



# 光遗传学技术在调控细菌生命活动中的应用\*

肖仕迪 马子冬 马彬广\*\*

(华中农业大学信息学院, 武汉 430070)

**摘要** 光遗传学技术利用光作为输入信号, 能够精准地调控细胞的生理功能, 同时具有高度的时间和空间特异性, 使得构建高度动态的调控系统成为可能. 近年来, 随着新型光敏蛋白的发现和光照系统的创新, 基于光遗传学技术的光控系统的效率得到了显著提高. 通过合成生物学方法构造各种生物回路, 光控系统在细菌中的应用也日益广泛. 将光控系统作为输入模块, 与其他生物功能模块相结合, 能够实现了对基因表达、蛋白质活性以及细菌生理功能的调控. 本文主要介绍光遗传学技术的基本原理及其在合成生物学和调控细菌生命活动方面的应用.

**关键词** 光遗传学, 细菌, 基因调控, 合成生物学

**中图分类号** Q7, Q81, Q93, O439

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0210

合成生物学旨在根据需求设计生物功能, 它利用天然的和新设计的生物部件构建具有特定功能的生物回路, 以满足相应的目的<sup>[1]</sup>. 以前, 对生物回路的调控主要通过化学诱导物实现, 然而, 化学诱导物的毒性和不可逆性限制了其应用<sup>[2-3]</sup>. 相比而言, 光控具有无毒(或弱毒)、低延时和操作可逆的特点, 能够实现高度动态的生物回路调控<sup>[4]</sup>. 因为具有精准快速、特异性强等特点, 光遗传学技术被广泛地应用于动物神经细胞的研究, 极大地推动了神经科学的发展<sup>[5]</sup>. 例如: 对于患有早期阿尔茨海默病的小鼠, 利用光刺激海马体的记忆痕迹细胞能够使小鼠恢复记忆<sup>[6]</sup>; 对癫痫疾病而言, 在海马体中表达NpHR基因后, 利用黄光照射能够缩短癫痫发作的时间<sup>[7]</sup>.

近年来, 光遗传学技术在细菌研究中的应用也越来越多. 2005年, Anselm等<sup>[8]</sup>在细菌中构建了第一个基于双组分系统的光控基因表达系统. 2009年, Tabor等<sup>[9]</sup>将红光感应的Cph8/OmpR光控系统与群体感应器结合实现了一个合成的边缘检测程序. 近年来, 光敏蛋白在动力学、离子选择性和光谱敏感性等方面的改进显著提高了光控系统的特异性和灵敏性. 目前, 光遗传学技术在细菌等微生物的研究中得到了越来越广泛的应用, 极大地推动了细菌生理功能和合成生物学的研究进展. 本文概述

了光遗传学技术的基本原理及其在细菌生命活动调控中的应用.

## 1 光遗传学技术

光遗传学是利用光学系统和基因工程技术精准地控制和监测细胞生物学功能的一种新型技术<sup>[10]</sup>. 光遗传学技术主要包含光敏蛋白、递送方法和光照系统. 该技术通过载体将特定的外源光敏蛋白靶向导入指定细胞, 并用特定的光源刺激光敏蛋白, 引发生物学响应, 从而精准调控细胞的生理状态和功能.

### 1.1 光敏蛋白

1997年, Yeh等<sup>[11]</sup>在蓝藻中发现了Cph1光敏蛋白. Cph1是受光信号调控的组氨酸激酶, 介导响应调节因子的红光可逆磷酸化, 其N端是光感受区, 包含PAS (Per/Arnt/Sim)、GAF (cGMP phosphodiesterase/adenyl cyclase/FhlA) 和PHY (phytochrome) 结构域, 其中GAF结构域是发色团结合部位, 其C端是光调节区, 包含组氨酸激酶区域(HKD), 负责信号传递. 同时, 经典的光敏

\* 国家自然科学基金(31971184)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 027-87280877; E-mail: mbg@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2020-06-29, 接受日期: 2020-10-27

蛋白还有膜相关的组氨酸激酶 CcaS, 而 CcaS 是蓝细菌光敏色素家族蛋白的成员, 可借助绿光增强其自磷酸化的效率以及向调节因子转移磷酸基团的能力<sup>[12]</sup>.

2002年, Losi等<sup>[13]</sup>在枯草芽孢杆菌中发现了蓝光受体 YtvA-LOV. YtvA的N末端与LOV域高度同源, 具有保守的半胱氨酸活性位点和LOV光化学反应特性. 2008年, Kojadinovic等<sup>[14]</sup>发现了来自沼泽红假单胞菌的光敏蛋白 BphP1, 其效应模块包含PAS/PAC和HOS两个结构域, 且在红外照射下与转录抑制子 RpPpsR2结合, 发挥其信号传递功能.

近年来, 更多的新型光敏蛋白逐渐问世, 例如, 新型光敏蛋白 All2699具有更快的动力学特征和光谱的偏移<sup>[15]</sup>, 其出现标志着光敏蛋白工程方面的突破以及光遗传学技术的发展.

