

基于壳聚糖的生物组装技术及应用研究进展

孟范平, 张爱静

中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266100

摘要: 壳聚糖是一种具有良好生物相容性、独特 pH 值响应性、易改性和易成膜特性的高分子材料。在生物组装技术中, 壳聚糖可作为多功能活性介体, 与生物组分和微加工装置连接, 制成高选择性、高灵敏度的生物微机电系统 (BioMEMS)。以下介绍了基于壳聚糖的 3 种生物组装技术——定向组装、酶促组装、自组装的制备原理和过程, 评述了基于壳聚糖的 BioMEMS 在生物、医学、环境领域中的应用现状, 并展望了今后的研究方向。

关键词: 定向组装, 酶促组装, 自组装, 生物微机电系统, 界面材料

Biofabrication with chitosan and its application progress

Fanping Meng, and Aijing Zhang

College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China

Abstract: Chitosan is a polymer with good biocompatibility, unique pH-responsive solubility, convenient modification and easier film-formability. Chitosan could serve as an active mediator between biological components and microfabricated devices to prepare biological micro electro mechanical systems (BioMEMS) with high selectivity and sensitivity. Recently, there has been a growing interest in BioMEMS based on biofabrication of chitosan. We reviewed the mechanisms and processes of three biofabrication methods based on chitosan, including directed assembly, enzymatic assembly and self-assembly. Current applications and research progress in biological, medical and environmental fields are also discussed. Finally, future research directions are prospected.

Keywords: directed assembly, enzymatic assembly, self-assembly, BioMEMS, interfacial material

生物组装技术 (Biofabrication) 是指利用生物衍生材料或生物催化剂作为加工助剂、结构材料构建微尺度组装体的技术^[1]。生物微机电系统 (Biological micro electro mechanical systems, BioMEMS) 则是指通过微加工和微电子技术构建的用于生物、医学等领域的微型集成系统^[2]。生物材料对生物组装技术的发展具有重要的促进作用, 因为生物材料具有精确的分子结构、独特的理化性质、高效高选择性的催化特性等诸多优点, 能够在微尺度构建具有大分

子结构的组装体^[1]; 其次, 生物组装技术可采用定向组装、酶促组装、自组装^[3]等多种方式。

壳聚糖 (Chitosan, CS) 是甲壳素分子脱乙酰基形成的直链型高分子聚合物, 在生物组装技术中作为连接生物组分和微加工装置的活性介体^[4,5], 广泛应用于 BioMEMS 的制备。以下介绍了 CS 在生物组装中的独特性能, 基于 CS 的生物组装原理和过程, 评述了基于 CS 的生物组装技术在 BioMEMS 方面的应用现状, 并对现存问题进行了分析。

Received: December 23, 2008; **Accepted:** March 23, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2001AA635130).

Corresponding author: Fanping Meng. Tel: +86-532-66782875; E-mail: fanpingm@tom.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2001AA635130) 资助。

1 CS 在生物组装中的独特性能

在 CS 分子中, 葡萄糖残基 C-2 位置上存在伯氨基(图 1), 使其在生物组装过程中表现出以下特殊性能。

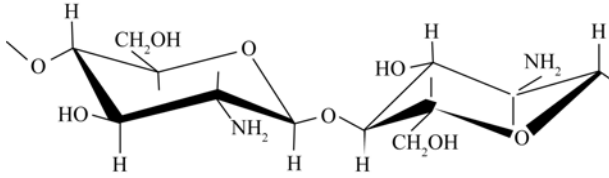


图 1 CS 的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of chitosan.

1.1 对 pH 值的响应特性

CS 的电荷状态和性能随 pH 值而变化。低 pH 值时, CS 的氨基发生质子化而带正电荷, 为可溶的阳离子聚电解质, 可以与阴离子聚电解质通过静电作用形成多聚复合物^[6,7]; 随 pH 值升高, CS 发生去质子化导致溶解度降低。因此, CS 对 pH 值具有响应的溶解特性, 并且其 pKa 近中性^[8], 有利于 CS 在生物组装中的应用。

1.2 易改性

CS 分子中的氨基活性较高, 能通过 N-烷基化、季铵化、接枝共聚、交联等反应, 与蛋白质、核酸等生物活性组分发生接枝或交联反应, 形成具有一定生物活性、机械性能的复合大分子^[9,10]。

