

# 重金属全细胞微生物传感器：设计原理、优化策略及监测应用

王明月<sup>1,2</sup>, 许玫英<sup>2</sup>, 纠敏<sup>1\*</sup>, 陈杏娟<sup>2\*</sup>

1 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳

2 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州

王明月, 许玫英, 纠敏, 陈杏娟. 重金属全细胞微生物传感器：设计原理、优化策略及监测应用[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1033-1052.

WANG Mingyue, XU Meiyang, JIU Min, CHEN Xingjuan. Whole-cell microbial biosensors for heavy metals: design principles, optimization strategies, and monitoring applications[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 1033-1052.

**摘要：**重金属因其毒性、持久性、生物蓄积性以及对抗性基因的潜在贡献等特点，已引起人们越来越多的关注。对环境中重金属进行准确、快速、高效和灵敏的监测，对于保护环境和人体健康具有重要意义。全细胞微生物传感器作为一种集成生物识别模块与传感处理模块的生物监测技术，为环境重金属污染的监测提供了新的解决方案。近年来，基于转录因子的全细胞微生物传感器在重金属监测应用方面取得了显著进展。本文综述了重金属全细胞微生物传感器的基本组成及设计原理，总结了近年来研发的重金属全细胞微生物传感器的构建及其应用情况，分析了通过合成生物学技术优化重金属全细胞微生物传感器检测性能的应用实例，并展望了该领域面临的挑战及未来可能的研究方向。本文有望为环境中重金属污染的高效监测与有效防控提供重要参考。

**关键词：**重金属；全细胞微生物传感器；设计；优化；应用

资助项目：广东省重点领域研发计划(2023B0202040001)；广东省科学院发展专项资金(2022GDASZH-2022010101)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Guangdong Province (2023B0202040001) and the GDAS Project of Science and Technology Development (2022GDASZH-2022010101).

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xingjuan, chenxj@gdim.cn; JIU Min, jiumin0912@163.com

Received: 2024-10-10; Accepted: 2024-11-25; Published online: 2024-12-23

# Whole-cell microbial biosensors for heavy metals: design principles, optimization strategies, and monitoring applications

WANG Mingyue<sup>1,2</sup>, XU Meiyong<sup>2</sup>, JIU Min<sup>1\*</sup>, CHEN Xingjuan<sup>2\*</sup>

1 College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, China

**Abstract:** Heavy metal pollution has attracted increasing attention because of its toxicity, environmental persistence, bioaccumulation, and potential contribution to antibiotic resistance. The accurate, rapid, efficient, and sensitive detection of heavy metals in the environment is of great significance for environmental protection and human health. A whole-cell microbial biosensor (WCMB), integrating a biorecognition module and a signal processing module, provides a new strategy for heavy metal monitoring. Great progress has been achieved in the transcription factor-based WCMBs for the monitoring of heavy metals in recent years. This paper introduced the basic composition and design principles of WCMBs, summarized the construction and application of WCMBs for heavy metal detection that were developed in recent years, analyzed the optimization strategies of WCMBs by synthetic biology, and finally prospected the future research directions of WCMBs. This paper is expected to be an important reference for the effective prevention and control of heavy metal pollution in the environment.

**Keywords:** heavy metals; whole-cell microbial biosensor; design; optimization; application

重金属一般是指密度大于  $5 \text{ g/cm}^3$  和分子量大于 40.04 的金属元素<sup>[1]</sup>。它们主要通过自然过程或人类活动进入环境，并以各种形式在食物链中富集<sup>[2-3]</sup>。重金属在人体内蓄积会引起多种健康问题，如中枢神经毒性、生殖毒性、心血管病甚至癌症等<sup>[4]</sup>；在水生生物体内蓄积会影响鱼虾等的生长和繁殖，最终可能导致整个生态系统的失衡和破坏<sup>[5]</sup>。重金属在土壤中积累会导致土壤酸化、结构破坏和肥力下降，影响农作物的生长发育<sup>[6]</sup>。农产品和食品中的重金属污染更会引发严重的健康和食用安全风险<sup>[7]</sup>。此外，越来越多的研究表明，环境中的重金属污染还会加剧细菌的抗生素耐药性，构成更为广泛的全球健康威胁<sup>[8]</sup>。因此，环境中的重金属污

染问题已引起了人们越来越多的关注<sup>[9]</sup>。

世界各国和组织均高度重视重金属污染控制问题，针对不同类型的重金属均制定了相应的限制标准和管制措施<sup>[10-11]</sup>。这些不断更新的限量标准和法规给重金属检测和污染控制带来了新的挑战。目前已有多种化学分析方法用于重金属的检测，例如电感耦合等离子体质谱法、原子荧光光谱法等；这些方法灵敏度高，识别特异性强<sup>[12]</sup>。然而，它们往往需要昂贵的仪器设备以及专业的测量人员，样品制备过程繁琐，并且无法提供生物可利用度及生物毒性效应等相关信息；为了克服这些限制，人们开始关注以酶、抗体和微生物细胞等生物材料作为识别模块的生物传感器研究<sup>[13]</sup>。

生物传感器的基本工作原理主要涉及生物识别与信号传感(图 1A)。生物识别主要通过高选择性和高灵敏性的生物受体(如全细胞、酶、抗体和 DNA 等)与检测物直接接触而发挥作用,该过程会产生各种报告信号变化,如发光、产热、产生电子、pH 改变以及颜色生成等<sup>[14]</sup>。信号传感则主要通过传感处理模块将报告信号变化转换为可被检测的形式;生物传感器具有快捷简便、成本低廉、高效灵敏等优点,不仅省去了繁琐的前处理操作,还具有生物毒性效应预警等功能<sup>[15]</sup>。目前,生物传感器已广泛应用于临床诊断、环境监测、食品安全和地质勘探等领域<sup>[16-19]</sup>。

全细胞微生物传感器(whole-cell microbial biosensor, WCMB)采用完整的微生物细胞集成生物识别模块与信号传感模块,与酶、核酸生物

传感器相比,其制备成本更低、操作性能更稳定,能够在复杂环境中生存和适应,并可重复使用;其中以转录因子作为生物识别模块构建的重金属 WCMB 数量最多、应用最广,不仅展现出对多种重金属离子的高灵敏性和特异性响应,还具备简单快速、现场检测的能力<sup>[20]</sup>。

虽然早在 10 年前已有研究者对重金属 WCMB 的信号输出/输入、特异性/耐受性、底盘细胞选择以及环境应用、安全风险及监管等方面进行了详细综述<sup>[21]</sup>,但当时重金属 WCMB 的特异性及灵敏性仍有较大提升空间。近 10 年来,随着合成生物学技术方法的飞速发展,基于转录因子的重金属 WCMB 的特异性与灵敏性得到了前所未有的提升,其实际环境应用也得到了极大的拓展。本文在前人研究的基础上,更新了大量研究数据和成果,进一步探讨了

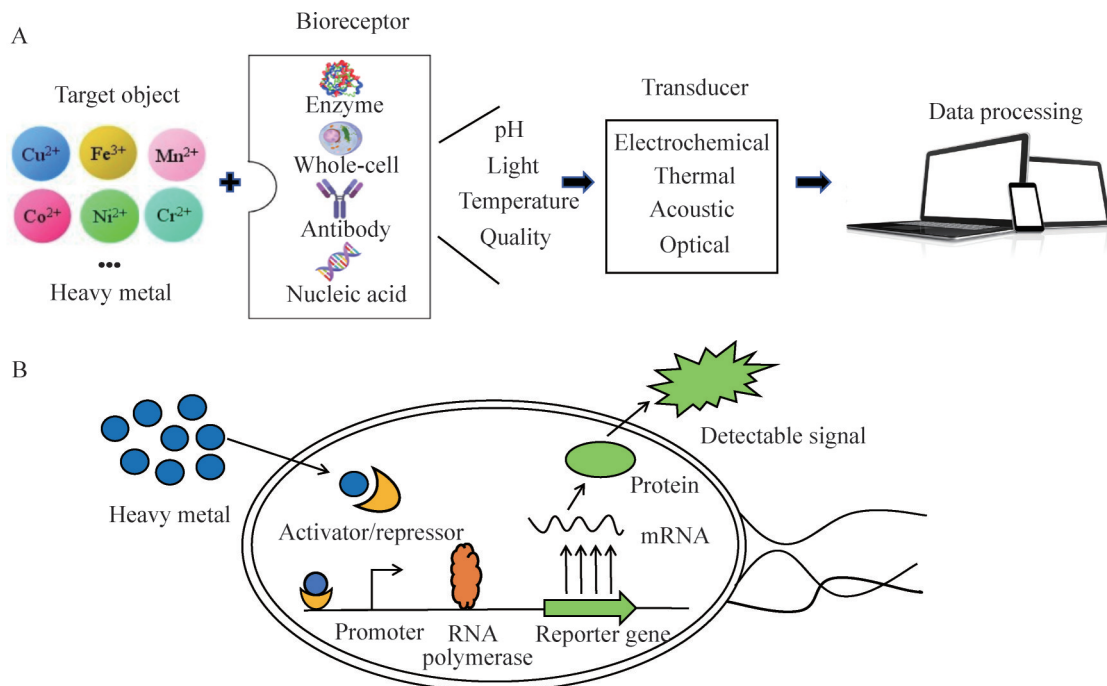


图1 生物传感器的工作原理。A: 生物传感器的一般组成; B: 重金属全细胞微生物传感器的生物识别与信号传输过程。

Figure 1 Working principle of biosensor. A: General composition of biosensors; B: Recognition and sensing of heavy metals by whole-cell microbial biosensors.

