分离的均相免疫分析法和需要分离的非均相免疫分析法. 我们早期在均相电化学发光免疫分析法(homogeneous ECL immunoassay)方面开展了一系列研究.

鲁米诺是一种典型的ECL试剂. 1929年, Harvey^[39]首次报道了鲁米诺的ECL现象. 在没有催化剂的情况下, 在含有H₂O₂的中性水溶液或弱碱性溶液中, 鲁米诺能产生电化学发光. 鲁米诺-H₂O₂体系的ECL机制为鲁米诺被电化学氧化产生鲁米诺自由基; H₂O₂电化学氧化产生HO₂[·]自由基, 去质子化生成O₂[·]自由基. 鲁米诺自由基与HO₂[·]和O₂[·]反应生成激发态氨基邻苯二甲酸, 其回到基态时发出蓝光($\lambda_{\max}=425\text{ nm}$). 在ECL生物传感法中, 使用鲁米诺作为ECL试剂一般分为两种情况: 一种是鲁米诺直接标记在生物识别物质上, 另一种是氧化还原酶标记在生物识别物质上而鲁米诺在溶

液中. 1999年, 我们提出了均相电化学发光免疫分析法, 即基于待测抗体(分子量~50 kD)与小分子鲁米诺标记地高辛(digoxin)半抗原(ECL信号探针)形成的免疫复合物. 此复合物与ECL信号探针在溶液中的扩散速率和电极上氧化速率不同(分子量不同、空间位阻不同), 即产生的电化学发光强度不同, 可实现均相电化学发光免疫分析, 即免分离的电化学发光免疫分析. 基于此设计思想, 我们将小分子鲁米诺标记在地高辛(半抗原)上合成ECL信号探针, 在10 mM H₂O₂的0.10 M磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.40)中, 合成的ECL信号探针在玻碳电极(GCE)上产生ECL信号($E = 0.70\text{ V vs. Ag/AgCl}$), 待测物地高辛抗体可使合成的ECL信号探针的ECL强度降低, 建立了测定地高辛抗体的均相ECL免疫分析新方法; 基于地高辛与ECL信号探针对于固定量地高辛抗体的竞争结合, 建立了测定地高辛的竞争均相电化学发光免疫分析新方法, 测定地高辛的检出限达0.1 ng/mL^[40].

为了提高上述ECL免疫分析方法的灵敏度, 我们提出了牛血清白蛋白(BSA)为ECL试剂鲁米诺和小分子地高辛(半抗原)的载体, 合成了多负载ECL信号和识别物质的ECL探针(BSA-luminol-digoxin). 在10 mM H₂O₂的0.10 M PBS (pH=7.40)中, 合成的多负载ECL信号探针在铂电极上产生强ECL信号($E = 0.75\text{ V vs. Ag/AgCl}$); 基于地高辛抗体使合成的ECL信号探针的ECL强度降低, 建立了测定地高辛抗体的均相ECL免疫方法; 基于地高辛与ECL信号探针对于固定量地高辛抗体的竞争结合, 也建立了测定地高辛的竞争均相电化学发光免疫分析^[41].

鲁米诺通过苯环上的氨基偶联到抗体或半抗原上, 由于空间位阻使其化学发光或电化学发光效率严重降低. *N*-(4-氨基丁基)-*N*-乙基异鲁米诺(简称ABEI)连接臂上的氨基与苯环上的发光反应基团相距较远, 其标记到抗体后化学发光或电化学发光效率降低很小. 纳米材料引入ECL生物传感分析极大地促进了该研究领域的发展. 将金纳米修饰到石墨电极上, 可极大地增强鲁米诺及其衍生物的ECL. 基于此, 我们将ABEI标记到人免疫球蛋白G (hIgG)抗体上合成ECL探针, 建立了在金纳米修饰石墨电极上测定hIgG抗原的均相电化学发光免疫分析新方法, 方法的检出限为0.01 ng/mL^[42].

钆联吡啶配合物[Ru(bpy)₃]²⁺-三正丙胺(TPA)体系



图1 (网络版彩图)电化学发光生物传感关键要素
Figure 1 (Color online) Scheme of the main scopes of ECL biosensing.

是经典的ECL体系^[5,8], 前者为发光试剂, 后者为共反应试剂. 该体系测定 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 的检出限可低至200 fM^[4]. 在生物传感分析中, 钌联吡啶配合物衍生物标记或标签到分子识别物质上合成ECL探针. 因此, 在3个2,2'-联吡啶配体分子(bpy)中, 需要1个配体分子含有能与分子识别物质偶联的基团, 例如, 4,4'-二羧基联吡啶(dcbpy)、4-甲基-4'-羧基联吡啶(mcbpy)、4-甲基-4'-N-羧基琥珀酰亚胺甲酯基联吡啶(mcbpy-NHS)等, 用于与识别物质氨基的偶联; 4,4'-二乙二胺羧基联吡啶、4-甲基-4'-乙二胺羧基联吡啶等, 用于与识别物质羧基偶联. 为了叙述方便, 本文中将这些钌联吡啶配合物衍生物用Ru1表示. 我们将本实验室合成的钌联吡啶配合物衍生物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})\text{-NHS}]^{2+}$ 和地高辛多负载在BSA上, 合成了多负载ECL信号探针(BSA-Ru1-digoxin). 在含0.1 M TPA的0.10 M PBS (pH=7.40)溶液中, 合成的多负载ECL信号探针在铂电极上产生强ECL信号($E = 1.30 \text{ V vs. Ag/AgCl}$). 基于地高辛抗体对多负载ECL信号探针信号强度的抑制和地高辛对地高辛抗体与多负载ECL信号探针的竞争反应, 分别建立了测定地高辛抗体和地高辛(LOD=0.1 ng/mL)的均相ECL免疫分析新方法^[43].

上述均相电化学发光免疫分析方法的优点是涉及试剂或检测物的固定化过程和分离-冲洗过程, 方法易于自动化. 但是, 其缺点是由于基于抗体分子对ECL探针ECL信号的抑制, 方法的线性范围窄. 另外, 由于没有分离-冲洗过程, 应用于复杂样品的实际分析有限.

3.2 电化学发光DNA杂交生物传感法

在ECL DNA杂交生物传感法中, 分子识别物质单链DNA与测定单链DNA的杂交原理遵从Watson-Crick碱基配对规则. 通常以与待测单链DNA (ss-DNA)部分互补的单链DNA (cs-DNA)作为俘获探针, 而以ECL信号物质Ru1标签与待测单链DNA另一部分互补的单链DNA作为信号探针; 先将俘获探针固定在电极表面, ss-DNA与固定在电极表面的俘获探针和信号探针杂交, 在电极表面形成“夹心”杂交复合物, 冲洗电极后, 将电极置于含共反应试剂的溶液中进行ECL测量, 根据ECL强度的增强对ss-DNA进行定量分析. 本课题组发展了多种DNA杂交传感及信号增强策略, 包括纳米材料多负载探针信号增强^[44,45]、发卡DNA杂交构型

转换^[46]和DNA超夹心放大^[47,48]等策略.

ECL免疫传感方法中的ECL信号探针通常一个抗体分子上可以标记多个电化学发光试剂, 而DNA杂交ECL信号探针上一般1个DNA分子上只能连接1个电化学发光试剂分子. 为了提高待测ss-DNA与ECL探针杂交后形成复合物中电化学发光试剂的个数, 进而提高方法的灵敏度, 我们提出了以金纳米粒子(AuNP)为载体, 将端基巯基化HS-(CH₂)₃-cs-DNA-Ru1自组装在AuNP上, 合成了金纳米负载ECL DNA信号探针; 将端基巯基化的ss-DNA(目标检测物)自组装到金电极表面, 将该组装电极插入金纳米粒子负载的ECL DNA信号探针溶液中进行杂交反应, 在电极表面形成了含金纳米负载ECL DNA信号探针的双链DNA, 冲洗杂交电极后, 将杂交电极插入0.10 M PBS (pH=7.40)-0.10 M TPA溶液中进行ECL测量. 该方法测定目标DNA的检出限为 $5.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ ^[44].

上述方法^[44]的缺点是所测定ss-DNA需要巯基化并需在电极上先固定. 为了克服该缺点, 我们提出了三段DNA杂交策略, 即根据所测定的ss-DNA1, 设计与所测定的ss-DNA1完全匹配的俘获ss-DNA2和信号ss-DNA3. 将端基氨基化的信号ss-DNA3和被乙二胺修饰后的含氨基连接基团的Ru1, 通过共价键连接到羧基化的单壁碳纳米管表面组成多负载信号探针. 将端基巯基化俘获ssDNA2自组装到金电极表面制成DNA俘获电极. 将该电极插入待测的ss-DNA1溶液进行杂交反应, 再将冲洗杂交后的电极再插入多负载信号探针溶液进行杂交反应, 最后将冲洗三段杂交后的电极插入0.10 M PBS (pH =7.40)-0.10 M TPA溶液中进行ECL测量. 该方法测定目标DNA的检出限为 $9.0 \times 10^{-15} \text{ M}$ ^[45].

上述方法^[45]的优点是可以制备ECL DNA捕获电极, 缺点是测定过程过于复杂. 为了简化测定步骤, 实现真正意义上DNA杂交ECL传感测定, 我们提出了发卡DNA (hairpin DNA)杂交构型变化ECL传感器新策略^[46]. 设计合成了一端为巯基, 另一端连接钌联吡啶配合物衍生物的发卡DNA的信号探针, 将该探针自组装到金电极表面制成发卡DNA ECL传感器. 将该传感器插入待测的HIV基因溶液中进行杂交反应, 然后进行ECL测量. 由于杂交后, 发卡DNA探针打开, 钌联吡啶配合物衍生物一端远离电极表面, 电化学发光强度降低. 根据ECL的降低可进行HIV基因的测定. 我们提

出的基于发卡DNA构型变化进行DNA测定的方法, 检出限为 9×10^{-11} M. 该方法可实现单碱基错配DNA的检测, 极大地提高了方法的选择性, 也由于信号探针固定再电极上也实现了杂交后电极免冲洗, 具有广泛的应用前景.

