

群体感应基因电路的设计与应用进展

周永胜^{#1}, 王海娇^{#1}, 乔建军^{1,2,3,4}, 财音青格乐^{1,2,3}, 吴胜波^{*1,2}

1 天津大学 化工学院, 天津 300072

2 天津大学浙江研究院(绍兴), 浙江 绍兴 312300

3 天津大学 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

4 天津化学化工协同创新中心合成生物学平台, 天津 300072

周永胜, 王海娇, 乔建军, 财音青格乐, 吴胜波. 群体感应基因电路的设计与应用进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4311-4326.

ZHOU Yongsheng, WANG Haijiao, QIAO Jianjun, Caiyinqinggele, WU Shengbo. Progress in design and application of quorum sensing gene circuits[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4311-4326.

摘要: 群体感应(quorum sensing, QS)是一种细菌协调菌群行为的通信系统。自然界中广泛存在的QS系统通过对外界环境的感知来提升微生物群落生殖繁衍的能力。由于其自主感知和密度依赖的自然特性和模块化、易于工程化改造的特性在合成生物学技术的推动下,取得了快速的发展和应用。QS机制的阐明为基因回路的设计及验证和执行预期的生物功能奠定了基础。然而,如何保证QS基因回路的有效性和功能稳定性是合成生物学应用的重大挑战。因此,本综述中先对自然常见的QS调控机制和基因电路的发展进行整理,然后对其在细胞之间通信中的组装优化进行分析和概括,接着对其在群落中的应用进展进行梳理,最后对QS基因电路如何更好地应用于微生物改造提出了建议和展望。

关键词: 群体感应; 细胞通信; 基因回路; 人工合成菌群; 动态调控

资助项目: 中国博士后基金面上项目(2023M732599); 国家自然科学基金(32300022); 中国创新研究群体基金(21621004)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (2023M732599), the National Natural Science Foundation of China (32300022), and the Fund for Creative Research Groups (21621004).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: wushengbo@tju.edu.cn

Received: 2024-03-18; Accepted: 2024-05-04; Published online: 2024-05-13

Progress in design and application of quorum sensing gene circuits

ZHOU Yongsheng^{#1}, WANG Haijiao^{#1}, QIAO Jianjun^{1,2,3,4}, Caiyinqingge^{1,2,3},
WU Shengbo^{*1,2}

1 School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Zhejiang Institute of Tianjin University, Shaoxing 312300, Zhejiang, China

3 Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Tianjin University, Tianjin 300072, China

4 Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), Tianjin 300072, China

Abstract: Quorum sensing (QS) is a communication system in bacteria that coordinates group behaviors. QS systems widely found in nature enhance the reproductive capacity of microbial communities by sensing the external environment. Due to its natural properties of autonomous perception, density-dependence coupled with modularity, and ease of engineering modification, QS has achieved rapid development and application, facilitated by synthetic biology technology. The elucidation of QS mechanisms has laid the foundation for the design of genetic circuits, which are then applied to verify and perform expected biological functions. However, how to ensure the effectiveness and functional stability of QS gene circuits is a major challenge in synthetic biology applications. Therefore, this review first summarized the natural and common QS regulatory mechanisms and the development of genetic circuits. Subsequently, an analysis and summary of the assembly optimization in intercellular communication were provided, followed by an overview of its application progress in communities. Finally, suggestions and development trends were proposed for the better application of QS genetic circuits in microbial engineering.

Keywords: quorum sensing; cellular communication; genetic circuit; synthetic microbial consortia; dynamic regulation

群体感应(quorum sensing, QS)是细菌通过感知和响应种群密度来协调菌群群体行为的通信方式。细菌通过合成、分泌、释放扩散性小分子调控种群的密度,当信号分子积累到一定的阈值时引起特定基因在转录水平的协调表达,比如生物发光、毒力因子的表达、公共物品的释放和生物被膜的形成等对群体有利的生理行为^[1-4]。自然进化的QS系统应用的信号分子具有丰富的多样性,尤其是革兰氏阳性菌^[5-6]与革兰氏阴性菌^[7-8]之间的群体感应信号分子结构和调控机制存在很大的差异。目前,革兰氏阴性菌中多数以酰基高丝氨酸内酯

(acyl-homoserine lactone, AHL)为信号分子的QS系统得到了广泛研究,其易于设计改造的模块化和密度感知的特质,一方面可以赋予微生物自主调控的多样化智慧功能;另一方面能够高效地设计菌群之间的互动,组装复杂度更高、规模更大的合成生物学基因回路^[9-11]。

天然的QS通信途径有很强的多样性,由于信号分子结构的相似性和转录因子结合力的差异,这些系统之间经常出现不同程度的交叉激活或抑制^[12-13]。在自然进化压力的选择下,充分进化的串扰调控提高了微生物监听和逃避的能力,一定程度上增加了通信网络的冗余

度,提升了自然生态系统的稳定性^[14]。近期的研究^[15]也表明了这种监听能力的存在,其不仅存在于微生物的种内、种间,在宿主和微生物的跨界交流中也扮演了重要的角色。

另外,基于 QS 的人工合成基因回路的开发利用和 QS 调控机制的深入研究相辅相成,分子机制的阐明为 QS 工具箱提供了更丰富的元件^[15-16],人工合成基因回路的组装也为 QS 机制的解析和菌群行为控制提供了强有力的方式^[10,17-18]。此外,微生物群落基于 QS 的通信互作和多样化的代谢环境使微生物组得到更为广泛的应用,比如多环境因子感知的智能药物递送、复杂产物合成途径的合理部署等^[19-22]。

综上, QS 基因电路在单菌和菌群水平上的应用潜力巨大,赋予了研究者通过电路设计同时操纵菌群密度和细胞行为的能力。因此,本综述对 QS 的电路进行系统的调研和分析,对基因电路的优化方法进行总结,旨在推进生物技术在更多领域实现各种 QS 回路的高效应用。

1 单菌中的 QS 基因回路的设计及应用

细菌的群体感应是一种利用生物小分子进行通信并协调和完成群体性行为的过程。QS 以密度依赖型的方式感知微生物组成的特征和易于设计改造的模块化特质,从而广泛地应用于合成生物学基因回路的设计。群体感应耦合遗传裂解开关、代谢开关、工程化逻辑门等可以构建具备多样化功能的工程基因线路,实现工程菌株的定量可控。

1.1 基于 QS 的同步裂解回路

群体感应系统组装的同步裂解回路(synchronized lysis circuit, SLC)在宿主疾病的靶向治疗和代谢生产方面具有巨大的应用潜

力。Din 等^[23]采用了 Lux 系统和 ϕ X174E 元件,在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中使用耦合的正反馈回路和负反馈回路设计了 QS-SLC (图 1A),他们采用微流控装置证明了此工程裂解菌株可在小鼠体内定殖并可实现周期性的重复给药。受到上述设计系统的启发,Chowdhury 等^[24]设计了一种含有 QS-SLC 的非致病大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株,该菌株定殖于肿瘤细胞,在达到群体密度阈值时诱导噬菌体裂解蛋白 ϕ X174E 的表达,使细菌裂解并释放组成型表达生产的抗 CD47 阻断纳米抗体。这项研究实现了纳米抗体的稳定表达并在细菌裂解后释放到细胞外,以刺激抗肿瘤免疫并促进肿瘤消退。Gurbatri 等^[25]为了降低质粒丢失的风险,将 QS-SLC 整合到益生菌 EcN 细菌基因组上,与免疫疗法相结合,实现了程序性死亡受体(programmed death-ligand 1, PD-L1)和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA-4)拮抗剂有效、可控、局部持续地释放。常用于 QS 联用的裂解蛋白除了 ϕ X174E,还有 CcdB 杀伤蛋白与其对应的解毒蛋白 CcdA。本课题组 Wu 等^[26]用 CcdB 设计 QS-SLC 系统从而构建了生产红景天苷前体酪醇的苷元(aglycone, AG)菌株。AG 菌株中的 CcdB 杀伤蛋白能够可控地限制菌体的生长,以防其生长过快而与红景天苷生产菌株争夺有效资源,同时 AG 菌株还通过裂解的方式释放 β -葡萄糖苷酶(beta-glucosidase, BGL),为红景天苷的生产额外提供了前期生长资源和充足的后期产物生产所需的碳源,从而大幅提高了产量。