WCMB 在重金属监测领域的最新进展和未来趋势。本文系统阐述了基于转录因子的重金属 WCMB 的基本组成及设计原理，总结了近年来研发的重金属 WCMB 的构建策略及应用，分析了通过合成生物学技术方法优化 WCMB 检测性能的应用实例，并展望了该领域面临的挑战和未来可能的研究方向，以期环境中重金属污染的高效监测与有效防控提供重要参考。

## 1 基于转录因子的重金属全细胞微生物传感器的构建及应用

### 1.1 全细胞微生物传感器的基本组成和设计原理

WCMB 以完整细胞集成生物识别模块与传感处理模块<sup>[20]</sup>，包含响应元件及其结合的启动子及响应元件触发的下游信号报告元件，其对重金属的识别与传感过程如图 1B 所示。WCMB 的设计是一个复杂的过程，主要包括响应元件选择、基因回路设计、工程细胞构建、环境测试以及性能优化等步骤<sup>[22]</sup>。

#### 1.1.1 响应元件的选择

响应元件通常由一组响应重金属的转录因子及其启动子组成；基于转录因子构建的 WCMB 数量最多、应用最广，其工作原理模仿微生物的重金属抗性系统，依赖重金属与转录因子相互作用，从而驱动报告信号基因表达<sup>[23]</sup>。当环境中的重金属穿过细胞膜并与特定的转录因子相互作用时，转录因子的蛋白构象会发生变化，进而影响转录因子与基因表达调控区域之间的空间位阻或结合亲和力，从而使转录因子结合特定启动子以激活报告基因表达，或者从启动子区域释放以解除阻遏并启动报告基因表达<sup>[24]</sup>(图 2)。报告基因的转录和翻译会产生能被检测的信号；这种报告信号受转录因子调控，而转录因子构象的改变通常与重金属浓度相关，使生物传感器具有感应不同浓度重金属的能力<sup>[25]</sup>。金属抗性系统通常包括金属响应调控蛋白(转录因子)、金属转运蛋白、金属结合蛋白等<sup>[26]</sup>。目前，已知的金属响应调控蛋白家族主要有 7 类，如表 1 所示。

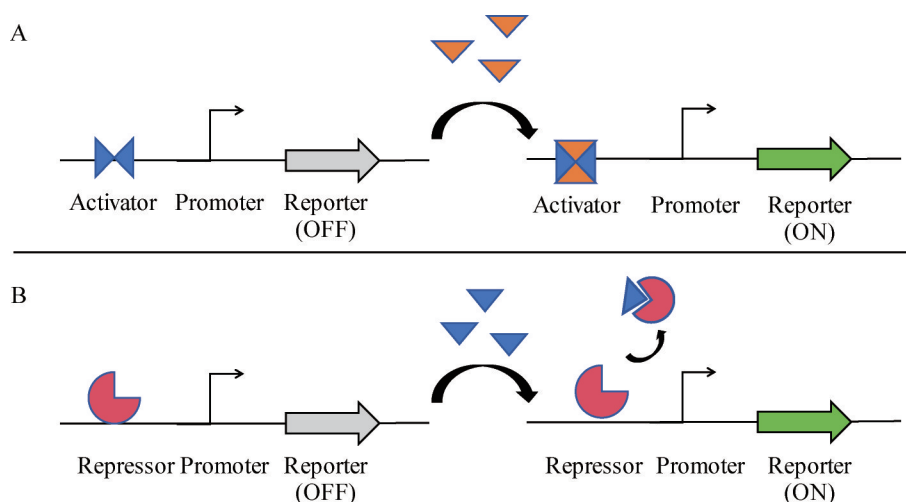


图2 转录因子对重金属的响应机制。A: 转录激活; B: 转录抑制。

Figure 2 Responsive mechanisms of transcription factors to heavy metals. A: Transcription activation; B: Transcription inhibition.

表1 金属响应调控蛋白家族

Table 1 Metal-responsive protein family

Metal-responsive protein family	Family members and responders	References
MerR family	MerR (Hg), ZntR (Cd, Pb, Zn), ZccR (Zn, PbrR (Pb), CueR (Cu, Au), GolS (Au), HmrR (Ag), CoaR (Co), CadR (Cd), NimR (Ni)	[27-30]
Fur family	Fur (Fe), Zur (Zn), Mur (Mn), Nur (Ni), PerR (Mn/Fe)	[31-32]
DtxR family	DtxR, IdeR, SirR (Fe), MntR (Mn, ScaR (Cd), TroR (Mn, Zn)	[33-36]
NikR family	NikR (Ni)	[37-38]
ArsR/SmtB family	CmtR, ZiaR, AztR (Zn), CzrA (Zn, Co), ArsR (As, Sb, Bi), CadC (Cd, Pb, Zn), SmtB (As, Cd), NmtR (Ni, Co), KmtR (Ni), BxmR (Cu, Ag, Zn, Cd)	[39-44]
CsoR-RcnR family	CsoR (Cu), RcnR (Ni, Co)	[45-47]
CopY family	CopY (Cu)	[48]

### 1.1.2 报告元件的选择

生物发光或荧光等光信号传导方式, 因其敏感性及报告基因的多样性而备受青睐。这些报告基因可以是荧光蛋白或荧光素酶; 常用的荧光蛋白包括绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)、黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP)、红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 等; 这些蛋白在特定波长的光激发下能够发出稳定且明亮的荧光, 对细胞无毒害且易于检测<sup>[49]</sup>。荧光素酶能够催化生物体产生荧光, 具有高灵敏度和可定量检测等特点, 因此也是理想的报告基因<sup>[50]</sup>。此外, 产酸碱蛋白、色素合成蛋白、电子介体蛋白等也是常见的生物传感器报告元件<sup>[51]</sup>。

### 1.1.3 基因回路的设计

基因回路主要由调节元件和被调节元件组成; 调节元件通常包括启动子和转录因子等, 它们负责重金属的识别和转录调控; 被调节元件则多为编码信号蛋白的基因, 负责产生输出信号; 金属 WCMB 基因回路的设计可以有多种方案, 如图 3 所示<sup>[52]</sup>, 最常见的通路有 4 种: (1)单输入信号通路; (2)双输入单诱导信号通路, 报告信号由 1 个输入诱导; (3)双输入双诱导信号通路, 报告信号由 2 个输入同时诱导; (4)多

输入信号通路, 用于开发需要复杂调控系统的多输入传感器。通过合理设计基因回路可以改善生物传感器的各种参数。

### 1.1.4 底盘细胞的选择

底盘细胞作为监测重金属浓度及毒性的受体宿主, 应具备良好的环境适应能力和遗传稳定性, 以提升传感器的可靠性、重复性和稳定性; 此外, 底盘细胞对目标检测物应具有较高的敏感性, 能在低目标物浓度下迅速响应, 从而拓宽检测范围并提高精度; 底盘细胞还应能够特异性地识别目标检测物, 避免交叉反应, 减少干扰和误差, 进而提高传感器的准确性<sup>[53]</sup>。在实际应用中, 常用的底盘细胞包括细菌、酵母、藻类、原生动物甚至植物细胞等<sup>[54-57]</sup>。细菌因生长迅速且环境适应能力强, 与其他真核生物相比被使用的频率更高; 随着基因工程与分子生物学等领域的快速发展, 经过改造的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和其他类型的基因工程菌也被广泛应用于 WCMB 的构建中<sup>[58]</sup>。

## 1.2 基于转录因子的重金属全细胞微生物传感器的构建及应用

转录因子是生物传感器中最常见的响应元件, 能够识别并结合特定的 DNA 序列, 从而调控相关基因的表达。由于转录因子具有结合特

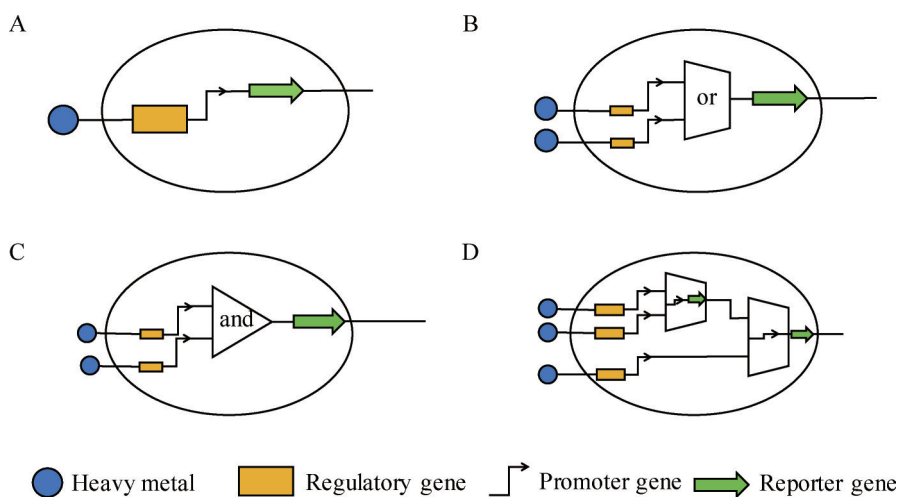


图3 重金属全细胞微生物生物传感器基因回路的设计方案。A: 单输入信号通路; B: 双输入单诱导信号通路; C: 双输入双诱导信号通路; D: 多输入信号通路。

Figure 3 Design of gene circuits for heavy metal whole-cell microbial biosensor. A: Single-input signal pathway; B: Double-input single-induction signal pathway; C: Double-input double-induction signal pathway; D: Multiple-input signal pathway.

异性和信号转导能力, 因此转录因子的选择与设计决定了 WCMB 的检测性能。转录因子通常由 DNA 结合域和配体结合域组成; 根据其作用机制可分为转录激活因子和转录抑制因子; 根据变构方式又可分为单组分转录因子和双组分转录因子<sup>[59]</sup>。近年来, 基于不同类型转录因子构建的生物传感器在环境重金属检测中的应用实例见表 2。

### 1.2.1 基于转录激活因子的重金属全细胞微生物传感器的构建及应用

MerR、ZntR、PbrR、CadR、CueR、CupR 以及 GolS 是细菌中用于重金属解毒的转录激活因子<sup>[27-30]</sup>。利用这些转录激活因子与相应重金属结合后促使报告基因表达的原理, 研究者们开发了多种监测  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Au}^{3+}$  等重金属的全细胞生物传感器, 并成功应用于化妆品、饮用水和尿液等环境样品中的重金属监测, 为环境污染监测与人体健康监测提供了新的有力工具<sup>[60-63,65-67,77-78]</sup>。

MerR 家族的金属调控蛋白是一种被广泛用于构建 WCMB 的关键元件, 通常具有保守的 N 端 DNA 结合域和结构存在差异的 C 端金属结合域, 能够特异性地与金属离子结合, 导致蛋白构象扭曲, 从而容易被 RNA 聚合酶识别并转录激活下游报告基因的表达, 产生可被检测的信号输出<sup>[77]</sup>。以 MerR 作为特异性识别元件及 RFP 作为报告元件, 在 *E. coli* DH5 $\alpha$  中构建的汞响应 WCMB 对 0.050 0–10  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Hg}^{2+}$  具有良好的线性响应能力 ( $R^2=0.9848$ ); 通过将该 WCMB 嵌入滤纸制成测试条, 实现了对化妆品中总无机汞污染物的快速、便捷的现场筛查; 其对  $\text{Hg}^{2+}$  离子的检测下限为 1  $\mu\text{mol/L}$ , 当  $\text{Hg}^{2+}$  离子浓度达到 5  $\mu\text{mol/L}$  时, 整个试纸会呈现出明显的红色; 此外, 该 WCMB 不仅能够响应  $\text{Hg}^{2+}$ , 还能够响应不溶性的  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  和  $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ <sup>[60]</sup>。同样, 以 MerR 作为特异性识别元件, 以及 AmilCP 和 RFP 蛋白作为报告元件, 开发的 2 种汞响应 WCMB (Mer-Blue 和 Mer-RFP)

