

# 牛血清蛋白纳米金团簇基于荧光共振能量转移法灵敏检测尿酸

丛剑涵<sup>1</sup>, 罗云敬<sup>1\*</sup>, 齐小花<sup>2</sup>, 邹明强<sup>2</sup>, 孔陈晨<sup>1</sup>

1. 北京工业大学环境与生命学部, 环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室, 北京 100124

2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123

**摘要** 基于纳米金团簇(AuNCs)良好的光学稳定性、生物相容性和简单无毒的制备方法, 开发了一种具有高度选择性、高灵敏度且可视化的尿酸(UA)传感器。使用牛血清白蛋白(BSA)作为模板合成了BSA-AuNCs。在尿酸氧化酶的催化下, UA产生化学计量的过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 导致AuNCs的荧光猝灭。此外, 发现BSA-AuNCs在该体系模拟过氧化物酶发挥酶活性, 它可以催化产物H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>将底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)氧化成ox-TMB, 此时BSA-AuNCs的发射光谱与ox-TMB的吸收光谱重叠, 发生了一种荧光共振能量转移(FRET)。BSA-AuNCs作为供体将激发能量转移到受体ox-TMB, 使ox-TMB产生荧光, 同时BSA-AuNCs的荧光强度明显低于单独存在时的强度, 从而大大提高了UA检测的灵敏度。在最佳条件下, 发现UA浓度在2~100 μmol·L<sup>-1</sup>猝灭程度线性关系良好, 线性方程为(F<sub>0</sub>-F)/F<sub>0</sub>=0.00585c<sub>UA</sub>+0.10364, 线性相关系数为0.9954, UA的检出限为0.26 μmol·L<sup>-1</sup>, 远低于正常人体UA水平的最低限(90 μmol·L<sup>-1</sup>), 同时研究了血液样本中UA的加标回收, 回收率在97.3%~104.7%, 表明了该方法在临床血样UA的检测中具有很大的应用潜力, 为进一步的临床分析提供了良好的理论依据和方法学指导。

**关键词** 纳米金团簇; 尿酸; 过氧化氢; 荧光共振能量转移

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)02-0483-07

## 引言

尿酸(uric acid, UA)是人类系统中嘌呤核苷酸代谢的最终产物, 通常存在于生物液体如血清和尿液中, 并且由于尿酸的溶解性极低, 使其易于在人体内累积<sup>[1]</sup>。尿酸过多积累会形成固体尿酸盐, 导致诸如高尿酸血症, 痛风性关节炎, 肾结石和高血压等疾病, 而血清中尿酸异常低可能会引发帕金森病或多发性硬化<sup>[2-3]</sup>。此外, 尿酸作为一种替代性抗氧化剂, 能够清除细胞中氧自由基, 从而使其在许多生理病理和损害发生中起到潜在的神经保护作用<sup>[4]</sup>。人体在健康的生理状态下体内尿酸的含量相对稳定, 男性150~420 μmol·L<sup>-1</sup>, 女性90~357 μmol·L<sup>-1</sup>, 但在病理状态下, 其含量会发生明显波动。因此, 血清中尿酸的测定是临床检测中最重要的生化指标之一, 开发一种具有高度选择性, 高灵敏, 高效的尿酸检测方法具有重要意义。

目前, 尿酸的测定方法主要包括高效液相色谱, 质谱,

紫外分光光度, 电化学, 化学发光和毛细管电泳法<sup>[5-10]</sup>。Ma等<sup>[10]</sup>开发了一种毛细管电泳法测定体液中尿酸。Liu等<sup>[11]</sup>通过高效液相色谱-质谱联用技术同时测定人唾液中尿酸和肌酐。陆娟等<sup>[12]</sup>采用静电纺丝法制备了碳量子点@纳米Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>生物传感器检测人血清中的尿酸。然而上述方法普遍存在繁琐的衍生、修饰和复杂的前处理等问题, 且仪器价格昂贵、成本高和特异性低, 限制了其在临床实验中尿酸检测的潜在应用。作为一种新型的纳米材料, AuNCs荧光探针具有操作简单、快速、灵敏度高的优点。由于其良好的光学性能, 光稳定性和生物相容性, 以及其简单且无毒的制备方法<sup>[13]</sup>, 在临床样品检测中具有广阔的应用前景。

本文以BSA为模板分子成功制备了BSA-AuNCs荧光探针, 并基于尿酸酶促反应产物H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对BSA-AuNCs荧光探针的猝灭效应, 开发了一种基于荧光共振能量转移(FRET)的超灵敏生物传感器检测尿酸。由于强荧光的BSA-AuNCs和氧化态的ox-TMB之间有效的FRET, 使得该方法简便快速, 灵敏度高。

收稿日期: 2021-01-24, 修订日期: 2021-03-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFF0203802), 北京市科技计划项目(Z201100009319001)资助

作者简介: 丛剑涵, 1993年生, 北京工业大学环境与生命学部, 环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室硕士研究生

e-mail: 15732636263@163.com \* 通讯作者 e-mail: luoyj@bjut.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

四水合氯金酸( $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 国药控股有限公司); BSA(纯度 $>98\%$ , 美国 Amresco 公司);  $\text{H}_2\text{O}_2$ (30%分析纯, 北京化工厂); TMB, UA, Urate Oxidase(纯度 $>98\%$ , 上海麦克林生化科技有限公司); NaOH,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Citric acid(分析纯, 国药控股有限公司); 实验用水为超纯水(电导率 $>18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ).