### 1.2 递送方法

光遗传学实验通常以病毒递送、质粒转化等方式将体外特定的光敏蛋白基因靶向导入到受体细胞中<sup>[16]</sup>. 慢病毒能携带外源目的基因, 并将其整合到宿主细胞的基因组中, 使得目的序列持久表达. 腺相关病毒(AAV)通常需要腺病毒协助复制, 将目的基因高效定点地整合到染色体中. 相比而言, AAV具有更高的生物学安全性和组织感染的特异性<sup>[17]</sup>. 对于细菌, 通常用光敏蛋白基因构建质粒, 然后将质粒转化到细菌中.

### 1.3 光照系统

光照系统将特定波长和强度的光信号传递到含有光敏蛋白的靶细胞, 迅速、灵敏地调控靶细胞的生物学功能和生理状态. LED和激光是两种常用的光源, 其中, LED光源构造简单, 价格较低, 对于普通的体外实验能够满足要求, 而激光光源的光谱范围更窄, 具有低发散性<sup>[18]</sup>, 适用于体内实验, 可利用光导纤维准确地将光传输到指定区域, 但价格昂贵.

## 2 光遗传学在细菌中的应用

### 2.1 光调控基因表达

可控的基因表达系统是生物学研究中不可或缺的工具. 以前主要使用化学分子诱导物调控基因表达, 但是化学分子的易扩散性、非特异性、毒性使得化学调控系统的应用受到很多限制. 相比而言, 光具有无毒(弱毒)、精准、高特异性等特点, 是

一种更为理想的诱导方式<sup>[19]</sup>.

光信号对细胞的毒性主要表现在以下几方面. 细胞内部会产生具有毒副作用的光敏因子, 这些光敏因子在光照作用下会干扰细胞功能和细胞活力<sup>[20]</sup>. 光信号主要通过光照强度、持续时间和波长影响细胞生长, 毒副作用包括光照照射下细胞内的热变化、有毒副产物和活性氧(ROS), 其中, 过量的ROS会造成蛋白质失活和细胞消融, 而通过精准地控制光照强度和光照时间能够减少光毒性对细胞生长所造成的干扰<sup>[21]</sup>. 为了防止长期光照下光毒性引起的细胞损伤, 通过加入抗氧化剂来消耗细胞介质中的氧气, 可以减少细菌等厌氧生物中与氧气作用产生的有毒活性氧<sup>[22]</sup>. 此外, 所有可见波长的光都对细胞存在潜在毒性, 而且, 波长越短, 毒性越强. 红光波长>500 nm, 穿透性比蓝光更强. 因此, 研究者开始使用红光激发的光敏蛋白来构建光控系统, 例如, 2018年 Ong等<sup>[23]</sup>使用响应近红外光(波长>700 nm, 光毒性小且与大多数波谱分离)的植物色素 BphP1在大肠杆菌中构建了近红外光传感器, 提高了光遗传系统的安全性.

光控双组分系统主要包含激酶和响应调节因子<sup>[24]</sup>. 2005年, 细菌中首次出现基于双组分系统的光控基因表达系统<sup>[8]</sup>. 该系统由光敏蛋白 Cph1与大肠杆菌 EnvZ/OmpR双组分信号通路组成, Cph1与EnvZ构成Cph8重组转录因子(图1a). 在无光照的情况下, Cph8自身磷酸化, 然后磷酸基团转移到响应调节因子 OmpR, 磷酸化后的 OmpR结合 ompC启动子, 目的基因的表达被启动. 在红光照射下, Cph8的自磷酸化过程被抑制, OmpR无法被磷酸化, ompC启动子失去活性, 目的基因的表达受到抑制. 2011年, Tabor等<sup>[25]</sup>利用 CcaS/CcaR系统实现了红绿光控制的基因表达(图1b). 在绿光刺激下, CcaS自身磷酸化, 随后磷酸基团转移到响应调节因子 CcaR, 磷酸化后的 CcaR结合 cpcG2启动子, 目的基因的表达被启动. 在红光照射下, CcaS的自磷酸化过程被抑制, CcaR无法被磷酸化, cpcG2启动子失去活性, 目的基因的表达受到抑制. 上述光控系统具有较强的稳定性和灵敏性, 但是其诱导效果一般, 不能大幅度提高表达水平. 在2014年, Schmidl等<sup>[26]</sup>对 Cph8/OmpR、CcaS/CcaR光控系统的启动子和基因表达进行了优化, 将诱导倍数分别提高到72倍和117倍. 2018年, Ong等<sup>[27]</sup>敲除了CcaS传感器组氨酸激酶中两

