微生物转化法合成甾药中间体研究进展

王玉珏，卢枚妍，宋明珠，罗敏佳，任夏蝉，刘腾伟，戴桂馥*

（郑州大学 生命科学学院，河南 郑州 450001）

摘 要 甾体类药物是仅次于抗生素的第二大类临床用药，具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗高血压等生理功能，市场需求量大。目前，利用微生物降解植物甾醇合成甾药中间体（甾药前体），再对其进行化学修饰的微生物半合成法是甾体药物工业化生产的主流方法。本文聚焦于合成甾药中间体的代表性菌株分枝杆菌（*Mycobacterium* sp.），对分枝杆菌中甾体化合物代谢途径的各环节（甾醇摄取、母核初步氧化、侧链降解、母核氧化、母核断裂）及其所涉及的关键酶进行综述，并总结了适用于分枝杆菌的基因过表达、敲除和敲低遗传改造系统。然而，鉴定并解析甾醇侧链降解过程的复杂酶系仍是当前研究的重难点，也是制约新型甾药中间体开发的关键瓶颈。因此，借助高通量测序、生物信息学分析和定点饱和突变等手段，加速甾醇代谢途径解析，对分枝杆菌细胞工厂的理性设计及新型甾药中间体高产菌株的构建至关重要。

关键词 分枝杆菌；甾体药物；甾药中间体；生物转化；菌株改造

中图分类号 Q939－93 **文献标识码** A **文章编号** 1005－7021（2026）02－0092－15

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.02.009

Research Progress on Steroid-Drug Intermediates Synthesis by Microbial Transformation

WANG Yu-jue, LU Mei-yan, SONG Ming-zhu, LUO Min-jia,
REN Xia-chan, LIU Teng-wei, DAI Gui-fu*

(*School of Life Sciences*, *Zhengzhou University*, *Zhengzhou* 450001)

Abstract Steroids are the second-largest category of clinical drugs following antibiotics, with significant physiological functions such as anti-inflammatory, antiviral, antitumor, and antihypertensive effects, bearing a huge market demand. Currently, the mainstream industrial approach for steroid drugs production is microbial semi-synthesis, which involves microbial degradation of phytosterols into steroid-drug intermediates (precursors) followed by chemical modification. This review focuses on *Mycobacterium* sp., a representative strain used for synthesizing steroid-drug intermediates, and outlines the key steps in its steroid metabolic pathway, including sterol uptake, initial oxidation of sterol nucleus, side chain degradation, further oxidation of sterol nucleus, and nucleus cleavage, along with the key enzymes involved. Furthermore, the genetic modification systems of gene overexpression, knockout and knockdown applicable to *Mycobacterium* are summarized. However, the identification and characterization of complex enzyme systems in the degradation process of sterol side chain remains a major challenge in current research and a key bottleneck restricting the development of novel steroid-drug intermediates. Therefore, accelerating the analysis of sterol metabolic pathways by high-throughput sequencing, bioinformatics analysis and site-directed saturation mutagenesis is essential for the rational design of mycobacterial cell factories and for the construction of strains with high-yield of new steroid intermediates.

基金项目：河南省高等学校重点科研项目计划项目（22A180011）；河南省重点研发与推广专项（科技攻关）（222102320151）；河南省中央引导地方科技发展资金项目（Z20231811004）；大学生创新创业训练计划项目（2024cxcy677）

作者简介：王玉珏 女，讲师，博士。研究方向为微生物转化及生物质利用。E-mail：wangyujue@zzu.edu.cn

* 通讯作者。女，教授，博士，博士生导师。研究方向为分子微生物学与新药研发。Tel：0371-67784867，E-mail：daiguifu@zzu.edu.cn

收稿日期：2025-03-04

中国知网 https://www.cnki.net

Keywords *Mycobacterium* sp.; steroid drugs; steroid-drug intermediates; biotransformation; strain modification

甾体类药物(简称甾药)含有环戊烷并多氢菲母核结构,对人体的生命活动起着极为重要的调节作用,是一类用于消炎、避孕、抗过敏、抗病毒的强效药物。随着甾体化合物普遍应用于临床,其市场需求量逐年上升,年销售额超百亿美元[1],巨大的市场需求使得甾药的生产和研发得到空前关注。由于其复杂的多元环构型,人们在探索甾药合成过程中,先后经历了直接从动植物组织中提取、全化学合成、半化学合成、微生物合成等多个阶段。目前,以植物甾醇为原料,通过微生物代谢积累甾药中间体(合成甾体药物的前体物质),再对其进行化学修饰合成目标甾药的微生物转化法是甾药制备的主流方法。研究发现,节杆菌(*Arthrobacter*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、链霉菌(*Streptomyces*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)、红球菌(*Rhodococcus*)和诺卡氏菌(*Nocardia*)等原核微生物以及曲霉菌(*Aspergillus*)、镰刀菌(*Fusarium*)和根霉菌(*Rhizopus*)等真核微生物均可降解甾类物质,而隶属于放线菌目(Actinomycetes)[2]的分枝杆菌因其强劲的甾醇降解能力,在甾药中间体的工业生产中应用最为广泛[3]。然而,野生型分枝杆菌大多会将植物甾醇完全降解为 CO_2、H_2O 和小分子化合物而不积累中间代谢物,或中间代谢物积累量低,无法直接应用于甾药中间体的工业化生产。因此,揭示并改造分枝杆菌代谢途径以实现甾药中间体的高效积累是甾体制药工业半合成路线中最重要的一步。本文概述了分枝杆菌属微生物中植物甾醇的代谢途径及关键酶系,汇总了获得甾药中间体高产菌株的分子改造策略及遗传改造系统,并对新兴的基因编辑方法进行介绍。

1 甾体简介

1.1 甾体化合物

甾体化合物(Steroids)又名类固醇,是一种多元环萜脂类物质[4]。其中四个稠合的环烷烃(三个六元环 A-C、一个五元环 D)作为甾体母核,A 环的 C3 位置常含有一个羟基,B 环的 C10 位和 C 环的 C13 位各有一个角甲基,D 环的 C17 位常连有不同长度的烷烃侧链(图 1)。甾体母核上位于不同取代位点的取代基种类和构型以及双键位置都会赋予甾体化合物不同的生理功能[5]。

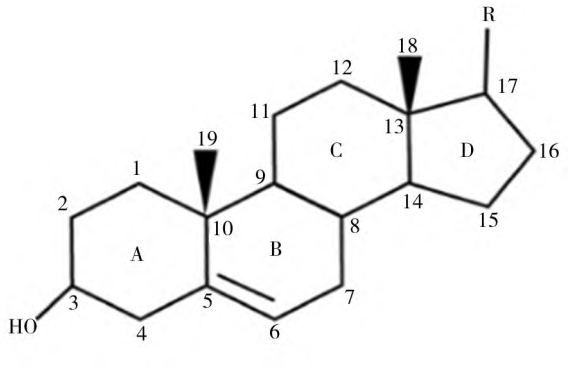


图 1 甾体类化合物结构通式

Fig. 1 General structural formula of steroids

甾体化合物种类繁多,存在于各种生物体内。胆固醇作为最常见的甾体化合物,存在于动物组织中,不仅能够有效调节细胞膜的成分,还能作为前体物质合成机体所需的各种激素,与机体内的生殖发育、稳态维持、细胞信号转导等密不可分[6];从植物中提取的豆甾醇和谷甾醇等在抗炎及抗肿瘤领域表现出重要药效;麦角固醇作为真菌细胞膜的结构成分,除了可以给予菌体物理支撑、保护微生物个体的完整性以外,还能参与细胞内的物质运输及酶活性调节等过程[7]。

1.2 甾体类药物

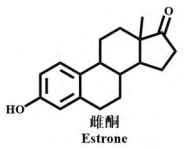
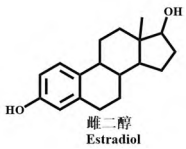
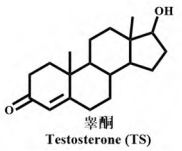
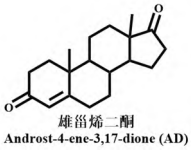
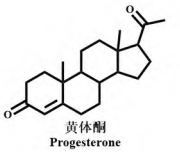
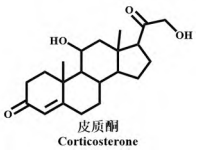
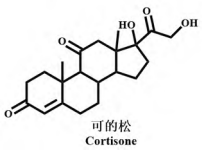
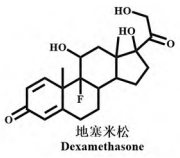
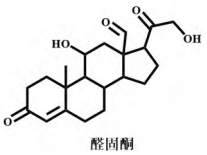
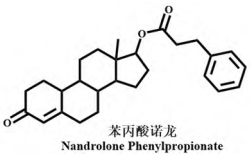
在高等生物体内,甾体通常扮演着“激素”的角色,密切参与生物反应调控及稳态维持,若激素分泌异常,则可能会引起由激素缺陷或功能紊乱导致的多种疾病,如生长迟缓、生殖功能障碍、骨质疏松症、免疫力下降等。因此人们很早就发现甾体可作为外源激素药物用于生殖健康、内分泌调控等领域;甾体也会发挥非激素功能,用于抗病毒、抗肿瘤、抗抑郁以及治疗心血管疾病等。此外,甾体类药物也是器官移植、重症感染等许多危重疾病的“刚需药”和“救命药”[3]。

目前,国内外已上市的甾体类药物达 400 余种,根据其药理功能的不同可分为性激素(雌激素、雄激素、孕激素)、肾上腺皮质激素(糖皮质激素和盐皮质激素)及蛋白同化激素三大类[8]常见甾体类药物如表 1 所示。

