

微生物全细胞传感器在芳香族化合物检测中的研究进展

李赛月, 吕凤娇, 赵桂煜, 王恩毅, 音建华, 余志良, 孟秋*

浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

李赛月, 吕凤娇, 赵桂煜, 王恩毅, 音建华, 余志良, 孟秋. 微生物全细胞传感器在芳香族化合物检测中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2899-2915.

LI Saiyue, LYU Fengjiao, ZHAO Guiyu, WANG Enyi, YIN Jianhua, YU Zhiliang, MENG Qiu. Advances in microbial whole-cell sensors for the detection of aromatic compounds[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2899-2915.

摘要: 芳香族化合物含有的苯环结构稳定性高、难以降解, 因此环境中的芳香族化合物不仅对生态环境构成威胁, 也严重影响人类健康。开发一种便捷有效的芳香族化合物检测方法至关重要。随着对芳香族化合物特性的深入理解, 基于微生物细胞开发的生物传感器在芳香族化合物检测方面展现出越来越重要的作用。本文综述了微生物全细胞传感器的工作原理, 概述了电活性生物被膜型、转录因子型和依赖于降解基因启动子这3类芳香族化合物全细胞传感器的构建方法和应用, 并探讨了基于表面展示技术、逻辑门构建、基因回路改造、群体感应信号放大等手段进一步提高传感器性能的优化策略。

关键词: 芳香族化合物; 微生物全细胞传感器; 转录因子; 检测; 优化策略

Advances in microbial whole-cell sensors for the detection of aromatic compounds

LI Saiyue, LYU Fengjiao, ZHAO Guiyu, WANG Enyi, YIN Jianhua, YU Zhiliang, MENG Qiu*

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

Abstract: The inherent stability and recalcitrance of benzene ring structures render aromatic compounds a major ecological concern and a substantial risk to human health. Hence,

资助项目: 浙江省自然科学基金(LQ22C010004); 国家自然科学基金(32300018)

This work was supported by the Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province (LQ22C010004) and the National Natural Science Foundation of China (32300018).

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

Received: 2024-02-26; Accepted: 2024-05-10; Published online: 2024-05-14

developing a facile and efficacious detection technique for aromatic compounds is essential. As our comprehension of aromatic compound characteristics deepens, microbial cell-based biosensors have emerged as increasingly popular tools in the detection of aromatic compounds. This article introduces the operational principles of microbial whole-cell biosensors and elucidates the construction techniques and applications of electroactive biofilm-based microbial whole-cell sensors, transcription factor-based microbial whole-cell sensors, and degradation gene promoter-dependent microbial whole-cell sensors in the detection of aromatic compounds. In addition, we review the methodologies for improving the performance of microbial whole-cell sensors based on surface display, logic gate construction, genetic circuit modification, and quorum sensing signal amplification.

Keywords: aromatic compounds; microbial whole-cell biosensors; transcription factors; detection; optimization strategy

芳香化合物涵盖苯系物(如苯、甲苯、苯酚等)和多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)等, 这些化合物通常具有毒性和致畸性, 对生态环境和人类健康构成严重威胁, 是环境中普遍存在且具有持久性危害的污染物^[1]。由于其分子结构中存在苯环, 芳香族化合物往往具有难降解的特点, 对其进行高效治理成为当今社会备受关注的议题。监测芳香族化合物污染对于环境防控和治理具有积极有效的作用。目前检测芳香族化合物的传统方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法、光学光谱法、电化学法、分子印迹技术等^[2]。虽然这些传统化学方法检测快速、鉴定分辨率高, 但往往依赖大型仪器设备, 具有成本昂贵、步骤复杂、耗时耗力等缺陷。微生物全细胞传感器(microbial whole-cell biosensors, MWCB)具有成本低、操作简单、可以原位检测等优势, 随着相关研究的深入, 已成为检测芳香族化合物中最具有潜力的方式之一。

传统检测芳香族化合物 MWCB 的设计通常为启动子与报告元件的简单组合, 主要用于单一信号的输入与输出。随着基因编辑、分子生物学、纳米技术以及光学和电化学检测等技

术的进步, MWCB 已逐步实现了检测灵敏度更高、检测特异性更好、检测更便捷的发展目标。目前的 MWCB 研究往往将多个不同的传感元件进行优化组合, 形成多维传感网络, 实现多因素复杂环境的感知和分析。MWCB 还能够与拨动开关、逻辑门和转录放大器等相结合, 实现智能控制, 提高了传感器的可靠性和实用性^[3-5]。

本文系统阐述了 MWCB 在苯系物和多环芳烃等芳香族化合物检测方面的研究进展, 包括 MWCB 的构建与优化方法, 并概述了开发新型生物传感器的前景策略, 从而为全细胞传感器更好地应用于该类化合物的监测提供借鉴。

1 用于检测芳香族化合物的微生物全细胞传感器

微生物全细胞传感器是以完整的微生物活细胞作为载体(底盘细胞), 借助基因编辑和基因工程技术, 通过特定基因或基因片段(感应元件)与目标物质的识别, 利用引入的报告基因(效应元件)将感知到的信息进行输出, 实现待检物质浓度与输出信号强度的对应。根据应用需求和目标物质特性, 底盘细胞的选择可能会有所不同, 合适的底盘细胞应对待检物质具备高度特

异性和灵敏性,并且对待检环境具有较高适应能力。感应元件决定了MWCB是否能够灵敏地感知周围环境中的物质浓度变化,是MWCB的核心元件。目前芳香族化合物检测常用的感应元件有转录因子和降解酶启动子等。效应元件可以将感应元件获取的信息转化为可读信号,如酶活大小、荧光强度、电流强弱等,实现对待检物质有效直观的监测^[6](图1)。

1.1 电活性生物被膜型MWCB

电活性微生物具有与细胞外基质进行电子交换的能力,可以氧化有机物并产生电流,研究者将这一现象称为生物电化学系统。电活性生物被膜(electrochemically active biofilm, EAB)是生物电化学系统的核心部分,由电活性细菌在降解有机物时覆盖在阳极电极表面形成,在生物电化学系统中起着生物催化剂的作用。EAB中的微生物通过氧化电子供体(芳香族化合物)以获得电子,随后通过胞外电子传递从电活性细菌的生物被膜和胞外基质转移到阳极,

并通过外部电路流向阴极。当MWCB暴露于有待检物的环境中时,生物被膜受到影响,导致胞内电流的生成和消耗速率发生变化,因此可以借助仪器检测电压和电流等变化的电信号来指示污染物的存在^[7]。由于生物被膜可以在任何可接触表面形成,并对恶劣环境展现了一定的耐受性、稳定性,因此成为开发芳香族化合物电化学生物传感器的潜力元件。

Kim等^[8]利用EAB为感应元件,通过检测电信号的变化,成功实现了对多氯联苯和有机磷农药等的快速检测。Santoro等^[9]开发了一种利用生物被膜型生物传感器检测甲苯的方法,将电活性细菌的生物被膜添加到大肠杆菌(*Escherichia coli*)中,同时利用2-羟基-1,4-萘醌用作氧化还原介质,促进*E. coli*中电子的转移,增强了传感器的电流输出,使用电位仪检测电流输出数据,甲苯的检测范围可达50–1 000 mg/L。对硝基苯酚(p-nitrophenol, PNP)是一种硝基芳香族化合物,很难在短时间内通过传统的生物

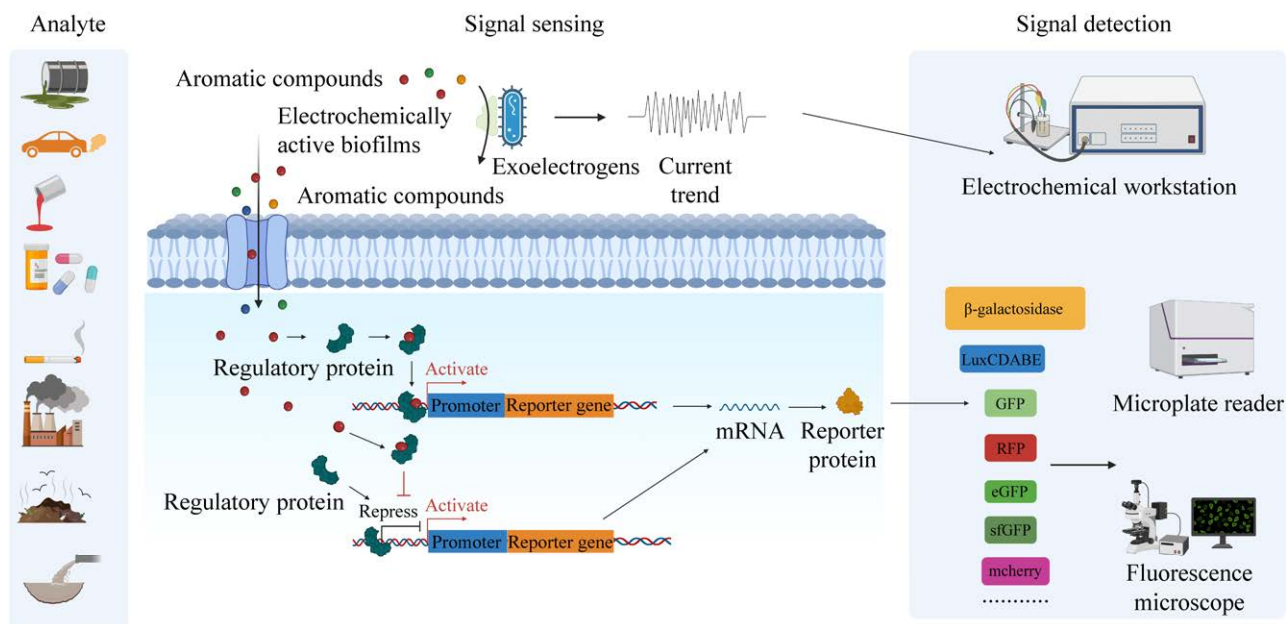


图1 常见多环芳烃微生物全细胞传感器类型

Figure 1 Types of aromatic compounds whole-cell microbial biosensors.

