

研究报告



基因重组大肠杆菌表达血红素加氧酶-1 及培养条件优化

梅建凤* 赵文渊 易喻 陈建澍 张彦璐 应国清

浙江工业大学药学院 浙江 杭州 310014

摘要:【背景】血红素加氧酶-1 (HO-1)具有抗氧化应激、抗凋亡和抗纤维化等多种生理效应,有望成为一种新型药物应用于临床疾病的治疗。【目的】构建表达 HO-1 的基因重组大肠杆菌(*Escherichia coli*),并优化其表达培养条件,实现 HO-1 高产率的表达。【方法】PCR 法克隆集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC 6803 的 HO-1 基因(*ho1*),构建重组质粒 pET-28a-ho1,转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,单因素实验优化表达培养基的种类、诱导剂添加时间、诱导培养时间、诱导剂浓度和诱导培养温度。【结果】构建了表达 HO-1 的基因重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a-ho1 菌株,用甘油(GY)培养基培养至菌体浓度 OD_{600} 约为 0.8 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导,30 °C 诱导培养 6 h,HO-1 的表达量最高,Ni-NTA 柱分离纯化得到的 HO-1 收率占细胞总蛋白的 10.9%。【结论】获得了可溶性表达 HO-1 的基因重组大肠杆菌及其较佳的培养条件,为进一步研究集胞藻来源的 HO-1 的酶学性质和应用奠定了基础。

关键词: 血红素加氧酶, 原核表达, 大肠杆菌, 表达条件优化

Expression of heme oxygenase-1 in gene recombinant *Escherichia coli* and optimization of its cultivation

MEI Jian-Feng* ZHAO Wen-Yuan YI Yu CHEN Jian-Shu

ZHANG Yan-Lu YING Guo-Qing

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

Abstract: [Background] Heme oxygenase-1 (HO-1) has many physiological effects, such as anti-oxidative stress, anti-apoptosis and anti-fibrosis, and is expected to become a new drug for the treatment of clinical diseases. [Objective] A gene recombinant *Escherichia coli* was constructed for expressing HO-1, and its culture conditions were optimized to achieve the high yield of HO-1. [Methods] The gene of HO-1 (*ho1*) was cloned from the cell of *Synechocystis* sp. PCC 6803, and was recombined with the plasmid of pET-28a. The recombinant plasmid (pET-28a-ho1) was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The single factor experiment was applied to optimize the type of medium, inducer adding time, cultivation time, inducer concentration and cultivation temperature for the expression of HO-1. [Results] A gene recombinant *E. coli* strain, BL21(DE3)/pET-28a-ho1, was successfully constructed for expressing HO-1. When the strain was cultured in glycerol medium (GY),

Foundation item: Zhejiang Provincial Public Welfare Technology Applied Research Project of China (2016C33167)

*Corresponding author: Tel: 86-571-88871029; E-mail: mrion@zjut.edu.cn

Received: 13-03-2018; Accepted: 02-05-2018; Published online: 11-06-2018

基金项目: 浙江省公益技术应用研究项目(2016C33167)

*通信作者: Tel: 0571-88871029; E-mail: mrion@zjut.edu.cn

收稿日期: 2018-03-13; 接受日期: 2018-05-02; 网络首发日期: 2018-06-11

and as the cell OD_{600} was about 0.8, IPTG with the final concentration of 0.1 mmol/L was added, the highest yield of HO-1 could be obtained after induction cultivation for 6 h at 30 °C. Separation of HO-1 by Ni-NTA column accounted for 10.9% yield of the total cell protein. **[Conclusion]** A gene recombinant *E. coli* strain, and its optimal cultivation conditions were achieved for the expression of soluble HO-1, which laid a foundation for further study on the enzymatic properties and application of HO-1 from *Synechocystis* sp.

