

基于适配体识别的沙门氏菌电化学传感器构建及其在生鸡蛋检测中的应用

郝进华, 谢显娟, 张长秋, 吕奕涛, 张敏, 张春玲*
(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 沙门氏菌在生鸡蛋中的检出率高达 3.9%~43.7%, 为了实现对生鸡蛋中沙门氏菌的灵敏、快速、准确检测, 该研究旨在探究不同适配体序列在电化学传感器中的性能差异, 并构建一种高效的电化学适配体传感器。基于已报道的四条沙门氏菌适配体序列, 首先比较了它们在电化学传感器中对沙门氏菌的识别能力和亲和力, 筛选出最优适配体序列。随后, 利用该序列构建电化学适配体传感器, 并评估其线性范围、检测限、重现性、特异性及实际样品中的加标回收率。研究发现, 适配体序列 1 在电化学传感器中表现出最强的识别能力和亲和力。基于该序列构建的传感器线性范围为 $3.37\sim 3.37\times 10^7$ CFU/mL, 检测限为 1 CFU/mL ($S/N=3$), 具有良好的重现性和特异性。在生鸡蛋样品中的加标回收率为 81.51%~109.35%。该研究为适配体在电化学传感器中的选择提供了理论依据, 并成功构建了一种快速、准确检测生鸡蛋中沙门氏菌的电化学适配体传感器, 为食品安全检测提供了新的技术支持。

关键词: 沙门氏菌; 生鸡蛋; 适配体; 电化学传感器

文章编号: 1673-9078(2026)3-341-350

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.0034

Construction of A *Salmonella* Electrochemical Sensor Based on Aptamer Recognition and Its Application in Raw Egg Detection

HAO Jinhua, XIE Xianjuan, ZHANG Changqiu, LYU Yitao, ZHANG Min, ZHANG Chunling*

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The detection rate of *Salmonella* in raw eggs is as high as 3.9%~43.7%. To achieve sensitive, rapid, and accurate detection of *Salmonella* in raw eggs, this study aimed to investigate the performance differences of various aptamer sequences in electrochemical sensors and construct an efficient electrochemical aptamer-based sensor. Based on four previously reported *Salmonella* aptamer sequences, this study first compared their recognition capabilities and affinities for *Salmonella* in electrochemical sensors, identifying the optimal aptamer sequence. Subsequently, an electrochemical aptamer-based sensor was constructed using this sequence, and its linear range, detection limit, reproducibility, specificity, and spike recovery rate in actual samples then evaluated. The results demonstrated that Aptamer Sequence 1 exhibited the strongest recognition capability and affinity in the electrochemical sensor. The sensor constructed based on this sequence showed a linear range of $3.37\sim 3.37\times 10^7$ CFU/mL, a detection limit of 1 CFU/mL ($S/N = 3$), and excellent reproducibility and specificity. The spike recovery rate in raw egg samples ranged from

引文格式:

郝进华, 谢显娟, 张长秋, 等. 基于适配体识别的沙门氏菌电化学传感器构建及其在生鸡蛋检测中的应用[J]. 现代食品科技, 2026, 42(3): 341-350.

HAO Jinhua, XIE Xianjuan, ZHANG Changqiu, et al. Construction of a *Salmonella* electrochemical sensor based on aptamer recognition and its application in raw egg detection [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3): 341-350.

收稿日期: 2025-01-08; 修回日期: 2025-03-11; 接受日期: 2025-03-14

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31901773); 中国博士后科学基金项目 (2022M712608)

作者简介: 郝进华 (2000-), 女, 硕士, 研究方向: 食源性致病菌特性与控制, E-mail: hjh15534432524@nwfufu.edu.cn

通讯作者: 张春玲 (1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物安全控制, E-mail: zbh545400370@163.com

81.51~109.35%。This study provides a theoretical basis for the selection of aptamers in electrochemical sensors and successfully developed a rapid and accurate electrochemical aptamer-based sensor for detecting *Salmonella* in raw eggs, offering new technical support for food safety detection.

Key words: *Salmonella*; raw egg; aptamer; electrochemical sensor

在全球范围内,沙门氏菌是引起细菌性食物中毒的主要病原体,其发病率位居首位^[1]。沙门氏菌污染在零售生鲜畜禽肉类食品中较为普遍,在蛋类及其制品中沙门氏菌检出率为3.9%~43.7%^[2]。鸡蛋广泛应用于酱汁、调味料及其他食品中,常以生食或半熟形式食用,这使其成为沙门氏菌污染的潜在来源。在家庭环境中,冰箱内食物储存或厨房烹饪过程中,生鸡蛋与熟食之间的交叉污染可能导致沙门氏菌感染,此类中毒案例屡见不鲜。此外,在鸡蛋的生产过程中,交叉污染现象同样存在^[3]。

沙门氏菌的检测方法包括平板培养计数方法、光学方法^[4]、酶联免疫法^[5]、环介导等温扩增^[6]、生物传感方法等。微生物培养计数法的培养周期较长,光学方法在检测真实复杂样品时存在一定的局限性,酶联免疫法可能出现假阴性和假阳性的问题,而聚合酶链式反应技术虽然灵敏度高,但其设备成本较为昂贵。尽管这些经典检测方法具有较高的可靠性,但仍存在耗时长、成本高以及灵敏度不足等局限性。电化学适配体传感器因其经济性、快速性和高灵敏度等优势,在食品安全检测领域得到了广泛关注。适配体(Aptamers, APT)是通过 SELEX 技术筛选得到的单链 DNA 或 RNA 分子,具有高特异性、易修饰和稳定性强的特点,能够与目标分子高效结合^[7,8]。电化学适配体传感器结合了适配体的高特异性和电化学检测的高灵敏度,已成功应用于多种食源性病原体的检测。不同研究团队通过改进电极材料和引入信号放大策略,显著提升了传感器的检测性能。例如,基于纳米材料(如金纳米颗粒、石墨烯等)修饰的电极能够有效提高传感器的灵敏度和稳定性。此外,适配体与目标分子的结合机制研究也取得了重要进展,为传感器的设计提供了理论支持。尽管已有研究团队利用 SELEX 技术筛选出对沙门氏菌具有高亲和力的适配体序列^[9-11],但其亲和力与结构之间的关系尚未完全阐明。现有研究多聚焦于电化学适配体传感器制备过程中纳米材料的修饰以及灵敏度的提升,而忽略了适配体序列结构差异对沙门氏菌特异性的影响。因此,探究适配体序列对检测性能的影响,对于优化传感器设计具有重要意义。

