

· 论 著 ·

截短适配体-荧光法检测水中双酚 A 研究

薛晨晨, 朱光平, 白洁, 吴南翔, 范宏亮

杭州医学院公共卫生学院, 浙江 杭州 310013

摘要: **目的** 建立截短适配体-荧光法测定水中双酚 A。 **方法** 选择包含 38 个碱基的双酚 A 截短适配体为双酚 A 识别元件, 在截短适配体的 5' 端修饰荧光基团 6-FAM, 在互补序列 cDNA 的 3' 端修饰淬灭基团 DABCYL, 配制双酚 A 及干扰物标准溶液, 优化互补序列 cDNA 的碱基个数、截短适配体与互补序列 cDNA 的浓度比、孵育温度、孵育时间和缓冲液 pH 值, 建立截短适配体-荧光法检测体系, 进行特异性与回收率实验。 **结果** 当互补序列 cDNA 包含 9 个碱基, 截短适配体与互补序列 cDNA 的浓度比为 1 : 1.5, 缓冲溶液 pH 值为 7.5, 55 °C 孵育 60 min 时, 10 ~ 75 pmol/L 浓度范围内, 双酚 A 的线性关系较好, 线性回归方程为 $y=2\ 230.7x+110\ 825$, 相关系数为 0.926, 检出限为 3.3 pmol/L。四溴双酚 A、雌二醇、雌三醇和双酚 S 等 4 种干扰物与双酚 A 的荧光强度差值区别较明显, 对检测结果未造成明显干扰。当加标浓度为 20.0、40.0 和 60.0 pmol/L 时, 回收率分别为 97.8%、98.8% 和 102.3%, 相对标准偏差分别为 4.4%、2.1% 和 2.6%。 **结论** 建立的截短适配体-荧光法操作简便, 灵敏度高, 特异性强, 可用于检测水中双酚 A。

关键词: 截短适配体; 荧光法; 检测; 双酚 A

中图分类号: R123.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5087 (2021) 11-1086-05

Determination of bisphenol A in water by truncated aptamer-fluorescence method

XUE Chenchen, ZHU Guangping, BAI Jie, WU Nanxiang, FAN Hongliang

School of Public Health, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310013, China

Abstract: Objective To establish a fluorescence method based on truncated aptamer for the determination of bisphenol A in water. **Methods** The bisphenol A truncated aptamer containing 38 bases was selected as a recognition module, and was modified with the fluorophore 6-FAM at the 5' end. The 3' end of the complementary sequence cDNA was modified with the quencher DABCYL. The standard solutions of bisphenol A and interfering compounds were configured. The detection system was established after optimizing the number of bases in cDNA, the concentration ratio of truncated aptamer to cDNA, the incubation temperature and time, and the pH of the buffer. The specificity and recovery experiments were carried out. **Results** When the complementary sequence cDNA included 9 bases, the concentration ratio of the truncated aptamer to cDNA was 1 : 1.5, the pH value of the buffer solution was 7.5, the cDNA was incubated at 55 °C for 60 minutes, in the concentration range of 10-75 pmol/L, the linear regression equation was $y=2\ 230.7x+110\ 825$, the correlation coefficient was 0.926. The limits of detection was 3.3 pmol/L. The difference values of fluorescence intensity between tetrabromobisphenol A, estradiol, estriol, bisphenol S and bisphenol A were obviously different, so there was no significant interference to the test result. The recovery rates were 97.8%, 98.8% and 102.3% with the spiked concentrations of 20.0, 40.0 and 60.0 pmol/L. The relative standard deviations were 4.4%, 2.1% and 2.6% ($n=5$), respectively. **Conclusion** The fluorescence method based on truncated aptamer has the advantages of easy operation, high sensitivity and specificity, which can be used for the determination of bisphenol A in water.

