



电化学发光免疫传感技术在生物药物分析中的研究进展

付志锋*, 魏伟, 李翠芳, 王振兴

发光与实时分析教育部重点实验室; 西南大学药学院, 重庆 400716

*通讯作者, E-mail: fuzf@swu.edu.cn

谨以本文祝贺西南大学药学院成立五周年

收稿日期: 2010-09-27; 接受日期: 2010-12-01

doi: 10.1360/032010-682

摘要 随着生物及药物分析领域的不断扩展, 发展高灵敏度及高选择性的分析手段以解决复杂样品体系中低浓度待测物的分析测试问题是十分迫切的需求. 电化学发光分析方法由于具有线性范围宽, 灵敏度高及可控性强等优点, 是处理低浓度样品的有效工具. 这种方法与免疫传感技术相结合, 有利于实现生物体液等复杂样品中极低含量生化物质与药物的高选择性、高灵敏度检测. 本文综述了电化学发光免疫传感技术的发展状况, 介绍了近年来在电化学发光免疫传感中出现的新型固相载体、电化学发光探针和共反应物、以及多组分免疫传感技术等, 并对其在生物药物分析中的应用情况进行了总结.

关键词

电化学发光
免疫传感器
电化学发光探针
共反应物
生物药物分析

1 引言

随着生命科学的快速发展, 生物药物分析已经从传统的体外物质含量测定逐渐扩展到体内的生物活性物质示踪、致病原检测以及药物代谢研究等领域. 由于生物样品组成十分复杂, 待测物质含量较低, 并且干扰成分较多, 所以需要不断发展高选择性、高灵敏度、简单可靠的分析方法来满足这些领域的特殊需求.

电化学发光(ECL)检测是在化学发光和电化学基础上发展而来的一种分析方法, 其通过在电极上施加一定电压以引发电化学反应, 电化学反应释放的能量再激发发光体, 当激发态发光体返回基态时便产生光发射, 从而可以根据光发射强度来实现对待测物的分析^[1]. 1929 年 Harvey^[2]发现了电解鲁米诺时在电极附近出现的电化学发光现象, 随后基于各种发光试剂的电化学发光分析技术取得了长足的发展.

由于电化学发光具备背景噪音低、灵敏度高、可控性强及设备简单等优点, 已广泛用于环境监测^[3, 4]、临床诊断^[5, 6]、药品检测^[7-9]等分析领域, 显示出较强的应用潜力. 随着生物传感技术的发展而出现的电化学发光免疫传感技术, 结合了抗原抗体反应的高特异性和电化学发光检测的高灵敏度, 适用于对生物组织、体液等复杂生物样品中极低含量的生化物质及药物的分析. 与传统的荧光免疫、放射免疫、酶联免疫及化学发光免疫分析方法相比, 电化学发光免疫分析方法具有多方面的优点: (1)无需荧光免疫分析中复杂的光路系统, 并避免了散射光的干扰; (2)采用无放射性的电化学发光物质作为标记探针, 避免了放射免疫分析对环境的污染; (3)外部环境对检测体系的影响较小, 较各类基于酶催化反应的免疫分析结果更加可靠; (4)通过控制电压增强了发光分析过程的可控性, 使其更加便于操作. 目前基于电化学发光免疫分析原理的检测仪器已成功商品化, 如罗氏诊

断公司(Roche Diagnostics)的 Roche Elecsys®型电化学发光免疫分析仪及其配套试剂盒(www.roche.com)采用钌联吡啶衍生物作为标记探针, 磁珠为反应载体, 并结合自动化的试剂传输系统, 可快速检测多种疾病标志物. 这意味着电化学发光免疫分析继放射免疫分析-酶联免疫吸收分析(ELISA)-时间分辨荧光免疫分析-化学发光免疫分析之后, 将在临床免疫分析研究中产生深远影响.

近年来, 为提高电化学发光免疫传感方法的检测能力、降低分析成本并拓展其使用范围, 一系列新技术、新材料、新试剂、新器件、新装置被引入到这一高速发展的研究领域. 同时也有多篇关于电化学发光分析的综述对电化学发光免疫分析的进展进行了部分介绍^[1, 10-14]. 本文在此基础上从固相载体修饰、电化学发光探针合成及新型共反应物发现等方面全面综述了电化学发光免疫传感技术的研究进展及其在生物药物分析中的应用, 并对多组分电化学发光免疫传感器进行了介绍.

2 固相载体修饰

免疫传感技术的核心问题之一是以具有良好生物相容性和抗原抗体固定能力的载体及相应的修饰技术构建传感器的反应界面. 理想的载体可以有效地将生物分子固定于反应界面上, 并维持其生物活性, 以保证其对目标物充分、高效的免疫结合. 对于电化学发光免疫传感器而言, 同时还要求载体具备良好的导电及导光能力, 以满足电激发和光检测的需要.

2.1 磁微球载体

磁微球由于其反应面积大、磁分离方便等优点, 是电化学发光免疫传感技术中应用最为成熟的固相载体. 其通常在微米级的包裹有顺磁性 Fe_3O_4 内核的聚苯乙烯球表面修饰上氨基、羟基、羧基或醛基等活性功能基团, 以化学键合及亲和素-生物素作用固定生物分子, 并利用外磁场将免疫磁微球吸附到电极表面进行免疫结合和信号检测, 实现对目标物质的快速、灵敏检测^[10].

Yan 等^[15]将免疫磁微球-电化学发光(IM-ECL)方法成功用于人血清中 p 53 抗体的检测. 其利用三抗体夹心模式, 即在链霉亲和素化的磁珠表面连接上

生物素化的 p 53 单克隆抗体, 随后与 p 53 蛋白、检测抗体以及钌联吡啶($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)标记的抗抗体形成免疫复合物, 然后在外加磁场的作用下将磁微球固定到电极表面. 当加入共反应物三丙胺(TPA)时产生可被检测的光信号, 实现了对 p 53 抗体的定量检测. 由于采用高免疫反应效率的磁微球载体及单克隆抗体等放大技术, 同时以自制的石英纤维束介导的光电信倍增管为检测器, 使得对 p 53 抗体的检测限达到了 10 pg/mL. 该分析方法只需 30 分钟的孵育时间及 50 秒的信号采集时间, 相对传统的 ELISA 在灵敏度、线性范围及分析速度方面都具有显著优势.

Wilson 等^[16]将生物素及 2,4,6-三硝基甲苯(TNT)结构类似物结合到氨基化葡聚糖上, 制备了抗原修饰的葡聚糖, 并基于竞争免疫分析原理, 发展了一种新颖的 TNT 检测方法. 首先, 样品中的 TNT 与葡聚糖固定的抗原竞争结合葡萄糖氧化酶标记的 TNT 抗体, 并通过与链霉亲和素修饰的磁微球反应, 将连接有酶标免疫复合物的葡聚糖在外磁场的作用下从样品中分离出来. 最后加入电化学发光反应溶液(包括鲁米诺及葡萄糖), 即可产生电化学发光用于分析 TNT 的含量, 检测限达到了 31 ppb.

