

基于模拟酶-天然酶级联反应的双模式传感平台 用于生物标志物的超灵敏检测

樊蕾 江群英 潘敏 王文晓 张丽 刘晓庆*

(武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

摘要 重要生物标志物例如碱性磷酸酶(ALP)的高灵敏度检测和准确分析对于疾病的早期检测和治疗至关重要。本工作合成了Cu基金属有机框架材料HKUST-1,探索了其类氧化酶性质。通过设计HKUST-1模拟酶与ALP天然酶的级联催化体系,构建了高灵敏度及高选择性的荧光/紫外双模式检测平台,用于生物标志物ALP及焦磷酸根离子(PPi)的检测。利用所设计的级联催化反应对信号的有效放大以及荧光和紫外双信号输出,对ALP的检测限分别低至0.0078和0.039 nmol·L⁻¹。本工作首次开发了基于模拟酶-天然酶级联催化放大的双模式生物分析方法,实现了两种生物标志物的灵敏检测以及酶抑制剂的抑制效率评估,并将其应用到人血清样品中ALP的超灵敏分析,在临床诊断中具有巨大应用潜力。

关键词 生物标志物检测;碱性磷酸酶;双模式检测;模拟酶;生物传感

Dual-Mode Sensing of Biomarkers by Mimic Enzyme-Natural Enzyme Cascade Signal Amplification

Fan, Lei Jiang, Qunying Pan, Min Wang, Wenxiao Zhang, Li Liu, Xiaoqing*

(College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Highly sensitive and accurate analysis of significant biomarkers such as alkaline phosphatase (ALP) is essential for early detection and treatment of diseases. In this work, a fluorescence/UV-vis dual-mode sensing platform was constructed for amplified detection of ALP and pyrophosphate ion (PPi) based on mimic enzyme-natural enzyme cascade reactions. Cu-Based metal-organic frameworks HKUST-1 which possesses of oxidase-like activity and can effectively catalyze the oxidation of indicator *o*-phenylenediamine (OPD) by the surface-active sites were prepared. The oxidation products of OPD exhibit strong UV-vis absorption and fluorescent signals at 416 and 568 nm, respectively. After adding PPi, the catalytic activity of HKUST-1 was selectively inhibited due to the combination of PPi with Cu²⁺ on the surface of HKUST-1, that resulted in fluorescence and UV-vis signal reducing. Once ALP was introduced into the system, PPi can be specifically hydrolyzed into phosphate ions (Pi), and the oxidase-like activity of HKUST-1 recovered. Thus, the fluorescent and UV-vis signals were regenerated by an ALP-triggered mimic enzyme-natural enzyme cascade reaction. On account of the inhibition of oxidase-like activity of HKUST-1 by PPi and the recovery by ALP, an ultrasensitive dual-mode sensing platform of biomarkers based on mimic enzyme-natural enzyme cascade reactions has been developed. Under optimal conditions, the linear range of ALP by fluorescence/UV-vis detection is 0.02~3.5 and 0.04~3.5 nmol·L⁻¹, and the detection limit of fluorescence and UV-vis assay is as low as 0.0078 and 0.039 nmol·L⁻¹, respectively. As far as we know, it is the first time that the mimic enzyme-natural enzyme cascade reaction is applied to dual-mode bioanalysis. Due to the enzyme cascade amplification and dual-mode signal output, this developed strategy has the advantages of high sensitivity, low detection limit, high accuracy and reliability, and can realize ultrasensitive analysis of ALP in human serum samples, which shows great potential for clinical diagnosis.

Keywords biomarker detection; alkaline phosphatase; dual-mode detection; mimic enzyme; biosensing

1 引言

生物标志物的高灵敏度检测和准确分析对于疾病的早期检测和治疗至关重要^[1~5]。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是一种广泛存在于哺乳动物组织和体液中的磷酸单酯酶,可以非特异性地催化磷酸单酯的水

解反应和磷酸基团的转移反应^[6]。ALP在许多关键的生理学和病理学进程中发挥着重要的作用^[7,8]。作为一种重要的生物标志物,血清中ALP的异常水平与许多疾病如骨病、肝功能不全、心力衰竭、卵巢癌和乳腺癌等密切相关^[9]。因此,开发便捷可靠的ALP测定方法在临床诊断和生物医学研究中具有重要意义。焦磷酸根离子

* E-mail: xiaoqingliu@whu.edu.cn

Received March 19, 2020; published May 6, 2020.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81602610) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2042018kf1006).

项目受国家自然科学基金(No. 81602610)和中央高校基本科研基金(No. 2042018kf1006)资助。

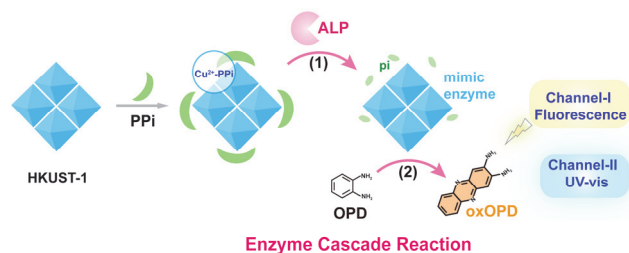
($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, PPI), 作为一种重要的生物阴离子, 参与很多关键的生理学过程, 例如 DNA 聚合^[10]、酶促反应^[11]和细胞代谢^[12]等。此外, PPI 在人体中是一种有效的矿化抑制剂, 在骨骼矿化和血管钙化中发挥着重要作用。作为 ALP 催化反应的底物, 其浓度可以通过 ALP 的水解程度来调节。因此, 开发一种可以便利的、高灵敏度和高选择性的检测 ALP 和 PPI 两种生物标志物的化学传感器很有必要。

迄今为止, 已经报道的 ALP 或 PPI 检测方法主要有荧光法^[13–16]、电化学法^[17]和比色法^[18]等。其中, 荧光分析法因其灵敏度高、简单易行、可实时检测而被广泛关注^[19,20]。而紫外-可见分光光度法具有测定准确度高、不易受干扰和应用范围广的优势。然而, 目前无论用于检测 ALP 还是 PPI 的分析方法, 大都局限于单一模式的信号输出。而结合不同信号输出的多模式检测方法, 可以有效减少环境因素影响, 提升检测方法的准确度和可靠性, 更适合实际应用^[21,22]。因此, 开发双信号输出的生物传感器用于重要生物标志物的高灵敏检测具有重要意义。