1.2 基于 QS 的代谢开关

QS 作为一种密度依赖型的生长自适应调控系统,赋予微生物在不同条件下对群体最有益的生长特性。借助 QS 系统的这一天然特性,

基于 QS 的代谢拨动开关(metabolic toggle switch, MTS)被广泛地应用于设计代谢途径独立的动态调控策略。QS-MTS 能使得工程菌株根据微生物密度自主调节合成途径的代谢通量,以最大限度地提高产量并减少人类对发酵的监督。除此之外, QS 利用自体诱导信号分子作为动态调控的媒介,在各种多样化的代谢环境中都具有良好的适用性。

群体感应 在细胞密度超过一定阈值时,会激活相关的胞内特定基因的表达,利用该特性设计的 QS-MTS 广泛应用于动态调控。Soma 等^[27]利用 LuxI/LuxR 系统设计了 QS 依赖型代谢通量的重新定向策略,将异丙醇的产量提升了 2 倍(图 1B)。Lux 型群体感应系统还可以耦合负反馈调控类型的元件在高密度激活的情况下逆转特定目的基因的上调,实现不同方向的调控。Gao 等^[28]利用 LuxI/LuxR 系统触发 Cre 重组酶的表达,利用 Cre 重组酶靶向下调木糖异构酶 *xylA*,实现菌株生长和生物生产的解耦合。

不同于应用最广泛的 Lux 型系统的正反馈调节, Esa 系统在达到特定细胞密度后, EsaR 与不同启动子的结合能够产生激活和抑制 2 种不同的调控模式。Gupta 等^[29]采用了 Esa QS 系统以调节细胞生长和肌醇生产之间的动态通量变化,他们将 Esa 系统整合到宿主基因组,利用 Esa 系统高密度抑制型 PesaS 启动子靶向调节糖酵解的关键基因 *pfkA* (磷酸果糖激酶 1 相应的基因位点为 *pfkA*),实现了菌株完全自主从“生长模式”切换到“生产模式”。此外,研究团队进一步探索了此技术在工业应用上的前景,在 3 L 生物反应器中采用一致培养条件进行培养,产物中肌醇的比滴度提高了近 10 倍,葡萄糖二酸的比滴度提高了近 5 倍,表明了 QS-MTS 组件在工业应用上的可拓展性^[29]。Doong 等^[30]

使用分层控制的策略来动态调节其细胞生长和 D-葡萄糖酸生产,其中一个策略是基于途径独立的 Esa QS 系统,在 AHL 浓度达到阈值时可将葡萄糖利用从糖酵解转变为产生 D-葡萄糖酸。EsaR 受体在不同浓度的信号分子下可以产生抑制和激活的双重作用。这项工作构建了有效的基因回路,在细胞水平实现对菌体生长和代谢表达的精确调控,成功实现了碳代谢通量的定向引导^[30]。类似于 Esa 系统,来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 Phr60-Rap6^[31]同样具有双功能,被用来设计双向的代谢拨动开关,该策略的应用使得甲萘醌-7 的产量提高了 40 倍。

1.3 基于 QS 的逻辑门

逻辑门常用于集成电路的组装,人工合成的基因电路也常需要用到逻辑门,而基于 QS 的逻辑门已应用于 AND、OR、NOR、NAND 和 XOR 等,通过将电子电路中逻辑门与生物系统的正负反馈回路、指示基因和 QS 系统等相结合,衍生出了大量基于 QS 的逻辑门的应用。

例如, Tominaga 等^[32]基于原核转录激活因子通过定向进化的方式在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中以 β -胡萝卜素合成途径的第一个和最后 2 个关键酶作为调控靶基因,构建了双输入 AND 门,证实了 QS 基因开关与其他代谢物响应传感器之间的正交性和即插即用性。Hu 等^[33]在奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*) MR-1 *mtrA* 敲除突变体中构建了基于 Lux QS 模块的 AND 逻辑门; IPTG 诱导模块和 QS 模块构成 AND 逻辑门,当 IPTG 和 QS 信号共同输入时激活 *mtrA* 的表达,促进细胞外电子转移,实现了逻辑门在微生物燃料电池方面的应用;表征明确的 LuxI/LuxR 型 QS 系统与逻辑门集成在一起,从而表明了 QS 广泛的应用和可组合性。Tabor 等^[34]基于 Lux QS

设计了(AHL AND (NOT (NOT light)))逻辑结构(图 1C), 微生物群落能精准识别明暗边界并定量感知光的图像。定量精准的基因回路的组合, 有助于编程更复杂的群落行为, 并为进一步自下而上调控网络的研究做了铺垫。Boehm 等^[35]设计了三色合成基因回路(图 1D), 耦合 QS 启动子和分裂活性的噬菌体 T7RNA 聚合酶, 构建了分层的渐进 AND 逻辑门。控制质粒包含 2 个双顺反子操纵子, 只有 2 种信号分子同时存在时, 完整的双顺反子控制质粒才会产生红色荧光。此研究为跨细胞群体的分层模式表征编程打开了一扇大门, 原则上, AND 门可以使用 n 个正交信号系统进行迭代, 以生成 $(2n)-1$ 个不同的域。

QS 系统在合成生物学工具不断扩充的同时也实现了协同互补。在单菌的改造中, QS 不仅可以解决代谢生产中面临的各种挑战, 以途径独立的方式控制代谢通量, 优化碳源分配, 还能耦合各种外界刺激(如 pH、氧气、生长状态等)、不同水平的正交基因调控方式(如 sRNA、CRISPRi/a、蛋白酶和降解标签等)实现多目的基因的不同调控方向和多样化的功能执行。单菌的多样化改造为进一步探究和设计菌群之间的通信互作铺垫了基础, 很大程度上促进了 QS 在自然群落发挥重要作用和功能的揭示。

2 菌群中 QS 基因回路的设计及应用

为保证通信信息高保真地传输并且能够具有稳健的可预测表现, 正交性是群体感应应用于菌群系统必不可少的特征。一系列的研究都在定量表征筛选和调整群体感应系统, 以获得正交的群体感应通道, 为实现菌株的密度控制提供了丰富的工具箱^[2,36]。

2.1 菌群 QS 基因回路的设计

QS 系统之间的串扰广泛存在, 近年来研究者们致力于减少 QS 串扰相互作用, 正交的 QS 工具作为合成生物学的重要组合工具之一, 被广泛应用于微生物群落的构建和应用^[20,37-38]。当单个细胞中同时使用多个 QS 系统或生物传感器时, 需要确保各个元件之间的正交性。例如, 在大肠杆菌中生产特定的中链脂肪酸, 可用 2 个完全正交的 QS 系统以便于部署自动且动态的全局资源分配系统^[39]。Kylilis 等^[36]还开发了一种软件工具, 可以自动识别 2-4 个不同 QS 系统之间的正交通信组合; 此外, 该研究确保了 QS 元件搭建的人工合成途径在液体和固体培养物中几乎无串扰; 最后确定了两组正交的合酶-调节子(BjaI/BjaR+ EsaI/TraR 和 LasI/LasR+ EsaI/TraR), 它们在非天然大肠杆菌 BL21 中表达时几乎不存在串扰现象。这些成果扩展了合成微生物群落表征元件的工具箱。Wu 等^[40]构建和利用了 QS 通信网络(quorum sensing connecting network, QSCN)对人工合成菌群进行编程, 剖析菌群内部隐藏的稳定性机制并在此基础上设计复杂的微生物群落来执行单细胞难以完成的各种任务^[41]。

