

用于检测牛奶中雌二醇的酶热传感技术研究

原 林, 宁保安, 彭 媛, 白家磊, 范献军, 姜随意, 高志贤*

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津市环境与食品安全风险监控技术重点实验室, 天津 300050)

摘 要: **目的** 建立一种用于检测牛奶中雌二醇的酶热传感技术。**方法** 羧基化雌二醇经 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)与 β -内酰胺酶偶联。酶热传感器中装 SPG 酶柱, 通过 ELISA 原理使游离雌二醇与结合雌二醇竞争结合雌二醇抗体, 从而检测基质中的雌二醇浓度。优化酶热传感检测体系中的反应底物、系统流速、抗原抗体稀释比例等实验因素。**结果** 磷酸盐缓冲液(PBS)基质中测定 IC_{50} 值为 10.2 ng/mL, 线性检测范围: 5.1~19.4 ng/mL, 最低检测限 2.8 ng/mL, 变异系数为 3.4%, 与多种雌激素类结构类似物之间均无交叉反应, 特异性良好。牛奶样品中测定 IC_{50} 值: 0.45 ng/mL, 线性检测范围: 0.24~0.79 ng/mL, 最低检测限 0.12 ng/mL。**结论** 酶热传感技术可以快速检测牛奶中的雌二醇残留, 操作便捷、样品前处理简单, 是一种高效、经济的适用于食品安全工作现场检测的方法。

关键词: 雌二醇; 酶热传感器; 牛奶

Research of enzyme thermistor technology for the detection of estradiol in milk

YUAN Lin, NING Bao-An, PENG Yuan, BAI Jia-Lei, FAN Xian-Jun, JIANG Sui-Yi, GAO Zhi-Xian*

(Department of Hygienic Examination, Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Science, Tianjin 30050, China)

ABSTRACT: Objective To establish an enzyme thermistor technique for determination of estradiol in milk. **Methods** Carboxyl transformation and coupled estradiol with β -lactamase through 1-ethyl-(3-dimethyl amino propyl) carbonyl imine hydrochloride (EDC). SPG was installed in thermal sensor as enzyme column, and direct competition ELISA principle was used to detect estradiol concentrations in matrix. Experimental factors such as the reaction substrate, the flow rate of the system, and the antigen-antibody dilution ratio were optimized. **Results** The linearity range was 5.1~19.4 ng/mL, IC_{50} was 10.2 ng/mL and the detection limit was 2.8 ng/mL in PBS sample. The result was stable, reliable and specific, no cross-reaction could be demonstrated with a variety of estrogen analogues and coefficient variation (CV) was 3.4%. The linearity range was 0.24~0.79 ng/mL, IC_{50} was 0.45 ng/mL, and the detection limit was 0.12 ng/mL in milk sample. **Conclusion** This method is successfully applied to detect estradiol in milk, it is simple, efficient, economic, and suitable for the on-site use.

KEY WORDS: estradiol; enzyme thermal sensor; milk

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAK08B06)

Fund: Supported by National Science and Technology Support Project (2012BAK08B06)

*通讯作者: 高志贤, 研究员/教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全风险控制技术研究。E-mail: gaozhx@163.com

*Corresponding author: GAO Zhi-Xian, Professor, Institute of Health and Environmental Medicine, No.1 Dali Road, Tianjin 300050, China. E-mail: gaozhx@163.com

1 引言

近年来牛奶及乳制品的安全问题越来越受到人们的关注,其中以雌激素为主的各类激素残留是引起牛奶危害的一个主要方面。有研究表明现代人饮食中摄入的外源性雌激素 60%~70%来源于牛奶及乳制品^[1],17- β 雌二醇是其中生物活性最强的一种,奶牛品种的变化^[2]、妊娠奶牛的持续产奶以及养殖户为提高瘦肉比、促进发情而非法添加的兽药共同造成了雌二醇的残留^[3]。雌二醇可通过食物链的富集作用对人体以及整个自然生态环境产生一系列的危害,如影响生殖^[4]、致癌^[5-6]、致畸^[7]、干扰免疫功能^[8]、影响生物固氮^[9]等。目前应用于食品中雌二醇残留的检测方法主要为各种以色谱技术为基础的大型仪器设备^[10-11],这些方法准确度高、重复性好,但同时也具有仪器设备昂贵、需要专业的操作、样品预处理耗时复杂等缺点,难以适用于食品安全检测工作所需要的在线、快速、经济简易等要求。本研究应用酶热生物传感器,构建一种快速、灵敏度高、样品前处理简单的检测牛奶中雌二醇残留的方法。

