

固定化蛋白质在沸石和介孔分子筛上的直接电子转移及生物传感

刘 倩, 戴志晖

(南京师范大学化学与材料科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 氧化还原蛋白质和电极之间的直接电子转移在理论和实验上都具有重要的意义. 通过对蛋白质和电极的修饰能够促进它们之间的直接电子转移. 蛋白质与电极表面直接接触易导致蛋白质变性. 在电极表面固定沸石或介孔分子筛可为氧化还原蛋白质提供一个类似于天然状态的微环境, 通过分子筛的传输通道加速直接电子转移. 本文主要介绍在沸石和介孔分子筛上固定化的蛋白质的电子转移和生物传感, 并重点评述这些方面的研究进展、遇到的挑战及发展趋势.

[关键词] 蛋白质, 沸石, 介孔分子筛, 直接电子转移, 生物传感

[中图分类号] O 646.54 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2011)02-0054-06

Direct Electron Transfer of Proteins Immobilized on Zeolite/Mesoporous Molecular Sieves and Their Biosensing Applications

Liu Qian, Dai Zhihui

(School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract Direct electron transfer between redox proteins and electrodes is of practical and theoretical interest and can be improved by electrode or protein modification. The direct contact of protein with electrode surfaces can lead to a significant change of the protein structure and/or function. Immobilized microporous and mesoporous molecular sieves on electrode surfaces provides a microenvironment similar to that of the redox protein in native systems and gives the protein molecules more freedom in orientation, thus facilitating the direct electron transfer through the conducting tunnels of molecular sieves. This brief review focuses on the microporous and mesoporous molecular sieves used for protein immobilization, electron transfer and biosensing with emphasis on recent advances, challenges and trends.

Key words protein, zeolite, mesoporous sieves, direct electron transfer, biosensor

氧化还原蛋白质与电极之间的直接电子转移研究在分析化学上具有重要的意义, 而电化学方法已经广泛地应用在生物分子的电子转移方面. 把氧化还原蛋白质固定在生物相容性的电极表面, 将会表现出快速的电子转移过程, 可以不加入媒介体直接对底物进行电化学检测.

酶促反应产生的物质在电极上发生氧化或还原反应产生的电流信号, 在一定的条件下, 与被测物浓度呈线性关系. 因此, 氧化还原蛋白质和酶的直接电化学可以用来构建生物传感器^[1]. 对这些蛋白质氧化还原电位的测定和电子转移速率的研究有助于我们理解环境对生物化学功能的影响^[2]. 蛋白质由于氧化还原反应易发生构象改变, 通常需要高的活化能, 因此在固体电极上表现出很低的电子转移动力学性质^[3], 这使它们在裸电极上实现直接电化学行为变得很困难, 甚至不可能. 然而由于蛋白质在设计生物传感器和控制电化学反应方面具有重要的应用价值, 蛋白质和酶的直接电化学研究已经引起人们广泛的关注. 通过选择合适的电极材料、修饰材料和蛋白质的固定化过程, 可以得到蛋白质的直接电子转移过程.

沸石和介孔分子筛的优点之一是它们具有高的比表面积, 因此有利于表面试剂的相互作用. 将其固定在电极表面有助于增强表面的电化学活性并且提高传感器的灵敏度, 高的孔内比表面积也有利于构建新

收稿日期: 2011-02-28

基金项目: 国家自然科学基金(20875046)、教育部优秀人才支持计划(NCET-09-0159)

通讯联系人: 戴志晖, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物电分析化学. E-mail: daizhihui@njnu.edu.cn

颖的传感器。

1 蛋白质直接电子转移

1.1 蛋白质直接电子转移的电极材料

蛋白质与金属表面的直接接触通常会使蛋白质的结构、功能发生很大的变化, 使之失去生物活性^[4]。通过对电极^[5]或蛋白质^[6]的修饰, 能够实现蛋白质的界面性质。许多报道阐述了蛋白质在滴汞电极^[7]、金电极^[8]、ITO电极^[9]、石墨电极^[10]、碳电极^[11]和碳糊电极^[12]上的功能化过程。

