

截短血红蛋白在大肠杆菌中的异源表达及性质分析

王家朔¹, 曹治康¹, 彭怡¹, 刘业学^{1,2}, 王稳航², 路福平¹, 李玉^{1*}

1 天津科技大学 生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 天津科技大学 食品科学与工程学院, 天津 300457

王家朔, 曹治康, 彭怡, 刘业学, 王稳航, 路福平, 李玉. 截短血红蛋白在大肠杆菌中的异源表达及性质分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 2077-2087.

WANG Jiashuo, CAO Zhikang, PENG Yi, LIU Yexue, WANG Wenhong, LU Fuping, LI Yu. Heterologous expression and characterization of truncated hemoglobin in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 2077-2087.

摘要: 截短血红蛋白(truncated hemoglobin)是一种存在于细菌中的血红蛋白。解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)来源的截短血红蛋白 YjbI 氨基酸序列与高等生物来源的 YjbI 存在差异。为了研究异源表达后 YjbI 的结构与性质, 本研究以大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)为宿主, 将 *yjbI* 基因序列密码子优化后连接到表达载体 pET-28a(+)上, 成功进行表达, 之后通过 His 亲和标签纯化得到较高纯度的 YjbI。采用 SDS-PAGE、圆二色光谱分析、血红素结合率测定和氧结合能力测定等方法对纯化后的截短血红蛋白进行了分析。发现在表达时间为 26 h, 2% 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)添加量的条件下产量最高, YjbI 表达量由 122.02 mg/L 提升至 133.19 mg/L。圆二色光谱分析、AlphaFold3 结构预测分析发现, YjbI 通过形成 α -螺旋结构并折叠出血红素结合位点, 最终构建出完整的蛋白质三维构象。经全波长扫描和比尔-朗伯定律计算得到, 添加 ALA 前后 YjbI 的血红素结合率由 13.18% 提升到 22.78%。利用氧化还原法对氧结合能力进行测定, 表明 YjbI 具有较高的氧气亲和力。本研究成功实现了截短血红蛋白在大肠杆菌中的异源表达, 系统分析了其结构与功能特性, 为微生物血红蛋白的应用提供了理论和技术基础。

关键词: 大肠杆菌; 截短血红蛋白; 蛋白结构; 血红素

资助项目: 国家重点研发计划(2024YFA0918301)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2024YFA0918301).

*Corresponding author. E-mail: liyu@tust.edu.cn

Received: 2024-11-16; Accepted: 2025-02-27; Published online: 2025-03-03

Heterologous expression and characterization of truncated hemoglobin in *Escherichia coli*

WANG Jiashuo¹, CAO Zhikang¹, PENG Yi¹, LIU Yexue^{1,2}, WANG Wenhong², LU Fuping¹, LI Yu^{1*}

¹ Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

² College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Truncated hemoglobin is a type of hemoglobin found in bacteria. The amino acid sequence of the truncated hemoglobin YjbI derived from *Bacillus amyloliquefaciens* differs from those of higher organisms and has garnered significant interest due to its distinctive structural configuration and functional characteristics. In this study, *Escherichia coli* BL21(DE3) was used as the host for heterologous expression of *yjbI* with optimized codon and connected to the expression vector pET-28a(+). High-purity YjbI was obtained after purification with the His affinity tag. The purified truncated hemoglobin was analyzed by SDS-PAGE and circular dichroism assay, and its heme-binding rate and oxygen-binding capacity were determined. After optimization, the highest yield was achieved at the expression time of 26 h and 2% 5-aminolevulinic acid (ALA) addition, and the expression level of YjbI increased from 122.02 mg/L to 133.19 mg/L. Circular dichroism and AlphaFold3 structure prediction results showed that YjbI formed α -helical structures and folds to generate the heme-binding site, ultimately assembling the complete three-dimensional conformation of the protein. The results from full wavelength scanning and calculation based on the Beer-Lambert law showed that the heme-binding rate of YjbI increased from 13.18% to 22.78% after the addition of ALA. The oxygen-binding capacity was determined by the redox method, which indicated that YjbI had a high oxygen affinity. This study successfully achieved heterologous expression of truncated hemoglobin in *E. coli*, systematically analyzed its structural and functional characteristics, and provided a theoretical and technical basis for the application of microbial hemoglobin.

Keywords: *Escherichia coli*; truncated hemoglobin; protein structure; heme

血红蛋白(人血红蛋白、肌红蛋白、豆血红蛋白、透明颤菌血红蛋白等^[1])由一条或多条珠蛋白多肽链和血红素辅基组成^[2],在氧气结合和运输、细胞内的氧化还原反应、氧化应激应对及信号传导等过程中发挥着重要作用^[3]。辅基血红素是一种由卟啉环和亚铁构成的铁卟啉化合物^[4],由前体物质 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)通过一系列酶促反应合成^[5],其与珠蛋白的 2 个特定氨基酸(近端组氨酸、远端组氨酸)通过共价键结合,从而形成具有完整功能的血红蛋白^[6-7]。血红蛋白

因具备高效的携氧能力和独特的风味色素呈现特性^[8-9],在医疗与食品领域中的应用前景广阔^[10-11]。

目前血红蛋白主要是从动物血液中提取,存在提取难度大、经济效益一般、危害环境、动物福利等方面的问题^[9,12-13]。利用微生物细胞工厂异源表达血红蛋白具有持续性强、可规模生产、成本低廉、环境友好等优势,因此成为目前的研究重点^[14-15]。例如, Yu 等^[16]通过代谢工程策略,利用密码子优化、增强血红素生物合成、重组血红素合成途径和抑制血红素