传统的 IM-ECL 方法只是将磁微球用作抗原抗体的载体, 利用其较大的反应面积及顺磁性来实现对检测物的快速结合与分离. Li 等^[17]却将磁微球作为 ECL 探针的载体, 发展了检测癌胚抗原(CEA)的超灵敏 IM-ECL 方法(见图 1). 其首先在硅烷化的玻片上固定 CEA 抗体, 后利用夹心免疫反应将 CEA、生物素化的 CEA 抗体及链霉亲和素化的磁珠连接到初期固定载体上. 再加入化学解链剂将磁珠转移到离心

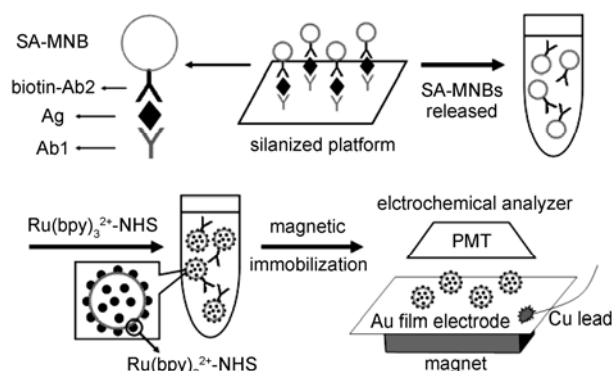


图 1 基于磁微球载体的电化学发光免疫传感器检测 CEA^[17]

管中与钌联吡啶琥珀酰亚胺酯($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS}$)结合, 经外加磁场分离后, 电化学发光物质在电极表面得到了富集, 实现了 ECL 信号的放大, 检测限达到了 1.6 pg/mL .

磁微球作为电化学发光免疫传感技术中应用最为成熟的载体, 具有巨大的实用价值. 目前, 商品化电化学发光检测仪及其配套试剂盒, 例如 Bio Veris ORIGIN[®]、M-SER-IES[®]及 Roche Elecsys[®] 等均是采用磁微球分离技术, 这些产品不仅具备极高的灵敏度, 还具有非常宽的线性范围, 在临床上已得到非常广泛的应用^[10].

2.2 修饰电极载体

电极类载体由于结构简单、制作成本低且可反复利用, 是电化学发光免疫分析中另一种重要的载体. 通过在电极表面直接固定生物分子, 只需简单的冲洗即可实现免疫复合物与游离抗原抗体的分离, 避免了复杂的实验装置, 降低了仪器及试剂成本. 为改善这类免疫传感器的技术参数, 发展具备良好导电/导光性及生物相容性, 且可与电极牢固结合的固定基质是十分重要的.

Miao 等^[18]利用金硫键作用将 3-巯基丙酸及 16-巯基十六烷基酸混合组装到金电极表面, 通过化学键合作用连接亲和素, 再与生物素化的 C-反应蛋白抗体结合, 实现了抗体在金电极表面的固定. 基于夹心免疫反应模式, 检测物 C-反应蛋白、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体被相继结合到电极载体表面. 在共反应物 TPA 作用下, 产生电化学发光信号, 建立了对 C-反应蛋白的检测方法, 线性范围为 $1\sim 24 \text{ }\mu\text{g/mL}$. 该电极修饰方法虽然简单, 但由于组装时间较长且电极表面固定抗体有限, 限制了免疫传感器的检测性能. 云雯等^[19]将金电极置于吡咯与抗体的混合溶液中, 通过施加 800 mV 电压 200 s , 即实现了抗体与吡咯在电极表面的共聚合, 并利用三明治夹心法检测了人免疫球蛋白(IgG), 检测限为 $20 \text{ }\mu\text{g/L}$.

近年来, 纳米材料的蓬勃发展为电极修饰技术带来了革命性的变化. 纳米材料拥有巨大的比表面积, 同时具有许多独特的生物学和光电性质. 因此越来越多的研究采用纳米材料对电极表面进行功能化, 创造适宜的免疫反应及电化学发光反应环境. 其中纳米金及碳纳米管(CNT)等材料不仅对蛋白质具有良好的结合能力和生物相容性, 还可增强电极表面

的电子传递能力, 因此在电化学发光免疫传感器的构建中得到了广泛应用^[12, 20].

Yin 等^[21]通过金电极表面上修饰的纳米金增大了抗体的固定量, 并采用 4-(二甲基氨基)丁酸作为示踪抗体的标记物, 在电化学发光剂 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的存在下, 实现了对人 IgG 及牛血清白蛋白(BSA)的测定. 与无纳米金放大的直接抗体固定模式相比较, 该检测方法对人 IgG 和 BSA 的灵敏度分别提高了 10 倍和 6 倍. 本课题组^[22]也曾采用壳聚糖-纳米金复合膜将人 IgG 修饰于玻碳电极上, 以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 为发光探针, 利用竞争免疫法检测了人体内 IgG 含量, 检测限达到了 6.5 ng/mL . 除以上简单的固定作用外, 纳米金还可以直接催化鲁米诺类物质的电化学发光反应, 增强 ECL 信号^[23, 24]. Qi 等^[25]以纳米金修饰的石墨电极为换能器, 采用 *N*-(4-氨基丁基)-*N*-乙基异鲁米诺(ABEI)探针标记兔抗人 IgG, 基于纳米金对 ABEI 电化学发光信号的增强作用, 建立了人 IgG 的高灵敏度均相电化学发光检测方法, 检测限达到 $1.0\times 10^{-11} \text{ g/mL}$. Tian 等^[26]通过 1,3-丙二硫醇将纳米金修饰到金电极表面, 用于吸附人 IgG 抗体, 并利用夹心免疫反应将 ABEI 标记抗体结合到电极表面, 由于纳米金对电化学发光信号的增强作用, 使得对人 IgG 检测限达到了 1.68 ng/mL , 在这项工作中纳米金同时起到了固定载体和信号放大的作用.

Wohlstadtter 等^[27]将 CNT 与聚乙烯基醋酸乙烯酯混合后进行压片, 得到的片状电极经一系列化学处理后可固定甲胎蛋白, 用于制备甲胎蛋白免疫传感器. 该传感器由于具有纳米纤维束的特点及宏观体系的优势, 使甲胎蛋白的检测限达到了 7 ng/mL . Sardesai 等^[28]将长约 $20\sim 30 \text{ nm}$ 的单壁碳纳米管垂直自组装到 Nafion-氧化铁薄膜修饰的热解石墨电极表面, 用以固定前列腺蛋白抗体, 并采用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 纳米粒子标记另一抗体, 实现了前列腺蛋白的高灵敏度检测. 该方法较无单壁碳纳米管修饰的电化学发光传感器灵敏度提高了 34 倍(见图 2).