Keywords: truncated aptamer; fluorescence analysis; detection; bisphenol A

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2021.11.002

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (21904118); 浙江省自然科学基金 (LY17B050008)

作者简介: 薛晨晨, 硕士在读, 主要从事环境卫生学工作

通信作者: 范宏亮, E-mail: hlfan@zju.edu.cn

双酚 A 是一种典型的环境内分泌干扰物，常作为制造日常生活用品的原材料，主要通过皮肤、呼吸道和口腔进入人体，具有肝脏毒性、免疫毒性和生殖毒性，可引发跨代毒性效应，与某些恶性肿瘤的发病相关^[1-3]。近年不断有研究报道在自然水体中检出双酚 A^[2-3]。双酚 A 的传统检测方法如液相色谱法^[4]、气相色谱质谱联用法^[5]和液相色谱质谱联用法^[6]等，样品制备步骤复杂，需专业技术人员操作^[7-8]；而双酚 A 的新型检测方法荧光法具有操作简便、灵敏度高和响应速度快等优点^[9-10]。核酸适配体是通过体外筛选获得的一段寡核苷酸序列，对待测物有较高的亲和力和特异性，常与其他方法结合检测双酚 A^[11]。截短适配体为剔除非必需结合序列后的核酸适配体，具有亲和力更高、灵敏度好、设计灵活多样和合成成本低的特点^[12-14]。本研究采用双酚 A 截短适配体作为识别元件，通过荧光法将待测物的荧光强度信号转化为浓度信号，建立水中双酚 A 的检测方法。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Spectra Max iD5 微孔板检测仪（上海美谷分子仪器有限公司）；Costar 黑色底透 96 孔板（美国 Costar 公司）；Mini-8KS 低速离心机（杭州奥胜仪器有限公司）；VORTEX-5 漩涡混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；Mag Q MilliQ 超纯水仪（美国 Millipore 公司）；H1650R 低温高速离心机（湖南湘仪离心机仪器有限公司）；FA1004N 电子分析天平（上海精密科学仪器有限公司）；Seven Excellence pH 测试仪（上海梅特勒-托利多仪器有限公司）。

双酚 A、双酚 S、六水氯化镁（货号：A601336）、Tris-HCl 溶液（1 mol/L, pH=7.5）、二甲亚砜（货号：A503039）、乙醇 [95%，生工生物工程（上海）股份有限公司]；雌二醇（98%）、氯化钠（货号：C111533）、氢氧化钠（货号：S140903，阿拉丁试剂有限公司）；雌三醇（货号：S47654）、四溴双酚 A（货号：S50851，源叶生物科技有限公司）；氯化钾（≥99.5%，上海申博化工有限公司）；盐酸（永华化学科技有限公司）；超纯水（电阻率 18.2 MΩ·cm）；所有试剂均为国产分析纯，实验用水为超纯水。

缓冲溶液：称取 5.844 g 氯化钠、7.455 g 氯化钾和 21.158 g 六水氯化镁，分别溶于 100 mL 超纯水中，均配制浓度为 1 mol/L 的标准溶液。取 4 mL

氯化钠溶液、7 mL 氯化镁溶液和 4 mL 氯化钾溶液，加入 6.5 mL Tris-HCl 溶液，用超纯水稀释至 50 mL（110 mmol/L Tris-HCl 溶液，70 mmol/L 氯化钠溶液，120 mmol/L 氯化镁溶液，70 mmol/L 氯化钾溶液，pH=7.5）。

1.2 方法

1.2.1 反应原理 本研究在双酚 A 截短适配体的 5' 端修饰荧光基团 6-FAM，互补序列 cDNA 的 3' 端修饰淬灭基团 DABCYL。当不含双酚 A 时，截短适配体与互补序列 cDNA 遵循碱基互补配对原则，杂交形成双链结构，截短适配体 5' 端的荧光基团 6-FAM 与互补序列 cDNA 3' 端的淬灭基团 DABCYL 在空间上靠近，发生荧光共振能量转移，此时体系的荧光强度较低。双酚 A 加入后，可特异性结合截短适配体，互补序列 cDNA 与截短适配体分离，荧光基团 6-FAM 与淬灭基团 DABCYL 的空间距离增大，此时体系的荧光强度较高。根据加入双酚 A 前后引起的荧光强度差值定量检测双酚 A。

