

食源性志贺菌核酸的高灵敏电化学检测研究

黄冠泽¹ 庄妙慧² 易思睿¹ 黄思佳¹ 陈冰滢¹ 林诗茜¹ 胡善文^{1*}

摘要 建立一种面向食源性志贺菌核酸的高灵敏电化学检测方法,以满足对低浓度样品的检测需求。在硫化镉纳米颗粒修饰的电极表面固定核酸探针,识别志贺菌核酸,通过靶标循环策略提高检测灵敏度,使用电化学扫描获得标记在探针核酸末端的二茂铁产生的示差脉冲伏安(DPV)信号,建立工作曲线,用于食品样本中志贺菌核酸检测。建立的电化学检测方法对志贺菌核酸的最低检测浓度为0.01 nM,检测用时0.5 h,有较好的稳定性和特异性,可以有效应用于食源性志贺菌核酸检测中。

关键词 志贺氏菌; 核酸检测; 电化学; 核酸循环

Highly Sensitive Electrochemical Analysis of Foodborne *Shigella* DNA

HUANG Guan-Ze¹ ZHUANG Miao-Hui² YI Si-Rui¹ HUANG Si-Jia¹
CHEN Bing-Yan¹ LIN Shi-Qian¹ HU Shan-Wen^{1*}

Abstract To establish a highly sensitive electrochemical approach for foodborne *Shigella* DNA. The nucleic acid probe was immobilized on the surface of cadmium sulfide nanoparticles modified electrode to recognize *Shigella* nucleic acid, and the detection sensitivity was improved by target cycle strategy. The DPV signals were generated by the ferrocene labeled at the end of modified probes. Working curve of *shigella* DNA was established for analysis of *shigella*. The results showed that the established electrochemical detection method had good stability and specificity while the minimum detection concentration of *Shigella* nucleic acid was 0.01 nM in 0.5 h, and can be effectively applied to the detection of foodborne *Shigella* nucleic acid.

Keywords *Shigella*; DNA analysis; electrochemical; DNA amplification

志贺菌大小约为 $(0.5 \sim 0.7) \times (2 \sim 3) \mu\text{m}$, 见的革兰阴性短杆病原菌^[1]。志贺菌是志贺氏菌无芽胞、无荚膜、无鞭毛,多数有菌毛,是一种常病的病原体,在三糖铁或双糖铁等培养基上具有

基金项目:福建省自然科学基金(2020J01637),福建医科大学“大学生创新创业训练计划项目”(C21108)

第一作者:黄冠泽(2000—),男,研究生,主要从事卫生检验与检疫,E-mail:384341158@qq.com

通讯作者:胡善文(1989—),男,博士,福建医科大学公共卫生学院副教授,研究领域为卫生检验与检疫、微生物核酸分析,E-mail:shanwenhu@fjmu.edu.cn

1. 福建医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫学系 福州 350122

2. 厦门国际旅行卫生保健中心(厦门海关口岸门诊部) 厦门 361000

1. Department of Health Inspection and Quarantine, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350122

2. Xiamen International Travel Healthcare Center (Xiamen Customs Port Outpatient Department), Xiamen 361000

特定的生长和生化特征，人是它唯一的宿主，通过粪-口途径传播，主要危害是引发细菌性痢疾，是常见的肠道传染病之一，症状为腹泻、发烧、胃痉挛^[2]。当前国标检测方法是通过选择性培养基培养、生化和血清试验鉴定，其步骤主要分为增菌、分离、初步生化试验、生化试验^[3]。分子生物学方法可以直接以抗体、核酸、酶等生物大分子为目标物来检测微生物的生活状态，相比于传统方法，避免了增菌培养等耗时较多的环节，因此近年来越来越多地应用于各类病原微生物的检测中。例如志贺氏菌的酶联免疫法检测已有报道，基于PCR的检测也可以获得很好的效果^[4-7]。但是，在实际检验样本中核酸等生物大分子的浓度特别低，常规的分子识别方法灵敏度受到识别效率和信号转换等环节的限制，往往无法实现高灵敏检测，因此开发高灵敏度、高选择性的检测方法对于各类微生物的检测具有重要意义^[8]。

