

细菌中2-4译码器基因电路设计研究

陈 梅^{1,2}

¹中央民族大学民族语言智能分析与安全治理教育部重点实验室, 北京

²中央民族大学信息工程学院, 北京

收稿日期: 2025年10月18日; 录用日期: 2025年11月11日; 发布日期: 2025年11月19日

摘 要

随着合成生物学与生物计算的快速发展, 利用生物系统实现逻辑运算与信息处理已成为研究热点。本文基于合成生物学方法, 设计并构建了一种在细菌中实现的2-4译码器基因电路。该电路以两种化学分子(IPTG与aTc)作为输入信号, 通过CRISPR/dCas9抑制系统与DNA重组酶(Cre/loxP)的协同作用, 实现2-4译码器的功能。实验采用分子克隆技术构建基因电路, 并通过红色荧光蛋白验证其功能。该2-4译码器在四种输入组合下均能实现与真值表一致的输出, 展现出生物系统在低功耗、高并行性及生物兼容性方面的优势。本研究为构建更复杂的生物计算系统奠定了基础, 在智能药物递送、环境监测及细胞编程等领域具有应用潜力。

关键词

DNA计算, 细胞计算, 生物计算, 译码器, 合成生物学

A Study on the Design and Implementation of a 2-to-4 Decoder Genetic Circuit in Bacteria

Mei Chen^{1,2}

¹Key Laboratory of Intelligent Analysis and Security Governance of Ethnic Languages, Ministry of Education, Minzu University of China, Beijing

²School of Information Engineering, Minzu University of China, Beijing

Received: October 18, 2025; accepted: November 11, 2025; published: November 19, 2025

Abstract

With the rapid advancement of synthetic biology and biological computing, the use of biological

文章引用: 陈梅. 细菌中 2-4 译码器基因电路设计研究[J]. 微生物前沿, 2025, 14(4): 143-150.

DOI: 10.12677/amb.2025.144017

systems to perform logical operations and information processing has become a prominent research focus. Using synthetic biology approaches, this study designed and constructed a 2-to-4 decoder genetic circuit implemented in bacteria. The circuit utilizes two chemical molecules, IPTG and aTc, as input signals, and employs a synergistic combination of the CRISPR/dCas9 repression system and DNA recombinases (Cre/loxP) to achieve the functionality of a 2-to-4 decoder. The genetic circuit was constructed using molecular cloning techniques, and its function was verified through the expression of red fluorescent protein. The 2-to-4 decoder produced outputs consistent with the truth table under all four input combinations, demonstrating advantages of biological systems such as low power consumption, high parallelism, and biocompatibility. This work lays a foundation for the development of more complex biological computing systems and shows potential for applications in intelligent drug delivery, environmental monitoring, and cell programming.

Keywords

DNA Computing, Cellular Computing, Bio-Computing, Decoder, Synthetic Biology

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着合成生物学与生物计算的快速发展,利用生物系统实现逻辑运算与信息处理已成为研究热点。传统电子计算机在处理复杂计算任务方面性能优异,但在能耗、并行处理能力及生物兼容性等方面存在一定局限。相比之下,选择 DNA 实现计算,以及在此基础上基于细菌等微生物构建的基因电路,为实现低功耗、高并行性、可编程的活体计算平台开辟了新路径[1]-[4]。细菌作为计算载体具有独特优势:它们能够直接与自然环境交互,感知并处理包括化学分子、光信号、温度变化等多种类型的环境信息;同时,细菌系统具备原位响应与处理能力,无需复杂的外部转换接口,即可在微观尺度完成信息输入与输出,为构建嵌入真实环境的智能传感与计算系统提供了理想基础。

基因电路,也常被称为基因线路,是合成生物学中的一个核心概念。它指的是通过工程化设计,在活细胞中构建出一套能够执行特定逻辑功能的生化反应网络。简单来说,就是像设计电子电路一样,用生物分子元件来“组装”出具有感知、计算和响应能力的生物系统。近年来,研究者已成功在细菌中实现了逻辑门[5]-[8]、振荡器[9]、计数器[10]等基本基因电路,展现出生物系统在复杂环境感知与信息处理方面的潜力。

