

基于活细胞的微生物砷离子传感器的性能拓展与优化

崔明航^{1,2} 李佳佳³ 汪劲^{1,2,4} 汪尔康^{1,2} 房晓娜^{*3}

¹(中国科学院长春应用化学研究所, 电分析化学国家重点实验室, 长春 130022)

²(中国科学技术大学应用化学与工程学院, 合肥 230026)

³(东北师范大学化学学院, 长春 130024) ⁴(纽约州立大学石溪分校化学系, 纽约 11794)

摘 要 在全细胞微生物传感器的开发中,细胞的代谢活性状态和信号输出形式等因素会直接影响传感器的稳定性和可重复性等性能,给传感器的应用开发中标准化方法的建立带来了挑战。本研究选择基于 Replication protein L(RepL)信号放大器的砷离子传感器为研究对象,探究了不同条件对砷离子传感器的检测性能的影响。研究表明,细胞的培养环境、生长状态(如不同的生长期)、报告子的类型以及诱导时长等均会对砷离子传感器的检测性能产生显著影响。传感器在不同培养基中的稳定性差别较大,其中在 LB 培养基中展现出更高的稳定性。同时,不同生长期的细胞也展现出不同的检测性能优势:在平台生长期的细胞中,传感器的检测灵敏度和线性度更佳;在对数期的细胞中,检出限更低。此外,传感器的响应存在最优的诱导时长,过长或过短的诱导时间都会影响传感器的响应,本研究中砷离子传感器的最佳诱导时间约为 2~3 h。通过对 3 种荧光蛋白报告子的对比研究发现,荧光蛋白的选取对传感器检出限的影响不大(均在 5~10 $\mu\text{g/L}$ 范围内),但会显著改变传感器的响应时间(从 40 min 到 2 h);同时,荧光蛋白的发光亮度越高,传感器响应越快。本研究结果表明,可以根据不同的需求选取不同状态的细胞,以最大限度优化细胞传感器的检测性能,拓展传感器的应用空间。本研究结果为微生物传感器在实际检测中的应用提供了可靠的依据。

关键词 砷离子微生物传感器;培养基;细菌生长阶段;荧光蛋白报告基因;响应时间

近年来,得益于合成生物学的迅猛发展^[1],越来越多的微生物细胞活体传感器被开发出来^[2]。这些微生物传感器通过在细胞膜上或细胞质中引入受体蛋白,使其能够与特定的化学物质或重金属离子结合^[3]。然后,通过信号传导级联效应^[4-5],最终改变报告基因的转录活性,实现长期检测。与传统的化学和生化检测方法不同,合成生物学的微生物传感器检测方法直接涉及活细胞内的基因表达活动。鉴于活细胞生物传感器的信号输出依赖于细胞一系列的生理过程,尽管微生物传感器能够实现比传统检测方法更低的检出限或更高的灵敏度,但由于基因表达过程的复杂性,如转录和翻译过程,影响其检测结果的变量远多于传统的检测方法。

目前,大多数微生物活细胞传感器的研究侧重于特定分子环路的设计以及对环路元件等细节的优化,通常忽视了微生物本身的生理状态对于检测的分子环路的信号输出可能产生的影响。同时,基因表达在不同阶段的调控会在一定程度上影响微生物传感器的稳定性,也为微生物传感器实际检测中标准化方法的建立提出了严峻的挑战。考虑到上述因素的复杂性和多样性,并处于实时动态变化之中,无法通过控制变量的方式逐一研究其对设计的分子环路的影响,因此,可以将微生物的宏观表型,如生长速度和生理状态等,作为这些因素的总和,并将其作为单一变量,测试其对微生物传感器的影响。同时,通过改变输出信号端的报告基因,可以研究输入信号端和输出信号端之间的关系,以降低这些宏观因素对微生物传感器的影响,从而为进一步优化微生物传感器的检测性能提供切实可行且简便的方法。

本研究利用基于 Replication protein L(RepL)信号放大器^[6-8]的砷离子传感器作为研究对象,对影响微生物传感器性能的参数进行了详细研究。Rep L 是噬菌体 P1 DNA L 复制子(Replicon L)内部的一个长度为 281 个氨基酸的开放阅读框编码蛋白质。在裂解周期(Lytic cycle)内,该蛋白可与 L 复制子相互作用

2023-09-20 收稿; 2023-10-10 接受

中央高校基本科研业务费项目(No. 2412022QD011)和国家自然科学基金项目(Nos. 32171245, 21721003)资助。

* E-mail: fangxn482@nenu.edu.cn

用,完成噬菌体 DNA 的复制,从而实现噬菌体增殖^[9]。由于 Rep L 基因位于 As^{3+} 诱导表达的启动子之后,因而可以通过改变 As^{3+} 浓度实现对 Rep L 蛋白的表达控制; Rep L 蛋白可与位于其 DNA 序列内的复制起始位点 OriL 结合,调控工作质粒的拷贝数,通过基因数目的扩增实现 As^{3+} 响应信号的放大(示意图见电子版文后支持信息图 S1)。通过对 3 组以不同荧光蛋白作为输出信号的细胞传感器进行对比测试,考察了不同的信号输出形式和操作条件对传感器性能的影响。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

