

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-031

基于基因线路的合成生物传感器设计与应用

邓稼轩¹, 陈升言^{1,2}, 王宝俊^{1,2}⁽¹⁾ 浙江大学化学工程与生物工程学院, 浙江 杭州 310058; ⁽²⁾ 浙江大学杭州国际科创中心, 浙江 杭州 311215)

摘要: 合成生物传感器利用基因编码的生物识别元件特异性识别靶标并将其转换成可量化的生物信号, 然后通过基因线路介导的功能器件实现生物信号的定制化处理与多模态信号输出, 具有生物相容性高、成本低、环境友好等优势, 已在环境监测、生物制造过程监控、精准医学诊疗等领域展现出重要应用潜力。合成生物学方法和前沿技术的突破性进展, 特别是基因线路的模块化工程设计原理、可编程动态调控策略和人工智能辅助的生物元件挖掘与从头设计技术, 为合成生物传感器的开发提供了前所未有的助力。然而, 当前合成生物传感器的产业化应用仍在多个性能指标方面面临制约。即: 敏感性 (Sensitivity)、特异性 (Specificity)、响应速度 (Speed)、稳定性 (Stability) 和安全性 (BioSafety) ——简称5S挑战。本文系统梳理了基于基因线路的合成生物传感器信号识别机制与设计范式, 深入剖析了各类型合成生物传感器的技术优势与应用瓶颈, 并归纳了代表性的基因线路传感功能扩展模块与应用案例。本文还介绍了合成生物传感器的关键特征以及典型优化方法, 探讨了未来需要交叉融合新机制与新技术以实现合成生物传感器的范式突破与可预测定制, 从而加速推动合成生物传感器广泛实际应用。

关键词: 合成生物传感器; 基因线路; 变构转录因子; 双组分系统; 核糖开关; 核糖核酸调节子; 成簇的规律性间隔的短回文重复序列/CRISPR相关蛋白 (CRISPR/Cas)

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Genetic circuit-enabled synthetic biosensors: designs and applications

DENG Jiakuan¹, CHEN Shengyan^{1,2}, WANG Baojun^{1,2}⁽¹⁾ College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China;⁽²⁾ ZJU-Hangzhou Global Scientific and Technological Innovation Center, Zhejiang University, Hangzhou 311215, Zhejiang, China)

Abstract: Synthetic biosensors leverage genetically encoded biorecognition components for specifically identified targets and convert them into quantifiable biological signals. These signals can then be processed

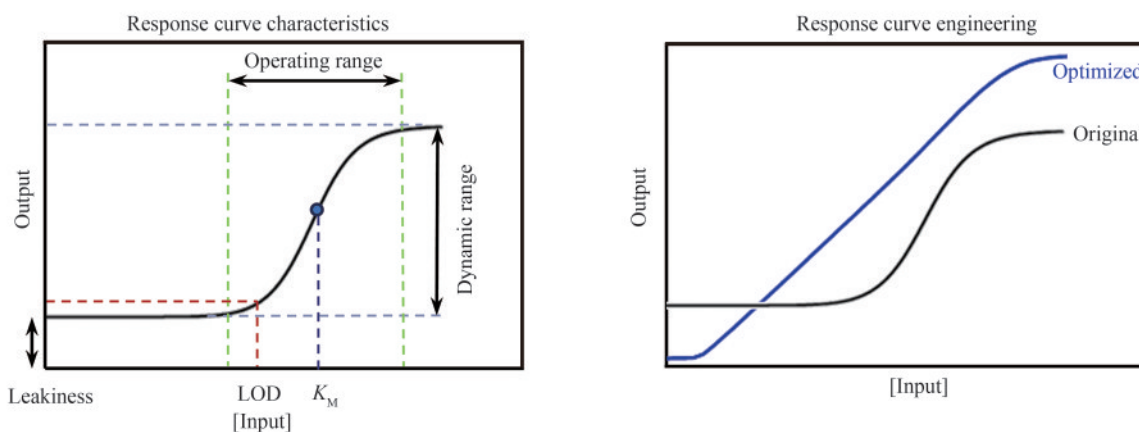
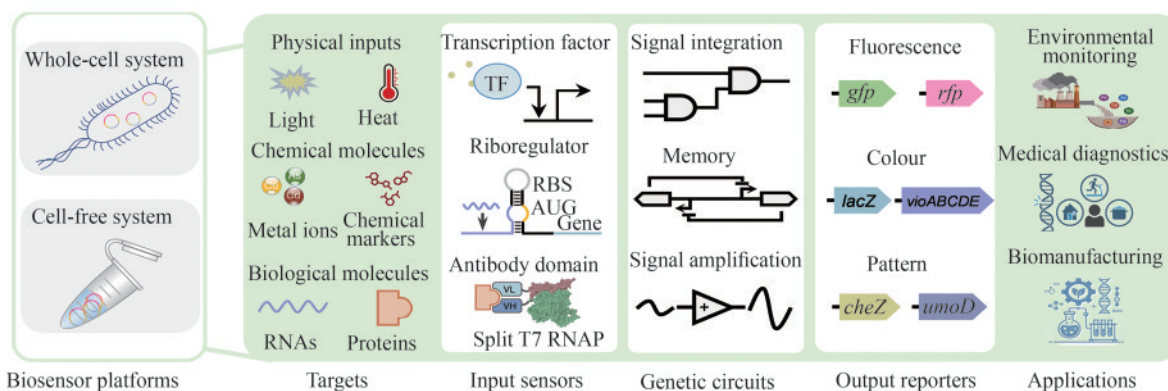
收稿日期: 2025-04-02 修回日期: 2025-05-28

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFF1204500); 国家自然科学基金 (32320103001, 32271475); 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划 (2024C03011)

引用本文: 邓稼轩, 陈升言, 王宝俊. 基于基因线路的合成生物传感器设计与应用[J]. 合成生物学, 2026, 7(1): 32-65

Citation: DENG Jiakuan, CHEN Shengyan, WANG Baojun. Genetic circuit-enabled synthetic biosensors: designs and applications [J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(1): 32-65

through genetic circuits to achieve customized signal processing and produce multi-modular signal outputs. Synthetic biosensors offer several compelling advantages including high biocompatibility, low cost, and sustainability, which have shown significant application potentials in environmental monitoring, biomanufacturing, and precision diagnostics. Advances in synthetic biology methods and technological developments, particularly the adoption of various engineering design principles, genetic circuit-enabled programmable signal processing, and AI-assisted mining, and *de novo* design of biological components, have provided unprecedented momentum for developing new generation synthetic biosensors. However, the practical applications of synthetic biosensors have been restricted by certain technical limitations in sensing performance including sensitivity, specificity, speed, stability, and biosafety, termed as the “5S” challenges. Here we summarize the signal recognition mechanisms and design principles of representative genetic circuit-enabled synthetic biosensors, and provide an in-depth analysis of their technical advantages and remaining challenges. Furthermore, we highlight typical genetic circuit-enabled functional expansion modules for myriad application scenarios. Finally, we introduce the key features of synthetic biosensors and the latest optimization methods for improving sensing performance. We conclude by discussing the challenges and opportunities for accelerating the development of new generation synthetic biosensors for achieving sustainable, affordable, and reliable detection in diverse settings.



Keywords: synthetic biosensor; genetic circuit; allosteric transcription factor; two-component system; riboswitch; riboregulator; CRISPR/Cas

合成生物学 (synthetic biology) 是一门融合了生命科学、工程学与信息技术等多学科的前沿交叉领域,旨在通过“自下而上”的工程化设计理念,由“元件”到“模块”再到“系统”来设计、创造生物系统,使细胞能够执行特定的生物功能^[1]。合成生物学的一大突破性进展是设计人工基因线路来编程和定制细胞功能——通过解耦天然的遗传调控网络,整合标准化的生物元件并设计构建模块化的功能器件和系统,以此实现对细胞行为的精准控制^[2-3]。在此技术框架下,基于基因线路的合成生物传感器 (genetic circuit-enabled synthetic biosensors) 作为合成生物学应用的典型范式,已在全细胞传感器和无细胞传感器领域得到了空前的发展。这类传感器通过转录因子、核糖开关等生物识别元件特异性捕获靶标信息,并将其转化为便于检测的物理化学信号^[4-7]。与传统电子或化学传感方法相比,其具有独特优势:①可生物复制的传感体系降低检测成本;②多样化、可冻干的反应体系适用于现场检测;③传感-调控一体化可支持工程细胞智能设计;④生物相容度高可适配活体原位检测^[8]。这些特性推动了其在环境监测^[9-11]、生物制造^[12-14]、生物医学诊疗^[15-17]等领域的创新应用。随着合成生物学标准化元件库的建立扩展和计算机辅助设计等使能技术工具的发展,工程化设计的基因线路已实现了对一些小规模人工生物系统的精准控制^[18],并提供了丰富的信号传感、处理和输出模块,用于定制生物传感器的功能^[19-20]。尽管这些新工具和策略加快了传感器的开发和优化,在概念上证明了合成生物传感器的成功。然而,合成生物传感器的技术转化与实际应用仍面临多个性能指标方面的制约,即:敏感性 (Sensitivity)、特异性 (Specificity)、响应速度 (Speed)、稳定性 (Stability) 和安全性 (BioSafety)^[21-23]——简称5S挑战。亟需采取创新多样的优化方法或探索新的传感范式以使合成生物传感器在竞争激烈的传感器市场中生存和发展。

本文将系统解析合成生物传感器的设计范式与创新应用,根据传感器的类型分类总结信号识别机制与最新研究进展,并归纳了代表性的基因线路传感功能扩展模块与应用案例,讨论了合成

生物传感器的关键特征和典型优化方法,最后总结探讨了未来加速推进合成生物传感器实现广泛实际应用的挑战与机遇。

1 基于基因线路的合成生物传感器设计原理与应用

在合成生物技术体系成熟之前,生物传感器的开发主要依赖于微生物对环境变化应激响应机制的随机发现。这使传感器的开发具有显著的偶然性特征,其技术路径难以实现标准化复现与模块化推广^[24]。随着合成基因线路工程化的发展,研究者正逐步建立起标准化、模块化、正交化的生物传感器理性设计策略^[7]。该策略的核心在于解析细菌进化形成的天然遗传调控网络(如反馈回路、级联放大、开关切换等动态调控系统)^[5, 25],从中提取功能明确的基因元件,并通过合成生物学手段将其重构于不同底盘细胞中,形成具有可编程特性的传感系统。从系统架构视角分析,此类传感器可解耦为三个功能单元:传感模块(靶标识别与信号捕获)、处理模块(信号转导与逻辑运算)及输出模块(响应信号生成),三者通过正交化基因线路实现精准耦合^[26-30]。当靶标分子触发传感模块时,传感器通过核酸或蛋白质构象变化完成信号转换,然后经处理模块的信息整合,最终激活荧光报告、电化学反应或代谢产物释放等输出,实现对靶标分子的实时动态监测。这种模块化架构赋予传感器高度的设计灵活性,目前已广泛应用于环境监测、生物制造与医学诊断等领域^[31],其代表性研究如表1所示。

基于中心法则建立的分子信息流层级(DNA→RNA→蛋白质)为生物传感器设计提供了天然的工程化框架^[73]。在此级联过程中,转录、翻译、翻译后修饰及蛋白质-DNA互作等关键分子事件可被工程化改造为生物传感触发节点。因此,根据信号识别触发系统的机制不同,当前主流的合成生物传感器分为基于变构转录因子、双组分系统、核糖开关、核糖核酸调节剂和CRISPR/Cas系统的传感器,涉及的传感器底盘包括原核细胞、真核细胞和无细胞体系。以下将按照信号识别触发系统的机制分类阐述。

表1 基于基因线路的合成生物传感器设计与典型应用

Table 1 Typical genetic circuit-enabled synthetic biosensors and applications

领域	具体应用	检测靶标	传感基因线路元件	检测限	工作范围	参考文献
环境监测	重金属离子	As ³⁺	转录因子 ArsR、转录信号放大器	0.1 μg/L	0.1~5 μg/L	[32]
		Cd ²⁺	转录因子 CadR	0.39 μg/L	0~60 μg/L	[10]
		As ³⁺	II型 CRISPR/Cas 系统		0~32 μmol/L	[17]
		U ⁶⁺	双组分系统 UzcRS-UrpRS、AND gate、天然系统活性放大器	1 μmol/L	1~5.2 μmol/L	[33]
		Hg ²⁺	toehold 开关、转录因子 MerR	5 nmol/L	5~7.5 nmol/L	[34]
		Au ³⁺	转录因子 HspR、重组酶系统	5 μmol/L	5~100 μmol/L	[35]
		Cu ²⁺	P _{CopA} 启动子		0~50 mmol/L	[36]
	爆炸残留物	2,4-DNT	yqiF 启动子	4.8 mg/L	4.8~25 mg/L	[37]
		TNT	TNT 核糖开关、记忆开关	25 μmol/L		[38]
	农药	有机污染物	2-苯基苯酚	转录因子 HbpR、转录信号放大器	1 μmol/L	1~50 μmol/L
单环芳烃			双组分系统 TodTS	0.04 mg/L	0.04~1 mg/L	[40]
甲醇			双组分系统 MxcQZ-OmpR		0~0.05%	[41]
环境病原细菌		AHL	转录因子 QscR	0.01 μmol/L	0.01~5 μmol/L	[42]
医学诊疗	监测体液物质	孕酮	从头设计转录因子 DLA	0.16 μg/L	0.16~60 μg/L	[43]
		人血清中的锌	转录因子 ZntR、Zur		0~20 μmol/L	[44]
		大麻素类化合物	基于 CB2 受体的酵母 GPCR	1 nmol/L		[45]
	检测疾病标志物以诊断疾病	转化生长因子-β	双组分系统 Smad	0.024 ng/mL	0.024~6.25 ng/mL	[15]
		胆盐	人工跨膜转录因子 CadC-TcpP	28.3 μmol/L	28.3~58.99 μmol/L	[46]
		血红素	转录因子 HrtR、拨动开关	0.12 mg/L		[47]
		肠炎标志物 NO	转录因子 NorR、重组酶记忆模块	30 μmol/L		[48]
		RNA	CRISPR-Cas13a/C2c2 系统			[49]
	传感并治疗疾病	DNA	CRISPR-Cas12a 系统			[50]
		血液脂肪酸	人工转录因子 LSR	5 μmol/L	5~100 μmol/L	[51]
		霍乱弧菌群体感应信号 CAI-1	人工转录因子 HR		细胞密度	[52]
				10 ⁸ CFU/mL		
		原儿茶酸	转录因子 PcaV		0~1 000 μmol/L	[53]
		硫代硫酸盐	双组分系统 ThsRS	0.016 mmol/L	0.016~1 mmol/L	[54]
		阿司匹林	复合转录因子 Myr-NPR1/NPR4-VanR-VP16		10~250 μmol/L	[55]
	调节肠道生态	硝酸甘油	级联生化反应和转录因子 CREB	75 μmol/L		[56]
		鼠李糖、硫酸软骨素、IPTG	转录因子 RhaR 和 LacI、双组分系统 BT3334- BT0267、CRISPR/Cas 记忆模块	0.3 mmol/L; 0.01 mmol/L; 6 μmol/L		[57]
生物制造	检测目标产物	L-赖氨酸	转录因子 LysG	40 mmol/L	40~320 mmol/L	[12]
		L-半胱氨酸	转录因子 CcdR		0~50 mmol/L	[58]
	产量辅助菌株筛选	苹果酸	转录因子 MalR	5 g/L	5~15 g/L	[59]
		柚皮素	柚皮素核糖开关		0~0.6 mmol/L	[60]
		半乳糖醛酸	转录因子 ExuR		1~100 mg/L	[61]
代谢动态调控	葡萄糖	转录因子 Mlc			[14]	
	L-赖氨酸	转录因子 LysG		0.05~8 mmol/L	[62]	
	长链脂肪酸	转录因子 FadR、TetR			[63]	
优化发酵参数		L-乳酸、D-乳酸	转录因子 EcLldR、PfpdhR		15~200 mmol/L; 0~50 mmol/L	[13]

续表

领域	具体应用	检测靶标	传感基因线路元件	检测限	工作范围	参考文献
生物制造	辅助酶的定向进化	乳果糖	转录因子 LacI-L5	5 $\mu\text{mol/L}$	10~500 $\mu\text{mol/L}$	[64]
		茶碱	茶碱核糖开关	10 $\mu\text{mol/L}$	10~1000 $\mu\text{mol/L}$	[65]
	生物碱	生物碱	转录因子 RamR		1~100 $\mu\text{mol/L}$	[66]
		4'-O-甲基去甲酰胺	转录因子 RamR	2.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5~100 $\mu\text{mol/L}$	[67]
食品安全	检测食物	腐胺	转录因子 PuuR	5.37 mmol/L		[68]
		毒素黄素	转录因子 ToxR	50 nmol/L	50~500 nmol/L	[69]
	毒性物质	组胺	转录因子 HinK	0.39 mg/L	0.28~18 mg/L	[70]
		四环素	转录因子 TetR、聚合酶链回收(PSR)放大线路	12 $\mu\text{g/L}$		[71]
细胞调控	调控细胞分裂与运动	光照	转录因子 LexRO、基因逻辑门	0.059 mW/cm ²		[72]

1.1 基于变构转录因子的合成生物传感器

生物体进化形成的天然转录因子库为合成生物传感器开发提供了丰富的分子元件资源, 通过基因组测序与生物信息学分析(例如序列相似性分析^[74]、蛋白质数据库标签检索^[75]等), 研究者已鉴定出大量具有配体响应特性的变构转录因子(aTF)^[76-77]。全球范围内建立的转录因子数据库(如 AnimalTFDB^[78]、JASPAR^[79]、GroovDB^[80])及其配套预测工具为传感元件的功能解析与快速筛选提供了系统支持^[81]。基于变构转录因子(aTF)的生物传感器采用三模块核心架构(图1): ①aTF表达单元; ②含aTF结合位点(TFBS)的受调控启动子; ③下游报告基因系统^[30]。aTF的核心功能域可解耦为配体结合结构域(LBD)与DNA结合结构域(DBD)。当aTF的LBD选择性识别到靶标分子后, 将触发aTF的DBD构象重排, 驱动aTF与启动子TFBS的解离或结合, 控制RNA聚合酶与启动子的相互作用, 从而激活或抑制转录过程^[76, 83] [图1(a)], 激活型和抑制型转录因子的动力学曲线呈现相反趋势, 如图1(d)所示。

目前已存在众多利用变构转录因子开发的传感器。在生物制造领域, Ding等^[14]利用转录抑制因子Mlc和磷酸转移酶组分EIIBC的相互作用构建了一种能监测葡萄糖摄取率的生物传感器(GURB)。当葡萄糖缺乏时, Mlc结合到P_{PisG}启动子上抑制转录; 当葡萄糖存在且细胞经EIIBC摄取葡萄糖时, EIIBC去磷酸化并招募Mlc, 迫使Mlc解除对下游报

告基因表达的抑制, 从而监测葡萄糖摄取率[图1(f)]。他们继续利用GURB在细胞工厂动态调控中央代谢途径的代谢流, 成功实现了副产物的减少和目标产物产量的提高。在医学诊疗领域, 抑制型转录因子PcaV在结合原儿茶酸后将发生构象变化解除对下游基因表达的抑制, Jiang等^[53]基于这一原理在益生菌*E. coli* Nissle 1917 (EcN)中构建了原儿茶酸传感系统, 可用于活体疗法或药物递送。在农业科学领域, Haskett等^[84]通过整合根瘤菌信号分子scyllo-inosamine合成途径与工程菌感知系统, 构建了植物-微生物互作固氮调控网络, 感知到信号分子后, 工程菌中的转录因子MocR将驱动下游固氮酶相关基因的表达。

值得注意的是, 从头设计策略突破了天然变构转录因子的局限性: Rössger等^[51]通过将过氧化物酶体的受体- α 与响应根皮素的阻遏转录因子TtgR融合, 构建了人工脂质感应受体, 实现了血液脂肪酸水平的实时监测; Liu等^[43]基于分子动力学模拟解析配体结合域构象变化, 成功设计了人工黄体酮特异性酿酒酵母传感器; Huang等^[55]采用结构域融合技术开发了阿司匹林响应型人工转录因子Myr-NPR1/NPR4-VanR-VP16, 可精准调控哺乳细胞治疗性蛋白表达。近年来, 人工智能技术的引入进一步推动了转录因子设计的可预测性^[85]。Tellechea-Luzardo等^[86]开发的Sensbio平台通过机器学习算法比对配体数据库并预测转录因子-靶标互作关系, 显著缩短了元件筛选周期。

