



构建冻干无细胞生物传感器快速检测临床铜绿假单胞菌感染

黄慧文¹, 俞鼎辰¹, 李一荣², 刘天罡^{1,3*}

¹ 武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071

² 武汉大学中南医院检验科, 湖北 武汉 430071

³ 武汉大学泰康生命医学中心, 湖北 武汉 430071

黄慧文, 俞鼎辰, 李一荣, 刘天罡. 构建冻干无细胞生物传感器快速检测临床铜绿假单胞菌感染[J]. 微生物学报, 2023, 63(5): 1959-1969.

HUANG Huiwen, YU Dingchen, LI Yirong, LIU Tiangan. Developing a lyophilized cell-free biosensor for rapid diagnostics of clinical *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(5): 1959-1969.

摘要: 【目的】铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是常见于医院感染的条件致病革兰氏阴性细菌, 其群体感应信号 3-氧代十二烷酰基高丝氨酸内酯(3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone, 3OC12-HSL)可作为铜绿假单胞菌感染的生物标志物。本研究期望开发针对 3OC12-HSL 的冻干无细胞生物传感器, 以实现临床铜绿假单胞菌感染的快速诊断。【方法】首先构建报告质粒以重建 3OC12-HSL 的应答过程, 而后将该质粒加入冻干无细胞表达系统中以实现生物传感器的制备; 接着利用梯度浓度的 3OC12-HSL 表征该传感器的灵敏度与动力学特征, 并测试其底物特异性; 最后通过临床样本测试验证其效果, 并优化临床样本的预处理方法。【结果】本研究构建的冻干无细胞生物传感器能够在 60 min 内实现对临床呼吸道样本中铜绿假单胞菌感染的诊断, 具有高灵敏度和高特异性。【结论】本研究构建了针对 3OC12-HSL 的冻干无细胞生物传感器, 并借助 RNase 抑制蛋白预表达的策略提升了其对体液样本的耐受性, 最终证明其具备开发成临床铜绿假单胞菌感染的快速检测方法的潜力。

关键词: 无细胞生物传感器; 铜绿假单胞菌; N-酰基高丝氨酸内酯

资助项目: 武汉大学泰康生命医学中心; 国家自然科学基金(31971341)

This work was supported by the TaiKang Center for Life and Medical Sciences of Wuhan University and the National Natural Science Foundation of China (31971341).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-68755086, E-mail: liutg@whu.edu.cn

Received: 2023-03-14; Accepted: 2023-04-20; Published online: 2023-05-08

Developing a lyophilized cell-free biosensor for rapid diagnostics of clinical *Pseudomonas aeruginosa* infections

HUANG Huiwen¹, YU Dingchen¹, LI Yirong², LIU Tiangang^{1,3*}

1 Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

2 Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

3 TaiKang Center for Life and Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract: [Objective] *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacterium prevalent that is conditionally pathogenic and commonly associated with nosocomial infections. Its quorum sensing signal, 3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone (3OC12-HSL), has been reported as a biomarker for its infection. Here, we aimed to develop a 3OC12-HSL biosensor for facilitating rapid diagnostics of clinical *P. aeruginosa* infections. [Methods] We constructed a reporter plasmid responsive to 3OC12-HSL and prepared a lyophilized cell-free biosensor based on that plasmid. We characterized the biosensor with 3OC12-HSL concentration gradient, validated its utility by testing clinical samples, and attempted to optimize the preprocessing procedure for clinical samples. [Results] Our cell-free biosensor is sensitive, specific, and capable of diagnosing *P. aeruginosa* infections in clinical respiratory samples within 60 min. [Conclusion] In this study, we developed a lyophilized cell-free 3OC12-HSL biosensor. By pre-expressing RNase inhibitor, we increased our biosensor's tolerance to body fluid, and further demonstrated its potential to be developed as a rapid diagnostic method for clinical *P. aeruginosa* infections.

Keywords: cell-free biosensor; *Pseudomonas aeruginosa*; N-acyl-homoserine lactone

无细胞表达系统又称体外转录-翻译系统或无细胞蛋白合成系统,其概念可追溯到20世纪60年代Marshall Nirenberg由体外翻译mRNA实验破译遗传密码子的经典研究^[1]。无细胞表达系统是一个开放体系,其绕过细胞膜与细胞壁之间的阻隔,直接向试管中添加线性或环状DNA模板进行基因表达,相比于活细胞表达系统有着操作简单、时间与人力成本较低的绝对优势。无细胞表达技术的成熟催生了无细胞合成生物学的出现与蓬勃发展。无细胞合成生物学着眼于在试管中自下而上地构建基因线路与生化过程,具有简约、快速、高效的“设计-构建-测试-学习”迭代周期和可观的自动化潜力,在科学研究与生产实际中都具有重要的价值。

无细胞生物传感器是一项通过表达基因线路来感知并响应环境变化的技术,可实现对离子、生物标志物和抗生素等小分子的检测,还可用于对病毒和其他病原体核酸序列的检测^[2],是无细胞合成生物学最为重要的应用之一。冻干无细胞表达系统的开发在无细胞生物传感器的发展过程中至关重要,其凭借易于储存、携带和分发的优点,吸引了众多科学家的研究目光。2014年,哈佛大学威斯研究所(Wyss Institute) James Collins课题组首次报道了纸基冻干无细胞表达系统,该系统可在室温下长期贮存,一经水化即能表达预期的基因线路并执行相应功能^[3];接着,他们将该系统应用于病原微生物核酸的快速检测^[4-5]和生物活性药物(如抗菌肽和疫苗)的微