Keywords: Heme oxygenase, Prokaryotic expression, *Escherichia coli*, Optimization of cultivation

血红素加氧酶(Heme oxygenase, EC 1.14.99.3, HO)是将血红素氧化为胆绿素的酶,包括3种类型,即HO-1、HO-2和HO-3,其中HO-1是将血红素氧化为胆绿素的主要限速酶,也称热休克蛋白32(Hsp32)^[1-2]。近些年来,关于HO-1的功能以及与疾病的关系逐渐被发现报道。首先,HO-1分解血红素,避免了血红素对细胞的损伤,催化过程中消耗了O₂,减少了氧自由基生成^[3];其次,HO-1的催化产物Fe²⁺、CO和胆红素在氧化应激中起着保护组织细胞的作用,其中Fe²⁺与蛋白结合形成铁蛋白,铁蛋白的形成可降低细胞内Fe²⁺的浓度,同时HO-1还可以上调内质网上的Fe²⁺通道,促进细胞内Fe²⁺泵出,防止由Fe²⁺介导的氧化应激损伤^[4-5];再者,胆红素作为HO-1的代谢产物,能有效地清除氧自由基,防止细胞脂质层过氧化,而且游离胆红素比结合胆红素更能有效地抑制低密度脂蛋白分解^[6]。大量研究结果表明:HO-1具有抗炎、抗氧化应激、抗凋亡、抗纤维化等生理效应,有望成为一种有效的治疗药物应用于临床^[7]。

目前大量文献主要集中于研究原核表达大鼠HO-1^[8-10],事实上,在藻类和植物中也同样存在HO-1,但鲜有关于原核表达集胞藻来源的HO-1的研究报道。Migita等^[11]指出集胞藻PCC 6803中HO-1与哺乳动物HO-1的总体结构和氨基酸序列相似度较高,且与人HO-1相似度达67%,同时预测集胞藻HO-1的三级结构与人HO-1十分相似。所以来自藻类细胞的HO-1也具有动物来源的HO-1的活性。克隆集胞藻来源的HO-1基因在大肠杆菌中表达,则具有表达效率高、成本低等优点。本文克隆了集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC 6803的

HO-1基因在大肠杆菌中表达,并优化了其表达HO-1蛋白的培养条件,实现HO-1高产率的表达,为进一步研究集胞藻来源的HO-1的酶学性质和应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC 6803、大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞、DH5 α 感受态细胞和质粒pET-28a由本实验室保存。

1.2 培养基

LB培养基(g/L):酵母浸出粉5.0,蛋白胨10.0, NaCl 10.0, pH 7.4, 1 \times 10⁵ Pa 灭菌30 min。

甘油(GY)培养基(g/L):甘油20.0,酵母浸出粉20.0, (NH₄)₂SO₄ 5.0, NaCl 5.0, Na₂HPO₄ 15.0, KH₂PO₄ 3.0, MgSO₄ 0.5, pH 自然, 1 \times 10⁵ Pa 灭菌30 min。

1.3 主要试剂和仪器

引物P₁和P₂、平端DNA片段添dA试剂盒、T载体PCR产物克隆试剂盒(含质粒pUCm-T)、DNA胶回收试剂盒、质粒DNA小量提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司; PrimeSTAR Max DNA聚合酶、琼脂糖、限制性内切酶(*Nde* I和*Xho* I), 宝日医生物技术(北京)有限公司; 镍-琼脂糖微球FF, 杭州费乐尔生物科技有限公司。

PCR仪, Eppendorf有限公司; 超声波细胞粉碎仪, 宁波新艺超声设备有限公司; 紫外-可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad有限公司; 核酸蛋白检测仪、层析图谱采集分析仪, 上海沪西分析仪器厂有限