作为经典的分子生物学技术, 酶级联反应可依次执行多种酶促反应, 广泛用于生命系统中的信号转导和扩增。由于其有效的信号放大机制, 天然酶的级联扩增体系近来被开发用于高灵敏度和选择性的生物分析^[23,24]。然而, 由于天然酶的不稳定、易失活及价格昂贵等缺点, 其发展和应用受到一定限制。近年来, 模拟酶因其成本低和热稳定性好等优点而受到广泛关注^[25,26]。 Fe_3O_4 纳米粒子^[27]、Pt 纳米颗粒^[28]、 CeO_2 纳米粒子^[29]和 MnO_2 纳米粒子^[30]等多种材料作为模拟酶已经被用于构建生物标志物的检测传感系统^[31,32]。受此启发, 我们认为, 构建模拟酶-天然酶级联反应体系, 有望用于信号放大的生物分析^[33,34]。目前, 一些作为模拟酶的材料合成步骤比较复杂, 水溶性较差容易聚沉, 从而影响了催化活性^[35]。金属离子和有机配体自组装形成的金属有机框架(MOFs)材料制备过程简单, 同时具有超高的表面积和孔隙率、孔隙大小均匀可调和结构多样等优点^[36–38]。其水溶性和稳定性可以通过调节配体结构进行优化^[39]。同时, MOFs 材料具有的表面积大和孔隙率高的特性, 使其具有作为模拟酶的潜力。基于以上分析, 我们以潜在的 MOFs 材料与 ALP 为例, 设计模拟酶-天然酶级联反应体系, 进行信号放大的生物分析。

我们发现 Cu 基 MOFs HKUST-1 具有类氧化酶活性, 可以在有氧条件下催化邻苯二胺(*o*-phenylenediamine, OPD)的氧化, 生成带有强荧光和紫外信号的氧化产物(2,3-diaminophenazine, oxOPD)。由于 PPI 可以和 HKUST-1 表面的 Cu^{2+} 配位^[40], 对其催化活性产生抑制, 从而导致荧光和紫外信号降低, 降低值与 PPI 浓度呈现正相关。此外, ALP 可以催化 PPI 去磷酸化, 从而恢复 HKUST-1 的催化能力, 使荧光和紫外吸收信号恢复。基

于设计的模拟酶-天然酶级联反应体系, 我们开发了一种可以灵敏检测 ALP 和 PPI 两种生物标志物的荧光/紫外双模式传感平台(图式 1)。该双模式检测结合了荧光检测的高灵敏度及紫外的准确度高且不易受干扰特性。两种不同的输出方式, 环境波动可以大大消除, 确保了检测结果的可靠性。据我们所知, 这是第一次将模拟酶-天然酶级联放大用于双模式的生物分析。由于酶级联催化放大效应, 该系统具有灵敏度高和检测限低的特点, 并实现了人血清样品中 ALP 的超灵敏分析。



图式 1 基于模拟酶-天然酶级联放大反应的荧光/紫外双模式 ALP 和 PPI 检测示意图

Scheme 1 Illustration of fluorescent and UV-vis dual-mode detection of ALP and PPI by designing mimic enzyme-natural enzyme cascade reactions

2 结果与讨论

2.1 HKUST-1 的合成和表征

根据文献报道的方法制备 HKUST-1^[41]。在室温下, 以水作为反应介质, 快速混合铜前体溶液($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)和配体均苯三甲酸(H_3BTC)悬浮液, 反应 2 h 后合成 HKUST-1。通过扫描电子显微镜(SEM)对 HKUST-1 颗粒的尺寸和形貌进行了表征(图 1a)。合成的 HKUST-1 是典型的八面体结构, 平均粒径约 4 μm 。此外, 通过紫外分光光度计对 HKUST-1 的紫外-可见吸收光谱进行表征(图 1b), HKUST-1 在 280 nm 处有明显的吸收。这些结果与文献报道一致^[42], 证明了 HKUST-1 的成功制备。

2.2 HKUST-1 类氧化酶性质研究及 PPI 双模式检测平台的构建

首先, 使用 OPD 作为典型的有机底物, 对 HKUST-1 类氧化酶活性进行了探究(图 2)。如图 2a 所示, 单独的 OPD 溶液无明显荧光信号。将 HKUST-1 加入到 OPD 溶液后, 该混合溶液在 568 nm 处产生明显的荧光, 说明 HKUST-1 可以催化 OPD 的氧化, 产生具有荧光的氧化产物 oxOPD。HKUST-1 所表现出的类氧化酶性质, 是因为它是铜基 MOFs。据文献报道, 很多其他铜基材料具有氧化酶模拟物的性质, 例如类漆酶活性、类葡萄糖氧化酶活性及类细胞色素 c 氧化酶活性^[43–45]。为了进一步确定最佳反应条件, 对 HKUST-1 的浓度和与 OPD 反应的时间进行优化。如图 2a, 固定 OPD 的浓度, 随 HKUST-1 浓度增加, 荧光信号逐渐增加。根据荧光信号

