DOI:10.12441/spyswjs.20230705003 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0097-09

Escherichia coli O157:H7的表面增强拉曼光谱检测方法建立

王盼雪 李 岑 李 香 刘 莹 李国梁

(陕西科技大学食品科学与工程学院,陕西 西安,710021)

摘要:【目的】提高大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*) O157:H7检测的特异性和灵敏度。【方法】基于磁分离和信号放大策略,结合表面增强拉曼光谱(SERS)技术建立了一种特异性好、灵敏度高的*E. coli* O157:H7检测方法。以适配体为识别元件,联合磁珠和聚苯乙烯(PS)微球,分别构建分离探针MB@Apt和信号放大型拉曼标签4-MBN@PS@Apt。【结果】当*E. coli* O157:H7存在时,MB@Apt、4-MBN@PS@Apt与*E. coli* O157:H7可形成MB@Apt/*E. coli* O157:H7/4-MBN@PS@Apt“三明治”结构复合物,该复合物可借助外源磁场实现快速分离和富集;加入四氢呋喃(THF)后,拉曼标签上负载的低生物背景拉曼报告物4-MBN可被快速释放。4-MBN在1 073.9 cm^{-1}处的相对拉曼强度与*E. coli* O157:H7浓度的对数值在1×10^3~1×10^8 CFU/mL的线性关系良好,决定系数(R^2)为0.98。该方法对*E. coli* O157:H7的检测限(LOD)为312 CFU/mL,在自来水和牛奶样本中的检测回收率为61.87%~135.55%,相对标准偏差(RSD)为0.27%~5.28%。【结论】该方法对*E. coli* O157:H7的检测灵敏度较高,为食源性致病菌的快速检测提供了新思路。

关键词:*Escherichia coli* O157: H7;快速检测;表面增强拉曼光谱;聚苯乙烯微球;低生物背景

Establishment of Surface-enhanced Raman Spectroscopy for Detection of *Escherichia coli* O157:H7

WANG Panxue LI Cen LI Xiang LIU Ying LI Guoliang

(School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to improve the detection specificity and sensitivity for *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7. [**Method**] A highly specific and sensitive method for the detection of *E. coli* O157: H7 was established based on magnetic separation and signal amplification strategies combined with surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). Aptamers were used as recognition elements and combined with magnetic beads and polystyrene (PS) microspheres to construct a separation probe (MB@Apt) and a signal amplification Raman tag (4-MBN@PS@Apt), respectively. [**Result**] In the presence of *E. coli* O157: H7, MB@Apt and 4-MBN@PS@Apt formed a "sandwich" structured composite (MB@Apt/*E. coli* O157: H7/4-MBN@PS@Apt), which could be rapidly separated and enriched by an external magnet. After tetrahydrofuran (THF) was added, the low biological background Raman reporter 4-MBN in the Raman tag was quickly released. The relative Raman intensity of 4-MBN at 1 073.9 cm^{-1} showed a good linear relationship with the logarithm of *E. coli* O157: H7 concentration in the range of 1×10^3 to 1×10^8 CFU/mL, with a determination coefficient (R^2) of 0.98. The established method showed a limit of detection (LOD) of 312 CFU/mL for *E. coli* O157:H7, the recovery rates ranging from 61.87% to 135.55% in tap water and milk samples,

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(32102063);陕西科技大学高水平博士人才科研启动项目(2017BJ-51)。

通信作者:王盼雪(1988—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品质量与安全检测研究。E-mail:wang-panxue@sust.edu.cn

收稿日期:2023-07-05 **修回日期:**2023-09-26

and relative standard deviations (RSD) between 0.27% and 5.28%. [**Conclusion**] This method exhibited high detection sensitivity for *E. coli* O157:H7 and provided a new approach for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria.

Keywords: *Escherichia coli* O157: H7; rapid detection; surface-enhanced Raman spectroscopy; polystyrene microspheres; low biological background

E. coli O157∶H7是一种革兰氏阴性细菌，属于肠出血型大肠杆菌（*Enterohemorrhagic Escherichia coli*）的一种血清型[1]。该菌可产生志贺毒素，引起人体肠道、肾脏、中枢神经系统等组织的血管内皮细胞病变，导致出血性结肠炎（HC）、溶血性尿毒症综合征（HUS）等疾病，严重时可危及生命[2-4]。因此，建立*E. coli* O157∶H7的快速、灵敏检测方法，对保障食品安全和及时发现、控制其引发的食源性疾病具有重要意义。

目前，我国对食品中*E. coli* O157∶H7的标准检测方法为常规培养法和免疫磁珠捕获法[5]。前者通过增菌、分离后，经血清学试验和生化反应对其进行分析鉴定；后者利用免疫磁珠捕获，经显色平板培养后，通过菌落特征进行识别。尽管标准检测方法准确性高、成本低，但操作步骤烦琐、检测时间长，无法满足快速检测需求。近年来，研究者开发了多种*E. coli* O157∶H7的快速检测技术[6-9]。这些方法虽然可以显著缩短检测时间，但存在检测成本高、依赖大型设备和专业技术人员等缺点。

SERS具有操作简便、响应速度快、可指纹识别等优势，在食源性致病菌快速检测方面展现出良好的应用前景[10-11]。为实现*E. coli* O157∶H7的快速灵敏检测，研究者开发了不同的SERS检测方法[12-14]，这些方法虽然在一定程度上提高了检测的灵敏度，但仍存在特异性差、易受基质干扰等问题，难以实现复杂食品基质中食源性致病菌的快速检测。作者利用SERS技术，结合特异性磁分离和信号放大策略，构建了一种快速灵敏的*E. coli* O157∶H7检测方法，并系统优化了试验参数，评价了其检测性能，为食源性致病菌的快速检测提供了一种新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

