(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112834469 B
(45)授权公告日 2022.07.22

(21)申请号 202011585233.4
(22)申请日 2020.12.28
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112834469 A
(43)申请公布日 2021.05.25
(73)专利权人 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所
地址 300050 天津市和平区大理道1号
(72)发明人 高志贤 姚子仪 贾雪霞 黄惠 张晓雨
(74)专利代理机构 北京丰浩知识产权代理事务所(普通合伙) 11781
专利代理师 董超
(51)Int.Cl.
G01N 21/64(2006.01)

审查员 黄景瑞

权利要求书2页 说明书10页
序列表2页 附图5页

(54)发明名称

一种环境雌激素的检测方法及应用

(57)摘要

本发明涉及生物检测领域，具体讲，涉及一种环境雌激素的检测方法及应用。检测方法包括：选择双酚A、雌二醇、多氯联苯、丙溴磷和阿特拉津的适配体，并设计对应的互补链；将适配体与微球分别偶联，得到偶联有适配体的微球；将偶联有适配体的微球与含有环境雌激素的待测样品、互补链混合；再加入荧光标记物，对荧光标记物的荧光信号进行检测。本发明通过设计与适配体互补的互补链，可同时检测五种环境雌激素，提高了间接竞争反应的灵敏度，实现了高通量标准化检测，方便快捷。

CN 112834469 B

1.一种环境雌激素的检测方法,所述环境雌激素选自双酚A、雌二醇、多氯联苯、丙溴磷和阿特拉津中的至少一种,其特征在于,所述检测方法至少包括以下步骤:

S1、选择双酚A、雌二醇、多氯联苯、丙溴磷和阿特拉津的适配体,并设计对应的互补链;

所述双酚A适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,

所述雌二醇适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,

所述多氯联苯适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,

所述丙溴磷适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示,

所述阿特拉津适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示;

S2、将所述适配体与微球分别偶联,得到偶联有适配体的微球;

所述微球为羧基化磁性微球;

所述适配体为氨基化适配体或两端分别连接有氨基和生物素的适配体;

所述适配体与所述微球偶联时适配体溶液的浓度为:雌二醇适配体的浓度为3～5μM、阿特拉津适配体的浓度为1～3μM、丙溴磷适配体的浓度为2～4μM、多氯联苯适配体的浓度为4～6μM、双酚A适配体的浓度为1～3μM;

S3、将所述偶联有适配体的微球与含有所述环境雌激素的待测样品、互补链混合;先将所述偶联有适配体的微球与含有所述环境雌激素的待测样品反应0.5～1小时,再加入互补链反应0.5～1小时;

S4、再加入荧光标记物,对所述荧光标记物的荧光信号进行检测;所述荧光标记物选自链霉亲和素藻红蛋白,和/或,所述链霉亲和素藻红蛋白的浓度为1:50～1:200。

2.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,

所述双酚A适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示,

所述雌二醇适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示,

所述多氯联苯适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示,

所述丙溴磷适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,

所述阿特拉津适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示。

3.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在S2中,

雌二醇适配体的浓度为4μM、阿特拉津适配体的浓度为2μM、丙溴磷适配体的浓度为3μM、多氯联苯适配体的浓度为5μM、双酚A适配体的浓度为2μM。

4.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在S2中,将所述偶联有适配体的微球保存在0.1M PBS中。

5.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在S3中,先将所述偶联有适配体的微球与含有所述环境雌激素的待测样品反应0.5小时,再加入互补链反应0.5小时。

6.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在S3中,反应温度为37℃。

7.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在S3中,所述互补链与所述适配体的摩尔浓度比为1:1。

8.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在S3中,所述环境雌激素的待测样品中雌二醇的最低检出限为0.29pg/mL、双酚A的最低检出限为3.5pg/mL,多氯联苯的最低检出限为0.32pg/mL,丙溴磷的最低检出限为1.93pg/mL,阿特拉津的最低检出限为2.83pg/mL。

9.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述链霉亲和素藻红蛋白的浓度为1:100。

10.如权利要求1～9任一项所述的方法在同时检测实际水体样品中五种环境雌激素含量中的应用。

一种环境雌激素的检测方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域，具体讲，涉及一种环境雌激素的检测方法及应用。

背景技术

[0002] 随着国内外对食品安全的关注，农药残留量成为评判食品是否安全的重要指标。生活中比较常见的杀虫剂丙溴磷，氧化乐果，水胺硫磷，甲拌磷等，少量残留就会对人体产生严重的危害。有机磷农药不仅与神经毒性的增加、生理缺陷有关，同时还会造成水体污染。因此研发灵敏度高，稳定性好，方便快捷的检测方法尤为重要。传统的农药残留检测技术包括气相色谱(GC)，高效液相色谱(HPLC)，酶抑制法(EIMs)和酶联免疫吸附法(ELISA)。这些方法操作上复杂，灵敏度较低。

[0003] 鉴于此，特提出本发明。

发明内容

[0004] 本发明的首要发明目的在于提供一种环境雌激素的检测方法。

[0005] 本发明的第二发明目的在于提供该方法的应用。

[0006] 为了完成本发明的发明目的，采用的技术方案为：

[0007] 本发明涉及一种环境雌激素的检测方法，所述环境雌激素选自双酚A、雌二醇、多氯联苯、丙溴磷和阿特拉津中的至少一种，所述检测方法至少包括以下步骤：

[0008] S1、选择双酚A、雌二醇、多氯联苯、丙溴磷和阿特拉津的适配体，并设计对应的互补链；所述双酚A适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示，所述雌二醇适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示，所述多氯联苯适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示，所述丙溴磷适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示，所述阿特拉津适配体的互补链的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示；

[0009] S2、将所述适配体与微球分别偶联，得到偶联有适配体的微球；

[0010] S3、将所述偶联有适配体的微球与含有所述环境雌激素的待测样品、互补链混合；

[0011] S4、再加入荧光标记物，对所述荧光标记物的荧光信号进行检测。

[0012] 可选的，所述双酚A适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示，所述雌二醇适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示，所述多氯联苯适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示，所述丙溴磷适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示，所述阿特拉津适配体的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0013] 可选的，所述微球为羧基化磁性微球；所述适配体为氨基化适配体或两端分别连接有氨基和生物素的适配体；所述适配体与所述微球偶联时适配体溶液的浓度为：雌二醇适配体的浓度为3～5μM、阿特拉津适配体的浓度为1～3μM、丙溴磷适配体的浓度为2～4μM、多氯联苯适配体的浓度为4～6μM、双酚A适配体的浓度为1～3μM；