SH-3 恒温磁力搅拌器(北京金科发展公司); PHS-25 数字 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); JEM-2100 透射电子显微镜(日本); U-3010 紫外-可见分光光度计(UV, HITACHI 日立); F-4500 荧光分光光度计(FL, HITACHI 日立); Labofuge 400R 离心机(美国 Thermo 公司).

### 1.2 基于 BSA-AuNCs 荧光探针的合成方法

由 BSA 合成的 AuNCs 作为生物学模板参考以前的方法<sup>[14]</sup>, 将 125 mg BSA 加入到 2.5 mL 超纯水中, 于 37 °C 水中搅拌至溶解, 在剧烈搅拌下迅速向 BSA 溶液中加入  $\text{HAuCl}_4$  水溶液( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2.5 mL)混匀 5 min 后, 加入 NaOH 溶液( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 0.25 mL), 在 37 °C 下温和搅拌 24 h. 所得 BSA-AuNCs 溶液的颜色从浅黄色变为浅棕色, 最后变为深棕色. 然后, 将获得的溶液在黑暗中静置 24 h, 之后倒入 20 000 MWCO 透析袋中透析 24 h(每 8 h 更换一次水), 以除去未反应的小分子  $\text{HAuCl}_4$  和 NaOH. 将透析后的混合溶液用注射器经过 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤除去多余的大粒径的杂质. 最终将获得的溶液在黑暗中于 4 °C 下保存.

### 1.3 BSA-AuNCs 荧光探针的表征

荧光探针的形貌通过高分辨场发射透射电镜(TEM)进行测试. 然后分别测试探针的紫外-可见光谱和荧光光谱, 并分别确定所有测试条件在 5 和 10 nm 下的激发和发射狭缝宽度. 实验的 pH 值采用  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液控制. 经 37 °C 温水中适当温育后, 在 UV 和 FL 上分别记录紫外吸收光谱和荧光光谱以定性.

### 1.4 基于 FRET 生物传感器的建立

依次将 100  $\mu\text{L}$  稀释后的 BSA-AuNCs 溶液、700  $\mu\text{L}$   $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0)、100  $\mu\text{L}$   $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB 溶液和 100  $\mu\text{L}$   $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液于 1.5 mL 离心管中混匀, 将混合溶液在 37 °C 温水中温育 15 min 后, 在 UV 上测量 ox-TMB 吸收光谱, 在 FL 上测量荧光光谱.

### 1.5 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的荧光猝灭检测

通过稀释  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%)至  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 并用  $\text{KMnO}_4$  滴定新鲜制备  $\text{H}_2\text{O}_2$  的原液. 根据以下步骤进行  $\text{H}_2\text{O}_2$  的荧光猝灭测定. 将 100  $\mu\text{L}$  各种浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  引入含有 100  $\mu\text{L}$  稀释后的 BSA-AuNCs 溶液、100  $\mu\text{L}$   $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB 溶液和 700  $\mu\text{L}$  柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0,  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的混合物中, 摇匀, 并在黑暗中 37 °C 下温育 15 min. 最后, 在 500 nm 的激发波长下测量荧光强度.

### 1.6 荧光猝灭检测 UA

配制  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UA 储备液, 用柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液稀释 UA 储备液至不同浓度, 将 700  $\mu\text{L}$  柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 6.0,  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、100  $\mu\text{L}$  稀释后的 BSA-AuNCs 溶液、100  $\mu\text{L}$   $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB 溶液、15  $\mu\text{L}$  尿酸酶( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和不同浓度的 UA 在 37 °C 黑暗中温育 15 min. 然后用 FL 以 500 nm 激发波长记录荧光光谱.

### 1.7 用该方法对血液样本进行分析

首先将血样(来自 3 名健康志愿者), 以  $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 去除部分沉淀物, 以消除蛋白质可能对人血清的干扰, 获得浅黄色血清. 随后, 将一定体积的上层血清样品与  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的尿酸酶在 37 °C 下温育 10 min, 然后取 100  $\mu\text{L}$  上述氧化后的溶液与 700  $\mu\text{L}$  柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 6.0,  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  稀释后的 BSA-AuNCs 溶液、100  $\mu\text{L}$   $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB 溶液混合摇匀, 在 37 °C 黑暗中温育 15 min. 最后, 在 FL 上进行血清中 UA 的分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 BSA-AuNCs 荧光探针的表征

BSA-AuNCs 的 TEM 图像如图 1 所示, BSA-AuNCs 是单分散的, 呈圆球形且分布均匀, 最小粒径 0.86 nm, 最大粒径 3.00 nm, 粒径平均直径为 1.86 nm. 图 2 显示了 BSA-AuNCs 的 UV-Vis 吸收光谱、荧光激发和发射光谱以及  $\text{HAuCl}_4$  和 BSA 的 UV-Vis 吸收光谱. 曲线 1 显示 BSA-AuNCs 在 275 nm 附近具有强吸收峰, 曲线 2 和曲线 3 分别是  $\text{HAuCl}_4$  和 BSA 的 UV-Vis 吸收曲线, 由图 2 可知, 三者 UV-Vis 吸收光谱明显不同. 当在 500 nm 激发时, BSA-AuNCs 发射峰出现在 617 nm. 插图显示在紫外灯 365 nm 的激发下, 深棕色的 BSA-AuNCs 溶液发出强烈的红色荧光. 上述结果与文献<sup>[14-15]</sup>相似, 表明成功地制备了 BSA-AuNCs 荧光探针.

