

## 重组 *Rhodobacter sphaeroides* hemA 表达的调控

王俊卿, 张肇铭\*

(山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

**摘要** *Rhodobacter sphaeroides* hemA 编码 5-氨基乙酰丙酸合酶 (ALAS), 催化磷酸吡哆醛依赖性琥珀酰 CoA 和甘氨酸缩合成 ALA. 将 *R. sphaeroides* hemA 导入 *E. coli* 进行表达, 当 hemA 具有与 lac 启动子相同的转录方向时, ALAS 有活性. lac 启动子与 hemA 之间的距离会影响 ALAS 在不同培养基上的表达. *E. coli* 宿主菌对 ALAS 表达、ALA 产量有显著影响, 在实验所用 6 种菌株中, *E. coli* DH1 是最佳宿主菌 ( $P < 0.05$ ). ALAS 表达还与碳源有关, 琥珀酸为碳源时, 重组 ALAS 活性最高 ( $P < 0.05$ ), 以乳酸为碳源时, ALAS 活性很低. 重组 ALAS 活性也受培养基 pH 值影响, pH 6.5 时, 活性最高 ( $P < 0.05$ ).

**关键词** 5-氨基乙酰丙酸合酶, 同工酶 hemA, 基因表达调控, 宿主菌, 培养基  
**中图分类号** Q786, Q756

### Regulation on Expression of Recombinant *Rhodobacter sphaeroides* hemA

WANG Jun-Qing, ZHANG Zhao-Ming\*

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract** *Rhodobacter sphaeroides* hemA gene encoding for 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS), which catalyzes pyridoxal phosphate-dependent condensation of succinyl coenzyme A and glycine forming ALA. *R. sphaeroides* hemA gene in pALA vector system was transformed into *E. coli*. ALA synthase activity level was maximal when hemA had the same transcription direction as the lac promoter. The distance between the lac promoter and hemA affected the expression of ALA synthase on different growth substrates. And *E. coli* host strain had a significant effect on recombinant ALA synthase activity level and ALA production, with *E. coli* DH1 being best suited among six host strains studied ( $P < 0.05$ ). ALA synthase activity was also dependent on the carbon sources. Succinate gave the highest level of ALA synthase activity ( $P < 0.05$ ), while lactose resulted in a repression of ALA synthase. ALA synthase activity level was also dependent on medium pH, with maximal activity occurring at pH 6.5 ( $P < 0.05$ ).

**Key words** hemA, 5-aminolevulinic acid synthase, regulation of gene expression, host strains, medium

5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 是一个五碳氨基酸, 是生物体内四吡咯生物合成的前体. 其生物合成主要有两条途径. C4 途径主要存在于原核细菌、酵母菌和哺乳动物细胞中. ALA 是在 5-氨基乙酰丙酸合酶 (ALAS) 催化下琥珀酰 CoA 和甘氨酸缩合而成的. 另一条 C5 途径中 ALA 是由谷氨酸经三步反应而成的. 还有关于 ALA 合成的第三途径的报道, 是 4,5-二氧代缬氨酸转氨基形成的, 此途径很少见<sup>[1]</sup>.

细胞的 ALA 合成量受所合成的 ALA 的反馈调节, 该反应是四吡咯合成的限速步骤. 添加外源 ALA 可打破此“瓶颈”限制, 从而提高细胞的四吡咯合成量<sup>[2]</sup>. 低浓度 ALA 由于可促进植物叶绿素合成, 故可作为植物生长调节剂. 同样地, ALA 可促进某些重

要的商业性四吡咯产物如  $V_{B12}$  等的合成<sup>[3]</sup>.

