

DOI: 10.13376/j.cblls/2025099

文章编号: 1004-0374(2025)08-1007-13



王福, 西安交通大学基础医学院教授、博导, 青年拔尖人才 A 类, 陕西省杰出青年基金获得者, 福建省“闽江学者”讲座教授, *BMC Biology*、*BMC Cancer* 等杂志编委, 中国光学学会生物医学光子学专委会委员。主要从事生物医学成像及分析传感领域的研究, 先后主持包括国家自然科学基金项目 (4 项), 科技部外国专家项目, 国家“973 计划”二级子课题, 陕西省自然科学基金面上、重点、杰青项目, 陕西省留学人员科技活动择优资助项目 (优秀类, 2 项) 等 10 余个国家、省部级基金项目。近年来以通讯作者在 *ACS Nano*、*Nano Letters*、*Biosensors and Bioelectronics*、*Analytical Chemistry* 等国际主流期刊发表 SCI 论文 50 余篇; 申请 / 授权中国发明专利 10 余项; 研究成果以第一完成人获得陕西省高等学校科学技术奖一等奖 (2022、2016) 等奖项。

RNA响应的合成基因线路设计及其生物医学应用

舒文杰, 王 福*

(西安交通大学基础医学院, 生物物理系, 医学工程研究所, 西安 710061)

摘 要: 合成基因线路是指利用合成生物学的方法对调控元件进行设计与组装, 以创造出能够执行特定生物功能的系统。近年来, 各类 RNA 分子响应的基因线路不断被报道, 并在基础生物学研究和医疗健康领域显现出极大应用潜力。这些 RNA 分子响应的基因线路具有良好的模块化和可编程特征, 能够精确地执行设定任务。本文综述了近年来使用不同策略构建的各类 RNA 分子响应的基因线路系统并探讨了其生物医学应用, 为以后理性设计 RNA 响应的基因线路提供新的思路。

关键词: 基因线路; RNA 分子; 基因表达调控; 合成生物学

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

RNA-responsive gene circuits and biomedical applications

SHU Wen-Jie, WANG Fu*

(Institute of Medical Engineering, Department of Biophysics, School of Basic Medicine,
Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Synthetic gene circuits refer to the use of synthetic biology methods to design and assemble regulatory elements to create systems capable of performing specific biological functions. In recent years, various RNA-responsive gene circuits have been reported, and have shown great application potential in basic biological research and medical health. These genetic circuits are modular and programmable, enabling them to perform set tasks precisely. In this work, we review the latest reported RNA-responsive gene circuits constructed by different strategies and discuss their biomedical applications, which will provide new insights for rational design of related gene circuits in the future.

Key words: gene circuits; RNA molecules; regulation of gene expression; synthetic biology

收稿日期: 2024-12-24; 修回日期: 2025-03-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(32271512, 32201199)

*通信作者: E-mail: wangfu@xjtu.edu.cn

合成生物学是一个快速发展的领域,结合了生物学、工程学和计算机科学的原理,旨在设计和构建具有新功能的生物系统。合成基因线路是指利用合成生物学的方法,对生物元件进行重新设计与组装,以创造出能够在活细胞中执行特定生物功能的系统。随着基础生物学研究的发展,更多的生物分子功能和基因表达调控机制被揭示,为合成基因线路的构建提供了潜在生物元件和设计指导。特别是哺乳动物细胞中基因表达调控机制的深入了解,以及CRISPR等基因编辑工具的快速发展,使合成基因线路在基础生物学研究、生命健康和医疗等领域表现出广泛的应用前景。合成基因线路的设计思路大致可分为两种:一种是设计出具有特定且相对独立于宿主细胞本身功能的基因线路,此时宿主细胞一般仅作为基因线路的承载者;另一种基因线路可以和宿主细胞进行良好互动,感知细胞内的生物分子信号并做出响应,从而对宿主细胞的生物功能进行调节。

RNA是细胞中一类非常重要的生物分子,其分为编码RNA和非编码RNA(ncRNA)两大类。编码RNA主要指信使RNA(mRNA),它们负责将遗传信息从DNA转录到蛋白质合成的过程。非编码RNA的种类较多,包括微小RNA(miRNA)、长非编码RNA(lncRNA)和环状RNA(circRNA)等。非编码RNA虽然不直接编码蛋白质,但其在多种生物过程中同样发挥着重要的调控作用^[1-4]。例如,miRNA通过与靶mRNA结合,抑制其翻译或促进其降解,从而在基因表达调控中发挥重要作用^[5,6]。2024年诺贝尔生理学或医学奖颁给了两位科学家,以表彰他们发现miRNA及其在转录后基因调控中的作用。由于RNA本身具有重要生物学功能,并且很多RNA分子在不同细胞类型或疾病状态中的表达具有特异性,近年来RNA分子响应的基因线路设计越来越受到重视。这种类型基因线路的功能

受宿主细胞自身表达的内源性RNA调节,根据目标RNA分子信号的表达情况,驱动信号输出从而实现特定的生物功能。

RNA响应的基因线路大致由三个模块组成(图1)。(1)信号输入:通过整合基因元件感知细胞中特定RNA分子信号,例如人工插入目标miRNA的识别位点到设计区域,用于感知特定细胞中的内源靶miRNA信号;(2)信号处理:通过设计的基因线路对RNA信号的输入进行处理,如利用两个癌细胞特异性miRNA分别调控转录抑制蛋白的表达,两个miRNA同时存在时下游报告基因才能被激活,实现“与门”的功能;(3)信号输出:设计不同类型的感兴趣基因作为输出信号从而实现特定的生物功能,如肿瘤细胞选择性杀伤。本文根据构建策略的不同分类,介绍了近年来发展的RNA分子响应基因线路并探讨了其生物医学应用,为以后理性设计RNA响应的基因线路提供新思路。

1 基于CRISPR系统构建的RNA分子响应线路

CRISPR-Cas系统是一种强大的遗传操作工具,在基因调控、碱基编辑、表观遗传修饰和核酸成像等方面均展现出了极大应用潜力。CRISPR-Cas系统由引导RNA(gRNA)和Cas蛋白组成,其中gRNA可以是单个分子,也可以是两个独立的部分。在II型CRISPR系统如CRISPR-Cas9系统中,天然的gRNA由CRISPR RNA(crRNA)和反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)两个部分组成,而在V型CRISPR系统如CRISPR/Cas12a系统中,其gRNA则仅由一条crRNA组成。

近年来,在CRISPR-Cas系统和合成生物学蓬勃发展的背景下,基于CRISPR-Cas系统构建的RNA响应基因线路不断被报道。根据所设计感应RNA分子的CRISPR组分不同,这些基因线路构建策略可分为三种:(1)构建RNA响应的功能性gRNA

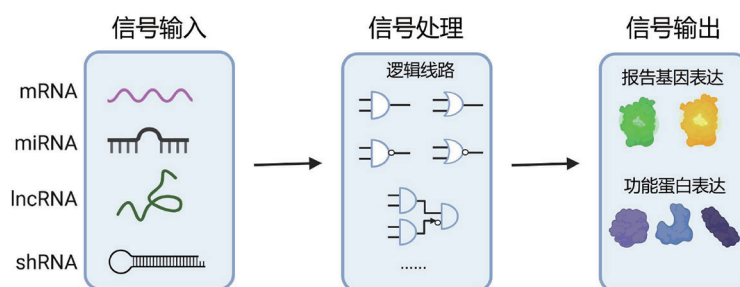


图1 RNA分子响应的基因线路组成

生成; (2) 构建 RNA 响应的 Cas 蛋白开关; (3) CRISPR 相关蛋白酶介导的蛋白剪切。这些基于 CRISPR-Cas 系统构建的基因线路, 已被用于感应细胞内多种 RNA (例如 mRNA、miRNA 和 lncRNA), 并可做出响应驱动信号输出, 从而实现特定的生物功能。

