DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.181038

酶级联反应放大策略用于灵敏检测酸性磷酸酶

李 苹 董玉明 王光丽*
(江南大学 合成与生物胶体教育部重点实验室 化学与材料工程学院,无锡 214112)

摘 要 构建了一个新型酶级联反应体系用于灵敏检测酸性磷酸酶(ACP)。焦磷酸根离子(PPi)与 Fe^{3+}有很强的结合作用,阻碍了具有模拟过氧化物酶活性的普鲁士蓝纳米粒子(PBNPs)的生成。ACP 可将底物 PPi 水解为 PO_4^{3-},从而释放出 Fe^{3+}。释放的 Fe^{3+}与亚铁氰化钾($K_4[Fe(CN)_6]$)形成 PBNPs,PBNPs 可以催化过氧化氢(H_2O_2)产生羟基自由基(·OH),进而催化氧化特征底物 3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB),使体系产生明显的颜色变化,同时伴随吸光度的变化。基于上述原理,构建了一种灵敏检测 ACP 的方法。结果表明,在 3 ~ 20 U/L的浓度范围内,氧化 TMB(oxTMB)的吸光度与 ACP 浓度呈较好的线性关系,检出限为 0.8 U/L。本研究中,通过天然酶的催化反应产生纳米材料模拟酶构建的酶级联催化反应体系具有高效的信号放大作用,有望在生物传感领域发挥重要作用。

关键词 酶级联反应; 普鲁士蓝纳米粒子; 模拟过氧化物酶; 酸性磷酸酶

1 引 言

生物体活动存在许多精巧的酶促反应。生命活动有条不紊地进行离不开这些酶反应之间的相互协调作用[1]。酶级联反应是指两种酶催化反应高效耦合,存在于生物体内,且具有很高的反应效率[2]。目前所构建的酶级联催化反应体系,主要是通过前一种酶的反应产物作为后一种酶的反应物以实现偶联。例如通过葡萄糖氧化酶(GOx)催化葡萄糖(Glucose)反应产生过氧化氢(H_2O_2),在辣根过氧化物酶(HRP)催化下,氧化其特征底物 2,2′-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)[3]。虽然酶级联催化反应体系具有良好的信号放大作用[4],但是,目前的酶级联反应构建的模式比较单一,且要求一种酶的底物/另一种酶的反应物的严格匹配,限制了其发展和应用。

模拟酶具有与天然酶相同的活性[5~8],同时又能弥补天然酶的不稳定、易失活、价格昂贵等缺点[9,10],因此,模拟酶的研究引起了越来越多的关注[11~13]。纳米材料模拟酶(纳米酶)因其价廉、稳定、性质可调控等优势成为模拟酶研究的热点。Jin 等[14]制备了酵母提取物稳定的具有模拟过氧化物酶性质的铂纳米团簇,实现了葡萄糖的检测。将纳米酶与天然酶进行偶联有望为新型酶级联催化体系的构建提供一条新途径。但是,目前的纳米酶研究多采用物理或化学方法合成的纳米材料。文献[15 ~ 17]通过碱性磷酸酶(ALP),以抗坏血酸氧化酶(AOx)为中介,实现了纳米酶与天然酶的初步偶联,但体系中还原性物质的引入对检测可能会产生一定干扰。因此,如何实现纳米酶与天然酶的完美偶联仍然是一个难点。

酸性磷酸酶(ACP)是一种能够将磷酸酯底物去磷酸化的酶,通过水解磷酸单酯将底物分子上的磷酸基团除去,并生成 PO_4^{3-},广泛存在于体内各组织、细胞和体液中。人体内的 ACP 含量对于某些疾病的辅助诊断具有重要意义,如前列腺癌、恶性骨肿瘤、肝癌、白血病等[18,19]。目前报道的 ACP 检测方法多为荧光检测法[20,21],而低成本、操作简便的比色方法却鲜有报道。

本研究构建了一种基于 ACP 的催化反应产生纳米模拟过氧化物酶的新型酶级联反应体系,并利用此体系的高效信号放大作用实现了 ACP 的高灵敏比色检测。ACP 催化 PPi 水解反应释放出被 PPi 络合的 Fe^{3+},释放出的 Fe^{3+}与亚铁氰化钾($K_4[Fe(CN)_6]$)反应形成普鲁士蓝纳米粒子(PBNPs)。所形成的 PBNPs 具有较高的模拟过氧化物酶的活性,在 H_2O_2 存在下催化氧化特征底物 3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)的显色反应。本研究构建的生物传感体系不仅具有高效的信号放大作用,可实现 ACP 的超灵敏

2018-01-17 收稿; 2018-04-20 接受
本文系国家自然科学基金项目(Nos. 21275065,21676123,21575052)资助
* E-mail: glwang@jiangnan.edu.cn

比色法检测,而且为新型酶级联反应体系的构建提供了借鉴。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Hitachi S-4800 高分辨率扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司,加速电压为 2 kV);FT-IR 6700 光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);TU-1901 分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);荧光分光荧光计(美国 Varian 公司);SpectraMax M5 酶标仪(美国)。

