



高负载 Cu 单原子纳米酶的制备和类酶活性研究*

陈心珠¹⁾ 刘晓宇²⁾ 张少芳^{1)**} 穆晓宇^{1)**} 张晓东^{1,2)**}

(¹⁾ 天津大学医学工程与转化医学研究院, 天津 300072; (²⁾ 天津大学理学院, 天津 300350)

摘要 **目的** 单原子纳米酶 (single-atom nanozyme, SAN) 因其高原子利用率及丰富的类酶活性被广泛研究。但是目前大多数 SAN 活性位点负载量较低, 限制了其进一步应用和发展。本研究旨在制备一种高原子负载量的 SAN, 并对其类酶活性进行系统研究, 希望为高负载 SAN 的制备提供思路, 并为 SAN 在更广泛领域的应用提供理论支持。**方法** 本研究通过原位锚定策略将金属盐前驱体锚定在氨基化石墨烯量子点框架中, 在惰性气体保护下进行高温热解稳定 Cu 原子和载体之间的化学键, 制备出负载量高达 7.66% (质量百分比) 的高负载 Cu 单原子纳米酶 (high-loading Cu SAN)。此外, 以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 和氮蓝四唑 (NBT) 为显色剂, 评估了 high-loading Cu SAN 的类过氧化物酶 (POD)、类氧化物酶 (OXD) 及类超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 并与传统金属有机框架锚定法制备的低负载 Cu 单原子纳米酶 (low-loading Cu SAN) 作比较。以过氧化氢 (H_2O_2) 为催化底物, 对比研究了高/低负载 Cu SAN 的类过氧化氢酶 (CAT) 活性。**结果** 研究表明, 本文制备的高负载 Cu SAN 的类 POD 和 SOD 活性分别是低负载 Cu SAN 的 3.4 倍和 8.88 倍, 且表现出类酶催化选择性。**结论** 本研究为高负载 SAN 的制备和活性研究提供了思路, 为 SAN 在检测传感、疾病治疗以及环境保护等方面的应用奠定了基础。

关键词 单原子纳米酶, Cu 原子, 高负载, 类过氧化物酶活性, 类超氧化物歧化酶活性

中图分类号 O643.36, Q814

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0533

人工酶是一种具有类似天然酶特性的材料, 可以模拟催化人体内的生物化学反应^[1-5]。其中, 作为新一代人工酶——纳米酶, 其相比于天然酶具有更强的稳定性、更低的制备成本以及更加普适的催化反应条件^[6-8], 因而被广泛应用于生物医学、检测传感、环境治理以及能源再生等多个领域^[9-15]。然而, 目前大多数纳米酶的催化活性低、底物选择性差, 难以实现催化活性的选择性调控。并且其结构组成复杂, 导致催化活性位点不明确、催化机理研究困难^[16-17]。因此, 纳米酶的设计开发需要新的方向和策略。

近年来, 在原子水平构建人工酶的策略为纳米酶的发展提供了新的思路, 通过将纳米酶的活性位点精确到具有明确配位结构的几个或几十个原子, 然后在原子水平调控设计出具有更高类酶活性和更强选择性的纳米酶^[18-23]。比如 Liu 等^[24] 制备了一

种由 25 个金原子组成的团簇酶 ($Au_{25}MPA_{18}$), 通过原子水平的调控, 成功地获得了类过氧化氢酶 (CAT) 活性提升的 $Au_{24}Cu_1MPA_{18}$ 和类超氧化物歧化酶 (SOD) 活性提升的 $Au_{24}Cd_1MPA_{18}$, 区别于团簇酶原有的优异的谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性。团簇酶自身精确的原子配位结构也为研究人员

* 国家重点研发计划 (2021YFF1200700), 国家自然科学基金 (91859101, 81971744, U1932107, 82001952, 11804248), 天津市杰出青年基金 (2021FJ-0009), 天津市自然科学基金 (19JCZDJC34000, 20JCYBJC00940, 21JCYBJC00550, 21JCZDJC00620, 21JCYBJC00490), 天津大学创新基金和中国科学院创新交叉团队 (JCTD-2020-08) 资助项目。

** 通讯联系人。

张晓东 Tel: 022-83612122, E-mail: xiaodongzhang@tju.edu.cn

穆晓宇 Tel: 022-83612122, E-mail: muxiaoyu@tju.edu.cn

张少芳 Tel: 022-83612122, E-mail: zhangsf@tju.edu.cn

收稿日期: 2022-11-14, 接受日期: 2023-01-28

分析计算催化反应路径以及反应的可能性提供了便利条件。此外, 一种新型的人工纳米酶——单原子纳米酶 (single-atom nanozyme, SAN) 因具有与天然酶相似的催化反应活性中心, 且配位环境简单、催化活性高、类酶活性丰富以及回收利用方便, 一经提出就成为了研究的热点^[25-27]。目前通过“自下而上”以及“自上而下”等方法制备的多种SAN已经被广泛研究并应用于检测传感以及抗肿瘤、杀菌抗炎、创伤性脑损伤的治疗等生物医学领域^[28-32]。

随着SAN的蓬勃发展, 多种金属元素组成的M-N-C结构(M为Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Mn、Ru、Ir、Pd等)被用于模拟天然酶的活性中心位点。其中Cu元素作为多种天然酶(如漆酶、SOD等)活性中心的组成部分, 其价格低廉, 获取渠道广泛, 被用于制备Cu SAN, 在多个领域取得了显著的成果。如Cheng等^[33]将制备的基于多孔碳基质的Cu-N₄单原子催化剂应用于电催化CO₂还原生成CO, 在-0.9 V vs. RHE (reversible hydrogen electrode, 可逆氢电极)时的CO法拉第效率(实际生成物与理论生成物的百分比)高达98%, 对于CO₂还原表现出强的活性和选择性。Zong等^[34]制备的Cu单原子催化剂同时具有优异的氧还原反应(ORR)和析氧反应(OER)两种电催化活性, 被成功应用于锌-空气电极的空气阴极材料, 性能优异。Zhang等^[35]则将Cu单原子催化剂用于催化苯氧化生成苯酚, 展现出83.7%的苯转化率和98.1%的苯酚选择性。以上研究结果均表明了Cu SAN在能源再生以及环境保护中潜在的应用价值。Wu等^[36]则将其制备的具有优异类过氧化物酶(POD)活性的高负载Cu单原子纳米酶(high-loading Cu SAN) (~5.1% (质量百分比))与天然乙酰胆碱酯酶以及胆碱氧化酶相结合构建了级联反应系统, 对于乙酰胆碱的检测限达到1.24 μmol/L, 对于有机磷农药的检测限达到了0.6 ng/L。除了体外研究应用, 研究人员也尝试将Cu SAN转化应用于生物医学领域, Wang等^[23]制备了Cu SAN, 具有强类POD活性、谷胱甘肽消耗作用和光热性能, 协同应用于抗菌可以达到接近100%的效率。Zhang等^[25]则创造性地将具有优异类SOD活性的Cu SAN以及其他一系列SAN与可吸收缝合线结合, 应用于创伤性脑损伤后的伤口缝合, 结果显示其可以促进血管内皮生长因子的产生, 加速脑损伤

后的头皮伤口愈合。总之, 以单原子作为活性中心的催化剂因其超高的催化性能和选择性已经在越来越广阔的领域展现出良好的应用前景。

虽然SAN的原子利用率较高, 但是较低的原子负载量使得SAN的整体活性仍然有限。据报道, 大多数SAN的金属原子负载量低于3% (质量百分比)。随着金属粒子尺度缩小至原子水平, 其表面自由能会急剧增加, 导致金属原子聚集形成纳米颗粒、金属氧化物晶体等从而影响原子利用率^[16, 37]。因此, 开发具有高分散性和高负载量的SAN成为目前研究的难点。现有的高负载SAN在制备过程中多借助金属和载体原子之间强的金属-载体相互作用来实现原子负载量的提升^[5, 38], 例如Zheng等^[39]在制备过程中使用二维层状过渡金属硫族化合物作为载体, 借助表面刻蚀后载体上形成高密度的阴离子空位捕获硫脲-过渡金属原子复合物, 使Fe单原子催化剂的负载量达10% (质量百分比)。Li等^[40]使用区别于传统金属有机框架(metal organic frameworks, MOFs)烧结制备单原子的方法, 以Cu MOF作为前驱体, 与双氰胺混合后烧结制备Cu单原子催化剂, 负载量达20.9% (质量百分比)。其中, 双氰胺为单原子锚定提供的丰富的N元素是负载量提升的关键。Wang等^[41]以具有高比表面积硫掺杂介孔碳为载体, 借助金属和S原子之间的强键合作用使得制备的Pt单原子催化剂的负载量达10% (质量百分比)。上述这些研究为制备高负载SAN提供了可行性策略。

