

细胞编程技术：助力高效细胞工厂的设计

琚康辉¹ 田晓雅¹ 王立² 陈晶瑜¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院 中国轻工业食品生物工程重点实验室, 北京 100083; 2. 苏州优信合生技术有限公司, 苏州 215000)

摘要: 合成生物学是近年来蓬勃发展的一门涉及分子生物学、生物工程、微生物学、系统生物学等多个学科新型交叉学科,旨在利用生物学原理和工程方法创造全新的生物学系统和生物产品。合成生物学的发展也受到了高效“细胞工厂”理念的推动,这使得生物工程技术朝着工业化应用的方向迈出了重要一步。然而,受制于生产效率低、遗传不稳定、调控过程难等问题,如何获得转化效率高、鲁棒性强的“细胞工厂”仍然是合成生物学领域面临的重要任务。近年来,细胞工程和基因工程领域发展迅速,新型细胞元件、细胞底盘以及基因回路构造方式等技术逐渐成熟,其通过精确的基因编辑和调控,可实现对细胞的特定功能进行编程,例如增强细胞的代谢能力、改变细胞的分化路径以及设计新的细胞功能模块等,具有广泛的应用前景。本文从新型细胞元件、底盘细胞以及基因回路构造方式等角度,综述了近年来在细胞工程和基因工程领域发展迅速的细胞编程技术,这些技术的进步已经或者将要用于合成生物学的发展中,将会赋予工程菌更加强大的工作能力。

关键词: 合成生物学; 细胞编程; 细胞元件; 底盘细胞

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-1227

Cell Programming Technology: Paving the Way for Efficient Cell Factories

JU Kang-hui¹ TIAN Xiao-ya¹ WANG Li² CHEN Jing-yu¹

(1. Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083; 2. U-Synbio Technologies Co., Ltd., Suzhou 215000)

Abstract: Synthetic biology, an emerging interdisciplinary field, involves molecular biology, bioengineering, microbiology, and system biology, aiming to create entirely new biological systems and products using principles of biology and engineering methods. The conceptualization of the “cell factory” has propelled synthetic biology towards industrial applications, allowing the bioengineering technology having a big step towards industrial application. However, challenges such as low production efficiency, genetic instability, and intricate regulatory processes persist, hindering the creation of highly efficient and robust “cell factories” for transformation. In recent years, the fields of cell engineering and genetic engineering have developed rapidly, with the maturation of technologies such as new cell elements, cell chassis, and gene circuit construction methods. Through precise gene editing and regulation, these technologies can enable the programming of specific functions in cells, such as enhancing cell metabolism, altering cell differentiation pathways, and designing new cell functional modules, with broad application prospects. This review provides a comprehensive overview of rapidly evolving cell programming technologies. These technologies, situated within the realms of cell engineering and genetic engineering, encompass novel cellular components, cellular chassis concepts, and gene circuit construction methods. The strategic integration of these advancements aims to address the existing challenges in synthetic biology. The utilization of these technologies is poised to empower engineered bacteria with enhanced working capacities, thus paving the way for the development of more efficient and resilient “cell factories.”

Key words: synthetic biology; cell programming; cellular components; cell chassis

收稿日期: 2024-01-02

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (L202045)

作者简介: 琚康辉, 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学及合成生物学; E-mail: jkh7252365@163.com

通信作者: 陈晶瑜, 女, 博士, 教授, 研究方向: 分子生物学及合成生物学; E-mail: chenjy@cau.edu.cn

细胞编程，广义上来说是指出通过人为干预和调控细胞内的基因表达、信号通路以及代谢网络等，来精确指导细胞的发育、分化和功能。这一技术的出现，源于对细胞生物学机制的深入理解和现代生物技术的飞速发展。研究者们逐渐掌握如何操控细胞，使其按照特定的需求进行转变。而细胞工厂则是基于细胞编程理念而构建的一种创新性应用模式，将细胞拓扑为一个微型工厂，具备生产各种有用物质的潜力。通过对细胞进行编程，可以将其改造成高效、精准的生产“车间”，用于合成药物、生物燃料、精细化学品等具有重要经济和社会价值的产品。例如，改造后的工程菌具备将生物原料转化为生物燃料的能力^[1]，这意味着每年会有超过10亿吨的生物原料可以得到重新利用。2007年，Liao JC实验室对丙酮酸代谢途径进行重构，在大肠杆菌内部实现了全新的高级醇合成路径，开辟了生物合成能源模式的新时代^[2]。除了在生物燃料方向所展现出来的隐藏潜力，合成生物学还相继被应用于医学、生命科学、食品、农业等领域。2013年，利用生物合成的方法实现了抗疟药物青蒿素的批量生产^[3]。2017年，天津大学、清华大学以及华大基因完成了对酵母5种天然染色体的重构，真正意义上实现了对生命重塑^[4]。近二十年来，细胞编程技术依托于合成生物学的技术突破愈加成熟，细胞工厂的发展正迎来深刻的变革，细胞编程和细胞工厂的巨大潜力使它们成为未来生命科学和生物技术发展的重要方向，有望为人类带来更多的福祉和创新成果。

虽然细胞编程和细胞工厂的发展具有多方面的重要意义。然而，要实现细胞编程和细胞工厂的广泛应用，仍然面临着诸多挑战。首先，对细胞进行复杂的编程改造会带来不可预料的代谢负担，这反而会给微生物生长带来不利影响；其次，工程电路与细胞系统相互作用以动态控制代谢通量仍是一个难题。即使人们将对化工原料、可再生能源、新型食品开发以及生物医药药物的生产寄希望于细胞工厂，可目前的发展依旧无法满足如此高的供给需求。针对如何提升工程菌的生长和生物合成能力，以及如何拓展工程化微生物的功能，研究者进行了大量的尝试。已经采用配置可以实现非自然功能的遗传元件、开发新的细胞底盘、创建新型的基因逻辑电

路等方式来赋能更高效的细胞工厂，这些方法统称为细胞的编程化改造。本文重点介绍近年来在细胞编程化改造方面的研究进展和成果。

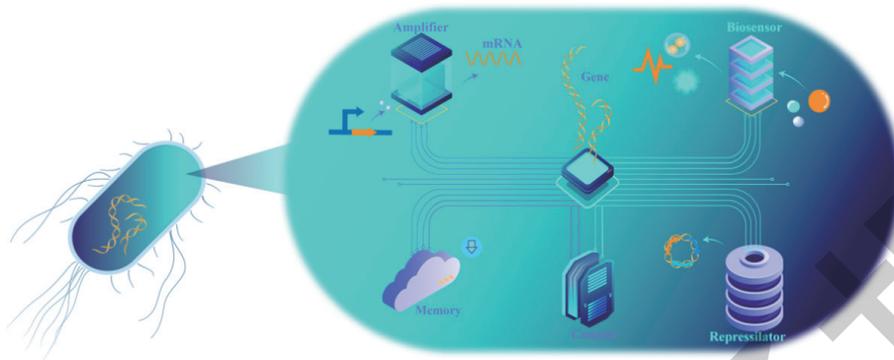
1 新型遗传元件：功能多样性工程菌组装的元器件

细胞是拥有着各个零件执行功能的高度统一体，很容易让人联想到具有相同层次结构的计算机，两者之间的拓扑性使得许多人将其进行对比^[5]。因此，可以将细胞这一抽象层次拓扑为电子计算设备，为之装备类似于计算机主板、CPU、内存、硬盘等标准化硬件（图1），提升其运行速度和协调能力，进而实现细胞高产，这是许多研究者努力的目标。下面主要介绍几种代表性的新型遗传元件，这些功能性细胞元件的植入赋予了细胞新的功能。

