

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-021

基因回路型全细胞微生物传感器的设计、优化与应用

杨璐¹, 吴楠¹, 白茸茸¹, 董维亮^{1,2}, 周杰^{1,2}, 姜岷^{1,2}

(¹ 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816; ² 南京工业大学材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816)

摘要: 基于合成生物学理念构建的基因回路型全细胞微生物传感器作为生物传感器的一大重要分支, 能够感知环境中特定的待测物质, 并按照一定规律将其转换成特定的信号输出, 在生物制造过程监控、环境监测与食品安全、医疗诊断与监护等领域的检测应用中显现出巨大的潜力。随着合成生物学各项技术的日益完善和遗传元件的逐渐丰富, 越来越多的基于不同响应机制、不同逻辑门与逻辑回路的全细胞微生物传感器已被陆续开发。然而, 目前基因回路型全细胞微生物传感器的设计与构建仍主要依靠假设-试错循环的经验性方法。如何设计与构建具有高响应特性的基因回路型全细胞传感器, 以及如何对元件、基因回路的优化提高其传感检测性能以满足不同实际应用场景的检测需求, 是目前亟需解决的瓶颈问题。本文将主要对基因回路型全细胞生物传感器的原理、分类以及发展历程进行综述, 着重介绍全细胞微生物传感器基因回路的设计与构建原则、传感检测性能的优化策略以及在不同检测领域的应用进展, 最后剖析了目前全细胞微生物传感器面临的生物安全性、设计构建烦琐、缺乏高效便捷性、难以进入传感器市场等诸多挑战, 以及对人工智能、合成生物学、液滴微流控等新兴技术将加速遗传传感元件的开发和生物传感器的人工设计与构建进行了展望。

关键词: 全细胞生物传感器; 转录因子; 核糖开关; 基因回路; 传感检测

中图分类号: Q812 文献标志码: A

Design, optimization and application of whole-cell microbial biosensors with engineered genetic circuits

YANG Lu¹, WU Nan¹, BAI Rongrong¹, DONG Weiliang^{1,2}, ZHOU Jie^{1,2}, JIANG Min^{1,2}

(¹College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; ²State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China)

Abstract: Whole-cell microbial biosensors with engineered genetic circuits constructed based on the concept of synthetic biology is an important branch of the biosensor. Whole-cell microbial biosensor is mainly composed of the sensing module, the computing module and the output actuating module. It can sense the concentration of specific

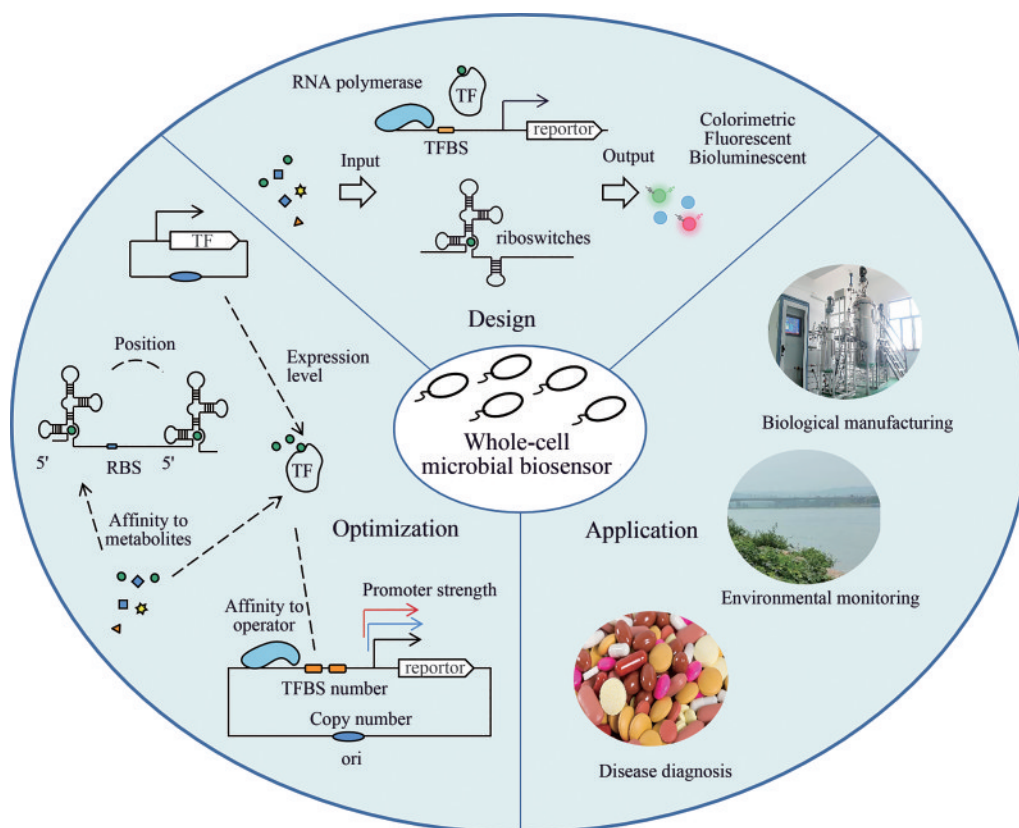
收稿日期: 2021-02-07 修回日期: 2021-04-23

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项(2018YFA0902200); 国家自然科学基金(21727818, 31961133017)

引用本文: 杨璐, 吴楠, 白茸茸, 董维亮, 周杰, 姜岷. 基因回路型全细胞微生物传感器的设计、优化与应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1061-1080

Citation: YANG Lu, WU Nan, BAI Rongrong, DONG Weiliang, ZHOU Jie, JIANG Min. Design, optimization and application of whole-cell microbial biosensors with engineered genetic circuits[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1061-1080

substances in the environment and then transfer it to specific signal outputs in time according to certain rules, which shows great potential in bioengineering process control, environmental monitoring, food safety, environmental quality monitoring and disease diagnosis and control, etc. With the improvement of various technologies in synthetic biology and the enrichment of genetic elements, more and more whole-cell microbial sensors based on different response mechanisms, different logic gates and logic circuits have been developed. However, the design and construction of genetically engineered whole-cell microbial biosensor still mainly rely on the empirical method of trial-and-error-learning. Therefore, how to design and construct high performance genetically engineered microbial whole-cell biosensors and how to tune its response curves by optimizing genetic elements or circuits to meet the detection requirements of different practical application scenarios is the new and important challenge. Here we reviewed the principle, classification and development process of genetically engineered whole-cell biosensor. We also focused on the design and construction of genetic circuit based on transcription factors and riboswitches, discussed optimization strategies for improving biosensor detection performance including dynamic range, specificity and working range, and then summarized its application progress in different detection fields. The optimization strategies are mainly involved in changing the expression level of genetic elements, adjusting the binding affinity between metabolites and genetic elements, restructuring the position of functional domains, etc. Finally, some challenges, such as biological safety, cumbersome design and construction, and inconvenience to enter the sensor market were discussed. It is expected that emerging technologies such as artificial intelligence, synthetic biology, and droplet microfluidics, will accelerate the development of genetic regulatory elements and the design and construction of novel biosensors.



Keywords: whole-cell microbial biosensor; transcription factor; riboswitch; genetic circuit; detection

生物传感是在生物学、医学、电化学、光学、热学及电子技术等多种学科相互交叉中新兴的一种检测技术。生物传感器 (biosensor) 是以生物学组件作为主要功能元件, 能够感应特定的待测物质, 并按照一定规律将其转换成可识别信号的器件或装置。全细胞微生物传感器 (whole-cell microbial biosensor) 是指以微生物细胞作为感受元件, 将收集的待测分子信息转换为光、电等信号, 信号强度与待测物含量成正比, 从而实现对细胞内外的待测物进行定量和定性动态监测, 是生物传感器的一大重要分支。与传统的化学和电子检测方法相比, 全细胞微生物传感器具有成本低、体积小、可降解、分析速度快、可在线或原位分析等优点, 并且能检测极微量的待测物质, 在生物制造过程监控^[1]、环境监测与食品安全^[2]、医疗诊断与监护^[3]等领域有极高的应用价值。

合成生物学 (synthetic biology) 是一门利用工程学设计理念来构建具有不同功能生物体系的新兴学科。伴随着合成生物学的快速发展, 利用微生物在不同环境条件下的进化优势和天然存在的调控元件, 结合基因回路工程化设计和优化, 研究者开发了一系列对底物 (代谢物、药物等) 以及环境波动 (温度、pH、有毒化合物等) 响应灵敏性高、特异性强的基因回路型全细胞微生物传感器。尽管基因回路型全细胞微生物传感器在不同领域检测方面已展现了巨大的潜在优势, 但目前全细胞微生物传感器的设计与构建仍主要依赖于“假设-试错”循环的经验性方法。如何理性设计基因回路来调控传感性能, 使工程化全细胞微生物传感器具备满足实际应用需求的响应特性成为亟需解决的难题。本文将主要对近年来基因回路型全细胞生物传感器的原理、发展历程以及基因回路的设计、构建与优化原则进行综述, 并介绍其在生物制造过程监控、环境监测与食品安全、医疗诊断与监护等领域应用的研究进展, 以期对未来基因回路型全细胞微生物传感器的理性设计、传感性能可控优化及检测应用提供参考。

1 全细胞微生物传感器及其发展概况

随着经济发展, 人们生活水平迅速提高, 亚

健康问题、食品安全问题、环境卫生问题越来越受到全社会的关注。作为传统色谱检测分析手段的补充, 全细胞微生物传感器具有其独特的优势。与此同时科学技术迅猛发展, 以微生物全细胞作为敏感元件构建生物传感的技术显示了巨大的优势和发展前景。

1.1 全细胞微生物传感器的分类

根据作用原理的不同, 全细胞微生物传感器可大致分成四类^[4]:

(1) 电活性物质测定型微生物传感器 微生物细胞与底物作用后生成各种电极敏感代谢产物 (如 H_2O_2 、还原型辅酶等), 利用对某种代谢产物敏感的电极即可检测原底物的浓度。

(2) 呼吸活性测定型微生物传感器 微生物细胞与底物作用后, 在同化样品中有机物的同时, 微生物细胞的呼吸活性有所提高, 反应中消耗的溶解氧量或生成的二氧化碳量, 反映了被微生物同化的有机物的量。

(3) 荧光共振能量转移型 (FRET) 生物传感器 该微生物传感器利用 Förster 荧光共振能量转移, 自荧光蛋白供体-受体对与小分子底物作用后结构改变, 进而导致的荧光变化反映了底物的量。

(4) 基因回路型微生物传感器 待测物可诱导微生物细胞中转录因子或核糖开关发生别构效应, 故设计与构建特定的基因回路, 实现对待测物质的感知与下游报告基因的表达。

报告基因的表达通常是可检测的, 其输出信号可供定量或定性检测, 包括荧光信号、比色参数、生物发光信号、细胞存活等 (图1)。基因回路型微生物传感器凭借其可在线实时原位表征胞内外代谢物浓度的能力, 为研究者们打开了微生物细胞内信号及环境变化的视野, 逐渐成为合成生物学研究的重要工具, 本文将着重介绍基因回路型全细胞微生物传感器。

