

[化学年会·论文]

介孔分子筛上的蛋白质直接电化学*

戴志晖

鞠焜先

(南京大学化学系, 生命分析化学教育部重点实验室, 南京 210093)

摘要 将介孔分子筛用于不同含血红素蛋白质的直接电子传递研究, 分别研究了辣根过氧化物酶、血红蛋白和肌红蛋白在六方介孔硅(HMS)上的直接电化学, 探讨了介孔分子筛与这些蛋白质间的相互作用, 构建了过氧化氢和亚硝酸根的新型的生物传感器。这些工作扩展了HMS在蛋白质固定、直接电子传递研究和无试剂生物传感器制备方面的应用。

关键词: 蛋白质, 介孔分子筛, 直接电化学, 相互作用, 生物传感器

中图分类号: O646

研究氧化还原蛋白质(酶)与电极表面间的直接电子传递在生命、环境、能源和分析化学中具有重要的理论和实践意义, 已成为生物电化学研究最重要的发展方向之一^[1-4]。寻找有效的方法和手段实现氧化还原蛋白质(酶)的直接电化学, 以满足生物医学、环境监测和工业快速分析的需要, 将成为这个领域的发展趋势。

氧化还原蛋白质与裸露的金属表面直接接触通常会引起蛋白质的结构与功能发生变化, 并失去其生物活性^[5], 蛋白质变性后会影响到其它自由扩散分子的直接电子转移; 而且由于蛋白质和酶分子具有庞大的空间结构, 其氧化还原中心被多肽链所包围, 阻碍了蛋白质和酶在电极表面的直接电子转移。将氧化还原蛋白质固定在具有生物兼容性的电极表面, 可实现一个快速的电子传递反应, 利用这一性质可制得无试剂生物传感器。因此, 探索合适的电极材料^[6-7]和固定方法或对蛋白质进行修饰^[8]以实现直接电子传递具有重要意义。目前, 血红素类蛋白质的直接电化学已被广泛研究, 例如肌红蛋白的直接电化学已经在汞^[9]、甲基紫修饰金^[10]和氧化钼^[11-12]电极上得以实现, 但是它们的电化学行为不稳定且易受样品纯度和电极表面条件的影响。一些有机和生物大分子如DNA^[13]、DDAB^[14]和葡聚糖^[15]等也已用于蛋白质的固定, 但因为其溶胀现象, 检测信号的稳定性受到限制。无机多孔材料具

有物理刚性、化学惰性、可忽略的溶胀性和对光、化学、热与生物降解的高稳定性^[16], 在生物传感器的研制中愈来愈受重视。粘土^[17]、蒙脱土^[18]、多孔铝^[19]、溶胶凝胶^[20]和NaY分子筛^[21]等这些无机多孔材料已被用于蛋白质固定和直接电化学研究。其中分子筛因为具有规则的尺寸和空腔以及选择性、吸附性和催化能力而引起了人们的关注^[22], 其独特的结构和催化性质能为电子传递提供合适的环境, 并防止生物分子的失活^[22]。但是分子筛的孔径太小而且含有亲水性的铝, 蛋白质和酶只能在其外表面吸附, 需要引入表面活性基团来键合蛋白质和酶。这样就无法发挥分子筛独特的孔道作用, 且铝的存在使孔内和表面的空位都能吸附水, 不利于蛋白质和酶的固定。本文使用六方介孔硅分子筛固定蛋白质并进行直接电化学研究。六方介孔硅(HMS)最早由Tanev合成^[23], 其纳米级孔道大小可通过表面活性剂、辅助的反应物以及反应条件来调节^[24]。由于它大的表面积、疏水性以及可任意调变的孔道尺寸, 这种材料在多方面的用途已得到开发^[25-26], 但它在蛋白质或酶的固定与直接电化学研究方面的工作尚未见报道。介孔分子筛比微孔分子筛有大得多的孔径, 可以把蛋白质和酶有效地固定在电极表面, 介孔可使蛋白质和酶进行有效的电荷传递。本文为蛋白质直接电子传递研究与生物传感的构建提供了新途径。

