

透明颤菌血红蛋白研究现状及其在中药中的应用展望

胡之璧

(上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

[关键词] 透明颤菌属; 血红蛋白类; 基因; 转基因

[中图分类号] R915 .1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2005)05-0337-05

Current research status of *Vitreoscilla* hemoglobin and the prospective application in traditional Chinese medicine

HU Zhi-Bi

(Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

KEY WORDS *Vitreoscilla*; hemoglobins; genes; transgenes

J Chin Integr Med, 2005, 3(5):337-341

氧传递直接或间接影响着需氧生物的初级代谢和次级代谢。在哺乳动物中,血红蛋白具有氧结合特性,过去曾认为这种氧结合蛋白只存在于哺乳动物中,近期发现,它几乎普遍存在于动物、植物和微生物中^[1]。透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb)是由透明颤菌属(*Vitreoscilla* sp. C1)中产生的一种可溶性血红蛋白,这种血红蛋白能在贫氧条件下被大量诱导合成,使透明颤菌在微氧条件下能够很好地生存。随着研究的深入,发现该基因的表达在转录水平上受氧浓度调控。因此在以溶氧为限制条件的生物反应器中,尤其是在大规模、高密度微生物发酵和动植物细胞培养解决供氧问题领域具有潜在的应用前景。

1 VHb 的结构及特性

透明颤菌是一种专性好氧的革兰氏阴性丝状菌,属于贝日阿托氏菌属(*Beggiatoe*),在沼泽、腐烂植物等贫氧的环境中生长旺盛。VHb 在透明颤菌中被发现,最初被认为是“细胞色素 o (cytochrome o, Cyo)”蛋白,具有末端氧化酶的性质^[2]。Cyo 在不同的环境条件下可呈现三种不同的状态,即氧化态、还原态、氧合态,并可以相互转化;其中还原态是生理活性态,而氧合态则是富氧条件下的表

现形式。它在 577、544 和 420 nm 处有最大吸收峰,若向溶液中鼓入 CO 气体,则可形成蛋白-CO 复合物,在 566、535 及 419 nm 处呈现特征吸收峰^[3]。但是随着 1983 年真正的 Cyo 的分离和确定^[4],实验表明该蛋白在光谱学和氧结合动力学性质上与氧合肌红、血红蛋白相似^[3, 5]。1986 年, Wakabayashi 等^[6]结合蛋白质初级结构、光谱性质、氧结合动力学确定了该蛋白的结构,并将该蛋白正式命名为透明颤菌血红蛋白。

VHb 为同型二聚体,带有两个相对分子量为 15 775 的亚基,每个亚基含有 146 个氨基酸残基和两个 b 型血红素^[7]。完整的 VHb 是可溶性的,但是脱去血红素辅基便不可溶。序列分析表明, VHb 与其它真核生物蛋白氨基酸有明显的同源性,其中与黄羽扇豆血红蛋白(*Yellow lupin LegHb*)的同源性最高,达到 24%^[8]。真核生物的血红蛋白形成 8 个螺旋区(A、B、C、D、E、F、G 和 H),而 VHb 每个亚基形成 6 个螺旋区(A、B、E、F、G 和 H)。X 射线晶体学表明 VHb 在近端和远端有独特的血红素端囊^[7],初步认为受 E 螺旋和 F 螺旋的干扰所致,通过氢键和 TyrB10、GlnE7、ProE8 及 LysE11 四个残基形成此结构。大多数种类的血红蛋白都有一个末端的 His(E7)残基,该 His 残基通常通过氢

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30100237); 国家中医药管理局基金资助项目(No. 02-03ZQ01, No. 02-03ZQ02); 上海市卫生局资助项目(No. 2002Q05)

[作者简介] 胡之璧(1934-), 女, 研究员, 中国工程院院士。

Correspondence to: Prof. HU Zhi-Bi. E-mail: huzhibi@hotmail.com

键与氧结合。而 VHb 端囊的 E7 位置为 Gln 残基。定点突变表明, GlnE7 His 突变对 VHb 立体结构影响很大, 野生型 VHb 解离常数比 GlnE7 His 突变型蛋白大很多, 因此, VHb 与被束缚的氧亲和力小, 从而使氧的传递速度更快^[9, 10], 这与晶体学研究结果一致。而在 N 端存在某些结构差异, 少了 α -螺旋, 这段序列曾被认为可能是前导肽, 影响 VHb 的分布, 使活性 VHb 主要分布在细胞周质^[11]。近期用电子显微镜对 VHb 在透明颤菌和大肠杆菌中分布的分析结果表明, VHb 主要分布在细胞质中而不是细胞周质, 作者还认为细胞周质中的 VHb 可能是 VHb 过量表达而被挤出的结果^[12]。

