

文章编号 1672-6634(2021)04-0061-19

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2021.04.009

基于金纳米簇构建荧光传感方法 在生化分析中的应用研究

范晓玉,张 聪,张 帅,胡莹莹,管仁田,岳巧丽

(聊城大学 化学化工学院 山东聊城 252059)

摘要 近几年来,基于配体保护的金纳米簇的合成工艺迅速发展,采用各种生物和有机化合物合成配体,多种结构性质和功能迥异的金纳米簇被成功制备。并且相较于其他金属纳米簇,金纳米簇在表现出良好生物相容性和物化性质的同时还具有较高的稳定性和合成效率,受到了各个领域的广泛关注,尤其是在化学和生物物质的传感领域。本文综述了采用荧光传感方法,基于金纳米簇检测化学和生物分子的新进展。根据检测对象进行分类,概括分析了几个代表性体系:无机离子、生物活性分子和小分子有机物,并详细阐述了其检测机理、灵敏度及样品检测等结果,同时介绍了各种金纳米簇的合成特点和传感优势。

关键词 金纳米簇;荧光传感方法;无机和有机分子;生物活性物质

中图分类号 Q503;TB383;O657.3

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on the Application of Fluorescence Sensor based on Gold Nanoclusters in Biochemical Analysis

FAN Xiaoyu, ZHANG Cong, ZHANG Shuai, HU Yingying,
GUAN Rentian, YUE Qiaoli

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract In recent years, the synthesis of gold nanoclusters based on the protection of ligands has developed rapidly, and many kinds of gold nanoclusters with different structures, properties and functions have been successfully prepared by using various biological and organic compounds to synthesize ligands. Compared with other metal nanoclusters, gold nanoclusters have not only good biocompatibility and physico-chemical properties, but also high stability and synthesis efficiency, which have attracted extensive attention in various fields, especially in the field of chemical and biological material sensing. In this review, we focus on the progress of gold nanoclusters' application in the assay of biochemical molecules by adopting fluorescence sensing methods. The main content is classified by three parts based on analyte. The target materials include inorganic ions, bioactive molecules and small molecular organics. For the three representative systems, the detection mechanism, detection results such as sensitivity and samples are illustrated in detail. The synthesis features and sensing advantages of various gold nanoclusters are listed as well.

Key words gold nanoclusters; fluorescence sensing method; inorganic and organic molecules; bioactive substance

收稿日期:2020-12-02

基金项目:国家自然科学基金项目(91543206);山东省自然科学基金项目(ZR2014BQ017、ZR2015BM024、2013SJGZ07);山东省“泰山学者”研究经费和聊城大学研究基金的资助

通讯作者:岳巧丽,女,汉族,博士,副教授,研究方向:新型纳米生物传感方法与器件, E-mail: yueqiaoli@lcu.edu.cn.

0 引言

在生物化学的分析中,物质的检测方法有很多。传统的检测方法有气相色谱、电化学分析、质谱检测、毛细管电泳等,但是这些方法有一定的局限性,如检测时间较长、操作繁琐或仪器复杂等。而荧光探针的制备便可以克服这些问题,具有灵敏度高、选择性好、测量方便等优点。其中,荧光金属纳米簇便是一种性质优秀的用于物质检测的荧光探针。它是一种新型的具有独特光学、电学和化学性质的超微纳米材料,它具有亚纳米尺寸(小于 2 nm),通常由几个到几十个金属原子构成,处于单个金属原子和较大的金属纳米颗粒之间的过渡状态^[1]。由于纳米团簇的尺寸接近电子的费米波长,因此它们呈现出离散的、尺寸可调的电子跃迁和较强荧光发射性^[2]。具有如荧光发射可调、斯托克斯位移大、荧光稳定性高、量子产率较高等优点。由于荧光金属纳米簇通常是通过生物矿化方式制备的,一些生物分子(如小硫醇分子、聚合物、蛋白质和核酸)常被作为模板剂来进行荧光金属纳米簇的合成制备^[3-9]。所以与传统的量子点(QD)和有机染料相比,荧光金属纳米簇的毒性大大降低,生物相容性显著提高^[10]。因此,它们作为一种新型的纳米荧光探针,在生化分析、环境检测、医学成像和肿瘤治疗等领域得到了广泛应用。

近年来,DNA 以其优异的分子识别性能、成本效益和对某些金属离子的亲和力,被认为是合成荧光金属簇的良好模板^[11-14]。而银离子能高选择地结合胞嘧啶并形成稳定的结构,从而合成荧光性优异的银纳米簇^[15-20]。铜离子在具有和金、银离子相似性能的同时,具有更高的金属簇合成效率和更为低廉的价格,这为铜纳米簇在传感领域的相关应用提供了便利^[21-27]。然而,这些纳米团簇都面临着低稳定性的缺点,这限制了它们在实验室中的实际应用^[28]。同时,金纳米团簇(AuNCs)作为荧光金属纳米团簇的另一个分支,由于其生物相容性和光稳定性能优异,在生物化学分析领域引起了广泛的关注和应用。由于可通过 Au-S 键形成 AuNCs 的组装,AuNCs 合成配体的选择上更为广泛。这使得大量高灵敏度和选择性的金纳米簇传感器被人们所制备和开发,拓宽了金纳米簇的应用传感领域。

在过去的几十年中,报道了很多用于制备性质稳定、荧光强度高、水分散性和生物相容性好的 AuNCs 的方法。现阶段主要有两种方法来制备 AuNCs,一是通过配体或模板来还原三价金离子制备^[29],另一种是通过蚀刻更大的非荧光性金纳米颗粒来制备^[30],AuNCs 的光学性质和生物兼容性依赖于他们的尺寸,表面配体和模板以及周围的介质。当加入分析物后,可通过改变配体的性质或环境来阻碍荧光配体到金属的电荷转移,从而淬灭 AuNCs 荧光^[31]。因此,AuNCs 可以被用于研究开发灵敏和选择性的传感与成像系统,用于检测各种分析物。

本文中,我们将介绍近年来 AuNCs 检测生物化学物质的各种设计方法。并且以检测的目标物进行分类,综述了 2016-2020 年来 AuNCs 在光学传感方面的研究进展。

1 检测无机离子

金属离子广泛存在于生物体中,参与生物体内各种复杂的生化过程,以维持生命体系的一切正常活动,但许多金属离子(如 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 等)超过一定浓度时均具有毒性作用。基于金纳米簇较高的物化活性,目前已构建了多种简便的传感平台用于金属离子的高灵敏检测^[28,32-64]。而当前对于阴离子的检测种类并不多,主要是 S^{2-} 、 CN^- 和 NO_2^- 以及卤素离子^[65-70]。在本节中,我们将重点讨论用于检测无机离子的金纳米簇的相关研究,并举例介绍其检测机理。所列举的检测物质如表 1 所示。

1.1 检测金属离子

重金属离子如 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 可与多种细胞成分结合,如蛋白质、酶和核酸,使得它们的生物学功能改变,这可能会导致严重的疾病甚至死亡。由于 Hg^{2+} 与 Au^+ 之间存在亲金属相互作用,这种 Au^+ ($4f^{14}5d^{10}$) 与 Hg^{2+} ($4f^{14}5d^{10}$) 之间存在的 $d^{10}-d^{10}$ 亲金属相互作用会引起金簇荧光淬灭,因此许多敏感的选择性传感系统已经被开发出来用于检测 Hg^{2+} ^[28,32-45]。Yang 等通过微波辅助,以牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)为模板合成了牛血清白蛋白保护的金纳米簇(BSA-AuNCs)^[32]。不同于以往需要加热几十个小

时来制备 BSA-AuNCs 的方法,微波(microwave, MW)合成法因为可以提供均匀的加热而大大缩短加热时间。由于溶剂的介电常数与反应物的介电常数不同,选择性的介电加热可以显著提高直接传递给反应物的能量,这通常会导致内部温度的瞬时升高,因此只需要普通的微波烤箱并在短短几分钟内就可以成功制备金簇。所制备的 AuNCs 显示出强烈的红色发射,较大的斯托克斯位移和较高的量子产率,其尺寸和组成上也更为均匀。在最佳的检测条件下,对 Hg^{2+} 的检出限为 2.98 nM ^[32]。Shuang 等同样通过微波合成法,以廉价的鸡蛋清蛋白(egg white protein, ew)作为还原剂和封盖剂,制备了具有远-红/近-红外发射的蛋清保护的金纳米团簇(ew@AuNCs)^[33]。得到的 AuNCs 在 667 nm 处有较强的发射,量子产率 7.23% ,较好的光稳定性和较大的斯托克斯位移($>350 \text{ nm}$)。 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 可以使得 ew@AuNCs 的光致发光淬灭,当加入乙二胺作为掩蔽剂后,该探针对 Hg^{2+} 的检测显示出了极高的灵敏度,其检出限为 20 pM ,比美国环境保护局在饮用水中限定的数值(10 nM)低 500 倍。因此,该方案在临床、食品卫生、环境检测等领域具有广阔应用前景。

表 1 金纳米簇对无机离子的检测

检测物质	模板	线性范围	检出限	文献
Hg^{2+}	牛血清白蛋白	$5\text{-}100 \text{ nM}$	2.98 nM	[32]
Hg^{2+}	鸡蛋清蛋白	$0.0446\text{-}5.90 \text{ nM}$	20 pM	[33]
Cu^{2+}	溶菌酶	$4.0\text{-}40.0 \mu\text{M}$	9 nM	[46]
Ag^+	谷胱甘肽	$0.5 \text{ nM}\text{-}20 \mu\text{M}$	0.2 nM	[50]
Ag^+	碳点-硅球	$0\text{-}0.1 \mu\text{M}$ 和 $0.1\text{-}10 \mu\text{M}$	1.6 nM	[63]
CN^-	鸡蛋清蛋白	$0.5\text{-}10 \mu\text{M}$ 和 $20\text{-}50 \mu\text{M}$	138 nM	[64]
S^{2-}	谷胱甘肽	$2\text{-}24 \mu\text{M}$	$0.7 \mu\text{M}$	[65]
S^{2-}	乙酰半胱氨酸	$0.002\text{-}120 \mu\text{M}$	1.8 nM	[67]
I^-	DNA	$0\text{-}10 \mu\text{M}$	$0.3 \mu\text{M}$	[69]
NO_2^-	牛血清白蛋白	$5\text{-}30 \mu\text{M}$	$0.7 \mu\text{M}$	[77]

出于应用考虑。Su 等利用金纳米团簇包埋牛血清白蛋白(AuNCs@BSA)纳米纤维和氧化石墨烯(GO),制备了一种新型的可检测和分离汞离子(Hg^{2+})的杂化膜^[34]。在 EDC/NHS 的帮助下,使得 BSA 纳米纤维和氧化石墨烯共价结合,并且沿 GO 表面的皱纹和缺陷部位生长。并通过简单的过滤过程制备了混合复合膜。该复合膜可高效的去除水中重金属离子污染物^[34],其对 Hg^{2+} 的吸附效率在第一周期可达到 90.45% ,并且可以多次重复分离过程而不会破坏膜结构^[34]。

溶菌酶(lysozyme, Lys)是一种由 129 个氨基酸残基组成的低分子量球状蛋白。由于含有自由羧基、氨基和四个二硫键,因此溶菌酶可以作为合成金簇的稳定剂。Ilanchelian 等合成了溶菌酶稳定的金纳米簇(Lys-AuNCs),用于检测水溶液中的 Cu^{2+} ^[46]。所合成的 Lys-AuNCs 平均粒径 $2.5 \pm 0.3 \text{ nm}$,在紫外灯照射下表现出强烈的荧光和红色光致发光。对 Cu^{2+} 检出限为 9 nM 并且具有良好的选择性。 Cu^{2+} 导致 Lys-AuNCs 淬灭机理是由于与 Lys-AuNCs 结合的 Cu^{2+} 的顺磁行为而导致 Lys-AuNCs 的激发电子在系统间交叉时失去能量,从而生成了基态络合物所引起的静态淬灭^[71]。这种基于 Lys-AuNCs 的荧光纳米传感器制备简单快速,成本低,选择性和灵敏度高,在检测环境样品和生物系统中的 Cu^{2+} 方面具有潜在的应用价值。

已有研究表明, Ag^+ 对常规金簇的光致发光有一定的影响。然而,由于配体和核心构象的差异,人们对 Ag^+ 诱导金簇荧光增强的机理有着不同的见解。在这些机制中,有些人认为价态的变化是导致 AuNCs 光致发光增强的关键因素。而在 Zhou 等的研究中,他们通过四氯金酸和谷胱甘肽(glutathione, GSH)溶液在不外加还原剂的条件下制备了具有聚集诱导发射性质的金纳米簇(aggregation-induced emission gold nanoclusters, AIE-AuNCs)。并且首次发现了 Ag^+ 可以显著增加 AIE-AuNCs 的发光,而自身不发生氧化还原反应^[50]。这种荧光增强机制并不符合以往的规则,因此他们详细讨论了可能的机理。根据先前文献所报道, AIE-AuNCs 的聚集可以引起发光增强^[72]。但通过 TEM 图像表征发现, Ag^+ 引入后并没有改变 AIE-AuNCs 粒径,因此排除了 Ag^+ 诱导 AIE-AuNCs 的聚集引起的发光增强的可能。同时通过 XPS 确定了纳