自从 1977 年 Hill^[13] 和 Kuwana^[14] 首次报道了细胞色素 c 在氧化铟修饰电极上的直接电子转移, 许多具有生物相容性的材料被用来修饰电极表面, 例如聚酰胺凝胶、双十二烷基二甲基氯化铵^[15]、交联葡聚糖^[16]、DNA^[17]、Nafion^[18]、生物膜-双十四酰基卵磷脂^[19]和聚酰磺酸^[20]等。这些电极材料给氧化还原蛋白质提供了类似于天然状态的微环境, 促进了蛋白质和电极之间的直接、可逆的电子转移, 同时也不需要加入电子媒介体^[21]。

近来用于蛋白质的直接电子转移和保持生物活性的无机多孔材料越来越引起人们的关注^[22]。它们具有层状稳定结构, 其中由于沸石和介孔分子筛具有规则、大的孔结构, 良好的机械强度、热化学稳定性、生物相容性和高的负载量, 可以作为修饰电极材料, 构成电子传递环境, 并抑制生物降解。分子筛作为酶的固定材料, 可不需要交联剂而直接通过物理或化学反应与酶混合, 并被用来制作新的生物传感器^[23]。把沸石和介孔分子筛的择型性、离子交换性、热化学稳定性和现代电化学技术的高灵敏度性结合起来, 其性能可大大超过基于其他化学修饰电极所构建的传感器。

1.2 沸石与介孔分子筛的制备和性质

Y 型沸石是一种典型的微孔沸石, 属于八面体沸石。铝氧四面体/硅氧四面体形成一个孔径为 0.74 nm 的三维孔道的网状结构。化学组成用一般式表达为 $M_{x/z} [Al_x Si_{92-x} O]^{x-} \cdot yH_2O$, x, y, z 均为整数, M 代表可交换的阳离子。大量文献报道了 Y 型沸石的存在、合成、表征以及在不同领域中的应用^[24]。

由于 Y 型沸石的孔径较小, 近年来对孔径介于大孔和微孔之间的介孔分子筛的研究逐渐兴起。上世纪 90 年代 Mobil 公司首次合成了 M41S 介孔分子筛, 这种分子筛是带有 4 价正电荷的铵胶束与无机阴离子通过静电作用相互自组装形成的^[25]。目前已经陆续提出了多种介孔分子筛的合成方法^[26], 孔道约从 1.5 nm 到 100 nm 范围内, 它们具有高的比表面积, 可达 $1000 m^2/g$ 具有好的热力学稳定性, 为大分子反应、吸附和分离展示了广阔的发展前景。另一方面, 均一规则的纳米通道可用来做纳米粒子的微反应器, 为其尺寸效应、表面效应和量子效应提供了重要的基础。

1.3 蛋白质在沸石和介孔分子筛上的固定

蛋白质或酶在无机材料上的固定可以在更大程度上提高酶的稳定性^[27]。关于酶在无机材料上的固定主要有吸附、共价键合、配位、嵌入等方法^[28], 而将酶固定在分子筛上的主要方法是吸附。Balkus^[29]研究了不同尺寸的介孔分子筛 MCM-41、MCM-48、SBA-15 固定酶, 他们认为固定效率取决于酶和吸附剂的尺寸以及发生在孔内的固定化过程, 进一步研究发现在吸附后蛋白质仍能保持原来的活性。Chen^[30]研究了在 SBA-15 上辣根过氧化物酶 (HRP) 的吸附。在 SBA-15 上固定的 HRP 构成的生物传感器表现出了很好的灵敏度和稳定性。Pandya^[31]最近研究了淀粉酶在 MCF-153 和 MCF-335 上的吸附优于在 MCM-41 和 SBA-15 上的吸附。Zhu 研究了在 Au-SBA-15 上葡萄糖氧化酶 (GOD) 的固定以及葡萄糖生物传感器的构建^[32]。Stucky^[33]报道了伴清蛋白的吸附和释放, 指出被吸附在介孔上的蛋白质是稳定且具有活性的。近来在不同孔径的介孔材料上细胞色素 c 的吸附和活性已有报道^[34]。细胞色素 c 只吸附在具有大孔径的 MCM-41 的介孔分子筛上, 然而过氧化物的活性却与材料的孔径无关。