Arhat 96 梯度 PCR 仪(莫纳生物科技有限公司); SPARKTM 多功能微孔板检测仪(瑞士 TECAN 公司); Sigma 3K15 台式高速离心机(德国 Sigma 公司); NanoDropTM One/One^C 微量紫外可见光分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司); PTX-JA210S 分析天平(华志电子科技有限公司); IS-RSDS 恒温振荡器(美国 CRYSTAL 公司); D1008E 掌上离心机(大龙兴创实验仪器股份公司); Micro Pulser 电穿孔仪(美国 BIO RAD 公司)。

质粒 pMT012^[10]和 pMT018^[10]由本实验室在前期工作中构建, pASQ_mCherry 质粒是以 pMT012 为载体改造而来(具体构建过程见电子版文后支持信息)。分别将以上 3 个质粒通过热激的方法转化至 DH5 α 的化学感受态细胞中,得到 3 种细胞传感器菌株 DH5 α (pMT012)、DH5 α (pMT018)和 DH5 α (pASQ_mCherry),将 3 种菌株细胞于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存,待用。

SalI(1080S)和 SphI(1246S)Restriction Enzyme(宝日医生物技术(北京)有限公司); DpnI Restriction Endonuclease(美国 New England Biolabs 公司); T4 DNA ligase(EL0011)、GeneJET Plasmid MiniPrep Kit(K0502)、GeneJET PCR Purification Kit(K0702)和 GeneJET Gel Extraction Ki(K0691)(美国赛默飞世尔科技公司); $2\times$ Phanta Flash Master Mix PCR kit(P510,南京诺唯赞生物科技股份有限公司); As^{3+} 标准溶液(分析纯,北京谱析标准技术有限公司); 氨苄青霉素储存液(100 mg/mL , A1170)、硫酸卡那霉素(K1030)、胰蛋白胍 OXOID(LP0042K)、琼脂粉(A8190)、酵母提取物(Y8020)和 DH5 α 感受态细胞(C1100)(北京索莱宝科技有限公司); $1\times$ PBS 缓冲液(G4202-100ML,武汉塞维尔生物科技有限公司); PCR 引物 pASQ vet F(5'-GCGTCGACATATTTTCCTCTGGAAGCTTCATTAC-3')、pASQ vet R(5'-ACGCC CATGCTAACGACTCAGGCTGCTACTG-3')、pASQ mCherry F(5'-GCGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGG AGGATAAC-3')和 pASQ mCherry R(5'-ACGCGCATGCTTACTTATACAGCTCGTCCATGCCGCCGGT-3')(吉林省库美生物科技有限公司)。如无特殊说明,实验用水均为去离子水。

1.2 实验方法

1.2.1 基于不同报告子和培养基条件的测试

将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存的 DH5 α (pMT012)、DH5 α (pMT018)和 DH5 α (pASQ_mCherry)菌株取出,分别在含有卡那霉素的琼脂平板上划线,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养过夜以获取单克隆。第 2 天,分别从培养平板上挑取 3 种菌株的单克隆,接种到含有硫酸卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床(250 r/min)培养过夜。测定 3 种菌液在 600 nm 的光密度(OD_{600})值,然后分别稀释、转接到 2 mL 新鲜的 LB 培养基、EZ-Rich 培养基和 M9 培养基中,至 $OD_{600}\approx 0.01$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床(250 r/min)培养 $2\sim 3\text{ h}$,直到菌液的 $OD_{600}\approx 0.4$,即大肠杆菌处于指数/对数生长期。取适量 As^{3+} 标准储存液分别添加到上述菌液中,使 As^{3+} 终浓度分别为 0 、 0.1 、 0.5 、 1.0 、 5.0 、 10 、 30 、 50 、 80 和 $100\text{ }\mu\text{g/L}$,继续培养 5 h ,使菌株在 As^{3+} 刺激下产生响应。

1.2.2 基于细菌不同生长状态的测试

在琼脂平板上挑选 pMT012、pMT018 和 pASQ_mCherry 的单克隆菌落,加入到含有硫酸卡那霉素的 LB、EZ-Rich 和 M9 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床(250 r/min)培养过夜。对于迟滞期(Lag phase)与平台期(Stationary phase)进行的诱导实验,分别将上述过夜培养的菌液在新鲜培养基中稀释至 $OD_{600}\approx 0.01$ 和 1 ,并按照预先设定的 As^{3+} 浓度梯度加入 As^{3+} 标准储存液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床(250 r/min)培养 5 h ,取出样本测试其荧光强度。对数期诱导实验的实验过程和条件与 1.2.1 节相同。

1.2.3 基于不同诱导时长的测试

首先在 pMT012、pMT018 和 pASQ_mCherry 琼脂平板上挑取单个菌落,接种到含硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 恒温摇床(250 r/min)培养过夜。分别在新鲜的 LB、EZ-Rich 和 M9 液体培养基中稀释至 $OD_{600} \approx 0.01$,继续培养 2~3 h,或者至菌液的 $OD_{600} \approx 0.4$ 。然后,加入适量的 As^{3+} 标准液至其浓度为 10 $\mu\text{g/L}$,继续诱导培养。在诱导的第 10 min、20 min、40 min、1 h、2 h、3 h 和 5 h 的时间点分别取出相应的菌液,进行后续的测试。

