

2012-08-28

## Electrochemical Immunosensor Based on Polycalconcarboxylic Acid Modified Electrode for the Determination of Alpha-Fetoprotein

Xiao LIN

Shao-Huang WENG

Jian-Zhang ZHOU

Ai-Lin LIU

Xin-Hua LIN

Yong-Ji YOU

---

### Recommended Citation

Xiao LIN, Shao-Huang WENG, Jian-Zhang ZHOU, Ai-Lin LIU, Xin-Hua LIN, Yong-Ji YOU. Electrochemical Immunosensor Based on Polycalconcarboxylic Acid Modified Electrode for the Determination of Alpha-Fetoprotein[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2012 , 18(4): Article 16.

DOI: 10.61558/2993-074X.2933

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol18/iss4/16>

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.

# 基于新型聚钙羧酸修饰电极的甲胎蛋白 电化学免疫传感器研究

林 晓<sup>1</sup>, 翁少煌<sup>1</sup>, 周剑章<sup>2</sup>, 刘爱林<sup>1</sup>, 林新华<sup>1\*</sup>, 游勇基<sup>1\*</sup>

(1. 福建医科大学药学院药物分析学系, 福建 福州 350004;

2. 厦门大学 固体表面物理化学国家重点实验室, 化学化工学院化学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 通过电聚合制得新型聚钙羧酸修饰电极,并用于构建检测甲胎蛋白(AFP)的高灵敏电化学免疫传感器. 采用扫描电镜(SEM)和电化学交流阻抗(EIS)观察、表征修饰电极和AFP单克隆抗体( $Ab_1$ )固定前后的差异. 固定 $Ab_1$ 的电极与一定浓度的AFP、辣根过氧化物酶(HRP)联AFP单克隆抗体(HRP- $Ab_2$ )反应,形成夹心型免疫复合物. 辣根过氧化物酶催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物产生电流信号,实现AFP浓度的测定. 本检测方法灵敏度高,重现性好.

**关键词:** 聚钙羧酸修饰电极; 甲胎蛋白; 免疫传感器

**中图分类号:** O646

**文献标识码:** A

简便快速地测定蛋白质尤其是肿瘤标记物的含量,日益受到医疗诊断和生物研究的重视. 目前,肿瘤标记物(如AFP、CA125、CA19-9和CEA等)主要采用酶联免疫(ELISA)、化学发光(CL)和电致化学发光(ECL)等多种方法检测<sup>[1-2]</sup>,但试剂昂贵,操作繁琐. 电流型电化学免疫传感器具有灵敏度高、小型化和价格便宜等优点,有望成为检测生物大分子的重要技术手段<sup>[3]</sup>.

近年来,多种新型材料如导电聚合物<sup>[4]</sup>、金属纳米颗粒<sup>[5]</sup>、量子点<sup>[6]</sup>和碳纳米管<sup>[7]</sup>等已应用于电化学免疫传感器. 导电聚合物修饰电极生物传感器能显著地提高电催化性能,改善电分析的灵敏度、稳定性和重现性<sup>[8]</sup>. 其中,聚苯胺<sup>[9]</sup>和聚吡咯<sup>[10]</sup>的应用已有较多报道,但聚钙羧酸电化学免疫传感器的报道很少. 本文采用循环伏安电沉积法制备了聚钙羧酸修饰电极(poly-CCA/GC),利用聚钙羧酸表面的羧基活性基团,通过碳化二亚胺试剂(EDC+NHS)将AFP单克隆抗体( $Ab_1$ )固定于电极表面( $Ab_1$ /poly-CCA/GC),根据抗体-抗原

反应,构建成检测AFP夹心型电化学免疫传感器(HRP- $Ab_2$ /Ag/ $Ab_1$ /poly-CCA/GCE),传感器构建过程及工作原理如图1所示.

