

生化与药用试剂

基于 ST-6-2 核酸适配体的显色探针用于快速检测新冠病毒 S 蛋白

王新妍¹, 朱鹤², 嘎鲁^{*1}, 爱军^{*2}

(1. 内蒙古医科大学 药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110;

2. 内蒙古师范大学 化学与环境科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010022)

摘要: 基于 ST-6-2 核酸适配体与金纳米颗粒 (AuNPs), 构建了一种用于快速检测新冠病毒 S 蛋白的比色生物传感器。采用柠檬酸钠还原氯金酸法制备粒径均匀的 AuNPs, 通过圆二色光谱验证适配体与 S 蛋白的结合构象变化。比较了冷冻解冻法、盐老化法和低 pH 法 3 种 DNA 与 AuNPs 的偶联策略, 以 UV-Vis 光谱评估偶联效果, 确定低 pH 法为最优方案。将巯基修饰的 cDNA 和 Poly T 共价偶联至 AuNPs 表面, 制备显色探针 (AuNPs@SH-DNA)。基于竞争性侧向流层析原理, 组装试纸条, 用于 S 蛋白的可视化检测。实验结果表明, 该传感器对 S 蛋白具有良好的信号响应, 可实现快速、低成本、便携式检测。该比色传感器平台为新冠病毒的即时检测提供了新方案, 在疫情筛查和分散式诊断中具有应用潜力。

关键词: 金纳米颗粒; 核酸适配体; 新冠病毒 S 蛋白; 比色传感器; 侧向流层析

中图分类号: O629.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2026)05-0032-07

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2026.0074

Colorimetric Probe Based on ST-6-2 Aptamer for Rapid Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein WANG Xin-yan¹, ZHU He², GA Lu^{*1}, AI Jun^{*2} (1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. College of Chemistry and Environmental Science, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China)

Abstract: A colorimetric biosensor based on ST-6-2 aptamer and gold nanoparticles (AuNPs) was developed for the rapid detection of the SARS-CoV-2 spike protein. AuNPs with uniform particle size were synthesized using the sodium-citrate reduction method, and the binding conformational change between the aptamer and the spike protein was verified via circular dichroism spectroscopy. Three conjugation strategies for the DNA functionalization of AuNPs, namely the freeze-thaw, salt-aging, and low-pH methods, were compared. The conjugation efficiency was evaluated based on UV-Vis absorption spectra, and the low-pH method was identified as the optimal strategy. A colorimetric probe (AuNPs@SH-DNA) was constructed by covalently coupling thiol-modified cDNA and Poly T to the surface of AuNPs. Based on the principle of competitive lateral-flow chromatography, a test strip was assembled for the visual detection of the spike protein. Experimental results showed that the sensor exhibited favorable signal response toward the spike protein, thus enabling rapid, low-cost, and point-of-care detection. This colorimetric aptasensor platform provides a novel solution for the point-of-care testing of SARS-CoV-2 and demonstrates significant potential for epidemic screening and decentralized diagnostics.

Key words: gold nanoparticles; aptamer; SARS-CoV-2 spike protein; colorimetric sensor; lateral flow chromatography

新冠肺炎 (COVID-19) 是由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 引起的急性呼吸道传染病, 自 2019 年底暴发以来, 已对全球公共卫生、经济和社会生活造成深远影响^[1,2]。SARS-CoV-2 属于冠状病毒科 β 属, 其表面分布有刺突蛋白 (Spike protein, S 蛋白)、包膜蛋白、膜蛋白和核衣壳蛋白 4 种结构蛋白。其中, S 蛋白以三聚体形式形成“王冠”状结构, 介导病毒与宿主细胞受体的结合。具体而言, S 蛋白的 S1 亚基通过受体结合结构域 (RBD) 识别宿主细胞表面的血管紧张素转换酶 II (ACE2), 随后 S2 亚基促进病毒包膜与细

