

XÁC NHẬN KHẢ NĂNG PHÁT HIỆN E.COLI BẰNG BIOCHIP THÔNG QUA PHƯƠNG PHÁP RAMAN

LÊ THỊ HUỲNH TRÂM^{1,2}, TRỊNH THỊ BÍCH HUYỀN^{1,2}, NGUYỄN THÁI ANH^{1,2},
NGUYỄN HỒNG YẾN NHI^{1,2}, ĐẶNG VŨ BÍCH HẠNH^{1,2*}

¹Khoa Môi trường và Tài nguyên, Trường Đại học Bách Khoa

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

Tóm tắt

Nghiên cứu tập trung xác nhận khả năng phát hiện DNA của E.coli dựa trên phương pháp sử dụng tia Raman. Nhận diện cảm biến được làm bằng để phủ vật liệu nano, xác nhận thông qua phương pháp SEM và EDS cùng quá trình phát hiện DNA E.coli được đánh giá qua phương pháp tán xạ Raman. Nghiên cứu này đã tổng hợp thành công AgNPs/ZIF-8 với kích thước trung bình ~ 700 nm, được xác nhận bằng phân tích SEM (Scanning Electron Microscope) và EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy), cho thấy sự hiện diện của C (37,22%), N (23,54%), Zn (21,04%) và Ag (9,64%). Vật liệu được phủ lên các chất nền thủy tinh, thể hiện phạm vi kích thước từ 700 - 1.000 nm và thành phần nguyên tố của C (37,63%), N (28,08%), Zn (29,43%), Ag (2,33%). Phổ Raman cho thấy tín hiệu thăm dò (480 và 780 cm^{-1}), tín hiệu DNA E.coli (560 và 1.094 cm^{-1}), với cường độ khuếch đại lai gấp 2,4 lần. Phát hiện DNA tối ưu đạt được ở 50 ng/mL (cường độ tín hiệu: 274), chứng minh hiệu quả của hệ thống đối với các ứng dụng cảm biến sinh học.

Từ khóa: AgNPs/ZIF-8, chip sinh học, E.coli, Raman.

Ngày nhận bài: 15/6/2024; Ngày sửa chữa: 20/7/2024; Ngày duyệt đăng: 22/8/2025.

Validation of Biochip-based E. Coli detection via Raman spectroscopy

Abstract

The study focuses on validating the capability to detect E.coli DNA based on the Raman spectroscopy method. The sensor, fabricated on a nano-material-coated substrate, was characterized using SEM and EDS techniques, and the E.coli DNA detection process was evaluated through Raman scattering analysis. This study successfully synthesized AgNPs/ZIF-8 with an average size of ~ 700 nm, confirmed by SEM and EDS analysis, showing the presence of C (37.22%), N (23.54%), Zn (21.04%), and Ag (9.64%). The material was coated onto glass substrates, exhibiting a size range of 700 - 1.000 nm and elemental composition of C (37.63%), N (28.08%), Zn (29.43%), and Ag (2.33%). Raman spectroscopy revealed probe signals (480 and 780 cm^{-1}) and E.coli DNA signals (560 and 1.094 cm^{-1}), with hybridization amplifying intensity by 2.4 - fold. Optimal DNA detection was achieved at 50 ng/mL (signal intensity: 274), demonstrating the system's efficacy for biosensing applications.

Keyword: AgNPs/ZIF-8; biochip; E.coli; Raman.

JEL Classifications: O13, Q53, Q56.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Escherichia coli (E.coli) là một trong những tác nhân phổ biến gây ô nhiễm nguồn nước và thực phẩm, ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe con người, khiến nhiều người tăng khả năng bị nhiễm các loại bệnh, dẫn đến gia tăng tình trạng nhập viện, được phát hiện và đánh giá thông qua một hoặc nhiều phương pháp truyền thống kết hợp (M. Mueller and R. Tainter, 2024; WHO, 2024; M. R. Nurliyana et al., 2018; Bộ Y tế, 2010). Hiện nay, E.coli được thực hiện bằng các phương pháp sinh học phân tử như ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) và PCR (Polymerase Chain Reaction) nhằm rút ngắn thời gian chờ từ vài ngày xuống còn

vài giờ. Tuy nhiên, việc thực hiện các phương pháp này gặp khó khăn do giá thành cao và quy trình vận hành kỹ thuật còn một số bất cập (L. Watterworth et al., 2005; C. M. Shih et al., 2015; A. M. Prescott and C. R. Fricker, 1999).

Việc phát hiện E.coli có bước nhảy vọt khi công nghệ cảm biến ra đời, dựa trên các ống các-bon đa thành phần, thông qua quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier, giúp rút ngắn thời gian, giảm chi phí và khả năng phát hiện E.coli trong thực phẩm, nguồn nước, đặc biệt có thể phát hiện nồng độ E.coli rất thấp, từ 2 CFU/ml (J. Juan-Colás et al., 2016).