电化学检测技术 (electrochemistry testing) 由于成本低廉、操作简单和灵敏度高等优势而广泛应用于分子生物学检测，尤其对于需要富集和依赖简单分析设备的细菌检测至关重要，近年来常用于病原微生物的检测，例如幽门螺旋杆菌、钩端螺旋体、致病大肠杆菌等，在临床样本致病菌的分析中展现了巨大的应用潜力^[9]。电化学技术结合核酸循环策略，可以增加单个目标分子引起的识别响应效果，使检出信号得到增强，尤其适合于低浓度样本的分析^[10-11]。使用电化学检测技术进行志贺菌检测已有相关报道，例如，Zarei 等^[12]在玻碳电极表面电沉积纳米金后，通过细菌电化学标记引起的阻抗信号变化实现检测。Yeap 等^[13]制备了一种电化学传感器，可以在志贺菌核酸进行滚换扩增后进行检测。Altintas, Z. 等^[14]设计了一种电化学自动传感芯片，完成了对志贺菌等一系列微生物的检测。目前，在食源性样品中进行志贺菌电化学检测的工作还比较少，而当前检测方法的灵敏度无法满足对核酸进行直接检测的要求，高灵敏的检测技术亟待开发。为了检测食品样本中低浓度的志贺菌核酸，本研究在电极上孵育纳米材料后，通过共价修饰方法构建面

向志贺菌核酸的特异性生物传感界面，完成对目标核酸序列的识别后集成靶标循环策略。

1 材料与方法

1.1 材料

巯基丙酸、 CdCl_2 、 NaOH 、 Na_2S 、EDC 和 NHS 购买自上海麦克林生化科技有限公司；所用 DNA 均购买自上海生工生物科技有限公司；所用试剂均为分析纯；所有的水溶液均由去离子水 (Milli-Q, Millipore, 电阻率 18.2 M Ω) 制备。

实验中所用到的核苷酸序列 (从 5' 到 3') 为志贺杆菌 DNA 序列^[15]: CCGCAGCACGTTCTTGCTTATGCATTCCGGCAGAACGTTTC; Probe 序列: 5'-ferro-GCAGCACGCCACGGAGCACGACCGA GAACGTGCTGCGG-NH₂-3'; 循环辅助链序列: ACGGAGCACTCGGTCTGTGCTCCGTGG。

1.2 方法

1.2.1 CdS量子点的合成

取 250 μL 巯基丙酸和 50 mL CdCl_2 (0.01 M)，侧口接通 N_2 除 O_2 ，加热搅拌。回流后，用 5 M NaOH 调节 pH 至 11，并保持回流 30 min 后，加入 5.5 mL 的 Na_2S (0.1 M) 水溶液后，在通 N_2 的情况下反应 4 h 得到 CdS 量子点，离心，分别用乙醇和去离子水，3 次后，放入 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存以用于后续反应^[16]。

1.2.2 玻碳电极的修饰

电极研磨清洗干净后，在 0.5 M 浓度硫酸中扫描循环伏安曲线对电极进行活化。随后，将合成的 CdS 滴在电极上，加入 Nafion 固定，在电极上滴加 0.2 M EDC 10 μL 后室温下孵育 30 min。将 Probe 进行预退火后加入 NHS 进行活化其氨基端，取 10 μL 滴到电极上孵育过夜^[17]。

1.2.3 电化学信号测量

用含有 0.1 M KCl 的 PBS 缓冲液为电解液测定电化学信号，扫描方法为示差脉冲伏安法 (differential pulse voltammetry, DPV)，扫描范围 0 ~ 0.2 V，电势增量 0.004 V，脉冲幅度 0.05 V，