胞膜的融合, 完成入侵过程^[3,4]。因此, S 蛋白不仅是病毒感染的关键分子, 也是机体免疫应答的主要靶点, 其序列变异直接关联病毒的传染性

收稿日期: 2026-03-23; **修回日期:** 2026-04-14; **接收日期:** 2026-04-15

基金项目: 国家自然科学基金区域联合基金项目 (U25A200831); 国家自然科学基金项目 (82160652)。

作者简介: 王新妍 (1999-), 女, 山东淄博人, 硕士生, 主要研究方向为小分子药物合成。

通讯作者: 嘎鲁, E-mail: 13404832082@163.com; 爱军, E-mail: imacaj01@163.com。

和免疫逃逸能力。快速、准确地检测 S 蛋白,对于早期诊断、疫情监测及变异株筛查具有重要意义^[5-7]。

目前,SARS-CoV-2 检测主要依赖实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR),该方法通过扩增病毒 ORF1ab、N 或 E 基因片段实现高灵敏检测,是临床确诊的金标准。然而,RT-qPCR 需要专业实验室、热循环仪器和训练有素的技术人员,检测时长通常为 2~4 h,难以满足基层社区、口岸、家庭等场景下的即时检测需求^[2,4]。抗原检测(如胶体金免疫层析法)操作简便、快速(15~20 min),适合大规模筛查,但其灵敏度相对较低,存在窗口期,易出现假阴性。基于 CRISPR/Cas 系统的检测技术(如 DETECTR、SHERLOCK)结合试纸条可实现可视化快速检测,灵敏度较高,但目前仍处于临床验证阶段,且部分体系需要预扩增步骤。病毒分离培养耗时数天,仅适用于科研^[2]。因此,开发一种快速、低成本、便携、无需复杂仪器的 S 蛋白检测新方法,是当前 COVID-19 防控技术的重要补充方向^[8]。

核酸适配体(Aptamer)是通过指数富集的配体系统进化技术(SELEX)从随机文库中筛选获得的单链 DNA 或 RNA 分子,能够折叠成特定的二级或三级结构,通过氢键、疏水相互作用、范德华力等与靶标高亲和力、高特异性结合。相较于传统抗体,适配体具有可化学合成,批间差异小,成本低廉;热稳定性好,可反复变复性,便于储存和运输;易于进行巯基、生物素等化学修饰,便于固定和信号标记;靶标范围广,包括小分子、毒素、蛋白质甚至完整细胞等显著优势^[9-11]。这些特性使适配体成为生物传感器领域中理想的识别元件^[12,13]。针对 SARS-CoV-2 S 蛋白,Wang 等^[14]筛选获得了一条名为 ST-6-2 的适配体,其平衡解离常数(Kd)为 80.22 nmol/L,表现出良好的亲和力,为本研究提供了关键识别元件。

金纳米颗粒(AuNPs)具有独特的局域表面等离子体共振(LSPR)特性^[8,15]。当 AuNPs 分散良好时,溶液呈酒红色,在 520 nm 附近有单一吸收峰,当 AuNPs 发生聚集或因表面修饰导致局部介电环境改变时,吸收峰红移,溶液颜色变为蓝紫色或紫红色。这种肉眼可辨的颜色变化使得 AuNPs 成为比色传感器的理想信号标签。通过 Au-S 共价键将巯基修饰的 DNA 探针固定在 AuNPs 表面,可构建稳定的显色探针^[8,15,16]。然而,DNA 磷

酸骨架带负电,与同样带负电的柠檬酸根保护 AuNPs 之间存在静电排斥,因此需要优化偶联条件^[17]。目前常用的偶联策略包括盐老化法、冷冻-解冻法和低 pH 法,不同方法在偶联效率、稳定性和操作便捷性上各有优劣,系统比较这 3 种方法对 AuNPs-DNA 探针制备的指导意义尚不充分^[15]。

本文旨在基于 ST-6-2 适配体,结合 AuNPs 比色信号放大,构建一种用于快速检测新冠病毒 S 蛋白的显色探针,并系统比较 3 种 AuNPs-DNA 偶联策略,确定最优制备方案。

本检测体系的核心是竞争性侧向流层析原理。显色探针(AuNPs@SH-DNA)由 AuNPs 表面共价偶联两条 DNA 链构成。一条是与 ST-6-2 适配体部分互补的巯基化 cDNA(SH-cDNA),另一条是辅助稳定巯基化 Poly T(SH-Poly T)。同时,试纸条的检测线(T 线)上固定有生物素化的 DNA 序列(DNA-TL),该序列与 ST-6-2 适配体另一区域互补。质控线(C 线)固定有链霉亲和素(SA),用于捕获生物素标记的对照分子。

当不存在 S 蛋白时,ST-6-2 适配体与显色探针混合后,适配体通过碱基互补配对与 cDNA 结合,从而被锚定在 AuNPs 表面。将该混合物滴加至试纸条样品垫,在层析作用下,适配体-显色探针复合物移动至 T 线,适配体上的另一区域与 T 线固定的 DNA-TL 杂交,从而将 AuNPs 富集在 T 线,显示红色条带。同时,部分未结合或游离的 AuNPs 继续泳动至 C 线,被 SA 捕获,C 线亦显红色。

当存在 S 蛋白时,ST-6-2 适配体优先与 S 蛋白高亲和力结合,形成适配体-S 蛋白复合物。该复合物占据了适配体与 cDNA 互补的区域,使得适配体无法再与显色探针上的 cDNA 杂交。因

