

doi: 10.12452/j.fxcxb.26041606

基于T7 RNA聚合酶突变体的DNA信号输出型无细胞生物传感系统

赖如惠, 舒柳, 黄燕, 聂舟, 雷春阳*

(湖南大学 化学化工学院, 化学生物传感全国重点实验室, 湖南 长沙 410082)

摘要: 该研究提出一种基于信号载体范式转换的无细胞生物传感新策略, 通过将能够高效利用dNTP合成单链DNA的T7 RNA聚合酶突变体QMF-M6引入以别构转录因子(aTF)为核心的转录调控系统, 实现了从RNA信号载体向稳定DNA报告分子的转变, 进而显著增强了传感体系的鲁棒性与抗干扰能力。实验结果显示, 该平台对四环素与铜离子展现出优异的检测性能, 检出限分别达0.62 $\mu\text{mol/L}$ 与26 nmol/L, 并在环境水样铜离子的加标回收实验中表现出良好的适用性。该研究提出了一种解决报告体系不稳定性的DNA信号输出策略, 为开发适用于现场监测、即时诊断等应用场景的稳健无细胞生物传感系统提供了可行的技术路径。

关键词: 无细胞生物传感; 别构转录因子; T7 RNA聚合酶; DNA

中图分类号: O646; S951.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)08-1671-08

A Cell-free Biosensing System with DNA Signal Output Based on T7 RNA Polymerase Mutants

LAI Ru-hui, SHU Liu, HUANG Yan, NIE Zhou, LEI Chun-yang*

(State Key Laboratory of Chemo and Biosensing, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: Cell-free biosensing systems that perform signal reporting at the RNA level feature a simple system architecture and rapid response. However, the poor stability and susceptibility to degradation of RNA limit their application in complex environmental samples. This study proposes a novel cell-free biosensing strategy based on a paradigm shift of the signal carrier. By introducing the T7 RNA polymerase mutant QMF-M6, which efficiently utilizes dNTPs to synthesize single-stranded DNA, into a transcription regulation system centered on an allosteric transcription factor (aTF), we achieved the transition from an RNA signal carrier to a stable DNA reporter molecule, thereby significantly enhancing the robustness and anti-interference capability of the biosensing system. Experimental results demonstrate that this platform exhibits excellent detection performance for tetracycline and copper ions, with limits of detection reaching 0.62 $\mu\text{mol/L}$ and 26 nmol/L, respectively, and shows good applicability in spiked recovery tests for copper ions in environmental water samples. In summary, this study proposes a DNA signal output strategy to overcome the instability of reporter systems, providing a feasible technical pathway for developing robust cell-free biosensing systems suitable for applications such as on-site monitoring and point-of-care testing.

Key words: cell-free biosensing; allosteric transcription factor; T7 RNA polymerase; DNA

无细胞生物传感技术是一种基于体外重构生物分子组件(如转录因子、核糖体与酶系统)构建的检测平台, 无需依赖活性细胞进行工作^[1-2]。与活细胞传感系统相比, 该技术既避免了潜在的生物安全风险与繁杂的培养操作^[3], 又能有效规避细胞代谢活动的背景干扰, 从而实现简捷、快速且可程序化的信号响应^[4-5]。在这一技术体系中, 别构转录因子(aTF)调控的转录开关是实现目标物特异性识别的核心机制^[6]。aTF作为一类天然基因调控蛋白, 可特异性地结合小分子效应物(如重金属离子、抗生素或代谢物等); 结合后诱导的构象变化可调节其与DNA操纵子序列的亲和力, 从而精确控制下游报告基

收稿日期: 2026-04-16; 修回日期: 2026-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22374036, 22422404)

* 通讯作者: 雷春阳, 博士, 教授, 研究方向: 生物分析化学, E-mail: cylei@hnu.edu.cn

网络首发日期: 2026-07-08

因的转录启动^[7-9]。通过更换不同 aTF 识别元件, 该系统具备检测多种化学物质的通用性与可拓展性, 在即时诊断、现场检测等领域呈现出广阔的应用前景^[4,10-11]。

为避免蛋白质翻译步骤的耗时与复杂性, 近年来研发了基于 RNA 水平的直接信号输出策略。例如, ROSALIND 平台通过将 aTF 调节的转录开关与荧光 RNA 适配体相结合, 以荧光 RNA 取代荧光蛋白作为报告元件^[5]实现了免翻译的快速信号响应, 极大地简化了无细胞系统的构建流程, 展现出优异的现场即时检测潜力。然而, 此类策略在实际应用中受限于 RNA 固有的生化不稳定性^[12-13]——RNA 分子易受复杂样品基质(如血清、细胞裂解液或环境水样)中存在的核糖核酸酶(RNase)降解, 导致信号载体快速衰减, 进而严重制约检测体系的灵敏度、重现性以及长期储存稳定性^[14-16]。

