

综述



方柏山, 厦门大学闽江学者特聘教授、博士生导师; 厦门市合成生物学重点实验室创始主任。先后获浙江大学和天津大学化学工程专业学士和博士学位; 斯图加特大学和德国生物技术研究中心访问学者、华盛顿大学高级研究员; 曾任华侨大学材料科学与工程学院院长、中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会副主任; 兼任中国微生物学会酶工程专业委员会委员、中国生物化学与分子生物学会工业专业分会常务委员、中国生物工程学会合成生物学专委会委员、福建省化工学会监事长等; 主持国家自然科学基金重点和面上项目等近20项; 在*Nature Catalysis*等期刊发表学术论文百余篇, 出版独著和编著作5部; 获“全国优秀教师”“福建省教育名师”等称号。

群体感应系统及其在基因线路中的应用

黄世阳^{1,2}, 方柏山^{1*}(¹厦门大学化学化工学院, 厦门 361005; ²华南农业大学兽医学院, 广州 510700)

摘要: 群体感应(quorum sensing, QS)是微生物通过信号分子进行交流以同步个体行为并表现出群体性的现象。近年来, 随着QS系统的作用机理与关键基因元件逐渐清晰, QS为合成生物学研究提供了一种动态调控细菌群体性行为的有效工具。应用合成生物学手段联合多基因元件和技术构建基于QS的基因线路在生物基化学品生产以及生物医药等领域有着巨大的应用前景。本文阐述了几种研究得比较清楚且存在比较广泛的微生物QS系统及其原理、群体感应淬灭, 归纳了基于QS动态调控功能的基因线路在种内种间通讯的应用, 并讨论了QS系统在调节代谢流、调控种群密度和多细胞种类通信等方面的发展前景。

关键词: 群体感应; 合成生物学; 基因线路; 群体感应淬灭; 动态调控

Quorum sensing and its application in genetic circuits

HUANG Shiyang^{1,2}, FANG Baishan^{1*}(¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510700, China)

Abstract: Quorum sensing (QS) is a phenomenon in which microorganisms communicate through signaling molecules to synchronize individual behavior and exhibit collective behavior. In recent years, with the gradual clarification of the mechanism of action and key gene elements of the QS system, it has provided an effective tool for dynamic regulation of bacterial population behavior in synthetic biology research. The application of synthetic biology methods combined with multi gene elements and technologies to construct QS-based gene circuits has enormous application prospects for the production of bio-based chemicals and biopharmaceuticals.

收稿日期: 2024-06-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(22278343)

第一作者: E-mail: 923998449@qq.com

*通信作者: E-mail: fbs@xmu.edu.cn

This paper elaborates on several microbial QS systems which have been well studied and widely used. The application of gene circuits based on QS dynamic regulation in intra and inter species communication and quorum quenching are summarized. The development prospects of QS systems in regulating metabolic flux, regulating population density, and multicellular species communication are discussed as well in this paper.

Key Words: quorum sensing; synthetic biology; gene circuits; quorum quenching; dynamic regulation

自然界中,微生物为了竞争资源进化出一种依赖种群密度的精细交流机制——群体感应(quorum sensing, QS),又称为“自诱导(autoinduction)”。其中,微生物通过分泌和响应特定的物理或化学信号分子,引发细胞运动、化学生物合成和生物膜形成等行为^[1]。QS中细菌产生和释放的化学信号分子,称为自诱导剂(autoinducer, AI),当细菌密度升高时信号分子的浓度也会随着升高^[2]。由于信号分子可以被细胞感知,这使得整个群体能够在信号分子达到某个临界浓度(对应于特定细胞密度)后发起协同行动^[3]。最初, Tomasz^[4]在1965年通过研究肺炎链球菌DNA的吸收机制发现了第一个群感因子。这是一种由肺炎链球菌合成并分泌的多肽分子,可以引起某些基因的表达来促进外源DNA进入其细胞。直至1994年, Fuqua^[5]使用了“群体感应”这个术语,他发现并报道了海洋细菌费氏弧菌(*Vibrio fischeri*, *V. fischeri*)的发光现象并利用了LuxR和LuxI蛋白进行细胞间通讯。在之后的其他研究中, QS现象被发现广泛存在于各种微生物群体中^[6-8]。QS是微生物按照局部细胞密度大小来协调基因表达和调节群体行为的一种机制。很多生理活动都受到QS的控制或调节,包括生物发光、孢子形成、抗生素生物膜形成、毒力因子的分泌和移动、第二代谢产物形成等^[9]。本文将介绍群体感应的主要类型和作用机制、群体感应淬灭以及群体感应系统在合成生物学基因线路中的应用进展。

1 群体感应系统及作用机制

QS是通过调节蛋白与信号分子(自诱导剂)结合来调节下游基因表达来实现的。细菌细胞产生信号分子后扩散至胞内或者向外扩散,所以信号分子的浓度与局部细胞密度息息相关。细菌之间通过自身合成的信号分子来达到种内或种间的信息

交流,使其能像多细胞生物,执行单个细胞无法完成的功能。解析QS系统以及由其介导的细胞间的信息交流和信号传导机制,不仅为明确病原菌致病机理、动态调控平衡机制和阐明微生物生态竞争提供了一个全新的切入点,也为发展新的病害防控策略、调控微生物生态体系和构建精准动态调控的基因线路等提供了有力的依据^[10]。

1.1 群体感应类型

细菌通讯的QS机制多种多样,目前已知的细菌间通讯的QS机制和相应的信号分子根据作用对象和分子结构可分为以下几种^[11]。

1.1.1 革兰氏阴性菌: LuxR/LuxI

革兰氏阴性细菌群体感应基因回路最少含有一对费氏弧菌(*V. fischeri*) QS蛋白的同系物——LuxI和LuxR^[12]。LuxI类蛋白是自诱导物合成酶,利用来源于酰基载体蛋白的酰基和S-腺苷甲硫氨酸的高丝氨酸内酯,合成自诱导物酰基高丝氨酸内酯化合物(acylated homoserine lactone, AHL)作为信号分子^[13,14]。在较高的细胞密度时,积累的AHL分子与LuxR类蛋白结合形成复合物,此复合物随后激活靶基因转录。利用这种群体感应机制,革兰氏阴性菌可以有效地将基因表达与细胞种群密度的波动结合起来^[15]。已知具有LuxI/LuxR蛋白或其同系物的QS系统有:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) LasI/LasR-RhlI/RhlR毒力系统、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) TraI/TraR毒力系统、胡萝卜软腐欧文(氏)菌(*Erwinia carotovora*) ExpI/ExpR-CarI/CarR毒力/抗生素系统^[16]等。因为每种LuxI类蛋白只产生一种自诱导剂,所以针对不同的QS系统,产生的AHL化合物存在特异性^[17],如图1所示。