该研究通过分析适配体序列的电信号差值和亲和

力,探究不同适配体序列对检测特异性的影响,并结合适配体序列二级结构和电化学表征,进一步阐明其识别机制。研究结果为电化学检测中适配体序列的选择提供了理论依据,并构建了一种用于生鸡蛋中沙门氏菌检测的电化学适配体传感器。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

铁氰化钾、亚铁氰化钾、氯化钾、固体琼脂、氯化钠、氧化铝粉、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、巯基修饰的沙门氏菌适配体;适配体序列 1:5'-HS-TATGGCGGCGT CACCCGACGGGGACTTGACATTATGACAG-3'^[9]、适配体序列 2:5'-HS-GAGGAAAGTCTATAGCAGAGGA GATGTGTGAACCGAGTAA-3'^[9]、适配体序列 3:5'-HS-GAGTTAATCAATAGGGGGAACATCCTTGCGCGT GC-3'^[10]、适配体序列 4:5'-HS-AACACGACAATACTG TGCGTCACGAACACCACTGGTGTGGGC-3'^[11]由上海生工生物工程有限公司合成(<https://store.sangon.com/userLogin>),适配体用 TE 缓冲液(含有 1 mmol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸的 10 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液, pH 值 7.4)稀释,不使用时在 -20 °C 条件下储存;该研究中使用的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、蜡样芽孢杆菌细菌(*Bacillus cereus*)培养物来自马来西亚马来亚大学生物医学科学实验室的培养物库。

1.2 仪器与设备

CHI760E 电化学工作站,上海辰华仪器有限公司; ME104E/02 电子分析天平,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司; Au130 金电极,天津艾达恒晟科技发展有限公司; CHI115 铂丝电极,上海辰华仪器有限公司; CHI111Ag/AgCl 电极,上海辰华仪器有限公司; CHI220 电极架,上海辰华仪器有限公司; VS-1 涡旋混合器,北京鼎昊源科技有限公司; KQ-250 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; JC-MJG30A 高压蒸汽灭菌锅,青岛精诚仪器仪表有限公司; JC-100A 型生化培养箱,青岛精诚仪器仪表有限公司; ISS-3075R 恒温摇床,韩国杰奥特有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 沙门氏菌的活化、培养和孔板计数

将沙门氏菌接种到 LB 液体培养基中, 在 37 °C 下振荡培养 12 h。将富集的细菌以 5 000 r·min⁻¹ 的速度离心 10 min (25 °C), 弃去上清液。沉淀物用磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.1 mol·L⁻¹, pH 值 7.4) 洗涤 3 次, 并重悬于磷酸盐缓冲液中。在 600 nm 处测量吸光度, 将收集物离心并反复稀释至光密度值 0.12。该制剂可作为原始沙门氏菌样品。然后, 将原始菌液使用 PBS 溶液逐级稀释。取 100 微升稀释梯度为 10⁻⁵、10⁻⁶ 和 10⁻⁷ 的沙门氏菌涂布在固体 Luria-Bertani 琼脂平板上, 每个梯度都涂有三块平行板。在 37 °C 下培养 12 h 后, 对菌落进行计数, 以计算沙门氏菌样品 (CFU/mL)。根据中国国家标准 GB 4789.2-2010 计算沙门氏菌的菌落总数。

1.3.2 适配体修饰传感器的制备

第一步: 机械抛光。用 0.05 μm 氧化铝粉末抛光金电极 (Au Electrode, AuE), 用蒸馏水冲洗干净将其放入 1 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾溶液中对打磨完成的 AuE 进行循环伏安法 (CV, 扫描范围为 -0.2~0.6 V, 扫描速度为 50 mV·s⁻¹) 测试, 其电流峰值电位差 $\Delta E_p < 70$ mV 时方可使用。

第二步: 适配体固定。将 10 μL 5 mol·L⁻¹ 的适配体 (APT) 溶液滴涂在电极表面, 在室温下静置孵育 1 h 后, 冲洗以去除物理吸收的适配体, 从而获得适配体修饰后的金电极, 记为 APT-AuE。

第三步: 巯基乙醇封闭。再用 1 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇 (MCH) 处理 15 min, 以阻断非特异性位点, 彻底冲洗并用 N₂ 干燥, 从而获得修饰有适配体的工作电极, 记为 MCH-APT-AuE。

第四步: 沙门氏菌稀释液识别检测。在制备的工作电极上滴加 10 μL 的稀释度为 10⁻⁶ 的沙门氏菌稀释菌液, 孵育 60 min, 用去离子水冲洗, 获得对沙门氏菌特异性识别的电极。

1.3.3 电化学测试

采用三电极系统进行检测, 包括工作电极 (金电极)、参比电极 (Ag/AgCl 电极) 和对电极 (铂电极)。通过循环伏安法 (CV)、方波伏安法 (SWV) 和电化学阻抗谱 (EIS) 检测电极的电信号变化。

1.3.4 探究适配体序列对检测特异性的影响

1.3.4.1 适配体的识别活性

采用方波伏安法分别测定不同适配体序列特异性识别沙门氏菌菌液前后的峰值电流 (I), 并计算其峰

值电流差值 (ΔI), 以探究不同适配体序列对沙门氏菌亲和力和大小。

1.3.4.2 适配体的亲和力分析

采用循环伏安法, 在适配体浓度逐渐增加 (0.5~2.5 μmol·L⁻¹) 的情况下记录其与菌液结合的伏安图, 观察峰电位和峰值电流随着适配体浓度变化的变化趋势。在相同的电化学条件下探究适配体与菌液的亲和力, 并通过 Vienna RNA (ViennaRNA Web Services (univie.ac.at)) 网站对适配体序列的二级结构进行预测^[12], 以进一步说明适配体与菌液的相互作用。

1.3.5 适配体修饰电极的表征

为了证明用于检测沙门氏菌的电化学适配体传感器组装成功, 进行电化学表征。采用方波伏安法、电化学阻抗谱法等表征各电极构建过程中的电化学性能的变化以判断传感器组装成功与否。在含有 5 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾和 0.1 mol·L⁻¹ 氯化钾溶液中以 100 mV·s⁻¹ 的扫描速率在 -0.2 到 +0.6 V 进行方波伏安法测试。在 pH 值 7.4 的 0.1 mol·L⁻¹ 氯化钾溶液和 5 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾、亚铁氰化钾溶液中进行电化学阻抗谱测试。