本文采用原位锚定策略将金属盐前驱体锚定在氨基化石墨烯量子点形成的框架中, 石墨烯量子点以及尿素中富含的N原子促进了金属原子与载体之间形成强的金属-载体相互作用, 协同实现了Cu原子的高密度均匀分散。文中系统地研究了金属负载量对于单原子结构和活性的影响, 将本研究制备的高负载Cu SAN与传统的MOFs锚定法制备的低负载Cu单原子纳米酶(low-loading Cu SAN)的多种类酶活性进行定量对比。结果表明, 本研究制备的高负载Cu SAN具有更高的模拟POD和SOD的生物催化活性, 并表现出催化选择性, 为高负载SAN的制备及类酶活性研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

无水氯化铜(CuCl₂, 98%)购自北京伊诺凯

科技有限公司, 尿素 ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) 购自天津希恩思生化科技有限公司, 六水合硝酸锌 ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%)、过氧化氢 (H_2O_2 , 30% (质量百分比))、二甲基亚砜 (DMSO, >99.8%)、异丙醇 (99.8%) 购自上海阿拉丁试剂有限公司, 2-甲基咪唑 (99%)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, 99%) 购自上海迈瑞尔化学技术有限公司, 辣根过氧化物酶 (HRP, >300 U/mg) 购自上海麦克林生化有限公司, 去离子水 (>99.5%) 购自天津元立化工有限公司, 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.5)、TMB底物显色试剂盒 (ELISA, HRP发光) 购自北京雷根生物技术有限公司, 总SOD活性检测试剂盒 (氮蓝四唑, NBT法) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 高负载Cu SAN的制备

本文制备的高负载Cu SAN是在参考文献的基础上进一步优化后合成的^[42]。将30 ml浓度为1 g/L的氨基化石墨烯量子点溶液与浓度为5 g/L的 CuCl_2 溶液 (分别含有0.01、0.02、0.03或0.05 mmol CuCl_2) 均匀混合, 混合后的溶液在冰水浴中超声15 min, 然后立刻在液氮中冻结并放入冷冻干燥机 (BSA224S, 美国Gibco生物科技公司) 中冷冻干燥。获得的粉末与尿素按照1:10的质量比研磨混匀放入刚玉舟中。然后将刚玉舟移入真空管式炉 (SK-GO6123K, 天津中环), 在氩气保护下以10°C/min的升温速度加热至50°C并煅烧2 h。待降温结束后, 得到的粉末即为不同掺杂比的Cu SAN。

文中用于对比的低负载Cu SAN也是参考文献的制备方法进一步优化后合成的^[25]。首先, 将0.590 9 g 2-甲基咪唑和0.508 5 g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 分别溶解在45 ml和50 ml甲醇中, 然后在磁力搅拌的作用下混匀, 60°C静置24 h后收集白色沉淀物, 使用无水乙醇洗涤至沉淀呈透明。真空干燥后收集晶体研磨均匀, 在氮气保护下900°C烧结2 h。称取120 mg烧结后的粉末分散于异丙醇中, 加入4.5 mg CuCl_2 , 混合液超声震荡。将超声后的溶液离心、洗涤及干燥后, 氮气保护下500°C烧结1 h。收集获得的粉末即为低负载Cu SAN。

1.3 高负载Cu单原子纳米酶的特征

使用球差校正透射电子显微镜 (AC-STEM, JEM-ARM200F, 日本电子) 对制备的高负载SAN的原子信息进行观察; 在X射线衍射仪 (XRD, Smartlab, 日本理学) 10°~60°的范围内对制备的

SAN进行了物象鉴定; 利用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS, 7900ICP-MS, 英国安捷伦) 测试了高/低负载的Cu SAN的原子负载量; X射线光电子能谱仪 (XPS, Axis Supra, Kratos) 测试分析了SAN的元素组成, 并通过分峰拟合推测了原子的成键情况。

1.4 类POD活性检测

本文按照TMB底物显色试剂盒中的说明书进行操作测试了纳米酶类POD活性。首先, 将试剂盒中的TMB显色液、TMB缓冲液和TMB氧化剂按照5 000:5 000:4的体积比配制工作液。然后将20 μl 浓度为100 mg/L的不同掺杂比例的Cu SAN和180 μl 工作液混合作为实验组, 20 μl 去离子水和180 μl 工作液混合作为对照组, 将样品放入96孔板中, 使用多功能酶标仪 (SuPerMax 3000FA, 上海闪谱) 实时检测652 nm处的吸光度值。不同浓度 (100、80、60、40、20和10 mg/L) 的高/低负载Cu单原子的类POD活性测试方法与上述操作相同。实验中选取不同浓度的HRP作为标准品制定了标准曲线, 将SAN在652 nm处的吸光度代入标准曲线中, 对纳米酶类POD活性进行了定量。

使用紫外-可见光分光光度计 (UV-3600, 日本岛津) 的动力学模式测试了Cu SAN类POD活性的动力学过程。测试时, 将高/低负载SAN、不同浓度的 H_2O_2 (0、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50 mmol/L) 或TMB (0、6、10、25、50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) 加入醋酸-醋酸钠缓冲液中, 保持溶液总体积为200 μl , 监测混合后的反应液在652 nm处的吸光度值。之后对测试的数据进行处理, 利用Origin软件作出双倒数图并拟合得到纳米酶催化底物的米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_m)。TMB的摩尔消光系数为: $\epsilon_{652\text{ nm}} = 39\ 000\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

1.5 类SOD活性检测

本文中所有类SOD活性检测均按照总SOD活性检测试剂盒的说明书进行。首先将试剂盒中的SOD提取液、NBT显色液和酶溶液按照100:30:30的比例混合配制成SOD检测工作液。检测时, 分别在96孔板的孔中加入160 μl 工作液, 20 μl 浓度为300 mg/L的样品, 20 μl 反应启动液, 光照对照组用20 μl SOD提取液替代样品, 将96孔板在日光灯下照射10 min至光照对照组的溶液变为蓝绿色。然后加入避光对照组, 避光对照组用40 μl

SOD提取液替代样品和反应启动液, 在560 nm处检测各孔的吸光度值。其中光照对照组未加入SAN, 所以光照之后的反应液在560 nm处具有明显的吸收; 避光对照组未加入SAN且未经过光照, 所以在560 nm处没有明显的紫外吸收。用紫外分光光度计测试上述反应后的混合液在400~800 nm处的吸收曲线以进一步比较高/低负载的Cu SAN的类SOD活性, 取光照对照组作为对照线(Con)。不同浓度(500、400、300、200、100、50和30 mg/L)的高/低负载Cu SAN活性测试方法与上述操作相同。按照试剂盒中的说明将吸光度转化为抑制率, 公式为抑制率/% = $(A_{\text{光照}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{光照}} - A_{\text{避光}}) \times 100$ 。计算SOD活力的公式为: 酶活力/U = 抑制率/(1-抑制率)。

1.6 类OXD活性检测

本文使用TMB显色法检测样品的类氧化物酶(OXD)活性。实验时, 称取TMB粉末溶解在DMSO中配成浓度为16 mmol/L的工作液, 分别将170 μl 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)、10 μl TMB工作液和20 μl 浓度为300 mg/L的不同掺杂比例的样品加入96孔板中, 对照组使用20 μl 醋酸-醋酸钠缓冲液替代样品。将各组溶液混合均匀后, 使用多功能酶标仪实时检测96孔板中的液体在652 nm处的吸光度值。不同浓度的高/低负载Cu单原子活性测试方法与上述操作相同, 使用的样品浓度分别为500、400、300、200、100和50 mg/L。

