

化学发光在生化分析中的应用研究进展

刘萌 王子月 张春阳*

(山东师范大学化学化工与材料科学学院, 济南 250014)

摘 要 化学发光分析是利用化学发光反应的发光现象,对化学发光物质由激发态跃迁回基态时发出的光信号进行测量的一种分析方法。化学发光分析具有无需外来光源、灵敏度高、操作方便、分析快速以及易于实现自动化等优点,可与其它分析技术联用,在临床检验、药物分析和环境监测等领域具有广泛应用。近年来,纳米材料、生物芯片及微流控技术的引入促进了化学发光分析技术的发展。本文综述了化学发光分析与高效液相色谱、毛细管电泳、量子点、微流控芯片和微阵列、以及滚环扩增、等温指数扩增和两级等温扩增联用技术的发展,介绍了化学发光分析技术在DNA、生物小分子、生物酶、蛋白质和金属离子检测中的应用研究进展,并展望了其发展趋势。

关键词 化学发光; 超灵敏检测; 生化分析; 综述

1 引言

化学发光是指由化学反应引起的发光现象。化学发光分析是利用化学发光反应,对化学发光物质由激发态跃迁回基态时发出的光信号进行测量的一种分析方法^[1]。自1902年Schmitz最早合成鲁米诺化学发光试剂并用于血迹鉴定以来,化学发光(Chemiluminescence, CL)分析经过不断的发展完善,已成为生化领域常用的分析方法。目前,鲁米诺-H₂O₂化学发光体系、联吡啶钌电化学发光体系和四价锰离子化学发光体系是应用最为广泛的3个化学发光体系。

鲁米诺(3-氨基邻苯二甲酰肼,即5-氨基-2,3-二氢-1,4-二杂氮萘二酮)是最常用的化学发光剂。1928年,Albrecht最早发现在鲁米诺碱性溶液中加入H₂O₂会发生氧化还原反应,观测到微弱的蓝色发光^[2]。加入辣根过氧化物酶(HRP)等氧化剂或催化剂可增强化学发光强度^[3]。DNA酶是具有催化功能的DNA序列,具有合成简单和稳定性高等特点,能结合锌卟啉、氯高铁血红素等辅助因子^[4~6]。氯高铁血红素/G-四联体DNA酶是一种功能化核酸,能催化鲁米诺-H₂O₂反应产生化学发光^[7]。近年来,已发展了一系列DNA酶催化的化学发光体系,并将其应用于检测生物酶活性^[8~10]、转录因子^[3]、DNA^[11,12]、ATP^[12]和金属离子^[12]。Li等^[13]应用锰卟啉催化鲁米诺-H₂O₂化学发光体系检测血管内皮生长因子(VEGF)。Yan等^[14]利用上述发光体系同时定量分析混合物中多种金纳米颗粒(AuNPs)。Mokhtari等^[15]利用Cu(OH)₂/CuO纳米线催化鲁米诺-H₂O₂化学发光体系检测血浆中的半胱氨酸。

电致化学发光(ECL)是在电极上施加电压引发电化学反应,激发高能级电子转移反应而产生化学发光^[16]。电致化学发光具有发光物质原位生成、背景干扰近于零、反应时间和空间可控等特点^[17]。目前应用最广泛的电致化学发光剂是三价联吡啶钌[Ru(bipy)₃]³⁺。稳定的二价联吡啶钌络合物[Ru(bipy)₃]²⁺通过电化学氧化形成三价的[Ru(bipy)₃]³⁺, [Ru(bipy)₃]³⁺与分析物(或分析物的氧化产物)反应生成激发态的二价联吡啶钌[Ru(bipy)₃]^{2+*},该激发态不稳定,易跃迁回到基态发射光子,产生光信号^[18]。联吡啶钌化合物稳定性好,发光效率高,电化学可逆,可重复激发^[16]。但联吡啶钌化合物易氧化水,在水溶液中不稳定,限制了其广泛应用。McDermott等^[19]研制了两种稳定的三价联吡啶钌试剂,可用于生物碱、生物分子和药物的化学发光检测。Dong等^[20]利用CdSe量子点作为共反应剂定