方法降解,利用微生物燃料电池中添加氧气有助于 PNP 生物降解,同时还能维护菌株的外生电力。Khan 等^[10]利用蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*) LZU-3 的生物被膜作为感应元件,通过增加溶解氧水平来促进相关降解基因的表达,既加速了 PNP 的降解,又促进了电压信号的输出,使 PNP 的可检测范围达 50–300 mg/L。

1.2 基于转录因子的 MWCB

转录因子是一种可以将待测物浓度的信号转化为靶基因表达水平的 MWCB 感应元件。根据待检物质对效应元件的激活或抑制作用,转录因子可分为诱导型正调控转录因子、诱导型负调控转录因子、阻遏型正调控转录因子和阻遏型负调控转录因子。目前已报道的芳香族化合物转录因子 MWCB 主要包括诱导型正调控 MWCB 和诱导型负调控 MWCB (表 1)。

1.2.1 芳香族化合物诱导的正调控型 MWCB

当待检测的芳香族化合物与诱导型转录因子结合,转录因子的构象会发生变化,从而激活下游相关靶基因的转录表达。目前在细菌中发现的能够被芳香族化合物激活的转录因子家族包括 NtrC、AraC、LysR 和 IclR 等^[38]。

XylR 和 DmpR 是 NtrC 蛋白家族中能够被芳香族化合物诱导的典型成员。来自恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的 XylR 参与调控苯系物的降解。Behzadian 等^[11]以 XylR 作为感知元件,通过由 XylR 调控的 P_u 启动子控制荧光素蛋白报告基因 *luxCDABE* 的表达,构建了可感应苯系物的 *E. coli* 传感器;当苯系物存在时,XylR 被激活并诱导 P_u 启动子转录,引发荧光素酶信号的输出;在低至 1 $\mu\text{mol/L}$ 苯系物诱导物下,依旧具有显著的检测灵敏度。除了能够检测环境中低浓度的苯系物,XylR 还具有检测底物广谱性,其他芳香类化合物如苯甲醛、五氯苯甲醛,以及甲基、乙基或双取代的氯甲苯、对氯苯甲

醛等也可受到该传感器感应^[39–40]。

DmpR 是 *P. putida* 中能够被苯酚诱导的转录因子,调控苯酚降解操纵子 Dmp 的表达^[41]。为了检测环境中苯酚的浓度,Gupta 等^[12]将 DmpR 及其控制的启动子 P_{dmp} 插入 pGLPX 质粒表达载体中,同样以荧光素酶为效应元件,构建了检测苯酚的 MWCB;当 DmpR 感知到诱导物苯酚的存在时,启动子 P_{dmp} 被激活,进而影响 *luxCDABE* 的表达,该传感器可感应低至 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的苯酚。Chong 和 Ching^[13]在该传感器的基础上,将 DmpR- P_{dmp} -*luxCDABE* 传感器模块中报告元件换成红色珊瑚荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP),并以高拷贝质粒 pEK-DR 作为载体,开发了一种基于比色法的 MWCB,与基于生物发光或荧光的生物传感器相比实现了更高的检测限,在苯酚同系物浓度范围为 0–200 $\mu\text{mol/L}$ 时仍可输出信号。此传感器解决了环境中含酚类的有机磷农药无法被传感器检测的问题,使有机磷酯代谢为 4-硝基苯酚时可被间接检测。此外,通过随机突变 DmpR 可进一步提高感应灵敏度,使得感应效果更加明显。

XylS 是首个被报道的 AraC 家族转录因子,它可以结合苯甲酸及其各种衍生物^[38]。聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)和邻苯二甲酸酯(phthalate esters, PAEs)是增塑剂的主要成分,在自然环境中降解缓慢,对污染和公共卫生造成了严重困扰。Li 等^[21]提出可通过检测 PET 和 PAE 的降解产物苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)和邻苯二甲酸(phthalic acid, PA)来表征环境中的增塑剂浓度。由于 XylS 无法识别 TPA 和 PA, Li 等^[21]通过定向进化改造,以获得能够结合和响应 PA 和 TPA 的 XylS;当构建的 MWCB 暴露于 TPA 和 PA 环境中时,XylS 突变体与诱导物结合并激活 XylS 的靶基因启动子 P_m 表达,在启动子 P_m 的控制下绿色荧光蛋白

表 1 转录因子型微生物全细胞传感器

Table 1 Microbial whole-cell biosensors classified by transcription factor

Family	Analytes	Transcription factors	Regulation	Sensor construction	Detection limit	References	
NtrC	BTEX ^a , benzaldehyde, p-chlorobenzaldehyde	XylR	Active	XylR-P _u -luxCDABE	1 μmol/L	[11]	
	phenol, methyl-phenol	DmpR	Active	DmpR-P _{dmp} -luxCDABE	0.5 μmol/L	[12]	
	p-nitrophenol			DmpR-P _{dmp} -rfp	0–200 μmol/L	[13]	
	Organic phosphate esters containing p-nitrophenol			DmpR-P _{dmp} -rfp	10 μmol/L	[14]	
	BTEX	TbuT	Active	TbuT-P _{tubA1} -gfp	0.022 μmol/L	[15]	
	BTEX	TbmR	Active	TbmR-P _{tmbA} -lacZ	/	[15]	
	2-hydroxybiphenyl	HbpR	Active	HbpR-P _{hbpC} -luxCDABE	0.2 mmol/L	[16]	
	Phenol	MopR	Active	MopR-P _{mop} -lacZ	0.46 μmol/L	[17-18]	
	Monoaromatic and diaromatic chemicals	TodS-TodT (todST)	Active	TodST-P _{todX} -gfp	0.04 mg/L	[19]	
	AraC	BTEX, phenol	XylS	Active	XylS ^{PEKLS} -P _m -mcherry	1 μmol/L	[20]
p-phthalic acid, phthalic acid			Active	XylS ^{K38R-L224Q} -P _m -sfGFP XylS ^{W88C-L224Q} -P _m -sfGFP	10 μmol/L	[21]	
Aromatic amines		FeaR	Active	FeaR-P _{tyrA} -rfp	10 μmol/L	[22]	
Cumene		IpbR	Active	IpbR-P _{ipb} -luxCDABE	0.1 μmol/L	[23]	
4-hydroxyphenylacetate		HpaA	Active	HpaA-P _{hpaCB} -lacZ	1 mmol/L	[24]	
Benzoate		BenR	Active	BenR-P _{benA} -lacZ	101 mmol/L	[25]	
2-chlorobenzoate, benzoate		CbdS	Active	/	/	[26]	
2,4-dichlorophenoxyacetic acid		CadR	Active	/	/	[27]	
LysR		Salicylaldehyde, salicylic acid	NahR	Active	NahF-NahR-P _{sal} -sfGFP	10 μmol/L	[28]
		Phenanthrene, naphthalene	PahR	Active	PahR-P _{pahA} -gfp	4 μg/L	[29]
	Phenanthrene		Active	PahR-P _{phnS} -luxCDABE	24 mg/L	[30]	
	Chlorocatechol	CbnR	Active	CbnR-P _{cbnABCD} -lacZ	5 mmol/L	[31]	
		TfdR	Active	/	/	[32]	
	Catechol	CatR	Active	/	/		
	Benzoic acid	BenM	Active	/	/		
<i>cis,cis</i> -muconic acid	CatM	Active	/	/			
TetR	Resorcinol	RolR	Repress	RolR-P _{rol} -gfp	0.5 mmol/L	[33]	
	Toluene, p-cymene, p-cumate	CymR	Active	CymR-P _{cmt} -gfp	1 g/L	[34]	
MarR	Protocatechuic acid	PacV	Repress	PacV-P _{pV} -egfp	369 μmol/L	[35]	
IcIR	Ethyl 4-hydroxymandelate	PobR	Active	PobR-P _{pobA} -gfp-Cm ^r	0.05 g/L	[36]	
	Lignin	PobR	Active	PobR-P _{pobA} -lacZ	2 mmol/L	[36]	
GntR	Phenol	PhcS	Active	PhcS-P _{mpH} -lacZ	2 mmol/L	[37]	
	2-phenylacetic acid-CoA	PaaX	Repress	PaaX-P _{paa} -gfp	10 μmol/L	[22]	

^a: BTEX mainly includes benzene, toluene, ethylbenzene, xylene, phenol and nitrobenzene.