## 1 实验

### 1.1 仪器和试剂

三电极体系由工作电极( $\phi = 3$  mm)、铂丝对电极和Ag/AgCl参比电极组成. CHI 660C电化学分析仪(上海辰华),S-4800场发射扫描电子显微镜(日本Hitachi),CTHI-150B恒温恒湿培养箱(施都凯仪器设备(上海)有限公司).

牛血清白蛋白(BSA),AFP单克隆抗体( $Ab_1$ ),辣根过氧化物酶联AFP单克隆抗体(HRP- $Ab_2$ ),AFP标准品( $0 \sim 200$  ng·mL<sup>-1</sup>,郑州博赛生物技术有限公司). 钙羧酸(CCA),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),含H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的TMB底物溶液(美国Neogen),PBS洗液(pH 7.4, 10 mmol·L<sup>-1</sup>,含0.05%吐温,by volume). 所用化学试剂均为分析纯,实验用水为Millipore超纯水.

收稿日期:2012-01-10,修订日期:2012-02-13 \* 通讯作者, Tel: (86-591)22862016, E-mail: xhl1963@sina.com; Tel: (86-591)87626886, E-mail: youyj@sina.com

福建省高校产学研科技重点项目(No. 2010Y4003)、福建省自然科学基金项目(No. 2011J05023)和福建医科大学博士启动基金(No. 2010BS006)资助

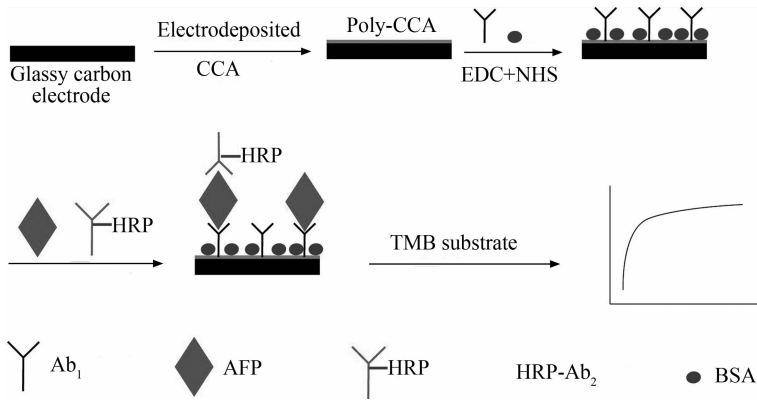


图1 聚钙羧酸修饰电极电化学免疫传感器示意图

Fig.1 Schematic diagram of electrochemical immunosensor based on poly-CCA modified electrode

## 1.2 实验方法

### 1) 基底预处理

GC 基底用  $0.3\ \mu\text{m}$  和  $0.05\ \mu\text{m}$  氧化铝粉(水微湿)在麂皮上分别依次抛光至镜面,用硝酸溶液(与水等体积配制)、无水乙醇和超纯水超声清洗,再于  $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{SO}_4$  中  $-0.4\sim 1.6\ \text{V}$  电位区间循环扫描至稳定( $0.1\ \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ ),超纯水清洗,  $\text{N}_2$  气吹干即可。