实验中采用 TELISA 技术^[12],即将酶热传感检测方法与 ELISA 中直接竞争法的原理结合起来,使用琼脂糖凝胶颗粒 SPG 作为填充酶柱的固相载体,利用其特异性吸附 IgG 抗体 Fc 片段的特点吸附雌二

醇抗体,此时游离雌二醇小分子(待测物)与 β -内酰胺酶标记的雌二醇竞争结合固定抗体上的位点,加入 β -内酰胺酶所对应的底物(氨苄西林),通过不同雌二醇浓度下采集的热信号构建标准曲线,此时产热的峰值与游离雌二醇的浓度成反比。实验中酶热传感体系中的单个样品检测结束之后通过再生切断抗体与 SPG 之间的连接,即可进行下一轮检测。实验流程如图 1 所示。

2 材料与方法

2.1 仪器及试剂

所用试剂均为分析纯或以上纯度,实验用水为重蒸去离子水。雌二醇标准品(武汉远程科技发展有限公司), β -内酰胺酶标准品、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、氨苄西林(Sigma, 美国),SPG(GE Healthcare, 美国),甘氨酸(NOVON, 美国),牛奶模拟样品(内蒙古伊利集团有限公司)。酶热生物传感器(Omic Bioscience Co., Ltd, 瑞典),3级高速数字振荡器(IKA, 德国),CR 22G II 大容量高速离心机(HIMAC, 日本),SH-3 双显恒温加热磁力搅拌器(北京金北德工贸公司),BX5200HP 超声波清洗器(上海新苗医疗器械有限公司),电热式恒温水浴锅(天津欧诺仪器仪表有限公司)。

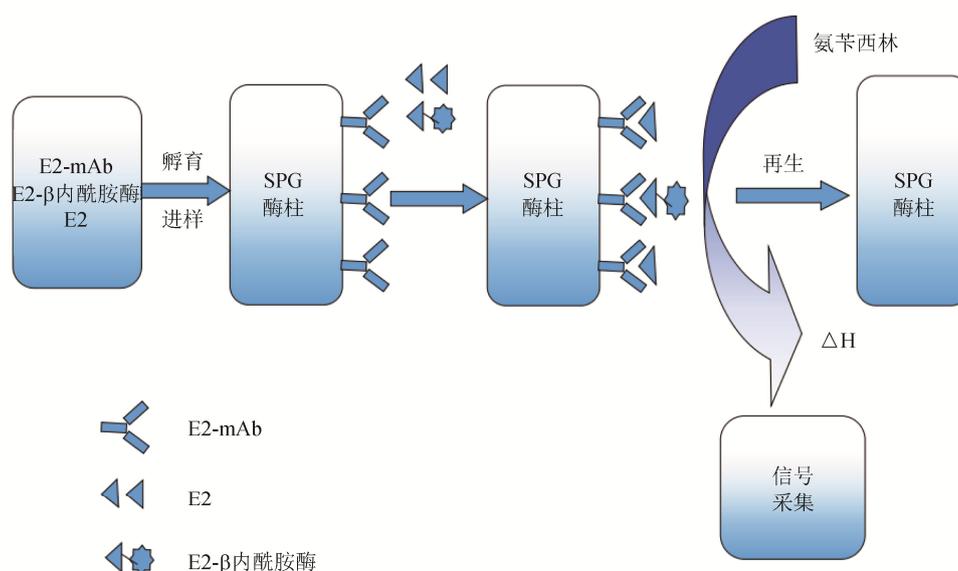


图 1 酶热法检测雌二醇流程图

Fig. 1 Flowchart of the estradiol detection by the enzyme thermistor technique

2.2 溶液配置

母液(0.2 mol/L NaH₂PO₄、0.2 mol/L Na₂HPO₄):称取 NaH₂PO₄·2H₂O、Na₂HPO₄ 31.2 g、71.6 g, 分别溶解于双蒸水, 定容至 1000 mL, 经 0.22 μm 的滤膜过滤, 室温密封储存备用。

透析液、抗体稀释液(0.01 mol/L PBS, pH 7.0):准确量取母液 NaH₂PO₄ 溶液 14 mL, Na₂HPO₄ 溶液 36 mL, NaCl 8.78 g, 溶解于双蒸水, 定容至 1000 mL, 经 0.22 μm 的滤膜过滤。

