

从透明颤菌血红蛋白谈到植物缺氧与转基因作物

焦瑞身*

(中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘 要 扼要介绍透明颤菌血红蛋白基因在多种微生物的表达、调节和生理功能,特别是在生物工程方面可能的应用。但最值得重视的是这一基因在烟草中的表达及其生理效应,它为我们提出一个重要的问题,就是植物是否缺氧,透明颤菌血红蛋白基因很可能是构建转基因作物的重要元件。

关键词 透明颤菌血红蛋白, 黄素血红蛋白, Vhb 转基因烟草

中图分类号 Q78 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)04-0381-06

血红蛋白在动物体内具有重要的生理功能,研究得最多,也是古老的蛋白家族之一。见 Poole 与 Hughes(2000 年)^[1] 的综述。多种植物也含有血红蛋白,如与根瘤细菌共生的豆科植物,与弗兰克氏菌共生的非豆科植物。最近 Taylor 等(1994)^[2] 从大麦中找到血红蛋白基因。微生物,包括细菌、真菌、酵母、原生动物,均含有血红蛋白,但有关研究进展很慢,部分原因是缺少明确的生理功能。例外的是根瘤共生组织中类细菌需氧的传递,豆血红蛋白起着主要作用。到目前为止,已知微生物血红蛋白可分为两大类,一类是单结构域的珠蛋白,如透明颤菌(*Vitreoscilla* C1),空肠弯曲杆菌, (*Campylobacter jejuni*), 共同念珠蓝细菌(*Nostoc commune*), 草履虫(*Paramecium caudatum*); 另一类是具有双结构域的珠蛋白,称为黄素血红蛋白(Flavo-hemoglobin)。本文主要介绍透明颤菌血红蛋白(Vhb),在多种异源宿主的表达,以及具有生物工程应用价值的生理功能,特别是 Holmberg 等(1997)^[3] 报道的 Vhb 基因在烟草中的表达,是提高植物供氧的转基因作物的先导工作。

1 透明颤菌血红蛋白(Vhb)在异源宿主的表达与生理功能

1.1 透明颤菌血红色蛋白在多种宿主中的表达

多年来,人们认为血红蛋白仅存在于真核细胞,一直到 Wakabayashi 等^[4](1986)从专性好氧透明颤菌找到第一个细菌血红蛋白(Vhb),才引起对细菌血红蛋白的注意。这一细菌常存在于低氧环境,如富含有机物的死水池塘。在供氧量条件下,细胞质中血红蛋白含量可增加 20~40 倍,由 Vhb 促进扩散进入细胞内的氧,促进菌体生长。美国伊利诺理工大学 Weber, 与瑞士苏黎世生物技术研究所 Bailey 两个实验

室对 Vhb 研究报道最多。后者曾于上一世纪 90 年代倡导“代谢工程”,受到同行们的重视,可惜未尽其天年,在 2002 年去世。

自从上述两个实验室开始 Vhb 基因研究以来,这一基因已在多种细菌、酵母、动物细胞中克隆和表达。Vhb 对菌体生长、蛋白合成、以及代谢产物的影响概括在表 1 和表 2 中。

如表 1 所示,Vhb 在不同宿主菌表达后,菌体生长和蛋白合成均有提高,代谢产物如酶的合成和芳香环的降解也都加快。次生代谢如抗生素合成的促进,尤为显著,特汇总在表 2。

表 2 中所列试验大都在摇瓶中进行,唯有红霉素是采用工业用菌株在小罐分批补料进行,结果更接近于实际生产。Minas 等(1998)^[5]对 Vhb 促进红色糖多孢菌发酵进行了细致的研究,获得有价值的结果。在 10~15L 小罐分批补料发酵,红霉素的产量,原种为 4.4g/L,比产量为 1.0g/g 菌体,携带 Vhb 基因的工程菌株产量为 7.4g/L,比产量为 2.3g/g 菌体。工程菌从 24 到 144h 以同一高速度合成,菌体量低于对照菌株约 1/3,说明前者合成抗生素的效率远高于后者。显然,Vhb 提高红霉素合成的作用是巨大的,其机制值得重视。Vhb 除了提高工程菌呼吸链供氧,促进末端氧化酶活力之外,如载有 Vhb 基因 *E. coli* 工程菌株(表 1)所显示,在红色糖多孢菌另一个作用部分可能在细胞色素 P450 系统。前人已有报道^[15,16] 红霉素生物合成涉及由两个基因(*ery F₁* 和 *ery K*)编码的细胞色素 P450 单加氧酶,可能 Vhb 与单加氧酶有直接联系。鉴于多种抗生素分子具有羟基,细胞色素 P450 参与合成是极有可能的,因而 Vhb 在抗生素产生菌的表达,值得进一步重视。