1.3 易成膜

采用相转化、相分离、层层组装等方法, 可制得具有生物相容性好、亲水性强、无毒性、环境友好等优点的 CS 膜, 进一步与生物活性组分结合得

到多功能膜(表 1)。

2 基于 CS 的生物组装技术原理与过程

生物组装技术中组装方式主要包括: 定向组装(Directed assembly), 即应用外部刺激进行组装; 酶促组装(Enzymatic assembly), 即经酶催化反应构建大分子结构; 自组装(Self-assembly), 即生物分子内部结构信息和识别能力指导组装^[3]。在生物组装过程中, CS 独特的 pH 值响应特性和易成膜特性, 使其能够响应外部刺激进行定向组装, 并与其他组装方法相结合, 形成多功能活性界面, 实现生物组分与微加工装置的结合, 以消除两者之间的不相容性。

2.1 定向组装

传统的微制备技术依赖于光、机械等外部刺激^[17,18], 但目前更多采用电刺激进行制备。许多生物组分可对电刺激作出响应, 例如蛋白质、核酸等都可通过在电场中的定向泳动而进行分离测定。

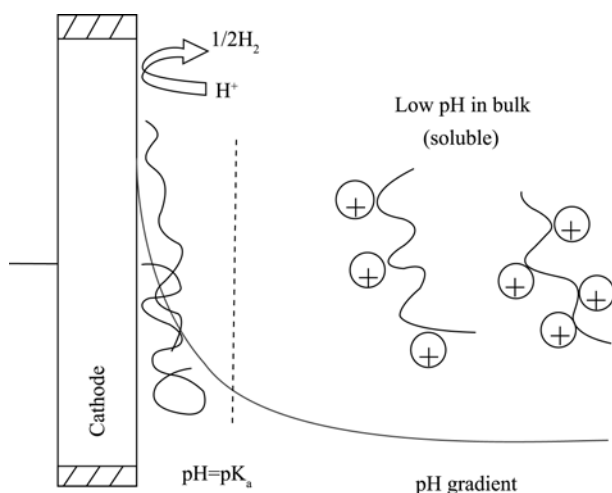
在电刺激作用下, CS 在装置表面发生电解沉积(Electrodeposition), 见图 2。其原理是: 在外加电压作用下, 阴极表面质子减少, 当 pH 值高于 CS 等电点时, CS 发生电解沉积形成薄膜或凝胶^[19]。沉积的薄层厚度从微米到毫米不等, 取决于沉积时间、CS 浓度、外接电压, 沉积速度与电流密度成正比^[19,20]。Wu 等^[21]研究表明, CS 能够选择性地沉积在图案化的硅晶片上, 沉积过程具有空间可控特征。CS 的电解沉积作用可使生物组分通过多种途径嵌入微加工装置中: 1)共沉积作用: CS 和生物组分的共同沉积能促使溶液中生物组分(如酶^[22,23]等)嵌入沉积薄层中; 2)先结合-后电解沉积: CS 首先与生物组分反应,

表 1 CS 制备成薄膜研究实例

Table 1 Research examples of CS's fabrication into membranes

Membrane composition	Fabrication method	Active component	Application	Reference
CNTs/TB/CS	Phase inversion method	GOD	Prepare a Glucose biosensor	11
CNTs/CS	Phase inversion method	GDH	Prepare a Glucose biosensor	12
CS/OPH polycation, CdSe QDs	LBL	...	Prepare an optical OPs biosensor	13
CS/DNA	LBL	AQDS	Electrochemical detection of natural DNA damage	14
CS/DS	LBL on the aminolyzed PTAT membrane	...	Resist the platelet adhesion, and prolong the blood coagulation times effectively	15
CS	Spin-coating	Lipid bilayers	The self-healing ability of chitosan-supported lipid membranes is stable	16

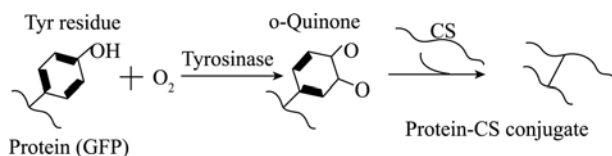
CNTs: carbon nanotubes; TB: toluidine blue; GOD: glucose oxidase; GDH: glucose dehydrogenase; OPH: organophosphorus hydrolase; QDs: quantum dots; LBL: layer-by-layer; OPs: organophosphorus pesticides; AQDS: 9,10-anthraquinone-2,6-disulfonate; DS: dextran sulfate; PTMAT: poly(tetramethylene adipate-co-terephthalate).