[0014] 优选为：雌二醇适配体的浓度为4μM、阿特拉津适配体的浓度为2μM、丙溴磷适配体的浓度为3μM、多氯联苯适配体的浓度为5μM、双酚A适配体的浓度为2μM。

[0015] 可选的，在S2中，将所述偶联有适配体的微球保存在0.1M PBS中。

[0016] 可选的，在S3中，先将所述偶联有适配体的微球与含有所述环境雌激素的待测样品反应0.5～1小时，优选0.5小时，再加入互补链反应0.5～1小时，优选0.5小时。

[0017] 可选的，在S3中，反应温度为37℃。

[0018] 可选的，在S3中，所述互补链与所述适配体的摩尔浓度比为1:1。

[0019] 可选的，在S3中，所述环境雌激素的待测样品中雌二醇的最低检出限为0.29pg/mL、双酚A的最低检出限为3.5pg/mL，多氯联苯的最低检出限为0.32pg/mL，丙溴磷的最低检出限为1.93pg/mL，阿特拉津的最低检出限为2.83pg/mL。

[0020] 可选的，在S4中，所述荧光标记物选自链霉亲和素藻红蛋白，和/或，所述链霉亲和素藻红蛋白的浓度为1:50～1:200，优选为1:100。

[0021] 本发明还涉及上述的方法在同时检测实际水体样品中五种环境雌激素含量中的应用。

[0022] 本发明至少具有以下有益的效果：

[0023] 本发明通过设计与适配体互补的新片段，可以同时检测五种环境雌激素，提高了间接竞争反应的灵敏度，实现了高通量标准化检测，方便快捷。本发明中五种环境雌激素可以任意搭配进行检测。

附图说明

[0024] 图1为本发明实施例的技术路线图；

[0025] 图2为本发明实施例的反应过程示意图；

[0026] 图3为本发明实施例的可行性验证结果图；

[0027] 图4为本发明实施例的微球偶联验证的扫描电镜结果图；

[0028] 图5为本发明实施例的微球偶联验证的Zeta电位结果图；

[0029] 图6为本发明实施例竞争反应时间的优化实验结果；

[0030] 图7为本发明实施例竞争反应温度的优化实验结果；

[0031] 图8为本发明实施例适配体与微球偶联时浓度的优化结果；

[0032] 图9为本发明实施例偶联后微球储存液的筛选结果；

[0033] 图10为本发明实施例的SA-PE浓度优化实验结果；

[0034] 图11为本发明实施例的检测曲线及最低检出限。

具体实施方式

[0035] 应该指出，以下详细说明都是例示性的，旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明，本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0036] 需要注意的是，这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式，而非意图限制根据本申请的示例性实施方式。如在这里所使用的，除非上下文另外明确指出，否则单数形式也包括复数形式，此外，还应当理解的是，当在本说明中使用术语“包含”和/或“包括”时，其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0037] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实

施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0038] 适配体广泛应用于医学诊断，食品，环境监测等方面。作为识别分子，适配体成功应用于微生物、细胞、重金属离子，也逐渐应用于农药残留的检测。与传统的抗原抗体结合的方法比较，适配体具有成本低，方便，可以与各种化学标签有良好的结合能力等优点。这些新方法通过指数富集(SELEX)对单链寡核苷酸序列进行优化筛选，得到最适的适配体进行检测。本发明实施例提出一种基于适配体高通量检测环境雌激素的检测方法。选取五种环境雌激素(阿特拉津，丙溴磷，雌二醇，双酚A，多氯联苯)与对应的互补链同时竞争适配体，最后通过识别磁球编码，检测磁球的荧光值对环境雌激素样品进行定性定量分析。以往的间接竞争法互补链设计在环境雌激素结合区域，本发明实施例将互补链设计在环境雌激素结合的一半区域，剩余的设计在相邻区域。本发明得设计可以提高适配体得结合稳定性，广泛应用于农药残留的快速高通量检测。技术路线图如图1所示。

[0039] 本发明实施例适配体的互补链的核苷酸序列如表1所示：

[0040] 表1

[0041]

	适配体的互补链的核苷酸序列	核苷酸序列编号
双酚 A	tttttttttttggtgcgaacccgtgatgcgctgggccata	SEQ ID NO:1
雌二醇	tttttttttttgcttccgcgcttcagcgcgcagcaa	SEQ ID NO:2
多氯联苯	tttttttttttcacgggccatcg	SEQ ID NO:3
丙溴磷	tttttttttttagctctgtggcgatcaa	SEQ ID NO:4
阿特拉津	tttttttttttcactgactggctaaa	SEQ ID NO:5

[0042] 本发明实施例适配体的核苷酸序列如表2所示：

[0043] 表2

[0044]

	适配体的核苷酸序列	核苷酸序列编号
双酚 A	tttttttttttccggtgggtggtcaggtgggatagcgttccgcgtatggcccagcg catcacgggttcgcacca	SEQ ID NO:6
雌二醇	tttttttttttgcttccagcttattgaattacacgcagagggtagcggctctgcgcatt caattgctgcgcgctgaagcgcggaagc	SEQ ID NO:7
多氯联苯	tttttttttttttgatttttttccgatggcccgtg	SEQ ID NO:8
丙溴磷	tttttttttttagcttgctgcagcgattcttgatcgccacagagct	SEQ ID NO:9

[0045]

阿特拉津	tttttttttttactgtttgcactggcggatttagccagtcagtg	SEQ ID NO:10

[0046] 具体实验方法包括以下步骤：

[0047] S1、选择双酚A、雌二醇、多氯联苯、丙溴磷和阿特拉津的适配体，并设计对应的互补链；

[0048] S2、将适配体与微球分别偶联，得到偶联有适配体的微球；

[0049] S3、将偶联有适配体的微球与含有所述环境雌激素的待测样品、互补链混合；

[0050] S4、分离后加入荧光标记物，再次分离，对所述荧光标记物的荧光信号进行检测。

[0051] 反应过程示意图如图2所示。

[0052] 其中，微球为羧基化磁性微球。

[0053] 适配体为氨基化适配体，即适配体核苷酸序列的5’端连接有氨基(-NH_2)，或适配体5’端连接有氨基(-NH_2)3’端连接有生物素；

[0054] 适配体与微球偶连时适配体溶液的浓度为：雌二醇适配体的浓度为3～5μM、阿特拉津适配体的浓度为1～3μM、丙溴磷适配体的浓度为2～4μM、多氯联苯适配体的浓度为4～6μM、双酚A适配体的浓度为1～3μM；