米簇(NCs)的价态。证实了 Ag^+ 与 AIE-AuNCs 相连形成 $\text{Ag}@$ AIE-AuNCs 的同时,其价态不发生变化。此外,当向 $\text{Ag}@$ AIE-AuNCs 中加入 KBr 时,它的发光特性可以完全恢复到 AIE-AuNCs,这表明其发光的变化是可逆的, Ag 可以从 NCs 中移除。同时其发光增强的快速响应特性也表明了 Ag^+ 有可能锚定在 AIE-AuNCs 的壳层上,而非与金核相结合。因此,如图 1 所示。 Ag^+ 通过与 AIE-AuNCs 表面富电子基团相结合使得壳层电荷发生了转移,从而影响其配体-金属电荷转移(ligand-to metal charge transfer, LMCT)或配体-金属-金属电荷转移(ligand-to metal-metal charge transfer, LMMCT)来改变 AIE-AuNCs 的发光特性。这种 AIE-AuNCs 纳米传感器对 Ag^+ 的检测灵敏、高效且选择性好。其线性范围为 0.5 nM - $20 \mu\text{M}$,检出限低至 0.2 nM 。该研究不仅首次将 AIE-AuNCs 用作银离子纳米传感器,而且为提高 AIE-AuNCs 在无氧化还原反应下的发光能力找到了一条新的途径。

Liu 等,通过耦合碳点-硅球复合材料(carbon dots-silicon spheres composites, CSs)和金纳米团簇(AuNCs),构建了用于检测 Ag^+ 的“开启式”比例荧光探针^[63]。为探索实验机理,Liu 等研究了在添加 Ag^+ 之前和之后双发射荧光探针(dual-emission fluorescent probes, CSA) CSA 复合探针的 zeta 电位,发现在有和没有 Ag^+ 的情况下 zeta 电位分别为 -29.49 mV 和 -10.30 mV , Ag^+ 在 AuNCs 上的荧光增强机理主要是由于 Ag^+ 固定在表面富电子基团上引起的壳中电荷转移的变化,从而影响了荧光的变化^[50]。这与从以前的相关论文解释是一致的。在 380 nm 的单次激发下,CSA 分别在 448 和 610 nm 处表现出两个荧光发射。加入 Ag^+ 时 AuNCs 的荧光强度显著增强,而 CSs 的荧光保持不变^[63]。随着 Ag^+ 浓度的增加,CSA 比例荧光探针的荧光颜色由蓝色变为紫色,再变为粉红色。当 Ag^+ 浓度在 0 - $0.1 \mu\text{M}$ 和 0.1 - $10 \mu\text{M}$ 的范围内时,FL 与 Ag^+ 浓度之比显示出良好的线性关系,并且检测限低至 1.6 nM 。同时,实验结果表明,CSA 比例荧光探针在检测 Ag^+ 时具有很高的选择性和出色的灵敏度。与单荧光探针相比,CSA 比例荧光探针提高了检测的准确性,可以有效消除背景信号和环境的干扰^[63],并且在这里第一次使用比率探针传感器用于视觉检测。利用 CSA 复合材料制备了便携式琼脂糖水凝胶,实现肉眼检测 Ag^+ 的能力。这种双发射比荧光探针有潜力应用于环境监测和食品安全评估中的 Ag^+ 检测,并且对重金属离子的检测具有重要的示范意义。

1.2 检测阴离子

多年以来,氰化物阴离子(CN^-)污染因其对环境特别是对生物的不利影响受到世界各国的广泛关注。 CN^- 可与细胞色素 C 氧化酶内的血红素辅因子中的 Fe^{3+} 发生强烈结合作用。使其氧传输功能迅速失效而导致人体死亡。因此,如图 2 所示,Li 等以鸡蛋清蛋白(egg white protein, ew)为模板,在微波辅助的条件下合成了金银纳米团簇($\text{AuAgNCs}@$ ew, GSNCs),用于检测 CN^- ^[65]。在适当的条件下, HAuCl_4 和 AgNO_3 先发生络合,之后 AuCl_4^- 被蛋白质中的酪氨酸所还原^[73],导致金、银原子共同形成合金体系的核。由于金的成核速率快于银种,因此会首先生成 AuNCs^[74,75]。随后, Ag^+ 会与金种晶体表面形成金属键^[76],并在金晶种的催化下还原沉积为 AgNCs。最终在蛋白质基体中共沉积,生成了金银合金。所合成的金银纳米团簇生物毒性低、稳定性好、荧光性能好,可成功地应用于细胞成像和温度检测。此外,相比于单金属纳米团簇($\text{AuNCs}@$ ew),银离子的存在可以增强 AuNCs 的荧光强度,同时提高了对 CN^- 检测的灵敏度,这可能是由于“金银协同作用”原理所导致的^[65]。实验表明, CN^- 对 GSNCs 的荧光淬灭机理是因为 CN^- 会在氧气(空气)存在下将金和银氧化为 Au^+ 和 Ag^+ ,并且通过 σ - π 配位键形成 $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ 和 $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ 。这种现象类似于金/银的蚀刻反应,即金/银核心的蚀刻而导致纳米团簇的尺寸减小,从而表现出荧光淬灭现象^[65]。

1.2 检测阴离子

最近的研究表明, H_2S 水平的失调和多种疾病密切相关,例如阿兹海默症、唐氏综合征和癌症等^[67]。故对 H_2S 在生理条件下的灵敏检测变得尤为重要。由于 S^{2-} 易于与 Cu^{2+} 生成难溶 CuS ,因此可以通过 Cu^{2+}

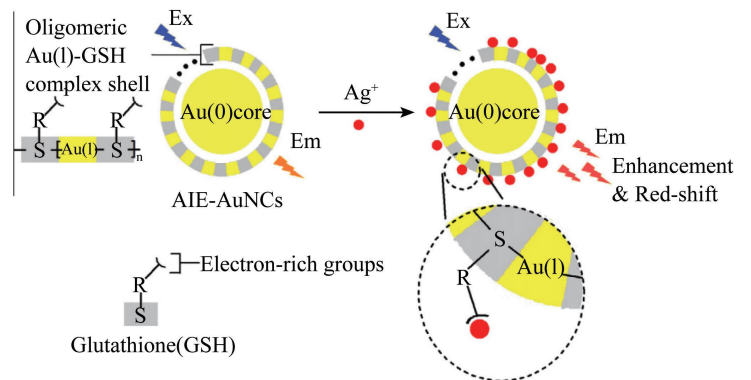


图 1 Ag^+ 增强 AIE-AuNCs 发光原理示意图^[50]

间接检测出 S^{2-} 浓度^[66,67]。Wu 等通过谷胱甘肽保护的纳米金团簇(GSH-AuNCs)和 Cu^{2+} , 建立了一种高选择性、高灵敏度的 S^{2-} 荧光检测方法^[66]。 Cu^{2+} 可以与金簇表面的羧基和氨基配位形成 Cu-GSH 络合物,使得 NCs 到 Cu^{2+} 之间发生有效的电荷转移,从而导致荧光淬灭。当加入 S^{2-} 后, S^{2-} 可以与 Cu^{2+} 发生强烈的结合作用,因而从 Cu-GSH 复合物中捕获 Cu^{2+} 并生成稳定的 CuS 沉淀。最终使得金簇荧光恢复。同时,他们还发现 Au_2S 具有较低的溶度积常数,因此理论上 S^{2-} 也可能通过与金簇中的金原子结合而降低荧光。然而实验表明,只有在 S^{2-} 浓度较高的情况下,才会发生一定程度的荧光减弱现象。其原因可能是 S^{2-} 和带负电荷的 GSH 之间的静电斥力作用,以及由 GSH 组成的有机配体壳可以阻止 S^{2-} 持续扩散到金原子所导致的^[66]。当然,基于 S^{2-} 结合金簇中的 Au(I)降低荧光来建立对 S^{2-} 传感方法也是可行的。Shuang 等就成功的合成了乙酰半胱氨酸稳定的金簇(acetylcysteine stabilized gold nanoclusters, ACC@AuNCs)用于 H_2S 的传感^[68]。其机理正是归因于 AuNCs 中 Au(I)与 H_2S 反应生成 Au_2S ,并最终导致金簇颗粒尺寸的增大和荧光淬灭的发生。与其他阴离子、氨基酸和硫醇相比,该传感器对 H_2S 具有较高选择性,其检测限为 1.8 nM,并在 0.002 至 120 μM 范围内具有稳定的响应^[68]。此外,还通过水样和血清样品对该荧光传感器进行了实际应用考察,均取得了较为满意的精确度和回收率结果。

碘离子的测定由于其重要性和紧迫性引起了人们的极大兴趣。体内缺碘可导致多种严重疾病,如克汀病和地方性甲状腺肿。基于 DNA 模板金/银纳米团簇(DNA-Au/AgNCs),Liu 等开发了一种新型的荧光比色检测平台,用于碘离子的简单选择性检测^[69]。该工作以 DNA 为模板制备了荧光双金属 Au/AgNCs (DNA-Au/AgNCs),并将其作为碘离子检测的选择性探针。该检测系统基于碘离子与 DNA-Au/Ag NCs 之间独特的相互作用,碘离子的加入具有明显的荧光淬灭作用,碘离子的线性范围在 0-10 $\mu mol/L$ 之间。DNA-Au/Ag 的 NCs 溶液在加入 I^- 后表现出明显的荧光淬灭,并伴有明显的颜色变化,从无色透明到紫红色^[69]。因此,基于 DNA-Au/AgNCs 探针,开发了碘离子特异性检测的双信号平台。检测过程可以在室温下快速进行,不需要任何催化剂或氧化剂。该体系对离子的选择性优于大多数阴离子和金属阳离子并且已成功应用于实际水样中碘离子的测定。

在过去的几十年里,亚硝酸盐离子(NO_2^-)对公众健康和水生生物的严重威胁引起了世界范围内的广泛关注。Chen 等,基于牛血清白蛋白(BSA)和 3-巯基丙酸(MPA)共修饰 AuNCs (BSA/MPA-AuNCs)的荧光淬灭,成功开发了一种简便有效的 NO_2^- 检测方法^[77]。从信号转导的角度来看,这里有一个十分有趣的现象, Fe^{2+}/Fe^{3+} 氧化还原对 BSA/MPA-AuNCs 的荧光淬灭作用不同,即 Fe^{3+} 可以有效抑制 BSA/MPA-AuNCs 的 PL,而相同浓度的 Fe^{2+} 荧光淬灭效率较低。由此提出一个新方法,即将 Fe^{2+}/Fe^{3+} 氧化还原反应与 BSA/MPA-AuNCs 的荧光淬灭/恢复结合起来,可以建立一种简单而通用的检测方法。在酸性条件下,在 NO_2^- 存在的环境中, Fe^{2+} 很容易氧化转化为 Fe^{3+} ,通过非辐射电子转移机制显著抑制 BSA/MPA-AuNCs 的荧光。该系统线性范围为 5-30 μM ($r = 0.9975$),检测限为 0.7 μM ^[77]。其他常见的阴离子和阳离子对 NO_2^- 检测的干扰非常小。此外,该传感策略在测定火腿样品中 NO_2^- 含量方面的良好表现验证了该策略的有效性,使其成为评估食品安全和水质的强大工具。这种感知方法的最大优点是它能够避免复杂或耗时的过程。我们相信,该方法在环境、生物、工业分析等诸多领域将具有广阔的应用前景。

2 检测生物活性分子

近几年来,各种各样的蛋白质(如胃蛋白酶、溶菌酶、鸡蛋清蛋白、辣根过氧化物酶、转铁蛋白等)都已被成功的用于金簇的合成中。并且一些硫醇分子、树状大分子、氨基酸、肽、DNA 等也均可作为配体参与金簇

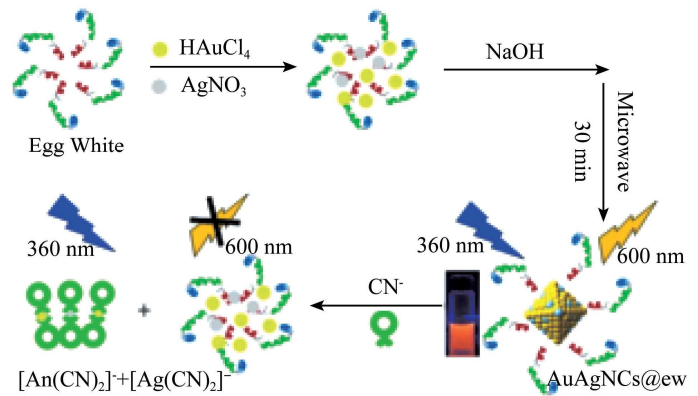


图 2 AuAgNCs@ew 的合成与 CN^- 的检测原理示意图^[65]

的合成。不同的配体具有不同的性质,对金前体的氧化还原、电化学和热力学稳定性具有重要的作用^[78]。因此金簇的识别和检测范围并不仅仅局限于无机离子。在本节中,将重点讨论一些具有代表性的检测酶、生物大分子和小分子的金纳米簇^[79-113],所列举的检测物质如表 2 所示。

