

表达大肠杆菌谷氨酸-1-半醛氨基转移酶对红色荧光报告蛋白尿卟啉原Ⅲ甲基化酶的影响

叶爱华², 张宽亮^{1,2}, 陈宗梅^{1,2}, 荣亮^{1,2}, 汪苗^{1,2}, 范军^{1,2}

1 安徽农业大学 省级作物生物学重点实验室, 合肥 230036

2 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036

摘要: 谷氨酸-1-半醛氨基转移酶 (Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, GSAT) 是尿卟啉原Ⅲ生物合成上游途径的一个酶, 尿卟啉原Ⅲ是红色荧光报告蛋白尿卟啉原Ⅲ甲基化酶 (Uroporphyrinogen III methyltransferase, UPMT) 的底物。为了探明大肠杆菌共表达 GSAT 对 UPMT 荧光强度的影响, 通过 PCR 扩增玉米 *upmt* 基因, 将其插入 pET Duet-1 质粒中第 2 个顺反子中, 构建的载体命名为 pETU, 表达 UPMT 的 N 端含有组氨酸标签; 通过 PCR 扩增大肠杆菌编码 GSAT 的 *hemL* 基因, 定点突变去除 *hemL* 基因中 *Nco* I 序列, 亚克隆至 pET-51b 质粒, 再将获得的 *hemL* 基因插入 pETU 质粒的第一个顺反子中, 构建 pETeGU 载体。表达 GSAT 的 N 端含有 Strep 标签。和单独表达 *upmt* 基因相比, 表达 2 个基因后, 蛋白印迹分析表明没有明显改变 UPMT 表达量, 光谱扫描分析显示没有改变荧光物质的组成, 但是增强了重组细胞的红色荧光物质三甲基咕啉的含量, 该物质在 354 nm 有特异吸收。用 2 mmol/L 的 GSAT 抑制剂 3-氨基-2,3 二羟基苯甲酸处理后, 表达两种酶的菌落荧光消失, 表明重组 GSAT 可能增加内源尿卟啉原Ⅲ水平, 从而增强重组 UPMT 催化产生的红色荧光。

关键词: 尿卟啉原Ⅲ甲基化酶, 红色荧光报告蛋白, 谷氨酸-1-半醛氨基转移酶, 共同表达, 大肠杆菌

Effect of the expression of *Escherichia coli* glutamate-1-semialdehyde aminotransferase on the red fluorescent protein uroporphyrinogen III methyltransferase

Aihua Ye², Kuanliang Zhang^{1,2}, Zongmei Chen^{1,2}, Liang Rong^{1,2}, Miao Wang^{1,2}, and Jun Fan^{1,2}

1 The Provincial Key Laboratory of Crop Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

2 School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (GSAT) is an enzyme in the upstream biosynthetic pathway of uroporphyrinogen III that is the substrate of uroporphyrinogen III methyltransferase (UPMT), a novel red fluorescent protein. In order to detect the effect of overexpression of GSAT with UPMT on the fluorescent intensity in *Escherichia coli*, we amplified maize *upmt* gene by PCR and inserted into the first cistron of pET Duet-1 plasmid to create the vector pETU. The expressed UPMT was

Received: February 20, 2010; **Accepted:** April 29, 2010

Supported by: Genetically Modified Organisms Breeding Major Project (No. 2009ZX08010-002B), Science and Technology Commission Foundation of Anhui Province (No. 07010302137).

Corresponding author: Jun Fan. Tel: +86-551-5786464; E-mail: fanjun@ahau.edu.cn

转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08010-002B), 安徽省科技攻关项目 (No. 07010302137) 资助。

fused histidine tag at N terminus. We also amplified *E. coli hemL* gene encoding GSAT by PCR reaction, eliminated *Nco* I site within the *hemL* gene by site-directed mutagenesis and subcloned into pET-51b plasmid. The resultant *hemL* gene was inserted the second cistron of pETU plasmid to produce the vector pETeGU. The expressed GSAT has the extra Strep-TagII at N terminus. Compared to overexpression *upmt* gene alone, coexpression both genes did not resulted in the remarkable change in either the amount of the UPMT, as estimated by western blot analysis, or the constitution of red fluorescent materials, as shown by UV/visible light scanning analysis, but increased cellular level of the fluorescent material trimethylpyrrocorphin with the specific absorption at 354 nm. The red fluorescence emitted by the colonies cooverexpressing both enzymes completely disappeared after treated by 2 mmol/L gabaculine, the GSAT inhibitor, suggested that the recombinant GSAT may increase the cellular level of uroporphyrinogen III, and thus enhanced the red fluorescence of the *E. coli* cells conferred by the recombinant UPMT.