影响蛋白质在沸石和介孔分子筛上固定的因素有两个。第一是与蛋白质分子尺寸相关的介孔材料的孔径。MCM-41 型介孔材料可以作为小的球状酶, 例如肌红蛋白的载体^[35]。在有限的时间内, 在 MCM-41 孔内吸附的蛋白质的量随着蛋白质的分子量的增加而减少。Kisler 已经指出在 MCM-41 上吸附的速率在很大程度上取决于与生物分子尺寸范围相关的吸附分子大小^[32]。第二个因素是沸石、介孔分子筛和蛋白质表面特性。沸石、介孔分子筛和蛋白质表面电荷应该是互补的, 因为沸石、介孔分子筛和蛋白质之间的静电作用是影响吸附和脱附的重要因素之一。一些研究者研究了影响蛋白质表面性质的因素, 例如蛋白质

溶液的 pH 值、离子强度^[36]. Takahashi 认为分别用阳离子和非离子表面活性剂制成的 MCM-41 和 SBA-15 具有不同的表面性质, 因此具有不同的吸附性质. Lei 报道了合适的有机功能化介孔对带电荷的蛋白质分子会有很高的亲和力, 合适的微环境可导致特殊的固定化效率^[37]. Wright 等也已经研究了通过硫醇、氯化物、胺及羟基功能化的 SBA-15 的吸附和脱附性质, 发现酶与载体的相互作用在很大程度上取决于被加入的功能基团的性质^[38].

当前对于蛋白质或酶在沸石和介孔分子筛上的固定化主要有 3 种方法. 第一种方法是沸石或介孔分子筛被加到蛋白质溶液中, 搅拌混合物, 离心分离, 用去离子水冲洗, 真空干燥, 这样就得到了吸附在沸石或介孔分子筛上的蛋白质或酶. 产物被覆在电极表面来研究固定化的蛋白质或酶的直接电子转移或者基于直接电化学发展生物传感器. 第二种方法是在碳糊中混入沸石或介孔分子筛, 制成沸石或介孔分子筛修饰的碳糊电极. 碳糊电极是通过混合石墨粉与石蜡油制成的, 沸石或介孔分子筛修饰的碳糊电极上的蛋白质的固定化是把蛋白质和沸石或介孔分子筛与碳糊的混合物混合, 抛光表面^[39]. 另一种简单的方法是首先制作沸石或介孔分子筛胶体. 将沸石或介孔分子筛分散到水中得到它们的悬浮液. 然后和聚乙烯醇混合形成胶状的沸石或介孔分子筛溶液. 再将该溶液与蛋白质溶液滴于预处理过的玻碳电极表面. 被修饰的电极用二次蒸馏水冲洗两到三次以除去未被吸附的不稳定的蛋白质.

1.4 固定在沸石和介孔分子筛上的蛋白质的直接电子转移

沸石和介孔分子筛修饰电极的应用可分为 5 类, 即分子识别、电荷质量传递、电催化作用、电池和电分析. 我们主要介绍沸石和介孔分子筛修饰电极在蛋白质或酶的直接电子转移和生物传感方面的应用.

氧化还原蛋白质在不同电极上的异相电子转移阐明了生物电子转移的复杂机理. 沸石和介孔分子筛能够加速蛋白质与电极表面之间的电子转移, 且不需要外加电子媒介体或促进剂. 因此为 H_2O_2 和其他生物分子传感器的构建提供了很好的条件^[40].

细胞色素 c 在 Y 型沸石上显示可逆的电子转移, 而在细胞色素 c 与玻碳电极之间不发生电子转移^[41]. 在 pH 为 7 的磷酸盐缓冲溶液中细胞色素 c 在 NaY 修饰的电极上, 在电位为 -44 mV 时有一对稳定的氧化还原峰. 细胞色素 c 与 NaY 之间的相互作用使电位向负方向移动^[42]. NaY 为细胞色素 c 进行直接电子转移提供了一个类似于天然系统的微环境. 固定化的细胞色素 c 在 NaY 修饰电极上发生一质子一电子的表面控制过程.