表 2 金纳米簇对生物活性分子的检测

检测物质	模板	线性范围	检出限	文献
磷酸酶	牛血清白蛋白	1.0-200.0 U/L	0.05 U/L	[79]
焦磷酸酶	牛血清白蛋白	0.1-3 U/L	0.07 U/L	[80]
胰蛋白酶	谷胱甘肽	10-100 ng/mL	4.50 ng/mL	[81]
鱼精蛋白	谷胱甘肽	0.15-3.00 $\mu\text{g/mL}$	0.07 $\mu\text{g/mL}$	[81]
腺苷脱氨酶	金纳米簇和金纳米粒子	2-120 U/L	0.72 U/L	[82]
检靶 DNA	富含腺嘌呤的 DNA	0.5-20 nM	0.2 nM	[92]
凝血酶	富含腺嘌呤的 DNA	0.2-20 nM	100 pM	[92]
肝素	谷胱甘肽	0.1-1.6 mg/mL	0.075 mg/mL	[94]
蓖麻蛋白	鸡蛋清蛋白	0.7 -4.6 μM	400 nM	[95]
黑色素	谷胱甘肽	0.1-20 $\mu\text{g/mL}$	0.060 $\mu\text{g/mL}$	[99]
抗坏血酸	谷胱甘肽	0.01-200 μM	3.2 nM	[100]
H ₂ O ₂	牛血清白蛋白	0.06-2 μM	—	[105]
多巴胺	牛血清白蛋白	0.05-8.0 μM	0.018 μM	[111]
D 青霉胺	木瓜蛋白酶	30.0 μM -2.0 mM	5.0 μM	[113]
组氨酸	牛血清白蛋白	3.0-10000 nM	0.9 nM	[133]

2.1 检测酶

醛水解的原理建立了一种可以灵敏检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)的回收型检测方法^[79]。Xu 等认为,对酶作为一种特殊的生物大分子,是由活细胞产生的,对其底物具有高度特异性和催化效能的蛋白质或 RNA。而通过底物与金纳米簇传感器之间存在的荧光响应以及酶与底物之间的定量关系,就可以实现对酶的间接检测^[79-92]。Xu 等通过磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)和 BSA-AuNCs 之间的淬灭现象,以及碱性磷酸酶催化磷酸吡于 AuNCs 的荧光淬灭机理可大致分为三种:金簇聚集过程产生的荧光变化、荧光共振能量转移效应(FRET)和金簇自身配体环境的变化所导致的淬灭^[79]。通过 TEM 或 DLS 表明,PLP 添加前后的金簇并没有发生明显的形貌变化,因此排除了 PLP 诱导金簇发生聚集淬灭的可能性。此外,由于 BSA-AuNCs 的荧光发射光谱与 PLP 的吸收光谱没有重叠,因此也排除了从 BSA-AuNC 到 PLP 之间的 FRET 现象的发生。所以 Xu 等推测其淬灭机理有可能是环境和 BSA 模板的构象变化所导致的^[79]。而通过之前的报道可知,PLP 与 BSA 有两个主要的高亲和力结合位点(I 和 II),PLP 可与这两个特异性结合位点形成高度稳定的配合物^[114,115]。因此 PLP 的淬灭效应可以归因于 PLP 与配体之间的特异性相互作用^[79]。与此同时,碱性磷酸酶可以催化磷酸吡哆醛水解生成吡哆醛(pyridoxal, PL),而 PL 无法与 BSA 配体形成稳定配合物。因此被 PLP 淬灭的荧光被碱性磷酸酶所恢复,从而间接检测出碱性磷酸酶。该方法在 1.0-200.0 U/L 范围内具有良好的灵敏度,其检出限为 0.05 U/L。并且在多种生物酶中具有优秀的选择性。同时该传感器可成功的应用于人血清样品中碱性磷酸酶的检测,回收率在 100.60-104.46 % 之间。除此之外,还可基于 PLP 对 BSA-AuNCs 荧光的淬灭作用实现对 PLP 浓度的检测。

同样是基于配体环境变化导致金簇淬灭的机理,Chen 等以 3-巯基丙酸(3-mercaptopropionic acid, MPA)为模型配体,牛血清白蛋白作为模型蛋白,制备了强橙色荧光发射的水溶性金纳米簇(BSA/MPA-AuNCs)。并通过 Fe³⁺和焦磷酸盐(pyrophosphate, PPI)构建了对焦磷酸酶(pyrophosphatase, PPase)的高选择性灵敏检测^[80]。如图 3 所示,Fe³⁺可以与 BSA/MPA-AuNCs 发生选择性配位,造成从 BSA/MPA-AuNCs 到 Fe³⁺D 轨道的激发态非辐射电子转移,导致 AuNCs 的淬灭^[116,117]。而 PPI 与 Fe³⁺之间存在很高

的亲和力,它可以从 BSA/MPA-AuNCs-Fe³⁺ 配合物中提取出 Fe³⁺,从而很大程度上恢复溶液荧光。最后,在溶液中引入的焦磷酸酶能特异性地催化无机焦磷酸盐水解成正磷酸盐(orthophosphate, Pi),而与 PPi 相比, Pi 对 Fe³⁺ 的亲和力较低。因此 BSA/MPA-AuNCs 的荧光又再次被淬灭。这种通过荧光“关-开-关”过程所设计出的实时检测焦磷酸酶活性的方法,具有实时性好、毒性低、选择性和灵敏度高等优点^[80]。其金簇的荧光强度与焦磷酸酶的活性在 0.1-3 U/L 的范围内呈良好的线性关系,检出限为 0.07 U/L。并且可应用于测定实际生物样品中的焦磷酸酶的活性以及对焦磷酸酶抑制剂的效用做出评估。

胰蛋白酶是一种在胰腺腺泡细胞中形成的蛋白酶。主要参与催化赖氨酸和精氨酸残基 C 末端的肽的水解。它的活性异常与胰腺癌和囊性纤维化有关^[83]。另一方面,鱼精蛋白富含赖氨酸和精氨酸残基,是胰蛋白酶的理想底物。目前,鱼精蛋白被广泛用作肝素的解毒剂,以降低抗凝活性,还可用于延长糖尿病治疗中胰岛素的释放。但是过量使用鱼精蛋白可能会导致血压骤降、心率过缓、肺动脉高压或呼吸困难等不良影响。You 等基于谷胱甘肽保护的金属纳米簇存在独特的聚集诱导发射特性,利用氨基修饰的硅纳米粒子(SiNPs)和

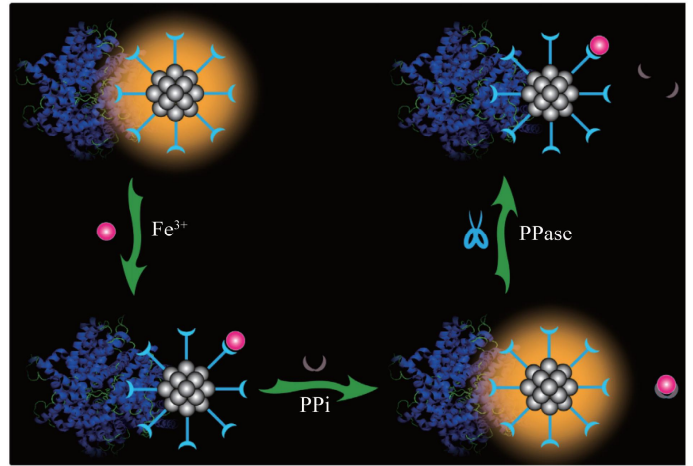


图 3 基于 BSA/MSA-AuNCs 的 PPase 活性测定方法的原理图^[80]

GSH 金簇(GSH-AuNCs)制备出了一种具有双发射特性的新型纳米杂化探针(SiNPs@GSH-AuNCs),用于检测鱼精蛋白和胰蛋白酶^[81]。如图 4 所示,氨基改性的硅纳米粒子和 GSH 金簇可以通过静电作用自组装形成球形粒子。从而使得 GSH-AuNCs 发生聚集诱导发射增强效应(AIEE),并在 570 nm 处出现较强红色荧光。而 SiNPs 在 450 nm 处保持自身蓝色荧光,两者构成双发射体系。当加入鱼精蛋白后,呈正电性的鱼精蛋白会与 SiNPs 竞争,并吸附到呈负电性的 GSH-AuNCs 表面,从而抑制其自组装过程,发生荧光淬灭现象。而胰蛋白酶可以催化鱼精蛋白的水解,使得自组装过程重新开始,AIEE 过程恢复^[81]。在检测过程中, SiNPs 可作为内标物,其发射保持恒定;GSH-AuNCs 为信号峰,对鱼精蛋白和胰蛋白酶浓度做出响应。通过两个荧光峰的强度比,实现对鱼精蛋白和胰蛋白酶的灵敏检测。这种基于金簇聚集诱导发射增强效应的新型纳米杂化探针对鱼精蛋白的检测线性范围为 0.15-3.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,检出限为 0.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对胰蛋白酶的检测线性范围为 10-100 ng/mL ,检出限为 4.50 ng/mL 。表现出了良好的灵敏度和选择性的同时可进一步应用于血清样品中鱼精蛋白和胰蛋白酶浓度的测定。

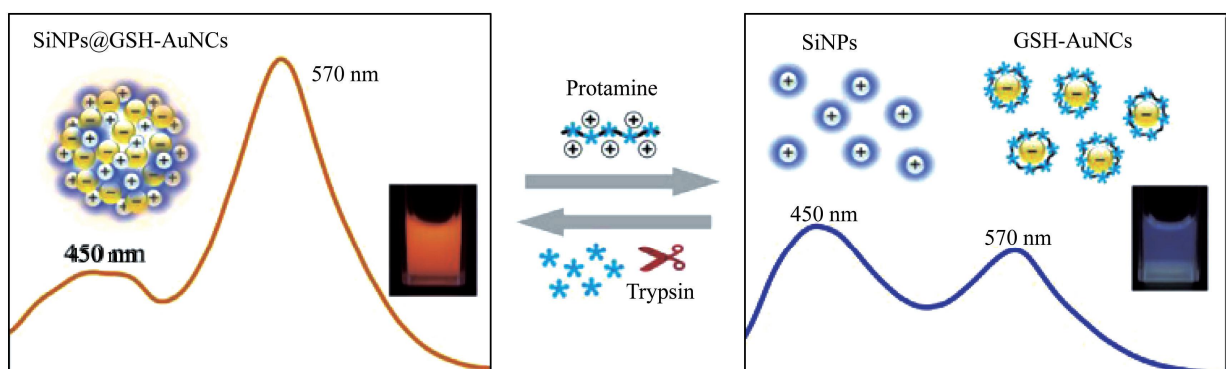


图 4 基于纳米杂化探针的鱼精蛋白和胰蛋白酶比率检测机理的原理图^[81]

荧光共振能量转移(FRET)是指在两个不同的荧光基团中,如果一个荧光基团(供体 Donor)的发射光谱与另一个基团(受体 Acceptor)的吸收光谱有一定的重叠,那么当这两个荧光基团间的距离合适时(一般小于 100 Å),就可观察到荧光能量由供体向受体转移的现象^[118]。Su 等通过金纳米簇和金纳米粒子(AuNPs)构建了基于拆分适配体的荧光共振能量转移(FRET)平台,以用于测定腺苷脱氨酶活性(adenosine deaminase, ADA)^[82]。他们先分别制备了 11-巯基十一烷酸(11-mercaptoundecanoic acid, 11-MUA)官能化的 AuNCs 和柠檬酸钠还原 HAuCl₄ 得到的 AuNPs,并将三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的核酸

适配体分裂为 P1 和 P2 两个片段。由于 11-MUA@AuNCs 表面存在大量羧基,因此可以和 P1 碱基末端的氨基通过缩合反应相结合,而 P2 可以通过 Au-S 键与 AuNPs 相结合,从而分别生成 P1-AuNCs 和 P2-AuNPs。最终,在 ATP 的存在下,P1 和 P2 可以与 ATP 结合,使得作为能量供体的 P1-AuNCs 和作为能量受体的 P2-AuNPs 相接近,以此发生 FRET 效应淬灭 P1-AuNCs 荧光。当加入腺苷脱氨酶后,ATP 会被转化为对适配体不具有亲和力的三磷酸肌苷(inosine triphosphate,ITP),P1 和 P2 链以此被释放,P1-AuNCs 和 P2-AuNPs 相远离并导致其系统的荧光恢复^[82]。该平台的荧光强度与 ADA 浓度在 2-120 U/L 范围内呈良好的线性关系,其检出限低至 0.72 U/L。这种 ATP 特异性结合其分裂适配体,连接 P1-AuNCs 和 P2-AuNPs 同时触发有效的 FRET 过程,与 ADA 高效的催化性能共同保证对 ADA 检测的灵敏度和选择性。

