

抗生素全细胞生物传感器的设计与应用研究进展

罗宇柯, 朱怡铃, 许健萍, 刘君凤, 音建华*

浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

罗宇柯, 朱怡铃, 许健萍, 刘君凤, 音建华. 抗生素全细胞生物传感器的设计与应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 79-91.

LUO Yuke, ZHU Yiling, XU Jianping, LIU Junfeng, YIN Jianhua. Research progress in the design and application of whole-cell biosensors for antibiotics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 79-91.

摘要: 抗生素是由微生物产生或人工合成的具有杀菌或抑菌活性的化学物质, 被广泛应用于临床治疗以及畜牧业和水产养殖行业中, 使得土壤、水体和食品等环境中抗生素的残留问题非常突出; 与此同时, 抗生素耐药性问题日益严重, 新型抗生素的开发迫在眉睫。全细胞生物传感器可以利用微生物细胞将抗生素信号转换为可读信号, 不仅能够简单快速、灵敏准确地对抗生素进行动态检测, 还能有效地发现新型抗生素。本文对目前报道的抗生素全细胞生物传感器进行了全面的梳理和总结, 将其分为特异型和广谱型两大类型, 并重点阐述了两大类型抗生素生物传感器的设计原理与应用实例, 为其他抗生素全细胞生物传感器的构建及应用提供了借鉴。

关键词: 抗生素; 全细胞生物传感器; 耐药基因; 调控蛋白; 特异性; 灵敏度

Research progress in the design and application of whole-cell biosensors for antibiotics

LUO Yuke, ZHU Yiling, XU Jianping, LIU Junfeng, YIN Jianhua*

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Antibiotics are chemicals with bactericidal or bacteriostatic activity produced by microorganisms and artificially synthesized. Since the discovery of penicillin by Alexander Fleming in 1928, antibiotics have been widely used in clinical treatments as well as in the animal husbandry and aquaculture, leading to antibiotic residues in soil, water, food and other environments. At the same time, antibiotic resistance is increasingly serious, which necessitates

资助项目: 国家自然科学基金(32270044)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270044).

*Corresponding author. E-mail: jianhuay@zjut.edu.cn

Received: 2024-05-15; Accepted: 2024-08-20; Published online: 2024-08-21

the discovery of novel antibiotics. In recent years, with the development of synthetic biology, researchers have developed a variety of whole-cell biosensors that can respond to antibiotics. These whole-cell biosensors use microbial cells to convert antibiotic signals into readable signals, which can not only perform dynamic detection of antibiotics simply, quickly, sensitively and accurately but also effectively discover novel antibiotics. This review comprehensively summarizes the reported whole-cell biosensors for antibiotics, classifies them into two types (specific and general), and elaborates on the design principles and applications of the two types of antibiotic biosensors. This review will provide reference for the construction and application of other whole-cell biosensors for antibiotics.

Keywords: antibiotics; whole-cell biosensors; antibiotic resistance genes; regulator; specificity; sensitivity

抗生素是具有杀菌或者抑菌活性的化学物质, 主要分为两类: 一是由微生物合成的天然次级代谢产物, 如青霉素和链霉素等; 二是由人工合成或半合成的化学物质, 如氨基青霉素和磺胺类药物等^[1]。自 1928 年弗莱明发现青霉素以来, 众多具有不同结构和作用机制的抗生素被不断发现, 并被广泛应用于感染性疾病的治疗, 拯救了无数的生命; 抗生素也被当作生长促进剂广泛应用于畜牧和水产养殖业^[2]。然而, 抗生素的不合理使用甚至滥用导致土壤、水体等环境和食品中的抗生素残留越来越多, 严重威胁环境安全和食品安全^[3]。传统的抗生素检测方法主要包括高效液相色谱法(含液相色谱-串联质谱法)和免疫层析法(包括胶体金免疫层析技术和荧光免疫层析技术)。其中, 前者测定精度高、分辨率好, 但具有成本昂贵、步骤复杂、耗时耗力以及高度依赖于大型精密仪器设备等缺点; 而后者测定简单快速, 但灵敏度差、难以精准定量以及无法进行动态监测^[4-5]。因此, 开发能够对抗生素进行快速、准确以及动态监测的方法至关重要。此外, 抗生素耐药性问题日益凸显, 迫切需要新的途径开发新型抗生素。

随着合成生物学的发展, 越来越多能够响应抗生素的全细胞生物传感器被成功设计和构

建, 传感器利用微生物细胞作为生物敏感元件将抗生素信号转换为可读信号, 从而实现对抗生素的检测。与传统的检测方法相比, 全细胞生物传感器具有成本低、操作简单、可以原位动态监测等优势^[6-7]。抗生素全细胞生物传感器的设计通常基于细菌中的抗生素感知和应答调控系统。感知元件包括转录调控因子(transcription factor, TF)、双组分系统(two-component system, TCS)和核糖体开关(riboswitch)等, 它们能够直接或间接响应抗生素浓度变化进而调控靶基因的表达; 报告基因元件包括荧光蛋白编码基因(*gfp*、*yfp*、*cfp* 和 *mCherry* 等)、 β -半乳糖苷酶编码基因 *lacZ* 和荧光素酶编码基因 *luxCDABE* 等, 其表达受响应抗生素的靶基因启动子控制, 可以将细胞对抗生素的应答反应转化为通过物理或化学方法可检测的信号^[7]。

根据检测范围可将抗生素全细胞生物传感器分为两大类型: 一类是仅能检测特定抗生素种类的特异型生物传感器(specific whole-cell biosensor); 另一类是具备更广检测范围的广谱型生物传感器(general whole-cell biosensor)。本文系统总结了这两大类抗生素生物传感器的设计思路、构建过程和应用范围, 并展望了该领域未来的发展方向。

1 特异型抗生素全细胞生物传感器

特异型抗生素全细胞生物传感器指特异性检测某种或某类抗生素的全细胞生物传感器(表 1), 其大多以该类抗生素耐药基因诱导表达调控蛋白为感知元件进行构建(图 1)。

1.1 β -内酰胺类抗生素生物传感器

β -内酰胺类抗生素(β -lactams)是临床治疗中应用最广泛且最悠久的抗菌药物, 其化学结构中含有 1 个 β -内酰胺环^[30], 主要包括青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类和单环 β -内酰胺类。该类抗生素能与青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins, PBPs)不可逆共价结合, 从而阻