量检测 DNA。Zhang 等^[21]将金纳米磁珠和电致化学发光相结合,用于检测前列腺特异性抗原 PSA。

酸性 KMnO_4 作为化学发光剂,历史悠久且应用广泛^[22],但四价锰化合物很少用作化学发光剂。1998 年,固定在聚酯树脂柱中的固体 MnO_2 首次作为新型化学发光剂用于检测异烟肼^[23]。检测原理是基于 MnO_2 还原产生的 Mn^{2+} 能抑制鲁米诺- H_2O_2 化学发光反应。但是 MnO_2 不溶于水,其应用范围有限。2001 年,Barnett 等^[24]首次将溶解在 H_3PO_4 和甲醛(可视作化学发光增敏剂)中的 Mn^{4+} 作为化学发光剂,用于检测吗啡和可卡因。McDermott 等^[25]将基于四价锰化合物的化学发光和高效液相色谱相结合,定量分析了血液中的谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)。

化学发光分析无需外部光源和单色器,背景干扰低,信噪比高,具有极高的灵敏度。另外,化学发光分析的仪器设备简单,造价低廉,操作方便,易于实现自动化^[26]。虽然化学发光分析存在特异性差、样品需前期处理等局限,但可通过与其它技术联用得以克服。尤其分子印迹技术、生物芯片和微流控技术以及纳米材料的引入显著提高了化学发光分析的特异性和灵敏度,简化了分析流程,节省了分析时间,促进了化学发光在临床检验、药物分析和环境监测等领域的应用。本文综述了化学发光分析与高效液相色谱、毛细管电泳、量子点、微流控芯片和微阵列、以及滚环扩增、等温指数扩增和两级等温扩增联用技术的发展,介绍了化学发光分析技术在 DNA、生物小分子、生物酶、蛋白质和金属离子检测中的应用研究进展,并对其发展趋势进行了展望。

2 化学发光与其它技术的联用

单一的化学发光分析在抗干扰性能、检测特异性和灵敏度、复杂样品的多重分析方面存在一定的局限性。化学发光分析与其它技术联用能显著提升功能,拓展应用范围。

2.1 基于非扩增技术的化学发光分析

2.1.1 基于高效液相色谱的化学发光分析 高效液相色谱法(HPLC)是常用的生物样品分离定量方法。高效液相色谱与化学发光分析联用综合了两者高分离效率和高灵敏度的优点,能实现多种物质的同时测定,显著提高检测通量和特异性。McDermott 等^[19]研制了两种可应用于 HPLC 柱后化学发光分析的三价联吡啶钌试剂。一种试剂是通过将 $[\text{Ru}(\text{bipy})_3](\text{ClO}_4)_2$ 溶解在乙腈(含 $0.05 \text{ mol/L HClO}_4$) 中获得,另一种试剂是通过将 $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解在 95:5 的冰醋酸-乙酸酐(含有 $0.05 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$) 中经 PbO_2 氧化而得到。这两种试剂都非常稳定,制备简便,无需反复校准,可重复使用。Ariga 等^[27]将鲁米诺化学发光和 HPLC 相结合,分析了植物中的 Fe^{3+} 螯合剂,检出限达 $7.7 \times 10^{-13} \text{ mol/L}$ 。Mu 等^[28]将 HPLC 和纳米金催化化学发光相结合,定量分析鼠脑中儿茶酚胺。McDermott 等将 HPLC 和化学发光联用,分别用酸性 KMnO_4 ^[29] 和三价联吡啶钌做化学发光剂^[25] 检测硫醇 GSH 和二硫化物 GSSG。

2.1.2 基于毛细管电泳的化学发光分析 应该指出的是,基于 HPLC 的化学发光分析的不足之处在于动态范围较窄。毛细管电泳(CE)的动态范围则相对较宽,且具有样品用量少、分辨率高和分离快速等优点^[30],与化学发光联用可以实现高选择性和高灵敏检测。微芯片毛细管电泳(MCE)是 CE 的微缩版,被广泛应用于检测无机和有机化合物、生物小分子和大分子^[26]。基于毛细管电泳的化学发光分析(CE-CL)的检出限一般在 $4.3 \times 10^{-6} \sim 3.6 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$,与化学发光共振能量转移(CRET)联用可改善至 $4.8 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$ ^[31]。Lin 等^[32]将离柱共轴流动接口和 CE-CL 相结合,有效克服了柱上气泡对检测稳定性的影响,可用于分析尿样中 4 种血红素蛋白,还可用于分析尿样中微量苯二酚异构体^[33]。

CE-CL 还可根据待测物对化学发光反应的增敏或抑制作用进行分析。Mu 等^[34]利用甲状腺素对鲁米诺-高锰酸钾化学发光反应的增敏作用,定量分析血清中甲状腺素,检出限为 $2.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。金纳米颗粒对鲁米诺- H_2O_2 化学发光反应具有增敏作用,可以和 CE-CL 联用检测人血清中免疫球蛋白 E^[35] 和癌胚抗原^[36]。另外,Zhang 等^[37]发展了一种与气相色谱联用的化学发光循环检测体系,通过周期性改变载体方向,可实现一次注射多次测量,显著提高了检测通量。

