细菌代谢产物的检测进展及应用

崔海珊1 胡玉林2 于春梅1 吴增强1*

(南通大学 1公共卫生学院;2化学化工学院 南通 226019)

摘 要 细菌在新陈代谢过程中会产生一系列分解和合成代谢产物,如醇类、脂类、酶、蛋白质等,这些 代谢物反映了细菌的生长、发育及其与环境的相互作用。监测细菌代谢物对于细菌感染的快速床旁检测、快 速测定抗生素敏感性、区分变质食品至关重要。本文综述了细菌代谢物检测的方法,包括色谱-质谱法、光谱 法、电化学法,并对各种检测方法的优缺点进行了分析总结,包括其灵敏度、选择性、成本和复杂性。此外还 总结了细菌代谢物检测所存在的问题,如样品制备、检测干扰的影响和检测限的提高等。最后,提出了解决 这些问题的几种方案,例如结合纳通道技术以及引入纳米材料来提高细菌代谢物分析方法的灵敏度。

关键词 细菌代谢物 色谱-质谱 光谱法 电化学法

Advancements and Applications in the Detection of Bacterial Metabolites

Cui Haishan¹, Hu Yulin², Yu Chunmei¹, Wu Zengqiang^{1*}

(¹School of Public Health, ²School of Chemistry and Chemical Engineering,

Nantong University, Nantong, 226019)

Abstract Bacterial metabolites, such as alcohols, lipids, enzymes, proteins, etc., are markers of bacterial growth and interaction between them and environment. Therefore, analysis of bacterial metabolites is crucial for detecting bacterial infections, antimicrobial susceptibility testing, and identifying spoiled food. This paper explores analytical methods for detecting bacterial metabolites: chromatography-mass spectrometry, spectroscopy, and electrochemical analysis. Each method is evaluated based on its advantages and limitations, including its sensitivity, selectivity, cost, and complexity. Additionally, the challenges associated with detecting bacterial metabolites are discussed, such as sample preparation, interference from other compounds, and improving limit of detection for measuring target bacteria. Finally, several solutions are presented for addressing these challenges, such as combining with nanofluidic technology, and introducing nanoscale materials to enhance sensitivity of analytical method for bacterial metabolites.

Keywords Bacterial metabolites, Chromatography-mass spectrometry, Spectroscopy, Electrochemical detection

细菌的营养要求、能量来源、酶系统、代谢产物各不相同,形成了多种多样的代谢类型,以适应 复杂的外界环境。细菌在分解和合成代谢中能产 生多种代谢产物,这些不同代谢产物的生物化学 差异可以作为细菌鉴别的依据,为细菌的检测提 供一个新的途径。如变形杆菌含有尿素酶可以水 解尿素,产生氨^[1];绿脓杆菌能产生水溶性的色 素绿脓菌素使培养基呈绿色^[2]。在临床中,检测 细菌感染患者标本中不同生长阶段分泌的代谢物 不仅可以提供与感染过程相关的信息,并且可以 作为细菌感染的生物标志物用于病原体的诊断, 给患者提供更有效的治疗方案。此外,检测细菌 在食品中代谢产生的特定挥发性气态代谢物,可 应用于实时跟踪食品的变质程度^[3]。同时,检测 细菌的代谢产物^[4]也可以快速筛选出合适的抗 生素,不仅能避免抗生素的误用与过度使用,而且 能减缓细菌耐药性蔓延,对监测耐药细菌^[5]的传 播具有重要意义。因此,对细菌代谢过程的检测 不仅有助于掌握细菌的生长过程,而且能够为细 菌感染的预防和治疗起到至关重要的作用。与直

国家自然科学基金项目(21974058,21775066)资助

^{*}联系人,吴增强 男,博士,教授,主要从事微纳流控分析方向的研究工作,E-mail: zqwu@ntu.edu.cn

²⁰²³⁻⁰⁴⁻⁰⁴ 收稿, 2023-05-20 接受

接进行细菌检测相比,检测细菌代谢物能够实现 抗生素的快速筛查,了解抗生素对细菌代谢的影 响,揭示耐药细菌和敏感细菌的代谢差异,有利于 治疗方案的优化;同时能实现对细菌生长、细菌种 群动态变化的实时监测。本文基于细菌代谢产物 检测的原理对其检测方法和应用进行了概述。

