

类过氧化物酶纳米酶及其分析应用的研究进展

王小宇^{*1,2} 魏辉^{*2}

¹(南京林业大学理学院化学与材料科学系, 南京 210037)

²(南京大学现代工程与应用科学学院, 江苏省功能材料设计原理与应用技术重点实验, 南京 210023)

摘要 在不同的纳米酶中,类过氧化物酶纳米酶因其在生物传感、生物成像和疾病治疗等方面具有良好的应用前景而受到广泛关注。通过将实验与理论计算相结合,一些研究阐明了类过氧化物酶的催化机制及其结构与活性之间的关系。此外,为了能够理性设计高活性的类过氧化物酶,一些开创性的研究开发了数个可以用于预测活性的描述符。这些研究设计的高活性纳米酶被用于体外和体内分析检测。本文首先概述了类过氧化物酶纳米酶理性设计取得的进展,介绍了类过氧化物酶纳米酶在分析检测中的一些典型应用实例,总结了类过氧化物酶纳米酶亟待解决的关键问题和存在的挑战,并对其发展前景进行了展望。

关键词 纳米酶; 过氧化物酶; 催化机制; 分析应用; 理性设计; 评述

随着纳米科技的发展,研究发现多种纳米材料具有类似天然酶的催化活性,这些具有类酶催化活性的功能纳米材料被定义为纳米模拟酶(Nanozymes, 简称为纳米酶)^[1]。在各种天然酶中,过氧化物酶(Peroxidase, POD)是一种广泛存在的氧化还原酶,它能够催化过氧化氢(H₂O₂)氧化一些还原性底物。对于该反应,一方面,过氧化氢为多种反应的中间产物,在食品、环境和制药等领域有重要作用;另一方面,过氧化氢分解时可产生羟基自由基,而羟基自由基在生物医学领域具有广泛的应用。因而,能够模拟 POD 催化的纳米酶被广泛用于生物分析与检测、生物成像、抗菌以及抗肿瘤治疗^[1-11]。

2007 年,我国科学家阎锡蕴及其合作者首次发现 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒具有类 POD 活性,并将该纳米酶用作酶联免疫吸附分析(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)中辣根过氧化物(Horseradish peroxidase, HRP)的替代物,实现了对一些疾病标志物如心肌梗死生物标志物心肌肌钙蛋白 I 的检测^[2]。该研究开辟了纳米酶研究的新领域。在此之后,具有类 POD 活性的纳米酶受到广泛的关注,并被作为天然酶的替代物应用于生物分析、环境污染检测、生物成像以及疾病治疗等领域^[3-12]。目前,类 POD 研究面临一些问题,例如,类 POD 纳米酶的设计和制备主要通过“试错”策略实现^[1,6,7]。试错法(Trial and error)的广泛使用是因为类 POD 纳米酶催化机制的缺失,结构-催化活性关系在很大程度上仍然未知。为了解决这些问题,已有一些研究者开创性地通过第一性原理计算阐明类 POD 纳米酶的催化机制^[12-18];还有研究者通过将实验结果与计算研究相结合实现对构性关系的探索^[15,19];一些研究者发现了可用于理性设计类 POD 纳米酶的预测描述符^[15,17,20]。受益于高活性纳米酶的合理设计,研究者已经使用类 POD 纳米酶开发了体外检测和活体分析新方法^[21]。本文首先介绍了类 POD 纳米酶的催化机制,概述了影响纳米材料类 POD 活性的因素,总结了类 POD 纳米酶理性设计的最新进展,并介绍了一些类 POD 纳米酶应用于分析检测的典型例子。

1 类POD纳米酶的催化机制研究

纳米酶催化反应在本质上属于异相催化范畴。异相催化反应是指催化剂和反应物以两相的形式存在^[22]。对于类 POD 纳米酶而言,其催化反应发生在固体催化剂的表面,而反应物(即过氧化物和 POD 的

2023-02-17 收稿; 2023-04-19 接受

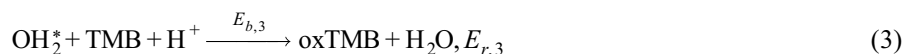
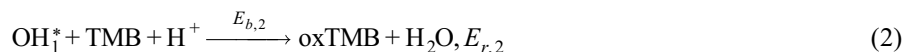
国家自然科学基金项目(Nos. 22104055, 21874067, 21722503)、国家重点研发计划项目(Nos. 2021YFF1200700, 2019YFA0709200)、江苏高校优势学科建设工程资助项目和中央高校基本科研业务费项目(Nos. 202200325, 021314380195)资助。

* E-mail: wxiaoyu91@126.com; weihui@nju.edu.cn

底物)则存在于液相之中。因此,异相催化当中的基本概念可用于阐明类 POD 纳米酶反应的催化机制。基于异相催化的基本概念,研究者已经通过第一性原理计算,对类 POD 纳米酶催化反应中的催化机制进行了分子水平的研究^[12,14-18,23-24]。

1.1 通过OH基团氧化底物

Shen 等^[17]使用密度泛函理论(Density functional theory, DFT)计算研究了纳米材料模拟 POD 的催化机制。该研究选择了 8 种具有不同晶体结构、暴露面和化学修饰的 Fe₃O₄ 层确定类 POD 纳米酶的反应路径和可能的中间态和过渡态结构。Fe₃O₄ 层的类 POD 催化过程包括 3 个反应步骤(图 1)。H₂O₂ 首先吸附在 Fe₃O₄ 层的表面,然后分解生成双 OH 吸附结构(式 1)。随后, 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB)在步骤 2 和 3 中被两个 OH 基团氧化(式(2)和式(3))。对于步骤 1,具有高还原性的 Fe₃O₄ 表面将有助于 H₂O₂ 的解离,而步骤 2 和 3 是氢原子从 TMB 到 OH 基团的质子耦合转移反应。除了 Fe₃O₄,该研究提出的催化机制也适用于贵金属和钙钛矿氧化物。



其中,星号表示 Fe₃O₄ 层表面的吸附物质; OH₁ 和 OH₂ 分别表示步骤 2 和 3 中的羟基吸附物; E_b 和 E_r 分别为活化能垒和反应能。

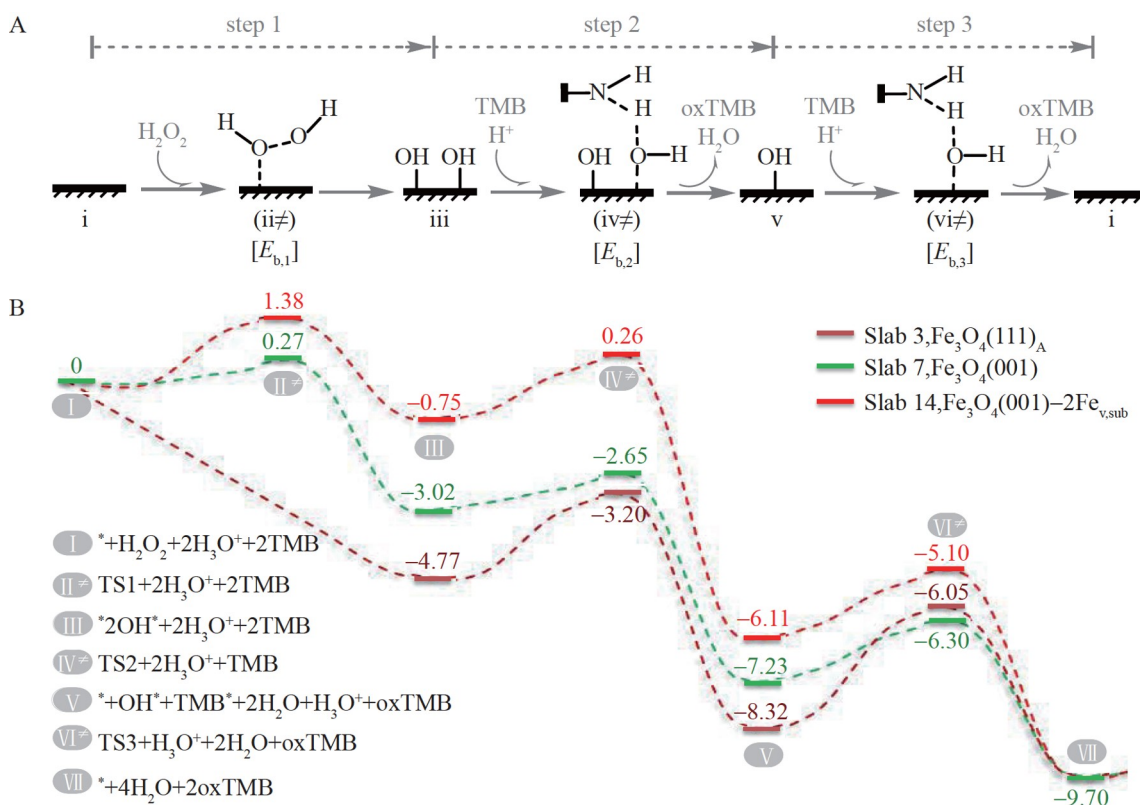


图1 氧化铁的类过氧化物酶(POD)反应机制和动力学^[17]: (A)Fe₃O₄层的类 POD 催化机制,其中[E_{b,1}], [E_{b,2}]和[E_{b,3}]分别是步骤 1~3 的能垒; (B)Fe₃O₄层 3、7 和 14 在催化循环中涉及的关键中间体和过渡态的相对能量值(以 eV 为单位)

Fig.1 Mechanism and kinetics of peroxidase (POD)-like reactions catalyzed by iron oxides^[17]: (A) Proposed mechanism of POD-like catalysis of iron-oxide slabs, where [E_{b,1}], [E_{b,2}], and [E_{b,3}] are energy barriers for steps 1–3, respectively; (B) Relative energy values (in eV) for key intermediates and transition states involved in the catalytic cycles of slabs 3, 7 and 14