表 1 特异型抗生素全细胞生物传感器
Table 1 Specific whole-cell biosensors for antibiotics

Class	Regulator	Promoter	Reporter	Host	Antibiotics	References
β -lactams	AmpR	P_{ampC}	Lux	<i>Escherichia coli</i> SN0301	Ampicillin, imipenem, cefoximycin	[8]
	AmpR	P_{ampC}	mCherry	<i>E. coli</i> SN0301	Meropenem, imipenem, penicillin, cephalosporin	[9]
	BlaR ₁	P_{blaZ}	Lux	<i>Bacillus subtilis</i>	Penicillin, carbenicillin, cefotaxime, aztreonam, cephalosporin, cefoperazone	[10]
Tetracyclines	TetR	P_{tetA}	Lux	<i>E. coli</i> K12	Tetracycline, terramycin	[11-12]
	TetR	P_{tetA}	GFP/mCherry	<i>E. coli</i> DH5 α	Tetracycline	[13]
	TetR	P_{tetA}	LacZ	<i>E. coli</i>	Tetracycline, chlortetracycline	[14-15]
	TetR	P_{tetA}	sfGFP	<i>E. coli</i>	Tetracycline, terramycin, Chlortetracycline, doximycin, metacycline, minocycline, tigacycline, declomycin	[16]
	TetR	P_{tetA}	GFP	<i>E. coli</i> DH5 α	Tetracycline	[17]
	TetR	P_{tetA}	Lux	<i>E. coli</i> K12	Tetracycline, doximycin, chlortetracycline, terramycin	[18-19]
	TetR	P_{tetA}	eGFP	<i>E. coli</i> DH5 α	Tetracycline	[20]
	rtTA	P_{tetO}	RFP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CML282	Doximycin	[21]
Macrolides	MphR	P_{mphR}	GFP	<i>E. coli</i> TOP10	Erythromycin	[22]
	MphR	P_{mphR}	GFP	<i>E. coli</i> NEB	Erythromycin	[23]
	MphR	P_{mphR}	Lux	<i>E. coli</i> SM101	Erythromycin, oleandomycin, narbomycin, picromycin, clarithromycin, azithromycin, methmycin	[24]
	MphR	P_{mphR}	Lux	<i>E. coli</i> DH5 α	Clarithromycin	[25]
	PamR	P_{pamA}	LacZ	<i>Streptomyces albus</i> J1074	Pamamycin	[26]
Glycopeptides	LnrJK	P_{lnrL}	Lux	<i>B. subtilis</i>	Amphotericin B	[27]
	VanSR	P_{vanYR}	Lux	<i>B. subtilis</i>	Vancomycin	[28]
	VanSR	P_{vanHAX}	Related to growth	<i>Streptomyces coelicolor</i> M1146	Vancomycin	[29]

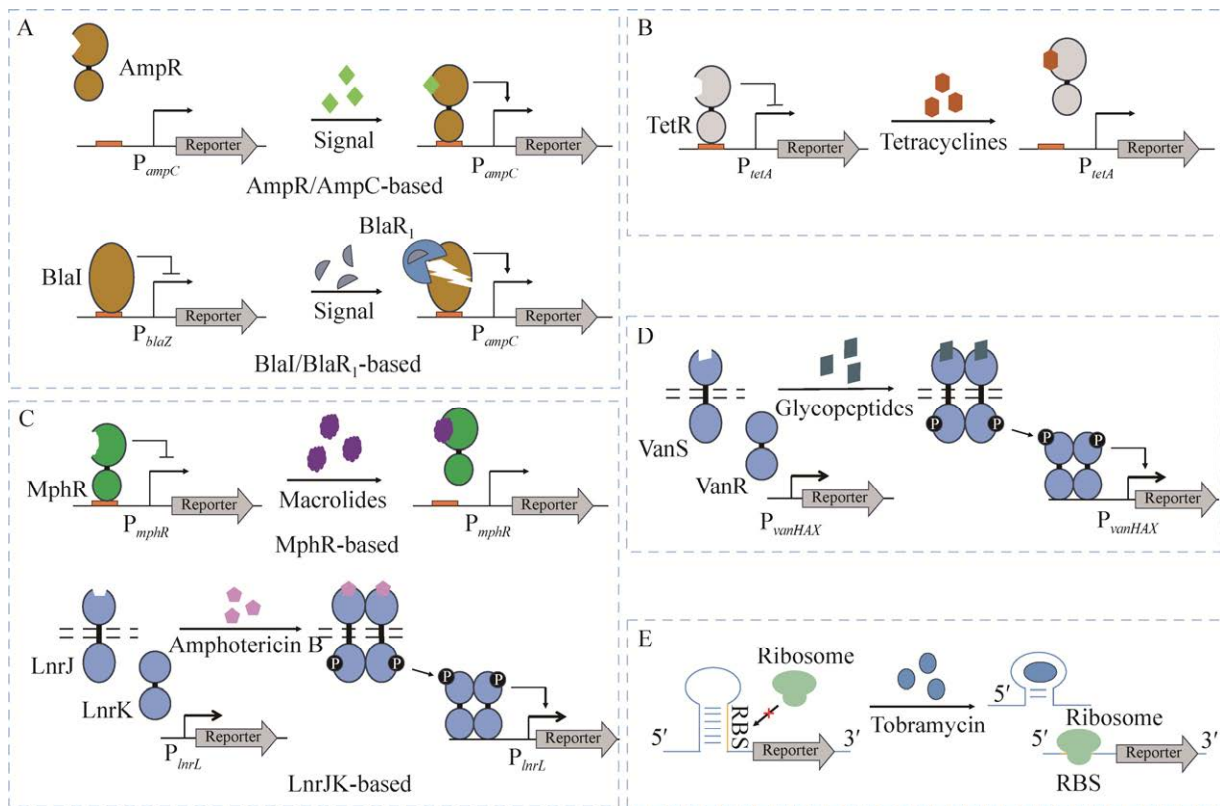


图 1 特异型抗生素全细胞生物传感器模式图

Figure 1 Schematic of specific whole-cell biosensors for antibiotics. A: β -lactam biosensors; B: Tetracycline biosensor; C: Macrolide biosensors; D: Glycopeptide biosensor; E: Tobramycin biosensor.

断肽聚糖的生物合成过程，导致细菌裂解死亡^[31]。通过对耐药菌的研究发现，有些细菌能够感知 β -内酰胺类抗生素，通过特定调控系统诱导 β -内酰胺酶的表达，进而水解抗生素产生耐药性。基于这些 β -内酰胺类抗生素感知-应答调控系统，研究者们构建了 β -内酰胺类抗生素全细胞生物传感器。

以革兰氏阴性菌作为底盘细胞构建的 β -内酰胺类抗生素生物传感器依赖于经典的 β -内酰胺酶诱导表达调控系统 AmpR/AmpC。该系统中，*ampR* 和 *ampC* 基因分别编码 LysR 型转录调控因子 AmpR 和 β -内酰胺酶 AmpC，两个基因相邻排列、转录方向相反，形成 divergon 结构；无抗生素时 AmpR 抑制 *ampC* 基因的表达； β -内酰胺类抗生素存在时，肽聚糖水解产物