型化与去中心化生产^[6]；随后，该课题组进一步开发了嵌有冻干无细胞表达系统的防护服、口罩等纺织品，实现了对环境中 SARS-CoV-2 等病毒或污染性化学品的实时报告^[7]。此外，西北大学 Julius Lucks 课题组针对水资源污染问题开发了冻干无细胞检测平台 ROSALIND，以转录因子响应重金属离子、抗生素和小分子污染物等水体污染输入信号，以荧光 RNA 适配体作为输出信号，成功应用于市政水体重金属污染情况的实地考察^[8]。由此可见，众多冻干无细胞生物传感器的相关研究拉近了无细胞合成生物学与人类生产生活的距离。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是常见于医院感染的革兰氏阴性杆菌，可作为条件致病菌定殖于患者呼吸道、皮肤等处，在插管部位造成感染，尤其常见于囊性纤维化患者中(约六成的囊性纤维化患者同时患有铜绿假单胞菌感染^[9])。当前，最常用的铜绿假单胞菌感染临床检测方法是依赖细菌培养的菌落计数法，其更是病原体微生物检测的“金标准”^[10-11]，具有简单、可靠和准确的优势，同时也存在着检测周期长的关键缺陷。因此，开发针对临床铜绿假单胞菌感染的快速检测方法，能一定程度上满足医疗机构的需求，具有重大的研究价值。

群体感应是微生物通过自诱导物进行细胞间交流和群体依赖性基因表达的信号系统，是多种病原菌的毒力调控枢纽。其中，N-酰基高丝氨酸内酯类群体感应系统在革兰氏阴性菌中分布广泛，且其信号分子酰基侧链的长度与修饰具有一定的种属特异性，介导了革兰氏阴性菌复杂的种

内与种间交流活动^[12-13]，如铜绿假单胞菌的群体感应系统可经过复杂的级联机制调控生物膜的形成、绿脓菌素与蛋白酶等直接或间接毒力因子的分泌等毒力行为的发生^[14]。铜绿假单胞菌的群体感应系统包括 las 系统、rhl 系统与 pqs 系统，对应的自诱导物分别为 3-氧代十二烷酰基高丝氨酸内酯 (3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone, 3OC12-HSL)、丁酰基高丝氨酸内酯(butyryl-homoserine lactone, C4HSL)与假单胞菌喹诺酮信号(*Pseudomonas* quinolone signal, PQS)。其中，las 系统占主导地位^[14]，其信号分子 3OC12-HSL 在临床上可作为铜绿假单胞菌感染的生物标志物^[15]。

鉴于此，本研究旨在构建基于 3OC12-HSL 的冻干无细胞生物传感器，以实现临床铜绿假单胞菌感染的快速检测。本研究首先构建相应质粒以重构 3OC12-HSL 群体感应应答过程；接着，结合大肠杆菌(*Escherichia coli*)无细胞表达系统与冷冻干燥技术开发针对铜绿假单胞菌感染的冻干无细胞生物传感器，并对其进行灵敏度、特异性和动力学的表征；而后，利用该传感器对临床铜绿假单胞菌感染样本进行测试，以探究该传感器的实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

1.1.1 菌株

本研究中所使用的菌株及其用途如表 1 所示。

1.1.2 质粒

本研究中所使用的质粒如表 2 所示。

表 1 本研究中所用菌株及其用途

Table 1 Strains and their application used in this study

Strains	Usage
<i>Escherichia coli</i> DH10 β	Plasmids construction
<i>Escherichia coli</i> BL21 Star TM (DE3)	Cell-free extracts preparation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	3OC12-HSL extraction
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	3OC12-HSL extraction

表 2 本研究中所用质粒

Table 2 The plasmids used in this study

Plasmids	Descriptions
pJL1	sfGFP expression driven by T7 promoter
pDY5	GFPmut3b expression driven by BBa_J23100 promoter
pDY14	LasR expression driven by BBa_J23100 promoter, 3OC12-HSL-induced GFPmut3b expression driven by <i>Plas</i> (BBa_K649000)
pDY37	Murine RNase inhibitor expression driven by T7 promoter

1.2 大肠杆菌裂解物的制备

本研究选取 *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) 菌株。取其感受态菌液(或已转化所需质粒的菌液)接种于 LA 固体培养基[(g/L), 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 琼脂 16]中, 37 °C 过夜培养活化。从平板上挑取单菌落于 10 mL LB 培养基[(g/L), 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10]中, 37 °C、220 r/min 过夜培养获得种子液; 将种子液转接于 1 L 2×酵母胰蛋白胨磷酸 (yeast tryptone phosphate, YTP) 培养基[(g/L), 胰蛋白胨 16, 酵母提取物 10, 氯化钠 5, 磷酸氢二钾 7, 磷酸二氢钾 3, pH 7.2]中, 于 37 °C、250 r/min 条件下培养至 OD_{600} 为 0.5–0.8。加入异丙基硫代半乳糖(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度 $(0.05\text{--}0.1)\times 10^{-3}$ mol/L, 30 °C、250 r/min 条件下继续培养至 OD_{600} 为 3。后续操作在 4 °C 下低温进行: 将培养液倒入 1 L 离心管中, 于 4 °C、5 000×g 条件下离心 15 min; 将菌体沉淀转移至预置 25 mL S30 缓冲溶液(谷氨酸钾 60×10^{-3} mol/L, 谷氨酸镁 14×10^{-3} mol/L, 三羟甲基氨基甲烷 10×10^{-3} mol/L, 冰醋酸调节 pH 至约 8.2, 115 °C 灭菌 30 min, 添加二硫苏糖醇至终浓度 2×10^{-3} mol/L, 超声波处理助溶, 4 °C 保存)的 50 mL 离心管中, 涡流振荡至完全重悬, 于 4 °C、5 000×g 下离心 10 min, 保留菌体沉淀; 重复以上洗涤操作 2 遍。于 4 °C、7 000×g 下离心 10 min, 保留菌体沉淀, 按 1 mL/g 沉淀的比