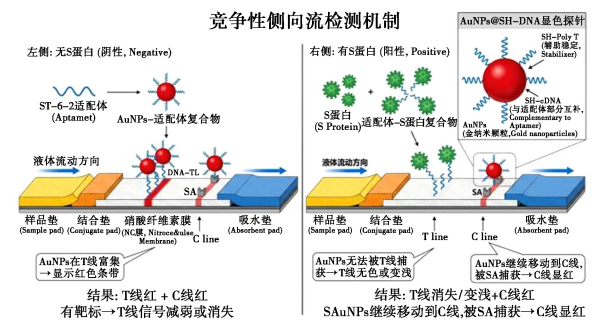


图 1 竞争性侧向流层析原理设计显色探针意图

Fig.1 Design intention of a colorimetric probe based on the principle of competitive lateral flow chromatography

此, AuNPs 表面未能携带适配体, 当层析至 T 线时, 无法被 DNA-TL 捕获, T 线不显色或显色减弱, 而 C 线由于 SA 捕获机制不受影响, 仍显红色。通过 T 线红色信号的有无或强度, 即可定性或半定量判断 S 蛋白的存在, 如图 1 所示。

该策略实现了“有靶标→T 线信号消失”的竞争型检测模式, 可有效避免假阳性, 并可通过调节适配体与 cDNA 的比例来调控检测灵敏度。

本研究中, 首先采用圆二色光谱验证 ST-6-2 适配体与 S 蛋白的结合构象变化。其次, 通过柠檬酸钠还原氯金酸法制备粒径均一的 AuNPs, 并优化浓缩条件。然后, 比较冷冻-解冻法、盐老化法和低 pH 法 3 种偶联策略, 筛选出最佳方案制备显色探针。最后, 组装侧向流试纸条, 对 S 蛋白进行检测, 初步评估传感器的响应性能。该比色传感器平台为新冠病毒 S 蛋白的快速、低成本、可视化检测提供了新的技术方案, 有望应用于基层筛查和即时检测。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

UV2600 型紫外分光光度计(日本高新技术有限公司); Super Mini Dancer 型调速型迷你离心机(生工生物工程(上海)股份有限公司); ST2100 型 pH 计(奥豪斯仪器(常州)有限公司); TLE204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); EQ-100DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); W31 型多头磁力加热搅拌器(国华(常州)仪器制造有限公司); JEOL-2100F 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); J-815 型圆二色光谱仪(日本分光株式会社)。

四氯金酸(HAuCl_4 , 分析纯, 上海皓鸿生物医药科技有限公司); 蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)、柠檬酸三钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 氯化钠(NaCl , 分析纯, 天津市北联精细化学品开发有限公司); 牛血清白蛋白(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP, $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_6 \cdot \text{HCl}$, 分析纯, 北京华中海威基因科技有限公司); 浓盐酸(HCl , 分析纯, 成都市科隆化学品有限公司); 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 分析纯, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(分析纯, 北京博尔西科技有限公司)。所用试剂均为分析纯。

SARS-CoV-2 刺突蛋白适配体 ST-6-2 序列(5'-GGGGAGGGCGGGTGGATTGGATGCCGA-3') 源于 Yang 等^[3] 研究, 表观解离常数为 80.22 nmol/L。本实验使用的引物由 Sangon 公司合成并纯化, 具体序列如表 1 所示。

表 1 实验所用适配体

Tab.1 Oligonucleotide sequences of aptamers used in this study

名称	碱基序列
ST-6-2	5'-GGGGAGGGCGGGTGGATTGGATGCCGA-3'
cDNA	CGCCCTCCCC-SH
DNA _{TL}	GGGGAGGGCGG-biotin
Poly T	TTTTTTTTTTTTTT-SH
DNACL(Poly A)	AAAAAAAAAAAAAAAA-biotin

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 探针的制备

圆二色光谱(CD)可以应用于核酸、蛋白质、多糖等生物大分子的分析, 通过测量分子左右圆偏振光之间的吸收差异, 揭示分子构象的细微变化和二级结构特征, 为深入了解核酸适配体与目标分子的作用机制提供理论依据^[12]。分别在新冠病毒 S 蛋白冻干粉和适配体 ST-6-2 储备液中加入超纯水, 使其溶解, 配制成 500 ng/mL 的 S 蛋白溶液和 10 $\mu\text{mol/L}$ 适配体溶液, 并将两种溶液混合反应 30 min。

分别取适配体 ST-6-2 和混合溶液加入比色皿中, 在相同条件下用圆二色光谱仪(扫描范围 200~400 nm, 扫描速率 100 nm/min, 光程 1 mm) 进行扫描, 每个样品平行测定 3 次。