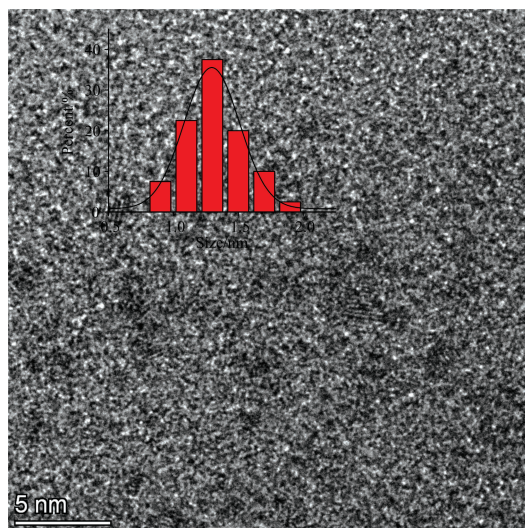


图 1 BSA-AuNCs 的 TEM; 插图为 BSA-AuNCs 粒径分布图  
Fig. 1 HRTEM image of BSA-AuNCs; Inset is particle size distribution of BSA-AuNCs

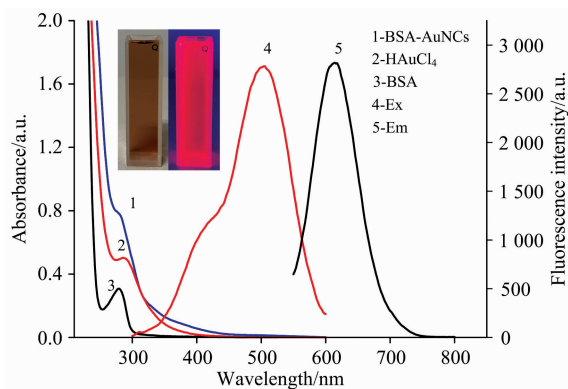


图 2 BSA-AuNCs(1);  $\text{HAuCl}_4$ (2); BSA(3)的紫外吸收光谱; BSA-AuNCs的荧光激发光谱(4)和发射光谱(5); 插图为 BSA-AuNCs在日光和 365 nm 紫外灯下的照片

Fig. 2 UV absorption spectra of BSA-AuNCs (1);  $\text{HAuCl}_4$  (2); BSA (3); Fluorescence excitation spectra (4) and emission spectra (5) of BSA-AuNCs; Inset are images of BSA-AuNCs under sunlight and 365 nm light

## 2.2 FRET 生物传感器增强荧光猝灭

BSA-AuNCs 的良好稳定性归因于被模板分子完全包裹的金核的化学惰性。从而使其在 FRET 中的应用成为可能, 如图 3(a)所示, 在 BSA-AuNCs 和 TMB 存在下加入  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 此时 BSA-AuNCs 显示出固有的过氧化物酶活性, 在没有 BSA-AuNCs 的情况下,  $\text{H}_2\text{O}_2$  几乎不能氧化 TMB。在 654 nm 处显示为无色溶液且无明显吸收[图 3(a), 1], 在 BSA-AuNCs-TMB[图 3(a), 2]和 BSA-AuNCs- $\text{H}_2\text{O}_2$ [图 3(a), 3]中发现了相同的结果, 然而, 当将 BSA-AuNCs 引入  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 TMB 溶液中时, 它可以催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  将 TMB 氧化为 ox-TMB。ox-TMB 在 654 nm 处出现最大吸收光谱并且获得明显的蓝色溶液[图 3(a), 4]。如图 3(b)由于 BSA-AuNCs 的发射光谱和 ox-TMB 的最大吸收光谱重叠, 证明他们之间存在 FRET 的可能, 插图显示, 可见光下, 在 BSA-AuNCs 催化下 TMB 被氧化前后, 颜色从无色变为蓝色。因此, 该传感系统产生了双光信号的变化。

引入 TMB 进行荧光检测, 当 BSA-AuNCs 中仅存在 TMB 时, 不会改变其荧光强度和吸收[图 4(2)], 加入一定量  $\text{H}_2\text{O}_2$  时, 测量荧光值略有降低, 并能保持荧光值数小时无明显波动[图 4(3)]。然而将 TMB 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 BSA-AuNCs 共同作用时, 其荧光强度迅速降低, 且较单独加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  时显示出荧光猝灭明显增强, 这比不含 TMB 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  样品直接检测要明显得多[图 4(4)]。这是由于 BSA-AuNCs 和 ox-TMB 之间的内部过滤作用, BSA-AuNCs 和 ox-TMB 分别作为 FRET 的供体和受体, 在能量转移过程中, 受体 ox-TMB 在 BSA-AuNCs 发射区域表现出较强的吸收, 使得供体 BSA-AuNCs 的荧光强度被显著猝灭。因此, 基于 FRET 的分析方法具有灵敏度高, 可视化等优点, 证明了这是一种超灵敏荧光传感器。

