

基于核酸适配体的牛奶和鸡蛋中雌二醇纳米金比色检测

王欣 孙涵颖

(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 雌二醇是一种典型的雌激素,易通过食物链影响人体健康。因此,探索简单、快速、灵敏的雌二醇检测技术及方法很有必要。以纳米金比色分析为基础,以雌二醇特异性适配体(长度为76 mer)为传感探针,在优化试验条件的基础上,提出一种基于核酸适配体的雌二醇纳米金比色传感检测方法,并分析了对牛奶和鸡蛋中雌二醇检测的可行性。结果表明,当纳米金粒子与核酸适配体浓度比为1:11 000、在室温孵育30 min后,在NaCl浓度为24 mmol/L的条件下,水体系的 A_{650}/A_{530} 与雌二醇浓度间呈良好的线性关系($R^2=0.915$),线性区间为0.25~0.60 nmol/L,检测限为0.233 nmol/L,具有良好的特异性。该方法可实现对牛奶和鸡蛋样品中雌二醇的检测,对牛奶和鸡蛋样品的线性检测区间分别为0.5~0.8 nmol/L和0.3~0.9 nmol/L,检测限分别为0.183 nmol/L和0.185 nmol/L,加标回收率分别为101.6%~105.4%和97.97%~115.30%,相对标准偏差小于6%。该方法具有较高的检测灵敏度和特异性,且简单可行,为牛奶、鸡蛋样品中雌二醇的快速检测提供了新思路。

关键词: 牛奶; 鸡蛋; 雌二醇; 核酸适配体; 纳米金比色分析

中图分类号: O657.3; O629.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)09-0319-10

OSID:



Gold Nanoparticles Colorimetric Detection Based on Aptamer for 17β-estradiol in Milk and Eggs

WANG Xin SUN Hanying

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: As a typical estrogen, 17β-estradiol can easily affect human health through accumulation in animal food. Therefore, the establishment of a simple and sensitive technique for rapid analysis of 17β-estradiol is of great practical significance. On the basis of the gold nanoparticles colorimetric analysis, a gold nanoparticles colorimetric detection method for 17β-estradiol based on aptamer was designed, using the 17β-estradiol aptamer as the sensing probe. The test conditions were also optimized, and the feasibility of this method for the detection of 17β-estradiol in milk and eggs was analyzed. Under the optimized conditions, the A_{650}/A_{530} of water system showed a good linear correlation with the concentration of 17β-estradiol ($R^2=0.915$) with a linear range from 0.25 nmol/L to 0.60 nmol/L, and the detection limit was 0.233 nmol/L. The proposed method also illustrated an excellent specificity to 17β-estradiol, when the ratio of gold nanoparticles to aptamer was 1:11 000 which were incubated at room temperature for 30 min, and under the condition of 24 mmol/L NaCl. The method can also be applied successfully for the detection of 17β-estradiol in milk and egg samples. The linear range were 0.5~0.8 nmol/L (milk) and 0.3~0.9 nmol/L (eggs) with the detection limit of 0.183 nmol/L and 0.185 nmol/L, respectively. The recovery were 101.6%~105.4% (milk) and 97.97%~115.30% (eggs), respectively. Meanwhile, the relative standard deviation was less than 6%. With the advantage of higher sensitivity and specificity, the simple and practical method can provide a way for the rapid detection of 17β-estradiol in milk and egg samples.

Key words: milk; eggs; 17β-estradiol; aptamer; gold nanoparticles colorimetric analysis

收稿日期: 2019-12-02 修回日期: 2020-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(81773482)

作者简介: 王欣(1975—),女,副教授,主要从事食品安全研究,E-mail: 18918629281@126.com

0 引言

雌二醇(17β-estradiol, E₂)是一种具有较强生物活性的雌激素。近年来,一些养殖户为了加快畜、禽的生长和繁殖而频繁使用雌激素。雌二醇化学性质稳定,在动物体内没有特定的代谢系统,极易在畜、禽体内滞留,进而通过食物链扰乱人体及动物的正常生理功能,影响人体健康。因此,加强对可食性畜、禽产品中的 E₂残留水平的监测是保障食品安全的重要措施之一^[1]。

传统的色谱技术可对雌二醇进行检测,如高效液相色谱法^[2-3]、液相色谱串联质谱法^[4-5]、气相色谱-质谱联用方法^[6]等。但这些方法存在操作复杂、成本高、检测结果易受干扰等问题。因此,有必要探索一种简单、快速、灵敏的雌激素靶向检测技术和方法,以便对可食性畜、禽产品中的 E₂残留水平进行现场快速检测。

核酸适配体能与靶标发生类似抗原-抗体反应,且比抗体和酶具有更好的选择性、亲和力及稳定性,故而在各类高效、快速生物传感器的构建中发挥了重要作用^[7]。其中,核酸适配体与纳米金(AuNPs)粒子相结合形成的比色分析技术具有结果稳定可靠、操作简单快速、灵敏度高、靶向性强的特点。目前,基于核酸适配体的纳米金比色传感分析技术可用于检测食品中的金属离子^[8]、生物毒素^[9]和小分子^[10]等污染因子。目前研究大多基于文献[11]首次筛选得到的长度为 76 mer 的 E₂的核酸适配体进行。文献[12]设计了 E₂的核酸适配体比色传感器,可对河水中的 E₂进行快速分析,但检测限较高,为 36.7 nmol/L。文献[13]基于相同的适配体设计了针对尿液和唾液中 E₂检测的核酸适配体纳米金比色传感器,其灵敏度较高,检测限为 0.2 nmol/L。文献[10]比较了 3 种长度的适配体(75、35、22 mer)对比色传感器检测 E₂效果的影响,认为长度为 35 mer 的适配体对牛乳中 E₂的检测具有较好效果。文献[14]应用 35 mer 的适配体设计了比色传感器,可对尿液中 E₂进行有效检测,检测限为 0.2 nmol/L。针对食品体系中 E₂的基于核酸适配体的纳米金比色检测技术仍需进一步研究,以明确该方法适宜的检测条件和对不同食品的适用性及稳定性。

本文以牛奶和鸡蛋作为典型的研究对象,以建立简单、灵敏的雌二醇快速分析技术为目标,以纳米金比色分析为基础,以雌二醇特异性适配体为传感探针,对各试验条件进行优化,提出基于核酸适配体的雌二醇纳米金比色传感分析技术和方法,并分析对牛奶和鸡蛋中雌二醇检测的可行性,以期为动物

食品样品中雌二醇的快速检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UV-9100 D 型紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器股份有限公司);JEOL2100F 型透射电镜(日本电子株式会社);173plus 型动态光散射仪(美国 Brookhaven 公司);PWC254 型分析天平(武汉艾德姆衡器有限公司);SynergyH4 型多功能酶标仪(美国 biotek 公司);KQ-50DE 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);涡旋混合器(德国 IKA 公司)。雌二醇适配体(5'-GCTTCCAGCTTATTGAATTACACGCAGAGGGTAGCGGCTCTGCG-CATTCAATTGCTGCGCGCTG-AAGCGCGGAAGC-3')由上海生工公司合成^[11]。柠檬酸(99.5%)、氯金酸(48%~50%)、二水合柠檬酸钠等(99%)、雌二醇(98%)、双酚 A(>99%)、甲基睾酮(98%)、己烯雌分(99%)、黄体酮(99%)、甲醇,购自麦克林试剂有限公司(上海)。纯牛奶、鸡蛋样品购于本地超市。

