光电化学免疫分析研究进展

赵伟伟, 马征远, 徐静娟*, 陈洪渊*

南京大学化学化工学院, 生命分析化学国家重点实验室, 南京 210093

* 联系人, E-mail: xujj@nju.edu.cn; hychen@nju.edu.cn

2013-04-16 收稿, 2013-06-03 接受, 2013-08-15 网络版发表

国家自然科学基金重点项目(21135003)、国家自然科学基金创新研究群体项目(21121091)和国家重点基础研究发展计划(2012CB932600)资助

摘要 光电化学分析是近年建立起来的一种基于物质的光电转换特性而进行检测的新型分析方法, 它具有灵敏度高、设备简单、易于微型化等特点. 光电化学免疫分析则是光电化学分析与免疫反应的结合, 体现了光电化学传感的高灵敏度和免疫反应的高特异性. 其基本方法原理是, 在光照条件下, 光电活性物质将免疫反应转变为电信号, 从而实现对待测物的定量测定. 在过去 10 年中, 伴随着光电化学分析技术的进步, 光电化学免疫分析经历了快速发展的过程. 本文介绍了光电化学免疫分析的方法原理和特点, 对其代表性的研究工作进行介绍和评述, 并展望其未来的发展趋势.

关键词

光电化学
半导体
免疫分析
传感机理
研究进展

近年来, 由于免疫生物学及相关理论、技术与方法的不断发展, 利用免疫应答过程进行的诊断技术日趋成熟. 其基本原理是抗原与抗体之间的特异性结合能够导致相关信号产生变化, 即以抗体(或抗原)作为识别元件以实现对各种目标物的灵敏检测. 由于免疫分析的特异性与高灵敏度, 它能够应用于许多复杂生物样品如血液、尿液的分析, 在临床检测与食品监测等诸多领域具有重要的实用价值^[1~10].

传统的免疫分析方法包括放射免疫分析、酶联免疫分析、凝聚反应分析、免疫浊度测定、琼脂扩散分析、免疫电泳等方法. 随着科技的发展, 免疫技术又与压电技术、表面等离子体共振、电化学、表面增强拉曼散射、荧光、电化学发光、各类先进色谱技术等相结合, 派生出了一系列新型高效的免疫检测方法. 另一方面, 根据标记与否可将免疫分析分为两大类: 非标记免疫分析和标记免疫分析. 非标记型免疫分析方法通过直接测定抗原抗体复合物形成时物理、化学性质的变化来推测抗原或抗体的浓度, 极大地简化了制备和操作过程, 因此相关研究也成为生物传感器发展的一个重要方向. 如凝聚反应分析、免疫浊

度测定等方法都是经典的非标记型免疫分析. 但 these 方法普遍存在分析测定时间长、定量精度低、难以进行痕量检测的缺点. 近年来, 又相继出现了表面等离子共振型免疫传感器、石英晶体微天平型免疫传感器以及电容型免疫传感器等非标记型免疫传感器. 标记免疫分析是指将标记技术与抗原、抗体的免疫反应相结合的一类分析方法. 标记免疫传感先将各种酶、电活性物质、荧光物质、电化学发光物质、放射性同位素等作为标记物对抗原或抗体进行标记, 然后通过光学、电化学、电化学发光等手段, 在跟踪抗原与抗体之间的反应过程的同时对浓度信息进行放大(如酶标记), 从而实现对目标物的高灵敏检测. 采用标记免疫分析能够达到较高的灵敏度, 但检测过程相对复杂, 检测时间和成本也相对较高.

光电化学(PEC)过程指光电活性物质在光照作用下产生电荷转移的过程^[11,12]. 例如, 当一束能量等于或大于半导体带隙(E_g)的光照射在半导体光电材料上时, 电子(e^-)受激发由价带跃迁到导带, 并在价带上留下空穴(h^+), 电子与空穴有效分离, 在一定的条件下, 实现了电子或空穴的转移, 这便是光电转化的

引用格式: 赵伟伟, 马征远, 徐静娟, 等. 光电化学免疫分析研究进展. 科学通报, 2014, 59: 122–132

Zhao W W, Ma Z Y, Xu J J, et al. Progress in photoelectrochemical immunoassay (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 122–132, doi: 10.1360/972013-446

过程^[13]。此外,很多生物大分子如 DNA,甚至细胞也都具有 PEC 活性^[14~17]。PEC 传感则是基于物质的光电转化特性而发展出的一种新兴的检测技术,在生物分析领域具有广阔的应用前景^[18~22]。待测物与光电活性物质之间的直接/间接相互作用,或者生物识别过程前后所产生的光电流(或光电压)的变化与待测物浓度之间的关系,是 PEC 定量分析的基础。根据测量参数的不同,PEC 传感方法可分为电位型(即光寻址电位型传感器, LAPS)和电流型两种。和电化学发光检测正好相反,在 PEC 检测中,光被用作激发源来激发光电活性物质,通过光激发所产生的电信号作为检测信号^[23~27]。由于激发与检测信号属于不同的能量形式,PEC 传感信号的背景要比传统的电化学方法低,因此,检测限可以进一步降低^[28]。实验表明,在采用相同或类似的流程对同一种物质进行检测时,用 PEC 法获得的检测限通常要比用传统电化学方法低一个数量级^[29~31]。此外,由于利用电信号响应^[32~36],同传统的光学方法相比,PEC 检测仪器设备简易^[37~40]、价格低廉且易于微型化^[41~45]。随着研究的不断深入,可以预期,PEC 传感将在生物分子测定、环境和食品安全检测、新药研究和医学诊断等诸多方面发挥重要作用,其应用前景将十分广阔。在过去数十年中,伴随着 PEC 传感技术的进步,PEC 免疫分析经历了从提出到实现,从探索到迅速发展的过程。本文将从现有相关工作出发,对 PEC 免疫研究的基本概念、原理、应用以及最新进展作一个系统的评述,希望为未来开发更加先进的、选择性更好、分析速度更快、灵敏度更高的 PEC 免疫分析方法提供一定的借鉴。对于基于 LAPS 的免疫分析因出版年代较早,本文就不再赘述,感兴趣的读者可以进一步参阅文献[46~50],本文主要介绍最新发展的电流型免疫传感器。