1.2.4 荧光测试

每种测试条件下的细菌菌液各取出 500 μL ,以 13000 r/min 离心 1 min,弃上清液,收集菌体;加入 500 μL PBS 缓冲液进行洗涤,13000 r/min 离心 1 min,弃上清液;采用适量的 PBS 缓冲液重悬细菌细胞,使细菌终浓度为 $OD_{600} \approx 0.2 \sim 0.8$ 。

取 200 μL 重悬菌液加入到 96 孔板中,使用酶标仪测定不同条件下细菌的 OD_{600} 和荧光强度值,以 PBS 缓冲液作为对照。对于 GFP 和 sfGFP,激发波长为 475 nm,检测 515 nm 处的荧光强度值作为输出信号。对于 mCherry,激发波长为 560 nm,检测 610 nm 处的荧光强度值作为输出信号。各实验均进行 3 组平行实验。

2 结果与讨论

2.1 不同培养基条件下 As^{3+} 的响应

对比了 3 种菌株(DH5 α (pMT012)、DH5 α (pMT018)和 DH5 α (pASQ_mCherry))在 3 种培养基(LB、M9 和 EZ rich)中对不同浓度 As^{3+} 的响应。图 1A 为 DH5 α (pASQ_mCherry)菌株在 3 种培养基中的生长曲线,细胞在 M9 中的生长速度远低于另外两种培养基,因为 M9 是贫乏培养基,细胞在其中生长速度较慢;在丰富培养基 LB 和 EZ-Rich 中细胞均展现出较快的生长和繁殖速度。其它两个菌株也表现出了相同的趋势。

图 1B~1D 显示了 3 种菌株分别在不同的培养基中对不同浓度 As^{3+} 的响应情况。结果表明,3 种菌株在不同的生长环境中均在一定浓度区间内具有线性响应,但是不同培养基中的线性范围差异较大。不同培养条件下 3 种报告子的线性拟合结果见表 1, DH5 α (pMT012)菌株在 LB 和 EZ-Rich 中的线性范围较宽,分别为 1~80 $\mu\text{g/L}$ 和 10~100 $\mu\text{g/L}$,但是在 M9 中的线性范围明显变窄,只有 30~100 $\mu\text{g/L}$; DH5 α (pASQ_mCherry)展现出类似的趋势;而 DH5 α (pMT018)菌株的结果有所不同,在 EZ-Rich 培养基中显示出较窄的线性范围。上述结果说明,传感器检测的线性范围与培养基和报告基因的性质均密切相关。综上,不同菌株在 LB 培养基中的线性范围变化较小,在其它两种培养基中,线性范围在不同报告基因的传感器中变化较大。

3 种菌株在 M9 培养基中对 As^{3+} 的检出限高于 LB 和 EZ-Rich,推断可能是由于 M9 属于贫乏培养基,整体的蛋白合成和 DNA 复制等过程处于较低水平,在较低浓度(如 1 $\mu\text{g/L}$) As^{3+} 的诱导下,难以产生足够的质粒拷贝数,最终导致荧光强度较低。DH5 α (pMT012)和 DH5 α (pMT018)菌株在 LB 中表现出更稳定的线性区间(1~80 $\mu\text{g/L}$)和斜率(约 14500)。与 LB 相比, DH5 α (pMT012)菌株在 EZ-Rich 中展现出相对更高的灵敏度, DH5 α (pASQ_mCherry)菌株的检测范围更宽,但检测灵敏度很低,而 DH5 α (pMT018)的检测灵敏度和线性范围位于两者之间。这些结果表明,尽管 EZ-Rich 培养基成分更简单,理论上背景荧光信号应更低,但在 3 种菌株中呈现出较差的稳定性。这可能因为与基于天然提取物的 LB 培养基相比,由多种无机盐组成的 EZ-Rich 培养基成分相对简单,由于细菌内部生理状态之间存在随机差异,成分相对简单的 EZ-Rich 培养基可能会放大这种差异。与此相反, LB 培养基由于营养成分更复杂和丰富,掩盖了细菌群体内部生理状态之间的随机差异,因此呈现出更稳定的测试性能。

2.2 细菌在不同生长状态下对 As^{3+} 的响应

细菌在培养过程中的生长通常分为迟滞期(Lag phase)、对数期(Exponential phase)、平台期(Stationary phase)和衰亡期(Decline phase)4 个阶段^[11],其中,前 3 个阶段为活细胞最重要的时期。以往的研究中,微生物传感器大多集中在细菌的对数期进行检测^[12],目前还没有对其它 2 个时期的检测性能进行研究的报道。