译码器作为数字系统中的基本组件,其功能是将编码输入信号辨别并转换为特定的输出控制信号,在电子领域广泛应用于数据分配、存储寻址与信号转换。将译码器功能引入基因电路,意味着活体细胞能够具备“多路判别”与“精准响应”的能力,从而在复杂生物环境中实现更高层次的信息处理与控制。尽管在活体细胞中实现稳定可靠的译码功能仍面临信号干扰、代谢负担和噪声抑制等挑战,该方向已在多个前沿应用中展现出重要潜力。

译码器基因电路在以下方面具有应用前景:第一,智能药物递送与疾病诊疗:通过设计能够识别多个疾病标志物组合的译码器电路,使工程菌或治疗性细胞在体内区分健康与病变组织,仅在特定信号组合存在时才激活治疗程序,提高治疗的安全性与精准度。第二,多通道环境监测与生物传感:利用译码器对多种环境信号(如重金属、毒素、氧压等)进行编码识别,实现单一生物传感器对复杂污染状况的判别与分类,输出不同荧光或色素报告信号,用于实时环境评估与预警。第三,细胞编程与定向分化控制:

在合成发育生物学中，译码器电路可用于解析形态梯度信号，引导细胞在特定空间位置执行分化或代谢路径切换，为人工组织构建和再生医学提供新型控制工具。可见，随着合成生物学等领域对多路信号并行处理能力的需求日益增长，开发能够高效解码复杂生物输入并驱动特异性响应的译码器基因电路具有重要意义。

本文基于合成生物学方法，设计并构建了一种在细菌中实现的 2-4 译码器基因电路。该电路以两种化学分子(IPTG 与 aTc)作为输入信号，通过 CRISPR/dCas9 抑制系统与 DNA 重组酶(Cre/loxP)的协同作用，在四种不同的工程菌株中实现输入组合的识别与输出信号的精确控制。本研究不仅拓展了基因电路在逻辑计算中的应用，也为构建更复杂的生物计算系统奠定了基础。

2. 细菌中 2-4 译码器基因电路设计

2.1. 2-4 译码器简介

2-4 译码器的输入是 2 位二进制代码，2 位二进制代码共有 $2^2 = 4$ 种组合，故输出是与这 4 种组合一一对应的 4 个输出信号。表 1 为 2-4 译码器的真值表。从表 1 中可以看出，对 2 位二进制代码的任意一种组合，都只打开一位不同的输出位，从而对应唯一一种输出(如 00 打开 Out4 位，输出为 0001；01 打开 Out3 位，输出为 0010)，达到译码功能。

Table 1. Truth table of a 2-to-4 decoder
表 1. 2-4 译码器真值表

输入		输出			
In 1	In 2	Out 1	Out 2	Out 3	Out 4
0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	1	0
1	0	0	1	0	0
1	1	1	0	0	0

2.2. 基因电路设计原理

基因电路设计原理包括：

1) 基因组成模块化，可人为替换基因中的各个组件：以细菌中的基因为例，完整的原核基因由启动子、核糖体结合位点、蛋白质编码区和终止子四个模块化部分组成，各组件具备独立功能且可自由互换组合，为人工构建基因电路提供了结构基础；

2) 基因表达可人为调控，包括：

a) 通过转录因子与启动子特定序列的结合实现精确调控，包括正调控(转录因子 X 结合启动子开启转录基因 Y)和负调控(转录因子 X 结合启动子抑制转录基因 Y)两种模式，从而实现对目标蛋白质表达的程序化控制。

b) 通过 DNA 定点重组酶对基因片段的翻转或切除来调控，该方法利用重组酶识别特定 DNA 位点，通过可逆的 DNA 倒位或不可逆的切除反应改变基因结构，从而精确控制基因的激活与沉默，为复杂基因电路的时序调控与逻辑运算等提供关键技术支撑。

