

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-010

工程细菌的生物安全防控策略

甘牡丹, 左静蕊, 曹友志

(苏州大学功能纳米与软物质研究院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 随着人工设计的基因元件和工程菌应用于医学诊断和疾病治疗领域的增加, 由此产生的生物安全风险也越来越受到重视。本文回顾了合成生物学的生物安全防控策略, 特别介绍了近几年医学诊疗工程菌的生物安全防控研究。工程菌的生物安全防控可以防止宿主菌和基因元件脱离病灶区域向环境泄漏。基于营养缺陷或自杀基因的调控系统广泛用于限制工程菌的逃逸, 基因元件拆分和靶向降解策略则可以防止基因元件扩散到环境中被其他细胞利用。环境中的代谢物和基因片段可能转移进入工程菌, 这是导致生物安全防控机制失效的重要因素。非天然核苷酸和非天然氨基酸等非天然复制翻译系统的正交性好, 可以大幅减少环境和工程菌间的相互影响。综合不同合成生物学原理设计的多层生物安全防控系统对于未来解决生物安全问题具有极大潜力。

关键词: 生物安全防控; 营养缺陷; 自杀基因; 毒素-抗毒素; 基因编辑; 非天然核苷酸; 非天然氨基酸

中图分类号: Q816 文献标志码: A

Biosafety strategies for engineered bacteria

GAN Mudan, ZUO Jingrui, CAO Youzhi

(Functional Nano and Soft Materials (FUNSOM), Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

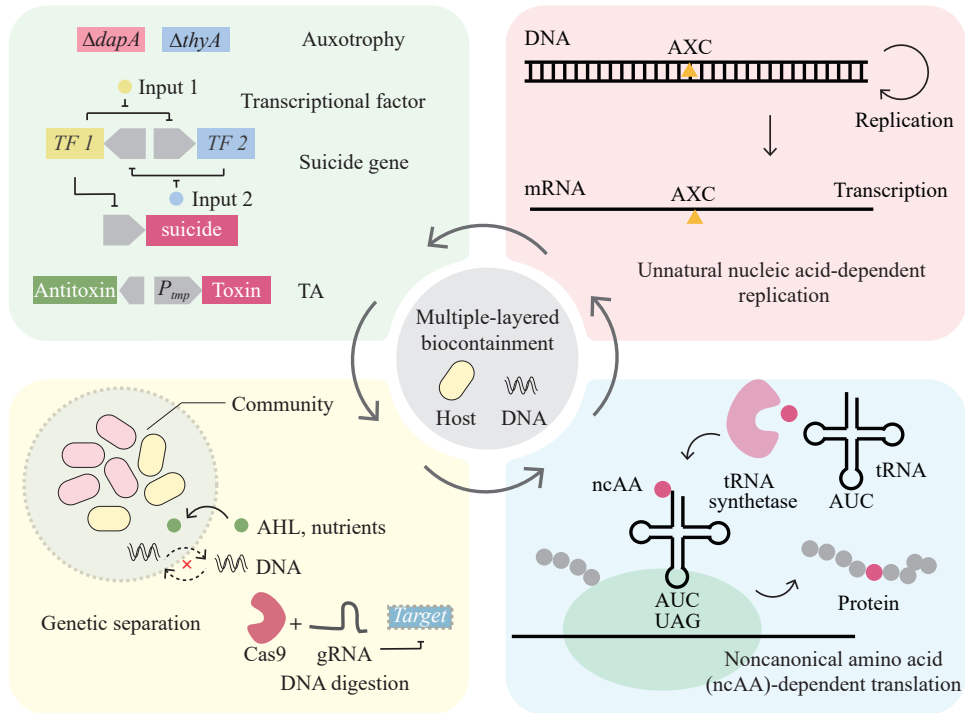
Abstract: With the rapid rise of synthetic genes and engineered bacteria in disease diagnosis and treatment, they pose a growing risk of biosafety. We review the biosafety strategies based on synthetic biology, and especially highlight recent studies on biocontainments with diagnosis or therapeutic bacteria. There are several goals of controlling biocontainments. One is to reduce the escape of engineered bacteria by limiting them within biological barriers. The second is to prevent synthetic genes transferring from engineered bacteria into other organisms. Auxotrophies and kill-switch are widely applied in controlling the biocontainment of engineered bacteria. Auxotrophic organisms with essential genes knockout rely on key metabolites that are supplemented for survival. Kill-switches are inducible toxic gene circuits, such as suicide switches and toxin-antitoxin systems. Once engineered bacteria leave from human bodies, the toxic genes are switched on to kill them. Genetic separation and DNA breaking are useful strategies to keep synthetic genes from spreading into environmental organisms. Essential genes and genes of interest can be distributed into multiple vectors or chromosomes, and each vector or chromosome depends on the others for replications. DNA breaking technologies like CRISPR or other DNA nucleases are used to digest chromosome or plasmid inside

收稿日期: 2025-02-14 修回日期: 2025-04-27

引用本文: 甘牡丹, 左静蕊, 曹友志. 工程细菌的生物安全防控策略[J]. 合成生物学, 2026, 7(1): 265-278

Citation: GAN Mudan, ZUO Jingrui, CAO Youzhi. Biosafety strategies for engineered bacteria[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(1): 265-278

engineered bacteria, which regulate host survival and synthetic gene transferring. The feeding of unusual metabolites or engineering specific genes into engineered bacteria could lead to the spreading failure of the biocontaminants. Several unnatural nucleic acids have been developed for replication and transcription, and much more unnatural amino acids are deployed for protein translation. One advantage of these unnatural systems is the orthogonality, which prevent synthetic genes from transferring to natural organisms. The chemically synthesized unnatural nucleic acids and amino acids are not present in environments, so the synthetic auxotrophies can overcome the cross-feeding limitation of natural auxotrophies. Biosafety systems with multiple-layered designs based on different synthetic biological principles have potentials to solve the challenges in the future.



Keywords: biocontaminants; auxotrophies; suicide genes; toxin-antitoxin; gene editing; unnatural nucleic acids; unnatural amino acids

随着合成生物学的快速发展，人工设计并改造的基因元件和工程菌的数量日益增长。利用合成生物学方法设计的工程菌在消化系统、肿瘤等疾病诊疗领域已展现出重要潜力^[1-7]。但是，这些人工设计的基因元件和工程菌可能向周围环境泄漏，带来生物安全的潜在风险^[8-12]。例如，抗生素抗性基因是合成生物学常用的基因元件，抗性基因向病原菌转移可以导致耐药菌的出现，为抗感染治疗带来巨大挑战^[13]。因此，生物安全防护对于合成生物学（尤其是用于医学诊疗的工程菌）至关重要^[14-16]。

生物安全防护包括两个方面^[17]。一是通过杀死或抑制工程菌，防止工程菌向周围环境扩散。美国国立卫生研究院（NIH）发布的指南建议工程菌的逃逸率应低于 10^{-8} 个细菌^[18]。但随着近年来工程菌数量的激增，对降低逃逸率提出了更高要求。二是减少基因元件向周围环境转移，减少环境微生物对基因元件的摄取和利用^[19-20]。我国发布的《基因工程安全管理办法》明确要求从事基因工程研究应对目的基因、载体和宿主进行转移性的安全评价^[21]。针对这两方面要求，在工程菌的基因改造之初就利用合成生物学原理为工程菌设

计生物安全防护屏障，是从根本上降低生物安全风险的生物安全防控策略。本文主要对合成生物学的生物安全防控策略进行综述，重点介绍最近几年疾病治疗相关工程菌的生物安全防控研究。

1 生物安全防控的基本策略

自从DNA重组技术诞生以来，生物安全问题就逐渐开始受到人们关注。合成生物学学科的建立，不但为生物安全带来了更为严峻的挑战，同时也为解决生物安全问题创造了机遇。经过几十年的发展，针对如何限制工程菌的扩散和基因元件的转移，利用合成生物学原理开发出多种生物安全防控系统。根据合成生物学的设计原理不同，可以将生物安全防控划分为以下几种基本策略进行介绍，各种策略以及应用实例总结于表1。