1.1 设计RNA响应的功能性gRNA生成

通过设计 RNA 激活的 gRNA 策略, 很多不同 RNA 响应的 CRISPR-Cas 线路被设计出来用于特定 RNA 检测^[7, 8]。这种构建策略工作模式如下: 在没有目标 RNA 时, 不产生功能性的 gRNA, 因此 CRISPR 系统不被激活; 在有目标 RNA 时, 生成功能性 gRNA, CRISPR 系统被激活, 并根据设定驱动信号输出。这种基因线路的设计策略主要包括以下 3 种 (图 2): (1) RNA 响应的分裂型 gRNA 重组 (图 2A); (2) 支点开关调控 gRNA 生成 (图 2B); (3) miRNA 切割介导的 gRNA 生成 (图 2C)。

1.1.1 RNA响应的分裂型gRNA重组

在 CRISPR-Cas9 系统中, 天然的 gRNA 由 crRNA 和 tracrRNA 两部分组成, 其中 crRNA 中包含识别目标位点的序列以及 tracrRNA 配对的区域, 当 crRNA 和 tracrRNA 配对时可以激活 CRISPR-Cas9 系统。近期研究表明, crRNA 和 tracrRNA 的配对区序列可以被其他任意序列替代, 并且人工设计的

crRNA-tracrRNA 对表现出了很好的正交性^[9], 这为构建 RNA 响应的功能性 gRNA 生成提供了理论基础。利用这种原理, Liu 等^[10]设计了一种 tracrRNA, 其能够响应大肠杆菌中的合成或天然 RNA。在该 CRISPR 系统中, 目标 RNAs 发挥类似 crRNA 的功能, 促进功能性 gRNA 生成, 通过进一步与核酸内切酶缺陷型 Cas9 (dCas9) 组装, 触发 GFP 报告基因表达。此外, 通过设计正反馈基因线路, 这种基于 tracrRNA 的传感器对目标小 rRNA 或 mRNA 的响应表现出高达 52.2 倍的变化。在另外一项研究中, 同样基于 tracrRNA 构建了一种 RNA 响应的基因线路^[11]。不同的是, 设计的 tracrRNA 通过与 Cas9 切口酶 (nCas9) 碱基编辑器进行组装, 从而在感知内源性 RNA 后对合成的 DNA 靶标进行碱基编辑, 使目标 RNA 的转录信息存储在编辑后的 DNA 中。这种通过基因编码的方式记录 RNA 转录本信息的方法被命名为 TIGER (Transcribed RNAs Inferred by Genetically Encoded Records)。TIGER 不仅能够精确测量某个基因的表达水平, 还能够区分单核苷酸变异并同时记录多个 RNA 转录本信息。

然而, 上述两种方法^[10, 11]都只在原核细胞中显示出强大的 RNA 检测能力, 尚未在真核细胞中被证明可行。Lin 等^[12]提出了一种自组装诱导的

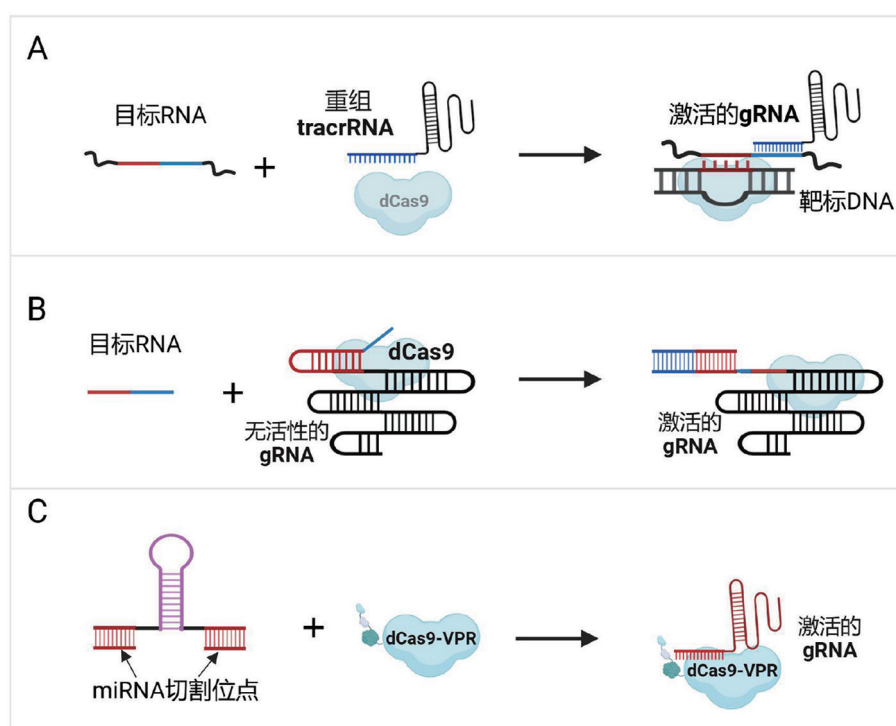


图2 RNA响应的功能性gRNA生成的三种设计原理示意图

RNA 线路, 通过设计一种对目标 RNA 响应的重编程 crRNA-tracrRNA 双链来控制 CRISPR 功能。目标 RNA 和 crRNA-tracrRNA 形成三元复合体, 促进 crRNA-tracrRNA 组装并激活 dCas9, 进而调控下游基因表达。该基因线路被证明在原核细胞和真核细胞中均能够响应目标 RNA, 但其在 HEK293T 细胞中表现出的检测灵敏度比在大肠杆菌中低。

1.1.2 支点开关调控gRNA生成

上述几种构建方法均是利用分裂 gRNA 型重组的策略进行基因线路构建的。除此之外, 基于链置换原理的支点开关也被广泛应用于构建条件型 gRNA。较早的一项研究利用这种支点开关策略, 通过结合 CRISPR-Cas9 系统, 实现在体外以单碱基分辨率检测寨卡病毒^[13]。之后, 越来越多研究将链置换反应用于条件型 gRNA 构建, 从而构建出多种 RNA 响应的基因线路。在这种设计中, gRNA 的间隔序列 (spacer sequence)^[14-20] 或支架区 (scaffold region)^[21-25] 被设计为支点区域, 只有目标 RNA 和支点区域发生链置换反应后才能形成功能性 gRNA。在近期的一项研究中, 基于链置换反应的功能性 gRNA 生成策略不仅被证明在原核细胞和真核细胞中均有效, 而且可以响应多种 RNA 靶标, 包括 sRNA、miRNA 和 mRNA^[25]。

然而, 为了保证 gRNA 功能能够被目标 RNA 恢复, 上述支点开关序列在设计上存在一些限制, 因此理论上无法实现对任意感兴趣目标 RNA 的检测。有趣的是, 通过设计一种自抑制的 gRNA 和靶 RNA 感应支点区, 在理论上实现了 RNA 靶标与支点开关区域的相互作用没有序列限制^[23]。在这项研究中, gRNA 的 5' 端融合了两个不同且不重叠的结构域: 一个结构域的碱基对与 gRNA 重复从而阻断 Cas12a 识别所需的发夹的形成, 另一个结构域能够与靶 RNA 杂交, 引起 gRNA 的重折叠和随后的功能性 gRNA 形成。这种设计极大扩大了可检测 RNA 序列的范围, 但其表现出了较严重的信号泄漏问题, 因此降低了检测的准确性和传感的动态范围。

1.1.3 miRNA切割介导的gRNA生成

和以上构建策略不同, miRNA 介导的切割也被用于功能性 gRNA 生成的调控^[15, 16, 26]。在这种策略中, gRNA 由聚合酶 II 转录, 同时在 gRNA 上下游插入目标 miRNA 的识别位点。在没有目标 miRNA 的时候, 转录本中的 5' 端帽子结构和 3' 端 PolyA 尾结构抑制 gRNA 功能; 当存在目标 miRNA 时, 目标 miRNA 会对靶标序列进行切割释放功能