2.3. 细菌 2-4 译码器基因电路方案

细菌细胞 2-4 译码器用 2 种化学信号作为输入，化学信号存在状态对应于 1，不存在状态对应于 0；

用 4 种包含不同电路的细菌细胞作为输出，如果该细胞表达指示信号，表示输出为 1，如果不表达指示信号，表示输出为 0。

本方案用于对异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)和无水四环素(aTc)两种信号的输入情况进行译码，IPTG 作为 In1，aTc 作为 In2；采用红色荧光作为指示信号；采用 CRISPR/dCas9 系统实现指示信号抑制，dCas9 蛋白是一种失去 Cas9 切割活性的蛋白，无法切割 DNA，但可结合在 DNA 上阻止转录的发生，利用 sgRNA 引导 dCas9 蛋白与相应的 DNA 片段结合，从而阻止转录的发生使基因无法表达；采用 DNA 定点重组酶 Cre/loxP 系统的翻转功能实现启动子解抑制/抑制；采用 DNA 定点重组酶 FLP/frt 系统的翻转功能实现指示信号解抑制/抑制。

各细胞中基因电路图如图 1~4 所示。

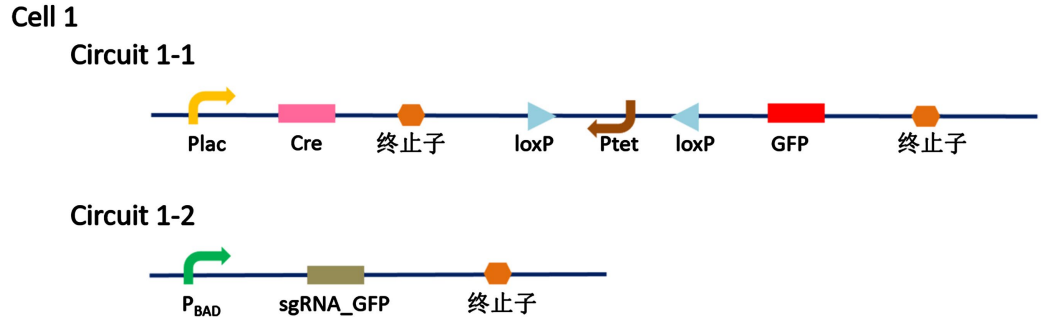


Figure 1. The genetic circuit in Cell 1
图 1. 细胞 1 基因电路图

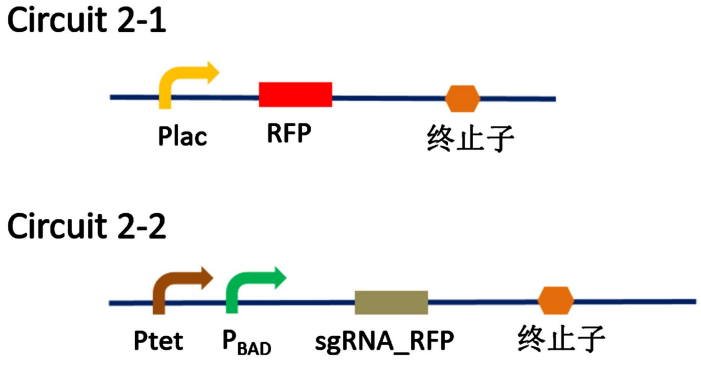


Figure 2. The genetic circuit in Cell 2
图 2. 细胞 2 基因电路图

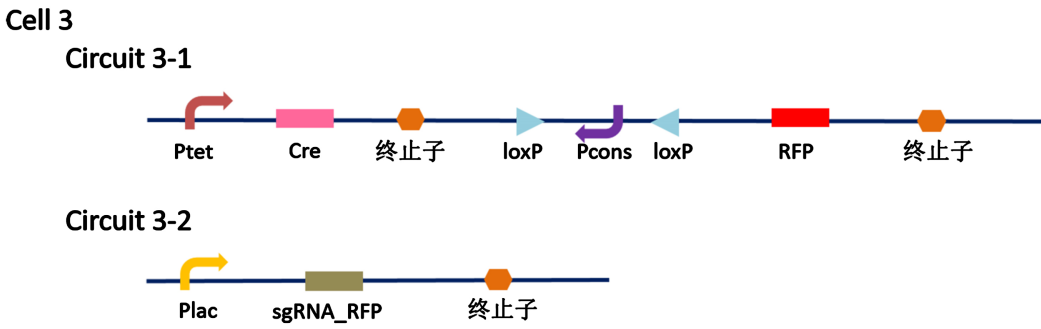


Figure 3. The genetic circuit in Cell 3
图 3. 细胞 3 基因电路图

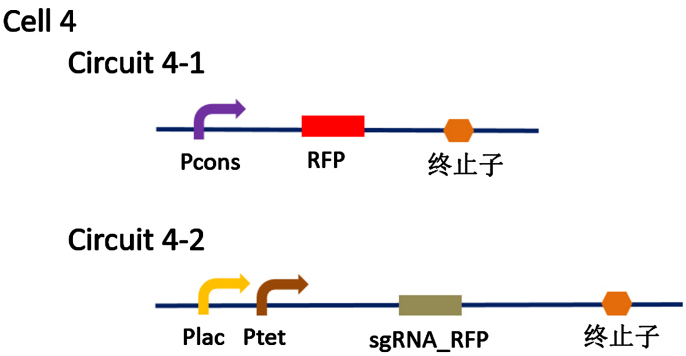


Figure 4. The genetic circuit in Cell 4
图 4. 细胞 4 基因电路图