表 1 透明颤菌血红蛋白(VHb)在不同宿主的表达及对代谢的影响

Table 1 *Vitreoscilla hemoglobin(VHb)* has been cloned and expressed in a variety of organisms used for production of primary and secondary metabolites and cloned proteins

Organism	Product or activity	Effect of VHb
<i>Escherichia coli</i>		
JM101 pRED2	Total cell protein	2.1-fold increase
Gro21 pTCAT	Total cell protein	30% increase
W3110 pKTV1	Total cell protein	2.2-fold increase
Gro22 pTCAT	Chloramphenicol Acetyltransferase(CAT) activity	80% increase
Gro21 pGE245	β -Galactosidase activity	40% increase
JM103 pMK79	α -Amylase activity	3.3-fold increase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
B-771 pSC160	Viable cell number	11% increase
<i>Xanthomonas maltophilia</i>		
XM pSC160	Viable cell number	15% increase
<i>Bacillus subtilis</i>		
1012M15 pMKV6	Neutral protease activity	30% increase
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
13287 pFS1	L-Lysine titer	30% increase
<i>Streptomyces lividans</i>		
TK64 pWLD5	Final cell density	50% increase
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
SEY2101 pEX-2	Final cell density	3-fold increase
Chinese hamster ovary (CHO) cells		
ATCC9606 pMSG-VHb	Tissue plasminogen activator production	40% ~ 100% increase
<i>Serratia marcescens</i> ^[6]	Alterations in fermentation pathways	decrease acetoin by 15 times and 2,3-butanediol by 3 ~ 4 times
<i>Burkholderia</i> sp. ^[7]	Cell mass , respiration degradation of 2,4-dinitrotoluene	Cell mass and respiration increased twice , degradation accelerated
<i>Escherichia coli</i> ^[8] encoding two <i>thb</i> genes	Cell mass , alteration in ribosome and tRNA levels	16% increase in cell mass , biosynthesis doubled
<i>Escherichia coli</i> ^[9]	Cell growth and poly(β -hydroxybutyrate) synthesis	Cell growth increased , PHB synthesis increased 3 times

表 2 透明颤菌血红蛋白(VHb)在不同宿主表达及对抗生素合成的影响

Table 2 *Vitreoscilla hemoglobin(VHb)* has been cloned and expressed in a variety of organisms used for production of antibiotics

Organism	Product or activity	Effect of VHb
<i>Streptomyces coelicolor</i> ^[10] M145 pWLD10	Actinorhodin production	10-fold increase
<i>Acremonium chrysogenum</i> ^[11] C10 pULXTR1	Cephalosporin production	3.2-fold increase , highest yield 4g/L
<i>St. rimosus</i> ^[5]	Oxytetracycline production	2.2-fold increase
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> ^[12] industrial strain VHb integrated in chromosome	Erythromycin production	Increase by 70%
<i>St. aureofaciens</i> ^[13]	Oxytetracycline production	Increase by 11.4%
<i>St. cinnamomensis</i> ^[14]	Monensin production	Cell growth increased by 6.3% ~ 10% , monensin by 10.7% ~ 27.9%

1.2 透明颤菌血红蛋白(VHb)在 *E. coli* 工程菌的作用机制

在氧供应不足条件下, VHb 的表达对 *E. coli* 细胞的生理影响, Tsai 等进行了比较详细的报道^[17, 18]。于葡萄糖分批补料培养, IPTG 诱导 VHb 浓度的增加, 菌体直线上升, 达到对照菌株的 2.7 倍。在生长阶段的发酵产物、乙酸、乙醇、甲酸、乳酸和琥珀酸的比分泌速度分别下降 25%、49%、68%、72% 和 50% 指明菌体趋向有氧型代谢。代谢流量分析发现表达 VHb 细胞中, 大部分的葡萄糖利用是通过戊糖磷酸途径, 仅小部分是经过三羧酸循环, 从而有更多的 NAD(P)H 和芳香氨基酸前体产出, 有助于菌体生长。