缓冲液:准确量取 NaH₂PO₄ 溶液 38 mL, Na₂HPO₄ 溶液 62 mL, NaCl 8.78 g, DMSO 20 mL, 溶解于双蒸水, 定容至 1000 mL, 经 0.22 μm 的滤膜过滤。

样品稀释液:缓冲液+甘油(95.5:0.5, v:v)。再生液:准确称取甘氨酸 7.507 g, NaCl 29.22 g, 准确量取 DMSO 10 mL, Triton X-100 1 mL, 溶于双蒸水, 使用 6 mol/L 的 HCl 调节 pH 值至 2.3, 定容至 1000 mL。

2.3 雌二醇-β内酰胺酶的制备

常温下准确称量雌二醇 300 mg(1.0 mmol), 溶于 6 mL DMSO 中, 加入 KOH 粉末 1 g(18 mmol)持续搅拌 5 min 至溶解, 加入 300 mg 溴乙酸, 室温下持续搅拌反应 2 h。在上述溶液中加入 50 mL 冰水终止反应。加入乙酸乙酯萃取去除剩余雌二醇, 水相中缓慢加入 2 mol/L HCl 溶液酸化直至出现白色沉淀物, 漏斗过滤、双蒸水洗涤后进行真空干燥。甲醇-氯仿(重量比 12.6:87.4)重结晶, 产生的无色晶体为羧基化雌二醇。称取 2 mg 雌二醇羧基化产物、1.06 mg NHS 和 1.77 mg EDC, 溶于 2 mL 无水 DMF 中, 常温下避光持续震荡反应 8 h, 为活化后的雌二醇半抗原溶液。将上述溶液缓慢滴入由 β-内酰胺酶溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中(10 mg/mL)制成的蛋白溶液中, 4 °C 持续震荡反应 8 h(半抗原与蛋白摩尔比 15:1~30:1)。反应完全后, 将反应液用 0.01 mol/L PBS 透析 2 d, 每 4 h 更换一次透析液, 透析完全后的反应液即为雌二醇-β内酰胺酶。

2.4 酶热传感体系优化

2.4.1 底物

取青霉素 V 钾、氨苄青霉素钠、青霉素钾、阿莫西林、氨苄西林、青霉素钠, 在 PBS 中溶解配置成 16 mmol/L 的液体(阿莫西林因其溶解度不佳, 配置为 8 mmol/L), 依次加入酶热传感器检测空白背景信

号。取信号稳定且峰值较高的底物, 分别对比其在几个稀释梯度下竞争抑制信号响应的强度。

2.4.2 抗原抗体稀释比

将雌二醇 β 内酰胺酶(E₂-β 内酰胺酶)经 PBS 依次稀释为 1:100、1:200、1:300、1:400 的比例, 进样检测酶热信号; 将 E₂-mAb 经 PBS 在 1:2000 至 1:64000 之间依次做倍比稀释, 构建六个梯度, 进样检测酶热信号。

2.4.3 流速

设定在 400~700 μL/min 的流速之间依次检测酶热信号, 比较其引起的信号变化。

2.5 测定

参考郗志伟构建的模型^[13], 实验所用的缓冲液、样品稀释液、底物溶液及载液均经 0.22 μm 滤膜过滤及超声除气, 于 37 °C 恒温水浴。E₂ 标准品用 DMSO 溶解后进行梯度稀释, 从 0 到 200 ng/mL 之间构建 9 个点的梯度, 与抗原抗体一起加入样品稀释液后 37 °C 水浴孵育 30 min。依标准程序打开酶热传感器, 选取体系温度 37 °C, 检测灵敏度 500, 安装 SPG 酶柱, 对整个管路系统进行除气, 待基线平稳后依次加样(每次进样量 350 μL)-再生-记录峰信号, 同等条件下重复试验 3 次, 取均值绘制标准曲线。取市售液态牛奶, 经样品前处理后加入 E₂ 标准品, 进行标准曲线的测定及绘制(方法同上)。