2.2 检测其他生物大分子

除了酶以外,生物体细胞内还存在核酸、多糖、蛋白质等大分子。每个生物大分子内有几千到几十万个原子,分子量从几万到几百万以上。其中,核酸作为生物聚合物,是所有已知生命形式必不可少的组成物质。不光局限于核酸的检测,以 DNA 或寡核苷酸为模板所合成的金属纳米团簇作为一种新型的发光纳米材料,由于其合成简单、性能和生物相容性好,近年来受到广泛的关注。例如以富含胞嘧啶的 DNA 为模板合成的银簇(AgNCs)和以随机 DNA 双链为模板所制备的铜纳米粒子(CuNPs)等,都凭借着自身的优点得到了广泛的应用。但是它们也分别存在着合成时间长和胶体分散不稳定等缺点。Tseng 等曾以 30 个腺苷核苷酸为模板序列,开发出了一种在紫外光辅助的条件下合成 DNA-AuNCs 的方法^[120]。然而该合成工艺需要 305 nm 紫外光辐射 24 h,其合成过程较为漫长和繁琐。鉴于此,Liu 和他的同事以富含腺嘌呤的 DNA 为模板,通过加热辅助还原法在较短的孵育时间(30 min)内成功合成了 DNA 金簇(DNA-AuNCs)。并通过 DNA-AuNCs 和 MnO₂ 纳米片成功的构建了可识别生物分子的新型荧光生物传感平台,以用于检测靶 DNA 和凝血酶^[92]。如图 5 所示,DNA-AuNCs 的单链 DNA 模板链设计为两个部分:前半部分为富含腺嘌呤的 DNA 序列(A15),以用于形成 AuNCs;后半部分则为识别序列。在 DNA-AuNCs 与 MnO₂ 纳米片共存时,DNA-AuNCs 可通过自身 DNA 单链的碱基与 MnO₂ 片基面之间的物理吸附作用而吸附在 MnO₂ 纳米片表面。使得自身荧光被 MnO₂ 纳米片所淬灭。当加入靶 DNA 序列后,DNA-AuNCs 中的识别序列可与靶 DNA 通过碱基互补配对杂交,形成 DNA 双链结构。核酸碱基因此被埋在带负电的螺旋状磷酸骨架之间,使得 DNA-AuNCs 与 MnO₂ 之间的物理吸附作用受到干扰,最终导致 MnO₂ 片上的 DNA-AuNCs 的释放和荧光强度的恢复。同理,将靶 DNA 识别序列更换为凝血酶适配体碱基序列后,在凝血酶存在的条件下,适配体碱基序列可与凝血酶形成适配体-凝血酶复合物结构并从 MnO₂ 片上解吸,从而实现了对凝血酶的灵敏检测。

多糖(polysaccharide)是由多个单糖分子缩合、失水而成,是一类分子结构复杂且庞大的糖类物质。它们广泛存在于动物细胞膜和植物、微生物的细胞壁中,是构成生命的四大基本物质之一。肝素(heparin)作为多糖的一种,在调节细胞生长和分化、炎症、免疫防御、脂质运输和代谢等各种生物过程中起着至关重要的作用,且在临床中常被用作抗凝血药物。然而,肝素的高剂量和长时间使用往往会导致高钾血症、出血、骨质疏松和血小板减少等不良反应。因此,Wu 等开发了一种简单有效的肝素荧光分析方法,即通过十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide,CTAB)和肝素对谷胱甘肽保护的纳米金簇竞争组装和拆卸调控来实现^[94]。CTAB 作为一种阳离子表面活性剂,可以很容易的通过静电相互作用和疏水相互作用与金属氧化物、二氧化硅和量子点等带负电荷的纳米粒子结合。因此 CTAB 可以与 GSH-AuNCs 自组装形成纳米复合材料,同时增强金簇荧光。然而,由于肝素具有更多的负电荷($\zeta=24.3$ mV)和三硫二糖重复单元所组成的更长的羟链,因此 CTAB 与肝素的结合能力比与 GSH-AuNCs 更强。最终可导致 CTAB 离开金簇表面,形成一个由 CTAB 和肝素组成的更为牢固的整体。而这种拆卸过程会使得先前被增强的荧光逐渐恢

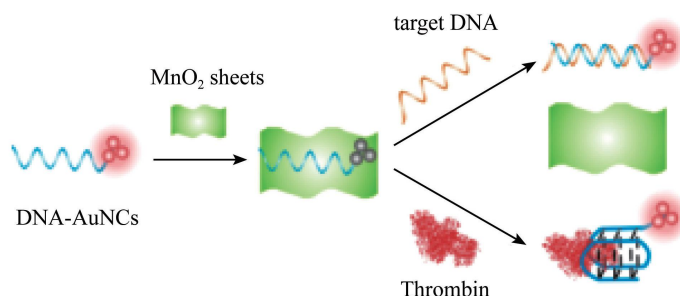


图 5 基于 DNA-AuNCs 和 MnO₂ 片的无标记通用荧光生物传感平台示意图^[92]

复。CTAB 作为一种阳离子表面活性剂,可以很容易的通过静电相互作用和疏水相互作用与金属氧化物、二氧化硅和量子点等带负电荷的纳米粒子结合。因此 CTAB 可以与 GSH-AuNCs 自组装形成纳米复合材料,同时增强金簇荧光。然而,由于肝素具有更多的负电荷($\zeta=24.3$ mV)和三硫二糖重复单元所组成的更长的羟链,因此 CTAB 与肝素的结合能力比与 GSH-AuNCs 更强。最终可导致 CTAB 离开金簇表面,形成一个由 CTAB 和肝素组成的更为牢固的整体。而这种拆卸过程会使得先前被增强的荧光逐渐恢

复,即在不外加荧光剂或淬灭剂的基础上实现了对肝素的灵敏检测。该方法对肝素的线性反应范围为 0.1-1.6 mg/mL,最低检出限为 0.075 mg/mL。选择性和灵敏度较好的同时避免了复杂的合成过程和危险试剂的使用。有望成为临床样本中肝素检测的有力工具。

蛋白质是组成人体一切细胞、组织的重要成分。机体所有重要的组成部分都需要有蛋白质的参与。因此对蛋白质的检测也尤为重要。Chen 等通过鸡蛋清蛋白为原料合成了具有明亮光致发光的鸡蛋清蛋白包覆的金纳米簇(chicken egg white protein-encapsulated gold nanoclusters, AuNCs@ew)以用于检测蓖麻蛋白(ricin)^[95]。蓖麻毒素是由全毒素、毒类素、凝集素三种物质组成的蛋白质。对所有哺乳动物真核细胞都有毒害作用,且对某些恶性肿瘤细胞的毒性效果表现的更强。这使它在医学上成为用于杀伤肿瘤细胞的首选毒素之一。该纳米团簇可以与蓖麻毒素相结合,生成共轭物。并且紫外灯下,可以观察到明亮的沉淀物。以荧光光谱为检测工具,其检出限可低至 400 nM。Chen 等还对结合机理进行了详细的探讨,认为其相互作用可能来源于 AuNCs@ew 上鸡蛋清蛋白所含的 Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc 末端多糖分子与蓖麻毒素 B 的分子识别作用。因此,他们利用 PNGase F 酶来处理 AuNCs@ew,在去除 AuNCs@ew 中的多聚糖同时仍然保持其荧光性。而处理后的金簇并没有对蓖麻毒素 B 表现出亲和性。最终证明了蓖麻毒素 B 与 AuNCs@ew 的结合作用主要来源于 AuNCs@ew 中鸡蛋清蛋白配体所含的半乳糖基结构。推翻了先前 Olsnes 等所提出的静电相互作用主导蓖麻毒素 B 和 AuNC@ew 的结合机理^[119]。该方法为快速确认可疑样品中是否存在蓖麻毒素提供了可行。同时也表明了天然可用的糖蛋白是开发功能性纳米探针的优秀候选者。

黑色素是一种天然的多功能色素,普遍存在于所有生物物种中,调节着与表皮稳态、色素沉着和黑色素瘤相关的多个生物学过程^[98,99]。因此,探索对黑色素敏感、有选择性并且能直接的检测方法,对于深入了解、诊断和正确处理色素不足和色素过多的疾病至关重要。当前用于黑色素估计的方法复杂且耗时长,因此需要替代技术。Moon-Moo Kim 等,首次报道了的直接检测黑色素的方法,在该方法中使用到的 GSH-AuNCs 更能够与黑色素相互作用从而引起荧光淬灭而实现黑色素快速检测^[99]。通常,黑色素具有光活性,因此,它可能通过荧光共振能量转移而产生荧光淬灭现象。其中黑色素充当能量供体,AuNCs 充当受体,这将有效淬灭 AuNCs 的荧光。制备的谷胱甘肽 AuNCs 在 350 nm 激发时在 600 nm 处显示发射峰。AuNC 发出的荧光可以被黑色素以浓度依赖的方式淬灭。因此,荧光强度随着黑色素浓度的变化而逐渐变化,这可以通过肉眼紫外线灯下容易地观察到,从而进行视觉检测。在优化条件下,所建立的淬灭法对黑色素具有较高的选择性和敏感性,检测限为 0.060 μ g/mL,相关系数为 0.993。整个过程在 30 min 内完成,因此克服了目前可用的黑色素检测方法耗时长的问题。该方法避免了使用浓 NaOH,并具备了对共存干扰物的高选择性,因此可以帮助方便地检测实际样品中的黑色素。而且,为了验证该方法对真实样本的性能,该团队对 B16F1 细胞裂解和头发样本进行了测试,得到了满意的结果。因此,开发的测定法对黑色素检测测定简单,响应快速,灵敏度高,使其在头发样品或其他含有黑色素的生物样品中检测黑色素有很大的实用价值,并且与多种疾病有关的黑色素的分析至关重要。

2.3 检测生物小分子

典型的细胞含有一万到十万种生物分子,而其中近半数都是小分子,其分子量一般在 500 以下,这些小分子包括一些无机/有机小分子、氨基酸、核苷酸、单糖、脂类和维生素等。他们通过有序的组合构成了生物大分子。抗坏血酸(ascorbic acid, AA)作为维生素的一种,在多种代谢途径中起到辅酶的作用。同时抗坏血酸的缺乏也被证实与抑郁症、坏血病、癌症和帕金森综合症等疾病的发病有关。因此目前已有多篇基于金簇检测抗坏血酸的文献被报道^[100-104]。Qu 等通过从 MnO₂ 纳米片中控制释放聚烯丙胺稳定的金纳米簇开发出了一种检测抗坏血酸的荧光“打开”分析法^[100]。他们首先合成了 GSH-AuNCs,并以 GSH-AuNCs 和聚烯丙胺为原料制得了聚烯丙胺-AuNCs(polyallylamine-AuNCs)。最后向聚烯丙胺-AuNCs 中加入单层 MnO₂ 纳米片以制备聚烯丙胺-AuNCs-MnO₂ 纳米复合材料。由于聚烯丙胺携带正电荷,因此聚烯丙胺-AuNCs 通过静电相互作用吸附在 MnO₂ 纳米片表面,金簇荧光也由于 FRET 过程而被纳米片所淬灭。当加入 AA 后,AA 可以将 MnO₂ 纳米片还原成 Mn²⁺,导致 MnO₂ 纳米片的分解,使得聚烯丙胺-AuNCs 荧光恢复。从

而可通过其荧光强度的变化实现对 AA 浓度的检测。与 AuNCs 相比,聚烯丙胺-AuNCs 的荧光强度明显增强,对提高检测灵敏度和扩大检测范围具有着重要意义。该纳米传感器对 AA 的检测范围为 0.01-200 μM ,其检出限为 3.2 nM。灵敏度高的同时具有良好的选择性和生物相容性。且其方法快速、经济、易于操作,有望推广到与抗坏血酸相关的生物和生物医学应用之中。

同样是基于 MnO_2 纳米片被还原为 Mn^{2+} 检测目标物,Liu 等以牛血清白蛋白为模板,在不使用任何强氧化剂和有毒有机溶剂的生理条件下通过一锅法引导 AuNCs- MnO_2 形成和组装。通过这种一锅型生物矿化过程(one-pot biomimetic mineralization process)所制备的金纳米簇-锚定(2D) MnO_2 纳米片可作为一种新型荧光/磁性双峰传感器,以用于检测 H_2O_2 ^[105]。在他们先前的工作中,发现可通过简单的混合金属离子和蛋白质来控制合成具有良好生物相容性的金属硫化物纳米颗粒^[121]。同时,Liu 等还报道了在碱性条件下,通过 BSA 孵育 Mn^{2+} 可以制备 MnO_2 纳米粒子^[122,123]。因此,Liu 等将两者结合,首次提出了基于 BSA 的仿生矿化以获得 2D MnO_2 纳米片^[105]。在合成过程中, Mn^{2+} 和 $[\text{AuCl}_4]^-$ 通过强涡作用与 BSA 水溶液混合,BSA 可通过羧基和硫醇基团捕获 Mn^{2+} 和 $[\text{AuCl}_4]^-$,从而形成 BSA-Mn 和 BSA-Au 配合物。随后,在 NaOH 的作用下,BSA 固载的 Mn 离子可经水解反应初步转化为 $\text{Mn}(\text{OH})_2$,并在溶解氧的帮助下氧化生成 MnO_2 。NaOH 引发了 2D MnO_2 生长的同时,还参与了 AuNCs 的成核。最后,在 BSA 的帮助下,BSA-AuNCs 与 2D MnO_2 组装生成了 AuNCs- MnO_2 。在没有 H_2O_2 存在时,2D MnO_2 纳米片上的 AuNCs 基于 FRET 效应,其荧光被纳米片所淬灭;而当加入 H_2O_2 后, MnO_2 纳米片会被分解成为 Mn^{2+} ,从而释放出 AuNCs,快速的恢复其荧光。同时由于 Mn^{2+} 的不断生成,还会产生磁共振(MR)信号,实现对 H_2O_2 浓度的荧光和磁共振的双信号检测。其荧光模式对 H_2O_2 的线性检测范围为 0.06-2 μM ,而 MR 模式也允许在 0.01-0.2 mM 的浓度范围内检测 H_2O_2 。并且由于 BSA 分子在产物表面的残留,所制备的 AuNCs- MnO_2 具有较低的细胞毒性和良好的生物相容性。这种金簇荧光与 Mn^{2+} 磁共振信号相结合的生物传感器为 H_2O_2 的细胞内外监测提供了一个高效的双模传感平台。