脉冲宽度 0.05 V, 采样宽度 0.0167, 脉冲周期 0.5, 静置时间 2 s^[18]。

1.2.4 目标核酸的检测及加标回收试验

使用 PBS 缓冲液 (含 5 mM 的 Mg^{2+}) 配制不同浓度的目标核酸标准溶液, 滴加在电极上, 反应一定时间后扫描电化学信号。

使用 PBS 缓冲液 (含 5 mM 的 Mg^{2+}) 配制含有设定浓度的目标核酸和循环辅助链的溶液, 滴加在电极上, 反应一定时间后扫描电化学信号。

向牛奶样品中加入过量的辅助核酸链, 然后按固定浓度间隔加入目标核酸链, 滴加在电极上, 反应一定时间后扫描电化学信号。

2 结果

2.1 传感界面的构建

本方法在电极上修饰了一种茎环探针, 探针的茎部序列与目标序列互补, 环部序列没有配对活性。在茎环闭合状态下末端标记的二茂铁在电极表面, 可以产生较强的电化学初始信号, 遇到目标核酸后, 发生碱基互补配对作用, 茎环被打开, 探针末端远离电极表面, 导致电化学信号降低, 并且环部序列暴露后恢复配对活性。之后, 环部序列与辅助探针的茎部序列产生碱基互补配对作用, 在保持信号不变的情况下, 辅助探针取代了目标序列与修饰探针配对, 目标核酸被重新释放到溶液中, 从而可以进入下一个循环。这种靶标循环方式使一个目标序列

可以激发多个处于闭合状态的茎环探针, 从而有利于低浓度核酸分子产生更大的信号, 如图 1 所示。

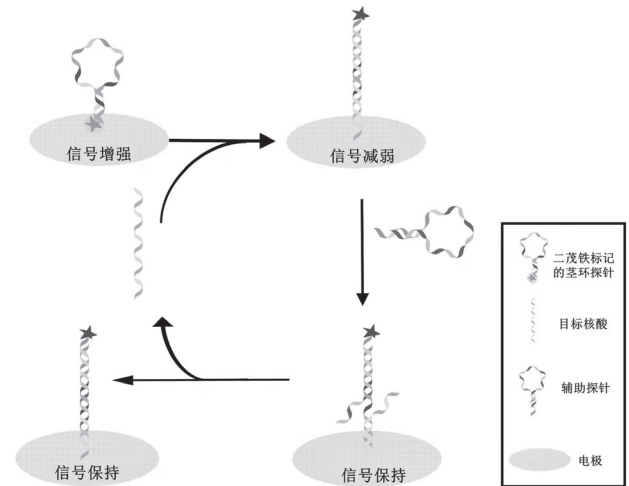


图1 电极上的核酸检测过程示意图

Fig.1 The schematic diagram of nucleic acid detection process on the electrode

2.2 靶标识别与靶标回收循环

为了修饰识别分子, 在电极上使用 Nafion 固定了表面带有羧基的 CdS 量子点; 使用扫描电镜和动态光散射法测试了 CdS 的粒径, 如图 2 所示, 扫描电镜图片显示粒径在 10 nm 以下, 动态光散射表征结果与电镜相比稍大, 因为纳米材料水合半径略大于其真实粒径。2 种表征均显示此纳米颗粒有较好的均一性, 粒径分布窄, 适合进行表面修饰。荧光光谱 (图 2c) 显示最大激发波长为 330 nm, 最大发射波长为 680 nm, 是典型的 CdS 荧光性能。

