



## 基于纳米酶的比色生物传感器在 生物医学检测中的应用\*

袁琳 陆冬筱\*\* 李金华\*\*

(长春理工大学物理学院, 纳米光子学与生物光子学吉林省重点实验室, 长春 130022)

**摘要** 比色生物传感技术由于具有灵敏度高、方法简单并且容易操作等优点, 已广泛应用于生物环境中污染物检测、生物体内重要标志物的检测以及癌症筛查等多个领域。基于纳米酶的比色生物传感器主要是借助纳米酶自身所具有的催化能力, 模拟类过氧化物酶活性, 将显色剂氧化生成有色溶液, 从而实现可视化检测, 并通过对有色溶液吸光度的检测得到相关物质的含量。与无纳米酶的比色生物传感器相比, 基于纳米酶的比色生物传感器具有选择性更高、检测更快以及灵敏度更高等优点。纳米酶在具有天然酶活性的同时还具有成本低、稳定性好的、易于合成等优点, 其相关研究越来越广泛。目前, 基于纳米酶的比色生物传感器已成为辅助相关医学检测的重要方法, 同时也广泛应用于便携和实时性相关检测当中, 为医学检测提供了重要的支持和保障。为了提高比色生物传感器的灵敏度以及应用范围, 研究人员也在致力于增加可检测物质的种类以及纳米酶种类的多样化等。本文主要介绍基于纳米酶的比色生物传感器的检测原理、几类典型的纳米酶, 以及基于纳米酶的比色生物传感器在生物医学检测领域中的应用情况和研究进展。

**关键词** 纳米酶, 比色生物传感器, 过氧化氢, 乙酰胆碱

**中图分类号** O469

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0401

对于疾病进行有效控制和治疗的關鍵是可以在早期进行准确的检测。目前医学诊疗手段日益丰富, 但是如计算机断层扫描 (CT) 等常规检查项目无法在早期对一些慢性病 (如糖尿病、痛风以及阿尔茨海默病等) 进行准确判断。建立快速、灵敏度高、选择性好的检测方法具有十分重要的意义。纳米材料和技术的快速发展为生物传感器的研究和发 展提供了很重要的平台和手段, 目前已经有多种生物传感器应用于生物检测, 根据生物传感器中的信号不同可以将其分为电化学生物传感器、热学生物传感器、压电生物传感器、场效应管生物传感器和光学生物传感器等。电化学传感器在进行检测时, 对温度十分敏感, 所以要进行内部温度补偿, 尽可能保持温度稳定, 同时, 电化学传感器在使用寿命内会老化, 需要频繁校准; 热学传感器在进行测试时对测量温度的范围有一定的限制, 程序也较为复杂; 压电型生物传感器由于传感器的表面与液体之间的结构会影响最后模型的建立, 情况也比较

复杂; 场效应管生物传感器在将生物物质与传感器固化过程中容易引起生物物质失活等问题, 同时操作比较复杂。而作为一种典型的光学传感器——基于纳米酶的比色生物传感器, 与无纳米酶的比色生物传感器相比, 具有制作成本低、操作简单、灵敏度高以及肉眼可视等特点, 所以被越来越多的研究者所青睐。本文主要综述基于纳米酶的比色生物传感器的相关原理、纳米酶的分类以及在生物检测方面的应用和最新进展。

\* 吉林省科技发展计划 (20210101155JC), 国家自然科学基金 (62174015, 62171115), 教育部“111”创新引智项目 (D17017) 和吉林省教育厅项目 (JKH20200730KJ, JJKH20210798KJ) 资助。

\*\* 通讯联系人。

陆冬筱 Tel: 0431-85582193, E-mail: ludongxiao@cust.edu.cn

李金华 Tel: 0431-85582739, E-mail: lijh@cust.edu.cn

收稿日期: 2022-08-23, 接受日期: 2022-11-11

## 1 基于纳米酶的比色生物传感器

### 1.1 基于纳米酶的比色生物传感器的传感机理

比色传感技术主要是以颜色变化为基础, 通过肉眼观察分析物的存在和浓度变化, 进行定性的判断, 基于纳米酶的比色传感主要是基于过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 可以催化某些显色底物发生氧化反应, 从而使显色底物变色, 达到可视化检测目的。在没有纳米酶存在的情况下也可以对  $H_2O_2$  进行检测, 但存在耗时更长、选择性一般等不足, 因此, 基于纳米酶构建的比色生物传感器被越来越多的人认可。比色法主要采用目视法和分光光度计法两种方法。目视法是直接通过肉眼观察溶液颜色的深浅变化; 分光光度计法是通过物质的吸光度值变化进行测定, 不仅可以定性地对待测物质进行识别, 同时也可以定量地进行分析检测, 在满足快速便捷的同时还具有较好的准确性。目前检测的显色底物一般为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 也有其他的显色底物如 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 或邻苯二胺 (OPD) 等。以显色底物 TMB 为例, 基于纳米酶的比色生物传感器显色过程主要是, 纳米酶中的活性位点首先吸附 TMB, 给纳米酶表面提供一定的孤电子对, 导致纳米酶的电子密度和迁移率增加, 由于此时体系界面上的强相互作用, 活性位点将会得到电子被还原, 同时将电子转移到  $H_2O_2$ , 活性位点在此被氧化, 从而加速了纳米酶与 TMB 之间的电子转移过程, 使检测时间大大缩短。

### 1.2 基于纳米酶的比色生物传感器的几种器件构建形式

目前, 比色生物传感器件的构建形式主要有纸基、便携式试剂盒、琼脂糖试剂条等。

a. 纸基生物检测。首先将沃特曼 (Whatman) 滤纸穿孔成大小一致的小圆盘, 并以纳米酶作为基础, 将纳米酶载于纸上, 以获得一次性高灵敏度的纸质生物分析仪, 然后再通过智能手机应用程序 (如: Color Assist) 在 RGB 模式下监测添加待测物质后纸质设备上的比色信号, 并进行拟合, 得到试剂条颜色与待测物质浓度的函数关系。纸基的检测方法主要是, 先将定性滤纸浸入含有 TMB 的溶液中一段时间, 在室温下风干后, 滴加含有纳米酶和待检测物质的溶液, 观察纸张的颜色变化, 再进一步采用软件进行分析, 如 Jin 等<sup>[1]</sup> 首先制备了具有

高灵敏性的氢氧化钴 ( $CoOOH$ ) 纳米酶, 然后应用于制备纸基纳米酶试纸条, 并通过结合智能手机和软件, 成功构建了检测乙酰胆碱酯酶 (AChE) 传感器, 图 1 为基于纳米酶纸基法检测  $H_2O_2$  的示意图。采用纸基生物检测可以实现低成本、快速、便携检测, 为临床应用提供了一种有前景的设计。

b. 便携式水凝胶试剂盒检测。首先制备纳米酶和 TMB 的水凝胶装置, 然后在加入待检测的物质, 等待一段时间, 让待测物质更好的扩散到水凝胶装置中, 采用数码相机记录检测结果, 然后再用 Image J 软件等进行量化, 并对数据进行分析, 采用图像处理的方法得到待测物质浓度与水凝胶颜色深浅度的线性直方图。便携式水凝胶试剂盒具有操作简单、选择性好以及成本低等优点, 可以满足频繁的筛查和诊断跟踪需要。

c. 琼脂糖凝胶试剂条检测。首先制备琼脂糖试剂条, 然后将纳米酶和 TMB 固定于琼脂糖凝胶中, 用于待测物质的比色检测, 一段时间后, 可以观察到琼脂糖凝胶试剂条的颜色变化, 用 UV-vis 分析仪进一步分析, 得到试剂条吸光度与待测物质浓度的关系曲线。琼脂糖试剂条灵敏度高<sup>[2]</sup>, 有望对气体进行检测。

由于具有操作简单、灵敏度高等优点, 已经有越来越多基于比色生物传感器的器件被成功构建, 这为生物检测提供了更多思路的同时, 也为现场实时检测提供了有力的支持。但是当需要对体内的血液、尿液或其他体液进行检测时, 则要保证纳米酶可以与生物物质很好地兼容, 所以对于纳米酶生物相容性的要求也大大提高。

