

基于氮化碳量子点和金纳米簇的尿液中胰蛋白酶高灵敏度荧光检测研究

胡雪桃, 石吉勇, 李艳肖, 史永强, 李文亭, 邹小波*

江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013

摘要 胰蛋白酶生产障碍会阻碍消化过程, 在胰腺组织以外产生胰蛋白酶可能涉及癌症过程。胰蛋白酶明显增高可能表明胰腺炎或者慢性肾功能衰竭等病症的发生, 它的含量与生命活动息息相关, 简单并及时监测胰蛋白酶含量对疾病的诊断具有重要的参考价值。因此, 该研究构建氮化碳量子点和金纳米簇(CNQDs和AuNCs)的复合纳米探针检测尿液中胰蛋白酶含量。通过煅烧三聚氰胺获得氮化碳粉末, 并将氮化碳粉末作为原材料通过溶剂热法合成了发射峰在440 nm的类石墨相氮化碳量子点(CNQDs)。牛血清蛋白(BSA)和CNQDs两者同时作为还原剂和稳定剂合成了金纳米簇(AuNCs), 且AuNCs吸附在氮化碳量子点表面形成具有双发射性质的CNQD-AuNCs复合荧光纳米材料, 发射波长分别为440 nm(CNQD的发射波长)和650 nm(AuNC的发射波长)。由于胰蛋白酶能特异性的水解CNQD-AuNCs中的牛血清蛋白, 导致牛血清蛋白结构被破坏, 从而破坏AuNCs稳定的结构, 使得其沉淀聚集, 引起荧光猝灭。由于AuNCs产生的650 nm处的荧光被猝灭, 而CNQDs产生的440 nm处的荧光不受影响, CNQD-AuNCs复合荧光纳米探针产生比率型荧光信号响应。利用比率型荧光信号的变化情况, 可实现胰蛋白酶的定量检测。CNQD-AuNCs探针在650 nm处的荧光强度随着胰蛋白酶浓度的增加而逐渐下降, 而440 nm处的荧光强度保持不变。胰蛋白酶在一定浓度下(10~400 ng·mL⁻¹)与荧光强度比值(I_{650}/I_{440})呈良好的线性关系, 建立的线性方程为 $y=2.471-0.004x$ [y 为荧光强度比值(I_{650}/I_{440}), x 为胰蛋白酶的浓度($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)], 相关系数(R^2)高达0.9976, 检测限为1.5 ng·mL⁻¹(3倍信噪比)。利用建立的荧光法检测尿液中胰蛋白酶(实际含量分别为50, 100和150 ng·mL⁻¹), 检测得到的平均含量分别为52.41, 103.25和154.39 ng·mL⁻¹。尿液中胰蛋白酶的回收率和相对标准偏差范围分别为102.93%~104.82%和3.57%~4.16%。结果表明, 利用荧光强度比值(I_{650}/I_{440})作为胰蛋白酶定量检测的信号, 能够校正外界影响因素的干扰, 克服单一荧光信号易受光漂白、探针浓度、激发光强度以及光程等外界因素的影响的缺点。基于CNQD-AuNCs建立的比率型荧光分析方法能够实现尿液中胰蛋白酶的高灵敏度和高特异性检测, 为实际样品中胰蛋白酶的检测提供科学依据。

关键词 氮化碳量子点; 金纳米簇; 比率型荧光探针; 胰蛋白酶

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)09-2901-06

引言

胰蛋白酶在胰腺中形成, 能水解肽链相连的氨基酸类化合物, 能够有效地消化蛋白质, 是人体最重要的消化酶之一^[1]。胰蛋白酶生产障碍会阻碍消化过程, 在胰腺组织以外产生胰蛋白酶可能涉及癌症过程^[2]。在正常人的尿液中基本不含胰蛋白酶, 但是急性胰腺炎病人及慢性肾功能衰竭病人的胰蛋白酶会明显增高, 半数以上的胰腺癌及慢性胰腺炎病

人的胰蛋白酶也会增高。因此, 简单并及时监测胰蛋白酶含量对疾病的诊断具有重要的参考价值。

目前, 检测胰蛋白酶的方法包括电化学法^[3]、荧光分析法^[4]、分光光度法^[5]、表面增强拉曼光谱法^[6]等。分光光度法容易受到复杂样品本身颜色的影响。电化学法和表面增强拉曼光谱法容易受到环境等外界因素的影响。荧光分析法因其灵敏度高、选择性强且操作简便受到了研究者的广泛关注, 但传统的荧光分析法需要特殊的荧光染料标记, 使得检测成本偏高^[7]。因此, 开发低成本以及高灵敏度的胰蛋白酶

