

# 基于磁性纳米材料构建酶联增敏生物 传感器检测双酚 A

Enzyme-linked sensitization biosensor detection of bisphenol A in  
food matrix Based on magnetic nanomaterials

许宙 唐瑶 汪荣 陈茂龙 文李 程云辉

XU Zhou TANG Yao WANG Rong CHEN Mao-long WEN Li CHENG Yun-hui

(长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114)

(School of Chemistry and Biological Engineering, Changsha University of Science & Technology,  
Changsha, Hunan 410114, China)

**摘要:**以纳米材料为载体,以双酚 A 适配体及互补链为生物识别单元,建立了基于功能化磁纳米粒子及金纳米粒子的辣根过氧化物酶酶联增敏检测平台,可实现对食品基质中双酚 A 的快速前处理和痕量检测,该方法将可与双酚 A 特异性结合的适配体偶联于磁性纳米材料上,再与适配体互补链及辣根过氧化物酶(HRP)修饰的金纳米粒子进行竞争性结合,通过 HRP 对底物的催化水解反应引起 450 nm 处特征峰的变化来定量检测双酚 A。结果表明:该检测体系在 0~100 ng/mL 时具有线性关系( $R^2=0.978\ 4$ ),检测限低至 0.5 pg/mL,具有较好的实用性,为更好地检测食品基质中的双酚 A 提供了有力的技术支持。

**关键词:**纳米材料;适配体;辣根过氧化物酶;双酚 A

**Abstract:** A horseradish peroxidase enzyme-sensitized detection platform based on functionalized magnetic nanoparticles and gold nanoparticles was established with the nanomaterials as the carrier and the bisphenol A aptamer and the complementary strand as the biometric recognition unit. The method about rapid pretreatment and trace detection of bisphenol A in food matrix was established. The BPA aptamer binding to the magnetic nanomaterials could compete with the complementary strands of the aptamer and the horseradish peroxidase (HRP) modified gold nanoparticles. The effect of HRP on the catalytic hydrolysis of the substrate resulted in the change of characteristic peaks at 450 nm, helping to quantitatively detect bisphenol A, which had the advantages of good selectivity, high sensitivity and

good specificity. The results showed that this detection system had a linear relationship ( $R^2=0.978\ 4$ ) in the concentration range of 0~100 ng/mL, and the limit of detection was as low as 0.5 pg/mL. This work provided strong technical support for detection of bisphenol A in future.

**Keywords:** nanoparticles; aptamer; horseradish peroxidase enzyme; bisphenol A

双酚 A(Bisphenol A, BPA)由两分子苯酚和一分子丙酮在酸性条件下催化缩合而成,其结构见图 1<sup>[1]</sup>。BPA 的应用非常广泛,是生产塑料及纸制品中环氧树脂、聚碳酸酯等多种高分子材料的主要原料,也可以用于抗氧剂、涂料、增塑剂等精细化工品的生产。此外,它还广泛用作各种罐头容器、婴儿奶瓶、矿泉水瓶、饮料包装、眼镜片以及其他日常用品的原材料<sup>[2-3]</sup>。存在于多种食物接触材料和环境、水体中的双酚 A 可通过浸出、迁移或蒸发等方式扩散到室内空气和食物中<sup>[4-5]</sup>,双酚 A 进入人体后可发挥拟雌激素的作用,从而影响正常激素在机体内的产生、释放、运输及代谢等相关生理作用<sup>[6-7]</sup>,进而干扰生物体的生殖、遗传、免疫等生理功能,导致流产<sup>[8-9]</sup>、不孕不育<sup>[10-11]</sup>、乳腺癌<sup>[12-13]</sup>、前列腺癌<sup>[14]</sup>等多种疾病。

检测双酚 A 的传统方法以色谱法为主,特别是高效液相色谱(HPLC)法<sup>[15-17]</sup>和气-质联用(GC-MS)法<sup>[18-19]</sup>,但是由于双酚 A 的沸点较高,且不易挥发,在 150 ℃ 时易产生分

