

## 纳米酶

范克龙<sup>1,2\*</sup> 高利增<sup>1\*</sup> 魏 辉<sup>3\*</sup> 江 冰<sup>2\*</sup> 王大吉<sup>1,4\*</sup> 张若飞<sup>1</sup> 贺久洋<sup>1</sup>  
孟祥芹<sup>1</sup> 王卓然<sup>1</sup> 樊慧真<sup>1</sup> 温 涛<sup>5</sup> 段德民<sup>1</sup> 陈 雷<sup>1</sup> 姜 伟<sup>2</sup>  
芦 宇<sup>2</sup> 蒋 冰<sup>6</sup> 魏咏华<sup>7</sup> 李 唯<sup>6</sup> 袁 野<sup>2</sup> 董海姣<sup>8</sup> 张 鹭<sup>9,10</sup>  
洪超仪<sup>1</sup> 张紫霞<sup>1</sup> 程苗苗<sup>2</sup> 耿 欣<sup>2</sup> 侯桐阳<sup>2</sup> 侯亚欣<sup>1</sup> 李建茹<sup>1</sup>  
汤国恒<sup>1</sup> 赵 越<sup>1</sup> 赵菡卿<sup>1</sup> 张 帅<sup>1</sup> 谢佳颖<sup>1</sup> 周子君<sup>3</sup> 任劲松<sup>9,10</sup>  
黄兴禄<sup>7\*</sup> 高兴发<sup>11\*</sup> 梁敏敏<sup>6\*</sup> 张 宇<sup>8\*</sup> 许海燕<sup>5\*</sup> 曲晓刚<sup>9,10\*</sup> 阎锡蕴<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院生物物理研究所 中国科学院纳米酶工程实验室 蛋白质与多肽药物所重点实验室 北京 100101; 2. 郑州大学 基础医学院 纳米酶医学研究中心 郑州 450001; 3. 南京大学 现代工程与应用科学学院 生物医学工程系 南京微结构国家实验室(筹) 江苏省功能材料设计原理与应用技术重点实验室 南京 210023; 4. 中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 深圳 518055; 5. 中国医学科学院 基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 北京 100005; 6. 北京理工大学 材料学院 北京 100081; 7. 南开大学 生命科学学院 生物活性材料教育部重点实验室 天津 300071; 8. 东南大学 生物科学与医学工程学院 南京 210096; 9. 中国科学院长春应用化学研究所 稀土资源国家重点实验室 化学生物学实验室 长春 130022; 10. 中国科学技术大学 合肥 230026; 11. 国家纳米科学中心 理论室 北京 100190)

**摘 要** 纳米酶(Nanozymes)是由我国科学家首次提出的新概念,它是一类具有生物催化功能的纳米材料,能够基于特定的纳米结构催化天然酶的底物并作为酶的代替品。自2007年首次报道以来,全球已有来自于55个国家的420多个研究机构证实了纳米酶的普遍规律。纳米酶的发现第一次揭示纳米材料蕴含一种独特的纳米效应——类酶催化效应。纳米酶作为一种新材料,既有纳米材料本身的理化性质,又有类似酶的催化功能,兼具天然酶与人工酶的优势于一身。其中,纳米结构不仅赋予纳米酶高效催化功能,而且使纳米酶比天然酶稳定,易于规模化生产。另外,纳米酶独特的多酶活性将为设计廉价、稳定、各种各样全新的催化级联反应提供功能分子。纳米酶是多学科交叉融合的典范,2022年被IUPAC评为十大化学新兴技术。在全球从事化学、酶学、材料学、生物学、医学、理论计算等多领域科学家的共同推进下,如今纳米酶已经成为新的研究热点。我国科学家在这一新兴领域一直发挥着引领作用,解析了纳米酶的构-效关系,将其催化活性提高了约1万倍,实现了超越天然酶的理性设计,创造了全球首个纳米酶产品,出版了纳米酶学英文专著,发布纳米酶术语及中国/国际标准化。更可喜的是,纳米酶新领域汇集了一大批多学科交叉融合的优秀青年科学家,推动纳米酶进入高速发展阶段,纳米酶的种类已经超过1200多种,其催化机制研究也更加深入,应用研究也从当初的检测逐步拓展到纳米酶催化医学、传感检测、绿色合成、新能源、环境治理等多个领域。本文向读者介绍纳米酶自发现以来的主要进展,包括最近发现的天然纳米酶,期待纳米酶从新概念、新材料衍生出新技术、新产品、新商品,服务人类健康,并带动新学科发展。

收稿: 2022年8月30日, 收修改稿: 2022年12月8日, 网络出版: 2023年1月3日

国家自然科学基金项目(No. 81930050, 22121003, 82122037), 国家重点研发计划(No. 2019YFA0709204, 2021YFC2102900)和中国科学院创新交叉团队(No. JCTD-2020-08)资助

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81930050, 22121003, 82122037), the National Key Research and Development Program of China (No. 2019YFA0709204, 2021YFC2102900), and the CAS Interdisciplinary Innovation Team (No. JCTD-2020-08).

\* Corresponding author e-mail: fankelong@ibp.ac.cn (Kelong Fan); gaolizeng@ibp.ac.cn (Lizeng Gao); weihui@nju.edu.cn (Hui Wei); jiangbing@zzu.edu.cn (Bing Jiang); dj.wang1@siat.ac.cn (Daji Wang); huangxinglu@nankai.edu.cn (Xinglu Huang); gaoxf@nanoctr.cn (Xingfa Gao); mmliang@bit.edu.cn (Minmin Liang); zhangyu@seu.edu.cn (Yu Zhang); xuhy@pumc.edu.cn (Haiyan Xu); xqu@ciac.ac.cn (Xiaogang Qu); yanxy@ibp.ac.cn (Xiyun Yan)

**关键词** 纳米酶 酶催化 生物催化 多酶活性

**中图分类号:** R318.08; TB383.1; TQ426.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-281X(2023)01-0001-87

## Nanozymes

*Kelong Fan*<sup>1,2\*</sup>, *Lizeng Gao*<sup>1\*</sup>, *Hui Wei*<sup>3\*</sup>, *Bing Jiang*<sup>2\*</sup>, *Daji Wang*<sup>1,4\*</sup>, *Ruofei Zhang*<sup>1</sup>, *Jiuyang He*<sup>1</sup>, *Xiangqin Meng*<sup>1</sup>, *Zhuoran Wang*<sup>1</sup>, *Huizhen Fan*<sup>1</sup>, *Tao Wen*<sup>5</sup>, *Demin Duan*<sup>1</sup>, *Lei Chen*<sup>1</sup>, *Wei Jiang*<sup>2</sup>, *Yu Lu*<sup>2</sup>, *Bing Jiang*<sup>6</sup>, *Yonghua Wei*<sup>7</sup>, *Wei Li*<sup>6</sup>, *Ye Yuan*<sup>2</sup>, *Haijiao Dong*<sup>8</sup>, *Lu Zhang*<sup>9,10</sup>, *Chaoyi Hong*<sup>1</sup>, *Zixia Zhang*<sup>1</sup>, *Miaomiao Cheng*<sup>2</sup>, *Xin Geng*<sup>2</sup>, *Tongyang Hou*<sup>2</sup>, *Yaxin Hou*<sup>1</sup>, *Jianru Li*<sup>1</sup>, *Guoheng Tang*<sup>1</sup>, *Yue Zhao*<sup>1</sup>, *Hanqing Zhao*<sup>1</sup>, *Shuai Zhang*<sup>1</sup>, *Jiaying Xie*<sup>1</sup>, *Zijun Zhou*<sup>3</sup>, *Jinsong Ren*<sup>9,10</sup>, *Xinglu Huang*<sup>7\*</sup>, *Xingfa Gao*<sup>11\*</sup>, *Minmin Liang*<sup>6\*</sup>, *Yu Zhang*<sup>8\*</sup>, *Haiyan Xu*<sup>5\*</sup>, *Xiaogang Qu*<sup>9,10\*</sup>, *Xiyun Yan*<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Protein and Peptide Pharmaceutical, CAS Engineering Laboratory for Nanozyme, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Nanozyme Medical Center, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 3. Department of Biomedical Engineering, College of Engineering and Applied Sciences, Nanjing National Laboratory of Microstructures, Jiangsu Key Laboratory of Artificial Functional Materials, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 4. Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China; 5. School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China; 6. School of Materials Science & Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; 7. Key Laboratory of Bioactive Materials for the Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 8. School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China; 9. State Key Laboratory of Rare Earth Resource Utilization, Laboratory of Chemical Biology, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China; 10. University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China; 11. Laboratory of Theoretical and Computational Nanoscience, National Center for Nanoscience and Technology of China, Beijing 100190, China)

**Abstract** Nanozymes, a new concept first proposed by Chinese scientists, is a class of nanomaterials with biocatalytic functions. Owing to their nanostructures, nanozymes can catalyze the substrates of natural enzymes and serve as enzyme substitutes. Since the first report in 2007, over 420 research groups from 55 countries have validated this phenomenon. The discovery of nanozymes demonstrates for the first time that nanomaterials may have a unique biological effect-enzyme-like catalytic activity. As a new material, nanozyme has both the physicochemical properties of nanomaterials and catalytic function similar to those of natural enzymes, with the benefits of both. Its nanostructure not only endows nanozymes with extremely effective catalytic activity but also renders them more stable and easier to mass production. The study of nanozymes is an example of interdisciplinary cooperation, being named as one of the 2022 top ten chemical emerging technologies by IUPAC. Nanozymes have become an emerging research focus due to the collaboration of experts from diverse fields worldwide such as chemistry, enzymology, materials science, biology, medicine, and theoretical calculations. Chinese scientists lead the way in this emerging field, investigating the structure-effect relationship of nanozymes, increasing their catalytic activity by 10 000 times, realizing rational design even surpassing natural enzymes, and developing the world's first nanozyme products, as well as publishing books on nanozyme science, releasing nanozyme terminology, and establishing Chinese/international standardization. Furthermore, the new field of nanozymes has attracted a substantial number of talented young multidisciplinary and interdisciplinary scientists who are driving its strong growth by discovering more than 1200 types of nanozymes

and uncovering their catalytic mechanisms. It has also evolved from the initial application in detection to nanozyme catalysis medicine, sensor detection, green synthesis, new energy, environmental protection, and many other. This article provides readers with an overview of the significant advances in nanozyme research since its discovery, including newly identified natural nanozymes. Ultimately, our goal is to see nanozymes improve human health and inspire the growth of a new field of study as they go from an idea to new materials, to technology and to products.

**Key words** nanozymes; enzyme catalysis; biocatalysis; multi-enzyme activity

## 目录

- 0 引言
- 1 纳米酶概述
  - 1.1 纳米酶的发现与命名
  - 1.2 纳米酶术语及标准化
    - 1.2.1 “纳米酶”术语的演变
    - 1.2.2 “纳米酶”术语国家标准的制定
    - 1.2.3 纳米酶催化活性测量方法的国家标准和国际标准制定
    - 1.2.4 与“纳米酶”有关的国家标准样品和国家标准物质的研制现状
    - 1.2.5 小结
  - 1.3 纳米酶的催化活力测定
    - 1.3.1 纳米酶的催化活性种类
    - 1.3.2 典型的纳米酶反应动力学
    - 1.3.3 纳米酶的活性位点及颗粒数计算
    - 1.3.4 小结
  - 1.4 纳米酶催化机制
    - 1.4.1 过氧化物酶纳米酶
    - 1.4.2 氧化酶纳米酶
    - 1.4.3 超氧化物歧化酶纳米酶
    - 1.4.4 过氧化氢酶纳米酶
    - 1.4.5 小结
- 2 纳米酶的设计
  - 2.1 纳米酶催化活性调节
    - 2.1.1 组成结构的影响
    - 2.1.2 外部因素的影响
  - 2.2 纳米酶的选择性调控
    - 2.2.1 分子印迹
    - 2.2.2 亲疏水作用
    - 2.2.3 物理和化学吸附
    - 2.2.4 表面修饰
    - 2.2.5 手性识别
    - 2.2.6 仿生设计
    - 2.2.7 集成式纳米酶
    - 2.2.8 小结
  - 2.3 纳米酶的多功能性特性
    - 2.3.1 引言
    - 2.3.2 酶活性与材料的磁性结合
    - 2.3.3 酶活性与金属等离子体性质结合
    - 2.3.4 酶活性与光热特性的结合
    - 2.3.5 酶活性与光声现象的结合
    - 2.3.6 酶活性与荧光特性的结合
    - 2.3.7 酶活性与材料的导电性结合
    - 2.3.8 表面修饰使纳米酶具有新功能
    - 2.3.9 小结
  - 2.4 纳米酶多酶活性
    - 2.4.1 POD-CAT
    - 2.4.2 POD-OXD
    - 2.4.3 SOD-CAT
    - 2.4.4 OXD-CAT
    - 2.4.5 具有3种及以上类酶活性的纳米酶
    - 2.4.6 小结
- 3 纳米酶工程化
  - 3.1 纳米酶与机器学习
  - 3.2 纳米酶制备与表征
    - 3.2.1 纳米酶的制备
    - 3.2.2 纳米酶的表征
  - 3.3 纳米酶的合成
    - 3.3.1 物理合成法
    - 3.3.2 化学合成法
    - 3.3.3 生物合成法
    - 3.3.4 小结
- 4 纳米酶的应用
  - 4.1 纳米酶传感
    - 4.1.1 比色分析法
    - 4.1.2 化学发光法
    - 4.1.3 荧光检测
    - 4.1.4 电化学检测
    - 4.1.5 表面增强拉曼散射(SERS)检测
    - 4.1.6 其他检测方法
    - 4.1.7 多模态检测

- 4.1.8 小结
- 4.2 纳米酶抗肿瘤
  - 4.2.1 纳米酶用于肿瘤催化治疗的应用现状
  - 4.2.2 纳米酶抗肿瘤的作用机制
  - 4.2.3 纳米酶抗肿瘤的应用策略
  - 4.2.4 小结
- 4.3 纳米酶抗菌、抗病毒
  - 4.3.1 纳米酶介导的表层杀菌
  - 4.3.2 纳米酶介导的深层杀菌
  - 4.3.3 生物正交纳米酶介导的杀菌
  - 4.3.4 纳米酶介导的海洋防污
  - 4.3.5 纳米酶介导的抗真菌治疗
  - 4.3.6 纳米酶介导的抗病毒治疗
- 4.4 纳米酶用于污水环境治理
  - 4.4.1 介绍
  - 4.4.2 水环境污染检测
  - 4.4.3 水环境污染处理
  - 4.4.4 小结
- 5 对纳米酶领域的展望
  - 5.1 关键科学问题
  - 5.2 结语

## 0 引言

生物催化是利用酶作为催化剂进行化学转化的过程,因此也被称为酶催化,具有催化效率高、选择性强、条件温和等特点。人类很早便在生活中使用生物催化,比如4000多年前(夏禹时代)将其用于酿酒,3000多年前(周朝)用其制造饴糖、食酱等。然而,彼时的人们并不清楚引发生物催化的物质是什么,这也成了200多年酶学研究中科学家重点探究的问题。19世纪,随着显微镜和发酵技术的普及,人们发现酒精发酵过程与酵母菌密切相关。1897年,德国化学家比希纳发现无需完整的细胞,仅使用酵母细胞提取液就能引起蔗糖发酵产生酒精。自此,人们开始认识到生物催化是能够由酶独立引发的过程。1926年,在蛋白质纯化结晶技术的日趋完善下,美国化学家萨姆纳成功结晶了脲酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶等,证实了这些酶的化学本质是蛋白质。之后,越来越多的研究证实酶是一种蛋白质,这一观点也成为了教科书中的定论。然而,20世纪80年代,随着RNA研究技术的进步,美国化学家切赫和生物学家奥特曼发现某些RNA也具有生物催化功能,并据此提出了核酶(Ribozyme)的概念,进一步拓展了酶的化学内涵。

酶工程是20世纪60年代应酶的大量需求而诞生的科学技术,它的主要任务是通过各种方法改善酶的催化性能,以解决酶在工业生产上存在的成本高、稳定性差、使用效率低及适用条件有限等问题。酶工程的研究内容包括酶制剂的制备、酶的固定化、酶的修饰与改造等。早期使用的酶,通常是从动植物和微生物的组织或细胞中提取的天然酶,这种生产方法不仅工艺复杂,而且原料有限,很难进行大规模的工业生产。70年代初,随着基因工程的诞生,人们可以利用基因工程菌株或细胞生产酶制剂,不仅克服了天然酶提取的高成本问题,而且可以通过基因改造进行酶的改良,相关的酶定向进化技术已获得2018年诺贝尔化学奖。此外,通过化学修饰等方法也可改善酶的催化性能。尽管酶工程技术促进了天然酶的应用,目前仍无法从根本上解决酶难以工业应用的问题,在8300余种天然酶中,只有约2%能够用于大规模生产,无法满足人们对酶日益增长的需求。

人工酶是化学家在20世纪中叶提出的概念,主要是利用环糊精等有机小分子、结合主客体化学原理研究酶催化的化学本质,进而合成模拟天然酶催化活性中心结构和作用机制的模拟酶。1965年,首个基于环糊精结构的模拟酶被报道,随后分子印迹聚合酶、抗体酶及DNA酶被陆续发现。自此,生物催化研究一直聚焦于蛋白质和有机小分子模拟酶<sup>[2-4]</sup>。然而,传统模拟酶有限的分子结构很难实现对天然酶精细结构的完全模拟,大部分模拟酶的催化活性并不能与天然酶媲美。因此,探索具有高生物催化活性的人工模拟酶,一直是科学家努力的方向。

纳米酶是随着纳米科学与技术的发展,揭示出的一种物质全新而又独特的纳米效应,即纳米材料蕴含酶学催化特征。与传统人工模拟酶不同的是,纳米酶的催化基于特殊的纳米结构,因此其催化活性高并且可以调节。很多实验已经证明,通过改变其纳米结构如尺寸、形貌等因素能够明显提高其催化活性。此外,丰富的纳米结构使得有些纳米酶同时具有多种酶活性。纳米酶的最大特点是兼具催化活性和纳米材料独特的理化性质(如磁性、光热特性),使得纳米酶成为一种双功能或多功能材料。

自首例纳米酶报道以来<sup>[1]</sup>,目前全球已有35个国家的400多个实验室发表纳米酶研究论文13800余篇,特别是近5年论文数量和引用次数均呈指数增长(图1),逐渐形成了纳米酶研究新领域。纳米

酶的发现突破了以往人们视纳米材料为生物惰性物质的传统观念,第一次发现除了蛋白质、核酸以外的另外一大类具有生物催化功能的物质,在纳米材料、化学、酶学和医学之间架起了一座桥梁,据此提出的纳米酶催化医学概念,正在从体外检测拓展到疾病治疗研究,如肿瘤、传染病、退行性病变和脑卒中等,证明了纳米酶干预病理过程的可行性,这将为纳米酶服务于人类健康奠定坚实的基础。

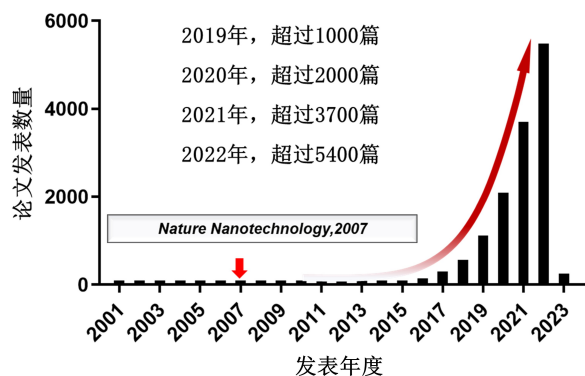


图1 自2007年首例纳米酶报道以来,论文数量逐年增多。原始论文被引用4000余次,是中国百年(1919~2019)百篇高被引论文之一(数据库:Scopus;检索关键词:Nanozyme;检索日期:2022年11月27日)

Fig. 1 Since the first nanozyme report in 2007, the number of papers has increased year by year. The original paper has been cited more than 4 000 times and is one of the 100 highly cited papers in China in 100 years (1919~2019) (database: Scopus; keywords: Nanozyme; 2022. 11. 27)

纳米酶是中国科学家发现并引领的新领域,中国科学家在纳米酶领域的贡献:发现并命名了纳米酶,建立了研究纳米酶催化活性的方法<sup>[1]</sup>,创立了纳米酶术语及标准化<sup>[5]</sup>,解析了纳米酶的构-效关系<sup>[6]</sup>,将纳米酶的催化活性提高了1万倍,实现了纳米酶活性超越天然酶的理性设计,创造了全球首个纳米酶产品并获得医疗器械证书及Atlas国际奖。2020年中国科学家主编了首部*Nanozymology*纳米酶学英文专著,首次明确了纳米酶学这一学术领域,该专著进入当年Springer出版社的热搜榜,迄今被下载40 000余次。纳米酶形成的新概念、新材料和新技术不仅为传统人工酶注入新活力,拓展酶工程技术的创新与应用,还将纳米科技、化学、生物医学等多学科理论和技术有机结合起来,成为交叉融合共通创新的新阵地。

本文从纳米酶的发现,延伸至纳米酶领域的整体发展过程,涵盖了纳米酶的活性/机制探索、理性化学进展, 2023, 35(1): 1~87

设计、工程化、应用方向及目前仍存在的关键问题等多个方面。我们希望这份评述能够拓宽大家对纳米酶的认识,开拓应用领域,促进新型纳米酶的研发。但因篇幅所限,遗憾未能涵盖所有报道,在此仅选用一些典型的例子代表相关领域进展,给予总结和展望。

## 1 纳米酶概述

### 1.1 纳米酶的发现与发展

纳米酶的发现纯属偶然,是我国科学家跨界合作的结果。最初,阎锡蕴团队想研究一种肿瘤免疫探针。然而,实验中却出现了一个“诡异”现象:作为阴性对照的磁纳米粒子不可思议地与过氧化物酶底物发生了反应。

起初,她们认为这可能是反应体系中某种成分被污染所致,于是轮番更换各种试剂,不断重复实验,但结果依然如此。难道四氧化三铁纳米粒子本身具有过氧化物酶的催化活性?为了证实这一猜测,她们首先请教了材料学家解思深院士,然后又用顾宁院士团队张宇教授提供的纳米材料验证,与酶学家Sarah Perrett教授一起设计实验方案。第一次从酶学角度研究了无机纳米材料的催化效率、机制和反应动力学,并与天然酶做了系统的比较。研究结果于2007年在《自然·纳米技术》发表<sup>[1]</sup>,被誉为纳米酶领域的奠基之作,引起国内外同行的极大关注。同期News & Views称这个发现第一次揭示了无机纳米材料蕴含一种不可预见的生物催化活性,改变了以往视其为惰性物质的传统观念<sup>[7]</sup>。英国皇家化学会会刊发表综述,认为这是酶学史上一个里程碑式的事件。2008年汪尔康院士团队发表了利用四氧化三铁的类过氧化物酶活性检测葡萄糖的新方法<sup>[8]</sup>;顾宁院士团队发现四氧化三铁纳米粒子在中性条件下表现出类过氧化氢酶活性<sup>[9]</sup>。随后,来自全球的科学家陆续报道了其他纳米材料也有类似酶的催化活性,证实了纳米材料蕴含的这种类酶催化特性是一种普遍存在的纳米效应。

阎锡蕴团队将这种全新而独特的纳米效应命名为“纳米酶”<sup>[10]</sup>;汪尔康团队赋予其英文名字“Nanozyme”,并提出纳米酶是新一代人工酶<sup>[11]</sup>。随后,纳米酶进入了高速发展时期,主要体现在以下五个方面。

其一,纳米酶概念不断完善<sup>[12]</sup>。早期描述纳米酶是一类蕴含酶学特性的纳米材料,强调在温和条件下催化酶的底物,遵从酶反应动力学<sup>[11, 13]</sup>;随着

研究的不断深入,近年发现纳米酶催化既能在温和的生理条件下进行,也能在极端条件如 $-20^{\circ}\text{C}$ 低温催化<sup>[14]</sup>,后者将具有更独特的应用价值。此外,对纳米酶催化机制有了更深入而系统的认识。通过对不同材料(金属氧化物、贵金属、碳类)纳米酶催化机理研究,证明纳米酶催化既不同于传统的离子催化(如芬顿反应),也不同于有机小分子或过渡金属催化剂。纳米酶催化与其纳米结构及活性中心的微环境密切相关。这些研究进展都进一步丰富了纳米酶的概念<sup>[12]</sup>。

其二,纳米酶新材料不断丰富,目前已有超过1000种不同材料的纳米酶被报道,从金属氧化物、贵金属、碳材料拓展到金属单原子-碳掺杂材料、金属有机框架材料等。这不仅证明了纳米材料蕴含酶学特性的普适性,还进一步证明纳米酶是一类集理化和催化双功能于一体的新材料。这种双功能新材料为今后人们巧妙设计各种探针、器械和药物提供了条件。有趣的是,纳米酶的催化活性也受到其理化性质的调节,例如磁场能够调节铁基纳米酶的催化活性。期待未来的研究能很好地利用这些特点,创造更好的纳米酶新技术、新器件、新产品。

其三,纳米酶催化活性不断提高,催化类型增多。纳米酶研究从早期的随机合成发展到了可控的理性设计,使其催化活性大幅提高,接近甚至超越天然酶<sup>[15,540]</sup>。纳米酶的催化类型也从最初的一种氧化还原类型,发展到四种催化类型,即水解酶、异构酶、氧化还原酶和裂合酶。自然界存在的天然酶有六大类,目前还有合成酶和转移酶两类催化类型有待研究。随着纳米酶领域研究数据的积累,大数据分析结合机器学习预测和设计高活性纳米酶成为可能<sup>[16,17]</sup>,有望加速纳米酶领域的进一步发展。

其四,建立纳米酶术语和活性检测的国家和国际(ISO)标准。纳米酶术语制定了命名规则,即“材料组成-酶名称+纳米酶”<sup>[5]</sup>,比如,四氧化三铁过氧化物纳米酶。另外,为了便于同行学术交流,使纳米酶产品的催化活性可量化,还建立了纳米酶催化活性的测量技术标准<sup>[18]</sup>,定义了纳米酶的催化活性单位(Nanozyme unit, U)和纳米酶的比活性(specific activity, U/mg)。纳米酶术语和催化活性标准化的提出不仅规范了学术界纳米酶的认识和理解,还极大推进了纳米酶的应用研究及产业化。2020年,中国医疗器械行业协会现场快速检测(POCT)分会成立了纳米酶与POCT应用研究专委会。随着纳米酶产品的广泛应用,还需要制定纳米酶的行业标准,指

导纳米酶商品的规范化,使其广泛应用于催化医学,不仅包括体外检测,还包括抗肿瘤、神经退行性疾病变、抗感染、抗氧化、抗衰老等。另外,纳米酶还被用于环境治理、能源、化工、国防、农业等多个领域。

其五,天然纳米酶的发现。最近,在自然界生命体中还发现一些天然纳米酶,比如细胞中的铁蛋白和磁细菌中的磁小体等。有趣的是,这些本身用于磁导航(磁小体)以及用于储存铁(铁蛋白)的纳米结构,也具有类过氧化物酶的活性并且能够在菌体中发挥抗氧化作用<sup>[19,20]</sup>。天然纳米酶的发现不仅拓展了纳米酶的研究空间,也提示了天然生物矿物的新功能。天然纳米酶的发现突出了纳米酶更深层次的意义,其不仅是一类新型的模拟酶,还可能作为一种体内天然催化剂,参与生命的代谢,在生理和病理中发挥重要作用。同时,针对天然纳米酶的探索不仅为纳米酶的设计合成提供了新的方向,也进一步拓宽了生命体内天然酶的化学本质。

综上,纳米酶日新月异的快速发展催生了许多新概念、新材料、新技术,期待在不久的将来,这一新兴领域能够造福人类。

## 1.2 纳米酶术语及标准化

标准化工作具有引导性、前瞻性。术语是传播知识、技能,进行社会文化、经济交流不可或缺的重要工具。随着纳米酶领域的蓬勃发展,制定标准化的纳米酶术语可以指导纳米酶的研发、交流及纳米酶技术标准的制定工作,为纳米酶领域的可持续健康发展提供重要支撑,也可为纳米酶相关企业提供重要技术基础。

### 1.2.1 “纳米酶”术语的演变

自 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米材料的类酶效应于2007年被首次报道之后<sup>[1]</sup>,中国科学家于2013年首次以“nanozyme”为题在英国皇家化学会旗下的《化学学会评论》(*Chemical Society Reviews*)发表了长篇综述文章,提出并使用“nanozyme”一词来描述这种具有类酶特性的纳米材料<sup>[11]</sup>。历经十余年积累和演变,纳米酶(nanozyme)以及相关的术语已经被学术界所接受和使用,迄今,“nanozyme”已在众多国际学术刊物上被广泛接受。例如,以“nanozyme”作为关键词,仅从web of science数据库中即可检索到自2013年以来的相关论文有超过2500篇。2013年,阎锡蕴院士团队提出了“nanozyme”的中文“纳米酶”一词<sup>[10]</sup>,指出纳米酶是一类既有纳米材料的独特性能,又有催化功能的模拟酶。现该名词被收录在《生物物理名词》(第二版)中<sup>[21]</sup>。

### 1.2.2 “纳米酶”术语国家标准的制定

在国内和国际上布局纳米酶相关标准,不仅能够确立中国在纳米酶研发与应用领域的引领地位,而且有利于规范纳米酶的研发及其相关评价,对于学术研究、技术转化和产品研发均具有重要意义,相关标准的制定将填补国内外空白。纳米酶术语体系的提出,有利于规范纳米酶相关技术和产品的研发与评价,使不同学科背景和领域的研发与生产人员形成统一的认识和理解。

2018年,全国纳米技术标准化技术委员会(简称“纳标委”)下属“健康、安全与环境”工作组(SAC/TC 279)秘书处通过前期调研及联合国内多家大学和研究机构,向国家标准化委员会(简称“国标委”,SAC)提交了制定《纳米科技 术语 纳米酶》国家标准的申请,2020年1月13日获得正式立项(立项号:20193987-T-491)。该标准界定了纳米酶相关的术语和定义。在基本术语“纳米尺度”、“纳米材料”和“酶”的基础上,定义了13个描述纳米酶的术语,包括“纳米酶”及其活性相关的常用术语;另外,根据催化反应性质的不同,定义了六类具有特定活性类型纳米酶的术语,包括氧化还原纳米酶、水解纳米酶、裂合纳米酶、异构纳米酶、连接纳米酶、转移纳米酶。此外,针对催化底物之间进行某些基团转移或交换的纳米酶,还给出了纳米酶的命名规则,即“材料组成-酶名称+纳米酶”。

在标准制定过程中,起草组与领域专家进行了线上线下的充分沟通和商榷,并向国内高校、研究机构、相关高新技术企业及部分国外学者等本领域专家广泛征求意见。经过国家标准预审和专家审查会,于2022年1月完成整个草案内容,形成国家标准报批稿,目前已经由中国科学院上报国标委,现处于批准阶段。与此同时,起草组部分成员共同撰写了《纳米酶标准术语》一文<sup>[5]</sup>,发表于核心期刊《中国科技术语》上。

### 1.2.3 纳米酶催化活性测量方法的国家标准和国际标准制定

除了纳米酶术语相关标准,近年来,纳米酶催化活性的测量技术标准也取得了重要进展。纳米酶始于氧化铁纳米颗粒的类过氧化物酶活性研究,但一直以来没有相关的标准方法来指导纳米颗粒类过氧化物酶活性的检测。由于纳米颗粒类酶活性显著依赖其种类、尺寸、比表面积、晶体结构等多种因素,其催化活性的测量和评价都比较复杂。由东南大学牵头的《纳米技术 氧化铁纳米颗粒类过氧化物酶活性化学进展, 2023, 35(1): 1~87

测量方法》于2015年08月获得国家标准立项,于2019年完成全部制定工作,获得发布并实施,标准号为GB/T 37966-2019。为响应国标委提出的促进国家标准的国际交流与合作,服务于“一带一路”倡议的号召,标准起草组向国标委申请了该标准草案的外文版计划并获批(项目号:W20190885)。此外,在纳米酶催化活性的测量方面,阎锡蕴院士和梁敏敏教授等<sup>[18]</sup>还在*Nature Protocols*发表研究论文,定义了纳米酶的催化活性单位(Nanozyme unit, U)和纳米酶的比活性(specific activity, U/mg),使得纳米酶产品的类酶活性可量化,有利于对纳米酶相关产品的评价以及开发,同时提高了纳米酶分析方法的重复性及准确性,有力推动了纳米酶相关产品的开发。

在纳米酶相关的国际标准制定方面,中国专家团队于2019年11月在国际标准化组织纳米技术委员会(ISO/TC229)第21次全体会议的“健康、安全和环境工作组(WG3)”工作会议上提出了国际标准草案“Nanotechnologies—Assessment of peroxidase-like activity of metal and metal oxide nanoparticles”,首次向国际标准专家介绍了金属和金属氧化物纳米颗粒类过氧化物酶活性的测量原理和方法,该标准规范了标准测量方案,对类过氧化物酶纳米材料的研发和质量控制,以及理解纳米酶的生物效应均具有重要意义。经过ISO国际项目申请程序和ISO各成员国投票,于2020年获得立项(项目号:ISO/DTS 5094)。该项目是中国在ISO/TC229/WG3中获得立项的首个国际标准提案。经过两年多与各国专家的多次工作会议沟通和商榷,此项国际标准草案已解决了专家提出的所有技术问题,预计于2023年1月出版。

目前与纳米酶相关的国家/国际标准数量还不充分(表1),且多以中国科学家为主体在进行相关制定工作,一方面体现了中国科学家在该领域的引领作用,同时也说明中国科学家在此方面应发挥更大的作用。

### 1.2.4 与“纳米酶”有关的国家标准样品和国家标准物质的研制现状

近年来,中国在纳米酶标准样品/物质的研制方面也取得了重要进展。国家标准样品(简称“标准样品”)是为实施和制定标准的需要而制定的,一般只在标准所涉及的范围内使用,是一种实物标准。标准样品由国家标准样品技术委员会实施、监督和管理,经过国家标准化管理委员会评审、审批和发

布。迄今,在纳米酶领域可用的颗粒相关的标准样品有 10 项<sup>[22]</sup>,主要包括纳米氧化钛、金标记纳米银和单晶金纳米棒三种(表 2)。

表 1 目前与纳米酶相关的国家/国际标准汇总

Table 1 Summary of current national/international standards related to nanozyme

序号	题目	标准类型	立项号/标准号
1	纳米科技 术语 纳米酶	国家	20193987-T-491
2	纳米技术 氧化铁纳米颗粒类过氧化物酶活性测量方法	国家	GB/T 37966-2019
3	纳米技术 氧化铁纳米颗粒类过氧化物酶活性测量方法(外文版)	国家	W20190885
4	Nanotechnologies— Assessment of peroxidase-like activity of metal and metal oxide nanoparticles	国际	ISO/DTS 5094

表 2 纳米酶领域可用的纳米颗粒相关的标准样品(GSB)列表

Table 2 List of reference materials (GSB) related to nanozyme

序号	样品编号	样品名称
1	GSB 02-3482-2018	纳米氧化钛能带宽度(3.2 eV)标准样品
2	GSB 02-3483-2018	纳米氧化钛能带宽度(3.3 eV)标准样品
3	GSB 02-2630-2010	吸收峰位于黄绿区的硒化镉纳米晶体标准样品
4	GSB 02-3606-2019	表面等离子共振峰位于 630 nm 的金标记纳米银标准样品
5	GSB 02-3607-2019	表面等离子共振峰位于 730 nm 的金标记纳米银标准样品
6	GSB 02-2629-2016	表面等离子共振峰位于 800 nm 的单晶金纳米棒标准样品
7	GSB 02-3282-2016	表面等离子共振峰位于 560 nm 的单晶金纳米棒标准样品
8	GSB 02-3283-2016	表面等离子共振峰位于 880 nm 的单晶金纳米棒标准样品
9	GSB 02-2993-2013	表面等离子共振峰位于 640 nm 的单晶金纳米棒标准样品
10	GSB 02-2994-2013	表面等离子共振峰位于 720 nm 的单晶金纳米棒标准样品

国家标准物质(简称“标准物质”)是计量标准,可以作为计量的传递,用于校正仪器、评价测量方法、确定物料的量值,只要适宜可以代替标准样品在制定、实施标准中使用。标准物质经过全国标准物质管理委员会审查,由国家质检总局计量行政部门批准发布。目前,在纳米酶领域可用的颗粒相关的标准物质有 21 项<sup>[23]</sup>,主要涉及金纳米颗粒、纳米二氧化钛、纳米银、纳米  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、硒化镉和硫化锌量

子点(附录一)。在研制纳米  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 标准物质的基础上,张宇团队<sup>[24]</sup>还使用单源法成功制备了尺寸均一、形貌良好的普鲁士蓝纳米颗粒,正在研制用以对比纳米酶过氧化物酶活性的普鲁士蓝纳米酶标准物质,此标准物质可作为纳米酶活性测量的重要溯源参考物质。

从美国<sup>[25]</sup>、德国、英国、澳大利亚、加拿大<sup>[26]</sup>、日本、韩国等其他国家的计量官方网站中可检索到 7 项可能具有纳米酶性质的纳米材料标准物质(Reference materials)(附录二)。

标准样品/标准物质是分析检测的“标尺”和“砝码”,其应用涉及经济活动和人类生活的各个方面,随着全球经济、科学技术、测量技术和社会生活需求的高速发展,对标准样品/标准物质品种、数量、质量的需求越来越多、越来越高。可以看到,中国在纳米酶相关材料标准样品/物质的制定中数量远超其他国家,这与我国在该领域的飞速发展密不可分。

### 1.2.5 小结

标准是国内外科研界及企业界争夺的制高点。作为中国原创,纳米酶术语、性质及相关标准样品/物质的制定和布局至关重要。中国在纳米酶标准化建设方面的进展,有助于确立我国在纳米酶研发与应用领域的国际引领地位,对中国从制造大国走向制造强国的战略布局的实施具有重要意义。

### 1.3 纳米酶的催化活力测定

纳米酶的动力学参数和催化机理是判断纳米材料是否属于纳米酶及量化其催化效率的重要评判依据。对纳米酶催化机制及活性中心位点的解析不仅可以揭示纳米材料模拟天然酶的本质,而且为提高纳米酶的活性和选择性及其理性设计提供理论基础,使纳米酶能够更好地运用到生物医学、农业、工业等各个领域。

与天然酶类似,纳米酶催化的反应与反应体系的 pH、温度和缓冲条件等密切相关。

#### 1.3.1 纳米酶的催化活性种类

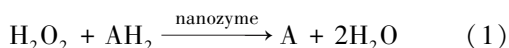
迄今为止,纳米材料可模拟的酶活性包括过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、氧化酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、蛋白酶、酯酶、核酸酶等数十种。下面将以几种典型酶活性为例简要介绍。

##### 1.3.1.1 类过氧化物酶(POD)活性

目前,发现最多的纳米酶为类过氧化物酶。类过氧化物酶为双底物纳米酶,它能够在第一底物氢受体(如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)存在的条件下,催化氢受体

产生大量的氧化自由基,进而将第二反应底物氢供体快速氧化。根据氢供体的不同,类过氧化物纳米酶可以模拟过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、脂质过氧化物酶等多种酶活性。类过氧化物酶的氢受体多种多样,例如:辣根过氧化物酶的氢受体是  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 脂质过氧化物酶的氢受体是脂质过氧化物。氢受体被催化产生的自由基可以氧化多种氢供体底物,包括小分子代谢物(甲酸、甲醇、乙醇等)及生物大分子(核酸、蛋白质、多糖、脂质等)。

以发现最早的类辣根过氧化物纳米酶为例,它的活性检测方法通常借鉴天然辣根过氧化物酶(HRP)的活性检测方法,以  $\text{H}_2\text{O}_2$  为氢受体,被类过氧化物纳米酶催化产生大量中间产物羟基自由基,进而将氢供体(如:TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)、DAB(二氨基联苯胺)、ABTS(2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐)等)氧化。其反应式如下:



如图 2a 中颜色反应所示,过氧化物纳米酶可催化发生图中的显色<sup>[18]</sup>。类过氧化物纳米酶的活性主要发生在酸性条件下,通常采用的是浓度为  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的醋酸钠-醋酸缓冲液,pH 值在 3~6 之间,最适 pH 值在 4 附近;最适温度在生理条件附近,为便于应用通常采用天然酶的最适温度  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>[1, 18]</sup>。

### 1.3.1.2 类过氧化氢酶(CAT)活性

类过氧化氢纳米酶拥有和过氧化氢酶一样的催化反应,可以将  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解为水和氧气,反应中有气泡产生,如图 2b 所示。过氧化氢酶活性的反应条件为中性或碱性环境,纳米酶会比天然过氧化氢酶有更宽的 pH 范围,常用的缓冲液为磷酸盐缓冲溶液(PBS)、碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液。

### 1.3.1.3 类氧化酶(OXD)活性

类氧化纳米酶以氧气为氢受体,直接将氢供体底物(如 TMB)氧化,不需要额外添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  等化合物。它的温度和 pH 范围与过氧化物酶相似。

### 1.3.1.4 类超氧化物歧化酶(SOD)活性

类超氧化物歧化纳米酶可以和 SOD 一样,将超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )转化为  $\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,发挥抗炎、抗氧化的作用。它的反应条件为弱碱性,通常 pH 值在 8~9 之间。

### 1.3.1.5 类蛋白酶活性

这类纳米酶可以水解蛋白质的肽键,将蛋白质、多肽分解为多肽或氨基酸。2016 年,Qu 等<sup>[27]</sup>报道

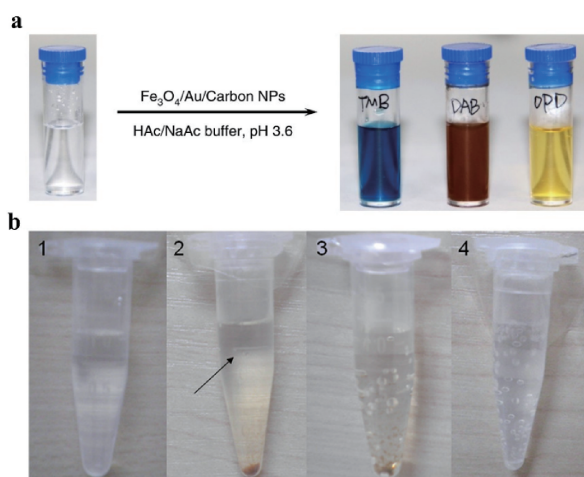


图 2 (a)类辣根过氧化物纳米酶催化底物的颜色反应<sup>[18]</sup>; (b)类过氧化氢纳米酶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生氧气的反应:pH = 7.4 PBS,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  (1: 对照; 2: D- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ; 3: D- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; 4: 过氧化氢酶)<sup>[9]</sup>

Fig. 2 (a) Colorimetric reactions of peroxidase-like activity<sup>[18]</sup>; (b) photograph of bubble reactions with  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  in pH 7.4 PBS buffer (1: control; 2, D- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ; 3, D- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; 4, catalase)<sup>[9]</sup>

了具有类蛋白酶活性的纳米酶  $\text{AuNPs} @ \text{POMD-8pep}$ ,它的最适反应 pH 值为 8.0,最适反应温度为  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 1.3.1.6 类核酸酶活性

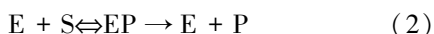
核酸酶可以将聚核苷酸链的磷酸二酯键切断,将 DNA 或 RNA 水解为核苷酸。2016 年,Qu 等<sup>[28]</sup>报道了类核酸纳米酶:  $\text{AuNPs} @ \text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,并将其应用于抑制生物膜的研究中,这种核酸酶的最适 pH 值为 7.4,最适温度为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

纳米酶有一些不同于天然酶的特点,一种纳米酶可以同时具有多种天然酶的活性,例如: $\text{Fe}_2\text{O}_3$  和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶都具有过氧化物酶和过氧化氢酶两种活性<sup>[9]</sup>;  $\text{Co}/\text{PMCS}$  纳米酶具有过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶三种活性<sup>[29]</sup>;  $\text{FeN}_3\text{P}$  单原子纳米酶具有过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、氧化酶四种活性。另外,不同的纳米酶可以具有相同的类酶活性<sup>[15]</sup>,例如:  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ <sup>[9]</sup>、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ <sup>[9, 18]</sup>、 $\text{FeN}_3\text{P}$ <sup>[15]</sup> 等纳米酶都具有过氧化物酶活性;  $\text{Co}/\text{PMCS}$ <sup>[29]</sup>、 $\text{Co}_3\text{O}_4$ <sup>[30]</sup>、 $\text{Pd} @ \text{TiO}_2$ <sup>[31]</sup> 等纳米酶都具有过氧化氢酶活性。除此之外,不同种类的纳米酶组成原子、晶型、尺寸及表面修饰也不尽相同。这使得纳米酶的活性测量和评价变复杂,因此,建立一种纳米酶催化活性测量和评价的标准方法对

纳米酶研究的重要性不言而喻。如前文所述, Yan 等<sup>[18]</sup> 针对过氧化物纳米酶发展了一套检测纳米酶活性及催化动力学的标准方法, 进而对不同来源、不同尺寸、不同修饰和不同材料的过氧化物纳米酶进行了活性检测与比较, 并计算其动力学常数以比较其催化效率。

### 1.3.2 典型的纳米酶反应动力学

一般而言, 纳米酶具有和天然酶一样的动力学机制, 催化动力学曲线符合米氏方程 (Michaelis-Menten equation)。例如, 2007 年 Yan 等<sup>[1]</sup> 发现的第一个纳米酶 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶) 的动力学曲线与天然 HRP 的动力学曲线类似, 符合米氏方程曲线, 而且其催化机理符合天然酶的乒乓机制, 如图 3 所示。在机理方面, 纳米酶与天然酶 (E) 一样, 首先与相应的底物 (S) 结合, 生成中间复合物 ( $\text{ES}^*$ 、EP), 然后通过表面催化反应将其转化为产物 (P), 只加快反应速度不会改变反应平衡。反应用下式表示:



在酶浓度恒定的条件下, 当底物浓度较低的情况下, 溶液中的酶没有被饱和, 反应速率取决于底物浓度, 随底物浓度线性增加; 当底物浓度足够高时, 溶液中的酶被完全饱和, 反应速率与底物浓度无关, 并渐近接近平台, 如图 3 中动力学曲线所示。通过动力学分析, 测定催化反应速率, 可以确定纳米酶的催化效率及其与反应条件之间的关系。

在动力学分析中, 反应速率可以根据底物的消耗或者产物的生成来确定。目前动力学的检测方法大多数情况下采用比色法, 使用分光光度计来操作。如果反应只含一个底物, 动力学分析通过改变底物浓度来进行; 如果有两个或两个以上底物, 需固定其中一种底物的浓度, 改变另一种底物的浓度来检测, 从而得到可以表征纳米酶催化效率的动力学参数。目前报道的大多数纳米酶的动力学曲线均符合米氏方程, 只有少数例外。

#### 1.3.2.1 米氏动力学反应

米氏动力学是最著名的酶动力学模型之一, 米氏方程表示了底物浓度 ( $[\text{S}]$ ) 与酶反应速率 ( $v$ ) 之间的定量关系, 可以用下面的公式表示:

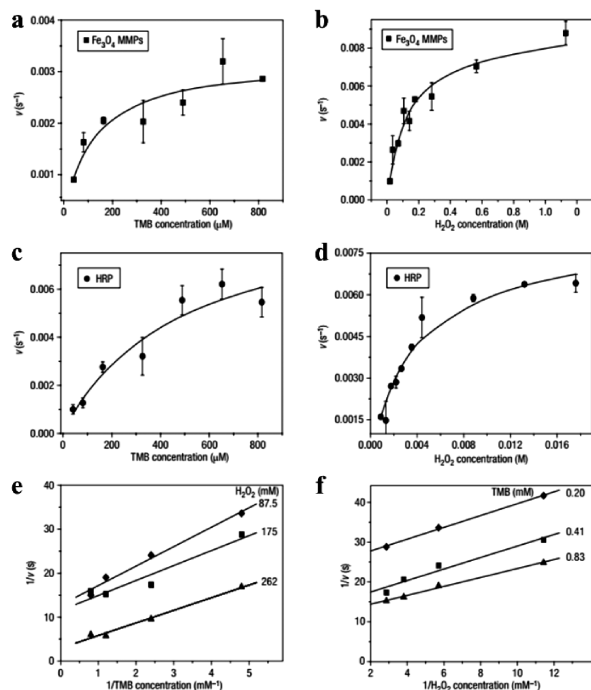


图 3  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶与 HRP 的催化动力学曲线比较<sup>[1]</sup>

Fig. 3 Comparison of catalytic kinetics between  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and HRP<sup>[1]</sup>

$$v = \frac{V_{\max} [\text{S}]}{K_{\text{M}} + [\text{S}]} \quad (3)$$

$V_{\max}$  为反应体系中酶达到饱和时的最大反应速率,  $K_{\text{M}}$  又称为米氏常数, 是反应速率达到  $V_{\max}$  一半时的底物浓度, 单位为 mol/L, 通常表示酶与底物之间的亲和力,  $K_{\text{M}}$  值越小表示底物亲和力越高, 可以用来判断纳米酶的最适底物。当底物浓度远远低于  $K_{\text{M}}$  时, 反应速率和底物浓度呈线性关系, 又称为一级反应 (First-order kinetics)。在此条件下,  $V_{\max}$  和  $K_{\text{M}}$  均为常数, 二者的比可以用一常数  $K'$  表示, 反应速率可以用下面的公式表示:

$$v = \frac{V_{\max}}{K_{\text{M}}} [\text{S}] \text{ 或 } v = K' [\text{S}] \quad (4)$$

当底物浓度远远高于  $K_{\text{M}}$  时, 反应速率达到  $V_{\max}$  且不受底物浓度变化的影响, 此时的反应达到稳态, 又称为零级反应 (Zero-order kinetics)。因此, 当反应处于零级反应时, 反应速率不受底物浓度的影响,

表 3  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶与 HRP 的催化动力学参数比较<sup>[1]</sup>

Table 3 Comparison of the kinetic parameters of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNPs and HRP<sup>[1]</sup>

	[E] (M)	Substrate	$K_{\text{M}}$ (mM)	$V_{\max}$ ( $\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ MNPs	$11.4 \times 10^{-13}$	TMB	0.098	$3.44 \times 10^{-8}$	$3.02 \times 10^4$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ MNPs	$11.4 \times 10^{-13}$	$\text{H}_2\text{O}_2$	154	$9.78 \times 10^{-8}$	$8.58 \times 10^4$
HRP	$2.5 \times 10^{-11}$	TMB	0.434	$10.00 \times 10^{-8}$	$4.00 \times 10^3$
HRP	$2.5 \times 10^{-11}$	$\text{H}_2\text{O}_2$	3.70	$8.71 \times 10^{-8}$	$3.48 \times 10^3$

只与酶的浓度( $[E]$ )有关,且酶完全与底物形成复合物(ES)。酶的催化活力可用 $k_{\text{cat}}$ 来表示,又称为催化常数(Catalytic constant),即酶被饱和时每秒钟每单位酶催化底物转变为产物的摩尔数。假设反应体系中总的酶浓度 $[E_T]$ 是已知的,在饱和 $[S]$ 下, $v = V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[E_T]$ ,因此:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_T]} \quad (5)$$

但是,在一般情况下,大多数纳米酶不被底物所饱和, $[S]/K_M$ 的比值在0.01~1.0之间,将以上公式带入米氏方程中,得到以下公式:

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad (6-1)$$

当 $[S] \ll K_M$ 时,游离酶的浓度 $[E]$ 大体接近于 $[E_T]$ ,于是就得到:

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[E_T][S]}{K_M} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M}[E][S] \quad (6-2)$$

此时,反应速率 $v$ 取决于酶E和底物S的浓度,是一种二级反应。因此, $k_{\text{cat}}/K_M$ 又称为E和S反应形成产物的表观二级速率常数(Apparent second-order rate constant)或专一性常数(Specificity constant),可以用来比较不同酶或者同一种酶催化不同底物的催化效率。

以类过氧化物纳米酶为例,过氧化物酶活性反应中有两种底物:氢受体和氢供体,因此在测量其的动力学时需要在固定一种底物的情况下改变另一种底物的浓度。在以 $\text{H}_2\text{O}_2$ -TMB为底物的颜色反应体系中, $\text{H}_2\text{O}_2$ 的动力学测定时需固定TMB的浓度,而TMB的动力学测定时则需固定 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度。如图3所示, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 过氧化物纳米酶的动力学曲线完全符合与HRP一样的米氏方程,经过计算所得的动力学数据如表3所示<sup>[1]</sup>,其中 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的米氏常数 $K_M$ 值比天然HRP小,说明 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶对底物TMB的亲合力高于HRP;但是对于另一底物 $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的米氏常数 $K_M$ 值却比天然HRP大,这与 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶实验所用的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 较HRP高是一致的。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶对TMB具有较强的亲合力而对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的亲合力较弱,这一现象在其他多种纳米酶中也存在,它可能与纳米材料独特的表面物理化学性质有关。纳米材料具有较大的比表面积,且表面电荷丰富、形貌复杂,容易与带正电荷的TMB吸附,因此具有较强的亲合力。另一方面, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的催化常数 $k_{\text{cat}}$ 值比天然HRP大,这可能与纳米酶表面拥有多个活性位点可同时发挥作用有关。另外,在催化机理方面, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶在发挥

过氧化物酶活性时符合天然酶的乒乓机制(如图3e,f所示),即 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 先与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反应,催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ ),形成 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶-自由基复合物,再催化TMB氧化并发生颜色反应。

对于类过氧化氢纳米酶来说,由于其在发挥作用时催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 生成 $\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{O}_2$ ,当 $\text{O}_2$ 达到一定浓度后溶液中会有气泡产生,如图1b中所示,会给它的动力学数据测定带来一定的难度<sup>[9]</sup>,在检测时需要控制好纳米酶和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的浓度,在不产生气泡的条件下检测。可以通过氧电极检测溶液中 $\text{O}_2$ 的含量<sup>[9, 32]</sup>,监测氧气产生的速率,从而得到过氧化氢纳米酶的动力学曲线,如图4所示<sup>[32]</sup>。

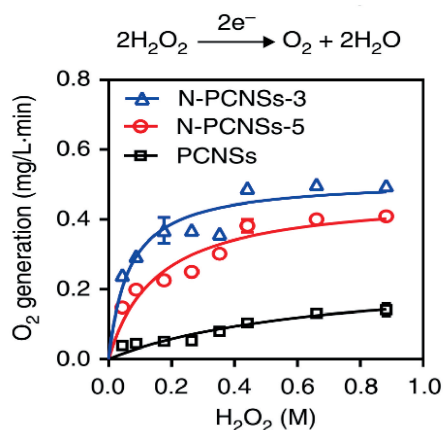


图4 类过氧化氢纳米酶动力学曲线<sup>[32]</sup>

Fig. 4 Kinetics for catalase-like activity of N-PCNSs<sup>[32]</sup>

### 1.3.2.2 非米氏动力学反应

除了米氏动力学外,一些纳米酶的催化作用也可能遵循其他动力学方程。例如,具有类硫化物氧化酶活性的三氧化钼( $\text{MoO}_3$ -TPP)纳米颗粒,可以在铁氰化物存在的条件下催化亚硫酸盐氧化,在 $\text{MoO}_3$ -TPP和铁氰化物浓度不变的情况下,纳米酶对底物的动力学曲线为S型(又称为反曲行为)(Sigmoidal behavior),如图5b所示<sup>[33]</sup>。这种现象的原因在于两种底物与活性位点的协同结合,亚硫酸盐阴离子与带负电的铁氰胺一起结合在 $\text{MoO}_3$ 纳米颗粒表面的结合位点上。这种曲线可以通过希尔方程(Hill equation)来计算出该纳米酶的动力学参数。计算出 $\text{SO}_3^{2-}$ 的 $K_M$ 值为 $0.59 \pm 0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,Hill系数(又称为协同常数)为 $2.35 \pm 0.15$ ,证明该反应确实为正协同反应,一旦一种底物结合到纳米酶表面之后,纳米酶对另外一种底物的亲合力就会增大。值得注意的是,同样的反曲行为在天然酶中也存在,说明它是一种普通的酶动力学。

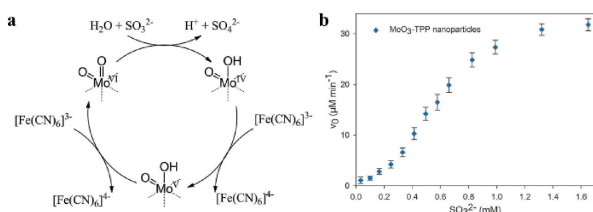


图5 类硫化物氧化纳米酶的催化机制及动力学曲线<sup>[33]</sup>

Fig. 5 Proposed catalytic sulfite oxidase mechanism and kinetic curve for  $\text{MoO}_3$  nanoparticles<sup>[33]</sup>

### 1.3.3 纳米酶的活性位点及颗粒数计算

纳米酶作为天然酶的模拟物,确定其活性位点对于揭示其催化机制是十分必要的。天然酶的活性位点是由氨基酸与辅因子组成的柔性结构,并可与底物结合部位共同完成催化作用,而与天然酶不同的是,纳米酶的活性中心与底物的结合位点为刚性纳米材料表面的统一结构。例如:辣根过氧化物酶、过氧化氢酶的活性中心都是由血红素分子和周围的氨基酸残基共同组成的,其中血红素卟啉结构中心的Fe原子在催化过程中发挥重要作用,它与不同的氨基酸残基相互作用产生不同的催化活性;而与天然酶不同的是,纳米酶表面拥有多个活性位点可同时发挥作用。以 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶为例,它既有过氧化物酶活性又有过氧化氢酶活性,它的活性是由纳米颗粒表面的Fe原子价态的改变而完成的,这点与天然酶相似,不同点在于, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶表面的Fe原子与O原子配位,而血红素中的Fe与N原子配位;另外, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶表面的Fe原子具有二价与三价两种价态,这对于其活性具有较大的影响。2007年,Yan等<sup>[1]</sup>报道, $\text{NaBH}_4$ 还原处理后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶活性升高,而 $\text{NaIO}_4$ 氧化后活性却降低,说明 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶的活性位点为 $\text{Fe}^{2+}$ 。目前,虽然 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶的催化机制有了一些进展<sup>[543]</sup>,然而具体催化机制尚不完全清楚,科学家利用密度泛函理论(DFT)计算模拟分析与实验共同验证将有望揭示相关机理。此方法适用于其他活性、种类的纳米酶活性位点及催化机制的解析。

关于纳米酶颗粒数的计算,可以根据纳米颗粒的尺寸计算出一个纳米颗粒的体积 $V_n$ ,然后查询出纳米颗粒的密度 $\rho_n$ ,计算出单位质量(1 mg)纳米酶的体积 $V$ ,则每毫克纳米酶所含颗粒数 $N$ 便可用下式表示:

$$N = \frac{1}{\rho_n \times V_n} \quad (7)$$

另外,随着纳米酶种类的增多,为了使多种纳米酶活性具有可比性,可以以参加反应的活性中心原子数为单位,例如,2021年,Yan等<sup>[15]</sup>报道的单原子 $\text{FeN}_3\text{P}$ 纳米酶以Fe原子的摩尔浓度为单位定义了纳米酶的比活力;2022年,Liu等<sup>[34]</sup>提到纳米颗粒表面活性位点的数量、纳米颗粒数、纳米酶的质量、总金属浓度均可以作为衡量纳米酶比活力的单位。

### 1.3.4 小结

纳米酶具有固有的类酶特性。它们不仅与天然酶具有相似的催化行为,包括底物、最佳pH、温度和激活剂/抑制剂,而且具有相似的酶促动力学和催化机理。纳米酶催化的典型过程包括底物吸附、电子转移和产物释放等,与天然酶的催化过程相同。然而,纳米酶具有非晶态的刚性纳米结构,而酶的蛋白质支架是柔性精确的三维结构,在底物结合和产物分离时遵循锁钥学说(又称“诱导契合”假说),因此活性中心会发生相应的结构变化,这也是纳米酶的活性、选择性往往低于天然酶的原因。因此,动力学计算使研究者对纳米酶的机理和性质有了很好的了解,这为纳米酶的设计和活性的预测奠定了很好的理论基础;另一方面,也可以通过模拟天然酶的结构和催化特性,来提高纳米酶的活性。我们希望本节对纳米酶动力学的计算方法的介绍对认识和理解纳米酶有一定的帮助。

### 1.4 纳米酶催化机制

催化的本质是催化剂改变反应途径,引导反应沿活化能较低的途径进行,加快反应速率。因此,纳米酶催化机制研究的重要目标是揭示反应物在纳米酶材料表面发生原子重排的历程,鉴定活化能最低的反应途径和动力学,建立其化学组成与结构影响催化效率的规律,为纳米酶研究和设计提供依据。由于目前实验手段难以原位、动态地检测纳米表面的原子过程,使用DFT计算与实验结合是表征纳米酶微观催化机制的主要手段。

前期发表的综述已对纳米酶催化机制进行了全面深入的讨论<sup>[11, 13, 35-37]</sup>,因此本节主要从微观视角回顾纳米酶催化机制及基于机制发展的原理来描述纳米酶催化活性的理论和规律。

最近研究表明,纳米酶催化机制可随类酶催化反应类型、反应底物类型和纳米材料类型的变化而变化;当前两者相同,纳米材料类型相近时,则遵循相似的机制。因此,纳米酶催化机制研究有两个值得关注的重点:(1)纳米酶催化机制及其变化规律;(2)催化机制确定时,纳米材料组成和结构影响催

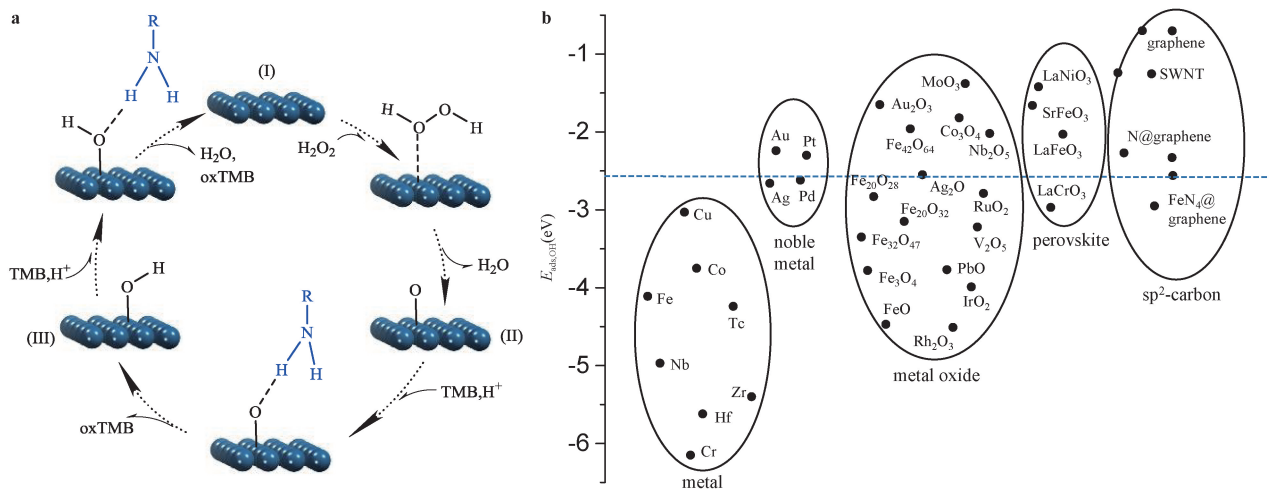


图6 纳米材料模拟过氧化物酶的催化机制与预测理论:(a)代表性催化机制;(b)以 $E_{\text{ads,OH}}$ 为描述符,预测纳米表面类过氧化物酶催化活性的理论模型;依据该模型,当 $E_{\text{ads,OH}}$ 越接近 $-2.6\text{ eV}$ 时,活性越强<sup>[41]</sup>

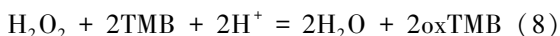
**Fig. 6** Catalytic mechanism and prediction theory for peroxidase-like activity of nanomaterials. (a) Typical catalytic mechanism. (b) Theoretical model predicting peroxidase-like catalytic activity of nanomaterial surfaces using hydroxyl adsorption energy ( $E_{\text{ads,OH}}$ ) of the site as the activity descriptor; according to the model, the activity is stronger when  $E_{\text{ads,OH}}$  is closer to  $-2.6\text{ eV}$ .