性 gRNA, 从而激活 CRISPR 功能并驱动下游报告基因表达, 实现对目标 miRNA 分子的检测。例如, Wang 等^[26] 利用这种 miRNA 介导的 sgRNA 释放策略和 dCas9-VPR 驱动红色荧光蛋白基因表达, 实现了活细胞中 miRNA 表达变化的检测, 并利用这套系统来监测干细胞的分化状态。有意思的是, 另外一项研究通过利用 miRNA 介导的 sgRNA 释放策略和 mRNA 介导的链置换反应, 设计出了一种响应目标 miRNA 和 mRNA 的“与门”基因线路, 实现同时检测 miRNA 和 mRNA^[16]。这种新颖的“与门”设计被成功用于以 RNA 响应的方式诱导泛素体 (ubiquibody) 的表达, 进而触发蛋白质降解^[16]。

1.2 设计RNA响应的Cas蛋白开关

在 CRISPR-Cas 系统中, 除了 gRNA 之外, Cas 蛋白是 CRISPR-Cas 系统发挥功能的另一必要组成部分。通过设计 RNA 响应的 Cas 蛋白开关, 一些 RNA 响应的基因线路系统也被开发出来。这些基因线路的设计策略包括利用 miRNA 和分裂核酶来调控 Cas 蛋白这两种方式。

1.2.1 利用miRNA抑制Cas蛋白表达或活性

通过利用 miRNA 介导的基因表达抑制机制, 一些 RNA 响应的 CRISPR-Cas 系统也被构建出来用于 RNA 分子检测。在这种设计思路中, miRNA 可以被设计为调控 Cas9 蛋白^[27] 或者抗 Cas 蛋白 AcrIIA4^[28, 29] 表达 (图 3A、B), 通过 RNA 诱导沉默复合体 (RISC) 机制沉默 Cas9 蛋白或 AcrIIA4 蛋白编码基因, 从而调控 CRISPR 功能, 进而实现对目标 miRNA 的表达检测。这种构建策略不仅能够用于活细胞水平 miRNA 检测^[27-30], 在小鼠体内也被证明同样有效^[30]。此外, 与直接利用 miRNA 调控 Cas 蛋白或抗 Cas 蛋白表达策略不同, He 等^[31] 利用 miRNA 来抑制突变的 tdMCP (突变的 tdMCP 竞争性抑制 MS2-VPR 与 tdMCP 结合) 的表达, 进而促进 MS2-VPR 与 dCas9-tdMCP 相互作用, 从而通过激活下游报告基因来显示目标 miRNA 的表达 (图 3C)。基于 miR-21 在 HCT116 细胞中高表达的特点, 他们成功利用该系统分离出细胞混合物中的 HCT116 细胞^[31]。

1.2.2 利用分裂核酶调控Cas蛋白表达

除了利用 miRNA 引发的 RISC 调控机制之外, 最近的一项研究则采用了一种完全不同的方法。该研究创新性设计了一种分裂核酶系统, 将 RNA 检测与 dCas9 蛋白输出连接起来, 实现了对目标 RNA 分子的检测^[32]。在这项设计中, 完整的 dCas9 mRNA

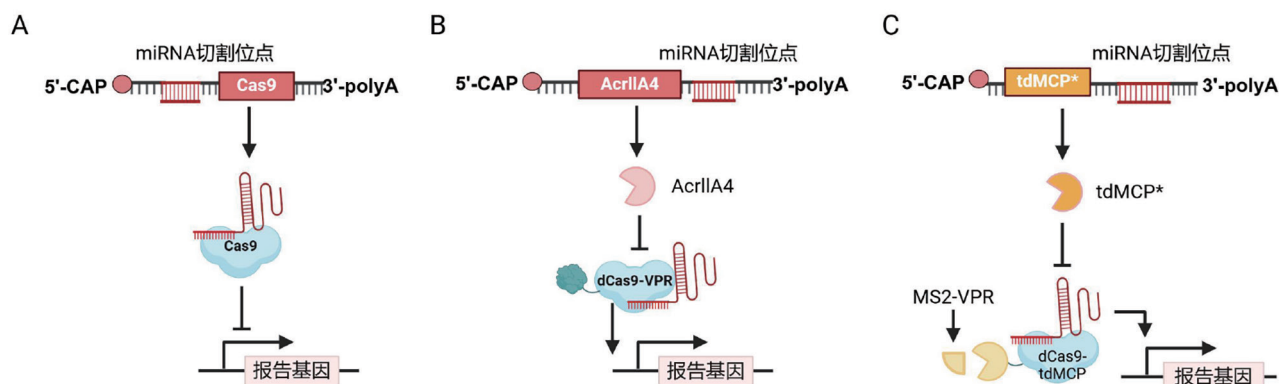


图3 利用miRNA抑制Cas蛋白表达或活性的三种设计原理图

被含有互补靶标 RNA 序列的内含子分开, 当目标 RNA 与内含子序列配对后, 形成模板组装分裂的核酶, 引发反式剪接反应, 产生功能完整的 dCas9 蛋白, 进而对下游 GFP 报告基因进行调控。然而, 该系统在没有目标 RNA 的情况下仍然存在泄漏活性, 说明这种设计在阻止 dCas9 表达方面并不完全有效。此外, 这种设计只在原核细胞中进行了验证, 尚没有研究表明其在真核细胞中的有效性。

1.3 基于CRISPR相关蛋白酶构建的基因线路

在 CRISPR 系统中, 除了有 Cas9 或 Cas12a 等核酸酶之外, 还存在一类 CRISPR 系统相关的蛋白酶^[33, 34]。Cas7-11 是一种 III-E 亚型 CRISPR 系统, 由 4 个 Cas7 和 1 个 Cas11 结构域融合形成一个大的效应蛋白^[35, 36]。Csx29 是一种蛋白酶, 可与 Cas7-11 形成功能复合物。这些 CRISPR 相关的蛋白酶也被成

功用于构建 RNA 响应的基因线路。

在之前的两项研究中, 研究者们基于 Cas7-11-Csx29-Csx30 蛋白酶系统, 设计构建了一种 RNA 响应的蛋白酶活化和底物切割体系^[37, 38]。在该系统中, Cas7-11-crRNA-Csx29 核糖核蛋白复合物在与靶 RNA 结合后引起 Csx29 的构象变化, 催化辅助蛋白 Csx30 的裂解。利用这一机制, 将荧光蛋白^[37]或重组酶^[38]与底物 Csx30 蛋白融合, 可以检测细菌和哺乳动物细胞中的靶标 RNA (图 4A-B)。在这种设计中, 预期是仅当与目标 RNA 结合时, Csx29 切割 Csx30 激活下游报告基因表达。然而, 由于系统灵敏度问题以及较为严重的泄漏问题, 这两种 RNA 检测系统对靶标 RNA 的响应分别只有 3 倍和 15 倍的动态范围。此外, 这种类型的 RNA 检测技术仅在合成 RNA 中被证明可行。