1.1 基因振荡器：探索基因调控动力学的工具

合成生物学的设计思路是构建和表达人工设计的遗传回路执行生产任务，但在大多数情况下，我们会发现精心设计的遗传回路远不如自然生理条件下的基因回路表达优异。也即人工重连的电路版本与野生型基因电路在结构上看似没有差别，且电路的动力学相似，但两个体系结构之间随机波动引起的差异最终会导致细胞走向不同模式。这种现象的主要原因是新合成的基因回路大多数是外源性且由外部诱导而设计的，在表达上会产生无可预料的生化噪声，导致无法响应细胞内源性的调节网络并与之耦合。因此，了解微生物内部形成的网络、机制和模式成为当下合成生物学的主要挑战之一。

基因振荡器是为了探索自然状态下的细胞复杂而又隐秘的调节机制而生，其本质上是一种特定的遗传电路，用来探究细胞内代谢和调节的生物模式，通过电路的相应结果来对更深层次的遗传结构作出调整。研究自然状态下的遗传调控网络能够显示出强大且精确的动力学调节机制，例如，蓝藻中的生物钟可以使用转录和翻译后控制机制的组合来保持相位数周而不会夹带，同时显示出对温度和生长速率变化的稳健性^[6]。如果能够深入了解其中基因调控网络的精确调节动力学，并将其运用到人工合成的遗传回路中，对生物合成将会很有意义。简单的基因振荡器主要由彼此之间相互抑制的操纵子组成。



在基因 (gene) 的调控下, 各元件执行相应功能, 放大器 (amplifier): 能够在级联基因网络中放大具有增益控制的转录信号, 并且可以通过预测和动态调制转录信号实现细胞内外的功能控制; 生物传感器 (biosensor): 对细胞工厂内外环境成分进行可视化的动态监测, 进行实时调控; 存储器 (memory): 细胞工厂中的记忆元件, 延长细胞的工作时间; 基因振荡器 (repressilator): 探究细胞内基因调控动力学的工具; 计数器 (counter): 通过计算细胞内部各单元的级联反应, 实现更加复杂的细胞编程和生物技术应用

Under genetic regulation, each element assumes a distinct role. Amplifier: It amplifies the transcriptional signals with gain control within cascade gene networks, and functional control inside and outside the cell can be achieved by predicting and dynamically modulating transcriptional signals. Biosensor: Real-time regulation through visual and dynamic monitoring of environmental components both inside and outside the cell factory. Memory: Memory elements within the cell factory extend its working time by preserving essential information. Repressilator: Probing intracellular regulatory dynamics. Counter: Catalyzing complex cell programming, the counter concept facilitates more intricate cell programming and broader biotechnological applications by calculating the cascade reactions of units within the cell

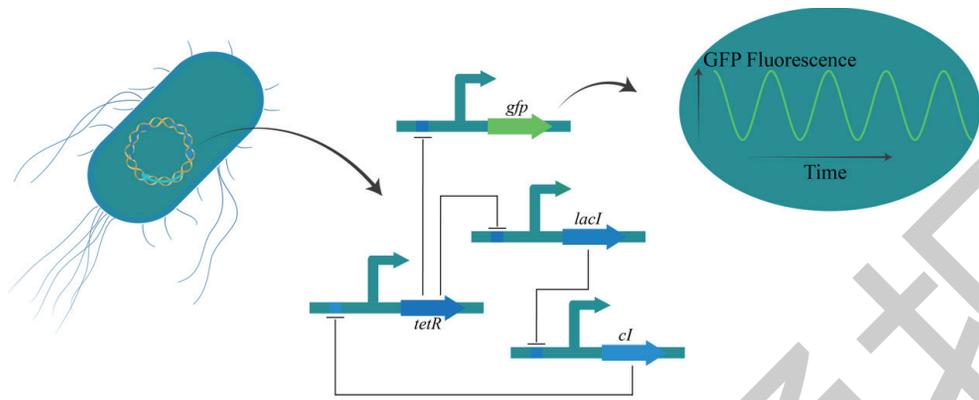
图 1 细胞编程拓扑概念

Fig. 1 Topology concepts on cell programming

初代基因振荡器由 Elowitz 和 Leibler 设计^[6], 命名为“repressilator” (RFL), 之后相继沿用。RFL 由 3 个编码转录抑制因子基因 (*lacI*、*tetR*、*ci*) 组成的环形振荡器 (图 2)。在这个振荡器中, 每一个基因产物都会抑制下一个基因的转录, 环形中的三者彼此抑制, 因而, 这个转录抑制器系统在大肠杆菌中建立起一个振荡网络, 定期诱导报告基因绿色荧光蛋白的合成。而后随着显微技术和分子克隆技术的更新换代, 很多研究重新复盘了这一构造^[5, 7-9] (表 1), 双反馈振荡器的出现更简化了振荡器的结构, Zhang 等^[9] 通过双输入启动子的策略构建了双反馈振荡器 (DFO), 使用两种诱导剂独立控制报告蛋白和振荡节点, 构造好的模型可以通过诱导剂浓度预测报告蛋白的振幅和周期, 真正实现了振荡器的独立控制, 这也意味着向创建可预测的生物回路和完全可操作的生物系统更进一步。由此, 研究者在尝试进行复杂细胞编程时, 可通过在上游构建振荡器的方式来实现蛋白的严谨表达, 从而为下游严谨基因电路的实现创造条件, 更为精确地实现复杂基因电路的表达。通过对基因调控模型的研究, 研究者

们揭示了大量随机因素对遗传表达的影响, 如质粒拷贝数、翻译效率、mRNA 降解速率对蛋白质微调控制的影响, 并发现基因振荡网络普遍存在于生物中且在生物学中起着核心作用^[8]。对于合成生物学而言更有意义的是, 通过对基因调控模型的研究, 我们可以有依据地预测细胞动力学行为, 更加合理地设计基因电路。

基因振荡器的开发为遗传回路的实际使用提供了一个新的保障元件, 减少了细胞内错误信号的传播和能量损失, 增强了遗传回路的稳定性和鲁棒性。从实验的角度来看, 合成基因振荡器的能力是衡量基因电路能力的标准, 对它的开发与应用是研究合成生物学基因精确调控的先驱, 为人工构建的遗传网络也能达到与自然系统相媲美的精度提供了有价值的参考, 更为复杂和多样的遗传回路提供了验证手段, 在一定程度上减少了试错成本。尤其在实际操作过程中, 能够考虑到随机效应对基因电路带来的影响, 设计振荡器精确检测电路随机效应和机制, 那么新一代的电路有可能超越自然状态下的基因网络, 实现细胞工厂稳定高效表达。