3 电化学发光标记物探针的合成

电化学发光探针的性能对于电化学发光免疫分析参数的影响是显而易见的, 发光效率高的探针可以有效而直接地提高这类方法的灵敏度, 实现对极低浓度样品的检测^[14]. 除了传统的钌联吡啶外, 近年

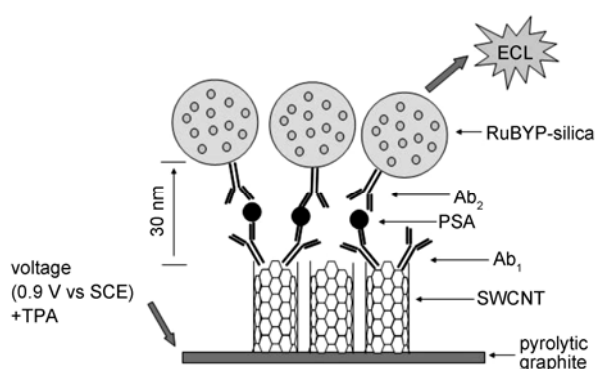


图2 基于单壁碳纳米管修饰电极的电化学发光免疫传感器检测 PSA^[28]

来也出现了一些新型的电化学发光探针,但是总体来说,这些新型探针在灵敏度、稳定性等关键性质上与钌联吡啶相比仍然有较为明显的差距。

3.1 钌联吡啶类探针

钌联吡啶琥珀酰亚胺酯($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS}$),由于保持了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的发光性能且易于和蛋白质结合,是电化学发光免疫分析中应用最为普遍的标记物,已广泛用于很多物质的检测。例如 Zhang 等^[29]和 Fang 等^[30]分别利用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS}$ 标记不同生物分子用于电化学发光免疫传感,成功建立了地高辛、BSA 和溶菌酶的检测方法。这种探针由于其在灵敏度和稳定性上的出众性能,已经率先实现商业化,并为各类电化学发光免疫试剂盒所采用。

基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的多钌金属复合物,由于具有多个电化学发光活性中心,可实现对 ECL 信号的倍增,近年来已有多篇文献报道^[31-33]。Zhou 等^[31]合成了具有 3 个 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 单元的树突状多钌金属复合物,并将其成功用于 BSA 的标记。该复合物不仅增强了电化学发光效率,而且由于该探针只与蛋白表面的一个氨基部位结合,避免了多部位标记方法可能造成的生物分子活性的下降。Staffilani 等^[32]连续合成了多种钌金属复合物用于抗体的标记,结合磁微球技术,对黄体酮进行了免疫竞争分析(见图 3)。虽然多钌复合物探针可提高 ECL 信号,但由于会造成抗体凝集以及非特异性背景信号增强,所以其应用性受到了限制。

Bard 等^[34]将包裹大量 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的聚苯乙烯微球进行表面亲和素化处理,与生物素标记的抗 C-反应蛋白进行反应,大大提高了探针标记量,该方法被

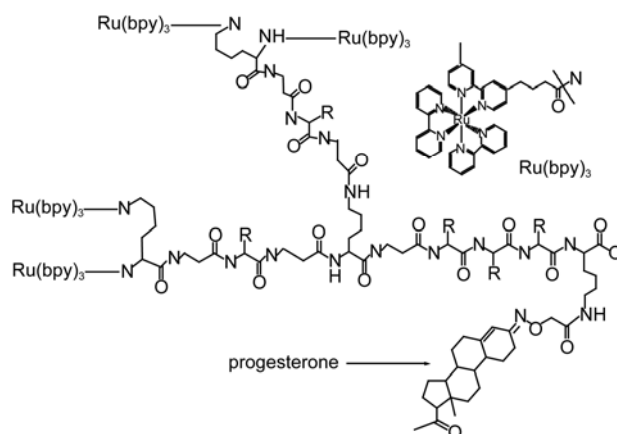


图3 四 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 复合物标记探针结构式^[32]

成功用于人体 C-反应蛋白的检测,检测限为 $0.010 \mu\text{g/mL}$ 。Pittman 等^[35]利用类似方法成功地对水及土壤中的 TNT 进行了灵敏的测定。以上检测方法由于在破坏聚苯乙烯微球使其释放 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 过程中需要使用乙腈等毒性有机溶剂,实际应用受到了限制。为解决这一问题, Bard 等^[36]随后又使用脂质体包裹 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 作为电化学发光标记物用于人体 C 反应活性蛋白的测定,测定过程中只需采用毒性较小的表面活性剂 Triton-100 将脂质体破坏并释放出大量 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。基于同一原理, Egashira 等使用这种脂质体放大技术通过竞争法测定了流感病毒红血球凝集素分子^[37]及 BSA^[38](见图 4)。

以上使用包裹型标记物的电化学发光信号放大

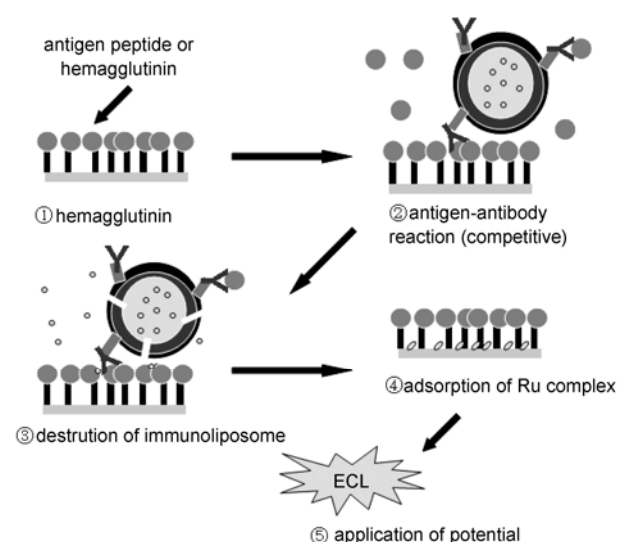


图4 基于脂质体包裹 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记探针检测流感病毒红血球凝集素分子^[37]

技术虽然提高了检测的灵敏度,但由于需要通过破坏外包围囊来释放 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,明显增加了操作的复杂性.而掺杂型纳米探针无需这个过程,使用起来更加方便,因此被更加广泛地使用^[28, 39~43].例如, Yang 等^[41]采用微乳化法合成了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 掺杂的硅纳米粒子,利用化学键合作用标记于羊抗鼠 IgG 抗体上.该标记物保持了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的电化学发光活性,且不需任何释放过程即可实现对鼠 IgG 的高灵敏检测. Mao 等^[43]采用 Nafion 膜修饰二氧化钛纳米粒子(TiO_2),利用静电作用吸附人绒毛膜促性腺激素抗体,再通过离子交换作用将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 结合到 TiO_2 纳米粒子表面,成功制备了 Ru-Nafion@ TiO_2 抗体标记物.基于夹心反应模式,该探针被结合到金电极表面,建立对人绒毛膜促性腺激素的检测方法,检测限为 0.007 mIU/mL.

3.2 鲁米诺类探针

基于鲁米诺类物质作为电化学发光探针标记生物分子的免疫传感器已有报道^[44, 45]. *N*-(4-氨基丁基)-*N*-乙基异鲁米诺(ABEI)由于易于标记且标记后发光性能不会明显降低,已成为最为成功的鲁米诺类电化学发光探针物质^[25, 26].和钌联吡啶类物质一样,鲁米诺类物质直接标记时,标记率不会太高,因此可以采用蛋白质和纳米粒子等载体进行间接标记,以克服这一问题.例如 Qi 等^[45]将鲁米诺连接到载体蛋白 BSA 上后再标记地高辛,避免了直接标记小分子半抗原所造成的标记率低,发光信号弱等缺陷. Tian 等^[46]利用鲁米诺直接还原氯金酸制备纳米金,然后用于标记 IgG 抗体.由于鲁米诺氨基中的氮原子可以与纳米金形成共价键,使大量鲁米诺分子结合在纳米金表面,倍增了电化学发光信号的强度,使检测灵敏度大大提高.结合亲和素-生物素放大体系,该电化学发光免疫传感器对人 IgG 的检测限低达 1.0 pg/mL.

虽然以鲁米诺类物质为电化学发光的信号探针具备了较高的灵敏度,但由于鲁米诺类物质的电化学发光机理较为复杂,影响因素较多,导致其稳定性较差,这非常不利于其进入到实际应用领域.因此,目前这类探针离商业化尚有较大差距.