图2 CS 电解沉积原理示意图^[20]Fig. 2 Schematic diagram of CS's electrodeposition^[20]

形成的产物具有 pH 值响应特性, 通过电解沉积作用结合在微加工装置表面^[24-28]; 3) 先电解沉积-后结合: 电解沉积形成的 CS 膜具有一定活性, 经活化改性后与生物组分反应, 完成生物组装过程^[29-31]。

2.2 酶促组装

酶的催化反应具有高效性、高选择性特点, 广泛用于生物组装中^[32-34], 但是这些制备大多需要通过酶促水解以选择性地断开分子链, 或者需要辅助因子构建大分子结构。目前, 仅有少数既简单又不需要辅助因子构建大分子结构的酶类^[3]。例如, 图 3 中, 酪氨酸酶(Tyrosinase)可以催化分子氧化蛋白质的酪氨酸(Tyrosine, Tyr)残基, 形成的苯醌有较高活性, 进一步与 CS 的氨基发生接枝反应^[9]。因此, 通过酶催化反应, 可将蛋白质接枝到 CS 上构建生物大分子, 实现酶促组装。此外, 多种蛋白质^[24,25,27,35]可与 CS 进行酶促组装, 形成的接枝产物不仅保持了 CS 的 pH 值响应特性^[36], 还具有较强的机械性能和独特的生物特性。

图3 酪氨酸酶的酶催化反应原理^[35]Fig. 3 Schematic diagram of catalytic reaction of Tyrosinase^[35]

2.3 CS 酶促组装和定向组装相结合

生物组分经酶促组装能够构建生物大分子结构, CS 及其接枝产物经定向组装能选择性地结合在微加工装置表面, 因此依靠 2 种组装的结合可将生物组分嵌入微加工装置, 从而在 BioMEMS 中进行特定的生化反应。

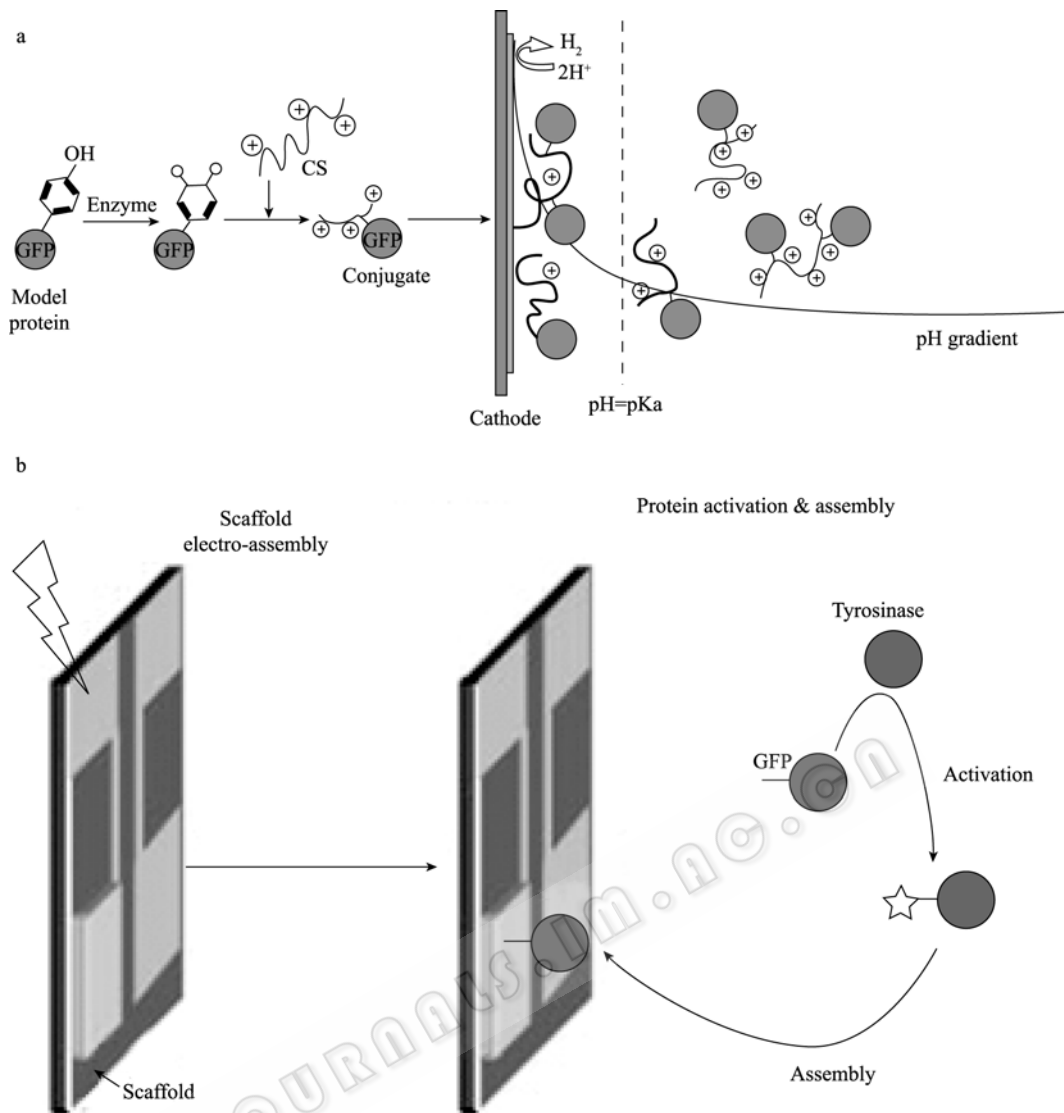
一方面, 蛋白质-CS 接枝产物具有 pH 值响应特性, 能够发生电解沉积。Chen 等^[35]采用绿色荧光蛋白(GFP)作为模式蛋白, 经酪氨酸酶活化后, 与 CS 形成接枝产物, 可电解沉积到微图案化的电极表面, 见图 4a。此时 GFP 仍保留荧光特性, 表明 GFP 经酶催化和电解沉积作用后, 其分子结构并未受损。Yi 等^[37]研究发现, 多种蛋白质能够依次定向组装在电极的不同区域, 实现空间选择性组装。

