

基于适配体-磁分离技术的电化学传感器的构建及其在金黄色葡萄球菌测定中的研究

刘蔚玄, 严雯, 贾丽丛, 牛凌梅*

(河北医科大学公共卫生学院卫生检验教研室, 河北石家庄 050017)

[摘要] 目的 设计并构建一种无需标记的电化学适配体传感器, 实现对金黄色葡萄球菌的高敏感度识别与检测。方法 基于适配体介导的靶标识别机制, 结合磁性纳米粒子(magnetic nanoparticles, MNPs)和电化学信号检测技术, 构建了一种无需标记的生物传感平台。以 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒为捕获探针, 利用适配体与金黄色葡萄球菌特异性结合引发单链 DNA(ssDNA)释放; 释放的 ssDNA 随后与固定在电极表面的连续腺嘌呤 DNA(consecutive adenine, CA DNA)杂交形成双链结构, 并嵌入亚甲基蓝(methylene blue, MB)分子产生可检测的电化学信号。结果 在 $10 \sim 10^7$ CFU/mL 浓度范围内, 所测得的电流响应值随金黄色葡萄球菌浓度的变化显示出优良的线性拟合特征, 检测限低至 2.07 CFU/mL。传感器表现出优异的特异性, 即使在混合细菌样本中也能准确识别金黄色葡萄球菌。传感器在牛奶样品中的加标回收率为 94.59%~101.13%, 相对标准偏差 < 3.46%, 显示其良好的稳定性和实际应用潜力。结论 本研究所构建的无标签电化学生物传感器结合了适配体的高度特异性、MNPs 的高效分离能力和 MB 的无标记信号输出优势, 实现了对金黄色葡萄球菌的高敏感度和高选择性检测。该方法操作简便、响应快速, 适用于复杂样品中病原菌的检测, 具备广阔的应用潜力和推广价值。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 生物传感技术; 磁性纳米粒子 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.10.014

[中图分类号] R378.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)10-1211-11

Construction of an electrochemical sensor based on aptamer-mediated magnetic separation and its application in the detection of *Staphylococcus aureus*

LIU Wei-xuan, YAN Wen, JIA Li-cong, NIU Ling-mei*

(Department of Sanitary Inspection, School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[Abstract] **Objective** To design and construct a label-free electrochemical aptasensor for highly sensitive identification and detection of *Staphylococcus (S.) aureus*. **Methods** Based on the aptamer-mediated target recognition mechanism, a label-free biosensing platform was constructed by combining magnetic nanoparticles (MNPs) and electrochemical signal detection technology. Using Fe_3O_4 magnetic nanoparticles as capture probes, the specific binding between the aptamer and *S. aureus* triggered the release of single-stranded DNA (ssDNA). The released ssDNA then hybridized with consecutive adenine DNA (CA DNA) immobilized on the electrode surface to form a double-stranded structure, which incorporated methylene blue (MB) molecules to generate a detectable electrochemical signal. **Results** Within the concentration range of 10 to

[收稿日期] 2025-07-02

[基金项目] 国家自然科学基金(82073601); 河北省自然科学基金面上基金(H2024206344); 河北省高等学校科学研究项目(QN2025402)

[作者简介] 刘蔚玄(1997-), 女, 重庆梁平人, 河北医科大学公共卫生学院医学硕士研究生, 从事卫生检验与检疫研究。

* 通信作者。E-mail: 17800872@hebm.u.edu.cn

10^7 CFU/mL, the measured current response exhibited an excellent linear relationship with the concentration of *S. aureus*, with a detection limit as low as 2.07 CFU/mL. The sensor demonstrated outstanding specificity and could accurately identify *S. aureus* even in mixed bacterial samples. The spiked recovery rates in milk samples ranged from 94.59% to 101.13%, with relative standard deviations $< 3.46\%$, indicating good stability and practical application potential. **Conclusion** The constructed label-free electrochemical biosensor combines the high specificity of aptamers, the efficient separation capability of MNPs, and the label-free signal output advantage of MB, achieving highly sensitive and selective detection of *S. aureus*. This method is simple to operate, provides rapid responses, and is applicable for detecting pathogenic bacteria in complex samples, demonstrating broad application potential and promotional value.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; biosensing techniques; magnetite nanoparticles

金黄色葡萄球菌,通常被称为“食肉细菌”,是一种革兰阳性细菌,广泛存在于人类皮肤表面以及人类和动物的黏膜部位。由于皮肤外伤或免疫反应受损,这些细菌可侵入皮肤表面,导致皮肤及周围软组织出现炎症和感染^[1-2]。微生物培养法长期以来被作为传统微生物检测的“金标准”,其常规操作流程主要包括样品富集、选择性培养基分离及后续的生化鉴定等多个步骤。尽管检测精度很高,但这种方法存在敏感度低、程序复杂的问题,培养过程需要24~72 h,需要耗费大量的人力、物力和时间^[3]。因此,实现自动化的高通量检测具有一定的挑战性。酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)已被应用于微生物检测,具有特异性、快速和便携性。然而,由于抗体具有热不稳定性和高成本的特点,该方法面临着实际的限制。适配体作为抗体的多功能替代品,具备与多种目标分子高特异性结合的能力,具有优越的热稳定性、低成本、易于合成、可编程等优点,更有利于对靶标的反应。在过去的几年里,金纳米粒子(gold nanoparticles, GNPs)^[4]、石墨烯^[5]、磁性纳米粒子(magnetic nanoparticles, MNPs)^[6]以及各种类型的量子点等纳米材料引发了生物传感技术领域的研究热潮。因此,本研究合成了 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒作为捕获探针,结合其他纳米材料提出了一种新的基于适配体介导的靶识别的无标记电化学策略,用于金黄色葡萄球菌的敏感检测。在金黄色葡萄球菌存在的情况下,靶标特异性地与适配体结合,导致单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)的释放。磁分离后,将含有释放的ssDNA的上清液转移到电极表面,ssDNA通过腺嘌呤-金的连续相互作用与固定在电极上的连续的腺嘌呤DNA(consecutive adenine, CA DNA)杂交,形成ssDNA-CA DNA双链。当电极浸入亚甲基蓝溶液中时,亚

甲基蓝嵌入到ssDNA-CA DNA双链中,产生电信号。在没有金黄色葡萄球菌的情况下,适配体与ssDNA形成稳定的双链,通过链亲和素-生物素相互作用牢固地附着在MNPs上,导致电信号减少。通过对关键实验参数的系统优化,成功实现了金黄色葡萄球菌的敏感、特异检测。值得注意的是,基于靶标与适配体特异性结合的策略为检测其他靶标提供了一种通用的手段。

1 材料与 方法

1.1 试剂与仪器

六水合三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司有限公司),乙二醇($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$,分析纯,天津益力化学试剂有限公司有限公司),1,6-己二胺($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$,H103908-500 mL,上海阿拉丁生化科技有限公司有限公司),无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$,天津百世化学有限公司),磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)(0.10 mol/L, pH 7.2~7.4, 500 mL,北京索莱宝科技有限公司),无水乙酸钠(CH_3COONa ,分析纯,国药化学试剂有限公司),戊二醛[$\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$,50%,上海阿拉丁生化科技有限公司有限公司],金黄色葡萄球菌 ATCC 29213(北京三药科技开发公司),链霉亲和素(streptavidin,1.00 g/L,上海阿拉丁生化科技有限公司有限公司),氯化钠(NaCl ,分析纯,天津大茂化学试剂厂),色氨酸(南京百得生物技术有限公司有限公司),酵母浸膏(化学纯,上海麦克林生化科技有限公司),琼脂粉(化学纯,国药集团化学试剂有限公司),胰蛋白胨(BR,南京都莱生物技术有限公司),丙酮($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$,分析纯,国药集团化学试剂有限公司),硝酸(HNO_3 ,分析纯,国药集团化学试剂有限公司),亚甲蓝(methylene blue, MB)(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、Tris 缓冲液(化学