1.2 试验方法

1.2.1 纳米金粒子的合成与表征

在文献[15]的基础上修改,在烧杯中准确加入 25 mL 去离子水,110℃恒温水浴搅拌条件下准确加入 350 μL 20 mmol/L 的氯金酸溶液及 300 μL 100 mmol/L 二水合柠檬酸钠,继续搅拌 15 min 直至溶液变红,表明生成纳米金粒子(AuNPs),冷却至室温(20℃),4℃避光保存备用。

利用透射电子显微镜观察 AuNPs 的形貌。具体步骤如下:将 AuNPs 分散液滴在覆有碳膜的铜网上,自然干燥后观察样品的微观形貌,测试加速电压为 200 kV,选取代表性部位进行拍照分析。

采用动态光散射仪测量 AuNPs 的平均水合动力学直径及多分散系数。具体步骤如下:将 AuNPs 分散于去离子水中,超声分散 3 min 后,进行 2 倍稀释,在 100 μL 样品皿中准确加入 65 μL 分散液样品,在 25℃、折光率为 0.331、pH 值为 7 的条件下进行检测。以水在 25℃的粘度和折射系数为参照,散射光以 90°的固定角度进行采集,扫描 15 次,直接读取并记录仪器测得的平均水合动力学直径和多分散系数,导出散射光强度原始数据进行归一化处理,绘制粒径分布曲线。

用紫外可见分光光度计测量 AuNPs 溶液在 400~700 nm 的吸收光谱。将 AuNPs 分散于离子水中,超声分散 3 min 后,进行 1 倍稀释,在 100 μL 光程为 1 cm 的比色皿中准确加入 65 μL 分散液样品,在波长 400~700 nm 范围内进行紫外吸收曲线扫

描,根据朗伯比尔定律计算 AuNPs 的浓度,公式为

$$A = \varepsilon bc \tag{1}$$

式中 A ——吸光度 ε ——摩尔吸光系数
 b ——光程,取 1 cm
 c ——AuNPs 的浓度

1.2.2 反应条件的优化

(1) 适配体和 NaCl 浓度

适配体原液:开盖前先将 E_2 适配体离心 (4 000 r/min,30 ~ 60 s),再开盖加入 100 μ L 去离子水,充分振荡混匀,得到 100 μ mol/L 的适配体原液,-20℃ 储存备用。

适配体溶液:以适配体原液进行一定程度的稀释,使适配体浓度分别为 0.825、1.24、1.65、2.06 μ mol/L。

反应过程:向含有 100 μ L 0.15 nmol/L 的 AuNPs 溶液的离心管中准确移加 100 μ L 不同浓度的适配体溶液,使检测体系中 AuNPs 与适配体的浓度比分别为 1:5 500、1:8 250、1:11 000、1:13 750,涡旋振荡 15 s,室温孵育 30 min 后,再向体系中分别加入 1.25、2.5、3.75、5、6.25、7.5 μ L 1 mol/L 的 NaCl 溶液,使体系中 NaCl 浓度分别为 6、12、18、24、30、36 mmol/L,涡旋振荡 15 s,孵育 5 min,观察体系的颜色变化,并用酶标仪测量其在 400 ~ 800 nm 的吸收光谱,计算 A_{650}/A_{530} (A_{650} 、 A_{530} 分别表示 650、530 nm 处的吸光度)及其变化量。分别以 AuNPs 溶液和不添加 NaCl 的体系为对照。

(2) 适配体与 AuNPs 孵育时间

向含有 100 μ L 1.65 μ mol/L 适配体原液的离心管中准确加入 100 μ L 0.15 nmol/L AuNPs 溶液,使体系中 AuNPs 与适配体浓度比为 1:11 000,涡旋振荡 15 s,室温下分别孵育 0、15、30、45、60 min 后,加入 5 μ L 1 mol/L 的 NaCl 溶液,使体系中 NaCl 浓度为 24 mmol/L。涡旋振荡 15 s 后,孵育 5 min。观察体系的颜色变化,并用酶标仪测量其在 400 ~ 800 nm 的吸收光谱,计算 A_{650}/A_{530} 。

1.2.3 检测方法的性能分析

(1) 工作曲线

E_2 标准溶液的配制:准确称取 0.6 g E_2 ,置于烧杯中,加入 20 mL 体积分数 99.99% 的甲醇,25℃ 水浴超声处理 30 min,使其充分溶解至澄清,再定容至 100 mL,即得 0.022 mol/L 的 E_2 标准溶液,现配现用。

E_2 工作溶液:将 E_2 标准溶液倍比稀释配制浓度为 5.4、6.5、7.6、8.7、9.7、10.8、12、15.2 nmol/L 的 E_2 工作溶液。

向含有 100 μ L 1.65 μ mol/L 适配体原液的离心

管中准确加入 100 μ L 0.15 nmol/L AuNPs 溶液,使体系中 AuNPs 与适配体浓度比为 1:11 000,涡旋振荡 15 s,室温孵育 30 min 后,再加入 5 μ L 1 mol/L 的 NaCl 溶液,使体系中 NaCl 浓度为 24 mmol/L,涡旋振荡 15 s,孵育 5 min 后,向反应体系中分别移加 10 μ L 不同浓度的 E_2 溶液,使体系中 E_2 浓度分别为 0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6 nmol/L。室温下反应 5 min,观察体系的颜色变化,并用酶标仪测量其在 400 ~ 800 nm 的吸收光谱,计算 A_{650}/A_{530} ,以 E_2 浓度为横坐标,以 A_{650}/A_{530} 为纵坐标,绘制工作曲线。

(2) 方法的灵敏度

在确定检测方法的基础上,向检测体系中加入 10 μ L 去离子水作为空白样品进行分析,用酶标仪分别测定 20 个空白样品在 400 ~ 800 nm 的吸收光谱,计算 A_{650}/A_{530} 及其标准偏差,方法检出限 (Limitation of detection, LOD)^[16] 计算公式为

$$L_{OD} = S_N S_D / S_L \tag{2}$$

式中 S_N ——信噪比,取 3

S_D ——标准偏差

S_L ——线性斜率

(3) 方法的特异性

参照上述 E_2 工作溶液的配制方法,配制浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 nmol/L 的甲基睾酮、己烯雌酚、双酚 A 和黄体酮溶液。用建立的方法对其进行分析,用酶标仪测量其在 400 ~ 800 nm 的吸收光谱,计算 A_{650}/A_{530} 。

1.3 样品的检测

以牛奶、鸡蛋为实际检测样品,参照文献[17-18]的方法对样品进行前处理。先将蛋清与水以体积比为 2:1 进行稀释,获得蛋清溶液,使牛奶体系中 E_2 的浓度为 0.5 ~ 0.9 nmol/L,蛋清溶液体系中 E_2 的浓度为 0.3 ~ 1.0 nmol/L。取 4 mL 牛奶或蛋清溶液于烧杯中,再加入 2 mL 10% 三氯乙酸和 2 mL 氯仿,涡旋振荡 1 min,超声 15 min 后,以 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,再以 10 000 r/min 离心 3 min,取上清液,按照 1.2.3 节的方法进行检测,测量其在 400 ~ 800 nm 的吸收光谱,计算 A_{650}/A_{530} ,绘制工作曲线,计算 LOD。

