

人工小 RNA 调控元件在合成生物学中的应用

张芬芳^{1,2,3}, 孙韬^{1,3,4}, 陈磊^{1,2,3}, 张卫文^{1,2,3,4}

1 天津大学 化工学院 合成微生物学实验室, 天津 300072

2 教育部系统生物工程重点实验室, 天津 300072

3 教育部合成生物学前沿科学中心, 天津 300072

4 天津大学生物安全战略研究中心, 天津 300072

张芬芳, 孙韬, 陈磊, 张卫文. 人工小 RNA 调控元件在合成生物学中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2459-2476.
ZHANG FF, SUN T, CHEN L, ZHANG WW. Application of synthetic small regulatory RNAs in synthetic biology. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2459-2476.

摘 要: 合成生物学通过改造天然系统或创造生物元件、模块和系统赋予生命体新的功能, 为农业、能源、制造业及医学进步带来了巨大推动力。对元件、模块或系统的精准、定量及高效调控将对合成生命系统的控制至关重要。细菌小 RNA 是一类长度在 50–300 bp 且通常不具备翻译能力的功能小分子, 在环境胁迫响应、代谢变化适应和细菌毒力控制过程中发挥着不可替代的调控作用。近年来, 基于天然小 RNA 设计构建的人工小 RNA 调控元件的工作日益丰富, 实现了对目的基因甚至通路的有效抑制或激活。人工小 RNA 分子小、灵活性高, 可程序化且易于设计, 几乎不会对宿主细胞造成代谢负担, 因此在合成生物学中具备广泛应用前景。为促进对人工小 RNA 的机理理解及应用拓展, 本文围绕若干人工小 RNA 调控元件进行了系统介绍及比较; 此外, 总结了其在合成生物学中的代表性应用; 最后, 对其未来优化方向进行了讨论。

关键词: 非编码; 人工小 RNA; 基因抑制; 基因激活; 智能调控

Received: January 26, 2022; **Accepted:** May 17, 2022; **Published online:** May 23, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903000); National Natural Science Foundation of China (31901017)

Corresponding author: SUN Tao. E-mail: tsun@tju.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0903000); 国家自然科学基金 (31901017)

Application of synthetic small regulatory RNAs in synthetic biology

ZHANG Fenfang^{1,2,3}, SUN Tao^{1,3,4}, CHEN Lei^{1,2,3}, ZHANG Weiwen^{1,2,3,4}

1 Laboratory of Synthetic Microbiology, School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education of China, Tianjin 300072, China

3 Frontier Science Center for Synthetic Biology, Ministry of Education of China, Tianjin 300072, China

4 Center for Biosafety Research and Strategy, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Synthetic biology has brought enormous impacts to the advancement of agriculture, energy, manufacturing and medicine by redesigning existing natural systems or creating biological elements, modules and systems to endow life with new functions. The precise, quantitative and efficient regulation of biological elements, modules and systems is critical for controlling living systems. Bacterial small regulatory RNAs are a class of functional molecules with a length of 50–300 nt and usually do not translate into proteins. They play an irreplaceable role in environmental stress response, metabolic adaptation and bacterial virulence control. In recent years, synthetic small regulatory RNAs have been designed based on natural small RNAs and were used to effectively inhibit or activate target genes and even pathways. Synthetic small regulatory RNAs have broad application advantages in synthetic biology because of their small size, high flexibility, programmability, easy design and little metabolic burden on host cells. To better understand the synthetic small regulatory RNAs and promote its application, this review summarized several synthetic small RNA systems and their representative applications in synthetic biology. Finally, future optimization directions were prospected.

Keywords: noncoding; synthetic small RNAs; gene inhibition; gene activation; intelligent regulation

合成生物学通过改造天然系统或创造生物元件、模块和系统来赋予生命体新的功能。利用不同生物元件、模块和系统,合成生物学为农业、能源、制造业及医学进步带来了巨大推动力。例如,通过将烟草内源的编码核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶基因敲除并替换为蓝细菌聚球藻的相关基因,转基因烟草的光合效率及生长速度得到大幅度改善,生物量明显提高^[1];全世界每年疟疾感染者数以亿计,特效药青蒿素前体物质青蒿酸可在酿酒酵母中实现高效合成 (25 g/L) 并在 2013 年被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 批准作

为临床药物使用^[2-3],改变了青蒿素长期依赖从植物黄花蒿中提取的局面;作为不可再生资源化石燃料的替代,基于微生物的第三代生物炼制将二氧化碳重新资源化利用已悄然兴起,有望发展绿色、可持续能源^[4-7]。从人工合成支原体染色体到合成真核酵母染色体,合成生物学展示了重构生命体系的潜能^[8-10]。而这其中,对特定基因、通路甚至代谢模式的调控对于实现人工模块的功能至关重要。为此,各种调控元件、核糖开关、群体感应 (quorum sensing, QS) 系统等被用于对目的基因的抑制、激活或构建复杂的基因线路^[11]。其中,人工小 RNA 调控元

件作为能够精准、定量及高效地对内、外源多基因进行调控的工具,在合成生物学研究中有广泛的应用^[12]。

非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA) 是一类不被翻译成蛋白质的 RNA,在细胞中天然 ncRNA 负责剪接、编辑和修饰 RNA,催化生化反应和调控基因表达等^[13]。而小 RNA (small RNA, sRNA) 是一种广泛存在于细菌中的调控基因表达的 ncRNA,长度在 50–300 bp 之间^[12]。细菌小 RNA 通过碱基互补配对靶向相应的 mRNA 实现对目标基因的抑制或激活,从而响应环境胁迫、适应代谢变化和控制毒力等^[12]。例如,在高渗条件下,为维持外膜孔蛋白 OmpC 的高占比, MicF 靶向另一个外膜孔蛋白基因 *ompF* 转录本的 5'非翻译区 (untranslated region, UTR) 和翻译起始区,以抑制 OmpF 蛋白的表达^[14];此外,在极端酸条件下, GadY 靶向基因 *gadX* 转录本的 3'-UTR 区起稳定作用,增加 GadX 的表达,以激活谷氨酸依赖型耐酸系统^[15]。

小 RNA 通过不同的序列和结构可以产生不同的二级结构和功能,一些特定的结构还能以模块域的形式存在,在设计时可直接对模块域进行组合,大大降低了小 RNA 工具使用的复杂性^[16]。在对天然小 RNA 的作用机制解析基础上,研究人员开发出了可根据调控需要进行理性设计的系列人工小 RNA 工具,在对特定基因的抑制、激活以及“开/关”型的精确调控方面均取得了一定的成果^[17]。人工小 RNA 工具高度模块化的结构和基于碱基互补配对的简单设计原则赋予其高度灵活性,由于几乎不会给宿主细胞带来任何代谢负担且对内源性和外源性基因均有调控作用,利用其对基因进行调控已经显示出很好的应用前景^[17];在代谢工程

中,传统的必需基因或途径的敲除策略通常对宿主细胞是致命的,而这些基因或途径可通过小 RNA 工具被定量沉默^[18–19];在应对环境胁迫时,合理利用小 RNA 对基因的全局调控,可使细菌的耐受性达到“事半功倍”的效果^[20];在细胞中构建复杂的调控网络时,可通过对碱基序列的合理设计构建生物传感器,小 RNA 工具可在分子检测上实现非常高的特异性和灵敏性^[21–23]。

为促进对人工小 RNA 的机制理解及应用拓展,本文对人工小 RNA 工具应用于合成生物学中的进展进行综述。我们首先总结了每种人工小 RNA 工具的作用机制以及改良优化;之后对人工小 RNA 工具在合成生物学的多个研究方面的应用进行介绍;最后,我们讨论人工小 RNA 工具存在的一些挑战及未来研究的方向。

1 基于人工小 RNA 的基因抑制系统

自研究人员发现小 RNA 参与基因调控以来,对其研究呈爆发性增长,研究路线主要以挖掘更多的天然小 RNA、探索其参与基因调控的机制及构建人工小 RNA 工具为主^[14]。最初研究发现的小 RNA 一般具有与靶 mRNA 互补配对的序列,可以高度特异性地对靶 mRNA 产生抑制作用,故将其称为反义 RNA (antisense RNA, asRNA)^[14]。天然 asRNA 发挥调控作用的关键在于其与靶 mRNA 发生碱基互补配对,基于此开发的人工 asRNA 利用碱基互补配对实现了对特定基因的抑制 (图 1A、1B)^[14,24]。2006 年, Nakashima 等在 asRNA 的两端加上了互补配对的末端 (paired-termini, PT),开发了 PTRNA 工具 (图 1C)^[25–28]。此外,人们发现了有一大类小 RNA 依赖伴侣蛋白 Hfq 发挥作用^[29]。2013 年, Na 等开发了基于 Hfq 发挥作用的人工小 RNA 工具 (图 1D),该工具因其设计方便、易于实现、普