纯,上海生工生物技术有限公司),TE 缓冲液(化学纯,上海生工生物技术有限公司),氯金酸(HAuCl_4 ,分析纯,国药集团化学试剂有限公司),氧化石墨烯(graphene oxide,GO)(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。所有定制的寡核苷酸链均来自生工生物技术(上海),序列如下:

金黄色葡萄球菌的适配体:5'-bio-TCCCTACGGCGCTAACCTCCCAACCGTCCA-CCCTGCCTCCGCCTCGCCACCGTGCTACAAC-3'; ssDNA:5'-TTG GCAGTCGCTCACTCGTA-3'; CA DNA:5'-AAATACGAGTGAGCGACT-GCCAA-3'。

扫描电镜(Scanning Electron Microscope, SEM,日立 S-4800)、CHI 440 和 CHI 650D 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)、Smart Plus 超纯水净化系统(Mill-Q 系统,上海力康仪器公司)。所有电化学实验均采用传统的三电极系统进行,银/银氯化银电极为参比电极,铂丝为反电极,玻碳电极(Glassy Carbon Electrode, GCE)为工作电极。本研究所有电位均相对于银/银氯化银参比电极测量。

1.2 细菌培养 通过平板划线接种技术,在 Luria-Bertani(LB)固体培养基上的培养实现了金黄色葡萄球菌的分离并获得纯化的单一菌落。在进行细菌肉汤培养时,首先从平板上挑选出单个细菌菌落,随后将其接种至 LB 液体培养基中,并置于 37 °C 的环境中进行振荡培养,持续过夜。随后,将过夜培养后的菌液以 1:1 000 的比例稀释于新鲜的 LB 培养基中,继续在 37 °C 下振荡培养 3 h,直到在 600 nm 波长处,它的光密度值(OD600)达到 0.5。接着,将培养好的均匀菌液按照 1:10 的比例连续稀释 4 次。LB 琼脂平板上被均匀涂布 100 μL 稀释后的菌液,对其进行平板培养及菌落形态观察,以测定肉汤中的细菌浓度。将平板置于 37 °C 倒置培养约 24 h,次日对菌落进行计数,并据此计算原始溶液中的细菌浓度。

1.3 捕获探针的制备 按照 Wang 等^[7]的方法,以 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为铁源, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$ 为配体,成功制备出粒径可以被调控的氨功能化空心磁性纳米球。首先,将 1.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 2.0 g CH_3COONa 通过磁搅拌与 30.0 mL 乙二醇充分混合。然后将 $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$ 加入反应混合物中,在油浴中保持,在 50 °C 下搅拌 15 min。形成清晰的暗红色溶液后,将其转移到高压釜中加热 6 h,然后在室温下冷却反应混合物。丢弃上清液,采用磁选法收集黑色产

物,即 MNPs。所得磁珠用乙醇和超纯水交替洗涤 3 次,于真空干燥箱中 50 °C 干燥 12 h,制得 Fe_3O_4 MNPs。

Fe_3O_4 MNPs 按照常用的戊二醛法对其进行^[8]活化。简单地说,5.0 mg MNPs 与 5.0 mL 0.01 mol/L PBS 混合,超声 10 min。然后加入 1.25 mL 戊二醛(25% w/v),室温下黑暗摇匀 2 h。接着,利用磁铁对磁性纳米颗粒进行收集,并使用 0.01 mol/L PBS 进行 3 次洗涤,以彻底去除残留的未反应戊二醛。所得沉淀物在 4.5 mL 0.01 mol/L PBS 中重悬。加入 0.5 mL 链霉亲和素(1.0 g/L)后,在培养箱中 37 °C 孵育 12 h。反应完成后,用 PBS 洗涤 MNPs 3 次,以去除未附着的链霉亲和素。最后,将链霉亲和素修饰的 Fe_3O_4 MNPs 在 5.0 mL 0.01 mol/L PBS 中重悬,4 °C 保存备用。

1.4 金黄色葡萄球菌电化学传感器的建立 使用前,依次用 1.0、0.3、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 三氧化二铝(Al_2O_3)粉末对 GCE 进行物理清洗,然后在超纯中超声波清洗 5 min,再在乙醇和超纯水中重复此步骤。首先在电极表面加入 5.0 μL 石墨烯悬浮液。干燥后,将电极置于 0.1 mol/L PBS 中,在 -1.2 V 的沉淀电位下电沉积 800 s,得到 GO/GCE。通过在中性水溶液中导电沉积 GO,可以精确控制 GO 膜的厚度和单层石墨烯的分散。然后,将 GO/GCE 浸入含有 0.1 mol/L H_2SO_4 的 1.0×10^{-4} mol/L HAuCl_4 溶液中,在 -0.25 V 的沉淀电位下电沉积 30 s,电极记为 GNPs/GO/GCE。随后,在 GNPs/GO/GCE 表面加入 5.0 μL 的 CA DNA (10.0 μL) 和 5.0 μL 的 Tris-HCl 缓冲液,在 4 °C 的条件下持续孵育 1 h。在此过程中,需维持较高的环境湿度,以确保 DNA 探针所处的缓冲液环境稳定。孵育完成后,使用 0.01 mol/L PBS 和超纯水缓慢冲洗电极,去除未结合的探针 DNA 和其余杂质。最后,用电极吹干装置(氮气)将电极吹干,以完成传感器的制备,该传感器被命名为 CA DNA/GNPs/GO/GCE。

在实验过程中,首先将 0.5 mL 修饰有链霉亲和素的 Fe_3O_4 MNPs 分散液与 0.5 mL 金黄色葡萄球菌适配体(浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$)混合,在 37 °C 条件下孵育 6 h,以促进适配体与链霉亲和素的结合。随后,用 0.01 mol/L PBS 冲洗混合物,以去除未结合的适配体。接着,向上述溶液中加入 0.5 mL 单链 DNA(浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$),并在 4 °C 冰箱中孵育 2 h,以实现 ssDNA 与适配体的结合。随后,向反应体系中加入不同浓度的金黄色葡萄球菌,置于 37 °C