[0055] 优选为：雌二醇适配体的浓度为4μM、阿特拉津适配体的浓度为2μM、丙溴磷适配体的浓度为3μM、多氯联苯适配体的浓度为5μM、双酚A适配体的浓度为2μM。保证微球上所有位点都偶联上适配体，在适配体饱和的情况下，间接竞争原理才得以成立。找到偶联适配体的饱和浓度即最适浓度，也大大节省了适配体的用量，降低成本。

[0056] 在S2中，将偶联有适配体的微球保存在0.1M PBS中。因为适配体偶联在微球表面是相对不稳定的。且一次偶联可以做很多次后续实验，所以微球储备液的选择尤为重要，选择合适的微球缓冲液可以延长微球的使用寿命。

[0057] 具体的，在S3中，先将偶联有适配体的微球与含有环境雌激素的待测样品反应0.5～1小时，优选0.5小时，再加入互补链反应0.5～1小时，优选0.5小时。

[0058] 具体的，在S3中，反应温度为37℃。

[0059] 具体的，在S3中，互补链与适配体的摩尔比为1:1。

[0060] 具体的，环境雌激素的待测样品中双酚A、雌二醇、多氯联苯、丙溴磷和阿特拉津浓度范围为0.001-1000ng/mL。环境雌激素的待测样品中雌二醇的最低检出限为0.29pg/mL、双酚A的最低检出限为3.5pg/mL，多氯联苯的最低检出限为0.32pg/mL，丙溴磷的最低检出限为1.93pg/mL，阿特拉津的最低检出限为2.83pg/mL。

[0061] 具体的，在S4中，荧光标记物选自链霉亲和素藻红蛋白，链霉亲和素藻红蛋白的浓度为1:50～1:200，优选为1:100。

[0062] 本发明还涉及该方法在检测实际水体样品中环境雌激素含量中的应用。

[0063] 1、实验试剂

[0064] 羧基化磁性聚苯乙烯微球和悬浮芯片微球校正试剂盒：美国Luminex公司；

[0065] Streptavidin-R-phycoerythrin(SA-PE)：美国Invitrogen公司；

[0066] 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride(EDC)，

[0067] N-Hydroxy-sulfo-succinimide(S-NHS)：美国Pierce公司；

[0068] [N-Morpholino]ethanesulfonic acid(MES)、雌二醇、双酚A：美国Sigma公司；

[0069] 阿特拉津，丙溴磷，多氯联苯：北京普天同创生物科技有限公司。

[0070] 2实验仪器

[0071] Bio-Plex TM xMap悬浮芯片仪:美国Bio-Rad公司;

[0072] Millipore纯水系统:美国Millipore公司;

[0073] KUBOTA6930型高速冷冻离心机:日本KUBOTA公司;

[0074] DELTA320型pH计:METTLER TOLEDO;

[0075] QE-1台式恒温振荡器:天津市欧诺仪器仪表有限公司;

[0076] MS-3型漩涡振荡器:德国IKA公司;

[0077] Eppendorf Mastercycle ersonal PCR仪:德国eppendorf公司;

[0078] 分析天平:METTLER TOLEDO;

[0079] TGL-16C台式离心机:上海安亭科学仪器厂AL-204;

[0080] WD-9403F紫外分析仪:北京市六一仪器厂;

[0081] 3603型96孔细胞板:美国Corning公司;

[0082] 扫描电镜:美国FEI Inspect F50;

[0083] Zeta电位:英国马尔文ZS90。

[0084] 实施例1实验可行性验证

[0085] 1、准备互补链:以雌二醇为例,将氨基化适配体,生物素修饰的互补链(购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM;将互补链放入离心机6000rpm离心30s,放入金属浴中95℃加热5min,反应后放入0℃冷却10min;

[0086] 2、准备微球:取50μL羧基化磁性微球用0.01MES多次清洗;磁分离后,将微球重悬于100μL PBS中;

[0087] 3、偶联:将雌二醇适配体稀释至5μM,取4μL适配体,5μL EDC,2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中,37℃反应2h进行偶联;将磁球进行磁分离,加入100μL封闭液(0.1BSA),37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次,加入100μL PBS保存微球于4℃中;按1:20稀释微球,确保浓度为200个/μL;

[0088] 4、竞争反应:将黑色不透明的离心管用润洗液润洗三次;配制不同浓度的雌二醇溶液(0ng/mL、2.56×10^{-4}ng/mL、0.16ng/mL、100ng/mL);每管加入10μL雌二醇溶液和20μL偶联好适配体的微球,37℃反应0.5h;加入10μL互补链,使适配体与互补链最终摩尔浓度比为1:1;每管用偶联缓冲液补齐至100μL,37℃反应0.5h;

[0089] 5、检测:用PBS多次清洗后,磁分离加入1:100的SA-PE 37℃反应0.5h;磁分离清洗后,加入200μLPBS,利用荧光分光光度计进行检测。

[0090] 得到实验结果如图3所示。

[0091] 根据图3可知:随着雌二醇的浓度的增加,荧光值逐渐减少,符合本实验的原理设计,证实了本实验的可行性。

[0092] 实验例2偶联验证

[0093] (一)、电镜观察:

[0094] 1、准备互补链:以雌二醇为例,将氨基化适配体,生物素修饰的互补链(购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM。将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min,反应后放入0℃冷却10min。

[0095] 2、准备微球:取50μL微球用0.01MES多次清洗磁分离后,将羧基化磁性微球重悬于100μL PBS中。

[0096] 3、偶联:将雌二醇适配体稀释至5μM,取4μL适配体,5μL EDC,2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中,37℃反应2h。将磁球进行磁分离,加入100μL封闭液(0.1M BSA),37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次,加入100μL PBS保存微球于4℃中。按1:20稀释微球,确保浓度为200个/μL。

[0097] 4、竞争反应:将黑色不透明的离心管用润洗液润洗三次向管中加入10μL,100ng/mL雌二醇和20μL偶联好适配体的微球,37℃反应0.5h。加入10μL互补链,使适配体与互补链最终摩尔浓度比为1:1。用偶联缓冲液补齐至100μL,37℃反应0.5h;取微球各50μL,共四组:分为单独微球、微球偶联适配体、微球偶联适配体加互补链、微球偶联适配体加互补链加雌二醇。

