

综述 (125 ~ 139)

基于金属有机框架材料的酶固定化策略及 药物筛选研究进展

常香蕾^{1,2}, 张 璞¹, Stanislas Nsanzamahoro^{1,2}, 王铖博¹, 王伟峰¹, 杨军丽¹

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室, 甘肃省天然药物重点实验室, 甘肃兰州 730000; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 酶抑制剂筛选是药物开发的重要途径之一。酶的三维结构易受到温度、盐浓度等外界因素的干扰, 导致其催化活性和稳定性降低, 增加了药物筛选成本。因此, 通过酶与载体之间的相互作用对其进行固定化, 提高酶结构稳定性, 已成为保持酶活力的重要策略。基于固定化酶从复杂样品中筛选酶抑制剂也成为了药物研发的热点领域。近年来, 金属有机框架材料(metal-organic frameworks, MOFs)因其具有孔径可调、比表面积大、结构简单、环境稳定等特点, 被认为是酶固定化的理想载体, 为实现酶抑制剂高效筛选提供了新的解决方案。总结了以 MOFs 为载体的酶固定化方法及其在抑制剂筛选和应用的相关研究进展, 对 MOFs 酶固定化和药物筛选的机遇和挑战进行了展望。

关键词: 金属有机框架材料; 酶固定化; 酶抑制剂; 药物筛选

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1006-3757(2023)02-0125-15

DOI: [10.16495/j.1006-3757.2023.02.001](https://doi.org/10.16495/j.1006-3757.2023.02.001)

Progress of Enzyme Immobilization Strategies and Drug Screening Based on Metal-Organic Framework Materials

CHANG Xianglei^{1,2}, ZHANG Ying¹, Stanislas Nsanzamahoro^{1,2}, WANG Chengbo¹,
WANG Weifeng¹, YANG Junli¹

(1. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources, Key Laboratory for Natural Medicines of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Screening of enzyme inhibitors is one of the important approaches for drug development. The three-dimensional structure of enzymes is susceptible to the interference of external factors such as temperature and salt concentration, leading to a decrease in its catalytic activity and stability and increasing the cost of drug screening. Therefore, immobilization through enzyme-carrier interactions to improve the stability of enzyme structure has become an important strategy to maintain the enzyme activity. Screening enzyme inhibitors from complex samples based on immobilized enzymes has also become a hot field of drug research and development. In recent years, metal-organic

收稿日期: 2023-03-09; 修订日期: 2023-05-08.

基金项目: 国家自然科学基金国际(地区)合作研究项目(32161143019), 中国科学院西部之光 [National Natural Science Foundation of China (32161143019), CAS "Light of West China" Program]

作者简介: 常香蕾(1999-), 女, 硕士生, 研究方向: 分离分析科学, E-mail: changxianglei@licp.cas.cn

通信作者: 王伟峰, 男, 副研究员, 研究方向: 药物分离分析新技术和方法, E-mail: wangwf@licp.cas.cn; 杨军丽, 男, 研究员, 《分析测试技术与仪器》编委, Tel: 13893659437, E-mail: yangjl@licp.cas.cn.

frameworks (MOFs) are known as the ideal carrier for enzyme immobilization due to their characteristics of adjustable aperture, large surface area, simple structure, stable environment, and so on, and it provides a novel method to achieve the efficient screening of enzyme inhibitors. The method of enzyme immobilization using MOFs as the carrier, the research progress of inhibitor screening and application were summarized. The opportunities and challenges of MOFs enzyme immobilization and drug screening were prospected.

Key words: MOFs; enzyme immobilization; enzyme inhibitors; drug screening

酶是一种参与人体内新陈代谢反应,维持人体与外部环境正常动态平衡的生物催化剂.由于基因或环境变化引起的人体酶活性失调可能诱发多种疾病,而酶抑制剂或激动剂可以调节其活性并恢复人体正常的代谢过程.基于高水平的疾病相关性和药物研发可行性,酶已经成为新药开发中十分重要的生物靶点之一,在制药领域显现出巨大的应用潜力^[1].目前,通过筛选试验鉴定的靶向酶抑制剂药物在临床使用方面占据主导地位,其已成为新药研发的重要有效途径之一^[2-4].然而,酶独特的三维结构容易受到温度、化学环境等外界因素的影响而被破坏^[5],导致酶活力和选择性下降.此外,酶的纯化和回收困难,重复使用的能力不足,这增加了药物筛选的成本^[6].为了解决上述问题,研究人员基于酶与载体之间的相互作用发展了酶固定化策略,用以提高酶结构稳定性、可重复使用性,保持酶催化活性,从而大大拓宽了酶的应用范围.

金属有机框架材料(metal-organic frameworks, MOFs)是一种新兴载体材料,具有孔径可调、结构多样化、比表面积大以及热稳定性好等优点,在酶固定化方面备受关注^[7-10].迄今为止,基于 MOFs 的酶固定化研究已经取得了显著进展.本文系统地阐述了以 MOFs 为载体实现酶固定化的基本方法,同时根据酶-MOFs 复合材料结合现代分析检测技术所构建的反应平台,介绍了 MOFs 在酶抑制剂筛选及药物研发等领域的应用进展.

1 MOFs 酶固定化

MOFs 是指过渡金属离子与有机配体通过自组装形成的具有周期性网络结构的晶体多孔材料. MOFs 作为酶固定化的载体,可以为酶提供适宜固定的键合位点以及三维隔间^[5,11],具有许多显著的优点.第一,可以通过调整 MOFs 的孔径大小和结构来匹配酶,为不同分子量大小的酶的固定化提供可能性.第二,较高的比表面积使 MOFs 具有更高

的酶负载量^[12].第三,高度有序的骨架对酶具有保护作用,使其在高温、有机溶剂、强酸强碱等恶劣条件下更加稳定,增强了酶在实际应用中的可操作性^[13].因此,MOFs 有效改善了酶的稳定性、催化活性和可重复使用性,有望成为酶固定化的理想载体^[14].

根据酶与 MOFs 相互作用方式的不同,一般将固定方法分为化学方法(共价^[15]、交联^[16])和物理方法(吸附^[17]、包埋^[18]).在实际操作中,酶固定化技术通常包含许多关键步骤,一般将预固定策略与化学修饰^[19-20]、介质调控^[21-22]等方法相结合,以显著提高酶固定化的效率.目前,已有大量研究以 MOFs 为载体通过不同的策略对酶进行固定化,如表 1 所列.

1.1 化学方法

酶固定化常用的化学方法有共价法和交联法.共价法是通过酶与载体之间的共价键实现固定化,而交联法则是利用双功能试剂使酶与载体之间以及酶分子之间发生交联反应,将酶固定在载体材料上^[31-33].为了提高固定化酶的长期稳定性,尽量避免酶的浸出,可以同时通过多个共价键将酶固定到 MOFs 上^[34].MOFs 表面的官能团,例如羧基、羟基、乙氧基、咪唑基、酰胺基、环氧基等,都可以为酶提供键合位点^[35].

在 *N,N*-二环己基碳二亚胺(DCC)或 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)作用下激活酰胺化是实现共价固定的有效方法之一. Shih 等^[23]利用 DCC 激活 MIL-88B-NH₂(Cr)的游离羧基,通过亲核反应共价结合胰蛋白酶暴露的氨基,在形成肽键的过程中将胰蛋白酶成功固定在 MOFs 的表面(如图 1 所示). Tudisco 等^[19]将共价法与合成后修饰法(PSM)相结合,通过 MOFs 与戊二酸酐反应引入游离羧酸,利用 *N*-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)活化侧链羧基,基于反应生成的酰胺键共价偶联葡萄糖氧化酶(GOx),将其成功固定到同一系列不同 MOFs[(NH₂-MIL53(Al)和 NH₂-MIL101(Cr))]的表面上,拓宽了 MOFs 的可选择范围.为进一步提高固定化酶活性,

表1 基于不同方法制备酶-MOFs复合材料的性能总结

Table 1 Summary of performances of enzyme-MOFs composites prepared based on different methods