另一方面, 沉积的 CS 薄膜可以作为结合蛋白质的活性位点。Lewandowski 等^[29]采用与 Chen 等^[35]方向相反的过程(图 4b), 将沉积 CS 膜的电极浸入酪氨酸酶和 GFP 溶液中, 经酶活化的 GFP 共价组装到膜上, 实现生物组分的空间定向组装。与上述方法相比, 该表面组装方法中蛋白质不依赖于 pH 值, 能更好地保持生物活性, 适于对酸碱敏感的生物组分; 且该方法提高了组装过程的空间选择性和方向可控性, 增强了膜表面活性, 因而在应用中具有较大优势。

酶促组装和定向组装的结合可使生物组分嵌入微加工装置中, 在生物医学领域具有重要应用价值。Luo 等^[27]将 S-腺苷高半胱氨酸核苷酶(S-adenosylhomocysteine nucleosidase, Pfs)-CS 共价接枝产物定向组装在微流控通道上, 酶在界面上保持较高活性, 能够催化代谢途径, 为寻找抗菌药物提供新型组装模式。Shi 等^[28]将生物素(Biotin)-CS 接枝产物电解沉积在电极表面, 借助生物素与亲和素之间的高度亲和力, 使链霉亲和素(Streptavidin)结合在电极表面上, 作为目标蛋白组装的介质, 此组装过程目标蛋白既不需溶于 CS 溶液, 也不需要高 pH 值环境, 克服了现有组装方法的不足。

2.4 自组装和 CS 定向组装相结合

生物分子(如核酸、微管蛋白、病毒粒子等)基于分子内部结构信息能够以共价键或非共价键自组装合成超分子结构, 在微米、纳米尺度上实现生物组装^[3]。自然界中许多生物材料^[38-40]可以进行自组装,

图 4 酶促组装和定向组装的结合^[3,29]Fig. 4 Coupling enzymatic assembly with directed assembly^[3,29]

作为生物组装的构建模块。自组装为生物组装技术提供了“自底至上”制备大分子结构的方法，很好地克服了传统微加工技术的缺陷^[41]。但是，仍不能用于生物组分与装置界面的结合^[42]。CS 能够响应信号进行定向组装，还易被活化改性，可作为装置与生物自组装系统的软连接体^[5]，即：在微加工装置界面上，通过对电解沉积的 CS 薄膜活化，使其与生物组分结合，产生连接自组装系统的识别位点。Yi 等^[42]用戊二醛将单链 DNA(ssDNA)共价交联到电解沉积的 CS 薄膜上，实现自组装和定向组装的结合，见图 5。带有氨基末端的 ssDNA 探针可与具有互补序列且荧光标记的核酸进一步杂交^[30]。此芯片浸入变性环境后，能进行可逆的解组装过程。由此可见，电解沉积的 CS 薄膜为 DNA 探针和微加工装置的结