## 2.3 FRET 生物传感器辅助荧光猝灭系统的优化

为了获得更高的  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 UA 的检测灵敏度, 我们考虑

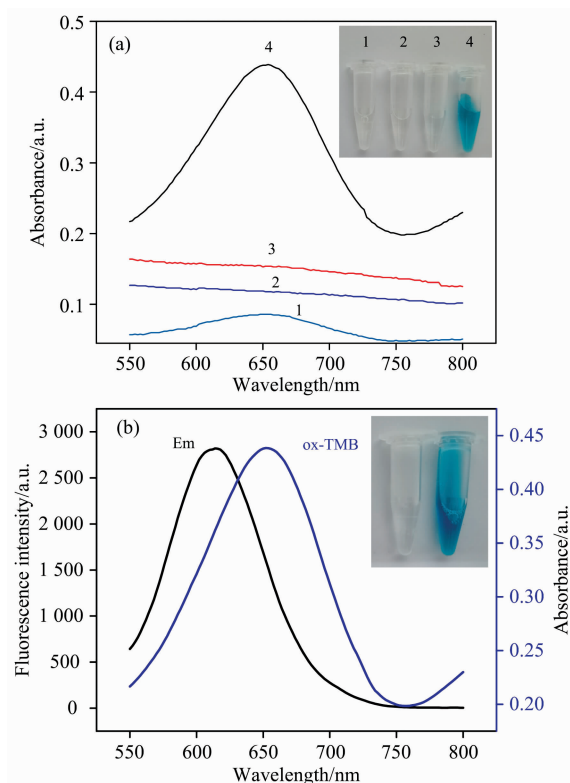


图 3 不同组分溶液的紫外-可见吸收光谱 (1) TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (2) BSA-AuNCs+TMB; (3) BSA-AuNCs+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (4) BSA-AuNCs+TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 插图显示相应组分溶液的照片 (a); BSA-AuNCs 的发射光谱和 ox-TMB 的紫外吸收光谱; 插图为 BSA-AuNCs 催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化 TMB 前后颜色变化对比照片 (b)

Fig. 3 UV-vis absorption spectra of different component solutions (1) TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (2) BSA-AuNCs+TMB; (3) BSA-AuNCs+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (4) BSA-AuNCs+TMB+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ; the illustration is a picture of the corresponding component solution (a); Emission spectra of BSA-AuNCs and UV absorption spectra of ox-TMB; inset are images of the color changes before and after  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidized TMB catalyzed by BSA-AuNCs (b)

了各种可能的影响因素, 包括溶液酸度、离子强度、培养温度和时间, 对实验条件进行了优化。

### 2.3.1 pH 的影响

考察了不同 pH 的柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液对 BSA-AuNCs 在检测中荧光强度的影响, 如图 5(a), 结果表明: 当 BSA-AuNCs 溶液在 pH(6.0~8.0)范围内对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的相对强度( $F_0/F$ )略有变化, 其中  $F_0$  和  $F$  分别是在不存在和存在  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 TMB 的情况下 BSA-AuNCs 的荧光强度, 考虑到进一步的生物学应用和最佳的检测效果, 我们选择了 pH6.0 作为最佳酸度。

### 2.3.2 离子强度的影响

离子强度是光谱检测方法中的一个重要影响因素, 在这项工作中, 我们使用 NaCl 来控制离子强度, 以研究荧光猝灭

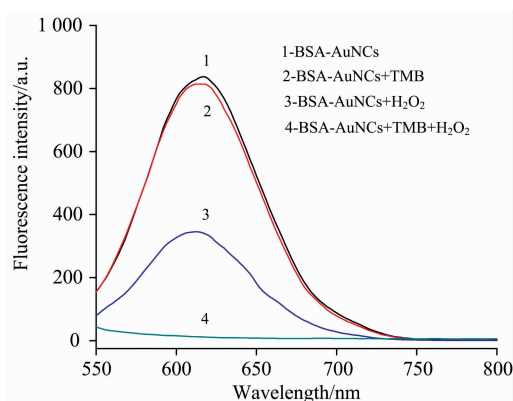


图 4 不同 BSA-AuNCs 样品的荧光光谱

1: 仅 BSA-AuNCs; 2: 含  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB 的 BSA-AuNCs; 3: 含  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的 BSA-AuNCs; 4: 含  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB 和  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的 BSA-AuNCs

Fig. 4 Fluorescence spectra of different BSA-AuNCs samples

1: BSA-AuNCs only; 2: BSA-AuNCs with  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB; 3: BSA-AuNCs with  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 4: BSA-AuNCs with both  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB and  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

