论著·基础医学

基于噬菌体展示技术筛选特异性M13噬菌体构建电化学生物传感器用于流产布鲁氏菌定量检测

敖建玥[1,2],马奉楼[1],江 悦[2],朱 吉[2],刘 明[3],郭 鹰[1] [1]重庆医科大学附属巴南医院检验科,重庆;陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系:[2]微生物与生化药学教研室,国家免疫生物制品工程技术研究中心,[3]药物分析学教研室,重庆

[摘要] **目的** 流产布鲁氏菌是导致布鲁氏菌病的主要致病菌之一,可对畜牧业生产及公共卫生安全构成潜在威胁,故筛选针对流产布鲁氏菌的特异性M13噬菌体并建立噬菌体功能化的电化学生物传感器,验证该传感器的检测性能及在实际样本检测中的应用潜力。**方法** 流产布鲁氏菌作为靶标,对噬菌体展示肽库进行生物淘选,并结合负筛以富集候选M13噬菌体克隆。采用间接ELISA检测各克隆的亲和力与特异性。将噬菌体修饰于金电极表面,以牛血清白蛋白封闭非特异位点,构建电化学生物传感器。以差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry,DPV)的电流响应值为指标,对噬菌体滴度、噬菌体孵育时间及样本孵育时间进行优化。测定1.0×10^3~1.0×10^7 CFU/mL的DPV电流响应值,采用四参数逻辑函数拟合标准曲线并计算最低检测限(limit of detection, LOD)。选择金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌作为阴性对照评价传感器特异性。重复检测同一浓度的流产布鲁氏菌样本10次,计算相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)以评价重复性。将传感器4 ℃保存并于不同时间点检测流产布鲁氏菌,计算RSD以评价稳定性。将流产布鲁氏菌悬液制备成以胎牛血清为基质的加标血清样本;将6~8周龄的SPF级雌性BALB/c小鼠(体质量16~18 g)按随机数字表法分为(n=5):空白组与感染组,感染组经腹腔内接种流产布鲁氏菌及空白组接种相同体积的PBS,获取小鼠脾脏样本,分别采用所构建的电化学生物传感器与平板计数法检测上述2类样本,计算回收率以评估传感器在实际样本中的检测准确性。**结果** 经生物淘选与间接ELISA验证筛选出可特异性结合流产布鲁氏菌的M13噬菌体克隆P-1,其与流产布鲁氏菌的结合亲和力优于其他对照菌株。传感器最优构建条件为:噬菌体滴度为1.0×10^{11} PFU/mL,噬菌体孵育时间为2 h,样本孵育时间为1 h。该传感器在1.0×10^3~1.0×10^7 CFU/mL细菌浓度内的拟合方程为$I/\mu A = 81.13 + \frac{(184.08 - 81.13)}{\left(1 + \frac{\mathrm{Log_{10}}\,C}{5.01}\right)^{8.68}}$($R^2$=0.999 9),LOD为157 CFU/mL。传感器具有良好的检测特异性(P<0.000 1)与重复性(RSD=2.70%),检测性能稳定(RSD=2.37%)。胎牛血清样本中传感器检测流产布鲁氏菌的回收率为98.2%~106.0%,同时在感染小鼠模型的脾脏样本中细菌载量检测结果为1.23×10^3 CFU/mL,方法准确度与金标准平板培养法一致。**结论** 筛选得到针对流产布鲁氏菌的特异性M13噬菌体克隆P-1,并以此构建了一种可定量检测目标菌的电化学生物传感器。

[关键词] 电化学生物传感器;噬菌体展示技术;噬菌体;流产布鲁氏菌

[中图法分类号] R378.52;R394-3;R446.9 [文献标志码] A

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2024NSCQ-MSX0981)

[通信作者] 刘 明,E-mail:lm1859@163.com

郭 鹰,E-mail:eaglegying@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2026,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:敖建玥,马奉楼,江悦,等. 基于噬菌体展示技术筛选特异性M13噬菌体构建电化学生物传感器用于流产布鲁氏菌定量检测[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(09):1218-1227. DOI:10.16016/j.2097-0927.202602018.

Citation:AO J Y,MA F L,JIANG Y,*et al*. Screening of specific M13 phage based on phage display for electrochemical biosensor construction for quantitative detection of *Brucella abortus*[J]. J Army Med Univ,2026,48(09):1218-1227. DOI:10.16016/j.2097-0927.202602018.

Screening of specific M13 phage based on phage display for electrochemical biosensor construction for quantitative detection of *Brucella abortus*