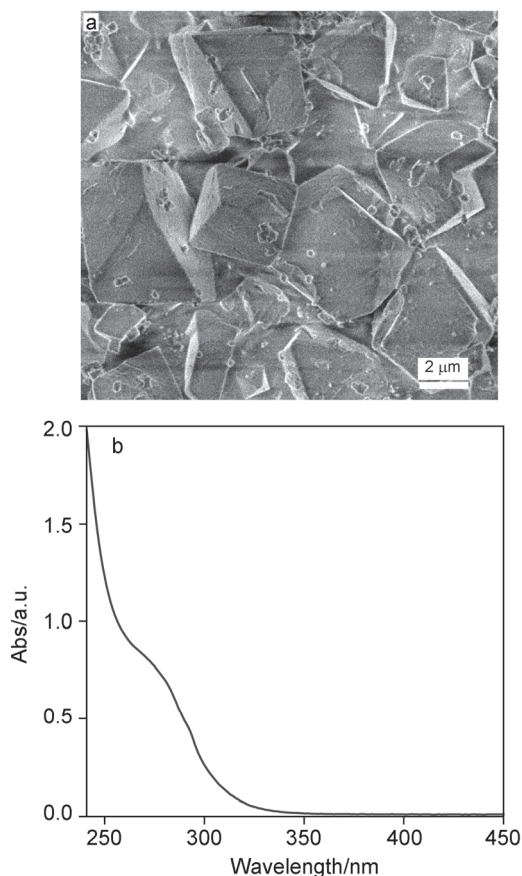


图1 (a) HKUST-1 的扫描电镜图和(b) HKUST-1 的紫外-可见吸收光谱图

Figure 1 (a) SEM image and (b) UV-vis absorption spectra of HKUST-1

增加的趋势, 最终确定 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HKUST-1 作为最终使用的材料浓度. 如图 2b 所示, 在 OPD 溶液中引入 HKUST-1 之后, 荧光信号随时间延长逐渐增强, 在 2 h 后达到平衡, 这表明 HKUST-1 催化 OPD 氧化的进程达到平衡. 因此在后续实验中我们选择 2 h 作为 HKUST-1 和 OPD 的最佳孵育时间.

据文献报道, PPi 对铜离子具有很强的亲和力, PPi 可以与铜离子配位, 抑制铜离子的催化能力^[40]. 基于此, 我们推测 PPi 同样可以与 HKUST-1 表面未配位的铜离子配位, 对 HKUST-1 的催化性质产生影响. 为了对此推测进行验证, 将 HKUST-1 与不同浓度的 PPi 进行预处理, 随后将预处理的 HKUST-1 与 OPD 溶液混合反应, 通过监测反应体系中荧光信号和紫外吸收来探究此反应过程. 如图 3a 和 3c 所示, 当没有 PPi 存在时, OPD 在 HKUST-1 的催化作用下逐渐氧化生成具有荧光和紫外信号的氧化产物(oxOPD). 在 HKUST-1 与 PPi 预处理后, 随 PPi 浓度增加, 检测体系荧光强度和紫外吸收均下降. 这种现象可能是由于 PPi 和 HKUST-1 表面 Cu^{2+} 配位, 导致催化位点封闭, HKUST-1 的催化能力降低, OPD 氧化产物减少, 从而导致荧光强度和紫外吸收下降. 基于此, 我们设计了这个荧光紫外双模式 PPi 检测体系.

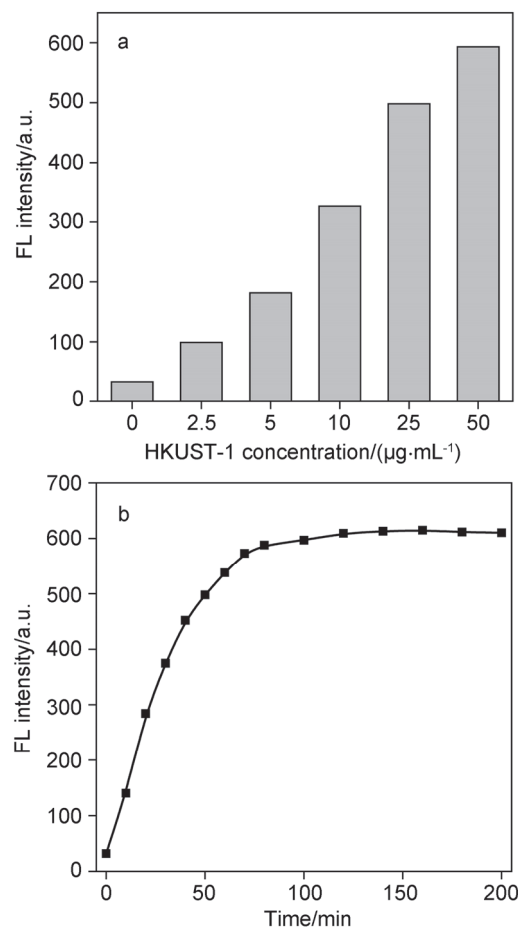


图2 (a)不同浓度的 HKUST-1 对 OPD 催化氧化后体系在 568 nm 处荧光强度的变化和(b) HKUST-1 催化 OPD 反应体系荧光随时间变化曲线

Figure 2 (a) Fluorescence intensity changes of the system at 568 nm after adding different concentrations of HKUST-1 and (b) time-dependent fluorescence intensity changes of the system in the presence of HKUST-1 OPD: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, HKUST-1: $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

如图 3a 和 3c 中插图所示, 检测体系的荧光强度和紫外吸收随 PPi 浓度的增加而降低, 当 PPi 浓度大于 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 信号强度降至最低且几乎不再发生变化. 并且荧光和紫外信号在 PPi 浓度分别为 $10\sim120$ 和 $10\sim100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围时呈线性降低(图 3b 和 3d). 通过线性拟合, 得到荧光和紫外工作曲线的回归方程分别为 $y=628.4-4.04x$ 和 $y=0.6984-0.00599x$, 检测限分别为 4.5 和 $4.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 其中 y 分别为荧光强度和紫外吸收值, x 为 PPi 浓度.

2.3 HKUST-1 模拟酶/ALP 天然酶级联催化放大体系用于 ALP 的双模式检测

PPi 具有抑制 HKUST-1 催化氧化 OPD 的能力, 同时, 碱性磷酸酶(ALP)可以催化 PPi 去磷酸化, 从而使 HKUST-1 催化活性恢复. 基于此, 我们利用模拟酶-天然酶级联反应, 设计了一种以 OPD 为底物的荧光/紫外双模式检测平台用于 ALP 的高灵敏检测. 如图 4a 所示,