例添加 S30 缓冲溶液, 涡流振荡重悬, 超声波细胞破碎仪处理悬液(10 s 开/40 s 关, 输入能量约 350 J/mL 悬液)。超声处理后于 4 °C、30 000×g 离心 30 min, 收集上清进行分装; 用铝箔覆盖离心管, 于 37 °C、220 r/min 摇床孵育 80 min。4 °C、12 000×g 离心 15 min, 保留上清液, 于冰上孵育 1–2 h 至上清液浑浊; 重复 4 °C、12 000 g 离心 15 min, 保留上清液, 液氮速冻, 放置于–80 °C 下保存。

1.3 冻干无细胞生物传感器的制备

大肠杆菌无细胞表达体系一般由 30% (体积分数)的大肠杆菌裂解物、25% (体积分数)的 4×能量缓冲溶液(谷氨酸钾 520×10^{-3} mol/L, 谷氨酸镁 48×10^{-3} mol/L, 醋酸铵 40×10^{-3} mol/L, 草酸钠 16×10^{-3} mol/L, 天然氨基酸每种 6×10^{-3} mol/L, 腺嘌呤核苷三磷酸 4.8×10^{-3} mol/L, 鸟嘌呤核苷三磷酸 3.4×10^{-3} mol/L, 尿嘧啶核苷三磷酸 3.4×10^{-3} mol/L, 胞嘧啶核苷三磷酸 3.4×10^{-3} mol/L, 大肠杆菌 tRNA 680 μ g/mL, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 1.32×10^{-3} mol/L, 辅酶 A 1.08×10^{-3} mol/L, 磷酸烯醇式丙酮酸 132×10^{-3} mol/L, 叶酸 136 μ g/mL, 腐胺 4×10^{-3} mol/L, 亚精胺 6×10^{-3} mol/L)、终浓度 100–400 ng/ μ L 的质粒(pDY14 添加量为 400 ng/ μ L)和补足体积的蒸馏水组成(此外可考虑添加适量 PEG 8000 等分子拥挤剂)。不同批次的大肠杆菌裂解物可通过表达 pJL1 或 pDY5 分别进行 T7 转录系统或内源转录系统的体外活性

的质量控制。将体系通过冷冻干燥机进行冻干(仪器: LABCONCO FreeZone[®]; 条件: collector -80 °C/vacuum 0.000 mbar), 制备获得冻干无细胞生物传感器, 放置于-80 °C冰箱保存。

1.4 3OC12-HSL 溶液的配制

称取相应量的 3OC12-HSL 粉末(Thermo Fisher Scientific), 用甲醇溶解, 分别配制成 5×10^{-9} 、 10×10^{-9} 、 50×10^{-9} 、 100×10^{-9} 、 250×10^{-9} 、 500×10^{-9} 、 1×10^{-6} 、 2.5×10^{-6} 、 5×10^{-6} mol/L 的母液。置 4 °C 冰箱保存。

1.5 N-酰基高丝氨酸内酯的萃取法

本方法参照了 Wen 等对铜绿假单胞菌感染痰样本的预处理方法^[9]。

取保藏菌株 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1、*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978) 于 LA 平板上划线稀释, 在 37 °C 下培养至生长出单克隆。挑取单克隆接种于 10 mL LB 培养基中, 于 37 °C、220 r/min 下培养 16–20 h, 接着取菌株培养液于 $5\,000 \times g$ 下离心 5 min; 保留上清液, 加入等体积 0.1% 甲酸酸化的乙酸乙酯, 振荡混匀 5 min, 于 $3\,000 \times g$ 离心 3 min; 收集上层有机相; 重复萃取步骤 3 次, 合并有机相并挥干; 加入 2 mL 甲醇重溶, 低温保存。

1.6 原始临床样本的处理

本研究测试的支气管肺泡灌洗液样本、痰样本、尿液样本、脓拭子样本和引流液样本等原始临床样本均由武汉大学中南医院检验科提供。

本研究采用了 2 种方法对临床样本进行预处理, 具体为:

预处理方法 1: 在原始样本中加入等体积的 PBS, 充分混匀, 煮沸 5 min, 于 $5\,000 \times g$ 离心 3 min; 保留部分上层溶液, 用于后续检测。

预处理方法 2: 在原始样本中加入等体积的 PBS, 充分混匀, 煮沸 5 min, 于 $5\,000 \times g$ 离

心 3 min; 保留部分上层溶液, 采用萃取法(具体见 1.5)进行萃取, 用于后续检测。

1.7 冻干无细胞生物传感器快检体系的配制与分析

从-80 °C 冰箱中取出冻干无细胞生物传感器, 加入 10% (体积分数) 的不同浓度的 3OC12-HSL 溶液(见 1.4)、10% (体积分数) 的菌株培养液萃取液(见 1.5)和 25% (体积分数) 的临床样本处理液(见 1.6), 用水补足至终体积 40 μ L, 混匀后短暂离心。按每个反应体积为 10 μ L 将体系转移至黑色 96 孔板, 每个反应设置 3 个平行, 于多功能酶标仪(Tecan, Spark)中在 30 °C 下孵育 2 h, 设置参数为激发波长 485 nm/发射波长 535 nm, 检测荧光表达动力学数据并记录终止点荧光强度。