2.1.3 基于量子点的化学发光分析 近年来,新兴纳米技术和新型材料的引入显著提高了化学发光的检测灵敏度和特异性,并有望实现多重检测。量子点具有宽激发窄发射、高量子产率及光学稳定性好等

特点,作为新型发光材料在生物成像等领域得到广泛应用^[38,39]。碳量子点(又称碳点,CDs)具有化学惰性、低细胞毒性、易于功能化和抗漂白的特点。Zhang 等^[40]将碳点和电致化学发光相结合,利用 CDs 产生的双峰 ECL 对金属离子进行选择性的检测。在 0.1 mol/L 四丁基溴化铵(TBAB)乙醇溶液中,电化学还原的碳点和共反应剂之间的能量转移反应产生 ECL-1 峰;离子湮灭反应产生另一个 ECL-2 峰(如图 1)。ECL-2 峰相比 ECL-1 峰不易受环境干扰,可作为内参,提高检测准确度。该方法可用于检测 Fe^{3+} , 检出限为 7×10^{-7} mol/L。与碳量子点相比,石墨烯量子点(GQDs)具有稳定的电致化学发光性能和近乎于零的起始电位。Lu 等^[41]将 GQDs 和电致化学发光相结合,用于分析 DNA 损伤,检出限为 1.3×10^{-8} mol/L。

Zhou 等^[42]将 CE-CL 与量子点修饰的核酸适配体探针相结合,用于分析癌胚抗原,检出限为 8 pg/mL^[42]。Freeman 等^[12]将 CRET 和 DNA 酶及 CdSe/ZnS 量子点相结合,应用于检测 Hg^{2+} 、ATP 和多种 DNA。

2.1.4 基于微流体芯片和微阵列的化学发光分析 临床检测要求仪器便携、分析快捷、成本低廉。微流控芯片^[43~45]和微阵列^[46,47]的引入使化学发光分析趋于微量化和微型化。Lebiga 等^[48]将纸塑一次性微流控装置和智能手机摄像头及化学发光相结合,用于分析 H_2O_2 , 检出限达 2.5×10^{-7} mol/L。Zhao 等^[49]将蛋白质微阵列和化学发光相结合,用于定量检测肝癌患者和正常人血清中甲胎蛋白。Kunze 等^[47]将等温核酸扩增技术(iNAATs)、DNA 微阵列和化学发光相结合,同时检测 3 种病原体 DNA,检出限分别为 35, 1 和 5×10^3 GU/ μL 。与实时荧光定量 PCR 相比,该方法具有灵敏度高、检测时间短、样品消耗量少等优点。

2.2 基于扩增技术的化学发光分析

将化学发光与核酸扩增技术联用可显著提高检测灵敏度和特异性。等温扩增是基于酶促反应的核酸扩增技术,包括链置换扩增(SDA)^[8,50]、滚环扩增(RCA)^[9,10,51]、等温指数扩增(EXPAR)^[3,11,52]和切口酶信号扩增(NESA)^[53]等。等温扩增在恒温条件下即可发生,无需严格控制反应温度,扩增流程简单、扩增时间短。化学发光与核酸扩增技术相结合已应用于检测生物酶活性、蛋白质和 DNA,检出限可达 1×10^{-19} mol/L^[8]。

2.2.1 与滚环扩增联用的化学发光分析

滚环扩增(RCA)以环状 DNA 为模板,通过复制产生含有多个串联重复序列的单链 DNA^[54],可应用于超灵敏检测核酸^[55,56]、蛋白质^[57]和金属离子^[58]。最近,Zeng 等^[9]将基于发夹型探针介导的滚环扩增(PG-RCA)和化学发光相结合,用于分析 DNA 甲基化转移酶。DNA 甲基化转移酶能使发夹型探针发生甲基化,被 Dpn I 酶特异性识别和切割,产生单链 DNA,引发 PG-RCA 反应,产生大量 DNA 酶(图 2)。该方法检出限可达 1.29×10^{-4} U/mL,优于大多数检测 DNA 甲基化转移酶的方法^[59]。