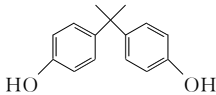


图 1 双酚 A 的结构图

Figure 1 The structure of bisphenol A

**基金项目:**国家自然科学基金(编号:31401566,31601550);国家重点研发计划(编号:2016YFF0203701)

**作者简介:**许宙,男,长沙理工大学讲师,博士。

**通信作者:**程云辉(1964—),女,长沙理工大学教授,博士。

E-mail: xz\_jnu@126.com

**收稿日期:**2017-07-27

解,因此在采用气相色谱法进行检测之前,通常要先将待测样品的提取液进行硅烷衍生化处理<sup>[20]</sup>,并利用质谱作为相应的检测信号以提高灵敏度。虽然传统色谱方法灵敏度较高、特异性好,但所需仪器昂贵、操作复杂。其他常规方法如酶联免疫法<sup>[21-22]</sup>也是近年常用的一类检测方法,Zhao 等<sup>[23]</sup>通过采用多克隆抗体建立了检测水中双酚 A 的间接 ELISA 法,其回收率为 92%~105%,检测范围为 1~10 000 ng/mL,检测限为 2 ng/mL。该方法采用的双酚 A 抗体可能会与其他物质产生一定的非特异性结合,尤其是与双酚 A 的结构类似物,因此其灵敏度和特异性均受到限制,且操作过程不够简便、耗时较长。

目前,已有多种纳米材料应用于物质快速检测的报道,其中基于超顺磁性和亲和分离原理的磁性纳米材料已成功地应用于 DNA<sup>[24]</sup>、多糖<sup>[25]</sup>、蛋白质<sup>[26]</sup>、重金属<sup>[27]</sup>及毒素等的检测。也有将磁性纳米材料与其他纳米材料结合并进行抗体修饰,利用抗原抗体的特异性识别特性而制备出竞争性免疫传感器用于检测毒素<sup>[28]</sup>、细菌<sup>[29]</sup>等的报道。而基于磁纳米材料的酶联增敏检测对有机小分子进行快速、原位检测的报道相对较少。本研究拟利用适配体核苷酸链的碱基互补配对作用,驱动辣根过氧化物酶功能化的金纳米粒子与功能化磁纳米粒子自组装,将适配体对 BPA 的识别过程转化为可见光吸收信号进行研究,实现对双酚 A 的高选择性、高特异性检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

双酚 A、4-辛基酚(4-OP)、双酚 A 缩水甘油醚(BDAGE)、双酚 F 缩水甘油醚(BDFGE)、双酚 A 二(3-氯-2-羟基醚)醚(DOA)、双酚 F 双(2,3-二羟基丙基)醚(BFDGE)、己二酸二(2-乙基己基)酯(DEHA)、对苯二甲酸二辛酯(DOTP):分析纯,北京百灵威科技有限公司;

DNA:上海生工生物工程技术有限公司;  
3,3',5,5'-四甲基联苯胺等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

辣根过氧化物酶:250 U/mg;  
试验用水:超纯水(18.2 MΩ),用超纯水仪制备;  
超纯水仪:Purelab Classic 系列,英国 ELGA 公司;  
紫外-可见分光光度计:UV-1800 型,日本岛津公司。

### 1.2 方法

1.2.1 磁性纳米粒子(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)的制备 采用水热法合成。准确称取 1 g 六水合氯化铁和 2.4 g 乙酸钠于烧杯中,加入 30 mL 乙二醇搅拌至溶解,再加入 0.75 g 聚乙二醇继续搅拌至溶解;将此混合溶液在机械搅拌器作用下搅拌 6 h;将溶解后的黄色液体转移至聚四氟乙烯内胆容器中,放置于密闭不锈钢水热反应釜中,在 210 ℃ 的油浴锅中持续加热反应 12 h;反应结束后快速冷却反应釜,将得到的黑色物质转移至干净烧杯中,用无水乙醇洗 6 遍,再用超纯水洗 2 遍,最后于 30 mL 无水乙醇中储存,备用。

1.2.2 适配体功能化磁纳米粒子(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DNA1)的制备

取 1 mL 磁纳米粒子于离心管中,加入 200 mmol/L EDC 和 100 mmol/L NHS,轻微振荡,在室温下反应活化 30 min。磁分离去除剩余的 EDC 和 NHS,加入 10 μL 1 mmol/L 的 DNA1[5'-NH<sub>3</sub>-(T)10-CCGGT GGGTG GT-CAG GTGGG ATAGC GTTCC GCGTA TGGCC CAGCG CATCA CGGGT TCGCA CCA-3'],室温下振荡反应 6 h。磁分离去除未反应的 DNA,用超纯水洗涤 3 遍,复溶于 1 mL 超纯水中,4 ℃ 下储存,备用。

