

# 基因重组与外源铁离子对大肠杆菌合成血红素的影响

王悦<sup>1</sup>, 杨燕<sup>1</sup>, 刘琪<sup>1</sup>, 唐蕾<sup>\*1,2</sup>

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

王悦, 杨燕, 刘琪, 唐蕾. 基因重组与外源铁离子对大肠杆菌合成血红素的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3382-3391.  
WANG Yue, YANG Yan, LIU Qi, TANG Lei. Effects of genetic recombination and exogenous iron on heme synthesis in *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3382-3391.

**摘要:**【背景】大肠杆菌通过 C5 途径合成卟啉及血红素, 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)是 C5 途径中关键的前体物质, 血红素由原卟啉 IX (protoporphyrin IX, PPIX)螯合一个铁离子所形成, 目前 5-ALA 与 PPIX 的外泌对卟啉的积累和血红素合成的影响尚不清楚。【目的】构建 5-ALA 外泌蛋白基因 *rhtA* 和卟啉外泌蛋白基因 *tolC* 双缺失的大肠杆菌以积累卟啉, 同时外源添加铁离子, 并过表达亚铁螯合酶基因 *hemH* 及参与铁摄取的基因 *efeB*, 促进卟啉向血红素的转化。【方法】通过 Red 同源重组敲除大肠杆菌 BL21(DE3)的 *rhtA* 和 *tolC*, 并外源添加不同浓度的  $\text{FeSO}_4$  及  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , 同时构建重组质粒 pEHE 过表达 *hemH* 和 *efeB*, 检测卟啉和血红素含量, 分析卟啉向血红素的转化。【结果】敲除 *rhtA* 和 *tolC* 对菌体生长无显著影响, 与野生菌 WT 相比, 敲除菌株 WT-RT 的卟啉含量增加, 血红素合成略有提升。外源添加  $100 \mu\text{mol/L Fe}^{2+}$  时, 菌株 WT-RT 的血红素含量最高为  $29.44 \mu\text{mol/g-DCW}$ 。外源添加  $25 \mu\text{mol/L Fe}^{3+}$  时, 菌株 WT-RT 的血红素含量达到了  $38.22 \mu\text{mol/g-DCW}$ , 是野生菌 WT 的 1.78 倍。过表达 *efeB* 的菌株 RT-pEE 血红素含量显著下降, 而共表达 *hemH* 和 *efeB* 的菌株 RT-pEHE 的血红素含量相较于菌株 RT-pEE 显著提高。【结论】*tolC* 和 *rhtA* 的缺失导致卟啉的积累, 适量添加  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$ 、共表达 *hemH* 和 *efeB* 可促进 PPIX 向血红素的转化。该结果为利用重组大肠杆菌生产血红素提供了新策略。

**关键词:** 大肠杆菌; *rhtA*; *tolC*; 卟啉; 积累; 转化

资助项目: 111 引智计划(111-2-06); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-27)

This work was supported by the 111 Project (111-2-06) and the National Light Industry Technology and Engineering First-class Discipline Independent Project (LITE2018-27).

\*Corresponding author. E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-11-08; Accepted: 2023-01-17; Published online: 2023-03-03

## Effects of genetic recombination and exogenous iron on heme synthesis in *Escherichia coli*

WANG Yue<sup>1</sup>, YANG Yan<sup>1</sup>, LIU Qi<sup>1</sup>, TANG Lei<sup>\*1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] *Escherichia coli* synthesizes porphyrins through the C5 pathway. 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is an important precursor for the synthesis of porphyrins through the C5 pathway. Heme is formed by the chelation of an iron to protoporphyrin IX (PPIX). However, it is still not clear how the secretion of 5-ALA and porphyrin affects the accumulation and conversion of porphyrin to heme. [Objective] To construct *E. coli* without *rhtA* and *tolC*, which encode 5-ALA and porphyrin secretion proteins, respectively, to accumulate porphyrins. Iron was added exogenously, and the ferrochelatase gene *hemH* and *efeB* involved in iron uptake were over-expressed to promote the conversion of porphyrins to heme. [Methods] The *rhtA* and *tolC* of *E. coli* BL21(DE3) were knocked out by Red homologous recombination, and different concentrations of  $\text{FeSO}_4$  and  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  were supplemented. Meanwhile, the recombinant plasmid pEHE for overexpressing *hemH* and *efeB* was constructed. The content of porphyrin and heme was analyzed to evaluate the conversion of porphyrins to heme. [Results] The removal of *rhtA* and *tolC* did not affect the strain growth significantly. As compared with wild-type strain WT, the porphyrin content of knockout strain WT-RT increased, and the synthesis of heme increased slightly. When  $100 \mu\text{mol/L Fe}^{2+}$  was added exogenously, the heme content in WT-RT strain was  $29.44 \mu\text{mol/g-DCW}$ . When  $25 \mu\text{mol/L Fe}^{3+}$  was added exogenously, the heme content in WT-RT reached  $38.22 \mu\text{mol/g-DCW}$ , which was 1.78 times compared with that in WT. The heme content in *efeB*-overexpressed strain RT-pEE decreased significantly, while that increased significantly in RT-pEHE strain with over-expressed *efeB* and *hemH*. [Conclusion] The deletion of *tolC* and *rhtA* leads to the accumulation of porphyrins. The addition of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  at appropriate amount and the co-expression of *hemH* and *efeB* can promote the conversion of PPIX to heme. The results provide a new strategy for producing heme by recombinant *E. coli*.

