

引用:熊婵如,王宝池,何军,等. 基于丝网印刷电极的磁辅助适配体传感器的构建及对污水中 H1N1 的电化学检测[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2025, 38(6): 882-890.

Citation: XIONG Chanru, WANG Baochi, HE Jun, CHEN Xing. Construction of magnetic-assisted aptamer sensor based on screen-printed electrode for electrochemical detection of H1N1 in wastewater[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2025, 38(6): 882-890.

文章编号 1672-6634(2025)06-0882-09

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025060004

基于丝网印刷电极的磁辅助适配体传感器的构建及对污水中 H1N1 的电化学检测

熊婵如¹, 王宝池², 何军³, 陈星¹

(1. 合肥工业大学 资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230009; 2. 合肥工业大学 材料科学与工程学院, 安徽 合肥 230009; 3. 安徽省疾病预防控制中心 微生物检验所, 安徽 合肥 230601)

摘要 H1N1 流感病毒作为一种高传染性病原体, 可通过水环境介质传播加剧扩散风险, 严重威胁公共卫生安全。在污水检测领域, H1N1 的传统检测技术面临着基质复杂导致的灵敏度不足、操作流程繁琐耗时以及难以实现现场快速筛查等诸多挑战。电化学适配体传感器因其具备高灵敏度、快速响应及良好的抗干扰能力, 尤其适用于复杂环境样本的检测。为进一步开发适用于现场即时检测污水中 H1N1 流感病毒的小型化传感器, 将两种适配体分别修饰于 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 磁性纳米颗粒和 Au@Pt 纳米酶表面, 并富集 H1N1-HA 蛋白形成“捕获组件-目标物-识别组件”的复合结构后, 通过外部磁场固定于丝网印刷电极上, 催化 H_2O_2 /对苯二酚(HQ)反应检测 H1N1-HA 蛋白。在实际污水样本中, 该传感器对 H1N1-HA 蛋白具有良好的回收率, 并且基于丝网印刷电极构建的传感器更便于现场即时检测。

关键词 电化学适配体传感器; 功能化 Fe_3O_4 ; 磁辅助法; 丝网印刷电极; H1N1-HA 蛋白

中图分类号 X832; O657.1

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Construction of magnetic-assisted aptamer sensor based on screen-printed electrode for electrochemical detection of H1N1 in wastewater

XIONG Chanru¹, WANG Baochi², HE Jun³, CHEN Xing¹

(1. School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. School of Materials Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 3. Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Microbiological Laboratory, Hefei 230601, China)

Abstract The H1N1 influenza virus, as a highly contagious pathogen, can exacerbate the risk of spread through water environment media, posing a severe threat to public health security. In wastewater testing, traditional detection methods for H1N1 face challenges such as insufficient sensitivity due to complex matrices, cumbersome and time-consuming procedures, and difficulty in achieving rapid on-site screening.

收稿日期: 2025-06-13

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFE0110100)资助

通信作者: 陈星, 男, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 纳米功能材料在环境污染物检测与处理方面应用, E-mail: xingchen@hfut.edu.cn.

Electrochemical aptamer sensors, with their high sensitivity, fast response, and excellent interference resistance, are particularly suitable for detecting samples from complex environments. This study aims to develop a miniaturized sensor for on-site, real-time detection of H1N1 influenza virus in wastewater. Two aptamers were modified onto $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ magnetic nanoparticles and Au@Pt nanoenzymes surfaces, respectively, to capture the H1N1-HA protein and form a composite structure of capture component-target-identification component. This structure was then fixed onto a screen-printed electrode via an external magnetic field, catalyzing the H_2O_2 /hydroquinone reaction to detect the H1N1-HA protein. In actual wastewater samples, the sensor demonstrated good recovery rates for the H1N1-HA protein, and the sensor based on screen-printed electrodes is more convenient for on-site real-time detection.

Keywords electrochemical aptamer sensor; functionalized Fe_3O_4 ; magnetic-assisted method; screen-printed electrode; H1N1-HA protein

0 引言

近百年来,流感病毒对人类健康和社会经济构成的威胁持续存在^[1-3]。传统的流感病毒检测技术在应对污水等复杂环境中痕量病毒的快速监测需求时,面临着基质复杂导致的灵敏度不足、操作流程繁琐耗时以及难以实现现场快速筛查等诸多挑战^[4]。流感病毒表面有两种糖蛋白,即血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)。甲型流感病毒根据 HA 和 NA 这两种特定蛋白质分为不同的亚型^[5]。H1N1 亚型是几种流感类型中最常见且致病性最强的人类病原体之一^[6-7]。HA 蛋白不仅是病毒入侵宿主细胞的关键媒介,更因其在水体中的稳定存在特性,可以作为环境病毒监测的理想生物标志物^[8]。因此,开发一种兼具高灵敏度、快速响应和强抗干扰能力的 H1N1-HA 蛋白检测技术,对流感疫情的早期预警和环境监测具有重要意义。

近年来,适配体作为一种新型分子识别元件,因其高特异性、易修饰性和低成本优势备受关注^[9-11]。与抗体相比,适配体通过体外筛选获得,可针对靶标分子设计特异性序列,且耐受极端 pH、高温等恶劣条件,在复杂环境检测中展现出显著优势^[12-13]。电化学适配体传感器因响应迅速、成本低廉、易微型化,成为流感病毒污水检测的新型方法^[14]。其中,丝网印刷电极(SPCE)具备成本低、可一次性使用及易集成等特性,在现场快速检测中优势显著^[15-17]。通过表面功能化修饰,功能化 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒可实现靶标分子的高效捕获与快速分离,尤其适用于污水等复杂基质中低浓度目标物的富集^[18-20]。SPCE 与磁辅助技术结合后,利用磁性纳米颗粒的磁响应特性,可高效富集污水等复杂基质中的低浓度目标物,快速分离并消除基质干扰,为痕量 H1N1 检测奠定基础^[21-22]。然而,单一磁性材料难以满足信号放大的需求,亟须与催化型纳米材料联用以提升检测灵敏度^[23]。近年来,贵金属纳米酶因其类过氧化物酶活性和优异导电性受到关注^[24]。铂(Pt)纳米颗粒可高效催化 H_2O_2 分解,产生的活性氧物种(ROS)能氧化底物分子,进而通过电化学信号变化实现靶标定量^[25]。将 Au@Pt 纳米酶作为信号标记物,既可避免传统生物酶酶标记物的稳定性缺陷,又能通过催化反应实现信号级联放大,为超灵敏检测提供新途径^[26-27]。