我们还发展了免标记超级杂交电化学发光DNA杂交生物传感新方法^[47,48]. 以人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)基因(38-mer ss-DNA)为检测物, 设计了一个端基巯基化俘获cs-DNA和两个辅助cs-DNA探针. 将端基巯基化俘获cs-DNA自组装在金电极表面, 将该自组装电极先插入待测HIV-1基因进行杂交, 然后在具有两个辅助cs-DNA探针的溶液中, 在金电极表面形成长链超级杂交双链DNA, 再将该电极浸入含有邻菲罗啉钌金属配合物 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (为ECL插入剂)的溶液中, $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ 插入到长链超级杂交双链DNA中, 测量ECL强度, 根据ECL强度的增强进行HIV-1基因的测定, 该方法的检出限为0.022 pM^[47].

我们以2-苯基苯并噻唑(bt)为主配体, 5,6-二甲基-1,10-菲罗啉(dmphen)为辅助配体, 合成了环铱金属配合物 $[(\text{bt})_2\text{Ir}(\text{dmphen})](\text{PF}_6)$, 发现该环铱金属配合物可作为双链DNA的ECL插入剂. 利用该ECL插入剂, 利用上述原理^[47], 建立了测定micro-RNA的免标记超级杂交电化学发光DNA杂交生物传感新方法, 该方法的检出限为13 fM^[48].

DNA的甲基化和羟甲基化常发生在胞嘧啶(C)的C-5位置. 该甲基化胞嘧啶的DNA简称为5-mC-DNA而羟甲基化胞嘧啶的DNA简称为5-hmC-DNA. 5-mC-DNA和5-hmC-DNA被认为是癌症等疾病的重要生物标志物. 我们围绕DNA甲基化检测开展了一些初步的研究工作. KRuO_4 氧化5-hmC-DNA产生醛基化胞嘧啶(C)的DNA, 该产物上醛基与ABEI的氨基缩合反应将ABEI偶合于原5-mC-DNA上, 测定ABEI的电化学发光便可测定5-hmC-DNA. 利用巯基自组装方法将捕获5-hmC-DNA的端基修饰巯基的ss-DNA固定到金电极表面, 与待测的5-hmC-DNA杂交后, 利用上述提出的策略进行测定, 建立了测定5-hmC-DNA生物传感新方法, 方法检出限达 1.4×10^{-13} M^[49].

我们还发展了基于目标物结合诱导的DNA链置换(binding-induced DNA strand displacement, BINS D)同时测定两种 N^6 -甲基腺苷miRNA ($m^6\text{A-Let-7a-5p}$ 和 $m^6\text{A-miR-17-5p}$)癌症生物标志物的免冲洗ECL生物传

感新方法. 该ECL生物传感法集成了“三重双分辨”策略, 即集成了空间和电位分辨、杂交和抗体识别结合以及ECL发光和猝灭的双分辨的策略. 通过将两种ECL试剂(金纳米粒子/g- C_3N_4 纳米片, 钌联吡啶衍生物/金纳米粒子/Nafion)和捕获DNA探针分别固定在玻碳电极的两个不同区域, 制备成分区域修饰电极; 选择 $m^6\text{A-Let-7a-5p}$ 和 $m^6\text{A-miR-17-5p}$ 作为两种模型分析物, 而 $m^6\text{A}$ 抗体-DNA3/二茂铁-DNA4/二茂铁-DNA5被设计为 $m^6\text{A}$ 结合探针, DNA6/DNA7被设计为与DNA3的杂交探针, 以释放猝灭探针二茂铁-DNA4/二茂铁-DNA5. 杂交和识别结合过程导致来自两个探针通过BINS D的ECL信号猝灭. 通过ECL强度的降低实现对两种 N^6 -甲基腺苷miRNA测定, 两种 $m^6\text{A-RNA}$ 的检出限为0.03 pM. 所发展方法具有免冲洗的优点^[50]. 该工作所提出的策略可以扩展到通过改变抗体和杂交探针序列来发展同时测定其他甲基化修饰RNA的新方法.

目前发表的大多数DNA杂交ECL生物传感方法或传感器论文主要围绕DNA扩增策略的研究, 主要包括三个方面: 一是增加目标DNA分子数量的扩增策略; 二是增加信号DNA数量的扩增策略; 三是增加信号物质负载量的杂交型DNA扩增策略. 但是, 已经成功商业化应用的聚合酶链式反应(PCR)、杂交链式反应(HCR)和滚环扩增反应(RCA)等技术已经可对几个DNA按指数级扩增到比较高的浓度. 因此, 从检出限和实际临床应用角度来看, DNA杂交型ECL杂交传感方法无法与现在的DNA数字PCR荧光方法相竞争; 对于不能扩增的miRNA, 特别是DNA的甲基化和羟甲基化测定, ECL生物传感方法具有一定的发展前景.

3.3 电化学发光适配体生物传感法

适配体(aptamer)是基于指数富集的配体系统进化技术(SELEX)从随机寡核苷酸库中筛选获得的寡核苷酸序列, 可以与多种目标分子(包括金属离子、小分子、蛋白质、病毒、癌症细胞等)进行高亲和力的结合, 可作为新的分子识别物质^[51,52]. 与通过动物获得的抗体分子识别物质相比, 适配体具有可人工合成和合成物间具有良好的一致性, 可作为多种目标分子的分子识别物质等优点. 1999年, Bruno等^[53]报道了基于适配体-磁珠-电化学发光夹心法策略应用于SELEX技术筛选炭疽孢子的适配体.

2006年开始, 本课题组^[54]开展了基于适配体的

ECL生物传感分析法研究. 2007年, 我们设计了一种基于适配体结合目标小分子药物可卡因后构型变化的电化学发光适配体生物传感器. 可卡因适配体的5'端修饰巯基, 3'端共价键连接钉联吡啶衍生物, 合成了ECL适配体探针. 该探针自组装在金电极表面构建了测定可卡因的ECL适配体生物传感器. 在可卡因存在时, 适配体与可卡因结合使适配体发生构象转变, 远离电极表面的钉联吡啶配合物衍生物接近电极表面, 电化学发光强度增强. 该方法测定可卡因的检出限为 1.0×10^{-9} M.

为了克服上述基于ECL试剂连接适配体的构型变化所构建的电化学发光适配体生物传感器高背景的不足, 我们设计了一种信号off/on型电化学发光适配体生物传感器^[55]. 将凝血酶(thrombin)的适配体(Apt)上连接一段巯基化的ss-DNA1所组成的HS-(CH₂)₆-ss-DNA1-Apt自组装到金电极表面, 将与ss-DNA1完全配对的钉联吡啶配合物衍生物标签的cs-DNA1-Ru1和二茂铁(Fc)标签的与Apt完全配对的Fc-cApt, 杂交到电极表面上. 由于二茂铁对钉联吡啶配合物衍生物的ECL信号的淬灭作用, 此时ECL强度很小; 当有待测物凝血酶存在时, 凝血酶与电极上适配体结合, 使ECL淬灭的Fc-cApt片段离开电极, ECL强度增大, 建立了测定凝血酶的off/on型电化学发光适配体生物传感新方法, 该方法的检出限为 6.0×10^{-11} M^[55].

为了进一步降低测定方法的检出限提高方法的灵敏度, 我们构建了纳米材料信号放大的电化学发光适配体生物传感器^[55]. 将一段俘获巯基化ss-DNA自组装在金纳米粒子上, 将该金纳米粒子通过双巯基化合物自组装到金电极表面, 再将含凝血酶适配体被钉联吡啶配合物衍生物标签的ss-DNA (ECL探针)杂交到金纳米粒子上. 当有待测物凝血酶存在时凝血酶与电极上ECL探针杂交, 杂交复合物离开电极表面, ECL降低, 该方法的检出限为 8×10^{-13} M^[56].

为了提高传感器的灵敏度, 我们还提出了构建邻位辅助探针诱导的适配体构型变化的ECL适配体生物传感器^[56]. 先将巯基化的凝血酶适配体自组装到金电极表面, 与凝血酶适配体互补的被钉联吡啶配合物衍生物标签的ss-DNA (信号DNA)杂交形成双链DNA, 再将一端巯基化的辅助DNA探针自组装到金电极表面. 当有凝血酶存在时, 凝血酶与电极上凝血酶适配体杂交, 解旋了部分信号DNA, 并使其与邻位辅助探针

杂交, 使钉联吡啶配合物衍生物标签接近电极表面, ECL强度增强, 该方法测定凝血酶的检出限达 2.0×10^{-15} M^[57].

免标记ECL生物传感器因其简单而备受研究者的关注. 适配体的磷酸骨架带负电荷可与带正电荷Ru(bpy)₃²⁺静电作用结合而构建免标记ECL适配体传感器. 将巯基化的溶菌酶(lysozyme)适配体自组装到金电极表面, Ru(bpy)₃²⁺静电作用结合到修饰适配体探针的电极表面, 产生的电化学发光响应. 而当测试溶液中溶菌酶与电极上的溶菌酶适配体结合后, 静电作用结合的Ru(bpy)₃²⁺量减小, 产生的ECL强度降低, 基于此可测定溶菌酶, 方法的检出限为 1.2×10^{-10} M^[58].

最近, 我们发展目标诱导适配体构型变化的免标记ECL适配体传感新方法, 先将一个巯基化的辅助ss-DNA自组装到金电极表面, 再将多巴胺适配体杂交到电极上形成双链DNA, 嵌入ECL插入剂[Ru(phen)₃]²⁺, 产生强的ECL; 当有多巴胺存在时, 多巴胺与电极上多巴胺适配体杂交而使双链DNA解旋脱离电极表面, 电极表面嵌入的[Ru(phen)₃]²⁺量减小, 基于此建立了目标诱导适配体构型变化的免标记ECL适配体传感新方法, 该方法测定多巴胺的检出限为0.05 nM, 并成功地应用于脑脊液和加标血样中多巴胺的测定^[59].