**Keywords:** *Escherichia coli*; *rhtA*; *tolC*; porphyrins; accumulation; transformation

卟啉是一类含 4 个吡咯环的大分子杂环化合物, 广泛存在于自然界中, 具有重要的生理功能和应用价值。例如, 原卟啉 IX (protoporphyrin IX, PPIX) 常被用作光敏剂参与光动力学治疗<sup>[1]</sup>。血红素(heme)是在 PPIX 中螯合了  $\text{Fe}^{2+}$  的金属卟啉<sup>[2]</sup>, 因此也被称作铁卟啉。血红素作为发色

剂和补铁剂可用于食品加工和制造<sup>[3-4]</sup>, 作为光谱淬灭剂可在病理条件下进行蛋白质功能的荧光检测<sup>[5]</sup>。

由于卟啉的应用日趋广泛, 传统的化学合成、从动物材料中提取等方法, 因步骤烦琐和产率低已无法满足需求。因此, 近年来利用微生

物合成血红素备受关注, 相关研究主要集中在对卟啉合成基因的表达调控方面。例如, 在大肠杆菌中通过过表达谷氨酰-tRNA 还原酶, 提高关键前体 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)的含量, 从而增加了终产物血红素的合成<sup>[6-7]</sup>。然而, 胞内前体物含量的上升也导致了其向外分泌量的增加, 但敲除参与外泌的基因虽然有助于血红素含量的提升, 也造成了卟啉如 PPIX 的大量积累<sup>[8]</sup>。因此, 进一步促进 PPIX 向血红素的转化成为关键问题, 但相关研究鲜见报道。

PPIX 向血红素转化依赖于胞内铁离子含量和亚铁螯合酶(HemH)的活性<sup>[9]</sup>。Fe<sup>2+</sup>可以通过专用途径被细菌吸收, Fe<sup>3+</sup>的利用则涉及 Fe<sup>3+</sup>

螯合分子的合成和分泌, 在 Fe<sup>3+</sup>-铁载体与细胞特定的外膜受体结合后, TonB-ExbB-ExbD 复合物和 ABC 型转运体将 Fe<sup>3+</sup>-铁载体运送到细胞质中, 使 Fe<sup>3+</sup>被还原并释放<sup>[10]</sup>。近年来的研究发现, 过氧化物酶 EfeB 与 EfeU 和 EfeO 组成了一种具有特异性的铁转运操纵子 EfeUOB, 参与细胞对铁的摄取<sup>[11]</sup>。

RhtA 和 TolC 蛋白参与 5-ALA 和 PPIX 外运<sup>[12-13]</sup>, 本研究以大肠杆菌为研究对象, 探究 *rhtA* 和 *tolC* 缺失, 同时过表达 *hemH* 和 *eFeB*, 以及外源添加铁离子对重组菌中卟啉积累和向血红素转化的影响(图 1), 以期利用重组大肠杆菌高效合成血红素提供新策略。

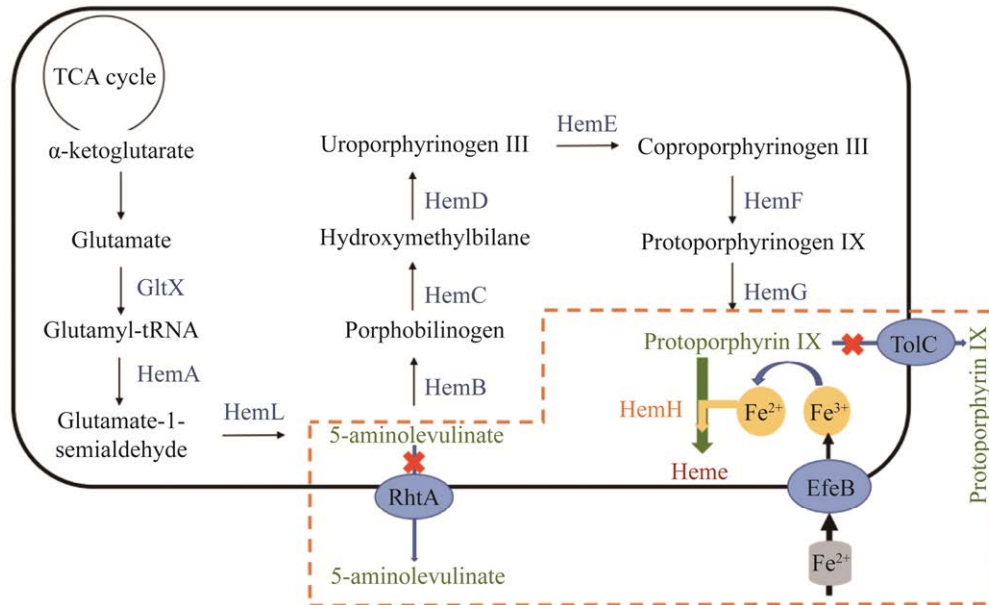


图 1 大肠杆菌血红素代谢途径 GltX: 谷氨酰-tRNA 合成酶; HemA: 谷氨酰-tRNA 还原酶; HemL: 谷氨酸-1-半醛-2,1-氨基变位酶; HemB: 5-ALA 脱氢酶; HemC: 羟甲基胆素合成酶; HemD: 尿卟啉原 III 合酶; HemE: 尿卟啉原 III 脱羧酶; HemF: 粪卟啉原 III 氧化酶; HemG: 原卟啉原氧化酶; HemH: 亚铁螯合酶