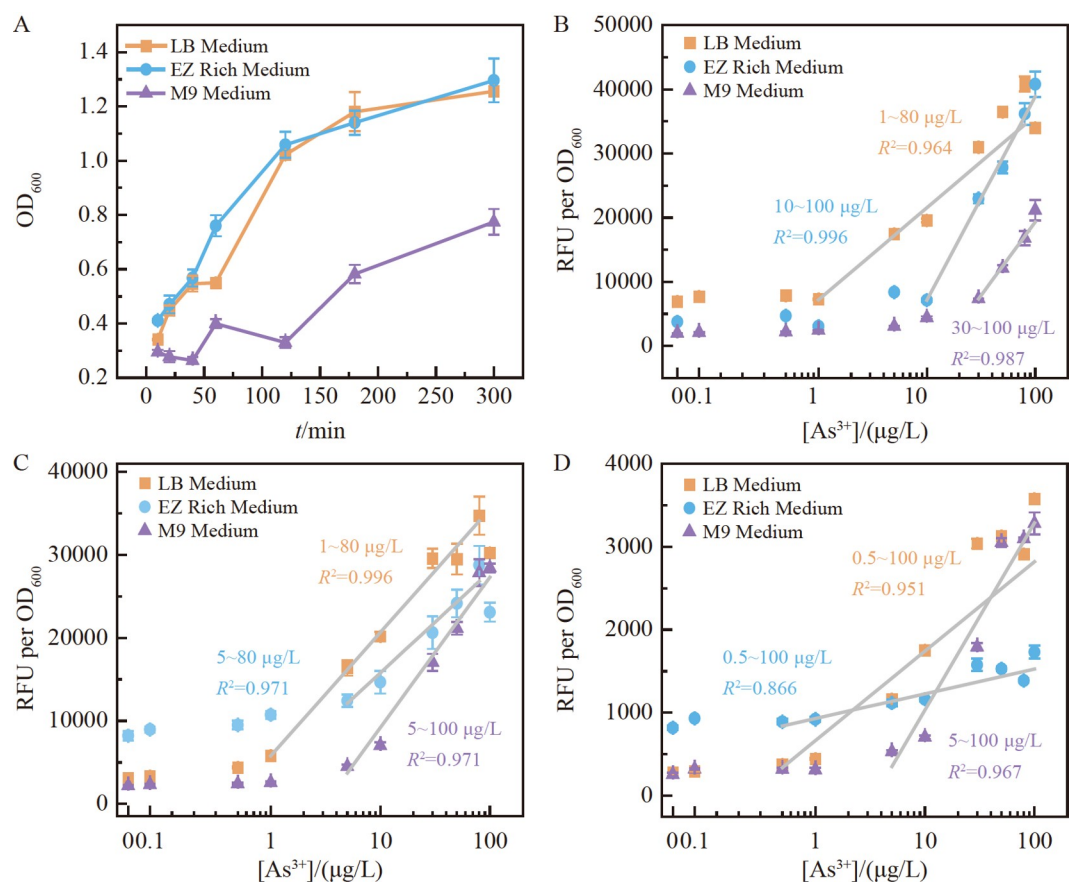


图1 (A)DH5α(pASQ_mCherry)菌株在3种培养基中的生长曲线; DH5α(pMT012)菌株(B)、DH5α(pMT018)菌株(C)与 DH5α(pASQ_mCherry)(D)菌株在不同培养基(LB、EZ-Rich 和 M9)中培养时对不同浓度 As³⁺ 的荧光信号响应

Fig.1 (A) Growth curves of DH5α (pASQ_mCherry) strain in three media; Fluorescence signal responses of DH5α (pMT012) strain (B), DH5α (pMT018) strain (C), and DH5α (pASQ_mCherry) strain (D) to various concentrations of As³⁺ during cultivation in different growth media (LB, EZ-Rich and M9)

表1 不同培养条件下3种报告子的荧光响应曲线线性拟合结果

Table 1 Linear fitting results of fluorescence response curves for three reporters under different cultivation conditions				
菌株 Strain	培养基 Medium	线性范围 Linear range/(μg/L)	斜率 k	相关系数 Correlation coefficient (R ²)
DH5α(pMT012)	LB	1~80	14351.10 ± 1232.74	0.964
DH5α(pMT012)	EZ-Rich	10~100	31735.36 ± 1061.67	0.996
DH5α(pMT012)	M9	30~100	22899.63 ± 1463.09	0.987
DH5α(pMT018)	LB	1~80	14860.02 ± 413.27	0.996
DH5α(pMT018)	EZ-Rich	5~80	12203.25 ± 1044.90	0.971
DH5α(pMT018)	M9	5~100	18126.01 ± 1391.14	0.971
DH5α(pASQ_mCherry)	LB	0.5~100	1077.95 ± 92.17	0.951
DH5α(pASQ_mCherry)	EZ-Rich	0.5~100	297.40 ± 43.66	0.886
DH5α(pASQ_mCherry)	M9	5~100	2255.67 ± 184.85	0.967

本研究分别对3种菌株的不同的生长阶段的菌体细胞对As³⁺的响应进行了对比研究(图2和电子版文后支持信息S2)。结果表明,传感器在细菌不同生长阶段对As³⁺的响应明显不同,并且这种差异在3种菌株中表现出一些共性(电子版文后支持信息S2)。首先,在迟滞期诱导的细菌均表现出很低的荧光信号响应,并且与菌株和培养基条件无关。迟滞期的细菌代谢活跃,大量合成细菌分裂所需的酶类、ATP