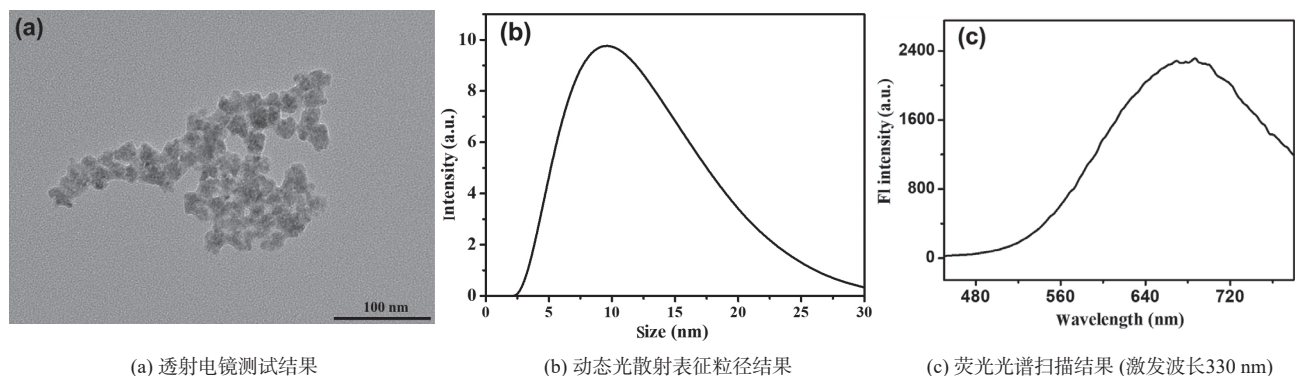


图2 CdS纳米材料性能

Fig.2 Characterization of the CdS Nanomaterials

Nafion 是一种常用的高分子材料,在固化过程中可以形成一层致密单分子薄膜,有效地把纳米材料固定在电极表面。在电极上修饰 CdS 的作用,一是将光滑的电极表面转变为具有纳米级粗糙度的界面,提高了界面的比表面积,可以增加后续对识别分子的修饰量,利于生物传感界面的构建;二是引入羧基官能团,便于后续生物识别分子的共价修饰。

之后,使用 EDC/NHS 催化羧胺加成反应,把修饰了胺基的茎环探针共价键合到电极表面,使用示差脉冲循环伏安法记录二茂铁标记的电化学信号,如图 3 所示。在茎环闭合状态下,二茂铁靠近电极表面,产生了较强的 DPV 信号。首先尝试直接使用目标核酸与茎环探针反应,可以看到引起了明显的信号降低;随后尝试在辅助探针存在的情况下使用同等浓度的目标核酸与茎环探针反应,可以看到这种模式显著放大了对茎环探针的打开效果,使 DPV 信号猝灭至几乎不可见。

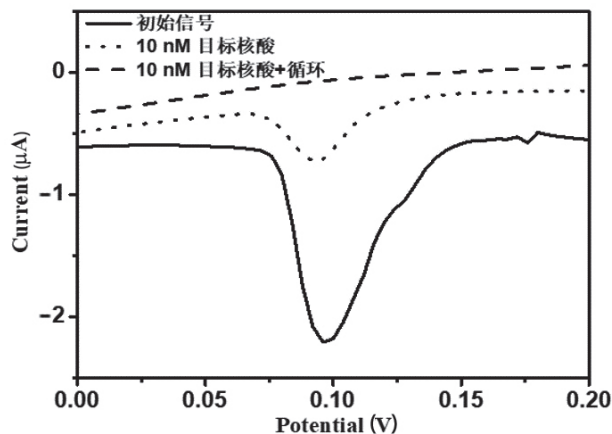


图3 修饰电极对靶标DNA响应的DPV谱线

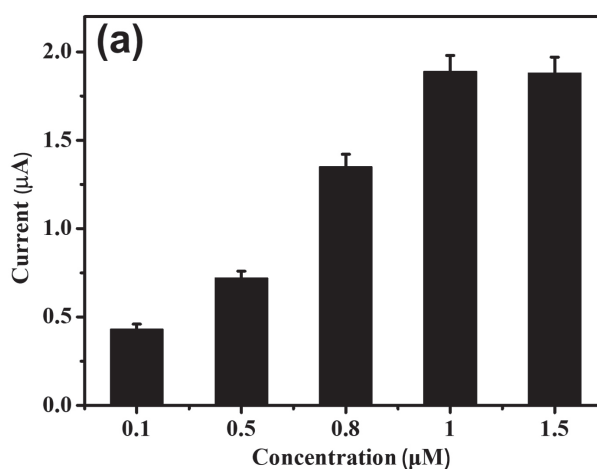
Fig.3 The DPV spectrum of the target DNA on the modified electrode