针对上述瓶颈, 本研究提出并实施了一种底层信号报告系统的重构方案: 利用突变型 T7 RNA 聚合酶(RNAP)直接合成单链 DNA(ssDNA)作为稳定报告分子。相关研究表明, 通过在 T7 RNAP 活性中心关键位点(如 Y639F)^[17]引入突变, 可显著改变其底物特异性, 使其能够高效利用脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs), 进而以 DNA 为模板催化合成 DNA/RNA 嵌合链^[18-20]。基于理性设计与定向进化, 本研究团队获得了一种新型 T7 RNAP 突变体 QMF-M6, 该突变体能以 dNTPs 为底物高效转录生成 ssDNA^[21]。在此基础上, 将转录信号报告介导的无细胞生物传感平台中的野生型 T7 RNAP 替换为 QMF-M6 突变体, 从而将系统的信号报告载体从“易降解的 RNA”彻底转换为“高稳定性的 ssDNA”(图 1), 这一转变显著提高了传感系统在复杂基质中的鲁棒性与操作稳定性。进一步地, 本研究以 TetR、CsoR 等 aTF 为识别元件, 将转录产物设计为可特异性结合硫黄素 T(ThT)并增强其荧光信号的 G-四联体结构。基于该策略, 实现了对四环素和铜离子的高灵敏度检测, 检出限分别为 0.62 $\mu\text{mol/L}$ 与 26 nmol/L, 充分证明了该平台在环境污染物监测中的实用价值。

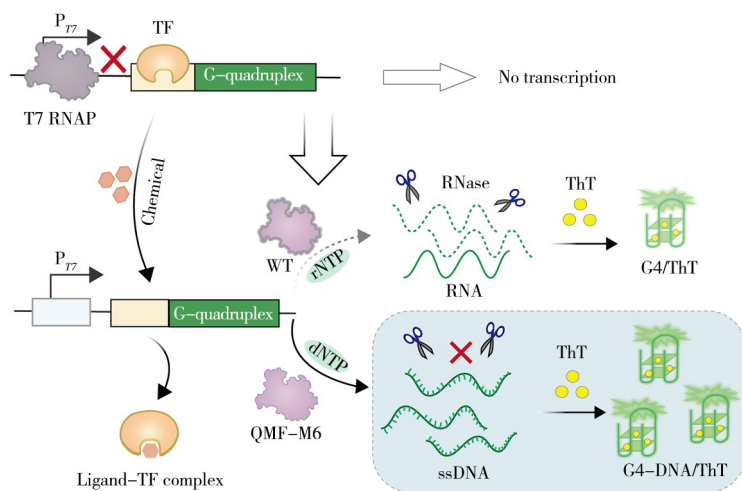


图 1 基于 T7 RNAP 突变体的生物传感系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the T7 RNAP mutant-based biosensing system

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

微型旋涡混匀仪(WH3, 上海沪西分析仪器), 二氧化碳振荡培养箱(ZQZY-BS, 知楚仪器), 超声波细胞粉碎机(O1C429, 新芝生物), pH 计(Five Easy Plus, 梅特勒-托利多), 凝胶成像系统(Azure300, Azure Biosystems), 垂直电泳装置(Mini protein tetra system, Bio-Rad), 高速离心机(H4-20KR, 可成仪器), 微量分光光度计(Nano-300, 杭州奥盛仪器有限公司), 细胞成像多功能酶标仪(Cytation 5, 美国 BioTek)。

卡那霉素(Kana)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、氯化钠(NaCl)、三羟基甲基甲烷(Tris)、咪唑(Imidazole)、二硫苏糖醇(DTT)均购于阿拉丁(上海); 甘油(Glycerol)、还原型谷胱甘肽、DEPC 水、2×TBE-Urea 上样缓冲液、磷酸盐缓冲液(PBS)等由生工生物工程(上海)股份有限公司提供; BL21(DE3)感受态细胞购于北京擎科生物科技股份有限公司; Gene Green 核酸染料购于天根生化科技(北

京)有限公司; PreScission Protease 酶、核糖核苷三磷酸(rNTPs)、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、1% TritonX-100、工具酶 DNase I、RNase A 和酵母无机焦磷酸酶等购于上海碧云天生物技术股份有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 无水硫酸铜购于毕得医药, 核酸染料 SYBR Green II RNA 购自索莱宝(北京)科技有限公司; 小分子染料 ThT 由课题组合成。

本实验所用的寡核苷酸序列购自通用生物(安徽)股份有限公司, 纯化方式为反相色谱(RPC)纯化, 具体序列如表1所示。

表1 寡核苷酸序列
Table 1 Oligonucleotide sequences

Name	Sequences(5' -3')
正义链-TG	<u>TAATACGACTCACTATA</u> <i>GGGAGATCCCTATCAGTGATAGAGGGTGGGTGGGTGGG</i>
反义链-TG	<i>CCCACCCAACCCACCCCTCTCTATCACTGATAGGGATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA</i>
正义链-CG	<u>TAATACGACTCACTATA</u> <i>GGGAGAGTAGCCACCCCACTGGGGTGGGATACGGGTGGGTGGGTGGG</i>
反义链-CG	<i>CCCACCCAACCCACCCCATCGGGTGGGGGTACCCCAACCCCTATGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA</i>