2 VHb 基因的克隆、表达与调控

20 世纪 80 年代中期以前, 学者们一直认为, 可溶性 Cyo 在细胞呼吸中作为一种终端氧化酶而起作用。1986 年, Orii 等^[5]对 VHb 与 O₂ 及 VHb 与 CO 结合的动力学进行了讨论, 指出 VHb 可能是作为 O₂ 载体和储存物而起作用的。1988 年, Dikshit 等^[13]根据已报道的 VHb 氨基酸序列合成探针, 与透明颤菌基因组 DNA 进行杂交, 在透明颤菌血红蛋白基因 (*Vitreoscilla hemoglobin gene, vgb*) 可能位区, 得到了含有 *vgb* 基因的 1.4 kb 的 DNA 片段, 且此 *vgb* 基因携带内启动子而不受载体启动子的控制; 同年, Khosla 等^[14]也用类似方法克隆了 *vgb* 基因, 在 *vgb* 重组大肠杆菌中表达时, 同样得出了 *vgb* 基因是以自身启动子启动表达的结论。他们还测定了 *vgb* 基因的核苷酸序列, 结果与 Wakabayashi^[6]报道的 VHb 氨基酸序列十分吻合。

将 *vgb* 基因转入大肠杆菌中表达, VHb 的量与环境中的氧含量有关, *vgb* 基因启动子在微氧条件下(小于 2% 大气饱和度)被诱导^[15]。将 *vgb* 基因启动子与氯霉素乙酰转移酶和儿茶酚双加氧酶等报告基因融合并转入大肠杆菌中表达, 发现在低氧条件(5%)下的报告基因产物比高氧条件(20%)下多 5~7 倍, 说明 *vgb* 基因启动子的活性受氧浓度的调控。当去掉启动子的 *vgb* 基因和大肠杆菌 *tac* 启动子融合后, 其表达不再受氧调控而异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside, IPTG)可以增加表达。*vgb* 基因在大肠杆菌和透明颤菌中表达条件相似, 都随溶氧水平下降而表达水平升高^[10]。光谱分析表明, 重组大肠杆菌表达的 VHb 的存在状态与透明颤菌中表达的 VHb 的存在状态相一致: 在富氧条件下呈氧合态, 而缺氧条件下呈现生理活性的还原态^[16]。溶氧并非直接作用于 *vgb* 基因启动子上, 而是由铁氧还蛋白-NADP 还原酶(ferredoxin-

NADP reductase, FNR) 或环腺苷酸受体蛋白质(cyclic AMP receptor protein, CRP)相关蛋白作为转录激活因子正向调控 *vgb* 基因表达。其中 *vgb* 基因启动子区域同大肠杆菌 *lac* 启动子 CRP 结合位点有极高的同源性。FNR 蛋白是细菌应答厌氧环境的一个调控子, 属于螺旋-转折-螺旋结构的 DNA 序列的结合蛋白, 并且富含半胱氨酸, 形成半胱氨酸口袋结构, 能与 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 参与细胞对氧的应答。FNR 调控系统是通过 FNR 蛋白在限氧条件下对厌氧基因的激活来应答环境信号的。在缺乏 *fnr* 的大肠杆菌突变体中, *vgb* 启动子在贫氧条件表达产物减少了一半, 这表明在调节 *vgb* 启动子活性中存在着 FNR 或 FNR 样蛋白质^[17]。另外 Khosla 等^[18]认为培养基中的氮源(例如酵母提取物)能抑制 *vgb* 启动子的表达, 具体机制目前仍不清楚。

3 VHb 的生理功能

目前, 透明颤菌血红蛋白使细菌在低氧条件下能够很好生存的生理功能尚不完全清楚, 各国科学家对 *vgb* 基因进行了细胞定位、表达调控以及该血红蛋白对能量代谢和呼吸链影响等多方面的研究。Kallio 等提出了两种假设: 易化扩散假说和氧化还原效应假说。易化扩散假说认为 VHb 与氧结合增加了氧在细胞周质空间的传递量。Khosla 和 Bailey 发现大肠杆菌中表达的 VHb 有 35%~45% 分布在周质空间。VHb 蛋白 N 端功能域具有弱输送前导肽的功能, 从而使 VHb 分布在细胞周质空间和细胞质内, 支持了易化扩散假说。氧化还原效应假说认为氧合透明颤菌血红蛋白可能影响了细胞内一些关键的氧化还原敏感分子的活性, 可能是呼吸链上的某个关键酶, 该影响可引起能量代谢效率的提高^[14]。