降解等方法,在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中高效合成了高活性的血红蛋白。Xue 等^[17]利用诱导表达策略和重建血红素合成途径等方法改造酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),成功高效合成了多种血红蛋白和肌红蛋白。Wang 等^[18]通过密码子优化、启动子工程、质粒拷贝数修改以及多组学引导的新靶点等方法,系统地工程化谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)以实现植物血红蛋白的可持续和高水平的微生物发酵生产。Shao 等^[19]通过基因剂量优化和血红素生物合成途径的整合,利用 *P. pastoris* 实现了高效分泌生产功能性大豆血红蛋白(leghemoglobin)。由此可知,微生物异源表达技术主要用于表达来源于高等生物的血红蛋白,并且发现不同动物或者植物来源血红蛋白的功能特性存在着差异。目前关于微生物来源的血红蛋白的研究主要为透明颤菌血红蛋白(VHb)在提高异源宿主菌的重组蛋白产量和发酵产量以及在改善转基因植物生长和提高代谢物产量方面的应用研究^[20],而对血红蛋白本身的结构与功能特性研究较少。因此,有必要对微生物来源的血红蛋白进行挖掘、表达及结构功能分析。

截短血红蛋白 YjbI 是一种细菌来源的血红蛋白,其氨基酸数量为 132 个,相较于高等生物来源的血红蛋白序列少 20–40 个氨基酸,氨基酸序列及蛋白质三维结构的差异使其具备独特的电子转移特性,这可用于反映截短血红蛋白的氧化还原活性和体内信号功能与配体结合相关的变化,因此在环境生物传感器的搭建及毒性筛选方面将发挥重要作用^[21–23]。本研究将经过密码子优化的来源于解淀粉芽孢杆菌的 *yjbI* 基因序列扩增连接到表达载体 pET-28a(+)上,并转化进入大肠杆菌中进行诱导表达,以 YjbI 蛋白表达量为指标,以血红素前体物质浓度为变量优化表达条件,以期提高其表达量;同时,对纯化得到的截短血红蛋白的二级结构和三级结构进行了测定与分析,测定珠蛋白与

血红素的结合率及其氧结合能力。本研究进一步丰富了微生物来源的血红蛋白库并可为其他微生物来源的血红蛋白在工程菌中的异源表达提供理论和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

选用大肠杆菌(*Escherichia coli*)工程菌株 BL21(DE3)作为宿主菌株, T1 为过程菌株,以 pET-28a(+)为基因表达载体(表 1)。*yjbI* 截短血红蛋白基因源自解淀粉芽孢杆菌,经大肠杆菌密码子偏好性优化设计。相关基因合成、引物构建及测序验证(表 2)由天津金唯智生物科技有限公司完成。

1.1.2 主要试剂和培养基

2×PrimeSTAR Max DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 2×Flash PCR MasterMix(Dye)聚合酶购自康为世纪生物科技有限公司; ClonExpress®

表 1 本研究所用的菌株和质粒信息

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Sources
<i>Escherichia coli</i> T1	Lab store
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Lab store
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-28a(+)	Lab store
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-28a(+)/ <i>yjbI</i>	This study
pET-28a(+)	Lab store
pET-28a(+)/ <i>yjbI</i>	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequence (5'→3')
pET-yjbI-F	ATACCATGGGCAGCAGCATGGGAC AATCGTTTAACGCACC
pET-yjbI-R	GTGGTGCTCGAGTCAATATGATCGA TGATGGTGATGGTGATGA
pET-28a-fp-F	CTCGAGCACCACCACCACCACCAC
pET-28a-fp-R	GCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTC TTAAAGTTAAAC
pET-28a-yz-F	CATCGGTGATGTCGGCGATATA
pET-28a-yz-R	GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG

MultiS One Step Cloning 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司；质粒提取、DNA 纯化、切胶回收等所用试剂盒均购自 Omega 公司；卡那霉素、考马斯亮蓝 R-250、蛋白预制胶、IPTG 等均购自北京索莱宝科技有限公司。

LB 培养基：5 g/L 酵母浸粉，10 g/L 胰蛋白胨，10 g/L 氯化钠。

ALA 溶液：称取 10 g 的 5-氨基乙酰丙酸盐 (ALA-HCl)，加入去离子水定容至终体积 100 mL，采用 0.22 μm 膜抽滤， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

硫酸亚铁溶液：称取 7.5 g FeSO_4 ，加入去离子水定容至终体积 100 mL，采用 0.22 μm 膜抽滤， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

PBS 缓冲液：称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.42 g Na_2HPO_4 、0.27 g KH_2PO_4 ，调节 pH 至 7.4，去离子水定容至终体积 1 L，采用 0.22 μm 膜抽滤。

Lysis 缓冲液：称取 3.152 g Tris-HCl，29.22 g NaCl，0.154 g 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)，1.361 5 g 咪唑，调节 pH 至 7.4，去离子水定容至终体积 1 L，采用 0.22 μm 膜抽滤。

不同咪唑浓度的缓冲液：称取 1.576 g Tris-HCl，8.766 g NaCl，0.077 1 g DTT，梯度浓度咪唑，调节 pH 至 7.4，去离子水定容至终体积 1 L，采用 0.22 μm 膜抽滤。

1.1.3 主要仪器

PCR 基因扩增仪购自 Eppendorf 公司；高速冷冻离心机购自赛默飞世尔科技公司；隔水恒温培养箱购自上海智城分析仪器制造有限公司；圆二色光谱仪购自比奥罗杰公司；多功能酶标仪购自 TECAN 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组菌株的构建

通过特定引物扩增 *yjbI* 基因，进行纯化处理，得到目的基因片段，通过反向 PCR 从 pET-28a(+)质粒中获取目标载体片段，进行纯化处理，得到线性载体片段，使用无缝克隆酶将 *yjbI* 基因与线性载体连接，构建重组质粒

pET-28a(+)/*yjbI*。利用热激法将重组质粒导入 *E. coli* T1 过程菌株感受态细胞中，过夜培养，通过菌落 PCR 验证得到阳性菌株，将构建正确质粒命名为 *E. coli* T1/pET-28a(+)/*yjbI*，进一步提取质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)宿主菌株感受态细胞中。