Cấu tạo cơ bản của cảm biến là một thiết bị phân tích chuyển đổi các tín hiệu sinh học thành những tín

hiệu có thể đo lường được, nhờ vào sự tương tác giữa các chất cần phân tích với các đầu dò sinh học, gồm 3 bộ phận chính: Cảm biến, bộ chuyển đổi, hệ thống tín hiệu đầu ra, có cấu thành như Hình 1 (V. Naresh and N. Lee, 2021; P. Mehrotra, 2015).

Lựa chọn giá thể của cảm biến: Dựa trên độ nhạy; giá thành và một số loại được chọn lựa là (a) Thủy tinh; (b) Silicon; (c) Nhựa; (d) Giấy.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hóa chất:

Zn (NO₃)₂, Merck, CH₃C₃H₂N₂H 99%, Sigma Aldrich, CH₃OH, Merck, C₂H₅OH, Merck, AgNO₃, Merck, NaBH₄, Sigma Aldrich, (3-Aminopropyl) triethoxysilan 98% (C₉H₂₃NO₃Si, A Johnson Matthey Company), bovine serum albumin 3%, Sigma Aldrich, và muối đệm phosphate (PBS, Sigma Aldrich). Môi trường Trypton Soya Broth, TM Media, bộ kit tách chiết DNA (Thermo Scientific), nước lọc siêu sạch.

Base (tấm nền):

Tấm thủy tinh kích thước 22 x 22 mm, dày 0,13 - 0,17 mm (cover glass-DeckGlaser-Marienfeld). Giấy mixed cellulose ester, kích thước lỗ rỗng 0,45 μm (Advantec®). Giấy micro-glass fiber filter - cellulose acetate, kích thước lỗ rỗng 0,45 μm (Finetech®).

Trình tự đầu dò:

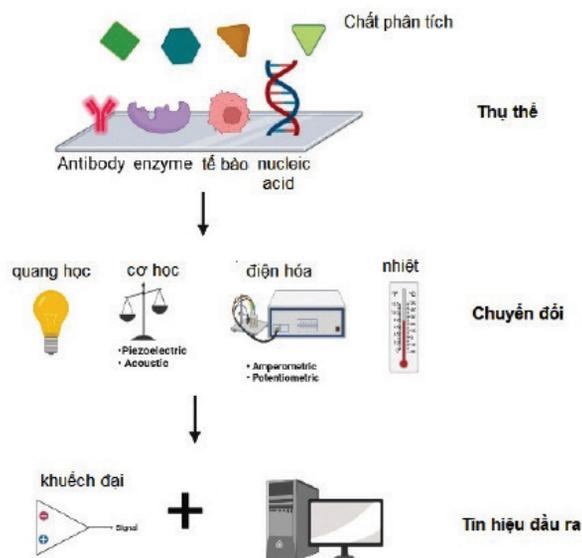
5'-SH-TACAAAGGGGAGAAGGGCATG-3' (Gene Wiz), tương đồng cao các chủng E.coli, không chia sẻ trình tự tương đồng với bất kỳ thành viên nào không thuộc họ Escherichia coli (P. Bakthavathsalam et al., 2012).

Chủng Escherichia coli mã VTCC12272 (Trung tâm Nguồn gen vi sinh vật quốc gia); ATCC 25922; nuôi cấy trên môi trường NA, pH 6,5 - 7; nhiệt độ 37°C, thời gian từ 24 - 48h, hiếu khí.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

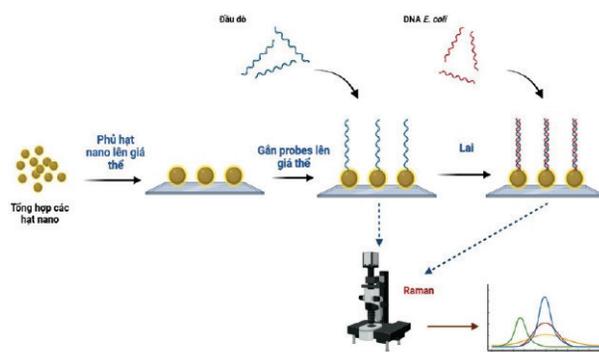
Phương pháp sử dụng vật liệu: Tổng hợp hạt nano (AgNPs and AgNPs@ZIF-8) dựa trên phản ứng khử của AgNO₃, NaBH₄ và AgNPs/ZIF-8, Ag⁺ được đưa vào khung trung tính ZIF-8 thông qua phản ứng khử với NaBH₄; lựa chọn giá thể và silane hóa bề mặt lai DNA của E.coli với cảm biến rồi đánh giá tín hiệu bằng phương pháp tán xạ Raman, so sánh với tín hiệu đầu dò trước đó (K. Mavani, 2013). Các hình vẽ mô phỏng được thực hiện trên phần mềm Open Office Drawing và Biorender (Hình 2).