1 PEC 免疫分析的基本装置

PEC 分析需要在光电检测系统中实现。该系统主要包括激发光源、吸收池以及三电极体系的电化学装置。在光激发条件下,电解质溶液中光电活性材料的表面将发生电荷的分离与跃迁,电极表面发生一定的氧化还原反应从而在外电路产生电流,这一过程由电化学装置所记录并用于特定检测对象的测定。

PEC 免疫分析的基本原理是基于免疫反应前后

光电流信号的变化。如图 1 所示,在一个简单典型的 PEC 免疫系统中,免疫探针分子(通常是特异性的抗体或抗原)首先被固定在光电换能器(transducer)表面作为识别元件(recognition element),抗原(或抗体)作为待测物与探针分子在电极表面形成免疫复合物,导致光电流信号的增强或降低。本节将介绍 PEC 免疫传感界面的基本构建过程,主要包括光电极的选择与制备、免疫探针分子的固定等重要步骤。

1.1 电极材料的选择与制备

PEC 检测的基本模式决定了其在免疫传感中必须使用特定的光电活性电极。而免疫探针分子则在这种电极表面固定,随后的免疫识别反应也在该表面发生,所以光电活性材料的选择和制备与免疫传感的检测性能密切相关。理想的光电活性电极应该具有较低的电子空穴复合率,以便获得稳定的光电流密度。一般而言,在 PEC 免疫传感中,光电活性电极的选择主要取决于所设计的检测路径与传感过程。常用的电极有整体电极和氧化铟锡(ITO)修饰电极。整体电极如二氧化钛纳米管阵列电极(TiO_2 NTs), ITO 修饰电极则由 ITO 基底和光电修饰材料两部分构成。一般来说,根据光电活性材料的不同,可将电极分为以下几类。

(1) 无机半导体材料。当前纳米科学的飞速发展作为光电免疫传感器中电极材料的选择与利用提供了极大的便利。由于其优良的光电转换特性, SnO_2 , TiO_2 和 CdS 等无机半导体纳米材料通常被用于各类 PEC 生物检测中。以无机半导体纳米粒子来说,其光电产生机理如图 2 所示^[51,52]。当半导体纳米粒子吸收的光子能量高于其能带间隙时,电子从价带跃迁至导带,因此产生了电子空穴对(e-h)。该电荷转移过程

图 1 典型的 PEC 免疫传感设计

图2 无机半导体材料(a)阳极与(b)阴极电流的产生机理

一旦发生,随之极易发生电子空穴对的复合或电荷转移.在光致发光或电化学发光检测中,其光学检测信号产生自e-h复合过程中的自发辐射.然而在PEC检测中,激发电子被表面态长时间捕获赋予了e-h对更长的寿命,使得导带电子得以转移至电极或溶液中的电子受体,从而产生响应的阳极(图2(a))或阴极(图2(b))光电流.与此同时,价带空穴将转移至半导体材料的表面进而被来自溶液或电极中的电子所猝灭.有效电子供体/受体的存在将高效抑制电子空穴对的复合,从而能够促进光电流的稳定产生.

由于具有制备相对简单、稳定性高、接近蛋白质的纳米级尺度、激发光谱范围较宽、表面修饰的多样化等特点^[53-55],量子点(QDs)自发现之日起就引发了大量的研究工作,在高灵敏光学和电化学等生物检测中都已获得大量应用^[56-58].在PEC传感领域,QDs作为一种重要的光电新材料也具有独特的优势和巨大的潜力. Willner 研究组首次应用 CdS QDs 作为 PEC 检测的功能基底,他们以此展开了酶抑制剂的生物检测,随后又拓展到了酪氨酸酶活性以及 DNA 序列等相关领域的检测^[51].在 PEC 免疫传感领域,本课题组在该方面开展了大量的研究工作,系统地优化了 CdS QDs 的合成条件.利用在 N₂ 保护气氛中制得有巯基乙酸修饰的水溶性的、表面带负电荷的 CdS QDs,我们采用层层组装的方法将带正电荷的聚电解质 PDDA 与 CdS QDs 交替沉积到 ITO 电极表面,从而得到以 CdS QDs 为光电活性物质的传感器基底,并以此为基础开发出了第一例基于 QDs 的 PEC 免疫传感器.值得注意的是,在检测中,如果溶液中没有电子供体存在, CdS QDs 受激发生电子跃迁后所产生的空穴易与自身发生氧化还原反应: $2h^+ + \text{CdS} \rightarrow \text{Cd}^{2+} + \text{S}$,这一过程被称作光腐蚀.因此,在光电免疫传感器的检测过程中选择高效的空穴捕获剂尤为重要.

此外,由于被检测的免疫反应物通常只在生物环境中存在,所选择的空穴捕获剂必须满足在温和 pH 条件下的高效工作条件.本课题组发现,抗坏血酸可以在温和的 pH 条件下有效捕获 CdS QDs 的光生空穴,从而避免了 CdS QDs 的光腐蚀,有利于光电流信号稳定地产生^[53].

除了 QDs 以外, TiO₂ NTs 在 PEC 传感中也受到广泛关注.最近,湖南大学蔡青云研究组^[59]对利用 TiO₂ NTs 为基底来开发 PEC 免疫分析做了报道.