1.1.2 革兰氏阳性菌: 自诱导肽(AIP)

与革兰氏阴性细菌不同,革兰氏阳性细菌通过分泌自诱导肽(autoinducing peptides, AIP)来充当

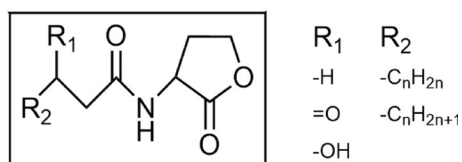


图1 AHL的分子结构

群体感应的诱导剂。AIP是一类短肽分子(如图2中的Oligopeptide), 同类之间没有特征鲜明的分子结构^[18], 不像短链的AHL能直接扩散到细胞外^[19], AIP通过ABC转运蛋白转移到细胞外部, 而且AIP只能通过与膜上传感器组氨酸激酶结合进行信号传递^[20]。多肽介导的双组分机制是一种磷酸化/去磷酸化的联级反应, 在革兰氏阳性菌中, 肽信号前体基因被翻译成一种前体蛋白质, 它被切割以产生加工过的肽自诱导物信号分子, 信号分子结合细胞表面的受体蛋白。信号分子的结合使受体蛋白磷酸化, 将其磷酸基团转移至响应调节蛋白, 然后与DNA中特定位点结合, 激活群体感应相关基因, 其中自诱导剂分泌肽的浓度随细胞密度的增加而增加^[21]。

1.1.3 自诱导剂 II 类分子(autoinducer-2, AI-2)

Surette等^[22]发现, 哈维氏弧菌有一个新的QS信号, 也就是自诱导剂 II 类分子。哈氏弧菌的群体感应信号传导则是通过双组分回路——信号系统1和信号系统2进行的, 分别响应自诱导剂 I 类分子(autoinducer-1, AI-1)和自诱导剂 II 类分子, 如图2中的AI-2。与革兰氏阴性菌相似, 前者由LuxI类蛋白合成, 后者随后被证实广泛存在于革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌中, 是由S2腺苷甲硫氨酸通过LuxS蛋白三步合成的呋喃酮酰基硼酸分子。自然条件下, 由于哈氏弧菌生存于含有其他种类细菌的混合种群中, 其分泌的两种自诱导剂——AI-1群体感应系统用于种内细胞间的通信, 而AI-2群体感应回路则用于种间细胞间的通信^[23,24]。

1.1.4 其他自诱导剂

群体感应自诱导剂种类庞杂, 除了上述三类自诱导剂外, 还有一些喹啉酮类化合物(如图2中的PQS)、二酮哌嗪类化合物、某些酯类化合物和脂肪酸类化合物等^[25,26]。

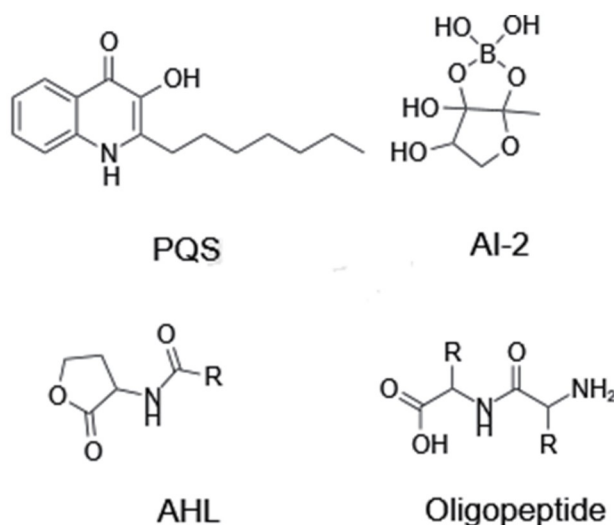


图2 四类群体感应信号分子的分子结构

1.2 酰基高丝氨酸内脂(acyl-homoserinellactone, AHL)

酰基高丝氨酸内脂在常温下是白色固体粉末, 在高温和碱性水溶液中, 内脂环容易自动水解, 而且短链的AHL比长链的更容易水解^[27]; 而在酸性pH的水溶液中, 水解的内脂环会重新酯化, 所以信号分子的半衰期会随着外界条件的变化而变化。如C6-HSL(*N*-hexanoyl-homoserine lactone)的半衰期从21 d(pH5.5、4 °C)到30 min(pH8.5、37 °C)不等^[28,29]。不同AHL化合物具有相同的高丝氨酸内酯环头部, 其主要差异取决于N-侧链长度、3-碳位置取代基种类和侧链饱和程度^[17]。感应不同AHL的群体感应系统及相关表型如表1所示。

2 群体感应淬灭

研究指出, 细菌群体感应不仅调节细菌细胞多种生理学反应, 还参与调控细菌细胞分化、种群竞争及毒力因子感染过程的营养分配。群体感应被抑制或者淬灭后, 细菌的各项生理学反应会减弱甚至丧失; 与此同时, 致病菌对抗生素的敏感程度上升。群体感应淬灭(quorum quenching, QQ)是指细菌群体感应中有干扰或者抑制作用的物质阻断细菌间的“信息交换”, 从而抑制致病性因子相关基因的表达而降低细菌毒害性的现象^[31]。由于QS淬灭不杀菌也不抑菌, 不会产生细菌抗药性问题, 所以QQ有望成为一种可以替代抗生素的致病菌控制技术^[32]。

表1 细菌AHL依赖型的群体感应系统及相关表型^[30]