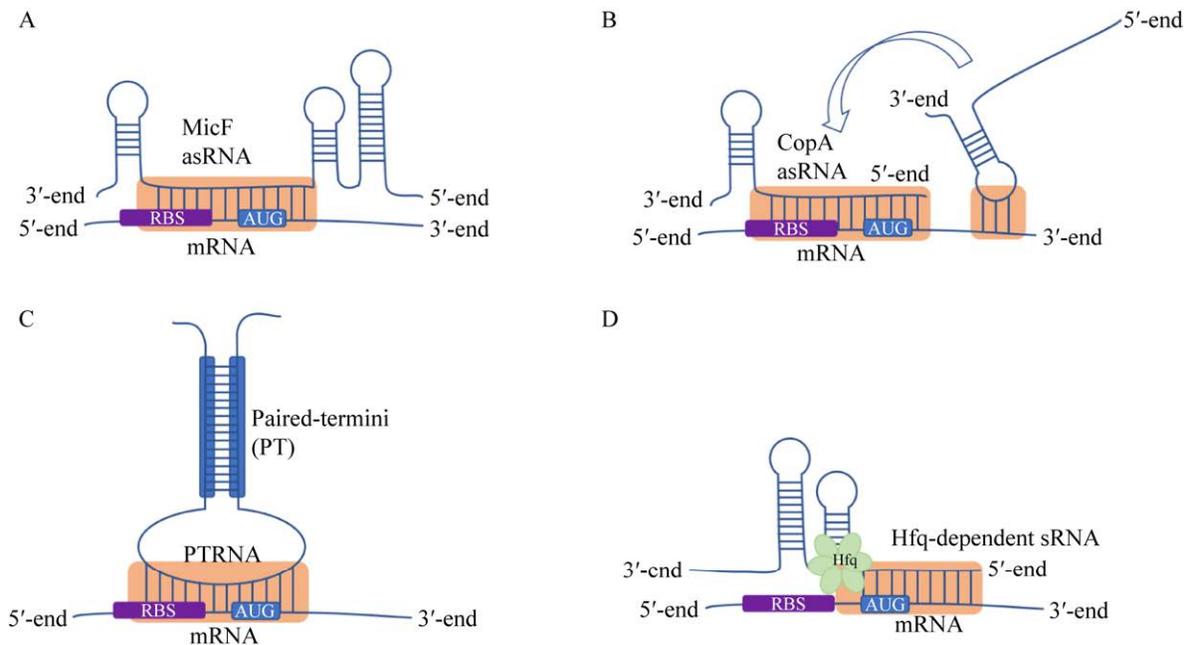


图 1 应用于基因抑制的人工小 RNA 系统 A: 基于天然 MicF 改造的 asRNA; B: 基于天然 CopA 改造的 asRNA; C: PTRNA 系统; D: 依赖 Hfq 的 sRNA 调控系统

Figure 1 Synthetic small regulatory RNAs for gene inhibition. (A) Antisense RNA modified based on natural MicF. (B) Antisense RNA modified based on natural CopA. (C) PTRNA system. (D) Hfq-dependent small regulatory RNA system.

适性好、抑制效率高等优势而成为基因抑制应用上的优先选择^[18,30]。

1.1 从天然到人工的 asRNA 基因抑制工具

研究发现,细菌中天然的 asRNA 可参与多个复杂代谢过程的调控,例如调节质粒复制和不相容性,调控孔蛋白的表达、噬菌体复制、cAMP 受体蛋白合成等^[14]。在对大肠杆菌的外膜孔蛋白 *ompC* 基因的鉴定过程中, Mizuno 等发现了大肠杆菌中的第一个细菌 asRNA, 其与另一个外膜孔蛋白 *ompF* 的 5'区有 70%的同源性并可抑制 OmpF 蛋白的合成,称之为 MicF (mRNA-interfering complimentary *ompF*, MicF)^[31]。MicF 长 174 bp, 两侧有稳定的茎环, 中间为与 *ompF* mRNA 产生碱基互补配对的结合区,通过抑制翻译发挥作用^[31]。随后, Coleman 等以天然 MicF 为参考, 保留与 MicF 两端一致的茎环

结构, 将中间与靶 mRNA 碱基互补配对的结合区分别替换成可与外膜脂蛋白基因 *lpp*、外膜孔蛋白基因 *ompC*、外膜孔蛋白基因 *ompA* 的 mRNA 的 5'端互补配对的序列, 均实现了对相应基因的抑制^[32]; 之后 Ellison 等也用相同的策略实现了对 *lacZ* 基因的抑制^[33] (图 1A)。研究表明, 基于 MicF 的人工小 RNA 的抑制作用强弱与结合区的长度、靶 mRNA 的结合位置及 asRNA 的表达丰度有关, 与基因的个体差异也有关^[32], 其中人工小 RNA 设计时包含 SD 序列和翻译起始位点 (AUG) 在内是比较有效的抑制策略^[32-33]。

一般而言, asRNA 发挥作用虽离不开与靶 mRNA 的碱基互补配对, 但不同的 asRNA 与其靶 mRNA 产生配对的方式也不尽相同。例如, CopA 是一个天然的 asRNA, 它通过与影响质

粒拷贝数的 RepA 蛋白的 mRNA——CopT 的上游区域形成双链 CopA-CopT 系统,从而抑制 RepA 蛋白的合成。Persson 等研究表明,形成双链 CopA-CopT 系统主要分为两步,第一步为 CopA 的茎环特异性识别 CopT 的互补区域,形成一个瞬时的互补双链,且这一步是整个反应的限速步骤;随后, CopA 上单链区域与 CopT 互补配对,从而形成稳定的双链 CopA-CopT 系统^[34](图 1B)。类似于 CopA 的天然 asRNA 还有 RNA I,其茎环结构与靶 mRNA (RNA II) 先形成瞬时的互补双链,随后 RNA I 的结合区再与靶 mRNA 互补区域形成稳定的双链 RNA I-RNA II 系统^[35]。根据天然的 CopA, Engdahl 等设计出可抑制 *lacI* 基因的人工 asRNA 工具^[36]。与 CopA 的两步反应相似,人工 asRNA 工具也分为识别单元和抑制单元。识别单元是将 CopA 的茎环设计为可与靶 mRNA 互补的茎环,以实现与靶 mRNA 形成瞬时互补双链这一关键步骤;抑制单元则是由一个与核糖体结合位点 (ribosome binding site, RBS) 互补的序列组成^[36]。利用该人工 asRNA 实现了对 *lacI* 基因最高 50% 的抑制^[36]。尽管天然 asRNA 工具发挥抑制作用的具体机制各有差异,但通过保留天然 asRNA 模块化的二级结构,设计与靶 mRNA 碱基互补配对的结合序列,已经成为研究人员构建人工 asRNA 工具的共识。

1.2 PTRNA 工具的设计策略

为进一步提升人工 asRNA 的抑制效果,研究人员做了诸多努力^[37]。RNA 较短的半衰期使得提高 asRNA 的稳定性及丰度成为提升抑制效率的有效途径。其中, Nakashima 等在 asRNA 两端加上互补配对末端 (PT) 设计出 PTRNA 工具,因其设计方便、抑制效果好而得到了广泛应用^[25-28]。PTRNA 是一个大型发卡结构,PT 为发卡的茎, asRNA 则存在于这个发卡结构的

大环中 (图 1C)。Nakashima 等认为, PTRNA 可增强抑制效果的主要原因是 PT 的设计提高了 asRNA 的稳定性及丰度进而增强了抑制效果^[25]。

PTRNA 工具中, PT 部分的 GC 含量和长度、 asRNA 部分的长度及其与靶 mRNA 结合的位置均是影响其抑制效率的因素。PT 部分中, GC 含量的增加可用来加强配对强度,以抵抗特异性 RNA 酶对双链 RNA 的降解, PT 的长度越长, PTRNA 的抑制效果越好,但其长倒置重复序列又使质粒的稳定性降低,导致质粒转化率降低或质粒丢失,故最优的 PT 长度需根据不同菌株中质粒的稳定性进行调整^[25]。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10、MG1655、BW25113、BL21(DE3) 和蓝细菌集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803 中的研究表明, 38 bp 可作为较优的 PT 长度^[25-27,38]。 asRNA 部分中,较长的序列不一定会获得更高的干扰效率,因为更长的序列意味着更复杂的二级结构,增加其与靶 mRNA 结合的难度或是影响 PTRNA 的末端互补配对的结构, 100 bp 的 asRNA 长度比 150、200 和 300 bp 具有更高的抑制效率^[26]。2021 年, Zhang 等以 asRNA 长度、与靶 mRNA 结合的位置和 asRNA 表达量为关键参数建立模型,确定了靶向 RBS 核心区域的 30 bp 的 asRNA 即可发挥高效和强大的抑制功能,而通过控制 asRNA 靶向 RBS 核心区域的碱基数,可预测 asRNA 的抑制效果,实现对基因的精细调控^[28]。最后,通过换用更强的启动子^[25,39]或高拷贝质粒^[26]均可使 PTRNA 的丰度增加而进一步加强抑制效果。