吴奕等^[19]提出了另一种假说即末端电子受体假说, 认为氧合态 VHb 作为末端电子受体参与大肠杆菌呼吸链末端氧化过程, 他们还依据这一假说定量研究了 VHb 对大肠杆菌能量代谢的影响。研究表明, VHb 在微氧代谢状态时的表达大大提高了呼吸链末端电子受体量, 促进电子传递过程转向能量代谢效率较高的 Cyo 途径, 从而使细胞适应贫氧的生活环境。

VHb 对生长的促进作用在有细胞色素 o 而无细胞色素 d 的突变体中比在有细胞色素 d 而无细胞色素 o 的突变体中更加显著。VHb 增加了这两种末端氧化酶(尤其是细胞色素 o)的含量并提高它们的活力^[20]。低氧条件下, VHb 的存在使更多的葡萄糖转向磷酸戊糖途径代谢, 而向三羧酸循环的碳

源减少,总的 ATP 产量加大,而底物水平磷酸化产生的 ATP 减少^[21]。VHb 还增加大肠杆菌吸收氧的速率,但细胞中的 NAD(P)H 含量减小。说明 VHb 提高了电子传递链的周转率^[22]。

VHb 在大肠杆菌中的表达明显促进了微氧条件下细胞的生长状况和蛋白质合成的能力。Khosla 等^[23] 分析了 VHb 表达前后菌体蛋白的组成,蛋白质的种类没有改变;从产生效应的时间来看 VHb 的功能是由其本身所引起,而不是细胞在基因水平的二次应答。

尽管 VHb 的作用机制还需要进一步研究,但用光谱分析方法发现 VHb 蛋白可与氧结合成稳定的氧合态,氧合态的形成是 VHb 发挥生理功能的必需条件。多数证据显示,以这种氧合态的形式介入细胞与氧的代谢途径,最终影响某些基因的表达。

4 VHb 在中药中的应用展望

当前,随着人们医疗保健意识的增强,中药产业显现出巨大的优势,但同时我们看到,传统中药材的生产也面临着一些挑战,由于长期盲目开采致使生态环境遭到破坏,许多野生植物濒临灭绝,一些特殊生态环境下的植物引种困难,能够引种的栽培中药材因为各种因素影响,人工栽培药材品质下降等问题使中药材质量产量得不到保障。另外,天然药材中药用价值高的有效成分(例如紫杉醇、长春新碱等)含量往往很低,不能够满足市场需求,采用化学合成的方法又会遇到工艺流程复杂、成本高、合成过程中伴随着副产品及造成环境污染等问题。随着生物技术广泛应用到中药栽培中,使这种局面得到了些许改善。利用植物细胞培养及毛状根培养技术具有人工栽培和野生采集所不具备的优点:占地少,周期短,不受地区和季节的限制,便于开展大规模的生产;无污染,无重金属积累,产物疏松,对于进行有用成分的生产 and 提取尤其便利。利用细胞培养生产活性成分较为常用,20 世纪 70 年代日本利用细胞培养生产人参皂苷,现已采用大容量发酵罐,产出的皂苷组分及药理活性与亲本植物基本相同,皂苷含量为亲本植株的 3 倍以上^[24]。利用毛状根培养进行活性成分生产,增殖速度快,合成能力强,产物稳定转化后遗传性能较稳定,并利于进行高产株系选择,如用黄芪毛状根生产黄芪甲苷等^[25]。据不完全统计,药用植物毛状根培养已在 26 个科 100 多种植物中获得成功。目前,植物细胞和毛状根大规模培养所采用的发酵罐多为微生物发酵所采用的平叶式生物反应系统或气升式生物反应器。但由于植物细胞本身所具有的一些特殊性,如细胞容易聚集、细胞分