### 1.3 纳米酶的特点及分类

纳米酶是一类具有类似于天然酶活性的纳米材料, 既具有接近天然酶的催化活性, 又具有性质稳定、成本低、易于合成等优点, 所以纳米酶在生物检测领域具有广泛的应用前景。近年来, 越来越多的研究者发现, 多种纳米材料均具有天然酶活性, 可以表现出模拟过氧化物酶活性, 并将具有过氧化物酶活性的纳米酶应用于比色生物传感器的制备, 目前基于纳米酶的比色传感器为人们的生活以及医疗方面提供了越来越多的便捷。对基于纳米酶的比色生物传感器而言, 纳米酶的模拟过氧化物酶活性对传感器的灵敏度等性能至关重要。根据核心材料分类, 纳米酶大致可分为贵金属基纳米酶、石墨烯基纳米酶、过渡金属基纳米酶等。

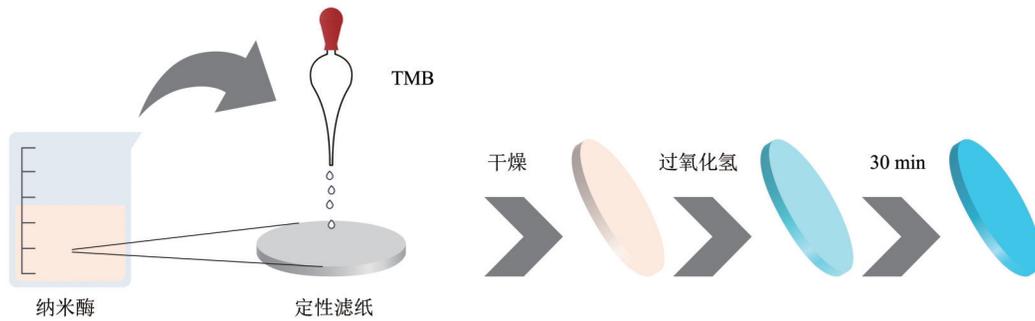


Fig. 1 Schematic diagram of detecting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> based on nanozyme paper-based method

图1 基于纳米酶纸基法检测H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的示意图

1.3.1 基于贵金属纳米酶的比色生物传感器

贵金属纳米材料由于具有独特的物理及化学性质、较好的活性位点以及局域表面等离子体共振特性，在一些领域得到较好的应用<sup>[3-6]</sup>。目前，已发现一些贵金属具有很好的模拟酶的催化活性，如金、银、铂等。Xu等<sup>[7]</sup>用不同浓度的Cu<sup>2+</sup>离子对金纳米棒进行诱导发现，不同Cu<sup>2+</sup>离子会诱导金纳

米棒 (Au NRs) 出现不同的高指数晶面，加速了活性电子从纳米酶转移到H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的过程，从而表现出较好的过氧化物酶活性，在此基础上对维生素饮料中的抗坏血酸进行了检测 (图2)，检测限可以达到25 μmol/L，为检测抗氧化分子提供了一个新的平台。与此同时，近年来对于金属Pt的报道也越来越多，由于Pt具有类辣根过氧化物酶的特性，

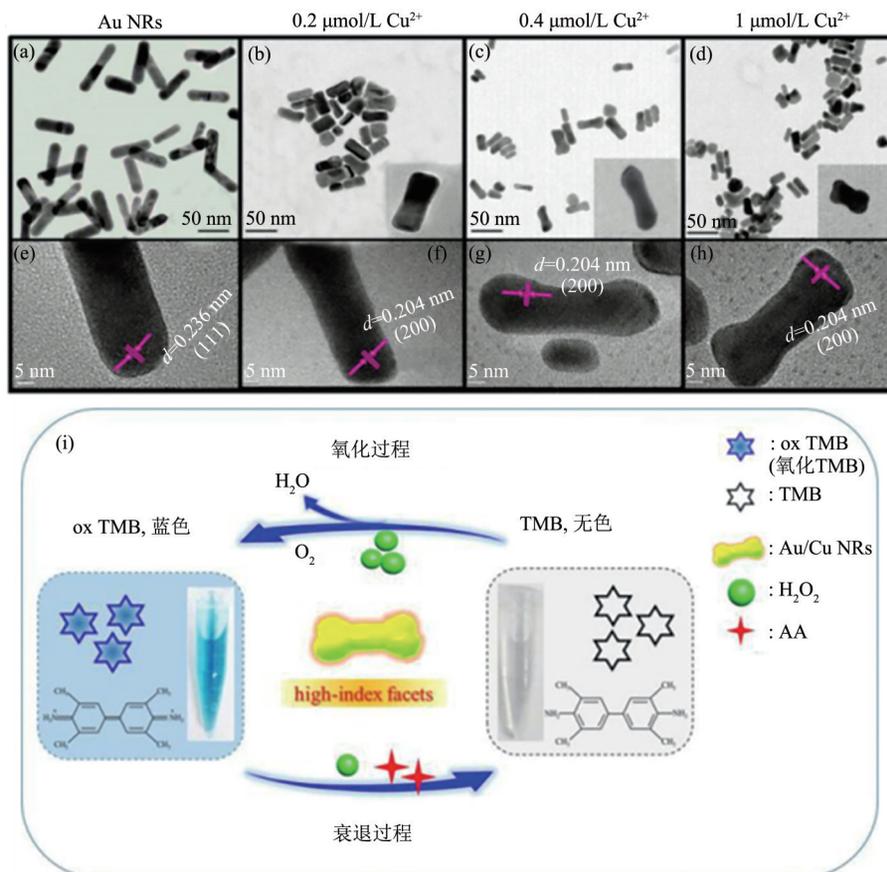


Fig. 2 TEM images of Au NRs under different copper ion concentrations and the mechanism of ascorbic acid detection<sup>[7]</sup>

图2 不同铜离子浓度下Au NRs的透射电子显微镜 (TEM) 照片以及检测抗坏血酸机制<sup>[7]</sup>

(a-d) Cu<sup>2+</sup>浓度为0 μmol/L (a)、0.2 μmol/L (b)、0.4 μmol/L (c)、1 μmol/L (d); (e-h) Cu<sup>2+</sup>浓度分别为0 μmol/L (e)、0.2 μmol/L (f)、0.4 μmol/L (g)、1 μmol/L (h); (i) 不同铜离子浓度Au NRs检测抗坏血酸的机制图。

也被越来越广泛地应用, Li等<sup>[8]</sup>研究基于BSA对金属Pt进行包覆得到BSA-Pt纳米酶, 其中Pt(0)参与底物与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的释放过程, 从而显示出较好的类辣根过氧化物酶活性, 而Hg<sup>2+</sup>离子可以通过与Pt间的亲金属相互作用调节其过氧化物酶活性, 从而

达到比色的效果。综上, 贵金属纳米酶可以很好地应用于比色生物传感器的构建, 进而很好地应用于相关生物分析检测和医学检验当中, 本文也列出基于贵金属纳米酶的比色生物传感器的检测物质以及灵敏度(表1)。

**Table 1 Colorimetric biosensor based on noble metal nanozyme was used for colorimetric detection**

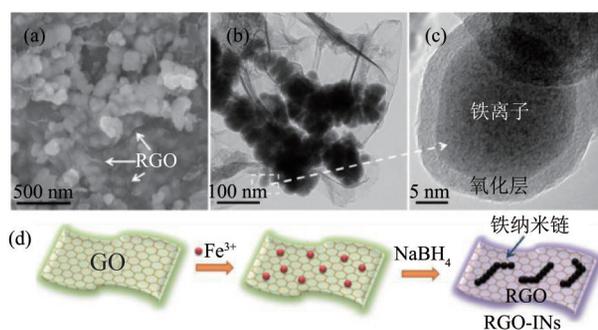
**表1 基于贵金属纳米酶比色生物传感器用于比色检测**

材料	检测物质	灵敏度	参考文献
Au/Cu NRs	抗生素	25 μmol/L	[7]
Au-Ag/L-Cys-rGO	Cr(VI)离子	26.39 μmol/L	[9]
Au QDs	硫氰酸盐(SCN <sup>-</sup> )	8 nmol/L	[10]
Pd@Au	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.78 μmol/L	[11]
GQDs-Au NPs	葡萄糖	9.28 μmol/L	[12]
	SCN <sup>-</sup>	3 nmol/L	

### 1.3.2 基于石墨烯基纳米酶的比色生物传感器

近年来, 碳纳米材料因具有多种良好的物理性质而被广泛地利用<sup>[13-17]</sup>。作为碳材料中最具代表性的材料之一, 石墨烯是一种碳原子以sp<sup>2</sup>杂化形成的, 其中碳原子紧密堆积形成具有二维蜂窝状结构的材料, 石墨烯每一个晶格内的σ键都十分稳定, 同时都贡献p轨道上一个电子形成大π键, 由于π电子可以自由运动, 所以石墨烯具有良好的导电性<sup>[18]</sup>。