四水合氯金酸、柠檬酸钠、氯化钠∶天津天力化学试剂有限公司；1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺、*N*-羟基琥珀酰亚胺、四巯基苯甲腈、THF、磷酸氢二钠∶上海阿拉丁生化科技股份有限公司；聚苯乙烯微球∶苏州知益微球科技有限公司；表面修饰链霉亲和素磁珠∶上海碧云天生物技术有限公司；*E. coli* O157∶H7适配体∶生工生物工程（上海）股份有限公司。

生物素标记适配体序列∶5′-Biotin-TTTTTTTCCGGACGCTTATGCCTTGCCATCTACAGAGCAGGTGTGACGG-3′；氨基标记适配体序列∶5′-NH_2C_6-TTTTTTTCCGGACGCTTATGCCTTGCCATCTACAGAGCAGGTGTGACGG-3′。

1.2 仪器与设备

便携式拉曼光谱仪∶BWS465-785型，美国B&W公司；紫外分光光度计∶Evolution 201型，美国Thermo Fisher Scientific公司；高速离心机∶H1750R型，湖南湘仪离心机仪器有限公司；超净工作台∶HCB-1300V型，青岛海尔生物医疗股份有限公司；恒温振荡器∶THZ-98A型，上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 检测原理

SERS技术结合特异性磁分离与信号放大策略检测*E. coli* O157∶H7的原理见图1。首先，利用氨基标记的适配体、低生物背景拉曼报告物4-MBN和聚苯乙烯微球制备*E. coli* O157∶H7的拉曼标签；同时，利用生物素修饰的适配体和链霉亲和素修饰的磁珠制备*E. coli* O157∶H7的分离探针。当*E. coli* O157∶H7存在时，分离探针与拉曼标签通过适配体的特异性识别作用与*E. coli* O157∶H7形成“三明治”结构复合物。随后，借助外源磁铁分离复合物，并加入THF释放出拉曼标签负载的4-MBN。最后，以金溶胶为SERS增强基底，利用便携式拉曼光谱仪检测洗脱液中的4-MBN，通过4-MBN的特征SERS信号实现*E. coli* O157∶H7的高灵敏检测。

1.4 研究方法

1.4.1 *E. coli* O157∶H7的制备

取10 μL *E. coli* O157∶H7菌液接种于10 mL灭菌的LB培养基中，37 ℃恒温振荡培养至OD_{600}值约为1。用无菌生理盐水稀释*E. coli* O157∶H7菌液，并用平板培养法进行计数。取1 mL菌液，以6 000 r/min离心5 min，弃去上清液后用PBS缓冲液（pH 7.4）清洗3次，重悬于1 mL的PBS缓冲液中备用。

1.4.2　分离探针MB@Apt的制备

用无核酸酶水配制浓度为100 μmol/L的适配体溶液，充分混匀后，分装于离心管中，-20 ℃保存备用。取15 μL链霉亲和素修饰的磁珠，在外源磁场作用下弃去上清液，分别加入50 μL的TBS缓冲液洗涤并重悬链霉亲和素修饰的磁珠。加入1 μL 50 μmol/L的生物素修饰的适配体溶液，于37 ℃孵育30 min，磁分离后用PBS缓冲液洗去多余的适配体，最后用15 μL PBS缓冲液重悬备用。

1.4.3　Au NPs溶胶的制备与表征

采用柠檬酸钠还原法制备Au NPs溶胶[15]。将300 μL $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$（10 g/L）和30 mL去离子水加入100 mL锥形瓶中，用磁力搅拌器以1 400 r/min搅拌并快速加热至沸腾。沸腾后立即加入180 μL柠檬酸钠（10 g/L），继续搅拌加热，当溶液变为酒红色后停止加热，冷却至室温后于4 ℃保存。将合成的Au NPs溶胶按照体积比1∶2加水稀释，采集稀释液测定UV-Vis吸收光谱。将合成的Au NPs溶胶按照体积比1∶50加水稀释，用纳米粒度分析仪及Zeta电位分析仪测定其粒径和表面电荷。

1.4.4　拉曼标签4-MBN@PS@Apt的制备

将5 μL 100 g/L的PS微球与87 μL去离子水加入1.5 mL离心管中，涡旋混匀1 min。加入50 μL含1×10^{-3} mol/L 4-MBN的THF溶液，涡旋5 min使PS微球充分吸附拉曼报告物，离心弃去上清液，用去离子水洗涤沉淀物3次以除去多余的THF，将洗涤后的4-MBN@PS重悬于去离子水中备用。制备Apt功能化的4-MBN@PS时，取5 μL 4-MBN@PS，离心弃去上清液，加入10 μL EDC（40 mmol/L）、10 μL NHS（100 mmol/L）和30 μL MES（pH 6.0），室温孵育15 min以激活羧基，离心收集活化的4-MBN@PS。向活化后的4-MBN@PS中加入50 μL PBS、1 μL 50 μmol/L氨基标记的适配体溶液，于37 ℃孵育2 h，用去离子水洗涤3次以除去游离DNA，然后将4-MBN@PS@Apt重悬于PBS缓冲液中，于4 ℃保存备用。