根据阿伦尼乌斯方程, 反应速率取决于活化能垒^[22]。此外, 速率决定步骤(Rate-determining step, RDS)是整个化学反应中最慢的基本步骤, 决定了整个反应过程的速率。因此, 纳米酶类 POD 活性通常受 RDS 的能垒控制。计算吸附能(E_{ads})、活化能垒和反应能的能量分布对于获得 RDS 和研究催化动力学至关重要。对于图 1A 中的类 POD 纳米酶催化反应, 3 个典型的 Fe_3O_4 层(即 3、7、14)的催化反应涉及的中间体和过渡态的能量分别标注在图 1B 中。对于上述 3 个步骤(式(1)~(3)), 由于结构 iii 比结构 v 的氧化性更强, 因此步骤 2 不可能是 RDS, 只有步骤 1 和 3 可能是 RDS。如图 1B 所示, 对于层 14, $E_{\text{b},1}$ 高于 $E_{\text{b},3}$, 表明其 RDS 是第一步; 对于层 3 和 7, $E_{\text{b},3}$ 更高, 其 RDS 为第三步。不同层具有不同的 RDS 和能量分布, 这主要归因于 E_{ads} 、活化能垒和反应能等具有结构依赖性。由于层 3 的表面具有高还原性, 因而 H_2O_2 在其表面很容易发生解离, 从而产生吸附在其表面的 OH 基团。然而, OH 基团在层 3 的表面吸附较强, 因而很难从催化剂表面移除, 因此第三步是 RDS。层 14 具有较低的化学还原性, 因而 H_2O_2 在其表面较难解离, 因此第一步是 RDS^[17]。

1.2 通过羟基自由基氧化底物

最近, 单原子纳米酶受到了广泛关注, 其明确的配位结构为催化机制研究提供了理想的实验模型^[16,18,25-27], 基于单原子纳米酶的机理研究揭示了相似的催化机制^[16]。首先, H_2O_2 吸附在单原子纳米酶的表面, 形成双 OH 吸附结构; 随后, 一个 OH 基团从纳米酶的表面解吸, 导致产生 $\cdot\text{OH}$ 。 $\cdot\text{OH}$ 的反应中间体可以通过电子自旋共振(Electron spin resonance, ESR)光谱实验进行验证^[16]。

2 影响类POD纳米酶活性的结构因素

2.1 元素组成的影响

通过改变组成来调节类 POD 纳米酶活性的方法大致可分为两类: (1)在活性较低的表面上涂覆或生长具有高类 POD 活性的材料; (2)将另一种元素掺杂到纳米材料的晶格中, 形成固溶体。一些贵金属纳米颗粒(如铱、钌和铂)已被证明具有优异类 POD 活性^[28-29]。通过在活性较低的材料上涂覆或生长高活性的贵金属纳米粒子, 不仅可以增强其类 POD 的活性, 还可以提高贵金属的原子利用效率^[29-30]。例如, Xia 等^[30]通过在钨纳米立方体外层沉积铱原子层获得钨-铱核壳立方体。相比于钨立方体和 HRP, 钨-铱纳米立方体的类 POD 活性分别增强了 20 倍和 400 倍。此外, 贵金属纳米颗粒也被用于调节碳基或金属氧化物基纳米材料的类 POD 活性, 这不仅可以增强活性较低的碳或金属氧化物基纳米材料的类 POD 活性, 而且还可以提高金属纳米颗粒的催化循环稳定性^[31-32]。此外, 大量研究表明, 复合纳米材料中的不同成分之间存在协同作用。例如, 通过在立方氧化铈表面原位沉积铂纳米颗粒制备铂/立方氧化铈, 得益于铂颗粒和氧化铈之间的金属-载体相互作用, 复合的铂/立方氧化铈表现出比同等质量的 Pt 和 CeO_2 的混合物更高的催化活性^[31]。

将其它元素掺杂到纳米材料的晶格中是另一种增强类 POD 活性的有效方法^[14,26,33-39], 增强的类 POD 活性归因于通过掺杂的元素改变了原本材料的电子结构。Hu 等^[14]将杂原子氮掺杂到还原氧化石墨烯(Reduced graphene oxide, rGO)和介孔碳中, 类 POD 活性分别提高了 100 倍和 60 倍以上。为了进一步提高碳纳米材料的类 POD 活性, 研究者成功合成了硫/氮共掺杂或氮/硼共掺杂的碳纳米材料, 这些材料具有比单独掺杂氮更强的类 POD 活性^[33,36]。除碳材料外, 也可通过元素掺杂的方法提高金属氧化物的类 POD 活性。例如, 将过渡金属掺杂到纳米氧化铈(CeO_2)的晶格中, 形成 $\text{M}_x\text{Ce}_{1-x}\text{O}_{2-\delta}$ 固溶体(M 代表过渡金属元素)。在这些以 CeO_2 为基底的掺杂材料中, 掺杂锰的铈固溶体表现出显著增强的类 POD 活性^[34]。

2.2 材料尺寸的影响

纳米酶催化反应发生在材料表面上, 尺寸较小的纳米材料具有较高的表面积与体积比, 在表面暴露出更多的催化活性位点。因此, 纳米材料的类 POD 活性与其尺寸密切相关^[2,40-42]。很多研究表明, 尺寸越小, 材料的类 POD 活性越高。Gao 等^[2]研究证明了 Fe_3O_4 纳米酶的催化活性具有尺寸依赖性, 随着 Fe_3O_4 纳米颗粒尺寸(30、150 和 300 nm)增加, Fe_3O_4 纳米颗粒相应的 POD 活性逐渐降低。较小的 Fe_3O_4 纳米颗粒具有更高的催化活性, 这是由于其具有更大的比表面积, 进而导致其能够暴露更多的催化活性位点。Peng 等^[43]制备了 3 个尺寸(11、20 和 150 nm)的 Fe_3O_4 纳米颗粒, 同样发现 Fe_3O_4 的类 POD 活性

随其尺寸的增加而降低。Ahmed 等^[44]以石墨烯为基底,在其表面原位还原获得了粒径为 10、80、200 和 500 nm 的 Au 纳米颗粒,该研究也发现 Au 纳米颗粒的尺寸越小,其类 POD 活性越高。然而,也有研究发现类 POD 活性并未随其尺寸减小而提高。Liu 等^[45]通过控制反应体系的温度,合成了 5 种尺寸(4.2、3.7、3.1、2.6 和 2.5 nm)的 CeO₂ 纳米颗粒,该研究发现随着反应温度降低,CeO₂ 纳米颗粒尺寸逐渐减小。当颗粒尺寸从 4.2 nm 降低到 2.6 nm 时,CeO₂ 纳米颗粒的类 POD 活性逐渐升高。当尺寸继续减小时,其类 POD 活性则会显著下降。因此,尺寸除了能够改变比表面积外,还能够改变纳米材料的其它表面性质,进而影响其类 POD 活性^[42,46]。在一些贵金属纳米酶中也同样发现了该现象。例如,富含胞嘧啶的寡核苷酸合成出的铂纳米酶(尺寸为 2.9 nm)比使用富含鸟嘌呤的寡核苷酸合成出的 Pt 纳米酶(尺寸为 1.8 nm)表现出更好的类 POD 活性^[42]。该研究表明,2.9 nm 的 Pt 纳米酶表面上具有更多的金属 Pt⁰,导致其具有很高的类 POD 活性,而在 1.8 nm 的 Pt 纳米酶的表面存在更多的 Pt²⁺。

2.3 形貌和晶面的影响

纳米材料的表面通常有不同的晶面,这些具有不同原子排列和不饱和配位点的晶面对同一底物表现出不同的吸附能、反应能和活化能垒,具有不同的催化活性。由于不同形貌的纳米材料具有不同的晶面,因而可以通过调控形貌调节纳米酶的类 POD 活性。Liu 等^[47]通过水热法分别获得了 3 种具有不同形貌(团簇球、八面体和三角形)的 Fe₃O₄ 纳米晶体。该研究表明,暴露{311}晶面的团簇球表现出最高的类 POD 活性,具有{200}晶面的三角形纳米晶表现出相对较弱的类 POD 活性,而具有{111}晶面的八面体四氧化三铁则具有最差的催化活性(图 7A)^[47]。最近,许多研究表明,由于高指数面上具有丰富的配位不饱和的原子台阶和框架等,因而,具有这些晶面的金属纳米颗粒通常比具有低指数晶面的纳米颗粒更具反应活性^[48-49]。Wu 等^[48]通过在钨核上生长密集的铂分支阵列,制备出钨-铂的核-框架纳米枝晶。为了进一步提高催化活性,选择性刻蚀掉其中活性较低的钨纳米核结构,形成能够暴露更多活性位点和高指数面(即{110}和{311}面)的铂框架结构。另外,密度泛函理论计算也证实了不同晶面的材料具有不同的类 POD 活性。Li 等^[12]通过密度泛函理论计算研究了不同晶面对于 Au 纳米晶体的类 POD 活性的影响,发现具有{111}、{110}和{211}晶面的 Au 纳米酶遵循相同的催化机制,并且具有相同的速率决定步骤。根据速率决定步骤的活化能垒,具有最高能垒的{111}晶面催化活性最低,而具有{211}面的 Au 纳米酶具有最高的催化活性^[12]。

纳米酶材料的元素组成、尺寸大小、形貌和晶面可以通过改变纳米酶的几何和电子结构影响纳米酶的类 POD 活性。然而,这些因素与材料的类 POD 活性之间的关系并不明确,导致类 POD 纳米酶的设计和合成主要通过“试错”策略实现。然而,通过“试错法”的方式筛选高活性的纳米酶通常成本较高、周期较长,不利于高性能纳米酶的开发。因此,亟需开发一些理性设计策略,即基于基本的物理化学原理,通过理论预测和实验验证实现高性能纳米酶的设计。

3 活性描述符

活性描述符是指材料的某种物理/化学性质能够作为其催化反应快慢的标度,用于描述或者预测其催化性能,通常将该物理/化学性质称之为催化剂的活性描述符^[50]。发展可用于纳米酶理性设计和优化的活性描述符,有助于合理设计具有高催化活性的类 POD 纳米酶,解决目前类 POD 纳米酶面临的瓶颈问题。本节将介绍一些代表性研究成果,这些研究为类 POD 纳米酶的理性设计提供了预测性的描述符。