尽管已存在上述在胞内作用的变构转录因子

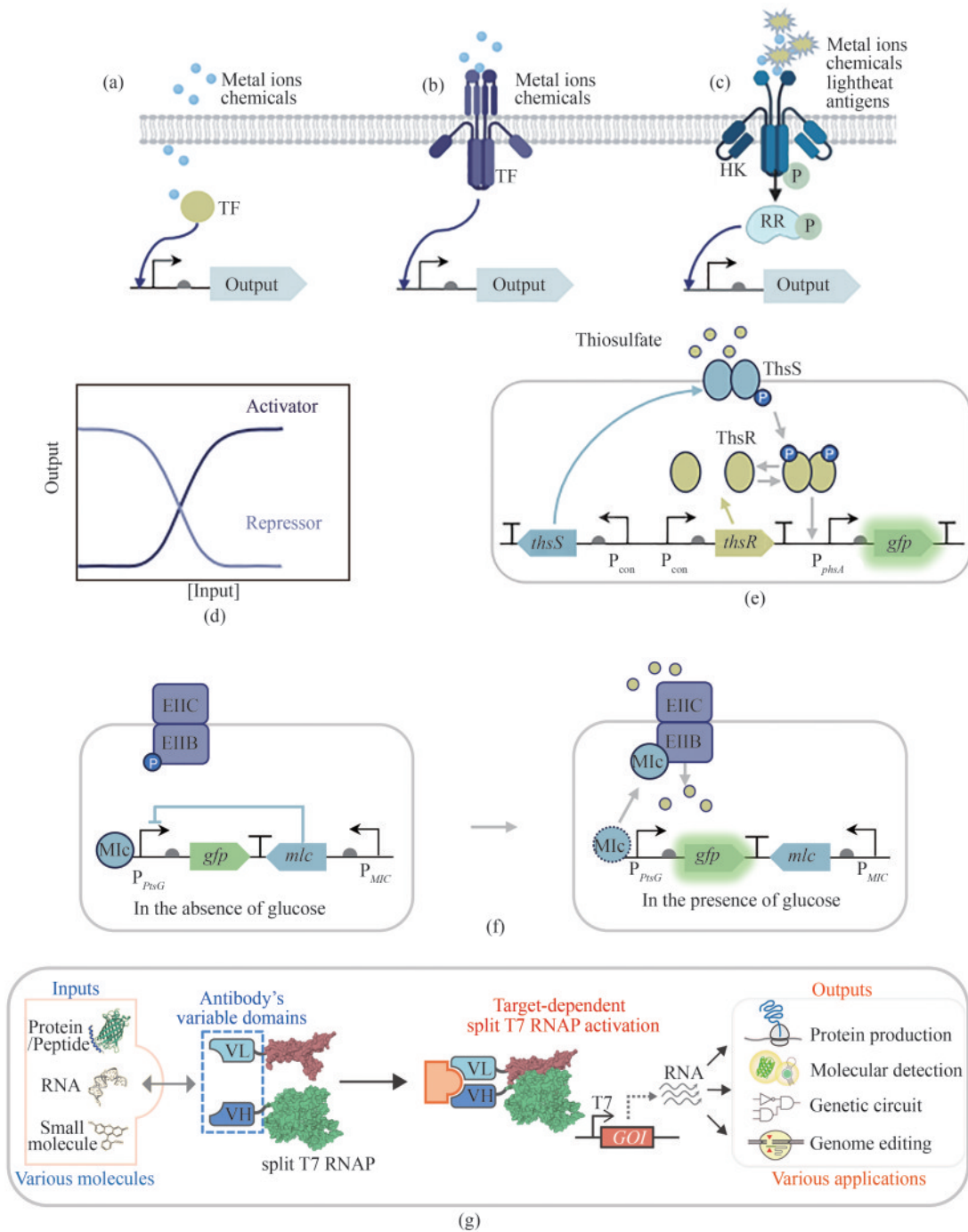


图 1 基于转录调控蛋白的合成生物传感器信号识别机制与应用 [14, 54, 82]

(a) ~ (c) 基于变构转录因子、跨膜转录因子和双组分系统的传感器信号识别机制；(d) 激活型和抑制型转录因子传感器的响应曲线；(e) 感应硫代硫酸盐的双组分系统 ThsRS 传感器基因线路示意图 [54]；(f) 监测葡萄糖摄取率的转录因子生物传感器基因线路示意图 [14]；(g) 基于靶标依赖性拆分 T7 RNA 聚合酶的生物传感器基因线路示意图 [82]；TF—转录因子；HK—组氨酸激酶；RR—响应调节子；*GOI*—目的基因

Fig. 1 Mechanisms and applications of transcriptional regulatory protein-enabled synthetic biosensors [14, 54, 82]

(a)~(c) Recognition mechanisms underlying allosteric transcription factor, transmembrane transcription factor, and two-component system-enabled biosensors; (d) Response curves of biosensors based on activation-type and repression-type transcription factors; (e) Gene circuit of a thiosulfate-sensing sensor based on the two-component system ThsRS [54]; (f) Gene circuit of a transcription factor-enabled biosensor for monitoring glucose uptake [14]; (g) Gene circuit of a target-dependent RNA polymerase-enabled biosensor [82]; TF—transcriptional factor; HK—histidine kinase; RR—response regulator; *GOI*—gene of interest

机制,跨膜信号传导系统的开发为胞外环境感知提供了新范式^[87]。以ToxR家族为代表的单组分系统通过膜整合结构域直接感应外界信号并利用胞内DNA结合域调控基因表达[图1(b)]^[88-89],其中大肠杆菌跨膜转录因子CadABC模块的分子机制已经得到广泛研究^[90]:CadC通过周质结构域感知环境pH变化,激活CadA/CadB基因表达^[91-92]。Chang等^[46]基于模块化设计理念构建了“EMeRALD”合成受体平台,通过将不同感应模块(如胆盐结合域TcpP)与CadC的DNA结合域融合,提出了一种通过更换目的感应模块来实现对不同的目标物进行检测的方法,并实现了咖啡因等分子的特异性检测^[93];Shen等^[94]对CadC及其结合位点CadO进行定向进化,有效提高镉传感器的性能,建立了一个简便快速的镉离子检测智能手机平台。

总的来说,基于转录因子的传感器具有极其丰富的传感元件结构多样性和广泛的潜在可检测分子库,尽管已经得到了广泛的研究,但其作为生物传感器的潜力仍未得到充分挖掘。目前,其设计与性能调控策略也主要依赖于反复的迭代优化,需建立具备普适性的基因元件调控体系,加强设计与优化的可预测性。此外,机器学习与传感器输出的深度耦合将成为未来的重要发展方向:例如Li等^[95]构建了包含4种传感器的全细胞阵列,结合线性回归、反向传播神经网络及最小二乘支持向量机算法,建立了小麦霉菌污染判别模型;Saltepe等^[35]通过深度神经网络解析金离子传感器的荧光强度-浓度非线性关系,在短时间内能够实现靶标浓度的精确定量。这些案例展示了人工智能在提升传感器性能与数据分析效率中的关键作用,提供了智能化的信号解读工具。值得注意的是,Komatsu等^[82]将人为拆分的T7 RNA聚合酶分别与抗体的重链、轻链可变结构域(VH和VL)融合,构建了一种靶标依赖性RNA聚合酶(TdRNAP),当融合的VH和VL结构域与特定分子靶标相互作用时,拆分的T7 RNA聚合酶将被组装成完整的活化RNA聚合酶,从而驱动T7启动子下游目标基因的表达产生各种传感输出[图1(g)]。这一通过融合转录调控蛋白与抗体结构域以实现基因线路传感输出的创新方法给转录

因子传感器的设计带来了启发,未来可尝试将拆分的转录因子与抗体或其他特异性识别分子融合构建新型人工转录因子。

1.2 基于原核生物双组分系统的合成生物传感器

双组分系统(two-component systems, TCS)是细菌中普遍存在的多步信号传导途径^[96],其核心由膜结合信号感知蛋白[组氨酸激酶(histidine kinase, HK)]、胞内转录调节蛋白[响应调节子(response regulator, RR)]及受RR调控的启动子构成^[96]。典型TCS生物传感器的信号传导流程为:细胞外信号触发HK的结构域构象重排,这种信号随后通过信号传导结构域传递给激酶结构域以增加其激酶活性,随后对RR接收域内保守的天冬氨酸残基进行磷酸化来调控同源启动子的转录^[97-99][图1(c)]。多数HK具有激酶和磷酸酶双功能活性^[100-101],在无信号刺激时,HK也会使其同源的RR去磷酸化而失活。因此,可以通过改变HK的激酶和磷酸酶活性来调节双组分系统的性能^[99-100]。

双组分系统凭借其跨膜的信号传导特性,在生物传感器开发中展现出独特优势^[102]。在环境污染检测领域已取得显著进展^[103],例如基于CusRS、ZraRS及NrsRS系统构建的TCS传感器可分别检测Cu²⁺、Zn²⁺及Ni²⁺^[96];Park与Taffet^[33]通过整合UrpRS与UzcRS双系统构建AND逻辑门,实现了U⁶⁺的特异性识别。在医学诊断领域,双组分系统的应用呈现多元化趋势:Zou等^[54]开发的i-ROBOT工程菌通过ThsRS系统感应炎症标志物,同步激活碱基编辑与治疗性分子分泌,为炎症性肠病诊疗提供了闭环调控方案[图1(e)];Woo等^[104]设计的硫代硫酸盐-硝酸盐双参数AND门传感器通过同时识别两种肠道炎症标志物,显著提升了诊断特异性;Zhang等^[105]基于TorRS系统开发了三甲胺N-氧化物传感器,为心血管疾病风险预警提供了新型分子工具。针对双组分系统天然输出启动子存在宿主兼容性差、背景噪声高等问题,研究者通过启动子工程策略,将RR特异性DNA结合位点与人工合成启动子或天然启动子进行组装,构建适配宿主、高动态范围的人工杂交启动子^[106-107],以提升TCS传感器的性能:例如基

于响应L-苹果酸的双组分系统MalRK, Zhang等^[59]首先利用天然启动子构建了枯草芽孢杆菌中的L-苹果酸生物传感器, Sun等^[108]进一步将MalR结合位点与酿酒酵母的天然启动子 P_{TEF1} 偶联, 获得酵母宿主中性能更优的杂交启动子, 并构建了L-苹果酸传感器用于苹果酸转运蛋白突变体的筛选, 助力了L-苹果酸的高效合成。

尽管双组分系统因其检测信号广谱, 响应细胞外环境的优势逐渐成为环境监测和疾病诊疗领域引人注目的工具, 当前研究仍存在显著失衡: 对HK-RR结构互动与调控机制的解析已较为深入, 而面向实际应用的传感器设计仍相对较少, 在传感优化方面也存在信号传导高度依赖于胞内ATP供应、不同TCS之间串扰大、宿主兼容性差等问题, 影响了其稳定性和特异性。未来需加强对TCS工程化设计的研究, 推动其在工业发酵调控、环境污染实时监测及精准医疗等领域的深度应用。

1.3 基于核糖开关的合成生物传感器

核糖开关(riboswitch)是一类位于mRNA非翻译区(UTR)的顺式作用RNA调控元件, 由能够直接结合特定代谢物或小分子化合物的适配体域(aptamer domain)和调控下游基因表达的表达式平台(expression platform)功能域构成^[109]。核糖开关特异性结合配体后, 位于mRNA 5'或3'非翻译

区的非编码核酸将使适配体域产生构象变化, 并传递给表达平台结构域, 从而通过调控转录起止、调控翻译起止和自剪切mRNA等机制调节基因表达^[110-111]。根据传感机制不同, 主要分为转录调控型和翻译调控型核糖开关传感器。

转录调控型核糖开关的表达平台一般包括与发夹结构类似的转录终止/抗终止结构^[19], 仅在与特定配体结合后会发生构象变化, 从而启动或终止基因的转录过程[图2(a)]。典型应用如Wang等^[112]开发的 Co^{2+}/Ni^{2+} 核糖开关传感器: 当结合金属离子时, 抗终止子结构形成, 驱动红色荧光蛋白高效表达, 适用于环境重金属污染监测; Michener等^[65]基于响应茶碱的转录调控型核糖开关, 构建了用于迭代筛选咖啡因脱甲基酶文库的酵母传感器, 将体内酶活性提高了20倍以上。翻译调控型核糖开关主要通过暴露或遮蔽RBS调控翻译效率, 从而控制下游基因的表达^[109][图2(b)], 例如McNerney等^[113]利用腺苷钴胺(AdoCbl)响应开关构建了维生素 B_{12} 全细胞传感器, 与维生素 B_{12} 转运泵过表达策略结合从而表现出比无细胞传感器更高的敏感性, 也可在冷冻干燥后用于现场检测; Qin等^[114]创新性地整合了核糖开关与腺苷脱氨酶(ADAR)编辑机制: 当靶标结合核糖开关发夹结构触发双链RNA形成时, 将触发ADAR介导的终止密码子A向I编辑, 从而解

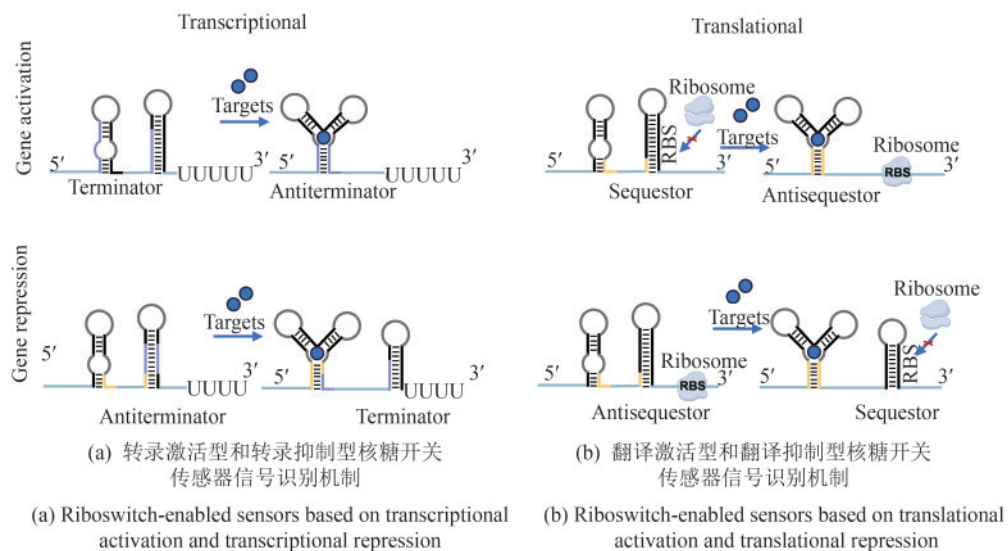


图2 基于核糖开关的合成生物传感器信号识别机制

Fig. 2 Mechanisms of riboswitches-enabled synthetic biosensors

除翻译抑制并激活荧光信号。

当前，指数富集的配体系统进化技术 (SELEX)^[115-116] 是一种成熟的适配体体外筛选优化方法，研究者无需预知RNA结构信息便可实现核糖开关的定向进化^[116]。近年来，计算机和生物信息学、结构预测、算法模拟和高通量筛选等技术的进步显著提升了核糖开关开发效率，使其逐渐成为了广泛使用的理想传感元件^[109, 117]。例如Yoshikawa等^[118]构建了一个用于将适配体转化为核糖开关的高通量筛选平台，为核糖开关的高效设计提供了一种通用的策略。

基于核糖开关的合成生物传感器展现出高度可编程性、低细胞负担的优势，然而其在全细胞表达系统中的实际应用仍面临多种问题，例如胞内复杂环境的干扰导致配体结合亲和力与选择性下降、开关比率低、细胞膜屏障使灵敏度降低以及检测靶标类型有限等^[119]。为此，众多研究者将无细胞转录翻译系统 (CFPS) 作为替代表达系统。相较于全细胞体系，CFPS具有以下优势：生物安全性高、检测所需样本量小、无细胞膜屏障、储存方便和响应快等，为核糖开关传感器提供了一个开放且易于调节的平台^[120]。最新研究显示，通过将CFPS核糖开关传感器与柔性电子器件集成，可构建穿戴式生物传感平台，用于毒素和核酸等物质的检测^[121]。

1.4 基于核糖核酸调节子的合成生物传感器

核糖核酸调节子 (riboregulator) 通过RNA二级结构的动态重构响应核酸分子，精准调控下游基因翻译，具有可模块化设计、快速响应 (秒级) 及低代谢负荷等优势，已成为合成生物传感领域的重要工具^[122]。迄今为止，科学家已经开发了大量核糖核酸调节子，例如toehold开关^[123-124]、核酶^[125]、环状启动的RNA激活因子 (LIRA)^[126]、三路连接开关^[127] 和小转录激活RNA (STAR)^[128] 等，以下主要介绍toehold开关和核酶。

作为原核系统中经典核糖核酸调节子，toehold开关通过发夹结构遮蔽RBS及起始密码子抑制翻译。当触发RNA与开关互补结合时，发夹结构将解旋并暴露翻译起始元件，启动下游基因

表达，与传统的核糖开关相比具有更高可编程性 [图3(a)]。在应用层面，toehold开关展现出跨体系适配性：Zhang等^[34]通过整合汞离子转录因子与toehold开关，构建了11种可编程双输入逻辑电路，实现对汞离子检测阈值的精准调控；Köksaldı等^[130]结合toehold开关和核酸序列扩增技术 (NASBA) 开发了SARS-CoV-2病毒无细胞传感器；Chen等^[131]基于toehold开关设计了高特异性、高敏感性的寨卡病毒无细胞传感器。目前研究者已建立系统的toehold开关设计优化平台：Cisneros等^[132]开发了基于分子动力学模拟的自动化设计软件Toeholder；Valeri等^[133]则利用深度学习架构 (STORM/NuSpeak) 实现了toehold开关性能的智能优化。

核酶 (ribozyme) 作为具有催化活性的RNA分子，可催化磷酸二酯键的断裂或形成，从而实现RNA链的特异性剪接，这一特性使其成为构建RNA响应型生物传感器的理想元件^[125]。Gambill等^[125]基于这一原理构建了核酶传感平台RENDER，其将天然核酶拆分为两个失活片段，分别连接一段与靶标RNA互补的引导序列。当靶标RNA存在时，引导序列将通过碱基互补配对与之结合并形成具有催化活性中心的核酶复合物，从而剪接产生具有信号输出功能的mRNA，这一设计后续被用于检测细菌中的抗生素耐药基因 [图3(b)]；Selinidis等^[129]将甲基卤化物转移酶基因拆分至两个接合质粒，分别携带互补的核酶片段，细菌接合过程中，两个质粒转录出的mRNA形成复合物恢复核酶活性，产生可以表达甲基卤化物转移酶的完整mRNA，进而释放出甲基卤化物以报告土壤中细菌的DNA转移 [图3(c)]；Gao等^[122]近期开发的断裂内含子反式剪接 (SENTR) 技术革新了RNA调控策略，该技术基于核酶I型内含子的反式剪接机制，将前体RNA分割为多片段并与分裂内含子序列相连，只有当各片段同时表达时内含子才能重新组装并将分裂前体RNA连接。他们利用这一技术实现了对基因编码区 (CDS)、5'非翻译区 (5'UTR) 及单链向导RNA (sgRNA) 的高效精准剪接，并进一步证实SENTR可响应胞内mRNA动态变化 (mRNA竞争性结合3'RNA阻碍反式剪接发生)，为构建多功能RNA传感平台提供

了新范式，在活细胞RNA互作监测与基因线路调控中展现出应用潜力 [图3(d)]。

然而，目前基于核糖核酸调节子的核酸检测仍主要依赖无细胞体系，全细胞环境下的检测敏感性与特异性亟待提升；同时需改善复杂环境中的工作稳定性（如抗核酸酶降解的能力）并延长传感器活性周期（如优化冻干封装工艺），以满足临床及现场检测需求。

