

基于转录因子生物传感器在环境分析中的应用

张迪¹ 鞠睿¹ 李丽梅² 王煜倩³ 陈瑞³ 王新一¹

(1. 大连大学生命健康学院, 大连 116622; 2. 沈阳农业大学理学院, 沈阳 110866; 3. 北京市科学技术研究院城市安全与环境科学研究所
职业安全健康北京市重点实验室, 北京 100054)

摘要: 转录因子是一类在细胞中通过引导 RNA 聚合酶与特定 DNA 序列结合调控基因表达的蛋白质。转录因子是生物体适应自然环境过程中的一类重要调节性蛋白, 可专一性的感知环境介质中的配体分子。利用转录因子作为识别元件构建生物传感体系并与不同的信号转导和放大系统耦合, 可在细胞、无细胞和体外等不同反应体系构建信号输出形式灵活多样的传感策略。基于转录因子构建的生物传感器 (TFBBs), 因其灵敏度高、体积小、价格低廉以及可应用于现场监测等优势, 在环境分析领域显示出巨大应用潜力。文中着重介绍了 TFBBs 的传感体系类型、核心元件组成和工作原理, 列举了其在重金属离子、芳香族化合物及抗生素等环境污染物检测中的应用进展, 在此基础上讨论了 TFBBs 在环境污染物检测中可能面临的机遇和挑战, 并对其发展趋势进行了展望, 指出合成生物学、人工智能等多学科新兴技术的高速发展将促进 TFBBs 人工设计和传感性能提升, 使其应用于更广泛的领域。

关键词: 转录因子; 生物传感; 环境分析; 重金属离子; 芳香族化合物; 抗生素

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-1184

Application of Transcription Factor-based Biosensors in Environmental Analysis

ZHANG Di¹ JU Rui¹ LI Li-mei² WANG Yu-qian³ CHEN Rui³ WANG Xin-yi¹

(1. College of Life and Health, Dalian University, Dalian 116622; 2. College of Sciences Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866;
3. Beijing Key Laboratory of Occupational Safety and Health, Institute of Urban Safety and Environmental Science, Beijing Academy of Science and Technology, Beijing 100054)

Abstract: Transcription factors are a class of proteins that regulate gene expression in cells by directing RNA polymerases to bind to specific DNA sequences. Transcription factors, as important regulatory proteins for prokaryotes to adapt to the natural environment, can specifically sense ligand molecules in environmental media. By coupling with different signal transduction and amplification systems, biosensing systems with transcription factors as recognition elements can construct flexible sensing strategies in whole-cell system, cell-free system and *in vitro* reaction systems. The transcription factor-based biosensors (TFBBs) have the advantages of high sensitivity, small size, low-cost, and on-site monitoring, showing great potential in the analysis of environmental pollutants. This paper introduces the reaction system types, core component compositions and working principle of TFBBs, as well as lists their application progress in the detection of environmental pollutants including heavy metal ions, aromatic compounds and antibiotics. On this basis, the opportunities and challenges for TFBBs in the detection of environmental pollutants are discussed, and the development trend of TFBBs is prospected. It points out that the rapid development of interdisciplinary emerging technologies such as synthetic biology and artificial intelligence will promote the artificial design and sensing performance improvement of TFBBs, making them applicable in a wider range of fields.

Key words: transcription factors; biosensor; environmental analysis; heavy metal ions; aromatic compounds; antibiotics

收稿日期: 2023-12-15

基金项目: 大连大学学科交叉项目 (DLUXK-2022-ZD-002)

作者简介: 张迪, 女, 博士, 研究方向: 环境化学; E-mail: deezhang163@163.com

通讯作者: 王新一, 男, 博士, 教授, 研究方向: 分析化学、纳米生物学; E-mail: wangxinyi@dlu.edu.cn

转录因子(transcription factors, TFs)是一类在细胞中通过引导RNA聚合酶与特定DNA序列结合调控基因表达的蛋白质。“转录因子”这一概念伴随学科发展不断更新,新观点认为真核生物和细菌都有TFs,细菌的结合DNA的转录调节蛋白就是转录因子^[1]。TFs作为微生物适应自然环境过程中的一类重要调节性蛋白,可以专一性地感知环境介质中的配体分子^[2]。基于转录因子构建的生物传感器(transcription factor-based biosensors, TFBBs)以其独特的优势,展现出巨大潜力。本文主要对TFBBs的工作原理进行综述,并介绍其在环境污染物检测中的研究进展,为今后该类型生物传感器的开发与应用提供参考。

1 基于转录因子生物传感反应体系(TFBBs)类型

TFBBs根据其反应平台不同可分为全细胞、无细胞和体外传感体系等。全细胞生物传感器也称为微生物传感器,一般是指以活的微生物全细胞作为感受元件,经过基因工程改造,可响应环境污染物并产生剂量依赖性可读信号^[3]。全细胞微生物传感器具有成本低、体积小、可在线或原位分析等优点,但问题也比较突出,包括传感性能提升、储存运输,以及转基因生物扩散引发的生物安全问题等。无细胞生物传感是利用无细胞转录翻译系统,即基于细胞提取物在体外快速表达蛋白质的系统而构建的一种生物传感平台^[4]。该系统绕过底盘细胞培养转化、克隆筛选、细胞裂解等过程,克服全细胞生产系统中细胞膜约束带来的表达局限性,可检测具有细胞毒性的分析物,更准确方便地控制反应底物,具有通用性和灵活性等优点^[5]。无细胞TFBBs的局限性主要体现在储存运输过程导致传感元件效率降低,影响灵敏度和特异性等方面。

体外TFBBs(*in vitro*-TFBBs)是受到ELISA工作原理的启发,利用变构转录因子(allosteric transcription factors, aTFs)作为体外识别元件,通过将aTF与不同的信号转导和放大系统耦合,构建信号输出形式灵活多样的传感策略^[6]。目前,*in vitro*-TFBBs传感平台主要分为三大类:(1)将aTF识别与邻近效应驱动的输出耦合(proximity effect-

driven),包括光激化学发光(AlphaScreen)^[7]和荧光共振能量转移(FRET)^[8];(2)将aTF识别与DNA信号输出耦合(DNA signal output),包括等温链置换扩增(SDA)^[9]、酶促/非酶促放大^[10],以及缺口DNA模板辅助(NAST)的重组酶聚合酶扩增(RPA)和滚环扩增(RCA)^[11];(3)将aTF识别与CRISPR-Cas输出耦合,包括基于Cas13的SHERLOCK技术^[12]、基于Cas12a开发了DETECTR、HOLMES和CDetection核酸检测技术^[11]。这些体外传感策略利用天然或设计人工aTFs的可调性,通过优化与信号转导和放大系统耦合兼容性,显著提高了传感器的便携性与稳定性。