表2 基于不同类型转录因子构建的生物传感器用于环境重金属检测

Table 2 Different types of transcription factor-based biosensors are used for heavy metal detection

Sensing element	Detection object	Reporter gene	Host cell	Application	Detection range ( $\mu\text{mol/L}$ )	References
Transcription activator						
MerR	$\text{Hg}^{2+}$	<i>rfp</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Rapid and convenient screening of total inorganic mercury in cosmetics	0.050 0–10	[60]
	$\text{Hg}^{2+}$	<i>rfp</i> , <i>amilcpblue</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	The extremely wide linear range meets the different monitoring requirements	0.001 0–1 (Mer-RFP), 0.002 0–0.125 0 (Mer-Blue)	[61]
ZntR	$\text{Zn}^{2+}$	<i>zntR</i> , <i>ribB</i> , <i>oprF</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21	Microbial fuel cell electrobiosensor	0–400	[62]
PbrR	$\text{Pb}^{2+}$	<i>vio ABCDE</i>	<i>Escherichia coli</i> TOP10	Detection of biologically available $\text{Pb}^{2+}$ in water	0.187 5–1.500 0	[63]
	$\text{Pb}^{2+}$	<i>Luc</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Detection of $\text{Pb}^{2+}$ in environmental and biological samples	1–100	[64]
CadR	$\text{Cd}^{2+}$	<i>vio ABCDE</i>	<i>Escherichia coli</i> TOP10	Detection of soluble $\text{Cd}^{2+}$ in environmental water samples	0.049 0–25	[65]
	$\text{Cd}^{2+}$	<i>rfp</i>	Multiple Gram-negative bacteria	The importance of WCMB testing in different genera of bacteria was emphasized	0.500 0 – 2.000 0 $\mu\text{g/mL}$ ( <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ) 0.100 0 $\mu\text{g/mL}$ ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1) 10 $\mu\text{g/mL}$ ( <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1) 0.250 0 $\mu\text{g/mL}$ ( <i>Enterobacter</i> sp. NCR3) 1 $\mu\text{g/mL}$ ( <i>Enterobacter</i> sp. LCR17)	[66]
	$\text{Pb}^{2+}$	<i>Luc</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	For the detection of $\text{Pb}^{2+}$ in environmental and biological samples	0.010 0–10	[64]
CueR	$\text{Au}^{3+}$	<i>rfp</i>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Monitoring the concentration of $\text{Au}^{3+}$ in human urine	$\geq 0.110 0$	[67]
Transcription inhibitors						
EcArsR	$\text{AsO}_3^{3-}$	<i>luc</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	A WCMB that is highly sensitive to arsenite has been developed	0.100 0–1 $\geq 0.040 0$	[68]
ArsR1	$\text{AsO}_3^{3-}$	<i>gfp</i>	<i>Escherichia coli</i> TOP10	A WCMB that is highly sensitive to arsenite has been developed	0.030 0–0.100 0 (2.250 0–7.500 0 $\mu\text{g/L}$ ) $\geq 0.010 0$	[69]

(待续)

(续表 2)

Sensing element	Detection object	Reporter gene	Host cell	Application	Detection range ( $\mu\text{mol/L}$ )	References
SxArsR	$\text{Sb}^{3+}$	<i>luc</i>	<i>Sphingobium xenophagum</i> C1	A novel subtype of the ArsR family transcription factor, designated as SxArsR, has been identified, which exhibits specific responsiveness to Sb	0.010 0–6 $\geq 0.010 0^*$	[70]
Combination of transcription factors						
MerR, CadR	$\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$	<i>egfp</i> , <i>mCherry</i>	<i>Escherichia coli</i> TOP10	Detection of concurrent heavy metal contaminants in the environment	0–40 ( $\text{Hg}^{2+}$ ), 0–200 ( $\text{Cd}^{2+}$ )	[71]
CadC, CadR	$\text{Cd}^{2+}$	<i>egfp</i> and <i>mCherry</i>	<i>Escherichia coli</i> TOP10	Detection of high concentrations of biologically available Cd in water	$\geq 0.050 0$ (CadC-eGFP), $\geq 0.100 0$ (CadR-mCherry)	[72]
MerR, PbrR	$\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$	Indigoidine biosynthetic module	<i>Escherichia coli</i> TOP10	Detection of $\text{Hg}^{2+}$ and $\text{Pb}^{2+}$ in environmental samples	$\geq 0.008 0$	[73]
CadR, MerR	$\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$	<i>vioABE</i> , <i>vioC</i>	<i>Escherichia coli</i> TOP10	Designed for detecting heavy metal contaminants in seawater	0.004 9–40, $\geq 0.004 9$ ( $\text{Cd}^{2+}$ ), 0.024 4–200, $\geq 0.024 4$ ( $\text{Pb}^{2+}$ ), 0.003 7–0.468 8, $\geq 0.000 5$ ( $\text{Hg}^{2+}$ )*	[74]
UzcRS, UrpRS	$\text{UO}_2^{2+}$	<i>gfp</i>	<i>Caulobacter vibrioides</i>	Detection of uranium (U) in groundwater samples	$\geq 1$	[75-76]

$\geq$  indicates the minimum detection limit; \* indicates that the detection performance is currently the best.

对  $\text{Hg}^{2+}$  具有特异性响应；其中 Mer-Blue 的线性范围为 2–125 nmol/L，而 Mer-RFP 具有 1–1 000 nmol/L 的极宽线性范围，适用于不同环境条件下的监测需求<sup>[61]</sup>。与 MerR 类似，MerR 家族的另一个成员 ZntR 也被常用作 WCMB 的构建元件。以 ZntR 作为识别元件及核黄素合成蛋白 RibB 作为报告元件，在 *E. coli* BL21 中设计了受 PzntA 调控的 *zntR-ribB-oprF* 基因融合表达系统，并引入微生物燃料电池 MFC 设计，构建了锌响应电化学 WCMB；该 WCMB 能够灵敏感知  $\text{Zn}^{2+}$  并促使核黄素的产生及电压的输出，实现了  $\text{Zn}^{2+}$  在 0–400  $\mu\text{mol/L}$  的线性检测 ( $R^2=0.977 7$ )<sup>[62]</sup>，为重金属离子的检测提供了一种新的思路和方法。

铅响应转录调控因子 PbrR 的金属结合域能

够特异性地结合  $\text{Pb}^{2+}$ ，使其在构建铅响应 WCMB 中具有重要意义；以 PbrR 蛋白作为识别元件及紫罗兰素生物合成蛋白 VioABCDE 作为报告元件，在 *E. coli* TOP10 中构建的铅响应 WCMB 可检测线性范围为 0.187 5–1.500 0  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Pb}^{2+}$ ，实现了对  $\text{Pb}^{2+}$  肉眼可见的定性检测，提高了检测的便捷性和直观性<sup>[63]</sup>。

CadR 金属调控蛋白具有 Cys77、Cys112、Cys119 等 3 个保守的金属结合位点，对  $\text{Cd}^{2+}$  具有高度的特异性和亲和力<sup>[78]</sup>。以 CadR 及其启动子作为识别模块，VioABCDE 作为报告模块，构建了镉响应 WCMB，对  $\text{Cd}^{2+}$  的响应明显强于其他重金属离子(包括  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Hg}^{2+}$ )，可检测浓度低至 0.049 0  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Cd}^{2+}$ ；当  $\text{Cd}^{2+}$  浓度达到 25  $\mu\text{mol/L}$  时，通过肉眼即可观察到紫罗

兰素颜色的变化<sup>[65]</sup>。以红色荧光蛋白(RFP)作为报告元件,以 CadR-GFP 作为识别元件,在宽宿主范围的载体上进行组装并分别导入 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1、奥奈达湖希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*) MR-1、肠杆菌属(*Enterobacter*)中,构建的不同宿主的镉响应 WCMB (pBBcadRgfp-rfp)对 Cd<sup>2+</sup>的线性范围和检测限存在显著差异;尽管条件相似,但多重镉响应 WCMB 可能受到所使用的宿主细胞种类的影响<sup>[66]</sup>。

当以 PbrR 和 CadR 作为识别元件,荧光素酶蛋白 Luc 作为报告元件时构建了 2 种 WCMB,其中 pGL3-luc/cad 可检测 0.010 0–10  $\mu\text{mol/L}$  的 Pb<sup>2+</sup>,在浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$  时才观察到铅对细胞的毒性;相比之下,pGL3-luc/pbr 具有较高的灵敏度和特异性,可检测 1–100  $\mu\text{mol/L}$  的 Pb<sup>2+</sup>,并且不受其他金属离子(如 Sn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>)的干扰<sup>[64]</sup>。

CueR 蛋白作为转录激活因子,能够结合在启动子 DNA 的–35–10 区之间,通过改变 DNA 构象来激活下游基因的转录;以 CueR 作为识别元件及红色荧光蛋白(RFP)作为报告元件,在耐重金属贫铜菌(*Cupriavidus metallidurans*)中构建的受启动子 PcopZ 驱动的金响应 WCMB 具有高度的 Au<sup>3+</sup>响应灵敏度,最低检测限为 110 nmol/L;基于智能手机分析系统,可以对金响应 WCMB 的红色荧光信号进行实时采集和分析,通过感知尿液样本中 Au<sup>3+</sup>的存在来监测人体健康,降低了疾病诊断的检测成本并提高了检测便捷性<sup>[67]</sup>。

尽管这些转录因子作为识别元件对重金属展现出高特异性,但在实际应用中,仍可能受到其他金属离子的影响,进而削弱 WCMB 的准确性和灵敏度。因此,持续的改进和优化工作仍然尤为重要。

## 1.2.2 基于转录抑制因子的重金属全细胞微生物传感器的构建及应用

目前,已有多种转录抑制因子被用于构建重金属监测 WCMB,其中最典型的是来自细菌砷解毒系统中的砷结合蛋白 ArsR; ArsR 能够与 *ars* 操纵子的启动子序列结合,是 *ars* 基因簇的负调控因子;当 ArsR 与砷结合后从启动子区域释放,从而促使编码相关解毒蛋白的 *ars* 操纵子中的基因转录<sup>[79]</sup>。

