

陈中婷, 杨松鑫, 张福鑫, 等. 基于金纳米球的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析快速检测技术 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (5): 90-98.

CHEN Z T, YANG S X, ZHANG F X, et al. Gold nanoparticles-based surface-enhanced Raman scattering immunochromatography for the rapid and quantitative detection of *Salmonella* Enteritis [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (5): 90-98.

基于金纳米球的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析快速检测技术

陈中婷^{1,2,3}, 杨松鑫^{1,2,3}, 张福鑫^{1,2}, 蒙淑玲^{1,3}, 陈海兰^{1,4,5},
郭隆华², 江明生^{1,4*}, 王悦靓^{2*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004;

2. 嘉兴学院生物与化学工程学院, 浙江 嘉兴 314001;

3. 广西壮族自治区兽用生物制品工程研究中心, 广西 南宁 530004;

4. 广西畜禽繁育与疾病防控重点实验室, 广西 南宁 530004;

5. 广西高校动物疫病预防与控制重点实验室, 广西 南宁 530004)

摘要: 为实现肠炎沙门菌的快速定量分析, 采用 Tris 辅助柠檬酸钠还原法制备新型胶体金并利用 Au-S 配位作用在纳米金球表面修饰一层 4-巯基苯甲酸 (4-MBA) 拉曼信号分子, 然后以此为标记材料建立肠炎沙门菌表面增强拉曼 (surface-enhancement of Raman scattering, SERS) 免疫层析检测技术, 并对其灵敏度、特异性和重复性进行考察。结果表明: 建立的 SERS 免疫层析技术对肠炎沙门菌的可视化最低检测限 (LOD) 为 10^6 CFU/mL, 而通过拉曼信号检测时 LOD 为 10^5 CFU/mL, 灵敏度比肉眼观察提高了 10 倍。在 $10^5 \sim 10^8$ CFU/mL 的浓度范围可根据标准曲线 $y = 30.23 \times \exp(-x/-1.47) - 215.83$ ($R^2 = 0.995$) 对肠炎沙门菌进行定量分析。该 SERS 免疫层析技术与鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌、甲型副伤寒沙门菌等多种血清型沙门菌和大肠杆菌、副溶血弧菌等常见病原无交叉反应, 特异性良好。同一批次的不同试纸条和不同批次的试纸条对同一样品的检测结果基本一致, 重复性良好。以粪便和鸡蛋壳为基质的加标试验回收率在 94.7%~104.9% 之间, 回收率良好。结果表明, 基于金纳米颗粒的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析快速检测技术灵敏度较高, 特异性强, 重复性好, 能弥补传统胶体金试纸条无法定量的不足, 可用于肠炎沙门菌的快速定量检测。

关键词: 肠炎沙门菌; 免疫层析; 胶体金; 表面增强拉曼散射; 快速检测

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)05-0090-09

Gold nanoparticles-based surface-enhanced Raman scattering immunochromatography for the rapid and quantitative detection of *Salmonella* Enteritis

CHEN Zhongting^{1,2,3}, YANG Songxin^{1,2,3}, ZHANG Fuxin^{1,2}, MENG Shuling^{1,3}, CHEN Hailan^{1,4,5},
GUO Longhua², JIANG Mingsheng^{1,4*}, WANG Yueliang^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. College of Biological and Chemical Sciences and Engineering, Jiaying University, Jiaying 314001, China;

3. Guangxi Zhuang Autonomous Region Veterinary Biological Products Engineering Research Center,
Nanning 530004, China;

4. Guangxi Key Laboratory of Animal Breeding and Disease Control, Nanning 530004, China;

5. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Prevention and Control of Animal Diseases,
Nanning 530004, China)

Abstract: To realize the rapid and quantitative detection of *Salmonella* Enteritis, a novel colloidal gold was prepared using the Tris-assisted sodium citrate reduction method. A layer of 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA) Raman signal molecule was conjugated on the surface of the

收稿日期: 2023-04-25; 修回日期: 2024-03-13

基金项目: 巴马人才科技专项 (巴人科 20210017); 广西自然科学基金面上项目 (2022GXNSFAA035562); 浙江省重点研发计划项目 (Q20B050018)

第一作者: 陈中婷, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 江明生, 硕士生导师, 研究方向为动物繁殖生物技术, E-mail: 13878896387@163.com; 王悦靓, 博士, 硕士生导师, 研究方向为分析化学, E-mail: wangyuel@zjxu.edu.cn.

gold nanoparticles via Au-S coordination, which was then used as the labeling material for establishing a SERS immunochromatographic assay of *S. Enteritidis*. Finally, the sensitivity, specificity and reproducibility of the assay were evaluated. The results showed that the established SERS immunochromatographic technique had a visual limit of detection (LOD) of 10^6 CFU/mL for *S. Enteritidis*, while the LOD was 10^5 CFU/mL according to the Raman signal intensity, which was 10-fold higher than that based on naked eye observation. Quantitative analysis of *S. Enteritidis* could be performed in the concentration range of $10^5 - 10^8$ CFU/mL based on the standard curve of $y = 30.23 \times \exp(-x/-1.47) - 215.83$ ($R^2 = 0.995$). This SERS immunochromatographic technique had no cross-reactivity with other *Salmonella* serotypes such as *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Paratyphi A*, and other common pathogens such as *Escherichia coli* and *Vibrio parahaemolyticus*, showing a strong specificity. The results of different test strips from the same batch and different batches for the same samples were generally consistent, suggesting good reproducibility. The recoveries of the spiked feces and egg samples ranged from 94.7% to 104.9%, showing good recoveries. The above results suggested that this gold nanoparticle-based SERS immunochromatographic technique with high sensitivity, high specificity and good repeatability, could be used for the rapid and quantitative detection of *S. Enteritidis*.