1.2.2 重组菌株的发酵培养

利用重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)/*yjbI* 进行异源表达，将重组菌株单克隆接种于 LB 液体培养基中进行扩增，按 2% 接种量转接至 250 mL 新鲜 LB 培养基，于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养 1–2 h 至对数生长期($OD_{600}=0.6$)；添加 0.5 mmol/L IPTG 诱导目标蛋白表达，再分别加入 FeSO_4 和前体物质 ALA， $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 26 h。

1.2.3 SDS-PAGE 分析并计算血红蛋白产量

细胞样品经 8 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀，利用 lysis 缓冲液重悬。将重悬液超声破碎 12 min，12 000 r/min 离心 15 min 收集上清液。应用 Bradford 法测定总蛋白浓度并进行归一化，利用 loading buffer 高温变性 10 min。电泳上样量 20 μL ，电泳电压 120 V，运行时间 1.5 h，经考马斯亮蓝 R-250 染色 2–3 h 后采用脱色液振荡脱色至条带清晰。最终通过 ImageJ 1.52v 软件对目标蛋白条带进行灰度定量分析。

1.2.4 截短血红蛋白的纯化

细胞样品经 8 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀，采用 Lysis 缓冲液重悬。12 min 超声破碎处理，在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min 获取裂解上清。采用重力流 Ni-NTA 亲和层析柱进行蛋白捕获，通过不同浓度咪唑缓冲液实现特异性洗脱。收集目标组分后，使用 10 kDa 超滤管实施浓缩及 PBS 缓冲液置换处理，去除残留咪唑。蛋白纯化产物保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.5 生长曲线的测定

为检测 *yjbI* 基因的过表达对宿主菌 BL21(DE3)的生长状况的影响，将 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)和 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)/*yjbI* 菌株在 LB 培养基中过夜培养，以 2% 的接种量转接于 LB 液体摇瓶中，装液量

为每个容量 250 mL 摇瓶装入 50 mL 培养基, 37 °C 振荡培养, 每隔 4 h 取样, 测定 OD_{600} , 绘制生长曲线。

1.2.6 圆二色光谱(circular dichroism, CD) 分析

纯化蛋白经 PBS 缓冲液稀释至终浓度 100 mg/L, 采用 1 mm 光径石英比色皿进行紫外光谱扫描分析。检测系统设定恒温 25 °C 条件, 执行 190–260 nm 全波段扫描, 重复 3 次。

1.2.7 血红素结合率测定

将 100 μ L 浓度为 1 mg/mL 纯化的截短血红蛋白与 100 μ L 溶液 I [40% (体积比)吡啶、0.2 mol/L NaOH 和 500 μ mol/L 铁氰化根]在 96 孔微量滴定板中混合。利用多功能酶标仪对该混合物进行 500–600 nm 全波长扫描, 获得氧化还原光谱图。随后, 将 2 μ L 溶液 II (在 0.5 mol/L NaOH 中的 0.5 mol/L 连二亚硫酸钠)添加到氧化的样品中, 再次扫描获得吸收光谱图。通过比尔-朗伯定律计算, 吡啶-血红蛋白的消光系数为 4.3 L/(mmol·cm)。通过比尔-朗伯定律计算物质的量浓度(c), 血红素结合率表示为: 血红素摩尔浓度/珠蛋白摩尔浓度 $\times 100\%$ ^[16,24-25], 计算如公式(1)所示。

$$\Delta A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

式中: A 表示溶液对光的吸收度(absorbance); ε 是摩尔消光系数, 表示单位浓度和单位路径长度下的吸收程度; c 是溶质的摩尔浓度; l 是光路长度, 即光线在溶液中传播的距离(通常为 1 cm)。

1.2.8 氧结合能力的测定原理及方法

将 100 μ L 浓度为 1 mg/mL 的血红蛋白。与 10 μ L 浓度为 10 mg/mL 的连二硫酸钠(sodium dithionate, SDT)溶液混合在 96 孔微量滴定板中, 扫描 526 nm 和 557 nm 波长处的吸光度, 每隔 1 min 扫描 1 次。根据公式(2)计算不同时间点的氧饱和度($S_{at.O_2}$), 以定量分析血红蛋白的氧结合能力, 从而完成对血红蛋白基氧载体氧结合行为的时间序列分析^[26]。

$$K_{Hb} = \frac{A_{557}}{A_{526 t=0}}, K_{HbO_2} = \frac{A_{557}}{A_{526 t=\infty}}, K_x = \frac{A_{557}}{A_{526 t=t}}$$

$$S_{at.O_2} = \frac{K_{Hb} - K_x}{K_{Hb} - K_{HbO_2}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: K_{Hb} 为全脱氧血红蛋白吸光度比; K_{HbO_2} 为全氧血红蛋白的吸光度; K_x 为充氧开始后 $t=x$ 时对应的吸光度比值。使用多功能酶标仪监测记录 A_{557} 和 A_{526} 的吸光值。

2 结果与分析

2.1 血红蛋白的表达及其纯化

本研究利用大肠杆菌表达系统成功构建了 BL21(DE3)/pET-28a(+)/yjbI 重组菌株, 并在 IPTG 诱导下实现 YjbI 的高效表达。SDS-PAGE 分析显示(图 1), 诱导后的菌体裂解液在 14.8 kDa 处出现目的条带, 与 YjbI 预测分子量(14.8 kDa)完全吻合, 而未诱导组无此条带, 证实 YjbI 在该系统中成功表达。

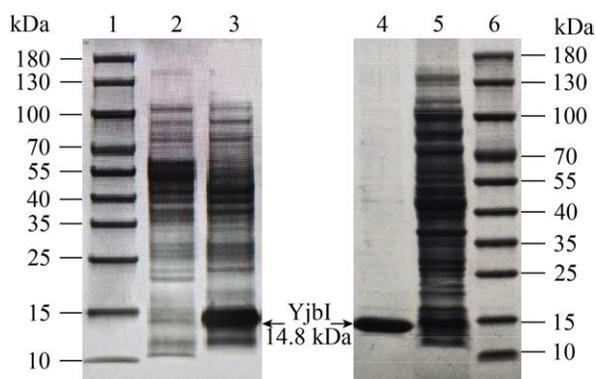


图 1 YjbI 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达及纯化结果 泳道 1.6 为蛋白 marker; 泳道 2 为对照菌株细胞破碎离心的上清液; 泳道 3 为表达 YjbI 菌株的细胞破碎离心的上清液; 泳道 4 为纯化后的 YjbI; 泳道 5 为未结合的上清液。

Figure 1 Expression and purification results of YjbI in *E. coli* BL21(DE3). Lane 1 and 6 are the protein markers; Lane 2 is the supernatant from cell crushing and centrifugation of the control strain; Lane 3 is the supernatant from cell crushing and centrifugation of the YjbI expressing strain; Lane 4 is the purified YjbI; Lane 5 is the supernatant that is not bound to the resin.