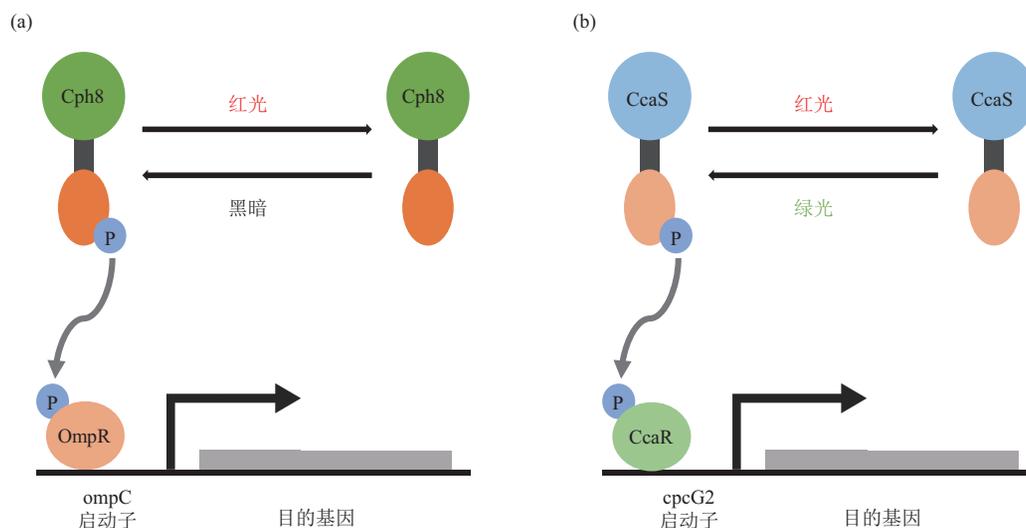


Fig. 1 Light-controlled gene expression system

图1 光控基因表达系统

(a) 在无光照的情况下, Cph8自身磷酸化, 然后将磷酸基团转移到响应调节因子OmpR, 磷酸化后的OmpR结合启动子ompC, 目的基因的表达被启动. 在红光照射下, Cph8的自磷酸化过程被抑制, OmpR无法被磷酸化, ompC启动子失去活性. (b) 在绿光照射下, CcaS自身磷酸化, 然后将磷酸基团转移到响应调节因子CcaR, 磷酸化后的CcaR结合启动子cpcG2, 目的基因的表达被启动. 在红光照射下, CcaS的自磷酸化过程被抑制, CcaR无法被磷酸化, cpcG2启动子失去活性.

个未知功能的PAS结构域, 将CcaS/CcaR光控系统的诱导倍数提高到近600倍. 而在2020年, Li等<sup>[28]</sup>利用来自类球红细菌的新型LOV结构域(RsLOV)构建了一种单组分光激活的细菌基因表达系统(eLightOn), 其具有高诱导倍数(>500倍)、活化动力学快、活化水平高、适应能力强的特点.

虽然有多种方式能够调控基因表达, 但是大多无法实现定量地调节表达水平. 2014年, Wu等<sup>[29]</sup>将光控系统与CRISPRi系统相结合, 实现了利用不同强度的蓝光信号定量地调控基因的表达水平. 该系统由3部分组成: 受YF1-FixJ-PFixK2蓝光光控系统调控的gRNA、稳定速率表达的dCas9蛋白以及由电脑控制的光照装置. 在该系统中, 受蓝光信号强度调控的gRNA与以稳定速率表达的dCas9蛋白结合形成dCas9:gRNA复合物, 随后该复合物结合到DNA目标区域并在转录过程中阻断RNA聚合酶, 从而调节目标基因的转录水平. 在不同光照强度下, 报告荧光蛋白的产量随着光照强度的增加而逐步提升, 最终增至两倍.

光遗传学技术与计算机技术相结合也是重要的发展方向, 可实现对反馈信号的检测和光信号的精确调整. 2016年, Miliasargeitis等<sup>[30]</sup>利用CcaS/

CcaR光控系统和荧光蛋白信号构建了自动反馈的光控基因表达系统(图2a), 通过检测报告荧光蛋白信号, 自动反馈并控制光信号的强度, 更加精准地控制基因的表达水平. 2017年, Chait等<sup>[31]</sup>同样采用CcaS/CcaR光控系统和荧光蛋白信号, 通过对单个细胞的光信号调控来调节细菌种群状态(图2b). 2018年, Rullan等<sup>[32]</sup>构建了实时的单细胞水平转录调控光遗传学技术平台, 实现快速、无记忆性的转录激活和抑制, 并通过光驱动的反馈回路在单细胞水平上调控转录. 该反馈回路能够显著减少细胞间的差异性, 为单细胞的动态转录研究提供了灵活的手段.

同时, 光控基因表达系统在基因回路工程化方面也有显著的发展. 2019年, Castillohair等<sup>[33]</sup>首次在枯草芽孢杆菌中实现了光控基因表达, 其组成包含基于绿/红光可逆双组分CcaS/CcaR系统的蓝藻光传感通路、两种用于合成藻青素发色团的代谢酶以及相应的启动子. 这种在菌株中引入外源通路的合成生物学方法有助于基因回路设计的工程化. 本文列举了细菌中已实现的部分光控基因表达系统, 并简要归纳了其组成和特点(表1).