Keywords: *S. Enteritidis*; immunochromatography; colloidal gold; SERS; rapid detection

沙门菌 (*Salmonella*) 是一种革兰阴性肠道杆菌, 可感染各种动物, 引起以腹泻、肠道出血等胃肠道症状和败血症为主要临床特征沙门菌病^[1]。此外, 沙门菌也是一种最常见的食源性致病菌, 可通过污染的肉、蛋、奶等动物性食品或饮用水传播给人类, 造成中毒, 危害人类健康。据统计, 由沙门菌引起的食品中毒病例在世界各地食物中毒病例中屡居首位, 在美国, 每年就有超过 1 500 万人因感染沙门菌而发生中毒^[2-3]。肠炎沙门菌 (*Salmonella Enteritidis*) 隶属于肠杆菌科沙门菌属肠道亚种肠炎血清型, 禽、猪、马、牛、羊等养殖动物均能感染, 特别是幼龄动物。此外, 肠炎沙门菌广泛存在于肉、蛋、奶等禽畜食品中, 在家禽产品中尤其常见, 可通过食源性途径传染给人类, 引起急性肠炎等疾病。肠炎沙门菌是引起动物疾病和食物中毒最主要的沙门菌血清型, 全球每年约 40%~60% 的人类感染沙门菌案例是由肠炎沙门菌引起^[4]。据我国 2015 年食源性监测报告显示, 肠炎沙门菌是我国微生物性食源性疾病暴发的主要致病因子之一^[5], 对人类健康和安全的影 响非常大。这种血清型在非洲、欧洲、北美和亚洲部分地区尤其流行, 特别是以家禽和家禽产品等作为主要感染源, 威胁人类健康^[6]。2014 年 5 月至 9 月, 肠炎沙门菌污染的鸡蛋在英国、德国、法国、奥地利和卢森堡等多个国家引起了食品中毒大暴发, 造成了超过 350 例的感染病例^[7-8]。疾病治疗方案、控制疾病传播和保障食品安全是关键, 因此开发可靠、快速、便捷的肠炎沙门菌检测技术具有重要意义^[9-11]。

目前沙门菌的主要检测方法包括传统检测方法、聚合酶链式反应 (PCR)、环介导等温扩增技术 (LAMP)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等。其中, 采用国家强制性标准 GB 4789.4—2024 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行沙门菌分离鉴定的方法是实验室常用且比较成熟的检测方法之一, 也是细菌检测的金标准^[12-13]。PCR 检测方

法灵敏度高、特异性强^[14-16], 而 ELISA 检测方法可实现大批样品的高通量检测, 且具有较高的灵敏度和特异性^[17-18]。但这些检测方法存在操作复杂、技术要求高、需要昂贵仪器设备、耗时长等限制, 一定程度上无法满足沙门菌的快速检测需求, 特别是食品销售场所和缺乏专业兽医人员与检测设备的偏远养殖场和农户的需求^[19-21]。LAMP 检测方法借助简单的水浴锅或其他恒温设备即可快速完成沙门菌的检测, 灵敏度高, 且操作简单, 反应结果易于观察^[22-24]。但由于气溶胶污染易造成假阳性, 且 LAMP 的检测试剂价格高, 一定程度上限制了它的广泛应用。胶体金免疫层析技术操作简单、成本低、耗时短, 是目前为止最成功的即时检测技术^[25-27]。但是, 胶体金免疫层析技术的灵敏度还有待提高, 且无法实现定量检测, 因此迫切需要一种能快速灵敏且能实现定量分析的肠炎沙门菌检测技术。

表面增强拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, SERS) 是指待测分子吸附在粗糙贵金属表面时, 其拉曼信号呈现 $10^6 \sim 10^{15}$ 倍数增强的光谱现象^[28]。随着 SERS 技术的不断发展, SERS 检测技术的灵敏度与稳定性也在不断提高, 已广泛应用于环境检测^[29]、食品安全^[30]、生物医学^[31]、药物分析^[32] 等领域。Zhai 等^[33] 将制备得到的 Au@Ag 修饰的金属有机框架材料固定在 ITO 玻璃上作为 SERS 基底, 对海水样品中多菌灵的检测限达到 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$, 表现出极高的敏感性和稳定性。Weng^[34] 等以 MNPS-Au 为 SERS 基底, 建立了一种利用碱性磷酸酶 (ALP) 对 5-溴-4-氯-3-吡啶酰磷酸 (BCIP) 酶促活性检测牛奶中大肠杆菌的夹心免疫分析方法, 该方法的检出最低限为 10 CFU/mL。Wang^[35] 等以 Au@Ag NPs 为 SERS 基底, 制备了一种三明治夹层结构的新型 SERS 纳米探针, 具有高特异性和高灵敏度, 对金黄色葡萄球菌的检出最低限为 10 CFU/mL。目前利用 SERS 技术检测肠炎沙门菌的研究还很少。

为了弥补胶体金免疫层析技术灵敏度不高和无法实现定量检测的不足,本试验将 SERS 技术与胶体金免疫层析试纸条相结合,利用拉曼信号分子修饰的金纳米颗粒代替传统免疫层析技术中的金纳米颗粒作为标记材料,开发了一种用于肠炎沙门菌快速定量检测的 SERS 免疫层析试纸条,为及时制定疾病治疗方案、控制肠炎沙门菌病传播和保障食品安全提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株与检测样品来源

菌株和病毒来源见表 1。肠炎沙门菌参考菌株购于中国微生物保藏中心,其余沙门菌临床分离株由广西壮族自治区兽医研究所惠赠,细菌样品来自于本实验室分离和保存,临床样品来源于广西大学动物科学技术学院动物实验基地,无菌鸡蛋购于大型商业超市。

表 1 主要菌株、病毒及其来源

菌株	来源
肠炎沙门菌 21SL010	广西壮族自治区玉林市疾病预防控制中心
肠炎沙门菌 SH 肠炎	广西壮族自治区兽医研究所
肠炎沙门菌 SM022	广西壮族自治区兽医研究所
鼠伤寒沙门菌 CMCC 50015	中国微生物菌种保藏中心
鸡白痢沙门菌 0923	广西壮族自治区兽医研究所
斯坦利沙门菌 21SL011	广西壮族自治区玉林市疾病预防控制中心
伦敦沙门菌 21SL055	广西壮族自治区玉林市疾病预防控制中心
肯塔基沙门菌 08	广西壮族自治区产品质量检验研究院
波茨坦沙门菌 22	广西壮族自治区产品质量检验研究院
黄金海岸沙门菌 19	广西壮族自治区产品质量检验研究院
大肠杆菌 CMCC 44102	中国微生物菌种保藏中心
副溶血弧菌 ATCC 33787	中国微生物菌种保藏中心
溶藻弧菌 ATCC 17802	中国微生物菌种保藏中心
猪流行性腹泻病毒 PEDV-JX2022	广西大学动物科学技术学院