2 TFBBs的结构组成和工作原理

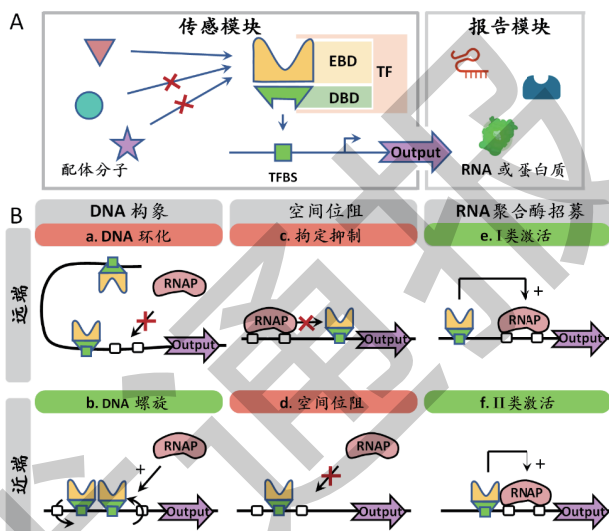
目前,广泛应用于TFBBs的为原核生物的aTFs,由传感模块和报告模块两个模块组成(图1-A)。传感模块负责将TFs与待测分子的识别信号转导至报告模块。TFs通常包含一个效应分子结合结构域(effector binding domain, EBD)和一个DNA结合结构域(DNA binding domain, DBD)。EBD通过与效应因子特异性结合产生构象改变,进一步将激活或抑制信号传输至DBD。DBD负责识别和结合操纵基因区域,调节报告基因表达。DBD由相对较短的特异性序列组成,展现出三种不同蛋白折叠构象,分别为螺旋-转角-螺旋(helix turn helix, HTH)基序^[13]、翼状螺旋-转角-螺旋(the winged helix turn helix, wHTH)基序^[14],以及带状螺旋(ribbon helix, RHH)基序^[15]。常见报告模块主要包括酶报告系统和荧光蛋白报告系统。前者在添加特定底物后,通过酶促反应间接量化污染物的浓度,后者通过荧光蛋白表达水平达到检测目的。最近,基因编码的小分子RNA适配体被开发为一种更为高效的生物传感器报告模块,该适配体可以特异性地结合化学发光团并激活荧光信号^[16]。Jaffrey实验室在2011年开发了一种名为“Spinach”的RNA适配体,与DFHBI化学发光团结合后激活荧光信号^[17]。在“Spinach”适配体的基础上,改进的“Spinach2”“Baby Spinach”“Broccoli”等RNA适配体在尺寸、折叠能力和信号强度等方面有所提升。Jung等^[18]将三臂二聚化的适配体(3WJdB)及化学发光团(DFHBI-1T)

作为报告模块,用于检测水中抗生素、金属离子及有机小分子等污染物。无论是荧光信号的输出速度还是强度,3WJdB 适配体都要明显优于超折叠绿色荧光蛋白 (sfGFP)。

TFs 通过 DNA 变构、空间位阻及 RNA 聚合酶招募三种调节机制 (图 1-B),直接或间接引导 RNA 聚合酶 (RNAP) 与核心启动子序列的相互作用,进一步调控转录的激活或抑制。根据 TFs 结合位点相对于核心启动子的位置,每种调节机制又可分为近端 (图 1-Bb、d、f) 和远端 (图 1-Ba、c、e) 两种调节模式。在 DNA 远端变构机制中,TFs 与启动子上下游相距较远的位置有多个结合位点,TFs 与 DNA 之间的相互作用使 DNA 自身“环化”,RNA 聚合酶无法与启动子结合,转录被抑制 (图 1-Ba);在近端变构调节模式中,TFs 改变启动子 DNA 双螺旋结构,调节启动子 -35 区和 -10 区之间的毗邻关系,使 RNA 聚合酶发挥作用 (图 1-Bb)。在空间位阻远端调节机制中,TFs 远程操控 RNA 聚合酶与启动子结合并将其锁定在启动子上,抑制转录的发生 (图 1-Bc);在空间位阻近端模式中,TFs 与核心启动子结合,阻碍 RNA 聚合酶对启动子的识别 (图 1-Bd),从而抑制转录。RNA 聚合酶招募机制被用于转录激活,在远端模式中,TFs 与启动子 -35 区的上游位点结合,并与 RNA 聚合酶的 α -CTD (C-terminal domain) 区作用激活转录 (图 1-Be);在近端模式中,TFs 与 RNA 聚合酶直接接触,促进 RNA 聚合酶的 σ 亚基与启动子结合,使下游基因得以表达 (图 1-Bf)。

相对而言,真核 TFs 在结合位点、启动子识别、功能行使以及调控方式等方面与原核细胞存在明显区别。真核转录因子通常不直接与配体结合,而是通过配体与受体结合触发信号转导途径控制基因表达。一大类基于酵母的生物传感器依赖于 GPCR 超家族,可以对与人类健康相关的多肽分子、代谢物和激素的所需浓度做出灵敏反应^[19-21]。酵母双杂交系统的建立得益于对真核生物调控转录起始过程的认识。由于遗传的保守性、基因组的可修改性和易于获得的分析方法,酵母成为设计细胞生物传感系统的高度灵活的微生物,用于研究疾病的发病机制和药物研发设计^[22]。虽然基于细菌的生物传感器已经被广泛报道,但最近人们对基于酵母的生物传感

器很感兴趣,它结合了微生物与真核生物的优势,包括拥有特定的受体,稳定性和高鲁棒性^[23]。



A: 生物传感器结构示意图; B: 转录因子激活及抑制机制示意图

A: Schematic diagram of biosensor structure; B: schematic description of transcription factor activation and repression mechanisms

图 1 TFBBs 结构及工作原理图

Fig. 1 Principle of transcription factor-based biosensors

3 TFBBs 的发展现状

利用基因工程、蛋白质工程、计算模拟等技术手段对 TFs 进行人工改造,可大幅提升传感器的特异性、灵敏度和检测范围。ColS 是一种与 MerR 高度同源的转录因子, Cerminati 等^[24]将 ColS 的第 77 位丝氨酸替换为半胱氨酸,构建了响应 Hg^{2+} 的突变体 (GolSS77C),灵敏性达 4.4 nmol/L,在不影响对 Au^+ 响应能力的条件下扩大了金属离子检测范围。Mendoza 等^[25]将 GolSS77C 金属结合环 (MBL) 替换为 MerR 的汞离子识别结构域,所构建的传感器检测限达纳摩尔。进一步,针对 TFs 功能域关键氨基酸位点构建突变体文库,或是对 TFs 功能域外的氨基酸位点突变 (如二聚体区域、铰链区等),筛选最佳突变体 TFs,可开发高度特异性和灵敏度的生物传感器^[26]。Jha 等^[27]着眼于转录因子整体结构设计,从蛋白质-蛋白质作用界面出发,建立了二聚体区域的突变体库,并与启动子突变体库相结合,成功构建了一种更为高效的全细胞 TFBBs。