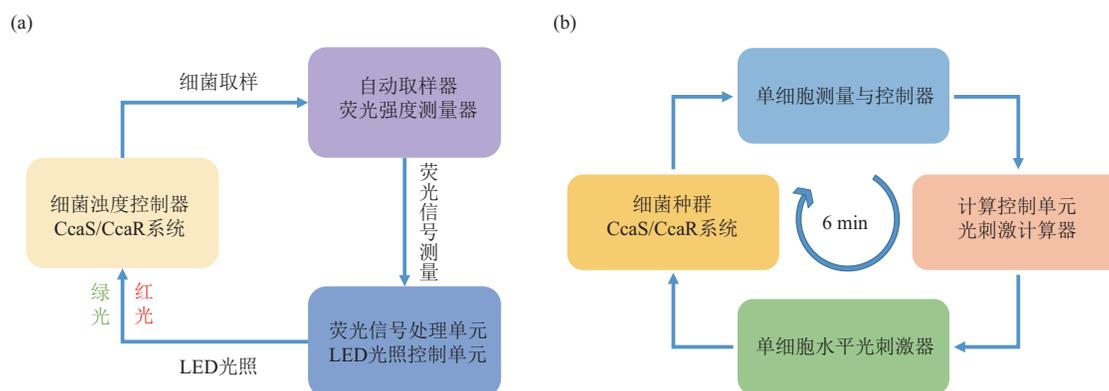


Fig. 2 Computer controller of bacterial optogenetics

图2 细菌光遗传学的计算机控制器

(a) 含有CcaS/CcaR光控系统和荧光信号的细菌菌液与浊度控制装置结合, 自动执行细菌取样和荧光信号测量<sup>[30]</sup>. 计算单元基于荧光信号强度信息计算出适当的光照信号和强度, 并控制LED光照. (b) 针对含有CcaS/CcaR光控系统的细菌种群, 测量单个细胞的生长状态<sup>[31]</sup>. 通过计算控制单元, 针对单个细胞计算出合适的光刺激信号, 并在单细胞水平上实行光信号刺激, 从而控制整个种群的生长状态, 每6 min执行一次.

Table 1 Composition and characteristics of some light-controlled gene expression systems used in bacteria

表1 细菌中用到的部分光控基因表达系统的组成和特点

光敏蛋白	系统组分	激活光源	生色团	诱导倍数	文献
YF1	YF1/FixJ, dCas9/gRNA	蓝光	FMN	2倍	[29]
BphP1	BphP1/PpsR2	红外光	BV	2.5倍	[23]
Ccas	CcaS/CcaR	绿光	PCB	2倍	[34]
Cph1	Cph8/OmpR	红光	PCB	10倍	[8]
UirS	UirS/UirR	绿光、紫光	PVB	6倍	[35]
Vivid	LEVI	蓝光	FAD	10 000倍	[36]
EL222	EL222	蓝光	FMN	5倍	[37]

## 2.2 光调控蛋白质活动

利用含有LOV结构域的光敏蛋白在光照条件下构象会改变的特点, 可以通过光照调控蛋白质降解过程. 2016年, Lutz等<sup>[38]</sup>通过将拟南芥的LOV<sub>2</sub>光感受器结构域与鸟氨酸脱羧酶羧基末端的合成降解子(cODC1)融合, 获得了光敏感的降解子模块, 将该模块连接到目标蛋白的C端, 用蓝光刺激, 引起LOV<sub>2</sub>区域的结构改变, 从而激活降解子, 实现了融合蛋白的有效酶降解.

在亚细胞水平上精准控制蛋白质相互作用的方法是细胞生物学的重要工具. 2016年Kaberniuk等<sup>[39]</sup>利用BphP1与其天然伴侣PpsR2的可逆光诱导结合, 成功将指定蛋白质转移到细胞膜. 此外, 通过光信号调控蛋白质的相互作用能够调节蛋白质

的相应功能. 2020年, Sheets等<sup>[40]</sup>利用光二聚体Vvd和拆分的重组酶Cre, 在大肠杆菌中构建蓝光激活的光遗传学重组酶, 实现了对细菌DNA更精准的切除(图3a).

光遗传学工具能实现可逆的蛋白质活性调控, 为研究蛋白质的功能提供技术支持<sup>[37]</sup>. 部分蛋白质会通过二聚化或寡聚化激活, 例如, 受体酪氨酸激酶<sup>[41]</sup>. 因此, 通过目标蛋白与光诱导二聚化/寡聚化感光结构域(VVD、CRY2等)的融合, 能够实现光信号调节目标蛋白的聚集状态, 从而调控目标蛋白的活性(图3b). 此外, 通过共有的J $\alpha$ 螺旋结构, 将枯草芽孢杆菌YtvA的LOV结构域与慢生型大豆根瘤菌FixL的组氨酸激酶结构域融合, 能够实现蓝光信号对激酶活性的抑制<sup>[42]</sup>.