公司。

1.4 表达 HO-1 重组大肠杆菌的构建

集胞藻 RT-PCR 的方法参见文献[12], 设计引物 P₁ (5'-GGGAATTCCATATGAGTGTCAACTTAGC-3')和 P₂ (5'-CCGCTCGAGCTAGCCTTCGGA G-3')扩增 *ho1* 基因(GenBank:BA000022.2: 317127-317849)。PCR 反应体系: 上、下游引物(100 μmol/L)各 2 μL, PrimeSTAR Max DNA 聚合酶 25 μL, 集胞藻 cDNA (约 100 ng) 1 μL, ddH₂O 补至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物 3'端加碱基 A 后连接 pUCm-T 载体, 转化 *E. coli* DH5α 菌株, 提取阳性克隆质粒酶切验证, 测序鉴定。

pUCm-T-*ho1* 与 pET-28a 质粒经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后, 目的基因和开环 pET-28a 经 T4 DNA 连接酶连接, 重组质粒 pET-28a-*ho1* 转化 *E. coli* BL21(DE3), 提取阳性克隆质粒酶切验证, 并经测序鉴定正确后, 接种重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-*ho1* 至含卡那霉素(Kan)抗性的 LB 培养基中制备种子液, 3%体积分数接种到 Kan 抗性的 LB 培养基, 37 °C 培养 2 h, 加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 30 °C、100 r/min 诱导 20 h, 取 1 mL 菌液离心收集菌体, SDS-PAGE 分析 HO-1, SDS-PAGE 的方法参见文献[13]。

1.5 重组菌表达 HO-1 的条件优化

重组大肠杆菌于 Kan 抗性的 LB 培养基, 37 °C、180 r/min 培养 12 h, 按 3%体积分数接种至 HO-1 表达培养的 LB 和 GY 培养基, 30 °C、100 r/min 培养至菌液达到一定 *OD*₆₀₀ 后, 加入 IPTG 或 2%的乳糖诱导, 继续培养一段时间, 取 1 mL 菌液离心收集菌体, SDS-PAGE 分析 HO-1 表达量。

首先对表达培养基的种类进行选择, 然后依次对诱导剂添加时间、诱导培养时间、诱导剂浓度和诱导培养温度进行优化。

2 结果与分析

2.1 表达 HO-1 的重组大肠杆菌的构建

2.1.1 HO-1 基因的 PCR 扩增

以集胞藻总 RNA 逆转录得到的 cDNA 为模板, 设计的引物 P₁ 和 P₂ 引入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点, PCR 产物的电泳图见图 1, 可见在 750 bp 左右存在单一的条带, 与目的基因 *ho1* 片段大小 (723 bp)一致。

2.1.2 克隆载体 pUCm-T-*ho1* 的构建

用 PrimeSTAR Max DNA 聚合酶扩增出的 PCR 产物为平末端, PCR 产物 3'端加碱基 A 后连接 pUCm-T 载体, 转化 *E. coli* DH5α 菌株, 提取阳性克隆质粒, 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 电泳图见图 2, 可见在 750 bp 处存在明显条带, 测序结果与目的基因序列一致(比对结果略), 说明 pUCm-T-*ho1* 构建成功。

2.1.3 表达载体 pET-28a-*ho1* 的构建

pUCm-T-*ho1* 与 pET-28a 质粒分别经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 目的基因 *ho1* 和开环 pET-28a 经 T4 DNA 酶连接后, 转化 *E. coli* BL21(DE3)菌株, 提取阳性克隆质粒, 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 电泳图见图 3, 可见在 750 bp 处存在明显条带, 测序结果与目的基因序列一致(比对结果略), 说明表达载体 pET-28a-*ho1* 构建成功。

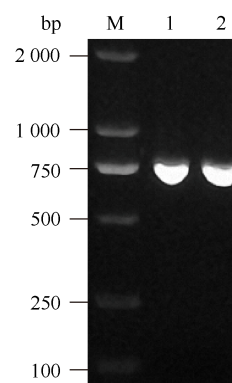


图 1 PCR 扩增 *ho1* 的电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of *ho1* by PCR

注: M: Marker; 1, 2: PCR 产物。

Note: M: Marker; 1, 2: PCR product.

