

纳米酶与病毒检测

刘 键¹, 刘 昕²

(1. 中国检验检疫科学研究院卫生检验与检疫研究所, 北京 100176; 2. 北京工业大学环境与生命学部, 北京 100124)

摘要: 综述了纳米酶的发展及其在病毒检测中的应用, 介绍当前纳米酶研究进展, 以期推动纳米酶在医学诊断治疗等领域的广泛应用. 通过对比当前常用的检测方法, 总结了部分具有代表性的纳米酶检测方法, 归纳基于纳米酶特性研发出的检测新技术、新方法及其思路与效果, 分析纳米酶面临的挑战. 与天然酶相比, 纳米酶拥有优越的特性, 不仅在病毒检测领域, 而且在其他生物医学、环境保护、疾病治疗等领域发挥越来越重要的作用. 随着人们对纳米酶性质和催化机理的深入研究, 必将设计出更多功能化的纳米酶, 发展出新的快速高效的检测技术.

关键词: 纳米酶; 纳米材料; 酶活性; 高灵敏; 病毒检测; 催化机理

中图分类号: Q 81

文献标志码: A

文章编号: 0254-0037(2021)01-0093-10

doi: 10.11936/bjutxb2019120016

Nanozymes and Virus Detection

LIU Jian¹, LIU Xin²

(1. Institute of Health Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;

2. Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: This paper reviewed the development of nanozymes and their application in virus detection, and introduced the current research progress of nanozymes to promote the wide application of nanozymes in medical diagnosis and treatment. By comparing the commonly used detection methods, some detection methods of nanozymes were presented. The new detection technology and methods based on the characteristics of nanozymes were summarized, as well as their ideas and effects. Additionally, the remaining challenges and unsolved problems were also highlighted. Compared with natural enzymes, nanozymes have superior properties and play an increasingly important role not only in virus detection, but also in other fields such as biomedicine, environmental protection and disease treatment. With the further research on the properties and catalytic mechanism of nanozymes, more functional nanozymes will be designed and new fast and efficient detection techniques will be developed.

Key words: nanozymes; nanomaterials; enzyme activity; highly sensitive; virus detection; catalytic mechanism

病毒是造成全球范围内疾病发病率和死亡率居高不下下的最主要的病原体, 由于病毒的大小在纳米级, 不便直接观察到其形状以及研究它们的结构. 同时, 病毒的结构相当简单, 通常只有蛋白质衣壳及

核酸内核, 这种结构使病毒能随着环境变化通过基因替换或基因重组等方式发生快速的突变和进化, 从而逃避免疫监测或免疫抑制, 增大病愈难度. 因此, 发展快速、高效的病毒检测方法, 是当前迫切的

收稿日期: 2019-12-19

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项资金资助项目(2016JK013)

作者简介: 刘 键(1978—), 男, 副研究员, 主要从事传染病检测方面的研究, E-mail: liuj9919@163.com

通信作者: 刘 昕(1974—), 女, 讲师, 主要从事分子生物学方面的研究, E-mail: dbliuxin@bjut.edu.cn

社会需求,也始终是科研工作者不断研究探索的方向。

目前,常用的病毒检测方法有病原体培养、核酸检测、免疫学方法等。病原体分离培养和核酸检测都需要专门的实验设备和专业技术人员且技术繁杂。免疫学方法有酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫荧光、胶体金免疫层析等,其中胶体金免疫层析技术快捷方便,非常适合现场快速检测,但其灵敏度低。

2007年,中国科学院阎锡蕴院士发现了纳米磁颗粒具有辣根过氧化物酶活性,能使辣根过氧化物酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine, TMB)、邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPD)、2,2'-二氨基联苯胺(2,2'-diaminobenzidine, DAB)变色,增加其检测灵敏度,从而展开了纳米酶学的研究。随着纳米材料在生物医学领域的应用研究及纳米酶学的发展,纳米酶所具有的内在酶活性、独特的理化性质、稳定性、经济性等优势,逐渐发展为替代天然酶的最佳选择,基于纳米酶的病毒检测方法也吸引了大量科学家进行探索和研究。

1 病毒概述

病毒是造成全球范围内疾病发病率和死亡率居高不下的最主要的病原体。艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)在全球的蔓延,始终没有放慢脚步,对人类造成巨大的损失;2003年,在中国横行肆虐的重症急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)令全世界人民心有余悸,从中国广东省开始,SARS病毒在短短5个月里传播到世界上30个国家和地区,截至2003年7月5日,全球有8439人受到感染,812人死于SARS^[1];1997年在中国香港首次发现人感染禽流感病毒H5N1病例^[2],死者是个3岁男孩,在那次病毒爆发中,共有18个人受到传染,6人死亡;2013年首次在中国安徽省发现的H7N9^[3],截至2015年1月10日,全国已确诊134人,37人死亡,2018年H7N9的死亡率达到38%^[4];寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)最早于1947年首次分离于非洲恒河猴,2015年引起南美洲和加勒比地区发生大规模疾病爆发,寨卡病毒感染能引起一些严重的潜在并发症,如新生儿小头症和格林巴利综合症,因此引起了社会的恐慌和全球的广泛关注^[5],2016年中国确诊了一例ZIKV输入性感染病例;中东呼吸综合征冠状病毒(middle

east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)首次于2012年从沙特阿拉伯2名病人体内分离发现,临床症状与SARS相似,所以也称为“类SARS-CoV病毒”,从2012年6月到2015年4月20日期间沙特阿拉伯病感染人数达到981例,死亡率高达43.6%^[6];2014年,源自西非的埃博拉病毒(Ebola virus, EBoV)引起大规模疾病爆发,截止到2015年4月14日,超过25515人感染,10572人死亡^[7]。这些病毒都对人类的生命财产构成巨大威胁。

由于病毒的大小在纳米级(20~900 nm),相对于其他病原体,例如细菌或真菌这些在光学显微镜下就能观察到的致病菌来说,只有在放大倍数达到10万倍以上的电子显微镜,才能直接观察到病毒的形状,研究它们的结构。这使得病毒更加难以观察、检测和分离。