Sinh khối sau quá trình nuôi cấy được sử dụng để chiết tách DNA tổng số (gDNA) bằng phương pháp phá màng, loại bỏ protein và tủa nucleic acid. DNA sau đó được sử dụng làm mạch khuôn cho phản ứng lai với đầu dò của cảm biến sinh học; DNA được biến tính tại 95°C trong vòng 5 phút rồi tiến hành ủ với cảm biến ở 42°C trong 2 giờ và được kiểm tra bằng Raman. Tán xạ Raman đóng vai trò chuyển đổi (transducer), giúp kiểm tra tín



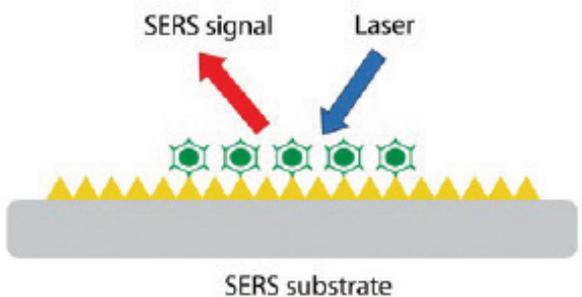
Hình 1. Các thành phần điển hình của một cảm biến sinh học

Nguồn: Nhóm nghiên cứu



Hình 2. Mô phỏng quá trình chế tạo cảm biến DNA quang sinh học sử dụng hạt nano làm chất nền

Nguồn: Nhóm nghiên cứu



Hình 3. Cơ chế phát hiện của tán xạ Raman và SERS

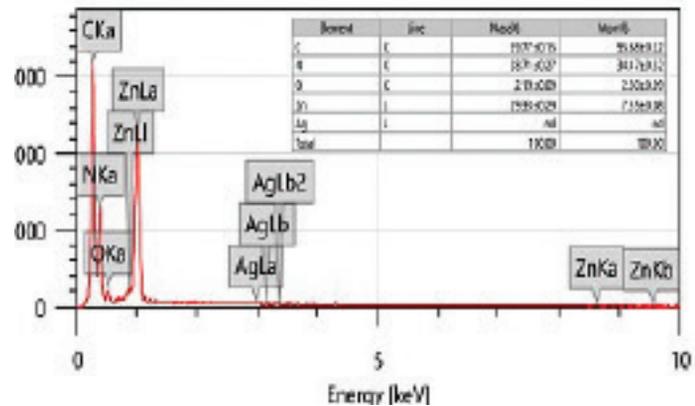
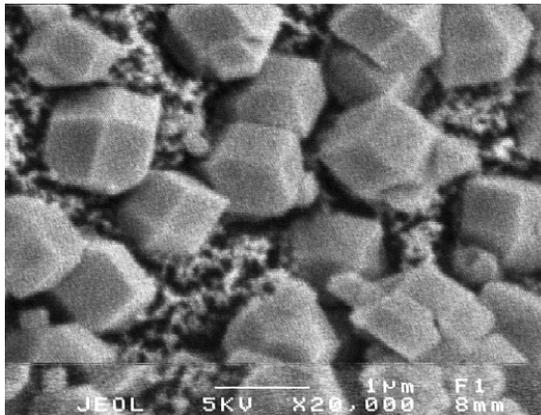
Nguồn: Nhóm nghiên cứu

hiệu trước - sau khi tương tác với chất cần phân tích của cảm biến (Hình 3) (Z. Movasaghi, 2007).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

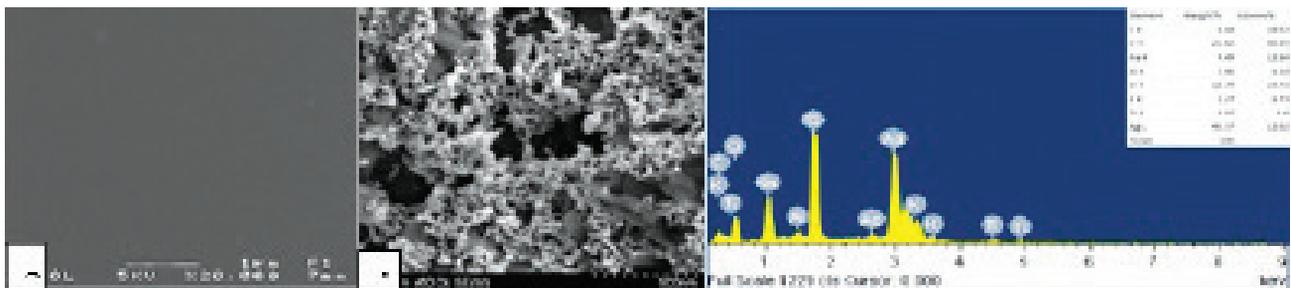
3.1. Kết quả tổng hợp AgNPs/ZIF-8

Kết quả tổng hợp AgNPs/ZIF-8 được trình bày ở Hình 4, trong đó, đường kính trung bình của khung