进一步通过 Ni-NTA 亲和层析技术对裂解液中的目的蛋白进行纯化, 纯化过程中, 使用 300 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱, 成功获得了单一蛋白条带, 洗脱组分经 SDS-PAGE 检测显示, 目标条带在 14.8 kDa 处显著富集, 且纯度较高, 表明 Ni-NTA 层析体系可有效分离血红蛋白, 其 His 标签与镍柱的高亲和力保证了纯化效率。电泳结果表明(图 1), 该纯化方法能够有效获得高纯度的目标蛋白。

2.2 YjbI 的表达对重组菌株生长发酵特征的影响

为了研究过表达截短血红蛋白后是否对菌株生长造成影响, 测定了 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)/yjbI 重组菌株(BL21-YjbI)和 *E. coli* BL21(DE3)对照菌株(BL21)的生长情况并绘制生长曲线, 结果如图 2 所示。在 5 h 之前, 2 个菌株的生长状况、菌体密度基本一致, 对照菌株在 15 h 前快速增长, 15 h 之后进入稳定期; 而重组菌株在 5 h 之后菌体密度基本达到最大值, 10 h 后进入稳定期。重组菌株的菌体密度明显低于对照菌株的菌体密度, 这可能是由于使用多拷贝质粒表达血红蛋白后导致细胞需要更多的资源和能量来生产和折叠蛋白, 增加了代谢负担, 导致菌体生长速度减慢。

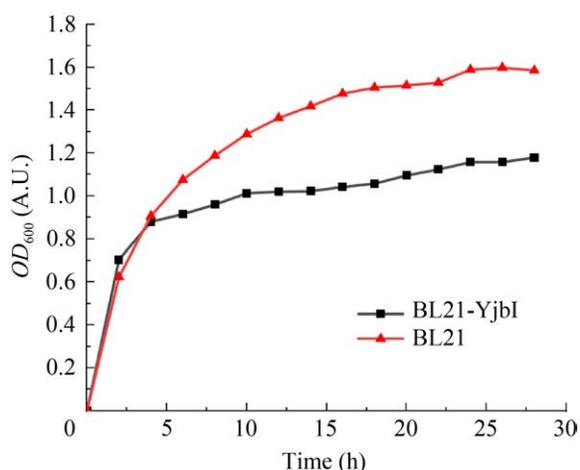


图 2 大肠杆菌发酵截短血红蛋白的生长曲线
Figure 2 Growth curves of truncated hemoglobin by *E. coli* fermentation.

2.3 截短血红蛋白的结构分析

血红蛋白是由 1 条珠蛋白多肽链和 1 个血红素辅基结合成完整且稳定的血红蛋白^[6,27], 为了进一步探究 YjbI 的结构, 利用圆二色光谱测定其二级结构, 通过 CD 光谱仪对 YjbI 进行 190–260 nm 波长范围内的扫描, 并将数据提交至分析网站 (<https://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>, Dichroweb) 得到结果(图 3A), 在 208 nm 和 222 nm 处的负峰证明在二级结构中富含 α -螺旋结构。利用在线软件 AlphaFold3 预测 YjbI 的三级结构模型, 得到 YjbI 的三维结构图(图 3B), 并从 NCBI 中获取豆血红蛋白(leghemoglobin)和猪肌红蛋白(porcine myoglobin)的氨基酸序列, 同样利用在线软件 AlphaFold3 进行结构预测, 得到豆血红蛋白(图 3C)和猪肌红蛋白(图 3D)三维结构图, 进一步说明 3 种血红蛋白的结构主要是以 α -螺旋为主。然而, 与另外 2 类血红蛋白的 3/3 fold 构型不同, 截短血红蛋白是特殊的 2/2 fold 构型, 这可能是对前者结构深度编辑的结果。从图 3B 中可以看出, 截短血红蛋白的三维结构基于 4 个主要的 α -螺旋, 与经典珠蛋白折叠的 B、E、G 和 H 螺旋对应, 这 4 个 α -螺旋结构排列成由 2 个反平行螺旋对组成的 α -螺旋束(B/E 和 G/H)。螺旋结构数量的不同也造成与血红素结合方式的差异, 除了都有组氨酸残基与血红素中的铁配位外, 截短血红蛋白中的残基 Thr45、Lys48 和 Tyr63 通过氢键进一步增强了血红素结合配体的稳定性。

2.4 截短血红蛋白发酵条件优化

为了提升 YjbI 的表达量, 通过调节发酵时间, 在不同时间节点取样并进行检测, 通过 SDS-PAGE 得到蛋白电泳图(图 4A), 根据 ImageJ 计算得到 YjbI 的含量变化(图 4B)。在 26 h 前 YjbI 含量快速增长, 在 26 h 时含量最高, 并趋于平稳, 随后略微减少, 在 10 h 后进入稳定期, 菌株的菌体浓度保持稳定, 由于菌株代谢产物的积累改变了最适的生长环境, 影响目的蛋白的表达。由此可知, 在发酵时间为 26 h 时 YjbI 表达量最高。