1.2 全细胞微生物传感器的发展

早在1967年, Updike和Hicks^[5]将氧化酶薄膜覆盖在铂电极上, 制成了首个酶生物传感器。然而, 酶纯化制备过程烦琐、成本昂贵且稳定性

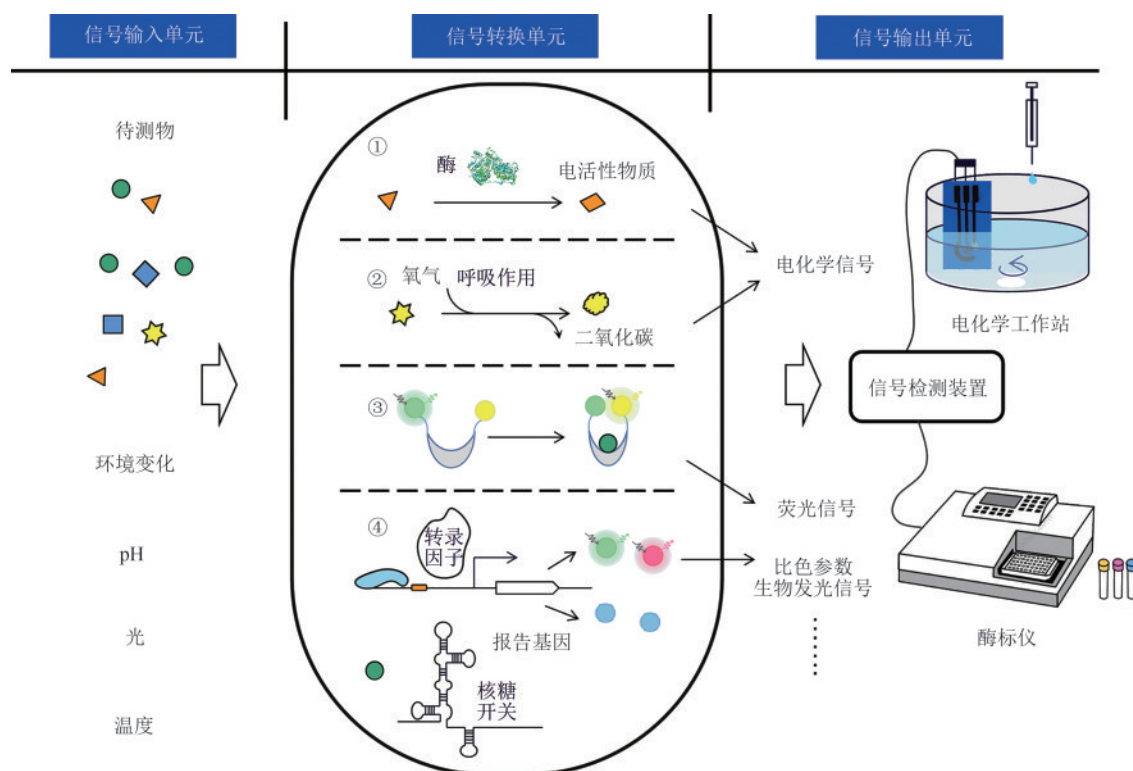


图1 全细胞微生物传感器的分类

Fig. 1 Classification of whole-cell microbial biosensor

Signal input: metabolites, environmental change, pH, light, temperature. **Signal conversion:** ① microbial biosensor for electroactive substances, ② microbial biosensor for respiratory activity, ③ fluorescence resonance energy transfer biosensor, ④ microbial biosensor with genetic circuit. **Signal output:** electron, fluorescence, colorimetry, bioluminescence that can be detected by electrochemical workstations microplate reader system.

易受环境影响等问题不容忽视。微生物细胞具有培养成本低廉，通过细胞繁殖可快速复制扩增、鲁棒性强等优势，将全细胞作为生物敏感元件有效克服了酶生物传感器的缺点。1981年，Bulich等^[6]利用毒性物质抑制发光细菌呼吸从而影响自身荧光强度的原理，首次实现了生物菌群对环境水样总毒性的非特异性检测，打开了全细胞微生物传感器的大门。自此之后，对细胞代谢物以及疾病关键物质响应的遗传元件也陆续被挖掘，全细胞微生物传感器逐步应用在生物制造和疾病诊断领域。Farmer等^[7]通过响应乙酰磷酸的转录因子NRI感知细胞内过量糖酵解通量，利用与其结合的启动子控制番茄红素合成关键酶基因的表达，构建了番茄红素通量动态传感调节器。Aravanis等^[8]敲除小鼠心肌细胞 β_1 -肾上腺素能受体，用微电极阵列测量野生和改造心肌细胞的自发搏动率，简化了异丙肾上腺素敏感信号分析及特定功能活性测定。

为实现对外界复杂信号环境的准确识别与信号表达，全细胞微生物传感器由最初对单一信号的输入输出向对多个输入信号做出响应的复杂基因回路设计发展。早在1999年，Weiss^[9]就提出了从数字逻辑电路映射到遗传调控网络的想法，使用抑制型转录因子构建了简单NOT逻辑门。自此之后，OR、AND、NOT、XOR、NAND、NOR等复杂的模块化逻辑门结构被设计与构建，并用于多层次基因回路型全细胞微生物传感器的开发^[10-11]。在大自然的更迭进程中，微生物已进化出多种分子响应机制，但是天然遗传传感元件仍不能满足人类研究和生产的需求。研究者们通过生物基因工程技术对现有的基因响应元件进行分子设计与改造，极大地丰富了全细胞微生物传感器。同时，随着大数据的快速发展和对遗传元件的深入解析，各类数据库也不断开发。2012年，华中科技大学郭安源教授团队^[12]建立了AnimalTFDB数据库，涵盖97类动物全基因组转录因子信息

12万余,是国内首个自主开发和维护的转录因子数据库,为全细胞微生物传感器的研究提供了庞大的元件基础。随着全细胞微生物传感器的检测应用场景的不断拓宽以及检测要求的不断提高,借助合成生物学中启动子工程、蛋白质工程等手段,研究人员已经建立了多种全细胞传感器检测性能的优化策略,实现对灵敏度、动态范围等检测性能的设计与优化^[13-14]。Ding等^[15]将人工智能应用于预测与优化全细胞微生物传感器的动态范围,建立的基于卷积神经网络的深度学习分类模型可实现核糖体结合位点(RBS)到生物传感器动态范围的可预测翻译调整。人工智能的发展为基因回路型全细胞微生物传感器的理性设计与优化提供了无限可能(图2)。

近年来,国家重点研发计划合成生物学专项连续3年围绕人工元器件与基因线路的任务部署了高灵敏环境持久性有毒污染物感知与识别生物系统(2018年)、代谢病诊疗基因回路的设计合成(2019年)、生物工业过程监控合成生物传感系统

(2019年)、有毒金属感知修复的智能生物体系(2020年)和高通量新型污染物生物筛选系统构建与环境监控应用(2020年)等5个项目,资助金额超亿元,为进一步阐明合成生物传感器设计与构建原则以及解决在实际应用过程中检测问题等一系列挑战提供了科技支撑与布局。

2 基因回路型全细胞微生物传感器构建原理

全细胞微生物传感器的功能由基因回路决定,基因回路主要由信号识别模块(sensing module)、信号转换模块(computing module)和输出/执行模块(output actuating module)构成。识别装置用于响应小分子代谢物等输入信号,以诱发转换模块产生构象改变,激活或者抑制下游信号输出模块的转录或者翻译。自然界中存在丰富的响应机制不同的信号识别与转换元件,如转录因子(transcription

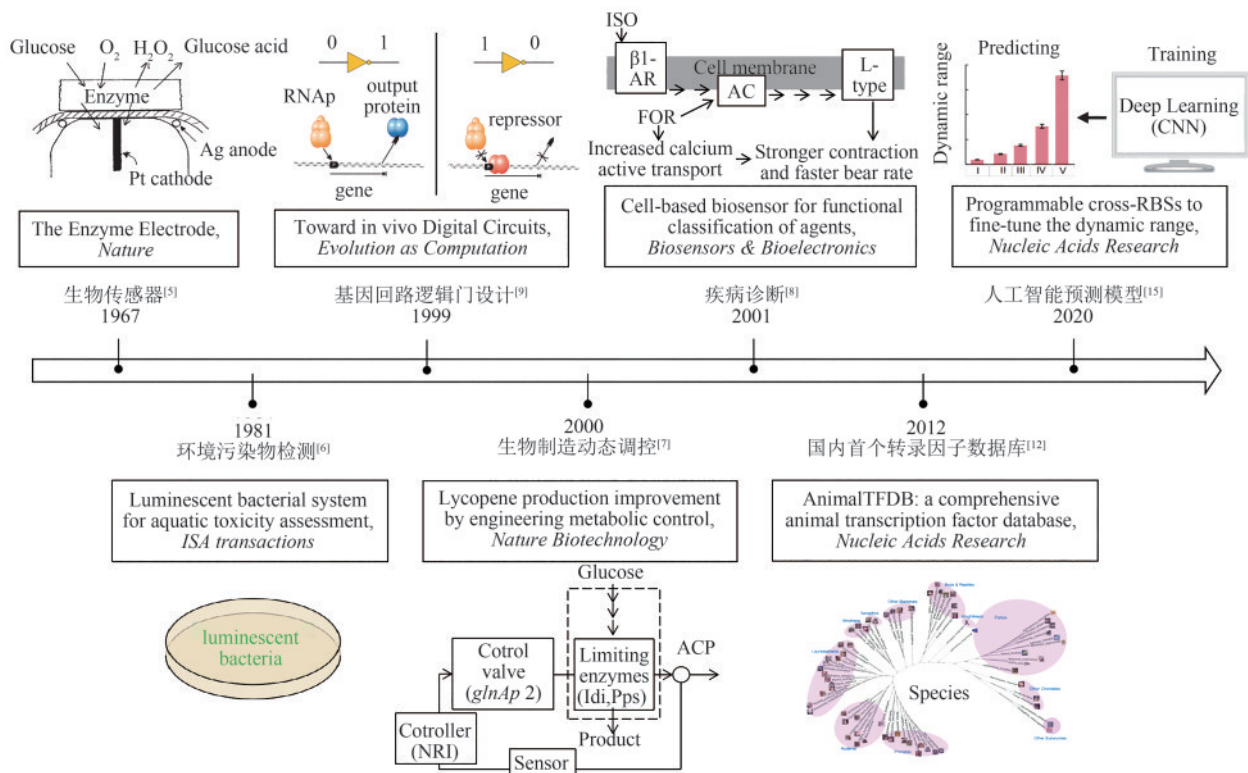


图2 全细胞微生物传感器研究进展及重要成果

Fig. 2 A brief timeline and important achievements in whole-cell microbial biosensor

(biosensors invention, environmental pollutants detection, logic gate design of genetic circuits, dynamic control in fermentation process, disease diagnosis, Transcription factor database, artificial intelligence prediction model.)