### 2) HRP- $\text{Ab}_2/\text{Ag}/\text{Ab}_1/\text{poly-CCA}/\text{GC}$ 电极的构建

$0.3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的钙羧酸溶液用 NaOH 溶液调至其溶液 pH 值为 11.5。将 GC 基底置于钙羧酸溶液中  $-0.4\sim 1.8\ \text{V}$  循环扫描 20 周,聚合,扫描速率  $0.1\ \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ 。超纯水清洗,  $\text{N}_2$  气吹干可得聚钙羧酸修饰电极 (poly-CCA/GC)。在该电极表面滴加  $10\ \mu\text{L}$  碳化二亚胺试剂 ( $400\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{EDC} + 100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NHS}$ ),活化 1 h,再滴加  $8\ \mu\text{L}$  的  $0.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 AFP 单克隆抗体 ( $\text{Ab}_1$ ),反应 3 h。含 0.05% 吐温的 PBS 洗液、超纯水依次冲洗,  $\text{N}_2$  气吹干,得  $\text{Ab}_1/\text{poly-CCA}/\text{GC}$  电极。在 3% BSA 溶液中室温封闭 1 h,然后用含 0.05% 吐温的 PBS 洗液冲洗,  $\text{N}_2$  气吹干。电极表面滴加  $8\ \mu\text{L}$  的特定浓度的 AFP 标准品,  $37\ ^\circ\text{C}$  下温育反应 1 h。而后相同洗液、超纯水依次冲洗,  $\text{N}_2$  气吹干。之后,电极表面滴加  $8\ \mu\text{L}$   $0.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  HRP- $\text{Ab}_2$ ,  $37\ ^\circ\text{C}$  下反应 1 h, 0.05% 吐温的 PBS 洗液、超纯水依次冲洗,  $\text{N}_2$  气吹干即可。

### 3) 电化学交流阻抗测定

将不同 GC 修饰电极浸入含有  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1:1) 和  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KCl}$  溶液中扫描,电位设定为  $0.25\ \text{V}$  (相对开路电位为  $0\ \text{V}$ ),频率范围  $100\ \text{kHz}\sim 0.1\ \text{Hz}$ ,振幅

为  $0.005\ \text{V}$ ,记录交流阻抗曲线。

### 4) AFP 浓度测定

将 HRP- $\text{Ab}_2/\text{Ag}/\text{Ab}_1/\text{poly-CCA}/\text{GC}$  电极置于含  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 TMB 底液测试循环伏安曲线和电流-时间曲线<sup>[11-12]</sup>,扫描速率  $100\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ,施加电位  $0.1\ \text{V}$ ,采样间隔  $0.1\ \text{s}$ ,时间  $100\ \text{s}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 poly-CCA/GC 电极的制备

图2示出 GC 基底在  $0.3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  钙羧酸溶

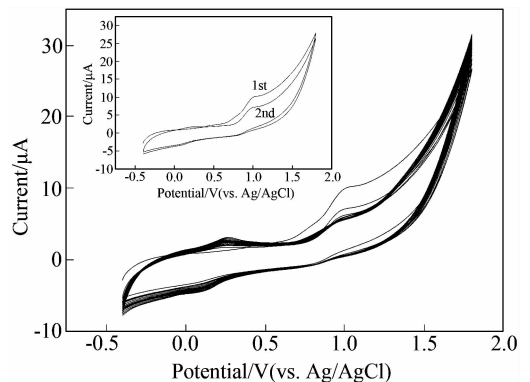


图2 GC 基底钙羧酸电聚合循环伏安曲线(插图为初始 2 周期循环)

电解液:  $0.3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的钙羧酸溶液 (pH 11.5),扫描速率:  $100\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ,电位范围:  $-0.4\sim 1.8\ \text{V}$ ,循环 20 周

Fig.2 Cyclic voltammograms of electropolymerization of poly-CCA on GC in  $0.3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  calconcarboxylic acid (pH 11.5) at a scan rate of  $100\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  from  $-0.4\ \text{V}$  to  $1.8\ \text{V}$  with 20 cycles (the inset shows the first 2 cycles of the cyclic voltammograms)

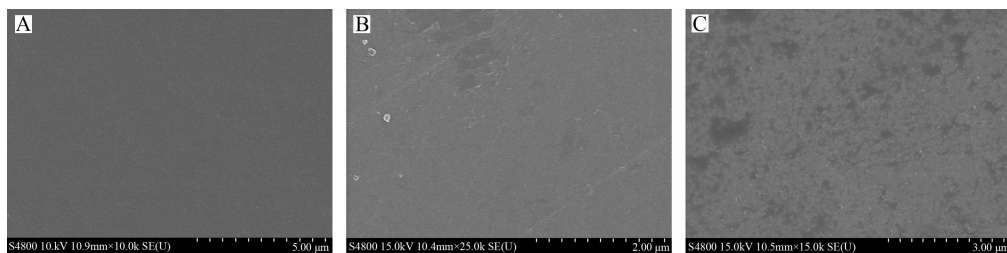


图3 GC基底(A)、poly-CCA/GC电极(B)和Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC电极(C)的SEM照片