1.1 基于营养缺陷的生物安全防控策略

营养缺陷 (auxotrophy) 是将工程菌的必需基因敲除，导致工程菌无法合成关键代谢物如核苷酸和氨基酸等，只有在人为提供关键代谢物时才能正常生长的方式。除了敲除关键代谢物的合成酶，敲除关键代谢物的转运蛋白也可以形成营养缺陷，细菌的生存必须依赖培养基中关键代谢物的前体才能合成关键代谢物^[36]。营养缺陷的设计原理简单，在生物安全防控的应用十分广泛^[37-42]。但是复杂环境中游离代谢物的补充会帮助工程菌绕开营养缺陷。人体环境相对复杂，不但有自身细胞代谢，还有肠道微生物参与代谢。营养缺陷型工程菌可能从周围环境直接获取关键代谢物，

或者从环境微生物中通过水平基因转移 (HGT) 获取必需基因而恢复合成关键代谢物的能力。很多营养缺陷型工程菌只是在缺乏营养的无机盐培养基中表现为营养缺陷^[36]，例如还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 营养缺陷型大肠杆菌^[43]。因此，应根据工程菌的应用场景谨慎选择营养缺陷的种类。

疾病诊疗工程菌的营养缺陷型设计应尽量选用原核细胞特有的关键代谢物，常用的有两种营养缺陷种类 (图1)。二氨基庚二酸 (DAP) 是细菌细胞壁的必要成分，由 *dapA* 基因合成，*dapA* 基因敲除的工程菌由于无法合成完整的细胞壁而无法存活^[22, 44]。哺乳动物细胞不存在细胞壁因而不能提供 DAP。脱氧胸腺嘧啶核苷 (THY) 由 *thyA* 基因合成，*thyA* 基因敲除的营养缺陷型工程菌必须依赖 THY 才能合成 dTTP 用于 DNA 复制，哺乳动物细胞外缺乏游离的脱氧胸腺嘧啶核苷^[45]。SYNB1891 是 Synlogic 公司开发的肿瘤免疫治疗性细菌，通过分泌 STING 激动剂来激活抗原递呈细胞诱导抗肿瘤免疫。SYNB1819 以大肠杆菌作为底盘细胞，同时敲除了 *dapA* 和 *thyA* 两个基因，在小鼠体内无法繁殖^[23]。目前 SYNB1819 已进入一期临床试验^[46]。营养缺陷设计需要依赖细菌代谢通路，然而常用工程菌的代谢通路还未被完全掌握^[47]，可能会出现未知代谢通路补偿代谢物的风险，所以设计新的营养缺陷型工程菌时应严格验证。

1.2 基于自杀基因调控开关的生物安全防控策略

自杀基因调控开关是通过诱导剂调控自杀基因表达而清除工程菌的方式^[48-50]。相比于抗生素，

表1 生物安全防控策略实例

Table 1 Examples of biosafety strategies

生物安全防控策略	实例
营养缺陷	<i>dapA</i> 基因敲除的营养缺陷 ^[22] ; <i>thyA</i> 基因敲除的营养缺陷 ^[23]
自杀基因调控开关	ATc 调控的 Deadman 自杀基因开关; LacI-GalR 融合转录因子的 Passcode 自杀基因开关 ^[24]
毒素-抗毒素	温度响应的 CcdB-CcdA 毒素-抗毒素分子对 ^[25] ; pH 响应的 Doc-Phd 毒素-抗毒素分子对 ^[26]
基因元件拆分	Geneguard 质粒宿主依赖系统 ^[27] ; AHL 调控的群体感应系统 ^[28]
DNA 降解	靶向外源基因的 Cas9 系统 ^[29] ; 温度响应的内含肽-DNA 内切酶系统 ^[30]
降低突变	基因组插入序列元件 IS 敲除 ^[24] ; 增加目的基因拷贝数 ^[31] ; JVC1-syn3.0 ^[32]
物理隔离	GelMA 包裹的工程菌 ^[33] ; alginate 和 HA-EGCG 包裹的工程菌 ^[34] ; 工程菌电子元件整合诊疗装置 ^[35]

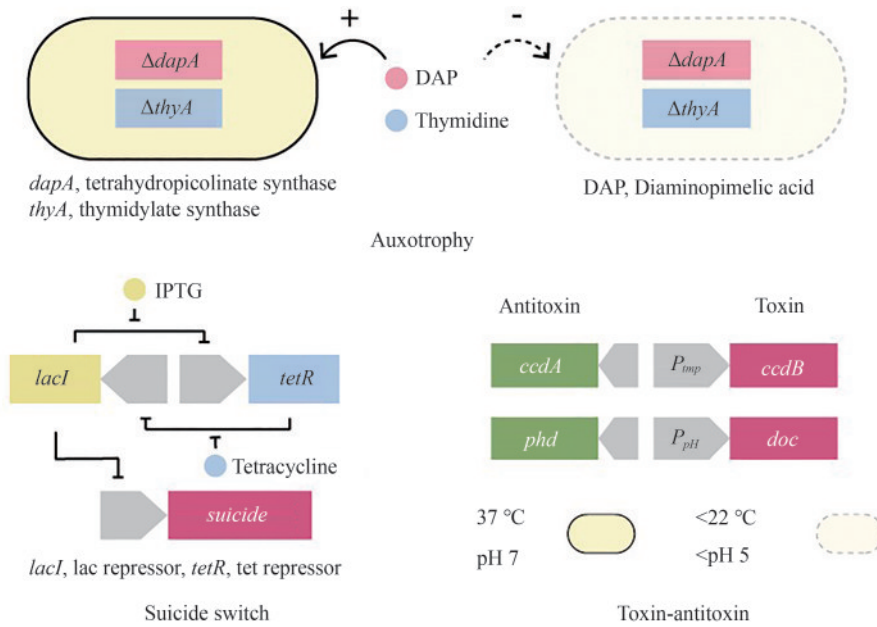


图1 营养缺陷、自杀基因调控开关和毒素-抗毒素系统调控的工程菌杀伤

Fig. 1 Killing engineered bacteria by auxotrophies, suicide switches, and toxin-antitoxin systems

自杀基因更具优势，自杀基因没有抗生素抗性转移的风险，有些自杀基因通过蛋白水平调节，细菌杀伤速度更快^[51]。调控开关可以将自杀基因和诱导剂相关联^[52]，当以环境因素如温度、pH和代谢物等作为诱导信号，可以根据环境变化调控自杀基因开关，构建环境因素敏感的工程菌。Deadman自杀基因调控开关是一个拨动开关（toggle switch），通过四环素（ATc）可以控制自杀基因表达和抑制两种状态间的切换。转录因子TetR和LacI相互阻遏，LacI阻遏toxin表达（图1）。要想保证细菌生存必须持续提供四环素，一旦缺乏四环素就会导致自杀基因表达，该系统还可以添加IPTG直接诱导自杀基因表达提高细菌的杀伤效果^[24]。多层调控开关形成的逻辑门设计可以实现不同诱导剂同时调控自杀基因表达，将工程菌逃逸率进一步降低。Passcode自杀基因调控开关利用LacI-GalR融合转录因子并结合多种转录因子，是3种诱导剂共同控制的复杂线路，只有在特定诱导剂组合情况下细菌才能生存。自杀基因调控开关往往会有背景表达，即使在没有诱导剂存在下的低水平表达，也会降低工程菌的适应性，而自杀基因调控开关失活的工程菌会慢慢占据主导，导致自杀基因调控开关最终失效。降低工程菌的基因突变水平将有助于提高自杀基因调控开关的长期稳定性。