1,6-anhydromuro-peptides 大量积累，作为信号分子激活 AmpR，进而诱导 *ampC* 基因的表达^[32]。基于此，Valtonen 等^[8]将弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 中的 *ampR* 和 *ampC* 基因启动子 (P_{ampC}) 转入 β -内酰胺类抗生素超敏菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) SN0301，并且将报告基因元件 *luxCDABE* 克隆至 P_{ampC} 下游，首次构建了 β -内酰胺类抗生素全细胞生物传感器；该传感器能够检测氨苄青霉素、哌拉西林、亚胺培南、头孢匹林、头孢西丁以及苯唑西林等多种 β -内酰胺类抗生素，并且其灵敏度较高，对哌拉西林和亚胺培南的检测限低至 2.5 ng/mL。最近，Higuera-Llantén 等^[9]采用类似策略将假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) IB20 的 *ampC-ampR* 系统导入至 *E. coli* SN0301 菌株，但报告元件替换为

mCherry 荧光蛋白。与铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PAO1 菌株相比, *Pseudomonas* sp. IB20 菌株对 β -内酰胺类耐药性更强, *ampC* 诱导表达水平更高; 该研究构建的传感器能够特异性检测 β -内酰胺类抗生素, 包括青霉素类(氨苄青霉素和羧苄青霉素)、头孢菌素类(头孢呋辛和头孢他啶)以及碳青霉烯类(亚胺培南和美罗培南), 其中对碳青霉烯类的响应具有极高的灵敏度, 能够检测 8 pg/mL 美罗培南和 40 pg/mL 亚胺培南, 对青霉素类和头孢菌素类抗生素的检测限为 1–10 ng/mL。

以革兰氏阳性菌作为底盘细胞构建的 β -内酰胺类抗生素全细胞生物传感器依赖于 BlaR1/BlaI 调控系统。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 中, 编码 β -内酰胺酶 BlaZ 的基因与 *blaR1I* 操纵子相邻, 没有 β -内酰胺类存在时, 阻遏蛋白 BlaI 结合在二者之间的间隔区, 抑制 *blaZ* 基因的表达; 当 β -内酰胺类抗生素存在时, 抗生素受体蛋白 BlaR1 的 C 端胞外感知结构域乙酰化, 从而激活其细胞质结构域中的蛋白酶活性, 致使 BlaI 降解, *blaZ* 基因开始转录^[33]。Lautenschläger 等^[10]将 *S. aureus* 的 BlaR1/BlaI 系统导入枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中, 利用 P_{blaZ} 控制报告基因 *luxCDABE* 的表达, 从而构建 β -内酰胺类抗生素生物传感器; 通过密码子优化、敲除内源 β -内酰胺酶基因以及组成型表达 *blaR1* 和 *blaI* 基因等多种策略, 显著提升生物传感器的响应性能, 其能够特异性检测 β -内酰胺类抗生素, 并且响应信号具有浓度依赖性, 10 种测试抗生素的动态范围为 7–53 倍; 进一步研究发现, 该传感器在固体平板和液体培养基中均具有良好的响应效果, 可用于筛选潜在的 β -内酰胺类抗生素产生菌。

1.2 四环素类抗生素生物传感器

四环素类(tetracyclines)抗生素是由链霉菌

产生或经半合成制备的一类广谱抗生素, 被广泛用于治疗由革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、支原体、衣原体、立克次氏体和原生动植物等微生物引起的各种传染病^[34]。四环素类抗生素主要包括四环素、土霉素、金霉素和替加环素等, 这类抗生素能特异性地结合细菌核糖体 30S 亚基的 16S rRNA, 并阻止氨基酰基-tRNA 与 A 位点的结合, 从而抑制蛋白的合成^[35]。当前, 四环素全细胞生物传感器通常以转录调控因子 TetR 为核心元件进行构建, TetR 是一种响应四环素的阻遏蛋白, 其在缺少抗生素时与四环素外排泵基因 *tetA* 操纵区结合进而阻遏基因转录, 而 TetR 与四环素结合后诱导 *tetA* 基因的表达, 使得细菌对四环素产生耐药性^[36]。

基于 TetR 介导的调控系统, 多个研究团队在 *E. coli* 中导入 TetR 以及 *tetA* 启动子(P_{tetA})与不同报告基因(*lacZ*、*luxCDABE* 和 *gfp*)融合片段, 进而构建出特异性响应四环素类抗生素的全细胞生物传感器^[11–12,18]。这些生物传感器具有很高的灵敏度, 能够检测牛奶^[18]、鱼片^[11]和鸡肉^[19]等多种食物中的四环素类抗生素, 最低检测限分别为 2–35 $\mu\text{g/L}$ 、20–50 $\mu\text{g/kg}$ 和 5–25 $\mu\text{g/kg}$ 。Hansen 等^[37]将构建的全细胞生物传感器与流式细胞分选技术相结合, 成功地对土壤中龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*)产生的四环素进行检测。Ma 等^[38]将 *gfp* 和 *mCherry* 作为报告基因元件在 *E. coli* DH5 α 中构建了可用于高通量检测土壤中四环素类抗生素的全细胞生物传感器, 检测限介于 5.32–10.80 $\mu\text{g/kg}$ 之间; 在此基础上, 将报告基因替换为 *lacZ*, 然后将传感器菌液滴加在滤纸中, 开发了一种低成本、便携式的“纸条型”全细胞生物传感器(whole-cell paper strip biosensors), 其对水和土壤中四环素的检测限分别为 5.23–17.10 $\mu\text{g/L}$ 和 5.21–35.30 $\mu\text{g/kg}$ ^[14]。

尽管利用野生型 TetR 构建的全细胞生物传感器能够响应多种四环素类抗生素,但其无法响应对抗超级细菌的新型四环素——替加环素。近期, Li 等^[16]采用定向进化策略对 TetR 蛋白进行突变,成功筛选出能够响应替加环素的四环素生物传感器;与野生型 TetR 构建的传感器相比,利用 TetR 突变体构建的传感器具有更低的检测限和更高的响应信号。由此可见,定向进化能够显著提升全细胞生物传感器的响应性能。

1.3 大环内酯类抗生素生物传感器

大环内酯类抗生素是具有大环内酯环的抗菌药物,包括红霉素、阿奇霉素和克拉霉素等。其中,红霉素类抗生素能够不可逆地与细菌核糖体 50S 亚基结合,通过阻断转肽作用及 mRNA 位移,进而抑制蛋白质的生物合成^[39]。

红霉素类抗生素全细胞生物传感器的构建通常基于转录调控因子 MphR, MphR 是一种属于 TetR 家族的阻遏蛋白,无抗生素时抑制大环内酯类磷酸转移酶基因(*mphA*)的表达,红霉素等大环内酯类抗生素存在时诱导 *mphA* 的表达,其表达产物能将红霉素进行磷酸化修饰进而产生耐药性^[40]。Kasey 等^[22]在 *E. coli* 中利用 MphR 构建了大环内酯类抗生素生物传感器,通过对 MphR 进行多位点饱和突变以及随机突变,筛选出对红霉素敏感性提升 10 倍的 MphR 突变体。Miller 等^[23]在 *E. coli* 中组成型表达 MphA,通过对红霉素进行磷酸化修饰阻止其自由扩散至细胞外,从而有效地在细胞内捕获红霉素,构建的全细胞生物传感器的灵敏度提高了约 10 倍,可以检测到低至 13 nmol/L 的红霉素。结合理性设计和定向进化策略可以改变 MphR 识别底物的特异性,野生型 MphR 无法区分红霉素和克拉霉素(C-6 羟基甲基化的红霉素),但利用 MphR 突变体 M9C4 构建的全细胞生物传感器能够特异性响应克拉霉素;进一步研究发