合提供了一个良好的界面，DNA 探针成为可逆自组装的识别位点。Yi 等^[31]将 ssDNA 探针结合在电解沉积 CS 膜上，然后解组装荧光标记的烟草花叶病毒粒子，暴露出 5'-末端的 RNA 可与具有互补序列的 ssDNA 杂交，表明 ssDNA 可以作为捕获病毒粒子的识别位点，在利用病毒粒子模板构建纳米器件中具有潜在的应用前景^[43]。

3 基于 CS 的生物组装技术在 BioMEMS 中的应用

3.1 制备生物传感器

生物传感器(Biosensor)是以生物活性组分作为敏感单元，高度选择性识别目标物质，并转换成一定信号输出的分析装置，具有选择性好、灵敏度高、

分析速度快、成本低、能在线连续监测等特点^[44]。CS 作为一种良好的活性界面材料, 通过与生物活性组分共沉积、电解沉积 CS 膜与生物组分结合等方式, 连接生物组分和传感器电极, 由此制备的生物传感器不仅能够保持生物组分活性, 提高传感器的灵敏度, 还有利于传感器的微型化, 可用于医学诊断、环境监测等领域(表 2)。

3.2 制备生物芯片

生物芯片是指通过微加工和微电子技术在固相基质表面构建的微型生物化学分析系统。微流控芯片(Microfluidic chip)又称芯片实验室(Lab-on-a-chip), 是以分析生物化学为基础, 以微加工技术为依托, 以微管道网络为结构特征, 将采样、生化反应、分离、检测等功能集约化形成的微全分析系统, 具有

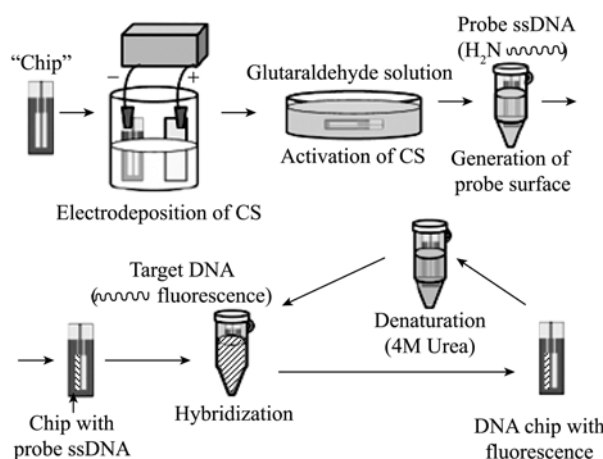


图 5 CS 定向组装和核酸自组装的结合^[30]

Fig. 5 Coupling directed assembly with self-assembly of nucleic acid^[30]

表 2 CS 的生物组装技术在生物传感器中的应用实例

Table 2 Applications of biofabrications based on chitosan in biosensor

Biological components	Assembly method	Microfabricated device	Recognition material	Biosensor type	Reference
CS/GOD/GNPs	co-deposition	Au electrode	Glucose	Amperometric	22
CS/GOD/CNTs	co-deposition	Au electrode	Glucose	Amperometric	23
CS/AChE	electrodeposition-enzyme conjugation	Au electrode	OPs	Amperometric	45
CS/GNPs/AChE	CS/GNPs co-deposition-enzyme conjugation	Au electrode	OPs	Amperometric	46
CS/HRP/BMIMBF ₄	co-deposition	Au electrode	H ₂ O ₂	Amperometric	47
CS/HeNTs	co-deposition	Au electrode	H ₂ O ₂	Amperometric	48
CS/HBsAb	CS electrodeposition-HBsAb conjugation	ITO electrode	HBsAg	Immunosensor	49
CS/DNA	CS electrodeposition-ssDNA conjugation	Microcantilever	Target DNA hybridization	Microcantilever sensors	10

GNPs: gold nanoparticles; AChE: acetylcholinesterase; HRP: horseradish peroxidase; BMIMBF₄: ionic liquid, 1-butyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate; HeNTs: hematite nanotubes; HBsAb: hepatitis B surface antibody; HBsAg: hepatitis B surface antigen; ITO: indium tin oxides.