1.3 基于毒素-抗毒素的生物安全防控策略

毒素-抗毒素（TA）系统可以帮助解决自杀基因降低宿主适应性的问题^[53-54]。TA系统是由毒素和相应抗毒素组成的成对分子，毒素通常是分子量较小的毒性蛋白，抗毒素是能够中和毒素的蛋白或非编码RNA^[55]。通过低水平表达抗毒素中和无诱导剂时的背景表达毒素，可以消除背景表达毒素对工程菌的影响，帮助维持自杀基因开关。CcdB-CcdA是一对常用的TA分子，CcdB毒素结合DNA回旋酶而导致细菌因DNA双链断裂而死亡，CcdA抗毒素可以结合CcdB毒素中和毒性。将温度敏感型启动子调控的CcdB-CcdA装载到肠道疾病治疗细菌中，体内温度37°C抑制CcdB表达可以维持工程菌的生长^[25]，当工程菌随粪便排出体外，温度低于22°C会启动CcdB表达导致工程菌死亡（图1）。将两对TA系统，如CcdB-CcdA和另一对pH调控的Doc-Phd毒素-抗毒素分子共同装载到工程菌^[26]，可以将工程菌的逃逸率降低到 10^{-11} 。Doc毒素通过磷酸化延长因子EF-TU导致无法结合tRNA而终止翻译，Phd抗毒素可以中和Doc启动翻译过程。TA系统的稳定工作需要依赖准确的表达调控以维持毒素和抗毒素的平衡，毒素或抗毒素的表达失衡会导致生物安全防控开关失效。依

据定量合成生物学原理进行设计可以提高TA系统的调控准确性。

1.4 基于基因元件拆分的生物安全防控策略

工程菌和环境微生物可以通过HGT相互转移遗传物质^[56]。工程菌的基因元件转移到环境中可能导致抗性基因等基因元件在环境微生物中扩散。环境微生物的遗传物质转移到工程菌中可能导致工程菌的功能受损。基因元件拆分在病毒载体包装中很常用。将病毒的基因组拆分，结构基因和复制基因分别分配到单独的载体，只有在全部载体都存在时才能包装病毒^[57]。由于细菌基因组比病毒基因组大几个数量级，将细菌基因组拆分还很难实现。目前主要是将目的基因元件或基因组上的特定基因进行拆分，达到各元件相互依赖的目的。

Geneguard是质粒和工程菌复制相互依赖的系统（图2），用于防止质粒向环境微生物转移^[27]。工程菌基因组上的*thyA*基因被敲除，而质粒带有*thyA*基因可以补充宿主菌的基因缺失。质粒复制起点ColE2的复制起始基因*repA*从质粒上移除而插入到工程菌基因组，所以质粒只能在工程菌中

复制，即使质粒转移到环境微生物中由于缺乏复制起始基因也无法复制。尽管Geneguard质粒可以通过多种机制在大肠杆菌中提供生物安全保障，但应用于其他种类的细菌仍需要进一步验证。

工程菌往往携带复杂的基因元件，这可能导致代谢负担增加和遗传稳定性下降，造成功能性基因元件或生物安全防控基因元件丢失。将功能性基因元件和生物防控元件拆分，放入多种宿主菌中制成细菌群落（community）^[58-59]，不但可以减少一种宿主菌的代谢负担，还能增加基因元件的稳定性^[60-61]。细菌群落中的各个宿主菌还可以设计成为代谢物相互依赖的营养缺陷型，即使一种工程菌泄漏到环境中也无法自我复制，进一步提高了生物安全性。在细菌群落设计中可以根据不同功能选择合适的宿主菌作为底盘细胞，例如把生物安全防控元件放在突变率低的宿主菌中，功能相关基因放到高表达的营养缺陷型宿主菌中，不但可以提高治疗性工程菌的功能，还能提高生物安全性^[62-65]。工程菌群落可以通过群体感应（quorum-sensing）元件调节群落数量，而且可以将一种细菌的不同个体行为进行同步^[66]。使用 P_{luxI} 启动子控制抗生素抗性基因表达，自诱导物AHL在高浓度时可以表达抗性基因而维持细菌数量，

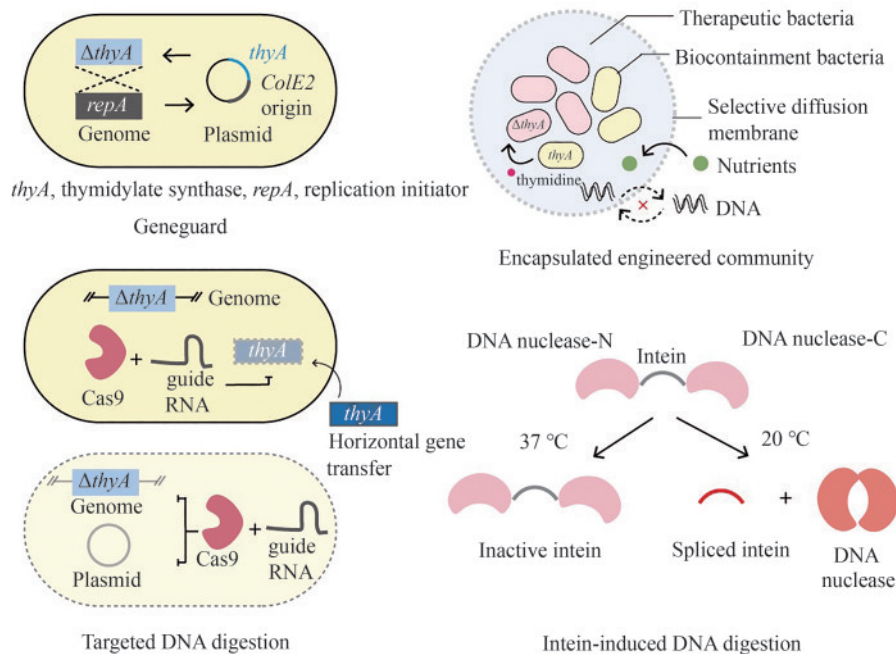


图2 基因拆分和DNA降解减少基因元件泄漏

Fig. 2 Reducing gene transferring by genetic separation and DNA digestion

AHL 在低浓度时无法表达抗性基因导致细菌大量死亡^[28]。

1.5 基于DNA降解的生物安全防控策略

DNA 降解不但可以在基因组形成DNA双链断裂导致工程菌死亡,还能靶向降解质粒减少目的基因向环境泄漏。CRISPR 基因编辑技术可以靶向特定序列切割DNA而广泛用于DNA降解,目前利用 Cas3^[67]、Cas9^[68-71]、Cas12^[72-73]等核酸酶均开发了相应的生物安全防控系统,可以将工程菌的逃逸率降低到 10^{-8} 以下。以Cas9为例,通过四环素和温度调控Cas9和gRNA表达的调控开关可以靶向切割工程菌基因组,完全清除小鼠胃肠道中的工程菌(图2)。营养缺陷型工程菌可能从环境细菌中获得缺失的必需基因而导致生物安全防控失效。将靶向*thyA*基因的Cas9系统引入*thyA*敲除的营养缺陷型工程菌中,一旦有外源*thyA*基因进入工程菌会立即被Cas9降解,避免了营养缺陷防控系统的失效^[29]。然而,环境中可能存在不同的基因通过HGT进入工程菌绕过营养缺陷,即使是同一*thyA*基因,不同环境微生物的基因序列也不同。可以通过引入多种gRNA靶向降解潜在的外源序列。

除了Cas蛋白外,其他核酸酶也被用于DNA的降解。2024年Foo等^[30]开发了温度敏感型内含肽-DNA内切酶融合蛋白用于肠道疾病治疗工程菌的生物安全防控。该内含肽在37℃没有活性,内含肽序列的插入会影响DNA内切酶折叠而使内切酶失活,因而工程菌在小鼠体内能正常生存(图2)。被排出其外后由于温度降低会导致内含肽激活形成完整的DNA内切酶,导致工程菌死亡,限制了工程菌对环境的泄漏。但该DNA内切酶不具备核酸序列特异性,因此无法用于特定基因的降解。