1.8 Western blotting

样品用 SDS-PAGE 电泳进行分离; 而后再转膜缓冲液(20×10^{-3} mol/L 三羟甲基氨基甲烷 pH 8.0, 150×10^{-3} mol/L 甘氨酸, 20% 甲醇)下进行转膜(硝酸纤维素膜); 接着在封闭缓冲液(20×10^{-3} mol/L Tris, pH 7.5, 0.9% 氯化钠, 0.05% Tween20, 5% 脱脂奶粉)中封闭 1 h; 洗膜后于 4 °C 环境下用 30 mL 一抗过夜孵育, 对目标蛋白携带的 His-tag 进行标记。次日使用辣根过氧化物酶在室温下用二抗孵育 1 h, 最后将新鲜配制的显色液加至膜上, 在成像仪(BIO-RAD ChemiDoc XRS+)中进行成像。

2 结果与分析

2.1 冻干无细胞生物传感器的构建和表征

在 N-酰基高丝氨酸内酯介导的革兰氏阴性菌群体感应过程中, LuxI 家族合酶催化底物脂酰-ACP 与 S-腺苷甲硫氨酸酰化、内酯化形成 N-酰基高丝氨酸内酯; N-酰基高丝氨酸内酯可通过被动运输出入细胞或在环境中自由扩散; 接

着, LuxR 家族转录因子结合 N-酰基高丝氨酸内酯后二聚化形成活化复合物,其随后可识别基因组中对应启动子的响应元件,募集 RNA 聚合酶以启动下游基因的转录表达^[14]。基于此,本研究首先构建了质粒 pDY14 (图 1A),其以组成型启动子 BBa_J23100 调控转录因子 LasR 的表达,并以诱导型启动子 BBa_K649000 (Plas)调控绿色荧光蛋白的表达,从而重建了 3OC12-HSL 群体感应的应答过程。此前,帝国理工学院 Paul Freemont 课题组同样开发了基于转录因子 LasR 的 3OC12-HSL 无细胞传感器(下文简称为 LasRV 传感器)^[9]。与其设计的报告质粒相比, pDY14 中转录因子表达盒与荧光报告表达盒的方向相反,这避免了由于终止子强度不足而导致的通读现象,从而一定程度上降低了报告基因的泄露表达。接着,制备了冻干无细胞生物传感器,分别向其中添加浓度为 10×10^{-9} mol/L 和 50×10^{-9} mol/L 的 3OC12-HSL 以进行初步测试。结果如图 1B 所示,二者均可在蓝光激发下观察到该传感器发出的显著绿色荧光,且后者的荧光强度较前者高,这表明该传感器能够实现对体系中 3OC12-HSL 的应答反应,且响应强度与底物浓度之间存在一定的关联。

为了进一步探究荧光响应强度与 3OC12-HSL 浓度之间的关系以及传感器响应过程的动力学特征,随后利用荧光酶标仪测试了其对不同梯度浓度 3OC12-HSL 的响应情况。结果显示,该传感器在添加 3OC12-HSL 后 20–30 min 开始响应荧光,而后荧光强度随时间呈线性增长,在 90–120 min 时达到饱和(图 1C)。因此,认为约 60 min 时的荧光强度具有指示意义,并将其 120 min 时的荧光强度记录为终止点荧光强度,利用 Hill 方程进行拟合,绘制了冻干无细胞生物传感器响应 3OC12-HSL 的剂量效应曲线(图

1D),得出该传感器的 50%激活浓度为 10.43×10^{-9} mol/L,协同性则达到了 1.52,较 LasRV 传感器相比有着明显的优势^[9]。且值得一提的是,与 Paul Freemont 组传感器的高背景表达^[9]相比,本研究开发的传感器几乎不存在泄露表达,这体现了质粒设计时转录因子与报告基因表达盒反向放置的合理性与重要性,更赋予了其检测更低浓度 3OC12-HSL 的潜力。因此,本研究进而测试了其对于浓度低至 500×10^{-12} mol/L 的 3OC12-HSL 的响应情况,从图 1E 可知,该传感器能够对体系中 500×10^{-12} mol/L 的 3OC12-HSL 做出准确判读,换言之,其最低检测限低于 500×10^{-12} mol/L,具有极高的灵敏度。

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)与铜绿假单胞菌同为变形菌门、假单胞菌目,其 aba 群体感应系统由 3-羟基十二烷酰基高丝氨酸内酯(3-hydroxyl-dodecanoyl-homoserine lactone, 3OHC12-HSL)介导^[16],且鲍曼不动杆菌 3OHC12-HSL 结构与铜绿假单胞菌 3OC12-HSL 结构高度相似(图 1F)。据此,本研究进而测试了冻干无细胞生物传感器对于鲍曼不动杆菌 3OHC12-HSL 和铜绿假单胞菌 3OC12-HSL 的响应情况,从而探究传感器的特异性。从实验结果来看(图 1G),传感器对铜绿假单胞菌培养液萃取物的响应水平与阳性对照相当,而对鲍曼不动杆菌培养液萃取物的响应水平则与阴性对照相当。这表明该传感器能够高度特异地识别其天然配体 3OC12-HSL。

综合以上结果可知,本研究开发的冻干无细胞生物传感器具有较高的灵敏度(最低检测限低于 500×10^{-12} mol/L)、快速的动力学特征(60 min 内即可指示)和专一的选择性(特异响应铜绿假单胞菌 3OC12-HSL),可供进一步用于临床样本铜绿假单胞菌感染的测试。