化、细胞的脆弱性、代谢途径和代谢产物形成与细胞生长关系的复杂性,使得植物细胞大规模培养难以达到最佳效果。

植物细胞及毛状根大规模培养存在着的制约因素限制了植物细胞次生代谢物合成能力的提高,甚至某些时候合成能力丧失。可见选择理想的生物反应器对植物细胞和毛状根大量培养很重要,需要考虑主要影响因素,如氧传输、营养物质混合性能和剪切力强度。增强反应器的混合性能,如增加通气和转速可以促进物质在反应器内传输,但较强的剪切力会对植物细胞产生伤害。因此反应器的设计和改进应综合考虑这几方面的因素,力求反应器的混合性能良好的同时,使系统的剪切环境降低。但是机械方面的改进往往成本高且达不到理想的效果,而 VHb 蛋白使专性好氧菌透明颤菌在限氧条件下生存得很好,为中药材细胞和毛状根培养解决供氧不足问题提供了一条新途径。

由于 *vgb* 基因调控机制在专性和兼性耗氧菌中十分保守,它在多种微生物中都获得了表达,如假单胞杆菌、链霉菌、霉菌、欧文氏菌等。VHb 在大肠杆菌中应用最早,也比较成熟。将 *vgb* 基因克隆到含 α -淀粉酶的基因工程大肠杆菌, VHb 的表达提高细胞密度,使酶产量提高数倍^[26]。1999 年,Nilsson 等^[27] 得到了 α -淀粉酶更高的含 *vgb* 基因的菌株。*vgb* 基因不仅能在大肠杆菌中进行表达,在其他菌种中也有很好的表现。VHb 在链霉菌中的表达可促进菌体生长^[28]; VHb 还能有效提高头孢菌素 C 在霉菌中的产量^[29]。Patel 等^[30] 在假单胞杆菌 (*Burkholderia sp.*) 中的研究也证实了 *vgb* 基因的表达对蛋白产量起正向作用。文莹等^[31] 将 *vgb* 基因转入阿维链霉菌 (*S. avermitilis*) 和肉桂地链霉菌 (*S. cinnamonensis*) 中,提高了抗生素的产量。Bhave 等^[32] 证实了 VHb 在酵母菌 (*Y. lipolytica*) 中的表达使细胞具有更高的生长率,加强了氧呼吸效率,并提高了呼吸效能。VHb 在转基因动物中的报道相对较少,有实验证明 *vgb* 基因转入已表达人组织型纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, tPA) 基因的中国仓鼠卵巢细胞中, tPA 的产量提高 40% ~ 100%^[33]。

1997 年, Holmberg 等^[34] 根据 VHb 在以上微生物及动物细胞中的表达均提高细胞生长、蛋白质合成以及代谢产物合成的结果,构建了含有 *vgb* 基因的表达载体,通过根癌农杆菌 LBA4404 介导将 *vgb* 基因导入烟草 (*Nicotiana tabacum*)。用 RT-PCR 证明了转 *vgb* 基因烟草表达的 mRNA 相当于理论大小 460 bp; Western blotting 发现分子

量为 15.8 kDa 的蛋白与 VHb 抗血清反应,而野生对照植株没有发现这种蛋白。与野生对照植株相比,VHb 明显地促进了植株生长,两个转基因株系(He3 和 He4)第一代种子萌发为 3~4 d,而对照种子为 6~8 d;35 d 后转基因植株较对照平均干重增加了 80%~100%;并且转基因植株从种子萌发到植株开花较对照缩短了 3~5 d;叶绿素含量较对照增加了 30%~40%,总叶绿素和叶绿素 A 只在株系 He4 与对照区别明显,而叶绿素 B 含量在两个株系 He3、He4 中都明显比对照增高;He3 中尼古丁的含量也增加 34%,但是新烟碱的含量却比对照减少了 80%。通过引入编码细菌血红蛋白的单个基因使转基因植物较早发芽和增强植物生长,这与增加细胞中氧浓度的假设相一致^[35]。

2002 年,鉴于植物细胞培养具有潜在的经济价值,植物细胞易受到培养液剪切力的损伤以及氧的传递效率低等障碍因素阻碍了植物细胞的大规模培养,而 VHb 在大肠杆菌中的表达能够增加微氧条件下细胞浓度和重组产物产量,Farres 等^[36]将转 *vgb* 基因的烟草植株诱导培养烟草悬浮细胞。实验结果表明:继代 2 年以上的烟草悬浮细胞仍能稳定地表达 VHb,与 CO 结合在 421、437 nm 处有特征性吸收峰,没有发现基因沉默现象;缩短了滞停期,增强了细胞生长;而且测定细胞内代谢产物乳酸盐发现,转基因烟草细胞中的浓度远远低于非转基因烟草细胞,认为细胞浓度越高乳酸盐的含量越低。近期研究还发现:VHb 能够在贫氧条件下保护细胞免受 NO 胁迫^[37]。转 *vgb* 基因植物能够提高抗涝能力及增加水培植物生长^[38]。熊爱生等^[39]利用植物偏爱密码子全合成的 *vgb* 基因,在大肠杆菌中明显地表现了功能。