3.3 量子点类探针

2002 年, Bard 等^[47]首先发现了硅量子点(QDs)的电化学发光现象,自此开辟了电化学发光研究的新领域. Wang 等^[48]合成了表面带有羧基的碲化镉/硫化

镉核壳结构 QDs,用于标记 C 反应蛋白抗体.基于夹心反应模式,该探针被结合到磁微球表面并在外磁场的作用下富集到 Au/CD 电极表面.通过与高效共反应剂二丁基乙醇胺(DBAE)的作用,产生了强烈的 ECL,该方法对 C 反应蛋白的检测限为 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Qian 等^[49]合成了碲化镉 QDs 修饰的二氧化硅纳米粒子,制备了新型电化学发光探针,用于标记羊抗兔 IgG.由于硅纳米粒子表面结合了较多 QDs,所以电化学发光信号得到显著放大.

除此之外, Shan 等^[50]还报道了一种基于能量清除原理的电化学发光淬灭型免疫传感器.其首先在电极表面修饰上硫化镉/镉复合 QDs,用于固定羊抗鼠 IgG,并经夹心免疫反应将碲化镉标记的抗体结合到电极表面.由于该碲化镉经活化处理后丧失了电化学发光特性,却反而吸收电极表面的硫化镉/镉复合 QDs 的电化学发光,造成电化学发光信号的降低.基于该现象,建立了对鼠 IgG 的免疫传感方法.

将 QDs 及生物分子共同固定在电极表面后,利用抗原和抗体的结合可影响电极表面的状态,进而降低 QDs 的 ECL 效率,可最终实现对抗原的 ECL 检测.基于这种思想, Jie 等以纳米金、碳纳米管、3-氨基丙基-三乙氧基硅烷以及二烯丙基二甲基氯化铵聚合物将 QDs 和抗体固定于电极表面,发展了一系列抑制型 ECL 免疫传感器,实现了对低密度脂蛋白^[51]、人血清蛋白^[52]以及人 IgG^[53~55]的高灵敏度检测,检测限可低至 pg 级.近来其又基于多重放大技术设计了超灵敏的直接抑制型电化学发光免疫传感器,用于肿瘤标记物 CEA 的分析时检测限达到了 0.064 pg/mL(见图 5).该方法首先合成了碲化镉-硫化镉 QDs,并在其表面修饰上二氧化硅包裹的纳米金单层,该复合纳米粒子较单纯 QDs 的电化学发光信号提高了 17 倍,通过使用硅烷偶联剂及纳米金作为交联剂固定抗体分子后,实现了对分析物的超灵敏检测,线性范围达到了 5 个数量级^[56].这种方式无需将发光探针标记到抗体上,它实际上是一种非标记型的探针使用方式,因此,和传统的标记型探针相比,显然更加方便和简单.

3.4 其他类型探针

稀土金属 Tb(III)的芳香族螯合物是热电子介导的阴极电化学发光免疫传感器中使用较为常用的标记探针,具有较长的电化学发光寿命及较高的发光

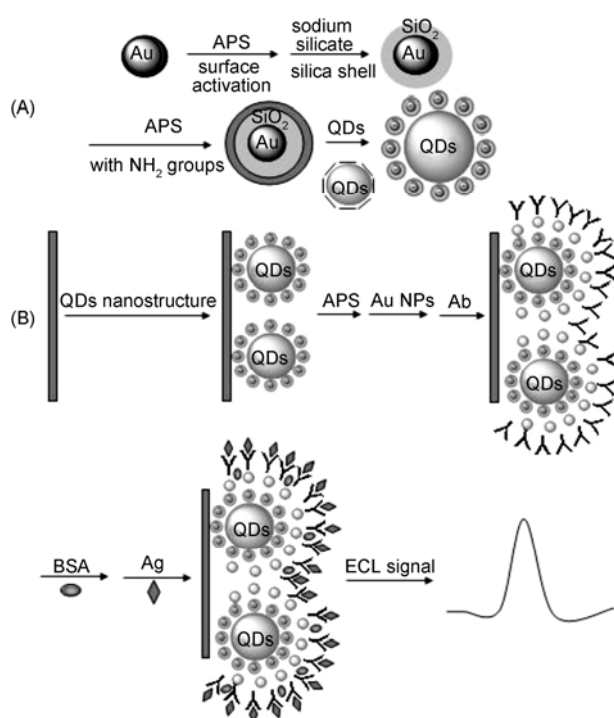


图5 直接抑制型硒化镉-硫化镉量子点电化学发光型免疫传感器检测CEA^[56]

效率, 因此可以通过控制时间窗口来有效降低背景噪音, 实现高灵敏度的信号检测. Kulmala 等^[57]及 Eskola 等^[58]分别利用自制及商业化的 Tb(III)芳香族螯合物标记抗体, 采用氧化物修饰的铝电极作为换能器, 建立了促甲状腺激素的竞争及夹心免疫检测方法. 但氧化物修饰铝电极在微碱性的水溶液中稳定性较差, 影响了分析方法的灵敏度. Helin 等^[59]及 Ala-Kleme 等^[60]采用氧化物修饰的硅电极作为换能器, 成功实现了促甲状腺激素及人 C 反应蛋白的高灵敏度免疫传感.

酶由于其较高的催化反应效率, 近年来在电化学发光免疫传感器构建中也得到一定程度的应用. 其原理是通过酶催化反应, 产生或消耗电化学发光反应中所需的共反应物质, 实现对分析物的免疫检测. 例如, Wilson 等以过氧化物酶及葡萄糖氧化酶标记抗体, 基于直接或间接免疫竞争反应结合到磁微粒及金电极表面后, 通过催化电化学反应或者葡萄糖氧化反应产生的 H_2O_2 与鲁米诺发生的电化学发光反应, 产生可检测的光信号, 从而对 TNT^[61]及季戊四醇四硝酸酯^[62]进行了检测. Kurita 等^[63]采用乙酰胆碱酯酶标记抗体, 通过对底物乙酰硫代胆碱的催化

分解作用产生硫代胆碱. 该酶解产物经金硫键作用被富集于金电极表面, 并与 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 发生强发光的电化学发光反应, 该方法对肿瘤坏死因子的检测限达到了 3.4 pg/mL. H_2O_2 作为硫化镉量子点的共反应剂对其电化学发光反应有着重要影响. Liu 等^[64]将二巯基丁二酸稳定的硫化镉 QDs 及人 IgG 固定于玻碳电极表面构筑了电化学发光识别层, 过氧化物酶标记的抗体经抗原-抗体反应结合到电极表面, 由于其降低了电极表面的电子传递速率, 并消耗了阴极极化过程自生的 H_2O_2 , 导致了 QDs 电化学发光信号的降低, 实现了对人 IgG 的宽范围检测.