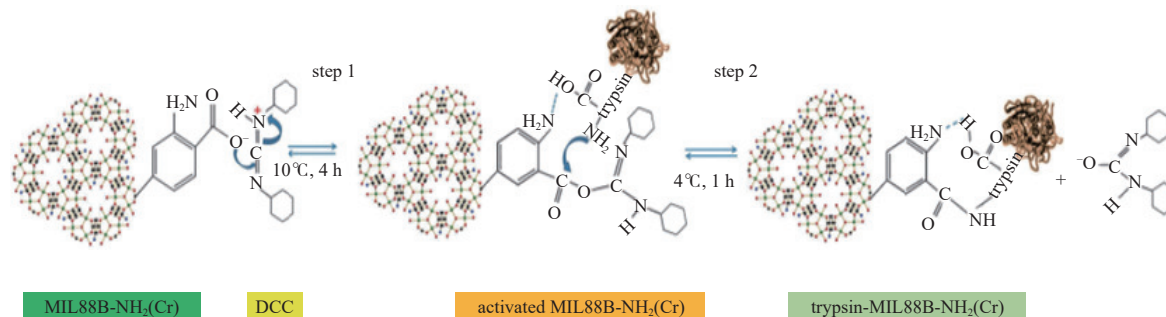
MOFs	酶	固定方法	对酶活力的影响	性能	参考文献
MIL-88B-NH ₂ (Cr)	胰蛋白酶	共价	—	优越的蛋白水解性能	[23]
NH ₂ -MIL53(Al)、NH ₂ -MIL101(Cr)	葡萄糖氧化酶	共价	抑制	高选择性、低检测限	[19]
ILs/Fe ₃ O ₄ @MOF	脂肪酶	共价	提升	催化活性高、稳定性好	[24]
Fe ₃ O ₄ -COOH@UiO-66-NH ₂	猪胰脂肪酶	交联	—	较高的负载量和固定化酶活性	[25]
Fe ₃ O ₄ @ZIF-67	α -葡萄糖苷酶	交联	抑制	高负载量	[20]
Cu-BTC	枯草芽孢杆菌脂肪酶	表面吸附	提升	较高的催化活性、优良的可重复使用性	[21]
HP-DUT-5	葡萄糖氧化酶、尿酸酶	表面吸附	—	稳定性好、特异性强	[26]
UiO-66-NH ₂	乙酰胆碱酯酶	表面吸附	—	较高的负载量	[27]
Cu-MOF	β -葡萄糖苷酶	共沉淀法	—	优异的包封效率和酸性稳定性	[28]
MTV-ZIF-8	脂肪酶	仿生矿化	提升	较高的催化活性	[5]
UiO-66-NH ₂ (30)	漆酶	表面吸附、扩散	提升	负载量高、稳定性好	[29]
BMOMs	糖基转移酶	微反应器	提升	优异的催化活性	[22]
DNA/ZIF-8	辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶	原位包埋	提升	催化效率高	[30]

—: 未注明

Suo 等^[24]利用离子液体(ILs)修饰磁性 MOFs,并在 NHS 作用下基于共价键固定脂肪酶(PPL). ILs/Fe₃O₄@MOF 通过多重相互作用为固定化 PPL 提供了良好的微环境,将其催化活性提高至游离酶的 2.09 倍.

此外,还可以通过交联剂戊二醛(GA)实现酶固定化.戊二醛是最常用的交联剂之一,可以促进多点键合,增加载体表面活性位点,提高固定化酶的负载量和稳定性^[36-38]. Xu 等^[25]利用 GA 制备了用

于 PPL 固定化的磁性 MOFs(Fe₃O₄-COOH@UiO-66-NH₂),使其构型更加稳定,增强了固定化酶对温度和 pH 的耐受性. Wu 等^[20]利用 3-氨丙基三乙氧基硅烷修饰 Fe₃O₄@ZIF-67,使其与 GA 一端的醛基发生席夫碱反应,基于交联法将 α -葡萄糖苷酶固定在 MOFs 上.在最佳条件下,酶负载量为 79.07 $\mu\text{g}/\text{mg}$,是以磁性纳米材料为载体(8.04 $\mu\text{g}/\text{mg}$)的 10 倍左右,这将为后续抑制剂筛选提供更高的效率和灵敏度.

图1 胰蛋白酶固定在 DCC 激活的 MOFs 上^[23]Fig. 1 Trypsin immobilization onto DCC-activated MOFs^[23]

1.2 物理方法

1.2.1 表面吸附法

表面吸附法是发展最早的酶固定化方法, 基于酶与载体之间的范德华力、静电作用或氢键等弱相互作用, 通过物理吸附将酶固定在载体表面^[11, 35]. 表面吸附法不需要额外的交联剂和修饰步骤, 反应条件温和, 只需将酶和载体混合孵育一定时间^[39], 是一种简单、方便、低成本的方法. 在众多 MOFs 材料中, 具有分层多孔结构的 MOFs 可以促进反应物的扩散过程, 并对酶表现出优异的吸附性能, 因此多被用作吸附固定的载体. 研究人员利用 Cu-BTC、HP-DUT-5、UiO-66-NH₂ 等分层多孔 MOFs, 基于表面吸附法成功制备了多种固定化酶.

Cao 等^[21] 通过表面活性剂修饰枯草芽孢杆菌脂肪酶(BSL2)形成配合物, 利用配合物与 Cu-BTC 之间的范德华力将 BSL2 固定在 MOFs 上, 成功提高了固定化 BSL2 的催化活性和可重复使用性, 使其在 10 个周期后仍具有 90.7% 的初始酶活性. HP-DUT-5 是另一种高度稳定的分层多孔 MOFs, 对葡萄糖氧化酶(GOx)和尿酸酶(URICASE)表现出良好的吸附能力, 最大吸附量分别为 208、225 mg/g^[26]. 基于这一特性, Liu 等^[26] 利用表面吸附法制备了具有优异热稳定性的固定化 GOx 和 URICASE. 此外, UiO-66-NH₂ 具有均匀致密的结晶层和丰富的晶间介孔, 其 BET 比表面积(1 049.2 m²/g)高于 Cu-BTC (905 m²/g), 表现出更优的吸附性能^[27]. 与 GA 共价固定乙酰胆碱酯酶(AChE)相比, UiO-66-NH₂ 对 AChE 的固定能力(213.1 mg/g)明显高于共价固定法(60.6 mg/g)^[27], 证实其显著提高了酶负载量, 间接改善了 AChE 的催化效率.

1.2.2 原位包埋法

与共价法、交联法和表面吸附法相比, 原位包埋法将 MOFs 合成和加酶过程整合为一步反应, 简化了操作流程, 同时为有效保护酶构象提供了 3D 微环境^[40-41], 不仅提高了固定化酶的稳定性, 还降低了酶在溶液中的浸出^[13, 42]. 此外, 该方法对酶的分子大小和 MOFs 的空腔结构没有具体要求, 表现出更好的通用性^[43]. 常用的原位包埋法包括共沉淀法和仿生矿化法.

共沉淀法是一种基于溶液的合成方法. 在合成过程中, 通常加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等辅助稳定剂保持酶的活性, 使其沉淀在生长的 MOFs 表

面^[13], 实现酶固定化. 为了满足实际应用中特定酶的固定需求, 可以通过调整反应介质、金属离子和有机连接剂的浓度和配比来操纵 MOFs 的结构特性, 优化酶-MOFs 复合材料的性能^[28, 44].

对于低 pH 条件下具有催化活性的酶而言, MOFs 在酸性环境下的稳定性是影响固定化酶性能的关键因素. 以 β -葡萄糖苷酶(β -G)为例, 其水解反应的最佳 pH 值在 5 左右, 而包埋法中常用的 ZIF-8 在该条件下不稳定. 为此, Wang 等^[28] 首先制备了在 pH 为 5 时结构稳定的 Cu-MOF, 然后通过调整 Cu²⁺ 和对氨基苯甲酸(PABA)的浓度, 混合含有 PVP 的酶溶液, 基于共沉淀法制备了具有优异的封装效率和酸性稳定性的 β -G@Cu(PABA). 此外, MOFs 的孔径通常小于 2 nm, 导致大尺寸的酶难以被原位包埋固定. 因此, 研究人员通过长链有机连接剂合成了大孔 MOFs 材料, 为包埋不同尺寸的酶提供了可能性^[45-46]. Gascón 等^[47] 通过引入 FeCl₃ 和三氯甲基碳酸酯(BTC), 基于共沉淀法快速合成了一系列不同尺寸的酶-MOFs 复合材料, 克服了固定化酶大小的限制.

然而, 共沉淀法只适用于在温和条件下合成的少数 MOFs 和不受金属盐和有机配体渗透的酶^[47-48]. 鉴于酶的高度多样性以及现有 MOFs 材料的稳定性, 迫切需要一种不受酶分子量和 MOFs 结构限制的酶固定化方法. 仿生矿化法完美地切合了这一需求. 在仿生矿化法中, MOFs 的成核、生长和酶固定化同时进行, 金属离子与酶生物界面相互作用, 诱导 MOFs 生长成核, 反应生成涂层, 将酶固定在 MOFs 的三维隔间中, 形成酶-MOFs 复合材料^[9, 13-14].