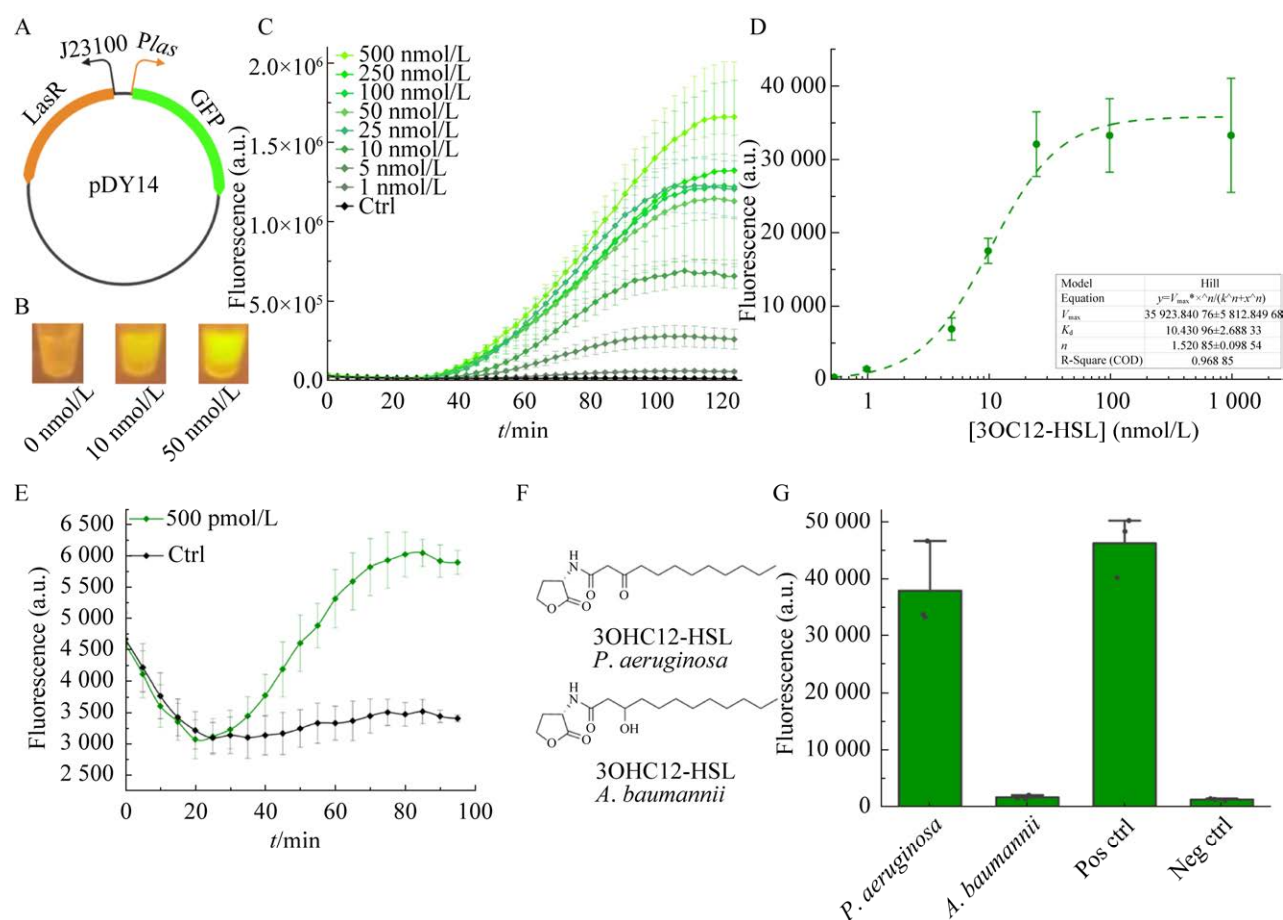


图 1 3OC12-HSL 无细胞生物传感器的构建与表征

Figure 1 Construction and characterization of 3OC12-HSL cell-free biosensor. A: General architecture of reporter plasmid pDY14. B: Cell-free reactions containing pDY14 and 3OC12-HSL under blue light excitation. C: Two-hour fluorescence kinetics of lyophilized cell-free biosensor treated with 3OC12-HSL concentration gradient. D: Dose-response curve for the biosensor, fitted with Hill function. E: The biosensor's lower limit of detection reaches picomolar level (500×10^{-12} mol/L) and leakage GFP expression is negligible. F: Chemical structures of 3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone and 3-hydroxyl-dodecanoyl-homoserine lactone. G: The biosensor is specific to 3OC12-HSL and can discriminate its difference with 3OC12-HSL, Pos Ctrl denotes 50×10^{-9} mol/L 3OC12-HSL, Neg Ctrl denotes methanol. Three replicates per sample were assayed and the error bars represent standard error.

2.2 冻干无细胞生物传感器检测临床样本

冻干无细胞生物传感器是无细胞合成生物学在人类生产生活中的重要应用, 实现了对 SARS-CoV-2、污染性化妆品及水体污染等的检测^[7-8]。鉴于本研究开发的冻干无细胞生物传感器在检测 3OC12-HSL 时的良好表现, 进一步探究了其应用于临床样本中铜绿假单胞菌感染检

测的可行性。本研究测试了临床样本共计 10 份, 其中痰样本 6 份、尿液样本 2 份、脓拭子样本 1 份和引流液样本 1 份; 涉及铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 共 5 种病原菌 (图 2A)。