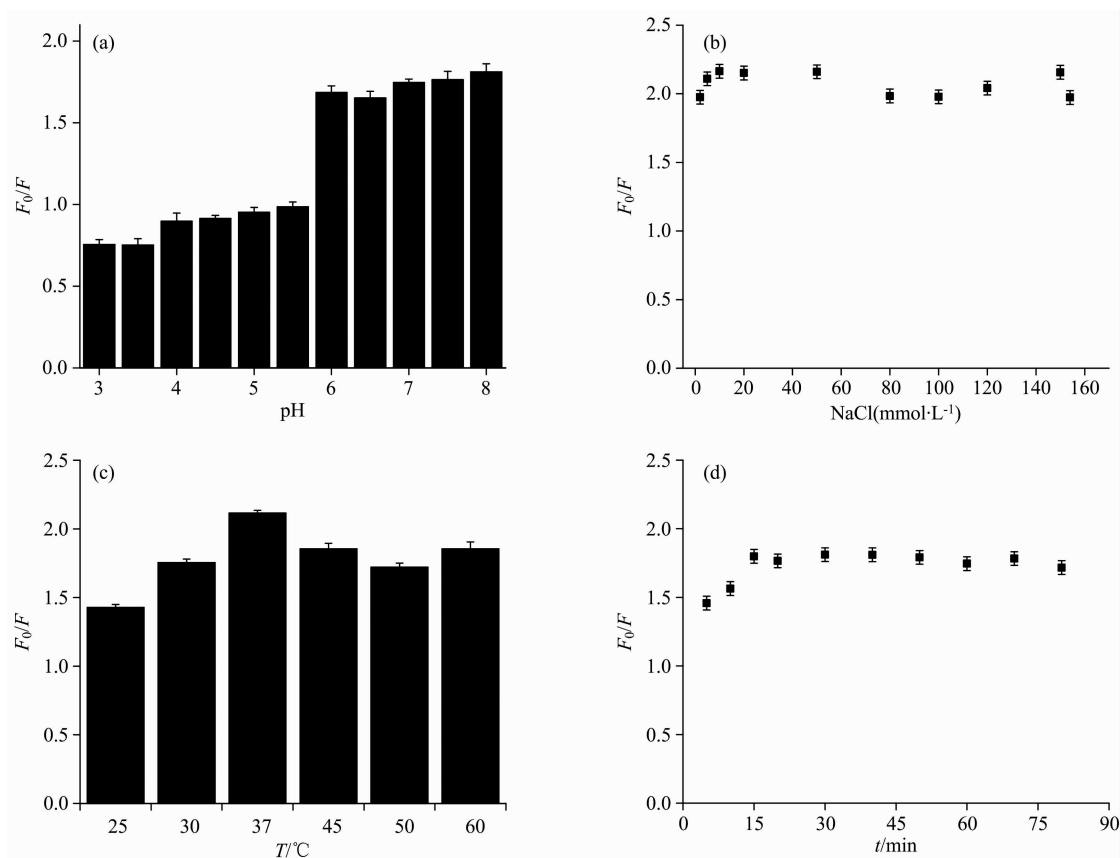


图 5 pH(a), 离子强度(b), 温度(c), 反应时间(d)对荧光的影响, 含  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB 的 BSA-AuNCs

Fig. 5 Effects of pH (a), ionic strength (b), temperature (c) and reaction time (d) on fluorescence intensity.

BSA-AuNCs containing  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMB

在最佳条件下, 不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度下 BSA-AuNCs 的荧光强度, 如图 6(a)所示, 随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度( $0, 0.02, 0.5, 2.5, 7, 9, 12, 15, 20, 25, 50, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的变化, BSA-AuNCs

的效果, 如图 5(b), 随 NaCl 浓度( $0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 80.0, 100.0, 120.0, 150.0, 153.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的增加, BSA-AuNCs 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的荧光响应没有明显变化, 表明我们的方法可以在正常生理盐浓度中进行。

### 2.3.3 温度的影响

如图 5(c)所示, 实验测试了温度对 FRET 辅助荧光猝灭系统的影响, 当温度从  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  上升到  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  时, 在  $25 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$  时,  $F_0/F$  逐渐升高, 当温度到达  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  时, 达到最佳状态, 温度由  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  变化到  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  时,  $F_0/F$  略有降低, 因此, 这里我们采用  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的生理温度作为最佳检测条件。

### 2.3.4 反应时间的影响

在动力学研究中, 为了检测 BSA-AuNCs 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  相对荧光强度随时间的变化, 对反应时间进行了动态检测, 如图 5(d)所示, 显示在 BSA-AuNCs 溶液中加入 TMB 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  后, 反应时间  $5 \sim 80 \text{ min}$  呈动态猝灭, 发现荧光强度在开始的  $15 \text{ min}$  内几乎呈线性且显著下降, 然后保持恒定。因此, 采用  $15 \text{ min}$  作为最佳反应时间, 与不加入 TMB 应用 BSA-AuNCs 荧光探针直接检测  $\text{H}_2\text{O}_2$  需  $70 \text{ min}$  时相比, 大大缩短了反应时间。

的荧光强度逐渐被猝灭, 如图 6(b)所示,  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 BSA-AuNCs 在  $0.5 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内的猝灭程度  $(F_0 - F)/F_0$  线性相关, 线性回归方程为  $(F_0 - F)/F_0 = 0.02583c_{\text{H}_2\text{O}_2}$