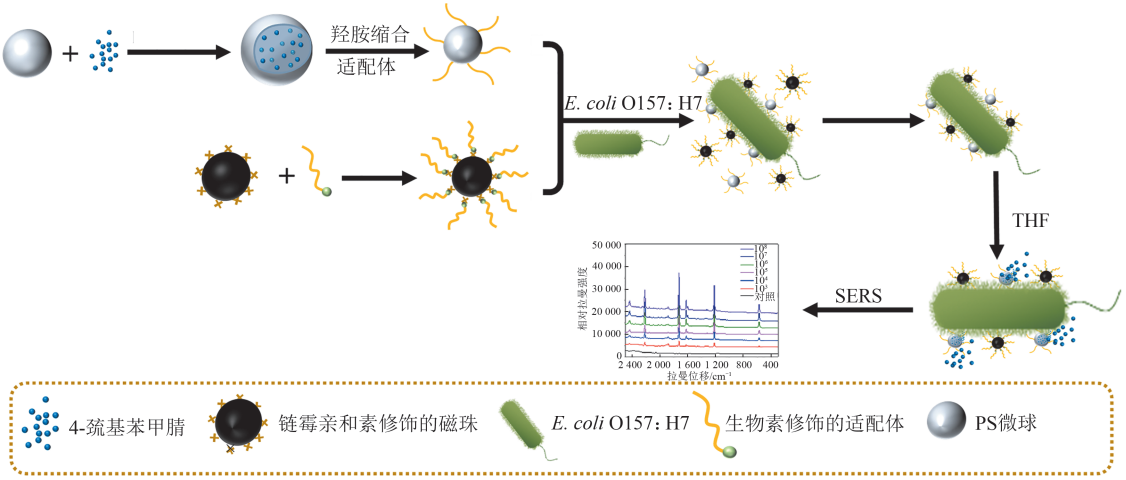


图1　SERS技术结合磁分离和信号放大策略检测*E. coli* O157:H7的原理图

Fig. 1　Schematic diagram of detecting *E. coli* O157:H7 by SERS combined with magnetic separation and signal amplification strategies

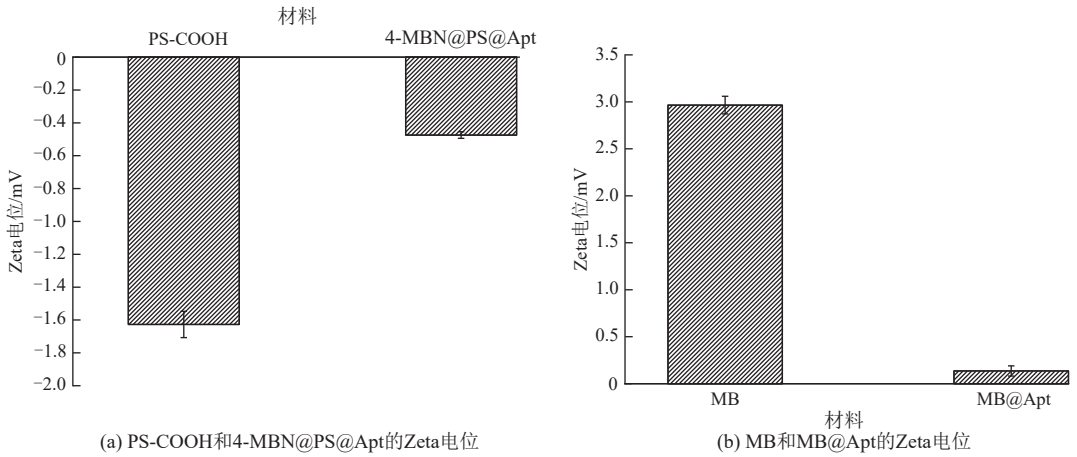
1.4.5　SERS检测

将16 μL MB@Apt、4 μL 4-MBN@PS@Apt和80 μL待测样品溶液加入1.5 mL离心管中，于37 ℃振荡孵育30 min。通过磁分离获得复合物，用灭菌水洗涤3次，加入40 μL THF释放拉曼标签中的4-MBN，收集洗脱液。取40 μL洗脱液和160 μL Au NPs充分混匀，转移至狭缝式微量比色皿中，在激发光波长785 nm、积分时间5 s、积分次数3次、激光功率320 mW条件下采集SERS，每个样品采集5条代表性光谱。

2　结果与讨论

2.1　材料表征

利用Zeta电位分析仪表征材料的表面电荷。PS-COOH经过功能化修饰后，Zeta电位从-1.6 mV变为-0.4 mV，见图2（a）。MB修饰适配体后，Zeta电位从2.90 mV降低至0.13 mV，见图2（b）。结果表明，材料表面成功连接了适配体[16]。



(a) PS-COOH和4-MBN@PS@Apt的Zeta电位　(b) MB和MB@Apt的Zeta电位

图 2　分离探针和拉曼标签的 Zeta 电位表征结果

Fig. 2　Results of Zeta potential characterization of the separation probe and the Raman tag

2.2　试验条件优化结果

2.2.1　MB 添加量的优化

作者利用链霉亲和素和生物素之间的强相互作用制备了磁分离探针 MB@Apt，用于捕获和分离 *E. coli* O157∶H7。试验中比较了 0、5、10、15、20、30、40、50 μL MB 与 1 μL 50 μmol/L 适配体溶液制备 MB@Apt 后上清液的 UV−Vis 吸收光谱，见图 3。随着 MB 添加量的增加，磁分离后上清液在 260 nm 处的吸光度逐渐降低，表明上清液中的 DNA 浓度随 MB 添加量的增多逐渐减少。当 MB 添加量为 50 μL 时，260 nm 处的吸光度与空白对照基本一致。综合考虑 MB 表面适配体的修饰量及试剂消耗，后续试验选择 40 μL 作为制备 MB@Apt 的最佳 MB 添加量。

2.2.2　Au NPs 与 4-MBN 的体积比优化

Au NPs 与 4-MBN 的体积比直接影响 SERS 信号强度和检测灵敏度。在 4-MBN 浓度为 1×10^{-6} mmol/L 条件下，比较 Au NPs 与 4-MBN 的体积比分别为 1∶1、3∶2、7∶3、4∶1、17∶3 和 9∶1 时，采集的 SERS 中 4-MBN 的相对拉曼强度，见图 4。随着 Au NPs 与 4-MBN 体积比的增加，4-MBN 在 1 073.9、1 586.1、2 227.2 cm^{-1} 拉曼位移处的相对拉曼强度先升高后降低。当体积比为 4∶1 时，4-MBN 的相对拉曼强度达到最大值。这可能是因为当体积比为 1∶1~4∶1 时，体系中 Au NPs 用量增加提高了 4-MBN 的释放效果，导致 4-MBN 的相对拉曼强度增强；而体积比为 4∶1~9∶1 时，过量 Au NPs 稀释了检测系统中的 4-MBN，致使其相对拉曼强度下降。因此，后续试验中将 Au NPs 与 4-MBN 的体积比设定为 4∶1。