1.6 降低突变的生物安全防控策略

工程菌的基因突变会导致生物安全防控系统的合成生物学元件丧失功能。对DNA合成、重组、损伤修复等机制做工程化改造可以降低突变率,减少工程菌逃逸。有报道表明,含有自杀基因调

控开关的大肠杆菌连续培养4d后部分细菌的自杀基因中会出现序列插入突变,将基因组的插入序列元件SI1和SI5敲除,可以减少序列插入突变,将工程菌的逃逸率降低3个数量级以上^[24]。

增加目的基因的拷贝数可以降低突变对生物元件功能的影响。有文献对逃逸的工程菌测序,发现其基因开关突变导致生物安全防控失效。通过引入多拷贝的调节基因,可以降低工程菌的逃逸率^[31]。工程菌的突变率往往是一定的,目的基因的多个拷贝全部突变失活的概率比单拷贝基因突变低。此外,将目的基因整合到宿主基因组,其基因稳定性也优于质粒。基因组由人工设计合成的工程菌可能更利于避免突变带来的不确定性。通过人工设计剔除非必需基因,不但可以掌控宿主的代谢背景,还能减少基因组而为目的基因元件提供更多空间。*Mycoplasma mycoides*的天然基因组为1079 kb,通过人工设计合成的JVCI-syn3.0细菌的基因组仅为531 kb^[32]。通过对大肠杆菌进行泛基因组分析,从867个基因中识别出243个必需基因,意味着大肠杆菌基因组有很大的压缩空间^[74]。

1.7 物理隔离的生物安全防控策略

物理隔离是提高工程菌生物安全性的重要策略,利用高分子材料如水凝胶等包裹工程菌在工程菌和环境间形成稳定的物理屏障(图2)。高分子材料形成的选择性透过膜可以只允许特定小分子如营养物质通过,而阻挡一定体积的DNA等生物大分子和细胞等通过,不但能将工程菌和基因元件限制在包埋材料内部,还能减少环境因素如机体免疫细胞、环境微生物、环境pH、盐浓度等对工程菌的影响^[75-77]。物理隔离策略对医学诊疗工程菌的临床应用具有很大潜力。将包裹工程菌的胶囊移植到身体特定部位,工程菌可以响应疾病的生物标记物或信号分子发挥诊断或治疗作用。利用gelatin methacrylate(GelMA)包裹工程菌的NMTS微球,可以耐受胃肠道的酸性环境和胆汁酸盐,防止工程菌泄漏造成的感染,并保护工程菌在胃肠道发挥抗病原微生物的治疗作用^[33]。先用alginate包裹工程菌,再在外层包裹hyaluronic acid

(HA) 和 epigallocatechin gallate (EGCG) 等生物相容性材料, 可以提高工程菌在肠道内的定植, 工程菌响应血红素分泌治疗性蛋白可以在肠道持续监测和治疗炎症性肠病^[34]。通过物理隔离还可以将工程菌和电子元件整合成个性化诊疗装置。例如, 含有工程菌的微电子胶囊装置移植到消化道内, 工程菌可以响应炎症分子表达荧光蛋白, 电子元件将光信号转换为电信号, 可以实现对肠道炎症的实时监控^[35]。高分子材料包裹工程菌的策略应用于临床还需要进一步验证材料的稳定性和生物相容性, 尤其是对于慢性疾病, 如何保证工程菌的长期有效性是一大挑战。另外, 体积较大的诊疗装置需要通过手术移植到机体特定部位, 为患者带来不便。生物相容性更高的包裹材料开发有望降低机体免疫排斥和炎症等副作用的发生。

2 非天然复制、翻译系统对生物安全防控的作用

从环境中获取代谢物和基因片段、基因突变等因素都可能造成生物安全防控系统失效, 这是生物安全防控策略面临的重要挑战。提高生物安全防控系统的正交性, 避免工程菌和环境微生物间代谢物或基因片段的相互干扰。非天然复制、翻译系统是指依赖非天然核苷酸^[78-82]、非天然氨基酸^[83-86]的基因复制、转录和翻译系统^[87]。非天然复制、翻译系统的显著优势是正交性好, 非天然核苷酸和非天然氨基酸通常只能化学合成, 降低了与天然复制、转录和翻译系统的交叉反应。非天然复制、翻译系统即使有部分元件泄漏到环境微生物中也无法被利用, 降低了基因转移的风险。非天然系统结合生物安全防控设计, 可以大幅降低细菌逃逸率, 对于生物安全防控的应用极具潜力。但是, 非天然复制、翻译系统通常需要较大规模的基因改造, 对某些模式细菌的适用性需要进行验证。

2.1 非天然核苷酸对于生物安全防控的作用

自然界的遗传密码子由 A、G、C 和 T(U) 等 4 种天然核苷酸组成, 通过复制和转录传递遗传信

息。近些年, 已开发出额外的非天然核苷酸用于编码和传递遗传信息, 并成功应用于生物安全防控。*thyA* 基因敲除的大肠杆菌只能在 THY 存在下才能合成 dTTP 进行基因组复制, 在培养基中通过提供 5-chlorouracil 逐渐替代 THY, 最终进化出只依赖 5-chlorouracil 复制 DNA 的大肠杆菌, 其基因组碱基中有 90% 的 T 都被替换成了 Cl-U。这种营养缺陷工程菌不再需要 THY, 由于 5-chlorouracil 不是天然代谢产物, 只能依靠人工添加^[88]。

天然核苷酸的碱基是通过氢键互补配对, 非天然核苷酸则有更多的碱基配对机制。dNaM-dTPT3 是通过疏水作用相互配对的非天然碱基对。将含有 dNaM-dTPT3 的质粒转化到大肠杆菌中, 可以利用非天然核苷酸 dNaM 和 dTPT3 复制子代质粒^[89] (图 3)。由于 dNaM 和 dTPT3 无法穿过大肠杆菌细胞膜, 该系统需要使用基因组整合 *PiNTT2* 转运蛋白基因的大肠杆菌, 将非天然核苷酸转运到细胞内。因此, 即使非天然核苷酸质粒泄漏到环境中, 也无法在野生型大肠杆菌中复制。含有 dNaM-dTPT3 的质粒还转录生成具有 NaM 和 TPT3 的 RNA, 并能以含有非天然核苷酸的三联碱基作为密码子翻译氨基酸。在质粒插入一个大肠杆菌 *serT* 基因突变体, 该基因产物 tRNA^{ser}_{GYU} 的反义密码子含有 TPT3 (Y=TPT3), 可以翻译含有新密码子 AXC (X=NaM) 的报告基因, 在 AXC 密码子位置翻译丝氨酸^[90]。非天然核苷酸的数量和在密码子中的位置会影响密码子的正交性, 并非所有位置都能形成正确的密码子和反义密码子配对。研究发现 AXC-GYU、GXC-GYC、AGX-XCU 相互正交, 可以用于密码子和反密码子翻译蛋白。此外, 还有 5SICS-NaM、TPT3-CNMO、TAT1-5FM 等多对非天然核苷酸。

2.2 非天然氨基酸对于生物安全防控的作用

蛋白质是直接发挥生物学功能的分子, 组成蛋白质的氨基酸有 20 种。为了扩展氨基酸的种类, 已开发出多种方法将具有特殊结构的非天然氨基酸插入蛋白质^[91]。其中, 基因密码子扩展是在活细胞内利用 tRNA 和氨酰 tRNA 合成酶 (aaRS) 正交分子对将非天然氨基酸定点插入蛋白质的技