加标回收率和精密度试验:在牛奶和鸡蛋样液中分别加入一定体积的 E_2 标准溶液,使牛奶体系中 E_2 的浓度分别为 0.5、0.6、0.7 nmol/L,鸡蛋样液中 E_2 的浓度分别为 0.3、0.6、0.9 nmol/L,每个添加水平平行检测 5 次,计算回收浓度、相对标准偏差和回收率。

1.4 数据分析方法

试验均设置3次平行,3次重复。采用SPSS 17.0软件进行统计分析。采用单因素方差分析(ANOVA)比较不同影响因素对 A_{650}/A_{530} 的影响。 $p < 0.05$ 被认为具有统计学意义。用Origin 8软件进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 检测原理

比色传感器由于其简单、高灵敏度而受到广泛关注。AuNPs 由于具有极高的消光系数和很强的粒子间光距效应,是一种非常敏感的比色指示剂^[19],因此可利用 AuNPs 这种光学性质进行靶分子的定量分析^[20]。基于核酸适配体的纳米金比色法检测 E_2 的原理如图1所示。

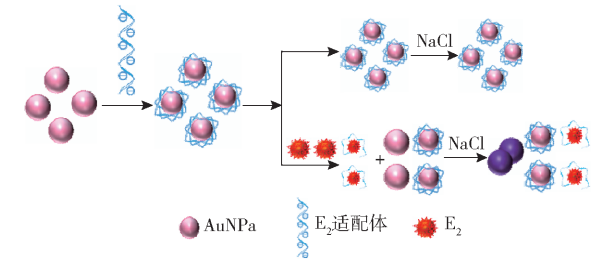
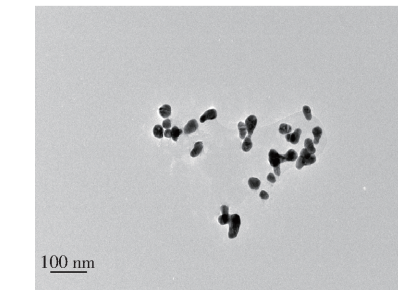


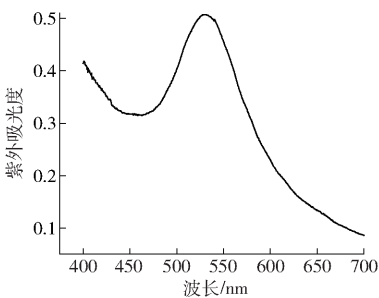
图1 基于核酸适配体的纳米金比色法检测 E_2 的原理示意图

Fig.1 Schematic of gold nanoparticles colorimetry assay for rapid determination of 17β-estradiol based on aptamer

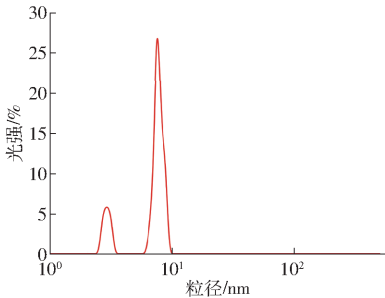
一般情况下,AuNPs 粒子表面呈负电性的柠檬酸盐离子通过静电斥力使体系稳定分散,当溶液中



(a) 透射电镜结果



(b) 紫光可见吸收光谱



(c) 动态光散射图

图2 AuNPs 的表征

Fig.2 Characterization of AuNPs

2.3 反应条件的优化

2.3.1 适配体浓度和 NaCl 浓度

由于本方法是基于 E_2 和 AuNPs 竞争结合适配体的原理来实现对 E_2 的检测,因此,适配体浓度、NaCl 浓度与方法的稳定性、灵敏度及检测结果的重现性密切相关^[25]。

一般情况下,当 AuNPs 发生聚集时,其在 530 nm 左右处的吸收峰强度将相对降低,而由于聚

存在 NaCl 时,AuNPs 表面的负电荷被溶液中的阳离子中和,导致 AuNPs 之间的静电作用力减小而引起聚集,溶液颜色相应地发生改变^[13]。当核酸适配体通过静电作用吸附在 AuNPs 的表面时,可以增强 AuNPs 在 NaCl 中的稳定性,使 AuNPs 粒子在高盐浓度下呈游离状态^[21-22]。加入目标物后,由于目标物与核酸适配体之间具有更强的亲和力,故核酸适配体从 AuNPs 表面脱落,导致 AuNPs 在 NaCl 的作用下发生聚集,溶液颜色发生变化。AuNPs 的颜色变化与其最大吸收峰也紧密相关,随粒径增大,其最大吸收峰波长增大,一般可用 530 nm 和 650 nm 处的吸收峰代表游离和聚集的 AuNPs 的相对数量,基于此,可通过分析 A_{650}/A_{530} 随目标物浓度的变化规律,建立标准曲线,实现对体系中目标物(E_2)的检测。

2.2 AuNPs 粒子的制备与表征

由图2a的透射电镜结果可知,所合成的 AuNPs 颗粒的直径约为 40 nm,分散状态较好。紫光吸收光谱结果(图2b)表明,AuNPs 体系在波长 530 nm 左右处有明显的金的吸收峰,吸光度为 0.51,已知 AuNPs 摩尔吸光系数 $\epsilon = 6.7 \times 10^9 \text{ L}/(\text{cm} \cdot \text{mol})$ ^[23],应用朗伯比尔定律计算可知 AuNPs 的浓度为 0.15 nmol/L。动态光散射可以测量 AuNPs 的水合粒径(图2c),反映 AuNPs 的聚集情况^[24]。AuNPs 的平均粒径为 44.44 nm,大部分粒子处于分散状态,说明 AuNPs 粒子的分散性良好,AuNPs 的粒径分布较均匀,可用于比色传感器的构建。

集体表面等离子体共振峰发生了红移,将在 650 nm 左右处出现新的吸收峰^[26]。图3a对 AuNPs、AuNPs + NaCl (24 mmol/L)、AuNPs + Apt (1 : 11 000) 及 AuNPs + Apt (1 : 11 000) + NaCl (24 mmol/L) 4 种体系的吸收光谱进行了对比。

图3a表明,当在 AuNPs 体系中加入 NaCl (24 mmol/L)时,体系在 530 nm 处的吸收峰显著下降,且在 650 nm 左右出现了明显的吸收峰。溶液颜