在金电极上自组装巯基化ss-DNA或适配体构建ECL适配体传感器, 其优点是通过Au-S键很容易将巯基化ss-DNA或适配体固定在金电极表面. 但是, 金电极存在两个方面的问题: 其一, 以钉联吡啶衍生物-TPA为检测体系, 在金电极上的电化学发光强度比玻碳电极(GCE)的电化学发光强度小10倍^[60]; 其二, 在高电位(正于0.68 V vs. SCE)下, Au-S断裂, 而只能构建一次性ECL适配体传感器. 为了将适配体或ss-DNA共价键偶合到碳电极表面, 我们发展了在碳电极上双共价键构建可重复使用的ECL适配体传感器. 对氨基苯磺酸在石墨电极(PIGE)上氧化形成氨基自由基苯磺酸被共价键偶联到PIGE上, 再将钉联吡啶衍生物标签化的端氨基可卡因适配体与PIGE上的氨基自由基苯磺酸共价键偶联, 构建了双共价键偶联的ECL适配体传感器(图2)^[61], 该方法测定可卡因的检出限为10 pM. 该策略建立的ECL传感方法显示了高的灵敏度、稳定性和重复性. 我们还发展了利用电化学接枝和点击化学(click chemistry)技术将钉联吡啶衍生物标签化的可卡因适配体共价键偶联到GCE上, 构建了基于适配体

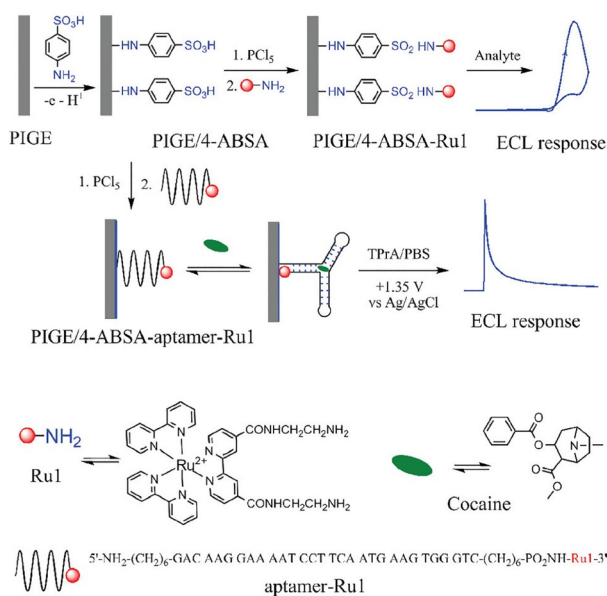


图2 (网络版彩图) 电化学发光化学传感器和可卡因电化学适配体生物传感器示意图^[61]

Figure 2 (Color online) Schematic diagram of the fabrication of ECL chemical sensor and ECL aptamer-based biosensor for cocaine detection^[61].

构型变化的测定可卡因的ECL适配体传感器^[62].

在上述PIGE上共价键固定适配体的基础上,我们以*N*-2-羧酸吡咯为功能化试剂与吡咯共聚合形成了表面带羧基的聚吡咯导电纳米粒子,以该导电纳米粒子为载体合成了多负载钌联吡啶衍生物和凝血酶适配体的纳米信号探针,以该纳米信号探针为基础,建立了夹心式电化学发光法测定凝血酶的新方法,凝血酶的检出限为30 nM,大大提高了方法的灵敏度^[63].

单壁碳纳米管(SWNTs)吸附在GCE能增强钌联吡啶衍生物的ECL强度,基于此,我们将钌联吡啶衍生物标签化的腺苷(adenosine)适配体吸附固定在SWNTs吸附修饰的玻璃碳电极,当腺苷与吸附在SWNTs上ECL适配体探针结合后,使其脱离电极, ECL强度降低,建立了测定腺苷的ECL适配体传感新方法^[64].我们还基于凝血酶与ABEI标签化的凝血酶适配体结合前后位阻的变化,建立了测定凝血酶的均相电化学发光适配体传感新方法^[65].

最近, Yang和Tan课题组^[66]回顾了基于适配体检测的最新进展,并提出了基于适配体的精确医学液体活检的机遇和挑战. 基于适配体为分子识别物质发展测定金属离子如 K^+ 、小分子药物如可卡因和抗原/抗体的ECL传感方法具有广阔的前景,合成筛选具有高

亲和性的适配体仍是今后重点研究的方向.

3.4 电化学发光凝集素生物传感法

凝集素(lectins)是从植物或动物中提取的蛋白质,可识别结合特定糖结构表位的蛋白质^[67]. 凝集素可作为分子识别物质,且稳定性好. 伴刀豆蛋白A (*Concanavalin A*, Con A)又称刀豆凝集素,和小麦胚凝集素(*wheat germ agglutinin*)是豆科植物凝集素. 基于凝集素与病毒或细胞表面的糖的特异性结合,我们发展了多种电化学发光糖/凝集素生物传感器^[68,69].

我们以钌联吡啶配合物衍生物为信号物质,以Con A为分子识别物质,将钌联吡啶衍生物Ru1标记在Con A上合成了电化学发光探针(Ru1-ConA);通过在石墨电极上吸附羧基化的单壁碳纳米管,将合成的电化学发光探针通过1-乙基-(3-(二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)/*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)共价结合在碳纳米管修饰的石墨电极表面上,构建了ECL凝集素传感器. 电化学发光强度的降低值与目标大肠杆菌*E. coli* O157:H7(灭活)浓度的对数在 $5.0 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^5$ cells/mL范围内呈良好的线性关系,方法的检出限为127 cells/mL,该传感器对革兰氏阳性菌(金黄葡萄球菌和藤黄微球菌)几乎没有响应,而对革兰氏阴性菌——大肠杆菌有响应,并揭示了对大肠杆菌有响应的原因,测得Ru1-ConA和甘露聚糖的结合常数为 $5.18 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$,研究了Ru1-ConA与单糖的相互作用. 研究表明,凝集素伴刀豆球蛋白与葡萄糖和甘露糖结合,而不与半乳糖和鼠李糖结合^[68].

为了提高ECL凝集素生物传感器的选择性和灵敏度,我们发展了抗体-凝集素双识别物质的ECL生物传感器. 以前列腺特异性抗原(PSA)单克隆抗体为捕获探针,以钌联吡啶衍生物标记的小麦胚芽凝集素为信号探针,发展了一种测定前列腺PC-3癌细胞的高选择性和灵敏度ECL凝集素生物传感新方法. 将捕获探针共价固定在氧化石墨烯涂层的玻璃碳电极上,选择性捕获目标PC-3细胞后,再与将信号探针结合形成夹心复合物. 在TPA存在下,电极上夹心复合物的ECL强度与PC-3细胞浓度对数成正比,方法的线性范围为 $7.0 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^4$ 个/mL,检出限为 2.6×10^2 个/mL^[69].

基于凝集素的ECL生物传感方法不仅可以检测生物标志物的含量,还可以检测生物标记物的异常糖基化^[68]. 然而,与抗体相比,凝集素与特定目标糖化物之

间的亲和力较低。

3.5 电化学发光DNA酶催化生物传感法

1994年, Breaker和Joyce^[70]发现DNA具有催化活性, 这类具有催化功能的DNA分子简称为脱氧核酶或DNA酶(DNAzyme)。脱氧核酶是通过体外筛选获得的一类具有催化活性的DNA分子, 具有分子相对较小、结构稳定、催化效率高、易于合成和修饰等优点。根据其催化功能可以分为切割RNA酶、切割DNA酶、连接酶、过氧化物酶、N糖基化激酶等类型。其中切割RNA的脱氧核酶包括两个结构域: 由15个核苷酸构成的催化结构域和两侧分别与底物RNA配对的7~8个脱氧核苷酸构成的结合结构域。RNA底物通过碱基配对与脱氧核酶两端的底物结合区结合, 中间有一个未配对的嘌呤残基。这个嘌呤残基与其相邻的嘧啶残基之间的磷酸二酯键就是脱氧核酶催化切割的位点。本课题组^[71]设计了一种信号增强型检测 Pb^{2+} 的电化学发光脱氧核酶生物传感方法。以8-17DNAzyme为分子识别物质, 以5'端修饰氨基、3'端标记钌联吡啶衍生物(Ru1)的酶链17E (简称Ru1-17E')作为电化学发光探针。首先将Ru1-17E'共价固定于对氨基苯甲酸修饰石墨电极表面, 然后将互补底物链与电极表面的Ru1-17E'杂交形成刚性的DNA双链。当不存在 Pb^{2+} 时, 电极上的双链DNA保持固定的刚性构象, 使得Ru1远离电极表面, 导致ECL信号较低; 当 Pb^{2+} 存在时, DNA双链变为自由卷曲的单链, 使得Ru1接近电极表面, 导致电化学发光信号增强。该传感方法有较高的灵敏度、稳定性、选择性和再生性等优点, 测定 Pb^{2+} 检出限为1.4 pM。然而, 与原子吸收光谱法相比, 这种ECL生物传感器的灵敏度和检出限并没有显著的优势。

本课题组^[72]还设计了一种以富含T碱基的寡核苷酸作为分子识别物质的ECL生物传感器用于测定 Hg^{2+} 浓度。 Hg^{2+} 存在时, 基于 Hg^{2+} 与胸腺嘧啶(T)的高度特异性相互作用, 形成T-Hg-T结构, 使寡核苷酸的结构由直链变为发卡式, 从而使信号物质接近电极表面导致ECL信号增强。但在上述体系的实际样品测定中, 如果金属离子与络合剂形成络合物, 如环境水样中的腐殖酸, 会产生负干扰。

最近, Lu和Li课题组^[73]对基于DNA酶的生物传感方法进行了全面的综述。基于DNA酶为分子识别物质发展测定金属离子如 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 的ECL传感方

法, 与原子吸收光谱法相比具有一定局限性。现在DNA酶已经发展为可作为小分子和蛋白质的分子识别物质^[73], 基于DNA酶的新功能发展测定小分子和蛋白质的生物传感新方法具有广阔的前景。