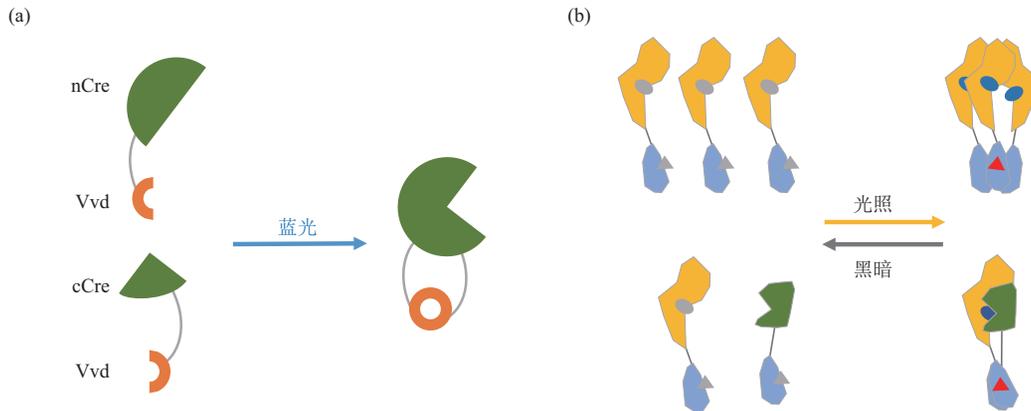


Fig. 3 Protein activity induced by light

图3 光信号诱导的蛋白质活性

(a) 光二聚体Vvd分别与拆分重组酶Cre的N端、C端结合, 蓝光使光二聚体Vvd间发生相互作用, 从而导致重组酶Cre的完整组合, 激活重组酶Cre的活性<sup>[40]</sup>. (b) 目标蛋白与光诱导寡聚化的感光结构域融合, 光照下感光结构域聚集, 从而使目标蛋白发生寡聚化, 激活目标蛋白的活性<sup>[37]</sup>.

### 2.3 光调控细菌生理功能

通过光感受器构建的光调控系统与细菌特定的功能蛋白或代谢途径结合, 实现光控制细菌生理功能是光遗传学应用的重要领域(图4). 2014年, Magaraci等<sup>[43]</sup>利用成孔细胞毒素溶酶A(ClyA)和pDawn光控质粒构成的光激活细胞毒素分泌系统改造了大肠杆菌, 使其能够在蓝光或红光照射下分泌强力的哺乳动物细胞毒素, 达到杀伤肿瘤细胞的目的(图4a), 为治疗肿瘤提供新的思路和技术手段. 2017年, Tardu等<sup>[44]</sup>在霍乱弧菌中利用蓝光信号调控抗 $\delta$ 因子(ChrR)和似金属调节蛋白(MerR)的表达, 调控部分基因转录水平, 促进活性氧化物的生成, 从而有效地灭活霍乱弧菌. 同年, Vizsnyiczai等<sup>[45]</sup>采用视紫红质(PR)这种光能驱动的质子泵来改造大肠杆菌, 靠光子能量在细胞膜上的电化学梯度泵送质子, 利用光照强度控制微型马达的速度, 从而实现绿光控制细菌的运动速度. 2019年, Tandar等<sup>[46]</sup>利用光诱导的代谢开关调节两个糖酵解途径之间的通量分布, 即糖酵解途径(EMP)和氧化戊糖磷酸通路(oxPPP). 光诱导的代谢开关是通过CcaS/CcaR光控系统控制代谢基因*pgi*的表达实现的, 而*pgi*的表达决定了EMP和oxPP通路之间的通量分布.

另外, 基于光控蛋白相互作用的细胞代谢通路调控也是光遗传学的重要应用方向. 2016年, Kaberniuk等<sup>[39]</sup>利用细菌光敏色素BphP1与其天然伴侣PpsR2之间的可逆光控结合, 激活Cdc42信号

通路, 将目标蛋白转移到细胞膜, 并利用该光控系统诱导细胞形态变化. 2020年, Lindner等<sup>[47]</sup>利用光控相互作用开关控制III型分泌系统(T3SS)组分SctQ和T3SS独立效应分泌物的结合, 在耶尔森氏菌中构建了LITESEC-T3SS系统, 实现了分泌系统迅速、特异、可逆地激活和失活, 从而能够高效、准确地将特定蛋白质分泌和转移到真核宿主细胞中. 该研究在细胞水平上实现了分子分泌和对靶细胞功能的精准调控.

光遗传学技术还被应用于细菌种群行为的调控. 2020年, Zhang等<sup>[48]</sup>将基因*Chez*与降解标签YbaQ融合, 并与蓝光诱导的启动子*P<sub>Bind</sub>*共同组成光控基因回路, 在蓝光的照射下, 细菌的定向移动和迁移能力大大增强, 使得细菌种群能够形成复杂的图案. 同年, Chen等<sup>[49]</sup>在细菌细胞膜表面分别表达nMag与pMag黏附蛋白, 并利用蓝光动态地控制细菌间的黏附状态, 从而调节细菌种群行为. 同年, Martegani等<sup>[50]</sup>发现蓝光能够有效抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成, 减弱其感染效果.