(superfolder green fluorescent protein, sfGFP)表达, 输出可检测的荧光信号, 对 TPA 和 PA 的检测下限可达 $10 \mu\text{mol/L}$ (图 2)。

NahR 是参与调控 PAHs 降解的 LysR 型转录因子, 可以感知水杨酸及其衍生物^[42]。水杨醛脱氢酶 NahF 可将 PAHs 降解生成的水杨醛氧化为水杨酸。因此, 当 NahF 与 NahR 感知元件结合使用时, 可将不可检测的化合物转化为可检测化合物, 从而扩展传感器的检测范围。Xue 等^[28]将 NahF 置于 J23114 强启动子的控制下进行表达, 以 NahR 为感知元件, 响应环境中的水杨酸后, 激活编码水杨酸降解的启动子 P_{sal} , 进而控制 *sfgfp* 表达输出荧光, 该传感器最低可响应 $10 \mu\text{mol/L}$ 的水杨醛浓度。

P. putida 的 PahR 是一种特异性感知菲的转录因子, Wei 等^[30]利用 PahR 为感知元件, 从菲降解菌株伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.) RP007 中克隆出编码 PAHs 分解代谢酶编码基因的 *PhnS* 的启动子, 控制 *luxCDABE* 的表达, 检测菲浓度最低可至 24mg/L 。Segura 等^[29]同样利用 PahR 作感知元件, 将启动子更换成来自新

鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium* sp.) HR1a 中编码菲羟基化双加氧酶基因 *pahA* 的启动子, 以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)作报告元件, 最低检测限可达 $4 \mu\text{g/L}$ 。Sun 等^[43]为了实现靶向检测萘, 首先以 *E. coli* 为宿主表达萘降解基因 *nahAD*, 将萘转化为水杨酸盐, 随之利用一种可响应水杨酸的 SalR 转录因子为感知元件, 将水杨酸代谢酶编码基因的启动子和 *luxCDABE* 组成报告元件位于 SalR 的控制下, 实现了在 $0.01 \mu\text{mol/L}$ 萘的情况下仍具有高特异性和敏感性。

IclR 家族的成员主要参与苯甲酸类化合物的分解代谢^[44]。四羟基扁桃酸(hydroxy-mandelic acid, HMA)是一种广泛应用于制药行业的芳香族化合物, 但目前尚未发现可以响应它的转录因子。由于 HMA 与四羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid, 4 HB)在结构上具有高度相似性, Liang 等^[36]将不动杆菌(*Acinetobacter*)中可响应 4 HB 的 P_{obR} 定向进化为感知 HMA 的转录因子, 激活羟基苯甲酸羟化酶 *PobA* 的转录表达, 并将 2 个增强型绿色荧光蛋白报告基因 *egfp* 和氯霉素抗性基因(chloramphenicol resistance gene, Cm^r)使用启动子 P_{pobA} 来控制, 利用双报告元件既可检测 $0.05\text{--}2.00 \text{g/L}$ 范围内的 HMA, 又可利用具有 Cm^r 的传感菌株在含有氯霉素的平板上存活的表现筛选出响应 HMA 的 P_{obR} 突变体。

芳香族化合物诱导的转录因子型传感器多以单组分转录因子为主, TodS-TodT (TodST)是目前唯一报道的可感知苯系物的双组分系统^[45]。与单组分转录因子仅在胞内发挥作用相比, 双组分系统是一种可在胞外发挥作用的天然感知系统。TodST 在感知到苯系物后, 诱导甲苯双加氧酶(toluene dioxygenase, TodX)的启动子 P_{todX} , 引起下游绿色荧光蛋白 GFP 输出信号, 对甲苯的最低检测浓度可达 0.04mg/L ^[19]。但与单组分

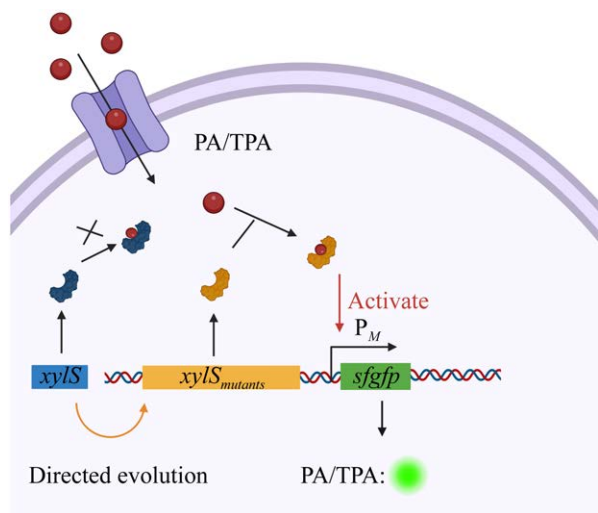


图 2 PA/PTA 诱导的正调控型 MWCBC^[21]
Figure 2 MWCBC induced by PA/PTA^[21].

转录因子的生物传感器相比,双组分转录因子遗传系统比较复杂,在传感元件的选择性方面稍逊一筹。

1.2.2 芳香族化合物诱导的负调控型 MWCB

一些转录因子自身可抑制下游靶基因的表达,当芳香族化合物与之结合后可解除这种抑制作用,提高下游基因转录水平。MarR、TetR 和 GntR 家族是目前已报道的能够被芳香族化合物诱导的负调控转录因子(阻遏蛋白)。

MarR 家族的 PcaV 阻遏蛋白常用于开发检测羟基取代苯甲酸的生物传感器。Machado 等^[35]利用来自天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的 PcaV,以 *E. coli* 为底盘细胞,开发出一种检测原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)的生物传感器;PcaV 可抑制噬菌体 T7A1 嵌合启动子 P_{pv} 的表达,导致其控制的 eGFP 无法产生荧光信号;而当 PcaV 感知环境中存在 PCA 时,PcaV 与 PCA 结合从而解除对 P_{pv} 的抑制作用,系统中检测到荧光信号的产生,其检测下限达 369 $\mu\text{mol/L}$;进一步对 PcaV 采用定向进化策略改变 PCA 型生物传感器的配体特异性,实现了包括香兰素在内的一系列小芳香醛的检测(图 3A)。

RolR 是 TetR 家族的阻遏蛋白,在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中,RolR 通过调控 *rolHMD* 基因簇来调控间苯二酚分解代谢。基于此,Nasr 等^[33]通过 IPTG 诱导型启动子控制 RolR 表达,并以可被 RolR 激活的 P_{rol} 启动子为感知元件,以该启动子控制的绿色荧光蛋白 GFP 为报告元件,构建了间苯二酚生物传感器;当环境中不存在间二苯酚时,报告元件可正常表达;添加 IPTG 诱导 RolR 表达后会抑制 P_{rol} ,从而导致 GFP 信号减弱;而在 IPTG 和间二苯酚同时存在时,RolR 与间二苯酚结合,解除了 RolR 对 P_{rol} 的抑制作用,传感器的荧光强度提高。

GntR 家族的 PaaX 是参与 2-苯乙酸(2-phenylacetic acid, PAA)分解代谢途径的阻遏型正调控转录因子,研究发现^[22],2-苯基乙胺(2-phenylethylamine, PEA)经酶催化后形成 PAA,2-苯乙酸由 PaaK 催化进一步形成 2-苯乙酸酰辅酶 A (PAA-CoA)。PAA 是一种内源性生长素,对植物的生长至关重要,因此同时检测 PAA 和 PEA 的含量有助于 PAA 生物合成的相关研究。由于没有可响应 PAA 的转录因子,通过检测其代谢物可间接定量 PAA 的存在,但为了避免检测时两种化合物造成的互相干扰,Guo 等^[22]设计了一个分别由不同转录因子调控信号输出的 MWCB;在该传感器中,*paaA/paaZ* 的启动子 $P_{paaA/paaZ}$ 可控制 GFP 的表达,PaaX 作为 *paaA/paaZ* 的转录阻遏物。当该传感器暴露于含有 PAA-CoA 的环境中时,PAA-CoA 结合 PaaX,使其失去对 $P_{paaA/paaZ}$ 的阻遏作用,编码 GFP 输出荧光信号;由于 PEA 转化为 PAA 后也会诱导 GFP 生成,因此会对检测造成干扰^[22]。为了解决这一问题,研究人员在原有传感器的基础上进一步引入另一转录因子 FeaR,FeaR 是 *E. coli* 中参与芳香胺分解代谢的 AraC 家族转录因子,可有效感知 PEA^[46]。当 PEA 存在时,FeaR 与 PEA 结合并激活 P_{tnaA} 启动子表达,诱导输出红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)信号,该传感器对 PEA 的检测下限可达 10 $\mu\text{mol/L}$ ^[22](图 3B)。

1.2.3 依赖降解基因启动子的 MWCB

虽然目前关于芳香族化合物诱导的正调控型及负调控型 MWCB 已有较多研究,但是基于阻遏型转录因子而开发的 MWCB 尚未见报道。此前所描述的 MWCB 基本都以 *E. coli* 为底盘细胞构建,然而,某些情况下由于参与感应芳香族化合物的调控蛋白尚不明确,通常会选择芳香族化合物降解菌株作为底盘细胞开发 MWCB。

