

DOI: 10.13208/j.electrochem.140439

Artical ID:1006-3471(2015)01-0013-09

Cite this: *J. Electrochem.* 2015, 21(1): 13-21

Http://electrochem.xmu.edu.cn

共反应试剂增强电致化学发光信号生物传感器

王海军, 肖丽娟, 何 颖, 蒋欣亚, 袁亚利, 卓 颖, 柴雅琴, 袁 若 *

(西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要: 在电致化学发光(ECL)生物传感器的构建中, 利用共反应试剂促进发光基团的发光效率是一种常见、方便且非常有效的方法. 然而, 如何更好地利用共反应试剂使其更加有效地与发光基团作用是提高该类生物传感器灵敏度的重要因素. 本文结合作者课题组部分工作综述了三种共反应试剂放大 ECL 信号的构建: 共反应试剂内置于检测底液; 共反应试剂共存于电极表面; 酶促生成共反应试剂, 并提出了今后 ECL 信号放大构建的展望.

关键词: 电致化学发光; 共反应试剂; 信号放大; 生物传感器

中图分类号: O646

文献标识码: A

电致化学发光(Electrochemiluminescence, ECL)系近年发展的一种新型分析技术, 其结合了电化学手段与化学发光方法^[1-3]. 通过对含发光基团的体系施加电压, 使氧化还原产物之间或氧化还原产物与体系其它共存物质(如共反应试剂)之间发生化学反应, 并生成不稳定的激发态, 该激发态发生电子跃迁致使其发光. 与传统的化学发光方法相比, ECL 分析技术选择性好、可控性强、稳定性及灵敏度高. 据此, ECL 分析技术已广泛地应用于分析检测领域. 尤其是将该技术与生物识别和传感技术相结合构建了一系列生物传感器, 实现了对细胞、蛋白质、核酸的灵敏检测^[4-6]. 生物传感器的构建、如何实现信号放大、提高检测的灵敏度均是关注的热点^[7-8]. 实践证明, 在 ECL 发光体系中引入共反应试剂可以极大地提高发光基团的发光效率和 ECL 生物传感器的灵敏度. 以联吡啶钌($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)及其衍生物的 ECL 体系为例, 其常见的共反应试剂有三丙基胺(TPA)^[9]、2-(二丁基氨基)乙醇(DBAE)^[10-11]及 2,5-二甲基噻吩(DMT)^[12]等. 上述共反应试剂加入 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 体系的检测底液可以极大提高传感器的检测灵敏度. 然而, 类似的 ECL 共反应试剂大多是水溶性小分子, 生物毒性大, 其加入检测底液将增加操作步骤和测定误差. 此外, 分子在溶液中扩散存在着弛豫现象, 使溶液中的共反应试剂与发光基团相互作用时呈现出电

子转移速率慢、效率低等缺陷, 限制了检测灵敏度的提高. 如何有效地利用共反应试剂提高发光基团的发光效率将成为该类 ECL 生物传感器构建的关键. 本文综述了几种共反应试剂放大 ECL 信号的技术, 为 ECL 生物传感器的构建以及其相关分析检测提供了新的思路.

1 共反应试剂内置溶液的电致化学发光生物传感器

共反应试剂在氧化或还原时产生强还原性或强氧化性的中间体, 该中间体和 ECL 体系的发光基团作用, 从而增强 ECL 发光效率. 因此, 研究之初, 为提高 ECL 检测的灵敏度, 通常直接在发光体系中加入共反应试剂, 如草酸离子($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$)^[13]、三丙基胺(TPA)^[14]、 H_2O_2 ^[15]及 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ^[16]等.

Yang 等^[17]将共反应试剂 TPA 直接加入检测底液中构建了夹心型免疫传感器. 将发光试剂 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 固载于较大比表面积的多孔二氧化硅纳米颗粒(Ru-SiO_2), 并用其标记 IgG 抗体. 通过抗原与抗体的特异性识别作用, 大量的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 可固载于电极表面. 当检测底液加入共反应试剂 TPA, 电极表面的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 与底液中的 TPA 相互作用, 从而有效地放大了该体系的 ECL 信号, 提高了检测灵敏度. 该方法制备的传感器具有较宽的线性范围和重现性, 能快速、特异性地检测 IgG 抗体. 该传感器的制备如图 1 所示:

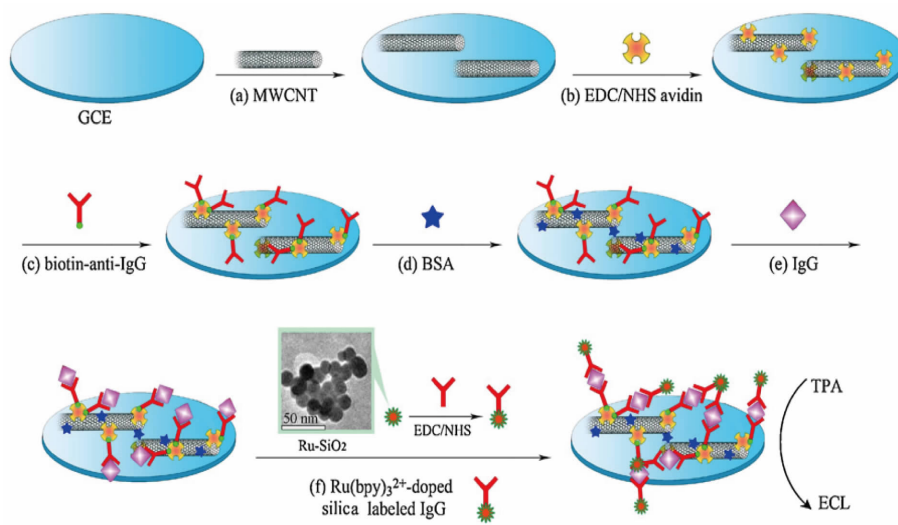


图 1 TPA 电催化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的 ECL 信号的免疫传感器组装原理示意图^[17]