介孔分子筛具有大的孔径可以用来修饰电极, 它们的孔径可调, 因此更适合酶的嵌入和负载. 我们研究了固定在六方介孔硅上的血红素类蛋白质、HRP 血红蛋白 (Hb), 肌红蛋白 (Mb) 和 GOD 的直接电子转移^[40-45]. 六方介孔硅是一种重要的介孔分子筛, 它具有规则的孔结构, 相对惰性的表面和相对狭窄的孔径分布. 由于它具有疏水的惰性表面, 当浸入溶液中, 其空穴不易被水分子占据, 更易于蛋白质的嵌入.

六方介孔硅的孔径取决于合成六方介孔硅的表面活性剂的种类. 十八烷基胺和十二烷基胺通常被用来作模板. 两者的孔径分别为 4.04 nm 和 3.35 nm. 由于孔径为 4 nm 和血红素类蛋白质的分子大小更加匹配, 因此在 4 nm 的六方介孔硅上嵌入的蛋白质分子更多. HRP、Hb、Mb 等在介孔分子筛修饰的电极上进行的是一质子一电子的表面控制可逆过程.

六方介孔硅与蛋白质之间的相互作用可以用红外光谱、氮气吸脱附实验来验证. 将介孔材料浸入蛋白质溶液可以用来固定蛋白质^[29]. 六方介孔硅的孔容量随着蛋白质的嵌入而降低, 且随着蛋白质分子的嵌入量不同孔容量下降的程度不同. 通过氮气吸附等温线可以看出嵌入的蛋白质分子的多少. 在 HRP、Mb 和 Hb 被负载之后, 六方介孔硅的孔容量分别下降了 31.2%、48.5%、15%, 表明蛋白质分子可以嵌入六方介孔硅的内部, 六方介孔硅为蛋白质的固定化提供了有效的材料.

红外光谱表明随着蛋白质在六方介孔硅上的吸附, 六方介孔硅中的 Si-O 伸缩振动向更高频方向移动, 这是由于蛋白质中的 NH_3^+ 分子与六方介孔硅中的 Si 的相互作用产生的.

细胞色素 c 固定在 Nb_2O_5 介孔材料上, Nb_2O_5 介孔材料的孔径易于与生物分子相匹配, 能够进行蛋白质的直接电化学, 表现出一对氧化还原峰^[46]. 此外固定在 TiO_2 介孔材料上的细胞色素 c 的电子转移的有效扩散系数为 $2 \times 10^{-14} m^2 \cdot s^{-1}$ ^[47]. 蛋白质在介孔分子筛 MCM-48 和 SBA-15 上是稳定的. 被固定的细胞色素 c 放置几个月后仍然能够保持其氧化还原性.

将沸石和介孔分子筛固定在电极表面, 使蛋白质分子处于一个类似于天然结构的微环境, 能够促进蛋

白质与电极之间的电子转移, 同时提高电极反应的可逆性。

2 基于沸石和介孔分子筛上蛋白质的固定构建无试剂生物传感器

首先是沸石修饰酶电极作为印刷电极传感器, 该传感器是将酪氨酸酶固定在掺杂沸石的聚亚胺酯水凝胶上。沸石的作用是通过离子交换把正电荷中间体固定在沸石上。对 8 种酚类化合物进行测定均具有较高的灵敏度。然而这种传感器不太稳定。沸石能够提高测定氧的性能。可以提高葡萄糖生物传感的线性范围, 这是由于沸石的亲水性造成的。几种不同交换度的 HY 沸石具有不同的亲水性, 可用来做酶修饰的碳糊电极^[48]。掺杂沸石的酪氨酸酶修饰电极的性质可用于对酚类化合物的测定。将葡萄糖氧化酶固定在脱铝沸石修饰的铂电极上也具有类似的效果。固定化的过程导致葡萄糖传感性能的提高^[48]。Wang^[49]等研究了用有序中孔 Si-SBA-15 和 Nafion 修饰电极来固定葡萄糖氧化酶。固定在 Si-SBA-15 和 Nafion 矩阵上的 GOD 表现了直接、可逆和表面可控的氧化还原反应。该传感器对氧气的还原表现了很好的电催化效果。Xie^[50]等研究了带正电荷的 Hb 和 Mb 与带负电荷的沸石粒子交替吸附到石墨电极表面构建传感器。自组装的多孔结构的蛋白质膜 {蛋白质/沸石}_n 对蛋白质的电化学起至关重要的作用, 对基底的催化也很有帮助。

