DOI:10.12441/spyswjs.20240905001 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0144-09

# 基于DNA银纳米簇的金黄色葡萄球菌检测方法的构建

陆晓彤 李金昭 杜欣军 康 青*

(天津科技大学食品科学与工程学院,天津 300457)

**摘要:【目的】**建立一种简单、灵敏的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)检测方法,用于食品中该致病菌的高效检测。**【方法】**以金黄色葡萄球菌为研究对象,基于指数扩增反应(exponential amplification reaction,EXPAR)结合DNA银纳米簇(P-AgNCs)开发了一种简单、灵敏的金黄色葡萄球菌荧光检测方法EXPAR-P-AgNCs。通过设计识别探针,可在金黄色葡萄球菌存在的情况下触发EXPAR,生成大量的靶标DNA(T),T与发夹P结合,富G序列远离P-AgNCs,从而降低P-AgNCs的相对荧光强度,实现了对金黄色葡萄球菌的检测。**【结果】**金黄色葡萄球菌浓度在$1\times10^2$~$1\times10^6$ CFU/mL时,相对荧光强度与其浓度呈线性相关,检测限达10 CFU/mL,且特异性明显,无交叉反应。在牛奶、猪肉样品中加入金黄色葡萄球菌,利用该方法测定金黄色葡萄球菌,回收率为94.5%~115.0%。**【结论】**所构建的检测方法灵敏度高、特异性好,为病原微生物及其他影响食品安全的污染物的检测提供了思路。

**关键词:**金黄色葡萄球菌;适配体;银纳米簇;指数扩增反应

# Construction of *Staphylococcus aureus* Detection Method Based on DNA Silver Nanoclusters

*LU Xiaotong LI Jinzhao DU Xinjun KANG Qing**

(School of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** [**Objective**] A simple and sensitive detection method for *Staphylococcus aureus* is established for the efficient detection of this pathogen in food. [**Method**] Targeting *Staphylococcus aureus*, a simple and sensitive fluorescent detection method for *Staphylococcus aureus*, EXPAR-P-AgNCs, was developed based on exponential amplification reaction (EXPAR) combined with DNA silver nanoclusters (P-AgNCs). A recognition probe was designed to initiate EXPAR in the presence of *Staphylococcus aureus*, generating a large amount of target DNA (T). The binding of T to hairpin P displaced the G-rich strand from P-AgNCs, resulting in a decrease in the relative fluorescence intensity of P-AgNCs and enabling the detection of *Staphylococcus aureus*. [**Result**] The relative fluorescence intensity showed a good linear relationship with *Staphylococcus aureus* concentration in the range of $1\times10^2$ and $1\times10^6$ CFU/mL. The limit of detection was as low as 10 CFU/mL. The method shows high specificity without cross-reactions. The recovery rates for *Staphylococcus aureus* spiked in milk and pork samples ranged from 94.5% to 115.0%. [**Conclusion**] The developed detection method demonstrates high sensitivity and excellent specificity, offering a promising approach for the detection of microbial pathogens or other contaminants threatening food safety.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; aptamer; silver nanocluster; exponential amplification reaction

---

**基金项目:**国家级大学生创新创业训练计划资助项目(202210057042)。

**通信作者:**康青(1990—),女,博士,讲师,硕士研究生导师,主要从事食品安全相关研究。E-mail:kangqing@tust.edu.cn

**收稿日期:**2024-09-05 **修回日期:**2024-12-26

金黄色葡萄球菌是一种普遍存在于人类与动物宿主体内的病原微生物，因其分布广泛，对公共卫生安全构成了不容忽视的潜在威胁。其对热、盐、干燥均有较强的抵抗力，在80 ℃下可存活30 min，在质量分数10%的氯化钠溶液中可长期存活并繁殖，在干燥的脓液、痰液中可存活2~3个月[1]。金黄色葡萄球菌存在于食物中时，会产生细胞外蛋白质内毒素，从而具有致病性，可引起各种疾病，从轻微的皮肤感染到严重的细胞内感染，甚至致命的败血症[2-3]。金黄色葡萄球菌是引发食物中毒的第二大细菌，威胁人类和动物的健康[4]。根据美国农业部经济研究局的数据，每年发生的食源性疾病案例中，超过180 000例是由金黄色葡萄球菌所致[5-6]。因此，构建精确且快速的金黄色葡萄球菌检测方法至关重要。

食品中金黄色葡萄球菌的检测方法包括传统培养法（如菌落计数法）、免疫学方法（如酶联免疫吸附试验）和分子生物学检测方法（如环介导等温扩增[7-8]、指数扩增[9]、滚环扩增[10-12]、重组酶聚合酶扩增[13]、催化发夹组装[14]和杂交链反应[15]等）。恒温指数扩增是一种典型的等温扩增方法，可以将单链切割与聚合酶链延伸相结合，并在恒定温度下短时间（<30 min）实现$1\times10^6$~$1\times10^9$倍的靶标DNA扩增，具有操作简便、恒温和扩增效率高等优点。

银纳米簇（silver nanoclusters，AgNCs）是由多个银离子通过特定方式堆积在一起形成的一种纳米级金属团簇[16]。不同模板（磷、硫醇、聚合物、蛋白质和DNA）合成的AgNCs，具有不同的发射波长和量子产率[17]。其中，以DNA为模板合成的AgNCs因荧光量子产率高、光稳定性好、抗光漂白性能强、生物相容性好等优势，在荧光传感器的构建方面具有一定的潜力[18-19]。