The T7 promoter sequence is indicated in bold and underlined, and the transcription factor binding sequence is indicated in italic and underlined. The corresponding sense and antisense strands were annealed separately to obtain double-stranded DNA templates: ds-TG and ds-CG(T7 启动子序列用下划线加粗格式标示, 转录因子结合序列用斜体下划线格式标示, 采用对应的正义链和反义链分别退火得到双链 DNA 模板: ds-TG、ds-CG)

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白表达与纯化 首先对 T7 RNA 聚合酶进行表达纯化, 将质粒 pGEX-6p-1-GST-T7 RNAP 转化入 BL21(DE3)感受态进行蛋白表达, 挑取转化后所得的单菌落, 置于含抗性的 LB 培养基中, 于 37 °C、180 r/min 条件下培养, 直至 OD₆₀₀ 值达到 0.6~0.8。随后加入 0.5 mmol/L IPTG 低温(15 °C、200 r/min)诱导 16 h。通过高速离心收集菌体后, 在低温条件下加入 PBS 重悬, 并采用超声法破碎细菌。将裂解液离心(10 000 r/min, 15 min)澄清并通过 0.45 μm 滤膜过滤。将备好的细胞裂解液上清加入 GST 层析柱(树脂先用 10 倍柱体积 PBS 预冷), 待液体流尽加入 PBS 以除去杂蛋白, 直到考马斯亮蓝不变色。取 10 倍柱体积 PreScission Protease 酶切缓冲液平衡柱子, 按比例加入 PreScission Protease 酶和酶切缓冲液, 置于 4 °C 条件酶切过夜。次日, 加入酶切缓冲液洗涤并收集流出液, 经考马斯亮蓝验证后, 取颜色更亮的蛋白液加入 20% 甘油, 置于 -80 °C 冰箱储存。

TetR 与 CsoR 蛋白的表达纯化步骤与 T7 RNAP 流程相似, 先将 pET28a-6× His-TetR 质粒表达, 诱导条件设定为 30 °C、160 r/min, 持续诱导 16 h。纯化时, 取 TetR 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、1.5 mol/L NaCl、10 mmol/L Imidazole、5%(体积分数)Glycerol、pH 8.0)重悬。将过滤后的蛋白上清加入镍亲和柱(柱子先用 10 倍柱体积一级水和 TetR 裂解液处理), 之后用 TetR 洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、1.5 mol/L NaCl、50 mmol/L Imidazole、5% Glycerol、pH 8.0)除去杂蛋白, 再加入含高浓度咪唑(600 mmol/L Imidazole)的 TetR 洗脱缓冲液将目的蛋白洗脱下来。最后, 将收集的蛋白加到脱盐柱进一步脱盐处理(20 mmol/L Tris-HCl、600 mmol/L NaCl、2 mmol/L DTT、pH 8.0), 处理完毕向蛋白液加 20% 甘油并储存在 -80 °C。在 CsoR 的诱导表达阶段, 设定条件为 30 °C、200 r/min, 共诱导 5 h。CsoR 裂解缓冲液(500 mmol/L NaCl、25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)、CsoR 洗涤缓冲液(500 mmol/L NaCl、25 mmol/L Tris-HCl、30 mmol/L Imidazole、pH 8.0)、CsoR 储存缓冲液(200 mmol/L NaCl、15 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L DTT、10%(体积分数)Glycerol、pH 8.0)。其余步骤与 TetR 蛋白的表达纯化操作一致。

1.2.2 体外转录及产物稳定性探究 T7 RNAP 的体外转录: 先在冰上配制总体积为 10 μL 的反应体系, 加入终浓度为 400 nmol/L 的 T7 RNA 聚合酶、200 nmol/L 的双链 DNA 模板、2.5 mmol/L 的 4 种核苷酸底物以及 1× 的转录反应缓冲液(60 mmol/L HEPES、2 mmol/L 亚精胺、40 mmol/L DTT、24 mmol/L MgCl₂、10% PEG8000、0.01%(体积分数)Triton、pH 7.5), 最后以 DEPC 水补齐体积。将混匀的反应液置于 37 °C 下孵育 4 h, 随后经 80 °C 高温反应 20 min 灭活聚合酶并终止反应。

接着对 T7 RNAP 进行稳定性探究, 取 5 μL 上述混匀溶液, 加入 10 μg/mL RNase A 或 10%(体积分数)的胎牛血清(FBS), 对照组加入等体积的 DEPC 水, 混匀离心后在 37 °C 条件孵育 1 h, 最后 70 °C 高温孵育 20 min 灭活核酸酶。

1.2.3 Urea-PAGE 凝胶电泳实验 首先, 向转录产物中加入 1 U DNase I, 于 37 °C 反应 1 h 消除

DNA 模板,随后通过 65 °C 高温灭活核酸酶。取 5 μ L 样品且加入同体积的 2 $\times$ TBE 缓冲液混匀,将混匀的样品置于 95 °C 变性 5 min,最后加入 10 μ mol/L 的 SYBR Green II 染料完成制样过程。以 1 $\times$ TBE buffer 作电泳缓冲液,取 10 μ L 样品与 3 μ L 核酸 marker 加到 15% 尿素-聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳实验,最终通过凝胶成像仪记录凝胶图像结果。