3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)、2,2′-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、葡萄糖氧化酶(GOx)和酸性磷酸酶(ACP)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;焦磷酸钠(PPi)、磷酸钠(Pi)、$Fe(NO_3)_3$、$K_4[Fe(CN)_6]$、胰蛋白酶(Try)、对苯二甲酸(TA)、凝血酶(Thr)、亲和素(AV)、溶菌酶(LZM)和牛血清白蛋白(BSA)均购自国药集团化学试剂有限公司;ACP 检测试剂盒(PNP 比色法)购于上海源叶生物科技有限公司;0.2 mol/L 醋酸缓冲溶液由醋酸钠(NaAc)和醋酸(HAc)混合制备。血清样本来源于江南大学校医院。

2.2 实验方法

2.2.1 生物酶级联反应检测 ACP 的活性 在 96 微孔板中加入 25 μL 0.1 mmol/L PPi,25 μL ACP 和 100 μL 40 mmol/L 醋酸缓冲溶液(pH=4),37℃下孵育 30 min。加入 25 μL 5.0 μmol/L Fe^{3+}、25 μL 0.1 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$、25 μL 5.0 mmol/L TMB 和 25 μL 10 mmol/L H_2O_2,混合均匀后,40℃下反应 20 min,测定 652 nm 处的吸光度。

2.2.2 人血清样本检测 实验步骤与 2.2.1 过程类似。标准检测方法采用 ACP 检测试剂盒(PNP 比色法):在 96 孔板中分别设置空白对照组(缓冲液+显色工作液)、标准品组(缓冲液+显色工作液+标准品)、血清样品组(缓冲液+显色工作液+血清样品),轻摇混匀,孵育 30 min 后,分别加入 160 μL 0.4 mol/L NaOH 水溶液为反应终止液终止反应。检测 405 nm 处吸光值,并与标准组对比,测得样品中的 ACP 含量。

3 结果与讨论

3.1 新型酶级联反应体系检测 ACP 的原理

本研究构建了一种通过 ACP 催化反应产生纳米过氧化物酶 PBNPs 的新型酶级联反应体系,并据此实现了 ACP 的测定。在 PPi 存在下,Fe^{3+}与 PPi 结合,但不能与 $K_4[Fe(CN)_6]$结合。如图 1 所示,在酸性条件下,ACP 将 PPi 水解为 Pi,释放出游离的 Fe^{3+}[22],与 $K_4[Fe(CN)_6]$生成 PBNPs。这种通过 ACP 触发反应产生的 PBNPs 具有较高的模拟过氧化物酶的活性,能催化 H_2O_2 与 TMB 反应,使无色的 TMB 转化为有色产物 oxTMB。

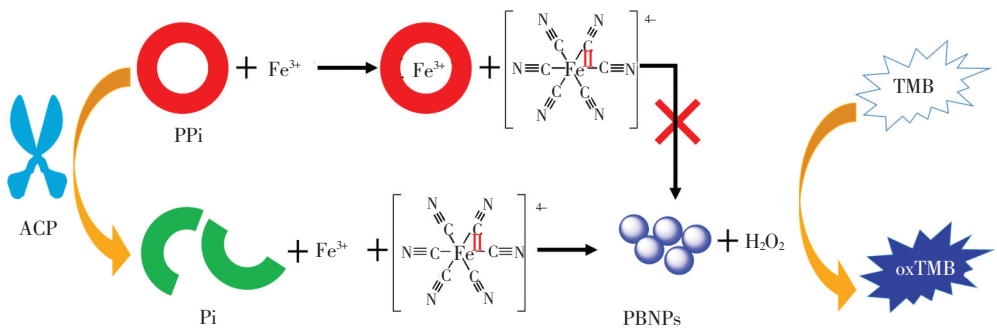

图 1 新型酶级联反应体系检测酸性磷酸酶(ACP)的原理示意图

Fig. 1 Schematic illustration of acid phosphatase (ACP) detection based on a enzyme cascade reaction. PBNPs, Prussian blue nanoparticles; TMB: 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine; PPi, pyrophosphate ion; Pi, phosphate ion

实现上述酶级联反应体系的关键是具有模拟酶活性的 PBNPs 的成功合成。据报道 PBNPs 晶体中有两种价态的铁，这种结构更有利于其分子内电子转移，从而产生模拟过氧化物酶活性[23]。然而，目前报道的 PBNPs 的合成方法大多比较繁琐（常需要较高的反应温度与较长的反应时间），如 Zheng 等[24]用 $K_3[Fe(CN)_6]$ 和葡萄糖为原料合成 PBNPs，需要在 120℃下加热 12 h。本研究首先探索了不同反应条件对 Fe^{3+} 与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 的反应产物的影响，如图 1A 所示，Fe^{3+} 与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 直接反应的产物在 720 nm 附近有一个明显的吸收峰，是 PBNPs 的特征吸收，主要是由于金属化合物 PBNPs 中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的电子转移所导致[25]。此外，PPi 对产物的生成有明显的抑制作用，但是 PPi 被 ACP 水解后的产物与单独 Pi 类似，对 PBNPs 的生成没有明显的影响。对 ACP 催化反应所生成的 PBNPs 进行了表征。由图 2B 的扫描电镜图可见，PBNP 粒径均匀，平均粒径约为 30 nm。PBNPs 的 EDS 谱表明其中存在 C、N、K 和 Fe 元素（图 2C），K 元素存在的可能原因是 $K_4[Fe(CN)_6]$ 中的 K^+ 可以掺入 PBNPs 的晶格所致[26]。FT-IR 图谱（图 2D）中，2050 cm^{-1} 的吸收峰为 PBNPs 中 Fe^{2+}-CN-Fe^{3+} 键的伸缩振动，500 cm^{-1} 的吸收峰是金属化合物 M-CN-M′ 的特征吸收[23]。另外，在 3415 和 1610 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 H—O—H 的 O—H 伸缩振动和弯曲振动[27]，表明样品中存在间隙水。上述实验结果证明，通过 ACP 催化反应成功形成了 PBNPs。