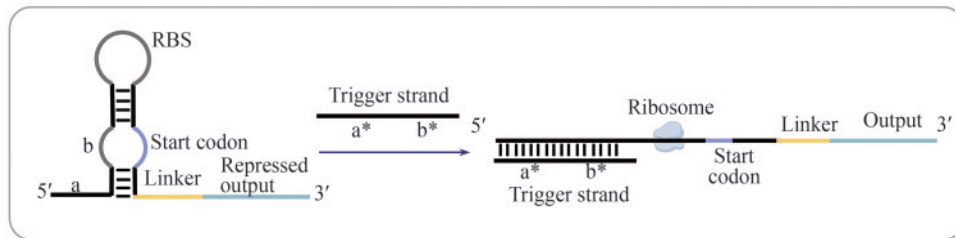
1.5 基于CRISPR/Cas系统的合成生物传感器

成簇的规则间隔短回文重复序列及相关蛋白（CRISPR/Cas）系统源于细菌适应性免疫机制，其精准的序列识别与切割能力不仅革新了基因编辑领域^[134]，也为核酸生物传感器设计提供了创新范式^[135]。SHERLOCK与DETECTR是CRISPR/Cas体外无细胞体系检测的典型代表：分别利用*LwaCas13a*和*LbCas12a*的侧链切割活性实现核酸的高灵敏度检测^[49-50]，此类技术需依赖核酸扩增

（如RT-RPA或RT-PCR）以降低检测限^[136]。在这里主要介绍原核细胞层面的CRISPR/Cas传感，相关策略主要基于以下原理^[135]：

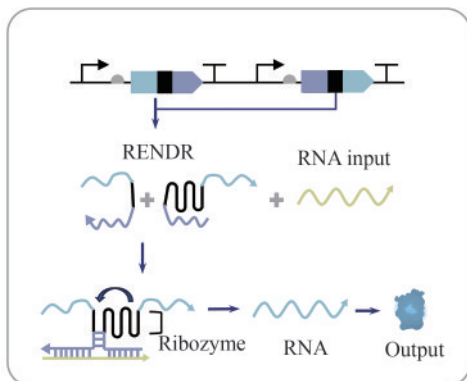
1.5.1 tracrRNA重编程

II型CRISPR/Cas9系统的向导RNA（gRNA）天然包含两个组分，即CRISPR RNA（crRNA）和反式激活CRISPR RNA（tracrRNA），二者可以融合成单链向导RNA（sgRNA）^[137]。crRNA 5'端的间隔序列（spacer）决定其DNA靶向性，而3'端与tracrRNA配对区域的原始序列也被证明是可编程的，因此人为设计的重编程tracrRNA可特异性识别并劫持靶标RNA作为crRNA，随后结合核酸内切酶缺陷型Cas9（dCas9）蛋白靶向特定DNA序列^[17, 138-139]。将这一原理与功能化Cas9变体耦合，可构建多样化生物传感器：例如，Liu等^[17, 140]将dCas9与转录激活因子融合构建了dCas9激活系统，在此基础上通过重编程tracrRNA劫持细菌内源性环境响应基因转录本（含sRNA和mRNA），进而精确定位dCas9激活系统并触发报告基因的表达，



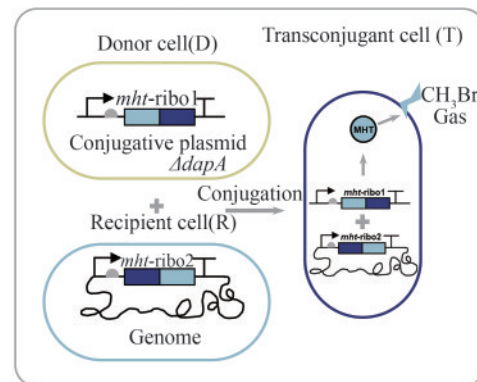
(a) toehold开关信号识别机制^[124]

(a) Mechanism of the toehold switch^[124]



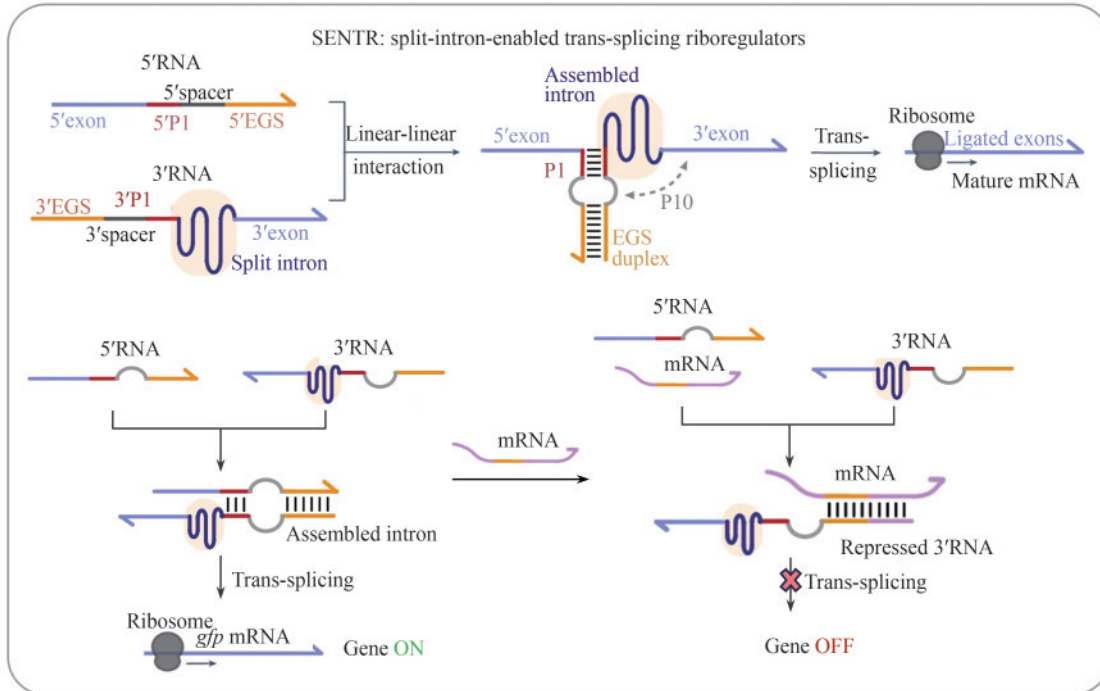
(b) 核酶传感平台RENDER的基因线路示意图^[125]

(b) A ribozyme-based sensing platform RENDR^[125]



(c) 利用分裂核酶报告土壤中细菌DNA转移的基因线路示意图^[129]

(c) Gene circuit of a sensor for reporting bacterial DNA transfer in soil using split ribozymes^[129]



(d) I 型断裂内含子反式剪接系统 SENTER 的信号识别机制以及传感细胞内目标 mRNA 分子的原理示意图^[122]

(d) Mechanism of the group I intron-enabled RNA trans-splicing system SENTER and its application for intracellular mRNA detection^[122]

图 3 基于核糖核酸调节子的合成生物传感器信号识别机制与应用^[122, 124-125, 129]

(RBS—核糖体结合位点; RENDR—核酶介导的 RNA 检测技术; SENTER—分裂内含子介导的反式剪接核糖调控系统)

Fig 3 Mechanisms and applications of riboregulator-enabled synthetic biosensors^[122, 124-125, 129]

(RBS—Ribosome binding site; RENDR—Ribozyme-enabled detection of RNA; SENTER—Split-intron-enabled trans-splicing riboregulators)

可用于监测砷和锌等环境污染物 [图 4(a)]; Jiao 等^[138] 同样基于 *tracrRNA* 重编程方法感应内源 RNA 并结合 Cas9 切口酶 (nCas9) 碱基编辑器实现了对合成 DNA 靶标的精确碱基编辑, 成功记录了单细胞的转录历史。

1.5.2 RNA 诱导的 RNA 加工

在 dCas9 介导的转录抑制系统中, sgRNA 通过其间隔序列 (spacer) 引导 dCas9 结合至靶 DNA 区域, 通过空间位阻效应阻断 RNA 聚合酶或转录因子的结合^[143]。因此, 通过工程化设计 sgRNA 的二级结构, 可实现 RNA 响应型基因调控, 例如 Lee 等^[141] 设计了嵌入反义 RNA (asRNA) 互补序列的工程化 sgRNA, 当靶 asRNA 结合时, sgRNA 二级结构被破坏并经 RNase III 切割, 从而解除 dCas9 对报告基因的抑制 [图 4(b)]。该策略具有高度灵活性和正交性,

但目前仅验证于合成 RNA 检测。

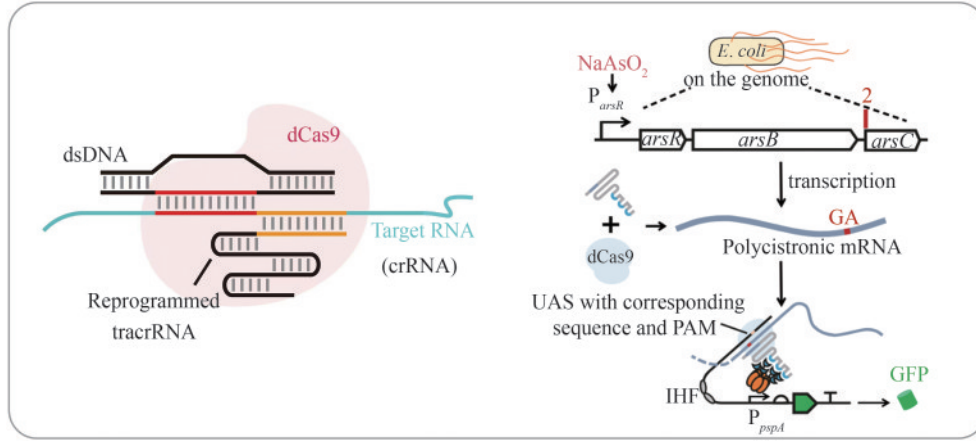
1.5.3 链置换调控

gRNA 的间隔序列若被阻挡或隔离, 则无法结合 DNA 靶标实现 CRISPR/Cas 功能^[137]。基于这一原理, 研究人员可设计工程化 gRNA, 使其间隔序列在无靶标 RNA 时被隔离, 而在靶标 RNA 存在时能够通过链置换重新暴露, 进而恢复功能以实现基因表达调控^[135] [图 4(c)]。典型的例子是结合 toehold 开关的 thgRNA 系统^[142], 能在感应细菌的外源或内源性 RNA 时触发 CRISPR/Cas 干扰功能, 将靶基因的表达抑制 15 倍, 但其本底泄漏问题显著影响传感器的动态范围。

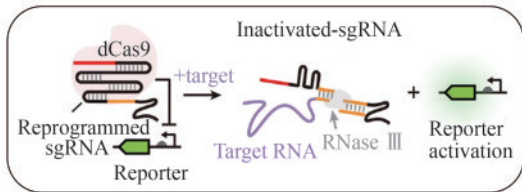
尽管 CRISPR/Cas 传感器展现出优异的可编程性、模块性与丰富的传感功能, 其临床应用仍面临多重挑战: 现有体系多基于合成 RNA 验证, 难以检测内源性 mRNA^[135]; CRISPR/Cas 系统存在脱靶效

应^[144]；体外检测中已得到广泛应用的 *LwaCas13* 等工具^[49, 145]，在胞内应用时可能引发非靶标 RNA 降解甚至细胞毒性，需探索其胞内安全应用策略。

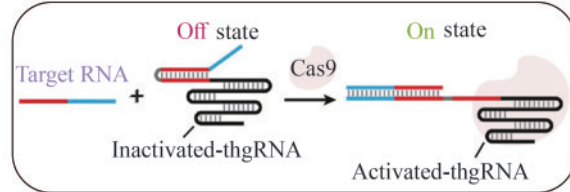
综上，本文总结归纳了五类合成生物传感器的设计原理与最新研究进展，表 2 集中概括了这五类合成生物传感器的信号识别机制与优劣势。



(a) 基于 II 型 CRISPR/Cas 系统重编程 tracrRNA 的细胞内 RNA 传感原理与应用案例^[17]
 (a) RNA sensing enabled by reprogrammed tracrRNA in the type II CRISPR/Cas system^[17]



(b) 基于 RNA 触发 RNA 加工的传感系统^[141]
 (b) RNA sensing enabled by RNA-triggered RNA processing^[141]



(c) 基于链置换反应的 RNA 传感^[142]
 (c) RNA sensing enabled by strand displacement reactions^[142]

图 4 基于 CRISPR/Cas 技术的合成生物传感器信号识别机制^[17, 141-142]

(UAS—上游激活序列；PAM—原间隔序列邻近基序；IHF—整合宿主因子；GFP—绿色荧光蛋白)

Fig. 4 Mechanisms of CRISPR/Cas-enabled synthetic biosensors^[17, 141-142]

(UAS—Upstream activating sequence; PAM—Protospacer adjacent motif; IHF—Integration host factor; GFP—Green fluorescent protein)

表 2 基于基因线路的合成生物传感器不同信号识别机制与优劣势

Table 2 Advantages and limitations of genetic circuit-enabled synthetic biosensors based on different signal recognition mechanisms

信号识别机制	优势	劣势
变构转录因子	信号识别元件和工程化优化改造手段丰富，调控机制简单，可监测胞内代谢物	细胞代谢负担大，响应速度慢，天然元件性能低下依赖人工优化
原核生物双组分系统	检测信号广谱，可响应细胞外环境	工程化改造困难，信号传导依赖胞内环境，元件串扰大特异性较低，宿主兼容性差
核糖开关	可编程性高，细胞代谢负担低，响应快速，特异性强	受胞内环境干扰较大，开关比率低，优化手段较少，检测靶标类型有限
核糖核酸调节子	可编程性与正交性高，跨体系适配性优异，设计与优化便捷，响应快速，细胞代谢负担低	全细胞环境中敏感性、稳定性低，检测靶标单一
CRISPR/Cas 系统	可编程性与正交性高，特异性高，传感功能丰富	泄漏水平较高，检测内源 mRNA 案例少，存在脱靶效应与细胞毒性

2 合成生物传感器的功能扩展模块与应用

2.1 生物信号记忆模块

传统生物传感器仅依赖传感与输出模块实现靶标检测，而引入具有记忆功能的信号处理模块可实现环境信号的持续记录^[146]，为复杂环境（如临床诊断场景）的滞后监测提供了工具^[147]。目前，合成生物学家已开发出多种具有记忆功能的元器件，并广泛应用于合成生物传感器中^[7]。

拨动开关（toggle switch）作为最早的可逆记忆元器件^[148]，通过两个相互抑制的转录因子（TR1/TR2）实现双稳态调控^[149] [图5(a)]。瞬时诱导可触发状态转换并维持稳定，直至反向诱导发生。这种二元状态特性可将连续输入信号转换为数字输出，显著提升传感器的鲁棒性与决策能力。例如，Zou等^[47]通过设计拨动开关，实现了粪便和尿液中血液标志物的超灵敏检测；Mannan等^[63]通过设计FadR-TetR正反馈回路构建了不可逆代谢开关，仅需单次诱导即可调控菌株从对数生长期向产物生产期转变。

位点特异性重组酶系统通过精准识别DNA重组元件的特征性识别位点并催化DNA的精准剪切和倒置反应，实现遗传信息的稳定记录^[153]。其记忆功能可通过两种方式实现：当识别位点正向排列时，重组酶在位点之间进行切除；当识别位点反向排列时，重组酶使位点间基因倒位^[154]。只要识别位点间的DNA是功能性生物元件，以上方式均可实现记忆元器件的功能^[155]。Zhu等^[150]利用重组酶int8构建了肠道炎症标志物响应型基因线路，感知炎症信号后可触发*sfgfp*基因倒位改变输出水平，实现肠道炎症的长期记录 [图5(b)]；Abedi等^[156]开发了超声热控重组酶系统，通过Bxb1介导的*attP/attB*位点倒位实现肿瘤治疗基因的不可逆激活。此外，利用整合酶-切除酶系统可构建可逆的记忆系统，实现信息的重复写入与擦除^[155]。

生物振荡是指生物体内某些生物分子或细胞活动随时间呈现周期性变化的现象^[157]，属于一种动态生物记忆模块，负反馈回路是其不可或缺的基础条件。生物制造领域，Guo等^[158]在大肠杆菌中构建了

基于人工代谢途径（SCTPK）的振荡系统提高了乙酰辅酶A的产率。SCTPK途径能够产生乙酰辅酶A的前体乙酰磷酸，当乙酰磷酸浓度较低时SCTPK途径将得到加强，使乙酰磷酸浓度升高并抑制SCTPK途径，促进产物乙酰辅酶A下游合成基因的表达。随后乙酰磷酸浓度将降低并强化SCTPK途径，从而构成负反馈线路以及周期振荡。疾病治疗领域，Din等^[159]通过群体层面的振荡线路维持细菌密度在可控水平，同时周期性同步化地释放药物，从而提高了细菌肿瘤疗法的安全有效性。

CRISPR/Cas系统不仅可用于基因编辑，其天然免疫记忆功能也为生物记忆模块设计提供了新思路。CRISPR/Cas介导的模拟多事件记录装置（CAMERA）通过选择性切割记录质粒以改变特定质粒的比例，或直接编辑质粒DNA序列实现了对抗生素、光照等众多刺激信号的记录^[151] [图5(c)]；Cooper等^[152]开发的CRISPR/Cas区分水平基因转移（CATCH）策略将CRISPR/Cas系统与水平基因转移（HGT）机制结合，样品中具有野生型序列的片段将被I-F CRISPR/Cas效应复合物Cascade识别并降解，而具有特定突变的肿瘤DNA可避免这种降解并被整合进入基因组，以去除对下游报告基因的抑制从而记录肿瘤信息 [图5(d)]；Zou等^[54]设计的记录和翻译激活（RAT）系统基于第二代碱基编辑器（BE2），当肠炎标志物硫代硫酸盐存在时，ACG被编辑为起始密码子ATG，从而激活靶蛋白翻译，实现肠炎信号的特异性记忆。除上述模块外，还有一些新颖的传感记忆机制，例如近期Kalvapalle等^[160]报道的RNA地址化修饰（RAM）技术，该技术基于由剪切核酶催化核心和特异性RNA识别区组成的合成RNA（cat-RNA），当细菌获取携带cat-RNA基因的质粒时，一个RNA条形码序列被拼接到细胞rRNA上，在微生物群落中实现基因转移的自动传感记录。这些记忆模块通过稳定记录环境信号变化，为复杂生物传感与诊断提供了强大的信息存储与检索能力，扩展了合成生物学传感器的应用范围。

2.2 多层次生物计算模块

传统生物传感器多采用单一线路检测单一靶标，难以应对复杂环境的多参数监测需求。基于合

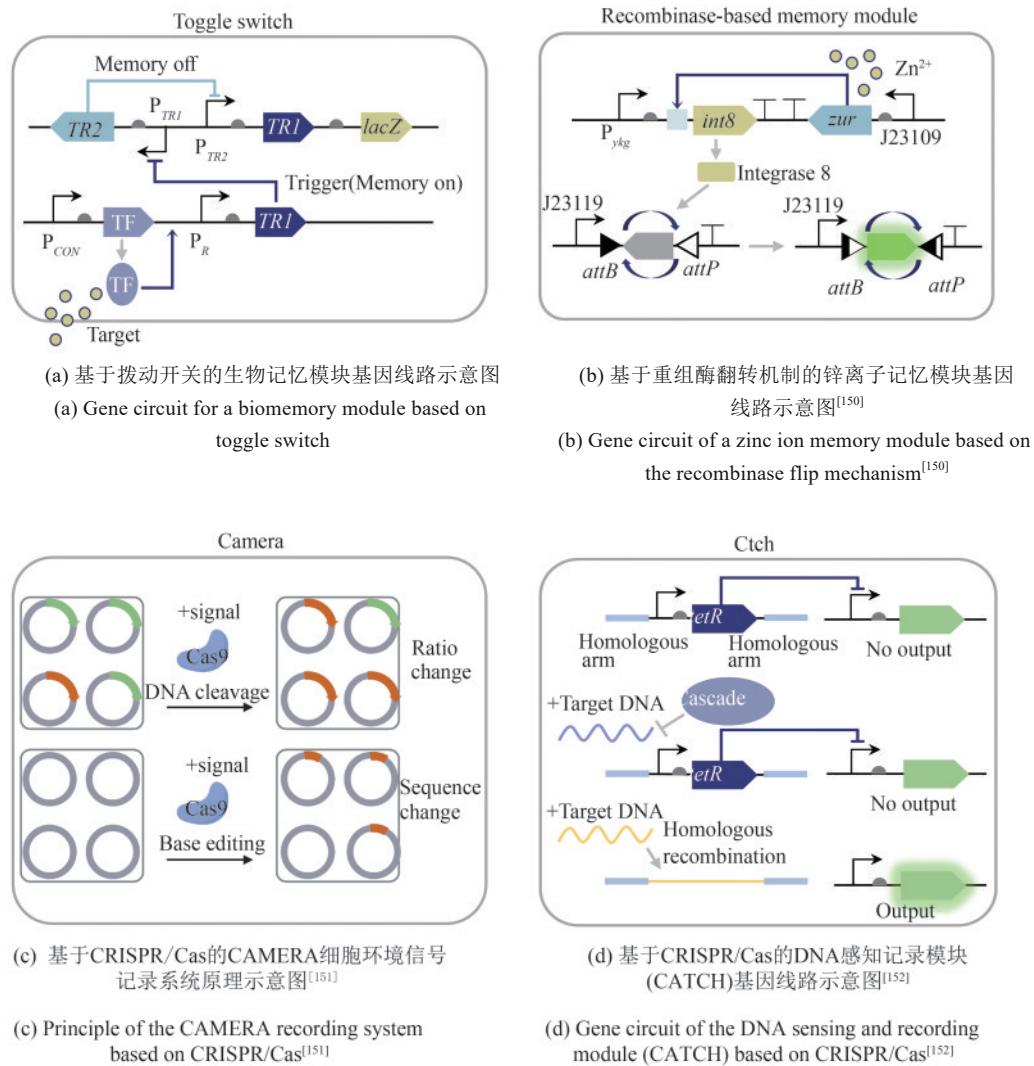


图5 典型合成生物传感信号记忆模块的设计原理^[150-152]