1.2.4 荧光实验探究转录产物稳定性 取 5 μ L 稳定性实验体系、100 mmol/L KCl 和 10 μ mol/L ThT,用 DEPC 水将体系补足至 20 μ L,形成荧光检测体系。混匀并使用酶标仪记录反应终点的荧光值,激发波长为 425 nm,吸收波长为 495 nm。

1.2.5 基于 T7 RNAP 突变体的生物传感系统验证实验 首先,在 20 μ L 的反应体系中,加入 200 nmol/L QMF-M6 突变体、100 nmol/L DNA 模板、1 $\times$ 优化转录反应缓冲液、0.02 U 酵母无机焦磷酸酶、2.5 mmol/L dNTPs、100 mmol/L KCl 以及 10 μ mol/L ThT,剩余体积用 DEPC 水补齐。使用酶标仪测量 3 h 的荧光动力学曲线,反应温度为 37 °C,激发波长为 425 nm,吸收波长为 495 nm。

1.2.6 转录因子对 T7 RNAP 突变体传感系统的影响 首先验证 TetR 对 T7 RNAP 的抑制,先配制 4 μ L TetR 与模板组装的体系,加入终浓度 500 nmol/L ds-TG、20 μ mol/L TetR、1 $\times$ TetR DNA 结合缓冲液(10 mmol/L Tris、0.5 mmol/L 无水乙酸镁、10 mmol/L NaCl、0.0525% NP-40、5%(体积分数)甘油、pH 7.4),剩余体积用 DEPC 水补齐。混匀后在 37 °C 孵育 30 min。再配制 20 μ L 反应体系用于荧光动力学检测,取 4 μ L 组装体系、200 nmol/L QMF-M6 突变体、1 $\times$ 优化转录反应缓冲液、0.02 U 酵母无机焦磷酸酶、2.5 mmol/L dNTPs、100 mmol/L KCl 以及 10 μ mol/L ThT,剩余体积用 DEPC 水补齐。混匀离心,用细胞成像多功能酶标仪测量荧光动力学曲线,反应温度为 37 °C,激发波长为 425 nm,吸收波长为 495 nm,检测 3 h。

再加入配体四环素解除抑制效果,在荧光动力学检测体系中,加入不同浓度(0、0.1、1、2、4、10、20、40、100 μ mol/L)的四环素,溶液总体积及检测条件不变。

1.2.7 T7 RNAP 突变体传感系统检测 Cu(II) 首先进行 CsoR 与模板 ds-CR 组装。每组配制总体积 4 μ L 的组装体系,加入 500 nmol/L ds-CG、1.5 μ mol/L CsoR、1 $\times$ CsoR DNA 结合缓冲液(1 mmol/L MgCl₂),剩余体积用 DEPC 水补齐。体系混匀离心,在 37 °C 孵育 30 min,再通过荧光动力学检测。每组 4 μ L 组装体系、200 nmol/L QMF-M6 突变体、1 $\times$ 优化转录反应缓冲液、0.02 U 酵母无机焦磷酸酶、2.5 mmol/L dNTPs、50 mmol/L KCl、10 μ mol/L ThT 以及不同浓度的铜离子(0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.07、0.1、0.2、0.3、0.4 μ mol/L),剩余体积用 DEPC 水补齐。采用细胞成像多功能酶标仪测量荧光动力学曲线,反应温度为 37 °C,激发波长为 425 nm,吸收波长为 495 nm,每隔 1 min 读取一次数据。

2 结果与讨论

2.1 QMF-M6 突变体转录产物抗降解性能研究

在复杂环境介质中, RNA 分子极易受内源性或外源性核糖核酸酶的降解影响。为系统评估 QMF-M6 突变体转录生成的 DNA 产物在抗酶解稳定性方面相较于野生型 T7 RNAP 转录 RNA 的优越性,首先比较了二者转录产物对 RNase A 的耐受性。实验选用 G-四联体序列作为模板^[22],分别采用野生型 T7 RNAP(以 rNTPs 为底物)和突变型 QMF-M6 T7 RNAP(以 dNTPs 为底物)进行体外转录。转录结束后,向反应体系中加入终浓度为 10 μ g/mL 的 RNase A 进行孵育处理,随后利用 15% Urea-PAGE 凝胶电泳分析产物完整性。如图 2A 所示,野生型 T7 RNAP 的转录产物在 RNase A 孵育 1 h 后发生显著降解;与之相比, QMF-M6 突变体转录生成的 DNA 分子展现出良好的抗降解性能。

为对上述结果进行定量验证,采用基于 G-四联体的荧光报告模型进行检测与分析。将转录产物(含 1 μ mol/L ThT)与 RNase A 共孵育 4 h 后测定荧光强度,并绘制柱状图(图 2B)。定量数据显示,无论反应体系中是否存在 RNase A, QMF-M6 突变体转录产物的荧光信号均保持稳定(相对荧光强度变化 <5%);而野生型 T7 RNAP 转录产物在 RNase A 处理后,荧光信号显著降低(下降约 99%)。

