

2016-06-28

Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Platinum Nanoparticles for the Determination of Apolipoprotein A1

LIAO Ni

College of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua 617000, Sichuan, China;
liaoni123456789@163.com

ZHUO Ying

YUAN Ruo

Recommended Citation

LIAO Ni, ZHUO Ying, YUAN Ruo. Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Platinum Nanoparticles for the Determination of Apolipoprotein A1[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2016 , 22(3): 299-305.

DOI: 10.13208/j.electrochem.150914

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol22/iss3/9>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

DOI: 10.13208/j.electrochem.150914

Artical ID:1006-3471(2016)03-0299-07

Cite this: *J. Electrochem.* 2016, 22(3): 299-305

Http://electrochem.xmu.edu.cn

基于花状铂纳米颗粒构建的电致化学 发光免疫传感器用于检测载脂蛋白 A1

廖妮^{1*}, 卓颖², 袁若²

(1. 攀枝花学院生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000; 2. 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要: 采用一锅合成法制备了新型的具有大比表面积的花状铂纳米颗粒(PtNFs), 并构建了一个高灵敏电致化学发光(ECL)免疫传感器用于检测载脂蛋白 A1(Apo-A1). 该 PtNFs 用于吸附二抗(anti-Apo-A1), 并用葡萄糖氧化酶(GOD)封闭其表面的非特异性位点, 最终制备了 PtNFs@anti-Apo-A1@GOD 信号探针. 当 Apo-A1 存在时, 通过夹心免疫反应将制备的信号探针捕获于电极表面, 并将所制得的电极置于含有葡萄糖的过硫酸根底液中检测. GOD 催化葡萄糖产生 H₂O₂, H₂O₂ 在 PtNFs 的催化下分解并在电极表面原位产生 O₂, 所产生的 O₂ 能够催化过硫酸根-氧气体系的电致化学发光反应, 放大发光信号, 提高检测灵敏度. 该传感器在 0.1 ng·mL⁻¹ ~ 100 ng·mL⁻¹ 范围内对 Apo-A1 有良好的线性响应, 检测下限达到 0.03 ng·mL⁻¹, 有望应用于临床分析诊断.

关键词: 花状铂纳米颗粒; 电致化学发光免疫传感器; 载脂蛋白 A1

中图分类号: O646

文献标识码: A

载脂蛋白是脂蛋白中的蛋白部分, 在脂蛋白的代谢中具有重要的生理功能. 载脂蛋白 A1(Apo-A1) 是高密度脂蛋白(HDL) 的主要载脂蛋白^[1-2], Apo-A1 能够稳定 HDL 的结构, 激活卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT), 并识别 HDL 受体, 在胆固醇的逆向转运中起到重要作用. 动脉粥样硬化(尤指引起阻塞者)、糖尿病、高脂蛋白血症、肝功不足均可导致 Apo-A1 的降低. 因此, 血清中 Apo-A1 含量的研究及检测具有重要意义.

目前已有多种方法用于 Apo-A1 的含量检测, 如免疫比色法、酶联免疫法^[3]、质谱分析^[4]. 其中, 基于酶联免疫的电致化学发光免疫传感器(ECL) 的检测方法引起了广大研究者的高度关注和重视. ECL 生物分析是最近发展起来的一种新型的分析方法, 是电化学、化学发光、生物分析、微电子技术以及传感技术相结合的最新产物, 主要用于临床、农业、环境监测等领域^[5-6]. 该法具有选择性高、操作简单、检测快速、灵敏度高、重现性好等优点, 被广泛应用于大分子蛋白质的检测^[7-9]. 在临床应用中, 检测信号的放大和干扰信号的降低对提高检测灵敏度至关重要^[10-11]. 而酶作为二抗标记物备受

关注^[12-13]. 常见的葡萄糖氧化酶(GOD) 可以催化葡萄糖产生 ECL 体系中广泛应用的共反应剂—H₂O₂^[14-15]. 但这一类传感器的检测限和灵敏度都较低, 不适用于实际应用. 近年来, 利用多种酶合作反应改善传感器性能的方法逐渐兴起. 作者曾报道, 利用三层磁珠纳米复合材料固载 GOD 和辣根过氧化物酶(HRP) 标记二抗, 用于电化学免疫分析测定大分子抗原, 检测限低至 pg·mL⁻¹^[16]. 尽管双酶作为标记物已成功地应用于电化学免疫传感器, 但是在 ECL 免疫分析中还比较少见. S₂O₈²⁻ 作为常见的电致化学发光试剂之一, 近年来已被广泛应用^[17-19], 然由于其光信号强度较弱, O₂ 作为它的光反应试剂难标记, 在检测底液中浓度低, 因而将 S₂O₈²⁻ 发光体系应用于免疫分析的研究工作非常少.