Tang 等^[10]进一步将 RCA 和化学发光相结合,用于检测多核苷酸激酶(PNK)。PNK 催化单链 DNA 底物发生磷酸化,与挂锁型探针相结合形成环状 DNA,引发 RCA,产生大量 DNA 酶,催化产生化学发光信号。该方法检出限可达 2.20×10^{-4} U/mL。此外,Chen 等^[57]发展了基于 RCA 的化学发光免疫分析方法,可检测血清中重组人泌乳素,检出限为 0.16 fg/mL。

2.2.2 与等温指数扩增联用的化学发光分析 等温指数扩增具有扩增效率高、扩增速度快的特点^[4],能在短时间内产生大量寡核苷酸短链,广泛应用于核酸和蛋白质分析^[60,61]。Ma 等^[3]将 RNA 转录、EXPAR 和 DNA 酶诱导的化学发光相结合,用于超灵敏检测转录因子。转录因子能引发 EXPAR,产生大量

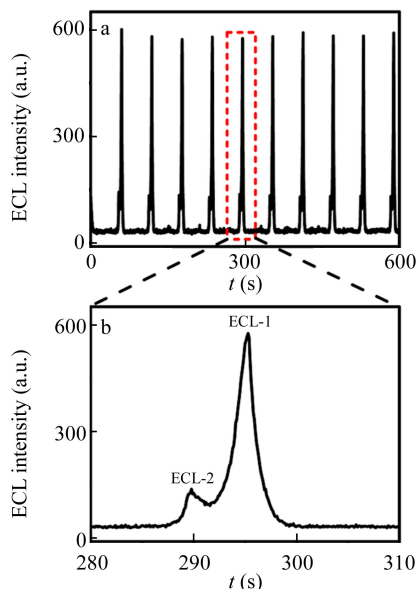


图1 碳点在含有 0.1 mol/L 四丁基溴化铵的乙醇溶液中的电致化学发光曲线。(a)电致化学发光具有良好重现性。(b)对(a)图中矩形内一个循环的放大^[40]

Fig. 1 ECL curves of CDs in ethanol containing 0.1 mol/L TBAB: (a) Reproducibility of ECL at a continuous scan mode. (b) Enlargement of one cycle highlighted with a rectangle in part a^[40] TBAB: tetrabutylammonium bromide.

DNA 酶,在氯高铁血红素辅助下催化产生放大的化学发光信号,检测动态范围为 $10^{-14} \sim 10^{-9}$ mol/L,检出限为 6.03×10^{-15} mol/L。

Gao 等^[11]将核酸外切酶 III (Exo III) 介导的指数扩增和化学发光相结合,用于超灵敏检测 DNA (图 3)。含 DNA 酶序列的探针和发夹型探针结合形成双链 DNA,可识别目标 DNA。Exo III 切割双链 DNA,释放目标 DNA 和 DNA 酶,引发指数扩增,产生大量目标 DNA 和 DNA 酶。DNA 酶可结合氯高铁血红素形成 G-四联体结构,催化产生化学发光信号。该方法检出限可达 8×10^{-15} mol/L。

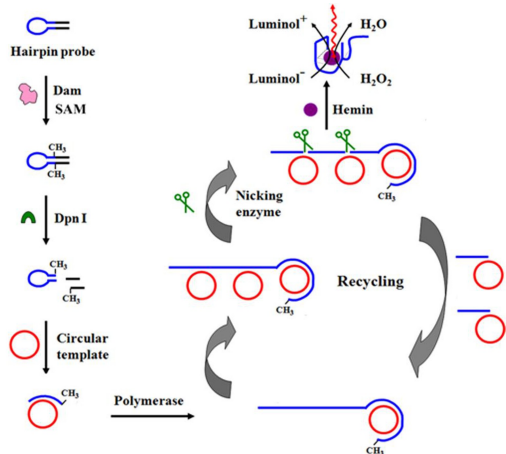


图 2 基于发夹型探针介导的滚环扩增和化学发光相结合,用于检测 DNA 甲基化转移酶^[9]

Fig. 2 Schematic illustration of Dam methyltransferase (MTase) assay using hairpin probe-based primer generation rolling circle amplification (PG-RCA)-induced chemiluminescence^[9]

应该指出的是,扩增反应不但需要考虑酶的特性和数量,而且需要设计特异性识别位点。最近,Bi 等将基于链置换的指数扩增和化学发光相结合,不需要酶的参与,可超灵敏检测 let-7a miRNA,检出限为 6.8×10^{-16} mol/L^[62]。