总之,本研究构建了一种基于丝网印刷电极的磁辅助适配体传感器,用于实现污水中 H1N1 流感病毒的现场快速检测。该传感器通过 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 磁性纳米材料的磁响应特性,结合磁辅助策略快速富集目标物,并利用丝网印刷电极的小型化优势实现便捷检测。针对污水复杂基质中痕量病毒检测的挑战,采用两种适配体作为特异性识别探针,通过高亲和力捕获 H1N1-HA 蛋白,同时引入纳米酶催化体系实现信号放大,显著提升检测灵敏度与特异性。实际样本测试表明,该体系能有效克服基质干扰,在污水环境中仍保持优异的检测性能,为污水中流感病毒的现场监测提供了新的思路。

1 传感器设计方案

如图所示,该磁辅助适配体传感器设计方案参照已报道方法^[28],包含以下关键环节,如图 1 所示。

H1N1-HA 的捕获(A 部分):以 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 磁性纳米复合材料为基底,通过 Au-S 键修饰捕获适配体(aptamer 1,序列为 HS-C6-5-GGC CTA CCG TAG TGT GCG TGG GCA CAT GTT CGC GCC ACC GTG CTA CAA C-3^[29]),经牛血清蛋白(BSA)封闭后可以特异性结合 H1N1-HA 蛋白。

信号标记(B部分):选用 Au@Pt 纳米酶作为信号载体,通过 Pt—S 键连接识别适配体(apramer 2,序列为 HS-C6-5-GGC AGG AAG ACA AAC AGC CAG CGT GAC AGC GAC GCG TAG GGA CCG GCA TCC GCG GGT GGT CTG TGG TGC TGT-3^[30]),利用其优异的导电性与催化活性为信号输出提供基础。

检测过程(A+B部分):将上述两部分结合形成复合结构,在丝网印刷电极下方施加磁场,利用磁性将复合物固定于工作电极表面。以 H₂O₂/对苯二酚(HQ)为电解液,通过 Au@Pt 纳米酶催化加速电子转移,采用差分脉冲伏安法记录电流信号。随着 HA 蛋白浓度增加,结合至电极表面的 Au@Pt 纳米酶,产生差分脉冲伏安信号。通过构建标准曲线计算检测限,实现对 H1N1-HA 的高灵敏快速检测。

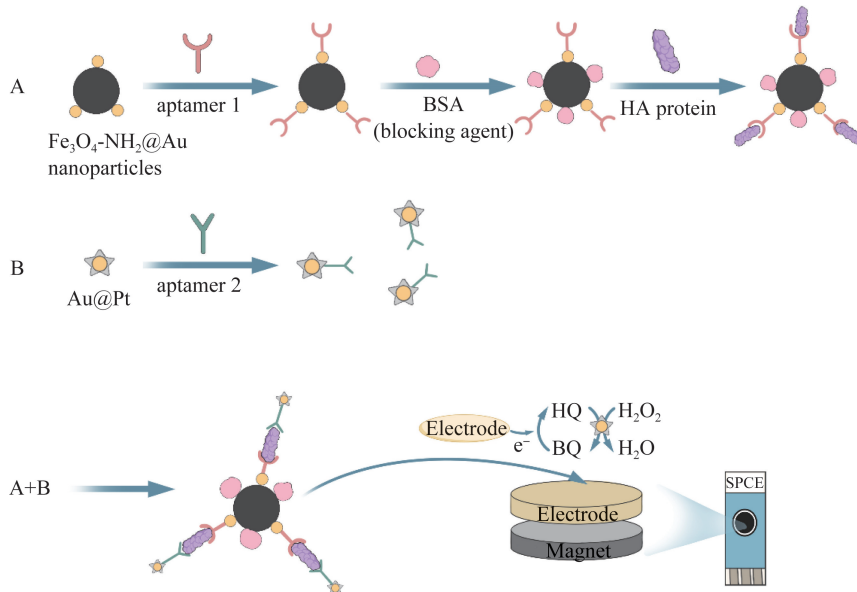


图1 用于检测 H1N1-HA 蛋白的磁辅助适配体传感器的设计方案

Fig. 1 The design scheme of the magnetically assisted aptamer sensor for detecting the H1N1-HA protein

2 实验部分

所用六水合氯化铁、乙二醇、柠檬酸三钠、醋酸钠、3-氨丙基三乙氧基硅烷、四水合氯金酸、乙醇、氯化钾、铁氰化钾、氧化铝、过氧化氢、对苯二酚、六水合氯铂酸、抗坏血酸均为分析纯;所用 H1N1 流感病毒血凝素蛋白、新冠病毒刺突蛋白和新冠病毒核衣壳蛋白购自北京义翘神州公司;所用牛血清白蛋白和人免疫球蛋白白购自北京鼎国昌盛公司。所用到 H1N1-HA 蛋白的特异性适配体购自上海生工生物工程有限公司。

材料表征所用仪器有:高分辨率透射电子显微镜(TEM,美国赛默飞)、X 射线衍射仪(XRD,荷兰帕纳德)、振动样品磁强计(美国 Lake Shore)、紫外可见分光光度计(日本岛津)和电化学工作站(上海辰华)。

2.1 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒的制备

采用溶剂热法合成尺寸均一的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒^[31]。称取 2 g 六水合氯化铁(FeCl₃ · 6H₂O),溶解于 60 mL 乙二醇中,于室温下磁力搅拌 1 h。随后加入 1.4 g 柠檬酸钠(C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O),水浴升温至 60 °C 并持续搅拌 30 min。最终加入 9.6 g 乙酸钠(CH₃COONa)以构建碱性体系,加热至乙酸钠完全溶解。将所得深黄色溶液转移至聚四氟乙烯(PTFE)衬里的反应釜中,于 200 °C 下反应 8 h。待 Fe₃O₄ 产物冷却至室温后,进行磁分离;然后,用乙醇和去离子水洗涤三次,最后在 60 °C 下真空干燥。