factors, TFs)、核糖开关 (riboswitches) 以及双组分信号转导系统 (two-component system, TCS) 等。信号输出模块为可监测的报告基因或者可指导代谢通路的相关基因, 通常由实际应用场景决定。本节将着重介绍最为常见的基于转录因子、核糖开关和报告基因的基因回路型全细胞微生物传感器构建原理。

2.1 全细胞微生物传感器的信号识别与转换

2.1.1 转录因子生物传感器的信号识别与转换

转录因子调控结构是目前研究与应用最为广泛的基因回路传感元件, 主要由转录因子和含转录因子结合位点 (transcription factor binding site, TFBS) 的启动子构成 (图3)。转录因子具有两个功能域: 配体结合域 (ligand-binding domain, LBD) 和 DNA 结合域 (DNA-binding domain, DBD)。配体结合域为传感元件的信号接收模块, 决定了配体的特异性与多样性, 与操作范围密切相关。DNA 结合域为信号转换模块, 可与转录因子结合位点的碱基对非共价作用进行特异性识别。DNA 结合域的位置与转录调控机制有关, 一般地, 在抑制体系中 DNA 结合域多位于转录因子的 N 端,

在激活体系中 DNA 结合域多在转录因子的 C 端^[16]。转录因子结合位点是一段特殊的 DNA 序列, 通常具有对称性, 多存在直接重复和回文序列。将转录因子结合位点插入到启动子序列的不同位置并本底表达转录因子是最常见的依赖于转录因子的全细胞生物传感器构建策略。

在配体存在的情况下, 转录因子优先结合配体诱发 DNA 结合域的构象变化, 脱离或结合启动子上的转录因子结合位点, 通过空间位阻效应调节 RNA 聚合酶与启动子的结合激活或者抑制转录, 从而调控信号的输出。在此基础上, 也有研究者将转录因子激活型回路进行反向构建, 通过 RNA 聚合酶空间位阻效应和反义 RNA 耦合机制干扰正向报告基因表达, 从而进行 ON 和 OFF 状态的转换, 构建抑制型基因回路, 丰富了全细胞生物传感器的多样性^[17]。

2002 年以来, 随着转录因子调控机制的深入解析和开发, 国内外各研究所对转录因子和转录因子结合位点大数据进行收集、归纳和分析, 陆续开发了相关数据库, 如 TRANSFAC、PAZAR、JASPAR、TRRD 等, 为基于转录因子调控的全细胞微生物传感器设计开发提供坚实基础。至今, 研究者们已陆续成功开发了木糖^[18]、阿拉伯

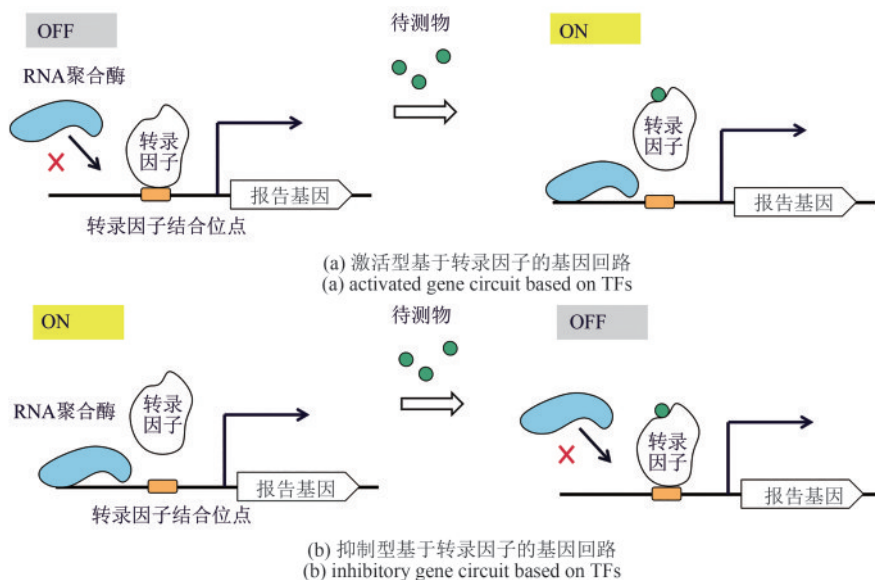


图3 基于转录因子全细胞微生物传感器构建原理

Fig. 3 Construction principle of whole-cell microbial biosensor based on TFs

[Transcription factors (TFs) preferentially bind to ligands and induce conformational changes in the DNA binding domain (DBD). TFs, via their DBD, recognize and bind to a particular DNA-regulatory sequences called binding sites. This may result in increased or decreased reporter gene transcription by promoting or blocking the recruitment of RNA polymerase.]

糖^[19]、丙二酰辅酶A^[20]、黏康酸^[21]、葡萄糖胺-6-磷酸^[22]、乙酰磷酸^[7]等依赖于天然转录因子的全细胞生物传感器，并基于大数据和基因工程手段不断挖掘、设计和开发具有新功能的遗传元件。设计模拟天然转录因子的结构，或者利用天然转录因子的两种结构的不同组合，可创造出天然不存在的转录因子。基于转录因子明确的功能域区分，Tungtur^[23]率先尝试整合了LacI的DNA结合域和PurR的配体结合域，开启了人工转录因子构建的进程。虽然结构域重组不会改变独立域的功能，但两个结构在连接序列上的相互作用复杂，仍是研究者需要攻克的一大难点。

2.1.2 核糖开关生物传感器的信号识别与转换

核糖开关是一类主要存在于细菌mRNA的5'非编码区(5' UTR)的顺式调节元件，通常由适

配体(aptamer)和表达平台(expression platform)两个功能域组成。适配体可特异性识别配体，进而诱发表达平台的别构作用通过转录起止、翻译起止和mRNA自剪切等机制控制基因的表达(图4)。

转录起止型核糖开关位于目的基因序列内部，只有当核糖开关与配体结合时发生内在终止子结构构象改变，基因才得以完成或终止转录。翻译起止型核糖开关表现为在结合配体后其茎环结构重排释放或遮蔽核糖体结合位点RBS，使得核糖体可以结合或脱离从而调节下游基因翻译表达。mRNA自剪切型核糖开关通过抑制或激活核酶活性，调控mRNA自剪切情况，从而控制翻译完整度。

2002年，Winkler等^[24]发现大肠杆菌中维生

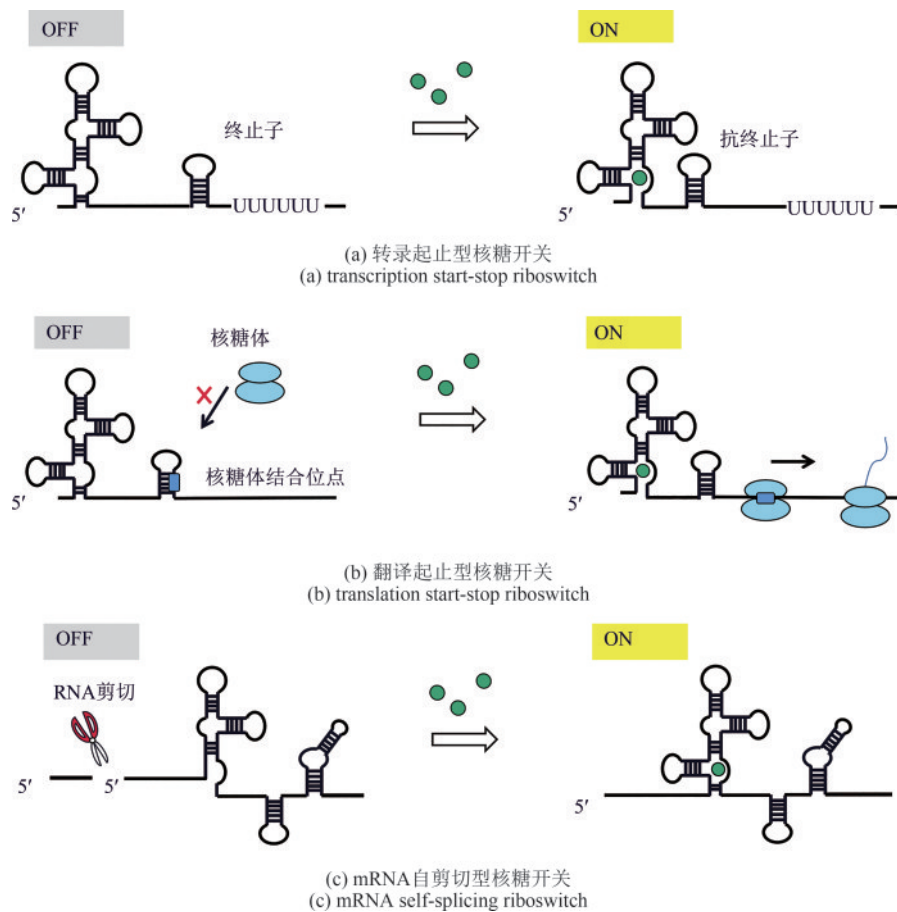


图4 基于核糖开关全细胞微生物传感器构建原理

Fig. 4 Construction principle of whole-cell microbial biosensor based on riboswitches

[Regulation by riboswitch. The riboswitch binds with a metabolite (a) to breaks formation of a terminator hairpin, leading to promote transcription of the reporter gene; (b) to activate translation of a reporter gene via its conformational change; or (c) to stabilize mRNA by blocking cleavage site in mRNA, leading to active translation of a reporter gene.]

素 B₁₂ 转运蛋白的 mRNA 可以结合硫胺素或其焦磷酸衍生物从而隔离核糖体结合位点导致基因表达降低, 首次提出核糖开关的概念。迄今为止, 已被开发的天然核糖开关效应物有 20 多种, 主要为基础代谢物, 包括氨基酸 (如甘氨酸^[25]、赖氨酸^[26])、辅因子 (硫胺素焦磷酸^[27]、黄素核苷酸^[28])、金属离子 (如 Mg²⁺^[29]、Mn²⁺^[30]) 等。此外, 通过对现有适配体和表达平台结构的合理设计改造, 四环素^[31]、四氢叶酸^[32]、茶碱^[33] 等人工核糖开关也陆续被开发。相比于转录因子调控机制, 核糖开关只由非编码 RNA 调控, 不依赖于蛋白质, 调控机制简单, 容易转移至其他微生物底盘中以设计与构建传感基因回路结构, 还具有配体特异响应快、对细胞代谢造成的负担小等优点, 有非常大的应用潜力。

2.2 全细胞微生物传感器的信号输出

在设计与构建全细胞微生物传感器时, 根据全细胞微生物传感器报告基因的信号输出强度, 建立与待测物含量之间的关系, 从而实现对细胞内外的待测物进行定量和定性动态监测。因此, 根据不同检测应用场景选择信号稳定且易于检测的报告基因以及考虑输出信号的检测方式尤为重要^[34]。根据信号检测方式, 目前生物传感器设计中已广泛使用的报告基因可大体分为 3 类: 荧光蛋白、比色基因和生物发光基因等。