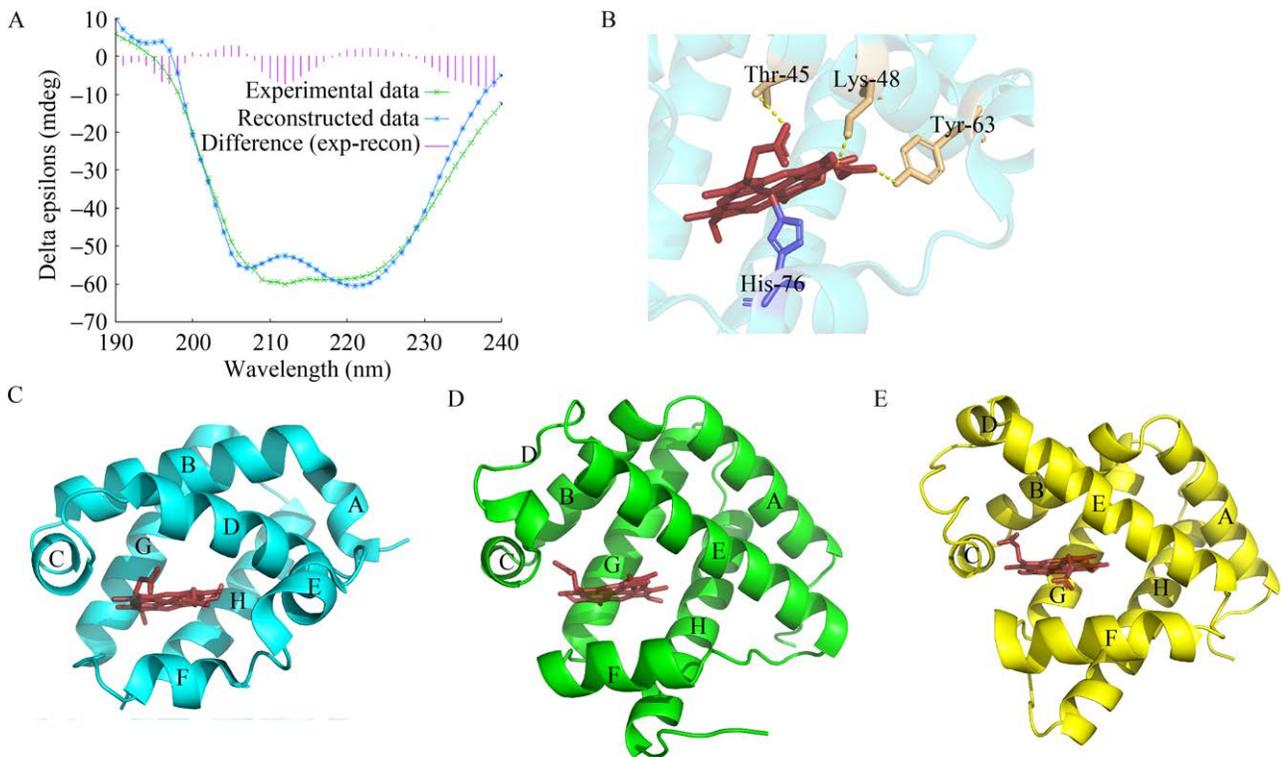


图3 截短血红蛋白结构分析及对比 A: 截短血红蛋白圆二色光谱数据; B: 截短血红蛋白中血红素的结合位点; C: 截短血红蛋白三维结构示意图; D: 豆血红蛋白三维结构示意图; E: 猪肌红蛋白三维结构示意图。

Figure 3 Structural characterization and comparative modeling of truncated hemoglobin. A: Truncated hemoglobin circular dichroism data; B: Truncation of heme binding sites in hemoglobin; C: Truncated hemoglobin 3D structure schematic; D: Leghemoglobin 3D structure schematic; E: Porcine myoglobin 3D structure schematic.

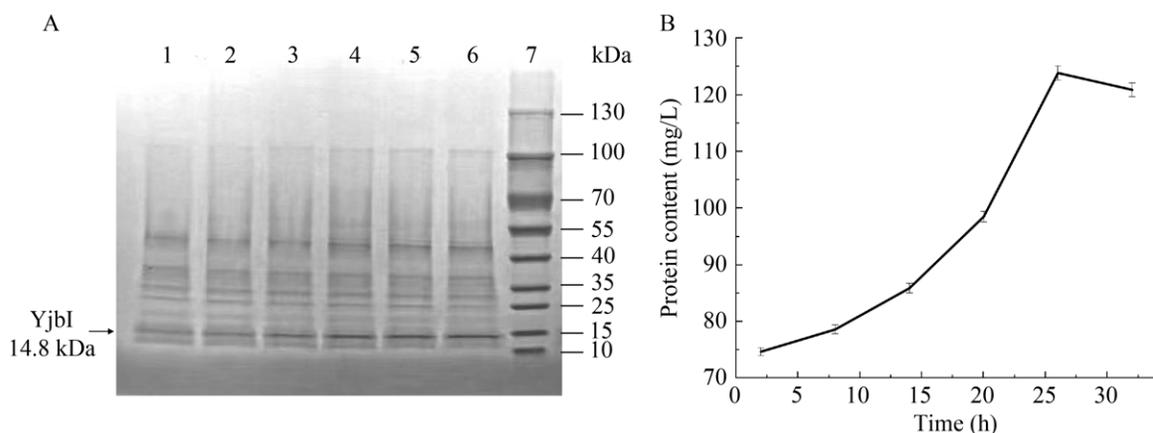


图4 不同发酵时间截短血红蛋白含量的变化 A: 不同时间的重组菌株破碎后的上清液。泳道1、2、3、4、5、6分别对应2、8、14、20、26、32 h; 泳道7为蛋白 marker。B: 根据 ImageJ 计算截短血红蛋白含量。

Figure 4 Variation in truncated hemoglobin content with fermentation time. A: Supernatant of recombinant strains were crushed at different times. Lane 1, 2, 3, 4, 5, and 6 correspond to 2, 8, 14, 20, 26, and 32 h, respectively; Lane 7 is the protein marker. B: Calculation of truncated hemoglobin content according to ImageJ.