同时,病毒的结构相当简单,通常只有蛋白质衣壳及核酸内核,这种简单结构使病毒能随着环境变化通过基因替换或基因重组等方式发生快速的突变和进化,使人类很难建立简便、长效、普适的体系进行病毒检测。

除了病毒自身基因突变和进化外,人类活动和生物迁徙等因素也会促使感染的传播。随着全球一体化程度的不断深入,人群的流动性大大增加,病毒感染引发的大规模传染病在人群中迅速扩散,造成巨大的社会、经济和财产损失^[8]。

病毒感染后,有时会因为临床表现不明确,病人常被误诊。快速有效的病毒检测方法,可以明确感染是否发生以及感染病毒的类型,不仅为临床尽早针对病因用药和制定准确的治疗方案提供有效的实验依据,而且可以立即采取公共卫生防控措施,及时限制它们的传播。

采用针对性强的诊断工具,发展快速、高效的病毒检测方法,对疾病的诊断治疗和公共卫生的监测都非常重要,是当前迫切需要解决的社会问题。新的检测方法的不断探索,也是当今生物医学研究的热点问题之一。

2 病毒传统检测方法

2.1 病原体分离培养法

传统的病毒检测方法是直接从病体血液、组织或分泌物中分离出病毒,接下来进行细胞培养或组织培养,通过观察病毒导致的细胞病变效应来量化感染病毒,通过检测半数组织细胞感染剂量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)衡量病毒滴度,

这是证实病毒感染的准确指标,也是病毒检测的“金标准”。

病原体分离培养法的关键点就是选择适合病毒体外培养的细胞系和培养条件,这些并不容易获得,而且不是所有病毒都可以培养,例如:诺如病毒(Norovirus)^[9]以及乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)^[10]就不能通过现有实验室的任何宿主细胞系进行培养,因此应用范围较为局限。同时,分离培养法耗时、耗力、实验花费大^[11],这些缺点都与当前发展快速、便捷的检测方法不相适应。

2.2 免疫学检测

免疫系统具有识别外来抗原性异物的功能,病毒作为外来入侵的抗原,入侵人体后能被人体免疫系统识别,并产生特异性抗体。病毒血清学检测就是利用抗原抗体特异性识别和结合的原理检测病毒及其抗体的技术。血清学检测常用方法包括酶联免疫吸附试验、放射免疫试验、化学发光免疫测定、免疫荧光方法、免疫印迹方法以及免疫层析试验等。

这些技术的主要原理都是利用特异性抗体与酶、放射性物质、化学发光或者荧光物质这样的信号报告系统相结合,产生底物复合物后经酶的作用发生颜色变化或者发出荧光、放射线等,来反映和指示病毒是否存在^[8]。这些方法不需要分离出病毒,操作相对方便,很多试剂也已经商品化。但是像肠道病毒、鼻病毒这样具有广泛的抗原异质性、缺乏交叉反应抗原的病毒,血清检测的准确性和可靠性就受到很大挑战,假阳性率较高^[12]。

在这些免疫学实验中,胶体金免疫层析技术最为快速简便,适合现场检测,但其灵敏度较低的缺点限制了其广泛推广。

2.3 核酸检测

1985年,核酸扩增——聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的发展和应^[13],使得病毒检测拓展到可直接检测病毒的遗传物质,基于PCR技术开展病原体检测的方法也得到广泛应用,陆续发展起来的反转录酶聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)、核酸杂交、基因芯片等方法,更是大大加速了医学检验事业的发展。但检测核酸的方法虽然灵敏度相对较高,但也存在一些弊端,如需要专业的技术人员操作,设备昂贵,需要特殊的实验条件。

核酸检测方法在病毒检测中耗时比较长,是该方法的一大弊端。例如:Shigemoto等^[14]用多重荧光RT-PCR方法检测诺如病毒,实验需要的时长6h;

刘乐庭等^[15]采用基于核酸序列的扩增技术,能准确检出H7亚型禽流感病毒,但通常需要4~6h;在HIV病毒的血液筛查中应用最广泛的定量核酸检测方法是反转录PCR法,利用雅培和罗氏等制造商提供的自动血浆处理器和检测设备,检测过程均需要6~8h^[16]。相比较,Duan等^[7]用纳米酶试纸条的方法检测埃博拉病毒,30min内就能得到精确的检测结果,消耗时长的优劣非常明显。

这些因素都导致核酸检测方法不能完全满足病毒快速筛查和实时检测的需求。

3 纳米酶的发展

酶是生物有机体内具有特定催化功能的蛋白质、核酸或蛋白-核酸复合体。天然酶催化效率相当高,并且具有底物专一性,但是天然酶稳定性差,容易失活,并且价格昂贵、不易获得。用化学方法合成既具有酶活性,又成本低廉、便于大量获得,还能在非生理条件下应用的人工模拟酶,一直是科学家努力的方向。

阎锡蕴院士课题组2007年首次研究发现无机纳米材料本身具有类似天然酶的催化活性^[17-18],打破Fe₃O₄纳米材料被认为是惰性无机物的传统观念,并建立过氧化物纳米酶动力学及催化活性检测的标准方法^[19],开启了新一代人工模拟酶发展的新篇章。

纳米酶是本身具有酶活性的纳米材料,它完全不同于过去将天然酶或者催化配基固定在纳米材料上从而发挥催化作用的物质^[17]。自2007年被首次发现后,已有上百种纳米酶被发现,模拟催化活性有过氧化物酶家族的过氧化物酶^[20-21]、谷胱甘肽过氧化物酶^[22]、卤素过氧化物酶^[23]等,氧化酶家族的葡萄糖氧化酶^[24]、亚硫酸氧化酶^[25]等,以及过氧化氢酶^[26]和超氧化物歧化酶^[27]等。目前,全世界已经有超过200个研究团队从事纳米酶研究,尤其在过去5年里有超过1100份关于纳米酶的研究报告发表^[28]。