2004-04-02 收到初稿, 2004-06-29 收到修改稿。 联系人: 鞠焜先 (E-mail: hxju@nju.edu.cn; Tel: 025-83593593)。 *国家杰出青年科学基金(20325518)、国家自然科学基金(20275017, 90206037)和教育部优秀青年教师资助计划项目

表1 HMS 的表征

Table 1 Characterization of ODA-HMS and DDA-HMS

HMS	A_{BET} $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	V_{total} $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	a_0 nm	D nm	L nm
ODA-HMS	718	0.57	6.54	4.04	2.50
DDA-HMS	943	0.53	5.11	3.35	1.76

A_{BET} : total specific surface area; V_{total} : total mesopore volume;
 a_0 : lattice parameter; D : mesopore diameter; L : wall thickness.
 HMS: hexagonal mesoporous silica; ODA: octadecylamine;
 DDA: dodecylamine

1 实验

1.1 HMS 合成与 HMS 胶的制备

HMS 的制备方法参见文献[23]。十八烷基胺(ODA)加入水和乙醇(摩尔比为 36:6.5)的混合溶液中,在 50 °C 搅拌至均匀,缓慢加入正硅酸乙酯(TEOS)使摩尔比为 1.0 TEOS:0.27 ODA:6.5 EtOH:36 H₂O,剧烈搅动 15 min,在 50 °C 时保存 24 h,冷却至室温,干燥,550 °C 焙烧 6 h 得 ODA-HMS 白色粉末状固体。DDA-HMS 的制备和上述方法类似,仅仅将模板剂由 ODA 换成短链模板剂 DDA(十二烷基胺)。其晶胞参数、比表面积、壁厚、孔容以及孔径数据列于表 1。

30 mg HMS 分散在 10 mL 水中得到 3 g·L⁻¹ HMS 的悬浮液,取 100 μL 悬浮液和 5 μL 3% (w) 聚乙烯醇(PVA)溶液混合得 HMS 胶。

1.2 电极修饰

玻碳电极(GCE,直径 3 mm)在毛皮上用 0.3

μm 和 0.05 μm Al₂O₃ 悬浊液抛光,分别在丙酮和二次蒸馏水中超声清洗,室温下晾干。分别在 GCE 表面上滴加蛋白质和 HMS 胶,晾干,用二次蒸馏水洗涤 2~3 次,然后浸入 0.1 mol·L⁻¹,pH 7.0 的磷酸缓冲盐水(PBS)中扫描至得到蛋白质稳定的电化学响应。电极不用时,在 4 °C 的 0.1 mol·L⁻¹,pH 7.0 的 PBS 中保存。

1.3 仪器和方法

循环伏安和安培检测使用 270 电化学系统(EG&G, USA)。采用三电极系统,铂电极作为对电极,饱和甘汞电极作为参比电极,修饰电极作为工作电极,测定前溶液通氮除氧至少 10 min,测定时保持氮气氛。安培检测在搅拌体系中进行,测定 H₂O₂ 选择的工作电位为 -400 mV,NO₂⁻ 选择的工作电位为 -800 mV。NEXUS 670 (Nicolet) FT-IR 和 ASAP 2000 (Micromeritics, Norcross, GA)用于电极与材料的表征。

2 结果与讨论

2.1 血红素类蛋白质在 HMS 上的直接电化学

分别研究了血红素类蛋白质辣根过氧化物酶(HRP)、血红蛋白(Hb)和肌红蛋白(Mb)在 ODA-HMS 上的直接电化学。图 1A 的曲线 b 和曲线 c 分别为 HRP 固定在裸 GCE 和 ODA-HMS/GCE 上的循环伏安图。在 ODA-HMS/GCE 上,HRP 显示出明显的电化学响应,出现两对氧化还原峰,而在