尽管 PTRNA 没有考虑 asRNA 本身的二级结构对抑制效果的作用,其在大肠杆菌、蓝细菌中的应用中均验证了可对目的基因产生较高的抑制率^[27-28],具有较强的实用性。PTRNA 工具不需要借助其他蛋白如 Hfq 发挥作用,可为不便表达 Hfq 时提供一种可行性方案。但在进

行多基因同步调控时,其高 GC 且互补的 PT 序列加大了质粒构建难度,并可能对质粒的稳定性造成影响。

1.3 基于伴侣蛋白 Hfq 的人工小 RNA 工具

Hfq 是一种 RNA 结合蛋白,最初被发现作为宿主因子与核糖体蛋白 S1 一起参与到大肠杆菌中 RNA 噬菌体 Q β 的复制中^[29]。在研究编码 RNA 聚合酶 σ^{38} 亚基的基因 *rpoS* 时发现 Hfq 对 *rpoS* 的翻译起到重要作用,*rpoS* 的表达受到多种调控,其中包括 DsrA、OxyS 等小 RNA 的抑制,而这种抑制均需要有 Hfq 的参与^[29]。而后对大肠杆菌已知的小 RNA 进行验证,发现其大部分均有 Hfq 参与并发挥重要作用^[29]。本文将此类依赖于伴侣蛋白 Hfq 发挥作用的小 RNA 统一称为 sRNA-Hfq。

2013 年,Na 等在大肠杆菌中系统地开发了一类人工 sRNA-Hfq 工具,利用该 sRNA-Hfq 工具建库系统地测试了影响酪氨酸和 1,5-戊二胺产量的基因,通过对关键基因的抑制显著地提高了二者的产量^[18]。该人工 sRNA-Hfq 工具设计分为高度模块化的两部分:靶点结合模块和 Scaffold 模块。其中靶点结合模块可与特定 mRNA 进行互补配对,而 Scaffold 模块包含 Hfq 结合位点和一个 Rho 因子非依赖性转录终止子,这二者是缺一不可的^[18]。在实现对靶基因的抑制时,靶点结合模块与靶 mRNA 形成碱基互补配对,阻碍核糖体与靶 mRNA 结合,抑制翻译;同时 Scaffold 模块招募伴侣蛋白 Hfq,以稳定 sRNA,促进 sRNA 与靶 mRNA 的配对并使核酸酶 RNase E 结合到靶 mRNA,促进靶 mRNA 的降解,最终实现对靶基因的抑制^[18]。只需更换结合模块的序列即可实现对不同基因的抑制。

对人工 sRNA-Hfq 工具的优化主要围绕提

高抑制效率、实现精细调控等。研究表明,人工 sRNA-Hfq 中结合模块与靶 mRNA 的结合位置、互补配对碱基数、Scaffold 结构等均可影响该系统的效率^[18]。结合模块至少有一部分需要在翻译起始区域内与靶 mRNA 互补配对,而通过调整与靶 mRNA 配对碱基数可以改变互补配对的结合能,亦可改变 sRNA-Hfq 的抑制效果,当结合能在 -20—40 kcal/mol 时,结合能与抑制程度有较好的线性关系,据此可以精细调控 sRNA-Hfq 的抑制能力^[18]。其次,在对 Scaffold 模块的优化中,发现富 A/U 区序列的改变和茎环结构中茎的长度的改变均可改变 sRNA-Hfq 的抑制率^[40]。此外,通过调节 sRNA-Hfq 与靶 mRNA 之间的丰度也可达到微调 sRNA-Hfq 抑制率的效果^[41]。

目前,这类人工 sRNA-Hfq 由于分子小、设计方便、易于实现、普适性好、抑制效率高优势而成为应用上的优先选择,除了在大肠杆菌中,sRNA-Hfq 工具还广泛地应用于谷氨酸棒杆菌^[42-43]、蓝细菌^[27]、枯草芽孢杆菌^[44]等菌株的代谢工程中。但是伴侣蛋白 Hfq 主要来源于大肠杆菌,尽管在近一半的细菌基因组中存在编码 Hfq 蛋白的同源基因,在较多细菌(如沙门氏菌、铜绿假单胞菌等)中也均有 Hfq 参与小 RNA 的调控^[45-46]。但仍有一些菌株(如金黄色葡萄球菌、谷氨酸棒杆菌、蓝细菌等)其 Hfq 蛋白并不参与小 RNA 的调控,在这些菌株中使用 sRNA-Hfq 工具需额外表达大肠杆菌来源的 Hfq 蛋白^[27,42-43,47]。即使是在大肠杆菌中,少量表达人工 sRNA 时对菌株并不会造成生长缺陷,但过多的 sRNA 可竞争性结合内源 Hfq 而对细菌产生影响。故而在不同菌株的不同需求下,还需根据具体情况使用不同的小 RNA 工具。

2 基于人工小 RNA 的基因激活系统

小 RNA 通常起到下调基因表达的作用,但是在自然界中依旧存在可激活基因表达的小 RNA,这类激活型小 RNA 依旧通过与靶 mRNA 碱基互补配对的方式发挥作用,通常为调控转

录初始或提高靶 mRNA 稳定性^[48](图 2)。在人工小 RNA 方面,虽像天然激活型小 RNA 一样可直接对内源基因激活的人工小 RNA 工具尚未得到开发,通过在目的基因中引入“开/关”模块实现对基因激活的小 RNA 工具已被建立^[49-50]。其中基于翻译激活的 Toehold 开关^[49](图 3A)和基于

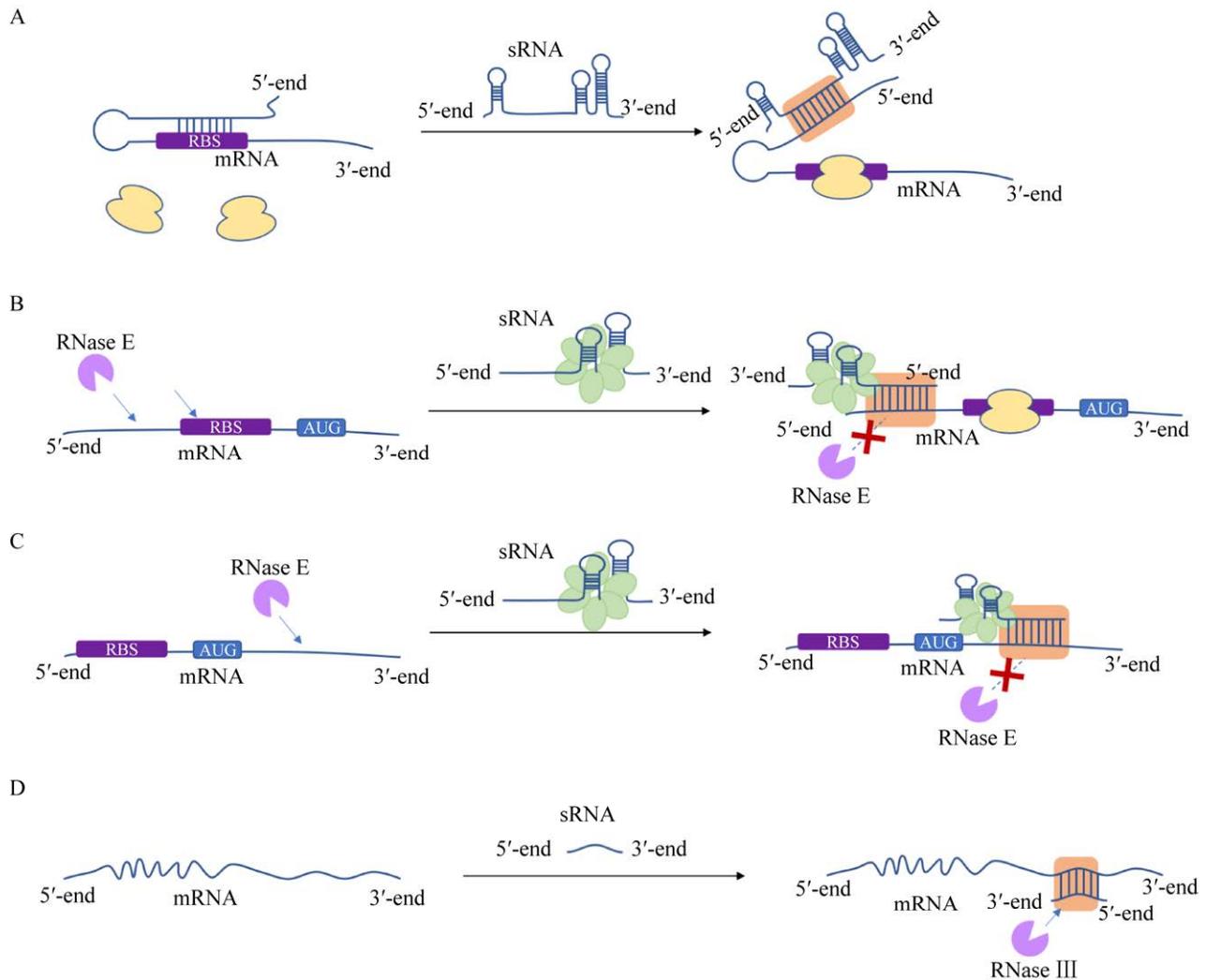


图 2 天然小 RNA 的基因激活机制 A: 小 RNA 通过打开 mRNA 被掩蔽的 RBS 实现激活; B: 小 RNA 通过阻断 5' RNase E 的结合实现基因激活; C: 小 RNA 通过阻断编码区 RNase E 的结合实现基因激活; D: 小 RNA 通过 RNase III 的后加工提升靶点稳定性实现基因激活

Figure 2 Gene activation mechanisms of natural small regulatory RNAs. (A) Small regulatory RNAs activates mRNA by opening the isolated RBS. (B) Small regulatory RNAs activates mRNA by blocking 5' binding sites of RNase E. (C) Small regulatory RNAs activates mRNA by blocking coding region recognized by RNase E. (D) Small regulatory RNAs activates mRNA by RNase III-dependent processing to enhance target stability.