对 VHb 蛋白提高宿主细胞呼吸、氧化型代谢产物等效应的机制, Bailey 实验室进行了多次报道。Tsai 等^[18]的工作, 证明 VHb 在 *E. coli* 胞内表达, 改变微氧条件下菌体代谢是由于提高细胞色素 *o* 的浓度和比活力。Park 等^[19]的工作明确 VHb 与细胞色素 *bo*-泛醌一氧化酶的结合部位, 对 VHb 促进末端氧化酶作用机制提供了一个模式。他们采用酵母双杂交系统, 检查细胞色素 *o*、*b* 亚基 (I, II, III, IV) 与 VHb 的结合部位。细胞色素 *bo* 来自 *E. coli* 和铜绿假单胞菌, VHb 对两菌生长均有促进作用。采用酵母双杂交系统进行测试, 证明只有亚基 I 与 VHb 有交互作用, 亚基 I 是还原氧成水的双核中心。这一结果支持 VHb 的功能是为末端氧化酶直接提供氧的建议。Park 等对 VHb 与细胞色素 *bo* 二泛醌氧化酶的相互作用机制如图 1 所示。

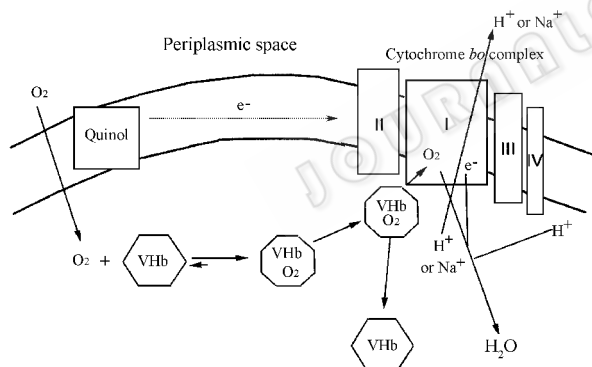


图 1 VHb 与细胞色素 *bo* 泛醌氧化酶亚基 I 相互作用可能的机制
Fig.1 Proposed mechanism of the interactions between VHb and subunit I of cytochrome *bo* ubiquinol oxidases

至此, 应补充说明是上述有关(VHb)的信息均来自透明颤菌菌株 C1, 同属的另一菌种透明颤菌(*V. stercoraria* DW)的血红蛋白基因和蛋白, 以及性状有巨大差别。后一菌种也是专性好氧菌, 存在于低氧环境中, 但其呼吸活力较低。Joshi 等(1998)^[10]对该菌的基因进行克隆和表达, 蛋白的氨基酸序列, 及三维结构等进行了详细研究。与 VHb 相比, 来自 DW 菌种的血红蛋白有 4 个氨基酸残基发生改变, 与血红素结合部位构象产生变化, 致使自身氧化速率很低。又缺失 N-端疏水区域, 主要存在于细胞质中, 而 VHb 则同时存在于细胞质与间区。DW 菌种血红蛋白基因在启动子区域缺少 FNR 还原调节盒, 其表达不受 FNR 调节。VHb 则受到 FNR 的正

调节, 见 Joshi 等^[21](1994) 和 Tsai 等(1995)^[22]的报道。

1.3 具有两个结构域的血红蛋白-黄素血红蛋白(FHP)

最近, 黄素血红蛋白的研究取得一些进展^[23-25], 其存在已在多种原核和真核细胞中发现, 如大肠杆菌、菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthem*)、枯草芽孢杆菌、假丝酵母(*Candida norvegensis*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、啤酒酵母, 以及一种兼性无机自养、氧化氢、革兰氏阴性细菌真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)。后一菌种, 如同透明颤菌一样, 存在于含氧稀薄的环境, 具呼吸型代谢, 但在无氧条件下可以硝酸盐或亚硝酸盐为末端电子受体而生长。限量氧的供应, 可使 FHP 含量提高约 20 倍之多, 正如透明颤菌的 VHb, 其合成受氧调节。