(2) 有机半导体材料. PEC 检测体系中也采用有机光电物质作为响应材料,可利用的物质主要有卟啉类衍生物、酞菁类衍生物、偶氮染料、甲苯胺蓝以及 PPV 类衍生物、噻吩类衍生物等高分子聚合物^[19,20].

在各类有机半导体材料中,钌联吡啶配合物([Ru(bpy)₃]²⁺, bpy = 2,2'-bipyridine)因其良好的 PEC 性质(如可见光吸收强、激发态稳定等),在 PEC 传感中引起了广泛的研究兴趣,并且已被用在生物素-亲和素相互作用、DNA 损伤检测以及本文所关注的免疫分析等诸多方面.

Cosnier 研究组^[60,61]利用化学方法合成了钌(II)联吡啶配合物的一种衍生物,并且成功应用到 PEC 免疫传感中.该衍生物的具体构型如图3所示,其核心部分即为钌联吡啶分子,衍生部分则分别为吡咯

图3 [Ru(L₂)₂(L₁)]²⁺配合物结构式^[61]

和生物素分子. 将吡咯分子成功衍生至钌联吡啶骨架后, 利用吡咯的电聚合反应可将该有机大分子固定到电极表面. 在光照条件下, 该衍生物内部发生电子跃迁从而产生激发态. 当溶液中存在足够量的电子受体(CoCl_3)时, 激发态的衍生物将与电子受体发生氧化还原反应, 生成钌(III)-联吡啶配合物. 由于该衍生物稳定地修饰于电极表面, 钌(III)-联吡啶配合物在电极上接收电子, 从而产生稳定的阴极光电流.

(3) 复合半导体材料. 半导体材料光电转化效率的提高有利于提升传感器的检测性能. 在 PEC 免疫传感中, 另外一类理想的、具有高光电转化效率的光电活性材料是复合半导体材料: 两种不同禁带宽度的无机半导体复合物或有机与无机半导体复合物. 实验证明, 将半导体材料与能带间隙更窄的无机纳米粒子或有机染料复合, 不但能够很好地提高激发效率而且也能使原半导体材料的有效激发波长范围变宽. 对单一半导体材料而言, 光生电子和空穴很容易复合, 这种复合会降低光电流的产生效率. 而当两种具有不同能带间隙的半导体材料构成复合物后, 光激发所产生的电子和空穴能够在两种半导体材料之间发生快速的电荷转移, 从而有效阻止两者之间的复合, 使得光电转换效率得到大幅度提高^[43]. 图 4 以 TiO_2/CdS 复合半导体材料为例, 当施加激发光后, 在窄禁带的 CdS 内部首先发生电荷的受激跃迁, 电子从价带(valence band)跃迁至导带(conduction band), 由于 CdS 导带能级高于 TiO_2 导带能级, 激发电子随即由 CdS 的导带转移到 TiO_2 的导带. 由于光生空穴与电子在空间上被分离至不同半导体内部, 其复合几率大大降低. 与此同时, 溶液中电子供体的存在高效地补充了 CdS 的价带空穴, 使得 TiO_2 迅速将得到的电子转移至电极表面, 使上述过程得以持续, 从而

图4 硫化镉/二氧化钛复合半导体材料光电流产生机理^[62]

产生稳定的光生电流.

利用 CdS/TiO_2 复合材料优异的光电转换性能, 本课题组开发出了第一例基于复合半导体材料的非标记型 PEC 免疫传感器^[62]. 其后, 蔡青云研究组^[63]成功制备了 $\text{CdSe}_x\text{Te}_{1-x}/\text{TiO}_2\text{NTs}$ 复合半导体电极用于构建新型非标记型 PEC 免疫传感器. 最近, 本课题组^[64]报道了一种利用 $\text{CdS QDs}/\text{TiO}_2\text{NTs}$ 复合电极免疫分析的新方法.

(4) 其他材料. 近年来, 基于 Au 纳米粒子和碳纳米管的导电性, 多种新型复合材料被陆续开发出来以提高半导体材料的光电活性, 具有代表性的材料如富勒烯/CdSe、碳纳米管/CdS、碳纳米管/CdSe、卟啉/富勒烯/Au 纳米粒子、CdS/Au 纳米粒子、石墨烯/CdSe、以及 Au 纳米粒子/ TiO_2 复合材料等^[19,45]. 张文研究组^[65]制备了具有良好生物相容性和光电活性的 Au 纳米粒子修饰的 TiO_2NTs 电极, 并以此为基础构建了一种标记型 PEC 免疫传感方法. 基于 $\text{CdS}/\text{Graphene}$ 复合材料, 赵慧敏研究组^[66]则开发了一种非标记型 PEC 免疫传感器.

1.2 免疫探针分子的固定

电极制备好后, 免疫探针分子的固定是传感器制备中重要的一步, 直接决定着传感器性能的优劣. 原则上, 电化学免疫传感器中可以使用的固定方法都可以用于 PEC 传感. 但因后者使用的电极材料有所不同, 所以具体采用的固定方法往往和电极材料的种类以及实验的设计有关. 另外, 为了保证探针分子的准确定位与吸附以使探针分子在固定后保持较高的活性和稳定性并形成具有适宜厚度、密度、多孔性的敏感膜, 同时为了避免非特异性吸附和结合的干扰, 在固定这一步骤中需对电极的表面化学性质进行严格控制, 因此需要对实验条件进行多重优化以便确定最佳条件. 具体来讲, 考虑到免疫探针生物分子具有不稳定性, 其固定需要满足以下两个条件: (i) 固定过程条件温和, 防止生物分子变性, 而且固定在电极表面后也能保持良好的活性; (ii) 固定后, 敏感层与电极表面接触紧密, 同时具有良好的稳定性和耐用性. 下面结合已报道的具体实例, 对 PEC 免疫传感中常用的固定方法进行介绍.