1.2.3 金纳米粒子(AuNPs)的制备 采用柠檬酸钠还原氯金酸法<sup>[30]</sup>合成粒径为 13 nm 的金纳米材料。首先在三角烧瓶中加入 97.5 mL 超纯水和 2.5 mL 质量浓度为 0.412% (10 mmol/L)的氯金酸溶液,置于磁力搅拌器上搅拌并加热至沸腾;7~8 min 后加入 2 mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸三钠溶液,溶液从无色变为红色后停止加热,继续搅拌 15 min,所得红色液体即为 13 nm 金纳米粒子。

1.2.4 功能化金纳米粒子(HRP-AuNPs-DNA2)的制备 取 10 μL 1 mmol/L 的 DNA2[5'-SH-(T)10-CCCAC CTGAC CACCC ACCGG-3']与 5 μL 25 mmol/L TCEP 在黑暗环境中反应 1 h,然后加入 1 mL 金纳米粒子,室温下孵育过夜;将金纳米粒子混合物在转速 7 000 r/min 下离心 20 min 去除未反应的 DNA2,重悬于 1 mL 超纯水中,所制备的材料即为适配体功能化的金纳米粒子(AuNPs-DNA2),4 ℃ 下储存备用。

取 50 μL 制备好的 AuNPs-DNA2 于离心管中,加入 5 μL 0.1 mg/mL 的辣根过氧化物酶(HRP),在黑暗环境中孵育 2 h;将孵育后的混合物于 6 500 r/min 离心 15 min 去除未反应的 HRP,重悬于 50 μL 超纯水中;所制得的 HRP-AuNPs-DNA2 溶液于 4 ℃ 下储存,备用。

1.2.5 检测体系的构建 首先准确称取 0.820 3 g 醋酸钠、0.273 2 g 柠檬酸于烧杯中,加入 100 mL 超纯水配制成 pH 5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液;准确称取 0.018 6 g EDTA 和 5 mL 甘油加入到醋酸钠-柠檬酸缓冲液中;所得溶液于 4 ℃ 下避光保存,供显色待用。显色之前,取 1 mL 上述配制好的显色液,加入 5 μL TMB 溶液(2.5 mg/mL)以及 0.5 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%),即配制成所需的 TMB 显色液。

用吸附缓冲液配制所需浓度梯度的双酚 A 标准溶液(0, 0.000 5, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng/mL),各取 1 mL 加入到制备好的功能化磁纳米粒子(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DNA1)中,振荡孵育 2 h;磁分离去除未反应的双酚 A,水洗 3 次,重悬于 1 mL 超纯水中;取 500 μL 反应后的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DNA1-BPA 纳米粒子与 500 μL 制备好的 HRP-AuNPs-DNA2 纳米粒子混合,振荡孵育 4 h。用超纯水洗涤 3 次除去未反应的 HRP-AuNPs-DNA2;取 1 mL 配制好的 TMB 显色液,将反应后的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AuNPs 纳米粒子加入到 TMB 显色液中,于黑暗中显色 30 min;加入 10 μL 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,30 min 后用紫外-可见分光光度计在 450 nm 波长下进行定量检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测原理

检测原理如图 2 所示,通过 BPA 适配体功能化的磁纳

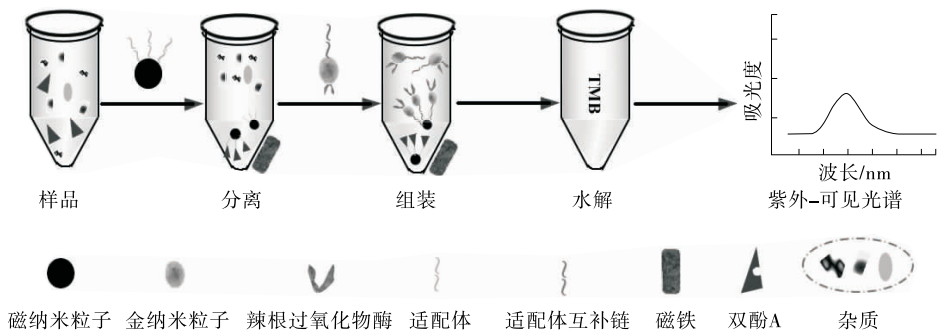


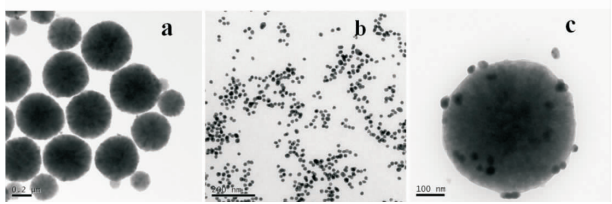
图 2 功能化磁、金纳米粒子检测双酚 A 原理图

Figure 2 Schematic diagram of enzyme-linked sensitization sensor for detection of bisphenol A