以及其它细胞成分,为细菌分裂做准备,这一时期细菌的主要任务是积累物质和能量,对环境的刺激不太敏感^[11],因此,迟滞期的细菌不适合用于检测。在 LB 和 EZ-Rich 培养基中,3 种菌株的平台期诱导组相对于指数生长期组表现出更好的线性特性和更高的荧光信号。对比拟合曲线的斜率发现,在较高浓度范围(10~100 $\mu\text{g/L}$)内, LB 和 EZ-Rich 中平台期的细菌响应灵敏度明显高于对数期。然而,在 M9 培养基中却展现出了完全不同的结果, M9 培养基中平台期的响应与对数期基本一致(如 DH5 α (pMT012))或更差(如 DH5 α (pMT018)和 DH5 α (pASQ_mCherry))。这可能是因为 M9 培养基中细菌的生长环境营养缺乏,处于半饥饿状态,细菌的生理状态与平台期处于饥饿状态的细菌相似。因此,对数期与平台期细菌生理状态和代谢活性相差较小,传感器对 As^{3+} 的响应也更接近。

对比 3 种菌株分别在不同生长阶段诱导的线性曲线方程的相关系数(R^2 , 图 2A~2C, 以及电子版文后支持信息表 S1)可知,平台期细菌传感器在其线性范围内普遍表现出更优异的线性响应,稳定性较好;迟滞期和对数期的细菌的线性响应程度随培养基和报告子的改变均会发生变化,并且在某些条件下线性响应很差,这种现象在迟滞期尤为明显,进一步证实了迟滞期的细菌不适合作为微生物传感器用于实际检测。采用拟合线性曲线的斜率(k)表征细菌传感器在其线性范围内的灵敏度(图 2D~2F, 电子版文后支持信息表 S1),在两种丰富培养基中,3 种菌株的平台期细菌的检测灵敏度也均远高于其它两个生长阶段的细菌,进一步显示了利用平台期细菌改善传感器性能的巨大潜力。

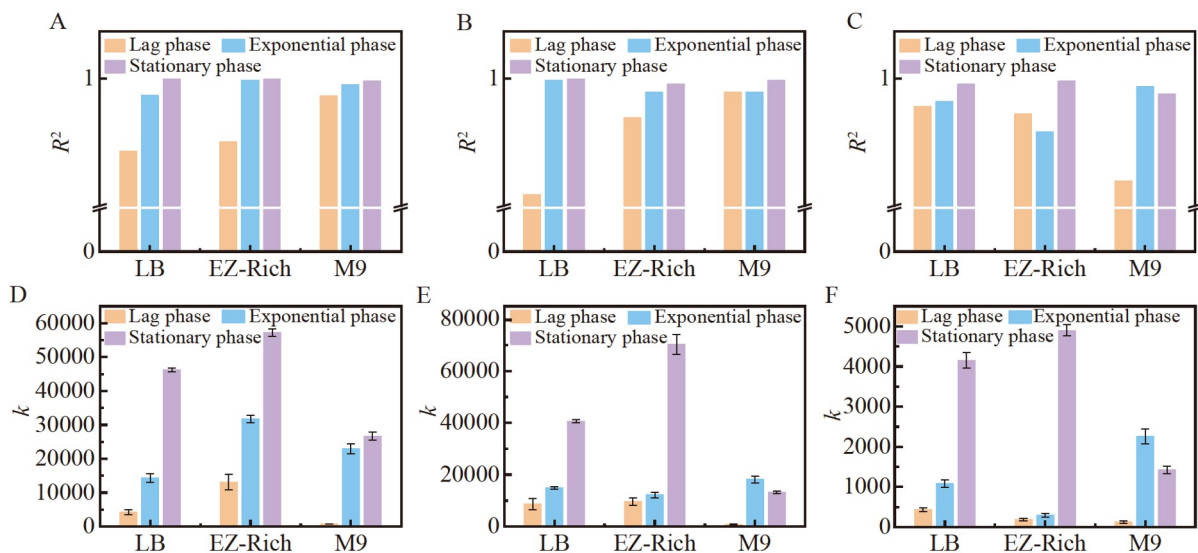


图2 不同生长状态的诱导条件下(A、D)DH5 α (pMT012)、(B、E)DH5 α (pMT018)和(C、F)DH5 α (pASQ_mCherry)3 种菌株的线性拟合曲线相关系数 R^2 (A~C)和曲线斜率 k (D~F)对比

Fig.2 Comparison of linear correlation coefficient R^2 (A~C) and slopes k (D~F) for the three strains of (A, D) DH5 α (pMT012), (B, E) DH5 α (pMT018) and (C, F) DH5 α (pASQ_mCherry) under induction conditions in different growth states

虽然平台期的细菌具有更好的线性响应和更高的灵敏度,但是其线性范围明显比对数期和迟滞期的细菌更窄。推测这可能因为在迟滞期或者对数生长期,细菌的大部分蛋白质表达系统用于与生长相关的基因表达,如各种 rRNA 和核糖体大小亚基蛋白等^[13];而在平台期的细菌,由于生长速度下降,细菌内的转录和翻译系统可以表达更多与生长无关的基因和蛋白质,这可能导致平台期的检出限较高。此外,由于平台期营养物质逐渐缺乏,细菌更容易进入应激状态^[14],从而导致包括金属离子外排蛋白质^[15]的表达上调,进一步影响其在低浓度条件下的检测性能。