3.1 纳米酶的优势

纳米酶相较于天然酶和其他人工模拟酶,具有独特的性能和优势。第一,纳米酶可以大规模生产,价格相对低廉。由于天然酶在体内的含量很低,比较难以大量获得,人工合成酶的过程复杂,成本较高,而无机纳米酶物质相比就很容易生产,且成本低、效率高。第二,纳米酶具有较强的稳定性。Gao等^[18]在研究中发现300nm粒径的Fe₃O₄磁纳米颗

粒在 pH 为 1 ~ 12、温度为 25 ~ 60 °C、 H_2O_2 浓度为 0.001 ~ 2.260 mol/L 的范围,均具有酶活性. 而天然酶的成分大多是蛋白质,遇到热、酸、碱等非生理条件,很容易变性失活. 第三,纳米酶很容易循环再利用. 纳米酶在催化过程中没有物质损失,可重复利用,并且回收相对便利,例如磁性纳米材料通过外加磁场即可回收. 第四,纳米酶双功能甚至多功能的理化特征,是天然酶或者其他人工模拟酶不可比拟的. 首先,纳米颗粒由于受到量子尺寸效应、表面效应等作用,往往具有电学、磁性、光学等独特性质,例如碳纳米点不仅具有催化活性,还可产生荧光^[29];其次,纳米酶能够随着环境变化改变活性或者酶的类型,比如在酸性环境下 (pH = 3.6) Fe_3O_4 纳米酶表现出过氧化物酶的活性,而在中性或者碱性条件下表现出过氧化氢酶的活性^[18];并且由于纳米材料比表面积大,表面电荷丰富,往往表面相原子配位不足,纳米材料表面形态复杂,可以实现异原子掺杂或者引入配体,实现多功能一体化.

鉴于纳米酶所具有的稳定性高、价格低廉和酶活性可调节等特性,将纳米酶方法应用到病毒检测中不仅符合当前发展实时快速检测技术的趋势,而且具有特殊的优势. 第一,利用纳米酶的多功能理化特征,将磁纳米材料的催化性能、磁性与显色效应结合,使催化、分离与显色指示同步实现,简化实验步骤,缩短实验时间;第二,纳米酶在病毒检测中通过显色反应,使检测信号扩大,不仅快速高效,灵敏度也显著提高;第三,金属纳米材料在催化反应过程中磁性不会发生改变,通过外加磁场能对纳米酶进行有效分离和回收,可实现重复利用.

3.2 纳米酶的催化机制

纳米酶受量子尺寸效应、界面效应、表面修饰等因素影响,催化活性主要取决于纳米材料表面的电子转移状况,通过调节纳米材料的大小、形状、结构、表面取代基等,改变纳米酶的催化活性. 许多纳米酶具有相同的催化活性,但是催化机制并不相同. 下面以几种主要的纳米酶为例,简要阐述其催化活性和催化机制.

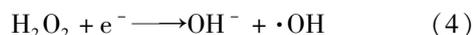
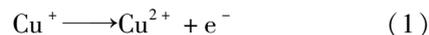
3.2.1 基于金属的纳米酶

基于金属的纳米酶通常由过渡金属氧化物、金属卤代物、金属硫化物或者贵金属等纳米材料构成,纳米酶和催化底物之间往往伴随着电子转移,在金属化合物中化合价发生变化,而在贵金属纳米材料中不发生化合价的变化,但是贵金属表面大量电子聚集,产生的活性氧物质 (reactive oxygen species,

ROS) 在氧化还原反应过程中起到重要作用.

Gao 等^[18] 研究表明, Fe_3O_4 纳米酶的催化活性主要受酶表面 Fe^{2+}/Fe^{3+} 间转换影响,在 H_2O_2 存在时,能催化底物 TMB 或 OPD 或 DAB 发生颜色反应. Chen 等^[30] 通过研究氧化还原电位发现, Fe^{2+}/Fe^{3+} 的标准氧化还原电位低于 TMB,说明 Fe^{2+}/Fe^{3+} 不能直接将电子从 TMB 传递到 H_2O_2 . 利用电子自旋共振 (electron spin resonance, ESR) 的方法,检测到在 Fe_3O_4 纳米酶存在的反应体系中有羟基自由基 ($\cdot OH$) 存在. Fe_3O_4 纳米酶的催化机制符合乒乓机制^[18],即 Fe_3O_4 纳米酶首先催化 H_2O_2 产生羟基自由基 ($\cdot OH$),之后 Fe_3O_4 纳米酶与羟基自由基 ($\cdot OH$) 复合物氧化氢供体底物 (如 TMB、OPD、DAB) 显色.

Shionoiri 等^[31] 在用诺如病毒的替代模型——猫杯状病毒 (feline calicivirus, FCV) 研究碘化亚铜纳米颗粒 (copper iodide nanoparticles, CuI NPs) 的抗病毒特性时,发现溶液中的 Cu^+ 通过类芬顿反应 (Fenton-like reactions) 产生了活性氧,正是超氧负离子 ($O_2^{\cdot -}$) 或羟基自由基 ($\cdot OH$) 这样的活性氧,导致病毒衣壳蛋白被氧化降解和破坏.



他们的研究还发现, CuI 纳米颗粒大量的表面积 (100 ~ 400 nm; 平均直径 160 nm) 促进了亚铜离子的有效释放. 这表明,纳米材料由于表面与界面效应,使物质的性质、性能发生了一些质变.

贵金属例如 Au、Pt 纳米酶在催化反应中不发生价态变化,贵金属纳米颗粒表面富集高密度自由电子,极易产生活性氧物质,例如氧分子在贵金属纳米材料表面活化裂解,形成单线态氧,使其具有过氧化物酶活性^[32]. 金纳米颗粒表面因为聚集了大量自由电子,被光激发后,电子振荡到远离原子核的一侧,而原子核在另一侧带正电荷,从而产生偶极等离子体^[8]. 光敏分子作为辅助因子,能够可逆地调节金纳米颗粒的催化活性^[33].

3.2.2 基于碳的纳米酶

碳基纳米材料由于具有丰富的比表面积、较好的吸附能力和电子传递性,作为纳米酶也越来越多地被应用到生物医学检测、疾病监控、治疗等多方面.