2.2.3 与两级等温扩增联用的化学发光分析 两级等温扩增涉及到两种扩增模板和两级扩增反应^[63]。第一级扩增反应产生目标序列,并引发下一级扩增;第二级扩增反应的产物为报告寡核苷酸(如 DNA 酶)。因为所涉及的两种引物相对独立,两级等温扩增的方案设计较为灵活,同一报告探针可用于分析多种目标序列^[63]。

Wang 等^[8]将两级等温扩增和化学发光相结合,可在单细胞水平上检测端粒酶活性(图 4)。一级反应为 SDA,二级反应为 EXPAR。端粒酶引发两级等温扩增,产生大量 DNA 酶,DNA 酶与氯高铁血红素反应形成氯高铁血红素-G-四联体,催化鲁米诺- H_2O_2 反应产生化学发光信号。该方法灵敏度高,可检测单个 HeLa 细胞中端粒酶活性,检出限达 1×10^{-19} mol/L,线性范围为 $10^{-19} \sim 10^{-9}$ mol/L。另外,Nie 等^[64]将两级等温扩增和 DNA 酶催化反应相结合,用于比色分析 DNA,检出限为 2.5×10^{-12} mol/L。应该指出的是,尽管比色分析的操作简便和低成本,但其检测灵敏度和线性范围与化学发光分析相比仍有差距。

3 化学发光分析的应用

3.1 检测 DNA

核酸分析是现代生物科学的核心领域。目前常用的核酸分析大都需要标记技术,例如光学分析中

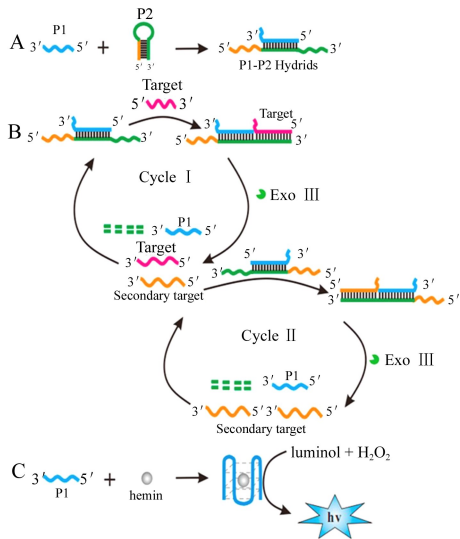


图 3 串联信号放大检测 DNA 示意图。(A) G-四联体结构序列 DNA(P1)和发夹型 DNA 探针(P2)结合形成无催化活性的杂交探针(P1-P2),(B) 外切酶 III 辅助的串联循环扩增,(C) G-四联体与氯高铁血红素结合形成 DNA 酶,催化 H_2O_2 -氧化鲁米诺反应产生化学发光^[11]

Fig. 3 Integration of exonuclease III (Exo III)-assisted cascade signal amplification with CL for homogeneous detection of DNA. (A) Hybridization of a quadruplex-forming DNA probe (P1) with a hairpin DNA probe (P2) leads to the formation of a catalytically inactive hybrid probe (P1-P2), (B) Exo III-assisted cascade signal amplification, and (C) the binding of G-Rich DNA with hemin yields a DNAzyme which can catalyze the luminal- H_2O_2 reaction to produce CL^[11]

3.5 检测金属离子

Freeman 等^[12]成功将化学发光应用于 Hg^{2+} 检测(图 5)。他们设计了两个 DNA 探针,这两个探针分别包含 DNA 酶亚基 I 和 II 以及含胸腺嘧啶(T)识别位点的亚基 III 和 IV。T 位点用于识别 Hg^{2+} ,亚基 III 和 IV 包含部分互补序列。 Hg^{2+} 能引发亚基 III 和 IV 形成 T- Hg^{2+} -T 复合物,导致两个 DNA 探针自组装成稳定 G-四联体,催化鲁米诺- H_2O_2 反应产生化学发光。

该方法检出限为 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。

Zhang 等^[40]将电致化学发光应用于铁离子检测。在 0.1 mol/L TBAB 乙醇溶液中,以 0.2 V/s 的速率在 $-3.0 \sim 3.0 \text{ V}$ 之间进行循环扫描,得到两个峰:一个峰(ECL-1)位于 -2.84 V 处,另一个峰(ECL-2)位于 -1.71 V 处,以 $R = \text{ECL-1}/\text{ECL-2}$ 对金属离子浓度作图可得到良好线性关系。该方法避免了复杂的分离和洗涤步骤,具有较好的准确度和灵敏度。

