



基于分子印迹技术的细菌传感检测*

何勇飞^{1,2)} 庞义全^{1,2)} 葛 闯^{1,4)**} 徐 溢^{1,3)**}⁽¹⁾ 重庆大学新型微纳器件与系统技术重点学科实验室&光电技术与系统教育部重点实验室, 重庆 400044;⁽²⁾ 重庆大学化学化工学院, 重庆 400044; ⁽³⁾ 重庆大学光电工程学院, 重庆 400044;⁽⁴⁾ 重庆大学肿瘤医院肿瘤转移转化与个体化治疗重点实验室, 重庆 400030)

摘要 分子印迹因其材料结构的稳定性及靶标物识别的特异性而被广泛应用于生化分离分析的相关领域。近年来, 将具有选择性捕获、分离和富集靶标物等优势分子印迹技术与生化传感检测技术有机结合, 是目前细菌等微生物高效检测领域备受关注的研究热点。本文就分子印迹技术在细菌分析中的印迹方法、分析检测技术和典型应用等方面的最新进展进行综述。首先介绍了细菌分子印迹原理, 对表面印迹的材料以及直接压印、间接印迹和电聚合等制备方法进行了总结和归纳; 重点对基于荧光、电化学、石英晶体微天平 (QCM) 等检测模式的细菌印迹传感监测在细菌分析检测及其与微流控芯片技术耦合的应用和进展进行了综述; 最后, 提出了存在的挑战及发展的趋势。

关键词 分子印迹技术, 细菌, 表面印迹, 传感检测, 微流控芯片

中图分类号 Q599, O65

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0286

自然界中种类繁多的细菌会引发各种疾病, 因此细菌检测备受关注。但细菌在环境或生理样本中通常浓度极低且基底背景复杂, 导致对细菌进行准确快速检测面临着极大的挑战^[1-3]。传统的致病菌检测主要依靠常规培养方法^[4]、聚合酶链反应^[5] (PCR) 和酶联免疫吸附试验^[6] (ELISA) 等, 存在操作条件苛刻、灵敏度不高, 以及在发生紧急事件时无法转移到现场检测的缺点。光电传感检测技术和方法以其所具有的高灵敏度、方便快捷和易于集成等优势, 成为细菌细胞等微生物高效检测的新途径。针对细菌等微生物分析, 本课题组将传感检测技术与微流控芯片分析技术结合^[7-11], 研究发现芯片集成传感监测是极具潜力的检测模式, 该检测方式的核心依然是敏感膜识别元件和传感检测方式。就敏感膜而言, 通过分子印迹技术 (molecular imprinted technology, MIT) 制备的分子印迹聚合物 (molecular imprinted polymers, MIPs) 与抗体或酶等天然受体相比具有高度的物理和化学稳定性, 可以长期重复使用。目前, 基于 MIPs 的传感器已被用于检测生化样本中的各种化学和生物组分, 从小分子^[12-14] (霉菌毒素和非法

食品添加剂) 到大分子^[15-16] (致敏蛋白和细菌外毒素), 甚至是致病菌和病毒的检测^[17-19]。利用 MIPs 对靶标物高效捕获的优势, 将 MIT 与传感器检测技术结合, 实现生化样本中细菌高灵敏、特异性和高稳定性的检测, 正逐渐成为生化传感检测技术发展的新亮点和新途径之一。

本文针对建立特异性强、快速、灵敏的细菌等微生物检测和鉴定方法及相关研究需求, 在简要介绍 MIT 原理基础之上, 分析讨论印迹材料与细菌的相互作用模式, 总结细菌印迹的方法和途径, 重点关注基于 MIT 的细菌传感分析技术及其在细菌检测中的应用, 并对相关领域面临的挑战和研发前景进行展望。

* 国家重点研发计划 (2020YFB2009001), 国家自然科学基金 (62071072), 中央高校基本科研业务费专项高校基金 (2021CDJYJH006), 新型微纳器件与系统技术重点学科实验室开放基金 (2020) 和智能传感与微纳生化系统 (2019 研究生导师团队) 资助项目。

** 通讯联系人。

徐溢 Tel: 023-65111022, E-mail: xuyibbd@cqu.edu.cn

葛闯 Tel: 15223340297, E-mail: gechuang1115@163.com

收稿日期: 2022-06-22, 接受日期: 2022-08-17

1 分子印迹与细菌印迹

1972年, Wulff和Sarhan^[20]首次报道了以D-甘油酸为模板的分子印迹的理念及相关研究。MIT即利用MIPs模拟酶-底物或抗体-抗原之间的相互作用,对模板分子进行专一识别的技术。MIPs的制备是利用单体和交联剂在模板分子的存在下,通过相互作用,形成预聚合复合物,该复合物由分子相互作用稳定,然后通过聚合作用“冻结”,使模板的“印迹”被保留在形成的聚合物上,从而产生能够识别模板及其类似物的特定结合位点^[21-22](图1)。该技术的特异性、高灵敏性和稳定性,使其在色谱分离^[23]、固相萃取^[24]、生物成像^[25]、组织工程^[26]、药物递送^[22]等领域得到广泛应用。

2001年, Dickert等^[21]以酵母为模板制备了聚氨酯(polyurethane, PU)印迹膜,由此提出了微生物印迹法并进行了相关的研究。其中,细菌印迹技术即以细菌作为模板制备细菌印迹聚合物(bacteria imprinted polymers, BIP),通过BIP三维

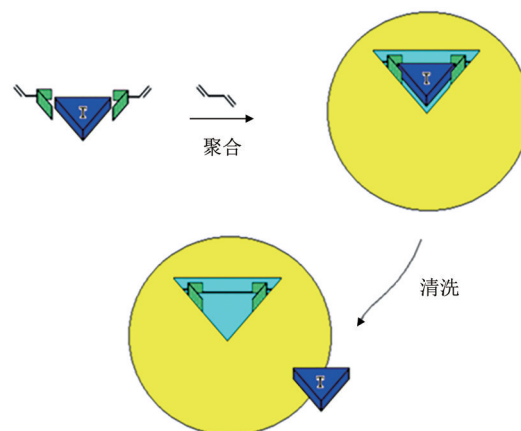


Fig. 1 Schematic diagram of the molecular imprinting process^[22]

图1 分子印迹过程示意图^[22]

空腔的物理结构与聚合物和细菌表面的化学结构共同作用下,特异性识别细菌的技术(图2)。近年来,细菌印迹在病毒^[27-28]、细菌^[29-31]和哺乳动物细胞^[32]等的分析检测中也已有研究及应用。