1 色谱-质谱法

1.1 气相色谱

细菌利用周围环境中的糖类、蛋白质和脂肪 等营养成分,在酶的作用下产生葡萄糖、氨基酸和 脂肪酸等。这些物质通过异化作用生成一系列复 杂的代谢产物,包含醇类、醛类、脂类、酸类、酯类 和酮类等挥发性物质[6]。采用气相色谱法可分 离检测细菌代谢过程中所产生的少部分特定酸 性、中性以及碱性挥发性代谢产物^[7,8]。随着色 谱技术的发展,二维气相色谱(GC×GC)具有比一 维气相色谱更高的峰容量、更快的分析速度,因而 逐渐被应用于细菌代谢物的检测。Heng 等^[9]采 用一种静态顶空综合二维气相色谱的方法检测受 污染的牛奶中挥发性有机化合物(乙醇、1-丙醇、 乙腈和乙醛等),证明了牛奶中存在大肠杆菌的 污染。气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术不仅能 够定性而且能够定量地鉴定出细菌大部分的挥发 性代谢物。例如,口腔内存在两种革兰氏阳性和 两种革兰氏阴性细菌, Khalid 等^[10]利用固相微萃 取这几种细菌培养物的顶部空间气体以及舌生物 膜微生物群中的挥发物,通过 GC-MS 对其进行了 检测,结果表明,口腔厌氧菌产生的挥发性代谢物 可作为全身性疾病或代谢紊乱的判断标准。 Goeminne 等^[11]利用 GC-MS 分析了 28 例支气管 扩张患者的痰液中细菌培养所产生的挥发性化合 物,表明病人痰液细菌培养物的挥发性代谢物可 以作为一种慢性肺部感染的早期筛选方法。 Rosamaria 等^[12]利用 GC-MS 分析了嗜肺军团菌 释放的挥发性代谢物,并与其他军团菌属和铜绿 假单胞菌产生的挥发性代谢物进行比较,鉴定出 了嗜肺军团菌特征性的挥发性有机化合物醇类和 酮类,以此作为区分嗜肺军团菌与其他水生微生 物的标志。Federica 等^[13]利用顶空固相微萃取 (HS-SPME)和 GC-MS 方法对受污染的肉类中的 挥发性有机碳进行定量和定性评价,研究结果表 明在受到伤寒沙门氏菌、空肠弯曲菌和金黄色葡 萄球菌三种细菌污染的牛肉中己烷的浓度最高,

归一化峰面积(PA%)达到 33.63%;在受到这三 种细菌污染的鸡肉和猪肉中乙醇的含量最高, PA%分别达到 12.33% 和 6.7%。通过此方法可 以快速检测肉类中的细菌污染。Marta 等^[14]利用 SPME-GC-MS 对好氧贮藏的生鸡胸肉中挥发性有 机物进行了定性和定量分析,研究结果显示乙醇、 3-甲基-1-丁醇、乙酸可作为生鸡胸肉贮存的化学 腐败指标,在最短保质期内,乙醇、3-甲基-1-丁醇 和乙酸的量分别为 25.5、0.3 和 58.5µg/g。此研 究有助于开发用于检测特征性化学腐败指标的快 速传感器,以实时监测禽肉品质。飞行时间质谱 (TOFMS)与二维气相色谱的联用可以提供比传 统的 GC-MS 更高的分辨率和灵敏度。Christiaan 等^[15]通过 HS-SPME 和 GC×GC-TOFMS 对体外培 养的艰难梭菌的挥发性代谢物进行分析,检测出 了新型含硫和含羰基分子。Davis 等^[16]利用 HS-SPME 和 GC×GC-TOFMS,分析了来自早期和晚期 慢性囊性纤维化(CF)肺部感染的铜绿假单胞菌 分离株的挥发性代谢组,表明这些早期和晚期感 染分离株之间挥发性代谢物的相对丰度存在差 异。此法可以用于测定铜绿假单胞菌 CF 肺部感 染的预后挥发性生物标志物。

1.2 液相色谱

液相色谱适合不易挥发、难汽化、对热敏感的 物质的分离分析,可用于细菌的不挥发代谢物进 行检测,包括脂肪族、二羧酸和酚酸等^[17]。将液 相色谱与质谱联用(LC-MS)可以扩大检测物质的 范围,提高检测的灵敏度。Sandeep 等^[18]利用 LC-MS 对万古霉素耐药肠球菌(VRE)中的丙氨 酸分支代谢物 L-Ala、D-Ala、D-Ala-D-Ala、D-Ala-D-Lac 进行了定量测定,这对研究万古霉素诱导 的 VRE 耐药以及开发针对万古霉素耐药的新药 具有重要意义。Gao 等^[19]开发了一种基于液滴 的微流控平台,利用该平台将细菌菌株包裹在液 滴中,通过 LC-MS 的方法,快速筛选了化学诱导 的突变菌株并分析了其代谢产物。图1展示了集 成微流体装置用于筛选和选择性提取含有突变菌 株的靶滴液的过程。将细菌封装的液滴滴入集成 微流体装置中,液滴在装置中的捕获位点处被捕 获,通过洗涤排除其他液滴后,在芯片上培养4h, 并在 571nm 荧光下观察单独筛选和提取出含有 突变菌株(显示红色荧光)的液滴。此外,将超高 效液相色谱与四极杆飞行时间质谱、线性离子阱/ 轨道阱质谱相结合,研究肠道细菌代谢蒙花 苷^[20]、梓醇^[21]、地黄^[22]、鸟苷^[23]等药物的途径及 其代谢产物,有助于进一步了解药物在体内的药 代动力学,揭示其在体内的作用机制,并为追踪药 物对疾病的治疗效果提供依据。同位素标记细菌 代谢产物也是目前最主要的研究细菌内代谢物的 方法之一。Safo等^[24]提出了一种新的液相色谱-同位素稀释质谱法(LC-IDMS),使用巴氏梭菌作 为来源分析 131种¹³C标记的细胞内代谢物。Wu 等^[25]对细菌细胞含有胺和酚的代谢物进行差异 同位素丹磺酰化标记,通过 LC-MS 分析标记的代 谢物,成功区分了巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、 大肠杆菌三种不同的细菌菌种。