体积小、微量分析、反应速度快、大量平行处理等优点, 适于基因检测和药物筛选^[50]。微流控芯片的核心部件是生化反应微系统, 由生物组分结合到微流控通道(Microfluidic channels, MFC)上构成。通过在 MFC 中电解沉积 CS 或其接枝产物, 可以实现生物组分嵌入 MFC 的目的。

Powers 等^[51]将 ITO 电极固定在 MFC 侧向, 然后将荧光素标记的 CS 选择性电解沉积在电极上, 通过捕获 MFC 侧向的荧光信号测定生物组分, 证明将 CS 及生物组分选择性结合在 MFC 上制备微流控芯片是可能的。Luo 等^[27]通过将 Pfs-CS 接枝产物定向组装在 MFC 特定位点上, 构建了微流控 BioMEMS。研究表明, Pfs-CS 组装过程可逆, 酶在

MFC 界面上保持较高活性, 能够催化代谢途径, 为构建筛选抗菌药物的 BioMEMS 提供了新型组装模式。Lewandowski 等^[29]首次报道在 MFC 中原位活化法组装蛋白质, 首先在 MFC 的特定位点上电解沉积 CS, 再泵入 GFP 和酪氨酸酶, 经酶原位活化后的 GFP 共价结合在 CS 膜上, 荧光强度随时间不断增强达到最大值, 且经缓冲液淋洗后 GFP 仍稳定结合在膜位点上。

4 结论和展望

CS 是具有 pH 响应特性的氨基多糖, 能够识别电刺激电解沉积形成薄层; 经酶促组装可与蛋白质结合构建大分子; 经交联反应结合核酸作为体系自

组装的结合位点; CS 作为活性界面材料可将生物组分组装在微加工装置特定定位点上, 这些优点使得 CS 在 BioMEMS 的制备中备受关注, 基于 CS 的生物组装技术取得了较大发展, 但目前仍停留在基础研究阶段。存在的问题和下一步研究方向归纳如下:

1) 目前, CS 与模式蛋白、模式核酸的组装过程研究已初步证明利用 CS 进行生物大分子组装方式的可能性, 今后应在加强各组装方法机理研究的基础上, 进一步引入其他生物活性组分(如水解酶、抗体、抗原等)与 CS 进行组装, 拓宽 CS 在生物组装技术中的应用。

2) 虽然对外部电刺激指导 CS 定向组装的机制进行了较深入研究, 掌握了电解沉积条件对组装过程的影响规律, 但目前尚无有关电解沉积薄膜的物理化学特性的研究, 今后应加强研究其电化学性质, 以提高经电解沉积 CS 制备的电化学生物传感器的性能。

3) 酶促组装中酪氨酸酶催化形成的醌类活性较高, 能进行一系列复杂的副反应, 影响酶在生物组装中的功能, 因此应进一步研究提高酶转换效率、减少副反应、增强活性界面反应可控性等的方法。

4) 基于 CS 的生物组装技术在微流控芯片中的应用尚处于起步阶段, 仅限于少数模式蛋白的组装。今后应注重在微流控装置中组装其他生物分子(如抗体、抗原、酶等), 构建不同种类的反应微系统, 并在界面多位点上组装多种生物分子以同时进行不同种类的生化反应, 提高微流体技术在药物筛选、环境监测中的工作效率。

5) 生物组装技术的发展, 将为构建微型分析系统提供有力的技术支持, 进一步促进向纳米尺度发展, 推动生物微机电系统(BioNEMS)的制备, 从而在生物、医学、环境领域发挥更大的作用。

REFERENCES

[1] Wu LQ, Gregory FP. Biofabrication: Using biological materials and biocatalysts to construct nanostructured assemblies. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(11): 593-599.
 [2] Urban GA. BioMEMS. Beijing: Science Press, 2007.
 Urban GA. 生物微机电系统. 北京: 科学出版社, 2007.
 [3] Yi HM, Wu LQ, William EB, *et al.* Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, 2005, **6**(6): 2881-2894.
 [4] Wu LQ, Fernandes R, Yi HM, *et al.* Chitosan at the interface of microfabrication and biotechnology. *Adv*

Chitin Sci, 2003, **7**: 146-149.