AO Jianyue[1,2], MA Fenglou[1], JIANG Yue[2], ZHU Ji[2], LIU Ming[3], GUO Ying[1] [1]Department of Clinical Laboratory, Banan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing; [2]Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, National Engineering Research Center of Immunological Products, [3]Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] Objective *Brucella abortus (B. abortus)* is one of the primary causative agents of brucellosis, posing potential threats to livestock production and public health security. This study aims to screen specific M13 phages targeting the bacteria and to establish a phage-functionalized electrochemical biosensor, thereby validating its detection performance and application potential in actual sample testing. Methods Using *B. abortus* as a target, biopanning of a phage display peptide library was performed, combined with negative screening to enrich candidate M13 phage clones. Indirect ELISA was employed to assess the affinity and specificity of each clone. The phages were immobilized onto a gold electrode surface, with bovine serum albumin used to block non-specific sites to construct an electrochemical biosensor. Differential pulse voltammetry (DPV) current response values were employed as an indicator to optimize phage titer, phage incubation time, and sample incubation time. The DPV current response values were measured for concentrations ranging from 1.0×10^3 to 1.0×10^7 CFU/mL. A four-parameter logistic function was used to fit the standard curve, and the limit of detection (LOD) was calculated. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli* were selected as negative controls to evaluate the specificity of the sensor. The same concentration of *B. abortus* samples was repeatedly detected 10 times, and the relative standard deviation (RSD) was calculated to assess repeatability. The sensor was stored at 4 ℃, and *B. abortus* was detected at different time points to calculate the RSD and evaluate the stability. *B. abortus* bacterial suspensions were prepared as spiked serum samples using fetal bovine serum as the matrix. SPF female BALB/c mice (6 to 8 weeks old, weighing 16 to 18 g) were randomly divided into a control group and an infected group, with 5 animals in each group. The infection group was intraperitoneally inoculated with *B. abortus*, and the blank group was inoculated with the same volume of PBS. Mouse spleen samples were collected. Both the constructed electrochemical biosensor and plate counting method were used to detect the above 2 types of samples. The recovery rate was calculated to evaluate the detection accuracy of the sensor in actual samples. Results Through biopanning and indirect ELISA validation, M13 phage clone P-1 capable of specifically binding to *B. abortus* was screened, and its binding affinity to *B. abortus* was superior to that of other control strains. The optimal construction conditions for the sensor were as follows: phage titer of 1.0×10^{11} PFU/mL, phage incubation time of 2 h, and sample incubation time of 1 h. The fitting equation for this sensor within the bacterial concentration range of 1.0×10^3 to 1.0×10^7 CFU/mL is $I/\mu A = 81.13 + \frac{(184.08 - 81.13)}{\left(1 + \frac{\mathrm{Log}_{10} C}{5.01}\right)^{8.68}}$ (R^2= 0.999 9), with an LOD of 157 CFU/mL. The sensor demonstrated favorable detection specificity (P<0.000 1) and repeatability (RSD=2.70%), with stable performance (RSD=2.37%). The recovery rate of *B. abortus* detected by the sensor in fetal bovine serum samples ranged from 98.2% to 106.0%, while the bacterial load in spleen samples from infected mouse model was detected as 1.23×10^3 CFU/mL, and the accuracy of this method was consistent with the gold standard plate culture method. Conclusion A

specific M13 phage clone, P-1, targeting *B. abortus* was identified through screening, and this clone was used to construct an electrochemical biosensor capable of quantitatively detecting the target bacterium.

[**Key words**] electrochemical biosensor; phage display technology; phage; *Brucella abortus*

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2024NSCQ-MSX0981). Corresponding authors: LIU Ming, E-mail: lm1859@163.com; GUO Ying, E-mail: eaglegying@hospital.cqmu.edu.cn

布鲁氏菌病(*Brucellosis*)是由布鲁氏菌感染引起的一种地方性人畜共患病,主要表现为发烧、多汗、乏力、关节和肌肉疼痛等,严重时可导致劳动能力丧失[1]。布鲁氏菌病被《中华人民共和国传染病防治法》规定为乙类传染病,美国疾病控制与预防中心也将布鲁氏菌归为B类生物战剂[2]。研究表明,布鲁氏菌病在全球范围广泛流行,每年新发感染病例为16万~210万例,我国布鲁氏菌感染人群也呈明显增长趋势[3-4]。布鲁氏菌在自然环境中生存能力极强,可通过皮肤黏膜接触、消化道、呼吸道等多种途径传播,而且潜伏期较长[5]。鉴于布鲁氏菌传播方式的复杂性,及其对健康的危害,一旦传播将严重威胁公共卫生安全。因此,快速精准地检测布鲁氏菌对于布鲁氏菌病的早期诊断与有效防控具有重要意义[6]。

目前临床检测布鲁氏菌的金标准为病原体分离培养法,但其存在培养周期长的明显不足。血清学检测技术,如血清凝集试验(serum agglutination test, SAT)与ELISA等,虽可作为辅助诊断手段,但其易受交叉反应干扰,难以区分既往感染与现症感染;分子检测技术(如qPCR等)具有高灵敏度和特异性,但检测成本高且依赖专业设备,上述2类技术均存在不同程度的局限性[7-8]。因此,开发高效、准确、便捷的布鲁氏菌检测新方法具有重要的现实意义。

电化学生物传感器作为一类新兴检测技术,兼具电化学分析的高灵敏度与免疫反应的高特异性,且具备检测快速、操作简便等显著优势,在病原微生物检测领域展现出良好的应用潜力[9]。本研究通过噬菌体展示肽库淘选,筛选出能够特异性结合流产布鲁氏菌的M13噬菌体,将其作为生物识别元件,设计构建了一种高性能检测流产布鲁氏菌的电化学生物传感器。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂 电化学工作站购自瑞士万通公司;全波长酶标仪购自美国Molecular Devices公司;金电极、铂电极、甘汞电极购自天津艾达恒晟科技发展有限公司;超纯水仪购自四川优普超纯科技有限公司;超声波清洗机购自宁波新芝生物科技股份有限公司;Ph. D.™-12噬菌体展示肽库试剂盒购自美国New England BioLabs公司;牛血清白蛋白购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清购自兰州荣畔生物科技有限责任公司;其他试剂($MgCl_2$、IPTG、Xgal、Tris、HCl)均为分析纯度;实验用水均为超纯水;流产布鲁氏菌疫苗菌株(104M)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、鲍曼不动杆菌(ATCC17978)、大肠杆菌(DH5α)均由陆军军医大学微生物与生化药学教研室提供,表皮葡萄球菌由重庆医科大学附属巴南医院检验科提供。

1.1.2 实验动物 10只6~8周龄BALB/c雌性小鼠(体质量16~18 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,小鼠实验前于SPF动物房适应性饲养7 d,每日更换垫料为灭菌玉米芯颗粒(厚度≥5 cm),所有动物自由摄食饮水,光照周期为12 h明/暗循环。本研究经陆军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(AMUWEC20240093)。所有侵入性操作在异氟烷吸入麻醉系统下进行,实验结束后对其实施安乐死(戊巴比妥钠过量注射)。

1.2 制备待测样本

流产布鲁氏菌培养与活化按文献[10]进行。将2次活化菌液在4 ℃下以5 000×*g*离心10 min后用0.01 mol/L PBS重悬,洗涤3次,然后调节*OD*(600)至1.000,此时细菌浓度为1.45×10^{10} CFU/mL,使用时以PBS稀释至所需浓度。