Keywords: uroporphyrinogen III methyltransferase, red fluorescent protein, glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, coexpression, *Escherichia coli*

生物四吡咯分子, 如血红素、叶绿素、维生素 B₁₂ 和西罗血红素, 合成的共有途径中第一个中间物是 5-氨基乙酰丙酸 (5-Aminolevulinic acid, ALA)。在动物、真菌和光合细菌中, ALA 由 ALA 合酶催化; 在植物和大部分微生物中, ALA 来自谷氨酸的碳骨架。首先合成谷氨酰 tRNA, 随后, 它被还原酶催化生成谷氨酸-1-半醛 (Glutamate-1-semialdehyde, GSA), 谷氨酸-1-半醛氨基转移酶 (GSA aminotransferase, GSAT) 催化 GSA 分子内转氨合成 ALA。从 ALA 到尿卟啉原 III 是所有生物合成四吡咯分子的共有途径, 尿卟啉原 III 的转化有 2 个分支反应, 一条途径最终合成血红素和叶绿素等卟啉类化合物; 另一条途径由尿卟啉原甲基化酶 (Uroporphyrinogen III methyltransferase, UPMT) 催化, 最终合成西罗血红素和维生素 B₁₂ 等卟吩烷化合物。其中, ALA 合成和 UPMT 催化的反应是四吡咯分子合成关键调节位点^[1]。

大肠杆菌 GSAT 由 *hemL* 基因编码, 一旦突变导致功能丧失, 细菌的生长依赖于体外添加 ALA, 否则细胞死亡^[2]。重组纯化的大肠杆菌 GSAT 活性被 3-氨基-2,3 二羟基苯甲酸抑制^[3]。谷氨酰 tRNA 还原酶是 ALA 合成的关键酶, 受血红素的反馈抑制, 它和 GSAT 相互作用, 调节 ALA 合成^[4]。聚胞藻 *Synechococcus* GSAT 突变蛋白对抑制剂不敏感^[5], 其编码基因作为植物转基因的筛选标记^[6-7]。

细菌 UPMT 的基因命名较多, 主要有 *cobA* 和 *CysG*^A 等。大肠杆菌重组表达 *cobA* 基因, 细胞积累催化产物, 菌落在紫外光照射下显示强烈红色荧光^[8], 这种特性用于克隆细菌 *cobA* 基因以及合成尿

卟啉原 III 的基因簇^[9-10]。*cobA* 及其下游维生素 B₁₂ 合成基因在大肠杆菌共同表达, 用于分析酶活性^[11-12]。作为报告基因, *cobA* 用于分析细菌、酵母和哺乳动物细胞中的转录水平^[13], 根据插入失活筛选克隆外源基因的重组子^[14], 以及分析细菌的基因启动子效应^[15]。最近发现, 表达 *cobA* 基因可以增加大肠杆菌对硝酸盐毒性的抵抗力^[16]。

大肠杆菌表达 *cobA* 基因产生的红色荧光存在荧光滞后和均一性差等缺点^[14,17], 添加 ALA 能提高胞内 UPMT 的活性, 缩短荧光滞后时间, 提高细胞的荧光强度^[16,18], 但是会导致大肠杆菌积累血红素合成的中间物, 对照菌落也产生红色荧光^[13], 此外, ALA 在溶液中不稳定^[19]。目前, *cobA* 作为报告基因的影响因子研究报道较少。由于 GSAT 和 UPMT 两个都是标记蛋白, 分别位于西罗血红素合成的关键调节酶, 因此, 它们之间的协调作用需要深入研究。