(1) 共价键合法. 利用共价键使生物活性分子与不溶性载体之间结合固定的方法, 称共价键合法. 经典的酰胺结合(Support-CO-NH-Protein)、席夫碱反

应(Support-CH=N-Protein)等都属于这一类. 共价键合法的特点是结合牢固, 蛋白质分子不易脱落, 使用寿命长. 缺点是操作步骤较多, 蛋白分子可能因发生化学键合而降低活性.

本课题组^[53]制备了巯基乙酸保护的 CdS QDs, 通过静电吸附法将其层层组装至 ITO 电极表面后, 再通过酰胺反应使得 QDs 表面的 COOH 与待固定的抗体蛋白分子中的 NH₂ 相结合, 从而实现了抗体分子在电极表面的固定. 在最近报道的基于 QDs 的标记放大型免疫传感中, 我们也采取了相同的方法^[64,67]. 在张文研究组^[65]的报道中, 将 Au/TiO₂ 复合电极吸附巯基乙酸而使得电极表面携带 COOH, 使用相同方法也实现了抗体的固定.

(2) 共价交联法. 共价交联法是使用交联剂的桥梁作用, 实现免疫探针分子固定到电极表面的方法. 交联剂是具有两个或两个以上功能团的试剂, 如戊二醛. 交联法广泛用于免疫分子膜制备, 操作简单, 结合牢固; 缺点是在固定过程中需严格控制 pH, 一般在蛋白质的等电点附近操作, 交联剂浓度也得小心调整.

壳聚糖是一种常用的生物相容性材料, 所形成的膜不但具有很好的渗透性而且还带有大量的 NH₂ 能够用于进一步的化学修饰. 本课题组^[62]将壳聚糖膜固定于 CdS/TiO₂ 修饰电极表面, 然后使用交联剂戊二醛实现抗体在电极表面的固定. 蔡青云研究组^[59,63]和赵慧敏研究组^[66]的报道中, 也分别使用了相同的交联固定法.

(3) 亲和吸附法. 亲和吸附法是另外一种得到广泛应用的高效免疫分子固定方法, 最常用的亲和试剂即是生物素-亲和素系统(avidin-biotin system). 该系统以生物素和亲和素具有的独特结合特性为基础, 结合二者即可偶联抗原抗体等生物活性大分子, 它们的结合专一、迅速、稳定. 自 20 世纪 70 年代该方法应用于免疫化学以来, 人们利用其可被酶、荧光素等材料标记的特点而建立了许多新型的检测方法, 尤其是与免疫标记技术的有机结合, 极大地提高了检测灵敏度. 在 PEC 传感领域, 利用 avidin-biotin 亲和系统, 也作了一些探索性工作^[23,68,69]. Cosnier 研究组^[60,61]将吡咯和生物素分子连接到光电活性物质钌联吡啶上, 然后利用吡咯的电聚合作用将该钌联吡啶衍生物固定至电极表面, 最后利用生物素和亲和素之间的亲和作用实现了免疫系统的构建.

(4) 其他方法. 其他常用的免疫探针分子固定方法还有自组装法、静电吸附法、聚合物法等. 自组装过程是免疫分子在溶液中自发通过共价键、静电引力、氢键等作用力牢固地吸附在电极表面而形成的有序分子膜. 这种方法简单易行, 制备的敏感膜具有优良的稳定性、取向有序并能很好地保持生物质的活性. 静电吸附法是以静电吸引为驱动力的一种自组装过程, 该方法具有保持生物分子活性和制作简单等优点. 实际上, 在有的吸附过程中, 氢键、范德华力也会起到重要的作用, 吸附过程也可能是多种键合形式协同作用的结果. 通过吸附法制备免疫敏感膜, 吸附过程一般不需要化学试剂, 因此对蛋白质活性影响较小. 缺点是在环境条件改变时, 蛋白质分子容易脱落. 因此实际操作中, 也常与其他固定方法结合使用, 如吸附交联法. 聚合物法指通过电聚合导电高分子材料的方法来固定免疫分子. 比如, 在聚合前将抗体加入含有导电高分子单体的电解液中, 然后进行电化学聚合. 这种方法的优点是形成的膜比较稳定不易脱落, 缺点则是膜的厚度与渗透性会影响传感器的检测性能.

2 光电免疫检测的分类与传感机理

和其他的免疫分析方法一样, PEC 免疫分析也可以简单地分为非标记型和标记型两大类. 结合不同的实验设计, 相应的传感机理也有所区别.

2.1 非标记型光电免疫传感器

非标记型光电免疫传感器通过直接测定抗原抗体免疫复合物形成时的光电流信号的变化来确定待测物的浓度. 在非标记型光电免疫传感中, 由于省去了对待测物的标记过程, 且样品前处理过程简单, 极大地简化了制备和操作步骤, 因此该类型的相关研究工作在免疫传感器领域一直具有不可取代的优势. 但是, 由于其检测原理大多基于免疫复合物形成前后所产生的位阻效应变化, 因此检测信号的变化幅度往往非常有限, 在检测灵敏度方面尚有待提高. 目前对非标记型光电免疫传感器的研究工作主要侧重在对新型光电基底的利用和目标检测物的多样化.

Cosnier 的非标记型 PEC 免疫工作中, 钌联吡啶配合物上被衍生连接了吡咯和生物素, 然后利用吡咯的电聚合作用实现了光电物质在电极表面的固定.

然后通过生物素-亲和素的连接作用,将标记有生物素的霍乱毒素(biotinylated cholera toxin)固定到光电物质表面.当向溶液中加入待测的霍乱毒素抗体(anti-cholera toxin antibody)时,形成的免疫复合物在光电物质表面产生更强的位阻效应,阻碍电子受体向电极扩散,从而导致光电流降低.该方法很好地实现了霍乱毒素抗体的免疫测定,检测限可以达到 $0.5 \mu\text{g/mL}$ [61].