不仅仅局限于 MnO_2 纳米片,2D 纳米片独特的结构和理化性质,以及良好的电子、光子和生物相容性使它们得到了广泛的关注。例如,类石墨氮化碳($\text{g-C}_3\text{N}_4$)具有类石墨结构,是一种在 C-N 层之间具有弱范德华力的无金属聚合物半导体。由于其出色的性质被普遍应用于光合作用、电催化光降解环境有机污染物以及生物成像与生物医学领域^[124]。有研究表明,在 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的表面接枝金属或者半导体纳米粒子可以改善其光学性质,提高荧光强度^[125]。因此,Kokot 等合成了一种由石墨样氮化碳纳米片($\text{g-C}_3\text{N}_4$ NSs)和牛血清白蛋白包覆的金纳米簇(BSA-AuNCs)组成的强红色荧光纳米复合材料($\text{g-C}_3\text{N}_4$ NSs-AuNCs),以用于检测多巴胺(DA)^[111]。所合成的纳米复合材料较单一的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ NSs 相比,其发射峰产生了轻微蓝移。并在紫外灯下发射出橘红色荧光,而非之前的蓝色荧光。当加入 DA 后,DA 会被环境氧氧化生成多巴胺醌(DA quinone),并通过强共价相互作用(包括静电相互作用和氢键生成)吸附于 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ NSs-AuNCs 表面。由于多巴胺醌在 400-500 nm 范围内存在吸收峰,与 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ NSs-AuNCs 的发射光谱发生了重叠。因而随着两者距离的缩短产生了供体($\text{g-C}_3\text{N}_4$ NSs-AuNCs)向受体(DA quinone)的 FRET 效应,从而使得 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ NSs-AuNCs 荧光不断被淬灭,最终得到其荧光信号与 DA 浓度之间的线性关系。而与多巴胺类似,血清素(5-hydroxytryptamine,5-HT)作为一种单胺类神经递质,在生物学过程中也扮演着重要角色。Liu 等利用转铁蛋白包覆的金纳米团簇(Tf-AuNCs)制备了 5-HT 荧光“打开”生物传感器^[122]。据报道,5-HT 与唾液酸(sialic acid,SA)具有很高的亲和力^[126]。且由于转铁蛋白含有四末端 SA 残基的二元复合型聚糖,使得其对 5-HT 具有良好的识别能力^[127]。因此,通过微波合成法所制得 Tf-AuNCs 会在 5-HT 的存在下与之结合并聚集,通过聚集诱导发射效应(AIE)增强其荧光强度,并最终定量的检测出 5-HT 浓度。

D 青霉胺(D-penicillamine,D-pen)是一种从青霉素中分离出来的氨基酸,对威尔逊病、原发性胆汁性肝硬化和进行性系统性硬化均有一定的治疗效果^[128]。并且由于 D-pen 是目前应用最为广泛的重金属解毒治疗药物,其自身易于与重金属离子发生螯合反应。因此对 D-pen 的检测也相对较为方便、简单。Li 等在水溶液中成功的合成了具有红色荧光发射的木瓜蛋白酶(papain)稳定的金纳米团簇(papain@AuNCs),并在

Cu^{2+} 的参与下实现了对 D-pen 的间接检测^[113]。由于木瓜蛋白酶是一种从木瓜乳胶中分离而来的可溶性半胱氨酸蛋白酶,存在有一条含有 212 个氨基酸残基的多肽链,包括半胱氨酸、天冬酰胺和组氨酸残基^[129]。因此该蛋白酶可以作为一种良好的蛋白质稳定剂以用于金簇的合成。而 Cu^{2+} 可以与木瓜蛋白酶的氨基酸残基配位结合,并且降低蛋白质金簇表面电子密度,从而淬灭其荧光^[70]。当加入 D-pen 后,D-pen 能从 papain@AuNCs 表面捕获 Cu^{2+} ,形成更加稳定的 Cu^{2+} -D-pen 螯合物,从而恢复金簇荧光。这种快速、选择性检测 D-pen 的荧光“开启”法其检测范围为 30.0 μM -2.0 mM,检出限为 5.0 μM 。并且在体内外大鼠血清样品中 D-pen 的代谢过程分析中获得了良好的回收率。在建立新的荧光“开启”检测和实际生物样品中的药物高选择性检测中显示出极大的应用潜力。

组氨酸(L-Histidine, His)是一种天然氨基酸,通常存在于酶的催化位点。他在生物系统中起着非常重要的作用^[130,131]。由于 His 含有一个芳香氮杂环咪唑侧链,因此可以与某些过渡金属离子(Cu^{2+})强结合,控制金属的输运^[132]。然而,由于其含量低,且与其他氨基酸和物种具有相似的性质和结构,使其在生物样品中进行灵敏、选择性的检测具有一定的挑战性。Liu 等,以牛血清白蛋白(BSA)为模板,简便地合成了金/铜双金属纳米簇(Au/Cu NCs)^[133]。合成的 Au/Cu NCs 在水溶液中显示出可忽略的荧光,His 也不能显示任何荧光。令人惊讶的是,随着 His 的出现,出现了非常强烈的红色荧光,被认为是 His 触发的红色荧光启动。我们推测是 His 诱导的 Au/CuNCs 的荧光打开可能是由于 Cu 和 His 的配位引起的配位发射,从而限制了配体的旋转。金属有机骨架(MOFs)以四吡嗪(4-羧基苯基)配位 Ln^{3+} 离子,也有类似的聚合诱导发射的报道。因此,一种新型的 His 传感器可能会基于这种红色荧光变亮的有趣现象被开发出来。通过实验探究证实 Au/Cu NCs 能够在 3.0-10000 nM 的宽动态范围和 0.9 nM 的 LOD 范围内实现对 His 的快速检测,这优于其他经典方法或迄今为止报道的最新荧光传感方法。同时,该方法也适用于真实样本的检测。因此,提出的 His 触发荧光性光敏开关应该为在活细胞中探测 His 或 His 的各种荧光传感器提供指导。

3 检测小分子有机物

除了生物分子外,金纳米簇还可用于检测小分子有机物。这些小分子有机物通常不会在生物体内合成和出现,但可能会对生物体产生严重的毒性作用。因此在本节中,我们将列举几种常见的对人体有害的小分子有机物,并介绍其金簇对它们的检测机理^[134-143]。所列举的检测物质如表 3 所示。

表 3 金纳米簇对小分子有机物的检测

检测物质	模板	线性范围	检出限	文献
有机磷(对氧磷)	鸡蛋清蛋白	0.25-50.0 ng/mL	0.1 ng/mL	[134]
毒死蜱	非硫代的 DNA	0-5.0 μM	0.50 μM	[136]
TNT	金属有机骨架	10 nM-10 μM	5 nM	[139]
三聚氰胺	谷胱甘肽	100 μM -5 mM	28.2 μM	[142]
三聚氰胺	碳纳米点和谷胱甘肽	0.1-30 μM	29.3 nM	[143]

3.1 检测有机磷

有机磷农药(organophosphorus pesticides, OPs)因其对农作物的高效保护作用,在世界范围内被广泛应用于农业。然而,有机磷的广泛使用和不当处理,可能会对食品、环境和生态系统造成严重污染。有机磷可以与体内的乙酰胆碱酯酶(Acetyl cholinesterase, AchE)结合形成磷酸化乙酰胆碱酯酶,使酶失去活性,从而使得神经递质乙酰胆碱大量积蓄,造成神经功能严重损伤,甚至死亡。并且由于部分有机磷可以经皮肤吸收或者吸入中毒,在低剂量的条件下都会对人体造成严重的,甚至是不可逆的后果。因此对有机磷的灵敏检测一直是人们关注的焦点。目前,有机磷化合物通常分为两类:具有 P=O 键的有机磷酸酯和具有 P=S 键的有机代磷酸酯^[144]。Su 等设计了一种简便、快速的荧光检测平台,基于金簇-酪氨酸酶荧光探针体系来检测有机磷(对氧磷)^[134]。他们通过鸡蛋清蛋白作为稳定剂和模板,合成了在 630 nm 具有最大发射波长的鸡蛋清蛋白金簇。并同时向金簇中加入酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)和多巴胺以构成检测体系。TRY 可以催化

多巴胺,将其氧化为 Dopaminechrome。而 Dopaminechrome 能够有效的接受 AuNCs 中的电子,将电子从最高占据分子轨道(highest occupied molecule orbital, HOMO)传递到最低占据分子轨道(lowest unoccupied molecule orbital, LUMO),从而造成动态荧光淬灭^[145-147]。当有对氧磷存在时,对氧磷可以有效抑制酪氨酸酶活性,阻断其酶促过程,导致 AuNCs 荧光恢复。该传感平台将 TYR 的氧化能力与 OPs 引起的活性抑制相结合,所开发出的基于 AuNCs 的传感系统对对氧磷的检出限可降至 0.1 ng/mL。并且其金簇可以滴加在滤纸上,以作为快速视觉检测有机磷的测试纸来使用。在改进了视觉传感探针的设计的同时拓展并促进了金簇的实际应用^[134]。

正如上文提到的,一些非硫醇试剂,例如聚合物、树枝状大分子和 DNA 等都可以用于制备发光 AuNCs。这些非硫醇试剂可通过 Au-N 键或 Au-O 键的弱配位作用作为模板剂,在形成金簇的同时会使金簇处于不稳定状态^[136]。因此,Liu 等基于这一特点,提出了一种新的化学传感器的构建策略,即用非硫代的 DNA 包覆的 AuNCs 作为光学探针来检测毒死蜱(chlorpyrifos, CP)^[136]。如图 6 所示,在碱性条件下,CP 可以水解生成 DEP 和 TCP,而 DEP 中含有 P-O 键和 P-S 键。因此,通过 Au-S 和 Au-O 的协同配位作用, DNA-AuNCs 中的非硫醇的 DNA 配体会被 DEP 所取代。同时, Au(I) 会被 S 原子还原为 Au(0)。从而最终导致 DNA-AuNCs 的聚集和微小 AuNCs 到等离子体 AuNPs 的转变,并伴随着明显的溶液颜色变化。基于这种聚集诱导淬灭效应,该策略对 CP 表现出了良好的敏感性响应,检测限为 0.50 μM 。同时,常见的金属离子和糖类不会影响 DNA-AuNCs 的发光强度,并且[(RO₃P)=O]结构的有机磷酸酯由于不存在游离的硫醇片段也不会对 DNA-AuNCs 产生响应。含有 P=S 键的有机磷对该 DNA-AuNCs 的淬灭效率可达 80% 以上,表现出了优异的选择性。

炸药的精确分析对于评估环境污染和预防恐怖主义至关重要。然而,以高选择性和灵敏度对爆炸物进行快速分析仍然很困难。Liu 等,报道了 MOF 复合 AuNCs 爆炸物检测的荧光探针^[139]。金纳米团簇修饰的金属有机骨架是用于爆炸物检测的出色光学探针,结合 AuNCs 的 ZIF-8 是一步合成的。由于锌离子介导的 ZIF-8 聚集作用,与原始 AuNCs 相比,封装的 AuNCs 显示出更强的发射。使用三指数衰减函数拟合荧光衰减,得到 AuNCs, AuNCs/ZIF-8 和混合有 TNT 的 AuNCs/ZIF-8 的寿命分别为 2.1、6.2 和 5.7 μs 。在掺入 ZIF-8 后 AuNCs 的寿命变长,这与锌离子介导的 AuNCs 的聚集

有关^[139]。TNT 的引入导致纳米探针的寿命相对较短。这些结果表明该反应涉及动态淬灭过程。另外, TNT 的吸收光谱与 AuNCs/ZIF-8 的发射光谱不重叠,表明该系统没有荧光共振能量转移。根据以上分析,认为从激发的 AuNCs/ZIF-8 到缺乏电子的 TNT 的光诱导电子转移是荧光淬灭的主要原因,并且与其他炸药相比对 2,4,6-三硝基甲苯具有选择性响应,检测限为 5 nM,在 1 min 内即可快速响应。有效的测定是由框架介导的簇聚集和 TNT 结合产生的。功能性 MOF 已成功应用于通过电子转移快速检测 TNT^[139]。由于框架介导的 AuNCs 聚集和 TNT 结合,设计的纳米探针对 TNT 的反应在 1 min 内具有出色的选择性和敏感性。该方法表明了放大光学测定的潜力。总而言之,使用 AuNCs 功能化的 MOF 实现了炸药的高效荧光感测,可以高灵敏度和快速响应性地选择性检测其他硝基炸药中的 TNT。