1.7 类CAT活性检测

本文借助紫外-可见分光光度计检测 H_2O_2 在240 nm处的吸光度的变化来比较样品催化 H_2O_2 分解的能力。使用去离子水将30% (质量百分比) 的 H_2O_2 稀释为40 mmol/L, 取180 μl 放入比色皿中, 然后加入20 μl Cu SAN (浓度为500 mg/L) 混合均匀, 立刻在紫外-可见分光光度计的动力学模式下检测加入样品后5 min内溶液的吸光度值变化。另外取180 μl 稀释的 H_2O_2 溶液(30 mmol/L)与20 μl 浓度为500 mg/L的样品混合孵育, 每20 min取反应液放入比色皿中测定吸光度值。另一方面, 使用溶氧仪(LD101探头, HACH HQ40d, US)测试纳米酶催化 H_2O_2 分解生成 O_2 的量来更加直观地比较高/低负载Cu SAN的类CAT活性。测试时, 首先向盛有6 ml去离子水的小烧杯中鼓入 N_2 以排出溶液中的 O_2 , 待水溶液中 O_2 的含量低至0.6 mg/L时, 迅速向溶液中依次边搅拌边加入60 μl H_2O_2

(10 mol/L)和90 μl 纳米酶(浓度为2 g/L), 对照组用90 μl 去离子水代替纳米酶。使用溶氧仪每10 s记录一次液体中 O_2 的含量。同时为了更加直观的观察以及证明样品的类CAT活性, 实验中取3个离心管均放入500 μl 浓度为2 mol/L的 H_2O_2 , 实验组的两个离心管中分别加入20 μl 高/低负载Cu SAN (浓度为1 g/L), 对照组用20 μl 去离子水代替SAN, 将离心管静置10 min, 观察气泡产生的速度和密度并拍照记录。定义过氧化氢酶的酶活力单位(unit)为在25°C、pH为7.0条件下, 在1 min内催化分解1 μmol H_2O_2 即为1个酶活力单位(1 U)。计算SAN类CAT活力值的公式为: $\text{CAT活力值}/(\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}) = \text{消耗} \text{H}_2\text{O}_2 \text{的微摩尔数}/(\text{反应分钟数} \times \text{样品质量})$ 。 H_2O_2 的摩尔消光系数为: $\epsilon_{240 \text{ nm}} = 39.4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 高负载Cu SAN的表征分析

利用原子分辨的AC-STEM观察金属掺杂比为0.03 mmol时制备的高负载Cu SAN中Cu单原子的分布, 如图1a中蓝色圆圈所标记, 有许多单个亮点均匀分布, 因为Cu原子的相对分子质量高于C、N和O等, 所以可以认为图中亮点为Cu原子以单原子的形式分散在石墨烯基底材料上, 并且原子分布密度高。通过XRD谱表征了不同掺杂比下Cu SAN的衍射峰(图1b), 在金属掺杂量为0.02和0.03 mmol时, 图谱中只显示了石墨烯载体在25°和44°附近的特征峰, 分别归属于石墨碳的(002)晶面和(010)晶面。当掺杂量增加到0.05 mmol时, 图谱中开始有Cu纳米颗粒尖锐的晶体衍射峰出现^[43]。通过ICP-MS检测了高/低负载Cu SAN中Cu元素的含量, 结果表明0.03 mmol掺杂时制备的高负载Cu SAN中Cu原子负载量为7.66% (质量百分比), 是低负载Cu SAN的12倍(图1c)。利用XPS技术表征高负载Cu SAN的元素组成和结构。图1d~f展示了高负载Cu SAN的XPS图谱, 全谱的元素分析结果显示Cu SAN中含有C、N、O和Cu元素。对N 1s高分辨能谱图进行分峰拟合, 发现材料中的氮主要由吡啶氮(398.5 eV)、吡咯氮(399.6 eV)和石墨烯氮(400.5 eV)组成^[44]。而C 1s的高分辨图显示C主要以C=C双键(284.8 eV)、C—N键(286.3 eV)和O—C=O键(288.6 eV)的形式存在^[45-46]。

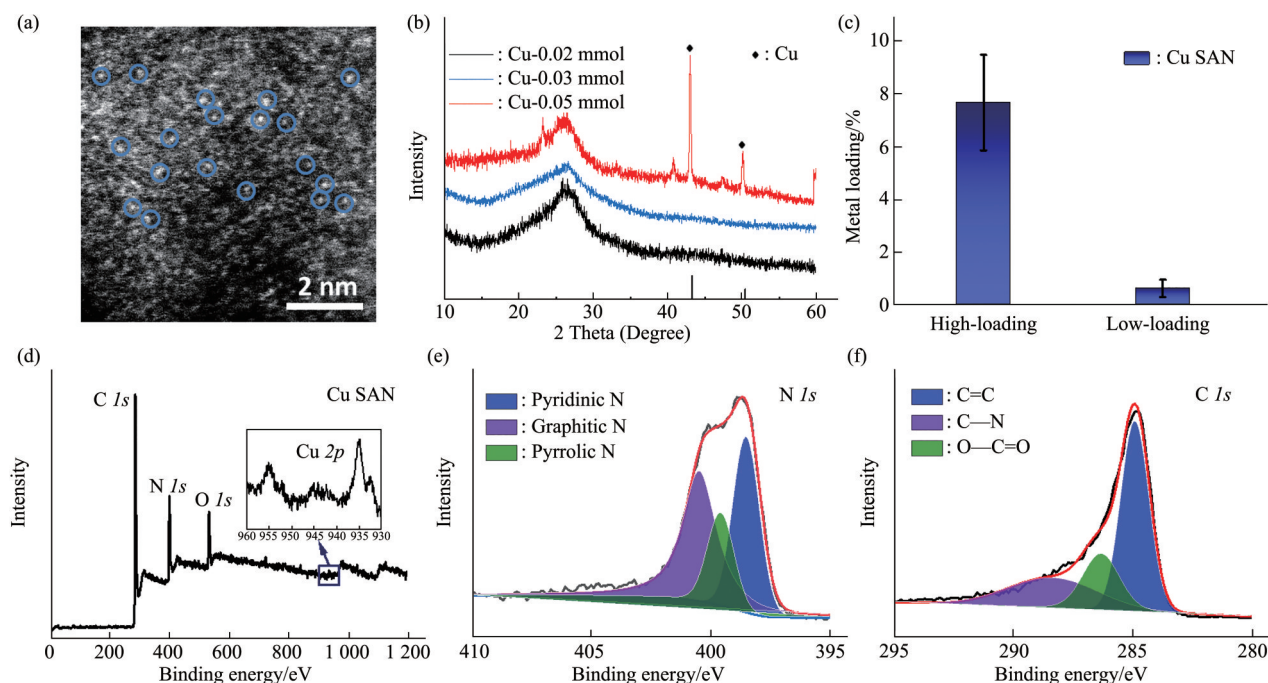


Fig. 1 Structural characterizations of Cu SAN

(a) AC-STEM image. (b) XRD patterns of Cu SAN with different doping amounts. (c) Metal loadings calculated from ICP-MS. (d) XPS spectrum of high-loading Cu SAN (Inset: high-resolution XPS spectrum of Cu 2p). (e, f) The high-resolution XPS spectra of N 1s (e) and C 1s (f).

