

基于功能化多壁碳纳米管的乙酰胆碱酯酶生物传感器制备

孙霞¹, 赵文革^{1,2}, 刘中合¹, 王相友^{1,*}

(1. 山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东 淄博 255049; 2. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 将功能化多壁碳纳米管(FCNTs)结合壳聚糖(CHIT)和戊二醛(GTA)导电聚合物形成凝胶溶胶, 将该凝胶溶胶悬滴在玻碳电极(GCE)表面制得 FCNTs-CHIT-GTA/GCE 电极, 结合自制的乙酰胆碱酯酶膜生成一种反应灵敏、快速、稳定、用于检测有机磷农药的电流型生物传感器。结果表明: 该传感器具有出峰电位低、峰流值高、电子传递速率高、阻抗值小等优点, 在研究不同浓度敌敌畏对酶抑制率的关系时, 得到的关系曲线线性良好, 最低检出限为 20ng/L。该传感器适用于有机磷农药残留跟踪检测。

关键词: 生物传感器; 乙酰胆碱酯酶; 有机磷农药残留; 功能化多壁碳纳米管

Preparation of Acetylcholinesterase Biosensor Based on Functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes for Pesticides Detection

SUN Xia¹, ZHAO Wen-ping^{1,2}, LIU Zhong-he¹, WANG Xiang-you^{1,*}

(1. School of Agricultural and Food Engineering, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China

2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: This paper describes the use of functionalized multiwalled carbon nanotubes (FCNTs) based conductive polymer for designing acetylcholinesterase (AChE) biosensor. Transducers were obtained by directly dropping the sol-gel solution formed from FCNTs, chitosan (CHIT) and glutaraldehyde (GTA) on the surface of glassy carbon electrode (GCE). Acetylcholinesterase (AChE) as bio-recognizer was immobilized onto a CHIT membrane to recognize pesticides selectively. Before the detection, the CHIT enzyme membrane was quickly fixed on the surface of FCNTs-CHIT-GTA/GCE with O-ring, and thus a sensitive, fast and stable amperometric sensor for quantitative determination of organophosphates (OP) was developed. The electrochemical behavior of AChE-FCNTs-CHIT-GTA/GCE was studied and the results showed the FCNTs-CHIT-GTA promoted electron-transfer reactions at a low potential and catalyzed the electro-oxidation of thiocholine, thus increasing detection sensitivity. Based on the inhibition of OP on AChE activity, using dichlorvos as a model pesticide, the biosensor had good linearity in the concentration range 25—50 ng/L and 50—100 µg/L with a correlation coefficient of 0.9995 and 0.9991, respectively. The detection limit was 20 ng/L. The biosensor exhibited high sensitivity and good reproducibility and stability, and it was suitable for trace detection of OP pesticide residue.

Key words: biosensor; acetylcholinesterase; pesticide residue; functionalized multi-walled carbon nanotubes

中图分类号: S481.8

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2012)04-0282-05

有机磷农药(OP)已广泛应用于农业生产以保护作物增产增收^[1], 有机磷农药的高毒性和在生物体内的可累积性造成了严重的危害^[2-3]。因而, 能够快速可靠测定、量化痕量级水平的有机磷农药残留对人类的健康日益重要。乙酰胆碱酯酶生物传感器因其简单快速, 选择性

高、相对成本较低等优点逐步替代了传统的农药残留检测方法^[4]。通过乙酰胆碱酯酶的酶活力降低指示有机磷农药的含量, 乙酰胆碱生物传感器在农药分析方面显示出令人满意的效果^[5-8]。将乙酰胆碱酯酶固定在工作电极的表面, 通过其催化水解底物氯化乙酰胆碱(acetylthiocholine

收稿日期: 2011-02-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30972055); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101286);

国家农业科技成果转化资金项目(2011GB2C60020); 山东省自然科学基金项目(Q2008D03)

作者简介: 孙霞(1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为农产品安全检测。E-mail: sunxia2151@sina.com