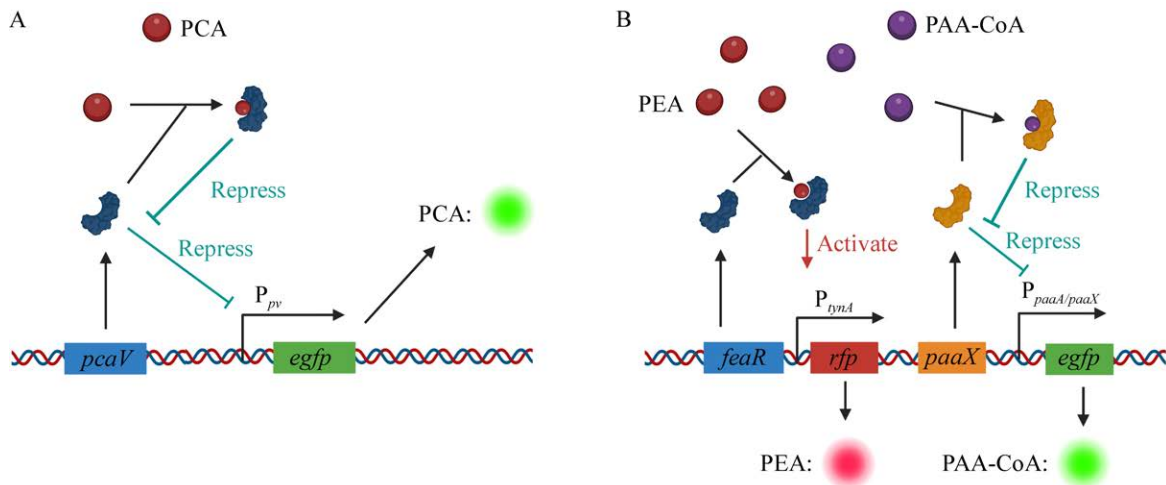


图3 芳香族化合物诱导的负调控型 MWCB^[22,35]
A: 感应原儿茶酸的负调控型 MWCB
B: 感应 2-苯乙酸酰辅酶的负调控型 MWCB

Figure 3 Negative regulatory MWCB induced by aromatic compounds^[22,35]. A: The negative regulatory MWCB that responds to protocatechuic acid. B: The negative regulatory MWCB that responds to 2-phenylacetic acid-CoA.

Applegate 等^[47]利用 *P. putida* F1 为底盘细胞, 将菌株中 *tod* 基因(编码甲苯双加氧酶)的启动子作为感应元件的模块之一, 并控制报告元件荧光素酶编码基因的表达, 可对环境中 30 $\mu\text{g/L}$ 以上的甲苯进行。来自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* HK4)的 NahG 可催化萘水解为水杨酸, 为监测萘和水杨酸的生物利用度, Heitzer 等^[48]以 *P. fluorescens* HK4 为宿主构建了分别以 *nahG* 的启动子 P_{nahG} 和 *luxCDABE* 为感应元件和效应元件的传感器, 最低可检测 45 $\mu\text{g/L}$ 的萘。此外, 该传感器在噻萘、吡啶等多种芳烃底物的环境中也表现出一定的检测能力^[49]。

为了开发检测高分子量的 PAHs 的降解基因启动子依赖的 MWCB, Segura 等^[29]以 PAHs 降解菌 *P. putida* 为底盘细胞, 利用参与 PAHs 代谢的双加氧酶 PahA 的启动子 P_{pahA} 响应环境中的 PAHs, P_{pahA} 控制下绿色荧光蛋白 GFP 为报告元件, 可特异性检测到低至 100 ng/L 的菲和 360 ng/L 的萘, 并具有不响应单环芳香族化合物和多环芳香族化合物的中间产物的优势。

A: 感应原儿茶酸的负调控型 MWCB. B: 感应 2-苯

乙酸酰辅酶的负调控型 MWCB.

2 微生物全细胞传感器的性能优化

生物传感器响应性能的可调节性使得研究人员能够灵活地控制其对目标物质的感知和报告能力, 以满足不同的应用场景。通过调整传感器的参数和设置, 实现传感器灵敏度、特异性、动态范围、稳定性等多方面的跨越, 成为当下开发 MWCB 的重点, 综合考虑这些方面, 可以使用以下策略进行优化。

2.1 应用表面展示技术固定化降解酶, 拓宽底盘细胞的应用

微生物表面展示技术是一种酶的固定化技术, 主要包括细胞外展示和细胞内展示。细胞外展示是将目标蛋白或多肽直接连接到微生物细胞表面, 使其暴露在细胞外; 细胞内展示则是将目标蛋白或多肽与微生物的细胞质或细胞膜内部结合, 在细胞自身的分泌系统的作用下最终将其释放到细胞外^[50]。双酚 A 是一种有害的内分泌干扰的化学物质, 即使低剂量也会对

野生动物和人类健康构成威胁。酪氨酸酶可以在溶解氧的存在下催化双酚 A 转化为邻醌, 该产物可在低电位下进一步被还原, 以产生用于检测双酚 A 的放大信号。Zhao 等^[51]利用表面展示技术将酪氨酸酶展示在 *E. coli* 表面, 并将重组菌株吸附在玻璃碳电极上, 构建了检测双酚 A 的电化学型生物传感器; 使用该传感器检测双酚 A 的准确性能与高效液相色谱相媲美, 最低限可达 50 mmol/L。Zhang 等^[52]将真菌中的漆酶表面展示在 *E. coli* 表面, 成功构建了用于检测儿茶酚的微生物电化学生物传感器, 儿茶酚的电化学响应范围在 0.5–300.0 $\mu\text{mol/L}$ 。矢野鞘氨醇菌(*Sphingobium yanoikuyae*)的邻苯二酚 2,3-双加氧酶(catechol 2,3-dioxygenase, C23O)催化邻苯二酚降解, Liu 等^[53]在 *E. coli* 中表达了该酶, 并使用纳米孔金材料将其固定在 *E. coli* 细胞表面, 开发了一种高灵敏度的基于全细胞的电化学生物传感器, 对儿茶酚检测表现出良好的线性响应, 可检测浓度在 1–500 $\mu\text{mol/L}$ 范围内的儿茶酚。

2.2 结合基因线路、逻辑门等系统实现生物传感器的智能调控

一些 MWCB 以对芳香族化合物具有降解作用的菌株为底盘细胞, 这导致菌株在获得生物传感器信号后会同时降解化合物, 此时污染物浓度处于不稳定的状态, 这会对 MWCB 产生可靠的输出信号造成影响。因此利用合成生物学手段开发一种可智能响应污染物的系统成为一种新方向。

Liu 等^[54]设计了一种包含 3 个模块的 MWCB, 可先后完成污染物检测、生物降解及其后续自杀的一系列生物过程; 他们选择工业废水中的典型污染物水杨酸作为示例化合物, 首先构建了响应水杨酸的生物传感器, 以水杨酸有响应的 NahR 为感知元件, 激活下游编

码水杨酸降解的启动子 P_{sal} , 进而控制单体红色荧光蛋白(monomeric red fluorescent protein, MRFP)表达输出荧光信号; 然而由于低响应性和狭窄的动态检测范围, 限制了该传感器的进一步应用, 因此通过使用强启动子控制 NahR 表达, 并选择不同的核糖体结合位点来调节报告基因的表达强度, 成功将其检测下限降至 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。第二个模块用于指示水杨酸的生物降解, 当菌株生长到稳定期晚期, 稳定期的启动子 P_{fic} 被激活, 驱动水杨酸 5-羟化酶代谢水杨酸; 待水杨酸完全耗尽后, 传感器的自杀模块工作, 自杀回路将表达一种有毒蛋白质来影响菌株的生长^[54]。自杀回路包含两种设计: 回路 1 使用 CI 阻遏蛋白作为“基因转换器”, 将毒性蛋白 CcdB 位于其控制下, 当水杨酸存在时, CI 被激活, 抑制了下游毒性蛋白的表达; 回路 2 是基于毒素(controller of cell death protein B, CcdB)/抗毒素(controller of cell death protein A, CcdA)蛋白构建的, CcdA 可以通过与 CcdB 结合来阻止 CcdB 作用, 当水杨酸存在时, NahR 激活 CcdA 的表达以使 CcdB 失活, 菌株存活, 相反, 如果消耗水杨酸, CcdB 的表达会导致细胞死亡^[54]。通过设计这种集成的工程菌株, 能够实现在没有任何外源诱导剂的情况下, 传感器按时空顺序进行智能化感应、降解和自杀, 极大满足了环境生物修复的需求(图 4)。

自 1999 年 Weiss 提出从数字逻辑电路应用到遗传调控网络的想法, 并使用阻遏型转录因子设计简单的 NOT(not gate)逻辑门开始, 研究人员已依次开发了 OR(or gate)、AND(and gate)、NOT、XOR(xor gate)、NAND(nand gate)、NOR(nor gate)等复杂的模块化逻辑门结构, 并将其用于多层次的基因回路型全细胞微生物传感器的构建^[55]。利用逻辑门对 MWCB 进行设计, 丰富了基因回路, 已被广泛应用于智能检测重金