2.2 类POD活性评估

基于以上结构表征, 本文对高/低负载Cu SAN进行系统地催化性能评估。首先, 以TMB为显色底物, 检测了Cu SAN的类POD活性。TMB在 H_2O_2 参与下可由POD催化生成蓝色的oxTMB产物, 此产物在652 nm处有特征吸收峰(图2a)。图2b显示, 随着金属前驱体掺杂量由0.01 mmol提升为0.05 mmol, Cu SAN的类酶活性呈现先升高后降低的趋势。当掺杂量为0.03 mmol时溶液反应60 min吸光度值达到2.35(图2c)。结合XRD结果, 在掺杂量为0.05 mmol时制备的SAN可能会形成金属纳米颗粒, 因此继续提高金属前驱体的添加量不但没有提高类POD催化活性, 反而因为降低了原子利用率, 使得SAN的整体活性呈现下降的趋势。实验进一步对比研究了高(掺杂量为0.03 mmol)/低负载Cu SAN的类POD活性的差异, 如图2d, e所示, 在相同的质量浓度和测试条件下, 本文制备的高负载Cu SAN的催化活性和催化反应速率相比于低负载SAN显著提升。根据天然HRP的活性作标准曲线对SAN的活性进行了定量分析, 结果表

明, 高/低负载Cu SAN的类POD活性分别约为0.134 U/mg和0.039 U/mg, 高负载Cu SAN相比低负载SAN提升了约3.4倍(图2f)。此外, 本文进一步研究了高/低负载Cu SAN类POD活性的动力学过程, 通过分别测试不同 H_2O_2 或TMB浓度下SAN催化TMB生成蓝色oxTMB产物的初始速度, 通过拟合可以得到SAN对于两种底物的 K_m 及 V_m 。结果显示高负载SAN对于TMB和 H_2O_2 的 K_m 分别为0.211 mmol/L和18 mmol/L(图S1), 低于现有研究中多数纳米酶^[25-26, 32, 36, 47-49](具体参数比较见表S1), 表明其对于底物具有良好的亲和力。纳米酶优异的类POD活性可以使检测传感更加灵敏, 如Wu等^[36]借助模板制备了一种高负载的Cu SAN(Cu-N-C), 具有优异的类POD活性, 作者将其研究应用于乙酰胆碱和有机磷农药的检测, 取得了显著的成效。文中终浓度为10 mg/L的Cu-N-C催化TMB显色反应, 吸光度为0.9, 比本研究所能到达的吸光度低。Yan等^[14]制备的一种Pt/CeO₂ SAN在终浓度为10 mg/L时催化TMB显色反应6 h吸光度达到1.6, 而本研究中的高负载Cu单原子在相同

浓度下仅 1 h 时吸光度可达 2.4, 远高于 Pt/CeO₂。于检测传感的潜力。
表明本文制备的 SAN 类 POD 活性优异, 具有应用

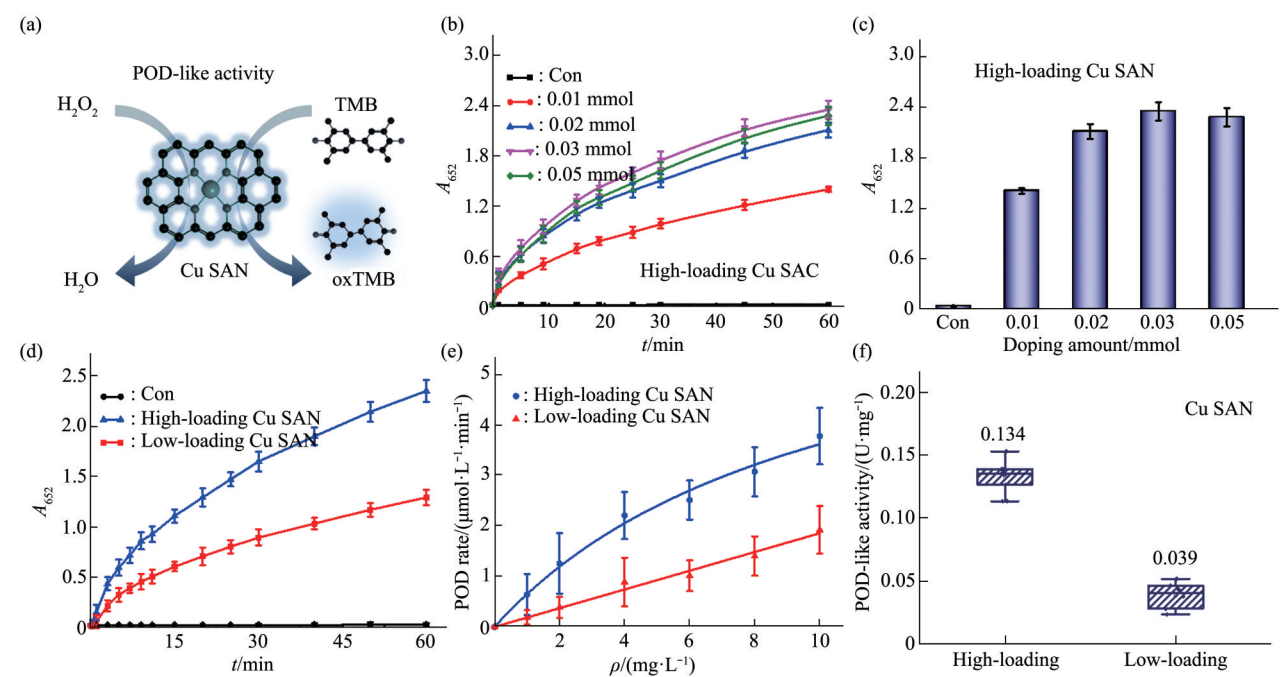


Fig. 2 POD-like activity of Cu SAN

(a) Schematic illustration of the POD-mimic reaction catalyzed by Cu SAN. (b) Time-dependent absorbance of oxTMB at 652 nm in the presence of high-loading Cu SAN with different doping amounts. (c) POD-like activities of high-loading Cu SAN with different doping amounts. (d) Time-dependent absorbance of oxTMB in the presence of high/low-loading Cu SAN. (e) POD reaction rates of Cu SAN at different concentration. (f) Quantification of POD-like activities of high/low-loading Cu SAN.

2.3 类SOD活性评估

SOD是人体内重要的抗氧化酶, 可以将体内病理状态下产生的过量的超氧阴离子 (O₂^{•-}) 催化生成O₂和H₂O₂, 从而避免O₂^{•-}被催化生成次级自由基 (ONOO⁻) 对人体产生进一步的伤害^[50]。本文使用NBT显色法检测了Cu SAN的类SOD活性。NBT作为显色底物, 在光照和O₂^{•-}存在的条件下被还原成蓝绿色的甲臍, 而SOD可以抑制甲臍的产生 (图3a)。基于该反应原理, 本文研究了不同掺杂量对Cu SAN的类SOD活性的影响, 实验结果表明, 随着金属前驱体投料量的提升, SAN类SOD活性逐渐增强, 当掺杂浓度为0.03 mmol时, 抑制率高达87.4% (图3b)。图3c为反应后溶液的紫外-可见光分光光度计吸收谱, 可以看出高负载的Cu SAN在560 nm处的吸光度明显低于光照对照组 (Con), 并且低于低负载Cu SAN, 表明高负载

Cu SAN具有更优的类SOD活性, 可以有效清除O₂^{•-}。当反应体系中抑制百分率为50%时, 反应体系中的SOD酶活力单位定义为一个酶活力单位 (unit, U)。图3d对高/低负载Cu SAN的类SOD活性进行定量分析, 结果表明高负载Cu SAN的类酶活性可以达到2.18 U/μg, 而低负载Cu SAN的活性约为0.24 U/μg, 高负载Cu SAN的酶活力值约是低负载Cu单原子的8.88倍。此外, 研究了高/低负载的Cu SAN浓度依赖的类SOD活性, 结果显示浓度为20 mg/L时高负载Cu SAN即显示出78.6%的抑制率, 而低负载Cu SAN在浓度高达50 mg/L时抑制率只达到了72.7% (图3f)。该研究结果揭示了通过增加SAN中Cu原子的负载量可实现其类SOD活性的增强。相同的浓度水平下, 本研究制备的高负载Cu SAN的类SOD活性高于现有研究中多数纳米酶 (图3e)。如Ruan等^[51]制备的Pd/CeO₂纳米