Figure 1 Heme metabolism pathway in *Escherichia coli*. GltX: Glutamyl-tRNA synthetase; HemA: Glutamyl-tRNA reductase; HemL: Glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase; HemB: 5-ALA dehydrogenase; HemC: Hydroxymethylbilane synthetase; HemD: Uroporphyrinogen III synthase; HemE: Uroporphyrinogen III decarboxylase; HemF: Coproporphyrinogen III oxidative decarboxylase; HemG: Protoporphyrinogen oxidase; HemH: Ferrochelatase.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和引物

研究中所使用的质粒、菌株及引物的详细信息分别见表 1 和表 2。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶 *Xho* I、*Xba* I 和质粒提

取试剂盒, TaKaRa 公司; ClonExpress<sup>®</sup> MultiS One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 氨苄青霉素(Amp)和硫酸卡那霉素(Kan), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 氯高铁血红素, Sigma-Aldrich 公司; 水合草酸, 国药集团化学试剂有限公司。

核酸电泳仪和多功能酶标仪, Bio-Rad 公

表 1 本实验所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Plasmids and strains	Related characteristics	Sources
Plasmids		
pET-28a	Expression plasmid, T7 promoter, Kan <sup>R</sup>	[14]
pET-22b	Expression plasmid, T7 promoter, Amp <sup>R</sup>	[15]
pKD4	Plasmid for red homologous recombination	[15]
pKD46	Plasmid for red homologous recombination	[15]
pCP20	Plasmid for red homologous recombination	[15]
pEE	pET28a inserted with <i>efeB</i>	[16]
pEHE	pET28a inserted with <i>hemH</i> and <i>efeB</i>	[17]
Strains		
WT	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dem lon hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ; <i>E. coli</i> B strain), with DE3, a λ prophage carrying the T7 RNA pol gene	[14]
WT-R	Strain WT deleted <i>rhtA</i>	[15]
WT-RT	Strain WT deleted <i>rhtA</i> and <i>tolC</i>	This study
RT-pEE	Obtained by transforming plasmid pEE into strain WT-RT	This study
RT-pEHE	Obtained by transforming plasmid pEHE into strain WT-RT	This study

表 2 实验所用引物

Table 2 Primer used in this study

Primer No.	Primer sequence (5'→3')	Purpose
F1	CTAGTCTAGAATCTCCAGTAGCCAGGGGGTTT	To amplify homologous sequence upstream to <i>tolC</i>
R1	CTAGTCTAGAATCTCCAGTAGCCAGGGGGTTT	
F2	CCCAAGCTTTGAACGTAAGGCAACGTAAAGATACG	To amplify homologous sequence downstream to <i>tolC</i>
R2	CCGCTCGAGGGCATCCAGAAACTCCCGC	
F3	CCGGAATTCATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	To amplify Kan-resistance gene containing FRT sites at both ends
R3	CCCAAGCTTGACATGGGAATTAGCCATGGTCC	
F4	ATCTCCAGTAGCCAGGGGGTTT	To amplify target fragments
R4	GGCATCCAGAAACTCCCGC	
F5	ATGCCCACTCATTAAAAACGCTTG	To verify <i>tolC</i> deletion
R5	TTTTGGTGCCATTGCCGTC	
F6	ATCCAGATGATCGATCAGTGCG	To verify <i>rhtA</i> deletion
R6	GCTGTTGTCTTCTTCATAGCGG	

司; 分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; pH 计, 梅特勒托利多公司; 微量核酸仪, 北京凯奥科技发展有限公司。

### 1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。抗性培养基: 在 LB 液体培养基灭菌降温后, 加入终浓度为 50 mg/L 的 Kan 和/或 100 mg/L 的 Amp。LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入 20 g/L 的琼脂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 大肠杆菌 *tolC* 的敲除

采用  $\lambda$ Red 同源重组<sup>[15]</sup>对菌株 WT-R 的 *tolC* 进行敲除。以 *E. coli* BL21 基因组序列为模板, 以 F1/R1 为引物对扩增 *tolC* 上游同源序列 Ut, 以 F2/R2 为引物对扩增 *tolC* 下游同源序列 Dt。以 pKD4 质粒为模板, 以 F3/R3 为引物对扩增两端含 FRT 的 Kan 抗性基因 tK。PCR 反应体系及条件详见杨燕等<sup>[15]</sup>。将 Ut、Dt 及 tK 与线性化的 pET-22b 质粒使用 ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit 连接后, 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 在含 50 mg/L Kan 和 100 mg/L Amp 抗性的固体培养基上 37 °C 培养过夜后, 挑取阳性克隆验证, 得到重组质粒 pEQT。以 pEQT 为模板, 以 F4/R4 为引物对扩增得到 *tolC* 的 DNA 打靶片段 QT。

采用电转化法, 将打靶片段 QT 转入含有 pKD46 质粒的 BL21(DE3)感受态细胞中, 电转结束后, 立即加入 1 mL 无菌 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 复苏 12 h, 15 000×g 离心 2 min 后浓缩菌体, 涂布于含 50 mg/L Kan 的 LB 平板, 37 °C 培养并筛选阳性克隆。以菌株 WT 为对照, 使用引物对 F4/R4 进行菌落 PCR, 菌落 PCR 反应体系及条件详见杨燕等<sup>[15]</sup>。将 pCP20 质粒转入验证正确的重组菌, 涂布于含 Amp 抗性