* 通信作者: 王相友(1961—), 男, 教授, 博士后, 研究方向为农产品加工与贮藏工程、食品安全检测。E-mail: wxy@sdut.edu.cn

chloride, ATCl)生成电活性产物硫代胆碱,有机磷农药的残留量可以通过监测硫代胆碱氧化时产生的电流来确定。然而该氧化反应的发生需要提供一定的电压和合适的电极表面条件,这就很容易导致对其他易被氧化物质的干扰。因而,许多报告着眼于研究电极的修饰方法以达到提供一个合适的电极表面和降低反应电压的作用^[9]。

多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWNTs)因其在酶活性中心和电极表面的高速电子转移能力而被用于酶生物传感器中电子转移的“导线”。因此,多壁碳纳米管修饰电极构造的生物传感器用于检测有机磷农药已被广泛报道^[6-7,10-15]。然而,多壁碳纳米管的低溶解度和难以操控性大大限制了它的应用^[7]。为了改善多壁碳纳米管和功能化多壁碳的可溶性,国内外相关人士进行了大量的工作^[16]。将多壁碳纳米管表面经过浓硫酸、浓硝酸或其他强氧化剂处理制得功能化碳纳米管(functional carbon nanotubes, FCNTs),FCNTs已成为一种很有前途的碳纳米管替代材料,被用于修饰电极以制备多种用途的生物传感器^[7,17-18]。

FCNTs表面带有大量活性官能团,如—OH和—COOH^[18]。这些官能团不仅改进了多壁碳的分散性,使其易溶于有机、无机或生物系统中,而且加速氧化还原物质与电极间的电子转移^[19]。FCNTs也已经被广泛应用于生物传感器领域。Chakraborty等^[17]采用FCNTs作为电催化氧化的介质成功地构建了谷氨酸生物传感器。Du等^[7]也构建了一种基于功能化碳纳米管-β环糊精的AChE生物传感器。Jha等^[18]开发了一种基于功能化碳纳米管和金纳米微粒等纳米复合材料的AChE生物传感器用于检测对氧磷,其最低检测限是1nmol/L。

壳聚糖(CHIT)含有大量的—NH₂和—OH,使其能够很好地保持固定在电极上的生物大分子的生物活性。此外,壳聚糖无毒副作用且成本低廉,因而被广泛用作固定酶的载体材料^[6,20]。

基于FCNTs和CHIT的上述优势,本实验将功能化碳、壳聚糖、戊二醛溶于水超声分散形成均一稳定的黑色悬浊液并将其用于修饰电极,FCNTs-CHIT-GTA的存在降低了酶水解底物生成电活性物质乙酰胆碱的所需电压。此生物传感器灵敏度高、稳定性好,具有极大的研究和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙酰胆碱酯酶 诺亚威生物技术(上海)有限公司;乙酰硫代胆碱(ATCl)、戊二醛(25%)、牛血清蛋白(BSA)美国Sigma公司;硝酸纤维素微孔滤(膜孔径0.45μm)杭州瑞康净化设备有限公司;壳聚糖(95%)、多壁碳纳米管(用之前进一步功能化);磷酸盐缓冲液和其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)测试在CHI 660D电化学工作站上进行 上海辰华仪器有限公司。本实验采用10mL电化学单元。工作电极选用裸玻碳电极和修饰的玻碳电极($d=3\text{mm}$)。饱和甘汞电极(saturated calomel electrode, SCE)和铂电极分别作为参比电极和辅助电极。电化学阻抗测试(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)在IM6e阻抗分析仪(德国Zahner公司)上进行。

1.3 FCNTs-CHIT-GTA/GCE的制备

1.3.1 电极清洗

电极修饰前,依次用0.3μm、30nm Al₂O₃浆在鹿皮上抛光至镜面,抛光后先双蒸水洗去表面污物,再移入超声水浴中清洗,每次2~3min,重复3次,最后依次用1:1乙醇溶液、1:1 HNO₃溶液和去离子水超声清洗,氮气环境下干燥。