现, M9C4 的结构与野生型 MphR 十分相似,说明微弱的结构差异可以显著改变响应蛋白对配体的结合偏好性^[25]。

雷帕霉素是由白黑链霉菌(*Streptomyces alboniger*) DSM 40043 产生的一种大环内酯类免疫抑制剂,该菌中 TetR 型转录因子 PamR2 能够响应雷帕霉素并启动外排基因 *pamW* 的表达;基于此, Rebets 等^[26]在链霉菌(*Streptomyces*)中构建了响应雷帕霉素的全细胞生物传感器,并通过改变输出模块的启动子强度以及转录因子与配体之间的亲和性提升了传感器的响应性能。

多烯类抗生素也属于大环内酯类,其结构中具有多个共轭双键及大环内酯骨架,如两性霉素 B、制霉菌素和纳他霉素等;该类抗生素对细菌无作用,对真菌有抑制作用,其中两性霉素 B 是治疗真菌感染的最重要抗生素之一^[41]。*B. subtilis* 中双组分系统 LnrJK 能够响应两性霉素 B 并激活 *lnrLMN* 操纵子的表达,其产物 LnrLMN 是一种与线性多烯类抗生素 linearmycins 耐药性有关的 ABC 转运系统^[42]。基于此, Revilla-Guarinos 等^[27]在 *B. subtilis* 中将 *luxCDABE* 置于 *lnrL* 基因启动子(P_{lnrL})后,开发了一种针对两性霉素 B 等多烯类抗生素检测的全细胞微生物传感器;通过对 *lnrLMN* 操纵子的敲除,显著提升了传感器的响应性能,其对两性霉素 B 和制霉菌素的响应信号分别提高了 6 倍和 36 倍,在固体平板和液体培养基中均具有良好的响应效果,能够有效地检测两性霉素 B 产生菌结节链霉菌(*Streptomyces nodosus*) ATCC 14899;该传感器后续可用于筛选针对真菌病原体的新型多烯类抗生素。

1.4 糖肽类抗生素生物传感器

糖肽类抗生素(glycopeptides)是由链霉菌属和放线菌属合成的次级代谢产物,在结构上共富含芳香族氨基酸的七肽骨架,常通过糖

基化、氯化等进一步修饰。该类抗生素被广泛应用于多重耐药革兰氏阳性菌(如 *Staphylococcus aureus*)的临床治疗,包括万古霉素、替考拉宁和去甲万古霉素等^[43]。这些抗生素可以结合肽聚糖合成前体中的 D-Ala-D-Ala 二肽从而阻止转肽反应,进而抑制肽聚糖的生物合成^[44]。通过对万古霉素耐药机制的研究发现,万古霉素能够激活由组氨酸激酶 VanS 和反应调控蛋白 VanR 组成的双组分系统,进而诱导 *vanHAX* 操纵子的表达^[44]。其中, VanH 能够将丙酮酸还原为 D-乳酸(D-Lac); VanA 催化 D-Ala 和 D-Lac 相连,形成 D-Ala-D-Lac 二肽;而 VanX 则是一种二肽酶,负责切割肽聚糖前体短肽链末端的 D-Ala-D-Ala 二肽^[44]。因此, *vanHAX* 诱导表达后细菌中肽聚糖前体短肽链末端二肽变为 D-Ala-D-Lac,不再被糖肽类抗生素结合,对该类抗生素表现出耐药性^[44]。

基于万古霉素感知-应答调控系统 VanSR,国内外研究团队设计和构建了检测糖肽类抗生素的全细胞生物传感器。Fang 等^[28]将粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)中的 VanS_B-VanR_B 在 *B. subtilis* 中异源表达,并将其调控的靶基因启动子 P_{vanYB} 与 *luxCDABE* 融合,构建了检测万古霉素的生物传感器;利用木糖诱导型启动子(P_{xyI})控制 VanS_B-VanR_B 的表达,在缺少木糖诱导时(即 P_{xyI} 本底活性)传感器对万古霉素具有较好的响应,0.05–0.25 μg/mL 万古霉素存在时输出信号强度提高了约 500 倍,检测限低至 0.01 μg/mL。

最近,上海交通大学邓子新团队以天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) M1146 作为底盘细胞构建了两种糖肽类抗生素全细胞生物传感器^[29]。第一种是将菌株生长与糖肽类抗生素存在相偶联的生长依赖型全细胞生物传感器。肽聚糖生物合成过程中,连接酶 DdlA 负责肽聚糖单体中短肽链末端 D-Ala-D-Ala 的合成,该

团队构建了 DdlA 失活菌株,当糖肽类抗生素存在时,受抗生素诱导的 D-Ala-D-Lac 连接酶 VanA 大量表达,细胞中含有足够多的 VanA 支持肽聚糖合成,细菌得以正常生长;相反,当没有糖肽类抗生素时, *vanA* 基因表达量很低,不足以支持肽聚糖的合成,细菌无法生长;该传感器菌株在固体平板上对万古霉素的检测下限为 0.5 μg/mL,并且能够对糖肽类抗生素生物合成基因簇的异源表达作出响应^[29]。第二种是利用报告基因 *luxCDABE* 构建可生物发光的全细胞生物传感器,选择了两个受万古霉素诱导程度高的启动子(P_{vanJ} 和 P_{vanHAX})控制报告基因的表达;构建的两个传感器菌株对万古霉素的响应均呈浓度依赖性,其中 P_{vanHAX} 构建的传感器具有更宽的动态范围和更高的响应灵敏度,成功实现了对 3 种糖肽类抗生素产生菌的检测^[29]。由于链霉菌是最重要的抗生素产生菌以及抗生素生物合成基因簇的异源表达宿主,以链霉菌为底盘细胞构建的全细胞生物传感器有助于新型糖肽类抗生素的发现。

1.5 其他特异性抗生素全细胞生物传感器

杆菌肽是一种多肽类抗生素,其主要作用机制是螯合游离形式的细菌萜醇,从而阻止其去磷酸化和再循环,最终抑制肽聚糖的生物合成^[45]。杆菌肽全细胞生物传感器的构建依赖于该抗生素的耐药基因表达调控系统, *E. faecalis* 中杆菌肽能够激活调控蛋白 BcrR 进而诱导 ABC 转运系统 BcrAB 的表达,赋予细菌对该抗生素产生耐药性。基于此, Fang 等^[28]将源自 *E. faecalis* 的 *bcrAB* 启动子(P_{bcrA})与 *luxCDABE* 融合,然后导入 *B. subtilis* 中,同时利用木糖诱导启动子控制 *bcrR* 的表达,从而构建了能够检测杆菌肽的全细胞生物传感器,经优化后该传感器在固体平板中的检测浓度低至 0.3 μg/mL。

妥布霉素属于氨基糖苷类抗生素，在临床治疗和畜牧养殖过程中被广泛使用，因此在环境中的残留较为严重。与其他抗生素全细胞生物传感器不同的是，妥布霉素生物传感器的构建并非依赖于转录调控蛋白，而是基于一种人工改造的能够感知妥布霉素的小 RNA 序列，即核糖开关(riboswitch)。当没有抗生素时，核糖开关中 SD (Shine-Dalgarno)序列与 anti-SD 序列互补配对，报告基因无法进行转录；当妥布霉素存在时，RNA 构象改变并发生自剪切，SD 序列得以释放，启动报告基因的转录^[46]。Wang 等^[46]将人工改造的感知妥布霉素的 RNA 序列导入 *E. coli* 中，构建了能够特异性检测妥布霉素的全细胞生物传感器；通过高通量筛选，获得了具有最佳响应性能的生物传感器，其检测限低至 40 nmol/L。