1.3.6 反应条件对电化学信号的影响

适配体和菌液孵育的过程在整个电化学检测过程中对检测信号的影响起着关键作用。并且出于经济和时间方面的考虑, 该研究优化了适配体孵育时间、适配体孵育体积、沙门氏菌菌液孵育时间这 3 个重要参数。

1.3.6.1 适配体孵育时间对电信号变化的影响

在经预处理后的金电极表面滴加 10 μL 5 μmol·L⁻¹ 的适配体溶液, 分别孵育 0、15、30、45、60 min 后, 用去离子水冲洗电极表面易去除未固定在金电极表面的适配体, 再用 1 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇 (MCH) 处理 15 min, 以阻断非特异性位点, 彻底冲洗并用 N₂ 干燥, 从而制备获得封闭后的适配体电极, 放在 4 °C 冰箱保存。将制备的电极用于检测稀释度为 10⁻³ 的沙门氏菌稀释菌液, 测定其电化学峰值电流, 并计算峰值电流差值。

1.3.6.2 适配体孵育体积对电信号的影响

在经预处理后的金电极表面分别滴加 2、4、6、8、10 μL 浓度为 5 μmol·L⁻¹ 的适配体溶液, 分别孵育 60 min, 后续的电极制备方式如 1.3.6.1 所示。制备的电极用于检测稀释度为 10⁻³ 的沙门氏菌稀释菌液, 测定其电化学峰值电流, 并计算峰值电流差值。

1.3.6.3 沙门氏菌菌液孵育时间对电信号的影响

在经预处理后的金电极表面分别滴加 10 μL 5 μmol·L⁻¹ 的适配体溶液, 分别孵育 60 min, 后续的电极制备方式如 1.3.6.1 所示。制备的电极用于检测稀

释度为 10^3 的沙门氏菌稀释菌液, 测定其电化学峰值电流, 并计算峰值电流差值。

1.3.7 检测性能评价

1.3.7.1 线性范围和检出限

该研究主要从线性范围和检出限、重现性、选择性等方面电化学适配体传感器的检测性能进行评价。通过对不同浓度沙门氏菌菌液 ($3.37\sim 3.37\times 10^7$ CFU/mL) 的 SWV 响应, 评估沙门氏菌电化学适配体传感器的线性范围和检出限。

1.3.7.2 重现性

通过制备 7 支工作电极分别对 10^3 稀释度的沙门氏菌菌液进行检测, 记录峰电流差值和相对标准偏差 (RSD) 以评价适配传感器的重现性。

1.3.7.3 选择性

通过分别检测稀释度均为 10^3 的沙门氏菌和非沙门氏菌细菌 (大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌) 以评价电化学适配体传感器对沙门氏菌的选择性。其中, 蜡样芽胞杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌作为选择性实验的对照细菌, 它们的活化和培养过程与沙门氏菌相同 (实验步骤如 1.3.1 所示)。

1.3.7.4 准确性

在该实验中, 将生鸡蛋作为沙门氏菌检测回收实验的真实样品。生鸡蛋首先在沸水中灭菌 5 s, 然后将其破碎后取 25 g (蛋壳和蛋液的混合物), 加入 5 mL 甲醇静置沉淀蛋白质 1 h, $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 1 mL 作为样品溶液。取 100 μL 沙门氏菌溶液 (10^3 、 10^4 和 10^5 CFU/mL) 分别加入到 900 μL 生鸡蛋样品中, 然后进行电化学检测并计算沙门氏菌的可检出量, 以判断电化学适配体传感器的准确性。

1.3.8 数据分析

所有处理进行 3 个平行试验, 利用 EXCEL 2019 软件分析数据, 通过 Origin 2019 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 探究适配体序列对检测特异性的影响及其识别机制

通过亲和力鉴定, 适配体识别活性来探究不同适配体序列对检测沙门氏菌特异性的影响。通过电化学方法研究沙门氏菌适配体的亲和力^[13], 在一定浓度范围内, 随着适配体浓度的增加, 电响应信号逐渐增加。

2.1.1 适配体识别活性

如图 1 所示, 测试并计算四条适配体链与 10^{-5} 、

10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释倍数沙门氏菌菌液 (对应菌液浓度分别为 3.37×10^2 、 3.37×10^1 、 $3.37\ \text{CFU/mL}$) 的方波伏安法峰电流差值。随着菌液浓度的降低峰电流差值也降低, 这是由于菌液浓度降低, 适配体特异性识别固定在电极表面的沙门氏菌数量也降低, 从而导致峰电流差值降低。其中, 适配体序列 1 的峰电流差值明显高于其他三条适配体序列, 且以适配体序列 1 构建的电化学传感器检测不同浓度菌液的峰电流差值呈现较为均匀的梯度趋势, 而其他 3 条适配体序列 (APT2、APT3、APT4) 在检测 10^{-6} 和 10^{-7} 稀释倍数的菌液时峰电流差值较为接近。由于适配体序列具有可以自然折叠成不同的三维结构, 具有特异性结合生物表面的能力, 因此, 推测造成以上现象的原因可能为适配体序列 1 与沙门氏菌之间的特异性结合能力强于比其他 3 条适配体序列, 所以接下来对适配体序列与沙门氏菌之间的亲和力进行了探究。

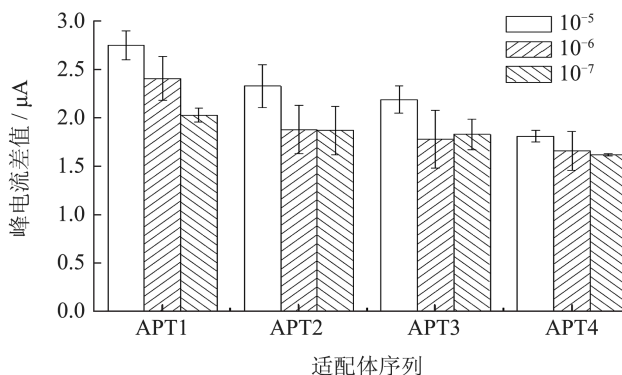


图 1 不同浓度适配体序列的峰电流信号差值图

Fig.1 Diagram of the difference between the peak current signals of different aptamer sequences