“repressilator”由3个操纵子相互作用，彼此抑制。其中，*tetR* 基因负责调节绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）报告节点。使用延时荧光显微镜观察 GFP 报告情况，电路会表现出周期性的振荡

The “repressilator” comprises three operons interacting and inhibiting with each other. Notably, the *tetR* gene assumes a pivotal role in governing the regulatory node of GFP. Through the application of a time-lapse fluorescence microscope to monitor the GFP signal, the circuit manifests periodic oscillations

图2 初代“repressilator”工作原理

Fig. 2 Work mechanism of initial “repressilator”

1.2 细胞存储器：用于延长工程菌的工作时间

虽然合成生物学最初的应用方向是为了控制发酵罐内不同微生物进行代谢的时间和活性，但随后微生物与人类之间共生关系的发现引发了对摄入天然微生物益生菌治疗效果的临床研究，“细胞存储器”因此引入。细胞存储器是细胞中的记忆元件，能够帮助菌株超出预期实现长时间的功能运转，从而给予体内工作的菌株以更强的鲁棒性和定植力。

近几年来合成生物学迅速发展出了一个新的应用分支：活体生物药（live biotherapeutic products, LBP）。LBP 是通过菌株进行工程化改造，实现对疾病的诊断、预防和治疗（表1）。LBP 的治疗范围极为广泛，尤其在肿瘤治疗、慢性疾病等治疗领域，对肥胖、高血糖、高血脂、炎症性胃肠道疾病甚至一些遗传代谢类的慢性疾病等方面有着广泛的应用前景^[10]。处于新兴的研究热潮中，LBP 取得了令人瞩目的成就，这离不开对细胞进行精准的编程改造。

利用 LBP 在动物甚至人体内进行诊断和治疗时，尤其是在进行肿瘤治疗和胃肠道治疗过程中常需要工程菌长期定植以及稳态功能的发挥。但是人工设计的遗传回路往往容易受到体内环境的影响，遗传表达受到严重干扰。例如，针对肿瘤的肠道鼠伤寒沙门氏菌株会在约1个月内从体内清除，而无法继续发挥作用。如果可以改善工程菌株的体内定

植和长久发挥作用的能力，会极大地改善 LBP 的治疗效果。Riglar 等^[11]根据炎症反应会产生连四硫酸盐的原理，设计了工程改造后的大肠杆菌来检测肠道炎症，该系统使用源自λ噬菌体的 Cro 蛋白诱导的 CI/Cro 转录开关作为一个“记忆元件”使得工程菌能够维持功能稳定至少6个月之久，显著增强了大肠杆菌的长期工作能力。Roquet 等^[12]通过使用重组酶特有的 DNA 切除和反转功能在大肠杆菌中构建状态机（state machines），这是一种人造的序列化信息处理元件，通过基于测序和转录组分析等操作，可以读取基因表达的状态，记录所有输入的时序，并对基因表达进行多输入、多输出的控制。类似地，Sheth 等^[13]通过生物信号触发细胞内 DNA 的产生，后使用基于 CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）的适应系统，构建了一种“生物磁带记录器”，将其用来描述细胞动态和环境变化，从而相对准确地描述时间间隔生物信号和调节程序的能力。

细胞记忆性元件的引入对于细胞遗传电路改造来说有极大的助力作用，它使合成电路具备了长期稳定性，赋予了细胞长久工作的能力，也变相地增加了基因回路的复杂性和控制能力，使生物改造结果更加向编程靠近。尤其是在 LBP 领域，具备记忆元件的工程菌能够降低定植过程中的突变率，可以

表 1 本文涉及到的部分细胞编程化改造基础与技术

Table 1 Partial modification basis and technology of the cell programming involved in this study

细胞编程 Cell reprogramming	描述 Description	来源 Reference
遗传元件 Genetic elements	振荡器	
	抑制振荡器 -RFL	初代“repressilator”, 3个转录抑制子建立的振荡网络, 开发早、研究范围广、独立控制尚未实现 [8]
	双反馈振荡器 -DFO	由两个诱导操纵子控制, 可以通过控制诱导剂的浓度实现振荡器电路的独立控制, 使得振荡器能够用于更复杂的电路设计 [10]
	存储器	
	功能稳态型存储器	利用λ噬菌体的 Cro 蛋白诱导的 CI/Cro 转录开关作为“记忆元件”使得工程菌能够维持功能稳定至少 6 个月之久 [11]
	状态机	使用重组酶特有的 DNA 切除和反转功能在大肠杆菌中构建状态机 (State machines), 读取基因表达的状态, 记录所有输入的时序, 并对基因表达进行多输入、多输出的控制 [12]
	生物磁带记录器	使用基于 CRISPR 的适应系统, 构建了一种“生物磁带记录器”, 将其用来描述细胞动态和环境变化, 从而相对准确地描述时间间隔生物信号和调节程序的能力 [13]
	生物传感器	
	产物响应型生物传感器	基于产物响应的生物传感器, 产物生成量越高, 细胞传感荧光水平越强, 以此建立了超高通量的筛选方式 [14]
	温敏型生物传感器	利用温敏型生物传感器控制启动子表达, 解偶联细胞生长与合成的关系, 极大地提高了类胡萝卜的产生 [15]
细胞底盘 Cell chassis	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	模式化的细胞工厂, 生产工业用酶的优良底盘 [16]
	酪丁酸梭菌 <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	在生产丁酸及丁醇的生产上有极高的生产效率, 短链脂肪酸潜在的理性“细胞工厂” [17]
	米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	在天然产物的生物合成领域有重要的研究价值 [18]
	嗜盐碱单胞菌 <i>Natronomonas kamekura</i>	用于高分子材料、化学品和燃料的生物制造 [19]
	解脂耶氏酵母 <i>Yarrowia lipolytica</i>	适合用于油脂及其衍生物的生物合成 [20]
	蓝藻	与上转换纳米粒子一起封装, 能够创建工程化的微氧细胞工厂 [21]
	Minicell	无染色体细胞, 药物递送的优良载体 [22]
	Simcell	无染色体细胞, 安全可编程的通用平台 [23]
复杂基因逻辑回路 设计 Complex gene logic circuit design	AND、NOT 联用型遗传 电路设计	利用 AND 和 NOT 联用的基因电路, 巧妙实现了细胞生长过渡到生物合成时间点的精确把控, 减少外源电路引入对宿主菌株的代谢负担 [24]
	CASwitch	将 CRISPR-Cas 内环核酸酶与 Tet-On3G 诱导基因系统相结合而设计的高性能基因电路, 用于哺乳动物系统中高性能诱导表达 [25]