3 结果与讨论

3.1 酶热传感体系的优化

3.1.1 底物

6 种底物依次进样后可见其中氨苄西林、氨苄西林钠、阿莫西林响应信号较佳(图 2), 选取以上三种底物各自稀释至 2、4、8 mmol/L 的浓度梯度, 分别检测其在 E₂=0 ng/mL 及 E₂=12.5 ng/mL 水平的信号峰值, 氨苄西林表现出稳定的竞争抑制效果, 在 4 mmol/L 浓度获得最优竞争抑制率 30.4%, 故选取此浓度下的氨苄西林作为反应底物。

3.1.2 抗原抗体稀释比

抗原-抗体稀释比的降低有助于检测灵敏度的提高, 但过低的稀释比可能无法产生有效的峰值信号。由图 3 可见, E₂-β 内酰胺酶在 1:200 的稀释度时信号值较可观, 而 E₂-mAb 在 1:16000 的稀释值之后信号出现明显下降, 综上选择 E₂ 1:200/E₂-mAb 1:16000 稀释比例的优化条件。

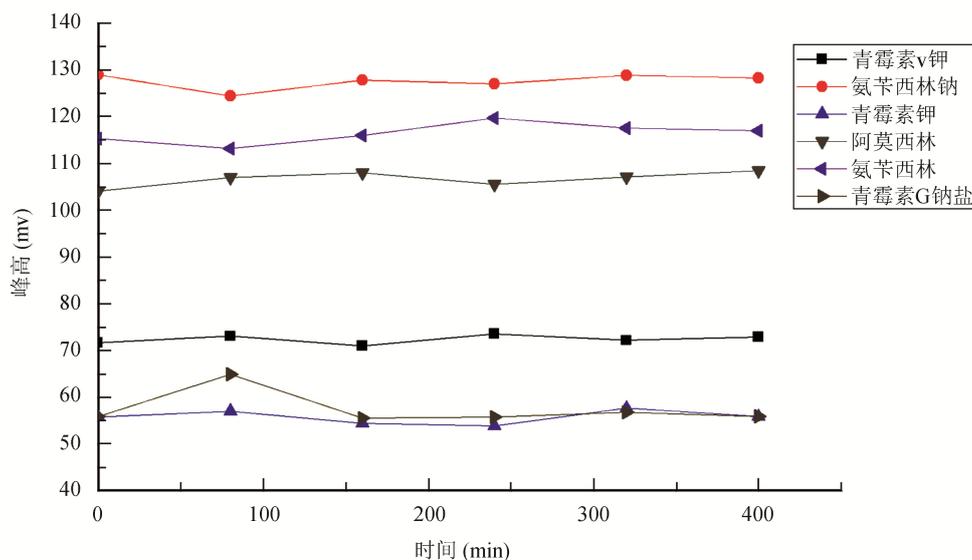


图 2 底物优化结果

Fig. 2 Optimization results of the substrate

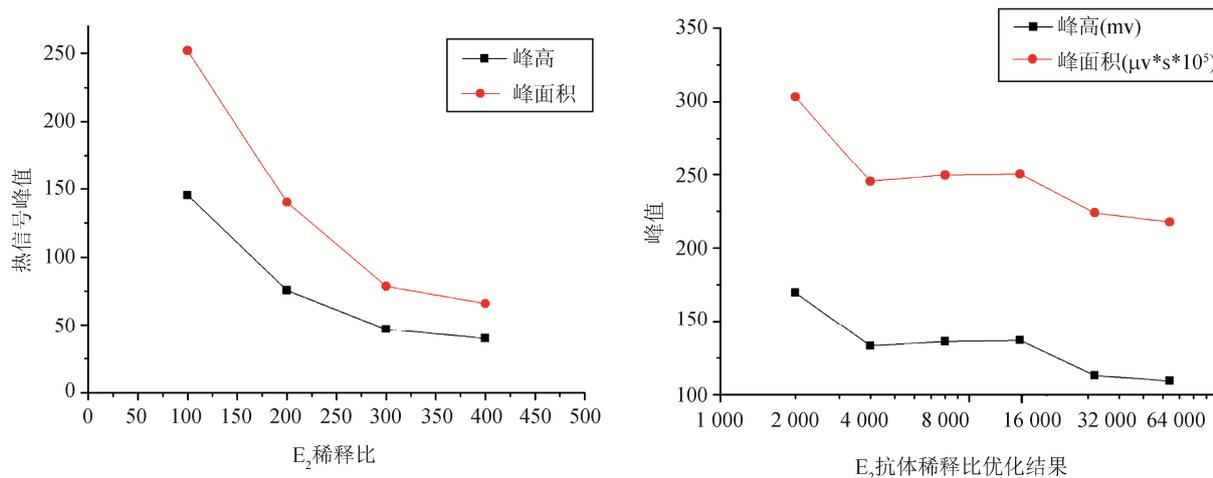


图 3 抗原抗体稀释比优化结果

Fig. 3 Optimization results of the antigen-antibody dilution ratio

3.1.3 流速

酶热传感器的流速范围通常是 500~2000 μL/min 之间,但在操作中发现随着流动注射系统速度的加快酶热信号有降低的趋势,考虑可能为过快的流速促进了热量的流失,且不利于抗体与 SPG 酶柱的充分结合。而过慢的流速容易引起酶柱的堵塞,不利于整体检测时间的经济化,在预实验的基础上设定 400~700 μL/min 速度之间依次检测

酶热信号。由图 4 可见随着流速的增大,信号呈明显下降的趋势,所以最终选取 400 μL/min 的最优流速。

3.1.4 体系优化结果