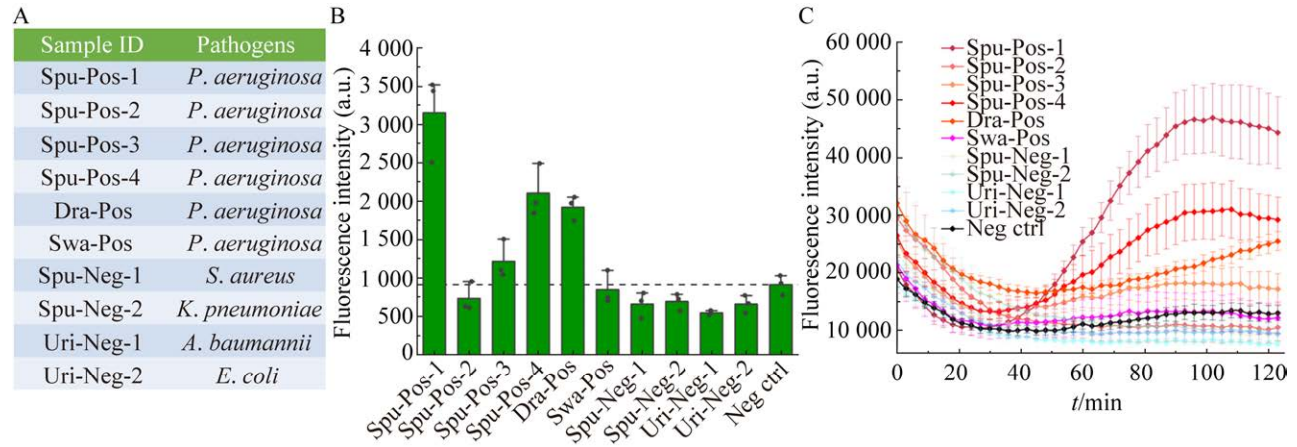


图2 萃取法检测临床样本铜绿假单胞菌感染

Figure 2 Detect 3OC12-HSL extracted from clinical samples with *Pseudomonas aeruginosa* infections. A: Overview of tested clinical samples. Spu-Pos denotes positive sputum sample, Dra-Pos denotes positive drainage sample, Swa-Pos denotes positive swab sample, Spu-Neg denotes negative sputum sample, and Uri-Neg denotes negative urine sample. B: Endpoint fluorescence of cell-free reactions treated with clinical sample extractions. C: Fluorescence kinetics of cell-free reactions treated with clinical sample extractions. Three replicates per sample were assayed and the error bars represent standard error.

首先,本研究对临床样本的预处理方法进行探究,设置了2种临床样本的预处理方法,其中,预处理方法2因涉及多轮的萃取步骤而较为繁琐耗时(见1.6)。接着,用2种方法分别对以上样本进行前处理,并配制相应的无细胞反应体系,对比分析了二者的荧光动力学数据。结果显示,预处理方法1基本无法观察到响应,预处理方法2的效果明显更佳。推测其原因可能是预处理方法2涉及的萃取过程浓缩了样本中的3OC12-HSL,使之达到了传感器的检测限,且其萃取过程去除了体液样本中可能含有的蛋白酶、核酸酶等无细胞表达系统的抑制性组分。由预处理方法2下的终止点荧光强度(图2B)数据可知,冻干无细胞生物传感器将1号阳性痰样本、4号阳性痰样本与阳性引流液样本报告为阳性;将2号阳性痰样本、3号阳性痰样本、阳性脓拭子样本与所有的阴性样本报告为阴性;同时,阳性引流液样本的荧光表达强度并不随反应时间的增长而显著提高,这提示其被报告为阴性(图2C)。考虑到

该样本颜色为深绿色,推测观察到的阳性荧光反应的原因可能是:样本中含有的色素成分在孵育过程中发生化学反应,其反应产物经由前处理过程被萃取出来,进而带入检测体系中。

基于以上结果,认为冻干无细胞生物传感器具有检测痰样本铜绿假单胞菌感染的一定潜力。同时,考虑到呼吸道是铜绿假单胞菌感染的主要场所,将本研究后续的测试目标设定为呼吸道样本。

2.3 优化样本预处理流程实现铜绿假单胞菌感染的快速检测

在实际应用中,繁琐的前处理过程往往会延长临床样本的检测周期。为了满足临床样本的快检需求,生物传感器应能够直接测试经简单预处理的体液样本,如在James Collins课题组开发的寨卡病毒检测方法中,待检测样本仅需煮沸2 min即可用于后续操作^[5]。然而,简单的样本预处理过程通常难以去除体液样本中丰富的DNase、RNase与蛋白酶等,这些残留在体系中

的酶则会阻碍无细胞传感器中转录和翻译过程的进行,进而影响传感器对外界刺激的响应。针对该问题,Jerome Bonnet 课题组建立了外源添加小鼠 RNase 抑制蛋白的策略,借此实现了无细胞生物传感器对含有马尿酸、可卡因的尿液样本的检测^[17];接着他们分别测试了预表达小鼠 RNase 抑制蛋白(murine RNase inhibitor, mRI)、细菌蛋白酶抑制蛋白和哺乳动物蛋白酶抑制蛋白的大肠杆菌裂解物,发现预表达小鼠 RNase 抑制蛋白可以显著缓解体液样本的抑制效果^[18]。

综上所述,本研究所建立的预处理方法 1 流程简单,但却因无法去除样本中的抑制性组分而不被生物传感器所响应;预处理方法 2 尽管对样本的处理效果明显更佳,却同时存在着萃取流程繁琐耗时的关键缺陷。因此,为了简化样本预处理流程并实现对铜绿假单胞菌感染的快速检测,本研究进而引入了 Jerome Bonnet 等的小鼠

RNase 抑制蛋白预表达策略。

首先,将小鼠 RNase 抑制蛋白表达质粒 pDY37 导入大肠杆菌 BL21 StarTM (DE3)内,并在制备裂解物的过程中于其对数生长期诱导表达挂载 His-tag 的 RNase 抑制蛋白,接着借助 Western blotting 实验确认该蛋白的正常表达(图 3A)。随后,换用这批预表达小鼠 RNase 抑制蛋白的大肠杆菌裂解物制备了 3OC12-HSL 冻干无细胞生物传感器,并使用流程简单的预处理方法 1 处理并测试了 30 份呼吸道样本,包括阳性支气管肺泡灌洗液样本 6 份、阴性支气管肺泡灌洗液样本 3 份、阳性痰样本 17 份和阴性痰样本 4 份。结果表明,阴性样本的荧光均维持在较低水平或不表达,而阳性样本则有近半能观察到荧光激活,尤其是在 6 例阳性肺泡灌洗液样本中观察到有 2 例显著荧光激活(图 3B)。这表明小鼠 RNase 抑制蛋白预表达的策略有效降低了体液样

