

刘晓, 朱成龙, 庞月红, 等. 基于黑磷纳米片的荧光适配体传感器检测雌激素 17 β -雌二醇 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 248-254. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090046

LIU Xiao, ZHU Chenglong, PANG Yuehong, et al. Fluorescence Aptasensor for 17 β -Estradiol Determination Based on Black Phosphorus Nanosheets [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 248-254. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090046

· 分析检测 ·

基于黑磷纳米片的荧光适配体传感器检测 雌激素 17 β -雌二醇

刘 晓¹, 朱成龙¹, 庞月红¹, 冯永巍², 史学丽³, 张 毅^{1,*}

(1. 江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 食品学院, 分析食品安全学研究所, 江苏无锡 214122;

2. 无锡市食品安全检验检测中心, 江苏无锡 214122;

3. 石家庄市妇幼保健院, 河北石家庄 050051)

摘 要: 建立一种定量检测雌激素 17 β -雌二醇 (E2) 的荧光适配体传感器。以黑磷晶体为原料, 利用超声辅助液相剥离技术制备了黑磷纳米片 (BPNs) 作为荧光受体, 基于 6-羧基荧光素标记的适配体 (FAM-Apt) 与 BPNs 间的荧光共振能量转移机制构建了荧光适配体传感器, 对 BPNs 浓度、FAM-Apt 浓度和反应时间进行优化, 并对自来水和牛奶样品进行测定。结果表明, 该 BPNs 具有独立的片层结构且粒径均匀; 在最优条件下, 即 BPNs 和 FAM-Apt 的浓度分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 7.5 nmol/L 时, 该传感器对 E2 检测的线性范围为 1.5~60 ng/mL, 检测限为 1.0 ng/mL。自来水和牛奶样品中加标回收率分别为 91.2%~104.8% 和 87.5%~104.3%; 相对标准偏差 (RSD) 为 4.99%~10.53% 和 4.48%~11.24%。该方法简便、灵敏, 30 min 即可完成检测, 特异性强, 能够实现对实际样品中 E2 的定量检测。

关键词: 适配体传感器, 黑磷纳米片, 17 β -雌二醇, 荧光共振能量转移

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)11-0248-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090046

Fluorescence Aptasensor for 17 β -Estradiol Determination Based on Black Phosphorus Nanosheets

LIU Xiao¹, ZHU Chenglong¹, PANG Yuehong¹, FENG Yongwei², SHI Xueli³, ZHANG Yi^{1,*}

(1. Institute of Analytical Food Safety, College of Food Science and Technology, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Food Safety Inspection and Testing Center of Wuxi, Wuxi 214122, China;

3. Maternal and Child Health Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: A fluorescence aptasensor for quantitative detection of 17 β -estradiol was constructed. Black phosphorus nanosheets (BPNs) were prepared by ultrasound-assisted aqueous phase exfoliation using black phosphorus crystal (BP) as fluorescence receptors. A 17 β -estradiol fluorescence aptasensor was constructed between FAM labeled aptamers and BPNs based on the fluorescence resonance energy transfer (FRET). After optimization of BPNs concentration, FAM-Apt concentration and reaction time, samples of tap water and milk were determined. The results showed that the prepared BPNs had independent lamellar structure and uniform particle size. With the concentrations of BPNs and FAM-Apt were 10 $\mu\text{g/mL}$ and 7.5 nmol/L respectively, the linear range of the sensor was 1.5~60 ng/mL and the detection limit was 1.0 ng/mL. The recoveries of tap water and milk were 91.2%~104.8% and 87.5%~104.3%. The relative standard deviation (RSD) were 4.99%~10.53% and 4.48%~11.24%, respectively. This method with simple, high sensitive and strong specificity could be

收稿日期: 2020-09-10

基金项目: 国家自然科学基金 (21876066, 41776110, 21435001); 食品科学与技术国家一级学科计划 (JUFSTR20180301); 河北医学科学研究课题计划 (20212039)。

作者简介: 刘晓 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全, E-mail: 957161806@qq.com。

* 通信作者: 张毅 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: zhangyijnu@jiangnan.edu.cn。

completed within 30 min and could realize quantitative detection of E2 in actual samples.

Key words: aptasensor; black phosphorus nanosheets; 17 β -estradiol; fluorescence resonance energy transfer

环境雌激素(Environmental estrogens, EEs)是一种具有内分泌干扰效应的类固醇类物质,主要包括内源性雌激素(如雌二醇、雌三醇、雌酮、孕酮等)、外源性雌激素(如双酚 A、己烯雌酚等)以及其它具有内分泌干扰效应的化合物(如滴滴涕、多氯联苯等)^[1-2]。其中,17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)具有较强的雌激素效应^[3],过量摄入会干扰机体的内分泌系统,引发生殖系统、免疫系统异常,甚至导致生殖器官癌变^[4-5]。由于 E2 对动物体的生长发育具有促进作用而被应用于养殖业^[6],并随动物排泄物进入土壤、水源中,导致肉类、乳类、蛋类以及环境中雌激素残留问题日益严重。因此,监测食品中的 E2 对保障食品安全具有重要意义。