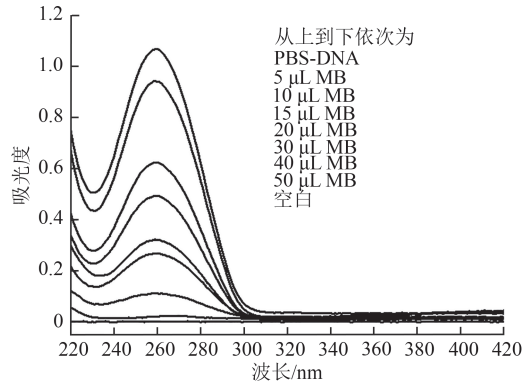
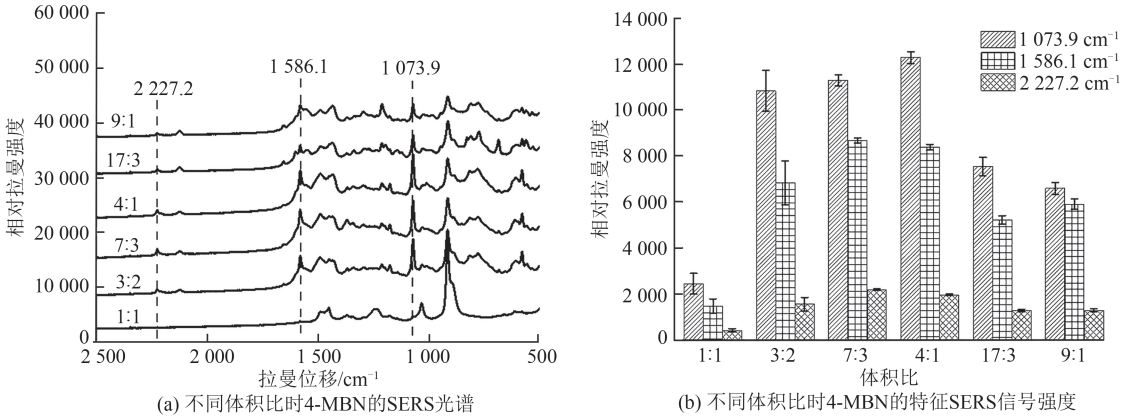


图 3　不同体积 MB 制备 MB@Apt 后上清液的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 3　UV-Vis absorption spectra of the supernatants of MB@Apt prepared with different volumes of MB

2.2.3　4-MBN 浓度的优化

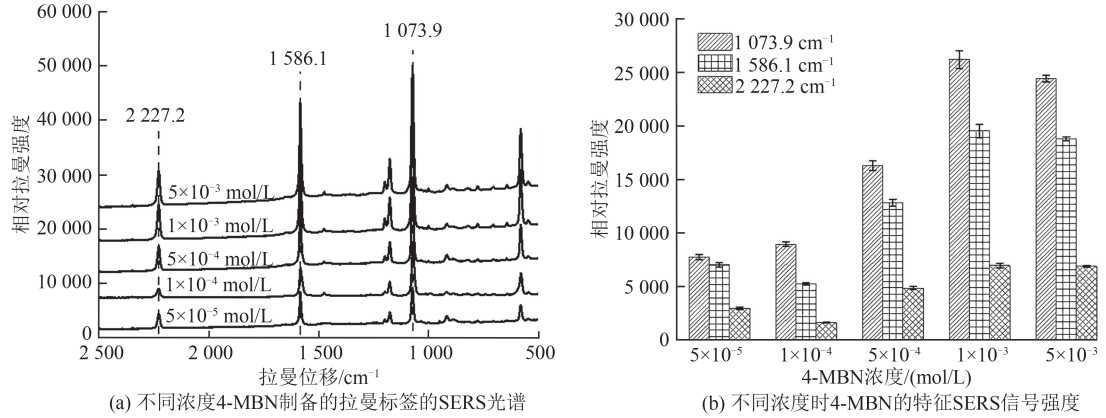
PS 微球负载拉曼报告物的数量直接影响 SERS 适配体传感器的灵敏度。单个 4-MBN@PS@Apt 拉曼标签封装的 4-MBN 数量越多，标签产生的 SERS 响应值越大。作者利用浓度为 5×10^{-5}~5×10^{-3} mol/L 的 4-MBN 制备 4-MBN@PS@Apt，并比较了加入 THF 后不同组别释放的 4-MBN 的相对拉曼强度，见图 5(a)。相对拉曼强度随 4-MBN 浓度的增加而增大。4-MBN 在 1 073.9、1 586.1、2 227.2 cm^{-1} 拉曼位移处的相对拉曼强度见图 5(b)。随着 4-MBN 浓度的增加，其相对拉曼强度先升高后趋于稳定。这可能是由于当 4-MBN 浓度小于 1×10^{-3} mol/L 时，PS 微球通过溶胀作用不断吸附溶液中的 4-MBN，随后也会释放更多的 4-MBN；当 4-MBN 浓度大于 1×10^{-3} mol/L 时，PS 微球对 4-MBN 的吸附达到饱和，导致相对拉曼强度趋于稳定。因此，后续试验选择 4-MBN 的浓度为 1×10^{-3} mol/L。



(a) 不同体积比时4-MBN的SERS光谱　(b) 不同体积比时4-MBN的特征SERS信号强度

图4　Au NPs与4-MBN体积比优化

Fig. 4　Optimization of the volume ratio of Au NPs to 4-MBN



(a) 不同浓度4-MBN制备的拉曼标签的SERS光谱　(b) 不同浓度时4-MBN的特征SERS信号强度

图5　制备拉曼标签的4-MBN浓度优化

Fig. 5　Optimization of the concentration of 4-MBN used for preparing the Raman tag