米粒子与双酚 A 发生特异性吸附,当体系中没有 BPA 存在时,功能化的磁纳米粒子与适配体互补链及辣根过氧化物酶 (HRP) 修饰的金纳米粒子进行结合,反之当体系中存在 BPA 时,BPA 会与适配体功能化的磁纳米粒子发生竞争性结合,导致功能化的磁纳米粒子与酶修饰的功能化金纳米粒子的复合物分解。随着 BPA 浓度的升高,HRP 对底物催化水解程度逐渐降低,在 450 nm 波长下特征峰的吸光度逐渐降低,依据紫外特征峰的吸光度及 TMB 显色反应,在酶联增敏效应体系下建立双酚 A 的紫外-可见光谱快速检测方法。

2.2 功能化磁、金纳米粒子的表征

纳米材料的分散性是该传感器构建的首要条件,它直接影响到纳米材料在修饰、吸附以及特异性竞争结合时的效果。图 3 是透射电子显微镜 (TEM) 对磁纳米粒子与金纳米粒子的表征结果。由图 3 可知,所合成的磁纳米粒子及金纳米粒子在铜网上均呈现出良好的分散性,并且颗粒大小相对均匀、一致,其平均尺寸分别为 200,13 nm。当体系中只存在少量浓度双酚 A 时,磁纳米粒子表面的适配体会与金纳米粒子表面的互补链发生特异性结合,见图 3(c)。



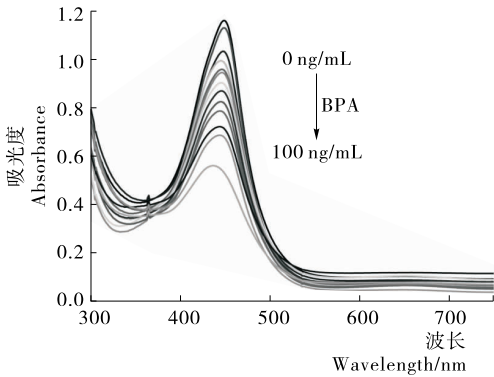
(a) 磁性纳米粒子 (b) 金纳米粒子 (c) BPA 添加浓度为 0.1 ng/mL

图 3 不同样品的透射电镜图

Figure 3 Transmission electron microscopy images of different samples

2.3 HRP 酶联增敏检测

将辣根过氧化物酶修饰在金纳米粒子上,根据其对底物催化水解所产生的特征反应作为检测信号,经硫酸终止后,用紫外-可见分光光度计在 450 nm 波长下对其底物的特征峰进行观测。图 4 展示了不同浓度双酚 A 的紫外-可见光谱图。由图 4 可知,从上到下随着双酚 A 浓度的增加,特征峰的吸光度越来越低,说明该反应体系所产生的水解程度越来越低。吸光度的变化是由该传感器中功能化磁纳米粒子所结合的功能化金纳米粒子的数量变化引起的,当没有双酚 A



由上至下 BPA 浓度依次为 0,0.0005,0.001,0.005,0.01,0.05,0.1,0.5,1.5,10,50,100 ng/mL

图 4 不同 BPA 浓度对应的紫外-可见分光光谱图

Figure 4 UV-vis absorption spectra of enzyme-linked sensitization sensor after adsorbent of different concentrations of BPA

存在时,大量的功能化金纳米粒子结合到磁纳米粒子表面,随着辣根过氧化物酶被带量增加,加入底物催化水解时,所产生的颜色反应就越快,特征峰的吸光度就越高。随着双酚 A 浓度的提高,双酚 A 与金纳米粒子的竞争性机制逐渐产生,双酚 A 被适配体特异性识别,磁纳米粒子结合的金纳米粒子就越少,吸光度也就越低。