大肠杆菌仅含有血红素和西罗血红素, 表达 ALA 合成相关的酶, 增加细胞内 ALA 以及尿卟啉原 III 含量^[20-21], 但表达 GSAT 的胞内效应未见报道。此前, 笔者发现纯化的玉米 UPMT 结合其催化的红色荧光产物, 而纯化的一些细菌 UPMT 不结合, 表明玉米 UPMT 更适合作为报告蛋白, 用于体外分析^[22]。本研究中, 将大肠杆菌 GSAT 和玉米 UPMT 共同表达, 研究 GSAT 对报告蛋白 UPMT 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和试剂

本研究保存的质粒见表 1, 大肠杆菌菌株

XL-Blue 和 BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术公司, 酵母浸出物和胰蛋白胨是英国 Oxoid 公司产品, 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 购自美国 Promega 公司, 3-氨基-2,3 二羟基苯甲酸 (Gabaculine)、DEAE-Sepharose CL-6B 和 Ni-NTA 是美国 Sigma-Aldrich 公司产品, Strep-tag 抗体和 His-tag 抗体是美国 Novagen 公司产品, 其他分子生物学试剂为大连宝生物公司生产。

1.1.2 仪器

紫外可见分光光度仪 U-2001 和高速冷冻离心机 SCR20BC 是日本 Hitachi 公司产品, 凝胶成像系统由日本 Kodark 公司生产, 蛋白质电泳和转移装置购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆

CTAB 法提取大肠杆菌基因组 DNA, 以此为模板, 扩增 *hemL* 基因, 引物见表 1, 扩增产物插入 pUC-18T 载体, 测序。采用同义突变去除 *hemL* 基因内 *Nco* I 作用序列, PCR 扩增, 电泳检测扩增产

物, 用限制性内切酶 *Dpn* I 消化 12 h, 除去模板, 然后转化大肠杆菌 XL-Blue, 挑选克隆, 测序。PCR 扩增玉米 *upmt* 基因, 产物琼脂糖电泳检测后纯化, 用相应的限制性内切酶作用, 再纯化。

1.2.2 表达载体构建

构建的载体及命名见表 2。将扩增的玉米 *upmt* 基因插入 pET Duet-1 质粒第 2 个顺反子, 构建 pETU 载体; 将大肠杆菌 *hemL* 基因插入 pET-51b 质粒, 构建 p51eG 载体; *Nco* I 和 *Hind* III 酶切 p51eG 质粒的 *hemL* 基因, 插入 pETU 质粒第 1 个顺反子, 构建 pETeGU 载体。

1.2.3 重组菌株诱导表达

不同表达载体转化到大肠杆菌 BL21(DE3), 在 LB 培养基中加入 100 μ g/mL 的氨苄青霉素, 37°C 培养 12 h, 按照 1:200 稀释, 待菌体浓度生长至 OD_{600} 约为 0.5 时, 加入 IPTG, 终浓度为 0.4 mmol/L, 37°C 诱导 5 h, 6 000 \times g 离心 10 min 收集菌体, 超声破碎, 加入裂解缓冲液 (100 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 8.0), 超声破碎, 15 000 \times g 离心 30 min, 弃沉淀, 上清液备用。

表 1 PCR 扩增引物及序列

Table 1 PCR primers used in this study

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Template	Size (bp)
<i>E. coli hemL</i>	Forward: GGTACCGAGTAAGTCGAAAAATCTTTAC Reverse: AAGCTTACAACCTTCGAAACACCCGACGTG	Genomic DNA	1 291
<i>E. coli hemL</i> mutation	Forward: GAACTGGTCCCACGATGGATATGGTGCATG Reverse: CATGCGGCACCATATCCATCGTCGGACCACTTC	p18eG1 plasmid	3 983
Maize <i>upmt</i>	Forward: ATGCTGCATATGAGAGGATCGCATCATC Reverse: ATGCTCGAGTTAAGATGAATCAACCCAG	p31S plasmid	880

The full length of the plasmid with the mutated *hemL* gene inserted into pUC18-T vector.