2.3 不同诱导时长条件下 As^{3+} 的响应

本研究测试了 3 种菌株在不同诱导时长内对 10 $\mu\text{g/L}$ As^{3+} 的响应,结果如图 3 所示,3 种菌株在 LB 培养基中均表现出了更灵敏的响应和更高的荧光强度,在 5 h 内均表现出稳定的高表达,这可能是由于

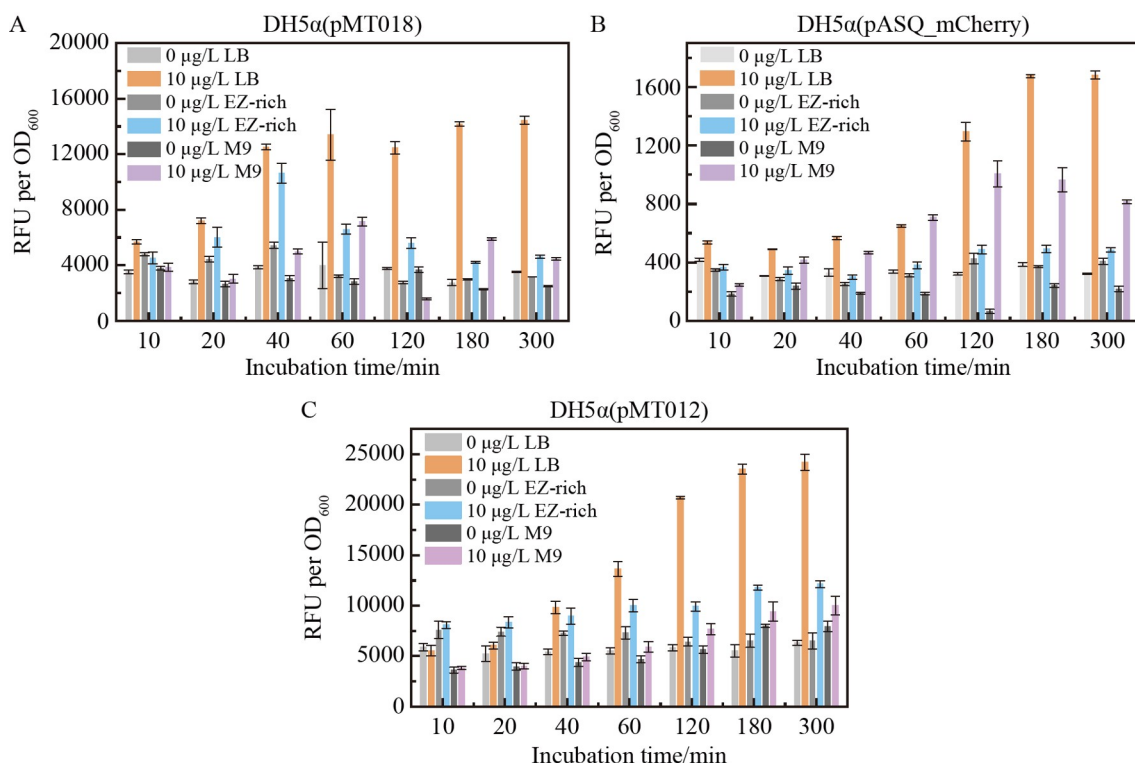


图3 不同诱导时长下3种菌株对10 $\mu\text{g/L}$ As^{3+} 的荧光响应对比: (A) DH5 α (pMT018); (B) DH5 α (pASQ_mCherry); (C) DH5 α (pMT012), 其中, 对照组为0 $\mu\text{g/L}$ As^{3+}

Fig.3 Fluorescence response of different strains under different induction durations to 10 $\mu\text{g/L}$ As^{3+} : (A) DH5 α (pMT018); (B) DH5 α (pASQ_mCherry); (C) DH5 α (pMT012). 0 $\mu\text{g/L}$ As^{3+} is used as controls

LB培养基营养丰富,能够长时间支持荧光蛋白的高表达。与此相反, EZ-Rich和M9培养基中荧光信号相对较弱,并且随着诱导时间延长,信号增强程度较小,甚至在DH5 α (pASQ_mCherry)菌株中诱导2 h后出现了荧光信号下降的趋势。此外, DH5 α (pASQ_mCherry)在EZ-Rich中的响应低于在LB和M9中的响应。3种菌株在所有培养基中诱导2~3 h条件下,砷离子传感器均表现出较高的信号响应,表明此传感器最佳诱导时长约为2~3 h。上述结果表明,传感器的响应时间均在数小时内,诱导时间并非越长越好,实际检测中应根据具体的传感器和培养环境选择最佳的诱导时长。