由于沸石具有亲水性质, 将其和碳糊混合, 修饰的电极可用来构建第一代和第二代生物传感器。而蛋白质酶与电极之间的直接电子转移主要应用在无试剂即第三代生物传感器的构建上。这种方法不需要加入电子媒介体。基于沸石或孔材料修饰电极构建的第三代生物传感器很少。固定在 NaY 沸石和介孔分子筛上的蛋白质具有较好的电催化活性。细胞色素 c 固定在 NaY 修饰玻碳电极上对 H₂O₂ 有良好的电催化作用, 且具有较好的亲合力和灵敏度, 能消除其他共存离子的干扰, 具有良好的重现性和稳定性。沸石为生物传感器的构建提供了有效的基质。

细胞色素 c 固定在介孔材料上对 H₂O₂ 的测量有一个从 0.07 mM 到 5.0 mM 的宽的线性响应范围^[41]。细胞色素 c、HRP、Hb 和 Mb 固定在介孔材料上均可构建无试剂生物传感器, 均具有快速、灵敏的特点, 具有很好的稳定性和重现性。基于将 Hb 和 Mb 固定于介孔材料上还可构建 NO₂⁻ 生物传感器^[40, 43]。该传感器检测限低, 线性范围宽, 有很好的应用前景。将葡萄糖氧化酶固定在磁性碳介孔材料上构建的葡萄糖生物传感器可以在 0.6V (vs SCE) 检测葡萄糖^[51], 灵敏度高, 检测限低。因而介孔材料可用于蛋白质固定、直接电子转移和生物传感。

3 结论

沸石和介孔分子筛为蛋白质的直接电子转移的研究和生物传感的应用提供了有效的方法和新的材料, 它们为蛋白质提供了类似于天然的微环境, 加速了蛋白质通过纳米孔的传导而进行的电子转移。而基于蛋白质和电极之间直接电子转移基础上构建的生物传感器具有重要的应用前景。将来在这方面的研究工作主要侧重于提高传感器的灵敏度、选择性和稳定性。

[参考文献]

- [1] Wang JW, Wang LP, Di JW, et al. Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor[J]. *Talanta* 2009, 77(4): 1454-1459
- [2] Hong J, Moosavi-Movahedi A, Ghouchian H, et al. Direct electron transfer of horseradish peroxidase on Nafion-cysteine modified gold electrode[J]. *Electrochim Acta* 2007, 52(21): 6261-6267.
- [3] Yang WW, Li YC, Bai Y, et al. Hydrogen peroxide biosensor based on myoglobin/colloidal gold nanoparticles immobilized on glassy carbon electrode by a Nafion film[J]. *Sens Actuators B* 2006, 115(1): 42-48
- [4] Fan DH, Sun JY, Huang KJ. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase on Nafion/[bmim]PF₆/agarose composite film modified glassy carbon electrode[J]. *Colloid Surface B* 2010, 76(1): 44-49
- [5] Ansari A, Solanki PR, Malhotra BD. Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized nanostructured cerium oxide film[J]. *J Biotechnol* 2009, 142(2): 179-184
- [6] Guo MM, Yang YH, Wang ZJ, et al. A mediator-free horseradish peroxidase biosensor based on concanavalin A[J]. *Chin*