FHP 的 N-端血红蛋白结构与 VHb 有高度序列同源性(51%), 是一个单亚基多肽, 含 403 个氨基酸残基(44.8kD), 具有两个不同的蛋白组件, 即 N-端血红蛋白(FHP_g, 残基 1 至 147)结构域和 C-端氧还活性结构域, 具有 FAD 结合位点与 NAD(P)H 位点。不同结构域之间有 4~7 个氨基酸短肽相连。FHP 的三维结构已由 X-射线结晶法进行了解析。FHP 生理功能研究指明除具有 VHb 相同的促进氧的扩散利用之外, 另一功能是对 NO_x 亚硝基胁迫的保护作用。

为了明确黄素血红蛋白 C-端还原活性部位能否促进在微氧条件下宿主 VHb 的作用, Frey 等(2000)^[24]构建了融合蛋白, 即在 VHb 基因之后融合编码 NAD(P)H, FAD 或 NAD(P)H-FAD 还原活力的序列, 并检测在转基因宿主中的活力, 结果证明这些融合蛋白均能提高微氧条件下 *E. coli* 菌体生长, 比仅含 VHb 对照 *E. coli* 增加 50%~70%。Frey 等(2002)^[26]又采用 NMR 对 ¹³C-标记氨基酸代谢进行胞内碳素流量分析, 证明表达 FHP 和 FHP_g(FHP 的 N 端血红素蛋白结构域)的 *E. coli* 具有更高有氧代谢, 产生较低的厌氧产物, 如甲酸、乙酸和 D-乳酸。其葡萄糖利用则显著低于表达 VHb 或 VHb-还原活力的 *E. coli*, 指出 FHP 和 FHP_g 在生物工程上利用时具有降低成本的潜力。

2 VHb 血红蛋白在转基因烟草中的表达

氧是植物呼吸代谢所必需, 也是多种氧化反应的底物或辅助因子, 影响着植物的初级代谢和次级代谢, 如黄酶反应中增加氧浓度可大幅度提高反应速度。但要研究植株需氧过程须改变外界氧的浓度, 较大范围的实验是有困难的, 大家习以为常, 认为大气氧浓度不是植物生长的限制因素。根据上述 VHb 在细菌、酵母以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, 瑞典和瑞士科学家在烟草中表达 VHb(第一个转 VHb 植物)并研究其生理效应, 取得有价值的结果(Holmberg 等, 1997)^[3]。

首先, 他们证明转 VHb 基因烟草表达的 mRNA 相当于理论大小 460bp。从叶中提出的 VHb 蛋白, Mr 为 15.775kD, 能与 VHb 抗血清相反应, 而对照植株则无这种蛋白。所得两个品系(He3, He4)的第一代种子萌发比对照种子加快 3~4d, 5d 生长植株的干重如图 2 所示, 较对照提高 80%。100%。

从种子萌发到植株开花,转基因植株缩短 3~5d。更重要的是 Vhb 转基因植株的叶绿素含量比对照提高 30%~40%。叶绿素总含量与叶绿素 A 含量只在植株 He4 明显,而叶绿素 B 含量在两株中都是明显的,见图 3。对植株所含尼古丁和

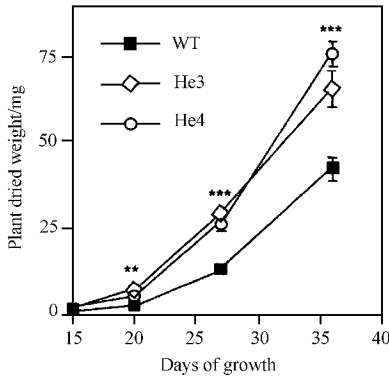


图 2 转基因植株 He3, He4 及野生对照烟草在土壤中生长比较
Fig.2 Tobacco growth rate in soil comparing the two transgenic lines, He3 and He4, with wild-type control