菌株	信号分子	表型
嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)	C4-HSL、C6-HSL	生物膜、外切蛋白酶、毒力因子
杀鲑气单胞菌(<i>Aeromonas salmonicida</i>)	C4-HSL、C6-HSL	外切蛋白酶
根瘤农杆菌(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	3OC8-HSL	质粒接合
葡萄农杆菌(<i>Agrobacterium vitiae</i>)	C14:1-HSL、3OC16:1-HSL	毒力因子
嗜酸氧化亚铁农杆菌(<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>)	3OH-C8-HSL、3OH-C10-HSL、C12-HSL、3OH-C12-HSL、C14-HSL、3OC14-HSL、3OH-C14-HSL、3OH-C16-HSL	未知
伯克霍尔德菌(<i>Burkholderia cenocepacia</i>)	C6-HSL、C8-HSL	胞外酶、生物膜、群集运动、铁载体、毒力因子
类鼻疽伯克氏菌(<i>Burkholderia pseudomallei</i>)	C8-HSL、C10-HSL、3OH-C8-HSL、3OH-C10-HSL、3OH-C14-HSL	毒力因子、外切蛋白酶
鼻疽伯克霍尔德菌(<i>Burkholderia mallei</i>)	C8-HSL、C10-HSL	毒力因子
紫色杆菌(<i>Chromobacterium violaceum</i>)	C6-HSL	胞外酶、氰化物、着色
欧文氏菌(<i>Erwinia carotovora</i>)	3OC6-HSL	碳青霉烯、胞外酶、毒力因子
玉米细菌性枯萎病菌(<i>Pantoea (Erwinia) stewartii</i>)	3OC6-HSL	胞外多糖
铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	C4-HSL、C6-HSL、3OC12-HSL	胞外酶、外毒素、蛋白分泌、生物膜、群集运动、次级代谢产物、喹诺酮信号传递、毒力因子
金色假单胞菌(<i>Pseudomonas aureofaciens</i>)	C6-HSL	吩嗪、蛋白酶、菌落形态、聚集、根部定植
绿针假单胞菌(<i>Pseudomonas chlororaphis</i>)	C6-HSL	吩嗪-1-甲酰胺
恶臭假单胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)	3OC10-HSL、3OC12-HSL	生物膜
荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	3OC10-HSL	莫匹罗星
冰核假单胞菌(<i>Pseudomonas syringae</i>)	3OC6-HSL	胞外多糖、群集运动、毒力因子
豆科根瘤菌(<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>)	C14:1-HSL、C6-HSL、C7-HSL、C8-HSL、3OC8-HSL、3OH-C8-HSL	根部结瘤、共生、质粒转移、生长抑制、稳定期适应
类球红细菌(<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	7-cis-C14-HSL	聚集
沙雷氏菌(<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006)	C4-HSL、C6-HSL	抗生素、着色、胞外酶
液化沙雷氏菌(<i>Serratia liquefaciens</i> MG1)	C4-HSL、C6-HSL	群集运动、外切蛋白酶、生物膜、生物表面活性剂
粘质沙雷氏菌(<i>Serratia marcescens</i> SS-1)	C6-HSL、3OC6-HSL、C7-HSL、C8-HSL	滑动运动、生物表面活性剂、着色、核酸酶、转座频率
变形斑沙雷氏菌(<i>Serratia proteamaculans</i> B5a)	3OC6-HSL	胞外酶
苜蓿中华根瘤菌(<i>Sinorhizobium meliloti</i>)	C8-HSL、C12-HSL、3OC14-HSL、3OC16:1-HSL、C16:1-HSL、C18-HSL	结瘤效率和共生、胞外多糖
费氏弧菌(<i>Vibrio fischeri</i>)	3OC6-HSL	生物发光
小肠结肠炎耶尔森氏菌(<i>Yersinia enterocolitica</i>)	C6-HSL、3OC6-HSL、3OC10-HSL、3OC12-HSL、3OC14-HSL	泳动和群集运动
假结核耶尔森氏菌(<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	C6-HSL、3OC6-HSL、C8-HSL	运动、聚集

2.1 群体感应淬灭应用

根据群体感应系统的特点和组成,群体感应淬灭有抑制信号分子合成^[33]、阻止信号分子与受体蛋白的结合^[34]、降解信号分子等途径^[35]。革兰氏阴性菌合成AHL的底物SAM(S-adenosyl-methionine)的结构类似物可以有效抑制信号分子

AHL的合成^[36]。AHL信号分子的类似物或者拮抗剂可以与AHL竞争其胞内受体(LuxR蛋白),从而破坏胞间通讯^[37]。目前已知的AHL信号分子有40余种,超过70种细菌产生AHL型群体感应信号,一些N-乙酰高丝氨酸内酯信号的内酯酶和酰基转移酶可以淬灭AHL分子,使致病菌失去毒力^[38,39]。

目前群体感应淬灭已成功应用于膜生物反应器、纳滤膜材料, 以减轻膜操作过程中的生物污染^[40,41]、经济农作物的疾病防治^[42,43], 具有很大的应用潜力。

随着抗生素耐药菌株的出现, 可用于治疗细菌的药物选择是有限的。群体感应淬灭被认为是一种可持续疗法, 尤其是考虑到微生物存活的选择性压力比抗生素治疗有限。Dong等^[44]第一次应用群体感应淬灭策略预防了微生物感染, 他们将*aiiA*基因转化入植物病原体胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)以减弱其在大白菜中的衰变表现。群体感应淬灭具备以下应用前景。

(1)控制植物病害。迄今为止, 有两种策略已被开发为控制植物病害的新型治疗工具。一种是将能够合成与分泌群体感应淬灭酶的微生物与群体感应依赖型病原体共培养^[45]。通过群体感应淬灭效应, 微生物可以限制或废除环境中QS信号分子的积累, 导致QS介导的病原体显著减少。另一种是利用基因工程改造植物使其能够产生群体感应淬灭酶, 从而使得植物对QS介导的病原体具有较高的耐受性^[46,47]。

(2)提高膜生物反应器性能。膜生物反应器在污水处理工程应用中越来越受到重视。然而, 由于微生物的不断生长降低了膜的通透性和寿命。研究表明, 群体感应淬灭酶可以削弱微生物形成生物膜的能力并提高了膜过滤性, 会影响污泥性质和生物污染, 而不会影响污染物的降解, 并且这种影响是可逆的, 在停止使用群体感应淬灭酶后, 膜性能不受影响^[48]。这表明群体感应淬灭战略是减缓膜过滤过程中生物污染的有效方法^[48]。

Yeon等^[49]利用附着在磁性载体上的AHL酰基转移酶来抑制膜生物反应器中的QS, 用于高级废水处理, 发现它有效地减少了生物污染并增强了膜的通透性。Kim等^[50]直接将AHL酰基转移酶连接