研究发现,富勒烯能够清除超氧负离子 ($O_2^{\cdot -}$)

自由基,具有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性^[34]. 碳纳米点、氧化石墨烯、碳纳米管等碳基纳米材料在双氧水的存在下,表现出过氧化物酶活性^[35]. 2011年,单壁纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)的过氧化物酶活性被发现^[36],在双氧水的存在下,能够催化底物TMB发生显色反应. 与辣根过氧化物酶相似,SWCNTs的催化活性依赖底物浓度,底物颜色表现出对反应时间的依赖性.

碳基纳米酶的作用机制逐渐被深入研究,Sun等^[37]通过选择性失活,首次阐明了石墨烯量子点(graphene quantum dots, GQDs)表面3种典型的含氧官能团在催化过程中的作用,其中羰基($-C=O$)作为催化活性位点,羧基($-COO^-$)作为底物结合位点,使石墨烯量子点在 H_2O_2 存在时发挥过氧化物酶活性. 同时,连接在碳原子上的羟基($-C-OH$)能够抑制过氧化物酶催化反应. 通过理论模拟计算发现, H_2O_2 进攻羰基($-C=O$)的双键形成中间产物,这是决定反应速率的关键步骤,需要跨越较高能垒($\Delta E = 0.90$ eV),随后中间产物通过较低的能垒($\Delta E = 0.09$ eV)裂解成为羟基自由基($\cdot OH$)和羰基($-C=O$),并且放出热量. 而由于氢键相互作用,羧基($-COO^-$)极易与 H_2O_2 相结合,结合能(-0.67 eV)低于羰基($-C=O$)或者碳羟基($-C-OH$)与 H_2O_2 的结合能(分别是 -0.30 、 -0.17 eV). 动力学模拟计算的结果与实验结果印证一致,即羰基($-C=O$)是催化活性位点,羧基($-COO^-$)是底物 H_2O_2 结合位点.

3.2.3 基于金属-碳杂体的纳米酶

碳纳米材料能够有效分散和稳定纳米颗粒和小分子,能显著提高模拟酶的活性. Fan等^[38]研究发现合成的 Fe_3O_4 与多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)复合物,过氧化物酶活性高于单独 Fe_3O_4 纳米酶,这是因为MWCNTs的作用使 Fe_3O_4 纳米颗粒稳定、不易聚集并且均匀分布,大大提高了其过氧化物酶活性;同时金属纳米材料所具有磁性没有改变,能够通过外加磁场对复合物进行有效分离和回收,经过5次回收后仍然具有过氧化物酶活性^[39]. Wang等^[40]研究表明,碳纳米管具有导电率高、表面积大、机械强度高、化学惰性强等特性,结合像 Fe_3O_4 纳米颗粒这样导电性差的物质,能够显著改善纳米酶活性. Xue等^[41]研究血红素与石墨烯的复合物,二者通过 $\pi-\pi$ 键堆叠相互作用而结合,由于石墨烯的支撑作用,使血红素保持

了天然酶中单分子状态的催化活性,具有非常高的催化能力和底物结合能力;同时,石墨烯载体还可以阻断卟啉分子的一侧,阻止过氧化氢从两侧进行攻击,导致血红蛋白因为被氧化而降低催化活性.

对纳米酶催化机制的了解,不仅可以促进构建更多催化活性高、靶向特异性强的纳米酶,同时也必将有助于启发纳米酶在实际应用方面的设计.

4 纳米酶在病毒检测中的应用

由于纳米酶具有较高的稳定性、低廉的价格和可调节的生物酶活性,越来越显示出广阔的应用前景,应用在体外检测方面也显示出强大的适用性和较强的灵敏度.

4.1 基于纳米酶的免疫试纸条法

阎锡蕴课题组继首次发现纳米酶之后,充分利用纳米酶的多功能理化特征,将磁纳米材料的催化活性、磁性与显色效应相结合,2015年成功研制用于埃博拉病毒(EBov)快速检测的“纳米酶试纸条”^[7]. 该技术将传统试纸条中的胶体金替换为磁纳米酶,利用纳米酶的磁性特征对样品进行分离和富集,同时利用纳米酶的催化特性使底物显色,测试灵敏度比常规试纸条法高100倍. 纳米酶试纸条的设计方案如图1所示,图1(a)为标准胶体金试纸条法;图1(b)用磁性纳米材料(magnetic nanoparticles, MNPs)代替胶体金作为探针,磁性纳米材料探针本身具有酶活性,能够催化底物发生显色反应,增强信号作用,使结果肉眼可见.

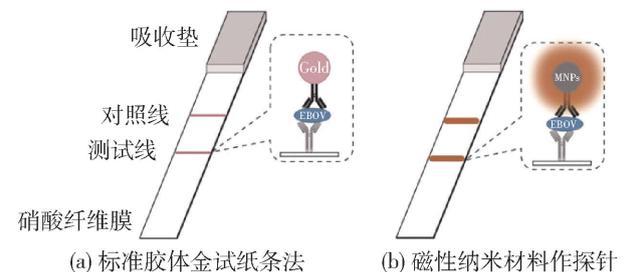


图1 纳米酶试纸条设计方案^[7]

Fig. 1 Nanozyme-strip design^[7]

这项新技术不仅为埃博拉等病毒的快速检测提供了一种简便手段,还可以通过切换探针上的抗体种类,应用于新布尼亚、流感等其他病毒的检测,随着科研人员的广泛研究,纳米酶在病毒检测应用上发挥了越来越重要的作用.

刘键等^[3]建立的免疫磁珠酶催化技术,用于H7N9流感病毒高灵敏检测,灵敏度比胶体金法可

提高 1~2 个数量级. 该方法利用磁纳米颗粒具有过氧化物酶活性的特征, 将 H7N9 鼠单克隆抗体 M-H7N9 与磁珠纳米颗粒孵育交联, 做成免疫磁纳米抗体探针. 用硝酸纤维素膜制作免疫磁纳米酶催化试纸条, 检测线(T 线)喷涂 H7N9 兔多克隆抗体 R-H7N9, 对照线(C 线)喷涂羊抗鼠抗体. 混合免疫磁纳米抗体探针与待测溶液, 插入免疫磁珠酶催化试纸条.