1.3 质谱法

虽然质谱法通常是与色谱法联用的,但是单独的质谱法也可应用于细菌代谢物的检测,作为 细菌感染诊断、细菌物种水平鉴别的一种方法。 Vaira 等^[26]利用选择离子流动管质谱(SIFI-MS) 准确定量测定了呼出气中的氨,以此判断幽门螺 杆菌在胃肠道中是否定植。Allardyce 等^[27]使用 SIFT-MS测量了铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、大肠 杆菌等五种细菌在 BacT/ALERTR 血培养瓶中产 生的代谢气体,实现了对菌血症的诊断。Slade 等^[28]通过 SIFI-MS 实时监测金黄色葡萄球菌、铜 绿假单胞菌和化脓性链球菌在胶原伤口生物膜模

型中生长时所产生的挥发性代谢物,鉴别了临床 伤口感染相关病原体的物种水平。Kristýna Sovová 等^[29]使用 SIFT-MS 对深红沙雷氏菌、粘质 沙雷氏菌和大肠杆菌三种不同细菌的挥发性化合 物进行实时顶空定量,监测了这三种不同细菌物 种的种群动态。Li 等^[30]建立了一种二次电喷雾 串联质谱(SESI-MS)方法对一对同基因型的甲氧 西林敏感和耐药金黄色葡萄球菌的挥发性有机物 代谢物进行了分析,研究了抗生素治疗对细菌代 谢的干扰。Jackson 等^[31]利用解吸电喷雾电离 (DESI)监测到了大肠杆菌猝灭上清液中靶向中 心碳代谢物的存在。Zhang 等^[32]利用 TiO, 辅助 激光解吸/电离质谱(LDI-MS)分析了超广谱β-内 酰胺酶抗性阳性大肠杆菌(ESBL)和 ESBL 阴性 菌株的代谢物,确定了11种独特的代谢物可作为 ESBL 阳性大肠杆菌的潜在生物标志物,以此来 进行 ESBL 阳性细菌鉴定。

利用色谱-质谱法进行细菌代谢物的分析虽 然是一种金标准,但其需要明确细菌的代谢物。 然而,目前的质谱数据库显有包含细菌产生的所 有化合物,对于未知的细菌代谢产物的检测仍需 要其他方法进行研究。此外这种方法需要昂贵庞 大的仪器,同时要求专业的操作人员,检测过程耗 时长,需要大量试剂。因此,色谱-质谱法不适用



图 1 (a)微生物菌株在水滴中的封装示意图;(b)在装置微结构中捕获液滴;(c)用突变菌株选择性提取液滴;(d)菌株的发酵培养; (e)通过 HPLC-MS/MS 进行的代谢产物分析;(f)活力指示剂的反应原理^[19]

Fig. 1 Schematic illustration of encapsulation of microbial strains in aqueous droplets (a), capture of droplets in the device microstructures (b), selective extraction of droplets with mutant strains (c), fermental cultivation of strains (d), metabolite analysis by HPLC-MS/MS (e), and the reaction principle of the viability indicator (f)^[19]

于细菌代谢物的实时床旁检测(POCT)。同时, 采用色谱质谱法检测需要提取细菌的代谢产物, 无法做到无损检测,时效性也不高。

2 光谱法

2.1 表面增强拉曼散射

表面增强拉曼光谱(SERS)在微生物检测方 面有着广泛的应用前景^[33]。SERS 具有快速、高 灵敏、无损、无标记等优点,越来越广泛地应用于 细菌代谢物的检测。细菌代谢物的浓度范围为 nmol/L~mmol/L^[34],其代谢物浓度的检测限和定 量范围通常在 µmol/L 量级。常规的拉曼光谱即 使在条件有利的情况下,10⁸个入射光子中也仅 可以激发一个拉曼分子[35],其检测灵敏度非常低 无法实现对细菌代谢物的检测。因此需要大幅度 增强拉曼信号,提高检测灵敏度。一般地,可以通 过调控基底的组成、形状、尺寸、间距和聚集方式 等提高 SERS 的灵敏度和检测限。例如, Nguyen 等[36] 通过化学方法控制纳米粒子间距增强了 SERS 的信号,在水性介质中检测到了铜绿假单 胞菌的次级代谢物——化脓青蛋白,其检测限达 到 100pg/mL。Guo 等^[37]将金纳米星(AuNS)负 载在平板滤片载体上制备了一种表面增强拉曼散 射器件,对细菌的气态代谢物响应灵敏,检测限低 至 8.7nmol/L,这种 SERS 器件能快速监测食品中 常见细菌的常见代谢物,且性能远高于人类感官。