彻底洗涤后,电极要在0.5mol/L H₂SO₄溶液中用循环伏安法活化,扫描范围-0.6~1.0V,扫速0.1V/s,反复扫描直至达到稳定的循环伏安图为止。最后在0.20mol/L KNO₃中记录 $1\times 10^{-3}\text{mol/L}$ K₃Fe(CN)₆溶液的循环伏安曲线,以测试电极性能,扫描速度50mV/s,扫描范围-0.1~0.6V。实验室条件下所得循环伏安图中的峰电位差在80mV以下,并尽可能接近64mV,电极方可使用,否则要重新处理电极,直到符合要求。

1.3.2 多壁碳纳米管的功能化

称取10mg多壁碳纳米管(MWNTs)放入100mL烧杯,量取40mL浓HNO₃和H₂SO₄混合液(1:3, V/V)加入烧杯混合后超声4h、120℃离心回流3h,水洗至中性,红外炉干燥,室温保存待用^[21]。

1.3.3 电极的修饰

2μL包含FCNTs 0.12g/100mL、CHIT 0.48 g/100mL、GTA 4.7%(V/V)的凝胶状混合物悬滴在电极表面,室温下晾4h,0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH8.0)彻底冲洗干净4℃待用^[6]。

1.3.4 乙酰胆碱酯酶的固定

壳聚糖膜的制备:0.1g壳聚糖加入10mL质量分数1%醋酸制得混合溶液,3000r/min离心5min去除不溶性颗粒形成溶胶凝胶。然后将预先处理的硝酸纤维素微孔滤膜浸入该溶胶凝胶保持12h,然后浸泡在0.1mol/L的磷酸盐缓冲液中(pH8.0)12h,取出干燥备用^[22]。

酶的固定:取100μL AChE液(100U/mL)、30μL牛血清蛋白(1.0%)、10μL戊二醛(5.0%)、360μL磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH8.0)在1mL离心管中混匀。取一壳聚糖膜浸入其中,4℃保持8h。最终用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L pH8.0)彻底冲洗至无泡沫,磷酸盐缓冲液中4℃保存待用^[23]。

1.3.5 乙酰胆碱酯酶生物传感器的制备

电化学检测时,将酶膜用O型圈固定在电极表面,FCNTs-CHIT-GTA/GCE生物传感器制备完成,如流程图1所示。

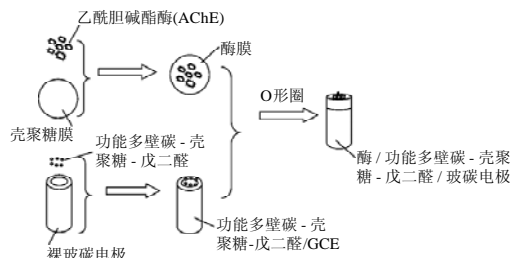


图1 制备AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE的过程

Fig.1 Flow chart for the preparation of AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE

1.4 测试过程

测试过程在含有10mL溶液的电化学单元中进行。将修饰好的电极浸入含有200 μ L 15mg/mL ATCl的PBS中,循环伏安法测得峰电流记为 I_0 。随后将该电极浸入不同浓度农药中抑制15min,冲洗后再次在含有200 μ L 15mg/mL ATCl的PBS中,循环伏安法测得峰电流记为 I_1 。计算不同浓度农药对该传感器中酶的抑制率($I/\%$)公式:

$$I/\% = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100$$

式中: I_0 和 I_1 分别为AChE/FCNTs-CHIT-GTA传感器在含底物的pH8.0的磷酸盐缓冲液中的循环伏安峰电流。

2 结果与分析

2.1 FCNTs-CHIT-GTA凝胶的表征

如图2所示,FCNTs-CHIT的混合液超声后几乎立刻出现沉淀(图2a)。而FCNTs-GTA没有立刻形成沉淀可能得益于戊二醛的黏性(图2b)。然而,FCNTs-CHIT-GTA复合材料在超声条件下均匀分散后能保持均匀悬浮状态至少1个月(图2c),显而易见,CHIT和GTA的引入大大增加了FCNTs的溶解度。