随着合成生物学、结构生物学及人工智能的迅猛发展,转录因子的从头设计受到了广泛研究与关注。中国科学院天津工业生物技术研究所郑平团队等^[28]以 LTTR 家族的 LysG 和 BenM 为研究对象,通过分子对接、MD 模拟和定向进化等技术解析了 EBD 与 DBD 间的铰链区的调控功能及机制,对仅包含约 30 个氨基酸的铰链区进行定向进化,获得响应性能显著提升的突变体,开发了一种通用型 TFBBs 优化策略,为 TFBBs 的应用提供了新思路。由于大数据的快速发展和对遗传元件的深入解析,各类数据库也不断开发。CoryneRegNet、PRODORIC、RegulonDB、RhizoRegNet、GroovDB 等变构转录因子数据库^[6]包含基因回路、转录因子结合位点、配体小分子等信息,为 TFBBs 的研究提供了庞大的元件基础,加快了遗传元件和生物传感器人工设计与构建的过程。

4 TFBBs 在环境分析中的应用

4.1 重金属污染物的检测

重金属离子是环境中主要的水质污染物,通过产生自由基导致人体严重的健康问题^[29]。TFBBs 在检测环境重金属污染物领域应用广泛。根据金属离子对转录因子的响应,TFs 可分为 7 个家族^[30]: MerR、ArsR/SmtB、DtxR、Fur、NikR、CsoR-RcnR 和 CopY 家族。MerR 家族包含 MerR、CadR、ZntR、PbrR、CueR、GolS、CoaR,可响应汞、镉、铅、锌、铜、金、钴、银等金属离子;ArsR/SmtB 包含 SmtB、ZiaR、CzrA、ArsR、CadC、AziR、CmtR、NmtR、KmtR、BxmR,可响应锌、钴、砷、锑、铋、镉、铅、铜、银、镍等金属离子;DtxR 家族包括 DtxR、IdeR、SirR、MntR、ScaR、TroR,可响应铁、锰、镉、锌、钴、镍等金属离子;Fur 家族包括 Fur、Zur、Mur 和 Nur,响应铁、锌、锰、镍。NikR 家族只响应镍,为镍响应蛋白;CsoR-RcnR 家族包括 CsoR、RcnR,响应铜、镍、钴等金属离子;CopY 家族为铜离子响应蛋白,主要包括 CopR。

汞和镉是受关注的重金属离子。转录因子 MerR 家族的 MerR 是一类常见的汞传感元件^[31]。在便携应用方面,Guo 等^[32]将 MerR 与红色荧光蛋白(RFP)报告基因结合,开发了一种低成本便携式试纸条,

可直接检测可溶性和不溶性无机汞污染物。在灵敏度提升方面,Wang 等^[33]基于细胞表面工程技术和 MerR 转录机制,构建了 Hg^{2+} 全细胞检测与修复系统,检测限低至 0.1 nmol/L。该系统中引入的 MerA 蛋白可将 Hg^{2+} 转化为毒性小的 Hg^0 ,对于解决重金属污染修复具有一定的参考价值。转录因子 ZntR、MerR、CadC (ArsR/SmtB 家族)、CadR 和 ZntR (MerR 家族)是常用的镉(Cd)传感元件。考虑到微生物的固有活性和机械性能对传感器灵敏度影响巨大,Bereza-Malcolm 等^[34]将 CadR、绿色荧光蛋白报告基因和红色荧光蛋白报告基因(mrfp1)结合,构建了一种既能检测 Cd^{2+} ,又可监测微生物自身功能和活力的生物传感器。在安全应用方面,Tang 等^[35]利用水凝胶技术及营养缺陷菌株,设计了一种物理封装和生物遏制双模式的 Cd^{2+} 微生物传感器。该传感器以 ZntR 作为传感元件,检测限低至 5 $\mu\text{mol/L}$,并且在长时间物理损伤下实现微生物的零逸出,为全细胞生物传感器的安全应用提供了新思路。

利用合成生物学手段定向改造或定向进化天然转录因子、优化基因回路以及改造底盘细胞的金属调控系统,可大幅提高生物传感器的检测灵敏度和特异性。Wang 等^[36]利用转录因子 ArsR 响应砷离子,CusR 响应铜离子,MerR 响应汞离子,ZraR 响应锌离子/铅离子,ZntR 响应锌离子/镉离子,与绿色荧光蛋白结合分别设计单信号输出、双信号输出以及三信号输出系统,实现砷离子、汞离子和铜离子的同时监测。Cayron 等^[37]将可响应 Ni^{2+} 信号的转录因子 RcnR 定点突变(C35A)后引入 TD2158 野生型大肠杆菌,并在敲除 Ni^{2+} 外排泵基因(rcnA)的同时引入编码促进 Ni^{2+} 摄取的基因,达到 Ni^{2+} 胞内富集的目的,检测限为 80 nmol/L。目前,检测环境重金属离子的细胞生物传感器从以下几个方面进行优化,包括合成生物组件(启动子、操纵子等)、传感元件(转录因子)、报告元件、基因回路和底盘细胞的设计改造^[38]。同时,TFBBs 还可结合微电子学和微流控装置,满足便携式高通量的现场检测需求^[39](表 1)。

4.2 芳香族化合物的检测

芳香族化合物作为一类典型的长效有机污染物

表 1 基于转录因子构建的生物传感器对重金属离子的检测

Table 1 Detection of heavy metal ions by transcription factor-based biosensors						
重金属 Heavy metal ion	转录因子 / 家族 TFs/families	PDB	反应平台 Reaction platform	报告元件 Report component	检测限 Limit of detection	参考文献 Reference
汞 Hg (II)	MerR/MerR	-	全细胞平台	mCherry	0.1 nmol/L	[33]
			全细胞平台	GFP	4.4 nmol/L	[24]
			全细胞平台	RFP	1 mg/kg	[32]
			无细胞平台	3WJdB	0.5 nmol/L	[40]
			全细胞平台	sfCherry3C	2.24 μmol/L	[41]
镉 Cd (II)	CadR/MerR	-	全细胞平台	GFP、RFP	0.01 μg/mL	[34]
			全细胞平台	sGFP	35 nmol/L	[42]
	ZntR/MerR	1Q08	全细胞平台	eGFP	1 000 nmol/L	[43]
			全细胞平台	Lux	100 nmol/L	[44]
			全细胞平台	GFP	283.9 nmol/L	[24]
	MerR/MerR	-	全细胞平台	eGFP	3 μmol/L	[45]
			全细胞平台	GFP	10 μg/mL	[46]
	CadC/ArsR/SmtB	1U2W	全细胞平台	mCherry	0.1 μg/mL	[47]
	ZntR/MerR	1Q08	全细胞平台	GFP	5 μmol/L	[35]
	ArsR/ArsR/SmtB	1R23	邻近效应驱动	Lac Z	8 ppb	[48]
砷 As (III)	ArsR/ArsR/SmtB	-	全细胞平台	GFP	0.1 μmol/L	[36]
			全细胞平台	GFP、RFP	0.01 μg/mL	[34]
	CopR/CopY	-	全细胞平台	RFP	24.3 μmol/L	[49]
	CueR/MerR	1Q05	全细胞平台	eGFP	0.08 μmol/L	[50]
铜 Cu (II)	CusR	-	全细胞平台	GFP	12 μmol/L	[36]
			全细胞平台	eGFP	1 μmol/L	[51]
	SmtB/ArsR/SmtB	1R23	全细胞平台	GFP、mCherry	5 mg/L	[52]
	ZntR/MerR	1Q08	全细胞平台	eGFP、mCherry	10 μg/mL	[53]
	MerRZntR/MerR	-	全细胞平台	Lux	0.03 mmol/L	[54]
铅 Pb (II)	CadR/MerR	-	全细胞平台	GFP、RFP	0.01 μg/mL	[34]
			全细胞平台	GFP	39.6 nmol/L	[24]
	PhrR/MerR	-	全细胞平台	靛蓝合成酶 Indigoidine synthetase	0.065 mol/L	[55]
			无细胞平台	3WJdB	0.1 nmol/L	[40]
			全细胞平台	比色法	2.93 nmol/L	[56]
锑 Sb (III)	ArsR/ArsR/SmtB	1R23	全细胞平台	eGFP	0.25 μmol/L	[57]
镍 Ni (II)	RcnR/CsoR-RcnR	-	全细胞平台	Lux	80 nmol/L	[37]