具体来说, SLC 可以实现群体密度的周期性变化, 有望应用于周期性药物输送。振荡电路对于维持群落的稳定性具有重要作用, 可以有效抵抗外部噪声的影响。Chen 等^[42]使用正交 QS 系统(Rhl 和 Cin)耦合负反馈调节和附加的负反馈回路来构建抑制菌株和激活菌株, 以实现群体密度的动态调节(图 2A)。Scott 等^[43]开发了一种正交种群密度控制系统, 此系统由 2 个 QS 系统(Lux 和 Rpa)组成, Lux 和 Rpa 系统之间几乎不存在串扰现象, 这种系统可以将 2 种沙门氏菌的种群密度维持在稳定状态(图 2B)。Stephens 等^[44]重新设计了大肠杆菌细胞, 开发了

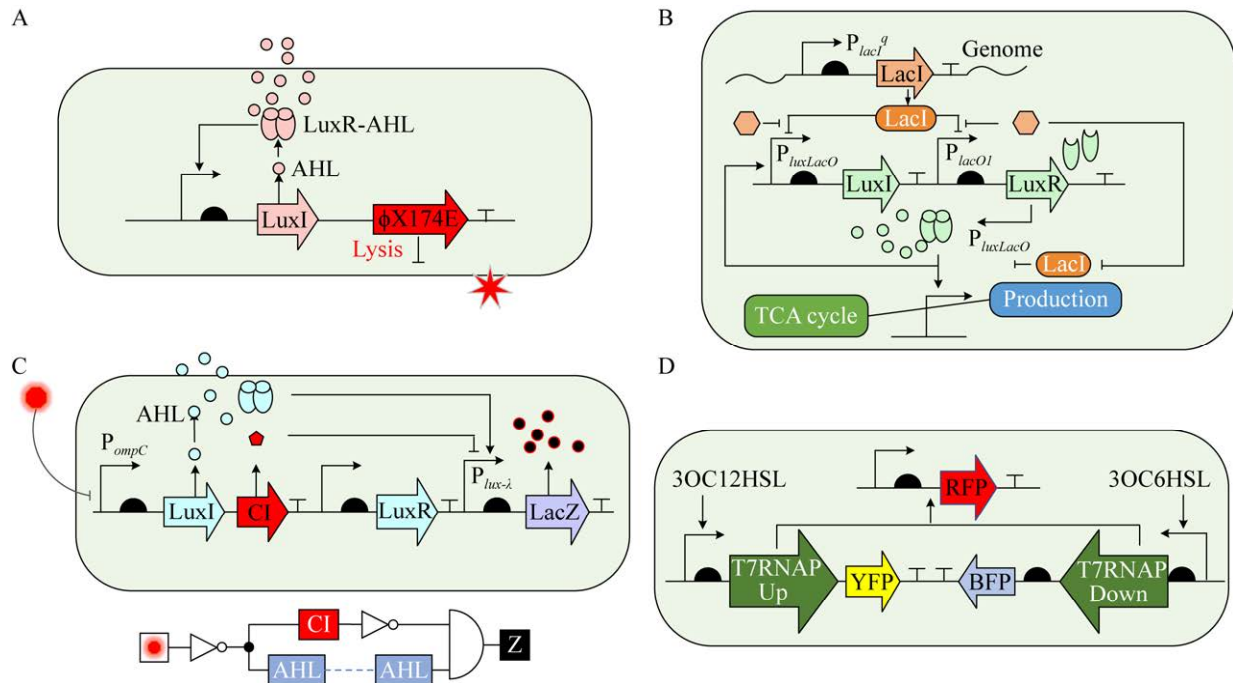


图 1 单菌中的 QS 基因回路 A: QS-SLC, LuxI 分泌 AHL 到胞外, 当环境中 AHL 的浓度达到一定阈值, AHL 将与胞内 LuxR 蛋白结合为 LuxR-AHL 复合物, 诱导噬菌体裂解蛋白 ϕ X174E 表达, 细菌裂解. B: QS-MTS, 前期 LacI 抑制 LuxI 和 LuxR 的表达, 碳源主要用于细菌生长, 当种群密度达到一定阈值, QS 模块促进了细菌碳源分配从细胞分配转换到产物合成. C: (AHL AND (NOT (NOT light))) 逻辑门, 在无光的区域内, LuxI 分泌 AHL, CI 阻遏 LacZ 的表达, 明暗交界处, AHL 与在明暗交界处的细菌结合, 诱导 LacZ 的表达, 产生黑色素. D: AND 逻辑门, 3OC12HSL 诱导 T7RNAP 上游酶和黄色荧光表达, 3OC6HSL 诱导 T7RNAP 下游酶和蓝色荧光表达, T7RNAP 的 2 个片段组合成完整酶后诱导红色荧光基因的表达

Figure 1 QS genetic circuits in single strain. A: QS-SLC. LuxI secretes AHL extracellularly. When the concentration of AHL in the environment reaches a certain threshold, AHL would combine with the intracellular LuxR protein to form a LuxR-AHL complex, leading to bacterial lysis. B: QS-MTS. LacI inhibits the expression of LuxI and LuxR in the early stage, and the carbon source is mainly used for bacterial growth. When the population density reaches a certain threshold, the QS module promotes the conversion of bacterial carbon source allocation from cell growth to product synthesis. C: (AHL AND (NOT (NOT light))) Logic gate. In the dark area, LuxI secretes AHL, CI inhibits the expression of LacZ. AHL combines with bacteria at the junction of light and dark to induce the expression of LacZ and produce melanin. D: AND logic gate. 3OC12HSL induces T7RNAP upstream enzyme and yellow fluorescence expression, 3OC6HSL induces T7RNAP downstream enzyme and blue fluorescence expression, and the two fragments of T7RNAP are combined into a complete enzyme to induce the expression of red fluorescent gene.

第一个基于 AI-2 (autoinducer-2, AI-2)信号分子的平台, 可以自主、特异性地调节微生物群落的构成。第一个翻译菌株接收 AI-2 并产生 AI-1

(autoinducer-1, AI-1), 而第二个控制菌株则在 AI-1 的驱动下借助糖转运蛋白 ptsH 的转录增强促进细胞的生长(图 2C)。

此外, 正交 QS 系统还可以与一些裂解基因耦合以实现时间和空间尺度上的细菌调控^[45]。例如, Miano 等^[45]设计和表征了对香豆酸介导的诱导型 QS (inducible QS, iQS)回路的动力学, 并将裂解基因与 iQS 耦合以创建诱导型同步裂解回路(inducible synchronized lysis circuit, iSLC) (图 2D)。为了验证 iQS 调节复杂群落的可用性, 研究者们开发了基于 QS 的 iSLC 和非诱导型 SLC 菌株的共培养来调节种群组成^[45]。

为了探究信号分子局部扩散引起的时空同步机制, Kim 等^[46]利用正交 QS 信号分子构建由激活菌株和抑制菌株组成的时空振荡微生物群落。结果表明, 激活菌株利用 QS 机制调节阻遏蛋白, 使形成的局部正反馈信号放大, 对于长期时空同步至关重要。这些研究证明了多样化的 QS 系统对细菌种群密度的调节和混菌的稳定周期性振荡具有重要意义。

2.2 菌群 QS 基因回路的应用

不同的遗传电路可以在微生物群落中执行各种计算功能, 如逻辑判断、计数、细胞记忆、循环振荡等, 用来控制微生物动力学并协调群落组成。基于正交 QS 的电路在细胞的动态控制中发挥着重要作用, 可应用于精准医疗^[47]和智能生物制造^[48]的开发。