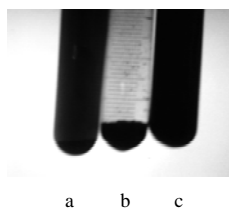
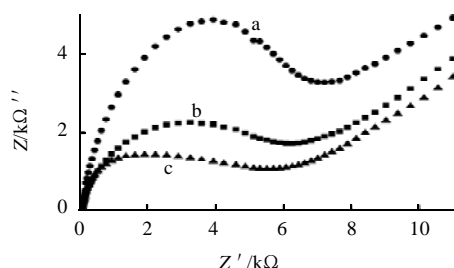


图2 FCNTs-CHIT(a)、FCNTs-GTA(b)和FCNTs-CHIT-GTA(c)溶于水的照片(0.1mg/mL)

Fig.2 FCNTs-CHIT, FCNTs-GTA and FCNTs-CHIT-GTA dispersed in water (0.1 mg/mL)

2.2 电化学阻抗图



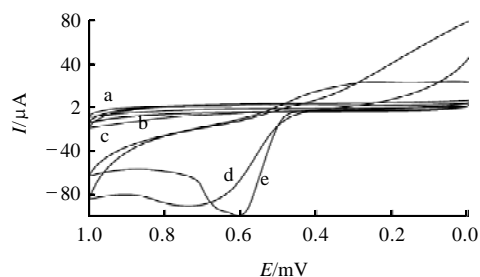
室温条件下, PBS溶液浓度0.1mol/L、pH8.0;
[Fe(CN) $_6^{3-4}$]溶液浓度5mmol/L(含0.1mol/L KCl)。

图3 裸玻碳电极(a)、FMWNTs/GCE(b)、FMWNTs-CHIT-GTA/GCE(c)在PBS和[Fe(CN) $_6^{3-4}$]混合液中的电化学阻抗图

Fig.3 Electrochemical impedance spectra of bare GCE, FMWNTs/GCE and FMWNTs-CHIT-GTA/GCE in 0.1 mol/L PBS (pH 8.0) containing 5 mmol/L [Fe(CN) $_6^{3-4}$] at room temperature

由图3可知,裸电极的界面阻力(R_{ct})很大(曲线a),当在电极表面形成功能化多壁碳膜时,可观察到 R_{ct} 变小很多(曲线b),这种现象是由功能化多壁碳优良的促电子转移性能决定的。然而用FCNTs-CHIT-GTA复合膜修饰电极的阻抗(曲线c)远远小于裸电极和FCNTs/GCE电极,这一结果表明FCNTs和CHIT复合物能够起到在电极表面强化电子转移的效果。

2.3 循环伏安曲线



a、b、c电极环境为pH8.0 PBS溶液; d、e的电极环境为含有200 μ L 15mg/mL ATCl的10mL pH8.0 PBS。

图4 裸电极(a)、AChE/FCNTs电极(b)、AChE/FCNTs-CHIT-GTA电极(c)及AChE/FCNTs电极(d)和AChE/FCNTs-CHIT-GTA电极(e)的循环伏安图

Fig.4 Cyclic voltammograms of bare GCE, AChE/FCNTs/GCE and AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE in pH 8.0 PBS; AChE/FCNTs/GCE and AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE in a mixture of 10 mL of pH 8.0 PBS and 200 μ L of 15 mg/mL ATCl. Scan rate: 100 mV/s

如图4所示,在裸玻碳电极(曲线a)、AChE/FCNTs/GCE(曲线b)和AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE(曲线c)入含有10mL 0.1mol/L pH8.0 PBS闭路时均未出现氧化还原峰。这表明在底物ATCl不存在时,回路中未出现明显的氧化还原反应。向0.1mol/L pH8.0 PBS底液中加入200 μ L 15mg/mL的ATCl时,AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE生物传感器的循环伏安图在600mV(曲线d)处出现了一个不可

逆的氧化峰(100 μA)。然而 AChE/FCNTs/GCE 在 735mV (曲线 e) 处出现一不可逆的氧化峰(92 μA)。众所周知, 峰电流源于 ATCl 的水解产物硫代胆碱的氧化。曲线 d 的高峰流值和低电位值(相比于曲线 e)是由于 FCNTs 凝胶状混合物固有的导电性能。进一步说, 壳聚糖包含大量的功能基团如 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$, 为乙酰胆碱酯酶生物传感器的构建和酶的活性保持提供了完美的微环境, FCNTs 和 CHIT 的合成效果提高了传感器的灵敏度和稳定性。