1.3 主要仪器

数控裁条机 (CTS300XYZ, 上海金标生物科技有限公司), 三维划膜喷金仪 (HM3035, 上海金标生物科技有限公司), 拉曼光谱仪 (SR-500 i-D1, 英国 ANDOR), 赛默飞透射电子显微镜 (F200S, 美国赛默飞公司)。

1.4 样品准备

将甘油低温保存的菌液从冰箱中取出,在超净台中室温融化,吸取菌液 100 μ L 加入到含有 5 mL 的 LB 培养基试管中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜后,将菌液涂布到

1.2 主要试剂

鼠抗肠炎沙门菌单克隆抗体 1 (Ab1, 货号: ACT-mAb-SMNLC-001, 批号: A684, 原始浓度: 1.9 mg/mL) 和鼠抗肠炎沙门菌单克隆抗体 2 (Ab2, 货号: ACT-mAb-SMNLC-002, 批号: A684, 原始浓度: 1.9 mg/mL), 是以肠炎沙门菌鞭毛蛋白为免疫原,通过杂交瘤技术生产并经过严格筛选的特异性抗体,购自常州中美歆新生物科技有限公司;牛血清蛋白和四氯金酸,购自美国 Sigma 公司;柠檬酸钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钾,均购自国药集团化学试剂有限公司;Tris-HCl 和羊抗鼠 IgG, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;硝酸纤维素 (NC) 膜,由美国 PALL 公司提供;样品垫、结合垫、PVC 底板和吸水纸,均购自上海金标生物科技有限公司;4-巯基苯甲酸 (4-MBA)、曲拉通 X-100、吐温 20 和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 购自美国阿拉丁工业公司。

固体培养基上。培养过夜后,挑取单菌落,用 LB 肉汤进行扩培,24 h 后将培养好的细菌离心弃上清液,PBS 重悬后,根据标准比浊管测定菌液浓度,并根据需求利用 PBS 进行稀释。

1.5 拉曼参数设定

拉曼光谱仪发射激光波长为 638 nm, 参数设定如下: 功率为 6.5 mW, 积分时间为 5 s。每次测量时在 T 线中间位置随机取 10 个点, 计算平均值作为有效数据, 确保数据的合理性和可信性。

1.6 纳米金球的合成

采用 Tris 辅助柠檬酸钠还原法制备的新型胶体金。在磁力搅拌器上,油浴加热超纯水,当油浴温度达到 100 ℃时,加入 10 mL 1% 柠檬酸钠溶液;继续加热 40 min,温度稳定于 137 ℃附近,注入 1 mL 1% 氯金酸溶液;60 s 后,往漩涡中心加入 5 mL 0.1 mol/L Tris-base 溶液,继续反应 30 min;开启通风橱加快降温,至 100 ℃时,加入 1 mL 1% 氯金酸,反应 30 min;重复上一步骤,反应结束后停止加热;在搅拌状态下自然冷却至室温;4 ℃避光保存。取制备好的胶体金 1 mL,8 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,1 mL 去离子水重悬。将 5 μL 重悬后的胶体金滴涂在铜网上,37 ℃过夜烘干,最后将样品进行透射电子显微镜 (TEM) 表征,确定金球的大小和均匀度。

1.7 拉曼信号分子标记金球的制备

将制得的纳米金先用拉曼信号分子进行修饰,使金球具有一定的表面增强拉曼光谱效应,产生拉曼信号。参考 Li 等^[36]的方法加以修改,将 1 mL 的 AuNPs 加入 1.5 mL 的干净试管中,加入 1 μL 1 mmol/L 的 4-巯基苯甲酸,混匀后室温下震荡反应 1 h,使 4-巯基苯甲酸与纳米金充分反应,然后 8 000 r/min 离心 20 min,弃掉上清液,去除多余的未反应的 4-巯基苯甲酸,1 mL 去离子水重悬,获得 Au-MBA 溶液。

1.8 拉曼免疫标签的制备

用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 将 Au-MBA 溶液的 pH 值调整为 8.5^[25]。静置 5 min 后加入 1 μL 抗沙门菌单克隆抗体 Ab2,混匀后室温下静置反应 30 min。然后加入 100 μL 10% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液,同样混匀后静置 1 h,封闭纳米金上暴露的活跃位点。接着在 4 ℃条件下 8 000 r/min 离心 20 min。弃上清液,底部的沉淀用 200 μL 的重悬液重悬。将制备好的拉曼免疫探针均匀滴涂在 5 mm 宽的结合垫上,37 ℃干燥 2.5 h。最后将干燥后的结合垫用含有干燥剂的密封袋封口 4 ℃保存。

1.9 SERS 免疫层析试纸条的组装

将抗沙门菌单克隆抗体 Ab1 和羊抗鼠 IgG 用 10 mmol/L 的 PB 溶液稀释为 1 mg/mL,然后用三维划膜仪将其分别划线于 NC 膜的中心位置,形成检测线 (T 线) 和质控线 (C 线)。立即将划好线的 NC 膜放入鼓风干燥箱中,37 ℃干燥 2.5 h。最后将烘干好的 NC 膜密封干燥保存。

先将样品垫和吸水纸用数控裁条机裁成 200 mm×20 mm 的规格,然后 NC 膜贴于 PVC 底板上,接着把结合垫贴于 NC 膜靠近 T 线的一端,两者重合 1 mm 左右,将样品垫紧贴着结合垫粘在 PVC 底板上,与结合垫重合约 2 mm。将吸水纸与 NC 膜重合 2 mm 贴

于靠近 C 线的一端。最后切割为宽 3 mm、长 6.5 cm 的试纸条,放置于含有干燥剂的自封袋中,密封保存备用。

1.10 试纸条制备工艺的优化

结合垫的处理:取 1 g 蔗糖,0.2 g BSA,0.1 g PVP,10 μL 曲拉通 X-100,100 μL 吐温-20 溶于 10 mL 去离子水中,制备出结合垫处理液。在涂布拉曼免疫探针前,将切割后的结合垫用结合垫处理液充分浸泡后,置于鼓风干燥箱中 37 ℃烘干 4 h。之后组装试纸条并对阴性样品进行检测,根据结合垫上拉曼免疫标签的释放情况和 C 线显色情况确定是否进行结合垫的处理。