该 2-4 译码器工作原理如下：

1) 当输入为 00 时(即没有信号输入)，各细胞工作状况和输出如表 2。

Table 2. Workflow when the input is 00

表 2. 输入为 00 时工作流程

细胞	工作状况	输出
细胞1	无电路工作	0
细胞2	无电路工作	0
细胞3	无电路工作	0
细胞4	4-1电路中的组成型启动子启动RFP，生成红色荧光；4-2电路不工作	1

2) 当输入为 01 时(即只输入 aTc)，各细胞工作状况和输出如表 3。

Table 3. Workflow when the input is 01

表 3. 输入为 01 时工作流程

细胞	工作状况	输出
细胞1	无电路工作	0
细胞2	无电路工作	0
细胞3	3-1电路的Ptet启动子启动，表达Cre重组酶，位于loxP位点间的反向Pcons启动子翻转为正向，RFP表达，生成红色荧光；3-2电路不工作。	1
细胞4	4-1电路中的组成型启动子启动RFP，4-2电路中的Plac启动子启动sgRNA_RFP，sgRNA_RFP抑制4-1电路中的RFP表达，无红色荧光生成。	0

3) 当输入为 10 时(即只输入 IPTG)，各细胞工作状况和输出如表 4。

Table 4. Workflow when the input is 10

表 4. 输入为 10 时工作流程

细胞	工作状况	输出
细胞1	1-1电路的Plac启动子启动，表达Cre重组酶，位于loxP位点间的反向Ptet启动子翻转为正向，因为不存在aTc，Ptet启动子仍然不启动；1-2电路不工作，无红色荧光生成。	0

续表

细胞2	2-1电路的Plac启动子启动，表达RFP，生成红色荧光；2-2电路不工作。	1
细胞3	3-1电路不工作；3-2电路的Plac启动子启动sgRNA_RFP，无红色荧光生成。	0
细胞4	4-1电路中的组成型启动子启动RFP，4-2电路中的Plac启动子启动sgRNA_RFP，sgRNA_RFP抑制4-1电路中的RFP表达，无红色荧光生成。	0