ALA 是微生物合成血红素的唯一前体物质^[5], 通过添加不同浓度 ALA, 提升血红素自身合成量^[28], 进而提升 Yjbl 表达量。通过 SDS-PAGE 得到蛋白电泳图(图 5A), 根据 ImageJ 计算得到 Yjbl 的含量变化(图 5B)。添加 1% 和 2% ALA 对表达量有促进作用, 超过 2% 则会抑制蛋白表达, 其中添加 2% ALA 的添加量 Yjbl 表达量最高。测得 Yjbl 产量从 122.02 mg/L 提升到 133.19 mg/L。

2.5 截短血红蛋白中珠蛋白-血红素结合率检测

血红素是血红蛋白的辅基, 血红蛋白的合成需要血红素的参与^[29]。Yjbl 的完整结构是由 1 条珠蛋白多肽链和 1 个血红素辅基结合而成的^[30], 为了探究血红素是否与珠蛋白结合成 Yjbl, 通过还原和氧化样品之间的差异光谱来研究血红素是否结合到珠蛋白中。全波长扫描结果(图 6)

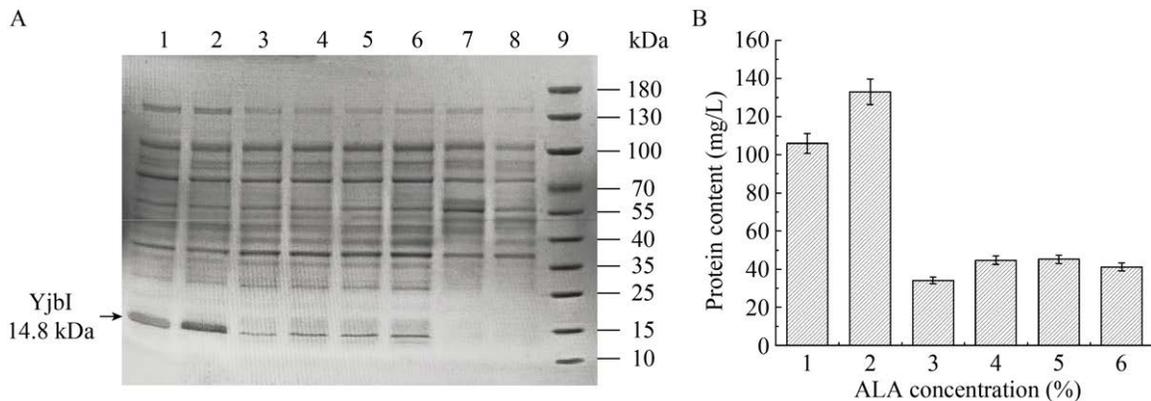


图 5 不同 ALA 浓度截短血红蛋白含量的变化 A: 添加不同浓度 ALA 的重组菌株破碎后的上清液。泳道 1、2、3、4、5、6 分别对应添加 1%、2%、3%、4%、5%、6% 浓度的 ALA; 泳道 7、8 为空载对照; 泳道 9 为蛋白 marker。B: 根据 ImageJ 计算截短血红蛋白含量。

Figure 5 Variation in truncated hemoglobin content with ALA concentration. A: Supernatants after crushing of recombinant strains with different concentrations of ALA addition. Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6 correspond to the 1%, 2%, 3%, 4%, 5% and 6% concentrations of ALA, respectively; Lane 7 and 8 are empty controls; Lane 9 is the protein marker. B: Calculation of truncated hemoglobin content according to ImageJ.

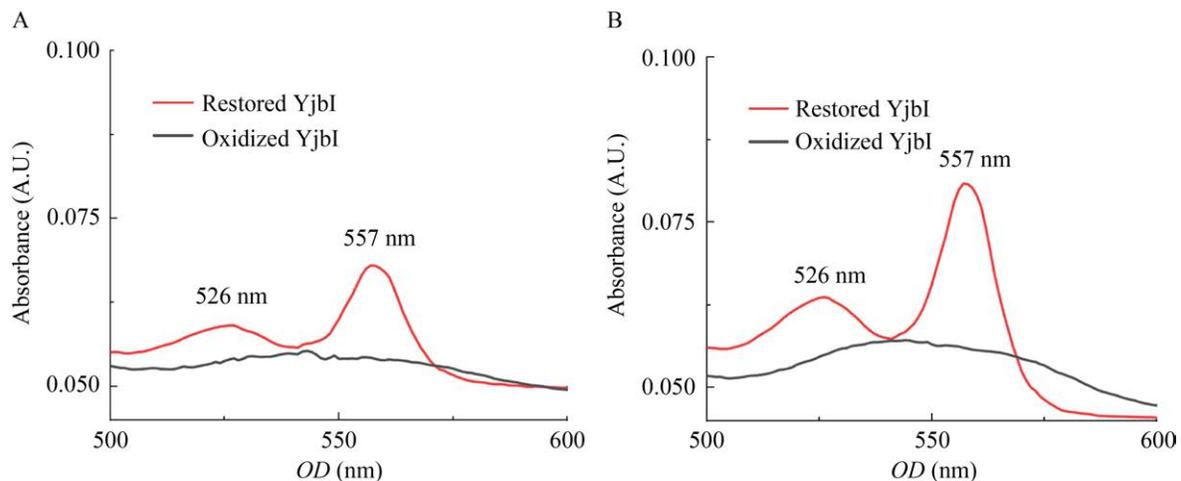


图 6 截短血红蛋白 500–600 nm 全波长扫描吸光度 A: 原始菌表达 Yjbl; B: 发酵优化后表达 Yjbl。Figure 6 Absorbance of truncated hemoglobin 500–600 nm full wavelength scan. A: The original bacteria expressed Yjbl; B: Fermentation optimized to express Yjbl.