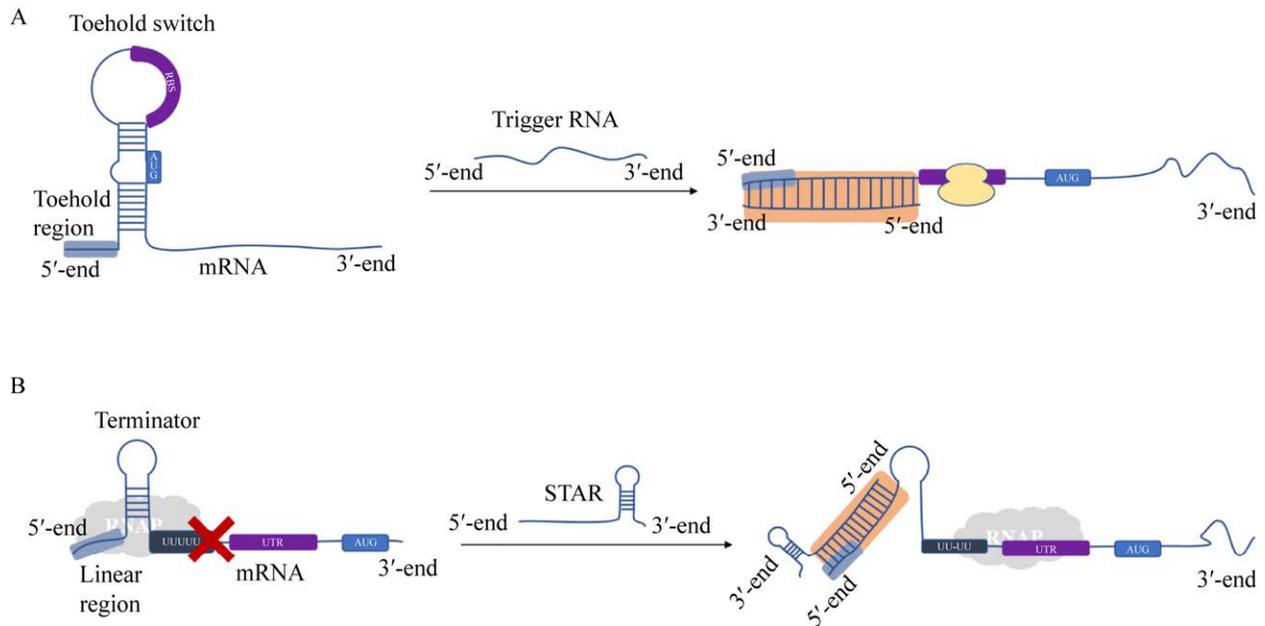


图3 “开/关”型人工小RNA工具用于基因激活 A: 基于 Toehold switch 的开关系统; B: 基于 STAR 的开关系统

Figure 3 “On/OFF” synthetic small regulatory RNA tools for gene activation. (A) Switching system based on Toehold switch. (B) STAR-based switching system.

转录激活的小RNA (small transcription activating RNA, STAR)^[50] (图3B) 有较为清晰的调控机制, 在应用上也表现出良好的性能。

2.1 细菌中天然小RNA激活机制

在细菌中, 小RNA与靶mRNA的5'-UTR区、基因编码区及3'-UTR区的碱基互补配对均可产生激活效果^[48]。小RNA靶向mRNA的5'-UTR区时, 通常有两种发挥激活作用的机制: 一是小RNA打开靶mRNA本身5'-UTR区的发卡结构, 释放出被掩蔽的RBS, 使得核糖体可与RBS结合, 从而促进翻译, 例如DsrA、RNA III和RprA等(图2A)^[51-53]; 二是干扰RNase E对靶mRNA的降解, 提高靶mRNA的稳定性, 以增加翻译, 这类小RNA如RydC(图2B)^[54]。小RNA靶向mRNA的编码区时, SgrS靶向*pldB*的编码区, 隔绝了一个RNase E的识别位点, 从而达到稳定*pldB*的作用(图2C)^[55]。

在小RNA靶向mRNA的3'-UTR区的情况下, GadY以完全碱基互补配对的方式靶向*gadX*的3'-UTR区形成双链末端, 进而被双链特异性酶RNase III处理, 处理后的*gadX*可能更具稳定性, 而增加GadX的表达(图2D)^[56]。当小RNA在细菌中发挥激活作用时, 往往离不开伴侣蛋白Hfq的帮助, 作为小RNA与靶mRNA相互作用的分子伴侣, Hfq不仅能促进小RNA与靶mRNA的结合, 还能保护小RNA免受核酸酶(如RNase E)的影响。DsrA、RydC、SgrS等小RNA发挥激活作用时均有Hfq的参与^[48]。迄今为止, 还没有通用的激活机制得以阐明, 因此尚无基于天然激活小RNA改造的人工小RNA用于内源基因的激活, 未来可能还需要探索更多的天然激活小RNA以发现其中的规律。

2.2 翻译激活的Toehold开关的作用机制

2004年, Isaacs等设计了一种完全人工合

成的核糖调节器 (riboregulator), 利用高度特异的 RNA-RNA 相互作用精确控制基因表达^[57]。这种人工核糖调节器通过在 mRNA 的 5'-UTR 区人为引入发卡结构, 隔离 RBS 并阻止它与核糖体结合, 从而获得对靶基因的抑制, 此时为顺式抑制 mRNA (*cis*-repressed mRNA, crRNA), 当反式激活 RNA (*trans*-activating RNA, taRNA) 靶向 crRNA 形成 RNA 双链时, crRNA 的构象发生变化, 茎环展开从而暴露出 RBS 区域, 翻译被重新激活^[57]。这种人工核糖调节器在一定程度上可利用 RNA 序列的多样性应用于基因网络的构建, 但是其“anti-RBS”部分的序列特异性使得核糖调节器中 30 bp 左右的碱基互补配对序列并不能达到它该有的潜在的 10^{18} 种配对方式, 减少了序列可用性, 大大降低了其正交性和调控范围^[49,57]。

2014 年, 为打破以上限制, Green 等设计了一种调控范围更宽、串扰更低的核糖调节器, 称为 Toehold 开关系统 (图 3A)。Toehold 开关中, crRNA 设计形成的茎环结构将 RBS 包含在环中, 与 AUG 本身及 RBS 均不形成互补结构, 这样即可设计任意的 crRNA 及其互补的 taRNA^[49]。同时, crRNA 部分还设计有突出一段的“toehold”单链, 这使得与 taRNA 的结合为“线-线”结合, 比“环-线”结合在热力学上和动力学上更具有优势^[49]。利用现有的 RNA 结构及自由能预测的算法及程序 (如 NUPACK), 可以设计出高度正交的 Toehold 开关, Green 等验证了 18 个相互串扰小于 2% 的 Toehold 开关元件组合和 26 个串扰小于 12% 的元件组合^[49]。在调控范围上, Toehold 开关最大可达超过 400 倍的动态调控, 可与基于蛋白质的转录调控媲美。如果将 Toehold 系统的 crRNA 部分整合到基因组上, 可调控内源基因的表达; 此外, 利用内源 RNA 作为 taRNA 从而设计独特的 crRNA,