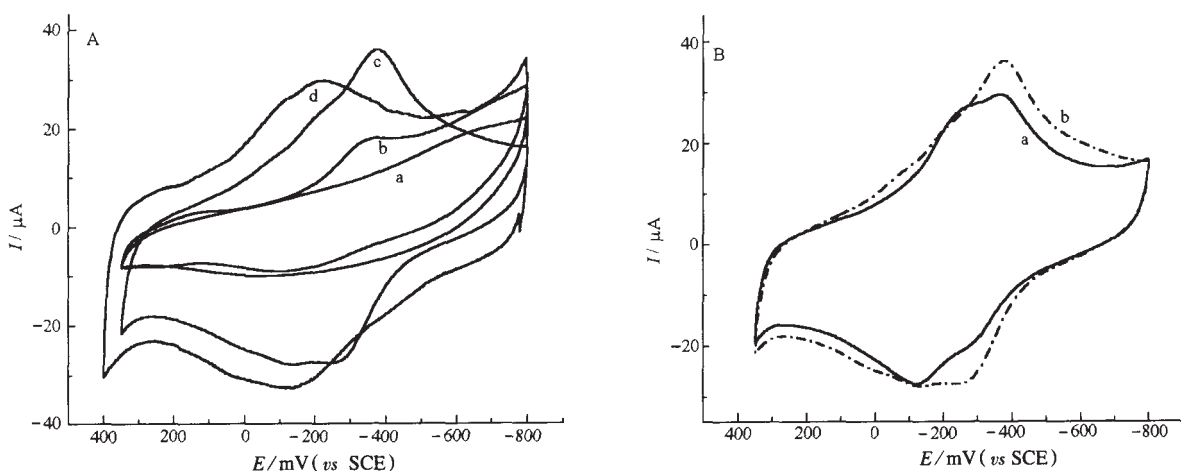


图1 ODA-HMS/GCE (A, a), HRP/GCE (A, b), HRP/ODA-HMS/GCE (A, c), Mb/ODA-HMS/GCE (A, d), HRP/ODA-HMS/GCE (B, a)和 HRP/DDA-HMS/GCE (B, b)的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of ODA-HMS/GCE (A, a), HRP/GCE (A, b), HRP/ODA-HMS/GCE (A, c), Mb/ODA-HMS/GCE (A, d), HRP/ODA-HMS/GCE (B, a) and HRP/DDA-HMS/GCE (B, b)

GCE: glassy carbon electrode, HRP: horseradish peroxidase, Mb: myoglobin;

PBS: (phosphate-buffered saline) 0.1 mol·L⁻¹, pH 7.0; scan rate: 100 mV·s⁻¹

裸 GCE 上只有一个很小的还原峰, 表明 HMS 的存在促进了 HRP 与电极间的直接电子传递. ODA-HMS/GCE 在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的 PBS 中无电化学响应(图 1A 曲线 a), 因此, 这两对峰是由固定化 HRP 的电活性中心产生的. 由于 HRP 的分子尺寸和 ODA-HMS 的孔径匹配, 且孔内比表面积比外表面大得多, 大部分 HRP 分子可进入 ODA-HMS 的孔道内部, 只有少数 HRP 分子吸附在外表面. 在循环伏安图上电位较负、电流响应较大的氧化还原峰对应于进入孔道内部的 HRP, 而电位较正、电流响应较小的氧化还原峰则对应于吸附在外表面的 HRP, 式量电位分别为 -0.315 V 和 -0.161 V . 用孔径为 3.35 nm 的 DDA-HMS 代替 ODA-HMS (孔径为 4.04 nm), 电位较负的那对氧化还原峰的电流响应变小, 而另一对峰的电流响应变大(图 1B), 因此嵌入孔内的 HRP 的量和介孔材料的孔径有关. 固定化 HRP 的峰电流和电位扫速的一次方成正比, 式量电位随溶液 pH ($5.5 \sim 9.3$) 变化的斜率为 -54.5 mV/pH , 因此, 该电极过程是一个质子参与的表面控制过程, 而质子的扩散速率是很快的.