将电化学发光共反应物作为标记探针, 用于电化学发光免疫传感器的构建也有报道. 例如, Yin 等^[21]将叔胺类衍生物 4-(二甲基氨基)丁酸标记 BSA 及羊抗鼠 IgG, 利用其与 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 的电化学发光反应, 实现了对 BSA 及鼠 IgG 的检测. Wu 等^[65]通过夹心反应将引发剂 *N*-羟基琥珀酰亚胺溴异丁酸酯标记的单克隆 CEA 抗体结合到金电极表面, 随后又利用一价铜及 2,2'-联吡啶介导的催化作用将甲基丙烯酸缩水甘油酯单体聚合到抗体上, 由于该聚合物具有大量的环氧基团可与二异丙基乙二胺反应, 实现了共反应物的富集, 极大增强了 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 的电化学发光强度, 对 CEA 的检测限达到了 0.5 pg/mL. 由于叔胺类衍生物大多具有良好的生物相容性及稳定性, 且标记效率较高, 使得更多的共反应物探针有望被应用.

4 高效共反应物

提高电化学发光免疫分析灵敏度的另一种途径是寻求高效的共反应物, 用以增强电化学发光信号强度. $Ru(bpy)_3^{2+}$ 由于其显而易见的优点, 在电化学发光分析中应用最为广泛, 同时对该发光体系的共反应物研究也较为深入. 李海娟等^[66]对 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 与各种共反应物例如草酸、过硫酸根、丙酮酸及胺等的电化学发光反应机理进行了归纳. 其中 TPA 由于增强效果好且稳定性高, 自 Leland 及 Powell^[67]发现以来一直被用作 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 电化学发光体系的共反应物. Zu 等^[68]和 Yin 等^[69]通过在反应溶液中添加卤化物或表面活性剂, 进一步改善了电极表面的疏水性, 并减少了表面氧化物的形成, 使 $Ru(bpy)_3^{2+}$ /TPA 的电化学发光信号大大增强. 但 TPA 具有挥发性且毒性较高, 通常需要在高浓度(100 mM)下参与电化学发光反应,

因此寻找其他低毒高效的共反应物成为近年来的研究热点. Liu 等^[70]发现了在电极表面具有较快氧化速度的共反应物二丁基乙醇胺在低浓度时即可实现对电化学发光信号的有效增强, 且对电极材料的要求也较低, 其在铂电极上的发光强度大约是 TPA 体系的 100 倍, 该体系已成功用于电化学发光免疫传感器的研究^[22]. Yin 等^[71]研究了三种氨基酸类物质对 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电化学发光的影响, 发现在强碱性条件下, 氨基三乙酸对 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的 ECL 具有明显的增强效果, 有望应用于电化学发光免疫传感.

基于量子点的电化学发光反应体系由于发现较晚, 其共反应物的研究也处于起步阶段, 但已有一些报道. 例如硫化镉/ $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 、碲化镉/DBAE、硒化镉/ H_2O_2 、碲化镉/ SO_3^{2-} 及硫化镉/ H_2O_2 等电化学发光体系相继建立, 有效的促进了电化学发光免疫传感技术的发展^[48, 54, 72-74].

5 多组分电化学发光免疫传感器

可在单个分析流程中同时检测多个组分的多组分免疫传感器近年来得到了长足的发展, 并在疾病早期诊断等重要领域具有较高的应用价值. 相对于近几年蓬勃发展的电化学^[75-77]、荧光^[78-80]和化学发光^[81-85]多组分免疫传感器, 基于电化学发光检测的多组分免疫传感器研究略显滞后, 相关文献也相应较少.

光导纤维技术的发展为电化学发光多组分免疫传感器提供了有用的研究平台. Chovin 等^[86]设计了一种基于光导纤维的亚微米传感器阵列, 可用于远程电化学发光成像. 通过对光导纤维束的化学腐蚀, 在光导纤维束一端形成圆锥形尖端阵列, 然后在被腐蚀端的表面溅涂透明的导电氧化铟锡薄层, 并将其他部位绝缘. 利用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /TPA 电化学发光体系, 在传感器阵列的另一端产生与被腐蚀端对应的 ECL 亮斑, 该设计有望用于阵列型电化学发光多组分免疫传感器的构建. Deiss 等^[87]使用灼蚀的修饰有金层的光导纤维作为电极, 用三种不同荧光编码的微球固定不同抗体后阵列式置于电极表面上, 采用夹心免疫反应结合 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的抗体, 最后通过荧光编码识别不同组分, 通过 ECL 强度测定各组分的浓度, 实现了电化学发光多组分免疫传感(图 6).

Meso Scale Diagnostics 公司(www.mesoscale.com)

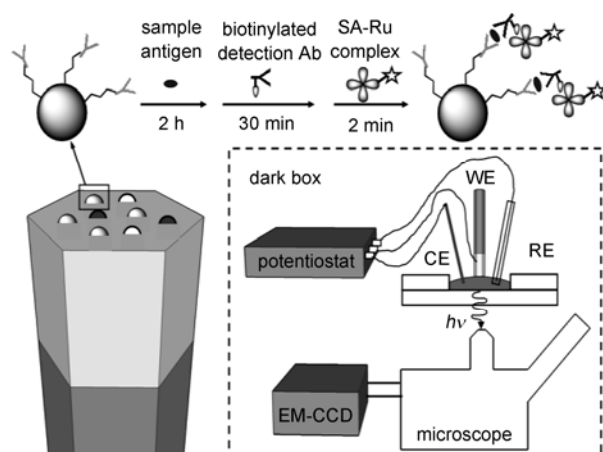


图6 基于光导纤维的阵列式电化学发光多组分免疫传感器^[87]

将丝网印碳电极组装到微孔板中, 制备了可用于电化学发光检测的 96 微孔板. 其中每个孔都具有独立的碳电极, 可用于抗体吸附和电化学激发. 因此, 采用其配套的阵列式光检测器, 即可实现多组分的同时检测. 该产品现已成功应用于人生长因子及其受体^[88]、肿瘤标记物^[89]及血清型肺炎球菌抗体^[90]的检测. 但是, 值得注意的是, 这种设计实际上仍然是在每个孔中独立测定一种组分, 并在每个孔中独立使用免疫试剂, 因此和其他传统意义上的多组分免疫传感器相比, 其在试剂与样品消耗、操作简便性上是处于劣势的; 而且, 这种集成电极的多孔板成本也相对较高.

6 展望

电化学发光分析作为一种高灵敏度、强可控性的检测方法, 通过与免疫传感技术联用, 适用于各类复杂体系中极低含量生物物质与药物的检测. 尤其是近年来以 Roche Elecsys[®]为代表的商品化仪器系统及化程度等关键技术参数上, 较传统的放射免疫分析和 ELISA 均体现出明显优势. 未来该领域的学术研究和产业开发可考虑着重在以下几方面展开: (1) 结合材料科学的最新成果, 筛选具备较好的导电性、导光性、生物相容性及稳定性的固定材料和固定方法, 并以电路印刷技术制备集成化的电极基底, 依此发展高性能、低成本、多组分的一次性免疫传感器; (2) 合成其他类型高灵敏度、高稳定性、且易于标记的新型电化学发光探针, 并寻求低毒、高效的共反应物, 拓展电化学发光免疫分析可用的电化学发光反应体系;

(3)设计和开发微型化、便携式的检测设备,使之满足现场分析、床前分析等特殊需求;(4)进一步拓展该分析技术的应用范围,使其从大分子蛋白质的分析拓展到小分子有机物的分析,从临床诊断拓展到环

境评价、食品安全分析等重要领域;(5)加快实现电化学发光免疫分析仪器和配套试剂盒的国产化,降低其使用成本,以推进该技术在我国基层机构的普及推广。

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20805036, 21035005)、高等学校博士学科点专项科研基金(200806351006)和重庆市自然科学基金(CSTC, 2009BB5116)资助,在此一并表示感谢。