Fig. 3 SEM images of GC electrode (A), poly-CCA/GC electrode (B) and Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC electrode (C)

液(pH 11.5)中的循环伏安曲线,电位范围 $-0.4 \sim 1.8$  V,扫描速率 $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ . 钙羧酸的起始氧化电位为 $1.0 \text{ V}$ ,且呈现氧化峰,后续循环电流逐步降低,在 $0.25 \text{ V}$ 附近出现一对可逆的新氧化还原峰(见插图). 循环周期递增,其氧化电流峰逐步升高,而 $1.0 \text{ V}$ 附近的钙羧酸单体氧化电流峰降低. 这可能是CCA在电极表面氧化形成钙羧酸寡聚体,并在该寡聚体链上继续聚合<sup>[13]</sup>,形成一层完整的聚合物膜.

GC基底表面钙羧酸聚合前后及AFP单克隆抗体(Ab<sub>1</sub>)固定后的扫描电子显微镜(SEM)照片如图3所示. 从图3A中可以看出,GC基底表面较光滑,只有少许起伏粗糙条纹. 电沉积后(图3B),聚合物表面粗糙,呈不规则的层状薄膜,有一定的多孔结构,有利于Ab<sub>1</sub>固定,可以提高Ab<sub>1</sub>的固定量,从而提高传感器的灵敏度. 通过EDC + NHS固定抗体,GC表面明显有生物大分子聚集(图3C),表明Ab<sub>1</sub>已固定成功.

图4是GC基底表面钙羧酸聚合前后及AFP单克隆抗体(Ab<sub>1</sub>)固定后的电化学交流阻抗谱图. 曲线a可以看出,GC基底只有一个很小的半圆,其电子转移阻抗( $R_{ct}$ )仅为 $35 \Omega$ . 电沉积后(曲线b),聚钙羧酸修饰GC基底的半圆明显增大, $R_{ct}$ 增加到 $300 \Omega$ . 这是由于聚钙羧酸表面的一COO<sup>-</sup>对Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>具有一定的排斥作用,也说明了钙羧酸在GC基底的成功聚合. 当进一步固定抗体,其阻抗进一步增加(曲线c), $R_{ct}$ 为 $775 \Omega$ ,这是由于抗体不导电,阻碍了Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>的扩散传导. 进一步计算GC基底的表面覆盖率<sup>[8]</sup>:

$$\theta = 1 - \frac{R_{ct}^{\text{Bare}}}{R_{ct}^{\text{Ab}_1/\text{poly-CCA}}} \quad (1)$$

$\theta$ 为表面覆盖率, $R_{ct}^{\text{Bare}}$ 为GC基底的电子转移

阻抗, $R_{ct}^{\text{Ab}_1/\text{poly-CCA}}$ 为Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC的电子转移阻抗. 得到固定Ab<sub>1</sub>后GC基底的覆盖率为95.5%,说明聚钙羧酸修饰的GC基底能够大量地固定Ab<sub>1</sub>,这主要是由于粗糙的poly-CCA/GC表面具有较大的比表面,有利于抗体的固定.