Reproduced with permission<sup>[41]</sup>. Copyright 2020, American Chemical Society

化效率的规律。下文将以纳米材料模拟过氧化物酶、氧化酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的催化反应为例,简述纳米酶催化机制研究在以上两方面取得的新进展。

#### 1.4.1 过氧化物酶纳米酶

现有 DFT 计算方法难以准确模拟溶液环境,因此纳米酶机制的计算研究通常采用气相条件近似。气相近似下的计算研究表明,纳米材料类过氧化物酶催化遵循与天然过氧化物酶相似的反应机制。不同课题组研究了包括贵金属<sup>[38]</sup>、金属化合物<sup>[39-42]</sup>、碳材料<sup>[43-45]</sup>和复合材料<sup>[15, 46-49]</sup>在内的纳米表面催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化 TMB 分子的催化机制,该反应式如下:



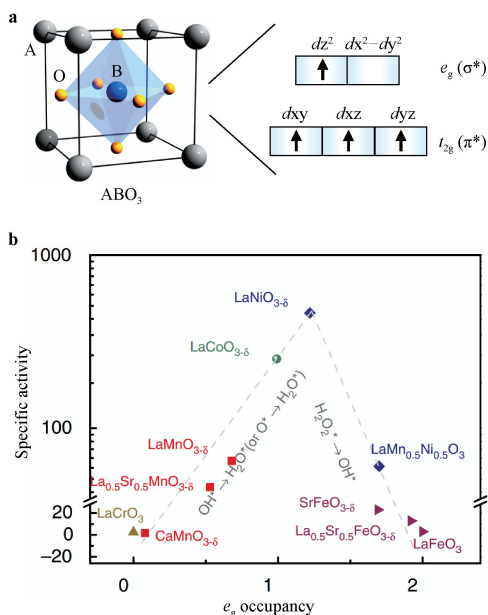
上式中,oxTMB 为 TMB 的氧化产物。研究发现,不同纳米材料的催化机制类似,大致可分为三步:第 1 步,一分子 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分子在纳米表面的催化中心分解,形成一分子 O(或两分子 OH)吸附中间体;第 2、3 步,两分子 TMB 依次靠近催化中心,各将一个 H 原子传递给上述中间体,形成 $\text{H}_2\text{O}$ 并从纳米表面脱附,完成催化循环(图 6a)。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 TMB 依次与纳米表面结合并反应,这与先前报道的该催化遵循乒乓机制吻合<sup>[1]</sup>。

不同纳米表面遵循相似的类过氧化物酶催化机制为发展通用活性预测理论奠定了基础。Shen 等<sup>[41]</sup>基于氧化铁的类过氧化物酶催化反应提出羟

基自由基 $\cdot\text{OH}$ 吸附能( $E_{\text{ads,OH}}$ )可作为预测纳米表面类过氧化物酶催化活性的理论描述符。当纳米表面对 $\cdot\text{OH}$ 的吸附力太弱( $E_{\text{ads,OH}} \gg -2.6\text{ eV}$ )时,氧化铁表面给电子能力(即还原性)太弱,将导致 $\text{H}_2\text{O}_2$ 难以分解形成活性中间体,限制了催化活性;而当纳米表面对 $\cdot\text{OH}$ 的吸附力太强( $E_{\text{ads,OH}} \ll -2.6\text{ eV}$ )时,纳米表面给电子能力太强,将导致活性中间体在表面吸附太强难以被还原,也限制催化活性;当 $E_{\text{ads,OH}}$ 既不太强也不太弱( $E_{\text{ads,OH}} \approx -2.6\text{ eV}$ )时,纳米表面的类过氧化物酶催化活性最强<sup>[41]</sup>。图 6b 显示了不同纳米表面的 $E_{\text{ads,OH}}$ 值,有助于系统性地理解纳米材料类过氧化物酶活性规律。活性中间体在催化剂表面的吸附力既不太强也不弱时催化活性最强,符合异相催化的 Sabatier 原理<sup>[50]</sup>。

使用 $E_{\text{ads,OH}}$ 预测类酶活性需要 DFT 计算,而多数纳米材料是无形性的,计算得到的 $E_{\text{ads,OH}}$ 难以反映材料的真实统计平均,因此为特定类型材料发展更易表征的活性描述符在实际应用中尤为重要。Wei 等<sup>[51]</sup>系统研究了不同钙钛矿材料( $\text{ABO}_3$ , A 和 B 代表金属)的类过氧化物酶活性规律,发现金属 B 是最重要的催化活性中心<sup>[51]</sup>。金属 B 和 6 个 O 原子配位,其 5 个 d 轨道能级发生分裂,形成 2 个 $e_g$ 和 3 个 $t_{2g}$ 轨道(图 7a)。其中 $e_g$ 轨道的平均电子占据数是类过氧化物酶活性的描述符;当 $e_g$ 占据数接近 1 时活性最大(图 7b)。由于平均 $e_g$ 占据数可通过测量

材料的磁矩获得,该描述符为实验中基于钙钛矿及相关材料筛选过氧化物酶纳米酶提供了可行方法<sup>[51]</sup>。



**图 7** 钙钛矿类过氧化物酶活性描述符:(a) 钙钛矿晶胞结构以及金属原子 B 的 d 轨道在晶胞中的能级图。(b) 以平均  $e_g$  电子轨道占据数为描述符,系统描述不同钙钛矿材料类过氧化物酶催化活性的火山型曲线<sup>[51]</sup>

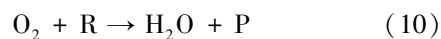
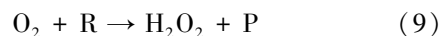
**Fig. 7** Descriptor for peroxidase-like activity of perovskites. (a) Crystal lattice structure of a perovskite and energy diagram of d-orbitals of B atom in the unit cell. (b) Volcano-shaped activity curve for different perovskites using average  $e_g$  occupancy as the descriptor. Reproduced with permission<sup>[51]</sup>. Copyright 2021, Springer Nature

在纳米材料类过氧化物酶催化反应体系中添加自由基捕获剂往往可检测到 $\cdot\text{OH}$ 信号<sup>[1]</sup>,因此该催化机制往往也被认为与芬顿机制类似。然而,检测到自由基信号仅表示捕获剂分子也可作为底物被 $\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化,并不证明反应过程中产生游离的 $\cdot\text{OH}$ 自由基并主导后续反应。 $\cdot\text{OH}$ 自由基具有极强氧化性,能无选择地氧化多数有机物<sup>[52]</sup>,而纳米材料类过氧化物酶催化并不具备该特征。例如,He等<sup>[53]</sup>发现类过氧化物酶合金反应体系抗坏血酸和邻苯二胺同时存在时,前者优先被氧化。纳米酶催化具有一定底物选择性的例子也存在于其他许多纳米酶催化反应体系中<sup>[54~56]</sup>,这些结果表明纳米酶催化更符合固-液异相催化机制和动力学,而不是自由基主导的芬顿机制。

#### 1.4.2 氧化酶纳米酶

纳米材料可以催化 $\text{O}_2$ 分子氧化有机底物,表现类似氧化酶的化学催化功能。该反应将 $\text{O}_2$ 还原为

$\text{H}_2\text{O}_2$ 或 $\text{H}_2\text{O}$ ,反应式分别为:



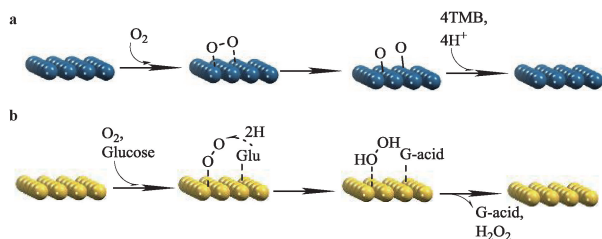
上式中,R和P分别表示反应物和产物。同一组纳米材料在催化不同有机底物时,催化活性顺序可能不同。最近,Chen等<sup>[57]</sup>发现不同贵金属纳米材料催化 $\text{O}_2$ 氧化葡萄糖的活性顺序( $\text{Au} > \text{Pt} > \text{Ru} > \text{Ir} > \text{Pd} > \text{Rh}$ )和氧化TMB的活性顺序( $\text{Pt} > \text{Ir} > \text{Pd} > \text{Rh} > \text{Ru} > \text{Au}$ )显著不同。还原产物也不同,其中Au催化时 $\text{O}_2$ 被还原为 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,而其他贵金属催化时 $\text{O}_2$ 被还原为 $\text{H}_2\text{O}$ 。这与其他贵金属同时具有较强类过氧化物酶活性,可进一步催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化底物有关。

Shen等<sup>[13]</sup>运用DFT计算结合实验的方法研究了不同贵金属催化 $\text{O}_2$ 氧化TMB的催化机制,提出如图8a所示的催化机制。根据该机制,首先 $\text{O}_2$ 在贵金属表面吸附并分解为O原子,在TMB作用下O原子被还原成 $\text{H}_2\text{O}$ 从金属表面脱附。该过程中, $\text{O}_2$ 在贵金属表面分解是关键,因此 $\text{O}_2$ 的分解活化能可作为该催化活性的描述符。金属d-带中心越高,金属电子越容易转移到 $\text{O}_2$ 反键轨道, $\text{O}_2$ 越容易分解,因此d-带中心的高度也可作为该催化活性的理论描述符。

Cheng等<sup>[58]</sup>用DFT计算方法研究了气相条件下Au催化 $\text{O}_2$ 氧化葡萄糖分子的过程,提出了不同的催化机制。如图8b所示,首先葡萄糖与 $\text{O}_2$ 分子共吸附在Au表面,随后葡萄糖在Au的协助下陆续转移两个H原子给 $\text{O}_2$ 形成 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,完成催化循环。由于Au催化 $\text{O}_2$ 氧化葡萄糖的反应一般在偏碱性条件进行,根据这一实验现象,Chen等<sup>[57]</sup>提出了与天然葡萄糖氧化酶类似的催化机制。他们认为碱性条件下, $\text{OH}^-$ 作为Brønsted碱可以夺去葡萄糖C1位OH上的氢原子(天然酶中,组氨酸残基起Brønsted碱的功能);将葡萄糖C1的氢进一步转移到Au上,生成葡萄糖酸内酯(酯进一步水解形成葡萄糖酸);吸附在Au上氢原子与氧气进一步反应生成双氧水,完成催化循环。底物为TMB和葡萄糖时催化机制不同,这与上文提到的底物的改变导致贵金属类氧化酶催化活性顺序改变的结果一致<sup>[57]</sup>。

最近,Wu等<sup>[59]</sup>实验研究发现,金属有机框架氧化TMB的类氧化酶活性可用配体的取代基精确调控,且活性与取代基的拉电子效应相关(可用取代基Hammett常数定量预测),取代基拉电子能力越强,活性越强;为了解释此构效关系,提出了TMB向

催化剂转移电子是反应决速步。系统研究催化机制随底物变化的规律以及不同机制对应的构效关系和预测模型,对未来自理设计纳米材料的类氧化酶活性具有重要意义。

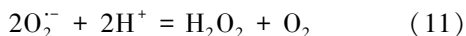


**图 8** 纳米材料模拟氧化酶的催化机制:(a) 贵金属纳米表面催化 O<sub>2</sub> 氧化 TMB 的分子机制<sup>[13]</sup>。(b) 金纳米表面催化 O<sub>2</sub> 氧化葡萄糖的分子机制<sup>[58]</sup>

**Fig. 8** Catalytic mechanisms for oxidase-like activity of nanomaterials. (a) Molecular mechanism for nano-surfaces of noble metals to catalyze O<sub>2</sub> to oxidize TMB<sup>[13]</sup>. (b) Molecular mechanism for nano-surface of gold to catalyze O<sub>2</sub> to oxidize glucose<sup>[58]</sup>

#### 1.4.3 超氧化物歧化酶纳米酶

纳米材料的 SOD 催化反应式如下:



该反应属于歧化反应,两个 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 在质子存在条件下发生分子间电子传递,给出电子的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 形成 O<sub>2</sub>,获得电子的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。Osuna 等<sup>[60]</sup>运用 DFT 计算方法研究了 C<sub>60</sub>(C(COOH)<sub>2</sub>)<sub>3</sub> 催化该反应的历程和能量曲线,Shen 等<sup>[61]</sup>研究了气相条件下该反应在贵金属表面的历程和能量变化。以上计算研究表明 C<sub>60</sub>(C(COOH)<sub>2</sub>)<sub>3</sub> 和贵金属是催化该反应的可行催化材料,解释了实验结果<sup>[62]</sup>。

为了发展预测纳米材料的类 SOD 活性的理论模型,Wang 等<sup>[63]</sup>考察了纳米材料在溶液中介导 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 发生分子间电子传递的可能方式,提出了两种类 SOD 催化机制——最低空轨道(LUMO)机制和最高占据轨道(HOMO)机制,并分别提出理论判据。LUMO 机制指纳米材料先从一分子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 攫取一个电子使之转化为 O<sub>2</sub>,再将电子传递给另一分子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 使之转化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,同时纳米材料恢复原状,整个过程纳米材料的 LUMO(或称之为导带底)发挥关键作用(图 9a)。纳米材料具有 LUMO 介导的 SOD 活性的判据是:

$$\varphi(\text{O}_2/\text{O}_2^-) < \varphi_{\text{NM,LUMO}} < \varphi(\text{O}_2^-, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2) \quad (12)$$

上式中的  $\varphi$  均为 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 相关的还原电势。相应的,

HOMO 机制指纳米材料先传递一个电子给一分子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 使之转化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,再从另一分子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 攫取一个电子使之转化为 O<sub>2</sub>,同时纳米材料恢复原状,整个过程纳米材料的 HOMO(或称之为价带顶)发挥关键作用(图 9b)。纳米材料具有 HOMO 介导的 SOD 活性的判据是:

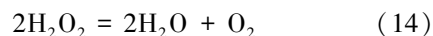
$$\varphi(\text{O}_2/\text{O}_2^-) < \varphi_{\text{NM,HOMO}} < \varphi(\text{O}_2^-, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2) \quad (13)$$

图 9c 显示了几种纳米材料的 HOMO 和 LUMO 能级,依此可以判断它们是否可能具有类 SOD 活性以及类 SOD 的机制。

由于  $\varphi(\text{O}_2/\text{O}_2^-)$  和  $\varphi(\text{O}_2, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2)$  的数值可从化学手册中查询,而纳米材料的 HOMO 和 LUMO 值可用光电子能谱、电化学方法等实验方法测定,当材料结构确定时也可用 DFT 计算方法,因此上述判据不仅可用于鉴定纳米材料的遵循何种类 SOD 催化机制,也可用于筛选具有相应类 SOD 活性的纳米材料。Wang 等<sup>[63]</sup>运用该方法从 3814 多种二维材料中筛选了 121 多种材料仅满足条件式(12)或仅满足(13),在计算机辅助高通量筛选纳米酶方向做出尝试。

#### 1.4.4 过氧化氢酶纳米酶

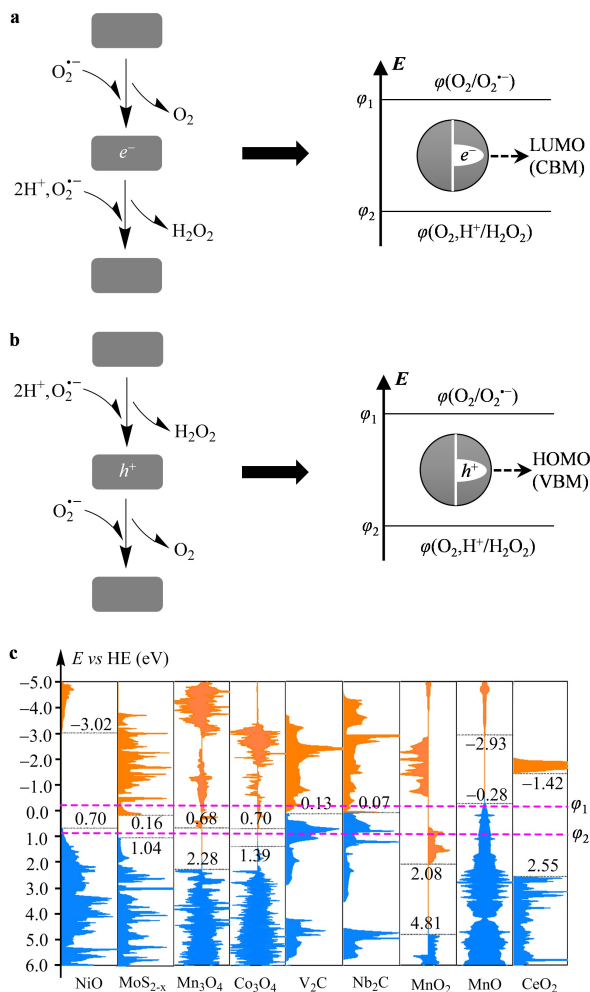
纳米材料类过氧化氢酶催化的总反应如下:



该反应也属于歧化反应。气相条件下的 DFT 计算研究表明,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分子可以在 CeO<sub>2</sub><sup>[64]</sup>、贵金属<sup>[38]</sup>和水铁矿<sup>[65]</sup>纳米表面发生原子重排反应,形成 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>,完成类过氧化氢酶催化循环。其中,CeO<sub>2</sub> 遵循图 10a 所示的机制,而贵金属和水铁矿遵循图 10b 的机制。

Zhang 等<sup>[65]</sup>通过实验研究发现,与多数纳米材料同时具有类过氧化物酶及类过氧化氢酶催化活性不同,水铁矿具有专一的类过氧化氢酶催化活性,这与其表面含有大量羟基结构相关,通过在合成过程中调控水铁矿的表面羟基丰度,可以规律性地调节水铁矿的类过氧化氢酶活性。DFT 计算研究表明,在一个完整的类过氧化氢酶催化循环过程中,水铁矿表面的铁合羟基基团通过产生 H 空位的方式促使一个 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分子断裂氧氧键(碱式分解),当第二个 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分子靠近催化中心时,氢空位可以较容易夺取过氧化氢中的氢原子,从而促使其断裂氧氢键(酸式分解)产生 O<sub>2</sub><sup>[65]</sup>。

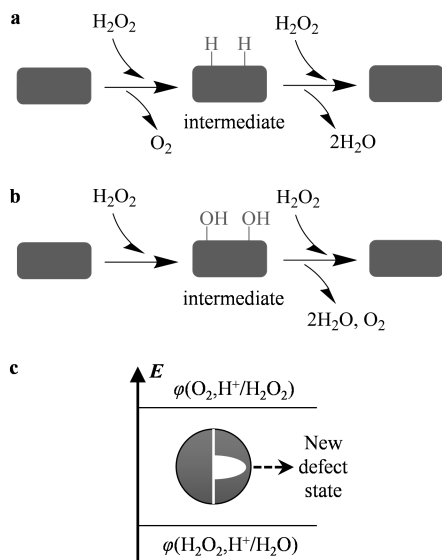
虽然纳米酶的实际应用发生在水溶液中,但纳米材料电子结构的精确实验表征往往只能在气相或



**图 9** 纳米材料 SOD 的催化机制与预测理论: (a) LUMO 介导的类 SOD 催化活性, 纳米材料 LUMO 能级介于  $\varphi_1$  和  $\varphi_2$  是该活性的判据; (b) HOMO 介导的类 SOD 催化活性, 纳米材料 HOMO 能级介于  $\varphi_1$  和  $\varphi_2$  是该活性的判据; (c) 几种纳米材料费米能级附近的电子态密度, 图中能量是以氢电极 ( $\text{pH} = 7$ ) 为参考的相对值, 数字标注了 HOMO 和 LUMO 的能级<sup>[63]</sup>

**Fig. 9** Catalytic mechanisms and prediction theory for SOD-like activity of nanomaterials. (a) SOD-like activity mediated by LUMOs of nanomaterials; existence of LUMO with energy in the range of  $\varphi_1$  and  $\varphi_2$  is the criterion of such activity. (b) SOD-like activity mediated by HOMOs of nanomaterials; existence of HOMO with energy in the range of  $\varphi_1$  and  $\varphi_2$  is the criterion of such activity. (c) Density of states near the Fermi level of several nanomaterials, in which the energy is with respect to the energy of hydrogen electrode at  $\text{pH} = 7$  and the energy levels of HOMOs and LUMOs are marked. Reproduced with permission<sup>[63]</sup>. Copyright 2021, Springer Nature

真空条件下进行。为此, Wang 等<sup>[64]</sup>提出了气相条



**图 10** 纳米材料模拟过氧化氢酶的催化机制与预测理论: (a)  $\text{CeO}_2$  模拟过氧化氢酶的分子机制。 (b) 水铁矿模拟过氧化氢酶的分子机制。 (c) 预测半导体纳米材料气相条件下类过氧化氢酶活性的理论模型; 依据该模型, 纳米材料在催化过程中在其表面吸附 H 或 OH 生成中间体, 从而在半导体禁带形成新缺陷态, 当缺陷态能级位于  $\text{H}_2\text{O}_2$  的两个还原电势之间时, 纳米材料具有催化活性<sup>[64]</sup>

**Fig. 10** Catalytic mechanisms and prediction theory for catalase-like activity of nanomaterials. (a) Mechanism for catalase-like activity of  $\text{CeO}_2$ . (b) Mechanism for catalase-like activity of ferrihydrite. (c) Theoretical model predicting the catalase-like activity of semiconducting nanomaterials in gas phase. According to the model of (c), H or OH species will be adsorbed onto the surfaces of nanomaterials to form intermediates, creating new defect states in the forbidden bands of nanomaterials; the nanomaterials will have catalase-like activity when the energies of defect states are located in the range of the reduction potentials of  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[64]</sup>

件下  $\text{CeO}_2$  模拟过氧化氢酶催化的理论模型。在水溶液环境, 反应中间体与  $\text{CeO}_2$  形成极性化学键容易电离进入溶液; 而气相环境条件则不同, 中间产物吸附在材料表面的寿命更长, 导致材料禁带产生新能级。该能级能量 ( $E_{\text{DS}}$ ) 可用于预测  $\text{CeO}_2$  类过氧化氢酶活性: 当  $\varphi(\text{O}_2, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2) < E_{\text{DS}} < \varphi(\text{H}_2\text{O}_2, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O})$  时,  $\text{CeO}_2$  具有类过氧化氢酶活性;  $E_{\text{DS}}$  的高度越接近两个电势的中间位置, 活性越强 (图 10c)。该模型也适用于其他半导体型金属氧化物材料, Liu 等<sup>[66]</sup>用实验表征了金属掺杂的  $\text{MnO}_2$  纳米涂层电子结构, 实验结果支持了理论模型。

### 1.4.5 小结

虽然用自由基捕获剂检测自由基常用于研究均相催化是否由自由基介导,但在纳米酶催化中,该方法不能甄别所捕获的自由基是“游离自由基”,还是吸附于纳米表面的反应中间体。因此,用自由基捕获剂检测自由基并不能用于确定纳米酶催化是自由基介导的。由于缺乏原位表征溶液中动态催化过程的实验手段,直接表征催化过程中间结构信息依然困难,目前纳米酶催化机制研究主要依靠 DFT 计算。虽然计算研究揭示了多种纳米酶催化机制,并成功解释了相应实验结果,但由于缺乏机制方面的直接实验证据,所提机制的有效性仍需接受广泛的实验检验。尤其实验已经证明,纳米酶催化机制可随纳米材料和反应底物的改变而改变,反应机制的变化规律仍需进一步研究。提高纳米酶对反应底物和反应方向的选择性具有重要应用前景,实验研究已发现不少纳米酶具有一定特异性<sup>[48, 65, 67]</sup>,纳米酶催化不同反应时的竞争性机制和规律也需要进一步研究。除模拟氧化还原酶外,纳米材料模拟其他类型生物酶功能也备受关注<sup>[13, 36]</sup>,相关催化机制和活性规律也应深入研究。

此外,尚需进一步在微观催化机制和表观动力学间建立联系。例如,实验研究表明,多数过氧化物酶纳米酶和天然过氧化物酶一样,催化动力学遵循米氏方程。其中,米氏方程中的  $V_{\max}$  与纳米酶的催化速率常数  $k_{\text{cat}}$  相关, $K_{\text{M}}$  与催化剂对底物的亲和力相关,两者均可用于调控纳米酶催化活性。然而,宏观测量的  $V_{\max}$  和  $K_{\text{M}}$  与纳米材料比表面积、尺寸等微观结构以及前文所述的微观催化机制之间的内在关联,仍需深入研究。基于纳米材料的内在特性发展纳米酶催化动力学方程,对于纳米酶优化和设计具有重要意义,是未来值得关注课题。

虽然 DFT 计算在研究纳米酶催化机制方面具有一定优势,但是也存在以下问题。(1) DFT 计算往往采用单晶材料为模型,与纳米酶多数情况具有无定形结构不符合,计算模型是否充分代表了真实纳米酶活性位点的结构是个问题。(2) 由于算力限制,为晶胞选择计算方法时往往采用广泛使用的广义密度近似或局域密度近似泛函,这些泛函因没有考虑电子自相互作用而产生误差。(3) 同样由于算力限制,计算过程中往往忽略溶剂效应和熵变对反应能的贡献,并忽略反应物和产物扩散过程对催化效率的影响。以上问题均可能对最终计算结果产生影响,因此未来应仍需将计算模拟和实验研究紧密化学进展, 2023, 35(1): 1~87

结合,共同研究纳米酶催化的微观机制。此外,未来发展可用于更大纳米酶体系的计算方法也是值得关注的方向,如机器学习势、QM/MM 方法等可将量子力学的高精度扩展到分子动力学尺度,综合考量更大尺度体系、复杂表面结构、多催化中心、以及溶剂效应等因素对纳米酶催化机制的影响。

## 2 纳米酶的设计

作为以实际应用为导向的交叉学科领域,纳米酶的研究始终围绕着其催化活性和理化性质展开。与依赖基因表达生产的酶不同,纳米酶可以从头合成,具有可设计改造的特点。因此,如何开发有效策略实现高性能纳米酶的设计一直是纳米酶研究领域的核心问题。早期纳米酶研究多是通过随机合成和逐批验证活性的策略来筛选活性较高的纳米酶。然而,因缺乏明确的理论指导和高通量筛选手段,此策略往往费时费力且收效甚微。

纳米酶种类繁多、组成结构多样,如何深入解析其构效关系,对于实现有据可依的纳米酶设计具有重要意义。近年来,随着纳米酶研究体量的增加,一些对纳米酶性能具有重要影响的要素被发掘出来,并被用于纳米酶的理性设计之中。此外,基于纳米酶与酶之间通用的构效关系,开发与酶的催化微环境和活性位点具有相似结构特点的纳米酶被证明是一种有效提高纳米酶活性与选择性的策略。尤其是,近些年随着单原子材料开发技术的进步,一系列具有独特催化位点的单原子纳米酶被设计开发出来,其中一些单原子纳米酶的催化性能甚至超越了具有相同活性的天然酶。此外,随着大数据分析、机器学习和理论计算等技术的进步,使高通量模拟设计与优化纳米酶成为了可能,为直接设计合成所需可用的纳米酶提供了新的手段。

本节介绍了纳米酶设计的主要策略,主要包括催化活性与选择性的优化、功能化修饰和多酶活性调控等方面,重点讨论了关键结构要素与纳米酶性能之间的相互关系,以及据此提出的纳米酶设计思路,并展望了未来可行的纳米酶设计策略。

### 2.1 纳米酶催化活性调节

纳米酶的催化活性受多种因素的影响,其中材料的组成结构在纳米酶的活性调控中起到了决定性的作用,不同的尺寸形貌、组成成分和表面修饰会赋予纳米酶不同的类酶活性。而催化体系中的外部因素,如溶液 pH、离子或分子、光热等外部能量也会在催化过程中调控纳米酶的活性。各种不同的因素对

纳米酶活性的影响本质来源于两方面:一是对纳米酶活性位点个数的影响,二是对单个活性位点活性的影响。以下我们将介绍组成结构和外部因素是如何影响纳米酶的活性位点个数或单个活性位点活性的。

## 2.1.1 组成结构的影响

### 2.1.1.1 尺寸

纳米酶的催化位点要发挥作用需要与反应底物进行接触,因此可与反应底物接触的活性位点会直接影响纳米酶的催化活性。纳米酶的尺寸越小,比表面积越大,活性位点就越多,催化活性会更高。2010年,Fan等<sup>[71]</sup>研究利用金颗粒的葡萄糖氧化酶(GOx)活性,催化葡萄糖氧化生成 $H_2O_2$ ,可以还原氯金酸实现金颗粒的种子生长。由于大尺寸金的GOx活性降低,金颗粒的生长停止,巧妙地实现了金颗粒的自限制生长。

### 2.1.1.2 形貌

除了尺寸,纳米酶的形貌也会影响活性位点数。2017年,Mugesh等<sup>[72]</sup>的研究表明,虽然尺寸最大,但由于花状 $Mn_3O_4$ 纳米酶具有高比表面积和孔径,

在5种不同形貌的 $Mn_3O_4$ 纳米酶中表现出最高的类酶活性。

纳米酶不同晶面上的活性位点表现出不同的活性。2018年,Mugesh等<sup>[68]</sup>制备了4种不同形貌的 $V_2O_5$ 纳米酶,并结合DFT计算证实了(010)晶面具备更高的谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性(图11a, b)。Chen等<sup>[39]</sup>也通过理论和实验解释了Pd纳米酶不同晶面OXD、POD活性的差异,主要晶面为Pd(100)的Pd立方体相比于主要晶面为Pd(111)的Pd八面体表现出更优的OXD和POD活性,并在对革兰氏阳性菌处理时表现出更高效的抗菌性能。

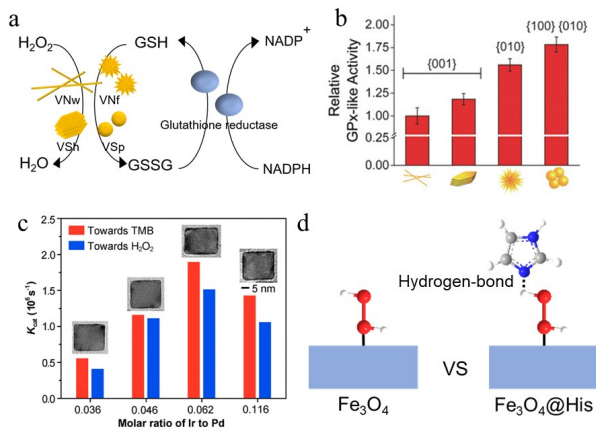
### 2.1.1.3 组成成分

目前按照材料的组成,纳米酶可以分为碳纳米酶、金属氧化物纳米酶、贵金属纳米酶以及其他类型纳米酶。不同种类的纳米酶可以通过特定的组成成分调节方式改变其活性位点的活性,从而实现催化活性的调控。

对碳纳米酶进行杂原子掺杂和天然酶活性位点的模拟是提高类酶活性的常见方式。2018年,Wei等<sup>[67]</sup>研究发现,杂原子N掺杂还原氧化石墨烯后, $H_2O_2$ 在N原子附近容易形成氧自由基并被N的孤对电子稳定,从而特异性地提高POD活性。N掺杂可以使还原氧化石墨烯和介孔碳的POD活性分别提高100倍和60倍以上。许多以碳为基底的单原子纳米酶通过模拟天然酶的活性位点实现了类酶活性的提升<sup>[73]</sup>。2019年,董绍俊院士团队<sup>[74]</sup>的研究发现,具有碳纳米框架约束的 $FeN_5$ 活性中心的单原子纳米酶的催化行为类似于细胞色素P450的轴向配体配位的血红素,额外的轴向配体N使 $Fe-N_5$ 相比于 $Fe-N_4$ 具有更强的电子推动效应,表现出更优的OXD活性。2020年,阎锡蕴院士团队<sup>[75]</sup>学习天然酶中辅助因子的作用,设计了由 $Fe-N_4$ 和铁原子团簇共同作用的类过氧化物酶体。该过氧化物酶体具备SOD、CAT、尿素氧化酶(UOD)、POD和OXD等多种类酶活性。

对金属氧化物纳米酶,元素掺杂也是调控酶活力的有效途径。2017年,Chen等<sup>[76]</sup>将不同比例的锆掺入二氧化铈中,由于锆相比于铈导带位置更低,锆掺杂后的二氧化铈更有利于接受还原剂TMB的电子,表现出更高的氧化酶活性。Hyeon等<sup>[77]</sup>也发现,锆离子的掺杂可以改变二氧化铈纳米酶中三价铈和四价铈的比例和转换速度,从而获得SOD活性更高的铈锆纳米酶。

合金化是贵金属纳米酶常见的组成成分调节方



**图 11** (a)  $V_2O_5$  纳米酶的晶面依赖性类酶活性的示意图<sup>[68]</sup>; (b)  $V_2O_5$  四种纳米形式(即线、片、花和球)的谷胱甘肽过氧化物酶活性<sup>[68]</sup>; (c) Ir 含量对 Pd@Ir 纳米酶催化效率的影响<sup>[69]</sup>; (d) 组氨酸在  $Fe_3O_4$  催化过程中对  $H_2O_2$  吸附的影响<sup>[70]</sup>

**Fig. 11** (a) Schematic demonstration of the crystal-facet-dependent enzyme-mimetic activity of  $V_2O_5$  nanozymes<sup>[68]</sup>. (b) The GPx-like activity of the four nanoforms of  $V_2O_5$ , namely wires, sheets, flowers and spheres<sup>[68]</sup>. (c) Effect of Ir content on the catalytic efficiency of Pd@Ir nanozyme<sup>[69]</sup>. (d) Effect of histidine on  $H_2O_2$  adsorption during  $Fe_3O_4$  catalysis<sup>[70]</sup>. Copyright 2018, Wiley-VCH. Copyright 2015, American Chemical Society

式。不同金属掺入后对原材料的活性位点几何形貌的改变、与原有金属之间发生的电荷转移,会影响活性位点的活性<sup>[78]</sup>。2010年,Wu等<sup>[53]</sup>在银纳米颗粒制备过程中掺入不同金属,形成AgM(M=Au/Pd/Pt)合金,AgM合金表现出组成和比例依赖的POD活性,证实了合金化这一途径可以实现催化活性的有效调节。贵金属纳米酶的另外一种合金化方式是形成核壳结构,外层金属会与内部金属之间存在表面应力和配体效应,影响材料整体的d带中心位置,进而影响活性位点的活性<sup>[79]</sup>。2015年,Xia等<sup>[69]</sup>研究了在Pd纳米立方体外生长Ir,Pd导致的Ir晶格膨胀使得Pd@Ir的POD活性明显升高,并且这种改变与外层金属的厚度相关(图11c)。

#### 2.1.1.4 表面修饰

在工作体系中,纳米酶受到体系中盐离子、小分子等的影响,容易发生聚集,因此需要通过表面配体修饰增强胶体的稳定性<sup>[80]</sup>。表面配体的修饰可以在材料合成时进行,也可以在材料合成后进行<sup>[81]</sup>。除了对颗粒的稳定作用,表面配体还可以改变活性位点个数或单个活性位点活性,其中单个活性位点活性的改变主要通过改变与底物的相互作用或者调整纳米酶催化过程的电子转移实现。本节我们将介绍表面修饰对纳米酶催化活性的影响。

若表面配体的覆盖只降低了纳米酶的活性位点数,那么纳米酶的催化活性会被明显抑制。2014年,Bansal等<sup>[82]</sup>的研究中,在表面修饰核酸适配体后,由于活性位点被屏蔽,金纳米颗粒的POD活性明显降低,这种活性的降低会在适配体响应分子的加入后恢复。

表面修饰对纳米酶单个活性位点活性的影响,一方面来自于对底物吸附的调节。2017年,Yan等<sup>[70]</sup>通过将组氨酸残基引入Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的表面,使Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>对底物H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的亲合力提升了10倍, $K_{cat}/K_M$ 提高了20倍(图11d)。2021年,Wu等<sup>[83]</sup>在金纳米棒表面修饰半胱氨酸,半胱氨酸侧链羧基与底物TMB质子化氨基之间的静电吸引作用可以提升金纳米棒的POD活性,并且这种效果只发生在对TMB底物的氧化中。

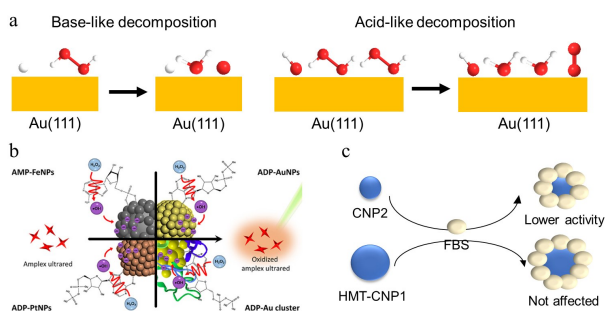
表面配体也可以通过影响催化过程中的电子转移调控纳米酶活性位点的活性。2016年,Liu等<sup>[84]</sup>对CeO<sub>2</sub>表面进行F<sup>-</sup>修饰,F<sup>-</sup>不仅可以通过静电相互作用调控对显色底物的吸附,还能促进催化过程中的电荷转移,从而使CeO<sub>2</sub>的OXD活性增强了100倍。2020年,Berret等<sup>[85]</sup>用具有不同基团和不化学进展, 2023, 35(1): 1~87

同侧链长度的聚合物对CeO<sub>2</sub>进行合成后修饰,发现聚合物对CeO<sub>2</sub>几种氧化还原酶类活性的影响并不一致。聚合物可能通过与金属中心的相互作用改变CeO<sub>2</sub>的氧化状态,从而抑制其CAT、SOD活性,而聚合物和颗粒之间的协同作用可以增强其POD活性。

纳米酶的组成结构从根本上决定了其催化性能,尺寸形貌、组成成分和表面修饰这三个方面相互影响,调控纳米酶的催化类型和效率。目前,基于密度泛函理论对反应所需的吉布斯自由能进行计算,可以解释很多情况下纳米酶的组成结构是如何调控催化活性的,也为纳米酶活性的理性调控提供了参考。详细的内容已经在1.4节进行了介绍。

#### 2.1.2 外部因素的影响

外部的因素可作用于纳米酶,改变纳米酶活性位点数量或活性位点活性,这种影响有时是可逆的。常见的外部因素包括溶液环境中的pH、离子或分子等。此外,结合纳米酶的物理化学性质,可通过外部能量如光能、热能、声能等实现能量转换,对活性位点的活性产生影响。下面将分别介绍以上几种因素对纳米酶催化活性的调控。



**图 12** (a) 酸性条件和碱性条件下, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在金(111)面上的分解过程<sup>[38]</sup>。(b) 不同腺苷类似物对磁铁矿纳米颗粒、金纳米颗粒、铂纳米颗粒和金纳米团簇 POD 酶活的增强效果<sup>[86]</sup>。(c) 牛血清蛋白对羟胺和环六亚甲基四胺法制备的 CeO<sub>2</sub> 磷酸酶活性的影响<sup>[87]</sup>

**Fig. 12** (a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decompositions on the surfaces of Au(111) in acidic and basic conditions<sup>[38]</sup>. (b) Adenosine analogue-enhanced peroxidase-like activity of FeNPs, AuNPs, PtNPs and Au cluster<sup>[86]</sup>. (c) Effects of FBS on the phosphatase-like activity of CeO<sub>2</sub> prepared by NH<sub>4</sub>OH (CNP2) and hexamethylenetetramine (HMT-CNP1)<sup>[87]</sup>. Copyright 2018, 2015 American Chemical Society

##### 2.1.2.1 pH

纳米酶活性位点的活性会受 pH 影响,通常纳米酶的 POD 活性在酸性环境中效率更高,CAT 活性

在碱性环境中效率更高。2015年, Gao等<sup>[38]</sup>以贵金属纳米酶为模型分析了 pH 影响纳米酶活性的机制。结果显示, pH 会改变反应物在贵金属表面的分解过程。酸性条件下,  $\text{H}_2\text{O}_2$  在金属表面倾向于进行 base-like 分解, 预吸附的氢会与得到的 OH 结合生成产物  $\text{H}_2\text{O}^*$  和  $\text{OH}^*$ ; 而碱性条件下, OH 的预吸附使  $\text{H}_2\text{O}_2$  倾向于进行 acid-like 分解, 最终得到  $\text{H}_2\text{O}^*$  和  $\text{O}_2^*$ 。不同 pH 下贵金属纳米酶经过不同的分解路径实现了 POD 和 CAT 活性之间的变化(图 12a)。

### 2.1.2.2 离子或分子

溶液中除了常见的  $\text{H}^+$  或  $\text{OH}^-$  离子外, 人为添加的其他离子或分子可以结合在纳米酶的表面, 影响纳米酶自身的稳定性或底物与纳米酶的结合, 从而对活性位点的个数或单个活性位点的活性产生影响。离子或分子这种结合受到离子、分子及纳米酶表面的电荷等性质的影响。例如, Guo等<sup>[88]</sup>的研究表明, 不同卤离子对金纳米酶颗粒的表面有不同的结合强度, 对其 POD 活性产生了不同的影响。 $\text{F}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$  对 Au 纳米酶的抑制效果依次增强, 类似于天然酶的可逆抑制和不可逆抑制。他们认为  $\text{I}^-$  与 Au 纳米酶表面有强吸附, 可能阻断了纳米酶表面的结合位点。结合活性位点是常见的抑制原理, 但并不适用于所有离子, 具体的原理需要具体分析。例如, 2011年, Self 课题组<sup>[89]</sup>发现磷酸根离子可以通过改变铈纳米酶表面 Ce 的价态影响催化活性。磷酸根离子使铈纳米酶表面偏向 +3 价, 从而抑制铈纳米酶的 SOD 活性、提高 CAT 活性。2017年, 该课题组又选择了与磷酸根离子相似的钨酸根、钼酸根、硫酸根及硒酸根四种离子探究其对铈纳米酶的活性影响<sup>[90]</sup>。他们的结果表明, 这四种离子对表面价态并无影响, 钨酸根、钼酸根可通过抑制 ATP 底物与纳米酶的作用而抑制磷酸酶活性, 但不影响 CAT 活性, 而硫酸根及硒酸根对活性没有影响。

溶液中游离的小分子如 ATP、ADP、AMP 等腺苷类分子, 也可以结合在纳米酶表面<sup>[86, 91, 92]</sup>。此类小分子可以通过促进  $\text{H}_2\text{O}_2$  活化, 增强羟基自由基与纳米材料的相互作用, 从而达到增强纳米酶 POD 活性的效果(图 12b)。而大分子类物质(如蛋白质)结合在纳米酶表面后, 通常会由于较大的空间位阻影响底物与纳米酶的结合, 抑制酶活性。2013年, Self等<sup>[87]</sup>发现, 细胞培养常用的牛血清蛋白可抑制  $\text{CeO}_2$  纳米酶的磷酸酶活性(图 12c)。用于体内治疗的纳米酶注射到血液中会面临大量的蛋白

质, 这些蛋白质在纳米酶表面会形成蛋白冠, 可能会导致不可恢复的活性抑制进而严重阻碍纳米酶在体内的应用。因此, 体内蛋白冠对纳米酶的活性影响是需要关注的问题。针对这一现象, Rotello等<sup>[93]</sup>在 2020 年用蛋白冠开发出纳米酶激活策略, 利用细胞内的蛋白酶水解蛋白冠, 实现纳米酶在细胞内的活性激活。

### 2.1.2.3 外部能量

以上介绍的离子或分子类活性调控方式主要是通过直接与纳米酶接触的方式产生效果, 而利用纳米酶本身带有的物理化学特性, 可以使用能量转换的方式远程调控活性位点的活性。例如, 许多金属都具有表面等离子共振的特性, 可利用电子的振荡对光能进行转换。目前已合成出多种贵金属纳米酶如 Au 纳米酶、Pd@Au 纳米酶等, 在近红外光的照射下, 通过表面等离子共振效应实现活性位点活性的提高<sup>[94, 95]</sup>。此外, 还可以在纳米酶上修饰具有光响应性的材料, 实现远程的光调控。如在纳米酶上修饰紫外光响应的偶氮苯材料, 环糊精可以通过偶氮苯连接在纳米酶表面, 阻断纳米酶表面的活性位点, 紫外照射后偶氮苯的变构促使环糊精释放, 纳米酶的活性恢复<sup>[96]</sup>。

其他能量如声能、热能等也可影响纳米酶的活性, 这种远程的调控可能是通过提高反应物在活性位点附近的热运动从而增强了单个活性位点的活性, 或是通过调控分子在活性位点的覆盖影响活性位点的数量。2020年, Lin等<sup>[97]</sup>通过碳化合成了无序的石墨结构纳米酶, 此纳米酶在温度升高到  $60^\circ\text{C}$  时可发挥出最高酶活性, 借助石墨烯本身的光热转化能力, 可用近红外光实现纳米酶在肿瘤治疗中的特异激活。2019年, Yang等<sup>[98]</sup>合成了  $\text{PtCu}_3$  纳米酶, 其金属原子排列高度有序, 具有声敏剂的特征, 在超声刺激下可实现 POD 活性的增强。2020年, Zheng等<sup>[99]</sup>在 Pd@Pt 纳米酶的表面连接了声敏剂 T790, T790 会阻碍 Pd@Pt 的 CAT 活性, 超声刺激后酶活性可恢复, 从而实现肿瘤部位可控的靶向治疗, 超声更强的穿透能力弥补了光能调控在体内应用中穿透性不足的问题。

外界因素对纳米酶的活性调控为纳米酶的多种应用创造了条件。利用离子或分子对酶活性的调控可以实现对这些离子或分子的高活性检测, 控制纳米酶在不同条件下按要求发挥出活性, 实现疾病的可控治疗等。具体的应用将在第 4 节进行详细介绍。

纳米酶的催化活性受到材料本身和外部溶液中多种因素的影响,这些因素通过影响纳米酶的活性位点数量或单个活性位点的活性调控纳米酶的活性,因此这两个方面是影响纳米酶活性的根本因素。在纳米酶活性的研究中,如何确定活性位点数对于客观评价纳米酶的活性以及分析活性改变的来源十分重要。最近,刘珏文课题组<sup>[100]</sup>提出观点,认为在对比纳米酶活性时以表面原子作为活性位点较为科学,同时也建议作者在进行纳米酶的活性比较时相关参数的提供应该尽量全面<sup>[34]</sup>。

活性调控的具体过程具有纳米酶类型特异性,系统了解这些因素如何调控纳米酶的催化并根据不同的纳米酶类型进行合适的优化,可以为纳米酶催化效率的提高提供思路。不同于目前纳米酶主要通过试错法进行制备,通过对以往研究经验的统计和分析,利用目前已有的纳米酶建立数据库,结合机器学习中的多种数据分析方法为纳米酶的设计提供指导<sup>[16]</sup>,有望推动纳米酶的研究进一步向理性设计的方向发展。

## 2.2 纳米酶的选择性调控

对底物和反应路径的严格选择性是酶的重要特征之一。绝大多数酶只作用于某一类底物,并催化其进行特定的化学反应。与之相比,纳米酶缺乏催化专一性。目前,尚未有严格催化专一底物发生特定反应的纳米酶被合成或发现。一方面,纳米酶底物选择性差。例如,过氧化物纳米酶往往能够催化多种有机分子底物发生氧化,如 TMB、OPD、ABTS 和鲁米诺等。另一方面,纳米酶反应路径选择性差。例如,一些纳米酶兼具类过氧化物酶与类过氧化氢酶催化活性,能同时催化  $H_2O_2$  分解产生  $\cdot OH$  或  $O_2$ 。因此,多数纳米酶表现出多底物和多活性的泛催化特性。

宽泛的底物谱使纳米酶在污水处理、抗菌、抑瘤等有广谱催化需求的应用中具有一定优势。纳米酶的多重活性之间也可能通过级联协同作用来执行多样化的催化功能。然而,缺乏选择性的无序催化可能会在反应过程中产生无益的副产物。另外,由多底物和多酶活性造成的竞争抑制作用也使得纳米酶的单一活性不高。因此,纳米酶尚难以在对催化有高选择性要求的应用领域有所作为。尤其在工业催化中,催化剂的选择性往往比活性更加重要。因此,有必要研究和改善纳米酶的催化选择性,以使其满足多种应用需求。

造成催化专一性差的主要原因是纳米酶缺乏特

异性识别和结合底物的结构域,以及受催化微环境精细调控的催化部位。由酶催化的反应一般包含三个步骤:底物结合、底物转化和产物释放。在底物结合阶段,酶与底物的结构互补性构成了底物选择性的基础。酶在与底物相互结合的过程中,构象受到底物诱导发生变化,使活性中心结构与底物结构契合,从而特异性催化底物发生反应。此外,酶的活性中心受到微环境的精细调节,能够使与酶结合的底物经过特定的反应路径转化为特定的产物。例如,由于底物结合部位和活性中心微环境的差异,同样以铁卟啉作为催化基团的过氧化物酶、氧化酶和过氧化氢酶等表现出完全不同的专一催化作用。纳米酶催化的反应步骤与酶大体类似。不同的是,多数纳米酶的催化位点直接暴露在粗糙表面,而缺乏能够特异性识别和结合底物的结合口袋和精确调控电子/基团转移的催化微环境。因此,许多纳米酶虽然具有类卟啉结构,但却难以表现出如含卟啉酶一样的催化专一性。

鉴于此,纳米酶的选择性研究一方面涉及利用分子印迹、物理和化学吸附、表面修饰等策略打造结合部位,引入一系列次级相互作用(氢键、离子键、疏水作用以及范德华力等),在纳米酶与底物之间建立结构互补性,实现纳米酶对底物的选择性识别与结合。另一方面,通过仿生设计策略以及基于纳米构效关系打造催化微环境,利用集成效应和级联反应放大特定催化反应,以优化纳米酶的催化反应路径。本节就目前纳米酶选择性调控研究的主要策略和进展进行介绍。

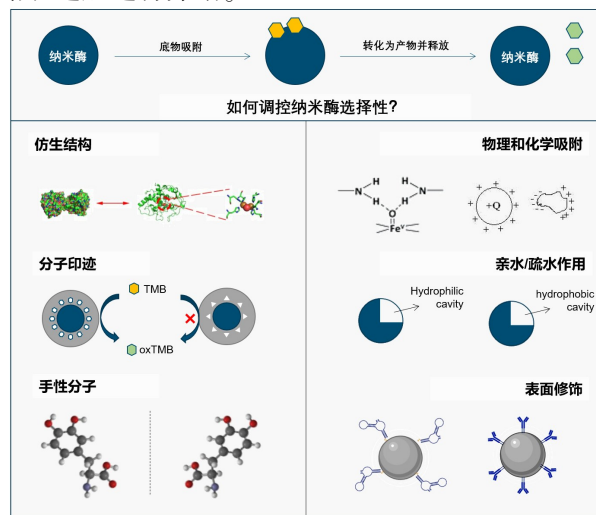


图 13 纳米酶选择性调控策略示意图

Fig. 13 Schematic diagram of strategies for regulating the selectivity of nanozymes

### 2.2.1 分子印迹

为了在纳米酶与底物之间建立结构互补性,许多技术被应用于纳米酶合成领域。其中,分子印迹被认为是最有潜力和最便捷的方法之一,其可以创建具有特定形状和官能团位置的三维网络模板分子,实现对特定底物的识别而无需引入其他物质。分子印迹纳米酶的合成一般经过以下 3 个步骤:(1) 底物模板与功能化单体在纳米酶表面吸附;(2) 功能化单体在纳米酶周围聚合产生交联基质;(3) 去除底物模板,留下一个与底物结构互补的结合口袋。例如,在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶表面吸附 TMB 或 ABTS,以此为模板和丙烯酸酯单体进行交联、沉淀、聚合,可以构建具有高度选择性的纳米凝胶。洗脱底物后的纳米凝胶保留了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  催化中心和与底物分子大小形状相匹配的结合口袋和空间位阻。因此,这种分子印迹纳米酶表现出优良的亲和力和高度的选择性。与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶相比,分子印迹化的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  过氧化物纳米酶的催化特异性提高了近 100 倍。相应地,其类过氧化物酶活性也显著提升<sup>[101]</sup>。研究表明,这种活性的提高可能归功于局部底物浓度富集和印迹聚合物较低的活化能<sup>[102]</sup>。采用类似的策略,PtPd 过氧化物纳米酶<sup>[103]</sup>、g- $\text{C}_3\text{N}_4$  过氧化物纳米酶<sup>[104]</sup>等都被报道可以实现对 TMB 底物的特异性催化。通过改变底物模板、功能化单体和纳米酶的类型,可以设计多样化的分子印迹纳米酶。例如,以甲基蓝作为底物模板、聚吡咯作为分子印迹聚合物开发的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  过氧化物纳米酶对甲基蓝具有优异的催化选择性<sup>[105]</sup>;以甲硝唑作为底物模板、多巴胺作为功能化单体开发的 MIL-53(Fe) 过氧化物纳米酶能够特异性识别和催化甲硝唑<sup>[106]</sup>。凭借模板分子可变、底物特异性强、催化性能提高等优点,各种类型的分子印迹聚合物纳米酶被广泛设计并应用于生物传感和分子检测等领域。如以血红素为催化中心、不同底物为模板可用于 2,4,6-三氯苯酚<sup>[107]</sup> 和血色素<sup>[108]</sup> 的特异性测定;与金属结合,研究人员发展了基于分子印迹聚合物的仿生酶联免疫吸附平台用于血清样本检测<sup>[109, 110]</sup> 和食品中组胺成分的测定<sup>[111]</sup>。在最近的研究中,基于 Co、Fe 双金属活性位点的分子印迹聚合物纳米酶用于双模检测,相较于单金属纳米酶具有更加优异的类过氧化物酶活性;以香草醛为模板分子合成分子印迹聚合物,表现出优异的底物特异性和选择催化的能力<sup>[112]</sup>。分子印迹与纳米酶的结合解决了纳米酶缺乏特异性的缺陷,相应地提高了其催化活性,在纳米酶领域开辟了

新的视野。尽管已经有相当多的分子印迹聚合物纳米酶被成功设计,然而,现存研究对其结合效率和相关热力学、动力学的认知尚浅,如何更好地对纳米酶选择性进行调控并进行实际应用有待更加深入和持久的研究。

### 2.2.2 亲疏水作用

酶通过在活性中心周围创造有利的微环境来实现高催化活性和选择性,例如疏水口袋,这些微环境可能与底物或产物发生相互作用。因此,人们开始关注亲水/疏水环境对纳米酶催化活性和底物选择性的影响。有研究以六方介孔二氧化硅为骨架、 $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米颗粒为活性中心、苯基为有机配体构建了一系列具有不同物理特性的氧化纳米酶。苯基含量的增加能够改变活性中心的亲水/疏水微环境。实验数据表明,随着微环境疏水性的增加,该纳米酶催化乙苯氧化的性能得到显著提升,这归功于孔隙疏水微环境增强的乙苯吸附<sup>[113]</sup>。截至目前,许多研究已经证明为纳米酶提供疏水微环境能够提升对底物的识别和结合能力<sup>[114~116]</sup>,在无机催化领域,亲水/疏水相互作用也常常被用于相选择性催化<sup>[117, 118]</sup>,可见,在纳米酶与底物之间引入相互作用是实现纳米酶的选择性调控的有效策略。

### 2.2.3 物理和化学吸附

物理/化学吸附是底物与纳米酶接触并开始催化反应不可避免的步骤,因此利用或增强这一过程是调控纳米酶选择性的简单且有效的策略。例如,基于纳米酶对单链 DNA 和双链 DNA 的亲和力差异可以构建生物传感平台<sup>[119, 120]</sup>;基于过渡金属和氮原子之间的配位结构可以选择性地与底物相互作用并形成临界结合氧中间体,实现高效的类酶催化活性和底物选择性<sup>[121]</sup>。类似地,静电相互作用作为一种更强的相互作用力被应用于纳米酶与底物的吸附过程。例如,将阳离子笼封装的金簇交联在多孔聚离子液体内部,可以制备一系列具有优异类酶催化性能的纳米体系,其中外部聚离子液体带负电荷,因此形成的超分子复合物能够通过静电相互作用模拟天然酶的底物分选行为,也能够显著提升催化性能<sup>[122]</sup>。基于物理/化学吸附对纳米酶进行选择调控具有可协调、高度适用的特点,但其较弱的结合力、较低的灵敏度在一定程度上限制了其进一步应用。

### 2.2.4 表面修饰

催化反应通常发生在表面,涉及底物的吸附、转化、释放三个步骤,因此纳米酶的表面基团、组成都

会影响催化过程,对纳米酶活性和选择性的调节也至关重要。纳米酶的选择性催化可以通过表面修饰抗体来实现,如将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶与抗轮状病毒和人表皮生长因子受体 2(EGFR2)的抗体偶联实现对应抗原的特异性检测<sup>[123]</sup>;将具有类过氧化物酶活性和类过氧化氢酶活性的  $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米酶与 EGFR 单结构域抗体偶联用于免疫组织化学分析<sup>[124]</sup>。上述纳米酶与抗体的偶联可以简单地通过螯合作用或偶联剂实现。因此,仅通过改变抗体种类即可实现纳米酶对不同底物的选择性识别和催化。然而,抗体制备繁琐、价格高昂,相应地提高了纳米酶工业化成本。近年发展的核酸适配体是纳米酶表面修饰的热点话题,与传统抗体相比,它们不仅对靶分子具有高亲和力,而且具有成本低、稳定性高、易修饰、免疫原性强等优点。黄鹏程和吴芳英等<sup>[125]</sup>将适体与具有类过氧化物酶活性的金纳米酶相结合,构建了一种具有高特异性和灵敏度的四环素检测平台。适体与四环素的特异性结合改变了该纳米酶的催化行为,从而实现了特定底物的识别和检测。相同的策略也被用于外泌体蛋白和卡那霉素的检测<sup>[126, 127]</sup>,即纳米酶的表面修饰能够通过简单地替换抗体种类或目标适体来选择性结合多种底物,具有广阔的应用前景。

### 2.2.5 手性识别

对底物对映异构体的手性鉴别是天然酶专一性的一个重要方面,然而目前只有极少数纳米酶表现出选择性和立体特异性。因此,通过引入手性分子对纳米酶的选择性进行调控是一种有效策略。生命中的大多数生物分子都表现出手性,如氨基酸的左旋特性、DNA 的右旋结构等,事实上,这些分子已被广泛应用于手性纳米酶的合成。例如,以 DNA 为环境响应手性配体可以合成具有类葡萄糖氧化酶活性的金纳米粒子。处于随机卷曲状态的 DNA 对 L-葡萄糖具有更高的亲和力,而处于堆叠状态的 DNA(双链体、G-四链体等)则优先识别 D-葡萄糖,这一结构的改变可以通过金属离子来触发,实现纳米酶可调节的立体选择性催化<sup>[128]</sup>。L-苯丙氨酸修饰的氧化铈纳米粒子表现出高的类酶活性和对 D-多巴更有效的立体选择性<sup>[129]</sup>。氨基酸修饰的纳米酶被报道可以表现出超越天然酶的催化活性<sup>[130]</sup>和立体选择性<sup>[131]</sup>,证明了氨基酸配体赋予纳米酶选择性催化能力并提高催化活性的可行性。考虑到手性选择性催化在生物学中的重要地位,已经开发了各种手性纳米酶并应用于不对称催化和分子检测等领域

化学进展, 2023, 35(1): 1~87

域<sup>[132-135]</sup>。最近的研究也越来越关注手性配体的光学效应和生物效应,可以预见的是,具有立体选择性的手性纳米酶的应用领域将不断被拓展。

### 2.2.6 仿生设计

经过长期进化,酶发展出了最适合底物结合和专一催化的活性中心结构。尤其是,酶活性中心的催化微环境能够精确地调控催化反应的活性和选择性。受此启发,一些研究利用理性设计策略模拟酶的活性中心结构打造纳米酶,实现了纳米酶选择性的优化。2017年,通过模拟 HRP 的氨基酸微环境,范克龙等首次将仿生设计的概念引入到了纳米酶的活性和选择性优化中。在 HRP 的结构中心处,位于铁卟啉平面轴向远端的组氨酸(His42)可以通过氢键辅助  $\text{H}_2\text{O}_2$  定位到活性中心口袋中并促进酶-底物起始中间态(复合物 I)的生成。受这种特定结构的启发,研究者发现在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶表面引入组氨酸可以显著提高其对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的亲和力并增强其类过氧化物酶催化活性<sup>[70]</sup>。此外,组氨酸含咪唑基团,对底物的亲核攻击起重要作用且通常作为水解酶活性中心的催化基团。基于此,娄文勇等<sup>[136]</sup>将组氨酸掺入锌离子驱动的工程肽自组装体系,成功构建了一系列具有内在水解酶活性、能催化 *p*-对硝基苯乙酸酯降解的生物纳米酶。除了提供氨基酸微环境,模拟天然酶活性中心的配位结构也是纳米酶仿生设计的策略之一。金属有机框架(MOF)具有独立的金属位点及周围配体,与金属蛋白酶结构类似,因此在模拟酶领域有天然的优势。董绍俊等<sup>[137, 138]</sup>借鉴人碳酸酐酶 II 活性中心的四面体配位结构和儿茶酚氧化酶活性位点的双铜离子中心,分别构建了能够有效促进  $\text{CO}_2$  水合的 ZIF-8 纳米酶和选择性催化邻二苯酚氧化的 MOF-818 纳米酶,较同类型纳米酶具有更高的催化活性和特异性。借鉴天然漆酶中多铜配位结构,以核苷酸为配体合成的 Cu-MOF 可以表现出优异的漆酶样活性和对含酚底物的特异性催化作用<sup>[139]</sup>。可以看出,基于酶与纳米酶之间存在通用的构效关系,发掘并模拟酶的结构特点,是一种优化纳米酶的可行手段。

### 2.2.7 集成式纳米酶

生命体系中广泛存在着复杂但专一的酶催化体系,这启发我们可以构建类似的纳米酶催化平台以实现底物选择性。魏辉课题组<sup>[140]</sup>提出了集成式纳米酶(INAzyme)这一概念,即通过将多种纳米酶组合在一定的限域空间内,使整体的类酶催化效率和底物选择性大幅提升。这种改善通常被认为是限域

效应提高底物浓度、邻近效应便于物质传递、级联反应加快反应速率的结果。张袁健课题组<sup>[141]</sup>设计了一种基于微流控装置的纳米酶催化平台,在受限空间中引入合理设计的两种纳米酶实现级联反应和底物选择。以碳氮纳米笼(类氧化酶活性)和普鲁士蓝纳米颗粒(类过氧化物酶活性)为例,第一级反应经双电子途径生成副产物  $H_2O_2$ ,并作为第二级反应的底物启动级联催化反应。研究人员对多种小分子底物进行筛选,发现只有抗坏血酸能够被氧化得到终产物,反映出底物选择性的显著增强。因此,这一反应平台被应用于抗坏血酸的检测,其灵敏度提高了上百倍,成功实现了基于纳米酶的高选择性催化反应。事实上,类似的研究已经在体外检测、生物传感、疾病治疗等领域取得了一些进展<sup>[142]</sup>。尽管级联反应的深层机制和反应路径仍有待进一步研究,但集成式纳米酶的出现不仅拓宽了提高底物选择性的思路,也是对纳米酶催化体系的有效补充,具有广阔的发展前景。