常用的 E2 检测方法主要为色谱法^[7-9]、免疫学方法^[10]和适配体传感法^[11-12]。其中,适配体传感器简便、快速、特异性强、灵敏度高。适配体是通过体外指数富集的配体系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选得到的一段能够与靶标特异性结合的单链 DNA 或 RNA^[13]。与抗体相比,适配体具有易于合成和修饰、稳定性高、适应范围广等优点^[14-16]。

目前,荧光适配体传感器已被应用于多种食品中污染物的检测^[12,17-19]。荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理是荧光传感中常用的检测原理,其实现条件有二,一是荧光供体的发射光谱与受体的吸收光谱存在重叠,二是供体和受体之间的距离小于一定程度(10 nm),当两个条件都满足时,供体-受体二者之间可以发生荧光共振能量转移,从而利用供-受体距离变化导致的荧光强度变化反映分析物的含量^[20]。常见的 FRET 供体有小分子荧光染料、量子点和上转换纳米材料等;受体有金纳米粒子、氧化石墨烯和二硫化钼纳米片等^[11,18,21-24]。

黑磷纳米片(Black phosphorus nanosheets, BPNs)是从黑磷晶体中剥离出来的片层状二维纳米材料。它与石墨烯、石墨相氮化碳和二硫化钼等其它二维材料有许多相似的属性,如在紫外可见近红外区都有较强的吸收、比表面积大等;同时还具有一些独特的性能,如具有高载流子迁移率、高传输各向异性、层数依赖的带隙和良好的生物相容性与生物安全性。在分析化学领域,BPNs 最初被用在气体和蒸汽传感器,后来又被应用于检测过氧化氢^[25]、无机离子^[26]、疾病标志物^[27]和单链核酸^[28]。与黑磷的另一种存在形态——黑磷量子点常作为 FRET 荧光供体的应用方式不同,BPNs 自身并不发光但却具有广泛的吸收光谱,因此 BPNs 可以作为 FRET 荧光受体实现 FRET 过程^[15,28]。与金纳米粒子需通过巯基末端共价结合核

酸的修饰方式不同,BPNs 中的 P 原子可以通过范德华力将单链核酸吸附在其表面进而使标记在单链核酸上的荧光团淬灭,但它对双链核酸和与靶标结合的适配体却没有吸附,故而无需修饰即可用于构建 FRET 体系。

因此,本文通过超声辅助液相剥离法制备 BPNs 并将其作为 FRET 受体,以 6-羧基荧光素(FAM)标记的 E2 适配体(FAM-Apt)作为 FRET 供体,构建荧光适配体传感器,应用于 E2 的定量分析,并对其检测性能和实际应用性能进行了评价。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

17 β -雌二醇适配体(5'-FAM-GCC-GTT-TGG-GCC-CAA-GTT-CGG-C-3') 生工生物工程(上海)股份有限公司;黑磷晶体 南京先丰纳米材料科技有限公司;17 β -雌二醇(E2)、雌三醇(E3)、双酚 A(BPA)、己烯雌酚(DS)、孕酮(P4) 上海阿拉丁生物技术有限公司;三羟基氨基甲烷(Tris)、氯化钠(NaCl)、氯化镁(MgCl₂)、氯化钾(KCl)、盐酸(HCl)、乙醇(C₂H₅OH)、冰醋酸 分析纯,北京国药集团化学试剂有限公司;超纯水 杭州娃哈哈集团有限公司;自来水 本实验室;牛奶 本地超市。

Synergy H1 多功能微孔板检测仪 美国伯腾仪器有限公司;F-7000 荧光分光光度计、JEM-2100 型透射电镜 日本日立公司;UV-3600PLUS 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司;ZEN3700 型纳米粒度仪 英国马尔文仪器有限公司;3K30 高速离心机 美国热电公司;Scientz-III 型超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司;KQ-100DB 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;冷冻干燥机 北京博励行仪器有限公司;BSA124S 型电子天平 北京赛多利斯公司;涡旋振荡器 德国艾卡公司;ST3100 实验室 pH 计 奥豪斯仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑磷纳米片的制备与表征 采用超声辅助液相剥离法制备黑磷纳米片(BPNs)。称取 25 mg 黑磷晶体(BP)于研钵中,加入少量水湿磨,然后转移至 50 mL 离心管中加水约 25 mL 制成悬浊液,悬浊液经超声波细胞破碎仪冰浴超声 10 h(超声功率 300 W,工作 4 s 停 4 s)后,4000 r/min 离心 15 min,弃去未剥离的黑磷沉淀,上清液经真空冷冻干燥后得到尺寸较小的 BPNs,将得到的 BPNs 配制成 1 mg/mL 的分散液备用。