的 LB 培养基, 28 °C 培养过夜, 挑取阳性克隆, 使用引物对 F5/R5 进行 PCR 扩增, 将扩增产物送去测序, 测序正确的转化子接种于 LB 培养基 42 °C 培养, 以消除胞内 pCP20 质粒, 得到 WT-RT 菌株。

### 1.2.2 单基因与双基因过表达菌株的构建

分别取 2  $\mu$ L 的 pEE 和 pEHE 质粒与 100  $\mu$ L WT-RT 感受态细胞轻轻混匀, 于冰上放置 30 min 后 42 °C 热激 90 s, 再冰浴 3 min, 加入 1 mL 无菌 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 复苏 45 min 后 15 000×g 离心 2 min, 去上清液, 浓缩菌液涂布于含 50 mg/L Kan 的 LB 固体平板上, 37 °C 培养过夜获得阳性克隆子。

### 1.2.3 培养条件

挑取菌株 WT、WT-RT、RT-pEE 及 RT-pEHE 接种至装有 LB 培养基的摇瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 后转接至装液量为 150 mL LB 培养基的 250 mL 摇瓶中, 转接量为 2%, 含有质粒的菌株需加入终浓度为 50 mg/L 的 Kan, 并在接种 2 h 后添加终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 以及 0、50、100、150、200  $\mu$ mol/L 的 Fe<sup>2+</sup>和/或 0、25、50、75、100  $\mu$ mol/L 的 Fe<sup>3+</sup>, 37 °C、200 r/min 诱导 10 h。

### 1.2.4 菌株生长曲线测定

将菌株 WT、WT-RT、RT-pEE 和 RT-pEHE 接种至装有 LB 培养基的摇瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 后, 以 2% 的转接量转接至装有 150 mL LB 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 测定菌体的初始  $OD_{600}$ , 37 °C、200 r/min 继续培养, 之后每隔 2 h 取样检测, 若菌体密度较大, 可将菌体进行适当稀释, 根据  $OD_{600}$  与时间关系绘制生长曲线。

### 1.2.5 菌体量的测定

取干净的 50 mL 离心管置于 105 °C 烘箱中干燥过夜, 冷却后称重。以 50 mL 的 LB 培养

基为对照, 分别取  $OD_{600}$  为 0.91、1.11、1.58、1.83 和 2.42 的大肠杆菌菌液,  $5\ 000\times g$  离心 10 min, 弃去上清, 将装有菌体的离心管置于  $105\ ^\circ\text{C}$  烘箱至菌体完全干燥, 冷却后称重。以菌体干重(dry cell weight, DCW)为横坐标、对应的细胞密度( $OD_{600}$ )为纵坐标绘制曲线, 得到 1  $OD_{600}$  对应 0.395 8 g/L-DCW。

### 1.2.6 血红素浓度检测

参考陈丹园等<sup>[14]</sup>的方法, 利用荧光法检测大肠杆菌胞内血红素浓度。

### 1.2.7 卟啉的测定

总卟啉含量通过荧光法检测。测定菌体浓度后, 取适量菌悬液  $V\ \text{mL}$ , 使  $OD_{600}\times V=8$ , 于  $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $15\ 000\times g$  离心 5 min 后去上清, 用超纯水重悬菌体并转移至 1.5 mL 琥珀色离心管中,  $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $15\ 000\times g$  再次离心 5 min 去上清。在离心管中加入 500  $\mu\text{L}$  的 20 mmol/L 草酸, 于  $4\ ^\circ\text{C}$  静置 16 h; 用移液枪将 500  $\mu\text{L}$  的 2 mol/L 草酸加入各离心管中并轻吹混匀, 常温放置 30 min 后  $15\ 000\times g$  离心 5 min, 吸取 200  $\mu\text{L}$  上清于黑色 96 孔荧光板, 使用酶标仪进行荧光值检测(激发波长为 400 nm, 发射波长为 620 nm)。3 份平行样。

### 1.2.8 统计学分析

结果为 3 次测定的平均值, 采用 IBM SPSS Statistics 的单因素  $t$  检验进行统计分析,  $P<0.05$  时认为有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 *tolC* 和 *rhtA* 缺失对大肠杆菌生长的影响

使用鉴定引物对 F5/R5 和 F6/R6 对 *tolC* 和 *rhtA* 双缺失菌株进行鉴定。针对 *tolC*, 利用引物对 F5/R5 对敲除成功的菌株和野生型菌株进行 PCR 扩增及凝胶电泳分析, 理论上野生菌株的扩增片段长度为 3 022 bp, 敲除菌株为 1 503 bp。针对 *rhtA*, 利用引物对 F6/R6 对敲除成功的菌

株和野生型菌株进行 PCR 验证, 理论上野生菌株的扩增片段长度为 1 946 bp, 而敲除菌株为 1 067 bp。由图 2 可知, 目的条带均验证正确。将该双缺失菌株命名为 WT-RT。

按 2%接种量分别接种菌株 WT 及 WT-RT 至 LB 培养基, 每隔 2 h 取样测定菌体量。以培养时间为横坐标, 菌体浓度为纵坐标, 得到各菌株的生长曲线(图 3)。

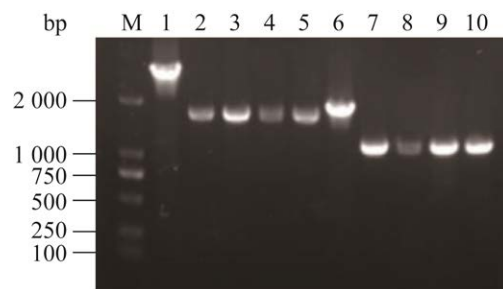


图 2 双缺失菌株的 PCR 验证 M: DL2000 DNA Marker; 1: WT 的 *tolC* 验证; 2-5: WT-RT 的 *tolC* 验证; 6: WT 的 *rhtA* 验证; 7-10: WT-RT 的 *rhtA* 验证

Figure 2 PCR verification of double deletion strain. M: DL2000 DNA Marker; 1: WT for *tolC*; 2-5: WT-RT for *tolC*; 6: WT for *rhtA*; 7-10: WT-R for *rhtA*.