1.2.2 设计寡核苷酸序列 参考文献 [15-16]，选择含有 38 个碱基的双酚 A 截短适配体作为双酚 A 识别元件。研究表明，当互补序列 cDNA 的长度约为截短适配体的 1/3 时，上述反应更易发生^[17-18]，结合预实验结果，选择 7~11 个碱基作为互补序列 cDNA 的长度。在截短适配体的 5' 端修饰荧光基团 6-FAM，互补序列 cDNA 的 3' 端修饰淬灭基团 DABCYL。寡核苷酸委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成和纯化。见表 1。

表 1 寡核苷酸序列

| 寡核苷酸名称 | 碱基序列 |
|--------|--|
| 截短适配体 | 5' - FAM-TGGGTGGTCAGGTGGGATAGCGTTCCGCGTATGGCCCA-3' |
| cDNA1 | 5' -CCACCCA-DABCYL-3' |
| cDNA2 | 5' -ACCACCCA-DABCYL-3' |
| cDNA3 | 5' -GACCACCCA-DABCYL-3' |
| cDNA4 | 5' -TGACCACCCA-DABCYL-3' |
| cDNA5 | 5' -CTGACCACCCA-DABCYL-3' |

1.2.3 寡核苷酸预处理 合成的寡核苷酸于棕色 EP 管中储存并呈干膜状，4 000 r/min 离心 60 s，离心半径为 10 cm。向 EP 管加入适量超纯水，于漩涡混合器震荡 3~5 s，低速离心 5~10 s，配制成浓度为 10⁻⁴ mol/L 的寡核苷酸原液。取适量超纯水稀释至 10⁻⁵ mol/L，再取适量缓冲溶液继续稀释至 10⁻⁶ mol/L，

置于-4℃或-20℃避光保存。

1.2.4 配制双酚 A、干扰物标准溶液 称取 0.002 3 g 双酚 A, 0.002 9 g 雌三醇, 0.002 7 g 雌二醇, 0.002 5 g 双酚 S, 各加入 5 mL 二甲亚砜; 称取 0.005 4 g 四溴双酚 A, 加入 5 mL 乙醇, 完全溶解后将上述溶液分别转移至 100 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度线, 分别配制成浓度为 10^{-4} mol/L 的标准溶液。取适量超纯水将双酚 A 标准溶液稀释至 10^{-9} ~ 10^{-11} mol/L, 将四溴双酚 A、雌二醇、雌三醇和双酚 S 溶液分别稀释至 2×10^{-9} mol/L, 备用。

1.2.5 建立检测体系 体系包含 4 种溶液: 截短适配体溶液、互补序列 cDNA 溶液、超纯水和缓冲溶液。使用黑色底透 96 孔板进行反应, 分为空白组和双酚 A 组, 空白组加入 10 mL 超纯水, 双酚 A 组加入 10 mL 适宜浓度的双酚 A 标准溶液。此外, 每孔加入 4 mL 10^{-6} mol/L 截短适配体溶液, 6 mL 10^{-6} mol/L 互补序列 cDNA 溶液, 适量缓冲溶液和超纯水。反应总体积为 200 μ L, 设 5 组平行。将黑色底透 96 孔板置于微孔板检测仪中, 震荡 30~60 s, 设置读板温度为 55℃, 避光孵育 60 min, 读板方式为终点法, 激发波长 485 nm, 发射波长 520 nm, 读板方向为顶读, 读板高度为 14.3 mm。空白组的荧光强度记为 F_0 , 双酚 A 组记为 F_1 , 系列浓度双酚 A 标准溶液引起的荧光强度差值即为 $F_1 - F_0$ 。