下孵育 120 min,以促进金黄色葡萄球菌与适配体的特异性结合。经过磁分离后,将含有 ssDNA 的上清液滴加到电极表面,并在 37 °C 下孵育 1 h,以使

ssDNA 固定在电极上。最后,将电极浸泡在亚甲基蓝溶液中 5 min,随后用 Tris-HCl 缓冲溶液漂洗,以去除未组装的亚甲基蓝分子,组装机制见图 1。

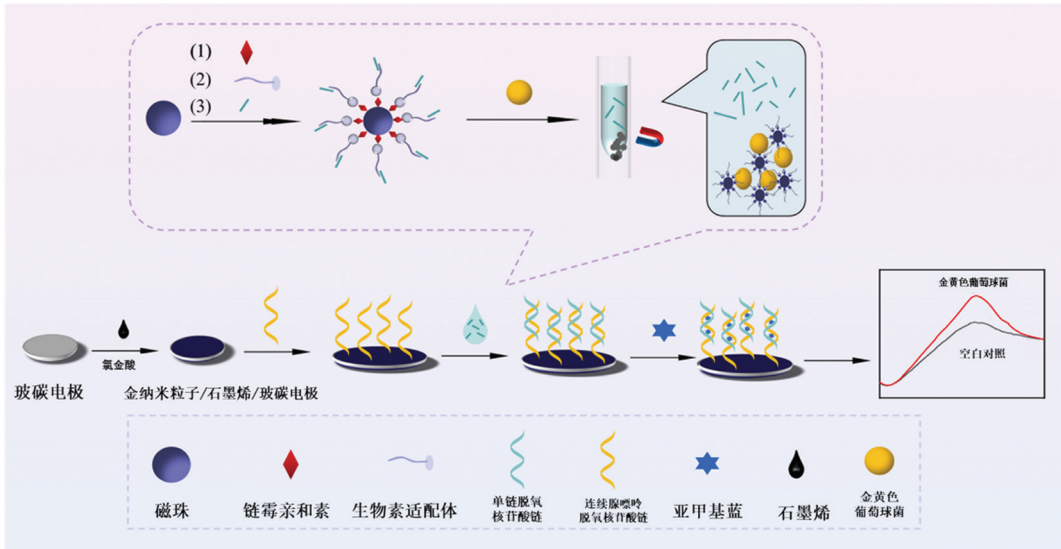


图 1 组装机制图:金黄色葡萄球菌适配体传感器的制备过程及传感原理

Figure 1 Assembly scheme: fabrication process and sensing principle of aptasensor for *Staphylococcus aureus*

1.5 实际样品中金黄色葡萄球菌的检测 菌液的制备过程为是在平板上稀释 10 μL 菌液,每次试验稀释 3 个平行样品,37 °C 孵育 18 h。挑选菌落数量介于 30~300 个的平板来进行计数操作。选择合适浓度的菌液进行稀释,最终浓度分别为 1 000.0、10 000.0、100 000.0 CFU/mL。在样品处理中,将 900 μL 牛奶与 100 μL 已知浓度的细菌混合,得到混合物中最终细菌浓度分别为 100.0、1 000.0 和 10 000.0 CFU/mL。

2 结 果

2.1 Fe₃O₄ MNPs 的表征结果 用扫描电镜对合成的 Fe₃O₄ MNPs 进行了表征。图 2A 显示 Fe₃O₄ MNPs 均匀分散,粒径约为 200 nm。图 2B 显示适配体修饰的 Fe₃O₄ MNPs 捕获金黄色葡萄球菌的情况。

2.2 无标记电化学生物传感器的可行性 为了验证该生物传感器的可行性,利用紫外-可见分光光度计对 Fe₃O₄ MNPs 同链霉亲和素、适配体和 ssDNA 结合前后的上清吸光度变化进行了表征。如图 2C 所示,曲线 a、b、c 分别为链霉亲和素、适配体和 ssDNA 的紫外吸收峰,图中 a' 表示 Fe₃O₄ 之前与之后的上清,b' 表示 MNPs 和适配体结合之前与之后的上清,而 c' 则表示 Fe₃O₄ MNPs 与 ssDNA 结合之前和之后的上清。图 2D 为生物传感器的循环伏安曲线,曲线 a 为裸电极的氧化还原峰,在修饰

了 GO 和 GNPs 后,可分别观察到峰电流的下降(曲线 b)和复升(曲线 c)。在电极表面修饰 CA DNA 后,可观察到一对可逆的氧化还原峰(曲线 a),但在杂交 ssDNA 后,峰值电流下降,见图 2E,其中 a 表示 CA DNA/GNPs/GO/GCE, b 表示 ssDNA-CA DNA/GNPs/GO/GCE。生物传感器的差分脉冲曲线如图 2F 所示,其中 a 表示 GCE, b 表示 GO/GCE, c 表示 GNPs/GO/GCE,而 d 则表示 CA DNA/GNPs/GO/GCE,随着电极表面修饰材料的逐渐增加,对金黄色葡萄球菌的响应电流也逐渐上升。

2.3 核酸反应的可行性 为了验证核酸反应,在 TBE 缓冲液中使用 15% 聚丙烯酰胺凝胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 分析(图 3)。泳道 1、2、3 和 6 分别为标记物、适体、ssDNA 和 CA DNA。泳道 4 包含适配体和 ssDNA,泳道 5 包含适配体、ssDNA 和金黄色葡萄球菌。泳道 7 含有 CA DNA 和 ssDNA,泳道 8 含有适体、ssDNA、CA DNA 和金黄色葡萄球菌。与适体和 ssDNA 的条带相比,在第 4 泳道出现了一条代表适体-ssDNA 复合物的新条带。但在第 5 泳道,当金黄色葡萄球菌存在时,适体-ssDNA 复合物的条带消失,而在泳道 7 中则出现了一个新的条带。在含有适体、ssDNA、CA DNA 和金黄色葡萄球菌的泳道 8 中,仍能观察到 ssDNA-CA DNA 复合物。

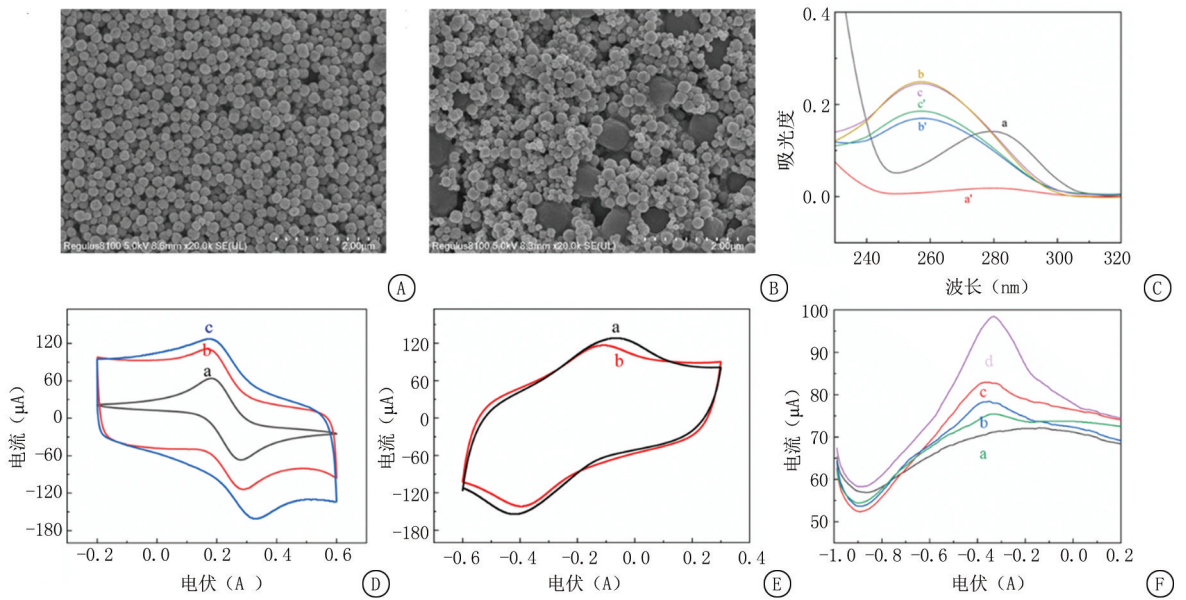


图2 修饰电极的特征

A. Fe_3O_4 MNPs 的 SEM 图像; B. 壳体修饰的 Fe_3O_4 MNPs 捕获的金黄色葡萄球菌的 SEM 图像; C. 紫外-可见吸收曲线; MNPs 和链霉亲和素的结合; D. 生物传感器组装过程的 cv 值; E. DNA 杂交过程的 cv 值; F. 生物传感器修饰过程的 DPVs