表 2 本研究所用载体

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant properties	Reference or source
p18eG1	<i>E. coli hemL</i> gene was cloned into pUC18-T vector	This study
p18eG2	Elimination of <i>Nco</i> I site within the <i>hemL</i> gene	This study
pET-51b	ColE replicon, <i>bla</i> , Strep-Tag II fusion tag (N terminus)	Novagen
pET Duet-1	ColE replicon, <i>bla</i> , two expression units	Novagen
p31S1	Maize <i>upmt</i> gene was inserted into pQE 31 plasmid	[22]
pETU	Maize <i>upmt</i> gene was inserted into the second expression unit of pET Duet-1 plasmid. The UPMT was fused with His6-tag at N terminus	This study
p51eG	<i>E. coli hemL</i> gene was inserted into pET-51b plasmid	This study
pETeGU	<i>E. coli hemL</i> gene from p51eG plasmid was inserted into the first expression unit of pETU plasmid. The HemL was fused Strep-Tag II tag at N terminus	This study

1.2.4 蛋白分析

蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝 G-250 方法, 以 BSA 作对照。蛋白 SDS-PAGE 分析, 分离胶为 12.5%, 电泳完毕后转移到 PVDF 膜, 转移效果用丽春红显示, 1×TBS/0.2% 戊二醛固定 40 min, 加 10 mL 封闭液封闭 1 h 阻断非特异性结合部位, 分别加入 10 μL 按 1:2 000 稀释的 Strep-Tag II 或者组氨酸标签的单克隆抗体, 室温孵育过夜。Western 漂洗液漂洗 3 次, 加 10 mL 封闭液及按 1:2 000 稀释的 HRP 标记第二抗体 10 μL, 孵育 1 h 后漂洗 3 次, 加 1 mL 化学发光剂, 置入暗室用 X 光胶片曝光, 然后显影, 定影。

1.2.5 重组细胞的荧光色素分析^[22]

不同表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 LB 固体培养基上 37℃ 生长 15 h, 长紫外光下观察菌落荧光。pETeGU 质粒转化大肠杆菌, 在 1 L LB 培养基中诱导表达后, 收集菌体, 破碎细胞, 上清液用 DEAE-Sepharose CL-6B (3 cm×3 cm) 吸附, 裂解缓冲液冲洗 5 个柱体积, 加入 20 mL 的洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 3 mol/L NaCl) 洗脱, 立即进行 300~700 nm 光谱扫描。

2 结果

2.1 基因扩增及突变

利用 NEBcutter V2.0 软件预测基因的限制性内切酶作用序列, 设计不同引物 (表 1), 分别扩增不同基因。根据 ExPASy 中 Translate tool 软件分析大肠杆菌 *hemL* 基因编码的氨基酸序列, 采用同义突变技术去除 *hemL* 基因的 *Nco* I 序列, 引物突变序列不改变大肠杆菌密码子的偏爱性。

利用 PCR 技术, 从大肠杆菌基因组 DNA 中扩增出 *hemL* 基因, 约 1.3 kb (图 1), 测序结果和公布的序列一致, 由于在 pET-51b 质粒表达的蛋白 N 端含有 Strep-Tag II 标签, 所以表达的 GSAT 删除第 1 个 Met 残基。

以本实验室已构建的含有玉米 *upmt* 基因 p31S1 载体为模板 (表 2) 进行 PCR 扩增, 产物约为 880 bp (图 2), 编码 N 端组氨酸标签和玉米 UPMT 的 Leu91-Ser363。玉米 UPMT 前体含有叶绿体导肽, 删除 N 端和 C 端一段氨基酸序列, 对其功能影响不大^[22]。

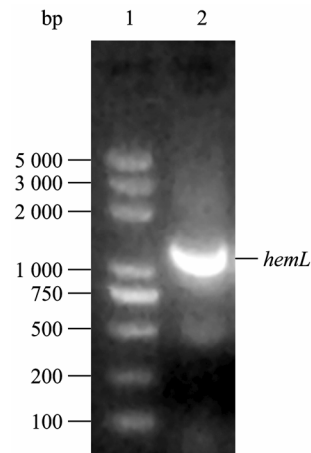


图 1 大肠杆菌 *hemL* 的 PCR 扩增

Fig. 1 *Escherchia coli hemL* gene obtained by PCR. 1: DL5000 DNA marker; 2: *E. coli hemL* gene.