NC 膜的选择:选取两种不同型号的 NC 膜,然后用三维划膜仪将鼠抗沙门菌单克隆抗体 (Ab1) 和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体分别固定于 CN140 和 PALL90 两种 NC 膜上作为检测线 (T 线) 和质控线 (C 线),然后置于鼓风干燥箱中 37 ℃烘干 2.5 h。组装试纸条并对相同的阳性样品进行检测,根据 T 线显色情况确定合适的 NC 膜。

1.11 灵敏度考察

将肠炎沙门菌用样品稀释液进行系列稀释,得到浓度为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 和 1×10^4 CFU/mL 的肠炎沙门菌稀释液。用移液枪各吸取 60 μL,滴加到制备好的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析试纸条的样品垫上,同时设阴性对照组。10 min 后,肉眼观察层析结果,C 线和 T 线都显红色判定为阳性,只有 C 线显红色判定为阴性,C 线不显色则判定为无效。同时采用拉曼光谱仪对 T 线位置的拉曼信号进行检测,每根试纸条的 T 线区域从左至右取 10 个点,计算特征拉曼位移处的拉曼信号强度平均值。试验重复 3 次,计算平均值,绘制标准曲线。

1.12 特异性考察

分别准备浓度为 1×10^7 CFU/mL 的肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌、斯坦利沙门菌、伦敦沙门菌、肯塔基沙门菌、波茨坦沙门菌、黄金海岸沙门菌、溶藻弧菌、大肠杆菌、副溶血弧菌菌液和滴度为 1.0×10^4 TCID₅₀/mL 的 PEDV 病毒液,用移液枪各吸取 60 μL,滴加到制备好的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析试纸条的样品垫上,同时设阴性对照组,等待 10 min 肉眼观察层析结果,拉曼光谱仪测定拉曼信号。试验重复 3 次。

1.13 重复性考察

从同一批次的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析试纸条中取 9 根试纸条,分别对 1×10^8 CFU/mL 和 1×10^7 CFU/mL 肠炎沙门菌阳性样品和阴性样品进行检测,反应结束后观察相同浓度下试纸条的显色情况,拉曼

光谱仪测定拉曼信号，计算变异系数 (CV) 值，分析传感器的批内重复性。

从 3 批不同的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析试纸条中分别取 3 根，并分别对 1×10^8 CFU/mL 和 1×10^7 CFU/mL 肠炎沙门菌阳性样品和阴性样品进行检测，反应结束后观察相同浓度下试纸条的显色情况，拉曼光谱仪测定拉曼信号，计算 CV 值，分析传感器的批间重复性。

1.14 实际样品加标试验

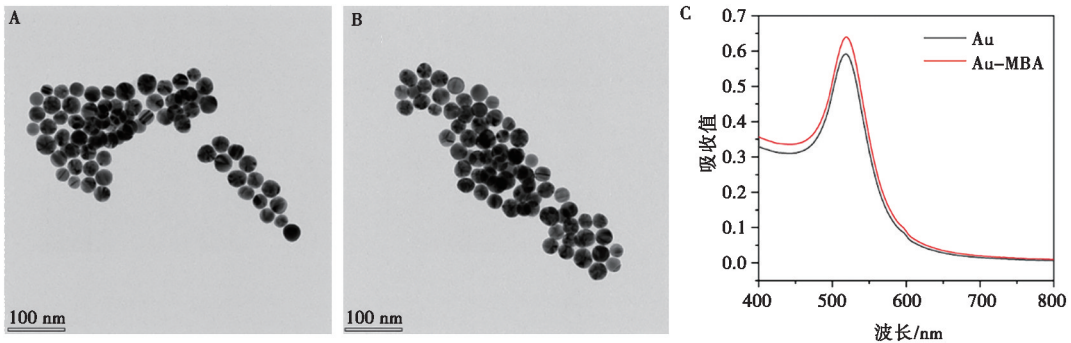
在 1 g 确定未含有肠炎沙门菌的鸡粪便样品或捣碎高压灭菌的蛋壳样品中加入一定量的肠炎沙门菌得到加标浓度分别为 3.16×10^7 、 3.16×10^6 和 3.16×10^5 CFU/g 的临床样品，搅拌均匀之后，加入 1 mL 样品处理液，混匀静置沉淀 2~5 min，然后取上清液用 SERS 免疫层析试纸条进行检测，并设阴性对照，每个浓度 3 个平行试验，肉眼观察检测结果并检测 T 线的拉曼信号值，计算每个样品的检测结果及回收率。回收率 = 该方法测得的菌量/样品中加入的菌量 ×

100%。

2 结果与分析

2.1 4-MBA 标记纳米金球制备与表征

将制得的金球和修饰拉曼信号分子 4-MBA 的金球使用紫外分光光度计和 TEM 进行表征。由图 1A 可见，所制备的金纳米球均为正圆形，且粒径大小分布较均匀 (图 1A)。修饰拉曼信号分子 4-MBA 后，金纳米球的形状和大小与修饰前基本一致 (图 1B)。紫外图谱 (图 1C) 显示，未修饰拉曼信号分子前，金纳米球溶液在 520 nm 处出现一个尖锐光谱的吸收峰，表明所制备的金纳米颗粒粒径均一度高，粒径大小约为 40 nm，与图 1A 结果相对应。修饰一层拉曼信号分子 4-MBA 后，金纳米球的紫外吸收峰发生微小的红移，即向长波长方向发生了微小的移动，说明拉曼信号分子被成功修饰到金球表面，引起了金纳米球粒径的略微变大。