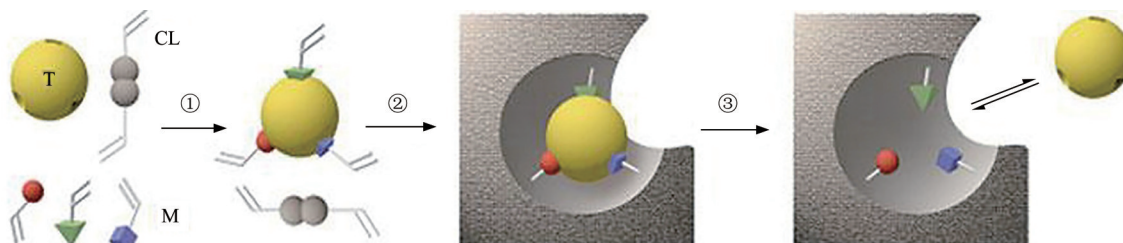


Fig. 2 Principle of bacteria imprinting

图2 细菌印迹原理

①功能单体(M)在模板分子(T)周围自组装,然后在交联剂(CL)存在下聚合,②形成具有印迹位点的三维聚合物结构,③随后去除模板会释放出可以特异性识别和结合目标分子的结合腔^[33]。

2 细菌印迹的材料和制备方法

2.1 细菌印迹材料

以BIP特异性捕获目标细菌,功能单体的合理选择是印迹成功的关键步骤,其选择通常依据模板的结构以及与模板作用力大小。细菌印迹材料主要包括有机聚合物、导电聚合物、溶胶-凝胶和复合型印迹材料等。表1归纳了几种典型的细菌印迹材料及其应用情况。

有机聚合物是一种常用于制备BIP的材料。Mosbach^[34]提出,模板和功能性单体之间存在非

共价相互作用,在适当的溶剂中,模板与单体配合物通过各种相互作用聚合,如氢键、静电作用、范德华力、 π - π 键等,在去除模板之后,官能化的聚合物基质可以通过相同的非共价作用重新和靶标物结合。主要单体包括丙烯酰胺(acrylamide, AAm)、甲基丙烯酸(methacrylic acid, MAA)、乙烯吡咯烷酮(N-vinyl-2-pyrrolidinone, NVP)等^[35]。

导电聚合物(conductive polymers, CP)中每个重复单元之间的电子共轭提供了适合于传感应用的结构和性质^[36]。对原始CP进行结构修改或在

CP中加入功能性改性组件来开发功能化CP^[37-38],既可以加入产生非共价作用的功能单体,也可以引入能够产生共价作用的特定官能团或单体;其中共价作用制备的BIP中能够获得更均匀的结合位点分布,但是在去除模板的处理上比较复杂。

溶胶-凝胶(sol-gel)是用于制备BIP的一种高效材料^[39-40],主要以共价作用的方式制备BIP。通过溶胶-凝胶法获得的硅基材料显示出良好的生物

相容性、亲水性和易于表面改性,这使它们易于生物医学应用。

复合型印迹材料^[41]是根据各种材料的不同功能性,合成制备得到的多组分材料,可获得更多独特性质,这种独特性质包括新的化学性质或在原有成分的某一性质上进行改进。其制备常采用半共价法,在温和条件下通过共价结合有效地掺入模板单体,通过非共价作用重结合^[42-43]。

Table 1 Classification of materials in bacteria imprinting and their applications

表1 细菌印迹的材料分类及其应用

材料		模板	检测方法	检测限 (CFU·mL ⁻¹)	参考文献
导电聚合物	过氧化聚吡咯	铜绿假单胞菌	石英晶体微天平	1×10 ³	[44]
	甘露糖苷化聚噻吩	大肠杆菌	石英晶体微天平、方波伏安法	50、25	[45]
	聚吡咯	大肠杆菌O157:H7	电化学阻抗法	10 ³	[46]
溶胶-凝胶	有机改性二氧化硅	耐辐射奇球菌	荧光法	—	[47]
	有机硅氧烷	大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌	解吸电喷雾质谱	—	[48]
有机聚合物	4-乙烯基吡啶	大肠杆菌	荧光法	—	[49]
	聚乙烯吡咯烷酮	血细胞	石英晶体微天平	0.5×10 ⁸	[50]
	聚氨酯	大肠杆菌等9种尿路感染细菌	热波转运分析	3×10 ⁴	[51]
复合型材料	3-氨基苯硼酸/聚苯胺	表皮葡萄球菌	电化学阻抗法	—	[52]
	N-GQDs/聚多巴胺	大肠杆菌O157:H7	电化学发光法	8	[53]

2.2 表面印迹的制备方法

根据模板的大小,可以选择不同的印迹策略。对于整体印迹方法包含沉淀聚合、乳液聚合等,其所具备的识别位点遍布聚合物基质^[54-55],有利于小分子的吸收和释放,但这种方法不适合细菌印迹,细菌的尺寸为微米级别,在高度交联的基质中洗脱会受到阻碍或破坏^[56],模板的去除毫无疑问是印迹膜制备的关键环节。基于此,印迹细菌主要是基于表面印迹的全细胞印迹法^[19],其能将更多的印迹位点保留在印迹膜的表面,表面印迹又可以分为直接压印、间接印迹和电聚合等多种印迹方式。表2归纳了不同表面印迹方法的比较。

2.2.1 直接压印法

在细菌表面印迹中最简单方法是直接印迹^[57],其可分为3种主要类型:邮票压印、薄膜压印和牺牲层印迹。邮票压印^[51]方法简单方便,采用整个细胞作为模板,当细菌压印在预聚物的表面上时,预聚物必须足够柔软,以形成压印空腔。薄膜压印是随着细菌印迹的发展出现的,可用于印迹细胞^[50]。牺牲层印迹法结合了表面压印去除模板容易和全细胞印迹能产生更多结合位点的优势,在样品和预聚物之间加入了可与形成聚合物共价结合的

牺牲层,阻止样品和聚合物单体之间的反应,并引入新的官能团,该方法主要通过溶胶-凝胶工艺实现。

2.2.2 间接印迹法

对于细菌、细胞、病毒等表面结构较为复杂的靶标物,直接压印法效果往往并不理想。因此,更多采用包括子结构印迹法、人工模板印迹法和人工抗体法等间接印迹法^[57]对这些复杂的靶标物进行处理。如针对细菌细胞表面的糖类^[58]、蛋白质^[59-61]等具有特异性的结构部分进行印迹,通过表面特异性结构片段的识别来检测细菌和细胞,或者通过印迹细菌细胞分泌的内毒素等特殊物质,间接确定细菌细胞的存在。

2.2.3 电聚合

电聚合是指在模板存在的情况下,在电极/支撑衬底材料上形成印迹聚合物层的沉积过程^[62]。电聚合可以通过伏安法^[63]、恒电位法^[64]和恒电流法^[65]等多种电化学技术实现。其允许通过控制单体在电极表面反应的速度/扫描速率,调节电聚合周期、电位和电流等参数,制备得到不同厚度的聚合物印迹膜层。