Fig. 1 Schematic illustration of fabrication of the immunosensor^[17]

Chen 等^[18]构建了以 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 共反应试剂促进 CdTe 量子点的 ECL 发光适体传感器并用于凝血酶 (Thrombin, TB) 的检测. 在聚苯乙烯 (PS) 上通过生物素与亲和素的相互作用层层自组装上大量的发光试剂 CdTe 量子点. 当共反应试剂 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 存在于底液时, ECL 信号得到了极大的增强. 该传感器在 $0.5 \sim 800 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围实现了 TB 的灵敏检测. 此外, Chen 等^[19]将 DNA 双链镶嵌邻菲啰啉钌经杂交链式反应 (HCR) 提高其固载量. 当向溶液加入共反应试剂 TPA 时, 传感器的 ECL 信号显著增强, 实现了对 DNA 的灵敏检测.

Noffsinger 等^[20]报道了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和烷基胺类

物质的 ECL, 并指出 ECL 强度与胺类物质的结构密切相关. 可卡因含有叔胺基团, 作为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的共反应试剂可增强其 ECL 信号, 还可被可卡因适体特异性识别. 基于此, Mao 等^[21]构建了以可卡因为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的共反应试剂的免疫传感器来检测 NT-proBNP. 如图 2, 首先将小分子可卡因包裹在脂质体中构建一个检测 NT-proBNP 的免疫检测平台. 然后, 制备一个 ECL 适体传感器来捕获脂质体中释放出来的可卡因. 通过可卡因引起的 ECL 信号的变化就可以间接检测 NT-proBNP 含量. 该传感器具有较高的灵敏度, 其线性范围为 $0.01 \sim 500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限可达 $0.77 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

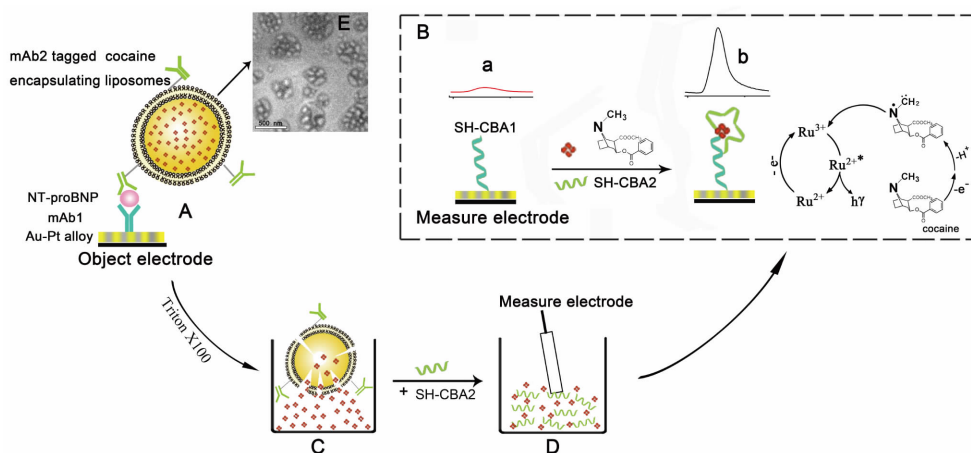


图 2 可卡因催化的免疫与适体结合的生物传感器示意图^[21]

Fig. 2 The schematic illustration for the preparation of biosensor^[21]

2 发光试剂与共反应试剂共存于电极上的生物传感器

与直接将共反应试剂加入检测底液相比,共反应试剂固定于电极上减少了共反应剂用量,缩短了电子传输距离,提高了发光试剂的发光效率及稳定性.该类 ECL 生物传感器已得到广泛应用.

Gan 等^[22]构建了将共反应试剂 4-二甲基氨基丁酸(DMBA)包裹的铂纳米颗粒(PtNPs)和发光试剂 Ru(bpy)₃²⁺ 同时固定于电极上,并构建目标物诱导适体链置换反应的 TB 适体传感器.如图 3,将合成的 Ru(bpy)₃²⁺ 与 PtNPs 的纳米复合物固定于电极上,通过 Pt—N 键连接 TB 适体链,又经 DNA 杂交互补作用连接上标记有 DMBA 包裹的 PtNPs 的互补链.因发光试剂和共反应试剂共存于电极表面,电子传递速率加快,该 ECL 信号极强. TB 与适体链的结合能力强于互补链,当孵育上 TB 后,标记有 DMBA 的互补链被置换,共反应试剂减少, ECL 信号减弱.因此,通过孵育 TB 前后的信号差值可实现 TB 的定量检测. TB 适体传感器线性范围为 0.001 ~ 30 nmol·L⁻¹,检出限为 0.4 pmol·L⁻¹.