[0098] 5、检测:取几滴溶液,进行干燥,之后上机进行检测。在1000x倍镜下照射扫描电镜。结果如图4所示。

[0099] 图4中,a是没有偶联适配体的微球表面电镜图,表面光滑大小均一。b里为表面偶联适配体的微球表面电镜。可以看出微球表面覆上一层薄薄的突起。c,d里微球表面分别是适配体偶联互补链,加入小分子后的微球表面。c微球表面突起更加明显,表面凹凸不平。d微球表面凹凸不平处减少,在凹凸不平的表面覆盖了一层薄膜,考虑为小分子成功富集在微球上。

[0100] (二)、Zeta电位验证:

[0101] 1、准备互补链:以雌二醇为例,将氨基化适配体,生物素修饰的互补链(购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM。将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min,反应后放入0℃冷却10min。

[0102] 2、准备微球:取50μL羧基化磁性微球用0.01MES多次清洗,磁分离后,将微球重悬于100μL PBS中。

[0103] 3、偶联:将雌二醇适配体稀释至5μM,取4μL适配体,5μL EDC,2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中,37℃反应2h。将磁球进行磁分离,加入100μL封闭液(0.1BSA),37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次,加入100μLPBS保存微球于4℃中。按1:20稀释微球,确保浓度为200个/μL。

[0104] 4、竞争反应:将黑色不透明的离心管用润洗液润洗三次,向管中加入20μL偶联好适配体的微球,再加入10μL互补链,使适配体与互补链最终浓度比为1:1。用偶联缓冲液补齐至100μL,37℃反应0.5h。取微球各50μL,共三组。分为单独微球,微球偶联适配体,微球偶联适配体加互补链。用PBS稀释至2mL。每管取1mL,进行Zeta电位的测量。得到实验结果如图5所示。

[0105] 根据图5可知:当测量氨基化空白微球时,氨基呈负电,电位值为-90。当偶联上适配体后,由于适配体带正电荷,加入适配体后,总体电位值显著上升。

[0106] 实验例3

[0107] 1、准备互补链:以雌二醇为例,将氨基化适配体(表2所示),生物素修饰的互补链(表1所示,购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM。将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min,反应后放入0℃冷却10min。

[0108] 2、准备微球:取50μL羧基化磁性微球用0.01MES多次清洗;磁分离后,将微球重悬于100μL PBS中。

[0109] 3、偶联：将雌二醇适配体稀释至4μM，取4μL适配体，5μL EDC，2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中，37℃反应2h。将磁球进行磁分离，加入100μL封闭液(0.1MBSA)，37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次，加入100μL PBS保存微球于4℃中。按1:20稀释微球，确保浓度为200个/μL。

[0110] 4、竞争反应：将黑色不透明的96孔板，用润洗液润洗三次；向每孔中加入10μL，100ng/mL雌二醇溶液和20μL偶联好适配体的微球，37℃下反应，反应时间如表3所示。加入10μL互补链，使适配体与互补链最终浓度比为1:1。每孔用偶联缓冲液补齐至100μL，37℃下反应，反应时间如表3。

[0111] 表3

[0112]

	雌二醇+微球	雌二醇+微球+互补链
0h	0 h	0 h

[0113]

0.5h	0 h	0.5 h
1h	0.5 h	0.5 h
2h	1 h	1 h

[0114] 5、用PBS多次清洗后，磁分离加入1:100的SA-PE37℃反应0.5h。磁分离清洗后，加入100μL鞘液，利用悬浮芯片仪进行检测。得到实验结果如图6所示。

[0115] 根据图6可知：竞争反应最佳时间组合为0.5+0.5小时。

[0116] 实验例4

[0117] 1、准备互补链：以雌二醇为例，将氨基化适配体，生物素修饰的互补链(购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM。将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min，反应后放入0℃冷却10min。

[0118] 2、准备微球：取50μL微球用0.01MES多次清洗，磁分离后，将羧基化磁性微球重悬于100μL PBS中。

[0119] 3、偶联：将雌二醇适配体稀释至4μM，取4μL适配体，5μL EDC，2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中，37℃反应2h。将磁球进行磁分离，加入100μL封闭液(0.1BSA)，37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次，加入100μL PBS保存微球于4℃中。按1:20稀释微球，确保浓度为200个/μL。

[0120] 4、竞争反应：将黑色不透明的96孔板，用润洗液润洗三次，向每孔中加入10μL，100ng/mL雌二醇溶液和20μL偶联好适配体的微球，25、37℃下反应0.5h。加入10μL互补链，使适配体与互补链最终浓度比为1:1。每孔用偶联缓冲液补齐至100μL，25、37℃反应0.5h；

[0121] 5、检测：用PBS多次清洗后，磁分离加入1:100的SA-PE 37℃反应0.5h。磁分离清洗后，加入100μL鞘液，利用悬浮芯片仪进行检测。得到实验结果如图7所示。

[0122] 根据图7可知：最佳温度为37℃。

[0123] 实验例5

[0124] 1、准备互补链：将生物素修饰的五种氨基化适配体(购于上海生工)按照说明书配

制成浓度为10μM,将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min,反应后放入0℃冷却10min。

[0125] 2、准备微球:取50μL羧基化磁性微球用0.01MES多次清洗,磁分离后,将微球重悬于100μL PBS中。

[0126] 3、偶联:分别将五种适配体稀释至1、2、3、4、5μM,取4μL适配体,5μL EDC,2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中,37℃反应2h。将磁球进行磁分离,加入100μL封闭液(0.1BSA),37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次,加入100μL PBS保存微球于4℃中。按1:20稀释微球,确保浓度为200个/μL。

[0127] 4、竞争反应:将黑色不透明的96孔板,用润洗液润洗三次;向每孔中加入10μL、100ng/mL环境雌激素和20μL偶联好适配体的微球,37℃反应0.5h。加入10μL互补链,使适配体与互补链最终浓度比为1:1。每孔用偶联缓冲液补齐至100μL,37℃反应0.5h。

[0128] 5、检测:用PBS多次清洗后,磁分离加入1:100的SA-PE37℃反应0.5h。磁分离清洗后,加入100μL鞘液,利用悬浮芯片仪进行检测。得到实验结果如图8所示。

[0129] 根据图8可知:阿特拉津,丙溴磷,多氯联苯,双酚A的最大偶联适配体浓度为4μM、2μM、3μM、5μM、2μM。

[0130] 实验例6

[0131] 1、准备互补链:以雌二醇为例,将氨基化适配体,生物素修饰的互补链(购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM。将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min,反应后放入0℃冷却10min。