1.2.6 优化反应条件 优化互补序列 cDNA 的碱基数, 截短适配体与互补序列 cDNA 的浓度比, 孵育时的温度、时间以及缓冲溶液 pH 值。每项优化反应设置 4~5 组条件, 检测体系的荧光强度, 计算荧光强度差值, 以荧光强度差值最大作为最佳条件的判定标准。

1.2.7 特异性实验 空白组不变, 双酚 A 组依次加入 10 mL 2×10^{-10} mol/L 双酚 A 标准溶液以及 10 mL 2×10^{-9} mol/L 四溴双酚 A、雌二醇、雌三醇和双酚 S 标准溶液, 检测荧光强度, 计算荧光强度差值, 对比双酚 A 及 4 种干扰物的结果。

1.2.8 加标回收率 取实验室自来水水样, 设置 5 组平行, 空白组不变, 双酚 A 组依次加入 10 mL 4×10^{-10} 、 8×10^{-10} 和 1.2×10^{-11} mol/L 双酚 A 标准溶液, 对应双酚 A 加标浓度分别为 20.0、40.0 和 60.0 pmol/L, 检测荧光强度, 计算自来水中双酚 A 的回收率。

2 结果

2.1 优化反应条件

2.1.1 互补序列 cDNA 的选择 5 组互补序列 cDNA1、

cDNA2、cDNA3、cDNA4 和 cDNA5 对应的序列分别包含 7、8、9、10 和 11 个碱基, 其中 cDNA3 的荧光强度差值最大, 说明加入双酚 A 后该体系的荧光恢复程度最好, 见图 1。本研究以 cDNA3 为互补序列。

2.1.2 截短适配体与互补序列 cDNA 的浓度比选择 固定截短适配体的终浓度为 2×10^{-8} mol/L, 按照 1:1、1:1.2、1:1.5、1:2 和 1:3 的比例分别加入适量互补序列 cDNA。随着互补序列 cDNA 的浓度增大, 荧光强度差值先增大后减小; 当互补序列 cDNA 浓度是截短适配体的 1.5 倍时, 荧光强度差值最大, 见图 2。本研究以 1:1.5 作为截短适配体与互补序列 cDNA 的浓度比。

2.1.3 孵育温度和时间的选择 固定截短适配体的终浓度为 2×10^{-8} mol/L, 互补序列 cDNA 的终浓度为 3×10^{-8} mol/L, 在 25、35、45、55 和 65℃下避光孵育 30、60、90 和 120 min。随着孵育温度的增高, 荧光强度差值逐渐增大; 当孵育温度超过 55℃时, 荧光强度差值减小, 见图 3。当孵育 60 min 时, 荧光强度差值最大; 当孵育超过 60 min 时, 荧光强度差值减小, 见图 4。本研究以 55℃避光孵育 60 min 作为孵育条件。

2.1.4 缓冲溶液 pH 值 当缓冲溶液 pH 值从 7 增加至 7.5 时, 荧光强度差值逐渐增大; 当缓冲溶液 pH 值从 7.5 增加至 9 时, 荧光强度差值逐渐减小, 见图 5。本研究以 7.5 作为缓冲溶液的最佳 pH 值。

2.2 线性关系 在优化条件下, 检测不同浓度双酚 A 在缓冲体系中的荧光强度。在 10~75 pmol/L 双酚 A 浓度范围内, 线性方程为 $y = 2\ 230.7x + 110\ 825$, 相关系数为 0.926, 荧光强度差值与双酚 A 的浓度呈较好的线性关系, 双酚 A 检出限为 3.3 pmol/L。

2.3 特异性 4 种类似物与双酚 A 的荧光强度差值区别较明显, 即干扰物的测定结果未造成明显干扰, 见图 6。因此, 本方法对双酚 A 具有较好的选择性。

2.4 加标回收率 自来水水样中双酚 A 的本底值 < 3.3 pmol/L, 当双酚 A 的加标量为 20.0、40.0 和 60.0 pmol/L 时, 测定值分别为 19.6、39.5 和 61.4 pmol/L, 加标回收率分别为 97.8%、98.8% 和 102.3%, 相对标准偏差分别为 4.4%、2.1% 和 2.6%。