#### 2.2.8 小结

本节论述了纳米酶选择性优化的几种常用策略,主要包括通过分子印迹、表面修饰、利用仿生设计、集成效应等手段实现纳米酶与底物之间的结构互补或邻近效应。在这些策略中,配体的类型对于纳米酶的底物选择性至关重要。通过选择合适的配体作为纳米酶的底物结合域,能够有效提高纳米酶对底物的识别和结合能力,并且因此提高了纳米酶对特定底物的催化活性。然而,不可否认的是,尽管纳米酶的选择性研究取得了一些研究进展,但与酶的严格专一性相比,纳米酶依旧相差甚远。与酶类似,纳米酶的催化过程涉及底物结合、底物转化和产物释放等步骤。除了利用配体介导底物结合外,一些纳米酶自身结构对底物结合和转化也有重要影响,例如,二硫化亚铁过氧化物纳米酶独特的纳米结构对  $H_2O_2$  有着高度亲和力<sup>[143]</sup>;水铁矿过氧化氢纳米酶的表面铁缔合羟基对  $H_2O_2$  分裂产生  $O_2$  有重要影响<sup>[65]</sup>。为进一步优化纳米酶的选择性,未来研究一方面要筛选新的高选择性配体介导纳米酶对底物的高选择性结合,另一方面要阐明影响底物转化路径的关键纳米酶构效关系,前者影响了纳米酶对底物的选择性,而后者决定了纳米酶催化反应的专一性。除了提升纳米酶的选择性之外,如何利用纳米酶的泛催化特性开发独特应用,以及研究多催化活性之间的构效关系和调控手段,也是未来研究的重要方向。

#### 2.3 纳米酶的多功能性特性

纳米酶是一类自身蕴含酶学特性的纳米材料。作为一种新型模拟酶,纳米酶区别于天然酶和传统模拟酶,其兼具酶和纳米材料的“双重身份”,最大的特征是除了具有催化功能之外,还具有纳米材料特有的物理和化学性质,这使得纳米酶成为一种双功能或者多功能的分子。科学家正在巧妙地将纳米酶的催化活性与理化特性结合起来,创造出许多奇特的新功能,并应用于环境监测、生物传感器、疾病诊断与治疗等领域。本节将重点介绍纳米酶的多功能特性研究及其应用。

##### 2.3.1 引言

纳米酶领域的迅速崛起得益于其独特的优势;作为一种新型模拟酶,相比天然酶,纳米酶具有经济、稳定、易于修饰及自我组装、活性可受尺寸/结构因素调节等优点<sup>[11]</sup>;更重要的是纳米酶还具备纳米材料特有的物理和化学性质,如  $Fe_3O_4$  纳米酶不仅具有过氧化物酶活性,还具有超顺磁性;二硫化钼( $MoS_2$ )纳米颗粒不仅有催化活性,还有近红外光热特性,这使得纳米酶成为一种双功能或者多功能的分子。很多科学家巧妙地将纳米酶的催化活性与其物理、化学特性结合起来,创造出许多奇特的新功能,在生物医学领域得到了很好的应用。

##### 2.3.2 酶活性与材料的磁性结合

纳米材料的超顺磁性赋予了其两种功能,首先使其可作为核磁共振成像(MRI)的造影剂,用于细胞和组织的体内成像,其次,还可通过外加磁场将其吸附的分子、细胞进行富集,从而提高分子的浓度或细胞的密度。

氧化铁是典型的超顺磁性材料,其超顺磁性可用于磁共振成像<sup>[144]</sup>,具有较高的生物安全性和生物相容性,成为美国食品药品监督管理局批准的第一代无机纳米材料<sup>[145]</sup>。Chen等<sup>[146]</sup>发现超顺磁性氧化铁纳米材料——Ferucarbotran不仅可以有效地进入间充质干细胞实现细胞的核磁成像,还可以发挥其纳米酶活性清除胞内的  $H_2O_2$ ,从而促进干细胞的生长,既实现了干细胞的示踪同时促进细胞的生长。Wang等<sup>[147]</sup>进一步将  $Fe_3O_4$  纳米材料用于肿瘤组织的MRI成像,同时通过其酶活性产生的活性氧(ROS)对肿瘤进行杀伤。

$Fe_3O_4$  纳米酶的超顺磁性还被广泛用于分子和细胞的富集<sup>[1, 148, 149]</sup>。如免疫检测中,通过外加磁场,将磁性纳米材料吸附的抗原进行富集,从而提高检测的灵敏度。基于此性质以及还原氧化石墨

烯/二硫化钼( $rGO/MoS_2$ )复合材料和 $Fe_3O_4$ 纳米酶双酶协同催化的信号放大作用, Tian 等<sup>[150]</sup>开发了一种超灵敏的循环肿瘤细胞电化学检测策略。通过插入用于电化学细胞传感的磁铁, 将免疫磁珠涂覆在磁性玻璃碳电极表面。 $rGO/MoS_2$ 复合材料与 $Fe_3O_4$ 纳米酶对 $H_2O_2$ 的协同催化表现出良好的电催化活性。利用 $rGO/MoS_2$ 和 $Fe_3O_4$ 纳米酶作为电化学信号指示剂和增强剂来制造生物传感器将不需要额外的氧化还原介质来放大检测灵敏度。

纳米酶的磁性作用在体内也有非常高的应用价值。Murohara 等<sup>[149]</sup>将 $Fe_3O_4$ 纳米酶与诱导性多能干细胞共孵育, 在外加磁场的作用下形成多层细胞板, 形成的细胞板机械性能有所增强, 而且 $Fe_3O_4$ 还可以发挥其酶活性, 产生抗氧化功能, 从而促进诱导多能干细胞的生长。Shen 等<sup>[151]</sup>报道了一种靶向线粒体的磁热纳米酶( $Ir@MnFe_2O_4$  NPs), 用于高效的癌症治疗。铱(III)复合物(Ir)在 $MnFe_2O_4$  NPs 表面充当线粒体靶向剂。在暴露于交变磁场时,  $Ir@MnFe_2O_4$  NPs 会引起局部温度升高, 从而导致线粒体损伤(MHT 效应)。该纳米平台将这些优异的治疗特性与双光子显微镜(体外证实)和磁共振成像(体内证实)相结合, 可以精确有效地治疗癌症。

### 2.3.3 酶活性与金属等离子体性质结合

金属的等离子体性质是指在金属表面存在的自由振动的电子与光子相互作用, 产生沿着金属表面传播的表面电磁波。这种电磁波使得金属具备特殊的光学性质, 如表面增强拉曼散射(SERS)和等离子体共振(SPR)现象。

SERS 效应是指在一些特殊的金属良导体(如金、银、铜)表面, 由于样品表面或近表面的电磁场的增强导致吸附分子的拉曼散射信号比普通拉曼散射信号大大增强的现象。科学家利用金、银纳米颗粒同时具备的纳米酶活性和 SERS 效应, 构建了有趣的传感系统, 用于多种物质的检测。如 Wei 等<sup>[152]</sup>巧妙地将金(Au)纳米颗粒的 HRP 酶活性和 SERS 效应结合起来, 偶联葡萄糖氧化酶和乳酸氧化酶形成级联反应, 使氧化酶氧化底物产生的 $H_2O_2$ 与纳米酶共同催化 TMB 产生氧化产物作为拉曼信号的探针, 根据探针拉曼信号的强弱, 实现对底物实时、高灵敏的检测。该方法可用于脑部和肿瘤组织葡萄糖和乳酸的检测, 为生物样品的医学检测提供了新的方法。类似的, 银纳米颗粒也同时具备纳米酶活性和 SERS 效应, 可通过催化产生拉曼信号探针, 从而用于 $H_2O_2$ 的高灵敏检测<sup>[153]</sup>。

SPR 是一种特殊的光学物理现象。当具有该性质的材料大小和形状发生改变时, 其 SPR 光谱性质会随即改变。Fan 等<sup>[154]</sup>将 Au 纳米颗粒的 GOx 活性与其 SPR 性质结合起来构建了一种新型检测系统。GOx 氧化反应产生的 $H_2O_2$ , 与 $HAuCl_4$ 生成 Au 颗粒, 附着在 Au 纳米材料表面, 使其大小和形状发生改变, 从而改变其 SPR 光学性质。而单链和双链 DNA 对 Au 颗粒具有不同的亲和力, 从而对其酶活性产生不同的封闭作用。因此, 该系统可根据单个金纳米颗粒 SPR 性质的改变来实时、特异地检测单链和双链 DNA(图 14)。



图 14 结合 Au 纳米颗粒的 GOx 酶活性和 SPR 性质用于单、双链 DNA 的检测<sup>[154]</sup>

Fig. 14 Combining GOxase activity and SPR properties of Au nanoparticles for single- and double-stranded DNA detection<sup>[154]</sup>

### 2.3.4 酶活性与光热特性的结合

近年来, 纳米酶-光热疗法因其在感染性疾病治疗中具有增强的治疗效果和较少的不良反应而引起了极大的兴趣。近红外光热特性是指具有较高光热转换效率的材料, 在近红外光的照射下将光能转化为热能的性质, 该性质使材料可用于癌细胞和细菌的杀伤。二硫化钼( $MoS_2$ )和聚吡咯/血红素(PPy/hemin)纳米材料具有良好的近红外光热特性, 与其自身的酶活性结合起来, 可实现纳米酶多种功能的协同应用<sup>[155, 156]</sup>。

Zhao 等<sup>[155]</sup>利用 PEG- $MoS_2$  纳米酶发展了一种协同抗菌体系(图 15)。抗菌的机制来源于两方面: (1) $MoS_2$  具有辣根过氧化物酶活性, 可催化低浓度的 $H_2O_2$ 产生 $\cdot OH$ , 避免了高浓度 $H_2O_2$ 对正常组织的毒副作用, 而且 $\cdot OH$ 具有更高的抗菌能力。(2)近红外光照射产生的过高热会加速细菌体内抗氧化物质谷胱甘肽的氧化, 从而破坏细菌的保护机制, 加快细菌的死亡。

然而, 由于尺寸效应的限制, 开发能够快速、有效和协同对抗病原菌的纳米酶-光热剂仍然是一个巨大的挑战。Wang 等<sup>[157]</sup>通过在锌基光敏剂上修饰铂纳米酶制作了一种新型金属-有机框架材料

(MOF) 衍生的杂化纳米酶抗菌策略, 用于增强光热疗法。在低浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下, MOF 衍生的杂化纳米酶具有优异的纳米催化活性, 可有效催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  的释放, 生成有毒的  $\cdot\text{OH}$ , 从而提高细菌膜通透性和热敏感性。一旦引入近红外激光, 纳米酶-光热抗菌平台就可以发挥“纳米刀”的作用, 通过物理切割进一步诱导受损细菌死亡。

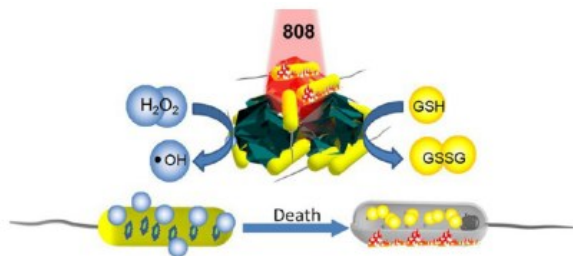


图 15 结合 PEG-MoS<sub>2</sub> 的过氧化物酶活性和近红外光热特性用于细菌的协同杀伤<sup>[155]</sup>

Fig. 15 Combining peroxidase activity of PEG-MoS<sub>2</sub> and NIR photothermal properties for synergistic bacterial killing<sup>[155]</sup>

Li 等<sup>[158]</sup>报道了一种具有双重酶活性的新型纳米酶 (PtFe@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), 用于高效的肿瘤催化治疗。PtFe@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 在酸性肿瘤微环境中表现出内在的光热效应以及光增强的过氧化物酶和过氧化氢酶样活性, 从而有效杀死肿瘤细胞并克服肿瘤缺氧。固然光热疗法是一种极具前景的肿瘤治疗方式, 但过热不可避免地会损伤肿瘤附近的正常组织, 而轻度高温对癌细胞的损伤很容易被应激诱导的热休克蛋白所修复。因此, 通过采用适当的治疗温度同时最大限度地提高光热效率并最大限度地减少对健康组织的损害是必要的。Chang 等<sup>[159]</sup>以钯单原子纳米酶 Pd SAzyme 为模型, 提出了铁死亡促进温和温度光热治疗的新概念。具有 POD 和谷胱甘肽氧化酶 (GSHOx) 模拟活性和光热转换性能的纳米酶, 可导致铁死亡, 其特征在脂质过氧化物 (LPO) 和活性氧的上调。

### 2.3.5 酶活性与光声现象的结合

一些纳米酶或催化产物具有光声效应, 其在近红外区域 (波长 700~1000 nm) 中暴露于非常短持续时间 (约纳秒) 的脉冲激光束时可以产生超声波。

Yan 等<sup>[160]</sup>合成了一种外泌体样石墨烯量子点纳米酶囊泡, 用于鼻咽癌的体内  $\text{H}_2\text{O}_2$  响应光声成像 (PAI)。石墨烯量子点纳米酶的内在类过氧化物酶活性在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下有效地将 ABTS 转化为其氧化形式。氧化的 ABTS 表现出强烈的近红外吸光

度, 使其成为 PAI 的理想造影剂。该研究为如何设计基于碳纳米酶的 PAI 造影剂提供了有趣的见解, 为鼻咽癌的诊断提供了新的思路和技术。

Wu 等<sup>[161]</sup>报道了一种用于急性肝功能衰竭 (ALF) 体内成像的 ROS 敏感型纳米酶增强光声纳米探针。由于纳米酶催化气泡产生和热弹性膨胀之间的协同作用, 纳米探针的深穿透光声信号可以被 ALF 中过表达的 ROS 激活。令人印象深刻的是, 纳米酶增强的 ROS 成像能够比临床 ALT 方法更早地诊断 ALF, 并且纳米探针的 ROS 激活的催化活性可以及时通过纳米酶活性催化治疗 ALF。

### 2.3.6 酶活性与荧光特性的结合

材料的荧光特性目前已广泛用于成像和检测领域, 将纳米材料的酶活性和荧光特性有机结合起来, 使得纳米酶的功能更加多元化。

Cai 团队<sup>[162]</sup>合成了一种新型荧光、过氧化物模拟酶 Au 纳米簇, 通过在其表面偶联肿瘤标志物的配体——叶酸, 使得该探针可同时实现对肿瘤的荧光和染色检测, 两种方法相互补充, 提高了诊断的特异性和准确性。另外, Meng 等<sup>[163]</sup>合成了一种 Cu-CDs 纳米酶, 该材料具有漆酶活性和荧光特性。有趣的是, 当该漆酶模拟酶催化底物对苯二酚时, 其荧光特性逐渐衰弱且与底物的存量成正比, 利用其的酶活性和荧光衰减的特性从而可实现对底物的检测。

Luo 等<sup>[164]</sup>在水相中合成了具有荧光和类过氧化物酶催化活性的多功能纳米粒子——Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@Au MNPs。由于 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@Au MNPs 的荧光被  $\text{H}_2\text{O}_2$  猝灭, 建立了一种视觉检测葡萄糖的方法。

各种结构的碳纳米酶已被广泛用于生物成像, 由于其独特的荧光特性, 近年来引起了广泛关注。Su 等<sup>[165]</sup>开发了 Co 和 N 掺杂的碳点纳米酶, 该纳米酶在非酸性环境中对邻苯二胺特别表现出类似过氧化物酶的活性, 同时也展示了比率荧光成像的应用。

### 2.3.7 酶活性与材料的导电性结合

比色法、化学发光法和电化学法是常用的物质检测方法。其中电化学法具有反应迅速、操作简便、灵敏度高的优点, 然而常用组成成分天然酶却由于稳定性差、成本较高成为限制其应用的因素。而纳米酶中的重金属、金属化合物和碳纳米管不仅具有催化活性还具有良好的导电能力, 可催化产生电子并加快电子的转移, 从而可增加检测的灵敏

度<sup>[166-172]</sup>。目前已有多种纳米酶如 Ag、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、CdS、FeS、FeSe、C 等用于电化学检测, 主要利用其过氧化物酶活性, 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生电子转移, 从而实现 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的检测。

### 2.3.8 表面修饰使纳米酶具有新功能

纳米酶的表面可修饰性为生物学中的众多应用提供了多功能的平台。抗体的修饰是在纳米酶中常用的手段。在纳米酶的开创性研究中, Yan 等<sup>[1]</sup>报道了两种利用修饰有抗体的纳米酶用于蛋白质检测的方法。此后, Yan 等<sup>[148]</sup>用修饰了抗体的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶开发了用于埃博拉病毒诊断的纳米酶试纸条。与标准胶体金试纸相比, 纳米酶试纸在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下通过催化过氧化物酶底物的氧化来放大信号, 显著提高了 100 倍的检测灵敏度, 对埃博拉病毒 (EBOV) 糖蛋白的检测限低至 1 ng/mL。如果利用 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的磁分离特性来富集目标, 则可以实现 10 倍的增强。此外, 临床样本可在 30 min 内诊断出来, 检测精度可与 ELISA 相媲美。这些结果表明, 纳米酶试纸条可以为埃博拉受灾地区的感染诊断提供更快、更简单的平台。Xia 等<sup>[173]</sup>使用标有抗体的钯-铱 (Pd-Ir) 立方体对人前列腺特异性抗原 (PSA) 进行免疫测定。与传统的免疫测定相比, 基于 Pd-Ir 纳米酶的 ELISA 的检测限低 110 倍。为了进一步提高免疫测定的检测灵敏度, 该团队在接下来的研究中开发了金囊包裹的 Pd-Ir NPs 作为过氧化物酶模拟物 (图 16)<sup>[174]</sup>。许多 Pd-Ir NPs 可以在加热时从金囊泡中释放出来, 从而形成用于免疫测定的信号放大平台。该方法对 PSA 的检测限为每毫升飞克, 比传统免疫测定法低三个数量级。

特异识别不仅可以来自抗原和抗体, 还可以来自适体及其相应的靶标。例如, Yang 等<sup>[175]</sup>开发了一种用于凝血酶检测的无标记比色法。首先通过生

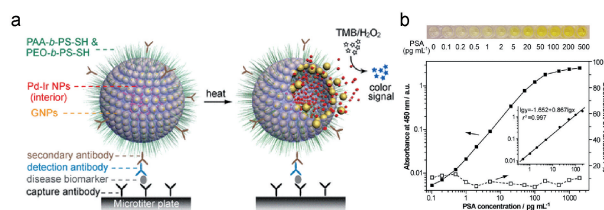


图 16 利用金囊包裹的 Pd-Ir NPs 进行信号放大, 以 ELISA 方式超灵敏检测疾病生物标志物<sup>[174]</sup>

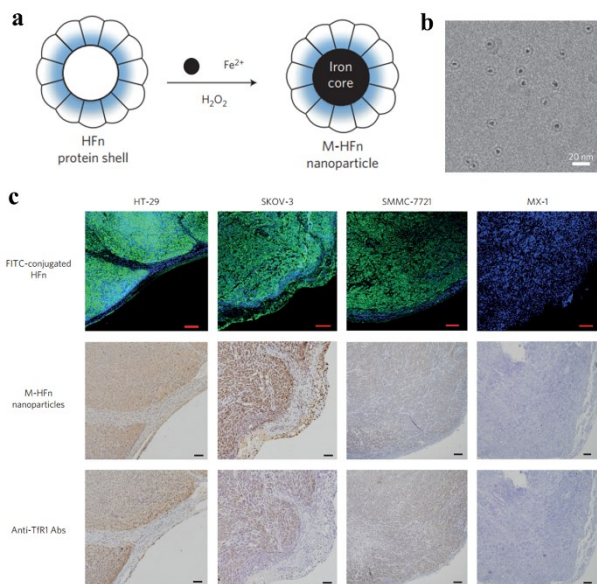
Fig. 16 ELISA for ultrasensitive detection of disease biomarkers by using gold vesicle encapsulated Pd-Ir NPs for signal amplification<sup>[174]</sup>. Reprinted with permission Copyright (2017) American Chemical Society

物素-链霉亲和素相互作用将一种抗凝血酶适体固定在 96 孔微孔板上。另一个 ssDNA 含有一部分抗凝血酶适体和另一部分用于 Ag/Pt NC 制备的模板 DNA。在目标凝血酶存在的情况下, 两个适体将结合形成三明治结构。以 DNA 为模板的 Ag/Pt 双金属纳米簇将催化 TMB 氧化为 oxTMB 用于比色信号。凝血酶的检测限为 2.6 nmol · L<sup>-1</sup>。此外, 基于 Zr<sup>4+</sup> 和磷酸盐之间的识别, Song 等<sup>[176]</sup>合成了 Zr<sup>4+</sup> 功能化的 Pt/碳点作为过氧化物酶模拟物来识别和检测磷蛋白。

Chen 等<sup>[177]</sup>开发了用于特定癌细胞检测的叶酸修饰纳米铂/氧化石墨烯 (PtNPs/GO) 纳米复合材料。PtNPs/GO 表现出增强的过氧化物酶样活性, 可在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下催化 TMB 的氧化以进行信号传导。当被叶酸修饰时, 纳米复合材料可以通过细胞膜上过表达的叶酸受体靶向到癌细胞。基于过氧化物酶模拟 PtNPs/GO 纳米复合材料的检测平台对癌细胞具有高灵敏度。肉眼甚至可以检测到 125 个细胞。为了使硫铁矿纳米酶在小鼠体内靶向到肿瘤组织, Yan 等<sup>[143]</sup>在该纳米酶表面修饰肿瘤靶向分子叶酸, 结果表面修饰后的纳米酶通过与 CT26 肿瘤表面高表达的叶酸受体结合, 被肿瘤摄入的量大大增加, 相比未修饰的材料产生更好的肿瘤治疗效果。

铁蛋白近年来成为赋予纳米酶靶向功能重要的修饰。Yan 等<sup>[178]</sup>通过将纳米酶封装在重组人重链铁蛋白壳中来制备磁性铁蛋白纳米酶 (M-HFn)。HFn 壳可以通过在肿瘤细胞表面过表达的转铁蛋白受体靶向到肿瘤组织, 而无需额外的识别配体。同时, 氧化铁核心催化过氧化物酶底物的氧化, 产生用于可视化肿瘤组织的有色产物。在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DAB 存在的情况下, M-HFn 显示出强烈的棕色, 用于观察肿瘤组织 (图 17)。为了证明基于 M-HFn 的染色平台的高特异性、敏感性和准确性, 对来自 9 种癌症患者的 474 个临床标本进行了测试。他们的结果表明, 纳米酶成像平台能够以 98% 的灵敏度和 95% 的特异性将癌细胞与正常细胞区分开。铁蛋白也可通过修饰在纳米酶表面发挥靶向作用。Yan 等<sup>[32]</sup>制备了氮掺杂多孔碳纳米球 (N-PCNs), 可表现出 4 种类酶活性, 包括氧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶, 可在体内调节活性氧。用铁蛋白进一步修饰 N-PCN 有助于通过受体介导的内吞作用靶向递送到溶酶体中。然后, 溶酶体的酸性环境促进了 N-PCN 进行过氧化物酶和氧化酶模拟活动以产生 ROS 并消耗氧气, 从而对肿瘤细胞产生毒性

作用和缺氧。此外,他们的动物实验结果表明,N-PCNs可以有效地减少肿瘤体积和提高荷瘤小鼠的存活率。



**图 17** 肿瘤组织的 M-HFn 染色:(a) M-HFn 的合成示意图;(b) M-HFn 的 TEM 图像;(c) M-HFn 作为过氧化物酶的模拟物用于肿瘤组织的靶向和可视化<sup>[178]</sup>

**Fig. 17** M-HFn staining of tumor tissues. (a) Schematic illustration of the synthesis of M-HFn. (b) TEM images of M-HFn. (c) M-HFn as a peroxidase mimic for targeting and visualizing tumor tissues<sup>[178]</sup>. Adapted with permission. Copyright (2012) Nature Publishing Group

### 2.3.9 小结

纳米酶作为一种新型模拟酶,有别于天然酶和传统模拟酶,它兼具酶和纳米材料的“双重身份”,除了具有催化功能之外,还具有纳米材料在光、电、磁、声等方面独有的物理和化学特性,从而可作为一种双功能或多功能分子用于医学、环境和化工等领域。虽然目前已经有一些关于纳米酶多功能特性的研究和应用,但为了使其更好地用于人类健康及环境的改善,纳米酶多功能特性的研究和应用仍是未来努力的方向。

对于多功能纳米酶在当前应用,大多数研究是基于过氧化物酶模拟物,或与天然氧化酶结合用于检测  $\text{H}_2\text{O}_2$  和葡萄糖,以及有机污染物的降解。鉴于目前存在六种主要类型的天然酶,我们预计会看到更多具有氧化还原反应之外的新催化活性的多功能纳米酶。另外,多功能纳米酶在临床使用之前,还需要仔细研究和测试各种纳米材料存在的问题,包括临床毒性、稳定性和催化机制。

对于 MRI 应用,除了磁性氧化铁  $\text{T}_2$  剂之外,基于钆(Gd)的纳米材料是另一种类型的 MR 造影剂,其表现出信号强度的增加并在  $\text{T}_1$  加权图像中显得明亮。 $\text{T}_1$  加权成像可用于识别脂肪组织,而  $\text{T}_2$  加权成像可用于检测炎症。因此,应考虑和探索作为过氧化物酶模拟物的 Gd 基纳米材料,以拓宽多功能纳米酶的 MRI 应用。对于基于 SERS 的活性纳米酶,受金属纳米颗粒(Au、Ag)本身的限制,通常其催化活性相对较低。为了解决这个问题,可以将一种具有高催化活性的纳米材料沉积在 Au/Ag 的表面上。除了本文所提到的功能外,还应研究其他功能,以拓宽多功能纳米酶的研究和应用。这方面还没有得到很大程度的探索,这可能是未来研究的一个新的重要方向。

### 2.4 纳米酶多酶活性

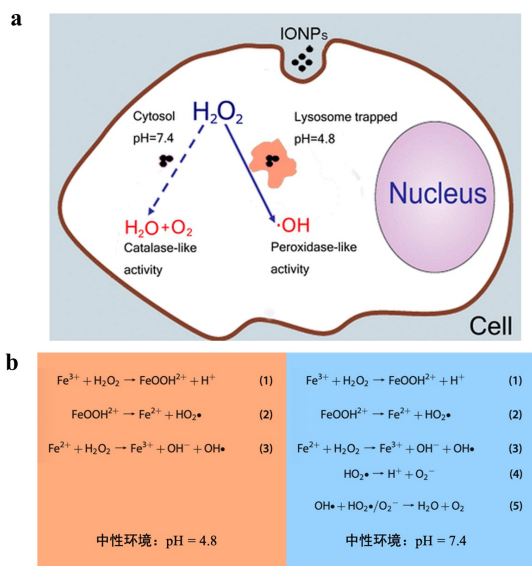
纳米酶作为一类具有类似天然酶催化活性和酶促反应动力学特征的纳米材料,近年来受到了广泛的关注,与天然酶相比,纳米酶具有更高的稳定性、更简易的存储条件、更低的成本和可调节的催化活性。自顾宁团队<sup>[9]</sup>在 2012 年首次发现  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶具有双酶活性以来,越来越多的研究者发现纳米酶能够同时表现出多种类似天然酶的酶活性,这些活性使得纳米酶能够广泛应用于传感检测、生物医学以及环境工程等领域。随着对纳米酶研究的深入,科学家们发现有些纳米酶不仅具有多酶活性,且各酶活性之间能巧妙地构成级联反应系统,实现中间产物的自给自足并构成反应的闭环,极大地提高了反应效率。本节将对纳米酶本身蕴含的多酶活性及其级联催化进行介绍(图 18),并对其应用前景进行展望。

利用纳米酶来设计下一代人工酶级联系统在催化研究领域受到了越来越多的关注,基于纳米酶本身蕴含的多酶活性来构建酶级联催化体系充满机遇和挑战。在近期的研究工作中,人们发现一些纳米酶在特定条件下能够表现出不同的催化特性,纳米酶本身蕴含的多酶活性这一发现丰富了纳米酶的应用范畴。纳米酶本身蕴含的多酶活性主要以 POD-CAT、POD-OXD 和 SOD-CAT 为主,此外,还有 OXD-CAT,以及具有 3 种及以上的一类酶活性(表 4),接下来我们将从以上 5 种多酶活性体系来介绍纳米酶本身蕴含的多酶活性特点及其应用。

#### 2.4.1 POD-CAT

POD 通常能够在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下催化底物氧化,消耗  $\text{H}_2\text{O}_2$  并产生  $\cdot\text{OH}$ 。天然 POD 是一种血红素结合蛋白,以铁卟啉为辅基,以  $\text{H}_2\text{O}_2$  为电子受体催





**图 19**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶具有 pH 依赖的类 POD 和类 CAT 双酶活性<sup>[9]</sup>; (a) 在酸性条件下,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶能够发挥类 POD 活性催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生  $\cdot\text{OH}$ , 而在中性条件下,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶则发挥类 CAT 活性将  $\text{H}_2\text{O}_2$  直接分解为  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ ; (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶催化机制示意图

**Fig. 19**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanozymes possess pH-dependent POD-like and CAT-like activities<sup>[9]</sup>. (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanozymes catalyze  $\text{H}_2\text{O}_2$  to produce  $\cdot\text{OH}$  through its peroxidase-like activity under acid environment. In neutral or alkaline environment,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanozymes decompose  $\text{H}_2\text{O}_2$  to produce  $\text{O}_2$  through its catalase-like activity. (b) Schematic diagram of the catalytic mechanism of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanozymes under different pH environment. Copyright© 2012, American Chemical Society

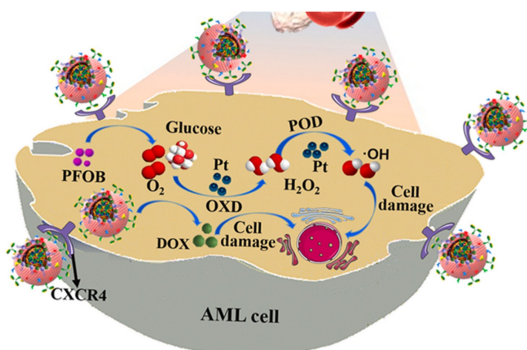
展其应用场景至关重要。目前已报道的具有类 POD-OXD 双酶活性的纳米酶类型按照 OXD 活性的催化底物种类可分为 POD-GOx、POD-AAO、POD-LAC、POD-GSH 氧化酶、POD-半胱氨酸氧化酶等。

#### 2.4.2.1 POD-GOx

金纳米颗粒 (AuNPs) 已被发现具有氧化葡萄糖生成葡萄糖酸的功能<sup>[185]</sup>, 后来被证实 AuNPs 具有类似天然酶 GOx 的催化活性能够消耗氧气, 氧化葡萄糖生成葡萄糖酸和  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[186]</sup>。随后人们发现通过对 Au 纳米酶进行不同的表面修饰, 能使 Au 纳米酶表现出类 GOx 或类 POD 活性。例如, 巯基乙胺修饰的 Au 纳米酶表现出类 POD 活性, 而柠檬酸盐修饰的 Au 纳米酶则表现出类 GOx 活性<sup>[187]</sup>。该作者进一步发现, 通过将未经表面修饰的 Au 纳米酶负载到介孔二氧化硅材料上, 不仅能够使 Au 纳米酶避免异质分布和聚集, 提高其稳定性, 而且使得 Au

纳米酶能够同时表现出类 GOx 和类 POD 活性。Au 纳米酶类 GOx 活性催化葡萄糖生成葡萄糖酸和  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 产物葡萄糖酸降低了反应 pH 环境, 并进一步激活了 Au 纳米酶类 POD 活性, 中间产物  $\text{H}_2\text{O}_2$  又可以催化 TMB 发生显色反应, 该自级联催化反应体系大大提高了葡萄糖的检测效率, 在生物催化、生物测定、纳米生物医学和纳米技术等领域具有广泛的应用价值。

与 Au 纳米酶相似, 同为贵金属的 Pt 纳米酶也被发现具有类 GOx 和类 POD 双酶活性。Zhang 和 Gu 等<sup>[182]</sup> 利用 PLGA 包载全氟溴辛烷 (PFOB) 后修饰 Pt 纳米酶, 构成了一套酶级联催化体系用于肿瘤治疗。PFOB 能够释放  $\text{O}_2$ , 为 Pt 纳米酶发挥类 GOx 活性氧化葡萄糖提供  $\text{O}_2$  来源, 催化产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  又被 Pt 纳米酶类 POD 活性消耗产生  $\cdot\text{OH}$  用于杀伤细胞 (图 20)。



**图 20** 纳米酶基于 POD-GOx 多酶活性的级联催化体系。PFOB@PLGA@Pt 协同 PFOB 载氧和 Pt 纳米酶 POD-GOx 级联催化, 消耗葡萄糖并产生  $\cdot\text{OH}$  诱发肿瘤细胞死亡<sup>[182]</sup>

**Fig. 20** Nanozymes based POD-GOx enzymatic cascade systems. PFOB@PLGA@Pt combined the oxygen-carrier ability of PFOB and the POD-GOx cascade catalysis of Pt nanozymes to consume glucose and produce  $\cdot\text{OH}$ , thus inducing tumor cell death<sup>[182]</sup>. Copyright © 2022 The Authors

基于此, Dong 等<sup>[57]</sup> 对包括 Au 在内的多种贵金属纳米酶模拟 GOx 进行了系统的机理研究。作者发现 Au 纳米酶在催化葡萄糖氧化的过程中, 以  $\text{O}_2$  作为电子受体时, 可以生成得到  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 同时 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 自由基 (ABTS $^{\cdot\cdot}$ ) 也可以作为电子受体参与到催化葡萄糖氧化的过程。但对于其他贵金属纳米酶而言 (比如 Pt、Pd、Ru、Rh 和 Ir),  $\text{O}_2$  作为电子受体时被还原成  $\text{H}_2\text{O}$ , 而非  $\text{H}_2\text{O}_2$  (图 21)。

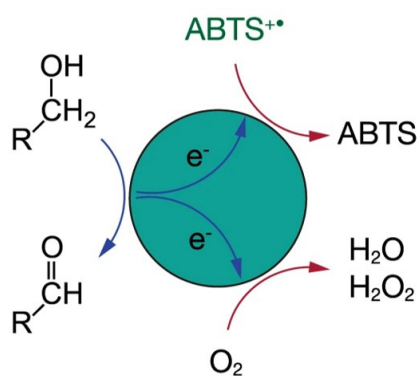


图 21 贵金属纳米酶催化  $O_2$  或  $ABTS^{+\cdot}$  氧化葡萄糖的机理<sup>[57]</sup>

Fig. 21 Mechanism of noble metal nanoparticles catalyzing glucose with  $O_2$  or  $ABTS^{+\cdot}$  as the oxidant<sup>[57]</sup>. Copyright © 2021, The Author(s)

#### 2.4.2.2 POD-AAO

天然 AAO 是一种含铜的酶,其能氧化抗坏血酸生成水和脱氢抗坏血酸,因此围绕含铜的纳米材料设计模拟 AAO 活性的纳米酶具备理论基础。在 CuS 纳米颗粒已经被发现具有类 POD 活性的基础上,Liu 等<sup>[183]</sup>通过合成方法改进,设计了一种 CuS 纳米簇纳米酶,该 CuS 纳米簇不仅具有类 POD 活性,而且也同时表现出类 AAO 催化活性,能够催化抗坏血酸氧化生成脱氢抗坏血酸。该项工作中,通过改变 CuS 纳米酶的尺寸和形貌,使其具备了多酶催化活性。

#### 2.4.2.3 POD-LAC

LAC 是一种催化活性中心含四个铜离子的多酚氧化酶,属于铜蓝氧化酶,可以氧化多酚化合物并生成  $H_2O$ ,在绿色化学中备受重视。受天然 LAC 酶活性中心的启发,潘海波团队<sup>[188]</sup>设计了一种利用  $Cu^{2+}$  和富马酸(FMA)合成的 Cu 金属有机框架材料纳米酶来模拟 LAC 的催化活性,该纳米酶在  $pH = 8.0$  时发挥类 LAC 活性,还原  $Cu^{2+}$  促进酚类化合物氢氧键解离,可用于绿色化学; $pH = 4.0$  时类 POD 活性较强,促进  $H_2O_2$  中 O—O 键断裂产生  $\cdot OH$ ,产生颜色反应用于人体内葡萄糖和肾上腺素的检测。

随后,Liang 等<sup>[189]</sup>在  $Cu^{2+}$  和鸟苷酸(GMP)组装形成的无定形金属有机框架材料 Cu/GMP 被发现能够模拟 LAC 的催化活性的基础上,在 Cu/GMP 体系中加入正铁血红素(hematin)与  $Cu^{2+}$  和 GMP 共组装合成了同时具备类 LAC 和类 POD 催化性能的 hematin@ Cu/GMP 纳米酶。该纳米酶通过模拟 LAC 和 POD 的催化活性中心,模拟了类 LAC 和类

POD 催化活性,能够高效催化有害染料降解。该项工作表明,在材料设计时模拟多种酶的催化活性中心,可以为实现多酶活性设计提供途径。

#### 2.4.2.4 POD-GSH 氧化酶

2021 年,Yan 等<sup>[143]</sup>报道了一种黄铁矿( $FeS_2$ )纳米酶具有类 POD 和类 GSH 氧化酶催化活性。一方面, $FeS_2$  纳米酶对底物  $H_2O_2$  具有超高的亲和力,使其能够利用肿瘤微环境低浓度的  $H_2O_2$  发挥类 POD 活性产生  $\cdot OH$ ,另一方面, $FeS_2$  纳米酶能够结合底物 GSH,在  $O_2$  存在下氧化 GSH 生成 GSSG 和  $H_2O_2$ ,生成的  $H_2O_2$  进一步被类 POD 活性利用来增强  $\cdot OH$  的生成,共同催化肿瘤细胞发生凋亡和铁死亡。此种多酶活性级联策略不仅有效消耗了肿瘤微环境的 GSH,破坏了肿瘤细胞内的抗氧化体系,从而增加了肿瘤细胞的氧化损伤;而且催化反应中间产物  $H_2O_2$  生成 ROS,放大了抗肿瘤效应。该项工作作为纳米酶发挥多酶级联催化活性治疗肿瘤提供了新思路。

#### 2.4.2.5 POD-半胱氨酸氧化酶

一种基于 CuO 纳米酶的双功能自级联催化系统凭借其类 OXD 活性模拟半胱氨酸的有氧氧化,生成胱氨酸与  $H_2O_2$ ,结合 CuO 纳米酶类 POD 活性,催化  $H_2O_2$  生成  $\cdot OH$ ,氧化对苯二甲酸产生荧光信号,从而构建了一种药品和人血浆中半胱氨酸的检测平台<sup>[190]</sup>。

#### 2.4.2.6 POD-底物多样氧化酶

我们前面介绍的几种具有类 POD-OXD 双酶活性的纳米酶 Au、Pt、Cu 金属有机框架、CuS、 $FeS_2$ 、CuO 表现出的类 OXD 活性均能够催化特定的 OXD 底物氧化,不过也有一些工作报道的类 POD-OXD 双酶活性纳米酶并没有明确的 OXD 底物,但是这类纳米酶均能在表现出类 POD 活性的同时还原  $O_2$  生成  $O_2^{\cdot -}$  或  $H_2O_2$ 。

其中包括贵金属类的纳米酶,如 AuPt<sup>[191]</sup>、PtRu<sup>[192]</sup>、AuPtPd<sup>[193]</sup> 这一类合金纳米酶,均被报道表现出了与 Au、Pt 纳米酶相似的类 POD-OXD 双酶活性。而且,AuPt 纳米酶类 POD-OXD 催化活性与合金材料中 Pt/Au 的比例呈正相关,通过调整合金比例,可以实现纳米酶催化活性的可调。

由于许多天然氧化酶的活性中心都含有铜离子,因此一些铜基纳米酶往往能模拟类 OXD 催化活性。除了前面介绍的 Cu 金属有机框架、CuS、CuO 纳米酶外, $Cu_2WS_4$  纳米晶纳米酶也被报道具有类

POD-OXD 双酶活性,在  $O_2$  存在条件下,氧化细菌内的还原性物质生成  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  再进一步被其类 POD 活性利用生成  $\cdot OH$  来发挥抗菌功能<sup>[194]</sup>。此外,Fe-N-S 掺杂的多孔碳纳米酶具有天然 POD 或 OXD 的 Fe—N 配位结构,故也能模拟类 POD-OXD 双酶活性,该纳米酶能催化  $O_2$  还原生成  $O_2^{\cdot-}$ 、单线态氧( $^1O_2$ )和  $H_2O_2$ ,因而配合其类 POD 活性产生  $\cdot OH$  实现了协同高效杀菌<sup>[195]</sup>。相似的如氧化钒( $VO_x$ )纳米点纳米酶也是利用这一特点实现级联协同杀菌的, $VO_x$  的多种氧化价态为其多酶活性提供了基础<sup>[196]</sup>。利用纳米酶类 POD-OXD 双酶级联催化生成多种自由基来杀菌与单一酶催化抗菌相比,效率大大提升。

Mn 基纳米酶也被报道具有类 POD-OXD 双酶活性,如 Li 等<sup>[197]</sup>报道了二维  $MnO_2$  纳米薄片纳米酶,在有无  $H_2O_2$  存在情况下,均可氧化底物 TMB 发生显色反应。而且只有纳米片状的  $MnO_2$  纳米酶表现出明显的 POD-OXD 双酶活性,而块状、球状的  $MnO_2$  纳米酶活性则显著下降,这可能与二维  $MnO_2$  纳米薄片的比表面积大、活性中心多、能够结合更多的 TMB、 $O_2$  和  $H_2O_2$  底物、更高的电子传递效率有关。

#### 2.4.3 SOD-CAT

除了基于 POD-OXD 的多酶活性将 OXD 把  $O_2$  还原为  $H_2O_2$  的能力与 POD 消耗  $H_2O_2$  产生  $\cdot OH$  的能力结合起来,形成级联酶催化体系产生自由基用于传感检测、抗菌、肿瘤治疗等方面外,基于 SOD-CAT 级联体系的纳米酶研究也成果颇丰。在 SOD-CAT 双酶活性级联体系中,SOD 活性清除  $O_2^{\cdot-}$  产生  $H_2O_2$ ,接着 CAT 活性能够将上一步产生的  $H_2O_2$  分解为  $O_2$ ,这种模拟酶活级联策略不仅体现了集多种酶活性于一体的高效性,也在清除炎症损伤部位 ROS 的同时减少了有害中间反应产物  $H_2O_2$  的产生,放大了抗氧化效应,提高了治疗效果。总的来说,在单一纳米酶材料上发挥该级联催化反应具有高局部反应物浓度,减少中间分解和高传质效率的优势,与单一酶催化或者两种酶单独使用相比,能够极大地提升酶催化效率<sup>[142]</sup>,在缓解炎症性疾病、对抗氧化损伤方面有巨大的潜力。

天然 SOD 酶属于金属酶,按照活性中心的金属离子类型主要分为三种:CuZnSOD、MnSOD、FeSOD。三种 SOD 酶均可催化  $O_2^{\cdot-}$  自由基发生歧化反应生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ ,从而清除炎症过程中伴随产生的过氧化物游离基,产生强大的抗炎作用。许多含有以

上 Cu、Zn、Fe、Mn 金属元素的纳米材料都被用来设计和合成 SOD 纳米酶,其催化机理大多涉及  $O_2^{\cdot-}$  质子化以及  $HO_2^{\cdot}$  的吸附和重排。如图 22 所示,以 Au 和 Pt 为代表的金属 SOD 纳米酶<sup>[61]</sup>的  $HO_2^{\cdot}$  吸附是一个高放热过程,这说明一旦  $HO_2^{\cdot}$  吸附在表面上,就能够很容易转化为  $O_2$  和  $H_2O$ 。

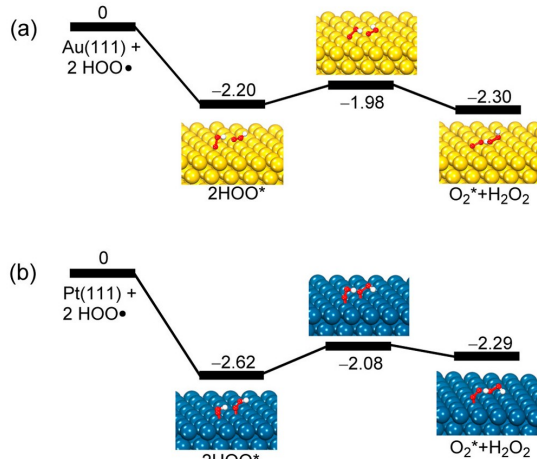


图 22 Au 和 Pt 的 (111) 晶面上两个  $HO_2^{\cdot}$  基团的重排<sup>[61]</sup>

Fig. 22 Rearrangements of two  $HO_2^{\cdot}$  groups on (111) facets of Au and Pt<sup>[61]</sup>. Copyright © 2015, American Chemical Society

前面我们已经介绍,天然 CAT 酶是以铁卟啉为辅基的结合酶,它可促使  $H_2O_2$  分解为分子氧和水,清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受  $H_2O_2$  的毒害,是生物防御体系的关键酶之一。为了模拟 SOD-CAT 双酶活性,人们设计了许多包含金属的纳米酶。

魏辉团队<sup>[198]</sup>长期关注抗氧化级联催化纳米酶的设计,2018 年该团队报道 Mn 基纳米酶  $Mn_3O_4$  能够通过  $Mn^{2+}$  和  $Mn^{3+}$  两种氧化态之间的转换模拟高活性的 SOD 和 CAT 酶,通过类 SOD 和类 CAT 催化级联抗炎。相似的,该团队还利用氧化铈( $CeO_2$ )纳米酶类 SOD 和类 CAT 催化级联治疗肠炎<sup>[199]</sup>,而  $CeO_2$  纳米酶的  $Ce^{3+}$  和  $Ce^{4+}$  两种氧化态之间的转换为其催化活性提供了来源。近期,该团队还利用锆(Zr)与 Mn 卟啉和 Pt 共组装合成了 Pt@PCN222-Mn 纳米酶<sup>[142]</sup>,该纳米酶中三价 Mn 卟啉通过模拟天然酶提供 SOD 活性来源,Pt 纳米颗粒提供类 CAT 活性来源,因而 Pt@PCN222-Mn 纳米酶形成了 SOD-CAT 级联催化,高效地用于体内 ROS 的清除(图 23)。

此外,Pd 纳米晶纳米酶被报道具有类 SOD 和

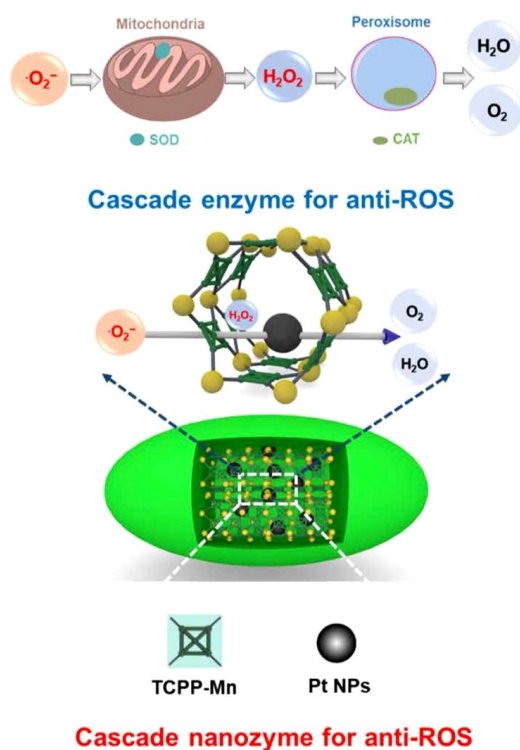


图 23 纳米酶基于 SOD-CAT 多酶活性的级联催化体系。Pt@PCN222-Mn 纳米酶通过 SOD-CAT 级联催化清除  $O_2^{\cdot-}$  [142]

Fig. 23 Nanozymes based SOD-CAT enzymatic cascade system. Pt @ PCN222-Mn nanozymes exert SOD-CAT cascade enzyme-like activities to scavenge  $O_2^{\cdot-}$  [142]. Copyright © 2020 The Authors

类 CAT 级联催化活性抵抗氧化损伤,而且该研究发现,具有较低表面能的(111)面 Pd 八面体纳米酶的催化活性显著高于具有较高表面能的(100)面 Pd 立方体纳米酶 [200],这表示除了纳米酶的尺寸、结构、元素组成外,表面能也是影响纳米酶级联催化性能的重要因素。

#### 2.4.4 OXD-CAT

Wei 等 [201] 报道了一种通过在  $CeO_2$  纳米棒上原位生长 Pt 纳米颗粒合成的 Pt/ $CeO_2$  纳米酶具有类 OXD-CAT 双酶活性。作者从具有类 CAT 催化活性的铂系元素 (Pt、Ir、Rh、Pd) 纳米酶中筛选存在潜在类尿酸氧化酶 (UOD) 的纳米酶,结果发现 Pt 纳米酶在具备类 CAT 催化活性的同时,具有最高的类 UOD 催化活性。通过将 Pt 纳米酶负载到  $CeO_2$  纳米棒上来提高纳米酶的稳定性和生物相容性,该 Pt/ $CeO_2$  纳米酶利用其类 UOD-CAT 活性,能够催化尿酸分解,并将  $O_2$  还原为  $H_2O_2$ ,再级联其类 CAT 活性,分解  $H_2O_2$  为  $O_2$ ,实现循环催化,高效分解尿酸,并避

免了中间反应产物  $H_2O_2$  的堆积。纳米酶模拟的多酶活性与级联反应的优势在治疗急性痛风中得到了有效的验证 (图 24)。

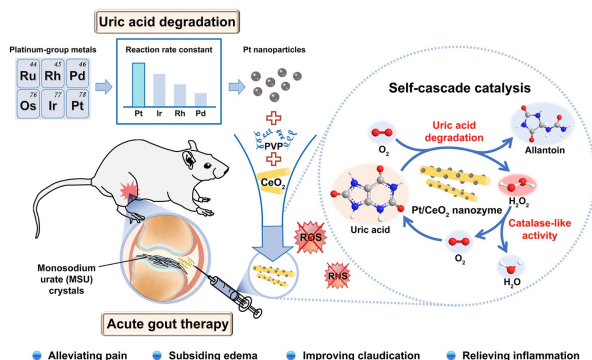


图 24 纳米酶基于 OXD-CAT 多酶活性的级联协同催化体系。Pt/ $CeO_2$  纳米酶通过 UOD-CAT 级联催化实现循环催化,高效分解尿酸 [201]

Fig. 24 Nanozymes based OXD-CAT enzymatic cascade system. Pt/ $CeO_2$  nanozymes exert UOD-CAT cascade enzyme-like activities to realize cyclic catalysis for consuming uric acid [201]. Copyright © 2022, American Chemical Society

#### 2.4.5 具有 3 种及以上类酶活性的纳米酶

##### 2.4.5.1 SOD-CAT-UOD

近期,一种精氨酸多肽-Pt 纳米颗粒簇杂化纳米酶被发现同时具有类 UOD、类 SOD、类 CAT 三种催化活性,其中形成 UOD-CAT 和 SOD-CAT 两组级联催化反应,能够模拟天然过氧化物酶体,分解尿酸并清除自由基,缓解炎症或氧化损伤 [202]。该纳米酶通过精氨酸修饰 Pt 纳米酶来模拟天然酶活性中心的氨基酸残基微环境,而且精氨酸含有一个带有氮孤对的胍官能团,能够通过氢键或静电相互作用结合多种底物,因而能够模拟天然过氧化物酶体,具备多种氧化还原酶类催化活性。

##### 2.4.5.2 SOD-CAT-POD

2016 年,Gu 和 Zhang 等 [203] 报道了同时具有类 POD、类 SOD、类 CAT 催化性能的普鲁士蓝 (PB) 纳米酶 [203]。PB 纳米酶中具有多氧化价态的 Fe,并且 PB 材料具有丰富的氧化还原电位,能够高效地传递电子,因而赋予其多种类酶催化活性。作者还提出,不同于以往的铁基纳米酶在酸性条件下发挥类芬顿反应产生  $\cdot OH$ ,PB 纳米酶发挥类 POD 催化活性消耗  $H_2O_2$ ,氧化细胞内的还原性物质,抑制  $\cdot OH$  的生成。协同类 SOD-CAT 级联催化,能够共同高效清除 ROS 保护细胞免受氧化损伤。

Liu 等 [205] 设计了一种使用硒 (Se) MOF 材料包

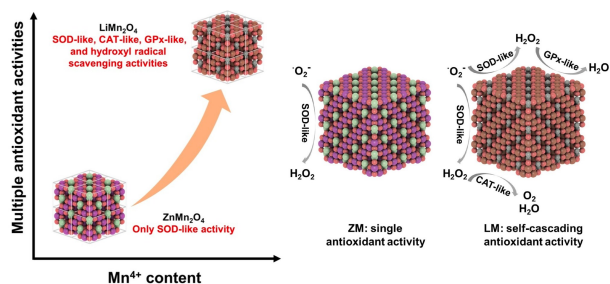


图 25 纳米酶基于 SOD-CAT-GPx 多酶活性的级联催化体系。LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶通过类 SOD、类 CAT 和类 GPx 活性清除 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [204]

Fig. 25 Nanozymes based SOD-CAT-GPx enzymatic cascade system. LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanozymes exert SOD-CAT-GPx cascade enzyme-like activities to scavenge O<sub>2</sub><sup>·-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [204]. Copyright © 2022 Wiley - VCH GmbH

裹双铁原子 Fe<sub>2</sub>NC 合成了 Fe<sub>2</sub>NC@Se 纳米酶,该纳米酶同时具有类 SOD、类 CAT 和 GPx 催化活性,能够通过级联催化高效清除自由基。其中 Se-MOF 能够模拟天然含硒 GPx 酶的活性中心,产生类 GPx 活性在氧化 GSH 为 GSSG 的同时,催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解为 H<sub>2</sub>O;而双铁原子 Fe<sub>2</sub>NC 纳米酶则具备优异类 SOD-CAT 级联催化功能,两个功能协同实现了针对 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的自由基清除,用于保护脑缺血再灌注损伤。

此外,Wei 等 [204] 发现 ZnMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶只有类 SOD 活性,而 LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶则具备了类 SOD、类 CAT、GPx 催化活性(图 25),进一步的机制分析发现,通过掺杂金属元素,并提高 Mn<sup>4+</sup>/Mn<sup>3+</sup> 比例,不仅能够提高 Mn 基纳米酶类 SOD 活性,而且能够使 Mn 基纳米酶出现多酶活性,并发挥抗氧化级联催化反应。SOD 清除 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 是抗氧化级联反应的第一步,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的分解是抗氧化级联反应的第二步,CAT 和 GPx 活性都能达到这一作用,因此 LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶表现出更好的体内抗炎效果。

#### 2.4.5.3 POD-OXD-CAT

近期,一种 Mn 单原子纳米酶被报道具有类 POD、类 OXD、类 CAT 三种催化活性 [179]。与前面介绍的具有类 POD-OXD 活性的 MnO<sub>2</sub> 纳米酶相比,Mn 单原子纳米酶具有更多的活性中心,因而催化活性更高。该纳米酶进入细胞后,利用其类 POD 和类 CAT 活性催化细胞内的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别生成 ·OH 和 O<sub>2</sub>,O<sub>2</sub> 又进一步被其类 OXD 活性利用生成 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 自由基。该催化级联体系生成的 ·OH 和 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 协同诱导了肿瘤细胞死亡,可用于肿瘤催化治疗。

#### 2.4.5.4 POD-OXD-SOD-CAT

此外,具有 4 种氧化还原酶催化活性(POD、OXD、SOD、CAT)的纳米酶也陆续被报道出来。如 Gao 等 [75] 报道了一种仿生合成的 Fe-N<sub>4</sub> 单原子纳米酶,该纳米酶能够模拟天然氧化还原酶如 SOD、CAT、UOD、POD 的酶活性中心的 Fe—N 配位形式,因而如同天然过氧化物酶体一样,同时具备了 SOD、CAT、UOD、POD 四种类酶催化活性。其中,该纳米酶通过 UOD-CAT 和 SOD-CAT 两组级联催化反应分解尿酸并清除自由基,用于治疗高尿酸血症和缺血性中风(图 26)。

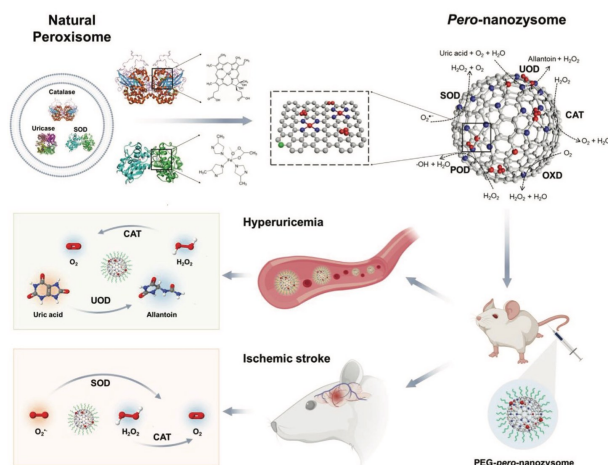


图 26 纳米酶基于 POD、OXD、SOD、CAT 多酶活性的级联协同催化体系。Fe-N<sub>4</sub> 单原子纳米酶模拟天然过氧化物酶体,通过 UOD-CAT 和 SOD-CAT 两组级联催化反应分解尿酸并清除自由基,用于治疗高尿酸血症和缺血性中风 [75]

Fig. 26 Nanozymes based POD-OXD-SOD-CAT enzymatic cascade system. Fe-N<sub>4</sub> single atom nanozymes as artificial peroxisome for ameliorating hyperuricemia and ischemic stroke by exerting UOD-CAT and SOD-CAT cascade catalysis to consuming uric acid and scavenging free radicals [75]. Copyright © 2020 Wiley - VCH GmbH

近期,通过将 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 原位沉降在卟啉多孔有机聚合物材料上合成的 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>PPOP 纳米酶,通过其 Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> 和 Co<sup>3+</sup>/Co<sup>2+</sup> 之间的价态转化,赋予了其高效的电子传递功能,因而使其具备了 POD、OXD、SOD、CAT 四种类酶活性,通过其四酶活性协同催化,能够发生灵敏的显色反应用于重金属检测 [206]。

#### 2.4.6 小结

总之,本节回顾了近十年来研究者们发现的具有多酶活性的纳米酶,并按照纳米酶本身蕴含的多酶活性类型(POD-CAT,POD-OXD,SOD-CAT,OXD-

CAT, 和具有 3 种及以上类酶活性的纳米酶) 对纳米酶的多酶活性进行了分类总结。

自从 2007 年阎锡蕴团队<sup>[1]</sup>首次提出  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒具有类 POD 催化活性以来, 纳米酶的研究工作受到了来自不同学科领域的科学家的关注。大量不同类型的纳米酶被发现或设计出来, 从金属到非金属, 从无机到有机, 从单金属到多金属, 不同类型的纳米材料都被设计出来用来探索类酶催化特性。在研究过程中, 人们发现纳米酶的催化反应具有两个特点, 一是宽泛的底物适应性, 即针对某一特定的催化反应, 纳米酶可以催化不同的底物发挥反应; 二是多酶活性, 即针对某一特定的底物, 纳米酶可以催化其发挥不同的反应, 生成不同的产物。也正是这两个特点, 使得纳米酶的底物非常广泛, 一种纳米酶往往能够在不同的应用场景下催化不同的底物发挥相同的催化反应, 使其广泛应用于不同领域, 与此同时, 纳米酶的多酶活性也被挖掘了出来, 纳米酶可以在特定条件下催化同一底物发挥不同反应, 表现出不同的催化活性。

2012 年, 顾宁团队<sup>[9]</sup>首次发现的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶具有 pH 依赖的类 POD 和类 CAT 双酶活性, 在不同 pH 条件下, 纳米酶可以催化同一底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  发生不同的反应。在随后的研究中, 越来越多的纳米酶被发现均具有与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  相似的 pH 依赖的多酶活性, 表明在酸性条件下表现类 POD 活性促自由基生成和在中性条件下表现类 CAT 活性清除自由基可能是纳米酶存在的普遍现象。因此, 在纳米酶的应用中, pH 环境对其催化活性具有重要的影响, 尤其是在体内应用中, 通过理性设计, 将纳米酶捕获在具有不同 pH 环境的亚细胞器中, 可以实现纳米酶功能的精准调控。

后来, 人们发现一部分纳米酶能够在特定条件下同时表现出多酶活性, 且酶催化反应之间可以构成级联系统, 产生级联效应, 不仅能够提高催化效率, 还可以减少反应中间物的生成。例如, 通过类 POD-OXD 双酶活性级联, 将 OXD 把  $\text{O}_2$  还原为  $\text{H}_2\text{O}_2$  的能力与 POD 消耗  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生  $\cdot\text{OH}$  的能力结合起来, 能够加速  $\cdot\text{OH}$  的产生, 使得纳米酶在传感检测、抗菌抗感染、肿瘤催化治疗领域具有巨大的应用潜力。此外, 还有通过类 SOD-CAT 双酶活性级联, SOD 活性清除  $\text{O}_2^{\cdot-}$  产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 接着 CAT 活性能够将上一步产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解为  $\text{O}_2$ , 从而实现自由基的彻底清除, 使得纳米酶在抗炎抗氧化损伤领域的应用潜力倍增。还有通过 UOD-CAT 级联, SOD-GPx 级联, 均可实现自由基的高效清除。在单一纳

米酶材料上发挥级联催化反应具有高局部反应物浓度, 减少中间分解和高传质效率的优势, 与单一酶催化或者两种酶单独使用相比, 能够极大地提升酶催化效率, 因此纳米酶的多酶级联催化活性为纳米酶的高效催化应用带来了新契机。

纳米酶出现多酶催化活性的机制目前研究得还不是很透彻, 不过也有一些工作在机制解释上做出了努力。例如, Fe 离子是许多氧化还原酶(如 POD、CAT、OXD、SOD) 的活性中心所必需的, 因而一些通过模拟天然酶活性中心的 Fe—N 配位特点设计的铁基纳米酶(如  $\text{Fe}-\text{N}_4$  单原子纳米酶<sup>[75]</sup>) 能够同时模拟上述四种酶催化活性。还有一些铜基纳米酶能够模拟一些含铜的天然氧化酶(如 AAO、LAC 等) 的催化活性, 在纳米酶体系中再加入模拟 POD 的功能元件, 如 hematin@ Cu/GMP 纳米酶<sup>[189]</sup>, 能够模拟 LAC 和 POD 的催化活性中心, 从而获得 POD-OXD 催化活性。进一步, 人们发现其他具有电子传递功能的金属元素和氨基酸的配位组装合成的纳米酶也同样能够模拟多种氧化还原酶的催化活性。这些工作都启示我们参考特定天然酶的活性中心对纳米酶进行理性设计, 将不同纳米酶的活性中心融合到同一种纳米酶的设计上, 从而为获取特定级联催化特性的纳米酶提供可能。

金属元素的氧化价态也会影响纳米酶的多酶活性, 例如, 魏辉团队<sup>[204]</sup>报道的  $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{3+}$  比例影响纳米酶的催化活性,  $\text{ZnMn}_2\text{O}_4$  纳米酶只有类 SOD 活性, 而  $\text{LiMn}_2\text{O}_4$  纳米酶则具备了类 SOD、类 CAT、类 GPx 活性, 提高高价态 Mn 的比例, 能够使 Mn 基 SOD 纳米酶的 CAT 活性提升, 出现多酶活性。同样的现象也在氧化铈纳米酶<sup>[199]</sup> 中被发现, 提高  $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$  的比例, 也能使氧化铈 SOD 纳米酶的 CAT 活性提升, 出现多酶活性。此外, PB 纳米酶<sup>[203]</sup>、 $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  纳米酶<sup>[206]</sup>, 其多酶活性的出现均与 Fe、Co 金属元素的多氧化价态和丰富的氧化还原电位相关。因此, 基于变价金属元素来设计具有多酶活性的纳米酶具备理论基础。