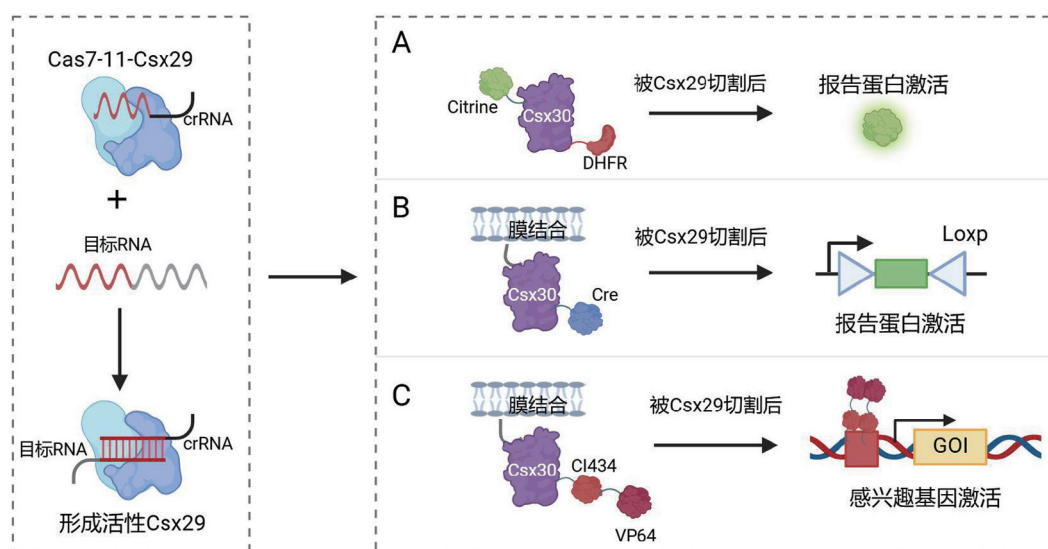


图4 基于Cas7-11-Csx29-Csx30蛋白酶系统构建基因线路的原理图

近期, 同样基于 Cas7-11-Csx29-Csx30 蛋白酶系统, 人们构建出了一种不同的高分辨率 RNA 感应及响应基因线路^[39]。在这项研究中, 底物蛋白 Csx30 一端和细胞膜定位序列融合, 另一端和效应蛋白 dCas9-VP64 融合; 靶标 RNA 激活 Cas7-11 复合物中 Csx29 蛋白酶并切割 Csx30, 从而使效应蛋白 dCas9-VR64 从细胞膜释放, 激活下游感兴趣基因 (GOI) 的表达 (图 4C)。与之前的两项研究不同, 这项研究证实了该基因线路不仅可以用于检测内源性靶标 RNA, 而且还可以用于检测 RNA 点突变, 且检测的突变信号变化倍数高至 94 倍。这些研究说明了 CRISPR 相关蛋白酶系统在构建合成基因线路及 RNA 检测上的适用性。在未来研究中, 基于 crRNA 的高度可编程性, Cas7-11-Csx29-Csx30 蛋白酶系统在构建更复杂的基因线路上仍然具有潜在价值。

2 基于ADAR脱氨酶构建的RNA分子响应线路

作用于 RNA 的腺苷脱氨酶 (ADAR) 以转录后腺苷 (A) 到肌苷 (I) 编辑的方式调节基因表达, 在多种生理和病理过程中发挥重要作用^[40, 41]。在哺乳动物细胞中, ADAR 蛋白家族包含 ADAR1、ADAR2 和 ADAR3 三个成员, 其中 ADAR1 和 ADAR2 具有脱氨酶活性, 而 ADAR3 无催化活性。ADAR 以结构依赖的方式作用于双链 RNA (dsRNA), 并催化 A 碱基发生脱氨反应生成 I 碱基 (A-to-I 编辑)。由于碱基 I 和鸟苷 (G) 之间的结构相似性, 在 mRNA 翻译时碱基 I 会被细胞机制识别为碱基 G, 从而实

现遗传信息的重写^[42]。ADAR 的这种 RNA 编辑功能被证明在治疗遗传性疾病, 如杜氏肌营养不良症^[43]、Hurler 综合征^[44] 和 Rett 综合征^[45] 上具有应用潜力。

近年来, ADAR 介导的 A-to-I 编辑被成功用于构建几种 RNA 响应型基因线路系统^[46-50]。在这些基因线路中, 目标 RNA 分子能够诱导生成可被 ADAR 编辑的双链 RNA 底物。双链 RNA 底物中的设计位点被 ADAR 编辑后能够驱动下游基因表达, 从而实现对目标 RNA 分子的检测或表达变化响应。根据双链 RNA 底物中的两条 RNA 分子来源不同, 这些基因线路的设计策略分为基于线性 RNA 的分子间双链底物和基于发夹 RNA 的分子内双链底物两种 (图 5)。

2.1 线性RNA分子间形成ADAR双链RNA底物

利用线性 RNA 分子间形成 ADAR 双链 RNA 底物的设计思路, 一些 RNA 响应的基因线路系统被成功开发。在这些基因线路中, 目标 RNA 分子能够和人工设计序列互补形成双链 RNA。利用这种设计思路, 一系列基于 ADAR 介导的 A-to-I 编辑的 RNA 分子感应及响应基因线路被报道, 如 CellREADR^[46]、RADARS^[47]、RADAR^[48] 和 DART VADAR^[49] 等。在这些基因线路设计中, 感兴趣基因上游通常会引入终止密码子 UAG, 使其翻译取决于内源性 RNA 转录物与感兴趣基因上游序列的结合及之后 ADAR 介导的终止密码子编辑 (图 5A)。其中, RADARS 感应器能够检测到表达水平低至 13 个 TPM (transcripts per million) 的内源性 RNA 转

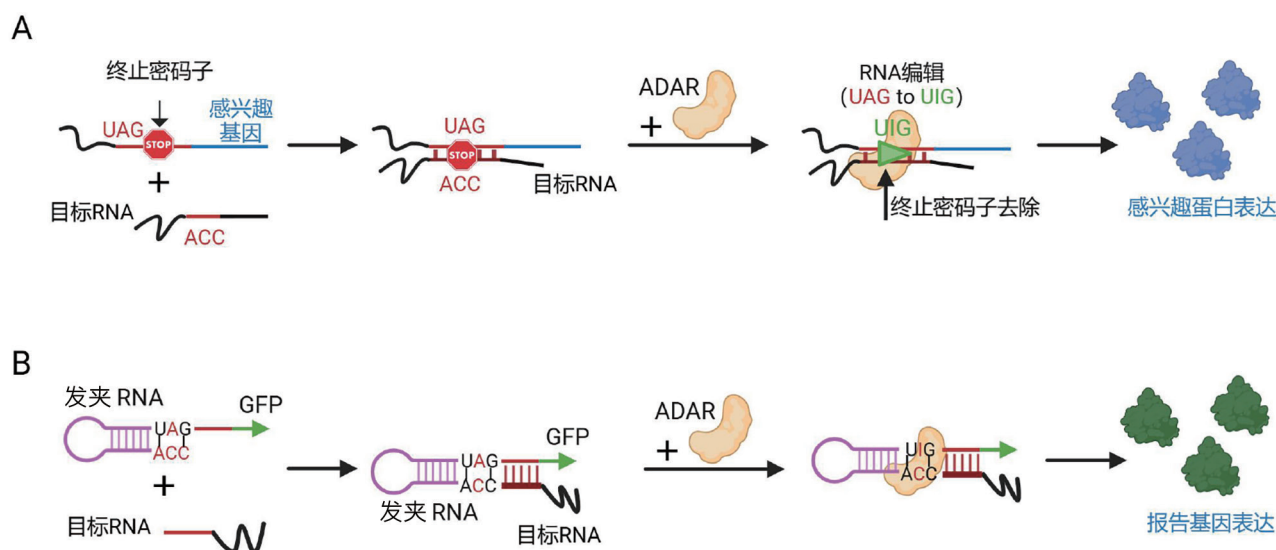


图5 基于ADAR的RNA响应型基因线路的两种不同设计原理图

录本, 并能够实现 277 倍的荧光素酶、荧光蛋白或重组酶等感兴趣基因的激活。

除了能够响应 RNA 转录本外, 基于 ADAR 构建的 RNA 感应系统还能够区分疾病相关 RNA 转录本序列的改变, 如点突变和融合^[48]。此外, 这类系统如 RADAR 可以被改造成“或门”和“与门”等逻辑线路, 实现对两种 RNA 分子的检测。RADAR 也被证明是一个独立发挥功能的系统, 能够在哺乳动物及植物等不同生物类型中发挥作用^[48]。而 CellREADR 被证实能够记录和控制小鼠特定类型的神经元, 突出了该类系统在基于 RNA 的动物体内细胞监测和编辑的应用潜力。

2.2 基于发夹RNA的分子内ADAR底物设计

在上述基于 ADAR 构建的 RNA 响应线路中, 一种含 UAG 的线性感应区域与细胞内靶标 RNA 反向互补形成分子间 dsRNA 后即成为 ADAR 的编辑底物。然而, 这种线性分子间底物设计存在一些固有限制, 如对 RNA 分子中的 UAG-CCA 错配中心序列的高度依赖性限制了目标序列的选择。