3 讨论

本研究选择长度为 38 个碱基的双酚 A 截短适配体作为双酚 A 的识别元件, 基于荧光能量共振转移原理, 构建由 6-FAM 和 DABCYL 修饰的截短适配

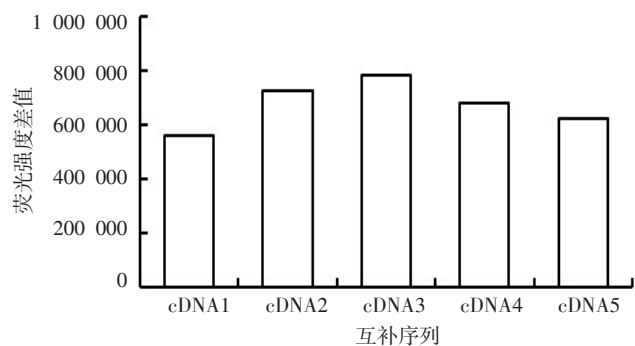


图1 不同互补序列 cDNA 的荧光强度差值

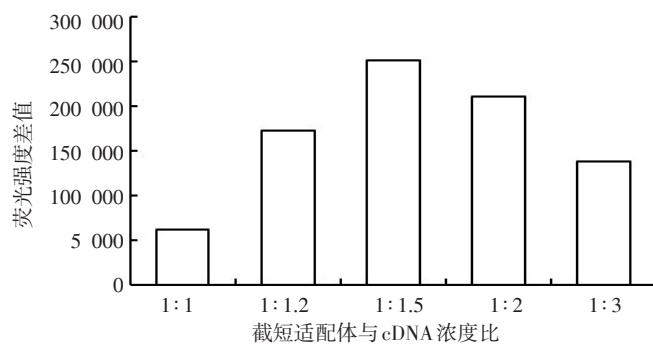


图2 截短适配体与 cDNA 不同浓度比的荧光强度差值

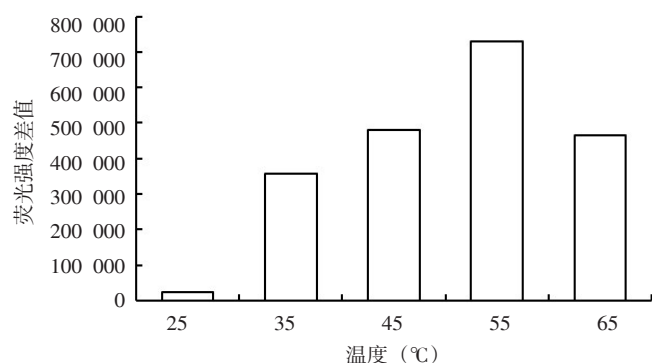


图3 不同孵育温度的荧光强度差值

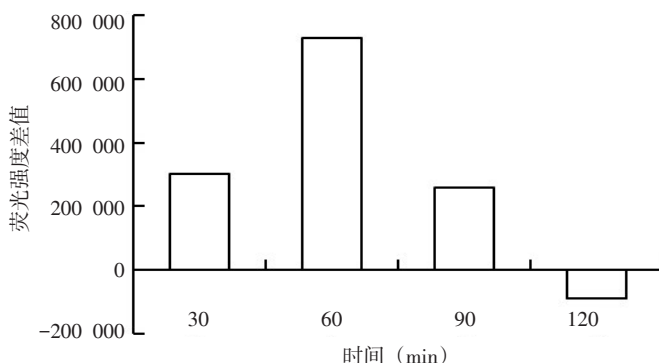


图4 不同孵育时间的荧光强度差值

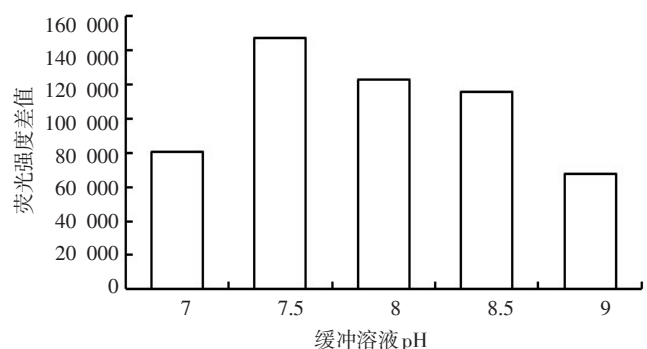


图5 不同缓冲溶液 pH 的荧光强度差值

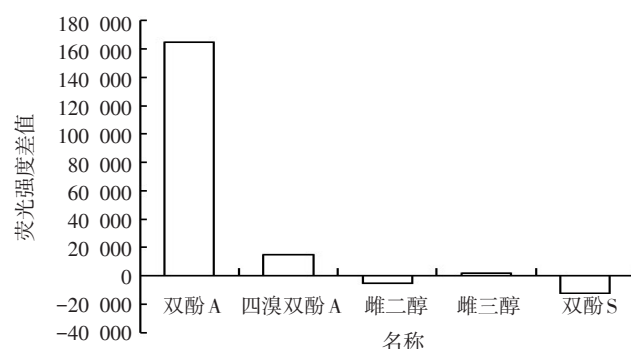


图6 双酚 A 及 4 种干扰物的荧光强度差值

体与互补序列 cDNA 组合型截短适配体传感器。互补序列 cDNA 的长度为 9 个碱基，截短适配体与互补序列 cDNA 的浓度比为 1 : 1.5，缓冲溶液的 pH 值为 7.5 时，55 °C 孵育 60 min 为最佳实验条件。