显示, 在 557 nm (还原态)和 526 nm (氧化态)处有明显的吸收峰, 根据 557 nm 和 526 nm 处的峰值, 经比尔-朗伯定律计算得到 Yjbl 中珠蛋白-血红素的结合率为 13.18%。而添加 ALA 后, Yjbl 的血红素结合率由 13.18%提升到 22.78%。说明 Yjbl 中具有血红素的结合, 进而形成具有功能性的血红蛋白。

2.6 截短血红蛋白氧结合能力的分析

Yjbl 中血红素的存在, 使其具有结合氧气的特性^[26], 依据该特性, 利用可见光谱分析并监测其转变过程。先以 SDT 作为还原剂与氧清除剂, 将 Yjbl 还原并除氧生成脱氧血红蛋白, 之后随着氧气不断溶解, 脱氧血红蛋白变为氧合血红蛋白。如图 7 所示, Yjbl 在低氧分压下就能结合氧气, 添加 ALA 之后, 曲线更快到达最高点, 对氧气的亲和力更强。

3 讨论与结论

本研究成功地在 大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达了截短血红蛋白 Yjbl, 并对其性质进行了详细的分析。研究发现, 通过将来源于解淀粉芽孢杆菌的 *yjbl* 基因进行密码子优化并克隆至表达载体 pET-28a(+), 实现了 Yjbl 的高效表达。通过优化表达时间及添加 ALA 等措施,

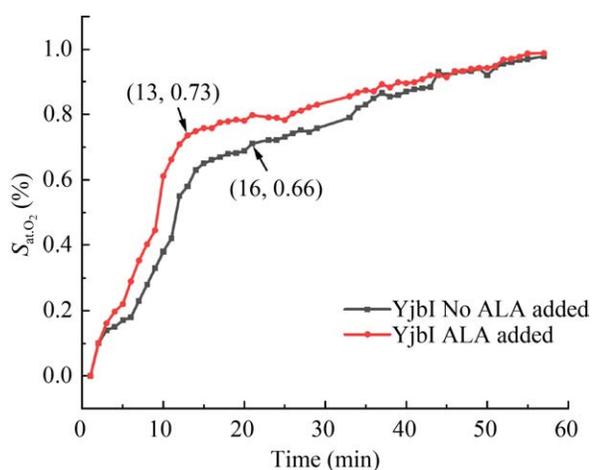


图7 添加 ALA 前后的截短血红蛋白的氧饱和度曲线

Figure 7 Oxygen saturation curves of truncated hemoglobin before and after addition of ALA.

提高了 Yjbl 的产量, 增强了血红素的结合率。通过 SDS-PAGE 验证, 表达产物的分子量约为 14.8 kDa, 与理论值一致, 说明 Yjbl 成功表达且纯度较高。但是 Yjbl 的过表达对宿主菌生长有一定负面影响, 可能与代谢负担和能量消耗增加有关。这表明在设计微生物工厂时需要权衡蛋白表达和细胞生长之间的平衡^[15]。经分析, 圆二色光谱检测结果显示 Yjbl 富含 α -螺旋的二级结构, 并通过 AlphaFold3 预测三维结构, 证实其形成了具有血红素结合位点的稳定结构。这种结构特点为其功能提供了结构基础。Yjbl 中结合了血红素, 通过比尔-朗伯定律计算得到血红素结合率在添加 ALA 后从 13.18%提升至 22.78%。氧结合能力实验表明, Yjbl 在低氧分压下具有较高的氧气亲和力, ALA 的添加进一步提升了其氧结合速度和稳定性, 体现了其潜在的氧气传递和储存功能。

目前, 植物来源的血红蛋白、动物来源的血红蛋白和肌红蛋白等, 主要应用在食品添加剂等方面, 为肉类产品增添风味和色泽, 具有重要的食品工业应用价值。有研究表明截短血红蛋白由于其独特的电子转移和配体结合特性, 在环境生物传感和毒性筛选等领域具有潜在的应用价值^[21]。然而其血红素结合率有待进一步提升。在未来的研究中, 可以将血红素结合率的优化作为改造的重点, 通过构建高效的细胞工厂, 利用代谢工程策略优化血红素合成途径, 促进血红蛋白合成量, 从而提升血红素结合率, 进一步提升血红蛋白的功能活性, 有利于其在食品和环境等领域更广泛地应用。

综上所述, 本研究实现了截短血红蛋白 Yjbl 在大肠杆菌中的表达并验证其功能特性, 通过发酵工艺优化提升了其表达量, 为截短血红蛋白的微生物表达提供了新的思路及技术支持。

