PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2021，48（1）：24~34
www.pibb.ac.cn

纳米水解酶的研究进展*

夏利伟　丁　利　陈茂龙　焦　叶　程云辉**　许　宙**
（长沙理工大学化学与食品工程学院，长沙 410114）

摘要　水解酶由至少200种单独的蛋白质组成，可催化一系列独特化学键的水解. 但是天然酶的固有缺点，如易变性、成本高、制备费力和回收困难，极大地限制了它们的实际应用. 为了克服这些缺点，研究人员长期以来致力于探索人工水解酶模拟物. 自从2007年发现Fe_3O_4纳米颗粒可以作为过氧化物酶模拟物，关于纳米酶的研究不断涌现. 与天然酶相比，纳米酶具有制备简单、可大规模生产、环境耐受性强、制备及储存成本低廉、可重复使用等优势. 纳米水解酶是指具有水解酶活性的纳米材料，金属有机框架材料、碳基纳米材料和金纳米粒子等的水解酶活性均已被报道. 近年来，纳米水解酶研究领域进入蓬勃发展期，然而至今尚未见关于纳米水解酶的综述. 本文首先根据水解底物的不同对纳米水解酶进行分类并分别讨论其催化机理，之后对影响纳米水解酶活性的因素及纳米水解酶的应用进行总结，最后概述和讨论纳米水解酶的当前挑战和未来前景.

关键词　纳米水解酶，分类，催化机制，活性调节
中图分类号　O643.3，TB383　　**DOI**：10.16476/j.pibb.2020.0073

酶是生物催化剂，可促进生命系统中发生的大多数生物反应[1]. 但是天然酶的固有缺点，如易变性、成本高、制备费力和回收困难等，极大地限制了它们的实际应用. 为了克服这些缺点，研究人员长期以来致力于探索人工酶模拟物[2]，在广泛的应用中建立了高稳定性和低成本的人工酶作为天然酶的替代品，许多材料包括环糊精、金属配合物、卟啉、聚合物、树枝状聚合物和生物分子（如核酸、催化抗体和蛋白质）已经被广泛探索，用于模拟天然酶的结构和功能[3]. 随着纳米技术的发展，一些新型纳米材料也表现出意想不到的类酶催化活性. 自2007年发现Fe_3O_4纳米颗粒作为过氧化物酶模拟物以来[4]，大量基于纳米材料的人工酶（称为“纳米酶”）的研究不断涌现. 金纳米粒子（gold nanoparticles，AuNPs）[5]、氧化铈纳米颗粒[6]、五氧化二钒纳米粒子[7]、石墨烯氧化物[8]和金属有机框架材料（metal-organic framework，MOF）[9]等都已经发现具有独特的模拟酶催化活性. 与天然酶相比，纳米酶具有制备简单、可大规模生产、环境耐受性强、制备及储存成本低廉和可重复使用等优势[10-11].

水解酶是一大类能催化生物水解反应的同工酶，自然界已经开发了几种不同的水解酶家族，包括蛋白酶、脂肪酶、核酸酶和淀粉酶等，每种酶都有独特的生化作用[12]. 虽然具体的结构和催化机制各不相同，但总的水解反应可以概括如下：

$$A—B + H_2O \rightarrow A—OH + B—H$$

纳米水解酶是指基于纳米材料的人工水解酶. 近年来，纳米水解酶研究领域进入了蓬勃发展期，大量具有水解酶活性的纳米材料被报道[13-14]. 然而至今尚未见关于纳米水解酶的综述. 本文对纳米水解酶的分类、催化机理、活性调节和应用进行综述，并概述和讨论纳米水解酶研究领域当前的挑战和未来的前景.

* 国家自然科学基金项目（31401566），国家重点研发计划（2018YFD0400405），湖南省创新平台与人才计划（2017RS3055）和粮食深加工与品质控制湖南省2011协同创新项目（2013448）资助.
** 通讯联系人.
许宙. Tel：13308444404，E-mail：xz_jnu@126.com
程云辉. Tel：1301616167，E-mail：chengyh6488@sina.com
收稿日期：2020-03-19，接受日期：2020-07-10

1　纳米水解酶的分类

水解酶由至少200种单独的蛋白质组成，可催化一系列独特化学键的水解. 考虑到水解酶在生命系统中的重要性及其固有的弊端，探索其替代品具有重要意义[12]. 由于研究人员的持续努力，许多纳米材料已成为潜在的水解酶候选材料[13-14]. 为了更清楚地理解纳米水解酶，可以根据水解底物的不同将纳米水解酶分为5类：核酸酶、酯酶、磷酸酶、蛋白酶和其他酶类. 例如功能化的氧化石墨烯和金属有机框架材料已经被证明具有很好的磷酸酶活性，能够催化化学战剂快速降解. 我们系统和全面地列出了目前具有类水解酶活性的纳米材料，以及它们的水解底物（表1）. 这种分类将有助于人们更好地理解纳米水解酶.

Table 1　Current nanomaterials as hydrolase mimics and hydrolyzed substrate and representative references

表1　当前作为水解酶模拟物的纳米材料和它们的水解底物及代表性参考文献

酶的种类	纳米材料	水解底物	参考文献
磷酸酶	氧化石墨烯	对氧磷	［15］
	Zr-MOF	化学战剂	［16-24］
	Ce-MOF	4-硝基苯基磷酸二甲酯	［25］
	纳米氧化铈	磷酸对硝基苯酯	［26-28］
蛋白酶	Cu-MOF	牛血清白蛋白	［29］
	MOF-808	鸡蛋清溶菌酶	［30］
	碳量子点	牛血清白蛋白	［31］
	Ce /多金属氧酸盐	β淀粉样肽	［32］
	手性硫化铜量子点	牛血清白蛋白	［33］
	MoS_2-Co	β淀粉样肽	［34］
核酸酶	金纳米粒子	苯基磷酸酯	［35-39］
	Fe_3O_4/SiO_2@AuNPs	DNA	［40］
	MOF/Ce	DNA	［41］
	CdTe纳米粒子	DNA	［42］
酯酶	金纳米粒子	苯基酸酯	［43-46］
	碳纳米管	对硝基苯乙酸酯	［47］
其他	纳米氧化铈	尿素	［48］
	氧化石墨烯	纤维二糖	［49］

2　纳米水解酶的催化机理

近年来纳米水解酶受到了广泛的关注，但对其催化机理和动力学的研究仍然不够深入. 本章节总结了具有独特活性的典型纳米水解酶的催化机制. 接下来将根据酶的种类对催化机理进行分析.