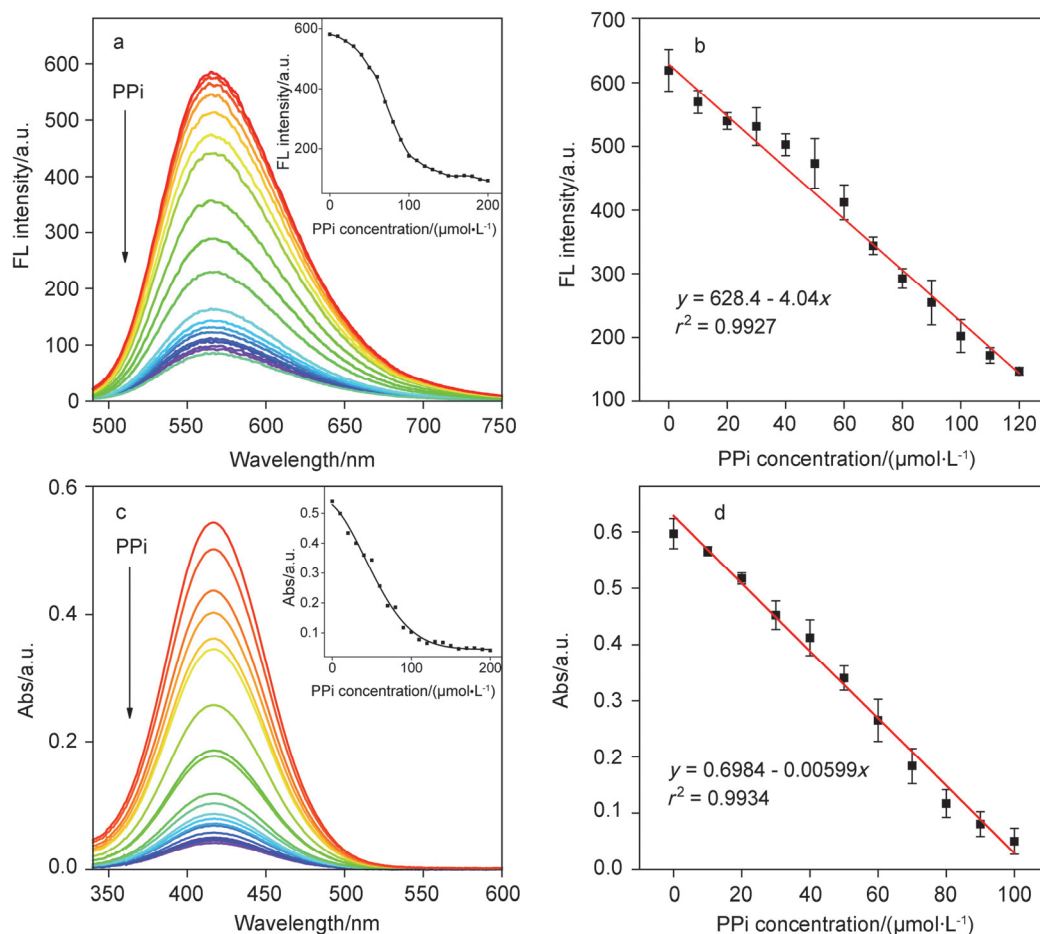


图3 (a)不同浓度 PPI 存在下(0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)体系的荧光光谱(插图是检测体系在 568 nm 处的荧光强度与 PPI 浓度的关系曲线), (b)检测体系在 568 nm 处的荧光强度与 PPI 浓度的线性拟合图, (c)不同浓度 PPI 存在下(0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)体系的紫外吸收光谱图(插图是检测体系在 416 nm 处的紫外吸收值与 PPI 浓度的关系曲线)和(d)检测体系在 416 nm 处的紫外吸收值与 PPI 浓度的线性拟合图

Figure 3 (a) Fluorescence evolution of the system upon addition of various concentrations of PPI (from 0 to 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Inset: the plots of fluorescent intensity at 568 nm versus PPI concentration), (b) the linearity of fluorescence intensity with respect to PPI concentrations, (c) the absorbance evolution of the system upon the addition of various concentrations of PPI (from 0 to 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Inset: the plots of UV-vis absorption at 416 nm versus PPI concentration) and (d) the linearity of UV-vis absorption at 416 nm with respect to PPI concentrations

OPD: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, HKUST-1: 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Error bars of (b) and (d) were estimated from three replicate measurements

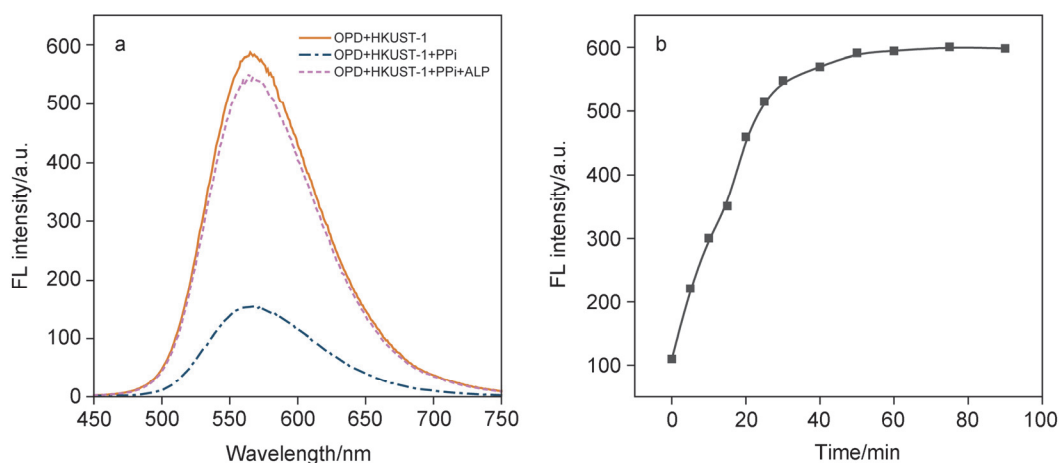


图4 (a) ALP 添加前后系统的荧光变化和(b)加入 ALP 后体系的时间依赖性荧光变化

Figure 4 (a) Fluorescence spectra of the system in the absence and presence of ALP and (b) time-dependent fluorescence intensity changes of the system upon adding ALP

OPD: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, PPI: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, HKUST-1: 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ALP: 4 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

当 ALP 和 PPi 共同存在时, 检测溶液在 568 nm 处有明显荧光信号产生. 这说明该条件下 HKUST-1 的催化活性恢复, OPD 被有效催化氧化. 而当不存在 ALP, 只有 PPi 的条件下, 无明显荧光信号产生. 该结果表明 ALP 可以催化 PPi 水解, 从而使 HKUST-1 的催化作用恢复, 荧光信号恢复. 为了获得最优的 ALP 检测时间, 我们对 ALP 催化水解 PPi 的反应时间进行优化. 如图 4b 所示, 在反应前 30 min 内, 随着时间的延长, PPi 水解程度增加, 荧光强度增加, 30 min 后荧光强度基本不变, 这意味着该时间段 ALP 水解 PPi 反应基本达到平衡. 因此选择 30 min 作为 ALP 和 PPi 的最佳孵育时间.