3.1 e_g 电子占有率

许多研究表明,电子结构相关参数(例如,金属的 d 带中心、O $2p$ 带中心和电子占有率(e_g))可以作为电催化剂和光催化剂理性设计的预测活性描述符。然而,电子结构对于类 POD 纳米酶的影响在很大程度上仍然未知。为了证明构效关系,并确定可供预测活性的描述符,Wei 研究组^[15]使用具有 BO₆ 八面体配位结构的 ABO₃ 型钙钛矿过渡金属氧化物(其中, A 是稀土或碱土金属, B 是过渡金属)作为模型系统。钙钛矿结构具有灵活可调节的组分及催化性能,已成为一种十分优异模型体系(图 2A)。该研究制备了 10 种钙钛矿氧化物,并研究了其类 POD 活性(图 2B)。钙钛矿中 B 点阳离子的 e_g 与其对应的类 POD 活性之间存在火山型关系(图 2C)。当 e_g 约为 1.2 时,钙钛矿氧化物具有最高的类 POD 活性; e_g 为 0

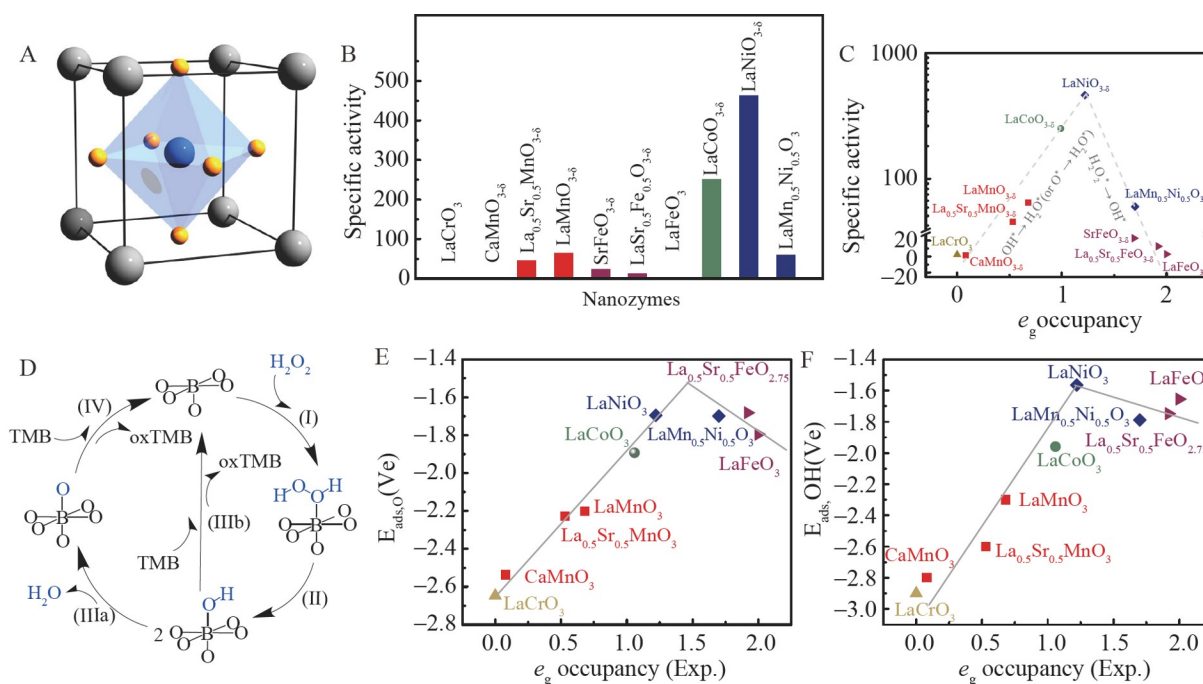


图2 (A) ABO₃ 钙钛矿结构示意图^[15]; (B) 钙钛矿氧化物经比表面积归一化后的类 POD 活性^[15]; (C) e_g 电子占有率相对于类 POD 催化活性的火山型关系图,图中以灰色显示的反应式为限速反应步骤^[15]; (D) TMB 氧化为 TMB_{ox} 的催化反应路径,以 ABO₃ 的(001)面作为类 POD 反应的晶面^[15]; e_g 电子占有率与(E)O(E_{ads,O})和(F)OH(E_{ads,OH})的吸附能之间的关系,吸附能和 e_g 电子占有率分别通过计算和实验获得^[15]

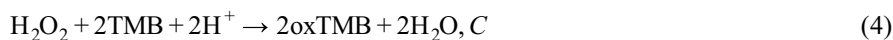
Fig.2 (A) Schematic of ABO₃ perovskite structure^[15]; (B) Specific POD-like activities of perovskite transition metal oxides (TMOs)^[15]; (C) Specific POD-like activities of perovskite TMOs plotted as a function of e_g occupancy, in which equations shown in gray are the rate-limiting reaction steps^[15]; (D) The proposed subprocesses responsible for the oxidation of TMB to TMB_{ox} with the (001) facet of ABO₃ as POD mimics; Adsorption energies of (E) O (E_{ads,O}) and (F) OH (E_{ads,OH}) plotted as a function of e_g occupancy, where E_{ads} and e_g occupancy are obtained by calculations and experiments, respectively^[15]

或 2 时,钙钛矿氧化物具有可忽略不计的类 POD 活性(图 2C)。因此, e_g 可作为基于钙钛矿氧化物的类 POD 活性的预测描述符。其它电子结构相关的参数,如过渡金属的氧化态、B 位离子的 3d 电子数,与纳米酶的催化活性均没有明显的相关关系。当 B 位阳离子的 e_g 接近 1 时, O 2p 带中心和 B-O 共价强度可作为次级描述符。通过进一步的密度泛函理论计算,该研究从理论上解释了 e_g 对催化活性的影响(图 2D~2F)。这些结果表明,不同的 e_g 一方面能够改变催化反应的速率决定步骤;另一方面也会影响催化剂对反应中间体的吸附能,进而改变钙钛矿氧化物的类 POD 活性。当 e_g 高于 1.2 时,速率决定步骤是 H₂O₂ 的解离;当 e_g 低于 1.2 时,速率决定步骤是类 POD 底物的氧化; e_g 约为 1.2 时,钙钛矿氧化物具有最佳能垒,并且可有效地促进催化反应的速率决定步骤,从而具有优异的类 POD 活性。此外, e_g 具有一定的普适性,也可作为 5 种具有八面体配位的二元金属氧化物纳米粒子及尖晶石氧化物纳米材料的类 POD 活性描述符^[15]。

在随后的研究中, Wei 研究组^[51]以尖晶石氧化物为研究对象,继续探索 e_g 作为描述符的通用性。首先选择正型 ZnB₂O₄ 作为模型材料,通过调整 B 位点的元素组成调节 ZnB₂O₄ 的类过氧化物酶活性,然后通过磁测量、电感耦合等离子光谱仪和其他表征方法进一步揭示决定尖晶石氧化物类过氧化物活性的因素。结果表明, e_g 仍然是有效的描述符,并且预测了当 e_g 约为 0.6 时,尖晶石具有最优的过氧化物酶活性。基于此,采用 Li 掺杂 ZnCo₂O₄ 调控 Co 元素的 e_g, 获得了 LiCo₂O₄, 该材料在所有尖晶石中具有最高的类 POD 活性。与 ZnCo₂O₄ 相比, LiCo₂O₄ 的活性不仅提高了一个数量级,并且该结果还进一步验证了 e_g 可以作为描述符指导尖晶石纳米酶的理性设计^[51]。

3.2 OH基团的吸附能($E_{\text{ads, OH}}$)

研究表明,根据化学反应原理和 Brønsted-Evans-Polanyi (BEP) 关系, OH 基团的吸附能 ($E_{\text{ads, OH}}$) 可以是 POD 模拟物的通用描述符^[17,52]。模拟 POD 的整体反应过程见公式(4):



其中, C 是类 POD 催化反应的反应能。

如前所述,整个反应(公式(4))可以分为 3 个步骤(公式(1)~(3))。3 种基元反应的反应能(E_r)分别为 $E_{r,1}$ 、 $E_{r,2}$ 和 $E_{r,3}$ 。因此, C 可以表示为公式(5):

$$C = E_{r,1} + E_{r,2} + E_{r,3} \quad (5)$$

由于第二步和第三步都涉及氢原子从 TMB 到 OH 基团的质子化耦合转移,因此这两个步骤的 E_r 遵循线性关系(公式 6):

$$E_{r,2} = cE_{r,3} \quad (6)$$

因此,可以得到公式(7)和式(8):

$$C = E_{r,1} + cE_{r,3} + E_{r,3} \quad (7)$$

$$E_{r,3} = \frac{C - E_{r,1}}{1 + c} \quad (8)$$

类 POD 的催化活性受速率决定步骤的能垒控制。如前所述,步骤 1 和 3 是类 POD 催化反应可能的速率决定步骤。根据异相催化中的 BEP 线性标度关系,相同反应的能垒和反应能呈正相关。因此,第一步和第三步的能垒(E_b)可以通过公式(9)和公式(10)计算:

$$E_{b,1} = a_1E_{r,1} + b_1 \quad (9)$$

$$E_{b,3} = a_3E_{r,3} + b_3 \quad (10)$$

将公式(8)代入公式(10),可以得到公式(11):

$$E_{b,3} = \frac{-a_3}{1+c}E_{r,1} + \frac{a_3c}{1+c} + b_3 \quad (11)$$

因此,根据上面的推导(公式(9)和公式(11)),无论是步骤 1,还是步骤 3,其 E_b 均与 $E_{r,1}$ 线性相关。此外,还以 Fe_3O_4 为例说明了 $E_{b,1}$ (或 $E_{b,3}$) 和 $E_{r,1}$ 之间的线性关系(图 3)^[17]。通过绘制 $E_{b,1}$ 或 $E_{b,3}$ 作为相应 $E_{r,1}$ 的函数,可以获得类火山曲线。 $E_{b,1}$ 或 $E_{b,3}$ 的函数曲线在 $E_{r,1} = -2.1$ eV 处相交。当 $E_{r,1} < -2.1$ eV 时, $E_{b,3} > E_{b,1}$,因此速率决定步骤为反应步骤 3。当 $E_{r,1} > -2.1$ eV 时,速率决定步骤为反应步骤 1。因此, $E_{r,1}$