3.2 检测三聚氰胺

三聚氰胺是一种富氮(按重量计占 66.7%)的工业化合物,广泛用于阻燃剂、杀虫剂、塑料和化肥的制造中。然而,三聚氰胺曾被发现非法添加在乳制品中,以增加氮含量。虽然三聚氰胺本身低毒,但是高浓度的三聚氰胺易形成水溶性差的高分子量配合物,并在肾小管中沉淀。最终导致泌尿系统损伤和肾结石,严重时可能会致人死亡^[140,141]。Joseph 等报道了一种新型的比率型纳米传感器,即利用谷胱甘肽稳定的金簇

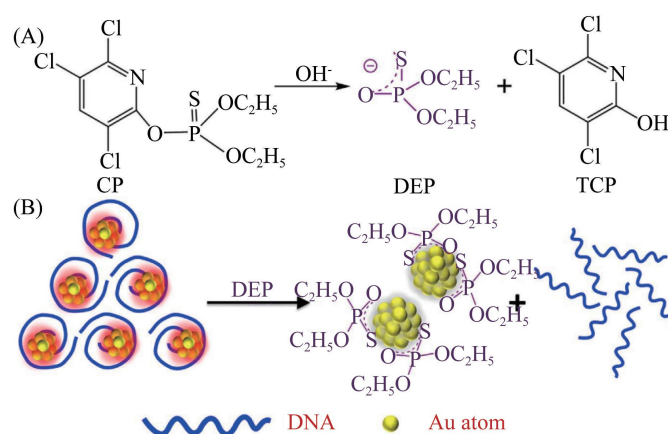


图 6 (A)CP 在碱性溶液中的水解过程.(B)DNA-AuNCs 检测 CP 原理示意图^[136]

(GSH-AuNCs)高选择性和灵敏地检测三聚氰胺^[142]。通过实验表明,三聚氰胺可以使得 GSH-AuNCs 聚集,使其平均粒径增大。这种聚集可能是由于三聚氰胺和 AuNCs 表面的谷胱甘肽之间形成氢键所导致的。随着三聚氰胺浓度的增加,金簇的不断聚集,会使得 AuNCs 在 600 nm 处的荧光发生淬灭。但同时,三聚氰胺又是一种富氮分子,具有很强的给电子能力,因此会增强 AuNCs 在 430 nm 处的荧光。从而可通过两个波长下荧光强度的比值与三聚氰胺的浓度绘制得出线性关系。其检出限可达到 28.2 μM 。同时,该纳米传感器不受其他生物分子所干扰,例如牛奶中常见蛋白质(丙氨酸、甘氨酸、胱氨酸等)和碳水化合物(葡萄糖)等,可成功应用于奶制品中三聚氰胺含量的测定。

为了进一步提高对三聚氰胺的检测灵敏度,You 等利用碳纳米点和谷胱甘肽稳定的金纳米簇(CNDS/GSH@AuNCs)的自组装技术,开发了一种新型比率型荧光探针来检测三聚氰胺^[143]。如图 7 所示,他们首先合成了可发射红光的 GSH-AuNCs 和可发射蓝光的抗坏血酸碳点,并通过超声将其均匀混合以制备 CNDS/GSH@AuNCs。之后再向其加入 Hg^{2+} 以构成传感平台。当加入 Hg^{2+} 后,由于 d^{10} - d^{10} 效应,汞离子可淬灭金簇荧光,但是不会影响 CNDS 的

荧光发射。而当有三聚氰胺存在时,由于其特殊的多氮结构,三聚氰胺对 Hg^{2+} 具有更高的配位亲和性,从而形成三聚氰胺-汞配合物,使得金簇荧光恢复。最终以碳点的荧光峰作为参比峰,金簇的荧光峰作为信号峰,通过荧光强度比率的方式灵敏准确的检测出三聚氰胺浓度。该 CNDS/GSH@AuNCs- Hg^{2+} 传感系统在 0.1-30 μM 范围内具有较好的灵敏度响应,且检出限可低至 29.3 nM。同时在实际加标样品(牛奶,猫粮)检测三聚氰胺实验中获得了令人满意的回收率数据,证明了其可靠性和准确性。有望成为检测食品中三聚氰胺的潜在候选物^[143]。

4 总结与展望

金纳米簇作为一种新型的荧光纳米材料,具有良好的荧光性质和生物相容性。并且相较于其他金属纳米材料,金簇具有易制备、易修饰、稳定性好等优异的特点。通过不同的配体合成和功能化修饰金簇,可以提高金簇对待测物质的靶向识别能力。同时也可以导致材料本身的荧光性质发生变化。这些优良的特性,使得金纳米簇在化学、生物和医学领域展现出了更多的应用潜能。尽管金纳米簇在化学生物检测领域已取得一定的成果,但进一步的发展还面临着严峻的挑战。制备纯度和量子产率偏低一直是金簇合成的首要问题。其次,金纳米簇在细胞或活体等复杂生物环境中的抗干扰检测能力还有待提高。但随着金簇的理论基础和合成技术的不断突破,有望为化学和生物医学领域的研究提供新的契机,为生物体内传感、成像以及治疗开拓新的途径。可以相信,在不久的将来,以荧光金纳米簇为基础构建的生物标记、生物传感、生物成像以及靶向的肿瘤治疗平台将展示出更为广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] JIN R. Quantum sized, thiolate-protected gold nanoclusters[J]. *Nanoscale*, 2010, 2(3): 343-362.
- [2] ZHENG J, NICOVICH P R, DICKSON R M. Highly fluorescent noble-metal quantum dots[J]. *Annu Rev Phys Chem*, 2007, 58: 409-431.
- [3] ZHOU T, RONG M, CAI Z, et al. Sonochemical synthesis of highly fluorescent glutathione-stabilized Ag nanoclusters and S^{2-} sensing[J]. *Nanoscale*, 2012, 4(14): 4103-4106.
- [4] ZHENG J, DICKSON R M. Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silver nanodot fluorescence[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(47): 13982-13983.
- [5] ZHOU T, HUANG Y, LI W, et al. Facile synthesis of red-emitting lysozyme-stabilized Ag nanoclusters[J]. *Nanoscale*, 2012, 4(17): 5312-5315.

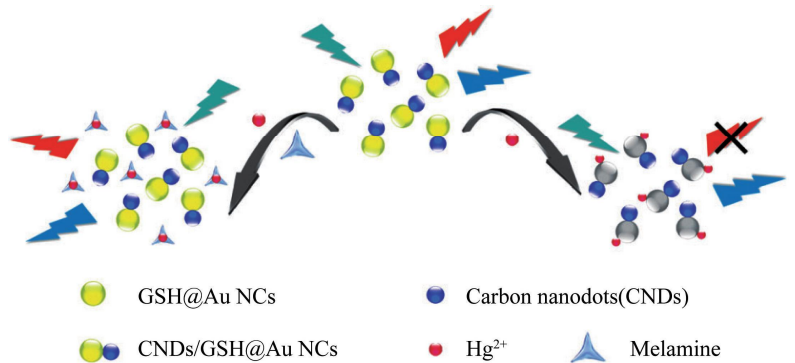


图 7 CNDS/GSH@Au NCs 作为比率度量荧光探针检测三聚氰胺示意图^[143]

- [6] WEN Q, GU Y, TANG L J, et al. Peptide-templated gold nanocluster beacon as a sensitive, label-free sensor for protein post-translational modification enzymes[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(24): 11681-11685.
- [7] XAVIER P L, CHAUDHARI K, BAKSI A, et al. Protein-protected luminescent noble metal quantum clusters: an emerging trend in atomic cluster nanoscience[J]. *Nano Rev*, 2012, 3(1): 14767.
- [8] GOSWAMI N, ZHENG K, XIE J. Bio-NCs—the marriage of ultrasmall metal nanoclusters with biomolecules[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(22): 13328-13347.
- [9] WANG Y W, TANG S, YANG H H, et al. A novel colorimetric assay for rapid detection of cysteine and Hg^{2+} based on gold clusters[J]. *Talanta*, 2016, 146: 71-74.
- [10] KUNDU S, PATRA A. Nanoscale Strategies for Light Harvesting[J]. *Chem Rev*, 2017, 117(2): 712-757.
- [11] HAN B, WANG E. DNA-templated fluorescent silver nanoclusters[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(1): 129-138.
- [12] LIU J. DNA-stabilized, fluorescent, metal nanoclusters for biosensor development[J]. *Trac-Trends Anal Chem*, 2014, 58: 99-111.
- [13] ZHENG C, ZHENG A X, LIU B, et al. One-pot synthesized DNA-templated Ag/Pt bimetallic nanoclusters as peroxidase mimics for colorimetric detection of thrombin[J]. *Chem Commun*, 2014, 50(86): 13103-13106.
- [14] SONG X R, GOSWAMI N, YANG H H, et al. Functionalization of metal nanoclusters for biomedical applications[J]. *Analyst*, 2016, 141(11): 3126-3140.
- [15] RICHARDS C I, CHOI S, HSIANG J C, et al. Oligonucleotide-Stabilized Ag Nanocluster Fluorophores[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(15): 5038-5039.
- [16] ZHANG M, GUO S M, LI Y-R, et al. A label-free fluorescent molecular beacon based on DNA-templated silver nanoclusters for detection of adenosine and adenosine deaminase[J]. *Chem Commun*, 2012, 48(44): 5488-5490.
- [17] YIN J, HE X, WANG K, et al. Label-free and turn-on aptamer strategy for cancer cells detection based on a DNA-silver nanocluster fluorescence upon recognition-induced hybridization[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(24): 12011-12019.
- [18] SHARON E, ENKIN N, ALBADA H B, et al. Aptasensors based on supramolecular structures of nucleic acid-stabilized Ag nanoclusters[J]. *Chem Commun*, 2015, 51(6): 1100-1103.
- [19] CHOI S, DICKSON R M, YU J. Developing luminescent silver nanodots for biological applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(5): 1867-1891.
- [20] LATORRE A, LORCA R, SOMOZA Á. Fluorescent DNA stabilized silver nanoclusters as biosensors[J]. *J Chem*, 2013, 2013: 1-6.
- [21] JIA X, LI J, HAN L, et al. DNA-hosted copper nanoclusters for fluorescent identification of single nucleotide polymorphisms[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(4): 3311-3317.
- [22] QING Z, HE X, QING T, et al. Poly(thymine)-templated fluorescent copper nanoparticles for ultrasensitive label-free nuclease assay and its inhibitors screening[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(24): 12138-12143.
- [23] QING Z, QING T, MAO Z, et al. dsDNA-specific fluorescent copper nanoparticles as a "green" nano-dye for polymerization-mediated biochemical analysis[J]. *Chem Commun*, 2014, 50(84): 12746-12748.
- [24] XU F, SHI H, HE X, et al. Concatemeric dsDNA-templated copper nanoparticles strategy with improved sensitivity and stability based on rolling circle replication and its application in microRNA detection[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(14): 6976-6982.
- [25] MAO Z, QING Z, QING T, et al. Poly(thymine)-Templated Copper Nanoparticles as a Fluorescent Indicator for Hydrogen Peroxide and Oxidase-Based Biosensing[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(14): 7454-7460.
- [26] ZHANG Y, CHEN Z, TAO Y, et al. Hybridization chain reaction engineered dsDNA for Cu metallization: an enzyme-free platform for amplified detection of cancer cells and microRNAs[J]. *Chem Commun*, 2015, 51(57): 11496-11499.
- [27] ZHU X, SHI H, SHEN Y, et al. A green method of staining DNA in polyacrylamide gel electrophoresis based on fluorescent copper nanoclusters synthesized in situ[J]. *Nano Res*, 2015, 8(18): 2714-2720.
- [28] QING T, HE X, HE D, et al. Oligonucleotide-templated rapid formation of fluorescent gold nanoclusters and its application for Hg^{2+} ions sensing[J]. *Talanta*, 2016, 161: 170-176.
- [29] XIE J, ZHENG Y, YING J Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(3): 888-889.
- [30] HUANG C C, YANG Z, LEE K H, et al. Synthesis of highly fluorescent gold nanoparticles for sensing mercury(II) [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 119(36): 6948-6952.
- [31] PYO K, THANTHIRIGE V D, KWAK K, et al. Ultrabright luminescence from gold nanoclusters: rigidifying the Au(I)-thiolate shell[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(25): 8244-8250.
- [32] HSU N Y, LIN Y W. Microwave-assisted synthesis of bovine serum albumin-gold nanoclusters and their fluorescence-quenched sensing of Hg^{2+} ions[J]. *New J Chem*, 2016, 40(2): 1155-1161.
- [33] ZHANG Y, JIANG J, LI M, et al. Bright far-red/near-infrared gold nanoclusters for highly selective and ultra-sensitive detection of Hg^{2+}