2.3 反应条件优化

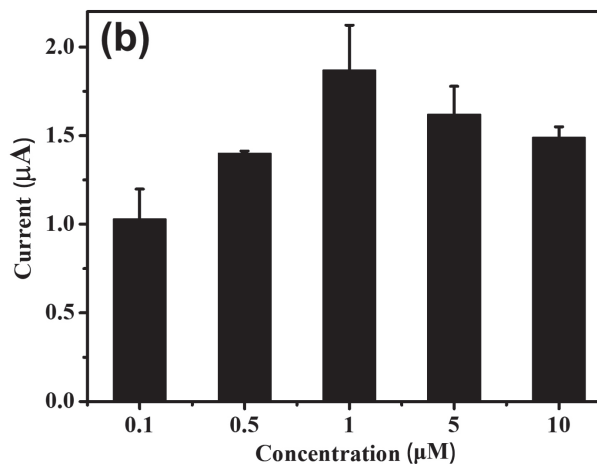
本方法的检测效果受到一些反应条件的影响,因此,对实验条件进行了优化以获得最佳测试效果。探针修饰浓度会决定电化学初试信号的大小。如图 4a 所示,对于固定的电极面积存在饱和浓度,达到饱和浓度后提高探针孵育浓度无法再进一步提高修饰密度。根据图示结果,综合信号效果和经济因

素,选择 1 μM 孵育浓度为最佳反应条件。

辅助链的浓度是影响靶标循环效果的关键因素,充分过量的辅助链可以有效提高单一靶标分子的循环次数。在 10 nM 靶标分子条件下验证了不同浓度辅助链的检测效果,结果(图 4b)显示 1 μM 以上可以获得饱和效果,考虑到实际检测的靶标分子浓度在 10 nM 以下,所以 1 μM 的辅助链足以支持靶标循环反应充分进行。



(a) 响应信号随探针孵育浓度变化



(b) 响应信号随辅助链加入浓度变化

图4 反应条件优化

Fig.4 Optimization of the biosensing process

盐浓度是碱基互补配对反应的必要条件之一,检测体系中盐浓度高低对于分子识别效率有很大影响。本实验探索了不同浓度的氯化钠对检测信号的

影响, 在图 5a 中可以看到 0.3 M 及以上的氯化钠有利于反应的进行, 因此选择 0.3 M 氯化钠为最佳测试条件。

由于本方法未引入生物酶, 仅依靠核酸反应的熵驱动进行循环, 因此在一定区间内反应对温度的敏感性不强, 如图 5b 所示, 在 30°C 附近, 同等反应时长的测试信号有轻微波动, 过高的温度不利于核酸结构的稳定, 过低的温度会导致达到饱和所需要的时间变长, 因此选择 30°C 为反应最佳温度。

2.4 传感性能与样品检测

对本方法的各项性能进行测试。首先是信号稳定性, 对同一样品进行了多次循环扫描, 图 6a 展示了循环扫描中的 DPV 信号情况, 信号波动偏差低于 3%, 这表明电化学信号有很好的稳定性。

之后, 尝试在不同微生物序列存在的情况下本方法的响应选择性。图 6b 所示结果表明, 大肠杆菌、幽门螺旋杆菌、沙门氏菌等常见微生物的核酸序列不会引起显著的反应, 本方法对志贺氏菌的特异性