作者通过将EXPAR与以发夹DNA为模板合成的AgNCs结合，构建了一种基于核酸信号放大技术和无荧光探针标记的荧光检测方法EXPAR-P-AgNCs，可实现对金黄色葡萄球菌的高灵敏检测。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与试剂

牛奶：当地超市；金黄色葡萄球菌：天津科技大学食品营养与安全国家重点实验室。硝酸银（$AgNO_3$）、硼氢化钠（$NaBH_4$）、磷酸二氢钾（$KH_2PO_4$）、十二水合磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4\cdot12H_2O$）、氢氧化钠（NaOH）、四甲基乙二胺（*N*，*N*，*N*’，*N*’-tetramethylethylenediamine，TEMED）、溴化乙锭（ethidium bromide，EB）：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；Nb.BbvCl剪切酶：上海易汇生物科技有限公司；rCutSmart™缓冲液：New England Biolabs（NEB）公司；50 bp的DNA标记、dNTPs：北京索莱宝科技有限公司；KF聚合酶：生工生物工程（上海）股份有限公司。

### 1.2　仪器与设备

荧光分光光度计：Lumina型，美国赛默飞世尔科技公司；透射电子显微镜（transmission electron microscopy，TEM）：Talos F200X G2型，美国赛默飞世尔科技公司；Zeta电位纳米粒度分析仪：DelsaNano型，贝克曼库尔特商贸（中国）有限公司。

### 1.3　试验方法

#### 1.3.1　序列设计

根据金黄色葡萄球菌的适配体序列，结合该方法的试验原理设计基因序列，见表1。基因序列由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

#### 1.3.2　EXPAR的方法

用恒温水浴锅进行EXPAR，体系包括：2 μL 100 μmol/L发夹探针（Hairpin Probe，HP）、2 μL 100 μmol/L模板探针（Template Probe，TP）、缓冲液为1×rCutSmart™缓冲液、1 μL 10 mmol/L dNTPs、2 μL KF聚合酶和4 μL Nb.BbvCl剪切酶。

#### 1.3.3　P-AgNCs的制备

将50 mmol/L发夹DNA（即表1中的发夹P）溶液加入超纯水稀释后，在90 °C下孵育10 min，随后在室温下保持1 h。将1 mmol/L $AgNO_3$溶液加入上述溶液中，室温下反应0.5 h，然后将1 mmol/L $NaBH_4$溶液加入混合物中，剧烈振荡1 min，然后在黑暗中保持4 h，制备P-AgNCs[20]。

#### 1.3.4　金黄色葡萄球菌的检测

识别单元（aptamer/C-aptamer，Apt/cApt）与金黄色葡萄球菌在37 ℃下孵育1 h，以5 000 r/min离心后取含有目标序列的上清液10 μL，加入EXPAR体系中，并在37 ℃下反应。反应完成后，从体系中取50 μL反应液，然后与150 μL的

表 1 本研究中使用的寡核苷酸序列

Table 1 Sequences of the oligonucleotides used in this study

| 序列编号 | 序列名称 | 序列(5′—3′) | 序列大小/bp |
|---|---|---|---|
| 1 | Apt | GCAATGGTACGGTACTTCCTCGGCACGTTCTCAGTAGCGCTCGCTGGTCATCCCACAGCTAC GTCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA | 88 |
| 2 | cApt | TTAGCAAAGTAGCGTGCACT | 20 |
| 3 | HP | AGTGCACGCTACTTTGCTAACCTCAGCGTGCACT | 34 |
| 4 | TP1 | TCAGTGTGGAAAATCTCTAGCCCTCAGCAGTGCACG | 36 |
| 5 | TP2 | GTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCCCTCAGCAGTGCACG | 37 |
| 6 | TP3 | AGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCCCTCAGCAGTGCACG | 38 |
| 7 | TP4 | TAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCCCTCAGCAGTGCACG | 39 |
| 8 | TP5 | CTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCCCTCAGCAGTGCACG | 40 |
| 9 | 发夹P | CCCTTAATCCCCTGCTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGGGTGGGGTGGGGTGGGG | 58 |

2 μmol/L P-AgNCs混合。随后,将混合溶液转移至比色皿中,设定荧光分光光度计的激发波长为563 nm,在580~720 nm收集混合溶液的荧光信号,以准确评估相对荧光强度。以未添加金黄色葡萄球菌的混合溶液为空白对照组($F_0$)。相对荧光强度差值($\Delta F$)计算方法见式(1)。

$$\Delta F = F_0 - F \quad (1)$$

式中:

$\Delta F$——检测体系和空白对照组的相对荧光强度差值;

$F$——检测体系的相对荧光强度;

$F_0$——空白对照组的相对荧光强度。

1.3.5 检测条件的优化

按照1.3.4节的方法,用控制变量法对EXPAR时间(30、60、90、120、150 min),材料合成时间(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h),表1中的TP序列(TP1、TP2、TP3、TP4、TP5),靶标DNA与P-AgNCs的反应时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)进行优化,测定反应前后的相对荧光强度。

1.3.6 检测方法的灵敏度分析

对培养至对数期的金黄色葡萄球菌进行10倍梯度稀释,制备出$1\times10^2$、$1\times10^3$、$1\times10^4$、$1\times10^5$、$1\times10^6$ CFU/mL的金黄色葡萄球菌的菌悬液梯度样本,将不含金黄色葡萄球菌的样本作为空白对照组。在最优反应条件下,根据1.3.4节的方法进行试验,得到相对荧光强度差值与菌浓度的对数之间的线性关系,进而推导得到线性回归方程。每种浓度的菌悬液都进行3次平行试验。根据式(2)计算该方法的检测限。

$$D = 3\delta/\mathrm{K} \quad (2)$$

式中:

$D$——检测限;

$\delta$——相对标准偏差,计算方法见式(3);

K——校正曲线的斜率,即152.019。

1.3.7 检测方法的特异性分析

以大肠杆菌、铜绿假单胞菌、单核细胞增生李斯特菌、阪崎克罗诺杆菌等常见的食源性致病菌为对照。金黄色葡萄球菌的菌悬液浓度为$1\times10^7$ CFU/mL,其他几种菌的菌悬液浓度为$1\times10^8$ CFU/mL。最优反应条件下,根据1.3.4节的方法进行检测,记录体系的相对荧光强度。每种浓度的菌悬液都进行3次平行试验。

1.3.8 样品的测定

牛奶样品分析:用1×PBS缓冲液10倍稀释金黄色葡萄球菌(通过平板计数法计算菌悬液的浓度),得到金黄色葡萄球菌终浓度为$1\times10^2$、$1\times10^4$、$1\times10^6$ CFU/mL的牛奶加标样品。在最佳反应条件下,按照1.3.4节的方法,计算体系的相对荧光强度。每组试验都进行3次平行试验,分别按照式(3)~(4)计算相对标准偏差和回收率。

$$\delta = \frac{\sqrt{\dfrac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$\delta$——相对标准偏差;

$n$——平行样品数;

$i$——平行样品序号,$i$=1,2,3,…,$n$;

$x_i$——样品$i$的$\Delta F$;

$\bar{x}$——所有样品的$\Delta F$的平均值。

$$R=C_A/C_B\times100\% \quad (4)$$

式中：

$R$——回收率，%；

$C_A$——加标后菌的检测浓度，CFU/mL；

$C_B$——菌的加标浓度，CFU/mL。

猪肉样品分析：将5 g生猪肉研磨，并分散在5 mL 1×PBS缓冲液中，随后用0.22 μm的滤膜过滤，将滤液作为缓冲液稀释金黄色葡萄球菌悬液，得到终浓度为$1\times10^2$、$1\times10^4$、$1\times10^6$ CFU/mL的猪肉加标样品。在最佳反应条件下，按照1.3.4节的方法，计算体系的相对荧光强度。每组试验都进行3次平行试验，分别按照式(3)~(4)计算相对标准偏差和回收率。

1.3.9　数据分析

采用Origin 2021软件分析试验数据及处理图像。

## 2　结果与讨论

### 2.1　EXPAR-P-AgNCs的工作原理

EXPAR-P-AgNCs的工作原理见图1。适配体链(aptamer，Apt)与其互补链(C-aptamer，cApt)依据碱基配对法则紧密结合，构建了作为识别元件的双链探针结构。当金黄色葡萄球菌存在时，Apt序列对其具有强亲和性，能特异性识别金黄色葡萄球菌，并释放等量的cApt。HP与cApt杂交后被打开。打开的HP的3′端与TP部分杂交，互为模板和引物。然后，DNA聚合酶催化的聚合反应被激活并延伸形成双链DNA。由于延伸的双链比打开HP的双链更稳定，因此cApt会被取代并释放，被置换的cApt就可以打开另一个新的HP并启动下一个循环。同时，得到的双链DNA即HP和TP的延伸产物，均含有Nb.BbvCl剪切酶识别位点(5′-CCTCAGC-3′)，Nb.BbvCl剪切酶特异性识别并切割后，释放cApt类似物和发夹P触发序列，并生成大量的T。接着利用一段富G序列的发夹P作为模板，通过控制反应的温度、时间等条件，使得银离子聚集在DNA的特定部位形成AgNCs。当EXPAR产生的T与发夹P结合时，将打开发夹P，AgNCs和富G序列相互远离，AgNCs的荧光信号明显降低，以此来检测金黄色葡萄球菌。