所制备的 BPNs 使用紫外-可见分光光度计测定吸光度值(扫描范围 400~900 nm,采样间隔 0.5 nm,玻

璃比色皿狭缝宽度 2 mm, 光程 10 mm, 规格 0.7 mL); 取少量溶液稀释超声, 吸取 10 μL 滴加至覆有碳膜的铜网上, 干燥后采用 JEM2110 透射电镜(工作电压 200 kV)进行表征; 采用布鲁克 Dimension 原子力显微镜(探针型号 SCANASYST-AIR, 扫描速率 1.0 Hz, 扫描像素 256 \times 256)进行片层厚度表征; 采用纳米粒度仪(以超纯水作为溶剂, 平衡时间 120 s)测定水合粒径^[29]。

1.2.2 标准溶液的制备 使用乙醇溶液(分析纯)分别配制 1 mg/mL 的 17 β -雌二醇、雌三醇、双酚 A、己烯雌酚、孕酮标准储备液, 不同浓度的标准溶液由 1 mg/mL 的储备液稀释得到, 溶剂为 Tris-HCl 缓冲溶液(100 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L NaCl、25 mmol/L KCl、10 mmol/L MgCl₂, pH7.54)。6-羧基荧光素(FAM)标记的适配体 4000 r/min 离心 1 min 后, 用超纯水溶解至 100 $\mu\text{mol/L}$ 备用。所有溶液置于 -4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 检测方法条件优化

1.2.3.1 检测原理 检测原理如图 1 所示, 将 FAM-Apt 与 BPNs 混合后, FAM-Apt 吸附在 BPNs 表面, 二者发生荧光共振能量转移, FAM 的荧光被淬灭; 当体系中存在 E2 时, E2 与适配体特异性结合引起适配体构象改变, 使 FAM-Apt 从 BPNs 表面脱离, FAM 的荧光恢复, 其恢复程度与目标物的浓度呈线性关系, 据此可以实现对 E2 的定量分析。

1.2.3.2 检测方法 取 96 孔黑色酶标板, 分别加入 50 μL FAM-Apt 和 50 μL BPNs, 混合均匀后立即加入 150 μL E2 标准溶液或样品溶液, 混匀后室温避光孵育一定时间, 然后用多功能微孔板检测仪测定荧光强度($E_x=490\text{ nm}$, $E_m=520\text{ nm}$), 平行测定三次。以 F_0 表示空白组(E2 浓度为 0 ng/mL)的荧光强度, F 表示样品溶液的荧光强度, 传感器的传感信号用相对荧光强度(F/F_0)表示。

1.2.3.3 条件优化 对 BPNs 浓度、FAM-Apt 浓度和孵育时间进行优化。当 FAM-Apt 浓度为 2.5 nmol/L 时, 考察不同 BPNs 浓度(5、10、15、20、40 $\mu\text{g/mL}$)反应 20 min 后传感器对 E2 的响应。然后在不同

FAM-Apt 浓度(1.25、2.5、5、7.5、10 nmol/L)的反应体系中等比例加入对应浓度的 BPNs(5、10、20、30、40 $\mu\text{g/mL}$), 孵育 20 min 后测定荧光强度。在 BPNs 和 FAM-Apt 浓度分别为 30 $\mu\text{g/mL}$ 和 7.5 nmol/L 的条件下, 考察不同孵育时间(10、20、30、35、40、50、60 min)下传感器对 E2 的响应。

1.2.4 特异性研究 96 孔黑色酶标板中加入 50 μL 37.5 nmol/L FAM-Apt, 50 μL 50 $\mu\text{g/mL}$ BPNs, 再分别加入 150 μL 空白对照溶液, 100 ng/mL E2 标准溶液和 E2 结构类似物(雌三醇、双酚 A、己烯雌酚、孕酮)标准溶液, 室温下避光孵育 30 min 后测定荧光强度, 平行测定三次。

1.2.5 实际样品分析 为验证本方法的准确性和对实际样品的检测能力, 测定了自来水和市售牛奶样品并进行了加标回收实验。首先称取 2 g 牛奶样品, 加入乙酸溶液调节 pH 至 4.6 以沉淀蛋白质, 10 $^{\circ}\text{C}$ 7000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。处理后的牛奶样品和自来水分别按照 1:20 的体积比用缓冲溶液稀释, 然后加入不同浓度的 E2 标准溶液(0、4.5、30、60 ng/mL), 按照 1.2.3.2 所述方法测定荧光强度, 平行测定三次, 外标法定量并计算加标回收率。

1.3 数据处理

使用 Origin 2018 对得到的吸光度值、荧光强度值、水合粒径分布进行处理, 并绘制紫外可见吸收光谱、荧光光谱和水合粒径分布图。使用 NanoScope Analysis 导入 AFM 图, 选取对应位置分析高度, 并使用 Origin 2018 绘制对应位置高度图。使用 SPSS 进行单因素显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 黑磷纳米片的表征