双酚 A 线性检测范围为 10 ~ 75 pmol/L，检出限为 3.3 pmol/L，自来水水样中双酚 A 加标回收率为 97.8% ~ 102.3%，相对标准偏差为 2.1% ~ 4.4%，可以满足 GB 5749—2006 《生活饮用水卫生标准》^[19] 规定的双酚 A 检测浓度要求。

LI 等^[21] 使用长度为 63 个碱基的核酸适配体建立的磁性分离-荧光法可以检测水体中 0.8 ~ 35 nmol/L 的双酚 A，最低检测限为 0.2 nmol/L。顾翔源等^[21]

建立银纳米粒子比色法，线性范围为 2.2 ~ 219 nmol/L，最低检测限为 1.3 nmol/L。ZHANG 等^[22] 建立纳米金比色法，线性检测范围为 1.5 ~ 500 nmol/L，最低检测限为 1.5 nmol/L。刘伟^[23] 建立小檗碱结合荧光法，线性检测范围为 200 ~ 500 μmol/L，最低检测限为 87 μmol/L。与既往文献相比，本研究建立的截短适配体-荧光法操作简便，灵敏度高，特异性强，花费成本较低，有效提高了双酚 A 检测能力。后续研究可在本研究的基础上结合信号放大机制的方法，或使用双酚 A 截短适配体的其余序列，进一步扩大双酚 A 的线性检测范围，提高灵敏度。