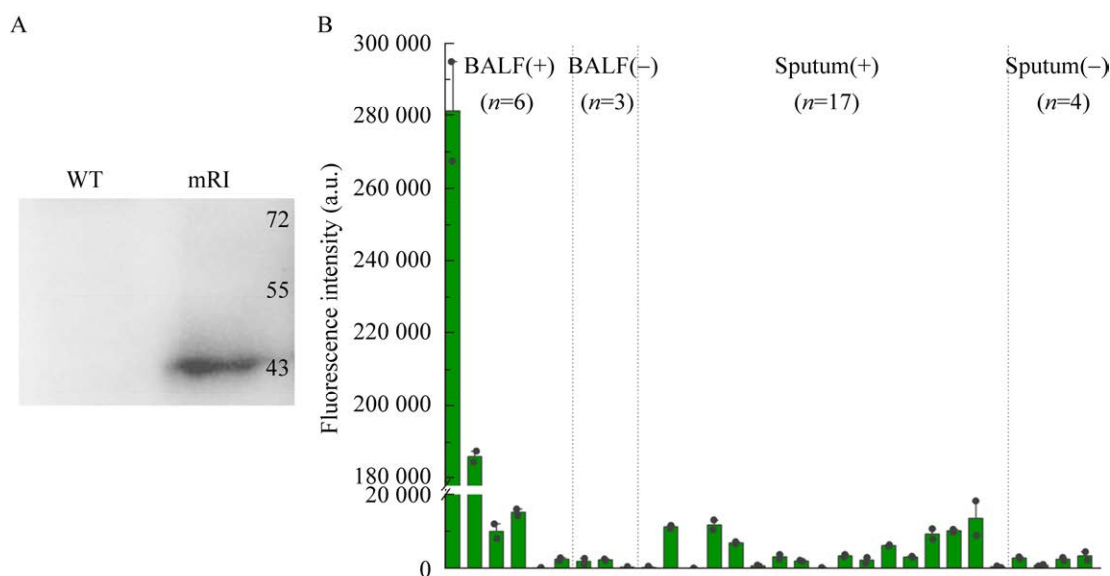


图 3 预表达 RNase 抑制蛋白实现呼吸道样本铜绿假单胞菌感染的快速检测

Figure 3 Pre-expression of RNase inhibitor enhances the biosensor's tolerance to body fluid, enabling faster preprocessing and readout. A: Western blotting demonstrated the expression of RNase inhibitor (~50 kDa) prior to *E. coli* lysis. B: Endpoint fluorescence of cell-free reactions treated with respiratory samples, whose preprocessing procedures only included PBS addition, boiling, and centrifugation. Two replicates per sample were assayed and the error bars represent standard error.

本对无细胞生物传感器的抑制效果,提升了传感器对体液样本的耐受性,从而大幅简化了本研究开发传感器测试样本时的预处理流程,允许研究人员在实际检测中直接使用经短时间煮沸、离心(即预处理方法 1;总用时<10 min)的体液样本,具有进一步开发成快速检测试剂盒的潜力。

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌是常见于医院感染的条件致病菌,其生物信号 3OC12-HSL 是铜绿假单胞菌群体感应与毒力调控的关键信号分子^[14],能够捕捉到质谱检测、核酸检测等方法难以提供的生物学意义,因而可作为铜绿假单胞菌感染的生物标志物,客观反映呼吸道铜绿假单胞菌感染的程度。

本研究基于铜绿假单胞菌的 Las 群体感应系统,开发了以 3OC12-HSL 为生物标志物的冻干无细胞生物传感器,实现了对临床样本铜绿假单胞菌感染的快速检测。该传感器在测试过程中表现出专一的选择性、较低的最低检测限和快速的动力学特征,能够在 60 min 以内指示呼吸道样本中的低浓度铜绿假单胞菌感染。与临床病原菌检测“金标准”——依赖细菌培养的菌落计数法相比,本研究所开发的生物传感器用于临床样本中铜绿假单胞菌感染的检测时具有易于储存与携带、检测周期短、检测结果直观的优势,这表明本传感器具备用于临床常规诊断呼吸道铜绿假单胞菌感染的潜力。

然而,尽管本研究已经取得了可观的初步结果,但要想将该生物传感器真正应用于临床快检领域,仍需要进一步地改进和优化。首先,在探究该传感器的特异性时,本研究出于对化合物相似度的考虑只选用了鲍曼不动杆菌来源的 3OHC12-HSL,而实际上,需要测试更多不同种类的 N-酰基高丝氨酸内酯或病原菌样本方能更准确地确定其响应谱。其次,尽管采用小鼠

RNase 抑制蛋白预表达的方法在一定程度上减少了体液样本中核酸酶对无细胞生物传感器的抑制效应,但无细胞系统作为一个开放体系,其中还可能存在着其他未知的干扰性组分,这些组分进而导致了假阴性检测结果的出现,这提示样本的处理方法还需更深入地优化。另外,呼吸道样本存在较大的异质性,如黏度、组成成分等会因患者情况不同而有较大差异,这则会进一步影响该传感器的普适性,启示在实际应用中样本的预处理流程还应更加地规范化。此外,本研究只对生物传感器的最低检测限、特异性以及反应动力学进行了探究,而并未建立其响应强度与 3OC12-HSL 浓度之间的数量关系,因此,该传感器只能对样本中是否存在铜绿假单胞菌感染做出定性判别,而不能对感染的程度做出定量结论;后续可进一步通过高效液相色谱-质谱联用法等分析方法确定临床样本中 3OC12-HSL 的绝对浓度,以实现对该传感器准确性的更精准判断。最后,期待本研究的预表达小鼠 RNase 抑制蛋白大肠杆菌裂解物能用于后续更多冻干无细胞生物传感器的开发,以实现对体液样本(如血液、尿液、唾液等)中其他重要生物标志物的检测。