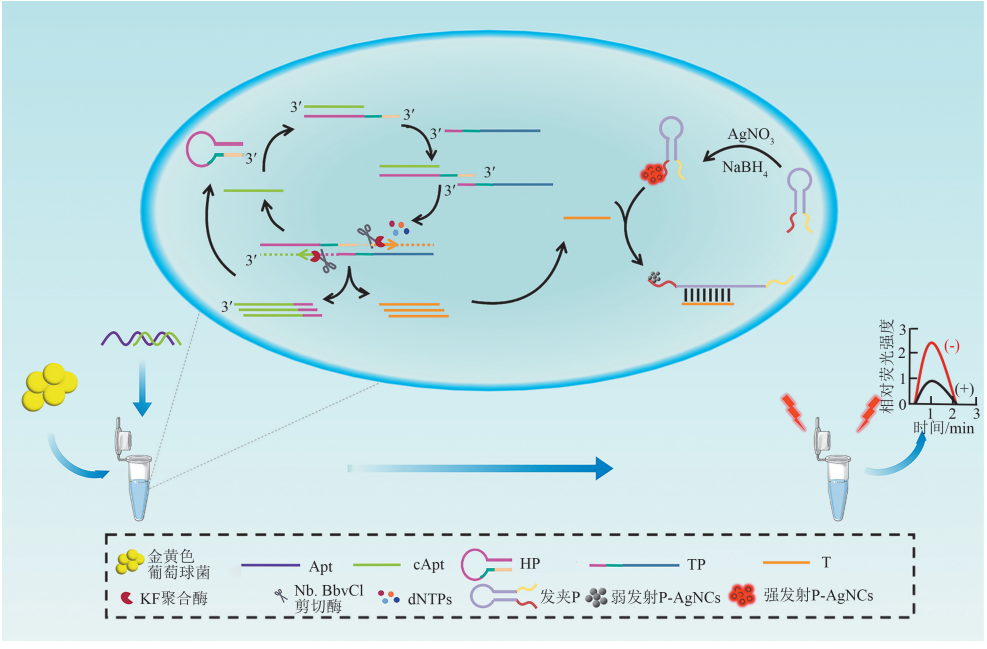



图1　EXPAR-P-AgNCs的工作原理图

Fig. 1　Schematic of EXPAR-P-AgNCs

### 2.2　P-AgNCs的表征

利用TEM对P-AgNCs进行形态与结构表征，所得结果见图2。在TEM下可以观察到P-AgNCs颗粒呈球形结构，对其进行粒径分析，结果见图3。粒径主要分布在2.0~3.0 nm，分散性较好。另外，通过紫外可见吸收光谱表征P-AgNCs的光学性质，结果见图4。P-AgNCs在近500 nm处有AgNCs的特征吸收峰，这是因为银离子的聚集导致

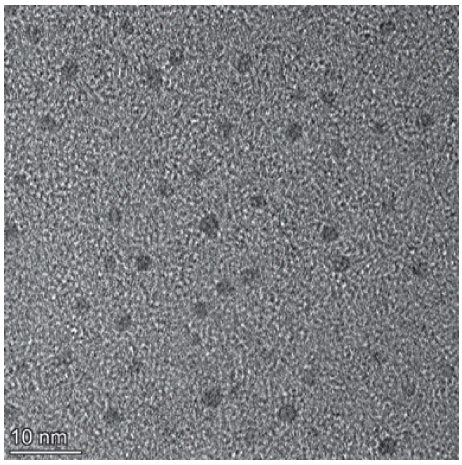



图 2　P-AgNCs 的 TEM 图

Fig. 2　TEM image of P-AgNCs

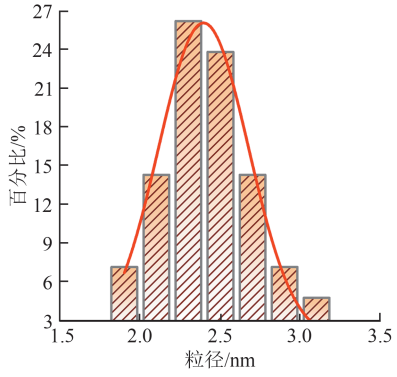



图 3　P-AgNCs 的粒径分布

Fig. 3　Particle size distribution of P-AgNCs

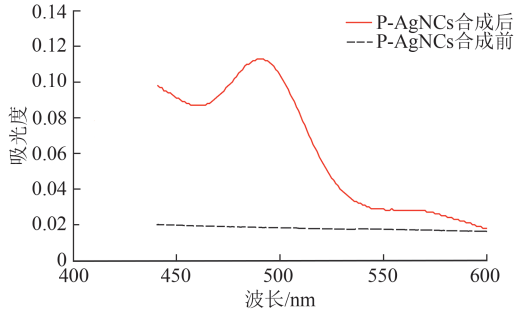


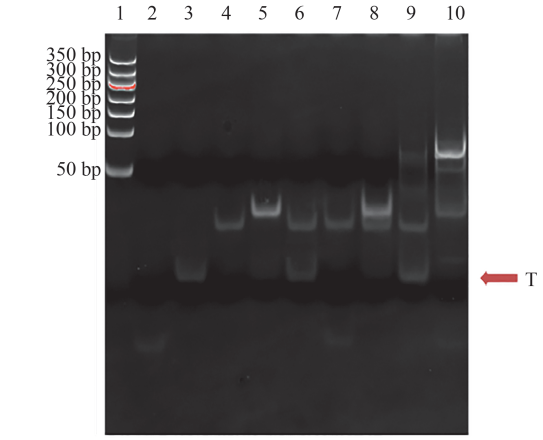

图 4　紫外可见吸收光谱图

Fig. 4　UV-Vis absorption spectra

形成了尺寸更大的 AgNCs，与现有的研究结果一致。以上结果均证明了 P-AgNCs 的成功合成。

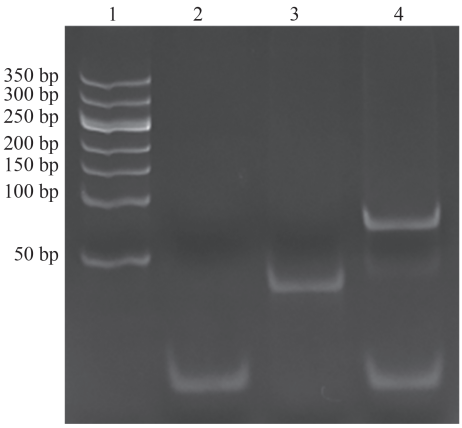
### 2.3　EXPAR 的可行性验证

为了验证 EXPAR 的可行性，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析，结果见图 5。图 5(a)的泳道 5 显示 cApt 与 HP 可发生反应，产生一条电泳迁移率较低的条带，表明 cApt 可以打开 HP 形成 cApt/HP 双链结构。并且，只有当 cApt、HP、TP、Nb.BbvCl 剪切酶、dNTPs、KF 聚合酶同时存在时，cApt 诱导 HP 打开，引发 EXPAR。同时聚合酶催化双链 DNA 形成，剪切酶在预设的酶切位点进行精准切割，从而产生电泳迁移率较高的产物 T（箭头所指）。另外，由图 5(b)可知，当 T 和发夹 P 同时存在时出现了一条新的条带，这表明 T 成功打开发夹 P，形成了 T-P 双链复合物。以上试验结果证明了 EXPAR 的可行性。