2.2.4　THF体积分数的优化

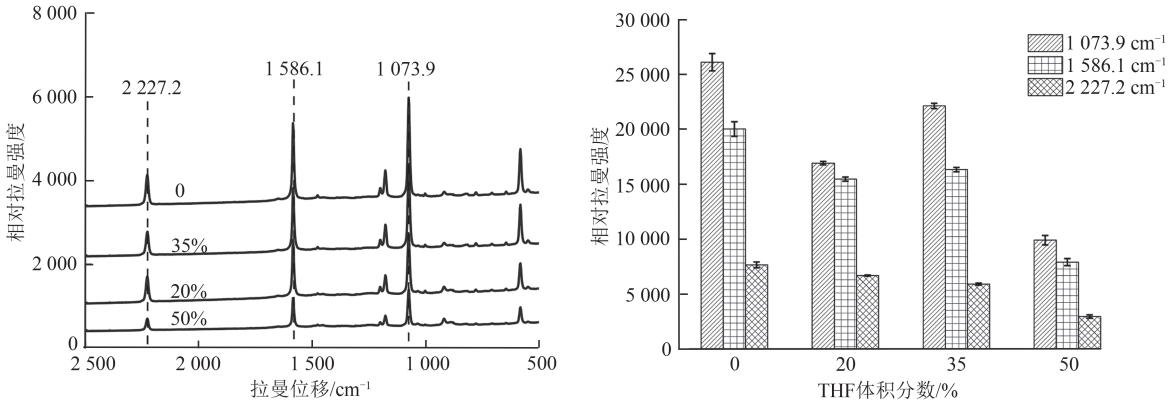
THF体积分数在诱导PS溶胀吸附4-MBN制备4-MBN@PS@Apt的过程中至关重要[17-18]。为获得最佳响应信号，采集了THF体积分数分别为20%、35%、50%时制备的4-MBN@PS@Apt释放的4-MBN的SERS，结果见图6(a)。4-MBN的相对拉曼强度随着THF体积分数的增加呈先增强后减弱的趋势。当体积分数为35%时，拉曼标签释放的4-MBN的相对拉曼强度最高，见图6(b)。这可能是由于在体积分数35%的THF水溶液中，PS微球的可逆收缩能力最强，可封装较多的4-MBN。相比之下，较低体积分数的THF水溶液会导致PS微球溶胀不充分，仅能吸附少量的4-MBA；而较高体积分数的THF水溶液体系抑制PS微球从溶胀状态恢复，进而导致4-MBN提前泄漏。因此，THF体积分数为35%是制备4-MBN@PS@Apt的最佳条件。

2.2.5　THF添加量的优化

THF添加量对4-MBN@PS@Apt拉曼标签释放4-MBN起关键作用。THF添加量在20~80 μL时，溶胀4-MBN@PS@Apt标签释放的4-MBN的SERS见图7(a)。使用40 μL THF处理4-MBN@PS@Apt标签释放的4-MBN的相对拉曼强度最强。4-MBN在1 073.9、1 586.1、2 227.2 cm^{-1}拉曼位移处的相对拉曼强度见图7(b)。结果表明，随着THF体积的增加，4-MBN的相对拉曼强度先升高后降低，在40 μL时达到最大值。这是由于当THF添加量为20~40 μL时，其体积的增加使PS微球溶胀程度增大，从而促使更多4-MBN从标签中释放；而过量的THF会稀释释放的4-MBN，从而促使更多的4-MBN被释放，导致相对拉曼强度下降。因此，后续试验选择40 μL作为处理THF4-MBN@PS@Apt拉曼标签释放4-MBN的最佳THF添加量。

2.2.6　PBS体积的优化

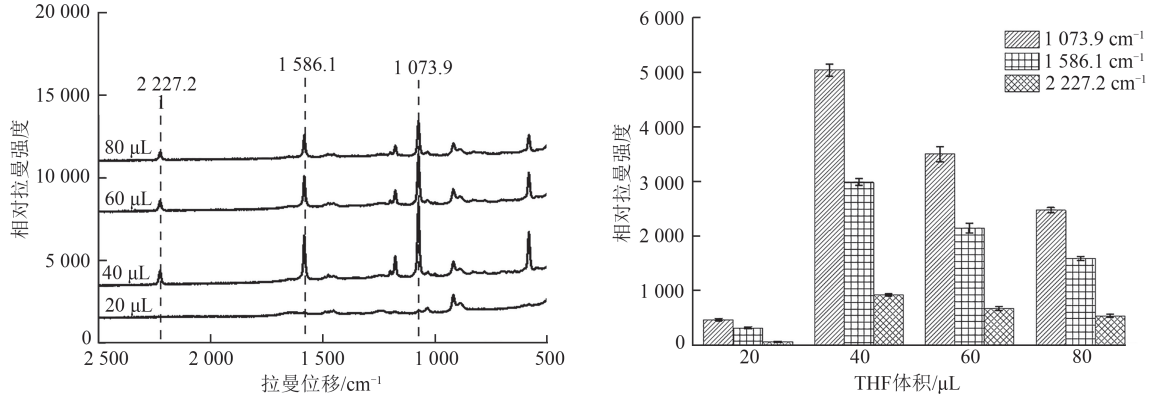
研究发现，使用THF处理拉曼标签4-MBN@PS@Apt以释放4-MBN的过程中，少量