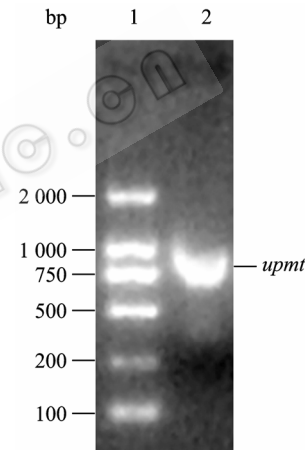


图 2 玉米 *upmt* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR analysis of maize *upmt* gene encoding Leu91-Ser363 amino acid sequence with His6-tag at N terminus. 1: DL2000 DNA marker; 2: maize *upmt* gene.

2.2 载体构建

本研究构建数个载体 (表 2) 用于基因克隆和表达。分别把大肠杆菌 *hemL* 基因和玉米 *upmt* 基因插入 pET Duet -1 质粒的第 1 和第 2 个顺反子, 表达重组蛋白分别含有 Strep-Tag II 和组氨酸标签。N 端组氨酸标签对大肠杆菌 GSAT 和玉米 UPMT 的活性没有影响^[4,22]。

2.3 GSAT 和 UPMT 蛋白在大肠杆菌的表达水平

分别转化 pETU 质粒和 pETeGU 质粒, 重组 UPMT 的表达水平没有显著变化 (图 3), 同时检测发现大肠杆菌 GSAT 也能高效表达, 表明 pETDuet-1 质粒的 2 个表达单元中每个启动子对下游基因的表达都起作用。

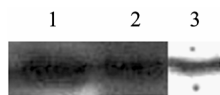


图3 UPMT 和 GSAT 的可溶性蛋白印迹分析

Fig. 3 Western blotting analysis of the soluble UPMT and GSAT. Lane 1 and 2 represented the expression of UPMT extracted from the induced *E. coli* BL21 (DE3) cells carrying pETU plasmid or pETeGU plasmid. Lane 3 represented the expression of GSAT from the induced cells carrying pETeGU plasmid.

2.4 表达 GSAT 和 UPMT 对菌落荧光的影响

将 pETU 质粒转化大肠杆菌, 没有 IPTG 诱导, 菌落不显示红色荧光, 但是诱导后菌落显示红色荧光 (表 3)。无论重组 pUC18 质粒中 Lac 启动子下的细菌 *cobA* 基因, 还是重组 pQE31 质粒中 T5 启动子下的玉米 *upmt* 基因, 其本底表达导致菌落显示红色荧光^[13,22], 表明菌株和质粒的不同启动子导致 UPMT 的表达存在差异。

含有 pETeGU 质粒的大肠杆菌依赖 UPMT 的本底表达, 菌落显示红色荧光。诱导后, 细胞荧光强度高于转化 pETU 质粒细胞的强度 (表 3), 由于两种重组细胞中 UPMT 的表达水平接近 (图 3), 推测表达 GSAT 促进 ALA 的合成, 提高细胞内尿卟啉原 III 水平。

表 3 转化不同载体的重组大肠杆菌荧光展示

Table 3 Fluorescent display from the recombinant *E. coli* carrying the different plasmid respectively

Plasmid	Colonies fluorescence		Pigment production (A_{354}/g cells)
	-IPTG	+IPTG	
pETU	-	+	6.318±1.224
pETeGU	+	+	10.224±1.683

2.5 GSAT 的抑制剂对诱导的重组菌落荧光的影响

添加 2 mmol/L 的 GSAT 抑制剂 3-氨基-2,3 二羟基苯甲酸, 表达 GSAT 和 UPMT 的重组菌落荧光消失 (图 4)。该抑制剂能穿过大肠杆菌细胞, 抑制 ALA 合成, 同时对重组聚胞藻 GSAT 和橙色绿屈挠菌 *Chloroflexus aurantiacus* 蛋白的表达基本没有影响^[5,23], 可能 ALA 合成被抑制, 尿卟啉原 III 的含量降低, 导致荧光消失, 不加抑制剂的菌落显示强烈红色荧光, 表明增强胞内 ALA 的合成比在体外添加