2 广谱型抗生素全细胞生物传感器

广谱型抗生素全细胞生物传感器指能够检

测多个种类抗生素的全细胞生物传感器(表 2、图 2)，通常这些抗生素化学结构差异明显但共同作用于细菌中某个重要的生物合成过程。这种类型的抗生素生物传感器检测范围广，适用于新型抗菌药物的高通量初筛；此外，还可用于抗生素作用机制的研究。

2.1 细胞壁靶向抗生素生物传感器

细菌细胞壁是位于细胞膜外侧具有一定刚性的保护层，主要由肽聚糖网状结构组成，具有维持细胞形态以及保护细胞免受渗透压裂解等作用。细胞壁对于绝大多数细菌来说是必需的，加之哺乳动物细胞中没有细胞壁结构，使得细菌细胞壁成为最重要的抗生素作用靶点，也被称为细菌的“阿喀琉斯之踵”(the Achilles' heel of bacteria)。许多常用的抗生素都能特异性靶向细胞壁的生物合成过程，除前文所述的 β -内酰胺类和糖肽类抗生素外，还包括 D-环丝氨酸、杆菌肽、磷霉素等。细胞壁靶向抗生素全细胞生物传感器的构建通常基于细胞壁损伤感知和应答系统。

表 2 广谱型抗生素全细胞生物传感器

Table 2 General whole-cell biosensors for antibiotics

Class	Regulator	Promoter	Host	Reporter	Antibiotics	References
Cell wall-targeting antibiotics	P _{ghKR}	P _{blaA}	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Lux	Ampicillin, carbenicillin, penicillin, vancomycin, D-cycloserine	[47]
	LiaFSR	P _{liaI}	<i>Bacillus subtilis</i>	Lux	Vancomycin, bacitracin	[48]
	σ^M	P _{ywaC}		Lux	Cell wall synthesis inhibitors	[49]
Cell envelope-targeting antibiotics	Unknown	P _{gltB} , P _{murZ} , P _{sgtB}	<i>Staphylococcus aureus</i>	LacZ	Cell wall synthesis inhibitors	[50]
	Unknown	P _{SCO3089}	<i>Streptomyces coelicolor</i> M1146	Lux	Vancomycin, flavomycin, penicillin, ampicillin, polymyxin	[29]
	σ^M	P _{ypuA}	<i>B. subtilis</i>	eGFP	Polymyxin B, polymyxin E, D-cycloserine, bacitracin, fosfomycin, ampicillin	[51]
Others	Unknown	P _{fabHB}	<i>B. subtilis</i>	Lux	Fatty acid synthesis inhibitors	[52]
	Unknown	P _{yorB}	<i>B. subtilis</i>	Lux	DNA synthesis inhibitors	[53]
	Unknown	P _{yvgS}	<i>B. subtilis</i>	Lux	RNA synthesis inhibitors	[53]
	Unknown	P _{yheI}	<i>B. subtilis</i>	Lux	Protein synthesis inhibitors	[53]

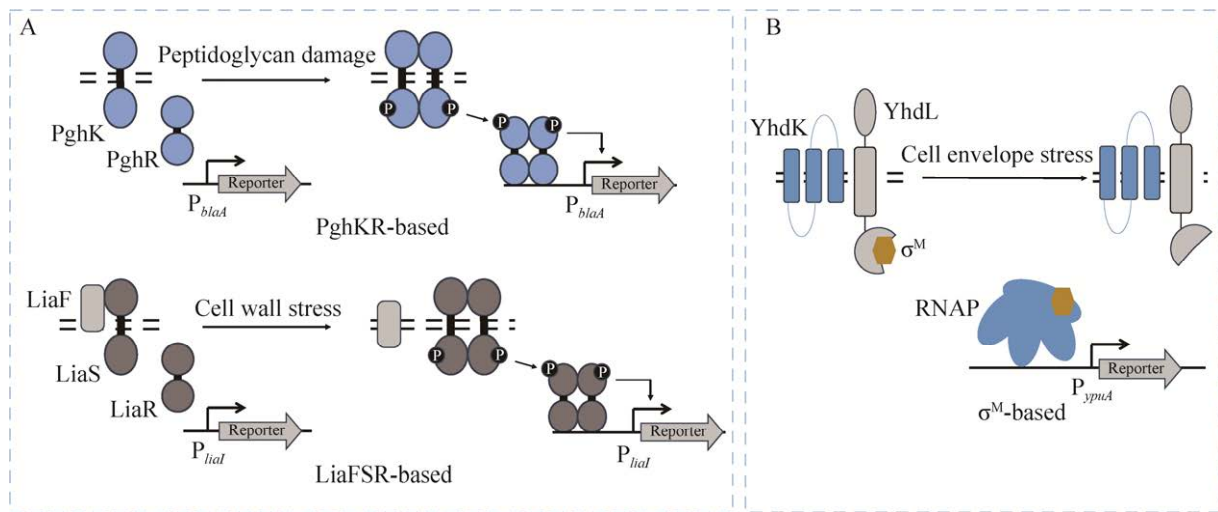


图 2 广谱型抗生素全细胞生物传感器模式图

Figure 2 Schematic of general whole-cell biosensors for antibiotics. A: Biosensors for cell wall-targeting antibiotics; B: Biosensors for cell envelope-targeting antibiotics.

LiaFSR 系统是 *B. subtilis* 中响应细胞壁损伤的调控系统，由组氨酸激酶 LiaS、应答调控蛋白 LiaR 以及膜结合抑制蛋白 LiaF 组成；当 LiaFSR 感知到万古霉素等抗生素作用引起的细胞壁损伤时，会激活 *liaIHGFSR* 操纵子的表达^[48]。Kobras 等^[48]通过将 P_{liaI} 启动子与报告基因 *luxCDABE* 融合，开发出特异性检测细胞壁靶向抗生素的全细胞生物传感器，对万古霉素和杆菌肽具有较好的灵敏度；该生物传感器在固体平板中也能响应细胞壁靶向抗生素。另一方面，Czarny 等^[49]也在 *B. subtilis* 中将启动子 P_{ywaC} 与 *luxCDABE* 融合(*ywaC* 编码在细胞壁应激下表达的鸟苷酸合成酶)，从而构建了细胞壁靶向抗生素生物传感器，随后利用该传感器对 26 000 余种小分子进行筛选，最终鉴定出 9 种新型细胞壁生物合成抑制剂。Galarion 等^[50]则将 *lacZ* 报告基因与 *S. aureus* 中 6 个涉及细胞壁生物合成的基因启动子(P_{gltB} 、 P_{ilvD} 、 P_{murZ} 、 P_{oppB} 、 $P_{ORF2768}$ 和 P_{sgtB})结合，结果显示 3 种启动子(P_{gltB} 、 P_{murZ} 和 P_{sgtB})构建的生物传感器能特异性响应细胞壁靶向抗生素，随后研究者利用 P_{murZ} 构建