[0132] 2、准备微球:取50μL羧基化磁性微球用0.01MES多次清洗,磁分离后,将微球重悬于100μL PBS中。

[0133] 3、偶联:将雌二醇适配体稀释至4μM,取4μL适配体,5μL EDC,2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中,37℃反应2h。将磁球进行磁分离,加入100μL封闭液(0.1M BSA),37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次,加入100μL 0.1M Hepes Buffer、Hybridisation Buffer、0.1M PBS、100x Tris-EDTA Buffer保存微球于4℃中,保存时间为4、8、12、24、48h。按1:20稀释微球,确保浓度为200个/μL。

[0134] 4、竞争反应:将黑色不透明的96孔板,用润洗液润洗三次,向每孔中加入10μL,100ng/mL雌二醇溶液和20μL偶联好适配体的微球,37℃下反应0.5h。加入10μL互补链,使适配体与互补链最终浓度比为1:1。每孔用偶联缓冲液补齐至100μL,37℃反应0.5h。

[0135] 5、检测:用PBS多次清洗后,磁分离加入1:100的SA-PE37℃反应0.5h。磁分离清洗后,加入100μL鞘液,利用悬浮芯片仪进行检测。得到实验结果如图9所示。

[0136] 根据图9可知:在1x PBS缓冲液中,荧光值最高,储存效果最好。

[0137] 实验例7

[0138] 1、准备互补链:以雌二醇为例,将氨基化适配体,生物素修饰的互补链(购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM。将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min,反应后放入0℃冷却10min。

[0139] 2、准备微球:取50μL羧基化磁性微球用0.01MES多次清洗;磁分离后,将微球重悬于100μL PBS中。

[0140] 3、偶联:将雌二醇适配体稀释至4μM,取4μL适配体,5μL EDC,2.5μL NHS(10mg/mL)

加入微球中，37℃反应2h。将磁球进行磁分离，加入100μL封闭液(0.1BSA)，37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次，加入100μL PBS保存微球于4℃中。按1:20稀释微球，确保浓度为200个/μL。

[0141] 4、竞争反应：将黑色不透明的96孔板，用润洗液润洗三次。向每孔中加入10μL，100ng/mL雌二醇溶液和20μL偶联好适配体的微球，37℃下反应0.5h。加入10μL互补链，使适配体与互补链最终浓度比为1:1。每孔用偶联缓冲液补齐至100μL，37℃反应0.5h。

[0142] 5、检测：用PBS多次清洗后，磁分离加入1:50、1:100、1:200的SA-PE37℃反应0.5h。磁分离清洗后，加入100μL鞘液，利用悬浮芯片仪进行检测。得到实验结果如图10所示。

[0143] 根据图10可知：作为最终的报告蛋白，SA-PE的浓度也十分关键。适合的浓度可以使荧光值改变趋势明显。根据实验，最后确定SA-PE的最适浓度为1:100。

[0144] 实验例8

[0145] 1、准备互补链：将五种氨基化适配体，生物素修饰的五种互补链(购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM。将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min，反应后放入0℃冷却10min。

[0146] 2、准备微球：取50μL羧基化磁性微球用0.01MES多次清洗，磁分离后，将微球重悬于100μL PBS中。

[0147] 3、偶联：将五种适配体稀释至最适浓度，取4μL适配体，5μL EDC，2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中，37℃反应2h。将磁球进行磁分离，加入100μL封闭液(0.1BSA)，37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次，加入100μL PBS保存微球于4℃中。按1:20稀释微球，确保浓度为200个/μL。

[0148] 4、竞争反应：将黑色不透明的96孔板，用润洗液润洗三次，配制不同浓度的环境雌激素(0、0.0001、0.01、0.1、1、10、100、1000ng/mL)每管同时加入5μL五种环境雌激素和10μL五种偶联好适配体的微球，37℃反应0.5h。加入5μL五种互补链，使适配体与互补链最终浓度比为1:1，37℃反应0.5h。

[0149] 5、检测：用PBS多次清洗后，磁分离加入1:100的SA-PE37℃反应0.5h。磁分离清洗后，加入100μL鞘液，利用悬浮芯片仪进行检测。得到实验结果如图11所示，标准曲线如表4所示：

[0150] 表4

[0151]

	微球编码	标准线方程	R^2	最低检出限(pg/mL)
阿特拉津	35	$Y=0.1553+1.29332/[1+(x/5.5695E-5)^{0.27737}]$	0.998	2.83
丙溴磷	36	$Y=0.1015+0.76118/[1+(x/0.0079)^{0.50882}]$	0.993	1.93
双酚A	42	$Y=-0.21441+0.79455/[1+(x/0.91874)^{0.37316}]$	0.994	3.5
雌二醇	45	$Y=0.35259+0.92104/[1+(x/1.16217E-4)^{0.26833}]$	0.900	0.29
多氯联苯	54	$Y=0.17716+0.54484/[1+(x/0.09952)^{0.6188}]$	0.981	0.32

[0152] 实验例9

[0153] 1、准备互补链：将五种氨基化适配体，生物素修饰的五种互补链(购于上海生工)按照说明书配制成浓度为10μM。将序列放入离心机6000rpm离心30s。放入金属浴中95℃加热5min，反应后放入0℃冷却10min。

[0154] 2、准备微球：取50μL羧基化磁性微球用0.01MES多次清洗，磁分离后，将微球重悬于100μL PBS中。

[0155] 3、偶联：将五种适配体稀释至最适浓度，取4μL适配体，5μL EDC，2.5μL NHS(10mg/mL)加入微球中，37℃反应2h。将磁球进行磁分离，加入100μL封闭液(0.1M BSA)，37℃反应0.5h。PBS清洗微球多次，加入100μL PBS保存微球于4℃中。按1:20稀释微球，确保浓度为200个/μL。

[0156] 4、竞争反应：将黑色不透明的96孔板，用润洗液润洗三次。配制浓度为1ng/mL阿特拉津，多氯联苯、10ng/mL丙溴磷，雌二醇，双酚A，加入到采集的海河水中。每管同时加入5μL五种含环境雌激素的实际样品和10μL五种偶联好适配体的微球，37℃反应0.5h。加入5μL五种互补链，使适配体与互补链最终浓度比为1:1，37℃反应0.5h。

[0157] 5、检测：用PBS多次清洗后，磁分离加入1:100的SA-PE 37℃反应0.5h。磁分离清洗后，加入100μL鞘液，利用悬浮芯片仪进行检测。

[0158] 通过标准曲线，得到浓度为如表5所示。

[0159] 表5

[0160]