超声辅助液相剥离方法可以打破黑磷层间范德华力, 将黑磷晶体剥离成少层甚至单层的黑磷纳米(BPNs)。对所制备的 BPNs 进行表征, 结果如图 2 所示。透射电镜(TEM)显示该 BPNs 具有独立的片层结构, 大部分纳米片都小于 200 nm; 由粒度仪获得水合粒径图可以看出该 BPNs 尺寸分布较为均匀, 水合粒径平均值为 310.3 nm; 使用原子力显微镜

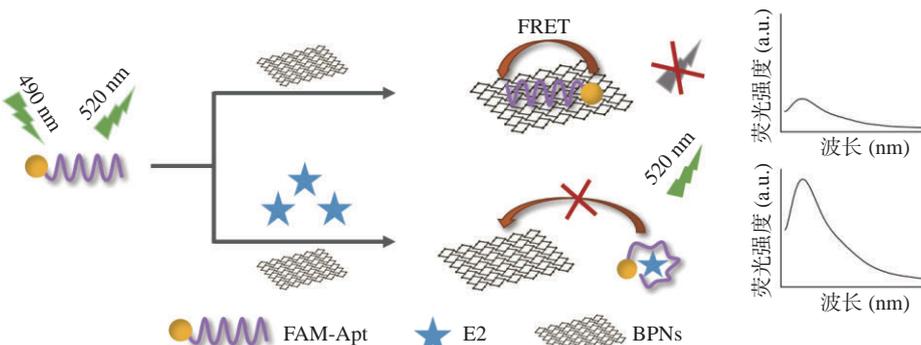


图 1 基于 FRET 原理测定 17 β -雌二醇(E2)的荧光适配体传感示意图

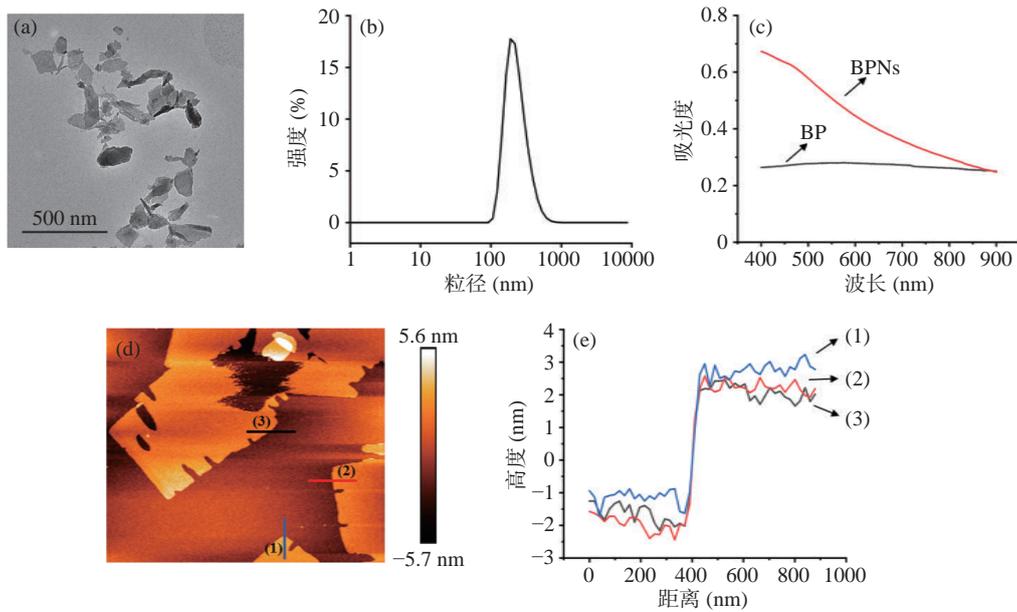


图 2 BPNs 的 TEM 图(a), 水合粒径(b)以及 BP 和 BPNs 的吸收光谱(c); BPNs 的 AFM 图(d) 和图(d)中对应位置的高度分析(e)

Fig.2 The TEM image (a), hydrodynamic diameter distribution (b) of BPNs; the absorption spectrum of BP and BPNs (c); AFM image of BPNs (d) and corresponding height analysis of BPNs in figure (e)

(AFM)分析材料的厚度,结果表明该 BPNs 片层厚度约为 4 nm,对应大约 2~4 层^[29];与黑磷晶体相比,BPNs 在 400~600 nm 范围内吸收明显增强。以上表征结果共同证明由 BP 晶体成功剥离得到尺寸较小、层数较少的 BPNs。

2.2 E2 检测

2.2.1 可行性检测 图 3(a)为 BPNs 的吸收光谱与 FAM-Apt 和 E2 的荧光发射光谱图。BPNs 的吸收范围与 FAM-Apt 的发射范围存在重叠;在 FAM-Apt 的荧光测试条件下,E2 不会产生荧光信号干扰。因此,该体系满足了 FRET 的第一个条件,即荧光供体的发射光谱与受体的吸收光谱存在重叠。以 60 ng/mL E2 进行荧光淬灭和恢复实验,结果如图 3(b)所示。与 FAM-Apt 相比,加入 BPNs 后 FAM 的荧光被显著淬灭,E2 的加入使被淬灭的荧光有所恢复,证明 FRET 体系的可行性。