收稿日期: 2018-07-16, 修订日期: 2018-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671844, 31772073), 国家重点研发计划项目(2016YFD0401104), 江苏省重点研发计划项目(BE2016306), 江苏省六大人才高峰(GDZB-016)资助

作者简介: 胡雪桃, 1992年生, 江苏大学食品与生物工程学院博士研究生 e-mail: 850304658@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: zou_xiaobo@ujs.edu.cn

荧光探针是研究的热点。

类石墨相氮化碳量子点(graphitic nitride carbon quantum dots, CNQDs)不含金属元素(由碳和氮元素组成),具有类石墨烯结构,其制备成本低,合成简单,具有明显的荧光特性、良好的水溶性、优良的生物相容性以及无毒性^[8]。这些优异的特性使得类石墨相氮化碳量子点备受关注,有望取代传统的量子点(如 CdTe 量子点)^[9]。因此本研究将类石墨相氮化碳量子点应用于胰蛋白酶的检测。

以牛血清蛋白(BSA)为模板合成的金纳米簇(AuNCs)作为荧光探针已经成功用于胰蛋白酶的检测^[10]。但利用金纳米簇单一的荧光信号进行定量分析时,所得结果易受光漂白、探针浓度、激发光强度以及光程等外界因素的影响。而比率型的荧光探针建立在两个荧光信号的基础上,可以克服单一型荧光材料的缺点,因而具有更广泛的应用范围^[11]。因此,本研究将利用金纳米簇和类石墨相氮化碳量子点的复合纳米材料构建比率型的荧光探针,并用于尿液中胰蛋白酶定量分析。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

聚乙二醇(PEG 200)和三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)来源于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。三聚氰胺、四氯金酸、牛血清蛋白(BSA)、胰蛋白酶等其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。实验所用的水均是超纯水设备(Milli-Q, Millipore)提供。透射电子显微镜(TEM, 日本 JEOL 公司)和中红外光谱仪(Thermo Fisher iS50, USA)用于材料的表征。荧光光谱仪(F-98, 上海棱光有限公司)用于实验中荧光光谱的获取。

1.2 CNQD-AuNCs 复合纳米材料的制备

CNQDs 的制备主要分为两步^[12-13]: (1)煅烧三聚氰胺粉末得到粉末状的 C_3N_4 ; (2)利用溶剂热法加热块状的 C_3N_4 得到 CNQDs。具体步骤为:首先称取 10 g 三聚氰胺放于 600 °C 马弗炉中煅烧 2 h。得到黄色的粉末状 C_3N_4 ; 其次,将 30 mg 的 C_3N_4 溶于 3 mL PEG 200 中,并加入 0.45 mL 浓 KOH; 搅拌 15 min 后,将溶液转移至反应釜中,在 180 °C 下反应 16 h; 冷却至室温后,将反应液用孔径为 0.22 μm 的有机膜进行抽滤,收集滤液在截留分子量为 1 000 KD 的透析袋中透析 24 h,将透析得到的溶液定容至 100 mL 待用。

合成 CNQD-AuNCs 的具体步骤为^[11]:将 20 mL 的 CNQDs 和 5 mL 牛血清蛋白溶液($50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)混合搅拌 2 h,随后加入 5 mL 四氯金酸溶液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 37 °C),37 °C 下搅拌混合 10 min 后加入 1 mL 浓氢氧化钠溶液,此时反应液的 pH 约为 12,溶液在 37 °C 下持续搅拌 12 h,得到了 CNQD-AuNCs 复合纳米材料。使用前将 CNQD-AuNCs 稀释 10 倍使用。

1.3 胰蛋白酶的检测

取制备好的 1 mL CNQD-AuNCs 复合纳米探针置于 5 mL 的比色试管中,并加入 0.5 mL 不同浓度的胰蛋白酶,并用 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 为 8 且含有 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2)

定容到 5 mL。在 37 °C 下反应 2 h 后采集荧光信号,根据荧光信号随胰蛋白酶浓度的变化情况建立检测胰蛋白酶的标准曲线。同时研究了一些蛋白酶和离子对 CNQD-AuNCs 荧光的影响。