2.1.2 适配体亲和力

如图 2 所示, 适配体浓度从 $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $2.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 观察到电位出现负向偏移, 峰值电流减小。这种电位变化验证了沙门氏菌菌液与适配体磷酸骨架之间的相互作用。基于电信号数据利用公式计算结合常数 K , 用 K 值表征四种适配体的亲和力, K 值越大, 代表适配体和靶标的结合能力越强。另外, n 表示形成络合物的个数, $n=1$ ^[14]。

$$\log\left(\frac{1}{[DNA]}\right)=\log K+n\log\left(\frac{I}{I_0-I}\right) \quad (1)$$

式中:

$[DNA]$ ——适配体浓度;

K ——结合常数;

n ——形成络合物的个数, 此处 $n=1$;

I ——加入适配体后的峰电流值;

I_0 ——加入适配体前的峰电流值。

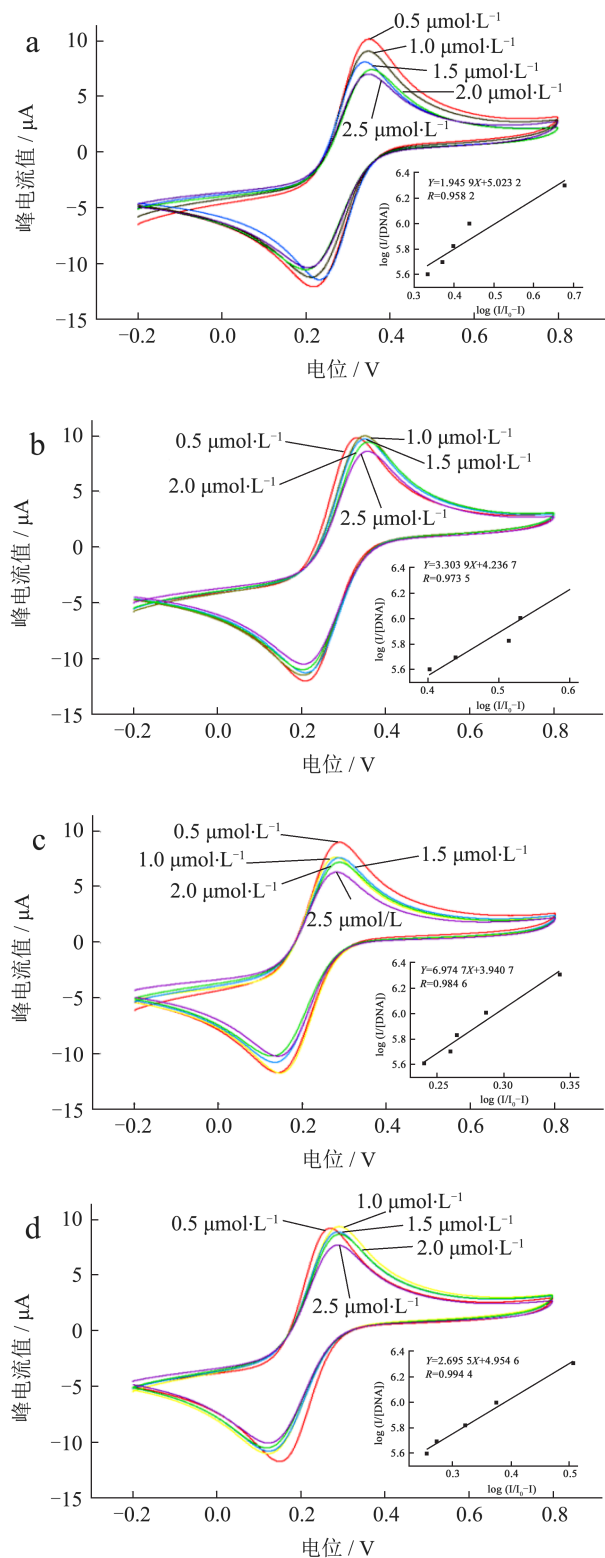


图2 适配体序列与沙门氏菌亲和力拟合线性图

Fig.2 Aptamer sequence fit linear diagram with *Salmonella* affinity

注：(a) 适配体序列 1；(b) 适配体序列 2；(c) 适配体序列 3；(d) 适配体序列 4。

如图 2 所示，通过沙门氏菌之间亲和力拟合出的线性图带入公式计算得知，四条适配体链的亲和力分别为 $K_1=1.05\times10^5 \text{ mol}^{-1}$ ， $K_2=1.72\times10^4 \text{ mol}^{-1}$ ，

$K_3=8.73\times10^3 \text{ mol}^{-1}$ ， $K_4=9.01\times10^4 \text{ mol}^{-1}$ ，其中，适配体序列 1 表现出最高的亲和常数，表明其与沙门氏菌菌液具有最强的结合能力，其亲和常数分别是适配体序列 2、3、4 的 6.10 倍、12.03 倍和 1.17 倍。这一显著差异可能与适配体序列的二级结构特征及其与目标分子的特异性相互作用密切相关。

适配体与目标分子的识别过程是一个动态的适应性识别过程。当适配体与目标分子结合时，其构象会从非结构化状态折叠成特定的三维结构，使目标分子稳定地嵌入核酸结构中，形成稳定的复合物。这种独特的识别机制使得适配体能够通过细微的结构差异精确区分目标分子及其类似物。为进一步阐明适配体的识别机制，该研究后续对适配体序列的二级结构进行了深入分析，以探究其结构与功能之间的关系。

2.1.3 二级结构预测

核酸适配体由于倾向于形成螺旋和茎环而呈现出各种形状，大多数适配体的结构特征为茎、环、发夹、凸起或三四丛^[15]。此外，适配体与靶标的结合通常是由芳香环的堆叠、结构相容性、静电、范德华和氢键等相互作用或这些作用的组合引起的^[16]。为了预测适配体-沙门氏菌络合物的形成过程，对四条适配体序列进行碱基组成分析和二级结构预测，如图 3 所示。