憧憬未来此类元件的持续突破将对活体生物药的发展带来极大的推动意义。

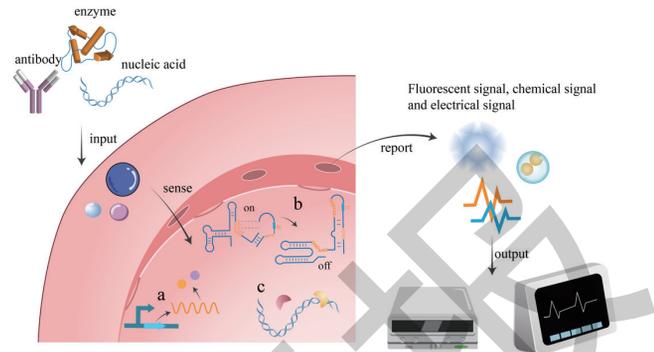
1.3 生物传感器：可视化微生物“细胞工厂”的内部动态监测

生物传感器是一类可以将外界物理、化学以及生物信号通过胞内或胞外的酶系反应将其转化为胞

外可检测的光学信号、电化学信号以及生物荧光信号等的新型细胞元件, 根据反应体系的不同, 可分为细胞生物传感器和无细胞生物传感器。细胞生物传感器以整个活细胞为载体, 以细胞代谢物及其衍生物作为输入信号, 通过活细胞内的反应将信号转化放大后输出 (图 3), 而无细胞生物传感器被开

发应用于无细胞合成生物学中，同样由输入、输出和检测元件构成，但其突破了细胞环境的限制，其安全性和鲁棒性更加优于细胞生物传感器。自1992年，首次研究报告等离子生物传感器技术起^[26](表1)，三十年来细胞生物传感器迎来了突飞猛进的发展，在此期间，生物传感器工程菌相继在有毒化合物检测^[27]、胞内状态监测^[28]、生物治疗^[29]、疾病诊断^[30]以及高通量筛选^[31]等领域作出了极大的贡献。在应用范围更广的同时，细胞生物传感器的精度也得到了极大的提高，从最初应用于大分子代谢物水平的检测到对转录组水平的精细定量^[32]，从单纯的检测和信号报告到利用其进行药物开发和疾病治疗^[33]，生物传感器的应用与发展给合成生物学带来新的技术突破。Adolfson等^[14]基于苯丙氨酸经PAL酶转化为反式肉桂酸的原理，设计了利用产物反式肉桂酸响应的生物传感器，苯丙氨酸转化效率越高，细胞经过生物传感器输出的荧光水平越强，从而建立了一种超高通量PAL酶突变文库的筛选方法，能从超过 10^6 个PAL酶突变体中筛选出酶活显著提升的突变体。以类似的方法，结合生物传感器可以高通量地筛选出酶的优势变体，完成定向进化，为编程细胞提供更优异的效应器。生物传感器的应用不仅促进了高通量筛选，还促进了微生物细胞工厂的定向进化。Zhou等^[15]筛选了一种温敏突变体Gal4m9，在30℃时失去诱导GAL启动子的功能，而在24℃时恢复功能，使用这种基于生物传感器的温度响应调节系统，能够解耦联细胞生长与蛋白表达的关系，极大地提高了类胡萝卜素的产生。

合成生物学发展的瓶颈之一来源于“细胞工厂”中复杂的代谢网络无法得到可视化的监测并对其进行精细调控，而生物传感器基于响应快、体积小、成本低、可实现原位监测等特点，在合成生物学领域已经走向了多元化发展。基于不同元件均可以构建生物传感器的关键元件，如启动子^[34]、转录调节因子^[35]、核糖开关^[36]等(图3)，优化后的生物传感器其感应的动态范围、灵敏度、底物特异性以及响应的严谨性均有不同程度地提高^[37]。对此，本实验室立足于苯丙酮尿症等活体生物药的研究与开发，基于活体生物给药的治疗方式，将温度诱导性生物传感器(在36℃以下几乎不表达，在36℃及以上完



细胞感受到外部核酸、抗体、酶分子等生物分子信号后，经过基于启动子(a)、核糖开关(b)和转录调节因子(c)等元件所设计的生物传感器后，转化为荧光信号、电信号、化学信号等输出胞外被捕捉分析

Upon detecting external biomolecular signals encompassing gene, antibody, and enzyme molecules, cells navigate through biosensors meticulously designed with elements such as promoters (a), riboswitch (b), and transcription regulators (c). These biosensors efficiently convert the sensed signals into diverse outputs, including fluorescence signals, electrical signals, and chemical signals. The translated signals are then captured and analyzed outside the cell, providing valuable insights into the intricate cellular responses to external stimuli

图3 基于不同元件响应的生物传感器原理

Fig. 3 Principle of biosensor based on the responses of different components

全表达)添加到基因电路启动子的构造中，通过体内37℃的环境激活表达目的基因，从而避免了使用化学诱导性启动子的体内诱导毒性问题，且在底物水平上展现出了极强的降解能力。

在未来的发展中，标准化生物传感器元件的开发将会更加兼容“细胞工厂”中其他元件的输入和输出功能，成为细胞中检测和调节的有力工具，为一些合成生物学的关键瓶颈问题带来解决办法。仍然许多正在发展中合成生物学的标准元件，如放大器(amplifier)、计数器(counter)^[38]、数字转换器^[39](digitizer)、滤波器(filter)^[40]等，这些元件的开发使用正在不断完善着基因网络的功能，增加了可执行的复杂性和无限性，赋予工程菌更加强大的工作能力。美国麻省理工学院为解决储存和组装问题，建立了标准生物部件登记处(registry of standard biological components, RSBP)，目前已经收集了大约3200个标准化生物学部件，并以标准化的格式对遗传原件进行编目和存储，便于供全世界科学家索取并在现有部件的基础上组装具有更复杂功能的生物系统。

2 合成生物学的新底盘概念：为细胞底盘提供更加多样的选择

在许多情况下，关注单个细胞元件属性的同时，还必须考虑到细胞本身特有的代谢路径所带来的影响。在对细胞工厂进行工程化改造时，现有的改造多倾向于对内部的部分改造，忽略了对全基因组细胞底盘的关注，底盘自身的潜能没有被系统地挖掘，这在很大程度上制约了工程化的改造能力。人们对大肠杆菌的不断深入研究证实了其具有结构简单、遗传背景明确、扩增方便以及安全性等特点，使之很快成为了分子生物学领域的模式菌株。作为一种典型的兼性厌氧菌，大肠杆菌能够利用氧气进行彻底的生物氧化释放大量能量，新陈代谢迅速，而且反应条件温和、经济效益高，被公认是最好用、最常用的工具（表1）。然而，在选择表达载体时，基于表达产物和表达系统的要求，经典的模式菌株使用起来往往力不从心，例如，枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）表达系统虽然作为基因工程菌的出发菌来说有很强的优势和潜力^[16]，是生产工业用酶的良好底盘，但是其自身存在的限制性修复系统会引起重组质粒不稳定以及胞外蛋白酶表达能力过强导致蛋白容易降解等缺点，也使得必须开发出新的工程底盘细胞用于生物合成，以满足更广泛的需求。例如，酪氨酸梭菌（*Clostridium tyrobutyricum*）在丁酸以及丁醇等方面具有较高的生产效率及产物耐受性等优点，被认为是短链脂肪酸、脂肪醇潜在的理性“细胞工厂”^[17]。米曲霉（*Aspergillus oryzae*）宿主因其强大的天然产物生物合成酶表达生产能力，在天然产物生物合成领域具有非常重要的研究和应用价值，尤其在聚酮化合物和非核糖体多肽领域的生产能力十分优异^[18]。嗜盐单胞菌（*Natronomonas kamekura*）以其独特的生物性能，可以应用于医疗和环境领域的聚羟基脂肪酸等高分子材料、化学品和燃料的生物制造^[19]。此外，有些菌株能够天然地积累过量油脂，特别适合用于油脂及其衍生物的合成，利用合成生物学手段对解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）进行了系统改造，油脂产量创纪录地达到98.7 g/L^[20]。