Figure 2 The characteristics of the modified electrode

| | | | | |
|---------------|---|---|---|---|
| 适配体 | + | + | + | + |
| 单链脱氧核糖核苷酸链 | + | + | + | + |
| 连续腺嘌呤脱氧核糖核苷酸链 | | | + | + |
| 金黄色葡萄球菌 | | | + | + |

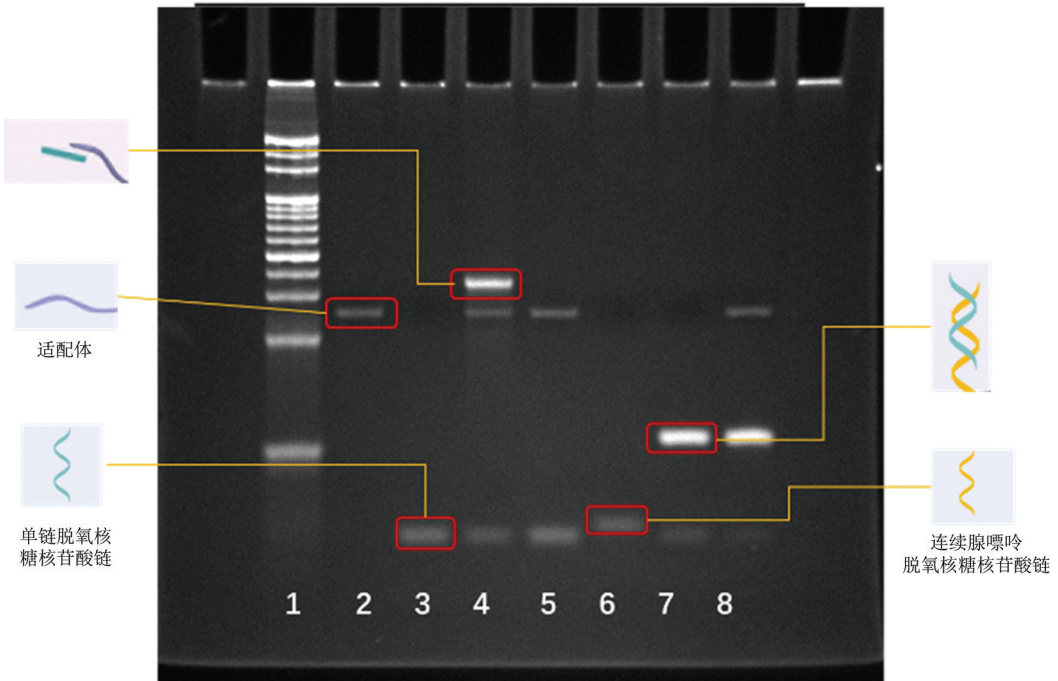


图3 PAGE 分析

泳道 1. Marker; 泳道 2. 适配体; 泳道 3. ssDNA; 泳道 4. 适配体和 ssDNA; 泳道 5. 适配体、ssDNA 和金黄色葡萄球菌; 泳道 6. CA DNA; 泳道 7. CA DNA 和 ssDNA; 泳道 8. 适配体、ssDNA、CA DNA 和金黄色葡萄球菌; 适配体、ssDNA 和 CA DNA 浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$, 金黄色葡萄球菌浓度为 2.0CFU/mL

Figure 3 PAGE analysis

2.4 实验条件的优化 为了实现无标记生物传感 策略的最佳分析性能, 对多个关键实验条件进行了

系统优化。这些条件包括 GO 的用量、GO 的电沉积电位和沉积时间、GNPs 的沉积时间、MB 的浓度和组装时间,以及 CA DNA 的浓度和组装时间。通过精确调控这些参数,确保了生物传感器在敏感度、特异度和稳定性方面的最优表现。如图 4A 所示,GO 浓度在 2.0~6.0 μL 之间,电流响应逐渐增大。图 4B 和图 4C 详细阐述了 GO 电沉积电位与沉积时间对实验结果的影响。随着 GO 沉积电位的逐渐降低,峰值电流呈现稳步上升的趋势,并在 -1.2 V 时达到最大值。对于 GO 的沉积时间的影响,如图 4C 所示,沉积时间从 180~600 s,电流迅速增加,并在 600 s 时达到最大值。GNPs 的沉积时间的影响,如图 4D 所示。随着 GNPs 沉积时间的增加,电流响应呈现出抛物线的形态,并且在第 30 s 时达到最大值。图 4E 中差分脉冲伏安法 (differential pulse

voltammetry,DPV)结果显示,当 MB 浓度增加到 1.0×10^{-4} mol/L 时,电流达到最大值,并随着 MB 浓度的进一步增加保持稳定。图 4F 显示了不同 MB 组装时间的影响。结果表明,随着组装时间从 1 min 增加到 5 min,DPV 测量产生的电流增强。CA DNA 浓度和组装时间的影响如图 4G 和 4H 所示,电流随着 CA DNA 浓度的升高而增大,在 7.0 $\mu\text{mol/L}$ 处达到峰值,随后下降。随着 CA DNA 组装时间从 10 min 增加到 60 min,电流逐渐增强,当时间达到 60 min 时,电流响应达到峰值。本研究得到的最佳实验条件为 6.0 μL GO, -1.2 V, 电沉积 GO 600 s, GNPs 沉积 30 s, MB 与 CA DNA-ssDNA 双链结合时间 5 min, CA DNA 浓度 7.0 $\mu\text{mol/L}$ 和组装时间 60 min。