除此之外, 纳米酶的尺寸、形貌<sup>[183]</sup>、表面能<sup>[200]</sup> 等也会影响纳米酶的多酶活性, 但其具体机制还需要进一步的探索。如何进一步揭示纳米酶的多酶活性机制还需要新的研究模型或理论计算体系的加入, 需要多学科交叉团队的参与。深入理解纳米酶多酶活性催化机制将指导我们设计出活性更高、催化效率更高的级联纳米酶, 为实现纳米酶的高效催化应用提供理论支持。

表 4 纳米酶本身蕴含的多酶活性

Table 4 Summary of the inherent multi-enzyme-like activities of nanozymes

序号	纳米酶名称	类酶活性	催化机理	应用	参考文献
1	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶	POD/ CAT	pH 依赖的类 POD 和类 CAT 活性,酸性条件下催化 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 产生·OH;中性条件下将 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 直接分解为 H <sub>2</sub> O 和 O <sub>2</sub> 。	纳米材料生物毒性评价	9
2	Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub> /CeO <sub>2</sub> -PVP 纳米酶		光热增强的类 POD 和类 CAT 活性,缓解乏氧,提高肿瘤微环境氧化应激,在近红外光照射下活性升高,协同发挥肿瘤催化治疗作用。	协同催化肿瘤治疗	180
3	PMNSG 纳米酶		pH 依赖的类 POD 和类 CAT 双酶活性,酸性条件下发挥类 POD 活性催化 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 产生·OH 诱发肿瘤细胞凋亡;中性条件下发挥类 CAT 活性将 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 直接分解为 H <sub>2</sub> O 和 O <sub>2</sub> ,使缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 表达下调继而减少肿瘤细胞对于葡萄糖的摄取。	肿瘤催化治疗	181
4	NDs 纳米酶		pH 依赖的类 POD 和类 CAT 双酶活性,在酸性条件下表现类 POD 活性,在碱性条件下表现类 CAT 活性,并且对 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 诱导的氧化损伤有保护作用。	抗氧化治疗	184
5	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -PDA-Au 纳米酶	POD/ GOx	Au 纳米酶具有类 GOx 活性,消耗葡萄糖,产生 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ;V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 纳米酶具有类 POD 活性,还原 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,氧化 ABTS,生成绿色产物。	比色法检测葡萄糖和 DNA	186
6	PFOB@ PLGA@ Pt 纳米酶		PFOB 能够释放 O <sub>2</sub> ,为 Pt 纳米酶发挥类 GOx 活性氧化葡萄糖提供 O <sub>2</sub> 来源,催化产生的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 又被 Pt 纳米酶的类 POD 活性消耗产生·OH 用于杀伤细胞。	急性髓系白血病治疗	182
7	EMSN-Au 纳米酶		类 GOx 活性催化 O <sub>2</sub> 氧化葡萄糖生成葡萄糖酸和 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,葡萄糖酸降低环境 pH,激活类 POD 活性,使 TMB 底物发生颜色反应。	检测	187
8	CuS 纳米酶	POD/ AAO	不仅具有类 POD 活性,而且也同时表现出类 AAO 催化活性,能够催化抗坏血酸氧化生成脱氢抗坏血酸	血清酸性磷酸酶检测	183
9	Cu FMA 纳米酶	POD- LAC	pH8.0 时,发挥类 LAC 活性,还原 Cu <sup>2+</sup> 促进酚类化合物氢氧键解离;pH4.0 时,发挥类 POD 活性,促进 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 中 O-O 键断裂产生·OH。	人血清中葡萄糖和肾上腺素的检测	188
10	Hematin@ Cu/GMP 纳米酶		Cu <sup>2+</sup> 和 GMP 自组装后同时具有类 LAC 和类 POD 活性。	染料降解	189
11	FeS <sub>2</sub> 纳米酶	POD- GSH 氧化酶	类谷胱甘肽氧化酶活性清除还原型谷胱甘肽,并产生 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,类 POD 活性催化 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 产生·OH,自级联诱导细胞凋亡和铁死亡。	肿瘤催化治疗	143
12	CuO 纳米酶	POD-半 胱氨酸 氧化酶	类半胱氨酸氧化酶活性将半胱氨酸氧化为胱氨酸并产生 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,类 POD 活性消耗 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 产生·OH,与非荧光分子 TA 反应生成高荧光的羟基对苯二甲酸酯。	药品和人血浆中半胱氨酸检测	190
13	AuPt 纳米酶	POD/ OXD	类 OXD 和类 POD 活性与 Au 和 Pt 的组成相关。通过研究 HS <sup>-</sup> 对 AuPt 纳米酶和活性的抑制作用,建立了 HS 的比色检测方法	比色法检测硫化物	191
14	BiOBr/PtRu 纳米酶		经辐照后 POD,OXD 活性提高,促进了光激发 BiOBr 的电子和空穴转移能力,提高载流子分离效率,促进 ROS 产生	检测	192
15	介孔三金属 AuPtPd 纳米酶		基于脲酶介导的质子消耗酶反应,原位调控 AuPtPd 纳米酶的协同催化活性,构建了一种用于评价脲酶活性的双模态 PEC 和 EC 生物传感器	唾液中尿素酶活性检测	193
16	Cu <sub>2</sub> WS <sub>4</sub> 纳米酶		在 O <sub>2</sub> 存在下,类 OXD 活性催化细菌中的抗氧化剂(AH <sub>2</sub> )产生 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,类 POD 活性催化 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 分解生成·OH	协同杀菌	194
17	Fe—N—C 纳米酶		发挥类 OXD/POD 活性,产生具有高度杀菌作用的 ROS	杀菌	195
18	VO <sub>x</sub> NDs 纳米酶		类 OXD 活性分解 O <sub>2</sub> 生成超氧阴离子自由基(O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )和羟基自由基(·OH),类 POD 活性诱导 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 生成·OH	抗耐药菌	196
19	2D MnO <sub>2</sub> 纳米酶		催化 O <sub>2</sub> 生成 ROS,并通过消除 MB 降低 DPV 峰值电流	miRNA 检测	197
20	Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶	SOD/ CAT	通过 Mn <sup>2+</sup> 和 Mn <sup>3+</sup> 两种氧化态之间的转换模拟高活性的 SOD 和 CAT 酶,通过类 SOD 和类 CAT 催化级联抗炎	缓解炎症	198
21	CeO <sub>2</sub> @ MMT 纳米酶		CeO <sub>2</sub> 纳米酶的类 SOD 和类 CAT 催化级联治疗肠炎 <sup>199</sup> ,而 CeO <sub>2</sub> 纳米酶的 Ce <sup>3+</sup> 和 Ce <sup>4+</sup> 两种氧化态之间的转换为其催化活性提供了来源	炎症性肠病治疗	199

续表 4

序号	纳米酶名称	类酶活性	催化机理	应用	参考文献
22	Pt@ PCN222-Mn 纳米酶	SOD/ CAT	三价 Mn 卟啉通过模拟天然酶提供 SOD 活性来源, Pt 纳米颗粒提供类 CAT 活性来源, 因而 Pt@ PCN222-Mn 纳米酶形成了 SOD-CAT 级联催化, 高效用于体内 ROS 清除	炎症性肠病治疗	142
23	Pd 纳米酶		具有较低表面能的(111)面 Pd 八面体纳米酶的催化活性显著高于具有较高表面能的(100)面 Pd 立方体纳米酶	氧化应激相关疾病治疗	200
24	Pt/CeO <sub>2</sub> 纳米酶	OXD/ CAT	Pt/CeO <sub>2</sub> 纳米酶利用其类 UOD-CAT 活性, 能够催化尿酸分解, 并将 O <sub>2</sub> 还原为 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 再级联其类 CAT 活性, 分解 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 为 O <sub>2</sub> , 实现循环催化, 高效分解尿酸	抗氧化治疗, 缓解痛风	201
25	ARP-PTNC 纳米酶	SOD/ CAT/UOD	通过精氨酸修饰 Pt 纳米酶来模拟天然酶活性中心的氨基酸残基微环境, 而且精氨酸含有一个带有氮孤对的孤官能团, 能够辅助通过氢键或静电相互作用结合多种底物, 因而能够模拟天然过氧化物酶体, 具备多种氧化还原酶类催化活性	痛风/高尿酸血症治疗	202
26	PB 纳米酶	SOD/ CAT/POD	PB 纳米酶中具有多氧化价态的 Fe, 并且 PB 材料具有丰富的氧化还原电位, 能够高效的传递电子, 因而赋予其多种类酶催化活性。PB 纳米酶发挥类 POD 催化活性消耗 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 氧化细胞内的还原性物质, 抑制·OH 的生成。协同类 SOD-CAT 级联催化, 能够共同高效清除 ROS 保护细胞免受氧化损伤	抗氧化治疗	203
27	Fe <sub>2</sub> NC@ Se 纳米酶		Se-MOF 能够模拟天然含硒 GPx 酶的活性中心, 产生类 GPx 活性在氧化 GSH 为 GSSG 的同时, 催化 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 分解为 H <sub>2</sub> O; 而双铁原子 Fe <sub>2</sub> NC 纳米酶则具备优异类 SOD-CAT 级联催化功能, 两个功能协同实现了针对·O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 和 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 的自由基清除, 用于保护脑缺血再灌注损伤	抗氧化治疗, 缓解脑缺血再灌注损伤	205
28	LiMn <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶		SOD 清除·O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 是抗氧化级联反应的第一步, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 的分解是抗氧化级联反应的第二步, CAT 和 GPx 活性都能达到这一作用	炎症性肠病治疗	204
29	Mn/PSAE 纳米酶	POD/ OXD/CAT	Mn 单原子纳米酶具有更多的活性中心, 因而催化活性更高。该纳米酶进入细胞后, 利用其类 POD 和类 CAT 活性催化细胞内的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 分别·OH 和 O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> 又进一步被其类 OXD 活性利用生成·O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 自由基。该催化级联体系生成的·OH 和·O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 协同诱导了肿瘤细胞死亡	肿瘤治疗	179
30	Fe-N <sub>4</sub> 单原子纳米酶	POD/ OXD/SOD/ CAT	该纳米酶能够模拟天然氧化还原酶的活性中心的 Fe—N 配位形式, 因而如同天然过氧化物酶体一样, 同时具备了 SOD、CAT、UOD、POD 四种类酶催化活性。该纳米酶通过 UOD-CAT 和 SOD-CAT 两组级联催化反应分解尿酸并清除自由基	高尿酸血症/缺血性中风治疗	75
31	CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> / H <sub>2</sub> PPOP 纳米酶		CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> PPOP 纳米酶, 通过其 Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup> 和 Co <sup>3+</sup> /Co <sup>2+</sup> 之间的价态转化, 赋予了其高效的电子传递功能, 因而使其具备了 POD、OXD、SOD、CAT 四种类酶活性	重金属检测	206

### 3 纳米酶工程化

在过去的几十年里, 酶在食品、农业、生物燃料、制药、皮革、化妆品、废物管理等不同领域的商业应用急剧增加, 全球工业酶的需求和贸易正在稳步增长, 预计到 2026 年将增至 87 亿美元<sup>[207]</sup>。虽然酶产业有着巨大的市场需求, 但天然酶的脆弱、昂贵、造价高等局限性促使人工模拟酶的加速研究和发展。目前工业化生产天然酶主要通过微生物来实现, 往往涉及基因组学技术、菌种改良、培养基优化、发酵方法改进、筛选鉴定、分离纯化等过程, 步骤繁琐, 成本昂贵<sup>[208]</sup>。此外, 天然酶的不稳定性对制备环境、操作过程、储藏运输等条件要求严苛, 进一步增加了工序和成本。而纳米酶作为新一代人工模拟酶, 既

拥有天然酶类似的催化性质, 又有独特的理化特性, 这为调控自身催化性能提供了无限可能。此外, 作为一种无机纳米材料, 纳米酶生产加工步骤更加简单便捷, 产率和纯度高, 其高稳定性也极大地降低了对生产环境和储存的要求和成本<sup>[209]</sup>, 因此, 纳米酶的工程化近年来备受关注。自 2007 年阎锡蕴院士等<sup>[1]</sup>初次发现至今, 纳米酶的研究取得了快速和辉煌的进展, 已有大量论文报道有关模拟酶活性的纳米材料, 包括掺杂碳<sup>[32]</sup>、金属氧化物<sup>[30]</sup>、贵金属<sup>[38]</sup>和金属有机框架<sup>[139]</sup>等, 并被应用于疾病治疗<sup>[75]</sup>、抗菌<sup>[210]</sup>、生物传感<sup>[211]</sup>和污染物降解<sup>[212]</sup>等研究领域, 这些研究成果推动了纳米酶基础与应用研究的系统化、模块化及规范化。

不同理化特性的纳米材料展现出不同的类天然

酶的催化活性,表现出纳米酶在类酶催化方面的复杂性和多样性。为了满足实际应用的需求,纳米酶的催化性能可以通过精准调控其成分组成、尺寸大小、表面修饰、封装载体等策略进行调控<sup>[213]</sup>。目前,纳米酶的合成通常是通过经验和试错来获得所需催化特性,这种策略耗时费力。为了打破这些限制,需要对纳米酶作用机制进行深入探究,通过计算机辅助设计的帮助,精确构建纳米酶模型,并利用其构效规律指导并预测纳米酶合成,达到纳米酶精准定制的目的。

本节将重点回顾纳米酶工程化的最新进展,首先介绍纳米酶数据库的建立,并利用机器学习等方法建立的模型,揭示不同制备条件对纳米酶结构和仿酶特性的影响,然后总结纳米酶制备与表征方法的最新进展,最后强调纳米酶在合成过程中不同改性方法对纳米酶结构的影响,并进一步讨论纳米酶结构与性能间的作用关系,建立纳米酶的构效关系,为纳米酶的设计制备提供理论指导。

### 3.1 纳米酶与机器学习

机器学习(ML)是人工智能(AI)的一个子领域,由于其在大数据处理、计算机视觉、语音识别和自然语言处理方面的巨大成功而引起了越来越多的关注<sup>[214]</sup>。在一些过去被认为仅由人类掌握的领域,如复杂的策略游戏<sup>[215]</sup>和医学图像诊断<sup>[216]</sup>等,机器学习已经展现出了接近甚至是超过专家的水平。依托于机器学习方法的新事物正迅速地在我们的生活中普及,Alpha Go的横空出世更是让世界惊叹于人工智能的潜在价值<sup>[215, 217]</sup>。在科研领域,大数据的理念正在改变着科研人员对未知领域的探索模式<sup>[218]</sup>。

在以往的纳米材料研究中,实验和计算模拟方法是探索纳米材料的两条主流途径,它们本质上受到专业知识门槛、实验条件或现有理论基础的限制。然而随着材料复杂性的增加,使用这两种传统方法已经无法满足人们对新材料或更高性能的需求。机器学习是一种能够在复杂数据中寻找规律的强大工具,其可以通过模拟材料属性和相关因素之间的线性或非线性关系来从经验数据中学习<sup>[219]</sup>。基于机器学习的数据挖掘和性能预测已经成为了一种新型的材料性能评价和新材料开发的重要途径。这种数据驱动的机器学习方法通常需要有大量的相关数据作为基础,而2011年材料基因组计划(MGI)的启动,也为机器学习在材料领域的发展提供了基础。利用机器学习进行材料方面的研究,主要分为三步(图27):数据库(Database)的建立、模型(Model)建立和模型应用(Output)。(1)数据库的建立。数据是根本,建立新的数据库或利用已有的数据库是前提条件。目前在材料学方面的数据库还非常有限,仍以自己收集数据为主,而数据的收集主要来源于文献报道,因此数据会存在很大的异质性,需要进一步将数据进行“清洗”,最后需要选取合适的特征用于机器学习模型的训练。(2)模型建立。建立准确的机器学习模型是这方面工作的关键,而选取合适的算法起着决定性作用。利用选取的材料特征和/或性能来训练模型,使其建立线性或非线性关系,再将这种关系进行验证并防止过拟合的发生。(3)模型应用。能否将建立的模型利用起来是其价值或意义的体现。目前主要的应用包括对材料性能的预测、设计/筛选所需要的材料和对某些材料特征的定量化等方面。

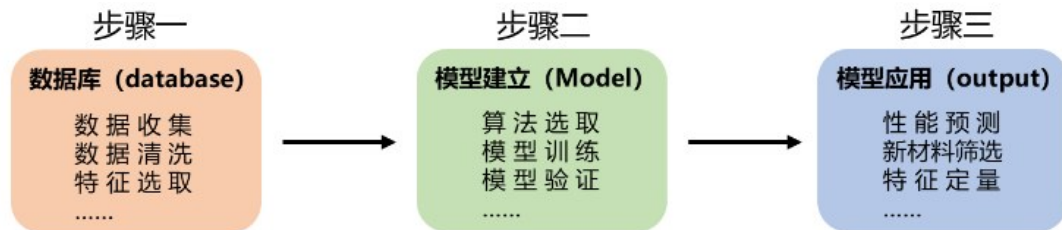


图 27 机器学习在材料领域的主要工作流程

Fig. 27 Key workflows for machine learning in materials

机器学习方法的基本原理决定了其在材料的构效关系尚不明确的情况下,能够根据现有数据发现材料与性能间的隐含规律。目前,机器学习在材料方面的研究主要包括两个方面:材料的性能预测和发现新材料。在材料性能预测方面,Ruoff等<sup>[220]</sup>利

用简单的回归方法实现了对 $C_{60}$ 在不同溶剂中溶解度的预测,开启了数据驱动的材料研究方法的大门。Gu等<sup>[221]</sup>利用前期工作构建的FEM(Finite element model)模型<sup>[222]</sup>生成的35 960条二维复合材料相关数据,结合卷积神经网络来预测二维复合材料的机

械性能(韧度和强度),并利用计算机高通量筛选预测了超过百万种目标材料的性能。Sun 等<sup>[223]</sup>使用包含 425 个直径在 0.5~4.9 nm 之间(13~2947 个原子)的银纳米粒子数据集,利用不同的机器学习分析算法(包括 k-means、逻辑回归、随机森林与人工神经网络)与电子结构模拟相结合来研究银纳米粒子的费米能级与各种结构和形态特征之间的关系。Rajan 等<sup>[224]</sup>生成了 23 870 种所有可能的 MXene 结构,从其中随机选择了 7200 种 MXene 创建数据优化的数据库,开发了可用于精确预测 MXene 带隙的机器学习模型,能准确地预测功能化 MXene 的带隙以研究其电学性能。在新材料发现方面,Lu 等<sup>[225]</sup>利用计算二维材料数据库(C2DB)中 2569 种二维材料的数据,以热力学稳定性、磁基态、带隙作为输出目标,建立了梯度增强分离模型,搭建了二维铁磁功能材料的智能化设计平台,并利用该模型成功筛选出 93 个具有铁磁性稳定的二维材料。Lu 等<sup>[226]</sup>利用来源于 212 种有机-无机钙钛矿材料(HOIPs)的数据进行训练,通过机器学习方法从 5158 个无铅钙钛矿材料中筛选出了 6 个具有热稳定性和合理带隙的太阳能电池材料。Guo 等<sup>[227]</sup>通过机器学习方法分析自建的催化剂添加剂数据库数据(包括 12 种金属盐和 200 种水溶性有机分子),利用“实验测试-机器学习-预测和重新设计”的不断循环,确定了调节剂浓度和配体溶解度是锆钪氧簇纳米 MOFs 合成中的关键影响因素,实现了一系列不同形态的锆钪氧簇纳米 MOFs 的精准制备。Erps 等<sup>[228]</sup>将机器学习方法与 3D 打印技术结合起来,找到了机械性能最佳的 3D 打印材料。这种半自动化数据驱动的工作流程,通过算法的优化大大减少试错过程,减轻开发人员负担。

类似于其他纳米材料,数据驱动的方法也开始渗透到纳米酶研究领域。Wang 等<sup>[51]</sup>提出  $e_g$  轨道电子个数可以用于  $ABO_3$  型钙钛矿类过氧化物酶活性的预测。该研究发现这一类纳米酶的类过氧化物酶活性随着 B 的  $e_g$  轨道电子个数的改变而变化,并以此实现对于  $ABO_3$  型钙钛矿类过氧化物酶的活性预测。Li 等<sup>[17]</sup>通过系统分析 105 篇已发表的论文来发现高性能水解纳米酶,来筛选和预测基于 MOF 的水解纳米酶的催化活性位点。Wang 等<sup>[63]</sup>使用 DFT 计算来研究类超氧化物歧化酶催化过程的热力学和动力学,并提出了能级原理和吸附能原理,通过实验验证了该原理具有预测部分超氧化物歧化酶活性的能力,可以利用它们从 C2DB 数据库中计算

筛选具有内在类超氧化物歧化酶活性的纳米酶(图 28)。

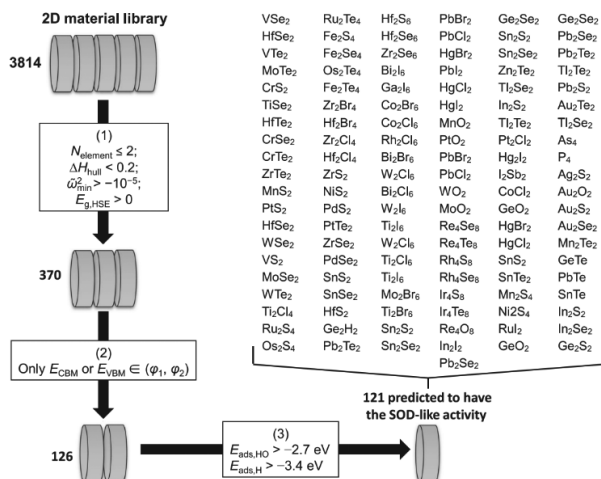


图 28 作为潜在超氧化物歧化酶模拟物的二维纳米材料的计算筛选<sup>[63]</sup>

Fig. 28 Computational screening of two-dimensional nanomaterials as potential superoxide dismutase mimics<sup>[63]</sup>

现阶段发现和测试新纳米酶的过程依然是以传统的试错法和化学理论计算为主,其知识门槛高、开发周期长、耗费成本高、评价过程过于繁琐,严重限制了纳米酶的开发速度和快速应用。因此,纳米酶的高效设计与开发已经成为了新的科学研究热点。然而,由于缺乏理论指导,纳米酶的发现主要依赖于对其化学成分的有限微调,如何利用现有技术实现纳米酶的快速设计与发现是现今纳米酶的重点研究方向。因此,人们高度期待通过采用自动化方法的合理设计开发纳米酶,以加速发现具有增强活性的新型纳米酶。近年来,随着计算机算力的提高和算法优化,机器学习方法正在加速纳米材料及纳米酶的发现、设计和研究。Razlivina 等<sup>[229]</sup>从 100 多篇已发表的研究论文中创建了一个开放存取的纳米酶数据库 DiZyme,其中包含超过 300 种现有无机纳米酶材料。作者利用该数据库开发并优化了用于评估纳米酶过氧化物酶活性的随机森林回归(RFR)模型,实现了对类过氧化物酶纳米酶的活性预测。最近,南开大学黄兴禄团队<sup>[16]</sup>从现有的已发表论文中收集了 920 条纳米酶数据,构建了一个过渡金属纳米酶数据库。该数据库包含有多种模拟酶类型的纳米酶(包括类过氧化物酶纳米酶、类氧化酶纳米酶、类过氧化氢酶纳米酶、类超氧化物歧化酶纳米酶、类水解酶纳米酶)的理化特征数据。该数据库将纳米酶特征分为内在特征与外部条件两大类。其中,内在

特征包含有纳米酶的元素组成及其比例、纳米酶尺寸、形貌、zeta 电位等性质,而外部条件指的是纳米酶发挥其类酶活性时所处于的外界反应体系条件,包括该体系的温度、pH 和催化底物种类等。利用该数据库中的数据,作者结合机器学习中的神经网络算法实现了对于纳米酶催化活性的特征描述符的选择以及对纳米酶活性的预测,针对类过氧化物酶纳米酶以及类氧化物酶纳米酶实现了  $R^2$  分别高达 0.66 和 0.80 的预测效果并成功利用该神经网络模型实现了高活性过渡金属纳米酶的选择性合成,该研究充分展现了纳米酶与机器学习方法结合潜力(图 29)。

目前,机器学习在纳米酶的研究方面才刚刚起步,在纳米酶性能预测方面报道还非常有限,在新纳米酶材料的发现方面更是未见报道。为了更好地利用机器学习在纳米酶研究方法取得实质性突破,亟需解决如下问题,如数据库、训练数据、机器学习自身等。

(1)数据库涵盖特征不全。目前建立的纳米酶材料相关数据库收集的数据样本不够系统全面,难以满足纳米酶领域日益增多的研发需求。一般而言,数据库当中的样本数据来源于已发表的实验数据,但是只有相当小部分的“成功”结果被发表出来,此外还有大量的“失败”实验数据未被公开发表,哈佛大学研究者在 2016 年 *Nature* 上提出“从失败中学习”,在该研究中用失败或不成功的实验数据预测了新材料的合成,并且发现机器学习模型预测的准确率超过了经验丰富的化学家,这意味着机

器学习将改变传统材料的发现方式,发明新材料的可能性也大幅提高<sup>[230]</sup>。因此,建立包含“成功”和“失败”的纳米酶数据库,对于利用机器学习进行信息挖掘同等重要。此外,一些纳米酶的重要特征参数,例如纳米酶的尺寸、形貌等数据的获取主要依赖于图像信息,这一类非结构化的数据获取主要依靠数据库构建者的主观判断与测量,难以保证其准确性,因此,有必要建立公开的材料图像数据库,推动这一类非结构化数据驱动的纳米酶材料研发和应用。对于特定类别的纳米酶可以建立特定纳米材料的小型数据库,从而更有针对性地对该类别纳米酶进行探究。

(2)训练数据的异质性。数据驱动的机器学习方法很大一部分取决于数据的质量,然而,全球各个研究机构对于纳米酶这一新材料概念和其表征手段目前并没有一个统一的标准。实验测量得到的数据会有合成方法的不同导致材料缺陷不同,以及不同实验室的设备和实验条件的不确定性导致的系统误差。这些误差带来的就是实验数据的千差万别,给数据驱动的纳米酶研究带来了非常大的困扰。因此,现阶段亟需一个纳米酶研究的标准化的通用方法,明确纳米酶的表征方式和酶催化活性的评价指标。另外,纳米酶材料在可控合成上也存在很大的困难,从而导致数据存在异质性。2020 年,汪聘等利用机器学习来指导纳米金属有机框架纳米材料的形貌调控<sup>[231]</sup>,他们利用“决策树”、“随机森林”算法以及图像识别方法找到合成“金属有机单层”的条件和规律,成功获得了更多种形貌的金属有机框架

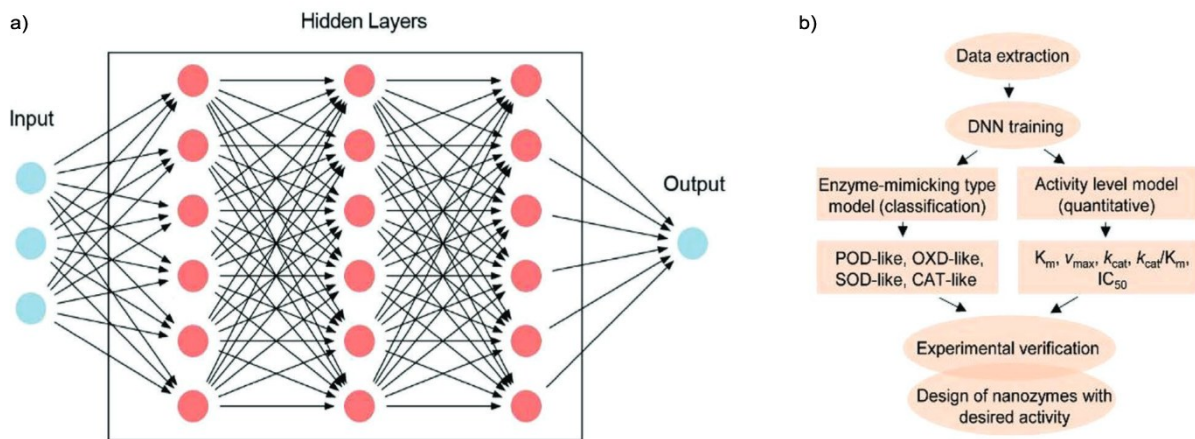


图 29 利用人工神经网络预测纳米酶活性。(a)人工神经网络示意图;(b)利用人工神经网络预测和设计纳米酶的工作流程<sup>[16]</sup>

Fig. 29 Prediction of nanoenzyme activity using artificial neural network. (a) Schematic diagram of artificial neural network; (b) workflow for prediction and design of nanoenzyme using artificial neural network<sup>[16]</sup>

材料(如六边形纳米片、八面体、凹八面体、中空八面体及截角八面体等)。因此,利用机器学习提高纳米酶材料的可控性,也是有效解决纳米酶材料数据异质性的关键。

(3)机器学习方法自身缺陷。机器学习模型可以为纳米酶的催化机制研究提供一定的方向指导,但是其解释性是有限的。它只关心结果而不关心过程,这与计算化学等理论研究是背道而驰的,这是机器学习方法自身所存在的缺陷问题。因此,机器学习方法也可以同计算化学方法结合,例如来自美国卡耐基梅隆大学的研究者提出了一种全自动的筛选方法,该方法通过机器学习方法来指导密度泛函理论计算,并用于预测电催化剂的性能,研究者通过对31种不同元素的合金进行筛选,证明了这种方法的可行性,从而实现了对部分d区元素和p区元素的筛选<sup>[232]</sup>。此外,机器学习的全过程仅仅围绕着提升模型预测精度这唯一目标展开,通常会忽略了相应领域的专业知识的重要性,将机器学习的结果与本领域专业知识结合起来,将有助于提高对于模型结果的理解,进一步优化相关机器学习模型的特征选取。

总之,尽管有诸多挑战的存在,将材料科学与信息化技术联合依然是一种方法上的重要创新。机器学习模型能够帮助研究者从根本上理解纳米材料的结构性质与类酶活性之间的关系,对纳米酶的开发和设计乃至纳米酶相关的机器学习技术都具有指导意义。机器学习方法在纳米材料领域的诸多成功应用实例使其逐渐成为纳米酶领域研究的新方向,为加速纳米酶研究开辟了新道路,有望在该领域取得重大突破。未来纳米酶的发展方向之一将是机器学习等大数据方式,通过流程化、自动化的高通量计算和实验积累原始数据;通过系统化、自动化的提取材料特征与类酶性质之间的隐含联系,形成材料筛选和预测机制,加速纳米酶材料的研发。

## 3.2 纳米酶制备与表征

### 3.2.1 纳米酶的制备

本部分具体介绍不同类型纳米酶的制备方法,包括金属纳米酶、金属化合物纳米酶、碳基纳米酶、金属有机框架纳米酶、单原子纳米酶及复合材料纳米酶,相关内容总结于表5中。

金属纳米酶由于具有出色的光、电、热及表面化学特性,在化学分析、生物检测、抗菌、疾病治疗等研究领域被广泛研究。金属纳米酶大致可分为单金属和金属合金纳米酶,主要合成方法包括一般还原法<sup>[233]</sup>、共还原法<sup>[250]</sup>、置换反应法<sup>[251]</sup>等。

一般还原法是指在一定温度下利用还原剂把金属从其化合物中还原出来从而合成金属纳米酶,属于氧化还原反应。Das等<sup>[233]</sup>将氯金酸和柠檬酸钠溶液在100℃下加热并剧烈搅拌,从而还原 $\text{Au}^{3+}$ 为Au原子,Au原子再通过成核-生长过程形成金纳米颗粒(GNP)。可以通过改变实验参数与改进实验方法进而有效调节纳米颗粒的尺寸、形貌及结构,这对研究纳米酶催化特性的构效关系具有重要意义。目前,各种大分子(如树状大分子、蛋白质、DNA等)和小分子(如柠檬酸、硫醇等)已被作为稳定剂与表面包覆剂广泛用于合成单金属纳米酶,而这些分子对纳米酶表面的吸附特性将会影响纳米酶的催化性能。例如,Liu等<sup>[252]</sup>制备了氨基封端的PAMAM树枝状大分子包裹的金纳米簇( $\text{AuNCs-NH}_2$ )。 $\text{AuNCs-NH}_2$ 表面的叔胺可以抑制羟自由基的产生,从而抑制其类POD酶活性。同时,叔胺在酸性环境中容易质子化而带正电荷,这促进了 $\text{H}_2\text{O}_2$ 在颗粒表面的预吸附和分解,从而拓宽了 $\text{AuNCs-NH}_2$ 发挥其类过氧化氢酶(CAT)活性的pH范围。

共还原法是指将两种金属前体同时还原成零价原子,这些原子成核并共同生长以生成A-B双金属纳米晶。通过改变金属离子的还原电势、还原剂的还原性、配体的性质和反应温度等实验参数可调控双金属纳米酶的结构和尺寸。He等<sup>[191]</sup>通过在水溶液中共同还原 $\text{Au}^{3+}$ 和 $\text{Pt}^{2+}$ 制备了Au/Pt合金纳米颗粒,并发现通过调整添加的 $\text{Pt}^{2+}$ 与 $\text{Au}^{3+}$ 的摩尔比,可以调控材料的形貌和合金组成。当Au/Pt摩尔比为1/1时所制备的纳米颗粒具有球形树枝状和多孔结构,如图30所示,并且在水中具有良好的分散性。Au/Pt合金纳米颗粒的类过氧化物酶和类氧化酶活性都高度依赖于合金成分及组成,共还原法为调控合金的催化性能提供了一种有效手段。

置换反应法是将还原性较强的金属纳米颗粒加入到另一种还原性较弱的金属盐溶液中,根据置换反应的原理,将还原性较弱的金属置换出来。Yang等<sup>[235]</sup>以Ag纳米颗粒为模板,通过其在甲苯中与 $\text{HAuCl}_4$ 间的置换反应制备了具有核壳结构的Ag/Au双金属纳米颗粒。结果表明,所制备的Ag/Au双金属纳米颗粒具有比Ag模板纳米颗粒更小的粒径。置换反应是一个由动力学和热力学共同控制的复杂过程,模板纳米颗粒的结构及粒径、金属离子的价态、反应温度与时间、保护剂的用量和类别等实验参数都是影响所制备金属纳米颗粒几何结构及催化性能的重要因素。

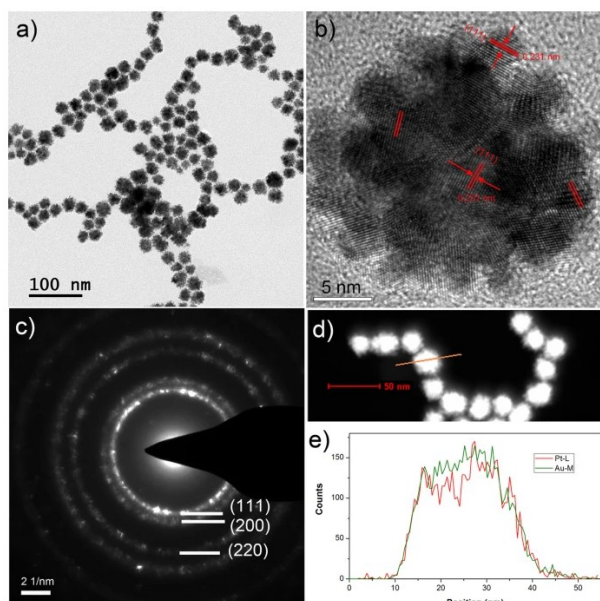
表 5 不同类型纳米酶的制备

Table 5 Synthesis of different types of nanozymes

	纳米酶	制备方法	具体描述	应用/意义	参考文献
金属纳米酶	金纳米颗粒 (GNP)	一般还原法	使用柠檬酸为还原剂和表面稳定剂,在加热条件下还原 $\text{Au}^{3+}$ 为 Au 原子, Au 原子再通过成核-生长过程形成 GNP	改变实验参数可有效调节纳米颗粒的尺寸、形貌及结构,对研究纳米酶催化特性的构效关系具有重要意义	233
	金铂合金纳米酶 (Au/Pt NPs)	共还原法 电沉积法	水溶液中共同还原 $\text{Au}^{3+}$ 和 $\text{Pt}^{2+}$ , 通过调整 $\text{Pt}^{2+}$ 与 $\text{Au}^{3+}$ 的投料量来调控材料的形貌和合金组成 将聚合物纳米复合薄膜在金电极上进行电聚合,然后将修饰电极浸入含有硫酸、氯金酸、氯铂酸溶液中,采用计时电流法进行电沉积	用于制备具有不同催化性能的 Au/Pt 合金纳米酶 通过控制电沉积参数来调控纳米酶的尺寸和形态	191 234
金属化合物纳米酶	银金双金属纳米酶 (Ag/Au NPs)	置换反应法	以 Ag NPs 为模板,通过其在甲苯中与 $\text{HAuCl}_4$ 间的置换反应制备 Ag/Au NPs	溶剂和温度是影响因素,决定了置换反应形成的纳米颗粒的结构和组成	235
	钯纳米晶体 (Pd Nanocrystals)	溶剂热法、种子生长法	使用不同大小的 Pd 立方体作为种子,甲醛作为还原剂,通过控制 Pd 前体 ( $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) 与种子的比例,得到不同晶面暴露的 Pd 立方体	可用于研究 Pd 纳米酶催化活性与暴露晶面间的关系	200
	四氧化三铁纳米酶 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs)	溶剂热法	将 $\text{FeCl}_3$ 和 $\text{CH}_3\text{ONa}$ 溶于丙二醇,在 $200^\circ\text{C}$ 高温高压环境下反应 10 h 制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs,通过调整 $\text{CH}_3\text{ONa}$ 的投料量可控制所得 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶的形貌	用于制备具有不同形貌的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶	236
	硫化铜 (CuS NPs)、硫化锌 (ZnS NPs) 和硫化镉 (CdS NPs) 纳米酶	液相沉淀法	将金属醋酸盐滴加到等体积的硫化钠溶液中制得不同金属硫化物纳米酶	用于制备各类金属硫化物纳米酶	237
碳基纳米酶	硫化镉纳米酶 (CdS NPs)	热分解法	将含不同阴离子的镉盐与硫脲混合生成镉硫脲复合物后,在高温下热处理得到一系列 CdS 纳米酶	用于制备高光催化活性的 CdS NPs 纳米酶。	238
	氧化石墨烯纳米酶 (GO NPs)	Hummers 法和超声剥离法	将一定量的浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KMnO}_4$ 加入到石墨粉末中,对其进行氧化得到石墨薄片,随后经超声处理得到稳定的单层氧化石墨烯	可用于制备具有类过氧化物活性的纳米材料,用于重金属离子的测定	239
	乙酰丙酮铁改性沸石咪唑骨架 (ZIF-8) 碳化介孔 Fe-N 掺杂碳纳米材料 ( $\text{Fe}_3\text{C}@ \text{Fe N-CM}$ )	水热法和高温煅烧法	通过水热法将乙酰丙酮铁包裹在以 ZIF-8 中,随后通过真空煅烧法原位生成介孔结构的 $\text{Fe}_3\text{C}@ \text{Fe N-CM}$	该纳米颗粒同时具有类过氧化物酶、类过氧化氢酶和类氧化酶活性,可用于食品安全快速检测	240
	仿生氧化铁复合的介孔碳纳米酶 (IO-MC)	浸渍法和高温煅烧法	将蔗糖(作为碳源)浸渍在介孔二氧化硅模板的空隙中,通过硬模板法合成介孔碳,最后利用高温煅烧法合成 IO-MC	具有类过氧化物酶活性,可实现葡萄糖的高灵敏检测	241
金属有机框架纳米酶	氮掺杂的碳基纳米酶	高温热解法	以带负电荷的天然黏土矿物作为硬模板,以带正电荷的具有高氮碳比的 PEI 作为 N 源和 C 源来合成高含氮的碳基纳米酶	具有类过氧化物酶活性,可用于过氧化氢、葡萄糖和抗坏血酸的测定	242
金属有机框架纳米酶	MOF-818	直接合成法	在 N,N-二甲基甲酰胺溶液中直接将 $\text{Zr}^{4+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 与 4-吡啶甲酸配位	具有特异性的儿茶酚氧化酶活性	138
	AuPt/MOF-rGO	合成后修饰法	采用湿化学法制备 ZIF-8 氧化石墨烯,再引入 $\text{AuCl}_4^-$ 和 $\text{PtCl}_4^{2-}$ ,通过还原法得到 AuPt 纳米颗粒复合的 ZIF-8-rGO	向 MOFs 中引入新的金属离子或配体,赋予其类酶催化活性	243
	ZIF8/Au-GOx NPs	复合制备法	将 Au 纳米酶和 GOx 整合入 ZIF-8 骨架	MOFs 作为载体负载其他纳米酶	244
单原子纳米酶	氮配位的铁单原子纳米酶 ( $\text{Fe-N}_5 \text{ SA/CNF}$ )	空间约束合成策略	通过抑制热解过程中原子的聚集迁移得到单原子分散性良好的纳米酶	$\text{Fe-N}_5$ 的活性位点类似于天然细胞色素 P450 的活性位点,有良好的类氧化酶活性	74
	不同金属元素的单原子纳米酶 (AMEs)	金属交换合成策略	由锌离子(主要离子)、杂离子(次要离子)和 2-甲基咪唑反应形成金属前驱体,再经过煅烧热解,制备了多种不同金属原子掺杂的单原子人工金属纳米酶	合成了一系列在结构形貌、尺寸、元素组成、晶面暴露等方面均相似的单原子纳米酶,有助于纳米酶类酶活性比较和催化机制的研究	245

续表 5

	纳米酶	制备方法	具体描述	应用/意义	参考文献
复合材料纳米酶	五氧化二钒@多巴胺@二氧化锰纳米复合物( $V_2O_5@pDA@MnO_2$ )	化学偶联法	多巴胺作为连接剂,连接 $V_2O_5$ 与 $MnO_2$	该复合纳米酶能模拟细胞内的抗氧化酶防御系统,在炎症治疗方面具有潜在应用	246
	铂碳集成式纳米酶(Pt-C)	原位还原法	通过原位还原法将超小 Pt 纳米酶固定到 MOF 衍生的碳纳米酶	该集成式纳米酶具有良好类过氧化氢酶活性和光敏性能	247
	铁铂复合纳米酶( $Fe_3O_4@Pt$ )	吸附并原位还原法	利用巯基修饰的 $Fe_3O_4$ 吸附 Pt 离子并原位还原	该方法结合了两种材料的优点,具有比表面积大、稳定性好、催化活性可控,具有产生大量活性氧的潜力	248
	铁氧化铈复合纳米酶( $Fe_3O_4@CeO_2$ )	化学偶联组装	将高温热解法制备的磁性 $Fe_3O_4$ 纳米粒子与水热法制备的超小 $CeO_2$ 纳米粒子进行组装	此制备方法简便、生物相容性好、颗粒分布均匀、稳定性和重复性好	249



**图 30** Au/Pt 摩尔比为 1/1 时制备的 Au/Pt 纳米颗粒<sup>[191]</sup>。(a)低倍率 TEM 照片;(b)高分辨 TEM 照片;(c)图 b 颗粒的选区电子衍射(ED)图像;(d)STEM HAADF 图像;(e)图 d 中标记颗粒的 STEM-EDX 横截面组成线轮廓

**Fig. 30** Au/Pt nanoparticles prepared at Au/Pt molar ratio of 1 : 1<sup>[191]</sup>. (a) Low-magnification TEM; (b) HRTEM image; (c) ED pattern of the single particle in Fig. b; (d) STEM HAADF image; (e) STEM-EDX cross section composition line profiles of the particle marked in panel d

此外,电化学沉积法<sup>[234]</sup>和溶剂热法<sup>[200]</sup>也经常被用于制备金属纳米酶。电化学沉积法可以通过控制沉积过程中的电沉积参数来调控纳米酶的尺寸和形态。溶剂热法是指在密闭的反应釜中,以水、乙二醇等溶剂作为反应介质,在高温高压下还原金属离子制备金属纳米酶。其主要特点是操作简单、成本低,同时能够合成出形貌特殊与性能优异的金属纳米酶。研究人员发现颗粒的组成和结构是影响金属合金纳米酶类酶特性的重要因素<sup>[253, 254]</sup>,因此调整各种金属的比例、扩大合金纳米材料的孔隙率和比表面积已被认为是调节类酶催化活性的有效途径<sup>[78]</sup>。

金属化合物纳米酶主要包括金属氧化物纳米酶、金属硫化物纳米酶、金属硒化物纳米酶、金属磷化物纳米酶等,主要合成方法有溶剂热法、液相沉淀法、热分解法等。

溶剂热法是指将原料置于高温高压环境条件下进行反应制备金属化合物纳米酶的方法。Liu 等<sup>[236]</sup>基于溶剂热法,将三氯化铁( $FeCl_3$ )和甲醇钠( $CH_3ONa$ )溶于丙二醇,并在 200℃ 高温高压环境下反应 10 h 制得四氧化三铁( $Fe_3O_4$ )纳米酶,该制备方法可通过调整  $CH_3ONa$  的投料量控制所得  $Fe_3O_4$  纳米酶的形貌(球形、八面体、三角形),进而调节其过氧化物酶活性。Wu 等<sup>[255]</sup>以溶剂热法为基础,通过调节  $N,N$ -二甲基甲酰胺(DMF)和水的比例得到了一系列暴露不同晶面的二硒化钼( $MoSe_2$ )纳米酶,并发现 DMF 用量的增加有利于  $MoSe_2$  纳米酶(002)晶面数量的增加,富含(002)晶面的  $MoSe_2$  纳米酶催化的析氢反应(HER) Tafel 斜率由 100 降至 62  $mV \cdot dec^{-1}$ ,表现出更强的 HER 电催化活性。

液相沉淀法是将金属盐溶液与沉淀剂混合直接生成金属化合物纳米酶的制备方法。Ayodhya 等<sup>[237]</sup>基于液相沉淀法,将金属醋酸盐滴加到等体积的硫化钠溶液中制备了硫化铜( $CuS$ )、硫化锌( $ZnS$ )和硫化镉( $CdS$ )纳米酶,并发现三种纳米酶中  $CdS$  纳米酶因其更大的比表面积而具备更强的光催化活性,其 60 min 内催化 BTB 染料降解量高达 83.42%。Zhang 等<sup>[124]</sup>分别通过液相沉淀法和溶剂热法制得了多面体状、立方体状、片状以及棒状的四

氧化三钴( $\text{Co}_3\text{O}_4$ )纳米酶(图 31), 研究结果显示具有(112)暴露晶面的片状  $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米酶的类过氧化物酶活性和类过氧化氢酶活性大小分别高达 0.031 和 3.23  $\text{U}/\mu\text{g}$ , 其更高的表面  $\text{Co}^{3+}$  占比使其在各种形貌的  $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米酶中表现出更强的类过氧化物酶和类过氧化氢酶活性。

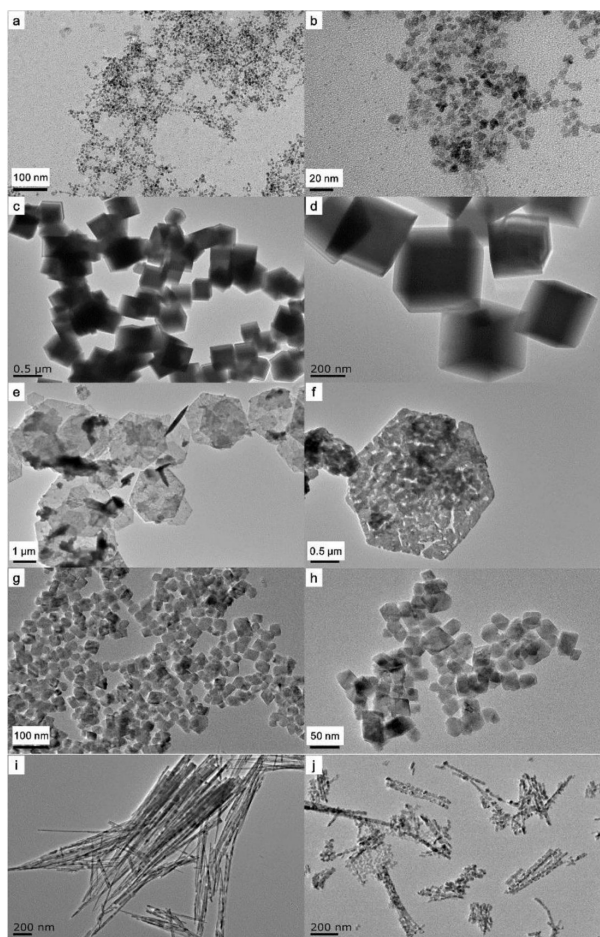


图 31 不同形貌的  $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米酶的 TEM 照片: 液相沉淀法制备的(a,b)多面体状  $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米酶; 溶剂热法制备的(c,d)立方体、(e,f)片状、(g,h)多面体状以及(i,j)棒状  $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米酶<sup>[124]</sup>

**Fig. 31** TEM images of (a, b)  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nanopolyhedrons prepared by coprecipitation method; (c, d)  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nanocubes, (e, f)  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nanoplates, (g, h)  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nanopolyhedrons, (i, j)  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nanorods prepared by solvothermal method<sup>[124]</sup>

热分解法指通过无氧有机溶剂中高温裂解金属化合物前体进而获得相应金属化合物纳米酶的制备方法。Gaur 等<sup>[238]</sup> 基于热分解法合成了 CdS 纳米酶, 通过将含不同阴离子的镉盐与硫脲混合生成镉硫脲复合物后, 在高温下热处理得到一系列 CdS 纳

米酶。作者详细讨论了镉硫脲复合物在固相热分解和液相热分解两个不同条件下所制备的 CdS 纳米酶的物化性质差异, 并指出固相热分解法制备的 CdS 纳米酶在降解紫罗兰的反应中其光催化活性是液相热分解制备的 CdS 纳米酶的 3 倍。

碳基纳米酶材料主要包括富勒烯( $\text{C}_{60}$ )、碳纳米管(CNTs)、氧化石墨烯(GO)、碳点(CDs)及其掺杂衍生物或复合物等, 它们由于具有出色的物理化学特性而在纳米酶研究领域被广泛关注。下面分别介绍碳纳米酶、金属/金属化合物复合的碳基纳米酶、原子掺杂的碳基纳米酶的制备方法。

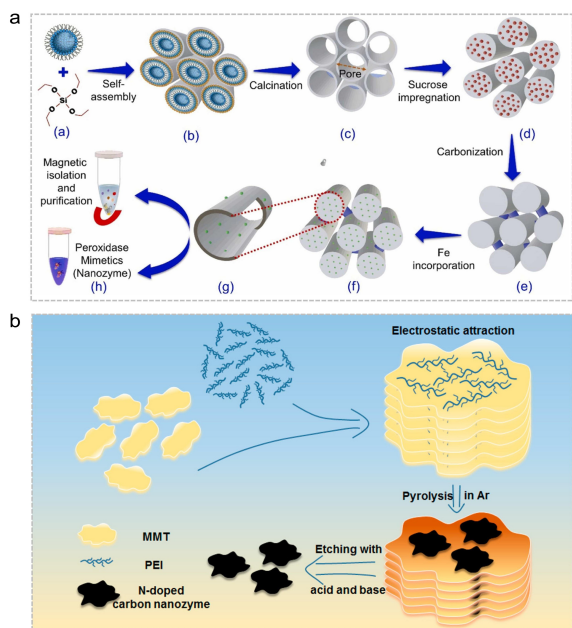
碳纳米材料的类酶催化特性已经被广泛报道, 其由紧密结合在蜂窝晶格中  $\text{sp}^2$  键合的碳原子组成, 具有导电性好、比表面积高、化学稳定性好等特点。目前碳纳米材料的主要制备方法包括化学气相沉积法、微波辅助合成法、水热法和剥离法(液相剥离、电化学剥离以及插层剥离)等<sup>[256-259]</sup>。例如, Nghia 等<sup>[239]</sup> 基于经典的 Hummers 法和超声剥离法合成了具有优异类过氧化物酶活性的 GO, 可用于  $\text{Cr}^{6+}$  的灵敏检测。

复合碳基纳米酶是将具有一定催化活性的金属或金属化合物以涂覆或沉积的方式负载在碳纳米材料上, 制备出催化性能更加优异的复合纳米材料。目前已开发了浸渍法、溶胶凝胶法、高温煅烧法等来实现碳基负载金属化合物纳米酶的构建<sup>[240, 260, 261]</sup>。例如, Wahab 等<sup>[241]</sup> 采用浸渍法和高温煅烧法, 整合  $\text{Fe}^{3+}$  作为催化活性中心, 三维介孔碳(3D-MC)作为载体及底物结合位点来制备仿生氧化铁复合的介孔碳纳米酶(IO-MC), 用于葡萄糖的比色检测(图 32a)。

原子掺杂的碳基纳米酶是指将一种或多种金属/杂原子掺杂进碳纳米材料中来制备碳基纳米酶。掺入金属或杂原子后, 碳材料的元素构成和表面电子环境会发生改变<sup>[262]</sup>, 从而有效改善材料的催化性能。该类纳米酶的制备方法包括高温碳化法、溶剂热法、高温热解法、化学气相沉积法等<sup>[263, 264]</sup>。例如, Lou 等<sup>[242]</sup> 通过高温热解法以带负电荷的天然黏土矿物(即蒙脱石, MMT)作为硬模板, 以带正电荷的具有高氮碳比的聚乙烯亚胺(PEI)作为 N 源和 C 源来合成高含氮的碳基纳米酶(图 32b)。结果表明, N 掺杂的碳纳米酶具有良好的类过氧化物酶活性, 可用于过氧化氢、葡萄糖和抗坏血酸的测定。

除了以上制备方法外, 碳基纳米酶还可以通过后功能修饰法<sup>[265]</sup>、模板辅助法<sup>[266]</sup> 以及调整碳基材

料自身的几何结构<sup>[267]</sup>等多种方法来制备。总之,碳基纳米酶既具有纳米材料的优异性能,又具有类酶催化功能,在生物催化、环境治理、化工等领域具有潜在应用。



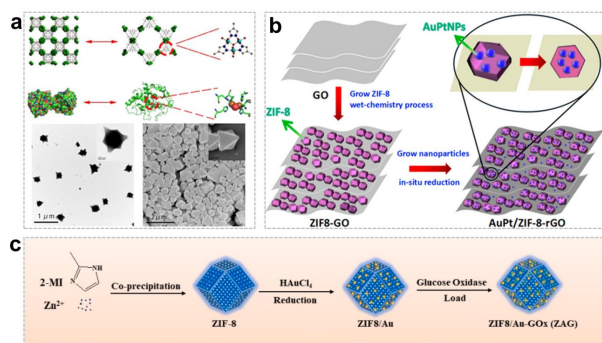
**图 32** (a) 利用介孔二氧化硅作为模板合成氧化铁复合的介孔碳纳米酶<sup>[241]</sup>; (b) 基于蒙脱石与聚乙烯亚胺之间强静电相互作用的氮掺杂碳纳米片合成过程示意图<sup>[242]</sup>

**Fig. 32** (a) The synthesis of iron oxide-doped mesoporous carbon nanozymes using mesoporous silica as template<sup>[241]</sup>. (b) The synthesis process of N-doped carbon sheets based on the strong electrostatic attraction between montmorillonite and polyethyleneimine<sup>[242]</sup>

MOFs 是一种独特的具有周期性网状结构的有机无机杂化多孔材料,由无机金属中心(金属离子或金属簇)与有机配体自组装而成。MOFs 材料具有化学成分独特、多孔结构有序、比表面积大、结构可调等特点。此外,高含量的金属中心和易修饰性也赋予了 MOFs 内在的类酶活性。以 MOFs 作为前体或模板可以合成具有较高稳定性和催化活性的纳米酶,并可将其广泛应用于催化、传感、检测和成像等领域。

目前,实验室中 MOFs 纳米酶的主要制备方法如下:直接合成法,即将金属离子盐与特定配体混合,在一定条件下合成 MOFs,如 Fe-MOFs、Zn-MOFs、Cu-MOFs、Co-MOFs、Ce-MOFs 等。例如, Li 等<sup>[138]</sup>采用直接合成法制备 MOF-818(图 33a),显示出高效的儿茶酚氧化酶活性,且具有良好的特异性。合成后修饰法,即向本身不具备类酶催化活性或活

性较弱的 MOFs 中引入新的金属离子或配体,从而使其具备类酶催化活性。例如, Zhang 等<sup>[243]</sup>采用湿化学法制备 ZIF-8-氧化石墨烯(ZIF-8-GO),进一步引入  $\text{AuCl}_4^-$  和  $\text{PtCl}_4^{2-}$ ,并通过还原法得到 AuPt 纳米颗粒复合的 ZIF-8-rGO,其显示出增强的过氧化物酶活性,用于人血清样品中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的检测,具有理想的性能(图 33b)。复合制备法,即利用 MOFs 作为载体负载其他纳米酶制备复合材料。Wang 等<sup>[244]</sup>以 ZIF-8 为载体,整合 GOx 和金(Au)纳米酶制备 ZIF8/Au-GOx NPs(图 33c),显示出多模态的抗菌治疗效果。



**图 33** (a) MOF-818 和儿茶酚氧化酶的结构示意图及 MOF-818 的电子显微镜照片<sup>[138]</sup>; (b) AuPt/ZIF-8-rGO 的制备过程<sup>[243]</sup>; (c) 利用 ZIF-8 整合葡萄糖氧化酶和金纳米酶制备多模态抗菌纳米酶<sup>[244]</sup>

**Fig. 33** (a) The structure of MOF-818 and catechol oxidase (PDB code 1BT1) and the electron microscope images of MOF-818<sup>[138]</sup>. (b) Synthesis process for AuPt/ZIF-8-rGO<sup>[243]</sup>. (c) The synthesis of dual-modal antibacterial nanozyme ZIF8/Au-GOx NPs via integrating GOx and Au nanozyme into ZIF-8<sup>[244]</sup>

不同的金属中心和有机配体可以赋予 MOFs 材料不同的空间类型和晶体结构,使 MOFs 纳米酶不仅能够形成三维晶体结构,还能形成二维片层结构。相较于三维结构,二维超薄 MOFs 纳米片(2D MOFs)由于具有更丰富的活性位点和更大的比表面积而表现出更优异的催化效率。例如,铁卟啉的 2D MOFs [Cu-TCPP(Fe)]具有类过氧化物酶活性的同时,比石墨烯氧化物和块状 MOFs 具有更高的荧光猝灭效率<sup>[268]</sup>。

虽然纳米酶的研究应用已取得较大进展,但仍然面临着两个挑战。首先是纳米酶活性位点的低密度分布导致纳米酶类酶活性远低于天然酶<sup>[269]</sup>;其次是纳米酶元素组成、尺寸结构、晶面暴露等的不同导致的催化机制复杂化<sup>[61]</sup>。而单原子纳米酶以过

过渡金属的衍生大环结构(M-N-C, M指过渡金属)模拟天然酶的M-N<sub>x</sub>结构,从而具备明确的电子和几何结构,有望成为传统酶的替代品。更重要的是,单原子纳米酶类酶活性和催化机制主要取决于活性中心的空间构型,这将有助于不同单原子纳米酶类酶活性和催化机制的统一研究<sup>[74]</sup>。单原子纳米酶的合成主要基于防止原子聚集和增强金属-载体相互作用两个原则,目前已有空间约束、金属交换等主要合成策略<sup>[270]</sup>。

空间约束策略是通过抑制热解过程中原子的聚集迁移得到单原子分散性良好的纳米酶。Huang等<sup>[74]</sup>制备了碳纳米框架约束的N配位的Fe单原子纳米酶(Fe-N<sub>5</sub> SA/CNF),将MOF包裹的酞菁铁在900 °C氮气氛围下煅烧热解,在碳化过程中,孤立的FeN<sub>4</sub>位点被碳纳米框架约束,形成了热力学更稳定的FeN<sub>5</sub>/C位点,这种活性位点类似于天然细胞色素P450的活性位点(图34a)。实验表明,该单原子纳米酶具有良好的类氧化酶催化活性。

MOF材料是一种新型多孔材料,经过处理后能够产生大量的配位点,可以和金属原子配位锚定,通过掺杂其他金属离子,可以得到待掺杂金属的单原子纳米酶。Cao等<sup>[245]</sup>利用可控的金属-有机配位策略,首先由锌离子(主要离子)、杂离子(次要离子)和2-甲基咪唑反应形成金属前驱体,再经过煅烧热解,制备了20多种不同金属原子掺杂的单原子人工金属纳米酶(AMEs),表征结果表明,这一系列单原子纳米酶在结构形貌、尺寸、元素组成、晶面暴露等方面均相似(图34b),这将有助于对纳米酶类酶活性比较和催化机制的研究。

除了上述单原子纳米酶制备方法以外,研究人员又开发了一些方法来合成单原子纳米酶,如自组装法<sup>[271]</sup>、牺牲模板法<sup>[272]</sup>、电化学腐蚀法<sup>[273]</sup>、低温(<0 °C)光催化还原法<sup>[274]</sup>等。

为了进一步提高纳米酶的催化效率,使其具有多种类酶催化活性,将不同种类纳米酶组装形成复合纳米酶是常用的制备策略<sup>[275]</sup>。例如, Huang等<sup>[246]</sup>利用V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>纳米线模拟GPx, MnO<sub>2</sub>纳米颗粒模拟SOD和过CAT,多巴胺作为连接剂,制备出V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>@pDA@MnO<sub>2</sub>纳米复合物,这种多纳米酶协同平台能够有效模拟细胞内的抗氧化酶防御系统,在炎症治疗方面具有潜在应用(图35a~c)。Wang等<sup>[276]</sup>先合成PtCo纳米颗粒,然后使用KMnO<sub>4</sub>还原法控制MnO<sub>2</sub>的生长,通过调整反应物的比例,制备出具有良好催化效率的MnO<sub>2</sub>@PtCo仿生纳米花

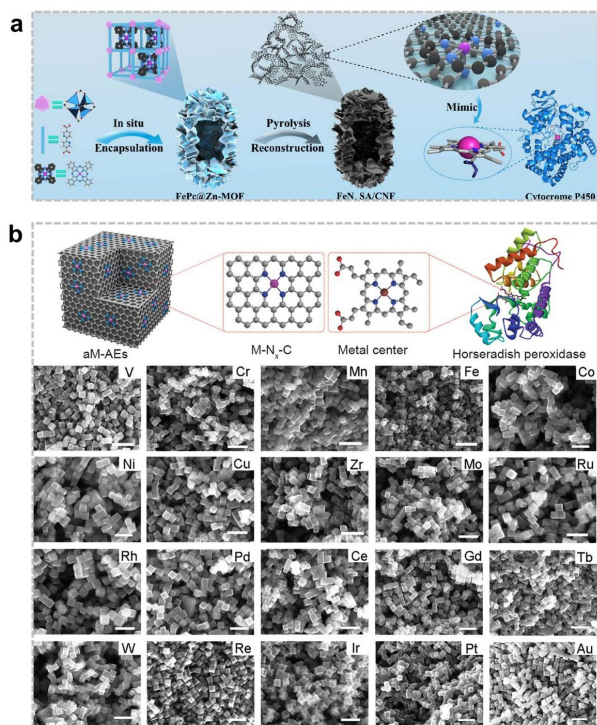


图34 (a)模拟细胞色素P450活性中心的碳框架约束的轴向5-N配位单原子Fe纳米酶合成示意图<sup>[74]</sup>; (b)单原子人工金属纳米酶(AMEs)和辣根过氧化物酶的结构以及20种具有不同金属中心的AMEs的SEM照片,比例尺为200 nm<sup>[245]</sup>