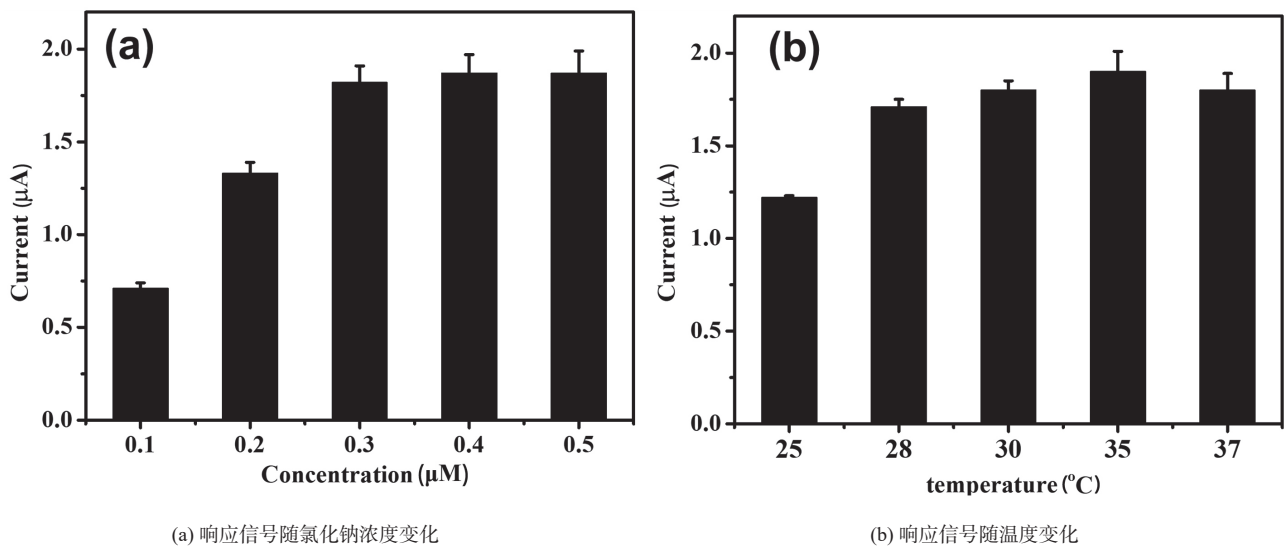


图5 反应条件优化

Fig.5 Optimization of the biosensing process

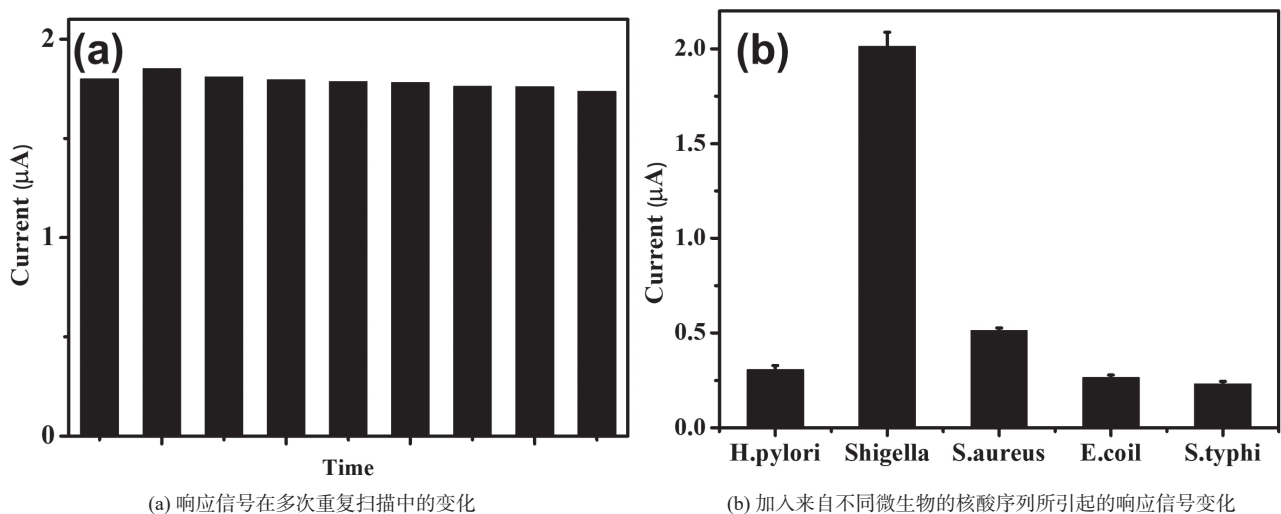


图6 传感性能测试

Fig.6 Biosensing results of this approach

序列有很好的选择性。

使用不同浓度的志贺氏菌核酸标准溶液建立工作曲线,如图 7a 所示,对于高浓度核酸样品,无需加入循环辅助链,探针直接响应目标核酸,电化学信号随着目标分子浓度的提高而降低,线性区间为 30 ~ 5 nM,线性拟合曲线为 $Y = 2.14 - 0.047 \times C$,检测限为 5 nM,折算质量浓度为 75 $\mu\text{g/L}$ 。对于低浓度核酸样品,加入循环辅助链引发靶标循环反应,使低浓度样品可以得到更好的响应,电化学信号随着核酸对数浓度的提高而降低,如图 7b 所示,线性区间为 0.01 ~ 10 nM,线性拟合曲线为 $Y = 1.0177 - 0.47775 \times \lg C$,检测限为 0.01 nM,折算为 0.15 $\mu\text{g/L}$ 。