到用于废水处理的滤膜表面发现, 这些酶能够干扰膜表面的QS系统并减少生物污染。群体感应淬灭的应用是减轻膜生物污染的有希望的替代方案。

2.2 AiiA酶

过去十几年内, 群体感应淬灭酶在多个领域呈现出较好的发展潜力。因其能消除革兰氏阴性菌AHL介导的群体感应通路及其与金属-内酰胺酶超家族中其他酶的关系而引起广泛关注。AiiA蛋白是第一种被发现的群体感应淬灭酶, 它由芽孢杆菌(*Bacillus*) 240B₁产生, 通过降解AHL信号分子来干扰QS。AiiA基因的存在使胡萝卜软腐欧文氏菌的致病基因与碳青霉烯抗生素基因无法表达, 从而削弱病菌毒力^[44]。如图3所示, AiiA酶主要作用于水解AHL分子的高丝氨酸内酯环, 从而生成酰基化高丝氨酸, 导致环境中pH值的下降。AiiA族类内酯蛋白序列同源性达90%, 虽然各同源蛋白特异性不同, 但都能水解AHL^[51]。由于AiiA酶在干扰致病性有机体的群体感应过程中具有重要的应用潜力, 诸多实验室开始探索新的手段来筛选高活性的*aiiA*菌株。

最初, 由于保守的HXHXDH基序的相似性, AiiA酶被归入金属内酰胺酶族(metallo-lactamase superfamily)。Thomas等^[52]证实, 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的AHL内酯酶实际上是一种立体特异性金属蛋白, 中心含有2个Zn²⁺离子, 形成双核中心, 并且双核之间的距离与已知的具有双核锌结构的人乙醛酶Ⅱ(human glyoxalase Ⅱ)晶体结构十分相似。双核中心周围第一层氨基酸残基为His¹⁰⁴、His¹⁰⁶、His¹⁰⁹、His¹⁶⁹、His²³⁵和Asp¹⁰⁸, 第二层残基为Tyr¹⁹⁴。

2009年, Liao等^[53]的研究表明, AHL内酯酶的反应机理为底物与活性位点结合而不直接与Zn²⁺配对。桥连氢氧化物作为亲核分子进攻底物的羰基

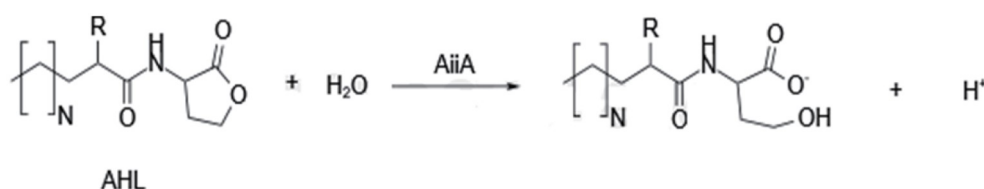


图3 AiiA酶反应方程式

碳, 第一个 Zn^{2+} 与194号位酪氨酸(Tyr^{194})稳定有四面体中间产物的电荷, 从而促进亲核攻击; 第二个 Zn^{2+} 稳定AHL开环后产物醇盐的电荷, 降低了AHL酯键C-O断裂的门槛; 两个锌离子之间的桥梁是天冬氨酸 Asp^{191} 和一个氧(羟基氧)。 Asp^{108} 为氢氧化物亲核进攻和官能团的离去提供质子, 此外, Zn1 与 Zn2 之间的距离由于产物的结合而变长(3.3~3.7 Å), 表明双核中心可以灵活协调不同的AHL化合物^[54,55]。

由于群体感应的生物学作用最近已扩展到真核生物和跨领域的相互作用, 因此, 研究者开始对AiiA酶与底物结合和催化有关的残基进行突变研究。Momb等^[56]在2008年利用计算机建模和定点突变来探索AiiA酶的底物结合模型和几个活性位点残基的功能。突变后, D108N和Y194F的 $k_{\text{cat}}/k_{\text{m}}$ 值至少比野生型AHL内酯酶低2个数量级, 表明 Asp^{198} 与 Tyr^{194} 是稳态水解过程中的限速步骤关键位点。该研究同时发现, 生长环境压力造成AiiA的低选择性, 让其尽可能地水解多种AHLs。

但随后研究发现, 野生型AiiA更倾向于降解无取代基的长酰基链底物, 且降解效率随侧链C原子数目单调提高。Kyeong等^[57]利用建模预测, 通过改变活性位点的关键氨基酸残基, 构建专一降解短链AHL的突变体。他们将三个关键氨基酸残基 Phe^{64} 、 Val^{69} 和 Ala^{206} 转化为不同大小的疏水氨基酸后进行动力学参数测定并筛选有利突变。

即使如此, AiiA酶对QS信号分子的低催化效率仍然是一个难题。Han等^[58]利用易错PCR(error-prone PCR, ep-PCR)和基因改组(DNA shuffling)突变手段结合合成生物学(synthetic biology), 设计了一个反义RNA的高通量筛选系统, 用于群体淬灭酶的定向进化。反义RNA(*ryhB*)可调节正义RNA(*sodB*)基因的表达, 解决了天然QS系统高本底水平表达造成的高假阳性率问题, 得到了一种催化效率比野生型高31倍的AHL降解酶。通过对接分析, 结合实验发现了三个突变位点(F64W/V69W/A206F)能够协同地增加与短酰基链AHL的疏水接触, 但会对长酰基链的AHL产生位阻效应。

3 基于群体感应的基因线路

目前, 对QS系统的作用机理研究已较为清

晰。在自然界中, 细菌受到相邻种内或种间的相互作用以及外界环境影响, 长期的共生共存使其进化出复杂的信号交流系统。QS系统通过细菌产生和感应化学信号分子, 以种群密度依赖的方式调控基因表达, 使细菌群体相互作用和牵制以致相互适应, 所以QS是细菌协调行为的重要机制。细菌的群体感应系统主要有种内细胞间通讯和种间细胞间通讯。针对QS特性, 研究者构建了多条响应种群浓度的基因线路, 主要集中在人工多细胞系统动态、动态调控细胞行为以及增加空间和时间复杂性等方面^[59]。

3.1 拨动开关

在代谢工程领域, 为了提高目标产物的生产效率和产量, 需要适时地激活或关闭基因的表达。拨动开关(toggle switch)又称双稳态开关, 是一大类代谢调控开关, 能够在不同的基因表达稳态之间切换, 可被应用于提高目标产物的产量。通过将拨动开关和QS系统结合, 以及细菌群体间的通讯, 可以实现细胞基因表达状态的自动切换。