Kelly 等^[38]将 Au 用作增强介质,通过 SERS 快速 地检测到细菌的代谢产物——二甲基二硫醚.提 供了一种新的快速床旁检测细菌感染的方法。然 而,这种将贵金属作为增强介质的成本比较高。 为降低成本, Sunho 等^[39]设计了一种新的纸基 3D SERS 基底,直接检测了铜绿假单胞菌的代谢产 物绿脓菌素。如图2所示,基底上水凝胶表皮可 以用作尺寸选择性分子过滤器以排除大分子,进 而选择性地放大绿脓菌素的拉曼信号。由于细菌 上清液的组成复杂,含有盐、蛋白质以及目标化合 物之外的代谢物,可能会导致光谱特征重叠。因 此有必要对样品进行预处理和净化,减少污染物。 Lidia 等^[40] 开发并优化了一种微流控支撑液膜 (SLM)萃取装置,并将其与 SERS 传感相结合,定 量了大肠杆菌的次级代谢物对香豆酸(pHCA)。 Zhang 等^[41]建立了一种集成膜过滤和 SERS 活性 基底的微流控系统,用于芯片上细菌富集、代谢产 物收集和抗生素敏感性的原位 SERS 检测,此方 法显著缩短了细菌培养时间。此外, Wang 等^[42] 向细菌培养物中加入可变病毒滴度,收集细菌代 谢物的 SERS 信号用于监测细菌生长和细菌定 量,以此为病毒感染的诊断提供了新见解。虽然 利用 SERS 检测细菌代谢物具有多种优势,但却 易受到外界干扰,并且需要构筑表面纳米金属材 料去增强 SERS 信号,且检测的再现性和稳定性 比较差。



图 2 在水凝胶封装的 3D 电极上一锅法金电沉积示意图,其中水凝胶表皮排斥蛋白质(胰蛋白酶和大豆蛋白)允许选择性输注 PCN; Au 颗粒生长到 3D 水凝胶网格的自由空间中,PCN 被捕获在 3D 水凝胶基质中生长的 Au 纳米结构的间

隙中,PCN的拉曼信号被 SERS 放大而不受蛋白质干扰^[39]

Fig. 2 Schematic showing the one-pot Au electrodeposition onto the hydrogel-encapsulated 3D electrode, where the hydrogel skin rejects proteins (tryptone and soytone) while allowing the selective infusion of PCN. Au grains grow into the free space in the 3D hydrogel mesh. PCN is trapped in the interstitial voids among growing Au nanostructures in the 3D hydrogel matrix. The Raman signal of PCN is amplified by SERS without interruption by proteins^[39]