- [5] Gregory FP, Srinivasa RR. Chitosan: A soft interconnect for hierarchical assembly of nano-scale components. *Soft Matter*, 2007, **3**(5): 521-527.
 [6] Zong L, Chen LL, Zhang SY, *et al.* Chitosan nanoparticles as gene vector for mucosa vaccination: Preparation, characterization and ability to protect plasmid DNA. *J China Pharm Univ*, 2005, **36**(6): 526-530.
 宗莉, 陈伶俐, 张淑芸, 等. 壳聚糖纳米粒作为基因载体的研究: 制备, 特征和对 DNA 的保护. *中国药科大学学报*, 2005, **36**(6): 526-530.
 [7] Richert L, Lavalle P, Payan E, *et al.* Layer by layer buildup of polysaccharide films: Physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir*, 2004, **20**(2): 448-458.
 [8] Rinaudo M, Pavlov G, Desbrieres J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 1999, **40**: 7029-7032.
 [9] Chen TH, Embree HD, Wu LQ, *et al.* In vitro protein polysaccharide conjugation: Tyrosinase-catalyzed conjugation of gelatin and chitosan. *Biopolymers*, 2002, **64**(6): 292-302.
 [10] Stephan TK, Michael AP, Yi HM, *et al.* Mechano-transduction of DNA hybridization and dopamine oxidation through electrodeposited chitosan network. *Lab Chip*, 2007, **7**: 103-111.
 [11] Wang CC, Yang MH, Lu YS, *et al.* Preparation of a new glucose biosensor modified by multilayer carbon nanotubes composite membrane. *Chin J Sens Act*, 2007, **20**(1): 18-21.
 王存嫦, 阳明辉, 鲁亚霜, 等. 一种新的多层碳纳米管复合膜修饰的葡萄糖生物传感器制备. *传感技术学报*, 2007, **20**(1): 18-21.
 [12] Zhang MG, Smith A, Gorski W. Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes. *Anal Chem*, 2004, **76**(17): 5045-5050.
 [13] Constantine CA, Gattas-Asfura KM, Mello SV, *et al.* Layer-by-layer biosensor assembly incorporating functionalized quantum dots. *Langmuir*, 2003, **19**(23): 9863-9867.
 [14] Liu Y, Hu NF. Loading/release behavior of (chitosan/DNA) *n* layer-by-layer films toward negatively charged anthraquinone and its application in electrochemical detection of natural DNA damage. *Biosens Bioelectron*, 2007, **23**: 661-667.
 [15] Yu DG, Jou CH, Lin WC, *et al.* Surface modification of poly(tetramethylene adipate-co-terephthalate) membrane via layer-by-layer assembly of chitosan and dextran sulfate polyelectrolyte multilayer. *Colloid Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, **54**: 222-229.
 [16] Baumgart T, Offenhausser A. Polysaccharide-supported planar bilayer lipid model membranes. *Langmuir*, 2003, **19**(5): 1730-1737.
 [17] Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1998, **37**: 550-575.
 [18] Gates BD, Xu Q, Love C, *et al.* Unconventional nanofabrication. *Annu Rev Mater Res*, 2004, **34**: 339-372.
 [19] Wu LQ, Gadre AP, Yi HM, *et al.* Voltage-dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface. *Langmuir*, 2002, **18**(22): 8620-8625.
 [20] Fernandes R, Wu LQ, Chen T, *et al.* Electrochemically-