为了实现跨物种种群通信, Wang 等^[49]在发送菌株大肠杆菌和接受菌株酿酒酵母中分别设计了 LasI 和 VP16-LasR 模块, 利用 QS 信号分子易于扩散的特性在人工设计的微球包裹的空间隔离室实现了有效通信。

乳酸菌的 QS 系统可以调节生物被膜、细菌素合成、环境应激等生理特性, 而且被认为是安全的, 所以其成为了合成微生物群落的常用成员之一。Nisin 是一种乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)产生的细菌素, 不仅可以作为天然抗菌肽, 还是乳酸菌群体感应系统的自

身诱导信号肽, 可以被用来设计各种基因回路。Kong 等^[50]设计了 6 种不同的成对相互作用关系, 表明了 QS 在人工自定义的合成生态菌群中可以组合其他反馈元件设计可控、可预测的结构。利用充分解析的信号级联和合成生物学技术开发新型的生物传感器, 在微生物智能诊断和治疗上有巨大的应用潜力^[50]。工程化改造乳酸乳球菌的双组分系统^[51], 利用杂合受体不仅可以特异性感知霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)专有的自体诱导物 CAI-1, 还能感知磷酸化信号以调节抗菌肽 nisin 的表达强度, 用于抑制霍乱弧菌。病原体的毒力因子表达离不开 QS 信号分子的调节, 但群体感应系统存在广泛的串扰, 受各种物理化学因素的影响。例如, pH、温度、自体诱导剂生产者细胞的生态位分布、代谢状态和信号反应扩散等因素。未来的努力可能需要在解析自然存在的 QS 调控模式的基础上纳入空间分布和环境变量等外部因素。

相较于生物合成领域其他类型的动态调控策略, QS 具有可以提供不依赖合成途径、适用于多种微生物底盘细胞的特点。Jiang 等^[52]组合优化了 Las 和 Tra 群体感应系统, 实现了两者在启动子水平和信号分子水平上的正交性。为了证明正交群体感应系统的可用性, 他们构建了一个自动延迟级联电路, 通过使用不同的荧光基因实现细胞内基因的顺序表达。该电路设计有望应用于动态代谢调节策略。为了优化 2 株交叉喂养大肠杆菌共培养生产红景天苷系统生长不均衡的问题, Wu 等^[26]结合理论建模分析和基因回路设计将不同的 QS 系统组合调控应用于混菌培养的动态调控中, 开发了一套新型的混菌组成和代谢控制系统来协调混菌体系的代谢生产, 较先前的产量提高了 76%。以上提到的 QS 系统都围绕 AHL 型系统进行应用, 而且利用辅助基因调控子(accessory gene regulator, Agr)

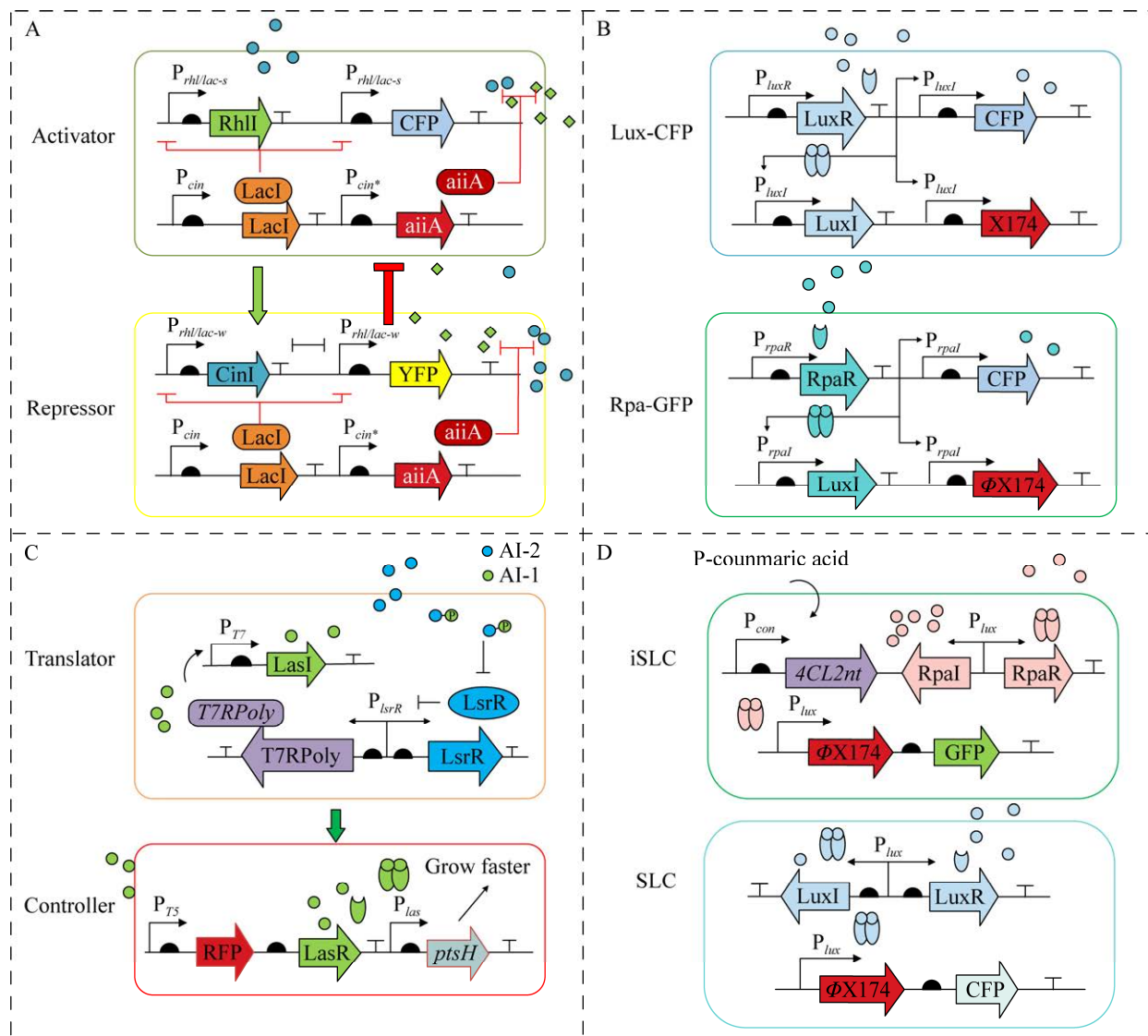


图 2 正交的细胞间通信示意图 A: 人工合成微生物群落振荡器的示意图, 包括基于 *rhl* 和 *cin* QS 系统正交组合的激活菌株和抑制菌株. B: 采用正交 *Lux* 和 *Rpa* QS 系统将不同鼠伤寒沙门氏菌的细胞生长与裂解基因的调控耦合起来. C: 基于 AI-1 和 AI-2 的细胞信号翻译器的细菌共培养示意图. 翻译菌株产生 AI-1 并感知 AI-2, 同时控制菌株在感应到 AI-1 后产生 HPr, 从而加速其细胞生长. D: 基于正交诱导型同步裂解回路(inducible synchronized lysis circuit, iSLC)和非诱导型(synchronized lysis circuit, SLC) QS 系统的细胞间通信示意图

Figure 2 Diagram of orthogonal intercellular communication. A: Synthetic microbial community oscillator, including activating strains and inhibitory strains based on orthogonal QS combinations of *rhl* and *cin* systems. B: Using orthogonal *Lux* and *Rpa* QS systems to couple cell growth and lysis genes of different *Salmonella typhimurium* strains. C: Bacterial co-culture based on AI-1 and AI-2 cell signal translators. The translating strain produces AI-1 and senses AI-2, while the control strain produces HPr after sensing AI-1, thereby accelerating its cell growth. D: Intercellular communication based on orthogonal inducible synchronized lysis circuit (iSLC) and non-inducible synchronized lysis circuit (SLC) QS systems.