本文构建的酶热体系参数如下:底物氨苄西林 (4 mmol/L); 抗原抗体稀释比 E₂ 1:200/E₂-mAb 1:16000; 载液 0.02 mol/LPBS+2%DMSO+0.5%甘油, pH7.0; 再生 0.1 mol/LGly-HCl+0.5 mol/LNaCl+

1%DMSO+0.1%Triton X-100, pH2.3(变速 1200 $\mu\text{L}/\text{min}\times 6\text{ min}$); 系统流速 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; 样品共同保温 30 min/共同进样; 进样时间: 6 min 30 s。

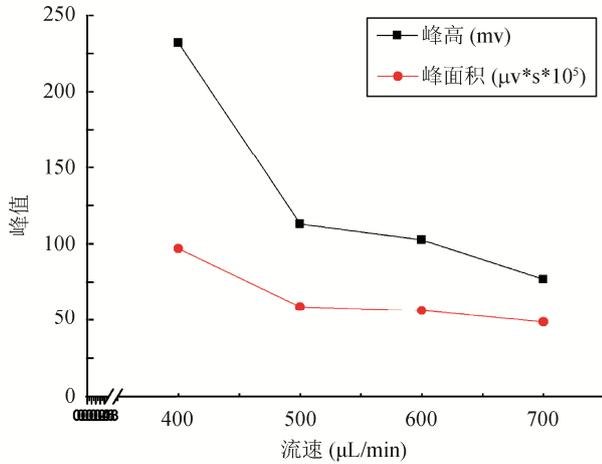


图4 流速优化结果

Fig. 4 Optimization results of the flow rate

3.2 样品前处理的优化

牛奶是一个复杂的胶态系统, 含有多种脂肪、蛋白质、乳糖和无机盐等成分, 目前针对牛奶中雌激素检测的各种方法往往均要经过复杂的样品前处理过程, 这些方法通常包括蛋白沉淀及各种萃取技术。这些技术复杂耗费, 同时在操作中使用的有机试剂对SPG材料及抗体的活性均有不同程度的影响, 因此不适用于酶热传感仪的检测^[14]。前期探索中曾试图进行蛋白沉淀, 牛奶中的乳清蛋白通常通过添加有机溶剂、酸性试剂、无机盐及金属离子等实现^[15]。而这些试剂加入后对酶热信号造成了较大的波动, 应用物理方法如加热、超声提取等技术的效果均不理想。参考文献中的方法^[16]最终采取样品前处理如下: 将液态牛奶样品分装后于 16000 r/min 离心 30 min, 抽取中层乳清层, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 储存备用。但是略去蛋白沉淀环节后不可避免的要承担一定程度蛋白基质效应的影响^[17], 所以试验暂以此作为牛奶模拟样品进行标物构建, 最终牛奶中获得的检测限与 PBS 有一定差异。