此外, 光遗传学技术也广泛应用于活细胞打印方面. 2017年, Chen等<sup>[51]</sup>利用蓝光将大肠杆菌特异性地附着到基质上. 他们通过在大肠杆菌膜表面表达pMag蛋白, 在基质上固定nMag蛋白, 并利用在蓝光照射下pMag与nMag蛋白相互结合的特点<sup>[52]</sup>, 能够在指定基质位置上固定大肠杆菌. 该工作提供了一种在基质上形成细菌图案的有效手段. 环二鸟苷酸(c-di-GMP)会刺激生物膜黏性物质

和胞外聚合物的合成,且降解后会引起细菌分离<sup>[53]</sup>.2018年,Pu等<sup>[54]</sup>将含有EAL结构域的功能蛋白PA2133的基因引入到光控系统中降解c-di-GMP,从而以蓝光信号抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成,使得生物膜更加稀疏和薄化.2018年,Huang等<sup>[55]</sup>利用光遗传学工具调控铜绿假单胞菌中c-di-GMP的含量(图4b),利用光照调节细菌的聚集状态,从而实现铜绿假单胞菌的活细胞生物打

印.2018年,Jin等<sup>[56]</sup>在大肠杆菌中利用光控质粒pDawn调控黏附素蛋白(Ag43)的表达,在有图案的蓝光照射下,能够在封闭的培养室内和各种基质上形成空间分辨率达到25 μm的活生物膜图案,且该过程不需要表面预处理.这种“生物膜光刻”工具比现有的细胞沉积/图案方法更具优势,可提供可生长、结构化的生物膜.

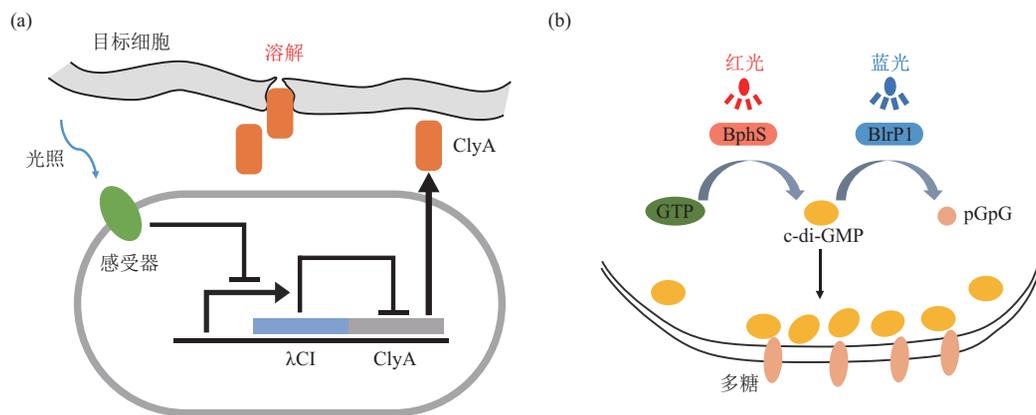


Fig. 4 Light control of bacteria physiological function

图4 光控细菌生理功能

(a) 在蓝光或红光的照射下,基因clyA与光控质粒pDawn融合的光控基因表达系统会刺激成孔细胞毒素溶酶A的表达.ClyA运输到细胞外后,会溶解目标细胞的细胞膜,从而杀伤目标细胞<sup>[43]</sup>。(b) 受红光调控的c-di-GMP合成酶(BphS)与受蓝光调控的降解酶(BlrP1)共同调控c-di-GMP的含量,而c-di-GMP能够调节胞外多糖和生物膜黏性物质的合成与分布,从而调控细菌生物膜的黏附和成熟状态<sup>[55]</sup>。

### 3 总结与展望

近年来,光遗传学技术得到了很大的发展,光控系统的多样性和灵敏性显著提升,用光控制细菌的生命活动成为重要的研究领域.光遗传学技术在细菌中的应用极大地推动了生物工程和合成生物学的发展.光遗传学技术应用于细菌基因回路的设计和调控是一个新兴的技术领域.整合以光为输入信号的基因模块和具有其他功能的基因模块,构造出光控基因回路,调控基因表达与蛋白质活性,从而实现对细菌细胞行为或生理状态的调控是当前的研究热点.然而,光控系统目前还面临着光毒性、光漂白等问题,有待改进,光控系统的稳定性、可诱导性、可移植性都有待提高,不同频率的输入光顺序或正交组合所构造的光控系统如何在细菌中进一步应用还有待开发,外源引入的光响应蛋白是否会影响细菌的正常生物功能也还有待检验.同时,将光控系统自动化是合成生物学的重要研究方向,通

过使用计算机作为输入控制手段,添加光强的反馈和动态校正是未来的发展方向,设计通用的基因回路在不同菌株和环境下稳定发挥功能是未来需要解决的问题.