3.6 电化学发光寡肽生物传感法

通过噬菌体技术可筛选出对目标物(蛋白质)特异性识别的寡肽。该特定寡肽可作为新的分子识别物质, 进行蛋白质生物标志物的测定。由于合成的寡肽经济可靠、具有优异的稳定性, 且比抗体更易于在分子水平上进行修饰改造等优点, 特定寡肽已被研究者广泛认为是很有前途的生物识别物质^[74]。根据寡肽与蛋白质相互作用的不同, 可分为亲合型、切割型和磷酸化型等。

3.6.1 电化学发光寡肽亲合生物传感法

我们提出了以特定结合心肌肌钙蛋白I (cTnI)直链寡肽(FYSHSFHENWPS-K)为分子识别物质, 以包埋钌联吡啶配合物衍生物信号试剂和表面用戊二醛连接的分子识别物质(FYSHSFHENWPS-K)的脂质体(磷酸胆碱、胆固醇和磷酸乙醇胺)为ECL信号探针; 异硫氰酸包被的磁珠与分子识别物质(FYSHSFHENWPS-K)发生加成-缩合反应合成了俘获磁珠; 当存在cTnI时, 形成夹心复合物, 进行磁性分离除去多余的ECL信号探针后, 用乙醇溶解夹心复合物中的信号探针, 释放出大量的联吡啶配合物衍生物信号试剂, 在GCE上进行ECL测定, 该方法测定cTnI的检出限为4.5 pg/mL^[75]。

为了简化测定步骤, 我们以直链寡肽FYSHSFHENWPS为cTnI分子识别物质, 一端增加一个半胱氨酸(C)以便自组装在修饰电极的表面金纳米粒子上, 另一端增加一个赖氨酸(K)以便标签钌联吡啶配合物衍生物。基于此, 建立了测定cTnI的夹心型ECL寡肽亲合生物传感新方法^[76]。

延续上述的设计思想, 我们将测定物质扩展到细菌的测定^[77]。以大肠杆菌O157:H7为目标测定物质, 以抗微生物肽Magainin I (GIGKFLHSAGKFGKAFV-GEIMKS)为分子识别物质, 构建了一种在金电极上自组装抗微生物肽结合型ECL生物传感器用于检测大肠杆菌O157:H7, 检出限为 1.2×10^2 CFU/mL^[77]。该ECL寡肽亲合生物传感法对革兰氏阴性大肠杆菌O157:H7和革兰氏阳性大肠杆菌、致病性大肠杆菌和非致病性大

肠杆菌具有良好的选择性。

3.6.2 电化学发光内肽酶生物传感法

蛋白酶(proteases)是一大类蛋白水解酶,包括胰蛋白酶、凝血酶、类胰蛋白酶和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)、基质金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶等,它们与许多疾病如癌症、炎症和感染有关。内肽酶(peptidase)是一种蛋白水解酶,可催化水解非末端氨基酸(即分子内氨基酸)的肽键。基于特异性内肽酶水解切割作用所设计的特定寡肽可作为酶的特定底物。将该特定底物标签ECL试剂后固定在电极或磁珠表面可构建测定内肽酶的ECL生物传感器。1997年,Denmeade等^[78]报道了序列为HSSKLQ的6个氨基酸寡肽可用作测量细胞液中游离的前列腺特异性抗原(PSA,作为内肽酶酶)的底物,并提出游离PSA可以切割HSSKLQ中S-K键。基于此原理,本课题组^[79-81]设计了一系列非均相及均相测定PSA的ECL生物传感分析法。

我们设计ECL探针的策略为:在特定寡肽HSSKLQ的一端加入半胱氨酸(C),使肽链在金电极或Au纳米粒子表面上自组装,而在特定寡肽HSSKLQ的另一端加入赖氨酸(K,游离-NH₂),以标签ECL试剂Ru1,合成PSA的信号探针(CHSSKLQK-Ru1)。将该探针通过巯基自组装在金电极表面构建测定游离PSA的信号降低型ECL生物传感器,方法的检出限为 3.8×10^{-11} g/mL^[79]。

为了构建测定游离PSA的信号增强型ECL生物传感器,我们将金纳米粒子(AuNPs)与全氟磺酸树脂(Nafion)溶液混合物吸附固定在GCE表面,进而将Ru(bpy)₃²⁺通过静电吸附在Nafion膜表面,构建了基础电极(AuNPs/Nafion/GCE);再将CHSSKLQK-Fc猝灭探针自组装在金纳米粒子表面,制成ECL生物传感器。当有游离PSA存在时,游离PSA切割电极表面的寡肽使KLQK-Fc片段离开电极表面,导致ECL信号增强。建立了测定游离PSA的信号增强型ECL生物传感分析新方法,方法的检出限为 8×10^{-13} g/mL^[80]。

为了克服上述方法^[79,80]中寡肽信号探针合成中寡肽信号探针与ECL试剂两种小分子难分离的问题,我们建立了一种简单的在包金磁珠(Fe₃O₄@Au)表面巯基自组装CHSSKLQK-Ru1固相合成磁珠电化学发光探针(Fe₃O₄@Au-CHSSKLQK-Ru1)的新方法,通过磁性分离技术将过量的CHSSKLQK-Ru1除去。当目标物

游离PSA与Fe₃O₄@Au-CHSSKLQK-Ru1反应后, KLQK-Ru1脱离磁珠表面进入溶液,通过测定溶液中KLQK-Ru1的浓度可实现对游离PSA的测定(图3)。我们发展了两种均相ECL测定模式:其一在裸铅笔电极(PGE)上进行均相电化学发光检测,方法的检出限为 5.0×10^{-12} g/mL;另一种是切割后的信号物质通过AuNPs/Nafion/PGE修饰铅笔电极富集进行检测,方法的检出限为 8×10^{-14} g/mL^[81]。

基质金属蛋白酶(MMPs)是锌依赖性的一大类内肽酶,能降解细胞外基质(ECM)中的蛋白质。MMPs在许多疾病(如癌症、心血管疾病和炎症性疾病等)诊断、治疗和预后评估中具有重要作用。不同的基质金属蛋白酶能切割特定寡肽。例如, MMP-2能切割GPLGVRG; MMP-7能切割RPLALWRS; MMP-9能切割LGRMGLPG。按照前述ECL探针的策略,我们发展了一系列应用于测定活细胞释放MMPs的ECL生物传感分析法^[82-85]。例如, Ru1标签的信号降低型测定MMP-2的新方法,检出限为0.7 ng/mL^[82];信号增强型测定MMP-2的新方法^[83]。以新合成的新环铱金属配合物[(pq)₂Ir(dcbpy)] (Ir1, pq=2-苯基喹啉, dcbpy=2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸)为ECL试剂,合成ECL探针(CLGRMGLPGK-Ir1)和钌联吡啶配合物衍生物标签的(CLGRMGLPGK-Ru1),建立了同时测定MMP-2和MMP-7的新方法^[84]。在基础电极AuNPs/Nafion/GCE上,建立测定佛波醇肉豆蔻酸酯醋酸酯(PMA)刺激下癌细胞分泌液释放的MMP-9的ECL传感新方法^[85]。

在上述传感方法的设计中,内肽酶是分析物,而寡肽是分子识别底物。因此,寡肽序列的设计包括主要断

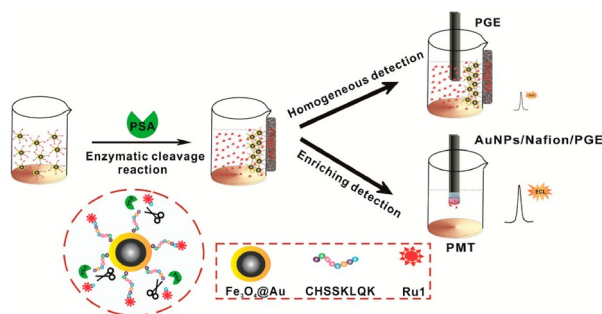


图3 (网络版彩图)基于磁珠电化学发光探针生物切割的电化学发光生物传感示意图^[80]

Figure 3 (Color online) Schematic representation of ECL bioanalytic system based on the biocleavage of ECL bioconjugated magnetic beads^[80].

裂位点、电极连接氨基酸和ECL试剂标记氨基酸等, 对传感方法设计均具有重要意义. 应进一步探索设计具有高选择性的寡肽, 以扩展ECL生物传感分析法测定更多的内肽酶.

3.6.3 电化学发光蛋白激酶生物传感法

蛋白激酶(protein kinase), 又称蛋白质磷酸化酶(protein phosphokinase), 是一类具有酶活性的蛋白质, 通过催化磷酸化反应将三磷酸腺苷(ATP)的磷酸末端转移到特定蛋白质/特定肽的一个或多个特定残基上. 蛋白激酶的过度表达会导致各种疾病, 如糖尿病、侵袭性肿瘤或阿尔茨海默病等. 蛋白激酶A (PKA)又称依赖于cAMP的蛋白激酶A (cAPK), 通过催化磷酸化反应将ATP磷酸末端转移到含有丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)的蛋白质/特定肽的一个或多个羟基上. 含有丝氨酸(S)的特定寡肽可以用作特异性蛋白激酶的分子识别物质. 基于此原理, 我们设计了用于测定酪蛋白激酶II (CK2)和PKA两种蛋白激酶活性的ECL生物传感分析新方法^[86]. 分别以特定寡肽CRRRAD-DSDDDDDD和CLRRASLG为CK2和PKA的识别底物, 这两种特定肽通过Au-S键自组装到金电极上以形成生物传感界面. 在CK2和PKA以及ATP存在时, 肽链上的丝氨酸位点磷酸化, 生成硫代磷酸化的肽, 该硫代磷酸化的肽能与信号物质 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -AuNPs通过Au-S键结合, 在电极表面形成复合物. 在共反应试剂存在下, 电极表面形成的复合物产生电化学发光, 该方法检出限分别为0.008 U/mL CK2及0.005 U/mL PKA. 该ECL法可用于检测血清样中的CK2以及PKA, 有望用于多种蛋白激酶测定和激酶抑制剂的筛选^[86].