为了进一步实现对 ALP 的检测, 基于之前优化的反应条件, 构建了基于模拟酶-天然酶级联放大的双模式检测系统. 将 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PPi 预处理的 HKUST-1 与不同浓度 ALP 反应, 通过监测体系中 OPD 氧化产物的

荧光和紫外信号来检测 ALP 的浓度. 如图 5a 和 5c 所示, 随着 ALP 浓度增加, 检测溶液的荧光强度和紫外吸收逐渐升高. 当 ALP 的浓度大于 $3.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 荧光强度和紫外吸收值达到峰值, 说明 ALP 将 HKUST-1 上起封闭作用的 PPi 几乎完全水解, HKUST-1 的催化氧化能力几乎完全恢复. 荧光强度和紫外信号(y)与 ALP 浓度(x)之间存在着良好的线性关系(图 5b, 5d). 在最佳条件下, 荧光检测的线性范围为 $0.02\sim 3.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性回归方程为 $y = 155.62 + 98.4x$, 基于酶级联反应对信号的有效放大, 检测限低至 $0.0078 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. 紫外检测的线性范围为 $0.04\sim 3.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 回归方程为 $y = 0.1063 + 0.1212x$, 检测限为 $0.039 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. 结果表明该方法对 ALP 的检测具有出色的灵敏度和可靠性, 检测效果与现有文献报道相当^[15,46].

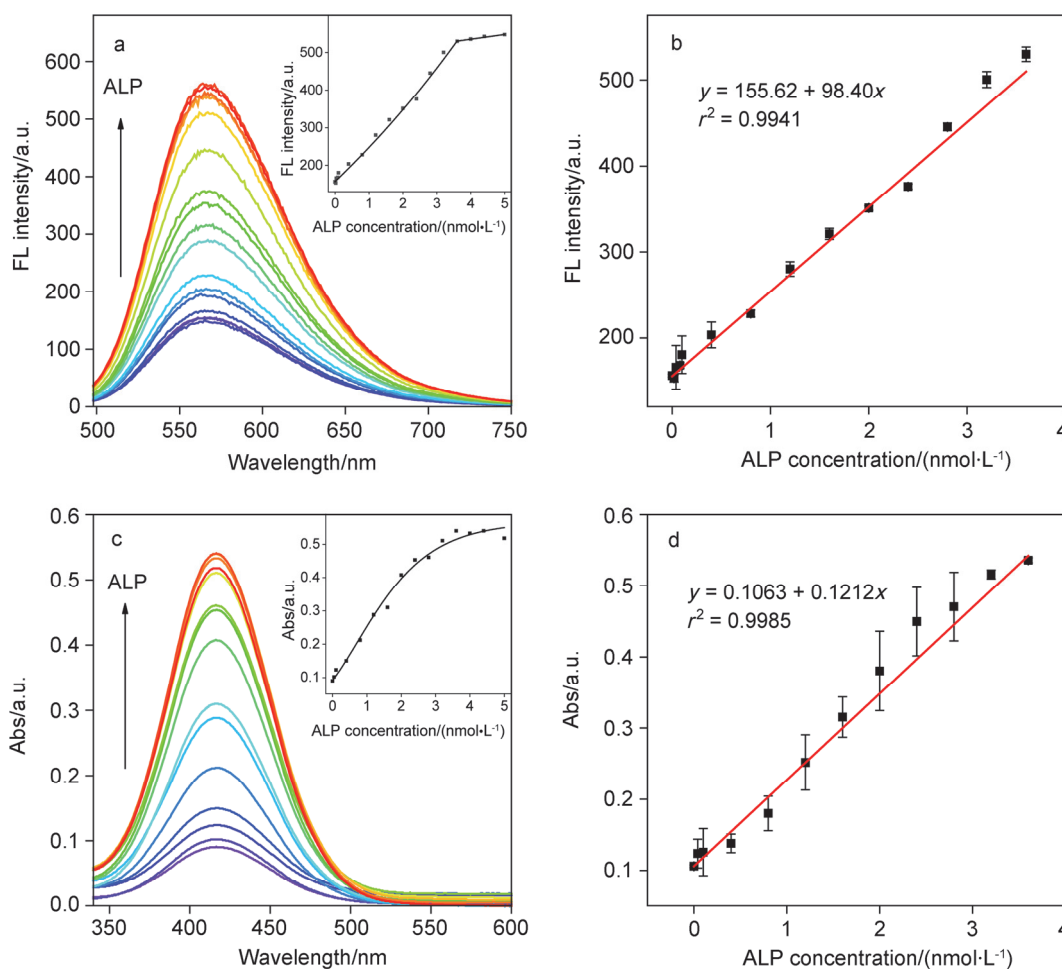


图 5 (a)不同浓度 ALP 存在下($0\sim 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)体系的荧光光谱(插图是体系在 568 nm 处的荧光强度与 ALP 浓度的关系曲线), (b)检测体系在 568 nm 处的荧光强度与 ALP 浓度的线性拟合图, (c)不同浓度 ALP 存在下($0\sim 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)体系的紫外吸收谱图(插图是体系在 416 nm 处的紫外吸收与 ALP 浓度的关系曲线)和(d)检测体系在 416 nm 处的紫外吸收与 PPi 浓度的线性拟合图

Figure 5 (a) Fluorescence evolution of the system upon the addition of various concentrations of ALP ($0\sim 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Inset: the plots of fluorescent intensity at 568 nm versus ALP concentration), (b) the linearity of fluorescence intensity with respect to ALP concentrations. Error bars were estimated from three replicate measurements, (c) the absorbance evolution of the system upon the addition of various concentrations of ALP (from 0 to $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Inset: the plots of UV-vis absorption at 416 nm versus ALP concentration) and (d) the linearity of UV-vis absorption at 416 nm with respect to ALP concentrations. Error bars were estimated from three replicate measurements
OPD: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, PPi: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, HKUST-1: $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.4 ALP 抑制剂的研究及模拟酶 HKUST-1 的可重复利用性的考察

考虑到该检测体系对 ALP 有出色的响应性, 我们进一步将该体系用于 ALP 抑制剂筛选潜能的研究. 选择磷酸二氢钾(KH_2PO_4)作为 ALP 的模型抑制剂, 以探究该分析方法筛选 ALP 抑制剂的能力. 当 ALP 的活性被 KH_2PO_4 抑制时, PPi 不能被 ALP 水解, 荧光强度不再恢复. 通过对这一过程的荧光进行监测得出 KH_2PO_4 对 ALP 抑制效率. 如图 6a 所示, 随着 KH_2PO_4 浓度从 0 增大到 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 抑制效率逐渐增加. 将酶活性降低 50% 所需的抑制剂浓度(IC_{50} 值)为 $1.522 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. 该结果表明该检测体系可以用于筛选潜在的 ALP 抑制剂.