Fig. 34 (a) Schematic formation process of carbon nanoframe-confined atomically dispersed Fe sites with axial five-N coordination for mimicking the active center of cytochrome P450<sup>[74]</sup>. (b) The structure of AMEs and horseradish peroxidase, and the SEM images of AMEs with different metal-N centers. The inset scale bar is 200 nm<sup>[245]</sup>

(图35d,e)。Yang等<sup>[247]</sup>首先采用双溶剂合成策略制备了ZIF-8纳米载体,根据Stober方法将SiO<sub>2</sub>包裹在ZIF-8粒子表面。通过化学刻蚀法和高温碳化得到ZIF-8衍生的中空多孔碳纳米酶。最后通过原位还原法将超小Pt纳米酶固定到MOF衍生的碳纳米酶中,成功地构建了具有良好类过氧化氢酶活性和光敏性能的Pt-C集成式纳米酶。Kong等<sup>[248]</sup>首先通过高温热解法制备粒径分布均匀的磁性Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米颗粒,再利用末端带功能基团的PEG修饰Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米颗粒,然后利用颗粒表面功能基团吸附Pt离子并原位还原制备Pt纳米颗粒形成Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pt二元复合纳米酶(图35f,g)。Sun等<sup>[249]</sup>通过化学偶联的方式将高温热解法制备的磁性Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米粒子与水热法制备的超小CeO<sub>2</sub>纳米粒子进行组装,制

备出具有冠状体形貌的  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{CeO}_2$  复合纳米酶, 该组装纳米酶可以发挥类多酶活性的近距离接力催化作用(图 35h); 此外他们还通过一锅法制备出由 Au 纳米粒子和  $\text{CeO}_2$  纳米粒子组装成的  $\text{Au}@ \text{CeO}_2$  复合纳米酶, 这种方法制备出的组装体同样具有冠状体的形貌(图 35i), 能够发挥多种类酶活性的接力催化

作用<sup>[277]</sup>。

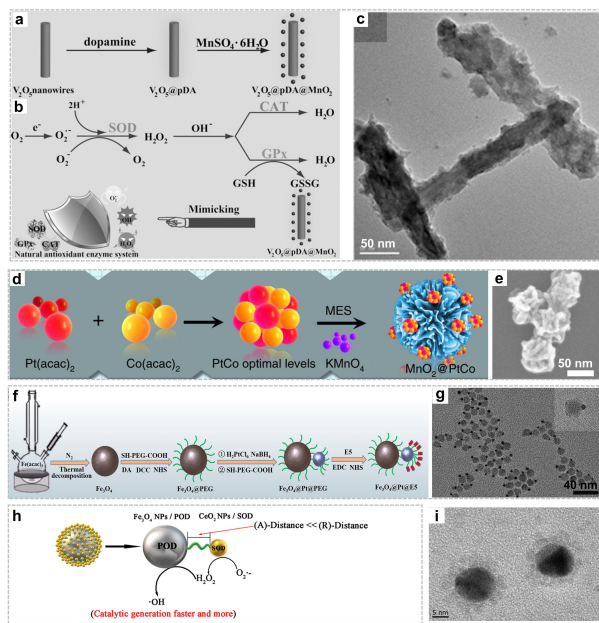
### 3.2.2 纳米酶的特征

纳米酶的尺寸、形貌、暴露晶面、化学组成以及表面修饰等是决定其催化性能和应用的关键因素<sup>[278]</sup>。要探讨纳米酶结构与性能间复杂的相互关系, 在纳米尺度和原子尺度对其进行表征与分析是十分必要的。下面从形貌分析、组成与结构分析、表面与界面分析三个角度总结了纳米酶常用的表征手段。

纳米酶的形貌分析主要利用电子显微镜观察法, 例如使用扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)对颗粒的形貌、大小、尺寸分布、聚集状态等进行分析测量。通过与其他技术相结合, 如选区电子衍射(SAED)、高分辨 TEM、X 射线能谱分析(EDS), 可以进一步获得材料关于晶体结构、原子排列、微区元素组成与分布等方面的可靠信息。

扫描隧道显微镜(STM)利用量子理论中的隧道效应可以对导电样品进行原子分辨级的观察。对于绝缘体材料表面的观察, 则可以选择原子力显微镜(AFM)。高角环形暗场扫描透射电子显微镜(HAADF-STEM)可以观察到更精细的结构和更低浓度的成分。由于其优秀的单原子成像能力, 近年来, HAADF-STEM 在单原子纳米酶的表征上应用广泛。对于多孔材料, 可以采用比表面积法 BET (Brunner-Emmet-Teller measurements) 来测定计算颗粒的比表面积和孔径。此外, 纳米颗粒溶液的水动力尺寸和表面电位可以通过动态光散射仪(DLS)进行测量, 从而反映纳米颗粒在溶液中的真实状态。

纳米酶的组成与结构分析主要包括对其物相组成、元素组成、晶体结构和电子结构等方面的表征。X 射线衍射法(XRD)是鉴定物质晶相和结晶度的有效手段。通过对衍射峰的位置及强度的分析, 可以得到材料的物相、结构以及分子间相互作用等信息。此外, 利用衍射峰的半高宽和位置可以计算粒子的晶粒度(Scherrer 公式)。对纳米酶的体相元素组成及掺杂元素的测量, 可以利用原子吸收/发射光谱仪、电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)或 X 射线荧光光谱仪(XFS)。现代同步辐射光源由于其高亮度、高偏振、宽波段、窄脉冲等特点, 可以对研究对象进行高空间和时间分辨率的表征, 因而在材料学、化学、环境科学、生命科学、医药学等众多领域具有重要应用。将实验室常规表征手段与同步辐射技术相结合是开启奇妙纳米世界的“钥匙”。例如, 基于同步辐射 X 射线技术发展起来的 X 射线吸收精细结



**图 35** (a)  $\text{V}_2\text{O}_5@ \text{pDA}@ \text{MnO}_2$  纳米复合物的合成示意图<sup>[246]</sup>; (b) SOD-CAT-GPx 协同平台清除活性氧的过程及多纳米酶体系模拟细胞内抗氧化酶防御体系的示意图<sup>[246]</sup>; (c)  $\text{V}_2\text{O}_5@ \text{pDA}@ \text{MnO}_2$  纳米复合物的 TEM 照片<sup>[246]</sup>; (d)  $\text{MnO}_2@ \text{PtCo}$  纳米花的制备过程示意图<sup>[276]</sup>; (e)  $\text{MnO}_2@ \text{PtCo}$  纳米花的 TEM 照片<sup>[276]</sup>; (f)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Pt}$  纳米酶制备过程示意图<sup>[248]</sup>; (g)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Pt}$  纳米酶的 TEM 照片<sup>[248]</sup>; (h)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{CeO}_2$  NPs 亚纳米尺度间的接力催化作用示意图<sup>[249]</sup>; (i) 冠状  $\text{Au}@ \text{CeO}_2$  NPs 的 TEM 照片<sup>[277]</sup>

**Fig. 35** (a) Scheme illustration of the synthesis of  $\text{V}_2\text{O}_5@ \text{pDA}@ \text{MnO}_2$  nano-composites<sup>[246]</sup>. (b) The reactive oxygen species removal progress of SOD-CAT-GPx synergistic system and the scheme of multi-nanozymes system to mimic intracellular antioxidant enzyme-based defense system<sup>[246]</sup>. (c) TEM image of  $\text{V}_2\text{O}_5@ \text{pDA}@ \text{MnO}_2$  hybrid nano-complex<sup>[246]</sup>. (d) Synthesis of  $\text{MnO}_2@ \text{PtCo}$  nanoflowers<sup>[276]</sup>. (e) TEM image of  $\text{MnO}_2@ \text{PtCo}$  nanoflowers<sup>[276]</sup>. (f) Schematic illustration for the formation process of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Pt}$  nanozymes<sup>[248]</sup>. (g) TEM images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Pt}$  nanozymes<sup>[248]</sup>. (h) Schematic illustrating the mechanism of efficient relay catalysis at sub-nanometer distance between  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{CeO}_2$  NPs<sup>[249]</sup>. (i) TEM image of  $\text{Au}@ \text{CeO}_2$  NPs<sup>[277]</sup>

构谱(XAFS)可以直接提供原子的电子结构信息(如价态、能带结构、电子轨道杂化、电荷转移、电子轨道自旋等)和配位环境信息(配位原子、配位数等近邻几何结构),可为纳米酶催化机制研究提供重要信息。

对于纳米酶的表面与界面分析,已有多种方法可以采用,如扫描探针显微技术、谱分析法、热分析法。其中,X射线光电子能谱(XPS)和俄歇电子能谱(AES)可以用作纳米酶表面元素的定性和半定量分析,以及表面元素的化学态分析。电子能量损失谱(EELS)也是获取表面原子、分子的物理和化学信息的一种分析方法,其具有XPS没有的微区分析能力,与AES相比具有更灵敏的特性,可以获取更为表层的信息。表面缺陷结构被证明在提升纳米酶催化性能方面发挥了重要作用<sup>[213]</sup>。这些缺陷结构可以通过像差校正HAADF-STEM、STM、电子顺磁共振技术(EPR)、XRD、XPS、XAFS、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、拉曼光谱(Raman)、正电子湮没能谱(PALS)、固体核磁共振波谱技术等进行表征。此外,DFT也是一种通过理论计算来研究空位性质的常用手段。核磁共振波谱法(NMR)可以通过探针分子与不同纳米酶表面结合后化学位移的高低来显示材料表面路易斯酸强度,进而定性分析材料表面的电子密度,用于探究具有不同电子密度的晶面与酶活性之间的关系。热分析法主要包括热重分析法(TGA)、差热分析(DTA)和差示扫描量热法(DSC),常用于研究纳米酶表面有机基团的存在、含量以及热失重温度等。对于纳米酶表面修饰物的检测,可以针对修饰物质本身特有的性质来选择适合的表征手段。

除了上述提到的方法,纳米材料领域其他的表征技术同样适用于纳米酶。每个方法都有其优缺点,往往需要多技术联用才能对纳米酶的微观结构具有较为细致的了解。随着纳米科学技术的进步,未来新的表征方法不断涌现,必将促进研究人员对纳米结构与催化性质间复杂关系的深刻认识,开发出更加高效、智能的新一代人工纳米酶。

### 3.3 纳米酶的合成

纳米酶聚合了天然酶和人工酶的优越性能,包括活性高、选择性好、稳定性高、可重复使用等优点,在医学、农业、环境、食品和制药等领域显示出广阔的应用前景。如何实现纳米酶的工程化制备将成为纳米酶实际应用的重点问题。纳米酶有两种合成思路:“自上而下”和“自下而上”,前者是将大尺寸材

料通过各种蚀刻技术分解成更小的纳米颗粒<sup>[279, 280]</sup>,后者则为将较小的结构单元(如原子、分子、纳米粒子等)通过相互作用组装成纳米尺寸的复杂结构<sup>[281]</sup>。基于以上两种制备策略,本节概述了实现纳米酶工程化的可能途径,包括物理合成法、化学合成法和生物合成法(图36)。

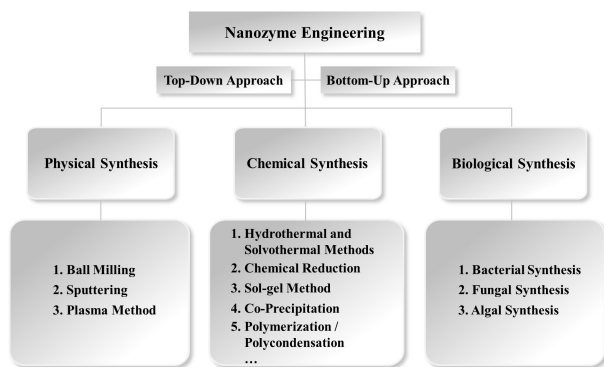


图 36 纳米酶工程化制备示意图

Fig. 36 Principal scheme of nanozyme engineering

#### 3.3.1 物理合成法

物理合成法是典型的“自上而下”纳米材料合成策略,即采用光、电技术使材料在真空或惰性气体中蒸发,然后使分子或原子形成纳米颗粒,以及机械、喷雾等以力学过程为主的制备技术(图37)。通过物理法制备的纳米颗粒虽然纯度较高,但其产量低下,设备成本极高。本节将列举几种纳米酶的物理合成法,包括球磨法、离子溅射法和等离子体法。

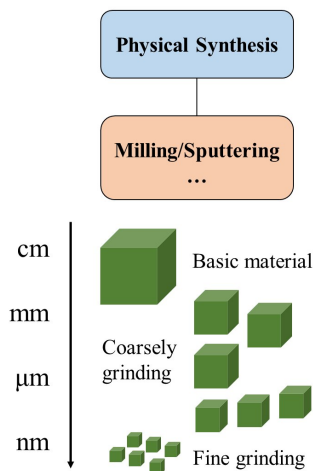


图 37 物理合成法示意图

Fig. 37 Schematic diagram of physical synthesis methods

球磨法是将微米或亚微米级的粒子长时间研磨,然后分散到介质中得到纳米颗粒,如将微米级长链  $\text{MoO}_3$  纳米带经过球磨,然后与  $\text{Na}^+$  和  $\text{H}_2\text{O}$  共插层,得到  $\text{Na}^+/\text{H}_2\text{O}$  共插层  $\text{MoO}_3$  纳米带 (NH-

MoO<sub>3</sub>)。与惰性 MoO<sub>3</sub> 相比, NH-MoO<sub>3</sub> 纳米带表现出良好的类过氧化物酶活性<sup>[282]</sup>。活性炭、金属硫化物均可通过球磨法获得分散良好的类过氧化物酶纳米酶, 用于葡萄糖检测等医疗诊断领域<sup>[283~285]</sup>。此外, 球磨法还是制备单原子纳米酶有效的方法, 依靠机械力破坏载体分子间的化学键, 形成的缺陷捕获金属原子<sup>[286, 287]</sup>。Gan 等<sup>[288]</sup>以四水乙酸 Ce(III) 和乙酸 Au(III) 为前驱体, 采用球磨法实现了 Au/CeO<sub>2</sub> 单原子催化剂的公斤级制备。通过球磨 Pt 前驱体和氮掺杂碳载体, 也可直接快速制备高负载量的 Pt 单原子催化剂<sup>[289]</sup>。因此, 这种环境友好、成本低廉的球磨法有望成为实现纳米酶工程化的有效方法。

离子溅射法是制备金属纳米粒子簇和纳米结构膜的主要手段。该方法采用热阴极熔化金属, 依靠高压放电产生高速气体离子冲击热阴极, 使熔化的原子或分子蒸发并在载体表面沉积形成纳米粒子, 如采用射频等离子体溅射法制备的 Cu/CeO<sub>2-x</sub> 纳米催化剂可用于一氧化碳的氧化反应<sup>[290]</sup>。Wang 等<sup>[291]</sup>通过离子溅射和原子层沉积技术合成的 TiO<sub>2</sub> 包裹 Au 纳米颗粒 (Au@TiO<sub>2</sub>) 具备良好的类过氧化物酶活性, 可用于葡萄糖和双氧水的检测。溅射法制备纳米粒子具有多个优势, 包括靶材料蒸发面积大、粒子回收率高、制备的粒子均匀、粒度分布窄等, 该方法适合制备高熔点金属型纳米粒子。

利用等离子体制备纳米酶具有高效、价廉、清洁等优点。Wang 等<sup>[262]</sup>利用等离子体辅助氮掺杂 MoS<sub>2</sub> 纳米片, 从而产生高效的纳米酶。随着等离子体处理时间的延长, 该纳米片的类过氧化物酶活性显著增强。利用一种高效的等离子体处理策略, 在室温下可将氮掺杂到石墨烯中获得碳基绿色纳米酶 (N-QG), 其催化活性比未掺杂氮的纳米材料高出近 5 倍。因此, 等离子体辅助下的氮掺杂可以提高 QG 的电导率并产生表面缺陷, 从而促进电子向 N-QG 的催化活性的增强转移<sup>[292]</sup>。

### 3.3.2 化学合成法

化学合成法是通过适当的化学反应, 从分子、原子、离子出发制备纳米材料 (图 38), 包括水热法和溶剂热法、化学还原法、溶胶-凝胶法和共沉淀法等, 化学合成法是目前纳米酶制备的主要手段。

水热法和溶剂热法是在密封的压力容器中, 通过对水或溶剂进行加热, 使反应体系形成一个高温高压的环境, 从而实现纳米材料的可控合成<sup>[294]</sup>。采用一锅水热法制备 Fe 掺杂 MoS<sub>2</sub> 纳米片 (Fe-

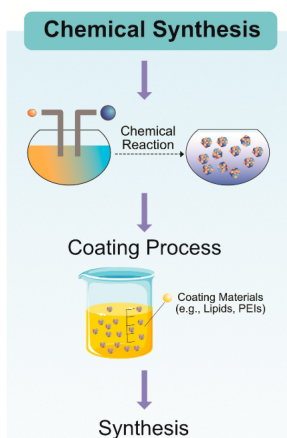


图 38 化学合成法示意图<sup>[293]</sup>

Fig. 38 Schematic diagram of Chemical synthesis methods<sup>[293]</sup>

MoS<sub>2</sub>), 通过调整 Mo/Fe 的摩尔比可实现其类过氧化物酶活性的可控调节, 所建立的 Fe-MoS<sub>2</sub> 纳米酶比色法具有实际应用的可行性<sup>[295]</sup>。Liu 等<sup>[296]</sup>受天然酶的启发, 首次通过水热和溶剂热法合成了新型具有类过氧化物酶活性的 FeS<sub>2</sub>@共价有机框架 (COF) 纳米酶 (FeS<sub>2</sub>@SNW-1)。Ji 等<sup>[15]</sup>通过溶剂热法制备了 ZIF-8, 使用磷原子作为合成体系的前驱体来锚定金属活性中心并调节局部配位结构, 再将 Fe 离子和聚 (环三磷腈-4, 4'-芳香共聚酰胺) (PZM) 聚合包覆在 ZIF-8 上, 制备了 Fe/ZIF-8@PZM 核壳复合单原子纳米酶 (FeN<sub>3</sub>P-SAzymes), 所设计的 FeN<sub>3</sub>P-SAzymes 的精确配位结构有利于提高催化性能。此外, 水热法和溶剂热法还广泛用于 CuO 纳米酶<sup>[297]</sup>、CoO 纳米酶<sup>[298]</sup> 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ag/Bi<sub>2</sub>MoO<sub>6</sub> 纳米酶<sup>[299]</sup> 等的制备。

化学还原法因简单快速已成为最常用的纳米催化剂制备方法, 通过改变反应物的摩尔浓度、还原剂类型和反应温度可实现纳米粒子的形貌和粒径的有效控制<sup>[300]</sup>。选择合适的还原剂是化学还原法实现高效制备纳米材料的关键因素, 合成过程中反应速度过快可得到较小的颗粒<sup>[301]</sup>, 而反应速度太慢则可能发生颗粒聚集<sup>[302]</sup>。Wang 等<sup>[303]</sup>采用化学还原法制备了平均粒径为 50 nm 的空心 CuS 纳米立方体, 其比表面积大于一般固体的 CuS, 并表现出较好的电催化和光热性能。利用化学还原法合成了一种平均粒径为 20~30 nm 的类过氧化物酶 AuNPs, 通过与铜绿假单胞菌特异性核酸适体结合, 可用于水或生物液体中病原体的快速、准确和现场检测<sup>[233]</sup>。将化学还原和电沉积相结合, 在金属卟啉有机框架

(PMOF)上对 Pt NPs 进行修饰,合成了一种多功能人工酶。在 Pt@PMOF(Fe)复合物中,PMOF(Fe)可以阻止 Pt NPs 的聚集,从而使 Pt NPs 具有较高的稳定性<sup>[304]</sup>。Zhang 等<sup>[305]</sup>将 6-氨基己酸稳定的 CeO<sub>2</sub> 通过静电吸附前驱体 PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>,再通过 NaBH<sub>4</sub> 进一步还原,实现了单原子 Pd 的成功掺杂。与 CeO<sub>2</sub> 相比,单原子 Pd/CeO<sub>2</sub> 纳米结构具有优良的类过氧化物酶和过氧化氢酶活性。

溶胶-凝胶法是将原料分散在溶剂中,经过水解反应生成活性单体,通过聚合形成溶胶,进而生成具有一定空间结构的凝胶,调整化学添加物的浓度、类型以及温度,可以控制纳米酶的结晶度、形貌和磁性等理化性质<sup>[306]</sup>。该方法具有操作简单,纳米颗粒纯度高、均匀性好、粒径分布较窄等优点。Yu 等<sup>[307]</sup>以植酸作为配位剂,采用溶胶-凝胶法合成了直径约 100 nm 的类过氧化物酶 Pt 纳米颗粒聚苯胺水凝胶(PtNP/PAni)。He 等<sup>[308]</sup>提出了一种介孔纳米酶,不仅具有类过氧化物酶活性,而且能和抗癌药物协同治疗肿瘤。通过溶胶-凝胶法制备了 Fe 掺杂介孔 SiO<sub>2</sub> 纳米酶(FeMSN),引入的 Fe 赋予了 FeMSN 类过氧化物酶活性,可在酸性条件下将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解为 ·OH,用于肿瘤的化学动力学治疗。

共沉淀法是将溶液中两种或多种阳离子,通过沉淀剂的作用后,得到化学成分均一的纳米材料,该方法容易制备粒度小而且分布均匀的纳米粉体材料。当需要较高的纯度和较好的化学计量控制时,共沉淀法是一种很好的选择。Lan 等<sup>[309]</sup>采用共沉淀法合成了两种纳米材料,分别是尺寸为 100~200 nm 的碳球(Mn-MPSA-HCS)和空心碳立方材料(Mn-MPSA-HCC),单层 Mn<sub>x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>y</sub> 均匀地分散在碳结构表面,从而为分析物的反应提供了大量的活性位点。该方法可用于制备各种形状和尺寸的过渡金属磷酸盐。共沉淀法还被广泛应用于层状双氢氧化物纳米酶(LDH)的制备,如具有氧化酶活性的 Co/Fe LDH<sup>[310]</sup>,以及过氧化物酶活性的 Ni/Co LDH<sup>[311]</sup>和 Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> LDH<sup>[312]</sup>等。

除了上述的化学合成法,聚合和缩聚法<sup>[313-315]</sup>、湿化学法<sup>[316-318]</sup>、电化学沉积法等<sup>[319, 320]</sup>也广泛用于纳米酶的化学合成。

### 3.3.3 生物合成法

相比于传统物理、化学合成法,生物法合成纳米材料具有成本效益好、生态友好、低能耗等优点,有望成为纳米酶规模化制备的有效途径<sup>[321]</sup>,各种微生物如细菌、真菌、藻类或植物均可作为“纳米工

厂”(图 39)。目前,生物法合成的纳米材料已用于各种应用,如去除重金属、处理工业废水、生物医学和生物传感器等<sup>[322]</sup>。

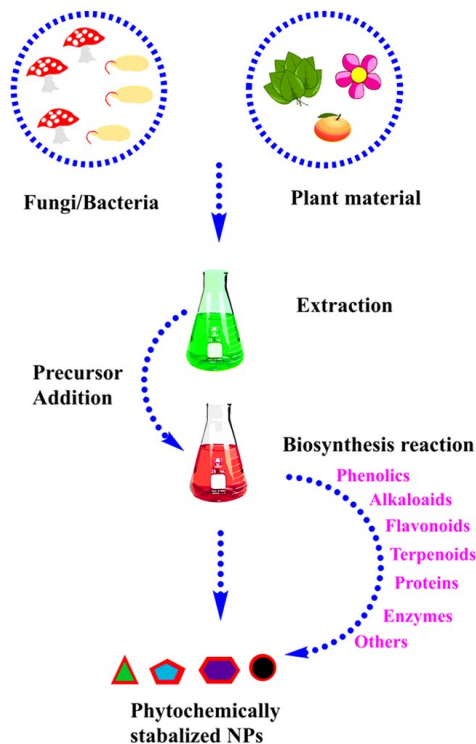


图 39 生物合成法示意图<sup>[323]</sup>

Fig. 39 Schematic diagram of biological synthesis methods<sup>[323]</sup>

与其他生物相比,原核细菌相对容易操作,已成为合成含金属纳米颗粒的主要细菌类型。研究表明纳米颗粒能在乳酸菌的质膜内合成,产生多种高度结构化的 Au 和 Ag 纳米催化剂<sup>[324]</sup>。通过改变希瓦氏藻 pH 实现了纳米 Au 的合成,在 pH = 7 时,合成的纳米颗粒尺寸为 10~20 nm;而 pH = 1 时,粒径调整为 50~500 nm<sup>[325]</sup>。pH 除了影响粒径外,还对纳米颗粒的形貌具有明显的作用。利用壳斗红假单胞菌合成 Au 纳米颗粒时,当 pH = 7 时,合成的纳米颗粒呈球形,而当 pH = 4 时,纳米颗粒呈平板状<sup>[326]</sup>。此外,芽孢杆菌<sup>[327, 328]</sup>、卤杆菌<sup>[329]</sup>、短杆菌等<sup>[330]</sup>均可用于纳米催化材料的生物合成。

真菌合成纳米材料具有多个优势,如真菌的表面积大、生物利用率高、便于扩增和下游加工等<sup>[331]</sup>。同时,真菌在实验室以及放大的工艺条件下都比较容易生长,具有更好的纳米材料规模化制备的应用前景。此外,真菌产生的胞外酶、多肽类物质及次级代谢产物有助于合成不同形貌和尺寸的纳米颗粒。多个真菌种属如尖孢镰刀菌、米曲霉、黄萎

病菌、链格孢菌和炭疽菌属等均可用于纳米颗粒的合成<sup>[332]</sup>。如利用尖孢镰刀菌合成粒径为 5~15 nm 的纯 Ag 纳米颗粒,并通过真菌蛋白稳定其纳米结构<sup>[333]</sup>。Mukherjee 等<sup>[334]</sup>报道了轮枝孢产生 Au 纳米颗粒的方法。Riddin 等<sup>[335]</sup>利用枯萎病菌成功实现了 Pt 纳米颗粒的胞内和胞外合成。

藻类制备纳米颗粒具有低毒、低温等优点,与使用其他生物制剂合成相比,藻类合成纳米颗粒的速度更快。多种藻类已被用于制备各种尺寸和形状的纳米颗粒,如小球藻能将 90% 以上的四氯金酸盐转化为金属态沉积在胞内外,形貌呈现为二十面体、十面体和四面体等结构<sup>[336]</sup>。莱茵衣藻可实现纳米 Ag 的体内外合成,但发现其体外合成速率较慢,所合成的纳米颗粒为 5~15 nm 的圆形,而体内合成较快,纳米颗粒为 5~35 nm 的矩形<sup>[337]</sup>。水绵藻能将 Au<sup>3+</sup> 转换为 Au<sup>0+</sup>,因此他们能够合成粒径为 2~50 nm 的球形、六边形和三角形的 Au 纳米颗粒<sup>[338]</sup>。此外,螺旋藻<sup>[339, 340]</sup>、马尾藻<sup>[341]</sup>、松香藻等<sup>[342]</sup>均可用于金属纳米颗粒的合成。

利用生物合成法制备纳米酶的研究相对较少,多为利用天然植物提取物为还原剂,体外合成纳米酶材料,如 Nath 等<sup>[343]</sup>以硝酸铈铵盐和氢氧化锆为原料、 $\beta$ -环糊精为稳定剂,利用印楝叶提取物作为还原剂,体外合成了锆酸铈(CeZrO<sub>4</sub>)纳米酶,在最适 pH=4.0 时表现出过氧化物酶和氧化酶活性,具有抗肿瘤的应用潜力。Nguyen 等<sup>[344]</sup>利用皂角提取物作为还原剂合成了粒径为 14 nm 的 Ag NPs,表现出过氧化物酶活性,在葡萄糖和抗坏血酸检测方面具有良好的应用前景。

### 3.3.4 小结

纳米酶工程化,即规模化制备理化性质稳定的纳米酶替代天然酶进行工业化生产的技术体系。目前制备纳米酶的方法主要包括物理合成法、化学合成法和生物合成法,其中化学法制备纳米酶由于反应温和、易操控、设备投入小,又避免了物理法中其他杂质的引入及微粒在空气中的氧化问题,因而在科研、生产中广泛应用。尤其是化学法中的溶胶-凝胶法及沉淀法,制备的颗粒分散均匀,粒子形状好,在催化反应中具有较高的催化活性。虽然纳米酶的制备已取得了一些成果,但其合成方式在实际生产中仍存在许多需要解决的问题,主要体现在:(1)现有的制备技术还停留在实验室和小规模生产阶段,应用于大规模生产还有许多技术瓶颈需要解决,这将是实现纳米酶工程化首先需要解决的问题;(2)

由于纳米酶的粒子尺寸小,在空气中极易被氧化、吸湿和团聚,性能很不稳定,给工业化生产应用带来了许多困难,使其使用性能降低;(3)纳米酶活性发生变化的机理及其在制备中的动力学和热力学过程仍需深入研究;(4)在实施绿色化学、倡导绿色合成化学的今天,致力于纳米酶的生物合成及工程化应用研究将会成为纳米酶工作者今后面临的难点、热点和前沿问题。

## 4 纳米酶的应用

催化剂在化工生产、医药卫生、环境保护等多个领域具有广泛而重要的应用,是现代社会经济基石。据统计,2020 年全球催化剂市场规模为 355 亿美元,预计 2030 年达到 575 亿美元,涉及 90% 以上的化工产品的生产过程<sup>[345]</sup>。然而,传统化学催化剂因催化效率有限,催化过程依然需要高温、高压、强酸、强碱等条件以及耐压、耐腐蚀材料的加持,且反应过程涉及大量有机溶剂的使用,具有耗能大、高污染的特点。近些年,随着能源与物质需求的急剧增长和绿色发展背景下的产业结构升级,学术界和工业界正致力于开发环境友好的各种催化剂。与化学催化剂相比,酶是一种绿色环保的生物催化剂,作用条件温和,具有无可比拟的高催化活性与选择专一性。然而,工业酶在应用中暴露出的缺点也格外明显。首先,多数工业酶需要通过微生物发酵生产,而只能使用经过长期的严格选择和研究的的高产菌株,且发酵过程中要严格防止杂菌污染。经发酵生产的酶还要经过繁琐的筛选鉴定、分离纯化和保存工艺才能获得可用的酶制剂。此外,由于酶对环境非常敏感,在非温和条件下极易失活,因此在催化过程中要严格控制反应条件。另外,反应混合物中的酶难以从催化体系中回收分离,因此难以实现连续化生产。综上,尽管目前已被鉴定的酶多达 3000 多种,但其中能够实现规模化生产的酶制剂只有 60 多种,主要应用于食品加工领域。尽管与生物体内的各项生命活动紧密相关,但因容易被蛋白酶降解失活等限制,酶在医药卫生领域的应用非常有限。

作为新一代模拟酶,纳米酶具有比传统化学催化剂和酶更广阔的应用前景。由于具有类酶催化活性,纳米酶的工作环境温和,能耗低、污染小,符合绿色发展的需要。此外,与酶相比,纳米酶的结构更加稳定且更易于规模化生产。除了具有高效的催化功能,许多纳米酶还具有独特的光、声、电、磁等理化特

性。一方面,巧妙利用纳米酶的双功能特性可以设计更实用的应用策略。例如,结合  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶的磁性与类过氧化物酶催化活性,可以打造集磁富集底物与催化显色于一体的酶联免疫层析新方法<sup>[148]</sup>。另一方面,由于纳米酶的理化性质与催化特性都是由其纳米结构决定,因此,利用磁、光、电等介质调控纳米酶的结构,有望对其催化活性进行调节。与酶的高度专一性不同,纳米酶的底物谱较广,且往往具有多种催化活性。这种泛催化性质使纳米酶在污水处理、抗菌、抑癌等有广谱催化需求的应用中具有一定优势。此外,纳米酶的一些催化活性之间能够级联催化,被证明在抗氧化等领域具有协同增效功能。然而,普遍的低选择性使纳米酶难以应用于对催化有专一性需求的领域。因此,如何提高选择性是纳米酶未来应用研究的重点方向之一。

近些年,随着催化类型的不断拓展与催化活性的持续提升,纳米酶的应用研究也在日趋广泛与深入。目前,纳米酶的应用研究主要集中在生物医学领域,涉及疾病诊断、生化检测与传感、抗肿瘤、抗微生物、消炎和抗氧化等方面。此外,一些纳米酶也被开发用于污水处理、化工合成和防化洗消等应用领域。尤其值得注意的是,随着纳米酶催化机制与构效关系的逐渐阐明,人们逐渐能够针对实际问题理性设计开发高性能纳米酶。尽管尚未有纳米酶实现实际应用,这些研究为开发真正的纳米酶产品积累了宝贵的经验。相信随着机制与应用研究的不断深入,纳米酶会在未来催化相关的各个领域大放异彩。

本节回顾了纳米酶的应用研究进展,主要涉及纳米酶传感、抗肿瘤、抗菌、抗病毒和环境治理等目前研究较为深入的几个方面,重点论述了如何针对实际问题开发具有独特催化活性和理化性质的纳米酶,并展望了纳米酶应用研究的可行设计策略和潜在应用方向。

#### 4.1 纳米酶传感

纳米酶的出现为传感领域提供了新的思路和方法<sup>[1]</sup>。纳米酶不仅成本低、稳定性好、易于大批量制备,而且还兼具酶和纳米材料的“双重特性”,这使得纳米酶可以作为一种双功能或多功能材料来使用<sup>[346]</sup>。正是基于纳米酶的这些特性,科学家们发展了多种新的传感技术和方法,应用范围涵盖传染病防控、体外诊断、环境监测、食品安全、法医物证等多个领域<sup>[11, 13, 36, 37]</sup>。本节将以纳米酶应用的方法学分类介绍近年来纳米酶在传感方面取得的进展并对未来的发展方向作出展望。

##### 4.1.1 比色分析法

纳米酶比色分析法以纳米酶催化无色底物产生有色化合物的显色反应为基础,具有简单快捷、对设备要求低、结果可视化等优点。其中,具有类氧化还原酶活性的纳米酶通过催化显色底物的氧化来实现颜色变化,比如过氧化物纳米酶相应的显色底物包括 TMB、DAB、ABTS 等;而具有水解酶类活性的纳米酶则通过催化显色底物的水解来引发颜色变化,其中的代表反应是对磷酸酯键的水解,相应的显色底物为 pNPP(对硝基苯磷酸盐,其磷酸酯键断裂产生 4-硝基苯酚)。

继 2007 年纳米材料具有类酶催化特性被报道之后,魏辉和汪永康<sup>[8]</sup>随即于 2008 年构建了基于 GOx 和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  过氧化物纳米酶的级联比色分析系统,GOx 催化葡萄糖的氧化以提供  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下催化 ABTS 显色以监测葡萄糖的浓度,该研究证明了将天然酶和纳米酶耦合用于级联生物传感的可行性。此后,纳米酶比色分析法已经与多种检测技术相结合,例如基于纳米酶比色的传感器、试纸条、酶联免疫吸附分析、免疫组织化学分析等,被广泛应用于临床生物标志物检测、环境污染监测、食品监管、法医鉴定等领域<sup>[347]</sup>。

Xia 等<sup>[40]</sup>研制了一种 Ni-Pt 纳米酶,相比天然过氧化物酶,其活性提高一万倍,将其应用于癌胚抗原的 ELISA 免疫检测,可以实现 1.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的超灵敏检测,比传统的基于天然酶的 ELISA 免疫检测(376  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )低数百倍,这体现出提高纳米酶的催化活性对检测灵敏度的提升至关重要(图 40)。

利用亚砷酸盐和砷酸盐能抑制某些纳米酶的催化特性<sup>[348]</sup>, Qiu 等<sup>[349]</sup>建立了一个基于过氧化物纳米酶的比色传感器用于检测砷酸盐。具有过氧化物酶活性的  $\text{CoOOH}$  纳米片可以通过 As—O 键和静电引力结合砷酸盐,导致其纳米酶活性的抑制和 ABTS 比色信号的减弱,与其他监测技术相比,该系统对砷酸盐检出限低至 3.72 ppb(世界卫生组织指导原则的饮用水中最大含量为 10 ppb),具有高度灵敏性。

Stevens 和 Bhatia 等<sup>[350]</sup>利用超小型金纳米团簇(AuNCs)的过氧化物酶模拟活性和肾脏的精准纳米级过滤,设计了对疾病微环境作出反应的纳米传感器。肿瘤环境中高表达的特定蛋白酶将 AuNCs 从载体上切割下来,随后超小型 AuNCs 通过肾脏排泄进入尿液。向尿液中加入 TMB 和过氧化氢,在类过氧化物酶活性的 AuNCs 的催化下,尿液会发生明显的颜色变化,从而直观快速地区分出携带肿瘤的

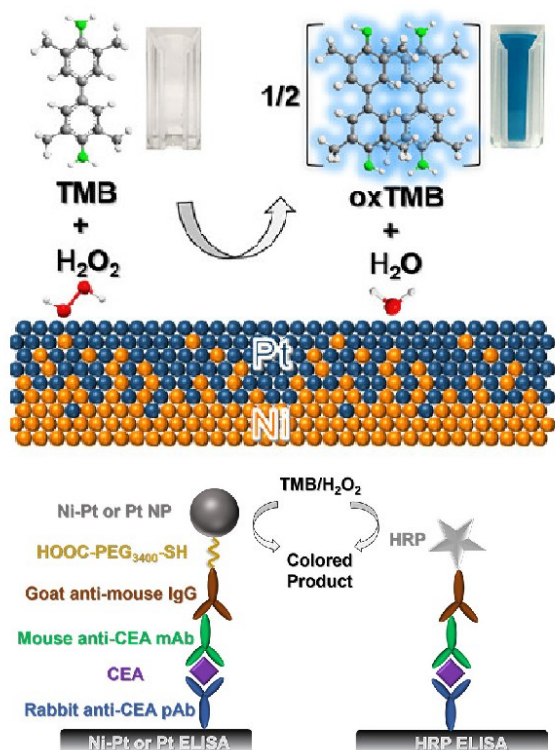


图 40 高活性 Ni-Pt 纳米酶应用于癌胚抗原的 ELISA 检测<sup>[40]</sup>

Fig. 40 High-performance Ni-Pt nanozyme applied in detection of carcinoembryonic antigen by ELISA<sup>[40]</sup>. Copyright 2021, American Chemical Society

个体。

2012 年, Yan 等<sup>[178]</sup> 开发了一种基于铁蛋白纳米酶的免疫组织化学新技术。其中, 重链铁蛋白外壳负责靶向并识别肿瘤细胞上高表达的转铁蛋白受体, 而内部的铁核则发挥过氧化物纳米酶的功能负责催化底物 DAB 产生棕色沉淀物, 从而实现了对肿瘤组织的快速灵敏检测。此外, 通过偶联不同的抗体, 纳米酶可以靶向并可视化组织切片上的多种生物标志物, 如肿瘤标志物血管内皮生长因子<sup>[30]</sup>、肝癌细胞特异性肽 SP94<sup>[351]</sup> 等。这些研究进一步证明了利用纳米酶免疫组织化学平台进行病理诊断的可行性和普适性。

#### 4.1.2 化学发光法

纳米酶化学发光分析法是基于纳米酶催化的化学发光反应, 是底物吸收化学能而产生电子激发态, 释放光辐射的过程。典型代表为过氧化物纳米酶/氧化纳米酶及其底物鲁米诺, 碱性磷酸纳米酶及其底物 1,2-二氧环乙烷衍生物(AMPPD) 等。

2015 年, 针对西非爆发埃博拉疫情的严峻形势, Yan 等<sup>[148]</sup> 利用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒作为过氧化

物纳米酶探针将埃博拉病毒糖蛋白的分离、识别和可视化试纸条检测进行高效整合, 克服了传统试纸条法因灵敏度低而长期应用受限的瓶颈问题。目前依托该技术开发的纳米酶检测试剂盒已获得多项医疗器械注册证书。新型冠状病毒疫情爆发后, 该团队又利用 Co-Fe@hemin 过氧化物纳米酶建立了一个更为灵敏的化学发光快速检测试纸条平台<sup>[352]</sup>, 可以在 16 min 内实现对 SARS-CoV-2 病毒的快速灵敏检测, 假病毒检测限达到与 ELISA 方法相当的 360 TCID<sub>50</sub>/mL, 有利于病毒的早期筛查和疫情防控(图 41)。

Hu 等<sup>[353]</sup> 发现纳米氧化铈具有类似碱性磷酸酶的催化活性, 能催化碱性磷酸酶的化学发光底物 CDP-star 发生去磷酸化, 从而产生化学发光信号, 而  $\text{Al}^{3+}$  的存在显著抑制氧化铈纳米酶的催化活性。基于此现象, 他们成功实现了细胞内的  $\text{Al}^{3+}$  水平的高灵敏度化学发光检测。随后, 他们与合作者将氧化铈碱性磷酸纳米酶进一步应用于对前列腺特异性抗原的夹心法酶联免疫分析<sup>[354]</sup>, 建立了基于纳米酶的化学发光检测平台, 其检测灵敏度达到 53 fg/mL。

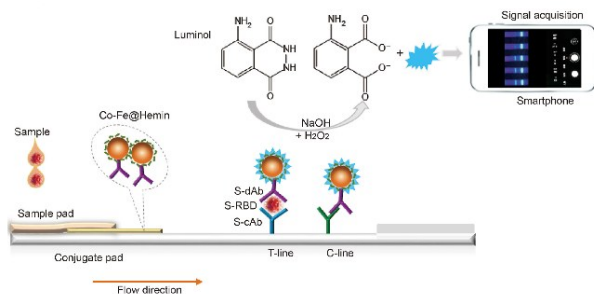


图 41 基于 Co-Fe@hemin 过氧化物纳米酶的化学发光试纸条用于检测 SARS-CoV-2<sup>[352]</sup>

Fig. 41 Co-Fe @ hemin peroxidase nanozyme-based chemiluminescence paper test for detection of SARS-CoV-2 antigen<sup>[352]</sup>. Copyright 2021, Elsevier

#### 4.1.3 荧光检测

基于纳米酶的荧光检测方法可以通过多种方式实现, 包括纳米酶直接催化荧光底物产生荧光信号, 以及纳米酶催化反应的产物间接增强或淬灭荧光信号。

Su 等<sup>[355]</sup> 构建了一个基于过氧化物纳米酶的比率型荧光传感平台用于葡萄糖的检测。首先, 葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化并为后续反应提供  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 随后, 荧光底物邻苯二胺(OPD)在铜掺杂碳基纳米酶(CuAA)的过氧化物酶活性催化下转变为荧光物质 2,3-二氨基苯肼(DAP), 在 558 nm 处具有最大

发射。由于荧光内滤效应的存在, DAP 猝灭了 Mg/N 掺杂碳量子点 (Mg-N-CQDs) 在 444 nm 处的荧光, 在一定范围内, 比例荧光信号  $I_{558}/I_{444}$  随葡萄糖浓度线性增加, 由此可以定量葡萄糖的浓度。该方法在人血清样本中得到了验证, 检出限为 1.56  $\mu\text{mol/L}$ 。

Ju 和 Wei 等<sup>[356]</sup> 开发了一种基于 CuO 纳米酶作为光电化学 (PEC)-荧光多功能信号标记的新型双模微流控传感平台, 用于检测神经元特异性烯醇化酶 (NSE, 小细胞肺癌的生物标志物之一)。固定在 PEC 传感器上的特异性抗体捕获 NSE, 随后被第一抗体和纳米酶标记的第二抗体接连识别并结合。CuO 纳米酶作为氧化酶模拟物以氧气为氧化剂高效催化抗坏血酸的氧化, 导致光电流信号的下降; 同时, 抗坏血酸被氧化脱氢后的产物与 OPD 发生反应释放荧光信号。这种传感策略在人血清样本中得到了验证, 具有良好的稳定性、重现性和选择性, 实现了对 NSE 在 0.0001 ~ 150 ng/mL (PEC 法) 和 0.001 ~ 150 ng/mL (荧光法) 范围内的超灵敏检测。此外, 微流控装置的引入使得生物传感器的小型化和自动化成为可能。在这里, 纳米酶同时作为 PEC 信号的猝灭剂和荧光信号的启动剂, 为构建高效双模生物传感平台提供了新的策略 (图 42)。

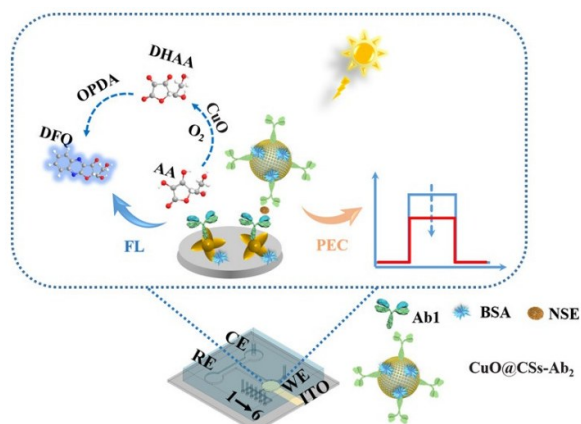


图 42 CuO 纳米酶通过催化氧化抗坏血酸来猝灭 PEC 信号并产生 FL 信号用于检测 NSE<sup>[356]</sup>

Fig. 42 Catalytic oxidation ascorbic acid by CuO nanozymes quenching the PEC signals and initiating FL signals for detection of NSE<sup>[356]</sup>. Copyright 2022, American Chemical Society

#### 4.1.4 电化学检测

电化学生物传感器可分为生物催化传感器和亲和传感器两类<sup>[357]</sup>。在生物催化传感器中, 纳米酶直接催化目标分析物发生化学反应, 产生用于信号

传导的电活性物质, 从而实现对物质的定量检测。一些小分子, 如  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[358]</sup>、多巴胺<sup>[359]</sup>、尿酸<sup>[360]</sup>、3, 4-二羟基苯乙酸<sup>[361]</sup>、去甲肾上腺素<sup>[362]</sup>和儿茶酚<sup>[363]</sup>等可以直接被氧化还原类纳米酶催化, 从而产生可检测的电信号。例如, Zhang 等<sup>[359]</sup>合成了具有氧化酶活性的 Co、N 共掺杂三维多孔碳复合材料, 成功地对人血清和人工脑脊液样品中的多巴胺进行了电化学检测。

亲和传感器则依靠生物识别元件与目标分析物的相互作用引起电化学信号的变化, 纳米酶在其中起到信号放大的作用。例如, Yang 等<sup>[364]</sup>发现 Pt NPs 的酯水解活性可以在具有氧化还原功能的  $\text{H}_3\text{N}-\text{BH}_3$  存在下被激活, 基于此开发了检测促甲状腺激素 (TSH) 的电化学传感器。固定在电极上的特异性抗体捕获 TSH, 随后抗体标记的 Pt NPs 结合 TSH 并发挥水解酶活性, 催化底物 4-氨基萘-1-乙酸酯生成 4-氨基-1-萘酚, 从而产生电化学信号 (图 43)。Zhu 等<sup>[193]</sup>合成了具有高效氧化酶和过氧化物酶活性的介孔三金属 AuPtPd 纳米球, 可协同催化 4-氯-1-萘酚氧化, 在光活性材料表面产生沉淀, 从而导致光电流的降低。脲酶可以催化尿素产生氨, 其消耗质子的特性会导致纳米酶活性的降低, 因此, 光电流随着脲酶浓度的不断增加而逐渐增加, 实现对脲酶的定量检测。

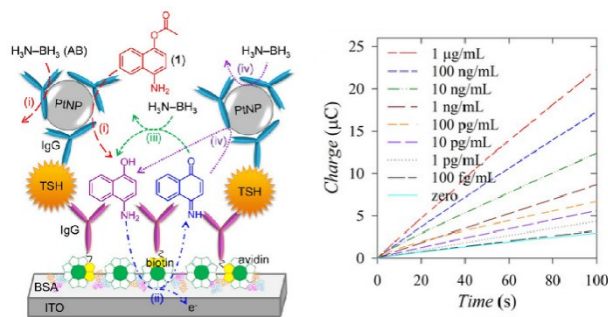


图 43 基于 PtNP 纳米酶的电化学免疫传感器用于检测促甲状腺激素<sup>[364]</sup>

Fig. 43 Electrochemical immunosensors based on PtNPs nanozyme for detection of TSH<sup>[364]</sup>. Copyright 2022, John Wiley and Sons

#### 4.1.5 表面增强拉曼散射 (SERS) 检测

拉曼光谱的信号来自于拉曼报告分子在等离子体纳米材料 (如 Au、Ag、Cu) 表面产生的拉曼散射。整合到等离子体纳米结构中的过氧化物酶纳米酶可以通过催化报告分子来改变 SERS 信号。Trau 等<sup>[365]</sup>设计了一个基于纳米酶的 SERS 传感平台来

检测生物标志物 miRNA。当目标 miRNA 存在时,核酸探针标记的 Au 过氧化物纳米酶通过碱基互补配对连接到中空纳米框架上,组装成等离子体纳米结构。随后添加的 TMB 被过氧化物纳米酶催化氧化,其氧化产物 oxTMB 作为拉曼报告分子产生信号。该策略在临床尿液样品中得到了验证,最低检测限达  $0.7 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

#### 4.1.6 其他检测方法

根据纳米酶的催化特性,也发展出了一些独特的检测策略。以过氧化氢纳米酶为例,其催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解产生氧气和水。利用这一特性,Tang 等<sup>[366]</sup>开发了一种基于 Pt NPs 纳米酶的压力传感系统。偶联抗体的 Pt NPs 识别癌胚抗原,同时发挥过氧化氢酶活性催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解产生大量氧气,引起封闭装置内气压的变化。通过压力传感器的高灵敏检测即可定量反映出癌胚抗原的浓度。

此外,纳米酶催化的反应还有助于成像。例如,Tremel 等<sup>[367]</sup>证明了具有 SOD 活性的氧化锰纳米酶催化超氧阴离子的过程能够增强磁共振成像的对比度;普鲁士蓝纳米酶在中性 pH 条件下能够发挥过氧化氢酶活性催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解来提供  $\text{O}_2$ ,因此可以作为超声造影剂来增强超声成像<sup>[368]</sup>。

#### 4.1.7 多模态检测

锦上添花的是,纳米酶材料的物理化学性质(如光、热等效应)与酶学特性相结合,在设计多模态检测平台中展现出良好的应用潜力。Shi 等<sup>[369]</sup>设计了一种原位生成普鲁士蓝纳米粒子(PBNPs)的多模态纳米酶联免疫吸附技术来测定黄曲霉毒素 B1(AFB1)。首先,固定在载体上的特异性抗体捕获 AFB1,随后适配体标记的磁性纳米颗粒(MNP)识别 AFB1 并被锚定在载体上,锚定 MNP 的数量与 AFB1 的浓度成正比。在 HCl 和  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  存在下,MNP 可以作为前体原位生成 PBNPs。具有优良光热效应的 PBNPs 在近红外光的照射下产生热能,通过温度计实现便携式定量检测。另一方面,PBNPs 具有过氧化物酶活性,可以催化 TMB 的氧化,从而产生比色信号。此外,MNP 还作为荧光猝灭剂,猝灭预孵育的荧光探针 Cy5。PBNPs 的原位生成伴随着 MNP 的蚀刻,使 Cy5 的荧光恢复,从而实现超灵敏荧光检测。与提供单一信号的检测方法相比,这种结合了光热、比色和荧光信号的多模态纳米酶免疫吸附检测策略具有更高灵敏度的特点,有利于减少由于操作条件和生物环境不稳定等偶然因素导致的假阳性/阴性结果。

#### 4.1.8 小结

纳米酶的多功能性、高稳定性以及成本低廉、易批量制备等特性赋予其应用于传感领域无限的潜力和前景。当然,纳米酶在传感领域的应用还面临着许多挑战和问题,这也吸引了相关领域的科研工作者投入更多的努力来进行解决和创新,如设计并研制活性更高的纳米酶是科研工作者们长久以来追求的目标,而提高纳米酶的催化活性可以提高检测灵敏度、降低检测限<sup>[370]</sup>。通常来说,研制更小粒径的纳米酶可以提高催化活性,这是由于纳米酶尺寸越小其比表面积越大,底物结合量则越多,表现出越强的活性。例如,在相同条件下,对于氧化铁纳米酶颗粒来说,30 nm 颗粒的过氧化物酶活性要高于 150 和 300 nm<sup>[1]</sup>。较小粒径的 Pt NPs 也具有更强的抗坏血酸氧化酶活性<sup>[371]</sup>和过氧化物酶活性<sup>[372]</sup>。纳米酶材料的形态、结构和表面修饰等对其催化活性也有相当大的影响,如朱俊杰课题组<sup>[236]</sup>报道了不同形状氧化铁纳米酶的过氧化物酶活性是:簇球状>三角片>八面体。 $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米酶的活性则是:纳米片>纳米多面体>纳米棒>纳米立方体<sup>[124]</sup>。Yan 等<sup>[70]</sup>研究发现,用组氨酸修饰可使  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶的  $k_{\text{cat}}/K_M$  提高 20 倍。此外,纳米酶的不同组装和掺杂也被用于提升酶活性,比如 Nagvenkar 和 Gedanken 等<sup>[373]</sup>用 Zn 掺杂 CuO NPs 形成纳米复合物(Zn-CuO) NPs 以增强其过氧化物酶活性;Kim 等<sup>[374]</sup>将类血红素 Fe-N<sub>4</sub> 活性位点嵌入石墨烯(Fe-N-rGO),模拟天然过氧化物酶中的血红素辅因子以提高其催化活性,实验表明与单纯的石墨烯相比,其催化活性提高了 700 倍。

纳米酶应用于传感技术,另一个需要关注和解决的难题是如何提高纳米酶的特异性。目前报道的纳米酶往往兼具多种酶活性(如同时具有过氧化物酶和过氧化氢酶活性),这在检测体系中常会产生不可避免的背景信号,从而降低检测灵敏度或准确性。魏辉和高兴发等<sup>[67]</sup>合作,通过在还原的氧化石墨烯(rGO)中掺入氮原子(N),得到了具有单一过氧化物酶催化活性的纳米酶,将其应用于  $\text{H}_2\text{O}_2$  的检测,发现比不掺入氮原子的 rGO 具有更好的线性范围。除提高类酶活性的特异性之外,对底物选择性的提高也具有挑战。目前在纳米酶表面涂覆分子印迹聚合物(MIPs)常用来提高针对底物的选择性,刘珏文等<sup>[101]</sup>通过此种策略将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的过氧化物酶活性对两种底物分子 TMB 和 ABTS 的特异性提高了 100 倍左右。通过模拟天然酶的结构也可以很好

地提高特异性,如 Dong 等<sup>[138]</sup>通过模拟天然儿茶酚氧化酶的活性中心,研制了儿茶酚氧化酶样 MOF-818,其具有高效的儿茶酚氧化酶样活性和良好的特异性,可以专一催化邻苯二酚生产相应的邻醌,但不显示过氧化物酶活性。

纳米酶催化机制的深入研究,可以为提高纳米酶催化活性及其特异性提供理论支持和指导,这也是近年来纳米酶领域重要的一个研究方向。目前主要采用紫外可见分光光度计、电子自旋共振技术、X射线光电子能谱和密度泛函理论计算等多种手段来探索纳米酶的催化反应机制。Gu 等<sup>[9]</sup>研究发现,  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  的标准氧化还原电位为 0.771 V,而 TMB 为 1.13 V,因此  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  不能直接将电子从 TMB 转移到  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,且 ESR 结果证实在酸性条件下反应体系中存在  $\cdot\text{OH}$ ,因此,氧化铁纳米酶的催化机制应该是  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  先与  $\text{H}_2\text{O}_2$  发生反应产生  $\cdot\text{OH}$ ,之后由  $\cdot\text{OH}$  氧化氢供体底物(如 TMB)发生显色反应<sup>[375]</sup>。Qu 等<sup>[376]</sup>发现碳基纳米酶表面的羰基( $\text{C}=\text{O}$ )是其活性位点,而羧基( $-\text{COO}-$ )是底物结合位点,可以与  $\text{H}_2\text{O}_2$  分子结合并将其转化为  $\cdot\text{OH}$ ,同时,碳原子上的羟基( $-\text{C}-\text{OH}$ )则会抑制 POD 活性。该研究为碳基纳米酶材料的 POD 活性机制及活性的可控设计提供了新的方向。

将纳米酶应用于传感领域,不仅可以充分利用纳米酶的多功能性和易制备性构建便捷、低廉以及快速的检测方法,还可以利用其高稳定性突破传统酶基传感器因适用条件苛刻而导致的应用局限性。目前,多种纳米酶检测试剂盒已获得医疗器械注册证书,相信商业化的产品也将很快进入市场。

## 4.2 纳米酶抗肿瘤

### 4.2.1 纳米酶用于肿瘤催化治疗的应用现状

根据全球癌症观察站(GCO)的数据,到2030年,每年将有大约3000万患者死于癌症<sup>[377]</sup>。目前没有有效的方法可以完全根除这种危及生命的疾病。耐药、复发和转移仍旧是癌症治疗失败的关键因素。因此,迫切需要开发有效的癌症治疗新策略。

作为一门前沿科学,纳米技术已成为解决包括癌症在内的各种世界级科学问题的尖端工具。纳米尺度材料能够改善渗透性和生物分布,同时展现出独特的理化性质,如高比表面积、增强的导电性、超顺磁行为、光吸收谱偏移和荧光特性等<sup>[378]</sup>。在众多纳米材料中,具有酶模拟能力的纳米酶在癌症治

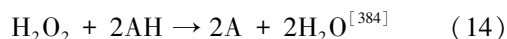
疗中展现出巨大的潜力。自2007年纳米酶提出后,将纳米酶用于抗肿瘤治疗的报道逐年递增(图44),研究表明,纳米酶催化治疗具有独特的优势:一方面,纳米酶可以作为治疗剂,通过独特的酶模拟能力用于催化治疗,可直接杀死肿瘤细胞或抑制肿瘤生长。另一方面,纳米酶可通过催化活性,改善肿瘤微环境条件,有利于联合并增强化疗、放疗、光热疗法、光动力疗法、声动力疗法及免疫疗法的治疗效果。因此,其催化的微环境直接关系到纳米酶功能的发挥及最终的治疗效果。

肿瘤微环境(TME)在动态调节癌症进展和影响治疗结果方面发挥着重要作用。TME具有如下特征:(1)缺氧:由于肿瘤细胞快速增殖,其耗氧量增加,同时异常肿瘤脉管系统供氧不足,TME中高氧耗和缺氧状态会使渗透压升高<sup>[379]</sup>。(2)糖代谢异常导致pH失衡:缺氧条件下肿瘤细胞主要通过糖酵解途径代谢使得TME内细胞质和细胞外液的pH值分别稳定在7.4和6.6<sup>[380]</sup>。(3)ROS水平升高导致 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、谷胱甘肽(GSH)水平升高:肿瘤细胞通过上调抗氧化系统应对细胞内相对较高水平的ROS<sup>[381]</sup>,TME中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 水平一定程度地升高,异常的氧化应激状态使TME表现出比正常组织更高的氧化还原电位水平<sup>[382]</sup>。因此,TME为纳米酶催化治疗提供了独特的优势。

### 4.2.2 纳米酶抗肿瘤的作用机制

#### 4.2.2.1 通过POD活性产生ROS

纳米酶应用于抗肿瘤治疗时,总体上以产生ROS杀伤肿瘤细胞为核心机理<sup>[383]</sup>。其中,POD活性是最多被用于进行肿瘤治疗的活性类型,反应式如下:

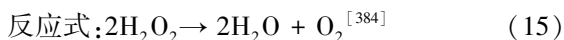


在该反应中, $\text{H}_2\text{O}_2$ 作为电子受体,在纳米酶的催化下产生以 $\cdot\text{OH}$ 为主的中间体, $\cdot\text{OH}$ 进一步与电子供体(AH)反应,生成其氧化形式(A)。由于 $\cdot\text{OH}$ 的反应活性极强,细胞内的各种有机小分子以及核酸、蛋白质、脂质等大分子均能够作为其反应底物而被氧化,因而造成严重的损伤,当损伤积累至一定程度时将导致细胞的死亡。

#### 4.2.2.2 通过其他类酶活性调控ROS水平

除了通过类POD活性直接杀伤肿瘤细胞以外,纳米酶还能够通过其他类酶活性对细胞内ROS水平进行调控,从而间接地发挥抗肿瘤作用,具体可分为以下几种类型。

##### (1)CAT活性



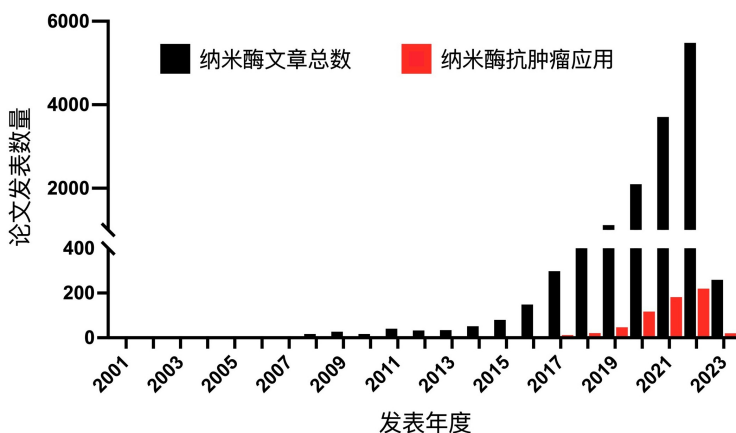
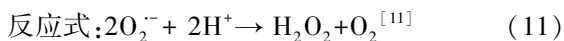


图 44 纳米酶用于肿瘤治疗的文章数量统计(Web of Science)

Fig. 44 Statistics on the number of articles on nanozymes used in antitumor therapy

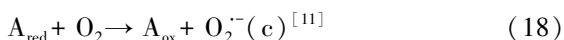
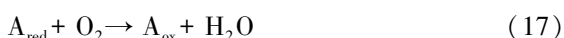
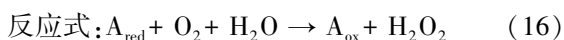
纳米酶类 CAT 活性主要被用于促进肿瘤内氧气的生成,虽然该活性类型消耗细胞内的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,降低了 ROS 水平,但能够改善肿瘤的乏氧微环境,并在联合放疗/光动力疗法/声动力疗法后将产生的  $\text{O}_2$  用于促进单线态氧 ( $^1\text{O}_2$ ) 的生成,从而杀伤肿瘤(具体内容见 3.2.1)。

#### (2) SOD 活性



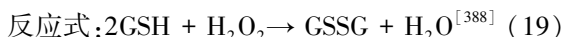
纳米酶类 SOD 活性将超氧阴离子 ( $\text{O}_2^-$ ) 形式的 ROS 转化为  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,本身对细胞起抗氧化作用,但若采取与 POD 纳米酶联用的策略后,同样能够发挥促进 ROS 生成的效果,将  $\text{H}_2\text{O}_2$  进一步转化为  $\cdot\text{OH}$  杀伤肿瘤<sup>[385]</sup>。

#### (3) OXD



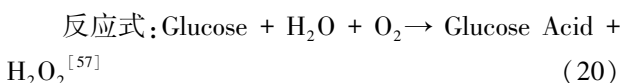
纳米酶类 OXD 活性同样能够产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  等形式的 ROS<sup>[386]</sup>,但独立作用时难以达到与  $\cdot\text{OH}$  同等的肿瘤杀伤能力,往往需要结合其他类酶活性共同杀伤肿瘤<sup>[387]</sup>。