为了验证本方法在食品检验中的应用性,使用牛奶样品进行加标回收试验。本研究所使用的牛奶样品中未测得志贺菌核酸,在加入目标核酸序列后,测得核酸浓度与加入量有较好的一致性,回收率均在 95% ~ 110% 区间内,表明本方法在食品中的检测结果较好,不会受到食源背景的干扰,见表 1。

3 结论

本方法面向志贺氏菌特异性序列,建立了一种电化学核酸检测方法,通过靶标循环测量提高

表1 牛奶样品的加标回收试验结果

Table 1 The Results of spike recovery assay in milk

样品	加入 (nM)	测得 (nM)	RSD (n=3, %)	Recovery (%)
牛奶	0.1	0.11	4.2	109.0
	0.5	0.65	3.7	106.8
	1.0	1.58	5.1	97.7
	2.0	3.71	5.9	105.6

了检测灵敏度,达到 0.15 $\mu\text{g/L}$ 。对比文献中检测效果,这一目标序列浓度对应菌落密度低于 0.1 CFU/mL^[9],相比于 PCR、酶联免疫等现有分子生物学方法均有较大改善。由于具有较好的灵敏度,本方法可以直接对样品的核酸序列进行检测,响应时间在 30 min 内,相比 GB 4789.5-2012 所规定的增菌培养鉴定法减少了增菌培养环节,缩短检测时间,优化了检测流程,有效提高了鉴定效率。本方法表现出了很好的稳定性、选择性和灵敏度,相比于当前常用的 PCR 相关核酸检测方法,避免了各类酶的使用和变温循环,通过等温循环和无酶放大获得了更好的检测效果,且降低了检测成本。本方法有潜力作为一种简单、有效、灵敏的志贺氏菌鉴定方法应用于进出口食品卫生检疫、口岸卫生监督工作中,一方面缩短检测环节所需时间,提高通关

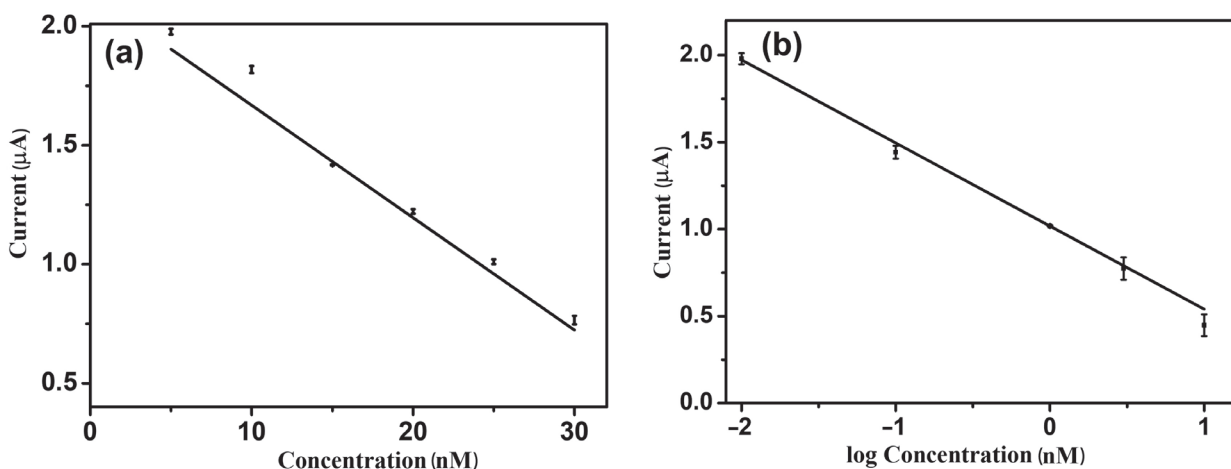


图7 (a) 不加循环辅助链时,响应信号随目标链浓度变化情况;(b) 加入循环辅助链后,响应信号随目标链浓度变化情况
Fig.7 (a) The signal changes with concentrations of target DNA when biosensing without auxiliary DNA; (b) The signal changes with concentrations of target DNA when biosensing with auxiliary DNA.