(TF—转录因子; TR—转录抑制因子)

Fig. 5 Typical biomemory modules for recording biosensing signals^[150-152]

(TF—Transcriptional factor; TR—Transcriptional repressor)

成生物学工程化理念, 通过标准化、模块化基因线路逻辑门(如OR、AND、NOT、NAND、NOR等)的层级化设计^[20], 可实现多输入信号的整合处理与选择性输出, 显著提升环境感知与信号分辨能力^[161]。

在环境监测领域, Wang等^[21]构建了基于AND逻辑门的多参数传感器, 通过整合天然双组分信号传导系统与合成细胞间通讯模块, 实现了砷、汞、铜离子的同步检测; Wan等^[32]开发的级联信号放大系统通过设计多层次级联放大器模块显著提升了砷、汞离子传感器的检测灵敏度(检测限小于0.1 μg/L、

0.01 μg/L)。在医学诊断方面, Chien等^[162]通过AND逻辑门耦合缺氧与乳酸传感器, 使工程菌的肿瘤靶向特异性提升; Woo等^[104]开发的硫代硫酸盐-硝酸盐双输入AND门传感器, 通过同时识别两种炎症标志物, 显著提高了肠炎诊断的特异性[图6(a)]。在生物制造领域, Moser等^[163]设计的多输入组合逻辑基因线路可同时监测细胞内葡萄糖、氧气及乙酸盐的浓度, 为代谢过程的精准调控提供了新工具[图6(b)]。这些案例展示了基因线路计算模块在复杂生物传感中的巨大潜力, 为开发智能传感系统提供了技术支撑。

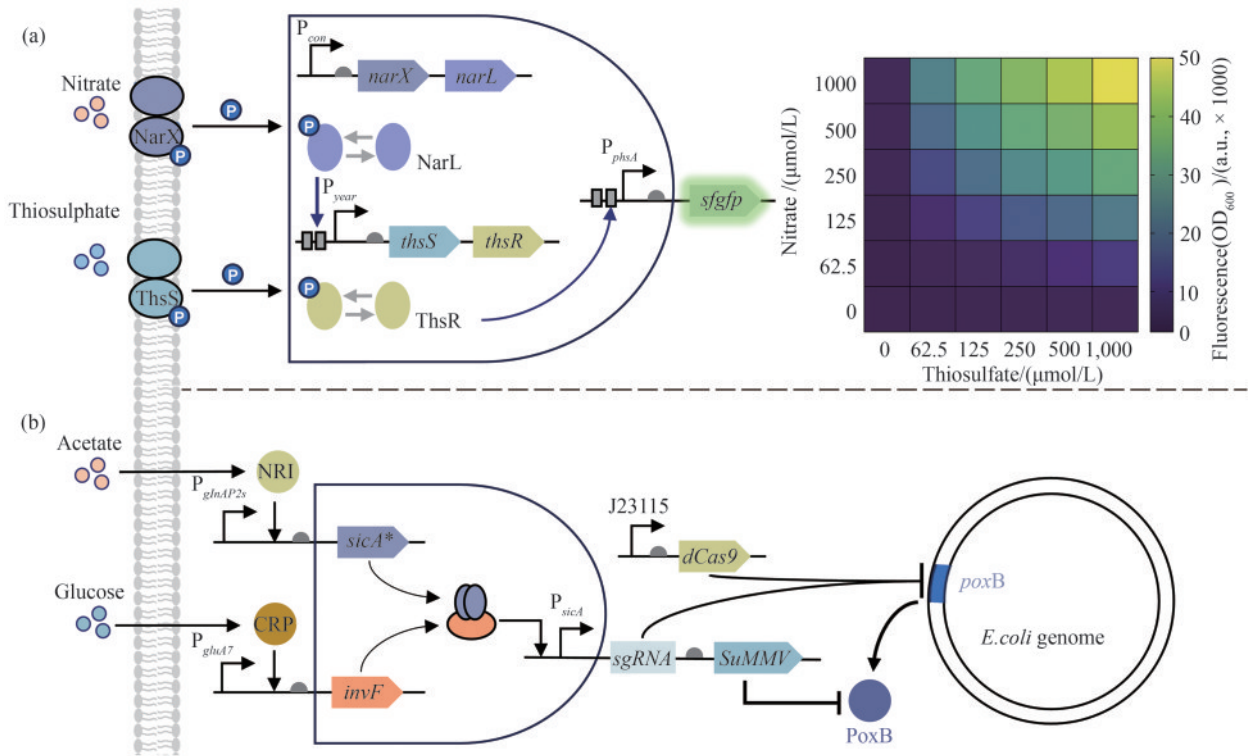


图6 基于多层次生物计算模块的生物传感基因线路设计与应用^[104, 163]

(a) 基于AND逻辑门构建的双输入生物传感器基因线路示意图及其响应热图^[104]; (b) 整合多靶标输入的代谢调控传感器基因线路示意图^[163]

Fig. 6 Circuit designs and applications of multilayered biocomputing modules^[104, 163]

(a) Gene circuit of a dual-parameter biosensor based on an AND logic gate and its response heatmap^[104]; (b) Gene circuit of a metabolic control sensor integrating a multi-input genetic logic circuit^[163]

2.3 与多种检测平台耦合的多模态输出模块

传统合成生物传感器多依赖荧光报告基因作为信号输出模块，但其现场应用常受限于专业荧光检测设备的配置要求。为突破这一应用瓶颈，合成生物学界已开发出多种可替代的标准化信号输出系统，主要技术路径可分为以下四类：

①生物-电信号转换系统：Atkinson等^[6]通过交叉结合合成生物学与材料工程，构建了基于电化学信号输出的生物传感器。该团队在大肠杆菌中编程构建了模块化的八组分合成电子传递链，使其在接触硫代硫酸盐等环境污染物后快速产生电极可检测的电流响应，为环境监测提供了快速响应的实时监测方案。

②比色传感系统：基于显色反应的可视化传感系统显著提升了现场检测便捷性，例如通过显色蛋白或酶催化显色反应实现肉眼可辨的信号输出^[44, 164-165]。

③空间图案传感系统：Wan等^[32]通过琼脂糖水凝胶包埋和微流控封装技术设计了便于解读的神离子传感阵列，其图案化的显色模式可通过便携设备快速解读[图7(a)]；Doshi等^[36]开发的细菌群体运动传感系统，通过环境信号调控鞭毛基因表达，诱导细菌形成特征性空间运动图案，为污染物检测提供了新型可视化策略[图7(b)]。

④光-电信号转换系统：在光信号转换领域，Mimee等^[166]开发的无线胶囊系统可将血红素诱导的荧光信号转换为射频信号，成功应用于猪模型消化道出血的精准诊断；进一步，Inda-Webb等^[48]将工程化益生菌传感器与光电芯片耦合成小于 1.4 cm^3 的微型胶囊，该胶囊可以将细菌的生物光信号转化为无线电信号，从而实现了胃肠道炎症分子的原位监测[图7(c)]。这些多模态输出技术通过降低设备依赖性与操作复杂度，显著推动了生物传感器的现场化应用进程。

3 基于基因线路的合成生物传感器关键特征和优化方法

与实现类似功能的电子或化学传感器相比，许多早期生物传感器的性能在现场应用中缺乏竞争力^[167]。近年来随着合成生物学的发展，众多全新的工具和策略为改进合成生物传感器的性能提供了助力（图8）。其性能可通过响应曲线进行系统评估 [图8(a)]，核心评价参数包括：

① 动态范围（dynamic range）：指信号增加的幅度与最小本底输出信号强度之比。

② 检测限（limit of detection, LOD）：指可触发显著输出信号的最低靶标浓度。

③ 泄漏（leaky expression）：反映无靶标存在时报告系统的本底噪声水平。

④ 工作范围（operating range）：界定输出信

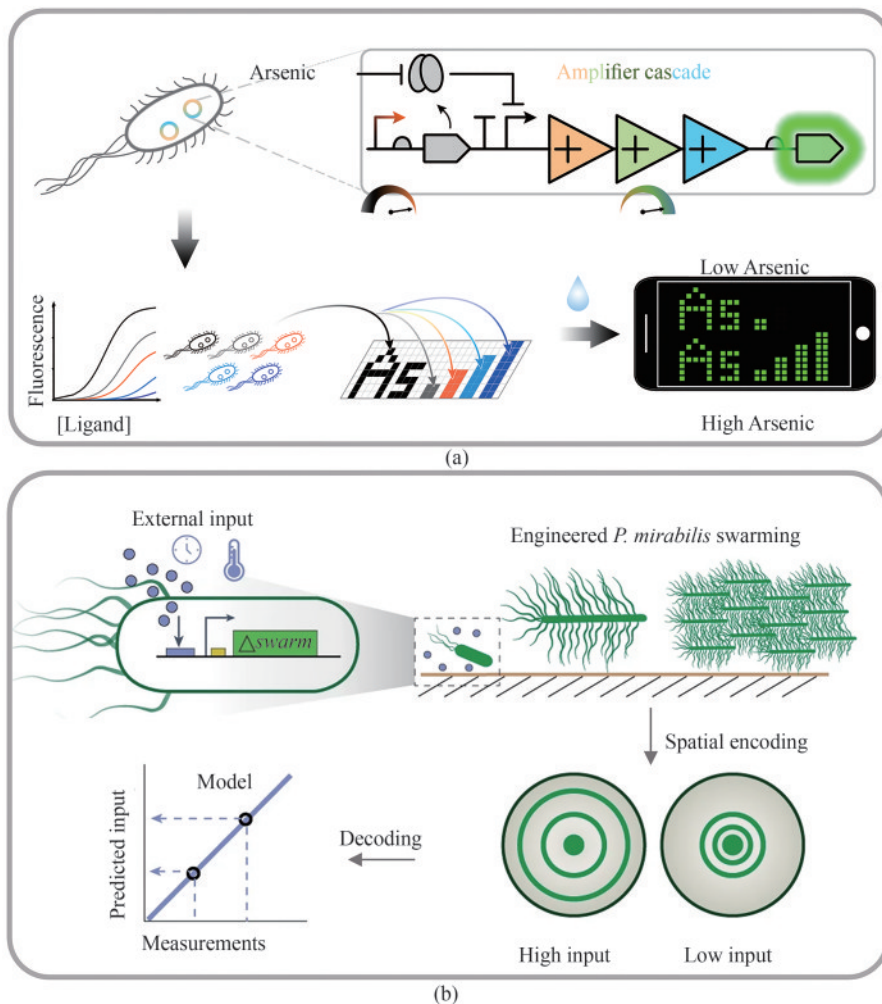
号与靶标浓度呈线性响应的检测窗口。

⑤ 半最大激活效应浓度（ K_M ）：信号增加幅度达到最大增幅一半时的靶标浓度。

然而，目前基于基因线路的合成生物传感器仍在敏感性（Sensitivity）、稳定性（Stability）、报告速度（Speed）、特异性（Specificity）和生物安全性（BioSafety）方面存在局限性，我们将它们称为合成生物传感器设计与优化的“5S”关键指标，以下将分别介绍每个指标的新兴优化方法。

3.1 敏感性（Sensitivity）优化

由于新型传感器常敏感性不足难以满足检测需求^[168]，人们结合生物识别元件工程化改造、转录调控网络重构、翻译效率优化及放大模块整合等技术手段，实现传感器响应曲线的精准调控。这类多参数协同优化策略为开发高敏感性生



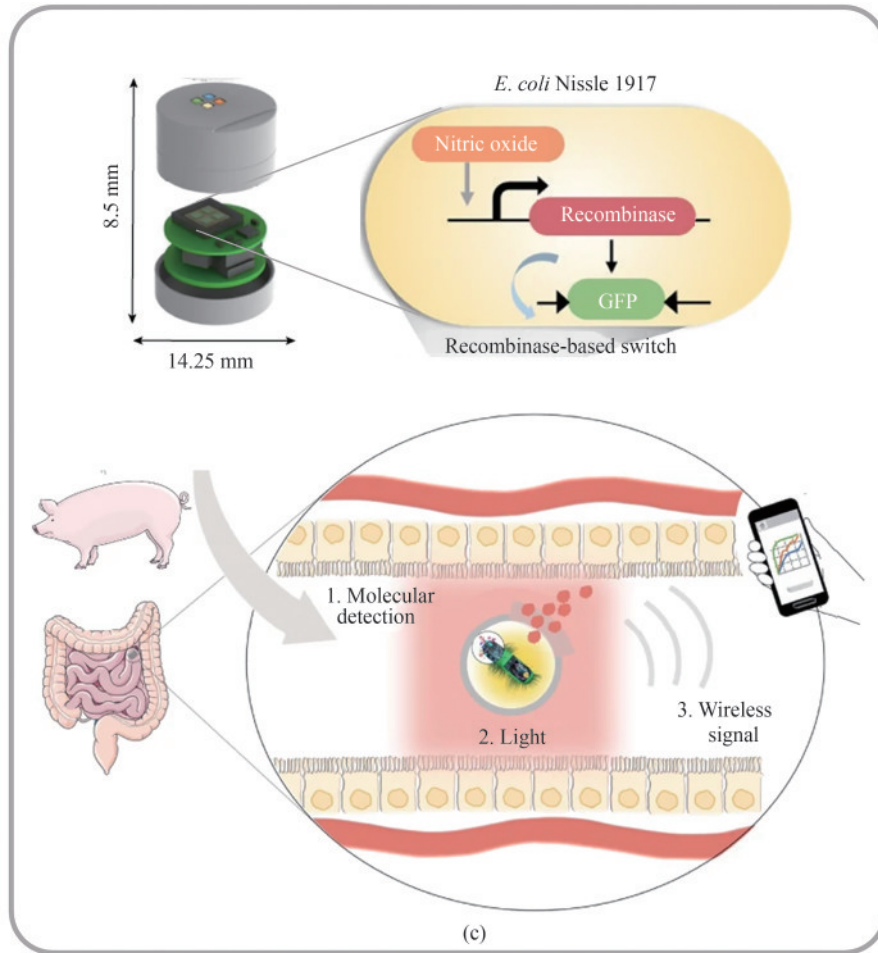


图7 与多种检测平台耦合的多模态输出合成生物传感系统设计^[32, 36, 48]

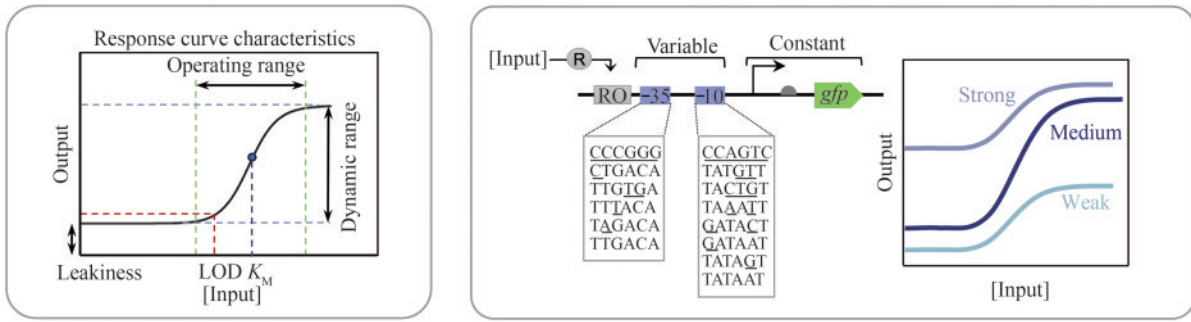
(a) 琼脂糖水凝胶封装砷离子传感器阵列，实现砷污染检测智能手机平台可视化阵列显示^[32]；(b) 通过细菌空间运动图案实现生物传感信号的可视化输出^[36]；(c) 荧光传感器与光电芯片耦合，将光信号转为无线信号输出^[48]

Fig. 7 Synthetic biosensing systems with multimodal outputs for integration with various detection platforms^[32, 36, 48]

(a) A agarose hydrogel-encapsulated arsenic ion sensor for visual array display on a smartphone platform^[32]; (b) A sensor that visualizes biosensing signals through the formation of bacterial spatial motility patterns^[36]; (c) A sensing system coupling a fluorescent sensor with a photoelectric chip to convert optical signals into wireless signals^[48]

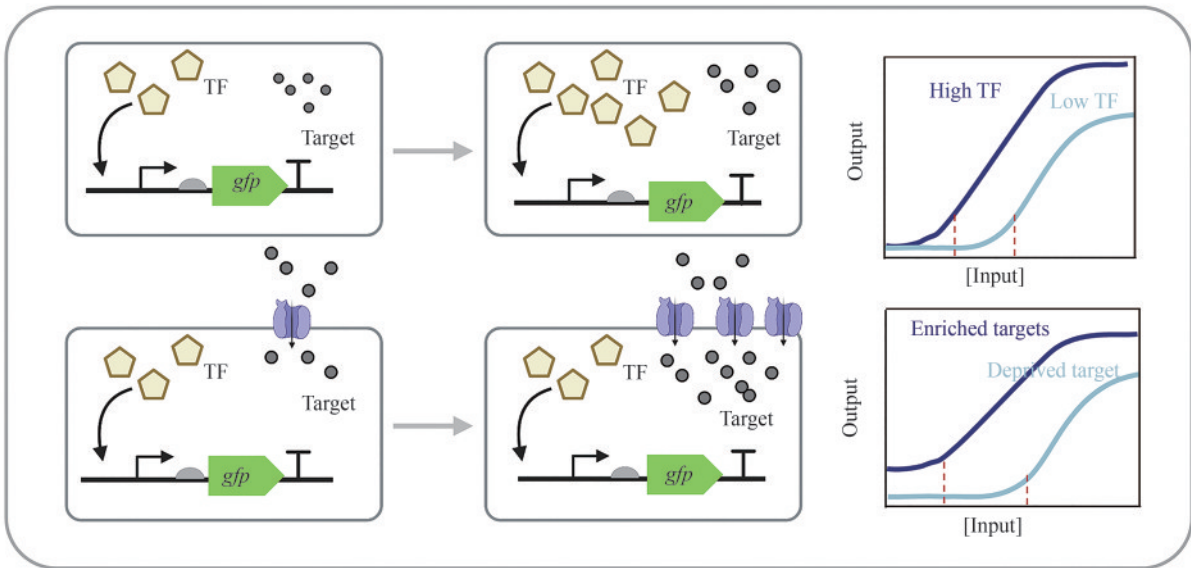
物传感器提供了系统性解决方案^[1]。其中，生物识别元件工程化改造是一种具有普适性的敏感性优化方案，可分为定向进化和理性设计两大方向。定向进化技术通过构建突变体文库并进行高通量筛选提升生物识别元件性能^[66]。典型案例包括：Meyer等^[169]通过定向进化技术优化构建了集成12种小分子传感模块的大肠杆菌“Marionette”工程菌株，显著提升了传感器的动态范围和生物制造过程动态调控能力；用于核糖开关筛选的SELEX技术基于体外合成的随机寡核苷酸文库，通过多轮筛选和扩增逐步富集与靶物质结合能力强的核酸序列，可筛选对特定靶标具有高敏感性的核糖