中国知网 https://www.cnki.net

表 1 甾体类药物及其应用[9]

Table 1 Steroid drugs and their applications[9]

甾体激素类药物	分类	常见甾体药物举例	应用
性激素	雌激素	 	治疗妇科疾病,用作口服避孕药
	雄激素	 	治疗性疾病,促进生殖健康
	孕激素	 	治疗不孕症、妇科疾病
肾上腺皮质激素	糖皮质激素	 	抗炎、抗过敏、免疫抑制,治疗系统性红斑狼疮等
	盐皮质激素		治疗阿狄森氏内分泌疾病
蛋白同化激素	蛋白同化激素		加速组织修复、促进蛋白质合成

1.3 甾体药物的合成

在 20 世纪 30 年代,科学家们就试图直接从动植物体提取特定的甾体药物,但是该法需要大量的动植物组织作为原材料,收益极低,提取工艺较为复杂。这导致甾药成本高、售价贵,严重阻碍了其在医药领域的应用,促使研究人员将目光放在化学合成上。

1.3.1 全化学合成法 起初,研究人员尝试从有机小分子出发,采用全化学合成工艺生产甾药化合物。然而,甾体母核多元环构型的复杂性,以及向特殊位点引入功能基团的高难度,导致合成路线长、反应性差、收率低,同时伴随着各种副产物以及生产废料的生成。这使得该方法重现性差,被定性为“理论可行”,缺乏生产应用价值。在此背景下,甾药合成便诉诸于更有价值的半化学合成法[10]。

1.3.2 半化学合成法 半化学合成法,即通过化学修饰向成本低廉、加工便捷、来源丰富的甾体类原料分子中引入重要的官能团,实现从天然甾体到甾药分子的人工合成。20 世纪 40 年代,Marker 利用薯蓣皂素制得黄体酮、睾酮等一系列甾体药物及前体,其所建立的“薯蓣皂素-双烯”半化学合成体系一直沿用至今[11]。黄鸣龙教授成功以薯蓣皂素为原料合成可的松,并于 1959 年实现其工业化生产,使中国成为当时为数不多可生产甾体药物的国家之一[12]。此后,全国各地的甾体药物产业蓬勃发展起来,使中国逐渐成为全球甾体药物生产大国。与此同时,美国 Upjohn 公司以豆甾醇为原料,通过化学法切断其 C22 双键,再经结构修饰使所得产物作为甾药中间体用于合成多种甾体药物[8]。半化学合成法虽然解决了制药成本问题,但仍然存在野生薯蓣皂素资源日趋枯竭,

中国知网 https://www.cnki.net

以及薯蓣皂素废水、废料难处理等环境相关问题。

1.3.3 *微生物转化法* 甾体的微生物转化是微生物以甾体化合物为底物,借助胞内各种酶的催化作用,改造甾体母核的特定结构,修饰甾体侧链,赋予其独特的结构特异性和立体选择性,使其成为具有不同生理活性的甾药前体的过程[5]。20 世纪 50 年代,研究发现黑根霉(*Rhizopus nigricans*)可催化孕甾酮的 C11 位发生特异性羟基化反应生成 11α-羟基孕甾酮[13],这不仅解决了可的松合成困难的问题,也是人们首次利用微生物转化法改造甾体化合物。虽然所有利用微生物及其酶系对甾体底物进行的催化修饰均可归为甾体的生物转化,但在研究过程中,甾药的微生物转化主要是指甾体底物经特定微生物分解代谢生成甾药中间体的过程。与传统的化学合成相比,生物转化法反应条件温和、产物得率高、无有毒有害物质排放、生产周期短[14]。此外,微生物在催化底物生成甾药中间体时,能在其特定位点引入带有活性的官能团,选择特异性高。目前,通过微生物转化生产甾体药物中间体,再对其进行化学修饰合成目标甾药的方法,已逐步替代薯蓣皂素-双烯半化学合成工艺,成为当今甾体药物生产的主流工艺[15]。

2 甾体药物中间体

2.1 甾药中间体类型

甾药中间体是用来合成甾体药物的前体物质,根据所含碳原子数目的不同,可分为 C19 型和 C22 型两类(图 2)。C19 型甾药中间体,主要包括雄甾-4-烯-3,17-二酮(4-androstene-3,17-dione, AD)及其脱氢产物雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(1, 4-androstadiene-3,17-dione, ADD)和羟基化产物 9α-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮(9α-hydroxy-4-androstene-3,17-dione, 9-OH-AD),其中 AD 可用于合成雄激素,ADD 可合成黄体酮和一些雌性激素,9-OH-AD 可合成地塞米松等皮质激素[16]。C22 型甾药中间体包括 22-羟基-23, 24-双降甾-4-烯-3-酮(22-hydroxy-23,24-bisnorchol-4-ene-3-one, 4-HBC)及其脱氢产物 22-羟基-23,24-双降甾-1,4-二烯-3-酮(22-hydroxy-23, 24-bisnorchol-1, 4-diene-3-one, 1,4-HBC)和羟基化产物 9-OH-HBC(9,22-dihydroxy-23,24-bisnorchol-4-ene-3-one, 9-OH-HBC),常应用于孕激素和肾上腺皮质激素的合成[17]。C19 型甾药中间体是用于合成免疫抑制剂、利尿剂、性激素以及神经甾体等多种甾体激素类药物的重要前体。近年来,AD 与 ADD 两项销售额达 10 亿美元,黄体酮类甾药中间体——99% 精制 16-去氧孕烯醇酮(又称双烯醇酮)的年需求量近 1 000 t(近 6 亿美元)[18]。

2.2 甾药中间体的生物转化原料

据统计,生产甾体药物的主要原料包括薯蓣皂素、胆固醇类、蓖麻皂素、植物甾醇等,其来源和占比如表 2 所示。其中,薯蓣皂素是半化学合成法的理想原料,但将其用于微生物转化时却存在转化困难、产率低、产品纯度差等问题,无法凸显微生物法合成甾药工艺的优势。动物来源的胆固醇成分单一,是生物体内各种甾体激素的天然合成前体,利用其进行微生物转化时产物得率高,但因价格昂贵,仅适宜用做高附加值甾药的生产原料。蓖麻皂素则被英、美、德等国用于生产地塞米松或倍他米松等原料药[19]。因此,一类具有 5-烯-3-酮结构,且 C17 侧链与胆固醇类似的天然甾醇物质(植物甾醇)逐渐引起人们的关注。

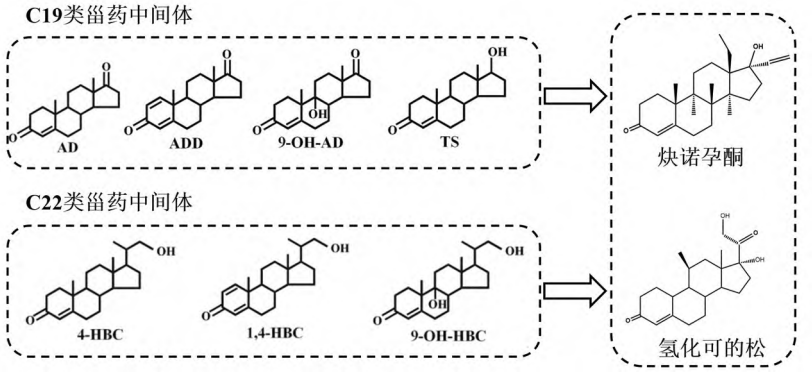


图 2 典型甾药中间体化学结构

Fig. 2 Chemical structures of typical steroid-drug intermediates

中国知网 https://www.cnki.net

表 2 甾体药物生产原料汇总[19]

Table 2 Summary of raw materials for the production of steroid drugs[19]

原料类型	占比/%	来源
薯蓣皂素	55	黄姜、小穗花薯蓣、穿地龙等
植物甾醇	15	制糖、食用油精炼等工业废料
胆固醇类	10	动物组织
蕃麻皂素	10	蕃麻
其他	10	剑麻皂素、麦角甾醇等

植物甾醇(植源性甾醇的统称)与甾体药物主体均为甾核,二者结构相似,这便决定了其作为甾体底物合成甾药中间体的可能性。作为一种天然存在的甾醇类化合物,植物甾醇最早被发现于植物体内,包括豆甾醇、β-谷甾醇、菜油甾醇及菜籽甾醇等,不同来源的植物甾醇中这四种甾醇的含量及比例也会有所不同[20]。随后发现,植物甾醇可提取于大豆作物提油后的残渣以及松油与沥青的加工废料等工农业废弃物[21-22]。作为一种来源广泛、获取便捷的工业残渣,植物甾醇的利用不仅能缓解甾药行业的燃眉之急,还能促进废弃资源的再次利用,减轻污染物排放和环境治理压力。因此如何巧妙改造植物甾醇中的甾体结构,构建低投入高产出的甾药生产线,一度成为甾体领域的热门问题。