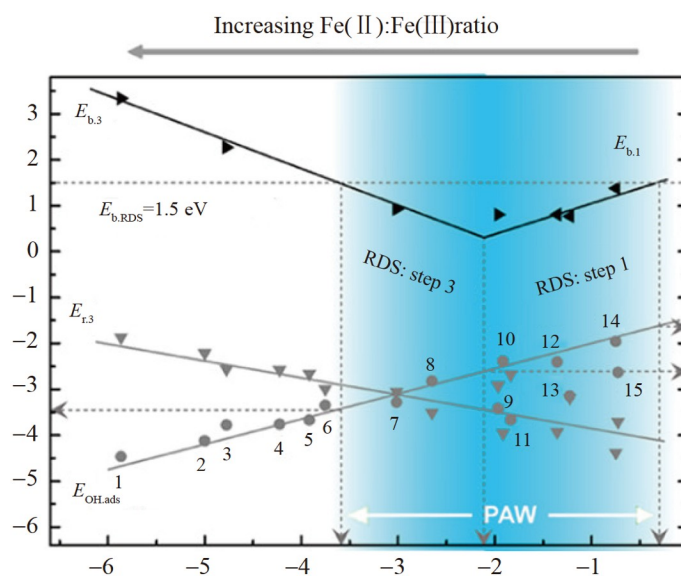


图3 过氧化氢化学吸附能($E_{r,1}$)与 Fe_3O_4 层 1~15 类 POD 活性之间的火山形曲线^[17]

Fig.3 Volcano-shaped plot of POD activity (black lines) as a function of H_2O_2 chemisorption energy ($E_{r,1}$) for Fe_3O_4 slabs 1-15^[17]

可作为类 POD 纳米酶的活性描述符。另外, $E_{\text{ads,OH}}$ 与 $E_{\text{r,1}}$ 呈现很好的线性关系(图 3)^[17]。 $E_{\text{ads,OH}}$ 的计算比 $E_{\text{r,1}}$ 更加容易, 因此, $E_{\text{ads,OH}}$ 可以代替 $E_{\text{r,1}}$ 成为更有效和更简单的类 POD 活性的描述符。为了证明 $E_{\text{ads,OH}}$ 描述符的普遍适用性, 研究了 57 种纳米材料, 包括金属、金属氧化物和碳材料等, 计算出的 $E_{\text{ads,OH}}$ 值展示了其预测高活性类 POD 纳米酶的强大能力^[17]。

尽管描述符可用于指导合成高活性的类 POD 纳米酶, 但仍然存在一些问题。例如, 活性描述符不是普适性的, 需要针对不同的材料类型开发不同的描述符; 另外, 虽然基于描述符指导设计高活性纳米酶的方法相较于传统的“试错法”有所进步, 但其筛选高活性纳米酶的效率仍然相对较低。因此, 将机器学习和高通量实验相结合开发高性能的类 POD 纳米酶将成为未来研究的重点^[53]。

4 类POD纳米酶在分析检测中的应用

4.1 活性小分子检测

类 POD 纳米酶可以催化 H_2O_2 氧化 POD 的底物(例如 TMB), 形成氧化产物。基于该反应, 生物活性小分子的检测原理主要分为 3 类: (1) 在类 POD 纳米酶存在的情况下, 通过氧化底物产生检测信号, 进而检测 H_2O_2 (或一些可被其相应氧化酶氧化产生 H_2O_2 的靶标物质); (2) 还原氧化产物(和/或消耗 H_2O_2) 可以导致信号减弱, 据此可检测该类靶标物质; (3) 通过与类 POD 纳米酶相互作用, 增强或抑制类 POD 活性, 进而用于这些物质的检测。

对于第一种类型, 一般原理是基于 H_2O_2 介导的底物氧化, 在类 POD 纳米酶的催化下生成用于信号转导的氧化产物^[1,3,6,54]。通过改变不同类型的底物, 比色、荧光、化学发光和拉曼信号均可用于信号传输^[3,55-57]。Wei 等^[3]报道了一种使用 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒作为类 POD 纳米酶和 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS)作为底物的 H_2O_2 比色检测法。通过 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化 H_2O_2 氧化 ABTS, 可以获得绿色产物(即 ABTS^{+}), 从而可以通过肉眼或吸收光谱检测 H_2O_2 。采用 Amplex Red 代替 ABTS, 构建用于 H_2O_2 检测的荧光方法^[58]。当 H_2O_2 存在时, 在类 POD 纳米酶的催化下, 还原孔雀石绿或 TMB 被氧化成具有拉曼活性的产物(即孔雀石绿或 TMB_{ox}), 通过表面增强拉曼散射(Surface-enhanced Raman scattering, SERS)光谱进行信号转导^[57,59]。此外, 利用电化学方法, 可以在不使用 POD 底物的情况下检测 H_2O_2 ^[60-61]。通过将 POD 底物的氧化与检测物对应的氧化酶的氧化偶联, 一些氧化酶底物可以通过上述 H_2O_2 检测方法进行检测。目前, 将相应的氧化酶(或氧化酶模拟物)与类 POD 纳米酶反应耦合, 已成功实现了对葡萄糖、乳酸、胆固醇、胆碱、肌氨酸和黄嘌呤等靶标物质的检测^[1,6,62]。

对于第二种类型, 可以通过抑制类 POD 纳米酶的催化反应检测具有还原性的靶标(如抗坏血酸、多巴胺、半胱氨酸、高半胱氨酸和谷胱甘肽等)^[1,6,63-64]。Feng 等^[63]基于谷胱甘肽对 TMB 氧化的抑制作用, 使用具有类 POD 活性的金纳米团簇建立了谷胱甘肽的比色检测方法, 成功实现了对细胞裂解物中谷胱甘肽的检测。此外, 由于肿瘤细胞中的谷胱甘肽水平高于正常细胞, 因此可以通过对细胞中谷胱甘肽的定量检测, 达到区分癌细胞与正常细胞的目的。

对于第三种类型, 一些生物活性小分子(如磷酸盐、氨基酸和三聚氰胺等)可以通过与纳米酶相互作用改变纳米酶的活性, 进而实现对这些生物活性小分子的检测^[1,6]。通过与纳米材料相互作用, 一些靶标物质可以改变纳米材料的结构和表面电荷, 进而调控其类 POD 催化活性。例如, 通过将三聚氰胺添加到裸 Au 纳米粒子中可以形成 Au 纳米粒子-三聚氰胺聚集体。这些裸 Au 纳米颗粒的类 POD 活性随着三聚氰胺浓度的增加而增大, 基于此, 可实现三聚氰胺的比色检测^[65]。

4.2 核酸检测

基于类 POD 纳米酶的检测方法主要分为两类: (1) 使用类 POD 纳米酶作为信号探针; (2) 使用核酸调节纳米酶活性, 进而实现核酸的检测。对于第一种类型, 大量研究表明纳米酶可用于标记核酸, 进而通过催化反应进行信号传递和放大^[66-71]。六氰基铁酸锆(ZrHCF)磁性纳米颗粒可作为类 POD 纳米酶用于目标 DNA(Target DNA, *t*DNA)的电化学检测^[68]。报告基因 DNA(Reporter DNA, *r*DNA)首先通过 ZrHCF 磁性纳米颗粒中的 Zr(IV)与 *r*DNA 中的磷酸基团之间的相互作用与 ZrHCF 磁性纳米颗粒结合。

*t*DNA 不仅可以通过与预先接枝的捕获 DNA (Capture DNA, *c*DNA) 相互作用而吸附到电极表面, 而且可以通过 *t*DNA 和 *r*DNA 之间的杂交反应与 *r*DNA 接枝的 ZrHCF 纳米酶结合。然后, *r*DNA 接枝的 ZrHCF 纳米酶可以催化 H_2O_2 还原, 进而产生可用于 *t*DNA 浓度定量的电化学信号^[68]。

对于第二种类型, 传感平台的构建是基于核酸调节纳米酶的催化活性实现的^[72-74]。Dong 研究组^[73]发现, 单链 DNA (ssDNA) 可以通过 π - π 相互作用稳定地吸附在氯化血红素-石墨烯杂化纳米片 (H-GNs) 的表面上。由于带负电荷的 ssDNA 骨架能够增加 H-GNs 的静电排斥作用, 因而可以防止 H-GNs 在氯化钠电解质中聚集。然而, 双链 DNA (dsDNA) 对 H-GNs 表现出非常弱的吸附亲和力, 因而无法避免 H-GNs 在氯化钠电解质中聚集。离心后, ssDNA 修饰的 H-GNs 没有沉淀, 上清液表现出极好的类 POD 活性。带有 dsDNA 的 H-GNs 离心后沉淀, 使上清液具有较低的种类 POD 活性。基于 ssDNA 和 dsDNA 对 H-GN 的明显不同的亲和力以及 H-GN 的类 POD 活性, 实现了 29 聚体乙型肝炎病毒 DNA 的比色检测^[73]。此外, 该方法还可以用于单核苷酸多态性 (Single-nucleotide polymorphisms) 的测定 (图 4)^[73]。

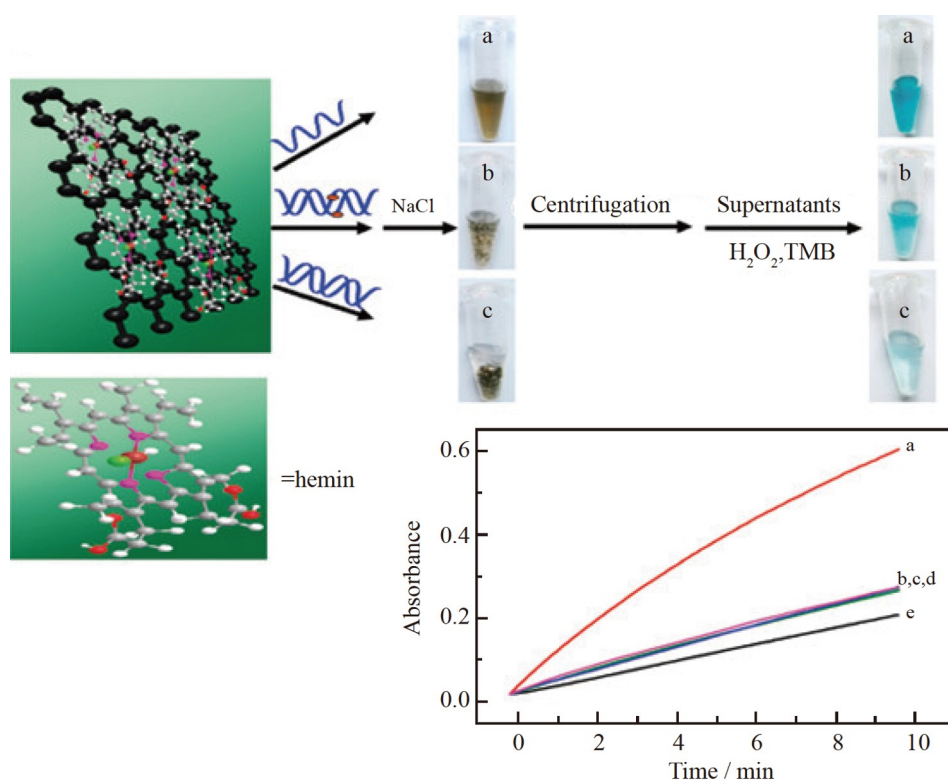


图4 单核苷酸多态性检测方法的示意图^[73]