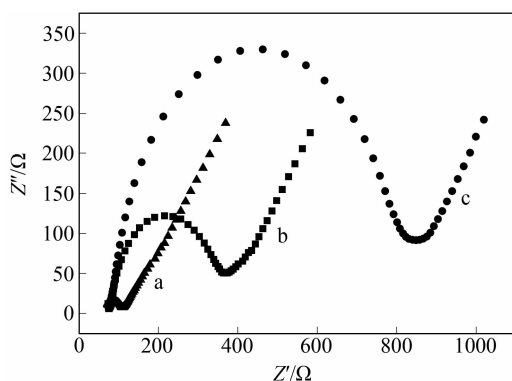


图4 GC基底(a)、poly-CCA/GC(b)和Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC(c)电极交流阻抗图谱(电位: $0.25 \text{ V}$ ,频率范围: $100 \text{ kHz} \sim 0.1 \text{ Hz}$ ,振幅: $0.005 \text{ V}$ )

Fig. 4 Electrochemical impedance spectra for different electrodes in  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  and  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$  solution (applied potential:  $0.25 \text{ V}$ ; frequency:  $100 \text{ kHz} \sim 0.1 \text{ Hz}$ ; amplitude:  $0.005 \text{ V}$ ) a. GC electrode; b. poly-CCA/GC electrode; c. Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC electrode

## 2.2 固定抗体的性能

poly-CCA/GC电极和HRP-Ab<sub>2</sub>/Ag/Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC电极在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的TMB底物溶液的循环伏安扫描曲线如图5所示. 从图看出,曲线有两对氧化还原峰. 对比曲线a、b,当电极表面引入HRP时,在含有底物TMB和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的测定溶液中,由于HRP的催化作用,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能氧化TMB生成双偶氮联苯胺类物质,大量的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>被催化发生氧化还原

反应,从而产生放大的氧化还原峰电流<sup>[14]</sup>. 进一步的电流-时间曲线(图6)对比说明了 HRP-Ab<sub>2</sub>/Ag/Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC 电极的信号显著增大. 这一方面证明了 poly-CCA/GC 电极表面可有效固定 AFP 抗体,另一方面也说明了 poly-CCA/GC 电极固定的 AFP 抗体可用于识别与检测 AFP.

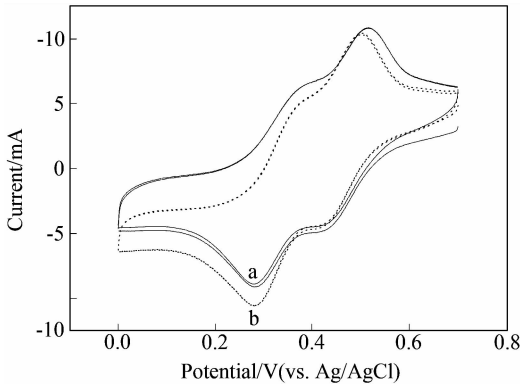


图5 poly-CCA/GC 电极(a)和 HRP-Ab<sub>2</sub>/Ag/Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC 电极(b)在 TMB 底物溶液中的循环伏安曲线(扫描速率:100 mV·s<sup>-1</sup>,电位范围: -0.4 V ~ 1.8 V,循环2周)

Fig.5 Cyclic voltammograms of poly-CCA/GC (a) and HRP-Ab<sub>2</sub>/Ag/Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC (b) electrodes in TMB substrate at a scan rate of 100 mV·s<sup>-1</sup> from 0.7 to 0 V for 2 cycles

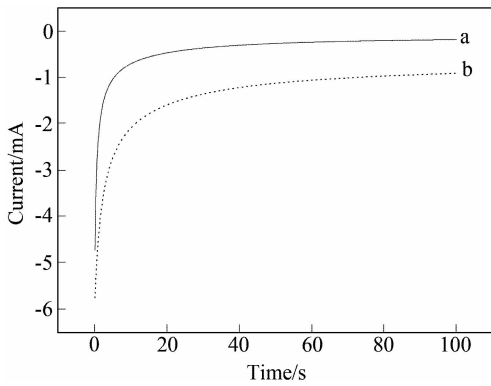


图6 poly-CCA/GC 电极(a)和 HRP-Ab<sub>2</sub>/Ag/Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC 电极(b)在 TMB 底物溶液中的电流-时间曲线(电位: 0.1 V,时间: 100 s)