3.3 标准曲线的测定和绘制

在 PBS 及牛奶样品测定并经 Logistic 回归拟合绘制的标准曲线如图 5 所示,

经公式 $IC_{50} = X_0 \times (A_1 - n) / (n - A_2)^{1/P}$ 计算, PBS 溶液测定 IC_{50} 值: 10.2 ng/mL, 线性检测范围: 5.1~19.4 ng/mL, 最低检测限 2.8 ng/mL; 在雌酮、雌三醇、左炔诺孕酮、己烯雌酚中均未检测到交叉反应, 特异性良好; E_2 12.5 ng/mL 浓度下测定峰值稳定性良好: $X \pm S$: 80.8 ± 2.8 mv, CV: 3.4% ($n=6$), 如图 6 所示。牛奶模拟样品中测定 IC_{50} 值: 0.45 ng/mL, 线性检测范围: 0.24~0.79 ng/mL, 最低检测限 0.12 ng/mL。可见在牛奶样品中检测限较 PBS 双蒸水明显降低, 灵敏度有了较大幅度的提高, 考虑原因可能为 1.牛奶中的某些物质促进了 β -内酰胺酶活性的发挥; 2.牛奶样品中未被去除的物质提高了抗原抗体之间的亲和能力。这对检测来说并非坏事, 但是由于检测限范围随之变窄, 在实际应用中如果待检测的样品高度怀疑雌二醇严重超标时, 可能需要采取一个稀释的步骤。

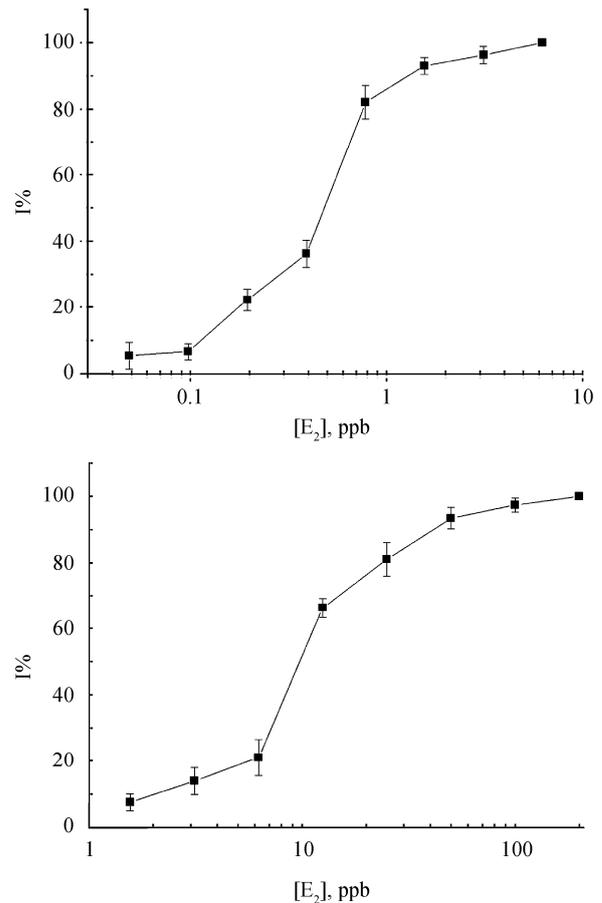


图5 酶热法检测雌二醇标准曲线(左: 牛奶样品, 右: PBS)

Fig. 5 The standard curve of the estradiol detection by the enzyme thermistor technique (left: milk, right: PBS)

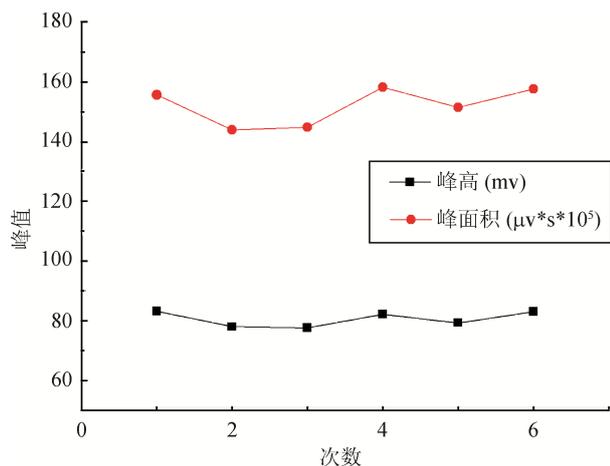


图 6 酶热法检测雌二醇稳定性结果

Fig. 6 The stability results of the estradiol detection by the enzyme thermistor technique