	样品浓度(ng/mL)	实际检测浓度(ng/mL)	相对标准偏差(%)
阿特拉津	1	0.875	17.35
丙溴磷	10	11.102	8.06
多氯联苯	1	0.956	14.91
雌二醇	10	11.009	28.44
双酚A	10	9.906	7.64

[0161] 由表5可知，实际样品检测的相对标准偏差在7.64-28.44%之间，雌二醇的相对标准偏差较高，高通量检测的情况下，均符合检测标准。

[0162] 本申请虽然以较佳实施例公开如上，但并不是用来限定权利要求，任何本领域技术人员在不脱离本申请构思的前提下，都可以做出若干可能的变动和修改，因此本申请的保护范围应当以本申请权利要求所界定的范围为准。

[0001] 序列表
[0002] <110> 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所
[0003] <120> 一种环境雌激素的检测方法及应用
[0004] <160> 10
[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
[0006] <210> 1
[0007] <211> 40
[0008] <212> DNA
[0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0010] <400> 1
[0011] tttttttttt tggtgcgaac ccgtgatgcg ctgggccata 40
[0012] <210> 2
[0013] <211> 35
[0014] <212> DNA
[0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0016] <400> 2
[0017] tttttttttt gcttccgcgc ttcagcgcgc agcaa 35
[0018] <210> 3
[0019] <211> 22
[0020] <212> DNA
[0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0022] <400> 3
[0023] tttttttttt cacgggccat cg 22
[0024] <210> 4
[0025] <211> 28
[0026] <212> DNA
[0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0028] <400> 4
[0029] tttttttttt tagctctgtg gcgatcaa 28
[0030] <210> 5
[0031] <211> 26
[0032] <212> DNA
[0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0034] <400> 5
[0035] tttttttttt tcactgactg gctaaa 26
[0036] <210> 6
[0037] <211> 73
[0038] <212> DNA

[0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0040] <400> 6

[0041] tttttttttt ccggtgggtg gtcaggtggg atagcgttcc gcgtatggcc cagcgcatca 60

[0042] cgggttcgca cca 73

[0043] <210> 7

[0044] <211> 86

[0045] <212> DNA

[0046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0047] <400> 7

[0048] tttttttttt gcttccagct tattgaatta cacgcagagg gtagcggctc tgcgcattca 60

[0049] attgctgcgc gctgaagcgc ggaagc 86

[0050] <210> 8

[0051] <211> 33

[0052] <212> DNA

[0053] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0054] <400> 8

[0055] tttttttttt ttgatttttt ccgatggccc gtg 33

[0056] <210> 9

[0057] <211> 46

[0058] <212> DNA

[0059] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0060] <400> 9

[0061] tttttttttt tagcttgctg cagcgattct tgatcgccac agagct 46

[0062] <210> 10

[0063] <211> 44

[0064] <212> DNA

[0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0066] <400> 10

[0067] tttttttttt tactgtttgc actggcggat ttagccagtc agtg 44

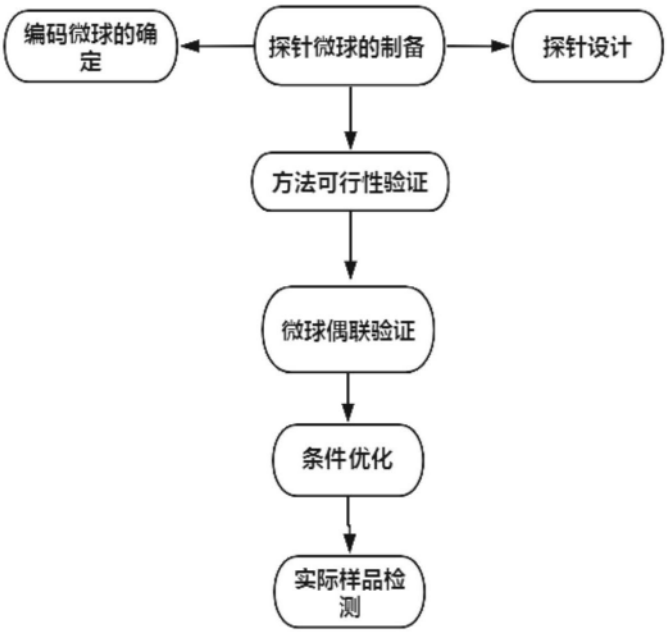
编码微球的确定
探针微球的制备
探针设计
方法可行性验证
微球偶联验证
条件优化
实际样品检测

图1

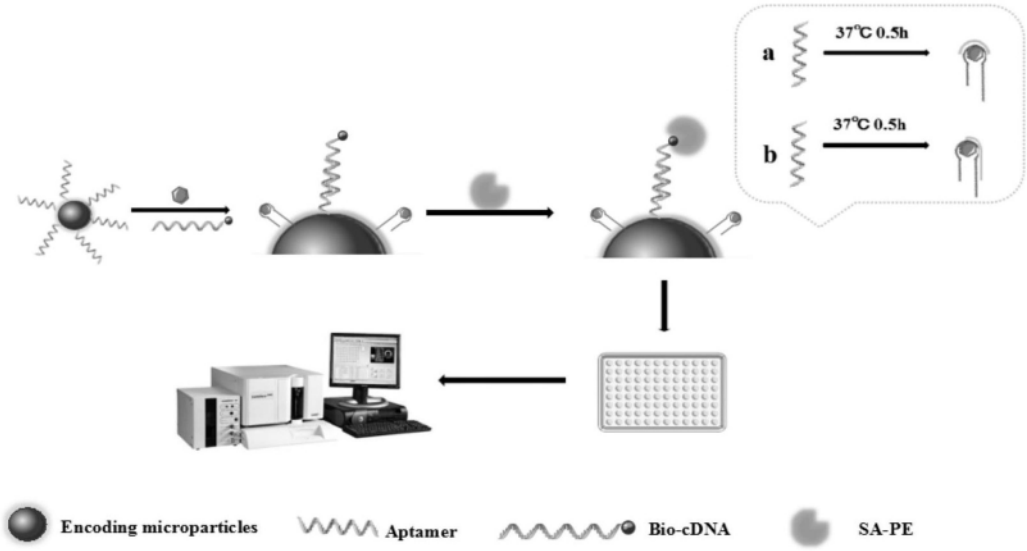
a
37℃ 0.5h
b
37℃ 0.5h
Encoding microparticles
Aptamer
Bio-cDNA
SA-PE