1.4 尿液中胰蛋白酶的检测

利用建立的方法对来自健康人体的新鲜尿液中胰蛋白酶进行加标回收实验。20 mL 样品静置 0.5 h 后,取上清液 10 mL 装入透析袋中透析 24 h^[7]。为了得到含有胰蛋白酶的尿液样品,我们向尿液样品中加入不同浓度的胰蛋白酶,最终得到了胰蛋白酶浓度为分别 50, 100 和 150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的尿

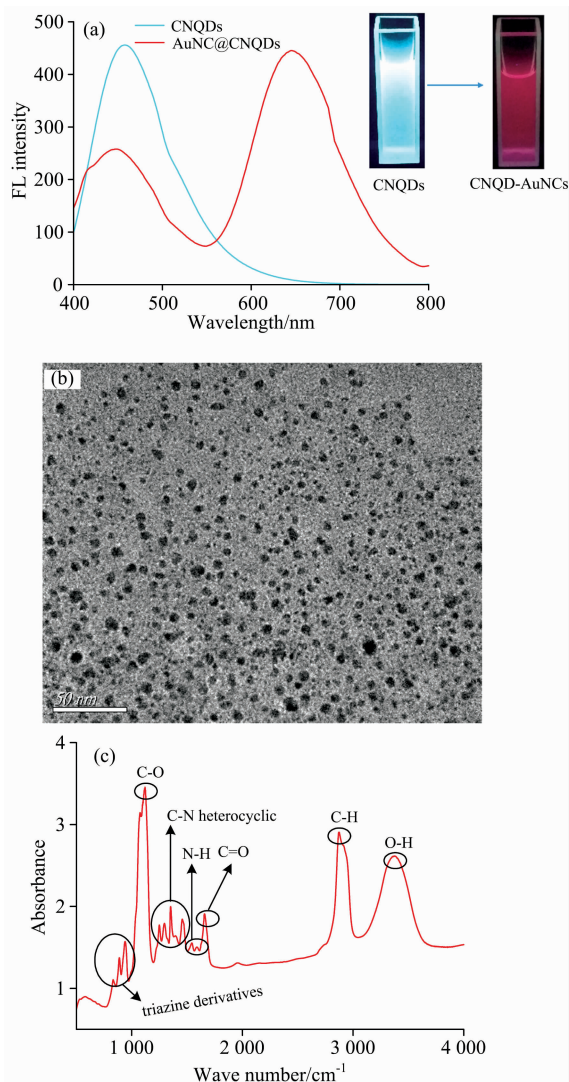


图 1 (a) CNQDs 和 CNQD-AuNCs 的荧光光谱(插图是氮化碳量子点和 CNQD-AuNCs 在 365 nm 紫外灯下的荧光图片); (b) CNQD-AuNCs 的 TEM 图; (c) CNQD-AuNCs 的 FTIR 光谱图

Fig. 1 (a) Fluorescent spectra of CNQDs and CNQD-AuNCs (inset: photographs of CNQDs and CNQD-AuNCs under irradiation of UV light at 365 nm); (b) TEM image of CNQD-AuNCs; (c) FTIR spectrum of CNQD-AuNCs