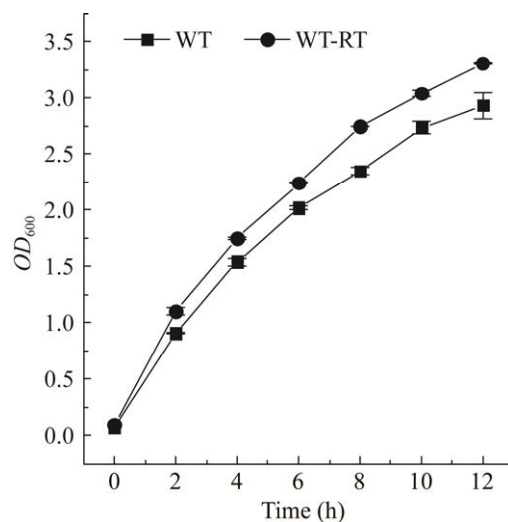


图 3 WT 和 WT-RT 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of WT and WT-RT.

由图 3 可知, 在 0–12 h 内, WT-RT 的菌体浓度稍高于 WT。这表明在 LB 液体培养基中 *tolC* 和 *rhtA* 的缺失并不会影响菌体的生长。

## 2.2 *tolC* 和 *rhtA* 缺失对卟啉和血红素合成的影响

5-ALA 对血红素的合成具有重要的作用, RhtA 蛋白已被报道参与 5-ALA 的外运<sup>[13]</sup>。ToIC 蛋白位于大肠杆菌的外膜, 与一些内膜外排泵相互作用, 向细胞外排放异生物质和胞内代谢物。有研究表明, 缺失 *tolC* 的大肠杆菌其胞内卟啉可以得到大量的积累<sup>[8]</sup>。因此, 本研究将大肠杆菌中的 *tolC* 和 *rhtA* 进行敲除, 以研究这种条件下卟啉与血红素的积累情况。

由图 4 可知, 菌株 WT-RT 中血红素的含量为 22.79  $\mu\text{mol/g-DCW}$ , 与菌株 WT 的 21.42  $\mu\text{mol/g-DCW}$  相比有较显著增加; 而 WT-RT 的荧光强度显著高于 WT, 表明敲除 *rhtA* 与 *tolC* 增加了卟啉的积累。这说明敲除菌中的原卟啉 IX 向血红素的转换效率较低。

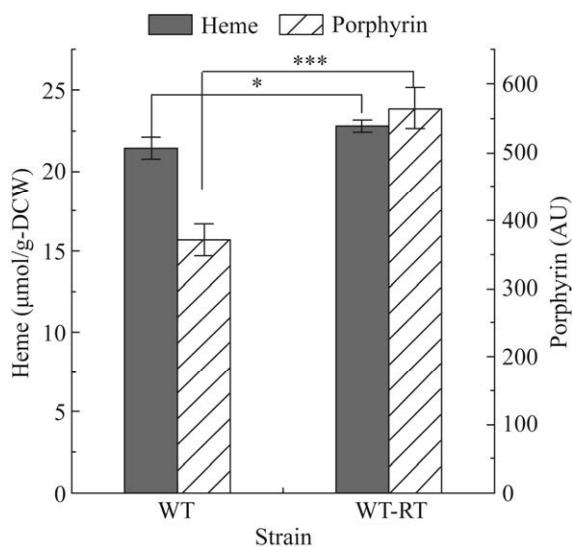


图 4 菌株 WT 与 WT-RT 的卟啉与血红素含量  
Figure 4 Contents of porphyrin and heme in strains WT and WT-RT. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## 2.3 外源铁离子对卟啉转化的影响

大肠杆菌中的血红素是由 PPIX 将铁离子螯合进卟啉环中形成的。菌株 WT-RT 中原卟啉的积累量较高, 但血红素含量相较于野生菌并无明显提升。推测这种现象可能是由于大肠杆菌胞内的铁离子含量较少, PPIX 无法结合足够的铁离子引起的。因此本研究探讨了外源添加铁离子后 PPIX 向血红素转化的情况。

如图 5 所示, 在外源添加的  $\text{Fe}^{2+}$  浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时, 菌株 WT-RT 的血红素含量达到最高值 29.44  $\mu\text{mol/g-DCW}$ 。与无外源添加  $\text{Fe}^{2+}$  时相比, 血红素含量有很显著的提升, 且卟啉的荧光值更低。这说明外源添加 100  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe}^{2+}$  可以有效地将 PPIX 转化为血红素。