2.3 甾药中间体的生物转化菌株

2.3.1 *转化天然甾体底物的微生物菌株* 放线菌是天然药物的重要来源[23],能够转化植物甾醇的微生物也以放线菌居多[3],其中分枝杆菌属和红球菌属因其突出的甾醇降解能力引起研究人员的广泛关注[24]。但野生型菌株除降解甾醇 C17 位侧链外,还会进一步裂解甾体母核,因而无法积累 C19 或 C22 型甾药中间体并用于工业生产。为实现甾体侧链的选择性降解而不破坏母核结构,研究者们分别从以下三个方面进行研究。①在发酵开始前向转化体系中额外添加开环抑制剂,如 α,α′-联吡啶、8-羟基喹啉、亚砷酸盐和重金属离子 Ni/Co/Pb 等[25]。②通过诱变处理选育裂解酶失活的突变株,如高效积累 ADD 和 AD 的突变株 *Mycobaccterium* sp. NRRL B-3683 和 NRRL B-3805[26]。③通过遗传改造避免生产菌中 3-甾酮-Δ^1-脱氢酶(3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase, KstD)和 3-甾酮-9α-羟化酶(3-ketosteroid-9α-hydroxylase, Ksh)共同存在,至少选择其一进行敲除。借助传统菌种选育和对菌株代谢通路的遗传改造,分枝杆菌成为微生物转化法合成甾药中间体的主要菌种[16],并逐渐用于工业生产,包括新金分枝杆菌(*M. neoaurum*)、耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)和偶发分枝杆菌(*M. fortuitum*)。

2.3.2 *从头全合成甾体的底盘微生物* 微生物转化法蓬勃发展期间,以合成生物学技术为基础,构建从头合成甾体药物工程菌株的“微生物全合成技术”逐渐涌现。该技术多以具备麦角甾醇合成能力的酵母(酿酒酵母、解脂耶氏酵母等)为底盘,通过改造麦角甾醇途径生成植物甾醇或胆固醇,再引入外源(动植物源)元器件,仿建天然甾体激素的合成途径,实现利用葡萄糖、木糖等廉价原料直接合成甾体药物的目标[27]。熊亮斌等[3]对甾体的生物合成途径以及甾体微生物全合成的研究进展进行了综述。其中,Zhang 等[28]以解脂耶氏酵母为底盘细胞,利用工程策略开发能够在其中高效运转的多组分细胞色素 P450 系统,实现甾药中间体孕烯醇酮(78 mg/L)的生物全合成。Corinne 等[29]在酿酒酵母中对胆固醇侧链降解酶系统相关基因进行多拷贝基因整合表达,使氢化可的松产量提高至 120 mg/L。利用天然甾体底物的微生物转化法技术成熟、工业应用广泛、合成甾药中间体产量高,但会受到原料来源限制;而利用简单碳源的微生物全合成技术彻底解决了原料来源不足问题,进一步简化甾药合成路线,但利用酵母工程菌株合成甾体药物(中间体)的产量都只达毫克级别,尚未见微生物一步发酵合成甾体药物或中间体的成功产业化案例。

3 分枝杆菌甾醇降解途径

近年来,随着全基因组测序技术的发展以及对分枝杆菌中植物甾醇降解相关基因簇的功能解析,植物甾醇代谢途径中的大部分环节已经被阐明,为甾药中间体合成途径的改造提供了理论依据。

3.1 甾醇的摄取

植物甾醇是一种疏水性脂质化合物,通过与分枝杆菌细胞壁直接接触并借助细胞的主动运输系统被摄取至菌体内部。研究人员从分枝杆菌基因组的甾醇降解基因簇中注释到 *mce4*(*mammalian cell entry*)操纵子,发现 C17 位含有长烷烃侧链

中国知网 https://www.cnki.net

的甾醇摄取与 Mce4 介导的主动运输相关[30]。结核分枝杆菌基因组中共含有四套 *mce* 操纵子(*mce1-4*),Mce4 转运系统不仅影响其对甾体分子的摄取,还是其侵染宿主细胞产生致病性的关键[31]。除此之外,作为胞外酶,参与底物降解的胆固醇氧化酶(Cholesteroloxidase,ChoM)也被认为在甾醇摄取过程中发挥了一定作用[30]。甾醇摄取是植物甾醇能否被利用的关键步骤,限制甾醇降解速率,影响微生物对甾醇底物的总体转化率[32]。除了负责主动摄取的转运系统外,细胞壁结构也是影响甾醇摄取效率的主要因素。

分枝杆菌细胞壁主要由肽聚糖(PG)-阿拉伯半乳聚糖(AG)-分枝菌酸(MA)组成,PG 以非共价的方式与细胞膜连接,以共价的方式与阿拉伯半乳聚糖连接,AG 在细胞壁组成中占绝大部分,末端分支通过酯键与分枝菌酸连接。这些结构致使分枝杆菌的细胞壁具有较强的致密性、亲脂性和低渗性,细胞被膜通透性差,甾醇摄取能力弱,这也是限制甾醇转化效率的一个重要因素。研究者们通过敲除细胞被膜合成过程中的关键基因以增加细胞壁通透性也是提高甾醇摄取效率的有效手段[33]。

近几年,研究者熊亮斌等对分枝杆菌细胞壁合成过程的几个关键基因进行系统性改造,结果显示,*mmpl3* 负责编码的海藻糖单霉菌酸酯(TMM)跨膜转运蛋白是影响分枝杆菌细胞被膜组装的重要蛋白,当 *mmpl3* 的表达受到抑制后会导致 TMM 大量积累,无法穿过细胞膜,从而影响海藻糖双霉菌酸酯(TDM)的合成,使其无法连接到 AG 上,细胞壁的合成受阻,通过破坏新金分枝杆菌 ATCC 25795 中 MmpL3 的表达使甾醇的转化率提高了 15.6%[34-35]。随后,熊亮斌课题组锁定了另外两个细胞壁合成关键酶,催化脂甘露聚糖合成脂阿拉伯甘露聚糖所需的关键酶 EmbC 和参与脂肪酸链合成的 β-酮酰基-酰基载体蛋白合酶 KasB,敲除 *embC* 基因使细胞的通透性提高了 26.0%,甾醇底物转化率提高了约 52.4%;而敲除 *kasB* 会导致分枝菌酸(MA)的比例紊乱,*kasB* 缺陷菌株的细胞通透性比野生型 *M. neoaurum* 高出约 2 倍,同时转化时间缩短了 33%[36-37]。因此,深度解析分枝杆菌细胞壁各组分的合成途径并锁定关键酶,对于改造细胞被膜结构至关重要。

3.2 甾醇的初步氧化

甾醇的初步氧化是目前研究较为透彻的阶段,该反应是甾醇降解的第一步,也是整个代谢的关键限速步骤,主要包括 3β-羟基氧化以及 C5, 6 位双键的异构化过程(图 3),由胆固醇氧化酶或 3β-羟基甾体脱氢酶(3β-Hydroxysteroid dehydrogenase,3β-HSD)催化。

胆固醇氧化酶是寡聚黄素氧化酶,以 FAD 为辅助因子,最终电子受体为氧分子。多数能降解植物甾醇的菌株中都存在 ChoM 同工酶,通常命名为 ChoM1 和 ChoM2,二者的区别在于 ChoM1 与 FAD 分子非共价结合,而 ChoM2 则与 FAD 共价结合。起初,研究者认为 Cho 是催化 3β-羟基氧化和 Δ5→4 异构化的唯一酶,但敲除 Cho 的菌株仍能在胆固醇为唯一碳源的培养基上生长[38],随后具有相同催化功能的 3β-羟基甾体脱氢酶被从 *M. smegmatis* mc^2155 中鉴定出来[31]。*M. neoaurum* ATCC 25795 基因组中鉴定出两种 Cho 同工酶(ChoM1 和 ChoM2),当敲除基因 *ChoM1* 和 *ChoM2* 后,菌株基本丧失利用胆固醇生长的能力,但仍可转化 60% 的甾醇;敲除基因 *3β-hsd*,胆固醇代谢与原始菌株没有明显差异,说明还存在未被鉴定的 Cho 或 3β-HSD 发挥作用[10]。李园园等[39]的研究也证实了这点,敲除基因 *3β-hsd* 只能在一定程度上使植物甾醇代谢速率减慢而未能将其彻底阻断,这就意味着在新金分枝杆菌中有多个 3β 位脱氢酶参与甾醇代谢。因此,设法挖掘并增强 ChoM 或 3β-HSD 的表达是提高分枝杆菌合成甾药中间体能力的有效手段。

3.3 甾醇的侧链降解

甾醇侧链降解主要是 C17 位碳链的断裂过程,该过程类似于脂肪酸 β 氧化,涉及多种酶系(图 3),目前部分酶系已经得到研究。甾酮 C27 单加氧酶(Steroid C27 monooxygenase,SMO)是催化甾醇侧链末端 C27 位羟基化的酶,隶属于细胞色素 P450 家族。此外,用于甾醇降解的细胞色素酶还有 Cyp125。在 *M. neoaurum* NRRL B-3805 中发现 5 种 Cyp 酶,过表达 *cyp125-3* 使 AD 产量达到 5.13 g/L[40]。在 *M. neoaurum* JC-12 中鉴定到 3 种 SMO,过表达 *smo2* 使 ADD 产量提高更为明显[41]。

甾酮 C27 位经羟基化反应后被进一步氧化为 C27 羧酸,经酰基 CoA 连接酶(FadD)催化酯

中国知网 https://www.cnki.net

化后生成甾酮 C27 羧酰 CoA，最终进入类 β 氧化过程。Wilbrink 等[42]从 *R. rhodochrous* RG32 中鉴定出一种酰基 CoA 连接酶（FadD19），其在菜油甾醇和 β-谷甾醇的侧链降解过程中发挥主要作用，对胆固醇侧链降解无影响。*M. smegmatis* mc^2 155 中 FadD19 具有类似的催化偏好性[43]，这或许与甾醇底物侧链结构差异有关。敲除 *fadD19-echA19* 后，*M. neoaurum* ATCC 25795 对植物甾醇的转化被削弱，而不影响胆固醇代谢，推断 FadD19 是植物甾醇降解的关键酶，而不是胆固醇降解的关键酶[10]，说明 FadD 催化不同类型甾醇侧链降解时存在底物偏好性。