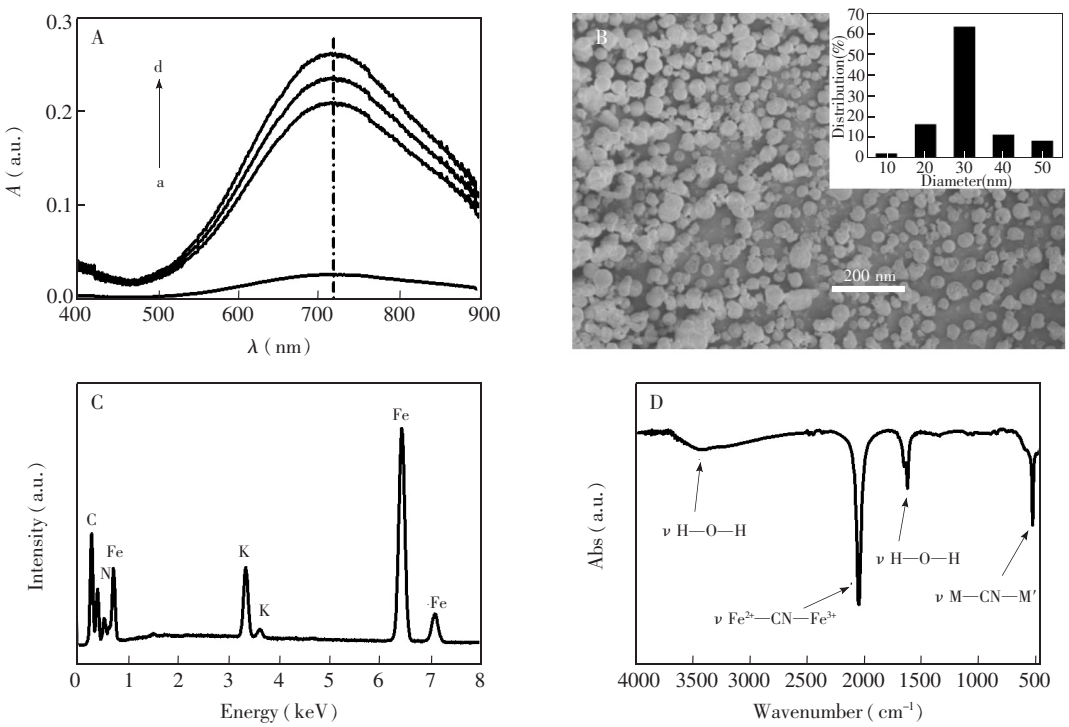

图 2　（A）不同溶液的吸收光谱：（a）PPi+Fe^{3+} + $K_4[Fe(CN)_6]$，（b）ACP+PPi+Fe^{3+} + $K_4[Fe(CN)_6]$，（c）Pi+Fe^{3+} + $K_4[Fe(CN)_6]$，（d）Fe^{3+} + $K_4[Fe(CN)_6]$；PBNPs 的（B）扫描电镜图、（C）EDS 谱与（D）FT-IR 光谱

Fig. 2　（A）Absorption spectra of different solutions：（a）PPi+Fe^{3+} + $K_4[Fe(CN)_6]$，（b）ACP+PPi+Fe^{3+} + $K_4[Fe(CN)_6]$，（c）Pi + Fe^{3+} + $K_4[Fe(CN)_6]$，（d）Fe^{3+} + $K_4[Fe(CN)_6]$；（B）Scanning electron microscopic（SEM）image，（C）energy dispersive spectrum（EDS）and（D）Fourier transform infrared（FT-IR）spectra of PBNPs. Reaction conditions：[Fe^{3+}] = 100 μmol/L，[$K_4[Fe(CN)_6]$] = 100 μmol/L，[PPi] = 50 μmol/L，[Pi] = 50 μmol/L，[ACP] = 100 U/L，40℃，20 min，pH = 4