与之前的报道不同, 最近的一项研究报道了一种发夹 RNA 传感器, 它利用新机制产生分子内 dsRNA 底物, 用于有效的 ADAR 招募和编辑, 并将其应用于检测各种细胞内分子, 包括 mRNA、小分子和蛋白质^[50]。在这项研究中, RNA 感应器序列被设计为含 UAG 的 RNA 发夹结构, 不能被 ADAR 编辑, 只有细胞内靶标 RNA 分子存在时才能使其成为 ADAR 的底物 (图 5B)。这种设计极大地增加了靶标 RNA 序列的可选择性, 理论上能够实现任意 mRNA 转录本的检测。此外, 该 RNA 传感器还具有识别 RNA 单核苷酸突变的能力。更有意思的是, 将相应 RNA 适配体整合到发夹 RNA 传感器中, 通过简单的构象改变来编程发夹 RNA 的激活, 实现了对活细胞中主要能量供应分子 ATP 和转录因子核因子 κ B (NF- κ B) 的检测。

3 其他类型RNA响应的基因线路

除了上面基于 CRISPR 系统和 ADAR 脱氨酶构建的 RNA 分子响应线路外, 合成生物学和生物改造技术的快速发展还提供了其他一些策略用于构建 RNA 响应基因线路。例如, 基于 RNA 稳定的荧光蛋白策略、基于 RNA 响应的支点开关和基于 miRNA 的负反馈调控等几种设计策略, 这些设计策略同样为以后理性设计 RNA 响应的基因线路及其应用提供了新方法和新思路。

3.1 基于RNA稳定的荧光蛋白策略

荧光蛋白是合成基因线路中常用的信号输出报告分子, 经常被用于检测细胞内 RNA 分子。有意思的是, 通过构建一种 RNA 稳定的荧光蛋白系统, 成功实现了外源性和内源性 mRNA 分子的表达检测^[51, 52]。在这种系统中, 一种包含蛋白降解子 (degron) 序列和 Tat 肽 (一种 RNA 结合肽) 的双功能肽和荧光蛋白融合, 在反式激活反应元件 (TAR) RNA 发夹与 Tat 结合时才会阻止蛋白降解子募集蛋白水解所需的蛋白酶体。

例如, 在 Wu 等^[51]的设计中, 将外源性 β -actin 和 TAR 进行融合表达, 从而利用该系统实现了活细胞水平 β -actin mRNA 成像 (图 6A)。而 Zhou 等^[52]重新设计了一种 RNA 感应模块, 目标 RNA 通过诱导 RNA 感应模块的构象变化, 形成能与 Tat 肽作用的发夹结构, 从而稳定降解子融合的荧光蛋白。这种设计被证明能够用于活细胞中内源性 *survivin* mRNA 丰度和动态的高对比度成像。此外, 通过使用不同荧光蛋白可以将这种系统扩展成多色成像 RNA, 而通过采用分裂荧光蛋白策略可以设计成信号放大器。该 RNA 传感器还被进一步用于 lncRNA MALAT-1 及其在有丝分裂过程中的易位动力学成像^[52]。

3.2 基于RNA响应的支点开关

支点开关是合成生物学系统中常用的一类基因开关, 常常被用于不同类型的基因线路设计^[53, 54]。早期的支点开关系统常常被应用于体外或原核生物基因表达调控^[55, 56]。2021 年, Zhao 等^[57]设计了一种基于内部核糖体进入位点 (IRES) 的真核生物支点开关 (eToehold) 系统, 并将其用于哺乳动物细胞 RNA 转录本检测。在该系统中, 缺乏目标 RNA 时, eToehold 形成抑制环抑制 IRES 活性从而抑制下游基因表达; 当目标 RNA 存在时, 通过链置换反应打开支点开关, 激活 IRES 介导的下游基因翻译 (图 6B)。该系统被证实可以根据外源性或内源性 RNA 转录物的存在来识别病毒感染状态、基因表达信息和细胞类型。然而, eToehold 响应外源性转录本时报告基因最高只显示出 16 倍的表达变化, 对不同内源性 RNA 转录本的检测最高只显示出 9 倍变化。因此, 这种设计在响应灵敏度上还需要进一步提高。

3.3 基于miRNA的负反馈调控

miRNA 是一类长度约为 19–25 nt 的非编码 RNA, 具有抑制基因表达的属性。利用 miRNA 与其靶标 RNA 完全互补配对会导致靶标 RNA 的切割这一天

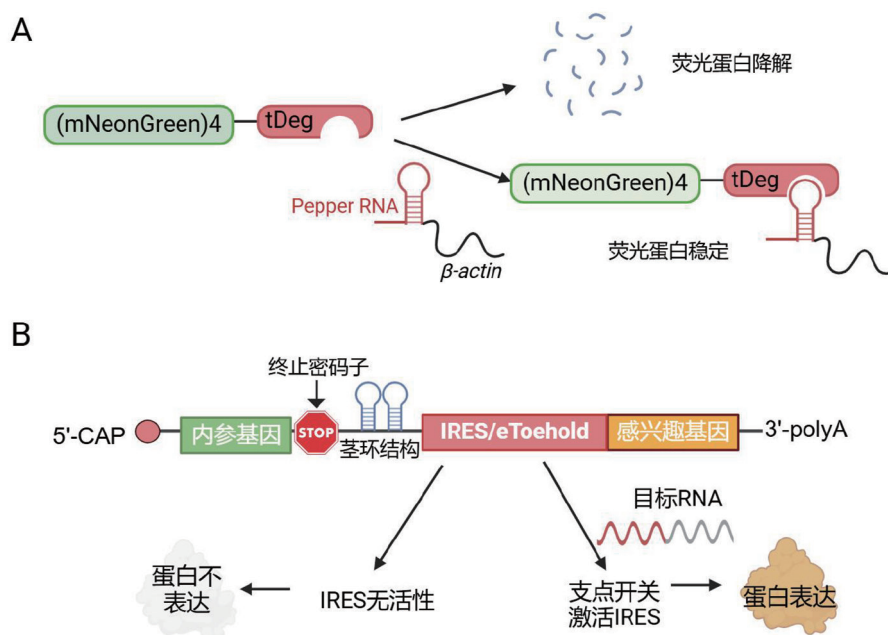


图6 RNA稳定的荧光蛋白和RNA响应的支点开关设计原理图

然机制，一系列 miRNA 响应的基因线路被成功开发^[58-63]。在这些基因线路中，可以将 miRNA 识别位点插入到一些基因表达抑制子的非编码区域，通过负反馈调控机制构建 miRNA 响应的基因线路系统。例如，通过将 miRNA 靶位点插入到转录抑制子 LacI 的非编码区域，并在报告基因上游插入 LacI 结合位点，便可以通过反馈调节机制实现对目标 miRNA 的检测与成像^[59]。

除了调控转录抑制子之外，miRNA 还可以被人工设计为调控一些在转录后水平发挥作用的抑制子，从而构建出不同基因线路用于 miRNA 检测或

细胞类型特异性基因激活^[60, 64-68]。例如，将 miRNA 的识别位点插入一种内切核糖核酸酶非编码区域，同时在感兴趣基因上游插入内切核糖核酸酶的特异性识别序列（图 7A），能够实现对目标 miRNA 的检测和响应^[60]。此外，为了降低基因线路系统的泄漏表达，一种偶联转录和翻译调控的双重调控策略也被成功用于 miRNA 检测和功能基因调控（图 7B）^[61]。然而，这些基因线路大多只能响应一个或两个 miRNA 分子，设计能够识别多个 miRNA 分子靶点的复杂基因线路在未来疾病诊断和治疗领域将更具意义。