Hb 在 ODA-HMS/GCE 上也有明显的电化学响应, 而 Hb/GCE 上的响应电流很小且只有不可逆的还原峰, HMS 同样加速了 Hb 电活性中心和电极表面的电子传递. Hb 的分子尺寸较 ODA-HMS 的孔径稍大, 大部分 Hb 分子吸附在 ODA-HMS 的外表面, 只有很少数的 Hb 分子可进入 ODA-HMS 的孔道内部, 因此在循环伏安图上对应于进入孔道内

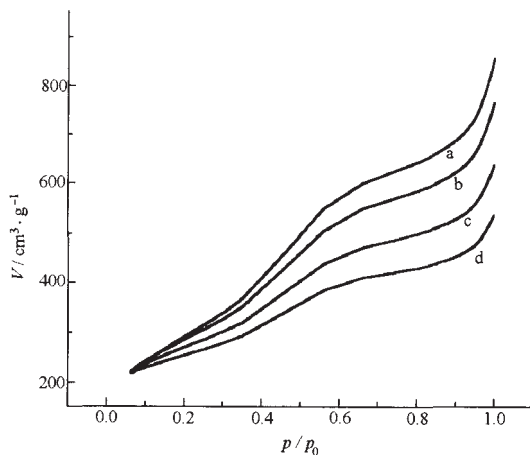


图 2 ODA-HMS(a)和固定 Hb(b)、HRP(c)和 Mb(d)后 ODA-HMS 的 N_2 吸附等温线

Fig. 2 N_2 adsorption isotherms of ODA-HMS before (a) and after immobilization of Hb (b), HRP (c) and Mb (d)

Hb: hemoglobin

部的 Hb 的电流响应较小, 电流响应较大的氧化还原峰对应于吸附在外表面的 Hb, 其式量电位分别为 -0.232 V 和 -0.037 V , 电极过程也是一个质子参与的表面控制过程^[27].

与 HRP 和 Hb 类似, 固定化 Mb 的循环伏安图也出现两对氧化还原峰(图 1A, d), 式量电位分别为 -0.167 V 和 -0.029 V , 它们对应于进入孔内和吸附在外表面的 Mb 的氧化还原. Mb 的尺寸较小, 大部分 Mb 分子进入 ODA-HMS 的孔内, 因此相应的电流响应也较大. 电极过程也是一个质子参与的表面控制过程^[28]. GCE 用 ODA-HMS 修饰后为蛋白质与电极的接触并保持其生物活性提供了一个生物相容界面, 加快了蛋白质与电极之间的电子传递速率, 改善了电极反应的可逆性.

2.2 蛋白质和 HMS 间的相互作用

将介孔材料浸入蛋白质溶液中, 蛋白质即可进入介孔材料的孔内^[29]. 图 2 为蛋白质固定前后的 N_2 吸附等温线, 固定 HRP、Mb 和 Hb 后, ODA-HMS 孔体积分别减小 31.2% 、 48.5% 和 15% , 说明蛋白质进入了 ODA-HMS 的孔道内部, 因此, HMS 是一种很好的固定蛋白质的材料.

由图 3 可以看出, ODA-HMS 在 1628 、 1089 、 968 和 805 cm^{-1} 有红外吸收, 其中 1628 cm^{-1} 的吸收峰对应于吸附水的 HOH 弯曲振动, 而其它吸收分别对应于 Si 基团的对称和非对称伸缩振动^[30], HRP 在 1651 和 1539 cm^{-1} 有红外吸收, 分别对应于酰胺 I 带和酰胺 II 带^[31], 在 HMS 上吸附后, ODA-

