

基于金属纳米簇的电化学发光分析应用研究进展

姜 晖 王雪梅*

(东南大学生物科学与医学工程学院, 生物医学工程国家级实验教学示范中心(东南大学), 南京 210096)

摘 要 近年来, 基于金属纳米簇结构的电化学发光 (Electrochemiluminescence, ECL) 特性发展新型分析检测方法已成为分析化学领域的研究热点。金属纳米簇作为一类介于分子和常规纳米颗粒之间的材料, 其发光特性备受关注。本文对近年来基于金属纳米簇 ECL 分析的研究进展进行了评述, 按配体分类简要介绍了与 ECL 相关的纳米簇的制备方法, 以及纳米簇 ECL 研究的机制与应用, 针对提高纳米簇 ECL 性能问题, 重点讨论 ECL 增强和生物信号放大方法这两个主要的策略。此外, 本文还对纳米簇在 ECL 体系中作为能量转移受体的应用进行了评述。

关键词 金属纳米簇; 电化学发光; 信号放大; 生物分析; 评述

1 引言

电 化 学 发 光 (Electrochemiluminescence, ECL), 或 电 致 化 学 发 光 (Electrogenerated chemiluminescence) 分析, 是以电化学过程中伴生的化学发光为基础的一大类方法^[1], 具有设备简单、信号背景低、灵敏度高、检测的线性范围宽等优势, 有着广泛的实际应用。经典的 ECL 体系有上世纪发展的 Ru(bpy)₃²⁺/三正丙胺和鲁米诺/双氧水体系^[2]。近二十年来, 围绕新型纳米结构发展其 ECL 分析方法已经成为相关领域的研究热点, 代表性结构包括半导体量子点^[3]、金属纳米簇^[4]以及最近新兴的钙钛矿量子点^[5]。这些新体系各有独特的物理效应, 相关研究推动了 ECL 应用水平的提高。

纳米簇是一类尺寸超小(一般小于 2 nm)的发光材料^[6], 性质介于原子和胶体颗粒之间, 其发光性能受尺寸和配体等多重因素调节。一方面, 金属原子的数目、价态和其空间分布决定其发光性能; 另一方面, 配体通过金属-配体电荷转移等相互作用可以调节发光状态^[7]。近年来, 基于纳米簇 ECL 分析应用的研究取得了诸多进展。本文将从 ECL 相关金属纳米簇合成、发光机制及其在分析化学中的应用等方面对近年来的相关工作进行总结, 针对提高金属纳米簇 ECL 性能问题重点讨论 ECL 增强方法和生物信号放大策略。在此基础上对其今后的发展作初步探讨, 以期对金属纳米簇 ECL 分析的相关研究提供参考。

2 纳米簇的制备

纳米簇的制备方法已有很多综述评论。以研究最为广泛的 Au 簇为例, 其发展历程如图 1 所示^[8]。本部分仅涉及与 ECL 相关的常见纳米簇的制备。以下将按配体的分类对纳米簇制备作简要介绍。

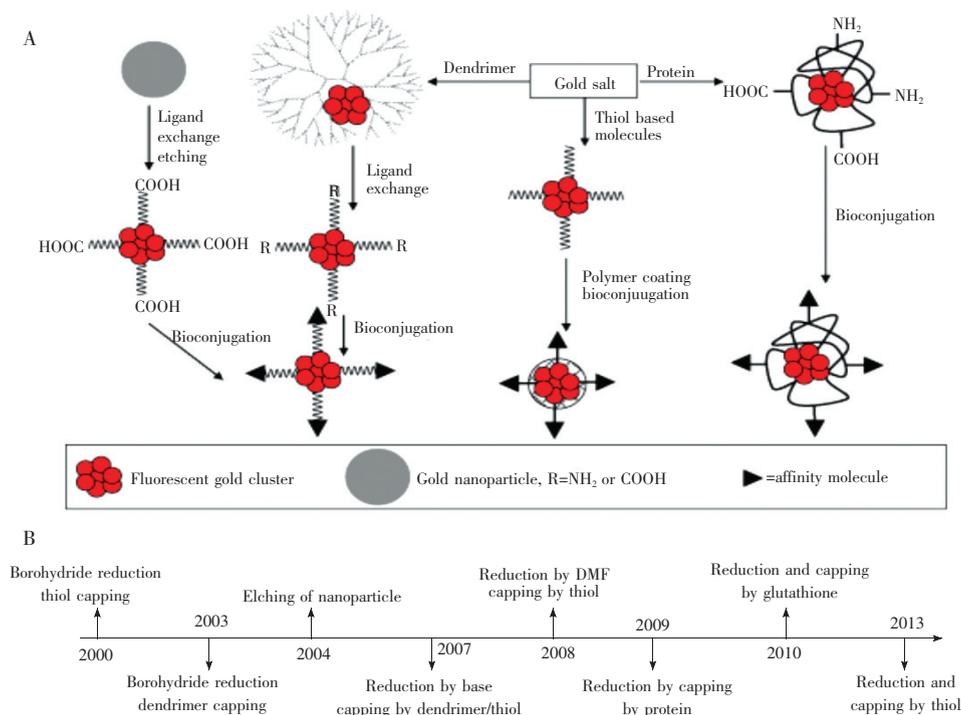
2.1 小分子配体

纳米簇的合成包括自下而上(Bottom up)和自上而下(Top down)两类方式, 前者以分子间反应和组装为基础, 后者需要选择适当的配体来刻蚀大的纳米颗粒。硫醇类小分子在这两类方式中均扮演重要角色。其作为模板和还原剂, 在还原金属盐的同时通过金属-硫醇键将配体锚定在纳米簇表面, 达到控制生长的目的。所得纳米簇易于功能化, 可发展为各类生物探针。常见的水溶性硫醇配体包括谷胱甘肽(GSH)、*N*-乙酰-*L*-半胱氨酸(NAC)^[9]、硫辛酸^[10]等。以 2-苯基乙硫醇(SCH₂CH₂Ph)等有机硫醇为配体可以合成 Au₂₅、Au₃₈、Au₁₄₄ 等一系列金簇, 便于有机相 ECL 过程中的电子转移机制研究^[11]。此外, 还有其它小分子如组氨酸^[12]和甲硫氨酸^[13]等氨基酸也可作为合成纳米簇的配体。