经 SMO 末端羟基化和 FadD19 酯化后，参与类 β 氧化的酶包括：酰基辅酶 A 脱氢酶（FadE）、烯酰辅酶 A 水合酶（EchA）、β 羟酰辅酶 A 脱氢酶（FadB、Hsd4A）和 β 酮酰基辅酶 A 硫解酶（FadA），Fad 蛋白家族大多聚集存在。解析侧链降解过程中所涉及的酶系是目前研究的难点。

在甾醇侧链类 β 氧化的第二轮反应中，羟酰辅酶 A 脱氢酶（Hsd4A）负责催化 22-羟基-3-氧代-胆甾-4-烯-24-羧基-CoA（22-OH-BNC-CoA）脱氢。Xu 等[44]在 *M. neoaurum* ATCC 25795 中鉴定出 Hsd4A 具有双重功能，它既可用于甾体侧链羟酰 CoA 的脱氢，也可催化 C17 位羟基脱氢。此外，由于 Hsd4A 催化底物位于甾醇代谢途径的重要分支节点，其表达与否决定了 C17 位侧链能否被完全氧化，以及最终合成的甾药中间体是 C19 型还是 C22 型（图 3）。甾醇 C17 侧链若被完全降解，则会生成 C19 型甾药中间体 AD、ADD、9-OH-AD 等；C17 侧链若氧化不完全，其类 β 氧化只完成两轮，并最终积累 C22 型甾药中间体 4-HBC、1,4-HBC 等[10]。Xu 等[44]敲除 *hsd4A* 后，*M. neoaurum* NwIB-XII 的产物从 AD（D）变成 HBCs。Peng 等[45]对同时合成 AD（D）和 4-HBC 的 *M. neoaurum* CCTCC AB2019054 进行改造，敲除 *hsd4A* 后，获得只合成 4-HBC 的菌株 mJTU8。随着侧链长度的减短，最后一轮氧化反应由于受到甾核的影响，反应特异性会显著提高，C17 位羟基消除后形成 AD 的反应由 17β-羟基甾体脱氢酶（17β-HSD）催化（图 3）。此外，部分 17β-HSD 还具有还原酶活性，可催化 C17 位酮基到羟基的逆反应，即转化 AD 和 ADD 生成 TS 和 BD（Boldenone，宝丹酮），但在多数微生物中该酶活性较低。Zhang 等[46]将经筛选和定点突变后获得的 17β-HSDbn 突变体在 *M. neoaurum* MN 中进行异源表达，经 72 h 生物转化宝丹酮产量达 2.88 g/L，与野生型菌株相比提高 56.52%。

3.4 甾醇的母核氧化

母核氧化是甾醇代谢的关键步骤，此过程与侧链降解相互独立，在不同种属菌株内反应的先后顺序有所不同。其中，3-甾酮-Δ^1-脱氢酶（KstD）和 3-甾酮-9α-羟化酶（Ksh）是甾醇母核氧化过程中的两个关键酶（图 3）。KstD 可专一性催化 C1，2 位氧化脱氢形成双键，分别将 AD、9-OH-AD 和 4-HBC 转化为 ADD、9-OH-ADD 和 1,4-HBC[47]；而 Ksh 可以在甾体母核 C9 位引入羟基获得羟基化中间体 9-OH-AD、9-OH-ADD 和 9-OH-HBC。

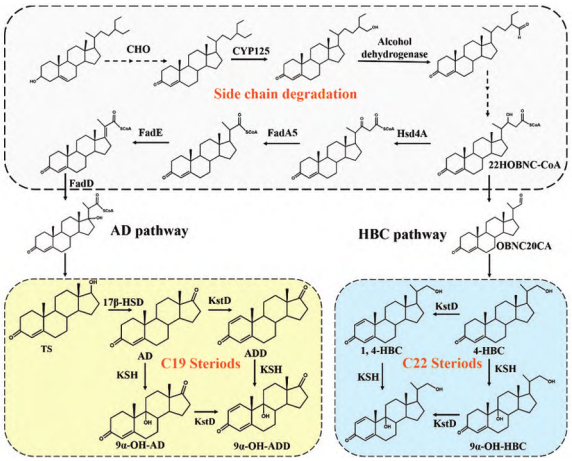


图 3 甾醇侧链降解过程[45]

Fig. 3 Sterol side-chain degradation process[45]

中国知网 https://www.cnki.net

3.4.1 3-甾酮-Δ^1-脱氢酶(KstD) 3-甾酮-Δ^1-脱氢酶(KstD)是一种FAD依赖型脱氢酶,能够特异性催化3-酮基类甾体底物发生脱氢反应。大多数KstD为寡聚膜蛋白,其分子序列中存在由疏水氨基酸组成的跨膜区[49]。研究初期,科学家们致力于挖掘KstD同工酶并揭示其催化作用机制和底物偏好性。迄今为止,KstD已经在多株胆固醇降解菌中得到注释,如 *A. simplex*、*P. opaca*、*M. fortuitum* 和 *R. erythropolis* 等。Van der Geize等[49]在红球菌SQ1中先后鉴定出两个KstD,其中 *kstd1* 的敲除使菌株的KstD酶活下降了超过99%,而敲除菌株仍旧无法积累甾药中间体。此后,又在该菌株中鉴定出与KstD1同源性为35%的KstD2,对 *kstd12* 进行双敲除后,SQ1能有效合成9-OH-AD[50]。*M. smegmatis* 中存在6个KstD同工酶[51],其中KstD1的缺失可直接导致甾药中间体AD的积累,而在 *kstd1* 缺失菌株中过表达 *kstd2* 并未恢复KstD的脱氢功能,仍能在产物中检测到AD。Bragin等[52]对分枝杆菌VKM Ac-1815D、1816D和1817D进行全基因组测序和比较基因组分析,发现菌株1815D和1816D中均只存在一个KstD,而1817D中至少存在3个KstD。Yao等[53]从新金分枝杆菌ATCC 25795中鉴定出三种KstD同工酶,并对其分别进行异源表达研究底物催化特异性,发现KstD1和KstD3分别对9-OH-AD和AD有催化作用,但只有敲除所有的 *kstd* 才能保证9-OH-AD的稳定和最大化积累。此外,Qin等[54]研究发现,位于FAD结合区域的氨基酸残基Y122\Y125\S138\E140\Y541和位于催化区域的Y365对 *M. neoaurum* 中KstD的催化活性很关键。Zhang等[55]通过CAVER分析、分子动力学计算和聚焦定向迭代饱和突变技术(FSISM)对耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)中KstD1的无活性腔体(Cavity A)进行理性设计,获得对氢化可的松催化活性提高10倍的四联突变体(H132M\L113F\V419W\M51L)。Xia等[56]对来自简单节杆菌(*A. simplex*)的KstD3进行分子对接和定点饱和突变,有效扩大了酶与底物的结合口袋,减轻了空间干扰,使突变体对AD等底物的催化效率提高近3倍。由此可见,借助生物信息学分析[57]预测酶蛋白结构,并对其进行理性设计或定向进化改造,可显著提高催化活性,这也是目前筛选高活性甾醇代谢酶的有效手段。

3.4.2 3-甾酮-9α-羟化酶(Ksh) 3-甾酮-9α-羟化酶(Ksh)的活性部分由末端单加氧酶(KshA)和铁氧蛋白还原酶(KshB)组成,所需辅酶为NADH。KshA有两个保守结构域:铁硫蛋白结构域(Rieske [2Fe-2S] domain)和非血红素Fe^{2+}结构域(Non-haem Fe(Ⅱ) domain);KshB有三个保守结构域:FMN结合结构域、NAD核糖结合结构域和植物型铁硫蛋白结合结构域,这些结构域中的保守序列在红球菌、分枝杆菌、诺卡氏菌属中高度相似且具有保守性[58]。其中KshA作为主反应中心,可以与甾体物质进行特异性结合,而KshB则负责给KshA提供还原力,使之处于还原态,并源源不断的进行羟化反应。研究发现甾药中间体C9位的羟基化可有效提高后续合成药物的抗炎抗敏能力[59]。与KstD一样,Ksh也存在多个同工酶。数据库检索发现 *M. smegmatis* mc^2155 中存在2个KshA同工酶和1个KshB。Bragin等[52]发现主产9-OH-AD的VKM Ac-1817D中至少存在5个KshA和1个KshB,而分别主产AD和ADD的VKM Ac-1815D和VKM Ac-1816D中都具有2个KshA和1个KshB。通过对 *M. neoaurum* 中的 *hsd4A* 和 *kshA1* 过表达,在环糊精助溶发酵体系中9-OH-AD产量提高27.5%[60]。同时敲除 *M. neoaurum* 中的 *kstd1 ~5* 和 *kshA1 ~3*,并过表达胆固醇氧化酶ChOx2和烯酰辅酶A水合酶EchA19,在微乳化发酵体系中4-HBC产量显著提高[61]。综上,通过代谢工程调控分枝杆菌中KstD和Ksh的表达可直接控制合成甾药中间体的类型与产量。以C19型甾药中间体的合成为例,若需积累AD,则应敲除菌株中所有的KstD和Ksh;若需积累ADD,则应敲除Ksh并过表达KstD;若需积累9-OH-AD,则应敲除KstD并过表达Ksh(图3)。若Ksh和KstD同时存在,AD则被转化为9-OH-ADD。