本文通过制备大比表面积的具有模拟 HRP 作用的 PtNFs, 并与 GOD 酶相结合, 对 Apo-A1 进行超灵敏的免疫分析, 论证了仿双酶标记可以大大增强 S₂O₈²⁻ 体系的 ECL 信号. 在含有适量葡萄糖的检测底液中, 利用 GOD 和 PtNFs 同时作为标记物, 通过 GOD 的催化作用产生 H₂O₂, 继而被 PtNFs 催化原位产生了高浓度的 O₂, 如此可克服 S₂O₈²⁻

收稿日期: 2015-09-14, 修订日期: 2015-11-10 * 通讯作者, Tel: 18080796729, E-mail: liaoni123456789@163.com

国家自然科学基金项目(No. 21575116)资助

体系中以溶解氧作为其共反应剂而存在标记困难、检测底液中浓度较低的缺点. 本文旨在探索优良的多元催化用于 ECL 检测, 进而诊断相关疾病.

1 实验

1.1 仪器与试剂

西安瑞迈 MPI-E 型电致化学发光分析系统, 上海辰华 CHI610A 型电化学工作站, 日本 Hitachi S-4800 扫描电子显微镜.

载脂蛋白抗体(anti-Apo-A1)和抗原(Apo-A1)购于郑州赛博生物技术研究所; $K_2S_2O_8$ 购于上海康达; 牛血清白蛋白 (BSA, 96%~99%) 和氯铂酸 (H_2PtCl_6) 购于 Sigma 公司. 实验用水均为超纯水.

1.2 纳米金和石墨烯复合物的制备

首先, 将 0.5 mg 氧化石墨烯(GO)通过超声分散溶于 5 mL 水中, 然后加入 5 mg *L*-抗坏血酸, 搅拌 8 h, 最后加入 2 mL 1%的 $H AuCl_4$ 溶液, 搅拌过夜, 制得纳米金和石墨烯复合物(Au-Gra). 通过离心洗涤去除多余的氧化石墨烯和 *L*-抗坏血酸, 将获得的离心沉淀物用 2.0 mL PBS 溶液冰浴超声溶解, 而后放置冰箱中备用.

1.3 花状铂纳米颗粒的制备

PtNFs 由一锅合成法制得, 步骤如下: 首先称取 0.0421 g 多巴胺 (DA) 作为还原剂溶于 10 mL 水中, 然后加入 20 μ L 0.5% Nafion 和 1 mL 1% H_2PtCl_6 溶液, 持续搅拌 1 h, 使 H_2PtCl_6 充分还原. Nafion 溶液可使还原生成的 Pt 纳米颗粒聚集生成具有更大表面积的 PtNFs.

1.4 二抗耦合物的制备

取 100 μ L Apo-A1 抗体加入上述 PtNFs 溶液中, 冰浴搅拌 12 h, 离心去除过量的抗体. 用 1.0 mL PBS 缓冲溶液溶解, 加入 2.0 mL GOD ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 溶液以封闭非特异性吸附位点, 冰浴搅拌 1 h. 然后离心, 用 PBS 缓冲溶液清洗, 反复两次以去除物理吸附试剂. 最后, 将获得的固体即二抗耦合物 (PtNFs@anti-Apo-A1@GOD) 用 2.0 mL PBS 溶液冰浴超声溶解, 放置冰箱中备用.

1.5 电致化学发光免疫传感器的制备

将玻碳电极(GCE) ($\phi = 4\text{ mm}$) 用 0.3、0.05 μ m 的 Al_2O_3 糊抛光, 蒸馏水冲洗干净, 并分别在蒸馏水、无水乙醇、蒸馏水中超声清洗. 而后将清洗后的电极置于室温下自然晾干备用.