- J Anal Chem, 2006, 34(3): 399-402
- [7] Luo D, Huang JX. Determination of cytochrome c and other heme proteins using the reduction wave of mercury protoporphyrin π groups generated by a hydroxylamine induced replacement reaction[J]. Anal Chem, 2009, 81(5): 2032-2036
- [8] Kartashov A V, Serafini G, Dong M D, et al. Long-range electron transfer in recombinant peroxidases anisotropically oriented on gold electrodes[J]. Phys Chem & Chem Phys, 2010, 12(34): 10098-10107.
- [9] Wang JW, Wang L P, Di JW, et al. Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor[J]. Talanta, 2009, 77(4): 1454-1459
- [10] Haghighi B, Hamidi H, Gorton L. Electrochemical behavior and application of Prussian blue nanoparticle modified graphite electrode[J]. Sens Actuators B, 2010, 147(1): 270-276
- [11] Ping J F, Ru S P, Fan K, et al. Copper oxide nanoparticles and ionic liquid modified carbon electrode for the non-enzymatic electrochemical sensing of hydrogen peroxide[J]. Microchim Acta, 2010, 171(1/2): 117-123
- [12] Liu L, Guo L P, Bo X J, et al. Electrochemical sensors based on binuclear cobalt phthalocyanine/surfactant/ordered mesoporous carbon composite electrode[J]. Anal Chim Acta, 2010, 673(1): 88-94
- [13] Eddows M J, Hill H A O. Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c[J]. J Chem Soc Chem Commun, 1977, 21: 771-772
- [14] Yeh P, Kuwana T. Reversible electrode reaction of cytochrome c[J]. Chem Lett, 1977, 6(10): 1145-1148
- [15] Guo Z M, Chen J, Liu H, et al. Direct electrochemistry of hemoglobin and myoglobin at didodecyl dimethylammonium bromide-modified powder microelectrode and application for electrochemical detection of nitric oxide[J]. Anal Chim Acta, 2008, 607(1): 30-36
- [16] Fan C, Wang H, Sun S, et al. Electron-transfer reactivity and enzymatic activity of hemoglobin in a SP sephadex membrane[J]. Anal Chem, 2001, 73(13): 2850-2854
- [17] Zhang Q, Qiao Y, Hao F, et al. Fabrication of a biocompatible and conductive platform based on a single-stranded DNA/graphene nanocomposite for direct electrochemistry and electrocatalysis[J]. Chem Eur J, 2010, 16(27): 8133-8139
- [18] Hong J, Moosavi-Movahedi A A, Ghourchian H, et al. Direct electron transfer of horseradish peroxidase on Nafion-cysteine modified gold electrode[J]. Electrochim Acta, 2007, 52(21), 6261-6267.
- [19] Li G P, Du L W, Chen H J, et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin in lipid film incorporated with room-temperature ionic liquid[J]. Electroanalysis, 2008, 20(20): 2171-2176
- [20] Al-Ahmed A, Ndangili P M, Jahed N, et al. Polyester sulfonic acid interstitial nanocomposite platform for peroxide[J]. Sensors, 2009, 9(12): 9965-9976
- [21] Wang F, Chen X X, Xu Y X, et al. Enhanced electron transfer for hemoglobin entrapped in a cationic gemini surfactant films on electrode and the fabrication of nitric oxide biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23(2): 176-182
- [22] Zhou M, Shang L, Li B L, et al. The characteristics of highly ordered mesoporous carbons as electrode material for electrochemical sensing as compared with carbon nanotubes[J]. Electrochem Commun, 2008, 10(6): 859-863
- [23] Li Y H, Zeng X D, Liu X Y, et al. Direct electrochemistry and electrocatalytic properties of hemoglobin immobilized on a carbon ionic liquid electrode modified with mesoporous molecular sieve MCM-41[J]. Colloid Surface B, 2010, 79(1): 241-245
- [24] Townsend R P. Properties and Applications of Zeolites [M]. London: Chem Soc Spec Publ, 1980: 33
- [25] Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism[J]. Nature, 1992, 359(6397): 710-712
- [26] Navrotsky A, Tofmilk O, Levchenko A A. Thermochimistry of microporous and mesoporous materials[J]. Chem Rev, 2009, 109(9): 3885-3902
- [27] Cosnier S, Mousty C, Gondran C, et al. Entrapment of enzymes within organic and inorganic materials for biosensor applications: comparative study[J]. Mater Sci Eng C, 2006, 26(2/3): 442-447
- [28] Park M, Park S S, Selvaraj M, et al. Effective heavy metal removal through porous stainless-steel-net supported low siliceous zeolite ZSM-5 membrane[J]. Microporous Mesoporous Mater, 2009, 124(1/3): 76-83
- [29] Diaz J F, Balkus K J Jr. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve[J]. J Mol Catal B: Enzymatic, 1996, 2(2/3): 115-126
- [30] Chen C C, Do J S, Gu Y S. Immobilization of HRP in mesoporous silica and its application for the construction of polyaniline modified hydrogen peroxide[J]. Sensors, 2009, 9(6): 4635-4648
- [31] Pandya P H, Jasra R V, Newalkar B L, et al. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas[J]. Microporous Mesoporous Mater, 2005, 77(1): 67-77
- [32] Zhang J J, Zhu J J. A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles-mesoporous silica composite for biosensing