### 参 考 文 献

- [1] Way J C, Collins J J, Keasling J D, *et al.* Integrating biological redesign: where synthetic biology came from and where it needs to go. *Cell*, 2014, **157**(1): 151-161
- [2] Mendelsohn A R. An enlightened genetic switch. *Nature Biotechnology*, 2002, **20**(10): 985-987
- [3] Xie J, Nair A, Hermiston T W. A comparative study examining the cytotoxicity of inducible gene expression system ligands in different cell types. *Toxicology in Vitro*, 2008, **22**(1): 261-266
- [4] Fernandezrodriguez J, Moser F, Song M, *et al.* Engineering RGB color vision into *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 2017, **13**(7): 706-708
- [5] Goncalves S B, Ribeiro J F, Silva A F, *et al.* Design and manufacturing challenges of optogenetic neural interfaces: a review. *Journal of Neural Engineering*, 2017, **14**(4): 041001

- [6] Roy D S, Arons A, Mitchell T, *et al.* Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*, 2016, **531**(7595): 508-512
- [7] Sukhotinsky I, Chan A M, Ahmed O J, *et al.* Optogenetic delay of status epilepticus onset in an *in vivo* rodent epilepsy model. *Plos One*, 2013, **8**(4): e62013
- [8] Anselm L, Chevalier A A, Tabor J J, *et al.* Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature*, 2005, **438**(7067): 441-442
- [9] Tabor J J, Salis H M, Simpson Z B, *et al.* A synthetic genetic edge detection program. *Cell*, 2009, **137**(7): 1272-1281
- [10] Joshi J, Rubart M, Zhu W. Optogenetics: background, methodological advances and potential applications for cardiovascular research and medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, **7**: 466
- [11] Yeh K, Wu S, Murphy J T, *et al.* A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*, 1997, **277**(5331): 1505-1508
- [12] Yoshihara S, Katayama M, Geng X, *et al.* Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms. *Plant and Cell Physiology*, 2004, **45**(12): 1729-1737
- [13] Losi A, Polverini E, Quest B, *et al.* First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophysical Journal*, 2002, **82**(5): 2627-2634
- [14] Kojadinovic M, Laugraud A, Vuillet L, *et al.* Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodospirillum rubrum*: enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, **1777**(2): 163-172
- [15] Xu Q, Bielytskyi P, Otis J, *et al.* MAS NMR on a red/far-red photochromic cyanobacteriochrome All2699 from *Nostoc*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(15): 3656
- [16] Luchkina N V, Bolshakov V Y. Diminishing fear: optogenetic approach toward understanding neural circuits of fear control. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 2018, **174**: 64-79
- [17] Grieger J C, Samulski R J. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods in Enzymology*, 2012, **507**: 229-254
- [18] Adamantidis A R, Zhang F, Aravanis A M, *et al.* Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, 2007, **450**(7168): 420-424
- [19] Liu X, Tonegawa S. Optogenetics 3.0. *Cell*, 2010, **141**(1): 22-24
- [20] Tischer D, Weiner O D. Illuminating cell signalling with optogenetic tools. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, **15**(8): 551-558
- [21] Boudreau C G, Wee T E, Duh Y S, *et al.* Excitation light dose engineering to reduce photo-bleaching and photo-toxicity. *Scientific Reports*, 2016, **6**(1): 30892
- [22] Stockley J H, Evans K A, Matthey M, *et al.* Surpassing light-induced cell damage *in vitro* with novel cell culture media. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 849
- [23] Ong N T X, Olson E J, Tabor J J. Engineering an *E. coli* near-Infrared light sensor. *ACS Synthetic Biology*, 2017, **7**(1): 240-248
- [24] Stock A M, Robinson V L, Goudreau P N. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, **69**(1): 183-215
- [25] Tabor J J, Levskaya A, Voigt C A. Multichromatic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 2011, **405**(2): 315-324
- [26] Schmid S R, Sheth R U, Wu A, *et al.* Refactoring and optimization of light-switchable *Escherichia coli* two-component systems. *ACS Synthetic Biology*, 2014, **3**(11): 820-831
- [27] Ong N T X, Tabor J J. A miniaturized *Escherichia coli* green light sensor with high dynamic range. *Chembiochem*, 2018, **19**(12): 1255-1258
- [28] Li X, Zhang C, Xu X, *et al.* A single-component light sensor system allows highly tunable and direct activation of gene expression in bacterial cells. *Nucleic Acids Research*, 2020, **48**(6): e33
- [29] Wu H, Wang Y, Wang Y, *et al.* Quantitatively relating gene expression to light intensity *via* the serial connection of blue light sensor and CRISPRi. *ACS Synthetic Biology*, 2014, **3**(12): 979-982
- [30] Miliarsargeitis A, Rullan M, Aoki S K, *et al.* Automated optogenetic feedback control for precise and robust regulation of gene expression and cell growth. *Nature Communications*, 2016, **7**(1): 12546
- [31] Chait R, Ruess J, Bergmiller T, *et al.* Shaping bacterial population behavior through computer-interfaced control of individual cells. *Nature Communications*, 2017, **8**(1): 1535
- [32] Rullan M, Benzinger D, Schmidt G W, *et al.* An optogenetic platform for real-time, single-cell Interrogation of stochastic transcriptional regulation. *Mol Cell*, 2018, **70**(4): 745-756.e746
- [33] Castillohair S M, Baerman E A, Fujita M, *et al.* Optogenetic control of *Bacillus subtilis* gene expression. *Nature Communications*, 2019, **10**(1): 3099
- [34] Shao J, Wang M, Yu G, *et al.* Synthetic far-red light-mediated CRISPR-dCas9 device for inducing functional neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(29): E6722-E6730
- [35] Ramakrishnan P, Tabor J J. Repurposing *Synechocystis* PCC6803 UirS-UirR as a UV-violet/green photoreversible transcriptional regulatory tool in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, 2016, **5**(7): 733-740
- [36] Hermann A, Liewald J F, Gottschalk A. A photosensitive degron enables acute light-induced protein degradation in the nervous system. *Curr Biol*, 2015, **25**(17): R749-R750
- [37] Liu Q, Tucker C L. Engineering genetically-encoded tools for optogenetic control of protein activity. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, **40**: 17-23
- [38] Lutz A P, Renicke C, Taxis C. Controlling protein activity and degradation using blue light. *Methods of Molecular Biology*, 2016, **1408**: 67-78