进一步地,为评估该转录系统在真实生物基质中的稳定性,考察了转录产物在 FBS 中的耐受性。将转录产物与 10%(体积分数)FBS 在 37 °C 共孵育 1 h 后,采用 15% Urea-PAGE 进行表征,同时测定荧光

信号(图2C、D)。凝胶电泳与荧光检测结果一致表明: 野生型T7 RNAP转录的RNA分子在FBS孵育后迅速降解; 而QMF-M6突变体转录生成的DNA产物结构保持完整, 且仍能与ThT结合产生稳定的荧光信号(相对荧光强度接近100%)。

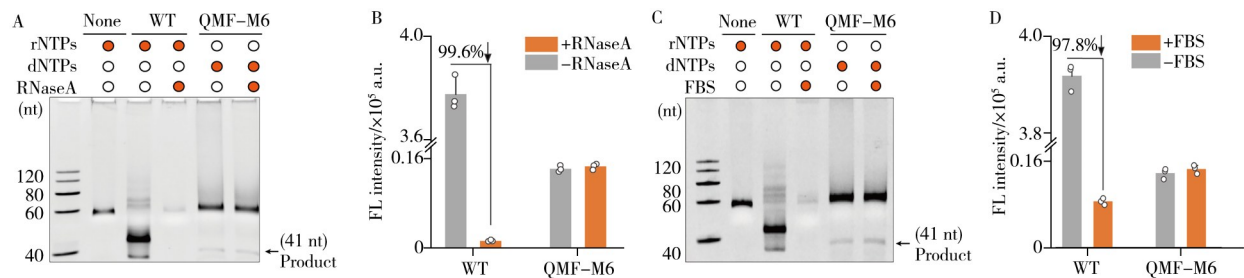


图2 Urea-PAGE实验表征G4 RNA产物和G4 DNA产物在RNase A中的稳定性(A)以及荧光验证结果(B), G4 RNA产物和G4 DNA产物在FBS中的稳定性(C)以及荧光验证结果(D)

Fig. 2 Urea-PAGE characterization of stability of G4 RNA and G4 DNA products in RNase A (A) and fluorescence validation results(B); stability of G4 RNA and G4 DNA products in FBS (C) and fluorescence validation results (D)

上述实验证实, QMF-M6突变体通过转录生成DNA产物实现信号载体从RNA到DNA的替换, 显著增强了报告分子在含有RNase生物环境(如血清)中的稳定性。该DNA产物在复杂介质中不仅能维持结构完整性, 还可保持功能活性, 从而为基于核酸的传感与信号放大系统提供了更为稳定可靠的输出载体。

2.2 基于QMF-M6突变体的无细胞DNA报告生物传感系统

基于前述QMF-M6突变体转录产物在抗降解性能上的显著优势, 本研究选择广谱抗生素调控因子TetR为识别元件, 构建了以QMF-M6突变体介导的无细胞DNA报告生物传感系统(图3A)。

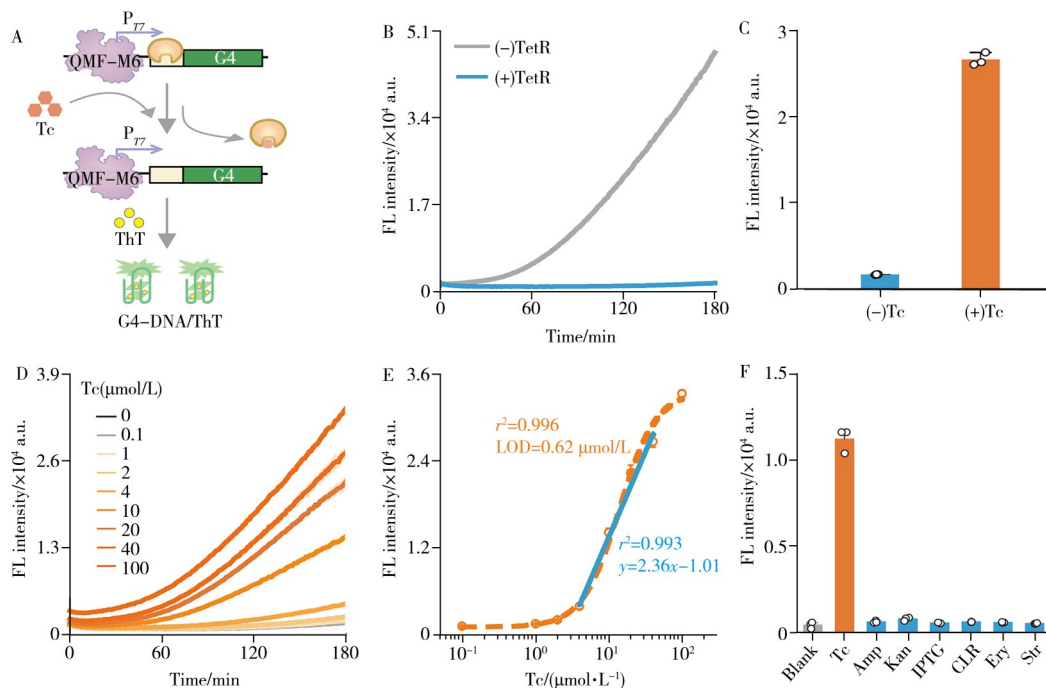


图3 基于T7 RNAP突变体生物传感系统检测四环素Tc系统方案(A), TetR抑制T7 RNAP突变体转录活性的荧光动力学曲线(B), 四环素Tc解除TetR对转录系统的抑制(C), 不同Tc浓度下转录活性的荧光动力学分析(D), 系统在不同浓度四环素中的响应曲线及检出限评估(E), T7 RNAP突变体转录系统的选择性(F)