为了提高方法的灵敏度和选择性, 在上述所建立方法的基础上, 利用蛋白质A具有与多种抗体结晶区片段(Fc)具有高亲和力这一特性, 将钌联吡啶配合物衍生物标记的蛋白质A用于测定PKA和CK2的通用型ECL探针^[87]. 在单克隆抗磷酸丝氨酸抗体识别磷酸化肽后, 通用型ECL探针在电极表面上与抗磷脂抗体特异性结合, 建立了ECL生物传感方法同时测定PKA和CK2的新方法, 方法的检出限为0.005 U/mL PKA和0.004 U/mL CK2^[87].

我们对基于寡肽的ECL生物传感分析法进行了简要综述^[88]. 对于特定的寡肽其优点是易于合成和设计构建多类型的ECL生物传感新方法, 而其缺点是生物

亲合性低或对于特定的内肽酶和蛋白激酶的选择性差. 基于寡肽所建立的ECL生物传感方法在临床检测应用中, 可能受到实际样品中其他蛋白质或蛋白酶等的干扰.

3.7 杂化识别电化学发光生物传感法

为了改善ECL生物传感的分析特性, 我们还发展了一系列基于DNA杂交策略和抗体或适配体为识别物质的杂化识别电化学发光生物传感新策略.

我们设计合成了甲胎蛋白(AFP)抗体(Ab1, Ab2)为识别物质的杂化探针(Ab1-DNA2, Ab2-DNA3), 以二茂铁衍生物标签的DNA4作为淬灭探针(DNA4-Fc), 以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /AuNPs/Nafion/GCE为基础电极, 将巯基化的俘获DNA1探针自组装到所制备基础电极的AuNPs上制成自组装电极; 测定AFP时, 将自组装电极插入AFP、Ab1-DNA2、Ab2-DNA3、DNA4-Fc混合溶液中, 在AFP的诱导下, 在电极表面形成DNA1/Ab1-DNA2·AFP·Ab2-DNA3/DNA4-Fc复合物, 由于DNA4-Fc靠近电极表面导致电化学发光强度降低, 基于此建立了测定AFP的信号降低型ECL新方法, 该法测定AFP的检出限为0.04 ng/mL^[89].

我们还发展了免信号物质标记目标物诱导邻位杂交电化学发光免疫分析新策略. 将末端含巯基ss-DNA3自组装在金电极表面, 以能部分与ss-DNA3杂交的两个特定ss-DNA分别连接在两个抗体上(DNA1-Ab1和DNA2-Ab2)作为双识别杂化探针, 当有目标分析物AFP存在时, 甲胎蛋白与两个抗体结合形成“夹心复合物”, 诱导两个抗体上的ss-DNA1和ss-DNA2与金电极表面自组装的ss-DNA3杂交形成ds-DNA, 并使电化学发光信号物质 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 嵌入杂交的ds-DNA中. 在TPA存在下, 产生电化学发光信号. 基于此, 建立了一种基于邻位杂交“非信号物质标记”的测定AFP的电化学发光免疫传感新方法, 该方法的检出限可达6.2 pg/mL. 将该方法成功地应用于检测AFP表达的癌细胞(60个MCF-7细胞/100 μL 细胞悬液)和区分不同细胞(MCF-7 cells、A549 cells、HeLa cells和RAW264.7 cells)表面AFP表达量^[90].

为了提高传感平台的再生性和构建信号增强型目标诱导邻位杂交ECL免疫分析新方法^[91], 我们以急性心肌梗死的生物标志物包括cTnI、心肌肌钙蛋白T(cTnT)和肌红蛋白(Myo)作为模型蛋白生物标志物, 相

应的抗体被用作识别探针, 标记了钌联吡啶配合物衍生物的DNA5被选作ECL信号探针(DNA5-Ru1). 将捕获探针DNA1共价偶联到玻碳电极表面, 再将竞争ss-DNA2与DNA1杂交来制得生物传感基础电极(平台). 将该基础电极插入含有测定物、识别探针(DNA3-Ab1和DNA4-Ab2)、信号探针和TPA的溶液中共孵育后, 模型蛋白生物标志物与两种识别探针结合, 从而诱导DNA杂交, 使DNA5-Ru1中的Ru1接近电极表面而使ECL信号增强, 无分离条件下ECL测量(图4), 发现DNA1杂交碱基数和长度以及DNA5-Ru1与DNA2对DNA1的竞争杂交具有重要作用. 基于此, 建立了检测三种急性心肌梗塞的生物标志物Myo、cTnI和cTnT的邻位杂交均相电化学发光分析新方法. 该方法测定cTnI、cTnT和Myo的检出限分别为0.4 pg/mL、0.4 pg/mL和0.5 ng/mL. 该法具有免冲洗均相检测省时、操作简便、一步完成、灵敏度高等优点, 制备的生物传感基础电极具有良好的稳定性和再生性, ECL信号探针具有通用性^[91].

4 磁珠电化学发光生物传感法

生物传感界面的构筑决定了生物传感方法的准确度和灵敏度及其应用. 在生物传感界面(电极、磁珠等)上固定分子识别物质的策略一般有两种: 一种是定向偶联, 分子识别物质端基为可偶联基团的分子识别物质, 如DNA、适配体、特异性寡肽等; 另一种是随机偶联, 分子识别物质是含有多个偶联基团的分子识别物质, 如抗体、酶等. 实际上, 电化学和光学生物传感器中构建生物界面的常规策略都可以用于电化学发光生物传感器的传感界面构筑, 如物理吸附、包覆、自组装和共价偶联等方法. 但是, 在电化学发光生物传感器界面构筑中很少使用物理吸附方法, 这是因为捕获探针由此方法固定后容易脱落. 磁珠电化学发光生物传感界面的构筑策略与电极传感器界面的构筑策略基本相同. 因为在磁珠合成过程中可以在其表面修饰更多的基团, 如链霉亲和素(streptavidin, SA)、环氧基团、甲苯磺酰基、羧基等, 所以磁珠表面固定化分子识别物质的策略比电极表面的固定化的策略更多.

在电化学发光生物传感方法研究中, 磁性纳米颗粒(MNPs)和磁性微米颗粒(即磁珠, MBs)通常作为固定分子识别物质的载体, 可用于蛋白质、酶和DNA等

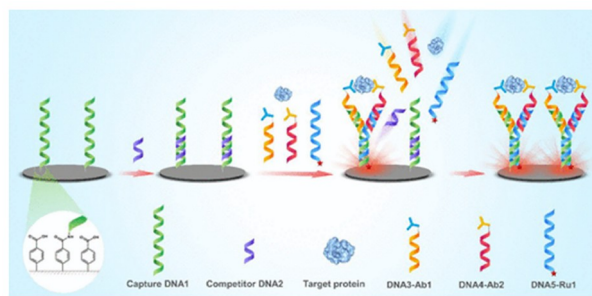


图4 (网络版彩图)动力学竞争和目标物诱导邻位杂交分离电化学发光免疫传感示意图^[91]

Figure 4 (Color online) Schematic diagram of the separation-free ECL immunoassay incorporating target assistant proximity hybridization and dynamically competitive hybridization ^[91].

生物分子的分离和检测, 加速了高灵敏度自动化免疫分析方法的发展. 从1991年Blackburn等^[4]系统报道了基于钌联吡啶配合物衍生物功能化MBs用于全自动ECL分析仪器进行免疫法检测和DNA杂交检测以来, 商业化全自动ECL免疫分析仪(如Origen I、Roche、Elecsys和国内安塞、普门科技等)已广泛应用于临床诊断中测定多种生物标志物. 该类仪器使用了可批量合成的功能性MBs捕获探针、易于电化学处理的贵金属(Au、Pt)工作电极、控温震动孵育装置、流动泵冲洗过量的信号探针等, 使测定时间缩短, 实现了计算机控制的自动化分析. 然而, 基于Ru(bpy)₃²⁺-TPA体系的ECL方法在Au和Pt工作电极(Origen I分析仪)上的灵敏度低于GCE^[60]. 此外, 全自动ECL免疫分析仪的价格比简单ECL分析仪昂贵得多. 为了开发基于简单ECL分析仪的高灵敏度磁珠ECL生物传感器, 并在基础研究和临床诊断之间建立桥梁, 我们设计了一系列磁珠ECL生物传感分析法.

基于磁珠的结合型ECL生物传感分析方法与电极上原理类似, 将电极表面的生物亲和反应或DNA杂交反应转移到在磁珠表面进行. 我们设计了基于磁珠及一次性金纳米电极(Au NEE)的ECL生物传感方法用于检测糖类抗原19-9 (CA 19-9)^[92]. 以链霉亲和素磁珠(MB@SA, $\phi=2.8\ \mu\text{m}$)上连接生物素化的CA19-9抗体(biotin-Ab1)作为捕获探针(MB@SA-biotin-Ab1), 以Ru1标记的CA 19-9抗体(Ru1-Ab2)为ECL信号探针. CA 19-9存在时, 磁珠上形成三夹心复合物, 之后将其转移到金纳米阵列电极上, 在TPA溶液中进行ECL测量. 该工作设计的Au NEE与常规金电极相比, Ru(bpy)₃²⁺-

TPA体系的ECL强度高12.9倍, luminol-H₂O₂体系的ECL强度高19.6倍, 这主要归因于Au NEE的扩散重叠和Au NEE的边缘效应. 该生物传感方法检测CA 19-9的检出限为0.4 U/mL. Au-NEE具有成本低、非特异性吸附小等优点, 可作为一种实用的一次性电化学发光平台.

我们还建立了一种在磁性纳米粒子表面负载脂膜二茂铁/钌联吡啶配合物用于测定PSA的切割型ECL生物传感新方法^[93]. 如图5所示, 以疏水长链烷基吡啶配合物[Ru(bpy)₂ddcbpy]PF₆(Ru)作为电化学发光信号物质(A), Cholesterol-Ahx-HSSKLQK-Fc(Chol-pep-Fc)作为识别-猝灭探针(A), 将两种探针插入纳米磁粒Fe₃O₄ NP@lipid (~200 nm)的脂膜中形成MMNP (Fe₃O₄ NP@lipid/Ru1/chol-pep-Fc, B). 当分析物PSA存在时, 识别-猝灭探针中SK的酰胺键断裂, Fc猝灭剂远离MMNP, 导致裸GCE上ECL强度增加(C). Chol-pep-Fc嵌入磁性纳米粒子表面信号探针磷脂膜的电化学发光猝灭常数($2.68 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)比嵌入ITO电极的电化学发光猝灭常数($1.95 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)大137倍, 比均相溶液两者(Fc-COOH+[Ru(bpy)₂ddcbpy]²⁺)的电化学发光猝灭常数($6.86 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)大391倍. 该方法测定PSA的检出限为3 pg/mL. 基于磁珠上的切割型ECL生物传感方法可以很容易地扩展到测定其他蛋白酶.