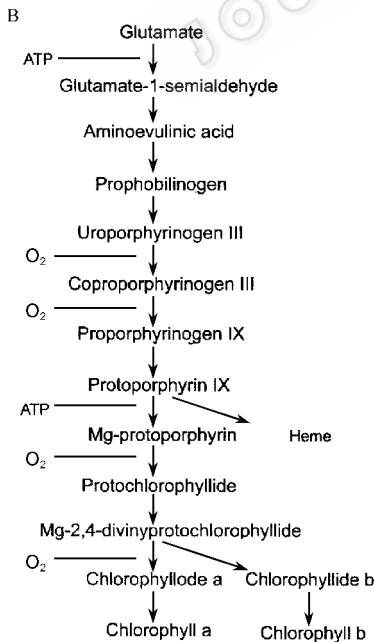
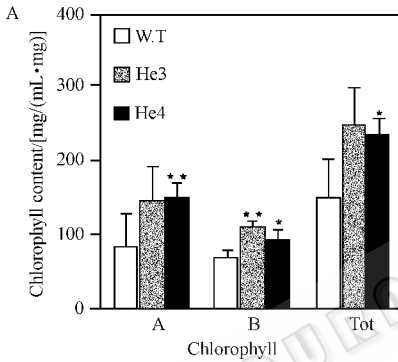


图 3 转基因植株与野生株叶绿素含量(A)植物叶绿素和血红素过程中需 O₂ 步骤

Fig.3 The total amount of chlorophyll and the amount of chlorophyll-A and -B, in the transgenic tobacco lines and a wild-type control (A). Oxygen dependent steps in chlorophyll and heme biosynthesis in plants (B)

毒藜碱含量进行了分析,结果见图 4。与野生株相比,转基因植株(He2)在尼古丁含量提高 34%,达到 108mg/g 干重。毒藜碱含量在转基因植株则低于野生株。图 4 表示两种植物碱合成反应,尼古丁碱合成酶是需氧反应,因而其合成由 Vhb 表达得到提高。毒藜碱的降低,可能是由于尼古丁合成途径加强,中间产物流向前者,从而使毒藜碱合成减少。

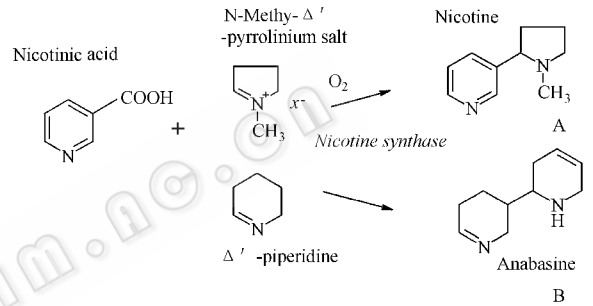
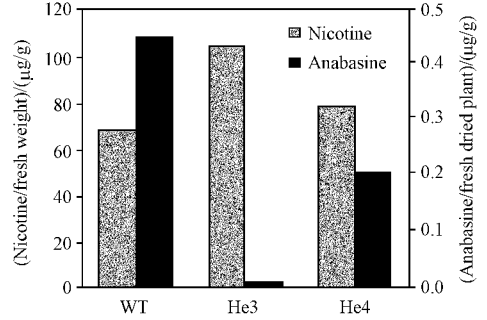


图 4 转基因植株 He3, He4 与野生株合成植物碱(A)尼古丁和毒藜碱合成的最后步骤,尼古丁合成依赖 O₂(B)

Fig.4 Nicotine and anabasine production in the transgenic lines, He3 and He4 and a wild-type line(A). The last steps in the *Nicotiana tabacum* biosynthesis of the secondary metabolites nicotine and anabasine(B)

Holmberg 等的结果,指出 Vhb 基因表达,提高转基因种子氧的供应,呼吸加速,降低发酵产物,从而提高萌发速度。萌发后植株的生长,植株所需能量的来源是光合作用,转基因植株叶绿素含量的提高,自然促进植株生长。叶绿素合成过程有需分子氧和 ATP 的步骤,这正是 Vhb 的生理功能的表现。上面 Vhb 在烟草的表现明显指出,对照烟草植株是在缺氧条件下生长。如将 Vhb 基因转入粮食作物,如水稻、小麦等,Vhb 提高供氧,可能导致和转基因烟草相似的生理功能,从而提高粮食的产量。看来,Vhb 为转基因作物的构建提供了一个重要的途径。