2017-10-03 收稿; 2017-10-27 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 81325011, 21675023)、江苏省自然科学基金项目(No. BK20161413)和东南大学-南京医科大学联合项目(No. 2242017K3DN29)资助

* E-mail: xuewang@seu.edu.cn

图 1 金簇合成的发展历程^[8]Fig. 1 Timeline of synthesis of Au nanoclusters^[8]

2.2 聚合物/核酸类配体

聚合物大分子也是常用的一类配体,其携带大量电荷和亲疏水基团。使用高度分支化的聚乙烯亚胺聚合物刻蚀胶体金,可以得到强荧光发射的 Au_8 簇^[14]。类似地,核酸类配体凭借其序列多样性可有效调控纳米簇的理化性质。由于核酸类携带大量负电荷,以其为模板的纳米簇中银簇占很大比例。该方法利用核苷(尤其是胞苷)和 Ag^+ 配位,还原后形成 DNA 包覆的银簇^[15]。尽管常见的金前驱物 AuCl_4^- 和 DNA 因为电荷排斥等因素而被认为难以结合,但 Kennedy 等^[16]证实以聚胞苷为模板可制备蓝光发射的金簇;Liu 等^[17]通过改变模板 DNA 序列亦获得发射波长可调的金簇。这类纳米簇表面包裹着携带大量正/负电荷的高分子,是一类有前景的 ECL 候选材料。

2.3 蛋白质配体

2009 年,Xie 等^[18]利用牛血清白蛋白(BSA)制备了在近红外区有荧光发射的 BSA-Au_{25} 簇。随后大量的蛋白被证实可以作为纳米簇的合成模板^[19]。蛋白质作为纳米簇配体的优势在于其内部亲疏水结构具有不对称性,为纳米簇的生长提供独特的微环境。 BSA-Au_{25} 簇是常见的 ECL 发光体,与其制备方便、稳定性好等特点有着重要联系。

3 纳米簇的 ECL 分析应用

3.1 基于纳米簇 ECL 行为的分析检测

2009 年,Diez 等^[20]首先报道了关于纳米簇 ECL 的工作。该工作以聚甲基丙烯酸为模板制备 Ag_2 、 Ag_3 等纳米簇,观察到其阴极热电子诱导 ECL。但其电位太高(-30 V),机制与常规的 ECL 可能有较大差异。2011 年,Li 等^[21]观察到 BSA-Au_{25} 簇与经典共反应剂 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 作用,ECL 峰电位高于 -1.0 V (*vs.* SCE)。鉴于所用的氧化铟锡(ITO)电极的导带能级比 Au 纳米簇的最低空轨道(LUMO)高得多,他们将 ECL 机理归因于从激发的 ITO 电极的导带到 Au 簇的有效电子转移产生 Au_{25}^- ,进而引发 ECL 过程。多巴胺可加速电子转移,由此发展了一种简单、无标记的多巴胺检测方法。Chen 等^[22]随即以双层石墨烯模板原位制备了近红外的石墨烯/金纳米团簇杂合物,其在 ITO 界面上也能产生阴极 ECL, H_2O_2 在 $4 \sim$

24 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围对 ECL 有猝灭作用,证明 Au 簇的 ECL 具有潜在的分析应用前景。与此同时,Fang 等^[23]观察到了在阳极电位下 Pt 电极上 BSA-Au₂₅ 簇与三乙胺共反应产生的 ECL,并证实 Pb²⁺ 的 ECL 猝灭作用。Guo 等^[24]使用异相配体交换诱导蚀刻方法,将金纳米颗粒蚀刻为十二烷胺外壳的 Au₈ 簇,其发射波长 436 nm。该簇属于有机相制备,可以在 Pt 电极上形成薄膜结构,同时具备与 H₂O₂ 共反应产生阳极 ECL,而与 S₂O₈²⁻ 共反应发生阴极 ECL 的能力。Liu 等^[25]利用超声法一锅合成制备水溶性佳的 BSA 稳定 Ag 簇。该簇与 S₂O₈²⁻ 的 ECL 峰的波长与荧光峰均位于 485 nm 附近。与 BSA-Au 簇类似,该 ECL 过程可以被多巴胺增强,ECL 的强度变化与多巴胺在 8.3 ~ 830 nmol/L 范围内呈线性关系,检出限为 0.92 nmol/L。该检测方法可排除常见生物基质和其它神经递质的干扰,适用于血清检测。

大多数纳米簇的水分散性好,不利于电极上的修饰固定。因此一些工作尝试制备能够固定在电极上的纳米簇复合材料,以检测过氧化氢、酚类等常见小分子。Wu 等^[26]以二氧化硅纳米颗粒为基底,利用碳二亚胺键合上 BSA-Au₂₅ 簇,用于过氧化氢的固态 ECL 检测,其线性范围 6.5 ~ 32.6 $\mu\text{mol/L}$ 。Yuan 等^[27]以阳离子聚合物聚乙烯亚胺为连接剂,原位制备石墨烯/多壁碳纳米管/Au 簇杂合物。酚类化合物可增强该杂合物与 S₂O₈²⁻ 玻碳电极上 ECL 信号,基于此设计了一种灵敏度高、稳定性和重复性好的酚类传感器。Luo 等^[28]也基于 Au 簇/石墨烯杂合物构建 ECL 传感器,检测持久性环境污染物五氯苯酚。石墨烯被认为可以促进 Au⁻ 和 SO₄⁻ 的生成而提高激发态 Au^{*} 的产率。与前述多巴胺增强机制不同的是,五氯苯酚造成 ECL 的猝灭,其灵敏度很高,检测限达 10⁻¹⁴ mol/L。该传感器在水质监测方面有着潜在的应用价值。