作者贡献声明

王家朔: 方案设计、实验操作、初稿写作; 曹治康: 提供材料、稿件润色修改; 彭怡: 数

据管理、实验操作；刘业学、王稳航、路福平、李玉：监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] ZHAO XR, ZHOU JW, DU GC, CHEN J. Recent advances in the microbial synthesis of hemoglobin[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(3): 286-297.
- [2] HARDISON R. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression[J]. Journal of Experimental Biology, 1998, 201(Pt 8): 1099-1117.
- [3] WILKINSON IVL, BOTTLINGER M, EL HARRAOUI Y, SIEBER SA. Profiling the heme-binding proteomes of bacteria using chemical proteomics[J]. Angewandte Chemie (International Edition), 2023, 62(9): e202212111.
- [4] 刘佳萌, 刘业学, 赵晨旭, 王稳航, 李庆刚, 路福平, 李玉. 解淀粉芽胞杆菌 *hemX* 基因缺失对血红素合成的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1119-1130. LIU JM, LIU YX, ZHAO CX, WANG WH, LI QG, LU FP, LI Y. Effect of *hemX* gene deletion on heme synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1119-1130 (in Chinese).
- [5] 刘佳萌, 李雪莹, 刘业学, 王稳航, 李庆刚, 路福平, 李玉. 微生物以 5-氨基乙酰丙酸为唯一前体物合成血红素的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(3): 99-109. LIU JM, LI XY, LIU YX, WANG WH, LI QG, LU FP, LI Y. Research progress on microbial synthesis of heme using 5-aminolevulinic acid as the sole precursor[J]. China Biotechnology, 2022, 42(3): 99-109 (in Chinese).
- [6] HARGROVE MS, KRZYWDA S, WILKINSON AJ, DOU Y, IKEDA-SAITO M, OLSON JS. Stability of myoglobin: a model for the folding of heme proteins[J]. Biochemistry, 1994, 33(39): 11767-11775.
- [7] GELL DA. Structure and function of haemoglobins[J]. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2018, 70: 13-42.
- [8] ZHANG L, HU YY, BADAR IH, XIA XF, KONG BH, CHEN Q. Prospects of artificial meat: opportunities and challenges around consumer acceptance[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 116: 434-444.
- [9] SUMAN SP, JOSEPH P. Myoglobin chemistry and meat color[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2013, 4: 79-99.
- [10] SCHECHTER AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine[J]. Blood, 2008, 112(10): 3927-3938.
- [11] LITTLEWOOD TJ. The impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer[J]. Seminars in Oncology, 2001, 28: 49-53.
- [12] 王庆沛, 宇光海, 廖爱美, 潘龙, 黄继红. 微生物合成血红蛋白的研究进展及其在食品中的应用[J]. 中国调味品, 2024, 49(1): 189-197. WANG QP, YU GH, LIAO AM, PAN L, HUANG JH. Research progress of synthesis of hemoglobin by microorganisms and its application in food[J]. China Condiment, 2024, 49(1): 189-197 (in Chinese).
- [13] HERRERO M, THORNTON PK. Livestock and global change: emerging issues for sustainable food systems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(52): 20878-20881.
- [14] BOLLINGER CJT, BAILEY JE, KALLIO PT. Novel hemoglobins to enhance microaerobic growth and substrate utilization in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Progress, 2001, 17(5): 798-808.
- [15] 于勇, 朱欣娜, 毕昌昊, 张学礼. 大肠杆菌细胞工厂的创建技术[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1564-1577. YU Y, ZHU XN, BI CH, ZHANG XL. Construction of *Escherichia coli* cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1564-1577 (in Chinese).
- [16] YU F, ZHAO XR, ZHOU JW, LU W, LI JH, CHEN J, DU GC. Biosynthesis of high-active hemoproteins by the efficient heme-supply *Pichia pastoris* chassis[J]. Advanced Science, 2023, 10(30): e2302826.
- [17] XUE JK, ZHOU JW, LI JH, DU GC, CHEN J, WANG M, ZHAO XR. Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient synthesis of hemoglobins and myoglobins[J]. Bioresource Technology, 2023, 370: 128556.
- [18] WANG MM, SHI Z, GAO N, ZHOU YY, NI XM, CHEN JZ, LIU J, ZHOU WJ, GUO X, XIN B, SHEN YB, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. Sustainable and high-level microbial production of plant hemoglobin in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 80.
- [19] SHAO YR, XUE CL, LIU WQ, ZUO SQ, WEI PL, HUANG L, LIAN JZ, XU ZN. High-level secretory production of leghemoglobin in *Pichia pastoris* through enhanced globin expression and heme biosynthesis[J]. Bioresource Technology, 2022, 363: 127884.
- [20] 吴巧雯, 崔洪志, 郭三堆. 透明颤菌血红蛋白基因的研究与应用[J]. 生物技术通报, 2004, 20(2): 27-30. WU QW, CUI HZ, GUO SD. The studies and applications of *Vitreoscilla* hemoglobin (vgb)[J]. Biotechnology Information, 2004, 20(2): 27-30 (in Chinese).
- [21] FERNANDEZ E, LARSSON JT, McLEAN KJ, MUNRO AW, GORTON L, von WACHENFELDT C, FERAPONTOVA EE. Electron transfer reactions, cyanide and O₂ binding of truncated hemoglobin from *Bacillus subtilis*[J]. Electrochimica Acta, 2013, 110: 86-93.

- [22] IMAI T, TOBE R, HONDA K, TANAKA M, KAWAMOTO J, MIHARA H. Group II truncated haemoglobin Yjbl prevents reactive oxygen species-induced protein aggregation in *Bacillus subtilis*[J]. *eLife*, 2022, 11: e70467.
- [23] BUSTAMANTE JP, RADUSKY L, BOECHI L, ESTRIN DA, TEN HAVE A, MARTÍ MA. Evolutionary and functional relationships in the truncated hemoglobin family[J]. *PLoS Computational Biology*, 2016, 12(1): e1004701.
- [24] KOSMACHEVSKAYA OV, TOPUNOV AF. Method of determination of the content of hemoglobin-like proteins in heterogenic mixtures[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, 43: 313-319.
- [25] KOSMACHEVSKAYA OV, NASYBULLINA EI, SHUMAEV KB, TOPUNOV AF. Expressed soybean leghemoglobin: effect on *Escherichia coli* at oxidative and nitrosative stress[J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7207.
- [26] OKAMOTO Y, SUGISAKI S, SUGA K, UMAKOSHI H. Development of time-course oxygen binding analysis for hemoglobin-based oxygen carriers[J]. *Analytical Sciences*, 2017, 33(8): 953-956.
- [27] 朱宏星, 王道营, 徐为民, 孙冲, 葛庆丰, 周宝晶, 刘潇. 肌红蛋白血红素辅基与珠蛋白相互作用机制[J]. *肉类研究*, 2020, 34(7): 7-12.
- ZHU HX, WANG DY, XU WM, SUN C, GE QF, ZHOU BJ, LIU X. Mechanism of interaction between heme prosthetic group of myoglobin and globin[J]. *Meat Research*, 2020, 34(7): 7-12 (in Chinese).
- [28] KERY V, ELLEDER D, KRAUS JP. Delta-aminolevulinatase increases heme saturation and yield of human cystathionine beta-synthase expressed in *Escherichia coli*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 316(1): 24-29.
- [29] 张迪, 张丽. 血红蛋白分析方法的研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2008, 11(3): 175-176.
- ZHANG D, ZHANG L. Review of analytical method of hemoglobin[J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 2008, 11(3): 175-176 (in Chinese).
- [30] HIROTA S. Oligomerization of cytochrome c, myoglobin, and related heme proteins by 3D domain swapping[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2019, 194: 170-179.