除此之外，作为地球上最大的产氧体系，蓝藻

由于其独特的光合作用和碳代谢能力，成为工程化产氧极佳的微生物底盘。而且，随着光合自养微生物基础生物学机制的阐明和发展以及遗传工具包的开发，工程化的蓝藻已经能够实现非天然的功能。Wang等^[21]将蓝藻和上转换纳米粒子封装在海藻酸钠微胶囊中，构建了微型氧气工厂，将其注射到肿瘤部位，能够实现定点的氧气供应，抑制肿瘤细胞的生长和转移。随着合成生物学的研究的深入，研究对象也正在从原核单细胞体系过渡到复杂的多细胞真核体系。与单细胞的原核微生物表达体系相比，植物细胞还有更为复杂的细胞器、丰富的内膜环境以及成熟的系统，能够为人工合成的复杂基因回路体系提供工作环境。例如，植物细胞的叶绿体是真核和藻类细胞特有的细胞器，其中蕴含着大量的代谢途径，被形象地称为细胞“生物合成中心”。在很多情况下，模式化的底盘展现出的生物合成能力并不理想，如在2013年，Keasling实验室以酿酒酵母为底盘实现了青蒿素前体物青蒿酸的合成，产量可以达到25 g/L^[41]，而后赛诺菲收购了这一专利并宣布进行大规模的转化，并承诺以不盈利的方式进行销售。但事实情况是，植物来源的青蒿素以每千克低于250美元的售价远低于赛诺菲公司同等重量350–400美元的慈善价，这使得2015年时，赛诺菲并未投入任何生产。从这件事中能够明显看出植物底盘在进行某些特殊化合物的生物合成时具有天然优势，是其他底盘所不能轻易代替的。虽然植物细胞丰富代谢途径的解析仍然是目前正在突破的瓶颈，但是由简单到复杂的设计改造，本身就是合成生物学所要经历的道路。

新一代产业链的迭代更新更加依托于利用微生物进行生物合成和发酵，因此对宿主的可控性、产率以及安全性等要求越来越严格。随着合成系统变得更大、更复杂，它们与内源性系统的相互作用变得更加明显。为了解决工程化使用过程中菌株的天然基因网络与设计的遗传回路之间的相互作用，以及细胞原有染色体基因的随机表达带来的不可预测性，研究者创造出了一种合成生物学新底盘概念——无染色体细胞。目前针对无染色体的研究主要集中在两方面，一类是Minicells，另一类是Simcells，两者根据其特性差异有着不同应用方式。

Minicells 是直径在 100–400 nm, 非活的、无核的、不分裂的细胞 (表 1), 由正常细菌细胞分裂相关的基因突变而再生^[42]。形成 Minicell 的 *min* 系统由 3 个基因组成: *minC*、*minD* 和 *minE*, *minC* 或 *minD* 基因的突变会导致细胞出现两极附近而不是中间细胞频繁的分裂, 并随后形成缺乏染色体的小球形微细胞和一个含有染色体的长丝状细胞^[43]。目前, 已尝试了对鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和单增李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 进行 *min* 系统的敲除, 分离纯化得到 Minicells^[42]。类似于它们的亲本细菌细胞, Minicells 也含有肽聚糖、核糖体、蛋白质、RNA 和质粒, 所以仍然保持着与亲本细胞完全一致的细胞活动, 包括 ATP 合成、mRNA 翻译、转录和质粒 DNA 翻译。

与 Minicell 不同, Simcells 是从天然菌株中去除染色体而存在的可重新编程底盘, 具有与亲本细胞除染色体外相同的表型, 因此可以执行比 Minicell 更广泛的功能。Rampley 等^[44]通过大肠杆菌衍生的 Simcells 可以将葡萄糖酸、丙烯酸酯和阿拉伯糖等的输入信号转化为绿色荧光蛋白的生产, 证明了 Simcells 能够作为由基因电路控制的智能底盘运行。Chen 等^[22]证实了 *E. coli* Nissle1917 和 MC 1000 Δ minD 具有特征良好和模块化的阿司匹林诱导系统, 可作为合成生物学有用的工具。最令人惊喜的是, Fan 等^[23]发现 Simcells 能够在染色体去除后 10 d 内连续表达合成遗传回路, 是可以编程为安全制造和交付产品, 而不受宿主基因组的生物合成载体。

Minicells 和 Simcells 通过去除染色体而存在的细胞衍生物, 减少了天然基因组的随机性表达以及人为设计的遗传回路和天然基因组的随机表达而产生的相互作用, 因而更加地纯粹, 也便于人为引入代谢通路更加顺畅地表达, 如果配以标准化零件和合适的遗传回路设计, 会具有更强的生物兼容性。但同时, 两者因缺少染色体的存在, 虽然消除了其他代谢副反应的影响, 但也基本丧失了 ATP 和 NADH/NADPH 的再生能力。所以, Fan 等^[23]的研究在 Simcells 里导入含有表达糖酵解途径的质粒后, 在增强细胞表达可诱导遗传回路的同时, 又显

著延长了 Simcells 的寿命。综合来看, Minicells 和 Simcells 作为新型简化了的合成生物学底盘, 有着安全性和可编程性, 如果可以进一步地优化下其能量供给能力, 在未来预计会成为极具潜力的生物合成底盘。但用途有所区别, Minicells 以其小巧的体型和优异的载药能力是绝佳的药物递送工具, 解决了完整细菌在体内应用受到生物安全问题的严重限制, 在活体生物药领域有着极大的应用前景。而 Simcells 作为天然无染色体的菌株, 在最大程度上保留了亲本细胞的功能, 是未来“细胞工厂”构造的有力选择。基于此, 本实验室立足于目前承担的“苯丙酮尿症益生菌活体生物药的研究与评价”项目同时构建了益生菌 *Escherichia coli* Nissle1917 的 Minicells 和 Simcells, 通过对其进行进一步的细胞编程改造, 将两者作为表达苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 的底盘细胞, 分别对其进行体外及体内给药, 发现改造后的两种无染色体细胞均呈现出良好的酶活降解能力以及体内给药时的生物安全性, 且两者结合给药时具有优秀的协同作用, 此项目为开发苯丙氨酸尿症活体生物药提供了新的理论支撑。