近来报道, ALA 可作为一种有效的光动力制剂. ALA 被机体摄入后可特异性在特定组织中累积, 然后转化为光动力化合物  $P_p$ , 经光活化后  $P_p$  可诱导单线态氧的形成, 导致细胞的过氧化反应而损伤、死亡. 因此 ALA 可作为光动力除草剂、杀虫剂、肿瘤

收稿日期: 2004-09-24, 接收日期: 2005-03-07

国家科技部攻关项目 (No. 2001BA540C)

\*联系人 Tel: (0351) 7011409, E-mail: Zhangzhm@sxu.edu.cn

Received: September 24, 2004; Accepted: March 7, 2005

Supported by National Research Foundation of Ministry of Science and Technology of China (No. 2001BA540C)

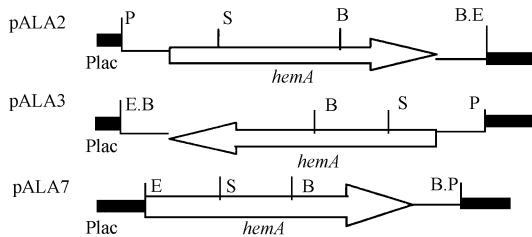
\*Corresponding author Tel: (0351) 7011409, E-mail: zhangzhm@sxu.edu.cn

等疾病的治疗剂,对哺乳动物无毒、易降解,对环境也不会造成污染<sup>[4]</sup>。

由于 ALA 化学合成过程很复杂,产量低,生物合成毫无疑问是最佳的途径。过去关于 ALA 合成量的报道在都在 17 ~ 200 μmol/L 范围内,王俊卿<sup>[5]</sup>等利用光合细菌作为生物催化剂,对生长速度和生物转化条件进行调控,可将产量提高到 9.3 mmol/L。提高 ALA 产量的另一途径是代谢途径的动力学调控。Chen<sup>[6]</sup>和 Li<sup>[7]</sup>分析了 C5 途径中酶基因表达活性对 ALA 合成的影响,由于 C5 途径中 3 个酶活性都依赖于 tRNA<sup>Glu</sup>,故 C4 途径中酶编码基因的高表达效果更直接。ALAS 可通过多种来源纯化获得,但 *Rhodobacter sphaeroides* 的 ALAS 是最适的<sup>[8]</sup>,因为它具有很高的特异性,很低的甘氨酸和琥珀酰 CoAKmS。

**Table 1** Bacterial strains and plasmids used

Strains and plasmids	Characteristics	Reference
<i>E. coli</i> .		
DH1	<i>SupE44, hadR17, recA1, gyrA96</i>	Ghrayeb <sup>[11]</sup>
BL21	<i>E. coli. B, F<sup>-</sup> dcm, ompT, lon hds, gal</i>	Ghrayeb <sup>[11]</sup>
C236	<i>dut1, ung1, thi1, relA1</i>	Ghrayeb <sup>[11]</sup>
TGI	<i>supE, hsd, thi,</i>	Ghrayeb <sup>[11]</sup>
HB101	<i>SupE44, hsd20, recA1, ara14</i>	Ferreira <sup>[12]</sup>
JA221	<i>lpp, hdsM<sup>+</sup>, trpE5, leuB6, lacY, recA</i>	Ferreira <sup>[12]</sup>
plasmids		
pUC18/19	Cloned vector	Ferreira <sup>[12]</sup>
pUC19kn	pUC19 containing a 1.282 kb kanamycin resistance Genblock.	Ferreira <sup>[12]</sup>
pUI1014	pUC18 harboring a 1,976 kb <i>Bam</i> HI <i>Nae</i> I fragment	Klotsky <sup>[13]</sup>
pUI1015	pUC19 harboring a 1,976 kb <i>Bam</i> HI <i>Nae</i> I fragment	Klotsky <sup>[13]</sup>
pALA2	pUI1015 containing a 1,282 kb kanamycin resistance Genblock in site.	This study
pALA3	pUI1014 containing a 1,282 kb kanamycin resistance Genblock in site.	This study
pALA7	pUC18 harboring the start condon of <i>hemA</i> directly next to <i>Eco</i> RI site.	This study



**Fig. 1** Structures of recombinant plasmids

Chromosomal insert of plasmid is shown by thin line, and vectors are shown as solid areas. Open arrow represents the *hemA* open reading frame and its transcription direction. The site and direction of the *lac* promoter (Plac) is indicated by arrow.