进一步研究了体系中的 PBNPs 的模拟酶活性，选择 TMB 作为显色底物[28]。对比实验表明，仅使用 $K_4[Fe(CN)_6]$、Fe^{3+}、H_2O_2 或 $K_4[Fe(CN)_6]$+H_2O_2、Fe^{3+} + H_2O_2、$K_4[Fe(CN)_6]$+Fe^{3+}，溶液均没有显著的颜色变化，表明对 TMB 没有明显的氧化效果（图 3A）。同时发现体系中 $K_4[Fe(CN)_6]$ 与 Fe^{3+} 反应产生

的 PBNPs 能在 H_2O_2 的存在下催化 TMB 氧化,使溶液变成蓝色(图 3A 插图),并且在 370 和 652 nm 出现了特征吸收峰(图 3A 曲线 g),这表明 TMB 被 PBNPs 催化的氧化反应与天然 HRP 以 H_2O_2 作为电子受体的催化氧化反应获得了相同的氧化产物[29,30]。上述结果证明,$K_4[Fe(CN)_6]$ 和 Fe^{3+} 产生 PBNPs,PBNPs 具有模拟过氧化物酶的活性,在 H_2O_2 存在下催化氧化 TMB。如图 3B 所示,PPi 的引入使得 TMB 的氧化程度受到抑制,同时,相同浓度的 Pi 加入,对 TMB 的氧化程度没有明显影响。这为构建针对 ACP 的检测提供了可行性。

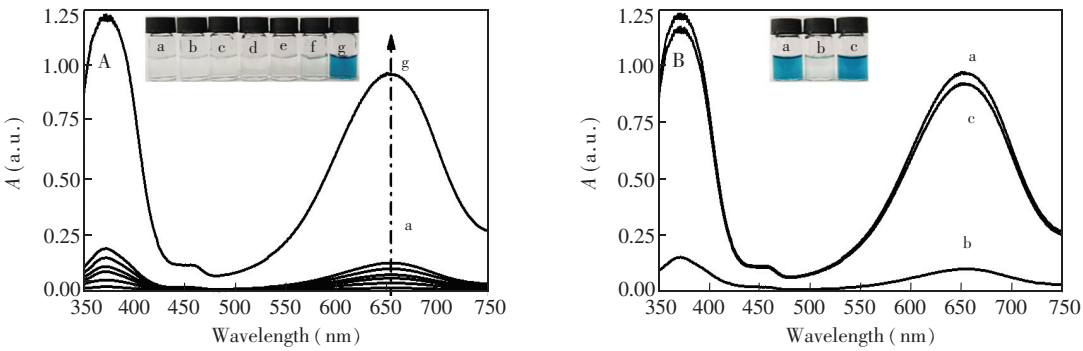

图 3 (A)TMB 在不同溶液中的紫外-可见吸收光谱:(a) Fe^{3+},(b) H_2O_2,(c) $K_4[Fe(CN)_6]$,(d) $Fe^{3+}+H_2O_2$,(e) $K_4[Fe(CN)_6]+Fe^{3+}$,(f) $K_4[Fe(CN)_6]+H_2O_2$,(g) $K_4[Fe(CN)_6]+Fe^{3+}+H_2O_2$;(B)不同反应溶液的吸收光谱,(a) $Fe^{3+}+K_4[Fe(CN)_6]+TMB+H_2O_2$,(b) $Fe^{3+}+PPi+K_4[Fe(CN)_6]+TMB+H_2O_2$,(c) $Fe^{3+}+Pi+K_4[Fe(CN)_6]+TMB+H_2O_2$;插图是对应溶液的照片

Fig. 3 (A) UV-vis absorption spectra of TMB in different solutions: (a) Fe^{3+}, (b) H_2O_2, (c) $K_4[Fe(CN)_6]$, (d) $Fe^{3+}+H_2O_2$, (e) $K_4[Fe(CN)_6]+Fe^{3+}$, (f) $K_4[Fe(CN)_6]+H_2O_2$, (g) $K_4[Fe(CN)_6]+Fe^{3+}+H_2O_2$; (B) Absorption spectra of different reaction solutions: (a) $Fe^{3+}+K_4[Fe(CN)_6]+TMB+H_2O_2$, (b) $Fe^{3+}+PPi+K_4[Fe(CN)_6]+TMB+H_2O_2$, (c) $Fe^{3+}+Pi+K_4[Fe(CN)_6]+TMB+H_2O_2$; Inset are photos of corresponding solutions. Reaction conditions: [TMB] = 0.5 mmol/L, [Fe^{3+}] = 0.5 μmol/L, [$K_4[Fe(CN)_6]$] = 10 μmol/L, [H_2O_2] = 1 mmol/L, 40℃, 20 min, pH = 4

与天然酶的催化反应类似,PBNPs 作为模拟酶的催化反应也受温度、pH 值和反应时间的影响。如图 4 所示,以相对催化活性(当前条件的催化强度或溶液吸光度与最优条件下的催化强度或溶液吸光度的比值)作为参考标准,PBNPs 催化体系的最适 pH 值和温度分别为 4.0 和 40℃,反应时间为 20 min。