1.2.2 显色探针(AuNPs@SH-DNA)的制备

1.2.2.1 AuNPs 的合成

AuNPs 的合成采用柠檬酸钠还原氯金酸法(Frens 法)。准确称取 0.10 g 氯金酸(HAuCl_4), 溶于 100 mL 超纯水中, 配制成质量浓度为 0.1% 的储备溶液, 转移至棕色试剂瓶中, 避光冷藏保存。另称取 1.00g 柠檬酸三钠, 溶于 100 mL 超纯水中, 配制成质量浓度为 1.0% 的溶液备用。

取 5 mL 上述配制的 HAuCl_4 储备液, 用超纯水稀释 10 倍, 得到 0.01% 的工作溶液, 并在 500 r/min 搅拌下加热至 90 $^{\circ}\text{C}$, 快速一次性加入 5 mL 上述配制柠檬酸钠(1.0%) 溶液, 快速搅拌下继续加热反应 10 min。当溶液颜色变为酒红色后, 停止加热, 搅拌速度调至 300 r/min, 冷却至室温, 获得胶体金溶液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2.2 AuNPs 与 DNA 探针的偶联

AuNPs 与巯基化 DNAs 之间通过 Au-S 共价键链接,由于磷酸骨架结构带负电荷,所以 DNA 引物与 AuNPs 结合困难。因此,AuNPs 表面修饰 SH-DNA 的关键一步是缩短 DNA 与 AuNPs 的间距^[5,18]。本文通过 3 种方法将 AuNPs 与 DNA 探针进行偶联。

(1) 冷冻-解冻法

Jing 等^[19]提出了 DNA 功能化 AuNPs 的新方法,即在超局部反应体积中发生化学共价反应交联,采用冰冻的方法减小反应的空间,从而增大反应物的浓度。结冰是一种物理现象,当气温下降时,水分子会慢慢凝结成冰晶,AuNPs、DNA 和盐分等会被迁移到“微囊”内,导致加速 DNA 的附着,提高 AuNPs 与 DNA 的结合力。

具体实验方法为在离心管中分别加入 50 μL (5 $\mu\text{mol/L}$) 的 SH-cDNA 与 SH-Poly T、20 μL (5 mmol/L) 的 TCEP,活化 30 min,加入 1000 μL AuNPs 溶液(1.2.2.1 中制备),置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境冷冻 14 h 后于室温下解冻。

(2) 盐老化法

盐老化法核心是将结构稳定且带负电荷的柠檬酸根离子引到 AuNPs 表面,为了减弱与 AuNPs 的电荷排斥,加入盐溶液^[15]。将高浓度的盐溶液加入到 AuNPs 和 DNA 的混合体系中,降低其扩散层的厚度,削弱 AuNPs 和 DNA 之间的排斥力,以此实现 AuNPs 与 DNA 探针偶联成功^[17]。

准确称取 0.2338 g 的 NaCl 固体,用超纯水配制 0.2 mol/L 溶液,微孔滤膜过滤,备用。在离心管中分别加入 50 μL (5 $\mu\text{mol/L}$) 的 SH-cDNA 与 SH-Poly T、20 μL (5 mmol/L) 的 TCEP,孵育 30 min,加入 1000 μL AuNPs,静置 24 h 后每隔 2 h 向溶液中加入适量 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液,加入 3 次,最终使体系中 NaCl 浓度为 50 mmol/L。

(3) 低 pH 法

有研究发现降低溶液的 pH 值可以显著加快 DNA 吸附速度。利用腺嘌呤 ($\text{pK}_a = 3.5$) 在柠檬酸钠 (pH 3.0) 中生成质子,降低 DNA 负电性,实现 AuNPs 与 SH-DNA 的快速偶联^[20]。低 pH (高浓度 H^+) 和盐在 DNA 附着过程中具有协同作用,只将 pH 调整到 3.0,而不加入其它的盐, DNA 会在初始时被吸附于 AuNPs,但进一步的吸附会受阻,加入盐,则加快进一步的吸附。500 mmol/L

柠檬酸钠-盐酸缓冲液含有 1500 mmol/L Na^+ 。因此,当 pH 3.0 时 H^+ 与 Na^+ 产生协同作用。此外,部分柠檬酸根离子也发生质子化,降低 AuNPs 与 DNA 间的电荷斥力,有利于 DNA 的快速附着^[15]。