(a) 不同THF体积分数制备的拉曼标签的SERS光谱　(b) 不同THF体积分数时4-MBN的特征SERS信号强度

图 6　THF 体积分数优化

Fig. 6　Optimization of THF volume fraction



(a) 不同THF添加量制备的拉曼标签的SERS光谱　(b) 不同THF添加量时4-MBN的特征SERS信号强度

图 7　THF 添加量优化

Fig. 7　Optimization of THF dosage

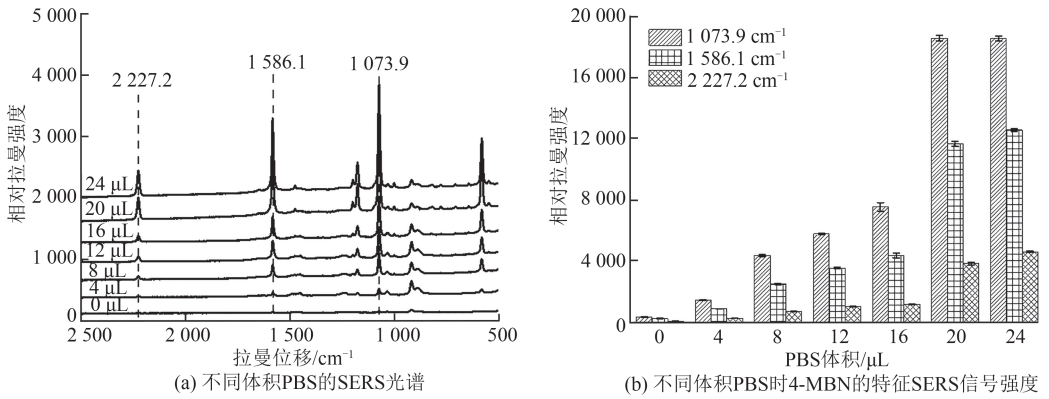
PBS可以促进4-MBN的释放。不同体积PBS（0~24 μL）对4-MBN释放效果的影响见图8。相较于未添加PBS的样品，添加20 μL PBS的样品的相对拉曼强度更高。SERS中4-MBN在1 073.9、1 586.1、2 227.2 cm^{-1}拉曼位移处的相对拉曼强度见图8（b）。结果表明，随着PBS体积的增加，4-MBN相对拉曼强度先升高后趋于稳定，在20 μL时达到最大值。这可能是由于少量的PBS能够调节4-MBN@PS@Apt表面的电荷，进而有助于拉曼报告物的释放。因此，选择添加20 μL PBS用于拉曼报告物的释放及后续检测。

2.2.7　4-MBN@PS@Apt与MB@Apt体积比的优化

拉曼标签4-MBN@PS@Apt与分离探针MB@Apt的体积比直接影响SERS传感器检测*E. coli* O157∶H7的灵敏度。在*E. coli* O157∶H7浓度为1×10^7 CFU/mL时，采集了4-MBN@PS@Apt与MB@Apt体积比分别为9∶1、4∶1、7∶3、3∶2和1∶1时的SERS，结果见图9（a）。结果表明，SERS适配体传感器对*E. coli* O157∶H7的响应值随4-MBN@PS@Apt在体系中占比的增加呈先增加后降低的趋势。SERS适配体传感器在1 073.9、1 586.1、2 227.2 cm^{-1}拉曼位移处的相对拉曼强度见图9（b）。当4-MBN@PS@Apt与MB@Apt体积比为4∶1时，相对拉曼强度最强；当4-MBN@PS@Apt占比进一步增加时，相对拉曼强度降低。因此，后续试验选择4-MBN@PS@Apt及MB-Apt体积比为4∶1。

2.3　*E. coli* O157∶H7的检测

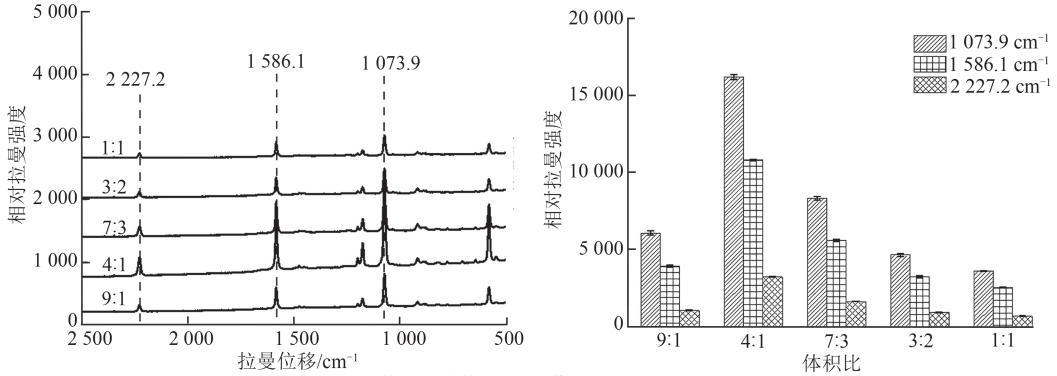
在最佳检测条件下，利用构建的SERS适配体传感器检测浓度为1×10^3~1×10^8 CFU/mL的*E. coli* O157∶H7，结果见图10。随着*E. coli* O157∶H7浓度的增加，相对拉曼强度逐渐增强。1 073.9 cm^{-1}拉曼位移处的相对拉曼强度见图10（b），可以看出，相对拉曼强度随着*E. coli* O157∶H7浓度的增加呈递增趋势。此外，*E. coli* O157∶H7浓度在1×10^3~1×10^8 CFU/mL时，相对拉曼强度与*E. coli*



(a) 不同体积PBS的SERS光谱　　(b) 不同体积PBS时4-MBN的特征SERS信号强度

图 8　PBS 体积的优化

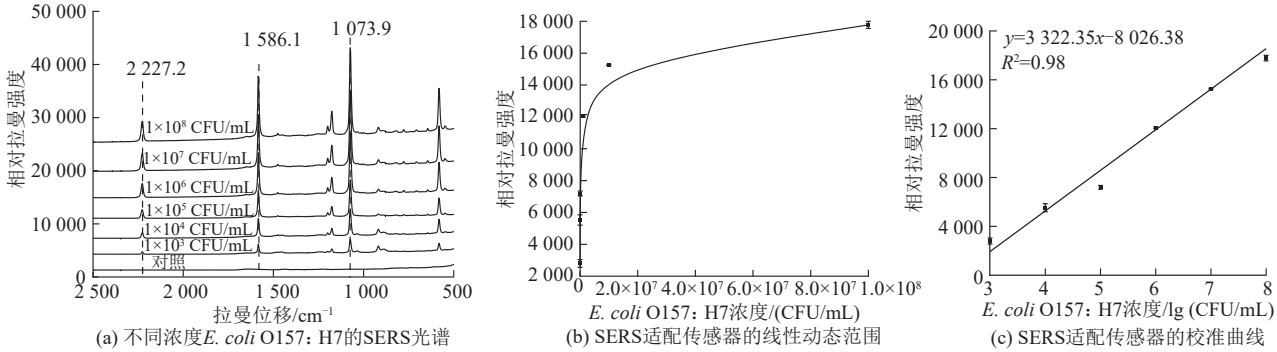
Fig. 8　Optimization of PBS volume



(a) 不同4-MBN@PS@Apt与MB@Apt体积比时的SERS光谱　　(b) 不同体积比时4-MBN的特征SERS信号强度

图 9　拉曼标签 4-MBN@PS@Apt 与捕获探针 MB@Apt 体积比的优化

Fig. 9　Optimization of the volume ratio of the Raman tag 4-MBN@PS@Apt to the separation probe MB@Apt