Hình 4. Hình ảnh AgNPs/ZIF-8 được chụp qua (a) SEM và phân tích (b) EDS

Nguồn: Nhóm nghiên cứu



Hình 5. Hình ảnh SEM và kết quả EDS của AgNPs/ZIF-8 phủ trên tấm thủy tinh

Nguồn: Nhóm nghiên cứu

ZIF-8 tổng hợp có kích thước khoảng 700 nm. Các nguyên tố C, N, Zn chiếm tỷ lệ lớn trong bảng thành phần EDS (Hình 4) lần lượt là 37,22% (C); 23,54% (N); 21,04% (Zn) theo khối lượng, chứng tỏ ZIF-8 tổng hợp thành công. Bên cạnh đó, sự có mặt của Ag trong bảng phân tích, đánh giá thành phần nguyên tố cho thấy, Ag⁺ đã đi vào khung ZIF-8, chiếm 9,64% về khối lượng.

Như vậy, nghiên cứu tổng hợp thành công AgNPs/ZIF-8 với kích thước trung bình khoảng 700 nm và có sự xuất hiện của nguyên tố C, N, Zn, Ag.

3.2. Kết quả phủ AgNPs/ZIF-8 lên tấm thủy tinh

AgNPs/ZIF-8 được phủ lên tấm thủy tinh bằng phương pháp ngâm trong 24 giờ và bay hơi tại 80°C. Ảnh chụp SEM cho thấy, khung kim loại ZIF-8 có kích thước dao động trong khoảng 700 - 1.000 nm; kết quả EDS cho thấy thành phần các nguyên tố của mẫu đo, trong đó, C chiếm 37,63%; N chiếm 28,08%; Zn chiếm 29,43% và Ag chiếm 2,33% (Hình 5).

3.3. Kết quả tăng sinh và tách chiết DNA của E.coli VTCC12272

Đánh giá việc tăng sinh khối đáp ứng mô tả của Trung tâm Nguồn gen vi sinh vật quốc gia về hình thái chủng E.coli VTCC12272, nồng độ DNA tổng lúc này đạt 106,7 ng/uL; tỷ lệ λ260/280 là 1,04, chứng tỏ mẫu DNA tương đối tinh sạch, không lẫn tạp chất, thông qua máy đo Nanodrops 2000 Thermo Scientific.

3.4. Tín hiệu Raman của đầu dò và DNA E.coli

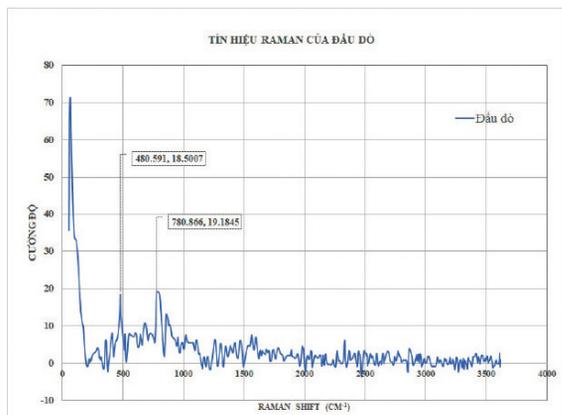
Tín hiệu Raman của đầu dò được thể hiện ở Hình 6, trong đó, hai đỉnh hấp thụ xuất hiện tại bước sóng 480 cm⁻¹ và 780 cm⁻¹, phù hợp với Zanyar Movasaghi, 2007. Do đó, kết quả Raman của mẫu đầu dò có hai đỉnh hấp thụ đều rơi vào hai vùng tín hiệu của DNA (Z. Movasaghi et al., 2007). Cường độ tín hiệu Raman của đầu dò ghi nhận được là 18 - 20. Tín hiệu Raman của đầu dò 5'-SH-TACAAAGGGAGAAGGGCATG-3' có hai đỉnh hấp thụ tại bước sóng 480 cm⁻¹ và 780 cm⁻¹; tín hiệu từ 18 - 20 đơn vị cường độ (Hình 6).