- [J].Sens Actuator B-Chem,2017,238:683-692.
- [34] YU X,LIU W,DENG X,et al.Gold nanocluster embedded bovine serum albumin nanofibers-graphene hybrid membranes for the efficient detection and separation of mercury ion[J].Chem Eng J,2018,335:176-184.
- [35] ZHAI Q,XING H,ZHANG X,et al.Enhanced Electrochemiluminescence Behavior of Gold-Silver Bimetallic Nanoclusters and Its Sensing Application for Mercury(II) [J].Anal Chem,2017,89(14):7788-7794.
- [36] BOTHRA S,UPADHYAY Y,KUMAR R,et al.Chemically modified cellulose strips with pyridoxal conjugated red fluorescent gold nanoclusters for nanomolar detection of mercuric ions[J].Biosens Bioelectron,2017,90:329-335.
- [37] WANG P,ZHAO L,SHOU H,et al.Dual-emitting fluorescent chemosensor based on resonance energy transfer from poly(arylene ether nitrile) to gold nanoclusters for mercury detection[J].Sens Actuator B-Chem,2016,230:337-344.
- [38] ZHANG T,XU H,XU S,et al.DNA stabilized Ag-Au alloy nanoclusters and their application as sensing probes for mercury ions[J].RSC Adv,2016,6(57):51609-51618.
- [39] QIAO Y,ZHANG Y,ZHANG C,et al.Water-soluble gold nanoclusters-based fluorescence probe for highly selective and sensitive detection of Hg^{2+} [J].Sens Actuator B-Chem,2016,224:458-464.
- [40] ZHANG Y,YAN M,JIANG J,et al.Highly selective and sensitive nanoprobe for $Hg(II)$ ions based on photoluminescent gold nanoclusters[J].Sens Actuator B-Chem,2016,235:386-393.
- [41] ZANG J,LI C,ZHOU K,et al.Nanomolar Hg^{2+} detection using beta-lactoglobulin-stabilized fluorescent gold nanoclusters in beverage and biological media[J].Anal Chem,2016,88(20):10275-10283.
- [42] ZHOU Y,MA Z.Colorimetric detection of Hg^{2+} by Au nanoparticles formed by H_2O_2 reduction of $HAuCl_4$ using Au nanoclusters as the catalyst[J].Sens Actuator B-Chem,2017,241:1063-1068.
- [43] DENG W,DAI R,HU P,et al.A traffic light-type sensitive visual detection of mercury by golden nanoclusters mixed with fluorescein[J].Microchem J,2018,141(8):163-169.
- [44] WU X J,KONG F,ZHAO C Q,et al.Ratiometric fluorescent nanosensors for ultra-sensitive detection of mercury ions based on AuNCs/MOFs[J].Analyst,2019,144:2523-2530.
- [45] KUNDU A,PARK B,RAY C,et al.Environmentally benign and cost-effective synthesis of water soluble red light emissive gold nanoclusters: selective and ultra-sensitive detection of mercuric ions[J].New J Chem,2019,43(2):900-906.
- [46] SHANMUGARAJ K,ILANCHELIAN M.A "turn-off" fluorescent sensor for the selective and sensitive detection of copper(ii) ions using lysozyme stabilized gold nanoclusters[J].RSC Adv,2016,6(59):54518-54524.
- [47] QING T,BU H,HE X,et al.A selective nanosensor for ultrafast detection of Cu^{2+} ions based on C5 DNA-templated gold nanoclusters and Fenton-like reaction[J].Anal Methods,2017,9(44):6222-6227.
- [48] CHEN Q,LI Y,XU S,et al.Highly fluorescent au nanoclusters: Electrostatically induced phase transfer synthesis for Cu^{2+} sensing[J].Luminescence,2017,32(3):271-276.
- [49] SU D,WANG M,LIU Q,et al.Dual-emission ratio fluorescence detection of bleomycin based on nitrogen doped graphene quantum dots@ gold nanoclusters assembly[J].Sens Actuator B-Chem,2019,290:163-169.
- [50] LI B,WANG X,SHEN X,et al.Aggregation-induced emission from gold nanoclusters for use as a luminescence-enhanced nanosensor to detect trace amounts of silver ions[J].J Colloid Interface Sci,2016,467:90-96.
- [51] BAIN D,MAITY S,PARAMANIK B,et al.Core-size dependent fluorescent gold nanoclusters and ultrasensitive detection of Pb^{2+} Ion[J].ACS Sustain Chem Eng,2018,6(2):2334-2343.
- [52] JIANG J,GAO P,ZHANG Y,et al.Rapid one-pot synthesis of MMTA protected fluorescent gold nanoclusters for selective and sensitive detection of ferric ion[J].Talanta,2017,174:44-51.
- [53] ZHANG J,CAI C,RAZZAQUE S,et al.Synthesis of water-soluble and highly fluorescent gold nanoclusters for Fe^{3+} sensing in living cells using fluorescence imaging[J].J Mat Chem B,2017,5(28):5608-5615.
- [54] HUANG H,LI H,FENG J J,et al.One-step green synthesis of fluorescent bimetallic Au/Ag nanoclusters for temperature sensing and in vitro detection of Fe^{3+} [J].Sens Actuator B-Chem,2016,223:550-556.
- [55] LI H,HUANG H,FENG J J,et al.A polypeptide-mediated synthesis of green fluorescent gold nanoclusters for Fe^{3+} sensing and bioimaging[J].J Colloid Interface Sci,2017,506:386-392.
- [56] KUPPAN B,MAITRA U.Instant room temperature synthesis of self-assembled emission-tunable gold nanoclusters: million-fold emission enhancement and fluorimetric detection of Zn^{2+} [J].Nanoscale,2017,9(40):15494-15504.
- [57] YANG Y,SUN Y,LIAO S,et al.Bimetallic gold-silver nanocluster fluorescent probes for Cr(iii) and Cr(vi) [J].Anal Methods,2016,8(39):7237-7241.
- [58] JIAN-FENG G,CHANG-JUN H,MEI Y,et al.Ultra-sensitive fluorescence determination of chromium(vi) in aqueous solution based on

- selectively etching of protein-stabled gold nanoclusters[J].RSC Adv,2016,6(106):104693-104698.
- [59] MO F, MA Z, WU T, et al. Holey reduced graphene oxide inducing sensitivity enhanced detection nanoplatfor for cadmium ions based on glutathione-gold nanocluster[J].Sens Actuator B-Chem,2019,281:486-492.
- [60] LI D, CHEN Z, YANG T, et al. Green synthesis of highly fluorescent AuNCs with red emission and their special sensing behavior for Al^{3+} [J].RSC Adv,2016,6(23):19182-19189.
- [61] ZHAO Q, YAN H, LIU P, et al. An ultra-sensitive and colorimetric sensor for copper and iron based on glutathione-functionalized gold nanoclusters[J].Anal Chim Acta,2016,948:73-79.
- [62] WANG L, CAO H X, HE Y S, et al. Facile preparation of amino-carbon dots/gold nanoclusters FRET ratiometric fluorescent probe for sensing of Pb^{2+}/Cu^{2+} [J].Sens Actuator B-Chem,2019,282:78-84.
- [63] AN J, CHEN R, CHEN M, et al. An ultrasensitive turn-on ratiometric fluorescent probes for detection of Ag^+ based on carbon dots/SiO₂ and gold nanoclusters[J].Sensors and Actuators B: Chemical,2020,329:129097.
- [64] LU H, YU C, XU S. A dual reference ion-imprinted ratiometric fluorescence probe for simultaneous detection of silver (I) and lead (II) [J].Sens Actuator B-Chem,2019,288:691-698.
- [65] TIAN L, LI Y, REN T, et al. Novel bimetallic gold-silver nanoclusters with "Synergy"-enhanced fluorescence for cyanide sensing, cell imaging and temperature sensing[J].Talanta,2017,170:530-539.
- [66] LI S, FENG J, HUANG P, et al. Cu^{2+} -Mediated turn-on fluorescence assay for sulfide ions using glutathione-protected gold nanoclusters: enhanced sensitivity, good reusability, and cell imaging[J].New J Chem,2017,41(21):12930-12936.
- [67] YANG Y, LEI Y, ZHANG X, et al. A ratiometric strategy to detect hydrogen sulfide with a gold nanoclusters based fluorescent probe[J]. Talanta,2016,154:190-196.
- [68] ZHANG Y, LI M, NIU Q, et al. Gold nanoclusters as fluorescent sensors for selective and sensitive hydrogen sulfide detection[J].Talanta, 2017,171:143-151.
- [69] LI Z, LIU R, XING G, et al. A novel fluorometric and colorimetric sensor for iodide determination using DNA-templated gold/silver nanoclusters[J].Biosens Bioelectron,2017,96:44-48.
- [70] YUE Q, SUN L, SHEN T, et al. Synthesis of fluorescent gold nanoclusters directed by bovine serum albumin and application for nitrite detection[J].J Fluoresc,2013,23(6):1313-1318.
- [71] DURGADAS CV, SHARMA CP, SREENIVASAN K. Fluorescent gold clusters as nanosensors for copper ions in live cells[J].Analyst, 2011,136(5):933-940.
- [72] JI L, GUO Y, HONG S, et al. Label-free detection of Pb^{2+} based on aggregation-induced emission enhancement of Au-nanoclusters[J]. RSC Adv,2015,5(46):36582-36586.
- [73] SELVAPRAKASH K, CHEN Y-C. Using protein-encapsulated gold nanoclusters as photoluminescent sensing probes for biomolecules[J]. Biosens Bioelectron,2014,61:88-94.
- [74] ZHENG B, ZHENG J, YU T, et al. Fast microwave-assisted synthesis of AuAg bimetallic nanoclusters with strong yellow emission and their response to mercury(II) ions[J].Sens Actuator B-Chem,2015,221:386-392.
- [75] SUN J, WU H, JIN Y. Synthesis of thiolated Ag/Au bimetallic nanoclusters exhibiting an anti-galvanic reduction mechanism and composition-dependent fluorescence[J].Nanoscale,2014,6(10):5449-5457.
- [76] ZHANG Y, JIANG H, WANG X. Cytidine-stabilized gold nanocluster as a fluorescence turn-on and turn-off probe for dual functional detection of Ag^+ and Hg^{2+} [J].Anal Chim Acta,2015,870:1-7.
- [77] DENG H H, HUANG K Y, ZHANG M J, et al. Sensitive and selective nitrite assay based on fluorescent gold nanoclusters and Fe^{2+}/Fe^{3+} redox reaction[J].Food chemistry,2020,317:126456.
- [78] VOITEKHOVICH SV, LESNYAK V, GAPONIK N, et al. Tetrazoles: unique capping ligands and precursors for nanostructured materials [J].Small,2015,11(43):5728-5739.
- [79] HALAWA MI, GAO W, SAQIB M, et al. Sensitive detection of alkaline phosphatase by switching on gold nanoclusters fluorescence quenched by pyridoxal phosphate[J].Biosens Bioelectron,2017,95:8-14.
- [80] DENG H H, WANG F F, SHI X Q, et al. Water-soluble gold nanoclusters prepared by protein-ligand interaction as fluorescent probe for real-time assay of pyrophosphatase activity[J].Biosens Bioelectron,2016,83:1-8.
- [81] XUE F, QU F, HAN W, et al. Aggregation-induced emission enhancement of gold nanoclusters triggered by silicon nanoparticles for ratiometric detection of protamine and trypsin[J].Anal Chim Acta,2019,1046:170-178.
- [82] WANG M, CHEN J, SU D, et al. Split aptamer based sensing platform for adenosine deaminase detection by fluorescence resonance energy transfer[J].Talanta,2019,198:1-7.
- [83] ZHAO D, CHEN C, ZHAO J, et al. Label-free fluorescence turn-on strategy for trypsin activity based on thiolate-protected gold nanoclus-