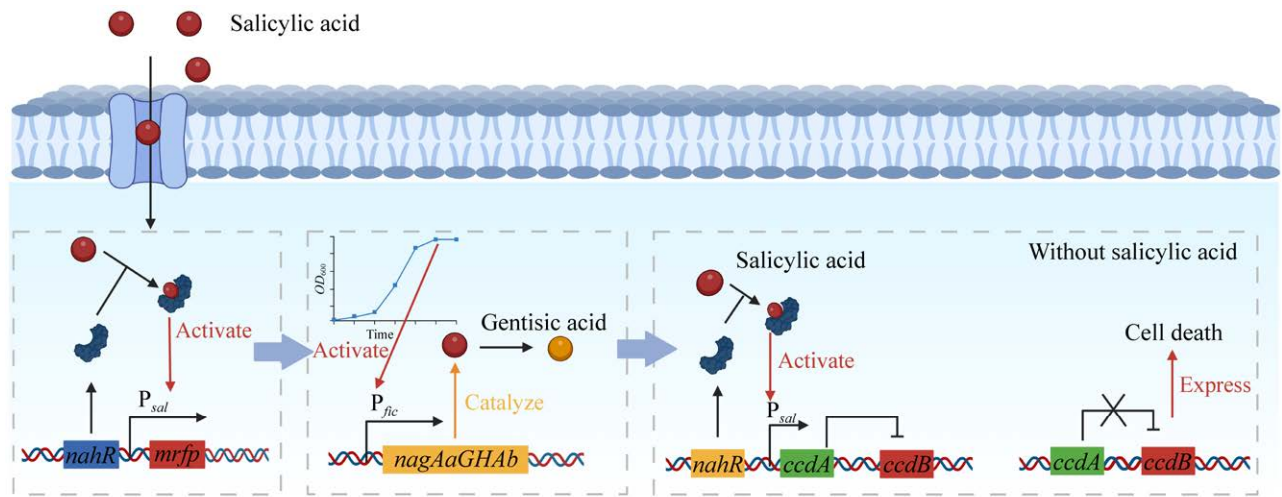


图4 利用基因线路智能调控的微生物全细胞传感器的组成^[54]

Figure 4 Composition of microbial whole-cell sensors implementing genetic pathways for intelligent regulation^[54].

属离子等污染物，但以芳香族化合物为对象的逻辑门传感器较少，近期 Jiang 等^[56]利用逻辑门的概念开发了 BUF (buffer)、NOT、AND、双功能电路(bifunctional circuit, BIF) 这 4 种 MWCB。

BUF 逻辑门是单一信号的输入与输出^[56]，以阻遏蛋白 PadR 为感应元件为例，仅当香豆酸(p-coumaric acid, CA)存在时，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的酚酸脱羧酶的启动子 P_{padC} 与 eGFP 为报告模块的 MWCB 才有信号输出；当不存在香豆酸时，PadR 结合在 $padC$ 启动子区，抑制 eGFP 表达。NOT 逻辑门与 BUF 逻辑门不同的是，当输入信号时，信号输出模块失效，反之输出模块产生信号^[56]。进一步通过将抑制基因翻译的反义 RNA (antisense RNAs, asRNA)和抑制基因转录的单向导 RNA (single guide RNAs, sgRNA)置于 P_{padC} 的控制下，成功将 BUF 型 MWCB 换成 NOT 型 MWCB。简单来说，不存在香豆酸时，PadR 抑制 P_{padC} ， P_{padC} 控制下的 asRNA/sgRNA 不转录，eGFP 表达发

出荧光信号；而随着香豆酸浓度的升高，抑制作用被解除， P_{padC} 被激活，asRNA/sgRNA 成功表达以抑制 eGFP 表达产生荧光。AND 逻辑门的原理是输入双信号后输出单一信号，因此 MWCB 的感应元件应由两种转录因子组成用来感知两种物质，报告模块的启动子则为两种独立的阻遏转录因子的结合序列组合成的一个启动子，称为杂交启动子 P_{hybrid} 。Jiang 等^[56]发现 TetR 或 LacI 阻遏因子与 PadR 组合可有效用于构建 AND 型 MWCB，当环境中存在香豆素和四环素时，PadR 和 TetR 均解除了自身对 P_{hybrid} 的抑制作用， P_{hybrid} 处于激活状态，eGFP 发出荧光信号。BIF 逻辑门是单一信号的输入，双信号的选择性输出。当不存在香豆素时，BUF 模块的 P_{padC} 被 PadR 抑制， P_{padC} 控制下的 RFP 不表达，而 NOT 模块的 P_{padC} 被 PadR 抑制， P_{padC} 控制下的 asRNA 不转录，eGFP 正常表达；当环境中存在香豆素时，BUF 模块对 P_{padC} 的抑制被解除，RFP 表达，NOT 模块 asRNA 处于激活状态，抑制 eGFP 使其不输出荧光信号(图 5)。

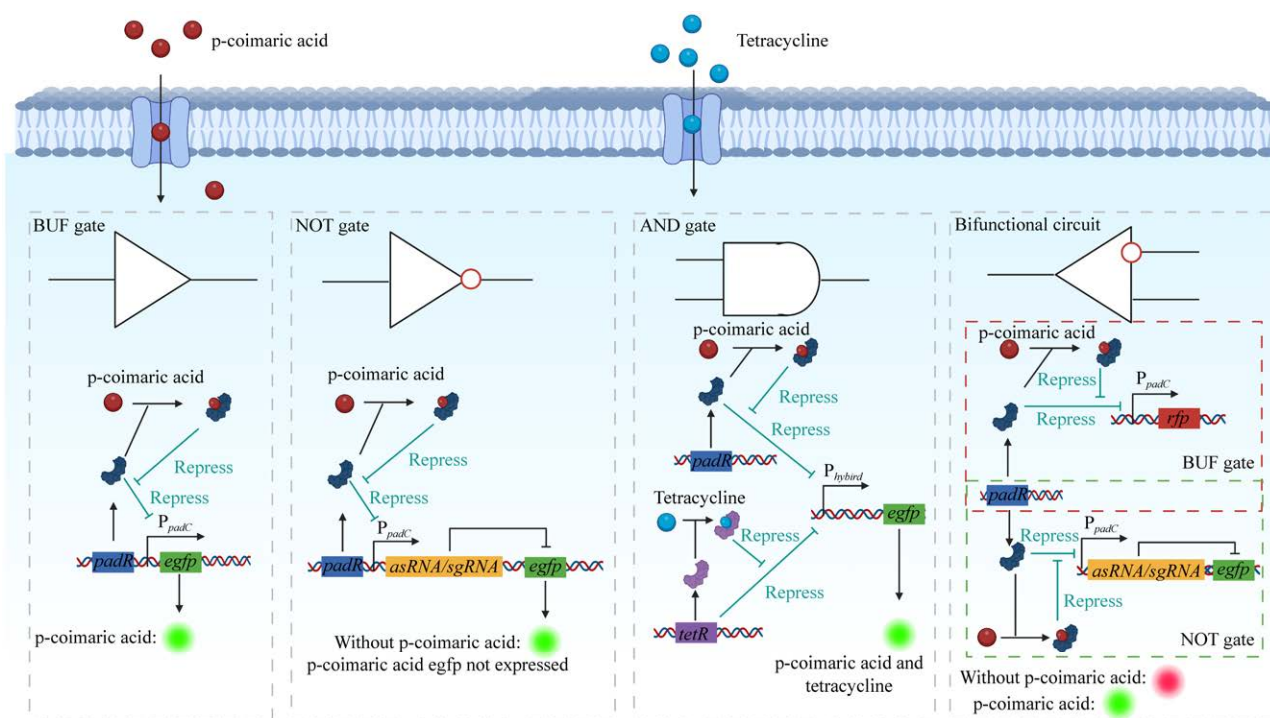


图5 利用逻辑门智能响应的 MWCB^[56]

Figure 5 MWCB utilizes logic gates for intelligent response^[56].

2.3 通过插入群体感应(quorum sensing, QS)模块、改造基因回路, 放大传感信号

转录因子型微生物全细胞传感器是由转录因子作为感应元件结合待测化合物, 激活或抑制靶基因启动子发挥作用的, 所以转录因子的表达对传感器的效果至关重要。除了常见的利用强启动子控制转录因子的表达外, 通过引入 QS 模块, 动态调节转录因子的浓度, 也是放大传感信号、调节感应灵敏度和动态范围的方式之一^[57]。

MWCB 常通过检测其代谢物(酚类化合物)来间接反映环境中有机磷酸酯的浓度。He 等^[58]为了更灵敏地检测环境中甲基对硫磷(methyl parathion, MP)的浓度, 在酚类传感模块(DmpR)和报告模块(sfGFP 或水解酶 OPH)之间引入 QS 模块。当存在 MP 时, 其自发水解产物对硝基苯酚(p-nitrophenol, p-NP)可以结合 DmpR, 以诱导 LuxI 合成 QS 信号分子 N-酰基高丝氨酸内酯

(N-acyl homoserine lactone, AHL)。AHL 与 LuxR 结合后可进一步激活 *sfgfp* 和 *oph* 的表达, 其中 OPH 降解 MP 可产生更多的 p-NP 继续作用于 DmpR, 形成了正反馈的回路, 增强传感器的信号输出效率。构建出的传感器可检测低至 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的苯酚和 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 p-NP(图 6A)。

通过插入 QS 模块, 放大传感信号也在其他 MWCB 领域广泛应用。例如, 为了提高砷传感器的检测性能, 研究人员在 *E. coli* 中构建了一个配备有 *luxI-luxR* 反馈回路的砷生物传感器, 具有反馈回路的 MWCB 的灵敏度比没有反馈回路的 MWCB 的灵敏度高约 1 个数量级, 最低检出限为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ^[59](图 6B)。

Sun 等^[60]利用苯酚响应调节因子 DmpR 作为感应元件, P_x 控制 DmpR 表达, DmpR 控制的苯酚降解操纵子 *dmp* 的启动子 P_{dmp} (P_0) 与 GFP 组合作为报告元件, 发现苯酚浓度在 0–100 $\mu\text{mol/L}$