高敏感免疫磁珠酶催化试纸条检测技术如图 2 所示, 当免疫抗体探针与样品中的 H7N9 病原体结合后, 层析至试纸条的检测线(T 线)与对照线(C 线)时, 就会被 T 线喷涂的抗体捕获、与 C 线处的羊抗鼠抗体结合, 在 2 条线处形成磁珠纳米颗粒的聚集, 这时加入过氧化物酶的底物如 DAB, 在过氧化氢存在下, 磁性纳米颗粒的酶催化 DAB 发生显色反应, 生成的大量棕褐色沉淀将检测信号放大, 实现 H7N9 的快速高敏感检测.

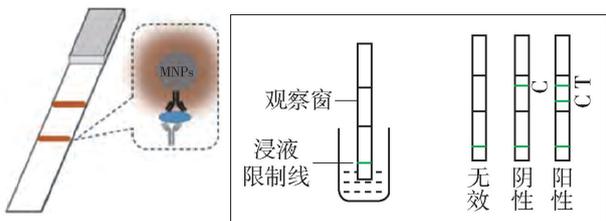


图 2 高敏感免疫磁珠酶催化试纸条检测技术^[3]

Fig. 2 High sensitive strip of immune-magnetic beads^[3]

4.2 基于纳米酶的比色免疫测定法

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是副黏病毒属的单链 RNA 病毒^[42], 能导致呼吸系统疾病, RSV 还能诱发其他疾病, 虽然致死率不高, 但是会造成全球范围的健康问题, 由于目前缺乏安全有效的疫苗, 发展高灵敏度的病毒检测方法, 进行早期诊断和治理尤为重要.

Zhan 等^[43] 创建了基于汞离子-金纳米颗粒-氧化石墨烯杂交体的比色免疫方法, 检测呼吸道合胞病毒. 该方法用杂交体与病毒抗体连接, 通过抗原抗体结合并在过氧化氢存在下与过氧化物酶底物 TMB 反应并显色, 病毒检出限 (limit of detection, LOD) 达到 0.04 pg/mL, 比商业化的酶联免疫测试盒 (LOD: 4 pg/mL) 灵敏度高 100 倍.

该方法应用了纳米材料的过氧化物酶活性, 同时采用金纳米颗粒 (AuNPs) 与氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 杂合, 如图 3 所示, 使金纳米颗粒附着在氧化石墨烯片层表面, 达到较高的分散

度, 受这种协同作用机制的影响, 相对于单独存在的金纳米颗粒或氧化石墨烯, 杂合体表现出显著提高的过氧化物酶活性. 在 H_2O_2 存在下, 能够使 TMB 氧化产生颜色反应.

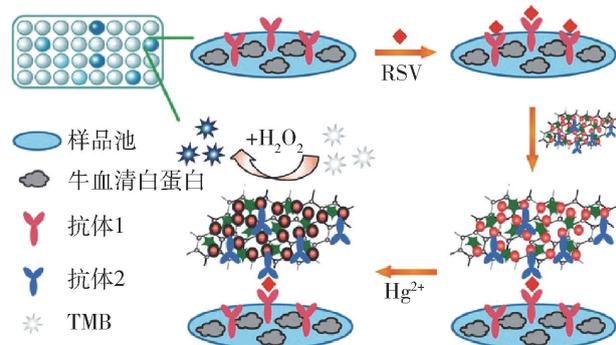


图 3 基于 Hg^{2+} -AuNPs-GO 杂合体用于 RSV 检测的比色免疫测定法示意图^[43]

Fig. 3 Schematic representation of the Hg^{2+} -AuNPs-GO hybrids for colorimetric immunoassay of RSV^[43]

然而, 纳米酶会因为表面加载血清蛋白或 DNA 而降低酶活性^[44-45], 纳米酶的作用机制表明, 酶底物结合位在纳米材料表面, 而纳米酶如果与其他生物分子相连接, 生物分子会占据酶表面积, 阻碍底物结合, 甚至会引起酶聚集, 从而降低酶活性. 研究表明, 金纳米颗粒表面沉积大量的金属原子或者金属离子能够增强金纳米的酶活性^[46-47], Ag^+ 、 Li^+ 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pt^{4+} 等离子都表现出增强酶活性的能力, 尤其是 Hg^{2+} -Au 的金属亲和性, Hg^{2+} 使金纳米颗粒表面聚集大量的汞原子, 比其他金属离子更能提高酶活性. 金纳米颗粒-氧化石墨烯因为结合了病毒抗体使酶活性丧失, 但是 Hg^{2+} 的掺杂能够恢复其过氧化物酶活性.

该方法的设计思路充分考虑了纳米酶的特点和催化机制, 用纳米酶代替容易失活的天然酶, 同时根据纳米酶特点使催化与显色反应一体化, 简化了实验步骤, 提高了灵敏度.

4.3 基于纳米酶的荧光测定法

HIV 病毒是导致人类获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 的致病菌, 属于逆转录病毒科慢病毒属, 其基因组是 2 条相同的 RNA. 目前 HIV 病毒检测多采用血清病毒抗体的检测方法, 但是人体感染 HIV 病毒后短则几周、长到几个月体内才会产生抗体, 所以不利于早期诊断. 而人体感染 HIV 后宿主细胞能迅速产生 HIV DNA, 针对 HIV DNA 的检测能够实现快速、早期

诊断^[48].