(POPs) 及内分泌干扰物 (EDCs), 严重威胁人类的健康安全^[58-59]。用于检测芳香类化合物的 TFs 家族主要可分 3 类: XylS-AraC、NahR-LysR 和 XylR-NtrC。传感策略呈现多样化和集成化。Sun 等^[60]将 DmpR 作为传感器识别元件, eGFP 作为报告元件, 通过 DmpR 串联和 eGFP 并联模式构建了两种模块化基因回路, 显示出比单一回路高近 9 倍和 16 倍的灵敏度。该传感器可在 12 h 内快速检测包括苯并芘、2,4-二甲苯酚、邻甲酚、2-氯苯酚等 6 种酚类污染物。

萘作为典型的多环芳烃, 其识别过程依赖于转录因子和代谢中间产物之间的相互作用。萘代谢通常由水杨酸途径介导, 即萘首先通过代谢途径转化为水杨酸, 随后转录因子 SalR 或 NahR 响应水杨酸信号, 激活下游基因的表达^[61]。Sun 等^[62]基于以上原理, 将能够诱导萘代谢的重组质粒转染至含有 SalR 操纵子的细菌中并与荧光素酶报告基因组合, 成功构建了全细胞生物传感器, 用于水体和土壤中萘含量的监测。

目前，基于天然转录因子 TFBBs 可响应的分子种类较少，不能满足检测其相应的同系物及衍生物。Chong 等^[26]在转录因子 DmpR 中引入随机突变，以珊瑚荧光蛋白基因作为报告模块，在低浓度 4- 硝基苯酚条件下筛选出两个 DmpR 突变体（DM01 和 DM12），相比于野生型 DmpR 明显增强了对底物的响应。不同于随机突变的进化模式，Roy 等^[63]通过模拟待测物质与转录因子 EBD 区的结合位点，突变关键区域氨基酸构建 MopR 突变体库，实现对八种单环芳香族化合物（苯酚、间氯苯酚、间甲酚、2,3- 二甲基苯酚、苯、甲苯、乙苯以及间二甲苯）的专一检测。目前，对传感元件的改造已不限于单独的 EBD 区，Juárez 等^[64]分别构建了 DBD、EBD 以及铰链区库，将库内元件进行排列组合，最终获得 67 830 种新型嵌合变构转录因子，以苯甲酸作为目标物进行高通量筛选验证。该方案流程普适性高，对新型污染物生物识别元件的快速筛选具有重大意义（表 2）。

4.3 抗生素的检测

抗生素污染是一个全球性问题，对人类健康、农业生产和生物安全构成直接威胁^[78-79]。响应抗生素的 TFs 通常参与抗生素耐药基因的表达，如 TetR 家族中的 TetR、ActR、MphR 等主要与抗生素抗性和编码小分子转运蛋白的基因调节有关，可作为识别元件感应四环素类及大环内酯类抗生素。在传感策略方面，Chern 等^[80]基于 TetR 构建了一种 TFBBs，生物素化的操纵基因与链霉素和素修饰的琼脂糖凝珠相连，TetR 被红色半导体量子点功能化修饰。当 TetR 与四环素结合，量子点从操纵基因上脱落，溶液转为红色，肉眼可视的检测限为 6 nmol/L。该项工作无需检测仪器、前处理、清洗或信号放大步骤，为现场快速检测提供新的思路。另一项工作中，Zhang 等^[81]构建了一种基于生物发光的无细胞 TFBBs（eBLUE），利用 TetR 调控下游特定 RNA 序列阵列的转录，作为激活重组荧光素酶片段的支架，并通过适配智能手机平台，可在 15 min

表 2 基于转录因子构建的生物传感器对芳香族化合物的检测

Table 2 Detection of aromatic compounds by transcription factor-based biosensors						
芳香族化合物 Aromatic compound	转录因子 / 家族 TFs/families	PDB	反应平台 Reaction platform	报告元件 Report component	检测限 Limit of detection	参考文献 Reference
苯甲酸	BenR/XylS-AraC	-	无细胞平台	sfGFP	1 μmol/L	[65]
			无细胞平台	GFP	21 702.8 nmol/L	[66]
苯	DmpR/XylR-NtrC	5KBE	体外酶放大系统	ATP 酶	0.3 ppm	[67]
氯苯酚	DmpR/XylR-NtrC		全细胞平台	Lac Z	100 μmol/L	[68]
苯并芘	DmpR/XylR-NtrC		全细胞平台	eGFP	2.5 ppb	[60]
甲苯	XylR/XylR-NtrC	4FE4	全细胞平台	荧光素酶	1 μmol/L	[69]
2,4- 二硝基甲苯	XylR/XylR-NtrC		全细胞平台	GFP/lux	~μmol/L	[70]
	XylRv17/XylR-NtrC	-	全细胞平台	荧光素酶 /lacZ	-	[71]
2- 羟基 -3',4'- 二氯联苯	HbpR/XylR-NtrC	-	全细胞平台	荧光素酶	10 nmol/L	[72]
苯酚	MopR/XylR-NtrC	5KBE	全细胞平台	荧光素酶	1 ppb	[63]
4- 硝基苯酚	Dm01/Dm12/XylR-NtrC	-	全细胞平台	RFP	10 μmol/L	[26]
水杨酸	SAR2349/NahR-LysR	4EM0	无细胞平台	3WJdB 荧光适配体 /sfGFP	~μmol/L	[18]
苯并芘	SalR/NahR-LysR	-	全细胞平台	荧光素酶	0.01 μmol/L	[62]
萘	NahR/NahR-LysR	-	全细胞平台	荧光素酶	50 nmol/L	[73]
水杨酸	CmeR/TetR	-	全细胞平台	eGFP	~μmol/L	[74]
苯扎氯氨	QacR/TetR/CamR	1JT0	无细胞平台	3WJdB 荧光适配体	~μmol/L	[18]
苯甲酸盐	MarR/MarR	1JGS	全细胞平台	yEGFP	~ fmol/L	[75]
苯甲醛	BldR/MarR	3F3X	全细胞平台	eGFP	~μmol/L	[76]
3- 羟基苯甲酸	MobR/MarR	-	无细胞平台	3WJdB 荧光适配体 /	-	[18]
苯亚砷酸盐	ArsR/ArsR	6J05	全细胞平台	GFP	1 μmol/L	[77]
丙酮酸盐	PdhR/GntR	-	全细胞平台	yEGFP	~ fmol/L	[75]