Fig.6 Current-time curves of poly-CCA/GC (a) and HRP-Ab<sub>2</sub>/Ag/Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC (b) electrodes in TMB substrate with an applied potential of 0.1 V for 100 s

### 2.3 传感器条件的优化

当温育温度由 4 °C 升至 60 °C,免疫传感器的

电流响应先增大后减小,37 °C 其电流响应最大. 温度影响着抗原-抗体反应,一般在 15 ~ 40 °C 温度范围内,尤以 37 °C 最适宜. 在此温度范围内升温加速抗原-抗体反应,温度偏低时,其反应速率减慢. 此外,温度还会影响 HRP 的活性,低于 30 °C HRP 的活性也降低,会影响电流响应. 因此选择 37 °C 为抗原-抗体反应的最佳温育温度.

温育时间影响传感器抗原-抗体反应的电流响应. 当超过 30 min,其电流信号几乎不变,故择取 30 min 温育时间.

不同浓度 AFP 电化学免疫传感器电流-时间曲线(电位 -0.1 V)如图7所示. 在 0.5 ~ 200 ng·mL<sup>-1</sup> AFP 范围内其响应电流值随 AFP 浓度的增加而非线性增强,其检测下限为 0.5 ng·mL<sup>-1</sup> (S/N=2). 5 支电极在 50 ng·mL<sup>-1</sup> 的 AFP 中,其相对标准偏差(RSD)为 2.6%,说明导电聚钙羧酸修饰电极的电化学免疫传感检测具有较高的精密度.

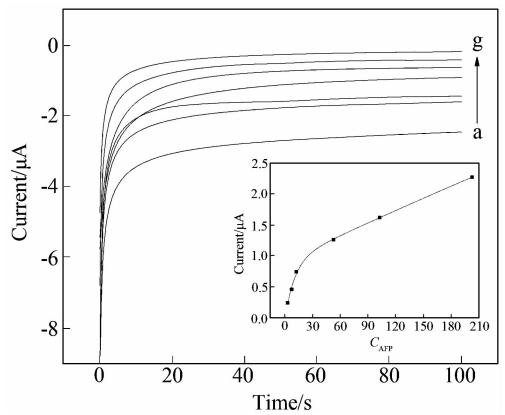


图7 不同浓度 AFP 的电流-时间曲线,插图为电流与 AFP 浓度的关系图(电位: 0.1 V,时间: 100 s)  
C<sub>AFP</sub> (a → g)/(ng·mL<sup>-1</sup>): 200, 100, 50, 10, 5, 0.5, 0

Fig.7 The current-time curves for different concentrations of AFP, the inset shows the relation between current and the concentration of AFP (applied potential: 0.1 V, time: 100 s)  
C<sub>AFP</sub> (a → g)/(ng·mL<sup>-1</sup>): 200, 100, 50, 10, 5, 0.5, 0

### 2.4 血清样品检测

使用导电聚钙羧酸修饰电极所制备的免疫传感器检测 3 人血清样品(福建医科大学附属第一医院检验科提供),检测结果与临床 ELISA 结果列于表1,相对误差小于 10%. 导电聚钙羧酸修饰电

极构建的免疫传感器为实际样品的测定提供了可能。

表1 血清样品 AFP 测定

Tab. 1 Detection results of AFP in real serum samples

Sample	ELISA result /(ng·mL <sup>-1</sup> )	Result of this work /(ng·mL <sup>-1</sup> )	Relative error/%
1	16.03	16.63	3.7
2	152.20	138.40	-9.0
3	35.29	37.98	7.6

### 3 结 论

通过电化学聚合制得聚钙羧酸电极 (poly-CCA/GC), 利用化学键合固定 AFP 抗体, 构建了夹心型电化学免疫传感器 (HRP-Ab<sub>2</sub>/Ag/Ab<sub>1</sub>/poly-CCA/GC) 并检测 AFP 样品, 获得了满意的结果. 该方法简便、经济、灵敏, 无需信号放大, 重现性较好, 有望用于临床检测.