3.5 甾醇的母核断裂

羟基化的脱氢产物(9-OH-ADD)分子势能较高,结构不稳定极易发生重排,它会自发打开甾醇B环形成3-羟基-9,10-雄甾-1,3,5-三烯-9,17-二酮(3-HSA)。3-HSA在Hsa酶系家族的催化作用下最终被降解为CO_2和H_2O(图4),所产生能量被用于微生物自身的新陈代谢。有研究报道,该

中国知网 https://www.cnki.net

过程的关键酶为 2,3-二羟基联苯 1,2 双加氧酶(HsaC),其可催化 3,4-DHSA 生成 4,9-DHSA[62]。近年来,可用于合成逆孕酮、诺龙及其衍生物的 A 环降解类甾药中间体谷内酯(HIL)和茚满双酚(HIP)的生物转化也逐渐引起关注[63]。

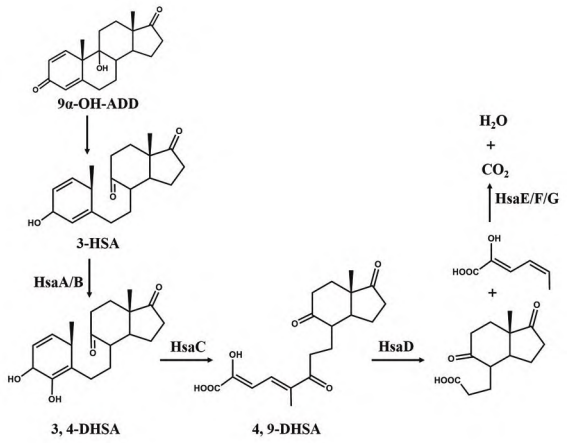


图 4 甾醇母核断裂过程[62]

Fig. 4 Process of sterol nucleus cleavage[62]

综上,分枝杆菌的甾醇降解途径包括甾醇摄取、母核初步氧化、侧链降解、母核氧化、母核断裂五个步骤,其中负责甾醇摄取的主动运输系统(Mce4)、催化初步氧化的 ChoM 和 3β-HSD 以及启动侧链降解的 SMO 是甾醇降解途径中的限速酶;侧链降解过程中的 Hsd4A 与母核氧化过程中的 KstD 和 Ksh 决定了合成甾药中间体的类型;而介导细胞被膜合成的关键酶(EmbC、KasB、MmpL3 等)也可间接影响甾醇摄取速率。对甾醇降解途径中各步骤的关键酶进行单独或联合调控(敲除或过表达),会直接影响甾醇代谢途径及合成甾药中间体的类型和产量(表 3)。总之,对甾醇降解途径的深入解析对于分枝杆菌的遗传改造至关重要。然而,对于侧链降解过程所涉及复杂酶系的鉴定研究仍是当前研究的重难点,也是制约开发新型甾药中间体的关键瓶颈。

4 分枝杆菌的遗传改造系统

利用代谢工程或基因工程技术对分枝杆菌甾醇代谢途径进行改造,可有效提高目的甾药中间体产量或积累新型甾药中间体,而高效的过表达和敲除系统对于分枝杆菌遗传改造不可或缺。

4.1 过表达系统

分枝杆菌拥有多种良好的多拷贝型穿梭表达质粒(表 4),其中较为常用的是游离型质粒 pMV261,该质粒包含一组多克隆位点以便连入外源基因,*OriE* 和 *OriM PaL5000* 使其可以同时在大肠埃希菌和分枝杆菌中复制,hsp60 组成型启动子可被分枝杆菌和大肠埃希菌识别并表达目的基因,卡那霉素抗性(Kan^R)有助于快速筛选出阳性克隆[64]。上述对 *ChoM*、*hsd4A*、*kstd* 等基因的过表达均利用该系统实现。此外,开展基因功能解析研究时,对敲除菌株进行基因回补常用整合型质粒 pMV306。近期,研究者们尝试向 pMV306 质粒中引入强启动子(pG13[45]、Psmyc[65] 等),使其具备增强基因表达的能力。同时,为避免游离型过表达质粒导致的代谢负担、生长抑制与质粒丢失问题,实现关键限速酶的稳定高效表达,Ke 等[66]通过筛选强启动子,将 pL2 启动子及强 RBS(核糖体结合位点)序列引入 pMV306 质粒,成功构建染色体整合质粒 pMV306-L2,其能在整合酶作用下将目的基因插入 NRRL B-3805 基因组特定位点。

4.2 基因敲除系统

在分枝杆菌中,常利用 pGOAL/p2NIL 同源重组系统敲除目的基因(表 4),其中 p2NIL 质粒负责携带目标基因上下游同源臂,pGOAL 质粒提供筛选标签盒,经自杀质粒构建、宿主重组酶激活、单交换克隆子筛选、双交换克隆子筛选等步骤获得基因缺陷型菌株。在此基础上,将两质粒功能融合进一个质粒的 pk18mobsacB[45]、pKADel[65] 系统与其作用原理类似。由于新金分枝杆菌的生长周期较长,使用这种同源重组基因敲除方法获得目标菌株,往往需要 16 d 以上;且菌株的假阳性概率较大,筛选过程工作量巨大;该方法也无法敲除菌株生长的必需基因[64]。

由于传统遗传改造系统的缺点和局限性,直接在菌株基因组上完成目的基因过表达和敲除的基因编辑系统应用越来越多。基因组编辑系统包括依赖同源重组的基因编辑方法,即人工核酸酶依赖的定点编辑技术,如转录激活因子效用物核酸酶(Transcription Activator-Like Effector Nuclease, TALEN)和锌指核酸酶(Zinc Finger Nuclease, ZFN)以及 CRISPR-Cas 基因编辑系统[72]。文献调研发现,在分枝杆菌属中应用较多的是 CRISPR 基因编辑系统。

中国知网 https://www.cnki.net

中国知网 https://www.cnki.net

表 3　分枝杆菌工程菌转化植物甾醇合成甾药中间体汇总

Table 3　Overview of engineered mycobacterial strains for the conversion of phytosterols into steroid-drug intermediates

出发菌株	遗传改造系统	关键基因改造策略	发酵体系	植物甾醇/(g·L^{-1})	改造前产物/(g·L^{-1})	改造后产物/(g·L^{-1})	文献
M. neoaurum WI	p2NIL/pGOAL19	*ΔkasB*	静息细胞转化 72 h,30 mL	20	9-OH-AD 8.9	9-OH-AD 10.9	[37]
M. neoaurum WI	p2NIL/pGOAL19	*ΔembC*	静息细胞转化 96 h,30 mL	20	9-OH-AD 8.9	9-OH-AD 9.9	[36]
M. neoaurum MS136	pMV261、p2NIL/pGOAL19	*Δkstd + 3β-hsd + hsd4A + kshA1 + kshB*	生长细胞发酵 108 h,N/A	13	9-OH-AD 4.7	9-OH-AD 6.8	[67]
M. fortuitum ATCC 35855	p38、pMV306、pKADel	*Δkstd1-5ΔopccR + hsd4A + fadE28-29*	生长细胞发酵 144 h,30 mL	20	无产物积累	9-OH-AD 12.21	[65]
M. neoaurum HK86-W	pMV261	*+ kshA1 + hsd4A*	静息细胞转化 144 h,N/A	50	9-OH-AD 22.18	9-OH-AD 28.27	[68]
M. smegmatis mc^{2}155	pJV53/pCR-Hyg	*Δkstd1-3*	生长细胞发酵 336 h,30 mL	5	无产物积累	9-OH-AD 2.86	[47]
M. smegmatis Msm1	pRH2502/pRH2521	*dkasB*	生长细胞发酵 192 h,20 mL	12	9-OH-AD 0.93	9-OH-AD 0.91	[69]
M. neoaurum JC-12	pMV261、pMV306、p2NIL/pGOAL19	*ΔkshA + smo2 + ChoM + kstd*	生长细胞发酵 120 h,N/A	30	ADD 7.9	ADD 20.1	[41]
M. neoaurum NRRL B-3805	pMV261、pMV306-L2、p2NIL/pGOAL19	*ΔkshA1ΔopccRΔsal + kstd1*	静息细胞转化 144 h,30 mL	30	ADD 3.39	ADD 16.59	[66]
M. neoaurum LY-2	QpJV53	*ΔkasB + hsd4A + pcc + vgb*	生长细胞发酵 192 h,N/A	20	ADD 3.51	AD 11.12	[70]
M. neoaurum HGMS2	p2NILSacB	*Δkstd + ΔkshB*	生长细胞发酵 168 h,10 L	80	AD 31.4	AD 38.3	[71]
M. neoaurum HGMS2	p2NILSacB	*ΔkstdΔkshB + kstd2*	生长细胞发酵 168 h,10 L	80	AD 31.4	ADD 34.2	[71]
M. neoaurum HGMS2	p2NILSacB	*ΔkstdΔkshA + kshA51*	生长细胞发酵 168 h,10 L	80	AD 31.4	9-OH-AD 37.2	[71]
M. neoaurum HGMS2	pMV261、p2NILSacB	*Δhsd4A1Δkstd1*	生长细胞发酵 168 h,3 L	80	AD 31.4	4-HBC 39.3	[72]
M. neoaurum HGMS2	pMV261、p2NILSacB	*Δhsd4A1 + kstd2*	生长细胞发酵 168 h,3 L	80	AD 31.4	1,4-HBC 37.9	[72]
M. neoaurum HGMS2	pMV261、p2NILSacB	*Δkstd1Δhsd4A1 + kshA1B1*	生长细胞发酵 168 h,3 L	80	AD 31.4	9-OH-HBC 42.18	[72]
M. neoaurum DSM 44074	p38、pMV306、pSBY1/pCR-Hyg	*ΔkstdΔhsd4AΔfadA5 + nox + kate*	生长细胞发酵 168 h,30 mL	5	无产物积累	9-OH-HBC 3.58	[73]
M. neoaurum DSM 44074	p38、pMV261、pSBY1/pCR-Hyg	*ΔkshA1-3Δhsd4A + kstd + nox + kate*	生长细胞发酵 168 h,30 mL	20	无产物积累	1,4-HBC 10.5	[74]
M. neoaurum DSM 44074	p38、pMV306、pSBY1/pCR-Hyg	*ΔkstdΔchsH2 + hsd4A + chsE1 + chsE2*	生长细胞发酵 168 h,30 mL	1	无产物积累	9-OH-PDCE 0.78	[75]
M. neoaurum DSM 44074	p38、pMV306、pSBY1/pCR-Hyg	*ΔkstdΔkshAΔchsH1H2 + chsE1E2 + hsd4A*	生长细胞发酵 168 h,30 mL	1	无产物积累	PDCE 0.56	[76]
M. fortuitum ATCC 35855	pMV306、p2NIL/pGOAL19	*Δkstd1-5Δhsd4AΔfadA5*	生长细胞发酵 144 h,30 mL	10	无产物积累	9-OH-HBC 6.81	[77]
M. neoaurum CCTCC AB2019054	pMV307、pk18mobsacB	*ΔkstdΔhsd4A + OpccR*	生长细胞发酵 144 h,87 mL	10	AD(D)、4-HBC 混合物	4-HBC 7.41	[45]
M. neoaurum WIII	pMV261、p2NIL/pGOAL19	*Δmmpl3 + cyp125 + ChoM1 + fadA5*	静息细胞转化 120 h,30 mL	20	4-HBC 6.31	4-HBC 7.59	[35]
M. neoaurum DSM 1381	pET-24a(+)-hyg、pJV53	*Δkstd1*	生长细胞发酵 168 h,N/A	20	1,4-HBC 3.0*	4-HBC 14.18	[78]
M. neoaurum NwIB-XII	pMV261	*Δhsd4AΔkstd1-3 + ChoM2*	静息细胞转化 72 h,10 mL	50	4-HBC 15.24	4-HBC 32.76	[79]