+0.095 12, 线性相关系数为 0.994 5。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的检出限为 0.07 μmol · L<sup>-1</sup>, 表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 具有较低的检测限。比不用 FRET 生物传感器辅助荧光猝灭系统检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 样品(检出

限 6.6 μmol · L<sup>-1</sup>) 低近两个数量级<sup>[16]</sup>。因此, 基于 FRET 的传感器具有灵敏度高, 检测限低, 可视化的优点, 大大提高了其检测性能, 为进一步灵敏地检测 UA 提供了基础。

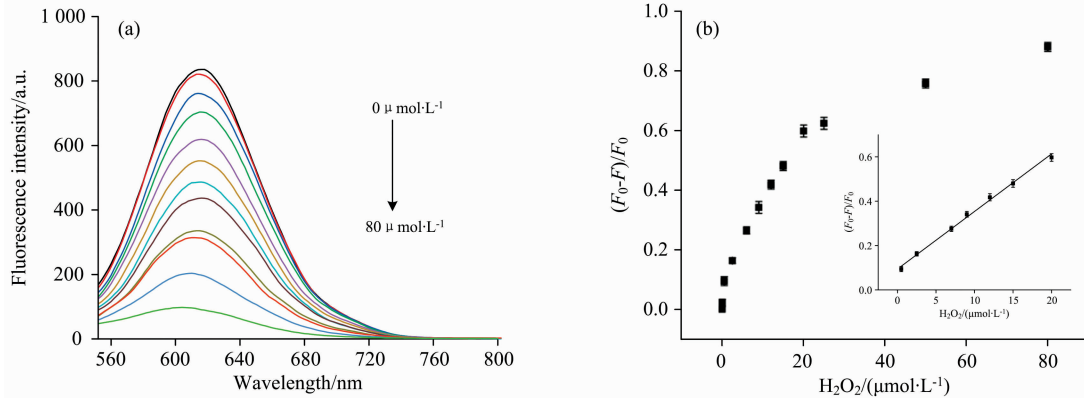


图 6 BSA-AuNCs 对不同量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 TMB 共存的荧光光谱图(a); 线性关系 Stern-Volmer 图(b)  
Fig. 6 Fluorescence spectra of BSA-AuNCs with different amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TMB (a); the Stern-Volmer plot showing the linear relationship (b)

### 2.4 UA 的检测

基于以上的检测结果, 我们已经建立了一种对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的灵敏、可视化的检测方法。由于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一系列特定底物氧化酶的酶促反应产物, 因此 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的灵敏检测可以扩展到生物催化过程的应用中。尿酸氧化酶在 UA 的存在下催化和氧

化 UA 生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 尿囊素(Allantoin)和二氧化碳(CO<sub>2</sub>)。基于 FRET 法灵敏检测 UA 如示意图 1 所示。

结果显示, 当添加 TMB 后, 在检测 UA 的酶促反应产物时, 显示出荧光猝灭较 UA 单独存在时增强, 如图 7(a) 所示, 随 UA 浓度(0, 0.7, 2.0, 15, 40, 65, 70, 80, 100, 150, 200 μmol · L<sup>-1</sup>) 的增加, BSA-AuNCs 的荧光强度持续降低, 并且研究了仅向 BSA-AuNCs 中添加 UA 或尿酸氧化酶不会引起其荧光强度的变化。而当 UA 和尿酸氧化酶同时存在时, BSA-AuNCs 的荧光发生猝灭, 这表明 BSA-AuNCs 的荧光强度降低是由于尿酸氧化酶催化尿酸产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的。在尿酸氧化酶存在下, 不同浓度的 UA 与 BSA-AuNCs 反应的相对强度(F<sub>0</sub>-F)/F<sub>0</sub>, 如图 7(b) 所示, 其中 F<sub>0</sub> 和 F 分别是不存在 UA 和存在 UA 的荧光强度, 结果发现, 在 2.0~100 μmol · L<sup>-1</sup> 范围内, 猝灭程度呈良好线性关系, 表示为(F<sub>0</sub>-F)/F<sub>0</sub>=0.005 85c<sub>UA</sub>+0.103 64, 线性相关系数为 0.995 4, 检出限为 0.26 μmol · L<sup>-1</sup>。远低于人体正常尿酸含量的最低值(90 μmol · L<sup>-1</sup>)。因此, 设计的 FRET, 灵敏传感

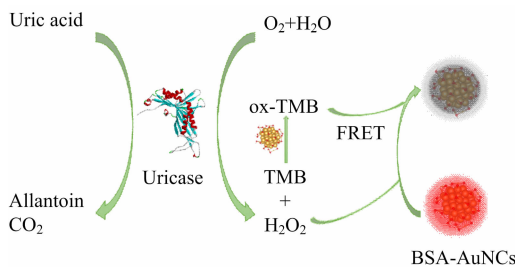


示意图 1 BSA-AuNCs 荧光探针基于 FRET 检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 UA 的示意图

Scheme 1 Schematic diagram of BSA-AuNCs fluorescent probe detecting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UA based on FRET