1.3 M13噬菌体淘选与活性考察

1.3.1 噬菌体展示技术淘选特异性M13噬菌体 向酶标板中加入1.0×10^{8} CFU/mL的流产布鲁氏菌悬液,每孔50 μL,37 ℃过夜至干燥,完成包被;接下来加入300 μL 1%PBSA(1×PBS+1%BSA),在室温下封闭1 h;以TBST洗板,然后加入1.0×10^{11} PFU/mL的噬菌体原始文库,室温温和振摇1 h,再次洗板;向孔板中加入洗脱缓冲液,室温摇晃10 min后进行洗脱;随后向洗脱液中加入7.5 μL的1 mol/L Tris-HCl(pH=9)以中和pH;将洗脱液倍比稀释后,分别取10 μL与200 μL大肠杆菌K12 ER2738菌液[*OD*(600)=0.5]室温孵育5 min,再与预热的0.1%$MgCl_2$顶层琼脂快速混匀,铺于LB/IPTG/Xgal平板上,于37 ℃培养过夜;测定洗脱液滴度[每10微升洗脱液的空斑形成单位(PFU)=

噬菌斑数×稀释倍数],并计算回收率[回收率=(噬菌体洗脱液产量/噬菌体输入量)×100%][11]。将洗脱液加入大肠杆菌K12 ER2738菌液[*OD*(600)=0.01~0.05]中,37 ℃培养4.5 h进行扩增,完成1轮淘选。以扩增液重复淘选7轮后,最后2轮分别以BSA和阴性细菌包被孔板进行淘选,取孔板噬菌体上清液以去除非特异性结合BSA或阴性细菌的噬菌体,进一步富集特异性噬菌体。以最后1轮淘选的噬菌体上清液进行铺板培养,然后随机选取30个噬菌体单斑进行扩增,分别提取DNA后送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序,引物序列为(5'→3'):CCCTCATAGTTAGCGTAACG(Ph.D.™-12噬菌体展示肽库试剂盒)。

1.3.2 间接ELISA检测噬菌体亲和力与特异性 分别在酶标板上包被50 μL流产布鲁氏菌悬液与等体积阴性细菌悬液(浓度均为1.0×10^8 CFU/mL),加入50 μL 1.0×10^{10} PFU/mL噬菌体溶液(0.05 mol/L TBS)室温孵育1 h;洗板后加入200 μL HRP标记的鼠抗M13噬菌体抗体(1∶5 000),37 ℃孵育1 h显色,于450 nm波长检测吸光度[*OD*(450)]值。通过间接ELISA法评估噬菌体克隆与流产布鲁氏菌的亲和力与特异性[12],选择综合表现最优的噬菌体克隆用于后续实验。

1.4 基于M13噬菌体构建电化学生物传感器与电化学方法表征构建过程 金电极的抛光、清洗与活化步骤按文献[13]进行。取1.0×10^{11} PFU/mL的噬菌体溶液10 μL滴加于金电极表面并于室温孵育2 h,以0.01 mol/L PBS轻柔清洗,自然晾干后继续滴加10 μL 0.25%BSA,室温孵育1 h封闭非特异性结合位点,再次清洗晾干,完成传感器的构建。采用三电极体系,以金电极为工作电极,铂片电极为对电极,甘汞电极为参比电极,在pH=7.5的10 mmol/L $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$(含0.1 mol/L KCl)扫描液中,分别以循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)和电化学阻抗法(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)对传感器的构建过程加以表征。

1.5 电化学方法优化传感器构建条件

1.5.1 差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)优化噬菌体孵育滴度 分别移取10 μL滴度为1.0×10^9、1.0×10^{10}、1.0×10^{11} PFU/mL的噬菌体溶液滴加于金电极表面,室温孵育1 h,清洗后在0.1~0.5 V电压内通过DPV检测电流响应值。

1.5.2 DPV优化噬菌体孵育时间 在金电极表面滴加10 μL滴度为1.0×10^{11} PFU/mL的噬菌体溶液,室温条件下分别孵育0.5、1.0、2.0、3.0 h,清洗后在0.1~0.5 V电压内通过DPV检测电流响应值。

1.5.3 DPV优化细菌孵育时间 按1.4方法构建传感器,滴加10 μL浓度为1.0×10^5 CFU/mL的流产布鲁氏菌悬液于电极表面,分别在室温下孵育15 min、30 min、1 h、2 h,随后清洗电极表面,在0.1~0.5 V电压内通过DPV检测电流响应值。

1.6 电化学方法评价电化学生物传感器性能

1.6.1 DPV评价线性范围与检测限 在方法1.5确定的最优构建条件下,使用传感器测定1.0×10^3~1.0×10^7 CFU/mL浓度流产布鲁氏菌的DPV电信号响应,以菌液浓度对数值为横坐标,电流值为纵坐标,绘制校正曲线,拟合线性方程并计算检测限。

1.6.2 DPV评价特异性 分别测定1.0×10^5 CFU/mL流产布鲁氏菌与阴性细菌样本(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌)的DPV电信号响应,通过对比分析确定传感器的检测特异性。

1.6.3 DPV评价重复性 使用该传感器对1.0×10^5 CFU/mL的流产布鲁氏菌样本进行检测,选择3个不同批次制备的传感器重复测定10次,根据得到的DPV检测电流值计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.6.4 DPV评价稳定性 将制备好的传感器置于4 ℃冰箱保存,分别在第0、1、2、3、5、7、10天检测浓度为1.0×10^5 CFU/mL的流产布鲁氏菌样本,评估其稳定性。

1.6.5 回收实验评价传感器检测性能 分别采用电化学生物传感器与作为临床检测金标准的平板计数法分别检测流产布鲁氏菌浓度为1.0×10^3、1.0×10^5和1.0×10^7 CFU/mL的胎牛血清加标样本,通过以下公式计算回收率:回收率=(检出细菌浓度/加标细菌浓度)×100%。

1.6.6 平板计数法与传感器对比检测小鼠感染器官样本 将BALB/c小鼠按随机数字表法分为(n=5):空白组与感染组,采用腹腔注射的方式,感染组小鼠接种5.0×10^7 CFU/mL流产布鲁氏菌悬液(以无菌PBS重悬),空白组接种相同体积的PBS。于5 d后经异氟烷气体麻醉后,以无菌手术切取脾脏组织,置于1 mL无菌PBS中进行匀浆处理,获得感染小鼠脾脏样本。随后,将样本于4 ℃下以600×g离心10 min,以去除脾脏组织碎片。通过电化学生物传感器对脾脏样本进行检测,同时采用平板计数法进行对比验证。