酶在浓度为 80 mg/L 时 SOD 抑制率仅为 67%，远远低于本文中的高负载 Cu SAN。Huang 等^[52] 制备的

V₂O₅ 纳米线在浓度为 15 mg/L 时约为 70%，与本文达到了相似的水平。

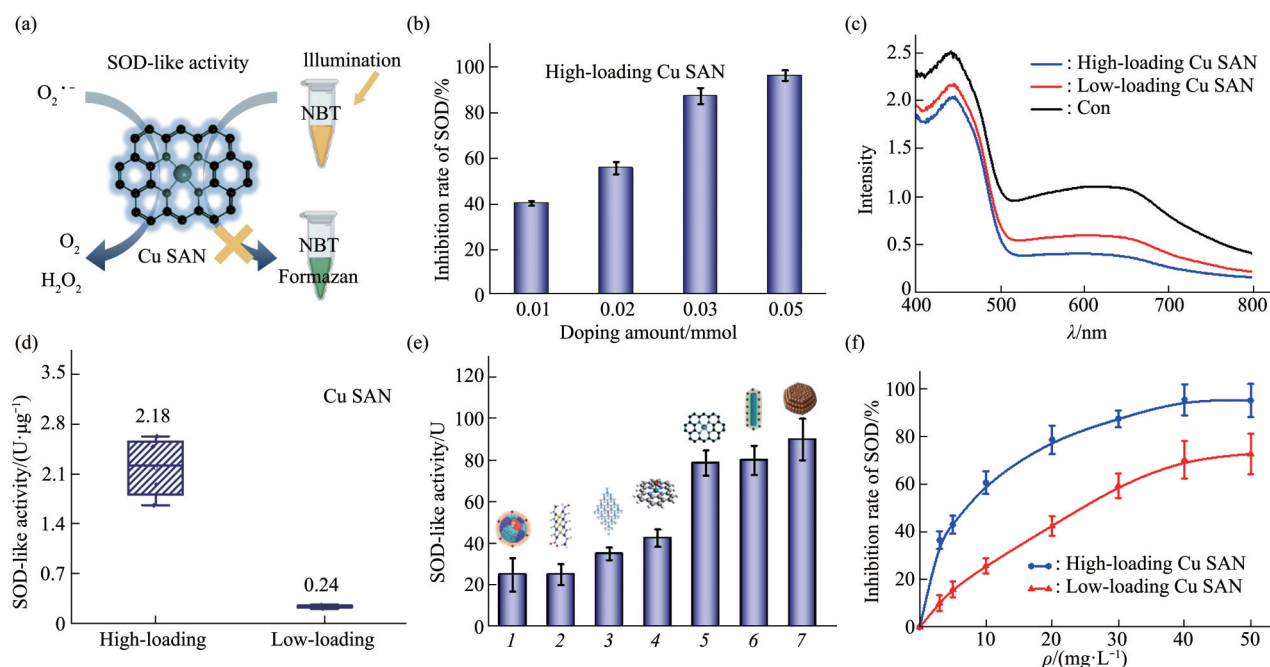


Fig. 3 SOD-like activity of Cu SAN

(a) Schematic illustration of the SOD-mimic reaction catalyzed by Cu SAN. (b) SOD-like activities of high-loading Cu SAN with different doping amounts. (c) UV-Vis spectra of reaction solution with or without Cu SAN (concentration: 100 mg/L. Con refers to the control group disposed under light). (d) Quantification of SOD-like activities of high/low-loading Cu SAN. (e) Comparison of SOD-like activities of different nanozymes at the same concentration: 1, MnO₂ Fenozyme^[53]; 2, Fe-NC-3 SAzyme^[54]; 3, Pd/CeO₂^[51]; 4, low-loading Cu SAN; 5, high-loading Cu SAN; 6, V₂O₅@pDA@MnO₂^[52]; 7, Cu_xO^[49]. (f) Inhibition rates of Cu SAN at different concentration.

2.4 类OXD活性评估

OXD以O₂作为电子受体催化底物氧化生成H₂O或H₂O₂。本文以TMB作为显色底物，检测了制备的Cu SAN的类OXD活性（图4a）。根据图4b, c所示，当掺杂比为0.03 mmol时，高负载Cu SAN的催化活性达到最高，反应180 min后oxTMB在652 nm处吸光度值可以达到0.31。但是，将高/低负载的Cu SAN在相同的质量浓度下进行比较，发现高负载Cu SAN催化TMB生成的蓝色产物的吸光度值在60 min时为0.18，而低负载Cu SAN催化反应60 min时吸光度值可达0.95，是高负载的5.28倍（图4d, f）。进一步计算高/低负载的Cu SAN催化TMB氧化的反应速率，结果显示，

当浓度均为50 mg/L时，低负载Cu SAN的反应速率为3.03 μmol/ (L·min)，而高负载的Cu SAN的反应速率仅为0.817 μmol/ (L·min)，低负载SAN的反应速率是高负载的3.7倍（图4e）。这个结果体现了高负载Cu SAN的类酶催化选择性，在实际的检测过程中，类OXD活性会提高反应的基底，对于类POD活性的应用是一种副反应，因此制备只具有单活性的纳米酶对于检测是有益的。如Liang等^[55]研究制备了一种颜色呈白色的单活性GeO₂纳米酶，该纳米酶只具有类POD活性，避免了类OXD活性的影响。推测本文中高/低负载SAN呈现出不同类酶活性选择的结果可能与材料的结构有关，产生这种现象的原因需要进一步的研究。

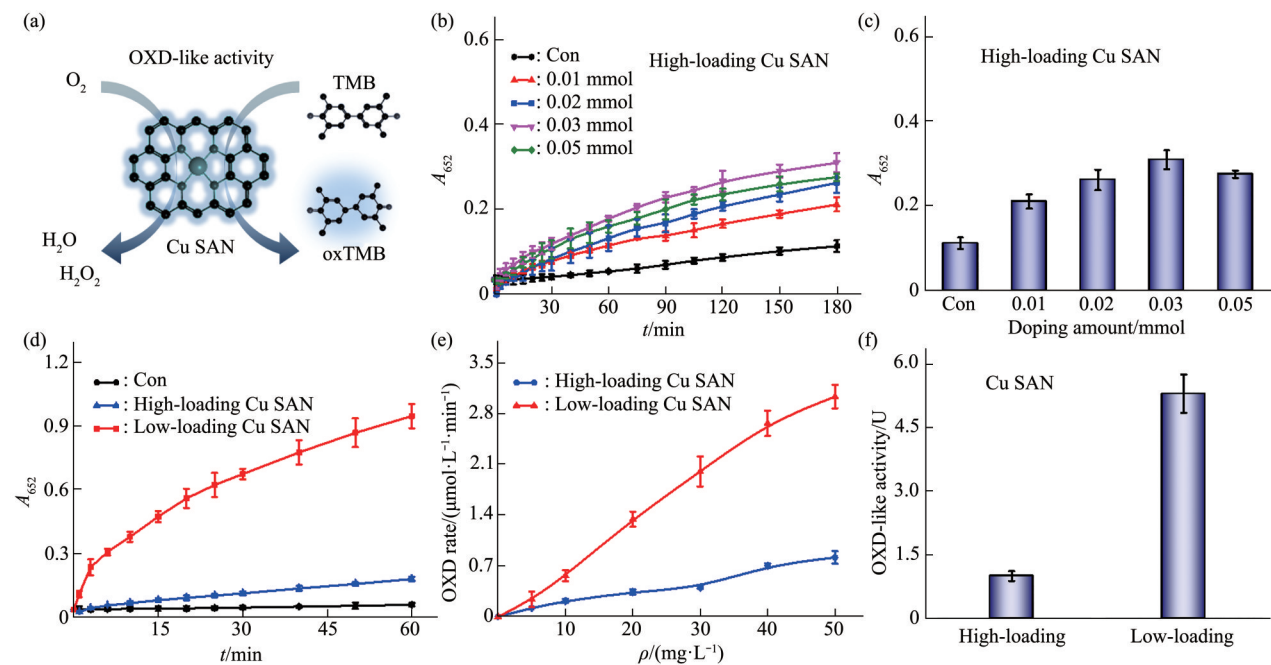


Fig. 4 OXD-like activity of Cu SAN

(a) Schematic illustration of the OXD-mimic reaction catalyzed by Cu SAN. (b) Time-dependent absorbance of oxTMB at 652 nm in the presence of high-loading Cu SAN with different doping amounts. (c) OXD-like activities of high-loading Cu SAN with different doping amounts. (d) Time-dependent absorbance of oxTMB in the presence of high/low-loading Cu SAN. (e) OXD reaction rates of Cu SAN at different concentration. (f) Comparison of OXD-like activities of high/low-loading Cu SAN.