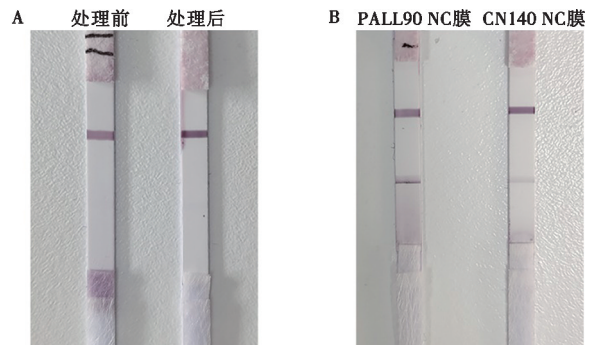


A. 金纳米球 TEM; B. 4-MBA 修饰金纳米球 TEM; C. 金纳米球修饰 4-MBA 前后的紫外光谱。

图 1 金纳米球和 4-MBA 修饰金纳米球的表征结果比较

2.2 试纸条制备条件的优化

图 2A 为使用未经样品垫处理液处理和经过处理的结合垫制备的试纸条对阴性样品的检测结果，发现未经处理的试纸条的结合垫仍呈紫红色，且 C 线清晰度低于处理后的，而使用经过处理结合垫的试纸条上 C 线非常清晰，且结合垫上无紫红色残留，说明样品垫处理液处理可显著提高结合垫上 SERS 免疫标签的释放性能和指示线位置的清晰度，因此后续试验均采用经过处理的结合垫来制备传感器。图 2B 为使用不同孔径大小的 NC 膜所制备的试纸条对同一份肠炎沙门菌溶液进行检测的结果，使用 PALL90 NC 膜的试纸条的 T 线比使用 CN140 的试纸条的 T 线更清晰，且使用 CN140 NC 膜的试纸条在 NC 膜与结合垫的交接处出现拉曼免疫标签的聚集，造成卡膜现象。因此，后续试验均使用 PALL90 NC 膜。



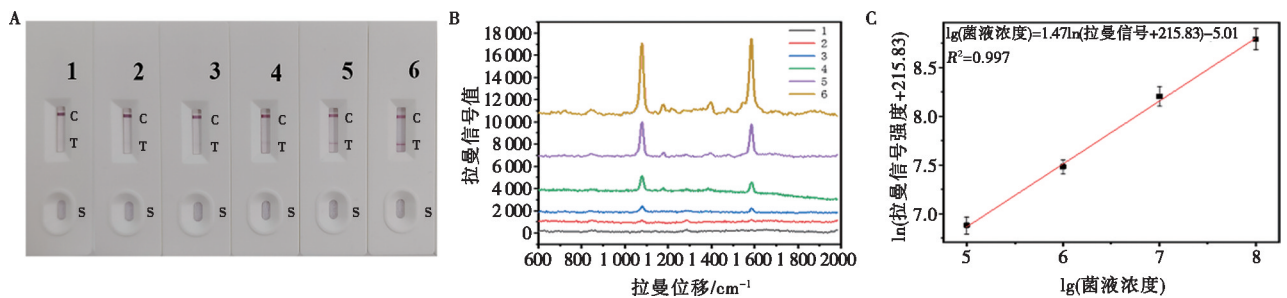
A. 结合垫处理前后对阴性样品的检测; B. 不同 NC 膜对样品的检测。

图 2 试纸条制备工艺优化结果比较

2.3 灵敏度考察

利用经优化工艺制备的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析试纸条对系列稀释的肠炎沙门菌进行检测,并测定 T 线的拉曼信号强度,绘制标准曲线。由图 3A 可见,当样品中肠炎沙门菌的浓度高于 1×10^6 CFU/mL 时, T 线明显,因此将该 SERS 免疫层析传感器对肠炎沙门菌的可视化最低检测限定为 1×10^6 CFU/mL。由图 3B 可见,在拉曼位移 $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 583\ \text{cm}^{-1}$ 处出现拉曼信号分子 4-MBA 的特征峰,且在 $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征峰在低浓度时更显著,因此以此拉曼位移处的特征峰强度作为判定和计算依据。从图中可以看出,当样品中不含有肠炎沙门菌时,在 $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ 处无拉曼特征峰,当肠炎沙门菌的浓度低至 1×10^5 CFU/mL,仍能观察到较明显的拉曼特征峰,且其拉曼信号强度

大于阈值 284.24,即阴性样品平均值+3 倍平均差,当肠炎沙门菌的浓度低至 1×10^4 CFU/mL 时,其拉曼信号强度 259.30 小于阈值,因此将通过拉曼信号对肠炎沙门菌的最低检测限定为 1×10^5 CFU/mL。与肠炎沙门菌胶体金免疫层析试纸条以及可视化检测相比,基于拉曼信号检测的灵敏度提高了将近 10 倍。将 T 线的拉曼信号强度与样品中肠炎沙门菌的浓度进行曲线拟合,发现肠炎沙门菌的对数浓度与 T 线拉曼信号强度的自然对数之间具有线性关系(图 3C),标准曲线方程为 $\lg(\text{肠炎沙门菌浓度}) = 1.47 \ln(\text{拉曼信号强度} + 215.83) - 5.01$, R^2 为 0.997,可通过测定 T 线的拉曼信号强度并根据此标准曲线实现肠炎沙门菌的定量检测。



1. 阴性样品; 2~6. 分别为 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 和 1×10^8 CFU/mL 的肠炎沙门菌样品。

A. 可视化检测结果; B. 试纸条 T 线区域拉曼光谱; C. 肠炎沙门菌浓度与 T 线区域拉曼信号强度的拟合结果。

图 3 不同浓度肠炎沙门菌灵敏度检测

2.4 特异性考察

利用所研制的肠炎沙门菌 SERS 免疫层析传感器对不同血清型的沙门菌和其他常见病原进行检测,根据可视化结果和拉曼信号检测结果考察传感器的特异性,结果如图 4 所示。SERS 免疫层析传感器可有效检测出由广西壮族自治区玉林市疾病预防控制中心提供的从食物中分离的肠炎沙门菌,也可检出有广西壮族自治区兽医研究所提供的从畜禽粪便中分离的肠炎沙门菌, T 线区域均出现明显的紫红色条带(图 4A),且采用拉曼光谱仪测定 T 线拉曼信号时,均出现显著的拉曼特征峰。当用于检测鼠伤寒沙门菌、鸡白痢沙门菌、斯坦利沙门菌、伦敦沙门菌、肯塔基沙门菌、波茨坦沙门菌、黄金海岸沙门菌等其他沙门菌血清型和大肠杆菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌和 PEDV 等其他常见病原时, T 线区域不显示条带,且对应的拉曼光谱上也无特征拉曼峰,特征拉曼位移处的拉曼信号强度与阴性样品无差异,特异性良好。