2.2.2 条件优化 BPNs 浓度影响 FAM 的淬灭程度,进而影响检测方法的灵敏度,因此 BPNs 的浓度对传感器的构建有重要影响。如图 4(A)所示,随着 BPNs 浓度增加,FAM-Apt 的荧光强度逐渐降低。但当体系中 BPNs 的浓度过高时,与 E2 竞争结合适配体的程度大大增加,导致 FAM-Apt 与 E2 的结合不稳定,加入目标物后荧光恢复不明显。以 F/F_0 为纵坐标作图可得,BPNs 的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时荧光强度恢复最明显。

适配体作为传感器的识别元件对检测方法的灵敏度具有重要影响,因此对 FAM-Apt 的浓度进行考察。由图 4(B)可以看出,随着 FAM-Apt 浓度增加,响应信号逐渐增大,FAM-Apt 浓度为 7.5 nmol/L 时

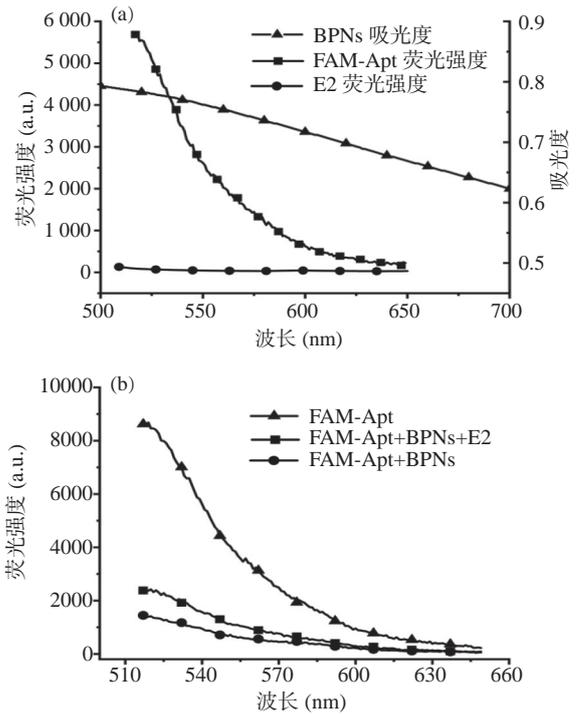


图 3 不同条件下 FAM-Apt 荧光强度变化

Fig.3 Fluorescence intensity of FAM-Apt under different conditions

注:(a)BPNs 的吸收光谱和 FAM-Apt、E2 荧光光谱;(b)FAM-Apt 荧光光谱,BPNs 对荧光的淬灭光谱以及加入 E2 后荧光恢复光谱($E_x=490\text{ nm}$, $E_m=520\text{ nm}$)。

光恢复强度最大,继续增大 FAM-Apt 浓度后响应信号降低,可能是因为过高的 FAM-Apt 浓度导致传感器对低浓度目标物响应不灵敏。因此,选择 7.5 nmol/L 作为 FAM-Apt 的最终浓度。

BPNs 淬灭 FAM 需要一定的时间,适配体与目

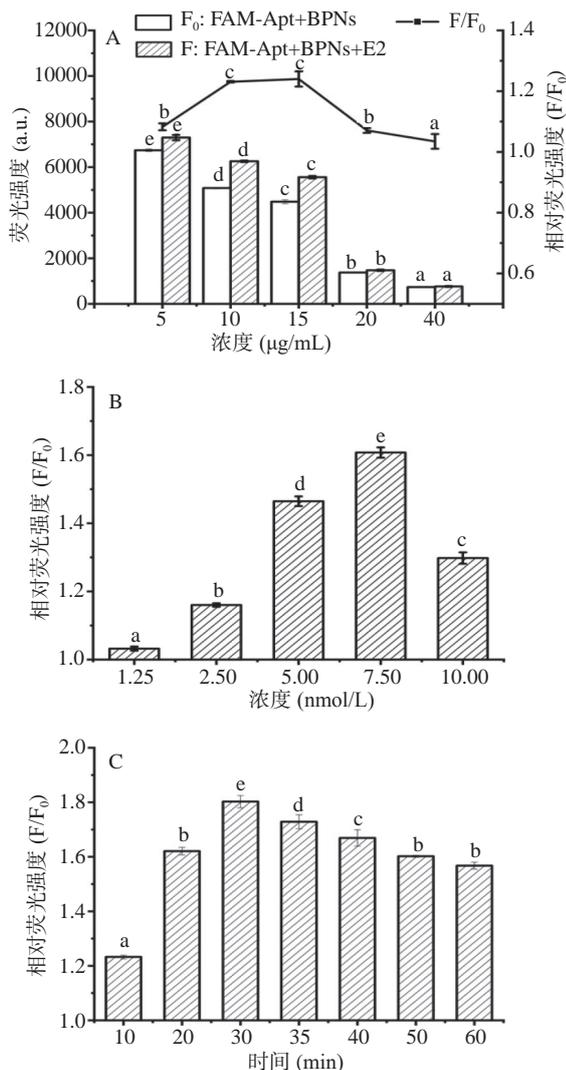


图4 BPNs浓度(A)、FAM-Apt浓度(B)和反应时间(C)对相对荧光强度的影响

Fig.4 Effect of BPNs concentration (A), E2 aptamer concentration (B) and incubation time (C) on the relative fluorescence intensity