4 结 论

本研究在酶热传感技术平台上基于 ELISA 竞争原理建立了一种快速、灵敏、简便的雌二醇检测方法。通过对酶热检测体系各条件的优化, 分别在 PBS 溶液及牛奶样品中绘制标准曲线, PBS 溶液中 IC_{50} 值: 10.2 ng/mL, 线性检测范围: 5.1~19.4 ng/mL, 最低检测线 2.8 ng/mL, 牛奶样品中 IC_{50} 值: 0.45 ng/mL, 线性检测范围: 0.24~0.79 ng/mL, 最低检测线 0.12 ng/mL。与多种雌激素结构类似物均未检测到交叉反应, 特异性良好; 在 E_2 12.5 ng/mL 浓度下测定峰值稳定性: $X \pm S$: 80.8 \pm 2.8 mv, CV: 3.4%($n=6$), 有较佳的重复性。与传统检测方法相比, 样品前处理简易, 耗时短(单个样品检测约 10 min), 具有可观的应用前景。

5 展 望

检测中引用 SPG 作为吸附抗体的固相载体, 既省略了固定化酶(或其它生物识别原件)的步骤, 又实现了更换抗原-抗体对子即可更换检测目标物的目的, 从而使这一传感技术具有良好的通用性。当然实验中仍有许多需要探索的地方, 如本文应用牛奶模拟样品构建了标准曲线, 但是实际牛奶样品中雌二醇的分布及转化要更为复杂。雌二醇在体内以游离形态及多种结合方式的形态分布, 与雌酮与雌三醇等物质之间还可以相互转换, 实验操作中人为添加的雌二醇标准品能否完全模拟体内的分布状态尚不明确,

以及实际检测时如何确定牛奶稀释的比例, 仍需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Ganmaa D, Wang PY, Qin LQ, *et al.* Is milk responsible for male reproductive disorders [J]. *Med Hypotheses*, 2001, 57(4): 510-514.
- [2] Qin LQ, Wang PY, Kaneko T, *et al.* Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer [J]. *Med hypotheses*, 2004, 62(1): 133-142.
- [3] Shephard, R. Investigation of a whole-herd controlled breeding program using GnRH and prostaglandin in commercial seasonally-caving dairy herds [J]. *Cattle Vet*, 2002, (23): 24-28.
- [4] Tato L, Savage M, Antoniazzi F, *et al.* International workshop on management of puberty for optimum auxological optimal therapy of pubertal disorders in precocious/early puberty [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2001, 14(S2): 985-995.
- [5] Salehi F, Turner MC, Phillips KP, *et al.* Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine disruptors [J]. *Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2008, 11(3-4): 276-300.
- [6] Landau-Ossondo M, Rabia N, Jos-Pelage J, *et al.* Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2009, 63(6): 383-395.
- [7] Christine LM, Pierre BJ. Central and peripheral isosexual precocious puberty [J]. *Curr Opin Endocrinol*, 2003, 18(1): 17-22.
- [8] Fairchild WL, Swansburg EO, Arsenaault JT, *et al.* Does an association between pesticide use and subsequent declines in catch of Atlantic salmon (*Salmo salar*) represent a case of endocrine disruption? [J]. *Environm Health Perspect*, 1999, 107(5): 349.
- [9] Cutolo M, Wilder RL. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases [J]. *Rheum Dis Clin Am*, 2000, 26(4): 825-839.
- [10] Shi Y, Peng D, Shi C. Selective determination of trace 17β -estradiol in dairy and meat samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and HPLC [J]. *Food Chem*, 2011, (126): 1916-1925.
- [11] Courant F, Antignac JP, Maume D, *et al.* Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors: 1. Analytical strategy for estrogens measurement in plasma at ultra-trace level [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 586(1): 105-114.
- [12] Yakovleva M, Bhand S, Danielsson B. The enzyme

- thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 766: 1–12.
- [13] Qie Z, Ning B, Liu M, *et al.* Fast detection of atrazine in corn using thermometric biosensors [J]. *Analyst*, 2013, 138(17): 5151–5156.
- [14] Socas-Rodríguez B, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, *et al.* Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2013, 44: 58–77.
- [15] Polson C, Sarkar P, Incedon B, *et al.* Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 785(2): 263–275.
- [16] Zhou S, Zhao Y, Mecklenburg M, *et al.* A novel thermometric biosensor for fast surveillance of β -lactamase activity in milk [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 49: 99–104.
- [17] Yan W, Li Y, Zhao L, *et al.* Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C 30 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(44): 7539–7545.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



原 林, 解放军 88 医院医师, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全关键技术研究。

E-mail: 18053822055@163.com



高志贤, 研究员/教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全风险控制技术研究。

E-mail: gaozhx@163.com