1.7 统计学分析 本研究实验数据采用Origin 2021软件进行整理分析,使用SPSS 29.0进行统计分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较采用单因素方差分析,以P<0.05表示差异具有统计学意义。

2　结果

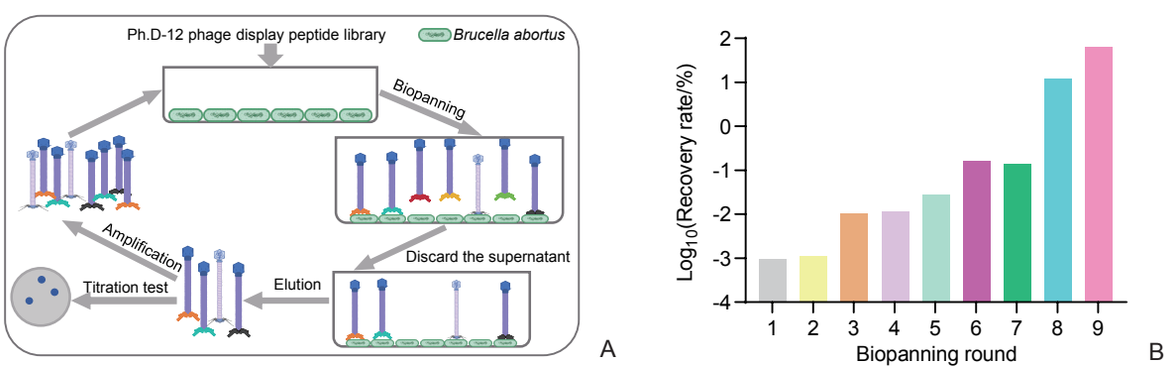
2.1　高特异性M13噬菌体的淘选与活性验证

本研究采用噬菌体展示肽库试剂盒，通过生物淘选以获得特异性结合流产布鲁氏菌的M13噬菌体。如图1所示，随着淘选轮数的递增，噬菌体的回收率呈现逐渐上升的趋势。在第6轮与第7轮，回收率基本趋于稳定，表明特异性噬菌体已富集饱和；接下来于第8轮与第9轮，针对非特异吸附孔板及阴性细菌所结合的噬菌体进行阴性淘选，最终获取30个噬菌体克隆。测序结果显示，共有5个噬菌体DNA样本成功测序，其中，有3个样本的序列为P-1噬菌体克隆序列(Leu-Pro-Trp-His-Trp-Trp-His-Phe-Gly-Asp-Val-Arg)；其余2个分别为P-2(Leu-Pro-Gly-His-Trp-Trp-His-Phe-Gly-Asp-Val-Arg)与P-3噬菌体克隆序列(Tyr-Asp-Asp-Gly-Gly-Tyr-Arg-Thr-Val-Thr-Thr-Ser)。

根据测序结果，本研究考察了3种噬菌体克隆与流产布鲁氏菌的亲和力，在滴度相同的情况下，P-1噬菌体的*OD*(450)值最高，表明其对流产布鲁氏菌的亲和力最强(图2A)。以金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌4种常见菌株作为阴性菌，对P-1噬菌体克隆进行特异性检测，结果可见，*OD*(450)比值=$OD(450)_{流产布鲁氏菌孔}/OD(450)_{阴性细菌孔}$，且*OD*(450)比值均>2.1(图2B)，表明P-1噬菌体克隆对流产布鲁氏菌具有良好的特异性结合能力。基于上述结果，确定选择P-1噬菌体克隆用于制备电化学生物传感器。

2.2　噬菌体功能化电化学生物传感器的成功构建

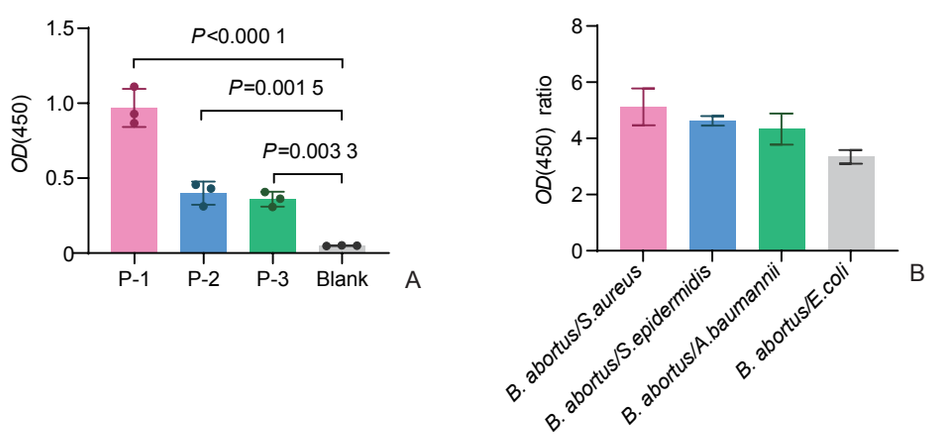
经预处理后的金电极表面滴加P-1噬菌体并于室温孵育，继而采用0.25%BSA对非特异性结合位点进行封闭处理。传感器组装完毕后，将样本滴加至电极表面，即可实现对流产布鲁氏菌的检测(图3A)。运用CV与EIS对传感器构建过程进行表征。结果如图3B、C，未经修饰的裸金电极电流值最高，阻抗最小；当电极表面固载噬菌体后，空间位阻使电子转移受到阻



A: Scheme of phage display biopanning; B: Recovery rate of biological sorting in each round

图1　生物淘选过程中噬菌体的富集情况

Figure 1　Enrichment of phages during biopanning



A: Evaluation of the affinity between phages and *B. abortus*; B: Evaluation of P-1 phage specificity using the *OD*(450) ratio