Fig. 3 Scheme of the T7 RNAP mutant-based biosensing system for tetracycline (Tc) detection (A), fluorescence kinetic curves of TetR inhibiting the transcriptional activity of T7 RNAP mutant (B), relief of TetR-mediated inhibition of the transcription system by tetracycline (Tc) (C), fluorescence kinetic analysis of transcriptional activity at different Tc concentrations (D), response curves and limit of detection assessment of the system at different tetracycline concentrations (E), selectivity of the T7 RNAP mutant transcription system (F)

首先, 在无配体条件下评估 TetR 对转录活性的抑制效果。实时荧光动力学监测结果显示: 在未添加 TetR 的对照组中, 系统呈现出典型的荧光信号递增趋势; 而添加 TetR 后, 荧光信号始终维持在基线水平且波动极小, 表明 TetR 能高效结合 *tetO* 操纵子序列, 高效地阻遏 QMF-M6 的转录起始(图 3B)。基于此, 进一步考察特异性配体四环素(Tc)对转录抑制的解除效应。如图 3C 所示, 加入 Tc(终浓度 40 $\mu\text{mol/L}$)后, 荧光信号立即呈现显著的上升趋势, 这表明 Tc 通过与 TetR 变构位点结合, 诱导其构象变化并使其从 DNA 模板解离, 从而恢复 QMF-M6 的转录活性, 成功驱动 G-四联体 DNA 产物的转录生成; 该产物可在存在 ThT 的条件下发出强烈荧光。以上结果初步验证了基于 QMF-M6 突变体的无细胞 DNA 报告传感系统在概念与功能上的可行性。

为系统评价该传感平台的定量检测性能, 进一步测定了系统对四环素的响应灵敏度。通过梯度添加不同浓度 Tc(0.1~100 $\mu\text{mol/L}$), 观测到荧光信号强度与 Tc 浓度呈正相关(图 3D)。采用剂量响应的 Logistic 模型对荧光强度-浓度数据进行拟合(图 3E), 所得 S 形响应曲线的线性范围为 2~40 $\mu\text{mol/L}$ ($r^2 > 0.99$)。根据 3 倍信噪比($S/N=3$)计算, 系统的检出限(LOD)为 0.62 $\mu\text{mol/L}$ 。上述结果表明, 该平台在宽浓度范围内对四环素具有灵敏且可定量的检测能力, 为其应用于实际样品分析提供了实验依据。

最后, 为考察系统的特异性, 选取一系列常见小分子配体作为潜在干扰物进行交叉响应实验。测试分子包括: 氨苄西林(Amp)、卡那霉素(Kan)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、克拉霉素(CLR)、红霉素(Ery)和链霉素(Str)。结果如图 3F 所示, 仅四环素能显著激活系统并产生显著的荧光信号增量, 其余测试分子引起的荧光响应均接近基线水平。该结果证实 TetR 识别元件在 QMF-M6 介导的 DNA 报告系统中仍保持高度特异性。

2.3 基于 QMF-M6 突变体的无细胞生物传感系统的通用性验证

鉴于 QMF-M6 突变体转录生成的 G-四联体结构在检测中展现出优异的灵敏度和特异性, 本研究进一步探索利用转录因子的天然多样性以拓展该系统的检测范围。CsoR 作为一种在多种细菌中高度保守的铜离子感应调控蛋白, 其能以纳摩尔级亲和力特异性结合 Cu(I) , 并通过构象改变对铜稳态相关基因的表达进行调节^[23]。鉴于转录反应体系中已含有较高浓度的 DTT, 能够有效地将体系中的 Cu(II) 还原为 Cu(I) 。通过将 CsoR 对应的 DNA 调控模板(即 CsoR 操纵子序列)引入转录系统中, 构建了基于 CsoR-QMF-M6 级联的铜离子生物传感平台(图 4A)。