近两年来,围绕生物大分子的 ECL 检测获得了更多关注。Nie 等^[29]在胃蛋白酶碱性溶液中制备了尺寸 3 ~ 5 nm 鲁米诺-Au 簇。其发光机制可能与超氧自由基共反应相关。尽管复合物的荧光峰位置 (490 nm) 与鲁米诺 (407 nm) 和对照组 Au 簇 (630 nm) 迥异,其 ECL 发射峰位置却与鲁米诺接近。由于碱性磷酸酶 (ALP) 催化苯基磷酸钠的水解产生苯酚,后者可有效抑制鲁米诺-Au 簇复合物的 ECL。ECL 强度降幅与 ALP 在 0.3 ~ 12.0 nmol/L 的浓度范围内线性相关,检出限为 0.1 nmol/L,且能用于人血清中 ALP 浓度的测定。Chen 等^[30]研究了二茂铁羧酸 (Fc) 对 BSA-Au₂₅ 簇和三乙胺共反应 ECL 体系的猝灭效应。该效应源于 Fc/Fc⁺ 对三乙胺自由基的湮灭。他们在 Au₂₅ 修饰玻碳电极上固定葡萄糖氧化酶 (GOD) 作为待测靶标伴刀豆球蛋白 A (ConA) 的捕获探针,依靠 GOD 上的糖基识别并固定 ConA,再结合 GOD@Fc-PtPd 纳米立方体复合物形成夹心结构。因此 ECL 信号随着 ConA 增加而下降,降幅与待测物 ConA 的量呈正相关。所得固态 ECL 传感器具有检测线性范围宽 (4 个数量级),检出限低 (1 pg/mL) 等特点,具有良好的生物分析前景。

提高纳米簇 ECL 效率是 ECL 分析应用过程的关键问题。2016 年,Wang 等^[31]在通过自发光方式显著促进了 ECL 共反应。该工作将共反应物 *N,N*-二乙基乙二胺 (DEDA) 共价连接到硫辛酸 (LA) 稳定 Au 簇上,由于两者的氧化还原活性相匹配,可以直接发生强烈的近红外 ECL (发射波长大于 700 nm)。相比常规的共反应物自由碰撞模式,这种新颖设计模式减少了物质传递过程中涉及的自由基中间体寿命问题,因而 ECL 显著增强 (图 2),其效率甚至高于 Ru(bpy)₃²⁺/三正丙胺体系。这种多重集群式的设计利用了单个 Au 簇的多个能级和多个 DEDA 配体,节约了共反应物的用量,ECL 氧化还原起始电位也低至 0.78 V (*vs* Ag/AgCl)。该策略具有普适性,可以延伸到其它材料的共反应体系,此近红外 ECL 也可在生物检测时显著降低干扰信号。最近,他们还发现 LA-Au 的 ECL 可以被乙二胺四乙酸 (EDTA) 增强,pH 7.4 时增强效果最佳^[32]。由于 Mg²⁺ 与 EDTA 络合,ECL 信号可以被 Mg²⁺ 调控。该体系具有无需除氧、生理 pH 条件发光、低干扰的近红外发射等诸多优点,对其传感和分析应用都非常有利。

利用特殊的配体调节纳米簇,特别是 Au 簇的氧化还原活性,可提高纳米簇 ECL 的反应效率。Jiang 等^[33]发现在玻碳电极上表面不饱和的 GSH-Au 簇和三乙胺共反应的阳极 ECL 较弱,ECL 发射峰电位为 +1.8 V (*vs* Ag/AgCl),波长 580 nm (与荧光一致)。但将巯基乙醇加入该体系后,在 +1.4 V (*vs* Ag/AgCl) 产生 ECL,其发射峰值位于 630 nm。双配体外壳 Au 簇的产生是造成 ECL 电位降低和发射红移的主要原因。该 ECL 体系有一定特殊性,其它常见硫醇都不能产生类似增强作用,在 ITO 和铂电极上

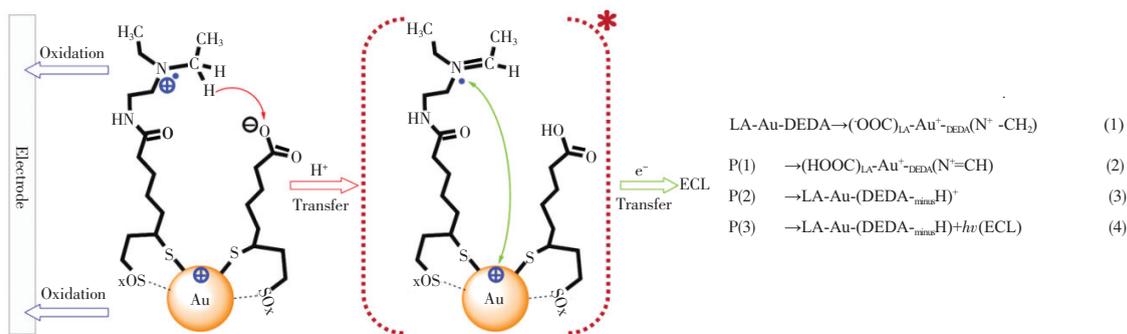


图 2 DEDA-Au 簇的 ECL 分多步完成: (1) 电极氧化; (2) 脱质子; (3) 自发光湮灭; (4) ECL [31]

Fig. 2 Electrochemiluminescence (ECL) emission by diethylethylenediamine (DEDA) linked Au nanoclusters was accomplished in multiple steps; (1) electrode oxidation; (2) deprotonation; (3) annihilation; (4) ECL [31]