准确称取 14.7050 g 的柠檬酸三钠固体,用超纯水配制 500 mmol/L 的溶液,并用盐酸制成 pH 3 的 500 mmol/L 的柠檬酸钠-盐酸缓冲液,微孔滤膜过滤,备用。在离心管中分别加入 50 μL (5 $\mu\text{mol/L}$) 的 SH-cDNA 与 SH-Poly T、20 μL (5 mmol/L) 的 TCEP,活化 30 min,加入 1000 μL AuNPs (1.2.2.1 中制备),孵育 10 min,加入适量柠檬酸钠-盐酸缓冲液,使其浓度为 10 mmol/L,孵育 3 min,用 1 mol/L HEPES (pH 7.6) 将体系 pH 调至中性。

1.2.3 试纸条的组装

常规的试纸条的制造流程包括多个步骤,涉及喷膜、干燥、组装、切条等工艺,对设备要求较高。本文选购了为正生物抗原抗体试剂盒,通过改装用于新冠病毒 S 病毒的检测,改装后,干燥避光备用。

1.2.4 检测突变蛋白

量取 3 μL (100 $\mu\text{mol/L}$) biotin-DNA_{TL} 和 3 μL (2 mg/mL) 链霉亲和素 (SA) 储存液,加入 60 μL PBS 缓冲液,稀释 10 倍,室温孵育 1 h,制得检测线 (T 线) 溶液。称取 2.0 g 蔗糖、1.0 g 牛血清白蛋白 (BSA) 及 500 μL Tween-80,配制成运行缓冲液。将 S 蛋白储备液用超纯水稀释,保证最终浓度为 13 $\mu\text{g/mL}$ 。将 S 蛋白储备液用超纯水稀释至终浓度 13 $\mu\text{g/mL}$,与 ST-6-2 适配体混合活化 30 min,得到样品液。随后,在探针垫上加入 5 μL AuNPs@SH-DNA,并在硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上涂布适量 T 线溶液,烘干备用。最后,将样品液与运行缓冲液混合,滴加至样品垫,观察显色情况。

2 结果与讨论

2.1 DNA 探针表征

圆二色谱测量结果如图 2 所示,ST-6-2 适配体在 262 nm 处呈现正峰,在 241 nm 处呈现负峰。与 S 蛋白结合后,ST-6-2 的正峰和负峰强度均减小。其中,正负峰减小表明右/左旋光性均减弱,该变化归因于适配体与靶标蛋白之间的产生相互作用^[5]。

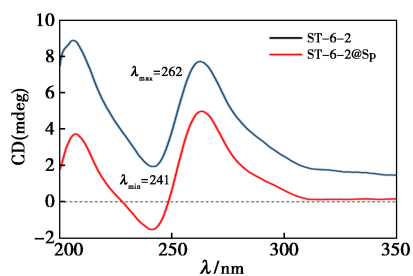


图 2 ST-6-2、ST-6-2 和 S 蛋白复合物的圆二色光谱图
Fig.2 Circular dichroism spectra of ST-6-2 aptamer and ST-6-2@Sp protein complex

2.2 AuNPs 的表征

2.2.1 不同浓度 HAuCl_4 对 AuNPs 的影响

紫外可见光谱测定结果如图 3 所示,所制备 AuNPs 的最大吸收波长约为 520 nm 处,是纳米金颗粒的特征吸收峰。而且 HAuCl_4 的浓度直接影响 AuNPs 的制备效率,0.1% 的 HAuCl_4 储备液稀释 8 倍时产物效果优于稀释 10 倍的产物,如图 3 所示。

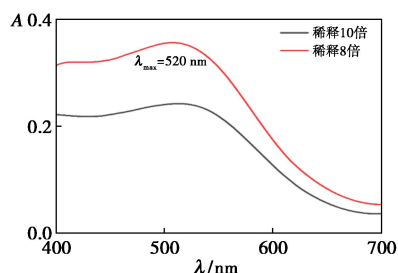
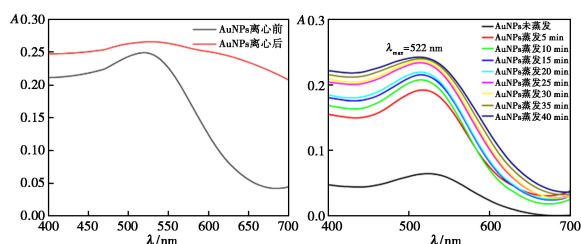