还可将 Toehold 开关用于内源 RNA 的检测, 这为 Toehold 开关应用于检测 RNA 病毒奠定了基础^[49]。

2.3 转录激活 RNA STAR 系统的作用机制

通过激活转录来激活基因表达, Chappell 等开发了一种完全人工合成的转录激活 RNA (small transcription activating RNA, STAR), 称为 STAR 系统 (图 3B)^[50]。STAR 系统在转录水平上调节基因表达, 包含两个模块, 模块一是位于靶 mRNA 的 RBS 上游的一段转录终止序列 (即感应序列), 在转录过程中, 转录形成终止子, 阻止下游目标 RNA 的转录; 模块二是一段与终止子发卡 5'端互补的小 RNA, 即 STAR, 当它与感应序列互补配对时, 能打开终止子的发卡从而破坏终止子的作用, 允许转录延伸从而激活转录^[50]。在解释 STAR 机制的动力学模型中, Chappell 等发现 STAR 介导的基因表达是不同 RNA 结构状态自由能的函数, 即与感应序列和 STAR 的初始状态和初始相互作用时的自由能差呈线性关系。这表明, 在应用 STAR 时, 主要考虑的仅是感应序列的长度^[50]。但 RNA 初始相互作用时瞬时的 RNA 结构和自由能预测在现有的计算算法中依旧是个难题, 只能从大量的实验中获得数据作为经验参考^[50,58]。Chappell 等在后续的研究中发现, STAR 在激活转录的过程中, 对感应序列中类似于“toehold”的线性单链的识别是其最后发挥作用的关键, 保持终止子发卡结构不变的情况下, 通过改变线性单链序列即可获得不同泄露、激活倍数的 STAR 系统, 且其大部分激活倍数可达 400 倍以上, 线性单链的二级结构越低, 表现出越好的激活倍数。对于线性序列相互作用的预测, 则可以选用现在已有的计算程序来实现 (如 NUPACK), 正交的 STAR 也可以完全通过纯计算来识别, 这一设计理念大大

降低了 STAR 系统设计的复杂性^[58]。

STAR 系统有着比 Toehold 开关更低的泄漏率,这可能是源于转录调控本身的优势,产生泄露的原因之一是 RNA 发生错误折叠,不能正确地形成抑制结构而表达,而基于转录的激活比基于翻译的激活存在更短的错误折叠的时间窗口,发生错误折叠的概率更低。当然,STAR 系统激活目的基因的表达量低于 Toehold 系统,在实际应用中或许需要按需求权衡两者的关系^[58]。

3 人工小 RNA 在合成生物学中的应用

3.1 代谢通路调控

在代谢工程中,识别潜在的关键基因并调控其表达是构建细胞工厂、高效合成产品的关键。人工小 RNA 可以在不破坏染色体的情况下有效地抑制基因表达,与传统的基因敲除技术相比,可实现快速、多重和基因组规模的调控,此外对必需基因的抑制方面具有不可替代的优势(表 1)^[59]。与同样可实现基因抑制的 CRISPRi 相比,人工小 RNA 系统大多情况下不需额外地表达一个对多种宿主表现出毒性或代谢负荷的 Cas 蛋白^[60]。

为识别潜在的关键基因, Nakashima 等构建了 71 个针对中心碳代谢的 PTRNA 表达载体,研究了这 71 个基因和相关代谢产物的积累,从结果中预测并实验验证了增加丙酮酸产量的方法,最终发现调控 *aceE* 可使丙酮酸产量提高了 427 倍,而对 *aceE* 和 *accA* 双基因进行调控达到了最高 10.5 g/L 的产量^[61]。Na 等构建了 122 个 sRNA-Hfq,以抑制尼龙前体——1,5-戊二胺在产生或调控途径中的相关基因,对其中 31 个基因的抑制均提高了 1,5-戊二胺的产量,其中对两个必需基因 *murE* 和 *ackA* 的抑制可使 1,5-戊二胺的产量从 1.40 g/L 提高到 2.15 g/L^[18]。

同样,针对酪氨酸^[18]、4-丁二胺^[41]、L-脯氨酸^[41]等的生产及调控途径, Noh 等均构建相应的 sRNA-Hfq 抑制库调控可能提高产量的关键基因,最终确定对 *csrA* 和 *tyrR* 基因的抑制是提高酪氨酸产量的关键,产量达到 2 g/L,而抑制 *glnA* 和 *argF* 基因使 4-丁二胺和 L-脯氨酸的产量达到最大,分别提升了 61.3%和 229.6%^[41]。

在调控基因表达方面, Yang 等在大肠杆菌中利用 PTRNA 对 *fabD* 基因达成 80%的抑制最终使胞内丙二酰辅酶 A 的浓度提高了 4.5 倍^[26]。Ge 等利用 PTRNA 抑制 *hemB* 基因,使血红素前体 5-氨基乙酰丙酸的产量增加了 17.6%^[62]。Sun 等在蓝细菌集胞藻 6803 中也利用 PTRNA 和 sRNA-Hfq 分别实现了对内源糖原合成相关基因 *glgC* 66.7%和 66.8%的抑制^[27]。Sun 等在谷氨酸棒杆菌中利用 sRNA-Hfq 实现对 *pyk*、*ldhA* 和 *odhA* 基因 80%的抑制,使谷氨酸的产量几乎增加了 3 倍^[42],当然,在代谢工程中,更高的抑制率并不意味着更高的产量,平衡细胞生长和目标产物的资源分配对于维持微生物细胞工厂所需的活力和实现最高效的生产至关重要^[28,40-41]。基于碱基互补配对的小 RNA 同样存在精细调控基因的潜力。Zhang 等改变 PTRNA 靶向 mRNA 的 RBS 核心区域的碱基数,预测并量化了对 *fabD* 和 *ydiI* 的抑制效率,使 4-羟基香豆素的产量增加了 3.58 倍^[28]。在对酪氨酸、1,5-戊二胺产量优化中, Na 等通过改变 sRNA-Hfq 与靶 mRNA 互补的碱基对数量以改变其结合能,从而调整 sRNA-Hfq 抑制率,对 *tyrR* 基因抑制时,结合能为 -39.2 kcal/mol 时达到了最高的酪氨酸产量;对 *murE* 基因抑制时,结合能为 -40.9 kcal/mol 时使 1,5-戊二胺的产量达到最高^[18]。此外,通过使用不同强度的启动子调节 sRNA-Hfq 的表达量来改变 sRNA-Hfq 抑制率,也优化了 4-丁二胺、L-脯氨酸的产量^[41]。

而使用不同的 Scaffold 以及重构 Scaffold 获得调控范围更广的 sRNA-Hfq 变体亦是实现精细调控的基础,使用抑制率最高的 sRNA-Hfq 变体抑制 *pgi* 基因和 *serA* 基因使得 1,5-戊二胺的产量提高了 27%^[40]。

3.2 环境胁迫适应

大多天然小 RNA 在胁迫环境下发挥作用,而对胁迫环境的鲁棒性亦是工程菌株所需的,菌株的耐酸性、抗氧化性和耐毒性化学物质等性质在生物生产和生物修复中非常重要 (表 1)^[63]。在大肠杆菌中, DsrA、RprA 和 ArcZ 这 3 种天然小 RNA,共同激活 σ 因子 *ropS*,增强菌株耐酸性, Gaida 等在大肠杆菌中过表达 *ropS* 基因时,其耐酸性仅与单独过表达 DsrA 时的耐酸性相似 (提高约 100 倍),但同时过表达 DsrA、RprA 和 ArcZ 三种小 RNA 时,其在对数生长期的耐酸性提高了 8 500 倍,同时还提高了菌株对羧酸和氧化应激的耐受性^[64]。在丙酮丁醇梭杆菌中, Jones 等过表达天然小 RNA 6S,提高了菌株的丁醇耐受性并增加了丁醇的产量^[65]。Wu 等在乳酸乳球菌中过表达天然小 RNA SO42 亦提高了菌株的酸耐受性^[30,66]。在蓝细菌中, Sun 等下调天然小 RNA CoaR 的表达量提高了菌株的丁醇耐受性^[67],而过表达天然小 RNA Nc117 则提高了菌株对乙醇和 1-丁醇的耐受性^[68]。与蛋白质的过度表达不同,对小 RNA 的过表达或下调几乎不会对细胞造成代谢负担,在应对环境胁迫时是一种有效且安全的策略。天然小 RNA 对靶基因调控的多样性,可能使其在细胞内形成调控网络,从而赋予在调控范围上的无限潜能;但同样,其带来的调控机制的复杂性也是利用天然小 RNA 提高菌株耐受性所面临的挑战^[64]。