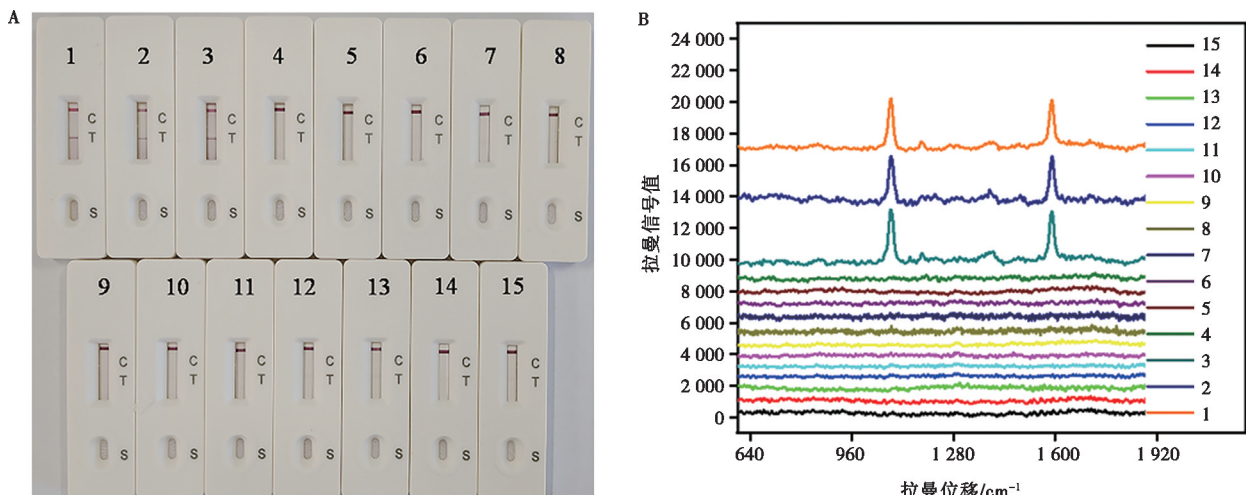
2.5 重复性考察

从同一批制备的试纸条中随机抽取 3 根试纸条,

对 1×10^8 CFU/mL 和 1×10^7 CFU/mL 的肠炎沙门菌进行检测,重复 3 次并设阴性对照,考察肠炎沙门菌 SERS 免疫层析传感器的批内重复性。如图 5 所示,3 组试纸条对对应浓度的肠炎沙门菌的检测结果基本一致, T 线清晰度、拉曼光谱图和特征位移处的拉曼信号强度无差异,对 1×10^8 CFU/mL 的肠炎沙门菌检测的 CV 值为 5.3%,对 1×10^7 CFU/mL 的肠炎沙门菌检测的 CV 值为 8.3%,均小于 10%,符合免疫层析体外诊断试剂的要求。

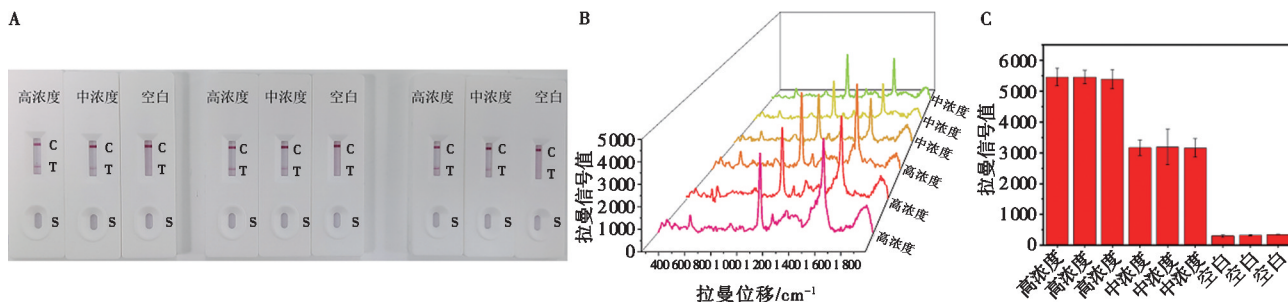
从 3 个不同批次的 SERS 免疫层析试纸条中分别随机抽取 3 根试纸条,对高浓度 (1×10^8 CFU/mL) 和中浓度 (1×10^7 CFU/mL) 的肠炎沙门菌进行检测,重复 3 次并设阴性对照,考察肠炎沙门菌 SERS 免疫层析传感器的批间重复性。由图 6 可见,不同批次的试纸条对相同浓度的肠炎沙门菌的检测结果一致, T 线清晰度无明显差异,拉曼光谱图基本一致,特征拉曼位移处的拉曼强度相似,对 1×10^8 CFU/mL 的肠炎沙门菌检测的 CV 值为 4.1%,对 1×10^7 CFU/mL 的肠炎沙门菌检测的 CV 值为 7.4%,均小于 10%,符合

免疫层析体外诊断试剂的要求。



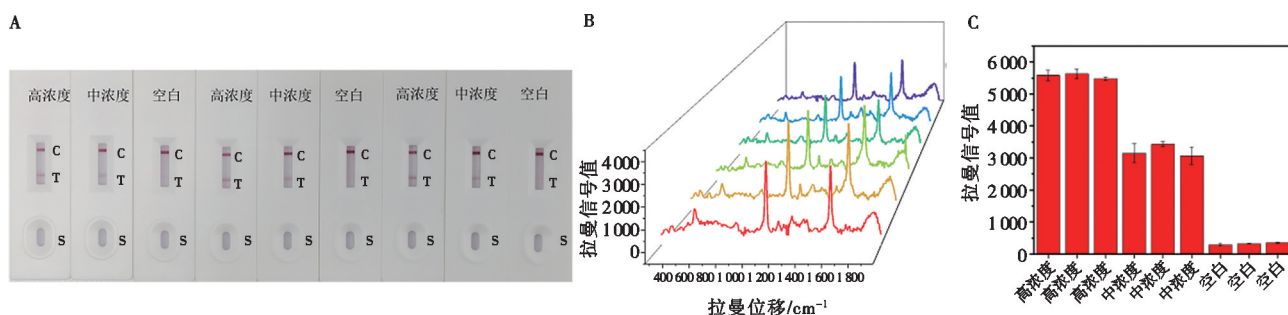
1~14. 分别为肠炎沙门菌 21SL010、肠炎沙门菌 SH 肠炎、肠炎沙门菌 SM022、鼠伤寒沙门菌 CMCC 50015、鸡白痢沙门菌 0923、斯坦利沙门菌 21SL011、伦敦沙门菌 21SL055、肯塔基沙门菌 08、波茨坦沙门菌 22、黄金海岸沙门菌 19、大肠杆菌 CMCC 44102、副溶血弧菌 ATCC 33787、溶藻弧菌 ATCC 17802、PEDV-JX2022；15. 阴性样品。A. 可视化检测结果；B. T 线区域拉曼信号检测结果。