ALA 对 UPMT 的荧光效果好。大肠杆菌 *hemB* 突变体不能合成尿卟啉原 III, 表达 UPMT 后, 菌落不显示红色荧光^[24], 表明 UPMT 的荧光依赖内源底物尿卟啉原 III 的含量。

2.6 重组细胞的荧光物质分析

转化 pETeGU 质粒的重组细胞呈红色, 光谱扫描纯化的上清液, 显示在 354 nm 和 378 nm 有 2 个吸收峰 (图 5), 分别是三甲基咕啉和西罗双氢叶绿三酸的特异光吸收, 是重组 UPMT 催化产生的主要荧光物质^[8], 这和表达玉米 UPMT 的结果一致^[22]。体外添加 ALA 能增加血红素合成中间物卟啉原的含量, 它们容易氧化产生尿卟啉和粪卟啉等化合物,

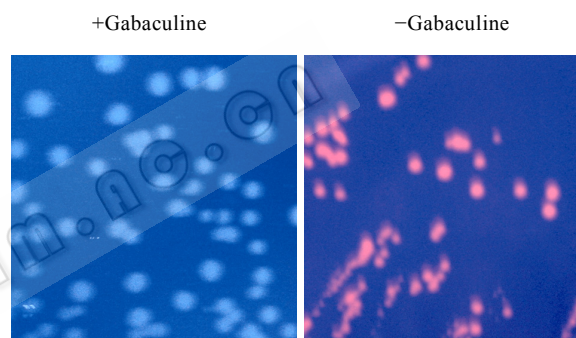


图 4 浓度为 2 mmol/L 的 3-氨基-2,3 二羟基苯甲酸对诱导含有 pETeGU 质粒的大肠杆菌菌落荧光的影响

Fig. 4 The effect of gabaculine at the concentration of 2 mmol/L on the red fluorescence from the induced colonies harboring pETeGU plasmid on LB agar plate upon UV light illumination.

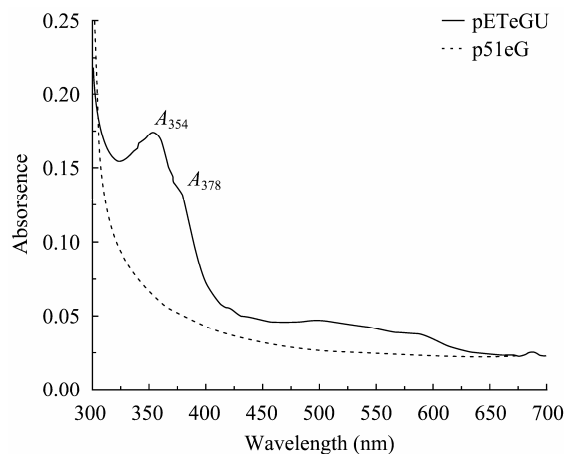


图 5 转化不同质粒的大肠杆菌诱导细胞破碎上清液的光谱扫描, 图上标注为转化的质粒名称

Fig. 5 UV-visible spectra of the extracts from the induced *E. coli* cells carrying the different plasmids (denoted on the figure). The specific absorption at 354 nm and 378 nm represent trimethylpyrrochlorin and sirohydrochlorin respectively.

在 405 nm 有吸收峰^[21], 本研究并未检测到, 可能是重组 GSAT 对提高 ALA 合成的能力有限, 以及重组表达 UPMT 导致大肠杆菌尿卟啉原Ⅲ的代谢流向发生改变。

3 讨论

本研究中, 我们选择了具有双顺反子的载体, 每个顺反子都有自己独立的启动子和核糖体结合位点, 选择表达的蛋白标签序列较短, 避免抑制酶活性, 便于检测。由于 GSAT 活性测定误差较大^[25]; 以及尿卟啉原Ⅲ和 UPMT 的催化产物难以区分^[24], 我们没有分析重组 GSAT 的比活和胞内尿卟啉原Ⅲ的含量。