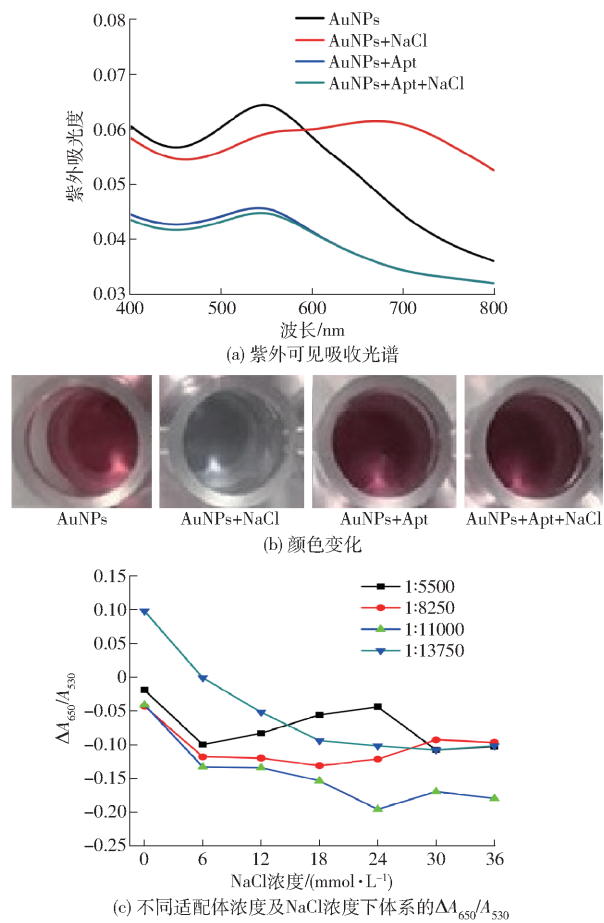


图 3 适配体及 NaCl 对体系的紫外可见吸收光谱、颜色及 $\Delta A_{650}/A_{530}$ 的影响

Fig. 3 Effects of aptamer and NaCl on UV - visible absorption spectra, colors and $\Delta A_{650}/A_{530}$ of system

色由酒红色变为蓝灰色,说明 AuNPs 发生了明显的聚集。与 AuNPs + Apt 组 (Apt 是指雌二醇的适配体) 相比, AuNPs + Apt + NaCl 试验组在 530 nm 处的吸光度变化不明显,溶液颜色仍为酒红色,这说明通过静电作用吸附于 AuNPs 表面的适配体增强了粒子的稳定性,阻止盐诱导的 AuNPs 聚集,使 AuNPs 维持了游离状态。

将不同适配体浓度及离子强度下 AuNPs 体系的 A_{650}/A_{530} 结果列于表 1。由表 1 可知,当体系中 NaCl 浓度为零时,在 AuNPs 与适配体浓度比为 1:0、

1:5 500、1:8 250 和 1:11 000 时,体系的 A_{650}/A_{530} 无显著区分,表明 AuNPs 呈良好的分散状态;而当 AuNPs 与适配体浓度比为 1:13 750 时,体系的 A_{650}/A_{530} 显著高于其他系列,说明此时体系中的 AuNPs 发生了一定程度的团聚。总体来看,随体系中 NaCl 浓度的增加,各体系的 A_{650}/A_{530} 均相对增大,其中未加以适配体保护的系列,即 AuNPs 与适配体浓度比为 1:0 时,体系的 A_{650}/A_{530} 变化最为显著,在 NaCl 浓度为 6 mmol/L 时,体系的 A_{650}/A_{530} 已显著增大至 0.878 ± 0.013 ,且在 NaCl 浓度为 24 mmol/L 时,体系的 A_{650}/A_{530} 则进一步增大至 1.000 ± 0.015 。比较 AuNPs 与适配体浓度比为 1:5 500、1:8 250 及 1:11 000 的 3 个体系的 A_{650}/A_{530} ,可以发现 1:11 000 系列对 AuNPs 有较好的保护作用,在 NaCl 浓度为 24 mmol/L 时,其 A_{650}/A_{530} 为 0.804 ± 0.002 ,显著低于其他适配体浓度的系列,说明此体系条件下,有利于保持 AuNPs 相对稳定的状态。

AuNPs 与加入不同比例适配体和不同浓度 NaCl 体系的 A_{650}/A_{530} 差值记为体系的 $\Delta A_{650}/A_{530}$ 。 $\Delta A_{650}/A_{530}$ 越大,说明 AuNPs 的聚集程度越大。反之,则 AuNPs 的聚集程度越小。图 3c 为不同适配体及 NaCl 浓度下体系的 $\Delta A_{650}/A_{530}$ 变化情况。

由图 3c 可知,不同的适配体浓度下,体系的 $\Delta A_{650}/A_{530}$ 有所区别。例如,当 AuNPs 与适配体浓度比为 1:13 750, NaCl 浓度为零时, $\Delta A_{650}/A_{530}$ 为 0.098,说明此时 AuNPs 已发生了一定程度的聚集,这与表 1 中 A_{650}/A_{530} 的变化相符。相比之下,在体系含有一定浓度的 NaCl 时,各 AuNPs - Apt 体系的 $\Delta A_{650}/A_{530}$ 均为负值,证明适配体的引入有效增强了 AuNPs 体系的稳定性。其中,当 AuNPs 与适配体浓度比为 1:11 000 时,在不同的 NaCl 浓度下体系的 $\Delta A_{650}/A_{530}$ 均相对较小,当 NaCl 浓度为 24 mmol/L 时, $\Delta A_{650}/A_{530}$ 为 -0.196,说明体系整体具有较好的稳定性, AuNPs - Apt 粒子呈良好的分散状态。综合分析,可选择 AuNPs 与适配体浓度比为 1:11 000、NaCl 浓度为 24 mmol/L 进行后续检测条件的优化。

表 1 不同适配体浓度及离子强度下 AuNPs 体系的 A_{650}/A_{530}

NaCl 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	AuPNs 与 Apt 浓度比				
	1:0	1:5 500	1:8 250	1:11 000	1:13 750
0	(0.778 ± 0.015) ^{bA}	(0.759 ± 0.012) ^{abA}	(0.735 ± 0.035) ^{abA}	(0.737 ± 0.008) ^{aA}	(0.876 ± 0.047) ^{cA}
6	(0.878 ± 0.013) ^{cB}	(0.778 ± 0.022) ^{bA}	(0.760 ± 0.027) ^{abA}	(0.745 ± 0.012) ^{aA}	(0.877 ± 0.013) ^{cA}
12	(0.922 ± 0.006) ^{dC}	(0.839 ± 0.017) ^{bB}	(0.802 ± 0.005) ^{ab}	(0.788 ± 0.015) ^{ab}	(0.870 ± 0.020) ^{cA}
18	(0.958 ± 0.008) ^{dC}	(0.902 ± 0.012) ^{cC}	(0.827 ± 0.014) ^{ab}	(0.804 ± 0.013) ^{ab}	(0.864 ± 0.021) ^{bA}
24	(1.000 ± 0.015) ^{dD}	(0.956 ± 0.019) ^{cD}	(0.878 ± 0.010) ^{bC}	(0.804 ± 0.002) ^{ab}	(0.898 ± 0.016) ^{bA}
30	(1.070 ± 0.044) ^{cD}	(0.962 ± 0.022) ^{bD}	(0.977 ± 0.012) ^{bD}	(0.900 ± 0.013) ^{aC}	(0.962 ± 0.016) ^{bB}
36	(1.080 ± 0.031) ^{cE}	(0.977 ± 0.016) ^{bD}	(0.983 ± 0.013) ^{bD}	(0.900 ± 0.021) ^{aC}	(0.978 ± 0.013) ^{bB}

注:同一行中不同小写字母表示数据有显著性差异 ($p < 0.05$);同一列中不同大写字母表示数据有显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.3.2 孵育时间