本课题组 [53] 通过层层组装的方法制备 CdS QDs 修饰的 ITO 电极,然后利用共价键合法实现小鼠免疫球蛋白 G 抗体(anti mouse IgG)在电极表面的固定,制备出了首例基于 QDs 的 PEC 免疫传感器.通过测量电极表面免疫复合物形成前后光电流响应值的变化可以检测出小鼠 IgG 的浓度,检测线性范围为 $10 \text{ pg/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$,最低检测限可达到 8 pg/mL .

甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)是一种常用的肿瘤标志物,约 80% 的原发性肝癌患者血清中 AFP 明显升高,病毒性肝炎、肝硬化患者 AFP 有不同程度的增高.显然,高灵敏的 AFP 传感对临床检测具有重要的意义.如图 5 所示,由于将窄禁带的半导体与宽禁带的半导体复合之后可以得到较高的光电转换效率,本课题组 [62] 在 CdS/TiO_2 复合半导体修饰电极的表面通过共价交联法固定甲胎蛋白抗体(α -fetoprotein antibody),制备了无标记型甲胎蛋白免疫传感器.这种传感方法在实际样品的测定中具有较好的效果,线性范围为 $50 \text{ pg/mL} \sim 50 \text{ ng/mL}$,检测限为 40 pg/mL .

蔡青云研究组利用光电沉积法将复合纳米晶 $\text{CdSe}_x\text{Te}_{1-x}$ ($0 \leq x \leq 1$) 沉积在 TiO_2 NTs 内外表面形成晶体阵列作为光电活性基底,显著扩大了光电传感器的光响应面积且实现了在可见光区的超高光电转化效率(图 6).五氯苯酚(Pentachlorophenol, PCP)是一种

图 5 基于 CdS/TiO_2 复合材料的 PEC AFP 免疫传感器 [62]

图 6 基于 $\text{CdSe}_x\text{Te}_{1-x}/\text{TiO}_2$ NTs 的 PEC AFP 免疫传感器 [63]

常见的环境污染物,水体中一定浓度的 PCP 会对人类健康造成极大的危害.利用所制备的电极,他们将五氯苯酚抗体(PCP antibody)通过共价交联法固定在电极基底上制备了 PCP 免疫传感器.该传感器可以实现对 PCP 的高灵敏检测,线性范围为 $1 \text{ nmol/L} \sim 0.3 \mu\text{mol/L}$,检测限为 1 pmol/L [63].

2.2 标记型光电免疫传感器

非标记型免疫分析法虽然有着很好的简易性,但是由于其负载量低以及无法实现信号放大,它在检测灵敏度方面仍然需要改进.在此情况下,标记型免疫传感分析应运而生.在不同的检测系统中,可以通过标记引入信号分子或实现信号放大.具有催化活性的酶分子因为易于与抗体或抗原结合,且可在短时间内将大量底物分子转化为具有电化学活性的产物,因此常被用做标记物.常用的标记酶有葡萄糖氧化酶(GOx)、辣根过氧化物酶(HRP)与碱性磷酸酶(ALP).

如图 7 所示,张文研究组 [65] 的工作首次涉及到标记技术在 PEC 免疫传感中的运用.在一抗和抗原在电极表面形成免疫复合物以后,又通过夹心反应标记了制备的二抗-金纳米粒子-GOx($\text{Ab}_2\text{-Au-GOx}$)生物复合物,形成三明治结构的免疫复合物.由于 GOx 能有效地催化葡萄糖分解产生过氧化氢,并以此作为电子供体参与电极反应和光电流的产生.值得注意的是,激发光照射在不透明的二氧化钛电极背面,酶催化产生的过氧化氢必须经过搅拌作用扩

图 7 基于 Au/TiO₂ NTs 的 PEC α -synuclein 免疫分析方法^[65]

散到电极的受光面才能发挥电子供体的功能. 这种设计未能实现信号的明显放大. 利用该方法制得的光电免疫传感器在 50 pg/mL~100 ng/mL 的范围内对突触核蛋白(α -synuclein)进行检测, 检测限为 34 pg/mL.

最近, 基于光电化学、酶联免疫方法和生物催化沉积(biocatalytic precipitation, BCP)的协同作用, 本课题组报道了用 HRP 标记的放大型 PEC 免疫分析方法(图 8). 在 CdS QDs 修饰的 ITO 电极表面, 通过免疫反应形成夹心结构 Ab₁-Ag-Ab₂-HRP 免疫复合物, 然后利用 BCP 反应在电极表面形成不溶物覆盖层. 与传统的非标记型 PEC 免疫传感器相比, 这种新型传感器通过 HRP 标记二抗和 BCP 的引入, 不仅极大地增加了空间位阻效应, 同时也通过 BCP 放大过程在电极表面引入沉淀从而改变电极的光吸收特性. 此外, 因为 HRP 在 410 nm 的实验条件下有很强的光吸收性质, 所以在该体系中 HRP 除了引发 BCP 反应, 还能够竞争性的吸收入射光, 协同提高了检测灵敏度. 该工作以小鼠 IgG 为模型分子, 实验结果表明可以实现对待测物的高灵敏检测. 因为很多种酶都可以被引入该系统并且引发相关 BCP 反应, 所以本工作为发展高灵敏性的 PEC 免疫分析方法提供了一种新思路. 基于该工作结合纳米金标记放大技术, 我们

进而实现了对前列腺肿瘤标记物(prostate-specific antigen)的高灵敏检测^[67,70]. 同样基于标记型的设计, 蔡青云研究组^[59]的最新报道则利用竞争法实现了对多环芳烃待测物苯[a]芘(benzo[a]pyrene)的高灵敏检测.