石墨烯的重要衍生物之一是氧化石墨烯和还原氧化石墨烯。氧化石墨烯的表面含有较多的含氧官能团(如: 羟基、羧基和环氧基等), 因此氧化石墨烯具有更好的水溶性, 也更易与其他分子偶联, 尤其是单层的氧化石墨烯, 具有更大的比表面积以及π电子结构, 其他分子可以更加容易地通过非共价的形式结合在其表面<sup>[19]</sup>。Li等<sup>[20]</sup>采用简单的铁自催化过程, 在室温下成功合成还原石墨烯(RGO)-铁纳米颗粒(INs), 原位形成的氧化壳可以有效引导铁的循环, 同时产生具有高活性的羟基自由基(•OH), 从而表现出良好的过氧化物酶活性(图3), 基于此建立了基于该纳米酶的比色生物传感器, 成功采用比色法对过氧化氢和葡萄糖进行检测。碳基纳米材料由于具有良好的导电性、水溶性和生物相容性, 被越来越多的研究者应用于比色传感的分析检测中, 本文也列出基于石墨烯纳米酶的比色生物传感器的检测物质以及灵敏度(表2)。



**Fig. 3 Characterization and synthesis of RGO-INs**

**图3 RGO-INs表征及合成示意图**

(a) RGO-INs 扫描电子显微镜 (SEM) 照片; (b) RGO-INs TEM 照片; (c) RGO-INs 高分辨透射电子显微镜 (HRTEM) 照片; (d) RGO-INs 合成示意图<sup>[20]</sup>。

**Table 2 Colorimetric biosensor based on graphene nanozyme is used for colorimetric detection**

**表2 基于石墨烯纳米酶比色生物传感器用于比色检测**

材料	检测物质	灵敏度	参考文献
Cu-frGO	Cr(VI)	67.13 nmol/L	[21]
Por/CoO/GO	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.294 2 mmol/L	[22]
	多巴胺 (dopamine, DA)	0.139 1 μmol/L	
RuO <sub>2</sub> /rGO	葡萄糖	3.34 μmol/L	[23]
Cu-rGO	葡萄糖	10 μmol/L	[24]
CuFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /rGO	Cr <sup>3+</sup>	35 nmol/L	[25]

### 1.3.3 基于过渡金属纳米酶的比色生物传感器

过渡金属通常是指由元素周期表的d区域中(如Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、Mo等)的金属元素组

成的单质，且这些金属都有很强的电化学特性和促进电子转移性质。过渡金属纳米材料具有极好的导电性、光学、化学稳定性，拥有大量的活性催化位点，其晶体结构可调，带隙与材料厚度息息相关。上述优势激发起愈来愈多研究者对过渡金属纳米材料的研究和关注<sup>[26-31]</sup>。过渡金属材料一定的修饰后会表现出其他材料无法比拟的物理特性<sup>[32]</sup>，同时也凭借着较大的比表面积以及良好的导电性成为了可以检测化学物质或者生物物质的新型材料。

二硫化钼 ( $\text{MoS}_2$ ) 是一种典型的过渡金属硫化物，具有二维层状结构，因其较大的比表面积以及较高的载流子迁移率等优点，被研究者们称为“无机石墨烯”。 $\text{MoS}_2$  合成方法也较多，主要有化学气相沉积法<sup>[33]</sup>、水热法<sup>[34]</sup>、溶剂热法<sup>[35]</sup>以及剥离法<sup>[36]</sup>等，所以受到越来越多研究者的关注。本课题组采用化学气相沉积法制备了  $\text{MoS}_2$  薄膜，然后将金纳米阵列与单层的  $\text{MoS}_2$  进行复合，用于水产品抗菌药物残留的检测，在此基础上，成功实现了对虾体内的抗菌药物残留的检测<sup>[37]</sup>。同时我们还对单层、双层二硫化钼的超快动力学特性进行了研究<sup>[38]</sup>。

Lin 等<sup>[39]</sup>首次发现， $\text{MoS}_2$  纳米片具有固有的类过氧化物酶活性，可以催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化 TMB，产生蓝色的氧化物，在此基础上建立了一种具有较高灵敏度可以对血清中葡萄糖进行检测的方法，同时也构建了琼脂糖水凝胶试剂盒，可以更加简单、廉价、便携地对血清中的葡萄糖进行检测。研究表明， $\text{MoS}_2$  纳米粒子的过氧化物酶活性与其表面所带的电荷息息相关，检测示意图如图 4 所示<sup>[40-41]</sup>。很多研究者对其进行了一定的表面修饰以获得较高

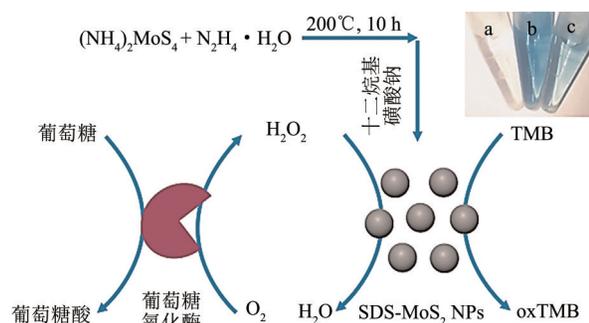


Fig. 4 Preparation process of SDS- $\text{MoS}_2$  NPs and schematic diagram of detecting  $\text{H}_2\text{O}_2$  and glucose<sup>[40]</sup>

图4  $\text{SDS-MoS}_2$  NPs的制备过程以及检测 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和葡萄糖示意图<sup>[40]</sup>

的灵敏度。 $\text{MoS}_2$  因比表面积大、电子迁移率高等优点被很好地应用于比色分析中。单纯裸露的  $\text{MoS}_2$  不溶于水，所以通常要对其表面进行修饰或与其他材料复合以增强其稳定性和分散性。 $\text{MoS}_2$  催化活性往往受其层数、厚度和形状等的影响，目前对其如何调控还需要进一步的研究。此外，研究表明，还有一些过渡金属硫化物具有良好的类酶特性，如二硫化钨 ( $\text{WS}_2$ )、硫化钴 ( $\text{CoS}$ ) 等。Lin 等<sup>[42]</sup>首次发现， $\text{WS}_2$  具有过氧化物酶活性，可以对葡萄糖采用比色法进行检测和分析；Das 课题组<sup>[43]</sup>基于  $\text{CoS}$ /还原石墨烯的复合材料较好的纳米酶特性，研制了一种简单的比色法对  $\text{Hg}^{2+}$  进行分析。对于过渡金属硫族化合物的研究越来越广泛，也成功地应用于比色生物传感领域，这为相关医学检测的应用提供了有力帮助，本文也列出基于过渡金属纳米酶的比色生物传感器的检测物质以及灵敏度 (表 3)。

Table 3 Colorimetric biosensors based on transition metal nanoenzymes are used for colorimetric detection

表3 基于过渡金属纳米酶比色生物传感器用于比色检测

材料	检测物质	灵敏度	参考文献
ZnO-g- $\text{C}_3\text{N}_4/\text{MoS}_2$	Hg (II)	1.9 nmol/L	[44]
$\text{WS}_2$	葡萄糖	0.144 5 nmol/L	[45]
$\text{MoS}_2@\text{CoFe}_2\text{O}_4$	半胱氨酸	0.10 $\mu\text{mol/L}$	[46]
	谷胱甘肽	0.21 $\mu\text{mol/L}$	
$\text{MoS}_2\text{-CPBNPs}$	多巴胺 (DA)	0.09 $\mu\text{mol/L}$	[47]
$\text{MoS}_2$ NSs	葡萄糖	2.1 $\mu\text{mol/L}$	[48]

目前已经有越来越多的材料被发现可以作为纳米酶，纳米酶的出现不仅弥补了天然酶的稳定性差等不足，也大大推进了在生物医学检测方面的进步

和应用，让疾病的早期干预和治疗变成可能，同时也为人们的生活提供了更多的保障。

## 2 基于纳米酶的比色生物传感器在生物医学检测中的应用

与天然酶相比, 纳米酶具有性质稳定、成本低、易于合成同时可以将一些信号放大等优点。基于纳米酶的比色生物传感器具有较高的灵敏度和较低的成本, 因此, 在生物环境检测、生物体内相关标志物检测和癌症早期筛查等有方面有着较好的应用前景。