作为酶固定化的载体, MOFs 的化学成分与独特性质是影响仿生矿化固定化酶活性的关键因素. Li 等^[5] 发现 MTV-ZIF-8 中脂肪酶(BCL)活性与亲水性连接子比率之间呈先递增后递减的非线性相关性. 随着 ZIFs 亲水性的增加, BCL 的结构从闭盖变为开盖构象(如图 2 所示). 这表明在 MOFs 的三维隔间上存在官能团的空间排列, 通过调整微环境的亲疏水性, 迫使酶呈现最佳构象, 使其表现出更高的催化活性^[49-56]. MOFs 的独特性质是指在金属离子或纳米组分的协同作用下具有的纳米酶催化性能. 利用这一特点可以增强固定化酶的活性. Jing 等^[57] 通过仿生矿化法将过氧化氢酶(CAT)封装在具有过氧化物酶样活性的 Fe-BTC 中, 制得具有协

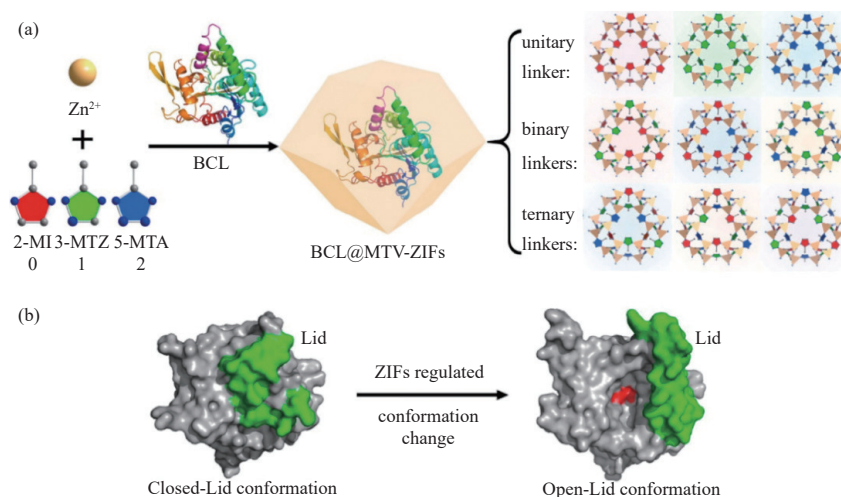


图 2 (a) BCL@MTV-ZIF-8 的合成, (b) MTV-ZIFs 作用下 BCL 的闭盖构象和开盖构象^[5]

Fig. 2 (a) Synthesis of BCL@MTV-ZIF-8, (b) Closed-Lid conformation and Open-Lid conformation of BCL regulated by MTV-ZIFs^[5]

同催化活性的 CAT@Fe-BTC. 此外, 在制备固定化酶的过程中, 酶的表面电荷和化学性质也至关重要. 研究发现, 表面赖氨酸残基与琥珀酸酐的反应可通过增加负电荷促进仿生矿化过程, 而羧酸盐与乙二胺反应生成的正电荷将阻碍该过程, 因此对酶分子表面氨基酸进行化学修饰是系统控制仿生矿化的有效途径^[58-61].

1.3 其他方法

共价、交联、表面吸附和原位包埋法已被广泛用于酶固定化研究, 但在实际应用中, 基于单一方法所制备的固定化酶存在活性降低等问题. 为改进酶固定化方法, 研究人员通常将上述方法相结合, 并与微反应器、多酶复合物等体系联用, 构建具有更优性能的酶-MOFs 复合材料.

表面吸附法中酶与载体之间的弱相互作用易受 pH 和盐浓度变化的影响, 导致其存在稳定性差、易浸出等问题. 因此, Liu 等^[29] 通过调整 Zr^{4+} 和月桂酸的摩尔比构建了孔径分布与漆酶(Lac)分子大小相匹配的 UiO-66-NH₂(30), 使 Lac 吸附扩散固定在 UiO-66-NH₂(30) 的表面和内部, 抑制了固定化 Lac 的浸出, 成功制备了具有优异稳定性、高负载量 (275.96 mg/g) 和高活性回收率 (618%) 的 Lac@UiO-66-NH₂(30).

由于 MOFs 与糖基转移酶(PmHS2)的生物相容性差, 易导致酶失活, 因此 MOFs 很少用作低聚糖和多糖酶促合成过程中的载体. 为了解决 PmHS2 固定化困难的问题, Qiao 等^[22] 在 ZIF-90 合

成方法的基础上, 引入 Mg^{2+} 稳定酶活性, 增加双金属有机材料(BMOMs)的介孔, 实现了糖基转移酶的固定化, 制备了具有优异催化活性的金属微反应器 PmHS2@Mg-BMOM, 如图 3(a)所示.

传统方法中, MOFs 一般用于单个酶的固定化. 但以往的研究表明, MOFs 由于其优良的性能, 可以作为固定多酶体系的载体^[11, 13, 35]. Song 等^[30] 首次将辣根过氧化物酶(HRP)和葡萄糖氧化酶(GOx)作为模型酶, 通过 DNA 支架网络进行交联, 将多酶复合物成功封装到 ZIF-8 中, 如图 3(b)所示. 该策略通过 DNA 支架网络对级联酶的紧密结合明显提高了整体催化效率、酶活性和动力学性能.

2 抑制剂筛选应用

以 MOFs 为载体的固定化酶具有优异的催化活性、稳定性和可重复使用性, 为从中药提取物等复杂样品中筛选靶向酶抑制剂奠定了基础. 已有大量研究工作结合毛细管电泳(CE)^[62]、高效液相色谱(HPLC)^[63] 以及传感策略^[64] 等多种分析检测技术, 建立了高效筛选平台, 以评估酶活性或鉴定配体结构, 从而加速了靶向酶抑制剂药物的研发. 表 2 总结了基于 MOFs 的固定化酶在靶向酶抑制剂筛选中的应用.

2.1 毛细管电泳

毛细管电泳(CE)具有耗样量小、分析时间短、分离效率高、易于自动化等优点, 适用于研究酶反应动力学, 已被广泛应用于酶抑制剂筛选领域^[68-73].

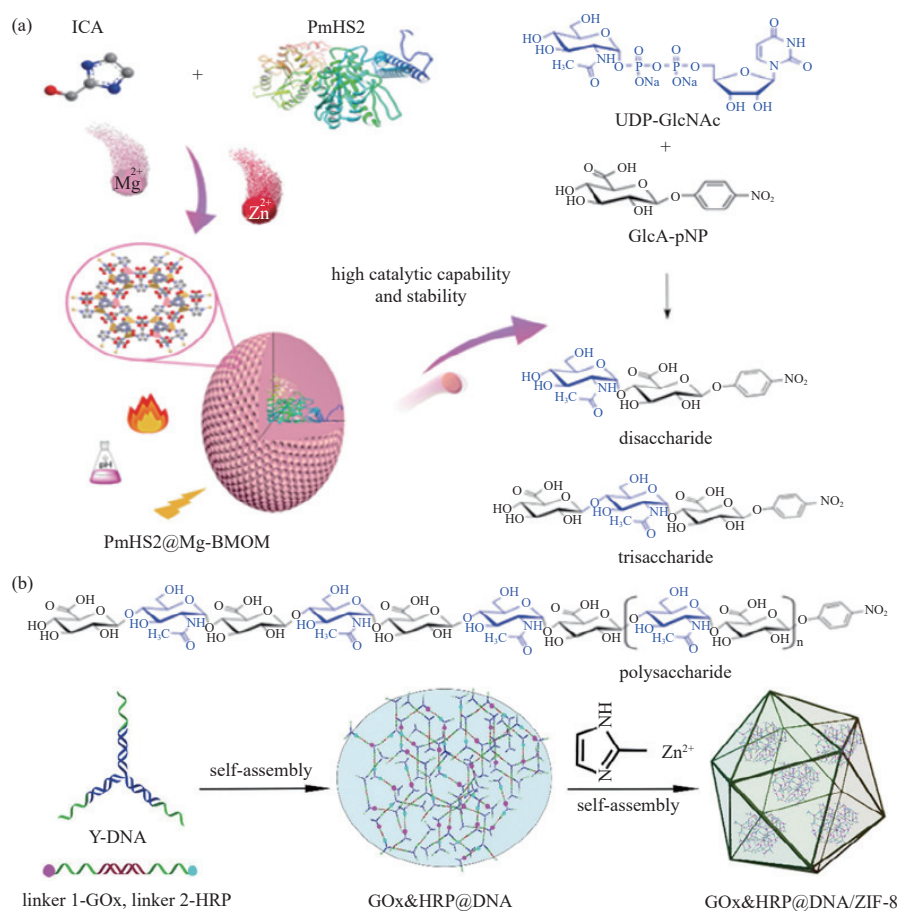


图 3 (a) PmHS2@Mg-BMOM 微反应器的合成示意图及其在肝素二糖、三糖和多糖合成中的应用^[22](ICA, Imidazole-2-carboxaldehyde), (b) 通过 Y-支架交联多种酶网络并在 ZIF-8 中固定的示意图^[30]