4 总结与展望

化学发光分析具有灵敏度高、设备简单、分析快速、易于实现自动化等优点,在生物分析、临床检验和环境监测等领域具有广泛应用^[74]。不可否认,化学发光分析也存在易受干扰、选择性差等局限。但这些问题可通过与分子印迹、毛细管电泳和等温扩增等技术联用得到解决。目前化学发光分析主要呈现出以下几个发展趋势:(1)发展新的化学发光剂和增强剂。尽管目前已有一系列性能优良的化学发光剂和增强剂^[75],但不同试剂适用于不同反应体系,急需发展更多新型的化学发光剂和增强剂,拓展化学发光分析的应用范围。(2)发展新的样品前期分离富集方法。通过开发分子印迹、固相萃取等样品前处理技术^[76,77],完善化学发光与 HPLC、CE 等高效分离方法的联用。(3)引入纳米材料,提高检测灵敏度。纳米材料尺寸小,具有其它材料无可比拟的物理和化学性能^[20,28,42,78]。纳米材料的引入将显著提高化学发光分析的检测灵敏度。(4)实现多种分析方法联用和多种组分同时测定^[12,47]。随着新分离富集方法的开发以及新型纳米材料的引入,有望实现单次分离多次测定和一份样品多组分测定。(5)实现样品的在线分析。目前生化分析逐渐向集成化和快速化方向迈进,推动化学发光分析向在线分析方向发展。(6)仪器设备小型/便携化、一体化、自动化。化学发光分析作为常用的即时检测(POC)手段,有助于推进实用化学发光仪器的商业化^[79,80]。(7)拓展化学发光分析的应用领域。随着化学发光分析技术的发展,其在生物分析、临床检验、药物筛选、食品分析和环境监测等领域的应用将会越来越广。

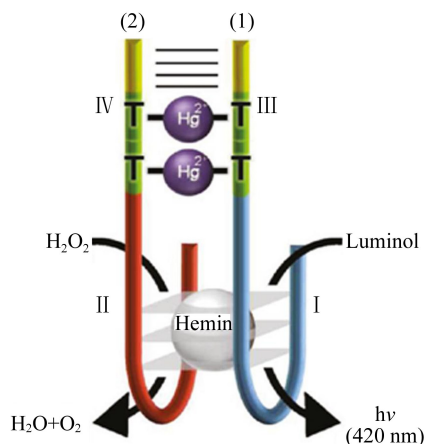


图 5 化学发光法检测 Hg^{2+} 示意图^[12]

Fig. 5 Schematic illustration for chemiluminescent detection of Hg^{2+} ^[12]

References

- 1 Weeks I. Amsterdam: Elsevier, 1992
- 2 Albrecht H O. Z. Phys. Chem., 1928, 136: 321
- 3 Ma F, Yang Y, Zhang C Y. Anal. Chem., 2014, 86(12): 6006–6011
- 4 Wang L J, Zhang Y, Zhang C Y. Chem. Commun., 2014, 50(97): 15393–15396
- 5 Zou P, Liu Y, Wang H, Wu J, Zhu F, Wu H. Biosens. Bioelectron., 2016, 79: 29–33
- 6 Wang G L, Fang X, Wu X M, Hu X L, Li Z J. Biosens. Bioelectron., 2016, 81: 214–220
- 7 Luo M, Chen X, Zhou G, Xiang X, Chen L, Ji X, He Z. Chem. Commun., 2012, 48(8): 1126–1128
- 8 Wang L J, Zhang Y, Zhang C Y. Anal. Chem., 2013, 85(23): 11509–11517
- 9 Zeng Y P, Hu J, Long Y, Zhang C Y. Anal. Chem., 2013, 85(12): 6143–6150
- 10 Tang W, Zhu G, Zhang C Y. Chem. Commun., 2014, 50(36): 4733–4735
- 11 Gao Y, Li B X. Anal. Chem., 2014, 86(17): 8881–8887
- 12 Freeman R, Liu X, Willner I. J. Am. Chem. Soc., 2011, 133(30): 11597–11604