荧光基因 (绿色荧光蛋白 *gfp*^[35]、红色荧光蛋白 *rfp*^[36] 等) 是目前应用最为广泛的一类报告基因, 在特定的激发光下可以快速准确测量荧光强度, 结合荧光激活细胞分选技术更是能够实现目的菌株的高通量筛选。为获得直接可视化效果, 比色基因 (β -半乳糖苷酶 *lacZ*^[37]、类胡萝卜素色素 *crtA*、*crtI*^[38] 等) 也被用于全细胞微生物传感器的构建中。不同地, Aleksic^[39] 设计了具有 pH 响应的硝酸盐大肠杆菌生物传感器, 无硝酸盐时表达脲酶增加 pH, 硝酸盐存在时表达 β -半乳糖苷酶 *lacZ*, 催化大肠杆菌乳糖发酵到乙酸和乳酸以降低 pH。生物发光基因 (萤火虫荧光素酶 *luc*^[40]、细菌荧光素酶 *lux*^[41] 等) 也是基于生化反应产生光, 但不需要激发光源。近期, 具有高发光活性和小尺

寸的新型纳米荧光素酶^[42] 逐渐成为全细胞生物传感器的首选生物发光报告基因。Lopreside 团队^[43] 更是系统性地研究了荧光报告基因 (*GFP*、*deGFP*、*mCherry* 和 *mScarlet-1*)、比色报告基因 (*lacZ*)、生物发光报告基因 (*NanoLuc*、*luxCDABE*) 等 3 类 8 种报告基因对全细胞微生物传感器的检测性能的影响。

3 全细胞微生物传感器的性能评价

全细胞微生物传感器的响应性能决定了其能否成功应用于实际应用场景的检测, 其性能主要包括特异性、操作范围、动态范围、灵敏度、稳定性, 响应时间以及安全性等 (表 1)。传感性能的评价主要由 Hill 方程拟合的输入输出响应曲线呈现 (图 5), 待测物浓度与生物传感器响应输出之间的关系刻画了全细胞生物传感器的转换函数, 提供了生物传感器的性能信息。其中特异性是指在复杂环境中特异性识别待测物的能力, 要求与该待测物结合时的输出信号较其他潜在配体具有明显差异。操作范围是待测物浓度的可检测范围, 是生物传感器工作弹性的体现, 在此范围内, 输出信号随待测物输入信号呈正相关变化。宽操作范围意味着可以测量更宽范围的底物浓度, 削弱对信号输入的严苛要求。动态范围定义为存在与不存在待测物时的最大输出信号 (ON 状态) 与最小输出信号 (OFF 状态) 的比例。高动态范围有利于输出信号与背景噪声的区分从而降低假阳性信号的概率, 并且有助于区分底物浓度的微小差异, 为检测提供更高精度。待测物分子检测的灵敏度和特异性是两个密不可分的参数。灵敏度反映全细胞生物传感器对待测物的敏感程度, 即信号输入与输出变化程度的比值, 由响应曲线斜率呈现。此外, 基于合成生物学工程化的全细胞微生物传感器属于转基因生物 (genetically modified organism, GMO), 可能造成的社会风险和与之相伴的生物安全问题也是考核的指标之一, 要求其符合合成生物学伦理以及相关安全政策、法规和指南。

表1 全细胞微生物传感器性能参数^[44]Tab. 1 Evaluation of whole cell microbial sensor^[44]

评价指标	描述
特异性	在复杂环境中专一性识别待测底物的能力
灵敏度	对待测物浓度变化的敏感程度
动态范围	最大输出信号和最小输出信号的比例
操作范围	输入与输出呈单一正相关或负相关的输入信号浓度范围
稳定性	样品检测过程中保持性能恒定的能力
响应时间	信号输入到信号输出的总时间
安全性	是否存在基因泄露转移、吸收外源DNA或潜在有害突变等风险

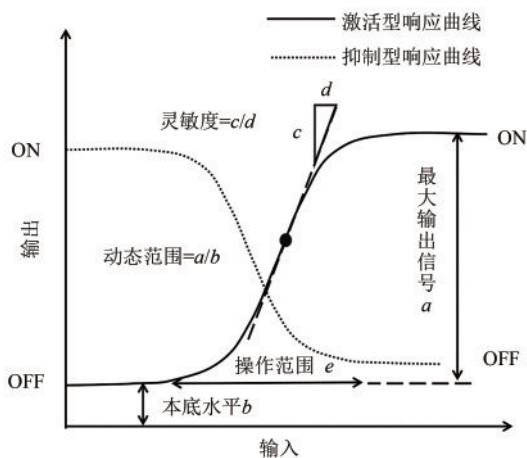


图5 全细胞生物传感器的Hill方程曲线

Fig. 5 Response curve of whole-cell microbial biosensor

(Main response performance parameters: maximum output signal a , background level b , dynamic range a/b , sensitivity c/d , operational range e .)

4 基因回路理性设计与响应性能优化

生物传感器往往需要可调节的响应性能以满足不同应用场景的需求。在多数细胞生物传感器的检测过程中，由于微生物本体的特殊性，我们无法对细胞内底物进行稀释、预分离等样品处理，也不能随意改变维持细胞内稳态以及维持生长条件等。此外，在设计复杂代谢通路的动态调控时，每个基因的代谢通量不同，要求上游基因的动态范围与下游目标的操作范围相兼容。这对全细胞生物传感器在动态范围、操作范围等性能方面提出了更高的要求，也意味着研究者们需要具备开发和操纵基因回路型全细胞生物传感器检测性能的能力。

4.1 基因回路微生物传感器响应性能影响因素

全细胞微生物传感器响应性能可通过改变遗传元件表达水平、代谢物与遗传元件的结合亲和力以及调整功能结构域位置等策略进行调节。影响因素包括核糖开关位置以及与配体结合情况、转录因子的蛋白质工程改造、转录因子与识别序列的结合情况、转录因子表达量、启动子强度等(图6)。其中，核糖开关的优化策略多集中于配体结合域的改造，如点饱和和突变和基于SELEX系统进化等。转录因子的蛋白质工程主要涉及DNA结合域和配体结合域的改造，直接影响其与识别序列、配体的结合情况。转录因子与识别序列的结合情况还与转录因子结合序列情况、位置及数量密切相关。此外，转录因子表达量的改变可有效调节全细胞微生物传感器的操作范围。通过更换不同强度的启动子从而改变报告基因转录水平可改变动态范围、本底表达水平等响应性能。目前基因回路型全细胞微生物传感器响应性能的优化往往采用对不同影响因素进行组合优化的策略。本节我们将对转录因子和核糖开关两种类型的全细胞微生物传感器性能优化策略进行详细的分类论述。

4.2 依赖于转录因子的全细胞生物传感器性能优化策略

依赖于转录因子的全细胞生物传感器可通过蛋白质工程、启动子工程以及蛋白质表达水平等手段对操作范围、动态范围、特异性、灵敏度等响应性能进行优化。虽然其调节机制较为明晰，但通常任一结构的改变会影响整个传感响应曲线，往往需要不断试错循环以得到预期的性能参数。

4.2.1 基于蛋白质工程的优化策略

转录因子包含配体结合域和DNA结合域两大功能域，与配体和DNA直接相互作用，从而间接影响RNA聚合酶的结合，在全细胞微生物传感器中发挥着关键作用。因此，通过随机/点饱和和突变、理性设计等蛋白质工程手段改造转录因子可有效改变其与配体以及DNA的亲和力，从而调节全细胞微生物传感器的传感性能参数。

Tang等^[18]对转录因子XylR进行整体随机突

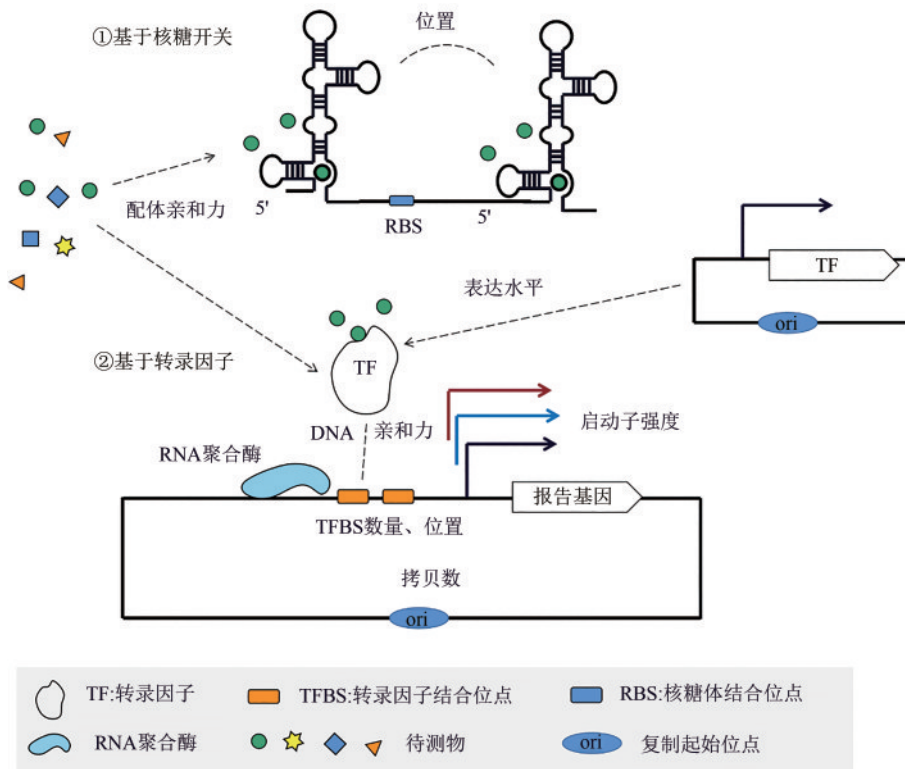


图6 全细胞微生物传感器响应性能优化原则

Fig. 6 Optimization principles of whole-cell microbial biosensor response performance

(The major impact factors of the performance of whole-cell microbial biosensor include the binding affinity of metabolites to TFs or riboswitches, and TFs to operators, functional domains position, TFs expression level, promoter strength, plasmid copy number, etc.)