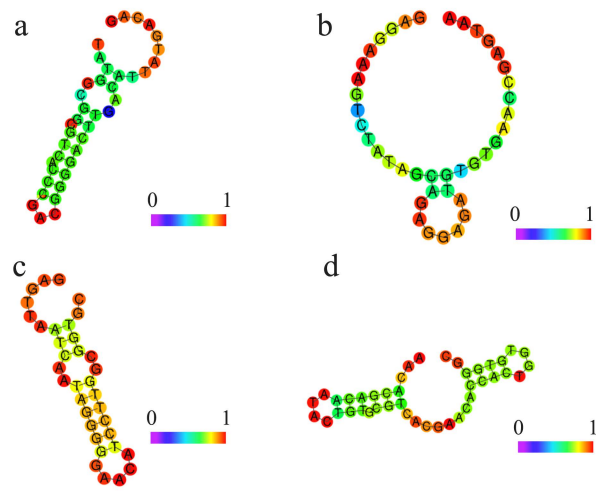


图3 适配体序列的二级结构

Fig.3 Secondary structure of aptamer sequences

注：(a) 适配体序列 1；(b) 适配体序列 2；(c) 适配体序列 3；(d) 适配体序列 4。

根据结构分析结果，适配体序列 1 和适配体序列 3 均呈现出三个长度相近、大小相似的茎环结构。图 3 中颜色条表示碱基配对概率 (0~1)，其中暖色系 (红色、橙色、黄色) 表示碱基配对概率较高 (趋近于 1)，而冷色系 (绿色、蓝色、紫色) 则表示碱基配对概率

较低。定量分析表明,适配体序列1、2、3、4中暖色系碱基占比分别为35%、60%、91%、38%,这一结果与2.1.2节中亲和力计算结果具有一致性:适配体序列1和4的碱基配对概率较低,但其对沙门氏菌的亲和力较高,进一步证实了适配体二级结构与亲和力之间存在显著相关性。

基于结构分析结果推测,适配体序列1表现出较强亲和力的可能机制如下:首先,其较低的碱基配对概率(暖色系碱基占比仅为35%)可能导致结构稳定性相对较低,更易发生构象变化,从而有利于与沙门氏菌的结合;其次,适配体序列1的最小自由能($-8.20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)在四条序列中最大,表明其结构相对不稳定,这种特性可能促进了适配体与沙门氏菌之间的相互作用。这些结构特征共同作用,可能是适配体序列1表现出优异结合性能的关键因素。

2.2 电极的电化学表征

分别采用方波伏安法(SWV)和电化学阻抗谱法(EIS)对传感过程进行了表征,如图4所示。杂质和其他污染物易吸附在金电极上形成氧化膜^[17],近而影响电极的功效,因此,金电极首先用氧化铝粉末抛光去除电极表面污染物,将打磨好的裸电极放入铁氰化钾溶液中进行方波伏安法检测,如图4b中曲线a所示;适配体滴涂修饰后占据了金电极表面的活性位点,导致电阻增加(图4a曲线b),影响了铁氰化钾离子扩散到电极表面的过程,从而使SWV曲线峰值电流降低(图4b曲线b);然后,在电极表面滴涂巯基乙醇以封闭未结合的活性位点,可以看到改性电极的电阻值显著增加(图4a曲线c),峰值电流显著降低(图4b曲线c),这表明金电极表面多余的活性位点被成功封闭;最后将沙门氏菌菌液滴涂在电极上继续进行孵育,可以看到电阻值有所增加(图4a曲线d),峰值电流继续降低(图4b曲线d),表明沙门氏菌已经通过适配体连接到电极表面,从而增大了空间位阻。从以上方波伏安曲线的变化以及电化学阻抗谱的证实下得出,沙门氏菌和适配体已成功附着在金电极上。

2.3 反应条件对电化学信号的影响

2.3.1 适配体孵育时间对电信号变化的影响

如图5a所示,研究了适配体在电极上的孵育时间和电信号变化的关系,电化学信号随着孵育时间的增加而增加,适配体与传感平台在30 min内基本固定,适配体孵育时间的进一步增加对峰值电流没有显著影响,出于时间成本的考虑,选取30 min作为最佳适配体孵育时间。

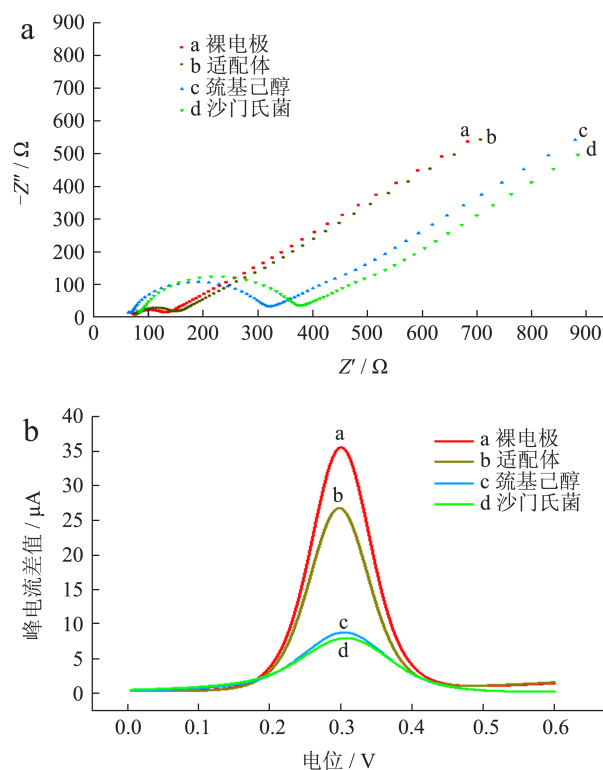


图4 电化学适配体传感器各制备环节的奈奎斯特图和方波伏安图

Fig.4 EIS diagram and SWV diagram of each preparation step of electrochemical aptamer sensor

注: a 为奈奎斯特图; b 为方波伏安图。

2.3.2 适配体孵育体积对电信号的影响

如图5b所示,随着适配体孵育体积的增加,沙门氏菌与适配体的结合增多,电信号也有所提升。电化学信号在适配体孵育体积8 μL 达到最大电流差值,此时,可能适配体的滴涂量已达到与沙门氏菌结合的饱和值,电流差值趋于平稳,出于经济方面考虑,选取8 μL 作为最佳适配体孵育体积。

2.3.3 沙门氏菌菌液孵育时间对电信号的影响

如图5c所示,研究了沙门氏菌孵育时间和电信号变化的关系,电化学信号随着沙门氏菌菌液孵育时间的增加而增加,当孵育时间到达30 min后,随着沙门氏菌菌液孵育时间的进一步增加,峰值电流差值反而略有下降,这可能是由于沙门氏菌与适配体结合已达到饱和,电子转移效率下降导致。最终选取适配体孵育时间30 min、适配体固定体积8 μL 、沙门氏菌菌液孵育时间30 min的条件继续接下来的试验。