为了获得磁珠型电化学发光生物传感器的高灵敏度和高重现性, 我们发展了基于磁珠型电化学发光生物传感方法在双磁场作用下有效驱动富集的增强信号新策略, 建立了磁珠型生物传感器高灵敏度测定癌症生物标志物和外泌体的电化学发光新方法^[94], 提出了包括用抗磁性光电倍增管代替传统的光电倍增管; 用放置在玻碳电极内的圆盘磁体代替堆叠的环形圆盘磁体, 以及使用外部磁体驱动增加磁珠均匀预浓缩于磁性电极表面等一系列信号增强策略. 实验结果表明, 通过本工作提出的三种信号增强策略, 可使链霉亲和素包被磁珠(MB@SA)应用于测定Ru1标记的生物素化单链DNA的灵敏度提高45倍. 通过测定PSA和外泌体来评估所发展的基于磁珠的电化学发光传感检测平台. 对于PSA, MB@SA生物素-Ab1 (PSA)作为捕获探针, Ru1标记的Ab2 (PSA)用作ECL探针; 对于外泌体, MB@SA生物素-适体(CD63)作为捕获探针, Ru1标记的Ab (CD9)作为ECL探针. 实验结果表明, 发展的新策略可以将磁珠型电化学发光生物传感器测定PSA和

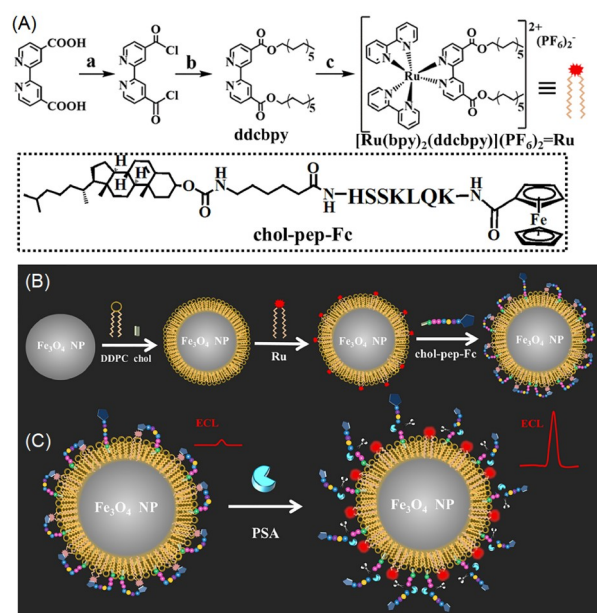


图5 (网络版彩图) (A) [Ru(bpy)₂ddcbpy]PF₆合成路线和chol-pep-Fc结构图; (B) Fe₃O₄ NP@lipid/Ru1/chol-pep-Fc合成; (C) 基于PSA切割识别-猝灭探针测定PSA示意图^[93]

Figure 5 (Color online) (A) Synthetic route of [Ru(bpy)₂ddcbpy]PF₆ and chemical structure of the chol-pep-Fc. (B) Preparation of MMNP (Fe₃O₄ NP@lipid/Ru1/chol-pep-Fc). (C) Approach for the determination of PSA using MMNP with ECL recognition-quenching probes^[93].

外泌体的灵敏度提高33倍, PSA的检出限为0.28 ng/mL, 外泌体的检出限为490 个/mL.

基于目标物与特定抗体结合诱导磁珠表面单链DNA的邻位杂交反应, 我们还建立了一种免洗涤磁珠型目标物诱导邻位杂交测定多种蛋白生物标志物电化学发光免疫分析新方法^[95]. 以AFP作为模型分析物, 用生物素-DNA1结合的链霉亲和素包被的磁性微珠(MMB@SA·生物素-DNA1)作为通用型捕获磁珠, 用DNA2或DNA3标记的相应两种抗体作为双杂交识别探针, 用Ru1标记的DNA4-10A作为通用ECL信号探针(DNA4-10A-Ru1). 当将捕获磁珠加入到混合物溶液(包含分析物、混合识别探针、信号探针和三正丙胺)中时, 在捕获磁珠表面形成生物复合物. 将所得磁珠磁性吸附于玻碳电极表面后, 在没有洗涤步骤的情况下进行ECL测量. 本工作推导了一个测量磁珠表面杂交反应二阶速率常数的ECL模型. 我们发现在旋转模式下磁珠表面杂交反应的速率常数提高了1.6倍; 合适的信号探针DNA长度可以提高信噪比. 基于上述原理建

立的免洗涤磁珠型目标物诱导邻位杂交测定甲胎蛋白电化学发光免疫分析新方法的检出限为0.04 ng/mL. 本文所发展的策略只改变抗体, 就可应用于多种生物标志物的测定, 如D-二聚体和肌红蛋白的测量, D-二聚体的检出限为0.1 ng/mL, 肌红蛋白的检出限为1.1 ng/mL^[95].

为了消除磁珠的光屏蔽效应, 设计制备了一种基于磁珠表面切割反应电化学发光测定蛋白酶的一次性薄层毛细作用填充装置, 该装置可基于重力将磁珠移出发光检测区域从而消除了磁珠的光屏蔽效应^[96]. 在聚对苯二甲酸乙二醇酯树脂(PET)板上设计反应区和检测区, 在该检测区印制碳糊工作电极和碳糊对极以及碳糊/银/氯化银参比电极, 使用适当厚度的双面贴将该印制电极的PET板与透明玻璃片黏接在一起制成薄层池. 以PSA作为模型分析物, 以Ru1标签的特异性肽(生物素-HSSKLQK-Ru1)为ECL探针, 将该探针结合于链霉亲和素包被的磁珠表面作为探针MB (MB@SA生物素-HSSKLQK-Ru1). 当含PSA分析物的样品溶液加入到PET板上加样区时, 由于薄层池的毛细作用使溶液流入薄层池的反应区, 在反应区PSA与探针MB表面上的肽之间发生生物裂解反应. 在外磁铁作用下, 磁珠被吸引固定于反应区, 将薄层池于水平面倾斜90°, 在重力作用下, 含有释放的Ru1部分的溶液流到装置检测区域中的工作电极表面, 进行电化学发光测定, 即消除了磁珠的光屏蔽效应. 在选定条件下, 所建立的ECL方法测定PSA的检出限为0.12 ng/mL. 这项工作表明, 所开发的ECL生物传感方法可以消除磁珠的光屏蔽效应, 并以高灵敏度和高选择性测定蛋白酶生物标志物.

最近我们发展了一种抗体和适配体双识别的外泌体电化学发光生物传感分析新方法. 以特异性适配体修饰的磁珠(MBs-(EK)4-EpCAM-适配体)作为捕获探针, 以CD9抗体标记纳米二氧化硅($\text{SiO}_2\text{cRu}(\text{bpy})_3^{2+}$)作为通用ECL信号纳米探针($\text{CD9 Ab-PEG@SiO}_2\text{cRu}(\text{bpy})_3^{2+}$), 外泌体存在时形成夹心型复合物, 结合自动电化学发光分析仪, 建立了一种无需分离的检测癌症外泌体的电化学发光生物传感分析新方法, 实现了外泌体的高灵敏检测, MCF-7外泌体的检出限为13颗/ μL . 基于外泌体上多生物标志蛋白的指纹特征, 发展了用于区分癌细胞和非癌细胞外泌体的自动ECL分析新策略^[97].

基于磁珠电化学发光生物传感法的最大优点是不需要在电极表面构筑传感界面, 可实现全自动化分析, 在临床检测生物标志物方面已经得到广泛应用. 目前存在的问题是磁珠表面对ECL探针的非特异性吸附造成高背景, 需要研究磁珠表面降低非特异性吸附的新策略. 另外, 发展能同时测定多种生物标志物的磁珠电化学发光生物传感法将是十分具有应用前景的研究方向.

5 电化学发光成像生物传感法

电化学发光成像技术是一种强有力的检测癌细胞的分析技术^[22]. 我们研制了一台多功能电致化学发光成像分析仪器, 包括电极移动平台和光电倍增管(PMT)以及电荷耦合器件(CCD)两种光检测模式, 可应用于阵列电极测定多种生物标志物和细胞的ECL成像^[98]. 在此仪器上, 我们发展了基于通用型信号探针和空间分辨的同时检测多种生物标志物的阵列电化学发光生物传感新方法^[99]. 以三种急性心肌梗塞生物标志物Myo、cTnI和cTnT为目标分析物, 以特异性适配体为捕获探针, 以生物素化抗体为识别探针, 以钌联吡啶标记的链霉亲和素的复合物为通用型信号探针, 分别将端基巯基修饰的特异性适配体自组装在阵列金电极表面构建了阵列生物传感平台. 测定时, 阵列传感平台上的捕获探针与目标分析物结合, 再与识别探针和通用型信号探针结合, 使用PMT或CCD作为检测器记录电化学发光信号. 使用PMT检测, 方法的检出限分别为0.30 ng/mL cTnT, 31 pg/mL Myo, 0.79 pg/mL cTnI; 使用CCD进行三种生物标志物的成像分析新方法, 阵列生物传感平台没有交叉干扰, 可同时准确测定三种AMI生物标记物, 该方法克服了使用多种信号探针的缺点, 为同时测定多种生物标志物提供了新思路^[99].