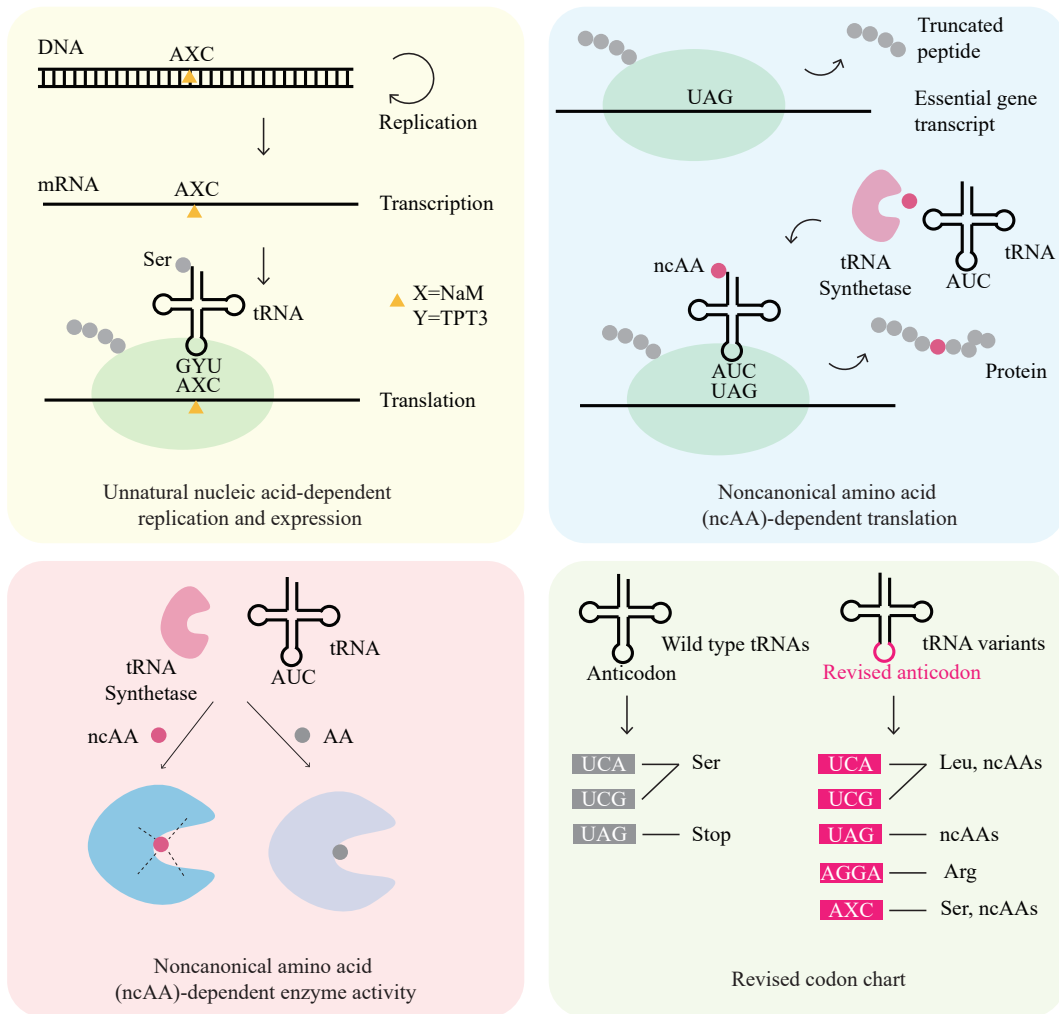


图3 非天然核苷酸和非天然氨基酸的生物安全防控系统

Fig. 3 Biocontamination controlling based on unnatural nucleic acids and noncanonical amino acids

术^[92]。正交 aaRS 催化非天然氨基酸 (ncAA) 和正交 tRNA 形成 ncAA-tRNA, ncAA-tRNA 通过反义密码子和 RNA 的密码子 (通常是提前终止密码子如 TAG) 互补配对将 ncAA 插入蛋白的特定位点^[93] (图3)。利用基因密码子扩展技术可以构建人工合成的营养缺陷型工程菌^[94]。对于含有 tRNA/aaRS 正交分子对的工程菌, 在其必需基因上引入提前终止密码子, 导致无法翻译完整的必需基因产物而引起工程菌死亡^[95-96]; 只有提供 ncAA 时才能翻译完整的必需基因产物保证细菌存活。相比于只依赖必需基因敲除的营养缺陷型, 人工合成的营养缺陷型工程菌通常无法从环境中获得非天然氨基酸, 所以细菌逃逸率更低。在多个必需基因上同时引入提前终止密码子, 可以进一步降低细菌逃逸率。基因密码子扩展技术已广泛应

用于多种工程细菌, 其中包括疾病诊疗相关的大肠杆菌 Nissle 1917^[97-98]。在大肠杆菌基因组的 22 个必需基因中引入 155 个提前终止密码子^[99], 筛选得到 *murG*、*dnaA* 和 *serS* 这 3 个必需基因同时引入提前终止密码子可以将工程菌逃逸率降低到 10^{-11} 。

正交 tRNA/aaRS 分子对并非 100% 完全正交, 在没有 ncAA 存在的情况下, 正交 aaRS 可以将少量与 ncAA 结构类似的天然氨基酸插入到提前终止密码子位点, 产生少量必需基因产物造成生物安全防控受损。通过蛋白质结构预测和定向进化, 可以设计出依赖非天然氨基酸独特化学结构的酶 (图3), 防止天然氨基酸插入造成的工程菌逃逸^[100-101]。例如, L-4,4'-联苯丙氨酸 (*bipA*) 的体积比天然氨基酸大很多, 将 *bipA* 插入酶活性中心,

并对周围氨基酸做突变,使得酶只能依赖 *bipA* 才能具有活性,而插入天然氨基酸都会失活^[102]。在大肠杆菌多个必需基因产物上引入 *bipA*,可以将逃逸率降低到 10^{-12} 。分枝酸变位酶 (CM) 是合成芳香侧链氨基酸的关键酶,天然 CM 是通过 Tyr72 的盐桥相互作用形成的同源二聚体。将 CM 的 Tyr72 突变为 TAG, tRNA/aaRS 在该位点插入苯甲酰-L-苯丙氨酸 (pBzF),两个 CM 分子可以通过 pBzF 之间的 π - π 堆积作用形成二聚体,因此工程菌必须依赖 pBzF 才能形成活性 CM^[103]。必需基因 *manA* 编码甘露糖-6-磷酸异构酶,ManA 的 His264 需要结合锌离子才能发挥活性,将甘露糖-6-磷酸转化为果糖-6-磷酸。在 ManA 活性中心进行突变改变氨基酸相互作用, tRNA/aaRS 分子对可以在 ManA 活性中心 His264TAG 位置插入 3-甲基组氨酸 (MeH),活性中心突变可以让 ManA 不再依赖 His 而依赖 MeH 结合锌离子发挥活性^[104]。

工程化改造 tRNA 与基因组合成技术相结合,可以更改密码子和氨基酸的对应关系^[105] (图3)。通过大肠杆菌全基因组合成构建了 Syn61 大肠杆菌, Syn61 基因组只含有 61 个密码子,丝氨酸的 2 个密码子 TCA 和 TCG 以及 1 个终止密码子 TAG 被释放并分配给不同非天然氨基酸^[106]。含有这 3 个密码子的质粒即使被环境微生物摄入,由于缺乏正交分子对,也无法翻译目的基因,限制了活性基因的转移。另一项研究突变了 tRNA^{Leu} 的反义密码子构成能够识别 TCA 和 TCG 的 tRNA^{Leu}_{UGA} 和 tRNA^{Leu}_{CGA},将这两种 tRNA 引入 Syn61,把丝氨酸的这两个密码子分配给亮氨酸^[107]。通过改造 tRNA 将反义密码子从 3 碱基换成 4 碱基,可以翻译四联密码子。大肠杆菌的 tRNA^{Arg}_{CCU} 被改造为 tRNA^{Arg}_{UCCU},在复制起始因子 *trfA* 必需基因和功能基因引入 AGGA 移码突变,工程菌必须依赖 tRNA^{Arg}_{UCCU} 才能翻译必需基因和功能基因,防止工程菌和基因元件泄漏^[108]。将非天然核苷酸构成的复制系统与有非天然氨基酸构成的反义系统相结合,可以在含有非天然核苷酸的密码子上翻译非天然氨基酸。例如,目的基因 AXC 新密码子 (X=NaM),含有正交分子对的大肠杆菌可以用 tRNA_{GYT(Y=TP3)} 插入非天然氨基酸。通过密码子的重新定义,不仅可以降低细菌逃逸率,还能限制活性基因片段的转移^[90]。