也没有观察到 ECL。这一发现为设计电位分辨型的 ECL 新系统提供了可能性。Peng 等^[34]发现 2.5 nm 甲硫氨酸-Au 簇修饰玻碳电极在 pH 7.4 下与 S₂O₈²⁻ 共反应, 产生强烈、稳定的阴极 ECL 信号。峰电位在 -1.86 V, 强度较 BSA-Au 簇修饰电极提高 5 倍。多巴胺能抑制此 ECL 信号, 其响应线性范围 0.1 ~ 4.0 μmol/L, 检出限为 32 nmol/L。该方法适用于 K⁺ 刺激 PC12 细胞时释放的多巴胺测定。该体系与前述体系^[21, 25]中多巴胺表现出的 ECL 增强效应恰好相反, 这可能与形成的中间体差别有关。他们进一步阐述了价态对金纳米簇 ECL 性能的影响^[35]。在不同电位下电化学还原处理 NAC-Au 簇, 发现其中 Au(I) 的含量取决于还原电位, 在 -1.5 V (vs. Ag/AgCl) 以上只有 Au(0) 存在。ECL 信号增强与 Au 簇的还原程度呈正相关, 而配体的脱附对 ECL 影响很小, 说明 Au 的价态与 ECL 性能密切相关。这种方法通过控制作用电位就可以调控 ECL 信号强度, 为设计和开发 ECL 传感技术开辟了新途径。

除常规的 Au、Ag 簇以外, 研究人员也在寻找其它具备高效 ECL 特性的纳米簇。Zhai 等^[36]通过调节 HAuCl₄/AgNO₃ 的摩尔比制备一系列 BSA-Au-Ag 双金属纳米簇(图 3)。该纳米簇与三乙胺共反应的 ECL 性能优于单金属簇。其最佳 Au:Ag 投料比为 6:1, 此时 ECL 增强了 5 倍。银掺杂后, ECL 的峰值电位和起始电位较 Au 簇分别降低了 0.23 和 0.10 V, ECL 光谱也蓝移了 38 nm。由于 Hg²⁺ 能通过形成 d¹⁰-d¹⁰ 金属亲和键结合到双金属簇上, 猝灭其 ECL, 由此提出一种高灵敏、高选择性和高稳定性的 Hg²⁺ 检测 ECL 传感器。Zhao 等^[37]发现了以 BSA 为模板制备的 Cu 簇能与胍共反应的高效阳极 ECL 体系。其 ECL 发射波长为 433 nm, 较其荧光峰红移了 25 nm。其可能发光机理是胍被氧化时, 能量转移到

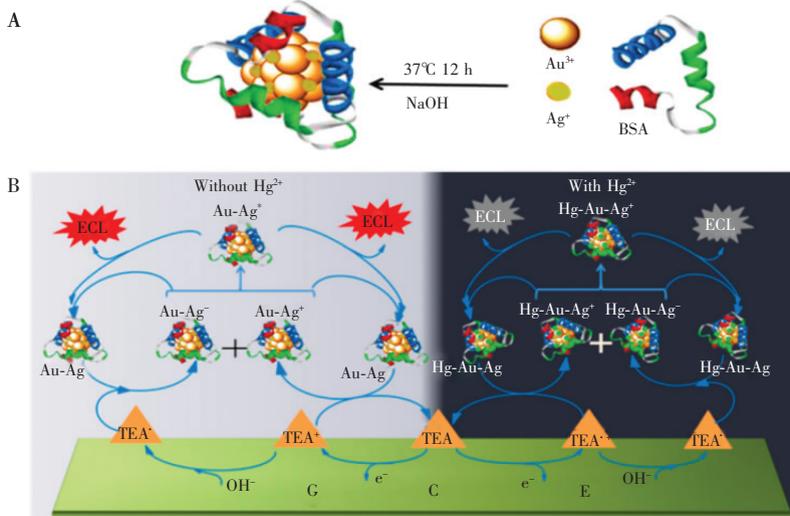


图 3 BSA-Au-Ag 簇的合成(A)、ECL 过程及 Hg²⁺ 测定 (B) [36]

Fig. 3 (A) Synthesis and (B) ECL emission of BSA-Au-Ag bimetallic NCs for detection of Hg²⁺ [36]

Cu 簇上产生其激发态,形成 ECL。相比之下,Cu 簇与三丙胺或 H_2O_2 的共反应 ECL 则很微弱。多巴胺阳极氧化产生的醌类能猝灭 ECL,因此该 ECL 系统能高灵敏测定多巴胺,检出限低至 3.5×10^{-13} mol/L。Han 等^[38]制备了 2-巯基-5-正丙基嘧啶(MPP)为配体的铜簇 $[Cu_8(MPP)_4]$,研究其在湮灭模式及三丙胺共反应模式的 ECL 细节。该铜簇的 ECL 位于 605 nm,与荧光一致。有机相电化学表征证实其氧化还原行为源于 Cu_8^+/Cu_8^{2+} , Cu_8/Cu_8^{2+} , Cu_8/Cu_8^+ 簇等电对。理论计算认为该 ECL 过程仅涉及单一的金属簇激发态,此激发态对应于从金属到配体的电子转移,其释放能量和簇的 LUMO→HOMO 能隙近似。因此,发展新型高效的金属簇在 ECL 生物传感方面也同样具有理想的应用前景。