- glucose[J]. *Sci China Ser B-Chem*, 2009, 52(6): 815-820
- [33] Han Y J, Stucky G D, Butler A. Mesoporous silicate sequestration and release of proteins[J]. *J Am Chem Soc*, 1999, 121(42): 9 897-9 898
- [34] Vinu A, Munugesan V, Tangemann O, et al. Adsorption of cytochrome c on mesoporous molecular sieves % Error figure (<http://pubs.acs.org/appl/literatum/publisher/achs/journals/entities/2009.gif>) is t in document influence of pH, pore diameter, and aluminum incorporation[J]. *Chem Mater*, 2004, 16(16): 3 056-3 065
- [35] Miyahara M, Vinu A, Arita K. Adsorption myoglobin on mesoporous silica molecular sieves: pore size effect and pore-filling model[J]. *Mater Sci Eng C*, 2007, 27(2): 232-236
- [36] Ho J, Danquah M K, Wang H T, et al. Protein loaded mesoporous silica spheres as a controlled delivery platform[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, 83(3): 351-358
- [37] Lei C H, Shin Y S, Liu J, et al. Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(38): 11 242-11 243
- [38] Yin H H P, Wright P A, Botting N P. Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2001, 15(1-3): 81-92
- [39] Walcarius A. Electroanalytical applications of microporous zeolites and mesoporous (organo) silicas: recent trends[J]. *Electroanalysis*, 2008, 20(7): 711-738
- [40] Dai Z H, Liu S Q, Ju H X, et al. Direct electron transfer and enzymatic activity of hemoglobin in a hexagonal mesoporous silica matrix[J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19(8): 861-867
- [41] Dai Z H, Liu S Q, Ju H X. Direct electron transfer of cytochrome c immobilized on a NaY zeolite matrix and its application in biosensing[J]. *Electrochim Acta*, 2004, 49(13): 2 139-2 144
- [42] Hawkridge F M, Kuwana T. Indirect coulometric titration of biological electron transport components[J]. *Anal Chem*, 1973, 45(7): 1 021-1 027
- [43] Dai Z H, Xu X X, Ju H X. Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized on a hexagonal mesoporous silica matrix[J]. *Anal Biochem*, 2004, 332(1): 23-31
- [44] Dai Z H, Liu S Q, Chen H Y, et al. Detection of trace phenol based on mesoporous silica derived tyrosinase-peroxidase biosensor[J]. *Electroanalysis*, 2005, 17(17): 1 571-1 577
- [45] Dai Z H, Ni J, Huang X H, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on a hexagonal mesoporous silica-MCM-41 matrix[J]. *Bioelectrochemistry*, 2007, 70(2): 250-256
- [46] Xiao Y, Ju H X, Chen H Y. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a colloidal/cysteine-modified gold electrode[J]. *Anal Biochem*, 2000, 278(1): 22-28
- [47] McKenzie K J, Marken F. Accumulation and reactivity of the redox protein cytochrome c in mesoporous films of T O₂ phytate[J]. *Langmuir*, 2003, 19(10): 4 327-4 331
- [48] Marko-Varga G, Burestedt E, Svensson C J, et al. Effect of HY-zeolites on the performance of tyrosinase-modified carbon paste electrodes[J]. *Electroanalysis*, 1996, 8(12): 1 121-1 126
- [49] Wang K Q, Yang H, Zhu L, et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified by Nafion and ordered mesoporous silica-SBA-15[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 58(1/4): 194-198
- [50] Xie Y, Liu H Y, Hu N F. Layer-by-layer films of hemoglobin or myoglobin assembled with zeolite particles: electrochemistry and electrocatalysis[J]. *Bioelectrochemistry*, 2007, 70(2): 311-319
- [51] Yu J J, Tu J X, Zhao F Q, et al. Direct electrochemistry and biocatalysis of glucose oxidase immobilized on magnetic mesoporous carbon[J]. *J Solid State Electrochem*, 2010, 14(9): 1 595-1 600

[责任编辑: 顾晓天]