2.4 不同报告基因响应的对比

不同荧光蛋白的发光性质(包括量子效率、发光亮度和成熟时间等)存在较大的差异,选取不同的荧光蛋白作为输出信号是否会影响传感器的性能,目前还没有明确的研究结论。本研究对基于3种报告子(GFP、sfGFP和mCherry)的细胞传感器进行了对比。鉴于3种荧光蛋白报告子的发光性质相差较大,对3种菌株的相对荧光强度(即不同 As^{3+} 浓度下各菌株的荧光强度 I 与 $[\text{As}^{3+}]=0$ 时的荧光强度 I_0 的比值)进行对比(图4)。结果表明,不同的荧光蛋白的亮度差别较大, mCherry的发光亮度远低于GFP和sfGFP,但是, DH5 α (pASQ_mCherry)响应的最低浓度与其它两个菌株差异较小,均在5 $\mu\text{g/L}$ 时具有较明显的响应。此外,尽管3种菌株在不同的培养基中的响应程度存在差异,但这种差异不具有规律性,在LB中DH5 α (pASQ_mCherry)的响应程度更大, EZ-Rich中DH5 α (pMT018)的响应更明显,而M9中DH5 α (pMT012)和DH5 α (pASQ_mCherry)均表现出较强的信号响应。这种差异可能是检测误差或细菌生理活性等因素导致的随机变化。以上结果表明,发光强且发光效率高的荧光蛋白不一定具有更优的信号响应。

通过与上述图3结果对比发现, 3种不同报告子菌株的响应时间不同,在菌株DH5 α (pMT018)和DH5 α (pMT012)中, As^{3+} 诱导20~40 min时, LB和EZ-Rich中培养的pMT018菌株已经开始出现响应,而在LB中生长的DH5 α (pASQ_mCherry)需要60~120 min时才出现明显的响应,这可能与GFP和mCherry的发光亮度和量子产率存在很大差异有关。与GFP相比, mCherry的发光效率和亮度较差^[16],这说明选

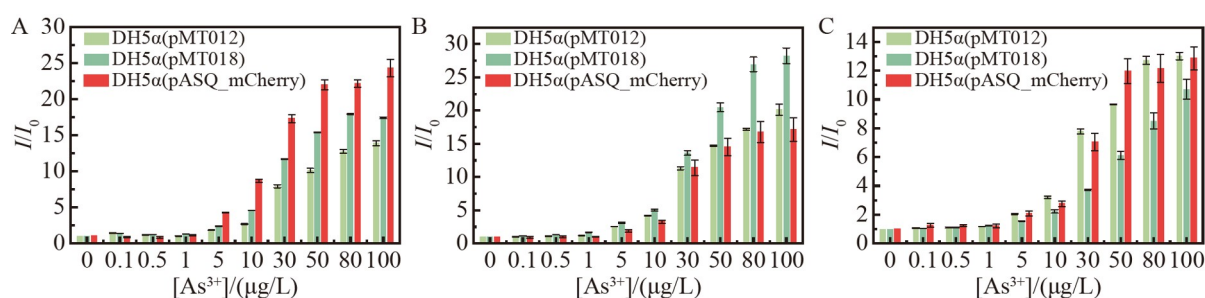


图4 3种不同报告子的菌株在(A)LB、(B)EZ-Rich和(C)M9培养基中对 As^{3+} 的响应

Fig.4 Comparison of As^{3+} responses among three different reporter strains in (A) LB, (B) EZ-Rich and (C) M9 growth media

择荧光蛋白作为报告子时,荧光蛋白的发光性能至关重要,在传感器可选择的范围内应尽量选择量子产率和荧光亮度较高的蛋白。荧光蛋白在发光之前需要经历转录、翻译和折叠等步骤,其中,折叠过程占据了大部分时间,该过程通常称为蛋白质的成熟时间,只有正确折叠的成熟荧光蛋白分子才会产生发色团。DH5 α (pMT012)和DH5 α (pMT018)菌株的报告子荧光蛋白分别为sfGFP和GFP,两者最大的区别在于成熟时间。荧光蛋白的成熟时间可能会影响传感器的响应速度,但本研究结果表明,虽然sfGFP的成熟时间(几分钟)比GFP(~40 min)短很多^[17],但快的成熟速度并未明显缩短传感器的响应时间。因此,传感器的响应时间不仅与报告蛋白的折叠速度有关,还可能受报告子蛋白和传感器调控环路中转录因子的成熟速度共同影响,为提高传感器的响应速度,需要同时缩短二者的成熟时间。

3 结论

对比了3种菌株(DH5 α (pMT012)、DH5 α (pMT018)和DH5 α (pASQ_mCherry))在不同的宏观因素(如生长环境、细菌生长状态和 As^{3+} 诱导时长)条件下,基于Rep L放大环路的微生物传感器的检测性能。实验结果表明,这些宏观因素对于微生物活细胞传感器的检测性能具有显著影响。采用LB培养基可获得更稳定的测试效果,平台期的细菌在较高浓度(5~100 $\mu\text{g/L}$) As^{3+} 的诱导下具有更好的线性响应和灵敏度。在实际样品的检测过程中,可根据检测需要合理选择测试条件。同时,考察了不同的荧光蛋白作为输出信号对传感器性能的影响。荧光蛋白的发光性质对传感器的性能(尤其是响应速度)至关重要,采用量子效率和发光亮度高的荧光蛋白会缩短传感器的响应时间,这为开发快速响应的微生物传感器提供了理论依据和可行性策略。由于生物系统自身的复杂性,影响基因表达的因素多种多样,难以确定某个具体因素。但是,作为宏观表型的细菌生长状态可作为降低这些因素影响的重要参考,为优化微生物传感器的检测性能提供切实可行和简单便捷的方法,在微生物传感器的应用和标准检测方法的建立方面具有重要意义。