GCE 上的修饰如图 1 所示. 首先, 在预处理好的 GCE 表面滴涂一层 Au-Gra, 自然晾干. 随后, 滴上 15 μ L Apo-A1 抗体溶液(简称 Ab1), 并在 4 $^{\circ}C$ 下孵育 12 h. 用超纯水洗去物理吸附的 Ab1, 然后在 15 μ L 1%的 BSA 溶液中孵育 1 h, 再用超纯水洗涤. 最终, 将得到的免疫传感器于 4 $^{\circ}C$ 下储存备用.

1.6 电化学测试

该测试根据双抗夹心模式, 在测试之前将免疫传感器在常温条件下浸于不同浓度的 Apo-A1 溶液中孵育 30 min, 然后将该结合有目标抗原的传感器与 PtNFs@anti-Apo-A1@GOD 生物耦合物

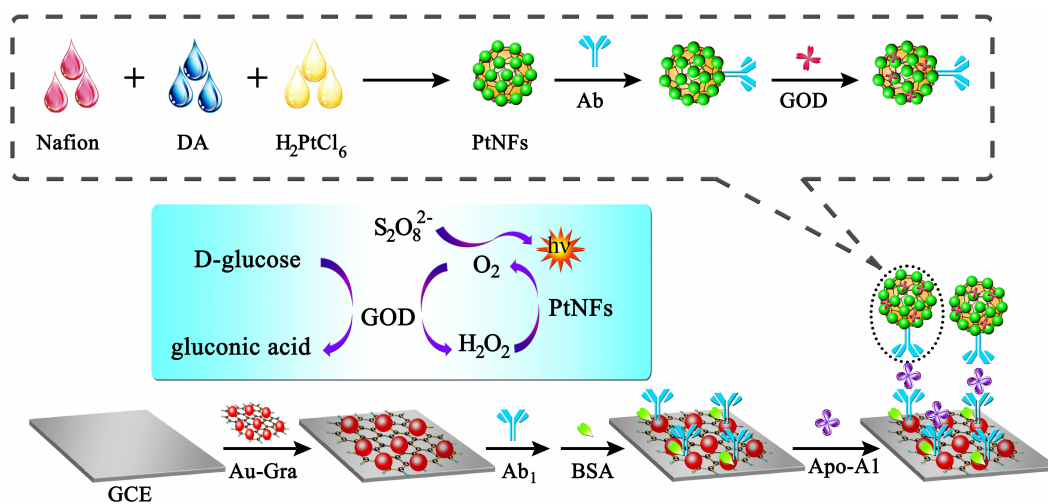


图 1 原位产生共反应试剂的电致化学发光免疫传感器的制备及放大原理示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of the immunosensor and the signal amplification mechanism

探针孵育 40 min, 生物耦合物探针通过免疫反应结合到电极表面. 采用 MPI-E 型电致化学发光分析系统对所修饰电极的电致化学发光行为进行研究, 测试底液为 3 mL 含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 和 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的 PBS 缓冲溶液 (pH 7.4).

2 结果与讨论

2.1 不同纳米材料的微观形貌表征

对不同纳米材料的微观形态和微观结构用扫描电子显微镜 (SEM) 进行了表征. 图 2A 为 Au-Gra 复合物的 SEM 照片, 从图中可以看出层状石墨烯上嵌有纳米金, 说明 Au-Gra 复合物制备成功. 图 2B 显示 PtNFs 为团簇的花状结构, 说明加入少量的 Nafion 可使合成的铂纳米颗粒具有更大的表面积.