图 3 AuNPs 紫外-可见光吸收光谱图
Fig.3 UV-Vis absorption spectrum of AuNPs

2.2.2 浓缩时间对 AuNPs 的影响

较高浓度的 AuNPs 才能够有效与 DNA 偶联。离心浓缩法虽然可以增加 AuNPs 的浓度,但是,导致 AuNPs 发生严重团聚,无法满足后期与 DNA 的偶联,如图 4a 所示。本文采用蒸发浓缩方法,以蒸发时间(5~40 min)对其浓缩时间进行研究。如图 4b 所示,蒸发 30 min 时,获得的 AuNPs 效果最佳。



a. 离心法; b. 不同时间蒸发法

图 4 紫外-可见光吸收光谱图

Fig.4 UV-Vis absorption spectra

2.2.3 AuNPs 的 TEM 及合成过程的颜色变化

透射电镜实验结果显示,所制得的 AuNPs 为粒径大小约 30 nm 左右的均匀分散颗粒,而且明显观察到 $d = 0.23$ nm 的晶格,如图 5a,图 5b 所示。所制得的 AuNPs 溶液呈现酒红色,并显示出很好的透明度。向 8 倍稀释的 0.1% HAuCl_4 溶液中加入 0.1% 柠檬酸钠溶液后溶液颜色由无色变为酒红色,并且随着加热时间延长颜色变深,如图 5c 所示。这种颜色变化可能与局域表面等离子体共振 (LSRP) 有关。当 AuNPs 被入射光激发时,自由电子远离平衡位置的相干振荡, AuNPs 可以吸收或散射一定波长的光线,从而使溶液呈现酒红色^[8]。

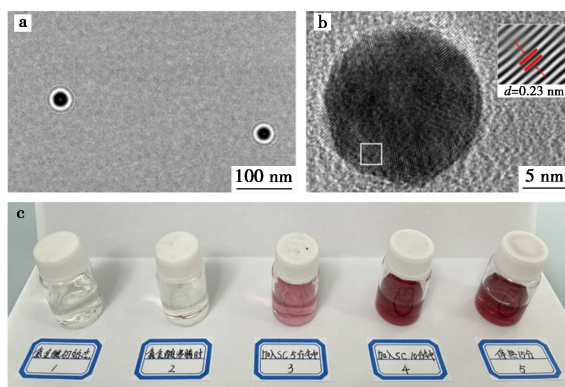


图 5 AuNPs 的 TEM 图(a,b); c. AuNPs 合成过程的颜色变化(1,2.常温 HAuCl_4 和加热至 90 °C 的 HAuCl_4 ; 3,5.加入柠檬酸钠溶液 5、10、15 min)

Fig.5 TEM images of AuNPs(a,b); c. Color changes during the synthesis of AuNPs (1,2. HAuCl_4 at room temperature and HAuCl_4 heated to 90 °C; 3,5. 5, 10, and 15 min after adding sodium citrate solution)

2.3 AuNPs@SH-DNA 的表征

2.3.1 AuNPs@SH-DNA 的 UV-Vis 及颜色

AuNPs 的 UV-Vis 全波段扫描结果显示,游离的 AuNPs 在 522 nm 处观察到表面等离子体共振

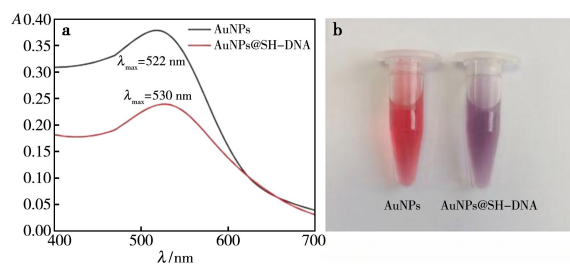


图 6 a. AuNPs 与 AuNPs@SH-DNA 的 UV-Vis 图;
b. AuNPs 与 AuNPs@SH-DNA 颜色区别

Fig.6 a. UV-Vis spectra of AuNPs and AuNPs@SH-DNA;
b. Color difference between AuNPs and AuNPs@SH-DNA