AuNPs 与适配体孵育时间会影响 AuNPs - Apt 聚合物的形成程度^[27]。将 AuNPs 与适配体孵育室温孵育 0 ~ 60 min 后,在 NaCl 浓度为 24 mmol/L 的条件下检测各体系的吸收光谱(图 4a)并分析 A_{650}/A_{530} 的变化(图 4b,图中不同字母表示差异显著)。由图 4a 可知,当孵育 0 min 时,AuNPs 在 530 nm 处的原始吸光度降低,而在 650 nm 处出现明显的吸收峰,相应地,图 4b 中该体系的 A_{650}/A_{530} 最高,为 1.06,说明不经孵育,适配体难以通过静电作用有效吸附于 AuNPs 表面,无法维持 AuNPs 粒子的稳定性,造成 AuNPs 在 NaCl 的作用下发生粒子的聚集。随着 AuNPs 与适配体孵育时间延长至 15 min,体系的 A_{650} 显著降低, A_{650}/A_{530} 相对减小,表明随着适配体在 AuNPs 表面的吸附,其对 AuNPs 的保护作用增强,使 AuNPs 呈良好分散状态。其中,孵育 30 min,体系的 A_{650}/A_{530} 较小,为 0.80,说明孵育 30 min 可使适配体充分吸附于 AuNPs 表面,从而起到保护 AuNPs 的作用。因此,选择 AuNPs 与适配体孵育时间为 30 min。

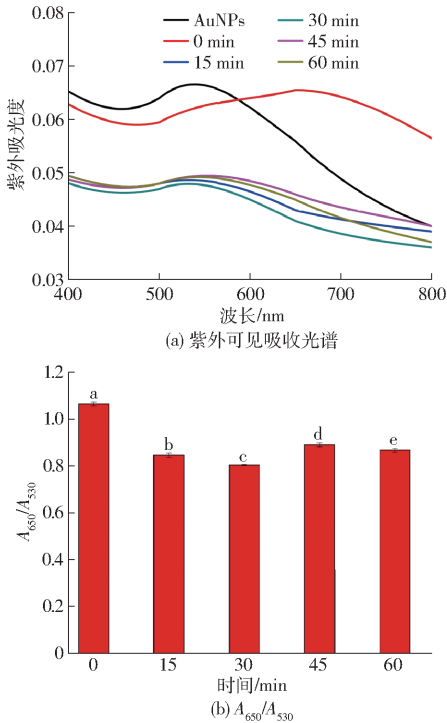


图4 AuNPs 与适配体孵育时间对体系的紫外可见吸收光谱及 A_{650}/A_{530} 的影响

Fig.4 Effects of incubation time of AuNPs and aptamer on UV - visible absorption spectra and A_{650}/A_{530} of system

2.4 灵敏度及标准曲线

为评价该检测方法对目标物 (E_2) 的响应度,在以上确定的检测条件下,对浓度 0.25 ~ 0.60 nmol/L E_2 体系进行分析,各体系的吸收光谱及 A_{650}/A_{530} 的变化如图 5 所示。

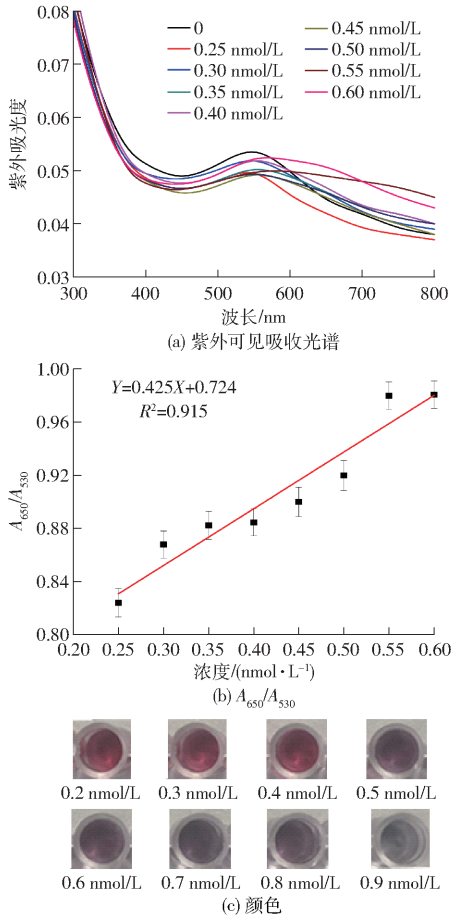


图5 E_2 浓度对 AuNPs - Apt 体系紫外可见吸收光谱及 A_{650}/A_{530} 的影响

Fig.5 Effects of E_2 concentration on UV - visible absorption spectrum and A_{650}/A_{530} of system

由图 5a 可知,随着体系中 E_2 浓度的增大,其在 650 nm 出现吸收峰,肉眼观察可见溶液颜色逐渐加深,由红色变为紫色后变蓝,当 E_2 浓度大于 0.50 nmol/L 时,溶液颜色变化肉眼可见。图 5b 中的 A_{650}/A_{530} 相应增大,当 E_2 浓度为 0.25 ~ 0.60 nmol/L 时,体系的 A_{650}/A_{530} 与 E_2 浓度间呈良好线性相关 ($R^2 = 0.915$)。进而计算可得到该方法的检测限 (LOD) 为 0.233 nmol/L。

2.5 方法的特异性

检验方法的特异性是反映其性能的重要指标。采用本方法对 E_2 及 4 种内分泌干扰物 (甲基睾酮、己烯雌酚、双酚 A、黄体酮) 进行分析,结果如图 6a 所示,图中不同颜色柱间不同大写字母表示数据有显著性差异 ($p < 0.05$);相同颜色柱间不同小写字母表示数据有显著性差异 ($p < 0.05$)。

图 6a 表明,当检测浓度 (0.2 nmol/L) 低于检出限 (0.233 nmol/L) 时, E_2 及 4 种内分泌干扰物的 A_{650}/A_{530} 无显著差异,而当检测浓度高于 LOD 时,如 0.4 ~ 0.8 nmol/L 时,总体而言,目标物 (E_2) 体系的 A_{650}/A_{530} 显著高于其他 4 种内分泌干扰物,己烯雌酚

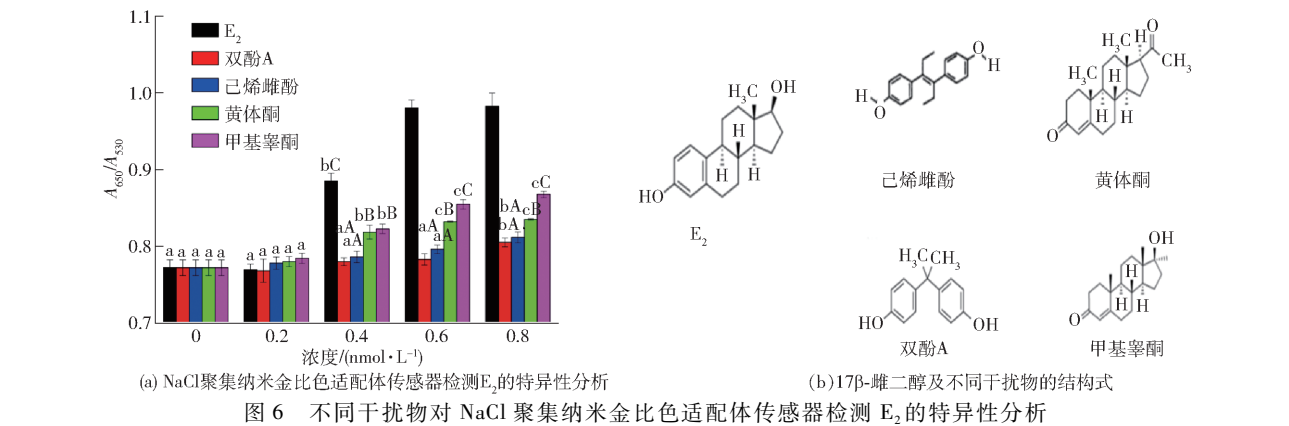


Fig. 6 Selectivity of colorimetric aptasensor for E₂ detection based different foreign substances