4) 当输入为 11 时(即同时输入 IPTG 和 aTc)，各细胞工作状况和输出如表 5。

Table 5. Workflow when the input is 11
表 5. 输入为 11 时工作流程

细胞	工作状况	输出
细胞1	1-1电路的Plac启动子启动，表达Cre重组酶，位于loxP位点间的反向Ptet启动子翻转为正向，因为存在aTc，Ptet启动子启动，表达RFP，生成红色荧光；1-2电路不工作。	1
细胞2	2-1电路的Plac启动子启动，表达RFP，2-2电路的Ptet启动子启动sgRNA_RFP，sgRNA_RFP抑制2-1电路中的RFP表达，无红色荧光生成。	0
细胞3	3-1电路的Ptet启动子启动，表达Cre重组酶，位于loxP位点间的反向Pcons启动子翻转为正向，3-2电路的Plac启动子启动sgRNA_RFP，sgRNA_RFP抑制3-1电路中的RFP表达，无红色荧光生成。	0
细胞4	4-1电路中的组成型启动子启动RFP，4-2电路中的Plac启动子和Ptet启动子启动sgRNA_RFP，sgRNA_RFP抑制4-1电路中的RFP表达，无红色荧光生成。	0

3. 细菌中 2-4 译码器构建过程

1) 基因电路组装与克隆

本实验采用标准的分子克隆技术构建基因电路。

菌株与试剂：实验可使用实验室广泛采用的克隆菌株，如 *E. coli* DH5 α 或 Top10。基因电路的组装使用 T4 DNA 连接酶(如 NEB 公司产品)进行。

质粒骨架选择：本基因电路可选择多种标准质粒作为克隆与表达骨架，例如：**pUC 系列**(如 pUC19)、**pET 系列**(如 pET-28a)、**pSB 系列**等。选择时需注意质粒的拷贝数、抗性标记及与基因电路部件的兼容性。

连接反应体系：在一个无菌的离心管中，按以下比例构建 20 μ L 连接体系，如表 6。

Table 6. Ligation reaction mixture
表 6. 连接反应体系

试剂	用量(μ L)
T4 DNA 连接酶缓冲液(10 $\times$)	2
载体 DNA	2
插入 DNA	2
T4 DNA 连接酶	1
ddH ₂ O	13
总计	20

反应条件与克隆：将连接反应体系于 16℃ 孵育 16 小时。取适量连接产物，利用热激法转化至感受态细胞。

2) 细胞封装与验证

将构建成功的基因电路质粒转化至宿主细胞中，完成“细胞封装”。**转化步骤如下：**首先，取 100 μL 感受态细胞，加入质粒或连接产物，冰上孵育 30 分钟。其次，42℃ 热激 90 秒，随后迅速转移至冰上冷却 2 分钟。然后，加入 100 μL LB 液体培养基，37℃、200 rpm 复苏培养 30~60 分钟。最后，将菌液涂布于含相应抗生素的 LB 平板，37℃ 倒置培养过夜。完成上述步骤后，挑取单克隆菌落进行测序，验证基因电路序列的正确性。

3) 2-4 译码器功能检测

将验证正确的、含有基因电路的四种工程菌株(细胞 1~细胞 4)分别进行功能测试。首先进行**活化培养：**将四种菌株按 1:100 的接种量分别转接至 4 支含有 LB 液体培养基的试管中(标记为试管 1~4)。37℃、200 rpm 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8。其次进行**诱导检测：**向试管 1~4 中分别加入相应的待测样本作为输入信号，继续在摇床中培养 12~16 小时。最后**读取结果：**分别取各试管中的菌液，在荧光显微镜下观察并记录红色荧光表达情况。根据预设的译码逻辑，通过四个试管的荧光输出组合，解读输入信号所对应的二进制编码。

4. 讨论

本研究成功设计了一种在细菌中实现的 2-4 译码器基因电路。该电路基于合成生物学原理，通过组合调控模块将两种化学输入信号转换为四种不同细胞中的荧光输出状态，实现了与电子译码器真值表一致的逻辑功能。该系统相较于传统电子器件，在生物兼容性、低功耗与并行处理方面具备潜在优势，未来在生物传感、智能药物递送及生物计算等领域具有应用前景。