### 参考文献 (References):

- [1] Yin Y M, Cao Y, Xu Y Y, et al. Colorimetric immunoassay for detection of tumor markers [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(12): 5078-5095.
- [2] Wang J, Cao Y, Xu Y Y, et al. Colorimetric multiplexed immunoassay for sequential detection of tumor markers [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 25(2): 532-536.
- [3] Wu J, Fu Z F, Yan F, et al. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26(7): 679-688.
- [4] Liu G D, Lin Y H. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays [J]. Talanta, 2007, 74(3): 308-317.
- [5] 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.
- [6] Wang S J, Harris E, Shi J, et al. Electrogenerated chemiluminescence determination of C-reactive protein with carboxyl CdSe/ZnS core/shell quantum dots [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010, 12(34): 10073-10080.
- [7] Lai G S, Wu J, Ju H X, et al. Streptavidin-functionalized silver-nanoparticle-enriched carbon nanotube tag for ultrasensitive multiplexed detection of tumor markers [J]. Advanced Functional Materials, 2011, 21(15): 2938-2943.
- [8] Liu A L, Zhang S B, Chen W, et al. Simultaneous voltammetric determination of norepinephrine, ascorbic acid and uric acid on polycalconcarboxylic acid modified glassy carbon electrode [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23(10): 1488-1495.
- [9] Weng S H, Lin Z H, Zhang Y, et al. Facile synthesis of SBA-15/polyaniline nanocomposites with high electrochemical activity under neutral and acidic conditions [J]. Reactive & Functional Polymers, 2009, 69(2): 130-136.
- [10] Li R (李容), Xiong J (熊健), Zhu W Q (朱伟琼), et al. Electrochemical behaviors of hydroquinone on polypyrrole/STAB-NaMMT/GC electrode [J]. Journal of Electrochemistry (电化学), 2011, 17(4): 453-457.
- [11] Wang Z Y, Liu L, Xu Y Y, et al. Simulation and assay of protein biotinylation with electrochemical technique [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(11): 4610-4613.
- [12] Wang J, Cao Y, Li Y, et al. Electrochemical strategy for detection of phosphorylation based on enzyme-linked electrocatalysis [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2011, 656(SI): 274-278.
- [13] Weng S H, Lin Z H, Chen L X, et al. Electrochemical synthesis and optical properties of helical polyaniline nanofibers [J]. Electrochimica Acta, 2010, 55(8): 2727-2733.
- [14] Fanj-Bolado P, Gonzalez-Garcia M B, Costa-Garcia A. Amperometric detection in TMB/HRP-based assays [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 382(2): 297-302.

## Electrochemical Immunosensor Based on Polycalconcarboxylic Acid Modified Electrode for the Determination of $\alpha$ -Fetoprotein

LIN Xiao<sup>1</sup>, WENG Shao-huang<sup>1</sup>, ZHOU Jian-zhang<sup>2</sup>, LIU Ai-lin<sup>1</sup>,  
LIN Xin-hua<sup>1\*</sup>, YOU Yong-ji<sup>1\*</sup>

(1. *Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China*; 2. *State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China*)

**Abstract:** A highly sensitive electrochemical immunosensor based on novel electropolymerized polycalconcarboxylic acid modified electrode (poly-CCA/GC) has been fabricated for the detection of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP). The differences of the poly-CCA/GC electrodes before and after the immobilization of AFP antibody were characterized via scanning electron microscopy (SEM) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The immobilization of antibody/antigen/antibody-HRP sandwich was formed on the poly-CCA modified electrode for the determination of special AFP concentrations. The electrochemical signals generated from the HRP which catalyzed the TMB substrate were measured. Experiment results indicated that the developed immunosensor showed a good sensitivity and precision.

**Key words:** polycalconcarboxylic acid modified electrode;  $\alpha$ -fetoprotein; immunosensor