依据双酚 A 分子与金纳米粒子在体系中的竞争性反应机制,考察了最佳试验条件下,不同浓度双酚 A 与吸光度之间的关系,见图 5。由图 5 可知,双酚 A 浓度在 0.001 ~ 50 ng/mL 时,吸光度  $y$  与双酚 A 浓度  $x$  的对数之间呈良好的线性相关,线性关系为:  $y = -0.033 \ln x + 0.8174$  ( $R^2 = 0.9784$ )。其线性关系呈负相关,因为双酚 A 浓度越高、吸光度越低;该方法对双酚 A 的检测限低至 0.5 pg/mL。

2.4 特异性分析

为了验证本方法检测双酚 A 的特异性,本研究对多种 BPA 结构类似物如 4-辛基酚 (4-OP)、双酚 A 缩水甘油醚 (BDAGE)、双酚 F 缩水甘油醚 (BDFGE)、双酚 A 二 (3-氯-2-羟基醚) 醚 (DOA)、双酚 F 双 (2,3-二羟基丙基) 醚 (BFDGE)、己二酸二 (2-乙基己基) 酯 (DEHA)、对苯二甲酸二辛酯 (DOTP) 进行了分析检测,其添加浓度均为 50 ng/mL,结果见图 6。在相同试验条件下,BPA 结构类似

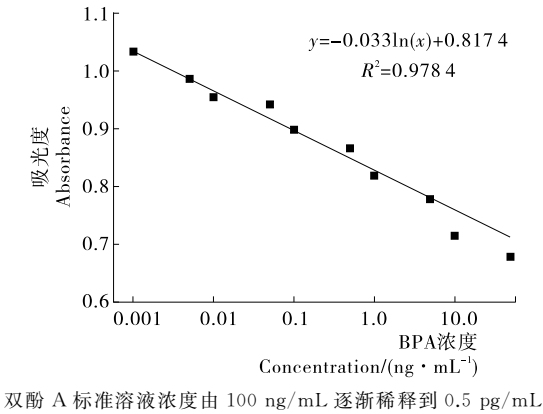


图 5 BPA 浓度与吸光度之间的标准曲线

Figure 5 Linear relationship of UV-vis absorbance versus target BPA concentration

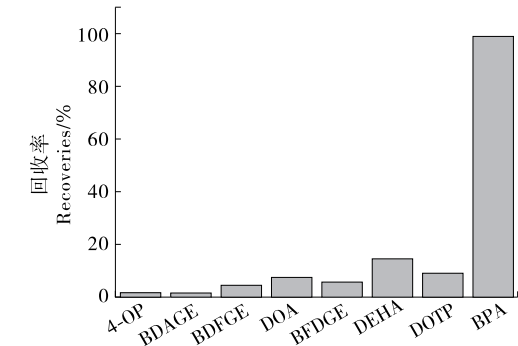


图 6 BPA 结构类似物对传感器的影响

Figure 6 Absorbance change of the detection of BPA and BPA analogs at a concentration of 50 ng/mL

物如 4-OP、BDAGE、BDFGE、DOA、BFDGE、DEHA、DOTP 的回收率分别为 1.63%，1.4%，4.42%，7.33%，5.59%，14.41%，8.94%，而双酚 A 的添加回收率在 98.75% 左右。表明该磁性纳米传感器具有很好的适配体一目标物识别响应，特异性良好，其他酚类没有明显的信号干扰。

2.5 实际样品分析

为了验证所建立的检测方法在实际样品应用中的精确性和实用性，本研究对自来水样品进行了添加回收检测试验。在自来水中添加不同浓度的双酚 A 标准样品，用本研究所制备的酶联增敏生物传感器进行检测，结果见表 1。由表 1 可知，其回收率在 98.75%~101.31%，表明本方法可用于实际样品的分析检测。

3 结论

该研究利用辣根过氧化物酶功能化的金纳米粒子与适配体功能化的磁性纳米粒子构建了一种基于酶联反应的双

表 1 实际样品(自来水)测定结果

| Table 1 Determination of BPA spiked into tap-water |                              |        |
|----------------------------------------------------|------------------------------|--------|
| 加标量/(ng · mL <sup>-1</sup> )                       | 检测值/(ng · mL <sup>-1</sup> ) | 回收率/%  |
| 0.1                                                | 0.101 2                      | 101.31 |
| 10.0                                               | 9.875 3                      | 98.75  |

酚 A 检测方法。该方法前处理简单快速，能够获得很好的回收率和极低的检测线，并可实现原位检测，在食品安全检测中具有较强的实用性。本研究所建立的方法不仅可应用于食品中有害因子双酚 A 的快速原位检测，同时也可构建食品中小分子危害因子检测新方法提供参考。

参考文献

[1] 代欢欢. 基于 HPLC 法对罐装食品中双酚 A 的测定方法研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 93-95.