Kobayashi等^[60]构建了四种基因拨动开关, 其中两种遗传线路包含Lux QS系统, 当AHL浓度处于低浓度时, 目的基因的表达在“OFF”状态, AHL浓度达到阈值时, 基因的表达切换到“ON”状态。Anesiadis等^[61]实现了拨动开关用于代谢工程动态调控, 有效提高了乙醇和琥珀酸的产量。Soma等^[62]构建了响应IPTG和AHL的杂合启动子及正反馈回路, 这个拨动开关基于QS, 其细胞浓度阈值受外源添加的IPTG浓度调节, 能够调节代谢关键基因从“ON”状态切换到“OFF”状态进而使代谢流从三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)重定向到异丙醇的生产途径, 显著提高了产量。Gupta等^[63]结合QS来调控*pfk-1*基因(该基因决定糖酵解和细胞生长的碳流量)的表达, 可根据所需要的时间和细胞浓度来关闭基因表达。当AHL浓度低时, 调节因子EsaR170V与PesaS结合, 随着细胞浓度的不断增加, AHL达到一定浓度后会降低EsaR170V的活性, 并关闭*pfk-1*基因的表达。此时, 大多数葡萄糖会转移到生产途径以提高肌醇(myoinositol, MI)产量。Kim等^[64]结合QS系统构建动态代谢调节的基因线路以生产甜没药烯(bisabolene), 使其产量比之前的诱导体系增加了

44%, 与传统化学诱导的系统相比, QS调节系统能够让体系中的细胞更好地做出一致的反应与改变。Doong等^[65]通过结合通路特异性策略和无关策略, 构建了两个动态正交可调策略的控制机制, 这种可实现分层调控的机制, 独立调节两种不同酶的表达, 提高了D-葡萄糖醛酸的产量。通路无关策略是在AHL达到浓度阈值后将葡萄糖的利用从糖酵解定向到D-葡萄糖醛酸的生产, 从而使细胞从“生长”状态切换到“生产”状态; 而通路特异性策略则是通过肌醇作为中间代谢物传感器来实现动态自主控制, 提高D-葡萄糖醛酸的产量。Gu等^[66]基于Esa-QS系统构建了双功能动态开关, 能够在不同的时间和间隔上同步基因的上调和下调。将该双功能动态开关应用于5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)和聚 β -羟基丁酸(polyhydroxybutyrate, PHB)的合成, 产量分别提高了6倍和12倍。Yang等^[67]在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中引入拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的AtIPT4和AtCRE1, AtIPT4将ATP转化成异戊烯基腺嘌呤IP, IP结合到其受体AtCRE1, 进而磷酸化YPD1和SKN7, 激活P_{SSRE}启动子, 当细胞浓度低时, IP浓度低, P_{SSRE}不启动, 随着细胞浓度增加, IP浓度增加, P_{SSRE}下游的AtIPT4和产物会启动表达, 应用这种策略来控制Erg9的降解和产 α -法呢烯, α -法呢烯产量提高了80%。Glasscock等^[68]结合QS与核糖调控的可切换反馈启动子(riboregulated switchable feedback promoters, rSFPs), QS系统调控转录激活RNA(small transcription-activating RNA, STAR)的转录, STAR会结合到启动子rSFPs下游, 使其下游的发卡结构发生改变, RNA聚合酶能持续转录目标基因, 通过该方法调控蛋白MevT和MBIS以及CYP725A4/tcCPR的表达, 含氧紫杉烷的产量提高了2倍。Hu等^[69]基于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的QS系统PhrQ-RapQ-DegU并联合活性不同的启动子突变库构建了模块化的合成 γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)的调控线路, 在适当菌群浓度下启动 γ -PGA的合成, 产量比静态调控的高6.53倍。Ge等^[70]基于CRP结合区域的数量创建了40个QS系统的库, 其中4个应用于水杨酸(salicylic acid, SA)的合成路径, 上调关键基因*tktA*、*ppsA*、

aroG、*aroL*、*entC*和*pchB*的表达, 并结合*dCas9-sgRNAs*技术下调基因*ppc*的表达, SA的摇瓶最高产量为2.1 g/L, 同样的调控策略用以生产4-羟基香豆素(4-hydroxycoumarin, 4-HC), 产量为288.8 mg/L, 是静态调控的12.3倍。

将QS系统与拨动开关元件相结合, 在达到细胞浓度阈值后激活基因线路, 从而实现自诱导代谢状态的转变。基于QS的拨动开关允许遗传回路在特定细胞密度下被激活, 导致自诱导代谢状态的切换, 使其在代谢工程中有较大的应用潜力, 为合成生物学继续做出新的贡献。

3.2 逻辑门

逻辑门也是数字逻辑电路基本单元, 由基因元件构成的布尔逻辑门线路主要包括OR、AND、NOR、NAND和XOR^[71]。结合QS元件和其他基因元件来构建基因线路会产生更复杂的计算。Tamsir等^[72]串联PBAD和PTet启动子, 构建了输入信号为aTc和Ara的OR门, 在OR门后结合转录抑制子构建了NOR门。同样, 作者又基于Las-QS构建了输入信号分别为30C12HSL和Ara、30C12HSL和aTc的两个NOR门以及基于RhI-QS的输入信号为30C4HSL的Buffer门, 最后作者将上述的三个NOR门和一个Buffer门组成了XOR门。Shong等^[73]合成并表征了两个杂合的与门启动子, 它们需要QS信号分子和外源添加的诱导剂才能启动基因的表达。LEE和TTE的基因都需要在两种物质同时存在时才能表达, 只有一方存在时, 基因都不会有高于本底水平的表达。他们还观察到, 只有外源添加的IPTG或者ATC存在时, 基因的表达才会随着细胞浓度的增加而增加。Hu等^[74]在奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis* MR-1) MtrA敲除突变体中构建了一个基于Lux-QS的AND门, 在两个输入信号IPTG和AHL同时存在的情况下, MtrA恢复才能表达以控制细菌胞外电子转移, 实现了AND门在微生物燃料电池(MFCs)中的应用。He等^[75]结合Lux-QS与响应细胞生理状态的启动子设计了一个杂合启动子, 构建了自诱导的AND门调控系统以监测细胞生长和调控聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)的合成。首先, 对LuxR进行随机突变并优化Lux启动子, 获得了一系列可感应不同细胞浓度的QS系统, 同时检测细胞生长过程中的荧

光强度,选择在稳定期能启动QS的系统。最后,将新构建的系统用于PHB生产,产量可提高1~2倍。结合QS元件逻辑门线路的应用价值已经得到了初步开发,以便更好地协调细胞菌群行为,从而促进其在产物合成、环境防治和生物医学等方面的应用。