Fig. 3 (a) Schematics of synthesizing a PmHS2@Mg-BMOM microreactor and its applications for synthesis of heparosan disaccharide, trisaccharide, and polysaccharide^[22](ICA, Imidazole-2-carboxaldehyde), (b) schematic for cross-linking multiple enzymes network by Y-scaffold and entrapment in zeolitic imidazolate framework (ZIF-8)^[30]

Liu 等^[27] 使用 UiO-66-NH₂ 作为毛细管电泳色谱(CEC)的固定相, 并利用表面吸附法将 AChE 固定在 MOFs 上, 构建了用于高效在线酶分析的 MOFs-IMER-CEC 一体化微量分析系统. 受益于 UiO-66-NH₂ 聚集过程中产生的介孔结构, UiO-66-NH₂ 涂层的酶可及性得到了极大改善, 增加了 CEC 固定相的酶负载量. Ma 等^[74] 通过伯氨基和醛基之间的缩合反应, 将纤维素酶固定在 UiO-66-NH₂ 上, 并作为 CEC 的手性固定相, 实现了对碱性外消旋药物的选择性分离.

以 ZIFs 为代表的 MOFs 孔隙微小、配位键较弱、在水溶液中不稳定^[75], 不利于抑制剂筛选过程中固定化酶的回收利用. 因此, 研究人员通过掺杂磁性纳米颗粒、MnO₂ 等其他材料提高了酶-MOFs 复合材料的分离性能和稳定性^[13, 76-77], 为实现电泳

法快速筛选酶抑制剂提供了新的解决方案. Wan 等^[62] 通过分步组装法制备了磁性核壳金属有机框架复合材料(Fe₃O₄@CS@ZIF-8), 并将 α-葡萄糖苷酶原位包封在 Fe₃O₄@CS@ZIF-8 晶格中. 研究发现, 固定化 α-葡萄糖苷酶对温度和 pH 的耐受性增强, 循环 10 次后仍具有 74% 初始酶活性, 大大提高了其可重复使用性. 随后, 将固定化酶用于 14 种中药的抑制剂筛选, 通过 CE 发现大黄中的没食子酸和表儿茶素等组分对 α-葡萄糖苷酶表现出最强的抑制作用(如图 4 所示). Liu 等^[65] 基于静电作用将 AChE 物理吸附在 MnO₂-ZIF-67 上, 制备了具有良好可重复使用性、耐酸碱和耐热性的固定化 AChE, 并将其与 CE 联用, 从大叶旋覆花中分离出的 11 种化合物中筛选 AChE 抑制剂, 发现大叶旋覆花酸 A 和邻苯二甲酸二丁酯具有较强的抑制活性, 为基于大叶旋

表2 基于MOFs的固定化酶在抑制剂筛选中的应用
Table 2 Application of immobilized enzyme based on MOFs in inhibitor screening

MOFs	酶	固定方法	对酶活力的影响	检测技术	应用	参考文献
Fe ₃ O ₄ @CS@ZIF-8	α -葡萄糖苷酶	原位包埋	—	毛细管电泳	14种中药中 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选	[62]
MnO ₂ -ZIF-67	乙酰胆碱酯酶	表面吸附	—	毛细管电泳	大叶旋覆花中AChE抑制剂筛选	[65]
UiO-66-NH ₂	猪胰脂肪酶	交联、共价结合	提升	高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱	夏枯草中脂肪酶抑制剂筛选	[63]
Fe ₃ O ₄ -COOH@UiO-66-NH ₂	猪胰脂肪酶	交联	抑制	超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱	黄芩中分离鉴定脂肪酶抑制剂	[25]
ZIF-90	α -葡萄糖苷酶	共价结合	—	高效液相色谱	淮山药和地黄等多种植物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂	[66]
Fe ₃ O ₄ @ZIF-67	α -葡萄糖苷酶	交联	抑制	高效液相色谱	信阳毛尖茶中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂	[20]
Cu-MOF	α -葡萄糖苷酶	原位包埋	提升	比色传感	齐墩果酸衍生物中筛选潜在的抗糖尿病药物	[64]
Au/Cu-MOFs	DNA甲基转移酶	共价结合	—	电化学检测法	检测酶活性并研究抑制剂筛选可行性	[67]

—: 未注明

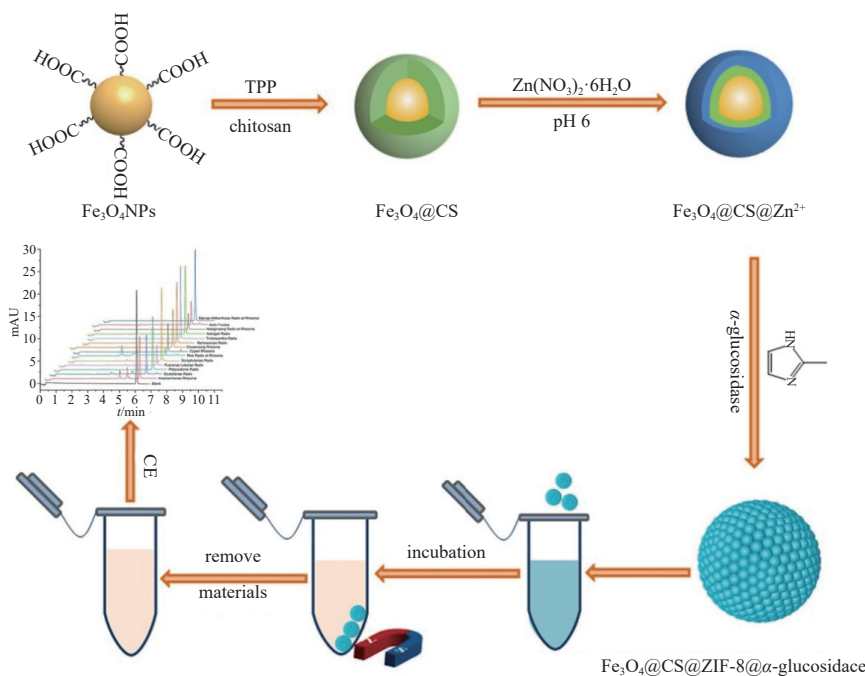


图4 Fe₃O₄@CS@ZIF-8@ α -葡萄糖苷酶的制备及酶抑制剂筛选示意图^[62](TPP, Sodium tripolyphosphate)

Fig. 4 Schematic illustration of fabrication of Fe₃O₄@CS@ZIF-8@ α -glucosidase microspheres and inhibitors screening^[62](TPP, Sodium tripolyphosphate)

覆花活性成分开发新药奠定了基础。

2.2 液相色谱法

液相色谱法(LC)具有分析速度快、灵敏度高、重复性好、可靠性强等优点,适用于筛选、分析天然药物中的活性化合物,为酶抑制剂的研究提供了丰富的来源。研究人员通常将 LC 与质谱、配体垂钓法相结合,以尽可能简化操作过程,全面分析活性化合物,避免假阳性结果,提高分离效率,从而达到快速筛选酶抑制剂的目的^[78]。

Chen 等^[63]通过共价键将 PPL 固定在 UiO-66-NH₂ 表面,使其活性位点与底物结合更加频繁,提高

了固定化酶的催化性能以及配体筛选试验的特异性。该工作结合高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术(HPLC-Q-TOF-MS/MS),建立了基于 PPL@MOF 的配体垂钓法,从夏枯草中筛选得到 13 个 PPL 抑制剂,其中熊果酸的半抑制浓度最低(28.97 μmol/L),具有优良的脂肪酶抑制活性[如图 5(a)所示]。为解决配体垂钓法中酶负载量小和回收困难的问题,Xu 等^[25]将 UiO-66-NH₂ 修饰为兼具磁性和大比表面积的 Fe₃O₄-COOH@UiO-66-NH₂,用作固定 PPL 的载体,以提高复合材料的负载能力(247.8 mg/g)和回收活性(101.5%)。该工作基于