### 2.1 生物环境检测应用

生物环境与人们的生产生活等方面息息相关, 尤其在食品安全方面的相关检测需要更加准确且便捷。其中常见的检测物质是 $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$ 经常作为稳定剂、防腐剂、漂白剂或于消毒剂来使用, 尤其是牛奶等相关饮品的处理和包装当中, 残留的 $H_2O_2$ 可能对人体造成一定的危害, 所以对于食品中 $H_2O_2$ 的检测具有重要意义。Fu等<sup>[49]</sup>通过简单的溶剂热方法制备了MIL-88B-Fe-MOF纳米酶, 证明其具有良好的酶活性, 并建立基于该纳米酶的比色传感平台。该传感平台在10~100  $\mu\text{mol/L}$ 范围内表现出较高的灵敏度, 其用于牛奶和啤酒样品中 $H_2O_2$ 的可行性得到了初步验证。上述工作体现了纳米酶在食品分析检测中的巨大潜力。与大尺寸的Fe基纳米酶相比, 超小型的量子点水溶性可以大大提高, 同时也增强了其与底物之间的亲和能力。2022年, Li等<sup>[50]</sup>通过实验发现, 采用两步水热法制备的超小型 $Fe_3O_4$ 量子点, 比 $Fe_3O_4$ 纳米颗粒具有更高的酶活性, 并用海藻酸钠(SA)将所制备的量子点包覆, 不仅提高了量子点的水溶性同时也显著增强了其酶活性。酶活性的显著提高可能归因于SA基质的引入可以很好地增强纳米酶与TMB之间的亲和力。此外, 利用SA的强成膜功能, 他们将TMB涂覆在阵列毛细管上, 开发并建立了一种阵列毛细管的快速比色分析方法, 其浓度检测范围可以达到10~400  $\mu\text{mol/L}$ , 这种便携式比色传感装置可以提高现场评估能力, 同时也有望应用于食品安全的检测中。与单纯的纳米颗粒相比, 具有三维结构的纳米酶由于其具有更高的比表面积进而会增加与底物之间的接触面积, 从而对催化活性有一定的提高。本课题组制备了具有独特三维结构的ZIF-67/rGO纳米酶, 并制作了基于该纳米酶的生物传感平台(图5), 实现了对 $H_2O_2$ 的灵敏检测(检测

限低至3.81  $\mu\text{mol/L}$ ), 同时也通过对牛奶样品中 $H_2O_2$ 的检测, 证明了其作为比色生物传感器具有很大的适用性, 为一些实际应用检测提供了很大的帮助<sup>[51]</sup>。抗氧化剂在食物系统中的综合活性是生物或食物环境等分析中必不可少的参数之一, 选择具有较强抗氧化能力的食物可以在一定程度上减少致病风险, 延长寿命<sup>[52]</sup>。Liang等<sup>[53]</sup>从墨鱼汁中提取天然黑色素纳米颗粒作为载体并以 $Fe^{3+}$ 进行功能化, 得到具有较高稳定性和活性的Fe-NMPs纳米酶, 用于生物环境中抗坏血酸(AA)的检测, 检测范围为5~250  $\mu\text{mol/L}$ , 最低检出限达到12.61  $\mu\text{mol/L}$ , 测试结果与饮料和水果中结果相似, 验证了该纳米酶进行实际抗氧化能力检测的可行性<sup>[53]</sup>。谷胱甘肽(GSH)作为一种天然多肽存在于稳定的细胞环境中, 维持着正常生物体的免疫系统功能, 血浆中GSH异常会导致衰老、心血管疾病等<sup>[54]</sup>, Li等<sup>[55]</sup>首先制备了 $WS_2$ 材料, 将其应用于GSH检测, 在100 pmol/L~10 nmol/L范围内均表现出良好的线性关系, 这也为食品以及细胞环境GSH的测定提供了有力的帮助和支持。

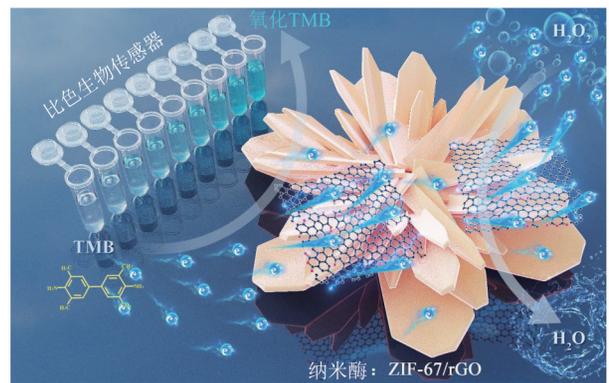


Fig. 5 Schematic of the colorimetric detection of  $H_2O_2$  using daisy-like ZIF-67/rGO nanozyme biosensor platform<sup>[51]</sup>

图5 基于ZIF-67/rGO生物传感平台比色检测 $H_2O_2$ 示意图<sup>[51]</sup>

### 2.2 生物标志物检测应用

疾病的发生一般会引体内某种标志物的特征性指标发生变化, 从而可以通过测定特定的生物标志物以获得生物体所处状态。本文将对乙酰胆碱、胆固醇、葡萄糖等生物体内重要标志物的检测及相关的检测原理进行总结, 同时也为其他相关标志物

的检测和应用提供一定的思路和方向。

### 2.2.1 乙酰胆碱的检测

乙酰胆碱 (ACh) 在生物体内发挥着不可或缺的作用。作为重要的神经递质, ACh 在生物体内的神经信号传递中发挥重要作用, 其紊乱与一些神经系统疾病, 如阿尔茨海默病、帕金森病<sup>[56]</sup>等, 密切相关。准确地测定生物体内 ACh 含量对于临床诊断相关疾病具有十分重要的意义。ACh 的检测原理是, 首先 AChE 降解 ACh 后生成胆碱, 在溶解氧的存在下, 胆碱氧化生成甜菜碱和  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  在纳米酶的催化下, 可以将一些显色底物进行氧化, 生成肉眼可见的有色物质。

Ni 等<sup>[57]</sup> 采用 Ag [I] 离子-TMB 通过比色法对 AChE 及其抑制剂进行检测。实验表明, 该方法具有较高的灵敏度, 检测限可以达到 4.3 nU/L。该系统也可以应用于 AChE 抑制剂的检测。该系统检测方法简单, 灵敏度较高, 具有较好的应用前景。2019年, Lu 课题组<sup>[1]</sup> 设计了一种基于胆碱氧化酶/氧化钴 (CHO/CoOOH) 的新型比色传感器, 用于 AChE 的灵敏检测, 并将其制备成试纸条, 可以目视和定性地检测 AChE, 同时使用智能手机和 Image J 软件实现对 AChE 的定量检测。该组也开发了一种新的基于蛋白质-无机杂交纳米花作为人工过氧化物酶的比色传感器 (图6) 该传感器主要包括一个测试工具和一个智能手机阅读器, 可以较为准确地测定人体血清中的 ACh。Lu 课题组利用该平台制备了用于 ACh 快速定性监测的便携式琼脂糖凝胶试剂盒, 结合手机 Image J 程序, 将检测试剂的图像信息转化为色相参数, 为检测 ACh 提供了直接的定量工具<sup>[58]</sup>。Lu 课题组方案的提出不仅为检测溶液中的 ACh 提出了新的想法, 也为检测方法的实际应用提供了更多的便利。通过将纸基和琼脂糖等器件与智能手机有机结合, 成功构建了 AChE 监测传感器, 为临床应用提供了新的设计方案。