2.2 金纳米粒子的制备

采用柠檬酸钠还原法制备金纳米粒子^[32]。取 3.7 mL 质量分数为 1% 的氯金酸四水合物,与超纯水混合定容至 100 mL。将该混合液加热至沸腾,同时进行磁力搅拌。随后,加入 10 mL 38.8 mmol/L 的柠檬酸钠溶液并继续搅拌 30 min,冷却后得到酒红色金纳米颗粒。

2.3 Fe₃O₄-NH₂@Au 纳米复合材料的制备

取 0.1 g Fe₃O₄ 纳米颗粒,超声分散于 50 mL 质量分数为 90% 的乙醇水溶液中,逐滴加入 0.4 mL 氨丙

基三乙氧基硅烷(APTES),室温搅拌3 h。反应结束时,含细颗粒的悬浮液呈浅棕色,所得产物为氨基化修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒。将 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ 溶解于40 mL去离子水,快速加入60 mL合成的金纳米颗粒溶液,低速搅拌反应至上清液澄清,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 纳米复合材料(MNPs)。分别用去离子水和乙醇洗涤3次后,置于60 °C烘箱干燥至粉末状。

2.4 Au@Pt 纳米酶的制备

Au@Pt 纳米酶参考已报道方法^[28]进行制备。

2.5 磁辅助适配体传感器的构建流程

该磁辅助适配体传感器设计方案参照已报道方法^[28]主要分为三步:

(1) H1N1-HA 蛋白捕获:取100 μL 3 mg/mL 的 MNPs 胶体与10 μL 最终浓度15 $\mu\text{mol/L}$ 的 aptamer 1 混合,在4 °C下避光静置16 h。磁铁分离后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗三次,再用1 mL 含有BSA(质量分数为1%)的 PBS 缓冲液溶液孵育30 min 阻断活性位点。最终 MNPs/aptamer 1/BSA 复合物与10 μL H1N1-HA 蛋白室温孵育20 min,PBS 重悬备用。

(2) 纳米酶-适配体结合:500 μL Au@Pt 纳米酶溶液与50 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 aptamer 2 混合,在4 °C下静置过夜。8 000 r/min 离心5 min 分离沉淀,PBS 重悬得到 Au@Pt-aptamer 2 结合物。

(3) 识别与检测:取20 μL Au@Pt-aptamer 2 结合物加入 HA 蛋白捕获复合物中,磁铁分离后 PBS 重悬。将复合物通过外部磁铁吸附固定在丝网印刷电极的工作电极上,滴加200 μL H_2O_2 /HQ 电解液覆盖电极,反应5 min 后检测 DPV 响应信号。

2.6 丝网印刷电极及样品的处理

丝网印刷电极在制备过程中,表面可能存在一些杂质或氧化层,这会阻碍电子的传输,降低电极的导电性。所以在使用新的丝网印刷电极之前,有必要对丝网印刷电极进行活化。具体活化方法如下:取出未经使用的丝网印刷电极,去除表面薄膜,将其通过信号转接器连接到电化学工作站。然后将含有5 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 和0.1 mol/L KCl 的 PBS 缓冲溶液滴加在电极表面,使电解液完全覆盖工作电极、参比电极和对电极。采用循环伏安法,在-0.2~0.6 V 以100 mV/s 的扫描速率进行5圈扫描,以此实现对丝网印刷电极稳定且高效的活化。

检测样品是以100 $\mu\text{g/mL}$ 的 H1N1-HA 蛋白作为母液,用 pH 值为7.2 的 PBS 缓冲溶液进行稀释,从而得到1 $\mu\text{g/mL}$ ~1 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度梯度的样品。这些样品被保存在-20 °C 的环境中直至使用。同时,为了验证实际污水检测中传感器系统的可靠性,向污水处理厂采集的污水样本中添加0.001 ng/mL、1 ng/mL 和1 000 ng/mL 三个浓度梯度的 HA 蛋白标准品进行加标回收实验,并计算回收率与相对标准偏差(RSD)^[33]。

2.7 电化学测试方法

电化学测试包括循环伏安法(CV)、电化学阻抗谱(EIS)和差分脉冲伏安法(DPV)。循环伏安法在-0.2 V 到0.6 V 的电压范围内以100 mV/s 的扫描速率进行。电化学阻抗谱测试是通过在0.1 Hz 至100 kHz 的频率范围内施加振幅小于10 mV 的输入电压进行。差分脉冲伏安法的扫描电位范围是从0~0.6 V,扫描速率是100 mV/s,当电位增加5 mV 时,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为0.05 s。电化学表征所用的电解液是将5 mmol/L 的铁氰化钾($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$)和0.1 mol/L 的氯化钾(KCl)溶解在0.1 mol/L PBS 缓冲溶液(pH=7.2)中制备而成,并且在每一个修饰步骤之后都要对电极进行电化学检测以验证修饰效果。电化学检测所用的电解液是将1 mg/mL 的 HQ 溶液和10 mmol/L H_2O_2 溶液(体积比为9:1)的混合溶液。通过比较添加 H1N1-HA 蛋白前后的 DPV 信号差异来评估所制备的磁辅助适配体传感器的检测效果。最后,通过分析不同浓度的 HA 蛋白所产生的信号变化,绘制拟合曲线确定该方法对 HA 蛋白的最低检测限。