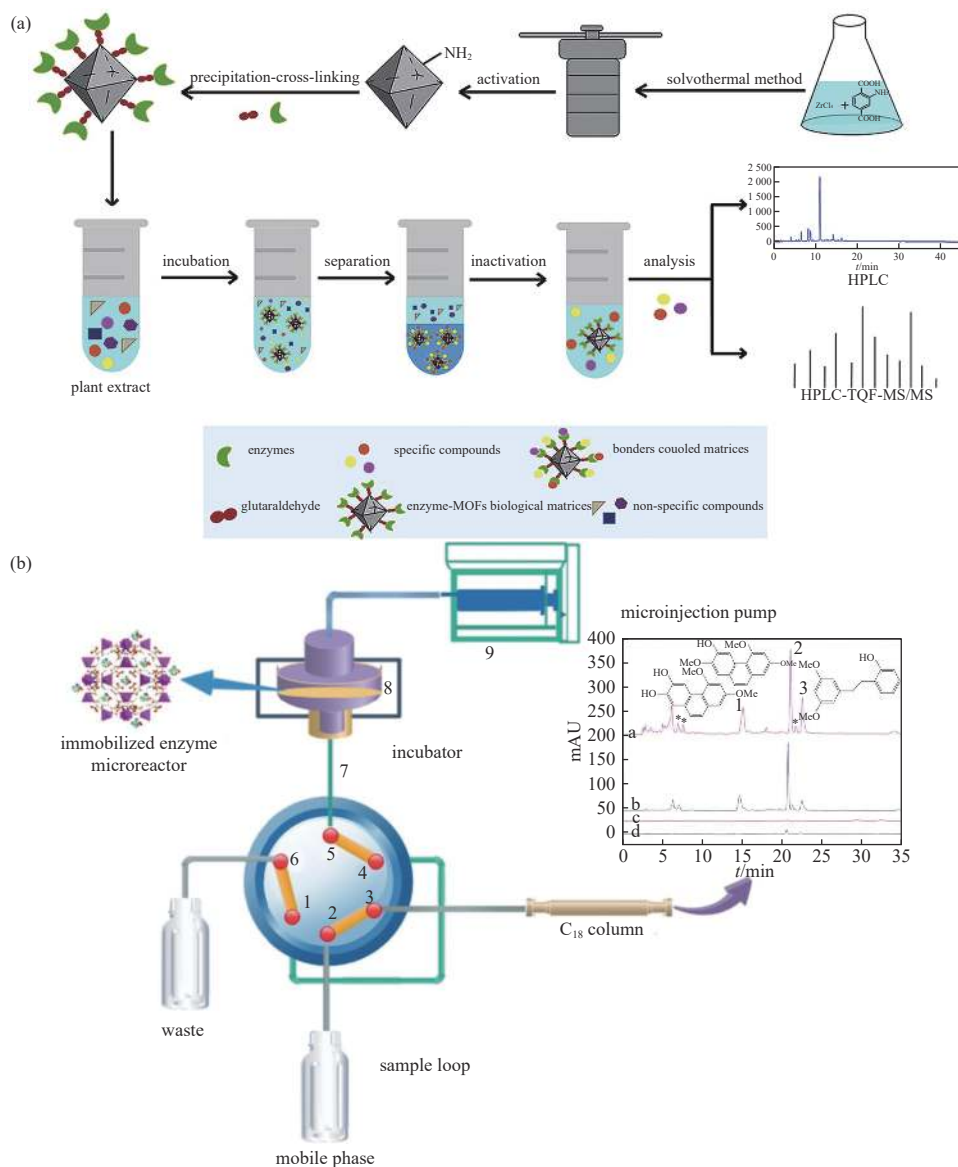


图 5 (a) PPL@MOF: 从天然草药中发现配体的新平台^[63], (b) 基于针式过滤器的在线筛选系统^[66]
 Fig. 5 (a) PPL@MOF: new platform for discovery of ligands from natural herbs^[63], (b) syringe filter-based online screening system^[66]

Fe₃O₄-COOH@UiO-66-NH₂@PPL 复合材料建立了具有可行性、选择性和有效性的配体筛选系统, 结合超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱技术 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 从黄芩中成功分离并鉴定出 8 个 PPL 抑制剂。

对比上述离线方法, 与液相色谱质谱联用技术相结合的在线分析技术将筛选、洗脱和分析等操作过程合为一体, 实现了连续分离和洗脱, 简化了整体分析过程, 显著提高了筛选效率。Qiu 等^[66] 利用 ZIF-90 共价结合 α -葡萄糖苷酶 (α -GLU) 并将其固定在针式过滤器中, 与 HPLC 和显微注射泵耦合, 建立了快速筛选中草药提取物中的 α -GLU 抑制剂的在线筛选系统 [如图 5(b) 所示]。该系统从淮山药、金银花叶片、信阳毛尖茶中发现了山药素 I、异绿原酸 B、儿茶素等结构已知的活性成分, 从地黄中成功筛选出了三种未知成分。为了尽可能避免洗脱、离心等过程造成的酶损失, 研究人员尝试利用具有较强的磁响应、结构稳定、易于操作的磁性 MOFs 建立在线筛选系统。受到 Fe₃O₄@DOTA-ZIF-67 固定胰蛋白酶^[79] 的启发, Wu 等^[20] 以 Fe₃O₄@ZIF-67 为载体, 制备了一种固定化 α -GLU 的生物微反应器, 并将其与 HPLC 相结合, 构建了简单高效的磁性在线筛选系统。该系统避免了离线离心步骤中的材料损失, 大大提高了分析效率, 并成功从信阳毛尖茶中筛选出潜在的 α -GLU 抑制剂。

2.3 传感策略

酶生物传感器结合了光学分析法(如比色法^[80]、荧光分析法^[81-82]、紫外光谱法^[83])、电化学检测法^[67, 84] 和表面等离子体共振检测法^[85] 等多种检测技术, 具有优异的选择性和灵敏度, 在酶抑制剂筛选领域应用潜力巨大。随着检测技术的不断发展, 越来越多的新方法被用于筛选酶抑制剂。目前, 基于 MOFs 固定化酶的传感策略常见的有比色传感法和电化学检测法。

比色传感法根据化学反应过程中颜色的变化检测目标化合物, 因其操作简单、易于读出、设备便携而受到广泛关注^[86]。Zhong 等^[64] 通过葡萄糖苷酶 (GAA)、葡萄糖氧化酶 (GOx)、Cu²⁺ 和 4, 4'-联吡啶自组装, 制备了具有高稳定性的球形杂化酶-MOFs 反应器 (GAA@GOx@Cu-MOF), 其酶活性较游离酶体系增加了约 4.58 倍。利用 Cu-MOF 的催化性能, 构建了基于酶-MOFs 复合材料的比色传感器, 可实

现高灵敏度筛选齐墩果酸衍生物中的 GAA 抑制剂 [如图 6(a) 所示]。此外, 该课题组还利用 IrO₂/MnO₂ 纳米复合材料的氧化酶活性, 结合 GAA@Cu-MOF 与比色传感策略, 开发了另一种筛选 GAA 抑制剂的方法 [如图 6(b) 所示]^[87]。该方法有效避免了过氧化氢在筛选过程中的潜在干扰, 提高了方法的灵敏度, 实现了抗坏血酸和阿卡波糖的低检测限和宽线性范围测定, 成功从齐墩果酸衍生物中筛选出潜在的 GAA 抑制剂。

电化学传感策略主要检测目标分析物和电极固定的识别元件之间的化学反应产生的输出电信号的变化, 而电信号的变化与目标分析物的浓度有关, 因此可用于目标物的定量分析^[88]。Chen 等^[67] 通过 Au/Cu-MOFs 构建了一种检测 DNA 甲基转移酶 (DNA MTase) 活性的电化学和血糖仪双响应的生物传感器。Au/Cu-MOFs 作为固定转化酶催化蔗糖水解生成葡萄糖的载体, 具有高密度的金属位点和优异的负载能力, 提高了催化效率, 放大了电化学和血糖仪的检测信号。通过信号放大策略, 建立了具有高灵敏度的生物传感器, 用于测定 DNA MTase 活性, 方法检测限为 0.001 U/mL, 线性范围为 0.002~12 U/mL。此外, 该方法具有良好的选择性, 通过双响应检测减少了假阳性结果, 可应用于抑制剂筛选。