2.2 荧光法

荧光分析法灵敏度高、选择性好、操作简便。 目前采用荧光法主要用于检测细菌代谢所产生的 酶。Pierre 等^[43]利用油包水乳液将单个大肠杆菌 细胞封装到皮升级的微反应器液滴中,将荧光标 记分子——4-甲基伞形酮-B-D-葡糖苷酸与液滴 的延时荧光成像相结合,监测每个液滴中大肠杆 菌在代谢过程中产生的β-葡萄糖醛酸酶活性,可 以在 2h 内检测到细菌的存在。但是油包水乳液 有毒且难以降解。因此, Dipankar 等^[44]提出了一 种高比表面积生物聚合物纳米凝胶纤维,无毒、无 致癌性,具有生物相容性和可降解性,与荧光标记 分子 4-甲基伞形酮-β-D-葡糖醛酸相结合后,可以 快速检测出产 β-葡萄糖醛酸酶的大肠杆菌,1mg 纳米凝胶纤维可检测 10⁸~10⁹CFU/mL 的大肠杆 菌。然而,该方法过程繁杂,对操作人员需要很高 的专业要求,时效性也不好。因此需要一种可以 实现微生物培养、选择性底物催化、实时荧光监测 于一体的仪器。Huang 等^[45]提出了一种全自动 实时光电传感分析微生物的荧光光电记录细菌鉴 定仪,以大肠杆菌中的β-葡萄糖醛酸酶和铜绿假 单胞菌中的 β-丙氨酰氨肽酶来催化底物产生荧 光指示剂,快速便捷地检测出了食品中的致病菌 大肠杆菌和铜绿假单胞菌,其检测限低至 1CFU/ mL。Ming 等^[46]以亮氨酸氨基肽酶(LAP)作为识 别基团,1,3-二氯-7-羟基-9,9-二甲基-2(9H)-吖 啶酮作为荧光基团,设计了一种 LAP 荧光探针, 从人的粪便中有效地鉴定了 6 种表达 LAP 的细 菌。β-内酰胺类抗生素是目前使用最广泛的抗生 素,耐药细菌为了对抗这种内酰胺类抗生素,分泌 出 β-内酰胺酶可以与 β-内酰胺环结合使 β-内酰 胺环裂解而被破坏,导致抗生素失去了抗菌活性。 Li 等^[47]将细菌样本以单水平封装在皮升大小的 液滴中,并在含抗生素和 β-内酰胺酶传感器的油 包水液滴中培养,通过荧光液滴来计数 β-内酰胺 耐药菌。这是首次使用基于液滴的微流控技术去 检测和定量产 β-内酰胺酶的细菌。Qing 等^[48]基 于荧光共振能量转移技术,制备了3种用于耐药 菌株标记的荧光试剂,水解后可作为反应性亲电 试剂与β-内酰胺酶结合,这种特异性β-内酰胺酶 响应细菌标记具有显著的荧光增强作用,可以直 接观察细菌生长,实时监测细菌感染。β-内酰胺 酶催化 β-内酰胺类抗生素水解时会产生一种新 的生物降解代谢物 H,S,检测这种生物降解物也 成为了一个监测细菌抗生素耐药性的新方向。 Gholap 等^[49]设计了一种高效化学发光探头监测 β-内酰胺酶阳性细菌所产生的生物降解代谢物 H₂S,成功区分了β-内酰胺抗性细菌菌株和敏感 的菌株。采用荧光检测的方法也可以实现细菌合 成代谢产物内毒素的检测。Anzhi等^[50]将二维材 料 MXene 与基因编辑系统偶联,通过是否产生荧 光来灵敏地检测细菌合成代谢物脂多糖。荧光标 记的方法虽然反应灵敏、速度快,但其不足之处在 于荧光物质不稳定,在正常情况下荧光物质也会 衰变,易造成检测误差。

2.3 其他的一些光学检测方法

Fransiska 等^[51] 开发了基于无标记多孔阳极 氧化铝的生物传感器,通过光的干涉反射方法检 测出了人类伤口液体中铜绿假单胞菌代谢所产生 的蛋白酶 K,并可进一步发展为慢性伤口中病原 性细菌感染的护理点诊断。Asif 等^[52]使用蜡染 法在滤纸上制备了微流控纸基分析设备,利用显 色底物与细菌代谢产生的酶反应形成有色产物, 通过比色法成功检测出乳汁中的金黄色葡萄球菌 和大肠杆菌及其抗生素耐药菌,可检出浓度低至 10CFU/mL的细菌。Kyra 等^[53]使用光学在线粘 度测量系统成功监测了枯草芽孢杆菌解聚酶敲除 突变体中所产生的聚 γ-谷氨酸。

利用光谱法检测细菌代谢物的分析速度比较快,操作简单,只需利用已知光谱图就可以进行光 谱定性分析,同时选择性好可同时测定多种化合物。但是光谱法定量能力差,也易受光学系统参 数等外部或内部因素的影响,影响检测结果的准确度。

3 电化学法

电化学传感器^[54]具有高灵敏度、低成本、小型化、便携等优点,在细菌代谢物检测中受到广泛 关注。铜绿假单胞菌能产生一种具有氧化还原活 性的细菌代谢物绿脓菌素,通过氧化还原循环可 以放大绿脓菌素的电化学信号,提高电化学检测 灵敏度。Eunkyoung等^[55]报道了一种具有良好生 物相容性的儿茶酚-壳聚糖氧化还原电容器,可以 原位监测绿脓菌素,并将绿脓菌素的检测限降低 至 50nmol/L。阵列电极是多个微电极设备并联 在一起共同发挥作用,具有电流放大的优势,同时 小的尺寸也可以对较小的样本进行快速响应。另 外,小的电活性面积可以实现较低的背景电流,从 而获得高的信噪比和低的检测限。Olja 等^[56]开 发了透明碳超微阵列电极(T-CUA)的电化学传 感平台,检测化脓青素以及其高反应性前体 5-甲 基吩嗪-1-羧酸,实现了铜绿假单胞菌吩嗪生物合 成的实时动态监测。Butler 等^[57]开发了一种纤 维素基激光诱导石墨烯的纸基阵列传感器,检测 了铜绿假单胞菌在浮游生物中和在芯片中生长时 所产生的吩嗪类代谢物。Sharp 等^[58]使用碳纤维 丝束作为电化学传感矩阵来检测化脓青素的产 生,实现了智能原位伤口铜绿假单胞菌的监测。 增强电极的导电性对于提高电化学传感器灵敏度 也有很大帮助。Molina 等^[59]在碳丝网印刷电极 涂上等规聚丙烯-聚3,4-乙基烯二氧基噻吩复合 薄膜,对细菌代谢产物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的 氧化进行检测,实现了革兰氏阳性和革兰氏阴性 细菌的生长监测。Rabeay 等^[60]使用多壁碳纳米 管修饰的丝网印刷电极直接检测细胞外基质中分 泌的代谢物,确定了金黄色葡萄球菌的活细胞和 非活细胞对抗生素和呼吸链抑制剂作用的反应, 为实时监测活死细胞功能和抗菌分析提供了一种 合理可靠的方法。基于纳米材料信号放大的电化 学传感器也是研究者们研究的热点之一。Ella 等[61]通过9,10-二羟基蒽/9,10-蒽醌组成的活性 氧化还原系统在硅纳米线氧化层上进行新型表面