3.3 生物传感与核酸检测

RNA 结构的灵活性和具有对各种输入信

号的感知和相互作用的能力,已被开发设计成各种生物传感器 (表 1)^[69]。基于 Toehold 开关的传感器具有 3 大主要模块:输入模块 (taRNA)、信号检测模块 (crRNA)、输出模块 (报告基因),是一个非常具有代表性的生物传感器。Toehold 开关本身的特性使其具有高水平的正交性和调控范围,成熟的基于最小自由能的 RNA 二级结构预测模型的开发 (如 NUPACK 程序) 为快速地设计和筛选特定功能的 Toehold 开关提供了支持^[70]。自 2014 年 Toehold 开关开发以来, Collins 团队先后将 Toehold 开关用于埃博拉病毒^[71-72]、寨卡病毒^[73]、诺如病毒^[74-75]等 RNA 病毒的检测。Toehold 开关用于 RNA 病毒检测时,选择 RNA 病毒基因组上的一段序列作为 taRNA,并设计相应的 crRNA,报告基因可选择表达 β -半乳糖苷酶的 *lacZ* 基因,该酶可将黄色底物 (氯酚红- β -D-半乳糖苷) 转化为紫色产物 (氯酚红),实现检测结果的可视化^[73]。将 Toehold 开关嵌入该团队所开发的无细胞冷冻干燥纸基蛋白质表达平台,在 20-90 min 内即可实现对病毒在非实验室下的快速、廉价检测,摆脱了对检测环境的要求。Toehold 开关检测限最低 taRNA 浓度可达 30 nmol/L,若与等温 RNA 扩增技术 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) 相结合,只需 3 fmol/L 的 taRNA,进行 NASBA 反应 2 h 即可被 Toehold 检测到,具有极高的灵敏性^[73]。Toehold 开关还具有高特异性,可以区分具有一定同源性的寨卡病毒和登革病毒。对于同一病毒不同变体的区分,Toehold 开关结合 CRISPR-Cas9 技术,创建 NASBA-CRISPR 切割 (NASBA-CRISPR cleavage, NASBACC) 法;该法利用 Cas9 依赖于前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列选择性切割的能力,设计了只在 PAM 序列处存

在一个碱基不同的非洲型和美洲型寨卡病毒 taRNA, 只有美洲型寨卡病毒 taRNA 存在正确的 NGG 型 PAM 序列而被 Cas9 切割, 由于被切割的 DNA 不能再扩增出全长的 RNA, 从而不能被 Toehold 开关检测到, 实现了对单碱基差异病毒的区别^[73]。Toehold 开关的高灵敏性和高特异性已经可与“金标准”的 RT-qPCR 核酸检测方法相媲美, 且更廉价、方便, 有望成为 RT-qPCR 核酸检测的理想替代方法^[70,73]。2019 年, 新型冠状病毒的迅速传播导致新冠肺炎 (COVID-19) 在全球大流行, 各个研究团队纷纷应用该 Toehold 开关技术开发出了检测新型冠状病毒的方案^[76-79]。在最新的研究中, Collins 团队开发了可用于真核细胞 Toehold 开关——eToehold, 该工具可实现在人体细胞中的感应细胞特异性或特定的病毒 RNA 以触发特定靶基因的表达, 这将指导 RNA 靶向的基因治疗、病毒诊断和癌症治疗等应用平台的开发^[80]。

3.4 构建基因电路

基因电路将各种生物传感器集合在一起, 对多重信号进行处理和整合, 最终实现更高阶的基因调控功能 (表 1)^[81]。基于 RNA 的基因电路是细胞信息处理系统中的新兴范例, 相比于基于 DNA 和 DNA 结合蛋白的基因电路, RNA 生物传感器具有模块化的结构, 可进行快速高效的设计; 其灵活性也大大增加了传感器的数量; 且具有较小的细胞代谢负担^[17]。最近开发出的 Toehold 开关和 STAR 系统在正交性上也完全满足构建基因电路的要求。Green 等最初使用 3 组 Toehold 开关联合转录因子构建了四信号输入型双层“与”门电路^[49]。而后, 他们使用 Toehold 开关构建了纯 RNA 的双信号、四信号和六信号输入型的“或”门和“与”门电路, 以及十二信号输入型的结合“与”“或”“非”门的

析取范式 (disjunctive normal form, DNF) 电路^[82]。Kim 等利用 Toehold 开关的翻译激活原理重新设计了 Toehold 翻译抑制开关和三向连接 (three-way junction, 3WJ) 抑制器, 并分别构建了基于 Toehold 翻译抑制开关和基于 3WJ 抑制器的双信号输入型“与非”门和“或非”门电路, 以及构建了三信号输入型和四信号输入型“非”门和“非或”门电路^[21]。同样, 利用 STAR 系统, Chappell 等构建了双信号输入型“与”门电路, 并通过与 CRISPRi 技术相结合, 将 STAR 系统的转录终止序列置于 gRNA 的上游, 构建了蕴涵非 (NIMPLY) 门电路^[58], Siu 等也将 Toehold 开关融合到 gRNA 的 5'端形成 thgRNA 用于 CRISPR-Cas9 技术, thgRNA 具有进行多通路调节的高选择性和正交性, 完全适用于复杂的基因电路的设计^[83]。Lehr 等则组合 Toehold 开关和 STAR 系统, 构建了在转录水平和翻译水平共同控制下的“与”门^[84]。通过精细的计算, 利用纯 RNA 元件可以构建多数量、高正交、高复杂的基因电路, 在应用上具有广泛的前景。

4 总结与展望

从最初侧重于调节翻译以影响蛋白质水平, 到进一步开发出能集成传感和控制功能的 RNA 装置 (RNA device) 以更精确地调节细胞功能, 在转录和翻译水平上均实现了对基因的调控, 小 RNA 工具在机理研究及应用上均取得系列成果。在对基因调控上, 低串扰、高正交性的基因调控工具是构建大型基因调控网络或具有复杂功能的合成生物电路的基础, Toehold 开关和 STAR 系统均开发出了基于 RNA 最小自由能的严密设计流程而实现高度正交的基因调控。相比而言, sRNA-Hfq 工具虽然具有易于设计、应用方便的优势, 但面对

表 1 人工小 RNA 在合成生物学中的应用

Table 1 Application of synthetic small regulatory RNAs in synthetic biology

sRNA types	Regulatory types	Application	Results
asRNA	Inhibition	Gene regulation	The inhibition of <i>lpp</i> ^[32] , <i>ompC</i> ^[32] , <i>ompA</i> ^[32] , <i>lacZ</i> ^[33] , <i>lacI</i> ^[36] were realized
	Inhibition	Environmental tolerance	Combined overexpression of asRNA DsrA, RprA and ArcZ improved the tolerance of <i>Escherichia coli</i> to acid and oxidative stresses ^[64]
	Inhibition	Environmental tolerance	Overexpression of asRNA Nc117 improved the tolerance of cyanobacteria to ethanol and 1-butanol ^[68]
PTRNA	Inhibition	Metabolic engineering	Establishing a PTRNA library to identify genes that can affect pyruvate production, and combined inhibition of <i>aceE</i> and <i>accA</i> increased pyruvate production ^[61]
	Inhibition	Metabolic engineering	The <i>fabD</i> gene was inhibited and the yield of malonyl-CoA was increased ^[26]
	Inhibition	Metabolic engineering	Modeling predicted the inhibition effect of PTRNA, and the inhibition efficiency of <i>fabD</i> and <i>ydjI</i> were predicted and quantified to improve the yield of 4-hydroxycoumarin ^[28]
sRNA-Hfq	Inhibition	Metabolic engineering	Establishing a sRNA-Hfq library to identify genes that can affect yield of cadaverine ^[18] , tyrosine ^[18] , putrescine ^[41] , L-proline ^[41] and other compounds, and inhibiting the corresponding genes improved the yield
	Inhibition	Metabolic engineering	Theophylline was used to induce the expression of sRNA-Hfq to regulate the essential gene <i>fabI</i> and increase the content of malonyl-CoA ^[27]
	Inhibition	Metabolic engineering	Combining sRNA-Hfq with group sensing system, a dual function group sensing circuit realized dynamic regulation α -amylase expression ^[43]
Toehold switch	Activation	Nucleic acid detection	Combining Toehold switch with a freeze-dried, paper-based, cell-free protein expression platform realized rapid, convenient and cheap <i>in vitro</i> detection of Ebola virus ^[71-72] , Zika virus ^[73] , norovirus ^[74-75] , SARS-CoV-2 ^[76-79] and other RNA viruses
	Activation	Logical circuit	The OR gate and AND gate circuit of double signal, four signal and six signal input type of pure RNA and the disjunctive normal form (DNF) circuit of twelve signal input type combined with AND, OR, NOT gate are constructed by using Toehold switch ^[82]
	Inhibition	Logical circuit	Constructing the translation-repressing riboregulators toehold repressors and three-way junction (3WJ) repressors, which were used to construct double signal input NAND gate and NOR gate circuit, three signal input and four signal input NAND gate and NOR gate circuit ^[21]
STAR	Activation	Logical circuit	The STAR system was used to construct a dual signal input AND gate circuit and a NIMPLY (A AND NOT B) logic gate was constructed by combining STAR system with CRISPRi technology and placing the transcription termination sequence of STAR system upstream of gRNA ^[58]
	Activation	Logical circuit	Via combining Toehold switch and STAR system, an AND gate circuit under the common control of transcription level and translation level was constructed ^[84]