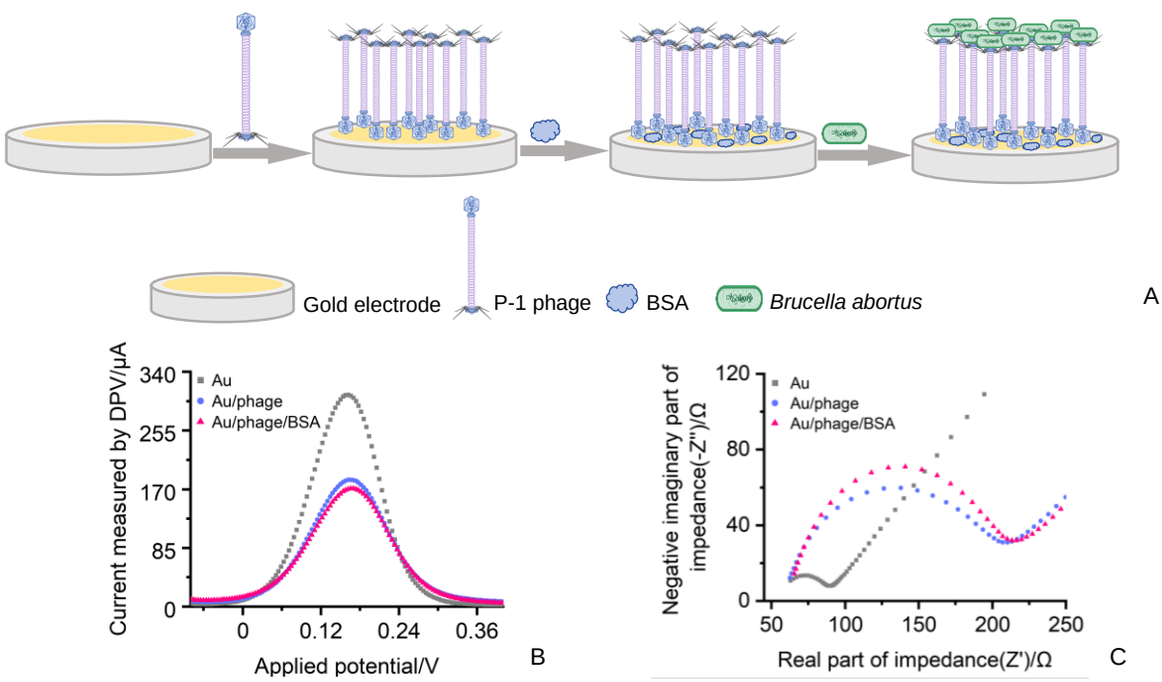
图2　噬菌体活性考察结果

Figure 2　Results of phage activity evaluation

碍,导致转移效率降低,表现为电流值降低,阻抗增大;以BSA封闭电极表面非特异性结合位点后,电极表面的电子转移效率进一步降低,但程度较弱,电流降幅与阻抗增幅小于噬菌体修饰步骤。上述电化学特征证明了基于噬菌体修饰的电化学生物传感器构建成功。

2.3 基于DPV的传感器最优构建条件筛选结果

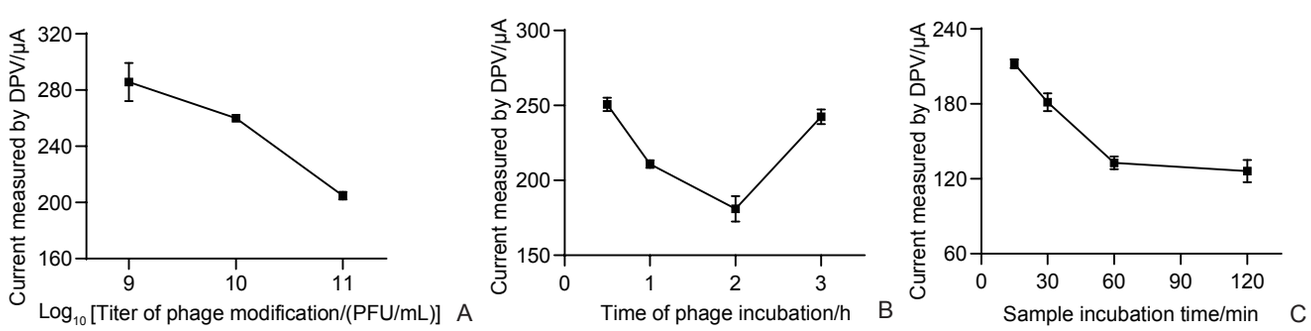
本研究对传感器构建的关键条件进行了优化,通过DPV测定结果确定最佳条件。电流值随噬菌体滴度增加逐渐减小,提示噬菌体固载率增加,当噬菌体滴度为1.0×10^{11} PFU/mL时,电流值最低,说明固载率达到最高(图4A)。噬菌体孵育时间在0.5~2.0 h内,随着孵育时间的延长,电流值不断降低,而当孵育时间超过2 h时,电流值开始增大,提示孵育2 h时达到最高固载量(图4B)。随后对流产布鲁氏菌样本的孵育时间进行了考察,电流值随着样本孵育时间的增加而减小,至60 min时趋于稳定(图4C),说明样本固载量达到饱和。基于上述实验结果,确定传感器最优构建条件为:噬菌体滴度为1.0×10^{11} PFU/mL,噬菌体与待测样本孵育时间分别为2 h与1 h。



A: Scheme of electrochemical biosensor assembly; B: Differential pulse voltammetry current curves for different modification steps on the electrode; C: Electrochemical impedance spectra for different modification steps on the electrode

图3 电化学生物传感器构建过程及电化学表征

Figure 3 Construction process and electrochemical characterization of the electrochemical biosensor



A: Line graph of DPV currents at different phage titers for phage-modified electrodes; B: Line graph of DPV currents at different time points for phage-incubated electrodes; C: Line graph of DPV current at different incubation time points for the sample

图4 传感器不同构建条件的DPV电流变化

Figure 4 Changes in differential pulse voltammetry (DPV) current under different sensor construction conditions