1—50 bp的DNA标记；2—cApt；3—HP；
4—TP；5—cApt+HP；6—HP+TP；7—cApt+TP；
8—cApt+HP+TP；9—HP+TP+Nb.BbvCl剪切酶+dNTPs+KF聚合酶；
10—cApt+HP+TP+Nb.BbvCl剪切酶+dNTPs+KF聚合酶。

(a) EXPAR的电泳结果




1—50 bp的DNA标记；2—T；3—发夹P；4—T+发夹P。

(b) 触发发夹反应的电泳结果

图 5　电泳结果

Fig. 5　Electrophoresis results

### 2.4　EXPAR-P-AgNCs 识别金黄色葡萄球菌的验证

该方法能否成功的关键在于适配体能否识别金黄色葡萄球菌。该方法对金黄色葡萄球菌检测有效性的验证结果见图 6。体系中金黄色葡萄球菌的引入明显降低了 P-AgNCs 的相对荧光强度，

证明适配体对目标菌可有效识别并随后触发EXPAR。这一结果表明，可利用EXPAR-P-AgNCs检测金黄色葡萄球菌。

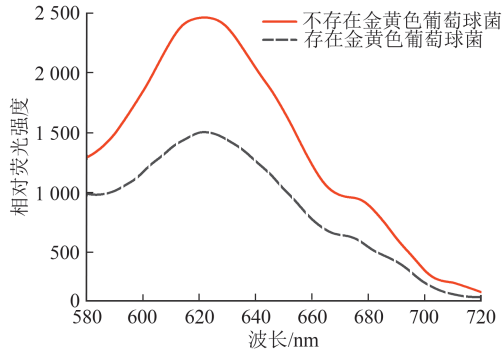



图6　基于EXPAR-P-AgNCs检测金黄色葡萄球菌的可行性

Fig. 6　Feasibility of *Staphylococcus aureus* detection based on EXPAR-P-AgNCs

## 2.5　EXPAR时间对EXPAR-P-AgNCs检测性能的影响

EXPAR时间会影响其扩增效率，从而影响EXPAR-P-AgNCs对金黄色葡萄球菌的检测性能。作者探究了EXPAR时间分别为30、60、90、120、150 min时，该方法对金黄色葡萄球菌的检测性能，结果见图7。当EXPAR时间为30~120 min时，随着反应周期的进行，目标序列的复制数迅速增加，呈现指数级增加，进一步导致扩增产物浓度急剧上升，从而引起$F$明显减弱，$\Delta F$增大。当EXPAR时间超过120 min，$F$趋于平稳，目标序列的复制数趋于饱和，并且非特异性反应增加，因此$\Delta F$呈下降趋势。因此，选择120 min作为EXPAR的时间。

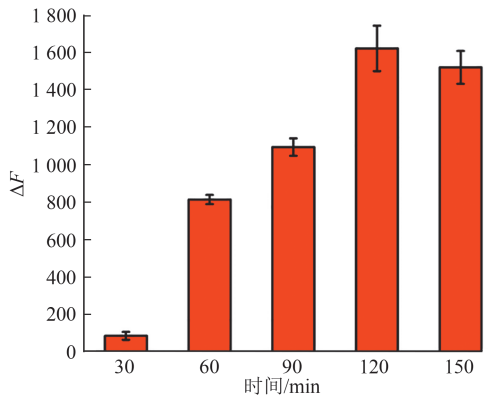
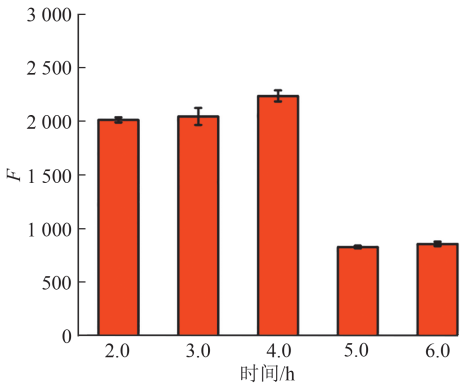



图7　EXPAR的时间优化

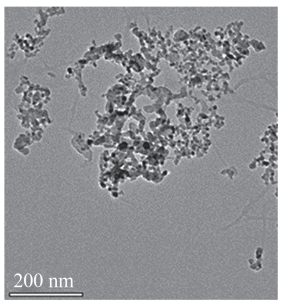
Fig. 7　Optimization of the reaction time of EXPAR

## 2.6　合成时间对P-AgNCs相对荧光强度的影响

P-AgNCs具有独特的荧光特性，它的合成需要一定的时间。随着时间的推移，团簇的形成程度逐渐增加，形貌和尺寸也会相应发生改变，从而影响其荧光性质。P-AgNCs的$F$随合成时间变化的规律见图8(a)。当P-AgNCs的合成时间为2.0~4.0 h时，P-AgNCs的聚合过程逐渐趋于完善，其相对荧光强度也随之逐渐增强。当合成时间为5.0~6.0 h时，P-AgNCs可能会出现过度聚集的现象，或者其表面缺陷增多，导致其相对荧光强度明显降低。合成时间为6.0 h时的P-AgNCs，其TEM观察结果见图8(b)，也证实了上述结论。因此，选取4.0 h作为P-AgNCs的最佳合成时间。