QS 系统在大肠杆菌和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)之间实现了种间信号交流^[53]。另一项研究中人工构建的异源 QS 信号通路 with Ypd1-Skn7^[54]信号转导通路相结合,在真菌酵母中用于动态调控蛋白质降解,并将该回路用于降解 Erg9 来提高 α -法尼烯的产量。

综上所述,在表 1 中列出了基于各种 QS

系统构建的针对不同应用的微生物生态系统的典型案例,案例时间跨度为从 2002–2023 年。

另外,大多数案例都集中在大肠杆菌相关的微生物生态系统,而且 AHL 型 QS 系统是各种应用中最常见的组件。预计未来会有更多研究者致力于构建细胞表型以及正交、精确、可扩展和可持续控制的基因回路^[71]。

表 1 基于群体感应分子机制构建的微生物生态系统

Table 1 Microbial ecosystem constructed based on quorum sensing molecular mechanism

Year	Quorum sensing system	Consortia	Application	Reference
2002	Lux	<i>Escherichia coli</i>	Synchronizing genetic relaxation oscillators	[55]
2005	Lux	<i>E. coli</i>	Multicellular system for programmed pattern formation	[56]
2008	Lux, Las	<i>E. coli</i>	Predator-prey ecosystem simulation	[57]
2009	Lux, Las	<i>E. coli</i>	Spatiotemporal investigation	[58]
2011	Las, Rhl	<i>E. coli</i>	Robust multicellular computing	[59]
2012	Las	<i>E. coli</i>	Biofilm formation & dissipation control	[60]
2013	Indole	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Enhance antibiotic tolerance	[61]
2014	Las, Rhl	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Combinatorial QS in social environment	[62]
2015	Cin, Rhl	<i>E. coli</i>	Emergent genetic oscillations	[42]
2016	Lux, Las, Rpa, Tra	<i>E. coli</i>	QS communication modules	[63]
2017	Lux, Rpa	<i>S. typhimurium</i>	Stabilized microbial ecosystem construction based on QS-SLC	[43]
2018	AIP (nisin)	<i>Lactococcus lactis</i>	Nisin-based consortia build with different ecological relationships	[50]
2018	Rhl, Lux, Tra, Las, Cin, Rpa	<i>E. coli</i>	Coordinate system behavior at community level	[36]
2019	Lux	<i>E. coli</i>	Engineered population dynamics increase genetic stability	[64]
2019	Cin, Rhl	<i>E. coli</i>	Long-range temporal coordination of gene expression	[46]
2020	Cin, Rhl	<i>E. coli</i>	Majority sensing in synthetic consortia	[65]
2020	Lux, Rpa	<i>E. coli</i>	Inducible communications for tunable dynamics in microbial communities	[45]
2020	AIP	<i>L. lactis</i>	Investigation on how interaction variability shape microbial succession	[50]
2021	Bacteriocin QS	<i>E. coli</i>	Automated design of synthetic microbial communities	[66]
2021	Lux, Las	<i>E. coli</i>	Combinational QS devices for population dynamic control	[26]
2022	Las	<i>E. coli</i>	Engineering consortia by polymeric microbial swarmbots	[49]
2022	Lux	<i>E. coli</i>	Spatial partitioning investigation	[67]
2022	Lux, Las, Rpa, Tra	<i>E. coli</i>	Cross-talk QS for dynamic regulation	[68]
2023	Lux, Las, Tra	<i>E. coli</i>	Dynamically adjustable cascade circuit	[69]
2023	Sal	<i>E. coli</i>	A self-induced salicylic acid QS system	[70]

3 小结与展望

在众多的 QS 应用中,大多数研究还是以传统的试错型进行的设计和优化,往往存在部分元件失效或者基因回路负荷过重导致不能长期稳定的情况。可能的原因有以下三点:首先是异源组装的 QS 元件序列由于存在重复序列或者其他功能元件的重复使用,在染色体或者质粒上发生同源重组导致的功能故障。因此,在相应的 QS 电路中使用序列多样性的大型元件库^[72]一定程度上可以避免同源重组。同时,采用诱导性的强启动子^[73]和强终止子^[74]有助于 QS 回路的遗传稳定。其次, QS 电路失效也有可能是因为不同模块的组装不当。比如顺反子之间的不完全隔离可能会将本应独立调节的基因表达联系起来,并可能导致未诱导目的基因的渗漏表达。这恰巧也是 QS 在很多菌株应用中的常见问题。最近一项研究^[75]开发了一种预测模型以 87.5%的准确率识别大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的 Rho-独立终止子,这将有助于对大型原核生物终止子库的开发,以及 QS 基因回路更高效地应用。模块组装不当的另一个常见问题是 QS 电路的上游输出信号无法达到激活下游串联电路所需的阈值。在基于 QS 的逻辑门中,这种参数不匹配会导致整个电路的动态输出范围减小或者回路功能丧失,可通过选择可调整阈值的部件来纠正,如选择适当的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)和启动子组合以达到所需的表达水平^[76-77]。当 QS 调节因子之间能与彼此的启动子相互作用时会发生串扰,这种串扰可能导致回路拓扑结构的改变以及错误的输出表达^[78]。需要设计组合实验测试启动子和调控元件的动态响应来筛选正交性较好的组合^[79-81]。最后,容易被忽略的是,除了元件之间的不期望的交叉调控, QS 回路的

功能还受到环境的影响,其中包括宿主代谢环境、细胞间的相互作用和空间异质性。异源表达的 QS 电路元件可能以意想不到的方式与内源元件相互作用。QS 电路元件的表达需要宿主分配细胞内资源,可能导致宿主的代谢负担,电路元件编码的产物可能对细胞而言是有毒成分。在进化压力下,细胞的突变体可通过抛弃产生负担或者有毒成分的电路,从而具有适应性优势成为主要群体。因此,为了更高效地使用 QS 电路,还需要在不同的宿主中进行 QS 电路的优化与适配,从而减少代谢负担和细胞毒性。

合成生物学的工程设计原理促进了遗传电路编程能力的提高,未来基因回路的设计会向着自动化和模型化的趋势发展并推动着更为广泛的应用场景^[82-83]。传统的方法通过基于先验知识或一般性设计原则进行的突变改造或者组合替换的方法,只在有限的动态范围内可利用,难以满足 QS 系统与合成生物学调控工具箱的大量需求和多功能特性。近年来,为了满足高通量需求,遗传电路的合成逐渐从人工设计转向生物设计自动化(bio-design automation, BDA)工具的开发和使用,如 Double Dutch^[84]、Cello^[85]、Galaxy-SynBioCAD^[86]。例如,Cello 是一款自动化设计基因回路的软件,基于输入传感器(例如化学分子诱导系统)、回路功能(如逻辑真值表),以及相应底盘细胞中的用户约束文件(user constraint file, UCF),自动将目标功能基因回路编译成 DNA 序列^[87]。Jones 等^[85]将 Cello 架构升级为 Cello 2.0,以适应更多场景的应用,未来 Cello 与 QS 基因电路的结合或许能够灵活地描述 QS 逻辑门的结构及其动态行为的表征。随机回路扰动(random circuit perturbation, RACIPE)^[88]方法能在无详细动力学参数的条件下探索基因调控回路的稳健动态特征。RACIPE