参考文献

- [1] CORBEL T, GAYRARD V, PUEL S, et al. Bidirectional placental transfer of bisphenol a and its main metabolite, bisphenol a-glucuronide, in the isolated perfused human placenta [J]. *Reprod Toxicol*, 2014, 47: 51-58.
- [2] LAN J, SHEN Z, GAO W, et al. Occurrence of bisphenol-A and its brominated derivatives in tributary and estuary of Xiaoqing River adjacent to Bohai Sea, China [J/OL]. *Mar Pollut Bull*, 2019, 149 [2021-08-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31543489/>. DOI: 10.1016/j.marpollbul.2019.110551.
- [3] PENG X, XIONG S, OU W, et al. Persistence temporal and spatial profiles of ultraviolet absorbents and phenolic personal care products in riverine and estuarine sediment of the pearl river catchment, China [J]. *J Hazard Mater*, 2017, 323 (Pt A): 139-146.
- [4] 周围, 王丽婷, 王波, 等. 高效液相色谱荧光检测法对一次性纸杯中双酚 A 的迁移规律研究 [J]. *分析试验室*, 2014, 33 (1): 12-16.
- [5] 朱军峰, 王卓妮, 李元博, 等. 表面印迹聚合物萃取/气相色谱质谱联用检测双酚 A [J]. *分析试验室*, 2014, 33 (1): 59-63.
- [6] 颜流水, 郑鄂湘, 杨晓燕, 等. 固相萃取-液质联用法同时测定饮用水中双酚 A 和邻苯二甲酸二丁酯 [J]. *分析试验室*, 2007, 26 (6): 10-14.
- [7] ZHOU X, KRAMER J P, CALAFAT A M, et al. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 944: 152-156.
- [8] MUDIAM M K, JAIN R, DUA V K, et al. Application of ethyl chloroformate derivatization for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol-A in water and milk samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401 (5): 1695-1701.
- [9] 李莹. 双酚 A 和 17 β -雌二醇的纳米荧光核酸适配体传感器的构建与应用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [10] 何珊, 陈卓亨, 赵静怡, 等. 基于核酸适配体的荧光传感器用于检测双酚 A [J]. *赣南师范大学学报*, 2019, 40 (3): 71-74.
- [11] JO M, AHN J Y, LEE J, et al. Development of single-stranded DNA aptamers for specific bisphenol a detection [J]. *Oligonucleotides*, 2011, 21 (2): 85-91.
- [12] GUO Z, TANG J, LI M, et al. An ultrasensitive fluorescent aptasensor based on truncated aptamer and AGET ATRP for the detection of bisphenol A [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411 (29): 7807-7815.
- [13] KWON Y S, RASTON N H A, GU M B. An ultra-sensitive colorimetric detection of tetracyclines using the shortest aptamer with highly enhanced affinity [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50 (1): 40-42.
- [14] ZHENG X, HU B, GAO S X, et al. A saxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation [J]. *Toxicon*, 2015, 101: 41-47.
- [15] LEE E H, LIM H J, LEE S D, et al. Highly sensitive detection of bisphenol A by NanoAptamer assay with truncated aptamer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9 (17): 14889-14898.
- [16] KATSURA T, KERMAN K, TAKAMURA Y, et al. Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors [J]. *Anal Chem*, 2007, 79 (2): 782-787.
- [17] 陈璐. 基于适配体的食品中黄曲霉毒素 B₁ 和 M₁ 的生物传感器检测方法研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
- [18] 乔尚娜. 基于核酸适配体结构开关的卡那霉素和氯霉素残留分析研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [19] 中华人民共和国卫生部, 国家标准化管理委员会. 生活饮用水卫生标准: GB 5749-2006 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [20] LI M K, HU L Y, NIU C G, et al. A magnetic separation fluorescent aptasensor for highly sensitive detection of bisphenol A [J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2018, 266: 805-811.
- [21] 顾翔源, 张瑞, 姜峰, 等. 银纳米粒子比色传感器法测定食品及水样中双酚 A [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46 (34): 185-186, 189.
- [22] ZHANG D, YANG J, YE J, et al. Colorimetric detection of bisphenol A based on unmodified aptamer and cationic polymer aggregated gold nanoparticles [J]. *Anal Biochem*, 2016, 499: 51-56.
- [23] 刘伟. 核酸适配体荧光传感技术在环境分析中的应用研究 [D]. 太原: 山西大学, 2017.

收稿日期: 2021-06-11 修回日期: 2021-08-09 本文编辑: 田田