模拟酶的重复利用性是在生物应用中的重要问

题之一. 为了研究该体系中 HKUST-1 的重复利用性, 将检测后的反应液进行离心, 分离 HKUST-1 并洗涤, 然后重新加入到新的反应体系中孵育, 再次检测反应溶液的荧光. 如图 6b 所示, HKUST-1 在重复利用 4 次后催化活性仍无明显下降, 显示出极好的重复利用性.

2.5 基于模拟酶-天然酶级联传感体系的选择性研究及人血清样品中 ALP 的检测

接下来我们对该检测体系对 PPi 和 ALP 的选择性分别进行了验证, 如图 7a 所示, 该体系只对 PPi 有响应, 除 PPi 以外其他阴离子的存在对 PPi 的检测几乎没有影响, 表明该体系对 PPi 的检测具有良好的选择性和抗干扰能力. 值得注意的是, 即使含多个磷酸根的分子如 ATP 也没有对 PPi 的检测产生干扰. 这可能是由于 ATP

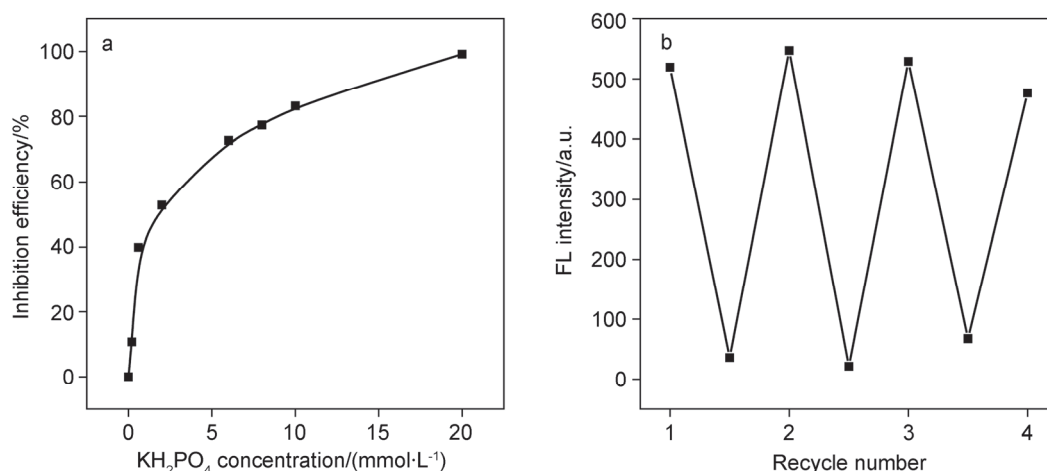


图 6 (a)不同浓度的 KH_2PO_4 对该体系 ALP 活性的抑制效率和(b)模拟酶 HKUST-1 重复利用率的考察

Figure 6 (a) Inhibition efficiency of different concentrations of KH_2PO_4 on the ALP activity of the system and (b) study of recycling rate of the mimic enzyme HKUST-1

OPD: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, PPi: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, HKUST-1: $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ALP: $4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

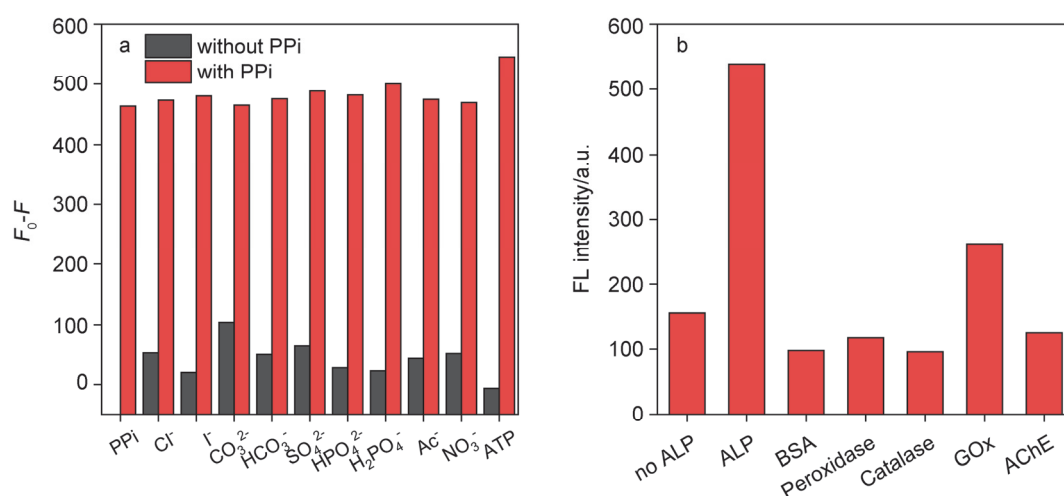


图 7 该检测体系对(a) PPi 和(b) ALP 的选择性

Figure 7 Selectivity of the established assay toward (a) PPi and (b) ALP

The final concentrations of PPi and other anions were $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The final concentrations of ALP and other biomolecules were $4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

等核苷三磷酸含有碱基和戊糖,与焦磷酸相比,具有更大的空间位阻和相对较小的阴离子电荷密度,从而导致其与 Cu^{2+} 的配位作用比 PPi 弱很多^[47]。此外,我们通过利用其他常见的生物分子,包括牛血清白蛋白(BSA)、过氧化物酶(peroxidase)、过氧化氢酶(catalase)、葡萄糖氧化酶(GOx)、乙酰胆碱酯酶(AChE),评估了该检测体系对 ALP 的选择性。如图 7b 所示,只有在 ALP 存在下才会导致荧光强度增加,而其它生物分子产生的信号接近系统的背景荧光,几乎可以忽略不计。结果表明该检测系统对 ALP 具有较高的选择性。