改性,实时监测了高离子强度溶液中细菌生物膜 的代谢活性,建立了消除细菌生物膜的医疗解决 方案,消除了生物膜的污染。Jia 等^[62]构建了由 pH 响应性嵌段共聚物(BCP) 膜和填充有金纳米 颗粒(AuNPs)的纳米孔阵列电极(NEAs)组成的 分级组织纳米结构来分离和检测铜绿假单胞菌的 代谢产物吩嗪-1-羧酸,可应用于复杂生物样品中 低浓度的其他氧化还原活性代谢物的检测,从而 帮助理解微生物群落中的代谢(如图3所示)。 在 pH=7.0 时,高于 BCP 膜中聚(4-乙烯基吡啶) (P4VP)的 pK_a(pK_a = 4.8), BCP 膜是疏水性的, 无物质运输;当 pH = 4.5 时,低于 P4VP 的 pK, BCP 膜的 P4VP 结构域被质子化使其带正电荷, 具有亲水性,可以允许阴离子选择性通过(图 3 (B,C))。Wang 等^[63]开发了装饰有氧化钴纳米 颗粒(ZnO NRs/Co₃O₄NPs)的气体传感器,可通过 检测细菌代谢物 3-羟基-2-丁酮来间接监测单核 细胞增生性李斯特菌,并且其检测限低至10-8。 对于细菌代谢物的分离、富集是一个复杂的操作。 因此 Sune 等^[64]在离心流体平台上将负载型液膜 萃取与电化学检测相结合以此开发光盘实验室系 统,能够从复杂的样品混合物中分离、富集和检测 大肠杆菌的次级代谢产物香豆酸。Alyah 等^[65]提 出将铜绿假单胞菌的细菌培养物经阳离子表面活



图 3 BCP@NEA 电化学 SERS 传感器的分层结构和方案:(A)铜绿假单胞菌中吩嗪生物合成途径(PCA:吩嗪-1-羧酸;1-OHP: 1-羟基吩嗪;5-MCA:5-甲基吩嗪-1-羧酸;PCN:吩嗪-1-甲酰胺;PYO:pyocyanin;转化反应的吩嗪修饰基因用箭头标记); (B)电化学 SERS 传感器示意图,BCP 门在 pH 7.0 下关闭;(C)电化学 SERS 传感器的示意图,BCP 门在 pH 4.5 时打开, 通过 SWV 和 SERS 选择性迁移和检测带负电的分子^[62]

Fig. 3 Architecture and scheme of the hierarchically organized BCP@NEA electrochemical SERS sensor. (A) Phenazine biosynthetic pathway in *P. aeruginosa.* PCA, phenazine-1-carboxylic acid; 1-OHP, 1-hydroxyphenazine; 5-MCA, 5-methylphenazine-1-carboxylic acid; PCN, phenazine-1-carboxamide; and PYO, pyocyanin. Phenazine-modifying genes for the conversion reactions are labelled along with arrows. (B) Schematic illustration of the electrochemical SERS sensor with BCP gate closed at pH 7.0. (C) Schematic illustration of the electrochemical SERS sensor with BCP gate open at pH 4.5 for the permselective transport and detection of negatively charged molecules by SWV and SERS^[62]

性剂十六烷基三甲基溴化铵处理,使用未修饰的 薄膜硼掺杂金刚石电极直接检测了细菌培养物中 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮、2-庚基-4-羟基喹啉和绿 脓杆菌素并成功应用于 CF 患者的痰液样本的检 测。利用电化学传感器虽然能实时监测细菌的代 谢过程,但仍然存在一些问题,电化学传感器的稳 定性和使用寿命容易受到温度、湿度等外界环境 影响,因此,提高检测的稳定性是解决细菌电化学 传感器在细菌代谢检测中应用的关键。