3.3 动态调控种群密度

基于QS的线路能够调控细胞亚群之间的基因表达,从而稳定或调整共培养系统中的种群结构,也可实现细胞群之间的通信,能够在构建具备特定功能或者用来探究生态学原理的合成微生物群落中发挥重要作用^[76]。Balagadde等^[77]构建了基于两种QS系统(Lux QS和Las QS)的合成线路,实现了两种大肠杆菌“猎物”与“捕食者”种群之间的双向通信。当“猎物”种群浓度低时,“捕食者”细胞在外源添加IPTG的诱导下启动致死蛋白CcdB的表达而死亡。在“猎物”细胞中,LuxI合成信号分子3OC6HSL,随着“猎物”细胞浓度的增加,3OC6HSL不断积累,当3OC6HSL浓度足够时,3OC6HSL与“捕食者”细胞中的调节蛋白LuxR结合诱导解毒基因*CcdA*的表达以拯救“捕食者”。在“捕食者”细胞中,LasI合成另一种信号分子——3OC12HSL,3OC12HSL渗透到“猎物”细胞中与调节蛋白LasR结合,激活致死蛋白CcdB的表达,使“猎物”死亡,完成“捕食”。Stephens等^[78]基于两套QS(分别感应信号分子AI-2和AHL)设计了能够调控种群结构的共培养系统(包括“翻译器”和“控制器”细胞),翻译器细胞感应外源添加的AI-2信号,AI-2与调节蛋白LsrR结合后诱导LasI的表达,LasI合成信号分子AHL,完成信号转化。控制器细胞响应AHL,AHL与调节蛋白LasR结合后诱导生长促进因子的产生,从而促进细胞生长,调整两个种群的浓度比例。基于QS的基因线路调控致死基因(如*CcdB*)或裂解基因(如*ψI74E*或*lysis*)的表达从而控制种群浓度的策略,已被用于共培养系统的构建,来完成多种生态体系的模拟^[79-82]。尽管目前基于QS构建的合成群落体系研究仍处于发展的初期,但是QS在设计稳定及可预测模拟的共培养菌群中的能

力已被证明。

3.4 振荡器

McMillen等^[83]在大肠杆菌中构建了一个由P_{RE}启动子、基因Y(*ftsh*)和基因X(*cii*)组成的振荡器,并结合了Lux QS系统,利用细胞间信号传导耦合振荡器来实现同步振荡。蛋白Ftsh能够降解Cii,而Cii能够诱导P_{RE}启动子,LuxR与信号分子AHL结合后能够诱导P_{lux}启动子。细胞1中包含两条线路(振荡线路和耦合线路),振荡线路P_{RE}启动子分别调控蛋白Ftsh和Cii的表达,耦合线路中P_{RE}调控蛋白LuxI的表达,LuxI合成信号分子AHL,P_{lux}调控Cii的表达,细胞2中P_{lux}调控Cii的表达。通过对系统建模,证明了新构建的线路会实现跨细胞群的同步行为。Danino等^[84]基于Lux QS系统设计偶联的同步基因时钟线路并于微流体平台下测试,证明了该线路能够实现群体水平振荡。LuxI合成信号分子AHL,AHL与LuxR结合以正反馈形式诱导受启动子P_{lux}调控的LuxI和信号分子降解酶AiiA的表达,而AiiA会降解AHL从而形成负反馈驱动振荡,这种通过正反馈和负反馈形成振荡的机制与双反馈振荡类似。Prindle等^[85]整合了遗传振荡器、Lux QS系统和气相氧化还原信号,在菌落间形成耦合的“生物混合体”。当亚砷酸盐含量低时,调节蛋白ArsR会阻遏LuxR的表达,此时无荧光和振荡的产生;当亚砷酸盐含量足够时,这种阻遏作用会被解除,启动LuxR的表达,LuxR与AHL结合诱导荧光蛋白的表达和产生振荡,最终实现数千个微流体小室在厘米级尺度上的同步振荡,形成耦合的遗传“生物像素”。Chen等^[86]构建了一个由两种细胞(“激活”菌株和“抑制”菌株)组成的微生物混合体,这两个菌株产生两种正交的信号分子。“激活”菌株产生Rhl-AHL,促进两株菌株的靶基因转录,而“抑制”菌株会产生Cin-AHL,还存在一个负反馈回路,其中AiiA蛋白可以降解AHL和LacI蛋白,阻遏两个信号分子合成酶的表达。只有共培养这两个菌株时才会有群体水平振荡的产生。Baumgart等^[87]构建了基于Lux QS系统的正反馈回路,基于抑制DNA拷贝数的靶向核酸酶(I-SceI)构建了负反馈回路,最终实现了DNA拷贝数的鲁棒性振荡,建立了菌落级别的

DNA “master clock” 的框架。Kim等^[88]构建了一个双菌株微生物联合体, 这两个菌株产生两种正交的群体感应信号分子, 形成一个正负反馈的调控网络。在微流控装置中共培养时, 这两个菌株会有振荡现象的产生。在大群体中, 发现正反馈线路的存在使整个群体能够暂时地协调振荡, 该线路放大和传递了细胞间的信号, 即通过利用细胞间的短距离、短暂的耦合可以实现多细胞系统基因的协调表达。

在微生物联合体同步性调控方面, QS和振荡模型相结合具有很大的潜力。利用基因工程来调控多菌株混合体的种群水平动态, 在代谢工程中有实际应用潜力, 特别是开发和生产高附加价值代谢物, 也为构建多种细胞类型混合的复杂组织或器官提供了借鉴。今后还要进一步优化相关的设计和构建, 从而实现更精确的调控。

4 展望

当前, 常用的微生物QS系统元件解析研究已经相对清晰, 利用QS的多样性和正交性可激活或抑制基因的表达, 按照特定的目的设计, 可以对微生物菌群行为进行精准的动力学调控, 在构建生物计算工具、调节代谢流和调控种群结构等方面有着广泛应用潜力。因此, 本文详细阐述了微生物常见的QS类型、作用机制以及近年来基于QS机制的动力学调控应用, 深入归纳了QS与多种生物调控元件相结合的研究进展。

QS为复杂基因线路元件和合成微生物群落联盟的构建和应用提供了可能性, 然而细菌QS还有许多待开发的方面, 如开发和探索多种新型正交性QS系统, 将会为线路设计提供更广阔的空间, 同时也会促进对多细胞类型体系行为的探索, 为未来更精准调控多信号输入输出的复杂线路提供更多的选择。同时也可以通过建立数学模型, 进而分析线路中各元件的系统特性, 准确地分析线路工作原理, 来指导和探索修改线路参数和设计线路的方法, 进一步优化所设计的线路; 还可以通过构建简化的合成群体振荡线路, 耦合细胞生长因子相关的元件, 实现能独立于细胞生长的合成群体线路。随着生物医疗和代谢工程的发展,