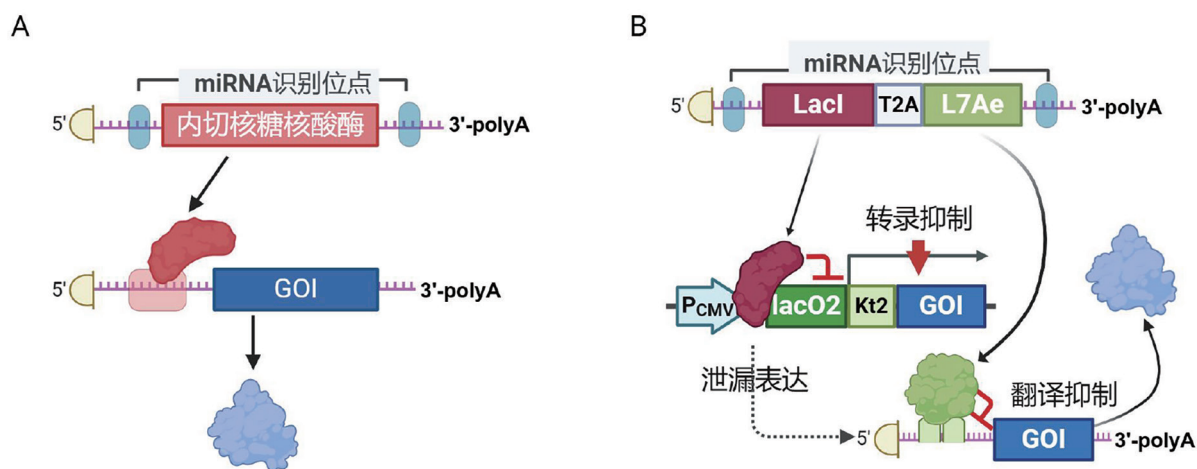


图7 两种基于miRNA负反馈机制的RNA基因线路设计原理图

4 RNA分子响应基因线路的生物医学应用

基于合成生物学方法构建的RNA响应型基因线路在生物医学领域展现出广阔的应用潜力,其核心在于通过动态感知细胞内RNA信号并触发特定基因表达,实现对细胞行为的精准调控。通过整合RNA感知与基因调控功能,这些RNA响应型基因线路不仅能够为基础生物学研究提供新工具,也为生物医学提供了从基础研究到临床转化的创新工具。

4.1 作为生物学基础研究的新工具

作为最基本的用途, RNA响应的基因线路可以输出报告基因,从而实现对目标RNA分子的检测与成像。与传统RNA检测方法(如RNA探针)相比,基于合成基因线路构建的RNA分子检测策略在检测灵敏度、特异性和适用性等各方面都显著提高。因此,这些RNA分子响应的基因线路能够为生物学基础研究提供新工具。

例如,在一种mRNA响应的基因线路中,内源性RNA的转录信息被记录在编辑后的DNA中从而存储在活细胞中,这样能够建立当前细胞状态和过去转录状态之间的联系,揭示了单个细胞内复杂的细胞反应^[11]。更有意义的是,基于miRNA细胞类型特异性表达的特征,一些miRNA响应的人工基因线路系统被用于细胞类型特异性调控CRISPR活性。这些基因线路能够用于细胞类型特异性基因组调控,从而更充分发挥CRISPR系统的应用潜力,为生物学研究提供新工具。利用miRNA响应的CRISPR系统进行筛选被认为是鉴定干细胞中miRNA活性异质性的一种有力工具^[26]。

miRNA响应的基因线路系统还能被应用到细胞分类中。Xie等^[69]最先将miRNA结合位点人工插入基因线路中的基因非编码区域,并基于逻辑线路设计从细胞混合物中识别HeLa细胞。目前这种以miRNA作为信号输入的人工基因线路已经被广泛应用到各种细胞分类问题上,如特定神经细胞的标记、分化细胞与多能干细胞的筛选等^[46, 66, 70, 71]。此外,通过监测特定miRNA或mRNA的表达变化,可实现动态监测干细胞分化过程^[26, 39]。这些成果证明了miRNA在构建合成基因线路系统中的优势,也为开发更多人工可控的基因线路提供了基础。

4.2 在生物传感与疾病诊断中的应用

RNA响应型基因线路在疾病诊断与生物传感中的应用核心在于将RNA信号转化为可检测的输

出(如荧光信号)。例如在无细胞体系中,通过设计一种基于体外转录RNA的传感荧光报告基因,可用于在大流行性流感环境中快速灵敏地检测严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV2)。在原核生物中,通过设计用于检测大肠杆菌中各种环境反应基因的转录水平,可用于环境污染物(如砷、锌、铅、铜和镉)的现场评估^[10]。在真核生物中, RNA响应的基因线路用于RNA分子检测在疾病诊断上同样具有重要意义。例如,很多RNA类型(如mRNA、miRNA、lncRNA)被认为是多种人类疾病的分子标志物,而RNA响应的基因线路可以很好地用于检测这些RNA分子的表达变化。此外,一些基因线路被证明不仅可以用于检测真核细胞RNA,并且能够区分其疾病相关突变体^[39, 48, 50]。因此,基于合成基因线路的RNA分子检测技术在疾病诊断和生物传感域具有很大应用潜力。

4.3 在精准医疗和细胞治疗领域的应用潜力

RNA分子响应的基因线路可以输出具有生物功能的蛋白,从而实现设定生物功能,这为精准医疗和细胞治疗领域提供了新方法和新策略。例如,在一些响应细胞类型特异性表达的miRNA或者mRNA基因线路中,通过人工设计驱动毒性基因表达,可以实现细胞类型特异性肿瘤细胞杀伤^[47, 61, 68, 70]。在最近报道的一种RNA-IN/RNA-OUT基因线路中,其能够高灵敏度地识别肿瘤相关基因的单碱基突变(如KRAS、TP53等),并触发效应模块激活凋亡信号通路,实现肿瘤细胞的特异性杀伤。该基因线路可将单点突变的检测灵敏度提升94倍,并成功应用于胰腺癌和肝癌细胞的靶向治疗^[39]。该基因线路还被证明能够响应内源性RNA信号以激活内源性孕酮生物合成途径^[39],这将赋予细胞新的生物功能,例如构建“智能细胞”用于激素替代治疗。此外, RNA响应的基因线路能够和CRISPR-Cas系统结合,从而在精准医疗领域发挥更大作用。

总的来说, RNA分子响应的基因线路理论上可以被设计成响应任意内源性mRNA或miRNA等编码或非编码RNA分子,并根据需求调控其他任意外源性或内源性基因表达,实现特定生物功能。这种灵活和可调节的基因线路在复杂的环境中具有巨大的应用潜力,例如在未来的临床治疗中,它可以根据疾病的变化情况控制效应分子的状态。因此, RNA响应的基因线路在未来精准医疗和细胞治疗领域中具有极大应用潜力。