3 总结和展望

随着合成生物学的广泛应用,生物安全问题越来越受到重视。生物安全防控策略的快速发展可以限制工程菌、基因元件向周围环境扩散和复制,但也存在着一些问题和限制需要进一步解决。使用原核细胞特有的必需基因设计营养缺陷广泛应用于诊疗工程菌的生物安全防控。基于非天然氨基酸或非天然碱基设计的营养缺陷能更大限度地减少环境代谢物对工程菌的影响。然而营养缺陷设计的正交性仍有待于提高。代谢组学分析有助于了解不同环境中代谢物的分布和含量,评估营养缺陷设计的可行性。对不同物种的 tRNA/合成酶的基因发掘,并利用蛋白质结构预测模型,将开发出正交性更好的正交分子对。自杀基因调控开关可以响应环境分子限制工程菌的逃逸,毒素-抗毒素系统能够减少自杀基因的少量背景表达导致的工程菌适应性降低。除了毒性基因,复杂的生物安全调控开关本身就会提高工程菌的代谢负担。随着定量合成生物学和人工智能技术的发展,未来将更多地基于理性设计开发更加复杂的基因调控开关和代谢通路^[109],优化生物安全防控开关和功能基因的表达。基因元件拆分可以设计宿主-质粒复制相互依赖的系统,也可以设计不同功能的混合细菌群落,降低基因片段在环境和工程菌之间转移的风险。目前,大多数生物安全防控系统都只在实验室模式细菌中验证。未来需要扩展宿主细菌的种类,将不同的细菌甚至天然微生物改造为宿主菌,实现不同细菌群落的复杂调控。生物安全防控元件的基因突变是导致工程菌逃逸的重要因素。改造工程菌的 DNA 复制和损伤修复系统有望降低宿主的突变率。基于对基因组功能的了解,人工设计合成细菌基因组将使遗传背景更加简单、可预测性更强。开发无细胞反应体系有助于从根本上消除工程菌的逃逸风险。未来,综合多种策略构成的生物安全防控系统将是重要的研究方向。例如,结合非天然复制和翻译系统,构成非天然 DNA、RNA、蛋白和代谢物的正交系统,将很大程度上降低工程菌和目的基因元件的泄漏,再加上高分子材料等物理屏障包裹工程菌^[110-112],未来有望开发出更加安全高效的医学诊

疗细菌产品。我国的《生物安全法》将生物技术研究开发活动分成高、中、低风险三类，并要求根据风险级别进行相应管理^[113]。对于高风险的生物技术的实验室管理，无论是研究、开发单位还是应用单位都需要付出高成本。利用合成生物学原理设计的生物安全防控策略可以从根本上降低工程菌和基因元件转移的风险，减少在实验室研究和临床使用过程中的生物安全管理压力，降低安全管理的成本。了解工程菌的生物安全防控策略也有助于科研人员、医疗从业者、实验室管理人员深刻理解工程菌的生物安全风险，根据工程菌的安全等级采用相应的防范管理措施，避免过度管理。从工程菌的生物安全防控系统的设计，到工程菌的应用场景管理以及追踪溯源，工程菌的生物安全需要全过程管理。

参 考 文 献

- [1] GURBATHRI C R, ARPAIA N, DANINO T. Engineering bacteria as interactive cancer therapies[J]. *Science*, 2022, 378(6622): 858-864.
- [2] KIM K, KANG M, CHO B K. Systems and synthetic biology-driven engineering of live bacterial therapeutics[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1267378.
- [3] RAMAN V, DESHPANDE C P, KHANDUJA S, et al. Build-a-bug workshop: using microbial-host interactions and synthetic biology tools to create cancer therapies[J]. *Cell Host & Microbe*, 2023, 31(10): 1574-1592.
- [4] CIOCAN D, ELINAV E. Engineering bacteria to modulate host metabolism[J]. *Acta Physiologica*, 2023, 238(3): e14001.
- [5] ZHAI L, FU L Y, WEI W, et al. Advances of bacterial biomaterials for disease therapy[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(5): 1400-1411.
- [6] YAN S Z, GAN Y, XU H Z, et al. Bacterial carrier-mediated drug delivery systems: a promising strategy in cancer therapy [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2025, 12: 1526612.
- [7] DEY S, SANKARAN S. Engineered bacterial therapeutics with material solutions[J]. *Trends in Biotechnology*, 2024, 42(12): 1663-1676.
- [8] LEE J W, CHAN C T Y, SLOMOVIC S, et al. Next-generation biocontainment systems for engineered organisms[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(6): 530-537.
- [9] ASIN-GARCIA E, KALLERGI A, LANDEWEERD L, et al. Genetic safeguards for safety-by-design: so close yet so far[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(12): 1308-1312.
- [10] PARKER M T, KUNJAPUR A M. Deployment of engineered microbes: contributions to the bioeconomy and considerations for biosecurity[J]. *Health Security*, 2020, 18(4): 278-296.
- [11] ARNOLDS K L, DAHLIN L R, DING L, et al. Biotechnology for secure biocontainment designs in an emerging bioeconomy [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 71: 25-31.
- [12] OU Y K, GUO S J. Safety risks and ethical governance of biomedical applications of synthetic biology[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1292029.
- [13] HALAWA E M, FADEL M, AL-RABIA M W, et al. Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2024, 14: 1305294.
- [14] PANTOJA ANGLAS A, VALLE-PÉREZ A U, HAUSER C, et al. Microbial biocontainment systems for clinical, agricultural, and industrial applications[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 830200.
- [15] HUANG Y, LIN X J, YU S Y, et al. Intestinal engineered probiotics as living therapeutics: chassis selection, colonization enhancement, gene circuit design, and biocontainment[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(10): 3134-3153.
- [16] ARBOLEDA-GARCÍA A, ALARCON-RUIZ I, BOADA-ACOSTA L, et al. Advancements in synthetic biology-based bacterial cancer therapy: a modular design approach[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2023, 190: 104088.
- [17] MOE-BEHRENS G H G, DAVIS R, HAYNES K A. Preparing synthetic biology for the world[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 5.
- [18] WILSON D J. NIH guidelines for research involving recombinant DNA molecules[J]. *Accountability in Research*, 1993, 3(2/3): 177-185.
- [19] FENG G Q, HUANG H N, CHEN Y G. Effects of emerging pollutants on the occurrence and transfer of antibiotic resistance genes: a review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 420: 126602.
- [20] WANG S M, LI W, XI B D, et al. Mechanisms and influencing factors of horizontal gene transfer in composting system: a review[J]. *Science of The Total Environment*, 2024, 955: 177017.
- [21] 中华人民共和国科学技术部. 基因工程安全管理办法[EB/OL]. [2025-02-12]. https://www.gov.cn/zhengce/1993-12/24/content_5711088.htm. Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Regulations on Safety Management of Genetic Engineering[EB/OL]. [2025-02-12]. https://www.gov.cn/zhengce/1993-12/24/content_5711088.htm.
- [22] NELSON M T, CHARBONNEAU M R, COIA H G, et al. Characterization of an engineered live bacterial therapeutic for the treatment of phenylketonuria in a human gut-on-a-chip[J].