未来也可以与 QS 的基因回路相结合, 将网络拓扑结构作为唯一输入, 生成具有不同随机参数的电路模型集合, 并通过统计分析确定其稳健动态特性。生物模型选择系统 (biomodel selection system, BMSS) 是基于常微分方程建立的自动生物模型选择系统, 可为 QS 电路提供瞬态的动态特性描述, 也可用于 QS 电路的设计与优化, 从而支持 QS 相关的生物模型的自动拟合和选择过程, 提供一种自动化获得最佳生物模型的方法^[89]。SYNBADm^[90]与 QS 电路的结合可以有效地处理高复杂性的 QS 电路, 并可以通过多目标优化考虑多个设计标准。此外, 它还提供灵活的设计功能, 即用户可以定义建模框架、组件库和目标性能函数。同样, 考虑微生物相互作用的复杂性, 微生物生态系统的分析和设计也需要开发各种系统级方法、基于模型的框架或计算工具。例如, 微生物组建模工具箱 2.0^[91]、COMETS^[92]、FLYCOP^[93]和 AutoCD^[67]。此外, 借助微生物群落的设计-构建-测试-学习 (design-build-test-learn, DBTL) 工程设计原理^[94], 微生物组工程已广泛应用于许多领域, 如分布式生物计算^[95]、微生态疗法^[96]、代谢工程^[97]和生物质降解^[98]等。

综上, 提高群体感应基因回路运行的长期功能稳定性需要综合考虑以下四点。首先是构建用到 QS 模块特征, 便于进行扩展组装, 减弱 QS 元件之间意料之外的串扰, 利用热力学或者动力学模型可以很大程度上捕捉特定元件动态特性, 尤其是利用机器学习的高通量 DNA 序列识别和调控操纵子的性能优化, 将会极大地扩充符合功能需求的 QS 元件库。其次是自动化设计软件和高通量的实验表征技术可以快速识别符合预期需求的回路拓扑结构和参数。当然, 通用性更强的 QS 回路组装标准和设计规则^[99]的应用可以创建预测性更好的计算模型,

在一定程度上有助于异源 QS 回路功能需求与宿主维持生长适应度的资源分配。最后, 要通过提高菌株的环境耐受性和生物安全性提高 QS 基因回路在实际应用中的可靠性^[100]。总之, QS 基因回路的稳定性表达需要综合考虑元件实现模块化、局部节点的精确调节和动态范围的优化、整体 QS 回路的拓扑结构设计以及其与宿主和环境的交互作用的适配。

REFERENCES

- [1] WANG MZ, LIAN YL, WANG YJ, ZHU L. The role and mechanism of quorum sensing on environmental antimicrobial resistance[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 322: 121238.
- [2] TEKEL SJ, SMITH CL, LOPEZ B, MANI A, CONNOT C, LIVINGSTONE X, HAYNES KA. Engineered orthogonal quorum sensing systems for synthetic gene regulation in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 80.
- [3] VASHISTHA A, SHARMA N, NANAJI Y, KUMAR D, SINGH G, BARNWAL RP, YADAV AK. Quorum sensing inhibitors as therapeutics: bacterial biofilm inhibition[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2023, 136: 106551.
- [4] WANG YS, BIAN ZR, WANG Y. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(19): 6365-6381.
- [5] MAHA SWETHA BR, SARAVANAN M, PIRUTHIVRAJ P. Emerging trends in the inhibition of bacterial molecular communication: an overview[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2024, 186: 106495.
- [6] MAJDURA J, JANKIEWICZ U, GAŁĄZKA A, ORZECZOWSKI S. The role of quorum sensing molecules in bacterial-plant interactions[J]. *Metabolites*, 2023, 13(1): 114.
- [7] RUHAL R, KATARIA R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria[J]. *Microbiological Research*, 2021, 251: 126829.
- [8] XIAO YP, ZOU HC, LI JJ, SONG TX, LV WT, WANG W, WANG ZY, TAO SY. Impact of quorum sensing signaling molecules in gram-negative bacteria on host cells: current understanding and future perspectives[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2039048.

- [9] TAKETANI M, ZHANG JB, ZHANG SY, TRIASSI AJ, HUANG YJ, GRIFFITH LG, VOIGT CA. Genetic circuit design automation for the gut resident species *Bacteroides thetaiotaomicron*[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 962-969.
- [10] HONJO H, IWASAKI K, SOMA Y, TSURUNO K, HAMADA H, HANAI T. Synthetic microbial consortium with specific roles designated by genetic circuits for cooperative chemical production[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 268-275.
- [11] SON HI, WEISS A, YOU LC. Design patterns for engineering genetic stability[J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2021, 19: 100297.
- [12] WU L, LUO YB. Bacterial quorum-sensing systems and their role in intestinal bacteria-host crosstalk[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 611413.
- [13] LI KY, LY K, MEHTA S, BRAITHWAITE A. Importance of crosstalk between the microbiota and the neuroimmune system for tissue homeostasis[J]. *Clinical & Translational Immunology*, 2022, 11(5): e1394.
- [14] SANDERS JG, AKL H, HAGEN SJ, XUE BK. Crosstalk enables mutual activation of coupled quorum sensing pathways through “jump-start” and “push-start” mechanisms[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 19230.
- [15] MILLER T, PATEL K, RODRIGUEZ C, STABB EV, HAGEN SJ. Dimension-reduction simplifies the analysis of signal crosstalk in a bacterial quorum sensing pathway[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 19719.
- [16] GROB A, Di BLASI R, CERONI F. Experimental tools to reduce the burden of bacterial synthetic biology[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2021, 28: 100393.
- [17] XIA PF, LING H, FOO JL, CHANG MW. Synthetic genetic circuits for programmable biological functionalities[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107393.
- [18] LV YK, QIAN S, DU GC, CHEN J, ZHOU JW, XU P. Coupling feedback genetic circuits with growth phenotype for dynamic population control and intelligent bioproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 109-116.
- [19] BOO A, LEDESMA AMARO R, STAN GB. Quorum sensing in synthetic biology: a review[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2021, 28: 100378.
- [20] STEPHENS K, BENTLEY WE. Synthetic biology for manipulating quorum sensing in microbial consortia[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(8): 633-643.
- [21] GU PF, MA QQ, ZHAO S, GAO J, LI CT, ZHOU H, JIANG SX, LI Q. Application of quorum sensing system in microbial synthesis of valuable chemicals: a mini-review[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 38(11): 192.
- [22] COQUANT G, AGUANNO D, PHAM S, GRELLIER N, THENET S, CARRIÈRE V, GRILL JP, SEKSIK P. Gossip in the gut: quorum sensing, a new player in the host-microbiota interactions[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2021, 27(42): 7247-7270.
- [23] DIN MO, DANINO T, PRINDLE A, SKALAK M, SELIMKHANOV J, ALLEN K, JULIO E, ATOLIA E, TSIMRING LS, BHATIA SN, HASTY J. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery[J]. *Nature*, 2016, 536: 81-85.
- [24] CHOWDHURY S, CASTRO S, COKER C, HINCHLIFFE TE, ARPAIA N, DANINO T. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25: 1057-1063.
- [25] GURBATRI CR, LIA I, VINCENT R, COKER C, CASTRO S, TREUTING PM, HINCHLIFFE TE, ARPAIA N, DANINO T. Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies[J]. *Science Translational Medicine*, 2020, 12(530): eaax0876.
- [26] WU SB, XUE YT, YANG SJ, XU CY, LIU CJ, LIU X, LIU JH, ZHU HJ, ZHAO GR, YANG AD, QIAO JJ. Combinational quorum sensing devices for dynamic control in cross-feeding cocultivation[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 186-197.
- [27] SOMA Y, HANAI T. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 7-15.
- [28] GAO C, GUO L, DING Q, HU GP, YE C, LIU J, CHEN XL, LIU LM. Dynamic consolidated bioprocessing for direct production of xylonate and shikimate from xylan by *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 60: 128-137.
- [29] GUPTA A, REIZMAN IMB, REISCH CR, PRATHER KLJ. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35: 273-279.
- [30] DOONG SJ, GUPTA A, PRATHER KLJ. Layered dynamic regulation for improving metabolic pathway