UPMT 作为指示蛋白, 从理论上推测, 其荧光强度可能与蛋白表达水平、内源底物浓度、荧光产物的稳定性以及表达系统有关^[13], 表达 UPMT 导致代谢流向改变, 可能降低大肠杆菌血红素含量, 解除了它对谷氨酰 tRNA 还原酶的反馈抑制^[14]。本研究中, 表达大肠杆菌 GSAT, 可能提高 ALA 合成能力, ALA 被大肠杆菌基因组编码的合成血红素一些酶转化成尿卟啉原Ⅲ^[21], 它被重组表达的 UPMT 催化, 从而提高转化细胞的荧光强度。

血红素合成的一些卟啉类中间物, 例如尿卟啉原Ⅲ, 可以作为治疗癌症的药物^[21]。大肠杆菌高效合成尿卟啉原Ⅲ, 需要重组表达 4 个酶, 不同蛋白的表达水平差异导致细胞的尿卟啉原Ⅲ浓度不同, 需要重组细菌长时间培养和 HPLC 技术分析才能确定^[21], 已发现, 体外添加 ALA 浓度和大肠杆菌表达 UPMT 产生的荧光强度成正相关^[15], UPMT 能否检测细胞内尿卟啉原Ⅲ的含量, 有待进一步研究。

物质体转化中, 氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶的 *aadA* 基因和绿色荧光蛋白的基因位于一个双顺反子, 作为双功能标记用于转基因后代的筛选和检测^[26]。甜菜碱醛脱氢酶基因不仅作为质体转化筛选标记, 还提高转基因植物的抗旱性^[27]。植物在叶绿体中不但合成四吡咯分子, 而且合成类胡萝卜素。研究发现, 转基因玉米的类胡萝卜素含量随着转化基因数目增加而升高^[28]。西罗血红素作为植物亚硝酸还原酶和亚硫酸还原酶的辅基, 参与植物氮和硫

的同化, 亚硝酸盐诱导玉米幼苗中 *upmt* 基因的表达^[29]。GSAT 和 UPMT 作为西罗血红素合成 2 个关键蛋白, 它们的编码基因能否在转基因植株中作为标记并增加西罗血红素的产量, 正在深入研究。

REFERENCES

- [1] Warren MJ, Bolt E, Woodcock SC. 5-Aminolaevulinic acid synthase and uroporphyrinogen methylase: two key control enzymes of tetrapyrrole biosynthesis and modification. *Ciba Found Symp*, 1994, **180**: 26-40.
- [2] Wang LY, Brown L, Elliott M, *et al*. Regulation of heme biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: activity of glutamyl-tRNA reductase (HemA) is greatly elevated during heme limitation by a mechanism which increases abundance of the protein. *J Bacteriol*, 1997, **179**(9): 2907-2914.
- [3] Ilag LL, Jahn D, Eggertsson G, *et al*. The *Escherichia coli hemL* gene encodes glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *J Bacteriol*, 1991, **173**(11): 3408-3413.
- [4] Lürer C, Schauer S, Möbius K, *et al*. Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the initial reactions of porphyrin biosynthesis. *J Biol Chem*, 2005, **280**(19): 18568-18572.
- [5] Smith MA, Grimm B. Gabaculine resistance of *Synechococcus* glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Biochemistry*, 1992, **31**(16): 4122-4127.
- [6] Rosellini D, Capomaccio S, Ferradini N, *et al*. Non-antibiotic, efficient selection for alfalfa genetic engineering. *Plant Cell Rep*, 2007, **26**(7): 1035-1044.
- [7] Gough KC, Hawes WS, Kilpatrick J, *et al*. Cyanobacterial GR6 glutamate-1-semialdehyde aminotransferase: a novel enzyme-based selectable marker for plant transformation. *Plant Cell Rep*, 2001, **20**(4): 296-300.
- [8] Warren MJ, Stolowich NJ, Santander PJ, *et al*. Enzymatic synthesis of dihydrosiro-hydrochlorin (precorrin-2) and of a novel pyrrocorphin by uroporphyrinogen III methylase. *FEBS Lett*, 1990, **261**(1): 76-80.
- [9] Lan XQ, Sato K, Taguchi G, *et al*. Characterization of a gene conferring red fluorescence isolated from an environmental DNA library constructed from soil bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, **72**(7): 1908-1914.
- [10] Anderson PJ, Entsch B, McKay DB. A gene, *cobA* + *hemD*, from *Selenomonas ruminantium* encodes a bifunctional enzyme involved in the synthesis of vitamin B₁₂. *Gene*, 2001, **281**(1/2): 63-70.