2.4 检测性能评价

2.4.1 线性范围和检出限

通过对不同浓度沙门氏菌菌液($3.37\sim 3.37\times 10^7 \text{ CFU/mL}$)的SWV响应,评估了沙门氏菌

电化学适配体传感器的检测性能。如图 6a 所示，随着沙门氏菌菌液浓度的增大，SWV 峰电流差值明显增强，检测信号随菌液浓度的增大而增大，其中，在 $3.37\sim3.37\times10^7$ CFU/mL 的范围内，沙门氏菌菌液浓度的对数与峰电流差值之间呈现良好的线性关系。如图 6b 所示，线性回归方程为 $\Delta I=0.282\ 8\lg C+3.091\ 8$ ($R^2=0.987\ 0$)。经计算检出限 (LOD) 为 1 CFU/mL ($S/N=3$)。由此可见，此电化学适配体传感器线性范围较广，准确性较好。

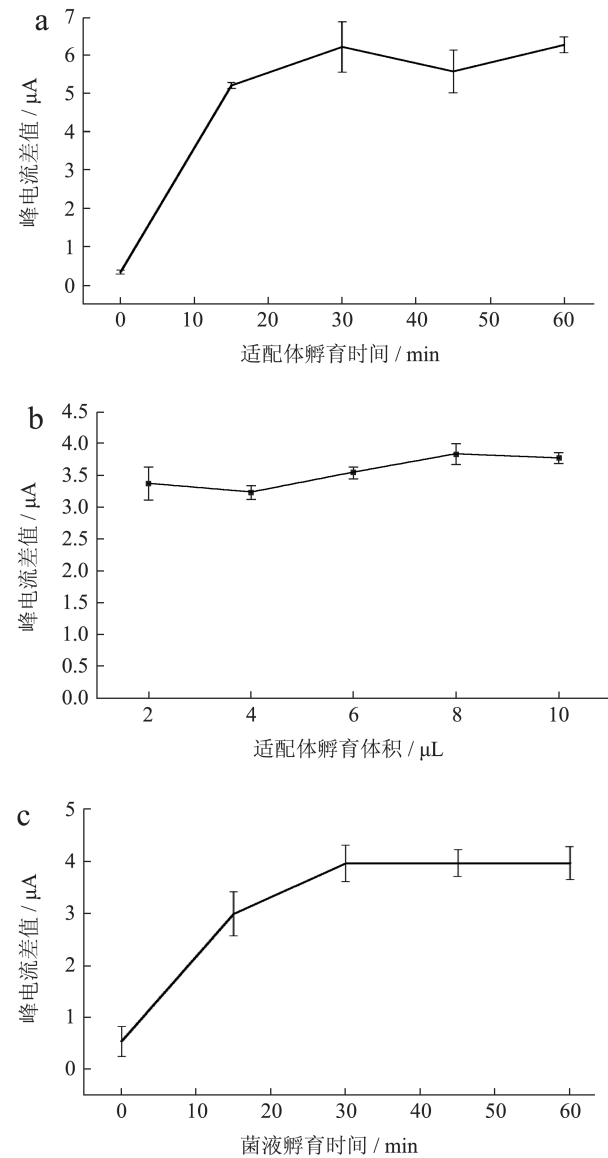


图 5 反应条件对电化学信号的影响

Fig.5 Effect of reaction conditions on electrochemical signals

注: a 为适配体孵育时间; b 为适配体孵育体积; c 为菌液孵育时间。

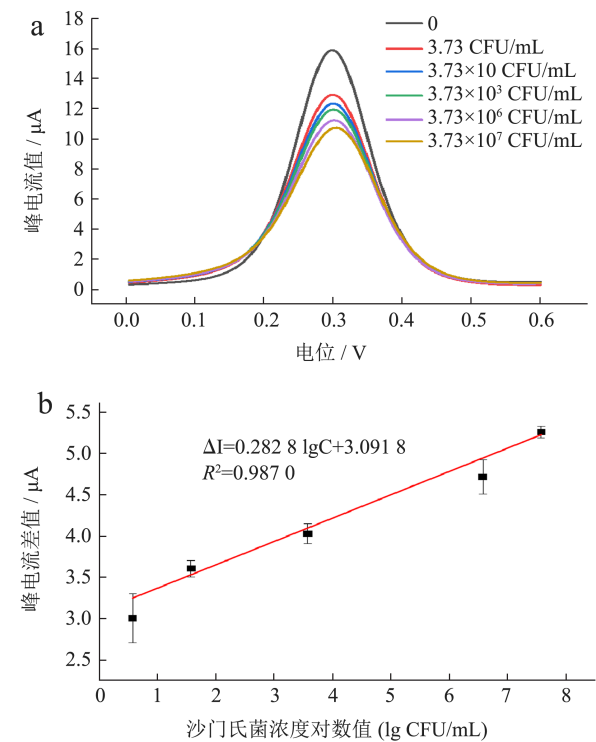


图 6 电化学适配体传感器的线性范围和检出限

Fig.6 Linear range and limit of detection of electrochemical aptasensor

注: a 为 MCH/APT/AuE 对不同浓度沙门氏菌的 SWV 曲线; b 为峰电流差值与沙门氏菌浓度之间的线性回归曲线。

2.4.2 适配体传感器的重现性和选择性

研究了适配传感器的重现性，如图 7a 所示，制备了 7 支工作电极分别对 10^{-3} 稀释度的沙门氏菌菌液进行检测，峰电流差值平均值为 4.05 μA ，相对标准偏差 (RSD) 为 8.28%，显示出该检测方法具有一定的稳定性。同时，还研究了适配传感器区分沙门氏菌和非沙门氏菌细菌细胞的能力，将制备的电化学适配体传感器分别检测稀释度均为 10^{-3} 的沙门氏菌和非沙门氏菌细菌。如图 7b 所示。其他食源性细菌（即大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌）也导致了峰值电流的变化，但是产生的峰值电流差值都相对较低，相反，相同稀释度的沙门氏菌菌液的峰值电流变化产生的差值为 3.94 μA ，是其他食源性细菌产生的峰值电流差值的 3~6 倍。由此判断，该研究采用的适配体序列对鼠伤寒沙门氏菌表现出良好的选择性。

2.4.3 回收率

为了评估新设计的检测系统在实际应用中的可行性，进行了生鸡蛋中沙门氏菌电化学检测。开发的电

化学适配传感器通过加标一定量的沙门氏菌来对购买的生鸡蛋样品进行检测。如表 1 所示，计算可得三个稀释度的菌液在生鸡蛋样品中的回收率为 81.51%~109.35%，表明适配传感器适用于生鸡蛋样品中的沙门氏菌检测。