开关^[115-116]。针对定向进化存在的迭代周期长、筛选通量受限等瓶颈，近年发展出基于结构生物学的理性设计方法^[170-171]，例如Kasey等^[172]针对MphR转录因子的大环内酯结合域进行了结构-功能协同设计，构建了结合口袋空间中五个关键氨基酸位点的饱和突变文库，筛选获得了对克拉霉素等药物的结合亲和力提升、检测限降低的突变体；Pu等^[62]整合分子动力学模拟与定点饱和突变等技术对LysG转录因子进行半理性功能重塑，开发出动态范围拓宽约3.84倍的L-赖氨酸生物传感器，成功应用于谷氨酸棒状杆菌的代谢通量实时监控。除此整体优化方案外，合成生物学界针对



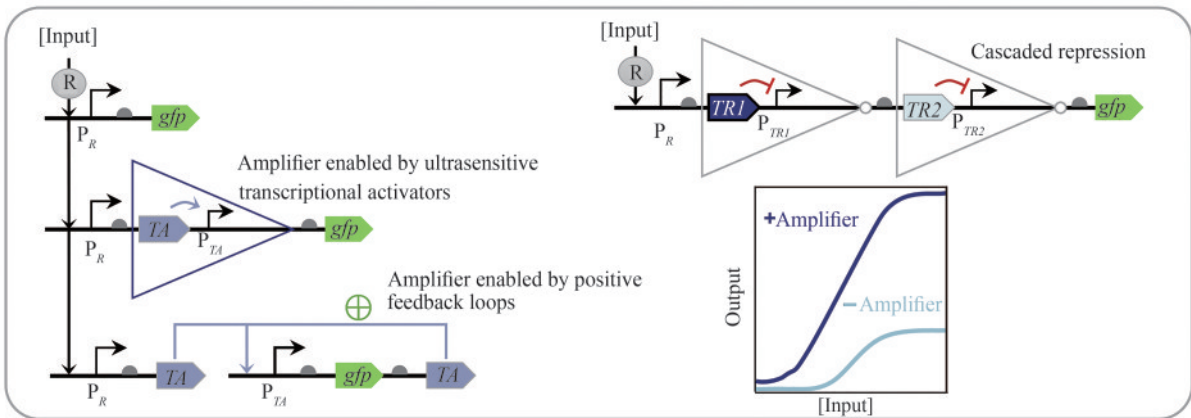
(a) 基于基因线路的合成生物传感器的典型响应曲线和特征
(a) Typical response curves and characteristics of genetic circuit-enabled synthetic biosensors

(b) 基于启动子工程的动态范围优化机制
(b) Dynamic range optimization based on promoter engineering



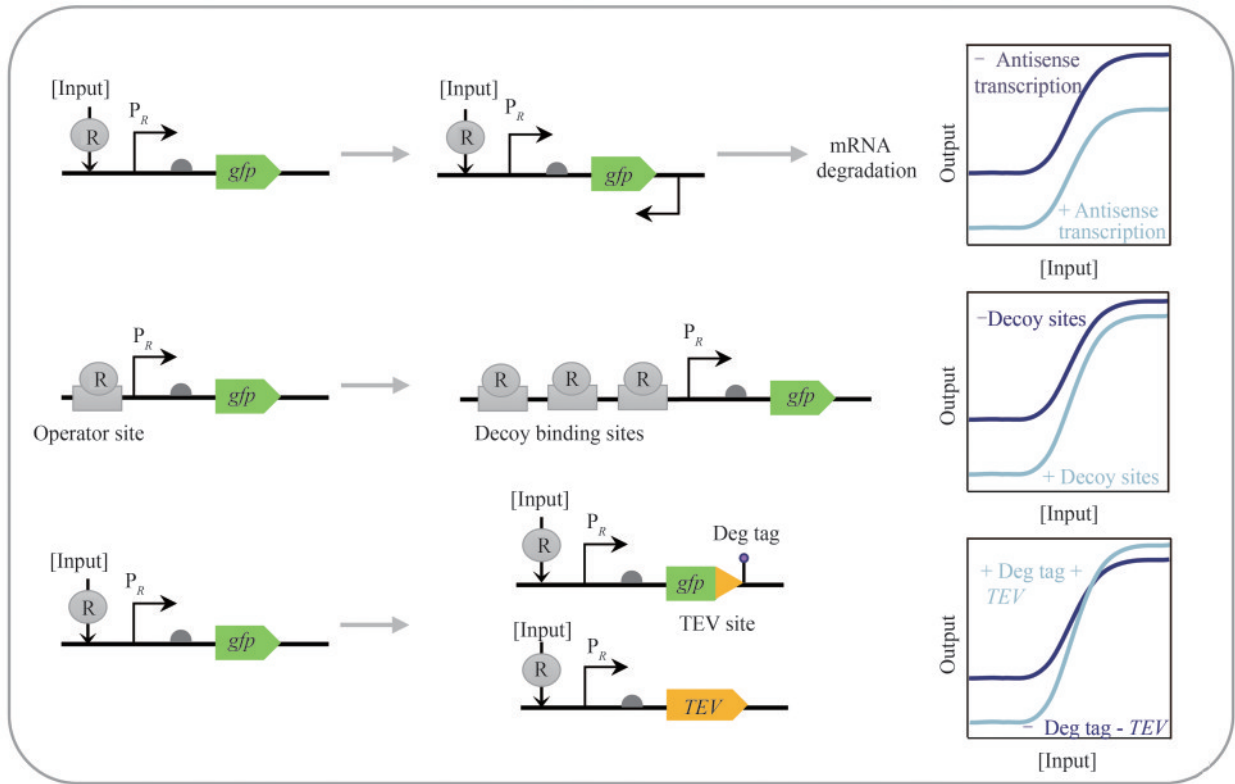
(c) 通过生物识别元件浓度梯度调节与靶标富集技术降低检测限

(c) Limit of detection optimization by gradient regulation of biorecognition components concentration and target enrichment technology



(d) 利用基于激活转录因子、正反馈回路和双抑制因子的传感信号放大器优化动态范围^[7]

(d) Dynamic range optimization using sensing signal amplifiers based on activator transcription factors, positive feedback loops and cascade repressors^[7]



(e) 利用反义RNA转录介导的翻译阻断、诱饵DNA结合位点竞争性抑制、引入输出蛋白降解标签减少传感器泄漏^[1]
 (e) Leakage optimization utilizing antisense RNA-mediated translation blocking, decoy DNA binding site competitive inhibition, and output protein degradation tags^[1]

图8 合成生物传感器的敏感性优化策略^[1, 7]

(R—调控因子; OR—调控因子操纵位点; TF—转录因子; TA—转录激活因子; TR—转录抑制因子)

Fig. 8 Strategies for increasing the sensitivity of genetic circuit-enabled synthetic biosensors^[1, 7]

(R—regulator; OR—operator site for regulator; TF—transcriptional factor; TA—transcriptional activator; TR—transcriptional repressor)

反映生物传感器敏感性的不同响应曲线参数已经开发出了众多具体优化策略。

3.1.1 半最大激活效应浓度与检测限优化策略

半最大激活效应浓度 (K_M) 是最直观反映生物传感器敏感性的指标, 与敏感度呈负相关, Landry 等^[173] 通过引入磷酸酶的突变增加其磷酸化活性, 显著降低了双组分系统传感器的 K_M , 提高了检测敏感性; Wan 等^[32] 设计级联放大基因线路降低了传感器的 K_M , 实现了砷离子和汞离子的超灵敏检测。此外, 敏感性也与生物传感器的检测限密切相关。相关优化可通过调控生物识别元件的浓度、提高局部靶标富集程度及优化报告系统等方式实现 [图8(c)]。Wang 等^[174] 通过调控细胞内转录因子浓度例如降低阻遏型转录因子 (如 TetR、ArsR) 的胞内浓度或提升激活型转录因子 (如 LuxR) 的表达水平, 显著降低全细胞生物传感器的 LOD 并拓宽动态

范围。该策略已成功应用于砷离子、汞离子传感器等多类系统, 成为响应曲线优化的经典范式。在靶标富集方面, 一般可通过以下策略提高靶标浓度: 对于检测化学小分子的全细胞传感器, 可通过强化细胞膜上的内转运系统或弱化外排系统来提升胞内靶标浓度^[175] [图8(c)]; 对于可执行核酸检测的无细胞传感器可采用核酸扩增技术 (如滚环扩增 RCA^[176]、聚合酶链回收 (PSR)^[71] 和 crRNA 竞争性反应^[177]) 提高反应体系中待检测靶标的浓度, 从而显著降低 LOD 和半最大激活效应浓度。值得注意的是, 报告基因对 LOD 具有重要影响。Lopreside 等^[178] 使用全细胞和无细胞表达体系评估了三类报告基因 (荧光、比色、生物发光) 中的八种报告器的性能, 结果显示: 全细胞体系中生物发光报告基因 (如 NanoLuc) 具有更快的响应速度 (≤ 30 min) 和检测敏感性 (pmol/L 级); 无细胞体系中 deGFP

与NanoLuc则具有更低的LOD (nmol/L级)。

3.1.2 动态范围优化策略

较大的动态范围是实现生物传感器可靠灵敏、检测的关键，其优化核心在于最小化本底泄漏并最大化信号增加幅度。当前主要优化策略包括：

(1) 启动子工程优化

RNA聚合酶亲和力与转录因子调控效力的平衡是动态范围调控的核心参数：强启动子易引发高本底泄漏，但激活态信号增幅有限；弱启动子虽可降低本底噪声，但最大输出强度显著受限[图8(b)]。Chen等^[179]系统比对了ArsR结合位点序列与RNA聚合酶结合位点库，确定了最佳启动子模型，经过优化成功开发出具有低泄漏与高动态范围(183.52倍)的新型启动子，该设计显著提升了砷离子荧光与比色传感器的性能指标。此外，基于启动子构效关系的高通量筛选技术为动态范围优化提供了新范式：例如另一研究组通过构建包含不同保守区域序列的启动子文库，建立了动态范围量化评估体系^[180]。利用该体系筛选获得的高性能启动子元件已被成功应用于复杂基因线路构建，验证了“设计-构建-测试-学习”(DBTL)循环在生物传感器启动子优化中的有效性。这种模块化设计策略不仅提升了单参数性能，更为多层次联系统的精准调控奠定了基础。

(2) 核糖体结合位点(RBS)工程优化

RBS作为调控翻译起始效率的核心元件，其强度直接影响动态范围的优化平衡：高翻译速率在提升最大表达量的同时加剧本底泄漏，而低翻译速率虽抑制泄漏但限制输出上限。通过理性设计RBS-启动子组合，可实现翻译效率与动态范围的协同优化。Gao等^[58]通过系统优化L-半胱氨酸生物传感器的RBS-启动子组合，显著提升了动态范围与敏感性，并据此建立了高通量筛选平台，成功应用于L-半胱氨酸合成途径关键酶的定向进化及高产菌株筛选；Ding等^[14]采用组合筛选策略，得出启动子J23106与Mlc转录因子的天然RBS偶联能够最大化葡萄糖传感器GURB的动态范围。然而生物元件在跨系统移植时易出现性能衰减及模块间正交性降低等问题。因此，Buson等^[19]开发的在线基因元件库BiopartsDB (<https://wanglab.net/biopartsdb/>)整合了经实验验证的启动

子、RBS及终止子等标准化元件，为合成生物学家提供模块化元件选择平台。该资源库的开放共享显著加速了生物传感器优化进程，为元件性能的跨系统适配性评估提供数据支撑。

(3) 基于基因信号放大器及其他优化策略的传感信号增强

基因信号放大技术通过重构基因线路的调控层级，显著提升生物传感器的检测性能。目前主要策略包括利用激活转录因子、正反馈回路和双抑制因子实现信号放大^[7] [图8(d)]。例如，Wang等^[181]利用hrpRS和hrpV转录因子构建了模块化、增益可调的传感信号放大器提高了传感器动态范围；Wan等^[32]设计了级联放大基因线路，相比于单一放大器进一步将动态范围提升；Liu等^[182]利用铜离子激活型CusSR双组分系统诱导T7 RNA聚合酶(T7 RNAP)表达，最终驱动T7启动子控制的目的基因高效转录，该系统不仅能实现输入信号的指数级放大，还可作为记忆模块维持基因持续表达。此外如本文3.1.1部分所述，核酸扩增技术是无细胞领域内重要的信号放大手段，例如Li等^[71]开发了聚合酶链回收(PSR)技术，利用T7 RNA聚合酶的脱靶转录特性，在无细胞体系中建立了核酸信号循环放大回路。该技术使四环素和锌离子传感器的检测限分别降低至0.025 μmol/L和0.1 μmol/L，动态范围扩展达17~20倍，为传感器信号放大设计提供了新思路。然而，信号放大过程中存在本底噪声协同放大的问题，为克服这一弊端，研究者提出系列优化策略：Son等^[183]开发了基因拷贝数动态调控ADEPT系统，能够通过带有负反馈机制的CRISPR/Cas9质粒消除系统将基因表达泄漏降低，同时通过F型接合转移和抗生素选择机制快速提升携带质粒细菌的比例从而放大信号，在提高传感器动态范围方面前景广阔；翻译后修饰是另一种有效方法，例如在输出蛋白中引入降解标签，并通过诱导表达同源蛋白酶构建自调控回路，该设计使基础表达量显著降低，同时维持最大输出强度^[32] [图8(e)]。

3.1.3 泄漏表达优化策略

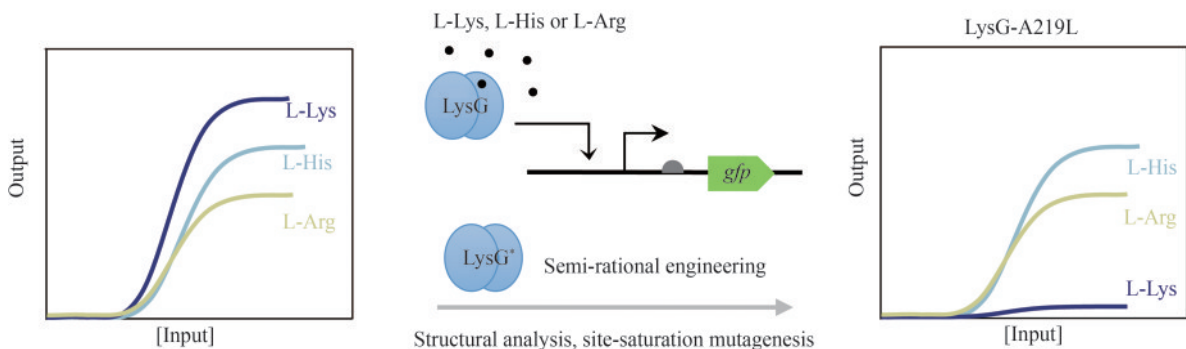
合成生物传感器的本底泄漏抑制是提升检测敏感性的关键环节，当前研究通过分子互作机制与基

因线路拓扑重构等路径实现泄漏的精准调控。在分子调控层面，融合降解标签^[44]并诱导表达特异性蛋白酶可靶向降低本底蛋白表达^[32]，而反向启动子介导的反义RNA转录能通过阻碍核糖体结合或触发RNA降解通路实现翻译级泄漏抑制^[184] [图8(e)]。Ho等^[185]将分裂内含肽与拆分的目标蛋白分别偶联，并用两个独立启动子控制，使得单一启动子泄漏不足以产生活性蛋白，这种基于AND逻辑的策略成功降低了目标蛋白泄漏表达，在传感器泄漏优化方面有着应用潜力。本文1.4部分提及的断裂内含子反式剪接 (SENTR) 技术^[122]同样有望通过类似策略降低传感器泄漏。在线路设计层面，Wan等^[186]通过引入多拷贝的转录因子结合位点作为诱饵 (DNA海绵^[187]) 竞争性捕获游离转录因子，使大肠杆菌报告系统泄漏表达降低至原来的1/20，动态范围提高70倍，同时降低宿主细胞毒性；结合位点空间排布的优化 (如调整其与转录起始位点间距^[180, 188]或在下游增设额外结合位点^[189]) 也可从转录层面有效降低泄漏表达 [图8(e)]。此外，通过正交调控模块的协同级联调控可实现泄漏的精准控制，如Greco等^[190]开发的多级控制器 (MLC) 在转录因子与翻译调节因子同时激活时才能启动报告基因表达，使泄漏水平较传统系统明显降低，动态范围提高1 000倍以上。

3.2 特异性 (Specificity) 优化

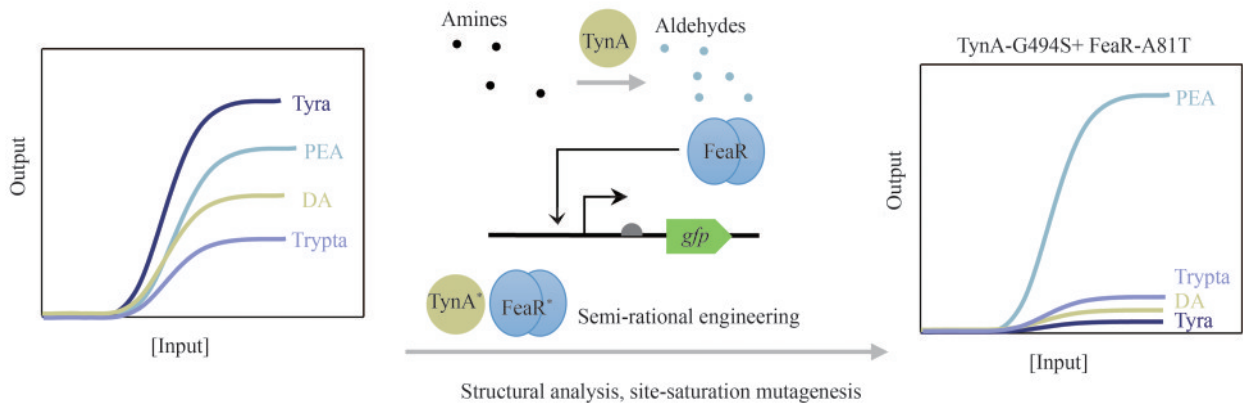
部分天然感知元件存在靶标非特异性，其非

特异性识别机制可能导致检测信号失真。针对该局限性，研究者已建立多维度优化策略：在生物识别元件改造层面，定向进化与高通量筛选技术展现出显著优势。Corte等^[191]通过半理性设计策略对LysG转录因子进行功能重编程，在消除其L-赖氨酸结合能力的同时保留对L-组氨酸和L-精氨酸的特异性识别，成功构建了高选择性L-组氨酸生物传感器 [图9(a)]；Rottinghaus等^[192]按照相似的思路对原本交叉响应多种配体的TyrR转录因子以及TynA-FeaR传感系统进行工程化改造，他们结合蛋白结构分析，理性选择关键结合残基附近的氨基酸位点进行突变，产生了分别特异性检测多巴胺 (DA)、苯乙胺 (PEA)、酪胺 (Tyra) 和色胺 (Trypta) 的突变体 [图9(b)]；Nishikawa等^[81]开发的Sensor-seq平台创新性地实现了转录因子结合域的系统性突变文库构建与配体特异性筛选流程集成，加速了转录因子的高通量特异性优化。在核糖开关领域，Bose等^[193]通过定点突变c-di-GMP核糖开关配体结合口袋的两个关键碱基，引入新型氢键网络使配体结合特异性提升超过10倍。除上述方法外，基因线路工程为提升生物传感器特异性提供了系统生物学解决方案^[26]，Wang等^[21]创新性地将ZraR (响应Zn²⁺/Pb²⁺) 与ZntR (响应Zn²⁺/Cd²⁺) 两种广谱金属感应元件偶联构建AND逻辑门，虽然二者均存在交叉响应，但这种逻辑整合实现了传感器对Zn²⁺的特异性识别 [图9(c)]。此外，基于HrpRS调控系统^[194]、分裂型T7 RNA聚合酶^[195]及重组酶级联^[147]的正交逻辑