#### (4) GPx 活性



纳米酶类 GPx 活性主要被用于清除肿瘤细胞中高含量的 GSH,进而削弱肿瘤细胞的抗氧化能力,在与其他促进 ROS 生成的手段联用后,能进一步提高肿瘤杀伤效果。

#### (5) GOx 活性



纳米酶类 GOx 活性既被用于消耗肿瘤细胞赖以进行能量代谢的葡萄糖,同时生成的  $\text{H}_2\text{O}_2$  还能够通过联合类 POD 活性进一步生成  $\cdot\text{OH}$  杀伤肿瘤<sup>[389]</sup>。

综上所述,不同活性类型的纳米酶所催化的反应之间存在关联性(图 45)。其中,类 POD 活性、类 SOD 活性、类 OXD 活性、类 CAT 活性能够实现不同类型 ROS 之间的相互转化,而在细胞内源存在的几种形式的 ROS 中<sup>[390]</sup>,将细胞内源性的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  或  $\text{H}_2\text{O}_2$  转化为  $\cdot\text{OH}$ ,是增强对肿瘤细胞氧化损伤效果的主要策略。此外,类 GPx 活性和类 GOx 活性则在调控细胞内氧化还原水平方面发挥重要的辅助作用(图 45)。

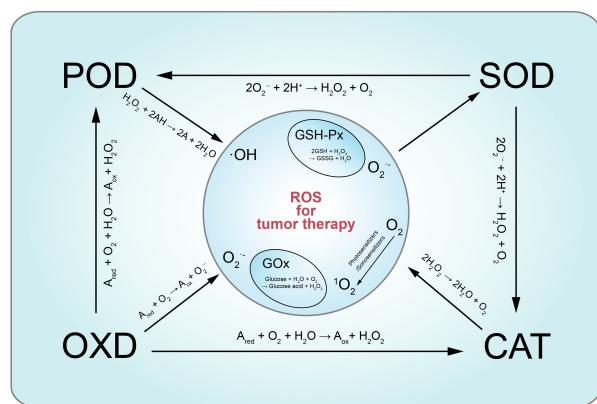


图 45 纳米酶抗肿瘤的主要催化活性类型及机制关联示意图

Fig. 45 Illustration of the main catalytic activities and mechanisms of nanozymes for tumor therapy

### 4.2.3 纳米酶抗肿瘤的应用策略

#### 4.2.3.1 纳米酶用于肿瘤催化治疗

基于以上的作用机制,已有许多研究将纳米酶

应用于肿瘤治疗当中。具体而言,起催化治疗作用的既可以是单一类型的纳米酶,也可以将设计与整合后的多种纳米酶进行联用。此外,研究人员也在现有纳米酶的基础上不断拓展新方向,以拓宽纳米酶催化治疗的应用前景。

#### 4.2.3.1.1 基于 POD 纳米酶的肿瘤催化治疗

研究发现,具有类 POD 活性的纳米酶可作为一种有效的治疗剂用于肿瘤催化治疗。一方面,肿瘤基质中的酸性微环境有利于纳米酶发挥类 POD 活性催化异常升高的  $H_2O_2$  生成  $\cdot OH$ , 直接杀死肿瘤细胞<sup>[391]</sup>。另一方面,Gu 等<sup>[9]</sup>观察到  $Fe_3O_4$  NPs 在肿瘤细胞内容酶体的酸性环境中能够更有效地发挥类 POD 活性,对人脑胶质瘤 U251 细胞产生了显著的杀伤作用。此后,纳米酶本身的抗肿瘤潜力受到越来越多的关注。例如,Weng 等<sup>[392]</sup>设计并开发了一种生物可降解氮化硼(BON)纳米结构。该材料兼具优良的生物相容性与较强的类 POD 活性,经瘤内注射后能够诱导显著的肿瘤细胞凋亡,展现出类似于抗癌药物的治疗能力(图 46)。纳米酶还能够通过掺入蛋白质支架(如铁蛋白)的仿生合成方式进一步提高其生物相容性与肿瘤治疗效果。Huang 等<sup>[393]</sup>在传统铁蛋白纳米酶的基础上,将多个铁蛋白纳米笼进行寡聚化,制备了 FTn-Ner-Pt-POD 纳米酶,同时增强了体内长循环能力以及对肿瘤细胞的靶向能力,为基于纳米酶的催化治疗策略提供了新

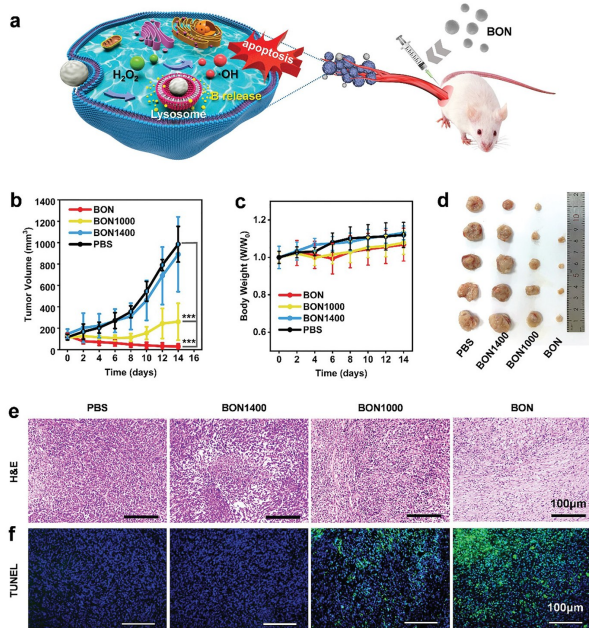


图 46 BON 纳米酶对乳腺癌动物模型的治疗评估<sup>[392]</sup>

Fig. 46 *In vivo* evaluations of BON nanozyme for breast cancer therapy<sup>[392]</sup>

思路。

尽管纳米酶已经在肿瘤催化治疗中得以应用,但最终疗效仍受到纳米酶自身催化活性不足的限制。单原子纳米酶是在单原子催化剂的概念基础上产生的新型纳米酶,具有原子级均匀分散的活性中心和明确的配位结构,相较于传统纳米酶在催化活性上得到了极大的提高,因而在肿瘤催化治疗中备受瞩目<sup>[394]</sup>。例如,Ji 等<sup>[15]</sup>开发了具有类 POD 活性的  $FeN_3P$  单原子纳米酶( $FeN_3P$ -SAzyme),通过精确地配位磷元素和氮元素调节单原子铁活性中心电子结构,构建出与天然辣根过氧化物酶类似的活性中心(图 47)。结果显示, $FeN_3P$ -SAzyme 的  $k_{cat}/K_M$  和  $K_M$  均与天然辣根过氧化物酶相当。在体内实验中, $FeN_3P$ -SAzyme 表现出相较于单种传统纳米酶显著提升的肿瘤治疗效果,且静脉注射后无明显毒性作用。然而,大多数单原子纳米酶仍存在制备时易发生团聚、难以精确优化局部配位结构的问题。因此,如何改进制备工艺是目前单原子纳米酶应用于肿瘤催化治疗时面临的重要挑战。Liu 等<sup>[395]</sup>设计合成了五配位的  $FeN_5$  单原子纳米酶,具有与天然酶相似的活性结构。通过在沸石咪唑酯骨架前体表面涂覆  $SiO_2$  壳层,不仅可以避免材料在高温热解过程中发生聚集,还能使所得的碳纳米颗粒具有更佳的孔隙结构和更高的比表面积,有利于此后 Fe 单原子位点的形成。 $FeN_5$  单原子纳米酶的  $k_{cat}/K_M$  分别比传统的  $FeN_4$  单原子纳米酶和商业化的  $Fe_3O_4$  纳米酶提高 7.64 倍和  $3.45 \times 10^5$  倍,在体内外实验中均表现出显著增强的抗肿瘤效果。

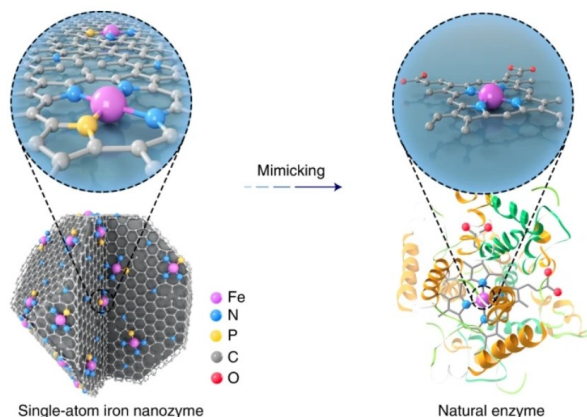


图 47 模拟天然酶的  $FeN_3P$  单原子纳米酶示意图<sup>[15]</sup>

Fig. 47 Schematic illustration of  $FeN_3P$ -SAzyme mimicking natural enzyme<sup>[15]</sup>

#### 4.2.3.1.2 基于纳米酶级联反应的催化治疗

相较于单种纳米酶的催化治疗体系,将多种纳米酶联合的策略能够发挥级联催化的优势,利用TME中相较于正常组织含量增加的多种底物(如 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、葡萄糖、GSH)以增强催化反应的持续性。Qu等<sup>[276]</sup>报道了基于纳米酶自组装的 $\text{MnO}_2@ \text{PtCo}$ 纳米花材料。其中,PtCo发挥类OXD活性, $\text{MnO}_2$ 发挥类CAT活性。 $\text{MnO}_2$ -CAT纳米酶催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解产生的氧气能够作为PtCo-氧化纳米酶的反应底物,被进一步转化为具有杀伤能力的 $\text{O}_2^-$ 和 $\cdot\text{OH}$ ,从而诱导细胞凋亡,在荷瘤小鼠模型中发挥了显著的肿瘤抑制效果。除了将类CAT活性与OXD活性级联以外,纳米酶催化治疗的另一种常见策略是将类GOx活性与类POD活性级联。Shi等<sup>[396]</sup>将Au NPs-GOx纳米酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs-POD纳米酶整合进树枝状介孔二氧化硅纳米颗粒(DMSN NPs)的孔道内,制备了能够在TME下触发级联反应的组合纳米酶体系。Au NPs既消耗了细胞内的葡萄糖造成肿瘤饥饿,又能够促进 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs催化释放出更多高毒性的 $\cdot\text{OH}$ 杀伤肿瘤细胞(图48)。体内实验表明,该级联反应体系不会在葡萄糖浓度相对更低、pH相对更高的正常组织内被触发,避免了毒副作用的产生。

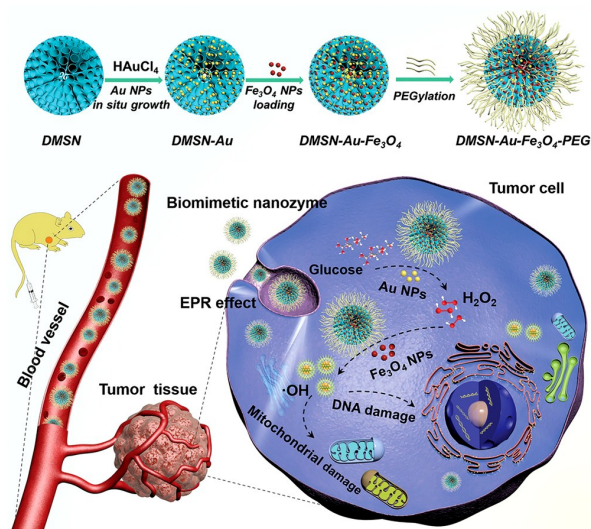


图48 级联催化反应介导的“无毒性药物”纳米催化肿瘤治疗示意图<sup>[396]</sup>

Fig. 48 Schematic illustration of “toxic-drug-free” nanocatalytic tumor therapy by cascade catalytic reaction<sup>[396]</sup>

#### 4.2.3.2 纳米酶催化增强肿瘤治疗的联合策略

当前肿瘤的临床治疗手段日益丰富,包括手术、化学进展, 2023, 35(1): 1~87

化疗、放疗、免疫疗法、基因治疗、光动力疗法、热疗、干细胞移植疗法、激素疗法等数十种。但是,单一的传统治疗手段通常面临缺氧、免疫逃逸、耐药性、毒副作用等问题,严重限制了治疗效果。纳米酶可通过催化活性,改善肿瘤微环境条件,被广泛用于辅助多种目前常用的肿瘤治疗方式,通过联合策略增强疗效,增强作用既可以体现在其催化活性对各治疗方法不足之处的弥补,也体现在其非催化活性带来的效益,如载药能力、光热转换能力、磁热转换能力等理化性质。

##### 4.2.3.2.1 纳米酶辅助需氧疗法

利用CAT纳米酶催化产氧可有效增强放疗(RT)、光动力疗法(PDT)、声动力疗法(SDT)等需氧疗法的疗效。

RT是肿瘤治疗的临床一线疗法之一,依靠放射性同位素产生的各种射线对肿瘤进行治疗<sup>[397]</sup>。水和氧气能够被放射线分解形成ROS,对肿瘤细胞造成损伤。然而,RT的疗效多年来始终受到肿瘤部位乏氧环境的限制。为此,已有研究人员利用CAT纳米酶的催化活性,分解肿瘤内源高浓度 $\text{H}_2\text{O}_2$ 并产生氧气,从而改善肿瘤乏氧问题。例如,Choi等<sup>[398]</sup>报道了多孔Pt NPs-CAT纳米酶,在纳米酶提高TME氧气浓度的同时,铂元素自身作为高Z元素的特性对放射起到增敏作用,从而提高了常规RT的疗效(图49a)。

PDT和SDT是临床研究中快速发展的两种前沿疗法,其核心原理为光敏剂/声敏剂分别在激光/超声波的作用下激活,从而将氧气转化为单线态氧( $^1\text{O}_2$ )<sup>[399, 400]</sup>。由于肿瘤部位氧气供给不足,有许多研究利用CAT纳米酶作为PDT和SDT的增敏剂。例如,Hu等<sup>[401]</sup>将 $\text{MnO}_2$ -BSA纳米颗粒与过氧化钙纳米颗粒( $\text{CaO}_2$  NPs)联合使用。在肿瘤部位, $\text{CaO}_2$  NPs能够与水分子反应生成 $\text{O}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,直接为 $\text{MnO}_2$ -BSA-CAT纳米酶提供更多的反应底物,而 $\text{CaO}_2$  NPs的产氧速率也能够在纳米酶的催化作用下得到提升。在通过BSA结合光敏剂二氢卟吩e6(Ce6)后,体内实验取得了显著增强的PDT治疗效果(图49b)。Zhang等<sup>[402]</sup>利用热熔剂法合成了中空结构的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米颗粒(HIONs)用于SDT以缓解肿瘤乏氧,在其内部装载声敏剂血卟啉、外部修饰聚多巴胺并连接聚乙二醇后,得到的材料(HP-HIONs@PDA-PEG)同样有效提高了肿瘤部位的 $\text{O}_2$ 含量,进而促进了 $^1\text{O}_2$ 的生成。HIONs-CAT纳米酶还具有特殊的磁热转换能力,动物实验表明其能够在外加

交变磁场后介导磁热疗法,与超声介导的 SDT 产生协同效应(图 49c)。

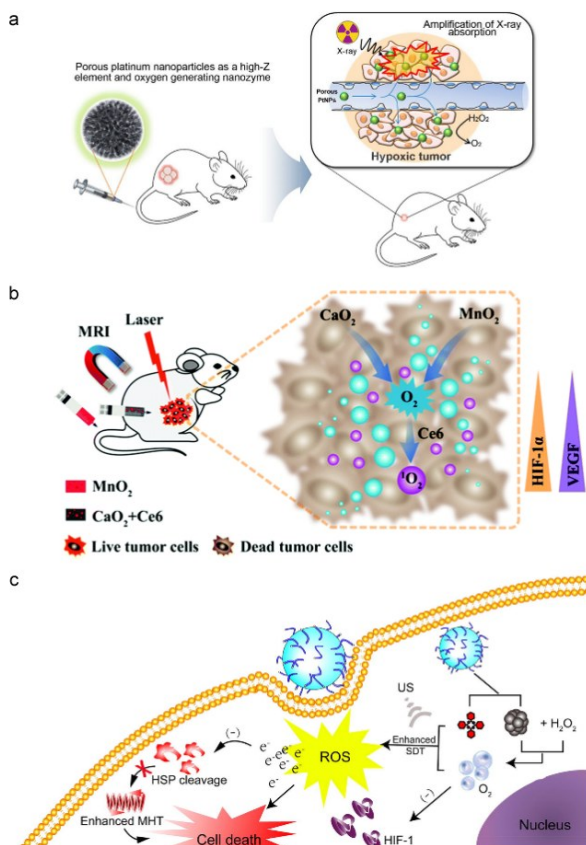


图 49 纳米酶在辅助 RT、PDT、SDT 中的应用示例。(a) 多孔 PtNPs 增强放疗示意图<sup>[398]</sup>。(b) MnO<sub>2</sub> 纳米酶催化 CaO<sub>2</sub> NPs 释放氧气以缓解肿瘤乏氧并用于核磁共振成像引导的 PDT 示意图<sup>[401]</sup>。(c) 基于 HP-HIONs@PDA-PEG 的 SDT 与 MHT 协同示意图<sup>[402]</sup>

**Fig. 49** Examples of nanozyme-assisted RT, PDT, and SDT. (a) Schematic illustration of enhanced radiotherapy using porous PtNPs<sup>[398]</sup>. (b) Schematic illustration of MnO<sub>2</sub> nanozyme-catalyzed O<sub>2</sub> release from CaO<sub>2</sub> NPs for hypoxia relief and MR image-guided PDT<sup>[401]</sup>. (c) Schematic illustration of SDT based on the multifunctional HP-HIONs@PDA-PEG in tandem with MHT<sup>[402]</sup>

#### 4. 2. 3. 2. 2 纳米酶辅助免疫疗法

由于大部分肿瘤已获得逃避机体免疫监视机制的能力,如何调整并改善 TME 以解除免疫抑制成为了免疫疗法的关键问题<sup>[403]</sup>。纳米酶主要经由三种机制在免疫疗法中扮演辅助性角色。

第一,乏氧可通过 HIF- $\alpha$  等信号通路促进肿瘤部位形成免疫抑制的微环境,此时可利用纳米酶催化产生氧气的的能力加以调节。例如,乏氧导致肿瘤内丰富存在的肿瘤相关巨噬细胞(TAM)诱导分化

为促进肿瘤生长的 M2 表型。为此, Liu 和 Wei 等<sup>[395]</sup> 构建了负载 TGF- $\beta$  抑制剂的聚乙二醇修饰铁锰硅酸盐纳米颗粒(IMS), IMS 进入肿瘤部位后,既发挥类 CAT 活性缓解乏氧环境以促进 TAM 向抗肿瘤生长的 M1 表型分化,又发挥类 POD 活性以引发铁死亡,在两种活性的协同作用下产生了良好的肿瘤治疗效果。

第二,肿瘤的酸性微环境也会促进肿瘤细胞的免疫逃逸,可应用具有调控 pH 能力的纳米酶加以调控。Chen 和 He 等<sup>[404]</sup> 报道了能够模拟乳酸脱氢酶的硒化锡纳米片(SnSe NSs),并负载天然碳酸酐酶 IX 抑制剂 ABS。ABS 抑制肿瘤细胞内异常活跃的糖酵解过程,SnSe NSs 将积累的乳酸转化为丙酮酸。在与 PD-L1 抗体联合应用后,SnSe@ABS 引发了显著的肿瘤消融,且有效抑制了肿瘤转移。

第三,肿瘤细胞本身也能够经由产生 ROS 的纳米酶诱发免疫原性死亡,释放出肿瘤相关抗原并被抗原呈递细胞摄取,以此激活 T 细胞介导的免疫反应。He 等<sup>[405]</sup> 设计了一种生物黏附的可注射水凝胶,内部装载钯单原子纳米酶(DA-CQD@Pd SAN)和免疫佐剂 CpG 寡脱氧核苷酸(CpGODN)。在注射至肿瘤部位后,DA-CQD@Pd SAN 的类 POD 活性产生的 $\cdot$ OH 不仅能杀死肿瘤细胞,而且能将其周围的硫化物分解为硫自由基,介导水凝胶的凝胶化。CpGODN 在死亡细胞释放的肿瘤相关抗原协助下增强了对抗原呈递细胞的激活效果(图 50)。经过治疗后的肿瘤组织内 CD8<sup>+</sup> T 细胞比例增加,调节性 T 细胞、髓源性抑制细胞以及 M2 巨噬细胞比例降低,说明该体系显著改善了 TME。

#### 4. 2. 3. 2. 3 纳米酶辅助化疗

化疗作为重要的临床肿瘤治疗方式。普遍存在着耐药性和毒副作用大的问题。

针对耐药性问题,可以利用纳米酶的促氧化活性进行协同。Yu 和 Zhan 课题组<sup>[406]</sup> 设计了兼具类 GPx 活性和类 POD 活性的碳纳米球@MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶,并负载化疗药物吉西他滨。该体系通过消耗细胞内 GSH、增加细胞脂质过氧化水平,进而诱导细胞发生铁死亡,提高了吉西他滨的治疗效果。另外,肿瘤内细菌也是造成化疗耐药性的重要原因之一,Gao 等<sup>[407]</sup> 开发了氮掺杂碳纳米球-POD 纳米酶,在由含菌肿瘤构建的小鼠模型中,该纳米酶通过产生 $\cdot$ OH 杀死瘤内菌,逆转了细菌胞苷脱氨酶诱导的吉西他滨耐药性,进一步增强了对肿瘤细胞的杀伤效果。

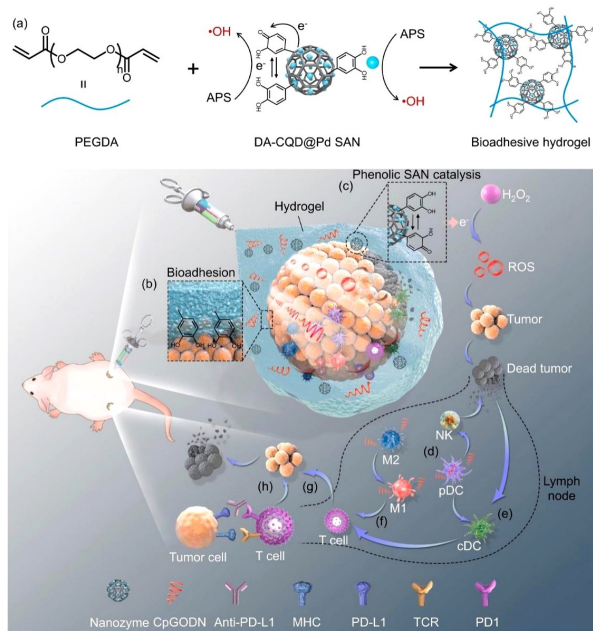


图 50 DA-CQD@Pd@CpGODN 水凝胶对初始肿瘤和远端肿瘤同时进行催化免疫治疗示意图<sup>[405]</sup>

Fig. 50 Schematic illustration of DA-CQD@Pd@CpGODN hydrogel-mediated catalytic immunotherapy of both primary treated and distant untreated tumors<sup>[405]</sup>

如何降低化疗药物的毒副作用也是目前的研究重点,为此,可以利用纳米酶的催化活性构建化疗前药激活策略,有望提高化疗药物的选择性。Huang 等<sup>[408]</sup>在铁蛋白纳米笼内部原位合成具有类 POD 活性和类 P450<sub>BM3</sub> 突变体活性的 Pd 纳米酶。Pd 纳米酶首先在溶酶体的酸性环境中发挥类 POD 活性,导致溶酶体膜的通透化,随后将释放出的羟基喜树碱前药分子(pro-HCPT)通过类 P450<sub>BM3</sub> 突变体活性介导的生物正交反应转化为具有毒性的 HCPT(图 51)。该药物递送系统在体内模型中抑制肿瘤生长的同时,有效避免了静脉注射给药造成的全身毒性。

#### 4.2.4 小结

尽管纳米酶领域近年来取得了显著进展,但用于肿瘤治疗的纳米酶研究仍处于起步阶段。为了增加纳米酶临床转化的可能,有几个关键问题尚需解决。

##### (1) 催化效率低

与天然酶和有机催化剂相比,纳米酶的催化活性和效率相对较低,限制了其在疾病治疗中的应用。纳米酶不均匀的原子组成和复杂的晶面结构导致很难识别实际的催化活性中心和揭示类酶活性机制。因此,必须对天然酶的酶活性中心有充分的了解,根据纳米酶的特性,通过调整纳米酶的尺寸、晶面、组

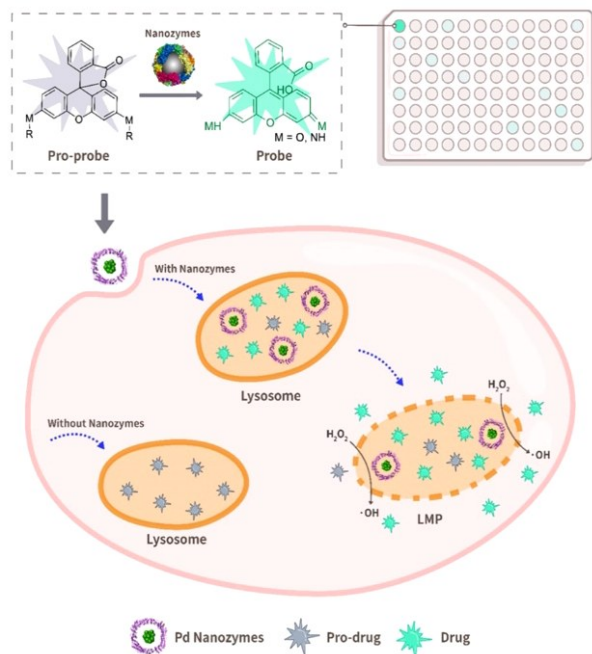


图 51 生物正交催化纳米酶介导的溶酶体膜渗透靶向给药示意图<sup>[408]</sup>

Fig. 51 Schematic illustration of bioorthogonal catalytic nanozyme-mediated lysosomal membrane leakage for targeted drug delivery<sup>[408]</sup>

成、表面修饰、混合纳米酶等方法来提高纳米酶的活性。目前单原子纳米酶具有高度分散的催化活性位点和原子利用效率,可有效提高纳米酶的催化性能,但单金属原子的负载效率有限的问题仍有待解决。此外,不同的纳米酶在抗肿瘤过程中可能具有协同作用。级联纳米酶的合理设计可能是提高催化效率的一种有前途的策略。

##### (2) 特异性差

静脉注射是施用抗肿瘤纳米制剂的主要方法之一,然而,在纳米制剂进入血液循环后可能被单核巨噬细胞系统捕获并消除,这将影响它们的生物利用度并增加药物在健康器官中积累。纳米酶可控设计对于实现其对疾病的酶模拟活性和高特异性具有重要意义。方法之一是利用微环境的特征,构建环境响应型纳米酶或对纳米酶表面进行修饰(官能团、靶向肽等),在纳米颗粒表面结合肿瘤的靶向分子,提高纳米酶的亲和力和特异性从而增强肿瘤细胞特异性摄取。此外,设计具有协同效应的混合多功能纳米材料是提高特异性的有效方法。近年来,许多研究表明多种外源刺激(如光、磁、热、超声等)可以作为触发器控制纳米酶的激活。这些模式可能提供可调节的选择,以提高纳米酶在肿瘤部位的特异性,

减少对非特异组织的伤害。

### (3) 生物安全性差

虽然纳米酶在疾病治疗方面具有巨大的潜力,然而,理想的生物相容性仍然面临挑战。与传统酶不同,纳米酶多为无机纳米颗粒,可进入细胞的溶酶体、线粒体或细胞核,并可能通过与细胞内成分的不可逆相互作用对细胞造成损害。以金属基纳米酶为例,尽管许多研究已经证明了纳米酶的细胞保护作用 and 生物相容性,但金属离子释放仍然被认为是由于金属过载而导致对正常组织产生副作用的因素。例如,正常细胞中过量的铜或铁可能会引发芬顿或类芬顿反应,从而严重损害生物大分子和核酸。研究表明,用聚合物如聚乙二醇、细胞膜包覆纳米颗粒的表面,可以提高它们的生物相容性。然而,作为外来物质,其仍可能在体内引起免疫反应。同时纳米酶与生物环境的相互作用模式仍有待阐明,这需要对其药代动力学、吸收、分布、代谢、治疗可持续性、排泄等方面进行深入研究。

综上所述,虽然纳米酶的抗肿瘤应用仍面临挑战,但由于其优异的酶活性和独特的理化特性,纳米酶在肿瘤治疗学领域具有重要意义。综合利用酶化学、纳米医学、生物纳米技术和肿瘤学的交叉研究,纳米酶显示出在肿瘤治疗方面的巨大应用潜力和发展前景。

### 4.3 纳米酶抗菌、抗病毒

近年来,微生物感染相关的个人和公共卫生事件越来越受到人们的重视。细菌、真菌以及病毒感染是威胁人类健康和安全的重大问题。目前,治疗细菌感染最常见的方法是使用抗生素<sup>[409]</sup>。然而,抗生素的过度使用导致了耐多药超级细菌的出现,这对公共卫生和环境造成了巨大的威胁<sup>[410]</sup>。此外,真菌感染也难以治疗,因为现有的抗真菌药物很少,而且许多药物有副作用,如肝、肾毒性和神经毒性或者引起过敏和胃肠道不适等<sup>[411]</sup>。更重要的是,随着新冠肺炎疫情的爆发和发展,由于缺乏有效的抗病毒药物和疫苗,人们的日常生活受到了严重的影响,并给世界各国造成了不可估量的损失<sup>[412]</sup>。基于这种情况,有必要开发具有抗菌、抗真菌、抗病毒等特性,但不产生耐药性的非传统治疗药物,以有效杀灭病原微生物,预防和控制重大传染病。

纳米酶具有仿酶活性可调节产生的活性氧自由基水平<sup>[36]</sup>。过多的活性氧自由基可以破坏细胞膜、蛋白、核酸,杀死包括细菌、真菌以及病毒在内的病原微生物<sup>[28, 413-415]</sup>。因此,近年来,纳米酶在抗菌和

抗病毒的治疗及辅助治疗方面展现出广阔的应用前景<sup>[416]</sup>。例如,一些纳米酶具有辣根过氧化物酶活性、脂质过氧化物酶活性、卤代过氧化物酶活性、氧化酶活性,可直接催化底物分子产生自由基杀伤病原微生物<sup>[417-420]</sup>。一些纳米酶具有谷胱甘肽过氧化物酶活性以及过氧化氢酶活性可中和由微生物感染产生的过多活性氧自由基,避免过度炎症反应,改善机体功能<sup>[421, 422]</sup>。一些纳米酶具有核酸酶活性或者蛋白酶活性可以降解病原微生物的核酸或者蛋白<sup>[423, 424]</sup>。此外,具有光热、声动力以及磁性等特殊功能性质的纳米酶还可以实现时空可控、深层、高效以及响应型纳米治疗平台的构建<sup>[99, 425, 426]</sup>。因此,纳米酶通过结合其固有的仿酶活性和物理化学性质,具有多种抗菌性能,可以成为抗生素的替代品,同时与常规对抗微生物的药物相比,纳米酶不容易引起耐药性。

本部分将简要地总结纳米酶在抗菌、抗病毒等领域的最新研究进展,并展望未来需要关注的机遇和挑战。

#### 4.3.1 纳米酶介导的表层杀菌

由致密上皮细胞组成的皮肤具有机械屏障作用,可阻挡外来病原体的侵入。皮肤受到损伤形成创面时极易受到细菌的感染<sup>[410]</sup>。尤其是一些慢性伤口,如烧伤、烫伤、湿疹以及糖尿病患者的皮肤损伤形成的伤口受到感染时不易愈合,需要长期的治疗且治疗失败时会导致严重的后果<sup>[427-429]</sup>。此外,细菌感染有时发生在皮肤下,引起皮下脓肿。皮下脓肿是由急性细菌感染且有时可能已经形成难以清除的细菌被膜而引起的浅表脓肿<sup>[423]</sup>。它可以发生在皮肤的任何部位,并可能导致发烧、淋巴结病和菌血症<sup>[416]</sup>。对于表皮细菌感染,常用的方法是在局部感染位点或全身使用抗生素。然而,抗生素的过度使用会导致耐药菌的出现,已成为体内感染治疗的一个重要挑战。近年来,各种功能型、响应型的纳米酶平台已经成功用于外部伤口愈合以及皮下脓肿局部治疗。

纳米酶通常具有广谱抗菌性,可以治疗多种细菌引发的感染。Willner 等<sup>[419]</sup>设计了 Au<sup>3+</sup>功能化的 UiO-67 金属有机骨架纳米颗粒作为 POD 与 OXD 双酶的模拟物,催化双氧水和氧气生成 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 杀死大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,促进伤口愈合(图 52a)。此外,通过对纳米酶的合理设计,可实现革兰氏选择性的细菌清除。Qu 等<sup>[430]</sup>基于二硫化钼( $\text{MoS}_2$ )和光酸分子设计了一种智能革兰氏选择性

抗菌体系 (Cit-MoS<sub>2</sub>), 赋予纳米酶对细菌选择性灭杀的能力。依赖于不同菌株细胞壁组成和结构, 通过调节光照时间实现对 MoS<sub>2</sub> 表面正负电荷比例以及 pH 的调控, 进而实现对不同细菌的选择性识别和杀伤 (图 52b)。此外, 通过对纳米酶的表面进行仿生的设计可实现纳米酶对细菌的捕获和黏附, 减少 ROS 与细菌之间的距离, 增强杀菌效果。例如, Ren 等<sup>[43]</sup> 受表面粗糙可增强黏附和缺陷提升催化活性等概念的启发, 构建了 Cu@MoS<sub>2</sub> 纳米酶, 可原位结合细菌并通过催化产生的 ROS 高效杀菌。

对于大多数纳米酶来说, 活性仅在酸性溶液中是最佳的, 而大多数生理条件的 pH 值超过 7.0 (在慢性伤口中甚至 >8.0)<sup>[431, 432]</sup>。同时, 双氧水的浓度也经常会对表皮的伤口杀菌及愈合有很大的影响, 外加的双氧水浓度过大会造成对正常细胞的损伤<sup>[433]</sup>。因此, 如何设计纳米酶抗菌体系使其在表皮伤口处不受 pH 以及双氧水浓度的限制而高效发挥抗菌功效是亟待解决的难题。基于此, Qu 等<sup>[433]</sup> 构建了基于金属有机框架的自激活杂交纳米酶平台 (图 52c)。该工作选取超薄的二维片层 MOF 作为模式过氧化物酶同时吸附葡萄糖氧化酶, 在伤口部位实现葡萄糖响应的 pH 降低和双氧水的生成, 因而, 获得了高效的酶活性和最小的副作用, 在体外和小鼠伤口创面均验证了杂交纳米酶的高效抗菌作用。

近年来, 纳米酶在口腔卫生方面的应用潜力也引起了研究人员的广泛关注。牙齿上的菌斑为许多细菌的定植和生长提供了优良的黏附位点<sup>[434]</sup>。某些类型的产酸细菌, 特别是变形链球菌 (*S. mutans*) 是一种存在于人类口腔中的共生微生物, 当蔗糖和果糖等糖存在时, 其可以在牙齿表面形成菌落, 并对牙齿结构造成损伤<sup>[435]</sup>。Gao 等<sup>[436]</sup> 为了解决这一问题, 具有类 POD 活性的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs 可以促使变形链球菌被膜基质降解, 并通过催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在原位产生自由基导致被膜中的细菌死亡。此外, Fang 等<sup>[437]</sup> 合成了类 POD 酶活性的氧化纳米金刚石, 能够催化低浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生 ·OH, 增强了对细菌细胞膜和被膜的破坏, 加速牙周感染周围的伤口的愈合。最近, Hwang 等<sup>[438]</sup> 将具有催化抗菌活性的纳米酶机器人 (CARs, 铁磁纳米粒子) 用于人类牙齿被膜清除。该研究针对牙齿内部最具挑战性的被膜形成区峡区及常见的被膜形成区牙槽, 通过利用磁场实现了控制 CARs 的运动和特殊形状进入、移动以及靶向有害细菌被膜, 达到了口腔防龋的目的。

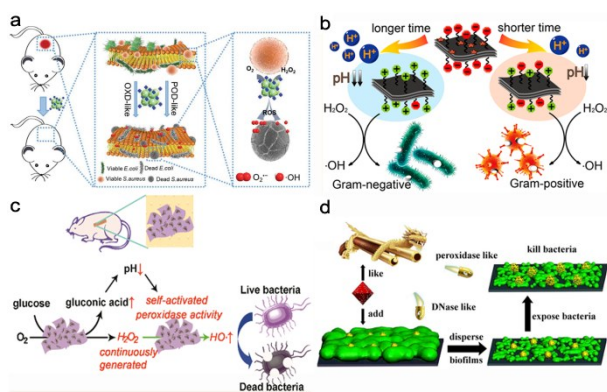


图 52 (a) Au<sup>3+</sup>-NMOFs 纳米酶用作抗菌治疗<sup>[419]</sup>; (b) 光调节的纳米酶 Cit-MoS<sub>2</sub> 的构建与革兰氏选择性的细菌杀伤<sup>[430]</sup>; (c) 二维 MOF/GOx 杂交纳米酶自激活的串联反应及抗菌机理<sup>[433]</sup>; (d) 具有破坏生物膜和杀死细菌的双酶样活性的纳米酶的示意图<sup>[423]</sup>

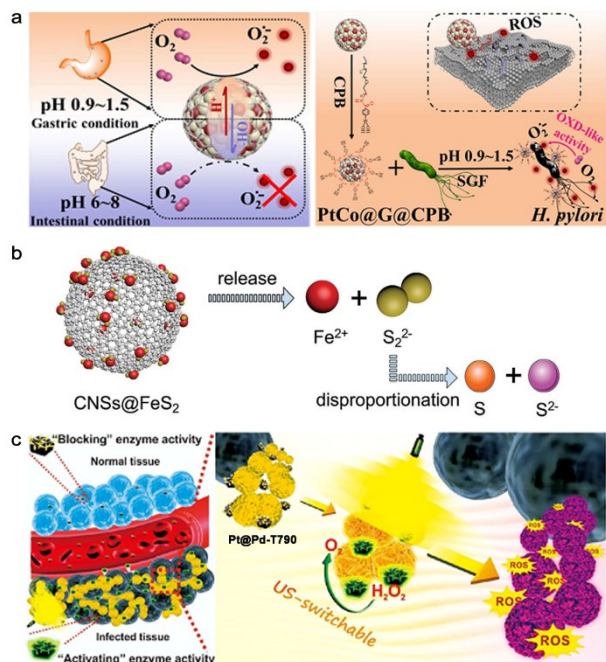
Fig. 52 (a) The use of Au<sup>3+</sup>-NMOFs as nanozymes for antibacterial therapy<sup>[419]</sup>. (b) The construction of light-modulated nanozyme Cit-MoS<sub>2</sub> and their gram-selective antimicrobial potential<sup>[430]</sup>. (c) The antibacterial mechanism of the 2D MOF/GOx hybrid nanocatalyst as a benign and self-activated cascade reagent<sup>[433]</sup>. (d) Schematic representation of the nanozymes with dual enzyme-like activities to disrupt biofilms and kill bacteria<sup>[423]</sup>

值得注意的是, 细菌耐药性的产生与细菌生物被膜有着不可分割的关系<sup>[439]</sup>。为此, 利用纳米酶可以降解被膜基质并杀灭内部的病原菌。Qu 等<sup>[423]</sup> 设计了一种具有类 DNase 和类过氧化物酶双重酶活性的基于 MOF/Ce 的纳米酶。如图 52d 所示, 一方面, MOF 上的 Ce 配合物可使纳米酶表现出优异类 DNase 酶活性, 高效地催化 eDNA 降解, 破坏已建立的生物膜。另一方面, 掺有 Au 的 MOF 在双氧水存在下显示出增强的类过氧化物酶活性, 可以高效杀死其中的细菌, 对皮下脓肿有很好的治疗效果。

#### 4.3.2 纳米酶介导的深层杀菌

纳米酶除了对表皮细菌感染有很好的治疗效果, 对于一些体内的深层细菌感染的治疗也展示出广阔的应用前景。例如, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌诱导的肺炎<sup>[440]</sup>、幽门螺旋杆菌感染诱导的胃炎<sup>[441, 442]</sup>、沙门氏菌诱导的肠炎<sup>[443, 444]</sup>以及细菌性胆囊炎<sup>[445]</sup>、腹膜炎<sup>[446]</sup>、脓毒症<sup>[29]</sup>以及植入医疗器械细菌污染<sup>[447]</sup>等。Tan 等<sup>[441]</sup> 开发了一种体内可激活的 pH 响应型纳米酶 PtCo@Graphene (PtCo@G), 用于选择性地处理幽门螺旋杆菌。这种纳米酶能抵

抗胃酸腐蚀,表现出类氧化酶活性,仅在酸性胃环境下稳定产生活性氧,并表现出优越的选择性杀菌性能。在小鼠的幽门螺旋杆菌感染模型中表现出高效的选择性抑菌活性,对正常组织以及体内共生菌群具有可以忽略的副作用(图 53a)。



**图 53** (a)在胃酸条件下 PtCo@G pH 响应的选择性类氧化酶活性的激活及其抗菌机理<sup>[441]</sup>; (b) CNSs@FeS<sub>2</sub> 的释放示意图<sup>[446]</sup>; (c) Pd@Pt-T790 在 US 下的活性激活及抗菌机理<sup>[99]</sup>

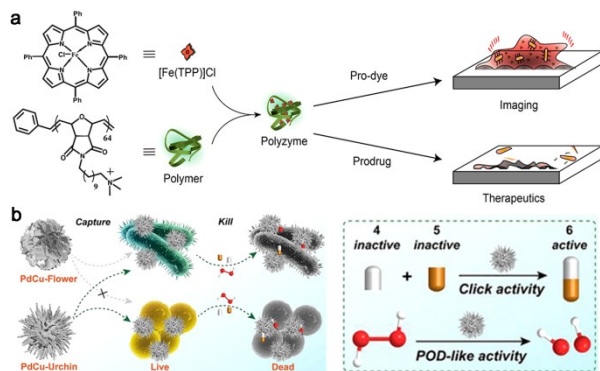
**Fig. 53** (a) Selective activated pH-responsive oxidase-like activity of PtCo@G in gastric acid conditions and their antibacterial mechanism<sup>[441]</sup>. (b) Schematics of release property of CNSs@FeS<sub>2</sub><sup>[446]</sup>. (c) Schematics of the activation of the enzyme activity of Pd@Pt-T790 and their antibacterial mechanism<sup>[99]</sup>

Gao 等<sup>[446]</sup>设计合成了碳纳米球(CNSs)包裹的超小 FeS<sub>2</sub> NPs 对由大肠杆菌导致的小鼠急性腹膜炎有良好的治疗作用。由于有硫的保护,Fe<sup>2+</sup>不断释放,通过氧化细菌的表面和内部分子触发细菌死亡(图 53b)。Sun 等<sup>[99]</sup>通过将具有类 CAT 活性的 Pd@Pt 纳米板与有机声敏剂 T790 相结合,构建了一种超声(US)可切换的 Pd@Pt-T790 纳米平台,用于治疗 MRSA 诱导的细菌性肌炎。T790 的修饰阻断了 Pd@Pt 的 CAT 仿酶活动,但在 US 作用下,酶活性恢复,催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 转化为 O<sub>2</sub>,可利用声动力诱导产生的 ROS 实现深层细菌感染的治疗(图 53c)。

#### 4.3.3 生物正交纳米酶介导的杀菌

基于过渡金属催化剂的生物正交纳米催化剂具有类酶样底物结合过程机制,可模仿天然酶催化行为,被称之为生物正交纳米酶<sup>[448]</sup>。近年来, Rotello 等<sup>[449-451]</sup>通过在纳米支架中加入过渡金属催化剂(TMC),设计生物正交纳米酶系统,用于前抗生素药物的合成,构建了时空可控、可逆激活的高效安全的抗菌平台。如图 54a 所示, Huang 等<sup>[450]</sup>将 TMC 封装在具有疏水口袋的季铵盐聚合物中,构建了一种自组装的聚合物纳米颗粒。所设计的生物正交纳米酶可以渗透到细菌被膜中,原位生成具有抗菌活性的抗生素。

Qu 等<sup>[452]</sup>合成了仿生的海胆状可捕获细菌的 PdCu 纳米酶,该纳米粒子具有类 POD 酶活性,同时可生物正交地原位合成抗生素分子,在双氧水和前驱体分子的存在下高效抗菌(图 54b)。



**图 54** (a) [Fe(TPP)]Cl、聚合物纳米粒子的结构及其生物正交激活用于细菌治疗<sup>[450]</sup>; (b) 类似海胆的 PdCu 纳米粒子用于捕获细菌和催化活性分子及活性氧的生产,用于协同抗菌治疗<sup>[452]</sup>

**Fig. 54** (a) Structures of [Fe(TPP)]Cl and polymeric nanoparticle and the bioorthogonal activation for therapeutics<sup>[450]</sup>. (b) Illustration of the sea urchin-like PdCu nanoparticles to capture bacteria and catalyze the production of active molecules and ROS for synergistic antibacterial therapy<sup>[452]</sup>

#### 4.3.4 纳米酶介导的海洋防污

海洋生物污损是指海洋生物附着生长在海洋人工设施表面,对人工设施的正常运转造成严重影响的现象。海洋生物污损形成的基础就是细菌等原核微生物通过物理作用附着在预先在机制表面累积的基膜上,形成微生物被膜,便于后续污损生物的附着,损害海洋人工设施<sup>[453]</sup>。近年来,具有卤代过氧化物酶活性的纳米酶在海洋防污中崭露头角<sup>[420, 454, 455]</sup>。海水中含有约 1 mmol/L 的 Br<sup>-</sup> 和

500 mmol/L 的  $\text{Cl}^-$ , 可提供卤化反应充足的卤素离子<sup>[456]</sup> (图 55a)。

Tremel 等<sup>[454]</sup> 发现氧化铈纳米棒 ( $\text{CeO}_{2-x}$ ) 具有类卤代过氧化物酶活性, 在海水条件下可产生  $\text{HOBr}$  和  $^1\text{O}_2$ 。将氧化铈纳米棒混合在市售涂料中涂覆于不锈钢表面, 在海水中可显著抑制微生物黏附, 有效防止生物膜的形成, 具有很强的防污性能 (图 55b)。尽管这类纳米酶应用于海洋防污有其过人之处, 但实际应用时仍存在一些问題, 例如, 纳米酶的催化活性低、海洋中的双氧水含量低。基于此, Wang 等<sup>[455]</sup> 探索了可见光响应的光热类 HPO 纳米酶, 以对抗生物污染。Mo 原子酶可以高效地催化氧化  $\text{Br}^-$  产生  $\text{HOBr}$ 。同时, 光热效果会增强其催化氧化活性及抗菌能力, 使其在海洋环境中用作表面涂层添加剂时也具有良好的抗菌性能。

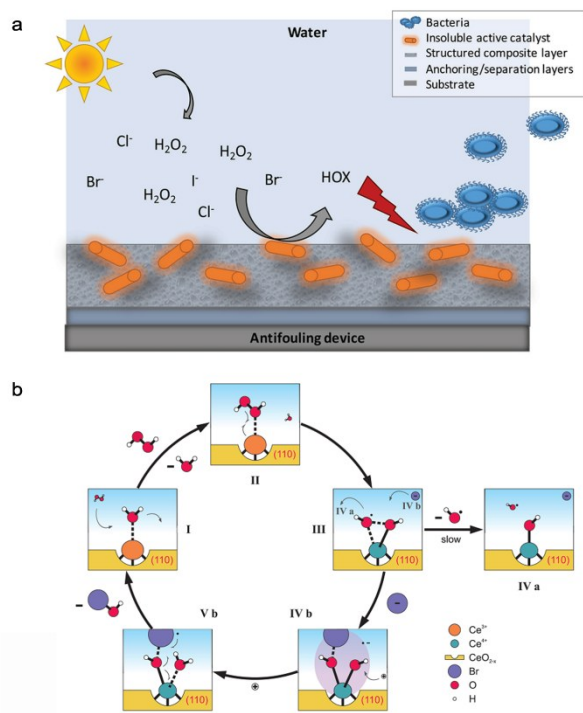


图 55 (a) 防污配方/装置示意图<sup>[456]</sup>; (b) 氧化铈纳米棒的催化溴化机理<sup>[454]</sup>

Fig. 55 (a) Sketch of antifouling formulation/device<sup>[456]</sup>. (b) Proposed catalytic bromination mechanism of the  $\text{CeO}_{2-x}$  nanorods<sup>[454]</sup>

#### 4.3.5 纳米酶介导的抗真菌治疗

真菌感染的诊断延迟、抗真菌药物的缺乏和毒性以及宿主防御系统的免疫力低下, 使其难以被治疗<sup>[416]</sup>。真菌的独特性也使得抗真菌治疗变得更困难, 例如更厚的细胞壁和菌丝的形成。此外, 真菌是真核细胞, 与宿主细胞具有相似的细胞结构和代谢

途径, 这使得开发无细胞毒性的特异性抗真菌药物面临挑战<sup>[457]</sup>。此外, 虽然目前可用的抗真菌药物种类很少, 但耐药性也已成为临床治疗真菌感染的重要课题。因此, 有必要开发具有不同作用机制的新型抗真菌药物。纳米酶可通过催化杀灭机制为抗真菌治疗提供一种新的选择。

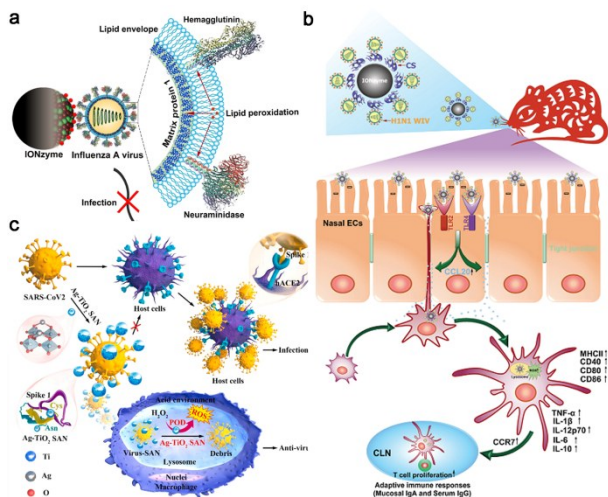
Abdelhamid 等<sup>[458]</sup> 合成了一种铈基 MOF (Ce-MOF), 具有 POD、CAT 和 SOD 等多种酶活性, 具有良好的抗真菌活性, 可对抗黄曲霉 (*A. flavus*)、白色念珠菌 (*C. albicans*)、红酵母 (*R. glutinis*) 等真菌以及从医院分离出的人体条件致病菌, 但该研究并未阐明其抗真菌作用的机制。此外, Li 等<sup>[459]</sup> 合成了氮、碘掺杂的碳点 (I-CDs) 可用作 POD 的模拟物, 用于消灭白色念珠菌。在双氧水存在下, I-CDs 催化形成  $\cdot\text{OH}$ , 对白色念珠菌的抑菌活性达到了 90%。同时, 可见光照射促进  $\cdot\text{OH}$  的产生, 成功抑制白色念珠菌的生长。但目前纳米酶在抗真菌感染治疗方面的研究较少, 这也预示着纳米酶在未来该领域有更广的发展空间。

#### 4.3.6 纳米酶介导的抗病毒治疗

目前, 对抗病毒性疾病策略是预防 (疫苗) 和治疗 (抗病毒药物和抗体)。在已知感染人类的 220 多种病毒中, 只有十几种临床批准的抗病毒药物<sup>[460]</sup>。此外, 大多数抗病毒药物的效力仅限于某些病毒株, 如果进化出突变株, 其效力可能会减弱。事实上, 由病毒基因组高度变异突变引起的耐药性是目前发展抗病毒药物的一个主要挑战<sup>[461]</sup>。为此, 纳米酶利用其催化和物理化学特性直接或间接地灭活病毒, 为对抗病毒感染提供了一个新的方向<sup>[462]</sup>。病毒治疗中纳米酶的作用主要是通过增加 ROS 水平、调节机体免疫环境、阻止病毒复制、氧化病毒脂质包膜和蛋白。

如图 56a 所示, 氧化铁纳米酶可导致甲型流感病毒 (IVAs) 的脂质包膜发生脂质过氧化, 破坏相邻蛋白 (包括基质蛋白 1、血凝素和神经氨酸酶) 的完整性, 抑制 IVAs 对细胞的感染<sup>[415]</sup>。同时, 该纳米酶对包括 H1~H12 亚型在内的各种亚型 IAVs 具有广谱作用。在口罩上应用氧化铁纳米酶可增强口罩对人的防护作用, 降低 H1N1、H5N1 和 H7N9 三种重要亚型病毒的威胁。此外, 壳聚糖修饰的氧化铁纳米酶也可用作失活病毒的疫苗佐剂, 提高对流感病毒的免疫响应<sup>[463]</sup> (图 56b)。

新冠肺炎疫情影响了世界各国人民的生活, 但目前仍没有有效的治疗方法。Wang 等<sup>[317]</sup> 尝试用



**图 56** (a)用 IONzymes 进行病毒脂过氧化实现病毒灭活的示意图<sup>[415]</sup>; (b)基于 CS-IONzyme 的流感疫苗增强抗原特异性免疫反应的机制示意图<sup>[463]</sup>; (c)具有抗 SARS-CoV2 活性的 Ag-TiO<sub>2</sub> SAN 的示意图<sup>[317]</sup>

**Fig. 56** (a) Schematic of viral liperoxidation by IONzymes for virus inactivation<sup>[415]</sup>. (b) Schematic of proposed mechanism for enhancing antigen-specific immune response by the CS-IONzyme-based influenza vaccine<sup>[463]</sup>. (c) Schematic of Ag-TiO<sub>2</sub> SAN with anti-SARS-CoV2 activity<sup>[317]</sup>

纳米酶来清除病毒。他们设计了一种二氧化钛负载的单原子纳米酶(Ag-TiO<sub>2</sub> SAN),其中含有原子分散的 Ag 原子以消除病毒。与传统的 TiO<sub>2</sub> NPs 相比,Ag-TiO<sub>2</sub> SAN 对 SARS-CoV2 伪病毒具有较高的吸附能力,有利于 SAN/病毒复合物的形成。然后复合物被巨噬细胞吞噬并进入溶酶体,其强酸性微环境有利于具有 POD 活性的 Ag-TiO<sub>2</sub> SAN 产生 ROS 以清除病毒(图 56c)。此外,纳米酶对人类免疫缺陷病毒(HIV)具有抗病毒作用。Singh 等发现,五氧化二钒(V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)纳米片可以模拟 GPx 活性,中和由 HIV-1 感染引起的细胞 ROS,并抑制 HIV-1 的再激活和复制<sup>[421]</sup>。此外,除了典型的病毒,纳米酶还可以防止朊病毒感染引发的相关疾病,在抗病毒治疗中展示出广阔的应用前景。

纳米酶因其可以模拟多种天然酶而具有清除病原微生物的特性,其以催化为本质的作用机制不易产生耐药性。此外,作为一种纳米材料,纳米酶具有特殊的物理化学性质,与光热、磁热和声动力治疗相结合时,可以增强其杀灭病原微生物的能力。对于表层细菌感染、深层细菌感染、海洋防污、真菌以及病毒感染均有良好的治疗效果。然而,纳米酶在未

来的临床应用中仍有许多问题和挑战需要解决。(1)大多数纳米酶的催化活性较天然酶相比还相差甚远,仍需依据天然酶的构效关系设计高活性纳米酶;(2)研究表明,人类的共生菌群种类与数量繁多,在维持人体健康方面发挥重大作用,如何进一步增强纳米酶与病原微生物的相互作用,增强纳米酶对有害菌的特异性杀伤,避免其对正常组织和共生菌群的伤害有待进一步研究;(3)当病原微生物入侵到人体内时,往往容易陷入到免疫细胞并存活下来,继续感染体内的正常细胞以及免疫细胞。这类细胞内的细菌感染往往难以治疗。纳米酶在这方面的研究还处于起步阶段。如何设计安全高效的细胞内杀菌纳米酶平台充满挑战。综上所述,我们相信,经过精巧的设计,纳米酶可成为一种新的强大武器,有效应对来自病原微生物对环境 and 人类健康的挑战,推动纳米酶产学研发展。

#### 4.4 纳米酶用于污水环境治理

开发高效、稳定、低成本的催化剂用于废水中污染物的检测和降解,对于环境保护和人类健康具有重要意义。纳米酶由于具有成本低、稳定性高、多重催化活性以及对环境影响小等特点,在环境污染物检测和治理方面显示出巨大的潜力。通过结合纳米材料独特的理化特性和类酶催化活性,研究人员已经开发了大量基于纳米酶的污染物检测方法和治理技术。通过开发新型的纳米酶传感器,目前已经实现了废水中金属离子和有机污染物的高灵敏检测;通过制备具有高效酶催化活性的纳米酶材料,实现了对苯酚、苯胺、染料等污染物的高效去除。本节综述了纳米酶用于废水中污染物检测和治理技术的最新进展,并提出了该技术可能的未来挑战。

##### 4.4.1 介绍

环境污染问题目前已经成为全球性问题,不仅影响了我们的正常生活方式,甚至可能威胁到未来的生存环境。在保护生态和维持环境安全的过程中,实现对长期积累的环境污染物和有毒化合物的灵敏检测和高效清除是目前的两大基本难题。酶是存在于生物体内的高效天然催化剂,为解决这些环境问题提供了有效方法。然而,天然酶稳定性差,且在非生理条件下易失活,严重影响了其在废水环境中的应用。

纳米酶是本身具有类酶活性的纳米材料,其不同于将天然酶固定到纳米材料上的“纳米固定化酶”。自 2007 年首次报道 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米颗粒具有内在类过氧化物酶活性以来<sup>[1]</sup>,已有超过数千种纳米酶

表 6 纳米酶用于水环境污染检测

Table 6 Nanozymes used for the detection of contaminants in water environment

Nanozymes	Contaminants	Linear range	LOD	Ref
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Glucose	50~1000 μM	30 μM	8
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Organophosphate	Not available	1 nM Sarin 10 nM methyl-paraoxon and 5 μM acephate	467
UsAuNPs/2D MOF	Trichlorfon	1.7~42.4 μM	1.7 μM	468
SACe-N-C	Organophosphorus and carbamate pesticide residues	100 ~ 700 μg/mL omethoate and methamidophos, 200 ~ 800 μg/mL carbofuran and carbosulfan	55.83 ng/mL omethoate, 71.51 ng/mL methamidophos, 81.81 ng/mL carbofuran, 74.98 ng/mL carbosulfan	469
CeO <sub>2</sub>	Methyl-paraoxon	0.1~100 μmol/L	0.06 μmol/L	470
Au/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /GO hybrid NPs	Hg <sup>2+</sup>	1~50 nM	0.15 nM	471
Pt NPs	Hg <sup>2+</sup>	0~120 nM	7.2 nM	472
Gold nanozyme-based paper chip	Hg <sup>2+</sup>	0.02~2000 ng	0.06 ng (30 μg L <sup>-1</sup> )	473
OEG-AuNPs	Hg <sup>2+</sup>	10~60 ppb	0.9 ppb	474
Glutathione capped Pd NPs	Ag <sup>+</sup>	10~100 nM	1.2 nM	475
His-Au NPs	Cu <sup>2+</sup>	20 nM~2 μM	20 nM	476
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Zn <sup>2+</sup>	60 nM~5 μM	60 nM	477
SACe-N-C	Al <sup>3+</sup>	5~25 μg/mL	22.89 ng/mL	518
Au@PuNP	Pb <sup>2+</sup>	20~800 nM	3.0 nM	478
Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , As	0.20~10 μg · L <sup>-1</sup> Cd <sup>2+</sup> , 0.40~20 μg · L <sup>-1</sup> Hg <sup>2+</sup> , 0.50~25 μg · L <sup>-1</sup> Pb <sup>2+</sup> , 0.50~20 μg · L <sup>-1</sup> As	0.085 μg · L <sup>-1</sup> Cd <sup>2+</sup> , 0.19 μg · L <sup>-1</sup> Hg <sup>2+</sup> , 0.2 μg · L <sup>-1</sup> Pb <sup>2+</sup> , 0.156 μg · L <sup>-1</sup> As	479
Au NPs	Kanamycin	1~100 nM	4.52 nM	480
CoO <sub>x</sub> H/graphene oxide nanohybrid	Cyanide	100 nM~100 μM	22 nM	481
Pd@Au nanorods	Malathion	Not available	60 ng/ml	482
Ir NPs	Malathion	0.1~5.0 μM	6 nM	483
Fe-N/C	Malathion	0.5~10 nM	0.42 nM	484
Heteroatom-Doped Graphene	Pesticides	Not available	Not available	497
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -TiO <sub>2</sub> /rGO	Atrazine	2~20 μg/L	2.98 μg/L	486
FDGs	Triazine	2.3~50 μM	2.24 μM	487
GNF	Phenolic compounds	0~25 μg/mL	4.5 μg/mL dopamine 3.0 μg/mL catechol, 4.5 μg/mL hydroquinone,	488
NiO hexagonal NPs	Parathion	0.1~30 μM	0.024 μM	489
A-PCM	Niclosamide	0.3~100 μM	8.4 nM	170
Phosphorene/Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub> -MXene	α-naphthalene acetic acid	0.02~40 μM	1.6 nM	490
PtNi NWs	Chloramphenicol	0.1 pM~100 nM	26 fM	491
COF-AI-ECL/Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Chloramphenicol	5×10 <sup>-13</sup> ~4×10 <sup>-10</sup> mol/L	1.18×10 <sup>-13</sup> mol/L	492
Ni@Mil-100 (Fe)@Ag NMAs	Cationic dyes	Not available	10 <sup>-10</sup> M crystal violet, malachite green, methylene blue	493
PANI/rGO	Kana	0.2~50 pM	0.063 pM	494

被报道,并因其高催化活性、低成本、高稳定性和从环境检测到污染物处理的广泛适用性而日益受到关注<sup>[465]</sup>。随着新概念“纳米酶学”的出现,纳米酶现已成为一个联系纳米技术和生物学的新兴领域,为纳米材料开辟了更广泛的应用领域<sup>[466]</sup>。

与天然酶相比,纳米酶具有以下显著优点:(1)高稳定性。无机纳米材料具有远高于天然生物酶的稳定性,可在更宽范围的 pH 值(1~12)和温度(4~90 °C)条件下使用。而天然酶通常在上述极端条件下失活。(2)成本低。天然酶的生产过程复杂且成本高,而无机纳米材料的生产效率高且成本相对较低。(3)可重用性。纳米酶可回收且在后续循环中保持较高的催化活性。(4)易多功能化。纳米酶具有足够大的比表面积来进行各种配体缀合,以实现纳米酶的表面功能化。

研究人员利用纳米酶的上述特性开发了基于纳米酶的新型技术和方法,用于水环境污染物的检测和去除等。

#### 4.4.2 水环境污染物的检测

纳米酶自发现以来,已被广泛应用于蛋白质、核酸、金属离子和环境小分子的检测。在 Yan 等<sup>[1]</sup>的最初工作中,首先开发了一种基于氧化铁纳米酶的免疫分析法用于检测乙型肝炎病毒,之后又开发了一种基于氧化铁纳米酶的试纸条用于检测埃博拉病毒<sup>[148]</sup>。由于氧化铁纳米酶的高催化活性和独特的理化性质,所开发的纳米酶试纸条的灵敏度与传统的胶体金试纸条相比提高了 100 倍。通过结合纳米酶的理化性质和催化活性,许多基于纳米酶的平台技术已被开发用于以下水环境污染物的检测(表 6)。