3.2 纳米簇 ECL 的机制研究

探讨纳米簇的 ECL 机制对构建新型分析方法有重要的指导意义。2014 年,Hesari 等^[39~43]研究了不同 Au 簇与三正丙胺共反应的 ECL 机制和反应动力学。他们详细讨论了 $Au_{25}(SCH_2CH_2Ph)_{18}$ 簇的 ECL 行为^[39],首先通过光谱和电化学研究构建了 Au 簇的 Latimer 型图(图 4),有助于 ECL 的机制探讨。Au 簇的 ECL 发射在近红外区域,峰值波长为 860、865 和 960 nm,分别对应于 Au_{25}^{+*} 、 Au_{25}^{0*} 和 Au_{25}^{-*} 的发射。其发光过程可用 HOMO-LUMO 带隙上的电子跃迁加以解释。通过改变施加电位和三正丙胺浓度能调控 ECL 发射波长和强度,其 ECL 发射效率可达经典 $Ru(bpy)_3^{2+}$ /三正丙胺体系的 103%。进一步研究表明,带负电荷的 Au_{25}^- 簇在湮灭模式下没有出现 ECL 发射^[40],这可能与反应中间体寿命短、反应速率慢有关;而在 Au_{25}^- /三正丙胺或 Au_{25}^- /过氧化苯甲酰(阴极电位下共反应物)体系中则能产生 Au_{25}^{2-} 或 Au_{25}^{2+} 等高价还原和氧化中间体,在 890 和 950 nm 附近出现 ECL。另一个带正电荷的 Au 簇 $[Au_{25}(SCH_2CH_2Ph)_{18}]^+[C_6F_5CO_2]^-$ 与三正丙胺共反应产生 872 和 945 nm 的 ECL 发射,其强度与三正丙胺浓度和工作电极电位相关^[41]。 $Au_{38}(SCH_2CH_2Ph)_{24}$ 簇与之类似,其在湮灭路径中没有产生 ECL 发射,而与三正丙胺共反应时观察到 930 nm 的 ECL 发射,其 ECL 效率达到 $Ru(bpy)_3^{2+}$ /三正丙胺体系的 3.5 倍^[42]。 Au_{38}^{+*} 及 Au_{38}^{3+*} 被认为是该发光过程中的主要激发物种。电化学过程产生的一系列 Au_{38}^q ($q=2-, 1-, 0, 1+, 2+, 4+$) 均在 930 nm 有荧光发射。此外,单分散 $Au_{144}(SCH_2CH_2Ph)_{60}$ 簇的近红外 ECL(峰值波长 930 nm)与电解生成的激发态 Au_{144}^{4+*} 和 Au_{144}^{5+*} 的荧光发射一致^[43]。

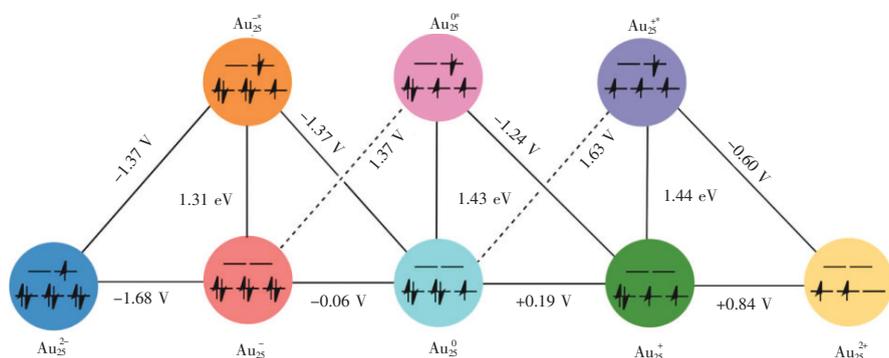


图 4 Au_{25} 簇的 Latimer 型图^[39]

Fig. 4 Latimer diagram of Au_{25} nanoclusters^[39]

Hesari 等^[11]最近详细总结了相关 ECL 机制,认为不同的 ECL 发射取决于不同的电激发中间体,而这一过程与不同施加电位下电极表面的电子交换情况相关。如在不同电位下产生的 Au_{25}^{0*} 和 Au_{25}^{+*} , ECL 机制类似(图 5);而 Au_{25}^{-*} 的 ECL 过程则因为要预先转化为 Au_{25}^{2+} 等,情况复杂得多,需结合 Latimer 型图作具体分析。

3.3 利用纳米基底和生物放大效应增强纳米簇 ECL 性能

作为新型 ECL 材料,金属纳米簇面临的一个棘手问题是发光效率相对较低,应用受到限制。因此近两年来的工作更关注如何提高纳米簇的 ECL 性能。这里主要介绍利用纳米基底效应和生物放大增强两类方法。

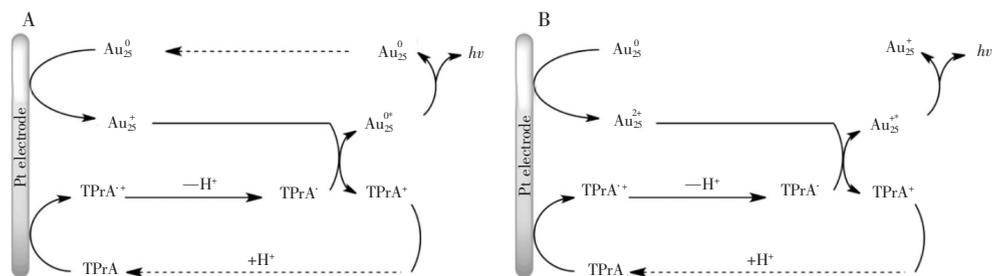


图 5 $\text{Au}_{25}^0/\text{TPrA}$ 体系中产生 (A) Au_{25}^{0*} 和 (B) Au_{25}^{+*} 的 ECL 发光机制^[39]

Fig. 5 Proposed ECL mechanisms for $\text{Au}_{25}^0/\text{TPrA}$ to generate (A) Au_{25}^{0*} and (B) Au_{25}^{+*} [39]