参考文献

- 1 Miao, WJ. Electrogenated chemiluminescence and its biorelated applications. *Chem Rev*, 2008, 108: 2506–2553
- 2 Harvey N. Luminescence during electrolysis. *Phys Chem*, 1929, 33: 1456–1459
- 3 Zheng XW, Zhang ZJ, Guo ZH, Wang Q. Flow-injection electrogenerated chemiluminescence detection of hydrazine based on its *in situ* electrochemical modification at a pre-anodized platinum electrode. *Analyst*, 2002, 127: 1375–1379
- 4 Xu ZH, Yu JG. A novel solid-state electrochemiluminescence sensor based on Ru(bpy)₃²⁺ immobilization on TiO₂ nanotube arrays and its application for detection of amines in water. *Nanotechnology*, 2010, 21: 245501–245501
- 5 Piao JS, Mitoma Y, Uda T, Hifumi E, Shimizu K, Egashira N. Application of electrochemiluminescence sensor to a rapid method of estimating activity of enzyme in hydrolysis of peptides. *Electroanalysis*, 2004, 16: 1262–1265
- 6 Jin JY, Muroga M, Takahashi F, Nakamura T. Enzymatic flow injection method for rapid determination of choline in urine with electrochemiluminescence detection. *Bioelectrochemistry*, 2010, 79: 147–151
- 7 Liu X, Jiang H, Lei JP, Ju HX. Anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots and its energy transfer for detection of catechol derivatives. *Anal Chem*, 2007, 79: 8055–8060
- 8 Dai H, Lin YY, Wu XP, Chen GN. A new electrochemiluminescent sensing interface for clonazepam based on titanate nanotubes self-assembled film. *Sensor Actuat B-Chem*, 2010, 145: 320–326
- 9 Sun B, Qi HL, Ma F, Gao QA, Zhang CX, Miao WJ. Double covalent coupling method for the fabrication of highly sensitive and reusable electrogenerated chemiluminescence sensors. *Anal Chem*, 2010, 82: 5046–5052
- 10 Pyati R, Richter MM. ECL — Electrochemical luminescence. *Annu Rep Prog Chem, Sect C*, 2007, 103: 12–78
- 11 Marquette CA, Blum LJ. Electro-chemiluminescent biosensing. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390: 155–168
- 12 Qi HL, Peng Y, Gao Q, Zhang CX. Applications of nanomaterials in electrogenerated chemiluminescence biosensors. *Sensors*, 2009, 9: 674–695
- 13 Hu LZ, Xu GB. Applications and trends in electrochemiluminescence. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 3275–3304
- 14 张军瑞, 陈健, 刘仲明. 电化学发光免疫检测技术研究进展. *分析化学*, 2010, 38: 1219–1226
- 15 Yan GH, Xing D, Tan SC, Chen Q. Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of p53 antibodies in human serum. *J Immunol Methods*, 2004, 288: 47–54
- 16 Wilson R, Clavering C, Hutchinson A. Paramagnetic bead based enzyme electrochemiluminescence immunoassay for TNT. *J Electroanal Chem*, 2003, 557: 109–118
- 17 Li MY, Sun YM, Chen L, Li L, Zou GZ, Zhang XL, Jin WR. Ultrasensitive eletrogenated chemiluminescence immunoassay by magnetic nanobead amplification. *Electroanalysis*, 2010, 22: 333–337
- 18 Miao WJ, Bard AJ. Electrogenated chemluminescence. 72. Determination of immobilized DNA and C-reactive protein on Au(III) electrodes using Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) labels. *Anal Chem*, 2003, 75: 5825–5834
- 19 云雯, 王晓英, 董平, 朱金坤, 徐颖, 何品刚, 方禹之. 基于电化学聚合固定抗体的电化学发光免疫分析法检测人免疫球蛋白. *分析化学*, 2009, 37: 8–12
- 20 Veetil JV, Ye KM. Development of immunosensors using carbon nanotubes. *Biotechnol Progr*, 2007, 23: 517–531
- 21 Yin XB, Qi B, Sun XP, Yang XR, Wang EK. 4-(Dimethylamino)butyric acid labeling for electrochemiluminescence detection of biological substances by increasing sensitivity with gold nanoparticle amplification. *Anal Chem*, 2005, 77: 3525–3530
- 22 魏伟, 付志锋, 李翠芳. 壳聚糖-纳米金复合膜修饰电化学发光免疫传感器检测人免疫球蛋白 G. *中国科学 B 辑: 化学*, 2010, 40: 704–710
- 23 Cui H, Xu Y, Zhang ZF. Multichannel electrochemiluminescence of luminol in neutral and alkaline aqueous solutions on a gold