如图 6 所示, 在外源添加 25  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe}^{3+}$  时, 菌株 WT-RT 的血红素浓度可达 38.22  $\mu\text{mol/g-DCW}$ ; 同时, WT-RT 的 PPIX 荧光强度最低。这说明添加该浓度的  $\text{Fe}^{3+}$  可以有效提升 PPIX 向血红素的转换率。

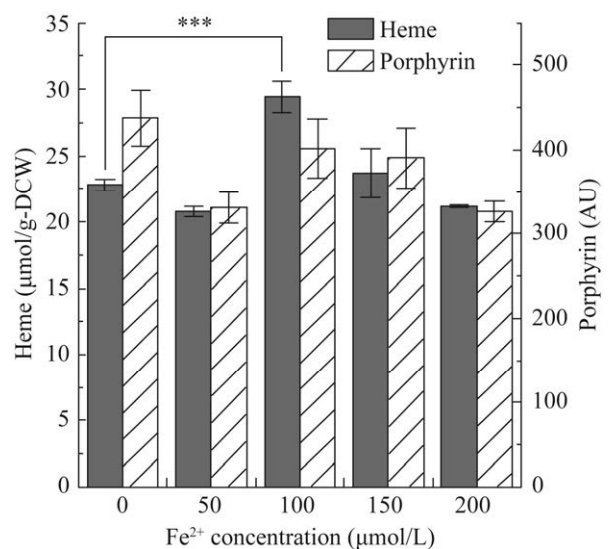


图 5  $\text{Fe}^{2+}$  对菌株 WT-RT 血红素和卟啉含量的影响  
Figure 5 Effects of ferrous ion on heme and porphyrin contents of strain WT-RT. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

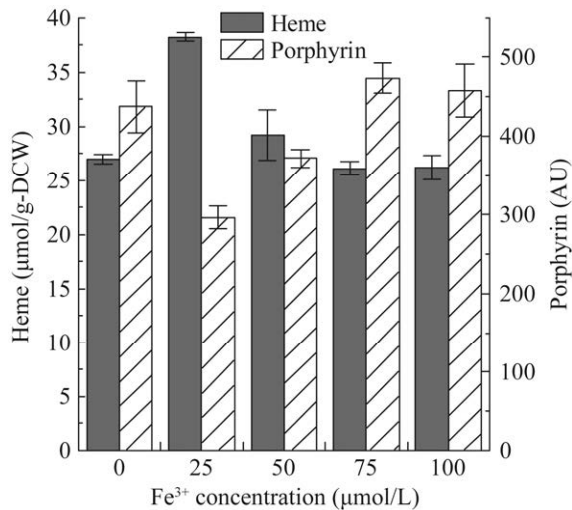


图6  $\text{Fe}^{3+}$ 对WT-RT菌株血红素和卟啉含量的影响  
Figure 6 Effects of ferric ion on heme and porphyrin contents of WT-RT strain.

#### 2.4 过表达 EfeB 与 HemH 对卟啉转化的影响

由 2.3 结果可知, 外源添加铁离子可促进 PPIX 向血红素的转化, 而且  $\text{Fe}^{3+}$  的效果更为明显。EfeUOB 作为一种三组分铁转运蛋白系统, 对  $\text{Fe}^{2+}$  比  $\text{Fe}^{3+}$  具有明显的偏好性, 其中的 EfeB 组分在转运过程中可将  $\text{Fe}^{2+}$  转化为  $\text{Fe}^{3+}$ [11]。因此, 本研究以  $\text{Fe}^{2+}$  为底物, 在 WT-RT 菌株中过表达 *efeB*, 增强 EfeUOB 铁转运系统中  $\text{Fe}^{2+}$  向  $\text{Fe}^{3+}$  的转化能力, 并进一步过表达 *hemH*, 提高亚铁螯合酶的表达水平, 以探讨在此条件下 PPIX 向血红素转化的情况。

研究结果表明, 单独过表达 *efeB* 的 RT-pEE 菌株, 其血红素含量仅为  $4.7\text{--}5.9\ \mu\text{mol/g-DCW}$  (图 7A), 相较于 WT-RT 的  $20.79\text{--}29.44\ \mu\text{mol/g-DCW}$  (图 5) 显著降低, 而 *efeB* 与 *hemH* 共表达的 RT-pEHE 菌株, 其血红素合成水平明显高于 RT-pEE (图 7B), 在外源添加  $150\ \mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe}^{2+}$  时, 其血红素含量为  $30.85\ \mu\text{mol/g-DCW}$ 。

刘琪等[17]在 *fur* 缺失的大肠杆菌中, 分别过表达 *hemH* 或 *efeB* 时血红素的合成反而下降,

而共表达这 2 个基因时则有效促进了血红素的增加, 本研究结果与其一致。

然而, 可能是由于多个基因共表达的影响, 菌株 RT-pEHE 的生长(图 7C)相较于敲除菌 WR-RT (图 3)和单基因过表达的 RT-pEE (图 7C)明显减弱, 因此血红素含量与菌株 WT-RT 的  $29.44\ \mu\text{mol/g-DCW}$  持平, 未显著增加。

### 3 讨论与结论

血红素具有重要的生物学功能, 在食品和医疗领域的应用价值日趋显著。然而人们对胞内血红素合成调控机制的认识尚存在诸多不明之处, 发酵法血红素生产仍达不到商业化水平。目前强化血红素合成的研究主要集中在关键基因的过表达上, 以提高途径中前体物如 5-ALA 的水平[18]; 或者通过多基因的模块化过表达调控终产物血红素的含量[2,19], 而关于前体物外泌对血红素合成影响的研究较少。本研究通过敲除外排蛋白的编码基因 *rhtA* 和 *tolC* 减少前体物的外泌, 并强化途径中的关键酶 HemH 和参与铁转运蛋白 EfeB 的基因表达, 在添加外源铁离子的条件下促进 PPIX 向血红素的转化, 为提高大肠杆菌血红素合成提供了新的策略。