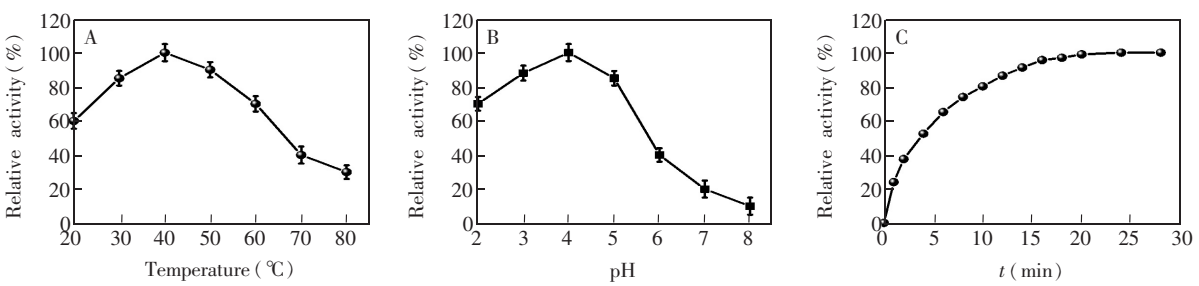

图 4 PBNPs 在不同(A)反应温度、(B) pH 值和(C)反应时间的相对催化活性

Fig. 4 Relative catalytic activity of PBNPs at different (A) reaction temperature, (B) pH value and (C) reaction time

为了进一步了解 PBNPs 催化反应的机理,本研究引入了一系列自由基消除剂证明体系中可能存在的活性物种。众所周知,KI 和乙二胺四乙酸(EDTA)是空穴(h^+)的消除剂[31],超氧化物歧化酶(SOD)是超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)的消除剂[32],而叔丁醇(*t*-Butanol)和 $NaHCO_3$ 是 ·OH 的消除剂[33]。图 5A 表明,KI、EDTA 和 SOD 的加入不引起 PBNPs 的催化反应的变化。而引入 *t*-Butanol 或 $NaHCO_3$ 时,PBNPs 的

催化活性明显受到抑制，证明活性物质可能是 · OH。为了进一步确定反应过程中产生的活性物质，进行了荧光检测实验。对苯二甲酸(TA)能够有效捕获 · OH，生成具有强烈荧光的 2-羟基对苯二甲酸[34]。如图 5B 所示，对比实验表明，TA 或 TA+H_2O_2 没有明显的荧光现象。然而，当 PBNPs 和 H_2O_2 共同加入到 TA 中时，可以观察到体系明显的荧光发射峰，表明 PBNPs 与 H_2O_2 反应产生 · OH。上述结果表明，PBNPs 具有模拟过氧化物酶活性，催化 H_2O_2 形成 · OH，从而氧化 TMB，使得溶液从无色变为蓝色。

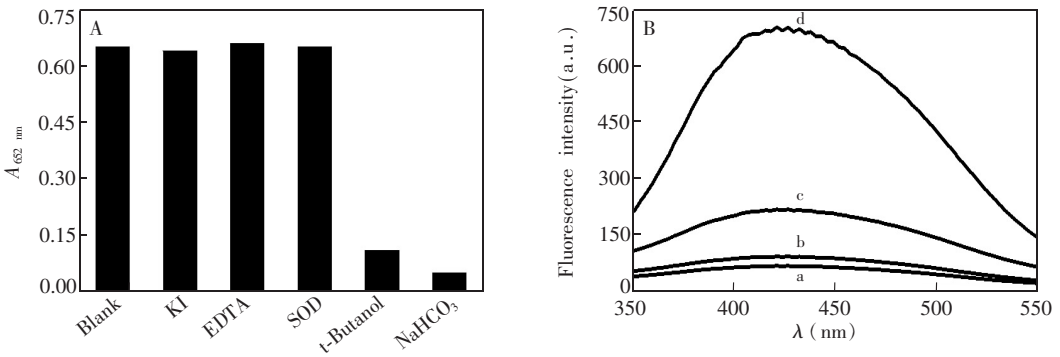

图 5　(A)不同自由基消除剂对 PBNPs 催化氧化 TMB 的影响；(B)对苯二甲酸(TA)在不同条件下的荧光光谱：(a) TA，(b) TA+PBNPs，(c) TA+H_2O_2，(d) TA+PBNPs+H_2O_2

Fig. 5　(A) Effect of different free radical scavengers on oxidation of TMB by PBNPs; (B) Fluorescence spectra of terephthalic acid under different conditions: (a) TA, (b) TA+PBNPs, (c) TA+H_2O_2, and (d) TA+PBNPs+H_2O_2.