2.5 类CAT活性评估

CAT是以 H_2O_2 为底物的一种氧化还原酶，可以催化 H_2O_2 分解产生 O_2 和 H_2O （图5a），从而有效清除体内产生的过量的 H_2O_2 。因此本研究也进一步探索了制备的高负载Cu SAN的类CAT活性。将 H_2O_2 和SAN均匀混合后，检测 H_2O_2 在240 nm处的吸光度值随时间的变化来定量对比高/低负载的Cu SAN对 H_2O_2 的分解能力。结果如图5b所示，反应120 min后高/低负载Cu SAN的反应液在240 nm处的吸光度分别由1.047降低至0.614和0.506，表明低负载Cu SAN具有更强的分解 H_2O_2 能力。并且根据动力学测试可以看出，低负载Cu单原子的催化速率明显较快（图5c）。图5d对比了Cu SAN对 H_2O_2 的清除率，发现在反应1.5 h后低负载Cu SAN的清除率为57.6%，高负载为44.5%，这个结果也证明了在相同时间内低负载Cu SAN比高负载Cu SAN可以催化分解更多的 H_2O_2 。此外，根据酶活力的定义计算得到高负载Cu SAN的类过氧化氢酶活力值为43.9 U/ μg ，而低负载Cu SAN为60.5 U/ μg ，表明低负载Cu SAN的催化活性约是高

负载Cu SAN的1.37倍（图5e）。研究中进一步借助溶氧仪测定了高/低负载Cu SAN加入 H_2O_2 溶液后催化产生的 O_2 量来比较其活性差异，结果表明，在100 mmol/L的 H_2O_2 中加入SAN 5 min后，低负载Cu SAN产生了3.67 μmol 的 O_2 ，高负载SAN仅产生了1.87 μmol （图5f）。通过观察加入SAN后， H_2O_2 溶液中产生的气泡数量也可以直观地比较高/低负载Cu SAN的类CAT活性，如图5f中插图所示，SAN和 H_2O_2 混合10 min后，低负载Cu SAN产生了更多的气泡，说明催化更多的 H_2O_2 产生了 O_2 。在一些显色检测的应用中，如Lu等^[56]将制备的Fe-N-C SAN应用在比色检测 H_2O_2 和谷胱甘肽， H_2O_2 作为检测目标，材料的类CAT活性可能会对这种检测产生干扰。因为具有较强类CAT活性的纳米酶会在类POD催化过程中出现竞争底物现象，从而使得计算出的底物亲和力和反应速率产生较大的偏差。在实际应用过程中，也会干扰反应路径以及降低检测灵敏性。因此，本文中制备的高负载Cu SAN略差的CAT活性或许有助于其在更广泛领域中的应用。

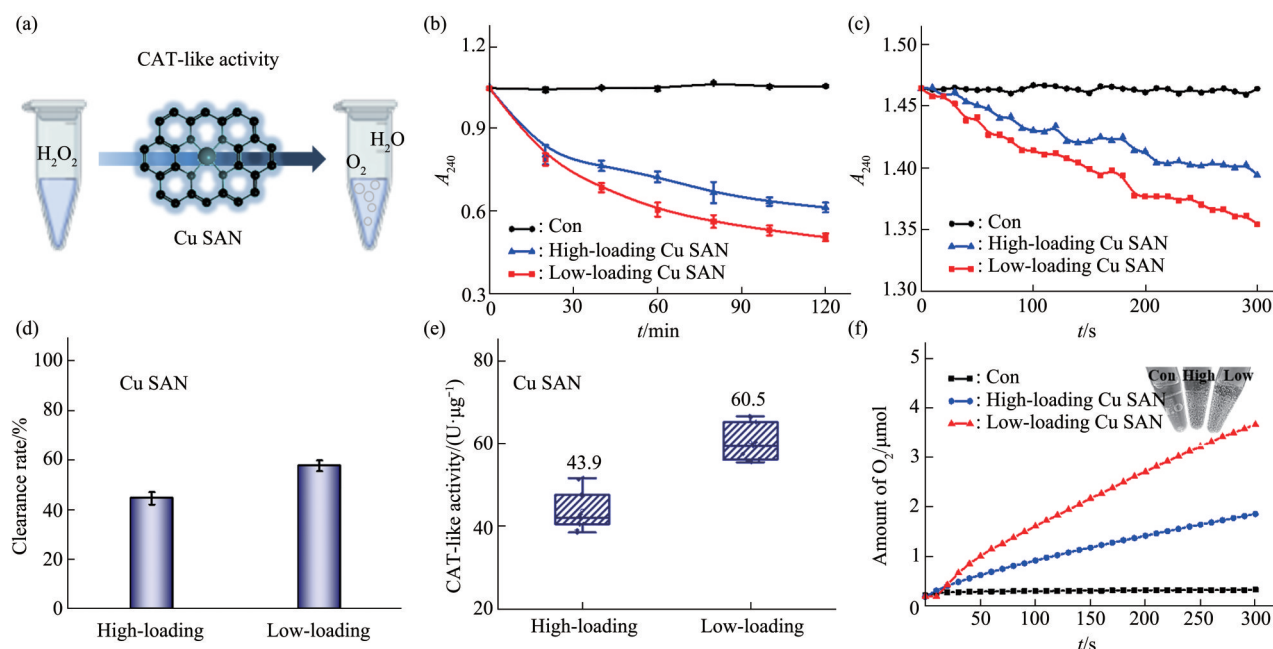


Fig. 5 CAT-like activity of Cu SAN

(a) Schematic illustration of the CAT-mimic reaction catalyzed by Cu SAN. (b-c) Time-dependent absorbance of H₂O₂ at 240 nm in the presence of high/low-loading Cu SAN. (d) Clearance rates of H₂O₂ in the presence of high/low-loading Cu SAN. (e) Quantification of CAT-like activities of high/low-loading Cu SAN. (f) Time-dependent O₂ content in H₂O₂ solution with or without of Cu SAN (Inset: photo images of H₂O₂ solution after reacting with Cu SAN for 10 min).

现代医学研究表明,多种疾病的产生和发展与生物体中过量活性氧(ROS)有关,具有清除ROS作用的纳米酶被证明可以延缓相关疾病的进程。Wu等^[57]制备了一种具有类POD、SOD、CAT、抗坏血酸过氧化物酶(APOD)以及硫醇过氧化物(TPx)等多种类酶活性的RuO₂-PVP纳米酶,将其应用在小鼠帕金森病模型中可以有效地提高酪氨酸羟化酶的表达以及抑制小胶质细胞被激活从而减轻炎症并防止神经细胞变性。Moglianetti等^[58]制备了具有类POD、CAT、SOD活性的Pt纳米酶,体外研究表明,该纳米酶可以有效降低人脑海绵状畸形疾病模型中病理细胞内ROS的总体水平。Yan等^[14]将制备的具有类POD、SOD、CAT、GPx等活性的Pt/CeO₂应用于创伤性脑损伤的治疗,能够有效减轻伤口处的炎症水平,改善受损的神经认知能力。以上研究均表明,具有多种类酶活性的纳米酶在氧化应激相关疾病的治疗中可以有效发挥作用。本研究中SAN具有优异类POD和SOD活性选择性,并且具有一定的类CAT活性和较弱的类OXD活性,总体上可以降低体系中的H₂O₂和O₂^{•-}等ROS。综上所述,本研究制备的Cu SAN可

能会通过清除生物体内病理状态下产生的过量ROS,从而调节生物体的稳态平衡,有望应用于糖尿病、心血管疾病、神经系统疾病、炎症等一系列氧化应激相关疾病的治疗。

3 结 论

本研究通过原位锚定策略制备了一种高负载Cu SAN,碳基载体中富含的N原子使得更多的金属Cu原子被牢固锚定,Cu原子负载量达到7.66%(质量百分比)。实验系统性评估了高/低负载Cu SAN的多种类酶活性(类POD、类SOD、类OXD、类CAT)的差异。以TMB和NBT为显色底物,活性定量结果表明,高负载Cu SAN具有优异的类POD和SOD活性,分别是低负载Cu SAN的3.4倍和8.88倍。动力学研究结果表明,本文制备的高负载Cu SAN对底物TMB和H₂O₂的K_m分别为0.211 mmol/L和18 mmol/L,低于现有研究中多数纳米酶。此外,高负载Cu SAN表现出对类POD和SOD活性的催化选择性。综上,本文研究结果为制备高负载SAN提供了思路,系统的活性研究增强了SAN实际应用转化的可能性和可信度。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn> 或 <http://www.cnki.net>):