References

- [1] MENG F, ELLIS T. *Nat. Commun.*, 2020, 11(1): 5174.
- [2] KIM H J, JEONG H, LEE S. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, 410: 1191-1203.
- [3] BONTIDEAN I, BERGGREN C, JOHANSSON G, CSÖREGI E, MATTIASSON B, LLOYD J R, JAKEMAN K J, BROWN N L. *Anal. Chem.*, 1998, 70(19): 4162-4169.
- [4] TYSON J J, CHEN K C, NOVAK B. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003, 15(2): 221-231.
- [5] ALON U. *Nat. Rev. Genet.*, 2007, 8(6): 450-461.
- [6] GARDIOL D, GRAMAJO H C, HIRSCHBEIN L, MENDOZA D. *Gene*, 1993, 123(1): 39-44.
- [7] ONGENAE V, AZEREDO J, KROPINSKI A M, ROZEN D, BRIEGEL A, CLAESSEN D. *Sci. Rep.*, 2022, 12(1): 17785.
- [8] MOCHIZUKI S, HIRATSU K, SUWA M, ISHII T, SUGINO F, YAMADA K, KINASHI H. *Mol. Microbiol.*, 2003, 48(6): 1501-1510.
- [9] HANSEN E B. *J. Mol. Biol.*, 1989, 207(1): 135-149.
- [10] LI J, CUI M, ZHAO J, WANG J, FANG X. *Biosens. Bioelectron.*, 2023, 221: 114937.

- [11] PELEG M, CORRADINI M G. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* , 2011, 51(10): 917-945.
- [12] BEREZA-MALCOLM L T, MANN G L, FRANKS A E. *ACS Synth. Biol.* , 2015, 4(5): 535-546.
- [13] DRYSELIUS R, IZUTSU K, HONDA T, IIDA T. *BMC Genom.* , 2008, 9(1): 559.
- [14] VOGT S L, SERAPIO-PALACIOS A, WOODWARD S E, SANTOS A S, DE VRIES S P, DAIGNEAULT M C, BRANDMEIER L V, GRANT A J, MASKELL D J, ALLEN-VERCOE E. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2190303.
- [15] DAS S, DASH H R, CHAKRABORTY J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2016, 100(7): 2967-2984.
- [16] PADILLA-PARRA S, AUDUCÉ N, LALUCQUE H, MEVEL J C, COPPEY-MOISAN M, TRAMIER M. *Biophys. J.* , 2009, 97(8): 2368-2376.
- [17] SHASHKOVA S, WOLLMAN A J, HOHMANN S, LEAKE M C. *Bio-protoc.* , 2018, 8(2): e2710.

Performance Expansion and Optimization of Live Cell-based Arsenic Ion Microbial Sensors

CUI Ming-Hang^{1,2}, LI Jia-Jia³, WANG Jin^{1,2,4}, WANG Er-Kang^{1,2}, FANG Xiao-Na^{*3}

¹(State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

²(School of Applied Chemistry and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

³(School of Chemistry, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

⁴(Department of Chemistry, The State University of New York at Stony Brook, New York 11794, United States of America)

Abstract During the development of whole-cell microbial sensors, factors such as cellular metabolic activity and signal output modes play pivotal roles in the stability and repeatability of the sensors, presenting numerous challenges for the standardization of sensor applications. This research focused on the arsenic ion sensor based on the RepL amplifier, adjusting the reporter genes, culture media, growth stages, and induction times of arsenic ions, aiming to investigate how these factors affect the sensor's detection performance. The results indicated that the cell's culturing environment, growth status (e.g., different growth phases), type of reporter, and induction time all had significant impacts on the performance of the arsenic ion sensor. First, the stability of the sensors varied greatly in different media, all the three sensors displayed greater stability in LB culture medium. Meanwhile, the cells in different growth stages also exhibited different performance advantages. Cells at the stationary growth phase exhibited better detection sensitivity and linearity, while cells in the logarithmic growth phase had lower limit of detection (LOD). Moreover, there was an optimal induction time for the response of the sensor, overly long or short induction time could interfere with its response. The optimal induction time for the arsenic sensor in this work was about 2–3 h. By comparing three types of fluorescent protein reporters, it was found that although their detection limits were fairly similar, all within the range of 5–10 $\mu\text{g/L}$, but their response times varied, ranging from 40 min to 2 h. The fluorescent proteins with higher brightness exhibited faster sensor response. These research outcomes provided a solid foundation for the practical application of microbes in detection. In practice, we could choose cells in specific states based on particular purpose, maximizing the performance of the cell sensors and further broadening the application scope of such sensors.

Keywords Arsenic ion microbial biosensor; Culture medium; Growth phases of bacteria; Fluorescent proteins reporter; Response time

(Received 2023-09-20; accepted 2023-10-10)

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2412022QD011) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 32171245, 21721003).