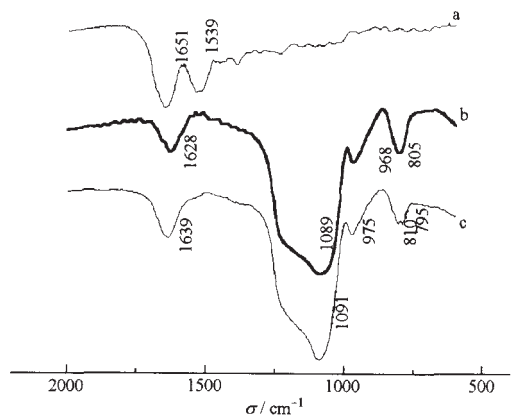


图 3 HRP (a), ODA-HMS (b)和 HRP/ODA-HMS (c)的 FT-IR 谱

Fig. 3 FT-IR spectra of HRP (a), HMS (b) and HRP/ODA-HMS (c)

HMS 的 1 089 和 968 cm^{-1} 两吸收峰移至 1 091 和 975 cm^{-1} , 805 cm^{-1} 吸收峰分裂成两个峰, 1 539 cm^{-1} 吸收峰完全消失, 这些变化说明 HMS 和 HRP 之间有强烈的相互作用.

1 089 和 968 cm^{-1} 向高频移动是由于 HRP 嵌入引起的扩孔效应, 这是由于 HRP 和 HMS 内壁的某些位点作用的结果.

2.3 直接电子传递的生物传感

利用 HRP 在 HMS 上直接电子传递构建的 H_2O_2 传感器在 5 s 内电催化响应可达稳态电流的 95%, 比 HRP 在钛凝胶^[20]和硅凝胶^[32]中的响应要快得多. 在最佳实验条件下, H_2O_2 检测的线性范围为 0.2 ~ 42 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相关系数为 0.9994 ($n = 22$), 从斜率 2.33 $\mu\text{A} \cdot (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ 可求得在 3σ 时, 检出限为 $1.7 \times 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 比聚邻氨基酸修饰电极的检出限 $8.5 \times 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[33] 还要低. 如此低的检测限是由 HMS 孔内大的比表面积和高负载量引起的. 当 H_2O_2 的浓度超过 42 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 可观察到一个平台, 显示 Michaelis-Menten 动力学机理的特征, HRP/HMS 对 H_2O_2 的米氏常数 ($K_{\text{M}}^{\text{app}}$) 为 $(0.260 \pm 0.012) \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 比 HRP 固定在硅凝胶上的 4.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[34], 钛凝胶上的 1.89 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[25], 自组装单层修饰金电极上的 2.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[33] 和溶液中的 11 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[35] 小很多. 因此, 被固定在 HMS 上的 HRP 对 H_2O_2 有很好的亲和性, HMS 的内壁为保持酶的生物活性提供了合适的微环境.

Hb/HMS/GCE 对 H_2O_2 的 $K_{\text{M}}^{\text{app}}$ 为 12.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在最佳反应条件下, 该传感器测定 H_2O_2 的线性范围为 0.4 ~ 6.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 3σ 时, 其检测限为 $1.86 \times 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

HRP/HMS/GCE 和 Hb/HMS/GCE 放置在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的 PBS 中一周, 对 H_2O_2 的催化电流均不发生改变, 一个月后, H_2O_2 传感器分别保持 95% 和 96% 的活性, 因此, HMS 对于保持固定化的 HRP 和 Hb 的生物活性是很有效的, 并可防止它们的漏出. 同时制备四根 HRP/HMS 电极检测 0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 时的相对标位偏差 (RSD) 为 4.3%; 六根 Hb/HMS 电极检测 4.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 的 RSD 为 4.6%, 均显示良好的制作重复性.

Mb/HMS/GCE 对 H_2O_2 的 $K_{\text{M}}^{\text{app}}$ 为 0.065 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在最佳反应条件下, 该传感器测定 H_2O_2 的线性范围为 4.0 ~ 124 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 3σ

时, 检测限为 $6.2 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 同时制备六根电极检测 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 的 RSD 为 4.2%. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的 PBS 中放置 52 天, 该传感器能保持 95% 的活性, 而在空气中仅保持 84.5% 的活性. 在 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的 PBS 中放置 3 个月, H_2O_2 传感器仅失去 8% 的活性, 该传感器有很好的稳定性.