PIBB_20220533_Figure S1.pdf

PIBB_20220533_Table S1.pdf

数据可用性声明 本论文的关联数据 (DOI: 10.57760/sciencedb.07790/CSTR:31253.11.sciencedb.07790) 可在科学数据银行 (Science Data Bank, ScienceDB) 数据库 (<http://www.scidb.cn>) 中访问获取。

参 考 文 献

- [1] Liang M, Yan X. Nanozymes: from new concepts, mechanisms, and standards to applications. *Acc Chem Res*, 2019, **52**(8): 2190-2200
- [2] Xi J, Zhang R, Wang L, *et al.* A nanozyme-based artificial peroxisome ameliorates hyperuricemia and ischemic stroke. *Adv Funct Mater*, 2020, **31**(9): 2007130
- [3] Liu T, Xiao B, Xiang F, *et al.* Ultrasmall copper-based nanoparticles for reactive oxygen species scavenging and alleviation of inflammation related diseases. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 2788
- [4] Mu X, Wang J, Li Y, *et al.* Redox trimetallic nanozyme with neutral environment preference for brain injury. *ACS Nano*, 2019, **13**(2): 1870-1884
- [5] Mu X, He H, Wang J, *et al.* Carbogenic nanozyme with ultrahigh reactive nitrogen species selectivity for traumatic brain injury. *Nano Lett*, 2019, **19**(7): 4527-4534
- [6] Gao L, Zhuang J, Nie L, *et al.* Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**(9): 577-583
- [7] Liu Q, Zhang A, Wang R, *et al.* A review on metal- and metal oxide-based nanozymes: properties, mechanisms, and applications. *Nanomicro Lett*, 2021, **13**(1): 154
- [8] 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
- [9] Wang Q, Wei H, Zhang Z, *et al.* Nanozyme: an emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay. *Trend Anal Chem*, 2018, **105**: 218-224
- [10] Jia Z, Lv X, Hou Y, *et al.* Mussel-inspired nanozyme catalyzed conductive and self-setting hydrogel for adhesive and antibacterial bioelectronics. *Bioact Mater*, 2021, **6**(9): 2676-2687
- [11] Wang J, Huang R, Qi W, *et al.* Construction of a bioinspired laccase-mimicking nanozyme for the degradation and detection of phenolic pollutants. *Appl Catal B Environ*, 2019, **254**: 452-462
- [12] Ai Y, Hu Z N, Liang X, *et al.* Recent advances in nanozymes: from matters to bioapplications. *Adv Funct Mater*, 2021, **32**(14): 2110432
- [13] Chen K, Sun S, Wang J, *et al.* Catalytic nanozymes for central nervous system disease. *Coord Chem Rev*, 2021, **432**: 213751
- [14] Yan R, Sun S, Yang J, *et al.* Nanozyme-based bandage with single-atom catalysis for brain trauma. *ACS Nano*, 2019, **13**(10): 11552-11560
- [15] Li S, Zhang Y, Wang Q, *et al.* Nanozyme-enabled analytical chemistry. *Anal Chem*, 2022, **94**(1): 312-323
- [16] Wang Z, Zhang R, Yan X, *et al.* Structure and activity of nanozymes: inspirations for *de novo* design of nanozymes. *Mater Today*, 2020, **41**: 81-119
- [17] Li Y, Fu R, Duan Z, *et al.* Adaptive hydrogels based on nanozyme with dual-enhanced triple enzyme-like activities for wound disinfection and mimicking antioxidant defense system. *Adv Healthc Mater*, 2022, **11**(2): e2101849
- [18] Chakraborty I, Pradeep T. Atomically precise clusters of noble metals: emerging link between atoms and nanoparticles. *Chem Rev*, 2017, **117**(12): 8208-8271
- [19] Liu H, Hong G, Luo Z, *et al.* Atomic-precision gold clusters for NIR-II imaging. *Adv Mater*, 2019, **31**(46): e1901015
- [20] Sun S, Liu H, Xin Q, *et al.* Atomic engineering of clusterzyme for relieving acute neuroinflammation through lattice expansion. *Nano Lett*, 2021, **21**(6): 2562-2571
- [21] Jiao M, Mu X, Sun S, *et al.* Establishing bilateral modulation of radiation induced redox damage *via* biocatalytic single atom engineering at Au clusters. *Chem Eng J*, 2022, **445**: 136793
- [22] Zhang S, Liu Y, Sun S, *et al.* Catalytic patch with redox Cr/CeO₂ nanozyme of noninvasive intervention for brain trauma. *Theranostics*, 2021, **11**(6): 2806-2821
- [23] Wang X, Shi Q, Zha Z, *et al.* Copper single-atom catalysts with photothermal performance and enhanced nanozyme activity for bacteria-infected wound therapy. *Bioact Mater*, 2021, **6**(12): 4389-4401
- [24] Liu H, Li Y, Sun S, *et al.* Catalytically potent and selective clusterzymes for modulation of neuroinflammation through single-atom substitutions. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 114
- [25] Zhang S, Li Y, Sun S, *et al.* Single-atom nanozymes catalytically surpassing naturally occurring enzymes as sustained stitching for brain trauma. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4744
- [26] Ji S, Jiang B, Hao H, *et al.* Matching the kinetics of natural enzymes with a single-atom iron nanozyme. *Nat Catal*, 2021, **4**(5): 407-417
- [27] Qiao B, Wang A, Yang X, *et al.* Single-atom catalysis of CO oxidation using Pt₁/FeO_x. *Nat Chem*, 2011, **3**(8): 634-641
- [28] Xiang H, Feng W, Chen Y. Single-atom catalysts in catalytic biomedicine. *Adv Mater*, 2020, **32**(8): e1905994
- [29] Shi Z, Yang W, Gu Y, *et al.* Metal-nitrogen-doped carbon materials as highly efficient catalysts: progress and rational design. *Adv Sci*, 2020, **7**(15): 2001069
- [30] Jiao L, Yan H, Wu Y, *et al.* When nanozymes meet single-atom catalysis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, **59**(7): 2565-2576
- [31] Pei J, Zhao R, Mu X, *et al.* Single-atom nanozymes for biological applications. *Biomater Sci*, 2020, **8**(23): 6428-6441
- [32] Chen Y, Jiao L, Yan H, *et al.* Fe-N-C single-atom catalyst coupling