内实现牛奶中四环素和红霉素的快速精确定量，检测限分别为 45 nmol/L 和 7.3 nmol/L。

基于抗生素检测的重要性，越来越多的 TFBBs 被开发。红霉素作为一种疏水性抗生素，主要通过跨膜的被动运输方式自由进出细胞，严重干扰全细胞生物传感器的灵敏度^[82]。Miller 等^[83]以转录因子 MphR 作为识别元件，向传感器中引入可对红霉素进行磷酸化修饰的 MphA 蛋白，将红霉素捕获进入细胞并减少其胞外扩散，增强了信号响应，检测限低至 13 nmol/L。在高通量和灵敏诊断方面，Li 等^[84]利用易出错 PCR 技术，生成了包含 10⁷ 个 TetR 突变体的文库，经过 2 轮定向进化筛选，分离

出 TerR 突变体 epS2-22 作为识别元件与 sfGFP 进行组装，对四环素、金霉素、土霉素等 7 种抗生素的检测限比野生型低 4–62 倍，在环境中低痕量抗生素检测方面表现出优异的性能。此外，体外传感体系也被广泛开发。Cao 等^[11]设计了一种基于转录因子的缺口 DNA 模板信号转导系统（aTF-NAST），利用 DNA 扩增技术（RT-qPCR、RCA 和 RPA）作为信号输出装置，构建了四环素的生物传感策略，其中以 RPA 作为信号输出模块的灵敏度最高，检测限为 0.005 nmol/L。由此可见，TFBBs 作为一种经济、稳健、灵敏和特异的检测手段，在环境抗生素检测领域显示出巨大的发展前景（表 3）。

表 3 基于转录因子生物传感器对抗生素的检测

Table 3 Detection of antibiotic by transcription factor-based biosensors						
抗生素 Antibiotic	转录因子 / 家族 TFs/Families	PDB	反应平台 Reaction platform	报告元件 Report component	检测限 Limit of detection	参考文献 Reference
四环素	TetR/TetR	1QPI	限制性内切酶	荧光探针	25 nmol/L	[85]
			全细胞平台	EGFP 和 mCherry	0.1 ng/mL	[86]
			aTF-NAST	RPA	0.005 nmol/L	[11]
			无细胞平台	荧光适配体	~125 nmol/L	[18]
			无细胞平台	G- 四链体	18.08 ng/mL	[87]
			无细胞平台	荧光适配体	10 nmol/L	[88]
			无细胞平台	CRISPR-Cas12a	-	[89]
			无细胞平台	荧光素酶	45 nmol/L	[81]
脱水四环素			QD-FRET	光致发光	6 nmol/L	[80]
			QD-FRET	光致发光	80 nmol/L	[90]
强力霉素			全细胞平台	yEmRFP	0.3 µg/mL	[91]
			无细胞平台	荧光适配体	~0.2 µmol/L	[18]
放线菌素	ActR/TetR	3B6C	全细胞平台	-		[92]
金霉素	MphR/MphR	3FRQ	无细胞平台	荧光适配体	~125 nmol/L	[18]
放线菌素			全细胞平台	GFP	-	[93]
红霉素			全细胞平台	GFP	13 nmol/L	[83]
			无细胞平台	荧光适配体	~2.5 µmol/L	[18]
			无细胞平台	荧光素酶	7.3 nmol/L	[81]
			无细胞平台	荧光适配体	~2.5 µmol/L	[18]
罗红霉素			无细胞平台	荧光适配体	~2.5 µmol/L	[18]
阿奇霉素			荧光适配体	荧光适配体	~2.5 µmol/L	[18]
叠氮红霉素			全细胞平台	荧光素酶	-	[94]
竹桃霉素			全细胞平台	荧光素酶	-	[94]
苦霉素			全细胞平台	荧光素酶	-	[94]
克拉霉素	MphR/MphR	6U18	全细胞平台	GFP	1 µmol/L	[95]
			无细胞平台	荧光适配体	~2.5 µmol/L	[18]
土霉素	CtcS/MarR		无细胞平台	荧光适配体	~125 nmol/L	[18]
美罗培南	AmpR/LysR		全细胞平台	mCherry	8 pg/mL	[96]
亚胺培南			全细胞平台	mCherry	40 pg/mL	[96]

5 总结与展望

基于转录因子开发的环境污染物生物传感器发展至今,研究热度持续增加。除了环境监测,该类型的传感器在食品安全、药物研发、临床诊断等领域也得到了广泛的应用。相对于传统检测方法,TFBBs具有经济、灵敏、操作简单等显著优点,为现场快速检测提供了新的思路。然而,TFBBs技术也存在一些不足,如检测成本高、组分不易保存、设计构建繁琐以及生物安全性等都是TFBBs技术未来需要解决的实际问题。近年来 *in vitro*-TFBBs 策略受到了广泛研究与关注。*in vitro*-TFBBs 有效避免了目前以全细胞和无细胞模式为主体 TFBBs 的缺点和不足,包括传感性能、储存运输、生物安全、大规模生产问题等。体外传感体系与信号转导和放大系统耦合兼容性更佳,实现了 TFBBs 多样的传感形式和可观的精确度与灵敏度,在环境监测领域显示了巨大的优势和发展前景。

此外,提升转录因子识别范围和实现设计标准化以满足不同实际应用场景的检测需求,也是目前亟需解决的瓶颈问题。目前 TFBBs 主要基于天然 TFs 构建,其性能可以通过定向进化、易出错 PCR 等方法进行提升^[97]。尽管天然 TFs 能够对多种效应分子产生响应,但大部分目标分子是异源产生的,天然 TFs 在检测应用中存在响应时间慢、检测范围窄以及特异性差等局限性。为了适应时代发展,越来越多人工合成的 TFs 应用到生物传感器中,极大提高了 TFs 识别范围和工作性能,从而为构建具有优良性状的生物传感器创造可能。TFs 的人工改造和从头设计是目前生物传感器设计开发领域的热点。研究者们利用合成生物学技术和大数据手段挖掘、设计和开发具有新功能的人工 TFs,大幅提升了传感器的特异性及灵敏度,拓宽了传感器检测范围。TFs 除了蛋白质工程改造外,对 TFs 与识别序列的结合情况、TFs 表达量、启动子强度等进行优化也可改变传感器动态范围、本底表达水平等响应性能。总体来说,随着合成生物学、结构生物学、工程学等多学科前沿技术的不断融合,微型化、智能化及集成化是 TFBBs 未来的发展方向,商业化产品的广泛应用指日可待。