3 总结与展望

MOFs 作为新兴载体材料改善了固定化酶的催化活性、稳定性和可重复使用性。基于 MOFs 固定化酶的抑制剂筛选系统简化了传统方法中的操作过程, 提高了分离效率、准确性和可靠性, 促进了酶抑制剂的高效筛选。然而, 在酶抑制剂筛选过程中仍有大量工作需要解决, 如: (1) 因 MOFs 骨架限制、孔隙过小等因素, 导致酶与底物可及性受限, 最优构象占比降低, 使得酶活力不能完全发挥^[89]。(2) 酶与 MOFs 的确切相互作用机制尚未完全阐明。(3) 通过配体垂钧等方法筛选抑制剂时无法完全排除假阳性结果。(4) 酶-MOFs 复合材料传感器抗干扰能力不足等^[13, 63, 90]。因此, 在接下来的工作中, 可以引入氨基酸、金属离子等介质对酶分子表面进行化学修饰或者利用超声预处理使酶呈现最优构象, 并通过调控诱导缺陷构建介孔多层 MOFs 材料, 增大其比表面积和孔径, 改善基底扩散, 制备基于 MOFs

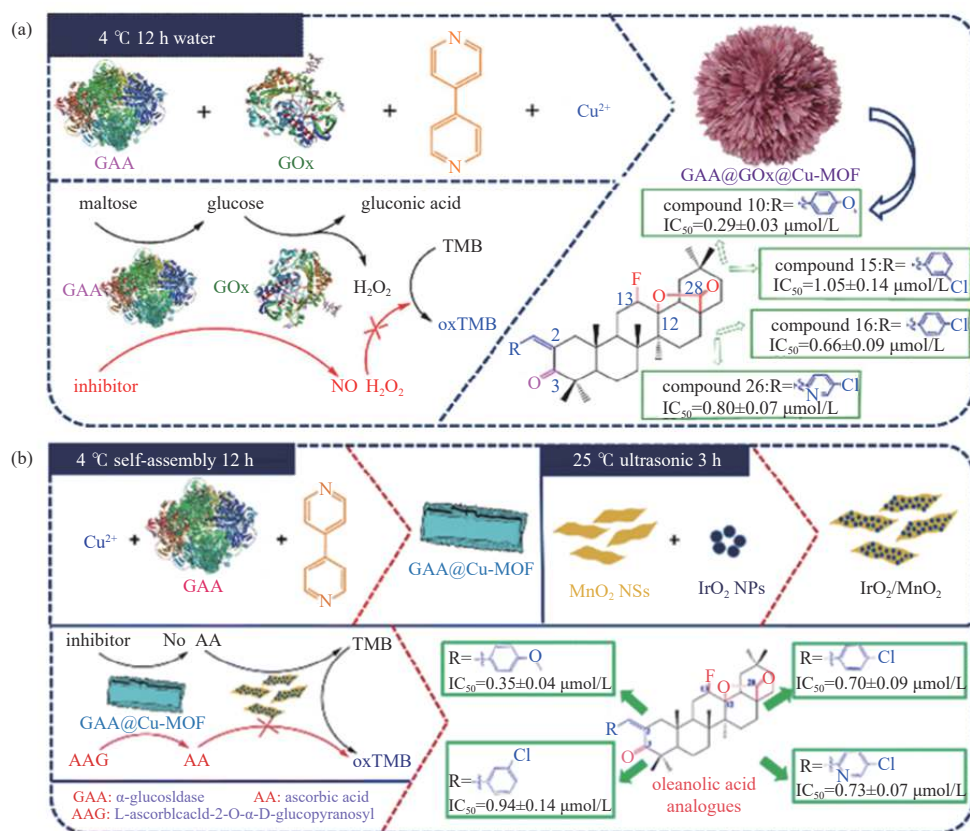


图 6 (a) 基于双功能杂化酶催化 MOFs 反应器的比色传感平台示意图^[64](TMB, 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride), (b) 基于 GAA@Cu-MOF 和 IrO₂/MnO₂ 纳米复合材料的 GAA 抑制剂筛选传感平台示意图^[87]

Fig. 6 (a) Schematic illustration of colorimetric sensing platform based on hybrid enzyme-catalytic MOF reactor^[64](TMB, 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride), (b) schematic illustration of sensing platform for GAA inhibitor screening based on GAA@Cu-MOF and IrO₂/MnO₂ nanocomposite^[87]

的固定化高活性酶. 利用电子自旋共振波谱仪、低温电子断层扫描技术、激光扫描共聚焦显微镜、计算机模拟等多种表征策略和方法研究酶在 MOFs 中的精确定位和空间分布, 实现原位微区高灵敏分析, 阐释其作用机制. 将酶-MOFs 复合材料与光电二极管阵列检测器、液滴微流控技术、金属螯合亲和层析等高选择性高灵敏度分析技术相结合获取更为精准的筛选结果, 提高方法的准确性和可靠性. 采用多通道、多模式检测策略进行传感器信号输出, 获取多维活性信息, 提高抗干扰能力, 开发快速、低成本、高特异性和高灵敏度的方法, 争取实现如中药提取物等复杂样品的精准筛选应用, 促进新药研发.

参考文献:

- [1] Alcántara A R, Domínguez de María P, Littlechild J A, et al. Biocatalysis as key to sustainable industrial chemistry[J]. ChemSusChem, 2022, 15 (9): e202102709.
- [2] Copeland R A, Harpel M R, Tummino P J. Targeting enzyme inhibitors in drug discovery[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2007, 11 (7): 967-978.
- [3] Liu L L, Shi S Y, Chen X Q, et al. Analysis of tyrosinase binders from *Glycyrrhiza uralensis* root: evaluation and comparison of tyrosinase immobilized magnetic fishing-HPLC and reverse ultrafiltration-HPLC[J]. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2013, 932 : 19-25.
- [4] Cardoso C L, de Moraes M C, Cass Q B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas[J]. Química Nova, 2009, 32 (1): 175-187.
- [5] Li Y M, Yuan J, Ren H, et al. Fine-tuning the micro-environment to optimize the catalytic activity of enzymes immobilized in multivariate metal-organic

- frameworks[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143 (37): 15378-15390.
- [6] Schmid A, Dordick J S, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow[J]. *Nature*, 2001, 409 (6817): 258-268.
- [7] Wu J, Wang X Y, Wang Q, et al. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II)[J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48 (4): 1004-1076.
- [8] Wang Q Q, Wei H, Zhang Z Q, et al. Nanozyme: an emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 105 : 218-224.
- [9] Nadar S S, Vaidya L, Rathod V K. Enzyme embedded metal organic framework (enzyme-MOF): De novo approaches for immobilization[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 149 : 861-876.
- [10] 李宏强, 王宏博, 席斌, 等. 金属有机骨架及其复合材料在食品安全检测中的应用[J]. *理化检验-化学分册*, 2022, 58(5): 612-620. [LI Hongqiang, WANG Hongbo, XI Bin, et al. Application of metal-organic framework materials and their composites in food safety detection[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis)*, 2022, 58 (5): 612-620.]
- [11] Drout R J, Robison L, Farha O K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal-organic frameworks[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, 381 : 151-160.
- [12] Lian X Z, Fang Y, Joseph E, et al. Enzyme-MOF (metal-organic framework) composites[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46 (11): 3386-3401.
- [13] Feng Y M, Xu Y, Liu S C, et al. Recent advances in enzyme immobilization based on novel porous framework materials and its applications in biosensing[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 459 : 214414.
- [14] Ye N R, Kou X X, Shen J, et al. Metal-organic frameworks: a new platform for enzyme immobilization[J]. *ChemBioChem*, 2020, 21 (18): 2585-2590.
- [15] Zhu Y T, Ren X Y, Liu Y M, et al. Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: characterization and application for enzymatic inhibition assays[J]. *Materials Science and Engineering:C*, 2014, 38 : 278-285.
- [16] Sahutoglu A S, Akgul C. Immobilisation of *Aspergillus oryzae* α -amylase and *Aspergillus niger* glucoamylase enzymes as cross-linked enzyme aggregates[J]. *Chemical Papers*, 2015, 69 (3): 433-439.
- [17] Junior J C Q, Ferrarezi A L, Borges J P, et al. Hydrophobic adsorption in ionic medium improves the catalytic properties of lipases applied in the triacylglycerol hydrolysis by synergism[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39 (12): 1933-1943.
- [18] Zdarta J, Meyer A, Jesionowski T, et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility[J]. *Catalysts*, 2018, 8 (2): 92.
- [19] Tudisco C, Zolubas G, Seoane B, et al. Covalent immobilization of glucose oxidase on amino MOFs via post-synthetic modification[J]. *RSC Advances*, 2016, 6 (109): 108051-108055.
- [20] Wu X R, Qiu B B, Chen Y N, et al. Online coupling $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-67@ \alpha$ -glucosidase bioreactor with high performance liquid chromatography for rapid screening of α -glucosidase inhibitors in tea and their inhibitory activity research[J]. *Journal of Chromatography B*, 2020, 1159 : 122398.
- [21] Cao Y, Wu Z F, Wang T, et al. Immobilization of *Bacillus subtilis* lipase on a Cu-BTC based hierarchically porous metal-organic framework material: a biocatalyst for esterification[J]. *Dalton Transactions*, 2016, 45 (16): 6998-7003.
- [22] Qiao M, Ji Y, Linhardt R J, et al. Fabricating bimetal organic material capsules with a commodious microenvironment and synergistic effect for glycosyltransferase[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14 (22): 26034-26043.
- [23] Shih Y H, Lo S H, Yang N S, et al. Trypsin-immobilized metal-organic framework as a biocatalyst in proteomics analysis[J]. *ChemPlusChem*, 2012, 77 (11): 982-986.
- [24] Suo H B, Geng H N, Zhang L, et al. Covalent immobilization of lipase on an ionic liquid-functionalized magnetic Cu-based metal-organic framework with boosted catalytic performance in flavor ester synthesis[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11 (6): 1302-1311.
- [25] Xu J F, Cao P K, Fan Z Y, et al. Rapid screening of lipase inhibitors in *scutellaria baicalensis* by using porcine pancreatic lipase immobilized on magnetic core-shell metal-organic frameworks[J]. *Molecules*, 2022, 27 (11): 3475.
- [26] Liu X, Qi W, Wang Y F, et al. A facile strategy for enzyme immobilization with highly stable hierarchically