参考文献

- [1] SILVERMAN AD, KARIM AS, JEWETT MC. Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2020, 21(3): 151-170.
- [2] VOYVODIC PL, BONNET J. Cell-free biosensors for biomedical applications[J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2020, 13: 9-15.
- [3] PARDEE K, GREEN AA, FERRANTE T, CAMERON DE, DALEYKEYSER A, YIN P, COLLINS JJ. Paper-based synthetic gene networks[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 940-954.
- [4] KARLIKOW M, da SILVA SJR, GUO YX, CICEK S, KROKOVSKY L, HOMME P, XIONG YL, XU TL, CALDERÓN-PELÁEZ MA, CAMACHO-ORTEGA S,

- MA D, de MAGALHÃES JJF, SOUZA BNRF, de ALBUQUERQUE CABRAL DG, JAENES K, SUTYRINA P, FERRANTE T, BENITEZ AD, NIPAZ V, PONCE P, et al. Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and Chikungunya viruses in serum samples[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(3): 246-256.
- [5] PARDEE K, GREEN AA, TAKAHASHI MK, BRAFF D, LAMBERT G, LEE JW, FERRANTE T, MA D, DONGHIA N, FAN M, DARINGER NM, BOSCH I, DUDLEY DM, O'CONNOR DH, GEHRKE L, COLLINS JJ. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [6] PARDEE K, SLOMOVIC S, NGUYEN PQ, LEE JW, DONGHIA N, BURRILL D, FERRANTE T, MCSORLEY FR, FURUTA Y, VERNET A, LEWANDOWSKI M, BODDY CN, JOSHI NS, COLLINS JJ. Portable, on-demand biomolecular manufacturing[J]. *Cell*, 2016, 167(1): 248-259.e12.
- [7] NGUYEN PQ, SOENKSEN LR, DONGHIA NM, ANGENENT-MARI NM, de PUIG H, HUANG A, LEE R, SLOMOVIC S, GALBERSANINI T, LANSBERRY G, SALLUM HM, ZHAO EM, NIEMI JB, COLLINS JJ. Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1366-1374.
- [8] JUNG JK, ALAM KK, VEROSLOFF MS, CAPDEVILA DA, DESMAU M, CLAUER PR, LEE JW, NGUYEN PQ, PASTÉN PA, MATIASSEK SJ, GAILLARD JF, GIEDROC DP, COLLINS JJ, LUCKS JB. Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(12): 1451-1459.
- [9] WEN KY, CAMERON L, CHAPPELL J, JENSEN K, BELL DJ, KELWICK R, KOPNICZKY M, DAVIES JC, FILLOUX A, FREEMONT PS. A cell-free biosensor for detecting quorum sensing molecules in *P. aeruginosa*-infected respiratory samples[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(12): 2293-2301.
- [10] RAJAPAKSHA P, ELBOURNE A, GANGADOO S, BROWN R, COZZOLINO D, CHAPMAN J. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms[J]. *The Analyst*, 2019, 144(2): 396-411.
- [11] CAPATINA D, FEIER B, HOSU O, TERTIS M, CRISTEA C. Analytical methods for the characterization and diagnosis of infection with *Pseudomonas aeruginosa*: a critical review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1204: 339696.
- [12] RUTHERFORD ST, BASSLER BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012, 2(11): a012427.
- [13] NG WL, BASSLER BL. Bacterial quorum-sensing network architectures[J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 197-222.
- [14] LEE J, ZHANG LH. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Protein & Cell*, 2015, 6(1): 26-41.
- [15] STRUSS AK, NUNES A, WAALEN J, LOWERY CA, PULLANIKAT P, DENERY JR, CONRAD DJ, KAUFMANN GF, JANDA KD. Toward implementation of quorum sensing autoinducers as biomarkers for infectious disease states[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(6): 3355-3362.
- [16] SUN XY, NI ZH, TANG J, DING Y, WANG XL, LI F. The *abal/abaR* quorum sensing system effects on pathogenicity in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 679241.
- [17] VOYVODIC PL, PANDI A, KOCH M, CONEJERO I, VALJENT E, COURTET P, RENARD E, FAULON JL, BONNET J. Plug-and-play metabolic transducers expand the chemical detection space of cell-free biosensors[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1697.
- [18] VOYVODIC PL, CONEJERO I, MESMOUDI K, RENARD E, COURTET P, CATTONI DI, BONNET J. Evaluating and mitigating clinical samples matrix effects on TX-TL cell-free performance[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 13785.

刘天罡, 武汉大学教授, 长期从事代谢工程和合成生物学研究, 致力于微生物天然产物的高效合成和高通量基因组挖掘与改造, 带领科研团队针对复杂天然产物生产效率低、发现速度慢两个难题进行攻关, 建立自动化微生物铸造平台, 微生物代谢物检测平台, 开发微生物靶向测序方法和基于体外重建与无细胞体系的分析方法, 打造了多种天然化合物高效合成的底盘细胞, 并助力提升多种天然产物工业合成效率和水平。近期将高效底盘结合自动化平台用于天然产物的基因组挖掘, 实现了新化合物的批量发现。作为项目负责人主持国家重点研发计划合成生物学专项项目, 并以第一完成人获 2018 年湖北十大科技事件和 2019 年湖北省科技进步一等奖。