3.5. Tín hiệu Raman của DNA E.coli

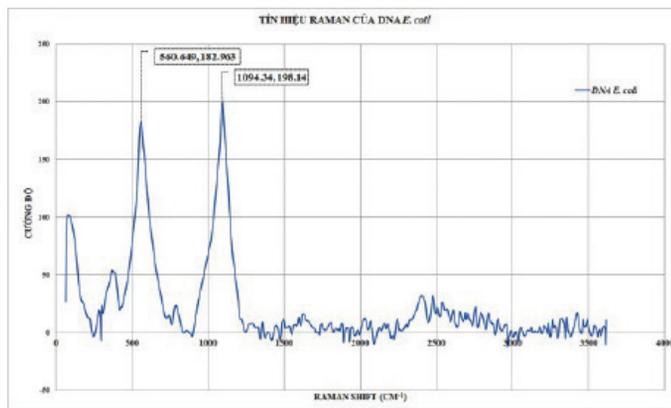
Tín hiệu Raman của DNA E.coli được thể hiện ở Hình 7, trong đó, hai đỉnh hấp thụ xuất hiện tại bước sóng tín hiệu cực đại xuất hiện tại vị trí bước sóng 560 cm⁻¹ và 1094 cm⁻¹, phù hợp với Zanyar, 2007. Các bước sóng trong vùng từ 545 - 570 cm⁻¹ chưa được ghi nhận cụ thể cho bất kỳ chất hoặc hợp chất nào (Z. Movasaghi et al., 2007). Cường độ tín hiệu Raman của DNA E.coli nồng độ 50 ng/ml ghi nhận được có hai đỉnh hấp thụ với cường độ 183 và 198; tín hiệu Raman của DNA E.coli có hai đỉnh hấp thụ tại bước sóng 560 cm⁻¹ và 1.094 cm⁻¹ với cường độ tín hiệu lần lượt là 183 và 198 (Hình 7).

3.6. Tín hiệu Raman của DNA E.coli lai với đầu dò

Hình 8 cho thấy, tín hiệu lai của DNA E.coli với đầu dò cho đỉnh hấp thụ tại bước sóng 1.094 cm⁻¹, tương



Hình 6. Tín hiệu Raman của đầu dò
Nguồn: Nhóm nghiên cứu



Hình 7. Tín hiệu Raman của DNA E.coli nồng độ 50 ng/mL
Nguồn: Nhóm nghiên cứu

đồng với nghiên cứu tổng hợp của Zanyar Movasaghi trước đó (Z. Movasaghi et al., 2007). Cường độ tín hiệu lai lên khoảng 250 - 274, gấp 14 lần so với tín hiệu Raman đầu dò trước đó (có cường độ khoảng 18 - 20) và gấp 1,4 lần so với tín hiệu DNA trước khi lai.

Để đánh giá sâu hơn khả năng phát hiện DNA E.coli của phương pháp Raman, các thí nghiệm trên nồng độ DNA tổng khác nhau lần lượt được thực hiện, bao gồm 100, 50, 25 ng/mL, thể hiện trong Hình 9. Kết quả so sánh cho thấy, đối với mẫu có nồng độ 50 ng/mL cho kết quả đo tốt nhất với cường độ tín hiệu thu nhận được dao động từ khoảng 250 - 275. Tiếp đến là mẫu mang nồng độ 100 ng/mL và 25 ng/mL, cho cường độ tín hiệu thu nhận không quá khác biệt trong khoảng 225 (Hình 9).

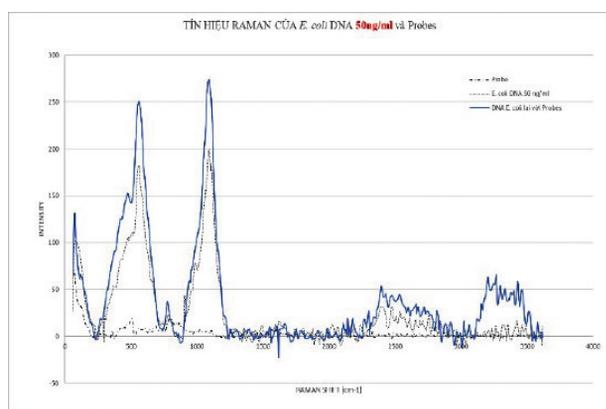
Việc phát hiện được DNA nồng độ 25 ng/mL cho thấy phương pháp tín hiệu Raman rất có tiềm năng khi so sánh với cảm biến phát hiện E.coli dựa trên đầu dò gắn trên vàng nano (AuNPs) với giá trị nhỏ nhất phát hiện được là 1µg/mL, tương đương 1.000 ng/mL (Zhu et al., 2019). Dù vậy, tính đến hiện nay, các cảm biến sinh học cho DNA và RNA đã không ngừng cải tiến,

có những cảm biến cho độ nhạy lên đến 0,02 ng/mL (1pM) (A. Lomae et al., 2023). Như vậy, tín hiệu lai thu nhận có hai đỉnh tại bước sóng 560 và 1.094 cm^{-1} ; cường độ tín hiệu tăng gấp 2,4 lần trước khi lai. Nồng độ DNA 50 ng/mL thu được kết quả tốt nhất với cường độ lên đến 274, nồng độ 100 ng/mL và 25 ng/mL có cường độ tín hiệu không quá khác biệt trong khoảng 220 - 230.