3 总结与展望

PEC 免疫传感在分析检测和生物分子识别方面展现了独特的优势和广阔的前景, 为新型高灵敏免疫传感器的发展提供了一个新的途径. 虽然这一领域的研究工作还处于起步阶段, 但是已经引起广大科学工作者的关注, 成了当前免疫分析领域的一个新的研究热点. 将来的研究工作需要从以下几个方面进行开拓: (1) 合成新型光电活性材料, 特别是具有强可见光吸收的材料; (2) 发展新型免疫分子在光电活性物质表面的固定方法, 减少非特异性吸附, 提高生物相容性, 增加免疫分子的有效固载量, 提高检测灵敏度; (3) 建立新体系、构建新方法、探索新的信号传感机理、扩大可测定物质的范围. 最近, 我们课题组^[64]利用 ALP 标记, 开发出了一种原位产生电子给体的 PEC 免疫方法新方法(图 9). 鞠焜先研究组^[71]则引入化学发光代替物理光源, 开发出了一种基于 QDs 的 HRP 标记的 PEC 免疫分析方法. 在多组

图8 基于QDs的新型信号放大型PEC免疫分析方法^[67]

图9 基于ALP标记原位产生AA的PEC免疫分析方法^[64]

分同时检测方面,金利通研究组^[72]做了有益探索,开发出基于QDs的阵列电极,用于无标记检测兽药残留。随着技术的不断发展和相关研究的不断深入,

我们相信PEC免疫分析在临床诊断、环境监测、食品安全和医药研究等诸多领域一定会发挥出更加重要的作用。

参考文献

- 1 Ronkainen N J, Halsall H B, Heineman W R. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 1747–1763
- 2 Wu J, Fu Z F, Yan F, et al. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *Trends Anal Chem*, 2007, 26: 679–688
- 3 Ronkainen-Matsuno N J, Thomas J H, Halsall H B, et al. Electrochemical immunoassay moving into the fast lane. *Trends Anal Chem*, 2002, 21: 213–225
- 4 Chen H, Jiang C M, Yu C, et al. Protein chips and nanomaterials for application in tumor marker immunoassays. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 3399–3411
- 5 Rusling J F, Kumar C V, Gutkind J S, et al. Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst*, 2010, 135: 2496–2511
- 6 Qi H L, Ling C, Ma Q Y, et al. Sensitive electrochemical immunosensor array for the simultaneous detection of multiple tumor markers. *Analyst*, 2012, 137: 393–399
- 7 Li X M, Yang X Y, Zhang S S. Electrochemical enzyme immunoassay using model labels. *Trends Anal Chem*, 2008, 27: 543–553
- 8 Wang H, Wang J, Timchalk C, et al. Magnetic electrochemical immunoassays with quantum dot labels for detection of phosphorylated acetylcholinesterase in plasma. *Anal Chem*, 2008, 80: 8477–8484
- 9 Privett B J, Shin J H, Schoenfish M H. Electrochemical sensors. *Anal Chem*, 2010, 82: 4723–4741
- 10 Bakker E, Qin Y. Electrochemical sensors. *Anal Chem*, 2006, 78: 3965–3984
- 11 Peter L M. Dynamic aspects of semiconductor photoelectrochemistry. *Chem Rev*, 1990, 90: 753–769
- 12 Hagfeldt A, Boschloo G, Sun L C, et al. Dye-sensitized solar cells. *Chem Rev*, 2010, 110: 6595–6663
- 13 Tada H, Fujishima M, Kobayashi H. Photodeposition of metal sulfide quantum dots on titanium(IV) dioxide and the applications to solar energy conversion. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 4232–4243
- 14 Zhang C Y, Feng J, Ci Y X, et al. Photoelectric behavior of supercoiled DNA and its applications in molecular biology. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998, 46: 145–150
- 15 Li Q W, Luo G A, Feng J, et al. Photoelectrochemistry as a novel strategy for DNA hybridization detection. *Analyst*, 2000, 125: 1908–1910
- 16 Ci Y X, Zhang C Y, Feng J. Photoelectric behavior of mammalian cells and its bioanalytical applications. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998, 45: 247–251
- 17 Feng J, Zhang C Y, Ottova A L, et al. Photoelectric measurements of s-BLM/nucleoli: A new technique for studying apoptosis. *Bioelectrochemistry*, 2000, 51: 187–191
- 18 Gill R, Zayats M, Willner I. Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 7602–7625
- 19 彭芳, 朱德荣, 司士辉, 等. 光电化学型半导体生物传感器. *化学进展*, 2008, 20: 586–593
- 20 王光丽, 徐静娟, 陈洪渊. 光电化学传感器的研究进展. *中国科学 B 辑: 化学*, 2009, 39: 1336–1347
- 21 Zhang X R, Guo Y S, Liu M S, et al. Photoelectrochemically active species and photoelectrochemical biosensors. *RSC Adv*, 2013, 3: 2846–2857
- 22 Jia S P, Zhu B Z, Guo L H. Detection and mechanistic investigation of halogenated benzoquinone induced DNA damage by photoelectrochemical DNA sensor. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 2395–2400
- 23 Dong D, Zheng D, Wang F Q, et al. Quantitative photoelectrochemical detection of biological affinity reaction: Biotin-avidin interaction. *Anal Chem*, 2004, 76: 499–501
- 24 Liang M M, Liu S L, Wei M Y, et al. Photoelectrochemical oxidation of DNA by ruthenium tris(bipyridine) on a tin oxide nanoparticle electrode. *Anal Chem*, 2006, 78: 621–623
- 25 Liang M M, Guo L H. Photoelectrochemical DNA sensor for the rapid detection of DNA damage induced by styrene oxide and the Fenton reaction. *Environ Sci Technol*, 2007, 41: 658–664
- 26 Liang M M, Jia S P, Zhu S C, et al. Photoelectrochemical sensor for the rapid detection of *in situ* DNA damage induced by enzyme-catalyzed Fenton reaction. *Environ Sci Technol*, 2008, 42: 635–639
- 27 Jia S P, Liang M M, Guo L H. Photoelectrochemical detection of oxidative DNA damage induced by Fenton reaction with low concentration and DNA-associated Fe^{2+} . *J Phys Chem B*, 2008, 112: 4461–4464
- 28 Liu S L, Li C, Cheng J, et al. Selective photoelectrochemical detection of DNA with high-affinity metallointercalator and tin oxide nanoparticle electrode. *Anal Chem*, 2006, 78: 4722–4726
- 29 Dilgin Y, Gorton L, Nisli G. Photoelectrocatalytic oxidation of NADH with electropolymerized toluidine blue o. *Electroanalysis*, 2007, 19: 286–293
- 30 Yildiz H B, Freeman R, Gill R, et al. Electrochemical, photoelectrochemical, and piezoelectric analysis of tyrosinase activity by functionalized nanoparticles. *Anal Chem*, 2008, 80: 2811–2816