3 基因逻辑回路设计：增加遗传表达的复杂性

目前, 阻碍合成生物学发展的一个极大的挑战是将多个遗传部件组装成更大的程序, 以实现更复杂的行为, 而且优秀的底盘和标准化零件只有在合适的基因网络的设计下, 才能发挥出其功能。随着合成生物学的发展, 人们构建细胞遗传回路的水平也极大地提高了。最初, 基因表达的方式是组成型表达, 启动子的类型决定了表达的结果, 如使用 tac 启动子、T7 启动子等, 选择容易拷贝的启动子还是高强度的启动子是最初设计时需要考虑的问题。到后来, 诱导性启动子的发现使得基因的调控表达变得可以在时间和空间上接受控制, 遗传回路也从真正意义上可以受人所操控。而转录因子的发现及在构建遗传回路上不断深入地应用, 使得研究者们更有能力构建出类似电子设备中逻辑电路的控制形式 (表 1)。如 DNA 结合蛋白可以通过募集或者阻断 RNA 聚合酶来发挥作用, RNA-IN/OUT 翻译抑制

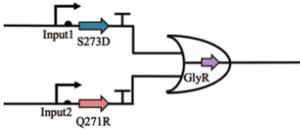
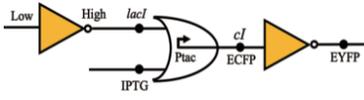
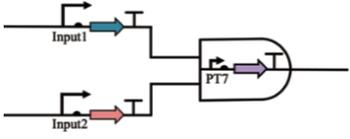
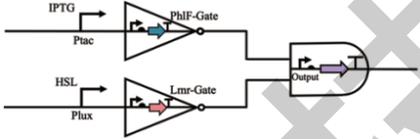
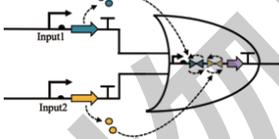
因子可以阻碍 RNA 聚合酶的作用, 基于 CRISPR 的 sgRNA 和 Cas9 蛋白影响基因组或者质粒 DNA 的作用来阻断转录过程^[45]。通过将这些转录因子整合到遗传回路中, 作为基因开关来控制关键基因的表达,

再以串联、并联甚至更复杂的连接方式将生物原件组合起来从而构建出整个基因回路, 表 2 是 5 种基本型的逻辑回路构造方式。

运用逻辑回路的设计思路已经创造出了不少精

表 2 基本逻辑电路构造方式汇总

Table 2 Summary of basic logic circuit construction

回路类型 Loop type	电路原理图 Electrical circuit diagram	原理 Principle	来源 Reference
OR		Input1 和 Input2 分别控制 S273 和 Q271R 的形成, 二者均可作为甘氨酸合成的前体	[46]
NOT		Lac I 和 IPTG 共同作用于 Ptac 启动子, 作为 OR 门电路的两个输入。当有高电平输出信号时, 会刺激 cI 和 EYFP 的表达, 进而通过非门抑制 EYFP 的表达	[47]
AND		Input1 控制 T7 RNA 聚合酶基因的转录, Input2 控制琥珀酸抑制剂 tRNA sup D。当两种成分转录后, 合成 T7 RNA 聚合酶, 实现后续的基因表达	[48]
NAND		PhIF 和 Lmr 是两个非门, 当 IPTG 和 HSL 同时诱导时, 黄色荧光蛋白的表达会停止, 其余情况正常	[49]
NOR		Input1 和 Input2 合成信号分子, 翻转两个终止子的状态, 当两个输入信号都表达时, 关闭输出启动子	[50-51]

妙的基因回路, 在发酵罐内, 相比于之前在不同阶段对基因表达进行定时控制或者在特定条件下进行激活酶活力来提高产量来说, 构建基因回路的方式对发酵过程的优化显得更加轻松。如, Li 等^[52] 结合内源性 I-E 型 CRISPR-Cas 系统和光传感器设计了将 AND 和 NOT 型联用的基因逻辑电路, 生成了一个重定向代谢通量的代谢平台, 实现了从细胞生长到产品合成时间点的完美把控, 在一定程度上解决了将外源性合成途径引入宿主菌株时产生的代谢负担问题, 将 β - 羟基丁酸的生产水平提升了 2-3 倍。除此之外, 在大多数情况下, 研究者在尝试构建更为复杂的电路时, 复杂的逻辑回路表达系统在为宿主带来代谢负担仍无法避免, 所以寻求基因回路的

复杂度与宿主可接受能力之间的平衡性会是一个不小的挑战。从长远来看, 电路需要精确平衡其元件噪声, 以产生适当的响应, 我们仍然缺少能够调整表达水平的计算工具和零件库^[24, 53], 所以开发出基于数学建模和计算机模拟的工具, 能够基于调控元件的特性和宿主生物的代谢网络, 预测不同基因调控元件组合的表达水平, 将为优化基因电路提供指导; 在此基础上, 建立高通量基因电路筛选平台将会更利于研究者快速评估大量基因调控元件的表达效果; 而且, 若能结合当下快速发展的 AI 学习, 建立基于学习和强化学习的模型来实现能够从大量实验数据中学习基因调控元件的性能和特征, 并预测新组合的表达效果, 将会提高基因电路设计的效率

和准确性。

因此，培养一个包容和协作的社区，构建开放共享的遗传回路平台，将尽可能多的构建方法和数据汇聚在一起进行共享和总结，帮助使用者选择更加适合的表达元件提供经验参考，才能获得鲁棒性更强、更高效表达的设计。已经有人开始为此付出行动，BioFab（国际促进生物技术开放设施）是一个生物设计-构造平台，它建立了表征细菌启动子、RBS序列和转录终止子的广泛文库，该文库可以切割每个基因侧翼目标位点转录回路的 mRNA 序列^[54]，使用者可以利用从中获取的从 5'UTR 和任何共转录基因的影响中移除的绝缘基因，大大缩短了潜在的漫长、迭代的调试过程。同时开发了一个“可靠性评分”标准，用于测量细胞元件在遗传背景下的行为，可以帮助识别电路工程设计和调试后阶段的潜在缺陷。除此之外，美国麻省理工学院还开发了一个公共维基平台——OpenWetware^[25]，OpenWetware 是一个在线资源平台，旨在促进生物学和生物工程领域的开放性合作和知识共享，它提供了一个包容性的平台，允许科学家们分享实验技术、协作项目、实验设计和结果等信息，还可以使研究人员共享实验方案、协作开发新技术，并且能够从其他研究人员的经验中学习。具体在进行细胞编程操作时，用户可以在浏览现有的页面，寻找实验技术、设计方案，也可以创建一个新的求助页面，等待他人关于基因电路构建、底盘改造等经验分享和技术指导，并且可以线上协作交流等。综合来看，OpenWetware 的目标是创建一个开放、透明、共享的生物学研究社区，促进科学研究的发现和创新，并且已经成为合成生物学社区里的一个宝贵资源共享平台和共享协议论坛^[55]。

4 总结与展望

细胞编程技术是合成生物学领域的技术创新，能够尽可能地实现人为设计、改造和操作细胞仍需要在细胞元件、新型底盘概念以及基因回路构建各个环节上付出努力。对于细胞元件本身来说，设计和合成序列更短且更具功能性的细胞元件将会有助于后续构建更精细的基因电路和调控网络。且未来细胞编程的发展会更加注重模块化设计，所以将细