2.1　磷酸酶

有机磷酸水解酶（organphosphorus hydrolase，OPH）是一种在细菌中发现的磷酸三酯酶，它能有效地降解含磷的农药和神经毒剂[50]. OPH的活性位点包含两个锌离子和由4个组氨酸、1个天冬氨酸和1个赖氨酸组成的第一壳配体. 受此启发Ma等[15]在氧化石墨烯（graphene oxide，GO）骨架上模拟了有机磷水解酶的活性位点用来水解神经毒剂模拟物对氧磷（图1）. 其催化机理如下：首先通过1-乙烯基咪唑的聚合，在GO表面产生咪唑团簇. 然后通过咪唑团簇与Zn^{2+}的配位形成双核金属中心. 该双核金属中心可通过极化P—O键激活对氧磷以引起亲核攻击. 此外，当用2-溴-1-苯乙烷酮使GO上的羧基失活时，复合材料的活性降低27.3%. 这表明GO的羧基基团可能与双核金属中心或底物结合位点产生协同催化作用.

大量基于Zr的金属有机框架材料（metal-organic framework，MOFs）也已被用作磷酸三酯酶模拟物，用于裂解化学战剂（chemical warfare agents，CWA）的酯键. 这一过程的催化机制是底物与MOF的金属中心Zr-OH-Zr结合，然后亲核羟基会攻击亲电磷并完成裂解[23]. 例如，2014年Katz等[19]报道UIO-66能在室温下催化4-硝基苯基磷酸二甲酯（dimethyl 4-nitrophenyl phosphate，DMNP）的水解. 有类似桥联基元的其他MOFs（如NU-1000[16-18]和MOF-808[20]）也被报道具有降解CWA的功能.

CeO_2纳米材料也被用做磷酸酶模拟物. 2010年Kuchma等[26]报道CeO_2纳米材料可以作为人工磷酸酶用来催化磷酸对硝基苯酯（para-nitrophenyl phosphate，p-NPP）水解，并通过电脑建模研究其催化机理. 研究表明，当Ce^{4+}被还原成Ce^{3+}时水解反应的活化能会降低，有利于反应进行.

2.2　蛋白酶

蛋白酶是工业中最常用的一种酶，因此人工蛋白酶一直是模拟酶研究的重点[51]. 近年来用纳米材料构建人工蛋白酶体系的研究也已经被报道. 例如，2014年Li等[29]报道了一种具有类蛋白酶活性的Cu-MOF，它能催化牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）和酪蛋白中肽键的水解. 由于MOF的大表面和多孔结构，这种Cu-MOF比天然胰蛋白酶及Cu（II）配合物对蛋白质的亲和力更

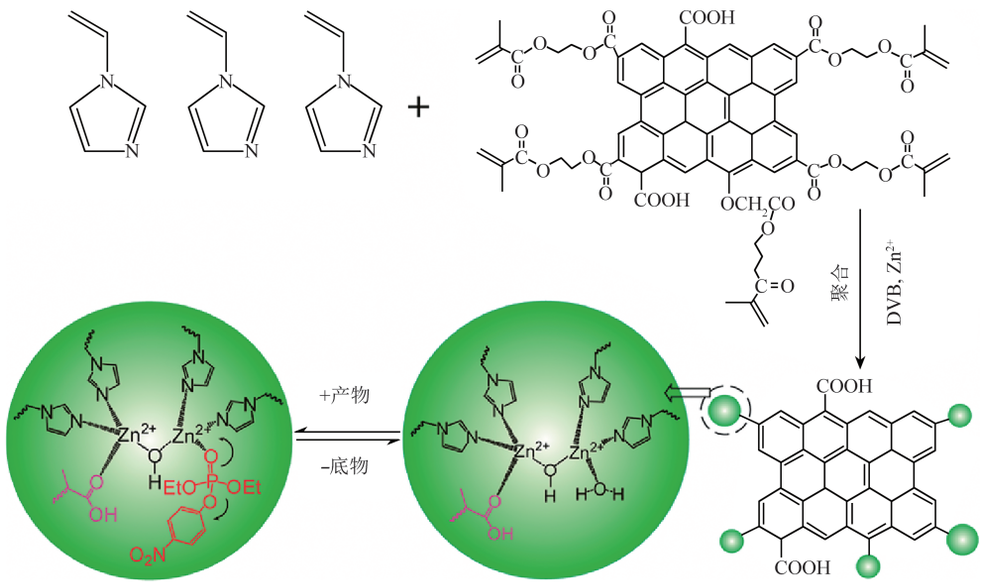

Fig. 1　Schematic representation of the synthesis of polymer bead−GOs and the degradation to paraoxon

图1　氧化石墨烯聚合物的合成及降解对氧磷的原理图

高. 其中配位-不饱和Cu（II）位点不但能增强Cu-MOF与BSA的界面相互作用，而且还能作为活性中心水解酰胺键，从而加快水解反应速率. 最近Ly等[30]报道MOF-808可以水解多种短肽和鸡蛋清溶菌酶中的肽键，并通过分子建模和密度泛函理论对其催化机理进行了研究. 其催化机理为：Zr_6O_8核的Zr（IV）中心能够分别与酰胺氧原子和氨基末端氮原子形成活性配合物，从而激活肽键以引起亲核攻击（图2）. 同时，用MOF-808水解一系列具有不同氨基酸侧链性质的Gly-X二肽的动力学实验表明，MOF-808对二肽的选择性取决于X侧链的大小和化学性质. 具有较小或亲水性残基二肽的水解速率比具有较大和疏水性残基二肽的水解速率快. 这是因为较小或亲水性残基缺乏富电子功能，可与配体发生很好的分子间相互作用.

Li等[31]报道Cu_2O修饰的碳量子点（carbon quantum dots，CQDs）也具有内在的拟蛋白酶活性，可在生理条件下水解BSA和酪蛋白. 动力学分析显示CQD_s/Cu_2O的活性与典型的米氏动力学相似，且在相同条件下酶活性优于胰蛋白酶. 催化BSA水解的机制如下：

$CQDs/Cu_2O + BSA \rightarrow BSA\text{-}CQDs/Cu_2O \rightarrow Hydrolysates$

首先，BSA分子通过CQDs与BSA氨基的亲和作用吸附在CQDs / Cu_2O纳米复合材料的表面，形成BSA-CQDs / Cu2O中间体. 之后活性位点（Cu_2O）和底物被限制在特定区域，然后Cu中心被激活从而将BSA水解成小段肽.