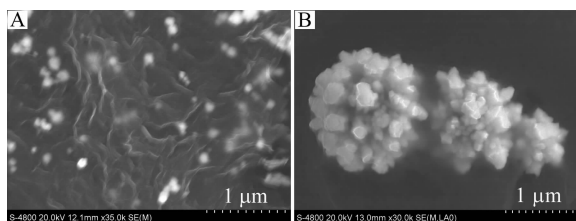


图 2 Au-Gra(A)和 PtNFs(B)的扫描电镜照片
Fig. 2 SEM images of Au-Gra (A) and PtNFs (B)

2.2 电极修饰过程的电致化学发光和循环伏安表征

如图 3A 所示, 以含有 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和葡萄糖 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 PBS 缓冲溶液作为检测底液, 在裸电极 GCE 上有一个较弱的光信号 (曲线 a), 这是过硫酸根体系发生 ECL 反应产生的光信号. 当 Au-Gra 修饰 GCE 表面后, ECL 信号明显增强 (曲线 b), 这是由于 Au-Gra 良好的导电性促进了电极表面电子的传递, 利于 ECL 反应, 从而增强发光信号; 而当 Apo-A1 抗体通过巯基或氨基吸附到 Au-Gra 层的表面后, 由于抗体是蛋白质大分子, 在电极表面阻碍了电子传递, 抑制了 ECL 反应, 发光信号降低 (曲线 c); 当 BSA 修饰到电极表面封闭非特异性位点后, ECL 信号进一步降低 (曲线 d); Apo-A1 抗原分子与 Apo-A1 抗体特异性结合修饰到电极表面后, 抗原与抗体结合形成的免疫复合物大分子进一步抑制了 ECL 反应的发生, 信号继续降低 (曲线 e); 然而, 当标记的二抗 (PtNFs@anti-Apo-A1@GOD) 与电极表面的抗原特异性结合后, ECL 信号大大增加 (曲线 f).

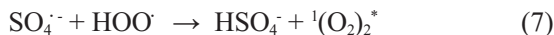
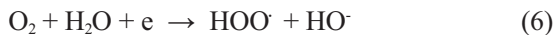
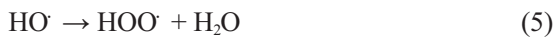
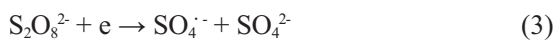
此外, 以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 为探针采用循环伏安法对电极的自组装过程进行了电化学特性表征, 如图 3B 所示, 图中曲线均是在目标电极连续扫描 3 周达到稳定响应后所得. 首先, 将打磨干净的裸电极放入 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中, 用三电极系统进行循环伏安扫描, 可以观察到一对明显的电化学氧化还原峰 (曲线 a), 说明裸电极的导电性能很好. 修饰 Au-Gra 的 GCE 上的氧化还原峰电流显著增加 (曲线 b), 表明 Au-Gra 具有优异的导电性和大的比表面积, 可以促进电子传输. 当电极修饰上 Apo-A1 抗体, 用 BSA 封闭电极上的非特异性结合位点和孵育 Apo-A1 抗原后, 氧化还原峰电流有所降低 (曲线 c、d、e), 这是由于电极吸附蛋白质分子从而阻碍了电子的传输.

2.3 催化效果分析

为进一步研究多重催化效果对检测灵敏度的影响, 作者进行了对比实验. 首先制备了两种不同标记的二抗, 分别标记为 PtNFs@anti-Apo-A1@BSA 和 PtNFs@anti-Apo-A1@GOD. 将一批孵育有 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原的修饰电极分别与上述两种不同标记的二抗反应, 并在含有适量葡萄糖的 PBS 缓冲溶液 (含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 检测, 结果如图 4 所示. 曲线 a 为空白对比信号, 即修饰 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原后的免疫传感器的光信号. 这一较低的光信号是由底液中 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 体系发生 ECL 反应产生的. 当 PtNFs@anti-Apo-A1@BSA 修饰到电极表面后, 信号有所增强 (曲线 b), 与曲线 a 相比增加了 1236 a.u., 由于 PtNFs 能够促进电子传递, ECL 信号相比空白信号有所增加, 而当 PtNFs@anti-Apo-A1@GOD 修饰到电极表面后, 信号大大增强 (曲线 b), 与曲线 a 相比增加了 8625 a.u. 这是因为 GOD 催化底液中的葡萄糖产生 H_2O_2 , 接着 H_2O_2 被仿 HRP 酶作用的 PtNFs 催化原位产生大量的共反应剂 O_2 , 涉及的反应如下:



从而循环往复, ECL 光信号大大增强, 进而提高了反应灵敏度, 可能的机理为^[20]:



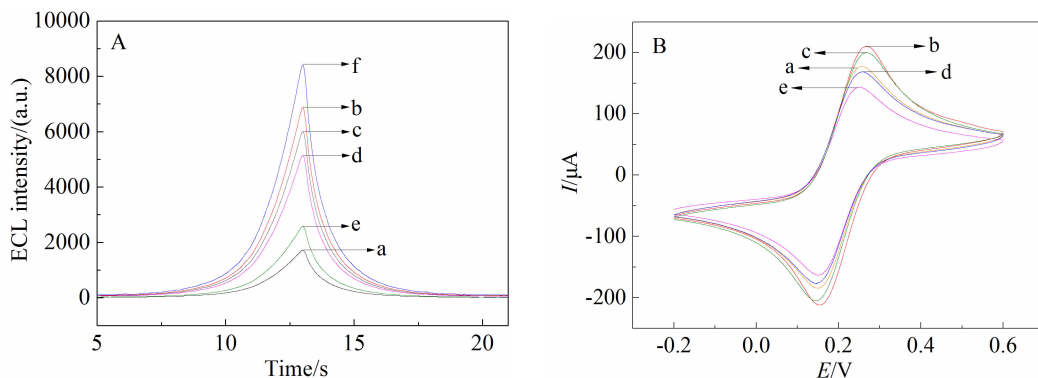


图 3 电极不同修饰阶段的电致化学发光(A)和循环伏安曲线(B)

a. GCE; b. Au-Gra/GCE; c. anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE; d. BSA/anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE; e. Apo-A1/BSA/anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE; f. PtNFs@anti-Apo-A1@GOD/Apo-A1/BSA/anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE

Fig. 3 ECL curves of the electrodes with different modifications measured in 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.4) containing 0.1 mol·L⁻¹ K₂S₂O₈ and 0.01 mol·L⁻¹ glucose (A) and CVs measured in 5.0 mmol·L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} containing 0.1 mol·L⁻¹ KCl by scanning the potential from -0.2 to 0.6 V at a scan rate of 100 mV·s⁻¹ (B)

a. GCE; b. Au-Gra/GCE; c. anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE; d. BSA/anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE; e. Apo-A1/BSA/anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE; f. PtNFs@anti-Apo-A1@GOD/Apo-A1/BSA/anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE



~ 100 ng·mL⁻¹ 范围内, ECL 强度与 Apo-A1 抗原浓

2.4 免疫传感器的性能

1) 对 Apo-A1 的电致化学发光响应特性

通过夹心免疫反应策略测定了不同标准浓度的 Apo-A1 抗原对应的 ECL 响应, 其响应信号随抗原浓度的增加而不断增加 (如图 5), 并且在 0.1

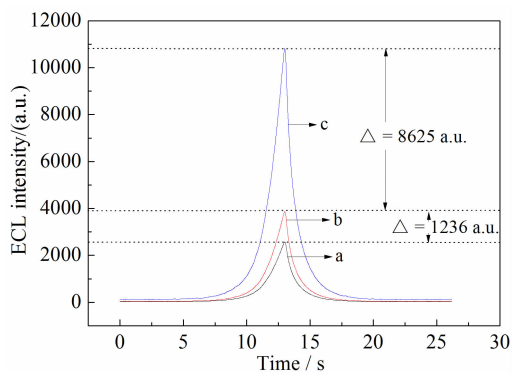


图 4 该免疫传感器对不同二抗标记物的响应对比

a. Apo-A1/BSA/anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE;
b. PtNFs@anti-Apo-A1@BSA bioconjugates;
c. PtNFs@anti-Apo-A1@GOD bioconjugates

Fig. 4 ECL responses of the modified electrode with the different labeled secondary antibodies

a. Apo-A1/BSA/anti-Apo-A1/Au-Gra/GCE;
b. PtNFs@anti-Apo-A1@BSA bioconjugates;
c. PtNFs@anti-Apo-A1@GOD bioconjugates