- productivity in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(12): 2964-2969.
- [31] CUI SX, LV XQ, WU YK, LI JH, DU GC, LEDESMA-AMARO R, LIU L. Engineering a bifunctional Phr60-Rap60-Spo0A quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(8): 1826-1837.
- [32] TOMINAGA M, NOZAKI K, UMENO D, ISHII J, KONDO A. Robust and flexible platform for directed evolution of yeast genetic switches[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1846.
- [33] HU YD, YANG Y, KATZ E, SONG H. Programming the quorum sensing-based AND gate in *Shewanella oneidensis* for logic gated-microbial fuel cells[J]. Chemical Communications, 2015, 51(20): 4184-4187.
- [34] TABOR JJ, SALIS HM, SIMPSON ZB, CHEVALIER AA, LEVSKAYA A, MARCOTTE EM, VOIGT CA, ELLINGTON AD. A synthetic genetic edge detection program[J]. Cell, 2009, 137(7): 1272-1281.
- [35] BOEHM CR, GRANT PK, HASELOFF J. Programmed hierarchical patterning of bacterial populations[J]. Nature Communications, 2018, 9: 776.
- [36] KYLILIS N, TUZA ZA, STAN GB, POLIZZI KM. Tools for engineering coordinated system behaviour in synthetic microbial consortia[J]. Nature Communications, 2018, 9: 2677.
- [37] WANG S, PAYNE GF, BENTLEY WE. Quorum sensing communication: molecularly connecting cells, their neighbors, and even devices[J]. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2020, 11: 447-468.
- [38] MA YT, BUDDE MW, MAYALU MN, ZHU JQ, LU AC, MURRAY RM, ELOWITZ MB. Synthetic mammalian signaling circuits for robust cell population control[J]. Cell, 2022, 185(6): 967-979.e12.
- [39] WU JJ, BAO MJ, DUAN XG, ZHOU P, CHEN CW, GAO JH, CHENG SY, ZHUANG QQ, ZHAO ZJ. Developing a pathway-independent and full-autonomous global resource allocation strategy to dynamically switching phenotypic states[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5521.
- [40] WU SB, FENG J, LIU CJ, WU H, QIU ZK, GE JJ, SUN SY, HONG X, LI YK, WANG XN, YANG AD, GUO F, QIAO JJ. Machine learning aided construction of the quorum sensing communication network for human gut microbiota[J]. Nature Communications, 2022, 13: 3079.
- [41] FEDOREC AJH, KARKARIA BD, SULU M, BARNES CP. Single strain control of microbial consortia[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1977.
- [42] CHEN Y, KIM JK, HIRNING AJ, JOSIĆ K, BENNETT MR. SYNTHETIC BIOLOGY. Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium[J]. Science, 2015, 349(6251): 986-989.
- [43] SCOTT SR, DIN MO, BITTIHN P, XIONG LY, TSIMRING LS, HASTY J. A stabilized microbial ecosystem of self-limiting bacteria using synthetic quorum-regulated lysis[J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 17083.
- [44] STEPHENS K, POZO M, TSAO CY, HAUK P, BENTLEY WE. Bacterial co-culture with cell signaling translator and growth controller modules for autonomously regulated culture composition[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4129.
- [45] MIANO A, LIAO MJ, HASTY J. Inducible cell-to-cell signaling for tunable dynamics in microbial communities[J]. Nature Communications, 2020, 11: 1193.
- [46] KIM JK, CHEN Y, HIRNING AJ, ALNAHHAS RN, JOSIĆ K, BENNETT MR. Long-range temporal coordination of gene expression in synthetic microbial consortia[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15: 1102-1109.
- [47] DANG ZC, GAO MX, WANG LN, WU JH, GUO YF, ZHU ZX, HUANG H, KANG GB. Synthetic bacterial therapies for intestinal diseases based on quorum-sensing circuits[J]. Biotechnology Advances, 2023, 65: 108142.
- [48] YAN X, LIU X, ZHAO CH, CHEN GQ. Applications of synthetic biology in medical and pharmaceutical fields[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8: 199.
- [49] WANG L, ZHANG X, TANG CW, LI PC, ZHU RT, SUN J, ZHANG YF, CUI H, MA JJ, SONG XY, ZHANG WW, GAO X, LUO XZ, YOU LC, CHEN Y, DAI ZJ. Engineering consortia by polymeric microbial swarms[J]. Nature Communications, 2022, 13: 3879.
- [50] KONG WT, MELDGIN DR, COLLINS JJ, LU T. Designing microbial consortia with defined social interactions[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14: 821-829.
- [51] MAO N, CUBILLOS-RUIZ A, CAMERON DE,

- COLLINS JJ. Probiotic strains detect and suppress cholera in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(445): eaao2586.
- [52] JIANG W, YANG XY, GU F, LI XM, WANG SM, LUO Y, QI QS, LIANG QF. Construction of synthetic microbial ecosystems and the regulation of population proportion[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(2): 538-546.
- [53] CANOVAS J, BALDRY M, BOJER MS, ANDERSEN PS, GRZESKOWIAK PK, STEGGER M, DAMBORG P, OLSEN CA, INGMER H. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* and other staphylococcal species via the *agr* quorum sensing system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1733.
- [54] YANG XY, LIU JH, ZHANG J, SHEN Y, QI QS, BAO XM, HOU J. Quorum sensing-mediated protein degradation for dynamic metabolic pathway control in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 85-94.
- [55] McMILLEN D, KOPELL N, HASTY J, COLLINS JJ. Synchronizing genetic relaxation oscillators by intercell signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(2): 679-684.
- [56] BASU S, GERCHMAN Y, COLLINS CH, ARNOLD FH, WEISS R. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation[J]. *Nature*, 2005, 434: 1130-1134.
- [57] BALAGADDÉ FK, SONG H, OZAKI J, COLLINS CH, BARNET M, ARNOLD FH, QUAKE SR, YOU LC. A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem[J]. *Molecular Systems Biology*, 2008, 4: 187.
- [58] SONG H, PAYNE S, GRAY M, YOU LC. Spatiotemporal modulation of biodiversity in a synthetic chemical-mediated ecosystem[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5: 929-935.
- [59] TAMSIR A, TABOR JJ, VOIGT CA. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires'[J]. *Nature*, 2011, 469: 212-215.
- [60] HONG SH, HEGDE M, KIM J, WANG XX, JAYARAMAN A, WOOD TK. Synthetic quorum-sensing circuit to control consortial biofilm formation and dispersal in a microfluidic device[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 613.
- [61] VEGA NM, ALLISON KR, SAMUELS AN, KLEMPNER MS, COLLINS JJ. *Salmonella typhimurium* intercepts *Escherichia coli* signaling to enhance antibiotic tolerance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(35): 14420-14425.
- [62] CORNFORTH DM, POPAT R, McNALLY L, GURNEY J, SCOTT-PHILLIPS TC, IVENS A, DIGGLE SP, BROWN SP. Combinatorial quorum sensing allows bacteria to resolve their social and physical environment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(11): 4280-4284.
- [63] SCOTT SR, HASTY J. Quorum sensing communication modules for microbial consortia[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(9): 969-977.
- [64] LIAO MJ, DIN MO, TSIMRING L, HASTY J. Rock-paper-scissors: engineered population dynamics increase genetic stability[J]. *Science*, 2019, 365(6457): 1045-1049.
- [65] ALNAHHAS RN, SADEGHPOUR M, CHEN Y, FREY AA, OTT W, JOSIĆ K, BENNETT MR. Majority sensing in synthetic microbial consortia[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3659.
- [66] KARKARIA BD, FEDOREC AJH, BARNES CP. Automated design of synthetic microbial communities[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 672.
- [67] WU FL, HA YC, WEISS A, WANG MD, LETOURNEAU J, WANG SY, LUO N, HUANG SQ, LEE CT, DAVID LA, YOU LC. Modulation of microbial community dynamics by spatial partitioning[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18: 394-402.
- [68] WU SB, QIAO JJ, YANG AD, LIU CJ. Potential of orthogonal and cross-talk quorum sensing for dynamic regulation in cocultivation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 445: 136720.
- [69] LI XM, QI QS, LIANG QF. Construction of cascade circuits for dynamic temporal regulation and its application to PHB production[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 158.
- [70] YANG JX, BOWRING JZ, KRUSCHE J, LEHMANN E, BEJDER BS, SILVA SF, BOJER MS, GRUNERT T, PESCHEL A, INGMER H. Cross-species communication via *agr* controls phage susceptibility in *Staphylococcus aureus*[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(9): 113154.
- [71] CHEN WCW, GAIDUKOV L, LAI Y, WU MR, CAO