- [11] Roessner CA, Park JH, Scott AI. Genetic engineering of *Escherichia coli* for the production of precorrin-3 *in vivo* and *in vitro*. *Bioorg Med Chem*, 1999, **7**(10): 2215–2219.
- [12] Raux E, Leech HK, Beck R, *et al.* Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem J*, 2003, **370**(2): 505–516.
- [13] Wildt S, Deuschle U. *CobA*, a red fluorescent transcriptional reporter for *Escherichia coli*, yeast, and mammalian cells. *Nat Biotech*, 1999, **17**(12): 1175–1178.
- [14] Roessner CA. Use of *CobA* and *CysG^A* as red fluorescent indicators. *Methods Mol Biol*, 2002, **183**: 19–30.
- [15] Feliciano J, Liu Y, Daunert S. Novel reporter gene in a fluorescent-based whole cell sensing system. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**(5): 989–997.
- [16] Araya MA, Tantaleán JC, Pérez JM, *et al.* Cloning, purification and characterization of *Geobacillus stearothermophilus* V uroporphyrinogen-III C-methyltransferase: evaluation of its role in resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 2009, **160**(2): 125–133.
- [17] Chou PL, Ohtsuka M, Minowa T, *et al.* Reddish *Escherichia coli* cells caused by overproduction of *Bacillus stearothermophilus* uroporphyrinogen III methylase: cloning, sequencing and expression of the gene. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(10): 1817–1824.
- [18] Schubert HL, Raux E, Wilson KS, *et al.* Common chelatase design in the branched tetrapyrrole pathways of heme and anaerobic cobalamin synthesis. *Biochemistry*, 1999, **38**(33): 10660–10669.
- [19] Kaliszewski M, Kwaśny M, Kamiński J, *et al.* The stability of 5-aminolevulinic acid and its ester derivatives. *Acta Pol Pharm*, 2004, **61**(1): 15–19.
- [20] Verderber E, Lucast LJ, Van Dehy JA, *et al.* Role of the *hemA* gene product and delta-aminolevulinic acid in regulation of *Escherichia coli* heme synthesis. *J Bacteriol*, 1997, **179**(14): 4583–4590.
- [21] Kwon SJ, de Boer AL, Petri R, *et al.* High-level production of porphyrins in metabolically engineered *Escherichia coli*: systematic extension of a pathway assembled from overexpressed genes involved in heme biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(8): 4875–4883.
- [22] Fan J, Wang DQ, Liang Z, *et al.* Maize uroporphyrinogen III methyltransferase: overexpression of the functional gene fragments in *Escherichia coli* and one-step purification. *Protein Expr Purif*, 2006, **46**(1): 40–46.
- [23] Oelze J. Light and oxygen regulation of the synthesis of bacteriochlorophylls a and c in *Chloroflexus aurantiacus*. *J Bacteriol*, 1992, **174**(15): 5021–5026.
- [24] Warren MJ, Bolt EL, Roessner CA, *et al.* Gene dissection demonstrates that the *Escherichia coli* *cysG* gene encodes a multifunctional protein. *Biochem J*, 1994, **302**(3): 837–844.
- [25] Pugh CE, Nair SP, Harwood JL, *et al.* Conditions for the assay of glutamate semialdehyde aminotransferase that overcome the problem of substrate instability. *Anal Biochem*, 1991, **198**(1): 43–46.
- [26] Jeong SW, Jeong WJ, Woo JW, *et al.* Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for selection and tracking of plastid-transformed cells in tobacco. *Plant Cell Rep*, 2004, **22**(10): 747–751.
- [27] Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Plastid-expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*, 2004, **136**(1): 2843–2854.
- [28] Zhu CF, Naqvi S, Breitenbach J, *et al.* Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(47): 18232–18237.
- [29] Sakakibara H, Takei K, Sugiyama T. Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize uroporphyrinogen III methyltransferase, an enzyme involved in the synthesis of siroheme, which is prosthetic group of nitrite reductase. *Plant J*, 1996, **10**(5): 883–892.