- nanoparticle self-assembled electrode. *Anal Chem*, 2004, 76: 4002–4010
- 24 Dong YP, Cui H, Xu Y. Comparative studies on electrogenerated chemiluminescence of luminol on gold nanoparticle modified electrodes. *Langmuir*, 2007, 23: 523–529
- 25 Qi HL, Zhang Y, Peng YG, Zhang CX. Homogenous electrogenerated chemiluminescence immunoassay for human immunoglobulin G using *N*-(aminobutyl)-*N*-ethylisoluminol as luminescence label at gold nanoparticles modified paraffin-impregnated graphite electrode. *Talanta*, 2008, 75: 684–690
- 26 Tian D, Duan C, Wang W, Li N, Zhang H, Cui H, Lu Y. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on *N*-(aminobutyl)-*N*-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification. *Talanta*, 2009, 78: 399–404
- 27 Wohlstadter JN, Wilbur JL, Sigal GB, Biebuyck HA, Billadeau MA, Dong LW, Fischer AB, Gudibande SR, Jamieson SH, Kenten JH, Leginus J, Leland JK, Massey RJ, Wohlstadter SJ. Carbon nanotube-based biosensor. *Adv Mater*, 2003, 15: 1184–1187
- 28 Sardesai N, Pan SM, Rusling J. Electrochemiluminescent immunosensor for detection of protein cancer biomarkers using carbon nanotube forests and $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ -doped silica nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*, 2009, 33: 4968–4970
- 29 Zhang CX, Qi HL, Zhang MN. Homogeneous electrogenerated chemiluminescence immunoassay for the determination of digoxin employing $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})\text{NHS}$ and carrier protein. *Luminescence*, 2007, 22: 53–59
- 30 Fang LY, Lu ZZ, Wei H, Wang EK. Quantitative electrochemiluminescence detection of proteins: Avidin-based sensor and tris(2,2'-bipyridine) ruthenium(II) label. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23: 1645–1651
- 31 Zhou M, Roovers J, Robertson GP, Grover CP. Multilabeling biomolecules at a single site. 1. Synthesis and characterization of a dendritic label for electrochemiluminescence assays. *Anal Chem*, 2003, 75: 6708–6717
- 32 Staffilani M, Hoss E, Giesen U, Schneider E, Hartl FE, Josel HP, De Cola L. Multimetallic ruthenium(II) complexes as electrochemiluminescent labels. *Inorg Chem*, 2003, 42: 7789–7798
- 33 Sun SG, Yang Y, Liu FY, Pang Y, Fan JL, Sun LC, Peng XJ. Study of highly efficient bimetallic ruthenium tris-bipyridyl ECL labels for coreactant system. *Anal Chem*, 2009, 81: 10227–10231
- 34 Miao WJ, Bard AJ. Electrogenerated chemiluminescence. 80. C-reactive protein determination at high amplification with $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ containing microspheres. *Anal Chem*, 2004, 76: 7109–7113
- 35 Pittman TL, Thomson B, Miao WJ. Ultrasensitive detection of TNT in soil, water, using enhanced electrogenerated chemiluminescence. *Anal Chim Acta*, 2009, 632: 197–202
- 36 Zhan W, Bard AJ. Electrogenerated chemiluminescence. 83. Immunoassay of human C-reactive protein by using $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -encapsulated liposomes as labels. *Anal Chem*, 2007, 79: 459–463
- 37 Egashira N, Morita S, Hifumi E, Mitoma Y, Uda T. Attomole detection of hemagglutinin molecule of influenza virus by combining an electrochemiluminescence sensor with an immunoliposome that encapsulates a Ru complex. *Anal Chem*, 2008, 80: 4020–4025
- 38 Egashira N, Hirata T, Hifumi E, Ohta T, Uda T. Rapid detection of BSA protein by electrochemiluminescence sensor combining an immunoliposome which encapsulates a Ru complex. *Electrochemistry*, 2008, 76: 579–582
- 39 Wei H, Liu JF, Zhou LL, Li J, Jiang X, Kang JZ, Yang XR, Dong SJ, Wang EK. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ -doped silica nanoparticles within layer-by-layer biomolecular coatings and their application as a biocompatible electrochemiluminescent tag material. *Chem Eur J*, 2008, 14: 3687–3693
- 40 Qian J, Zhou ZX, Cao XD, Liu SQ. Electrochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive detection of biomarker using $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -encapsulated silica nanosphere labels. *Anal Chim Acta*, 2010, 665: 32–38
- 41 Yang X, Yuan R, Chai YQ, Zhuo Y, Mao L, Yuan SR. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -doped silica nanoparticles labeling for a sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25: 1851–1855
- 42 Yuan SR, Yuan R, Chai YQ, Mao L, Yang X, Yuan YL, Niu H. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on Ru-silica@Au composite nanoparticles labeled anti-AFP. *Talanta*, 2010, 82: 1468–1471
- 43 Mao L, Yuan R, Chai YQ, Zhuo Y, Yang X. A new electrochemiluminescence immunosensor based on $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -doped TiO_2 nanoparticles labeling for ultrasensitive detection of human chorionic gonadotrophin. *Sensor Actuat B-Chem*, 2010, 149: 226–232
- 44 Zhang CX, Zhang HH, Feng ML. Homogeneous electrogenerated chemiluminescence immunoassay using a luminol-labeled digoxin hapten. *Anal Lett*, 2003, 36: 1103–1114
- 45 Qi HL, Zhang CX. Homogeneous electrogenerated chemiluminescence immunoassay for the determination of digoxin. *Anal Chim Acta*, 2004, 501: 31–35
- 46 Tian DY, Duan CF, Wang W, Cui H. Ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol functionalized gold nanoparticle labeling. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25: 2290–2295

- 47 Ding ZF, Quinn BM, Haram SK, Pell LE, Korgel BA, Bard AJ. Electrochemistry and electrogenerated chemiluminescence from silicon nanocrystal quantum dots. *Science*, 2002, 296: 1293–1297
- 48 Wang SJ, Harris E, Shi J, Chen A, Parajuli S, Jing XH, Miao WJ. Electrogenerated chemiluminescence determination of C-reactive protein with carboxyl CdSe/ZnS core/shell quantum dots. *Phys Chem Chem Phys*, 2010, 12: 10073–10080
- 49 Qian J, Zhang CY, Cao XD, Liu SQ. Versatile immunosensor using a quantum dot coated silica nanosphere as a label for signal amplification. *Anal Chem*, 2010, 82: 6422–6429
- 50 Shan Y, Xu JJ, Chen HY. Electrochemiluminescence quenching by CdTe quantum dots through energy scavenging for ultrasensitive detection of antigen. *Chem Commun*, 2010, 46: 5079–5081
- 51 Jie GF, Liu B, Pan HC, Zhu JJ, Chen HY. CdS nanocrystal-based electrochemiluminescence biosensor for the detection of low-density lipoprotein by increasing sensitivity with gold nanoparticle amplification. *Anal Chem*, 2007, 79: 5574–5581
- 52 Jie GF, Huang HP, Sun XL, Zhu JJ. Electrochemiluminescence of CdSe quantum dots for immunosensing of human prealbumin. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23: 1896–1899
- 53 Jie GF, Zhang JJ, Wang DC, Cheng C, Chen HY, Zhu JJ. Electrochemiluminescence immunosensor based on CdSe nanocomposites. *Anal Chem*, 2008, 80: 4033–4039
- 54 Jie GF, Li LL, Chen C, Xuan J, Zhu JJ. Enhanced electrochemiluminescence of CdSe quantum dots composited with CNTs and PDDA for sensitive immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 3352–3358
- 55 Jie GF, Liu P, Wang L, Zhang SS. Electrochemiluminescence immunosensor based on nanocomposite film of CdS quantum dots-carbon nanotubes combined with gold nanoparticles-chitosan. *Electrochem Commun*, 2010, 12: 22–26
- 56 Jie GF, Liu P, Zhang SS. Highly enhanced electrochemiluminescence of novel gold/silica/CdSe-CdS nanostructures for ultrasensitive immunoassay of protein tumor marker. *Chem Commun*, 2010, 46: 1323–1325
- 57 Kulmala S, Hakansson M, Spehar AM, Nyman A, Kankare J, Loikas K, Ala-Kleme T, Eskola J. Heterogeneous and homogeneous electrochemiluminoimmunoassays of hTSH at disposable oxide-covered aluminum electrodes. *Anal Chim Acta*, 2002, 458: 271–280
- 58 Eskola J, Makinen P, Oksa L, Loikas K, Nauma M, Jiang QH, Hakansson M, Suomi J, Kulmala S. Competitive immunoassay by hot electron-induced electrochemiluminescence detection and using a semiautomatic electrochemiluminometer. *J Lumin*, 2006, 118: 238–244
- 59 Helin M, Vare L, Hakansson M, Canty P, Hedman HP, Heikkila L, Ala-Kleme T, Kankare J, Kulmala S. Electrochemiluminoimmunoassay of hTSH at disposable oxide-coated n-silicon electrodes. *J Electroanal Chem*, 2002, 524: 176–183
- 60 Ala-Kleme T, Makinen P, Ylinen T, Vare L, Kulmala S, Ihalainen P, Peltonen J. Rapid electrochemiluminoimmunoassay of human C-reactive protein at planar disposable oxide-coated silicon electrodes. *Anal Chem*, 2006, 78: 82–88
- 61 Wilson R, Clavering C, Hutchinson A. Electrochemiluminescence enzyme immunoassay for TNT. *Analyst*, 2003, 128: 480–485
- 62 Wilson R, Clavering C, Hutchinson A. Electrochemiluminescence enzyme immunoassays for TNT and pentaerythritol tetranitrate. *Anal Chem*, 2003, 75: 4244–4249
- 63 Kurita R, Arai K, Nakamoto K, Kato D, Niwa O. Development of electrogenerated chemiluminescence-based enzyme linked immunosorbent assay for Sub-pM detection. *Anal Chem*, 2010, 82: 1692–1697
- 64 Liu XA, Zhang YY, Lei JP, Xue YD, Cheng LX, Ju HX. Quantum dots based electrochemiluminescent immunosensor by coupling enzymatic amplification with self-produced coreactant from oxygen reduction. *Anal Chem*, 2010, 82: 7351–7356
- 65 Wu YF, Shi HY, Yuan LA, Liu SQ. A novel electrochemiluminescence immunosensor via polymerization-assisted amplification. *Chem Commun*, 2010, 46: 7763–7765
- 66 李海娟, 韩双, 胡连哲, 徐国宝. 联吡啶钉电化学发光研究进展. *分析化学*, 2009, 37: 1557–1565
- 67 Leland JK, Powell MJ. Electrogenerated chemiluminescence: An oxidative-reduction type ECL reaction sequence using tripropyl amine. *J Electrochem Soc*, 1990, 137: 3127–3131
- 68 Zu YB, Bard AJ. Electrogenerated chemiluminescence. 66. the role of direct coreactant oxidation in the ruthenium tris(2,2')bipyridyl/triethylamine system and the effect of halide ions on the emission intensity. *Anal Chem*, 2000, 72: 3223–3232
- 69 Yin XB, Sha BB, Zhang XH, He XW, Xie H. The factors affecting the electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)/tertiary amines. *Electroanalysis*, 2008, 20: 1085–1091
- 70 Liu XQ, Shi LH, Niu WX, Li H, Xu GB. Environmentally friendly and highly sensitive ruthenium(II) tris(2,2'-bipyridyl) electrochemiluminescent system using 2-(dibutylamino)ethanol as co-reactant. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 421–424
- 71 Yin XB, Sha BB, He XW. Electrochemiluminescence from tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) in the presence of aminocarboxylic acid co-reactants. *Sci China Ser B-Chem*, 2009, 52: 1394–1401
- 72 Zou GZ, Ju HX. Electrogenerated chemiluminescence from a CdSe nanocrystal film and its sensing application in aqueous solution. *Anal*