此外，与已报道的沙门氏菌电化学适配体传感器的检测性能进行比较，如表 2 所示。该文所开发的沙门氏菌电化学适配体传感器由于使用金电极作为工作电极，其检出限与报道的传感器相比较低，具有良好的灵敏度。并且未使用信号放大策略，也未曾添加其他修饰材料，使得操作更加简便。同时，由表中可以看出，目前，大多数研究集中于肉类以及乳制品中沙门氏菌的检测，而检测生鸡蛋中沙门氏菌的电化学传感器相对较少。综上所述，此传感器仍且有较大的应用潜力。

表 1 电化学适配体传感器在生鸡蛋中的检测结果
Table 1 Detection results of the electrochemical aptamer sensor in the spiked raw eggs

生鸡蛋样品	添加浓度/(CFU/mL)	检测浓度/(CFU/mL)	回收率/%
N1	10	11	109.35 ± 2.87
N2	100	81	81.51 ± 2.41
N3	1 000	1 036	103.58 ± 3.45

表 2 各种已报道沙门氏菌电化学检测方法的性能比较

Table 2 Comparison of performance of various reported electrochemical detection methods for <i>Salmonella</i>					
工作电极	修饰材料	检测限/(CFU/mL)	回收率/%	真实样品	参考文献
玻碳电极	氧化石墨烯-金纳米颗粒	3	97.30~105.00	猪肉	[18]
玻碳电极	还原氧化石墨烯-多壁碳纳米管	25	—	鸡肉	[19]
玻碳电极	还原氧化石墨烯-碱性磷酸酶	10	—	鸡肉	[20]
玻碳电极	纳米多孔金	1	84.61~109.07	鸡蛋	[21]
玻碳电极	金属有机骨架-石墨烯	5	92.90~106.00	纯化乳	[22]
玻碳电极	还原氧化石墨烯-二氧化钛	10	—	鸡肉	[23]
玻碳电极	还原氧化石墨烯-碳纳米管	10	—	鸡肉	[24]
氟掺杂氧化锡电极	二硒化钼	10 ⁻¹⁰	—	苹果	[25]
丝网印刷电极	四面体 DNA 纳米结构	7	94.80~103.30	虾和鱼类	[26]
丝网印刷电极	锌介导的重氮接枝层	6	—	苹果汁	[27]
丝网印刷电极	聚[吡咯-钴-3-羧基-吡咯]共聚物	3	—	苹果汁	[28]
丝网印刷电极	金属有机骨架	3	91.50~119	牛奶、鸡蛋、生菜和冷冻虾	[29]
玻碳电极	还原氧化石墨烯-金纳米粒子	200	97.13~107.70	猪肉	[30]
玻碳电极	硒化铜-三嗪共聚物	3.4	92.49~108.09	鸡肉、鱼肉、虾	[31]
金电极	—	1	81.51~109.35	鸡蛋	该研究

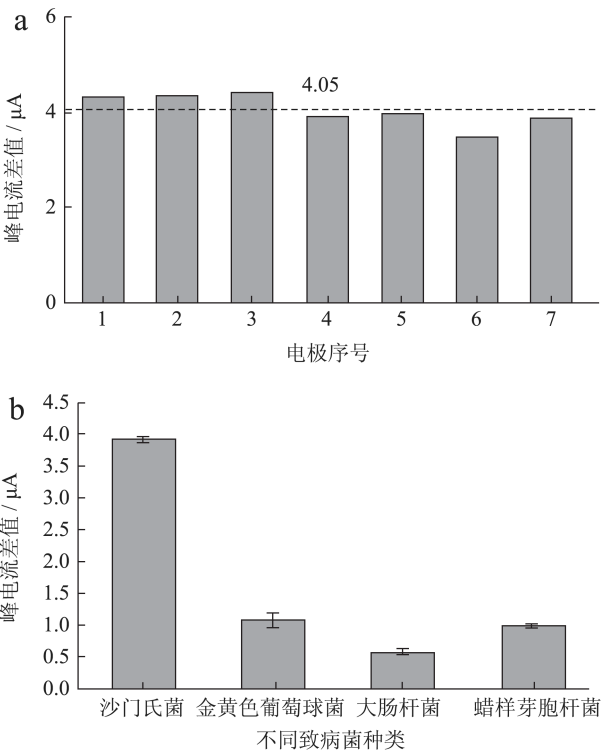


图 7 电化学适配体传感器的重现性和选择性评价
Fig.7 Evaluation of the reproducibility and selectivity of an electrochemical aptamer sensor

注：a 为重现性；b 为选择性。

3 结论

该文通过探究不同适配体序列对沙门氏菌检测特异性的影响, 综合适配体的识别活性、亲和力和二级结构, 筛选出适配体序列 1 进行传感器的构建, 为适配体序列的选择提供了理论依据。适配体通过巯基修饰固定在金电极表面, 利用巯基乙醇封闭电极表面的非特异性结合位点, 最终实现沙门氏菌和适配体特异性结合。通过方波伏安法和电化学阻抗谱对传感器的构建过程进行了电化学表征, 证实了传感器的成功构建。该电化学适配体传感器检测线性范围为 $3.37\sim 3.37\times 10^7$ CFU/mL, 检测限为 1 CFU/mL, 整个检测过程可在 90 min 内完成 (包括适配体孵育 30 min、巯基乙醇封闭 15 min、沙门氏菌孵育 30 min、打磨电极以及冲洗时间 15 min)。此外, 该传感器成功应用于生鸡蛋中沙门氏菌的检测, 加标回收率为 81.51%~109.35%。该传感器具有高选择性、高特异性、快速响应和低成本等优势, 为食品分析和环境监测提供了重要的技术支撑。尽管该研究构建的电化学适配体传感器在沙门氏菌检测中表现出优异的性能, 但仍有一些方面值得进一步探索。首先, 可以尝试将传感器与微流控技术或便携式设备相结合, 实现现场快速检测, 扩大其应用场景。此外, 针对复杂食品基质 (如肉类、乳制品等) 中的沙门氏菌检测, 可以进一步优化样品前处理方法, 以提高检测的准确性和稳定性。最后, 未来研究还可以探索适配体传感器在其他食源性病原体 (如李斯特菌、大肠杆菌等) 检测中的应用, 为食品安全监测提供更全面的解决方案。