3 结果与讨论

3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 和 Au@Pt 的材料表征

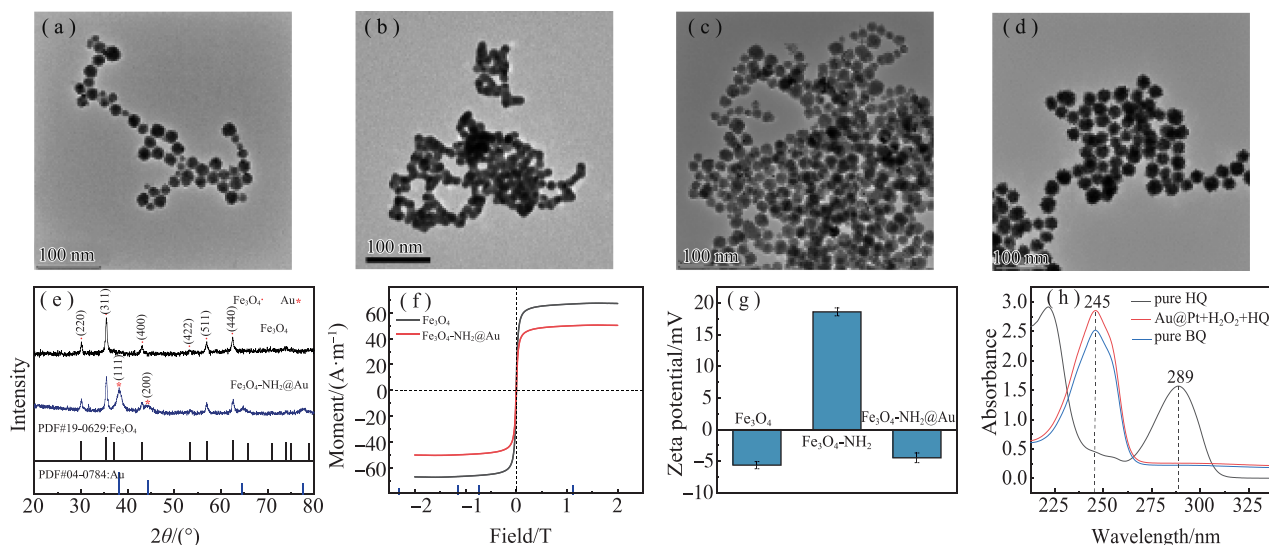
通过透射电子显微镜观察所制备纳米材料的形貌结构。如图2(a)和2(b)所示, Fe_3O_4 颗粒为均匀纳米

微球,平均粒径 100~110 nm;金纳米粒子呈椭圆形,粒径约 10 nm。如图 2(c)所示,经 APTES 氨化处理的 Fe_3O_4 表面带正电荷氨基基团,通过静电力与配位键作用,金纳米粒子有效负载在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ 表面,形成 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 纳米复合材料^[34]。图 2(d)显示,铂纳米粒子均匀包裹在金纳米粒子表面,形成粒径约 25 nm 的 Au@Pt 纳米酶。

图 2(e)的 XRD 图谱显示, Fe_3O_4 及 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 衍射峰与 Fe_3O_4 的 PDF 卡片高度匹配, Fe_3O_4 在 2θ 为 30.11° 、 35.46° 、 43.12° 、 53.51° 、 56.88° 和 62.54° 处出现特征衍射峰,分别对应于(220)、(311)、(400)、(422)、(511)和(440)晶面^[35]。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 除 Fe_3O_4 特征峰外,在 38.23° 和 44.41° 处出现金纳米粒子的(111)和(200)特征衍射峰,表明金纳米粒子成功负载。

图 2(f)磁滞回线图分析显示, Fe_3O_4 饱和磁化率为 67.2 A/m,矫顽力 0.058 96 T,无明显剩磁,磁性可控性好; $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 因引入非磁性金纳米粒子,饱和磁化率和矫顽力降至 50.23 A/m 和 0.037 86 T,但仍能维持足够磁分离性能,可借助磁铁在分散悬浮液中实现高效分离。

为深入探究材料的表面电位特性,测试了 Fe_3O_4 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 悬浮液($\text{pH} = 7.0$)的 Zeta 电位。如图 2(g)所示,裸露的 Fe_3O_4 纳米颗粒的 Zeta 电位值为 -5.61 mV,而用硅烷偶联剂 APTES 修饰后的 Fe_3O_4 纳米粒子的 Zeta 电位大幅上升至 18.6 mV,这充分证实了在 Fe_3O_4 基底的末端成功接枝了大量带正电荷的氨基基团,这为下一步金纳米粒子的负载提供了有利的条件。进一步探究了 Au@Pt 纳米酶催化 H_2O_2 氧化对苯二酚性能^[28],见图 2(h)。纯 HQ 吸收峰在 289 nm,纯 BQ 在 245 nm,向 H_2O_2 与 HQ 混合液中添加 Au@Pt 纳米酶静置 5 min 后,HQ 吸收峰显著降低,出现 BQ 吸收峰,表明 Au@Pt 纳米酶催化 H_2O_2 生成的氧化物可在 5 min 内将 HQ 完全转化为 BQ。



注:(a) Fe_3O_4 、(b) Au、(c) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 和 (d) Au@Pt 的 TEM 图像;样品的 (e) XRD 图谱、(f) 磁滞回线和 (g) Zeta 电位;(h) Au@Pt 纳米酶与 HQ 的催化反应性能。

图 2 材料的 TEM 图像、XRD 图谱、磁滞回线图、Zeta 电位表征结果; Au@Pt 纳米酶与 HQ 的催化反应性能

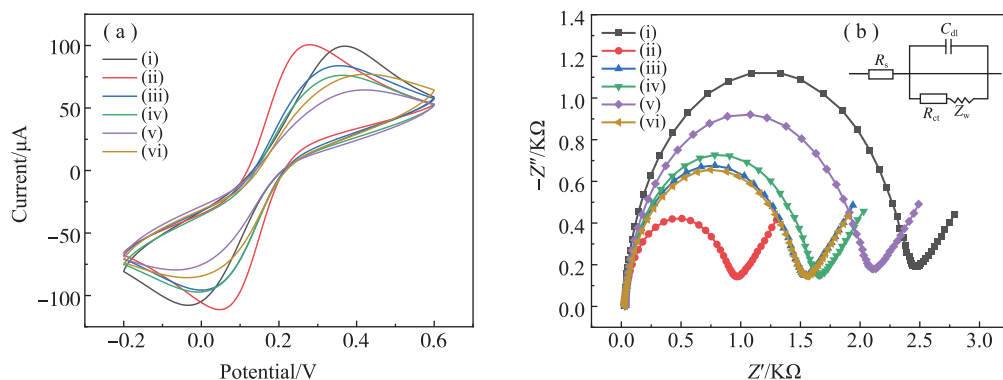
Fig. 2 TEM images, XRD spectra, hysteresis loop diagrams and Zeta potentials of samples; Catalytic reaction performance of Au@Pt nanoenzyme with HQ