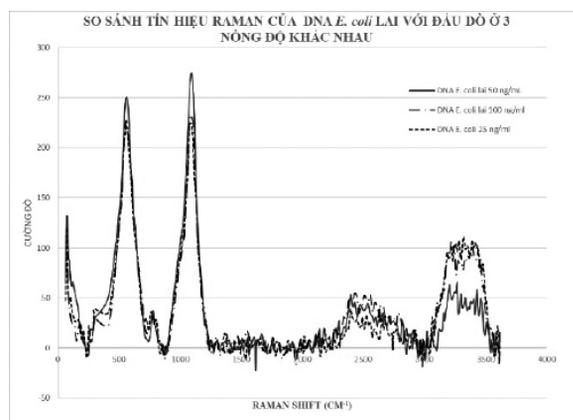
3.7. Tín hiệu Raman của cảm biến sinh học

Phương pháp Raman ghi nhận thành công tín hiệu của DNA ở nồng độ 25 ng/mL, do đó, 25 ng/mL DNA E.coli sẽ được chọn làm nồng độ tiếp tục thí nghiệm trên để cảm biến AgNPs. Đầu dò được gắn lên để cảm biến, sau đó ổn định và khóa bằng dung dịch BSA trong PBS, tạo nên cảm biến sinh học. DNA E.coli nồng độ 25 ng/mL sau khi biến tính ở 95°C trong 5 phút sẽ được ủ lai với cảm biến và tiến hành thu nhận tín hiệu Raman.

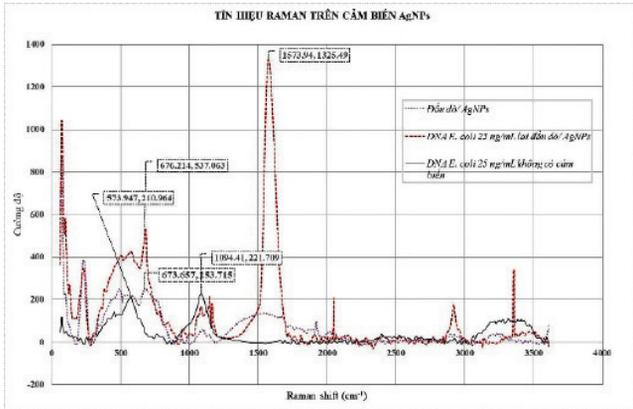
Từ Hình 10 có thể thấy, tín hiệu Raman của đế AgNPs có cường độ hấp thu thấp nhất với khoảng 165 đơn vị. Sau khi gắn đầu dò, cường độ hấp thu tăng lên gần 254 (gấp 1,5 lần so với AgNPs trước đó). Tín hiệu thay đổi rõ nhất khi cho DNA E.coli lai với cảm biến



Hình 8. Tín hiệu Raman sau khi lai DNA E.coli với đầu dò
Nguồn: Nhóm nghiên cứu

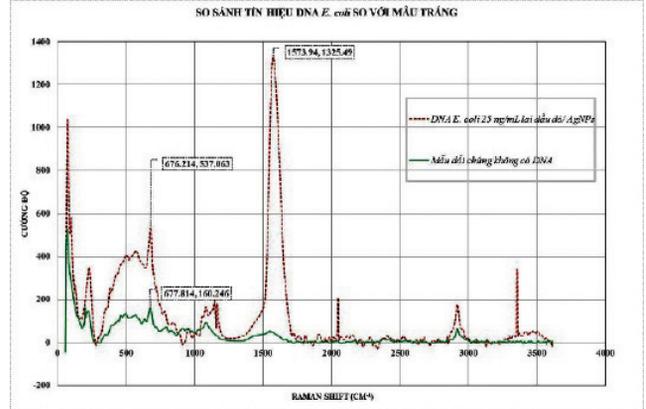


Hình 9. So sánh ba nồng độ DNA E.coli sau khi lai với đầu dò ở 3 nồng độ khác nhau
Nguồn: Nhóm nghiên cứu



Hình 10. Tín hiệu Raman của cảm biến sinh học phát hiện DNA của *E.coli*

Nguồn: Nhóm nghiên cứu



Hình 11. So sánh tín hiệu Raman phát hiện DNA của *E.coli* và mẫu trắng trên cảm biến sinh học