Restriction site: E: *Eco*R ; S: *Sac* ; B: *Bam*H ; P: *Pst*

## 1.2 DNA 克隆、表达

PCR 扩增、连接、转化、SDS-PAGE 检测均按常规操作进行<sup>[9]</sup>。Kn 抗性基因试剂盒、DNA 引物片段、酶等均从 Takara 公司购买。引物序列如下: 5-

本实验将编码 ALAS 的 *R. sphaeroides hemA* 基因导入 *E. coli*, 并对重组 ALAS 活性进行了分析, 主要包括以下 3 方面: (1) 质粒、宿主菌对 ALAS 表达的影响; (2) 诱导异源 ALAS 表达的最适条件; (3) 重组菌的 ALA 合成量。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和培养条件

实验所需的菌株、质粒见 Table 1 和 Fig. 1。对照组 *E. coli* 用 LB 培养基培养 16 h, 实验组培养基含 5 g/L 碳源和 0.25 g/L 酵母粉 (pH 6.5)。生长培养基中需加入抗生素: Amp 100 μg/ml、Kn 25 μg/ml, 于 37 摇瓶 (150 r/min) 培养 16 h 后收集细胞, 实验组在吸光度 ( $A_{660nm}$ ) 为 0.4 时收集细胞。

GGAATTCTCAGGGA GACGAA GATGGAC-3 和 5'-GAGGTCGGC GAGCTCGCCCTCG-3。(斜体表示 *Eco*R、*Sac* 酶切位点)。

### 1.3 免疫印迹分析

取 SDS/PAGE 分离的样品于硝酸纤维素膜上, 用封闭液 (1% 奶粉、0.02% 叠氮钠) 以 1:1000 稀释第一抗体 (制备方法见参考文献<sup>[8]</sup>), 将已封闭的硝酸纤维素 (NC) 膜按 0.1 ml/cm<sup>2</sup> 加第一抗体溶液, 密封, 4 轻微振荡 2h 后, PBS 冲洗 3 次, 转入 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5) 溶液, 室温轻微振荡 10 min 后, 将第二抗体碱性磷酸盐融合的羊抗兔 IgG 稀释 1:1000 (稀释液 1% 去脂奶粉, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 密封, 室温轻微振荡 1 h 后, 用稀释液冲洗 5 次, 碱性磷酸酶法显色。

### 1.4 酶活性分析

200 ml 菌液 10 000 r/min 离心 10 min, 细胞用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液反复冲洗 (pH 7.0), 悬浮于 4 ml 相同的缓冲液中, -20 °C 保存备用. 浸提液再用超声波破碎、离心 (15 000 r/min, 20 min), 取上清液. ALAS 活性用 Burham 法<sup>[10]</sup>进行, 反应混合物成分: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1 mol/L 琥珀酸钠、0.1 mol/L 甘氨酸、0.1 mmol/L ATP、0.2 mmol/L CoA, 在 10、20、30 min 时各取 300  $\mu$ l 样品于含 150  $\mu$ l 10% 三氯乙酸微量管中, 离心 (15 000 g, 5 min), 取 300  $\mu$ l 上清液于加有 400  $\mu$ l 1 mol/L 乙酸钠的试管中 (pH 4.6), 再加入 35  $\mu$ l 乙酰丙酮, 100 °C 水浴 15 min, 冷却后, 加入 200  $\mu$ l 新鲜的 Ehrlich's 试剂 (校正的 Ehrlich's 试剂成分: 42 ml 乙酸 + 8 ml 70% 高氯酸, 加入 1 g *N,N*-二甲氨基苯甲醛), 5 min 后 HPLC 分析 ALA 合成量.