液样品。最后按照 1.3 中的方法对加标样品中胰蛋白酶含量进行检测。

2 结果与讨论

2.1 CNQD-AuNCs 材料的表征

由图 1(a) 的 CNQDs 和 CNQD-AuNCs 的荧光光谱曲线以及荧光图片可以看出: 在 365 nm 紫外灯的照射下, CNQDs 显示蓝色的荧光而 CNQD-AuNCs 显示红色的荧光。在 365 nm 的激发光激发下, CNQDs 在 440 nm 有明显的发射峰, CNQD-AuNCs 在 440 和 650 nm 均有明显的发射峰。表明本研究成功合成了具有双发射性质的 CNQD-AuNCs 荧光纳米材料。图 1(b) 和 (c) 分别为 CNQD-AuNCs 纳米粒子的 TEM 照片和傅里叶红外光谱 FTIR 谱图。由 TEM 图[图 1(b)]发现 CNQD-AuNCs 纳米粒子是单分散的小颗粒, 统计后的平均粒径为 (7 ± 2.42) nm。CNQD-AuNCs 的 FTIR 光谱峰有 3 360, 2 875, 1 956, 1 659, 1 580, 1 543, 1 456, 1 405, 1 351, 1 295, 1 250, 1 122, 940, 887 和 830 cm^{-1} 。830 和 887 cm^{-1} 主要对应的是三嗪类化合物; 1 250~1 450 cm^{-1} 之间的光谱峰是由于含氮的杂环化合物引起的; 1 543 和 1 580 cm^{-1} 分别是由于酰胺中的 N—H 键的弯曲振动以及 N=N 键的伸缩振动引起。1 122 和 1 659 cm^{-1} 分别对应的是 C—O 和 C=O 键的伸缩振动峰; 2 875 cm^{-1} 主要是由 C—H 伸缩振动引起的。这些都表明两种材料的表面都存在大量的氨基羟基和羧基^[9]。通过观察 CNQD-AuNCs 的 FTIR

光谱峰, 发现 S—H 在 $\sim 2\,500\text{ cm}^{-1}$ 左右没有出现明显的伸缩振动峰, 说明在合成复合纳米材料的过程中, BSA 中的巯基与金离子结合, 作为稳定剂使金或者金离子聚集形成金纳米簇^[12], 使 S—H 的光谱峰消失。

2.2 CNQD-AuNCs 检测胰蛋白酶的机理

基于 BSA-AuNCs 合成及其检测胰蛋白酶的原理^[13], 图 2 阐述了比率荧光纳米材料(CNQD-AuNCs)的构建的及其检测胰蛋白酶的原理。根据已有文献报道牛血清蛋白既能作为还原剂(氨基酸残基), 又能作为稳定剂(半胱氨酸的巯基), 而氮化碳量子点主要是作为稳定剂存在(合成纳米簇的核心, 使纳米簇附着在量子点表面), 其次由于其表面含有氨基和羧基, 因此氮化碳量子点也具有微弱的还原性。因此, 两者同时都能作为还原剂和稳定剂合成 CNQD-AuNCs 加入射型的荧光纳米探针, 两个荧光发射峰波长分别是 440 nm (CNQDs) 和 650 nm (AuNCs)。有文献表明^[13], 牛血清蛋白是胰蛋白酶的有效反应底物, 向 BSA-AuNCs 体系中加入胰蛋白酶时会破坏 AuNCs 的结构, 使体系的荧光被猝灭, 从而实现胰蛋白酶的检测^[10]。因此, 当 CNQD-AuNCs 存在胰蛋白酶时, AuNCs 产生的荧光峰(650 nm 处)会被猝灭, 而 CNQDs 产生的荧光峰(440 nm 处)基本会保持不变。本研究设计合成了 CNQD-AuNCs 复合荧光纳米材料, 该材料具有双发射性质, 且能够对胰蛋白酶产生特异性荧光信号响应。根据两个荧光峰强度的比值 (I_{650}/I_{440}) 变化情况可实现胰蛋白酶比率荧光检测分析。