胞元件集群化靠近模块化地组装和拆卸，将会大大提高细胞编程的效率和可控性。除此之外，若能够将生物信息学融入和整合到细胞编程中，就能够更好地理解 and 预测细胞元件的功能，为细胞编程提供更智能化的设计工具。

细胞底盘作为承载和表达外源基因的宿主用于加快代谢速率和提高底物利用效率，使其能够在有限的资源下高效生产代谢产物，同时提高细胞的抗毒性和生存能力，增强细胞工厂的稳定性和可持续性。而目前 CRISPR 系统在不同属种间的完善和操作性的更新，使得我们对细胞底盘的设计和改造能力不断达到新的高度。

最后，对于基因电路的构建来说，理论上虽然已有上百个正交的调节器可以用来构造互不影响的基因调控网络，但是抛开设计和构造本身的难点不说，考虑到不同的电路和元件对于细胞中的 ATP、温度、还原力、RNAP 的敏感度不同，所以还没有合适的工具可以模拟合成基因网络的电路动态，因此在未来能够开发出在无细胞环境中模拟和调试电路的方法将会对基因逻辑回路的构造和应用做出突出性贡献。

如何在细胞编程中平衡基因回路的复杂度与宿主适应性一直是合成生物学和合成生态学中的一个重要议题，建议可以从以下几方面着手：

(1) 自适应调节。设计具有自适应调节功能的基因电路，能够根据宿主变化调整自身复杂程度，这样的构建的基因回路可以在不同的环境中平衡复杂度和适应性，从而更为有效地利用资源和应对挑战。

(2) 动态调控。开发具有动态调控的基因回路，使其能够在宿主细胞中实时根据宿主细胞的需求和外部刺激进行快速调整，从而减弱蛋白表达对宿主生长代谢的影响。

(3) 算法优化和网络动态建模。借助算法优化基因回路的设计，如能够计算出在不同环境下的最佳平衡点，通过模拟进化过程，找到最优的回路结构和参数配置，从而实现更好的适应性和稳定性。采用网络动态建模的方法可以研究基因回路与宿主细胞的相互作用，揭示他们的平衡机制和调节规律。通过理论模拟可以了解基因回路复杂度和宿主适应

性之间的关系,为之后的优化改进提供方案。

(4) 构建合成生态系统。可以将基因回路集成到合成生态系统中,如可以通过实现构造的工程菌与其他工程菌之间的竞争和协作来平衡基因电路与宿主代谢网络之间的耦合关系,从而实现较为稳定和高效的生物合成。

总的来说,具有功能化的细胞元件、新型细胞底盘以及基因回路构建方法的成熟正在赋予工程菌更强大的功能,但与此同时将三者完美融合创造出更复杂的遗传程序仍需要大量的实践和努力。例如,只追求元件的极致化往往容易适得其反,使得各个元件之间的属性并不相容,在进行“电路”连接时出现无法预知的高阶效应。然而我们也相信,未来由细胞编程技术产生的智能细胞,作为定制生物体的存在,能够胜任特定生产任务,例如生产药物、清理污染物、检测和治疗疾病等,尤其是基因电路的精确设计能够实现个体化医疗和精确的药物输送系统,对于罕见病患者来说将会是一个福音。

参考文献

- [1] Majidian P, Tabatabaei M, Zeinolabedini M, et al. Metabolic engineering of microorganisms for biofuel production [J] . *Renew Sustain Energy Rev*, 2018, 82: 3863-3885.
- [2] Gu PF, Liu LW, Ma QQ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of isobutanol: a review [J] . *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37 (10) : 168.
- [3] Fidock DA. Eliminating malaria [J] . *Science*, 2013, 340 (6140) : 1531-1533.
- [4] Kannan K, Gibson DG. Yeast genome, by design [J] . *Science*, 2017, 355 (6329) : 1024-1025.
- [5] Joshi YJ, Jawale YK, Athale CA. Modeling the tunability of the dual-feedback genetic oscillator [J] . *Phys Rev E*, 2020, 101 (1-1) : 012417.
- [6] Zúñiga A, Guizoui S, Mayonove P, et al. Rational programming of history-dependent logic in cellular populations [J] . *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 4758.
- [7] Tyler J, Shiu A, Walton J. Revisiting a synthetic intracellular regulatory network that exhibits oscillations [J] . *J Math Biol*, 2019, 78 (7) : 2341-2368.
- [8] Strelkowa N, Barahona M. Transient dynamics around unstable periodic orbits in the generalized repressilator model [J] . *Chaos*, 2011, 21 (2) : 023104.
- [9] Zhang FY, Sun YH, Zhang YH, et al. Independent control of amplitude and period in a synthetic oscillator circuit with modified repressilator [J] . *Commun Biol*, 2022, 5 (1) : 23.
- [10] Ozdemir T, Fedorec AJH, Danino T, et al. Synthetic biology and engineered live biotherapeutics: toward increasing system complexity [J] . *Cell Syst*, 2018, 7 (1) : 5-16.
- [11] Riglar DT, Giessen TW, Baym M, et al. Engineered bacteria can function in the mammalian gut long-term as live diagnostics of inflammation [J] . *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 653-658.
- [12] Roquet N, Soleimany AP, Ferris AC, et al. Synthetic recombinase-based state machines in living cells [J] . *Science*, 2016, 353 (6297) : aad8559.
- [13] Sheth RU, Yim SS, Wu FL, et al. Multiplex recording of cellular events over time on CRISPR biological tape [J] . *Science*, 2017, 358 (6369) : 1457-1461.
- [14] Adolfsen KJ, Callihan I, Monahan CE, et al. Improvement of a synthetic live bacterial therapeutic for phenylketonuria with biosensor-enabled enzyme engineering [J] . *Nat Commun*, 2021, 12 (1) : 6215.
- [15] Zhou PP, Li M, Shen B, et al. Directed coevolution of β -carotene ketolase and hydroxylase and its application in temperature-regulated biosynthesis of astaxanthin [J] . *J Agric Food Chem*, 2019, 67 (4) : 1072-1080.
- [16] 马平英, 罗雯, 詹怡昕, 等. 枯草芽孢杆菌表达系统研究进展 [J] . *江西科学*, 2020, 38 (6) : 867-871.
- [16] Ma PY, Luo W, Zhan YX, et al. Research progress of *Bacillus subtilis* expression system [J] . *Jiangxi Sci*, 2020, 38 (6) : 867-871.
- [17] Liu CZ, Qin Y, Li XJ, et al. Preparation and characterization of starch nanoparticles via self-assembly at moderate temperature [J] . *Int J Biol Macromol*, 2016, 84: 354-360.
- [18] Dong JW, Li XJ, Yang C, et al. The antioxidant activity and total phenolic and total flavonoid contents of *Pyracantha fortuneana* fruit can be improved by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* and *Penicillium commune* [J] . *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2022, 31 (6) : 452-460.
- [19] 晋彪, 张静, 洪坤强, 等. 嗜盐单胞菌利用乙酸盐合成 PHB 的研究 [J] . *化学工业与工程*, 2022, 39 (5) : 119-126.
- [19] Jin B, Zhang J, Hong KQ, et al. Studies on PHB production in *Haloferax volcanii* using acetate as substrate [J] . *Chem Ind Eng*, 2022, 39 (5) : 119-126.
- [20] 赵禹, 刘士琦, 李建, 等. 解脂耶氏酵母作为微生物细胞工厂的应用研究进展 [J] . *食品科学*, 2021, 42 (19) : 388-400.
- [20] Zhao Y, Liu SQ, Li J, et al. Advances in the application of *Yarrowia lipolytica* as a microbial cell factory [J] . *Food Sci*, 2021, 42 (19) : 388-400.
- [21] Wang WL, Zheng HZ, Jiang J, et al. Engineering micro oxygen factories to slow tumour progression via hyperoxic microenvironments [J] . *Nat Commun*, 2022, 13 (1) : 4495.
- [22] Chen JX, Steel H, Wu YH, et al. Development of aspirin-inducible biosensors in *Escherichia coli* and SimCells [J] . *Appl Environ*