图2

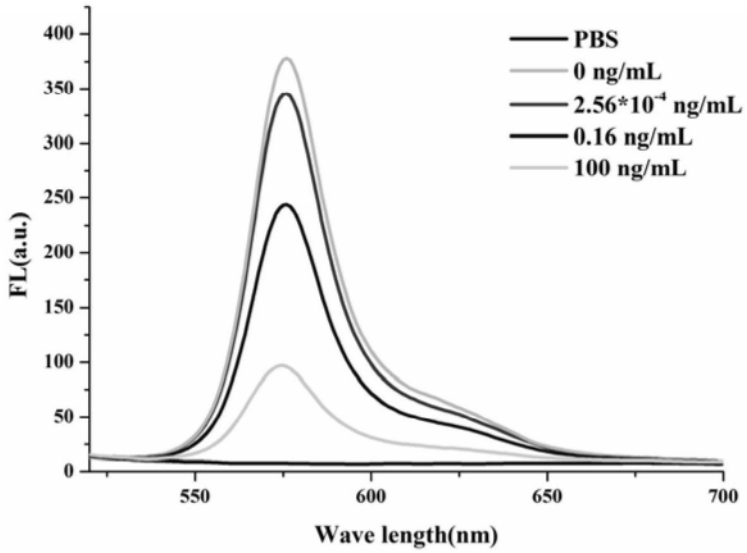
PBS
0 ng/mL
2.56*10⁻⁴ ng/mL
0.16 ng/mL
100 ng/mL
FL(a.u.)
Wave length(nm)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
550
600
650
700

图3

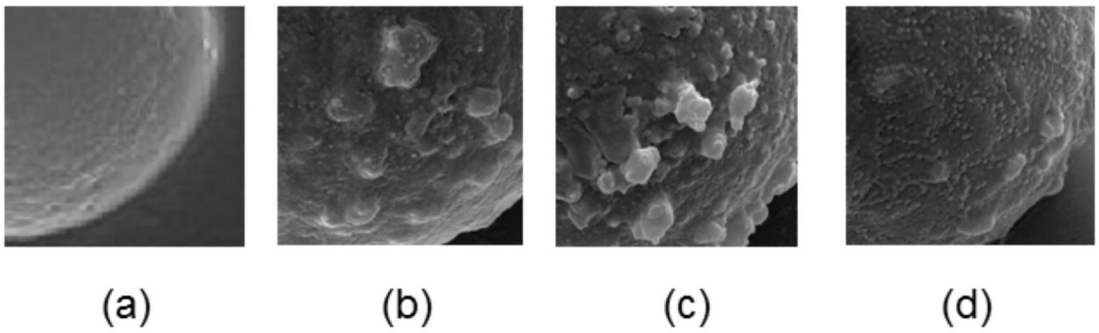
(a)
(b)
(c)
(d)

图4

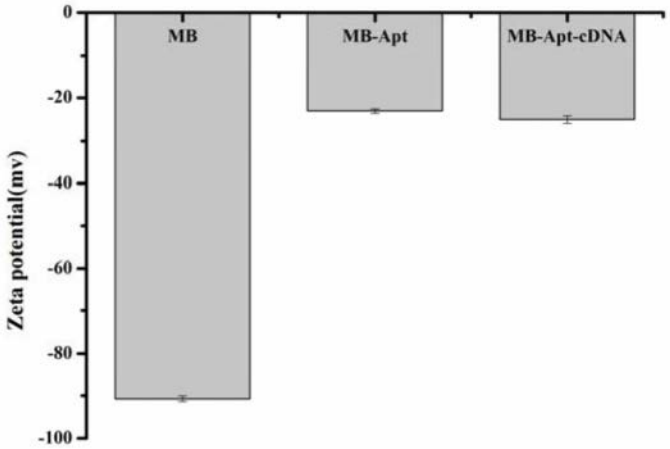
MB
MB-Apt
MB-Apt-cDNA
Zeta potential(mv)
0
-20
-40
-60
-80
-100

图5

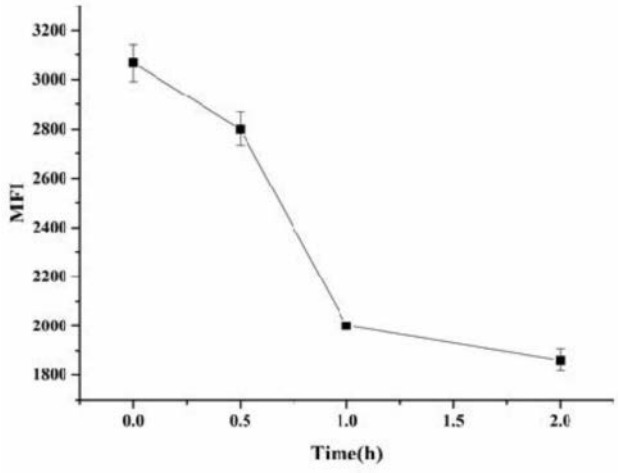
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
MFI
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
Time(h)

图6

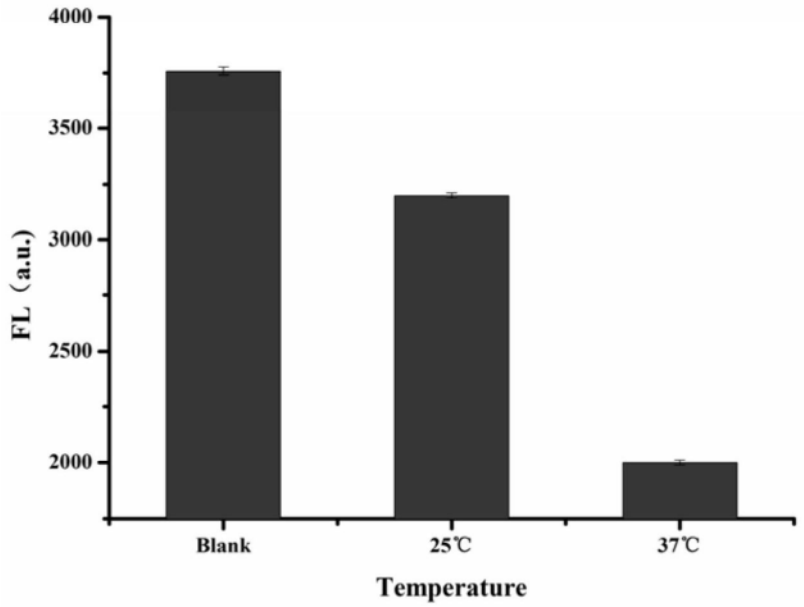
4000
3500
3000
2500
2000
FL（a.u.）
Blank
25℃
37℃
Temperature