参考文献

- [1] XIAO X N, WANG W, ZHANG J M, et al. A quantitative risk assessment model of *Salmonella* contamination for the yellow feathered broiler chicken supply chain in China [J]. Food Control, 2021, 121: 107612.
- [2] 钟立霞, 霍胜楠, 孟静. 国内外食品卫生标准中沙门氏菌限量比较分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5266-5270.
- [3] REGMI P, JONES D R, GAST R K, et al. Egg carton and eggshell: is there a possibility of *Salmonella* cross-contamination [J]. Journal of Applied Poultry Research, 2021, 30(4): 100185.
- [4] LI J X, KHAN S, GU J, et al. A simple colorimetric Au-on-Au tip sensor with a new functional nucleic acid probe for food-borne pathogen *Salmonella typhimurium* [J]. Angewandte Chemie, 2023, 62(20): e202300828.
- [5] SANNIGRAHI S, ARUMUGASAMY S K, MATHIYARASU J, et al. Magnetosome-anti-*Salmonella* antibody complex based biosensor for the detection of *Salmonella typhimurium* [J]. Materials Science and Engineering: C, 2020, 114: 111071.
- [6] HUANG T T, LIU S C, HUANG C H, et al. An integrated real-time electrochemical LAMP device for pathogenic bacteria detection in food [J]. Electroanalysis, 2018, 30(10): 2397-2404.
- [7] DU S, GE Y, LU Z, et al. Selection and application of highly specific *Salmonella typhimurium* aptamers against matrix interference [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2024, 249: 116013.
- [8] ZOLTI O, SUGANTHAN B, RAMASAMY R P. Lab-on-a-chip electrochemical biosensors for foodborne pathogen detection: a review of common standards and recent progress [J]. Biosensors, 2023, 13(2): 215.
- [9] JOSHI R, JANAGAMA H, DWIVEDI H P, et al. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars [J]. Molecular and Cellular Probes, 2009, 23(1): 20-28.
- [10] DUAN N, WU S, CHEN X, et al. Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using whole-bacterium systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(13): 3229-3234.
- [11] 周佳琪. 鼠伤寒沙门氏菌菌毛蛋白FimA特异性适配体及多克隆抗体的制备研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2019.
- [12] 孙煦茵. 多杀菌素核酸适配体筛选及适配体传感器构建[D]. 济南: 山东大学, 2022.
- [13] SU Z Q, YIN M M, YANG Z Q, et al. Interactions between two kinds of gold nanoclusters and calf thymus deoxyribonucleic acid: directions for preparations to applications [J]. Biomacromolecules, 2021, 22(11): 4738-4747.
- [14] FENG Q, LI N Q, JIANG Y Y. Electrochemical studies of porphyrin interacting with DNA and determination of DNA [J]. Anal. Chim. Acta, 1997, 344: 97-104.
- [15] 李玉娟, 张瀚文, 刘珊, 等. 闭锁连接蛋白-1核酸适配体的筛选与初步应用[J]. 北京理工大学学报, 2023, 43(8): 870-877.
- [16] 贾亚雪. 基于纳米酶和功能性核酸的新型光学生物传感器的构建与应用[D]. 长春: 东北师范大学, 2024.
- [17] 周岳琳. DNA逻辑电路介导的乳腺癌细胞电化学传感平台的构建及应用研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2023.
- [18] MA X Y, JIANG Y H, JIA F, et al. An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of *Salmonella* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 98: 94-98.
- [19] LOPEZ-TELLEZ J, SANCHEZ-ORTEGA I, HORNUNG-LEONI C T, et al. Impedimetric biosensor based on a *Hechtia argentea* lectin for the detection of *Salmonella* spp. [J]. Chemosensors, 2020, 8(4): 115.
- [20] MUNIANDY S, DINSHAW I J, TEH S J, et al. Graphene-based label free electrochemical aptasensor for rapid and sensitive detection of foodborne pathogen [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(29): 6893-6905.
- [21] RANJBAR S, SHAHROKHIAN S, NURMOHAMMADI F. Nanoporous gold as a suitable substrate for preparation of a new sensitive electrochemical aptasensor for detection of *Salmonella typhimurium* [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 1536-1544.
- [22] DAI G, LI Z, LUO F F, et al. Electrochemical determination of *Salmonella typhimurium* by using aptamer-loaded gold nanoparticles and a composite prepared from a metal-organic framework (type UiO-

- 67) and graphene [J]. *Mikrochimica Acta*, 2019, 186(9): 620.
- [23] ZHU Y G, LI X F, WU M F, et al. A novel electrochemical aptasensor based on eco-friendly synthesized titanium dioxide nanosheets and polyethyleneimine grafted reduced graphene oxide for ultrasensitive and selective detection of ciprofloxacin [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1275: 341607.
- [24] APPATURI J N, PULINGAM T, THONG K L, et al. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* with reduced graphene oxide carbon nanotube based electrochemical aptasensor [J]. *Analytical Biochemistry*, 2020, 589: 113489.
- [25] MISHRA A, NARANG J, PUNDIR C S, et al. Morphology-Preferable MoSe₂ nanobrooms as a sensing platform for highly selective Aptamers Capturing of *Salmonella* bacteria [J]. *ACS Omega*, 2018, 3(10): 13020-13027.
- [26] HU J H, SHEN Z P, TAN L, et al. Electrochemical aptasensor for simultaneous detection of foodborne pathogens based on a double stirring bars-assisted signal amplification strategy [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 345: 130337.
- [27] BAGHERYAN Z, RAOOF J B, GOLABI M, et al. Diazoniumbased impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of *Salmonella typhimurium* in food sample [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80: 566-573.
- [28] SHEIKHZADEH E, CHAMSAZ M, TURNER A P F, et al. Label free impedimetric biosensor for *Salmonella Typhimurium* detection based on poly[pyrrole-co-3-carboxyl-pyrrole]copolymer supported aptamer [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80: 194-200.
- [29] DAI G, YAO H D, YANG L H, et al. Rapid detection of foodborne pathogens in diverse foodstuffs by universal electrochemical aptasensor based on UiO-66 and methylene blue composites [J]. *Food Chemistry*, 2023, 424: 136244.
- [30] CHAI M Y. Aptamer based rGO-AuNPs electrochemical sensors and its application for detection of *Salmonella anatum* in Food [J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2022, 17: 1.
- [31] MA L, CHEN K G, DANG H, et al. Establishment of a photoactive heterojunction of triazine covalent-organic polymer and copper (II) selenide: Photoelectrochemical aptasensing strategy for efficiently detecting *Salmonella typhimurium* [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 193: 109162.