变，筛选到木糖微生物传感器操作范围增加了近10倍的XylR突变体(L73P或N220T)。对转录因子DmpR进行定向进化构建的几个4-硝基苯酚全细胞微生物传感器在操作范围和动态范围上都有所拓宽，但与野生型相比，本底表达水平也更高^[45]。类似地，Shin团队^[46]在转录因子NahR残基169和248处引入突变，构建了一系列响应性能的水杨酸全细胞微生物传感器，并获得灵敏度提高约50倍的突变NahR。这些研究证实了通过蛋白质工程策略优化全细胞微生物传感器响应曲线的可行性和潜在通用性。另外，不同来源的转录因子构建的微生物传感器也已被证实动态范围、操作范围等性能上有截然不同的表现^[47-48]。

转录因子配体结合域直接决定配体特异性，从转录因子配体结合域出发突变改造，可以拓宽或改变全细胞生物传感器的特异性。通过对尿素转录因子HucR底物结合口袋的四个氨基酸位点进行点饱和突变，Liang等^[49]结合荧光激活分选技术高通量筛选得到对香草醛低响应同时对阿魏酸

高响应的HucR突变体。类似地，来自于大肠杆菌的L-阿拉伯糖转录因子AraC被分别改造成响应D-阿拉伯糖^[19]、甲羟戊酸^[50]、三乙酸内酯^[51-52]和四氢嘧啶^[53]的转录因子，恶臭假单胞菌转录因子TtgR被改造为特异性识别白藜芦醇的突变体^[54]，粪产碱菌调节蛋白NitR突变为高特异识别内酰胺的转录因子^[55]等。这些研究表明，突变配体结合位点残基可以在不影响转录因子变构功能的情况下有效改变配体特异性。

此外，由于转录因子具有明确的功能域，在一定程度上可以模块化分离和重组，在天然转录因子的模块化结构基础上可进行设计构建人工转录因子。Meinhardt等^[56]将阻遏蛋白LacI的DNA结合域分别融合至9个不同配体结合域构建了一系列重组蛋白，构建的重组蛋白保留了各自配体的特异性和变构效应，但仍存在部分配体结合域和DNA结合域界面不匹配的问题。Chou和Keasling^[57]报道了一种新型杂合转录因子的设计，提出以代谢酶作为配体结合域的构想，将异戊烯

二磷酸异构酶序列分别融合到与转录因子 AraC 和 Gal4 的 DNA 结合域, 利用其与异戊烯二磷酸结合后的二聚化效应, 构建了异戊烯二磷酸人工转录因子。

4.2.2 基于启动子工程的优化策略

启动子包含 RNA 聚合酶识别、结合位点, 是决定转录起始、影响转录速率的一段关键 DNA 序列, 已被证实与全细胞微生物传感器的响应曲线有着密切联系, 可通过改变启动子强度^[17,58]、转录因子结合位点位置^[17,59-60]和数量^[47,60]、转录因子与 DNA 结合力^[17]等手段影响转录因子/转录因子结合位点和 RNA 聚合酶/核心启动子的相互作用, 从而调节响应性能。

启动子强度直接影响报告基因的转录水平。天然脂肪酸 Fad 转录因子的启动子 P_{fadBA} 输出动态范围为 5 倍, 替换为噬菌体 T7 启动子后可提升至 60 倍^[58]。Chen 等^[61] 模块化组装了基于转录因子 AraC 和 LasR 的大肠杆菌诱导型启动子组合文库, 证实了动态范围主要由 -35 和 -10 位点的序列控制, 具体地, 通过影响 RNA 聚合酶 σ^{70} 与 DNA 结合的平衡常数 K_{eq} 值来调节动态范围, 并在此基础上建立了一个热力学模型以支持平衡常数 K_{eq} 参数对转录起始速率和诱导折叠的预测, 以此为依据快速选择最佳组合构建了具有高诱导性和低本底表达的双输入和多输入的杂合启动子。

调节转录因子结合位点的位置、数量和结合力也可用于动态范围、操作范围、灵敏度的响应性能优化。转录因子结合位点的引入除了增强对启动子的抑制, 同时也会稍降低基础启动子活性, 往往需进行综合评估。David 团队^[60] 考察了转录因子 FapR 结合位点在 P_{TEF1} 启动子中的数量和位置, 整合 3 个 FapR 结合位点时动态范围提升至 7 倍。Xu 等^[17] 对转录因子 PdhR 结合位点的非保守区域进行突变以调节与 PdhR 的亲和力, 并细致考察 PdhR 结合位点与转录起始位点+1 的距离, 最终获得一系列动态范围在 0.6 倍到 30.7 倍的启动子, 用于枯草芽孢杆菌中葡萄糖二酸代谢途径动态调控。

4.2.3 基于蛋白表达水平的优化策略

依赖于转录因子的全细胞微生物传感器从底物识别、信号转换及输出过程中离不开转录因子和报告基因的表达。调节转录因子或报告基因表

达水平是另一种优化全细胞微生物传感器操作范围和动态范围的有效策略。

细胞内转录因子表达量与配体操作范围关系最为密切。通过调节控制转录因子的启动子强度^[47]、转录因子拷贝数^[62]等方法调节转录因子表达水平, 可以有效改变待测物操作范围。在激活型转录因子生物传感器中, 低转录因子表达水平使得操作范围趋于较低浓度, 高转录因子表达水平可将操作范围推向较高的底物浓度。在抑制型转录因子生物传感器中, 高转录因子表达水平可支持较低 OFF 状态和低表达泄露, 有利于拓宽操作范围和动态范围, 为构建设计的首选。此外, Ding 等^[15] 通过随机组合不同翻译水平的转录因子 CdaR 和报告基因 *sfGFP* 的 RBS, 构建了 81 种交叉 cRBS 的葡萄糖酸生物传感器, 其中基于 R7M10 和 RM10 cRBS 的传感器动态范围高于自然存在的 cRBS RG10 的 9 倍, 证实了 RBS 可以有效调控全细胞微生物传感器的动态范围。

4.3 依赖于核糖开关的全细胞生物传感器性能优化策略

从分子工程角度来看, 核糖开关是一种非常理想、不依赖蛋白质、组成结构简单的人工基因开关系统, 但调节机制尚不明晰。现阶段, 对依赖于核糖开关的全细胞微生物传感器性能优化策略多集中在配体结合域突变^[63]、基于 SELEX 系统进化体系和理性设计新型核糖开关。

4.3.1 基于 SELEX 系统进化的核糖开关优化策略

指数富集型配体系统进化 SELEX 技术可用于体外筛选高亲和力和特异结合小分子的核苷酸序列, 具有无需掌握基因序列结构的优点。SELEX 技术耦合微生物体内筛选体系, 逐渐成为辅助开发人工核糖开关的有力工具。Jang 等^[64] 体外构建了库容量为 1.8×10^{15} 的初始 RNA 文库, 经过 8 轮混合、筛选及扩增后获得柚子素结合率为 26.1% 的富集文库, 以此构建了 $10^7 \sim 10^8$ 的核糖开关文库, 基于四环素/ Ni^{2+} 阳性阴性筛选策略, 成功构建了 6 种动态范围为 1.93~2.91 倍的柚子素核糖开关, 并提出核糖开关与 RBS 连接序列也会影响核糖开关的特异性。基于 SELEX 技术还成功开发了己内酰胺^[65]、组胺^[66]、L-色氨酸^[67]、新霉素^[68]、环丙沙

星等^[69]等人工核糖开关。

对于核糖开关,除了优良的结合性能,配体结合后的构象转换特性同样至关重要,而后者通常需要在细胞内进行筛选确定。然而,在富集文库中找到具有核糖开关特性的适配体的概率低于0.01%^[70],往往需要投入大量的时间和劳动力。据此 Boussebayle 等^[70]开发了 RNA 捕获-SELEX 技术,在文库的随机区域内插入小片段对接序列,从而可与偶联生物素的互补寡核苷酸杂交固定在链霉亲和素磁珠上,游离配体洗脱过程中仅构象改变的适配体可被释放,在高亲和力基础上增加同样重要的 RNA 构象转换筛选指标,大幅度减少了筛选工作,提高了人工核糖开关的开发效率,并成功构建了一种基于人工核糖开关的巴母霉素生物传感器。

4.3.2 基于理性设计的核糖开关策略

基于理性设计的人工核糖开关往往从现有的适配体和表达平台结构域出发,通过结构域重组、合理设计表达平台等手段得以实现。该策略往往需要对核糖开关的适配体和表达平台有深入的认识,且配体结合和信号转导在连接域上相互作用的构象变化复杂难以预测,因此仍难以作为一种普适性的设计指导方法。

来自于变形链球菌四氢叶酸核糖开关的适配体和来自于枯草杆菌核糖开关 MetE 的内在终止子区域融合已被证实可构成具有功能性的重组四氢叶酸核糖开关^[32]。原则上,从已知的适配体序列和二级结构出发,合理设计构造表达平台可以实现人工核糖开关构建。早在 1998 年, Werstuck 和 Green^[71]证明将体外小分子结合的 RNA 适配体克隆至基因 mRNA 的 5'-非翻译区域可用于翻译水平的调节,开创了首个“人工核糖开关”。基于此设计策略,越来越多的人工核糖开关得以开发^[72-73]。此外, Seuss 等^[74]提出了一种核苷酸滑动机制,将茶碱适配体与螺旋通信模块相结合,成功构建了翻译控制型人工核糖开关。通过将硫酸素焦磷酸核糖开关的天然适配体结构域耦合到核酶表达平台, Weiland 等^[75]构建了基于 mRNA 自剪切型的人工基因表达核糖开关。Wachsmuth 团队^[76]通过依次组合茶碱适配体、间隔序列文库、与适配体

部分互补的序列文库和尿嘧啶富集序列以从头构建内在终止子结构,基于 Vienna RNA 数据库进行 RNA 折叠模拟分析完整结构的共转录折叠路径,开发了具有功能性的人工茶碱核糖开关,为转录终止型人工核糖开关设计提供重要指导作用。

4.4 基因回路逻辑门设计

利用转录因子、核糖开关、启动子等遗传元件构建单线程基因回路已得到广泛应用。然而,细胞需要感知各种各样的环境信号,信号的单一输入输出难以用于复杂条件的准确识别表达,需要进行组合处理以产生更为复杂的逻辑转换。因此,利用工程化思维、模块化组装设计不同的基因回路逻辑门以满足现实复杂检测应用需求是未来的研究重点与方向。

目前在全细胞微生物传感器中已成功构建了 OR、AND、NOT、XOR、NAND、NOR 等逻辑门的基因回路(图 7)。OR/XOR 逻辑门要求至少存在一个输入信号即可驱动信号输出,在模块化单输入基因回路基础上,构建的多信号输入往往控制相同的一级输出基因,通过 RNAs、转录因子、伴侣蛋白等作用机制^[77]驱动或抑制二级信号的表达。AND 逻辑门需要所有输入信号才能打开输出,缺少任何一个输入将导致最终输出关闭。AND 逻辑门的构建将多个输入信号的不同一级输出偶联,协同驱动指导二级信号输出。Anderson 团队^[78]设计的 AND 逻辑门结构包括两个遗传元件, T7 RNA 聚合酶基因和无义抑制因子 tRNA supD 基因,共同指导表达 T7 RNA 聚合酶,当这两个部分都通过输入信号启动转录时, T7 RNA 聚合酶被表达,从而激活了 T7 启动子输出。在此基础上,通过简单逻辑门的模块化重组可创建更为复杂多层次逻辑门,例如 NOT 和 OR、AND 逻辑门进行联用可构建 NAND^[79]、NOR^[80]逻辑门。

虽然,利用遗传逻辑门对全细胞生物传感器进行编辑丰富了基因回路的设计,但使用遗传级联来处理传感器中的多层信号传递存在潜在的缺点,由于下游基因表达和调控所需的额外时间,可能导致响应时间较长。

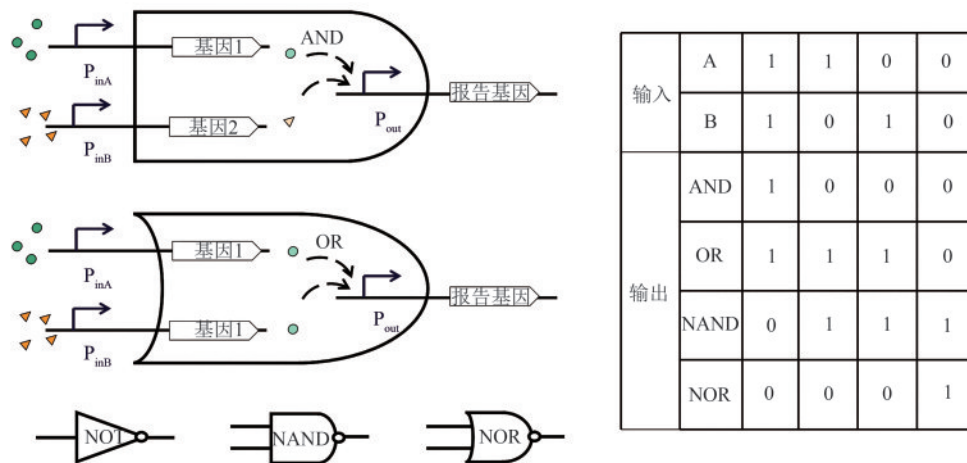


图7 全细胞微生物传感器基因回路逻辑门的设计

Fig. 7 Design of logic gate in whole-cell microbial biosensor

(AND, OR, NOT, NAND, NOR gate design and signal input/output change.)