多种胺类物质均可以作为 Ru(bpy)₃²⁺ 的共反应试剂,而氨基酸作为 Ru(bpy)₃²⁺ 的共反应试剂的研究仍不多见. Liao 等^[23]在电极上直接电聚合 L-赖氨酸(L-lysine)形成多聚赖氨酸(poly-L-lys),poly-L-lys 含有众多的伯胺和仲胺可作为 Ru(bpy)₃²⁺ 的共反应试剂.将茈四甲酸(PTCA)羧基化氧化石墨烯(GO),修饰于磁性四氧化三铁(Fe₃O₄),通过静电

吸附固载发光试剂 Ru(bpy)₃²⁺,作为信号标记.该传感器采用抗体-抗原-标记抗体的夹心免疫模式,可灵敏检测总三碘甲状腺原氨酸(T3)(如图 4).该传感器引入 GO,增加了 Ru(bpy)₃²⁺ 的固载量,使 Ru(bpy)₃²⁺ 与 poly-L-lys 均同时固定于电极上,缩短了分子作用距离,提高了发光效率.该生物传感器灵敏度和稳定性都得到了很大提高,且在外磁场的作用下可移除二抗信号探针,实现电极的循环再生.

超夹心 DNA 放大技术条件温和、反应时间短、操作简单,已被广泛地应用于传感器领域^[24]. He 等^[25]利用 L-组氨酸(L-histidine)作为共反应试剂并采用超夹心 DNA 放大技术实现了对癌胚抗原(CEA)的灵敏检测(图 5).该传感器将 L-histidine 标记于 DNA 链上,通过超夹心 DNA 放大技术,增大了共反应试剂的固载量.共反应试剂 L-histidine 不仅提高 Ru(bpy)₃²⁺ 的发光效率,且维持蛋白质的稳定性.该传感器制备简单、灵敏度高、稳定性好,线性范围为 0.1 pg·mL⁻¹ ~ 100 ng·mL⁻¹,检出限为 33.3 fg·mL⁻¹.

3 酶促生成共反应试剂的电致化学发光生物传感器

ECL 生物传感器中很多共反应试剂易分解、难标记.如 H₂O₂ 在常温下不稳定易分解,而溶解氧又易受到温度和压强的影响,两者均对检测的重现性和稳定性有影响^[26].然而,酶催化反应可以很好地解决上述问题.酶催化反应具有快速、高效的

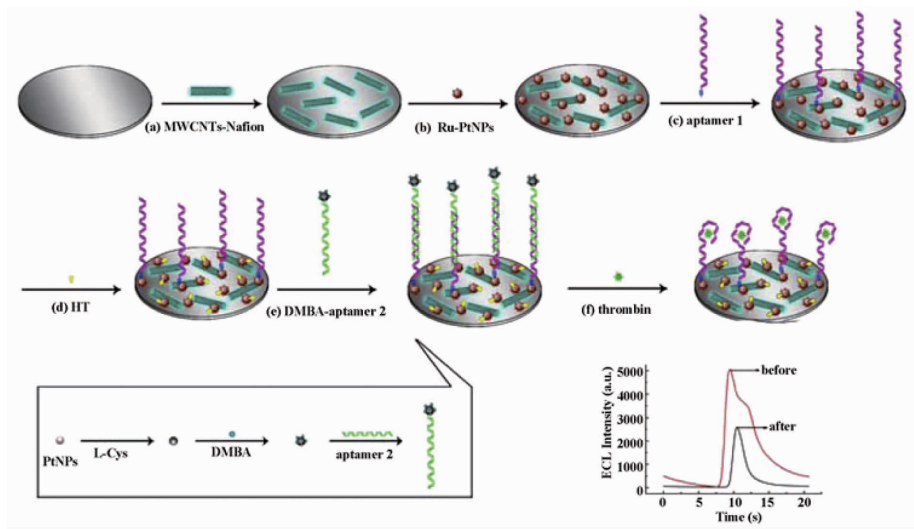


图 3 适体置换的 ECL 适体传感器组装及检测原理示意图^[22]

Fig. 3 The schematic illustration of the stepwise fabrication of aptasensor^[22]

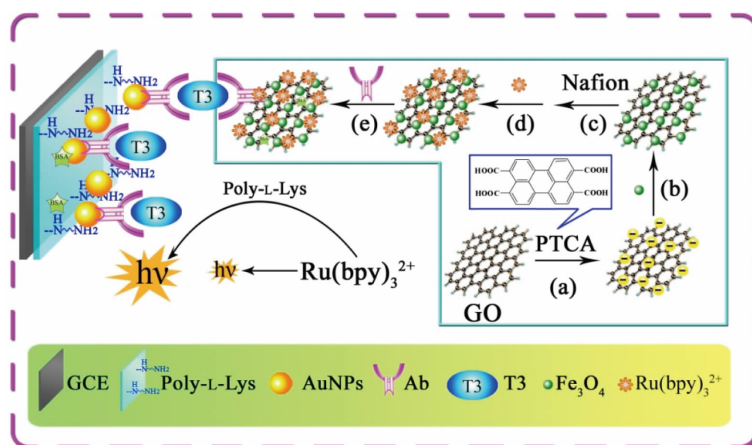


图 4 poly-L-lys 催化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的 ECL 信号放大免疫传感器制备及放大原理示意图^[23]