研究发现, 敲除 *rhtA* 和 *tolC* 对菌体生长无显著影响, 但 PPIX 得到大量的积累。PPIX 与  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合是血红素合成的关键也是最后一步, 因此铁离子的获取与 HemH 的活力成为影响终产物血红素含量的关键因素; 外源添加  $100\ \mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{2+}$  和  $25\ \mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{3+}$  对血红素的合成最佳, 分别达到  $29.44\ \mu\text{mol/g-DCW}$  和  $38.22\ \mu\text{mol/g-DCW}$ 。

作为铁转运三联体 EfeUOB 的重要组分, EfeB 起到将  $\text{Fe}^{2+}$  转化为  $\text{Fe}^{3+}$  的作用[11]。本研究发现, 在外源添加  $\text{Fe}^{2+}$  的条件下, 单独过表达 *efeB* 后反而造成血红素含量的下降; 而与 *hemH*



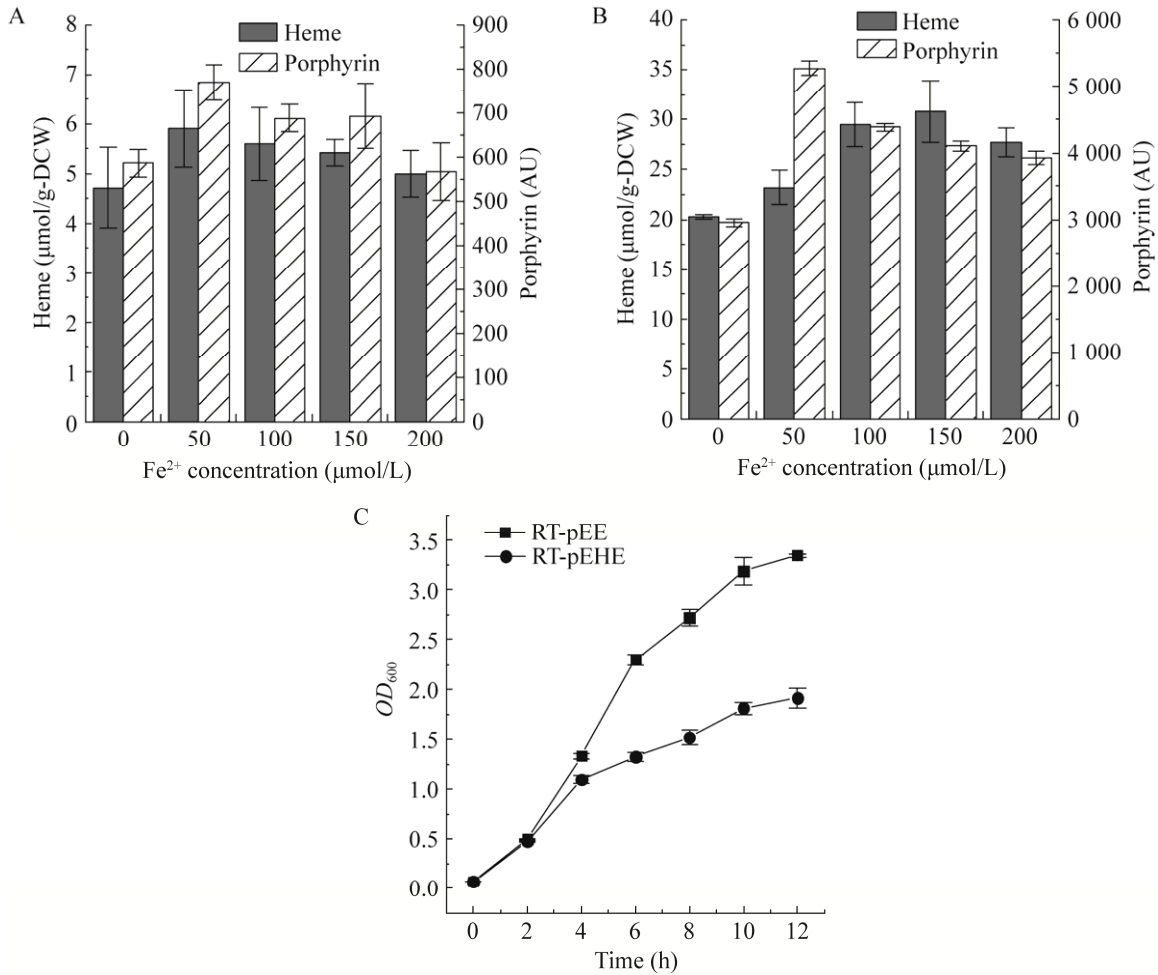


图 7 过表达菌株的血红素合成及菌体生长 A: RT-pEE 血红素含量及卟啉荧光强度. B: RT-pEHE 血红素含量及卟啉荧光强度. C: RT-pEE 和 RT-pEHE 的生长曲线

Figure 7 Heme synthesis and cell growth of gene overexpression strains. A: Heme and porphyrin contents of RT-PEE. B: Heme and porphyrin contents of RT-PEHE. C: Growth curves of RT-pEE and RT-pEHE.