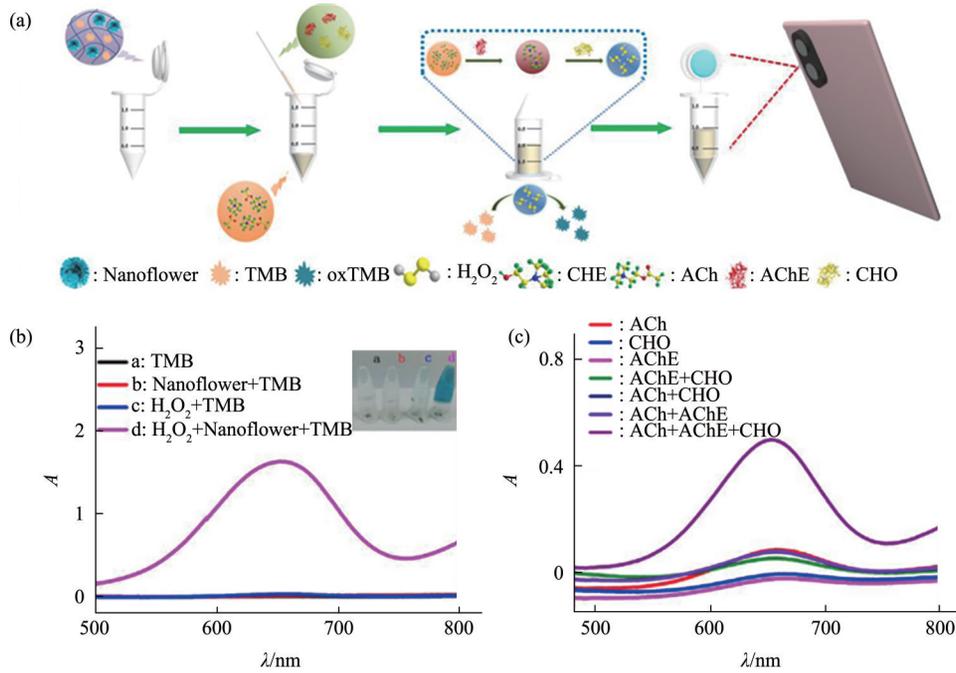
### 2.2.2 胆固醇的检测

胆固醇的测定对于多种临床疾病 (如: 低蛋白血症、贫血、败血症、营养不良、高血压、冠心病、动脉硬化以及心肌梗死等) 的诊断以及预防具有重要意义<sup>[59]</sup>。建立一种简单方便、经济实惠的胆固醇准确检测方法十分重要。胆固醇<sup>[60]</sup> 在胆固醇氧化酶存在的情况下, 可以产生胆甾烯酮和  $H_2O_2$ , 进而  $H_2O_2$  将显色底物氧化, 从而达到比色法检测的目的。

Hong 等<sup>[61]</sup> 通过耦合具有过氧化物酶活性的聚吡咯纳米粒子 (PPy NPs) 和胆固醇氧化酶 (ChOx), 构建了一种简单、方便的利用比色法对胆固醇进行检测的方法, 其线性范围为 10~100  $\mu\text{M}$ , 检测限为 3.5  $\mu\text{M}$ 。他们利用该体系设计了一种简易的检测试剂盒, 实现了对人体血清中胆固醇可视化检测, 为临床诊断以及健康管理提供了有力的帮助。目前, 有越来越多的检测方案采用有机分子对无机纳米材料进行一定的修饰, 以获得更好的催化活性, 从而对生物分子进行更灵敏的检测。Liu 课题组<sup>[62]</sup> 用 5,10,15,20-四 (4-羧基苯基) 卟啉功能化  $NiS_2$  纳米颗粒, 然后将其锚定在石墨烯 (Por- $NiS_2/GO$ ) 表面。卟啉分子和二维石墨烯的引入极大增强了 Por- $NiS_2/GO$  的过氧化物酶活性。由此, 他们构建了基于 Por- $NiS_2/GO$  纳米酶的快速、灵敏且具有选择性的比色生物传感平台 (图7), 通过对血清样本中胆固醇的检测验证了其有效性。该组还采用简单有效的溶剂热方法制备了 5,10,15,20-四 (4-羧基苯基) 卟啉功能化  $NiCo_2S_4$  蛋黄壳纳米球 (Por- $NiCo_2S_4$ ), 证明与纯  $NiCo_2S_4$  纳米颗粒相比, Por- $NiCo_2S_4$  具有更加明显的催化活性, 并结合胆固醇氧化酶 (Chox) 建立基于 Por- $NiCo_2S_4$  的比色生物传感平台, 该平台可在 0.1~9.0 mmol/L 范围内进行检测, 检测限低至 19.36  $\mu\text{mol/L}$ 。该纳米酶也成功用于测定人体血清中的胆固醇水平<sup>[63]</sup>。将无机纳米材料与有机分子进行复合可以在一定程度上增强其过氧化物酶活性, 有机分子的引入也可以在一定程度上增强其水溶性, 避免了部分纳米酶水溶性不好的问题, 为纳米酶的进一步发展和应用于更多生物分子的检测提供了思路和可能。

### 2.2.3 葡萄糖的检测

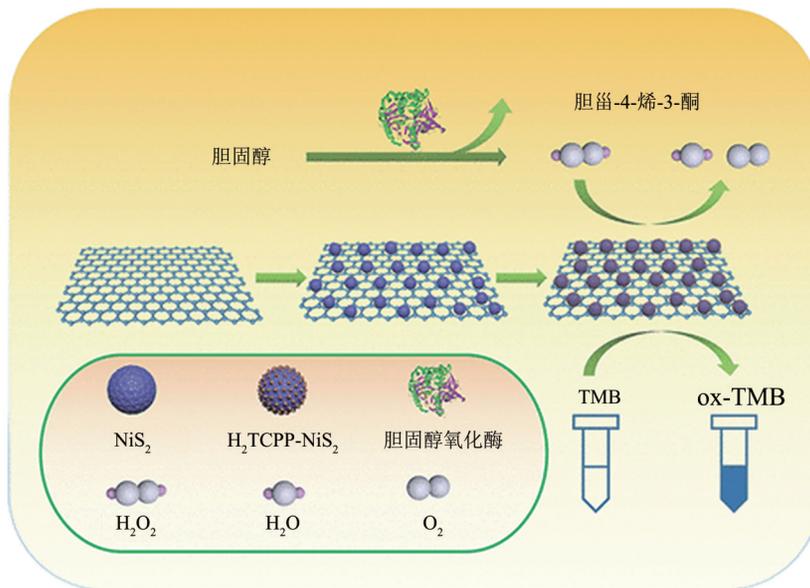
葡萄糖在细胞新陈代谢中发挥重要作用, 是生物体的重要能量来源, 对于维持人体正常的生理功能具有重要意义。越来越多的研究者也致力于葡萄糖检测研究。通常检测葡萄糖的机理如下, 由于葡萄糖氧化酶 (GOx) 存在时, 可以将葡萄糖氧化为葡萄糖酸, 同时产生  $H_2O_2$ , 然后再对显色底物 TMB 进行氧化, 得到不同葡萄糖浓度与吸光度之间的线性关系<sup>[64]</sup>。2018年, Vinita 等<sup>[65]</sup> 在二硫化钼上修饰金纳米粒子简单合成了  $AuNPs@MoS_2-QD$ , 构成了一个比色法检测平台, 该平台在室温下性能稳定, 可以对葡萄糖进行灵敏和选择性分析。Wang 等<sup>[66]</sup> 通过在还原氧化石墨烯 (rGO) 上修饰  $MoS_2$  纳米花和  $V_2O_5$  纳米颗粒得到一种新的纳米酶



**Fig. 6 Determination of acetylcholine in serum and its absorption spectrum by protein-inorganic hybrid nanoflowers**

**图6 蛋白质-无机杂化纳米花检测血清中乙酰胆碱及吸收光谱**

(a) 蛋白质-无机杂化纳米花检测血清中乙酰胆碱示意图。(b) 反应溶液的UV-vis吸收曲线。a: 空白对照, b: 纳米花, c:  $H_2O_2$ , d: 纳米花+ $H_2O_2$ , 插图为对应的颜色变化。(c) 不同物质在纳米花/TMB体系中的紫外-可见吸收光谱<sup>[58]</sup>。



**Fig. 7 Schematic illustration of the fabrication procedure of Por-NiS<sub>2</sub>/GO and the process of detecting cholesterol<sup>[62]</sup>**

**图7 Por-NiS<sub>2</sub>/GO纳米酶的制备和检测胆固醇过程的示意图<sup>[62]</sup>**

(3D  $V_2O_5$ - $MoS_2$ /rGO), 并证明其具有过氧化物酶活性, 可以对人体血样和尿液中的葡萄糖可以灵敏检测。三维纳米酶的制备在一定程度上更好地提供了催化位点, 与 rGO 的复合也更大程度上解决了

$MoS_2$  的水溶性差的问题, 进一步提高了纳米酶的催化活性。越来越多的纳米酶采用绿色合成的方法, 在保证无污染、催化活性高的同时也更好地增加了其生物相容性。2021年, Alle 等<sup>[67]</sup> 采用新型

微波绿色原位合成阳离子纳米纤维 (C.CNF) 负载金纳米粒子 (AuNPs) 的方法, 合成了 (AuNPs@C.CNF) 纳米酶薄膜, 并建立基于此的比色生物传感平台, 此平台具有灵敏、快速、操作简单和可回收等优点, 在生物医学、生物检测等相关领域具有十分广阔的前景。