Reaction conditions: [PBNPs] = 20 μg/mL, [KI] = 10 mmol/L, [EDTA] = 1 mmol/L, [SOD] = 20 μg/mL, [t-Butanol] = 10 mmol/L, [$NaHCO_3$] = 10 mmol/L, [H_2O_2] = 1 mmol/L, [TA] = 1 mmol/L, 40℃, 20 min, pH = 4

3.2　ACP 的检测

PPi 与 Fe^{3+} 间有较强的络合作用，阻止了 Fe^{3+} 与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 反应生成 PBNPs。在酸性条件下，ACP 水解 PPi 生成 Pi，从而释放出 Fe^{3+}，与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 反应生成 PBNPs。如图 6A 所示，随着 ACP 用量增加，溶液的吸光度明显增大。图 6B 表明，当 ACP 的浓度在 3 ~ 20 U/L 范围内，溶液吸光度的变化值($\triangle A = A - A_0$，A 和 A_0 分别为有无 ACP 加入时的反应体系的吸光度)与 ACP 的浓度呈线性关系，线性范围为 3.0 ~ 20 U/L，线性方程为 $y = 0.031x - 0.018$，$R^2 = 0.996$ 检出限为 0.8 U/L。如图 6C 所示，潜在的干扰物质 GOx、Try、Thr、AV、LZM 和 BSA 的响应信号很小，表明本方法对 ACP 具有良好的选择性。与已经报道的文献方法对比，本方法检出限较低(表 1)。另外，与文献报道的 ACP 检测不同，本研究采用可视化检测 ACP 的方法，相对于复杂且需贵重检测仪器的方法，本方法具有操作简单、可视化、检出限低、选择性好等优点。

表 1　不同方法检测 ACP 的比较

Table 1　Comparison of different methods for detection of ACP

检测方法 Detection method	材料 Material	检出限 Detection limit (U/L)	线性范围 Linear range (U/L)	参考文献 Reference
电化学法 Electrochemistry	MFP	Not given	8 ~ 40	[35]
荧光法 Fluorescence	CQDs	5.5	18.2 ~ 1300	[36]
荧光法 Fluorescence	SQ	4.9	0 ~ 533	[37]
荧光法 Fluorescence	AuNCs	Not given	1 ~ 50	[22]
比色法 Colorimetry	$Cu(BCDS)_2^{2-}$	3.16	0 ~ 220	[38]
比色法 Colorimetry	PBNPs	0.8	3 ~ 20	本方法 This method

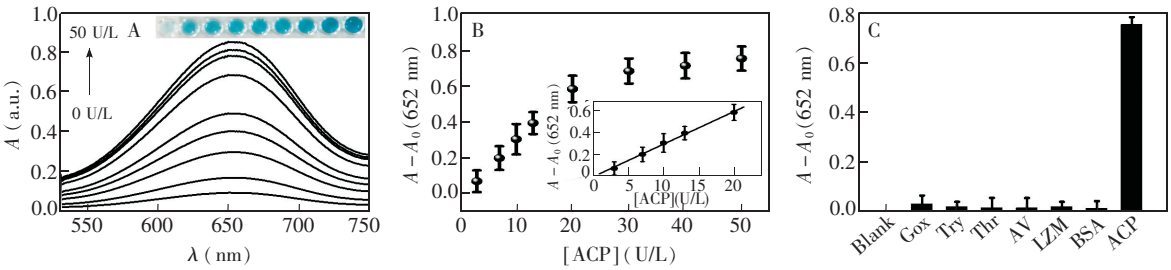

图 6 (A)不同浓度的 ACP(由下到上浓度依次是 0,3,7,10,13,20,30,40,50 U/L)存在下反应溶液的吸收光谱;(B)溶液吸收值的变化与 ACP 浓度之间的关系,插图为线线性关系图;(C)不同物质(ACP 的浓度为 50 U/L(≈0.28 μmol/L)干扰物质浓度为 2 μmol/L)对检测体系的吸光度变化值的影响

Fig. 6 (A) Absorption spectra of reaction solutions in the presence of different concentrations of ACP (0, 3, 7, 10, 13, 20, 30, 40, 50 U/L); (B) relationship between the change in absorption intensity of reaction solution and concentration of ACP; (C) effect of different substances on the change of absorbance of reaction system (ACP concentration is 50 U/L (≈0.28 μmol/L) and interfering substance concentration is 2 μmol/L)

3.3 血清中 ACP 的检测

为了验证检测方法的可行性,对实际血清样本进行了检测,结果如表 2 所示。对比标准检测方法与本方法的检测结果,发现两种方法得到的结果接近,相对误差小于 5%。表明本研究建立的 ACP 比色检测法具有潜在的应用价值。

表 2 人血清样品中 ACP 的测定

Table 2 Determination of ACP in human serum samples.

序号 No.	浓度 Concentration (mean±SD) (RSD, %), n=3, U/L]		相对误差 Relative error (%)
	本方法 Found by the proposed method	ACP 检测试剂盒 Found by ACP Assay Kit	
1	2.15±0.21	2.19±0.15	−1.8
2	3.73±0.33	3.66±0.31	1.9
3	5.96±0.51	5.99±0.44	−0.5
4	1.12±0.11	1.11±0.11	0.9
5	6.75±0.71	6.96±0.54	−3.0

3.4 抑制剂钒酸钠(Na_3VO_4)的筛选

酶抑制剂的筛选在生物实验中具有重要意义。Na_3VO_4 是一种典型的磷酸酶抑制剂,对环境和人体有毒害作用。本研究采用 Na_3VO_4 抑制 ACP 水解 PPi,从而实现 Na_3VO_4 的检测。图 7 显示通过添加不同浓度的 Na_3VO_4 抑制 ACP 活性的效果,计算得到的 IC_{50} 值为 1.48 μmol/L。结果表明,本研究所提出的检测 ACP 的生物传感器可用于 ACP 抑制剂的筛选。