利用固定于 HMS 上 Hb 和 Mb 的直接电化学, 可以检测 NO_2^- . Hb/HMS/GCE 对 NO_2^- 的 $K_{\text{M}}^{\text{app}}$ 为 49.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 显示出很好的亲和力. 在最佳反应条件下, 该传感器测定 NO_2^- 的线性范围为 0.2 ~ 3.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 在 3σ 时, 其检测限为 $6.11 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 一个月后, NO_2^- 传感器保持 93% 的活性. Mb/HMS 修饰 GCE 对 NO_2^- 的 $K_{\text{M}}^{\text{app}}$ 为 0.72 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 测定 NO_2^- 的线性范围为 8.0 ~ 216 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $8.0 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 同时制备六根电极检测 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_2$ 的 RSD 为 5.2%. 该传感器也有很好的稳定性, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的 PBS 中放置 52 天, 能保持 95% 的活性, 放置 3 个月, 仅失去 11% 的活性.

3 结 论

HMS 是蛋白质固定及其直接电化学研究的新材料, 它为蛋白质分子提供了一个具有生物相容性的微环境, 使固定化蛋白质能与底物分子发生选择性相互作用. 利用固定化蛋白质的直接电子传递构建电化学传感器具有广阔的前景.

References

- 1 Armstrong, F. A.; Hill, H. A. O.; Walton, N. J. *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *21*: 407
- 2 Aguey-Zinsou, K. F.; Bernhardt, P. V.; Kappler, U. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*: 530
- 3 Elliott, S. J.; McElhaney, A. E.; Feng, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*: 11612
- 4 Willner, I.; Katz, E. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*: 1180
- 5 Yang, M.; Chung, F. L.; Thompson, M. *Anal. Chem.*, **1993**, *65*: 3713
- 6 Chattopadhyay, K.; Mazumdar, S. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **2001**, *53*(1): 17
- 7 Sevilla, J. M.; Pineda, T.; Román, A. J.; Madueño, R.; Blázquez, M. *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, *451*: 89
- 8 Heller, A. *Acc. Chem. Res.*, **1990**, *23*: 128
- 9 Bowden, E. D.; Hawkrige, F. M.; Blount, H. N. *Bioelectrochemistry*. New York: Plenum Press, 1985: 297
- 10 Stargardt, J. F.; Hawkrige, F. M.; Landrum, H. L. *Anal. Chem.*,