### 2.3 癌症诊断应用

21 世纪, 癌症已严重地影响了人类健康, 目前对于癌症的诊断、筛查手段主要有 CT 和核磁共振检查等, 但是无论哪种检测方法对于身体都是有一定的伤害。有报道指出, 癌细胞内  $H_2O_2$  的含量明显高于人体正常细胞内  $H_2O_2$  的含量<sup>[68]</sup>, 可以通过对  $H_2O_2$  的含量检测实现对癌症的诊断做到早期干预和治疗。Zhang 等<sup>[69]</sup> 通过将多孔铂纳米粒子原位生长在氧化石墨烯的表面获得了具有较强过氧化物酶活性的纳米酶, 成功对乳腺癌细胞 (MCF-7) 中的  $H_2O_2$  进行比色检测。2021 年, Lian 等<sup>[70]</sup> 通过调节聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 作为不同的模板剂, 设计了一种双金属硫化物  $NiCo_2S_4$  (PVP) 和  $NiCo_2S_4$  (CTAB) 纳米材料, 并证明  $NiCo_2S_4$  (PVP) NP 表现出优异的过氧化物酶活性和高特异性。 $NiCo_2S_4$  (PVP) NP 具有优异的催化活性的主要可能归因于其具有较高的 Ni/Co 比, 而较高的特异性则归因于 TMB 的阳离子与  $NiCo_2S_4$  (PVP) NP 阴离子之间的强静电驱动协同作用, 在较强的静电驱动作用下进行检测可以在一定程度上增强其特异性。双金属硫化物的构建也使  $NiCo_2S_4$  (PVP) NP 稳定性在一定程度上有所增强。以  $NiCo_2S_4$  (PVP) NP 基纳米酶模拟物作为传感平台, 可以实现对  $H_2O_2$  的高灵敏、高选择检测, 在具有良好的生物相容性的同时生物毒性较低, 可以检测人乳腺癌 (MDA-MB-231) 细胞中产生的  $H_2O_2$ , 这为建立高特异性纳米酶提供了新的方向和思路。

### 2.4 病毒、重金属检测应用

纳米酶还可用于对病毒、重金属离子等的检测。Khoris 等<sup>[71]</sup> 通过采用自组装的方法制备了蛋白质-无机铜纳米花作为纳米酶, 并通过自组装和纳米共沉淀制备了 TMB-NP 包覆 PLGA 纳米囊泡作为信号放大源, 该方法用于高选择和高灵敏度地检测流感病毒 (IV) /A, 在缓冲液和血清中的检出限分别低至 32.37 pg/L 和 54.97 pg/L, 该方法还可检测到临床分离的严重急性呼吸综合征冠状病毒 2

(SARS-CoV-2) IV/A/H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 和刺突蛋白, 检出限分别为 17 pfu/ml 和 143 fg/L, 实现了较高灵敏度的检测。Khoris 等的方法为各种呼吸道感染病毒的检测提供了一个可靠、易于适应且高灵敏的检测平台。Buyuksunetci 等<sup>[72]</sup> 合成了具有磁性的  $\gamma Fe_2O_3$  纳米酶, 并通过比色法检测了 SARS-CoV-2, 同时也将其应用于实际样品检测, 得到的结果与聚合酶链式反应 (PCR) 检测法一致, 同时该方法也可以很好地应用于新冠病毒  $\alpha$  型的变异检测, 该检测系统为新型冠状病毒感染 (COVID-19) 疑似病例的诊断和筛查提供了强有力的支持和保障。如今, 公众越来越注重健康和环保, 所以快速、高灵敏度和高选择性地对水中有毒物质进行检测也具有重要意义。Zhang 等<sup>[73]</sup> 通过化学键合合成了 rGO/PEI/Au 纳米酶, 当溶液中存在微量  $Cr^{6+}$  离子时, 在纳米酶的催化下, 可以触发 TMB 与  $H_2O_2$  的反应, 从而产生视觉上的变化, 实现可视化检测, 检测限低至 2.14 nmol/L; Borthakur 等<sup>[74]</sup> 采用溶剂热的方法合成了 CuS/prGO 和 NiS/p-rGO 纳米酶, 当  $H_2O_2$  存在时, 纳米酶可以催化其氧化 TMB, 而 Hg (II) 存在时可以抑制纳米酶的氧化, 阻断催化活性位点, 降低催化效率, 从而达到可视化检测的目的, 合成的 CuS/prGO 和 NiS/p-rGO 纳米酶对 Hg (II) 的灵敏度可达 13.05 nmol/L 和 48.73 nmol/L。

## 3 总结与展望

本文主要对常见几种标志物——乙酰胆碱、胆固醇和葡萄糖的检测进展和检测原理以及癌症的早期筛查和诊断进行了相关综述和介绍, 同时也对其其他方面如病毒和重金属离子的相关检测进行了介绍和分析, 这将为生物体内其他标志物的检测以及医学上检测和早期诊断提供了有力支持和保障。

目前基于纳米酶在生物传感领域研究与应用的综述很多, 但是都仅给出了基于纳米酶在传感领域的相关检测应用和一些纳米酶的进展, 并未全面给出基于纳米酶的比色生物传感器的相关检测机理, 本文综述了纳米酶的相关典型分类以及对生物物质的检测原理和相关机理, 同时也对目前基于纳米酶的比色生物传感器总结出以下问题并进行展望。

### 3.1 现存问题

作为天然酶替代物的纳米酶与底物的特异性关系尚未很好地解决; 目前存在的纳米酶的反应类型对于所有酶反应来说还不够全面; 纳米酶的生物毒

性以及生物相容性还有待进一步探索。

### 3.2 展望

可以通过引入一些配体(如适配体或分子聚合物等),采用底物结合特异性较高的材料进行复合,扩大可适用的催化条件等以提高纳米酶与底物的特异性关系。目前纳米酶的反应类型主要有氧化还原、水解等,未来需要对于不同纳米酶种类的反应进行分类研究,进一步增加纳米酶的种类,以适应更多的酶反应。由于纳米酶在未来是面向生物检测,所以在提高纳米酶的酶活性的同时也要考虑其生物相容性、生物毒性,以及是否会对环境造成污染,也可以对纳米酶进行适当的表面修饰,争取研制出绿色、环保的纳米酶以更好地应用于生物医学检测。