(a) 不同浓度*E. coli* O157：H7的SERS光谱　　(b) SERS适配传感器的线性动态范围　　(c) SERS适配传感器的校准曲线

图 10　利用 SERS 适配体传感器检测 *E. coli* O157∶H7

Fig. 10　Detection of *E. coli* O157∶H7 by the SERS aptamer sensor

O157∶H7浓度的对数值呈现良好的线性关系，线性回归方程为y=3 322.25lg C−8 026.38，R^2为0.98。利用定量限（LOQ）的计算公式确定LOQ为528 CFU/mL；利用LOD的计算公式确定LOD为312 CFU/mL。我国国家标准要求食品中不得检出*E. coli* O157∶H7，尽管本方法的灵敏度尚未满足国家标准要求，但其性能与其他研究的方法相当。如Shang等[19]利用免疫磁珠和AgPt纳米粒子装饰的金属有机框架开发了一种检测自来水中*E. coli* O157：H7的传感器，该传感器的灵敏度为276 CFU/mL。

2.4　贮存稳定性分析

SERS适配体传感器检测*E. coli* O157∶H7的稳定性是评价其性能的一个重要指标。在*E. coli* O157∶H7浓度为1×10^7 CFU/mL条件下，检测了分离探针MB@Apt和拉曼标签4-MBN@PS@Apt在

4 ℃贮存不同时间后 *E. coli* O157：H7 的相对拉曼强度，见图 11。结果表明，贮存 2 d 后，1 073.9、1 586.1、2 227.2 cm^{-1} 拉曼位移处的相对拉曼强度无显著变化。对 3 个特征峰处的相对拉曼强度进行统计学分析，发现 5 d 后相对拉曼强度分别降低了 3.16%、1.54%、0.95%，10 d 后分别降低 9.19%、6.59%、5.07%。上述结果表明，SERS 适配体传感器的分离探针和拉曼标签均具有良好的稳定性。

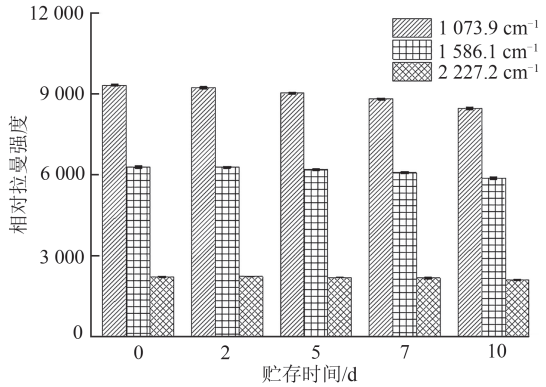


图 11　分离探针和拉曼标签贮存稳定性分析

Fig. 11　Storage stability of the separation probe and the Raman tag

2.5　特异性分析

通过比较所建立的 SERS 适配体传感器对相同浓度（1×10^7 CFU/mL）的 *E. coli* O157：H7 和 5 株非靶标菌（*E. coli* ATCC25922、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌）的检测结果，分析了该传感器的特异性，见图 12。SERS 适配体传感器对 *E. coli* O157：H7 的响应信号显著高于其他 5 株非靶标菌。结果表明，所构建的 SERS 适配体传感器对 *E. coli* O157：H7 具有良好的特异性。

2.6　实际样品检测

为验证所构建的 SERS 适配体传感器对实际样品中 *E. coli* O157：H7 的检测性能，采用该传感器对人为污染的灭菌自来水和市售常温牛奶中的 *E. coli* O157：H7 进行检测。对自来水和牛奶进行 *E. coli* O157：H7 加标，使其在样品中的最终浓度分别为 5×10^3、1×10^5、1×10^7 CFU/mL，然后利用建立的 SERS 方法对空白样品和加标样品进行检测。其中，空白样品中均未检出 *E. coli* O157：H7，加标样品的检测结果见表 1。结果表明，SERS 适配体传感器检测自来水和牛奶中 *E. coli* O157：H7 的稳定性较好，RSD 为 0.27%~5.28%。该传感器对牛奶中

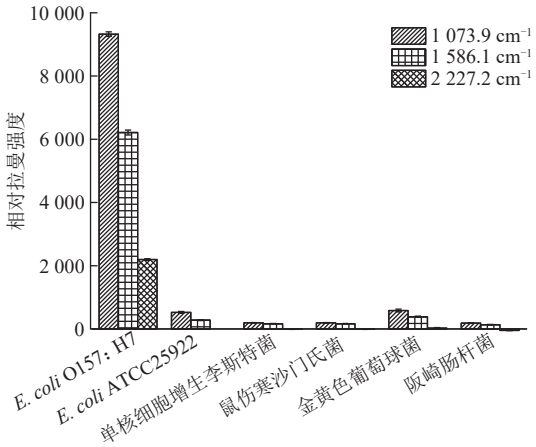


图 12　特异性分析

Fig. 12　Results of specificity analysis

E. coli O157：H7 的回收率为 79.09%~102.34%，对自来水中 *E. coli* O157：H7 的回收率为 61.87%~135.55%。推断检测自来水中 *E. coli* O157：H7 准确性差的原因主要为：1）拉曼标签在自来水中可能发生变化，PS 微球在水环境中发生收缩，导致粒径和孔径减小，使其与菌体的结合量增加，同时拉曼报告分子泄漏减少，进而引起检测回收率偏高；2）适配体对细菌的识别在缓冲液、牛奶等离子强度较高的体系中表现更佳，而在自来水中，适配体与细菌的结合效率降低，致使菌体结合的捕获探针和拉曼标签数量减少，从而导致检测的回收率偏低。