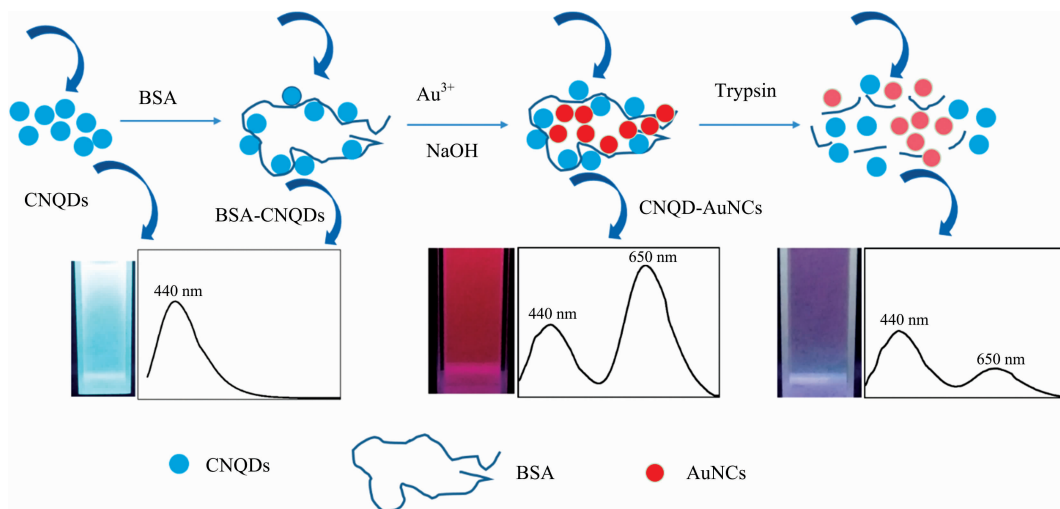


图 2 CNQD-AuNCs 复合纳米材料的制备及其检测胰蛋白酶的原理

Fig. 2 Synthesis of CNQD-AuNCs and principle for trypsin detection

2.3 胰蛋白酶检测方法的建立

为了提高检测的灵敏度, 获得低的检测限, 我们优选出反应时的最佳参数, 如最佳的反应 pH 值, 反应时间和反应温度。根据文献报道^[10], 胰蛋白酶在 pH 为 8, 且有 Ca^{2+} 存在的情况下, 具有较高的活性, 因此我们选用 pH 为 8 且含 CaCl_2 (浓度为 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 Tris-HCl 作为实验的缓冲液。将稀释的荧光纳米探针 (1 mL) 与最终浓度为 $400\text{ }\mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} 胰蛋白酶混合, 并用所配制的 Tris-HCl 缓冲液将其定容至 5 mL, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下反应 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 140 和 160 min。通过扫描荧光光谱曲线, 得到了不同反应时间下的荧光强度变化情况[图 3(a)]。实验发现, 刚开始胰蛋白酶水解 BSA 的速度非常快, 15 min 后, I_{650}/I_{440} 下降了 40%, 之后反应速度逐渐下降。待反应 120 min 后, 荧光强度几乎保持不变, 显示胰蛋白酶水解 BSA 的反应完成。

因此将 120 min 作为反应的最佳时间。因为胰蛋白酶是一种蛋白酶, 温度过低会抑制酶的活性, 温度过高会使蛋白质变性, 失去活性, 因此需要对反应的温度进行优化。将 CNQD-AuNCs(1 mL)与胰蛋白酶混合, 并利用 Tris-HCl 缓冲液将其定容到 5 mL, 此时胰蛋白酶的浓度为 $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在温度为 10, 20, 30, 37, 40, 45 和 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中反应 120 min。通过获得荧光光谱曲线, 得到了不同反应温度下的荧光强度变化情况[图 3(b)]。我们发现在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中, 其活性最佳, 反应最快, 荧光下降最明显, 故选取 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作为实验的最佳温度。这些最佳反应参数与已有的文献报道相一致^[10]。

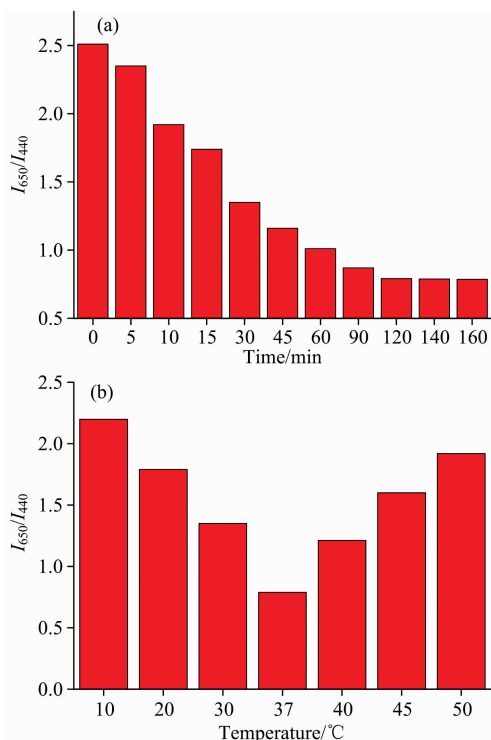


图 3 反应时间(a)及反应温度(b)的优化

Fig. 3 Optimization of reaction time (a) and temperature (b)