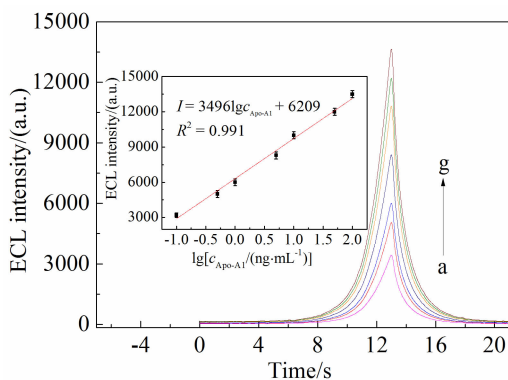


图 5 ECL 免疫传感器在不同 Apo-A1 浓度下的 ECL 强度-时间曲线, 插图为线性斜率图

Apo-A1 浓度: a. 0.1 ng·mL⁻¹; b. 0.5 ng·mL⁻¹; c. 1 ng·mL⁻¹; d. 5 ng·mL⁻¹; e. 10 ng·mL⁻¹; f. 50 ng·mL⁻¹; g. 100 ng·mL⁻¹

Fig. 5 ECL intensity-time curves of the immunosensor with different concentrations of Apo-A1 in 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.4) containing 0.1 mol·L⁻¹ K₂S₂O₈ and 0.01 mol·L⁻¹ glucose (the inset shows the relationship between ECL intensity and the concentration of Apo-A1), the voltage of the photomultiplier tube was set at 800 V, scan rate was 100 mV·s⁻¹

Apo-A1 concentration: a. 0.1 ng·mL⁻¹; b. 0.5 ng·mL⁻¹; c. 1 ng·mL⁻¹; d. 5 ng·mL⁻¹; e. 10 ng·mL⁻¹; f. 50 ng·mL⁻¹; g. 100 ng·mL⁻¹

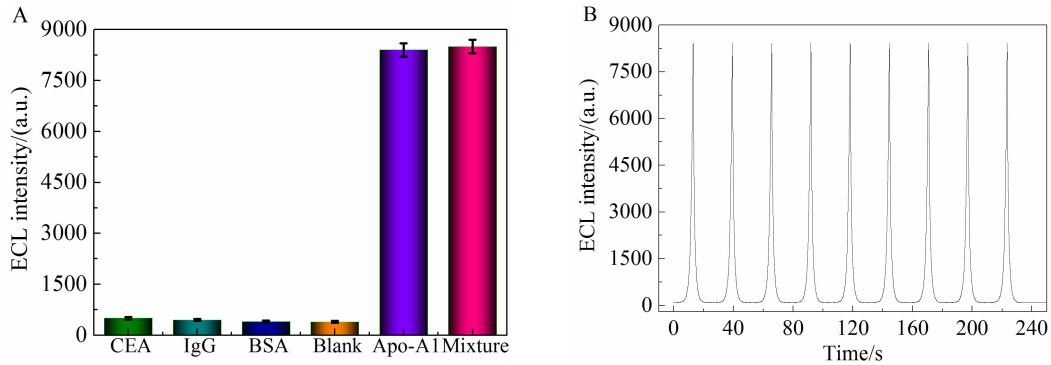


图6 A. 电致化学发光免疫传感器选择性示意图;B. 孵育了 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Apo-A1 免疫传感器的稳定性

Fig. 6 A. The selectivity of the proposed ECL immunosensors toward different targets: BSA ($20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); CEA ($20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); IgG ($20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); A mixture containing Apo-A1($5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), BSA ($20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), CEA ($20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and IgG ($20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); B. The stability of the proposed ECL immunosensor incubated with $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ Apo-A1 based on sandwich format under consecutive cyclic potential scans for 10 cycles in PBS (pH 7.4, 3.0 mL) containing $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose, scan rate was $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

度的对数值呈现良好的线性关系,检出限为 $0.03 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 3$). 图5中的插图为该免疫传感器对 Apo-A1 检测的标准曲线,线性方程为 $I = 34961gc + 6209$ (其中 I 为 ECL 强度, c 为 Apo-A1 浓度),相关系数 $R = 0.999$. 因此,该方法可以实现样品中 Apo-A1 含量的测定.