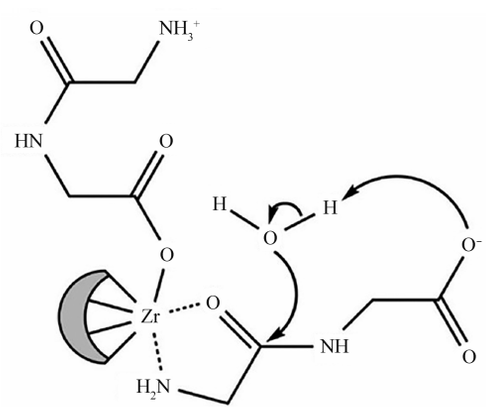

Fig. 2　Principal mechanism of nucleophilic attack on the amide carbon atom of Gly−Gly in the complex

图2　复合物对双甘肽酰胺碳原子进行亲核攻击的主要机理

2.3　核酸酶

核酸酶是指能够将聚核苷酸链的磷酸二酯键切断的酶. 这些核酸酶需要在活性位点存在至少一种金属离子（Zn^{2+}、Mg^{2+}和Ca^{2+}），因为金属离子不但激活了易裂变的磷酸根基团，而且还能促进配位水分子的去质子化或醇羟基提供反应性亲核试剂[38].

为了模拟核酸酶系统，Manea等[35]在金纳米粒子（AuNPs）表面组装了含有1，4，7-三氮杂环壬烷（1，4，7-triazacyclononane，TACN）和Zn^{2+}催化复合物的烷基硫醇配体. 这种由有机分子单层保护的纳米金（nano-gold protected by a monolayer of organic molecules，AuMPC）具有类RNA酶的活性，能催化RNA模型底物2-羟丙基-4-硝基苯基磷酸酯（2-hydroxypropyl-4- Nitrophenylphosphate，HPNPP）的水解. 其催化机理为：在单层中两个相邻的TACN- Zn^{2+}配合物产生一个催化结合袋，两个锌离子协同作用于底物[36]（图3）. 与无催化剂和未组装的催化复合物TACN-Zn^{2+}相比，这种AuMPC的反应分别提高了4个和2个数量级. 进一步的研究表明，这种优异的催化性能可归功于HPNPP局部浓度的提高、2个或2个以上金属中心之间的协同作用，以及金硫键的高稳定性. 除了TACN-Zn^{2+}催化配合物，其他单层也被用于构建核酸酶. 例如，Bonomi等[38]选择用双（2-氨基-吡啶基-6-甲基）胺（bis-（2-amino- pyridyl-6-methyl）amine，BAPA）功能化的硫醇来作为AuNPs的单层，用于DNA的裂解. 由于BAPA-Zn^{2+}配合物能有效地激发金属Lewis酸和氢键之间的协同作用，因此这种AuMPC对DNA模型底物双对硝基苯基磷酸酯（bis-p-nitrophenyl phosphate，BNPP）的裂解效率提高了100倍以上. 除了Zn^{2+}之外，这种催化体系还可以扩展到其他金属离子，如Ce[37]和Cu[39].

最近Sun等[42]报道，在光诱导条件下，手性半胱氨酸修饰的CdTe QDs可以模拟核酸内切酶，切割双链DNA中的特定位点. 研究表明，当DNA

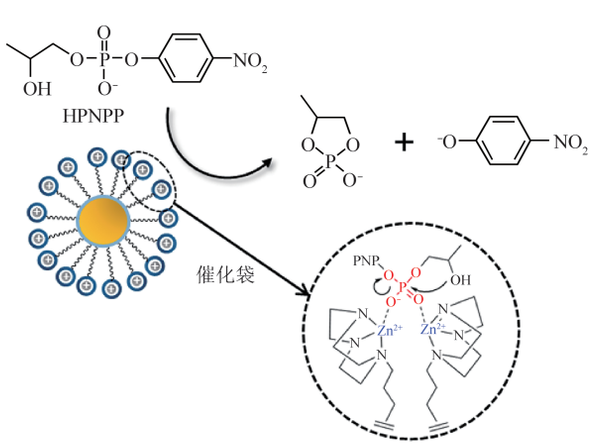

Fig. 3　Transphosphorylation of HPNPP catalyzed by functionalized AuNPs

图3　功能化AuNPs催化HPNPP的转磷酸化

超过90个碱基对时，圆偏振光诱导手性半胱氨酸修饰的CdTe纳米粒子产生活性氧，特异性地切割GAT'ATC位点.

2.4　酯酶

酯酶是一类能将酯分解成酸和醇的水解酶[52]. 类酯酶活性的纳米酶通常是将活性中心组装在纳米材料上得到的，其催化机理与活性中心密切相关. 例如Zaramella等[43]通过静电吸附把小肽序列组装在三甲基胺功能化的AuMPC表面，得到多价肽-金杂化MPC配合物. 这些肽有3个去质子化的天冬氨酸（确保通过静电作用结合带正电的三甲基胺）、1个色氨酸（用于荧光检测）以及可变数量的组氨酸残基（用于酯的裂解）. 该AuMPC表面的组装使酯交换反应的速率至少加快了2个数量级. 类似的，Pengo等[45]把十二肽修饰到AuNPs表面制备了另一个更复杂的系统，该十二肽含有1个His、2个Arg和1个Lys残基，这有望实现亲核、广义酸和广义碱催化以及稳定沿酯水解途径产生的带负电荷的过渡态. 研究表明当该肽与金纳米粒子表面结合时，可使n-羧基苯丙氨酸对硝基苯酯（DNPB）的酯交换反应速率加快2个数量级. 这些AuMPC不仅使底物和催化剂紧密靠近，而且还产生pH局部增强的微环境，从而进一步活化其表面上的活性基团.

2016年，Zhang等[47]将功能性短肽组装到碳纳米管（carbon nanotubes，CNT）上，形成一种能有效催化对硝基苯乙酸酯（p-nitrophenylacetate，PNPA）水解的纳米水解酶（图4）. 该肽含有一个催化三联体（丝氨酸、谷氨酸、组氨酸，SHE）和一个结合域（色氨酸，W），分别与LKLKLKL序列相连（SHELKLKLKL，WLKLKLKL）. 当催化中心SHELKLKLKL和连接中心WLKLKLKL的组装比例为2∶1时得到了最佳模拟酶CNT-（SHE/W）2∶1-LKLKLKL. CNT-（SHE/W）-LKLKLKL催化PNPA水解可能的催化机理是丝氨酸的羟基与组氨酸形成氢键，产生氧负离子，从而对底物PNPA发起亲核攻击. 此外，谷氨酸的羧基作为广义碱接受从咪唑转移的质子. 实验中还发现当催化三联体靠近碳纳米管的活性表面时比靠近溶液时活性更高，这表明碳纳米管不仅作为连接肽的平台，同时也创造了疏水微环境，促进质子转移过程，提高了催化活性.