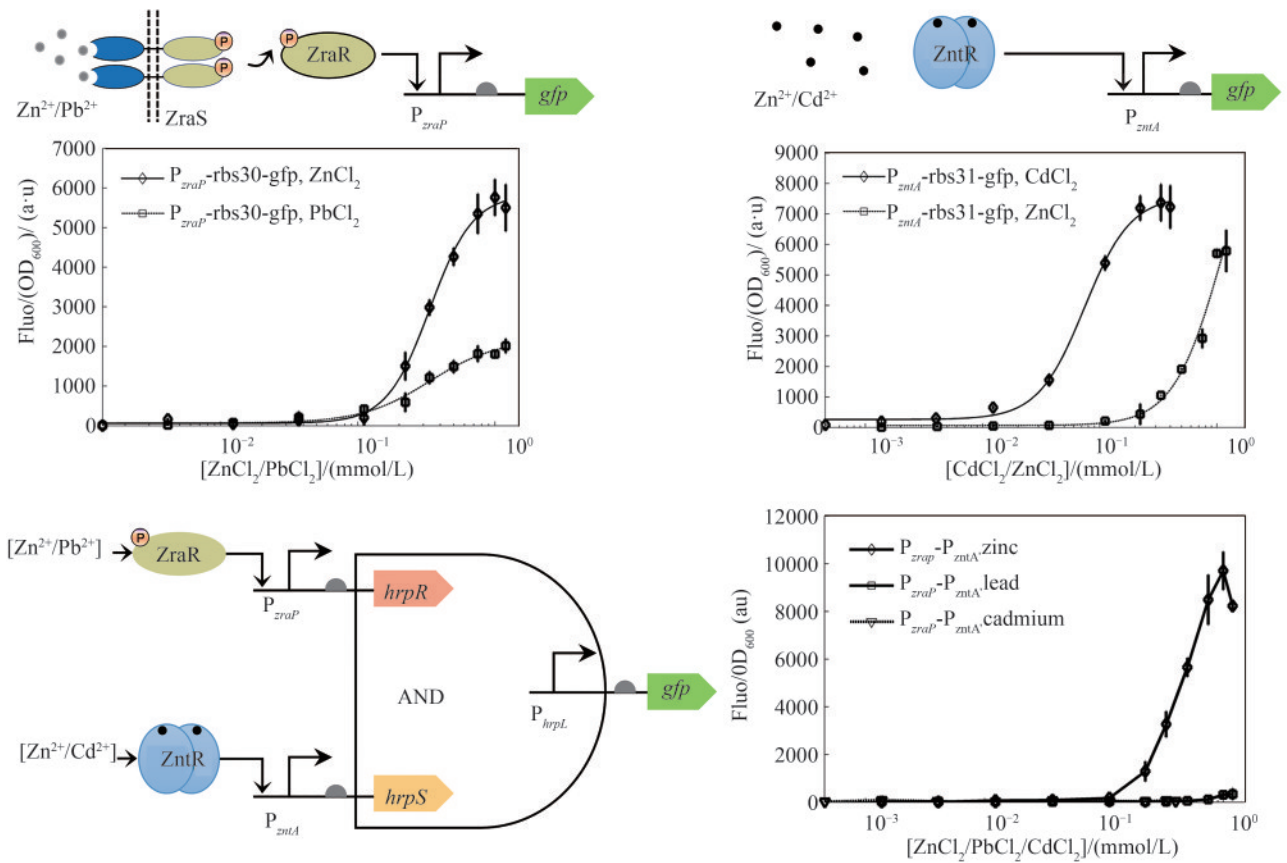
(a) 对转录因子LysG进行半理性设计与饱和突变，使其不结合L-赖氨酸 (L-Lys)，同时保持其L-组氨酸 (L-His) 和L-精氨酸 (L-Arg) 结合能力^[191]

(a) Semi-rational designs and saturation mutagenesis of the transcription factor LysG to prevent its binding with L-lysine (L-Lys) while retaining its ability to bind with L-arginine (L-Arg) and L-histidine (L-His)^[191]



(b) 对 TynA-FeaR 传感系统进行半理性设计与饱和突变，使其特异性检测苯乙胺^[192]
(DA—多巴胺；PEA—苯乙胺；Tyra—酪胺；Trypta—色胺)

(b) Semi-rational design and saturation mutagenesis of the TynA-FeaR sensing system for specific detection of phenylethylamine^[192]
(DA—dopamine; PEA—phenylethylamine; Tyra—tyramine; Trypta—tryptamine)



(c) 将转录因子 ZraR、ZntR 通过 AND gate 耦合后特异性响应 Zn^{2+} ^[7, 21]

(c) Coupling transcription factors ZraR and ZntR through an AND gate for specific respond to Zn^{2+} ^[7, 21]

图 9 合成生物传感器的特异性优化策略^[7, 21, 191-192]

Fig. 9 Strategies for increasing the specificity of genetic circuit-enabled synthetic biosensors^[7, 21, 191-192]

辑门技术已形成模块化工具库，为复杂环境下的精准检测提供技术支持。

除上述靶标特异性提升策略外，时空特异性调控技术也取得重要突破。Thompson等^[196]通过在适配体结构中插入双正交调控元件，在不改变原有序列的前提下成功将其改造为pH响应型核糖开关，拓展了传感模块的环境特异性；Chien等^[162]将缺氧响应模块与乳酸传感单元通过AND逻辑门偶联，显著提升了肿瘤治疗工程菌的肿瘤微环境靶向精度，展示了多靶标协同调控在精准医学中的应用潜力。

3.3 响应速度 (Speed) 优化

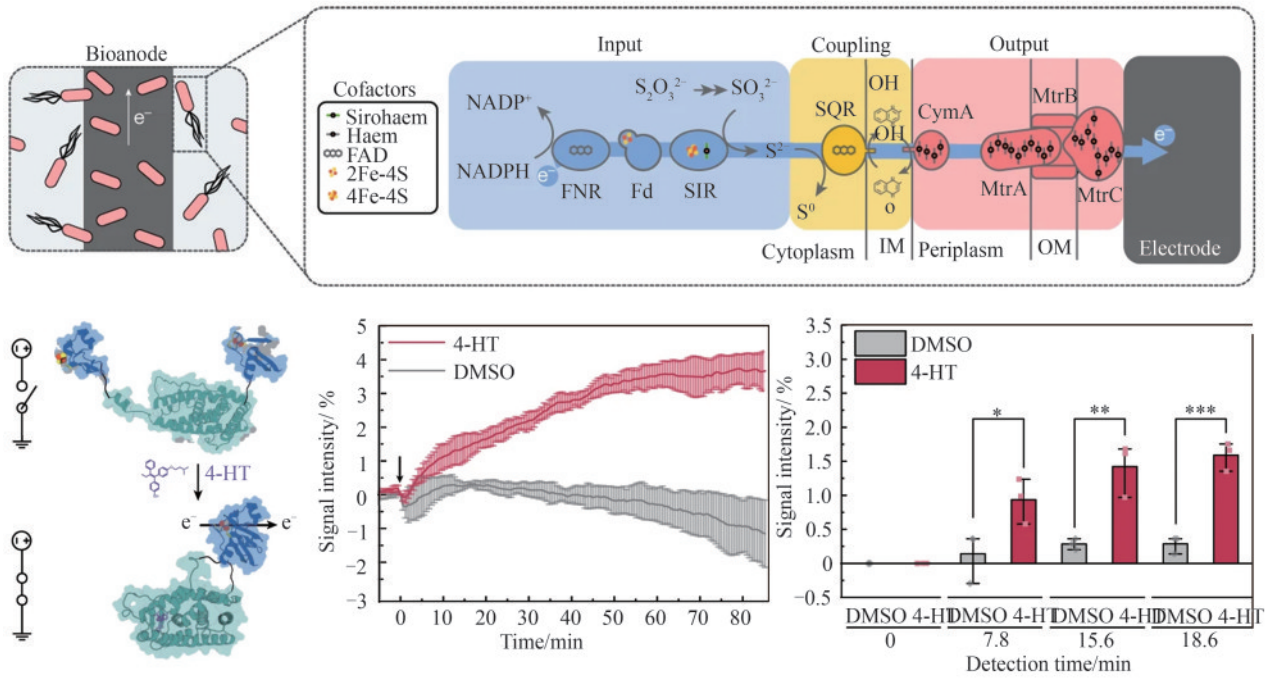
当前，基于基因线路的合成生物传感器在响应速度方面仍面临巨大挑战。相较于已实现实时检测的电子或化学传感技术，依赖基因转录-翻译级联反应的传感器通常需要30分钟至数小时才能输出信号，这一滞后性严重制约其产业化应用进程^[167]。近年来，研究者通过创新传感机制已取得突破性进展。Atkinson等^[6]构建了基于合成电子传递链的电流输出型生物传感器，可于2分钟内感知硫代硫酸盐，暴露于内分泌干扰物（4-HT）环境中3分钟内产生可检测的电流输出 [图10(a)]；Yang等^[197]在哺乳动物细胞中设计了快速激活/失活的磷酸化信号网络，该体系感知肿瘤坏死因子TNF- α 并动态调控IL-10分泌过程，实现了相较于传统哺乳细胞传感方式更加快速的可逆性响应 [图10(b)]。在蛋白质工程领域，翻译后修饰、构象转换及福斯特共振能量转移（Förster resonance energy transfer, FRET）技术为快速传感提供了核心策略。Wang等^[198]开发的蛋白酶修饰快速分泌系统（PASS）创新性地利用内质网驻留信号预存目标蛋白，在检测到小分子、光或抗原时将分裂的切割酶二聚化以激活其切割功能，实现了治疗性蛋白的快速可控释放；Susana等^[199]借助深度学习设计出可特异性结合螺旋肽的人工变构蛋白，据此构建了变构发光型的快速生物传感器；在FRET技术领域，Hellweg等^[200]构建了模块化FRET传感器构建平台ChemoX，通过替换荧光蛋白或合成荧光团可实现多色信号输出，已成功开

发出钙离子、ATP等靶标的分钟级响应传感器。此外，本文2.3部分所述传感器多模态输出模块中的光-电信号转换^[48, 166]、比色传感^[42, 160-161]和空间图案传感^[32, 36]等系统可使传感输出信号以方便识读的形式快速获取，加速传感器信号报告。这些创新机制（包括高效信号级联、预存元件激活、变构效应利用等）和创新报告形式为突破合成生物传感器响应速度瓶颈提供了新思路。未来研究需通过开发新型信号识别机制与信号报告策略，构建兼具快速响应与精准识别的新一代生物传感器。

3.4 稳定性 (Stability) 优化

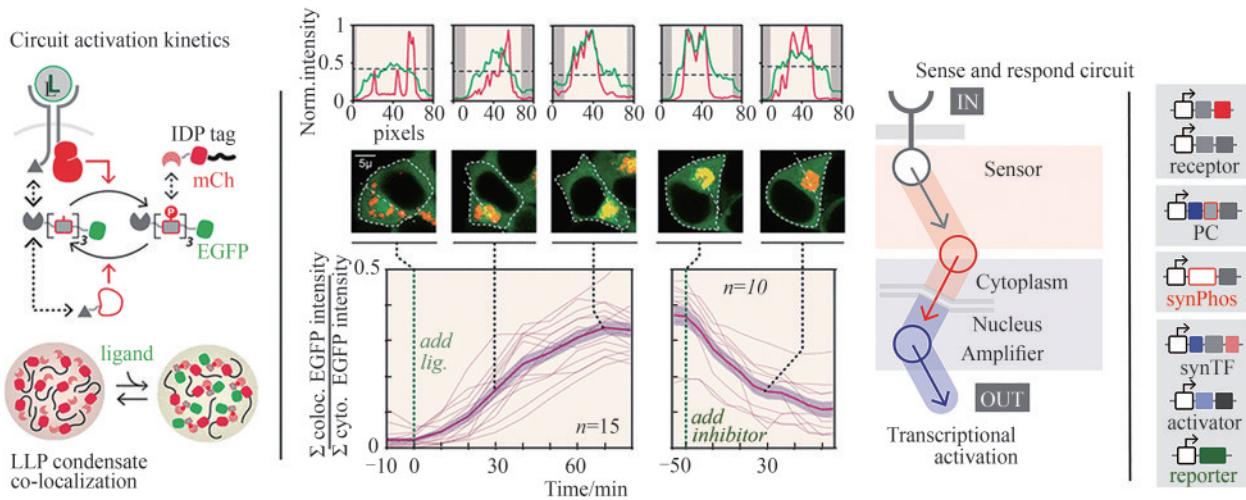
基于基因线路的合成生物传感器的稳定性与长期保存性能对于其实现商业化应用至关重要^[7]。这涉及两个核心维度：其一，基因线路结构在宿主细胞内必须保持遗传完整性，避免功能衰减或突变积累；其二，传感器在真实检测环境中需维持输出信号的稳定性以确保结果可靠性。

首先，基因线路内嵌的动态调控网络可显著提升系统鲁棒性。例如，通过转录因子的自调控机制稳定其胞内浓度，可有效降低表达波动性并维持稳定的响应阈值^[201]。此外，代谢负荷的精准调控是维持线路功能的关键，外源基因的过量插入可能引发宿主资源竞争，导致线路功能退化甚至基因突变。因此，Shao等^[202]将控制论引入启动子工程，设计出可在不同基因组位点及质粒载体中维持恒定表达水平的启动子系统，为代谢负荷控制提供了标准化工具，该团队进一步开发了多维度单细胞分析技术，通过融合荧光报告系统与质粒或RNA结合蛋白，实现了质粒拷贝数、启动子活性（以RNA聚合酶/秒为单位）及蛋白质表达的同步量化分析^[203]。Park等^[204]在敲除宿主染色体中生长必需基因*infA*（编码翻译起始因子IF-1）的基础上，整合了带有反馈回路与诱导系统的功能质粒，实现了必需基因*infA*表达量（与质粒拷贝数成反比）的动态调控，从而建立了无需抗生素的大肠杆菌质粒拷贝数自适应调控平台，为精准优化基因线路负载开辟了新路径 [图11(a)]。在储存稳定性方面，冻干封装技术^[39, 206]的突破显著延长了传感器活性保存周期，但其对储存条件的要求严苛；而基于产孢子细



(a) 基于大肠杆菌合成电子传递链的传感器设计，通过控制蛋白导电开关快速检测内分泌干扰素 4-hydroxytamoxifen (4-HT)^[6]

(a) An *E. coli*-based sensor with a synthetic electron transfer chain that express an electrical protein switch enable rapid detection of an endocrine disruptor 4-hydroxytamoxifen (4-HT)^[6]



(b) 快速激活和失活的蛋白质磷酸化信号传导网络的可逆性响应动力学曲线以及传感机制^[197]
(IM—内膜；OM—外膜；PC—磷酸偶联组件)

(b) Reversible response kinetics curves and sensing mechanisms of a protein phosphorylation signaling network with rapid activation and deactivation^[197]

(IM— Inner membrane； OM— Outer membrane； PC—Phospho-couple)

图 10 合成生物传感器的响应速度优化示例^[6, 197]

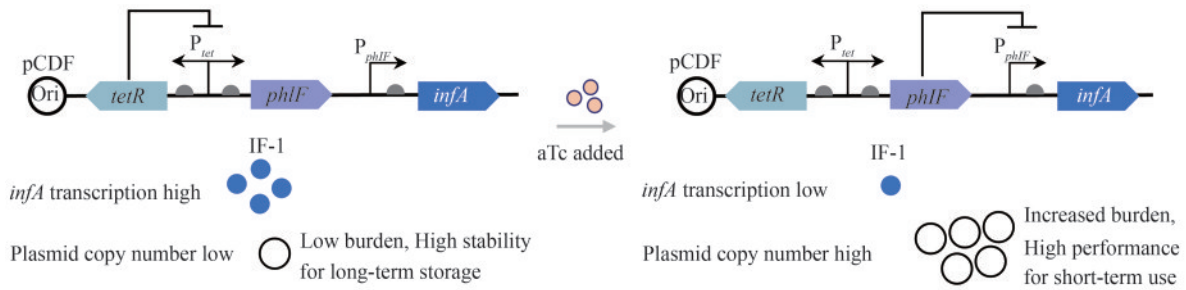
Fig. 10 Examples of improving the response speed of genetic circuit-enabled synthetic biosensors^[6, 197]

菌的储存策略展现出独特优势：研究人员将传感器线路整合至产孢子菌株，产生的孢子可在休眠状态下实现传感线路的长期稳定保存，待检测时则可通过特定诱导程序激活其功能^[207-208]；廉价的微流控装置也被开发作为生物传感器的应用平台，但在现场检测多样本时仍存在不便^[32]。这些生物传感器储存模式为开发实地部署型生物传感器提供了创新的稳定性提升思路。

3.5 生物安全性 (BioSafety) 优化

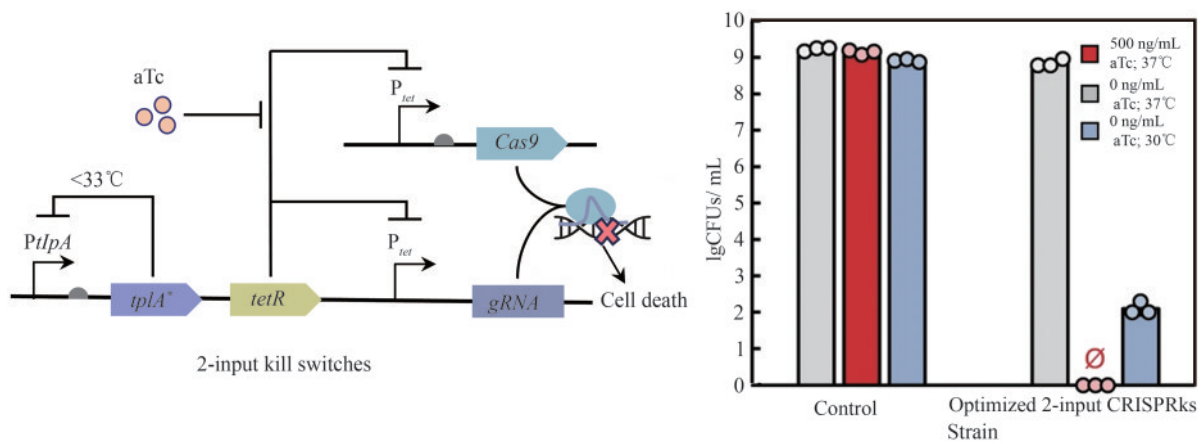
现阶段，生物安全问题仍是制约合成生物传感器商业化与现场应用的关键瓶颈^[23]，针对这一难题，合成生物学领域已发展出多种创新性解决方案。例如“GeneGuard”系统通过整合三种生物防护机制有效控制了大肠杆菌的生物安全风险：

营养缺陷型选择标记、宿主依赖性复制起点和毒素-抗毒素系统^[209]。也有研究将毒性基因置于合成计时器^[210]或计数电路^[211]控制下，促使宿主细胞在环境滞留超过预设时限后启动自毁程序。此外，通过引入非典型氨基酸构建物种特异性屏障能够有效阻断人工基因元件向环境微生物的水平转移，例如在关键位点插入非天然碱基替代终止密码子使未经改造的生物体在获得外源基因时仅能合成截短蛋白^[212]。CRISPR/Cas相关技术的创新应用为传感器生物安全优化提供了新范式，例如Rottinghaus等^[205]在EcN菌株中构建的CRISPR/Cas9双模态杀伤开关（CRISPRks）展现出双重控制优势：既能响应化学诱导剂无水四环素（aTc），又可感知宿主体外排泄时的温度变化，该系统在感知信号后介导必需基因的剪切使细菌无法存活，



(a) 一种基于翻译起始因子动态调控的大肠杆菌质粒拷贝数控制及遗传稳定性提升方法^[204]

(a) A plasmid copy number control platform in *Escherichia coli* based on dynamic regulation of translation initiation factors^[204]



(b) 一种响应化学诱导剂无水四环素（aTc）和温度变化的CRISPR/Cas9大肠杆菌双模态杀伤开关设计（CRISPRks）^[205]

(b) A biocontaining CRISPR/Cas9 dual-modular kill switch (CRISPRks) for *E. coli* under the dual control of chemical inducer anhydrotetracycline (aTc) and temperature changes^[205]

图11 基于基因线路的合成生物传感器稳定性和生物安全性优化示例^[204-205]

Fig. 11 Examples of stability and biosafety optimization for genetic circuit-enabled synthetic biosensors^[204-205]

从而实现肠道细菌的原位清除与体外细菌存活的遏制 [图 11 (b)]；Hayashi 等^[213]在 *B. thetaiotaomicon* 中敲除胸苷合成酶编码基因 *thyA* 构建了营养缺陷型菌株，同时引入定向敲除 *thyA* 的 CRISPR/Cas 装置 (CD)，该设计既能维持工程菌的代谢依赖性，又可清除获得外源基因的野生菌株，形成基因扩散的双向屏障。值得注意的是，尽管现有技术有在细胞内安全维持方面取得显著进展，然而公众对基因改造生物传感器（特别是用于人体的在体检测类型）的接受度仍存在显著落差，这仍是生物传感领域面临的一大难题。