Table 2 Comparison of bacteria surface imprinting methods

表2 细菌表面印迹法的比较

印迹方法	印迹模板	优点	缺点	参考文献
直接印迹法	邮票压印	从小分子到整个细胞	应用广泛、操作简单	对于细菌细胞等大分子的印迹效果差 [21, 66-68]
	薄膜压印	大分子（如细胞）	操作简单	特异性较差 [50]
	牺牲层印迹法	具有特定亲和力的模板分子	针对某些非聚合材料与模板之间的特定亲和力	操作复杂、聚合物与模板关系不兼容 [40]
间接印迹法	大分子（如细菌、细胞）	特异性强	操作复杂、目标表位确定困难	[69-71]
电聚合	小分子到细胞	操作简单，过程可控	印迹效果差异大	[72]

3 基于BIP的细菌传感检测研究进展

3.1 电化学传感检测

以具有特异性捕获效能的BIP修饰的电极作为电化学传感界面，是一种新型的基于印迹技术对细菌进行高效检测方式。Idil等^[72]以N-甲基丙烯酸基-L-组氨酸甲酯（N-methacryloyl-L-histidine methylester, MAH）、甲基丙烯酸2-羟乙酯（2-hydroxyethyl methacrylate, HEMA）为单体，乙二醇二甲基丙烯酸酯（ethyleneglycol dimethacrylate, EGDMA）为交联剂，采用微接触印迹技术制备了大肠杆菌印迹膜修饰的金电极，这两种技术的独特组合使其能够选择性检测目标菌，当与已知具有相似形状的竞争细菌菌株共存时，能够区分大肠杆菌，检测限为70 CFU/ml。Jafari等^[39]使用四乙氧基硅烷和（3-巯基丙基）三甲氧基硅烷制备的大肠杆菌UTI89印迹有机硅溶胶凝胶膜，采用阻抗法检测，检测限低至1 CFU/ml。Wu等^[46, 73]研制的BIP印迹膜，具有位于聚吡咯（polypyrrole, PPy）表面的非屈光性印迹位点，其

更易于且可以预期增强传质和结合动力学，对大肠杆菌O157:H7（*E.coli* O157:H7）有高选择性，检测限为 10^3 CFU/ml，检测水平与常规基于BIP的传感器相比更好，特别是能够具体鉴定细菌血型，能够用于实际样品中*E.coli* O157:H7的检测。

电聚合法近些年来逐渐成为了细菌印迹膜制备的热点，单体浓度、扫描次数等多种参数对其制备的影响是不可忽略的。Lahcen等^[74]通过循环伏安法电聚合PPy制备炭疽芽孢杆菌孢子印迹聚合物功能化的碳糊电极，研究了超声波处理和带电荷的表面活性剂对模板去除的影响，优化了单体浓度、扫描次数、去除剂种类和浓度、孵育时间等参数对印迹膜制备的影响。为了克服印迹空洞明显受损和细菌细胞壁部分滞留的问题，Golabi等^[52]以表皮葡萄球菌为BIP的模板菌，3-氨基苯硼酸（aminobenzenboronic acid, 3-APBA）作为功能单体，制备了全细胞印迹膜（图3a），选择性研究表明，BIP可以区分目标菌和形状相似的非目标细菌，与其他非靶细菌如蛋白水解链球菌、大肠杆菌和肺炎链球菌相比，该研究的阻抗传感器对表皮葡萄球菌具有高度特异性。

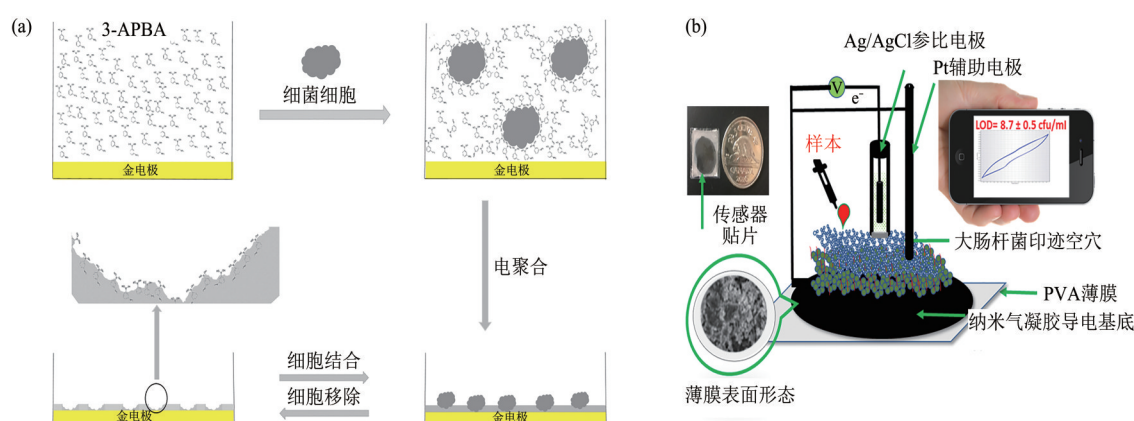


Fig. 3 Schematic diagram of the bacterial imprinting process for doping 3-APBA (a)^[52] and scheme of the *Escherichia coli* sensor (b)^[68]

图3 掺杂3-APBA的细菌印迹过程示意图 (a)^[52] 和*E.coli*印迹传感器示意图 (b)^[68]

结合电化学传感检测技术, 通过对电极表面的印迹膜材料进行掺杂和改性修饰, 实现对电信号的放大, 进一步提高细菌检测的灵敏度。Mugo 等^[68]使用聚苯胺 (polyaniline, PANI) 掺杂苯硼酸、多壁碳纳米管、纳米纤维素薄膜对电极表面多层修饰 (图 3b), 采用电容和阻抗传感检测模式, 对 *E.coli* 的检测限低至 (8.7 ± 0.5) CFU/ml, 响应时间 ≤ 5 min。

研究显示, 将BIP作为敏感界面, 对其修饰改性, 结合电聚合等制备方法在电极表面制备印迹膜, 其可与安培法、电容法、阻抗法^[75-76]等电化学传感检测方法结合, 将BIP对细菌的吸附转化为电信号输出, 实现快速、高选择、原位细菌检测。

3.2 石英晶体微天平传感检测

已有的研究表明, 以具有特异性捕获效能的BIP修饰石英晶体微天平 (quartz crystal microbalance, QCM) 的电极, 电极表面印迹膜吸附或捕获细菌后质量变化而导致的谐振频率变化, 可为细菌细胞的检测提供新的技术途径。检测时间的长短是细菌检测中急需解决的一个问题。Tokonami 等^[44]在 QCM 电极上制备了铜绿假单胞菌的 PPy 印迹膜, 经过氧化处理, 在 PPy 印迹膜中形状互补的空腔, 形成过氧化 PPy 印迹膜 (oPPy), 采用双向电泳技术, 在 3 min 内检测到浓度为

10^3 CFU/ml 的铜绿假单胞菌, 在一定程度上解决了检测时间过长的缺点。Schnettelker 等^[66]通过沉降和邮票压印技术, 直接在 QCM 表面上生成的大肠杆菌印迹层, 也在 3 min 内获得了细菌的响应信号, 能够达到快速检测的目的。