(a) P-AgNCs的相对荧光强度




(b) 合成时间为6.0 h的P-AgNCs的TEM图

图8　P-AgNCs的合成时间优化

Fig. 8　Optimization of the synthesis time of P-AgNCs

## 2.7　TP序列对EXPAR-P-AgNCs检测性能的影响

P-AgNCs的相对荧光强度受扩增产物(靶标DNA)的序列影响。因此通过优化TP序列，考察靶标DNA与发夹P的碱基配对数对P-AgNCs相对荧光强度的影响，结果见图9。当碱基配对数分别为21对(TP1序列)、22对(TP2序列)和23对(TP3序列)时，$\Delta F$逐渐增加；当碱基配对数为23

对（TP3 序列）时，Δ*F* 最大；当碱基配对数增加到 24 对（TP4 序列）和 25 对（TP5 序列）时，Δ*F* 逐渐降低。因此，选择 TP3 序列作为该方法的 TP 序列。

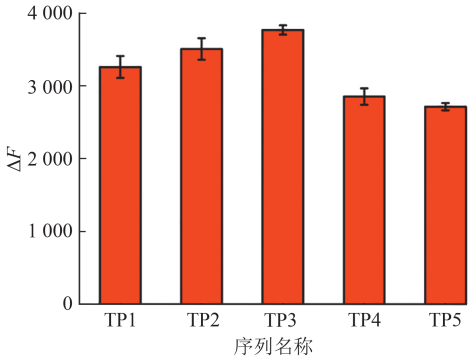



图 9　序列优化

Fig. 9　Sequence optimization

### 2.8　靶标 DNA 与 P-AgNCs 的反应时间对 EXPAR-P-AgNCs 检测性能的影响

P-AgNCs 与扩增产物（靶标 DNA）动态平衡的反应时间是检测体系的关键，分别探究了扩增产物与 P-AgNCs 反应时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 时体系的 Δ*F*，结果见图 10。在 0.5~1.5 h，随着反应时间的增加，Δ*F* 逐渐增加；当反应时间为 1.5 h 时，Δ*F* 最高；1.5 h 以后，Δ*F* 反而有所下降。因此，选择 1.5 h 作为扩增产物与 P-AgNCs 的最佳反应时间。

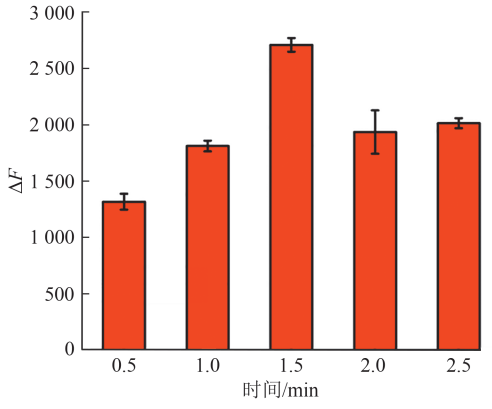


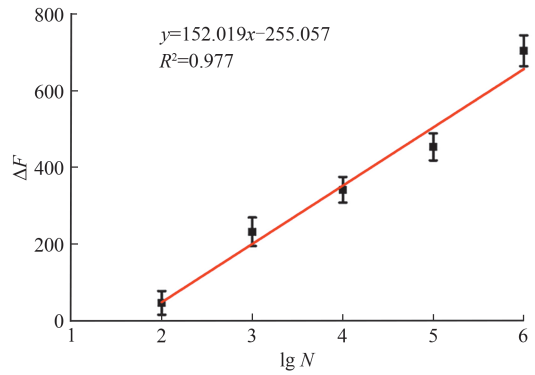

图 10　靶标 DNA 与 P-AgNCs 的反应时间优化

Fig. 10　Optimization of the reaction time between target DNA and P-AgNCs

### 2.9　性能分析

#### 2.9.1　EXPAR-P-AgNCs 对金黄色葡萄球菌的灵敏度分析

为了研究 EXPAR-P-AgNCs 检测金黄色葡萄球菌的灵敏度，利用该方法对不同浓度的金黄色葡萄球菌进行检测，结果见图 11。随着金黄色葡萄球菌的浓度增加，Δ*F* 逐渐增加，并且在 $1\times10^2$~$1\times10^6$ CFU/mL 时与菌浓度的对数值线性相关，回归方程为 $y=152.019x-255.057$，相关系数 $R^2$ 为 0.977。根据式（2）计算得出该方法的检测限为 10 CFU/mL。




*N*—菌浓度/(CFU/g)。

图 11　EXPAR-P-AgNCs 对不同浓度金黄色葡萄球菌的响应

Fig. 11　Response of EXPAR-P-AgNCs to different concentrations of *Staphylococcus aureus*

#### 2.9.2　EXPAR-P-AgNCs 对金黄色葡萄球菌的特异性分析

由图 12 可知，只有在金黄色葡萄球菌存在的情况下，Δ*F* 较大，这是因为适配体对金黄色葡萄球菌具有良好的特异性，从而降低了 P-AgNCs 的 *F*。当其他食源性致病菌存在时，*F* 没有明显变化。结果表明，该方法对金黄色葡萄球菌具有良好的特异性。