##### 4.4.2.1 直接利用纳米酶活性

过氧化物酶可以催化  $H_2O_2$  将底物氧化成有色产物,进而可以利用其产物颜色的变化实现对目标物的检测。基于此原理,Wei 和 Wang 等<sup>[8]</sup>首次利用  $Fe_3O_4$  NPs 开发了基于纳米酶的比色法来检测  $H_2O_2$ 。 $Fe_3O_4$  纳米酶通过催化  $H_2O_2$  将底物 ABTS 氧化成有色产物,实现了  $H_2O_2$  的比色检测。检出限低至  $3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,线性检测范围为  $5 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。除此之外,目前已有许多纳米酶被应用于过氧化氢检测,包括  $Fe_3O_4$ 、 $Co_3O_4$ 、 $Cu_2O$ 、 $FeS$ 、 $CeO_2$ 、 $CoFe_2O_4$ 、 $BiFeO_3$ 、 $MnFe_2O_4$ 、 $CdS$ 、 $FeSe$ 、 $FeTe$ 、 $ZnFe_2O_4$  NPs、氧化石墨烯、富勒烯和碳纳米管等<sup>[495]</sup>。

Kim 等<sup>[488]</sup>利用具有漆酶活性的 DNA-铜杂化纳米花制备了纸质微流体装置,可用于比色检测多巴胺、儿茶酚和对苯二酚等多种酚类化合物。在酚

类化合物存在下,GNFs 可催化其氧化与 4-氨基安替比林反应生成有色加合物。三种酚类化合物的检测限分别为 4.5、3.0 和 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

##### 4.4.2.2 抑制纳米酶活性

通过抑制纳米酶活性可以降低底物显色度,依据显色度的变化可以实现对待测物的检测。Liang 等<sup>[467]</sup>首先开发了一种纳米酶与天然酶级联反应体系,用于有机磷农药和神经性毒剂的快速检测。当乙酰胆碱存在时,天然酶乙酰胆碱酯酶(AChE)和胆碱氧化酶(CHO)催化  $H_2O_2$  生成,激活  $Fe_3O_4$  纳米酶,催化比色底物氧化产生显色反应(图 57)。有机磷化合物(OPs)孵育后,AChE 酶活性受到抑制,产生的  $H_2O_2$  减少,导致  $Fe_3O_4$  纳米酶对比色底物的催化氧化降低,同时颜色吸光度下降。在这项工作中,可以检测到  $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  沙林、10 nM 甲基对氧磷和  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酰甲胺磷。同样是基于酶级联反应,Liu 等<sup>[468]</sup>构建了 UsAuNPs/2D MOF、AChE 和胆碱氧化酶(ChOx)三元级联酶反应体系,并基于有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制作用,实现了比色法检测敌百虫。Huang 等<sup>[469]</sup>基于具有 POD 活性的 SACe-N-C 单原子纳米酶和 AChE 的级联催化反应,制备了一种用于有机磷农药残留检测的生物活性纸,并构建了 3D 打印平台,实现了氧化乐果、甲胺磷、克百威、丁硫克百威的现场便携式检测。

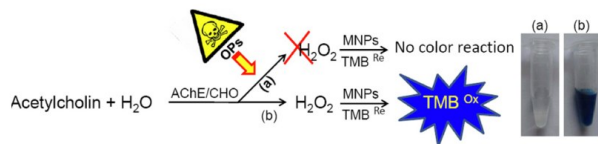


图 57 基于磁性纳米粒子(MNPs)过氧化物酶模拟物的比色测定法检测有机磷酸盐化合物(OPs)<sup>[467]</sup>

Fig. 57 Organophosphate compounds (OPs) detection on magnetic nanoparticle (MNPs) peroxidase mimetic-based colorimetric assay<sup>[467]</sup>

环境中金属离子的检测十分重要。利用金属离子会抑制酶活性的能力,研究者们开发了一系列纳米酶材料实现了低浓度金属离子的检测。例如,Fu 等<sup>[472]</sup>利用基于 BSA 的成核模板合成的铂基过 POD 纳米模拟物实现了水溶液中  $Hg^{2+}$  的检测,检出限为  $7.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,线性响应范围为  $0 \sim 120 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;利用  $Ag^+$  能显著抑制 Pd 纳米酶的过氧化物酶催化活性,实现了  $Ag^+$  的检测,检出限为  $1.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[475]</sup>。考虑到铜离子不仅参与多种酶的合成,而且还参与代谢过程<sup>[496]</sup>,Liu 等<sup>[477]</sup>利用  $Cu^{2+}$  抑制金纳米簇酶活性,展示了一种简便的检测  $Cu^{2+}$  的策略。Peng 等<sup>[478]</sup>

利用  $\text{Pb}^{2+}$ - $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  对  $\text{Au}@ \text{PuNP}$  纳米酶催化活性降低的性质,首次基于比色法实现了  $\text{Pb}^{2+}$  的检测。Cheng 等<sup>[518]</sup> 开发了一种具有磷酸酶活性的单原子纳米酶 (SACe-N-C), 研究发现  $\text{Al}^{3+}$  可以与 O 原子特异性结合形成 Al—O 键, 从而抑制其磷酸酶活性, 从而实现对  $\text{Al}^{3+}$  快速、便携、高效检测。Wu 等<sup>[479]</sup> 建立了一种具有过氧化物纳米酶活性的多孔  $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米片, 可用于多种重金属离子的快速、超灵敏检测。

同样是基于待检测物能够抑制纳米酶活性的能力, 已经实现了多种有机物的检测。例如, Singh 等<sup>[482]</sup> 利用钯金双金属纳米酶开发了一种用于马拉硫磷敏感检测的比色传感器。在过氧化氢存在下, 钯金纳米酶以邻苯二胺为显色底物, 表现出良好的过氧化物酶模拟活性。而且所开发的钯金纳米酶在宽温度范围 ( $4\sim 70\text{ }^\circ\text{C}$ ) 内稳定, 并且在  $2\sim 6$  的 pH 范围内显示出高过氧化物酶活性, 因此可以实现极端条件下的马拉硫磷的检测。该方法的最低检出限为  $60\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Han 等<sup>[483]</sup> 利用马拉硫磷可以同时抑制 Ir NPs 类 POD 和 OXD 活性的能力, 开发了一种高选择性检测马拉硫磷的比色法, 其中检测线性范围为  $0.1\sim 5.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 检测限为  $6\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Wei 等<sup>[497]</sup> 开发了基于杂原子掺杂石墨烯的比色纳米酶传感器阵列, 实现了芳香族农药的检测 (图 58)。石墨烯材料具有吸附性, 即当不同农药吸附在石墨烯上时, 纳米酶的活性位点可能被不同程度地覆盖, 从而导致其 POD 活性降低。基于该方法成功识别了  $5\sim 500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内的 5 种农药 (乳氟禾草灵、氟草烟、苄嘧磺隆、氟磺胺草醚和丁醚脲)。除此之外, 基于纳米酶材料检测氰化物<sup>[481]</sup>、农药阿特拉津<sup>[486]</sup>、西玛津<sup>[487]</sup>、酚类化合物<sup>[170]</sup> 的方法均已被报道。

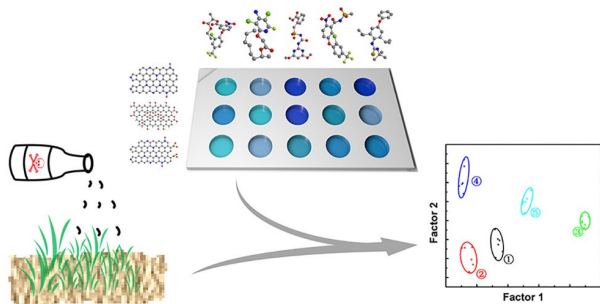


图 58 用于检测农药的基于杂原子掺杂石墨烯的纳米酶传感器阵列示意图<sup>[497]</sup>

Fig. 58 Schematic illustration of nanozyme sensor arrays based on heteroatom-doped graphene for detecting pesticides<sup>[497]</sup>

#### 4.4.2.3 增强纳米酶活性

通过检测物对纳米酶活性的增强来实现待测物的检测也是一种重要方法。汞离子 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) 是公认的环境中最有害的污染物之一, 其在人体中的积累可对中枢神经系统造成损害<sup>[498]</sup>。Yang 等<sup>[471]</sup> 基于  $\text{Hg}^{2+}$  可以被柠檬酸钠还原生成  $\text{Hg}^0$ , 并分散在 Au NPs 表面进而改变其表面性质, 提高 POD 活性这一特性, 开发了一种高效的基于  $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ /氧化石墨烯杂化纳米材料的纳米酶策略, 用于水溶液中的  $\text{Hg}^{2+}$  的高灵敏度检测和快速去除。Au-Hg 汞齐 (合金) 的形成可以显著增强酶活性。基于此, Kwon 等<sup>[473]</sup> 也开发了一种基于金纳米酶的纸芯片用于  $\text{Hg}^{2+}$  的比色检测, 检出限为  $0.06\text{ ng}$  以及线性响应范围为  $0.02\sim 2000\text{ ng}$  (图 59)。同样, Cao 等<sup>[474]</sup> 制备的低聚乙二醇修饰的 AuNPs (OEG-AuNPs) 也实现了  $\text{Hg}^{2+}$  的特异性检测。

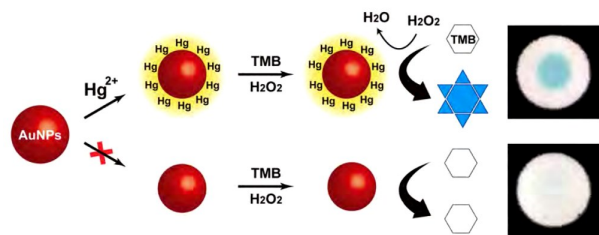


图 59 用于  $\text{Hg}^{2+}$  检测的基于金纳米酶的纸芯片传感机制的示意图<sup>[473]</sup>

Fig. 59 Schematic illustration of the gold nanozyme-based paper chip sensing mechanism for  $\text{Hg}^{2+}$  detection<sup>[473]</sup>

通过待测物与适配体结合, 可以恢复材料酶活性。基于此, Bansal 等<sup>[480]</sup> 将金纳米颗粒 (GNPs) 固有的过氧化物酶样活性与 ssDNA 适配体的高亲和力和特异性结合起来, 开发了一种用于卡那霉素检测的表面等离子体共振传感器 (图 60), 其中适配体分子与附着在 GNPs 上的卡那霉素具有较高的亲和力和特异性。当靶分子存在时, 适配体从 GNPs 中释放并与卡那霉素黏附, 同时游离 GNPs 发挥催化活性。该方法在  $3\sim 8\text{ min}$  内提供了卡那霉素的目视检测, 检出限为  $1.49\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

近年来, 纳米材料在水环境污染检测中表现出较大的应用潜力。基于纳米材料的检测方式主要包括荧光、化学发光、拉曼和电化学传感等, 但是其检测手段常具有灵敏度低、重复性差、操作复杂等困难。基于纳米酶与底物作用引起的颜色变化, 可以轻松构建基于纳米酶的比色传感器。其具有操作简单、响应快速、仪器设备简单、可视化半定量等优

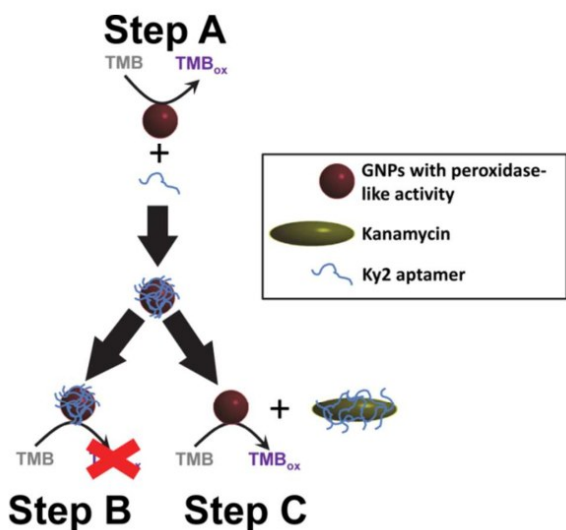


图 60 用于检测卡那霉素的适体功能化 GNP 的“关闭/开启”纳米酶活性示意图<sup>[480]</sup>

Fig. 60 Schematic representation of the “turn-off/turn-on” nanozyme activity of aptamer-functionalized GNP for the detection of Kanamycin<sup>[480]</sup>

势,可用于水环境污染中金属离子、农药、神经性毒剂、毒素等有机物的灵敏、快速可视化检测。

#### 4.4.3 水环境污染处理

开发用于去除废水中环境污染物的高效、稳固和低成本催化剂对环境和健康具有重要意义。纳米酶类酶催化活性已被广泛研究用于催化降解苯酚、苯胺、罗丹明 B、亚甲基蓝和二甲酚橙等环境污染物(表 7)。利用纳米酶作为催化剂处理水环境污染具有成本低、易制备、稳定性高、环境影响小、可回收利用等优点。

##### 4.4.3.1 过氧化物酶

过氧化物纳米酶可以作用于过氧化物产生瞬态的自由基活性中间体,进而可以利用自由基的强氧化性实现对污染物的降解。

2008 年, Yan 等<sup>[499]</sup>首次利用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒作为类过氧化物酶的模拟物实现了去除废水中的苯酚。在  $16\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}=3$  的条件下,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶可以催化过氧化氢产生羟基自由基,能够有效去除 85% 的苯酚,而且该纳米酶可以多次回收再利用。Zuo 等<sup>[500]</sup>设计了一种碳纳米管/磁性纳米颗粒纳米复合材料,用于苯酚的高效催化氧化及其从工业废水中的去除。合成的纳米复合物保留了单个磁性纳米颗粒的磁性,因此可以在外部磁场下有效分离。此外,纳米复合材料的形成增强了磁性纳米颗粒的固有类 POD 活性,在 10 h 的处理时间后实现了约 99% 的苯酚去除效率。而且,生成的不溶性多芳烃

产物可以很容易地从废水中分离出来。2012 年, Fang 等<sup>[505]</sup>研究了利用铁磁性纳米酶的类过氧化物酶催化活性去除双酚 A,并实现了高达 95% 的清除率。除此之外,人们通过优化氧化铁纳米酶合成方法与制备复合材料的方式来提高其过氧化物酶活性,实现了多种酚类化合物<sup>[516, 537]</sup>、苯胺<sup>[499]</sup>、染料<sup>[502, 504, 512-514, 521, 534, 538]</sup>、腐殖酸<sup>[533]</sup>等降解。Tang 等<sup>[503]</sup>发现  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒可以激活硫酸根阴离子产生自由基,进而降解磺胺嘧啶,并进一步研究了其催化机制。

除了氧化铁纳米酶外,用于污染物降解的非铁基过氧化物纳米酶也相继报道。2015 年, Feng 等<sup>[525]</sup>开发了一种具有 POD 活性的氧化铜纳米颗粒以去除苯酚污染物。在最佳条件下,苯酚可在 35 min 内完全清除。2014 年, Jiang 等<sup>[511]</sup>开发了一种用于去除亚甲基橙有机染料污染物的溴化铋纳米酶。2016 年, Yang 等<sup>[524]</sup>首次报道了立方氮化硼分解  $\text{H}_2\text{O}_2$  和产生羟基自由基的类过氧化物酶催化活性,并实现了对罗丹明 B 的去除。在 Tang 等<sup>[526]</sup>的工作中,利用混合纳米材料的类过氧化物酶活性,将多孔  $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米棒/氧化石墨烯杂化纳米材料用于亚甲基蓝去除。与单独的  $\text{Co}_3\text{O}_4$  NPs 或氧化石墨烯相比,杂化纳米材料表现出显著增强的污染物吸附能力和增强的过氧化物酶活性。Xu 等<sup>[527]</sup>还报道了空缺氧化钒纳米膜的过氧化物酶活性,可用于降解罗丹明污染物。而且,作者提出纳米酶中不同的氧空位可以模拟天然酶的复杂性和功能性。

##### 4.4.3.2 氧化酶

氧化酶可以在  $\text{O}_2$  的存在下将底物氧化。在污染物处理过程中,氧化酶材料通常与活化的过硫酸盐联用,以达到降解有机物的目的。例如, Huang 等<sup>[522]</sup>报道了新型的 Fe-Bi 双金属 MOF 衍生的碳支持  $\text{Fe-N}_4$  和  $\text{Bi-N}_4$  双位点 FeBi-NC SAzyme 单原子纳米酶,具有较高的 OXD 活性,可用于级联催化和过硫酸盐(PMS)活化降解染料污染物(图 61)。FeBi-NC 中的  $\text{Fe-N}_4$  和  $\text{Bi-N}_4$  都显示出强大的结合能和给电子能力,可以促进 PMS 活化以生成用于罗丹明 B 降解的高活性中间体,其可在  $25\text{ }^\circ\text{C}$  环境下 5 min 内实现 100% 降解。2020 年, Huang 等<sup>[528]</sup>通过离子辅助反应和低温度反应制造了 Co 基双金属空心纳米笼(HNCs)(C-CoM-HNC,  $M = \text{Ni, Mn, Cu, and Zn}$ )。其中铜掺杂的 C-CoM-HNCs 纳米结构比其他 C-CoM-HNC 具有更强的氧化酶活性和过硫酸氢盐(PMS)激活能力,可应用于降解罗丹明 B,且在 8 个循环中具有良好的可重复使用性。

表 7 纳米酶用于水环境污染物的降解

Table 7 Nanozymes used for water environmental pollutant decomposition

Nanozymes	Pollutant	Treatment efficiency	ref
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Phenol	85%	499, 500
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Phenol	100%	501
	Analine	100%	
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Rhodamine B	90%	502
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Sulfamonomethoxine	100%	503
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Methylene blue	96%	504
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Biphenol A	95%	505
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	2,4-DCP	73%	506
nanoparticulate zero-valent iron	4-chloro-3-methyl phenol	100%	507
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /CeO <sub>2</sub> hybrid NPs	4-chlorophenol	100%	508
Fe <sub>2</sub> (MoO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> NPs	Acid orange II	94.1%	509
Humic acid coated Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Sulfathiazole	90%	510
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /MSU-F-C	Phenol/As(III)	Not available	511
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> on CNTs	Acid orange II	94.0%	512
carbon capsule encapsulated Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Methylene blue	99%	513
	Congo red	Not available	
	Phenol	Not available	
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> porous nanospheres	Xylenol orange	100%	514
BiFeO <sub>3</sub> NPs	Rhodamine B	95.2%	515
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /GQDs composites	Phenolic compound	80.3%	516
CeO <sub>2</sub> /γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> composites	Organophosphate	100%	517
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @ALG/Fe NPs	Norfloxacin	100%	519
γ-FeOOH 2D nanosheets	Phenol	80%	520
iron-oxide-modified textile squares	Crystal violet	>90%	521
FeBi-NC SAzyme	Rhodamine B	100%	522
Fe <sub>1</sub> @CN-20	2,4-DP	65%	523
	2,6-dimethoxy-phenol	100%	
Cubic BN	Rhodamine B	86%	524
CuO NPs	Phenol	100%	525
Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanorodes	Methylene blue	97%	526
VO <sub>x</sub> nanoflakes	Rhodamine B	95%	527
C-CoM-HNC, M = Ni, Mn, Cu, and Zn	Rhodamine B	>95%	528
BSA-NiCo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @MnO <sub>2</sub> /C	Tetracycline hydrochloride	>95%	529
CH-Cu	2,4-dichlorophenol	90%	530
	hydroquinone		
CuNi/CoMoO <sub>4</sub>	Acid fuchsin	99.45%	531
CA-Cu	2,4-DP	>90%	532
	Hydroquinone	>50%	
	Catechol	>90%	
	o-aminophenol	>70%	
CeO <sub>2-x</sub> nanorods	Biofoul	69%	533
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Rhodamine B	98%	534
	Methyl orange	60%	
	Methylene blue	77%	
CFPN	NOM in membrane	Not available	535
FeNZ	Humic acid	Not available	536

除此之外,同时具有氧化酶和过氧化物酶活性的纳米材料也被用于污染物处理。2021年,Zuo等<sup>[529]</sup>报告了一种同时具有氧化酶和过氧化物酶活性的3D分层BSA-NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@MnO<sub>2</sub>/C多功能微电机,可以通过气泡反冲机制在水溶液中快速向前移

动,不仅可以增强比色传感性能,还可以在检测和催化降解系统中通过增强质量转移提高对Cu<sup>2+</sup>的去除效率。此外,微电机对盐酸四环素的降解表现出良好的催化活性,在室温条件下,180 min内的降解效率>95%。

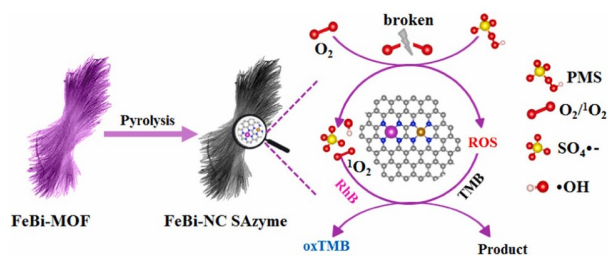


图 61 FeBi-NC 合成和去除 RhB 的示意图<sup>[522]</sup>

Fig. 61 Schematic illustration of FeBi-NC synthesis and removal of RhB<sup>[522]</sup>

#### 4.4.3.3 其他

漆酶具有氧化多酚物质的功能,可以用于水环境中酚类物质的清除。例如,Zhang 等<sup>[523]</sup>为了解决漆酶敏感性、变性稳定性差、纯化工工艺成本高等固有缺陷,制备了可作为漆酶模拟物的铁单原子锚定 N 掺杂碳材料 ( $\text{Fe}_1@ \text{CN}-20$ )。其表现出与漆酶相当的动力学常数。该材料具有优异的稳定性和在极端 pH 值 (2 ~ 9)、高温 (100 °C)、强离子强度 (500 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl)、高乙醇浓度 (体积比 40%) 和长储存时间 (2 个月) 的条件下能够保持稳定。该材料可应用于酚类化合物的检测和降解,分别在 12 和 4 h 内实现 2,4-二氯苯酚和 2,6-二甲氧基苯酚的降解,其效率分别为 65% 和 100%。Huang 等<sup>[530]</sup>通过  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  与半胱氨酸 (Cys)-组氨酸 (His) 二肽的配位,制备了一种具有类漆酶活性的新型纳米酶 (CH-Cu)。与漆酶相比,CH-Cu 纳米酶在降解氯酚和双酚方面具有更高的效率,降解效率可在 12 h 达到 90%。Huang 等<sup>[532]</sup>通过氰尿酸和  $\text{Cu}^{2+}$  的简易溶热反应,模拟其活性部位咪唑和  $\text{Cu}^{2+}$  之间的 N-Cu 配位环境,制备了一种新型的基于 MOF 的无定形纳米酶 (CA-Cu),同时具有漆酶和儿茶酚酶的活性,可以在中性 (pH=6.8) 环境中实现酚类化合物的降解。Rao 等<sup>[531]</sup>通过水热法、煅烧和浸渍技术合成了具有类似漆酶活性的  $\text{CuNi}/\text{CoMoO}_4$  纳米酶,可用作过硫酸盐 (PMS) 活化剂 (图 62)。 $\text{CuNi}/\text{CoMoO}_4$  可以活化 PMS 产生  $\cdot\text{OH}$  和  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ,用于有机污染物酸性品红的降解。其降解效率可在 40 min 内达到 99.45%。

钒卤过氧化物酶可催化卤化物 ( $\text{Cl}^-$  和  $\text{Br}^-$ ) 与过氧化氢氧化形成次卤酸 ( $\text{HOCl}$  和  $\text{HOBr}$ )。基于此,Tremel 等<sup>[541]</sup>将具有钒卤过氧化物酶活性的  $\text{CeO}_{2-x}$  纳米棒嵌入到聚合物垫中,以防止水环境中的生物污染。在  $\text{H}_2\text{O}_2$  的作用下, $\text{CeO}_{2-x}$  纳米棒催化  $\text{Br}^-$  氧化溴化为  $\text{HBrO}$ ,进而会破坏微生物的群体感应,防止海藻的生物污染。



图 62  $\text{CuNi}/\text{CoMoO}_4/\text{PMS}$  降解酸性品红的示意图<sup>[531]</sup>

Fig. 62 Schematic illustration of mechanism of Acid Fuchsin decolorization by  $\text{CuNi}/\text{CoMoO}_4/\text{PMS}$  system<sup>[531]</sup>

除此之外,具有磷酸酶活性的纳米酶也被用于降解有机物。2015 年,Janoš 等<sup>[517]</sup>研究表明, $\text{CeO}_2$  纳米材料具有磷酸酶活性,可用于有机磷农药甲基对硫磷和某些神经毒剂的快速降解。该复合材料保持了良好的磁性,并表现出高效的降解性能,反应半衰期约为 10 min,转化度接近 100%。2016 年,Mugesh 等<sup>[542]</sup>发现氧化铈纳米颗粒的空位可以模拟磷酸三酯酶的催化活性,快速降解对氧磷、对硫磷、马拉硫磷等神经毒性物质,以减少甚至消除其对人体的危害。他们证明纳米酶的水解作用是由于位于活性位点中的  $\text{Ce}^{3+}$  和  $\text{Ce}^{4+}$  离子之间的协同作用。

综上所述,基于纳米酶自身所特有的类酶催化活性,可直接用于废水中多种有机物的去除。相比于其他利用光催化、电催化的纳米催化技术来说,直接利用纳米酶自身能够产生强氧化性自由基的特性,可以有效实现有机物的降解。该过程可以减少高能量的消耗以及大量氧化剂的使用,能够降低成本且避免造成二次污染。

#### 4.4.4 小结

作为一个新兴领域,纳米酶在环境污染物检测和去除方面也存在很多挑战。在检测环境污染物方面,即使有机污染物和金属离子污染物的检测限已经降低到纳摩尔浓度范围,基于纳米酶的传感器在检测各种废水样品时容易受到废水中复杂污染物的干扰。因此,需要进一步提高检测的稳定性和抗干扰能力,加强检测的特异性。近年来也有不少策略提高纳米酶的检测活性,如分子印迹法使得纳米酶具有人工选择性结合位点。另一种方案是建立纳米酶与生物酶的级联体系,如本文所提到的利用乙酰胆碱酯酶和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米酶完成有机磷农药和神经性

毒剂的快速检测。对于纳米酶应用于废水中污染物降解来说,虽然一些纳米酶的催化活性高于天然酶,但仍迫切需要提高其催化活性以处理实际环境中的大量污染物。近十年来,研究人员通过各种修饰方法来提高纳米酶的催化活性,从而更好地应用于实际环境中的污染物去除,如将碳纳米材料与磁性纳米颗粒复合、多金属掺杂等<sup>[500, 512, 513, 522]</sup>。在上述材料的基础上,继续增强酶催化活性,提高降解效率,减少成本投入,是迫切需要解决的问题。其次,虽然近年来已经发展了多种具有酶活性的纳米酶材料用于污染物降解,但是具有过氧化物酶样活性的纳米酶仍然是用于污染物去除的主要催化剂,并且类过氧化物纳米酶仅在低 pH 下表现出高催化活性,表明基于纳米酶的处理技术只能用于酸性废水。将纳米酶降解技术应用于广泛 pH 环境中污染物的降解是急需解决的问题。第三,在实际应用过程中,微生物降解法是常见的用于污水处理的方法。该方法是指利用微生物的新陈代谢对废水中的有机物进行降解。但是微生物易受到来自高毒性或高浓度有机物生物毒性的干扰,使其降解功能下降。一种新的思路是将纳米酶与微生物相结合,利用纳米酶的活性提高微生物降解有害物质的活性。Qu 等<sup>[539]</sup>发现表面质子化的纳米聚合物增强了藻类去除有害物质的生物活性。代谢组学分析表明,纳米材料可诱导藻类的适度氧化应激,上调细胞外聚合物的生物合成,以抵抗水中有毒物质造成的生理损伤。除此之外,温度也是影响微生物降解能力的重要因素。过低的环境温度不仅干扰微生物的生成,而且也会导致降解活性的降低。因此,探究一种具有高效、低成本且不易受低温环境干扰等优势的方法是降解废水中有机物的关键。纳米酶具有更强的环境适应性,即在低温环境下也能保持较强的酶活性。所以,开发、利用纳米酶材料进行污水处理,能够克服低温干扰,解决低温寒冷地区废水处理问题。虽然纳米酶领域已针对环境应用进行了实质性的开发,但未来纳米酶技术仍需实现突破,才能将纳米酶技术大规模地应用于实际废水污染物的检测和降解工作中。

固碳、固氮和清洁能源开发也是环境领域的重要问题。二氧化碳是温室气体的主要成分,直接诱导全球气温上涨。除了减少二氧化碳的排放外,主动从大气中捕获二氧化碳是一个解决办法。氨在农业领域具有重要的作用,是一个重要的农业肥料。现今大部分氨的制备都来源于哈勃制氨法。该过程

化学进展, 2023, 35(1): 1~87

使用到氮气和氢气,是一个大量消耗能量的过程,也会产生大量的二氧化碳。化石燃料的使用大大推动了工业的发展,但是同时给人类生活环境带来了不好的影响。开发和利用清洁能源、推动绿色产业的发展,对于环境保护具有重要意义。目前,人们在上述领域已经开发了一系列相应技术,例如将二氧化碳矿化变为石灰石等建筑材料,改变土壤微生物和植物提高土壤的固碳能力,将生物质能转换为电能/热能或氢能,通过催化氮气制氨来固氮,通过改变催化金属或使用光电催化来提高固氮效率,进行生物质发酵或光解电解水的方式产氢等。虽然方法多样,但是却各自具有相应的局限性,比如土地的使用、效率不高、使用大量贵金属、缺乏长期持续发展模型等。当然,自然界中存在的不同酶也会在环境保护过程中起到作用。具有光合作用的植物或微生物可以将空气中的二氧化碳和水转变成葡萄糖,固氮菌可以将空气中的氮气转换为氨,氢化酶在常温常压下可以将质子还原为氢气。但是上述天然酶环境耐受力较弱,或相应的酶仅存在于少数菌群中。因此,开发具有类酶活性、环境耐受力高且可大量制备的纳米酶材料,来达到提高催化效率的目的,将对固碳、固氮和清洁能源行业的发展有着重大影响。综上所述,纳米酶在固碳、固氮和清洁能源行业也展示出强大的应用前景。

通过结合独特的物理化学性质和催化特性,纳米酶在环境污染物检测和降解处理方面显示出巨大的前景<sup>[534, 535]</sup>。迄今为止,纳米酶已成功实现多种水环境污染物的高灵敏检测,如重金属离子、农药、神经毒剂、毒素等有机污染物。利用纳米酶的酶催化活性已经实现了去除多种水环境污染物,包括含有苯酚类、胺类以及染料类有机物废水等。纳米酶的应用在去除水环境污染物方面表现出巨大优势,通常其结合了磁性纳米颗粒的高氧化效率和磁分离特性,还表现出高催化活性、温和的应用条件和易于回收等特点。因此,将纳米酶引入更多的环境领域研究中,不断提高纳米酶材料的催化效率和特异性,能够使其在环境保护过程中发挥重要作用。

## 5 对纳米酶领域的展望

### 5.1 关键科学问题

(1) 解析纳米酶关键催化位点:除了少数单原子纳米酶,我们对多数纳米酶催化位点的关键结构信息依旧知之甚少。纳米材料表面结构复杂,目前尚不清楚纳米酶的催化活性是否是由某些或某种特

定的纳米结构主导。发掘这些关键的结构要素,不仅有助于理解纳米酶催化机制,还将使高性能纳米酶的设计有据可依。

(2) 解析限域微环境与纳米酶催化选择性的关系:催化反应的路径选择往往由活性位点周围的催化微环境决定。深入理解纳米酶限域微环境与其催化选择性之间的相互关系,将对开发具有高度底物专一性和单一催化活性的纳米酶具有重要意义。

(3) 解析纳米酶的催化机制:纳米酶虽然具有与天然酶类似的催化能力,但其结构与天然酶大相径庭。因此,纳米酶具有不同于天然酶的独特催化机制。然而,目前纳米酶研究多数聚焦于催化活性的优化,而较少关注于催化机理的解析。虽然一些研究采用理论计算等方法对纳米酶的催化路径进行了预测,但较少有研究能够从实验验证的层面阐释清楚纳米酶发挥主要催化作用的关键位点、催化过程中纳米酶结构的动态变化、纳米酶-底物复合物和反应中间体的结构形式等关键信息。采用先进的纳米表征手段深入解析纳米酶的催化机制,从原子/分子层面理解纳米酶催化类酶反应的整个过程,建立适用于纳米酶的催化动力学,对于未来理性设计和合成高性能纳米酶至关重要。

(4) 拓展催化类型:现有纳米酶的催化反应为较为简单的氧化还原反应。可以从两方面拓展纳米酶的催化类型。一方面,可以研究具有重要社会经济价值的氧化还原反应,如甲烷单加氧反应;另一方面,拓展研究纳米酶在非氧化还原反应方面的应用。

(5) 拓展应用领域:目前纳米酶的应用集中在医药卫生领域,也得了许多重要进展。但是纳米药物临床转化难度大且市场认可度低的现状导致纳米酶在短时间内仍难以创造显著的社会效益。在绿色发展的大背景下,纳米酶本身作为一种绿色环保的催化剂,在化工合成、新能源开发、环境保护等领域具有巨大的应用潜力。基于开发周期短的优势,一旦合适的纳米酶被开发出来,预期将取得较高的市场认可度,并有望在短期内产生较大影响,拓展和激活纳米酶的应用研究领域。

(6) 建立纳米酶数据库(Database):目前纳米酶文献和数据数量已经颇具规模,其种类及催化类型繁多。通过建立纳米酶数据库,将有利于整合大数据分析手段解析纳米酶的机制和构效关系,并为纳米酶催化理论体系的建立奠定基础。

(7) 建立纳米酶文库(Library):依托纳米酶研究标准化,依据纳米酶催化的反应类型或材料的类

型,建立相应的纳米酶文库。这将有助于纳米酶研究的大规模生产应用。

(8) 规模化生产与质量控制:为满足转化应用,需要建立纳米酶规模化生产工艺和质量控制标准。目前绝大多数纳米酶均处于实验室小体系合成,用于材料表征和性能测试。而对于材料的批量生产、中试放大工艺开展较少,并且缺少材料和酶学质量控制方法和标准,包括材料纳米尺度、形貌、分散性,以及酶活力、稳定性等。因此,需要建立相关规模化生产与质量控制体系,为转化应用奠定材料基础。

## 5.2 结语

作为一项全新的科学发现,纳米酶对酶学研究、生物催化和纳米技术的发展都起到了颠覆性的推动作用。一方面,纳米酶为纳米生物学研究建立了一种新的范式。自纳米酶被发现之后,人们开始从生物催化的角度,利用酶学研究理论和方法来研究纳米效应和设计纳米材料。这种新的研究范式使我们更容易理解纳米材料在生物体系中的催化行为,有利于推动纳米材料的生物医学相关应用。

另一方面,纳米酶让我们认识到,尽管“酶是蛋白质或RNA”的概念在人们心中根深蒂固,酶可能仍是一座尚未展现其全貌的冰山。人们对事物的客观认识总是在随着科学技术的进步而不断完善。纵观酶的研究历史,可以发现酶的核心内涵是“高效的生物催化作用”,并不局限于其物质属性(细胞、蛋白质、RNA或DNA等),而是指能够在生理条件下高效催化生物化学反应的任何物质。蛋白表征技术的进步使得蛋白质这一类酶被发现,核酸表征技术的进步使得核酸这一类酶被发现,而纳米酶则是随着纳米表征技术的进步而被发现的。随着科学技术的进步,未来可能会有更多形式的酶被揭示出来。

纳米酶作为一类“新材料”,其核心内涵和科学意义仍然随着研究的深入在进一步地明晰。不可否认的是,纳米酶具有高效的生物催化作用,能够在生理环境中高效催化已知的生化反应,并且能够通过催化行为干预体内生命活动。此外,纳米酶的催化活性是由其自身内在结构所决定的,不依赖于任何已知的生物酶分子。因此,我们相信随着纳米酶研究的不断深入和理论体系的逐渐完善,人们对于纳米酶会有越来越准确的定位和评价,并有望对生物医学、环境保护、绿色合成等领域产生深远的影响。

致谢 感谢磨东泽校读本文。

## 参考文献

- [ 1 ] Gao L Z, Zhuang J, Nie L, Zhang J B, Zhang Y, Gu N, Wang T H, Feng J, Yang D L, Perrett S, Yan X Y. *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, 2(9): 577.
- [ 2 ] Anonymous. *Nature Catalysis*, **2020**, 3(3): 179.
- [ 3 ] Hauer B. *ACS Catal.*, **2020**, 10: 8418.
- [ 4 ] Yi D, Bayer T, Badenhorst C P S, Wu S K, Doerr M, Höhne M, Bornscheuer U T. *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, 50(14): 8003.
- [ 5 ] Gao L Z, Liang M M, Wen T, Wei H, Zhang Y, Fan K L, Jiang B, Qu X G, Gu N, Pang D W, Xu H Y, Yan X Y. *China Terminol.*, **2020**, 22(6): 21. (高利增, 梁敏敏, 温涛, 魏辉, 张宇, 范克龙, 江冰, 曲晓刚, 顾宁, 庞代文, 许海燕, 阎锡蕴. 中国科技术语, **2020**, 22(6): 21.)
- [ 6 ] Wang Z R, Zhang R F, Yan X Y, Fan K L. *Mater. Today*, **2020**, 41: 81.
- [ 7 ] Perez J. *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, 2(9): 535.
- [ 8 ] Wei H, Wang E. *Analytical Chemistry*, **2008**, 80(6): 2250.
- [ 9 ] Chen Z W, Yin J J, Zhou Y T, Zhang Y, Song L N, Song M J, Hu S L, Gu N. *ACS Nano*, **2012**, 6(5): 4001.
- [ 10 ] Gao L Z, Yan X Y. *Prog. Biochem. Biophys.*, **2013**, 40(10): 892. (高利增, 阎锡蕴. 生物化学与生物物理进展, **2013**, 40(10): 892.)
- [ 11 ] Wei H, Wang E. *Chemical Society Reviews*, **2013**, 42(14): 6060.
- [ 12 ] Wei H, Gao L Z, Fan K L, Liu J W, He J Y, Qu X G, Dong S J, Wang E K, Yan X Y. *Nano Today*, **2021**, 40: 101269.
- [ 13 ] Shen X M, Liu W Q, Gao X J, Lu Z H, Wu X C, Gao X F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137: 15882.
- [ 14 ] Chen Y, Tian Q, Wang H Y, Ma R N, Han R T, Wang Y, Ge H B, Ren Y J, Yang R, Yang H M, Chen Y J, Duan X Z, Zhang L B, Gao J, Gao L Z, Yan X Y, Qin Y. *Adv. Mater.*, **2022**: 2206421.
- [ 15 ] Ji S F, Jiang B, Hao H G, Chen Y J, Dong J C, Mao Y, Zhang Z D, Gao R, Chen W X, Zhang R F, Liang Q, Li H J, Liu S H, Wang Y, Zhang Q H, Gu L, Duan D M, Liang M M, Wang D S, Yan X Y, Li Y D. *Nat. Catal.*, **2021**, 4(5): 407.
- [ 16 ] Wei Y H, Wu J, Wu Y X, Liu H J, Meng F Q, Liu Q Q, Midgley A C, Zhang X Y, Qi T Y, Kang H L, Chen R, Kong D L, Zhuang J, Yan X Y, Huang X L. *Adv. Mater.*, **2022**, 34(27): 2201736.
- [ 17 ] Li S R, Zhou Z J, Tie Z X, Wang B, Ye M, Du L, Cui R, Liu W, Wan C H, Liu Q Y, Zhao S, Wang Q, Zhang Y H, Zhang S, Zhang H G, Du Y, Wei H. *Nat. Commun.*, **2022**, 13: 827.
- [ 18 ] Jiang B, Duan D M, Gao L Z, Zhou M J, Fan K L, Tang Y, Xi J Q, Bi Y H, Tong Z, Gao G F, Xie N, Tang A F, Nie G H, Liang M M, Yan X Y. *Nat. Protoc.*, **2018**, 13(7): 1506.
- [ 19 ] Li K F, Chen C F, Chen C Y, Wang Y Z, Wei Z, Pan W D, Song T. *Enzyme Microb Tech.*, **2015**, 72: 72.
- [ 20 ] Chi Z L, Yu G H, Kappler A, Liu C Q, Gadd G. *Environmental Science & Technology*, **2021**, 56(1): 672.
- [ 21 ] China National Committee for Terminology in Science and Technology. *Chinese Terms in Biophysics (2nd ED.)*. Beijing: Science Press, **2018**. (全国科学技术名词审定委员会. 生物物理学名词(第二版), 北京: 科学出版社, **2018**.)
- [ 22 ] 国家标准信息公共服务平台, 国家标准样品. [ 2022-08-01 ] <http://std.samr.gov.cn/gsm/query>.
- [ 23 ] 国家标准标准物质资源共享平台. [ 2022-08-01 ] <https://www.ncrm.org.cn/Web/Material/List?fenleiAutoID=5&pageIndex=1#>.
- [ 24 ] Dong H, Wang G, Feng K, Wu X, Fan Y, Zhang W, Ma M, Gu N, Zhang Y. *Analyt.*, **2022**, 147(24): 5633.
- [ 25 ] NIST. SRM Online Request System. [ 2022-08-01 ] <https://www-s.nist.gov/srmors/detail.cfm?searchstring=>.
- [ 26 ] NRC. List of CRM products. [ 2022-08-01 ] <https://nrc.canada.ca/en/certifications-evaluations-standards/certified-reference-materials/list>.
- [ 27 ] Gao N, Dong K, Zhao A D, Sun H J, Wang Y, Ren J, Qu X. *Nano Res.*, **2016**, 9: 1079.
- [ 28 ] Chen Z. W, Ji H. W, Liu C. Q, Bing W, Wang Z. Z, Qu X. G. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2016**, 55(36): 10732.
- [ 29 ] Cao F. F, Zhang L, You Y. W, Zheng L. R, Ren J. S, Qu X. G. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2020**, 59(13): 5108.
- [ 30 ] Dong J. L, Song L. N, Yin J. J, He W. W, Wu Y. H, Gu N, Zhang Y. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2014**, 6(3): 1959.
- [ 31 ] Wang C C, Li Y Q, Yang W J, Zhou L, Wei S. *Adv. Healthc. Mater.*, **2021**, 10(19): 2100601.
- [ 32 ] Fan K L, Xi J Q, Fan L, Wang P X, Zhu C H, Tang Y, Xu X D, Liang M M, Jiang B, Yan X Y, Gao L Z. *Nat. Commun.*, **2018**, 9: 1440.
- [ 33 ] Ragg R, Natalio F, Tahir M N, Janssen H, Kashyap A, Strand D, Strand S, Tremel W. *ACS Nano*, **2014**, 8(5): 5182.
- [ 34 ] Zandieh M, Liu J W. *Langmuir*, **2022**, 38(12): 3617.
- [ 35 ] Gao L, Gao X, Yan X. *Kinetics and Mechanisms for Nanozymes. In Nanozymology: Connecting Biology and Nanotechnology*. Singapore: Springer, **2020**. 17.
- [ 36 ] Huang Y Y, Ren J, Qu X. *Chemical Reviews*, **2019**, 119(6): 4357.
- [ 37 ] Liang M M, Yan X Y. *Accounts Chem. Res.*, **2019**, 52(8): 2190.
- [ 38 ] Li J N, Liu W Q, Wu X C, Gao X F. *Biomaterials*, **2015**, 48: 37.
- [ 39 ] 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.
- [ 40 ] Xi Z, Wei K, Wang Q, Kim M. J, Sun S, Fung V, Xia X. *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143(7): 2660.
- [ 41 ] Shen X M, Wang Z Z, Gao X F, Zhao Y L. *ACS Catal.*, **2020**, 10: 12657.
- [ 42 ] Wang Z, Shen X, Gao X. *J. Phys. Chem. C*, **2021**, 125(42): 23098.
- [ 43 ] Cao F F, Zhang L, Wang H, You Y W, Wang Y, Gao N, Ren J S, Qu X G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58

- (45): 16236.
- [44] Guo S, Guo L. *J. Phys. Chem. C*, **2019**, 123(50): 30318.
- [45] Zhao R, Zhao X, Gao X. *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21(3): 960.
- [46] Song Y J, Qu K G, Zhao C, Ren J, Qu X. *Adv. Mater.*, **2010**, 22(19): 2206.
- [47] Sun H. J, Zhao A. D, Gao N, Li K, Ren J. S, Qu X. G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(24): 7176.
- [48] Wang Y, Jia G R, Cui X Q, Zhao X, Zhang Q H, Gu L, Zheng L R, Li L H, Wu Q, Singh D J, Matsumura D, Tsuji T, Cui Y T, Zhao J X, Zheng W T. *Chem.*, **2021**, 7(2): 436.
- [49] Zhao Y, Zhuang S L, Liao L W, Wang C M, Xia N, Gan Z B, Gu W M, Li J, Deng H T, Wu Z K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142(2): 973.
- [50] Hu S L, Li W X. *Science*, **2021**, 374: 1360.
- [51] Wang X Y, Gao X J, Qin L, Wang C D, Song L, Zhou Y N, Zhu G Y, Cao W, Lin S C, Zhou L Q, Wang K, Zhang H G, Jin Z, Wang P, Gao X F, Wei H. *Nat. Commun.*, **2019**, 10: 704.
- [52] Buxton G V, Greenstock C L, Helman W P, Ross A B. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **1988**, 17(2): 513.
- [53] He W W, Wu X C, Liu J B, Hu X N, Zhang K, Hou S, Zhou W Y, Xie S. *Chem. Mater.*, **2010**, 22: 2988.
- [54] Zhang K, Hu X N, Liu J B, Yin J J, Hou S, Wen T, He W W, Ji Y L, Guo Y T, Wang Q, Wu X C. *Langmuir*, **2011**, 27(6): 2796.
- [55] Kong J J, Zheng J, Li Z M, Huang J, Cao F H, Zeng Q Y, Li F. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2021**, 413: 5383.
- [56] Adegoke O, Zolotovskaya S, Abdolvand A, Daéid N. *Talanta*, **2021**, 224: 121875.
- [57] Chen J X, Ma Q, Li M H, Chao D Y, Huang L, Wu W W, Fang Y X, Dong S J. *Nat. Commun.*, **2021**, 12: 3375.
- [58] Cheng P, Wang H, Shi X H. *Nanoscale*, **2020**, 12(5): 3050.
- [59] Wu J, Wang Z, Jin X, Zhang S, Li T, Zhang Y, Xing H, Yu Y, Zhang H, Gao X, Wei H. *Adv. Mater.*, **2021**, 33(3): e2005024.
- [60] Osuna S, Swart M, Solà M. *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16(10): 3207.
- [61] Shen X, Liu W, Gao X, Lu Z, Wu X, Gao X. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(50): 15882.
- [62] Liu G F, Filipović M, Ivanović-Burmazović I, Beuerle F, Witte P, Hirsch A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47(21): 3991.
- [63] Wang Z Z, Wu J, Zheng J J, Shen X M, Yan L, Wei H, Gao X F, Zhao Y L. *Nat. Commun.*, **2021**, 12: 6866.
- [64] Wang Z Z, Shen X M, Gao X F, Zhao Y L. *Nanoscale*, **2019**, 11(28): 13289.
- [65] Zhang R, Chen L, Liang Q, Xi J, Zhao H, Jin Y, Gao X, Yan X, Gao L, Fan K. *Nano Today*, **2021**, 41: 101317.
- [66] Liu S W, Li K, Shao D D, Shen Q, Huang S S, Ji H, Xie Y, Zheng X B. *Appl. Surf. Sci.*, **2020**, 534: 147649.
- [67] Hu Y H, Gao X J, Zhu Y Y, Muhammad F, Tan S H, Cao W, Lin S C, Jin Z, Gao X F, Wei H. *Chem. Mater.*, **2018**, 30(18): 6431.
- [68] Ghosh S, Roy P, Karmodak N, Jemmis E D, Mugesh G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57(17): 4510.
- [69] Xia X H, Zhang J T, Lu N, Kim M J, Ghale K, Xu Y, McKenzie E, Liu J B, Ye H. *ACS Nano*, **2015**, 9(10): 9994.
- [70] Fan K L, Wang H, Xi J Q, Liu Q, Meng X Q, Duan D M, Gao L Z, Yan X Y. *Chem. Commun. (Camb)*, **2016**, 53(2): 424.
- [71] Luo W, Zhu C, Su S, Li D, He Y, Huang Q, Fan C. *ACS Nano*, **2010**, 4(12): 7451.
- [72] Singh N, Savanur M. A, Srivastava S, D'Silva, P, Mugesh G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56(45): 14267.
- [73] Zhang R F, Yan X Y, Fan K L. *Acc. Mater. Res.*, **2021**, 2(7): 534.
- [74] Huang L, Chen J X, Gan L F, Wang J, Dong S J. *Sci. Adv.*, **2019**, 5(5): eaav5490.
- [75] Xi J, Zhang R, Wang L, Xu W, Liang Q, Li J, Jiang J, Yang Y, Yan X, Fan K, Gao L. *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 2007130.
- [76] Jiang L, Fernandez-Garcia S, Tinoco M, Yan Z X, Xue Q, Blanco G, Calvino J J, Hungria A B, Chen X W. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9(22): 18595.
- [77] Soh M, Kang D. W, Jeong H. G, Kim D, Kim D. Y, Yang W, Song C, Baik S, Choi I. Y, Ki S. K, Kwon H. J, Kim T, Kim C. K, Lee S. H, Hyeon T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2017**, 56(38): 11399.
- [78] Tao F. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41(24): 7977.
- [79] Kitchin J, Nørskov J, Barteau M, Chen J G. *J. Chem. Phys.*, **2004**, 120(21): 10240.
- [80] Guerrini L, Álvarez-Puebla R, Pazos-Pérez N. *Materials (Basel)*, **2018**, 11(7): 11071154.
- [81] Heuer-Jungemann A, Feliu N, Bakaimi I, Hamaly M, Alkilany A, Chakraborty I, Masood A, Casula M F, Kostopoulou A, Oh E, Susumu K, Stewart M H, Medintz I L, Stratakis E, Parak W J, Kanaras A G. *Chem. Rev.*, **2019**, 119(8): 4819.
- [82] Weerathunge P, Ramanathan R, Shukla R, Sharma T K, Bansal V. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(24): 11937.
- [83] Cai R, Gao X S, Zhang C Q, Hu Z J, Ji Y L, Liu J B, Wu X C. *Nanotechnology*, **2021**, 32(48): 485702.
- [84] Liu B W, Huang Z C, Liu J W. *Nanoscale*, **2016**, 8(28): 13562.
- [85] Baldim V, Yadav N, Bia N, Graillot A, Loubat C, Singh S, Karakoti A S, Berret J F. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2020**, 12(37): 42056.
- [86] You J. G, Wang Y. T, Tseng W. L. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10(44): 37846.
- [87] Dowding J M, Das S, Kumar A, Dosani T, McCormack R, Gupta A, Sayle T X T, Sayle D C, von Kalm L, Seal S, Self W T. *ACS Nano*, **2013**, 7(6): 4855.
- [88] Liu Y, Xiang Y, Zhen Y, Guo R. *Langmuir*, **2017**, 33(25): 6372.
- [89] Singh S, Dosani T, Karakoti A, Kumar A, Seal S, Self W.

- Biomaterials*, **2011**, 32(28): 6745.
- [90] Dhall A, Burns A, Dowding J, Das S, Seal S, Self W. *Environ. Sci. Nano*, **2017**, 4: 1742.
- [91] Shah J, Purohit R, Singh R, Karakoti A S, Singh S. *J. Colloid Interface Sci.*, **2015**, 456: 100.
- [92] Vallabani, N. V. S, Karakoti A. S, Singh S. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2017**, 153: 52.
- [93] Zhang X Z, Liu Y C, Gopalakrishnan S, Castellanos-Garcia L, Li G T, Malassiné M, Uddin I, Huang R, Luther D C, Vachet R W, Rotello V M. *ACS Nano*, **2020**, 14(4): 4767.
- [94] Wang C, Shi Y, Dan Y Y, Nie X G, Li J, Xia X. *Chemistry*, **2017**, 23(28): 6717.
- [95] Yang Y, Chen M, Wang B, Wang P, Liu Y, Zhao Y, Li K, Song G, Zhang X. B, Tan W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2019**, 58(42): 15069.
- [96] Wang F M, Ju E G, Guan Y J, Ren J, Qu X. *Small*, **2017**, 13(25): 1603051.
- [97] Xiong X Q, Tang Y H, Xu C J, Huang Y Y, Wang Y P, Fu L L, Lin C X, Zhou D F, Lin Y H. *Small*, **2020**, 16: 2070232.
- [98] Zhong X Y, Wang X W, Cheng L, Tang Y A, Zhan G T, Gong F, Zhang R, Hu J B, Liu Z, Yang X L. *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30(4): 1907954.
- [99] Sun D, Pang X, Cheng Y, Ming J, Xiang S J, Zhang C, Lv P, Chu C C, Chen X L, Liu G, Zheng N. *ACS Nano*, **2020**, 14(2): 2063.
- [100] Zandieh M, Liu J W. *ACS Nano*, **2021**, 15(10): 15645.
- [101] Zhang Z J, Zhang X H, Liu B W, Liu J W. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(15): 5412.
- [102] Zhang Z J, Li Y Q, Zhang X H, Liu J W. *Nanoscale*, **2019**, 11(11): 4854.
- [103] Fan C N, Liu J J, Zhao H Y, Li L, Liu M, Gao J, Ma L. *RSC Adv.*, **2019**, 9: 33678.
- [104] Wu Y H, Qiang C, Liu S, Xiao H W, Zhang M T, Zhang X F. *Chin. Chem. Lett.*, **2019**, 30: 2186.
- [105] Hu Y F, Liu J, Xing H W, Zhou H, Wu M H. *Chemistry Select.*, **2020**, 5(27): 8284.
- [106] Zhang Z P, Liu Y S, Huang P C, Wu F Y, Ma L H. *Talanta*, **2021**, 232:122411.
- [107] Díaz-Díaz G, Diñeiro Y, Menéndez M I, Blanco-López M C, Lobo-Castañón M J, Miranda-Ordieres A J, Tuñón-Blanco P. *Polymer*, **2011**, 52(12): 2468.
- [108] Santos W J R, Lima P R, Tarley C, Höehr N F, Kubota L. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 631(2): 170.
- [109] Zhang Y D, Shi Y P. *Anal Chim Acta*, **2021**, 1184: 339039.
- [110] Song Z R, Zhai X H, Jiang C R, Chen R, Ye S J, Tong J Z, Dramou P, He H. *Biosens. Bioelectron.*, **2022**, 203: 114037.
- [111] Wang X, Song X, Si L, Xu L, Xu Z. A. *Food and Agricultural Immunology*, **2020**, 31(1): 1036.
- [112] Zhang Y, Feng Y S, Ren X H, He X W, Li W Y, Zhang Y K. *Biosens Bioelectron*, **2022**, 196: 113718.
- [113] Zhao L, Shi S, Liu M, Chen C, Zhu G Z, Gao J, Xu J. *ChemCatChem*, **2020**, 12(3): 903.
- [114] Lyu Y C, Morillas-Becerril L, Mancin F, Scrimin P. *J. Hazard. Mater.*, **2021**, 415: 125644.
- [115] Shi C, Huang Q G, Zhang R R, Liang X T, Wang F, Liu Z J, Liu M, Hu H Y, Yin Y Z. *RSC Adv.*, **2021**, 11: 39758.
- [116] Zhang D, Jamieson K, Guy L, Gao G, Dutasta J. P, Martinez A. *Chem. Sci.*, **2017**, 8(1): 789.
- [117] Ko Y, Kim D, Kwon C H, Cho J. *Appl. Surf. Sci.*, **2018**, 436: 791.
- [118] Greydanus B, Schwartz D. K, Medlin J. W. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2020**, 12(2): 2338.
- [119] Zhang Y F, Xu C L, Li B X, Li Y B. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 43: 205.
- [120] Zhang S P, Chen Y J, Huang Y T, Dai H, Lin Y Y. *Biosens Bioelectron*, **2020**, 159: 112201.
- [121] Chen X, Zhao L, Wu K, Yang H, Zhou Q, Xu Y, Zheng Y, Shen Y, Liu S, Zhang Y. *Chem. Sci.*, **2021**, 12: 8865.
- [122] Tan L X, Zhou J H, Sun J K, Yuan J Y. *Nat. Commun.*, **2022**, 13(1): 1471.
- [123] Woo M. A, Kim M. I, Jung J. H, Park K. S, Seo T. S, Park H. G. *International Journal of Molecular Sciences*, **2013**, 14(5): 9999.
- [124] Zhang, W, Dong J, Wu Y, Cao P, Song L, Ma M, Gu N, Zhang Y. *Colloid Surface B*, **2017**, 154: 55.
- [125] Zhang Z P, Tian Y, Huang P C, Wu F Y. *Talanta*, **2020**, 208: 120342.
- [126] Liu M X, Zhang H, Zhang X W, Chen S, Yu Y L, Wang J H. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(25): 9002.
- [127] Zhu X, Tang L, Wang J J, Peng B, Ouyang X L, Tan J, Yu J F, Feng H P, Tang J L. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **2021**, 330: 129318.
- [128] Zhan P F, Wang Z G, Li N, Ding B Q. *ACS Catal.*, **2015**, 5: 1489.
- [129] Sun Y H, Zhao C Q, Gao N, Ren J, Qu X. *Chem-Eur. J.*, **2017**, 23(72): 18146.
- [130] Zhou Y, Wei Y, Ren J, Qu X. *Materials Horizons*, **2020**, 7(12): 3291.
- [131] Zhou Y, Wei W L, Cui F C, Yan Z Q, Sun Y H, Ren J, Qu X. *Chem. Sci.*, **2020**, 11: 11344.
- [132] Zhang H, He H, Jiang X, Xia Z, Wei W. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2018**, 10(36): 30680.
- [133] Li F, Li S, Guo X, Dong Y, Yao C, Liu Y, Song Y, Tan X, Gao L, Yang D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(27): 11087.
- [134] Song Y, Lu S, Hai J, Liang K, Sun S, Meng G, Wang B. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(33): 11470.
- [135] Chen J, Pezzato C, Scrimin P, Prins L J. *Chem-Eur. J.*, **2016**, 22(21): 7028.
- [136] Liang S, Wu X. L, Zong M. H, Lou W. Y. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2022**, 622: 860.
- [137] Chen J X, Huang L, Wang Q Q, Wu W W, Zhang H, Fang Y X, Dong S. *Nanoscale*, **2019**, 11(13): 5960.
- [138] Li M H, Chen J X, Wu W W, Fang Y X, Dong S J. *J. Am.*

- Chem. Soc.*, **2020**, 142(36): 15569.
- [139] Liang H, Lin F, Zhang Z, Liu B, Jiang S, Yuan Q, Liu J. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2017**, 9(2): 1352.
- [140] Wu J, Li S R, Wei H. *Chem. Commun.*, **2018**, 54(50): 6520.
- [141] Zhou Q, Yang H, Chen X H, Xu Y, Han D, Zhou S S, Liu S Q, Shen Y F, Zhang Y J. *Angewandte Chemie*, **2022**, 134(2): e202112453.
- [142] Liu Y F, Cheng Y, Zhang H, Zhou M, Yu Y J, Lin S C, Jiang B, Zhao X Z, Miao L Y, Wei C W, Liu Q Y, Lin Y W, Du Y, Butch C J, Wei H. *Sci. Adv.*, **2020**, 6(29): eabb2695.
- [143] Meng X, Li D, Chen L, He H, Wang Q, Hong C, He J, Gao X, Yang Y, Jiang B, Nie G, Yan X, Gao L, Fan K. *ACS Nano*, **2021**, 15(3): 5735.
- [144] Zhao S Z, Yu X J, Qian Y N, Chen W, Shen J L. *Theranostics*, **2020**, 10: 6278.
- [145] Frtús A, Smolková B, Uzhytchak M, Lunova M, Jirsa M, Kubinová Š, Dejneka A, Lunov O. *J. Control. Release*, **2020**, 328: 59.
- [146] Huang D M, Hsiao J K, Chen Y C, Chien L Y, Yao M, Chen Y K, Ko B S, Hsu S C, Tai L A, Cheng H Y, Wang S W, Yang C S, Chen Y C. *Biomaterials*, **2009**, 30(22): 3645.
- [147] Zhang D, Zhao Y X, Gao Y J, Gao F P, Fan Y S, Li X J, Duan Z Y, Wang H. *J. Mater. Chem. B*, **2013**, 1(38): 5100.
- [148] Duan D M, Fan K L, Zhang D X, Tan S G, Liang M F, Liu Y, Zhang J L, Zhang P H, Liu W, Qiu X G, Kobinger G P, Fu Gao G, Yan X Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 74: 134.
- [149] Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, Yamamura Y, Yamamoto T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Tanigawa T, Yamashita J K, Ouchi N, Honda H, Isobe K, Murohara T. *Sci. Rep.*, **2013**, 3: 1418.
- [150] Tian L, Qi J, Qian K, Oderinde O, Cai Y, Yao C, Song W, Wang Y. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 260: 676.
- [151] Shen J, Rees T W, Zhou Z, Yang S, Ji L, Chao H. *Biomaterials*, **2020**, 251: 120079.
- [152] Hu Y H, Cheng H J, Zhao X Z, Wu J, Muhammad F, Lin S C, He J, Zhou L Q, Zhang C P. *ACS Nano*, **2017**, 11(6): 5558.
- [153] McKeating K, Sloan-Dennison S, Graham D, Faulds K. *Analyst*, **2013**, 138(21): 6347.
- [154] Zheng X X, Liu Q, Jing C, Li Y, Li D, Luo W J, Wen Y Q, He Y, Huang Q, Long Y T, Fan C H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50(50): 11994.
- [155] Yin W Y, Yu J, Lv F T, Yan L, Zheng L, Gu Z J, Zhao Y L. *ACS Nano*, **2016**, 10(12): 11000.
- [156] Hu P, Han L, Dong S. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, 6(1): 500.
- [157] Wang X, Sun X, Bu T, Wang Q, Jia P, Dong M, Wang L. *Composites Part B: Engineering*, **2022**, 229: 109465.
- [158] Li S S, Shang L, Xu B L, Wang S H, Gu K, Wu Q Y, Sun Y, Zhang Q H, Yang H L, Zhang F R, Gu L, Zhang T R, Liu H Y. *Angew. Chem.*, **2019**, 131(36): 12754.
- [159] Chang M Y, Hou Z Y, Wang M, Yang C Z, Wang R F, Li F, Liu D L, Peng T L, Li C X, Lin J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(23): 12971.
- [160] Ding H, Cai Y J, Gao L Z, Liang M M, Miao B P, Wu H W, Liu Y, Xie N, Tang A, Fan K L, Yan X Y, Nie G H. *Nano Lett.*, **2019**, 19(1): 203.
- [161] Wu H, Xia F, Zhang L, Fang C, Lee J, Gong L, Gao J, Ling D, Li F. *Adv. Mater.*, **2022**, 34(7): 2108348.
- [162] Hu D H, Sheng Z H, Fang S T, Wang Y N, Gao D Y, Zhang P F, Gong P, Ma Y F, Cai L T. *Theranostics*, **2014**, 4: 142.
- [163] Ren X, Liu J, Ren J, Tang F, Meng X. *Nanoscale*, **2015**, 7(46): 19641.
- [164] Luo S J, Liu Y Q, Rao H B, Wang Y Y, Wang X X. *Anal. Biochem.*, **2017**, 538: 26.
- [165] Su L, Qin S N, Cai Y X, Wang L, Dong W P, Mao G J, Feng S L, Xie Z J, Zhang H. *Sens. Actuat. B Chem.*, **2022**, 353: 131150.
- [166] Cui L, Yin H S, Dong J, Fan H, Liu T, Ju P, Ai S. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26(7): 3278.
- [167] Dai Z, Liu S H, Bao J, Ju H. *Chemistry*, **2009**, 15(17): 4321.
- [168] Dutta A K, Maji S K, Mondal A, Karmakar B, Biswas P, Adhikary B. *Sens. Actuat. B Chem.*, **2012**, 173: 724.
- [169] Fang H T, Pan Y L, Shan W Q, Guo M L, Nie Z, Huang Y, Yao S. *Anal. Methods*, **2014**, 6: 6073.
- [170] Yi Y, Wang P, Fan G, Wang Z, Chen S, Xue T, Wen Y. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2020**, 8: 9937.
- [171] Liu Z L, Zhao B, Shi Y, Guo C Y, Yang H B, Li Z. *Talanta*, **2010**, 81(4/5): 1650.
- [172] Mu J, Wang Y, Zhao M, Zhang L. *Chem. Commun. (Camb)*, **2012**, 48(19): 2540.
- [173] Jiang X Y, Wang H J, Wang H J, Zhuo Y, Yuan R, Chai Y. *Nanoscale*, **2016**, 8(15): 8017.
- [174] Ye H, Yang K K, Tao J, Liu Y J, Zhang Q, Habibi S, Nie Z, Xia X H. *ACS Nano*, **2017**, 11(2): 2052.
- [175] Zheng C, Zheng A. X, Liu B, Zhang X. L, He Y, Li J, Yang H. H, Chen G. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(86): 13103.
- [176] Wang Y, Qi W, Song Y. *Chem. Commun.*, **2016**, 52(51): 7994.
- [177] 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.
- [178] Fan K L, Cao C Q, Pan Y X, Lu D, Yang D L, Feng J, Song L N, Liang M M, Yan X Y. *Nat. Nanotechnol.*, **2012**, 7(7): 459.
- [179] Zhu Y, Wang W Y, Cheng J J, Qu Y T, Dai Y, Liu M M, Yu J N, Wang C M, Wang H J, Wang S C, Zhao C, Wu Y E, Liu Y Z. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(17): 9480.
- [180] Tang M L, Shi Y T, Lu L, Li J Q, Zhang Z, Ni J T, Wang W X, Zhang Y H, Sun T D, Wu Z G. *Chem. Eng. J.*, **2022**, 449: 137847.
- [181] Lei S, Zhang J, Blum N, Li M, Zhang D Y, Yin W M, Zhao F, Lin J, Huang P. *Nat. Commun.*, **2022**, 13(1): 1298.