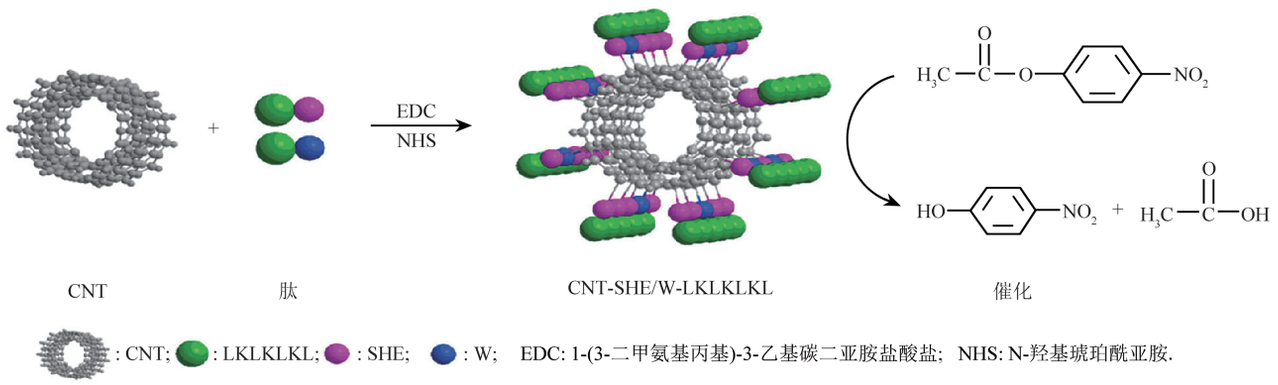

Fig. 4　The peptides of SHELKLKLKL and WLKLKLKL were attached on the carbon nanotube surface，resulting in the formation of conjugated CNT−peptides that can catalyse hydrolysis of 4−nitrophenyl acetate

图4　将SHELKLKLKL和WLKLKLKL吸附在碳纳米管表面，形成CNT−肽复合物，催化4−硝基乙酸苯酯的水解

2.5　其他

Korschelt等[48]首次报道CeO_2-x纳米棒可以作为一种有效的脲酶模拟物，能在中性条件下催化尿素水解. 他们用La^{3+}取代Ce^{4+}来改变Ce^{4+}/Ce^{3+}比，以此来研究CeO_{2-x}纳米棒的表面性质. 结果表明，虽然La取代增加了晶格表面缺陷的数量，但具有较高路易斯酸度的Ce^{4+}位点的减少导致其催化活性略有下降. 其活性（k_{cat}=9.58×10^1 s^{-1}）仅比天然脲酶低一个数量级，且水解活性不受典型的脲酶抑制剂（重金属离子）的影响.

He等[49]通过π-π堆积作用把由谷氨酸（E）和精氨酸（A）组成的肽纳米纤维（peptide nanofiber，PNF_S）掺杂到氧化石墨烯中形成一种纳米水凝胶（GO-PNF_S），可以作为多糖水解酶的模拟物. 研究表明，当肽序为AAAAEE时GO-PNF_S对纤维二糖和纤维五糖的水解速率最高. 这种活性可以归因于肽的纳米纤维结构的形成、最佳的分子构象和进入底物时较少的空间位阻. 更重要的是，GO不仅作为连接PNFs的载体，而且还创造了一个疏水的微环境，促进质子转移，从而提高催化活性.

3　纳米水解酶活性的调节

影响纳米水解酶活性的因素已经被广泛研究，如尺寸[21]、形状和形貌[27]、掺杂[22]、促进剂和抑制剂[30]等. 在本节中，将从结构和组成方面着重介绍以下3种影响纳米水解酶催化活性的因素：活性基团、金属离子和pH值.

3.1　活性基团

天然酶超高的酶催化活性归因于其固有的催化结构，如催化活性中心和底物结合位点[12]. 其中活性位点的活性基团可直接参与水解反应，对水解酶活性起着关键作用. 类似的，活性基团也会影响纳米水解酶的催化能力.

咪唑基已经被证明能在许多水解体系中起到关键作用[53]，因此有很多文献报道将咪唑、咪唑复合物或含组氨酸的短肽组装在金纳米粒子上，用来构建类酯酶活性的纳米酶. 例如Pasquato等[44]利用咪唑功能化的AuNPs首次实现金纳米粒子对羧酸酯的水解，并以模型酯2，4-二硝基苯乙酸酯（2，4-dinitrophe nylacetate，DNPA）为底物研究AuMPC的催化性能. 该体系由十二烷基硫醇和咪唑端硫醇混合单层（摩尔比为1∶1）以及AuNPs组成. 在最优pH值下，该AuMPC催化速率比含咪唑的单体快30倍，这与质子化咪唑（广义酸）和未质子化咪唑（广义碱或亲核位点）之间的协同作用有关. 此外，Pengo等[46]将二肽（组氨酸和脯氨酸）修饰在硫醇化的AuNPs上形成一种AuMPC. 在低pH条件下该AuMPC相对于单体催化剂的水解速率提高了300倍以上. 这是因为去质子化羧酸作为广义碱激活水分子，而质子化的咪唑基作为广义酸为四面体提供质子.

氨基也会影响纳米水解酶的催化活性. 例如Katz等[54]研究了将氨基引入UIO-66配体的影响. 与UIO-66相比，UiO-66-66-NH_2水解DMNP的速率提高了20倍，半衰期缩短到了1 min. 这是因为氨基在催化循环中充当质子传递剂，从而提高了催化

效率. 类似的，Islamoglu 等[25] 证明 Ce MOF-NH_2 的催化活性比 Ce MOF 高.

3.2　金属离子

众所周知很多水解酶的活性中心都有金属离子，因此 Cu、Zn、Zr 和 Ce 等金属离子都已经被用来构建纳米水解酶. 例如 Zaupa 等[36] 将含有 Zn^{2+} 的催化复合物组装在 AuNPs 上得到一种类核酸酶活性的纳米水解酶. 类似的 Ce[37] 和 Cu[39] 复合物也被组装在 AuNPs 上用来构建类核酸酶. 其中基于 Ce 的类核酸酶催化活性大于 Zn 和 Cu. MOFs 的金属中心不同，其催化活性也会不同. 例如 Islamoglu 等[25] 合成了一种与 UiO-66（Zr MOF）结构相似的 Ce MOF，其对 DMNP 的水解速率比 UiO-66 更高. 他们推测 Ce MOF 的高活可能是因为 Ce（IV）的 4f 轨道和 P=O 轨道杂化形成易受攻击的中间体.

即使是同一种金属离子，不同的可配位中心也会影响纳米水解酶的催化活性. 例如，Moon 等[20] 研究了不同可配位中心的 Zr 对 Zr-MOF 水解化学战剂速率的影响. 其中 UiO-66 和 NU-1000 中分别含有 12 和 8 个配位基团，而 MOF-808 中 Zr 只有 6 个配位基团. 随着配位基团的增加，Zr 的可配位中心减少，结果表明不同可配位中心的 Zr MOFs 催化活性遵循顺序：MOF-808（6）> NU-1000（4）> UiO-66（0）.