- 13 Li W, Zhang Q, Zhou H, Chen J, Li Y, Zhang C, Yu C. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(16): 8336–8341
- 14 Yan N, Zhu Z, He D, Jin L, Zheng H, Hu S. *Sci. Rep.*, **2016**, 6: 24577
- 15 Mokhtari A, Goudarzi A, Benam M, Langroodi S M, Karimmohammad S, Keyvanfar M. *RSC. Adv.*, **2016**, 6(7): 5320–5329
- 16 Miao W. *Chem. Rev.*, **2008**, 108(7): 2506–2553
- 17 Deng S, Ju H. *Analyst*, **2013**, 138(1): 43–61
- 18 Leland J K, Powell M J. *J. Electrochem. Soc.*, **1990**, 137(10): 3127–3131
- 19 McDermott G P, Jones P, Barnett N W, Donaldson D N, Francis P S. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(13): 5453–5457
- 20 Dong Y P, Gao T T, Zhou Y, Jiang L P, Zhu J J. *Sci. Rep.*, **2015**, 5: 15392
- 21 Zhang J, Qi H, Li Z, Zhang N, Gao Q, Zhang C. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(13): 6510–6515
- 22 Srivastava S, Adholeya A, Conlan X A, Cahill D M. *Plant Food Hum. Nutr.*, **2016**, 71(1): 72–80
- 23 Alapont A G, Giménez E A, Zamora L L, Calatayud J M. *J. Biolumin. Chemilumin.*, **1998**, 13(3): 131–137
- 24 Barnett N W, Hindson B J, Lewis S W, Jones P, Worsfold P J. *Analyst*, **2001**, 126(10): 1636–1639
- 25 McDermott G P, Terry J M, Conlan X A, Barnett N W, Francis P S. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(15): 6034–6039
- 26 Liu Y X, Huang X Y, Ren J C. *Electrophoresis*, **2016**, 37(1): 2–18
- 27 Ariga T, Imura Y, Suzuki M, Yoshimura E. *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1014: 75–82
- 28 Mu C, Zhang Q, Wu D, Zhang Y, Zhang Q. *Biomed. Chromatogr.*, **2015**, 29(1): 148–155
- 29 McDermott G P, Francis P S, Holt K J, Scott K L, Martin S D, Stupka N, Barnett N W, Conlan X A. *Analyst*, **2011**, 136(12): 2578–2585
- 30 Xue Y, Gu X, Wang Y, Yan C. *Electrophoresis*, **2015**, 36(1): 124–134
- 31 Yang T, Vdovenko M, Jin X, Sakharov I Y, Zhao S. *Electrophoresis*, **2014**, 35(14): 2022–2028
- 32 Lin Z, Sun X, Lin Y, Chen G. *Analyst*, **2013**, 138(8): 2269–2278
- 33 Lin Z, Sun X, Hu W, Yin Y, Chen G. *Electrophoresis*, **2014**, 35(7): 993–999
- 34 Mu X, Li S, Lu X, Zhao S. *Electrophoresis*, **2014**, 35(7): 962–966
- 35 Liu Y M, Cao J T, Liu Y Y, Zhang J J, Zhou M, Huang K J, Chen Y H, Ren S W. *Electrophoresis*, **2015**, 36(19): 2413–2418
- 36 Jiang J, Zhao S, Huang Y, Qin G, Ye F. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1282: 161–166
- 37 Zhang R, Hu Y, Li G. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(12): 6080–6087
- 38 Zhou J, Wang Q X, Zhang C Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(6): 2056–2059
- 39 Zhou J, Yang Y, Zhang C Y. *Chem. Rev.*, **2015**, 115(21): 11669–11717
- 40 Zhang P, Xue Z, Luo D, Yu W, Guo Z, Wang T. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(12): 5620–5623
- 41 Lu Q, Wei W, Zhou Z, Zhou Z, Zhang Y, Liu S. *Analyst*, **2014**, 139(10): 2404–2410
- 42 Zhou Z M, Feng Z, Zhou J, Fang B Y, Ma Z Y, Liu B, Zhao Y D, Hu X B. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **2015**, 210: 158–164
- 43 Zeng X, Zhang K, Pan J, Chen G, Liu A Q, Fan S K, Zhou J. *Lab Chip*, **2013**, 13(14): 2714–2720
- 44 Lin X, Chen Q, Liu W, Zhang J, Wang S, Lin Z, Lin J. *Sci. Rep.*, **2015**, 5: 9643
- 45 Ge L, Wang S, Ge S, Yu J, Yan M, Li N, Huang J. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(43): 5699–5702
- 46 Seidel M, Niessner R. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406(23): 5589–5612
- 47 Kunze A, Dilcher M, Abd El Wahed A, Hufert F, Niessner R, Seidel M. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(1): 898–905
- 48 Lebiga E, Fernandez R E, Beskok A. *Analyst*, **2015**, 140(15): 5006–5011
- 49 Zhao Y, Zhang Y, Lin D, Li K, Yin C, Liu X, Jin B, Sun L, Liu J, Zhang A, Li N. *J. Int. Med. Res.*, **2015**, 43(5): 639–647
- 50 Zhu C, Wen Y, Peng H, Long Y, He Y, Huang Q, Li D, Fan C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399(10): 3459–3464
- 51 Yin J, Gan P, Zhou F, Wang J. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(5): 2572–2579
- 52 Zhang Y, Hu J, Zhang C Y. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(21): 9544–9549
- 53 Chen F, Zhao Y. *Analyst*, **2013**, 138(1): 284–289
- 54 Liu D, Daubendiek S L, Zillman M A, Ryan K, Kool E T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118(7): 1587–1594
- 55 Li Y, Liang L, Zhang C Y. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(23): 11174–11179