纳米基底的引入可以提高电子转移效率,加速 ECL 进程。Tian 等^[44]发现以纳米基底改善材料荧光效率在一定程度上可以提高 ECL 量子产率。将 1.5 nm Au 簇层层组装在层间间隙 2.0 nm 的二维层状双氢氧化物(LDH)纳米片上,获得了有序而致密的 $(\text{Au}/\text{LDH})_n$ 超薄膜,提高 Au 簇的荧光性能。理论模拟和实验结果都表明,LDH 纳米片施加的局域和约束效应诱导 Au(I)单元的比例显著增加,荧光效率提升 5 倍以上。该有序结构与 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 共反应时 ECL 响应增强,且这种增强受环境温度调控。这个工作对纳米簇的快速固定具有积极意义,也对发展优异的 ECL 温敏材料具有潜在价值。Lyu 等^[45]用碱溶液去除 NiGdAl 合金中 Al,获得多孔三维纳米 NiGd 合金(NP-NiGd)。在该合金表面生长氧化物并结合金纳米颗粒,构建具有高比表面积和快速电子传递能力的 NP-NiGd- Ni_2O_3 - Gd_2O_3 @Au 界面来固定癌胚抗原(CEA)的捕获抗体。使用生物相容的 BSA-Au 簇修饰石墨烯氧化物标记第二抗体,制备了新型 ECL 免疫传感器。其线性范围为 0.1 pg/mL ~ 5.0 ng/mL,检出限为 0.03 pg/mL。Zhou 等^[46]在含甘氨酸的电解液中电化学原位产生 Ag 簇,发现其 ECL 峰位置(458 nm)与荧光峰(450 nm)接近。他们进一步提出以 Fe_3O_4 - CeO_2 -Pt 纳米复合物为第二抗体的标记物,促进纳米 Ag 簇与 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 的 ECL 共反应。待测靶细胞周期蛋白 D1(CCND1)越多,则标记上的纳米复合物越多,对 ECL 增强效应也越明显。由此可超灵敏检测 50 fg/mL ~ 50 ng/mL 的 CCND1,检出限为 28 fg/mL。该传感器还可以用于抗癌中药的筛查研究。由于 CCND1 与人乳腺癌 MCF-7 细胞的生长和转移相关,而中药苦参对 MCF-7 细胞过表达的 CCND1 具有抑制作用,因此检测苦参处理后的 MCF-7 细胞表面 CCND1 时 ECL 信号出现下降。Yang 等^[47]提出了一种基于 Pt 簇/石墨烯复合物与三乙醇胺的 ECL 共反应体系,石墨烯可显著增强阳极 ECL 信号。在 Cu^{2+} 存在下 ECL 强度被大大削弱,由此发展了检测实际水样中痕量 Cu^{2+} 的 ECL 传感器。但该工作中 Pt 颗粒的尺寸远超纳米簇的阈值,其 ECL 机制还有待进一步研究。Zhang 等^[48]在 ITO 电极表面电聚合聚苯胺/聚吡咯复合物,再电镀 Ag 纳米树枝作为捕获抗体的基底;以载荷大量 Ag 簇的多孔 ZnO 球为第二抗体标记物,实现 Ag 簇与 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 共反应的信号放大。针对癌胚抗原构建 ECL 夹心免疫传感器。其最佳响应浓度达 5 个数量级(1 pg/mL ~ 100 ng/mL),检出限为 0.4 pg/mL。

将纳米簇 ECL 与核酸的生物放大策略相结合也是一类常见 ECL 增强方法。Chen 等^[49]提出了一种简单而超灵敏的 microRNA 的 ECL 生物传感器。采用滚环放大(RCA)技术放大信号,结合原位电化学生成 Ag 簇作为信号探针。该工作巧妙地设计了一个圆形模板,其中一端为富含鸟嘌呤区域,另一端为 miRNA 的识别域。以靶 miR-21 为靶标模型,其与圆形模板杂交形成三元 P 结(Ternary "P" junction)结构,由 phi29DNA 聚合酶启动 RCA 过程,miR-21 从模板上释放后继续进入 RCA 循环。由于模板中富含鸟苷, RCA 循环后其互补链上将产生大量富胞苷的周期性串联序列,可作为模板原位电化学合成 Ag 簇,再与 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 共反应产生 ECL 信号。最终的 ECL 强度取决于 Ag 簇量,而后者与靶 miR-21 浓度正相关。该传感器可以选择性地检测 miR-21,检测范围达 6 个数量级(10^{-16} ~ 10^{-10} mol/L),检出限低至 22 amol/L。以 miR-21 高表达的肺癌 A549 细胞和 miR-21 低表达的宫颈癌 HeLa 细胞作为模型,检测结果证实了该方法的可靠性。Zhou 等^[50]以 ECL 猝灭剂二茂铁(Fe)-DNA 结构介导的 ECL 开关为信标,结合 TiO_2 纳米花对 Ag 簇-溶解 O_2 共反应 ECL 的促进作用,设计了淀粉样蛋白($\alpha\beta$)的生物传感器(图 6)。微量的靶蛋白被免疫识别后能诱导形成 DNA 纳米结构,利用核酸外切酶 III 剪切产生大量次级

应, ECL 信号较弱。该工作以 ECL 为“尺”设计距离依赖性的 ERET 系统, miRNA 的检测线性范围为 100 fmol/L ~ 100 nmol/L, 且特异性强、速度快。该策略核心的发夹 DNA 设计多样性强, 方便扩展到其他相似体系。同一课题组的 Huang 等^[54] 还将该 CdTe-发卡-Au 簇的 ERET 组合与 Au 簇对共反应物的电催化还原联合, 构建双重猝灭途径, 用于超灵敏检测 ATP。该设计将靶辅助型 Zn^{2+} 依赖性 DNA 酶分割为两个片段, 在两个辅助 DNA 和 ATP 协助下, 在发夹上特定位点形成了 ATP 适体的 G-四联体结构。此时 Zn^{2+} 依赖性 DNA 酶两个片段靠近, Zn^{2+} 存在时即切割基质链, 释放 Au 簇, 导致 ECL 信号恢复。其核心思路在于表面原位产生 Zn^{2+} 依赖性 DNA 酶。该传感器可用于血清样品中的 ATP 检测。Zhang 等^[55] 提出了双 ECL 猝灭效应的思路来实现信号放大(图 7)。由于 CdS 纳米晶的 ECL 发射与寡核苷酸模板制备的 Ag 簇的吸收带相匹配, Ag 簇可以作为 CdS 纳米晶 ECL 的能量受体, 发生有效的 ERET; 同时, Ag 簇能催化 $S_2O_8^{2-}$ 的电化学还原, 减少有效的共反应物供给, ECL 强度进一步下降。当 miRNA 打开电极上发夹结构后, Ag 簇标记核苷酸即结合到电极上, 发生双 ECL 猝灭效应, 其效应与 miRNA 负相关。该方法可检测 10 fmol/L ~ 100 pmol/L 范围的 miRNA, 具有高稳定性和重复性。