和双酚 A 体系的 A_{650}/A_{530} 均相对较低,而甲基睾酮和黄体酮体系的 A_{650}/A_{530} 相对增大。这可能是由于适配体与靶标是基于构象进行识别的^[12],如图 6b 所示,甲基睾酮、黄体酮和 E₂ 均具有环戊烷及多氢菲环结构,这使其与 E₂ 具有类似的结构特征,故甲基睾酮和黄体酮与 E₂ 适配体间存在一定的亲和度^[19]。而双酚 A、己烯雌酚与 E₂ 的分子结构区别较大,故与 E₂ 的适配体的亲和度较小。该方法虽然对

浓度为 0.8 nmol/L 的目标物也有较好的特异性,但因为超出了线性检测范围,故 E₂ 的检测结果与 0.6 nmol/L 时的结果间无显著差异。因此,本方法在线性检测范围内可以实现对 E₂ 的特异性识别和检测。

2.6 加标样品的检测

以本方法对牛奶和鸡蛋的加标样品进行分析,结果如图 7 所示。

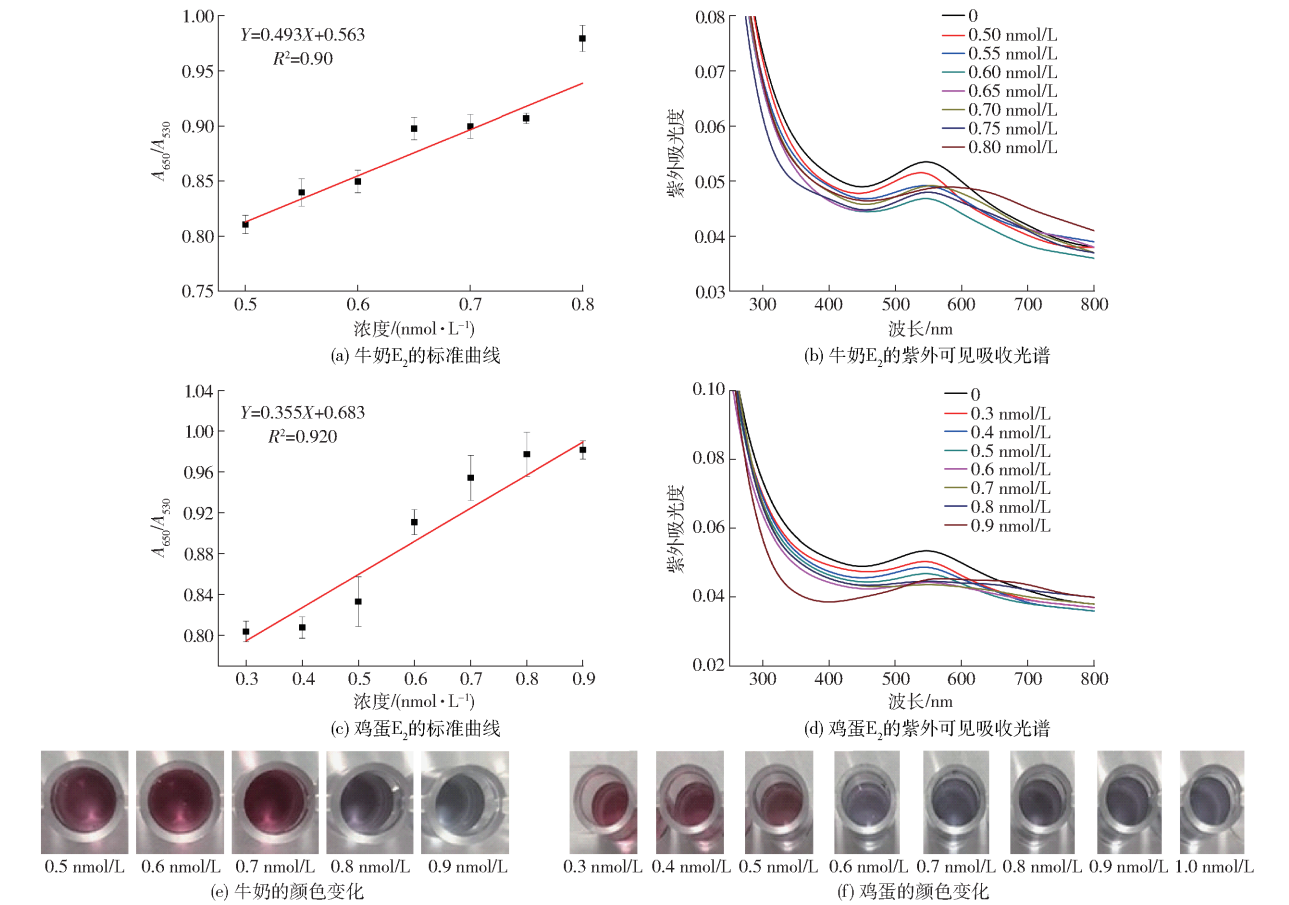


图 7 不同检测体系 E₂ 的标准曲线及紫外可见吸收光谱

Fig. 7 Calibration curves for E₂ in different systems and UV - visible absorption spectra

图 7a 表明,当对牛奶体系中的 E₂ 进行检测时,当 E₂ 浓度为 0.5 ~ 0.8 nmol/L 时,体系的 A_{650}/A_{530}

与 E₂ 浓度呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.900$),计算可得方法的检出限为 0.183 nmol/L。由图 7c 可知,对

鸡蛋中的 E₂ 检测而言,在 E₂ 浓度为 0.3 ~ 0.9 nmol/L 时,体系的 A₆₅₀/A₅₃₀ 与 E₂ 浓度呈良好的线性关系 ($R^2=0.920$),方法的检出限为 0.185 nmol/L。此外,当牛奶体系中的 E₂ 浓度高于 0.8 nmol/L,鸡蛋中的 E₂ 浓度高于 0.6 nmol/L 时,通过肉眼即可观察到颜色变化。牛奶、鸡蛋体系中 E₂ 的加标回收率结果如表 2 所示。由表 2 可知,E₂ 在牛奶、鸡蛋体系中的加标回收率分别为 101.6% ~ 105.4% 和 97.97% ~ 115.30%,相对标准偏差小于 6%,表明本方法精密度较高,准确性较好,可用于实际牛奶、鸡蛋样品中 E₂ 的检测。

表 2 牛奶和蛋清样品中 E₂ 的加标回收结果
Tab.2 Recoveries of E₂ in milk and albumen samples

样本	实际浓度/ (nmol·L ⁻¹)	平均回收浓 度/(nmol·L ⁻¹)	回收率/ %	相对标准 偏差/%
牛奶	0.5	0.527	105.4	5.87
	0.6	0.610	101.7	1.37
	0.7	0.711	101.6	3.42
蛋清	0.3	0.346	115.3	4.0
	0.6	0.640	106.7	4.3
	0.9	0.882	97.97	3.6