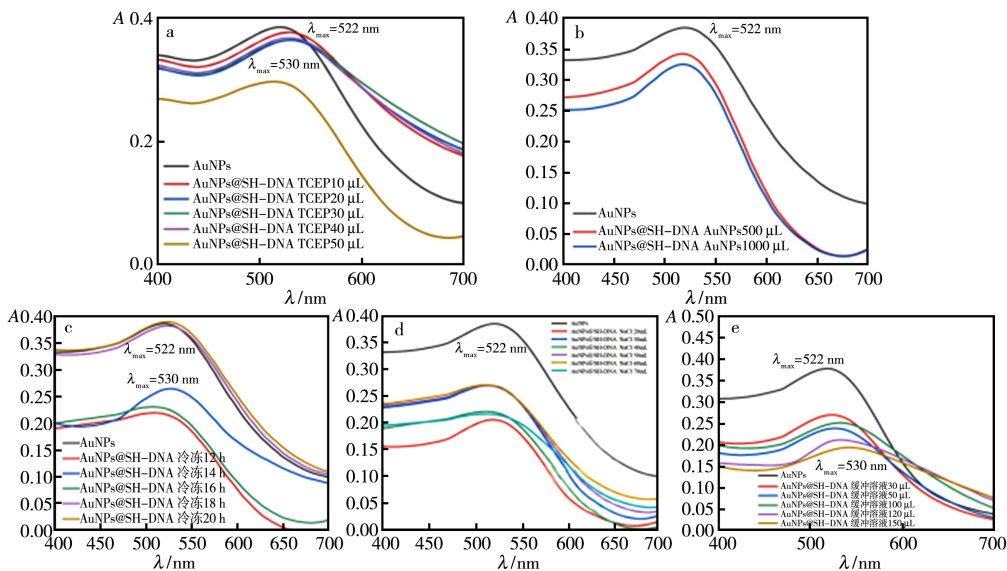
的特征性吸收峰。DNA 探针与 AuNPs 的偶联使其最大吸收波长红移 8 nm, AuNPs@SH-DNA 最大吸收峰在 530 nm 处,如图 6a 所示。这种红移是由于 AuNPs 表面功能化引起的折射率增加所导致^[10]。AuNPs 与 DNA 探针偶联,使其颜色由酒红色变为紫红色,如图 6b 所示,这可能与特征吸收峰红移有关。

2.3.2 不同偶联法制 AuNPs@SH-DNA 的 UV-Vis

在冷冻-解冻法制备 AuNPs@SH-DNA 中,考察体系中加入 TCEP 和 AuNPs 溶液的量及冷冻时长等 3 个因素对 AuNPs 与 DNA 探针的偶联效果影响。发现 TCEP 的加入使紫外最大吸收波长发生红移,当加入量为 20 μL (5 mmol/L) 时,最大吸收波长达到 530 nm 左右,说明 AuNPs 与 DNA 偶联形成 AuNPs@SH-DNA。继续增加 TCEP 的

量 (30、40、50 μL), 则吸收强度减弱,如图 7a 所示。单纯改变 AuNPs 的加入量 (500、1000 μL) 未能改变最大吸收波长发生红移,证明 AuNPs 与 DNA 无法偶联成 AuNPs@SH-DNA,如图 7b 所示。冷冻时间对偶联影响显著,冷冻 14 h 后的紫外最大吸收波长红移 8 nm,表明 AuNPs 与 DNA 探针偶联成功,如图 7c 所示。冷冻时间长或者短于 14 h,均不利于偶联制备 AuNPs@SH-DNA。

用盐老化法偶联制备 AuNPs@SH-DNA 时,加入不同量的 NaCl 溶液,均未能使 AuNPs 的紫外最大吸收波长从 522 nm 红移至 530 nm,所以此法未成功将 AuNPs 与 DNA 探针进行偶联,如图 7d 所示。而在低 pH 法偶联时,加入柠檬酸钠-盐酸缓冲液可以将最大吸收波长红移至 532 nm 左右,说明偶联成功,如图 7e 所示。



a.加不同量 TCEP; b.加不同量 AuNPs; c.不同冷冻时间; d.加不同量缓冲溶液; e.加不同量缓冲溶液

图 7 不同偶联法制 AuNPs@SH-DNA 的 UV-Vis

Fig.7 UV-Vis spectra of AuNPs@SH-DNA prepared by different conjugation methods

2.4 S 蛋白检测的试纸

实验结果显示, T 线试纸显红色, C 线试纸无

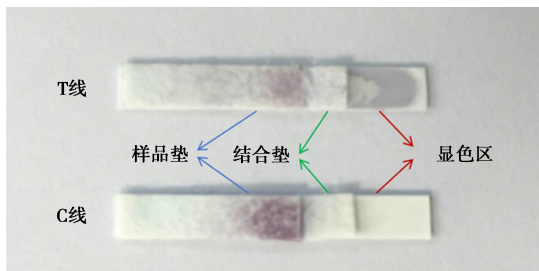


图 8 S 蛋白检测的试纸

Fig.8 Test strip for S protein detection

明显变化,设计的 Apt-LFTS 具有良好的灵敏度,能够实现高效的定性分析和定量检测,满足对 S 蛋白浓度的精确测定需求。

3 结论

本研究成功构建了一种基于 ST-6-2 核酸适配体与 AuNPs 的比色生物传感器,用于快速检测新冠病毒 S 蛋白。通过圆二色光谱验证了适配体与 S 蛋白结合后构象发生变化,为传感器的识别机制提供了理论依据。采用柠檬酸钠还原氯金酸法制备了粒径均匀的 AuNPs,并优化了其浓缩条