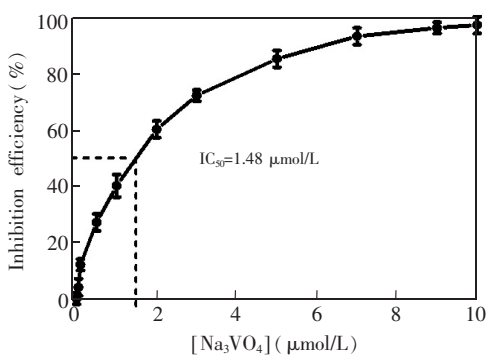

图 7 Na_3VO_4 浓度与抑制效率的关系图

Fig. 7 Plot of inhibition efficiency versus concentration of Na_3VO_4

4 结 论

通过天然酶 ACP 的催化反应原位产生纳米酶 PBNPs,PBNPs 进一步催化 H_2O_2 氧化 TMB,导致溶液颜色和特征吸收峰强度的变化,构建了新型酶级联反应体系以有效放大信号,实现了 ACP 的高灵敏检测。本方法操作简便,有望应用于生物医学等领域,具有良好的实用价值。

References

1 Ngo T A, Nakata E, Saimura M, Worii T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138(9): 3012-3021
2 Schoffelen S, Hest J C M V. *Soft Matter.*, **2012**, 8(6): 1736-1746
3 Lu S S, Hu T, Wang S, Sun J, Yang X R. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9(1): 167-175
4 Gallardo M G, Labay C, Trikalitis V D, Kempen P J, Larsen J B, Andresen T L, Rigau L H. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9(19): 15907-15921
5 Wang C, Chen W T, Chang H T. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(22): 9706-9712
6 NIE Dong-Xia, SHI Guo-Yue, YU Yan-Yan. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(2): 179-185
聂冬霞, 施国跃, 于妍妍. 分析化学, **2016**, 44(2): 179-185
7 Hu Y H, Cheng H J, Zhao X Z, Wu JJ X, Muhammad F, Lin S C, He J, Zhou L Q, Zhang C P, Deng Y, Wang P, Zhou Z Y, Nie S M, Wei H. *ACS Nano*, **2017**, 11(6): 5558-5566
8 Cheng H J, Liu Y F, Hu Y H, Ding Y B, Lin S C, Cao W, Wang Q, Wu J J X, Muhammad F, Zhao X Z, Zhao D, Li Z, Xing H, Wei H. *Anal. Chem.*, **2017**, **89**(**21**): 11552-11559
9 Cheng H J, Zhang L, He J, Guo W J, Zhou Z Y, Zhang X J, Nie S M, Wei H. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(10): 5489-5497
10 Wei H, Wang E. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(6): 2250-2254
11 Cheng H, Lin S, Muhammad F, Lin Y W, Wei H. *ACS Sensors*, **2016**, 1(4): 1336-1343
12 Wei H, Wang E K. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 44(38): 6060-6093
13 Wang X Y, Hu Y H, Wei H. *Inorg. Chem. Front.*, **2016**, 6(1): 41-60
14 Jin L H, Meng Z, Zhang Y Q, Cai S J, Zhang Z H, Shen Y H. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9(11): 10027-10033
15 Gao Z Q, Hou L, Xu M D, Tang D P. *Sci. Rep.*, **2014**, 4(2): 3966
16 Lai W Q, Wei Q H, Xu M D, Zhuang J Y, Tang D P. *Biosens. Bioelectron*, **2015**, 89(1): 645-652
17 Jin L Y, Dong Y M, Wu X M, Cao G X, Wang G L. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(20): 10429-10436
18 Xie Y, Tan Y, Liu R, Zhao R, Tan C, Jiang Y Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, 4(8): 3784-3787
19 Marzal P C, Rosatto S S, Granjeiro P A, Aoyama H, Kubota L T. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 441(2): 207-214
20 Guo P, Yan S Y, Zhou Y M, Wang C C, Zhou X. *Analyst*, **2013**, 138(12): 3365-3367
21 Huang Y Y, Feng H, Liu W D, Zhou Y G, Tang C, Qian Z S. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(23): 11575-11583
22 Sun J, Yang F, Yang X R. *Nanoscale*, **2015**, 7(39): 16372-16380
23 Ni P J, Sun Y J, Dai H C, Lu W D, Jiang S, Wang Y L, Li Z, Li Z. *Sens. Actuators B*, **2017**, 240: 1314-1320
24 Zheng X J, Kuang Q, Xu T, Jiang Z Y, Zhang S H, Xie Z X, Huang R B, Zheng L S. *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111(12): 4499-4502
25 Pyrasch M, Tieke B. *Langmuir*, **2001**, 17(24): 7706-7709
26 Wang Q F, Zhang L, Qiu L Y, Sun J Q, Shen J C. *Langmuir*, **2007**, 23(11): 6084-6090
27 Zhang X Q, Gong S W Y, Zhang Y, Yang T, Wang C Y, Gu N. *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20(24): 5110-5116
28 Porstmann T, Kiessig S T. *J. Immunol. Methods*, **1992**, 150(2): 5-21
29 Bos E S, Doelen A A, Schuurs A H W M. *J. Immunoassay*, **1981**, 2(3-4): 187-204
30 Thiramanas R, Jangpatarapongsa K, Tangboriboonrat P, Polpanich D. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(12): 5996-6002
31 Cao J, Xu B Y, Luo B D, Lin H L, Chen S F. *Appl. Surf. Sci.*, **2011**, 257(16): 7083-7089
32 Wang W, Jiang X P, Chen K Z. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(58): 7289-7291
33 An C H, Wang J Z, Qin C, Jiang W, Wang S T, Li Y, Zhang Q H. *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22(26): 13153-13158
34 Huang H W, Liu L F, Zhang L Y, Zhao Q, Zhou Y, Yuan SS, Tang Z L, Liu X Y. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(1): 666-672
35 Ogonczyk D, Glab S, Koncki R. *Anal. Biochem.*, **2008**, 381(1): 169-171
36 Qian Z S, Chai L J, Zhou Q, Huang Y Y, Tang C, Chen J R, Feng H. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(14): 7332-7339
37 Xu Y Q, Li B H, Xiao L L, Ouyang J, Sun S G, Pang Y. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(63): 8677-8680
38 Hu Q, Zhou B J, Li F, Kong J M, Zhang X J. *Chem. Asian J.*, **2016**, 11(21): 3040-3045