4 总结与展望

快速检测细菌代谢物对于细菌感染的早期诊 断、适当的抗生素治疗以及揭示药物的治疗效果 非常重要。虽然色谱-质谱法是细菌代谢物检测 的金标准,但是该方法一方面需要提纯细菌代谢 产物,不能做到无损检测,另一方面检测耗时长, 难以实现对细菌代谢物的实时监测。因此,开发 出能快速、高灵敏、实时监测细菌代谢物的方法是 目前的发展趋势。虽然 SERS、荧光法、电化学传 感器的研究可以高灵敏、实时监测细菌感染,但是 这些方法都容易受到外界环境的干扰而导致它们 的检测稳定性存在一定的问题,同时,这些方法检 测在检测的时效性仍有待提升的空间。综上所 述,为了解决目前细菌代谢物检测时效性和稳定 性的问题,可从以下几个方面考虑。一是将纳通 道技术与电化学、SERS 方法相结合,利用纳米通 道富集提高代谢物的浓度进而缩短细菌的培养时 间,从而减少细菌抗生素敏感性试验的时间。另 外,引入纳米材料,提高对代谢物识别的选择性, 避免因其他物质的干扰导致的传感器信号扰动, 增加检测的稳定性。此外,为了实现细菌感染的 快速实时床旁检测,开发便携式高通量的检测装 置也是未来的研究热点。

参考文献

- [1] Follmer C. J. Clin. Pathol., 2010, 63(5): 424~430.
- [2] Alatraktchi F A, Dimaki M, Støvring N, et al. Anal. Biochem., 2020, 593: 113586.
- [3] Gram L, Ravn L, Rasch M, et al. Int. J. Food Microbiol., 2002, 78(1-2): 79~97.
- [4] Stokes J M, Lopatkin A J, Lobritz M A, et al. Cell Metab., 2019, 30(2): 251~259.
- [5] Wu J, Li F Y, Hu X, et al. ACS Cent. Sci., 2019, 5(8): 1366~1376.
- [6] 陈娟,史辉,王琼,等.微生物学杂志,2015(1):89~94.
- [7] Larsson L, Mårdh P A, Odham G. Acta Pathol. Microbiol.

Scand. B, 1978, 86(4): 207~213.

- [8] Edson R S, Rosenblatt J E, Washington J A, et al. J. Clin. Microbiol., 1982, 15(6): 1059~1061.
- [9] Heng W S, Jadhav S R, Ueland M, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2022: 1~11.
- [10] Khalid T Y, Saad S, Greenman J, et al. J. Breath. Res., 2013, 7(1): 017114.
- [11] Goeminne P C, Vandendriessche T, Van J E, et al. Respiratory Res., 2012, 13(1): 87.
- [12] Capuano R, Mansi A, Paba E, et al. Sensors (Basel), 2023, 23(3): 1401.
- [13] Carraturo F, Libralato G, Esposito R, et al. J. Food Sci., 2020, 85(10): 3467~3477.
- [14] Mikš-Krajnik M, Yoon Y J, Ukuku D O, et al. J. Food Sci., 2016, 81(8): M2006~M2014.
- [15] Rees C A, Shen A, Hill J E. J. Chromatogr. B, 2016, 1039: 8~16.
- [16] Almstetter M F, Oefner P J, Dettmer K. Anal. Bioanal. Chem., 2012, 402(6): 1993~2013.
- [17] Adams R F, Jones R L, Conway P L. J. Chromatogr., 1984, 336(1): 125~137.
- [18] Putty S, Vemula H, Bobba S, et al. Anal. Biochem., 2013, 442(2): 166~171.
- [19] Gao B, Li G Q, Zhou L T, et al. Sens. Actuat. B, 2021, 348: 130655.
- [20] Tao J H, Duan J A, Jiang S, et al. J. Chromatogr. B, 2016, 1025: 7~15.
- [21] Tao J H, Zhao M, Wang D G, et al. J. Chromatogr. B, 2016, 1009-1010: 163~169.
- [22] Zhao M, Qian D, Shang E, et al. Anal. Methods, 2015, 7 (12): 5325~5333.
- [23] Zhao M, Xu J, Qian D, et al. J. Chromatogr. B, 2014, 949-950: 30~36.
- [24] Safo L, Abdelrazig S, Grosse-Honebrink A, et al. ACS Omega, 2021, 6(21): 13518~13526.
- [25] Wu Y M, Li L. Anal. Chem., 2013, 85 (12): 5755 ~5763.
- [26] Vaira D, Holton J, Ricci C, et al. Aliment. Pharmacol. Ther., 2002, 16: 105~113.
- [27] Allardyce R A, Langford V S, Hill A L, et al. J. Microbiol. Methods, 2006, 65(2): 361~365.
- [28] Slade E A, Thorn R M S, Young A E, et al. J. Appl. Microbiol., 2022, 132(3): 1558~1572.
- [29] Sovová K, Čepl J, Markoš A, et al. Analyst, 2013, 138 (17): 4795~4801.
- [30] Li H R, Zhu J J. Anal. Chem., 2018, 90(20): 12108
 ~12115.
- [31] Jackson A U, Werner S R, Talaty N, et al. Anal. Biochem., 2008, 375(2): 272~281.
- [32] Zhang R T, Qin Q, Liu B H, et al. Anal. Chem., 2018, 90
 (6):3863~3870.
- [33] Cui L, Zhang D, Yang K, et al. Anal. Chem., 2019, 91

(24):15345~15354.