[2] ALONSO-MAGDALENA P, ROPERO A B, SORIANO S, et al. Bisphenol-A: a new diabetogenic factor [J]. Hormones, 2010, 9(2): 118-126.

[3] 刘肖. 仪器分析技术在矿泉水及包装材料分析中的新进展[J]. 中国食品工业, 2011(12): 24-26.

[4] 张彦丽, 任佳丽, 李忠海, 等. 食品包装材料中双酚 A 的研究进展[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 155-157.

[5] SHARP L, BLACK R J, MUIR C S, et al. Will the Scottish Cancer Target for the year 2000 be met? The use of cancer registration and death records to predict future cancer incidence and mortality in Scotland[J]. British Journal of Cancer, 1996, 73(9): 1 115-1 121.

[6] MERCEA P. Physicochemical process involved in migration of bisphenol A from poly carbon[J]. Applied Polymer Science, 2009, 112(2): 579-593.

[7] HEGNEROVÁ K, HOMOLA J. Surface plasmon resonance sensor for detection of bisphenol A in drinking water[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010, 151(1): 177-179.

[8] 刘银梅, 沈月平, 梁红, 等. 双酚 A 与复发性流产的相关性[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 5(4): 344-349.

[9] TAKAO T, NANAMIYA W, NAGANO I, et al. Exposure with the environmental estrogen bisphenol a disrupts the male reproductive tract in young mice[J]. Life Sciences, 1999, 65(22): 2 351-2 357.

[10] 郭伟鹏, 吴清平, 梁达清, 等. 聚碳酸酯饮水桶中双酚 A 迁移量的研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 78-81.

[11] 邓茂先, 吴德生, 陈祥贵, 等. 双酚 A 雄性生殖毒性的体内外实验研究[J]. 中华预防医学杂志, 2004, 38(6): 383-387.

[12] 刘蕾, 王彦军, 高虹, 等. 职业暴露妇女血清、尿液双酚 A 水平与乳腺癌关系的研究[J]. 中国公共卫生管理, 2012(6): 845-847.

[13] 杨淋清, 庄志雄. 低剂量双酚 A 与乳腺癌关系研究进展[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(12): 1 557-1 559.

[14] ABDI Hamidreza, POURMALEK Farshad, ZARGAR Homayoun, et al. Multiparametric magnetic resonance imaging enhances detection of significant tumor in patients on active surveillance for prostate cancer[J]. Urology, 2015, 85(2): 423-429.

[15] ANA B G, SOLEDAD R, DOLORES P B. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food.[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1 216(3): 449-469.

[16] STUART J D, CAPULONG C P, LAUNER K D, et al. Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by

both gas and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 079(s1/2): 136-145.

[17] BRAUNRATH R, CICHNA M. Sample preparation including sol-gel immunoaffinity chrom-atography for determination of bisphenol A in canned beverages, fruits and vegetables[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 062(2): 189-198.

[18] 李丽莎, 杨湘霞, 汪莉. 高效液相色谱法检测桶装饮用水中双酚 A[J]. 实用预防医学, 2006,13(2): 429-430.

[19] IMANAKA M, SASAKI K, NEMOTO S, et al. Determination of bisphenol A in foods using GC/MS[J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 2001, 42(2): 71-78.

[20] 陈啟荣, 魏岩, 郎爽, 等. 加速溶剂萃取/气相色谱-质谱法测定糖果包装材料中的双酚 A[J]. 食品科学, 2010(6): 165-167.

[21] FLOOD H, KNAPP W J. Comparison of Elisa-and LC-MS-based methodologies for the exposure assessment of bisphenol A[J]. Toxicology Mechanisms & Methods, 2006, 16(8): 427-430.

[22] ZHENG Jie, ZHANG Kun, ZHAO Su-qing. Study on Spectral and immune identification of artificial antigen of bisphenol A[J]. Spectroscopy & Spectral Analysis, 2008, 28(7): 1 583-1 586.