3.3　pH

pH 能影响活性基团的质子化和去质子化从而影响纳米水解酶的催化性能. 例如 Pasquato 等[44] 研究了 pH 对咪唑功能化的 AuMPC 催化 DNPA 水解反应速率的影响. 研究发现，当 pH 为 6.2 时，二阶反应速率常数（K_2）达到最大. 这是因为 DNPA 的水解与质子化咪唑（广义酸）和未质子化咪唑（广义碱或亲核位点）之间的协同作用有关，而当 pH 为 6.2 时咪唑之间的协同效果最好. Pengo 等[46] 还讨论了 pH 对二肽（组氨酸和脯氨酸）功能化 AuMPC 催化活性的影响. 研究发现，当 pH 小于 7 时该 AuMPC 相对于单体催化剂（二肽）的水解速率提高了 300 倍以上. 这是因为在较低 pH 时脯氨酸的羧基（kPa=4.2）电离为羧酸阴离子，可以作为广义碱激活水分子，质子化咪唑基作为广义酸将质子转移到四面中间体中，这大大提高了水解反应速率.

此外，pH 还能影响纳米水解酶与底物的结合. Katz 等[55] 在考察 UiO-66 催化对氧磷水解速率与 pH 之间关系时发现水解速度会随着溶液 pH 降低而增加，这与典型的磷酸酯水解机制（羟基作为亲核试剂攻击磷氧键）相反. 研究了 UiO-66 和 UiO-67 的结构后发现，pH 会改变 Zr_6 节点上的配体取代：pH 较大时配体是 OH^{-1}，pH 较小时配体是 H_2O，而后者更有利于对氧磷与 UIO-66 的结合. 故当底物与酶结合是限制性步骤时，降低 pH 有利于对氧磷的水解.

4　纳米水解酶的应用

4.1　降解化学战剂

化学战剂（CWA）是针对战争的化学物质，具有极大的毒性和大规模杀伤性[56]. 其中，神经毒剂是一种含有磷酸键的 CWA，是人类已知的最具毒性的化学物质之一. 它们可以通过各种方式进入人体，例如呼吸道和皮肤. 当其与胆碱酯酶结合时，这些神经毒剂将使胆碱酯酶失活，从而导致神经系统功能障碍[57]. 一些固体异质材料，例如改性的活性炭和金属氧化物，具有破坏 CWA 的潜力[58]，但是这些材料通常有吸附能力差和易于失活等缺点，因此迫切需要探索能有效催化降解神经毒剂和类似物的新型材料.

在细菌系统中，有一种磷酸三酯酶（phosphotriesterase，PTE），它能有效分解这些有机磷神经药物[59]. 受此启发，Vernekar 等[28] 设计了空位工程纳米氧化铈（vacancy-engineered nanoceria，VE CeO_2 NPs）作为 PTE 模拟物，用来降解神经毒剂. 在组氨酸或 N-甲基吗啉存在下，VE CeO_2 NPs 能有效降解神经毒剂类似物对氧磷. 动力学研究表明其周转频率（k_{cat}）和催化效率（k_{cat}/K_m）分别达到 5.42 s^{-1} 和 3.44 × 10^2 $m^{-1}\cdot s^{-1}$，明显高于报道的一些金属配合物，甚至与天然 PTF 活性相当. 他们的工作可能会促进探索治疗神经毒剂的新方法，并拓宽纳米酶的潜在应用.

Ma 等[15] 通过自组装成功地在 GO 表面修饰了具有有机磷水解酶（OPH）样性质的有机基团. 所得纳米复合材料可作为 OPH 模拟物，有效降解对氧磷. 酶促动力学研究表明该模拟酶具有高达 0.65 s^{-1} 的周转频率和很好的稳定性（循环 5 次后还保留 94.8% 的活性）.

此外，一些基于 Zr 的 MOFs 也被用于化学战剂的降解. 例如，Mondloch[18] 等报道 NU-1000 可以催化神经毒剂类似物 4-硝基苯基磷酸二甲酯（dimethyl 4-nitrophenyl phosphate，DMNP）的分解，且其半衰期只有 1.5 min. NU-1000 还可以有效

催化高毒性化学战剂 Soman 的降解. 类似的，Moon 等[20]报道了一种比 NU-1000 催化活性更高的 MOF：MOF-808，其降解 DMNP 的半衰期小于 0.5 min.

4.2　水解蛋白质

在各种类型的酶中，蛋白酶是生物技术行业的重要工具，因为它们可用作生化试剂或用于制造多种产品[60]. 也有研究表明，蛋白酶是决定病理生理过程的关键多效性因子[61]. 因此人造蛋白酶模拟物的研究具有重要意义. 然而，这是一项具有挑战性的任务，因为肽键非常稳定，在生理 pH 和温度下，肽键的半衰期高达 350 年[62].

近年来一些纳米材料被报道具有很好的蛋白酶活性. 例如，2014 年 Li 等[29]报道了一种具有类蛋白酶活性的 Cu-MOF，它能催化牛血清白蛋白的水解. 且其米氏常数（*K*m）比游离胰蛋白酶小 26 000 倍，这表明 BSA 对 Cu-MOF 表面的亲和力比对胰蛋白酶高得多. 此外，他们还将 Cu-MOF 用于模拟胰蛋白酶消化，因为 Cu-MOF 即使在没有 EDTA 的情况下也能使培养细胞分离. 类似的，Ly 等[30]报道在生理 pH 下 MOF-808 可以水解鸡蛋清溶菌酶中的肽键，反应 25 h 后观察到蛋白质的选择性片段化，产率为 55%.

Gao 等[32]采用 CeO_2 纳米颗粒和多金属氧酸盐（POM）自组装形成 CeONP @ POMs 杂化纳米材料，将其用于降解 β 淀粉样肽（amyloid-β，Aβ）. Aβ 的积累是一种神经衰退性疾病的标志现象[63]. 研究表明，该复合材料能够有效地抑制 Aβ 聚集，同时可以降低细胞内活性氧的含量. 这一工作有助于设计多功能的人工纳米酶，用于缓解 Aβ 造成的神经毒性. 类似的，Ma 等[34]又使用二硫化钼纳米片（MoS_2）和钴配合物构建了一种新的人工金属蛋白酶（MoS_2-Co）. 该蛋白酶不仅提高对 Aβ 单体的水解活性，而且还增强 Aβ 纤维的降解.

4.3　生物传感

除了降解化学战剂和水解蛋白质之外，纳米水解酶还可以用于生物传感. 例如，Bonomi 等[64]利用 Au MPC 固有的核酸酶活性，开发了一种新的蛋白酶检测方法（图 5）. 由于所选的寡阴离子肽可以与阳离子 Au MPC 的表面牢固结合，因此该肽底物可以有效抑制 Au MPC 的催化活性. 当肽底物被酶水解时，Au MPC 的催化活性得以恢复，从而有效地裂解 2-羟丙基-4-硝基苯基磷酸酯（2-hydroxypropyl-4- nitrophenylphosphate，HPNPP）. HPNPP 被水解时会产生信号分子，在 400 nm 处有最大的紫外光吸收. 该检测方案可广泛应用于各种蛋白酶，包括枯草杆菌蛋白酶 A、天冬酰胺酶、谷氨酰胺酶、谷氨酸羧肽酶 II 和胱天蛋白酶 1. 与常规测定法相比，这种方法提供更强的催化作用，从而提高检测的灵敏度. 此外，只需改变抑制肽探针，就可以使该测定法对特定的酶具有选择性.