共表达后血红素的含量有所回升, 达到 30.85 μmol/g-DCW。这表明 PPIX 向血红素的转化与铁离子浓度、铁离子向胞内的转运和 HemH 的活性之间存在制约关系, 三者之间的相互作用及对胞内血红素合成的调控机制有待进一步深入研究。

## REFERENCES

[1] CHEN JY, MAK NQ, CHEUNG NH, LEUNG RN, PENG Q. Endogenous production of protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in leukemia cells[J].

Acta Pharmacologica Sinica, 2001, 22(2): 163-168.

[2] 翁焕娇, 丁雯雯, 石雅南, 李江华, 康振. 基于模块化优化策略强化大肠杆菌合成血红素[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(6): 86-94.

WENG HJ, DING WW, SHI YN, LI JH, KANG Z. Enhancement of heme synthesis pathway in *Escherichia coli* via a modular optimization strategy[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(6): 86-94 (in Chinese).

[3] ETHERIDGE PA, HICKSON DW, YOUNG CR, LANDMANN WA, DILL CW. Functional and chemical characteristics of bovine plasma proteins isolated as a metaphosphate complex[J]. Journal of Food Science, 1981, 46(6): 1782-1784.

- [4] 汪学荣, 王飞. 生物态补铁剂-血红素铁研究进展[J]. 粮食与油脂, 2007, 20(4): 40-43.  
WANG XR, WANG F. Biology iron supplement-heme iron and its progress[J]. Cereals & Oils, 2007, 20(4): 40-43 (in Chinese).
- [5] 陈帆. 血红素作为广谱淬灭剂在荧光探针设计中的应用[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2022.  
CHEN F. Hemin as a broad-spectrum dark quencher for designing fluorescent probes[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2022 (in Chinese).
- [6] ZHAO XR, CHOI KR, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for secretory production of free haem[J]. Nature Catalysis, 2018, 1(9): 720-728.
- [7] 陈久洲, 王钰, 蒲伟, 郑平, 孙际宾. 5-氨基乙酰丙酸生物合成技术的发展及展望[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 1000-1016.  
CHEN JZ, WANG Y, PU W, ZHENG P, SUN JB. Advances and perspective on bioproduction of 5-aminolevulinic acid[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 1000-1016 (in Chinese).
- [8] TURLIN E, HEUCK G, SIMÕES BRANDÃO MI, SZILI N, MELLIN JR, LANGE N, WANDERSMAN C. Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-ToIC pump in *Escherichia coli*[J]. Microbiology Open, 2014, 3(6): 849-859.
- [9] PRANAWIDJAJA S, CHOI SI, LAY BW, KIM P. Analysis of heme biosynthetic pathways in a recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(6): 880-886.
- [10] BEAUCHENE NA, METTERT EL, MOORE LJ, KELEŞ S, WILLEY ER, KILEY PJ. O<sub>2</sub> availability impacts iron homeostasis in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(46): 12261-12266.
- [11] CAO JN, WOODHALL MR, ALVAREZ J, CARTRON ML, ANDREWS SC. EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe<sup>2+</sup> transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(4): 857-875.
- [12] TATSUMI R, WACHI M. ToIC-dependent exclusion of porphyrins in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(18): 6228-6233.
- [13] 张良程. 大肠杆菌中 5-氨基乙酰丙酸转运蛋白的研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2016.  
ZHANG LC. Study on 5-aminolevulinic acid transporters in *Escherichia coli*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2016 (in Chinese).
- [14] 陈丹园, 沈云杰, 杨燕, 唐蕾. 关键酶基因的过表达与环境因素对大肠杆菌血红素合成的调控[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(11): 7-14.  
CHEN DY, SHEN YJ, YANG Y, TANG L. Regulation of heme synthesis in *Escherichia coli* by overexpression of genes for the key enzymes and environmental factors[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(11): 7-14 (in Chinese).
- [15] 杨燕, 郑珂, 潘梅, 唐蕾. 大肠杆菌 *rhtA* 缺失对血红素合成的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3216-3224.  
YANG Y, ZHENG K, PAN M, TANG L. The effect of *rhtA* deletion on heme synthesis in *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3216-3224 (in Chinese).
- [16] 丁亮亮, 刘进生, 顾鹏帅, 唐蕾. 大肠杆菌过氧化物酶 EfeB 在细胞氧化应激中的作用[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 33-39.  
DING LL, LIU JS, GU PS, TANG L. The role of peroxidase EfeB 19 in *Escherichia coli* under cell oxidative stress[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(17): 33-39 (in Chinese).
- [17] 刘琪, 李蒙蒙, 丁亮亮, 唐蕾. 大肠杆菌铁相关基因的调控对血红素合成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032077.  
LIU Q, LI MM, DING LL, TANG L. Effect of regulation of iron related genes in *Escherichia coli* on heme synthesis[J]. Food and Fermentation Industries, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032077 (in Chinese).
- [18] FENG CQ, PAN M, TANG L. 5-Aminolevulinic acid level and dye-decolorizing peroxidase expression regulate heme synthesis in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2022, 44(2): 271-277.
- [19] KWON SJ, de BOER AL, PETRI R, SCHMIDT-DANNERT C. High-level production of porphyrins in metabolically engineered *Escherichia coli*: systematic extension of a pathway assembled from overexpressed genes involved in heme biosynthesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4875-4883.