结合多种传感系统与正交QS系统, 有望探索出在医学领域或生物基化学品生产中应用的实时高效传感器。今后, 相信基于QS系统优化动态监测和调控线路的策略在生物化工医药等领域有着更广阔的发展空间。

参考文献

- [1] Chen S, Jing X, Tang J, et al. Quorum sensing signals enhance the electrochemical activity and energy recovery of mixed-culture electroactive biofilms. *Biosens Bioelectron*, 2017, 97: 369-376
- [2] Moreno-Gámez S, Hochberg ME, Van DGS. Quorum sensing as a mechanism to harness the wisdom of the crowds. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3415
- [3] Portnoy DA, de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*, 2000, 68(9): 4839-4849
- [4] Tomasz A. Control of the competent state in pneumococcus by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature*, 1965, 208(5006): 155-159
- [5] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, 176(2): 269-275
- [6] Oliveira RA, Cabral V, Torcato I, et al. Deciphering the quorum-sensing lexicon of the gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 2023, 31(4): 500-512
- [7] Mayer C, Borges A, Flament-Simon SC, et al. Quorum sensing architecture network in *Escherichia coli* virulence and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, 2023, 47(4): fuad031
- [8] Kai K. The *phc* quorum-sensing system in *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu Rev Microbiol*, 2023, 77(1): 213-231
- [9] He YW, Deng Y, Miao Y, et al. DSF-family quorum sensing signal-mediated intraspecies, interspecies, and inter-kingdom communication. *Trends Microbiol*, 2023, 31(1): 36-50
- [10] Wang M, Lian Y, Wang Y, et al. The role and mechanism of quorum sensing on environmental antimicrobial resistance. *Environ Pollution*, 2023, 322: 121238
- [11] Wu F, Menn DJ, Wang X. Quorum-sensing crosstalk-driven synthetic circuits: from unimodality to trimodality. *Chem Biol*, 2014, 21(12): 1629-1638
- [12] Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, 25(4): 365-404

- [13] Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, et al. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(8): 4360-4365
- [14] Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296(2-3): 149-161
- [15] Liu L, Zeng X, Zheng J, et al. AHL-mediated quorum sensing to regulate bacterial substance and energy metabolism: a review. *Microbiol Res*, 2022, 262: 127102
- [16] Jones S, Yu B, Bainton NJ, et al. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J*, 1993, 12(6): 2477-2482
- [17] Wang X, Yi K, Pang H, et al. An overview of quorum sensing in shaping activated sludge forms: Mechanisms, applications and challenges. *Sci Total Environ*, 2024, 927: 171886
- [18] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55(1): 165-199
- [19] Eberl L, Molin S, Givskov M. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, 1999, 181(6): 1703-1712
- [20] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21(1): 319-346
- [21] Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, 37(2): 156-181
- [22] Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1639-1644
- [23] Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(2): 191-197
- [24] Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 2001, 42(3): 777-793
- [25] Yaniv K, Golberg K, Kramarsky-Winter E, et al. Functional marine metagenomic screening for anti-quorum sensing and anti-biofilm activity. *Biofouling*, 2017, 33(1): 1-13
- [26] Turan NB, Chormey DS, Büyükpınar Ç, et al. Quorum sensing: little talks for an effective bacterial coordination. *TrAC Trends Anal Chem*, 2017, 91: 1-11
- [27] Yates EA, Philipp B, Buckley C, et al. *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 2002, 70(10): 5635-5646
- [28] Byers JT, Lucas C, Salmond GPC, et al. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol*, 2002, 184(4): 1163-1171
- [29] Delalande L, Faure D, Raffoux AÃ, et al. N-hexanoyl-l-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 52(1): 13-20
- [30] Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 2007, 153(12): 3923-3938
- [31] Otto M. Critical assessment of the prospects of quorum-quenching therapy for *Staphylococcus aureus* infection. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 4025
- [32] Fan X, Liu X, Liu Y. The cloning and characterization of one novel metagenome-derived thermostable esterase acting on *N*-acylhomoserine lactones. *J Mol Catal B-enzym*, 2012, 83(29): 37
- [33] Chen T, Sheng J, Fu Y, et al. ¹HNMR-based global metabolic studies of *Pseudomonas aeruginosa* upon exposure of the quorum sensing inhibitor resveratrol. *J Proteome Res*, 2017, 16(2): 824-830
- [34] Maisuria VB, Los Santos YL, Tufenkji N, et al. Cranberry-derived proanthocyanidins impair virulence and inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 30169
- [35] Sheffield WP, Eltringham-Smith LJ, Bhakta V. Fusion to human serum albumin extends the circulatory half-life and duration of antithrombotic action of the kunitz protease inhibitor domain of protease nexin 2. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(2): 772-782
- [36] Jakobsen TH, Warming AN, Vejborg RM, et al. A broad range quorum sensing inhibitor working through sRNA inhibition. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2045-2322
- [37] Corral-Lugo A, Daddaoua A, Ortega A, et al. So different and still so similar: the plant compound rosmarinic acid mimics bacterial homoserine lactone quorum sensing signals. *Communicative Integr Biol*, 2016, 9(2): e1156832
- [38] Dong YH, Wang LH, Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil Trans R Soc B*, 2007, 362(1483): 1201-1211
- [39] Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol*, 2005, 43(1): 101
- [40] Wang R, An Z, Fan L, et al. Effect of quorum quenching on biofouling control and microbial community in membrane bioreactors by *Brucella* sp. ZJ1. *J Environ Manage*, 2023, 339: 117961
- [41] Liu QX, Feng X, Shen ZY, et al. Enhanced wastewater