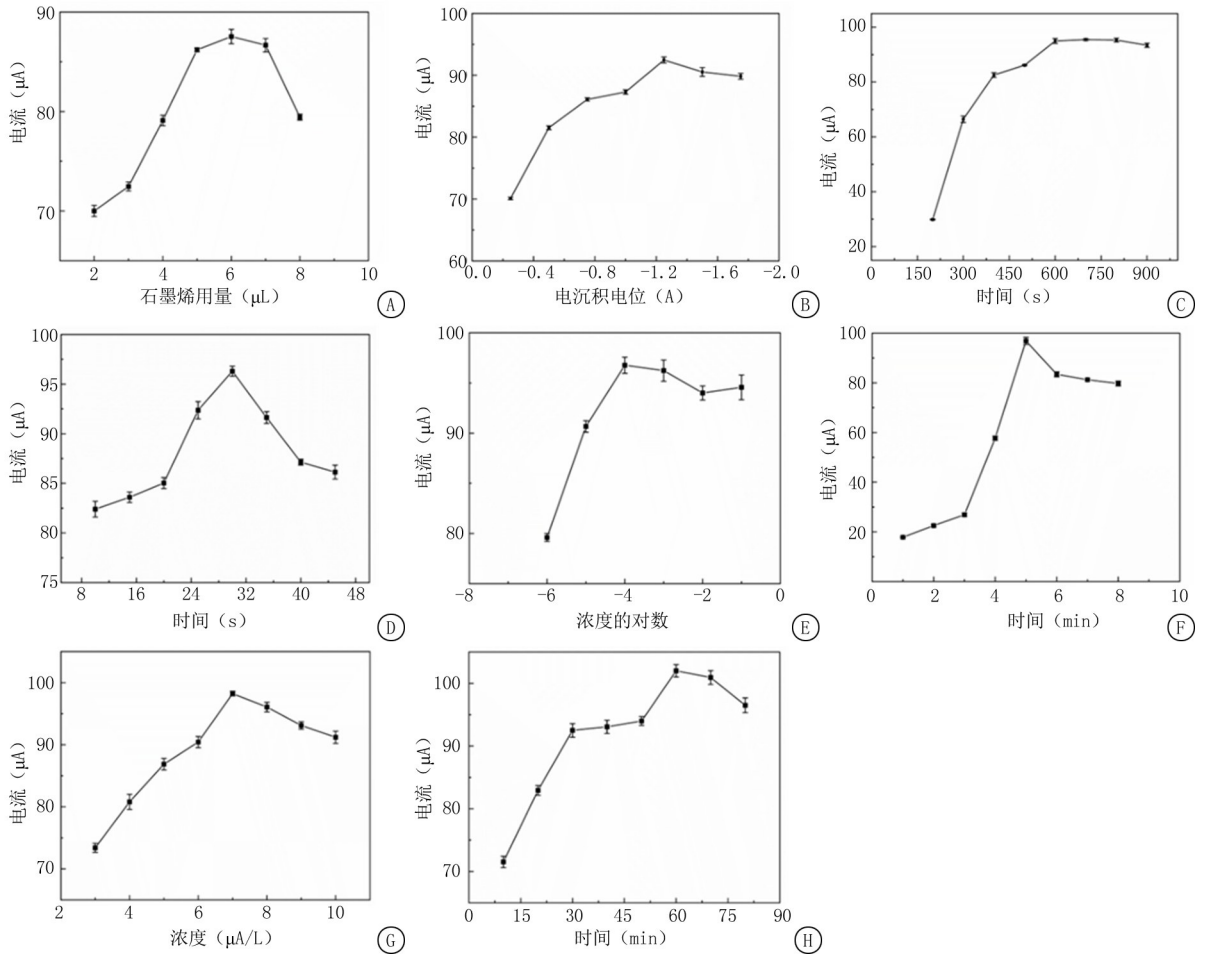


图 4 实验条件的优化

A.GO 添加量;B.GO 的沉积电位;C.GO 的沉积时间;D.GNPs 的沉积时间;E.MB 浓度;F.MB 组装时间;G.CA DNA 浓度;H. CA DNA 组装时间

Figure 4 Optimization of several experimental conditions

2.5 分析性能 在最佳实验条件下,对不同浓度的金黄色葡萄球菌的响应性能进行了详细考察(图 5A,B),金黄色葡萄球菌浓度与电流值在 $10 \sim$

10^7 CFU/mL 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $I=0.8479 \log c+4.040$, $r=0.993$ (I : μA , c : CFU/mL)。根据“ $3\sigma/b$ ”规则(σ 为线性回归线截距的标

准差, b 为斜率) 确定检测限 (LOD) 为 2.07 CFU/mL, 见表 1。

为了评估该方法的特异度, 本研究选择大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、单核增生李斯特菌以及包含所有这些物种的混合物作为对照样本进行测试(图 5C), 其他细菌显示出弱的电流响应, 而在金黄色葡萄球菌存在的混合溶液中观察到一个强烈的峰值, 并且

电流非常接近金黄色葡萄球菌单独存在的电流。接下来, 对 7 种不同的金黄色葡萄球菌浓度进行了一系列实验。相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 2.23%~8.20% ($n=5$), 表明生物传感器具有较好的重复性。30 d 后对 7 种金黄色葡萄球菌浓度进行检测, RSD 范围为 3.49%~7.32% ($n=5$), 表明该生物传感器稳定性良好。

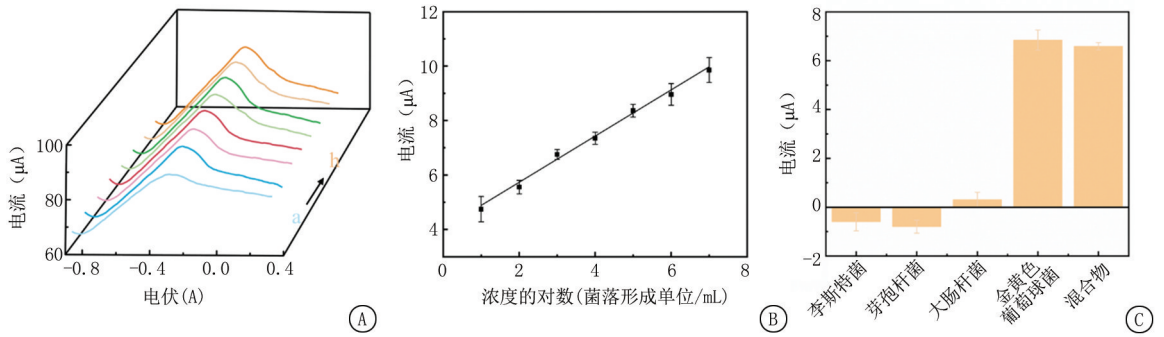


图 5 修饰电极对不同浓度金黄色葡萄球菌的响应及特异性考察

A. 生物传感器在 0、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 CFU/mL 金黄色葡萄球菌存在电流响应; B. 金黄色葡萄球菌浓度与电流强度的对应校准; C. 该方法对金黄色葡萄球菌的特异性测定

Figure 5 Investigation of the response and specificity of modified electrodes toward different concentrations of *Staphylococcus aureus*

表 1 本研究中传感器与其他不同方法的比较

Table 1 Comparison of the developed biosensor with different methods

| 检测方法 | 线性范围 (CFU/mL) | 检出限 (CFU/mL) | 参考文献 |
|-----------|--|-------------------|------|
| 表面增强拉曼光谱法 | $10 \sim 10^4$ | 10 | [9] |
| | $10 \sim 10^7$ | 10 | [10] |
| 荧光法 | $1.05 \times 10^3 \sim 1.05 \times 10^7$ | 12 | [11] |
| | $10^3 \sim 10^9$ | 2.9×10^2 | [12] |
| 比色法 | $7.8 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^5$ | 2.3×10^2 | [13] |
| 电化学法 | $10 \sim 10^8$ | 5 | [14] |
| 电化学法 | $10 \sim 10^7$ | 2.07 | 本方法 |

表 2 实际样品中金黄色葡萄球菌检测结果

Table 2 Detection results for the *Staphylococcus aureus* in real samples

| 牛奶样品组别 | 初始值(CFU/mL) | 加标量(CFU/mL) | 检出量(CFU/mL) | 回收率(%) | RSD($n=3$)(%) |
|--------|-------------|-------------|-------------|--------|-----------------|
| 组别一 | 19.6 | 100.0 | 101.13 | 101.13 | 3.465 |
| 组别二 | 19.6 | 1 000.0 | 982.46 | 98.25 | 2.282 |
| 组别三 | 19.6 | 10 000.0 | 9 458.80 | 94.59 | 2.286 |