表1 RNA响应的基因线路设计策略

总体策略	具体策略	RNA输入信号	输出信号	性能和应用	细胞类型	参考文献
基于CRISPR系统	分裂型gRNA重组	合成RNA、内源性mRNA和sRNA	荧光信号、碱基编辑	动态范围高达52倍, 监测内源基因转录水平	大肠杆菌	[10, 11]
基于CRISPR系统	分裂型gRNA重组	合成RNA、内源性mRNA和sRNA	基因调控	大肠杆菌和哺乳动物细胞的动态范围分别为20倍和6倍; 可用于控制大肠杆菌细胞表型	大肠杆菌和哺乳动物细胞	[12]
基于CRISPR系统	支点开关调控gRNA生成	合成RNA、内源性mRNA	荧光或生物发光信号、基因调控	动态范围可达25倍; 监测大肠杆菌的细胞代谢和应激	大肠杆菌和哺乳动物细胞	[15, 22, 23]
基于CRISPR系统	支点开关调控gRNA生成	合成RNA、miRNA、sRNA和mRNA	生物发光信号、基因调控	控制内源基因表达; 控制细胞凋亡	大肠杆菌和哺乳动物细胞	[14, 16-19, 25]
基于CRISPR系统	miRNA切割介导的gRNA生成	miRNA和mRNA	荧光信号、基因调控	控制内源基因表达	哺乳动物细胞	[15, 16]
基于CRISPR系统	miRNA切割介导的gRNA生成	miRNA	荧光信号、基因调控	控制内源基因表达; 监测肝细胞分化状态; 可以同时检测两个miRNA	哺乳动物细胞	[26]
基于CRISPR系统	miRNA抑制Cas蛋白表达或活性	miRNA	荧光信号、基因调控、基因编辑	细胞/组织类型特异性基因调控, 细胞分类器	哺乳动物细胞, 小鼠体内	[27-30]
基于CRISPR系统	利用分裂核酶调控Cas蛋白表达	合成RNA	荧光信号、基因调控	动态范围达93倍	细菌	[32]
基于CRISPR系统	利用CRISPR相关蛋白酶	合成RNA、mRNA及点突变	荧光信号、基因调控	动态范围最高达到94倍, 激活内源性孕酮生物合成途径	细菌和哺乳动物细胞	[37-39]
基于ADAR脱氨酶	设计线性的分子间双链底物	mRNA及点突变	荧光信号、生物发光信号、基因调控	能够检测到表达水平低至13个转录本的RNA, 动态范围高至277倍, 两种RNA分子的检测	哺乳动物细胞, 植物中	[46-49]
基于ADAR脱氨酶	设计发夹结构的分子内双链底物	mRNA及点突变	荧光信号	能够用于检测小分子和蛋白质, 识别RNA单核苷酸突变	哺乳动物细胞	[50]
其他类型	设计RNA稳定的荧光蛋白	mRNA、lncRNA	荧光信号	扩展成多色成像RNA, 信号放大器	哺乳动物细胞	[51-52]
其他类型	设计RNA响应的支点开关	mRNA	荧光信号、基因调控	最高16倍变化, 识别病毒感染状态, 基因表达信息和细胞类型	哺乳动物细胞	[57]
其他类型	利用miRNA的负反馈调控	miRNA	荧光信号、基因调控	细胞类型特异性基因调控	哺乳动物细胞, 小鼠体内	[58-63]

5 总结和展望

随着合成生物学的快速发展, 近年来 RNA 分子响应的基因线路不断被报道 (表 1), 并在基础生物学研究和未来个性化医疗中表现出极大应用潜力。这些 RNA 响应的基因线路系统具有良好的模块化和可编程性, 使系统能够精确地执行指定任务。特别是基于 CRISPR 系统构建的 RNA 分子响应线路为天然转录物和感兴趣基因之间建立人工连接提供了前所未有的机会。此外, RNA 分子响应的基因线路也为构建其他更为复杂的基因线路提供了广泛的可能性。

在已报道的 RNA 响应的基因线路中, 大多只对一个或少数几个特定内源 RNA 分子进行了验证。然而, 由于不同内源性 RNA 分子表达水平相差很大, RNA 分子响应的基因线路的检测灵敏度和动态范围显得至关重要。目前大多数基于合成基因线路的 RNA 传感器均以线性的方式存在于细胞内, 线性 RNA 固有的不稳定而快速降解性质可能是影响检测灵敏度和动态范围的因素之一。近期一项研究表明, 可以仅用一个环状 RNA 分子就实现多个内源性 miRNA 的检测^[70], 这种设计方法为 RNA 响应基因线路设计提供了一种新思路。为了使 RNA 响应的基因线路更具应用性, 未来仍有必要针对性开发灵敏度和检测范围更广的基因线路。此外, 目前 RNA 响应的基因线路大多是以单一种类的一个或两个 RNA 分子作为信号输入。在临床诊断或治疗中, 往往需要根据多个 RNA 分子靶点来提高检测结果的可靠性和提出个性化治疗方案, 这就需要优化构建多个级联线路, 并保持良好的灵敏度和可观察的信号输出。

[参 考 文 献]

- [1] Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 430-47
- [2] Ali SA, Peffers MJ, Ormseth MJ, et al. The non-coding RNA interactome in joint health and disease. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17: 692-705
- [3] Butz H, Patócs A, Igaz P. Circulating non-coding RNA biomarkers of endocrine tumours. *Nat Rev Endocrinol*, 2024, 20: 600-14
- [4] Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, et al. Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. *Nat Rev Genet*, 2024, 25: 211-32
- [5] Shang R, Lee S, Senavirathne G, et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet*, 2023, 24: 816-33
- [6] Wang X, He Y, Mackowiak B, et al. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut*, 2021, 70: 784-95
- [7] Liu Y, Liu W, Wang B. Engineering CRISPR guide RNAs for programmable RNA sensors. *Biochem Soc Trans*, 2023, 51: 2061-70
- [8] Galizi R, Duncan J N, Rostain W, et al. Engineered RNA-interacting CRISPR guide RNAs for genetic sensing and diagnostics. *CRISPR J*, 2020, 3: 398-408
- [9] Jiao C, Sharma S, Dugar G, et al. Noncanonical crRNAs derived from host transcripts enable multiplexable RNA detection by Cas9. *Science*, 2021, 372: 941-48
- [10] Liu Y, Pinto F, Wan X, et al. Reprogrammed tracrRNAs enable repurposing of RNAs as crRNAs and sequence-specific RNA biosensors. *Nat Commun*, 2022, 13: 1937
- [11] Jiao C, Reckstadt C, König F, et al. RNA recording in single bacterial cells using reprogrammed tracrRNAs. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1107-16
- [12] Lin J, Wang WJ, Wang Y, et al. Building endogenous gene connections through RNA self-assembly controlled CRISPR/Cas9 function. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 19834-43
- [13] Pardee K, Green AA, Takahashi MK, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016, 165: 1255-66
- [14] Siu KH, Chen W. Riboregulated toehold-gated gRNA for programmable CRISPR-Cas9 function. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 217-20
- [15] Oesinghaus L, Simmel FC. Controlling gene expression in mammalian cells using multiplexed conditional guide RNAs for Cas12a*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60: 23894-902
- [16] Hunt VM, Chen W. A microRNA-gated thgRNA platform for multiplexed activation of gene expression in mammalian cells. *Chem Commun (Camb)*, 2022, 58: 6215-18
- [17] Lin J, Liu Y, Lai P, et al. Conditional guide RNA through two intermediate hairpins for programmable CRISPR/Cas9 function: building regulatory connections between endogenous RNA expressions. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 11773-84
- [18] Ying ZM, Wang F, Chu X, et al. Activatable CRISPR transcriptional circuits generate functional RNA for mRNA sensing and silencing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59: 18599-604
- [19] Hunt VM, Chen W. Deciphering the design rules of toehold-gated sgRNA for conditional activation of gene expression and protein degradation in mammalian cells. *ACS Synth Biol*, 2022, 11: 397-405
- [20] Pelea O, Mayes S, Ferry Q R V, et al. Specific modulation of CRISPR transcriptional activators through RNA-sensing guide RNAs in mammalian cells and zebrafish embryos. *Elife*, 2024, <https://doi.org/10.7554/eLife.87722.1.sa2>
- [21] Li Y, Teng X, Zhang K, et al. RNA strand displacement responsive CRISPR/Cas9 system for mRNA sensing. *Anal*