为了评估所提出的方法在实际样品检测中的可行性,将开发的方法应用于人血清样品中 ALP 的测定。将不同浓度的 ALP 掺入稀释的人血清样品(体积分数为 0.1%)中,并根据标准曲线进行计算。该检测方法的重复性和准确性较好,相对标准偏差小于 8.21%,回收率在 91.8%和 103.0%之间(表 1)。这些结果证明了该方法在生物样品分析中的潜在应用。

表 1 该方法对人血清样品中 ALP 的检测

Table 1 Determination of ALP in spiked human serum by the proposed method

样品	加入 ALP/(nmol·L ⁻¹)	测定 ALP/(nmol·L ⁻¹)	回收率/%	相对标准偏差/%
1	0.01	0.0102	102.0	5.54
2	0.10	0.0918	91.8	5.74
3	0.50	0.5152	103.0	7.94
4	1.00	1.0010	100.1	8.21

3 结论

综上所述,本工作发现 HKUST-1 可以作为氧化酶模拟物,催化 OPD 的氧化。基于 PPi 对 HKUST-1 催化位点的封闭及 ALP 将 PPi 水解后 HKUST-1 催化活性的恢复,建立了荧光/紫外双模式传感平台用于两种重要生物标志物 ALP 与 PPi 的灵敏检测。由于模拟酶-天然酶的级联催化放大效应及双模式信号输出,该体系具有灵敏度高、检测限低、准确度和可靠性高等优势,能够实现人血清样品中 ALP 的超灵敏分析,并可用于 ALP 抑制剂的筛选。这是第一次将模拟酶-天然酶级联放大用于双模式的生物分析。此外,作为氧化酶模拟物, HKUST-1 具有成本低、易于制备和可重复利用的特点,该检测平台拓宽了具有类酶性质的微纳材料在生物催化领域的应用,为深入理解酶催化体系及其在生物传感领域的应用提供了一种新的策略。

4 实验部分

4.1 实验仪器和试剂

实验中的扫描电子显微镜图由蔡司高分辨扫描电镜(Zeiss Merlin Compact)表征,荧光光谱由安捷伦荧光光度计记录,紫外光谱由岛津 UV-2600 型紫外可见分光

光度计记录。

硝酸铜($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、1,3,5-苯三甲酸(H_3BTC)、焦磷酸钠($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)均购自上海国药集团化学试剂有限公司。邻苯二胺(OPD)、碱性磷酸酶(ALP)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)购自美国西格玛奥德里奇公司。以上试剂在使用前均未做任何处理。

4.2 HKUST-1 的合成

根据文献报道的方法合成 HKUST-1。分别称取 0.126 g 的 H_3BTC 和 0.07 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 各溶于 6 mL 超纯水中,然后将 H_3BTC 溶液加入 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液中,在室温下快速搅拌 2 h。将产物离心 12 min,并用乙醇洗涤三遍以除去未反应的 H_3BTC ,最后,将洗涤后的产物分散到乙醇中备用。

4.3 HKUST-1 对 OPD 氧化的影响

为了评估 HKUST-1 对 OPD 氧化的影响,取 10 μL 不同浓度的 HKUST-1 溶液,20 μL 5 mmol·L⁻¹ 的 OPD 溶液和 170 μL 10 mmol·L⁻¹ 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4)于 1.5 mL 离心管中,在 37 °C 下孵育 2 h,反应结束后取出进行后续的荧光和紫外吸收测定。此外,在孵育时间优化实验中, HKUST-1 浓度为 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每隔 10~20 min 测量一次荧光。

4.4 PPi 的检测

在 PPi 的荧光和紫外检测中,先将 10 μL 不同浓度的 PPi 溶液和 HKUST-1 溶液(25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)在 37 °C 下预孵育 30 min,以使 PPi 和 HKUST-1 充分结合。然后再和 OPD (500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)孵育进行后续荧光和紫外吸收测试。在选择性测试中,通过使用其他常见的阴离子代替 PPi 评估该检测平台对 PPi 的选择性。文中检测限计算方法为:检测限=3×空白信号标准差/灵敏度。这里空白信号标准差是在一定时间内 20~30 次空白测定后统计处理得到的,灵敏度为校准灵敏度,即测定浓度范围内校准曲线斜率。

4.5 ALP 的检测

为了检测 ALP,先将不同浓度的 ALP 分别加入 PPi 溶液(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,并在 37 °C 下孵育 30 min。其他后续反应步骤与检测 PPi 相同。在选择性测试中,通过使用其他常见的生物分子代替 ALP 评估该检测平台对 ALP 的选择性。实验中使用 ALP 酶活性为 1 nmol·L⁻¹ ALP 对应 0.53 U·mL⁻¹。

4.6 ALP 抑制剂的研究及模拟酶 HKUST-1 可重复利用性的考察

将 ALP (4 nmol·L⁻¹)和不同浓度的 KH_2PO_4 混合并孵育 30 min。将混合物加入 PPi 溶液(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,并根据 ALP 检测步骤进行了后续实验。为了评估 HKUST-1 是否可以重复利用,将检测液离心取沉淀,然后加入新鲜的 OPD 溶液重新孵育进行下一次测试。

4.7 实际血清样品中 ALP 的检测

将不同浓度的 ALP 加标到稀释的人血清样品(体积分数为 0.1%)中. 血清中 ALP 的检测方法与缓冲液中的相同.