注: 相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同表示差异显著($P<0.05$)。

标物也需要一段时间才能完成结合过程, 因此对反应时间进行了优化。结果如图 4(C)所示, 随着反应时间的增加, 体系的荧光恢复强度逐渐增加, 当反应时间达到 30 min 时相对荧光强度最大, 此后稍有降低。因此, 最终的反应时间确定为 30 min。

2.3 标准曲线

在确定的最优条件下, 将不同浓度(0~300 ng/mL)的 E2 标准溶液加入反应体系中, 测定体系荧光恢复强度, 以验证本方法的灵敏度, 确定线性范围和检测限。由图 5(a)可得, 随着 E2 浓度增加, 荧光强度逐渐增强, 当体系中 E2 浓度达到 300 ng/mL 时, 荧光强度与 E2 浓度的关系偏离线性。以 520 nm 处的相对荧光强度(F/F_0)对 E2 浓度作图, 结果如图 5(b)所示。从图中可以看出, E2 浓度在 1.5~60 ng/mL 的范围内表现出良好的线性关系, 线性回归方程为

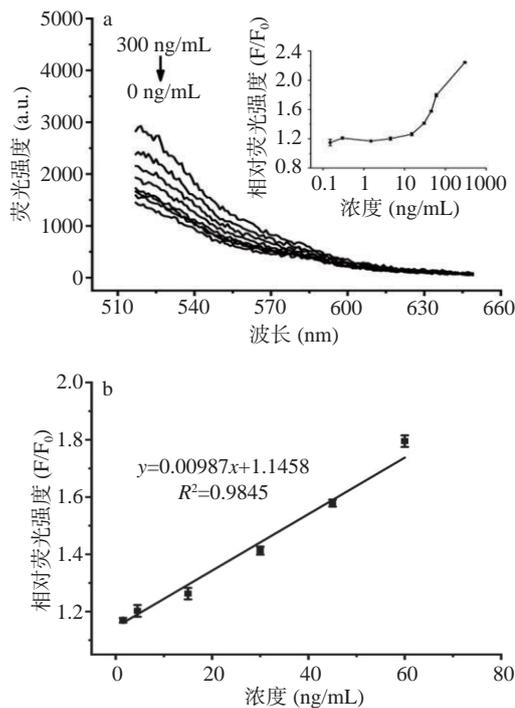


图5 不同浓度 E2 对传感器的荧光响应

Fig.5 Fluorescence intensity against different concentrations of E2

注: (a) 荧光强度与 E2 浓度的关系曲线, 内插图为 520 nm 处相对荧光强度(F/F_0)与 E2 浓度的关系曲线; (b) 相对荧光强度(F/F_0)与 E2 浓度的标准曲线。

$y=0.00987x+1.1458$ ($R^2=0.9845$)。以 3N/S (N 指空白样品信号标准偏差, S 指标准曲线斜率) 计算检测限为 1.0 ng/mL。以上结果表明, 该方法具有良好的准确性和灵敏度。

表 1 列举了本方法与之前报道的其它 E2 检测方法的比较结果。本实验所述方法具有与纳米金比色法相当的线性范围和灵敏度, 在满足食品样品检测要求的前提下能够在一定程度上避免纳米金比色法和电化学方法抗干扰能力差的缺点。

2.4 特异性研究

为了验证本方法对 E2 的选择性, 选择 E2 的结构类似物雌三醇、双酚 A、己烯雌酚、孕酮进行特异性研究, E2 和四种结构类似物的浓度均为 60 ng/mL, 测定结果如图 6 所示。由于 E2 与适配体特异性结合, 导致 FAM-Apt 从 BPNs 表面脱离, FAM-Apt 荧光恢复; 而结构类似物与适配体结合的亲和力较低, 加入反应体系后不能引起 FAM-Apt 从 BPNs 表面脱离, 因此荧光恢复不明显。以上结果表明, 构建的基于适配体的荧光传感器对 E2 具有良好的选择性, 可以实现对目标物的特异性检测。

2.5 实际样品分析

为了验证本方法的准确性和在实际样品中的应用能力, 对自来水和牛奶样品进行加标回收实验。样品中分别加入不同浓度 (0、4.5、30、60 ng/mL) 的 E2, 按本方法测定 E2 含量, 回收率结果如表 2 所

表 1 不同 17 β -雌二醇检测方法的比较Table 1 Comparison of different detection methods of 17 β -estradiol