表 1　自来水和牛奶中 *E. coli* O157：H7 的检测结果

Table 1　Results of detecting *E. coli* O157：H7 in tap water and milk

样品	加标量/（CFU/mL）	检出量/（CFU/mL）	回收率/%	RSD/%
牛奶	5×10^3	4.24×10^3	84.83%	1.89%
	1×10^5	7.91×10^4	79.09%	5.28%
	1×10^7	1.02×10^7	102.34%	0.27%
自来水	5×10^3	4.66×10^3	93.20%	3.13%
	1×10^5	1.36×10^5	135.55%	0.65%
	1×10^7	6.19×10^6	61.87%	1.06%

3　结论

作者利用 SERS 技术结合磁分离和信号放大策略，构建了一种快速、灵敏的 *E. coli* O157：H7 检测方法。该方法以生物素和氨基标记的适配体为识别元件，构建磁分离探针和拉曼标签，有效克服了配对抗体筛选困难的问题。在最优条件下，该方法对 *E. coli* O157：H7 的 LOD 低至 312 CFU/mL，线

性范围为1×10^3~1×10^8 CFU/mL，R^2为0.98。该方法可以在40 min内完成实际样品中*E. coli* O157:H7的定量检测，回收率为61.87%~135.55%，RSD为0.27%~5.28%。该方法具有制样简便、灵敏度高、特异性强、检测速度快及抗基质干扰能力强等优势，为食源性致病菌的快速检测提供了新思路。

参考文献

[1] GONZÁLEZ GARCIA E A. Animal health and foodborne pathogens: enterohaemorrhagic O157:H7 strains and other pathogenic *Escherichia coli* virotypes (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC)[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2002, 5(2): 103-115.

[2] LEBLANC J J. Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157: H7 pathogenesis [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2003, 29(4): 277-296.

[3] SHAO K K, SHI X H, ZHU X J, et al. Construction and optimization of an efficient amplification method of a random ssDNA library by asymmetric emulsion PCR[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2017, 64(2): 239-243.

[4] MONU E A, VALLADARES M, D'SOUZA D H, et al. Determination of the thermal inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 in buffer and a spinach homogenate [J]. Journal of Food Protection, 2015, 78(8): 1467-1471.

[5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌O157:H7/NM检验：GB 4789.36—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2017.

[6] 曹宁，申炳阳，喻梓瑄，等. 用于3种食源性致病菌核酸提取的微流控芯片制备[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(1)：28-35.
CAO N, SHEN B Y, YU Z X, et al. Microfluidic chip for nucleic acid extraction of three food-borne pathogenic bacteria[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(1): 28-35.(in Chinese)

[7] CHANG H H, LV J, ZHANG H C, et al. Photoresponsive colorimetric immunoassay based on chitosan modified AgI/TiO_2 heterojunction for highly sensitive chloramphenicol detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 87: 579-586.

[8] KIM J, KIM M, KIM S, et al. Sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 from foods using a luciferase-reporter phage phiV10lux [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 254: 11-17.

[9] LIU Y J, SINGH P, MUSTAPHA A. High-resolution melt curve PCR assay for specific detection of *E. coli* O157:H7 in beef[J]. Food Control, 2018, 86: 275-282.

[10] CHUESIANG P, RYU V, SIRIPATRAWAN U, et al. Aptamer-based surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) for the rapid detection of *Salmonella* enteritidis contaminated in ground beef[J]. LWT-Journal of Food Science and Technology, 2021, 150: 111937.

[11] LIN H Y, HUANG C H, HSIEH W H, et al. On-line SERS detection of single bacterium using novel SERS nanoprobes and a microfluidic dielectrophoresis device [J]. Small, 2014, 10(22): 4700-4710.

[12] LIU H B, CHEN C Y, ZHANG C N, et al. Functionalized AuMBA@Ag nanoparticles as an optical and SERS dual probe in a lateral flow strip for the quantitative detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(10): 2916-2924.

[13] YOU S M, LUO K, JUNG J Y, et al. Gold nanoparticle-coated starch magnetic beads for the separation, concentration, and SERS-based detection of *E. coli* O157:H7[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(16): 18292-18300.

[14] ZHU T F, HU Y J, YANG K, et al. A novel SERS nanoprobe based on the use of core-shell nanoparticles with embedded reporter molecule to detect *E. coli* O157:H7 with high sensitivity[J]. Microchimica Acta, 2017, 185(1): 30.

[15] WANG P X, LI X, SUN Y, et al. Rapid and reliable detection and quantification of organophosphorus pesticides using SERS combined with dispersive liquid-liquid microextraction[J]. Analytical Methods, 2022, 14(45): 4680-4689.

[16] LIU J H, CHEN J H, WU D, et al. CRISPR-/Cas12a-mediated liposome-amplified strategy for the surface-enhanced Raman scattering and naked-eye detection of nucleic acid and application to food authenticity screening [J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(29): 10167-10174.

[17] LIU X J, BING T, SHANGGUAN D H. Microbead-based platform for multiplex detection of DNA and protein [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(11): 9462-9469.

[18] YAO D M, WANG H L, LU S S, et al. On-signal amplification of silver nanosol RRS/SERS aptamer detection of ultratrace urea by polystyrene nanosphere catalyst[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2022, 265: 120353.

[19] SHANG Y T, XING G W, LIN H F, et al. Portable biosensor with bimetallic metal-organic frameworks for visual detection and elimination of bacteria [J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(35): 13368-13375.

（责任编辑：刘冬梅）