表 3 本方法与标准方法的检测结果

Table 3 The test results of the standard method and this method

| 组别 | 加标量 | |
|------|--------------------|------------------------|
| | 100.0 | 10 000.0 |
| 标准方法 | 116.70 ± 15.30 | $10 266.70 \pm 305.50$ |
| 本方法 | 101.13 ± 3.50 | $9 458.80 \pm 215.90$ |

3 讨 论

3.1 Fe_3O_4 MNPs 的表征 扫描电子显微镜作为

2.6 真实样本中的金黄色葡萄球菌的测定 鉴于该生物传感器的优良性能, 将其用于食品中牛奶样的金黄色葡萄球菌的检测, 检测到的金黄色葡萄球菌浓度为 19.6 CFU/mL。通过加标实验进一步评估了所开发生物传感器的适用性。当金黄色葡萄球菌注射浓度分别为 100.0、1 000.0 和 10 000.0 CFU/mL 时 ($n=3$), RSD 值 $\leq 3.465\%$, 加样回收率分别为 101.13%、98.25% 和 94.59%, 见表 2。本方法与标准检测方法对牛奶样品的检测结果见表 3。

材料科学与生命科学领域的重要研究工具, 能够通过电子束与样品表面相互作用产生的二次电子信号, 实现对样品表面形貌的高分辨率观察, 其分辨率可达纳米级别, 可清晰呈现微观结构的精细特征, 为探究纳米材料与生物分子的相互作用提供直观的图像依据。金黄色葡萄球菌适配体对目标物具有高度特异性亲和力。当金黄色葡萄球菌加入体系后, 适配体通过碱基堆积、氢键作用等分子间作用力, 与细菌表面的特定靶标位点精准结合, 引发适配体的构象从松散无序转变为紧密有序的三维结构。这种构

象变化使适配体修饰的 Fe_3O_4 MNPs 表面活性位点重新分布,暴露出更多利于结合的基团,从而显著增强对金黄色葡萄球菌的捕获能力,可以清晰看到 Fe_3O_4 MNPs 表面附着大量金黄色葡萄球菌,直观呈现了纳米磁珠对目标物的捕获结果。这些图像不仅证实了适配体-磁珠体系捕获金黄色葡萄球菌的可行性,也为后续实验奠定了基础。

3.2 无标记电化学传感器的可行性 金黄色葡萄球菌是人类化脓性感染的主要病原体,据美国疾病预防控制中心(centers for disease control and prevention, CDC)统计数据显示,金黄色葡萄球菌是除大肠杆菌外最常见的感染性病原体之一。其传播途径主要包括肉类、乳制品、禽类及其制品、蛋类等食品媒介,感染严重时可能危及生命,已对公共健康造成显著威胁。据统计,在美国,由金黄色葡萄球菌引发的食物中毒就占细菌性食物中毒的 33%,而在加拿大则占 45%^[15-16]。适配体通常由 20~100 个核苷酸组成的短链单链 DNA 或 RNA 构成,可与病毒、小分子和金属离子特异性结合^[17-18]。此外,适配体可以在更广泛的 pH 值和温度条件下发挥作用,并且可重复使用,基于其在分析检测中的强大识别能力,增强了传感器的竞争力^[19]。其中,电化学适配体传感器因其易于读取的信号输出、快速响应和高敏感度的特点而被广泛使用。大多数传统的电化学生物传感器都需要电活性分子的标记,其涉及将二茂铁或亚甲基蓝等电活性标签固定在电极表面。电化学分子标记的特点是操作时间长和成本高,大大增加了生物传感器的制造费用^[20-21]。因此,构建一种新型的无标记电化学生物传感器,以实现敏感、简便、低成本的靶标检测仍然是迫切需要的^[22-25]。

纳米材料是指尺寸从 1~100 nm 不等的纳米材料,由于其尺度接近原子或分子层级,因而表现出明显的表面-界面效应、量子尺寸效应以及尺寸依赖性等特殊性能。与不同的纳米材料相比, MNPs 具有显著的优势,包括可调节的尺寸、高敏感度、低毒性和良好的生物相容性^[26-27]等优势。这些显著的特性使得 MNPs 在传感器构建中成为一个强大的捕获探针成为可能。而 GO 作为新兴的二维纳米材料,凭借其物理化学性质和独特的层状结构,近年来在材料科学领域备受关注^[28-29]。从其微观形貌分析,GO 呈现由单层碳原子构成的蜂窝状晶格结构,同时表面及边缘接枝大量富氧官能团,包括羧基(-COOH)、羰基(-CO)、羟基(-OH)^[30]等,这些官能团赋予了材料显著的亲水性与化学反应活性,

可与金纳米颗粒等多种电极修饰材料相结合,从而有效提升修饰电极的负载性能。其中,复合材料的协同作用,有助于加快目标物质在电极界面的氧化还原反应动力学过程,进而显著增强了传感器的检测敏感度。正因如此,GO 在电化学领域得到了广泛的应用^[31-33]。该无标记电化学生物传感器将无需标记的快速、直接分析的优点与电化学检测的高敏感度相结合。本研究将 GO 与纳米金修饰于电极表面,利用生物素化适配体(Bio-apt)、与适配体部分互补的 ssDNA 和 CA DNA 构建对金黄色葡萄球菌特异响应的生物传感器。为了验证该生物传感器的可行性,利用紫外-可见分光光度计对 Fe_3O_4 MNPs 同链霉素亲和素、适配体和 ssDNA 结合前后的上清吸光度变化进行了表征。与 Fe_3O_4 MNPs 孵育 3 h 后,链霉素亲和素的上清液的 UV 吸收显著降低,表明链霉素亲和素成功地结合到 MNPs 表面。同样,与 MNPs 孵育 3 h 后,适配体上清液的 UV 吸收光谱下降,此结果是由于适配体通过链亲和素-生物素作用 MNPs 结合,上清液适配体浓度下降。对于 ssDNA,与适配体修饰的 MNPs 孵育 2 h 后,ssDNA 的吸光度在 260 nm 处有降低,则表明了 ssDNA 与适配体成功杂交。

采用循环伏安法对生物传感器的构建过程进行了分析。GCE 显示出一对清晰且可逆性良好的氧化还原峰。用 GO 修饰电极表面后,由于 GO 表面的负电荷与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 之间的排斥作用,峰值电流下降。由于 GNPs 优异的导电性,峰值电流显著增加。

电极组装后,在 Tris 缓冲溶液中使用循环伏安法进一步评估电极表面 DNA 杂交过程的可行性。CA DNA/GNPs/GO/GCE 表现出一对可逆的氧化还原。然而,CA DNA 与 ssDNA 杂交后峰值电流下降。这种减少是由于形成了更刚性的 CA DNA-ssDNA 双链结构,阻碍了电子转移,从而降低了电流。并记录了生物传感器修饰过程的 DPV 曲线。当金黄色葡萄球菌存在时,由于静电吸附作用,在 GCE 上可以观察到一个明显的 MB 峰。在经过 GO 修饰的 GO/GCE 上,亚甲基蓝的峰电流显著增强。这是因为 GO 表面富含大量的活性基团,能够促进亚甲基蓝分子的结合。在 GO 修饰的 GCE 基础上进一步负载 GNPs 后,由于其优良的导电性能及较大的比表面积,电化学响应信号明显增强。在经过 CA DNA 修饰后,电流强度进一步明显提升。这是因为 CA DNA 与 ssDNA 形成的双链结构为亚甲基蓝提供了额外的结合位点,从而进一步增加了峰值