4.5 人工智能计算机模拟预测性能

对基因回路中任一遗传元件的改动往往影响整体的传感性能，需针对该传感体系重新优化调整获得最佳动态范围等性能参数，这是非常耗时费力且试错成本高的研究工作。如何预测优化基因回路遗传元件以获得目的输出变化从而高效指导传感性能微调是解决上述问题的关键，也是实现基因回路型全细胞微生物传感器的理性设计与可控优化面临的一个重要挑战。

Ding 课题组^[15]在葡萄糖酸生物传感器研究基础上，深入分析了RBS调控机制和设计原则，并基于该原则通过DNA微阵列芯片构建了12000种cRBS组合文库，借助卷积神经网络深度学习模型以RBS数据及其特征为基础不断训练，建立了cRBS和动态范围的分类模型CLM-RDR，最后随机选择18个cRBS分别在葡萄糖酸、糖酸酯和阿拉伯糖生物传感器中进行验证，计算机模拟预测结果与实验观察到的一致性均超过50%。该模型具有较为优越的预测性能，为通过RBS数据表征生物传感器动态范围提供了重要指导和借鉴作用（图8）。

5 全细胞微生物传感器的检测应用领域

全细胞微生物传感器是一种新颖、廉价、可

便携的微生物菌株，其携带的遗传物质含特异性响应元件，可感应信号分子的浓度变化，并有望适用于多种复杂环境。随着微生物学、基因工程、高通量筛选等平台和技术的高速发展，近年来越来越多的全细胞微生物传感器被设计开发，广泛用于生物制造过程监控、环境监测与食品安全、医疗诊断与监护等领域（表2）。

5.1 生物制造过程监控

微生物细胞工厂通过基因设计和改造被广泛用于天然产物、药品等高附加值生物物质的生产制造^[88]。全细胞微生物传感器可以原位表征细胞内外代谢物浓度，有效推动了微生物代谢精准动态调控和目标产物筛选。现阶段已完成多种代谢底物（木糖^[48]等）、代谢中间物（丙酮酸^[17]、丙二酰辅酶^[89]等）以及代谢产物（衣康酸^[36]、赖氨酸^[26]等）的浓度监测。Xu等^[17]在磷酸戊糖代谢途径和葡萄糖二酸生产途径中分别构建丙酮酸抑制型回路和激活型回路，从而使得细胞内丙酮酸积累时上调葡萄糖二酸代谢合成通路并且下调生物量累积途径，细胞内丙酮酸匮乏时推动细胞生长，动态调控细胞生长和产物合成，改造后的菌株葡萄糖二酸产量由207 mg/mL提升至527 mg/mL。Hanko等^[36]鉴定了一种衣康酸转录因子并构建基于荧光检测的生物传感器，将衣康酸浓度与荧光强度偶联有望用于衣康酸微生物细胞工厂的高通量筛选。

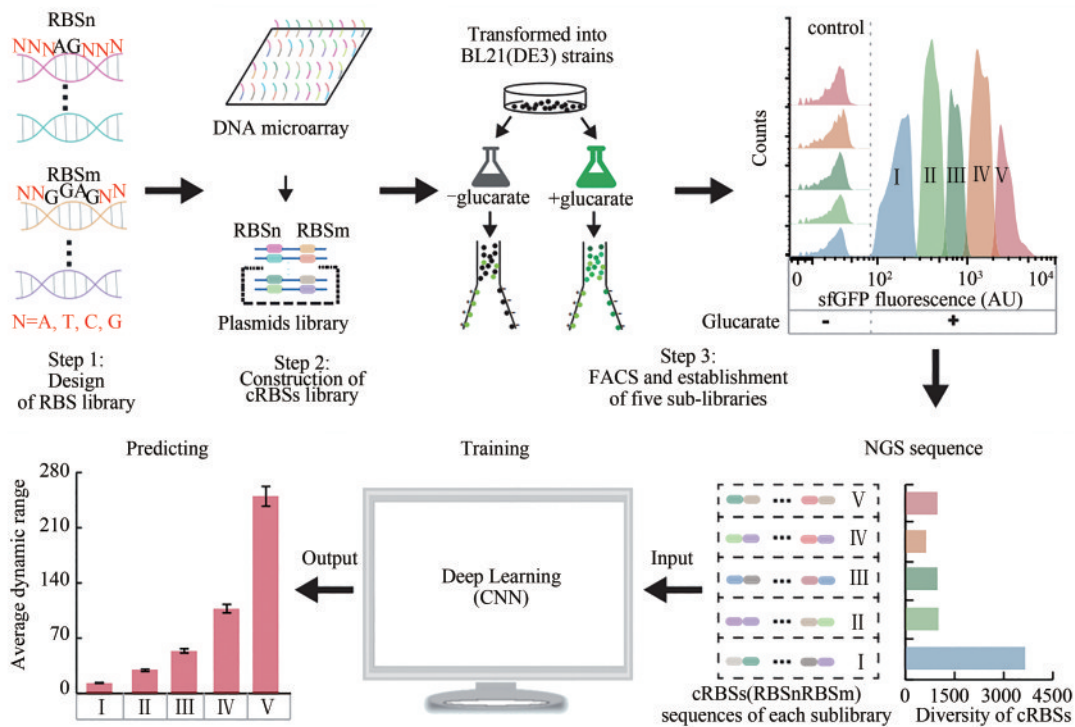
图8 人工计算CMN预测模型建立^[15]Fig. 8 Establishment of CLM-RDR classification model^[15]

表2 全细胞微生物传感器的应用实例

Tab. 2 Application examples of whole-cell microbial biosensor

领域	检测物	传感元件	操作范围	应用	参考文献
生物制造过程监控	木糖	XylR	0~20 g/L	木糖转运蛋白筛选	[18]
	甘氨酸	甘氨酸核糖开关	20~200 μmol/L	动态调控5-氨基乙酰丙酸合成	[25]
	丙酮酸	PdhR	10~35 nmol/g	动态调控葡萄糖二酸合成	[17]
	衣康酸	YpLysR	16~160 μmol/L	衣康酸高产菌株筛选	[36]
环境监测食品安全	4-甲基苯二酚	ChpR	25~500 nmol/L	农药毒死蜱检测	[81]
	As ³⁺ /As ⁵⁺	ArsR	0.74~60 μg/L	水样重金属离子检测	[82]
	四环素	TetR	>20 μg/kg	鱼肉四环素、土霉素含量检测	[83]
	土霉素		>50 μg/kg		
医疗诊断与监护	硫代硫酸盐	ThsR	0.1~1 mmol/L	小鼠结肠炎诊断	[84]
	茶碱	茶碱核糖开关	0~5 mmol/L	支气管扩张剂药物摄取监测	[85]
	尿酸	HucR	0~5 mmol/L	血液中尿酸稳态维持	[86]
	葡萄糖	GBP	1~10 mmol/L	糖尿病患者血糖监测	[87]

此外,全细胞微生物传感器也广泛用于药物高产菌株的开发。Wu等^[22]联用CRISPRi和目标途径中关键代谢物葡萄糖胺-6-磷酸生物传感器,创建了一个自主的双控制系统,使得代谢流动态通向高价值风湿性关节炎药物*N*-乙酰葡萄糖胺,产量提升至131.6 g/L。

5.2 环境监测与食品安全

伴随着经济和科技的发展,国家对环境问题也日益关注。全细胞生物传感器具有可快速、准确检测痕量化学物质的优点,被广泛用于环境污染物的检测,现已衍生出了可检测不同环境有毒有害物质的全细胞微生物传感器,包括有机物

(苯^[90]、萘^[91]、酚类^[81, 92]等)、重金属离子(As^{3+} ^[82]、 Cd^{2+} ^[93]、 Zn^{2+} ^[94]等)以及抗生素残留(四环素^[95]、卡那霉素^[96]等)。Wang团队^[97]设计了一种基于Hrp操纵子的AND逻辑门运算,构建了可同时检测 As^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 的大肠杆菌全细胞生物传感器,为复杂环境中多组分输入生物传感器设计提供指导。抗生素是人类治疗最成功的药物之一,然而人类治疗及农业生产等活动中释放到环境的大量抗生素导致细菌种群的抗生素耐药性增强,也被视为食品中重要污染源^[98]。Pellinen等^[83]偶联四环素响应元件TetR和荧光素酶操纵子,构建了可特异性检测四环素类抗菌剂的生物发光大肠杆菌K12,实现鱼肉中的四环素和土霉素的检测,最低检测水平分别为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.3 医疗诊断与监护

全细胞微生物传感器作为疾病诊断以及传统药物治疗的替代疗法,具有非常广阔的应用前景^[99]。现已开发了针对组胺过敏反应^[100]、肝损伤^[101]、胰岛素抵抗^[102]、格雷夫斯病^[103]和炎症^[104]等病症的全细胞微生物传感器。将偶联有报告基因*sfGFP*的硫代硫酸盐ThsR生物传感器转移到大肠杆菌中,已被证实可用于结肠炎小鼠的诊断^[84]。对于人类细胞,Zager^[105]报道了一种基于DNA损伤诱导基因表达的遗传毒性检测生物传感器,用于评估化学试剂引起的遗传损伤。此外,茶碱(支气管扩张剂药物)适配体构建的核糖开关^[85]可用于检测血液中茶碱浓度,从而监测药物摄取、疗效以及预防茶碱中毒^[106]。尿酸水平升高与痛风性关节炎有关,Kemmer等^[86]设计了一种基于HucR转录因子的尿酸微生物传感器,通过感知尿酸水平触发尿酸氧化酶表达,剂量依赖性抑制和消除尿酸从而恢复血液中的尿酸稳态。

6 展望

现阶段基因回路型全细胞微生物传感器的设计和应用已取得了重大突破,为代谢途径改造、定向进化等提供了高效工具,在生物制造、环境监测、食品安全以及疾病诊断等领域得到了广泛