的传感器建立了一种高通量筛选分析方法，成功地从 9 000 余种天然产物提取物中筛选出一种新的细胞壁生物合成抑制剂。

近年来，本课题组在革兰氏阴性菌奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*)中挖掘出一套新颖的感知和应答细胞壁损伤的双组分系统；该系统由组氨酸激酶 PghK 和反应调控蛋白 PghR 组成，能够感知由青霉素类 β -内酰胺类抗生素引起的细胞壁损伤并诱导 β -内酰胺酶基因 *blaA* 的表达；随后以该菌为底盘细胞，在 *blaA* 基因的启动子(P_{blaA})后连接报告基因元件 *luxCDABE*，构建了全细胞生物传感器；该生物传感器能够特异性响应 β -内酰胺类抗生素(如青霉素类)、糖肽类抗生素(如万古霉素)和 D-环丝氨酸等肽聚糖靶向抗生素，而对多黏菌素等非细胞壁靶向抗生素无响应；通过构建 β -内酰胺类抗生素超敏菌株 $\Delta blaA$ 和双组分系统 PghKR 易激活菌株 $\Delta ampG$ ，显著提升了生物传感器的响应性能；同时，还利用双层平板建立了细胞壁靶向抗生素高通量筛选方法，成功地从土壤环境中筛选到 7 株潜在的细胞壁靶向抗

生素产生菌^[47]。这是目前唯一已知以革兰氏阴性菌为底盘细胞构建的细胞壁靶向抗生素生物传感器,有望发现对抗革兰氏阴性耐药菌的新型抗生素。

2.2 细菌胞膜靶向抗生素生物传感器

细菌胞膜(cell envelope)是保护细菌细胞免受外界不利环境影响的复杂多层结构,革兰氏阳性菌和阴性菌的细菌胞膜不同,前者由多层肽聚糖和细胞膜组成,而后者由细菌外膜、薄的肽聚糖层和细胞膜组成^[54-55]。从范围上来说细菌胞膜包含细胞壁和细胞膜,因而靶向细菌胞膜的抗生素包含靶向细胞壁和靶向细胞膜的抗生素。现有的细菌胞膜靶向抗生素生物传感器均以革兰氏阳性菌为底盘细胞并基于胞膜胁迫应答调控系统进行构建。

B. subtilis 对细胞胞膜胁迫的应答主要由细胞质外功能(extracytoplasmic function, ECF)因子 σ^M 介导。 σ^M 的活性受抗 σ 因子 YhdL 及其辅助蛋白 YhdK 调节,在正常条件下 σ^M 被抗 σ 复合体 YhdKL 结合,无法激活下游基因的表达;当细菌胞膜胁迫时,抗 σ 因子 YhdL 的构象发生改变使 σ^M 被释放,释放的 σ^M 激活下游基因的表达^[56]。本课题组利用 *B. subtilis* 中由 σ^M 介导的胞膜胁迫应答调控系统构建全细胞生物传感器^[51]。首先,对 σ^M 调控的多个靶基因启动子(P_{sigM} 、 P_{yjuA} 、 P_{ydaH} 、 P_{yacK} 和 P_{yjbG})以及不同报告基因元件(*egfp*、*sfgfp*、*lacZ*和*luxCDABE*)进行了筛选,获得了背景值较低、信号输出与抗生素浓度线性关系最佳的启动子元件 P_{yjuA} 以及最佳的报告基因元件 *egfp*;基于这些优选元件构建的全细胞生物传感器能够特异性响应引起细菌胞膜胁迫的抗生素,包括多黏菌素等细胞膜靶向抗生素和杆菌肽、D-环丝氨酸以及氨基青霉素等细胞壁靶向抗生素,而对非靶向细菌胞膜的抗生素(如卡那霉素和氯霉素)则无法响应;

通过对抗 σ^M 因子的过表达以及 σ^M 和抗 σ^M 因子表达量的动态调控,显著降低了传感器的背景噪声;该生物传感器不仅能用于多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)发酵培养基中多黏菌素产量的检测,还能用于细菌胞膜靶向抗生素产生菌的高通量筛选^[51]。

最近, Wang 等^[29]以 *S. coelicolor* M1146 为底盘细胞构建了细菌胞膜靶向抗生素全细胞生物传感器。通过比较转录组学发现 11 个基因的转录水平受杆菌肽、默诺霉素、多黏菌素 E 和万古霉素共同显著上调,进而挖掘出响应胞膜胁迫程度最高的启动子 $P_{SCO3089}$;将该启动子与*luxCDABE*融合,构建的传感器菌株能够特异性检测靶向细菌胞膜的抗生素,如青霉素类、头孢菌素类、杆菌肽、默诺霉素、多黏菌素、万古霉素和达托霉素等;该传感器菌株可用于细菌胞膜靶向抗生素产生菌的高通量筛选,从包含 2 399 个生物合成基因簇的 166 个细菌菌株中成功筛选到 17 个潜在的细菌胞膜靶向抗生素产生菌。

2.3 其他广谱型抗生素生物传感器

除上述检测细胞壁和细菌胞膜靶向抗生素的生物传感器外,还有一些广谱型生物传感器能够检测靶向其他重要生物合成途径的抗生素。例如, Hutter 等^[52]依据基因转录谱选择了多个受抗生素诱导的启动子元件,然后与荧光素酶报告基因融合,在 *B. subtilis* 中成功构建了响应脂肪酸生物合成抑制剂(*fabHB* 启动子)的全细胞生物传感器;在此基础上, Urban 等^[53]还构建了能够响应 DNA (*yorB* 启动子)、RNA (*yvgS* 启动子)以及蛋白质(*yheI* 启动子)等生物合成抑制剂的全细胞生物传感器,并利用这些生物传感器对 14 000 余种天然产物进行高通量测试,发现高铁霉素 A1 是一种抑制蛋白质生物合成的抗生素。

3 总结与展望

综上所述,以微生物细胞为底盘构建的抗生素生物传感器主要分为两大类:一类是检测特定种类抗生素的特异型生物传感器,其检测范围较窄,通常以该种类抗生素耐药基因诱导表达调控蛋白为感知元件进行构建;另一类是检测范围更宽的广谱型生物传感器,能够检测不同种类但靶点相同的抗生素,通常基于感知和应答抗生素靶点损伤的调控系统进行构建。不同类型的抗生素生物传感器具有不同的应用范围,其中特异性生物传感器适用于对食品、水体和土壤等环境中残留的抗生素进行动态监测,也适用于代谢工程研究中对抗生素高产菌进行高通量筛选,而广谱型生物传感器在发现新抗生素以及研究抗生素作用机制方面具有更大的优势。