An Enzyme Cascade Strategy for Sensitive Detection of Acid Phosphatase

LI Ping, DONG Yu-Ming, WANG Guang-Li*

(*Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids*, *Ministry of Education*, *School of Chemical and Material Engineering*, *Jiangnan University*, *Wuxi* 214122, *China*)

Abstract An enzyme cascade strategy was introduced for sensitive detection of acid phosphatase (ACP). Pyrophosphate ions (PPi) can strongly bound Fe^{3+} and thus hinders the production of Prussian blue nanoparticles (PBNPs). ACP can hydrolyze PPi to form phosphate ions, and the released Fe^{3+} reacts with potassium ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$) to form PBNPs. The formed PBNPs have high peroxidase-like activity, which can decompose hydrogen peroxide (H_2O_2) to produce hydroxyl radical (·OH) for oxidizing the typical substrate of 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (TMB). Therefore, a novel sensing strategy for detecting ACP based on the high signal amplification of enzyme cascade was constructed. The results showed that there was a good linear relationship between the absorbance of oxidized TMB (oxTMB) and the concentration of ACP in the range of 3 – 20 U/L, with a detection limit of 0.8 U/L. Different from the conventional enzyme cascades in which the product of one enzyme is the substrate of the other, this study opens up a new way to construct novel enzyme cascade system.

Keywords Enzyme cascade; Prussian blue nanoparticles; Peroxidase mimics; Acid phosphatase

(Received 17 January 2018; accepted 20 April 2018)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21275065, 21676123, 21575052).

中国化学会第十三届全国分析化学年会在西安召开

2018 年 6 月 15 ~ 17 日,由中国化学会和国家自然科学基金委主办、西北大学和南京大学承办的第十三届全国分析化学年会在西安市曲江国际会议中心成功举行,年会的主题是“分析化学进展与未来”。中国化学会分析化学年会每三年举办一届,至今已有数十年的历史。在广大科技工作者的支持和参与下,分析化学年会已经发展成为行业内最高端、最前沿、最具影响力的系列学术会议,是全国分析化学工作者、相关领域专家和学者交流、学习、研论学术思想、分享学术成就的重要平台。

本次大会由南京大学陈洪渊院士、中国科学院长春应用化学研究所杨秀荣院士担任主席,到会代表 2500 余人,是历次分析化学年会参会人数最多的会议。来自全国各地的专家学者做了 426 场学术报告,其中大会报告 37 个,中国科学院长春应用化学研究所汪尔康院士、湖南大学俞汝勤院士和南京大学陈洪渊院士介绍了分析化学发展新形势。

本次会议共收到论文投稿 1671 篇,其中电化学方面的投稿论文数量最多,共 330 篇,占总投稿论文的 20%,其次是纳米分析、光谱与波谱分析;电化学、纳米分析、光谱与波谱分析、色谱与分离技术、显微成像与生物分析 5 个分会场的口头报告数量都超过 30 个。在“高新分析技术论坛”上,湖南大学谭蔚泓院士等 15 位学者介绍了分析化学的新技术;国家自然科学基金委化学部化学测量学王春霞项目主任在“基金论坛”上介绍了化学测量学申请与资助情况。

在开幕式上,颁发了中国化学会分析化学基础研究梁树权奖和中国青年分析化学家奖。中国科学院化学研究所毛兰群研究员、华东理工大学龙亿涛教授和华中师范大学钟鸿英教授荣获第九届中国化学会分析化学基础研究梁树权奖,中国地质大学夏帆教授和北京大学郭少军研究员荣获第二届中国青年分析化学家奖。。

会议期间,还成功召开了《分析化学》期刊第 15 届编委会会议,近 40 位编委参加了会议。