- with Pt clusters boosts peroxidase-like activity for cascade-amplified colorimetric immunoassay. *Anal Chem*, 2021, **93**(36): 12353-12359
- [33] Cheng H, Wu X, Li X, *et al.* Construction of atomically dispersed Cu-N₄ sites *via* engineered coordination environment for high-efficient CO₂ electroreduction. *Chem Eng J*, 2021, **407**: 126842
- [34] Zong L, Fan K, Wu W, *et al.* Anchoring single copper atoms to microporous carbon spheres as high-performance electrocatalyst for oxygen reduction reaction. *Adv Funct Mater*, 2021, **31**(41): 2104864
- [35] Zhang T, Sun Z, Li S, *et al.* Regulating electron configuration of single Cu sites *via* unsaturated N, O-coordination for selective oxidation of benzene. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6996
- [36] Wu Y, Wu J, Jiao L, *et al.* Cascade reaction system integrating single-atom nanozymes with abundant Cu sites for enhanced biosensing. *Anal Chem*, 2020, **92**(4): 3373-3379
- [37] An S, Zhang G, Wang T, *et al.* High-density ultra-small clusters and single-atom Fe sites embedded in graphitic carbon nitride (g-C₃N₄) for highly efficient catalytic advanced oxidation processes. *ACS Nano*, 2018, **12**(9): 9441-9450
- [38] Li Y, Kong M, Hu J, *et al.* Carbon-microcuboid-supported phosphorus-coordinated single atomic copper with ultrahigh content and its abnormal modification to Na storage behaviors. *Adv Energy Mater*, 2020, **10**(19): 2000400
- [39] Zheng J, Lebedev K, Wu S, *et al.* High loading of transition metal single atoms on chalcogenide catalysts. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(21): 7979-7990
- [40] Li F, Han G F, Noh H J, *et al.* Boosting oxygen reduction catalysis with abundant copper single atom active sites. *Energy Environ Sci*, 2018, **11**(8): 2263-2269
- [41] Wang L, Chen M X, Yan Q Q, *et al.* A sulfur-tethering synthesis strategy toward high-loading atomically dispersed noble metal catalysts. *Sci Adv*, 2019, **5**(10): eaax6322
- [42] Xia C, Qiu Y, Xia Y, *et al.* General synthesis of single-atom catalysts with high metal loading using graphene quantum dots. *Nat Chem*, 2021, **13**(9): 887-894
- [43] Mardiansyah D, Badloe T, Triyana K, *et al.* Effect of temperature on the oxidation of Cu nanowires and development of an easy to produce, oxidation-resistant transparent conducting electrode using a PEDOT:PSS coating. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 10639
- [44] Zhao L, Zhang Y, Huang L B, *et al.* Cascade anchoring strategy for general mass production of high-loading single-atomic metal-nitrogen catalysts. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 1278
- [45] Sun Y, Xue Z, Liu Q, *et al.* Modulating electronic structure of metal-organic frameworks by introducing atomically dispersed Ru for efficient hydrogen evolution. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1369
- [46] Guo P, Cao L, Wang R, *et al.* In situ construction of “anchor-like” structures in FeNCN for long cyclic life in sodium-ion batteries. *Adv Funct Mater*, 2020, **30**(17): 2000208
- [47] Hu B, Xiao X, Chen P, *et al.* Enhancing anti-tumor effect of ultrasensitive bimetallic RuCu nanoparticles as radiosensitizers with dual enzyme-like activities. *Biomaterials*, 2022, **290**: 121811
- [48] Liu C, Cai Y, Wang J, *et al.* Facile preparation of homogeneous copper nanoclusters exhibiting excellent tetraenzyme mimetic activities for colorimetric glutathione sensing and fluorimetric ascorbic acid sensing. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(38): 42521-42530
- [49] Hao C, Qu A, Xu L, *et al.* Chiral molecule-mediated porous Cu_xO nanoparticle clusters with antioxidation activity for ameliorating Parkinson's disease. *J Am Chem Soc*, 2019, **141**(2): 1091-1099
- [50] Tong L, Chuang C C, Wu S, *et al.* Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Lett*, 2015, **367**(1): 18-25
- [51] Ruan H, Zhang S, Wang H, *et al.* Single-atom Pd/CeO₂ nanostructures for mimicking multienzyme activities. *ACS Appl Nano Mater*, 2022, **5**(5): 6564-6574
- [52] Huang Y, Liu Z, Liu C, *et al.* Self-assembly of multi-nanozymes to mimic an intracellular antioxidant defense system. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(23): 6646-6650
- [53] Zhang Y, Khalique A, Du X, *et al.* Biomimetic design of mitochondria-targeted hybrid nanozymes as superoxide scavengers. *Adv Mater*, 2021, **33**(9): e2006570
- [54] Chen S, Lu W, Xu R, *et al.* Pyrolysis-free and universal synthesis of metal-NC single-atom nanozymes with dual catalytic sites for cytoprotection. *Carbon*, 2023, **201**: 439-448
- [55] Liang X, Han L. White peroxidase-mimicking nanozymes: colorimetric pesticide assay without interferences of O₂ and color. *Adv Funct Mater*, 2020, **30**(28): 2001933
- [56] Lu W, Chen S, Zhang H, *et al.* Fe-N-C single atom nanozymes with dual enzyme-mimicking activities for colorimetric detection of hydrogen peroxide and glutathione. *J Materiomics*, 2022, **8**(6): 1251-1259
- [57] Wu C, Han X, Feng W, *et al.* Multi-enzymatic activities of ultrasmall ruthenium oxide for anti-inflammation and neuroprotection. *Chem Eng J*, 2021, **411**: 128543
- [58] Moglianetti M, De Luca E, Pedone D, *et al.* Platinum nanozymes recover cellular ROS homeostasis in an oxidative stress-mediated disease model. *Nanoscale*, 2016, **8**(6): 3739-3752

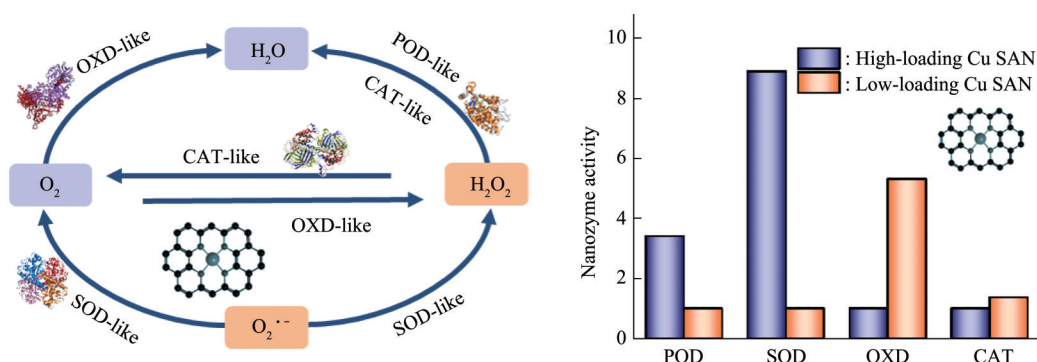
Design and Enzyme-mimicking Activity of High-loading Cu Single-atom Nanozyme*

CHEN Xin-Zhu¹⁾, LIU Xiao-Yu²⁾, ZHANG Shao-Fang^{1)**}, MU Xiao-Yu^{1)**}, ZHANG Xiao-Dong^{1,2)**}

¹⁾Academy of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

²⁾School of Sciences, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Recently, single-atom nanozyme (SAN) has been widely studied due to its high atom utilization and various enzyme-mimicking activities. However, most of the SANs present low metal-atom densities, which restrict their further application and development. The aim of this study is to prepare SAN with high atomic loading and to systematically investigate its enzyme-like activities, in the hope of providing ideas for the preparation of highly loaded SANs and theoretical support for the application of SANs in a wider range of fields. **Methods** In this work, high-loading Cu SAN with metal contents up to 7.66% (w/w) was prepared using *in-situ* anchoring strategy. The metal salt precursors were confined into the carbon carriers consisting of aminated graphene quantum dots, and then urea was introduced to provide a rich N-coordination environment for Cu atoms. The chemical bond between Cu atoms and the carrier was further stabilized by pyrolysis under the protection of Ar gas. The low-loading Cu SAN used for comparison was prepared according to traditional metal organic framework (MOFs) anchoring method. Then, the peroxidase (POD)-like, oxidase (OXD)-like and superoxide

* This work was supported by grants from the National Key Research and Development Program of China (2021YFF1200700), The National Natural Science Foundation of China (91859101, 81971744, U1932107, 82001952, 11804248), Outstanding Youth Funds of Tianjin (2021FJ-0009), National Natural Science Foundation of Tianjin (19JCZDJC34000, 20JCYBJC00940, 21JCYBJC00550, 21JCZDJC00620, 21JCYBJC00490), the Innovation Foundation of Tianjin University, and CAS Interdisciplinary Innovation Team (JCTD-2020-08).

** Corresponding author.

ZHANG Xiao-Dong. Tel: 86-22-83612122, E-mail: xiaodongzhang@tju.edu.cn

MU Xiao-Yu. Tel: 86-22-83612122, E-mail: muxiaoyu@tju.edu.cn

ZHANG Shao-Fang. Tel: 86-22-83612122, E-mail: zhangsf@tju.edu.cn

Received: November 14, 2022 Accepted: January 28, 2023

dismutase (SOD)-like catalytic activities of high/low-loading Cu SAN were tested and compared with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and nitrotetrazolium blue chloride (NBT) as chromogenic substrates. The catalase (CAT)-like catalytic activities of high/low-loading Cu SAN were assessed by monitoring the decomposition rate of hydrogen peroxide (H_2O_2). **Results** The results suggested that the high-loading Cu SAN possesses the improved catalytic activity and selectivity towards POD-like and SOD-like activities, showing 3.4-fold and 8.88-fold higher than low-loading Cu SAN, respectively. **Conclusion** This work provides a strategy to synthesize SAN with high metal-atom density. And the results show that atomic regulation can be achieved by adjusting preparation methods which assist to obtain SAN with different catalytic selectivity, and lay foundation for the development and application of SAN in detection and sensing, diseases treatment and environmental protection.

Key words single-atom nanozyme, Cu, high-loading, peroxidase-like activity, superoxide dismutase-like activity

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0533