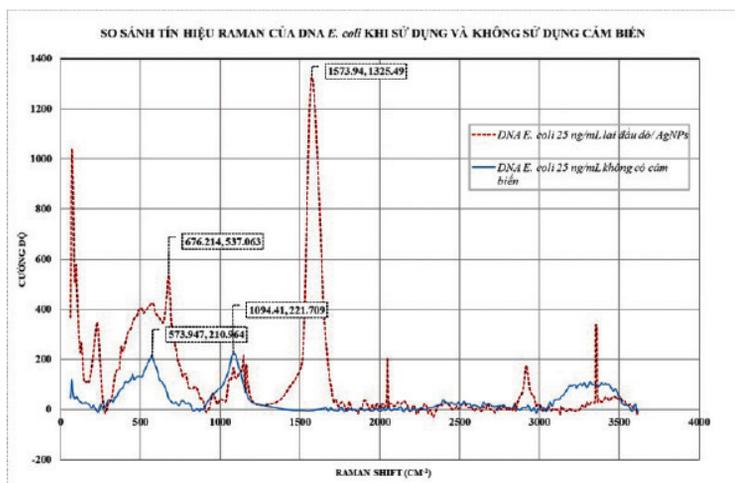
Nguồn: Nhóm nghiên cứu

sinh học, hai đỉnh hấp thụ xuất hiện tại bước sóng 676 và 1.573 cm^{-1} . Theo Movasaghi et al., 2007, các tín hiệu tương đồng của DNA cũng được ghi nhận trong vùng bước sóng 630 - 678 cm^{-1} và từ 1.573 - 1.576 cm^{-1} . Đỉnh 637 cm^{-1} có cường độ hấp thụ 537 và đỉnh 1.537 cm^{-1} có cường độ cực đại lên đến 1.325 đơn vị (gấp từ 2,5 - 5 lần so với cảm biến trước khi có sự xuất hiện của DNA *E.coli*). Đồng thời, quan sát được mẫu trắng không có DNA của *E.coli* lúc này có cường độ thấp hơn hẳn so với mẫu lai với *E.coli* (chỉ đạt 160 đơn vị và không xuất hiện bất kỳ đỉnh hấp thụ nào tại vùng bước sóng 1.573 cm^{-1}) (Hình 11). Tín hiệu Raman phát hiện DNA *E.coli* bằng cảm biến sinh học có hai đỉnh hấp thụ tại 676 và 1.573 cm^{-1} với cường độ lần lượt là 537 và 1.325.

So sánh tín hiệu phát hiện DNA của *E.coli* khi sử dụng và không sử dụng cảm biến có sự khác biệt rất lớn về cường độ: Tín hiệu Raman của mẫu lai không dùng

cảm biến có cường độ tín hiệu khoảng 210 - 220, trong khi tín hiệu phát hiện DNA *E.coli* bằng cảm biến đạt cường độ hấp thụ 537 và 1.325 (gấp 2,5 - 6 lần) (Hình 12). Điều này chứng tỏ AgNPs giúp tán xạ Raman tốt hơn, khuếch đại lượng lớn tín hiệu sinh học.

Việc phát hiện được DNA nồng độ 25 ng/mL cho thấy, phương pháp phát hiện cảm biến sinh học dựa trên AgNPs rất có tiềm năng khi so sánh với cảm biến phát hiện *E.coli* dựa trên đầu dò gắn trên vàng nano (AuNPs) của nhóm nghiên cứu Longjiao Zhu vào năm 2019, giá trị nhỏ nhất cảm biến có thể phát hiện được là 1 $\mu\text{g/mL}$, tương đương 1.000 ng/ml. Với cường độ tín hiệu Raman cao của cảm biến sinh học trong nghiên cứu này hứa hẹn có thể phát hiện DNA ở nồng độ thấp hơn, tương tự cảm biến sinh học DNA và RNA phát hiện COVID-19 trong nghiên cứu của Lomae, 2023; cảm biến cải tiến cho độ nhạy lên đến 0,02 ng/mL (1pM) (A. Lomae et al., 2023).



Hình 12. So sánh tín hiệu Raman trong phát hiện DNA *E.coli* khi sử dụng và không sử dụng cảm biến sinh học

Nguồn: Nhóm nghiên cứu

Nghiên cứu đã thành công phát hiện DNA *E.coli* bằng đế cảm biến AgNPs/thủy tinh. AgNPs giúp khuếch đại lượng lớn tín hiệu tán xạ trong chế tạo cảm biến sinh học phát hiện DNA *E.coli*, cường độ tín hiệu tăng cao nhất gấp 6 lần so với khi không dùng cảm biến và nồng độ DNA phát hiện được là 25 ng/mL.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã tổng hợp thành công AgNPs/ZIF-8 với kích thước trung bình khoảng 700 nm, xuất hiện các nguyên tố C, N, Zn và Ag; AgNPs/ZIF-8 được phủ lên tấm thủy tinh có kích thước dao động trong khoảng 700 - 1.000 nm; thành phần nguyên tố của C chiếm 37,63%; N chiếm 28,08%; Zn chiếm 29,43% và Ag chiếm 2,33%.



Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, tín hiệu Raman của đầu dò 5'-SH-TACAAAGGGAGAAGGGCATG-3' có hai đỉnh hấp thụ tại bước sóng 480 và 780 cm^{-1} với tín hiệu từ 18 - 20 đơn vị cường độ; tín hiệu Raman của DNA E.coli có hai đỉnh hấp thụ tại bước sóng 560 và 1.094 cm^{-1} , cường độ tín hiệu lần lượt là 183 và 198. Tín hiệu lai thu nhận có hai đỉnh tại bước sóng 560 và 1.094 cm^{-1} , cường độ tín hiệu tăng gấp 2,4 lần trước khi lai. Nồng độ DNA 50 ng/mL thu được kết quả tốt nhất với cường độ lên đến 274; nồng độ 100 ng/mL và 25 ng/mL có cường độ tín hiệu không quá khác biệt, trong khoảng 220 - 230.