- 31 Golub E, Pelossof G, Freeman R, et al. Electrochemical, photoelectrochemical, and surface plasmon resonance detection of cocaine using supramolecular aptamer complexes and metallic or semiconductor nanoparticles. *Anal Chem*, 2009, 81: 9291–9298
- 32 Lu W, Jin Y, Wang G, et al. Enhanced photoelectrochemical method for linear DNA hybridization detection using Au-nanoparticle labeled DNA as probe onto titanium dioxide electrode. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23: 1534–1539
- 33 Lu W, Wang G, Jin Y, et al. Label-free photoelectrochemical strategy for hairpin DNA hybridization detection on titanium dioxide electrode. *Appl Phys Lett*, 2006, 89: 263902
- 34 Chen D, Zhang H, Li X, et al. Biofunctional titania nanotubes for visible-light-activated photoelectrochemical biosensing. *Anal Chem*, 2010, 82: 2253–2261
- 35 Zhu W, An Y R, Luo X M, et al. Study on acetylcholinesterase inhibition induced by endogenous neurotoxin with an enzyme-semiconductor photoelectrochemical system. *Chem Commun*, 2009, 45: 2682–2264
- 36 Zhang X R, Zhao Y Q, Li S G, et al. Photoelectrochemical biosensor for detection of adenosine triphosphate in the extracts of cancer cells. *Chem Commun*, 2010, 46: 9173–9175
- 37 Zhang X R, Li S G, Jin X, et al. A new photoelectrochemical aptasensor for the detection of thrombin based on functionalized graphene and CdSe nanoparticles multilayers. *Chem Commun*, 2011, 47: 4929–4931
- 38 Tu W W, Dong Y T, Lei J P, et al. Low-potential photoelectrochemical biosensing using porphyrin-functionalized TiO₂ nanoparticles. *Anal Chem*, 2010, 82: 8711–8716
- 39 Tu W W, Wang P, Lei J P, et al. Photoelectrochemistry of free-base-porphyrin-functionalized zinc oxide nanoparticles and their applications in biosensing. *Chem Eur J*, 2011, 17: 9440–9447
- 40 Shen Q M, Zhao X M, Zhou S W, et al. ZnO/CdS hierarchical nanospheres for photoelectrochemical sensing of Cu²⁺. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 17958–17964
- 41 Wang G L, Xu J J, Chen H Y. Dopamine sensitized nanoporous TiO₂ film on electrodes: Photoelectrochemical sensing of NADH under visible irradiation. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 2494–2498
- 42 Wang G L, Xu J J, Chen H Y. Selective detection of trace amount of Cu²⁺ using semiconductor nanoparticles in photoelectrochemical analysis. *Nanoscale*, 2010, 2: 1112–1114
- 43 Zhao W W, Yu P P, Xu J J, et al. Ultrasensitive photoelectrochemical biosensing based on biocatalytic deposition. *Electrochem Commun*, 2011, 13: 495–497
- 44 Zhao W W, Wang J, Xu J J, et al. Energy transfer between CdS quantum dots and Au nanoparticles in photoelectrochemical detection. *Chem Commun*, 2011, 47: 10990–10992
- 45 Zhao W W, Tian C Y, Xu J J, et al. The coupling of localized surface plasmon resonance-based photoelectrochemistry and nanoparticle size effect: towards novel plasmonic photoelectrochemical biosensing. *Chem Commun*, 2012, 48: 895–897
- 46 Merrick H, Hawlitschek G. A complete system for quantitative analysis of total DNA, protein impurities and relevant proteins. *Biotech Forum Eur*, 1992, 6: 398–403
- 47 Hurni W M, Miller W J, Zuk R F, et al. Detection of antibody to the PreS2 sequence of the hepatitis B virus envelope protein using an immuno-ligand assay with a silicon sensor detection system. *Immunol Method*, 1991, 145: 19–26
- 48 Olson J D, Panfili P R, Armenta R, et al. A silicon sensor-based filtration immunoassay using biotin-mediated capture. *J Immunol Methods*, 1990, 134: 71–79
- 49 Lee W E, Thompson H G, Hall J G, et al. Rapid detection and identification of biological and chemical agents by immunoassay, gene probe assay and enzyme inhibition using a silicon-based biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2000, 14: 795–804
- 50 Owicki J C, Bousse L J, Hafeman D G, et al. The light-addressable potentiometric sensor: Principles and biological applications. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1994, 23: 87–113
- 51 Pardo-Yissar V, Katz E, Wasserman J, et al. Acetylcholine esterase-labeled CdS nanoparticles on electrodes: Photoelectrochemical sensing of the enzyme inhibitors. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 622–623
- 52 Qian Z, Bai H J, Wang G L, et al. A photoelectrochemical sensor based on CdS-polyamidoamine nano-composite film for cell capture and detection. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25: 2045–2050
- 53 Wang G L, Yu P P, Xu J J, et al. A label-free photoelectrochemical immunosensor based on water-soluble CdS quantum dots. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 11142–11148
- 54 Wang J, Shan Y, Zhao W W, et al. Gold nanoparticle enhanced electrochemiluminescence of CdS thin films for ultrasensitive thrombin detection. *Anal Chem*, 2011, 83: 4004–4011
- 55 Wang J, Zhao W W, Tian C Y, et al. Highly efficient quenching of electrochemiluminescence from CdS nanocrystal film based on biocatalytic deposition. *Talanta*, 2012, 89: 422–426
- 56 Tong P, Zhao W W, Zhang L, et al. Double-probe signal enhancing strategy for toxin aptasensing based on rolling circle amplification. *Biosens Bioelectron*, 2012, 33: 146–151