将不同浓度的胰蛋白酶与 CNQD-AuNCs(1 mL)混合, 并用 Tris-HCl 缓冲溶液定容到 5 mL, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中反应 120 min。不同浓度胰蛋白酶下探针溶液的荧光光谱曲线如图 4(a)所示。随着胰蛋白酶浓度的升高, 荧光探针在 650 nm 处的荧光强度降低, 而 440 nm 处的荧光强度几乎保持不变。当胰蛋白酶的浓度高于 $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 650 nm 处的荧光强度达到稳定状态。以荧光强度的比值(I_{650}/I_{440})为纵坐标, 胰蛋白酶的浓度为横坐标($10 \sim 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)建立检测胰蛋白酶的标准曲线。由图 4(b)中可见, I_{650}/I_{440} 与胰蛋白酶浓度在 $10 \sim 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈线性关系, 线性方程为 $y = 2.471 - 0.004x$ ($R^2 = 0.9976$)。检测限为 $1.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (3 倍的信噪比)。为了体现比率型荧光法的优越性, 本研究将单一的荧光信号(I_{650})为纵坐标, 胰蛋白酶的浓度为横坐标($10 \sim 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)建立检测胰蛋白酶的标准曲线[图 4(c)], 结果发现, I_{650} 与胰蛋白酶浓度在 $10 \sim 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈线性关系, 线性方程为 $y = 216.15 - 0.3975x$ ($R^2 =$

0.9872)。根据检测限计算公式(3 倍的信噪比), 其检测限为 $9.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。另外, 通过与已有文献对比(表 1)^[4, 10, 14-16], 发现本研究的检测范围宽($10 \sim 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} / 0.417 \sim 16.667 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 检测限低($1.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} / 0.0625 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 所建立的荧光方法能够实现胰蛋白酶的超灵敏、准确检测。

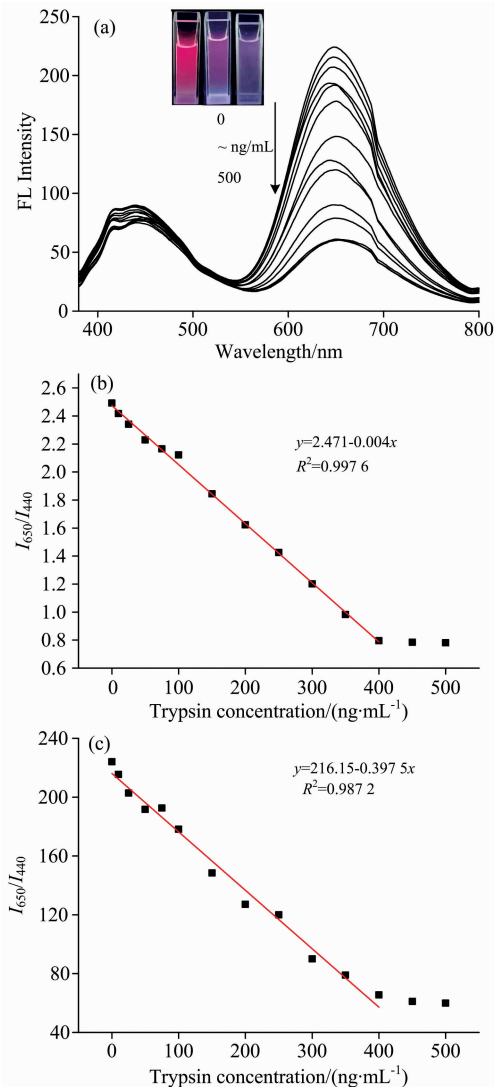


图 4 (a)不同浓度胰蛋白酶存在时 CNQD-AuNCs 的荧光光谱曲线; (b)胰蛋白酶浓度与相应的荧光比值 I_{650}/I_{440} 建立的标准曲线; (c)胰蛋白酶浓度与相应的荧光比值 I_{650} 建立的标准曲线

Fig. 4 (a) Fluorescent spectra of CNQD-AuNCs in presence of trypsin with different concentrations; (b) A calibration curve between trypsin and I_{650}/I_{440} ; (c) A calibration curve between trypsin and I_{650}

2.4 特异性考察

本实验选择了一部分离子(K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^-), 一些常见的酶(葡萄糖氧化酶(GOD), 溶菌酶, 凝血酶, 胃蛋白酶, 木瓜蛋白酶), 测定他们对 CNQD-AuNCs 荧光特性的影响。如图 5 所示, 与空白样的荧光比值

表 1 本研究建立的方法检测结果与其他方法检测结果的对比
Table 1 The performance of results obtained by this method and other methods