Fig.4 Illustration of the protocols for detection of single-nucleotide polymorphisms^[73]

4.3 蛋白质检测

类 POD 纳米酶已被广泛用于蛋白质检测^[2,28,30,39,75-79]。Yan 研究组^[2]使用具有类 POD 活性的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒作为探针, 通过免疫测定法对乙型肝炎病毒抗原和心肌钙蛋白 I 进行检测。在随后的研究中, 该研究组^[75]开发了一种基于 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的免疫层析试纸条, 用于检测埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 的糖蛋白 (Glycoprotein, GP)。由于具有类 POD 活性的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的催化放大能力, 纳米酶试纸条的灵敏度比胶体金试纸条高约 100 倍, 检出限为 1 ng/mL (图 5A)。除了 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒外, Xia 等^[30]在钡立方体上沉积具有几个原子层厚度的铈原子, 获得了钡-铈立方体, 并开发了具有更高催化活性的类 POD 纳米酶, 作为信号转换的免疫测定标签。随后将其用于人源前列腺表面抗原 (Prostate surface antigen, PSA) 的免疫测定。得益于其出色的类 POD 活性, 基于钡-铈立方体的免疫测定实验的检出限比基于 HRP 的低 110 倍 (图 5B)。Yan 研究组^[76]使用具有类 POD 活性的 Co-Fe@hemin 作为催化探针, 开发了一种用于检测 SARS-CoV-2 抗原的纳米酶化学发光试纸条 (图 5C), 其灵敏度与

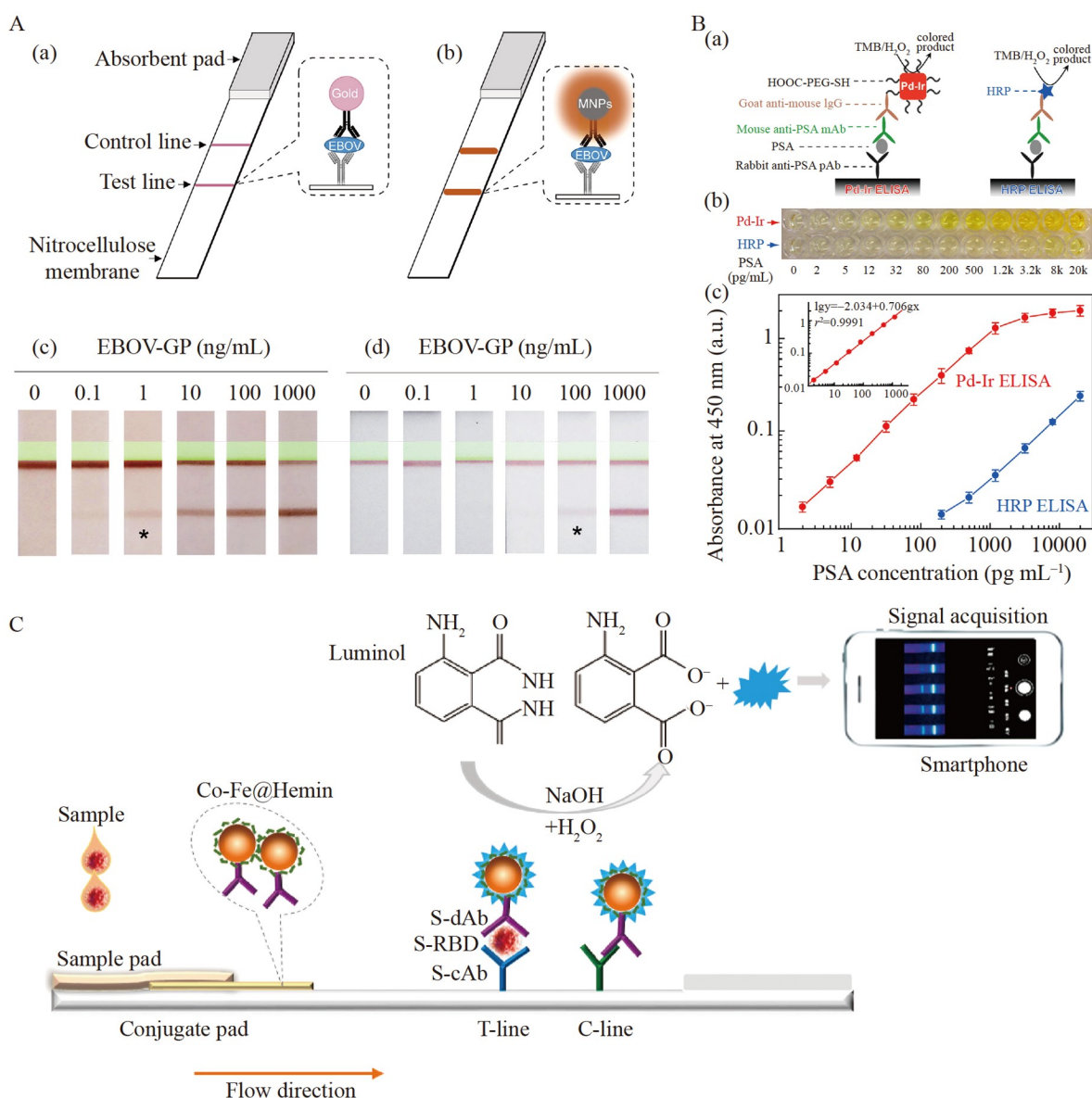


图5 (A) 标准胶体金试纸条和 Fe₃O₄ 纳米酶试纸条用于埃博拉病毒糖蛋白(EBOV-GP)检测的示意图^[75]; (B) 基于钯-铱立方体的酶联免疫吸附测定和传统的基于 HRP 的实验方法用于检测前列腺表面抗原(PSA)^[30]; (C) SARS-CoV-2 抗原的纳米酶化学发光试纸条测试示意图^[76]

Fig.5 (A) Illustration of standard colloidal Au strip and nanozyme strip employing Fe₃O₄ MNPs for Ebola Virus glycoprotein (EBOV-GP) detection^[75]; (B) Detection of prostate surface antigen(PSA) with Pd-Ir cube-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional HRP-based ELISA (HRP ELISA)^[30]; (C) Illustration of the nanozyme chemiluminescence paper test for SARS-CoV-2 antigen^[76]

ELISA 相当,并且诊断可在 16 min 内完成,比核酸检测的时间短。

4.4 糖类检测

肝素是多糖,广泛应用于抗凝研究。研究表明,肝素可在中性 pH 值下提高金团簇的类 POD 活性。基于这种现象, Hu 等^[80]开发了肝素比色检测平台,检测肝素的线性范围为 0.5~25 μg/mL。另外, Wei 研究组^[81]制备了一系列具有优异类 POD 活性的二维金属有机框架纳米片。AG73 多肽与肝素特异性结合,吸附在二维金属有机框架纳米片上,可以阻止 POD 底物与催化活性位点结合,从而降低其催化活性; 当与肝素相互作用时,肝素可以从二维金属有机框架纳米片表面将 AG73 多肽竞争下来,恢复二维金属有机框架纳米片的类 POD 活性。基于此原理,二维金属有机框架纳米片可用于肝素的检测^[81]。

4.5 外泌体和细胞检测

一些特征受体(通常是蛋白质)在外泌体和细胞表面是过度表达的,这些受体可被其对应的抗体或配体特异性识别,因此,可以通过将抗体或配体与纳米酶结合构建用于检测外泌体和细胞的探针。在该类探针中,抗体或配体可与外泌体或细胞特异性结合,而其中的类 POD 纳米酶可用于信号转导。研究表明,将抗体或配体与纳米酶结合,可用于检测外泌体^[82-83]。例如,通过吸附 CD63 特异性适配体可以显著提高 C₃N₄ 纳米片的类 POD 活性,这主要归因于适配体能够促进 TMB 吸附到 C₃N₄ 纳米片上。当外泌体存在时,其表面的 CD63(外泌体的表面标志物)与适配体结合,导致适配体从 C₃N₄ 纳米片的表面脱离,进而导致 C₃N₄ 纳米片的催化活性降低。基于此原理, Wang 等^[82]构建了一种可以通过监测 TMB 的催化氧化实现外泌体检测的比色定量检测平台。基于 CD63 在不同肿瘤外泌体中的差异性表达,该比色平台可以区分由乳腺癌细胞系(MCF-7)和对照细胞系(MCF-10A)产生的外泌体。Boriachek 等^[83]使用负载 Au 的 Fe₂O₃ 纳米立方体(Gold-loaded ferric oxide nanocubes, Au-NPFe₂O₃NC)构建了用于检测外泌体的 ELISA 方法。Au-NPFe₂O₃NC 同时具有磁性和类 POD 活性,可以产生用于外泌体定量的比色信号或电化学信号。CD-63 特异性抗体首先与 Au-NPFe₂O₃NC 结合,捕获细胞培养基中的外泌体,然后通过磁洗程序分离和纯化 Au-NPFe₂O₃NC/CD63/外泌体结合物。将带有抗体修饰的丝网印刷电极与 Au-NPFe₂O₃NC/CD/外泌体偶联物结合,构建了免疫夹心实验方法。