- Microbiol, 2019, 85 (6) : e02959-e02918.
- [23] Fan C, Davison PA, Habgood R, et al. Chromosome-free bacterial cells are safe and programmable platforms for synthetic biology [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117 (12) : 6752-6761.
- [24] Salis HM, Mirsky EA, Voigt CA. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression [J] . Nat Biotechnol, 2009, 27 (10) : 946-950.
- [25] De Carluccio G, Fusco V, di Bernardo D. Engineering a synthetic gene circuit for high-performance inducible expression in mammalian systems [J] . Nat Commun, 2024, 15 (1) : 3311.
- [26] Schuster SC, Swanson RV, Alex LA, et al. Assembly and function of a quaternary signal transduction complex monitored by surface plasmon resonance [J] . Nature, 1993, 365 (6444) : 343-347.
- [27] Thouand G, Horry H, Durand MJ, et al. Development of a biosensor for on-line detection of tributyltin with a recombinant bioluminescent *Escherichia coli* strain [J] . Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62 (2-3) : 218-225.
- [28] Misawa N, Osaki T, Takeuchi S. Membrane protein-based biosensors [J] . J R Soc Interface, 2018, 15 (141) : 20170952.
- [29] Maskow T, Kemp R, Buchholz F, et al. What heat is telling us about microbial conversions in nature and technology: from chip- to megacalorimetry [J] . Microb Biotechnol, 2010, 3 (3) : 269-284.
- [30] Zhu C, Gerald RE II, Huang J. Micromachined optical fiber sensors for biomedical applications [J] . Methods Mol Biol, 2022, 2393: 367-414.
- [31] Koveal D, Rosen PC, Meyer DJ, et al. A high-throughput multiparameter screen for accelerated development and optimization of soluble genetically encoded fluorescent biosensors [J] . Nat Commun, 2022, 13 (1) : 2919.
- [32] Bourque K, Pétrin D, Sleno R, et al. Distinct conformational dynamics of three G protein-coupled receptors measured using FIAsh-BRET biosensors [J] . Front Endocrinol, 2017, 8: 61.
- [33] Alloush HM, Anderson E, Martin AD, et al. A bioluminescent microbial biosensor for *in vitro* pretreatment assessment of cytarabine efficacy in leukemia [J] . Clin Chem, 2010, 56 (12) : 1862-1870.
- [34] Dhyani R, Shankar K, Bhatt A, et al. Homogentisic acid-based whole-cell biosensor for detection of alkaptonuria disease [J] . Anal Chem, 2021, 93 (10) : 4521-4527.
- [35] Dabirian Y, Li XW, Chen Y, et al. Expanding the dynamic range of a transcription factor-based biosensor in *Saccharomyces cerevisiae* [J] . ACS Synth Biol, 2019, 8 (9) : 1968-1975.
- [36] Serganov A, Nudler E. A decade of riboswitches [J] . Cell, 2013, 152 (1-2) : 17-24.
- [37] Ma Q, Zhang QW, Xu QY, et al. Systems metabolic engineering strategies for the production of amino acids [J] . Synth Syst Biotechnol, 2017, 2 (2) : 87-96.
- [38] Friedland AE, Lu TK, Wang X, et al. Synthetic gene networks that count [J] . Science, 2009, 324 (5931) : 1199-1202.
- [39] Rubens JR, Selvaggio G, Lu TK. Synthetic mixed-signal computation in living cells [J] . Nat Commun, 2016, 7: 11658.
- [40] Kong WT, Blanchard AE, Liao C, et al. Engineering robust and tunable spatial structures with synthetic gene circuits [J] . Nucleic Acids Res, 2017, 45 (2) : 1005-1014.
- [41] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J] . Nature, 2013, 496 (7446) : 528-532.
- [42] MacDiarmid JA, Mugridge NB, Weiss JC, et al. Bacterially derived 400 nm particles for encapsulation and cancer cell targeting of chemotherapeutics [J] . Cancer Cell, 2007, 11 (5) : 431-445.
- [43] Ali MK, Liu Q, Liang K, et al. Bacteria-derived micelles for cancer therapy [J] . Cancer Lett, 2020, 491: 11-21.
- [44] Rampley CPN, Davison PA, Qian P, et al. Development of SimCells as a novel chassis for functional biosensors [J] . Sci Rep, 2017, 7 (1) : 7261.
- [45] Brophy JAN, Voigt CA. Principles of genetic circuit design [J] . Nat Methods, 2014, 11 (5) : 508-520.
- [46] Han L, Shan Q. Pair of residue substitutions at the outer mouth of the channel pore act as inputs for a Boolean logic “OR” gate based on the *Glycine* receptor [J] . ACS Chem Neurosci, 2020, 11 (20) : 3409-3417.
- [47] Yokobayashi Y, Weiss R, Arnold FH. Directed evolution of a genetic circuit [J] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99 (26) : 16587-16591.
- [48] Anderson JC, Voigt CA, Arkin AP. Environmental signal integration by a modular AND gate [J] . Mol Syst Biol, 2007, 3: 133.
- [49] Stanton BC, Nielsen AAK, Tamsir A, et al. Genomic mining of prokaryotic repressors for orthogonal logic gates [J] . Nat Chem Biol, 2014, 10 (2) : 99-105.
- [50] Bonnet J, Yin P, Ortiz ME, et al. Amplifying genetic logic gates [J] . Science, 2013, 340 (6132) : 599-603.
- [51] Siuti P, Yazbek J, Lu TK. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells [J] . Nat Biotechnol, 2013, 31 (5) : 448-452.
- [52] Li XM, Jiang W, Qi QS, et al. A gene circuit combining the endogenous I-E type CRISPR-cas system and a light sensor to produce poly- β -hydroxybutyric acid efficiently [J] . Biosensors, 2022, 12 (8) : 642.
- [53] Mutalik VK, Guimaraes JC, Cambrey G, et al. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements [J] . Nat Methods, 2013, 10 (4) : 354-360.
- [54] Cameron DE, Bashor CJ, Collins JJ. A brief history of synthetic biology [J] . Nat Rev Microbiol, 2014, 12 (5) : 381-390.
- [55] MacKenzie A. From validating to verifying: public appeals in synthetic biology [J] . Sci Cult, 2013, 22 (4) : 476-496.