件,提高了偶联效率。系统比较了冷冻-解冻法、盐老化法和低 pH 法 3 种 DNA-AuNPs 偶联策略,结果表明低 pH 法偶联效果最佳,可使最大吸收波长红移 8~10 nm,溶液颜色由酒红色变为紫红色。基于竞争性侧向流层析原理组装了检测试纸条,实现了对 S 蛋白的可视化定性检测。该传感器具有操作简便、响应快速、成本低廉、无需复杂仪器等优点,符合即时检测的需求,在新冠病毒大规模筛查和基层分散式诊断中具有良好的应用前景。后续工作可进一步优化检测灵敏度,建立定量或半定量分析方法,并评估其在真实样本中的检测性能。

参考文献:

- [1] Koc H C, Xiao J, Liu W W, Li Y, Chen G K. *Int. J. Biol. Sci.*, 2022, **18** (12): 4768-4780.
- [2] Li Y, Long F, Han S T, Wang Y, Zhu A N. *Microchim. Acta*, 2025, **192** (4): 256.
- [3] Yang F Y, Feng Y N, Chen C. *Chin. J. Virol.*, 2025, (3): 889-900.
杨馥荧,冯晔因,陈操.病毒学报,2025,(3):889-900.
- [4] Svobodova M, Skouridou V, Jauset-rubio M, Viéitez I, Fernández-villar A, Cabrera A J J, Poveda E, Bofill C B, Sans T, Bashammakh A, Alyoubi A O, O'sullivan C K. *ACS Omega*, 2021, **6** (51): 35657-35666.
- [5] Wang J C. Development of Aptamer-Based Test Strips for Rapid Detection of SARS-COV-2 S Protein and Research of Uncertainty Evaluation. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2024.
王佳晨.快速检测新冠病毒 S 蛋白的适配体试纸条开发与不确定度评估研究.北京:北京化工大学,2024.
- [6] Yang G, Zhang S N, Wang Y C, Li L, Li Y, Yuan D Y, Luo F T, Zhao J C, Song X, Zhao Y Y. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2022, **7** (1): 120.
- [7] Shrikrishna N S, Halder S, Kesarwani V, Nagamani K, Gandhi S. *Chem. Eng. J.*, 2024, **493**: 152841.
- [8] Smith-jeffcoat S E, Mellis A M, Grijalva C G, Talbot H K, Schmitz J, Lutrick K, Ellingson K D, Stockwell M S, McLaren S H, Nguyen H Q. *MMWR*, 2024, DOI: 10.15585/mmwr.mm7316a2.
- [9] Dinnes J, Deeks J, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J. *Cochrane db. Syst. Rev.*, 2021, DOI: 10.1002/14651858.CD013705.pub2.
- [10] Chen X R, Ding L, Huang X L, Xiong Y H. *Theranostics*, 2022, **12** (2): 574-602.
- [11] Röthlisberger P, Hollenstein M. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2018, **134**: 3-21.
- [12] Feng J L, Wu Y Y, Shen Q. *Food Anal. Methods*, 2022, **15** (8): 2202-2212.
- [13] Wei X J, Ma P F, Imran M K, Zhang Y, Wang Z P. *Talanta*, 2023, **253**: 124003.
- [14] Wang C, Zhu K X, Shi P F, Ding X L, Zhang S S. *Chem. Commun.*, 2022, **58** (30): 4779-4782.
- [15] Chen L, Yang G, Qu F. *Talanta*, 2024, **276**: 126246.
- [16] Chen A L, Yang S M. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **71**: 230-242.
- [17] Zhang J L. Study on the Comparison of Strategy and Mechanism of DNA Functionalized Gold Nanoparticles. Guilin: Guangxi Normal University, 2022.
张锦玲. DNA 功能化修饰金纳米粒子策略比较及作用机制研究. 桂林: 广西师范大学, 2022.
- [18] Xu R R, Cheng Y Q, Qi X X, Li X T, Zhang Z W, Chen L Y, Sun T, Gao Z H, Zhu M J. *Anal. Chim. Acta*, 2022, **1230**: 340377.
- [19] Jing X X, Zhang Y Y, Li M, Zuo X L, Fan C H, Zheng J H. *Mater. Horiz.*, 2023, **10** (4): 1185-1209.
- [20] Jin R Y, Fan Y B, Ruan Y J, Long X, Guo H, Tang Y P. *Chin. J. Chem. Educ.*, 2021, **42** (22): 93-97.
靳如意, 范焱宝, 阮玉俊, 龙旭, 郭惠, 唐于平. 化学教育, 2021, **42** (22): 93-97.
- [21] Lee J, Huh J H, Kim K, Lee S. *Adv. Funct. Mater.*, 2018, **28** (15): 1707309.
- [22] Zhang X, Servos M R, Liu J W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134** (17): 7266-7269.