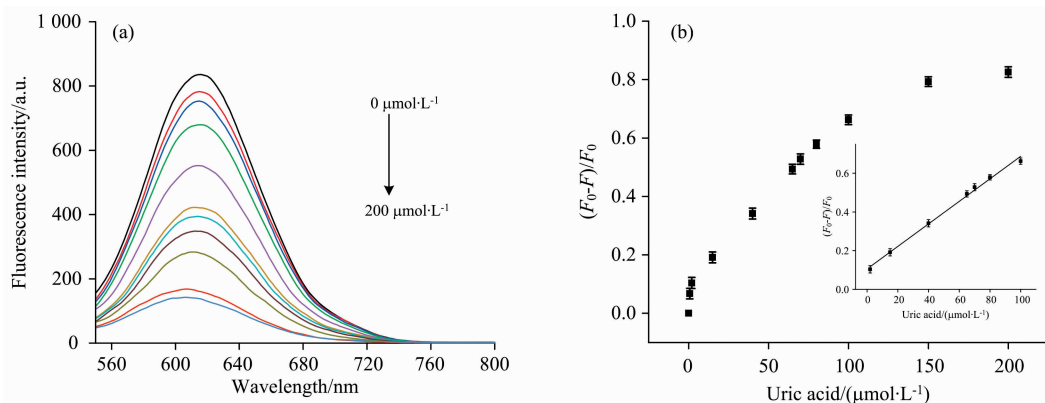


图 7 BSA-AuNCs 对不同量的 UA 和 TMB 共存的荧光光谱图(a); 线性关系 Stern-Volmer 图(b)  
Fig. 7 Fluorescence spectra of BSA-AuNCs with different amounts of UA and TMB (a); the Stern-Volmer plot showing the linear relationship (b)

器在检测 UA 方面优于以前的报道<sup>[16-17]</sup>, 显示了高灵敏度和低检测限的优势。为其进一步应用于临床血样的检测提供了基础。

### 2.5 BSA-AuNCs 的选择性评估

为了证明我们设计的灵敏传感器的选择性, 还研究了一些其他潜在干扰物对 BSA-AuNCs 的响应, 实验是在最佳检测条件和  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  尿酸氧化酶存在下进行的, UA 的浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 干扰物质 BSA, 谷胱甘肽(GSH), 抗坏血酸(Vc), 柠檬酸(CA), 尿素(Urea), 葡萄糖(Glu), 甘氨酸(Gly), 酪氨酸(Tyr), 氯化钠(NaCl)和氯化钾(KCl)的浓度为  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 结果如图 8, 上述干扰物质中仅 Vc 提供了较小的荧光增强, 除此之外其他物质存在下 BSA-AuNCs 的荧光强度几乎保持恒定, 仅当存在 UA 时, 荧光才显著猝灭。这归因于尿酸氧化酶的高催化活性和对 UA 的高特异性, 结果表明, 所提出的灵敏 UA 检测方法具有高选择性。

### 2.6 临床血液样本的分析

由于该方法具有的高灵敏度、高度选择性和高特异性, 因此将本方法应用于实际临床血样中 UA 的测定, 结果如

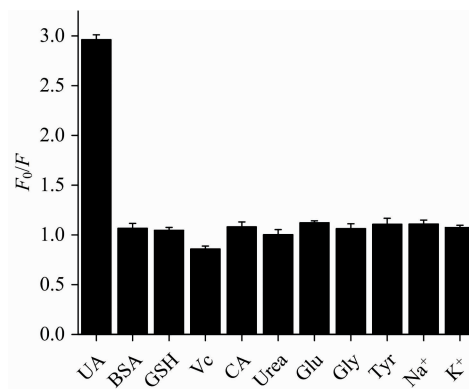


图 8 UA 的潜在干扰物对 BSA-AuNCs 荧光探针的影响

Fig. 8 Effect of potential interfering compounds of UA on BSA-AuNCs fluorescent probe

表 1, 采用标准加样回收的方法检测血样中的 UA, 加标回收率为  $97.3\% \sim 104.7\%$ , 相对标准偏差 RSD 为  $2.4\% \sim 3.2\%$ , 表明此方法可以应用于临床血液样本中 UA 的灵敏检测。

表 1 血液样本 UA 回收率结果

Table 1 Results of UA recovery rate of blood samples

Blood samples	UA detected / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	UA Standard added / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	UA added found / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Recovery/%	RSD/%
1	272.8	40.0	314.1	103.2	2.4
2	291.6	40.0	333.5	104.7	3.2
3	305.5	40.0	344.4	97.3	2.7

## 3 结 论

以 BSA 作为模板分子, 以简单、绿色的方法合成了 BSA-AuNCs 荧光探针, 基于超灵敏的 FRET 多功能生物传感系统检测  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 UA, BSA-AuNCs 在这里显示出特征性的过氧化物酶活性, 在检测中催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化 TMB, 从而生成 ox-TMB。强荧光的 BSA-AuNCs 和 ox-TMB 之间有效的 FRET 使得对  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 UA 的检测限极低, 分别为  $0.07$  和