Lin 等^[49]设计的基于纳米酶“三明治”复合物荧光检测方法,用结合纳米酶和安培红(amplex red, AR)的 HIV 病毒互补 DNA 片段检测病毒 DNA,将病毒 HIV 互补 DNA 裂解为 2 段,其中一段 CHIV₁与 PtAu 合金纳米颗粒相连,形成寡聚核酸链修饰的合金纳米颗粒 CHIV₁-PtAuNPs,另一段 CHIV₂与磁性纳米颗粒 MNPs 相连接。

与 HIV DNA 混合共育后形成“三明治”复合物 CHIV₁-PtAuNPs/DNA/CHIV₂-MNPs,磁性纳米颗粒 MNPs 与靶标 DNA 结合后,能通过外加磁场定向分离,经过吸附、清洗和解吸,将靶标物质与其他样品残余分离,从而得到高浓度和高纯度的靶标结合分子;双金属纳米颗粒 PtAuNPs 具有过氧化物酶活性,与靶标 DNA 结合后,经过外加磁场分离,不会被去除,在过氧化氢 H₂O₂存在下能催化氧化非荧光底物安培红 AP 成为荧光性很强的试卤灵(resorufin),好似打开荧光开关,被荧光仪记录,LOD 达到 5×10^{-12} mol/L. 非靶标 DNA 因为不能与 PtAuNPs 和 MNPs 结合形成“三明治”复合物,通过外加磁场分离作用能把 DNA 和 PtAuNPs 去除,溶液加入安培红 AP 不能产生荧光。

该方法利用了双金属纳米酶的过氧化物酶活性,在过氧化氢存在下能把无荧光性的底物氧化成为具有强荧光性的物质,同时利用纳米酶的磁性分离去除未结合的 DNA,创建了无酶、无荧光标记的荧光检测方法,简化检测过程,增加特异性,提高检测灵敏度。

4.4 基于纳米酶的酶联免疫吸附法

麻疹病毒(measles virus, MV)属副黏病毒^[50],是麻疹的病原体,在儿童当中是一种常见的急性传染病.麻疹传染性极强,任何没患过麻疹又没接种过麻疹疫苗的人接触后几乎全部发病,病症以皮疹、发热及呼吸道症状为特征。

Long 等^[51]在麻疹病毒检测中,采用具有过氧化物酶活性的“金核铂壳”纳米棒(Au@Pt NRs)与抗原结合,建立基于纳米酶的酶联免疫吸附法,麻疹病毒的检出限为 10 ng/mL,是商品化酶联免疫吸附试剂盒检出限的 1 000 倍.该方法利用铂的优秀催化作用,同时为避免铂容易产生的聚集而影响酶活力,使铂附着在金纳米棒的表面,增加铂的分散度,增强酶活力。

如图 4 所示,在该方法中,纳米酶抗原复合物探针是由“金核铂壳”纳米棒(Au@Pt NRs)与麻疹抗

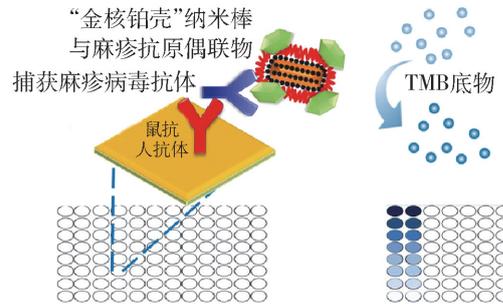


图 4 “金核铂壳”纳米棒与麻疹抗原偶联物的 ELISA 系统免疫分析过程示意图^[51]

Fig. 4 Illustrated process of the immunoassay of Au@Pt NR-antigen conjugates based ELISA system^[51]

原结合形成,96 孔板预先由鼠抗人抗体 IgM 包被,麻疹抗体 IgM 通过孵育与固相结合,经过洗脱,非特异性交联的部分被洗脱掉.纳米酶抗原复合物探针加入后,探针中的抗原被麻疹抗体捕获,探针被吸附到固相载体.洗脱掉未结合成分后,加入过氧化物酶底物 TMB 和过氧化氢,在纳米酶作用下发生显色反应,从而使灵敏度提高 3 个数量级。

4.5 基于纳米酶的适配体探针显色法

人诺如病毒(human Norovirus, NoV)是杯状病毒科中诺如病毒属的一种病毒,能在全球范围内引起急性肠胃炎的食源性病原体,食品基质的复杂性很大程度上影响了病毒检测的效果.当前,诺如病毒定量检测的“金标准”是基于基因扩增技术的方法,例如逆转录定量聚合酶链反应等,虽然也有一些其他方法被报道,但是当前检测敏感性最强的一种以适配体探针结合诺如病毒的电化学传感器方法^[52],检测鼠诺如病毒(murine Norovirus, MNV)的检出限 LOD 达到 6 000 MNV/mL,这个值仍然远,远达不到病毒感染剂量中值(50% infective dose, ID₅₀)的最低限度。

在实验中,由于 MNV 是一种易于培养的传染性人诺如病毒的替代物,Weerathunge 等^[53]通过 MNV 模型,建立起适配体 AG3 与金纳米酶相结合的适配体探针显色法,病毒检出限 LOD 达到 30 viruses/mL,是目前为止检出限的最低值,而且检测时间只要 10 min。

Weerathunge 等建立的适配体探针显色法,是将具有过氧化物酶活性的金纳米颗粒(gold nanoparticle, GNP)表面结合 MNV 衣壳蛋白特异性适配体 AG3,适配体 AG3 的结合使金纳米酶失去酶活性,金纳米颗粒被钝化.将这种被钝化的 GNP-AG3 偶联物作为探针,检测待测液中的 MNV,一旦

有病毒,适配体 AG3 就会与病毒衣壳蛋白特异性结合并改变 AG3 的构象,适配体 AG3 构象改变后即从金纳米颗粒表面解离下来,从而恢复了金纳米颗粒的过氧化物酶活性,在 H_2O_2 存在下使 TMB 溶液显蓝色. 对于其他病毒或者蛋白质,适配体 AG3 不会与之结合,纳米酶就无法恢复活性,因此不发生显色反应.

该方法利用纳米酶过氧化物酶活性及纳米酶会因为表面加载蛋白或核酸而降低酶活性的特征,使用病毒特异性结合适配体作为酶活性的开关,结合使酶活性丧失,解离使酶活性恢复,同时利用纳米酶的显色反应特征,建立起灵敏度高且快速简便的诊断方法.