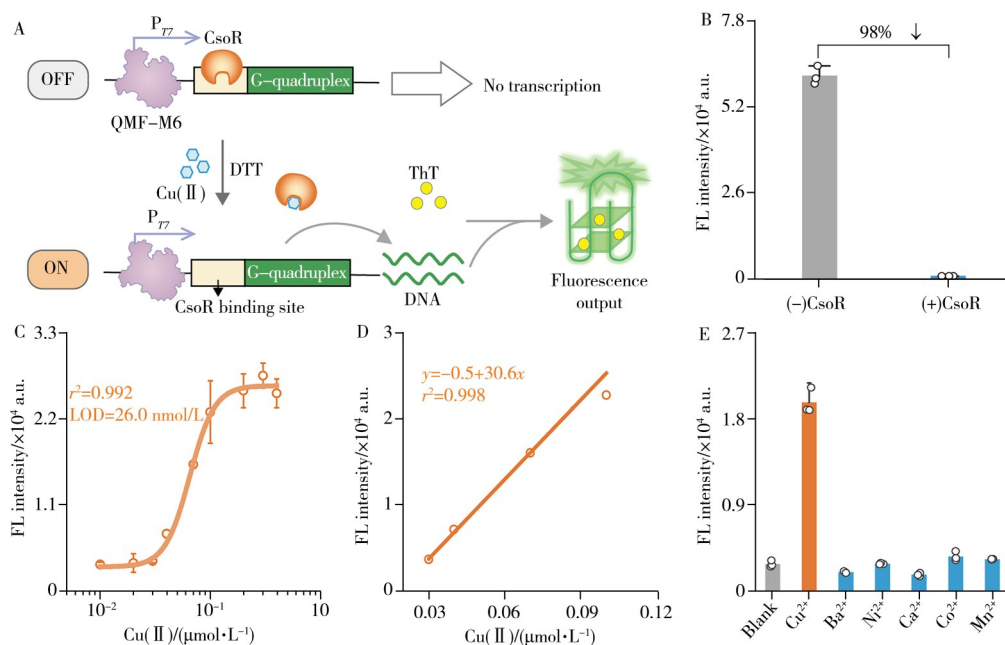


图 4 T7 PNAP 突变体转录系统检测铜离子的示意图(A), CsoR 对 T7 RNAP 突变体转录的抑制效率分析(B), 铜离子的响应曲线(C)以及线性区间(D)和系统选择性(E)

Fig. 4 Schematic diagram of the T7 RNAP mutant transcription system for copper ion detection (A), analysis of CsoR-mediated inhibition efficiency on T7 RNAP mutant transcription (B), response curve of copper ions (C) and linear range (D) and system selectivity (E)

为验证该平台的可行性,首先在无铜离子条件下评估CsoR对转录活性的抑制作用。反应3 h后测定荧光强度,结果显示:缺乏CsoR的对照组产生强烈的荧光信号;而在存在CsoR的情况下,荧光信号被抑制约98%(图4B),这表明CsoR在无配体条件下能高效结合其操纵子序列,有效阻遏QMF-M6的转录。

进一步地,通过梯度添加不同浓度CuSO₄(0.01~0.4 μmol/L),对该传感平台对Cu(Ⅱ)的剂量依赖性响应展开系统考察。实验结果表明,各浓度Cu(Ⅱ)均能解除CsoR的转录抑制,产生明显的荧光响应,荧光强度随Cu(Ⅱ)浓度升高而单调增强,呈现出典型的浓度-信号正相关性。采用Logistic模型对荧光强度-Cu(Ⅱ)浓度数据进行拟合,得到典型的S形剂量-响应曲线($r^2 > 0.99$)。基于3倍空白标准偏差(3σ)计算,系统对Cu(Ⅱ)的LOD为26 nmol/L(图4C),线性区间范围为0.03~0.1 μmol/L(图4D)。在同一条件下比较Cu(Ⅱ)和其他金属离子(如Ba²⁺、Ni²⁺、Ca²⁺、Co²⁺和Mn²⁺)对荧光信号的影响(图4E),除Cu(Ⅱ)产生显著信号响应外,其他离子的检测信号均不明显。进一步表明该传感平台具有较好的选择性,能够特异性检测Cu(Ⅱ)。

上述结果显示,通过对识别元件进行简单替换以及更换相应的DNA模板,QMF-M6介导的无细胞生物传感系统能够成功转化为高灵敏度的铜离子检测平台,实现对Cu(Ⅱ)的宽动态范围、定量检测,充分验证了传感系统的通用性与可拓展性。

2.4 环境水样中Cu(Ⅱ)的实际检测应用

基于上述研究获得的高灵敏度与宽线性范围响应特性,本研究进一步将基于QMF-M6突变体的无细胞生物传感系统应用于实际水体中铜离子的定量分析。为系统性评估系统的准确性与抗基质干扰能力,采集本地桃子湖水过滤后在水样中进行铜离子加标回收实验,以模拟实际水体中不同污染水平的铜离子检测(加标浓度:40、70和100 nmol/L)。实验结果显示,相同加标浓度下的荧光响应信号高度相近,实际水样中铜离子的加标回收率为83.0%~107%,相对标准偏差(RSD)≤5.5%(表2),表明该传感系统具有良好的选择性与抗干扰能力。

表2 环境水样中Cu(Ⅱ)加标回收实验(n=3)

Table 2 Experiment of spiked recoveries of Cu(Ⅱ) in environmental water samples (n=3)