高度同源序列时, sRNA-Hfq 具有极大的脱靶及串扰风险, 一些天然的 sRNA-Hfq 在细菌体内通常可以调控多个基因, 例如天然小 RNA SgrS 的靶基因包括 *ptsG*、*manX*、*manY*、*pldB*、*sopD* 等, SgrS 与这些基因的靶 mRNA 通过 11–18 个碱基的不完全互补配对即可发挥出抑制或激活作用^[85]。在人工 sRNA-Hfq 中, 仅通过一段 24 bp 左右的与靶 mRNA 完全互补的线性单链实现对目的基因的特异性抑制^[18], 脱靶及串扰风险极大地增加了将其应用于代谢调控的不确定性。或许在未来还需考虑将线性单链设计成稳健性二级结构才能更好地解决这个问题, 例如, 将 sRNA-Hfq 设计成具有像 Toehold 开关一样的茎环结构, 只有当被靶 mRNA 触发时才能满足结合能的变化, 展开成正常功能的 sRNA-Hfq, 实现对靶基因的抑制。此外, 为实现更精准的调控并进一步提高小 RNA 传感器的灵敏性、特异性, 预测 RNA 相互作用的程序软件在未来还需不断的迭代升级, 构建类似于蛋白质数据库那样大型、注释良好的 RNA 数据库或许也是关键^[69]。

鉴于细胞网络的复杂性, 在基础研究和应用研究中经常需要同时对多个基因进行调控。目前, 应用小 RNA 实现多基因调控最多达到 3–4 个, 多质粒表达时受限于相容性质粒的数量, 单质粒表达时多个启动子、终止子与小 RNA 自身的重复序列使质粒在构建和表达上均不稳定^[38,59]。在此, 使用单个启动子转录所有包含小 RNA 的转录本, 然后通过不同的策略处理以释放单个小 RNA 可能是解决这一问题的有效方案。例如, Zhang 等即在酿酒酵母中使用该方案开发了 CRISPR-Cas9 多基因编辑技术, 用单一启动子转录出具有 8 个 gRNA 的单一转录本, 每两个 gRNA 之间都有一段 tRNA^{Gly} 序列, 利用 tRNA^{Gly} 自成熟机制将单一

转录本处理成 8 个单独的 gRNA, 实现了对 8 个基因、高达 87% 敲除率的同步敲除率^[86]。除了 tRNA, 还可利用自切割核酶序列 (如锤头状核酶和 HDV 核酶)^[87–88]、外源性切割因子识别序列 (如 Cys4)^[89] 等方式。目前这种方案在 CRISPR 技术中应用较为广泛, 或可成为小 RNA 实现多基因调控的参考。

为平衡细胞生长和生产的系关系, 小 RNA 在精细调控上做了诸多努力, 只为寻求最佳抑制率以实现最大生产^[18,40–41]。而在合适的时间和空间对基因进行时空调控, 或是小 RNA 实现精细调控的下一步策略, 通过各种诱导型启动子表达的小 RNA 已有不少应用^[27,47], 但传统诱导剂存在调控范围有限、无法动态响应特定的细胞阶段、价格高昂等问题, 在未来, 与可实现自诱导的群体感应系统相结合^[43,90], 或与利用不同波长光进行诱导的光控系统相结合^[91], 将使小 RNA 在基因调控上更为动态、方便及高效。综上所述, 未来进一步开发及优化人工小 RNA 工具将更好地为合成生物学研究服务。

REFERENCES

- [1] Bailey-Serres J, Parker JE, Ainsworth EA, et al. Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 2019, 575(7781): 109–118.
- [2] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496(7446): 528–532.
- [3] Kung SH, Lund S, Murarka A, et al. Approaches and recent developments for the commercial production of semi-synthetic artemisinin. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 87.
- [4] Yunus IS, Anfelt J, Sporre E, et al. Synthetic metabolic pathways for conversion of CO₂ into secreted short-to medium-chain hydrocarbons using cyanobacteria. *Metab Eng*, 2022, 72: 14–23.
- [5] Chen FYH, Jung HW, Tsuei CY, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol. *Cell*, 2020, 182(4): 933–946.e14.

- [6] Gleizer S, Ben-Nissan R, Bar-On YM, et al. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂. *Cell*, 2019, 179(6): 1255-1263.e12.
- [7] Pavan M, Reinmets K, Garg S, et al. Advances in systems metabolic engineering of autotrophic carbon oxide-fixing biocatalysts towards a circular economy. *Metab Eng*, 2022, 71: 117-141.
- [8] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329(5987): 52-56.
- [9] Shen Y, Wang Y, Chen T, et al. Deep functional analysis of synII, a 770-kilobase synthetic yeast chromosome. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4791.
- [10] Xie ZX, Liu D, Li BZ, et al. Design and chemical synthesis of eukaryotic chromosomes. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(23): 7191-7207.
- [11] Kent R, Dixon N. Contemporary tools for regulating gene expression in bacteria. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(3): 316-333.
- [12] Dutta T, Srivastava S. Small RNA-mediated regulation in bacteria: a growing palette of diverse mechanisms. *Gene*, 2018, 656: 60-72.
- [13] Muro-Pastor AM, Hess WR. Regulatory RNA at the crossroads of carbon and nitrogen metabolism in photosynthetic cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020, 1863(1): 194477.
- [14] Green PJ, Pines O, Inouye M. The role of antisense RNA in gene regulation. *Annu Rev Biochem*, 1986, 55: 569-597.
- [15] Opdyke JA, Kang JG, Storz G. GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2004, 186(20): 6698-6705.
- [16] Isaacs FJ, Dwyer DJ, Collins JJ. RNA synthetic biology. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(5): 545-554.
- [17] Ahmed W, Hafeez MA, Ahmed R. Advances in engineered *trans*-acting regulatory RNAs and their application in bacterial genome engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(6): 819-830.
- [18] Na D, Yoo SM, Chung H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(2): 170-174.
- [19] Grütznert J, Remes B, Eisenhardt KMH, et al. sRNA-mediated RNA processing regulates bacterial cell division. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(12): 7035-7052.
- [20] Jeon HJ, Lee Y, N MPA, et al. sRNA-mediated regulation of *gal* mRNA in *E. coli*: involvement of transcript cleavage by RNase E together with Rho-dependent transcription termination. *PLoS Genet*, 2021, 17(10): e1009878.
- [21] Kim J, Zhou Y, Carlson PD, et al. *De novo*-designed translation-repressing riboregulators for multi-input cellular logic. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(12): 1173-1182.
- [22] Larkey NE, Phillips JL, Jang HS, et al. Small RNA biosensor design strategy to mitigate off-analyte response. *ACS Sens*, 2020, 5(2): 377-384.
- [23] Kilic T, Erdem A, Ozsoz M, et al. microRNA biosensors: opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. *Biosens Bioelectron*, 2018, 99: 525-546.
- [24] Lioliou E, Romilly C, Romby P, et al. RNA-mediated regulation in bacteria: from natural to artificial systems. *N Biotechnol*, 2010, 27(3): 222-235.
- [25] Nakashima N, Tamura T, Good L. Paired termini stabilize antisense RNAs and enhance conditional gene silencing in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(20): e138.
- [26] Yang YP, Lin YH, Li LY, et al. Regulating malonyl-CoA metabolism via synthetic antisense RNAs for enhanced biosynthesis of natural products. *Metab Eng*, 2015, 29: 217-226.
- [27] Sun T, Li SB, Song XY, et al. Re-direction of carbon flux to key precursor malonyl-CoA via artificial small RNAs in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 26.
- [28] Zhang RH, Zhang Y, Wang J, et al. Development of antisense RNA-mediated quantifiable inhibition for metabolic regulation. *Metab Eng Commun*, 2021, 12: e00168.
- [29] Gottesman S. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol*, 2004, 58: 303-328.
- [30] 赵秀丽, 周丹丹, 闫晓光, 等. 细菌小 RNA 的调控及在代谢工程中的应用. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(6): 97-106.
Zhao XL, Zhou DD, Yan XG, et al. Regulation and application in metabolic engineering of bacterial small RNAs. *China Biotechnol*, 2017, 37(6): 97-106 (in Chinese).
- [31] Mizuno T, Chou MY, Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *PNAS*, 1984, 81(7): 1966-1970.
- [32] Coleman J, Green PJ, Inouye M. The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the