通过抗体或配体修饰的纳米酶也可实现细胞(通常是肿瘤细胞)的检测^[5,84-85]。Zhang 等^[84]使用叶酸修饰的铂纳米颗粒/氧化石墨烯(Pt/GO)纳米复合材料构建了肿瘤细胞检测平台(图 6)。纳米复合材料表面的叶酸可以通过细胞膜上的叶酸受体作为识别元件实现细胞的靶向,而具有类 POD 活性的 Pt/GO 纳米复合材料可以作为信号转导单元。该比色检测平台具有高灵敏度,通过肉眼观察即可检测到 125 个肿瘤细胞。除叶酸外,抗体也被用于特异性识别癌细胞。Li 等^[85]基于抗黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖(Anti-melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan, MCSP)抗体修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒开发了一种循环肿瘤细胞(Circulating tumor cell, CTC)检测平台。MCSP 抗体可特异性识别黑色素瘤 CTC 表面过表达的 MCSP,而具有类 POD 活性的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒可用于 CTC 分离和信号转导。采用该检测平台可在 50 min 内成功检测低至每毫升 13 个的黑色素瘤 CTC。

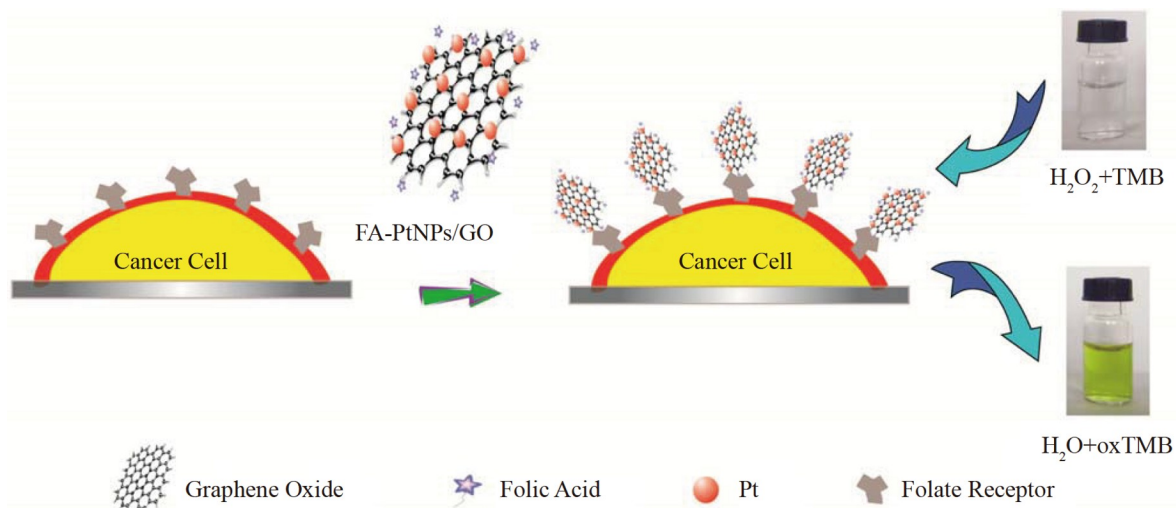


图6 使用叶酸功能化的铂纳米颗粒/氧化石墨烯(Pt/GO)复合材料比色检测肿瘤细胞^[84]

Fig.6 Colorimetric detection of cancer cells by using folic acid-functionalized platinum nanoparticles/graphene oxide (Pt NPs/GO) complex^[84]

4.6 活体检测

类 POD 纳米酶已被应用于检测活体大脑中的神经化学物质^[58,81,86-88]。Mao 研究组^[86]使用普鲁士蓝纳米酶,通过电化学方法实现了葡萄糖和乳酸的同时在线检测。由于该方法是通过将葡萄糖氧化酶

(Glucoseoxidase, GOx)或乳酸氧化酶(Lactate oxidase, LOx)与类 POD 纳米酶耦合来实现对分析物的检测,因而具有良好的选择性。其中,葡萄糖或乳酸可被其相应的氧化酶氧化生成 H_2O_2 ,然后普鲁士蓝催化 H_2O_2 还原产生用于信号传递的阴极电流。基于该级联反应,通过使用具有葡萄糖氧化酶/普鲁士蓝和乳酸氧化酶/普鲁士蓝修饰的双玻碳电极的连续流动电化学电池,可以实现对大鼠纹状体微透析液中的葡萄糖和乳酸的同时测定^[86]。

为了进一步实现有效的传质并最大限度地减少 H_2O_2 分解,进而提高级联反应的催化效率,Wei 研究组^[58]开发了用于体内传感的集成纳米酶(Integrated nanozymes, INAzymes)(图 7A)。该研究首先通过将分子催化剂血红素和 GOx 封装到 ZIF-8 中构筑 INAzymes。由于纳米邻近效应,INAzymes 在级联反应中表现出更强的级联反应活性。将该检测平台与活体微透析技术结合,实现了对活体大鼠脑内葡萄糖变化的离线检测。此外,通过结合微流体技术,建立了基于 INAzymes 的在线监测活体脑内葡萄糖水平的荧光传感光学平台(图 7B)^[58],并利用此平台监测了缺血/再灌注过程中纹状体葡萄糖的动态变化,展示了其在体内传感的实际应用价值(图 7C)^[58]。

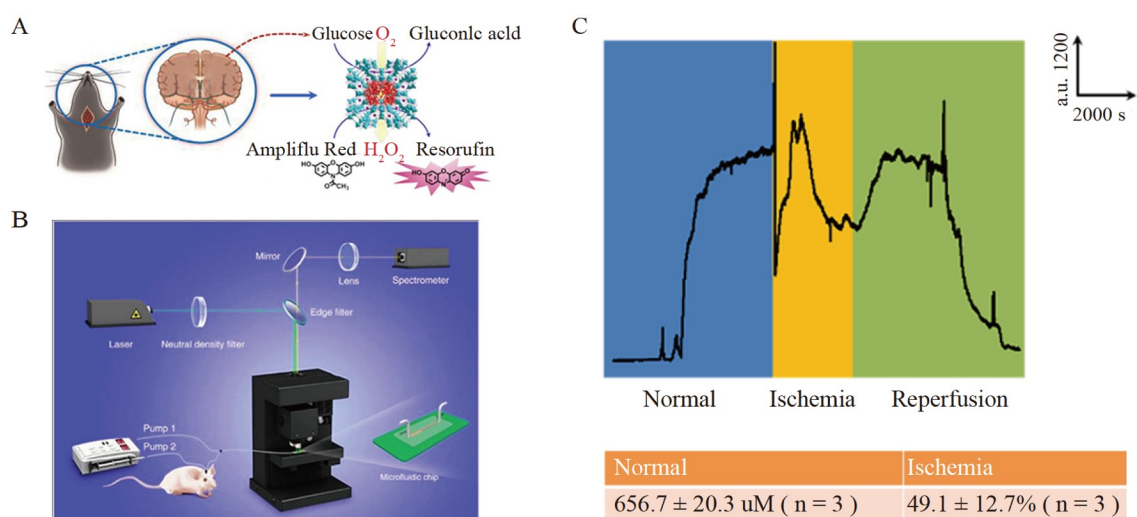


图 7 (A)集成纳米酶催化的级联反应测量大鼠大脑中葡萄糖的示意图^[58]; (B)用于连续监测活体大鼠神经化学物质的荧光传感光学平台^[58]; (C)使用荧光传感光学平台持续监测全脑缺血/再灌注后活鼠脑纹状体中葡萄糖水平的动态变化^[58]

Fig.7 (A) Illustration of measuring glucose in the brain of living rats by the integrated nanozymes (INAzyme)-catalyzed cascade reactions, which produces fluorescent resorufin for signaling^[58]; (B) Fluorescence sensing optical platform for continuous *in vivo* measurement of neurochemicals in living rats^[58]; (C) Continuously monitoring dynamic changes of glucose level in the striatum of a living rat brain following global ischemia/reperfusion with the fluorescence sensing optical platform^[58]

代谢蛋白酶通常在肿瘤细胞中具有更高的表达量,如基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase 9, MMP9)。因此,监测蛋白酶活性可以实现癌症的早期诊断。为了实现体内肿瘤监测,Loynachan 等^[89]利用 MMP9 特异性肽序列将 4 个具有类 POD 活性的金团簇与中性抗生物素蛋白(Neutravidin, NAv)偶联,并基于此设计了一种纳米传感器(图 8A)。整个纳米传感器因为太大而无法通过肾脏随尿液排出。然而,在荷瘤大鼠中,纳米传感器会被肿瘤中过量表达的 MMP9 分解成单个金团簇(图 8B)^[89]。这些超小尺寸($<2 \text{ nm}$)的金团簇可以通过肾脏途径有效清除,积累在收集的尿液之中。因此,可以通过监测尿液中金团簇的类 POD 活性实现肿瘤的诊断(图 8C)^[89]。

尽管纳米酶在分析检测中的应用发展十分迅速,但在在体分析中的应用还很少。为实现纳米酶的在体检测,需解决以下方面的问题:(1)如何获得高活性和特异性的类过氧化物酶纳米酶,进而更好地用于在体检测时的催化信号放大;(2)如何通过表面修饰等策略减少纳米酶在体循环时表面形成蛋白冠,延长纳米酶的在体循环时间;(3)如何实现纳米酶对于特定疾病的靶向性以及对于疾病微环境进行响