Fluorescent sensor	Linear range	LOD	Reference
BSA-AuNCs	0.01~100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	[10]
UCNP-AuNPs	12~208 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.15 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	[4]
CdTe QDs	1.25~375 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.42 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	[14]
Mn-ZnS QDs	0.88~15.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	42 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	[15]
AgInS ₂ : Mn-ZnS	0.5~4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	50 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	[16]
This work	10~400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (0.417~16.667 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (0.062 5 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	/

比较发现只有加入胰蛋白酶(200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)时引起了荧光比值的降低,而其他的干扰成分(400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)的加入没有引起荧光的变化。以上结果表明,本研究制备的 CNQD-AuNCs 能够实现胰蛋白酶的特异性检测。

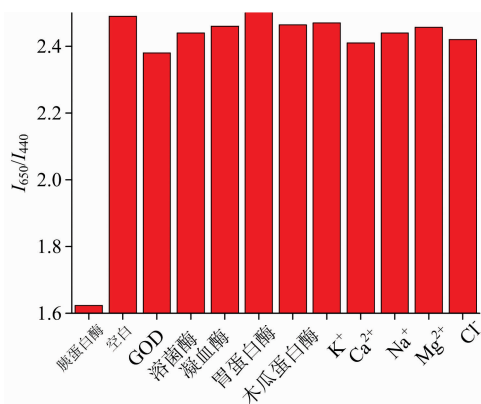


图 5 干扰物质(400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)存在时 CNQD-AuNCs 荧光的变化

Fig. 5 The fluorescent responses of CNQD-AuNCs in presence of interferences

2.5 实际尿液样品的分析

为了测试 CNQD-AuNCs 在实际样品中的应用效果,将建立的方法应用于尿液的检测分析。样品经预处理后,采用加标回收的方法进行检测研究。尿液中加入不同浓度的胰蛋白酶标准溶液,然后在同样的实验条件下对样品进行检测,每个浓度平行测定 3 次,结果列于表 2。由结果可见,本方法

表 2 尿液中胰蛋白酶加标检测结果

Table 2 Analytical results of trypsin in urine

Samples	Added/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Detected/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Recovery/ %	RSD/ %
1	50.00	52.41	104.82	3.74
2	100.00	103.25	103.25	4.16
3	150.00	154.39	102.93	3.57

检测尿液样品中的胰蛋白酶的加标回收率(Recovery)为 102.93%~104.82%,其相对标准差(RSD)分别为 3.74%,4.16%和 3.57%。结果表明本研究建立的方法可应用于实际样品中胰蛋白酶的检测。

3 结 论

构建了具有双发射性质(440 和 650 nm)的 CNQD-AuNCs 比率型复合纳米探针,并利用该复合探针成功实现了胰蛋白酶的高灵敏检测。当比率型荧光探针中加入胰蛋白酶时,该体系中 650 nm 处的荧光猝灭,而 440 nm 处的荧光保持不变。荧光信号(I_{650}/I_{440})与胰蛋白酶的浓度(10~400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)呈良好的线性关系,相关系数(R^2)高达 0.997 6,最低检测线为 1.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。另外,将建立的方法用于尿液中胰蛋白酶的检测分析得到的回收率为 102.93%~104.82%,相对标准差的范围为 3.57%~4.16%。结果表明建立的比率型荧光检测法能够实现尿液胰蛋白酶的简单且准确检测,能够为实际样品中胰蛋白酶的检测提供重要的科学依据。

References

- [1] Huang Shanshan, Li Fangfang, Liao Caiyun, et al. Talanta, 2017, 170: 562.
- [2] Poon C, Li Q, Zhang J, et al. Analytica Chimica Acta, 2016, 917: 64.
- [3] Dong M, Qi H, Ding S, et al. Microchimica Acta, 2015, 182(1-2): 43.
- [4] Wu M, Wang X, Wang K, et al. Talanta, 2017, 174: 797.
- [5] Miao P, Liu T, Li X, et al. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 49: 20.
- [6] YANG Li-yuan, WU Tong, FU Cui-cui, et al(杨丽园, 吴桐, 付翠翠, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2016, 36(Supp.): 269.
- [7] LIU Chang-qing, LIAO Xiu-fen, TAO Hui-lin, et al(刘长青, 廖秀芬, 陶慧林, 等). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2016, 32(1): 79.
- [8] Wang W, Yu J C, Shen Z, et al. Chemical Communications, 2014, 50(70): 10148.
- [9] Zhan Y, Liu Z, Liu Q, et al. New Journal of Chemistry, 2017, 41(10): 3930.
- [10] Hu L, Han S, Parveen S, et al. Biosensors & Bioelectronics, 2012, 32(1): 297.