基于BIP的QCM传感检测中, 表面印迹的方法被广泛应用于制备细菌印迹膜, 不仅能够获得很好的印迹位点, 相对于全细胞印迹技术能够更好地清洗印迹膜表面的细菌, 保留完整的印迹空腔。Seifner 等^[50]采用表面印迹技术在 QCM 电极上制备了对红细胞具有选择性识别位点的 BIP, 其显示出血液亚组之间的选择性, 当暴露于模板血型时, A1 红细胞印迹层产生 40 kHz 的效果, 而 A2 红细胞在同一印迹层上仅产生该值的 11%, 细胞密度低至 0.5×10^{11} /L 时, 仍可观察到千赫范围内的质量敏感效应。Yilmaz 等^[77]利用微接触印迹技术, 以 MAH、HEMA 为单体, EGDMA 为交联剂, 使大肠杆菌表面与修饰后的金表面形成三明治结构, 制备 *E.coli* 的 BIP 获得与天然抗体相似的识别能力 (图 4)。对于表面印迹材料的研究, Spieker 等^[67]采用沉降法和邮票压印法, 获得蜡样芽孢杆菌的 BIP, 实验筛选了聚苯乙烯 (polystyrene, PS)、聚丙烯酸酯 (polyacrylate, PA)、聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP)、聚丙烯酰胺

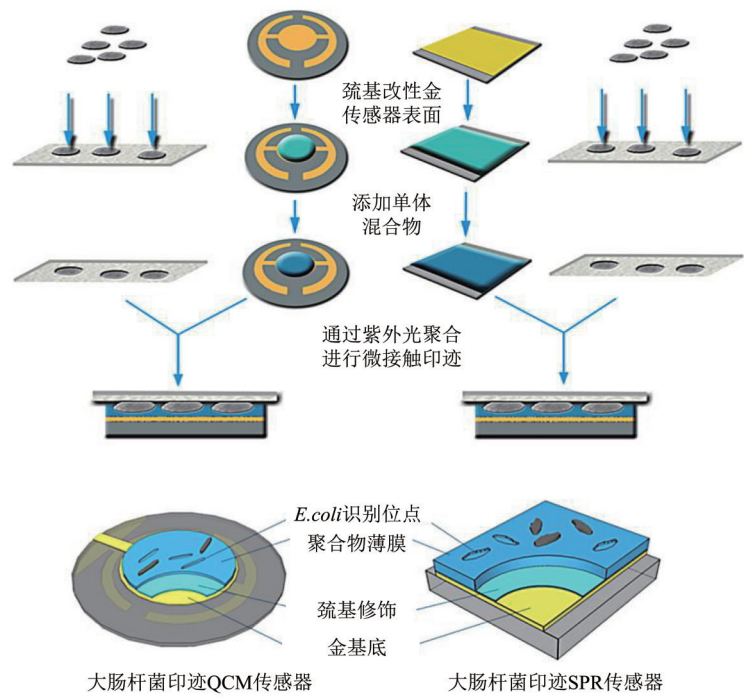


Fig. 4 Schematic diagram of microcontact imprinted SPR and QCM sensor surfaces^[77]
图4 微接触印迹法制备SPR和QCM传感表面的示意图^[77]

(polyacrylamide, PAA) 和 PU 五种聚合物, 发现 PU 和 PAA 对蜡样芽胞杆菌的亲合力最高。

可以看到, 基于 BIP 和抗体相近的特异性识别性能, 表面印迹法的应用, 将诸如双向电泳等电场技术应用于表面带电的细菌的检测, 结合 QCM 传感监测能实现极低的质量变化监测优势^[78-79], 对细菌细胞的快速、特异性和高灵敏检测具有很大的发展潜力。

3.3 荧光传感检测

在荧光传感检测中, 量子点 (quantum dots, QDs) 作为一种吸收光谱宽、发射光谱窄且可调谐的半导体纳米晶体, 具有良好的光致发光性能^[80]。其既可以作为荧光信号源, 又可以作为与生物分子结合的多功能支持物。量子点独特的光学性能和 BIP 的特异性识别结合, 为细菌检测提供了一种新型荧光检测方式。Chen 等^[53] 在电极表面直接电聚合制备 *E. coli* O157:H7 的聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 印迹膜, 构建了电化学发光 (ECL) 传感器 (图 5)。将 *E. coli* O157:H7 多克隆抗体 (pAb) 用氮掺杂石墨烯量子点 (N-GQDs) 标记, BIP-*E. coli* O157:H7 和 pAb-N-GQDs 的生物结合在 $K_2S_2O_8$ 的作用下, 可以产生强烈的 ECL, 检测限为 8 CFU/ml, 测试的线性响应范围为 $10^1 \sim 10^7$ CFU/ml。这种基于 N-GQDs 的 ECL 分析方法, 对 *E. coli* O157:H7 具有高选择性 (记录了添加沙门氏菌的 ECL 信号作为比较), 成功应用于水样检测。

将荧光的方法应用于实际样品的检测是一种更加简便的方法, 能够简化检测的预处理过程。Zhao 等^[81] 以整个单核细胞增生李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 为模板, 采用水包油 Pickering 乳液聚合法, 合成了包含水溶性 CdTe QDs 的 BIP

微球, 在嵌入 CdTe QDs 的微球表面产生识别位点。在靶标菌存在下, 可直接通过荧光猝灭进行视觉荧光检测, 对牛奶和猪肉样品中的 *L. monocytogenes* 进行定性检测。Bezdekova 等^[82] 采用金黄色葡萄球菌磁性 BIP 对患有乳腺炎的奶牛的原料奶、健康奶牛的牛奶、熟米饭和非液体食品样品进行荧光检测, 检测限为 1×10^3 CFU/ml, 这对应于欧盟立法中对食品微生物控制设定的限制。

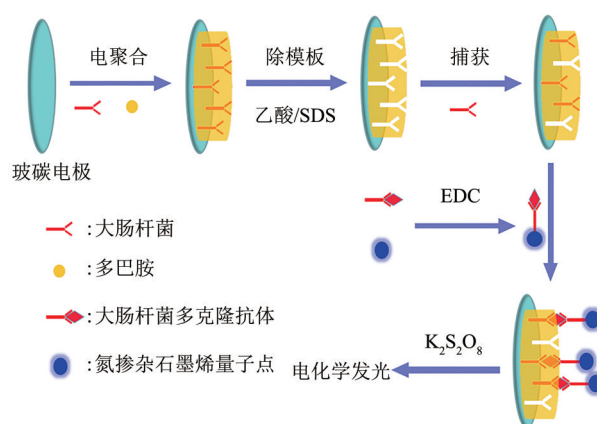


Fig. 5 Schematic diagram of the fabrication procedure of the BIP and the detection process^[53]

图5 BIP制作和检测过程示意图^[53]