- 56 Zhang L R, Zhu G, Zhang C Y. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(13): 6703–6709
- 57 Chen H, Wu S, Dong F, Cheng W, Li Q, Ding S, Luo R. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **2015**, 221: 328–333
- 58 Zhou X, Su Q, Xing D. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 713: 45–49
- 59 Zhang Y, Xu W J, Zeng Y P, Zhang C Y. *Chem. Commun.*, **2015**, 51(73): 13968–13971
- 60 Ye L P, Hu J, Liang L, Zhang C Y. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(80): 11883–11886
- 61 Xue Q, Lv Y, Xu S, Zhang Y, Wang L, Li R, Yue Q, Li H, Gu X, Zhang S, Liu J. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 66: 547–553
- 62 Bi S, Zhang J, Hao S, Ding C, Zhang S. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(10): 3696–3702
- 63 Zhang Y, Zhang C Y. *Anal. Chem.*, **2011**, 84(1): 224–231
- 64 Nie J, Zhang D W, Tie C, Zhou Y L, Zhang X X. *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, 56: 237–242
- 65 Maity D, Jiang J, Ehlers M, Wu J, Schmuck C. *Chem. Commun.*, **2016**, 52(36): 6134–6137
- 66 Peterson E M, Manhart M W, Harris J M. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(12): 6410–6417
- 67 Liu S, Lin Y, Wang L, Liu T, Cheng C, Wei W, Tang B. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(8): 4008–4015
- 68 Zheng L, Liu X, Zhou M, Ma Y, Wu G, Lu X. *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 848: 67–73
- 69 Zhao L, Huang Y, Zhang L, Zhao S. *Plasmonics*, **2014**, 9(5): 1155–1161
- 70 El-Mahdy A F M, Shibata T, Kabashima T, Kai M. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(7): 859–861
- 71 Herbert B S, Hochreiter A E, Wright W E, Shay J W. *Nat. Protoc.*, **2006**, 1(3): 1583–1590
- 72 Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. *Cancer Res.*, **2016**, 76(12): 1–5
- 73 Hou T, Wang X, Liu X, Lu T, Liu S, Li F. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(1): 884–890
- 74 Lara F J, Airado-Rodríguez D, Moreno-González D, Huertas-Pérez J F, García-Campaña A M. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 913: 22–40
- 75 Gao L, He X, Ju L, Liu X, Li F, Cui H. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**: 1–8
- 76 Duan H, Wang X, Wang Y, Sun Y, Li J, Luo C. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 918: 89–96
- 77 Kang J, Han L, Chen Z, Shen J, Nan J, Zhang Y. *Food Chem.*, **2014**, 159: 445–450
- 78 Zhong J, Yuan Z, Lu C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**: 1–16
- 79 Park J Y, Kricka L J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406(23): 5631–5637
- 80 Ge L, Yu J, Ge S, Yan M. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406(23): 5613–5630

Recent Advance in Chemiluminescence Assay and Its Biochemical Applications

LIU Meng, WANG Zi-Yue, ZHANG Chun-Yang*

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract Chemiluminescence (CL) assay is able to measure the optical signal emitted from the CL reagents as a result of the transition from the excited state back to the ground state. CL assay has significant advantages such as no external light source, high sensitivity, convenient operation, rapid analysis and easy automation, and has wide applications in clinical test, drug analysis and environmental monitoring. Recently, the introduction of nanomaterials, biochip and microfluidic techniques promote the development of CL assay. In this review, we summarize the recent progress in CL assay with the integration of high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, quantum dots, microfluidic chips, microarrays, rolling circle amplification, isothermal exponential amplification, and two-stage isothermal amplification for the detection of DNA, small biological molecules, enzymes, proteins and metal ions. We also give a summary of its future directions and highlight its potential applications.

Keywords Chemiluminescence; Ultrasensitive detection; Bioanalysis; Review

(Received 7 June 2016; accepted 8 September 2016)

This work was supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (No. 21325523).