Wilhelmson 等^[40]将 *vgb* 基因转入黑莨菪 (*Hyoscyamus muticus*)毛状根中,经同期培养,转基因毛状根干重平均较对照增加了 18%;转基因毛状根中莨菪碱平均含量比对照高 22%,单位体积中转基因毛状根中莨菪碱含量平均较对照高 43%;而且 3 年期间转基因毛状根株系和非转基因毛状根株系干重产量和莨菪碱含量无明显变化。

近年来,我们实验室对 VHb 在传统中药研究中的应用进行了探索,成功地将 *vgb* 基因转入黄芪毛状根,实验证明可使黄芪甲苷含量高出非转基因黄芪毛状根 5~6 倍,高出山西膜荚黄芪药材约 10 倍,而毛蕊异黄酮含量与非转基因黄芪毛状根比较,几乎检测不到,说明 *vgb* 基因转入,对黄芪毛状根某些活性成分的生物合成产生了明显的影响。

综上所述,*vgb* 基因在各种细胞中表达,不同程

度地促进了细胞生长、蛋白质的合成、次生代谢产物的生成,并提高了利用能量的效率。VHb 可在低氧条件下加速氧的传递,从 VHb 在植物尤其在药用植物中的应用结果看,VHb 可以改善植物细胞的生长和增加某些有效成分的含量,展示了 *vgb* 基因应用到中药中具有潜在的美好前景。

[参考文献]

- 1 Hardison R. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression[J]. *Exp Biol*, 1998, 201(Pt 8): 1099-1117.
- 2 Tyree B, Webster DA. The binding of cyanide and carbon monoxide to cytochrome o purified from *Vitreoscilla*. Evidence for subunit interaction in the reduced protein[J]. *J Biol Chem*, 1978, 253(19): 6988-6991.
- 3 Choc MG, Webster DA, Caughey WS. Oxygenated intermediate and carbonyl species of cytochrome o (*Vitreoscilla*) characterization by infrared spectroscopy [J]. *J Biol Chem*, 1982, 257(2): 865-869.
- 4 DeMaio RA, Webster DA, Chance B. Spectral evidence for the existence of a second cytochrome o in whole cells of *Vitreoscilla*[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258(22): 13768-13771.
- 5 Orii Y, Webster DA. Photodissociation of oxygenated cytochrome o(s) (*Vitreoscilla*) and kinetic studies of re-association[J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(8): 3544-3547.
- 6 Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA. Primary sequence of a dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*[J]. *Nature*, 1986, 322(6078): 481-483.
- 7 Tarricone C, Galizzi A, Coda A, *et al*. Unusual structure of the oxygen-binding site in the dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* sp [J]. *Structure*, 1997, 5(4): 497-507.
- 8 Kuhse J, Pfler A. Conserved sequence motifs in the untranslated 3' end of leghemoglobin transcripts isolated from broadbean nodules [J]. *Plant Sci*, 1987, 49: 137-143.
- 9 Dikshit KL, Orii Y, Navani N, *et al*. Site-directed mutagenesis of bacterial hemoglobin: the role of glutamine (E7) in oxygen-binding in the distal heme pocket [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 349(1): 161-166.
- 10 Verma S, Patel S, Kaur R, *et al*. Mutational study of the bacterial hemoglobin distal heme pocket [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(2): 290-297.
- 11 Khosla C, Bailey JE. Evidence for partial export of *Vitreoscilla* hemoglobin into the periplasmic space in *Escherichia coli*. Implications for protein function [J]. *J Mol Biol*, 1989, 210(1): 79-89.
- 12 Ramandeep, Hwang KW, Raje M, *et al*. *Vitreoscilla* hemoglobin. Intracellular localization and binding to