EDC: 1-乙基-3-(3-二甲基氨基)碳二酰亚胺 (1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl) carbodiimide)。

将 BIP 和量子点耦合到一个系统中产生了一种新型的荧光传感器, 不仅使细菌印迹成为可能, 简化细菌检测的前处理过程, 而且还提高了细菌识别的特异性和细菌检测的灵敏度。

上述不同的传感检测方式其检测原理各有不同, 在应用中需要依据实际测试的需求进行选择, 表 3 给出了不同传感检测方法的简单比较。

Table 3 Comparison of three sensing detection methods

表3 三种传感检测方法的优缺点

传感检测方法	优点	缺点	参考文献
电化学传感检测	操作简便、便携	体系复杂, 背景干扰大	[39, 68, 72]
QCM传感检测	灵敏度高、响应快	背景干扰大	[44, 66]
荧光传感检测	简化预处理过程, 选择性好	检测限高, 检测过程中存在荧光猝灭等影响	[81-82]

3.4 集成BIP传感监测模式的微流控芯片分析技术

微流控芯片分析技术已经在化学^[83]、细胞分析^[84]和临床诊断^[85]、生物医学及即时检测^[86] (point-of-care testing, POCT) 等领域中获得广泛应用。本课题组长期开展基于微流控芯片的细菌传

感检测研究, 研制了多种不同类型的集成微流控细菌传感芯片^[10, 87-88], 针对肉类、牛奶、自来水等样本中金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等的检测开展了大量研究, 发现选择性捕获和采集样本中细菌并通过光电信号予以展示是实现高效检测的关键环节。

将BIP与微流控芯片有机结合, 构建设计细菌检测的传感芯片, 对于检测过程中的多个环节以及功能化具有重大的意义, 可实现更宽范围和更高灵敏度的细菌检测, 必将为细菌的高效检测提供新的技术途径。

Birnbaumer等^[27]以烟草花叶病毒(TMV)和人鼻病毒2血清型(HRV2)为模板, 在微流控芯片检测区通过NVP和MAA共聚物表面压印获得了印迹膜, 采用4个非接触式叉指电容器(μIDC)与集成到2个微流控通道网络中印迹聚合物的新颖组合构建了具有高灵敏度和高选择性的非接触微传感芯片, 可创建无噪音检测环境, 实现了病毒污染情况的连续监测。在5~500 kHz的应用频率范围内, 获得最佳传感器的表现在203 kHz。在流体流速增加50倍后, 能够完全清除BIP上的病毒并证明了设备的可重用性。Bao等^[89]利用表达绿色荧光蛋白的大肠杆菌作为模板, 通过细菌模板表面引发的原子转移自由基聚合(SI-ATRP)来印记细菌表面电荷的异质性, 选择了两个单体作为构筑基团, 一种是甲基丙烯酰氧乙基三甲氯化铵, 这是一种永久性阳离子单体, 能够在带负电荷的细菌外表面自组装, 另一种是两性离子单体3-二甲基(甲基丙烯酰氧乙基)丙磺酸铵, 用两性离子单体填充

识别位点之间的空隙可以抑制非特异性细菌在所生成BIP膜上的附着, 从而提高细菌的选择性; 使用单细胞力谱量化了单个细菌细胞和BIP之间的黏附力。将细菌识别与EIS的耦合, 两电极体系(BIP接枝金电极和对电极)连接到电化学工作站(图6a), 这种基于微流控芯片BIP膜的检测限低于一些基于生物受体的传感器, 竞争性细菌识别和EIS测试的结果表明, BIP膜仍表现出良好的细菌选择性。

通过调节传感检测、流体控制等方式, 可以在更大的范围内、更高灵敏度的条件下检测细菌细胞, 达到实际应用的目标。Redeker等^[51]采用表面印迹的方法在铝片表面制得基于PU材料的BIP, 作为合成的“细菌受体”, 与热波转运分析(thermal wave transport analysis, TWTA)结合(图6b), 可分析通过功能界面的热波传播, 较之前使用的传热法(heat-transfer method, HTM)灵敏度至少提高了2倍。实验将3 ml细菌悬浮液以2.5 ml/min的流速通过传感界面进行测试, 对9种细菌进行了分析。最后还提供了首次应用的证据, 能够检测加标尿液样本中临床相关浓度低至 3×10^4 CFU/ml的细菌, 证明了该传感器在尿样中的性能。

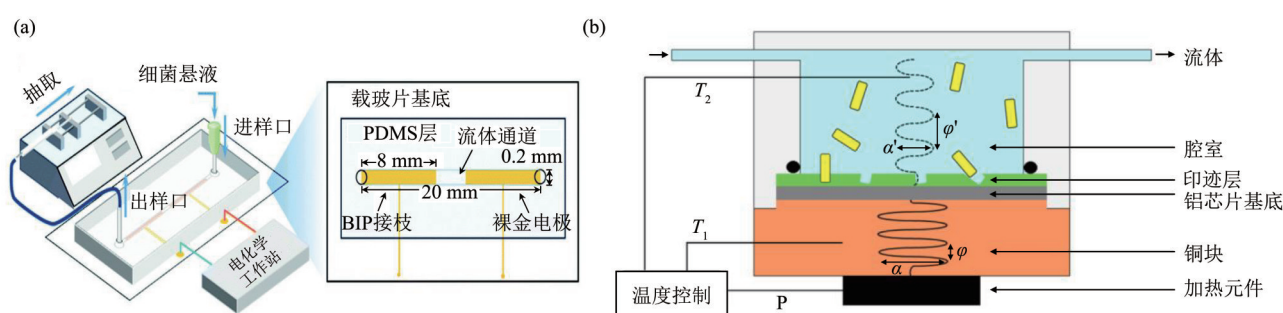


Fig. 6 Schematic diagram of EIS-BIP coupling system and microfluidic chip (a)^[89]; schematic representation of the TWTA setup (b)^[51]

图6 EIS-BIP耦合系统和微流控芯片 (a)^[89] 以及TWTA设计示意图 (b)^[51]

4 总结与展望

基于BIP细菌传感检测方法的研究和应用对细菌的高效检测具有重要意义。其中敏感膜材料的设计和效能, 很大程度上决定了细菌传感检测的优劣, 研制高灵敏度和高选择性的敏感膜是细菌传感检测的一个重要研究方向。近年来MIT在细菌检

测方面显示出良好的发展潜力和应用前景, 表面印迹的方法毫无疑问已经成为印迹制备的主流方向, 但如何解释细菌与印迹腔的特异性结合是有效应用的必要条件, 如何去除模板获得完整有效的印迹空腔是重中之重, 如何选择印迹材料以及印迹材料的修饰改性是优化印迹膜效能的重要环节, 如何将印迹膜、传感检测手段和微流控芯片有机地结合起来