3.2 传感器的电化学表征

图 3 展示了磁辅助适配体传感器的制备过程,首先对传感器的组装过程进行了研究。采用含 5 mmol/L 铁氰化钾($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$)、0.1 mol/L 氯化钾(KCl)的 0.1 mol/L PBS 缓冲溶液($\text{pH}=7.2$)作为 CV 和 EIS 表征电解液。如图 3(a)的 CV 曲线表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@Au}$ 磁性纳米材料使 SPCE/MNPs 电极电子转移加快,峰电流升高,电位差减小;MNPs 修饰 aptamer 1、BSA 及 HA 蛋白后,因生物分子干扰电子转移,氧化还原电流持续降低;而修饰 Au@Pt 纳米酶与 aptamer 2 结合物后,凭借纳米酶导电性和催化活性,电流响应回升,证明 aptamer 2 与 HA 蛋白成功结合和磁辅助适配体传感器构建成功。

图 3(b)的 EIS 结果表明,SPCE/MNPs 修饰电极较未修饰电极电子转移电阻显著降低;引入 aptamer 1

后,因不导电特性导致电阻增加;BSA 封闭多余活性位点,进一步抑制电子转移;捕获 HA 蛋白后电阻再次增大;而引入 Au@Pt-aptamer 2 后,纳米酶促进电子转移,电阻显著降低。EIS 结果与 CV 对应,均证实传感器成功制备及检测 H1N1-HA 蛋白的可行性。



注:(a) CV 和(b) EIS; (i) SPCE, (ii) SPCE/MNPs, (iii) SPCE/MNPs/aptamer 1, (iv) SPCE/MNPs/aptamer 1/BSA, (v) SPCE/MNPs/aptamer 1/BSA/HA protein, (vi) SPCE/MNPs/aptamer 1/BSA/HA protein/Au@Pt-aptamer 2。

图3 磁辅助适配体传感器每个修饰步骤的 CV 和 EIS 表征

Fig. 3 CV and EIS characterization of each modification step of the magnetic-assisted adapter sensor

图4评估了添加 HA 蛋白前后磁辅助适配体传感器 DPV 响应电流的变化。DPV 检测显示加入 HA 蛋白后响应电流变化明显,这是由于 HA 蛋白存在时,Au@Pt-aptamer 2 可以与 HA 蛋白结合,这样传感器系统中 Au@Pt 纳米酶就可以将 H_2O_2 /HQ 电解液中的 HQ 转化为 BQ,从而产生可检测的 DPV 信号。磁辅助适配体传感器与 HA 蛋白结合后 DPV 电流显著升高,这表明使用 DPV 法可以高灵敏度地检测 H1N1-HA 蛋白。

3.3 优化实验

为提升磁辅助适配体传感器的灵敏度与电化学响应稳定性,对 H_2O_2 与 HQ 溶液体积比例、aptamer 2 浓度及 Au@Pt-aptamer 2 与 HA 蛋白结合时间进行优化。实验中固定 H_2O_2 浓度(10 mmol/L)和 HQ 浓度(1 mg/mL)。图5结果表明, H_2O_2 与 HQ 溶液的体积比例为 9:1 时,Au@Pt 纳米酶催化效率最高,电流响应达峰值。而过高的 H_2O_2 占比会因 HQ 不足导致响应降低。通过 5 个浓度梯度测试 aptamer 2 结合效果,确定 10 $\mu\text{mol/L}$ 为检测 HA 蛋白的最佳浓度;捕获组件与识别组件的结合时间测试显示,混合反应 20 min 时,基于 DPV 响应的检测效果最优。

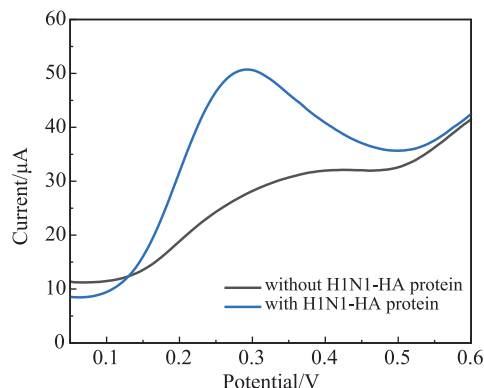
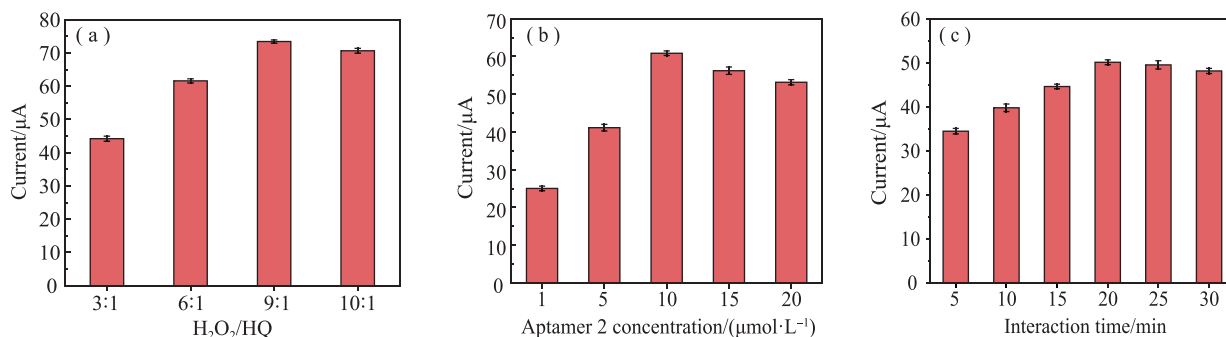


图4 评估添加 HA 蛋白前后磁辅助适配体传感器 DPV 响应电流的变化

Fig. 4 Evaluates the changes in the DPV response current of the magnetic auxiliary aptamer sensor before and after the addition of HA protein