- [39] Kaberniuk A A, Shemetov A A, Verkhusha V V. A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light. *Nature Methods*, 2016, **13**(7): 591-597
- [40] Sheets M B, Wong W W, Dunlop M J. Light-inducible recombinases for bacterial optogenetics. *ACS Synth Biol*, 2020, **9**(2): 227-235
- [41] Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990, **61**(2): 203-212
- [42] Moglich A, Ayers R A, Moffat K. Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *Journal of Molecular Biology*, 2009, **385**(5): 1433-1444
- [43] Magaraci M S, Veerakumar A, Qiao P, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for light-activated cytolysis of mammalian cells. *ACS Synthetic Biology*, 2014, **3**(12): 944-948
- [44] Tardu M, Bulut S, Kavakli I H. MerR and ChrR mediate blue light induced photo-oxidative stress response at the transcriptional level in *Vibrio cholerae*. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 40817
- [45] Viznyiczai G, Frangipane G, Maggi C, *et al.* Light controlled 3D micromotors powered by bacteria. *Nature Communications*, 2017, **8**: 15974
- [46] Tandar S T, Senoo S, Toya Y, *et al.* Optogenetic switch for controlling the central metabolic flux of *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2019, **55**: 68-75
- [47] Lindner F, Milne-Davies B, Langenfeld K, *et al.* LITESEC-T3SS - light-controlled protein delivery into eukaryotic cells with high spatial and temporal resolution. *Nature Communications*, 2020, **11**(1): 2381
- [48] Zhang J, Luo Y, Poh C L. Blue light-directed cell migration, aggregation, and patterning. *Journal of Molecular Biology*, 2020, **432**(10): 3137-3148
- [49] Chen F, Wegner S V. Blue-light-switchable bacterial cell - cell adhesions enable the control of multicellular bacterial communities. *ACS Synthetic Biology*, 2020, **9**(5): 1169-1180
- [50] Martegani E, Bolognese F, Trivellini N, *et al.* Effect of blue light at 410 and 455 nm on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Photochem Photobiol B*, 2020, **204**: 111790
- [51] Chen F, Wegner S V. Blue light switchable bacterial adhesion as a key step toward the design of biofilms. *ACS Synthetic Biology*, 2017, **6**(12): 2170-2174
- [52] Kawano F, Suzuki H, Furuya A, *et al.* Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nature Communications*, 2015, **6**(1): 6256
- [53] Jenal U, Malone J G. Mechanisms of Cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 2006, **40**(1): 385-407
- [54] Pu L, Yang S, Xia A, *et al.* Optogenetics manipulation enables prevention of biofilm formation of engineered *pseudomonas aeruginosa* on surfaces. *ACS Synth Biol*, 2018, **7**(1): 200-208
- [55] Huang Y, Xia A, Yang G, *et al.* Bioprinting living biofilms through optogenetic manipulation. *ACS Synthetic Biology*, 2018, **7**(5): 1195-1200
- [56] Jin X, Riedelkruse I H. Biofilm lithography enables high-resolution cell patterning via optogenetic adhesin expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(14): 3698-3703

## Application of Optogenetics in The Regulation of Bacterial Life Activities\*

XIAO Shi-Di, MA Zi-Dong, MA Bin-Guang\*\*

(College of Informatics, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** Using light as input signal, optogenetics technology can precisely regulate the physiological functions of cells and has high specificity of time and space, which makes it possible to construct highly dynamic regulatory system. In recent years, with the discovery of novel photosensitive proteins and the innovation of light systems, the efficiency of optogenetics-based light control systems has been significantly improved. The application of light control system in bacteria is becoming more and more extensive. By using the lightcontrol system as an input module and combining it with other biological function modules, the regulation of gene expression, protein activity and bacterial physiological function can be realized. This paper mainly introduces the basic principle of optogenetics and its application in synthetic biology and the regulation of bacterial life activities.

**Key words** optogenetics, bacteria, gene regulation, synthetic biology

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0210

---

\* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31971184).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-27-87280877; E-mail: mbg@mail.hzau.edu.cn

Received: June 29, 2020 Accepted: October 27, 2020