时响应灵敏度很低；考虑到感应元件是响应待检化合物的关键，他们通过将多个 DmpR 以串联的方式组合在一起，发现 2 个 DmpR 串联表达比单个 DmpR 的感应灵敏度提高了近 9 倍；当苯酚浓度为 0–100 $\mu\text{mol/L}$ 时，其浓度与 GFP

的表达量呈良好的线性关系；受到在传感模块中连接的多个 DmpR 成功提高信号的启发，作者在报告模块中“并联”表达多个 GFP，发现 2 个 GFP 对苯酚的检测灵敏度是单个 GFP 的 16 倍，且也呈现出良好的线性关系(图 7A)。该研究通

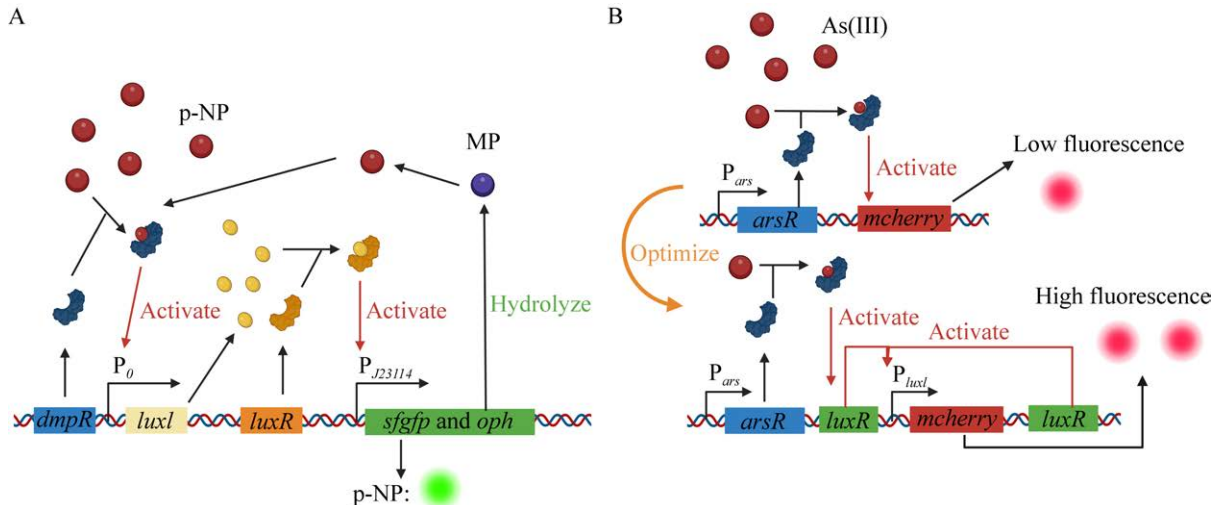


图 6 插入 QS 模块放大信号的 MWCB^[58-59] A: 利用 QS 系统放大对对硝基苯酚的检测信号. B: 利用 QS 系统放大对砷的检测信号

Figure 6 MWCB with QS module inserted to amplify signals^[58-59]. A: Utilizing the QS system to amplify the detection signal for p-nitrophenol. B: Utilizing the QS system to amplify the detection signal for arsenic.

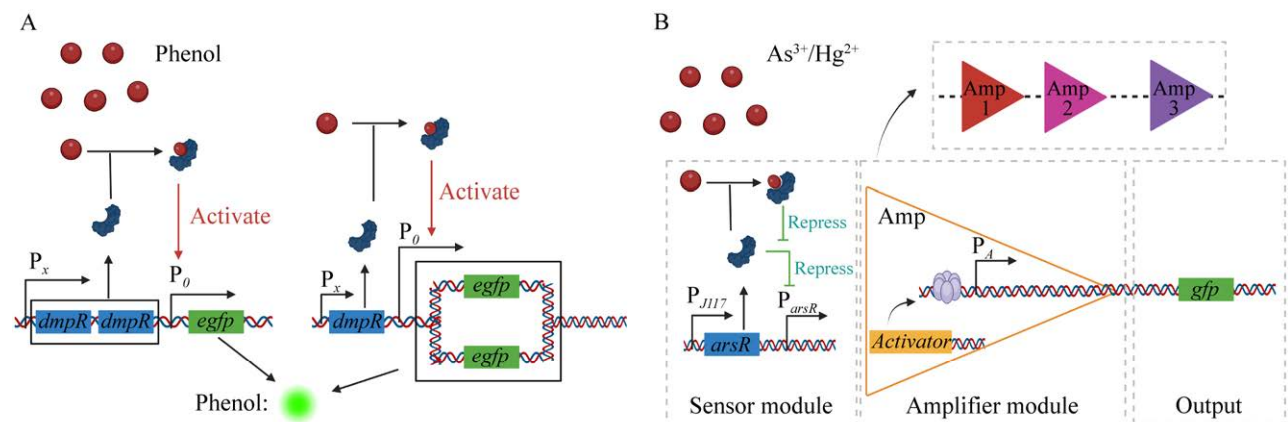


图 7 设计遗传电路放大信号的 MWCB^[60-61] A: 感应元件串联(左)或效应元件并联(右)的方式放大输出信号. B: 感应元件串联级联放大输出信号

Figure 7 MWCB for designing genetic circuits to amplify signals^[60-61]. A: The output signal is amplified by connecting the sensing elements in series (left) or the effect elements in parallel (right). B: The output signal is amplified by cascading the sensing elements in series.

过基因线路的合理设计,成功开发出模块化的遗传电路作为信号放大器,能够更加快速、灵敏地检测出待检化合物浓度。Wan 等^[61]开发了一种用于信号放大的级联模块化方法,首先通过组成型启动子 P_{J117} 调整胞内 *arsR* 表达水平来提高灵敏度,然后将多层转录扩增器以串联的方式设计在传感器中,逐步提高 *gfp* 的输出表达水平,这种方式使检测限提高了 750 倍(图 7B)。

2.4 利用抗生素耐药基因的双重选择模式改变传感器感知元件的特异性

转录因子通过识别化合物结合形成复合物,实现对下游基因转录调控。然而,天然的转录因子有时无法完全匹配目标化合物,因此对转录因子进行底物选择性和特异性调整,对提高生物传感器的可用性具有重要的意义,其中定向进化是实现该目标的重要策略。但是在定向进化过程中,得到的转录因子突变体往往底物特异性不高,造成传感器信号干扰^[62]。为了使产生的转录因子突变体仅响应目标化合物,研究中常使用双重选择系统,用以筛选特异性转录因子。

Ogawa 等^[63]将 XylS 作为感知元件,开发了一种双重选择系统的新型传感器,成功将转录因子 XylS 响应物从间甲基苯甲酸转换为对甲基苯甲酸;当环境中存在间甲基苯甲酸时,XylS 与之结合,激活靶基因启动子 P_{Pm} , P_{Pm} 控制氨苄青霉素耐药基因 *bla* 表达,利用抗生素耐药性来选择具有间甲基苯甲酸结合特异性的 XylS 突变体。然而假阳性菌株产生的 XylS 突变体在没有任何化合物或内源物质刺激下也会转录,造成筛选干扰;因此在此传感器的基础上,引入了同样位于 P_{Pm} 控制下的阻遏型转录因子 TetR,同时将 TetR 的靶基因启动子 P_{tet} 和 P_{tet} 控制的氯霉素抗性基因 *cat* 设计在 TetR 的下游。当间甲基苯甲酸与 XylS 结合, P_{Pm} 被

激活表达 Bla 和 TetR。TetR 进一步抑制 P_{tet} , 抑制 *cat* 表达,此时菌株表现出对氨苄青霉素耐药和氯霉素敏感;当 P_{Pm} 不被 XylS 激活时, Bla 和 TetR 不表达, P_{tet} 启动子解除抑制,导致 *cat* 正常表达,此时该菌株表现出对氨苄青霉素敏感和氯霉素耐药。这种双重选择系统使得只有含特定 XylS 突变体的宿主细胞才能响应对甲基苯甲酸,且能排除无需化合物响应或没有活性的 XylS 突变体;这种方法筛选出来的突变体对间甲基苯甲酸几乎没有反应,对对甲基苯甲酸具有很高的敏感性,检测范围在 1–100 $\mu\text{mol/L}$ ^[63](图 8A)。

Jia 等^[64]设计了一个双重选择系统提高 PbrR 对 Pb^{2+} 的检测特异性,以氨苄青霉素抗性基因 *amp* (ON 选择)为阳性选择标记,蔗糖致死基因 *sacB* (OFF 选择)为阴性选择标记的传感器,成功筛选得到了响应性更高的 PbrR 突变体;正选择标记基因 *amp* 和反向选择标记基因 *sacB* 均由启动子 P_{pbrA} 控制下, P_{pbrA} 的表达受 PbrR 调控;当环境中存在 Pb^{2+} 时,对 Pb^{2+} 具有强烈响应性的 PbrR 突变体会激活 *amp* 和 *sacB* 的表达,细胞可以在氨苄青霉素存在下存活,而弱结合突变体则会导致细胞死亡;相反,具有与 Zn^{2+} 结合能力较弱的 PbrR 突变体的细胞可以存活,因为对 Zn^{2+} 有强烈响应的突变体可以激活 *sacB* 的表达,从而在蔗糖存在下导致细胞死亡;与野生型相比,突变株 M1 和 M2 对 Pb^{2+} 的响应分别提高了 1.8 倍和 2 倍(图 8B)。这种基于抗生素耐药基因的双重选择系统为改变生物传感器的感应特异性提供了有效的策略^[65]。