构建细胞译码器的核心挑战在于，必须确保在每一种输入编码下，仅有一个特定输出通道被激活，而其余三个输出均处于严格关闭状态，从而避免误码与信号串扰。为此，本研究提出一种多层调控策略：一方面利用 DNA 重组酶系统实现启动子的可逆翻转，另一方面通过 CRISPR/dCas9 系统实施转录抑制，从而构建高特异性响应网络。尤为重要，本 2-4 细胞译码器在每个细胞中最多仅引入三个不同的启动子，显著降低了因启动子资源不够所导致的基因不稳定风险，从理论上提高了电路在实际构建中的可行性与成功率。

尽管本设计在逻辑层面具备完整性，我们仍认为存在若干潜在实施挑战。例如，可能因蛋白质表达延迟、sgRNA 结合效率不均或启动子间串扰而导致信号竞争与抑制不完全。此外，化学信号在细胞内的扩散效率、代谢负担以及响应延迟等因素亦可能影响电路性能。未来在实验转化阶段，可进一步通过动态建模、启动子工程或引入反馈调控机制，优化系统的鲁棒性与响应精度。

本工作为在细菌中实现复杂逻辑功能提供了一种结构简洁、模块清晰的基因电路设计方案。所提出的架构在降低构建复杂度的同时，提高了系统的可实现性，为后续开发诸如编码器、多路选择器等更复杂的生物计算元件奠定了设计基础。随着合成生物学工具与建模方法的不断完善，此类细胞译码器未来有望在环境监测、疾病诊断等智能生物系统中发挥重要作用。

参考文献

- [1] 高歌, 边旗, 王宝俊. 合成基因线路的工程化设计研究进展与展望[J]. 合成生物学, 2025, 6(1): 45-64.
- [2] 阮扬名, 施倍宇, 洪尚伟, 等. DNA 计算研究现状[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2020, 19(6): 23-34.
- [3] 娄春波, 杜沛, 孟凡康, 等. 人工基因线路的研究进展和未来挑战[J]. 中国科学院院刊, 2018, 33(11): 1158-1165.

-
- [4] 潘林强, 宋弢. 细胞计算进展与展望[J]. 中国科学院院刊, 2014, 29(1): 115-123.
 - [5] Green, A.A., Kim, J., Ma, D., Silver, P.A., Collins, J.J. and Yin, P. (2017) Complex Cellular Logic Computation Using Ribocomputing Devices. *Nature*, **548**, 117-121. <https://doi.org/10.1038/nature23271>
 - [6] Tamsir, A., Tabor, J.J. and Voigt, C.A. (2010) Robust Multicellular Computing Using Genetically Encoded NOR Gates and Chemical ‘Wires’. *Nature*, **469**, 212-215. <https://doi.org/10.1038/nature09565>
 - [7] Regot, S., Macia, J., Conde, N., Furukawa, K., Kjellén, J., Peeters, T., *et al.* (2010) Distributed Biological Computation with Multicellular Engineered Networks. *Nature*, **469**, 207-211. <https://doi.org/10.1038/nature09679>
 - [8] Shao, J., Qiu, X., Zhang, L., Li, S., Xue, S., Si, Y., *et al.* (2024) Multi-Layered Computational Gene Networks by Engineered Tristate Logics. *Cell*, **187**, 5064-5080.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.07.001>
 - [9] Zhou, Z., Liu, Y., Feng, Y., Klepin, S., Tsimring, L.S., Pillus, L., *et al.* (2023) Engineering Longevity—Design of a Synthetic Gene Oscillator to Slow Cellular Aging. *Science*, **380**, 376-381. <https://doi.org/10.1126/science.add7631>
 - [10] Friedland, A.E., Lu, T.K., Wang, X., Shi, D., Church, G. and Collins, J.J. (2009) Synthetic Gene Networks That Count. *Science*, **324**, 1199-1202. <https://doi.org/10.1126/science.1172005>