- [34] Bennett B D, Kimball E H, Gao M, et al. Nat. Chem.
 Biol., 2009, 5(8): 593~539.
- [35] Jarvis R M, Brooker A, Goodacre R. Anal. Chem., 2004, 76(17):5198~5202.
- [36] Nguyen C Q, Thrift W J, Bhattacharjee A, et al. ACS Appl. Mater. Interf., 2018, 10(15): 12364~12373.
- [37] Guo J X, Liu Y, Yang Y J, et al. Anal. Chem., 2020, 92 (7): 5055~5063.
- [38] Kelly J, Patrick R, Patrick S, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2018, 57(48): 15686~15690.
- [39] Kim S, Ansah I B, Park J S, et al. Sens. Actuat. B, 2022, 358: 131504.
- [40] Morelli L, Andreasen S Z, Jendresen C B, et al. Analyst, 2017, 142(23): 4553~4559.
- [41] Chang K W, Cheng H W, Shiue J, et al. Anal. Chem., 2019, 91(17): 10988~10995.
- [42] Wang W, Kang S, Vikesland P J. Environ. Sci. Technol., 2021, 55(13): 9119~9128.
- [43] Marcoux P R, Dupyo M, Mathey R, et al. Colloids Surf. A, 2011, 377(1-3): 54~62.
- [44] Das D, Alhusaini Q F M, Kaur K, et al. ACS Appl. Mater. Interf., 2021, 13(11): 12928~12940.
- [45] Huang J M, Zhong Y J, Li W X, et al. ACS Sensors, 2021, 6(2): 443~449.
- [46] Zhang M, Tian Z H, Wang J Y, et al. ACS Sensors, 2021, 6(10): 3604~3610.
- [47] Li Y Y, Cherukury H, Labanieh L, et al. Sensors (Basel), 2020, 20(17): 4667.
- [48] Shao Q, Zheng Y, Dong X M, et al. Chem. Eur. J., 2013, 19(33): 10903~10910.
- [49] Gholap S P, Yao C Y, Green O, et al. Bioconjug. Chem.,

(上接第1480页)

- [12] Eary C T, Spencer S, Crane Z, et al. US: 20190106438A1.
- [13] Wang A, Liu Y, Shen Z, et al. Org. Lett., 2022, 24(7): 1454~1459.

 $2021, 32(5): 991 \sim 1000.$

- [50] Sheng A Z, Wang P, Yang J Y, et al. Anal. Chem., 2021, 93(10): 4676~4681.
- [51] Krismastuti F S H, Bayat H, Voelcker N H, et al. Anal. Chem., 2015, 87(7): 3856~3863.
- [52] Asif M, An wan F R, Khan Q M, et al. Analyst, 2020, 145
 (22): 7320~7329.
- [53] Hoffmann K, Halmschlag B, Briel S, et al. Biotechnol. Prog., 2023, 39(1): e3293.
- [54] 郭杰. 化工设计通讯, 2022, 48(4): 184~186.
- [55] Kim E, Gordonov T, Bentley W E, et al. Anal. Chem., 2013, 85(4): 2102~2108.
- [56] Simoska O, Sans M, Fitzpatrick M D, et al. ACS Sensors, 2019, 4(1): 170~179.
- [57] Butler D, Kammarchedu V, Zhou K, et al. Sens. Actuat.B, 2023, 378: 133090.
- [58] Sharp D, Gladstone P, Smith R B, et al. Bioelectrochemisity, 2010, 77(2): 114~119.
- [59] Molina B G, del Valle L J, Turon P, et al. J. Phys. Chem.
 C, 2019, 123(36): 22181~22190.
- [60] Hassan R Y A, Wollenberger U. Electroanalysis, 2019, 31
 (6): 1112~1117.
- [61] Yeor-Davidi E, Zverzhinetsky M, Krivitsky V, et al. J. Nanobiotechnol., 2020, 18(1): 81.
- [62] Jia J, Kwon S R, Baek S, et al. Anal. Chem., 2021, 93: 14481~14488.
- [63] Wang C, Du L L, Xing X X, et al. Nanoscale, 2022, 14 (2): 482~491.
- [64] Andreasen S Z, Sanger K, Jendresen C B, et al. ACS Sensors, 2019, 4(2): 398~405.
- [65] Buzid A, Reen F J, Langsi V K, et al. Chem. Electro. Chem., 2017, 4(3): 533~541.
- [14] 许勇,陈龙,范昭泽,等. CN: 111057075A.
- [15] 许勇,余艳平,陈龙,等. CN: 111004257A.
- [16] Srinivasan T R, Sajja E, Ghojala V R, et al. WO: 2022168122A1.