- induced deposition of a polysaccharide hydrogel onto a patterned surface. *Langmuir*, 2003, **19**(10): 4058–4062.
- [21] Wu LQ, Yi HM, Li S, *et al.* Spatially selective deposition of a reactive polysaccharide layer onto a patterned template. *Langmuir*, 2003, **19**(3): 519–524.
- [22] Luo XL, Xu JJ, Du Y, *et al.* A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Anal Biochem*, 2004, **334**(2): 284–289.
- [23] Luo XL, Xu JJ, Wang JL, *et al.* Electrochemically deposited nanocomposite of chitosan and carbon nanotubes for biosensor application. *Chem Commun*, 2005, **16**: 2169–2171.
- [24] Lewandowski AT, Small DA, Chen TH, *et al.* Tyrosine-based “activatable pro-tag”: enzyme-catalyzed protein capture and release. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**(6): 1207–1215.
- [25] Freddi G, Anghileri A, Sampaio S, *et al.* Tyrosinase-catalyzed modification of *Bombyx mori* silk fibroin: Grafting of chitosan under heterogeneous reaction conditions. *J Biotechnol*, 2006, **125**(2): 281–294.
- [26] Ahmed SR, Lutes AT, Barbari TA. Specific capture of target proteins by oriented antibodies bound to tyrosinase immobilized protein A on a polyallylamine affinity membrane surface. *J Membr Sci*, 2006, **282**: 311–321.
- [27] Luo XL, Lewandowski AT, Yi HM, *et al.* Programmable assembly of a metabolic pathway enzyme in a prepackaged reusable BioMEMS device. *Lab Chip*, 2008, **8**: 420–430.
- [28] Shi XW, Liu Y, Lewandowski AT, *et al.* Chitosan biotinylation and electrodeposition for selective protein assembly. *Macromol Biosci*, 2008, **8**: 451–457.
- [29] Lewandowski AT, Yi HM, Luo XL, *et al.* Protein assembly onto patterned microfabricated devices through enzymatic activation of fusion pro-tag. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **99**(3): 499–507.
- [30] Yi HM, Wu LQ, Ghodssi R, *et al.* A robust technique for assembly of nucleic acid hybridization chips based on electrochemically templated chitosan. *Anal Chem*, 2004, **76**(2): 365–372.
- [31] Yi HM, Nisar S, Lee SY, *et al.* Patterned assembly of genetically modified viral nanotemplates via nucleic acid hybridization. *Nano Lett*, 2005, **5**(10): 1931–1936.
- [32] Jang CH, Stevens BD, Carlier PR, *et al.* Immobilized enzymes as catalytically active tools for nanofabrication. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(41): 12114–12115.
- [33] Xu P, Kaplan DL. Horseradish peroxidase catalyzed polymerization of tyrosine derivatives for nanoscale surface patterning. *J Macromol Sci Pure Appl Chem*, 2004, **41**(12): 1437–1445.
- [34] Fernandes R, Yi HM, Wu LQ, *et al.* Thermo-biolithography: A technique for patterning nucleic acids and proteins. *Langmuir*, 2004, **20**(3): 906–913.
- [35] Vazquez DR, Tinoco R, D’Antonio P, *et al.* Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: smart biocatalysts and biocatalytic hydrogels. *Bioconjugate Chem*, 2001, **12**(2): 301–306.
- [36] Chen TH, David AS, Wu LQ, *et al.* Nature-inspired creation of protein-polysaccharide conjugate and its subsequent assembly onto a patterned surface. *Langmuir*, 2003, **19**(22): 9382–9386.
- [37] Yi H, Wu LQ, Ghodssi R, *et al.* Signal-directed sequential assembly of biomolecules on patterned surfaces. *Langmuir*, 2005, **21**(6): 2104–2107.
- [38] Yan H, Zhang X, Shen Z, *et al.* A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. *Nature*, 2002, **415**(6867): 62–65.
- [39] Patolsky F, Weizmann Y, Willner I. Actin-based metallic nanowires as bio-nanotransporters. *Nat Mater*, 2004, **3**(10): 692–695.
- [40] Mao C, Solis DJ, Reiss BD, *et al.* Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. *Science*, 2004, **303**(5655): 213–217.
- [41] Whitesides GM. The ‘right’ size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(10): 1161–1165.
- [42] Yi HM, Wu LQ, Sumner JJ, *et al.* Chitosan scaffolds for biomolecular assembly: Coupling nucleic acid probes for detecting hybridization. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **83**(6): 646–652.
- [43] Lee SY, Royston E, Culver JN, *et al.* Improved metal cluster deposition on a genetically engineered tobacco mosaic virus template. *Nanotechnology*, 2005, **16**: S435–S441.
- [44] Wu BL, Zhang GM, Gao CG, *et al.* Application and development of biosensors. *China Biotechnol*, 2004, **24**(7): 65–69.
武宝利, 张国梅, 高春光, 等. 生物传感器的应用研究进展. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(7): 65–69.
- [45] Du D, Ding JW, Cai J, *et al.* Determination of carbaryl pesticide using amperometric acetylcholinesterase sensor formed by electrochemically deposited chitosan. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, **58**: 145–150.
- [46] Du D, Ding JW, Cai J, *et al.* One-step electrochemically deposited interface of chitosan-gold nanoparticles for acetylcholinesterase biosensor design. *J Electroanal Chem*, 2007, **605**: 53–60.
- [47] Xi FN, Liu LJ, Wu Q, *et al.* One-step construction of biosensor based on chitosan-ionic liquid-horseradish peroxidase biocomposite formed by electrodeposition. *Biosens Bioelectron*, 2008, **24**: 29–34.
- [48] Gong JM, Wang LY, Zhao K, *et al.* One-step fabrication of chitosan-hematite nanotubes composite film and its biosensing for hydrogen peroxide. *Electrochem Commun*, 2008, **10**: 123–126.
- [49] Liang RP, Peng HZ, Qiu JD. Fabrication, characterization, and application of potentiometric immunosensor based on biocompatible and controllable three-dimensional porous chitosan membranes. *J Colloid Interf Sci*, 2008, **320**: 125–131.
- [50] Manz A, Harrison DJ, Elisabeth MJ, *et al.* Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip. *J Chromatogr A*, 1992, **593**: 253–258.
- [51] Powers MA, Koev ST, Schleunitz A, *et al.* A fabrication platform for electrically mediated optically active biofunctionalized sites in BioMEMS. *Lab Chip*, 2005, **5**: 583–586.