- porous metal-organic frameworks[J]. *Nanoscale*, 2017, 9 (44): 17561-17570.
- [27] Liu R, Yi G Y, Ji B A, et al. Metal-organic frameworks-based immobilized enzyme microreactors integrated with capillary electrochromatography for high-efficiency enzyme assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94 (17): 6540-6547.
- [28] Wang L, Zhi W J, Wan J, et al. Recyclable β -glucosidase by one-pot encapsulation with Cu-MOFs for enhanced hydrolysis of cellulose to glucose[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7 (3): 3339-3348.
- [29] Liu C, Zhang X Y, Zhou Y, et al. A reusable and leakage-proof immobilized laccase@UiO-66-NH₂(30) for the efficient biodegradation of rifampicin and lincomycin[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2023, 194 : 108897.
- [30] Song J Y, He W T, Shen H, et al. Construction of multiple enzyme metal-organic frameworks biocatalyst via DNA scaffold: a promising strategy for enzyme encapsulation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 363 : 174-182.
- [31] Singh O, Lee P Y, Matysiak S, et al. Dual mechanism of ionic liquid-induced protein unfolding[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020, 22 (35): 19779-19786.
- [32] Akkas T, Zakharyuta A, Taralp A, et al. Cross-linked enzyme lyophilisates (CLELs) of urease: a new method to immobilize ureases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 132 : 109390.
- [33] Imam H T, Marr P C, Marr A C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23 (14): 4980-5005.
- [34] 周梓昕. 基于金属有机骨架材料的酶固定化方法研究及其分析应用[D]. 北京: 北京化工大学, 2022. [ZHOU Zixin. Fabrication and analytical application of immobilized enzymes based on metal-organic frameworks[D]. Beijing University of Chemical Technology, 2022.]
- [35] Cui J D, Ren S Z, Sun B T, et al. Optimization protocols and improved strategies for metal-organic frameworks for immobilizing enzymes: current development and future challenges[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, 370 : 22-41.
- [36] Trindade Ximenes I A, de Oliveira P C O, Wegermann C A, et al. Magnetic particles for enzyme immobilization: a versatile support for ligand screening[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 204 : 114286.
- [37] Liu D M, Chen J, Shi Y P. Tyrosinase immobilization on aminated magnetic nanoparticles by physical adsorption combined with covalent crosslinking with improved catalytic activity, reusability and storage stability[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1006 : 90-98.
- [38] Jiang J B, Yu Y J, Wang L P, et al. Enzyme immobilized on polyamidoamine-coated magnetic microspheres for α -glucosidase inhibitors screening from Radix Paeoniae Rubra extracts accompanied with molecular modeling[J]. *Talanta*, 2019, 195 : 127-136.
- [39] Liu D M, Chen J, Shi Y P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 102 : 332-342.
- [40] Gascón V, Jiménez M B, Blanco R M, et al. Semi-crystalline Fe-BTC MOF material as an efficient support for enzyme immobilization[J]. *Catalysis Today*, 2018, 304 : 119-126.
- [41] Gkaniatsou E, Sicard C, Ricoux R, et al. Metal-organic frameworks: a novel host platform for enzymatic catalysis and detection[J]. *Materials Horizons*, 2017, 4 (1): 55-63.
- [42] Asadi V, Kardanpour R, Tangestaninejad S, et al. Novel bovine carbonic anhydrase encapsulated in a metal-organic framework: a new platform for biomimetic sequestration of CO₂[J]. *RSC Advances*, 2019, 9 (49): 28460-28469.
- [43] Ghasemi S, Yousefi M, Nikseresht A, et al. Covalent binding and in situ immobilization of lipases on a flexible nanoporous material[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 102 : 92-101.
- [44] Kempahanumakkagari S, Kumar V, Samaddar P, et al. Biomolecule-embedded metal-organic frameworks as an innovative sensing platform[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36 (2): 467-481.
- [45] Pan Y X, Li Q B, Li H, et al. A general Ca-MOM platform with enhanced acid-base stability for enzyme biocatalysis[J]. *Chem Catalysis*, 2021, 1 (1): 146-161.
- [46] Zhang Y, Ma S Q. Controllable immobilization of enzymes in metal-organic frameworks for biocatalysis[J]. *Chem Catalysis*, 2021, 1 (1): 20-22.
- [47] Gascón V, Carucci C, Jiménez M B, et al. Rapid in situ immobilization of enzymes in metal-organic framework supports under mild conditions[J]. *ChemCatChem*, 2017, 9 (7): 1182-1186.

- [48] Gascón V, Castro-Miguel E, Díaz-García M, et al. In situ and post-synthesis immobilization of enzymes on nanocrystalline MOF platforms to yield active biocatalysts[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2017, 92 (10): 2583-2593.
- [49] Chen G S, Huang S M, Kou X X, et al. Embedding functional biomacromolecules within peptide-directed metal-organic framework (MOF) nanoarchitectures enables activity enhancement[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59 (33): 13947-13954.
- [50] Chen Y J, Jiménez-Ángeles F, Qiao B F, et al. Insights into the enhanced catalytic activity of cytochrome c when encapsulated in a metal-organic framework[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142 (43): 18576-18582.
- [51] Navarro-Sanchez J, Almora-Barrios N, Lerma-Berlanga B, et al. Translocation of enzymes into a mesoporous MOF for enhanced catalytic activity under extreme conditions[J]. *Chemical Science*, 2019, 10 (14): 4082-4088.
- [52] Chen W H, Vázquez-González M, Zoabi A, et al. Biocatalytic cascades driven by enzymes encapsulated in metal-organic framework nanoparticles[J]. *Nature Catalysis*, 2018, 1 (9): 689-695.
- [53] Liang J Y, Liang K. Biocatalytic metal-organic frameworks: prospects beyond bioprotective porous matrices[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30 (27): 2001648.
- [54] Liao F S, Lo W S, Hsu Y S, et al. Shielding against unfolding by embedding enzymes in metal-organic frameworks via a *de novo* approach[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139 (19): 6530-6533.
- [55] Liang W B, Xu H S, Carraro F, et al. Enhanced activity of enzymes encapsulated in hydrophilic metal-organic frameworks[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141 (6): 2348-2355.
- [56] Yang X G, Zhang J R, Tian X K, et al. Enhanced activity of enzyme immobilized on hydrophobic ZIF-8 modified by Ni²⁺ ions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62 (7): e202216699.
- [57] Jing Y Q, Li J X, Zhang X W, et al. Catalase-integrated metal-organic framework with synergetic catalytic activity for colorimetric sensing[J]. *Environmental Research*, 2022, 207 : 112147.
- [58] Chen G S, Huang S M, Kou X X, et al. A convenient and versatile amino-acid-boosted biomimetic strategy for the nondestructive encapsulation of biomacromolecules within metal-organic frameworks[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58 (5): 1463-1467.
- [59] Maddigan N K, Tarzia A, Huang D M, et al. Protein surface functionalisation as a general strategy for facilitating biomimetic mineralisation of ZIF-8[J]. *Chemical Science*, 2018, 9 (18): 4217-4223.
- [60] Liang W B, Ricco R, Maddigan N K, et al. Control of structure topology and spatial distribution of biomacromolecules in Protein@ZIF-8 biocomposites[J]. *Chemistry of Materials*, 2018, 30 (3): 1069-1077.
- [61] Wang S Z, Wang J Y, Yao Y, et al. A mild one-pot self-assembly approach to encapsulating enzymes into metal-organic framework with Asp-boosted enzymatic performance for clean production[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 401 : 136710.
- [62] Wan G Z, Ma X H, Jin L, et al. α -glucosidase immobilization on magnetic core-shell metal-organic frameworks for inhibitor screening from traditional Chinese medicines[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 205 : 111847.
- [63] Chen X L, Xue S, Lin Y L, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto a metal-organic framework, PPL@MOF: a new platform for efficient ligand discovery from natural herbs[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1099 : 94-102.
- [64] Zhong Y Y, Yu L J, He Q Y, et al. Bifunctional hybrid enzyme-catalytic metal organic framework reactors for α -glucosidase inhibitor screening[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11 (36): 32769-32777.
- [65] Liu J, Ma R, Ha W, et al. An MnO₂-ZIF-67 immobilized acetylcholinesterase method for acetylcholinesterase activity assay and inhibitor screening from *Inula macrophylla* based on capillary electrophoresis[J]. *Talanta*, 2023, 253 : 124025.
- [66] Qiu B B, Shi Y Q, Yan L Y, et al. Development of an on-line immobilized α -glucosidase microreactor coupled to liquid chromatography for screening of α -glucosidase inhibitors[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 180 : 113047.
- [67] Chen Y, Meng X Z, Gu H W, et al. A dual-response biosensor for electrochemical and glucometer detection of DNA methyltransferase activity based on functionalized metal-organic framework amplification[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 134 : 117-122.