检测方法	传感器组成	定量范围(nmol/L)	检测限(nmol/L)	参考文献
纳米金比色法	基于裸适配体、金纳米粒子和氯化钠溶液	37~330	31.0	[30]
电化学方法	基于碳纳米管	50~1.6 $\times 10^3$	50	[31]
	基于硫化钴纳米片和金纳米粒子	1 $\times 10^{-3}$ ~1	7 $\times 10^{-4}$	[32]
基于纳米粒径	基于粒径和电势聚苯乙烯传感器	5.0~150	5.0	[33]
	基于Cy5.5标记适配体和量子点	0.82~20.5	0.22	[11]
荧光法	基于量子点标记适配体和Ru复合物	80~400	37	[12]
	基于罗丹明B标记适配体和金纳米粒子	0.48~200	0.48	[24]
	基于FAM标记适配体和黑磷纳米片	5.5~220.3	3.7	本实验

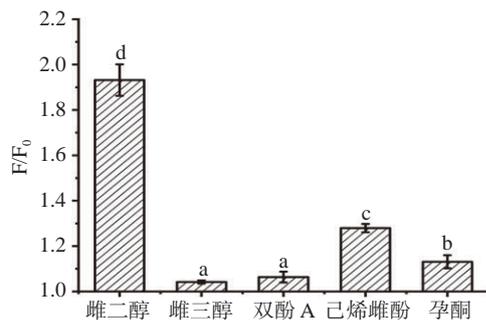


图 6 荧光适配体传感器的选择性实验结果

Fig.6 Specificity results of fluorescence aptasensor

表 2 实际样品中雌二醇加标回收实验结果

Table 2 Recovery results of 17 β -estradiol in real samples (n=3)

样品	加标浓度 (ng/mL)	检出浓度(ng/mL) (平均值 \pm 标准偏差)	回收率(%) (平均值 \pm 标准偏差)	相对标准 偏差(%)
自来水	0.0	<定量限		
	4.5	4.5 \pm 0.47	99.7 \pm 10.50	10.53
	30.0	27.4 \pm 1.36	91.2 \pm 4.55	4.99
	60.0	62.9 \pm 5.44	104.8 \pm 9.10	8.65
牛奶	0.0	<定量限		
	4.5	3.9 \pm 0.44	87.5 \pm 9.84	11.24
	30.0	28.5 \pm 1.28	95.1 \pm 4.27	4.48
	60.0	62.6 \pm 3.83	104.3 \pm 6.38	6.12

示。自来水和牛奶样品的回收率分别为 91.2%~104.8% 和 87.5%~104.3%，相对标准偏差 (RSD) 分别为 4.99%~10.53% 和 4.48%~11.24%。以上结果表明，本方法可以应用于自来水和牛奶样品中 E2 的检测。

3 结论

利用 FAM 标记的 E2 适配体作为荧光供体，BPNs 作为荧光受体，基于 FRET 原理构建了荧光适配体传感器用于 E2 的检测。在最优实验条件下，本方法在 1.5~60 ng/mL 的范围内表现出良好的线性关系，检测限为 1.0 ng/mL，且检测特异性、稳定性和重复性均良好，本方法可以实现雌二醇的快速灵敏检测。自来水和牛奶样品中加标回收实验结果理想，表明该方法具有实际样品检测能力。与传统的仪器检测方法相比，本方法操作简单，成本低，30 min 即可完成检测，在 E2 检测方面具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Omar T F T, Ahmad A, Aris A Z, et al. Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds[J]. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2016, 85: 241–259.
- [2] Caupos E, Mazellier P, Croue J P. Photodegradation of estrone enhanced by dissolved organic matter under simulated sunlight[J]. Water Research, 2011, 45(11): 3341–3350.
- [3] Noppe H, Le Bizec B, Verheyden K, et al. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 611(1): 1–16.
- [4] Parodi P W. Impact of cows' milk estrogen on cancer risk[J]. International Dairy Journal, 2012, 22(1): 3–14.
- [5] Ren S Y, Li Q F, Li Y, et al. Upconversion fluorescent aptasensor for bisphenol A and 17 β -estradiol based on a nanohybrid composed of black phosphorus and gold, and making use of signal amplification via DNA tetrahedrons[J]. Microchimica Acta, 2019, 186(3): 151.
- [6] Pezzolato M, Maurella C, Varello K, et al. High sensitivity of a histological method in the detection of low-dosage illicit treatment with 17 beta-estradiol in male calves[J]. Food Control, 2011, 22(10): 1668–1673.
- [7] Lu H Z, Xu S F. Mesoporous structured estrone imprinted Fe₃O₄@SiO₂@mSiO₂ for highly sensitive and selective detection of estrogens from water samples by HPLC[J]. Talanta, 2015, 144: 303–311.
- [8] Guedes-Alonso R, Santana-Viera S, Sosa-Ferrera Z, 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 wastewater[J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(22): 3961–3968.
- [9] Janssens G, Mangelinckx S, Courtheyn D, et al. Simultaneous detection of androgen and estrogen abuse in breeding animals by gas chromatography-mass spectrometry/combustion/isotope ratio mass spectrometry (GC-MS/C/IRMS) evaluated against alternative methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(34): 7574–7581.
- [10] Wang S H, Zhuang H S, Du L Y, et al. Determination of estradiol by biotin-avidin-amplified electrochemical enzyme immunoassay[J]. Analytical Letters, 2007, 40(5): 887–896.