- 1978, 50: 930
- 11 Taniguchi, I. ; Watanabe, K. ; Tominaga, M. ; Hawkrige, F. M. *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, **333**: 331
- 12 Tominaga, M. ; Kumagai, T. ; Takita, S. ; Taniguchi, I. *Chem. Lett.*, **1993**, (10): 1771
- 13 Nassar, A. E. F. ; Rusling, J. F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, **118**: 3043
- 14 Chen, X. ; Hu, N. ; Zeng, Y. ; Rusling, J. F. ; Yang, J. *Langmuir*, **1999**, **15**: 7022
- 15 Fan, C. ; Wang, H. ; Sun, S. ; Zhu, D. ; Wagner, G. ; Li, G. *Anal. Chem.*, **2001**, **73**: 2850
- 16 Zhou, Y. L. ; Hu, N. F. ; Zeng, Y. H. ; Rusling, J. F. *Langmuir*, **2002**, **18**: 211
- 17 Lei, C. ; Lisdat, F. ; Wollenberger, U. ; Scheller, F. W. *Electroanalysis*, **1999**, **11**: 274
- 18 Fan, C. ; Zhuang, Y. ; Li, G. ; Zhu, J. ; Zhu, D. *Electroanalysis*, **2000**, **12**: 1156
- 19 Ikeda, O. ; Ohtani, M. ; Yamaguchi, T. ; Komura, A. *Electrochim. Acta*, **1998**, **43**: 833
- 20 Yu, J. ; Ju, H. *Anal. Chem.*, **2002**, **74**: 3579
- 21 Liu, B. ; Hu, R. ; Deng, J. *Anal. Chem.*, **1997**, **69**: 2343
- 22 Rolison, P. *Chem. Rev.*, **1990**, **90**: 867
- 23 Tanev, P. T. ; Chibwe, M. ; Pinnavaia, T. J. *Nature*, **1994**, **368**: 321
- 24 Kresge, C. ; Leonowicz, M. ; Roth, W. ; Vartuli, J. ; Beck, J. *Nature*, **1992**, **359**: 710
- 25 Corma, A. *Chem. Rev.*, **1997**, **97**: 2373
- 26 Mal, N. ; Fujiwara, M. ; Tanaka, Y. *Nature*, **2003**, **421**: 350
- 27 Dai, Z. H. ; Liu, S. Q. ; Ju, H. X. ; Chen, H. Y. *Biosens. Bioelectron*, **2004**, **19**: 861
- 28 Dai, Z. H. ; Xu, X. X. ; Ju, H. X. *Anal. Biochem.*, **2004**, in press
- 29 Diaz, J. F. ; Balkus, K. J. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1996**, **2**: 115
- 30 Anderson, M. W. ; Klinowski, J. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, **1986**, **82**: 1449
- 31 Kauppinen, J. K. ; Moffatt, D. J. ; Mantsch, H. H. ; Cameron, D. G. *Appl. Spectrosc.*, **1981**, **35**: 271
- 32 Bond, A. M. *Modern polarographic methods in analytical chemistry*. New York: Dekker, 1980, 27
- 33 Wang, J. ; Liu, J. ; Chen, L. ; Lu, F. *Anal. Chem.*, **1994**, **66**: 3600
- 34 Li, J. ; Tan, S. N. ; Ge, H. *Anal. Chim. Acta*, **1996**, **335**: 137
- 35 Ferri, T. ; Poscia, A. ; Santucci, R. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1998**, **44**: 177

Direct Electron Transfer of Protein Immobilized on Mesoporous Molecular Sieves Matrix*

Dai Zhi-Hui Ju Huang-Xian

(Department of Chemistry, Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, Ministry of Education of China, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract The direct electron transfer of different heme proteins immobilized on mesoporous molecular sieves was studied. The direct electrochemistry of horseradish peroxidase (HRP), hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb) immobilized on hexagonal mesoporous silica (HMS) was described, respectively. The immobilized heme proteins at modified glassy carbon electrodes (GCE) showed good direct electrochemical behaviors, which depended on the specific properties of the HMS. Two couples of redox peaks corresponding to the Fe(III) to Fe(II) conversion of the proteins intercalated in the mesopores and adsorbed on the surface of the HMS in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 PBS (phosphate-buffered saline), respectively, were observed. The amount of proteins intercalated in the mesopores of HMS was proved to be related to the porous size. The result showed the electrode processes to be surface-controlled electrode processes with a single proton transfer. The interactions between proteins and HMS were investigated by using FT-IR, N_2 adsorption isotherms and electrochemical methods, and the new biosensors of hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitrite (NO_2^-) were constructed. These works extended the application of HMS in immobilizing protein, the direct electron transfer of protein and the construction of reagentless biosensors.

Keywords: Proteins, Mesoporous molecular sieves, Direct electrochemistry, Interaction, Biosensors

Received: April 2, 2004; Revised: June 29, 2004. Correspondent: Ju Huang-Xian (E-mail: hxju@nju.edu.cn; Tel: 025-83593593). * The Project Supported by the National Outstanding Young Scientists Foundation (20325518), NSFC (20275017, 90206037) and the Specialized Research Fund for the Excellent Young Teachers from Ministry of Education of China