目前 ArsR 家族分为 5 种亚型,分别具有独特的 As/Sb 结合位点<sup>[80]</sup>。I 型 ArsR 以 *E. coli* 质粒 R773 中的 EcArsR 为代表,其砷结合域含有 3 个半胱氨酸残基的保守“CXCXXC”结构,分别位于 Cys32、Cys34 和 Cys37 位<sup>[81]</sup>。II 型 ArsR 以谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中的 CgArsR 为代表,其砷结合域具有保守的半胱氨酸残基“CCX(42–43)CXC”结构,形成结合位点的 3 个半胱氨酸中的 Cys15 和 Cys16 位于一个二聚体亚基,而第 3 个 Cys55 则位于另一个二聚体亚基<sup>[82]</sup>。III 型 ArsR 以亚铁氧化酸硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)中的 AfArsR 为代表,其砷结合域具有保守的半胱氨酸残基“CCX(4–7)C”结构,分别为 Cys95、Cys96 和 Cys102,位于 C 端柔性末端<sup>[83]</sup>。IV 型 ArsR 以腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)中的 SpArsR 为代表,其砷结合域具有由 Cys83、Cys101 和 Cys102 组成的保守半胱氨酸残基“CX(17)CC”结构,参与甲基 AsO<sub>3</sub><sup>3-</sup>的解毒而对 AsO<sub>3</sub><sup>3-</sup>无响应<sup>[84]</sup>。V 型 ArsR 以食异源物鞘氨醇菌(*Sphingobium xenophagum*)的 SxArsR 为代表,是 Chen 等<sup>[70]</sup>发现的一种新型 ArsR 转录抑制因子,具有保守的“HCXC”结构域,分别位于 His28、Cys29 和 Cys31 位;与其他 4 种已表征的 ArsR 亚型相比,新型 SxArsR 缺少第 3 个与 AsO<sub>3</sub><sup>3-</sup>结合的半胱氨酸残

基, 是  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  的特异性结合位点。

基于 I 型 ArsR 构建的砷响应 WCMB 是研究最多的一种, 其中 Fang 等<sup>[68]</sup>基于 *E. coli* 筛选和优化了 EcArsR 及其变构体作为识别元件, 以荧光素酶作为报告元件, 构建了一系列砷响应 WCMB, 实现了对水体中低浓度  $\text{AsO}_3^{3-}$  (0.100 0–1  $\mu\text{mol/L}$ ) 的快速监测。以硫还原地杆菌 (*Geobacter sulfurreducens*) 的 ArsR1 蛋白作为识别元件并融合 GFP 作为报告元件构建的砷响应 WCMB, 在最佳测试条件下对  $\text{AsO}_3^{3-}$  检测限达到 0.010 0  $\mu\text{mol/L}$ , GFP 荧光强度与  $\text{AsO}_3^{3-}$  浓度在 0.030 0–0.100 0  $\mu\text{mol/L}$  (2.250–7.500  $\mu\text{g/L}$ ) 范围内呈线性相关<sup>[69]</sup>。以 III 型 AfArsR 作为识别元件, 替换 GFP 的第 146–147 位氨基酸并融合在其中, 构建的荧光增强型砷响应 WCMB 对 1 mmol/L 的  $\text{AsO}_3^{3-}$  响应的荧光强度变化达到 31.6%; 将 GFP 的 Met146 和 Gln263 分别突变为 Phe146 和 His263, 并随机诱变 Glu147-Pro148 和 Gly261-Asn262 后, 获得的突变体对  $\text{AsO}_3^{3-}$  响应的荧光强度变化最大达到 44.9%<sup>[85]</sup>。Chen 等<sup>[70]</sup>基于 V 型 SxArsR 作为识别元件并融合荧光素酶作为报告元件, 构建了铈响应 WCMB, 在  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  浓度为 0.010 0–6  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈现极好的线性关系 ( $R^2=0.99$ ), 检测限低至 0.010 0  $\mu\text{mol/L}$ ; 在实际应用中该新型 WCMB 对环境水样和沉积物样品中  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  的检测也表现出良好的性能。

NikR 是另一种被广泛用于构建重金属监测生物传感器的转录抑制因子。NikR 是 Ni 依赖的转录调节蛋白, 通过负调控 Ni ABC 型转运体 (Nik ABCDE) 的表达来应对过量的 Ni 摄入, 在维持细菌细胞中的 Ni 稳态发挥关键作用<sup>[86]</sup>。NikR 最初以四聚体的形式存在, 本身并不具备与 DNA 结合的能力, 但  $\text{Ni}^{2+}$  的结合使其能够识别特定的启动子序列, 并抑制下游  $\text{Ni}^{2+}$  摄取基因的表达; 以 *E. coli* *nik* 操纵子的启动子及

NikR 作为响应元件并以 eGFP 作为报告元件, Yoon 等<sup>[87]</sup>构建了一种重金属响应 WCMB; 在一系列重金属离子 (如  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{5+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ ) 的监测中发现, 只有  $\text{As}^{3+}$  被该 WCMB 响应; 通过对 NikR 的结构分析, 发现其金属结合域中的一些残基 (如 His62、His79、His92 等) 可能有助于  $\text{As}^{3+}$  的结合;  $\text{As}^{3+}$  的结合导致 NikR 的构象变化, 使其从 *nik* 操纵子的启动子区释放出来, 从而激活 *egfp* 报告基因的转录。

### 1.2.3 基于组合转录因子的重金属全细胞微生物传感器的构建及应用

利用不同转录因子组合可以在单一传感细胞内构建多种传感模块, 实现多种重金属的同时检测; 目前已有多种基于转录因子组合的重金属 WCMBs 成功应用于实际环境中的重金属检测 (表 2)。以 MerR 和 CadR 作为独立的响应元件, 分别控制 eGFP 和 mCherry 荧光蛋白的表达, 构建了同时检测  $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  的双通道 WCMB; 可通过双荧光信号检测 0–40  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围的  $\text{Hg}^{2+}$ , 通过红色荧光信号检测浓度 <200  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Cd}^{2+}$ <sup>[71]</sup>。此外, 利用 CadC 和 CadR 作为响应元件, 分别控制 eGFP 和 mCherry 荧光蛋白的表达, 构建的镉响应 WCMB 能够分别通过 CadC-eGFP 系统产生绿色荧光和 CadR-mCherry 系统产生红色荧光检测低至 0.050 0  $\mu\text{mol/L}$  和 0.100 0  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Cd}^{2+}$ <sup>[72]</sup>。利用 MerR 和 PbrR 作为响应元件, 以靛蓝生物合成基因簇作为报告元件, 分别构建的 WCMB 能够通过靛蓝比色法检测到低至 0.008 0  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Hg}^{2+}$  和低至 0.008 0  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Pb}^{2+}$ , 在  $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  浓度分别达到 0.033 0  $\mu\text{mol/L}$  和 2.080 0  $\mu\text{mol/L}$  时, 可通过肉眼观察到靛蓝颜色变化, 为现场快速检测超标重金属提供了便捷方法, 实现了对水样中生物可利用 Hg 和 Pb 的

检测<sup>[73]</sup>。分别以 CadR 和 MerR 作为响应元件、以 VioABE 和 VioC 作为报告元件构建的一种新型双色 WCMB, 可检测低至 4.900 0 nmol/L 的 Cd<sup>2+</sup>、24.400 0 nmol/L 的 Pb<sup>2+</sup>和 0.500 0 nmol/L 的 Hg<sup>2+</sup>; 并且在 0.004 9–40 μmol/L 的 Cd<sup>2+</sup>和 0.024 4–200 μmol/L 的 Pb<sup>2+</sup>浓度范围内观察到灰绿色强度增加, 在 0.003 7–0.468 8 μmol/L 的 Hg<sup>2+</sup>浓度范围内观察到紫色强度增加, 并呈剂量依赖性<sup>[74]</sup>。这种低成本、新型 WCMB 具有同时检测环境水样中多种有毒重金属的潜力。

双组分系统是细菌体内的另一种信号转导系统, 由组氨酸激酶与应答受体/转录因子组成, 分别负责信号识别和细胞行为调控; 基于双组分转录因子构建的 WCMB 具有复杂的遗传调控网络, 其在实际环境监测应用中的普及程度尚不及上述基于单组分转录因子系统构建的 WCMB<sup>[88]</sup>。铀(U)是一种放射性重金属元素, 对细菌具有显著毒性; 然而, 细菌如何感知 U 的分子机制长久以来鲜有报道; Park 等<sup>[75]</sup>通过反向遗传策略筛选获得新月柄杆菌(*Caulobacter vibrioides*)中受 UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>强烈诱导表达的启动子 PurcA 的调控元件, 揭示了一种新的双组分系统 UzcRS。此外, 他们还鉴定了另一种由 UrpR 和 UrpS 两个蛋白构成的 U 响应双组分系统 UrpRS, 通过集成这 2 种功能分离的 UzcRS 和 UrpRS 双组分系统, 构建了铀响应 WCMB, 实现了对浓度低至 1 μmol/L 的 UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>的精准检测, 为评估地下水等环境样本中的铀污染提供了有力工具<sup>[76]</sup>。

## 2 基于合成生物学策略的全细胞微生物传感器性能改造与优化

尽管现有的 WCMB 能够检测多种重金属, 但仍面临着部分重金属因毒性机制复杂或环境浓度低而导致检测难度增大的挑战; 此外,

WCMB 在灵敏度、特异性和稳定性方面仍有待提高, 以满足更为复杂、精细的环境监测需求<sup>[22]</sup>。针对这些挑战, 利用快速发展的合成生物学技术方法对天然蛋白质及调控 DNA 序列进行特异性改造, 能够极大地优化 WCMB 的传感性能; 其中的两大核心策略, 蛋白质工程通过精细设计与定向进化技术可以改造识别元件的结构与功能, 启动子工程通过优化启动子与操纵子的调控序列可以改造报告元件的表达强度; 对识别元件与报告元件的精准改造可以实现 WCMB 检测特异性与灵敏性的双重提升; 这些策略的综合运用, 不仅有助于深化人们对生物传感机制的理解, 更为 WCMB 在实际应用中的性能优化开辟了新路径<sup>[89]</sup>。近年来, 合成生物学策略在 WCMB 性能优化与改造领域的具体应用实例见表 3。

### 2.1 蛋白质工程——改变转录因子的蛋白结构

除了对特定重金属的专一性响应外, 多数天然转录因子还对其他重金属具有非特异性响应, 这在复杂环境应用中常导致多金属干扰问题; 转录因子的特异性改造, 对于解决实际应用过程中的响应干扰问题具有重要的意义<sup>[22]</sup>。

基于已知转录因子的结构, 利用人工智能模拟与预测蛋白质结构, 通过精确改造关键氨基酸残基的位置、电荷及亲疏水性等, 优化转录因子与目标分子的相互作用, 从而设计出新型结构的转录因子<sup>[58,90-91]</sup>。Kim 等<sup>[90]</sup>基于 ZntR 的晶体结构信息对 ZntR 的金属结合域“CCGTAHSSVYCS”的不同位点进行定点突变, 构建了 23 个对重金属具有不同响应敏感性的传感细胞, 并成功获得了对 Cr<sup>2+</sup>或 Pb<sup>2+</sup>具有更高选择性的 WCMB, 进一步拓展了基于 ZntR 构建的 WCMB 在重金属检测领域的应用范围; 该研究将定点突变技术应用于 ZntR 的金属结合域

表3 基于合成生物学策略优化全细胞微生物传感器

Table 3 Optimization of whole-cell microbial biosensors based on synthetic biology strategy