$0.26 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , BSA-AuNCs 催化的过氧化物酶底物 TMB 生成 ox-TMB 的颜色变化可以更直观的观察实际样品中的 UA。与之前的方法相比, 本方法操作简单, 快速, 具有较高的灵敏度和选择性且可视化, 此方法用于测定临床实际血样中 UA 的浓度, 获得了较为满意的结果, 有望应用于临床实际样品中 UA 的快速、灵敏和高特异的检测。本研究设计的 FRET 传感器在这里显示出灵敏度高, 检测限低等优点, 大大提高了 UA 酶促反应产物  $\text{H}_2\text{O}_2$  的检测性能, 使得该方法有助于实现其他特定酶促反应产物的快速筛查分析。

## References

- [1] LIU Hong-ying, JIN Teng-fei, DAI Da-xiang, et al(刘红英, 金腾飞, 戴大响, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2017, 45(8): 1103.
- [2] ZHENG Bin, WEN Bao-ying, SU Li-zhong, et al(郑彬, 温宝英, 苏立众, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2017, 37(6): 1789.
- [3] Ni W Q, Wang R, Liu Z, et al. Metabolic Syndrome and Related Disorders, 2020, 18(2): 103.
- [4] Badejogbin C, Areola D E, Olaniyi K S, et al. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2019, 392(11): 1411.
- [5] Li Q Z, Qiu Y L, Han W N, et al. RSC Advance, 2018, 8(45): 25808.
- [6] Cao Y Y, Wen J X, Li Y, et al. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019, 47(1): 3774.
- [7] Rahman M M, Hussain M M, Asiri A M. New Journal of Chemistry, 2020, 44(45): 19581.
- [8] WU Hai, ZHANG Lei, LI Jing-cao, et al(武海, 张雷, 李竞草, 等). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2017, 33(2): 232.
- [9] Vakh C, Koronkiewicz S, Kalinowski S, et al. Talanta, 2017, 167: 725.

- [10] Ma S, Xu Z Q, Ren J. *Analytical Methods*, 2019, 11(20): 2712.
- [11] Liu X Y, Luo Y, Zhou C Y, et al. *Bioanalysis*, 2017, 9(22): 1751.
- [12] LU Juan, WANG Yue, HU Yue, et al(陆娟, 王月, 胡玥, 等). *Chinese Journal of Analysis Laboratory (分析试验室)*, 2020, 39(6): 711.
- [13] Zhang X P, Zhao C X, Shu Y, et al. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(24): 15866.
- [14] Li R P, Xu P P, Tu Y F, et al. *Microchimica Acta*, 2016, 183(1): 497.
- [15] Shu T, Wang J X, Su L, et al. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(22): 11193.
- [16] Wang J, Chang Y, Wu W B, et al. *Talanta*, 2016, 152: 314.
- [17] Liu Y Y, Li H C, Guo B, et al. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 91: 734.

## Sensitive Detection of Uric Acid Based on BSA Gold Nanoclusters by Fluorescence Energy Resonance Transfer

CONG Jian-han<sup>1</sup>, LUO Yun-jing<sup>1\*</sup>, QI Xiao-hua<sup>2</sup>, ZOU Ming-qiang<sup>2</sup>, KONG Chen-chen<sup>1</sup>

1. Beijing Key Laboratory of Environmental and Viral Oncology, Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

2. China Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China

**Abstract** Based on gold nanoclusters (AuNCs) with good optical stability, biocompatibility and simple and non-toxic preparation method, this paper developed a highly selective, highly sensitive and visualized uric acid (UA) sensor. We synthesized BSA-AuNCs using bovine serum albumin (BSA) as a template. Under the catalysis of urate oxidase, UA produces stoichiometric hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), which causes the fluorescence of AuNCs to be quenched. In addition, we found that BSA-AuNCs mimic the peroxidase activity in this system, catalysing the substrate's oxidation 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) to ox-TMB by  $H_2O_2$ . At this time, the emission spectrum of BSA-AuNCs overlaps the absorption spectrum of ox-TMB, and a kind of fluorescence resonance energy transfer (FRET) occurs. BSA-AuNCs acts as a donor to transfer the excitation energy to the acceptor ox-TMB, which makes ox-TMB produce fluorescence. At the same time, the fluorescence intensity of BSA-AuNCs is significantly lower than when it exists alone, which significantly improves the sensitivity of UA detection. Under optimum conditions, it is found that the UA concentration has an excellent linear relationship between the quenching degree of  $2\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the linear equation is  $(F_0 - F)/F_0 = 0.00585c_{\text{UA}} + 0.10364$ , the linear correlation coefficient is 0.9954, and the detection limit is  $0.26\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , which is far below the minimum limit of normal human UA levels ( $90\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Meanwhile, the recovery of UA in blood samples was studied, and the recovery rate was 97.3% to 104.7%, indicating that this method is effective in clinical blood samples. The detection has tremendous application potential, and provides an excellent theoretical basis and methodological guidance for further clinical analysis.

**Keywords** Gold nanoclusters; Uric acid; Hydrogen peroxide; Fluorescence resonance energy transfer

(Received Jan. 24, 2021; accepted Mar. 20, 2021)

\* Corresponding author