4 结论和展望

合成生物学基于工程化的理念，自下而上模块化地构建功能基因线路以及新型合成生物传感器，这种合成生物传感器通过重构生物识别元件与信号处理线路，实现了靶标信息的智能化感知与处理。随着传感元件库的扩展与计算机辅助设计工具的革新，该类传感器在环境监测、医疗诊断及智能制造等领域展现出独特应用价值。从信号识别机制层面分析，基于基因线路的合成生物传感器主要将转录因子、双组分系统、核糖开关、核糖核酸调节子及 CRISPR/Cas 系统等作为传感元件。在此基础上，以生物记忆、多层次生物计算和多模态输出为主的功能扩展模块进一步提升了生物传感器在信号接收、处理和输出方面的能力。

尽管基于基因线路的合成生物传感器已得到长足发展，但该领域仍面临系统性挑战。首先是敏感性 (Sensitivity) 方面，天然调控元件本底泄漏与动态范围等响应曲线特征方面的缺陷导致其性能难以满足实际需求。虽然标准化元件库的扩充和创新方法的建立提升了敏感性优化的效率，但现有优化策略仍依赖经验性筛选，亟需建立高度可预测生物传感器设计优化策略，并强化标准化元件在不同类型传感器中的普适性。关于生物传感器的特异性 (Specificity)，通过传感元件突变^[191]、构建 AND 逻辑门^[21]等方法，可有效加强生物传感器的靶标特异性和作用环境特异性，未来人工智能、机器学习的发展将使传感元件的理

性设计以及基因线路的自动化构建变得更加高效，助力传感器特异性的优化。响应速度 (Speed) 方面，受限于传统转录-翻译机制，众多生物传感器检测时限较长，而基于新型传感机制例如电信号转换^[6]的方法可将检测时间缩短至分钟级，生物传感器多模态输出模块可使传感输出信号以方便识读的形式快速获取，未来需通过挖掘创新传感与信号报告机制实现快速而准确的传感响应。稳定性 (Stability) 优化方面，减少传感器基因线路负担对提高工程菌的鲁棒性至关重要，可借助量化基因线路负担^[203]以及质粒拷贝数动态控制^[204]等相关方法进行优化。同时，亟需改进储存方法以减少环境条件波动的影响，尽管传统材料如水凝胶可以保持传感细胞功能^[214]，但保持时间有限，利用冷冻干燥方法、孢子储存机制是未来的发展方向。最后，生物安全性 (BioSafety) 一直是合成生物学研究的重点考虑因素，当前众多的层级防护策略已被证明能够有效抑制基因水平转移等生物危害，然而宿主本身的无害性以及生物安全系统的严谨性仍需进一步优化以提高传感器在消费者人群中的接受度。

展望基于基因线路的合成生物传感器的未来，研究人员应聚焦不同调控机制、不同领域和学科知识的交叉，融合人工智能自动化可预测设计，以实现传感范式的创新性突破与高性能低成本合成生物传感器的定制，加速推进合成生物传感器的广泛实际应用。

参 考 文 献

- [1] HICKS M, BACHMANN T T, WANG B J. Synthetic biology enables programmable cell-based biosensors[J]. *ChemPhysChem*, 2020, 21(2): 131.
- [2] 高歌, 边旗, 王宝俊. 合成基因线路的工程化设计研究进展与展望[J]. *合成生物学*, 2025, 6(1): 45-64.
GAO G, BIAN Q, WANG B J. Synthetic genetic circuit engineering: principles, advances and prospects[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2025, 6(1): 45-64.
- [3] SEDLMAYER F, AUBEL D, FUSSENEGGER M. Synthetic gene circuits for the detection, elimination and prevention of disease[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(6): 399-415.
- [4] VAN DER MEER J R, BELKIN S. Where microbiology meets

- microengineering: design and applications of reporter bacteria [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(7): 511-522.
- [5] WANG B J, KITNEY R I, JOLY N, et al. Engineering modular and orthogonal genetic logic gates for robust digital-like synthetic biology[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 508.
- [6] ATKINSON J T, SU L, ZHANG X, et al. Real-time bioelectronic sensing of environmental contaminants[J]. *Nature*, 2022, 611(7936): 548-553.
- [7] WAN X Y, HO T Y H, WANG B J. Engineering prokaryote synthetic biology biosensors[M/OL]//THOUAND G. *Handbook of cell biosensors*. Cham: Springer International Publishing, 2022: 283-318. (2021-10-01)[2025-03-03]. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23217-7_131.
- [8] VELUSAMY K, PERIYASAMY S, KUMAR P S, et al. Biosensor for heavy metals detection in wastewater: a review [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 168: 113307.
- [9] LI J J, CUI M H, ZHAO J, et al. A self-amplifying plasmid based ultrasensitive biosensor for the detection of As(III) in water[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 221: 114937.
- [10] ZHANG T Y, ZHU K L, ZHANG X, et al. Development of CadR-based cadmium whole cell biosensor for visual detection of environmental Cd²⁺[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1330: 343299.
- [11] WANG S H, WANG J W, ZHAO L T, et al. Soil microbial fuel cell based self-powered cathodic biosensor for sensitive detection of heavy metals[J]. *Biosensors*, 2023, 13(1): 145.
- [12] LIU J, XU J Z, RAO Z M, et al. An enzymatic colorimetric whole-cell biosensor for high-throughput identification of lysine overproducers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 216: 114681.
- [13] AUGUSTINIENE E, JONUSKIENE I, KAILIUVIENE J, et al. Application of whole-cell biosensors for analysis and improvement of L- and D-lactic acid fermentation by *Lactobacillus* spp. from the waste of glucose syrup production [J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 223.
- [14] DING D Q, ZHU Y R, BAI D Y, et al. Monitoring and dynamically controlling glucose uptake rate and central metabolism[J]. *Nature Chemical Engineering*, 2025, 2(1): 50-62.
- [15] RUAN Q, LIN X Z, WANG L X, et al. An engineered (CAGA)₁₂-EGFP cell-based biosensor for high-content and accurate detection of active TGF- β [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 220: 114884.
- [16] HO C L, TAN H Q, CHUA K J, et al. Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(1): 27-37.
- [17] LIU Y, PINTO F, WAN X Y, et al. Reprogrammed tracrRNAs enable repurposing of RNAs as crRNAs and sequence-specific RNA biosensors[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1937.
- [18] 毛瑞超, 王宝俊. 合成生物元件与线路的智能设计[J]. *生物工程学报*, 2025, 41(3): 1023-1051.
- MAO R C, WANG B J. Machine learning-aided design of synthetic biological parts and circuits[J]. *Chinese Journal of Biothchnology*, 2025, 41(3): 1023-1051.
- [19] BUSON F, GAO Y L, WANG B J. Genetic parts and enabling tools for biocircuit design[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(3): 697-713.
- [20] GAO Y L, WANG L, WANG B J. Customizing cellular signal processing by synthetic multi-level regulatory circuits[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 8415.
- [21] WANG B J, BARAHONA M, BUCK M. A modular cell-based biosensor using engineered genetic logic circuits to detect and integrate multiple environmental signals[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 40(1): 368-376.
- [22] MERULLA D, VAN DER MEER J R. Regulatable and modulable background expression control in prokaryotic synthetic circuits by auxiliary repressor binding sites[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(1): 36-45.
- [23] CHEMLA Y, SWEENEY C J, WOZNAK C A, et al. Design and regulation of engineered bacteria for environmental release [J]. *Nature Microbiology*, 2025, 10(2): 281-300.
- [24] NAKAMURA H, KARUBE I. Current research activity in biosensors[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377(3): 446-468.
- [25] ZHANG H Q, LIN M, SHI H D, et al. Programming a Pavlovian-like conditioning circuit in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3102.
- [26] BERNARD E, WANG B J. Synthetic cell-based sensors with programmed selectivity and sensitivity[M/OL]//PRICKRIL B, RASOOLY A. *Biosensors and biodetection*. New York: Springer New York, 2017: 349-363. (2017-03-16)[2025-03-01]. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6911-1_23.
- [27] KIM H J, JEONG H, LEE S J. Synthetic biology for microbial heavy metal biosensors[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(4): 1191-1203.
- [28] BRADLEY R W, WANG B J. Designer cell signal processing circuits for biotechnology[J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(6): 635-643.
- [29] WANG B J, BUCK M. Customizing cell signaling using engineered genetic logic circuits[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(8): 376-384.
- [30] DE PAEPE B, DE MEY M. Biological switches: past and future milestones of transcription factor-based biosensors[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(1): 72-86.
- [31] JOSHI S H N, JENKINS C, ULAETO D, et al. Accelerating genetic sensor development, scale-up, and deployment using synthetic biology[J]. *BioDesign Research*, 2024, 6: 37.
- [32] WAN X Y, VOLPETTI F, PETROVA E, et al. Cascaded

- amplifying circuits enable ultrasensitive cellular sensors for toxic metals[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(5): 540-548.
- [33] PARK D M, TAFFET M J. Combinatorial sensor design in *Caulobacter crescentus* for selective environmental uranium detection[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(4): 807-817.
- [34] ZHANG Q L, WEI Z X, JIA X Q. Controllable detection threshold achieved through the toehold switch system in a mercury ion whole-cell biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2024, 256: 116283.
- [35] SALTEPE B, BOZKURT E U, GÜNGEN M A, et al. Genetic circuits combined with machine learning provides fast responding living sensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 178: 113028.
- [36] DOSHI A, SHAW M, TONEA R, et al. Engineered bacterial swarm patterns as spatial records of environmental inputs[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(7): 878-886.
- [37] YAGUR-KROLL S, AMIEL E, ROSEN R, et al. Detection of 2,4-dinitrotoluene and 2,4,6-trinitrotoluene by an *Escherichia coli* bioreporter: performance enhancement by directed evolution[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(17): 7177-7188.
- [38] ESSINGTON E A, VEZEAU G E, CETNAR D P, et al. An autonomous microbial sensor enables long-term detection of TNT explosive in natural soil[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 10471.
- [39] LUISI B, HEGAB R, PERSON C, et al. Engineered biosensors in an encapsulated and deployable system for environmental chemical detection[J]. *ACS Sensors*, 2022, 7(9): 2589-2596.
- [40] HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ V, MOLINA L, RAMOS J L, et al. New family of biosensors for monitoring BTX in aquatic and edaphic environments[J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(6): 858-867.
- [41] SELVAMANI V, MARUTHAMUTHU M K, ARULSAM Y K, et al. Construction of methanol sensing *Escherichia coli* by the introduction of novel chimeric MxcQZ/OmpR two-component system from *Methylobacterium organophilum* XX[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2017, 34(6): 1734-1739.
- [42] WU Y, WANG C W, WANG D, et al. A whole-cell biosensor for point-of-care detection of waterborne bacterial pathogens [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(2): 333-344.
- [43] LIU K, ZHANG Y S, LIU K, et al. *De novo* design of a transcription factor for a progesterone biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 203: 113897.
- [44] WATSTEIN D M, STYCZYNSKI M P. Development of a pigment-based whole-cell zinc biosensor for human serum[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 267-275.
- [45] MIETTINEN K, LEELAHAKORN N, ALMEIDA A, et al. A GPCR-based yeast biosensor for biomedical, biotechnological, and point-of-use cannabinoid determination[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3664.
- [46] CHANG H J, ZÚÑIGA A, CONEJERO I, et al. Programmable receptors enable bacterial biosensors to detect pathological biomarkers in clinical samples[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5216.
- [47] ZOU Z P, YANG Y, WANG J S, et al. Coupling split-lux cassette with a toggle switch in bacteria for ultrasensitive blood markers detection in feces and urine[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 214: 114520.
- [48] INDA-WEBB M E, JIMENEZ M, LIU Q, et al. Sub-1.4 cm³ capsule for detecting labile inflammatory biomarkers *in situ*[J]. *Nature*, 2023, 620(7973): 386-392.
- [49] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [50] CHEN J S, MA E B, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [51] RÖSSGER K, CHARPIN-EL-HAMRI G, FUSSENEGGER M. A closed-loop synthetic gene circuit for the treatment of diet-induced obesity in mice[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2825.
- [52] MAO N, CUBILLOS-RUIZ A, CAMERON D E, et al. Probiotic strains detect and suppress cholera in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(445): eaa02586.
- [53] JIANG S, CHEN H F, CHEN S Y, et al. Genetically encoded biosensors for constrained biological functions in probiotic *Escherichia coli* Nissle[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(1): 296-303.
- [54] ZOU Z P, DU Y, FANG T T, et al. Biomarker-responsive engineered probiotic diagnoses, records, and ameliorates inflammatory bowel disease in mice[J]. *Cell Host & Microbe*, 2023, 31(2): 199-212.e5.
- [55] HUANG J B, TEIXEIRA A P, GAO T, et al. Aspirin-responsive gene switch regulating therapeutic protein expression[J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 2028.
- [56] MAHAMEED M, XUE S, DANUSER B, et al. Nitroglycerin-responsive gene switch for the on-demand production of therapeutic proteins[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2025, 9(7): 1129-1143.
- [57] MIMEE M, TUCKER A C, VOIGT C A, et al. Programming a human commensal bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to sense and respond to stimuli in the murine gut microbiota[J]. *Cell Systems*, 2016, 2(3): 214.
- [58] GAO J S, DU M H, ZHAO J H, et al. Design of a genetically encoded biosensor to establish a high-throughput screening platform for L-cysteine overproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 144-157.

- [59] ZHANG Y P, LI Y R, XIAO F X, et al. Engineering of a biosensor in response to malate in *Bacillus licheniformis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(7): 1775-1784.
- [60] XIU Y, JANG S, JONES J A, et al. Naringenin-responsive riboswitch-based fluorescent biosensor module for *Escherichia coli* co-cultures[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(10): 2235-2244.
- [61] NI C, FOX K J, PRATHER K L J. Substrate-activated expression of a biosynthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Journal, 2022, 17(3): 2000433.
- [62] PU W, CHEN J Z, LIU P, et al. Directed evolution of linker helix as an efficient strategy for engineering LysR-type transcriptional regulators as whole-cell biosensors[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 222: 115004.
- [63] MANNAN A A, BATES D G. Designing an irreversible metabolic switch for scalable induction of microbial chemical production[J]. Nature Communications, 2021, 12: 3419.
- [64] WU J Y, JIANG P X, CHEN W, et al. Design and application of a lactulose biosensor[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45994.
- [65] MICHENER J K, SMOLKE C D. High-throughput enzyme evolution in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic RNA switch[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(4): 306-316.
- [66] D'OELSCHNITZ S, KIM W, BURKHOLDER N T, et al. Using fungible biosensors to evolve improved alkaloid biosyntheses [J]. Nature Chemical Biology, 2022, 18(9): 981-989.
- [67] D'OELSCHNITZ S, DIAZ D J, KIM W, et al. Biosensor and machine learning-aided engineering of an amaryllidaceae enzyme[J]. Nature Communications, 2024, 15: 2084.
- [68] SELIM A S, PERRY J M, NASR M A, et al. A synthetic biosensor for detecting putrescine in beef samples[J]. ACS Applied Bio Materials, 2022, 5(11): 5487-5496.
- [69] CHOI O, LEE Y S, HAN I, et al. A simple and sensitive biosensor strain for detecting toxoflavin using β -galactosidase activity[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 50: 256-261.
- [70] BHATT A, JAIN S, NAVANI N K. Rapid, sensitive, and specific microbial whole-cell biosensor for the detection of histamine: a potential food toxin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(49): 27466-27478.
- [71] LI Y Y, LUCCI T, VILLARRUEL DUJOVNE M, et al. A cell-free biosensor signal amplification circuit with polymerase strand recycling[J]. Nature Chemical Biology, 2025, 21(6): 949-958.
- [72] LI X, ZHANG C C, XU X P, et al. A single-component light sensor system allows highly tunable and direct activation of gene expression in bacterial cells[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(6): e33.
- [73] LIU C C, JEWETT M C, CHIN J W, et al. Toward an orthogonal central dogma[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14(2): 103-106.
- [74] JOHNS N I, GOMES A L C, YIM S S, et al. Metagenomic mining of regulatory elements enables programmable species-selective gene expression[J]. Nature Methods, 2018, 15(5): 323-329.
- [75] XUE H R, SHI H L, YU Z, et al. Design, construction, and characterization of a set of biosensors for aromatic compounds [J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(12): 1011-1014.
- [76] LI S S, LI Z L, TAN G Y, et al. *In vitro* allosteric transcription factor-based biosensing[J]. Trends in Biotechnology, 2023, 41(8): 1080-1095.
- [77] GRAZON C, BAER R C, KUZMANOVIĆ U, et al. A progesterone biosensor derived from microbial screening[J]. Nature Communications, 2020, 11: 1276.
- [78] SHEN W K, CHEN S Y, GAN Z Q, et al. AnimalTFDB 4.0: a comprehensive animal transcription factor database updated with variation and expression annotations[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D39-D45.
- [79] RAULUSEVICIUTE I, RIUDAVETS-PUIG R, BLANC-MATHIEU R, et al. JASPAR 2024: 20th anniversary of the open-access database of transcription factor binding profiles[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(D1): D174-D182.
- [80] D'OELSCHNITZ S, LOVE J D, DIAZ D J, et al. GroovDB: a database of ligand-inducible transcription factors[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(10): 3534-3537.
- [81] NISHIKAWA K K, CHEN J, ACHESON J F, et al. Highly multiplexed design of an allosteric transcription factor to sense new ligands[J]. Nature Communications, 2024, 15: 10001.
- [82] KOMATSU S, OHNO H, SAITO H. Target-dependent RNA polymerase as universal platform for gene expression control in response to intracellular molecules[J]. Nature Communications, 2023, 14: 7256.
- [83] MITCHLER M M, GARCIA J M, MONTERO N E, et al. Transcription factor-based biosensors: a molecular-guided approach for natural product engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 69: 172-181.
- [84] HASKETT T L, PARAMASIVAN P, MENDES M D, et al. Engineered plant control of associative nitrogen fixation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(16): e2117465119.
- [85] DING N N, YUAN Z N, MA Z, et al. AI-assisted rational design and activity prediction of biological elements for optimizing transcription-factor-based biosensors[J]. Molecules, 2024, 29(15): 3512.
- [86] TELLECHEA-LUZARDO J, MARTÍN LÁZARO H, MORENO LÓPEZ R, et al. Sensbio: an online server for biosensor design[J]. BMC Bioinformatics, 2023, 24(1): 71.
- [87] JUNG K, FABIANI F, HOYER E, et al. Bacterial transmembrane signalling systems and their engineering for biosensing[J]. Open Biology, 2018, 8(4): 180023.
- [88] ULRICH L E, KOONIN E V, ZHULIN I B. One-component