注:(a) H_2O_2 与 HQ 的比例;(b) aptamer 2 的浓度;(c) Au@Pt-aptamer 2 与 HA 蛋白的结合时间。

图5 电化学实验条件的优化

Fig. 5 Optimization of electrochemical experimental conditions

3.4 磁辅助适配体传感器的检测性能

在优化后的最佳条件下使用所构建的磁辅助适配体传感器对不同浓度的 H1N1-HA 蛋白进行检测。如图 6 所示,在 1 pg/mL~1 μg/mL 的检测浓度范围内,随着 HA 蛋白浓度依次升高,DPV 电流响应信号的峰值也随之升高,HA 蛋白浓度的对数与电流响应信号的峰值变化呈线性关系。根据图 6 插图显示,该磁辅助适配体传感器的线性回归方程为 $Y = (2.95 \pm 0.2) X + (50.3 \pm 0.1)$ ($R^2 = 0.998$),经检测限(LOD)的计算公式得出,所制备的磁辅助适配体传感器的 LOD 为 0.77 pg/mL。由于 Au@Pt 纳米酶能够在 5 min 内与 H₂O₂/HQ 电解液体系完全反应,因此对每种浓度的 HA 蛋白检测时间不超过 5 min,从而实现了快速且灵敏的检测。

表 1 为不同电化学检测方法对 H1N1-HA 蛋白的检测性能比较。可以看出,本研究中基于丝网印刷电极开发的磁辅助适配体传感器具有以下几点优势:(1) 更宽的线性检测范围和更高的灵敏度;(2) 无需使用复杂且昂贵的抗体来进行病毒检测;(3) 借助外部磁场辅助,从而简化了预处理流程,丝网印刷电极可做到即用即测;(4) 检测时间短,可在 5 min 内得出结果。综上所述,本研究开发的磁辅助传感器在 H1N1 病毒检测方面展现出了巨大的应用潜力。

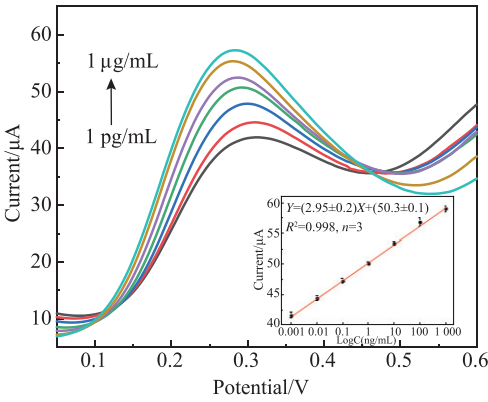


图 6 磁辅助适配体传感器用于检测不同浓度 H1N1-HA 蛋白的 DPV 响应信号图及对数校准曲线
Fig. 6 The DPV response signal diagram and logarithmic calibration curve of the magnetically assisted aptamer sensor for detecting different concentrations of H1N1-HA protein

表 1 不同电化学检测方法对 H1N1-HA 蛋白的检测性能比较

Tab. 1 Comparison of detection performances of different electrochemical detection methods for H1N1-HA protein

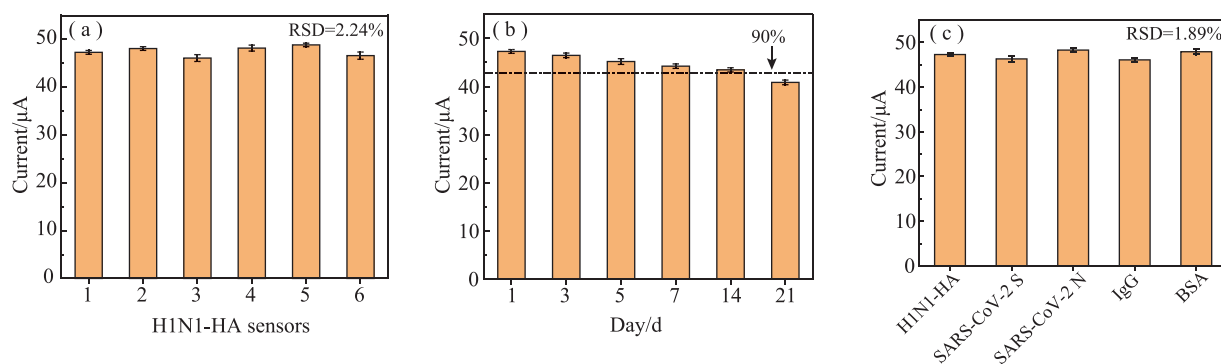
检测方法	基质	检测范围	检测限	参考文献
CV	鼻拭子	0.2~20 000 ng/mL	0.04 ng/mL	[36]
EIS	血清	0.01~100 nmol/L	0.01 nmol/L	[37]
EIS	鼻拭子	0.1~400 ng/mL	4 pg/mL	[38]
DPV	/	0.25~5 pg/mL	0.25 pg/mL	[39]
DPV	唾液	1~10 000 ng/mL	0.28 ng/mL	[40]
DPV	污水	0.001~1 000 ng/mL	0.77 pg/mL	This work

3.5 重现性、稳定性和特异性

重现性、稳定性和特异性是评估电化学传感器性能的重要指标。为验证所制备的磁辅助适配体传感器的重现性,选取了六个不同的丝网印刷电极修饰 SPCE/MNPs/aptamer 1/BSA/HA protein/Au@Pt-aptamer 2 磁辅助适配体传感器,用于检测浓度为 0.1 ng/mL 的 H1N1-HA 蛋白。如图 7(a)所示,六个电极测得的电流响应基本相同,相对标准偏差(RSD)为 2.24%,这表明该磁辅助适配体传感器具有良好的重现性。

随后,将制备好的 MNPs/aptamer 1/BSA 与 Au@Pt-aptamer 2 传感器组件置于 4 ℃ 的环境中保存三周,并在第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天对浓度为 0.1 ng/mL 的 HA 蛋白进行检测,以研究该传感器的长期稳定性。结果如图 7(b)所示,在第 14 天时,传感器保持了初始检测结果的 92%,尽管电流响应有所下降,但其稳定性仍在合理范围内。