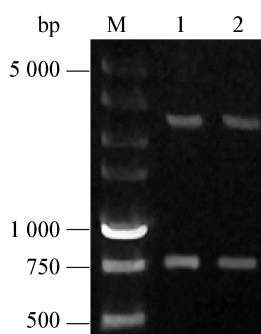


图2 阳性克隆载体双酶切后电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of the digested cloning vector from positive clone

注: M: Marker; 1, 2: pUCm-T-ho1 质粒使用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切.

Note: M: Marker; 1, 2: Plasmid pUCm-T-ho1 digested by *Nde* I and *Xho* I.

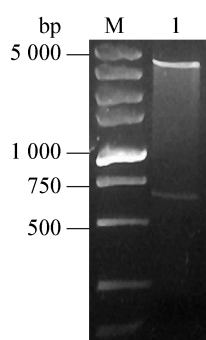


图3 阳性表达载体双酶切后电泳图

Figure 3 Electrophoretogram of the digested expression vector from positive clone

注: M: Marker; 1: pET-28a-ho1 质粒使用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切.

Note: M: Marker; 1: Plasmid pET-28a-ho1 digested by *Nde* I and *Xho* I.

2.1.4 重组菌表达 HO-1 的检测

重组 *ho1* 的 *E. coli* BL21(DE3) 菌株 (*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-ho1) 使用 LB 培养基培养 2 h (OD_{600} 约为 0.7), 加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 20 h, SDS-PAGE 电泳分析见图 4。可见 IPTG 诱导的菌体(泳道 2), 在 26.0 kD 与 33.0 kD 之间出现一明显条带, 与预估的 HO-1 蛋白分子量 29 kD 相符, 未重组 *ho1* 培养的菌体, 相同位置无此条带, 判断该蛋白即为重组蛋白 HO-1。

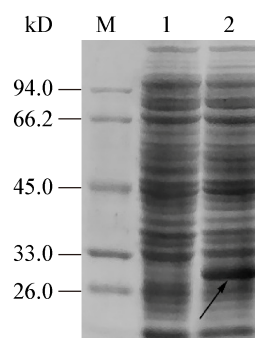


图4 SDS-PAGE 分析 HO-1 诱导表达

Figure 4 SDS-PAGE analysis of expression of HO-1

注: M: Marker; 1: BL21(DE3)/pET-28a; 2: BL21(DE3)/pET-28a-ho1.

Note: M: Marker; 1: BL21(DE3)/pET-28a; 2: BL21(DE3)/pET-28a-ho1.

2.2 重组菌表达 HO-1 的培养条件优化

2.2.1 诱导培养基的选择

考察采用 LB 和 GY 培养基培养重组菌表达 HO-1 的表达量。重组菌培养至 2 h 后, LB 培养基分别加 0.5 mmol/L 的 IPTG 和 2% 的乳糖诱导, GY 培养基加 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导, 继续培养 20 h, SDS-PAGE 分析重组菌表达 HO-1 的结果见图 5。

由图 5 可知, GY 培养基(泳道 3)培养重组菌, 经 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 HO-1, 蛋白条带的颜色深度显著高于 LB 培养基培养的 2 种诱导方式, 所以采用 GY 培养基较为合适。

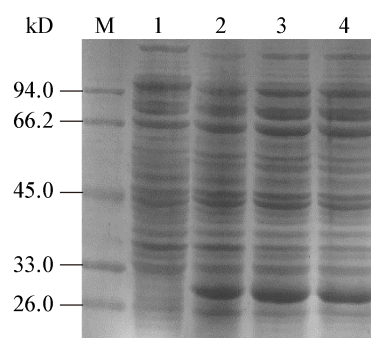


图5 培养基种类对 HO-1 表达的影响

Figure 5 Effects of culture medium on the expression of HO-1

注: M: Marker; 1: 对照组; 2: LB 加 IPTG; 3: GY 加 IPTG; 4: LB 加乳糖.

Note: M: Marker; 1: Control; 2: LB+IPTG; 3: GY+IPTG; 4: LB+lactose.