2.7 E₂ 常用检测方法对比

表 3^[2,4,10,12-14,28-34] 列出了目前部分 E₂ 的检测

表 3 E₂ 常用检测方法性能对比
Tab.3 Comparison of detection methods for E₂

方法	适配体长 度/mer	检出限/ (nmol·L ⁻¹)	线性范围	样品	回收率/ %	相对标准 偏差/%	来源
高效液相色谱法		0.084	0.037 ~ 370	不同河水	96.8 ~ 111.3	5.73	文献[28]
		1.47	1.84 ~ 367	自来水、河水、湖水	86 ~ 94	<5.3	文献[2]
液质联用法		55.1	3.67 ~ 183.6	鲜牛乳	76.1 ~ 99.8	<9.7	文献[4]
		3.3 × 10 ⁻⁵	1.5 × 10 ⁻⁶ ~ 5.0 × 10 ⁻⁵	医用废水、湖水、自来水	90.0 ~ 102.8	<5.45	文献[33]
电化学法	76	6 × 10 ⁻⁵	5 × 10 ⁻⁴ ~ 5	尿液	96.3 ~ 104.3		文献[34]
荧光法	76	2.1		废水	95 ~ 105		文献[31]
	35	37	80 ~ 400	牛胎血清	96.5 ~ 104.8		文献[32]
三联体传感体系		1.84	36.8 ~ 552	河水	86.1 ~ 107.4	<6.2	文献[30]
	35	0.17	0 ~ 0.2	水			文献[13]
		0.05		牛乳			文献[13]
比色法	35	0.2	50 ~ 800	尿液	104.5 ~ 114.5	2.79 ~ 4.34	文献[14]
	76	1.57	1.57 ~ 350	环境水			文献[29]
	76	0.2		尿液、唾液			文献[10]
	76	36.7	36.7 ~ 36700	河水	99 ~ 112	5.8 ~ 8.4	文献[12]
	76	0.233	0.25 ~ 0.6	去离子水			本文
		0.183	0.5 ~ 0.8	牛奶	101.6 ~ 105.4	1.37 ~ 5.87	本文
		0.185	0.3 ~ 0.9	鸡蛋	97.97 ~ 115.3	3.6 ~ 4.3	本文

3 结束语

作为一种典型的雌激素,雌二醇易通过食物

方法。包括检出限、检测线性范围、检测对象、回收率和相对标准偏差等信息。由表 3 可知,在对水体系的雌二醇进行检测时,与传统的高效液相色谱法相比,本方法的 LOD 为 0.233 nmol/L,这虽然比文献[28]高,但明显优于文献[2]的 LOD。而在检测牛奶中的雌二醇时,本方法较液质联用方法更为灵敏,回收率更高。与基于 76 mer 核酸适配体的雌二醇检测方法相比,虽然文献[34]所采用的电化学法对 E₂ 进行检测时,LOD 为 6 × 10⁻⁵ nmol/L,比本方法的 LOD 更低,灵敏度更高,但该方法的检测对象为尿液。在对河水及废水体系中的 E₂ 进行检测时,本方法的 LOD 则小于荧光法、三联体传感体系及文献[29](比色法),具有较高的灵敏度。虽然有研究认为使用长度较短的适配体有助于提高纳米金比色检测的灵敏度^[15,21],但目前研究中应用广泛,识别效果优良的仍是长度为 76 mer 的 E₂ 核酸适配体。本方法中应用长度为 76 mer 的适配体也得到了与文献[13]相当的 LOD,也证明了该适配体具有较好的 E₂ 识别能力。总体而言,本方法可以作为一种有效的 E₂ 快速分析方法。结果可靠,且具有较高的检测灵敏度。尤其是当前利用核酸适配体检测畜、禽食品中的 E₂ 的报道还较少,而本研究所建立的方法对于牛奶和鸡蛋中 E₂ 的快速检测有很好的应用前景。

链影响人体健康。探索简单、快速、灵敏的雌二醇检测技术对保障食品安全具有重要意义。本文提出一种基于核酸适配体的雌二醇纳米金比色检测

方法。当纳米金粒子与核酸适配体浓度比1:11 000、室温孵育30 min后,可使核酸适配体与纳米金粒子充分结合。检测 E_2 时,在NaCl浓度为24 mmol/L的条件下,水体系的 A_{650}/A_{530} 与雌二醇浓度间呈良好的线性关系($R^2=0.915$),检测的线性区间为0.25~0.60 nmol/L,检测限(LOD)为0.233 nmol/L,具有良好的特异性。在对牛奶和鸡蛋样品中的雌二醇进行检测时,该方法的线性检

测区间分别为0.5~0.8 nmol/L和0.3~0.9 nmol/L,检测限(LOD)分别为0.183 nmol/L和0.185 nmol/L,加标回收率分别为101.6%~105.4%和97.97%~115.30%,相对标准偏差小于6%。基于核酸适配体的雌二醇纳米金比色分析检测方法具有较高的灵敏度和特异性,简单、快速,具有良好的应用价值,可推广应用于实际畜、禽食品中的 E_2 检测。