- [182] Kong F, He H L, Bai H Y, Yang F, Ma M, Gu N, Zhang Y. *Bioact. Mater.*, **2022**, 18: 526.
- [183] Zhang Y J, Yang S Q, Wang J, Cai Y Y, Niu L X, Liu X, Liu C Y, Qi H, Liu A H. *Talanta*, **2021**, 233: 122594.
- [184] Chen T M, Tian X, Huang L, Xiao J, Yang G. *Nanoscale*, **2017**, 9(40): 15673.
- [185] Manea F, Houillon F B, Pasquato L, Scrimin P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43(45): 6165.
- [186] Qu K G, Shi P, Ren J, Qu X. *Chemistry*, **2014**, 20(24): 7501.
- [187] Lin Y. L Z, Chen Z, Ren J, Qu X. *Biomaterials*, **2013**, 34(11): 2600.
- [188] Ying M H, Yang G Z, Xu Y J, Ye H Q, Lin X, Lu Y, Pan H, Bai Y, Du M Z. *Analyst*, **2021**, 147(1): 40.
- [189] Memon A. H, Wei B, Shams S, Jiang Y, Jiao M, Su M, Liang H. *Catalysis Science & Technology*, **2022**, 12(9): 2846.
- [190] Hu A L, Deng H H, Zheng X Q, Wu Y Y, Lin X L, Liu A L, Xia X H, Peng H P, Chen W, Hong G L. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 97: 21.
- [191] He W W, Han X N, Jia H M, Cai J H, Zhou Y L, Zheng Z. *Sci. Rep.*, **2017**, 7: 40103.
- [192] Liu C. Y Y, Mao Y, He W. *J. Environ. Sci. Health. C Toxicol. Carcinog.*, **2020**, 38(4): 299.
- [193] Liu M W, Chen G J, Qin Y, Li J L, Hu L Y, Gu W L, Zhu C Z. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(28): 9897.
- [194] Shan J Y, Li X, Yang K L, Xiu W J, Wen Q R, Zhang Y Q, Yuwen L H, Weng L X, Teng Z G, Wang L H. *ACS Nano*, **2019**, 13(12): 13797.
- [195] Borkowski A, Kicinski W, Szala M, Topolska J, Dzialak P, Syczewski M. D. *Materials (Basel)*, **2020**, 13(17).
- [196] Ma W. Z. T, Li R, Niu Y, Yang, X, Liu J, Xu Y, Li C. M. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2020**, 559: 313.
- [197] Wu J. L W, Yang Q, Li H, Li F. *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, 171: 112707.
- [198] Yao J. C. Y, Zhou M, Zhao S, Lin S, Wang X, Wu J, Li S, Wei H. *Chem. Sci.*, **2018**, 9(11): 2927.
- [199] Zhao S, Li Y X, Liu Q Y, Li S R, Cheng Y, Cheng C Q, Sun Z Y, Du Y, Butch C J, Wei H. *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30(45): 2004692.
- [200] Ge C. F, Ge S, Chong X M, Wamer Yu, Gao W G, Chai X F, Chen Z F, Yin C Y, Jun J. *ACS Nano*, **2016**, 10(11): 10436.
- [201] Lin A Q, Sun Z Y, Xu X Q, Zhao S, Li J W, Sun H, Wang Q, Jiang Q, Wei H, Shi D Q. *Nano Lett.*, **2022**, 22(1): 508.
- [202] Liu Y, Qin Y, Zhang Q, Zou W, Jin L, Guo R. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2021**, 600: 37.
- [203] Zhang W, Hu S L, Yin J J, He W W, Lu W, Ma M, Gu N, Zhang Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138(18): 5860.
- [204] Wang Q, Cheng C Q, Zhao S, Liu Q Y, Zhang Y H, Liu W L, Zhao X Z, Zhang H, Pu J, Zhang S, Zhang H G, Du Y, Wei H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61(27): e202201101.
- [205] Tian R, Ma H, Ye W, Li Y, Wang S, Zhang Z, Liu S, Zang M, Hou J, Xu J, Luo Q, Sun H, Bai F, Yang Y, Liu J. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(36): 2204025.
- [206] Guo X F, Yang F, Jing L, Li J, Li Y H, Ding R, Duan B Q, Zhang X M. *J. Hazard. Mater.*, **2022**, 431: 128621.
- [207] BCC Global Markets for Enzymes in Industrial Applications; BIO030L; Aug 2021, **2021**.
- [208] Fasim A, More V S, More S S. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2021**, 69: 68.
- [209] Ai Y J, Hu Z N, Liang X P, Sun H B, Xin H B, Liang Q L. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(14): 2110432.
- [210] Bhattacharyya S, Ali S R, Venkateswarulu M, Howlader P, Zangrando E, De M, Mukherjee P S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142(44): 18981.
- [211] Shi W B, Wang Q L, Long Y J, Cheng Z, Chen S C, Zheng H Z, Huang Y M. *Chem. Commun.*, **2011**, 47(23): 6695.
- [212] Mishra P, Lee J S, Kumar D, Louro R O, Costa N, Pathania D, Kumar S, Lee J, Singh L. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(8): 2108650.
- [213] Wu Y, Xu W Q, Jiao L, Tang Y J, Chen Y F, Gu W L, Zhu C Z. *Mater. Today*, **2022**, 52: 327.
- [214] LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. *Nature*, **2015**, 521(7553): 436.
- [215] Silver D, Schrittwieser J, Simonyan K, Antonoglou I, Huang A, Guez A, Hubert T, Baker L, Lai M, Bolton A, Chen Y T, Lillicrap T, Hui F, Sifre L, van den Driessche G, Graepel T, Hassabis D. *Nature*, **2017**, 550(7676): 354.
- [216] Esteva A, Kuprel B, Novoa R A, Ko J, Swetter S M, Blau H M, Thrun S. *Nature*, **2017**, 542(7639): 115.
- [217] Silver D, Huang A, Maddison C J, Guez A, Sifre L, van den Driessche G, Schrittwieser J, Antonoglou I, Panneershelvam V, Lanctot M, Dieleman S, Grewe D, Nham J, Kalchbrenner N, Sutskever I, Lillicrap T, Leach M, Kavukcuoglu K, Graepel T, Hassabis D. *Nature*, **2016**, 529(7587): 484.
- [218] Granda J M, Donina L, Dragone V, Long D L, Cronin L. *Nature*, **2018**, 562(7728): E26.
- [219] Yong W, Zhang H, Fu H, Zhu Y, He J, Xie J. *Computational Materials Science*, **2022**, 204: 111181.
- [220] Ruoff R S, Tse D S, Malhotra R, Lorents D C. *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97(13): 3379.
- [221] Gu G X, Chen C T, Buehler M J. *Extreme Mech. Lett.*, **2018**, 18: 19.
- [222] Gu G X, Dimas L, Qin Z, Buehler M. J. *Journal of Applied Mechanics*, **2016**, 83(7): 071006.
- [223] Sun B C, Fernandez M, Barnard A S. *J. Chem. Inf. Model.*, **2017**, 57(10): 2413.
- [224] Rajan A C, Mishra A, Satsangi S, Vaish R, Mizuseki H, Lee K R, Singh A K. *Chem. Mater.*, **2018**, 30(12): 4031.
- [225] Lu S H, Zhou Q H, Guo Y L, Zhang Y H, Wu Y L, Wang J L. *Adv. Mater.*, **2020**, 32(29): 2002658.
- [226] Lu S H, Zhou Q H, Ouyang Y, Guo Y L, Li Q, Wang J L. *Nat. Commun.*, **2018**, 9(1): 3405.
- [227] Guo Y, He X, Su Y, Dai, Y, Xie M, Yang S, Chen J, Wang K, Zhou D, Wang C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143

- (15): 5755.
- [228] Erps T, Foshey M, Luković M K, Shou W, Goetzke H H, Dietsch H, Stoll K, von Vacano B, Matusik W. *Sci. Adv.*, **2021**, 7(42): eabf7435.
- [229] Razlivina J, Serov N, Shapovalova O, Vinogradov V. *Small*, **2022**, 18(12): 2105673.
- [230] Raccuglia P, Elbert K C, Adler P D F, Falk C, Wenny M B, Mollo A, Zeller M, Friedler S A, Schrier J, Norquist A J. *Nature*, **2016**, 533(7601): 73.
- [231] Chen P C, Tang Z Y, Zeng Z M, Hu X F, Xiao L P, Liu Y, Qian X D, Deng C Y, Huang R Y, Zhang J Z, Bi Y L, Lin R K, Zhou Y, Liao H G, Zhou D, Wang C, Lin W B. *Matter*, **2020**, 2(6): 1651.
- [232] Tran K, Ulissi Z W. *Nat. Catal.*, **2018**, 1: 696.
- [233] Das R, Dhiman A, Kapil A, Bansal V, Sharma T K. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2019**, 411: 1229.
- [234] Jain U, Gupta S, Chauhan N. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, 105: 549.
- [235] Yang J, Lee J. Y, Too H. P. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109(41): 19208.
- [236] Liu S. H, Lu F, Xing R. M, Zhu J. J. *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17(2): 620.
- [237] Ayodhya D, Veerabhadram G. *J. Sci-Adv. Mater. Dev.*, **2019**, 4(3): 381.
- [238] Gaur R, Jeevanandam P. *New J. Chem.*, **2015**, 39: 9442.
- [239] Nghia N N, Huy B T, Lee Y. *Microchimica Acta*, **2018**, 186: 1.
- [240] Li R, Qiao X. H, Ma H. J, Li H. M, Li C, Jin L. H. *J. Mater. Chem. B*, **2022**, 10(17): 3311.
- [241] Wahab M A, Hossain S M A, Masud M K, Park H, Ashok A, Mustapić M, Kim M, Patel D, Shahbazi M, Hossain M S A, Yamauchi Y, Kaneti Y V. *Sens. Actuat. B Chem.*, **2022**, 366: 131980.
- [242] Lou Z P, Zhao S, Wang Q, Wei H. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(23): 15267.
- [243] Zhang T T, Xing Y, Song Y, Gu Y, Yan X Y, Lu N N, Liu H, Xu Z Q, Xu H X, Zhang Z Q, Yang M. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(16): 10589.
- [244] Wang M X, Zhou X, Li Y H, Dong Y Q, Meng J S, Zhang S, Xia L B, He Z Z, Ren L, Chen Z W, Zhang X C. *Bioact. Mater.*, **2022**, 17: 289.
- [245] Cao S J, Zhao Z Y, Zheng Y J, Wu Z H, Ma T, Zhu B H, Yang C D, Xiang X, Ma L, Han X L, Wang Y, Guo Q, Qiu L, Cheng C. *Adv. Mater.*, **2022**, 34(16): 2270120.
- [246] Huang Y Y, Liu Z, Liu C Q, Ju E G, Zhang Y, Ren J S, Qu X G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55(23): 6646.
- [247] Yang Y, Zhu D M, Liu Y, Jiang B, Jiang W, Yan X Y, Fan K L. *Nanoscale*, **2020**, 12(25): 13548.
- [248] Kong F, Bai H Y, Ma M, Wang C, Xu H Y, Gu N, Zhang Y. *Nano Today*, **2021**, 37: 101106.
- [249] Sun Y X, Xu L, Liu X, Shen Y D, Zhang Y, Gu N, Xiong F. *Chem. Eng. J.*, **2022**, 429: 132303.
- [250] Cai S. F, Qi C, Li Y. D, Han Q. S, Yang R, Wang C. *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4(10): 1869.
- [251] Wang Q Q, Zhang L L, Shang C S, Zhang Z Q, Dong S. *Chem. Commun.*, **2016**, 52(31): 5410.
- [252] Liu C P, Wu T, Liu C Y, Chen K C, Chen Y X, Chen G S, Lin S Y. *Small*, **2017**, 13(26): 1700278.
- [253] Sun Y H, Wang J, Li W, Zhang J L, Zhang Y D, Fu Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 74: 1038.
- [254] Zhu Z J, Zhai Y L, Zhu C Z, Wang Z X, Dong S. *Electrochem. Commun.*, **2013**, 36: 22.
- [255] Wu J Z, Li B B, Shao Y B, Wu X H, Sun Y C. *J. Mater. Sci.*, **2020**, 55(5): 2129.
- [256] Yi K Y, Liu D H, Chen X S, Yang J, Wei D P, Liu Y Q, Wei D C. *Acc. Chem. Res.*, **2021**, 54(4): 1011.
- [257] Kirchner E, Hirsch T. *Microchim Acta*, **2020**, 187: 441.
- [258] Novoselov K S, Fal'ko V I, Colombo L, Gellert P R, Schwab M G, Kim K. *Nature*, **2012**, 490(7419): 192.
- [259] Yuan C L, Qin X, Xu Y J, Jing Q, Shi R, Wang Y L. *Microchem. J.*, **2020**, 159: 105365.
- [260] Li S J, Pang E N, Li N, Chang Q, Yang J L, Hu S L. *J. Colloid Interface Sci.*, **2022**, 608: 1348.
- [261] Zhao J, Wang H H, Geng H Q, Yang Q, Tong Y P, He W W. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2021**, 4(7): 7253.
- [262] Feng L. P, Zhang L. X, Zhang S, Chen X, Li P, Gao Y, Xie S, Zhang A. C, Wang H. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2020**, 12(15): 17547.
- [263] Zhu D Q, Zhang M L, Pu L, Gai P P, Li F. *Small*, **2022**, 18(3): 2104993.
- [264] Chen Y. F, Jiao L, Yan H. Y, Xu W. Q, Wu Y, Wang H. J, Gu W. L, Zhu C. Z. *Anal. Chem.*, **2020**, 92(19): 13518.
- [265] Tian H, Liu J X, Guo J R, Cao L G, He J H. *Talanta*, **2022**, 242: 123320.
- [266] Chen Q M, Zhang X D, Li S Q, Tan J K, Xu C J, Huang Y M. *Chem. Eng. J.*, **2020**, 395: 125130.
- [267] Wang Q, Li Q. T, Lu Y. W, Zhang X. D, Huang Y. M. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2021**, 9(22): 7668.
- [268] Yang H Y. Master Dissertation of Wuhan Polytechnic University, **2021**. (杨环玉. 武汉轻工大学硕士论文, **2021**.)
- [269] Lin Y H, Ren J, Qu X. *Accounts Chem. Res.*, **2014**, 47(4): 1097.
- [270] Yang H Z, Shang L, Zhang Q H, Shi R, Waterhouse G I N, Gu L, Zhang T R. *Nat. Commun.*, **2019**, 10: 4585.
- [271] Wang D D, Wu H H, Phua S Z F, Yang G B, Lim W Q, Gu L, Qian C, Wang H B, Guo Z, Chen H Z, Zhao Y L. *Nat. Commun.*, **2020**, 11(1): 357.
- [272] Zhang M L, Wang Y G, Chen W X, Dong J C, Zheng L R, Luo J, Wan J W, Tian S B, Cheong W C, Wang D S, Li Y D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(32): 10976.
- [273] Fan L L, Liu P, Yan X C, Gu L, Yang Z Z, Yang H, Qiu S, Yao X. *Nat. Commun.*, **2016**, 7: 10667.
- [274] Zhou P, Lv F, Li N, Zhang Y. L, Mu Z. J, Tang Y. H, Lai J. P, Chao Y. G, Luo M. C, Lin F, Zhou J. H, Su D, Guo S.

- J. Nano Energy*, **2019**, 56: 127.
- [275] Maddheshiya S, Nara S. *Front. Bioeng. Biotech.*, **2022**, 10: 880214.
- [276] Wang Z Z, Zhang Y, Ju E G, Liu Z, Cao F F, Chen Z W, Ren J, Qu X. *Nat. Commun.*, **2018**, 9: 3334.
- [277] Sun Y X, Liu X, Wang L, Xu L, Liu K L, Xu L, Shi F F, Zhang Y, Gu N, Xiong F. *Bioact. Mater.*, **2022**, 10: 117.
- [278] Dong H J, Fan Y K, Zhang W, Gu N, Zhang Y. *Bioconjugate Chem.*, **2019**, 30(5): 1273.
- [279] Khan I, Saeed K, Khan I. *Arab. J. Chem.*, **2019**, 12(7): 908.
- [280] Roy A, Bharadvaja N. *Innovative Techniques in Agriculture*, **2017**, 1(2): 88.
- [281] Nath D, Banerjee P. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2013**, 36(3): 997.
- [282] Zhou Z, Wang Y, Peng F, Meng F, Zha J, Ma L, Du Y, Peng N, Ma L, Zhang Q. *Angewandte Chemie*. **2022**, 134(16): e202115939.
- [283] Rauf S, Nawaz M A H, Muhammad N, Raza R, Shahid S A, Marty J L, Hayat A. *Journal of Molecular Liquids*, **2017**, 243: 333.
- [284] Meng S, Zhang Y Y, Wang H D, Wang L D, Kong T T, Zhang H, Meng S. *Biomaterials*, **2021**, 269: 120471.
- [285] Yang E H, Datta D, Hader G G, Ding J J. *Synthesis, Modeling, and Characterization of 2D Materials, and Their Heterostructures*. Amsterdam: Elsevier, **2020**, 3/6.
- [286] Chen S, Zhou Y, Li J, Hu Z, Dong F, Hu Y, Wang H, Wang L, Ostrikov K K, Wu Z. *ACS Catal.*, **2020**, 10(17): 10185.
- [287] Chen J, Jiang M, Chen J, Xu W, Jia H. *Journal of Hazardous Materials*, **2020**, 392: 122511.
- [288] Gan T, He Q, Zhang H, Xiao H J, Liu Y F, Zhang Y, He X H, Ji H B. *Chem. Eng. J.*, **2020**, 389: 124490.
- [289] Jin H Y, Sultan S, Ha M R, Tiwari J, Kim M, Kim K S. *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30(25): 2000531.
- [290] Ying J, Tschöpe A, Levin D. *Nanostructured Materials*, **1995**, 6(1/4): 237.
- [291] Peng X, Wan G, Wu L, Zeng M, Lin S, Wang G. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 257: 166.
- [292] Li S, Zhao X T, Gang R T, Cao B Q, Wang H. *Anal. Chem.*, **2020**, 92(7): 5152.
- [293] Jeyaraj M, Gurunathan S, Qasim M, Kang M H, Kim J H. *Nanomaterials-Basel*, **2019**, 9(12): 1719.
- [294] Li J L, Wu Q L, Wu J. *Handbook of Nanoparticles*, **2015**, 1.
- [295] Feng L P, Zhang L X, Chu S, Zhang S Z, Chen X, Du Z Z, Gong Y S, Wang H. *Applied Surface Science*, **2022**, 583: 152496.
- [296] He N, Zhu X, Liu F X, Yu R, Xue Z H, Liu X H. *Chem. Eng. J.*, **2022**, 445: 136543.
- [297] Zheng S, Li B, Tang Y, Li Q, Xue H, Pang H. *Nanoscale*, **2018**, 10(27): 13270.
- [298] Mao M, Guan X J, Wu F, Ma L. *Nanomaterials-Basel*, **2022**, 12(4): 638.
- [299] Cao C, Zou H, Yang N, Li H, Cai Y, Song X, Shao J, Chen P, Mou X, Wang W. *Adv. Mater.*, **2021**, 33(52): 2106996.
- [300] Chou K, Ren C. *Mater. Chem. Phys.*, **2000**, 64: 241.
- [301] Rane A V, Kanny K, Abitha V K, Thomas S. *Synthesis of Inorganic Nanomaterials*. Amsterdam: Elsevier, **2018**, 121.
- [302] Guzmán M. G, Dille J, Godet S. *Int. J. Chem. Biomol. Eng.*, **2009**, 2(3): 104.
- [303] Zhu J L, Peng X, Nie W, Wang Y J, Gao J W, Wen W, Selvaraj J N, Zhang X H, Wang S F. *Biosensors and Bioelectronics*, **2019**, 141: 111450.
- [304] Ling P, Cheng S, Chen N, Qian C, Gao F. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2020**, 12(15): 17185.
- [305] Ruan H, Zhang S, Wang H, Pei J, Zhao R, Mu X, Wang H, Zhang X. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2022**, 5(5): 6564.
- [306] Wu Q, He L, Jiang Z, Li Y, Cao Z, Huang C, Li Y. *Biosensors and Bioelectronics*, **2019**, 145: 111704.
- [307] Zhai D, Liu B R, Shi Y, Pan L J, Wang Y Q, Li W B, Zhang R, Yu G H. *ACS Nano*, **2013**, 7(4): 3540.
- [308] Fan X Y, Gong X Y, Zhou F F, Chen B T, Tan S W, Xu H, Pan A Q, Liang S Q, He Y J. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2022**, 216: 112603.
- [309] Cai X, Wang Z, Zhang H, Li Y, Chen K, Zhao H, Lan M. *J. Mater. Chem. B*, **2019**, 7(3): 401.
- [310] Zhang Y W, Tian J Q, Liu S, Wang L, Qin X Y, Lu W B, Chang G H, Luo Y L, Asiri A, Al-Youbi A O, Sun X P. *Analyst*, **2012**, 137(6): 1325.
- [311] Sun Y, Xu H, Zhao X, Hui Z, Yu C, Wang L, Xue J, Zhao Y, Zhou R, Dai H. *J. Mater. Chem. B*, **2019**, 7(40): 6232.
- [312] Ponlakhet K, Jarujamrus P, Amatongchai M, Tamuang S. *Analytical Methods*, **2019**, 11(37): 4785.
- [313] Zhu X, Xu N, Zhang L, Wang D, Zhang P. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2022**, 114456.
- [314] Tian R Z, Li Y J, Xu J Y, Hou C X, Luo Q, Liu J Q. *J. Mater. Chem. B*, **2022**, 10(35): 6590.
- [315] Bai Y H, Zheng Y J, Wang Z, Hong Q, Liu S Q, Shen Y F, Zhang Y J. *New J. Chem.*, **2021**, 45(27): 11876.
- [316] Amourizi F, Ghaedi M. *Polyhedron*, **2021**, 210: 115506.
- [317] Wang D J, Zhang B, Ding H, Liu D, Xiang J Q, Gao X J, Chen X H, Li Z J, Yang L, Duan H X, Zheng J Y, Liu Z, Jiang B, Liu Y, Xie N, Zhang H, Yan X Y, Fan K L, Nie G H. *Nano Today*, **2021**, 40: 101243.
- [318] Jia G R, Wang Y, Cui X, Zhang H Z, Zhao J X, Li L, Gu L, Zhang Q H, Zheng L R, Wu J D, Wu Q, Singh D J, Li W W, Zhang L, Zheng W. *Matter*, **2022**, 5(1): 206.
- [319] Yang W, Fan L, Guo Z, Wu H P, Chen J M, Liu C J, Yan Y R, Ding S J. *Microchim. Acta*, **2021**, 188(10): 1.
- [320] Kang K, Wang B B, Ji X P, Liu Y H, Zhao W R, Du Y Q, Guo Z Y, Ren J J. *RSC Adv.*, **2021**, 11: 2446.
- [321] Roy A, Bharadvaja N. *MOJ Bioequiv. Availab.*, **2017**, 3(5): 00046.
- [322] Liang X J, Kumar A, Shi D L, Cui D. *J. Nanomater.*, **2012**, 2012: 1.

- [323] Ovais M, Khalil A, Islam N. U, Ahmad I, Ayaz M, Muthupandian S, Shinwari Z, Mukherjee S. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2018**, 102.
- [324] Nair B, Pradeep T. *Cryst. Growth & Des.*, **2002**, 2: 293.
- [325] Konishi Y, Ohno K, Saitoh N, Nomura T, Nagamine S. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **2004**, 29: 2341.
- [326] He S Y, Guo Z R, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Gu N. *Mater. Lett.*, **2007**, 61: 3984.
- [327] Reddy A S, Chen C Y, Chen C C, Jean J S, Chen H R, Tseng M J, Fan C W, Wang J C. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2010**, 10(10): 6567.
- [328] Almalki M. A, Khalifa A. Y. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2020**, 204: 111786.
- [329] Bruna N, Collao B, Tello A, Caravantes P, Díaz-Silva N, Monrás J P, Órdenes-Aenishanslins N, Flores M, Espinoza-Gonzalez R, Bravo D, Pérez-Donoso J M. *Sci. Rep.*, **2019**, 9: 1953.
- [330] Saravanan M, Barik S K, MubarakAli D, Prakash P, Pugazhendhi A. *Microb. Pathog.*, **2018**, 116: 221.
- [331] Gupta R, Padmanabhan P. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **2021**, 2021: 732.
- [332] Roy A, Elzaki A, Tirth V, Kajoak S, Osman H, Algahtani A, Islam S, Faizo N L, Khandaker M U, Islam M N, Bin Emran T, Bilal M. *Catalysts*, **2021**, 11(12): 1494.
- [333] Ahmad A, Senapati S, Khan M I, Kumar R, Sastry M. *Langmuir*, **2003**, 19: 3550.
- [334] Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar S R, Khan M I, Parishcha R, Ajaykumar P V, Alam M, Kumar R, Sastry M. *Nano Lett.*, **2001**, 1(10): 515.
- [335] Riddin T, Gericke M, Whiteley C. *Nanotechnology*, **2006**, 17: 3482.
- [336] Xie J, Lee J Y, Wang D I, Ting Y P. *Small*, **2007**, 3(4): 672.
- [337] Barwal I, Ranjan P, Kateriya S, Yadav S. *J. Nanobiotechnology*, **2011**, 9: 56.
- [338] Roychoudhury P, Pal R. *J. Algal. Biomass. Utln.*, **2014**, 5(1): 15.
- [339] Mahdih M, Zolanvari A, Azimee A S, Mahdih M. *Sci. Iran.*, **2012**, 19(3): 926.
- [340] Uma Suganya K S, Govindaraju K, Ganesh Kumar V, Stalin Dhas T, Karthick V, Singaravelu G, Elanchezhyan M. *Mater. Sci. Eng. C*, **2015**, 47: 351.
- [341] Sanaeimehr Z, Javadi I, Namvar F. *Cancer Nanotechnology*, **2018**, 9(1): 1.
- [342] Fatima R, Priya M, Indurthi L, Radhakrishnan V, Sudhakaran R. *Microb. Pathog.*, **2020**, 138: 103780.
- [343] Ali S, Sikdar S, Basak S, Rajbanshi B, Mondal M, Roy D, Dutta A, Kumar A, Dakua V K, Chakrabarty R, Roy A, Barman A, Datta A, Roy P K, Chakraborty B, Roy M N. *ACS Omega*, **2022**, 7(5): 4457.
- [344] Doan V D, Nguyen V C, Nguyen T L H, Nguyen A T, Nguyen T D. *Spectrochimica Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2022**, 268: 120709.
- [345] Chidanand Mittal, N, Prasad E. *Catalyst Market by Type, Process, and Application: Global Opportunity Analysis and Industry Forecast*. **2021**, 2021.
- [346] Gao L Z, Yan X Y. *Prog. Biochem. Biophys.*, **2013**, 40(10): 892.
- [347] Hong C Y, Meng X Q, He J Y, Fan K L, Yan X Y. *Particuology*, **2022**, 71: 90.
- [348] Christus A B, Panneerselvam P, Ravikumar A. *Anal. Methods*, **2018**, 10: 4378.
- [349] Wen S H, Zhong X L, Wu Y D, Liang R P, Zhang L, Qiu J D. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(10): 6487.
- [350] Loynachan C N, Soleimany A P, Dudani J S, Lin Y Y, Najer A, Bekdemir A, Chen Q, Bhatia S N, Stevens M M. *Nat. Nanotechnol.*, **2019**, 14(9): 883.
- [351] Jiang B, Yan L, Zhang J L, Zhou M, Shi G Z, Tian X Y, Fan K L, Hao C, Yan X Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2019**, 11(10): 9747.
- [352] Liu D, Ju C H, Han C, Shi R, Chen X H, Duan D M, Yan J H, Yan X Y. *Biosens. & Bioelectron.*, **2021**, 173: 112817.
- [353] Tian X, Liao H, Wang M, Feng L Y, Fu W S, Hu L Z. *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 152.
- [354] Huang T, Hu X L, Wang M, Wu Y X, Hu L Z, Xia Z N. *Chem. Commun.*, **2021**, 57(24): 3054.
- [355] Fu Q J, Zhou X B, Wang M J, Su X. *Anal. Chim. Acta*, **2022**, 1216: 339993.
- [356] Wu T T, Yu S Q, Dai L, Feng J H, Ren X, Ma H M, Wang X Y, Wei Q, Ju H X. *ACS Sens.*, **2022**, 7(6): 1732.
- [357] Wang X Y, Dong S, Wei H. *Electroanalysis*, **2022**, 35(1): e202100684.
- [358] Zhang L, Zhai Y, Gao N, Wen D, Dong S. *Electrochem. Commun.*, **2008**, 10(10): 1524.
- [359] Lu N N, Yan X Y, Gu Y, Zhang T T, Liu Y, Song Y, Xu Z Q, Xing Y, Li X W, Zhang Z Q, Zhai S Y. *Electrochim. Acta*, **2021**, 395: 139197.
- [360] Wang K D, Wu C, Wang F, Liao M H, Jiang G Q. *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 150: 111869.
- [361] Liu J, Zhang W, Peng M, Ren G, Guan L, Li K, Lin Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2020**, 12(26): 29631.
- [362] Son S E, Ko E, Tran V K, Hur W, Choi H, Lee H B, Park Y, Seong G. *ChemElectroChem*, **2019**, 6(17): 4666.
- [363] Dinu Gugoasa L, APogacean F, Kurbanoglu S, Tudoran L. B, Serban A. B, Kacso I, Pruneanu S. *J. Electrochem. Soc.*, **2021**, 168(6): 067523.
- [364] Nandhakumar P, Kim G, Park S, Kim S, Kim S, Park J K, Lee N S, Yoon Y H, Yang H. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **2020**, 59(50): 22419.
- [365] Li J, Koo K. M, Wang Y, Trau M. *Small*, **2019**, 15(50): 1904689.
- [366] Yu Z, Cai G, Liu X, Tang D. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2020**, 12(36): 40133.
- [367] Ragg R, Schilman A M, Korschelt K, Wiesotte C, Kluncker

- M, Viel M, Völker L, Preiß S, Herzberger J, Frey H, Heinze K, Blümler P, Tahir M N, Natalio F, Tremel W. *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4(46): 7423.
- [368] Yang F, Hu S L, Zhang Y, Cai X W, Huang Y Q, Wang F, Wen S, Teng G, Gu N. *Adv. Mater.*, **2012**, 24(38): 5205.
- [369] Lu D, Jiang H M, Zhang G Y, Luo Q, Zhao Q, Shi X B. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **2021**, 13(22): 25738.
- [370] Li S R, Zhang Y H, Wang Q, Lin A Q, Wei H. *Anal. Chem.*, **2022**, 94(1): 312.
- [371] Chen C, Fan S H, Li C, Chong Y, Tian X, Zheng J W, Fu P, Jiang X M, Wamer W G, Yin J J. *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4(48): 7895.
- [372] Moglianetti M, De Luca E, Pedone D, Marotta R, Catelani T, Sartori B, Amenitsch H, Retta S F, Pompa P P. *Nanoscale*, **2016**, 8(6): 3739.
- [373] Nagvenkar A P, Gedanken A. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **2016**, 8(34): 223001.
- [374] Kim M, Lee J S, Kim H S, Cho A, Shim K, Le T N, An S A, Han J, Kim M, Lee J. *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30(1): 1905410.
- [375] Perez-Benito J F. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, 108: 4853.
- [376] Sun H J, Zhou Y, Ren J, Qu X. *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2018**, 57(30): 9224.
- [377] Lancet T. *Lancet*, **2018**, 392(10152): 985.
- [378] Sharma P, Bhargava M. *Res. Dev.*, **2013**, 3: 63.
- [379] Nia H, Munn L, Jain R. *Science*, **2020**, 370(6516): 546.
- [380] Barar J, Omid Y. *Bioimpacts*, **2013**, 3: 149.
- [381] Stowe D, Camara A. *Antioxid Redox Sign.*, **2009**, 11(6): 1373.
- [382] Ren X Y, Chen D X, Wang Y, Li H F, Zhang Y B, Chen H Y, Li X, Huo M F. *J. Nanobiotechnology*, **2022**, 20: 92.
- [383] Yang J C, Yao H L, Guo Y D, Yang B W, Shi J L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61(17): e202200480.
- [384] Gao L Z, Fan K L, Yan X Y. *Theranostics*, **2017**, 7: 3207.
- [385] Yang P P, Tao J, Chen F Z, Chen Y Y, He J Q, Shen K, Zhao P, Li Y W. *Small*, **2021**, 17(7): e2005865.
- [386] He F, Mi L, Shen Y F, Mori T, Liu S Q, Zhang Y J. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2018**, 10(41): 35327.
- [387] Fan L, Xu X D, Zhu C H, Han J, Gao L Z, Xi J Q, Guo R. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10(5): 4502.
- [388] Ghosh S, Prasad S, Mugesh G. *Inorg. Chim. Acta*, **2019**, 484: 283.
- [389] Feng N, Li Q, Bai Q, Xu S C, Shi J X, Liu B J, Guo J C. *J. Colloid Interface Sci.*, **2022**, 618: 68.
- [390] Nonell S, Flors C. *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, **2016**, 1: 78262.
- [391] Liu F, Lin L, Zhang Y, Wang Y. B, Sheng S, Xu C. N, Tian H. Y, Chen X. S. *Adv. Mater.*, **2019**, 31(40): 1902885.
- [392] Zeng L L, Han Y X, Chen Z W, Jiang K, Golberg D, Weng Q H. *Adv. Sci.*, **2021**, 8(16): 2101184.
- [393] Liu Q Q, Tian J W, Liu J J, Zhu M S, Gao Z, Hu X Y, Midgley A C, Wu J, Wang X Y, Kong D L, Zhuang J, Liu J F, Yan X Y, Huang X L. *Adv. Mater.*, **2021**, 33(39): 2103128.
- [394] Chang M Y, Hou Z Y, Wang M, Li C X, Al Kheraif A A, Lin J. *Chem-Eur J.*, **2022**, 28(15): e202104081.
- [395] Xu B L, Cui Y, Wang W W, Li S S, Lyu C L, Wang S, Bao W E, Wang H Y, Qin M, Liu Z, Wei W, Liu H Y. *Adv. Mater.*, **2020**, 32(33): 2003563.
- [396] Gao S S, Lin H, Zhang H X, Yao H L, Chen Y, Shi J L. *Adv. Sci.*, **2019**, 6(3): 1801733.
- [397] Gong L, Zhang Y, Liu C, Zhang M, Han S. *Int. J. Nanomed.*, **2021**, 16: 8139.
- [398] Li Y, Yun K H, Lee H, Goh S, Suh Y, Choi Y. *Biomaterials*, **2019**, 197: 12.
- [399] Abrahamse H, Hamblin M. *Adv. Healthc. Mater.*, **2019**, 8(13): 347.
- [400] Son S, Kim J H, Wang X W, Zhang C L, Yoon S A, Shin J, Sharma A, Lee M H, Cheng L, Wu J S, Kim J S. *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, 49(11): 3244.
- [401] Hu Y P, Wang X C, Zhao P, Wang H, Gu W, Ye L. *Biomater. Sci-Uk*, **2020**, 8(10): 2931.
- [402] Zhang Y, Xu Y J, Sun D, Meng Z Y, Ying W W, Gao W, Hou R, Zheng Y Y, Cai X J, Hu B, Lin X F. *Chem. Eng. J.*, **2020**, 390: 124521.
- [403] Ma J, Qiu J J, Wang S R. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2020**, 3(6): 4925.
- [404] Ling J B, Chang Y Z, Yuan Z W, Chen Q, He L Z, Chen T F. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2022**, 14(24): 27651.
- [405] He H, Fei Z Y, Guo T, Hou Y, Li D, Wang K F, Ren F, Fan K L, Zhou D J, Xie C M, Wang C, Lu X. *Biomaterials*, **2022**, 280: 121272.
- [406] Zhang G R, Li N L, Qi Y F, Zhao Q Q, Zhan J, Yu D X. *Acta Biomater.*, **2022**, 142: 284.
- [407] Xi J, Wang Y, Gao X, Huang Y, Chen J, Chen Y, Fan L, Gao L. *Nano Today*, **2022**, 43.
- [408] Sun Z Y, Liu Q Q, Wang X Y, Wu J, Hu X Y, Liu M M, Zhang X Y, Wei Y H, Liu Z J, Liu H J, Chen R, Wang F, Midgley A C, Li A T, Yan X Y, Wang Y M, Zhuang J, Huang X L. *Theranostics*, **2022**, 12(3): 1132.
- [409] Chellat M F, Raguž L, Riedl R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55(23): 6600.
- [410] Chen Z W, Wang Z Z, Ren J, Qu X. *Accounts Chem. Res.*, **2018**, 51(3): 789.
- [411] Wambaugh M A, Denham S T, Brammer B, Stonhill M A, Brown J C S. *Elife*, **2020**, 9: e54160.
- [412] Wiersinga W J, Rhodes A, Cheng A C, Peacock S J, Prescott H C. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*, **2020**, 324(8): 782.
- [413] Fu J J, Shen T, Wu J, Wang C. *Journal of Inorganic Materials*, **2021**, 36(3): 257. (傅佳骏, 沈涛, 吴佳, 王成. 无机材料学报, **2021**, 36(3): 257.)
- [414] Wu Q Z, Zou S J, Wang Q, Chen L, Yan X Y, Gao L Z. *Nanotechnol. Rev.*, **2021**, 10(1): 1277.
- [415] Qin T, Ma R N, Yin Y Y, Miao X Y, Chen S J, Fan K L, Xi J Q, Liu Q, Gu Y H, Yin Y C, Hu J, Liu X F, Peng D X, Gao L Z. *Theranostics*, **2019**, 9(23): 6920.

- [416] Wang Q, Jiang J, Gao L Z. *Wires Nanomed. Nanobi.*, **2022**, 14 (2): e1769.
- [417] Hu W C, Younis M R, Zhou Y, Wang C, Xia X. *Small*, **2020**, 16(23): e2000553.
- [418] Liu Y H, Xu B L, Lu M Z, Li S S, Guo J, Chen F Z, Xiong X L, Yin Z, Liu H Y, Zhou D S. *Bioact. Mater.*, **2022**, 12: 246.
- [419] Pan M. M, Ouyang Y, Song Y. L, Si L. Q, Jiang M, Yu X, Xu L, Willner I. *Small*, **2022**, 18 (23): 2200548.
- [420] Natalio F, André R, Hartog A F, Stoll B, Jochum K P, Wever R, Tremel W. *Nat. Nanotechnol.*, **2012**, 7(8): 530.
- [421] Singh S, Ghosh S, Pal V K, Munshi M, Shekar P, Narasimha Murthy D T, Mughesh G, Singh A. *EMBO Mol. Med.*, **2021**, 13 (5): e13314.
- [422] Li Y, Fu R Z, Duan Z G, Zhu C H, Fan D D. *Adv. Healthc. Mater.*, **2022**, 11(2): 2101849.
- [423] Liu Z W, Wang F M, Ren J, Qu X. *Biomaterials*, **2019**, 208: 21.
- [424] Xi J Q, An L F, Wei G, Huang Y L, Li D D, Fan L, Gao L Z. *Biomater. Sci-Uk*, **2020**, 8(22): 6225.
- [425] Wang X W, Shi Q Q, Zha Z B, Zhu D D, Zheng L R, Shi L, Wei X W, Lian L, Wu K L, Cheng L. *Bioact. Mater.*, **2021**, 6: 4389.
- [426] Deng Q Q, Zhang L, Liu X M, You Y W, Ren J S, Qu X G. *Chem. Commun.*, **2022**, 58(55): 7634.
- [427] D'Avignon L C, Hogan B K, Murray C K, Loo F L, Hospenthal D R, Cancio L C, Kim S H, Renz E M, Barillo D, Holcomb J B, Wade C E, Wolf S E. *Burns*, **2010**, 36(6): 773.
- [428] Norbury W, Herndon D N, Tanksley J, Jeschke M G, Finnerty C C. *Surg. Infect.*, **2016**, 17(2): 250.
- [429] Chen L F, Xing S H, Lei Y L, Chen Q S, Zou Z, Quan K, Qing Z H, Liu J W, Yang R H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(44): 23534.
- [430] Niu J S, Sun Y H, Wang F M, Zhao C Q, Ren J S, Qu X G. *Chem. Mater.*, **2018**, 30(20): 7027.
- [431] Li Y Q, Liu J W. *Materials Horizons*, **2021**, 8(2): 336.
- [432] Mai H T, Wang Y, Li S, Jia R Z, Li S X, Peng Q, Xie Y, Hu X, Wu S. *Chem. Commun.*, **2019**, 55(51): 7374.
- [433] Liu X P, Yan Z Q, Zhang Y, Liu Z W, Sun Y H, Ren J S, Qu X G. *ACS Nano*, **2019**, 13(5): 5222.
- [434] Bedoya-Correa C M, Rincón Rodríguez R J, Parada-Sanchez M T. *J. Oral Biosci.*, **2019**, 61(1): 22.
- [435] Forssten S D, Björklund M, Ouwehand A C. *Nutrients*, **2010**, 2 (3): 290.
- [436] Gao L Z, Liu Y, Kim D, Li Y, Hwang G, Naha P, Cormode D, Koo H. *Biomaterials*, **2016**, 101: 272.
- [437] Fang J, Wang H, Bao X F, Ni Y X, Teng Y, Liu J S, Sun X L, Sun Y, Li H D, Zhou Y M. *Carbon*, **2020**, 169: 370.
- [438] Hwang G, Paula A J, Hunter E E, Liu Y, Babeer A, Karabucak B, Stebe K, Kumar V, Steager E, Koo H. *Sci. Robot.*, **2019**, 4(29): eaaw2388.
- [439] Qiu H, Pu F, Liu Z W, Deng Q Q, Sun P P, Ren J S, Qu X G. *Small*, **2019**, 15(36): 1902522.
- [440] Shen X Y, Ma R N, Huang Y X, Chen L, Xu Z B, Li D D, Meng X Q, Fan K L, Xi J Q, Yan X Y, Koo H, Yang Y L, Jiang J, Gao L Z. *Nano Today*, **2020**, 35: 100981.
- [441] Zhang L F, Zhang L, Deng H Y, Li H, Tang W, Guan L Y, Qiu Y, Donovan M, Chen Z, Tan W. *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1): 2002.
- [442] Zhang J X, Chen Z T, Kong J L, Liang Y L, Chen K, Chang Y A, Yuan H, Wang Y J, Liang H J, Li J C, Mao M R, Li J, Xing G M. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2020**, 12(26): 29013.
- [443] Shi S R, Wu S, Shen Y R, Zhang S, Xiao Y Q, He X, Gong J S, Farnell Y, Tang Y, Huang Y X, Gao L Z. *Theranostics*, **2018**, 8(22): 6149.
- [444] Shen Y R, Xiao Y Q, Zhang S, Wu S E, Gao L Z, Shi S R. *Front. Physiol.*, **2020**, 10: 1580.
- [445] Ding L, Jiang J, Cheng L, Wang Y, Zhang W, Li D, Xu Z, Jiang J, Gao L, Li Z. *ACS Applied Bio Materials*, **2021**, 4(5): 3773.
- [446] Xi J Q, An L F, Huang Y L, Jiang J, Wang Y Q, Wei G, Xu Z L, Fan L, Gao L Z. *Small*, **2021**, 17(13): e2005473.
- [447] Cao Z C, Wang H M, Chen J L, Zhang Y N, Mo Q Y, Zhang P, Wang M Y, Liu H Y, Bao X Y, Sun Y Z, Zhang W, Yao Q Q. *Bioact. Mater.*, **2023**, 20: 221.
- [448] Cao-Milán R, He L D, Shorkey S, Tonga G Y, Wang L S, Zhang X Z, Uddin I, Das R, Sulak M, Rotello V M. *Mol. Syst. Des. Eng.*, **2017**, 2(5): 624.
- [449] Cao-Milán R, Gopalakrishnan S, He L D, Huang R, Wang L S, Castellanos L, Luther D C, Landis R F, Makabenta J M V, Li C H, Zhang X Z, Scaletti F, Vachet R W, Rotello V M. *Chem*, **2020**, 6(5): 1113.
- [450] Huang R, Li C H, Cao-Milán R, He L D, Makabenta J M, Zhang X Z, Yu E L, Rotello V M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142(24): 10723.
- [451] Hardie J, Makabenta J M, Gupta A, Huang R, Cao-Milán R, Goswami R, Zhang X Z, Abdulpurkar P, Farkas M E, Rotello V M. *Mater. Horiz.*, **2022**, 9(5): 1489.
- [452] Niu J S, Zhao C Q, Liu C, Ren J, Qu X. *Chemistry of Materials*, **2021**, 33(20): 8052.
- [453] Lejars M, Margaillan A, Bressy C. *Chemical Reviews*, **2012**, 112(8): 4347.
- [454] Herget K, Hubach P, Pusch S, Deglmann P, Götz H, Gorelik T E, Gural'skiy I A, Pflitzner F, Link T, Schenk S, Panthöfer M, Ksenofontov V, Kolb U, Opatz T, André R, Tremel W. *Adv. Mater.*, **2017**, 29(4): 1603823.
- [455] Wang W, Luo Q, Li J Y, Li L Q, Li Y H, Huo X B, Du X W, Li Z S, Wang N. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32 (36): 2205461.
- [456] Herget K, Frerichs H, Pflitzner F, Tahir M, Tremel W. *Adv. Mater.*, **2018**, 30(36): 1707073.
- [457] Perlin D S, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. *Lancet Infect. Dis.*, **2017**, 17(12): e383.
- [458] Abdelhamid H, Mahmoud G, Sharmoukh W. *J. Mater. Chem.*

- B*, **2020**, 8(33): 7548.
- [459] Li X, Wu X M, Yuan T, Zhu J R, Yang Y L. *Biochem. Eng. J.*, **2021**, 175: 108139.
- [460] Adamson C, Chibale K, Goss R, Jaspars M, Newman D, Dorrington R. *Chemical Society Reviews*, **2021**, 50(6): 3647.
- [461] De Clercq E, Li G D. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2016**, 29(3): 695.
- [462] Zhou J R, Krishnan N, Jiang Y, Fang R H, Zhang L F. *Nano Today*, **2021**, 36: 101031.
- [463] Qin T, Ma S, Miao X, Tang Y, Huangfu D D, Wang J Y, Jiang J, Xu N, Yin Y C, Chen S J, Liu X F, Yin Y Y, Peng D, Gao L Z. *Adv. Sci.*, **2020**, 7(18): 2000771.
- [464] Liu Y Q, Mao Y Y, Xu E Q, Jia H M, Zhang S, Dawson V, Dawson T, Li Y M, Zheng Z, He W W, Mao X B. *Nano Today*, **2021**, 36: 101027.
- [465] Shin H Y, Park T J, Kim M I. *J. Nanomater.*, **2015**, 2015: 1.
- [466] Ragg R, Tahir M N, Tremel W. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2016**, 2016(13/14): 1906.
- [467] Liang M M, Fan K L, Pan Y, Jiang H, Wang F, Yang D L, Lu D, Feng J, Zhao J J, Yang L, Yan X Y. *Analytical Chemistry*, **2013**, 85(1): 308.
- [468] Yang H Y, Sun Z P, Qin X G, Wu H Y, Zhang H Z, Liu G. *Food Chem.*, **2022**, 376: 131906.
- [469] Song G C, Zhang J J, Huang H X, Wang X, He X Y, Luo Y B, Li J C, Huang K L, Cheng N. *Food Chem.*, **2022**, 387: 132896.
- [470] Sun Y, Wei J, Zou J, Cheng Z, Huang Z, Gu L, Zhong Z, Li S, Wang Y, Li P. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **2021**, 11(5): 653.
- [471] Zhang S T, Li H, Wang Z Y, Liu J, Zhang H L, Wang B D, Yang Z Y. *Nanoscale*, **2015**, 7(18): 8495.
- [472] Li W, Chen B B, Zhang H X, Sun Y H, Wang J, Zhang J L, Fu Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 66: 25.
- [473] Han K, Choi J S, Kwon J. *Sci. Rep.*, **2017**, 7(1): 2806.
- [474] Logan N, McVey C, Elliott C, Cao C. *Nano Res.*, **2020**, 13: 989.
- [475] Fu Y, Zhang H, Dai S, Zhi X, Zhang J, Li W. *Analyst*, **2015**, 140(19): 6676.
- [476] Liu Y, Ding D, Zhen Y, Guo R. *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 92: 140.
- [477] Liu B W, Han X X, Liu J W. *Nanoscale*, **2016**, 8(28): 13620.
- [478] Xie Z J, Shi M, Wang L Y, Peng C F, Wei X L. *Microchim Acta*, **2020**, 187(4): 1.
- [479] Zou W, Tang Y, Zeng H, Wang C, Wu Y. *Journal of Hazardous Materials*, **2021**, 417: 125994.
- [480] Sharma T K, Ramanathan R, Weerathunge P, Mohammadtaheri M, Daima H K, Shukla R, Bansal V. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(100): 15856.
- [481] Lien C W, Unnikrishnan B, Harroun S G, Wang C M, Chang J Y, Chang H T, Huang C C. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 102: 510.
- [482] Singh S, Tripathi P, Kumar N, Nara S. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 92: 280.
- [483] Liang X, Wang X, Zhang Y, Huang B, Han L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2022**, 70(12): 3898.
- [484] Ge J, Yang L, Li Z, Wan Y, Mao D, Deng R, Zhou Q, Yang Y, Tan W. *Journal of Hazardous Materials*, **2022**, 129199.
- [485] Santos A L, Cebola M, Santos D. *Energies*, **2021**, 14: 3193.
- [486] Boruah P. K, Das M. R. *Journal of Hazardous Materials*, **2020**, 385: 121516.
- [487] Boruah P K, Darabdhar G, Das M. *Chemosphere*, **2021**, 268: 129328.
- [488] Tran T, Nguyen P, Le T N, Kim M. *Biosensors and Bioelectronics*, **2021**, 182: 113187.
- [489] Khairy M, Ayoub H. A, Banks C. E. *Food Chemistry*, **2018**, 255: 104.
- [490] Zhu X Y, Lin L, Wu R M, Zhu Y F, Sheng Y Y, Nie P, Liu P, Xu L L, Wen Y P. *Biosensors and Bioelectronics*, **2021**, 179: 113062.
- [491] Zhu X, Gao L, Tang L, Peng B, Huang H W, Wang J J, Yu J F, Ouyang X L, Tan J S. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 146: 111756.
- [492] Li S H, Ma X H, Pang C H, Wang M Y, Yin G H, Xu Z, Li J P, Luo J H. *Biosensors and Bioelectronics*, **2021**, 176: 112944.
- [493] Jiang G H, Wang Z Y, Zong S F, Yang K, Zhu K, Cui Y P. *J. Hazard. Mater.*, **2021**, 408: 124426.
- [494] Zeng R, Luo Z, Zhang L, Tang D. *Analytical Chemistry*, **2018**, 90(20): 12299.
- [495] Weerathunge P, Sharma T. K, Ramanathan R, Bansal V. *Advanced Environmental Analysis: Applications of Nanomaterials*. The Royal Society of Chemistry, **2017**, 2: 108.
- [496] Osredkar J. *J. Clin. Toxicol.*, **2011**, 2013: 1.
- [497] Zhu Y, Wu J, Han L, Wang X, Li W, Guo H, Wei H. *Analytical Chemistry*, **2020**, 92(11): 7444.
- [498] Ha E, Basu N, Bose-O' Reilly S, Dórea J G, McSorley E, Sakamoto M, Chan H M. *Environ. Res.*, **2017**, 152: 419.
- [499] Zhang J B, Zhuang J, Gao L Z, Zhang Y, Gu N, Feng J, Yang D L, Zhu J D, Yan X Y. *Chemosphere*, **2008**, 73(9): 1524.
- [500] Zuo X L, Peng C, Huang Q, Song S P, Wang L H, Li D, Fan C. *Nano Res.*, **2009**, 2: 617.
- [501] Zhang S X, Zhao X L, Niu H Y, Shi Y L, Cai Y Q, Jiang G. *J. Hazard. Mater.*, **2009**, 167(1/3): 560.
- [502] Wang N, Zhu L, Wang D, Wang M, Lin Z, Tang H. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2010**, 17(3): 526.
- [503] Yan J C, Lei M, Zhu L H, Anjum M N, Zou J, Tang H Q. *J. Hazard. Mater.*, **2011**, 186(2/3): 1398.
- [504] Jiang J Z, Zou J, Zhu L H, Huang L, Jiang H P, Zhang Y X. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2011**, 11(6): 4793.
- [505] Huang R X, Fang Z, Yan X M, Cheng W. *Chem. Eng. J.*, **2012**, 197: 242.
- [506] Xu L, Wang J. *Applied Catalysis B: Environmental*, **2012**, 123/124: 117.
- [507] Xu L, Wang J. *J. Hazard. Mater.*, **2011**, 186(1): 256.

- [508] Xu L, Wang J. *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46(18): 10145.
- [509] Tian S H, Tu Y T, Chen D S, Chen X X, Xiong Y. *Chem. Eng. J.*, **2011**, 169: 31.
- [510] Niu H Y, Zhang D, Zhang S X, Zhang X L, Meng Z F, Cai Y Q. *J. Hazard. Mater.*, **2011**, 190(1/3): 559.
- [511] Li L, Ai L, Zhang C, Jiang J. *Nanoscale*, **2014**, 6:4627.
- [512] Deng J H, Wen X, Li J X. *Environ. Technol.*, **2016**, 37: 2214.
- [513] Zhang Y, Xu S, Luo Y, Pan S, Ding H, Li G. *Journal of Materials Chemistry*, **2011**, 21(11).
- [514] Zhu M, Diao G. *J. Phys. Chem. C*, **2011**, 115(39): 18923.
- [515] Luo W, Zhu L H, Wang N, Tang H Q, Cao M J, She Y B. *Environmental Science & Technology*, **2010**, 44(5): 1786.
- [516] Wu X C, Zhang Y, Han T, Wu H X, Guo S W, Zhang J Y. *RSC Adv.*, **2014**, 4: 3299.
- [517] Janoš P, Kuraň P, Pilařová V, Trügl J, Štastný M, Pelant O, Henych J, Bakardjieva S, Životský O, Kormunda M, Mazanec K, Skoumal M. *Chem. Eng. J.*, **2015**, 262: 747.
- [518] Song G, Li J C, Majid Z, Xu W, He X, Yao Z, Luo Y, Huang K, Cheng N. *Food Chem.*, **2022**, 390: 133127.
- [519] Niu H Y, Dizhang, Meng Z F, Cai Y Q. *J. Hazard. Mater.*, **2012**, 227/228: 195.
- [520] Peng C, Jiang B, Liu Q, Guo Z, Xu Z, Huang Q, Xu H, Tai R, Fan C. *Energy & Environmental Science*, **2011**, 4(6).
- [521] Safarik I, Prochazkova J, Schroer M A, Garamus V M, Kopcansky P, Timko M, Rajnak M, Karpets M, Ivankov O I, Avdeev M V, Petrenko V I, Bulavin L, Pospiskova K. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13(20): 23627.
- [522] Chen Q, Liu Y, Lu Y, Hou Y, Zhang X, Shi W, Huang Y. *Journal of Hazardous Materials*, **2022**, 422: 126929.
- [523] Lin Y, Wang F, Yu J, Zhang X, Lu G. P. *Journal of Hazardous Materials*, **2022**, 425: 127763.
- [524] Chen T. M, Xiao J, Yang G. W. *RSC Adv.*, **2016**, 6(74): 70124.
- [525] Feng Y B, Hong L, Liu A L, Chen W D, Li G W, Chen W, Xia X H. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **2015**, 12(2): 653.
- [526] Zhang Z, Hao J, Yang W, Lu B, Ke X, Zhang B, Tang J. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5(9): 3809.
- [527] Zeb A, Xie X, Yousaf A B, Imran M, Wen T, Wang Z, Guo H L, Jiang Y F, Qazi I A, Xu A W. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8(44): 30126.
- [528] Li S, Hou Y, Chen Q, Zhang X, Cao H, Huang Y. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2019**, 12(2): 2581.
- [529] Yang W, Li J, Lyu Y, Yan X, Yang P, Zuo M. *Journal of Cleaner Production*, **2021**, 309: 127294.
- [530] Wang J H, Huang R L, Qi W, Su R, Binks B, He Z M. *Applied Catalysis B: Environmental*, **2019**, 254: 452.
- [531] Sun M M, Dang Y B, Du R, Lu Z W, Wang Y Y, Wang X X, Song C, Liu T, Wang G T, Ye J S, Rao H B. *Chem. Eng. J.*, **2021**, 425: 130586.
- [532] Wang J H, Huang R L, Qi W, Su R, He Z M. *Chem. Eng. J.*, **2022**, 434: 134677.
- [533] Hu M, Korschelt K, Viel M, Wiesmann N, Kappl M, Brieger J, Landfester K, Therien-Aubin H, Tremel W. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10:44722.
- [534] Jain S, Panigrahi A, Sarma T. *ACS Omega*, **2019**, 4: 13153.
- [535] Yang H K, Xue W, Liu M J, Yu K, Yu W Z. *Water Research*, **2020**, 174: 115637.
- [536] Yang H K, Wu X, Su L, Ma Y M, Graham N, Yu W Z. *Water Research*, **2020**, 171: 115491.
- [537] Cheng R, Li G Q, Cheng C, Shi L, Zheng X, Ma Z. *RSC Adv.*, **2015**, 5: 66927.
- [538] Wan D, Li W B, Wang G H, Chen K, Lu L, Hu Q. *Appl. Surf. Sci.*, **2015**, 349: 988.
- [539] Bian J Y, Liao Y, Liu R, An X Q, Hu C Z, Liu H J, Qu J. *Water Research*, **2022**, 218: 118465.
- [540] Gao W, He J, Chen L, Meng X, Ma Y, Cheng L, Tu K, Gao X, Liu C, Zhang M, Fan K, Pang D W, Yan X Y. *Nature Communications*, **2023**, 14(1):1.
- [541] Hu M, Korschelt K, Viel M, Wiesmann N, Kappl M, Brieger J, Landfester K, Therien-Aubin H, Tremel W. *ACS Applied Materials Interfaces*, **2018**, 10: 44722.
- [542] Vernekar A A, Das T, Mughesh G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55: 1412.
- [543] Dong H J, Du W, Dong J, Che R C, Kong F, Cheng W L, Ma M, Gu N, Zhang Y. *Nature Commun.*, **2022**, 13(1): 5365.

## 附录一 纳米酶领域可用的纳米颗粒相关标准物质(GBW)列表

## Appendix 1 List of reference materials (GBW) related to nanozyme

序号	编号	中文名称
1	GBW12037	金纳米粒度标准物质
2	GBW12038	金纳米粒度标准物质
3	GBW12039	纳米二氧化钛粒度标准物质
4	GBW12040	纳米二氧化钛粒度标准物质
5	GBW13915	纳米二氧化钛比表面积标准物质
6	GBW13916	纳米二氧化钛比表面积标准物质
7	GBW(E) 120126	纳米级金颗粒粒度标准物质
8	GBW(E) 120127	纳米级金颗粒粒度标准物质
9	GBW(E) 120150	纳米级金颗粒粒度标准物质
10	GBW(E) 120192	纳米银粒度标准物质
11	GBW(E) 120193	纳米银粒度标准物质
12	GBW(E) 130387	纳米 $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 弛豫率标准物质
13	GBW(E) 130407	CTAB 包覆金纳米棒标准物质
14	GBW(E) 130408	PSS 包覆金纳米棒标准物质
15	GBW(E) 130409	PDDAC 包覆金纳米棒标准物质
16	GBW(E) 130410	硒化镉量子点纳米晶体标准物质
17	GBW(E) 130411	硒化镉/硫化锌量子点纳米晶体标准物质
18	GBW(E) 130474	PSS 包覆 LSPR 位于 640 nm 金纳米棒标准物质
19	GBW(E) 130475	PDDAC 包覆 LSPR 位于 640 nm 金纳米棒标准物质
20	GBW(E) 130476	PSS 包覆 LSPR 位于 720 nm 金纳米棒标准物质
21	GBW(E) 130477	PDDAC 包覆 LSPR 位于 720 nm 金纳米棒标准物质

## 附录二 纳米酶领域可用的纳米颗粒国际标准物质列表

## Appendix 2 List of international reference materials related to nanozyme

序号	描述
1	Titanium Dioxide Nanomaterial(二氧化钛纳米材料)
2	Powder Diffraction Line Profile Standard for Crystallite Size Analysis (Nano-Crystalline ZnO Powder)(晶粒尺寸分析用粉末衍射线轮廓标准(氧化锌纳米晶粉末))
3	Gold Nanoparticles (Nominal 10 nm Diameter)(金纳米粒子(标称直径 10 nm))
4	Polyvinylpyrrolidone Coated Silver Nanoparticles (Nominal Diameter 75 nm)(聚乙烯吡咯烷酮包覆的银纳米粒子(标称直径 75 nm))
5	Single-Wall Carbon Nanotubes (Dispersed, Three Length-Resolved Populations)(单壁碳纳米管)
6	Nanoscale Reference Materials-Boron Nitride Nanotubes(纳米标准物质-氮化硼纳米管)
7	Single-wall carbon nanotube certified reference material(单壁碳纳米管标准物质)

注 1、2、3、4、5 项来自美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST), 6、7 来自加拿大国家研究理事会(National Research Council Canada, NRC)。