- [11] Park E J, Reid K R, Tang W, et al. *Journal of Materials Chemistry*, 2005, 15(27-28): 2913.
- [12] Xie H, Dong J, Duan J, et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 259: 1082.
- [13] Wang L, Shi F, Li Y, et al. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2016, 222: 945.
- [14] Zhang W, Zhang P, Zhang S, et al. *Analytical Methods*, 2014, 6(8): 2499.
- [15] Liu W, Li H, Wei Y, et al. *RSC Advances*, 2017, 7(43): 26930.
- [16] LÜ Jian-quan, DING Ran, YE Yun-si, et al(吕鉴泉, 丁然, 叶韵斯, 等). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 2017, 33(1): 63.

Sensitive Determination of Trypsin in Urine Using Carbon Nitride Quantum Dots and Gold Nanoclusters

HU Xue-tao, SHI Ji-yong, LI Yan-xiao, SHI Yong-qiang, LI Wen-ting, ZOU Xiao-bo*

School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract Low level of trypsin has adverse impacts on digestion, and the obvious increase of trypsin may indicate the occurrence of pancreatitis or chronic renal failure. In addition, the secretory of trypsin outside of pancreatic tissue may involve a precursor to cancer. Trypsin concentration is closely related to life activities. Simple and timely monitoring of trypsin content can provide important reference value for disease diagnosis. Therefore, a sensitive and rapid fluorescent method was developed for determination of trypsin in urine based on carbon nitride quantum dots (CNQDs) and gold nanoclusters (AuNCs). CNQDs was synthesized via solvothermal treatment of bulk carbon nitride (C_3N_4) powder which was obtained by calcining melamine. The CNQDs displayed blue emission under radiation of UV light at 365 nm and the fluorescent band was at 440 nm. Albumin bovine serum (BSA) and CNQDs were used as reducing agents and stabilizers to prepare AuNCs which absorbed on the surface of CNQDs forming CNQD-AuNCs. CNQD-AuNCs with dual emission wavelengths at 440 and 650 nm displayed red fluorescence under radiation of UV light at 365 nm. BSA and AuNCs structure can be destroyed leading to aggregation of AuNCs in the presence of trypsin owing to the hydrolysis of BSA catalyzed by trypsin. Emission at 650 attributed to AuNCs is quenched and emission at 440 nm produced by CNQDs remain unchanged. The detection of trypsin can be performed by using fluorescent responses of CNQD-AuNCs. Fluorescent intensity at 650 nm gradually decreased with increasing trypsin concentration, while fluorescent intensity at 440 nm stayed unchanged. The ratio of fluorescent intensities at 650 and 440 nm had a perfect linear correlation with the concentrations of trypsin in the range of $10\sim 400\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a good coefficient ($R^2=0.9976$). The linear regression equation was $y=2.471\sim 0.004x$, where x was the concentration of trypsin ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), and y represented ratio of intensity at 650 and 440 nm. Limit of detection (LOD) for trypsin was calculated to be $1.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ at a signal-to-noise ratio of 3. The concentration of trypsin in urine (the actual concentration was 50, 100 and $150\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) detected by this ratiometric method was 52.41, 103.25 and $154.39\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The recoveries of trypsin were $102.93\%\sim 104.82\%$ with relative standard deviations of $3.57\%\sim 4.16\%$. AuNC@CNQDs nanosensor provide build-in self-calibration for correction of a variety of unfavorable factors by using the ratiometric responses as signals to detect trypsin. The ratiometric method can overcome shortcomings of signal response which is susceptible to effects of external factors such as light bleaching, nanosensor concentration, excitation light intensity and optical path, and so on. In summary, the developed method has been applied for detection of trypsin in urine with high sensitivity and selectivity, providing scientific basis for detection of trypsin in real application.

Keywords Carbon nitride quantum dots; Gold nanocluster; Ratiometric sensor; Trypsin

(Received Jul. 16, 2018; accepted Dec. 20, 2018)

* Corresponding author