最后,针对存在 SARS-CoV-2 S 蛋白、SARS-CoV-2 N 蛋白、IgG 及 BSA 的情况,对该磁辅助适配体传感器的特异性进行了评估。图 7(c)展示了这些干扰物对浓度为 0.1 ng/mL 的 HA 蛋白检测所造成的影响。结果显示,在无干扰物和有干扰物的条件下,电流响应均未发生较大变化,相对标准偏差为 1.89%。这表明该传感器具备高度的特异性,真实环境中的干扰物对检测结果的影响较小。



注:(a) 六个不同磁辅助适配体传感器的重现性;(b) 磁辅助适配体传感器在 4 ℃ 下分别保存 1、3、5、7、14 和 21 d 的稳定性;(c) 磁辅助适配体传感器的特异性。

图 7 磁辅助适配体传感器的重现性、稳定性和特异性

Fig. 7 Reproducibility, stability, and specificity of the magnetic-assisted adapter sensors

3.6 检测污水中的 H1N1-HA

为了验证所制备的磁辅助适配体传感器在污染水体中对 H1N1 流感病毒的检测性能,采用加标回收法来检测污水样本中的 H1N1-HA 蛋白。将浓度分别为 0.001 ng/mL、1 ng/mL 和 1 000 ng/mL 的 HA 蛋白添加到预处理后的污水样本中,然后使用差分脉冲伏安法进行三次检测,以确定回收率和相对标准偏差。如表 2 所示,污水样本中 HA 蛋白的回收率在 97.1%至 102%之间,相对标准偏差值保持在 5%以下。这些结果证实了所开发的磁辅助适配体传感器在污水中检测 H1N1 流感病毒具有实际应用前景。

表 2 污水样本中 HA 蛋白的回收率

Tab. 2 The recovery rate of HA protein in sewage samples

样本	添加量/(ng · mL ⁻¹)	检测量/(ng · mL ⁻¹)	回收率/%	RSD/% n=3
污水	0.001	0.001	100	3.84
	1	1.02	102	3.63
	1 000	971	97.1	2.79

4 结论

为进一步开发适用于现场即时检测污水中 H1N1 流感病毒的小型化传感器,基于丝网印刷电极构建了磁辅助适配体传感器用于污水中 H1N1 流感病毒的快速灵敏检测。将捕获适配体和识别适配体分别修饰于 Fe₃O₄-NH₂@Au 磁性纳米颗粒和 Au@Pt 纳米酶表面,并富集 HA 蛋白形成“捕获组件-目标物-识别组件”的复合结构后,通过外部磁场固定于丝网印刷电极上,催化 H₂O₂/HQ 反应检测 H1N1-HA 蛋白。该传感器对 HA 蛋白的检测限低至 0.77 pg/mL,检测范围为 1 pg/mL~1 μg/mL,检测时间不超过 5 min,并且该传感器兼具良好的重现性、稳定性与特异性。加标回收实验表明,污水样本中 HA 蛋白的回收率在 97.1%~102%,相对标准偏差低于 5%,证实了该方法在复杂水环境中检测 H1N1 病毒的可靠性。

参 考 文 献

- [1] JESTER B J, UYEKI T M, PATEL A, et al. 100 years of medical countermeasures and pandemic influenza preparedness[J]. American Journal of Public Health, 2018, 108(11): 1469-1472.
- [2] 张晓辉. 适配体在 SARS-CoV-2 检测与靶向治疗中的应用[D]. 合肥:安徽农业大学, 2023.
- [3] 陈光, 柴洪亮, 孙静, 等. H1N1 亚型禽流感毒株基质蛋白基因全序列扩增及遗传进化分析[J]. 野生动物, 2013, 34(3): 141-143.
- [4] WANG W, KANG S J, ZHOU W, et al. Environmental routes of virus transmission and the application of nanomaterial-based sensors for virus detection[J]. Environmental Science: Nano, 2023, 10(2): 393-423.
- [5] TANNER A R, DOREY R B, BRENDISH N J, et al. Influenza vaccination: protecting the most vulnerable[J]. European Respiratory Review, 2021, 30(159): 200258.