图 4 肠炎沙门菌 SERS 免疫层析传感器特异性考察



A. 肉眼观察结果；B. 拉曼信号检测结果；C. 拉曼信号在 1 078 cm⁻¹ 检测结果。

图 5 肠炎沙门菌试纸条批内重复性考察



A. 肉眼观察结果；B. 拉曼信号检测结果；C. 拉曼信号在 1 078 cm⁻¹ 检测结果。

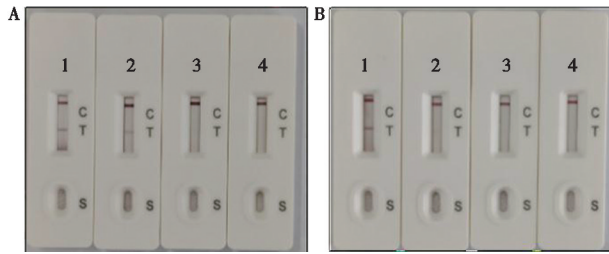
图 6 肠炎沙门菌试纸条批间重复性考察

2.6 实际样品加标试验

将一定量的肠炎沙门菌添加到临床样品粪便和鸡蛋壳中，采用所研制的 SERS 免疫层析传感器对样品中的肠炎沙门菌进行检测，根据拉曼信号强度和标准

曲线计算所测得的肠炎沙门菌量，并与加标量对比，计算加标回收率，结果如图 7 和表 1 所示。在鸡粪便和鸡蛋壳中添加 3.16×10^7 和 3.16×10^6 CFU/g 的肠炎沙门菌时，T 线明显，而添加 3.16×10^5 CFU/g 的肠

炎沙门菌和不添加肠炎沙门菌时，T线不显示，但从拉曼信号上可以看出，添加3个不同量的肠炎沙门菌时，均在特征拉曼位移处观察到拉曼信号，且信号强度显著大于阴性样品。根据拉曼信号强度和标准曲线计算出检测到的肠炎沙门菌浓度，并根据体积计算沙门菌量，计算得到的加标回收率在93.4%~109.5%之间，符合检测要求，见表2，说明该传感器可用于粪便和食物等临床实际样品中肠炎沙门菌的检测。



1~3. 肠炎沙门菌浓度分别为 3.16×10^7 、 3.16×10^6 和 3.16×10^5 CFU/g; 4. 空白对照。

A. 肠炎沙门菌粪便加标试验结果; B. 肠炎沙门菌蛋壳加标试验结果。

图7 肠炎沙门菌加标检测结果

表2 肠炎沙门菌加标检测结果

样品	加标浓度/ (CFU · g ⁻¹)	检测浓度/ (CFU · g ⁻¹)	回收率/%
粪便	3.16×10^7	3.22×10^7	101.9
	3.16×10^6	3.31×10^6	104.9
	3.16×10^5	2.99×10^5	94.7
	0	0	-
蛋壳	3.16×10^7	3.09×10^7	97.8
	3.16×10^6	2.95×10^6	93.4
	3.16×10^5	3.46×10^5	109.5
	0	0	-

3 讨论

胶体金免疫层析试纸条具有快速、便捷、成本较低、不依赖专业检验人员、不需要昂贵仪器设备等优点，已被广泛用于疾病诊断、毒品检测和环境监测中^[37]。但是一方面由于肉眼观察的局限性，胶体金试纸条的灵敏度不高；另一方面，胶体金免疫层析技术只能完成定性和半定量检测，无法实现定量检测。因此，如何突破胶体金免疫层析技术的局限，提高其灵敏度和实现定量检测，成为该领域的研究重点之一。

SERS 通过激光激发的局域等离子体激元模式引

起金属表面附近电磁场的放大，可对拉曼散射信号提高 $10^6 \sim 10^{15}$ 倍，是目前最为灵敏的技术之一。将免疫层析技术与 SERS 技术相结合，不仅保留了免疫层析快速、便捷等优势，还可极大提高检测灵敏度，实现定量检测。因此，本研究结合两者优势，构建了基于金纳米球的 SERS 免疫层析传感器，用于肠炎沙门菌的高灵敏定量检测。

在之前的胶体金免疫层析传感器相比，本研究构建的基于金纳米球的 SERS 免疫层析传感器利用具有拉曼信号的纳米金球代替胶体金作为标记材料，兼具了胶体金的生物稳定性、可视性和易于吸附抗体等特性，其表面的拉曼信号分子在激光的激发下还能提供敏感的拉曼信号，实现肠炎沙门菌的定量检测。因此，本研究的试纸条在 10 min 内完成检测，可视化检测的灵敏度与胶体金试纸条一致，最低检测限都是 1×10^6 CFU/mL，但通过拉曼信号测量的灵敏度则显著提高，最低检测限为 1×10^5 CFU/mL。根据标准曲线，所构建的传感器还能实现肠炎沙门菌的定量检测。由于金球本身的拉曼增强效应以及基底的材料特性，拉曼信号增强效果不是很好，因此未来将对纳米颗粒及基底进行更深入的研究以提高灵敏度。

4 小结

本试验将胶体金免疫层析与 SERS 相结合构建了可用于肠炎沙门菌定性和定量检测的 SERS 免疫层析传感器，在 10 min 内完成检测，通过拉曼信号检测时肠炎沙门菌的最低检测限为 1×10^5 CFU/mL，灵敏度提高了 10 倍且特异性良好。在鸡粪便和蛋壳中肠炎沙门菌的加标回收率在 93.4%~109.5% 之间，回收率良好。

参考文献:

- [1] 岳春路. 动物沙门氏菌病的临床表现与实验室检验 [J]. 养殖技术顾问, 2014 (7): 222.
- [2] MACHADO I, GARRIDO V, HERNANDEZ L I, et al. Rapid and specific detection of *Salmonella* infections using chemically modified nucleic acid probes [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1054: 157-166.
- [3] SEIF Y, KAVVAS E, LACHANCE J C, et al. Genome-scale metabolic reconstructions of multiple *Salmonella* strains reveal serovar-specific metabolic traits [J]. *Nature Communications*, 2018, 9 (1): 3771.
- [4] MADISON E P, NABIL-FAREED A, TIMOTHY J D, et al. Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European *Salmonella* serovar Enteritidis outbreak [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 274: 1-11.
- [5] 付萍, 王连森, 陈江, 等. 2015 年中国大陆食源性疾病暴发事件