的应用。生物传感基因元件设计与调控是未来构建人工生物体系的重大科学问题之一。自2018年起,在科技部合成生物学重点专项中围绕“人工元器件与基因线路”这一任务立项并启动了多个合成生物传感系统方向的重大科研项目。在2021年项目申报指南的征求意见稿中,对疾病诊断与监护生物传感系统、食品安全检测的合成生物传感系统和真实环境中痕量内分泌干扰物的合成生物感知系统开发与结构识别应用等3个合成生物传感系统方向也进一步加强了科研项目部署。

合成生物学的快速发展为我们提供了新的用于创造模块化和多级生物控制系统的技术与工具。虽然目前已经有很多开创性的工作,但这一领域的研究成果仍有很多不足,值得研究者们继续探索和创建新的策略。例如,重组工程菌的设计需求正在逐步从实验室转移到实际条件,工程菌的鲁棒性亟待提升;其对生态环境和人类健康的潜在影响也需要更系统的安全评估;部分生物传感机制不明晰,底物谱图有限,生物控制效率也需要进一步提高;同时,性能调控策略主要依托于经验性分析和繁重的筛选试错工作,未建立具备普适性的调控体系等等。此外,为实现高要求或特殊应用目的,生物传感器的设计未来必然要耦合更多有用的调控元件,如CRISPR^[107-108],并利用工程原理进行更多层次复杂遗传路径的设计开发,这就需要在未来挖掘和解析更多机制清晰、标准化的遗传传感元件。

全细胞微生物传感器已有近40年的历史,但是鲜少进入传感器市场。究其原因,可总结为以下三点:①基因改造生物带来的潜在生物安全问题;②低效的传感功能;③缺乏低价易用的传感平台。因此除了致力于遗传元件和基因回路的人工设计与构建,针对全细胞生物传感器的检测性能提供更多的优化策略,提高其动态范围、操作范围等响应性能参数,同时基于不同检测限的全细胞微生物传感器开发一种价格低廉且易用的微生物传感器阵列(microbial sensor array),有望解决上述三个问题并进一步扩大其应用价值^[109]。近年来,人工智能、流式细胞、液滴微流控等新兴技术的不断发展为生物传感元件的开发和定向改造提供了强有力的支撑,为全细胞微生物传感器

基因回路的理性设计和性能精细调控提供了科学指导,加快了遗传元件和生物传感器人工设计与构建的过程。新时期,伴随着大健康发展需求的不断提高,必定会产生新思想、新原理和新方法,促进生物传感技术的高速发展。

参 考 文 献

- [1] 周益康, 吴亦楠, 王天民, 等. 代谢物生物传感器: 微生物细胞工厂构建中的合成生物学工具[J]. 生物技术通报, 2017, 33(1): 1-11.
ZHOU Y K, WU Y N, WANG T M, et al. Metabolite biosensor: a useful synthetic biology tool to assist the construction of microbial cell factory[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(1): 1-11.
- [2] 秦伟彤, 田健, 伍宁丰. 全细胞生物传感器的设计及其在环境监测中的应用[J]. 生物技术进展, 2018, 8(5): 369-375.
QIN W T, TIAN J, WU N F. Design of the whole-cell biosensor and its application in environmental monitoring[J]. Current Biotechnology, 2018, 8(5): 369-375.
- [3] 张静, 吕雪飞, 邓玉林. 基因工程微生物传感器及其应用研究进展[J]. 生命科学仪器, 2019, 17(1): 11-16.
ZHANG J, LV X F, DENG Y L. Application research of genetically engineered microbial biosensors[J]. Life Science Instruments, 2019, 17(1): 11-16.
- [4] 施冬艳, 何珣, 陈怡露. 合成生物学在微生物传感器中的应用[J]. 东南大学学报, 2012, 31(3): 363-369.
SHI D Y, HE X, CHEN Y L. Application of synthetic biology in microbial sensors[J]. Journal of Southeast University, 2012, 31(3): 363-369.
- [5] UPDIKE S J, HICKS G P. The enzyme electrode[J]. Nature, 1967, 214(5092): 986-988.
- [6] BULICH A A, ISENBERG D L. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity[J]. ISA transactions, 1981, 20(1): 29-33.
- [7] FARMER W R, LIAO J C. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(5): 533-537.
- [8] ARAVANIS A M, DE BUSSCHERE B D, CHRUSCINSKI A J, et al. A genetically engineered cell-based biosensor for functional classification of agents[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2001, 16(7/8): 571-577.
- [9] WEISS R, HOMSY G E, KNIGHT T F. Toward *in vivo* digital circuits[C]//LANDWEBER L F, WINFREE E. Evolution as Computation. Berlin: Springer, 2002:275-295.
- [10] SALTEPE B, KEHRIBAR E S, YIRMIBESOGLU S S S, et al. Cellular biosensors with engineered genetic circuits[J]. ACS Sensors, 2018, 3(1): 13-26.
- [11] AUSLANDER S, AUSLANDER D, MULLER M, et al. Programmable single-cell mammalian biocomputers[J]. Nature, 2012, 487(7405): 123-127.
- [12] ZHANG H M, CHEN H, LIU W, et al. AnimalTFDB: a comprehensive animal transcription factor database[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 40(D1): D144-D149.
- [13] ANG J, HARRIS E, HUSSEY B J, et al. Tuning response curves for synthetic biology[J]. ACS Synthetic Biology, 2013, 2(10): 547-567.
- [14] RICCI F, VALLEE-BELISLE A, SIMON A J, et al. Using nature's "tricks" to rationally tune the binding properties of biomolecular receptors[J]. Accounts of Chemical Research, 2016, 49(9): 1884-1892.
- [15] DING N N, YUAN Z Q, ZHANG X J, et al. Programmable cross-ribosome-binding sites to fine-tune the dynamic range of transcription factor-based biosensor[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(18): 10602-10613.
- [16] DE PAEPE B, PETERS G, COUSSEMENT P, et al. Tailor-made transcriptional biosensors for optimizing microbial cell factories[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(4/5): 623-645.
- [17] XU X H, LI X L, LIU Y F, et al. Pyruvate-responsive genetic circuits for dynamic control of central metabolism[J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16(11): 1261-1268.
- [18] TANG R Q, WAGNER J M, ALPER H S, et al. Design, evolution, and characterization of a xylose biosensor in *Escherichia coli* using the XylR/xytO system with an expanded operating range[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(10): 2714-2722.
- [19] TANG S Y, FAZELINIA H, CIRINO P C. AraC regulatory protein mutants with altered effector specificity[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(15): 5267-5271.
- [20] XU P, LI L Y, ZHANG F M, et al. Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(31): 11299-11304.
- [21] YANG Y P, LIN Y H, WANG J, et al. Sensor-regulator and RNAi based bifunctional dynamic control network for engineered microbial synthesis[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3043-3052.
- [22] WU Y K, CHEN T C, LIU Y F, et al. Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(2): 996-1009.
- [23] TUNGTUR S, EGAN S M, SWINT-KRUSE L. Functional consequences of exchanging domains between LacI and PurR are mediated by the intervening linker sequence[J]. Proteins:

- Structure, Function, and Bioinformatics, 2007, 68(1): 375-388.
- [24] WINKLER W, NAHVI A, BREAKER R R. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression[J]. *Nature*, 2002, 419(6910): 952-956.
- [25] ZHOU L B, REN J, LI Z D, et al. Characterization and engineering of a clostridium glycine riboswitch and its use to control a novel metabolic pathway for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2327-2335.
- [26] ZHOU L B, ZENG A P. Exploring lysine riboswitch for metabolic flux control and improvement of L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(6): 729-734.
- [27] ONTIVEROS-PALACIOS N, SMITH A M, GRUNDY F J, et al. Molecular basis of gene regulation by the THI-box riboswitch [J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(4): 793-803.
- [28] WINKLER W C, COHEN-CHALAMISH S, BREAKER R R. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(25): 15908-15913.
- [29] CROMIE M J, SHI Y X, LATIFI T, et al. An RNA sensor for intracellular Mg²⁺[J]. *Cell*, 2006, 125(1): 71-84.
- [30] SHI Y X, ZHAO G, KONG W. Genetic analysis of riboswitch-mediated transcriptional regulation responding to Mn²⁺ in *Salmonella*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(16): 11353-11366.
- [31] SUESS B, HANSON S, BERENS C, et al. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(7): 1853-1858.
- [32] TRAUSCH J J, CERES P, REYES F E, et al. The structure of a tetrahydrofolate-sensing riboswitch reveals two ligand binding sites in a single aptamer[J]. *Structure*, 2011, 19(10): 1413-1423.
- [33] DESAI S K, GALLIVAN J P. Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(41): 13247-13254.
- [34] BEREZA-MALCOLM L T, MANN G, FRANKS A E. Environmental sensing of heavy metals through whole cell microbial biosensors: a synthetic biology approach[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(5): 535-546.
- [35] TAO H C, PENG Z W, LI P S, et al. Optimizing cadmium and mercury specificity of CadR-based *E. coli* biosensors by redesign of CadR[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(8): 1253-1258.
- [36] HANKO E K R, MINTON N P, MALYS N. A Transcription factor-based biosensor for detection of itaconic acid[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(5): 1436-1446.
- [37] YAGI K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2007, 73(6): 1251-1258.
- [38] FUJIMOTO H, WAKABAYASHI M, YAMASHIRO H, et al. Whole-cell arsenite biosensor using photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(2): 332-338.
- [39] ALEKSIC J, BIZZARI F, CAI Y, et al. Development of a novel biosensor for the detection of arsenic in drinking water[J]. *IET Synthetic Biology*, 2007, 1(1/2): 87-90.
- [40] FEENEY K A, PUTKER M, BRANCACCIO M, et al. In-depth characterization of firefly luciferase as a reporter of circadian gene expression in mammalian cells[J]. *Journal of Biological Rhythms*, 2016, 31(6): 540-550.
- [41] TINIKUL R, CHUNTHABOON P, PHONBUPPHA J, et al. Bacterial luciferase: molecular mechanisms and applications[J]. *The Enzymes*, 2020, 47: 427-455.
- [42] LOPRESIDE A, CALABRETTA M M, MONTALI L, et al. Prêt-à-porter nanoYES α and nanoYES β bioluminescent cell biosensors for ultrarapid and sensitive screening of endocrine-disrupting chemicals[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(19): 4937-4949.
- [43] 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.
- [44] DIETRICH J A, MCKEE A E, KEASLING J D. High-throughput metabolic engineering: advances in small-molecule screening and selection[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 563-590.
- [45] CHONG H Q, CHING C B. Development of colorimetric-based whole-cell biosensor for organophosphorus compounds by engineering transcription regulator DmpR [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1290-1298.
- [46] SHIN H J. Development of highly-sensitive microbial biosensors by mutation of the *nahR* regulatory gene[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(2): 246-250.
- [47] TEO W S, HEE K S, CHANG M W. Bacterial FadR and synthetic promoters function as modular fatty acid sensor- regulators in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2013, 13(5): 456-463.
- [48] TEO W S, CHANG M W. Bacterial XylRs and synthetic promoters function as genetically encoded xylose biosensors in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(2): 315-322.
- [49] LIANG C N, ZHANG X X, WU J Y, et al. Dynamic control of toxic natural product biosynthesis by an artificial regulatory circuit[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 57: 239-246.
- [50] TANG S Y, CIRINO P C. Design and application of a mevalon-