2.2.2 诱导剂添加的时间

采用 GY 培养基, 重组菌培养至 OD_{600} 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 时, 加入 0.5 mmol/L 的 IPTG, 30 °C、100 r/min 培养 20 h, SDS-PAGE 分析 HO-1 表达量的结果见图 6。

由图 6 可知, HO-1 表达量随着诱导前菌液 OD_{600} 的增加而提高。当诱导前菌液 OD_{600} 约为 0.8 后, HO-1 的表达量不再显著增加, 所以较佳的 IPTG 添加时间为诱导前菌液 OD_{600} 约为 0.8。

2.2.3 诱导培养的时间

于 GY 培养基培养重组菌至 OD_{600} 约为 0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 30 °C、100 r/min 培养 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 h, SDS-PAGE 分析相同菌体浓度下的 HO-1 表达量结果见图 7。

由图 7 可知, 重组蛋白 HO-1 在诱导剂加入 2 h (泳道 2) 后开始大量积累, 随着诱导培养时间的延长, 相同菌体生物量的 HO-1 表达量在 6 h (泳道 4) 达到最高; 继续培养, HO-1 的表达量逐渐下降, 其原因可能是在培养后期, 胞内蛋白水解酶活性逐渐增强, 对 HO-1 产生降解作用, 所以较佳的诱导时间为 6 h。

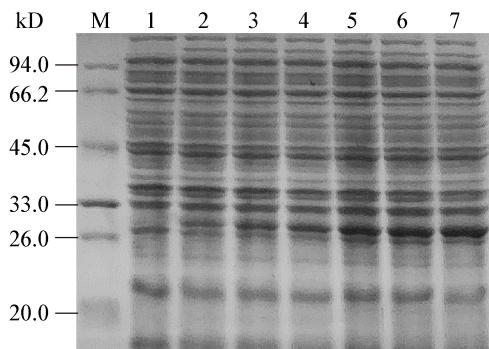


图 6 诱导剂添加时间对 HO-1 表达的影响

Figure 6 Effects of IPTG adding time on the expression of HO-1

注: M: Marker; 1: 对照组; 2-7: 添加 IPTG 前不同的菌液 OD_{600} (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2)。

Note: M: Marker; 1: Control; 2-7: OD_{600} of cells before IPTG adding (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2).

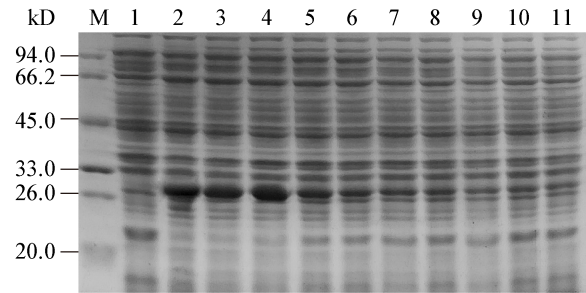


图 7 诱导培养时间对 HO-1 表达的影响

Figure 7 Effects of cultivation time after induction on the expression of HO-1

注: M: Marker; 1: 对照组; 2-11: 不同诱导培养时间(2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 h)。

Note: M: Marker; 1: Control; 2-11: Cultivation time after induction (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 h).

2.2.4 诱导剂添加的浓度

于 GY 培养基培养重组菌至 OD_{600} 约为 0.8 时, 分别加入终浓度为 0、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0 和 1.25 mmol/L 的 IPTG, 30 °C、100 r/min 培养 6 h, SDS-PAGE 分析 HO-1 表达量的结果见图 8。

由图 8 可知, 在 IPTG 浓度为 0.1-0.5 mmol/L 时, 对 HO-1 表达的影响不显著, 高于 0.75 mmol/L 后, HO-1 表达量显著减少, 所以较佳的 IPTG 诱导浓度为 0.1-0.5 mmol/L。