5 结论

对已经发现的纳米酶催化机制进行了梳理和归纳,综述了近年来基于纳米酶在病毒检测方面的新技术、新方法. 随着纳米酶、材料科学、分析技术等领域新研究成果的不断涌现,极大地促进了实时快速检测技术的发展,现场检测范围不断扩大,不仅精准度高、可靠性强,而且快速、简便、经济、高效,非专业人员也便于操作. 纳米酶有望替代天然酶,不仅在病毒检测领域,而且在其他生物医学、环境保护、疾病治疗等各领域发挥越来越重要的作用.

纳米酶的研究同时也面临许多挑战,在病毒检测领域,需要重点关注以下几个问题:

1) 纳米酶具有天然酶所不具备的可调节性和可设计性,纳米酶的形貌、尺度、表面修饰状况、组成成分的比例、反应体系微环境等,都能够影响酶的活性甚至改变酶的属性,因此设计基于纳米酶的检测方法时,要充分考虑这些因素,反复摸索适合的条件,才能构建更加高效的实验方法.

2) 纳米酶缺乏特异性^[54],表面修饰虽然能够提高特异性,但是会影响酶活力,如何设计巧妙的级联作用,利用好特异性与表面修饰的关系,需要扎实的生物学理论基础和不断创新思维的结合.

3) 纳米酶具有可塑性和多功能性,因此需要继续深入研究纳米酶的催化机理,通过对比天然酶的活性及作用机制,设计合适的纳米酶以适应多领域的应用需求.

4) 纳米材料易于聚集,具有不稳定性,这也是纳米酶在应用方面的一个挑战,在应用中往往需要设计纳米酶与化学惰性强、表面积大的物质形成复合物,使纳米颗粒不易聚集,充分发挥酶的作用,这

些都是需要考虑的方面.

致谢 感谢中国科学院生物物理研究所段德民研究员对本文给予的建议和指导.

参考文献:

- [1] World Health Organization. Media centre: SARS outbreak contained worldwide [EB/OL]. [2013-07-05]. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr56/en/>
- [2] KOMADINA N, SULLIVAN S G, KEDZIERSKA S M, et al. Prior exposure to immunogenic peptides found in human influenza A viruses may influence the age distribution of cases with avian influenza H5N1 and H7N9 virus infections [J/OL]. *Epidemiology and Infection*, 147, e213, 1-9. <https://doi.org/10.1017/S095026881900102X>
- [3] 刘健,王艳丽,赵勇,等. 免疫磁珠酶催化新技术在 H7N9 流感病毒高灵敏检测中的应用[J]. *转化医学电子杂志*, 2017,4(4): 52-54, 60.
LIU J, WANG Y L, ZHAO Y, et al. The application of immunomagnetic beads as enzyme in the highly sensitive detection of H7N9 influenza virus [J]. *E-J Transl Med*, 2017, 4(4): 52-54, 60. (in Chinese)
- [4] MOSTAFA A, ABDELWHAB E M, METTENLEITER T C, et al. Zoonotic potential of influenza a viruses: a comprehensive overview [J]. *Viruses*, 2018, 10 (9): 497-535.
- [5] SEJVAR J J. Zika virus and other emerging arboviral central nervous system infections[J]. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 2018, 24(5): 1512-1534.
- [6] AL-AMRI S, BHARTI R, ALSALEEM A, et al. Knowledge and practices of primary health care physicians regarding updated guidelines of MERS-CoV infection in Abha city [J]. *J Family Med Prim Care*, 2019, 8(2): 455-461.
- [7] DUAN D M, FAN K L, ZHANG D X, et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 134-141.
- [8] DRAZ M S, SHAFIEE H. Applications of gold nanoparticles in virus detection [J]. *Theranostics*, 2018, 8(7): 1985-2017.
- [9] PECSON B M, ACKERMANN M, KOHN T. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity [J]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(6): 2257-2263.
- [10] JURSCH C A, GERLICH W H, GLEBE D, et al. Molecular approaches to validate disinfectants against

- human hepatitis B virus [J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2002, 190(4): 189-197.
- [11] RYU H, SCHRANTZ K A, BRINKMAN N E, et al. Applicability of integrated cell culture reverse transcriptase quantitative PCR (ICC-RTqPCR) for the simultaneous detection of the four human enteric enterovirus species in disinfection studies [J]. *J Virol Methods*, 2018, 258: 35-40.
- [12] STORCH G A. Diagnostic virology [J]. *Clin Infect Dis*, 2000, 31(3): 739-751.
- [13] SAIKI R K, SCHARF S, FALOONA F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia [J]. *Science*, 1985, 230(4732): 1350-1354.
- [14] SHIGEMOTO L N, FUKUDAL S, TANIZAWA Y, et al. Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers [J]. *Microbiology & Immunology*, 2011, 55(5): 369-372.
- [15] 刘乐庭, 刘爽, 封燕芸, 等. NASBA——一种新型禽流感病毒检测方法[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(11): 91-94.
- LIU L T, LIU S, FENG Y Y, et al. NASBA—a new method to detect avian influenza virus [J]. *China Biotechnology*, 2005, 25(11): 91-94. (in Chinese)
- [16] 邵丽丽, 齐蔓莉. HIV感染实验室诊断技术现状与进展[J]. *皮肤科学通报*, 2019, 36(3): 317-323.
- SHAO L L, QI M L. Status and progress of laboratory-based diagnostic tests for HIV infection [J]. *Dermatology Bulletin*, 2019, 36(3): 317-323. (in Chinese)
- [17] LIANG M M, YAN X Y. Nanozymes: from new concepts, mechanisms, and standards to applications [J]. *Acc Chem Res*, 2019, 52(8): 2190-2200.
- [18] GAO L Z, ZHUANG J, NIE L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(9): 577-583.
- [19] JIANG B, DUAN D M, GAO L Z, et al. Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(7): 1506-1520.
- [20] SUN H, ZHOU Y, YAN X, et al. Carbon nanozymes: enzymatic properties, catalytic mechanism, and applications [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(30): 9224-9237.
- [21] ZHAO R, ZHAO X, GAO X. Molecular-level insights into intrinsic peroxidase-like activity of nanocarbon oxides [J]. *Chemistry*, 2015, 21(3): 960-964.
- [22] WIRTH T. Small organoselenium compounds: more than just glutathione peroxidase mimics [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(35): 10074-10076.
- [23] RAGG R, TAHIR M N, TREMEL W. Solids go bio: inorganic nanoparticles as enzyme mimics [J]. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016(13/14): 1906-1915.
- [24] LI K, WANG K, QIN W, et al. DNA-directed assembly of gold nanohalo for quantitative plasmonic imaging of single-particle catalysis [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(13): 4292-4295.
- [25] RAGG R, NATALIO F, TAHIR M N, et al. Molybdenum trioxide nanoparticles with intrinsic sulfite oxidase activity [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(5): 5182-5189.
- [26] XU C, QU X G. Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications [J]. *NPG Asia Materials*, 2014, 6(3): 102-108.
- [27] YANG Z Y, LUO S L, DONG S W, et al. Alendronate as a robust anchor for ceria nanoparticle surface coating: facile binding and improved biological properties [J]. *Rsc Advances*, 2014, 4(104): 59965-59969.
- [28] WU J, WANG X, WANG Q, et al. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II) [J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48(4): 1004-1076.
- [29] 胡超, 穆野, 李明宇, 等. 纳米碳点的制备与应用研究进展[J]. *物理化学学报*, 2019, 35(6): 572-590.
- HU C, MU Y, LI M Y, et al. Recent advances in the synthesis and applications of carbon dots [J]. *Acta Phys Chim Sin*, 2019, 35(6): 572-590 (in Chinese)
- [30] CHEN Z, YIN J J, ZHOU Y T, et al. Dual enzyme-like activities of iron oxide nanoparticles and their implication for diminishing cytotoxicity [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(5): 4001-4012.
- [31] SHIONOIRI N, SATO T, FUJIMORI Y, et al. Investigation of the antiviral properties of copper iodide nanoparticles against feline calicivirus [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, 113(5): 580-586.
- [32] SHEN X, LIU W, GAO X, et al. Mechanisms of oxidase and superoxide dismutation-like activities of gold, silver, platinum, and palladium, and their alloys: a general way to the activation of molecular oxygen [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(50): 15882-15891.
- [33] NERI S, MARTIN S G, PEZZATO C, et al. Photoswitchable catalysis by a nanozyme mediated by a light-sensitive cofactor [J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(5): 1794-1797.