Chem, 2004, 76: 6871–6876

- 73 Liu X, Ju HX. Coreactant enhanced anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots at low potential for sensitive biosensing amplified by enzymatic cycle. *Anal Chem*, 2008, 80: 5377–5382
- 74 Wang XF, Zhou Y, Xu JJ, Chen HY. Signal-on electrochemiluminescence biosensors based on CdS-Carbon nanotube nanocomposite for the sensitive detection of choline and acetylcholine. *Adv Funct Mater*, 2009, 19: 1444–1450
- 75 Wu J, Zhang Z, Fu ZF, Ju HX. A disposable two-throughput electrochemical immunosensor chip for simultaneous multianalyte determination of tumor markers. *Biosens Bioelectron*, 2007, 23: 114–120
- 76 Tang DP, Tang J, Su BL, Ren JJ, Chen GN. Simultaneous determination of five-type hepatitis virus antigens in 5 min using an integrated automatic electrochemical immunosensor array. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25: 1658–1662
- 77 Song ZJ, Yuan R, Chai YQ, Zhuo Y, Jiang W, Su HL, Che X, Li JJ. Horseradish peroxidase-functionalized Pt hollow nanospheres and multiple redox probes as trace labels for a sensitive simultaneous multianalyte electrochemical immunoassay. *Chem Commun*, 2010, 46: 6750–6752
- 78 Rissin DM, Walt DR. Duplexed sandwich immunoassays on a fiber-optic microarray. *Anal Chim Acta*, 2006, 564: 34–39
- 79 Hu M, Yan J, He Y, Lu HT, Weng L X, Song SP, Fan CH, Wang LH. Ultrasensitive, multiplexed detection of cancer biomarkers directly in serum by using a quantum dot-based microfluidic protein chip. *Acs Nano*, 2010, 4: 488–494
- 80 Rauf S, Glidle A, Cooper JM. Application of quantum dot barcodes prepared using biological self-assembly to multiplexed immunoassays. *Chem Commun*, 2010, 46: 2814–2816
- 81 Fu ZF, Liu H, Ju HX. Flow-through multianalyte chemiluminescent immunosensing system with designed substrate zone-resolved technique for sequential detection of tumor markers. *Anal Chem*, 2006, 78: 6999–7005
- 82 Fu ZF, Yang ZJ, Tang JH, Liu H, Yan F, Ju HX. Channel and substrate zone two-dimensional resolution for chemiluminescent multiplex immunoassay. *Anal Chem*, 2007, 79: 7376–7382
- 83 Fu ZF, Yan F, Liu H, Lin JH, Ju HX. A channel-resolved approach coupled with magnet-captured technique for multianalyte chemiluminescent immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23: 1422–1428
- 84 Fu ZF, Yan F, Liu H, Yang ZJ, Ju HX. Channel-resolved multianalyte immunosensing system for flow-through chemiluminescent detection of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23: 1063–1069
- 85 Knecht BG, Strasser A, Dietrich R, Martlbauer E, Niessner R, Weller MG. Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. *Anal Chem*, 2004, 76: 646–654
- 86 Chovin A, Garrigue P, Vinatier P, Sojic N. Development of an ordered array of optoelectrochemical individually readable sensors with submicrometer dimensions: Application to remote electrochemiluminescence imaging. *Anal Chem*, 2004, 76: 357–364
- 87 Deiss F, LaFratta CN, Symer M, Blicharz TM, Sojic N, Walt D R. Multiplexed sandwich immunoassays using electrochemiluminescence imaging resolved at the single bead level. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 6088–6089
- 88 Stenaelin M, Mathew A, Stromgren SA, Abdu A, Glezer EN, Grulich P, Joern J, Wilbur JL, Wohlstadter J N. Development of multiplexed immunoassay panels for human growth factors and growth factor receptors: bFGF, sFlt-1, PIGF, VEGF, KDR and c-kit. *Cancer Biomarkers*, 2006, 2: 204–205
- 89 Stengelin M, Levy J, Glezer EN, Wohlstadter JN. Development of a multiplexed immunoassay panel for ten cancer markers: AFP, Ca125, Ca19-9, CEA, cKit, E-Cadherin, EGFR, ErbB2, MMP-9, & Osteopontin. *Cancer Biomarkers*, 2008, 4: 161–162
- 90 Marchese RD, Puchalski D, Miller P, Antonello J, Hammond O, Green T, Rubinstein LJ, Caulfield M J, Sikkema D. Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16: 387–396

Electrochemiluminescent immunosensing and its application in biological and pharmaceutical analysis

FU ZhiFeng, WEI Wei, LI CuiFang & WANG ZhenXing

Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, Ministry of Education; College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: With the development of biological and pharmaceutical analysis, assay technique with high sensitivity and selectivity, and suitable for multianalyte assay, is required for complicated sample matrix. Due to its advantages such as wide linear range, high sensitivity and good controllability, electrochemiluminescence (ECL) analysis technique becomes a useful tool for low-level analyte. Combined with immunosensing, it shows great promise in assaying low-level biological substances and drugs in complicated matrix such as biological fluid. This review presents the development of ECL immunosensing technique in recent years. Some novel substrates, ECL probes, co-reactants, multianalyte immunosensing methods and their application in biological and pharmaceutical analysis have been introduced.

Keywords: electrochemiluminescence, immunosensor, electrochemiluminescent probe, co-reactant, biological and pharmaceutical analysis