- [6] LIANG H, ZHANG L, WANG L N, et al. Repositioning drugs on human influenza A viruses based on a novel nuclear norm minimization method[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 11:597494.
- [7] 李红梅, 郑伟娟, 李家璜, 等. 抗菌肽 urumin 与甲型流感病毒 H1N1 HA 蛋白的相互作用研究[J]. *药科学报*, 2021, 56(9): 2553-2560.
- [8] KIM J I, LEE I, PARK S, et al. Surface glycoproteins determine the feature of the 2009 pandemic H1N1 virus[J]. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 2012, 45(11): 653-658.
- [9] ALI M H, ELSHERBINY M E, EMARA M. Updates on aptamer research[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(10):2511.
- [10] 张滨予. 基于双重信号放大的比率电化学适配体传感器用于灵敏检测双酚A[D]. 太原:山西大学, 2024.
- [11] 黄少坤, 谢秀琳, 蔡华宾, 等. 以鲁米诺/过氧化氢作为报告体系的微通道电化学发光传感器用于四环素的检测[J]. *分析化学*, 2025, 53(3): 356-363.
- [12] GAVRILAŞ S, URSACHI C Ş, PERŢA-CRIŞAN S, et al. Recent trends in biosensors for environmental quality monitoring[J]. *Sensors*, 2022, 22(4): 1513.
- [13] 张雨婷, 陈灏翰, 李惠, 等. 基于杂交指示剂的无标记适配体电化学传感器用于铅离子检测[J]. *分析测试学报*, 2022, 41(11): 1629-1635.
- [14] 郭婷, 黄馨瑞, 周莹, 等. 基于适配体封盖介孔材料的电化学传感器检测猪肉中磺胺二甲嘧啶[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(6), 294-299.
- [15] SHI Z H, ZHANG X Q, ZHEN Q N, et al. Direct electrochemical measurement of metanephrines in spot urine samples for the diagnosis of pheochromocytomas[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 8041.
- [16] 黄若涵, 谢显娟, 龚梓琪, 等. 基于丝网印刷电极的农药残留快速检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(20): 217-224.
- [17] 何英杰. 基于丝网印刷电极修饰技术快速检测稻米中无机砷方法的应用[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2024.
- [18] XIE L J, JIANG R F, ZHU F, et al. Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(2): 377-399.
- [19] 崔耀莹. 中空核壳结构 Fe_3O_4 纳米酶的制备及其传感研究[D]. 淮安:淮阴工学院, 2024.
- [20] 丁杰. 功能化 Fe_3O_4 @C 材料的制备及其对水中污染物的吸附性能研究[D]. 盐城:盐城工学院, 2024.
- [21] SONG X X, FREDJ Z, ZHENG Y Q, et al. Biosensors for waterborne virus detection: Challenges and strategies[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2023, 13(11): 1252-1268.
- [22] 杨美清, 王路, 卢浩滋, 等. 用于丝网印刷光电化学生物传感器的功能纳米材料的最新进展[J]. *物理化学学报*, 2025, 41(2), 38-53.
- [23] DAVYDOVA A S, VOROBYEVA M A. Aptasensors based on non-enzymatic peroxidase mimics: current progress and challenges[J]. *Biosensors*, 2023, 14(1): 1.
- [24] YANG L L, YAN Z B, YANG L, et al. Photothermal conversion of SiO_2 @Au nanoparticles mediated by surface morphology of gold cluster layer[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(55): 33119-33128.
- [25] GATTO F, MOGLIANETTI M, POMPA P P, et al. Platinum nanoparticles decrease reactive oxygen species and modulate gene expression without alteration of immune responses in THP-1 monocytes[J]. *Nanomaterials*, 2018, 8(6): 392.
- [26] MIRRES A C, SILVA B, TESSARO L, et al. Recent advances in nanomaterial-based biosensors for pesticide detection in foods[J]. *Biosensors*, 2022, 12(8):572.
- [27] 邵相森. 磁性纳米磷酸钛 Fe_3O_4 @TiP 的优化制备及其对稀土 La^{3+} 的吸附/解吸特性研究[D]. 赣州:江西理工大学, 2024.
- [28] YU Q C, WANG Y, LIU Y, et al. Dually-amplified electrochemical aptasensor based on the self-linking AuPt nanoflowers for ultrasensitive determination of hemagglutinin[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1329: 343257.
- [29] SELVOLINI G, LAZZARINI C, MARRAZZA G. Electrochemical nanocomposite single-use sensor for dopamine detection[J]. *Sensors*, 2019, 19(14): 3097.
- [30] LAI H C, WANG C H, LIOU T M, et al. Influenza A virus-specific aptamers screened by using an integrated microfluidic system[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(12): 2002-2013.
- [31] LI S C, ZHANG T L, TANG R Z, et al. Solvothermal synthesis and characterization of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2015, 379: 226-231.
- [32] ROHIMAN A, ANSHORI I, SURAWIJAYA A, et al. Study of colloidal gold synthesis using turkevich method[C]//The 4th Nanoscience and Nanotechnology Symposium (NNS2011), September 23-25, 2011, Bali Indonesia, 2011:39-42.
- [33] TRIASTUTI A, ZAKIYYAH S N, GAFFAR S, et al. CeO_2 @ NH_2 functionalized electrodes for the rapid detection of SARS-CoV-2 spike receptor binding domain[J]. *RSC Advances*, 2023, 13(9): 5874-5884.

- [27] 窦勇,董静,陈成,等. ϵ -聚赖氨酸对苹果灰霉病菌的抑菌机制[J]. 食品工业科技, 2025, 46(3): 196-203.
- [28] 陈薇,刘惠芳,马驰宇,等. 香茅醇和柠檬醛对茶炭疽病菌丝结构和酶活性的影响[J]. 贵州农业科学, 2024, 52(9): 90-99.
- [29] 黄伟,王宁,宋博,等. 猫木霉 M6-5 挥发性物质对香梨采后链格孢细胞膜和细胞壁的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(22): 247-254.
- [30] 范宗强,李欣苒,冯靖涵,等. 解淀粉芽孢杆菌 9-2 防控黄瓜枯萎病及其诱导系统抗性研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2025, 38(4): 625-632.
- [31] 乔奕,郑美辰,盛鑫如,等. 瓦尼木层孔菌培养基优化及抗炎作用研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2023, 36(5): 91-98.
- [32] 王兴国,刘霞,张哲,等. 大丽轮枝孢激活蛋白(VdAL)对马铃薯晚疫病发生的影响[J]. 江西农业学报, 2022, 34(10): 101-107.
- [33] 张超,文庭池,曾祥宇,等. 和厚朴酚对红托竹荪腐烂病菌抑菌活性的影响[J]. 北方园艺, 2024, 21: 92-98.

(责任编辑:刘庆松)

(上接第 890 页)

- [34] WANG J J, JIA Z H. Metal nanoparticles/porous silicon microcavity enhanced surface plasmon resonance fluorescence for the detection of DNA[J]. Sensors, 2018, 18(2): 661.
- [35] LIANG Y X, JIANG L, XU S T, et al. Synthesis and characterization of Fe_3O_4 nanoparticles prepared by solvothermal method[J]. Journal of Materials Engineering and Performance, 2023, 33(13): 6804-6815.
- [36] YADAV M, ARORA R, DHANDA M, et al. TiO_2 -guanine as a new amalgamation compound for fabrication of a disposable biosensor with high sensitivity and rapid detection of H1N1 swine flu virus[J]. Microchimica Acta, 2023, 190(10): 412.
- [37] PARK J A, KIM J, KIM S M, et al. Fabrication of electrochemical influenza virus (H1N1) biosensor composed of multifunctional DNA four-way junction and molybdenum disulfide hybrid material[J]. Materials, 2021, 14(2): 343.
- [38] RAVINA, MOHAN H, GILL P S, et al. Hemagglutinin gene based biosensor for early detection of swine flu (H1N1) infection in human[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 720-726.
- [39] BAO Q W, LI G, YANG Z C, et al. Electrochemical biosensor based on antibody-modified Au nanoparticles for rapid and sensitive analysis of influenza A virus[J]. Ionics, 2023, 29(5): 2021-2029.
- [40] LIN J C, LIU J J, XU J. Ultrasensitive electrochemical immunoassay for screening the influenza A (H1N1) virus based on atomically Ru-dispersed nitrogen-doped carbon[J]. New Journal of Chemistry, 2023, 47(4): 1685-1690.

(责任编辑:蒲锡鹏)