参 考 文 献

- [1] 白宇, 张井, 胡景炎, 等. 牛奶中雌二醇胶体金试纸条快速检测技术研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(11): 3351-3357.
BAI Yu, ZHANG Jing, HU Jingyan, et al. Study on colloidal gold immunochromatographic assay for rapid detection of estradiol in milk[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(11): 3351-3357. (in Chinese)
- [2] LU H, XU S. Mesoporous structured estrone imprinted $Fe_3O_4@SiO_2@mSiO_2$ for highly sensitive and selective detection of estrogens from water samples by HPLC[J]. Talanta, 2015, 144: 303-311.
- [3] ALONSO R G, VIERA S S, FERRERA Z S, et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with ultra high performance liquid chromatography and fluorescence detection for the determination of estrogens and their metabolites in waste water[J]. J. Sep. Sci., 2015, 38(22): 3961-3968.
- [4] 张震, 张俊, 赵新芳, 等. 液相色谱-质谱/质谱法检测生鲜乳中雌二醇方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(21): 226-229.
- [5] YANG F X, HUANG W, XIE W, et al. Targeted analytical toxicology: simultaneous determination of 17α -ethynylestradiol and the estrogen-induced vitellogenin biomarker[J]. Environ. Int., 2015, 74: 119-124.
- [6] TSAKALOF A K, GKAGTZIS D C, KOUKOULIS G N, et al. Development of GC-MS/MS method with programmable temperature vaporization large volume injection for monitoring of 17β -estradiol and 2-methoxyestradiol in plasma[J]. Anal. Chim. Acta, 2012, 709: 73-80.
- [7] DONG Y, XU Y, YONG W, et al. Aptamer and its potential applications for food safety[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2014, 54(12): 1548-1561.
- [8] WU Y, ZHAN S, WANG F, et al. Cationic polymers and aptamers mediated aggregation of gold nanoparticles for the colorimetric detection of arsenic(III) in aqueous solution[J]. Chemical Communications, 2012, 48(37): 4459-4461.
- [9] TAGHDISI S M, DANESH N M, RAMEZANI M, et al. A novel colorimetric aptasensor for zearalenone detection based on nontarget-induced aptamer walker, gold nanoparticles and exonuclease-assisted recycling amplification[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(15): 12504-12509.
- [10] SOH J H, LIN Y, RANA S, et al. Colorimetric detection of small molecules in complex matrixes via target-mediated growth of aptamer-functionalized gold nanoparticles[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(15): 7644-7652.
- [11] KIM Y S, JUNG H S, MATSUURA T, et al. Electrochemical detection of 17β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(11): 2525-2531.
- [12] 牛书操, 吕珍珍, 刘金钊, 等. 基于适配体的纳米金比色法快速检测雌二醇研究[J]. 分析测试学报, 2014, 33(7): 835-839.
NIU Shucao, LÜ Zhenzhen, LIU Jinchuan, et al. Rapid detection of 17β -estradiol using gold nanoparticle based colorimetric aptasensor[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(7): 835-839. (in Chinese)
- [13] 付田, 曹锦轩, 潘道东, 等. 基于DNA核酸适配体序列的超灵敏比色法检测牛乳中的雌二醇[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 272-278.
FU Tian, CAO Jinxuan, PAN Daodong, et al. A supersensitive colorimetric method based on DNA aptamers for estradiol detection in milk[J]. Food Science, 2017, 38(8): 272-278. (in Chinese)
- [14] ALSAGER O A, KUMAR S, ZHU B, et al. Ultrasensitive colorimetric detection of 17β -estradiol: the effect of shortening DNA aptamer sequences[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(8): 4201-4209.
- [15] BANERJEE S, RAJA S O, SARDAR M, et al. Iron oxide nanoparticles coated with gold: enhanced magnetic moment due to interfacial effects[J]. Journal of Applied Physics, 2011, 109(12): 123902.
- [16] MA Q, WANG Y, JIA J. Colorimetric aptasensors for determination of tobramycin in milk and chicken eggs based on DNA and gold nanoparticles[J]. Food Chemistry, 2018, 249: 98-103.
- [17] 孙春燕, 张民, 李宏坤, 等. 金纳米粒子比色探针检测牛奶及鸡蛋中的三聚氰胺[J]. 分析化学, 2012, 40(3): 386-390.
SUN Chunyan, ZHANG Min, LI Hongkun, et al. Gold nanoparticles-based colorimetric sensing of melamine in milk and eggs[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(3): 386-390. (in Chinese)

- [18] 罗叶丽. 金纳米粒子比色传感器检测瘦肉精和抗生素的研究与应用[D]. 长春:吉林大学,2015.
LUO Yeli. Studies and applications of gold nanoparticles-based colormetric sensors for β -agonists and antibiotic [D]. Changchun: Jilin University,2015. (in Chinese)
- [19] LIU Jinchuan, BAI Wenhui, NIU Shucao. Highly sensitive colorimetric detection of 17β -estradiol using split DNA aptamers immobilized on unmodified gold nanoparticles[J]. Scientific Reports, 2014, 4:7571.
- [20] 周斌,石启炜,黄凌燕,等. 纳米金共振光散射光谱法和比色法检测牛奶中庆大霉素[J]. 分析试验室, 2017, 36(11): 1316 – 1319.
ZHOU Bin, SHI Qiwei, HUANG Lingyan, et al. Detection of gentamicin in milk based on gold nanoparticles by resonance light scattering and colorimetry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory,2017,36(11): 1316 – 1319. (in Chinese)
- [21] ALSAGER O A, ALOTAIBI K M, ALSWIELEH A M, et al. Colorimetric aptasensor of vitamin D3: a novel approach to eliminate residual adhesion between aptamers and gold nanoparticles [J]. Scientific Reports, 2018, 8:12947.
- [22] 耿玉慧, 沙隽伊, 王文静, 等. 核酸适配体在环境雌激素检测领域的研究进展[J]. 食品研究与开发,2019,40(13): 207 – 215.
GENG Yuhui, SHA Junyi, WANG Wenjing, et al. The development of aptasensor in environmental estrogens detection[J]. Food Research and Development, 2019,40(13):207 – 215. (in Chinese)
- [23] JELANI G A K, SINGH D, SENAPATI P, et al. Size-and distance-dependent nanoparticle surface-energy transfer (NSET) method for selective sensing of hepatitis C virus RNA [J]. Chemistry,2009,15(2):342 – 351.
- [24] 倪璇, 周晓彤, 吴诗剑, 等. 基于 NaCl 高效聚集纳米金的比色适配体传感器检测多菌灵[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2018, 36(3):57 – 64.
NI Xuan, ZHOU Xiaotong, WU Shijian, et al. Colorimetric aptasensor for carbendazim determination based on the salt-induced aggregation of gold nanoparticles [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agriculture Science), 2018, 36(3): 57 – 64. (in Chinese)
- [25] MEI Z, CHU H, CHEN W, et al. Ultrasensitive one-step rapid visual detection of bisphenol A in water samples by label-free aptasensor [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 39(1):26 – 30.
- [26] 李燕萍, 江凌, 张涛, 等. 基于点击反应的纳米金比色检测还原糖的研究[J]. 分析化学, 2013, 41(11):1688 – 1693.
LI Yanping, JIANG Ling, ZHANG Tao, et al. Colormetric detection of reducing sugar based on gold nanoparticles via click-reaction [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(11):1688 – 1693. (in Chinese)
- [27] STORHOFF J J, LAZARIDES A A, MUCIC R C, et al. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies [J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(19):4640 – 4650.
- [28] TAN S C, LEE H K. A metal-organic framework of type MIL – 101 (Cr) for emulsification-assisted micro-solid-phase extraction prior to UHPLC – MS/MS analysis of polar estrogens [J]. Microchimica Acta, 2019, 186(3):165.
- [29] ZHANG D, ZHANG W, YE J, et al. A label-free colorimetric biosensor for 17β -estradiol detection using nanoparticles assembled by aptamer and cationic polymer[J]. Australian Journal of Chemistry, 2015, 69(1):12 – 19.
- [30] 李巧凤, 任舒悦, 王瑜, 等. 基于 AuNP – AuNP – UCNP 三联体结构的传感体系高效检测环境雌激素双酚 A 和雌二醇[J]. 分析化学, 2018,46(4):486 – 492.
LI Qiaofeng, REN Shuyue, WANG Yu, et al. Efficient detection of environmental estrogen bisphenol A and estradiol by sensing system based on AuNP – AuNP – UCNP triple structure[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018,46(4):486 – 492. (in Chinese)
- [31] YILDIRIM N, LONG F, GAO C, et al. Aptamer-based optical biosensor for rapid and sensitive detection of 17β -estradiol in water samples [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(6):3288 – 3294.
- [32] HUANG Hailiang, SHI Shuo, GAO Xing, et al. A universal label-free fluorescent aptasensor based on Ru complex and quantum dots for adenosine, dopamine and 17β -estradiol detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 79:198 – 204.
- [33] FAN L, ZHAO G, SHI H, et al. A Femtomolar level and highly selective 17β -estradiol photoelectrochemical aptasensor applied in environmental water samples analysis [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(10): 5754 – 5761.
- [34] HUANG K J, LIU Y J, ZHANG J Z. Aptamer-based electrochemical assay of 17β -estradiol using a glassy carbon electrode modified with copper sulfide nanosheets and gold nanoparticles, and applying enzyme-based signal amplification [J]. Microchimica Acta,2015,182: 409 – 417.