图7

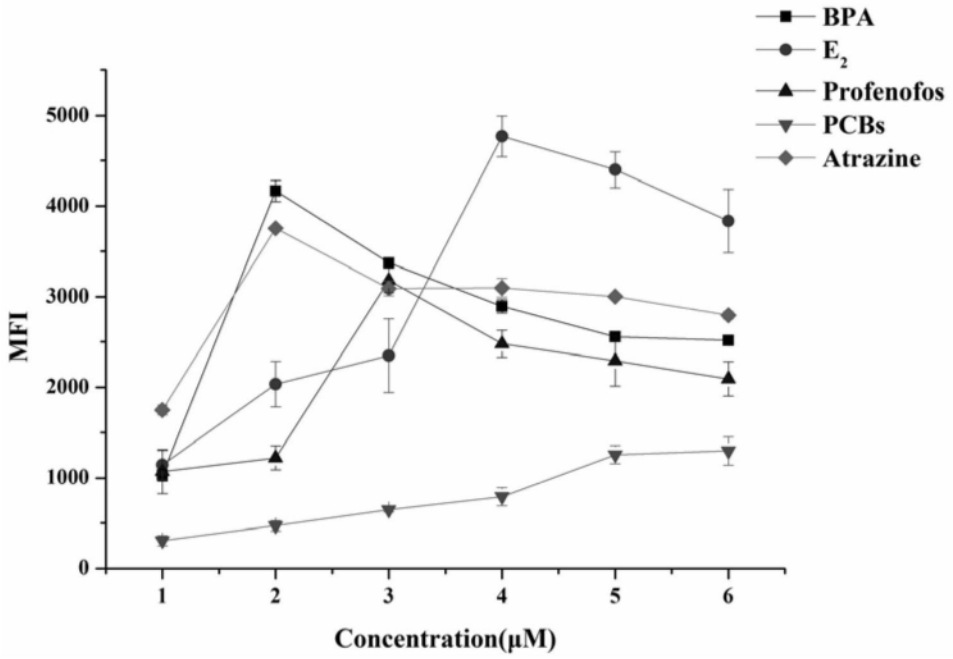
BPA
E2
Profenofos
PCBs
Atrazine
MFI
5000
4000
3000
2000
1000
0
1
2
3
4
5
6
Concentration(μM)

图8

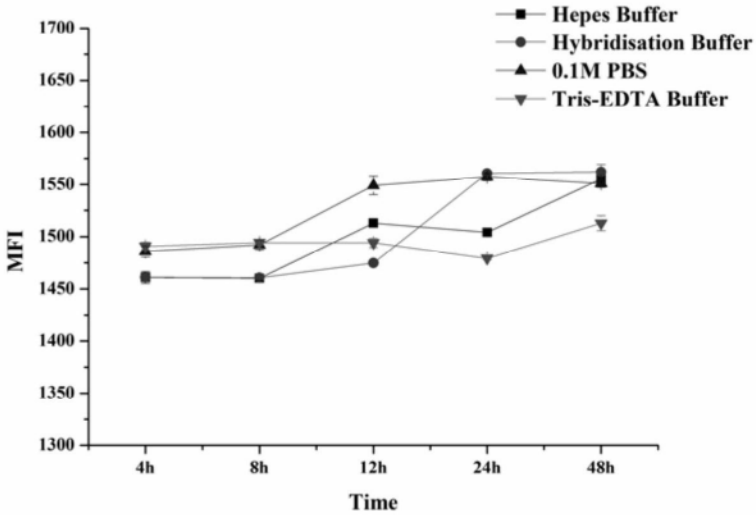
Hepes Buffer
Hybridisation Buffer
0.1M PBS
Tris-EDTA Buffer
MFI
1700
1650
1600
1550
1500
1450
1400
1350
1300
4h
8h
12h
24h
48h
Time

图9

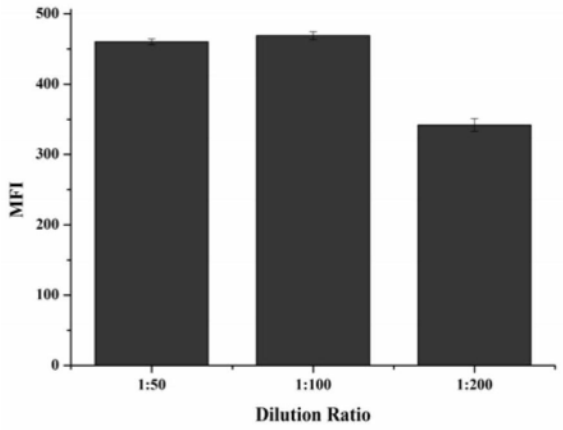
500
400
300
200
100
0
MFI
1:50
1:100
1:200
Dilution Ratio

图10

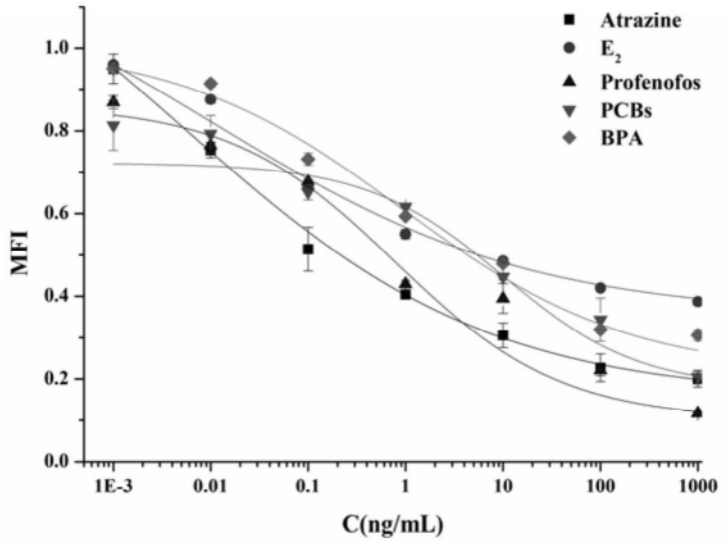
Atrazine
E2
Profenofos
PCBs
BPA
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MFI
1E-3
0.01
0.1
1
10
100
1000
C(ng/mL)

图11