- ters with bovine serum albumin as the substrate[J].Sens Actuator B-Chem,2017,247:392-399.
- [84] XU S,FENG X,GAO T, et al.A novel dual-functional biosensor for fluorometric detection of inorganic pyrophosphate and pyrophosphatase activity based on globulin stabilized gold nanoclusters[J].Anal Chim Acta,2017,958:22-29.
- [85] WANG J,CHANG Y,WU W B, et al.Label-free and selective sensing of uric acid with gold nanoclusters as optical probe[J].Talanta,2016,152:314-320.
- [86] YOU X,LI Y,LI B, et al.Gold nanoclusters-based chemiluminescence resonance energy transfer method for sensitive and label-free detection of trypsin[J].Talanta,2016,147:63-68.
- [87] HU X L,WU X M,FANG X, et al.Switchable fluorescence of gold nanoclusters for probing the activity of alkaline phosphatase and its application in immunoassay[J].Biosens Bioelectron,2016,77:666-672.
- [88] ZHANG R L,LIANG S S,JIN M, et al.Simple and sensitive fluorescence assay for acetylcholinesterase activity detection and inhibitor screening based on glutathione-capped gold nanoclusters[J].Sens Actuator B-Chem,2017,253:196-202.
- [89] PANG S,LIU S.Lysozyme-stabilized bimetallic gold/silver nanoclusters as a turn-on fluorescent probe for determination of ascorbic acid and acid phosphatase[J].Anal Methods,2017,9(47):6713-6718.
- [90] XU D D,ZHENG B,SONG C Y, et al.Metal-enhanced fluorescence of gold nanoclusters as a sensing platform for multi-component detection[J].Sens Actuator B-Chem,2019,282:650-658.
- [91] LI H,YANG M,KONG D, et al.Sensitive fluorescence sensor for point-of-care detection of trypsin using glutathione-stabilized gold nanoclusters[J].Sens Actuator B-Chem,2019,282:366-372.
- [92] WANG H B,LI Y,BAI H Y, et al.DNA-templated Au nanoclusters and MnO₂ sheets: a label-free and universal fluorescence biosensing platform[J].Sens Actuator B-Chem,2018,259:204-210.
- [93] WANG H B,BAI H Y,DONG G L, et al.DNA-templated Au nanoclusters coupled with proximity-dependent hybridization and guanine-rich DNA induced quenching: a sensitive fluorescent biosensing platform for DNA detection[J].Nanoscale Advances,2019,1(4):1482-1488.
- [94] LI S,HUANG P,WU F.Highly selective and sensitive detection of heparin based on competition-modulated assembly and disassembly of fluorescent gold nanoclusters[J].New J Chem,2017,41(2):717-723.
- [95] SELVAPRAKASH K,CHEN Y C.Detection of ricin by using gold nanoclusters functionalized with chicken egg white proteins as sensing probes[J].Biosens Bioelectron,2017,92:410-416.
- [96] XU S,GAO T,FENG X, et al.Dual ligand co-functionalized fluorescent gold nanoclusters for the “turn on” sensing of glutathione in tumor cells[J].J Mat Chem B,2016,4(7):1270-1275.
- [97] LINDGREN J,MOYER A,SCHWEITZER M H, et al.Interpreting melanin-based coloration through deep time: a critical review[J].Proceedings Biological sciences,2015,282:20150614.
- [98] ANDRZEJ SLOMINSKI D J,TOBIN S S,WORTSMAN J.melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation[J].Physiol Rev,2004,84:1155-1228.
- [99] SIDDIQUI M F,JEON S,KIM M M.Rapid and sensitive detection of melanin using glutathione conjugated gold nanocluster based fluorescence quenching assay[J].Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy,2020,247:119086.
- [100] TAN Q,KONG W,SUN H, et al.Fluorometric turn-on detection of ascorbic acid based on controlled release of polyallylamine-capped gold nanoclusters from MnO₂ nanosheets[J].Microchim Acta,2019,186(5):282.
- [101] YAN X,HE L,ZHOU C, et al.Fluorescent detection of ascorbic acid using glutathione stabilized Au nanoclusters[J].Chem Phys,2019,522:211-213.
- [102] CUI W,WANG Y,YANG D, et al.Fluorometric determination of ascorbic acid by exploiting its deactivating effect on the oxidase-mimetic properties of cobalt oxyhydroxide nanosheets[J].Microchim Acta,2017,184(12):4749-4755.
- [103] MENG H,YANG D,TU Y, et al.Turn-on fluorescence detection of ascorbic acid with gold nanoclusters[J].Talanta,2017,165:346-350.
- [104] ABARGHOEI S,FAKHRI N,BORGHEI YS, et al.A colorimetric paper sensor for citrate as biomarker for early stage detection of prostate cancer based on peroxidase-like activity of cysteine-capped gold nanoclusters[J].Spectrochim Acta Pt A-Molec Biomolec Spectr,2019,210:251-259.
- [105] SHENG J,JIANG X,WANG L, et al.Biomimetic mineralization guided one-pot preparation of gold clusters anchored two-dimensional MnO₂ nanosheets for fluorometric/magnetic bimodal sensing[J].Anal Chem,2018,90(4):2926-2932.
- [106] BISWAS A,BANERJEE S,GART EV, et al.Gold nanocluster containing polymeric microcapsules for intracellular ratiometric fluorescence biosensing[J].ACS Omega,2017,2(6):2499-2506.
- [107] MANICKAM P,VASHIST A,MADHU S, et al.Gold nanocubes embedded biocompatible hybrid hydrogels for electrochemical detection of H₂O₂[J].Bioelectrochemistry,2019,131:107373.

- [108] YU H, LIU Y, WANG J, et al. A gold nanocluster-based ratiometric fluorescent probe for cysteine and homocysteine detection in living cells[J]. *New J Chem*, 2017, 41(11): 4416-4423.
- [109] PARAMANIK B, KUNDU S, DE G, et al. Structural evolution, photoinduced energy transfer in Au nanocluster-CdTe QD nanocomposites and amino acid sensing[J]. *J Mater Chem C*, 2016, 4(3): 486-496.
- [110] ZHONG T, YIN Z, GAO P, et al. NIR fluorescence detection of dopamine using 3-aminophenyl boronic acid-functionalized and lysozyme-templated gold nanoclusters[J]. *Anal Methods*, 2017, 9(23): 3414-3417.
- [111] GUO X, WU F, NI Y, et al. Synthesizing a nano-composite of BSA-capped Au nanoclusters/graphitic carbon nitride nanosheets as a new fluorescent probe for dopamine detection[J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 942: 112-120.
- [112] SHA Q, SUN B, YI C, et al. A fluorescence turn-on biosensor based on transferrin encapsulated gold nanoclusters for 5-hydroxytryptamine detection[J]. *Sens Actuator B-Chem*, 2019, 294: 177-184.
- [113] CHEN Y, QIAO J, LIU Q, et al. Fluorescence turn-on assay for detection of serum D-penicillamine based on papain@AuNCs-Cu²⁺ complex[J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1026: 133-139.
- [114] DEMPSEY WB, CHRISTENSEN HN. The specific binding of pyridoxal 5'-phosphate to bovine plasma albumin[J]. *J Biol Chem* 1962, 237(4): 1113-1120.
- [115] ANDERSON BB, NEWMARK PA, RAWLINS M, et al. Plasma binding of vitamin B6 compounds[J]. *Nature*, 1974, 250(5466): 502-504.
- [116] HE L, LI J, XIN JH. A novel graphene oxide-based fluorescent nanosensor for selective detection of Fe³⁺ with a wide linear concentration and its application in logic gate[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 70(42): 69-73.
- [117] MEI Q, JIANG C, GUAN G, et al. Fluorescent graphene oxide logic gates for discrimination of iron (III) and iron (II) in living cells by imaging[J]. *Chem Commun*, 2012, 48(60): 7468-7470.
- [118] FÖRSTER T. Zwischen molekulare energie wanderung und fluoreszenz[J]. *Ann Physik*, 1948, 437: 57-75.
- [119] OLSNES S. Ricin and ricinus agglutinin, toxic lectins from castor bean[J]. *Methods Enzymol: Academic Press*, 1978, 35: 330-335.
- [120] LI Z Y, WU Y T, TSENG W L. UV-light-induced improvement of fluorescence quantum yield of DNA-templated gold nanoclusters: application to ratiometric fluorescent sensing of nucleic acids[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(42): 23708-23716.
- [121] SHENG J, WANG L, HAN Y, et al. Dual roles of protein as a template and a sulfur provider: A general approach to metal sulfides for efficient photothermal therapy of cancer[J]. *Small*, 2018, 14(1): 1702529-1702540.
- [122] LIU J, CHEN Q, ZHU W, et al. Nanoscale-coordination-polymer-shelled manganese dioxide composite nanoparticles: A multistage redox/pH/H₂O₂-responsive cancer theranostic nanoplatfrom[J]. *Adv Funct Mater*, 2017, 27(10): 1605926.
- [123] CHEN Q, FENG L, LIU J, et al. Intelligent albumin-MnO₂ nanoparticles as pH-/H₂O₂-responsive dissociable nanocarriers to modulate tumor hypoxia for effective combination therapy[J]. *Adv Mater*, 2016, 28(33): 7129-7136.
- [124] LI H, YANG M, LIU J, et al. A practical and highly sensitive C₃N₄-TYR fluorescent probe for convenient detection of dopamine[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(28): 12068-12075.
- [125] SRIDHARAN K, SREEKANTH P, PARK TJ, et al. Nonlinear optical investigations in nine-atom silver quantum clusters and graphitic carbon nitride nanosheets[J]. *J Phys Chem C*, 2015, 119(28): 16314-16320.
- [126] BERRY LR, PUZZUOLI FV, HATTON MWC. On the interaction between 5-hydroxytryptamine and N-acetylneuraminic acid under aqueous conditions[J]. *Can J Biochem Cell Biol* 1985, 63(7): 757-763.
- [127] HAMANO NAGAOKA M, MAITANI T. Effects of sialic acid residues of transferrin on the binding with aluminum and iron studied by HPLC/high-resolution ICP-MS[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2001, 1526(2): 175-182.
- [128] PEREZ-RAFOLS C, SERRANO N, DIAZ-CRUZ JM, et al. Penicillamine-modified sensor for the voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) ions in natural samples[J]. *Talanta*, 2015, 144: 569-573.
- [129] KAUL P, SATHISH HA, PRAKASH V. Effect of metal ions on structure and activity of papain from *Carica papaya*[J]. *Nahr-Food*, 2002, 46(1): 2-6.
- [130] ZHAO Y, TANG Y, HE J, et al. Surface imprinted polymers based on amino-hyperbranched magnetic nanoparticles for selective extraction and detection of chlorogenic acid in Honeysuckle tea[J]. *Talanta*, 2018, 181: 271-277.
- [131] LI L D, CHEN Z B, ZHAO H T, et al. Electrochemical real-time detection of L-histidine via self-cleavage of DNazymes[J]. *Biosensors & bioelectronics*, 2011, 26(5): 2781-2785.
- [132] SUNDBERG R J, MARTIN R B. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems[J]. *Chemical Reviews* 1974, 74: 471-517.
- [133] CAI Y, WANG J, LIU C, et al. Histidine-triggered turning-on of gold/copper nanocluster fluorescence for the sensitive and selective detection of histidine[J]. *Chemical communications*, 2020, 56: 11637.
- [134] YAN X, LI H, HU T, et al. A novel fluorimetric sensing platform for highly sensitive detection of organophosphorus pesticides by using

- egg white-encapsulated gold nanoclusters[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 232-237.
- [135] LUO QJ, LI ZG, LAI JH, et al. An on-off-on gold nanocluster-based fluorescent probe for sensitive detection of organophosphorus pesticides[J]. *RSC Adv*, 2017, 7(87): 55199-55205.
- [136] LU Q, ZHOU T, WANG Y, et al. Transformation from gold nanoclusters to plasmonic nanoparticles: A general strategy towards selective detection of organophosphorothioate pesticides[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 99: 274-280.
- [137] LI H, JIN R, KONG D, et al. Switchable fluorescence immunoassay using gold nanoclusters anchored cobalt oxyhydroxide composite for sensitive detection of imidacloprid[J]. *Sens Actuator B-Chem*, 2019, 283: 207-214.
- [138] YANG X, JIA Z, TAN Z, et al. Determination of melamine in infant formulas by fluorescence quenching based on the functionalized Au nanoclusters[J]. *Food Control*, 2016, 70: 286-292.
- [139] ZHAO Y, PAN M, LIU F, et al. Highly selective and sensitive detection of trinitrotoluene by framework-enhanced fluorescence of gold nanoclusters[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1106: 133-138.
- [140] LEE C Y, HSU N Y, WU M Y, et al. Microwave-assisted synthesis of BSA-stabilised gold nanoclusters for the sensitive and selective detection of lead(ii) and melamine in aqueous solution[J]. *RSC Adv*, 2016, 6(82): 79020-79027.
- [141] WU H, QIAO J, HWANG YH, et al. Synthesis of ficin-protected AuNCs in a droplet-based microreactor for sensing serum ferric ions[J]. *Talanta*, 2019, 200: 547-552.
- [142] KALAIYARASAN G, K A, JOSEPH J. Melamine dependent fluorescence of glutathione protected gold nanoclusters and ratiometric quantification of melamine in commercial cow milk and infant formula[J]. *Appl Surf Sci*, 2017, 420: 963-969.
- [143] QU F, XU X, YOU J. A new dual-emission fluorescence sensor based on carbon nanodots and gold nanoclusters for the detection of melamine[J]. *New J Chem*, 2017, 41(17): 9438-9443.
- [144] CARULLO P, CETRANGOLO GP, MANDRICH L, et al. Fluorescence spectroscopy approaches for the development of a real-time organophosphate detection system using an enzymatic sensor[J]. *Sensors*, 2015, 15(2): 3932-3951.
- [145] YAN X, LI H, ZHENG W, et al. Visual and fluorescent detection of tyrosinase activity by using a dual-emission ratiometric fluorescence probe[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(17): 8904-8909.
- [146] TENG Y, JIA X, LI J, et al. Ratiometric fluorescence detection of tyrosinase activity and dopamine using thiolate-protected gold nanoclusters[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(9): 4897-4902.
- [147] ZHU X, HU J, ZHAO Z, et al. Kinetic and sensitive analysis of tyrosinase activity using electron transfer complexes: in vitro and intracellular study[J]. *Small*, 2015, 11(7): 862-870.