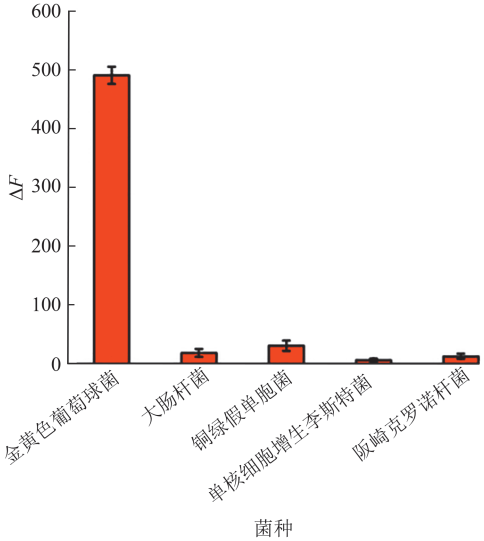



图 12　EXPAR-P-AgNCs 对金黄色葡萄球菌的特异性

Fig. 12　Specificity of EXPAR-P-AgNCs to *Staphylococcus aureus*

2.9.3 与其他荧光检测方法的比较

为了进一步考察该方法的检测性能，将其与类似的荧光检测金黄色葡萄球菌的方法进行对比，结果见表2，数据表明该方法检测限低、灵敏度高。

2.9.4 样品中金黄色葡萄球菌的检测

为验证该检测方法的精度与应用性能，采用牛奶与猪肉做了加标回收试验，掺入金黄色葡萄球菌使其浓度为$1\times10^2$、$1\times10^4$、$1\times10^6$ CFU/mL，按照1.3.4节进行检测，结果见表3。金黄色葡萄球菌在样品中的回收率为94.5%~115.0%，且相对标准偏差为4.2%~7.3%。此结果表明，该检测方法在实际应用中展现出优异的重现性、稳定性及实用性。

表2 金黄色葡萄球菌荧光检测方法对比

Table 2 Comparison of fluorescence detection methods for *Staphylococcus aureus*

| 方法 | 检测范围/（CFU/mL） | 检测限/（CFU/mL） | 参考文献 |
|---|---|---|---|
| 基于原子转移自由基聚合的荧光检测方法 | $1\times10^3$~$1\times10^8$ | 100 | ［21］ |
| 基于适配体-万古霉素-铜纳米簇的双重检测方法 | $1\times10^2$~$1\times10^8$ | 80 | ［22］ |
| 基于CRISPR/Cas12a整合侧流层析的荧光检测方法 | — | 540 | ［23］ |
| 基于多色时间分辨荧光纳米粒子的荧光检测方法 | $1\times10^2$~$1\times10^5$ | 20 | ［24］ |
| 本研究 | $1\times10^2$~$1\times10^6$ | 10 | — |

注：“—”表示无。

表3 样品中金黄色葡萄球菌的检测结果

Table 3 Detection results of *Staphylococcus aureus* in samples

| 样品 | 添加的菌浓度/（CFU/mL） | 检测浓度/（CFU/mL） | 回收率/% | 相对标准偏差/% |
|---|---|---|---|---|
| 牛奶 | $1\times10^2$ | $1.15\times10^2$ | 115.0 | 7.3 |
| | $1\times10^4$ | $1.01\times10^4$ | 101.0 | 4.5 |
| | $1\times10^6$ | $9.45\times10^5$ | 94.5 | 6.5 |
| 猪肉 | $1\times10^2$ | $9.50\times10^1$ | 95.0 | 4.2 |
| | $1\times10^4$ | $1.03\times10^4$ | 103.0 | 5.1 |
| | $1\times10^6$ | $1.05\times10^6$ | 105.0 | 6.2 |

## 3 结论

开发了一种基于EXPAR结合P-AgNCs的检测方法，旨在高效检测金黄色葡萄球菌。通过TEM、紫外可见吸收光谱、粒径分析等技术，对P-AgNCs的结构与形态进行了表征与解析，证明P-AgNCs呈球形结构。该方法将恒温扩增技术及纳米技术相结合，有较高的灵敏度，线性响应范围为$1\times10^2$~$1\times10^6$ CFU/mL，检测限达10 CFU/mL。另外，该检测方法对金黄色葡萄球菌有较高的特异性，并可用于牛奶、猪肉样品中金黄色葡萄球菌的检测，回收率为94.5%~115.0%。该研究不仅拓宽了基于DNA模板的AgNCs作为内源性荧光探针在无标记光学检测病原菌领域的应用视野，还为未来相关研究提供了重要启示。

## 参考文献


［1］谭慧林，吴忠红，金永生，等. 食品中金黄色葡萄球菌的快速检测及其评估[J]. 新疆农业科学，2022，59（2）：410-416.
TAN H L，WU Z H，JIN Y S，et al. Determination of *Staphylococcus aureus* in food and evaluation of the fast kit [J]. Xinjiang Agricultural Sciences，2022，59（2）：410-416.（in Chinese）

［2］伊廷存，胡梅，霍胜楠，等. 基于核酸等温扩增技术金黄色葡萄球菌检测的研究进展[J]. 中国酿造，2023，42（9）：26-31.
YI T C，HU M，HUO S N，et al. Research progress on the detection of *Staphylococcus aureus* based on nucleic acid isothermal amplification technology[J]. China Brewing，2023，42（9）：26-31.（in Chinese）

［3］DAI J H，LI J T，JIAO Y，et al. Colorimetric-SERS dual-mode aptasensor for *Staphylococcus aureus* based on $MnO_2$@AuNPs oxidase-like activity[J]. Food Chemistry，2024，456：139955.