3 总结与展望

芳香族化合物在化学品生产、香精香料开发、染料制备和医药生产等领域扮演着重要角色,同时也由于其苯环结构的存在,许多芳香族化合物对人类健康造成严重影响。因此,开

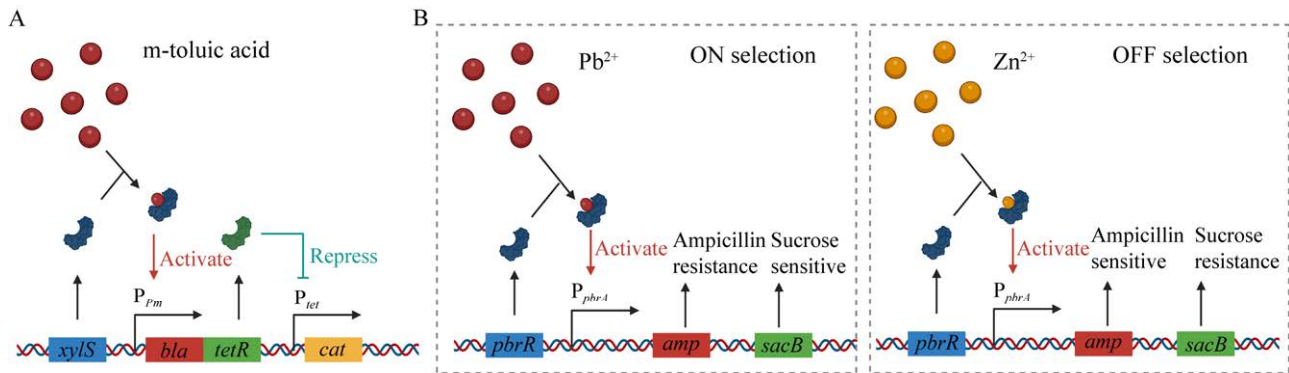


图 8 基于双重选择系统的 MWCB^[64-65] A: 抗生素耐药基因的双重选择模式筛选响应单一化合物的特异性转录因子. B: 抗生素耐药基因的双重选择模式区分响应不同种类化合物的特异性转录因子
Figure 8 MWCB based on dual selection system^[64-65]. A: The dual selection mode of antibiotic resistance genes screens for specific transcription factors that respond to a single compound. B: The dual selection mode of antibiotic resistance genes is used to differentiate specific transcription factors that respond to different types of compounds.

发一种高灵敏度、高选择性、快速实时检测以及易于操作和维护检测方法尤为重要。MWCB 显著地避免了传统的化学检测方法对大型仪器设备依赖性，昂贵复杂，耗时耗力等因素，在环境监测、医学病理诊断和生物合成等多个领域已得到广泛关注和应用。MWCB 也逐渐成为检测芳香族化合物的重要手段之一。本文系统综述了 WMCB 的工作原理、构建方法及其在检测芳香族化合物方面的应用，并探讨了进一步提高传感器性能的优化策略。

尽管关于检测芳香族化合物的 MWCB 的研究越来越多，然而目前已报道的芳香族化合物感应元件仍不够丰富，MWCB 的进一步开发也面临一系列挑战，如何提高传感灵敏度、增强传导模块的表达稳定性和特异性等问题亟待解决。随着研究的不断深入，代谢工程和合成生物学等领域的技术将逐步应用于生物传感器的开发。合成生物学不仅可通过去除底盘细胞基因组中具有交叉反应性潜力的生物部件，提高 MWCB 性能，还能通过对响应污染物的生物元件进行理性的设计改造提高灵敏度。结合遗

传电路思路，将多个报告基因元件组装在一起形成多信号模块，进一步拓宽菌株检测范围和便捷性。此外，通过进一步表达代谢酶，将污染物降解与检测相结合，实现实时检测、实地降解。构建的 MWCB 还可应用于高产量菌株的高通量筛选和代谢通路的动态控制等方面。随着研究的深入和技术的不断进步，MWCB 的构建必将朝着更加稳定、高效且智能化的方向发展。

REFERENCES

- [1] KIM KH, JAHAN SA, KABIR E, BROWN RJC. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects[J]. *Environment International*, 2013, 60: 71-80.
- [2] ZHANG Y, YUAN LM, HE SL, TAO HL, XIE WL, ZHANG XY, REN XL, JIANG T, LI LH, ZHU ZQ. Contemporary research progress on the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(5): 2790.
- [3] XUE ZH, ZHENG X, YU WC, LI A, LI SH, WANG YM, KOU XH. Review: research progress in detection technology of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2021, 168(5): 057528.

- [4] BILAL M, IQBAL HMN. Microbial-derived biosensors for monitoring environmental contaminants: recent advances and future outlook[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2019, 124: 8-17.
- [5] 杨璐, 吴楠, 白茸茸, 董维亮, 周杰, 姜岷. 基因回路型全细胞微生物传感器的设计、优化与应用[J]. *合成生物学*, 2022, 3(6): 1061-1080.
YANG L, WU N, BAI RR, DONG WL, ZHOU J, JIANG M. Design, optimization and application of whole-cell microbial biosensors with engineered genetic circuits[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(6): 1061-1080 (in Chinese).
- [6] VERMA ML, RANI V. Biosensors for toxic metals, polychlorinated biphenyls, biological oxygen demand, endocrine disruptors, hormones, dioxin, phenolic and organophosphorus compounds: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2021, 19(2): 1657-1666.
- [7] HU YD, HAN X, SHI L, CAO B. Electrochemically active biofilm-enabled biosensors: current status and opportunities for biofilm engineering[J]. *Electrochimica Acta*, 2022, 428: 140917.
- [8] KIM M, PARK HS, JIN GJ, CHO WH, LEE DK, HYUN MS, CHOI CH, KIM HJ. A novel combined biomonitoring system for BOD measurement and toxicity detection using microbial fuel cells[C]. *Sensors*, 2006 IEEE. Daegu, Korea (South). 2006: 1247-1248.
- [9] SANTORO C, MOHIDIN AF, GRASSO LL, SEVIOUR T, PALANISAMY K, HINKS J, LAURO FM, MARSILI E. Sub-toxic concentrations of volatile organic compounds inhibit extracellular respiration of *Escherichia coli* cells grown in anodic bioelectrochemical systems[J]. *Bioelectrochemistry*, 2016, 112: 173-177.
- [10] KHAN A, CHEN ZJ, ZHAO S, NI H, PEI YX, XU R, LING ZM, SALAMA ES, LIU P, LI XK. Micro-aeration in anode chamber promotes *p*-nitrophenol degradation and electricity generation in microbial fuel cell[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121291.
- [11] BEHZADIAN F, BARJESTE H, HOSSEINKHANI S, ZAREI AR. Construction and characterization of *Escherichia coli* whole-cell biosensors for toluene and related compounds[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(2): 690-696.
- [12] GUPTA S, SAXENA M, SAINI N, Mahmooduzzafar, KUMAR R, KUMAR A. An effective strategy for a whole-cell biosensor based on putative effector interaction site of the regulatory DmpR protein[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43527.
- [13] CHONG HQ, CHING CB. Development of colorimetric-based whole-cell biosensor for organophosphorus compounds by engineering transcription regulator DmpR[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1290-1298.
- [14] STINER L, HALVERSON LJ. Development and characterization of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1962-1971.
- [15] LEAHY JG, JOHNSON GR, OLSEN RH. Cross-regulation of toluene monooxygenases by the transcriptional activators TbmR and TbuT[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3736-3739.
- [16] JASPERS MC, SUSKE WA, SCHMID A, GOSLINGS DA, KOHLER HP, van der MEER JR. HbpR, a new member of the XylR/DmpR subclass within the NtrC family of bacterial transcriptional activators, regulates expression of 2-hydroxybiphenyl metabolism in *Pseudomonas azelaica* HBP1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(2): 405-417.
- [17] RAY S, GUNZBURG MJ, WILCE M, PANJIKAR S, ANAND R. Structural basis of selective aromatic pollutant sensing by the effector binding domain of MopR, an NtrC family transcriptional regulator[J]. *ACS Chemical Biology*, 2016, 11(8): 2357-2365.
- [18] SINGH J, ANAND R, HOROVITZ A. Cooperativity in ATP hydrolysis by MopR is modulated by its signal reception domain and by its protein and phenol concentrations[J]. *Journal of Bacteriology*, 2022, 204(8): e0017922.
- [19] HERNANDEZ-SANCHEZ V, MOLINA L, RAMOS JL, SEGURA A. New family of biosensors for monitoring BTX in aquatic and edaphic environments[J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(6): 858-867.
- [20] OGAWA Y, SAITO Y, YAMAGUCHI H, KATSUYAMA Y, OHNISHI Y. Engineering the substrate specificity of toluene degrading enzyme XylM using biosensor XylS and machine learning[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(2): 572-582.
- [21] LI JW, NINA MRH, ZHANG XY, BAI YP. Engineering transcription factor XylS for sensing phthalic acid and terephthalic acid: an application for enzyme evolution[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(3): 1106-1113.
- [22] GUO KH, LU KH, YEH YC. Cell-based biosensor with dual signal outputs for simultaneous quantification of phenylacetic acid and phenylethylamine[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(12): 2790-2795.
- [23] SELIFONOVA OV, EATON RW. Use of an ipb-lux fusion to study regulation of the isopropylbenzene catabolism operon of *Pseudomonas putida* RE204 and to detect hydrophobic pollutants in the environment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(3):

778-783.