与 Holmberg 等报道转 Vhb 基因烟草相关的工作是 Ramirez 等²⁷(1999)的报道。携带 Vhb 基因的根瘤菌(*Rhizobium*)在菜豆中共生固氮,提高固氮活力和植株总氮量。这一结果指明 Vhb 的合成提高单独培养根瘤呼吸效率,也可能提高共生的类菌体的效率,导致提高了的共生固氮作用。

本文作者认为 Romirez 等的报道还不能算作真正的转基因植物,与 Holmberg 等报道的 Vhb 转基因烟草尚有区别,菜豆固氮量的增加,尚未涉及全植株生长、光合作用、代谢等。

3 结语

本文对透明颤菌血红蛋白(VHb)在微氧条件下 *E. coli* 等宿主中表达,促进菌体生长、蛋白合成、以及代谢产物进行了扼要综述。特别对抗生素合成的促进,证明 VHb 不仅可节约动力,更值得注意的是细胞色素 P-450 促进羟基化反应的可能。另外,VHb 在宿主菌促进氧的供应、呼吸链电子流量、ATP 酶活力、以及作用机制也都作了简略介绍。近年,具有双结构域的黄素血红蛋白(FHP)受到注意,初步认识的功能是与 VHb 相似的促进供氧,以及对亚硝基胁迫的保护作用。因为具有双结构域的黄素血红蛋白有潜在功能与应用前景,显然是值得继续深入的方面。

本文着重介绍 VHb 在烟草上表达充分显示 VHb 在转基因作物上的应用前景。祝愿 VHb 在我国转基因作物上发挥其功能,增产粮食。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Poole R K, Hughes M N. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Molecular Microbiol*, 2000, **36**(4): 775 - 783
- [2] Taylor E R, Nie X Z, MacGregor A W *et al.* A cereal hemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Molecular Biol*, 1994, **24**: 853 - 862
- [3] Holmberg N, Lilius G, Bailey J E *et al.* Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nature Biotechnology*, 1997, **15**: 244 - 247
- [4] Wakabayashi S, Matsubara H, Webster D A. Primary sequence of a dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*, 1986, **322**: 481 - 483
- [5] Bailey J E, Sburlati A, Hatzimanikatis V *et al.* Inverse metabolic engineering: A strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **52**: 109 - 121
- [6] Wei M L, Webster D A, Stark B C. Metabolic engineering of *Serratia marcescens* with the bacterial hemoegobin gene: Alterations in fermentation pathways. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **59**: 640 - 646
- [7] Patel S M, Stark B C, Hwang K W *et al.* Cloning and expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Burkholderia* sp. Strain DNT for enhancement of 2, 4-dinitro-toluene degradation. *Biotechnol Prog*, 2000, **16**: 26 - 30
- [8] Roos V, Andersson C I J, Arfvidsson *et al.* Expression of double *Vitreoscilla* hemoglobin enhanced growth and alters ribosome and tRNA levels in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2002, **18**: 652 - 656
- [9] Yu H, Shi Y, Zhang Y *et al.* Effects of *Vitreoscilla* hemoglobin biosynthesis in *Escherichia coli* on production of poly(β -hydroxybutyrate) and fermentative parameters. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **214**: 223 - 227
- [10] 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. *Biol Technology*, 1991, **9**: 473 - 476
- [11] DeModena J A, Gutierrez S, Velasco J *et al.* The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 926 - 929
- [12] Minas W, Brunker P, Kallio P T *et al.* Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**: 561 - 566
- [13] MENG (孟春), YE (叶勤), SHI X A (石贤爱) *et al.* Cloning and expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Streptomyces aureofaciens*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2002, **42**: 305 - 310
- [14] WEN Y (文莹), SONG Y (宋渊), LI J L (李季伦). The effects of *Vitreoscilla* hemoglobin expression on growth and antibiotic production in *Streptomyces cinnamonensis*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17**: 24 - 28
- [15] Stassi D, Donadio S, Staver M *et al.* Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the hydroxylation step in erythromycin biosynthesis. *J Bacteriol*, 1995, **175**: 182 - 189
- [16] Katz L, Donaldio S, Macrolides. In genetics and biochemistry of antibiotic production (Vining LS, stuttard C, Eds), Butterworth-Heinemann: Newton, MA, 1995, pp.385-420
- [17] Tsai P S, Hatzimanikatis V, Bailey J E. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **49**: 139 - 150
- [18] Tsai P S, Nageli M, Bailey J E. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome O. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **79**: 558 - 567
- [19] Park K W, Kim K J, Howard A J *et al.* *Vitreoscilla* hemoglobin binds to subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidases. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 33334 - 33337
- [20] Joshi M, Mande S, Dikshit K L. Hemoglobin biosynthesis in *Vitreoscilla stercoraria* DW: cloning, expression and characterization of a new homology of a bacterial globin gene. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2220 - 2228
- [21] Joshi M, Dikshit K L. Oxygen-dependent regulation of *Vitreoscilla* globin gene-evidence for positive regulation by FNR. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **202**: 535 - 542
- [22] Tsai P S, Kallio P T, Bailey J E. FNR, a global transcriptional regulator of *Escherichia coli*, activates the *vitreoscilla* hemoglobin(VHb) promoter and intracellular VHb expression increases cytochrome promoter activity. *Biotechnol Prog*, 1995, **11**: 288 - 293
- [23] Bollinger CJT, Bailey J E, Kallio P T. Novel hemoglobins to enhance microaerobic growth and substrate utilization in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2001, **17**: 788 - 808
- [24] Frey A K, Bailey J E, Kallio P T. Expression of *Alcaligenes eutrophus* flavohemoglobin and engineered *Vitreoscilla* hemoegobin-reductase fusion protein for improved hypoxic growth of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 98 - 104
- [25] Kaur R, Pathania R, Sharma V *et al.* Chimeric *Vitreoscilla* hemoglobin(VHb) carrying a flavoreductase domain relieves nitrosative stress in *Escherichia coli*: new insight into the functional role of VHb. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 152 - 160