[23] ZHAO Mei-ping, LI Yuan-zong, GUO Zhen-quan, et al. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of estrogenic bisphenols[J]. Talanta, 2002, 57(6): 1 205-1 210.

[24] ZHU Xiao-li, HAN Kun, LI Gen-xi. Magnetic nanoparticles

applied in electrochemical detection of controllable DNA hybridization[J]. Analytical Chemistry, 2006, 7(4): 285-289.

[25] HUI W, ERKANG W. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose detection.[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(6): 2 250-2 254.

[26] TSAI H Y, HSU C F, CHIU I W, et al. Detection of C-reactive protein based on immunoassay using antibody-conjugated magnetic nanoparticles[J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(21): 8 416-8 419.

[27] ZHANG Jia-jia, DAI Pei-qing, LI Chao, et al. A symmetrically split g-quadruplex dnazymes biosensor based on magnetic nanoparticles for the rapid detection of Hg<sup>2+</sup> [J]. Acta Chimica Sinica, 2014, 72(9): 1 029-1 035.

[28] TANG Dian-ping, LIU Bing-qian, Niessner R, et al. Targetinduced displacement reaction accompanying cargo release from magnetic mesoporous silica nanocontainers for fluorescence immunoassay[J]. Analytical chemistry, 2013, 85(21): 10 589-10 596.

[29] YUNJ S, SUK H J, SUNG H Y, et al. Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of Staphylococcus aureus in milk[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 43(1): 432-439.

[30] AMBROSI A, CASTANEDA M T, KILLARD A J, et al. Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(14): 5 232-5 240.

(上接第 38 页)

养时间 16 h、培养温度 34 ℃、蔗糖浓度 1 g/100 mL,该条件下 BD3900 产生的抑制物质对变形链球菌生物膜形成抑制达到 71.5%,比未优化前提高了 10%。通过对比优化前后样品以及对照组样品对变形链球菌合成的不溶性多糖的产量,推测 BD3900 所产生的物质可能是通过减少 *S.mutans* 不溶性多糖的合成,从而抑制其生物膜的形成量,但影响变形链球菌生物膜形成的因素众多,还需进一步的试验进行论证。

参考文献

[1] BURTON J P, DRUMMOND B K, CHILCOTT C N, et al. Influence of the probiotic Streptococcus salivarius strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial [J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(6): 875-884.

[2] WESCOMBE P A, HALE J D, HENG N C, et al. Developing oral probiotics from Streptococcus salivarius[J]. Future Microbiology, 2012, 7(12): 1 355-1 371.

[3] KACI G, GOUDERCOURT D, DENNIN V, et al. Anti-Inflammatory Properties of Streptococcus salivarius, a Commensal Bacterium of the Oral Cavity and Digestive Tract[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 928-934.

[4] VAN Hoogmoed C G, GEERTSEMA-DOORNBUSCH G I, TEUGHEL W,et al. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains[J]. Oral Microbiology Immunology, 2008, 23: 43-48.

[5] 郭夏蕾, 张健, 杨贞耐. 抑制口腔变异链球菌的乳酸菌筛选及其抑菌机理[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 117-122.

[6] KACI G, GOUDERCOURT D, DENNIN V, et al. Anti-inflammatory properties of Streptococcus salivarius, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 928-934.

[7] BARIRA I, KHAN S N, HAQUE I, et al. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of Streptococcus mutans biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from Morus alba[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 62(4): 751-757.

[8] 池源, 王丽波. 苯酚-硫酸法测定南瓜籽多糖含量的条件优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 89-92.

[9] 李润静. 产果聚糖蔗糖酶菌株筛选及酶的分离纯化、酶学性质研究和 levan 果聚糖的酶法合成[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 43.

[10] OGAWA A, FURUKAWA S, FUJITA S, et al. Inhibition of Streptococcus mutans Biofilm Formation by Streptococcus salivarius FruA [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(5): 1 572-1 580.

[11] 范文姬, 吴正钧, 郭本恒. 响应面法优化干酪乳杆菌 LC2W 代谢 α-葡萄糖苷酶抑制剂的发酵条件[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(10): 228-231.

[12] 梁景平. 牙菌斑生物膜特性研究进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2007, 27(2): 123-127.

[13] WU C C, LIN C T, WU C Y, et al. Inhibitory effect of Lactobacillus salivarius on Streptococcus mutans biofilm formation [J]. Molecular Oral Microbiology, 2015, 30(1): 16-27.