- [24] PRIETO MA, GARCIA JL. Identification of a novel positive regulator of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 232(3): 759-765.
- [25] COWLES CE, NICHOLS NN, HARWOOD CS. BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(22): 6339-6346.
- [26] SUZUKI K, OGAWA N, MIYASHITA K. Expression of 2-halobenzoate dioxygenase genes (*cbdSABC*) involved in the degradation of benzoate and 2-halobenzoate in *Burkholderia* sp. TH2[J]. Gene, 2001, 262(1/2): 137-145.
- [27] KITAGAWA W, TAKAMI S, MIYAUCHI K, MASAI EJ, KAMAGATA Y, TIEDJE JM, FUKUDA M. Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(2): 509-518.
- [28] XUE HR, SHI HL, YU Z, HE SX, LIU SY, HOU YH, PAN XJ, WANG H, ZHENG P, CUI C, VIETS H, LIANG J, ZHANG YH, CHEN SB, ZHANG HM, OUYANG Q. Design, construction, and characterization of a set of biosensors for aromatic compounds[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(12): 1011-1014.
- [29] SEGURA A, HERNANDEZ-SANCHEZ V, MARQUES S, MOLINA L. Insights in the regulation of the degradation of PAHs in *Novosphingobium* sp. HR1a and utilization of this regulatory system as a tool for the detection of PAHs[J]. The Science of the Total Environment, 2017, 590/591: 381-393.
- [30] WEI H, ZE-LING S, LE-LE C, WEN-HUI Z, CHUAN-CHAO D. Specific detection of bioavailable phenanthrene and mercury by bacterium reporters in the red soil[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2014, 11(3): 685-694.
- [31] OGAWA N, McFALL SM, KLEM TJ, MIYASHITA K, CHAKRABARTY AM. Transcriptional activation of the chlorocatechol degradative genes of *Ralstonia eutropha* NH9[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(21): 6697-6705.
- [32] UCHIYAMA T, MIYAZAKI K. Metagenomic screening for aromatic compound-responsive transcriptional regulators[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75795.
- [33] NASR MA, MARTIN VJJ, KWAN DH. Divergent directed evolution of a TetR-type repressor towards aromatic molecules[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(14): 7675-7690.
- [34] SEO SO, SCHMIDT-DANNERT C. Development of a synthetic cumate-inducible gene expression system for *Bacillus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(1): 303-313.
- [35] MACHADO LFM, CURRIN A, DIXON N. Directed evolution of the PcaV allosteric transcription factor to generate a biosensor for aromatic aldehydes[J]. Journal of Biological Engineering, 2019, 13: 91.
- [36] LIANG YY, LUO J, YANG CH, GUO SN, ZHANG BW, CHEN F, SU KR, ZHANG YL, DONG Y, WANG ZH, FU HD, SUI GC, WANG PC. Directed evolution of the PobR allosteric transcription factor to generate a biosensor for 4-hydroxymandelic acid[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(6): 104.
- [37] TERAMOTO M, HARAYAMA S, WATANABE K. PheS represses gratuitous expression of phenol-metabolizing enzymes in *Comamonas testosteroni* R5[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(14): 4227-4234.
- [38] CHENG F, TANG XL, KARDASHLIEV T. Transcription factor-based biosensors in high-throughput screening: advances and applications[J]. Biotechnology Journal, 2018, 13(7): e1700648.
- [39] DVORAK P, GALVAO TC, PFLUGER-GRAU K, BANKS AM, de LORENZO V, JIMENEZ JI. Water potential governs the effector specificity of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida*[J]. Environmental Microbiology, 2023, 25(5): 1041-1054.
- [40] PARK KH, KIM S, LEE SJ, CHO JE, PATIL VV, DUMBREPATIL AB, SONG HN, AHN WC, JOO C, LEE SG, SHINGLER V, WOO EJ. Tetrameric architecture of an active phenol-bound form of the AAA⁺ transcriptional regulator DmpR[J]. Nature Communications, 2020, 11: 2728.
- [41] RAY S, BANERJEE A. Molecular level biodegradation of phenol and its derivatives through *dmp* operon of *Pseudomonas putida*: a bio-molecular modeling and docking analysis[J]. Journal of Environmental Sciences, 2015, 36: 144-151.
- [42] SCHELL MA, WENDER PE. Identification of the *nahR* gene product and nucleotide sequences required for its activation of the *sal* operon[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 166(1): 9-14.
- [43] SUN YJ, ZHAO XH, ZHANG DY, DING AZ, CHEN C, HUANG WE, ZHANG HC. New naphthalene whole-cell bioreporter for measuring and assessing naphthalene in polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated site[J]. Chemosphere, 2017, 186: 510-518.
- [44] CHAO HJ, ZHOU NY. GenR, an IclR-type regulator, activates and represses the transcription of *gen* genes

- involved in 3-hydroxybenzoate and gentisate catabolism in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(7): 1598-1609.
- [45] ZSCHIEDRICH CP, KEIDEL V, SZURMANT H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(19): 3752-3775.
- [46] ZENG J, SPIRO S. Finely tuned regulation of the aromatic amine degradation pathway in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(22): 5141-5150.
- [47] APPLGATE BM, KEHRMEYER SR, SAYLER GS. A chromosomally based *tod-luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(7): 2730-2735.
- [48] HEITZER A, WEBB OF, THONNARD JE, SAYLER GS. Specific and quantitative assessment of naphthalene and salicylate bioavailability by using a bioluminescent catabolic reporter bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(6): 1839-1846.
- [49] MENN FM, APPLGATE BM, SAYLER GS. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(6): 1938-1942.
- [50] MIN P. Surface display technology for biosensor applications: a review[J]. Sensors, 2020, 20(10): 2775.
- [51] ZHAO S, ZHOU TY, KHAN A, CHEN ZJ, LIU P, LI XK. A novel electrochemical biosensor for bisphenol A detection based on engineered *Escherichia coli* cells with a surface-display of tyrosinase[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 353: 131063.
- [52] ZHANG Z, LIU J, FAN J, WANG ZY, LI L. Detection of catechol using an electrochemical biosensor based on engineered *Escherichia coli* cells that surface-display laccase[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1009: 65-72.
- [53] LIU Z, ZHANG YC, BIAN CC, XIA T, GAO Y, ZHANG XL, WANG HM, MA HY, HU Y, WANG X. Highly sensitive microbial biosensor based on recombinant *Escherichia coli* overexpressing catechol 2,3-dioxygenase for reliable detection of catechol[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 126: 51-58.
- [54] 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.
- [55] BROPHY JAN, VOIGT CA. Principles of genetic circuit design[J]. Nature Methods, 2014, 11: 508-520.
- [56] JIANG T, TENG YX, LI CY, GAN Q, ZHANG JL, ZOU YS, DESAI BK, YAN YJ. Establishing tunable genetic logic gates with versatile dynamic performance by varying regulatory parameters[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(12): 3730-3742.
- [57] AN XY, VOLPETTI F, PETROVA E, FRENCH C, MAERKL SJ, WANG BJ. Cascaded amplifying circuits enable ultrasensitive cellular sensors for toxic metals[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15: 540-548.
- [58] HE JW, ZHANG XY, QIAN YY, WANG QY, BAI YP. An engineered quorum-sensing-based whole-cell biosensor for active degradation of organophosphates[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 206: 114085.
- [59] LIU CJ, YU H, ZHANG BC, LIU SL, LIU CG, LI F, SONG H. Engineering whole-cell microbial biosensors: design principles and applications in monitoring and treatment of heavy metals and organic pollutants[J]. Biotechnology Advances, 2022, 60: 108019.
- [60] SUN SW, PENG KL, SUN S, WANG MX, SHAO YT, LI LX, XIANG JH, SEDJOAH RC AA, XIN ZH. Engineering modular and highly sensitive cell-based biosensors for aromatic contaminant monitoring and high-throughput enzyme screening[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(3): 877-891.
- [61] MENON G, KRISHNAN J. Design principles for compartmentalization and spatial organization of synthetic genetic circuits[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(7): 1601-1619.
- [62] de PAEPE B, PETERS G, COUSSEMENT P, MAERTENS J, de MEY M. Tailor-made transcriptional biosensors for optimizing microbial cell factories[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(4): 623-645.
- [63] OGAWA Y, KATSUYAMA Y, UENO K, OHNISHI Y. Switching the ligand specificity of the biosensor XylS from meta to para-toluic acid through directed evolution exploiting a dual selection system[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(12): 2679-2689.
- [64] JIA XQ, MA YB, BU RR, ZHAO TT, WU K. Directed evolution of a transcription factor PbrR to improve lead selectivity and reduce zinc interference through dual selection[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 67.
- [65] van ROSSUM T, MURAS A, BAUR MJJ, CREUTZBURG SCA, van der OOST J, KENGEN SWM. A growth- and bioluminescence-based bioreporter for the *in vivo* detection of novel biocatalysts[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(3): 625-641.

(本文责编 陈宏宇)