电流。

3.3 核酸反应的可行性 PAGE 是一种基于凝胶介质的电泳技术,因其具有高分辨率、可精确控制孔径大小等特点,被广泛应用于核酸、蛋白质等生物大分子的分离与分析。根据用途不同,可分为非变性 PAGE 和变性 PAGE,前者能保持生物大分子的自然结构和功能,后者则通过添加变性剂(如尿素、甲酰胺)破坏分子内的氢键,使大分子解旋为单链状态。在证明 DNA 链杂交解离的过程中,非变性 PAGE 可用于分析 DNA 双链的形成。由于双链 DNA 分子在凝胶中的迁移速率与其分子大小和构象有关,当 2 条互补 DNA 链杂交形成双链后,相较于单链 DNA,其分子结构更为紧密,在电场作用下通过凝胶孔隙的阻力更大,迁移速率较慢。通过对比单链与双链 DNA 在凝胶中的条带位置,可直观判断杂交是否发生。与适体和 ssDNA 的条带相比,在第 4 泳道出现了一条代表适体-ssDNA 复合物的新条带,表明形成了双链结构。相反,在第 5 泳道,适体-ssDNA 复合物的条带消失,说明适配体特异性结合金黄色葡萄球菌。同时,在泳道 7 中出现了新的条带表明 ssDNA 与 CA DNA 结合。在泳道 8 中,仍能观察到 ssDNA-CA DNA 复合物,这表明金黄色葡萄球菌可以与适体结合,而游离的 ssDNA 则成功地与 CA DNA 结合。

3.4 实验条件的优化 优化条件是确保实验科学性与有效性的核心环节,通过对实验条件的精准调控,可减少干扰因素,提升实验结果的准确性与重复性,降低误差率。这些条件包括 GO 的用量、GO 的电沉积电位和沉积时间、GNPs 的沉积时间、MB 的浓度和组装时间,以及 CA DNA 的浓度和组装时间。随着 GO 浓度逐渐增加,电流响应逐渐增大,这是因为丰富的石墨烯为 GNPs 的修饰提供了更多的结合位点,当 GO 用量为 6.0 μL 时,结合位点达到饱和。因此,GO 的最佳添加量为 6.0 μL 。GO 沉积电位越低,峰值电流则逐渐升高,这主要是因为三个方面的原因:①低的沉积电位增强了 GO 与电极表面的相互作用,促进其在电极表面吸附沉积,增加活性位点数量;②低的电位利于形成更均匀致密的薄膜,优化电子传递路径,降低电荷转移电阻,加快电子转移速度;③低电位下沉积的 GO 结构缺陷更少, $\pi-\pi$ 共轭体系能更好参与电子传递,从而使氧化峰电流显著增加。基于这一结果,-1.2 V 被确定为 GO 的最佳沉积电位。GO 的沉积时间则是通过影响电极表面的负电荷从而对响应电流产生了影响,因此,GO 层的最佳沉积时间为 600 s。随着

GNPs 沉积时间的增加,电流响应呈现出抛物线的形态,这一结果与 Zhang 等^[34]之前开展的类似实验结论相符。电极表面修饰的 GNPs 数量与其体积以及沉积时间呈正相关关系。反应时间较短导致 GNPs 数量少,提供的反应位点不足。相反,过长的沉积时间会导致 GNPs 数量的增加,从而降低电极的比表面积,导致电流信号降低^[35]。因此,GNPs 的最佳沉积时间为 30 s。随着 MB 浓度的增加,电流逐渐增加并趋于稳定,表明 MB 与 CA DNA-ssDNA 双链的结合达到了平衡。随着 MB 组装时间的延长,电流逐渐增强,表明有更多的 MB 插入到 CA DNA-ssDNA 双链中。超过 5 min 后,电流稳定,表明该反应完成。CA DNA 浓度和组装时间的影响,电流先升高随后下降。这一结果可以用较高的 CA DNA 浓度允许更多的 ssDNA 结合形成 CA DNA-ssDNA 双链,其携带更多的电化学分子 MB,从而增加电流响应。而 CA DNA 组装时间也具有相同的影响,这表明 CA DNA 在电极表面的结合已接近饱和状态。

3.5 分析性能 目前,金黄色葡萄球菌的常规检测方法,如传统培养法、免疫分析法等,存在检测周期长、敏感度不足、操作繁琐等问题,难以满足快速、精准检测的需求。本研究构建的生物传感器,凭借独特的设计与原理,实现了检测性能的突破。通过优化适配体与信号传导机制,该传感器将检测范围拓宽至更低浓度和更宽浓度区间,在极微量样本中也能精准识别金黄色葡萄球菌,敏感度远超传统方法,可实现超痕量目标物的快速检测^[9-13]。

在特异性验证实验中,当将多种细菌混合置于检测体系时,除金黄色葡萄球菌外,其他致病菌检测产生的电流极小。这是因为这些细菌与金黄色葡萄球菌适配体的结合力微弱,无法触发捕获探针的识别机制,也就无法释放 ssDNA 引发显著的电信号变化。实验结果充分证明,该配体传感器能够在复杂混合细菌环境中,精准靶向金黄色葡萄球菌,展现出卓越的特异性检测能力,为病原体快速筛查与精准诊断提供了高效可靠的新方案。

综上所述,本研究开发了一种基于适配体介导的目标识别的新型无标签电化学生物传感器。该策略利用 MNPs 作为捕获探针,有效降低了非特异性识别对背景信号的干扰。此外,MB 与 DNA 链的结合所产生的信号传导机制和强烈的信号输出,提高了生物传感器的敏感度。本方法结合了高亲和力和适配体的特异性、MNPs 强大的分离能力、MB 分子的无标记性以及易于读取的电化学信号输出等优点。

该生物传感器在金黄色葡萄球菌的检测中表现出优异的分析性能,结果表明,细菌浓度在 10 和 10^7 CFU/mL 之间与电流信号线性良好。对实际样品进行了测定,回收率良在 $94.6\% \sim 101.1\%$ 之间。本研究的方法能对复杂样品基质中的金黄色葡萄球菌进行检测,具有高选择性和良好的准确性等优点。由于采用了以适体作为相应靶标的识别元件的通用信号转换策略,因此该检测方法可以适用于检测其他小分子,使其具有广泛的通用性。

[参考文献]