- [68] Iqbal J, Iqbal S, Müller C E. Advances in immobilized enzyme microreactors in capillary electrophoresis[J]. *Analyst*, 2013, 138 (11): 3104-3116.
- [69] Tang L L, Zhang W P, Zhao H Y, et al. Tyrosinase inhibitor screening in traditional Chinese medicines by electrophoretically mediated microanalysis[J]. *Journal of Separation Science*, 2015, 38 (16): 2887-2892.
- [70] Wu Z Y, Zhang H, Li Q Q, et al. Capillary electrophoresis-based online immobilized enzyme reactor for beta-glucosidase kinetics assays and inhibitors screening[J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1110-1111 : 67-73.
- [71] Krylova S M, Okhonin V, Krylov S N. Transverse diffusion of laminar flow profiles-a generic method for mixing reactants in capillary microreactor[J]. *Journal of Separation Science*, 2009, 32 (5-6): 742-756.
- [72] Li X J, Yin Z R, Cui X J, et al. Capillary electrophoresis-integrated immobilized enzyme microreactor with graphene oxide as support: Immobilization of negatively charged L-lactate dehydrogenase via hydrophobic interactions[J]. *Electrophoresis*, 2020, 41 (3-4): 175-182.
- [73] Wu Z Y, Zhang H, Yang Y Y, et al. An online dual-enzyme co-immobilized microreactor based on capillary electrophoresis for enzyme kinetics assays and screening of dual-target inhibitors against thrombin and factor Xa[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1619 : 460948.
- [74] Ma M X, Zhang J, Li P P, et al. Immobilization of cellulase on monolith supported with Zr(IV)-based metal-organic framework as chiral stationary phase for enantioseparation of five basic drugs in capillary electrochromatography[J]. *Microchimica Acta*, 2021, 188 (6): 1-11.
- [75] Sun Y Y, Shi J F, Zhang S H, et al. Hierarchically porous and water-tolerant metal-organic frameworks for enzyme encapsulation[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2019, 58 (28): 12835-12844.
- [76] Nadar S S, Rathod V K. Magnetic-metal organic framework (magnetic-MOF): a novel platform for enzyme immobilization and nanozyme applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120 : 2293-2302.
- [77] Nadar S S, Varadan N O, Suresh S, et al. Recent progress in nanostructured magnetic framework composites (MFCs): Synthesis and applications[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2018, 91 : 653-677.
- [78] Hou W C, Xia J L, Liu C M, et al. Development of a method to screen and isolate bioactive constituents from *Stellera chamaejasme* by ultrafiltration and liquid chromatography combined with semi-preparative high-performance liquid chromatography and high-speed counter current chromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2019, 42 (22): 3421-3431.
- [79] Zhai R, Yuan Y F, Jiao F L, et al. Facile synthesis of magnetic metal organic frameworks for highly efficient proteolytic digestion used in mass spectrometry-based proteomics[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 994 : 19-28.
- [80] Wang F, Liu M X, Niu X K, et al. Dextran-assisted ultrasonic exfoliation of two-dimensional metal-organic frameworks to evaluate acetylcholinesterase activity and inhibitor screening[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1243 : 340815.
- [81] Zhao Y, Hu J J, Bai X L, et al. Fast screening of tyrosinase inhibitors from traditional Chinese medicinal plants by ligand fishing in combination with in situ fluorescent assay[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414 (6): 2265-2273.
- [82] Mu J, Xu W H, Huang Z Z, et al. Encapsulating copper nanoclusters in 3D metal-organic frameworks to boost fluorescence for bio-enzyme sensing, inhibitor screening, and light-emitting diode fabrication[J]. *Microchemical Journal*, 2023, 189 : 108533.
- [83] Qi S L, Guan H D, Deng G, et al. Rapid, reliable, and sensitive detection of adenosine deaminase activity by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and its application to inhibitory activity evaluation of traditional Chinese medicines[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 153 : 175-181.
- [84] Song W L, Yin W S, Zhang Z H, et al. A DNA functionalized porphyrinic metal-organic framework as a peroxidase mimicking catalyst for amperometric determination of the activity of T4 polynucleotide kinase[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186 (3): 149.
- [85] Salehabadi H, Khajeh K, Dabirmanesh B, et al. Surface plasmon resonance based biosensor for discovery of new matrix metalloproteinase-9 inhibitors[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2018, 263 : 143-150.
- [86] Zhang X L, Li G L, Wu D, et al. Recent progress in the design fabrication of metal-organic frameworks-based nanozymes and their applications to sensing and can-

- cer therapy[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 137: 178-198.
- [87] Zhong Y Y, Li Q L, Lu M L, et al. A colorimetric sensing strategy based on enzyme@metal-organic framework and oxidase-like IrO₂/MnO₂ nanocomposite for α -glucosidase inhibitor screening[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187 (12): 675.
- [88] 江兰, 杭永正, 邹立娜, 等. 基于金属有机骨架材料的电化学DNA传感器在分析检测领域的应用进展[J]. *理化检验-化学分册*, 2022, 58(9): 1109-1116. [JIANG Lan, HANG Yongzheng, ZOU Lina, et al. Application progress of electrochemical DNA sensors based on metal-organic framework materials in analysis and detection field[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis)*, 2022, 58 (9): 1109-1116.]
- [89] Liang J Y, Bin Zulkifli M Y, Yong J, et al. Locking the ultrasound-induced active conformation of metalloenzymes in metal-organic frameworks[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144 (39): 17865-17875.
- [90] Bolivar J M, Nidetzky B. On the relationship between structure and catalytic effectiveness in solid surface-immobilized enzymes: advances in methodology and the quest for a single-molecule perspective[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2020, 1868 (2): 140333.

请速订阅 2023 年《分析测试技术与仪器》

如果您想

了解当代分析测试领域的新进展和新动向

交流分析测试研究的新理论与新成果

开发分析测试研究工作的新技术与新方法

扩展分析测试仪器的新用途与新功能

研制分析测试的新仪器与新组件

.....

请您订阅向国内外公开发行的《分析测试技术与仪器》杂志, 刊号 $\frac{\text{ISSN } 1006-3757}{\text{CN } 62-1123/O6}$, 邮发代号: 54-90, 定价: 15 元/册, 全年定价 60 元. 投稿请与《分析测试技术与仪器》编辑部联系, 联系电话: 0931-4968280, E-mail: fxcs@licp.cas.cn, 网址: <http://www.fxcsjyq.net>, 联系人: 魏丽萍, 地址: 甘肃省兰州市天水中路 18 号, 中国科学院兰州化学物理研究所.