注:Δ:基因敲除;+:基因过表达;d:基因敲低;*OpccR*:dual-role reductase,双功能还原酶;*sal*:thiolase-like protein,硫解酶样蛋白;*pcc*:propionyl coenzyme A carboxylase,丙酰辅酶 A 羧化酶;*vgb*:Vitreoscilla hemoglobin,透明颤菌血红蛋白;*kate*:catalase,过氧化氢酶;*nox*:NADH oxidase,NADH 氧化酶;*chsE1-E2*:acyl-CoA dehydrogenase,酰基辅酶 A 脱氢酶;*chsH1-H2*:enoyl-CoA hydratase,烯酰辅酶 A 水合酶;9-OH-PDCE:9-hydroxy-3-oxo-4,17-pregadiene-20-carboxylic acid methyl ester,9-羟基-3-酮-4,17-二烯孕甾-20-羧酸甲酯;PDCE:3-oxo-4,17-pregadiene-20-carboxylic acid methyl ester,3-氧代-4,17-孕二烯-20-羧酸甲酯;N/A:data not available,发酵体积未提及;*:发酵用植物甾醇浓度为 5 g/L

4.3 CRISPR-dCas9 基因编辑系统

CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats,成簇的规律间隔短回文重复序列)系统可以根据 Cas 蛋白的不同分为三类。在Ⅱ型 CRISPR/Cas 系统中,CRISPR/Cas9 由 tracrRNA(反式激活序列)、crRNA 以及 Cas9 蛋白(来自酿脓链球菌)组成复合物,借助 RNA 靶向 DNA 行使切割功能,其原间隔区序列临近基序(Protospacer Adjacent Motif,PAM)为 5′-NGG-3′(N 为任意核苷酸)[81]。目前,在使用 CRISPR 工具编辑 DNA 分子时,常把 tracrRNA 和 crRNA 融合为单个 RNA,称为 sgRNA(单链向导 RNA)。该系统可以通过靶向切割 DNA 特定位点导致 DNA 双链断裂,DNA 双链断裂后,细胞通常会采用非同源末端连接(NHEJ)的方式进行修复,在该过程中往往会发生移码突变,使目标基因丧失功能,进而达到“基因敲除”的目的。但是,当有 DNA 修复模板进入细胞时,断裂的部分将会与模板发生同源重组(HR),实现“基因敲入”[82]。

加州大学旧金山分校的 Qi 等[83]对 Cas9 蛋白的两个核酶区域(HNH 和 RuvC)进行点突变(D10A 和 H840A),使其失去核酸内切酶活性成为阻遏蛋白(dead Cas9, dCas9),只能特异识别靶基因而不能切割,通过阻碍靶基因转录达到“基因表达抑制”的目的,称为 CRISPR 干扰(CRISPR interference, CRISPRi)。Singh 等[84]成功构建了 pRH2502 和 pRH2521 两个质粒(表 4),其中 pRH2502 载体表达 dCas9 蛋白,pRH2521 载体携带 sgRNA 克隆位点,将其应用于结核分枝杆菌验证了 CRISPRi 系统的表达抑制作用。随后,李梦[69]在 *M. neoaurum* B-3805 中构建了 *hsd4A* 的表达抑制菌株,发现发酵产物中 C22 甾药中间体产量上升,又在 *M. neoaurum* 2967 中构建了 *hsd4A* 和 *kstd* 的双抑制菌株,使发酵主产物从 ADD 变成 4-HBC。

表 4 分枝杆菌中常用质粒汇总

Table 4 Summary of commonly-used plasmids in Mycobacteria

质粒	启动子	抗性筛选标记	功能描述
pMV261[68]	hsp60	Kan^R	过表达质粒
pMV306[41]	无启动子	Kan^R	整合型质粒,单拷贝,用于回补敲除基因
pMV307[45]	pG13	Kan^R	过表达质粒,由 pMV306 改造,带有强启动子 pG13
p38[65]	Psmyc	Kan^R	过表达质粒,由 pMV306 改造,带有 Psmyc 启动子
pMV306-L2[66]	pL2	Kan^R	过表达质粒,由 pMV306 改造,带有 pL2 启动子及 RBS
pGOAL19[41]	hsp60	Hyg^R、Amp^R	携带 *SacB*、*lacZ* 筛选标记
p2NIL[41]	SP6	Kan^R	携带同源臂,用于等位交换,在分枝杆菌中无法复制
pKADel[65]	hsp60,SP6	Apr^R、Kan^R	敲除自杀质粒,携带同源臂,携带 *SacB*、*lacZ* 筛选标记,将 pGOAL19 与 p2NIL 重组至同一质粒改造而来
pk18mobsacB[45]	*SacB* promoter	Kan^R	敲除质粒
QpJV53[70]	P10760	Kan^R	过表达质粒,去除 pJV53 载体中的乙酰胺诱导型表达启动子和 Che9c gp60&61,并插入菌体强启动子 P10760 改造而来
p2NILSacB[71]	SP6、*SacB* promoter	Kan^R	同源重组质粒,将 pT18mobsacB 质粒中的 *SacB* 基因及其启动子、终止子片段连入 p2NIL 改造而来,用于基因敲除/敲入
pCM[80]	hsp60,tetO	Kan^R	敲除质粒,hsp60 表达 Cas12a 蛋白,tetO 表达 crRNA,将 Cas12a 蛋白与 crRNA cassette 组建至同一质粒
pSBY1_FnCpf1cg[73-76]	hsp60	Kan^R	表达 Cpf1 蛋白,与 pCR-Hyg 联合使用进行基因敲除
pJV53-Cas12a[47]	tetO,acetamidase promoter	Kan^R	表达 Cas12a 蛋白及重组酶 Che9c gp60&61,与 pCR-Hyg 联合使用进行基因敲除
pRH2502[69]	tetO	Kan^R	表达 dCas9 蛋白,与 pRH2521 联合使用进行基因敲低
pRH2521[45]	tetO	Hyg^R	表达 sgRNA
pCR-Hyg[73-76]	hsp60	Hyg^R	表达 crRNA

注:Kan:卡那霉素;Hyg:潮霉素;Amp:氨苄青霉素;Apr:安普霉素;SacB:蔗糖致死基因;acetamidase:乙酰胺酶

4.4 CRISPR-Cas12a 基因编辑系统

Cas12a(又称 Cpf1)蛋白,是Ⅱ类 V 型 DNA 内切酶,存在于普雷沃氏菌属(*Prevotella* sp.)和弗朗西斯氏菌属(*Francisella* sp.)等细菌中[73]。

中国知网 https://www.cnki.net

Cas12a 可以对 pre-crRNA 进行加工,识别“TTTV”(V 为任意核苷酸)PAM 序列,并在 crRNA 的引导下对 PAM 远端的第 18 位和第 23 位核苷酸进行剪切,产生黏性末端缺口,且此系统不需要核酸酶和 tracrRNA,是目前研究中最简约的 CRISPR 系统[85]。

pJV53-Cas12a/pCR-Hyg 系统可借助非同源末端连接(NHEJ)修复或同源重组(HR)修复在分枝杆菌中进行基因敲除。优化 Cpf1 蛋白密码子的 pSBY1_FnCpf1cg/pCR-Hyg 系统在新金分枝杆菌中借助 NHEJ 修复实现基因敲除,马治国[86]利用该表达系统通过连续传代消除抗性的方法,在 *M. neoaurum* DSM 44074 中连续敲除 3 个羟化酶基因(*kshA1&2&3*)为获得 1,4-HBC 生产菌株奠定基础。Liu 等[80]在 *M. neoaurum* ATCC 25795 中将 CRISPR-Cas12a(pCM 质粒)与 pNIL/pGOAL 系统联合使用,成功靶向删除各种长度的 DNA 序列,还能将目标基因整合到基因组中的特定位点,显示了其在分枝杆菌中进行精确基因组编辑的强大潜力。利用 CRISPR 基因编辑技术构建甾药中间体高产菌株成为当前研究的热门方向。