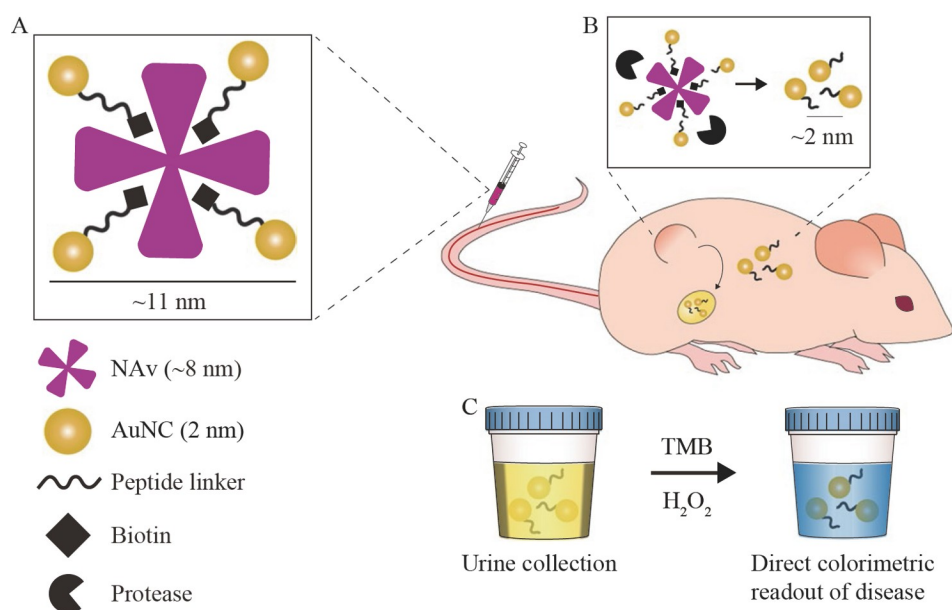


图8 纳米催化信号放大传感系统的设计：(A)生物素化的蛋白酶可切割肽将具有催化能力的金团簇 (AuNCs)与中非抗生物素蛋白(NAv)蛋白支架结合示意图^[89]；(B)AuNCs/NAv复合物(~11 nm)在蛋白酶活性表达失调的疾病部位分解的示意图^[89]；(C)基于类POD反应实现尿液中AuNCs的检测^[89]

Fig.8 Design of a nanocatalyst signal-amplification sensing system: (A) Illustration of catalytic Au nanoclusters (NCs) conjugated to a neutravidin (NAv) protein scaffold through a biotinylated protease-cleavable peptide linker; (B) Protease-sensitive AuNCs/NAv complex (~11 nm) designed to specifically disassemble when exposed to the activity of the relevant dysregulated proteases at the site of disease^[89]; (C) Detection of AuNCs in urine by POD-like reaction^[89]

应,进而实现信号转导。

5 总结与展望

本文围绕类过氧化物酶的理性设计以及分析应用,重点介绍了类过氧化物酶纳米酶的催化机制、影响类过氧化物酶活性的组成和结构的因素、用于理性设计高活性过氧化物酶纳米酶的活性描述符等方面的研究进展。得益于高性能纳米酶的开发,过氧化物酶纳米酶在体外和体内的分析检测中的应用都取得了很大进展。但是,该领域的研究也面临着一些挑战。(1)纳米酶催化活性有待进一步提高。具有高催化活性的纳米酶是实现高灵敏度检测的材料基础。尽管已经制定了多种策略用于纳米酶的理性设计,但目前纳米酶的催化效率仍普遍低于天然酶。为加速发现具有高催化活性的纳米酶,将机器学习与高通量实验相结合是未来可能的发展方向。(2)提升纳米酶的特异性。已开发的纳米酶通常具有多酶活性,这大大限制了其在分析检测中的应用。例如,同时具有类过氧化物酶和类氧化酶活性的纳米酶用于H₂O₂检测时,即使没有H₂O₂也会产生强背景信号,极大地影响了检测灵敏度。此外,生物样品(尤其是活体分析样品)成分通常极其复杂,因此还需要具有高度特异性类过氧化物酶活性的纳米酶进行高选择性检测。因此,需要进一步开发各种高度特异性的模拟过氧化物酶。(3)到目前为止,纳米酶在分析领域的应用研究非常有限,缺少重要的应用。发展高活性和高特异性的纳米酶,并结合纳米材料表面修饰等技术,实现纳米酶在体内的疾病部位靶向驱动和疾病微环境响应,进而实现在体疾病监控等方面的重要应用,是纳米酶在分析领域中的发展趋势。

References

- [1] WEI H, WANG E. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42(14): 6060-6093.
- [2] GAO L, ZHUANG J, NIE L, ZHANG J, ZHANG Y, GU N, WANG T, FENG J, YANG D, PERRETT S, YAN X. *Nat. Nanotechnol.*, 2007, 2(9): 577-583.

- [3] WEI H, WANG E. *Anal. Chem.*, 2008, 80(6): 2250-2254.
- [4] FAN K, CAO C, PAN Y, LU D, YANG D, FENG J, SONG L, LIANG M, YAN X. *Nat. Nanotechnol.*, 2012, 7(7): 459-464.
- [5] TAO Y, LIN Y, HUANG Z, REN J, QU X. *Adv. Mater.*, 2013, 25(18): 2594-2599.
- [6] WU J, WANG X, WANG Q, LOU Z, LI S, ZHU Y, QIN L, WEI H. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, 48(4): 1004-1076.
- [7] HUANG Y, REN J, QU X. *Chem. Rev.*, 2019, 119(6): 4357-4412.
- [8] JIANG D, NI D, ROSENKRANS Z T, HUANG P, YAN X, CAI W. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, 48(14): 3683-3704.
- [9] DING H, CAI Y, GAO L, LIANG M, MIAO B, WU H, LIU Y, XIE N, TANG A, FAN K, YAN X, NIE G. *Nano Lett.*, 2019, 19(1): 203-209.
- [10] LI S, SHANG L, XU B, WANG S, GU K, WU Q, SUN Y, ZHANG Q, YANG H, ZHANG F, GU L, ZHANG T, LIU H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58(36): 12624-12631.
- [11] ZHEN W, LIU Y, WANG W, ZHANG M, HU W, JIA X, WANG C, JIANG X. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, 59(24): 9491-9497.
- [12] LI J, LIU W, WU X, GAO X. *Biomaterials*, 2015, 48: 37-44.
- [13] FANG G, LI W, SHEN X, PEREZ-AGUILAR J M, CHONG Y, GAO X, CHAI Z, CHEN C, GE C, ZHOU R. *Nat. Commun.*, 2018, 9(1): 129.
- [14] HU Y, GAO X J, ZHU Y, MUHAMMAD F, TAN S, CAO W, LIN S, JIN Z, GAO X, WEI H. *Chem. Mater.*, 2018, 30(18): 6431-6439.
- [15] WANG X, GAO X J, QIN L, WANG C, SONG L, ZHOU Y N, ZHU G, CAO W, LIN S, ZHOU L, WANG K, ZHANG H, JIN Z, WANG P, GAO X, WEI H. *Nat. Commun.*, 2019, 10(1): 704.
- [16] XU B, WANG H, WANG W, GAO L, LI S, PAN X, WANG H, YANG H, MENG X, WU Q, ZHENG L, CHEN S, SHI X, FAN K, YAN X, LIU H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58(15): 4911-4916.
- [17] SHEN X, WANG Z, GAO X, ZHAO Y. *ACS Catal.*, 2020, 10(21): 12657-12665.
- [18] LU X, GAO S, LIN H, YU L, HAN Y, ZHU P, BAO W, YAO H, CHEN Y, SHI J. *Adv. Mater.*, 2020, 32: 2002246.
- [19] WANG Z, ZHANG R, YAN X, FAN K. *Mater. Today*, 2020, 41: 81-119.
- [20] DONG J, SONG L, YIN J J, HE W, WU Y, GU N, ZHANG Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, 6(3): 1959-1970.
- [21] LI S, ZHANG Y, WANG Q, LIN A, WEI H. *Anal. Chem.*, 2022, 94(1): 312-323.
- [22] SCHLÖGL R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54(11): 3465-3520.
- [23] ZHAO R, ZHAO X, GAO X. *Chem. Eur. J.*, 2015, 21(3): 960-964.
- [24] SHEN X, WANG Z, GAO X J, GAO X. *Adv. Mater.*, 2023: e2211151.
- [25] LIN S, WEI H. *Sci. China Life Sci.*, 2019, 62(5): 710-712.
- [26] KIM M S, LEE J, KIM H S, CHO A, SHIM K H, LE T N, AN S S A, HAN J W, KIM M I, LEE J. *Adv. Funct. Mater.*, 2020, 30(1), 1905410.
- [27] JIAO L, YAN H, WU Y, GU W, ZHU C, DU D, LIN Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, 59(7): 2565-2576.
- [28] WANG X, QIN L, ZHOU M, LOU Z, WEI H. *Anal. Chem.*, 2018, 90(19): 11696-11702.
- [29] HE W, WU X, LIU J, HU X, ZHANG K, HOU S, ZHOU W, XIE S. *Chem. Mater.*, 2010, 22(9): 2988-2994.
- [30] XIA X, ZHANG J, LU N, KIM M J, GHALE K, XU Y, MCKENZIE E, LIU J, YE H. *ACS Nano*, 2015, 9(10): 9994-10004.
- [31] LI Z, YANG X, YANG Y, TAN Y, HE Y, LIU M, LIU X, YUAN Q. *Chem. Eur. J.*, 2018, 24(2): 409-415.
- [32] IVANOVA M N, GRAYFER E D, PLOTNIKOVA E E, KIBIS L S, DARABDHARA G, BORUAH P K, DAS M R, FEDOROV V E. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, 11(25): 22102-22112.
- [33] KIM M S, CHO S, JOO S H, LEE J, KWAK S K, KIM M I, LEE J. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 4312-4321.
- [34] GUO W, ZHANG M, LOU Z, ZHOU M, WANG P, WEI H. *ChemCatChem*, 2019, 11(2): 737-743.
- [35] LIANG Q, XI J, GAO X J, ZHANG R, YANG Y, GAO X, YAN X, GAO L, FAN K. *Nano Today*, 2020, 35: 100935.
- [36] ZHU Y, WU J, HAN L, WANG X, LI W, GUO H, WEI H. *Anal. Chem.*, 2020, 92(11): 7444-7452.
- [37] FENG L, ZHANG L, ZHANG S, CHEN X, LI P, GAO Y, XIE S, ZHANG A, WANG H. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, 12(15): 17547-17556.
- [38] LI S, ZHAO X, GANG R, CAO B, WANG H. *Anal. Chem.*, 2020, 92(7): 5152-5157.
- [39] XI Z, WEI K, WANG Q, KIM M J, SUN S, FUNG V, XIA X. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143(7): 2660-2664.
- [40] XI Z, GAO W, XIA X. *ChemBioChem*, 2020, 21(17): 2440-2444.
- [41] HE W, ZHOU Y T, WAMER W G, HU X, WU X, ZHENG Z, BOUDREAU M D, YIN J J. *Biomaterials*, 2013, 34(3): 765-773.
- [42] FU Y, ZHAO X, ZHANG J, LI W. *J. Phys. Chem. C*, 2014, 118(31): 18116-18125.
- [43] PENG F F, ZHANG Y, GU N. *Chin. Chem. Lett.*, 2008, 19(6): 730-733.
- [44] AHMED S R, TAKEMEURA K, LI T C, KITAMOTO N, TANAKA T, SUZUKI T, PARK E Y. *Biosens. Bioelectron.*, 2017, 87: 558-565.