- ate-responsive regulatory protein[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50(5): 1084-1086.
- [51] TANG S Y, QIAN S, AKINTERINWA O, et al. Screening for enhanced triacetic acid lactone production by recombinant *Escherichia coli* expressing a designed triacetic acid lactone reporter[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(27): 10099-10103.
- [52] FREI C S, WANG Z Q, QIAN S, et al. Analysis of amino acid substitutions in AraC variants that respond to triacetic acid lactone[J]. *Protein Science*, 2016, 25(4): 804-814.
- [53] CHEN W, ZHANG S, JIANG P X, et al. Design of an ectoine-responsive AraC mutant and its application in metabolic engineering of ectoine biosynthesis[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 149-155.
- [54] XIONG D D, LU S K, WU J Y, et al. Improving key enzyme activity in phenylpropanoid pathway with a designed biosensor[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 115-123.
- [55] YEOM S J, KIM M, KWON K K, et al. A synthetic microbial biosensor for high-throughput screening of lactam biocatalysts[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5053.
- [56] MEINHARDT S, MANLEY M W, BECKER N A, et al. Novel insights from hybrid LacI/GalR proteins: family-wide functional attributes and biologically significant variation in transcription repression[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(21): 11139-11154.
- [57] CHOU H H, KEASLING J D. Programming adaptive control to evolve increased metabolite production[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2595.
- [58] ZHANG F Z, CAROTHERS J M, KEASLING J D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(4): 354-359.
- [59] DABIRIAN Y, LI X W, CHEN Y, et al. Expanding the dynamic range of a transcription factor-based biosensor in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(9): 1968-1975.
- [60] DAVID F, NIELSEN J, SIEWERS V. Flux control at the malonyl-CoA node through hierarchical dynamic pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(3): 224-233.
- [61] 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.
- [62] LI S J, SI T, WANG M, et al. Development of a synthetic malonyl-CoA sensor in *Saccharomyces cerevisiae* for intracellular metabolite monitoring and genetic screening [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(12): 1308-1315.
- [63] PANG Q X, HAN H, LIU X Q, et al. *In vivo* evolutionary engineering of riboswitch with high-threshold for *N*-acetylneuraminic acid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 36-43.
- [64] JANG S H, JANG S Y, XIU Y, et al. Development of artificial riboswitches for monitoring of naringenin *in vivo*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(11): 2077-2085.
- [65] JANG S Y, JANG S H, IM D K, et al. Artificial caprolactam-specific riboswitch as an intracellular metabolite sensor[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(6): 1276-1283.
- [66] DWIDAR M, SEIKE Y, KOBORI S, et al. Programmable artificial cells using histamine-responsive synthetic riboswitch[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(28): 11103-11114.
- [67] YANG J, SEO S W, JANG S H, et al. Synthetic RNA devices to expedite the evolution of metabolite-producing microbes[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1413.
- [68] WEIGAND J E, SANCHEZ M, GUNNESH EB, et al. Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation[J]. *RNA*, 2008, 14(1): 89-97.
- [69] GROHER F, BOFILL-BOSCH C, SCHNEIDER C, et al. Riboswitching with ciprofloxacin-development and characterization of a novel RNA regulator[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(4): 2121-2132.
- [70] BOUSSEBAYLE A, TORKA D, OLLIVAUD S, et al. Next-level riboswitch development-implementation of Capture-SELEX facilitates identification of a new synthetic riboswitch[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(9): 4883-4895.
- [71] WERSTUCK G, GREEN M R. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions[J]. *Science*, 1998, 282(5387): 296-298.
- [72] GRATE D, WILSON C. Inducible regulation of the *S. cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA aptamer-ligand complex[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2001, 9(10): 2565-2570.
- [73] HARVEY I, GARNEAU P, PELLETIER J. Inhibition of translation by RNA-small molecule interactions[J]. *RNA*, 2002, 8(4): 452-463.
- [74] SUESS B, FINK B, BERENS C, et al. A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression *in vivo*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(4): 1610-1614.
- [75] WIELAND M, BENZ A, KLAUSER B, et al. Artificial ribozyme switches containing natural riboswitch aptamer domains[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009, 48: 2715-2718.
- [76] WACHSMUTH M, FINDEISS S, WEISSHEIMER N, et al. *De novo* design of a synthetic riboswitch that regulates transcription termination[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(4): 2541-2551.

- [77] TEO W S, CHANG M W. Development and characterization of AND-gate dynamic controllers with a modular synthetic GAL1 core promoter in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(1): 144-151.
- [78] ANDERSON J C, VOIGT C A, ARKIN A P. Environmental signal integration by a modular AND gate[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3: 133.
- [79] 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.
- [80] TAMSIR A, TABOR J J, VOIGT C A. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires' [J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 212-215.
- [81] WHANGSUK W, THIENGMAG S, DUBBS J, et al. Specific detection of the pesticide chlorpyrifos by a sensitive genetic-based whole cell biosensor[J]. *Analytical Biochemistry*, 2016, 493: 11-13.
- [82] HU Q, LI L, WANG Y J, et al. Construction of WCB-11: a novel phiYFP arsenic-resistant whole-cell biosensor[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 9(22): 1469-1474.
- [83] PELLINEN T, BYLUND G, VIRTA M, et al. Detection of traces of tetracyclines from fish with a bioluminescent sensor strain incorporating bacterial luciferase reporter genes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(17): 4812-4815.
- [84] DAEFFLER K N M, GALLEY J D, SHETH R U, et al. Engineering bacterial thiosulfate and tetrathionate sensors for detecting gut inflammation[J]. *Molecular Systems Biology*, 2017, 13(4): 923.
- [85] JO J J, SHIN J S. Construction of intragenic synthetic riboswitches for detection of a small molecule[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(10): 1577-1581.
- [86] KEMMER C, GITZINGER M, DAOUD-EL BABA M, et al. Self-sufficient control of urate homeostasis in mice by a synthetic circuit[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(4): 355-360.
- [87] PICKUP J C, KHAN F, ZHI Z L. Fluorescence intensity- and lifetime-based glucose sensing using glucose/galactose-binding protein[J]. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2013, 7(1): 62-71.
- [88] 于政, 申晓林, 孙新晓, 等. 动态调控策略在代谢工程中的应用研究进[J]. *合成生物学*, 2020, 1(4): 440-453.
- YU Z, SHEN X L, SUN X X, et al. Application of dynamic regulation strategies in metabolic engineering[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(4): 440-453.
- [89] LIU D, XIAO Y, EVANS B S, et al. Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl-CoA sensor-actuator [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(2): 132-140.
- [90] DE LAS HERAS A, MARTINEZ-GARCIA E, DOMINGO-SANANES M R, et al. Rationally rewiring the connectivity of the XylR/Pu regulatory node of the m-xylene degradation pathway in *Pseudomonas putida*[J]. *Integrative Biology*, 2016, 8(4): 571-576.
- [91] WERLEN C, JASPERS M C M, VAN DER MEER J R. Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phases by use of a *Pseudomonas putida* biosensor [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 43-51.
- [92] MADHUSHANI A, DEL PESO-SANTOS T, MORENO R, et al. Transcriptional and translational control through the 5'-leader region of the dmpR master regulatory gene of phenol metabolism[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(1): 119-133.
- [93] JOE M H, LEE K H, LIM S Y, et al. Pigment-based whole-cell biosensor system for cadmium detection using genetically engineered *Deinococcus radiodurans*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(1/2): 265-272.
- [94] RAVIKUMAR S, GANESH I, YOO I K, et al. Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(5): 758-765.
- [95] KISKER C, HINRICHS W, TOVAR K, et al. The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg²⁺ reveals mechanism of antibiotic resistance[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 247(2): 260-280.
- [96] CHANG Y M, CHEN C K M, KO T P, et al. Structural analysis of the antibiotic-recognition mechanism of MarR proteins[J]. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 2013, 69(6): 1138-1149.
- [97] 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.
- [98] FERNANDEZ-LOPEZ R, RUIZ R, DE LA CRUZ F, et al. Transcription factor-based biosensors enlightened by the analyte[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 648.
- [99] CHEN X, LV Y, WU R Q. Current technologies of synthetic biosensors for disease detection: design, classification and future perspectives[J]. *Chinese Medical Sciences Journal*, 2018, 33(4): 240-251.
- [100] AUSLANDER D, EGGERSCHWILER B, KEMMER C, et al. A designer cell-based histamine-specific human allergy profiler[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4408.
- [101] BAI P, YE H F, XIE M Q, et al. A synthetic biology-based device prevents liver injury in mice[J]. *Journal of Hepatology*, 2016, 65(1): 84-94.
- [102] YE H F, XIE M Q, XUE S, et al. Self-adjusting synthetic gene circuit for correcting insulin resistance[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2016, 1: 0005.
- [103] SAXENA P, CHARPIN-EL HAMRI G, FOLCHER M, et al.

Synthetic gene network restoring endogenous pituitary-thyroid feedback control in experimental Graves' disease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(5): 1244-1249.

- [104] SMOLE A, LAINSCEK D, BEZELJAK U, et al. A synthetic mammalian therapeutic gene circuit for sensing and suppressing inflammation[J]. Molecular Therapy, 2017, 25(1): 102-119.
- [105] ZAGER V, CEMAZAR M, HRELJAC I, et al. Development of human cell biosensor system for genotoxicity detection based on DNA damage-induced gene expression[J]. Radiology and Oncology, 2010, 44(1): 42-51.
- [106] 刘泽辉, 张亚同, 胡欣. 我院茶碱血药浓度监测及其影响因素综合性评[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(21): 2514-2520.
LIU Z H, ZHANG Y T, HU X. Analysis of influence factors on blood concentration monitoring of theophylline in our hospital [J]. Chinese Journal of New Drug, 2016, 25(21): 2514-2520.
- [107] TIAN J Z, YANG G H, GU Y, et al. Developing an endogenous quorum-sensing based CRISPRi circuit for autonomous and tunable dynamic regulation of multiple targets in Streptomyces[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(14): 8188-8202.
- [108] CUNNINGHAM-BRYANT D, SUN J W, FERNANDEZ B, et al. CRISPR-Cas-mediated chemical control of transcriptional dynamics in yeast[J]. ChemBioChem, 2019, 20(12): 1519-1523.
- [109] 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.



通讯作者: 周杰(1991—), 男, 博士, 副教授。研究方向为合成生物传感器的设计与应用。
E-mail: jayzhou@njtech.edu.cn



通讯作者: 姜岷(1972—), 男, 博士, 教授。研究方向为人工多细胞体系设计与构建。
E-mail: bioengine@njtech.edu.cn



第一作者: 杨璐(1997—), 女, 硕士研究生。研究方向为合成生物传感器的设计与应用。
E-mail: luyang97@njtech.edu.cn