参考文献

- [1] 杨克恭. 细菌有转录因子吗? — “转录因子”概念的形成和发展浅析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(6): 691-696.
Yang KG. Do bacteria have the transcription factors? The formation and development of the concept of “transcription factor” [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2021, 37(6): 691-696.
- [2] 卜恺璇, 周翠霞, 路福平, 等. 细菌转录起始调控机制[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(11): 89-99.
Bu KX, Zhou CX, Lu FP, et al. Research on the regulation mechanism of bacterial transcription initiation [J]. China Biotechnol, 2021, 41(11): 89-99.
- [3] 杨璐, 吴楠, 白茸茸, 等. 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, et al. Design, optimization and application of whole-cell microbial biosensors with engineered genetic circuits [J]. Synth Biol J, 2022, 3(6): 1061-1080.
- [4] 赵晓蕊, 陈慧芳, 雷春阳, 等. 无细胞生物传感技术在环境污染检测方面的应用进展[J]. 分析化学, 2023, 51(8): 1223-1231.
Zhao XR, Chen HF, Lei CY, et al. Advances in application of cell-free biosensing technologies for detection of environmental pollutant [J]. Chin J Anal Chem, 2023, 51(8): 1223-1231.
- [5] Gu YQ, Fan F, Liu Y, et al. Cell-free protein synthesis system for bioanalysis: advances in methods and applications [J]. Trac Trends Anal Chem, 2023, 161: 117015.
- [6] Li SS, Li ZL, Tan GY, et al. *In vitro* allosteric transcription factor-based biosensing [J]. Trends Biotechnol, 2023, 41(8): 1080-1095.
- [7] Li SS, Zhou L, Yao YP, et al. A platform for the development of novel biosensors by configuring allosteric transcription factor recognition with amplified luminescent proximity homogeneous assays [J]. Chem Commun, 2017, 53(1): 99-102.
- [8] Nguyen TT, Chern M, Baer RC, et al. A Förster resonance energy transfer-based ratiometric sensor with the allosteric transcription factor TetR [J]. Small, 2020, 16(17): e1907522.
- [9] Yao YP, Li SS, Cao JQ, et al. Development of small molecule biosensors by coupling the recognition of the bacterial allosteric transcription factor with isothermal strand displacement amplification [J]. Chem Commun, 2018, 54(38): 4774-4777.
- [10] Yao YP, Li SS, Cao JQ, et al. A novel signal transduction system for development of uric acid biosensors [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(17): 7489-7497.

- [11] Cao JQ, Yao YP, Fan KQ, et al. Harnessing a previously unidentified capability of bacterial allosteric transcription factors for sensing diverse small molecules *in vitro* [J]. *Sci Adv*, 2018, 4 (11) : eaau4602.
- [12] Iwasaki RS, Batey RT. SPRINT: a Cas13a-based platform for detection of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48 (17) : e101.
- [13] Eddy SR. Computational genomics of noncoding RNA genes [J]. *Cell*, 2002, 109 (2) : 137-140.
- [14] Gajiwala KS, Burley SK. Winged helix proteins [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10 (1) : 110-116.
- [15] Schreiter ER, Drennan CL. Ribbon-helix-helix transcription factors: variations on a theme [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5 (9) : 710-720.
- [16] Yu QK, Ren KW, You MX. Genetically encoded RNA nanodevices for cellular imaging and regulation [J]. *Nanoscale*, 2021, 13 (17) : 7988-8003.
- [17] Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR. RNA mimics of green fluorescent protein [J]. *Science*, 2011, 333 (6042) : 642-646.
- [18] Jung JK, Alam KK, Verosloff MS, et al. Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38 (12) : 1451-1459.
- [19] Qiu CX, Zhai HT, Hou J. Biosensors design in yeast and applications in metabolic engineering [J]. *FEMS Yeast Res*, 2019, 19 (8) : foz082.
- [20] Mukherjee K, Bhattacharyya S, Peralta-Yahya P. GPCR-based chemical biosensors for medium-chain fatty acids [J]. *ACS Synth Biol*, 2015, 4 (12) : 1261-1269.
- [21] Dong CY, Ly C, Dunlap LE, et al. Psychedelic-inspired drug discovery using an engineered biosensor [J]. *Cell*, 2021, 184 (10) : 2779-2792.e18.
- [22] Dhakal S, Macreadie I. The use of yeast in biosensing [J]. *Microorganisms*, 2022, 10 (9) : 1772.
- [23] Wahid E, Ocheja OB, Marsili E, et al. Biological and technical challenges for implementation of yeast-based biosensors [J]. *Microb Biotechnol*, 2023, 16 (1) : 54-66.
- [24] Cerminati S, Soncini FC, Checa SK. A sensitive whole-cell biosensor for the simultaneous detection of a broad-spectrum of toxic heavy metal ions [J]. *Chem Commun*, 2015, 51 (27) : 5917-5920.
- [25] Mendoza JI, Soncini FC, Checa SK. Engineering of a Au-sensor to develop a Hg-specific, sensitive and robust whole-cell biosensor for on-site water monitoring [J]. *Chem Commun*, 2020, 56 (48) : 6590-6593.
- [26] Chong HQ, Ching CB. Development of colorimetric-based whole-cell biosensor for organophosphorus compounds by engineering transcription regulator DmpR [J]. *ACS Synth Biol*, 2016, 5 (11) : 1290-1298.
- [27] Jha RK, Bingen JM, Johnson CW, et al. A protocatechuate biosensor for *Pseudomonas putida* KT2440 via promoter and protein evolution [J]. *Metab Eng Commun*, 2018, 6: 33-38.
- [28] Pu W, Chen JZ, Liu P, et al. Directed evolution of linker helix as an efficient strategy for engineering LysR-type transcriptional regulators as whole-cell biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 222: 115004.
- [29] Zhang P, Yang MJ, Lan JJ, et al. Water quality degradation due to heavy metal contamination: health impacts and eco-friendly approaches for heavy metal remediation [J]. *Toxics*, 2023, 11 (10) : 828.
- [30] 朱振宇, 华堃堃, 胡婷婷, 等. 微生物金属响应蛋白研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2018, 45 (8) : 1794-1803.
- [30] Zhu ZY, Hua YK, Hu TT, et al. Advances in microbial metal response proteins [J]. *Microbiol China*, 2018, 45 (8) : 1794-1803.
- [31] Guo Y, Hui CY, Liu LS, et al. Development of a bioavailable Hg (II) sensing system based on MerR-regulated visual pigment biosynthesis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1) : 13516.
- [32] Guo MZ, Wang JL, Du RX, et al. A test strip platform based on a whole-cell microbial biosensor for simultaneous on-site detection of total inorganic mercury pollutants in cosmetics without the need for predigestion [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 150: 111899.
- [33] Wang D, Zheng YN, Xu LN, et al. Engineered cells for selective detection and remediation of Hg²⁺ based on transcription factor MerR regulated cell surface displayed systems [J]. *Biochem Eng J*, 2019, 150: 107289.
- [34] Bereza-Malcolm L, Aracic S, Kannan RB, et al. Functional characterization of Gram-negative bacteria from different Genera as multiplex cadmium biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 380-387.
- [35] Tang TC, Tham E, Liu XY, et al. Hydrogel-based biocontainment of bacteria for continuous sensing and computation [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17 (6) : 724-731.
- [36] Wang BJ, Barahona M, Buck M. A modular cell-based biosensor using engineered genetic logic circuits to detect and integrate multiple environmental signals [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 40 (1) : 368-376.
- [37] Cayron J, Prudent E, Escoffier C, et al. Pushing the limits of nickel detection to nanomolar range using a set of engineered