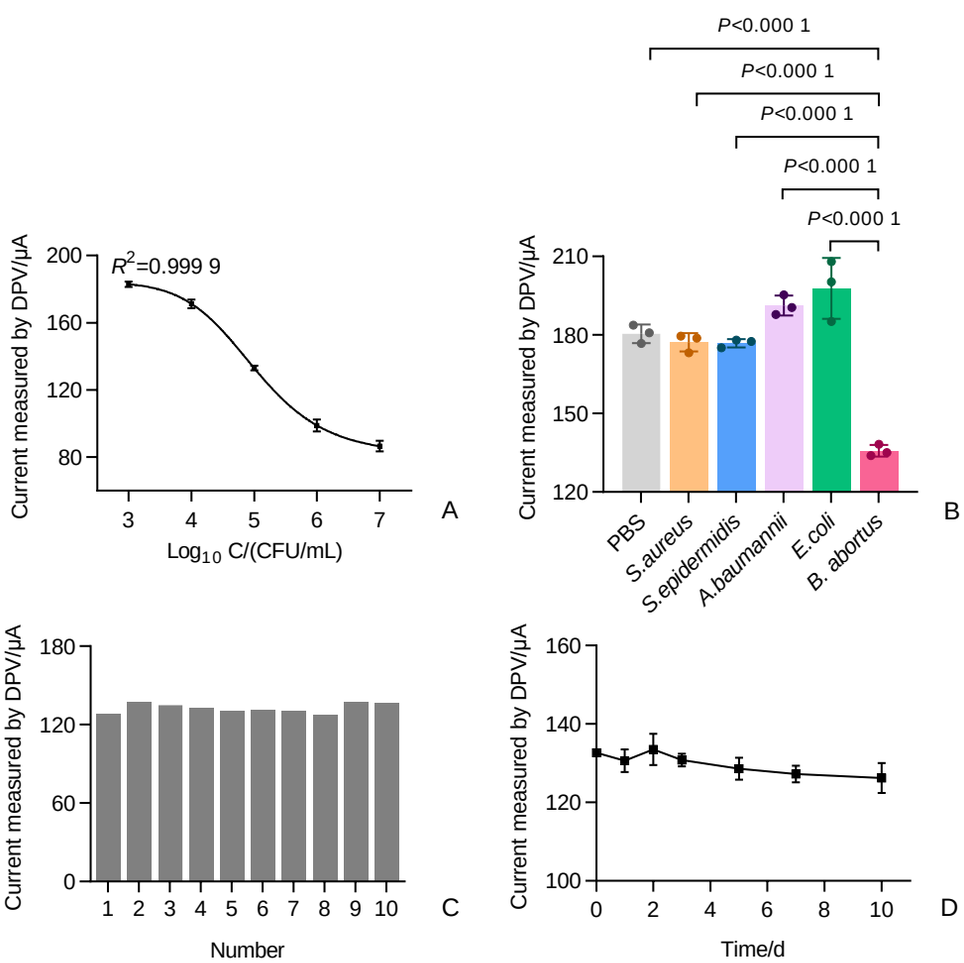
2.4 特异性M13噬菌体电化学生物传感器具有优异的检测性能

线性实验结果如图5A所示,在1.0×10^3~1.0×10^7 CFU/mL的浓度内,DPV电流值随待测细菌浓度升高而降低,以菌液浓度对数值为横坐标,电流值为纵坐标,采用非线性回归方程(四参数逻辑函数)对上述曲线进行拟合处理,结果显示,拟合曲线具有优异的决定系数(R^2=0.999 9),表明样本浓度与电流值之间具有极高的相关度,拟合公式为:$I/\mu A = 81.13 + \frac{(184.08 - 81.13)}{\left(1 + \frac{\mathrm{Log}_{10} C}{5.01}\right)^{8.68}}$。将$\bar{x}_{blank}$ + 3SD(SD为3个空白样本测量电流值的标准偏差)带入以上拟合公式,得出最低检测限(limit of detection, LOD)为157 CFU/mL。

特异性考察结果中,流产布鲁氏菌样本与阴性细菌及对照组的电流值差异显著(P<0.000 1),提示该传感器具有良好抗干扰能力(图5B)。重复性测定结果可见,对中浓度(1.0×10^5 CFU/mL)流产布鲁氏菌样本进行重复检测,所得DPV电流信号值的相对标准偏差为2.70%,表明该传感器的检测重复性良好(图5C)。如图5D所示,在4 ℃下储存10 d,传感器对同浓度待测样本的检测信号无显著变化,RSD为2.37%,说明其具有较好稳定性。

为了确定所构建电化学生物传感器的检测准确度,进行加标回收实验,分别测定低、中、高浓度加标胎牛血清中的流产布鲁氏菌,同时以临床检测金标准平板计数法的检测结果作为对照。结果见表1,平板计数法回收率在83.3%~103.0%,传感器法的回收率在98.2%~106.0%,证明其检测结果准确可靠。

小鼠模型是研究流产布鲁氏菌感染的经典模型



A: Linear curve for testing samples of *B. abortus* at different concentrations; B: Bar chart of DPV currents for testing different samples during specificity evaluation; C: Bar chart of DPV current for repeated testing of samples at the same concentration; D: Line graph of DPV currents measured by this sensors at different storage times for samples of the same concentration

图5 传感器不同方面的性能表现

Figure 5 Performance characteristics of the sensor in various aspects

表1 不同浓度加标样本的检测结果与回收率(n=3)

Table 1 Detection results and recovery rates for spiked samples at different concentrations(n=3)

Sample /(CFU/mL)	Detected/(CFU/mL)		Recovery rate/%	
	Plate counting method	Electrochemical sensor	Plate counting method	Electrochemical sensor
1.0×10^3	8.33×10^2	1.06×10^3	83.3	106.0
1.0×10^5	8.33×10^4	9.82×10^4	83.3	98.2
1.0×10^7	1.03×10^7	1.04×10^7	103.0	104.0

之一,而脾脏是其主要定植器官。因此本研究还利用该传感器对感染流产布鲁氏菌小鼠的脾脏样本进行检测,结果表明,传感器检测结果为1.23×10^3 CFU/mL,与平板计数法的检测结果(1.68×10^3 CFU/mL)基本一致,证明所构建传感器具备应用于临床实际检测的潜力。