尽管抗生素全细胞生物传感器已经取得了一些研究进展,但仍存在许多不足之处,具体包括:(1) 抗生素生物传感器构建的核心是基于微生物中感知和应答抗生素胁迫的调控系统,然而目前关于微生物细胞对抗生素信号的感知-转导机制研究较为匮乏,特异性响应抗生素的感知元件及其调控的靶基因启动子元件还不够多,极大地限制了抗生素生物传感器的设计与优化;未来可利用生物信息学和机器学习等多种手段挖掘更多的抗生素感知元件和启动子元件,从而设计更多新颖的抗生素全细胞传感器。(2) 现有的许多抗生素生物传感器在应用时存在响应时间慢、检测范围窄、灵敏度不高和稳定性差等局限性,可以采用定向进化、构建文库等多种策略对各个元件进行优化,同时构建对抗生素超敏且鲁棒性强的底盘细胞,最终获得响应迅速、检测范围广、灵敏度高、稳定性强以及特异性好的抗生素生物传感器。(3) 抗生素生物传感器通常使用经基因工程改造的微生物

活体作为敏感元件,存在重组工程菌扩散引发的生物安全问题;未来可以采用生物控制策略对工程菌进行限制,如近期上海交通大学研究团队在水杨酸降解菌中引入自杀系统,在水杨酸降解耗尽时启动自杀回路,从而避免工程菌在环境中的扩散,类似的研究思路可以应用在抗生素生物传感器的设计和构建中^[57]。(4) 目前已有多种基于免疫层析技术而开发的商业化试剂盒能够对抗生素进行快速检测^[58-59],相较之下,抗生素全细胞生物传感器的开发尚处于实验室研究阶段,并无商业化产品研发成功;在解决好传感性能、生物安全的基础上,下一步应加大对便携式生物传感器检测设备和仪器的研发,使抗生素生物传感器更加方便地用于不同环境中抗生素残留的动态监测。

REFERENCES

- [1] PHAM JV, YILMA MA, FELIZ A, MAJID MT, MAFFETONE N, WALKER JR, KIM E, CHO HJ, REYNOLDS JM, SONG MC, PARK SR, YOON YJ. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1404.
- [2] AARESTRUP F. Sustainable farming: get pigs off antibiotics[J]. *Nature*, 2012, 486(7404): 465-466.
- [3] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *The Lancet*, 2022, 399(10325): 629-655.
- [4] HUANG YX, LI Q, ZHANG YL, MENG ZJ, YUAN XX, FAN SF, ZHANG Y. Determination of six eugenol residues in aquatic products by gas chromatography-orbitrap mass spectrometry[J]. *Journal of Food Quality*, 2021, 2021: 9438853.
- [5] MU SH, WANG CY, LIU H, HAN G, WU LD, LI JC. Development and evaluation of a novelty single-step cleanup followed by HPLC-QTRAP-MS/MS for rapid analysis of tricaine, tetracaine, and bupivacaine in fish samples[J]. *Biomedical Chromatography*, 2021, 35(10): e5176.
- [6] CHEN YQ, GUO YY, LIU YW, XIANG YP, LIU GL, ZHANG QH, YIN YG, CAI Y, JIANG GB. Advances in bacterial whole-cell biosensors for the detection of bioavailable mercury: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 868: 161709.
- [7] INDA ME, LU TK. Microbes as biosensors[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2020, 74: 337-359.
- [8] VALTONEN SJ, KURITTU JS, KARP MT. A luminescent *Escherichia coli* biosensor for the high

- throughput detection of β -lactams[J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2002, 7(2): 127-134.
- [9] HIGUERA-LLANTÉN S, ALCALDE-RICO M, VASQUEZ-PONCE F, IBACACHE-QUIROGA C, BLAZQUEZ J, OLIVARES-PACHECO J. A whole-cell hypersensitive biosensor for beta-lactams based on the AmpR-AmpC regulatory circuit from the Antarctic *Pseudomonas* sp. IB20[J]. *Microbial Biotechnology*, 2024, 17(1): e14385.
- [10] LAUTENSCHLÄGER N, POPP PF, MASCHER T. Development of a novel heterologous β -lactam-specific whole-cell biosensor in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2020, 14: 21.
- [11] PELLINEN T, BYLUND G, VIRTÄ M, NIEMI A, KARP M. 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.
- [12] HANSEN LH, SØRENSEN SJ. Detection and quantification of tetracyclines by whole cell biosensors[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 190(2): 273-278.
- [13] MA Z, LIU J, LI H, ZHANG W, WILLIAMS MA, GAO YZ, GUDDA FO, LU C, YANG B, WAIGI MG. A fast and easily parallelizable biosensor method for measuring extractable tetracyclines in soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(2): 758-767.
- [14] MA Z, LIU J, SALLACH JB, HU XJ, GAO YZ. Whole-cell paper strip biosensors to semi-quantify tetracycline antibiotics in environmental matrices[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 168: 112528.
- [15] BAHL MI, HANSEN LH, SØRENSEN SJ. Construction of an extended range whole-cell tetracycline biosensor by use of the tet(M) resistance gene[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 253(2): 201-205.
- [16] LI SL, CHEN DD, LIU ZQ, TAO SP, ZHANG TY, CHEN YW, BAO LZ, MA J, HUANG YE, XU SM, WU LJ, CHEN SP. Directed evolution of TetR for constructing sensitive and broad-spectrum tetracycline antibiotics whole-cell biosensor[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 460: 132311.
- [17] LIU YE, WU YF, WANG L, ZHU LJ, DONG YL, XU WT. A ratiometric dual-fluorescent paper-based synthetic biosensor for visual detection of tetracycline on-site[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 467: 133647.
- [18] KORPELA MT, KURITTU JS, KARVINEN JT, KARP MT. A recombinant *Escherichia coli* sensor strain for the detection of tetracyclines[J]. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(21): 4457-4462.
- [19] VIROLAINEN NE, PIKKEMAAT MG, ELFERINK JW, KARP MT. Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(23): 11065-11070.
- [20] ULLRICH T, WEIRICH S, JELTSCH A. Development of an epigenetic tetracycline sensor system based on DNA methylation[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232701.
- [21] MILLER RA, BROWN G, BARRON E, LUTHER JL, LIEBERMAN M, GOODSON HV. Development of a paper-immobilized yeast biosensor for the detection of physiological concentrations of doxycycline in technology-limited settings[J]. *Analytical Methods*, 2020, 12(16): 2123-2132.
- [22] KASEY CM, ZERRAD M, LI YW, CROPP TA, WILLIAMS GJ. Development of transcription factor-based designer macrolide biosensors for metabolic engineering and synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 227-239.
- [23] MILLER CA, HO JM, PARKS SE, BENNETT MR. Macrolide biosensor optimization through cellular substrate sequestration[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(2): 258-264.
- [24] MÖHRLE V, STADLER M, EBERZ G. Biosensor-guided screening for macrolides[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 388(5/6): 1117-1125.
- [25] LI YW, REED M, WRIGHT HT, CROPP TA, WILLIAMS GJ. Development of genetically encoded biosensors for reporting the methyltransferase-dependent biosynthesis of semisynthetic macrolide antibiotics[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(10): 2520-2531.
- [26] REBETS Y, SCHMELZ S, GROMYKO O, TISTECHOK S, PETZKE L, SCRIMA A, LUZHETSKYY A. Design, development and application of whole-cell based antibiotic-specific biosensor[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 263-270.
- [27] REVILLA-GUARINOS A, DÜRR F, POPP PF, DÖRING M, MASCHER T. Amphotericin B specifically induces the two-component system LnrJK: development of a novel whole-cell biosensor for the detection of amphotericin-like polyenes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2022.
- [28] FANG C, STIEGELER E, COOK GM, MASCHER T, GEBHARD S. *Bacillus subtilis* as a platform for molecular characterisation of regulatory mechanisms of *Enterococcus faecalis* resistance against cell wall antibiotics[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93169.
- [29] WANG HY, SHENG Y, OU YX, XU M, TAO MF, LIN SJ, DENG ZX, BAI LQ, DING W, KANG QJ. *Streptomyces*-based whole-cell biosensors for detecting diverse cell envelope-targeting antibiotics[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2024, 249: 116004.
- [30] LLARRULL LI, TESTERO SA, FISHER JF, MOBASHERY S. The future of the β -lactams[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(5): 551-557.
- [31] ZAPUN A, CONTRERAS-MARTEL C, VERNET T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(2): 361-385.
- [32] ZENG XM, LIN J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 128.
- [33] ALEXANDER JAN, WORRALL LJ, HU J, VUCKOVIC M, SATISHKUMAR N, POON R, SOBHANIFAR S, ROSELL FI, JENKINS J, CHIANG D, MOSIMANN WA, CHAMBERS HF, PAETZEL M, CHATTERJEE SS, STRYNADKA NCJ. Structural basis of broad-spectrum β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Nature*, 2023, 613(7943): 375-382.
- [34] CHOPRA I, HAWKEY PM, HINTON M.