Fig. 4 Schematic diagrams of the immunosensor and the signal amplification mechanism^[23]

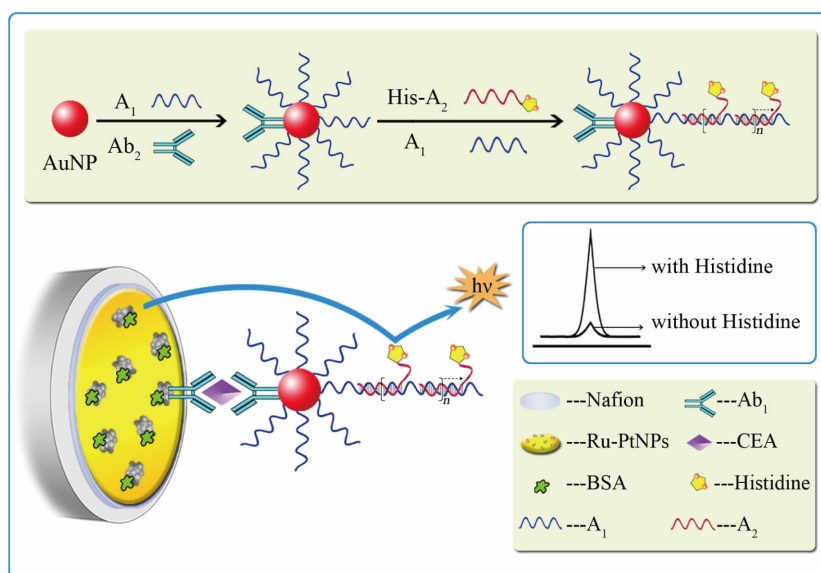


图 5 超夹心 DNA 放大技术的免疫传感器制备及放大原理示意图^[24]

Fig. 5 The schematic diagrams of the immunosensor and signal amplification mechanism^[24]

特点,若利用酶促反应产生共反应试剂,可有效增强 ECL 信号,从而提高检测灵敏度.这是因为通过酶促反应电极表面共反应试剂的浓度在短时间内迅速提高,缩短了反应的时间和距离,实现了电子的高效传递^[27].作者课题组引入多种功能化纳米材料增加发光试剂的固载量、增强电子传输能力,并借助酶高效快速电催化相应底物产生共反应试剂,显著增强了 ECL 响应信号和稳定性,实现对多种蛋白的高灵敏检测.

Liao 等^[28]构建了酶促生成的抗坏血酸(AA)与发光试剂 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 共反应的 ECL 适体传感器.将

纳米复合物 Ru-PtNPs 固载于已滴涂有 Nafion 的基底上,又将亲和素标记的碱性磷酸酶(SA-ALP)固载于电极表面,通过亲和素和生物素的特异性结合将生物素标记的 TB 适体链(Bio-TBA)固载于电极表面(图 6).电极表面的 ALP 电催化检测底液中的抗坏血酸酯(AA-p)水解产生 AA,生成的 AA 快速与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 共反应,明显增强了 ECL 信号.该传感器的 ECL 信号在 $1 \times 10^{-15} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与 TB 的浓度呈现良好的线性关系.

Xiao 等^[29]通过层层静电吸附组装,构建了夹心型 ECL 免疫传感器.如图 7 所示,固载于电极表

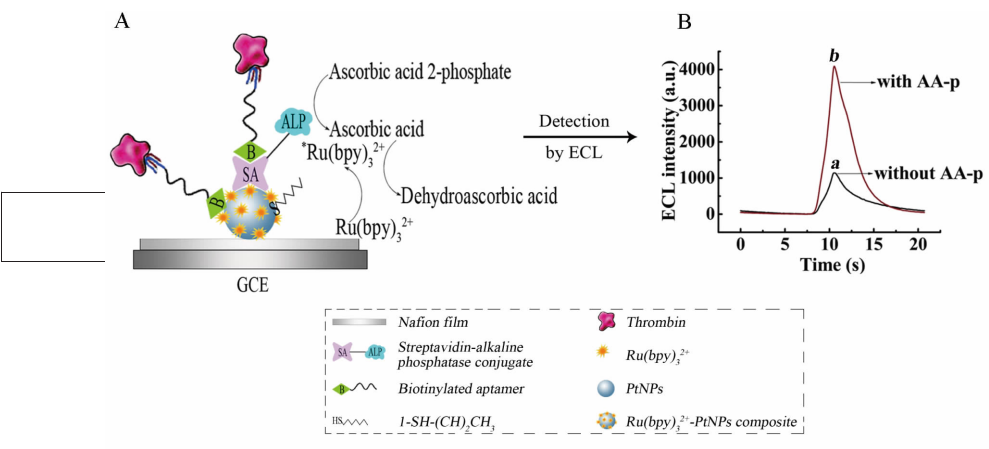


图 6 AA 与 Ru(bpy)₃²⁺ 共反应电致化学发光适体传感器电极的制备(A)及其催化性能(B)^[28]