- Chem, 2019, 91: 3989-96
- [22] Oesinghaus L, Simmel FC. Switching the activity of Cas12a using guide RNA strand displacement circuits. *Nat Commun*, 2019, 10: 2092
- [23] Collins SP, Rostain W, Liao C, et al. Sequence-independent RNA sensing and DNA targeting by a split domain CRISPR-Cas12a gRNA switch. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 2985-99
- [24] Hochrein LM, Li H, Pierce NA. High-performance allosteric conditional guide RNAs for mammalian cell-selective regulation of CRISPR/Cas. *ACS Synth Biol*, 2021, 10: 964-71
- [25] Wang WJ, Lin J, Wu CQ, et al. Establishing artificial gene connections through RNA displacement-assembly-controlled CRISPR/Cas9 function. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51: 7691-703
- [26] Wang XW, Hu LF, Hao J, et al. A microRNA-inducible CRISPR-Cas9 platform serves as a microRNA sensor and cell-type-specific genome regulation tool. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 522-30
- [27] Hirose M, Fujita Y, Parr CJC, et al. Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: e118
- [28] Hirose M, Fujita Y, Saito H. Cell-type-specific CRISPR activation with microRNA-responsive AcrIIA4 switch. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 1575-82
- [29] Hoffmann MD, Aschenbrenner S, Grosse S, et al. Cell-specific CRISPR-Cas9 activation by microRNA-dependent expression of anti-CRISPR proteins. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: e75
- [30] Lee J, Mou H, Ibrahim R, et al. Tissue-restricted genome editing *in vivo* specified by microRNA-repressible anti-CRISPR proteins. *RNA*, 2019, 25: 1421-31
- [31] He M, Zhou X, Li Z, et al. Programmable transcriptional modulation with a structured RNA-mediated CRISPR-dCas9 complex. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 12690-7
- [32] Gambill L, Staubus A, Mo KW, et al. A split ribozyme that links detection of a native RNA to orthogonal protein outputs. *Nat Commun*, 2023, 14: 543
- [33] Shmakov SA, Makarova KS, Wolf YI, et al. Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E5307-16
- [34] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18: 67-83
- [35] Özcan A, Krajcski R, Ioannidi E, et al. Programmable RNA targeting with the single-protein CRISPR effector Cas7-11. *Nature*, 2021, 597: 720-25
- [36] van Beljouw SPB, Haagsma AC, Rodríguez-Molina A, et al. The gRAMP CRISPR-Cas effector is an RNA endonuclease complexed with a caspase-like peptidase. *Science*, 2021, 373: 1349-53
- [37] Kato K, Okazaki S, Schmitt-Ulms C, et al. RNA-triggered protein cleavage and cell growth arrest by the type III-E CRISPR nuclease-protease. *Science*, 2022, 378: 882-89
- [38] Strecker J, Demircioglu FE, Li D, et al. RNA-activated protein cleavage with a CRISPR-associated endopeptidase. *Science*, 2022, 378: 874-81
- [39] Zhang M, Zhang X, Xu Y, et al. High-resolution and programmable RNA-IN and RNA-OUT genetic circuit in living mammalian cells. *Nat Commun*, 2024, 15: 8768
- [40] Eisenberg E, Levanon EY. A-to-I RNA editing - immune protector and transcriptome diversifier. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 473-90
- [41] Booth BJ, Nourreddine S, Katrekar D, et al. RNA editing: expanding the potential of RNA therapeutics. *Mol Ther*, 2023, 31: 1533-49
- [42] Pfeiffer LS, Stafforst T. Precision RNA base editing with engineered and endogenous effectors. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1526-42
- [43] Wang X, Zhang R, Yang D, et al. Develop a compact RNA base editor by fusing ADAR with engineered EcCas6e. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10: e2206813
- [44] Yi Z, Qu L, Tang H, et al. Engineered circular ADAR-recruiting RNAs increase the efficiency and fidelity of RNA editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 946-55
- [45] Sinnamon JR, Kim SY, Fisk JR, et al. *In vivo* repair of a protein underlying a neurological disorder by programmable RNA editing. *Cell Rep*, 2020, 32: 107878
- [46] Qian Y, Li J, Zhao S, et al. Programmable RNA sensing for cell monitoring and manipulation. *Nature*, 2022, 610: 713-21
- [47] Jiang KY, Koob J, Chen XD, et al. Programmable eukaryotic protein synthesis with RNA sensors by harnessing ADAR. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 698-707
- [48] Kaseniit KE, Katz N, Kolber NS, et al. Modular, programmable RNA sensing using ADAR editing in living cells. *Nat Biotechnol*, 2022, 41: 482-87
- [49] Gayet RV, Ilia K, Razavi S, et al. Autocatalytic base editing for RNA-responsive translational control. *Nat Commun*, 2023, 14: 1339
- [50] Qin PP, Chen PR, Tan L, et al. Programming ADAR-recruiting hairpin RNA sensor to detect endogenous molecules. *Nucleic Acids Res*, 2025, 53: gkae1146
- [51] Wu J, Zaccara S, Khuperkar D, et al. Live imaging of mRNA using RNA-stabilized fluorogenic proteins. *Nat Methods*, 2019, 16: 862-65
- [52] Zhou WJ, Li H, Zhang KK, et al. Genetically encoded sensor enables endogenous RNA imaging with conformation-switching induced fluorogenic proteins. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 14394-401
- [53] Yarra SS, Ashok G, Mohan U. "Toehold switches; a foothold for synthetic biology". *Biotechnol Bioeng*, 2023, 120: 932-52
- [54] Li S, Zhu L, Lin S, et al. Toehold-mediated biosensors: Types, mechanisms and biosensing strategies. *Biosens Bioelectron*, 2023, 220: 114922
- [55] Green AA, Silver PA, Collins JJ, et al. Toehold switches: *de-novo*-designed regulators of gene expression. *Cell*, 2014, 159: 925-39
- [56] Takahashi MK, Tan X, Dy AJ, et al. A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut

- microbiota and host biomarkers. *Nat Commun*, 2018, 9: 3347
- [57] Zhao EM, Mao AS, de Puig H, et al. RNA-responsive elements for eukaryotic translational control. *Nat Biotechnol*, 2021, 40: 539-45
- [58] Sano M, Morishita K, Oikawa S, et al. Live-cell imaging of microRNA expression with post-transcriptional feedback control. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 547-56
- [59] Shu W J, Ma Z, Tian X J, et al. Near-infrared fluorescence imaging of miRNA using a transmembrane polypeptide-based genetic reporter. *Small Methods*, 2024, 8: e2300990
- [60] Wang L, Xu W, Zhang S, et al. Sensing and guiding cell-state transitions by using genetically encoded endoribonuclease-mediated microRNA sensors. *Nat Biomed Eng*, 2024, 8: 1730-43
- [61] Shu WJ, Lee K, Ma Z, et al. A dual-regulation inducible switch system for microRNA detection and cell type-specific gene activation. *Theranostics*, 2023, 13: 2552-61
- [62] Zhang C, Zhang B, Tang C, et al. A ratiometric gene-switch system for miRNA sensing and gene regulation. *Small Methods*, 2024, 8: e2301266
- [63] Shi X, Hu C, Jiang Y, et al. Harnessing PUF-based reporters for noninvasive imaging of the microRNA dynamics in differentiation. *Anal Chem*, 2023, 95: 4786-94
- [64] Zhang C, Shi X, Tang C, et al. Engineering synthetic CopT/A-based genetic biosensors for miRNA imaging and functional gene regulation. *Anal Chem*, 2023, 95: 6748-56
- [65] Caddle LB, Guo M, Hay BA. A positive readout single transcript reporter for site-specific mRNA cleavage. *PeerJ*, 2017, 5: e3602
- [66] Fujita Y, Hirosawa M, Hayashi K, et al. A versatile and robust cell purification system with an RNA-only circuit composed of microRNA-responsive ON and OFF switches. *Sci Adv*, 2022, 8: eabj1793
- [67] Matsuura S, Ono H, Kawasaki S, et al. Synthetic RNA-based logic computation in mammalian cells. *Nat Commun*, 2018, 9: 4847
- [68] Lin MW, Tseng YW, Shen CC, et al. Synthetic switch-based baculovirus for transgene expression control and selective killing of hepatocellular carcinoma cells. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: e93
- [69] Xie Z, Wroblewska L, Prochazka L, et al. Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells. *Science*, 2011, 333: 1307-11
- [70] Ning H, Liu G, Li L, et al. Rational design of microRNA-responsive switch for programmable translational control in mammalian cells. *Nat Commun*, 2023, 14: 7193
- [71] Miki K, Endo K, Takahashi S, et al. Efficient detection and purification of cell populations using synthetic microRNA switches. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 699-711