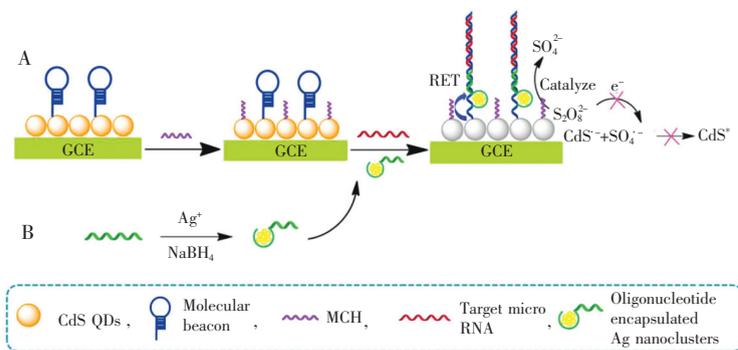


图 7 (A) 双 ECL 猝灭效应的设计思路; (B) DNA-银纳米簇合成^[55]

Fig. 7 (A) Design of dual ECL quenching effect; (B) Preparation of DNA templated Ag nanoclusters^[55]

除了能量转移, 也有工作报道纳米簇对经典 ECL 体系的增强效应。Wei 等^[56] 以纳米二氧化钛负载 AuAg 合金簇修饰到 ITO 电极表面。在该电极上鲁米诺微乳液的 ECL 发射大大增强, 表现出纳米复合物和微乳液的协同增敏效应。该电极对 H_2O_2 的 ECL 响应更灵敏, 检出限低至 nmol/L 级, 可应用于水果的总抗氧化活性测定, 效果良好。

4 展望

近年来, 纳米簇的 ECL 研究飞速发展, 在机制研究和检测应用方面都取得了不少成果。但还有一些关键问题值得深入思考: (1) 需要研究通过工程化手段获得高品质纳米簇的方法。尽管纳米簇具有确定的分子结构, 但在其制备时通常产物均一性差, 多数情况下得到多种簇的混合物, 其分离纯化和表征必须借助色谱和电泳技术, 增加了制备成本。因此发展高效、可控的纳米簇制备技术对于其广泛应用有着至关重要的意义。(2) 需要在获得高品质纳米簇的基础上深入研究其构效关系, 挖掘 ECL 动力学信息, 诠释 ECL 机制与荧光等其它发光机制的相关性, 对发展稳定、高效的纳米簇 ECL 分析体系至关重要。(3) 数个工作报道了具有近红外 ECL 发射的纳米簇, 但如何充分利用这一特性尚需理性设计。近红外发光的优势通常表现为生物背景干扰较低, 因此能否将近红外纳米簇与近来发展的细胞 ECL 成像技术^[57-59] 结合, 有待进一步探索。(4) 努力寻找纳米簇 ECL 在物质科学和生物医学前沿交叉研究中的角色定位。例如在生物医学领域发展集 ECL 检测、成像、载药控释、靶向治疗等一体化的复合型纳米簇, 可能有更为实际的应用前景。

References

- Li L L, Chen Y, Zhu J J. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(1): 358-371
- Liu Z Y, Qi W J, Xu G B. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44(10): 3117-3142

- 3 Benoit L, Choi J P. *Chemelectrochem*, **2017**, 4(7): 1573–1586
- 4 Han S, Zhang Z, Li S, Qi L, Xu G. *Sci. China Chem.*, **2016**, 59(7): 794–801
- 5 Tan X, Zhang B, Zou G Z. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(25): 8772–8776
- 6 Luo Z T, Zheng K Y, Xie J P. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(40): 5143–5155
- 7 Su X Q, Jiang H, Wang X M. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(20): 10230–10236
- 8 Palmal S, Jana N R. *Wiley Interdisciplinary Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2014**, 6(1): 102–110
- 9 Farrag M, Tschurl M, Heiz U. *Chem. Mater.*, **2013**, 25(6): 862–870
- 10 Shang L, Azadfar N, Stockmar F, Send W, Trouillet V, Bruns M, Gerthsen D, Nienhaus G U. *Small*, **2011**, 7(18): 2614–2620
- 11 Hesari M, Ding Z. *Acc. Chem. Res.*, **2017**, 50(2): 218–230
- 12 Yang X, Shi M M, Zhou R J, Chen X Q, Chen H Z. *Nanoscale*, **2011**, 3(6): 2596–2601
- 13 Deng H H, Zhang L N, He S B, Liu A L, Li G W, Lin X H, Xia X H, Chen W. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 65: 397–403
- 14 Duan H W, Nie S M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129(9): 2412–2413
- 15 Gwinn E G, O'Neill P, Guerrero A J, Bouwmeester D, Fygenson D K. *Adv. Mater.*, **2008**, 20(2): 279–283
- 16 Kennedy T A C, MacLean J L, Liu J W. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(54): 6845–6847
- 17 Liu G Y, Shao Y, Wu F, Xu S J, Peng J, Liu L L. *Nanotechnology*, **2013**, 24(1): 015503
- 18 Xie J, Zheng Y, Ying J Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(3): 888–889
- 19 Voet A R D, Tame J R H. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2017**, 46: 14–19
- 20 Diez I, Pusa M, Kulmala S, Jiang H, Walther A, Goldmann A S, Muller A H E, Ikkala O, Ras R H A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48(12): 2122–2125
- 21 Li L, Liu H, Shen Y, Zhang J, Zhu J J. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(3): 661–665
- 22 Chen Y, Shen Y, Sun D, Zhang H, Tian D, Zhang J, Zhu J J. *Chem. Commun.*, **2011**, 47(42): 11733–11735
- 23 Fang Y M, Song J, Li J, Wang Y W, Yang H H, Sun J J, Chen G N. *Chem. Commun.*, **2011**, 47(8): 2369–2371
- 24 Guo W, Yuan J, Wang E. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(25): 3076–3078
- 25 Liu T, Zhang L, Song H, Wang Z, Lyu Y. *Luminescence*, **2013**, 28(4): 530–535
- 26 Wu Y, Huang J, Zhou T, Rong M, Jiang Y, Chen X. *Analyst*, **2013**, 138(19): 5563–5565
- 27 Yuan D, Chen S, Yuan R, Zhang J, Zhang W. *Analyst*, **2013**, 138(20): 6001–6006
- 28 Luo S, Xiao H, Yang S, Liu C, Liang J, Tang Y. *Sens. Actuators B*, **2014**, 194: 325–331
- 29 Nie F, Luo K, Zheng X, Zheng J, Song Z. *Sens. Actuators B*, **2015**, 218: 152–159
- 30 Chen S, Fan Y, Zhang C, He Y, Wei S. *Electrochim. Acta*, **2017**, 228: 195–202
- 31 Wang T, Wang D, Padelford J W, Jiang J, Wang G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138(20): 6380–6383
- 32 Wang T, Padelford J W, Ma H, Gubitosi-Raspino M F, Wang G. *Chemelectrochem*, **2017**, 4(7): 1697–1701
- 33 Jiang H, Liu L, Wang X. *Nanoscale*, **2017**, 9(28): 9792–9796
- 34 Peng H, Deng H, Jian M, Liu A, Bai F, Lin X, Chen W. *Microchimica Acta*, **2017**, 184(3): 735–743
- 35 Peng H, Jian M, Deng H, Wang W, Huang Z, Huang K, Liu A, Chen W. *ACS Appl. Mater. Interface*, **2017**, 9(17): 14929–14934
- 36 Zhai Q, Xing H, Zhang X, Li J, Wang E. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(14): 7788–7794
- 37 Zhao M, Chen A Y, Huang D, Zhuo Y, Chai Y Q, Yuan R. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(23): 11527–11532
- 38 Han A, Yang Y, Zhang Q, Tu Q, Fang G, Liu J, Wang S, Li R. *J. Electroanal. Chem.*, **2017**, 795: 116–122
- 39 Hesari M, Workentin M S, Ding Z. *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20(46): 15116–15121
- 40 Hesari M, Workentin M S, Ding Z. *Chem. Sci.*, **2014**, 5(10): 3814–3822
- 41 Hesari M, Workentin M S, Ding Z. *RSC Adv.*, **2014**, 4(56): 29559–29562
- 42 Hesari M, Workentin M S, Ding Z. *ACS Nano*, **2014**, 8(8): 8543–8553
- 43 Hesari M, Ding Z, Workentin M S. *Organometallics*, **2014**, 33(18): 4888–4892
- 44 Tian R, Zhang S, Li M, Zhou Y, Lu B, Yan D, Wei M, Evans D G, Duan X. *Adv. Funct. Mater.*, **2015**, 25(31): 5006–5015
- 45 Lyu X, Ma H, Wu D, Yan T, Ji L, Liu Y, Pang X, Du B, Wei Q. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 75: 142–147