Sensing element	Detection object	Optimization strategy	Application	Performance enhancement ( $\mu\text{mol/L}$ )	References
ZntR	Cr <sup>2+</sup> or Pb <sup>2+</sup>	Protein engineering	Cr and Pb-responsive WCMB were developed from the znt-manipulation subsystem for the determination of Pb <sup>2+</sup> or Cr <sup>2+</sup> in environmental system	New selectivity for Cr <sup>2+</sup> or Pb <sup>2+</sup>	[90]
	Pb <sup>2+</sup>	Protein engineering	The content of Pb <sup>2+</sup> in environmental samples was monitored	0–0.010 0, <0.005 0*	[58]
ArsR	Pb <sup>2+</sup>	Protein engineering	The content of Pb <sup>2+</sup> in environmental samples was monitored	Detection accuracy>95%	[91]
MerR	Hg <sup>2+</sup>	Protein engineering	The content of Hg <sup>2+</sup> in water samples was monitored	$\geq 0.020 4$	[92]
	Hg <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	Protein engineering	A new chimeric regulator WCMB was developed by replacing the metal-binding domain of MerR with ZntR or CueR	$\geq 0.001 0$ Hg <sup>2+</sup> (MerR-Luc) $\geq 30$ Zn <sup>2+</sup> (MerRZntR-Luc) $\geq 10$ Cu <sup>2+</sup> (MerRCueR-Luc)	[93]
CadR	Cd <sup>2+</sup>	Protein engineering	The content of Cd <sup>2+</sup> in water samples was monitored	$\geq 0.450 0$ $\mu\text{g/L}$	[94]
	Cd <sup>2+</sup>	Protein engineering	The interference of Hg <sup>2+</sup> was reduced and the response to Cd <sup>2+</sup> was enhanced	0.500 0–100, $\geq 0.079 0$ *	[30]
MerR	Hg <sup>2+</sup>	Protein engineering	The “Parabola principle” is proposed and a visualized WCMB for Hg <sup>2+</sup> detection in natural water is developed	0.200 0–0.250 0	[95]
	Hg <sup>2+</sup>	Protein engineering Promoter engineering	A super-sensitive visualized WCMB for the detection of ultra-trace Hg <sup>2+</sup> was developed	$\geq 0.313 0$ ng/L. When the fluorescence signal is more than 2.500 0 ng/l, it can be observed directly*	[96]
ArsR	AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	Promoter engineering	A high sensitivity AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> WCMB was developed, and the background reduction and signal output improvement were realized	0.100 0–4, $\geq 0.010 0$	[97]
	AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	Promoter engineering	A highly sensitive and specific WCMB for AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> detection in drinking water was developed	$\geq 0.010 0$ *	[98]
	AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	Promoter engineering	A functional promoter library screening method was developed, and different AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> responsive elements arsR and OsmE1 were obtained, and a novel OsmE1 biosensor was constructed	$\geq 0.040 0$	[99]
	AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	Promoter engineering	A highly sensitive and specific WCMB for AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> detection in drinking water was developed	$\geq 0.100 0$	[100]
ArsR MerR	AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> Hg <sup>2+</sup>	Promoter engineering	A modular cascaded signal amplification method was developed, and a low-cost, portable and accurate AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> and Hg <sup>2+</sup> ultra-sensitive WCMB was constructed	$\geq 0.100 0$ ppb AsO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> $\geq 0.010 0$ ppb Hg <sup>2+</sup>	[101]
CadR	Cd <sup>2+</sup>	Promoter engineering	A highly sensitive and specific Cd <sup>2+</sup> responsive WCMB was developed for the detection of Cd <sup>2+</sup> in water	$\geq 0.010 0$	[102]
	Cd <sup>2+</sup>	Promoter engineering	A Cd <sup>2+</sup> responsive WCMB with a negative feedback amplifier was developed to detect Cd <sup>2+</sup> below the WHO and FAO standards with extremely high sensitivity and specificity	$\geq 0.000 1$ *	[103]

$\geq$  indicates a minimum detection limit; < indicates a lower detection limit; \* indicates that the detection performance is currently the best; ppb is a unit of concentration, meaning “one part per billion”. It is often used to describe the concentration of very low concentrations of chemicals in the environment, biological samples or industrial products; Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )=Concentration (ppb)×Molecular weight (g/mol)/1 000 000.

中, 改变了 ZntR 的金属结合特性, 为开发具有更高特异性和敏感性的 WCMB 提供了可能。Jeon 等<sup>[58]</sup>不仅对 ZntR 金属结合域的不同位点(如 C115I、C115S、T117del、H119R、C124S)进行了定点突变, 还敲除了宿主细胞中的金属离子输出基因 *copA* 和 *zntA*, 所构建的 WCMB 实现了对  $Pb^{2+}$  的特异性检测, 在 0–10 nmol/L 的  $Pb^{2+}$  浓度范围内呈线性相关, 检测限低于 5 nmol/L, 足以监测食品中铅的最大允许值(1.200 0–6.000 0  $\mu\text{mol/L}$ )。Lee 等<sup>[91]</sup>通过对 ArsR 的砷结合序列“ELCVCDLCTA”的不同位点进行精准改造, 也构建了 23 个对重金属具有不同响应敏感度的突变体, 实现了 ArsR 从  $As^{3+}$  到  $Pb^{2+}$  的识别功能的转换; 同时通过敲除 *copA* 和 *zntA* 基因, 减弱了 WCMB 对  $Cd^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  的选择性, 增强了 WCMB 对  $Pb^{2+}$  的识别特异性。这些研究成果不仅改变了铅响应操纵子 pbr 是唯一用于铅响应 WCMB 构建的识别元件的传统观点, 还为构建其他重金属 WCMB 提供了新的思路和方向。

除了定点突变以外, 研究者们还通过 DNA 大片段的替换, 改造出性能更为优越的 WCMB。Mendoza 等<sup>[92]</sup>通过替换识别元件 GolS 的金属结合域为 MerR 蛋白的等效区域, 不仅提升了原有 WCMB 对高浓度  $Hg^{2+}$  的耐受性(高达 5  $\mu\text{mol/L}$ ), 还保持了原有 WCMB 的高灵敏检测能力, 检测限达到 20.400 0 nmol/L。Ghataora 等<sup>[93]</sup>使用结构域交换策略设计并构建了对重金属离子高灵敏和高特异检测的 WCMB, 通过在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) TW2043 中引入了 *E. coli* 的 MerR 回路, 所构建的汞响应 WCMB 可检测低至 1 nmol/L 的  $Hg^{2+}$ ; 随后对 MerR 与 ZntR 和 CueR 进行结构域交换, 设计了具有特定金属选择性的嵌合体调节器(MerRZntR 和 MerRCueR), 结合 Lux ABCDE 蛋白构建了 2 种 WCMB, 其

中嵌合体 MerRZntR WCMB 可检测低至 0.030 0 mmol/L 的  $Zn^{2+}$ , MerRCueR WCMB 可检测低至 10  $\mu\text{mol/L}$  的  $Cu^{2+}$ , 为设计具有新型特异性的金属检测传感器提供了可能。

此外, 通过基因随机诱变与定向进化, 可以筛选出与目标分子结合能力显著增强的突变体, 从而提升转录因子的结合与调控性能<sup>[30,94]</sup>。Cai 等<sup>[94]</sup>以 CadR 作为识别元件及 GFP 为报告元件构建的镉响应 WCMB 为原始模板, 利用易错 PCR 在 CadR 蛋白编码区进行随机突变, 经过多轮荧光激活细胞分选后, 获得了一株性能更高的细菌突变体 epCadR5, 其对  $Cd^{2+}$  的检测灵敏度比天然 CadR 构建的 WCMB 提高了 6.8 倍, 检测限达到 0.450 0  $\mu\text{g/L}$ 。Guo 等<sup>[30]</sup>通过随机突变方法改变了 CadR 金属结合位点氨基酸的空间位置, 构建了以 CadR 为响应元件、以 RFP 为报告元件的镉响应 ebCadR-RFP WCMB, 优化后的 WCMB 降低了  $Hg^{2+}$  的干扰并增强了对  $Cd^{2+}$  的响应, 线性动态浓度范围为 0.500 0–100  $\mu\text{mol/L}$ , 检测限为 0.079 0  $\mu\text{mol/L}$ 。

## 2.2 启动子工程——优化结合位点序列、增强报告信号

### 2.2.1 优化转录因子结合位点及 RNA 聚合酶结合位点序列

当了解目标基因的启动子序列及转录因子结合位点信息时, 可通过优化启动子与操纵子的调控序列以增强报告元件的表达强度, 这对提升 WCMB 的检测灵敏性具有重要作用。传统重金属 WCMB 的设计主要依赖于模拟细菌的重金属抗性系统, 而 Guo 等<sup>[95]</sup>设计了一系列不同强度的组成型启动子来表达 CadR 蛋白, 以 GFP 作为报告元件构建了一系列 WCMB, 结果发现传感器蛋白的表达水平可以作为 WCMB 检测灵敏度的“调节器”, 并且检测曲线的斜率与传感器蛋白的表达水平(启动子表达效率的对数值)之

间的关系可以用抛物线曲线( $R^2=0.8867$ )来表示, 于是提出了“启动子-斜率的抛物线原理”; 同时还验证了抛物线原理同样适用于基于 MerR 家族其他传感器蛋白(如 CueR、PbrR)的 WCMB, 为 MerR 家族传感蛋白的 WCMB 设计提供了一种新的策略, 即通过选择不同表达强度的启动子调整传感蛋白的表达水平来精确控制 WCMB 的检测灵敏度; 基于此原理, 选择了 5 个 *merR* 基因的启动子来表达 MerR 蛋白, 构建了用于天然水体中  $Hg^{2+}$  检测的可视化 WCMB, 其中 P429-*merR* WCMB 表现出较好的抗干扰能力, 在  $Hg^{2+}$  浓度为 0.200 0–0.250 0  $\mu\text{mol/L}$  时呈现出肉眼可见的绿色变化。