2.4 传感器性能参数的优化

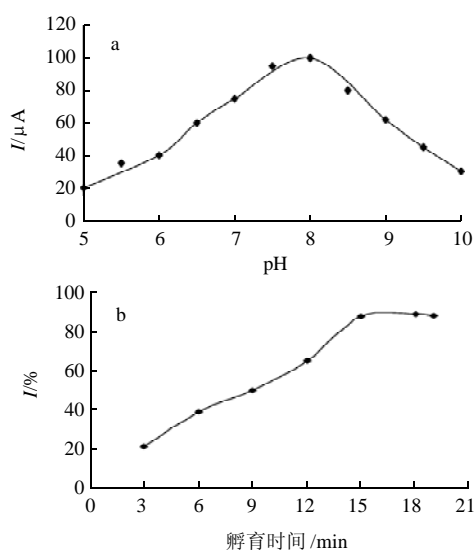


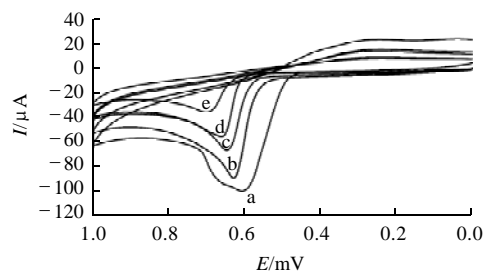
图5 磷酸盐缓冲液 pH 值对 AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE(a)和农药孵育时间对 AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE(b)的影响曲线

Fig.5 Effect of phosphate buffer pH on AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE, and effect of incubation time of pesticides on AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE

循环伏安图的峰电流受 PBS 溶液的 pH 值影响很大, 故对 pH 值进行优化(图 5a), 结果表明 pH8.0 为最优值。

生物传感器在农药中的抑制时间是另一个被优化因素。图 5b 表明, AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE 上的峰电流随着抑制时间的延长持续减小直至时间超过 15min。表明此时达到最大抑制率, 最佳孵育时间确定为 15min。

2.5 抑制率曲线的确定



抑制剂敌敌畏的不同质量浓度为: a. 0ng/L; b. 20ng/L; c. 100ng/L; d. 500ng/L; e. 5 $\mu\text{g/L}$; 各处理 PBS 溶液中均可 200 μL 15mg/LATCl

图6 不同质量浓度敌敌畏抑制前后 AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE 在包含 200 μL 15mg/L ATCl 的 PBS 中的循环伏安图

Fig.6 Cyclic voltammograms of AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE biosensor in a mixture of pH 8.0 PBS and 200 μL of 15 mg/L ATCl

如图 6 所示, 将 AChE/FCNTs-CHIT-GTA/GCE 分别浸入各已知浓度的敌敌畏标准品中抑制 15min 后, 测得的峰电流(曲线 b~e)比未抑制之前的初电流 I_0 大大减小(曲线 a)。实验测得 20ng/L 的敌敌畏抑制率达到 11%, 更高浓度的药品(5 $\mu\text{g/L}$)对应更高的抑制率(65%)。然而抑制率最大未达到 100% 这可能是因为农药与酶的结合位点达到平衡^[24]。

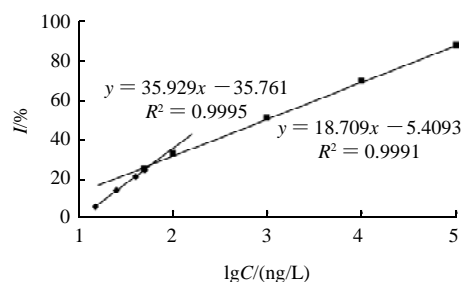


图7 抑制率与敌敌畏质量浓度常用对数的线性关系
Fig.7 Relationships between inhibition rate and dichlorvo concentration