- expression of individual bacterial genes. *Cell*, 1984, 37(2): 429-436.
- [33] Ellison MJ, Kelleher RJ 3rd, Rich A. Thermal regulation of beta-galactosidase synthesis using anti-sense RNA directed against the coding portion of the mRNA. *J Biol Chem*, 1985, 260(16): 9085-9087.
- [34] Persson C, Wagner EG, Nordström K. Control of replication of plasmid R1: structures and sequences of the antisense RNA, CopA, required for its binding to the target RNA, CopT. *EMBO J*, 1990, 9(11): 3767-3775.
- [35] Tomizawa J. Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. *Cell*, 1984, 38(3): 861-870.
- [36] Engdahl HM, Hjalt TA, Wagner EG. A two unit antisense RNA cassette test system for silencing of target genes. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(16): 3218-3227.
- [37] Engdahl HM, Lindell M, Wagner EG. Introduction of an RNA stability element at the 5'-end of an antisense RNA cassette increases the inhibition of target RNA translation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001, 11(1): 29-40.
- [38] Nakashima N, Tamura T. Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of a mutator strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(15): e103.
- [39] Zhou SH, Du GC, Kang Z, et al. The application of powerful promoters to enhance gene expression in industrial microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33(2): 23.
- [40] Noh M, Yoo SM, Yang D, et al. Broad-spectrum gene repression using scaffold engineering of synthetic sRNAs. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(6): 1452-1461.
- [41] Noh M, Yoo SM, Kim WJ, et al. Gene expression knockdown by modulating synthetic small RNA expression in *Escherichia coli*. *Cell Syst*, 2017, 5(4): 418-426.e4.
- [42] Sun DH, Chen JZ, Wang Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* by synthetic small regulatory RNAs. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(2): 203-208.
- [43] Liu HY, Shi F, Tan SY, et al. Engineering a bifunctional ComQXPA-P_{srfA} quorum-sensing circuit for dynamic control of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(7): 1761-1774.
- [44] Liu YF, Zhu YQ, Li JH, et al. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved N-acetylglucosamine production. *Metab Eng*, 2014, 23: 42-52.
- [45] Hör J, Matera G, Vogel J, et al. Trans-acting small RNAs and their effects on gene expression in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus*, 2020, 9(1): 10.1128/ecosalplus.ESP-10.1128/ecosalplus0030-2019.
- [46] Chihara K, Bischler T, Barquist L, et al. Conditional Hfq association with small noncoding RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* revealed through comparative UV cross-linking immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing. *mSystems*, 2019, 4(6): e00590-19.
- [47] Sun XY, Li SB, Zhang FF, et al. Development of a N-acetylneuraminic acid-based sensing and responding switch for orthogonal gene regulation in cyanobacterial *Synechococcus* strains. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(8): 1920-1930.
- [48] Papenfort K, Vanderpool CK. Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, 39(3): 362-378.
- [49] Green AA, Silver PA, Collins JJ, et al. Toehold switches: *de-novo*-designed regulators of gene expression. *Cell*, 2014, 159(4): 925-939.
- [50] Chappell J, Takahashi MK, Lucks JB. Creating small transcription activating RNAs. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(3): 214-220.
- [51] Morfeldt E, Taylor D, Von Gabain A, et al. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the *trans*-encoded antisense RNA, RNA III. *EMBO J*, 1995, 14(18): 4569-4577.
- [52] Resch A, Afonyushkin T, Lombo TB, et al. Translational activation by the noncoding RNA DsrA involves alternative RNase III processing in the *rpoS* 5'-leader. *RNA*, 2008, 14(3): 454-459.
- [53] Majdalani N, Chen S, Murrow J, et al. Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol*, 2001, 39(5): 1382-1394.
- [54] Fröhlich KS, Papenfort K, Fekete A, et al. A small RNA activates CFA synthase by isoform-specific mRNA stabilization. *EMBO J*, 2013, 32(22): 2963-2979.
- [55] Papenfort K, Sun Y, Miyakoshi M, et al. Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis. *Cell*, 2013, 153(2): 426-437.
- [56] Opdyke JA, Fozo EM, Hemm MR, et al. RNase III participates in GadY-dependent cleavage of the

- gadX-gadW* mRNA. *J Mol Biol*, 2011, 406(1): 29-43.
- [57] Isaacs FJ, Dwyer DJ, Ding CM, et al. Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(7): 841-847.
- [58] Chappell J, Westbrook A, Verosloff M, et al. Computational design of small transcription activating RNAs for versatile and dynamic gene regulation. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1051.
- [59] Yang D, Yoo SM, Gu C, et al. Expanded synthetic small regulatory RNA expression platforms for rapid and multiplex gene expression knockdown. *Metab Eng*, 2019, 54: 180-190.
- [60] Cho S, Choe D, Lee E, et al. High-level dCas9 expression induces abnormal cell morphology in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(4): 1085-1094.
- [61] Nakashima N, Ohno S, Yoshikawa K, et al. A vector library for silencing central carbon metabolism genes with antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(2): 564-573.
- [62] Ge FL, Wen DM, Ren Y, et al. Downregulating of *hemB* via synthetic antisense RNAs for improving 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. *3 Biotech*, 2021, 11(5): 230.
- [63] Holmqvist E, Wagner EGH. Impact of bacterial sRNAs in stress responses. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(6): 1203-1212.
- [64] Gaida SM, Al-Hinai MA, Indurthi DC, et al. Synthetic tolerance: three noncoding small RNAs, DsrA, ArcZ and RprA, acting supra-additively against acid stress. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(18): 8726-8737.
- [65] Jones AJ, Venkataramanan KP, Papoutsakis T. Overexpression of two stress-responsive, small, non-coding RNAs, 6S and tmRNA, imparts butanol tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(8): fnw063.
- [66] Wu H, Song SY, Tian KR, et al. A novel small RNA S042 increases acid tolerance in *Lactococcus lactis* F44. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(3): 544-549.
- [67] Sun T, Pei GS, Wang JX, et al. A novel small RNA CoaR regulates coenzyme A biosynthesis and tolerance of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to 1-butanol possibly via promoter-directed transcriptional silencing. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 42.
- [68] Bi YQ, Pei GS, Sun T, et al. Regulation mechanism mediated by *trans*-encoded sRNA Nc117 in short chain alcohols tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front Microbiol*, 2018, 9: 863.
- [69] Dykstra PB, Kaplan M, Smolke CD. Engineering synthetic RNA devices for cell control. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(4): 215-228.
- [70] Chau THT, Mai DHA, Pham DN, et al. Developments of riboswitches and toehold switches for molecular detection-biosensing and molecular diagnostics. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3192.
- [71] Pardee K, Green AA, Ferrante T, et al. Paper-based synthetic gene networks. *Cell*, 2014, 159(4): 940-954.
- [72] Nguyen PQ, Soenksen LR, Donghia NM, et al. Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(11): 1366-1374.
- [73] Pardee K, Green AA, Takahashi MK, et al. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [74] Ma D, Shen LH, Wu KY, et al. Low-cost detection of norovirus using paper-based cell-free systems and synbody-based viral enrichment. *Synth Biol (Oxf)*, 2018, 3(1): ysy018.
- [75] Zhang Q, Ma D, Wu FQ, et al. Predictable control of RNA lifetime using engineered degradation-tuning RNAs. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(7): 828-836.
- [76] Park S, Lee JW. Detection of coronaviruses using RNA toehold switch sensors. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1772.
- [77] Cao MC, Sun QL, Zhang X, et al. Detection and differentiation of respiratory syncytial virus subgroups A and B with colorimetric toehold switch sensors in a paper-based cell-free system. *Biosens Bioelectron*, 2021, 182: 113173.
- [78] Hunt JP, Zhao EL, Free TJ, et al. Towards detection of SARS-CoV-2 RNA in human saliva: a paper-based cell-free toehold switch biosensor with a visual bioluminescent output. *N Biotechnol*, 2022, 66: 53-60.
- [79] Chakravarthy A, Nandakumar A, George G, et al. Engineered RNA biosensors enable ultrasensitive SARS-CoV-2 detection in a simple color and luminescence assay. *Life Sci Alliance*, 2021, 4(12): e202101213.
- [80] Zhao EM, Mao AS, De Puig H, et al. RNA-responsive elements for eukaryotic translational control. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(4): 539-545.
- [81] Otero-Muras I, Banga JR. Synthetic gene circuit analysis and optimization. *Methods Mol Biol*, 2021,

- 2189: 89-103.
- [82] Green AA, Kim J, Ma D, et al. Complex cellular logic computation using ribocomputing devices. *Nature*, 2017, 548(7665): 117-121.
- [83] Siu KH, Chen W. Riboregulated toehold-gated gRNA for programmable CRISPR-Cas9 function. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(3): 217-220.
- [84] Lehr FX, Hanst M, Vogel M, et al. Cell-free prototyping of AND-logic gates based on heterogeneous RNA activators. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(9): 2163-2173.
- [85] Bobrovskyy M, Vanderpool CK. The small RNA SgrS: roles in metabolism and pathogenesis of enteric bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, 4: 61.
- [86] Zhang YP, Wang J, Wang ZB, et al. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1053.
- [87] Pu QL, Zhou S, Huang X, et al. Intracellular selection of theophylline-sensitive hammerhead aptazyme. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 400-408.
- [88] Weinberg CE, Weinberg Z, Hammann C. Novel ribozymes: discovery, catalytic mechanisms, and the quest to understand biological function. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(18): 9480-9494.
- [89] Ferreira R, Skrekas C, Nielsen J, et al. Multiplexed CRISPR/Cas9 genome editing and gene regulation using Csy4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(1): 10-15.
- [90] Li X, Jin J, Zhang XC, et al. Quantifying the optimal strategy of population control of quorum sensing network in *Escherichia coli*. *NPJ Syst Biol Appl*, 2021, 7(1): 35.
- [91] Castillo-Hair SM, Baerman EA, Fujita M, et al. Optogenetic control of *Bacillus subtilis* gene expression. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3099.

(本文责编 郝丽芳)