- bioluminescent *Escherichia coli* [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2017, 24 (1) : 4-14.
- [38] Kim HJ, Jeong H, Lee SJ. Synthetic biology for microbial heavy metal biosensors [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410 (4) : 1191-1203.
- [39] Zhao XY, Dong T. A microfluidic device for continuous sensing of systemic acute toxicants in drinking water [J]. Int J Environ Res Public Health, 2013, 10 (12) : 6748-6763.
- [40] Zhang YK, Zhao C, Bi HX, et al. A cell-free paper-based biosensor dependent on allosteric transcription factors (aTFs) for on-site detection of harmful metals Hg^{2+} and Pb^{2+} in water [J]. J Hazard Mater, 2022, 438: 129499.
- [41] Lin PH, Tsai ST, Chang YC, et al. Harnessing split fluorescent proteins in modular protein logic for advanced whole-cell detection [J]. Anal Chim Acta, 2023, 1275: 341593.
- [42] Elein E, Öktem HA. Inorganic cadmium detection using a fluorescent whole-cell bacterial bioreporter [J]. Anal Lett, 2020, 53 (17) : 2715-2733.
- [43] Kim H, Lee W, Yoon Y. Heavy metal (loid) biosensor based on split-enhanced green fluorescent protein: development and characterization [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103 (15) : 6345-6352.
- [44] Hou QH, Ma AZ, Wang T, et al. Detection of bioavailable cadmium, lead, and arsenic in polluted soil by tailored multiple *Escherichia coli* whole-cell sensor set [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407 (22) : 6865-6871.
- [45] Kim HJ, Lim JW, Jeong H, et al. Development of a highly specific and sensitive cadmium and lead microbial biosensor using synthetic CadC-T7 genetic circuitry [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 79: 701-708.
- [46] Kumar S, Verma N, Singh AK. Development of cadmium specific recombinant biosensor and its application in milk samples [J]. Sens Actuat B Chem, 2017, 240: 248-254.
- [47] Jia XQ, Liu T, Ma YB, et al. Construction of cadmium whole-cell biosensors and circuit amplification [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105 (13) : 5689-5699.
- [48] Fernández M, Morel B, Ramos JL, et al. Paralogous regulators ArsR1 and ArsR2 of *Pseudomonas putida* KT2440 as a basis for arsenic biosensor development [J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82 (14) : 4133-4144.
- [49] Chen PH, Lin C, Guo KH, et al. Development of a pigment-based whole-cell biosensor for the analysis of environmental copper [J]. RSC Adv, 2017, 7 (47) : 29302-29305.
- [50] Kang Y, Lee W, Kim S, et al. Enhancing the copper-sensing capability of *Escherichia coli*-based whole-cell bioreporters by genetic engineering [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102 (3) : 1513-1521.
- [51] Date A, Pasini P, Daunert S. Construction of spores for portable bacterial whole-cell biosensing systems [J]. Anal Chem, 2007, 79 (24) : 9391-9397.
- [52] Yoon Y, Kim S, Chae Y, et al. Use of tunable whole-cell bioreporters to assess bioavailable cadmium and remediation performance in soils [J]. PLoS One, 2016, 11 (5) : e0154506.
- [53] Yoon Y, Kim S, Chae Y, et al. Simultaneous detection of bioavailable arsenic and cadmium in contaminated soils using dual-sensing bioreporters [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100 (8) : 3713-3722.
- [54] Ghataora JS, Gebhard S, Reeksting BJ. Chimeric MerR-family regulators and logic elements for the design of metal sensitive genetic circuits in *Bacillus subtilis* [J]. ACS Synth Biol, 2023, 12 (3) : 735-749.
- [55] Hui CY, Guo Y, Li LM, et al. Indigoidine biosynthesis triggered by the heavy metal-responsive transcription regulator: a visual whole-cell biosensor [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105 (14-15) : 6087-6102.
- [56] Hui CY, Guo Y, Zhu DL, et al. Metabolic engineering of the violacein biosynthetic pathway toward a low-cost, minimal-equipment lead biosensor [J]. Biosens Bioelectron, 2022, 214: 114531.
- [57] Lee W, Kim H, Jang G, et al. Antimony sensing whole-cell bioreporters derived from ArsR genetic engineering [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104 (6) : 2691-2699.
- [58] Muir T, Michalek JE, Palmer RF. Determination of safe levels of persistent organic pollutants in toxicology and epidemiology [J]. Rev Environ Health, 2022, 38 (3) : 401-408.
- [59] 郭庆伟, 王倩, 张海东, 等. 新污染物检测技术研究进展 [J]. 化学通报, 2024, 87 (1) : 78-85.
- Guo QW, Wang Q, Zhang HD, et al. Research progress in detection technology of emerging pollutants [J]. Chemistry, 2024, 87 (1) : 78-85.
- [60] Sun SW, Peng KL, Sun S, et al. Engineering modular and highly sensitive cell-based biosensors for aromatic contaminant monitoring and high-throughput enzyme screening [J]. ACS Synth Biol, 2023, 12 (3) : 877-891.
- [61] Darjee SM, Modi KM, Panchal U, et al. Highly selective and sensitive fluorescent sensor: Thiocalix [4] arene-1-naphthalene carboxylate for Zn^{2+} ions [J]. J Mol Struct, 2017, 1133: 1-8.
- [62] Sun YJ, Zhao XH, Zhang DY, et al. New naphthalene whole-cell