- treatment performance by understanding the interaction between algae and bacteria based on quorum sensing. *Bioresource Tech*, 2022, 354: 127161
- [42] Ouyang LJ, Li LM. Effects of an inducible *aiiA* gene on disease resistance in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*. *Transgenic Res*, 2016, 25(4): 441-452
- [43] Dong YH, Wang LH, Xu JL, et al. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 2001, 411(6839): 813-817
- [44] Dong YH, Xu JL, Li XZ, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3526-3531
- [45] Wang WZ, Morohoshi T, Ikenoya M, et al. AiiM, a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(8): 2524-2530
- [46] Vanjildorj E, Song SY, Yang ZH, et al. Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(10): 1581-1591
- [47] D'Angelo-Picard C, Chapelle E, Ratet P, et al. Transgenic plants expressing the quorum quenching lactonase AttM do not significantly alter root-associated bacterial populations. *Res Microbiol*, 2011, 162(9): 951-958
- [48] Chen F, Gao Y, Chen X, et al. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 17477-17500
- [49] Yeon KM, Lee CH, Kim J. Magnetic enzyme carrier for effective biofouling control in the membrane bioreactor based on enzymatic quorum quenching. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(19): 7403-7409
- [50] Kim JH, Choi DC, Yeon KM, et al. Enzyme-immobilized nanofiltration membrane to mitigate biofouling based on quorum quenching. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(4): 1601-1607
- [51] Liu D, Lepore BW, Petsko GA, et al. Three-dimensional structure of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone hydrolase from *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(33): 11882-11887
- [52] Thomas PW, Stone EM, Costello AL, et al. The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry*, 2005, 44(20): 7559-7569
- [53] Liao RZ, Yu JG, Himo F. Reaction mechanism of the dinuclear zinc enzyme N-acyl-L-homoserine. *Inorg Chem*, 2009, 48(4): 1442-1448
- [54] Liu D, Momb J, Thomas PW, et al. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. product-bound structures. *Biochemistry*, 2008, 47(29): 7706-7714
- [55] Charendoff MN, Shah HP, Briggs JM, et al. New insights into the binding and catalytic mechanisms of *Bacillus thuringiensis* lactonase: insights into *B. thuringiensis* AiiA mechanism. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e75395
- [56] Momb J, Wang C, Liu D, et al. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. substrate modeling and active site mutations. *Biochemistry*, 2008, 47(29): 7715-7725
- [57] Kyeong HH, Kim JH, Kim HS. Design of N-acyl homoserine lactonase with high substrate specificity by a rational approach. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(11): 4735-4742
- [58] Han SS, Park WJ, Kim HS, et al. Antisense RNA-based high-throughput screen system for directed evolution of quorum quenching enzymes. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(11): 2598-2605
- [59] Su Y, Xu M, Cui Y, et al. Bacterial quorum sensing orchestrates longitudinal interactions to shape microbiota assembly. *Microbiome*, 2023, 11(1): 241
- [60] Kobayashi H, Kærn M, Araki M, et al. Programmable cells: interfacing natural and engineered gene networks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(22): 8414-8419
- [61] Anesiadis N, Cluett WR, Mahadevan R. Dynamic metabolic engineering for increasing bioprocess productivity. *Metab Eng*, 2008, 10(5): 255-266
- [62] Soma Y, Hanai T. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production. *Metab Eng*, 2015, 30: 7-15
- [63] Gupta A, Reizman IMB, Reisch CR, et al. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(3): 273-279
- [64] Kim EM, Woo HM, Tian T, et al. Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*. *Metab Eng*, 2017, 44: 325-336
- [65] Doong SJ, Gupta A, Prather KLJ. Layered dynamic regulation for improving metabolic pathway productivity in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(12): 2964-2969
- [66] Gu F, Jiang W, Mu Y, et al. Quorum sensing-based dual-function switch and its application in solving two key metabolic engineering problems. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(2): 209-217
- [67] Yang X, Liu J, Zhang J, et al. Quorum sensing-mediated protein degradation for dynamic metabolic pathway control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2021, 64: 85-94
- [68] Glasscock CJ, Biggs BW, Lazar JT, et al. Dynamic control

- of gene expression with riboregulated switchable feedback promoters. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(5): 1199-1213
- [69] Hu L, Zhao M, Hu W, et al. Poly- γ -glutamic acid production by engineering a DegU quorum-sensing circuit in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2022, 11(12): 4156-4170
- [70] Ge C, Yu Z, Sheng H, et al. Redesigning regulatory components of quorum-sensing system for diverse metabolic control. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2182
- [71] Nielsen AAK, Der BS, Shin J, et al. Genetic circuit design automation. *Science*, 2016, 352(6281): acc7341
- [72] Tamsir A, Tabor JJ, Voigt CA. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires'. *Nature*, 2011, 469(7329): 212-215
- [73] Shong J, Collins CH. Quorum sensing-modulated AND-gate promoters control gene expression in response to a combination of endogenous and exogenous signals. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(4): 238-246
- [74] Hu Y, Yang Y, Katz E, et al. Programming the quorum sensing-based AND gate in *Shewanella oneidensis* for logic gated-microbial fuel cells. *Chem Commun*, 2015, 51(20): 4184-4187
- [75] He X, Chen Y, Liang Q, et al. Autoinduced AND gate controls metabolic pathway dynamically in response to microbial communities and cell physiological state. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(3): 463-470
- [76] Stephens K, Bentley WE. Synthetic biology for manipulating quorum sensing in microbial consortia. *Trends Microbiol*, 2020, 28(8): 633-643
- [77] Balagaddé FK, Song H, Ozaki J, et al. A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Mol Syst Biol*, 2008, 4(1): 187
- [78] Stephens K, Pozo M, Tsao CY, et al. Bacterial co-culture with cell signaling translator and growth controller modules for autonomously regulated culture composition. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4129
- [79] You L, Cox III RS, Weiss R, et al. Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. *Nature*, 2004, 428(6985): 868-871
- [80] Scott SR, Din MO, Bittihn P, et al. A stabilized microbial ecosystem of self-limiting bacteria using synthetic quorum-regulated lysis. *Nat Microbiol*, 2017, 2(8): 17083
- [81] Kong W, Meldgin DR, Collins JJ, et al. Designing microbial consortia with defined social interactions. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(8): 821-829
- [82] Wu F, Lopatkin AJ, Needs DA, et al. A unifying framework for interpreting and predicting mutualistic systems. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 242
- [83] McMillen D, Kopell N, Hasty J, et al. Synchronizing genetic relaxation oscillators by intercell signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(2): 679-684
- [84] Danino T, Mondragón-Palomino O, Tsimring L, et al. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 2010, 463(7279): 326-330
- [85] Prindle A, Samayoa P, Razinkov I, et al. A sensing array of radically coupled genetic 'biopixels'. *Nature*, 2012, 481(7379): 39-44
- [86] Chen Y, Kim JK, Hirning AJ, et al. Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium. *Science*, 2015, 349(6251): 986-989
- [87] Baumgart L, Mather W, Hasty J. Synchronized DNA cycling across a bacterial population. *Nat Genet*, 2017, 49(8): 1282-1285
- [88] Kim JK, Chen Y, Hirning AJ, et al. Long-range temporal coordination of gene expression in synthetic microbial consortia. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(11): 1102-1109