是实现其应用的关键。这些挑战也为基于BIP的细菌检测带来了更好的前景。随着发展不断提高BIP的稳定性、选择性和灵敏度,这不仅有助于细菌细胞分析、病毒疾病治疗和POCT等方面的应用,也极大地丰富了MIT的研究内涵。

参 考 文 献

- [1] Gentile C L, Weir T L J S. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*, 2018, **362**(6416): 776-780
- [2] 赵彤. 食源性致病菌检测现状与食品微生物危险性评估. 中国卫生标准管理, 2019, **10**(4): 7-9
Zhao T. China Health Standard Management, 2019, **10**(4): 7-9
- [3] Atarashi K, Suda W, Luo C, *et al.* Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science*, 2017, **358**(6361): 359-365
- [4] Arthur T M, Bosilevac J M, Nou X W, *et al.* Evaluation of culture- and PCR-based detection methods for *Escherichia coli* O157 : H7 in inoculated ground beef. *J Food Prot*, 2005, **68**(8): 1566-1574
- [5] Zhang Y, Zhu L Q, Zhang Y T, *et al.* Simultaneous detection of three foodborne pathogenic bacteria in food samples by microchip capillary electrophoresis in combination with polymerase chain reaction. *J Chromatogr A*, 2018, **1555**: 100-105
- [6] Law J W F, Ab Mutalib N S, Chan K G, *et al.* Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*, 2015, **5**: 770
- [7] 蒋艳, 徐溢, 王人杰, 等. 新型纳米荧光探针在微流控细菌芯片检测中的应用. 化学进展, 2015, **27**(9): 1240-1250
Jiang Y, Xu Y, Wang R J, *et al.* *Prog Chem*, 2015, **27**(9): 1240-1250
- [8] Cui F, Shen X, Cao B, *et al.* Bacterial identification and adhesive strength evaluation based on a mannose biosensor with dual-mode detection. *Biosens Bioelectron*, 2022, **203**: 114044
- [9] 苏喜, 葛闯, 陈李, 等. 基于水凝胶的细菌传感检测. 化学进展, 2021, **32**(12): 1908-1916
Su X, Ge C, Chen L, *et al.* *Prog Chem*, 2020, **32**(12): 1908-1916
- [10] Su X, Ren R, Wu Y, *et al.* Study of biochip integrated with microelectrodes modified by poly-dopamine-co-chitosan composite gel for separation, enrichment and detection of microbes in the aerosol. *Biosens Bioelectron*, 2021, **176**: 112931
- [11] 夏也, 苏喜, 陈李, 等. 用于细胞检测的微电极传感器设计及传感分析. 化学进展, 2019, **31**(8): 1129-1135
Xia Y, Su X, Chen L, *et al.* *Prog Chem*, 2019, **31**(8): 1129-1135
- [12] Sergeyev T, Yarynka D, Piletska E, *et al.* Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes. *Talanta*, 2019, **201**: 204-210
- [13] Guo W, Pi F, Zhang H, *et al.* A novel molecularly imprinted electrochemical sensor modified with carbon dots, chitosan, gold nanoparticles for the determination of patulin. *Biosens Bioelectron*, 2017, **98**: 299-304
- [14] Moein M M, Javanbakht M, Karimi M, *et al.* Molecularly imprinted sol-gel nanofibers based solid phase microextraction coupled on-line with high performance liquid chromatography for selective determination of acesulfame. *Talanta*, 2015, **134**: 340-347
- [15] Li D Y, He X W, Chen Y, *et al.* Novel hybrid structure Silica/CdTe/ molecularly imprinted polymer: synthesis, specific recognition, and quantitative fluorescence detection of bovine hemoglobin. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, **5**(23): 12609-12616
- [16] Wang H Y, Cao P P, He Z Y, *et al.* Targeted imaging and targeted therapy of breast cancer cells via fluorescent double template-imprinted polymer coated silicon nanoparticles by an epitope approach. *Nanoscale*, 2019, **11**(36): 17018-17030
- [17] Sykora S, Cumbo A, Belliot G, *et al.* Virus-like particles as virus substitutes to design artificial virus-recognition nanomaterials. *Chem Commun (Camb)*, 2015, **51**(12): 2256-2258
- [18] Ren K, Banaei N, Zare R N. Sorting inactivated cells using cell-imprinted polymer thin films. *ACS Nano*, 2013, **7**(7): 6031-6036
- [19] Pan J, Chen W, Ma Y, *et al.* Molecularly imprinted polymers as receptor mimics for selective cell recognition. *Chem Soc Rev*, 2018, **47**(15): 5574-5587
- [20] Wulff G, Sarhan A. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1972, **11**: 341-346
- [21] Dickert F L, Hayden O. Bioimprinting of polymers and sol-gel phases. Selective detection of yeasts with imprinted polymers. *Anal Chem*, 2002, **74**(6): 1302-1306
- [22] Piletsky S, Canfarotta F, Poma A, *et al.* Molecularly imprinted polymers for cell recognition. *Trends Biotechnol*, 2020, **38**(4): 368-387
- [23] Zhang W J, Li D, Xu Y, *et al.* Synthesis and application of novel molecularly imprinted solid phase extraction materials based on carbon nanotubes for determination of carbofuran in human serum by high performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*, 2019, **67**(18): 5105-5112
- [24] Speltini A, Scalabrini A, Maraschi F, *et al.* Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: a review. *Anal Chim Acta*, 2017, **974**: 1-26
- [25] Zhang H. Molecularly imprinted nanoparticles for biomedical applications. *Adv Mater*, 2020, **32**(3): e1806328
- [26] Bonatti A F, De Maria C, Vozzi G. Molecular imprinting strategies for tissue engineering applications: a review. *Polymers (Basel)*, 2021, **13**(4): 548
- [27] Birnbaumer G M, Lieberzeit P A, Richter L, *et al.* Detection of viruses with molecularly imprinted polymers integrated on a microfluidic biochip using contact-less dielectric microsensors. *Lab Chip*, 2009, **9**(24): 3549-3556
- [28] Cumbo A, Lorber B, Corvini P F X, *et al.* A synthetic nanomaterial for virus recognition produced by surface imprinting. *Nat Commun*, 2013, **4**(1): 1503
- [29] Zhang Z, Guan Y, Li M, *et al.* Highly stable and reusable imprinted artificial antibody used for *in situ* detection and disinfection of