### 参 考 文 献

- Jin R, Xing Z H, Kong D S, *et al.* Sensitive colorimetric sensor for point-of-care detection of acetylcholinesterase using cobalt oxyhydroxide nanoflakes. *J Mat Chem B*, 2019, **7**(8): 1230-1237
- Zeng J B, Cao Y Y, Chen J J, *et al.* Au@Ag core/shell nanoparticles as colorimetric probes for cyanide sensing. *Nanoscale*, 2014, **6**(17): 9939-9943
- Li X W, Han C H, Lu D X, *et al.* Highly electron-depleted ZnO/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/Au hollow meshes as an advanced material for gas sensing application. *Sens Actuator B Chem*, 2019, **297**: 126769
- Li X W, Zhou X, Guo H, *et al.* Design of Au@ZnO Yolk-Shell Nanospheres with enhanced gas sensing properties. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, **6**(21): 18661-18667
- Li X W, Feng W, Xiao Y, *et al.* Hollow zinc oxide microspheres functionalized by Au nanoparticles for gas sensors. *RSC Adv*, 2014, **4**(53): 28005-28010
- Li X W, Zhao L, Shao C L, *et al.* Immobilization of ultrafine Ag nanoparticles on well-designed hierarchically porous silica for high-performance catalysis. *J Colloid Interface Sci*, 2018, **530**: 345-352
- Xu S Y, Dong X J, Chen S Q, *et al.* The preparation of high-index facet Au/Cu NRs and their application for colorimetric determination ascorbic acid. *Sens Actuator B Chem*, 2019, **281**: 375-382
- Li W, Bin C, Zhang H X, *et al.* BSA-stabilized Pt nanozyme for peroxidase mimetics and its application on colorimetric detection of mercury(II) ions. *Biosens Bioelectron*, 2015, **66**: 251-258
- Das P, Borthakur P, Boruah P K, *et al.* Peroxidase mimic activity of Au-Ag/L-Cys-rGO nanozyme toward detection of Cr(VI) ion in water: role of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine adsorption. *J Chem Eng Data*, 2019, **64**(11): 4977-4990
- Ahmed S R, Sherazee M, Srinivasan S, *et al.* Positively charged gold quantum dots: an nanozymatic "off-on" sensor for thiocyanate detection. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2022, **11**(9): 1189
- Li F, Hu Y T, Zhao A Q, *et al.* beta-Cyclodextrin coated porous Pd@Au nanostructures with enhanced peroxidase-like activity for colorimetric and paper-based determination of glucose. *Microchim Acta*, 2020, **187**(8): 425
- Ahmed S R, Sherazee M, Srinivasan S, *et al.* Nanozymatic detection of thiocyanate through accelerating the growth of ultra-small gold nanoparticles/graphene quantum dots hybrids. *Food Chem*, 2022, **379**: 132152
- Lu D X, Li J H, Lu G H, *et al.* Enhanced photovoltaic properties of dye-sensitized solar cells using three-component CNF/TiO<sub>2</sub>/Au heterostructure. *J Colloid Interface Sci*, 2019, **542**: 168-176
- Lu D X, Qin L G, Liu D Y, *et al.* High-efficiency dye-sensitized solar cells based on bilayer structured photoanode consisting of carbon nanofiber/TiO<sub>2</sub> composites and Ag@TiO<sub>2</sub> core-shell spheres. *Electrochim Acta*, 2018, **292**: 180-189
- Jiang Q, Liu M Z, Shao C L, *et al.* Nitrogen doping polyvinylpyrrolidone-based carbon nanofibers via pyrolysis of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> with tunable chemical states and capacitive energy storage. *Electrochim Acta*, 2020, **330**: 135212
- Tao R, Li X H, Li X W, *et al.* TiO<sub>2</sub>/SrTiO<sub>3</sub>/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ternary heterojunction nanofibers: gradient energy band, cascade charge transfer, enhanced photocatalytic hydrogen evolution, and nitrogen fixation. *Nanoscale*, 2020, **12**(15): 8320-8329
- Tao R, Yang S, Shao C L, *et al.* Reusable and flexible g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Polyacrylonitrile heterojunction nanofibers for photocatalytic dye degradation and oxygen evolution. *ACS Applied Nano Materials*, 2019, **2**(5): 3081-90
- Qin C L, Lu X, Yin G P, *et al.* Activated nitrogen-enriched carbon/carbon aerogel nanocomposites for supercapacitor applications. *T Nonferr Metal Soc*, 2009, **19**(S3): 738-742
- Dreyer D R, Park S, Bielawski C W, *et al.* The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev*, 2010, **39**(1): 228-240
- Li L L, Zeng C M, Ai L H, *et al.* Synthesis of reduced graphene oxide-iron nanoparticles with superior enzyme-mimetic activity for biosensing application. *J Alloys Compounds*, 2015, **639**: 470-477
- Borthakur P, Boruah P K, DAS M R, *et al.* Cu(0) nanoparticle-decorated functionalized reduced graphene oxide sheets as artificial peroxidase enzymes: application for colorimetric detection of Cr(VI) ions. *New J Chem*, 2019, **43**(3): 1404-1414
- Zhao X, Zhao S, Li S, *et al.* CoO nanotubes loaded on graphene and modified with porphyrin moieties for colorimetric sensing of dopamine. *ACS Applied Nano Materials*, 2021, **4**(9): 8706-8715
- Li H L, Sun H Y, Ding J W, *et al.* RuO<sub>2</sub>/rGO heterostructures as mimic peroxidases for colorimetric detection of glucose. *Microchim Acta*, 2022, **189**(7): 1-9
- Kim K, Nanaji C K, Kimshinik, *et al.* Facile single-step synthesis of Cu-rGO nanocomposite through simultaneous reduction process and its peroxidase mimic activity. *J Ind Eng Chem*, 2021, **95**: 388-396
- Yi W W, Zhang P, Wang Y P, *et al.* Copper ferrite nanoparticles loaded on reduced graphene oxide nanozymes for the ultrasensitive colorimetric assay of chromium ions. *Anal Methods*,

- 2022, **14**(35): 3434-3443
- [26] Zheng X Y, Tian L C, Qi Y, *et al.* Preparation and characterization of wheat spike CuO array thin film. *Nano*, 2021, **16**(5):2150057
- [27] Han X, Lin Z, He X, *et al.* The construction of defective FeCo-LDHs by *in-situ* polyaniline curved strategy as a desirable bifunctional electrocatalyst for OER and HER. *Int J Hydrog Energy*, 2020, **45**(51):26989-26999
- [28] Li X W, Wang C, Guo H, *et al.* Double-shell architectures of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanosheets on ZnO hollow spheres for high-performance gas sensors. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, **7**(32): 17811-17818
- [29] Li X W, Lu D X, Shao C L, *et al.* Hollow CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/alpha-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> composite with ultrathin porous shell for acetone detection at ppb levels. *Sens Actuator B Chem*, 2018, **258**: 436-446
- [30] Li X, Zhou X, Liu Y, *et al.* Microwave hydrothermal synthesis and gas sensing application of porous ZnO core-shell microstructures. *RSC Adv*, 2014, **4**(61): 32538-32543
- [31] Zhang J, Xin J Y, Shao C L, *et al.* Direct Z-scheme heterostructure of p-CuAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/n-Bi<sub>2</sub>WO<sub>6</sub> composite nanofibers for efficient overall water splitting and photodegradation. *J Colloid Interface Sci*, **550**: 170-179
- [32] Tan C, Cao X, Wu X J, *et al.* Recent advances in ultrathin two-dimensional nanomaterials. *Chem Rev*, 2017, **117**(9): 6225-6331
- [33] Shi J P, Ma D L, Han G F, *et al.* Controllable growth and transfer of mono layer MoS<sub>2</sub> on Au foils and its potential application in hydrogen evolution reaction. *ACS Nano*, 2014, **8**(10): 10196-10204
- [34] Tang G G, Sun J R, Chen W, *et al.* Surfactant-assisted hydrothermal synthesis and tribological properties of flower-like MoS<sub>2</sub> nanostructures. *Micro Nano Lett*, 2013, **8**(3): 164-168
- [35] Li Y G, Wang H L, Xie L M, *et al.* MoS<sub>2</sub> nanoparticles grown on graphene: an advanced catalyst for the hydrogen evolution reaction. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(19): 7296-7299
- [36] Liu N, Kim P, Kim J H, *et al.* Large-area atomically thin MoS<sub>2</sub> nanosheets prepared using electrochemical exfoliation. *ACS Nano*, 2014, **8**(7): 6902-6910
- [37] Zhai Y J, Yang H, Zhang S N, *et al.* Controllable preparation of the Au-MoS<sub>2</sub> nano-array composite: optical properties study and SERS application. *J Mater Chem C*, 2021, **9**(21): 6823-6833
- [38] Lu D X, Zhou Q, Li F F, *et al.* Influence of interlayer interactions on the relaxation dynamics of excitons in ultrathin MoS<sub>2</sub>. *Nanoscale Adv*, 2019, **1**(3): 1186-1192
- [39] Lin T, Zhong L, Guo L, *et al.* Seeing diabetes: visual detection of glucose based on the intrinsic peroxidase-like activity of MoS<sub>2</sub> nanosheets. *Nanoscale*, 2014, **6**(20): 11856-11862
- [40] Zhao K, Gu W, Zheng S, *et al.* SDS-MoS<sub>2</sub> nanoparticles as highly-efficient peroxidase mimetics for colorimetric detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose. *Talanta*, 2015, **141**(Complete): 47-52
- [41] Lu Y, Yu J, Ye W C, *et al.* Spectrophotometric determination of mercury(II) ions based on their stimulation effect on the peroxidase-like activity of molybdenum disulfide nanosheets. *Mikrochim Acta*, 2016, **183**: 2481-2489
- [42] Lin T R, Zhong L S, Song Z P, *et al.* Visual detection of blood glucose based on peroxidase-like activity of WS<sub>2</sub> nanosheets. *Biosens Bioelectron*, 2014, **62**: 302-307
- [43] Borthakur P, Darabdhara G, Das M R, *et al.* Solvothermal synthesis of CoS/reduced porous graphene oxide nanocomposite for selective colorimetric detection of Hg(II) ion in aqueous medium. *Sens Actuator B Chem*, 2017, **244**: 684-692
- [44] Christus A A B, Pannheerselvam P, Ravikumar A, *et al.* MoS<sub>2</sub> nanosheet mediated ZnO-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocomposite as a peroxidase mimic: catalytic activity and application in the colorimetric determination of Hg(II). *RSC Adv*, 2019, **9**(8): 4268-4276
- [45] Jiao Y F, Li J T, Xiang J Y, *et al.* Tungsten disulfide nanosheets-based colorimetric assay for glucose sensing. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, **242**: 118706
- [46] Xian Z Q, Zhang L, Yu Y, *et al.* Nanozyme based on CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> modified with MoS<sub>2</sub> for colorimetric determination of cysteine and glutathione. *Microchim Acta*, 2021, **188**(3): 65
- [47] Zhu Z Q, Gong L B, Miao X Y, *et al.* Prussian blue nanoparticle supported MoS<sub>2</sub> nanocomposites as a peroxidase-like nanozyme for colorimetric sensing of dopamine. *Biosensors*, 2022, **12**(5): 260
- [48] Shi R, He Q L, Cheng S Q, *et al.* Determination of glucose by using MoS<sub>2</sub> nanosheets as a peroxidase mimetic enzyme. *New J Chem*, 2021, **45**(38): 18048-18053
- [49] Fu M J, Chai B, Yan J T, *et al.* Facile preparation of MIL-88B-Fe metal-organic framework with high peroxidase-like activity for colorimetric detection of hydrogen peroxide in milk and beer. *Appl Phys A*, 2021, **127**(12): 928
- [50] Li P, Zhang S, Xu C C, *et al.* Coating Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> quantum dots with sodium alginate showing enhanced catalysis for capillary array-based rapid analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in milk. *Food Chem*, 2022, **380**: 132188
- [51] Lu D X, Li J H, Wu Z, *et al.* High-activity daisy-like zeolitic imidazolate framework-67/reduced graphene oxide-based colorimetric biosensor for sensitive detection of hydrogen peroxide. *J Colloid Interface Sci*, 2022, **608**: 3069-3078
- [52] Lou Z P, Zhao S, Wang Q, *et al.* N-Doped carbon as peroxidase-like nanozymes for total antioxidant capacity assay. *Anal Chem*, 2019, **91**(23): 15267-15274
- [53] Liang Y M, Li R L, Sun H, *et al.* Functionalized natural melanin nanoparticle mimics natural peroxidase for total antioxidant capacity determination. *Sens Actuator B Chem*, 2022, **359**: 131541
- [54] Lasier-Cirujeda J, Coronel P, Aza M, *et al.* Beta-amyloidolysis and glutathione in Alzheimer's disease. *J Blood Med*, 2013, **4**: 31-38
- [55] Li L, Wang Q N, Chen Z B. Colorimetric detection of glutathione based on its inhibitory effect on the peroxidase-mimicking properties of WS<sub>2</sub> nanosheets. *Microchim Acta*, 2019, **186**(4): 257
- [56] Perry E, Walker M, Grace J, *et al.* Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?. *Trends Neurosci*, 1999, **22**(6): 273
- [57] Ni P, Sun Y, Dai H, *et al.* Colorimetric assay for acetylcholinesterase and inhibitor screening based on the Ag [I] ion-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). *Sensors Actuators B*