- [45] LIU X, WU J, LIU Q, LIN A, LI S, ZHANG Y, WANG Q, LI T, AN X, ZHOU Z, YANG M, WEI H. *J. Mater. Chem. B*, 2021, 9(35): 7238-7245.
- [46] NILSSON A, PETTERSSON L G M, HAMMER B, BLIGAARD T, CHRISTENSEN C H, NRSKOV J K. *Catal. Lett.*, 2005, 100(3-4): 111-114.
- [47] LIU S, LU F, XING R, ZHU J. *Chem. Eur. J.*, 2011, 17(2): 620-625.
- [48] WU R, CHONG Y, FANG G, JIANG X, PAN Y, CHEN C, YIN J J, GE C. *Adv. Funct. Mater.*, 2018, 28(28), 1801484.
- [49] TIAN N, ZHOU Z Y, SUN S G, DING Y, WANG Z L. *Science*, 2007, 316(5825): 732-735.
- [50] ZHAO Z J, LIU S, ZHA S, CHENG D, STUDDT F, HENKELMAN G, GONG J. *Nat. Rev. Mater.*, 2019, 4(12): 792-804.
- [51] WANG Q, LI C, WANG X, PU J, ZHANG S, LIANG L, CHEN L, LIU R, ZUO W, ZHANG H, TAO Y, GAO X, WEI H. *Nano Lett.*, 2022, 22(24): 10003-10009.
- [52] BLIGAARD T, NØRSKOV J K, DAHL S, MATTHIESEN J, CHRISTENSEN C H, SEHESTED J. *J. Catal.*, 2004, 224(1): 206-217.
- [53] ZHUANG J, MIDGLEY A C, WEI Y, LIU Q, KONG D, HUANG X. *Adv. Mater.*, 2023: e2210848.
- [54] LI T, WANG Y, LIU W, FEI H, GUO C, WEI H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, 62(12): e202212438.
- [55] WANG X, QIN L, LIN M, XING H, WEI H. *Anal. Chem.*, 2019, 91(16): 10648-10656.
- [56] LUO F, LIN Y, ZHENG L, LIN X, CHI Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, 7(21): 11322-11329.
- [57] HU Y, CHENG H, ZHAO X, WU J, MUHAMMAD F, LIN S, HE J, ZHOU L, ZHANG C, DENG Y, WANG P, ZHOU Z, NIE S, WEI H. *ACS Nano*, 2017, 11(6): 5558-5566.
- [58] CHENG H, ZHANG L, HE J, GUO W, ZHOU Z, ZHANG X, NIE S, WEI H. *Anal. Chem.*, 2016, 88(10): 5489-5497.
- [59] WU J, QIN K, YUAN D, TAN J, QIN L, ZHANG X, WEI H. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, 10(15): 12954-12959.
- [60] KARYAKIN A A, PUGANOVA E A, BUDASHOV I A, KUROCHKIN I N, KARYAKINA E E, LEVCHENKO V A, MATVEYENKO V N, VARFOLOMEYEV S D. *Anal. Chem.*, 2004, 76(2): 474-478.
- [61] KIM M I, YE Y, WON B Y, SHIN S, LEE J, PARK H G. *Adv. Funct. Mater.*, 2011, 21(15): 2868-2875.
- [62] ZHANG C, CHEN C, ZHAO D, KANG G, LIU F, YANG F, LU Y, SUN J. *Anal. Chem.*, 2022, 94(8): 3485-3493.
- [63] FENG J, HUANG P, SHI S, DENG K Y, WU F Y. *Anal. Chim. Acta*, 2017, 967: 64-69.
- [64] LOU Z, ZHAO S, WANG Q, WEI H. *Anal. Chem.*, 2019, 91(23): 15267-15274.
- [65] NI P, DAI H, WANG Y, SUN Y, SHI Y, HU J, LI Z. *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 60: 286-291.
- [66] CHEN W, ZHANG X, LI J, CHEN L, WANG N, YU S, LI G, XIONG L, JU H. *Anal. Chem.*, 2020, 92(3): 2714-2721.
- [67] ZHANG G Y, DENG S Y, CAI W R, COSNIER S, ZHANG X J, SHAN D. *Anal. Chem.*, 2015, 87(17): 9093-9100.
- [68] LING P, LEI J, ZHANG L, JU H. *Anal. Chem.*, 2015, 87(7): 3957-3963.
- [69] LI X, LI X, LI D, ZHAO M, WU H, SHEN B, LIU P, DING S. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, 168: 112554.
- [70] TIAN L, QI J, ODERINDE O, YAO C, SONG W, WANG Y. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, 110: 110-117.
- [71] BROTO M, KAMINSKI M M, ADRIANUS C, KIM N, GREENSMITH R, DISSANAYAKE-PERERA S, SCHUBERT A J, TAN X, KIM H, DIGHE A S, COLLINS J J, STEVENS M M. *Nat. Nanotechnol.*, 2022, 17(10): 1120-1126.
- [72] SONG Y, WANG X, ZHAO C, QU K, REN J, QU X. *Chem. Eur. J.*, 2010, 16(12): 3617-3621.
- [73] GUO Y, DENG L, LI J, GUO S, WANG E, DONG S. *ACS Nano*, 2011, 5(2): 1282-1290.
- [74] CHAU L Y, HE Q, QIN A, YIP S P, LEE T M H. *J. Mater. Chem. B*, 2016, 4(23): 4076-4083.
- [75] DUAN D, FAN K, ZHANG D, TAN S, LIANG M, LIU Y, ZHANG J, ZHANG P, LIU W, QIU X, KOBINGER G P, GAO G F, YAN X. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 74: 134-141.
- [76] LIU D, JU C, HAN C, SHI R, CHEN X, DUAN D, YAN J, YAN X. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 173: 112817.
- [77] JIANG X, WANG X, LIN A, WEI H. *Anal. Chem.*, 2021, 93(14): 5954-5962.
- [78] TANG Y, WU Y, XU W, JIAO L, CHEN Y, SHA M, YE H R, GU W, ZHU C. *Anal. Chem.*, 2022, 94(2): 1022-1028.
- [79] WEI Z, LUCIANO K, XIA X. *ACS Nano*, 2022, 16(12): 21609-21617.
- [80] HU L, LIAO H, FENG L, WANG M, FU W. *Anal. Chem.*, 2018, 90(10): 6247-6252.
- [81] CHENG H, LIU Y, HU Y, DING Y, LIN S, CAO W, WANG Q, WU J, MUHAMMAD F, ZHAO X, ZHAO D, LI Z, XING H, WEI H. *Anal. Chem.*, 2017, 89(21): 11552-11559.
- [82] WANG Y M, LIU J W, ADKINS G B, SHEN W, TRINH M P, DUAN L Y, JIANG J H, ZHONG W. *Anal. Chem.*, 2017, 89(22): 12327-12333.
- [83] BORIACHEK K, MASUD M K, PALMA C, PHAN H P, YAMAUCHI Y, HOSSAIN M S A, NGUYEN N T, SALOMON C, SHIDDIKY M J A. *Anal. Chem.*, 2019, 91(6): 3827-3834.
- [84] ZHANG L N, DENG H H, LIN F L, XU X W, WENG S H, LIU A L, LIN X H, XIA X H, CHEN W. *Anal. Chem.*, 2014, 86(5): 2711-2718.
- [85] LI J, WANG J, WANG Y, TRAU M. *Analyst*, 2017, 142(24): 4788-4793.
- [86] LIN Y, LIU K, YU P, XIANG L, LI X, MAO L. *Anal. Chem.*, 2007, 79(24): 9577-9583.

- [87] SARDESAI N P, GANESANA M, KARIMI A, LEITER J C, ANDREESCU S. *Anal. Chem.*, 2015, 87(5): 2996-3003.
- [88] DING Y, REN G, WANG G, LU M, LIU J, LI K, LIN Y. *Anal. Chem.*, 2020, 92(6): 4583-4591.
- [89] LOYNACHAN C N, SOLEIMANY A P, DUDANI J S, LIN Y, NAJER A, BEKDEMIR A, CHEN Q, BHATIA S N, STEVENS M M. *Nat. Nanotechnol.*, 2019, 14(9): 883-890.

Advance in Peroxidase-like Nanozymes and Their Analytical Applications

WANG Xiao-Yu^{*1,2}, WEI Hui^{*2}

¹(Department of Chemistry and Material Science, College of Science,
Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

²(Jiangsu Key Laboratory of Artificial Functional Materials,
College of Engineering and Applied Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract Among different nanozymes, peroxidase-like nanozymes have attracted extensive attention because of their great prospects in biosensing, bioimaging and disease treatment. By combining experiments with computational studies, several reports have elucidated the catalytic mechanism and structure-activity relationship of peroxidase-like nanozymes. Furthermore, to enable the rational design of highly active peroxidase-like nanozymes, several pioneering studies have developed numerous descriptors that can be used to predict their catalytic activity. These rationally designed highly active nanozymes have been used for *in vitro* and *in vivo* assays. This review first focused on the progress in the rational design of peroxidase-like nanozymes, and then introduced some typical examples of the analytical applications of peroxidase-like nanozymes. In addition, the key issues and challenges faced by peroxidase-like nanozymes were summarized and their further development directions were prospected.

Keywords Nanozymes; Peroxidase; Catalytic mechanisms; Analytical applications; Rational design; Review

(Received 2023-02-17; accepted 2023-04-19)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22104055, 21874067, 21722503), the National Key R&D Program of China (Nos. 2021YFF1200700, 2019YFA0709200), the Priority Academic Program Development Jiangsu Higher Education Institutions Program and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (Nos. 202200325, 021314380195).