5 展 望

本文综述了分枝杆菌降解植物甾醇合成甾药中间体的代谢途径及其所涉及的关键酶,并对分枝杆菌代谢工程改造所使用的遗传操作系统进行介绍,为甾药中间体高产菌株的构建提供了理论依据与方法支撑。然而,综合近几年研究进展发现仍有许多问题有待解决:①甾醇侧链降解过程步骤繁多,对该过程的解析尚不完善,许多未知酶类有待挖掘研究;②传统同源重组敲除手段效率低、假阳率高且实验周期长。因此,可从以下两方面继续开展研究,一方面借助全基因组测序、转录组分析、比较基因组学等手段深度解析甾醇降解途径,挖掘更多与甾醇降解功能相关的关键基因(脱氢酶、水合酶、硫解酶等)和调控因子,从而开发更多新型甾药中间体;另一方面,基于 CRISPR 技术建立高效精准、脱靶率低、普适性强的无痕基因编辑系统,为 CRISPR 技术改造的无标签工程菌广泛应用于甾体制药工业夯实基础。此外,基于对关键酶的同源建模和活性结构域预测,利用定点突变技术和自动高通量筛选方法对其进行理性设计或定向进化改造,可筛选出催化活性显著提高的关键酶突变体,将其用于异源表达或引入甾体合成的底盘细胞将有效增强相关代谢途径。因此,加强甾体生物催化转化酶的挖掘及改造以及微生物代谢转化甾醇机制的解析,对分枝杆菌细胞工厂的理性设计以及甾体药物的绿色制造至关重要。

参考文献:

[1] Zhang Y, Zhou X, Wang X, et al. Improving phytosterol biotransformation at low nitrogen levels by enhancing the methylcitrate cycle with transcriptional regulators PrpR and GlnR of *Mycobacterium neoaurum*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 13.

[2] 尚坤, 阎瑾逸, 高君梅, 等. 放线菌来源活性天然产物发现研究进展[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(4): 101-108.

[3] 熊亮斌, 宋璐, 赵云秋, 等. 甾体化合物绿色生物制造:从生物转化到微生物从头合成[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 942-963.

[4] Zhang Y, Xiao P, Pan D, et al. New insights into the modification of the non-core metabolic pathway of steroids in *Mycolicibacterium* and the application of fermentation biotechnology in C-19 steroid production[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): 5236.

[5] Donova M. Microbial steroid production technologies: Current trends and prospects[J]. Microorganisms, 2021, 10(1): 53.

[6] Zhao M, Li X, Xiong L, et al. Green manufacturing of steroids via *Mycolicbacteria*: Current status and development trends[J]. Fermentation, 2023, 9(10): 890.

[7] Gu Y, Jiao X, Ye L, et al. Metabolic engineering strategies for de novo biosynthesis of sterols and steroids in yeast[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2021, 8(1): 110.

[8] 李辉, 郭霞凌. 分枝杆菌转化植物甾醇定向积累甾药中间体的代谢工程研究进展[J]. 中国油脂, 2022, 47(4): 125-132.

[9] Hernández-Fernández G, Acedos MG, de la Torre I, et al. Improving the production of 22-hydroxy-23, 24-bisnorchol-4-ene-3-one in *Mycolicibacterium smegmatis*[J]. Microbial Biotechnology, 2024, 17(8): e14551.

[10] 姚抗. 分枝杆菌甾醇代谢机制的解析以及其代谢工程改造应用于制备重要甾药中间体的研究[D]. 上海:华东理工大学,2014.

[11] Wang Z, Qiu H, Chen Y, et al. Microbial metabolism of diosgenin by a novel isolated *Mycolicibacterium* sp. HK-90: A promising biosynthetic platform to produce 19-carbon and 21-carbon steroids[J]. Microbial Biotechnology, 2024, 17(2): e14415.

中国知网 https://www.cnki.net

[12] Pathak N, Negi AS. Plant based steroidal and triterpenoid sapogenins: Chemistry on diosgenin and biological aspects[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2024, 279: 116915.

[13] Zhao A, Zhang X, Li Y, et al. *Mycolicibacterium* cell factory for the production of steroid-based drug intermediates[J]. Biotechnology Advances, 2021, 53: 107860.

[14] Zappaterra F, Costa S, Summa D, et al. Biotransformation of cortisone with *Rhodococcus rhodnii*: Synthesis of new steroids [J]. Molecules, 2021, 26(5): 1352.

[15] Donova MV. Current trends and perspectives in microbial bioconversions of steroids[J]. Methods in Molecular Biology, 2023, 2704: 3-21.

[16] 吴杰群, 徐顺清, 王鸿, 等. 生物转化甾醇制备甾体药物中间体研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(7): 801-814.

[17] 宋士奎, 何建新, 黄永棋, 等. 以分枝杆菌为底盘细胞生物合成甾药中间体的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1056-1069.

[18] Feng J, Wu Q, Zhu D, et al. Biotransformation enables innovations toward green synthesis of steroidal pharmaceuticals[J]. Chemistry-Sustainability-Energy-Materials, 2022, 15(9): e202102399.

[19] 龚金梅, 肖红卫, 安庆, 等. 甾体类激素原料药地塞米松生产工艺与市场分析[J]. 云南科技管理, 2012, 25(6): 69-72.

[20] 孙玉莹, 赵佳, 王玉婷, 等. 非水相脂肪酶催化合成 β-谷甾醇正辛酸酯的研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(11): 94-98,103.

[21] Shen M, Yuan L, Zhang J, et al. Phytosterols: Physiological functions and potential application[J]. Foods, 2024, 13(11): 1754.

[22] Josefsen KD, Nordborg A, Le SB, et al. Bioconversion of phytosterols into androstenedione by *Mycolicibacterium*, microbial steroids: Methods and protocols[M]. New York, NY: Springer US, 2023: 245-267.

[23] 夏焕章, 翟航. 放线菌次级代谢产物研究进展[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(4): 1-9.

[24] Wang XX, Ke X, Liu ZQ, et al. Rational development of mycobacteria cell factory for advancing the steroid biomanufacturing[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(11): 191.

[25] El Menoufy HA, Elkhateeb WA, Daba GM. Biotransformation of Steroids. History, Current Status, and Future Prospects, Fungi Bioactive Metabolites: Integration of Pharmaceutical Applications[M]. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024: 743-762.

[26] Nunes VO, Vanzellotti ND, Fraga JL, et al. Biotransformation of phytosterols into androstenedione-a technological prospecting study[J]. Molecules, 2022, 27(10): 3164.

[27] Ke X, Pan ZH, Du HF, et al. Secretory production of 7-dehydrocholesterol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Journal, 2023, 18(12): e2300056.

[28] Zhang R, Zhang Y, Wang Y, et al. Pregnenolone overproduction in yarrowia lipolytica by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system[J]. American Chemical Society Synthetic Biology, 2019, 8(12): 2666-2678.

[29] Corinne BM, Isabelle B, Bruno D. Process for preparing genetically transformed yeasts capable of producing a molecule of interest at a high titre: WO2012175453[P]. 2012.

[30] Klepp LI, Garcia JSY, Bigi F. Mycobacterial MCE proteins as transporters that control lipid homeostasis of the cell wall[J]. Tuberculosis, 2022, 132: 102162.

[31] Fieweger RA, Wilburn KM, Montague CR, et al. MceG stabilizes the Mce1 and Mce4 transporters in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2023, 299(3): 102910.

[32] Kopylov AT, Malsagova KA, Stepanov AA, et al. Diversity of plant sterols metabolism: The impact on human health, sport, and accumulation of contaminating sterols[J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1623.

[33] Xiong LB, Liu HH, Song L, et al. Improving the biotransformation efficiency of soybean phytosterols in *Mycolicibacterium neoaurum* by the combined deletion of fbpC3 and embC in cell envelope synthesis[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(1): 453-459.

[34] Williams JT, Abramovitch RB. Molecular mechanisms of mmpL3 function and inhibition[J]. Microbial Drug Resistance, 2023, 29(5): 190-212.

[35] Xiong LB, Liu HH, Xu LQ, et al. Improving the production of 22-hydroxy-23,24-bisnorchol-4-ene-3-one from sterols in *Mycobacterium neoaurum* by increasing cell permeability and modifying multiple genes[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 89.

[36] Xiong LB, Liu HH, Song XW, et al. Improving the biotransformation of phytosterols to 9α-hydroxy-4-androstene-3,17-dione by deleting embC associated with the assembly of cell envelope in *Mycobacterium neoaurum*[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 323: 341-346.

[37] Xiong LB, Liu HH, Zhao M, et al. Enhancing the bioconversion of phytosterols to steroidal intermediates by the deficiency of kasB in the cell wall synthesis of *Mycobacterium neoaurum*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 80.

[38] Shapira M, Dobysh A, Liaudanskaya A, et al. New insights into the substrate specificity of cholesterol oxidases for more awareapplication[J]. Biochimie, 2024, 220: 1-10.

[39] 李园园, 田威, 邹雷, 等. 新金分枝杆菌 3β-脱氢酶(3β-HSD)的多基因控制机制[J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(7): 617-625.