## 2 结果

### 2.1 质粒载体对重组 ALAS 活性的影响

据报道 pU11015 转化的 *E. coli* 菌体呈红色, 可能是导入 pU11015 的 *E. coli* DH1 四吡咯合成增多的缘故<sup>[13]</sup>. 菌体浸提物中可检测到 ALAS 活性, 但水平从 0~3 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> 不等. 可能是 pU11015 的不稳定性造成的. 本实验构建的质粒 pALA2 是在 pU11015 *EcoR* 位点带有 *Kn* 抗性, 所有带有此质粒的菌体在 LB 培养基上生长时都保留了完整的 *Kn* 抗性. 对不同质粒转化的 *E. coli* DH1 的 ALAS 活性测定结果见 Table 2. 在不带有 *R. sphaeroides hemA* 的对照组菌体中 ALAS 活性极低; pALA3 转化的 *E. coli* 细胞, 由于 *hemA* 转录方向和 *lac* 启动子方向相反 ALAS 活性也极低; pALA2 转化的细胞, 尽管 *hemA* 转录方向与 *lac* 启动子方向相同 ALAS 活性也很低. 说明 *R. sphaeroides hemA* 的启动子不能为 *E. coli* 识别, 只有当 *R. sphaeroides hemA* 在 *E. coli lac* 启动子控制下时, *hemA* 才能在 *E. coli* 中表达, IPTG (异丙基-*D*-半乳糖吡喃糖苷) 可诱导 *E. coli lac* 启动子. 但它并未能提高重组 ALAS 的活性 (Table 3). 对以琥珀酸或乳酸为碳源的重组菌 ALAS 活性分析表明, 以琥珀酸为碳源时 ALAS 活性比 LB 上的高 ( $P < 0.05$ ), 乳酸为碳源时 ALAS 活性几乎检测不到, 在各种培养基中加入 IPTG 对 ALAS 活性影响差异不显著 ( $P > 0.05$ ). 为了分析 *R. sphaeroides hemA* 的启动子对重组 ALAS 表达的影响, 重新构建了质粒 pALA7, 该质粒在 *hemA* 的下游区域起始密码子发生缺失, 在 *hemA* 的 5 端用 pU11015 诱导 *EcoR* 的限

**Table 2** ALA-related enzymes activity and ALA production by *E. coli* DH1 containing deferent plasmid

Plasmids	Enzymes activity		ALA
	/mmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>		/mmol L <sup>-1</sup>
Control	0.01 $\pm$ 0.005		0.19 $\pm$ 0.014
pUC19Kn	0.01 $\pm$ 0.001		1.58 $\pm$ 0.021
pALA3	0.01 $\pm$ 0.005		1.11 $\pm$ 0.010
pALA2	3.42 $\pm$ 0.079		9.22 $\pm$ 0.052

**Table 3** ALAS activity and ALA production by *E. coli* DH1 containing *hemA* at different distances from the lac promoter in the absence and presence of IPTG

Plasmids	Medium	IPTG	ALAS activity	ALA
			/mmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	/mmol L <sup>-1</sup>
pALA2	LB	-	3.42 $\pm$ 0.49	9.22 $\pm$ 1.28
		+	3.15 $\pm$ 0.27	8.93 $\pm$ 1.07
	Lactose	-	0.006 $\pm$ 0.001	0.19 $\pm$ 0.036
		+	0.006 $\pm$ 0.001	0.15 $\pm$ 0.001
pALA7	LB	-	53.54 $\pm$ 0.95	27.8 $\pm$ 1.12
		+	52.23 $\pm$ 1.37	27.1 $\pm$ 0.58
	Lactose	-	12.47 $\pm$ 1.20	18.4 $\pm$ 1.51
		+	13.12 $\pm$ 0.99	18.7 $\pm$ 0.68
succinate	-	0.004 $\pm$ 0.001	0.15 $\pm$ 0.005	
	+	0.005 $\pm$ 0.001	0.16 $\pm$ 0.019	
		-	16.33 $\pm$ 0.64	21.9 $\pm$ 0.84
		+	18.46 $\pm$ 1.19	23.8 $\pm$ 1.23