- pathogens. *Chem Sci*, 2015, **6**(5): 2822-2826
- [30] Ren K, Zare R N J a N. Chemical recognition in cell-imprinted polymers. *ACS Nano*, 2012, **6**(5): 4314-4318
- [31] Shen X, Svensson Bonde J, Kamra T, *et al.* Bacterial imprinting at pickering emulsion interfaces. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(40): 10687-10690
- [32] Kunath S, Panagiotopoulou M, Maximilien J, *et al.* Cell and tissue imaging with molecularly imprinted polymers as plastic antibody mimics. *Adv Healthc Mater*, 2015, **4**(9): 1322-1326
- [33] Bui B T S, Auroy T, Haupt K. Fighting antibiotic-resistant bacteria: promising strategies orchestrated by molecularly imprinted polymers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, **61**(8): e202106493
- [34] Mosbach K. Molecular imprinting. *Trends Biochem Sci*, 1994, **19**(1): 9-14
- [35] Vasapollo G, Del Sole R, Mergola L, *et al.* Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *Int J Mol Sci*, 2011, **12**(9): 5908-5945
- [36] Aig A, Sk A, Nm A, *et al.* Functionalized conjugated polymers for sensing and molecular imprinting applications. *Prog Polym Sci*, 2019, **88**: 1-129
- [37] Bobacka J, Ivaska A, Lewenstam A. Potentiometric ion sensors. *Chem Rev*, 2008, **108**(2): 329-351
- [38] Gerard M, Chaubey A, Malhotra B D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens Bioelectron*, 2002, **17**(5): 345-359
- [39] Jafari H, Amiri M, Abdi E, *et al.* Entrapment of uropathogenic *E. coli* cells into ultra-thin sol-gel matrices on gold thin films: a low cost alternative for impedimetric bacteria sensing. *Biosens Bioelectron*, 2019, **124-125**: 161-166
- [40] Starosvetsky J, Cohen T, Cheruti U, *et al.* Effects of physical parameters on bacterial cell adsorption onto pre-imprinted Sol-Gel films. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2012, **03**(04): 499-507
- [41] Gopalan A I, Komathi S, Muthuchamy N, *et al.* Functionalized conjugated polymers for sensing and molecular imprinting applications. *Prog Polym Sci*, 2019, **88**: 1-129
- [42] Qi P, Wang J, Wang L, *et al.* Molecularly imprinted polymers synthesized *via* semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols. *Polymer*, 2010, **51**(23): 5417-5423
- [43] He C, Long Y, Pan J, *et al.* Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, **70**(2): 133-150
- [44] Tokonami S, Nakadoi Y, Takahashi M, *et al.* Label-Free and selective bacteria detection using a film with transferred bacterial configuration. *Anal Chem*, 2013, **85**(10): 4925-4929
- [45] Ma F, Rehman A, Liu H, *et al.* Glycosylation of quinone-fused polythiophene for reagentless and label-free detection of *E. coli*. *Anal Chem*, 2015, **87**(3): 1560-1568
- [46] Wu J, Wang R, Lu Y, *et al.* Facile preparation of a bacteria imprinted artificial receptor for highly selective bacterial recognition and label-free impedimetric detection. *Anal Chem*, 2019, **91**(1): 1027-1033
- [47] Cohen T, Starosvetsky J, Cheruti U, *et al.* Whole cell imprinting in Sol-Gel thin films for bacterial recognition in liquids: macromolecular fingerprinting. *Int J Mol Sci*, 2010, **11**(4): 1236-1252
- [48] Dulay M T, Zaman N, Jaramillo D, *et al.* Pathogen-imprinted organosiloxane polymers as selective biosensors for the detection of targeted *E. coli*. *C (Basel)*, 2018, **4**(2): 29
- [49] Mankar J S, Sharma M D, Rayalu S S, *et al.* Molecularly imprinted microparticles (microMIPs) embedded with reduced graphene oxide for capture and destruction of *E. coli* in drinking water. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, **110**: 110672
- [50] Seifner A, Lieberzeit P, Jungbauer C, *et al.* Synthetic receptors for selectively detecting erythrocyte ABO subgroups. *Anal Chim Acta*, 2009, **651**(2): 215-219
- [51] Redeker E S, Eersels K, Akkermans O, *et al.* Biomimetic bacterial identification platform based on thermal wave transport analysis (TWTA) through surface-imprinted polymers. *ACS Infect Dis*, 2017, **3**(5): 388-397
- [52] Golabi M, Kuralay F, Jager E W H, *et al.* Electrochemical bacterial detection using poly(3-aminophenylboronic acid)-based imprinted polymer. *Biosens Bioelectron*, 2017, **93**: 87-93
- [53] Chen S, Chen X, Zhang L, *et al.* Electrochemiluminescence detection of *Escherichia coli* 0157: H7 based on a novel polydopamine surface imprinted polymer biosensor. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(6): 5430-5436
- [54] Schirhagl R. Bioapplications for molecularly imprinted polymers. *Anal Chem*, 2014, **86**(1): 250-261
- [55] Bui B T S, Auroy T, Haupt K. Fighting antibiotic-resistant bacteria: promising strategies orchestrated by molecularly imprinted polymers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, **61**(8): e202106493
- [56] Andersson L I. Molecular imprinting for drug bioanalysis: a review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, **739**(1): 163-173
- [57] Jia M, Zhang Z, Li J, *et al.* Molecular imprinting technology for microorganism analysis. *Trends Anal Chem*, 2018, **106**: 190-201
- [58] Long Y, Li Z, Bi Q, *et al.* Novel polymeric nanoparticles targeting the lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Pharm*, 2016, **502**(1): 232-241
- [59] Khan M A R, Moreira F T C, Riu J, *et al.* Plastic antibody for the electrochemical detection of bacterial surface proteins. *Sens Actuators B Chem*, 2016, **233**: 697-704
- [60] Khan M A R, Aires Cardoso A R, F. Sales M G, *et al.* Artificial receptors for the electrochemical detection of bacterial flagellar filaments from *Proteus mirabilis*. *Sens Actuators B Chem*, 2017, **244**: 732-741
- [61] Wu Z, Hou J, Wang Y, *et al.* Preparation and evaluation of amoxicillin loaded dual molecularly imprinted nanoparticles for anti-helicobacter pylori therapy. *Int J Pharm*, 2015, **496**(2): 1006-1014
- [62] De Leon A, Advincula R C. Chapter 11-conducting polymers with superhydrophobic effects as anticorrosion Coating//Tiwari A, Rawlins J, Hihara L H. Intelligent Coatings for Corrosion Control.