Fig. 6 The schematic illustration of the self-assembled aptasensor (A) and catalytic performance of the modified electrode (B)^[28]

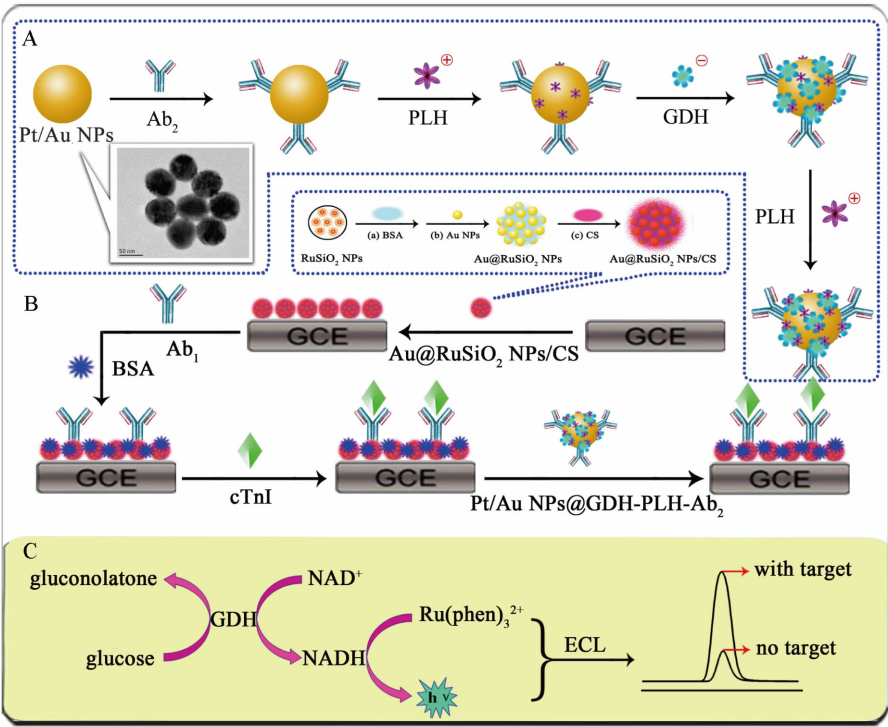


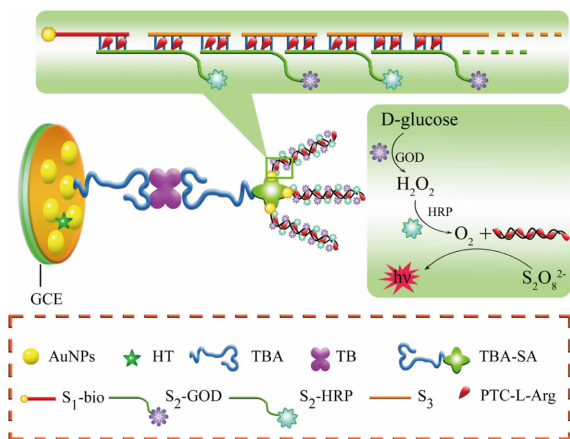
图 7 酶促产生 NADH 的免疫传感器的制备(A, B)及信号放大原理(C)^[29]

Fig. 7 The preparation procedure of Pt/Au NPs@GDH-PLH-Ab₂ bioconjugates (A), the illustration of the stepwise preparation of the immunosensor (B) and the ECL signal amplification mechanism (C)^[29]

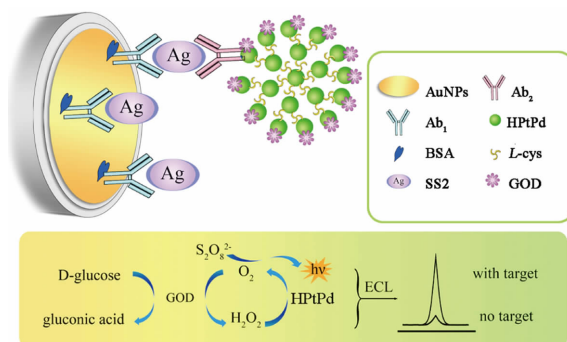
面的葡萄糖脱氢酶(GDH)催化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)生成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)作为邻菲罗啉钌(Ru(phen)₃²⁺)的共反应试剂,从而放大了 ECL 响应信号,提高了检测的灵敏度.另外,作者课题组利用葡萄糖氧化酶(GOD)电催化葡萄糖产生 H₂O₂ 作为鲁米诺的共反应试剂,构建了信号增强型的鲁米诺 ECL 免疫传感器^[30-31].

此外,为更好地促进电子传递效率,还将双酶(GOD 和 HPR)催化反应引入 ECL 传感器的构建中,并辅以纳米材料和杂交链式反应的固载和放大作用构建灵敏的 ECL 传感器(如图 8)^[32-33].