- Nature Communications, 2021, 12: 2805.
- [23] LEVENTHAL D S, SOKOLOVSKA A, LI N, et al. Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity[J]. Nature Communications, 2020, 11: 2739.
- [24] CHAN C T Y, LEE J W, CAMERON D E, et al. ‘Deadman’ and ‘Passcode’ microbial kill switches for bacterial containment[J]. Nature Chemical Biology, 2016, 12(2): 82-86.
- [25] JURENAS D, FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, et al. Biology and evolution of bacterial toxin – antitoxin systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20: 335-350.
- [26] STIRLING F, NAYDICH A, BRAMANTE J, et al. Synthetic cassettes for pH-mediated sensing, counting, and containment [J]. Cell Reports, 2020, 30(9): 3139-3148. e4.
- [27] 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.
- [28] HUANG S Q, LEE A J, TSOI R, et al. Coupling spatial segregation with synthetic circuits to control bacterial survival [J]. Molecular Systems Biology, 2016, 12(2): 859.
- [29] 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.
- [30] FOO G W, LEICHTHAMMER C D, SAITA I M, et al. Intein-based thermoregulated meganucleases for containment of genetic material[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(4): 2066-2077.
- [31] CAI Y Z, AGMON N, CHOI W J, et al. Intrinsic biocontainment: multiplex genome safeguards combine transcriptional and recombinational control of essential yeast genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(6): 1803-1808.
- [32] CALLAWAY E. ‘Minimal’ cell raises stakes in race to harness synthetic life[J]. Nature, 2016, 531(7596): 557-558.
- [33] WU F, LIN S S, LUO H L, et al. Noncontact microbiota transplantation by core-shell microgel-enabled nonleakage envelopment[J]. Science Advances, 2025, 11(6): eadr7373.
- [34] ZOU Z P, CAI Z H, ZHANG X P, et al. Delivery of encapsulated intelligent engineered probiotic for inflammatory bowel disease therapy[J]. Advanced Healthcare Materials, 2025, 14(3): 2403704.
- [35] 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.
- [36] HIROTA R, ABE K, KATSUURA Z I, et al. A novel biocontainment strategy makes bacterial growth and survival dependent on phosphite[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44748.
- [37] AGMON N, TANG Z J, YANG K, et al. Low escape-rate genome safeguards with minimal molecular perturbation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(8): E1470-E1479.
- [38] ASIN-GARCIA E, BATIANIS C, LI Y S, et al. Phosphite synthetic auxotrophy as an effective biocontainment strategy for the industrial chassis *Pseudomonas putida*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 156.
- [39] SEBESTA J, XIONG W, GUARNIERI M T, et al. Biocontainment of genetically engineered algae[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 839446.
- [40] BONGAERTS N, EDOO Z, ABUKAR A A, et al. Low-cost anti-mycobacterial drug discovery using engineered *E. coli*[J]. Nature Communications, 2022, 13: 3905.
- [41] HEDIN K A, KRUSE V, VAZQUEZ-URIBE R, et al. Biocontainment strategies for *in vivo* applications of *Saccharomyces boulardii*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1136095.
- [42] RUEDA-MEJIA M P, BÜHLMANN A, ORTIZ-MERINO R A, et al. Pantothenate auxotrophy in a naturally occurring biocontrol yeast[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(7): e00884-23.
- [43] LINDNER S N, RAMIREZ L C, KRÜSEMANN J L, et al. NADPH-auxotrophic *E. coli*: a sensor strain for testing *in vivo* regeneration of NADPH[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(12): 2742-2749.
- [44] ISABELLA V M, HA B N, CASTILLO M J, et al. Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(9): 857-864.
- [45] KURTZ C B, MILLET Y A, PUURUNEN M K, et al. An engineered *E. coli* Nissle improves hyperammonemia and survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans[J]. Science Translational Medicine, 2019, 11(475): eaau7975.
- [46] LUKE J J, PIHA-PAUL S A, MEDINA T, et al. Phase I study of SYNBI891, an engineered *E. coli* Nissle strain expressing STING agonist, with and without atezolizumab in advanced malignancies[J]. Clinical Cancer Research, 2023, 29(13): 2435-2444.
- [47] ATA Ö, MATTANOVICH D. Into the metabolic wild: unveiling hidden pathways of microbial metabolism[J]. Microbial Biotechnology, 2024, 17(8): e14548.
- [48] JONES B S, LAMB L S, GOLDMAN F, et al. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer[J]. Frontiers in Pharmacology, 2014, 5: 254.
- [49] ČELEŠNIK H, TANŠEK A, TAHIROVIĆ A, et al. Biosafety of biotechnologically important microalgae: intrinsic suicide switch implementation in *Cyanobacterium synechocystis* sp.

- PCC 6803[J]. *Biology Open*, 2016, 5(4): 519-528.
- [50] ZHOU Y Q, SUN T, CHEN Z X, et al. Development of a new biocontainment strategy in model *Cyanobacterium Synechococcus* strains[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(11): 2576-2584.
- [51] HOFFMANN S A, CAI Y Z. Engineering stringent genetic biocontainment of yeast with a protein stability switch[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 1060.
- [52] VARMA S, GULATI K A, SRIRAMAKRISHNAN J, et al. Environment signal dependent biocontainment systems for engineered organisms: leveraging triggered responses and combinatorial systems[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2025, 10(2): 356-364.
- [53] MU Z P, ZOU Z N, YANG Y, et al. A genetically engineered *Escherichia coli* that senses and degrades tetracycline antibiotic residue[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(3): 196-203.
- [54] HALVORSEN T M, RICCI D P, PARK D M, et al. Comparison of kill switch toxins in plant-beneficial *Pseudomonas fluorescens* reveals drivers of lethality, stability, and escape[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(11): 3785-3796.
- [55] JURĖNAS D, FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, et al. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(6): 335-350.
- [56] SOUCY S M, HUANG J L, GOGARTEN J P. Horizontal gene transfer: building the web of life[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(8): 472-482.
- [57] WOLFF J H, MIKKELSEN J G. Delivering genes with human immunodeficiency virus-derived vehicles: still state-of-the-art after 25 years[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2022, 29(1): 79.
- [58] ENG A, BORENSTEIN E. Microbial community design: methods, applications, and opportunities[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 58: 117-128.
- [59] IBRAHIM M, RAAJARAAM L, RAMAN K. Modelling microbial communities: harnessing consortia for biotechnological applications[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 3892-3907.
- [60] MIMEE M, CITORIK R J, LU T K. Microbiome therapeutics — advances and challenges[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 105(Pt A): 44-54.
- [61] KE J, WANG B, YOSHIKUNI Y. Microbiome engineering: synthetic biology of plant-associated microbiomes in sustainable agriculture[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(3): 244-261.
- [62] RAPP K M, JENKINS J P, BETENBAUGH M J. Partners for life: building microbial consortia for the future[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 66: 292-300.
- [63] OZDEMIR T, FEDOREC A J H, DANINO T, et al. Synthetic biology and engineered live biotherapeutics: toward increasing system complexity[J]. *Cell Systems*, 2018, 7(1): 5-16.
- [64] DOU J, BENNETT M R. Synthetic biology and the gut microbiome[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(5): 1700159.
- [65] NEVOT G, SANTOS-MORENO J, CAMPAMÀ -SANZ N, et al. Synthetically programmed antioxidant delivery by a domesticated skin commensal[J]. *Cell Systems*, 2025, 16(2): 101169.
- [66] VANARSDALE E, NAVID A, CHU M J, et al. Electrogenetic signaling and information propagation for controlling microbial consortia *via* programmed lysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(5): 1366-1381.
- [67] CALIANDO B J, VOIGT C A. Targeted DNA degradation using a CRISPR device stably carried in the host genome[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6989.
- [68] 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.
- [69] ASIN-GARCIA E, MARTIN-PASCUAL M, GARCIA-MORALES L, et al. ReScribe: an unrestrained tool combining multiplex recombineering and minimal-PAM *Scas9* for genome recoding *Pseudomonas putida*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(10): 2672-2688.
- [70] HARTIG A M, DAI W T, ZHANG K, et al. Influence of environmental conditions on the escape rates of biocontained genetically engineered microbes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2024, 58(51): 22657-22667.
- [71] ASIN-GARCIA E, MARTIN-PASCUAL M, DE BUCK C, et al. GenoMine: a CRISPR-Cas9-based kill switch for biocontainment of *Pseudomonas putida*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1426107.
- [72] PANTOJA ANGLAS A, ALI Z, MAHFOUZ M. CS-cells: a CRISPR-Cas12 DNA device to generate chromosome-shredded cells for efficient and safe molecular biomanufacturing[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(1): 430-440.
- [73] YANG B, WU C, TENG Y X, et al. Tailoring microbial fitness through computational steering and CRISPRi-driven robustness regulation[J]. *Cell Systems*, 2024, 15(12): 1133-1147. e4.
- [74] YANG Z K, LUO H, ZHANG Y M, et al. Pan-genomic analysis provides novel insights into the association of *E. coli* with human host and its minimal genome[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(12): 1987-1991.
- [75] TANG T C, THAM E, LIU X Y, et al. Hydrogel-based biocontainment of bacteria for continuous sensing and computation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(6): 724-731.
- [76] DATTA D, WEISS E L, WANGPRASEURT D, et al. Phenotypically complex living materials containing engineered