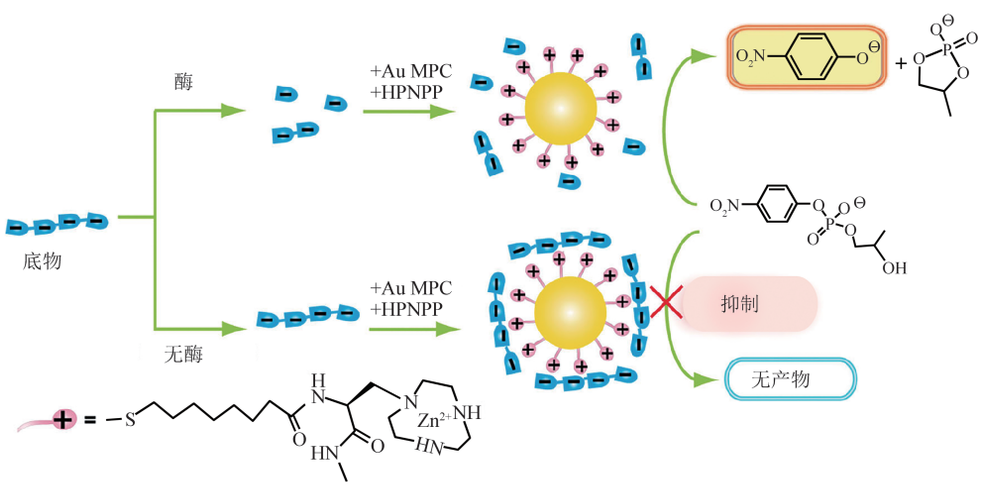

Fig. 5　Schematic representation of an enzyme assay based on catalytic Au MPC

图5　基于Au MPC催化作用的酶分析法原理图

4.4 抗菌

胞外DNA（extracellular DNA，eDNA）作为一种重要的结构成分参与生物膜的形成[65]，且可以增加初始细菌在接触表面上的黏附力，并增强细菌的聚集[66]. 因此，用脱氧核糖核酸酶（deoxyribonuclease，DNase）切割eDNA对抗菌有重要意义. 受此启发，Chen等[40]成功构建了一种模拟DNA酶的人工酶（DNase-mimetic artificial enzyme，DMAE），用来对抗细菌生物膜. 该DMAE是通过将钝化的含四价铈的金纳米颗粒组装到磁性四氧化三铁/二氧化硅核壳胶体颗粒表面得到的，其活性中心是四价铈. 研究表明该DMAE可以有效裂解模型底物和eDNA，且具有很好的稳定性和循环性. 将这一纳米酶涂层于表面，可以降解金黄色葡萄球菌生物膜基质中的eDNA. 生物膜测试结果表明：这一材料可以有效预防90%以上的细菌黏附和抑制早期生物膜生长. 同时它还可以降解成熟生物膜中的eDNA，破坏生物膜结构的完整性，使其变得更加松散. 最近Liu等[41]又合成一种新的MOF/Ce基纳米酶用来杀菌. 它同时具有DNase和过氧化物酶模拟活性，其中Ce（IV）配合物能够水解eDNA并破坏已建立的生物膜，而具有过氧化物酶样活性的MOF可以杀死分散在生物膜中暴露的细菌，因此该纳米酶具有很好的杀菌效果.

5 总结与展望

本文综述了纳米水解酶的分类、催化机理、活性调控以及历年来的研究进展. 尽管纳米水解酶克服了一些天然酶的缺点，但仍然存在一些令人兴奋的挑战. a. 活性低，选择性差：和其他纳米酶一样，纳米水解酶也有活性低和选择性差的缺点. 尽管许多纳米材料已证明可作为水解酶模拟物，且某些纳米酶的催化活性与天然酶相当甚至更高，但是大多数纳米水解酶的催化活性仍远低于相应的天然酶. 此外，纳米水解酶也存在底物选择性差的问题. b. 催化机制尚不完善：尽管研究者们在研究纳米水酶的催化机制方面做了大量的工作，但到目前为止只报道了几种机制，许多催化机制尚不清楚. 了解催化动力学和机理可能有益于纳米水解酶催化活性的调节. 因此，我们仍然需要投入更多的精力来探索它们的催化动力学和机制. c. 水解类型少，应用范围窄：目前对纳米水解酶的研究主要集中在水解小分子，如DNA、化学战剂等，对蛋白质和多糖类等大分子的研究还相当有限. 随着纳米水解酶的发展以及相关理论研究的不断深入，相信这些问题都能在未来得到解决.

参 考 文 献

[1] Garcia-Viloca M, Gao J, Karplus M, *et al*. How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. Science (New York, NY), 2004, **303**(5655): 186-195

[2] Yan X Y. Nanozyme: a new type of artificial enzyme. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2018, **45**(2): 101-104

[3] Wei H, Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. Chemical Society Reviews, 2013, **42**(14): 6060-6093

[4] Gao L, Zhuang J, Nie L, *et al*. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. Nature Nanotechnology, 2007, **2**(9): 577-583

[5] Wu J, Qin K, Yuan D, *et al*. Rational design of Au@Pt multibranched nanostructures as bifunctional nanozymes. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, **10**(15): 12954-12959

[6] Popov A L, Popova N R, Tarakina N V, *et al*. Intracellular delivery of antioxidant CeO_2 nanoparticles *via* polyelectrolyte microcapsules. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2018, **4**(7): 2453-2462

[7] Ghosh S, Roy P, Karmodak N, *et al*. Nanoisozymes: crystal-facet-dependent enzyme-mimetic activity of V_2O_5 nanomaterials. Angewandte Chemie-International Edition, 2018, **57**(17): 4510-4515

[8] Wen Y, Yan L, Ling Y-C. The designing strategies of graphene-based peroxidase mimetic materials. Science China-Chemistry, 2018, **61**(3): 266-275

[9] Chen K, Wu C-D. Designed fabrication of biomimetic metal-organic frameworks for catalytic applications. Coordination Chemistry Reviews, 2019, **378**: 445-465

[10] Liang M, Yan X. Nanozymes: from new concepts, mechanisms, and standards to applications. Accounts of Chemical Research, 2019, **52**(8): 2190-2200

[11] Wang H, Wan K, Shi X. Recent advances in nanozyme research. Adv Mater, 2019, **31**(45): e1805368