Chen 等<sup>[97]</sup>通过对 *arsR-ParsWT* 操纵子的 -10 位点进行一系列的突变, 构建了 7 个启动子突变体的砷响应 WCMB, 为了减少突变体中的背景无诱导表达, 在砷响应启动子-10 位点的下游添加了第 2 个 ArsR 结合位点, 实现了 WCMB 性能的显著提升; 其中, 启动子突变体 ParsD-ABS-8 的灵敏度是天然启动子的 11 倍, 在 0.100 0–4.000 0  $\mu\text{mol/L}$   $AsO_3^{3-}$  范围内显示出优异的剂量响应 ( $R^2=0.9928$ ), 检测限约 10 nmol/L。通过研究砷响应蛋白 ArsR 基因的调控特征, Chen 等<sup>[98]</sup>发现了砷结合蛋白 ArsR 的 DNA 非保守碱基对在蛋白质-DNA 结合和基因转录调控中发挥重要作用, DNA 非保守碱基对可以改变 ArsR 蛋白与其靶 DNA 序列的结合, 非保守碱基对的变化也可以影响 ArsR 蛋白与 DNA 结合后的功能; 通过对非保守碱基对的定点突变改造, 开发了更灵敏和准确的砷响应 WCMB, 对  $AsO_3^{3-}$  的检测限提高到了 0.010 0  $\mu\text{mol/L}$ , 远低于世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 对饮用水中  $AsO_3^{3-}$  的限量标准 (0.010 mg/L 或 0.130 0  $\mu\text{mol/L}$ ), 为饮用水安全监测提供了有力工具。此外, Li 等<sup>[99]</sup>利用一种新的响应启动

子高通量筛选技术直接从基因组中挖掘重金属响应启动子片段, 构建了功能性启动子文库, 并成功获得了  $AsO_3^{3-}$  响应的不同组件, 用于砷响应 WCMB 的构建, 这种方法构建的功能性启动子文库可以有效地筛选和发现重金属胁迫刺激下的响应性启动子, 不仅高效而且不依赖现有基因组和转录因子信息, 为重金属 WCMB 的构建与优化开辟了新路径。

### 2.2.2 设计增强报告信号的基因回路

在复杂环境中, 目标信号往往微弱且易受干扰; 对此, 可以通过对基因回路的巧妙设计, 包括正反馈和负反馈机制等, 来放大报告基因的响应强度, 以显著提高检测的灵敏度和准确性, 对增加生物传感器的检测范围具有重要的作用<sup>[99]</sup>。

Jia 等<sup>[102]</sup>将 T7 RNA 聚合酶基因元件置于 CadR 转录因子及其启动子的调控下, 随后串联 T7 RNA 聚合酶启动子以调控报告蛋白 mCherry 元件的表达, 并且在 mCherry 元件上游添加了受 CadR 抑制的操纵元件 *cadO*, 使用该策略构建的镉响应 WCMB 对  $Cd^{2+}$  的检测限可以低至 0.010 0  $\mu\text{mol/L}$ , 并且具有优异的响应特异性; 此外, 他们还将群体感应因子受体蛋白 LuxR 元件置于 ArsR 转录因子及其启动子的调控之下, 同时将报告蛋白 mCherry 元件及另一个拷贝的群体感应因子受体蛋白 LuxR 元件置于群体感应因子合成酶的启动子调控下, 构建了 2 种基因调控回路, 使得报告蛋白 mCherry 元件的表达受到正反馈调节, 通过该策略构建的砷响应 WCMB 的检测灵敏度和特异性大大提高, 其灵敏度比未经改造的 WCMB 提高了约 10 倍, 对  $AsO_3^{3-}$  的检测限低至 0.100 0  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[100]</sup>。除此之外, 负反馈基因回路改造也是提高 WCMB 灵敏性的一种常见方法。Zhang 等<sup>[103]</sup>将四环素阻遏蛋白 TetR 元件置于 CadR 转录因子的下游, 使

其显著抑制 CadR 启动子 Plteto1 的本底表达, 从而大大降低了无 Cd<sup>2+</sup>条件下的背景信号干扰; 通过此策略改造的镉响应 WCMB 对 Cd<sup>2+</sup>的灵敏度比未经改造的 WCMB 提高了 400 倍, 检测限低至 0.100 0 nmol/L, 且对 Cd<sup>2+</sup>的耐受性也显著增加。

在需要快速、大量检测样本的情况下, 通过调整识别元件和报告元件的数量以及增加信号放大模块是一种更为有效地提高 WCMB 灵敏性的方法; 通过简单的组件调整和数量增加, 即可实现对信号的放大和检测灵敏度的提升, 相较于复杂的基因回路设计, 该策略在成本控制方面可能更具优势<sup>[104]</sup>。Zhu 等<sup>[96]</sup>首先对汞响应转录激活因子 MerR 进行定向进化, 获得了高灵敏度的突变体, 其中突变体 m4-1 对 Hg<sup>2+</sup>检测限低至 0.313 0 ng/L; 然后在 m4-1 的 GFP 报告元件下游通过优化的 5' 非编码区序列集成了另一个 GFP 报告模块, 构建了荧光信号增强且可视化的 WCMB; 在 Hg<sup>2+</sup>浓度低至 2.500 0 ng/L 时, 荧光信号仍然可通过肉眼直接观测, 实现了对超痕量 Hg<sup>2+</sup>的灵敏检测。Wan 等<sup>[101]</sup>进一步探索了级联模块化的信号放大策略, 通过调节细胞内 ArsR 识别元件的数量来提高 AsO<sub>3</sub><sup>3-</sup>的检测灵敏度, 然后集成 3 个转录放大器, 逐级提升 GFP 报告元件的表达水平; 成功开发了针对 AsO<sub>3</sub><sup>3-</sup>和 Hg<sup>2+</sup>检测的超灵敏 WCMB, 灵敏度分别提高了 750 倍和 200 倍, 检测限分别低至 0.100 0 ppb 和 0.010 0 ppb。在实际应用中, 应根据具体需求和条件选择合适的优化策略或进行综合运用。目前, 通过以上这些合成生物学的优化策略, 大多数 WCMB 都可以实现重金属的痕量检测。

### 3 总结与展望

基于不同类型转录因子的 WCMB 在环境重

金属污染检测方面展现出极为广阔的应用潜力。由于重金属如 Pb、Hg、Cd、As 等对人体健康和生态环境系统构成严重威胁, 因此对环境中重金属进行准确、快速、高效且灵敏的检测对于保护环境和人体健康具有重要的意义。这种检测技术不仅能确定重金属污染的种类与浓度, 还为重金属污染的防控提供有力支持。此外, 借助合成生物学的策略, 可以对 WCMB 的结构和功能进行改造和优化, 从而实现低浓度重金属污染物的精准检测, 对于及时发现和解决潜在的重金属环境污染问题具有重要意义。此外, WCMB 还具有实时在线监测的潜力, 通过将 WCMB 集成到常规环境监测系统中, 可以实现对重金属污染物的实时、连续监测, 为环境保护部门提供及时、准确的数据支持, 有助于制定科学的污染防控策略。

然而, 与一些化学检测仪器(如 ICP-MS 等)相比, 尽管化学仪器成本较高、操作相对复杂, 但其准确性高; 相比之下, WCMB 在成本上更具优势, 但在准确性方面仍有待提升。其次, 由于现有合成生物学技术的局限性和转基因生物可能带来的安全威胁等问题, 目前 WCMB 的设计过程和实际应用仍存在困难。不同类型转录因子的选择和应用仍需更多实验验证和优化。此外, WCMB 的稳定性和可重复性问题也亟待解决, 将其从实验室规模转移到商业规模同样面临重大挑战。未来可以继续提高基于转录因子的 WCMB 的灵敏度和特异性, 降低 WCMB 的制造成本和操作复杂性, 并优化其稳定性和再生性, 以实现实时连续监测。此外, WCMB 的设计可以更加注重创新和智能化。一方面, 通过开发新的识别元件, 有望为重金属污染的有效防控提供更有力的技术支持; 另一方面, 随着互联网、人工智能等技术的不断发展, 重金属 WCMB 可以向小巧、便携、灵敏、可重复

使用等方向进一步发展。随着相关技术和法规的不断进步与完善,相信这一领域将会取得更加丰硕的成果,为保护环境和人体健康提供更加有力的保障。

## 作者贡献声明

王明月: 综述撰写、表格制作和图形绘制;  
许玫英: 主题选择, 提供了该领域内的专业见解和建议;  
纠敏: 文献查阅整理与格式校对;  
陈杏娟: 文献的深入分析和讨论, 对综述进行修改和补充。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] VELUSAMY K, PERIYASAMY S, KUMAR PS, RANGASAMY G, PAULINE JMN, RAMARAJU P, MOHANASUNDARAM S, VO DV. Biosensor for heavy metals detection in wastewater: a review[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 168: 113307.
- [2] KARTHIK V, SELVAKUMAR P, KUMAR P, SATHEESKUMAR V, VIJAYSUNDER MG, HARIHARAN S, ANTONY K. Recent advances in electrochemical sensor developments for detecting emerging pollutant in water environment[J]. *Chemosphere*, 2022, 304: 135331.
- [3] 张祖焯, 何梦园, 乔月, 贾润梅, 彭祥轩, 麦华明, 陈思. *Agromyces* sp. CS16 去除水体中重金属镉、镍、铜、锌离子的研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(7): 2791-2808.  
ZHANG ZY, HE MY, QIAO Y, JIA RM, PENG XX, MAI HM, CHEN S. Removal of cadmium, nickel, copper, and zinc ions from water by *Agromyces* sp. CS16[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(7): 2791-2808 (in Chinese).
- [4] BRIFFA J, SINAGRA E, BLUNDELL R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans[J]. *Heliyon*, 2020, 6(9): e04691.
- [5] ALI Z, YOUSAFZAI AM, SHER N, MUHAMMAD I, NAYAB GE, AQEEL SAM, SHAH ST, ASCHNER M, KHAN I, KHAN H. Toxicity and bioaccumulation of manganese and chromium in different organs of common carp (*Cyprinus carpio*) fish[J]. *Toxicology Reports*, 2021, 8: 343-348.
- [6] GU TY, LU YQ, LI F, ZENG WM, SHEN L, YU RL, LI JK. Microbial extracellular polymeric substances alleviate cadmium toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) by regulating cadmium uptake, subcellular distribution and triggering the expression of stress-related genes[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 257: 114958.
- [7] ZHANG P, YANG MJ, LAN JJ, HUANG Y, ZHANG JX, HUANG SS, YANG YS, RU JJ. Water quality degradation due to heavy metal contamination: health impacts and eco-friendly approaches for heavy metal remediation[J]. *Toxics*, 2023, 11(10): 828.
- [8] KOMIJANI M, SHAMABADI NS, SHAHIN K, EGHBALPOUR F, TAHSILI MR, BAHRAM M. Heavy metal pollution promotes antibiotic resistance potential in the aquatic environment[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 274: 116569.
- [9] NAZ S, FAZIO F, HABIB SS, NAWAZ G, ATTAULLAH S, ULLAH M, HAYAT A, AHMED I. Incidence of heavy metals in the application of fertilizers to crops (wheat and rice), a fish (common carp) pond and a human health risk assessment[J]. *Sustainability*, 2022, 14(20): 13441.
- [10] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Stronger protections from lead in drinking water: next steps for the lead and copper rule [EB/OL]. (2021-12-01) [2024-3-20]. [https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-12/lcrr-review-fact-sheet\\_0.pdf](https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-12/lcrr-review-fact-sheet_0.pdf).
- [11] EUROPEAN COMMISSION. Water framework directive [EB/OL]. (2023-12-20) [2024-3-20]. [https://environment.ec.europa.eu/topics/water/water-framework-directive\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/water/water-framework-directive_en).
- [12] ARJOMANDI M, SHIRKHANDI H. A review: analytical methods for heavy metals determination in environment and human samples[J]. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*, 2019, 2(3): 97-126.
- [13] MATHUR S, SINGH D, RANJAN R. Genetic circuits in microbial biosensors for heavy metal detection in soil and water[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2023, 652: 131-137.
- [14] KIM YS, RASTON NHA, GU MB. Aptamer-based nanobiosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 76: 2-19.
- [15] REBOLLAR-PÉREZ G, CAMPOS-TERÁN J, ORNELAS-SOTO N, MÉNDEZ-ALBORES A, TORRES E. Biosensors based on oxidative enzymes for detection of environmental pollutants[J]. *Biocatalysis*, 2016, 1(1): 118-129.
- [16] HOSSAIN MF, SLAUGHTER G. Flexible electrochemical uric acid and glucose biosensor[J]. *Bioelectrochemistry*, 2021, 141: 107870.
- [17] LI MT, JIANG F, XUE LY, PENG C, SHI ZZ, ZHANG Z, LI J, PAN YP, WANG XY, FENG CQ, QIAO DF, CHEN ZZ, LUO QZ, CHEN XC. Recent progress in biosensors for detection of tumor biomarkers[J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7327.
- [18] GAVRILAS S, URSACHI CŞ, PERŢA-CRIŞAN S, MUNTEANU FD. Recent trends in biosensors for environmental quality monitoring[J]. *Sensors*, 2022, 22(4): 1513.
- [19] MAJER-BARANYI K, SZÉKÁCS A, ADÁNYI N.