- 46 Zhou Y, Chen M, Zhuo Y, Chai Y, Xu W, Yuan R. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(12): 6787–6793
- 47 Yang Y, Wu W, Wang Q, Xiao H, Kuang Y, Liu C. *J. Electroanal. Chem.*, **2016**, 772: 73–79
- 48 Zhang L, Wang Y, Shen L, Yu J, Ge S, Yan M. *Analyst*, **2017**, 142(14): 2587–2594
- 49 Chen A, Ma S, Zhuo Y, Chai Y, Yuan R. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(6): 3203–3210
- 50 Zhou Y, Wang H, Zhuo Y, Chai Y, Yuan R. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(6): 3732–3738
- 51 Jie G, Tan L, Zhao Y, Wang X. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 94: 243–249
- 52 Feng L, Wu L, Xing F, Hu L, Ren J, Qu X. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 98: 378–385
- 53 Cheng Y, Lei J, Chen Y, Ju H. *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, 51: 431–436
- 54 Huang Y, Lei J, Cheng Y, Ju H. *Electrochim. Acta*, **2015**, 155: 341–347
- 55 Zhang Y Y, Feng Q M, Xu J J, Chen H Y. *ACS Appl. Mater. Interface*, **2015**, 7(47): 26307–26314
- 56 Wei X, Xiao C, Wang K, Tu Y. *J. Electroanal. Chem.*, **2013**, 702: 37–44
- 57 Ma G Z, Zhou J Y, Tian C X, Jiang D C, Fang D J, Chen H Y. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(8): 3912–3917
- 58 Xu J J, Huang P Y, Qin Y, Jiang D C, Chen H Y. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(9): 4609–4612
- 59 Xu J J, Jiang D P, Qin Y L, Xia J, Jiang D C, Chen H Y. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(4): 2216–2220

Progress of Metal Nanoclusters-based Electrochemiluminescent Analysis

JIANG Hui, WANG Xue-Mei*

(School of Biological Science and Medical Engineering, National Demonstration Center for Experimental Biomedical Engineering Education (Southeast University), Southeast University, Nanjing 210096, China)

Abstract In the past ten years, the development of electrochemiluminescent (ECL) analytical methods based on various types of nanostructures has become a research hotspot. Nanocluster, an intermediate between molecules and conventional nanoparticles, is renowned for its luminescent feature. The first report on ECL for nanoclusters can be traced back to 2009. Here we summarized the main research progresses since 2011. Firstly, the preparation of ECL-related nanoclusters was briefly introduced. Then, the mechanisms and applications of ECL by nanoclusters were described. To improve ECL performances, two main strategies, i. e., nanostructure-based ECL enhancement and biological signal amplification were proposed. Besides, the nanoclusters as the energy transfer receptors in ECL systems were also discussed. In prospect part, the future development of ECL by nanoclusters was considered. We believed that the synthesis of high quality nanoclusters, the reveal of ECL structure-activity relationships, the rationale design and application of near-infrared ECL, and the role of ECL in the interdisciplinary research were the main problems we faced in the future.

Keywords Metal nanoclusters; Electrochemiluminescence; Signal amplification; Bioanalysis; Review

(Received 3 October 2017; accepted 27 October 2017)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81325011, 21675023), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20161413), and the Southeast University-Nanjing Medical University Joint Project(No. 2242017K3DN29).