3 讨论

3.1 噬菌体展示技术是筛选布鲁氏菌特异性识别元件的有效策略

目前,已有较多电化学生物传感器被报道应用于细菌检测领域[14-16],也有部分研究针对布鲁氏菌检测设计并构建了传感器[17-18]。例如,DURSUN等[19]开发了一种表面等离子体共振(surface plasmon resonance,SPR)应用传感器,用于检测牛奶样品中的布鲁氏菌;ABUAWAD等[20]基于磁性纳米粒子标记物设计了一种DNA传感器对布鲁氏菌DNA进行现场检测和定量;本课题组前期设计的电化学传感器修饰纳米复合材料,通过单克隆抗体捕获布鲁氏菌[21]。然而,上述布鲁氏菌检测传感器均存在构建流程复杂、材料制备步骤繁琐或检测灵敏度不足等问题,在一定程度上限制了其实际应用。

合理选择生物识别元件是成功构建高性能生物传感器的关键所在。抗体与噬菌体是特异性捕获细菌的常用材料,与抗体相比,噬菌体一般具备制备成本低廉、理化稳定性强和能够高效捕获整体细菌等突出优势[22],是致病菌检测传感器构建的理想选择。噬菌体展示技术以目标细菌为靶标,通过多轮生物淘选,让能与细菌表面抗原特异性结合的噬菌体不断富集,最终获得具有高特异性与高亲和力的阳性噬菌体,可直接作为生物识别元件用于传感器构建[23]。本研究基于噬菌体展示技术,以M13噬菌体为载体,通过生物淘选方法成功筛选出能够特异性结合流产布鲁氏菌的P-1噬菌体,并将其作为生物识别元件用于电化学生物传感器的构建。除此,P-1噬菌体可直接固载于金电极表面,无需额外引入交联剂或生物相容性材料等复杂的修饰步骤,从而显著简化了传感器构建流程,提高了方法的可操作性与稳定性。

3.2 所构建电化学生物传感器具有快速、准确和操作简便的优势

与现有临床检测技术相比,本研究构建的电化学生物传感器在流产布鲁氏菌检测中展现出明显优势。病原体分离培养虽为流产布鲁氏菌检测的金标准,但该菌生长缓慢,通常需7~10 d方可获取结果[24-25],而本传感器可在1.5 h内完成检测,且胎牛血清加标回收实验与感染动物模型验证结果均表明,其检出结果与金标准基本一致,在实现快速检测的同时保证了较高的准确性。血清学检测(如ELISA等)的灵敏度与特异性受抗体交叉反应限制[26]。相关研究显示,血清学诊断中常用的传统抗原(如脂多糖等)易与大肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森菌等发生交叉反应,可能导致假阳性结果[27]。本研究以噬菌体作为生物识别元件,显著提高了检测特异性,检测灵敏度可达157 CFU/mL。分子检测技术(如qPCR等)虽具较高灵敏度,但需进行DNA的提取与扩增,操作专业性强且耗时相对较长[24]。本传感器依托噬菌体识别探针实现对菌体直接捕获与电信号转换,无需核酸提取等复杂前处理,具有检测耗时更短、易于操作等优势。

尽管本研究取得了阶段性进展,但仍存在一定局限性:①在样本验证方面,目前仅对血清加标和小鼠脾脏样本进行初步评估,尚未开展临床患者样本检测。②在特异性评估方面,仍需考察种属相近的其他菌株如小肠结肠炎耶尔森菌,以及血红蛋白等基质干扰物的影响。后续研究将纳入临床样本,进一步完善特异性评价体系。③该传感器目前仍处于实验室研究阶段,如推进临床转化应用,需完善传感器制备及检测流程的标准化体系,进一步提升可重复性;同时系统对比本方法与其他检测方法在灵敏度等关键指标上的差异。未来可将该传感器与便携式电化学设备集成,进行微型化设计,优化检测流程、降低制备成本,提升其在基层医疗及现场检测场景中的应用潜力。

综上所述,本研究以流产布鲁氏菌为检测靶标,运用噬菌体展示技术开展生物淘选,成功筛选出一种

能够特异性结合该菌的M13噬菌体P-1。将该噬菌体直接修饰于金电极表面,进而成功构建出一种高性能用于实验室检测流产布鲁氏菌的电化学生物传感器。该传感器构建流程简便,检测快速准确,为布鲁氏菌检测方法研究提供了新的思路和实验依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P, AKRITIDIS N, *et al*. The new global map of human brucellosis[J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(2): 91-99. DOI:10.1016/S1473-3099(06)70382-6.

[2] 胡高维, 陈明亮, 蔡霞, 等. 布鲁菌病的生物安全及防控[J]. 微生物与感染, 2022, 17(2): 118-122. DOI:10.3969/j.issn.1673-6184.2022.02.008.
HU G W, CHEN M L, CAI X, *et al*. Biosafety, prevention and control of brucellosis[J]. J Microbes Infect, 2022, 17(2): 118-122. DOI:10.3969/j.issn.1673-6184.2022.02.008.

[3] LIU B F, LIU G T, MA X P, *et al*. Epidemiology, clinical manifestations, and laboratory findings of 1, 590 human brucellosis cases in Ningxia, China[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1259479. DOI:10.3389/fmicb.2023.1259479.

[4] LAINE C G, JOHNSON V E, SCOTT H M, *et al*. Global estimate of human brucellosis incidence[J]. Emerg Infect Dis, 2023, 29(9): 1789-1797. DOI: 10.3201/eid2909.230052.

[5] WU M, ABDURAHMAN X, TENG Z D. Optimal control strategy analysis for an human-animal brucellosis infection model with multiple delays[J]. Heliyon, 2022, 8(12): e12274. DOI:10.1016/j.heliyon.2022.e12274.

[6] LAVIGNE J P, MAGNAN C, LOUBET P, *et al*. What's new in the diagnosis and treatment of human brucellosis?[J]. Infect Dis Now, 2025, 55(7): 105121. DOI: 10.1016/j.idnow.2025.105121.