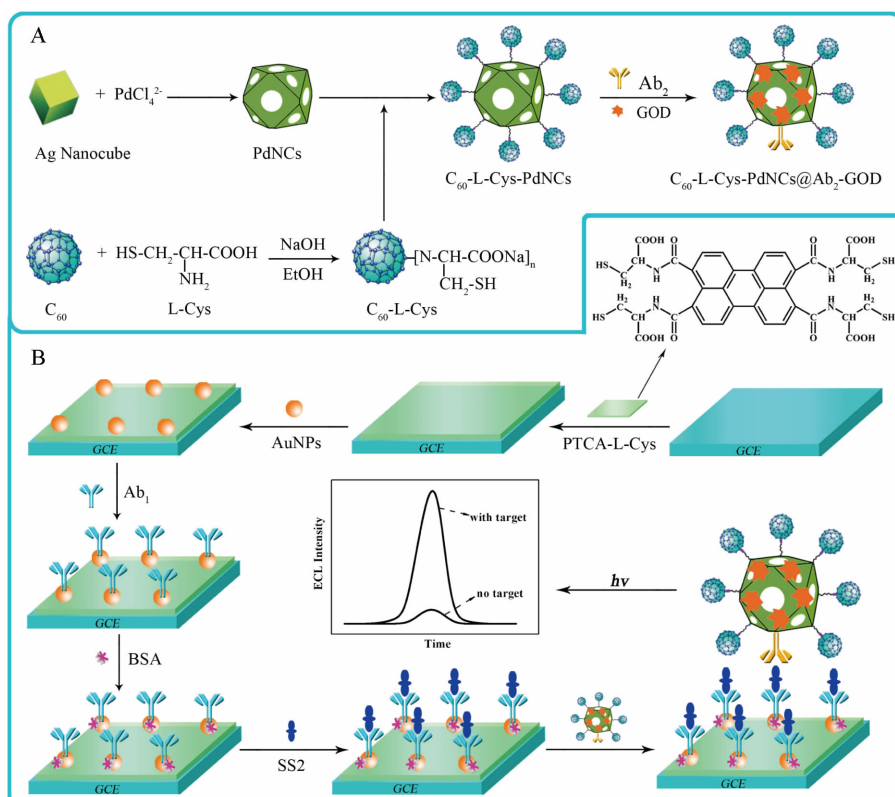
近年来,新型纳米生物材料和纳米复合材料的研究备受关注.因其具有特殊的结构层次、较强的吸附能力、良好的定向能力和生物兼容性,对生

图 8 双酶催化产生溶解氧的适体传感器制备示意图^[33]Fig. 8 Schematic diagram showing the dual signal amplification strategy for ECL detection of TB^[33]

物分子有良好的捕集和结合能力，并使生物分子保持良好的生物活性等优点^[34-36]。某些纳米材料还具有类似生物酶的性质，如空心铂钯纳米合金 (HPtPd) 不仅比表面积大、生物兼容性好、催化能

图 9 GOD 和 HPtPd 仿双酶免疫传感器制备及催化机理示意图^[37]Fig. 9 Schematic diagram of preparation and reaction mechanism of the ECL immunosensor^[37]

力强，还可作为 HRP 模拟酶催化 H_2O_2 分解产生 O_2 。据此，Wang 等^[37]将 HPtPd 与 GOD 一起组成模拟双酶系统构建了超灵敏的 ECL 免疫传感器（如图 9）。当存在底物葡萄糖时，GOD 催化葡萄糖产生 H_2O_2 ，HPtPd 作为 HRP 模拟酶电催化 H_2O_2 分解

图 10 A. 复合材料 C_{60} -L-Cys-PdNCs 和二抗耦合物 C_{60} -L-Cys-PdNCs@Ab₂-GOD 的制备；B. 传感器制备示意图^[38]Fig. 10 A. The preparation procedure of C_{60} -L-Cys-PdNCs and C_{60} -L-Cys-PdNCs@Ab₂-GOD; B. Schematic diagram of the preparation of the ECL immunosensor^[38]

产生 O_2 , 生成的 O_2 作为 $S_2O_8^{2-}$ 的共反应试剂有效地放大了 ECL 信号。

复合纳米材料将不同性能的纳米材料结合起来,故复合材料体现出更多特性。Wang 等^[38]制得了 L-半胱氨酸(L-Cys)连接的富勒烯(C_{60})功能化的空心钯纳米笼(PdNCs)复合纳米材料(C_{60} -L-Cys-PdNCs), 并用于 GOD 的固载和 ECL 信号电催化放大。如图 10 所示,固载于 C_{60} -L-Cys-PdNCs 上的 GOD 催化底物葡萄糖生成 H_2O_2 , 复合纳米材料中 PdNCs 作为 HRP 模拟酶电催化 H_2O_2 分解产生 O_2 , 进而增强了 $S_2O_8^{2-}$ 的 ECL 响应。此外 L-Cys 连接的 C_{60} (C_{60} -L-Cys)作为一个新型的共反应试剂也能有效地提高 $S_2O_8^{2-}$ 的 ECL 信号。