- [34] ALI S S, HARDE J I, QUICK K L, et al. A biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(8): 1191-1202.
- [35] LIN Y, REN J, QU X. Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes [J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47(4): 1097-1105.
- [36] CLARK A, ZHU A, SUN K, et al. Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis [J]. *J Nanopart Res*, 2011, 13(10): 5547-5555.
- [37] SUN H J, ZHAO A D, GAO N, et al. Deciphering a nanocarbon-based artificial peroxidase: chemical identification of the catalytically active and substrate-binding sites on graphene quantum dots [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2015, 54(24): 7176-7180.
- [38] ZUO X L, PENG C, HUANG Q, et al. Design of a carbon nanotube/magnetic nanoparticle-based peroxidase-like nanocomplex and its application for highly efficient catalytic oxidation of phenols [J]. *Nano Research*, 2009, 2(8): 617-623.
- [39] HUANG Y, REN J, QU X. Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications [J]. *Chem Rev*, 2019, 119(6): 4357-4412.
- [40] WANG H, LI S, SI Y M, et al. Recyclable enzyme mimic of cubic Fe₃O₄ nanoparticles loaded on graphene oxide-dispersed carbon nanotubes with enhanced peroxidase-like catalysis and electrocatalysis [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(28): 4442-4448.
- [41] XUE T, JIANG S, QU Y, et al. Graphene-supported hemin as a highly active biomimetic oxidation catalyst [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(16): 3822-3825.
- [42] PRENDERGAST C, PAPPENBURG J. Rapid antigen-based testing for respiratory syncytial virus: moving diagnostics from bench to bedside [J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(4): 435-444.
- [43] ZHANG L, LI C M, WU W B, et al. A colorimetric immunoassay for respiratory syncytial virus detection based on gold nanoparticles-graphene oxide hybrids with mercury-enhanced peroxidase-like activity [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50(78): 11526-11528.
- [44] PARK K S, KIM M I, CHO D Y, et al. Label-free colorimetric detection of nucleic acids based on target-induced shielding against the peroxidase-mimicking activity of magnetic nanoparticles [J]. *Small*, 2011, 7(11): 1521-1525.
- [45] PAUTLER R, KELLY E Y, HUANG P J, et al. Attaching DNA to nanoceria: regulating oxidase activity and fluorescence quenching [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5(15): 6820-6825.
- [46] WANG C I, HUANG C C, LIN Y W, et al. Catalytic gold nanoparticles for fluorescent detection of mercury (II) and lead (II) ions [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 745: 124-130.
- [47] LIEN C W, CHANG H T, HUANG C C, et al. Logical regulation of the enzyme-like activity of gold nanoparticles by using heavy metal ions [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(17): 8227-8234.
- [48] GUO Y, CHEN J H, CHEN G N. A label-free electrochemical biosensor for detection of HIV related gene based on interaction between DNA and protein [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2013, 184: 113-117.
- [49] LIN X, LIU Y, TAO Z, et al. Nanozyme-based barcode assay for high sensitive and logic-controlled specific detection of multiple DNAs [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 471-477.
- [50] YANAGI Y, TAKEDA M, OHNO S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 10): 2767-2779.
- [51] LONG L, LIU J, LU K, et al. Highly sensitive and robust peroxidase-like activity of Au-Pt core/shell nanorod-antigen conjugates for measles virus diagnosis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 46.
- [52] GIAMBERARDINO A, LABIB M, HASSAN E M, et al. Ultrasensitive norovirus detection using DNA aptasensor technology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79087.
- [53] WEERATHUNGE P, RAMANATHAN R, TOROK V A, et al. Ultrasensitive colorimetric detection of murine norovirus using nanozyme aptasensor [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(5): 3270-3276.
- [54] LIU B W, LIU J W. Surface modification of nanozymes [J]. *Nano Research*, 2017, 10(4): 1125-1148.

(责任编辑 杨开英)