Cu(Ⅱ) concentration/(nmol·L ⁻¹)	Measured value/(nmol·L ⁻¹)			Recovery/%	RSD/%
40	44.78	41.62	42.17	107	3.9
70	60.84	55.86	57.59	83.0	4.4
100	82.29	88.79	79.89	85.6	5.5

3 结 论

本文构建了基于QMF-M6突变体转录生成单链DNA(ssDNA)的无细胞生物传感系统,该系统有效突破了传统RNA报告分子易被降解的局限,显著增强了传感体系在复杂样品基质中的稳定性和鲁棒性。以TetR和CsoR作为别构识别元件的模块化设计,不仅实现了对四环素和铜离子的高灵敏度、宽动态范围检测,还充分证实了该平台的通用性和可拓展性。该系统在水样分析中的良好性能进一步验证了其实际应用潜力。综上所述,本研究通过重构信号报告分子体系,开发出一个稳健且耐RNase的无细胞生物传感平台,为无需翻译步骤、适用于现场即时检测的分子诊断技术的发展提供了新方案,在环境污染监测、即时医疗诊断等领域具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Wang T, Lu Y. *Biosensors*, **2022**, 12(5): 318.
- [2] Silverman A D, Karim A S, Jewett M C. *Nat. Rev. Genet.*, **2020**, 21(3): 151-170.
- [3] Gräwe A, Dreyer A, Vornholt T, Barteczko U, Buchholz L, Drews G, Ho U L, Jackowski M E, Kracht M, Lüders J, Bleckwehl T, Rositzka L, Ruwe M, Wittchen M, Lutter P, Müller K, Kalinowski J. *PloS One*, **2019**, 14(3): e0210940.
- [4] Jung J K, Archuleta C M, Alam K K, Lucks J B. *Nat. Chem. Biol.*, **2022**, 18(4): 385-393.
- [5] Jung J K, Alam K K, Verosloff M S, Capdevila D A, Desmau M, Clauer P R, Lee J W, Nguyen P Q, Pastén P A, Matiassek S J, Gaillard J F, Giedroc D P, Collins J J, Lucks J B. *Nat. Biotechnol.*, **2020**, 38(12): 1451-1459.
- [6] Li S, Li Z, Tan G Y, Xin Z, Wang W. *Trends Biotechnol.*, **2023**, 41(8): 1080-1095.
- [7] Zou Y, Gong X, Zhang J, Gan Q, Yan Y. *Metab. Eng.*, **2025**, 91: 405-414.

- [8] Ding N, Zhou S, Deng Y. *ACS Synt. Biol.*, **2021**, 10(5): 911–922.
- [9] Li Y, Lucci T, Villarruel Dujovne M, Jung J K, Capdevila D A, Lucks J B. *Nat. Chem. Biol.*, **2025**, 21(6): 949–958.
- [10] Zhang Y, Zhao C, Bi H, Zhang X, Xue B, Li C, Wang S, Yang X, Qiu Z, Wang J, Shen Z. *J. Hazard. Mater.*, **2022**, 438: 129499.
- [11] Thavarajah W, Silverman A D, Verosloff M S, Kelley–Loughnane N, Jewett M C, Lucks J B. *ACS Synt. Biol.*, **2020**, 9(1): 10–18.
- [12] Cesarini V, Appleton S L, de Franciscis V, Catalucci D. *Mol. Aspects Med.*, **2025**, 102: 101350.
- [13] Zhou J, Rossi J. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2017**, 16(3): 181–202.
- [14] Bender A T, Sullivan B P, Lillis L, Posner J D. *J. Mol. Diagn.: JMD*, **2020**, 22(8): 1030–1040.
- [15] Coenen–Stass A M L, Pauwels M J, Hanson B, Martin Perez C, Conceição M, Wood M J A, Mäger I, Roberts T C. *RNA Biol.*, **2019**, 16(5): 696–706.
- [16] Lu X, Ding K, Fang Z, Liu Y, Ji T, Sun J, Zeng Z, He L. *Biosensors*, **2024**, 14(2): 103.
- [17] Sousa R, Padilla R. *EMBO J.*, **1995**, 14(18): 4609–4621.
- [18] Padilla R, Sousa R. *Nucl. Acids Res.*, **2002**, 30(24): e138.
- [19] Rusakova E E, Tunitskaya V L, Memelova L V, Kochetkova S V, Kostyuk D A, Kochetkov S N. *FEBS Lett.*, **1998**, 423(2): 189–192.
- [20] Gudima S O, Kostyuk D A, Grishchenko O I, Tunitskaya V L, Memelova L V, Kochetkov S N. *FEBS Lett.*, **1998**, 439(3): 302–306.
- [21] Nie Z, Lei C Y, Yang L J, Huang Y. China Patent (聂舟, 雷春阳, 杨丽娟, 黄燕. 中国专利), 119530191A.
- [22] Kuryavyi V, Cahoon L A, Seifert H S, Patel D J. *Structure*, **2012**, 20(12): 2090–2102.
- [23] Liu T, Ramesh A, Ma Z, Ward S K, Zhang L, George G N, Talaat A M, Sacchettini J C, Giedroc D P. *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3(1): 60–68.

(责任编辑: 盛文彦)