References

- [1] Xiong, Y.; Chen, Y.; Ju, H. *Acta Chim. Sinica* **2019**, 77, 1221. (熊莹莹, 陈云龙, 鞠焜先, 化学学报, **2019**, 77, 1221.)
- [2] Xia, L.; Cheng, Z.; Zhu, H.; Yang, Z. *Acta Chim. Sinica* **2019**, 77, 172. (夏雷, 程震, 朱华, 杨志, 化学学报, **2019**, 77, 172.)
- [3] Chen, M.; Mu, L.; Cao, X.; She, G.; Shi, W. *Chin. J. Chem.* **2019**, 37, 330.
- [4] Wang, W.; Liu, Y.; Shi, T.; Sun, J.; Mo, F.; Liu, X. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 1598.
- [5] Sun, J.; Liu, F.; Yu, W.; Jiang, Q.; Hu, J.; Liu, Y.; Wang, F.; Liu, X. *Nanoscale* **2019**, 11, 5014.
- [6] Barrozo, A.; Duarte, F.; Bauer, P.; Carvalho, A. T. P.; Kamerlin, S. C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 9061.
- [7] Coleman, J. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441.
- [8] Stebbing, J.; Lit, L. C.; Zhang, H.; Darrington, R. S.; Melaiu, O.; Rudraraju, B.; Giamas, G. *Oncogene* **2014**, 33, 939.
- [9] Liang, J.; Kwok, R. T. K.; Shi, H.; Tang, B. Z.; Liu, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 8784.
- [10] Ronaghi, M.; Haramohamed, S.; Pettersson, B.; Uhlen, M.; Nyren, P. *Anal. Biochem.* **1996**, 242, 84.
- [11] Steinberg, K. M.; Okbu, D. T.; Zwick, M. E. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 520.
- [12] Farre, E. M.; Geigenberger, P.; Willmitzer, L.; Trethewey, R. N. *Plant Physiol.* **2000**, 123, 681.
- [13] Dong, P.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Wang, W.; Pan, M.; Liu, Y.; Liu, X. *Sens. Actuators, B* **2020**, 310, 127873.
- [14] Goswami, S.; Manna, A.; Paul, S.; Aich, K.; Das, A. K.; Chakraborty, S. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 8078.
- [15] Liu, Y.; Dong, P.; Jiang, Q.; Wang, F.; Pang, D. W.; Liu, X. *Sens. Actuators, B* **2019**, 279, 334.
- [16] Zhang, J.; Liu, H.; Meng, L. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, 39, 3132. (张继东, 刘鸿泽, 孟丽, 有机化学, **2019**, 39, 3132.)
- [17] Hayat, A.; Andreescu, S. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 10028.
- [18] Wei, H.; Chen, C.; Han, B.; Wang, E. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7051.
- [19] Zhao, J. Y.; Chen, G.; Gu, Y. P.; Cui, R.; Zhang, Z. L.; Yu, Z. L.; Tang, B.; Zhao, Y. F.; Pang, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 1893.
- [20] Liu, X.; Li, Y.; Liang, J.; Zhu, W.; Xu, J.; Su, R.; Yuan, L.; Sun, C. *Talanta* **2016**, 160, 99.
- [21] Wang, W.; Zhao, Y.; Jin, Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 11741.
- [22] Liu, Y.; Pan, M.; Wang, W.; Jiang, Q.; Wang, F.; Pang, D. W.; Liu, X. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 2086.
- [23] Liang, H.; Jiang, S.; Yuan, Q.; Li, G.; Wang, F.; Zhang, Z.; Liu, J. *Nanoscale* **2016**, 8, 6071.
- [24] Kou, B.; Chai, Y.; Yuan, Y.; Yuan, R. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 10701.
- [25] Meng, X.; Fan, K.; Yan, X. *Sci. China: Life Sci.* **2019**, 62, 1543.
- [26] Li, Z.; Feng, K.; Zhang, W.; Ma, M.; Gu, N.; Zhang, Y. *Chin. Sci. Bull.* **2018**, 63, 2128. (李卓轩, 封开政, 张薇, 马明, 顾宁, 张宇, 科学通报, **2018**, 63, 2128.)
- [27] Gao, L.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T.; Feng, J.; Yang, D.; Perrett, S.; Yan, X. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 577.
- [28] Wang, Y.; He, C.; Li, W.; Zhang, J.; Fu, Y. *Catal. Lett.* **2017**, 147, 2144.
- [29] Chen, J.; Patil, S.; Seal, S.; McGinnis, J. F. *Nat. Nanotechnol.* **2006**, 1, 142.
- [30] Liu, X.; Wang, Q.; Zhao, H.; Zhang, L.; Su, Y.; Lv, Y. *Analyst* **2012**, 137, 4552.
- [31] Wang, X.; Hu, Y.; Wei, H. *Inorg. Chem. Front.* **2016**, 3, 41.
- [32] Guo, Y.; Li, W.; Zheng, M.; Huang, Y. *Acta Chim. Sinica* **2014**, 72, 713. (郭颖, 李午戌, 郑敏燕, 黄怡, 化学学报, **2014**, 72, 713.)
- [33] Cheng, H.; Zhang, L.; He, J.; Guo, W.; Zhou, Z.; Zhang, X.; Nie, S.; Wei, H. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 5489.
- [34] Wang, Q.; Zhang, X.; Huang, L.; Zhang, Z.; Dong, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56, 16082.
- [35] Xie, J.; Cao, H.; Jiang, H.; Chen, Y.; Shi, W.; Zheng, H.; Huang, Y. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 796, 92.
- [36] Long, J. R.; Yaghi, O. M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 1213.
- [37] Wang, H.; Yuan, S.; Zhou, M.; Guo, L. *Electroanalysis* **2020**, 32, 648.
- [38] Zhao, Y.; Pan, M.; Liu, F.; Liu, Y.; Dong, P.; Feng, J.; Shi, T.; Liu, X. *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1106, 133.
- [39] Yang, Z. R.; Wang, M. M.; Wang, X. S.; Yin, X. B. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 1930.
- [40] English, J. B.; Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; Murase, I. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 258, 183.
- [41] Huo, J.; Brightwell, M.; Hankari, S. E.; Garai, A.; Bradshaw, D. J. *Mater. Chem. A* **2013**, 1, 15220.
- [42] Zhu, Q.; Chen, Y.; Wang, W.; Zhang, H.; Ren, C.; Chen, H.; Chen, X. *Sens. Actuators, B* **2015**, 210, 500.
- [43] Ren, X.; Liu, J.; Ren, J.; Tang, F.; Meng, X. *Nanoscale* **2015**, 7, 19641.
- [44] Liang, H.; Lin, F.; Zhang, Z.; Liu, B.; Jiang, S.; Yuan, Q.; Liu, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 1352.
- [45] Chen, M.; Wang, Z.; Shu, J.; Jiang, X.; Wang, W.; Shi, Z. H.; Lin, Y. W. *Inorg. Chem.* **2017**, 56, 9400.
- [46] Gao, Z.; Deng, K.; Wang, X. D.; Miró, M.; Tang, D. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 18243.
- [47] Lee, D. H.; Kim, S. Y.; Hong, J. I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 4777.

(Zhao, C.)