制性位点, 将 320 bp 的 PCR 片段和含有 *hemA* 3 端 1.4 kb 的 *Sac*、*Bam*H 片段连接到 pUC18 上, 可在 *Pst* 位点诱导产生 *Kn* 抗性基因. 含 pALA7 的重组菌无论在 LB 培养基上, 还是在琥珀酸培养基上, 都具有与含 pALA2 相似的 ALAS 活性, 但均低于琥珀酸培养基上 pALA2 转化的 *E. coli* DH1 的 ALAS 活性. 同样含 pALA7 的细胞在乳酸培养基上也几乎检测不到 ALAS 活性, IPTG 也不能诱导 ALAS 的表达. 由于 pALA2 转化的菌体 ALAS 活性最高 ( $P < 0.05$ ), 后面的实验中采用了此质粒.

### 2.2 宿主菌对重组 ALAS 活性的影响

对 pALA2 转化的不同 *E. coli* 菌株的 ALAS 活性分析表明 (Table 4), 不同宿主菌 ALAS 活性差异很大. 某些 pALA2 转化的菌株菌液呈亮红色, 如 HB101、JA221, 且菌株产生了大量的四吡咯, 而 DH1、TGI 菌液不呈红色, 无大量四吡咯产生, 尤其 *E. coli* DH1, 其 ALAS 活性最高 ( $P < 0.05$ ), 是最佳宿主菌.

### 2.3 碳源对重组 ALAS 活性的影响

本实验分析了 9 种碳源对 pALA2 转化的 *E. coli* DH1 的 ALAS 活性的影响, 发现乙醛酸、*L*-缬氨酸、*L*-蛋氨酸、*L*-异亮氨酸和丙氨酸都不能作为碳源利用, 一些 4C 二羧酸可提高重组 ALAS 活性和 ALA 的合成 ( $P < 0.05$ ), *D*-苹果酸、谷氨酸、胱氨酸、葡萄

**Table 4** ALAS activity and ALA production by different host strains containing plasmid pALA2

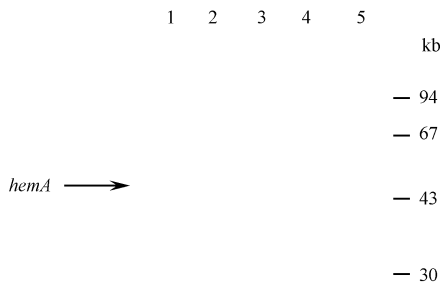
<i>E. coli</i>	ALAS activity /mmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	ALA/mmol L <sup>-1</sup>	Pyrrole ( <i>A</i> <sub>405nm</sub> )
BL21	5.91 ±0.74	11.2 ±0.79	1.23 ±0.08
CJ236	1.26 ±0.03	3.24 ±0.08	1.15 ±0.04
DH1	53.54 ±1.15	27.8 ±1.12	0.07 ±0.01
HB101	0.04 ±0.01	1.62 ±0.04	5.56 ±0.32
JA221	0.31 ±0.07	1.35 ±0.04	5.43 ±0.08
TGI	1.89 ±0.11	3.33 ±0.13	0.08 ±0.01

糖等则会使 ALAS 活性下降,以乳酸为碳源时几乎检测不到 ALAS 活性 (Table 5).

**Table 5** Effect of substrates on ALAS activity and ALA production by *E. coli* DH1 containing pALA2

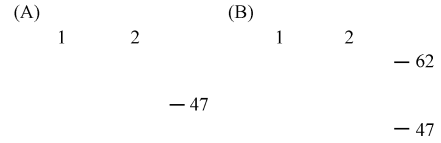
Growth substrate	ALAS activity /mmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	ALA /mmol L <sup>-1</sup>
Succinate	53.54 ±1.15	27.8 ±1.12
Fumarate	47.19 ±1.14	21.3 ±0.85
L-Malate	45.13 ±1.26	19.5 ±1.11
-Ketoglutarate	24.10 ±0.96	8.94 ±0.89
D-Malate	2.99 ±0.22	5.71 ±0.54
L-Glutamate	1.89 ±0.27	2.12 ±0.31
L-Serine	1.29 ±0.19	1.04 ±0.17
L-Threonine	1.66 ±0.09	1.79 ±0.22
Glucose	0.08 ±0.01	0.31 ±0.01
Lactose	0.01 ±0.01	0.19 ±0.01