Trong khuôn khổ của nghiên cứu đã đạt được kết quả khả quan trong việc dùng Raman để phát hiện E.coli bằng chip sinh học tại phòng thí nghiệm, mở ra hướng nghiên cứu cho tương lai, hướng tới phát hiện E.coli trong môi trường thực tế áp dụng trong quan trắc môi trường.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ Đề tài mã số C2024-20-17■

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Mueller and R. Tainter, "Escherichia coli Infection." StatPearls Publishing. Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>.
2. WHO, "Diarrhoeal disease," World Health Organization. Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
3. WHO, "Bệnh Tiêu chảy cấp và bệnh Tả," World Health Organization. Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: <https://www.who.int/vietnam/vi/health-topics/cholera>.
4. M. R. Nurliyana et al., "The Detection Method of Escherichia coli in Water Resources: A Review," J Phys Conf Ser, vol. 995, no. 1, 2018, doi: 10.1088/1742-6596/995/1/012065.
5. Bộ Y tế, "QCVN 01:2010/BYT - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước ăn uống," Hà Nội, Việt Nam, 2010.
6. L. Watterworth, E. Topp, H. Schraft, and K. T. Leung, "Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic Escherichia coli," J Microbiol Methods, vol. 60, no. 1, pp. 93-105, 2005, doi: 10.1016/j.mimet.2004.08.016.
7. C. M. Shih et al., "Paper-based ELISA to rapidly detect Escherichia coli," Talanta, vol. 145, pp. 2-5, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.07.051.
8. A. M. Prescott and C. R. Fricker, "Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of Escherichia

- coli in water," Mol Cell Probes, vol. 13, no. 4, pp. 261-268, 1999, doi: 10.1006/mcpr.1999.0246.
9. V. Naresh and N. Lee, "A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors," Sensors (Switzerland), vol. 21, no. 4, pp. 1-35, 2021, doi: 10.3390/s21041109.
10. P. Mehrotra, "Biosensors and their applications - A review," J Oral Biol Craniofac Res, vol. 6, no. 2, pp. 153-159, 2016, doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
11. J. Juan-Colás, A. Parkin, K. E. Dunn, M. G. Scullion, T. F. Krauss, and S. D. Johnson, "The electrophotonic silicon biosensor," Nat Commun, vol. 7, no. 1, p. 12769, Sep. 2016, doi: 10.1038/ncomms12769.
12. S. Petralia et al., "Silicon nitride surfaces as active substrate for electrical DNA biosensors," Sens Actuators B Chem, vol. 252, pp. 492-502, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.06.023.
13. S. Lanzalaco and B. G. Molina, Polymers and plastics modified electrodes for biosensors: A review, vol. 25, no. 10. 2020. doi: 10.3390/molecules25102446.
14. B. Padmavathy, R. Vinoth Kumar, and B. M. Jaffar Ali, "A direct detection of Escherichia coli genomic DNA using gold nanoprobe," J Nanobiotechnology, vol. 10, pp. 1-10, 2012, doi: 10.1186/1477-3155-10-8.
15. ATCC, "ATCC 25922 - Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers." Accessed: May. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.atcc.org/products/25922.html>
16. K. Mavani, "Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent," International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT), vol. 2, no. 3, pp. 388-397, 2013, doi: 10.13140/2.1.3116.8648.
17. Index Health and Science, "What is Surface-Enhanced Raman Scattering?" Accessed: Nov. 06, 2022. [Online]. Available: <https://www.semrock.com/surface-enhanced-raman-scattering-sers.aspx>
18. E. Murugan, S. Santhosh Kumar, K. M. Reshna, and S. Govindaraju, "Highly sensitive, stable g-CN decorated with AgNPs for SERS sensing of toluidine blue and catalytic reduction of crystal violet," J Mater Sci, vol. 54, no. 7, pp. 5294-5310, Apr. 2019, doi: 10.1007/s10853-018-3184-5.
19. Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, "Raman spectroscopy of biological tissues," Applied Spectroscopy Reviews, vol. 42, no. 5, pp. 493-541, Sep. 2007. doi: 10.1080/05704920701551530.
20. L. Zhu et al., "Colorimetric detection and typing of E.coli lipopolysaccharides based on a dual aptamer-functionalized gold nanoparticle probe," Microchimica Acta, vol. 186, no. 2, p. 111, Feb. 2019, doi: 10.1007/s00604-018-3212-9.
21. A. Lomae et al., "Label free electrochemical DNA biosensor for COVID-19 diagnosis," Talanta, vol. 253, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123992.