- 监测资料分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31: 64-70.
- [6] JOHNSON N B, HAYES L D, BROWN K, et al. CDC national health report: leading causes of morbidity and mortality and associated behavioral risk and protective factors - United States, 2005-2013 [J]. *Mmwr Surveill Summ*, 2014, 63 (Suppl 4): 3-27.
- [7] DALLMAN T, INNS T, JOMBART T, et al. Phylogenetic structure of European *Salmonella* Enteritidis outbreak correlates with national and international egg distribution network [J]. *Microbial genomics*, 2016, 2 (8): e000070.
- [8] INNS T, LANE C, PETERS T, et al. A multi-country *Salmonella* Enteritidis phage type 14b outbreak associated with eggs from a German producer: 'near real-time' application of whole genome sequencing and food chain investigations, United Kingdom, May to September 2014 [J]. *Eurosurveillance*, 2015, 20 (16): 21098.
- [9] 张偲偲, 刘兴泉, 杨媚婷, 等. 食源性致病菌现场即时检测技术研究进展 [J]. *分析化学*, 2021, 49: 1631-1639.
- [10] 宋姣, 何婷婷, 齐冬琴. 胶体金免疫层析技术在食品快速检测中的应用 [J]. *现代食品*, 2022, 28 (21): 75-77.
- [11] BARBERI O N, BYRON C J, BURKHOLDER K M, et al. Assessment of bacterial pathogens on edible macroalgae in coastal waters [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32 (1): 683-696.
- [12] 蔡标, 戴陈伟, 吴纳新, 等. 沙门氏菌的分离与鉴定能力验证 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2018 (9): 5666-5670.
- [13] 刘莉莉. 沙门氏菌检测中应用 PCR 法与传统细菌培养法检测的分析 [J]. *医学食疗与健康*, 2020, 18 (24): 174-175.
- [14] 曲隽. 食品沙门氏菌检测中 PCR 技术的应用分析 [J]. *航空航天医学杂志*, 2021, 32 (10): 1230.
- [15] 陆瑶, 丁仕豪, 曹俊, 等. 鸡白痢沙门氏菌 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43: 1178-1183.
- [16] 靳冬, 王建召, 盛敏, 等. 动物疾病诊断中应用 PCR 时的污染控制 [J]. *河南畜牧兽医 (综合版)*, 2007 (10): 23-25.
- [17] 利志锋. 酶联免疫吸附法 (ELISA) 在乳制品检测中的应用 [J]. *食品安全导刊*, 2020 (12): 187.
- [18] 李倩影, 张抗抗, 周耀锋, 等. pH 响应比色酶联免疫吸附法检测牛奶中猪霍乱沙门氏菌 [J]. *食品工业科技*, 2021, 42: 227-232.
- [19] 张萍, 冯芳. 沙门氏菌的检测技术和方法的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2015 (6): 1834-1841.
- [20] 董冠波, 孙岩, 程小果. 沙门氏菌分子生物学检测方法研究进展 [J]. *饲料与畜牧*, 2017 (9): 66-68.
- [21] 李丹. 沙门氏菌检测技术研究进展 [J]. *山东畜牧兽医*, 2022, 43 (12): 90-92.
- [22] 刘单单, 李婉珊, 周露, 等. LAMP 和 MALDI-TOF-MS 技术在检测食品中沙门氏菌方面的应用 [J]. *质量安全与检验检测*, 2021, 31: 27-34.
- [23] 马佳睿, 谢婧, 李瑞乾, 等. LAMP 在食源性致病菌检测中的应用进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021 (17): 39-43.
- [24] 胡仲皓. 微流控-LAMP 同时检测多种食源性致病菌方法的建立与应用 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2021.
- [25] 杨松鑫, 郭隆华, 张宁, 等. 沙门氏菌胶体金免疫层析试纸条的研究与制备 [J]. *饲料研究*, 2022, 45: 108-111.
- [26] 闫灵芝. 免疫层析试纸条信号放大技术研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43 (11): 34-44.
- [27] 杜正坤, 张月, 曾景斌, 等. 胶体金试纸条检测沙门氏菌综合实验 [J]. *实验技术与管理*, 2022, 39: 50-55.
- [28] JONES A C. Raman spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 1964, 36 (5): 296-307.
- [29] 李学剑. 基于柔性材料的 SERS 基底制备及其在环境分析中的应用 [D]. 上海: 上海应用技术大学, 2022.
- [30] 李春颖, 王红义, 陈高乐, 等. 表面增强拉曼光谱法在动物源性食品安全检测中的应用 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44 (16): 1-22.
- [31] 王佳蕾. 核酸信号放大型表面增强拉曼散射 (SERS) 生物传感平台的构建及其在癌症标志物测定中的应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [32] 夏真蓉. 高通量纸质 SERS 基底的制备及其在食品安全和药物分析中的应用 [D]. 太原: 太原理工大学, 2022.
- [33] ZHAI Y, XUAN T, WU Y, et al. Metal-organic-frameworks-enforced surface enhanced Raman scattering chip for elevating detection sensitivity of carbendazim in seawater [J]. *Sensors and Actuators: B Chemical*, 2021 (9): 326.
- [34] BOZKURT A G, BUYUKGOZ G G, SOFOROGLU M, et al. Alkaline phosphatase labeled SERS active sandwich immunoassay for detection of *Escherichia coli* [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 194: 8-13.
- [35] YANLIN W, QIAOYU L, REN Z, et al. SERS-based immunocapture and detection of pathogenic bacteria using a boronic acid-functionalized polydopamine-coated Au@Ag nanoprobe [J]. *Mikrochimica Acta*, 2020, 187 (5): 290.
- [36] LI M, YANG H, LI S, et al. An ultrasensitive competitive immunochromatographic assay (ICA) based on surface-enhanced Raman scattering (SERS) for direct detection of 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ) in tissue and urine samples [J]. *Sensors & Actuators: B Chemical*, 2015, 211: 551-558.
- [37] CLAUDIO P, ARBEN M. Paper-based nanobiosensors for diagnostics [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42 (2): 450-457.