- membranes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 24781-24789.
- 13 Dikshit KL, Webster DA. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1988, 70(2): 377-386.
- 14 Khosla C, Bailey JE. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*[J]. *Mol Gene Genet*, 1988, 214(1): 158-161.
- 15 Khosla C, Bailey JE. Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(11): 5995-6004.
- 16 Dikshit KL, Spaulding D, Braun A, *et al*. Oxygen inhibition of globin gene transcription and bacterial haemoglobin synthesis in *Vitreoscilla* [J]. *J Gen Microbiol*, 1989, 135(10): 2601-2609.
- 17 Tsai PS, Kallio PT, Bailey JE. Fnr, a global transcriptional regulator of *Escherichia coli*, activates the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) promoter and intracellular VHb expression increases cytochrome d promoter activity[J]. *Biotechnol Prog*, 1995, 11(3): 288-293.
- 18 Khosla C, Curtis JE, Bydalek P, *et al*. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* using an oxygen-responsive promoter [J]. *Biotechnology (NY)*, 1990, 8(6): 554-558.
- 19 吴奕, 杨胜利. 透明颤菌血红蛋白基因调控与功能的研究[J]. *生物工程学报*, 1997, 13(1): 1-5.
- 20 Tsai PS, Nageli M, Bailey JE. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome o[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 79(5): 558-567.
- 21 Tsai PS, Hatzimanikatis V, Bailey JE. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 49: 139-150.
- 22 Tsai PS, Rao G, Bailey JE. Improvement of *Escherichia coli* microaerobic oxygen metabolism by *Vitreoscilla* hemoglobin: new insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 47: 347-354.
- 23 Khosla C, Curtis JE, DeModena J, *et al*. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology*, 1990, 8(9): 849-853.
- 24 孙禄. 日本药用植物生物技术的研究进展[J]. *特产研究*, 1998, 20(3): 43-46.
- 25 郑志仁, 彭佑松, 刘涤, 等. 黄芪毛状根的大量培养[J]. *植物生理学通讯*, 1997, 33(2): 133-134.
- 26 Kallio PT, Bailey JE. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) enhances total protein secretion and improves the production of alpha-amylase and neutral protease in *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnol Prog*, 1996, 12(1): 31-39.
- 27 Nilsson M, Kallio PT, Bailey JE, *et al*. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli* enhances ribosome and tRNA levels: a flow field-flow fractionation study[J]. *Biotechnol Prog*, 1999, 15(2): 158-163.
- 28 Magnolo S K, Leenutaphong D L, Demodena J A, *et al*. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin[J]. *Biotechnology (N Y)*, 1991, 9(5): 473-476.
- 29 DeModena JA, Gutierrez S, Velasco J. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin[J]. *Biotechnology (N Y)*, 1993, 11(8): 926-929.
- 30 Patel SM, Stark BC, Hwang KW, *et al*. Cloning and expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Burkholderia sp.* strain DNT for enhancement of 2,4-dinitrotoluene degradation[J]. *Biotechnol Prog*, 2000, 16(1): 26-30.
- 31 文莹, 宋渊, 李季伦. 透明颤菌血红蛋白在肉桂地链霉菌中的表达对其细胞生长及抗生素合成的影响[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(1): 24-28.
- 32 Bhave SL, Chattoo BB. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves growth and levels of extracellular enzyme in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 84(6): 658-666.
- 33 Pendse GJ, Bailey JE. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin expression on growth and specific tissue plasminogen-activator productivity in recombinant Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44(11): 1367-1370.
- 34 Holmberg N, Liljus G, Bailey JE, *et al*. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(3): 244-247.
- 35 Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering [J]. *Science*, 1991, 252(5013): 1668-1675.
- 36 Farres J, Kallio PT. Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing *Vitreoscilla* hemoglobin [J]. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(2): 229-233.
- 37 Frey AD, Kallio PT. Nitric oxide detoxification—a new era for bacterial globins in biotechnology? [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(2): 69-73.
- 38 Li X, Peng RH, Fan HQ, *et al*. *Vitreoscilla* hemoglobin overexpression increases submergence tolerance in cabbage[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(10-11): 710-715.
- 39 熊爱生, 彭日荷, 陈建民, 等. 透明颤菌血红蛋白(VHb)基因合成及原核生物中的效应[J]. *上海农业学报*, 2000, 16(3): 19-24.
- 40 Wilhelmson A, Kallio PT, Oksman-Caldentey KM, *et al*. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin enhances growth of *Hyoscyamus muticus* hairy root cultures[J]. *Planta Med*, 2005, 71(1): 48-53.