- bioreporter for measuring and assessing naphthalene in polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated site [J]. *Chemosphere*, 2017, 186: 510-518.
- [63] Roy R, Ray S, Chowdhury A, et al. Tunable multiplexed whole-cell biosensors as environmental diagnostics for ppb-level detection of aromatic pollutants [J]. *ACS Sens*, 2021, 6 (5): 1933-1939.
- [64] Juárez JF, Lecube-Azpeitia B, Brown SL, et al. Biosensor libraries harness large classes of binding domains for construction of allosteric transcriptional regulators [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 3101.
- [65] Voyvodic PL, Pandi A, Koch M, et al. Plug-and-play metabolic transducers expand the chemical detection space of cell-free biosensors [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1697.
- [66] Zhang P, Feng HB, Yang JZ, et al. Detection of inorganic ions and organic molecules with cell-free biosensing systems [J]. *J Biotechnol*, 2019, 300: 78-86.
- [67] Ray S, Panjekar S, Anand R. Design of protein-based biosensors for selective detection of benzene groups of pollutants [J]. *ACS Sens*, 2018, 3 (9): 1632-1638.
- [68] Campos VL, Zaror CA, Mondaca MA. Detection of chlorinated phenols in kraft pulp bleaching effluents using DmpR mutant strains [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2004, 73 (4): 666-673.
- [69] Behzadian F, Barjeste H, Hosseinkhani S, et al. Construction and characterization of *Escherichia coli* whole-cell biosensors for toluene and related compounds [J]. *Curr Microbiol*, 2011, 62 (2): 690-696.
- [70] Garmendia J, de las Heras A, Galvão TC, et al. Tracing explosives in soil with transcriptional regulators of *Pseudomonas putida* evolved for responding to nitrotoluenes [J]. *Microb Biotechnol*, 2008, 1 (3): 236-246.
- [71] de Las Heras A, de Lorenzo V. Cooperative amino acid changes shift the response of the σ^{54} -dependent regulator XylR from natural m-xylene towards xenobiotic 2, 4-dinitrotoluene [J]. *Mol Microbiol*, 2011, 79 (5): 1248-1259.
- [72] Turner K, Xu SF, Pasini P, et al. Hydroxylated polychlorinated biphenyl detection based on a genetically engineered bioluminescent whole-cell sensing system [J]. *Anal Chem*, 2007, 79 (15): 5740-5745.
- [73] Werlen C, Jaspers MCM, van der Meer JR. Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phases by use of a *Pseudomonas putida* biosensor [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 (1): 43-51.
- [74] Nasr MA, Timmins LR, Martin VJJ, et al. A versatile transcription factor biosensor system responsive to multiple aromatic and indole inducers [J]. *ACS Synth Biol*, 2022, 11 (4): 1692-1698.
- [75] Asemoloye MD, Marchisio MA. Synthetic metabolic transducers in *Saccharomyces cerevisiae* as sensors for aromatic permeant acids and bioreporters of hydrocarbon metabolism [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 220: 114897.
- [76] Fiorentino G, Ronca R, Bartolucci S. A novel *E. coli* biosensor for detecting aromatic aldehydes based on a responsive inducible archaeal promoter fused to the green fluorescent protein [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82 (1): 67-77.
- [77] Chen J, Sun S, Li CZ, et al. Biosensor for organoarsenical herbicides and growth promoters [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48 (2): 1141-1147.
- [78] Anomaly J. Harm to others: the social cost of antibiotics in agriculture [J]. *J Agric Environ Ethics*, 2009, 22 (5): 423-435.
- [79] Founou LL, Founou RC, Essack SY. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1881.
- [80] Chern M, Garden PM, Baer RC, et al. Transcription factor based small-molecule sensing with a rapid cell phone enabled fluorescent bead assay [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59 (48): 21597-21602.
- [81] Zhang R, Wang Y, Deng HF, et al. Fast and bioluminescent detection of antibiotic contaminants by on-demand transcription of RNA scaffold arrays [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1273: 341538.
- [82] Richter MF, Drown BS, Riley AP, et al. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic [J]. *Nature*, 2017, 545 (7654): 299-304.
- [83] Miller CA, Ho JM, Parks SE, et al. Macrolide biosensor optimization through cellular substrate sequestration [J]. *ACS Synth Biol*, 2021, 10 (2): 258-264.
- [84] Li SL, Chen DD, Liu ZQ, et al. Directed evolution of TetR for constructing sensitive and broad-spectrum tetracycline antibiotics whole-cell biosensor [J]. *J Hazard Mater*, 2023, 460: 132311.
- [85] Rodríguez-Serrano AF, Hsing IM. Allosteric regulation of DNA circuits enables minimal and rapid biosensors of small molecules [J]. *ACS Synth Biol*, 2021, 10 (2): 371-378.
- [86] Ullrich T, Weirich S, Jeltsch A. Development of an epigenetic tetracycline sensor system based on DNA methylation [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (5): e0232701.
- [87] Liu RN, Liu X, Yang H, et al. A cell-free biosensor based on strand displacement amplification and hybridization chain reaction for fluorescence detection of tetracycline [J]. *Microchem J*, 2023,

- 185: 108239.
- [88] Bi HX, Zhao C, Zhang YK, et al. IVT cell-free biosensors for tetracycline and macrolide detection based on allosteric transcription factors (aTFs) [J] . Anal Methods, 2022, 14 (44) : 4545-4554.
- [89] Mahas A, Wang QC, Marsic T, et al. Development of Cas12a-based cell-free small-molecule biosensors via allosteric regulation of CRISPR array expression [J] . Anal Chem, 2022, 94 (11) : 4617-4626.
- [90] Chen MF, Nguyen TT, Varongchayakul N, et al. Surface immobilized nucleic acid-transcription factor quantum dots for biosensing [J] . Adv Healthc Mater, 2020, 9 (17) : e2000403.
- [91] Miller RA, Brown G, Barron E, et al. Development of a paper-immobilized yeast biosensor for the detection of physiological concentrations of doxycycline in technology-limited settings [J] . Anal Methods, 2020, 12 (16) : 2123-2132.
- [92] Ahn SK, Tahlan K, Yu Z, et al. Investigation of transcription repression and small-molecule responsiveness by TetR-like transcription factors using a heterologous *Escherichia coli*-based assay [J] . J Bacteriol, 2007, 189 (18) : 6655-6664.
- [93] Kasey CM, Zerrad M, Li YW, et al. Development of transcription factor-based designer macrolide biosensors for metabolic engineering and synthetic biology [J] . ACS Synth Biol, 2018, 7 (1) : 227-239.
- [94] Möhrle V, Stadler M, Eberz G. Biosensor-guided screening for macrolides [J] . Anal Bioanal Chem, 2007, 388 (5/6) : 1117-1125.
- [95] Li YW, Reed M, Wright HT, et al. Development of genetically encoded biosensors for reporting the methyltransferase-dependent biosynthesis of semisynthetic macrolide antibiotics [J] . ACS Synth Biol, 2021, 10 (10) : 2520-2531.
- [96] Higuera-Llantén S, Alcalde-Rico M, Vasquez-Ponce F, et al. A whole-cell hypersensitive biosensor for beta-lactams based on the AmpR-AmpC regulatory circuit from the Antarctic *Pseudomonas* sp. IB20 [J] . Microb Biotechnol, 2024, 17 (1) : e14385.
- [97] Liu CJ, Yu H, Zhang BC, et al. Engineering whole-cell microbial biosensors: design principles and applications in monitoring and treatment of heavy metals and organic pollutants [J] . Biotechnol Adv, 2022, 60: 108019.

(责任编辑 朱琳峰)