[40] Li X, Zhang R, Li J, et al. The function of steroid terminal

中国知网 https://www.cnki.net

monooxygenase in cholesterol or phytosterol degradation by the *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2023, 3(4): 585-592.

[41] Shao M, Zhang X, Rao Z, et al. Identification of steroid C27 monooxygenase isoenzymes involved in sterol catabolism and stepwise pathway engineering of *Mycobacterium neoaurum* for improved androst-1,4-diene-3,17-dione production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(5): 635-647.

[42] Wilbrink MH, Petrusma M, Dijkhuizen L, et al. FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzyme A ligase essential for degradation of C-24 branched sterol side chains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4455-4464.

[43] Wronska N, Brzostek A, Szewczyk R, et al. The role of fadD19 and echA19 in sterol side chain degradation by *Mycobacterium smegmatis*[J]. Molecules, 2016, 21(5): 598.

[44] Xu LQ, Liu YJ, Yao K, et al. Unraveling and engineering the production of 23,24-bisnorcholenic steroids in sterol metabolism [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21928.

[45] Peng H, Wang Y, Jiang K, et al. A dual role reductase from phytosterols catabolism enables the efficient production of valuable steroid precursors[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(10): 5414-5420.

[46] Zhang B, Zhu S, Zhu Y, et al. Construction of a cell factory for the targeted and efficient production of phytosterol to boldenone in *Mycobacterium neoaurum*[J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(11): e202400489.

[47] 李梦, 李雪梅, 冯进辉, 等. 耻垢分枝杆菌中3-甾酮-Δ1-脱氢酶对植物甾醇转化积累9α-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(4): 739-746.

[48] Rohman A, Dijkstra BW. Application of microbial 3-ketosteroid Δ(1)-dehydrogenases in biotechnology[J]. Biotechnology Advances, 2021, 49: 107751.

[49] van Der Geize R, Hessels GI, van Gerwen R, et al. Targeted disruption of the kstD gene encoding a 3-ketosteroid delta(1)-dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2029-2036.

[50] van der Geize R, Hessels GI, Dijkhuizen L. Molecular and functional characterization of the kstD2 gene of *Rhodococcus erythropolis* SQ1 encoding a second 3-ketosteroid Delta(1)-dehydrogenase isoenzyme[J]. Microbiology (Reading), 2002, 148(Pt 10): 3285-3292.

[51] Rohman A, Dijkstra BW. The role and mechanism of microbial 3-ketosteroid Δ(1)-dehydrogenases in steroid breakdown[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 191: 105366.

[52] Bragin EY, Shtratnikova VY, Dovbnya DV, et al. Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. strains[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 138: 41-53.

[53] Yao K, Xu LQ, Wang FQ, et al. Characterization and engineering of 3-ketosteroid-△1-dehydrogenase and 3-ketosteroid-9α-hydroxylase in *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795 to produce 9α-hydroxy-4-androstene-3,17-dione through the catabolism of sterols [J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 181-191.

[54] Qin N, Shen Y, Yang X, et al. Site-directed mutagenesis under the direction of in silico protein docking modeling reveals the active site residues of 3-ketosteroid-Δ(1)-dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(7): 146.

[55] Zhang Y, Liu M, Wang H, et al. Focused mutagenesis in non-catalytic cavity for improving catalytic efficiency of 3-ketosteroid-Δ1-dehydrogenase[J]. Molecular Catalysis, 2022, 531: 112661.

[56] Xia ML, Yan XY, Zan ZH, et al. Construction of automated high-throughput screening method for finding efficient 3-ketosteroid 1,2-dehydrogenating strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(21): 7301-7314.

[57] 杨雨婷, 杨国平. 结核分枝杆菌 Rv0081 基因编码蛋白的生物信息学分析[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(5): 81-90.

[58] 孙鸿. 分枝杆菌降解植物甾醇合成9-OHAD及甾醇1,2位脱氢的研究[D]. 天津:天津大学,2020.

[59] Sun H, Yang JL, He K, et al. Enhancing production of 9α-hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione (9-OHAD) from phytosterols by metabolic pathway engineering of mycobacteria [J]. Chemical Engineering Science, 2021, 230: 116195.

[60] Zhu X, Wang X, Zhang J, et al. Enhancing production and purity of 9-OH-AD from phytosterols by balancing metabolic flux of the side-chain degradation and 9-position hydroxylation in *Mycobacterium neoaurum*[J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(1): e2300439.

[61] Wang X, Ke X, Dong H, et al. High-efficiency bioconversion of phytosterol to bisnoralcohol by metabolically engineered *Mycobacterium neoaurum* in a micro-emulsion system[J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(9): e2400387.

[62] Bergstrand LH, Cardenas E, Holert J, et al. Delineation of steroid-degrading microorganisms through comparative genomic analysis[J]. mBio, 2016, 7(2): e00166-16.

[63] Liu N, Feng J, Zhang R, et al. Efficient microbial synthesis of key steroidal intermediates from bio-renewable phytosterols by genetically modified *Mycobacterium fortuitum* strains[J]. Green Chemistry, 2019, 21(15): 4076-4083.

[64] 张振建. 新金分枝杆菌胞膜甲基支链脂质合成途径强化及CRISPR系统初步研究[D]. 天津:天津科技大学,2021.

[65] Liu X, Zhang J, Yuan C, et al. Improving the production of 9α-hydroxy-4-androstene-3,17-dione from phytosterols by 3-ke-

中国知网 https://www.cnki.net

tosteroid-Δ1-dehydrogenase deletions and multiple genetic modifications in *Mycobacterium fortuitum*[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 53.

[66] Ke X, Cui J H, Ren QJ, et al. Rerouting phytosterol degradation pathway for directed androst-1,4-diene-3,17-dione microbial bioconversion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 186.

[67] Sun H, Yang J, He K, et al. Enhancing production of 9α-hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione (9-OHAD) from phytosterols by metabolic pathway engineering of mycobacteria[J]. Chemical Engineering Science, 2021, 230: 116195.

[68] Zhu X, Wang X, Zhang J, et al. Enhancing production and purity of 9-OH-AD from phytosterols by balancing metabolic flux of the side-chain degradation and 9-position hydroxylation in *Mycobacterium neoaurum*[J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(1): 2300439.

[69] 李梦. 基因编辑技术在甾醇代谢途径关键基因再解析中的应用[D]. 合肥:中国科学技术大学,2020.

[70] Ma Q, Li H, Xue M, et al. Multidirectional pathway engineering of *Mycobacterium neoaurum* LY-2 for the enhancement of androstenedione production from phytosterols[J]. Biochemical Engineering Journal, 2024, 206: 109294.

[71] Li X, Chen T, Peng F, et al. Efficient conversion of phytosterols into 4-androstene-3,17-dione and its C1,2-dehydrogenized and 9α-hydroxylated derivatives by engineered *Mycobacteria*[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 158.

[72] Song S, He J, Gao M, et al. Loop pathways are responsible for tuning the accumulation of C19- and C22-sterol intermediates in the mycobacterial phytosterol degradation pathway[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 19.

[73] Yuan CY, Ma ZG, Zhang JX, et al. Production of 9,21-dihydroxy-20-methyl-pregna-4-en-3-one from phytosterols in *Mycobacterium neoaurum* by modifying multiple genes and improving the intracellular environment[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 229.

[74] Yuan C, Ma Z, Li Y, et al. Production of 21-hydroxy-20-methyl-pregna-1,4-dien-3-one by modifying multiple genes in *Mycolicibacterium*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(5-6): 1563-1574.

[75] Yuan C, Song S, He J, et al. Bioconversion of phytosterols to 9-hydroxy-3-Oxo-4, 17-pregadiene-20-carboxylic acid methyl ester by enoyl-coA deficiency and modifying multiple genes in *Mycolicibacterium neoaurum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(22): e0130322.

[76] Yuan C, Li Y, Han S, et al. Functional analysis of acyl-CoA dehydrogenases and their application to C22 steroid production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(11): 3419-3428.

[77] Han S, Liu X, He B, et al. Efficient Production of 9,22-Dihydroxy-23, 24-bisnorchol-4-ene-3-one from phytosterols by modifying multiple genes in *Mycobacterium fortuitum*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(7): 3579.

[78] Zhang R, Liu X, Wang Y, et al. Identification, function, and application of 3-ketosteroid Δ1-dehydrogenase isozymes in *Mycobacterium neoaurum* DSM 1381 for the production of steroidic synthons[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 77.

[79] Cao D, Zhu X, Zhang J, et al. A combined strategy to enhance phytosterols biotransformation to 22-hydroxy-23,24-bisnorchol-4-ene-3-one by *Mycobacterium neoaurum*[J]. Process Biochemistry, 2023, 128: 94-97.

[80] Liu K, Gao Y, Li Z H, et al. CRISPR-Cas12a assisted precise genome editing of *Mycolicibacterium neoaurum*[J]. New Biotechnology, 2022, 66: 61-69.

[81] 邓名, 丁俊美. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在微生物细胞中的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28(3): 787-795.

[82] Liu K, Lin GH, Liu K, et al. Multiplexed site-specific genome engineering in *Mycolicibacterium neoaurum* by Att/Int system[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(3): 1002-1011.

[83] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. Cell, 2013, 152(5): 1173-1183.

[84] Singh AK, Carette X, Potluri LP, et al. Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(18): e143.

[85] Meliawati M, Schilling C, Schmid J. Recent advances of Cas12a applications in bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(8): 2981-2990.

[86] 马治国. 降解植物甾醇产 22-羟基-23,24-双降甾-1,4-二烯-3-酮工程菌株的构建[D]. 上海:上海大学,2021.

中国知网 https://www.cnki.net