- Chem, 2016, **226**: 104-109
- [58] Kong D S, Jin R, Zhao X, *et al.* Protein-inorganic hybrid nanoflower-rooted agarose hydrogel platform for point-of-care detection of acetylcholine. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(12): 11857-11864
- [59] Vogeser M, Halser B, Baron A, *et al.* Corticosteroid-binding globulin and unbound serum cortisol in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Biochem*, 2000, **33**(2): 157-159
- [60] Lin T R, Zhong L S, Chen H, *et al.* A sensitive colorimetric assay for cholesterol based on the peroxidase-like activity of MoS<sub>2</sub> nanosheets. *Microchim Acta*, 2017, **184**(4): 1233-1237
- [61] Hong C, Zhang X, Wu C, *et al.* On-site colorimetric detection of cholesterol based on polypyrrole nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(49): 54426-54432
- [62] Zhu X X, Xue Y, Li H Y, *et al.* Porphyrin-modified NiS<sub>2</sub> nanoparticles anchored on graphene for the specific determination of cholesterol. *ACS Applied Nano Materials*, 2021, **4**(11): 11960-11968
- [63] He Y L, Li N, Li W K, *et al.* 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylphenyl) porphyrin functionalized NiCo<sub>2</sub>S<sub>4</sub> yolk-shell nanospheres: excellent peroxidase-like activity, catalytic mechanism and fast cascade colorimetric biosensor for cholesterol. *Sens Actuator B Chem*, 2021, **326**: 128850
- [64] Luo Y, Shen R, Li T, *et al.* The peroxidase-mimicking function of acetate and its application in single enzyme-based glucose test paper. *Talanta*, 2019, **196**: 493-497
- [65] Vinita, Nirala N R, Prakash R. One step synthesis of AuNPs@MoS<sub>2</sub>-QDs composite as a robust peroxidase-mimetic for instant unaided eye detection of glucose in serum, saliva and tear. *Sens Actuator B Chem*, 2018, **263**: 109-119
- [66] Wang D H, Dang X M, Tan B, *et al.* 3D V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MoS<sub>2</sub>/rGO nanocomposites with enhanced peroxidase mimicking activity for sensitive colorimetric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2022, **269**: 120750
- [67] Alle M, Park S C, Bandi R, *et al.* Rapid *in-situ* growth of gold nanoparticles on cationic cellulose nanofibrils: recyclable nanozyme for the colorimetric glucose detection. *Carbohydr Polym*, 2021, **253**: 117239
- [68] Dong Z L, Yang Z J, Hao Y, *et al.* Fabrication of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven nanoreactors for innovative cancer treatments. *Nanoscale*, 2019, **11**(35): 16164-16186
- [69] Zhang L N, Deng H H, Lin F L, *et al.* In situ growth of porous platinum nanoparticles on graphene oxide for colorimetric detection of cancer cells. *Anal Chem*, 2014, **86**(5): 2711-2718
- [70] Lian M L, Liu M H, Zhang X, *et al.* Template-regulated bimetallic sulfide nanozymes with high specificity and activity for visual colorimetric detection of cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(45): 53599-53609
- [71] Khoris I M, Ganganboina A B, Suzuki T, *et al.* Self-assembled chromogen-loaded polymeric cocoon for respiratory virus detection. *Nanoscale*, 2021, **13**(1): 388-396
- [72] Buyuksunetci Y T, Cital B E, Tapan U, *et al.* Development and application of a SARS-CoV-2 colorimetric biosensor based on the peroxidase-mimic activity of gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Microchim Acta*, 2021, **188**(10): 335
- [73] Zhang T, Zhang S T, Liu J, *et al.* Efficient visual chemosensor for hexavalent chromium *via* a controlled strategy for signal amplification in water. *Anal Chem*, 2020, **92**(4): 3426-3233
- [74] Borthakur P, Boruah P K, Das M R. CuS and NiS nanoparticle-decorated porous-reduced graphene oxide sheets as efficient peroxidase nanozymes for easy colorimetric detection of Hg(II) ions in a water medium and using a paper strip. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2021, **9**(39): 13245-13255

## Application of Colorimetric Biosensor Based on Nanozyme in Biomedical Detection\*

YUAN Lin, LU Dong-Xiao\*\*, LI Jin-Hua\*\*

(*Nanophotonics and Biophotonics Key Laboratory of Jilin Province, College of Physics, Changchun University of Science and Technology,  
Changchun 130022, China*)

**Abstract** Because of its advantages of high sensitivity, simple method and easy operation, colorimetric biosensing technology has been widely used in many fields such as the detection of pollutants in the biological environment, the detection of important markers in the organism and cancer screening. The colorimetric biosensor based on nanozymes mainly uses the catalytic ability of nanozymes to simulate peroxidase-like activities, oxidize the chromogenic agent to form a colored solution, so as to realize visual detection, and obtain the content of related substances through the detection of its absorbance. Compared with colorimetric biosensors without nanozymes, colorimetric biosensors based on nanozymes have the advantages of higher selectivity, faster detection and higher sensitivity. Nanozymes, on the other hand, are more and more widely studied for their natural enzyme activity while also having the advantages of low cost, good stability, and easy synthesis. At present, colorimetric biosensors based on nanozymes have become an important method to assist related medical detection, and are also widely used in portable and real-time related detection, providing important support and guarantee for medical detection. In order to improve the sensitivity and application range of colorimetric biosensors, researchers are also working on increasing the variety of substances to be detected and diversifying the types of nanozymes. This paper mainly introduces the detection principle of nanozyme-based colorimetric biosensors, several typical used nanozymes, and the application and research progress of nanozyme-based colorimetric biosensors in the field of biomedical detection.

**Key words** nanozymes, colorimetric biosensor, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acetylcholine

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0401

---

\* This work was supported by grants from the Developing Project of Science and Technology of Jilin Province (20210101155JC), The National Natural Science Foundation of China (62174015, 62171115), the "111" Project of China (D17017), and the Project of Education Department of Jilin Province (JJKH20200730KJ, JJKH20210798KJ).

\*\* Corresponding author.

LU Dong-Xiao. Tel: 86-431-85582193, E-mail: ludongxiao@cust.edu.cn

LI Jin-Hua. Tel: 86-431-85582739, E-mail: lijh@cust.edu.cn

Received: August 23, 2022 Accepted: November 11, 2022