[12] Nothling M D, Xiao Z, Bhaskaran A, *et al*. Synthetic catalysts inspired by hydrolytic enzymes. ACS Catalysis, 2018, **9**(1): 168-187

[13] Huang Y, Ren J, Qu X. Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications. Chem Rev, 2019, **119**(6): 4357-4412

[14] Wu J, Wang X, Wang Q, *et al*. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II). Chem Soc Rev, 2019, **48**(4): 1004-1076

[15] Ma X, Zhang L, Xia M, *et al*. Mimicking the active sites of organophosphorus hydrolase on the backbone of graphene oxide to destroy nerve agent simulants. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, **9**(25): 21089-21093

[16] Chen H, Liao P, Mendonca M L, *et al*. Insights into catalytic hydrolysis of organophosphate warfare agents by metal–organic framework NU-1000. The Journal of Physical Chemistry C, 2018, **122**(23): 12362-12368

[17] De Koning M C, Van Grol M, Breijaert T. Degradation of paraoxon and the chemical warfare agents VX, tabun, and soman by the metal-organic frameworks UiO-66-NH_2, MOF-808, NU-1000, and PCN-777. Inorg Chem, 2017, **56**(19): 11804-11809

[18] Mondloch J E, Katz M J, Isley W C, 3rd, *et al*. Destruction of chemical warfare agents using metal-organic frameworks. Nat Mater, 2015, **14**(5): 512-516

[19] Katz M J, Mondloch J E, Totten R K, *et al*. Simple and compelling biomimetic metal-organic framework catalyst for the degradation of nerve agent simulants. Angewandte Chemie International Edition, 2014, **53**(2): 497-501

[20] Moon S-Y, Liu Y, Hupp J T, *et al*. Instantaneous hydrolysis of nerve-agent simulants with a six-connected zirconium-based metal-organic framework. Angewandte Chemie International Edition, 2015, **54**(23): 6795-6799

[21] Li P, Klet R C, Moon S Y, *et al*. Synthesis of nanocrystals of Zr-based metal-organic frameworks with csq-net: significant enhancement in the degradation of a nerve agent simulant. Chem Commun (Camb), 2015, **51**(54): 10925-10928

[22] Gil-San-Millan R, Lopez-Maya E, Hall M, *et al*. Chemical warfare agents detoxification properties of zirconium metal-organic frameworks by synergistic incorporation of nucleophilic and basic Sites. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, **9**(28): 23967-23973

[23] Plonka A M, Wang Q, Gordon W O, *et al*. *In situ* probes of capture and decomposition of chemical warfare agent simulants by Zr-based metal organic frameworks. Journal of the American Chemical Society, 2017, **139**(2): 599-602

[24] Kalaj M, Momeni M R, Bentz K C, *et al*. Halogen bonding in UiO-66 frameworks promotes superior chemical warfare agent simulant degradation. Chem Commun (Camb), 2019, **55**(24): 3481-3484

[25] Islamoglu T, Atilgan A, Moon S-Y, *et al*. Cerium(IV) vs zirconium (IV) based metal–organic frameworks for detoxification of a nerve agent. Chemistry of Materials, 2017, **29**(7): 2672-2675

[26] Kuchma M H, Komanski C B, Colon J, *et al*. Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles. Nanomedicine, 2010, **6**(6): 738-744

[27] Manto M J, Xie P, Wang C. Catalytic dephosphorylation using ceria nanocrystals. ACS Catalysis, 2017, **7**(3): 1931-1938

[28] Vernekar A A, Das T, Mugesh G. Vacancy-engineered nanoceria: enzyme mimetic hotspots for the degradation of nerve agents. Angewandte Chemie-International Edition, 2016, **55**(4): 1412-1416

[29] Li B, Chen D, Wang J, *et al*. MOFzyme: intrinsic protease-like activity of Cu-MOF. Sci Rep, 2014, **4**: 6759

[30] Ly H G T, Fu G, Kondinski A, *et al*. Superactivity of MOF-808 toward peptide bond hydrolysis. Journal of the American Chemical Society, 2018, **140**(20): 6325-6335

[31] Li B, Chen D, Nie M, *et al*. Carbon dots/Cu_2O composite with intrinsic high protease-like activity for hydrolysis of proteins under physiological conditions. Particle & Particle Systems Characterization, 2018, **35**(11): 1800277

[32] Gao N, Dong K, Zhao A, *et al*. Polyoxometalate-based nanozyme: design of a multifunctional enzyme for multi-faceted treatment of alzheimer's disease. Nano Research, 2016, **9**(4): 1079-1090

[33] Hao C, Gao R, Li Y, *et al*. Chiral semiconductor nanoparticles for protein catalysis and profiling. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, **58**(22): 7371-7374.

[34] Ma M, Wang Y, Gao N, *et al*. A near-infrared-controllable artificial metalloprotease used for degrading amyloid-beta monomers and aggregates. Chemistry, 2019, **25**(51): 11852-11858

[35] Manea F, Houillon F B, Pasquato L, *et al*. Nanozymes: gold-nanoparticle-based transphosphorylation catalysts. Angew Chem Int Ed Engl, 2004, **43**(45): 6165-6169

[36] Zaupa G, Mora C, Bonomi R, *et al*. Catalytic self-assembled monolayers on Au nanoparticles: the source of catalysis of a transphosphorylation reaction. Chemistry, 2011, **17**(17): 4879-4889

[37] Bonomi R, Scrimin P, Mancin F. Phosphate diesters cleavage mediated by Ce(IV) complexes self-assembled on gold nanoparticles. Org Biomol Chem, 2010, **8**(11): 2622-2626

[38] Bonomi R, Selvestrel F, Lombardo V, *et al*. Phosphate diester and DNA hydrolysis by a multivalent, nanoparticle-based catalyst. J Am Chem Soc, 2008, **130**(47): 15744-15745

[39] Zhang Z, Fu Q, Li X, *et al*. Self-assembled gold nanocrystal micelles act as an excellent artificial nanozyme with ribonuclease activity. Journal of Biological Inorganic Chemistry , 2009, **14**(5): 653-662

[40] Chen Z, Ji H, Liu C, *et al*. A multinuclear metal complex based DNase-mimetic artificial enzyme: matrix cleavage for combating bacterial biofilms. Angew Chem Int Ed Engl, 2016, **55**(36): 10732-10736

[41] Liu Z, Wang F, Ren J, *et al*. A series of MOF/Ce-based nanozymes with dual enzyme-like activity disrupting biofilms and hindering recolonization of bacteria. Biomaterials, 2019, **208**: 21-31

[42] Sun M, Xu L, Qu A, *et al*. Site-selective photoinduced cleavage and profiling of DNA by chiral semiconductor nanoparticles. Nature Chemistry, 2018, **10**(8): 821-830