- Application of electrochemical biosensors for determination of food spoilage[J]. *Biosensors*, 2023, 13(4): 456.
- [20] MORASKIE M, ROSHID MHO, O'CONNOR G, DIKICI E, ZINGG JM, DEO S, DAUNERT S. Microbial whole-cell biosensors: current applications, challenges, and future perspectives[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 191: 113359.
- [21] BEREZA-MALCOLM LT, MANN G, FRANKS AE. Environmental sensing of heavy metals through whole cell microbial biosensors: a synthetic biology approach[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(5): 535-546.
- [22] LIU CJ, YU H, ZHANG BC, LIU SL, LIU CG, LI F, SONG H. Engineering whole-cell microbial biosensors: design principles and applications in monitoring and treatment of heavy metals and organic pollutants[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 60: 108019.
- [23] DING NN, ZHOU SH, DENG Y. Transcription-factor-based biosensor engineering for applications in synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(5): 911-922.
- [24] HOSSAIN GS, SAINI M, MIYAKE R, LING H, CHANG MW. Genetic biosensor design for natural product biosynthesis in microorganisms[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(7): 797-810.
- [25] YU WW, XU XH, JIN K, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. Genetically encoded biosensors for microbial synthetic biology: from conceptual frameworks to practical applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 62: 108077.
- [26] MA Z, JACOBSEN FE, GIEDROC DP. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing[J]. *Chemical reviews*, 2009, 109(10): 4644-4681.
- [27] TULIN G, FIGUEROA NR, CHECA SK, SONCINI FC. The multifarious MerR family of transcriptional regulators[J]. *Molecular Microbiology*, 2024, 121(2): 230-242.
- [28] DOS REIS FERREIRA GM, PIRES JF, RIBEIRO LS, CARLIER JD, COSTA MC, SCHWAN RF, SILVA CF. Impact of lead (Pb<sup>2+</sup>) on the growth and biological activity of *Serratia marcescens* selected for wastewater treatment and identification of its *zntR* gene: a metal efflux regulator [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(4): 91.
- [29] EKAS HM, WANG B, SILVERMAN AD, LUCKS JB, KARIM AS, JEWETT MC. Engineering a PbrR-based biosensor for cell-free detection of lead at the legal limit[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(9): 3003-3012.
- [30] GUO MZ, CHEN SJ, SU HF, CHEN XL, LIU HL, SUN BG. High-throughput visualization mutation screening technology to enhance the specificity of CadR based whole-cell cadmium biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2024, 256: 116266.
- [31] KANDARI D, JOSHI H. PerR: a peroxide sensor eliciting metal ion-dependent regulation in various bacteria[J]. *Molecular Biotechnology*, 2024: 1-12.
- [32] SEVILLA E, BES MT, PELEATO ML, FILLAT MF. Fur-like proteins: beyond the ferric uptake regulator (Fur) paralogs[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2021, 701: 108770.
- [33] BARROWS JK, STUBBS KA, PADILLA-MONTOYA IF, LEEPER TC, DYKE MW. Manganese-dependent transcription regulation by MntR and PerR in *Thermus thermophilus* HB8[J]. *Molecular Microbiology*, 2024, 121(6): 1228-1244.
- [34] MARCOS-TORRES FJ, JUNIAR L, GRIESE JJ. The molecular mechanisms of the bacterial iron sensor IdeR[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2023, 51(3): 1319-1329.
- [35] JELIĆ MATOŠEVIĆ Z, RADMAN K, LOUBSER J, CRNOLATAČ I, PIANTANIDA I, CUKROWSKI I, LEŠČIĆ AŠLER I, BERTOŠA B. Structural dynamics of the *Bacillus subtilis* MntR transcription factor is locked by Mn<sup>2+</sup> binding[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 957.
- [36] ZHENG CK, WEI M, QIU J, JIA MD, ZHOU XH, JIAO XN. TroR negatively regulates the TroABCD system and is required for resistance to metal toxicity and virulence in *Streptococcus suis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(20): e01375-21.
- [37] CAO KM, LI SX, WANG Y, HU HZ, XIANG SJ, ZHANG QL, LIU YZ. Cellular uptake of nickel by NikR is regulated by phase separation[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(6): 112518.
- [38] ZAMBELLI B. Intracellular phase separation and its role in nickel sensing[J]. *Trends in Cell Biology*, 2023, 33(9): 732-733.
- [39] RIGOLI M, POTESIO R, MENICHETTI R. A multi-scale analysis of the CzrA transcription repressor highlights the allosteric changes induced by metal ion binding[EB/OL]. 2024. <https://arxiv.org/abs/2409.03584v1>.
- [40] GALLO G, ANTONUCCI I, PIRONE L, AMORESANO A, CONTURSI P, LIMAURO D, PEDONE E, BARTOLUCCI S, FIORENTINO G. A physicochemical investigation on the metal binding properties of TtSmtB, a thermophilic member of the ArsR/SmtB transcription factor family[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 1056-1063.
- [41] QIU YK, TONG YJ, YANG HL, FENG SS. Molecular insights into a novel Cu(I)-sensitive ArsR/SmtB family repressor in extremophile *Acidithiobacillus caldus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(1): e01266-22.
- [42] CHEN SY, ZHANG Y, LI RJ, WANG BJ, YE BC. *De novo* design of the ArsR regulated P<sub>ars</sub> promoter enables a highly sensitive whole-cell biosensor for arsenic contamination[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(20): 7210-7218.
- [43] KUMARI WMNH, THIRUCHITTAMPALAM S, WEERASINGHE MSS, CHANDRASEKHARAN NV, WIJAYARATHNA CD. Characterization of a *Bacillus megaterium* strain with metal bioremediation potential and in silico discovery of novel cadmium binding motifs in the regulator, CadC[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(6): 2573-2586.
- [44] LI XH, CHEN L, LIAO JJ, HUI JC, LI WH, HE ZG. A

- novel stress-inducible CmtR-ESX3-Zn<sup>2+</sup> regulatory pathway essential for survival of *Mycobacterium bovis* under oxidative stress[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(50): 17083-17099.
- [45] IGBARIA-JABER Y, HOFMANN L, GEVORKYAN-AIRAPETOV L, SHENBERGER Y, RUTHSTEIN S. Revealing the DNA binding modes of CsoR by EPR spectroscopy[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(42): 39886-39895.
- [46] LI C, VAVRA JW, CARR CE, HUANG HT, MARONEY MJ, WILMOT CM. Complexation of the nickel and cobalt transcriptional regulator RcnR with DNA[J]. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 2020, 76(1): 25-30.
- [47] HAN LC, CUI WJ, LIN Q, CHEN QQ, SUO FY, MA K, WANG Y, HAO WL, CHENG ZY, ZHOU ZM. Efficient overproduction of active nitrile hydratase by coupling expression induction and enzyme maturation *via* programming a controllable cobalt-responsive gene circuit[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 193.
- [48] HIRSCH M, HOFMANN L, SHENBERGER Y, GEVORKYAN-AIRAPETOV L, RUTHSTEIN S. Conformations and local dynamics of the CopY metal sensor revealed by EPR spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 2023, 62(3): 797-807.
- [49] NAM KH. Fluorescent protein-based metal biosensors[J]. *Chemosensors*, 2023, 11(4): 216.
- [50] BOGDANOVA YA, ZAITSEVA ER, SMIRNOV AY, BALEEVA NS, GAVRIKOV AS, MYASNYANKO IN, GONCHARUK SA, KOT EF, MINEEV KS, MISHIN AS, BARANOV MS. NanoLuc luciferase as a fluorogen-activating protein for GFP chromophore based fluorogens[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(9): 7958.
- [51] WU XJ, DONG DW, QU JY, HAN Y, YOU ZY, LI PP, HAN JG. An enzyme-fused phycobiliprotein synthesis system developed for visual whole-cell biosensors for the detection of cadmium during wastewater treatment[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2024, 36: 103882.
- [52] SINGH A, KUMAR V. Recent advances in synthetic biology-enabled and natural whole-cell optical biosensing of heavy metals[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(1): 73-82.
- [53] MA ZL, MELIANA C, MUNAWAROH HSH, KARAMAN C, KARIMI-MALEH H, LOW SS, SHOW PL. Recent advances in the analytical strategies of microbial biosensor for detection of pollutants[J]. *Chemosphere*, 2022, 306: 135515.
- [54] ZHU XJ, XIANG QY, CHEN L, CHEN JS, WANG L, JIANG N, HAO XR, ZHANG HY, WANG XH, LI YQ, OMER RB, ZHANG LF, WANG YH, ZHUANG YP, HUANG JF. Engineered *Bacillus subtilis* Biofilm@Biochar living materials for *in-situ* sensing and bioremediation of heavy metal ions pollution[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 465: 133119.
- [55] FAN C, ZHANG DL, MO QW, YUAN JF. Engineering *Saccharomyces cerevisiae*-based biosensors for copper detection[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(11): 2854-2860.
- [56] LIU XL, TANG KX, HU JL. Application of cyanobacteria as chassis cells in synthetic biology[J]. *Microorganism*, 2024, 12(7): 1375.
- [57] WANG X, CHENG MZ, YANG Q, WEI HY, XIA A, WANG LH, BEN Y, ZHOU Q, YANG ZB, HUANG XH. A living plant cell-based biosensor for real-time monitoring invisible damage of plant cells under heavy metal stress[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 697: 134097.
- [58] JEON Y, LEE YJ, JANG G, KIM BG, YOON Y. Design of Pb(II)-specific *E. coli*-based biosensors by engineering regulatory proteins and host cells[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 881050.
- [59] KIM SK, KIM SH, SUBHADRA B, WOO SG, RHA E, KIM SW, KIM H, LEE DH, LEE SG. A genetically encoded biosensor for monitoring isoprene production in engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(10): 2379-2390.
- [60] GUO MZ, WANG JL, DU RX, LIU YE, CHI JN, HE XY, HUANG KL, LUO YB, XU WT. 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]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 150: 111899.
- [61] ZEVALLOS-ALIAGA D, de GRAEVE S, OBANDO-CHÁVEZ P, VACCARI NA, GAO Y, PEETERS T, GUERRA DG. Highly sensitive whole-cell mercury biosensors for environmental monitoring[J]. *Biosensors*, 2024, 14(5): 246.
- [62] KHAN A, SALAMA ES, CHEN ZJ, NI HYH, ZHAO S, ZHOU TY, PEI YX, SANI RK, LING ZM, LIU P, LI XK. A novel biosensor for zinc detection based on microbial fuel cell system[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 147: 111763.
- [63] HUI CY, GUO Y, LIU L, ZHANG NX, GAO CX, YANG XQ, YI J. Genetic control of violacein biosynthesis to enable a pigment-based whole-cell lead biosensor[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(47): 28106-28113.
- [64] NOURMOHAMMADI E, HOSSEINKHANI S, NEDAEINIA R, KHOSHDEL-SARKARIZI H, NEDAEINIA M, RANJBAR M, EBRAHIMI N, FARJAMI Z, NOURMOHAMMADI M, MAHMOUDI A, GOLI M, FERNS GA, SADEGHIZADEH M. Construction of a sensitive and specific lead biosensor using a genetically engineered bacterial system with a luciferase gene reporter controlled by *pbr* and *cadA* promoters[J]. *Biomedical Engineering Online*, 2020, 19(1): 79.
- [65] HUI CY, GUO Y, LI H, GAO CX, YI J. Detection of environmental pollutant cadmium in water using a visual bacterial biosensor[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 6898.
- [66] BEREZA-MALCOLM L, ARACIC S, KANNAN R, MANN G, FRANKS AE. Functional characterization of