效率, 优化口岸营商环境; 另一方面降低单次检测所需成本, 从而获得更好的经济效益。

参考文献

- [1] S.Mani, T.Wierzb, R.I.Walker. Status of Vaccine Research and Development for *Shigella*[J]. *Vaccine*, 2016, 34: 2887-2894.
- [2] 杨霞, 王川庆. 志贺菌致病的分子机制及分子流行病学研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2006, 7: 101-104.
- [3] 卢鑫, 王立娟, 郭威, 等. 食品中志贺氏菌检测技术研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43: 412-418.
- [4] 陈棋炯, 丁水军, 孙永祥, 等. 实时荧光 PCR 技术在预防性健康检查沙门菌与志贺菌检测中的应用 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25: 1937-1340.
- [5] 吴平芳, 王冰, 贺连华, 等. 改良分子信标 - 实时 PCR 快速检测志贺菌 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16: 394-396.
- [6] 牛娜, 赵芳, 刘莹, 等. 六种非 O157 产志贺毒素大肠埃希氏菌的研究进展 [J]. *中国口岸科学技术*, 2020(12): 4-9.
- [7] 王丹云, 黄海民, 朱俊玮, 等. 食品安全检验中微生物检测技术应用研究 [J]. *中国口岸科学技术*, 2021, 3(10): 37-41.
- [8] R.E.Levin. Molecular Methods for Detecting and Discriminating *Shigella* Associated with Foods and Human Clinical Infections A Review[J]. *Food Biotechnol*, 2009, 23: 214-228.
- [9] Z.Q.Wang, Q.Xu, S.Y.Liu, et al. Rapid and multiplexed quantification of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Shigella flexneri* in ground beef using flow cytometry[J]. *Talanta*, 2022, 238: 123005.
- [10] J.L.Luo, J.P.Wang, A.S.Mathew, et al. Ultrasensitive Detection of *Shigella* Species in Blood and Stool[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88: 2010-2014.
- [11] H.O.Kaya, A.E.Cetin, M.Azimzadeh, et al. Pathogen detection with electrochemical biosensors: Advantages, challenges and future perspectives[J]. *Journal Of Electroanalytical Chemistry*, 2021, 882: 114989.
- [12] S.S. Zarei, S. Soleimani-Zad, A.A. Ensafi. An impedimetric aptasensor for *Shigella dysenteriae* using a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185: 538.
- [13] C.S.Y.Yeap, T.Chaibun, S.Y.Lee, et al. Ultrasensitive pathogen detection with a rolling circle amplification-empowered multiplex electrochemical DNA sensor[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57: 12155-12158.
- [14] Z.Altintas, M.Akgun, G.Kokturk, Y.Uludag, A fully automated microfluidic-based electrochemical sensor for real-time bacteria detection, *Biosensors&Bioelectronics*, 2018, 100: 541-548.
- [15] D.Vijian, S.V.Chinni, L.S.Yin, et al. Non-protein coding RNA-based genosensor with quantum dots as electrochemical labels for attomolar detection of multiple pathogens[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 77: 805-811.
- [16] Y.Y.Zhang, Q.M.Feng, J.J.Xu, et al. Silver Nanoclusters for High-Efficiency Quenching of CdS Nanocrystal Electrochemiluminescence and Sensitive Detection of microRNA[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(47): 26307-26314.
- [17] C.Y.Tian, J.J.Xu, H.Y.Chen. Enhanced Electrochemiluminescence of TiO₂ Nanoparticles Modified Electrode by Nafion Film and Its Application in Selective Detection of Dopamine[J]. *Electroanalysis*, 2013, 25: 1294-1300.
- [18] P Lach, M Cieplak, K.R Noworyta, et al. Self-reporting molecularly imprinted polymer with the covalently immobilized ferrocene redox probe for selective electrochemical sensing of p-synephrine[J]. *Sensors and Actuator B-Chemistry*, 2021, 344: 130276.
- [19] 石晓路, 扈庆华, 张佳峰, 等. 多重实时 PCR 快速同时检测沙门菌和志贺菌 [J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(12): 1053-1056.