2) 稳定性、重现性和选择性

为考察该免疫传感器的选择性,选择了免疫球蛋白 G 抗原(IgG)、牛血清白蛋白(BSA)作为干扰物质,将制备好的传感器分别孵育抗原.如图6A所示, $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IgG 和 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 的 ECL 响应信号和背景信号无明显差别,而在 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IgG, $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 和含有 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Apo-A1 抗原混合物中孵育测得的 ECL 响应信号较强,但与只孵育 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Apo-A1 抗原时的 ECL 响应信号强度无明显差别.说明制得的免疫传感器在有其他干扰蛋白存在时,对 Apo-A1 检测的选择性也比较好.

为考察该 ECL 免疫传感器的稳定性,将目标传感器在测试底液中连续扫描 10 周, ECL 的响应变化很小,几乎可忽略不计,说明该传感器的稳定性很好(如图6B).此外,对于该 ECL 免疫传感器的重现性也作了相应的考察,取 5 支制备的免疫传感器,分别对同一浓度 ($5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 Apo-A1 标准溶液进行检测,结果用 5 支传感器测得结果的相对标准偏差(RSD)为 2.35%.此外,取 5 支不同批次制备的免疫传感器,分别对同一浓度的 Apo-

A1 标准溶液进行检测,所得相对标准偏差(RSD)均小于 4%,表明该免疫传感器具有良好的精确性和重现性.

3) 回收测定

为进一步研究该免疫传感器的实际应用价值,向血清样品中加入标准浓度的 Apo-A1 抗原配制成 5 个不同浓度的 Apo-A1 血清样品溶液(临床血清样品取自重庆市第九人民医院).用该免疫传感器对上述含有 Apo-A1 血清样品溶液进行检测,结果见表 1. 该免疫传感器的回收率在 98.0% ~ 106.0%,说明其可较好的应用于人血清样品中 Apo-A1 的直接检测.

3 结论

本文制备了基于新型的过硫酸根体系的 ECL

表 1 Apo-A1 免疫传感器的回收结果 ($n = 5$)

Tab. 1 The recovery of the proposed immunosensor in human serum

Sample number	Added/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Found/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) ^a	Recovery/%
1	0.05	0.053 ± 0.009	106.0
2	0.10	0.098 ± 0.02	98.0
3	0.50	0.53 ± 0.03	106.0
4	1.00	1.02 ± 0.02	102.0
5	5.00	5.13 ± 0.18	102.6

a: Mean value \pm SD of three measurements

免疫传感器,用于超灵敏检测载脂蛋白质分子.提出了仿双酶循环反应原位产生共反应剂促进 ECL 反应的有效放大策略,成功地提高了检测灵敏度,扩大了检测范围,所构建的免疫传感器也显示了良好的选择性、重现性和稳定性,拓展了过硫酸根体系在生物分析中的应用.

参考文献(References):