我们还发展了负反馈模式细胞电化学发光成像新策略(图6A)^[100], 即基于活细胞对ECL信号产生的屏蔽作用, 提出了一种应用于外部(电、化学物质)刺激下对活细胞进行形态学表征和定量分析的负反馈模式细胞电化学发光成像新策略. 在 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -TPA溶液中, GCE表面培养的MCF-7细胞的负反馈模式ECL成像方法可直接获得活细胞的重要形态特征(包括细胞形状、细胞面积、平均细胞边界和两个相邻细胞之间的

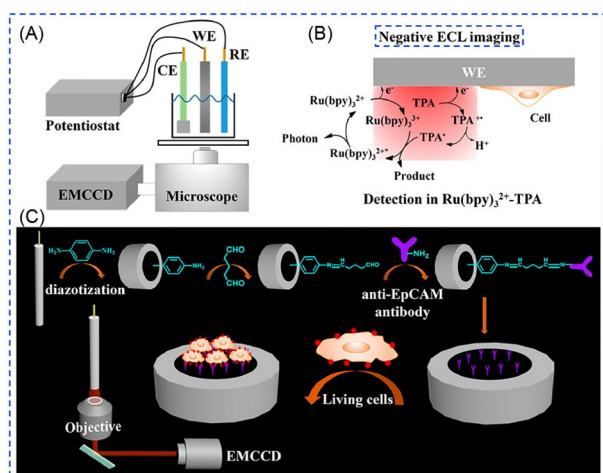


图6 (网络版彩图) (A) 负反馈模式细胞电化学发光成像仪组件; (B) 细胞形态电化学发光成像反应; (C) 细胞形态和个数电化学发光传感成像原理图^[100]

Figure 6 (Color online) (A) Set-up for the negative ECL imaging. (B) Morphological characterization of living cells on electrode. (C) Morphology and quantitation of living cells ^[100].

结合距离)和GCE表面细胞的形态变化过程的信息(图6B)。在 H_2O_2 刺激GCE表面上细胞过程中,显示了细胞收缩、变圆、与周围细胞脱离,最后与电极表面脱离的过程。在电刺激(+0.8 V vs. Ag/AgCl)的过程中,GCE表面上的细胞表现出聚集的行为。此外,使用负反馈模式ECL成像策略还发展了一种测定MCF-7细胞的新方法(图6C),其检出限为29个细胞/mL。提出的负反馈模式ECL成像策略是一种有应用前景的细胞电化学发光成像新策略。

在细胞ECL成像中, CCD常置于附着细胞于不透明电极的上方。因此,进行ECL成像时则由于细胞在电极上的黏附导致共反应试剂与电极的接触受阻,且电极上细胞表面的发光受到细胞的光屏蔽效应。为了研究细胞的这些影响,我们利用ECL细胞模拟物,即钌联吡啶配合物衍生物修饰聚苯乙烯微珠(Ru1-PS@MB),以TPA为共反应试剂,在GCE上对该ECL细胞模拟物的大小、成像深度对ECL的成像结果的影响进行了研究^[101]。实验结果显示,在GCE上的Ru1-PS@MB的荧光成像图和ECL的成像图有“边缘强发射和中心弱发射”的现象;与荧光图像图相比,获得ECL清晰图像所能用的CCD成像聚焦与固定在电极表面的Ru1-PS@MB间的距离更短。另外,当Ru1-PS@MB微珠直径从5 μm 增加到18 μm ,清晰ECL发光图距电

极表面距离只从5 μm 增加到7 μm 。这些实验结果说明ECL图像主要受制于电极上产生的共反应试剂(TPA)自由基寿命,影响了其扩散距离。这些实验结果与COMSL数值模拟基本一致。该研究结果对电极表面微米物体(细胞、颗粒等)的ECL成像研究提供了重要的参考性材料。

电化学发光成像生物传感法对于多种生物标志物的同时测定具有一定的优势;对于癌细胞及其表面特定蛋白质表达量的测定也显示了一定的优势。但是该领域的研究进展比较缓慢,其原因可能是因为ECL成像仪器及其分析软件远不及激光共聚焦荧光成像仪器及其分析软件,另外,应进一步开发应用于电化学发光成像生物传感法新的ECL-共反应试剂体系。

6 总结与展望

ECL分析方法是一类具有发展前景的高灵敏度的分析方法。ECL化学传感方法(流动注射法、能量转移法和偶合化学反应法),对小分子药物测定具有高的灵敏度高等优点,但是方法线性范围窄、选择性较差。将样品预处理、在线分离、数据处理等技术与ECL化学传感方法结合,有望提高方法的选择性,扩大方法的应用范围。

基于生物识别建立的ECL生物传感方法具有良好的选择性,可应用于生物标志物的分析。我们在ECL生物传感方法前期的研究中,侧重研究了基于不同分子识别构建传感界面的策略和信号放大的策略。我们认为发展高灵敏度实用性强的ECL生物传感方法还存在巨大的挑战。

在ECL生物传感的基础研究中,合成新的ECL探针、构筑新型生物界面策略和开发新的信号放大策略将是继续建立具有良好的准确度、高灵敏度和高选择性分析方法的基础。大多数报道的ECL探针只是使用现有的分子识别物质和ECL试剂,大多数报道的生物界面构筑策略和信号放大策略主要来源于电化学和荧光生物传感。ECL过程,特别是对于ECL共反应过程,涉及电子转移过程和CL过程,不稳定的自由基参与其中,与电化学过程(仅电子转移)和荧光过程(仅光激发)有很大不同。因此,应考虑ECL反应以及独特的ECL生物界面构建和信号探针标记策略。例如,新ECL试剂的合成应源于小分子如鲁米诺等;在ECL探针的设计时

应同时考虑ECL效率与分子识别物质的亲和力, 如利用直接方法合成的ECL探针而不只是利用ECL试剂标记的分子识别物质来合成ECL探针. 此外, 具有良好导电率和透光性的电极及其生物传感界面的构筑研究也需要加强.

在ECL生物传感的应用研究中, 发展的ECL生物传感方法必须符合实际应用目的, 应该具有高灵敏度、高选择性、快速、低成本等特点, 可与其他生物传感方法(包括使用类似生物识别物质的电化学、荧光和化学发光方法)相竞争. 此外, 应加大磁珠界面构

筑策略以及降低背景策略的研究, 促进商业化自动电化学发光生物传感方法的应用; 发挥ECL高灵敏度或CCD成像等技术的优势, 拓展ECL生物传感的应用领域, 如生物医学、环境、法医学、食品等; 应努力发展具有高灵敏度和良好空间分辨率的ECL细胞表面蛋白图谱传感法或使用智能手机作为检测器集采样、分离、检测一体化的床旁检测(POCT)方法等.

我们相信ECL生物传感方法作为一类高灵敏度、高选择性、实用性强的定量分析方法将广泛应用于临床诊断、环境评估和毒理学分析等.

参考文献

- 1 Biomarkers Definitions Working Group. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 69: 89–95
- 2 Sawyers CL. *Nature*, 2008, 452: 548–552
- 3 Wang L, Hu Y, Jiang N, Yetisen AK. *Biosens Bioelectron*, 2024, 256: 116242
- 4 Blackburn GF, Shah HP, Kenten JH, Leland J, Kamin RA, Link J, Peterman J, Powell MJ, Shah A, Talley DB. *Clin Chem*, 1991, 37: 1534–1539
- 5 Qi H, Zhang C. *Anal Chem*, 2020, 92: 524–534
- 6 Wei Y, Qi H, Zhang C. *Chem Commun*, 2023, 59: 3507–3522
- 7 Richter MM. *Chem Rev*, 2004, 104: 3003–3036
- 8 Miao W. *Chem Rev*, 2008, 108: 2506–2553
- 9 Rebecani S, Zanut A, Santo CI, Valenti G, Paolucci F. *Anal Chem*, 2022, 94: 336–348
- 10 Qi H, Peng Y, Gao Q, Zhang C. *Sensors*, 2009, 9: 674–695
- 11 Qi H, Zhang C. *Curr Opin Electrochem*, 2022, 34: 101023
- 12 Cao Y, Zhou JL, Ma Y, Zhou Y, Zhu JJ. *Dalton Trans*, 2022, 51: 8927–8937
- 13 Fang C, Li H, Yan J, Guo H, Yifeng T. *ChemElectroChem*, 2017, 4: 1587–1593
- 14 Husain RA, Barman SR, Chatterjee S, Khan I, Lin ZH. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 3192–3212
- 15 Nasrollahpour H, Khalilzadeh B, Naseri A, Sillanpää M, Chia CH. *Anal Chem*, 2022, 94: 349–365
- 16 Huo XL, Lu HJ, Xu JJ, Zhou H, Chen HY. *J Mater Chem B*, 2019, 7: 6469–6475
- 17 Hu L, Wu Y, Xu M, Gu W, Zhu C. *Chem Commun*, 2020, 56: 10989–10999
- 18 Li L, Chen Y, Zhu JJ. *Anal Chem*, 2017, 89: 358–371
- 19 Zhang Y, Zhang R, Yang X, Qi H, Zhang C. *J Pharm Anal*, 2019, 9: 9–19
- 20 Ma C, Cao Y, Gou X, Zhu JJ. *Anal Chem*, 2020, 92: 431–454
- 21 Giagu G, Fracassa A, Fiorani A, Villani E, Paolucci F, Valenti G, Zanut A. *Microchim Acta*, 2024, 191: 359
- 22 Knežević S, Han D, Liu B, Jiang D, Sojic N. *Angew Chem Int Ed*, 2024, 63: e202407588
- 23 Zhang C, Zhang SC, Zhang ZJ. *Analyst*, 1998, 123: 1383–1386
- 24 Zhang C, Huang J, Zhang Z, Aizawa M. *Anal Chim Acta*, 1998, 374: 105–110
- 25 Huang JC, Zhang CX, Zhang ZJ. *Chin Chem Lett*, 1998, 9: 843–845 (in Chinese) [黄嘉初, 张成孝, 章竹君. 分析化学, 1998, 9: 843–845]
- 26 Zhang C, Huang J, Feng M, Zhang Z. *Anal Lett*, 1998, 31: 1917–1928
- 27 Huang J, Zhang C, Zhang Z. *Fresenius J Anal Chem*, 1999, 363: 126–128
- 28 Huang JC, Zhang CX, Zhang ZJ. *Chin J Anal Chem*, 1999, 27: 41–43 (in Chinese) [黄嘉初, 张成孝, 章竹君. 分析化学, 1999, 27: 41–43]
- 29 Chen XN, Zhang CX, Lu JR. *Chin J Anal Chem*, 2000, 28: 1126–1128 (in Chinese) [晨晓霓, 张成孝, 吕九如. 分析化学, 2000, 28: 1126–1128]
- 30 Chen XN, Shen SL, Zhang CX, Lu JR. *Chin J Anal Chem*, 2002, 30: 1501–1503 (in Chinese) [晨晓霓, 申双龙, 张成孝, 吕九如. 分析化学, 2002, 30: 1501–1503]