- [11] Long F, Zhu A, Shi H C, et al. Hapten-grafted graphene as a transducer for homogeneous competitive immunoassay of small molecules[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(6): 2862–2866.
- [12] Huang H L, Shi S, Gao X, et al. A universal label-free fluorescent aptasensor based on Ru complex and quantum dots for adenosine, dopamine and 17 beta-estradiol detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 79: 198–204.
- [13] Ming T, Wang Y, Luo J P, et al. Folding paper-based aptasensor platform coated with novel nanoassemblies for instant and highly sensitive detection of 17 β -estradiol[J]. *ACS Sensors*, 2019, 4(12): 3186–3194.
- [14] Alnajrani M N, Alsager O A. Lateral flow aptasensor for progesterone: Competitive target recognition and displacement of short complementary sequences[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 587: 113461.
- [15] Tan W H, Donovan M J, Jiang J H. Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(4): 2842–2862.
- [16] Pei H, Zuo X L, Zhu D, et al. Functional DNA nanostructures for theranostic applications[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(2): 550–559.
- [17] Bai W H, Zhu C, Liu J C, et al. Split aptamer-based sandwich fluorescence resonance energy transfer assay for 19-nortestosterone[J]. *Microchimica Acta*, 2016, 183(9): 2533–2538.
- [18] Kim T Y, Lim J W, Lim M C, et al. Aptamer-based fluorescent assay for simple and sensitive detection of fipronil in liquid eggs[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2020, 25(2): 246–254.
- [19] Khan I M, Niazi S, Yu Y, et al. Aptamer induced multicolored AuNCs-WS₂ "turn on" FRET nano platform for dual-color simultaneous detection of aflatoxin B₁ and zearalenone[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(21): 14085–14092.
- [20] 蒋林玲, 丁立平, 房喻, 等. 荧光共振能量转移技术在生命科学和超分子科学中的应用研究进展[J]. *自然杂志*, 2004(6): 27–32.
- [21] Hu X X, Wang Y Q, Liu H Y, et al. Naked eye detection of multiple tumor-related mRNAs from patients with photonic-crystal micropattern supported dual-modal upconversion bioprobes[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(1): 466–472.
- [22] 张纪梅, 魏硕名, 李萍, 等. 基于量子点的分子灯塔探针的制备及其在 DNA 探针中的应用[J]. *纳米技术与精密工程*, 2009, 7(6): 528–531.
- [23] Neema P M, Tomy A M, Cyriac J. Chemical sensor platforms based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) and 2D materials[J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 124: 115797.
- [24] Ni X, Xia B, Wang L M, et al. Fluorescent aptasensor for 17 beta-estradiol determination based on gold nanoparticles quenching the fluorescence of Rhodamine B[J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 523: 17–23.
- [25] Yan S C, Wang B J, Wang Z L, et al. Supercritical carbon dioxide-assisted rapid synthesis of few-layer black phosphorus for hydrogen peroxide sensing[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 80: 34–38.
- [26] Gu W, Pei X Y, Cheng Y X, et al. Black phosphorus quantum dots as the ratiometric fluorescence probe for trace mercury ion detection based on inner filter effect[J]. *ACS Sensors*, 2017, 2(4): 576–582.
- [27] Peng J, Lai Y Q, Chen Y Y, et al. Sensitive detection of carcinoembryonic antigen using stability-limited few-layer black phosphorus as an electron donor and a reservoir[J]. *Small*, 2017, 13(15): 1603589.
- [28] Zhou J, Li Z J, Ying M, et al. Black phosphorus nanosheets for rapid microRNA detection[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(11): 5060–5064.
- [29] Li Y, Liu Z M, Hou Y Q, et al. Multifunctional nanoplatform based on black phosphorus quantum dots for bioimaging and photodynamic/photothermal synergistic cancer therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(30): 25098–25106.
- [30] Li Y, Xu J Y, Jia M M, et al. Colorimetric determination of 17 beta-estradiol based on the specific recognition of aptamer and the salt-induced aggregation of gold nanoparticles[J]. *Materials Letters*, 2015, 159: 221–224.
- [31] Zheng H Y, Alsager O A, Wood C S, et al. Carbon nanotube field effect transistor aptasensors for estrogen detection in liquids[J]. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 2015, 33(6): 06F904.
- [32] Huang K J, Liu Y J, Zhang J Z, et al. Aptamer/Au nanoparticles/cobalt sulfide nanosheets biosensor for 17 beta-estradiol detection using a guanine-rich complementary DNA sequence for signal amplification[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 67: 184–191.
- [33] Alsager O A, Kumar S, Willmott G R, et al. Small molecule detection in solution via the size contraction response of aptamer functionalized nanoparticles[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 57: 262–268.