- cyanobacteria[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 4742.
- [77] CHE H C, WANG Z Y, LI Y, et al. A stable and sensitive engineering bacterial sensor *via* physical biocontainment and two-stage signal amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(21): 8807-8813.
- [78] ROMESBERG F E. Creation, optimization, and use of semi-synthetic organisms that store and retrieve increased genetic information[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2022, 434(8): 167331.
- [79] KIMOTO M, HIRAO I. Genetic alphabet expansion technology by creating unnatural base pairs[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(21): 7602-7626.
- [80] KIMOTO M, HIRAO I. Genetic code engineering by natural and unnatural base pair systems for the site-specific incorporation of non-standard amino acids into proteins[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 851646.
- [81] GERECHT K, FREUND N, LIU W, et al. The expanded central dogma: genome resynthesis, orthogonal biosystems, synthetic genetics[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2023, 52: 413-432.
- [82] DÖRRENHAUS R, WAGNER P K, KATH-SCHORR S. Two are not enough: synthetic strategies and applications of unnatural base pairs[J]. *Biological Chemistry*, 2023, 404(10): 883-896.
- [83] AWAWDEH A, RADECKI A A, VARGAS-RODRIGUEZ O. Suppressor tRNAs at the interface of genetic code expansion and medicine[J]. *Frontiers in Genetics*, 2024, 15: 1420331.
- [84] COSTELLO A, PETERSON A A, CHEN P H, et al. Genetic code expansion history and modern innovations[J]. *Chemical Reviews*, 2024, 124(21): 11962-12005.
- [85] YI H B, LEE S, SEO K, et al. Cellular and biophysical applications of genetic code expansion[J]. *Chemical Reviews*, 2024, 124(11): 7465-7530.
- [86] KIM Y J, CHO S H, KIM J C, et al. tRNA engineering strategies for genetic code expansion[J]. *Frontiers in Genetics*, 2024, 15: 1373250.
- [87] GÓMEZ-TATAY L, HERNÁNDEZ-ANDREU J M. Xenobiology for the biocontainment of synthetic organisms: opportunities and challenges[J]. *Life*, 2024, 14(8): 996.
- [88] MARLIÈRE P, PATROUX J, DÖRING V, et al. Chemical evolution of a bacterium's genome[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(31): 7109-7114.
- [89] MALYSHEV D A, DHAMI K, LAVERGNE T, et al. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet[J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 385-388.
- [90] ZHANG Y, PTACIN J L, FISCHER E C, et al. A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information[J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 644-647.
- [91] MUKAI T, LAJOIE M J, ENGLERT M, et al. Rewriting the genetic code[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2017, 71: 557-577.
- [92] WANG L, BROCK A, HERBERICH B, et al. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2001, 292(5516): 498-500.
- [93] KATO Y. Translational control using an expanded genetic code [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (4): 887.
- [94] CHANG T T, DING W C, YAN S R, et al. A robust yeast biocontainment system with two-layered regulation switch dependent on unnatural amino acid[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6487.
- [95] KATO Y. An engineered bacterium auxotrophic for an unnatural amino acid: a novel biological containment system [J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1247.
- [96] KATO Y. Extremely low leakage expression systems using dual transcriptional-translational control for toxic protein production[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 705.
- [97] KURU E, MÄÄTTÄLÄ R M, NOGUERA K, et al. Release factor inhibiting antimicrobial peptides improve nonstandard amino acid incorporation in wild-type bacterial cells[J]. *ACS Chemical Biology*, 2020, 15(7): 1852-1861.
- [98] GAO X W, SUN Y J, YANG Y H, et al. Directed evolution of hydroxylase XcP4H for enhanced 5-HTP production in engineered probiotics to treat depression[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 307: 142250.
- [99] ROVNER A J, HAIMOVICH A D, KATZ S R, et al. Recoded organisms engineered to depend on synthetic amino acids[J]. *Nature*, 2015, 518(7537): 89-93.
- [100] XUAN W M, SCHULTZ P G. A strategy for creating organisms dependent on noncanonical amino acids[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(31): 9170-9173.
- [101] TACK D S, ELLEFSON J W, THYER R, et al. Addicting diverse bacteria to a noncanonical amino acid[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(3): 138-140.
- [102] MANDELL D J, LAJOIE M J, MEE M T, et al. Biocontainment of genetically modified organisms by synthetic protein design[J]. *Nature*, 2015, 518(7537): 55-60.
- [103] KOH M, NASERTORABI F, HAN G W, et al. Generation of an orthogonal protein-protein interface with a noncanonical amino acid[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(16): 5728-5731.
- [104] GAN F, LIU R H, WANG F, et al. Functional replacement of histidine in proteins to generate noncanonical amino acid dependent organisms[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(11): 3829-3832.
- [105] LAJOIE M J, ROVNER A J, GOODMAN D B, et al.

- Genomically recoded organisms expand biological functions [J]. *Science*, 2013, 342(6156): 357-360.
- [106] FREDENS J, WANG K H, DE LA TORRE D, et al. Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome[J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 514-518.
- [107] NYERGES A, VINKE S, FLYNN R, et al. A swapped genetic code prevents viral infections and gene transfer[J]. *Nature*, 2023, 615(7953): 720-727.
- [108] CHOI Y N, KIM D, LEE S, et al. Quadruplet *Codon decoding*-based versatile genetic biocontainment system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2025, 53(1): gkae1292.
- [109] LAWSON C E, MARTÍ J M, RADIVOJEVIC T, et al. Machine learning for metabolic engineering: a review[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 63: 34-60.
- [110] DIANAWATI D, MISHRA V, SHAH N P. Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(10): 1685-1716.
- [111] NGUYEN T T, NGUYEN P T, PHAM M N, et al. Synbiotics: a new route of self-production and applications to human and animal health[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2022, 14(5): 980-993.
- [112] HASSANISAADI M, VATANKHAH M, KENNEDY J F, et al. Advancements in xanthan gum: a macromolecule for encapsulating plant probiotic bacteria with enhanced properties [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2025, 348: 122801.
- [113] 中华人民共和国生态环境部. 中华人民共和国生物安全法 [EB/OL]. [2025-02-12]. https://www.mee.gov.cn/ywgz/fgbz/fl/202303/t20230314_1019536.shtml.
Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Biosecurity Law of the People's Republic of China [EB/OL]. [2025-02-12]. https://www.mee.gov.cn/ywgz/fgbz/fl/202303/t20230314_1019536.shtml.



第一作者及通讯作者：甘牡丹 (1987—), 女, 硕士, 实验师。研究方向为基因工程改造病毒、工程菌和病原微生物的生物安全评价和实验室管理。
E-mail: gmd@suda.edu.cn

广告索引: 天津大学合成生物技术全国重点实验室(后彩一)/安及义实业(上海)有限公司(后彩二)/北京擎科生物科技股份有限公司(后彩三)/上海蓝晶微生物科技有限公司(后彩四)/安徽华恒生物科技股份有限公司(后彩五)/诚志生命科技有限公司(封三)