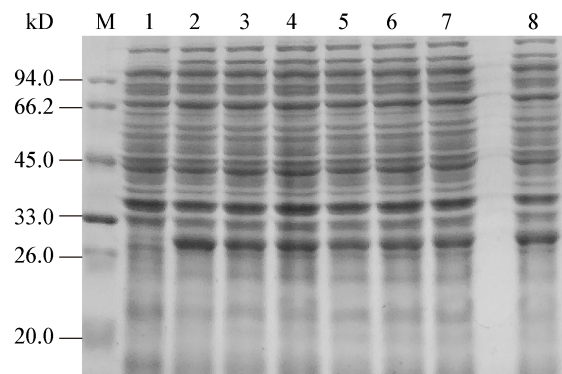


图 8 诱导剂 IPTG 浓度对 HO-1 表达的影响

Figure 8 Effects of the concentrations of IPTG on the expression of HO-1

注: M: Marker; 1-8: 不同 IPTG 浓度(0、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 和 1.5 mmol/L)。

Note: M: Marker; 1-8: Concentrations of IPTG (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 and 1.5 mmol/L).

2.2.5 诱导培养的温度

于GY培养基培养重组菌至 OD_{600} 约为0.8时,加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG,分别在25、30和37 °C下,100 r/min培养6 h和20 h,SDS-PAGE分析HO-1表达量的结果见图9。

由图9可知,25、30、37 °C下诱导培养20 h,HO-1的表达量均低于6 h。在相同诱导培养时间下,30 °C诱导培养下的HO-1表达量显著高于37 °C,所以较佳的诱导培养温度为30 °C。

2.3 重组菌表达HO-1的收率

采用Ni-NTA柱分离纯化表达的HO-1,用含200 mmol/L咪唑的磷酸缓冲液(20 mmol/L, 500 mmol/L NaCl, pH 6.5)洗脱,SDS-PAGE分析洗脱液中HO-1的结果表明,分离得到的HO-1有较高的纯度(图10),HO-1蛋白收率占细胞总蛋白的10.9%,表明构建的重组菌株BL21(DE3)/pET-28a-ho1,在经过培养条件优化后,HO-1表达量较高。

3 讨论与结论

近些年来,对血红素加氧酶的功能、与疾病之间的关系以及作为药物应用于临床疾病的治疗都

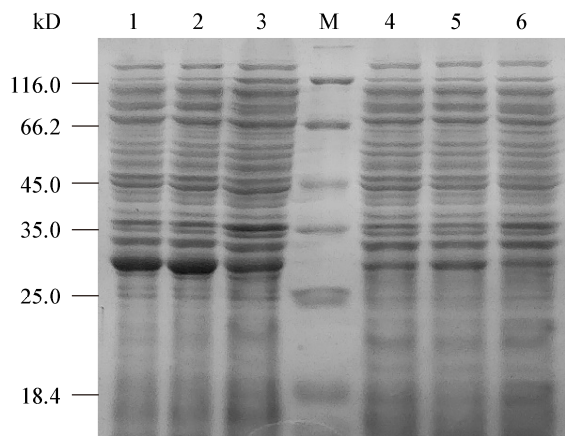


图9 诱导培养温度对HO-1表达的影响

Figure 9 Effects of cultivation temperature on the expression of HO-1

注: M: Marker; 1-3: 培养时间6 h (25、30和37 °C); 4-6: 培养时间20 h (25、30和37 °C).

Note: M: Marker; 1-3: Cultivation time 6 h (25, 30 and 37 °C); 4-6: Cultivation time 20 h (25, 30 and 37 °C).

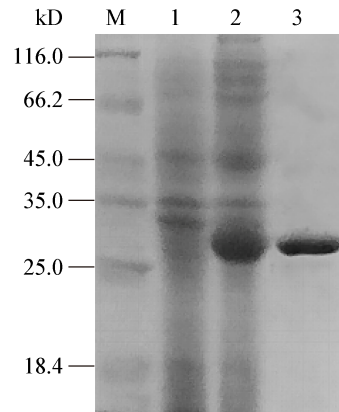


图10 经Ni-NTA柱分离纯化的HO-1 SDS-PAGE分析
Figure 10 SDS-PAGE analysis of HO-1 separated by Ni-NTA column

注: M: Marker; 1: 对照组; 2: 细胞裂解液; 3: 经Ni-NTA分离的HO-1.