tabolism of hemoglobin-expressing *Escherichia coli* by ^{13}C nuclear magnetic resonance flux distribution analysis in microaerobic bioprocesses. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 152 – 160

[27] Ramirez M , Valderrama B , Arredono-Peter R *et al.* *Rhizobium etli*

genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin :effects on free-living and symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interactions*, 1999, **12**: 1008 – 1015

Recent Advances in the Study of *Vitreoscilla* Hemoglobin(Vhb) and Related Proteins——Cloning , Expression and Physiological Actions in Heterologous Hosts and in Transgenic Tobacco Plants

J. S. Chiao*

(Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology , Shanghai , 200032 ,China)

Abstract The first bacterial hemoglobin(Vhb) was found in a strictly aerobic bacterium ,*Vitreoscilla* strain C1 , occurring in marshes low in oxygen , but rich in organic matter. The hemoglobin gene is induced under low oxygen tension and may amount to 20 times as high. The expression of Vhb promotes cell growth , protein biosynthesis and primary and secondary metabolism of the host cells , because the increased intracellular oxygen accelerates both the function of respiratory chain and terminal oxidases. The serial action of increased oxygen concentration is elucidated through yeast two hybrid system and a model is proposed.

In addition , novel globin proteins known as flavohemoglobins have been isolated from various procaryotes and eucaryotes , with a N-terminal similar to Vhb and C-terminal with reductase activity. Primary study shows that flavohemoglobin proteins exhibit similar function as Vhb and also protection effect to nitrosative stress. Further work is needed to learn more about the physiology of these flavohemoglobins.

The most remarkable physiological effects of Vhb are exhibited in transgenic tobacco plants , including accelerated seed germination and growth in plant , increased synthesis of chlorophyll and dry weight. Without doubt , these effects are brought about through the increased oxygen supply to plant cells. It is deemed that Vhb transgenic tobacco is a forerunner for transgenic crops and Vhb may be a valuable route for staple seed crops.

Key words *Vitreoscilla* hemoglobin , flavohemoglobin , Vhb transgenic tobacco plant

Received : 03-03-2003

* Corresponding author. Tel 86 – 21 – 64042090.