据报道, *R. sphaeroides hemA* 编码的 ALAS 分子量为 44.6 kb<sup>[13]</sup>,本实验中只有 pALA2 转化的 *E. coli* DH1 才能检测到具有近似分子量的蛋白 (Fig. 2). pALA2 转化的重组蛋白 Western 印迹分析也进一步证实了此结论 (Fig. 3).



**Fig. 2** SDS-PAGE of *E. coli* DH1 containing different plasmid on succinate or lactose medium.

1. *E. coli* DH1 containing pALA2 on lactose medium; 2. *E. coli* DH1 containing pALA2 on succinate medium; 3. Wild-type *E. coli* DH1 on succinate medium; 4. *E. coli* DH1 containing pUC19Kn on succinate medium; 5. *E. coli* DH1 containing pALA3 on succinate medium



**Fig. 3** Cross reactivity analysis of anti-hemA by Western blotting

(A) 1. Purified hemA; 2. Whole cells of an induced culture of *E. coli* DH1 containing pALA2; primary antibody, anti-GST-hemA antisera; secondary antibody, goat anti-(rabbit IgG) conjugated with alkaline phosphate;

(B) 1. Primary antisera, anti-GST-hemA antisera, secondary antibody, goat anti-(rabbit IgG) conjugated with alkaline phosphate against 0.5 µg purified mouse ALAS; 2. Marker

### 2.4 培养基 pH 对重组 ALAS 活性的影响

菌体培养过程中,培养基 pH 会升高,不同初始 pH 对 ALAS 活性的影响分析结果 (Table 6) 表明,培养基 pH 6.5 时,ALAS 活性最高 ( $P < 0.05$ ),高于或低于 6.5,ALAS 活性都会下降.

**Table 6** Effect of medium pH on ALAS activity in *E. coli* DH1 containing pALA2

Medium pH		ALAS activity /mmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>
Beginning	End	
5.0	5.20	11.33 ±0.69
5.5	5.71	17.24 ±1.02
6.0	6.49	33.91 ±1.30
6.5	7.12	53.54 ±1.15
7.0	7.51	32.58 ±0.37
7.5	7.80	17.05 ±1.42
8.0	7.81	11.35 ±0.85

### 3 讨论

本实验将 *R. sphaeroides hemA* 导入 *E. coli*,分析了影响 *hemA* 表达及重组 ALAS 活性的因子.野生型细胞中 ALA 合成受严格调控,因为在四吡咯合成过程中只需很少量的 ALA,且不能分泌到细胞外中,因而不易分离得到.可见利用野生型菌株获取大量 ALA 非理想途径.将 *R. sphaeroides hemA* 导入 *E. coli* DH1 后,ALA 合成可利用 C5 途径,但获得 ALAS 的最大活性, *hemA* 表达还需 *E. coli* DH1 *lac* 启动子的诱导.但是 *lac* 启动子的常规诱导物 IPTG 并不能提高重组 ALAS 的活性.

由于重组质粒 pALA2 中, *R. sphaeroides hemA* 启动序列正常,其转化的 *E. coli* DH1 在琥珀酸培养基上生长时,ALAS 活性显著提高 ( $P < 0.05$ ),当启动序列发生缺失,如 pALA7,琥珀酸培养基上和 LB 上的 ALAS 活性相近,这说明启动序列调节信号会影响重组 *E. coli* DH1 的 ALAS 活性.