［4］LI Z B，XU H W，FENG Q M，et al. Two-step förster resonance energy transfer amplification for ratiometric detection of pathogenic bacteria in food samples[J]. Food Chemistry，2023，404（Pt A）：134492.

［5］HENNEKINNE J A，DE BUYSER M L，DRAGACCI S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins：characterization and outbreak investigation [J]. FEMS Microbiology Reviews，2012，36（4）：815-836.

［6］RAJKOVIC A，JOVANOVIC J，MONTEIRO S，et al. Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria[J]. Comprehensive Reviews in

Food Science and Food Safety，2020，19(4)：1605-1657.

[7] 周巍，张薇，刘亮，等. 环介导等温扩增技术检测酸乳中蜡样芽孢杆菌[J]. 乳业科学与技术，2013，36(5)：29-31.
ZHOU W，ZHANG W，LIU L，et al. Detection of *Bacillus cereus* in yogurt by loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Journal of Dairy Science and Technology，2013，36(5)：29-31.(in Chinese)

[8] LIN X Y，FANG M，YI C Y，et al. Functional hydrogel for fast，precise and inhibition-free point-of-care bacteria analysis in crude food samples[J]. Biomaterials，2022，280：121278.

[9] 袁长婧. 基于3D DNA步行器与指数扩增的恒温传感新方法构建及其应用研究[D]. 重庆：中国人民解放军陆军军医大学，2022.

[10] 杨玉琦，何秀霞. 滚环扩增技术在电化学生物传感器中的应用[J]. 生物技术进展，2023，13(6)：863-867.
YANG Y Q，HE X X. Application of rolling circle amplification technique in electrochemical biosensors[J]. Current Biotechnology，2023，13(6)：863-867.(in Chinese)

[11] XIE X L，CHENG X X，DONG J，et al. Visual assay for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on rolling circular amplification triggering G-quadruplex/hemin DNAzyme proximity assembly[J]. Analytical Chemistry，2023，95(5)：3098-3107.

[12] LIU J X，CHEN P，HU X L，et al. An ultra-sensitive and specific nanoplasmonic-enhanced isothermal amplification platform for the ultrafast point-of-care testing of SARS-CoV-2[J]. Chemical Engineering Journal，2023，451(4)：138822.

[13] 张蕾，陈亮，江波涛，等. 重组酶聚合酶扩增技术在动物病原菌检测中的应用进展[J]. 动物医学进展，2024，45(1)：89-94.
ZHANG L，CHEN L，JIANG B T，et al. Progress on application of recombinase polymerase amplification technology for detection of animal pathogenic bacteria[J]. Progress in Veterinary Medicine，2024，45(1)：89-94.(in Chinese)

[14] 马克，廖栩捷，徐景辉，等. 催化发夹自组装(CHA)优化的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报，2024，10：1287-1297.
MA K，LIAO X J，XU J H，et al. Research progress of catalytic hairpin self-assembly (CHA) optimization[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University，2024，10：1287-1297.(in Chinese)

[15] 王瑞安，杜再慧，康帅帅，等. 基于杂交链式反应扩增检测奶粉中阪崎肠杆菌的适配体磁珠荧光传感器[J]. 食品科学，2024，45(1)：191-197.
WANG R A，DU Z H，KANG S S，et al. Aptamer-functionalized magnetic bead-based fluorescence sensor for the detection of *Cronobacter sakazakii* in milk powder using hybridization chain reaction amplification[J]. Food Science，2024，45(1)：191-197.(in Chinese)

[16] 李敬文. 基于银纳米簇和核酸等温扩增策略的microRNA检测[D]. 济南：济南大学，2022.

[17] WANG X Y，TIAN Y H，GAO X L，et al. A novel fluorescence sensor for streptomycin detection based on hairpin DNA-AgNCs and core-shell gold-palladium nanoparticles[J]. Sensors and Actuators B：Chemical，2022，373：132735.

[18] LIU Y，HUSSAIN M，WANG C Q，et al. Programmable DNA templates for silver nanoclusters synthesis to develop on-demand FRET aptasensor[J]. Analytical Chemistry，2024，96(25)：10391-10398.

[19] GWINN E，SCHULTZ D，COPP S M，et al. DNA-protected silver clusters for nanophotonics[J]. Nanomaterials，2015，5(1)：180-207.

[20] CAO Q，TENG Y，YANG X，et al. A label-free fluorescent molecular beacon based on DNA-Ag nanoclusters for the construction of versatile biosensors[J]. Biosensors and Bioelectronics，2015，74：318-321.

[21] WANG Z J，MA N，ZHANG J，et al. Bacteria-instructed synthesis of free radical polymers for highly sensitive detection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Analytica Chimica Acta，2024，1329：343259.

[22] BAGHERI A P，MOUSAVIZADEGAN M，HOSSEINI M. Sensitive detection of *S. aureus* using aptamer- and vancomycin-copper nanoclusters as dual recognition strategy[J]. Food Chemistry，2021，361：130137.

[23] ZHOU B Q，YE Q H，LI F，et al. CRISPR/Cas12a based fluorescence-enhanced lateral flow biosensor for detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Sensors and Actuators B：Chemical，2022，351：130906.

[24] WANG X L，HUANG Y K，WU S J，et al. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* using multicolor time-resolved fluorescence nanoparticles as labels[J]. International Journal of Food Microbiology，2016，237：172-179.

（责任编辑：金文苑）