4 结 论

对于 ECL 生物传感器灵敏度的提高, 共反应试剂的作用尤为重要。共反应试剂的使用方式不同,所达到的共电催化活性也有很大差异。本文评述共反应试剂内置溶液、共反应试剂共存于电极及利用酶促反应在电极上产生共反应试剂的研究进展。三种构建方式层层深入,其共反应试剂与发光基团的作用距离逐渐缩短、电子转移速率逐渐加快、反应过程中能量损失逐渐减少、ECL 发光强度及稳定性逐渐增强。尤其是文中提到的酶促反应产生共反应试剂的方法开辟了 ECL 信号放大的新方向, 提供了化学技术与生物放大和检测相结合的新思路。随着 ECL 检测技术的发展,对共反应试剂放大作用和机理的研究将更加深入。如何将发光试剂与共反应试剂的分子间作用转化为发光基团和共反应基团的分子内作用, 实现电子在分子内高效、快速的传递,并提高发光物质的发光效率和稳定性将是 ECL 生物传感器构建的又一重要课题。

参考文献(References):

- [1] Richter M M. Electrochemiluminescence (ECL)[J]. Chemical Reviews, 2004, 104(6): 3003-3036.
- [2] Knight A W. A review of recent trends in analytical applications of electrogenerated chemiluminescence [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1999, 18(1): 47-62.
- [3] Hu L Z, Xu G B. Applications and trends in electrochemiluminescence[J]. Chemical Society Reviews, 2010, 39(8): 3275-3304.
- [4] Shi H W, Wu M S, Du Y, et al. Electrochemiluminescence aptasensor based on bipolar electrode for detection of adenosine in cancer cells[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 55: 459-463.
- [5] Jiang, X Y, Chai, Y Q, Wang, H J, et al. Electrochemiluminescence of luminol enhanced by the synergetic catalysis of hemin and silver nanoparticles for sensitive protein detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 54: 20-26.
- [6] Zhang P, Wu X Y, Chai Y Q, et al. An electrochemiluminescent microRNA biosensor based on hybridization chain reaction coupled with hemin as the signal enhancer[J]. Analyst, 2014, 149(11): 2748-2753.
- [7] Miao W J, Bard A J. Electrogenated chemiluminescence. 77. DNA hybridization detection at high amplification with $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ -containing microspheres [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(18): 5379-5386.
- [8] Zhou X M, Xing D, Zhu D B, et al. Magnetic bead and nanoparticle based electrochemiluminescence amplification assay for direct and sensitive measuring of telomerase activity[J]. Analytical Chemistry, 2009, 781(1): 255-261.
- [9] Zanarini S, Rampazzo E, Della C L, et al. $Ru(bpy)_3^{2+}$ covalently doped silica nanoparticles as multicenter tunable structures for electrochemiluminescence amplification [J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(6): 2260-2267.
- [10] Liu X Q, Shi L H, Niu W X, et al. Environmentally friendly and highly sensitive ruthenium(II) tris(2,2'-bipyridyl) electrochemiluminescent system using 2-(dibutylamino) ethanol as co-reactant[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2007, 46(3): 421-424.
- [11] Crespo G, Mistlberger G, Bakker E. Electrogenated chemiluminescence triggered by electroseparation of $Ru(bpy)_3^{2+}$ across a supported liquid membrane[J]. Chemical Communications, 2011, 47: 11644-11646.
- [12] Kodamatani H, Komatsu Y, Yamazaki S, et al. Electrogenated chemiluminescence reaction of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) with 2,5-dimethylthiophene as co-reactant in aqueous solution[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 622(1/2): 119-125.
- [13] Li F, Cui H, Lin X Q. Potential-resolved electrochemiluminescence of $Ru(bpy)_3^{2+}/C_2O_4^{2-}$ system on gold electrode [J]. Luminescence, 2002, 17(2): 117-122.
- [14] Wu M S, Yuan D J, Xu J J, et al. Sensitive electrochemiluminescence biosensor based on Au-ITO hybrid bipolar electrode amplification system for cell surface protein detection [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(24): 11960-11965.
- [15] Xu S J, Liu Y, Wang T H, et al. Positive potential operation of a cathodic electrogenerated chemiluminescence immunosensor based on luminol and graphene for cancer