宿主菌对重组 ALAS 活性影响,主要是不同菌株 ALA 转化为四吡咯的效率不同,ALAS 可被血红素强烈抑制,大量产生的四吡咯不仅使 ALA 由于转化为四吡咯而合成量下降,而且由于 ALAS 活性抑制,ALA 合成速率也下降,除 BL21 外,其它菌株均为 *E. coli* K12 的随机突变衍生菌株,可能是突变过程改变了细胞内四吡咯的合成途径。

此外碳源、前体物、培养基 pH 对 ALAS 活性也有显著影响。这些因子可能会导致质粒拷贝数的改变。Klotsky 曾报道质粒拷贝数取决于生长底物<sup>[13]</sup>。以 4C 二羧酸为 C 源可提高重组 ALAS 活性,以乳酸或以 D-葡萄糖为碳源均会抑制 ALAS 活性,说明 *R. sphaeroides* hemA 本身携带的调控序列未能调节 *E. coli* DH1 的 ALAS 表达。Chen<sup>[6]</sup>报道,在 hemA 上游序列有转录调节因子 Fnr 和 Fixk 的结合位点。这些调节因子可适应通氧状况的变化,pALA2 转化的 *E. coli* DH1 的 ALAS 活性不受通气状况影响,可能 hemA 的此段序列发挥了作用。

本实验通过对 pALA2 转化的 *E. coli* DH1 的表达条件的调控,可使重组菌 ALA 合成量提高到 27.8 mmol/L,这是目前有关此类的报道中最高的。我们认为通过高水平静止酶体系可进一步提高 ALA 产量,另外,由于琥珀酸比 ALA 便宜 300 倍以上,以琥珀酸等廉价碳源,通过构建重组菌合成 ALA 是生物合成上很有前景的一条途径。

## 参考文献 (References)

- Lascelles J. Regulation of Pyrrole Synthesis. *The Photosynthetic Bacteria*. New York: Plenum Press. 1998,795 ~ 808
- 王俊卿,张肇铭. 5-氨基乙酰丙酸的光动力应用研究进展. 微生物学通报 (Wang Jun-Qing, Zhang Zhao-Ming. Development in photodynamic application of 5-aminolevulinic acid. *Microbiology*), 2004,31(3):136 ~ 140
- Fritsch C, Hmey B, Stahl W. preferential relative porphyrin enrichment in solar keratoses upon topical application. *J Photochem Photobiol B*, 1998,62: 218 ~ 222
- Novo M, Huttman G, Didden H. Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis. *J Photochem Photobiol B*, 1996,60: 143 ~ 149
- 王俊卿,张肇铭. 前体物、乙酰丙酸对 5-氨基乙酰丙酸合成的影响. 应用与环境生物学报 (Wang Jun-Qing, Zhang Zhao-Ming. Effect of precursors and levulinic acid on accumulation of 5-aminolevulinic acid. *Chin J Appl Environ Biol*), 2004,10:660 ~ 662
- Chen W, Russell Y, Murooka Y. 5-ALA synthesis in *Escherichia coli* requires expression of hemA. *J Bacteriol*, 1994,176: 2743 ~ 2746
- Li J M, Brathwaite S D, Cosloy S. 5-ALA synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1989,171: 2547 ~ 2552
- 王俊卿,张肇铭. 重组球形红细菌 5-氨基乙酰丙酸合酶同工酶 hemA, hemT 的特性. 中国生物化学与分子生物学报 (Wang Jun-Qing, Zhang Zhao-Ming. Characteristics of recombined *rhodobacter sphaeroides* 5-aminolevulinic acid synthase isoenzymes hemA and hemT. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2005,21(3):369 ~ 375
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- Burnham B F. 5-aminolevulinic acid synthase (*Rhodobacter sphaeroides*). *Methods Enzymol*, 1990,17A: 195 ~ 204
- Grayeb J, Kimura M, Takahara H. Secretion cloning vector in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 1994,33: 2437 ~ 3442
- Ferreira G, Dailey H A. Expression of mammalian 5-aminolevulinic acid synthase in over production, purification and characterization. *J Biol Chem*, 2002,277: 1720 ~ 1723
- Klotsky R A, Schwarts I. Measurement of cat expression from growth-rate-regulated promoters employing lactamase activity as an indicator of plasmid copy number. *Gene*, 2003,61:141 ~ 146