- JC, GUTBROD MJ, CHOI GCG, UTOMO RP, CHEN YC, WROBLEWSKA L, KELLIS M, ZHANG L, WEISS R, LU TK. A synthetic transcription platform for programmable gene expression in mammalian cells[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 6167.
- [72] BUSON F, GAO YL, WANG BJ. Genetic parts and enabling tools for biocircuit design[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(3): 697-713.
- [73] LaFLEUR TL, HOSSAIN A, SALIS HM. Automated model-predictive design of synthetic promoters to control transcriptional profiles in bacteria[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5159.
- [74] HE ZY, DUAN YT, ZHAI WJ, ZHANG XM, SHI JS, ZHANG XJ, XU ZH. Evaluating *Terminator* strength based on differentiating effects on transcription and translation[J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(14): 2067-2072.
- [75] FENG CQ, ZHANG ZY, ZHU XJ, LIN Y, CHEN W, TANG H, LIN H. iTerm-PseKNC: a sequence-based tool for predicting bacterial transcriptional terminators[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(9): 1469-1477.
- [76] HOSSAIN A, LOPEZ E, HALPER SM, CETNAR DP, REIS AC, STRICKLAND D, KLAVINS E, SALIS HM. Automated design of thousands of nonrepetitive parts for engineering stable genetic systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 1466-1475.
- [77] GE C, YU Z, SHENG HK, SHEN XL, SUN XX, ZHANG YF, YAN YJ, WANG J, YUAN QP. Redesigning regulatory components of quorum-sensing system for diverse metabolic control[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 2182.
- [78] MÜLLER IE, RUBENS JR, JUN T, GRAHAM D, XAVIER R, LU TK. Gene networks that compensate for crosstalk with crosstalk[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4028.
- [79] VAISHNAV ED, de BOER CG, MOLINET J, YASSOUR M, FAN L, ADICONIS X, THOMPSON DA, LEVIN JZ, CUBILLOS FA, REGEV A. The evolution, evolvability and engineering of gene regulatory DNA[J]. *Nature*, 2022, 603: 455-463.
- [80] RAY S, DANDPAT SS, CHATTERJEE S, WALTER NG. Precise tuning of bacterial translation initiation by non-equilibrium 5'-UTR unfolding observed in single mRNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(15): 8818-8833.
- [81] van BREMPT M, CLAUWAERT J, MEY F, STOCK M, MAERTENS J, WAEGEMAN W, de MEY M. Predictive design of sigma factor-specific promoters[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5822.
- [82] ŞİMŞEK E, YAO Y, LEE D, YOU LC. Toward predictive engineering of gene circuits[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(6): 760-768.
- [83] LIU YX, ZHU ZM, JIANG L. Programming therapeutic probiotics by self-tunable sense-and-respond genetic circuits[J]. *Trends in Microbiology*, 2023, 31(11): 1099-1101.
- [84] ROEHNER N, YOUNG EM, VOIGT CA, GORDON DB, DENSMORE D. Double Dutch: a tool for designing combinatorial libraries of biological systems[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(6): 507-517.
- [85] JONES TS, OLIVEIRA SMD, MYERS CJ, VOIGT CA, DENSMORE D. Genetic circuit design automation with Cello 2.0[J]. *Nature Protocols*, 2022, 17: 1097-1113.
- [86] HÉRISSON J, DUIGOU T, du LAC M, BAZI-KABBAJ K, SABETI AZAD M, BULDUM G, TELLE O, EL MOUBAYED Y, CARBONELL P, SWAINSTON N, ZULKOWER V, KUSHWAHA M, BALDWIN GS, FAULON JL. The automated Galaxy-SynBioCAD pipeline for synthetic biology design and engineering[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5082.
- [87] NIELSEN AAK, DER BS, SHIN J, VAIDYANATHAN P, PARALANOV V, STRYCHALSKI EA, ROSS D, DENSMORE D, VOIGT CA. Genetic circuit design automation[J]. *Science*, 2016, 352(6281): aac7341.
- [88] HUANG B, JIA DY, FENG JC, LEVINE H, ONUCHIC JN, LU MY. RACIPE: a computational tool for modeling gene regulatory circuits using randomization[J]. *BMC Systems Biology*, 2018, 12(1): 74.
- [89] YEOH JW, NG KBI, TEH AY, ZHANG JY, CHEE WKD, POH CL. An automated biomodel selection system (BMSS) for gene circuit designs[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(7): 1484-1497.
- [90] OTERO-MURAS I, HENRIQUES D, BANGA JR. SYNBADm: a tool for optimization-based automated design of synthetic gene circuits[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(21): 3360-3362.
- [91] HEINKEN A, THIELE I. Microbiome Modelling Toolbox 2.0: efficient, tractable modelling of microbiome communities[J]. *Bioinformatics*, 2022, 38(8): 2367-2368.
- [92] DUKOVSKI I, BAJIĆ D, CHACÓN JM, QUINTIN M, VILA JCC, SULHEIM S, PACHECO AR,

- BERNSTEIN DB, RIEHL WJ, KOROLEV KS, SANCHEZ A, HARCOMBE WR, SEGRÈ D. A metabolic modeling platform for the computation of microbial ecosystems in time and space (COMETS)[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16: 5030-5082.
- [93] GARCÍA-JIMÉNEZ B, GARCÍA JL, NOGALES J. FLYCOP: metabolic modeling-based analysis and engineering microbial communities[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i954-i963.
- [94] LEGGIERI PA, LIU YY, HAYES M, CONNORS B, SEPPÄLÄ S, O'MALLEY MA, VENTURELLI OS. Integrating systems and synthetic biology to understand and engineer microbiomes[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2021, 23: 169-201.
- [95] DU P, ZHAO HW, ZHANG HQ, WANG RS, HUANG JY, TIAN Y, LUO XD, LUO XX, WANG M, XIANG YH, QIAN L, CHEN YH, TAO Y, LOU CB. De novo design of an intercellular signaling toolbox for multi-channel cell-cell communication and biological computation[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4226.
- [96] KOH E, HWANG IY, LEE HL, de SOTTO R, LEE JWJ, LEE YS, MARCH JC, CHANG MW. Engineering probiotics to inhibit *Clostridioides difficile* infection by dynamic regulation of intestinal metabolism[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3834.
- [97] SHAHAB RL, BRETHAUER S, LUTERBACHER JS, STUDER MH. Engineering of ecological niches to create stable artificial consortia for complex biotransformations[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 129-136.
- [98] GILMORE SP, LANKIEWICZ TS, WILKEN SE, BROWN JL, SEXTON JA, HENSKE JK, THEODOROU MK, VALENTINE DL, O'MALLEY MA. Top-down enrichment guides in formation of synthetic microbial consortia for biomass degradation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(9): 2174-2185.
- [99] LAWSON CE, HARCOMBE WR, HATZENPICHLER R, LINDEMANN SR, LÖFFLER FE, O'MALLEY MA, GARCÍA MARTÍN H, PFLEGER BF, RASKIN L, VENTURELLI OS, WEISSBRODT DG, NOGUERA DR, McMAHON KD. Common principles and best practices for engineering microbiomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 725-741.
- [100] KUMAR S, HASTY J. Stability, robustness, and containment: preparing synthetic biology for real-world deployment[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2023, 79: 102880.