Note: M: Marker; 1: Control; 2: Cell disruption; 3: HO-1 separated by Ni-NTA column.

有大量研究报道,血红素加氧酶作为药物开发的前景巨大。长期以来,血红素加氧酶主要通过分离分级法从肝、脾、脑等组织细胞中提取分离^[14],但其缺点在于程序繁琐、产量和产率较低,虽然可供进行酶学研究,但无法满足作为临床药物开发的需求,因此迫切需要开发基因工程方法制备血红素加氧酶。本研究克隆了集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC 6803中的 $ho1$,构建了BL21(DE3)/pET-28a-ho1菌株,表达的重组蛋白HO-1相对分子质量约为29 kD。采用单因素实验优化了表达HO-1的培养条件,使用GY培养基,在菌体浓度培养至 OD_{600} 约为0.8下加入终浓度为0.1 mmol/L的诱导剂IPTG,30 °C诱导培养6 h,HO-1表达量最高。初步采用Ni-NTA柱分离纯化重组大肠杆菌表达的HO-1,用含200 mmol/L咪唑的磷酸缓冲液(20 mmol/L, 500 mmol/L NaCl, pH 6.5)洗脱,获得的HO-1有较高的纯度,HO-1蛋白收率占细胞总蛋白的10.9%,表明构建的BL21(DE3)/pET-28a-ho1基因重组菌株,在经过培养条件优化后,能高效地表达HO-1,结果为进一步研究集胞藻来源的HO-1的酶学性质和应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Maines MD. The heme oxygenase system: update 2005[J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2005, 7(11/12): 1761-1767
- [2] Cerny-Reiterer S, Meyer RA, Herrmann H, et al. Identification of heat shock protein 32 (Hsp32) as a novel target in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(5): 1198-1211
- [3] Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(1): 558-567
- [4] Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein[J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3505-3516
- [5] Barañano DE, Wolosker H, Bae BI, et al. A mammalian iron ATPase induced by iron[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(20): 15166-15173
- [6] Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, et al. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2000, 278(2): H643-H651
- [7] Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase[J]. *Pharmacological Reviews*, 2008, 60(1): 79-127
- [8] Ishikawa K, Sato M, Yoshida T. Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli*, as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 202(1): 161-165
- [9] Wilks A, Ortiz PR. Rat liver heme oxygenase. High level expression of a truncated soluble form and nature of the meso-hydroxylating species[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(30): 22357-22362
- [10] Wu CY, Pang QF, Zeng YM, et al. Expression of rat heme oxygenase-1 gene in *Lactococcus lactis*[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science)*, 2006, 26(2): 101-104 (in Chinese)
- 吴长毅, 庞庆丰, 曾因明, 等. 大鼠血红素加氧酶-1 基因在乳酸乳球菌中的表达[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2006, 26(2): 101-104
- [11] Migita CT, Zhang XH, Yoshida T. Expression and characterization of cyanobacterium heme oxygenase, a key enzyme in the phycobilin synthesis[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(4): 687-698
- [12] Yang GD, Zhang JY, Chen WL. Improving methods for preparing quantitative PCR template from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2016, 35(6): 44-51 (in Chinese)
- 阳桂丹, 张巨源, 陈雯莉. *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 定量 PCR 模板制备方法的改进[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(6): 44-51
- [13] Liu F. Cloning, expression and functional analysis of two heme oxygenase genes in Roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*)[D]. Weihai: Master's Thesis of Shandong University, 2014 (in Chinese)
- 刘芳. 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)两种血红素加氧酶基因的克隆、表达与功能分析[D]. 威海: 山东大学(威海)硕士学位论文, 2014
- [14] Ryter SW, Kvam E, Tyrrell RM. Heme oxygenase activity current methods and applications[A]//Walker JM, Keyse SM. *Methods in Molecular Biology*[M]. New York: Springer Publisher, 2000: 369-391