[43] Zaramella D, Scrimin P, Prins L J. Self-assembly of a catalytic multivalent peptide-nanoparticle complex. J Am Chem Soc, 2012, **134**(20): 8396-8399

[44] Pasquato L, Rancan F, Scrimin P, *et al*. N-methylimidazole-functionalized gold nanoparticles as catalysts for cleavage of a carboxylic acid ester. Chemical Communications, 2000, **22**: 2253-2254

[45] Pengo P, Baltzer L, Pasquato L, *et al*. Substrate modulation of the activity of an artificial nanoesterase made of peptide-functionalized gold nanoparticles. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, **46**(3): 400-404

[46] Pengo P, Polizzi S, Pasquato L, *et al*. Carboxylate-imidazole

cooperativity in dipeptide-functionalized gold nanoparticles with esterase-like activity. J Am Chem Soc, 2005, **127**(6): 1616-1617

[47] Zhang Q, He X, Han A, *et al*. Artificial hydrolase based on carbon nanotubes conjugated with peptides. Nanoscale, 2016, **8**(38): 16851-16856

[48] Korschelt K, Schwidetzky R, Pfitzner F, *et al*. CeO_2-x nanorods with intrinsic urease-like activity. Nanoscale, 2018, **10**(27): 13074-13082

[49] He X, Zhang F, Liu J, *et al*. Homogenous graphene oxide-peptide nanofiber hybrid hydrogel as biomimetic polysaccharide hydrolase. Nanoscale, 2017, **9**(45): 18066-18074

[50] Ghanem E, Raushel F M. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, **207**(2 Suppl): 459-470

[51] Mihaylov T T, Parac-Vogt T N, Pierloot K. A mechanistic study of the spontaneous hydrolysis of glycylserine as the simplest model for protein self-cleavage. Chemistry, 2014, **20**(2): 456-466

[52] Lin Y, Ren J, Qu X. Nano-gold as artificial enzymes: hidden talents. Adv Mater, 2014, **26**(25): 4200-4217

[53] Broo K S, Nilsson H, Nilsson J, *et al*. Cooperative nucleophilic and general-acid catalysis by the HisH+ − His pair and arginine transition state binding in catalysis of ester hydrolysis reactions by designed helix-loop-helix motifs. Journal of the American Chemical Society, 1998, **120**(17): 4063-4068

[54] Katz M J, Moon S Y, Mondloch J E, *et al*. Exploiting parameter space in MOFs: a 20-fold enhancement of phosphate-ester hydrolysis with UiO-66-NH_2. Chem Sci, 2015, **6**(4): 2286-2291

[55] Katz M J, Klet R C, Moon S-Y, *et al*. One step backward is two steps forward: enhancing the hydrolysis rate of UiO-66 by decreasing [OH^-]. ACS Catalysis, 2015, **5**(8): 4637-4642

[56] Chauhan S, Chauhan S, D'cruz R, *et al*. Chemical warfare agents. Environ Toxicol Pharmacol, 2008, **26**(2): 113-122

[57] Bigley A N, Raushel F M. The evolution of phosphotriesterase for decontamination and detoxification of organophosphorus chemical warfare agents. Chemico-Biological Interactions, 2019, **308**: 80-88

[58] Cannard K. The acute treatment of nerve agent exposure. J Neurol Sci, 2006, **249**(1): 86-94

[59] Khare S D, Kipnis Y, Greisen P, Jr., *et al*. Computational redesign of a mononuclear zinc metalloenzyme for organophosphate hydrolysis. Nature Chemical Biology, 2012, **8**(3): 294-300

[60] Laxman R S, Sonawane A P, More S V, *et al*. Optimization and scale up of production of alkaline protease from conidiobolus coronatus. Process Biochemistry, 2005, **40**(9): 3152-3158

[61] Bonda W L M, Iochmann S, Magnen M, *et al*. Kallikrein-related peptidases in lung diseases. Biological Chemistry, 2018, **399**(9): 959-971

[62] Radzicka A, Wolfenden R. Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases. Journal of the American Chemical Society, 1996, **118**(26): 6105-6109

[63] Taylor J P, Hardy J, Fischbeck K H. Toxic proteins in neurodegenerative disease. Science (New York, NY), 2002, **296**(5575): 1991-1995

[64] Bonomi R, Cazzolaro A, Sansone A, *et al*. Detection of enzyme activity through catalytic signal amplification with functionalized gold nanoparticles. Angew Chem Int Ed Engl, 2011, **50**(10): 2307-2312.

[65] Chen Z, Wang Z, Ren J, *et al*. Enzyme mimicry for combating bacteria and biofilms. Acc Chem Res, 2018, **51**(3): 789-799

[66] Das T, Sharma P K, Busscher H J, *et al*. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. Applied and Environmental Microbiology, 2010, **76**(10): 3405-3408

Research Progress of Nanohydrolase*

XIA Li-Wei, DING Li, CHEN Mao-Long, JIAO Ye, CHENG Yun-Hui**, XU Zhou**

(*College of Chemistry and Food Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha* 410114, China)

Abstract Hydrolases are a class of more than 200 individual proteins that catalyze the hydrolysis of a range of unique chemical bonds. However, the inherent disadvantages of natural enzymes, such as variability, high cost, laborious preparation and difficult recovery, greatly limit their practical applications. To overcome these shortcomings, researchers have been devoted to the exploration of hydrolases mimics for a long time. Since the discovery of Fe_3O_4 nanoparticles as peroxidase mimics in 2007, a large number of studies on nanoenzymes have continued to emerge. Compared with natural enzymes, nanoenzymes have the advantages such as simple preparation, large-scale production, strong environmental tolerance, low preparation and storage costs, and reusability. Nanohydrolase are nanomaterials with hydrolase activity,and the hydrolase activity of metal organic frame materials, carbon based nanomaterials and gold nanoparticles has been reported. In recent years, the research field of nano hydrolase has entered a booming period, but so far no one has reviewed nanohydrolase. In this review, we first classifies nanohydrolases according to the different substrates and discusses their catalytic mechanisms, then summarizes the factors affecting the activity of nanohydrolases and the application of nanohydrolases, and finally summarizes and discusses the current challenges and future prospects of nanohydrolases.

Key words nanohydrolase, classification, catalytic mechanism, activity regulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0073

---

* The work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China（31401566）, National Key Research and Development Program（2018YFD0400405）, Hunan Innovation Platform and Talent Plant（2017RS3055）and 2011 Collaborative Innovation Project of Grain Deep Processing and Quality Control in Hunan Province（2013448）.

** Corresponding author.

XU Zhou. Tel：86-13308444404，E-mail：xz_jnu@126.com

CHENG Yun-Hui. Tel：86-1301616167，E-mail：chengyh6488@sina.com

Received：March 19，2020 Accepted：July 10，2020