- biomarker detection[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(10): 3817-3823.
- [16] Divsar F, Ju H X. Electrochemiluminescence detection of near single DNA molecules by quantum dots-dendrimer nanocomposites for signal amplification[J]. Chemical Communications, 2011, 47: 9879-9881.
- [17] Yang X, Yuan R, Chai Y Q, et al. Ru(bpy)₃²⁺-doped silica nanoparticles labeling for a sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25: 1851-1855.
- [18] Chen Y, Jiang B Y, Xiang Y, et al. Apeamer-based highly sensitive electrochemiluminescent detection of thrombin via nanoparticle layer-by-layer assembled amplification labels[J]. Chemical Communications, 2011, 47: 7758-7760.
- [19] Chen Y, Xu J, Su J, et al. *In situ* hybridization chain reaction amplification for universal and highly sensitive electrochemiluminescent detection of DNA[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(18): 7750-7755.
- [20] Noffsinger J B, Danielson N D. Generation of chemiluminescence upon reaction of aliphatic amines with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II)[J]. Analytical Chemistry, 1987, 59(6): 865-868.
- [21] Mao L, Yuan R, Chai Y Q, et al. Signal-enhancer molecules encapsulated liposome as a valuable sensing and amplification platform combining the aptasensor for ultrasensitive ECL immunoassay[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26: 4204-4208.
- [22] Gan X X, Yuan R, Chai Y Q, et al. 4-(Dimethylamino) butyric acid@PtNPs as enhancer for solid-state electrochemiluminescence aptasensor based on target-induced strand displacement[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 34: 25-29.
- [23] Liao N, Zhuo Y, Chai Y Q, et al. Reagentless electrochemiluminescent detection of protein biomarker using graphene-based magnetic nanoprobe and poly-L-lysine as co-reactant[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 45: 189-194.
- [24] Zhang B, Liu B Q, Tang D P, et al. DNA-based hybridization chain reaction for amplified bioelectronic signal and ultrasensitive detection of proteins[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(12): 5392-5399.
- [25] He Y, Chai Y Q, Yuan R, et al. An ultrasensitive electrochemiluminescence immunoassay based on sandwich DNA structure amplification with histidine as a coreactant[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 50: 294-299.
- [26] Wang H J, Yuan R, Chai, Y Q, et al. Bi-enzyme synergetic catalysis *in situ* generate coreactant of peroxydisulfate solution for ultrasensitive electrochemiluminescence immunoassay[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 37: 6-10.
- [27] Wang H J, Chai Y Q, Yuan R, et al. Highly enhanced electrochemiluminescent strategy for tumor biomarkers detection with *in situ* generation of L-homocysteine for signal amplification[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 815: 16-21.
- [28] Liao Y H, Yuan R, Chai, Y Q, et al. *In-situ* produced ascorbic acid as coreactant for an ultrasensitive solid-state tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) electrochemiluminescence aptasensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26: 4815-4818.
- [29] Xiao L J, Chai Y Q, Wang H J, et al. Electrochemiluminescence immunosensor using poly(L-histidine) protected glucose dehydrogenase on Pt/Au bimetallic nanoparticles to *in situ* generate co-reactant[J]. Analyst, 2014, 139: 4044-4050.
- [30] Cao Y L, Yuan R, Chai, Y Q, et al. Ultrasensitive luminol electrochemiluminescence for protein detection based on *in situ* generated hydrogen peroxide as coreactant with glucose oxidase anchored AuNPs@MWCNTs labeling [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 31: 305-309.
- [31] Niu H, Yuan R, Chai, Y Q, et al. Highly enhanced electrochemiluminescence based on synergetic catalysis effect of enzyme and Pd nanoparticles for ultrasensitive immunoassay[J]. Chemical Communications, 2011, 47: 8397-8399.
- [32] Niu H, Yuan R, Chai, Y Q, et al. Highly amplified electrochemiluminescence of peroxydisulfate using bienzyme functionalized palladium nanoparticles as labels for ultrasensitive immunoassay[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 39: 296-299.
- [33] Zhao M, Zhuo Y, Chai, Y Q, et al. Dual signal amplification strategy for the fabrication of an ultrasensitive electrochemiluminescent aptasensor[J]. Analyst, 2013, 138 (21): 6639-6644.
- [34] Xia Y N, Yang P D, Sun Y G, et al. One-dimensional nanostructures: Synthesis, characterization, and applications[J]. Advanced Materials, 2003, 15(5): 353-389.
- [35] Skrabalak S E, Chen J Y, Sun Y G, et al. Gold nanocages: Synthesis, properties, and applications[J]. Accounts of Chemical Research, 2008, 41(12): 1587-1595.
- [36] Jin Y D. Multifunctional compact hybrid Au nanoshells: A new generation of nanoplasmonic probes for biosensing, imaging, and controlled release[J]. Accounts of Chemical Research, 2014, 47(1): 138-148.
- [37] Wang H J, Yuan R, Chai, Y Q, et al. An ultrasensitive

peroxydisulfate electrochemiluminescence immunosensor for *Streptococcus suis* serotype 2 based on L-cysteine combined with mimicking bi-enzyme synergetic catalysis to in situ generate coreactant[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 43: 63-68.

[38] Wang H J, Bai L J, Chai, Y Q, et al. Synthesis of multi-fullerenes encapsulated palladium nanocage, and its application in electrochemiluminescence immunosensors for the detection of streptococcus suis serotype 2[J]. *Small*, 2014, 10(9): 1857-1865.

Electrochemiluminescence Biosensors Based on the Signal Amplification of Co-Reactants

WANG Hai-jun, XIAO Li-juan, HE Ying, JIANG Xin-ya, YUAN Ya-li, ZHUO Ying,
CHAI Ya-qin, YUAN Ruo*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Using co-reactants to enhance the luminous efficiency of luminophores is a common, convenient and effective method in the construction of the electrochemiluminescence (ECL) biosensors. However, the different methods of introducing co-reactants in the construction of the ECL biosensors will bring different amplification effects. In this review, several signal amplification methods through co-reactants are summarized: 1) Adding the co-reactants directly into the detection solution; 2) Immobilizing the co-reactants onto the electrode surface; 3) Using enzymatic reaction to generate co-reactants in situ around the electrode surface. And then, the outlook of the ECL signal amplification strategy is proposed on those bases.

Key words: electrochemiluminescence; co-reactants; amplification; biosensors