- systems dominate signal transduction in prokaryotes[J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(2): 52-56.
- [89] GUBENSÁK N, SAGMEISTER T, BUHLHELLER C, et al. *Vibrio cholerae*'s ToxRS bile sensing system[J]. eLife, 2023, 12: e88721.
- [90] DELL C L, NEELY M N, OLSON E R. Altered pH lysine signalling mutants of *cadC*, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli cadBA* operon[J]. Molecular Microbiology, 1994, 14(1): 7-16.
- [91] EICHINGER A, HANEBURGER I, KOLLER C, et al. Crystal structure of the sensory domain of *Escherichia coli* CadC, a member of the ToxR-like protein family[J]. Protein Science, 2011, 20(4): 656-669.
- [92] FRITZ G, KOLLER C, BURDACK K, et al. Induction kinetics of a conditional pH stress response system in *Escherichia coli* [J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 393(2): 272-286.
- [93] CHANG H J, MAYONOVE P, ZAVALA A, et al. A modular receptor platform to expand the sensing repertoire of bacteria [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(1): 166-175.
- [94] SHEN L, CHEN Y W, HU L W, et al. Development of a highly sensitive, visual platform for the detection of cadmium in actual wastewater based on evolved whole-cell biosensors[J]. ACS Sensors, 2024, 9(2): 654-661.
- [95] LI Q Q, CHEN S F, WANG H W, et al. Decoding wheat contamination through self-assembled whole-cell biosensor combined with linear and non-linear machine learning algorithms [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2025, 267: 116869.
- [96] CAO W Y, HUANG C, ZHOU X, et al. Engineering two-component systems for advanced biosensing: from architecture to applications in biotechnology[J]. Biotechnology Advances, 2024, 75: 108404.
- [97] SADOTRA S, LOU Y-C, TANG H-C, et al. Structural basis for promoter DNA recognition by the response regulator OmpR[J]. Journal of Structural Biology, 2021, 213(1): 107638.
- [98] ALVAREZ A F, GEORGELLIS D. Environmental adaptation and diversification of bacterial two-component systems[J]. Current Opinion in Microbiology, 2023, 76: 102399.
- [99] GALPERIN M Y. Diversity of structure and function of response regulator output domains[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(2): 150-159.
- [100] ISHII E, EGUCHI Y. Diversity in sensing and signaling of bacterial sensor histidine kinases[J]. Biomolecules, 2021, 11(10): 1524.
- [101] BHATE M P, MOLNAR K S, GOULIAN M, et al. Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures [J]. Structure, 2015, 23(6): 981-994.
- [102] ZHOU S H, ALPER H S, ZHOU J W, et al. Intracellular biosensor-based dynamic regulation to manipulate gene expression at the spatiotemporal level[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(4): 646-663.
- [103] LIU C J, YU H, ZHANG B C, et al. Engineering whole-cell microbial biosensors: design principles and applications in monitoring and treatment of heavy metals and organic pollutants[J]. Biotechnology Advances, 2022, 60: 108019.
- [104] WOO S G, MOON S J, KIM S K, et al. A designed whole-cell biosensor for live diagnosis of gut inflammation through nitrate sensing[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 168: 112523.
- [105] ZHANG J, XU J P, YIN J Y, et al. Design and optimization of a two-component TorRST-based biosensor for detection and degradation of trimethylamine N-oxide[J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(2): 553-563.
- [106] RAMAKRISHNAN P, TABOR J J. Repurposing *Synechocystis* PCC6803 UirS - UirR as a UV-violet/green photoreversible transcriptional regulatory tool in *E. coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 733-740.
- [107] SCHMIDL S R, EKNESS F, SOFJAN K, et al. Rewiring bacterial two-component systems by modular DNA-binding domain swapping[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(7): 690-698.
- [108] SUN L, ZHANG Q W, KONG X, et al. Highly efficient neutralizer-free L-malic acid production using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 2023, 370: 128580.
- [109] WU Y F, ZHU L J, LI S T, et al. High content design of riboswitch biosensors: all-around rational module-by-module design[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 220: 114887.
- [110] DOUAKI A, GAROLI D, INAM A K M S, et al. Smart approach for the design of highly selective aptamer-based biosensors[J]. Biosensors, 2022, 12(8): 574.
- [111] LEE M, SHIN S, KIM S, et al. Recent advances in biological applications of aptamer-based fluorescent biosensors[J]. Molecules, 2023, 28(21): 7327.
- [112] WANG X Y, WEI W, ZHAO J. Using a riboswitch sensor to detect Co²⁺/Ni²⁺ transport in *E. coli*[J]. Frontiers in Chemistry, 2021, 9: 631909.
- [113] MCNERNEY M P, PIORINO F, MICHEL C L, et al. Active analyte import improves the dynamic range and sensitivity of a vitamin B₁₂ biosensor[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(2): 402-411.
- [114] QIN P-P, CHEN P-R, TAN L, et al. Programming ADAR-recruiting hairpin RNA sensor to detect endogenous molecules [J]. Nucleic Acids Research, 2025, 53: gkae1146.
- [115] MCCOWN P J, CORBINO K A, STAV S, et al. Riboswitch diversity and distribution[J]. RNA, 2017, 23(7): 995-1011.
- [116] GAN Z, ROSLAN M A M, ABD SHUKOR M Y, et al. Advances in aptamer-based biosensors and cell-internalizing SELEX technology for diagnostic and therapeutic application [J]. Biosensors, 2022, 12(11): 922.

- [117] GUO M Z, HUANG K L, XU W T. Third generation whole-cell sensing systems: synthetic biology inside, nanomaterial outside[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(6): 550-559.
- [118] YOSHIKAWA A M, RANGEL A E, ZHENG L W, et al. A massively parallel screening platform for converting aptamers into molecular switches[J]. Nature Communications, 2023, 14: 2336.
- [119] MURANAKA N, SHARMA V, NOMURA Y, et al. Efficient design strategy for whole-cell and cell-free biosensors based on engineered riboswitches[J]. Analytical Letters, 2009, 42(1): 108-122.
- [120] COPELAND C E, LANGLOIS A, KIM J, et al. The cell-free system: a new apparatus for affordable, sensitive, and portable healthcare[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 175: 108124.
- [121] NGUYEN P Q, SOENKSEN L R, DONGHIA N M, et al. Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(11): 1366-1374.
- [122] GAO Y L, MARDIAN R, MA J X, et al. Programmable trans-splicing riboregulators for complex cellular logic computation [J]. Nature Chemical Biology, 2025, 21(5): 758-766.
- [123] GREEN A A, SILVER P A, COLLINS J J, et al. Toehold switches: *de-novo*-designed regulators of gene expression[J]. Cell, 2014, 159(4): 925-939.
- [124] YARRA S S, ASHOK G, MOHAN U. "Toehold switches; a foothold for synthetic biology" [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2023, 120(4): 932-952.
- [125] GAMBILL L, STAUBUS A, MO K W, et al. A split ribozyme that links detection of a native RNA to orthogonal protein outputs[J]. Nature Communications, 2023, 14: 543.
- [126] MA D, LI Y X, WU K Y, et al. Multi-arm RNA junctions encoding molecular logic unconstrained by input sequence for versatile cell-free diagnostics[J]. Nature Biomedical Engineering, 2022, 6(3): 298-309.
- [127] KIM J, ZHOU Y, CARLSON P D, et al. *De novo*-designed translation-repressing riboregulators for multi-input cellular logic[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(12): 1173-1182.
- [128] CHAPPELL J, WESTBROOK A, VEROSLOFF M, et al. Computational design of small transcription activating RNAs for versatile and dynamic gene regulation[J]. Nature Communications, 2017, 8: 1051.
- [129] SELINIDIS M A, CORLISS A C, CHAPPELL J, et al. Ribozyme-mediated gene-fragment complementation for nondestructive reporting of DNA transfer within soil[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(11): 3539-3547.
- [130] KÖKSALDI İ Ç, KÖSE S, AHAN R E, et al. SARS-CoV-2 detection with *de novo*-designed synthetic riboregulators[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(28): 9719-9727.
- [131] CHEN Y B, XIA W H, PAN Z W, et al. Development of a cell-free, toehold switch-based biosensor for rapid and sensitive Zika virus detection[J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(6): 3486-3494.
- [132] CISNEROS A F, ROULEAU F D, BAUTISTA C, et al. Toeholder: a software for automated design and *in silico* validation of toehold riboswitches[J]. PeerJ Physical Chemistry, 2023, 5: e28.
- [133] VALERI J A, COLLINS K M, RAMESH P, et al. Sequence-to-function deep learning frameworks for engineered riboregulators[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5058.
- [134] JINEK M, EAST A, CHENG A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells[J]. eLife, 2013, 2: e00471.
- [135] JIANG G, GAO Y L, ZHOU N, et al. CRISPR-powered RNA sensing *in vivo*[J]. Trends in Biotechnology, 2024, 42(12): 1601-1614.
- [136] DÍAZ-GALICIA E, GRÜNBERG R, AROLD S T. How to find the right RNA-sensing CRISPR-Cas system for an *in vitro* application[J]. Biosensors, 2022, 12(2): 53.
- [137] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
- [138] JIAO C L, RECKSTADT C, KÖNIG F, et al. RNA recording in single bacterial cells using reprogrammed tracrRNAs[J]. Nature Biotechnology, 2023, 41(8): 1107-1116.
- [139] JIAO C L, SHARMA S, DUGAR G, et al. Noncanonical crRNAs derived from host transcripts enable multiplexable RNA detection by Cas9[J]. Science, 2021, 372(6545): 941-948.
- [140] LIU Y, WAN X Y, WANG B J. Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3693.
- [141] LEE Y J, HOYNES-O'CONNOR A, LEONG M C, et al. Programmable control of bacterial gene expression with the combined CRISPR and antisense RNA system[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(5): 2462-2473.
- [142] SIU K H, CHEN W. Riboregulated toehold-gated gRNA for programmable CRISPR-Cas9 function[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(3): 217-220.
- [143] BIKARD D, JIANG W Y, SAMAI P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [144] FU Y F, FODEN J A, KHAYTER C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 822-826.
- [145] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. Science, 2018, 360(6387): 439-444.

- [146] CHIANG A J, HASTY J. Design of synthetic bacterial biosensors [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2023, 76: 102380.
- [147] COURBET A, ENDY D, RENARD E, et al. Detection of pathological biomarkers in human clinical samples *via* amplifying genetic switches and logic gates[J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(289): 289ra83.
- [148] RIGLAR D T, GIESSEN T W, BAYM M, et al. Engineered bacteria can function in the mammalian gut long-term as live diagnostics of inflammation[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(7): 653-658.
- [149] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-342.
- [150] ZHU D L, GALLEY J, PIZZINI J, et al. Microbial biosensor for sensing and treatment of intestinal inflammation[J]. *Advanced Science*, 2025, 12(27): 2504364.
- [151] TANG W X, LIU D R. Rewritable multi-event analog recording in bacterial and mammalian cells[J]. *Science*, 2018, 360(6385): eaap8992.
- [152] COOPER R M, WRIGHT J A, NG J Q, et al. Engineered bacteria detect tumor DNA[J]. *Science*, 2023, 381(6658): 682-686.
- [153] OLORUNNIJI F J, ROSSER S J, STARK W M. Site-specific recombinases: molecular machines for the Genetic Revolution [J]. *Biochemical Journal*, 2016, 473(6): 673-684.
- [154] WANG Y J, YAU Y Y, PERKINS-BALDING D, et al. Recombinase technology: applications and possibilities[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(3): 267-285.
- [155] BONNET J, YIN P, ORTIZ M E, et al. Amplifying genetic logic gates[J]. *Science*, 2013, 340(6132): 599-603.
- [156] ABEDI M H, YAO M S, MITTELSTEIN D R, et al. Ultrasound-controllable engineered bacteria for cancer immunotherapy[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1585.
- [157] NOVÁK B, TYSON J J. Design principles of biochemical oscillators[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(12): 981-991.
- [158] GUO L K, LIU M, BI Y J, et al. Using a synthetic machinery to improve carbon yield with acetylphosphate as the core[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5286.
- [159] DIN M O, DANINO T, PRINDLE A, et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery[J]. *Nature*, 2016, 536(7614): 81-85.
- [160] KALVAPALLE P B, STAUBUS A, DYSART M J, et al. Information storage across a microbial community using universal RNA barcoding[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2025. (2025-02-14) [2025-03-01]. <https://doi.org/10.1038/s41587-025-02593-0>.
- [161] BROPHY J A N, VOIGT C A. Principles of genetic circuit design[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(5): 508-520.
- [162] CHIEN T, HARIMOTO T, KEPECS B, et al. Enhancing the tropism of bacteria *via* genetically programmed biosensors[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(1): 94-104.
- [163] MOSER F, ESPAH BORUJENI A, GHODASARA A N, et al. Dynamic control of endogenous metabolism with combinatorial logic circuits[J]. *Molecular Systems Biology*, 2018, 14(11): e8605.
- [164] DIDOVYK A, TONOOKA T, TSIMRING L, et al. Rapid and scalable preparation of bacterial lysates for cell-free gene expression[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(12): 2198-2208.
- [165] ZEVALLOS-ALIAGA D, DE GRAEVE S, OBANDO-CHÁVEZ P, et al. Highly sensitive whole-cell mercury biosensors for environmental monitoring[J]. *Biosensors*, 2024, 14(5): 246.
- [166] MIMEE M, NADEAU P, HAYWARD A, et al. An ingestible bacterial-electronic system to monitor gastrointestinal health [J]. *Science*, 2018, 360(6391): 915-918.
- [167] HUANG Z F, GUSTAVE W, BAI S S, et al. Challenges and opportunities in commercializing whole-cell bioreporters in environmental application[J]. *Environmental Research*, 2024, 262: 119801.
- [168] PHAM C, STOGIOS P J, SAVCHENKO A, et al. Advances in engineering and optimization of transcription factor-based biosensors for plug-and-play small molecule detection[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 76: 102753.
- [169] MEYER A J, SEGALL-SHAPIRO T H, GLASSEY E, et al. *Escherichia coli* “Marionette” strains with 12 highly optimized small-molecule sensors[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(2): 196-204.
- [170] NASR M A, MARTIN V J J, KWAN D H. Divergent directed evolution of a TetR-type repressor towards aromatic molecules [J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(14): 7675-7690.
- [171] LIU Y E, ZHOU Z Y, WU Y F, et al. Engineered transcription factor-binding diversified functional nucleic acid-based synthetic biosensor[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 77: 108463.
- [172] KASEY C M, ZERRAD M, LI Y W, et al. Development of transcription factor-based designer macrolide biosensors for metabolic engineering and synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 227-239.
- [173] LANDRY B P, PALANKI R, DYULGYAROV N, et al. Phosphatase activity tunes two-component system sensor detection threshold[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1433.
- [174] WANG B J, BARAHONA M, BUCK M. Amplification of small molecule-inducible gene expression *via* tuning of intracellular receptor densities[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(3): 1955-1964.
- [175] CAYRON J, PRUDENT E, ESCOFFIER C, et al. Pushing the limits of nickel detection to nanomolar range using a set of engineered bioluminescent *Escherichia coli*[J]. *Environmental*

- Science and Pollution Research, 2017, 24(1): 4-14.
- [176] YAN H, WEN Y J, TIAN Z M, et al. A one-pot isothermal Cas12-based assay for the sensitive detection of microRNAs [J]. Nature Biomedical Engineering, 2023, 7(12): 1583-1601.
- [177] MOON J, LIU C C. Asymmetric CRISPR enabling cascade signal amplification for nucleic acid detection by competitive crRNA[J]. Nature Communications, 2023, 14: 7504.
- [178] LOPRESIDE A, WAN X Y, MICHELINI E, et al. Comprehensive profiling of diverse genetic reporters with application to whole-cell and cell-free biosensors[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(23): 15284-15292.
- [179] CHEN S Y, ZHANG Y, LI R J, et al. *De novo* design of the ArsR regulated P_{ars} promoter enables a highly sensitive whole-cell biosensor for arsenic contamination[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(20): 7210-7218.
- [180] CHEN Y, HO J M L, SHIS D L, et al. Tuning the dynamic range of bacterial promoters regulated by ligand-inducible transcription factors[J]. Nature Communications, 2018, 9: 64.
- [181] WANG B J, BARAHONA M, BUCK M. Engineering modular and tunable genetic amplifiers for scaling transcriptional signals in cascaded gene networks[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(14): 9484-9492.
- [182] LIU L R, ZHANG L, WANG J Y, et al. Copper-inducible expression system for metabolic engineering of *Escherichia coli* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(6): 1xad109.
- [183] SON H I, HAMRICK G S, SHENDE A R, et al. Population-level amplification of gene regulation by programmable gene transfer[J]. Nature Chemical Biology, 2025, 21(6): 939-948.
- [184] BROPHY J A, VOIGT C A. Antisense transcription as a tool to tune gene expression[J]. Molecular Systems Biology, 2016, 12: 854.
- [185] HO T Y H, SHAO A, LU Z Y, et al. A systematic approach to inserting split inteins for Boolean logic gate engineering and basal activity reduction[J]. Nature Communications, 2021, 12: 2200.
- [186] WAN X Y, PINTO F, YU L Y, et al. Synthetic protein-binding DNA sponge as a tool to tune gene expression and mitigate protein toxicity[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5961.
- [187] LEE T H, MAHESHRI N. A regulatory role for repeated decoy transcription factor binding sites in target gene expression[J]. Molecular Systems Biology, 2012, 8: 576.
- [188] COX R S III, SURETTE M G, ELOWITZ M B. Programming gene expression with combinatorial promoters[J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3: 145.
- [189] HAO N, KRISHNA S, AHLGREN-BERG A, et al. Road rules for traffic on DNA: systematic analysis of transcriptional roadblocking *in vivo*[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(14): 8861-8872.
- [190] GRECO F V, PANDI A, ERB T J, et al. Harnessing the central dogma for stringent multi-level control of gene expression[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1738.
- [191] DELLA CORTE D, VAN BEEK H L, SYBERG F, et al. Engineering and application of a biosensor with focused ligand specificity[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4851.
- [192] ROTTINGHAUS A G, XI C G, AMROFELL M B, et al. Engineering ligand-specific biosensors for aromatic amino acids and neurochemicals[J]. Cell Systems, 2022, 13(3): 204-214.e4.
- [193] BOSE D, SU Y C, MARCUS A, et al. An RNA-based fluorescent biosensor for high-throughput analysis of the cGAS-cGAMP-STING pathway[J]. Cell Chemical Biology, 2016, 23(12): 1539-1549.
- [194] LIU Q J, SCHUMACHER J, WAN X Y, et al. Orthogonality and burdens of heterologous AND gate gene circuits in *E. coli* [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(2): 553-564.
- [195] SCHAERLI Y, GILI M, ISALAN M. A split intein T7 RNA polymerase for transcriptional AND-logic[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(19): 12322-12328.
- [196] THOMPSON I A P, ZHENG L W, EISENSTEIN M, et al. Rational design of aptamer switches with programmable pH response[J]. Nature Communications, 2020, 11: 2946.
- [197] YANG X Y, ROCKS J W, JIANG K Y, et al. Engineering synthetic phosphorylation signaling networks in human cells [J]. Science, 2025, 387(6729): 74-81.
- [198] WANG X Y, KANG L P, KONG D Q, et al. A programmable protease-based protein secretion platform for therapeutic applications[J]. Nature Chemical Biology, 2024, 20(4): 432-442.
- [199] VÁZQUEZ TORRES S, LEUNG P J Y, VENKATESH P, et al. *De novo* design of high-affinity binders of bioactive helical peptides[J]. Nature, 2024, 626(7998): 435-442.
- [200] HELLWEG L, EDENHOFER A, BARCK L, et al. A general method for the development of multicolor biosensors with large dynamic ranges[J]. Nature Chemical Biology, 2023, 19(9): 1147-1157.
- [201] TELLECHEA-LUZARDO J, STIEBRITZ M T, CARBONELL P. Transcription factor-based biosensors for screening and dynamic regulation[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1118702.
- [202] SEGALL-SHAPIRO T H, SONTAG E D, VOIGT C A. Engineered promoters enable constant gene expression at any copy number in bacteria[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(4): 352-358.
- [203] SHAO B, RAMMOHAN J, ANDERSON D A, et al. Single-cell measurement of plasmid copy number and promoter activity[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1475.
- [204] PARK G, YANG J N, SEO S W. Dynamic control of the plasmid copy number maintained without antibiotics in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Engineering, 2024, 18(1): 71.
- [205] ROTTINGHAUS A G, FERREIRO A, FISHBEIN S R S, et al. Genetically stable CRISPR-based kill switches for engineered

- microbes[J]. Nature Communications, 2022, 13: 672.
- [206] NAHER L, QUARIN S M, VANG D, et al. Lyophilizing SERS biosensors to enable translation into an easy-to-use assay[J]. Analytical Methods, 2024, 16(44): 7613-7623.
- [207] GOEL P, VISHWESWARAIAH R H, KUMAR N. Spore-based innovative paper-strip biosensor for the rapid detection of β -lactam group in milk[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 21965.
- [208] VOLPETTI F, PETROVA E, MAERKL S J. A microfluidic biodisplay[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(11): 1979-1987.
- [209] WRIGHT O, DELMANS M, STAN G B, et al. GeneGuard: a modular plasmid system designed for biosafety[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(3): 307-316.
- [210] ELLIS T, WANG X, COLLINS J J. Diversity-based, model-guided construction of synthetic gene networks with predicted functions[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(5): 465-471.
- [211] CALLURA J M, DWYER D J, ISAACS F J, et al. Tracking, tuning, and terminating microbial physiology using synthetic riboregulators[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(36): 15898-15903.
- [212] PINHEIRO V B, TAYLOR A I, COZENS C, et al. Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution[J]. Science, 2012, 336(6079): 341-344.
- [213] HAYASHI N, LAI Y, FUERTE-STONE J, et al. Cas9-assisted

biological containment of a genetically engineered human commensal bacterium and genetic elements[J]. Nature Communications, 2024, 15: 2096.

- [214] SUN S W, CHEN J J. Recent advances in hydrogel-based biosensors for cancer detection[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2024, 16(36): 46988-47002.



通讯作者: 王宝俊(1982—),男,浙江大学求是讲席教授,教育部“长江学者奖励计划”讲席学者。研究方向为合成生物学和生物工程,长期从事合成生物使能技术、基因线路设计研究及其在生物传感、智能诊疗和生物制造领域的创新应用。

E-mail: baojun.wang@zju.edu.cn



第一作者: 邓稼轩(2002—),男,博士研究生。研究方向为基于基因线路的合成生物传感器设计与肿瘤诊疗应用。

E-mail: jiaxuan.deng@zju.edu.cn