[7] QURESHI K A, PARVEZ A, FAHMY N A, *et al*. Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment-a comprehensive review[J]. Ann Med, 2023, 55(2): 2295398. DOI:10.1080/07853890.2023.2295398.

[8] YAGUPSKY P, MORATA P, COLMENERO J D. Laboratory diagnosis of human brucellosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 33(1): e00073-e00019. DOI: 10.1128/CMR.00073-19.

[9] 王纯. 电化学生物传感器在细菌病原体检测中的应用及发展趋势[J]. 卫生研究, 2021, 50(1): 168-172. DOI: 10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2021.01.030.
WANG C. Application and development trend of electrochemical biosensor in bacterial pathogen detection[J]. J Hyg Res, 2021, 50(1): 168-172. DOI: 10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2021.01.030.

[10] FENG Q S, HA X Q, LIN T, *et al*. *Brucella cultures* characteristics, clinical characteristics, and infection biomarkers of human brucellosis[J]. J Infect Public Health, 2023, 16(3): 303-309. DOI:10.1016/j.jiph.2023.01.002.

[11] 覃伟, 李通, 田力. 基于噬菌体展示技术鉴定与RhE抗原高亲和力的小分子多肽[J]. 中国输血杂志, 2025, 38(8): 1023-1029. DOI:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2025.08.004.
QIN W, LI T, TIAN L. Identification of small molecule peptides with high affinity for RhE antigen based on phage display technology[J]. Chin J Blood Transfus, 2025, 38(8): 1023-1029. DOI:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2025.08.004.

[12] MA H M, ZHOU Y H, WANG S P, *et al*. An optimized sandwich ELISA for quantitative detection of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) in chickens[J]. Poult Sci, 2026, 105(2): 106259. DOI:10.1016/j.psj.2025.106259.

[13] 李佳根, 王杰, 付凤琴, 等. 无酶自组装葡萄糖生物传感器研究[J]. 化学研究与应用, 2021, 33(11): 2228-2233.
LI J G, WANG J, FU F Q, *et al*. Study on self-assembly of enzyme-free glucose biosensor[J]. Chem Res Appl, 2021, 33(11): 2228-2233.

[14] PAN M T, ZHAO Y R, QIAO J J, *et al*. Electrochemical biosensors for pathogenic microorganisms detection based on recognition elements[J]. Folia Microbiol, 2024, 69(2): 283-304. DOI:10.1007/s12223-024-01144-5.

[15] WANG K, LIN X G, ZHANG M X, *et al*. Review of electrochemical biosensors for food safety detection[J]. Biosensors, 2022, 12(11): 959. DOI: 10.3390/bios12110959.

[16] KHOSHROO A, MAVAEI M, ROSTAMI M, *et al*. Recent advances in electrochemical strategies for bacteria detection[J]. Bioimpacts, 2022, 12(6): 567-588. DOI: 10.34172/bi.2022.23616.

[17] CHEN H S, LIU H B, CUI C J, *et al*. Recombinant protein G/Au nanoparticles/graphene oxide modified electrodes used as an electrochemical biosensor for *Brucella* testing in milk[J]. J Food Sci Technol, 2022, 59(12): 4653-4662. DOI: 10.1007/s13197-022-05544-8.

[18] WU H Y, ZUO Y M, CUI C J, *et al*. Rapid quantitative detection of *Brucella melitensis* by a label-free impedance immunosensor based on a gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode[J]. Sensors, 2013, 13(7): 8551-8563. DOI:10.3390/s130708551.

[19] DURSUN A D, BORSA B A, BAYRAMOGLU G, *et al*. Surface plasmon resonance aptasensor for *Brucella* detection in milk[J]. Talanta, 2022, 239: 123074. DOI: 10.1016/j.

talanta.2021.123074.

[20] ABUAWAD A, ASHHAB Y, OFFENHÄUSSER A, *et al*. DNA sensor for the detection of *Brucella* spp. based on magnetic nanoparticle markers[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(24): 17272. DOI:10.3390/ijms242417272.

[21] CHI Y, CAO Y, CAO W X, *et al*. Label-free electrochemical immunosensor for rapid and highly sensitive detection of *Brucella abortus* in serum[J]. Microchem J, 2024, 207: 111897. DOI:10.1016/j.microc.2024.111897.

[22] PELTOMAA R, BENITO-PEÑA E, BARDERAS R, *et al*. Phage display in the quest for new selective recognition elements for biosensors[J]. ACS Omega, 2019, 4(7): 11569-11580. DOI:10.1021/acsomega.9b01206.

[23] XU J T, CHAU Y, LEE Y K. Phage-based electrochemical sensors: a review[J]. Micromachines, 2019, 10(12): 855. DOI:10.3390/mi10120855.

[24] SMIRNOVA E A, VASIN A V, SANDYBAEV N T, *et al*. Current methods of human and animal brucellosis diagnostics[J]. Adv Infect Dis, 2013, 3(3): 177-184. DOI:10.4236/aid.2013.33026.

[25] 付薪静, 穆耶赛尔·艾尼娃尔, 赵帆, 等. 布鲁氏病菌临床实验室诊断技术应用研究进展[J/OL]. 中华临床医师杂志(电子版), 2024, 18(10): 949-954. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2024.10.011.
FU X J, MUYESAIER A N W E, ZHAO F, *et al*. Progress in applied laboratory diagnostic techniques for brucellosis[J/OL]. Chin J Clin Electron Ed, 2024, 18(10): 949-954. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2024.10.011.

[26] SEE W, EDWARDS W H, DAUWALTER S, *et al*. *Yersinia enterocolitica*: an unlikely cause of positive brucellosis tests in greater Yellowstone ecosystem *Bison* (*Bison bison*)[J]. J Wildl Dis, 2012, 48(3): 537-541. DOI: 10.7589/0090-3558-48.3.537.

[27] ISLAM M S, HABIB M A, TONU N S, *et al*. Beyond serology: a meta-analysis of advancements in molecular detection of *Brucella* spp. in seronegative animals and biological samples[J]. Vet Med Sci, 2025, 11(1): e70200. DOI:10.1002/vms3.70200.

(**收稿**:2026-02-03;**修回**:2026-03-11)

(编辑 汤锦波)