- Boston: Butterworth-Heinemann, 2015: 409-430
- [63] Losito I, Palmisano F, Zamboni P G. O-phenylenediamine electropolymerization by cyclic voltammetry combined with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal Chem*, 2003, **75**(19): 4988-4995
- [64] Komaba S, Seyama M, Momma T, *et al.* Potentiometric biosensor for urea based on electropolymerized electroinactive polypyrrole. *Electrochim Acta*, 1997, **42**(3): 383-388
- [65] Uang Y M, Chou T C. Criteria for designing a polypyrrole glucose biosensor by galvanostatic electropolymerization. *Electroanalysis*, 2002, **14**(22): 1564-1570
- [66] Schnettler A, Lieberzeit P. A self-organisation synthesis approach for bacteria molecularly imprinted polymers. *Procedia Eng*, 2016, **168**: 557-560
- [67] Spieker E, Lieberzeit P A. Molecular imprinting studies for developing QCM-sensors for *Bacillus cereus*. *Procedia Eng*, 2016, **168**: 561-564
- [68] Mugo S M, Lu W, Dhanjai D. A pathogen imprinted hybrid polymer capacitive sensor for selective *Escherichia coli* detection. *Med Devices Sens*, 2020, **3**(2): e10071
- [69] Boysen R I, Schwarz L J, Nicolau D V, *et al.* Molecularly imprinted polymer membranes and thin films for the separation and sensing of biomacromolecules. *J Sep Sci*, 2017, **40**(1): 314-335
- [70] Schirhagl R, Ren K N, Zare R N. Surface imprinted polymers in microfluidic devices. *Sci China Chem*, 2012, **42**: 937-953
- [71] Cieplak M, Kutner W. Artificial biosensors: how can molecular imprinting mimic biorecognition?. *Trends Biotechnol*, 2016, **34**(11): 922-941
- [72] Idil N, Hedstrom M, Denizli A, *et al.* Whole cell based microcontact imprinted capacitive biosensor for the detection of *Escherichia coli*. *Biosens Bioelectron*, 2017, **87**: 807-815
- [73] Haupt K. Molecularly imprinted polymers: the next generation. *Anal Chem*, 2003, **75**: 376A-383A
- [74] Lahcen A A, Arduini F, Lista F, *et al.* Label-free electrochemical sensor based on spore-imprinted polymer for *Bacillus cereus* spore detection. *Sens Actuators B Chem*, 2018, **276**: 114-120
- [75] Huang H, Liu M, Wang X, *et al.* Label-free 3D Ag nanoflower-based electrochemical immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 pathogens. *Nanoscale Res Lett*, 2016, **11**(1): 507
- [76] Wang Y, Ye Z, Ying Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors (Basel)*, 2012, **12**(3): 3449-3471
- [77] Yilmaz E, Majidi D, Ozgur E, *et al.* Whole cell imprinting based *Escherichia coli* sensors: a study for SPR and QCM. *Sens Actuators B Chem*, 2015, **209**: 714-721
- [78] Mujahid A, Mustafa G, Dickert F L. Label-free bioanalyte detection from nanometer to micrometer dimensions-molecular imprinting and QCMs. *Biosensors (Basel)*, 2018, **8**(2): 52
- [79] Marrazza G. Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review. *Biosensors (Basel)*, 2014, **4**(3): 301-317
- [80] Amjadi M, Jalili R. Molecularly imprinted mesoporous silica embedded with carbon dots and semiconductor quantum dots as a ratiometric fluorescent sensor for diniconazole. *Biosens Bioelectron*, 2017, **96**: 121-126
- [81] Zhao X, Cui Y, Wang J, *et al.* Preparation of fluorescent molecularly imprinted polymers *via* pickering emulsion interfaces and the application for visual sensing analysis of listeria monocytogenes. *Polymers (Basel)*, 2019, **11**(6): 984
- [82] Bezdekova J, Zemankova K, Hutarova J, *et al.* Magnetic molecularly imprinted polymers used for selective isolation and detection of *Staphylococcus aureus*. *Food Chem (Oxf)*, 2020, **321**: 126673
- [83] Marcus J S, Anderson W F, Quake S R. Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics. *Anal Chem*, 2006, **78**(3): 956-958
- [84] Rothbauer M, Zirath H, Ertl P. Recent advances in microfluidic technologies for cell-to-cell interaction studies. *Lab Chip*, 2018, **18**(2): 249-270
- [85] Wu J, Chen Q, Liu W, *et al.* Recent advances in microfluidic 3D cellular scaffolds for drug assays. *Trends Analyt Chem*, 2017, **87**: 19-31
- [86] Hol F J H, Dekker C. Zooming in to see the bigger picture: microfluidic and nanofabrication tools to study bacteria. *Science*, 2014, **346**(6208): 1251821
- [87] Wang R, Xu Y, Sors T, *et al.* Impedimetric detection of bacteria by using a microfluidic chip and silver nanoparticle based signal enhancement. *Mikrochim Acta*, 2018, **185**(3): 184
- [88] Wang X, He X, He Z, *et al.* Detection of prostate specific antigen in whole blood by microfluidic chip integrated with dielectrophoretic separation and electrochemical sensing. *Biosens Bioelectron*, 2022, **204**: 114057
- [89] Bao H, Yang B, Zhang X, *et al.* Bacteria-templated fabrication of a charge heterogeneous polymeric interface for highly specific bacterial recognition. *Chem Commun (Camb)*, 2017, **53**(15): 2319-2322

Molecular Imprinted Technology-based on Sensing Detection of Bacteria*

HE Yong-Fei^{1,2)}, PANG Yi-Quan^{1,2)}, GE Chuang^{1,4)**}, XU Yi^{1,3)**}

⁽¹⁾Key Disciplines Lab of Novel Micro-Nano Devices and System Technology, Key Laboratory of Optoelectronic Technology and Systems, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

²⁾School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

³⁾School of Optoelectronic Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

⁴⁾Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

Abstract Molecular imprinted technology has been applied to identify template molecules by using molecular imprinted polymers to simulate the interaction between enzymes and substrates or antibody and antigens. In recent years, to meet the needs of efficient microbial detection, bacteria, cells and other microbial imprinted technologies has been gradually derived from molecular imprinted technology, which was of the advantages of selective capture, effective separation and enrichment of targets, and easy to integrate sensing detection technology and so on. In this review, the latest advances of bacteria imprinted technology were introduced and summarized, including imprinting materials, imprinting mechanisms, detecting techniques and their typical applications. Firstly, the principle of bacteria imprinting was introduced. The materials of surface imprinting and the preparation methods of direct imprinting, indirect imprinting and electropolymerization were summarized. The applications and progress of bacteria imprinted sensing monitoring based on different analytical methods, such as fluorescence, electrochemistry, quartz crystal microbalance (QCM) and so no, were discussed in details. Especially, the analytical methodology based on microfluidic chip integrated with bacteria molecular imprinting was presented. Finally, the existing challenges of related fields and developing trends were put forward. It was illustrated that the imprinting technologies for bacteria, cells and other microbial could be widely adopted in the fields of biochemical separation and analysis because of its stability of material structure and specificity of target identification.

Key words molecular imprinted technology, bacteria, surface imprinting, sensing detection, microfluidic chip

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0286

* This work was supported by grants from the National Key Research and Development Plan (2020YFB2009001), The National Natural Science Foundation of China (62071072), the Central Universities (2021CDJKYJH006), Open Fund for Key Discipline Laboratories of New Micro-nano Devices and System Technology (2020), and Project of Intelligent Sensing and Micro-nano Biochemical System (2019 Graduate Tutor Team).

** Corresponding author.

XU Yi. Tel: 86-23-65111022, E-mail: xuyibbd@cqu.edu.cn

GE Chuang. Tel: 86-15223340297, E-mail: gechuang1115@163.com

Received: June 22, 2022 Accepted: August 17, 2022