- Tetracyclines, molecular and clinical aspects[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1992, 29(3): 245-277.
- [35] BRODERSEN DE, CLEMONS WM, CARTER AP, MORGAN-WARREN RJ, WIMBERLY BT, RAMAKRISHNAN V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit[J]. Cell, 2000, 103(7): 1143-1154.
- [36] MØLLER TSB, OVERGAARD M, NIELSEN SS, BORTOLAIA V, SOMMER MOA, GUARDABASSI L, OLSEN JE. Relation between tetR and tetA expression in tetracycline resistant *Escherichia coli*[J]. BMC Microbiology, 2016, 16: 39.
- [37] HANSEN LH, FERRARI B, SØRENSEN AH, VEAL D, SØRENSEN SJ. Detection of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in soil microcosms by combining whole-cell biosensors and flow cytometry[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 239-244.
- [38] MA JN, HARPAZ D, LIU Y, ELTZOV E. Smartphone-based whole-cell biosensor platform utilizing an immobilization approach on a filter membrane disk for the monitoring of water toxicants[J]. Sensors, 2020, 20(19): 5486.
- [39] VÁZQUEZ-LASLOP N, MANKIN AS. How macrolide antibiotics work[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2018, 43(9): 668-684.
- [40] NOGUCHI N, TAKADA K, KATAYAMA J, EMURA A, SASATSU M. Regulation of transcription of the mph(A) gene for macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*: characterization of the regulatory gene mphR(A)[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(18): 5052-5058.
- [41] 张博, 周奕腾, 黄恺, 樊林鸽, 柳志强. 多烯大环内酯类抗生素生物合成基因簇中调控因子的研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(1): 172-183.
ZHANG B, ZHOU YT, HUANG K, FAN LG, LIU ZQ. Research progress of regulators in polyene macrolide antibiotic biosynthetic gene clusters[J]. Microbiology China, 2019, 46(1): 172-183 (in Chinese).
- [42] STUBBENDIECK RM, STRAIGHT PD. Escape from lethal bacterial competition through coupled activation of antibiotic resistance and a mobilized subpopulation[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(12): e1005722.
- [43] KAHNE D, LEIMKUHNER C, LU W, WALSH C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics[J]. Chemical Reviews, 2005, 105(2): 425-448.
- [44] HIRAMATSU K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2001, 1(3): 147-155.
- [45] JORDAN S, HUTCHINGS MI, MASCHER T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(1): 107-146.
- [46] WANG ZZ, CHENG JW, DAI GM, SUN XQ, YIN XL, ZHANG YY. The establishment of a tobramycin-responsive whole-cell micro-biosensor based on an artificial ribozyme switch[J]. Life, 2023, 13(7): 1553.
- [47] YIN JH, ZHU YL, LIANG YQ, LUO YK, LOU J, HU X, MENG Q, ZHU TH, YU ZL. Development of whole-cell biosensors for screening of peptidoglycan-targeting antibiotics in a Gram-negative bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(18): e0084622.
- [48] KOBAS CM, MORRIS SM, MASCHER T, GEBHARD S. Application of a *Bacillus subtilis* whole-cell biosensor (PliAI-lux) for the identification of cell wall active antibacterial compounds[M]// Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2022: 259-270.
- [49] CZARNY TL, PERRI AL, FRENCH S, BROWN ED. Discovery of novel cell wall-active compounds using PywaC, a sensitive reporter of cell wall stress, in the model Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(6): 3261-3269.
- [50] GALARION LH, MITCHELL JK, RANDALL CP, O'NEILL AJ. An extensively validated whole-cell biosensor for specific, sensitive and high-throughput detection of antibacterial inhibitors targeting cell-wall biosynthesis[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2023, 78(3): 646-655.
- [51] YIN JH, CHENG D, ZHU YL, LIANG YQ, YU ZL. Development of a whole-cell biosensor for detection of antibiotics targeting bacterial cell envelope in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(2): 789-798.
- [52] HUTTER B, FISCHER C, JACOBI A, SCHAAB C, LOFERER H. Panel of *Bacillus subtilis* reporter strains indicative of various modes of action[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(7): 2588-2594.
- [53] URBAN A, ECKERMANN S, FAST B, METZGER S, GEHLING M, ZIEGELBAUER K, RÜBSAMEN-WAIGMANN H, FREIBERG C. Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6436-6443.
- [54] SILHAVY TJ, KAHNE D, WALKER S. The bacterial cell envelope[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010, 2(5): a000414.
- [55] MITCHELL AM, SILHAVY TJ. Envelope stress responses: balancing damage repair and toxicity[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(7): 417-428.
- [56] KEI A. Anti-sigma factor-mediated cell surface stress responses in *Bacillus subtilis*[J]. Genes & Genetic Systems, 2017, 92(5): 223-234.
- [57] LIU H, ZHANG LG, WANG WW, HU HY, OUYANG XY, XU P, TANG HZ. An intelligent synthetic bacterium for chronological toxicant detection, biodegradation, and its subsequent suicide[J]. Advanced Science, 2023, 10(31): e2304318.
- [58] LAN JQ, ZHAO HW, JIN XT, GUAN H, SONG Y, FAN YM, DIAO XP, WANG BM, HAN Q. Development of a monoclonal antibody-based immunoaffinity chromatography and a sensitive immunoassay for detection of spinosyn A in milk, fruits, and vegetables[J]. Food Control, 2019, 95: 196-205.
- [59] XU NF, XU LG, MA W, KUANG H, XU CL. Development and characterisation of an ultrasensitive monoclonal antibody for chloramphenicol[J]. Food and Agricultural Immunology, 2015, 26(3): 440-450.