- [1] Zhang Z T, Pak J, Huang H Y, et al. Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation[J]. *Oncogene*, 2001, 20(12): 1973-1980.
- [2] Chen Y T, Chen C L, Chen H W, et al. Discovery of novel bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics using iTRAQ technology[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(11): 5803-5815.
- [3] Li C Y, Li H J, Li J M, et al. Discovery of Apo-A1 as a potential bladder cancer biomarker by urine proteomics and analysis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 4(446): 1047-1052.
- [4] Li H J, Li C Y, Wu H L, et al. Identification of Apo-A1 as a biomarker for early diagnosis of bladder transitional cell carcinoma[J]. *Proteome Science*, 2011, 9: 21-23.
- [5] Wu Y, Shi H, Yuan L. A novel electrochemiluminescence immunosensor via polymerization-assisted amplification [J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(41): 7763-7765.
- [6] Zanarini S, Rampazzo E, Ciana L D. Ru(bpy)₃ covalently doped silica nanoparticles as multicenter tunable structures for electrochemiluminescence amplification[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(6): 2260-2267.
- [7] Chen Z H, Liu Y, Wang Y Z, et al. Dynamic evaluation of cell surface N-Glycan expression via an electrogenerated chemiluminescence biosensor based on concanavalin A-Integrating gold-nanoparticle-modified Ru(bpy)₃²⁺-doped silica nanoprobe[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(9): 4431-4438.
- [8] Hu L Z, Xu G B. Applications and trends in electrochemiluminescence[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(8): 3275-3304.
- [9] Chen X M, Wu G H, Chen J M, et al. A novel electrochemiluminescence sensor based on bis(2,2'-bipyridine)-5-amino-1,10-phenanthroline ruthenium(II) covalently combined with graphite oxide[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26(2): 872-876.
- [10] Tang D and Ren J. *In situ* amplified electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen using horseradish peroxidase-encapsulated nanogold hollow microspheres as labels[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(21): 8064-8070.
- [11] Jian H, Ju H. Enzyme-quantum dots architecture for highly sensitive electrochemiluminescence biosensing of oxidase substrates[J]. *Chemical Communications*, 2007: 404-406.
- [12] Liu X, Ju H. Coreactant enhanced anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots at low potential for sensitive biosensing amplified by enzymatic cycle[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(14): 5377-5382.
- [13] Liu X, Zhang Y, Lei J. Quantum dots based electrochemiluminescent immunosensor by coupling enzymatic amplification with self-produced coreactant from oxygen reduction[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(17): 7351-7356.
- [14] Qiu B, Lin Z, Wang J. An electrochemiluminescent biosensor for glucose based on the electrochemiluminescence of luminol on the nafion/glucose oxidase/poly-(nickel(II) tetrasulfophthalocyanine)/multi-walled carbon nanotubes modified electrode[J]. *Talanta*, 2009, 78(1): 76-80.
- [15] Liu X, Niu W, Li H. Glucose biosensor based on gold nanoparticle-catalyzed luminol electrochemiluminescence on a three-dimensional sol-gel network[J]. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10(9): 1250-1253.
- [16] Zhuo Y, Yuan P, Yuan R, et al. Bionzyme functionalized three-layer composite magnetic nanoparticles for electrochemical immunosensors[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(12): 2284-2290.
- [17] Niu H, Yuan R, Chai Y, et al. Electrochemiluminescence of peroxydisulfate enhanced by L-cysteine film for sensitive immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(7): 3175-3180.
- [18] Lei Y M, Huang W X, Yuan R, et al. Electrochemiluminescence resonance energy transfer system: Mechanism and application in ratiometric aptasensor for lead ion[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(15): 7787-7794.
- [19] Lv X H, Pang X H, Li Y Y, et al. Electrochemiluminescent immune-modified electrodes based on Ag₂Se@CdSe nanoneedles loaded with polypyrrole intercalated graphene for detection of CA72-4[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(1): 867-872.
- [20] Reshetnyak O V, Koval'chuk E P, Skurski P, et al. The origin of luminescence accompanying electrochemical reduction or chemical decomposition of peroxydisulfates [J]. *Journal of Luminescence*, 2003, 105(1): 27-34.

Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Platinum Nanoparticles for the Determination of Apolipoprotein A1

LIAO Ni^{1*}, ZHUO Ying², YUAN Ruo²

(1. *College of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua 617000, Sichuan, China*; 2. *Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China*)

Abstract: In this paper, a novel electrochemiluminescence (ECL) immunosensor for the detection of apolipoprotein A1 was constructed based on flower-like platinum nanoparticles (PtNFs) via a one-pot chemical synthesis method. The PtNFs was used to immobilize the secondary antibody and enzyme (GOD). Then the prepared bioconjugates were introduced onto the electrode via sandwich immunoreactions. Accordingly, the ECL luminophore peroxydisulfate ($S_2O_8^{2-}$) was presented in the working buffer solution containing an appropriate amount of glucose. Through the ECL responses of $S_2O_8^{2-}$ and O_2 , a dramatically amplified ECL signal was obtained for the reason that hydrogen peroxide (H_2O_2) produced by GOD to glucose was subsequently catalyzed by PtNFs to *in situ* generate O_2 . The present immunosensor showed a wide linear range of $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, with a low detection limit of $0.03 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ for detecting Apo-A1. This new signal amplification strategy for preparation of ECL immunosensor could be easily realized and has potential application in ultrasensitive bioassays.

Key words: flower-like structures platinum nanoparticles; electrochemiluminescence immunosensor; apolipoprotein A1