- 31 Zhang C, Zhou G, Zhang Z, Aizawa M. *Anal Chim Acta*, 1999, 394: 165–170
- 32 Zhang M, Zhang C, Qi H. *Microchim Acta*, 2004, 144: 155–160
- 33 Zhang C, Qi H. *Anal Sci*, 2002, 18: 819–822
- 34 Qi H, Zhang C. *Luminescence*, 2004, 19: 21–25
- 35 Qi H, Zhang C, Huang Z, Wang L, Wang W, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 1947–1954
- 36 Liu H, Wang L, Gao H, Qi H, Gao Q, Zhang C. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 44324–44331
- 37 Wang X, Liu H, Jiang J, Qian M, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2022, 94: 5441–5449
- 38 Shen L, Wang H, Liu S, Bai Z, Zhang S, Zhang X, Zhang C. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 7878–7884
- 39 Harvey N. *J Phys Chem*, 1929, 33: 1456–1459
- 40 Zhang C, Zhang H, Feng M. *Anal Lett*, 2003, 36: 1103–1114
- 41 Qi H, Zhang C. *Anal Chim Acta*, 2004, 501: 31–35
- 42 Qi H, Zhang Y, Peng Y, Zhang C. *Talanta*, 2008, 75: 684–690
- 43 Zhang C, Qi H, Zhang M. *Luminescence*, 2007, 22: 53–59
- 44 Wang H, Zhang C, Li Y, Qi H. *Anal Chim Acta*, 2006, 575: 205–211
- 45 Li Y, Qi H, Fang F, Zhang C. *Talanta*, 2007, 72: 1704–1709
- 46 Zhang J, Qi H, Li Y, Yang J, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2008, 80: 2888–2894
- 47 Ruan S, Li Z, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Microchim Acta*, 2014, 181: 1293–1300
- 48 Zhao Y, Yang X, Han D, Qi H, Gao Q, Zhang C. *ChemElectroChem*, 2017, 4: 1775–1782
- 49 Ma S, Sun H, Li Y, Qi H, Zheng J. *Anal Chem*, 2016, 88: 9934–9940
- 50 Li S, Shi J, Yang X, Qiao Y, Jiang Y, Zhou Y, Li Y, Zhang C. *ACS Sens*, 2023, 8: 2771–2779
- 51 Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249: 505–510
- 52 Ellington AD, Szostak JW. *Nature*, 1990, 346: 818–822
- 53 Bruno JG, Kiel JL. *Biosens Bioelectron*, 1999, 14: 457–464
- 54 Li Y, Qi H, Peng Y, Yang J, Zhang C. *Electrochem Commun*, 2007, 9: 2571–2575
- 55 Li Y, Qi H, Peng Y, Gao Q, Zhang C. *Electrochem Commun*, 2008, 10: 1322–1325
- 56 Li Y, Qi H, Gao Q, Yang J, Zhang C. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26: 754–759
- 57 Li Z, Sun L, Zhao Y, Yang L, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Talanta*, 2014, 130: 370–376
- 58 Li Y, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 2733–2736
- 59 Zhang D, Qian M, Yang X, Zhang C, Qi H, Qi H. *Anal Chem*, 2023, 95: 5500–5506
- 60 Zu Y, Bard AJ. *Anal Chem*, 2000, 72: 3223–3232
- 61 Sun B, Qi H, Ma F, Gao Q, Zhang C, Miao W. *Anal Chem*, 2010, 82: 5046–5052
- 62 Wang XF, Zhang T, Wang B, Qi HL, Zhang CX. *J Electrochem*, 2019, 25: 223–231
- 63 Ma F, Jia LJ, Zhang Y, Sun B, Qi HL, Gao Q, Zhang CX. *Sci China Chem*, 2011, 54: 1357–1364
- 64 Li Z, Qi H, Yang H, Gao Q, Zhang C. *Anal Methods*, 2014, 6: 1317–1323
- 65 Zhang Y, Qi HL, Zhang CX. In: *The 8th Annual IEEE Conference on Sensors*. New York: IEEE, 2009. 1191–1195
- 66 Wu L, Wang Y, Xu X, Liu Y, Lin B, Zhang M, Zhang J, Wan S, Yang C, Tan W. *Chem Rev*, 2021, 121: 12035–12105
- 67 Nilsson CL. *Anal Chem*, 2003, 75: 348 A–353 A
- 68 Yang H, Wang Y, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Biosens Bioelectron*, 2012, 35: 376–381
- 69 Yang H, Li Z, Shan M, Li C, Qi H, Gao Q, Wang J, Zhang C. *Anal Chim Acta*, 2015, 863: 1–8
- 70 Breaker RR, Joyce GF. *Chem Biol*, 1994, 1: 223–229
- 71 Ma F, Sun B, Qi H, Zhang H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chim Acta*, 2011, 683: 234–241
- 72 Ma F, Zhang Y, Qi H, Gao Q, Zhang C, Miao W. *Biosens Bioelectron*, 2012, 32: 37–42
- 73 McConnell EM, Cozma I, Mou Q, Brennan JD, Lu Y, Li Y. *Chem Soc Rev*, 2021, 50: 8954–8994
- 74 Iqbal SS, Mayo MW, Bruno JG, Bronk BV, Batt CA, Chambers JP. *Biosens Bioelectron*, 2000, 15: 549–578
- 75 Qi H, Qiu X, Xie D, Ling C, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2013, 85: 3886–3894
- 76 Shan M, Li M, Qiu X, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Gold Bull*, 2014, 47: 57–64

- 77 Li Z, Yang H, Sun L, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Sens Actuat B-Chem*, 2015, 210: 468–474
- 78 Denmeade SR, Lou W, Lövgren J, Malm J, Lilja H, Isaacs JT. *Cancer Res*, 1997, 57: 4924–4930
- 79 Qi H, Wang C, Qiu X, Gao Q, Zhang C. *Talanta*, 2012, 100: 162–167
- 80 Qi H, Li M, Dong M, Ruan S, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2014, 86: 1372–1379
- 81 Zhang J, Qi H, Li Z, Zhang N, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2015, 87: 6510–6515
- 82 Dang Q, Gao H, Li Z, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408: 7067–7075
- 83 Zhang M, Shi L, Liu X, Qian M, Qi H. *Electroanalysis*, 2022, 34: 281–285
- 84 Gao H, Dang Q, Xia S, Zhao Y, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Sens Actuat B-Chem*, 2017, 253: 69–76
- 85 Zeng Y, Qian M, Yang X, Gao Q, Zhang C, Qi H. *Microchim Acta*, 2023, 190: 422
- 86 Dong M, Liu X, Dang Q, Qi H, Huang Y, Gao Q, Zhang C. *Anal Chim Acta*, 2016, 906: 72–79
- 87 Liu X, Dong M, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2016, 88: 8720–8727
- 88 Qi H, Dang Q, Dong M, Gao H, Li M. *Rev Anal Chem*, 2014, 33: 255–263
- 89 Gao H, Wang X, Li M, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Biosens Bioelectron*, 2017, 98: 62–67
- 90 Wang X, Gao H, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2018, 90: 3013–3018
- 91 Wang B, Shi S, Yang X, Wang Y, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2020, 92: 884–891
- 92 Yang X, Wei Y, Du Y, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2020, 92: 15837–15844
- 93 Yang X, Wei Y, Wang Z, Wang J, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2022, 94: 2305–2312
- 94 Wei Y, Zhang J, Yang X, Wang Z, Wang J, Qi H, Zhang C. *Talanta*, 2023, 259: 124485
- 95 Wei Y, Zhang J, Yang X, Wang Z, Wang J, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chim Acta*, 2023, 1253: 340926
- 96 Yang X, Li J, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Analyst*, 2023, 148: 6253–6260
- 97 Yang X, Liu L, Feng Y, Guo X, Wu Y, Gao Q, Zhang C, Qi H. *Anal Chem*, 2024, 96: 10459–10466
- 98 Jiang G, Liu X, Wang Y, Ruan S, Qi H, Yang Y, Zhou Q, Zhang C. *Anal Sci*, 2016, 32: 1023–1027
- 99 Yang X, Zhao Y, Sun L, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 257: 60–67
- 100 Gao H, Han W, Qi H, Gao Q, Zhang C. *Anal Chem*, 2020, 92: 8278–8284
- 101 Feng Y, Zhou W, Wang X, Zhang J, Zou M, Zhang C, Qi H. *Chem Biomed Imag*, 2023, 1: 648–658

Electrochemiluminescence chemical and biosensing methods

Honglan Qi¹, Yan Li², Chengxiao Zhang^{1*}

¹ Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science of Shaanxi Province, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

² Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecule Chemistry of the Ministry of Education, College of Chemistry and Materials Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

*Corresponding author (email: cxzhang@snnu.edu.cn)

Abstract: This Feature article mainly presents the research work of the author's laboratory in the field of chemical and biosensing methods based on electrochemiluminescence (ECL). This article extensively describes the basic principles of not only ECL chemical sensing methods (flow injection, energy transfer and chemical coupling) but also ECL biosensing methods (homogeneous immunoassay, DNA hybridization, aptamer, lectin, DNzyme, oligopeptide, *etc.*) for the determination of biomarkers, highlights the design of ECL signal probes, construction of biosensing interfaces, and signal amplification strategies with illustrative examples, and presents the challenges and perspectives of ECL chemical and biosensing methods.

Keywords: electrochemiluminescence, biosensing, biomarker, molecular recognition element

doi: [10.1360/SSC-2024-0129](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0129)