- [1] Yöney B, Oborilová R, Lacina K, et al. Pathogen-on-a-Chip: Impedance-based detection of biofilm formation of staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis[J]. Biosensors, 2025, 15(9):596.
- [2] Denuga S, Dutta P, Duleba D, et al. Tuning ion current rectifying nanopipettes for sensitive detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Anal Chem, 2025, 97(4): 2003-2010.
- [3] Zhou Y, Kang H, Zhang X, et al. Combining immunomagnetic beads and the phage lysin LysGH15 for fluorescence detection of Staphylococcus aureus[J]. Anal Chim Acta, 2025, 1368: 344300.
- [4] Lim JY, Lee SS. A QCM immunosensor employing signal amplification strategies by enlarging the size of nanoparticles using gold or silver staining[J]. Analyst, 2022, 147(24): 5725-5731.
- [5] Bareza NJR, Wajs E, Paulillo B, et al. Quantitative mid-infrared plasmonic biosensing on scalable graphene nanostructures[J]. Adv Mater Interfaces, 2023, 10(2): 2201699.
- [6] Sun Y, Du Z, Zhang H, et al. Simultaneous estimation of magnetic moment and Brownian relaxation time distributions of magnetic nanoparticles based on magnetic particle spectroscopy for biosensing application[J]. Nanoscale, 2023, 15(39):16089-16102.
- [7] Wang L, Bao J, Wang L, et al. One-pot synthesis and bioapplication of amine-functionalized magnetite nanoparticles and hollow nanospheres[J]. Chem-Eur J, 2006, 12(24): 6341-6347.
- [8] Hou X, Zhao C, Tian Y, et al. Preparation of functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ magnetic nanoparticles for monoclonal antibody purification[J]. Chem Res Chin Univ, 2016, 32(6): 889-894.
- [9] Kearns H, Goodacre R, Jamieson LE, et al. SERS detection of multiple antimicrobial-resistant pathogens using nanosensors[J]. Anal Chem, 2017, 89(23): 12666-12673.
- [10] Lv D, Jiao H, Dong J, et al. Biomimetic octopus-like particles for ultraspecific capture and detection of pathogens[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(25): 22164-22170.
- [11] Qiao J, Chen X, Xu X, et al. A metal-organic framework-based fluorescence resonance energy transfer nanoprobe for highly selective detection of Staphylococcus aureus[J]. J Mater Chem B, 2023, 11(35): 8519-8527.
- [12] Kong W, Xiong J, Yue H, et al. Sandwich fluorimetric method for specific detection of staphylococcus aureus based on antibiotic-affinity strategy[J]. Anal Chem, 2015, 87(19): 9864-9868.
- [13] Zhang Y, Tan W, Zhang L, et al. Highly sensitive and selective colorimetric determination of Staphylococcus aureus via chicken anti-protein A IgY antibody[J]. Anal Methods, 2019, 11(29): 3665-3670.
- [14] Chen Y, Chen Y, Yi HC, et al. An electrochemical and colorimetric dual-mode aptasensor for Staphylococcus aureus based on a multifunctional MOF and magnetic separation technique[J]. Microchem J, 2023, 190: 108681.
- [15] Albashir D, Lu H, Gouda M, et al. A novel polydiacetylene-functionalized fibrinogen paper-based biosensor for on-spot and rapid detection of Staphylococcus aureus[J]. Food Chem, 2024, 458: 140291.
- [16] Jaradat ZW, Ababneh QO, Sha'aban ST, et al. Methicillin resistant Staphylococcus aureus and public fomites: A review[J]. Pathog Glob Health, 2020, 114(8): 426-450.
- [17] Qian S, Chang D, He S, et al. Aptamers from random sequence space: Accomplishments, gaps and future considerations[J]. Anal Chim Acta, 2022, 1196: 339511.
- [18] Yu H, Alkhamis O, Canoura J, et al. Advances and challenges in small-molecule DNA aptamer isolation, characterization, and sensor development[J]. Angew Chem Int Ed, 2021, 60(31): 16800-16823.
- [19] Kang K, Zhang H, Jia L, et al. Enhanced sensitivity for Aflatoxin B1 detection in food through a h-Zn1Cd5S-based photoelectrochemical aptasensor[J]. Sens Actuators B Chem, 2024, 413: 135894.
- [20] Miglione A, Raucci A, Amato J, et al. Printed Electrochemical Strip for the Detection of miRNA-29a: A possible biomarker related to Alzheimer's disease[J]. Anal Chem, 2022, 94(45): 15558-15563.
- [21] Villalonga A, Parrado C, Díaz R, et al. Supramolecular enzymatic labeling for aptamer switch-based electrochemical biosensor[J]. Biosensors, 2022, 12(7): 514.
- [22] Liu X, Gao X, Yang L, et al. Metal-organic framework-functionalized paper-based electrochemical biosensor for ultrasensitive exosome assay[J]. Anal Chem, 2021, 93(34): 11792-11799.
- [23] Hu H, Wang R, Yao T, et al. Rigid DNA tetrahedral scaffold-mediated dumbbell hybridization chain reaction for the ultrasensitive electrochemical detection of ochratoxin A[J]. Sens Actuators B Chem, 2025, 437: 137593.
- [24] Pérez DJ, Patiño EB, Orozco J. IL-5R α -based electrochemical biosensor: Towards building biosensors with natural receptors[J]. Chem Eng J, 2025, 505: 159789.
- [25] Zhang T, Zhao Y, Zhu C, et al. CRISPR/Cas12a protein switch powered label-free electrochemical biosensor for sensitive viral protease detection[J]. Anal Chem, 2025, 97

- (14):8039-8047.
- [26] Kumar PPP, Nafiujjaman M, Makela AV, et al. Development of iron oxide nanochains as a sensitive magnetic particle imaging tracer for cancer detection [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2025, 17(14):20859-20871.
- [27] Liu S, Jiang X, Wan F, et al. A novel detection of MicroRNA based on homogeneous electrochemical sensor with enzyme-assisted signal amplification[J]. *Talanta*, 2023, 256:124263.
- [28] Garg M, Pamme N. Microfluidic (bio)-sensors based on 2-D layered materials[J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2023, 158:116839.
- [29] Gao Y, Wang Y, Liu X, et al. One-step self-assembly of multilayer graphene oxide via streamlined click reactions for sensitive colorimetric assays[J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1241:340806.
- [30] Lv G, Huang Z, Qin L, et al. N-type hydroxylated reduced graphene oxide for DMMP molecular olfactory sensing[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2025, 440:137870.
- [31] Calucho E, Álvarez-Diduk R, Piper A, et al. Reduced graphene oxide electrodes meet lateral flow assays: A promising path to advanced point-of-care diagnostics[J]. *Biosens Bioelectron*, 2024, 258:116315.
- [32] Li S, Jiang Q, Ge L, et al. One-step electrodeposition of a novel gold nanoparticles/MoS₂-graphene nanocomposite based electrochemical sensor for simultaneous determination of tert-butylhydroquinone and butylated hydroxyanisole[J]. *Microchem J*, 2024, 204:111046.
- [33] Yang Z, Greschner AA, Skokan L, et al. A hybrid molecule/graphene van der waals heterostructure for DNA immobilization and detection[J]. *Nano Lett*, 2025, 25(22):8884-8891.
- [34] Zhang SJ, Kang K, Niu LM, et al. Electroanalysis of neurotransmitters via 3D gold nanoparticles and a graphene composite coupled with a microdialysis device [J]. *J Electroanal Chem*, 2019, 834:249-257.
- [35] Navailles S, Lagièrre M, Contini A, et al. Multisite intracerebral microdialysis to study the mechanism of L-DOPA induced dopamine and serotonin release in the parkinsonian brain[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013, 4(5):680-692.

(本文编辑:赵丽洁)