农药对酶活性的抑制率与其质量浓度的对数呈良好的线性关系, 可分为两个线性段: 25~50ng/L 和 50~100 $\mu\text{g/L}$ ^[25]。线性方程为 $I = 35.929x - 35.761$ 和 $I = 18.697x - 5.3303$, 线性相关系数分别为 0.9995 和 0.9991(图 7)。在此规定 10% 酶活抑制率为农药的最低检出限, 得出该传感器的最低检出限为 20ng/L。这个结果和目前基于酶抑制剂的电化学传感器具有可比性^[18]。其最低检出限比用金-聚吡咯修饰电极的生物传感器(2ng/mL)低得多^[26], 也比金纳米嵌入凝胶溶胶层构造的 AChE 传感器(0.6ng/mL)低^[27], 表明该传感器用于检测有机磷农药精度较高。

2.6 酶片的复活

有机磷农药对 AChE 酶的强抑制性限制了该类传感器的重复利用。通过将酶片浸泡在 0.1mol/L pH8.0 的 PBS 中去除部分失活的酶, 实现酶片的重复利用^[23]。现将酶片浸泡 48h 以上, 其峰流值大约能够恢复到原来的 95%。与已有报道^[28-29]中应用 TMB-4 或 2-PAM 作为活性恢复剂相比, 此法简单可靠。

2.7 生物传感器的精度和稳定性

批内精度的测定: 连续采集 10 个经 500ng/L 敌敌畏抑制 15min 的酶电极在浸入由 10mL 含 200 μL 15mg/mL ATCl 的 PBS 底液中的电流响应获得。批间精度的测定: 通过采集一个酶膜分别固定在三根电极上的电流响应来确定。批内和批间的相对标准偏差分别是 4.5% 和 3.0%, 传感器的可重复性和精确性是可以接受的。

电极和酶膜不用时可分别保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的干净烧杯和 PBS8.0 中。10d 后, 该传感器的峰电流无明显降低, 20d 后传感器保持其初响应的 90%。表明该传感器为酶片提供了良好的生物相容性。

3 结 论

本实验采用 FCNTs-CHIT-GTA 组成的凝胶构建的一种用于检测农药的生物传感器, 该凝胶在水中具有良好的分散性和可溶性, 该传感器最低检出限可达 20ng/L, 具有高灵敏度、高精度、低成本、易操作等优点, 并适用于检测多种有机磷农药。

参考文献:

- [1] DU Dan, CHEN Shizhen, CAI Jie, et al. Electrochemical pesticide sensitivity test using acetylcholinesterase biosensor based on colloidal gold nanoparticle modified sol-gel interface[J]. *Talanta*, 2008, 74(4): 766-772.
- [2] RAMÍREZ G V, FOURNIER D, SILVA M T R, et al. Sensitive amperometric biosensor for dichlorovos quantification: Application to detection of residues on apple skin[J]. *Talanta*, 2008, 74(4): 741-746.
- [3] LASCHI S, OGOŃCZYK D, PALCHETTI I, et al. Evaluation of pesticide-induced acetylcholinesterase inhibition by means of disposable carbon-modified electrochemical biosensors[J]. *Enzym Microb Technol*, 2007, 40(3): 485-489.
- [4] VAKUROV A, SIMPSON C E, DALY C L, et al. Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: I. Modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase[J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20(6): 1118-1125.
- [5] SUN Xia, WANG Xiangyou. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(12): 2611-2614.
- [6] DU Du, CAI Jie, SONG Dandan, et al. Rapid determination of triazophos using acetylcholinesterase biosensor based on sol-gel interface assembling multiwall carbon nanotubes[J]. *J Appl Electrochem*, 2007, 37(8): 893-898.
- [7] DU Dan, WANG Minghui, CAI Jie, et al. Sensitive acetylcholinesterase biosensor based on assembly of β -cyclodextrins onto multiwall carbon nanotubes for detection of organophosphates pesticide[J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2010, 146(1): 337-341.
- [8] ISTAMBOULIE G, SIKORA T, JUBETE E, et al. Screen-printed poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT): A new electro-chemical mediator for acetylcholinesterase-based biosensors[J]. *Talanta*, 2010, 82(3): 957-961.
- [9] PCHELINTSEV N A, VAKUROV A, MILLNER P A. Simultaneous deposition of Prussian-Blue and creation of an electrostatic surface for rapid biosensor construction[J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2009, 138(2): 461-466.
- [10] DU Dan, WANG Ming, CAI Jie, et al. One-step synthesis of multiwalled carbon nanotubes-gold nanocomposites for fabricating amperometric acetylcholinesterase biosensor[J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2010, 143(2): 524-529.
- [11] IVANOV Y, MARINOV I, GABROVSKA K, et al. Amperometric biosensor based on a site-specific immobilization of acetylcholinesterase via affinity bonds on a nanostructured polymer membrane with integrated multiwall carbon nanotubes[J]. *J Molecul Catal B: Enzym*, 2010, 63(3/4): 141-148.
- [12] MORAES F C, MASCARO L H, MACHADO S A S, et al. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode[J]. *Talanta*, 2009, 79(5): 1406-1411.
- [13] QU Yunhe, SUN Qian, XIAO Fei, et al. Layer-by-Layer self-assembled acetylcholinesterase/PAMAM-Au on CNTs modified electrode for sensing pesticides[J]. *Bioelectrochem*, 2010, 77(2): 139-144.
- [14] SUN Xia, WANG Xiangyou, ZHAO Wenping. Multiwall carbon nanotube-based acetylcholinesterase biosensor[J]. *Sensor Lett*, 2010, 8(2): 247-252.
- [15] VISWANATHAN S, RADECKA H, RADECKI J. Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(9): 2772-2777.
- [16] WU Haichen, CHANG Xueling, LIU Lei, et al. Chemistry of carbon nanotubes in biomedical applications[J]. *J Mater Chem*, 2010, 20(6): 1036-1052.
- [17] CHAKRABORTY S, RAJ C R. Mediated electrocatalytic oxidation of bioanalytes and biosensing of glutamate using functionalized multiwall carbon nanotubes-biopolymer nanocomposite[J]. *J Electroanal Chem*, 2007, 609(2): 155-162.
- [18] JHA N, RAMAPRABHU S. Development of Au nanoparticles dispersed carbon nanotube-based biosensor for the detection of paraoxon[J]. *Nanoscale*, 2010, 2(5): 806-810.
- [19] WANG Jun, LIN Yuehe. Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications[J]. *Trends Anal Chem*, 2008, 27(7): 619-626.
- [20] ION A C, ION I, CULETU A, et al. Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on carbon nanostructure-chitosan composite material for organophosphate pesticides[J]. *Mater Sci Eng: C*, 2010, 30(6): 817-821.
- [21] ZHAO Yuandi, ZHANG Weide, CHEN Hong, et al. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase at carbon nanotube powder microelectrode[J]. *Sens Actuators B*, 2002, 87(1): 168-172.
- [22] QIANG Zhibin, CHEN Yinsheng, GUO Huawen, et al. Property of different molecular weight and degree of deacetylation chitosan membranes[J]. *J Dong Hua Univer*, 2007, 33(2): 212-215.
- [23] SUN Xia, WANG Xiangyou, LIU Zhanli. Study on immobilization methods of acetylcholinesterase[J]. *Int J Food Eng*, 2008, 4(8): 1-11.
- [24] DU Dan, HUANG Xi, CAI Jie, et al. Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 23(2): 285-289.
- [25] ZHANG Shuping, ZHENG Yi, SHI Liyi. The pesticide residue monitoring technique based on the sensitive nano-biosensors[J]. *J Biotechnol*, 2008, 136(Suppl 1): 754.
- [26] GONG Jingming, WANG Lianyi, ZHANG Lizhi. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au-polypyrrole interlaced network-like nanocomposite[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(7): 2285-2288.
- [27] DU Du, CHEN Shizhen, CAI Jie, et al. Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol-gel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide[J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 23(1): 130-134.
- [28] ANITHA K, MOHAN S V, REDDY S J. Development of acetylcholinesterase silica sol-gel immobilized biosensor-an application towards oxydemeton methyl detection[J]. *Biosens, Bioelectron*, 2004, 20(4): 848-856.
- [29] LUCKARIFT H R, GREENWALD R, BERGIN M H, et al. Biosensor system for continuous monitoring of organophosphate aerosols[J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 23(3): 400-406.