- Gram-negative bacteria from different genera as multiplex cadmium biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 94: 380-387.
- [67] GUO KH, CHEN PH, LIN C, CHEN CF, LEE IR, YEH YC. Determination of gold ions in human urine using genetically engineered microorganisms on a paper device[J]. *ACS Sensors*, 2018, 3(4): 744-748.
- [68] FANG Y, ZHU CJ, CHEN XJ, WANG Y, XU MY, SUN GP, GUO J, YOO J, TIE CJ, JIANG X, LI XQ. Copy number of ArsR reporter plasmid determines its arsenite response and metal specificity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(13): 5753-5761.
- [69] LI PS, WANG YM, YUAN X, LIU XY, LIU CM, FU XF, SUN DZ, DANG Y, HOLMES DE. Development of a whole-cell biosensor based on an ArsR-Pars regulatory circuit from *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2021, 6: 100092.
- [70] CHEN XJ, YAO H, SONG D, LIN JH, ZHOU H, YUAN WF, SONG P, SUN GP, XU MY. A novel antimony-selective ArsR transcriptional repressor and its specific detection of antimony trioxide in environmental samples via bacterial biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 220: 114838.
- [71] HUI CY, GUO Y, LI H, CHEN YT, YI J. Differential detection of bioavailable mercury and cadmium based on a robust dual-sensing bacterial biosensor[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 846524.
- [72] HUI CY, GUO Y, WU J, LIU L, YANG XQ, GUO X, XIE Y, YI J. Detection of bioavailable cadmium by double-color fluorescence based on a dual-sensing bioreporter system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 696195.
- [73] HUI CY, GUO Y, LI LM, LIU L, CHEN YT, YI J, ZHANG NX. Indigoidine biosynthesis triggered by the heavy metal-responsive transcription regulator: a visual whole-cell biosensor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(14/15): 6087-6102.
- [74] HU SY, HUI CY, WU C, GAO CX, HUANG ZL, GUO Y. Dual-colored bacterial biosensor responsive to cadmium, mercury, and lead for detecting heavy metal pollution in seawater[J]. *Ecological Indicators*, 2024, 166: 112244.
- [75] PARK DM, OVERTON KW, LIOU MJ, JIAO YQ. Identification of a U/Zn/Cu responsive global regulatory two - component system in *Caulobacter crescentus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(1): 46-64.
- [76] PARK DM, TAFFET MJ. Combinatorial sensor design in *Caulobacter crescentus* for selective environmental uranium detection[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(4): 807-817.
- [77] FANG C, ZHANG Y. Bacterial MerR family transcription regulators: activation by distortion: the mechanism of transcription regulation by MerR[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2021, 54(1): 25.
- [78] LI JR, WEI XZ, YU PL, DENG X, XU WX, MA M, ZHANG HY. Expression of *cadR* enhances its specific activity for Cd detoxification and accumulation in Arabidopsis[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(8): 1720-1731.
- [79] LEE W, KIM H, JANG G, KIM BG, YOON Y. Antimony sensing whole-cell bioreporters derived from ArsR genetic engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104: 2691-2699.
- [80] CHEN J, ROSEN BP. Biosensors for inorganic and organic arsenicals[J]. *Biosensors*, 2014, 4(4): 494-512.
- [81] SALTIKOV CW, OLSON BH. Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB*, and *arsC* genes in arsenic-resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic-enriched creek waters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 280-288.
- [82] SANTHA S, PANDARANAYAKA EPJ, ROSEN BP, THIYAGARAJAN S. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the arsenic repressor ArsR from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2011, 67(12): 1616-1618.
- [83] QIN J, FU HL, YE J, BENCZE KZ, STEMMLER TL, RAWLINGS DE, ROSEN BP. Convergent evolution of a new arsenic binding site in the ArsR/SmtB family of metalloregulators[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(47): 34346-34355.
- [84] CHEN J, NADAR VS, ROSEN BP. A novel MAs (III)-selective ArsR transcriptional repressor[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 106(3): 469-478.
- [85] KHAN SS, SHEN Y, FATMI MQ, CAMPBELL RE, BOKHARI H. Design and prototyping of genetically encoded arsenic biosensors based on transcriptional regulator AfArsR[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(9): 1276.
- [86] MUSIANI F, ZAMBELLI B, BAZZANI M, MAZZEI L, CIURLI S. Nickel-responsive transcriptional regulators[J]. *Metallomics*, 2015, 7(9): 1305-1318.
- [87] YOON Y, KANG Y, CHAE Y, KIM S, LEE Y, JEONG SW, AN YJ. Arsenic bioavailability in soils before and after soil washing: the use of *Escherichia coli* whole-cell bioreporters[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(3): 2353-2361.
- [88] GONZALEZ-FLO E, ALABALL ME, MACIA J. Two-component biosensors: unveiling the mechanisms of predictable tunability[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(6): 1328-1335.
- [89] QIN L, LIU X, XU K, LI C. Mining and design of biosensors for engineering microbial cell factory[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 75: 102694.
- [90] KIM H, JANG G, KIM BG, YOON Y. Modulation of the metal (loid) specificity of whole-cell bioreporters by genetic engineering of ZntR metal-binding loops[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(5): 681-688.
- [91] LEE Y, JEON Y, JANG G, YOON Y. Derivation of Pb(II)-sensing *Escherichia coli* cell-based biosensors from arsenic responsive genetic systems[J]. *AMB Express*, 2021, 11: 169.

- [92] 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]. *Chemical Communications*, 2020, 56(48): 6590-6593.
- [93] 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 Synthetic Biology*, 2023, 12(3): 735-749.
- [94] CAI YS, ZHU KL, SHEN L, MA J, BAO LZ, CHEN DD, WEI LC, WEI N, LIU BM, WU YJ, CHEN SP. Evolved biosensor with high sensitivity and specificity for measuring cadmium in actual environmental samples[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(14): 10062-10071.
- [95] GUO MZ, DU RX, XIE ZX, HE XY, HUANG KL, LUO YB, XU WT. Using the promoters of MerR family proteins as “rheostats” to engineer whole-cell heavy metal biosensors with adjustable sensitivity[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2019, 13(1): 70.
- [96] ZHU KL, CHEN DD, CAI YS, ZHANG TY, MA J, BAO LZ, ZHAO F, WU LJ, CHEN SP. Engineering the ultrasensitive visual whole-cell biosensors by evolved MerR and 5' UTR for detection of ultratrace mercury[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(44): 16964-16973.
- [97] CHEN SY, WEI WP, YIN BC, TONG YB, LU JJ, YE BC. Development of a highly sensitive whole-cell biosensor for arsenite detection through engineered promoter modifications[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2295-2302.
- [98] CHEN XJ, JIANG X, TIE CJ, YOO J, WANG Y, XU MY, SUN GP, GUO J, LI XQ. Contribution of nonconsensus base pairs within ArsR binding sequences toward ArsR-DNA binding and arsenic-mediated transcriptional induction[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2019, 13: 53.
- [99] LI XQ, JIANG X, XU MY, FANG Y, WANG Y, SUN GP, GUO J. Identification of stress-responsive transcription factors with protein-bound *Escherichia coli* genomic DNA libraries[J]. *AMB Express*, 2020, 10: 199.
- [100] JIA XQ, BU RR, ZHAO TT, WU K. Sensitive and specific whole-cell biosensor for arsenic detection[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(11): e00694-19.
- [101] WAN XY, VOLPETTI F, PETROVA E, FRENCH C, MAERKL SJ, WANG BJ. Cascaded amplifying circuits enable ultrasensitive cellular sensors for toxic metals[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(5): 540-548.
- [102] JIA XQ, LIU T, MA YB, WU K. Construction of cadmium whole-cell biosensors and circuit amplification[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(13): 5689-5699.
- [103] ZHANG GB, HU ST, JIA XQ. Highly sensitive whole-cell biosensor for cadmium detection based on a negative feedback circuit[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 799781.
- [104] WANG WJ, ZHANG J, TAO H, LV XF, DENG YL, LI XQ. *E. coli* biosensor based on modular GFP and LuxI/LuxR cyclic amplification circuit for sensitive detection of lysine[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(29): 8299-8307.