- 57 Dong X Y, Mi X N, Zhao W W, et al. CdS nanoparticles functionalized colloidal carbon particles: Preparation, characterization and application for electrochemical detection of thrombin. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 3654–3659
- 58 Dong X Y, Zhao W W, Xu J J, et al. Magnetic particles and cadmium sulfide nanoparticles tagging for signal-amplifying detection of nucleic acids. *Sci China Chem*, 2011, 54: 1304–1310
- 59 Kang Q, Chen Y F, Li C C, et al. A photoelectrochemical immunosensor for benzo[a]pyrene detection amplified by bifunctional gold nanoparticles. *Chem Commun*, 2011, 47: 12509–12511
- 60 Haddour N, Cosnier S, Gondran C. Electrogeneration of a biotinylated poly(pyrrole–ruthenium(II)) film for the construction of photoelectrochemical immunosensor. *Chem Commun*, 2004, 40: 2472–2473
- 61 Haddour N, Chauvin J, Gondran C, et al. Photoelectrochemical immunosensor for label-free detection and quantification of anti-cholera toxin antibody. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 9693–9698
- 62 Wang G L, Xu J J, Chen H Y, et al. Label-free photoelectrochemical immunoassay for α -fetoprotein detection based on TiO_2/CdS hybrid. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25: 791–796
- 63 Kang Q, Yang L X, Chen Y F, et al. Photoelectrochemical detection of pentachlorophenol with a multiple hybrid $\text{CdSe}_x\text{Te}_{1-x}/\text{TiO}_2$ nanotube structure-based label-free immunosensor. *Anal Chem*, 2010, 82: 9749–9754
- 64 Zhao W W, Ma Z Y, Yan D Y, et al. *In situ* enzymatic ascorbic acid production as electron donor for CdS quantum dots equipped TiO_2 nanotubes: A general and efficient approach for new photoelectrochemical immunoassay. *Anal Chem*, 2012, 84: 10518–10521
- 65 An Y R, Tang L L, Jiang X L, et al. A photoelectrochemical immunosensor based on Au-doped TiO_2 nanotube arrays for the detection of α -synuclein. *Chem Eur J*, 2010, 16: 14439–14446
- 66 Tian J P, Zhao H M, Zhao H R, et al. Photoelectrochemical immunoassay for microcystin-LR based on a fluorine-doped tin oxide glass electrode modified with a CdS-graphene composite. *Microchim Acta*, 2012, 197: 163–170
- 67 Zhao W W, Ma Z Y, Yu P P, et al. Highly sensitive photoelectrochemical immunoassay with enhanced amplification using horseradish peroxidase induced biocatalytic precipitation on a CdS quantum dots multilayer electrode. *Anal Chem*, 2012, 84: 917–923
- 68 Baş D, Boyacı İ H. Quantitative photoelectrochemical detection of biotin conjugated CdSe/ZnS quantum dots on the avidin immobilized ITO electrodes. *Electroanalysis*, 2009, 21: 1829–1834
- 69 Zhou H Q, Tang Y L, Zhai J, et al. Enhanced photoelectrochemical detection of bioaffinity reactions by vertically oriented Au nanobranes complexed with a biotinylated polythiophene derivative. *Sensors*, 2009, 9: 1094–1107
- 70 Zhao W W, Dong X Y, Wang J, et al. Immunogold labeling-induced synergy effect for amplified photoelectrochemical immunoassay of prostate-specific antigen. *Chem Commun*, 2012, 48: 5253–5255
- 71 Tu W W, Wang W J, Lei J P, et al. Chemiluminescence excited photoelectrochemistry using graphene-quantum dots nanocomposite for biosensing. *Chem Commun*, 2012, 48: 6535–6537
- 72 Xiao F, Lai Y J, Zhang N D, et al. Photoelectrochemical immunosensor array based on thioglycolic acid capped CdS quantum dots for multiplexed detection of veterinary drug residues. *Chin J Chem*, 2012, 30: 1168–1176

Progress in photoelectrochemical immunoassay

ZHAO WeiWei, MA ZhengYuan, XU JingJuan & CHEN HongYuan

State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Photoelectrochemical (PEC) analysis is a newly established analytical approach based on the photo-to-electrical properties of photoactive materials. It possesses many intrinsic advantages such as remarkable sensitivity, simple instrument and inherent miniaturization. On basis of the combination of PEC analysis and immunoassay, the PEC immunoassay has advantageously inherited the high sensitivity and specificity from the PEC analysis and the immunorecognition, respectively. Its general sensing mechanism is that, upon illumination, the photoactive materials could convert the specific immunoreactions into electrical signals, thereby realizing the quantification of various analytes. In past years, with the rapid development of PEC analysis, the PEC immunoassay has attracted considerable interests, and significant progresses have been achieved in its advancement and application. This review introduces the basic principles, classification, characteristics as well as the progress of PEC immunoassay. The future prospects in this area are also evaluated and discussed.

photoelectrochemistry, semiconductor, immunoassay, sensing mechanism, progress

doi: 10.1360/972013-446