

透明颤菌血红蛋白的分离纯化与分析检测^{*}

于慧敏^{**} 史悦 沈忠耀

(清华大学化工系 生物化工研究所 北京 100084)

摘要 透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 是惟一种研究得较为透彻的原核生物氧结合蛋白血红蛋白。它支持细胞在微氧条件下进行好氧生长, 克服发酵过程中的溶氧限制, 因此在需氧微生物发酵工业中具有重要的应用价值。简述了 VHb 的分离纯化过程, 综述了 VHb 的各种定性检测和定量分析方法, 比较了各种检测分析方法的优缺点和适用性。提出利用改进的一氧化碳差光谱法以全细胞悬浮液为对象直接进行 VHb 的定量分析是发酵工业中应用 VHb 重组菌株的研究发展方向。

关键词 透明颤菌血红蛋白 纯化 定性定量分析

透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 是 Beggiatoa 家族的一种无色、丝状、专性好氧菌, 常可在沼泽或腐烂的蔬菜中分离得到^[1]。20 世纪 70 年代, 美国科学家 Tyree 等在透明颤菌中发现了类似于血红蛋白的可溶物质 (即透明颤菌血红蛋白, VHb), 它能在极低的溶氧水平下被大量的诱导合成, 并可使透明颤菌在贫氧环境如泥塘中生存^[2], 由此预示了该血红蛋白在需氧的微生物发酵工业中的应用价值。

VHb 在细胞内的作用机制, 目前仍处于假说状态, 主要有扩散促进假说、氧化还原效应物假说和末端电子受体假说等^[2]。在考察 VHb 对细胞生长的影响时发现, VHb 与氧结合可以形成氧合态, 并以这种方式介入细胞与氧有关的代谢途径中某些关键步骤或途径分支点, 从而改变限氧时细胞原有的代谢方式。在相同的培养条件下, VHb 的表达可以加快细胞的生长速率, 提高细胞的呼吸强度, 降低细胞的临界氧浓度, 在大幅度的溶氧变化中保持恒定的呼吸率, 从而使其在低氧条件下仍然具有一定的生长优势^[3]。自从 1988 年 Khosla 和 Bailey 成功地解决了透明颤菌血红蛋白 (VHb) 在重组大肠杆菌中的外源表达问题^[4~6] 问题以来, 它已越来越多地应用到微生物发酵工业的许多领域, 并取得了

显著效果。例如, 将 VHb 应用于 α -淀粉酶的生产时, 发现 VHb 对 α -淀粉酶产量的提高具有很大的作用。而将 *vgb* 基因转入青霉素酰化酶 (*pac*) 基因工程菌中可以明显提高 *pac* 的表达量。中国科学院上海生物工程研究中心也通过实验证实, VHb 在维生素 C 两步法生产中可以改善欧文氏菌 (*Erwinia*) 的生产状况, 且在发酵过程中, 通气状况越差, VHb 的效果越明显。在链霉菌 (*Streptomyces*) 发酵中, 供氧矛盾更为突出, 而且次级代谢产物的合成对氧的供给相当敏感, 因此 VHb 的引入不仅可以成倍地提高细胞密度, 而且可以更有效地促进次级代谢产物的生产, 并减弱其对氧的敏感性。在酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 乃至真核生物霉菌 (*Acremonium chrysogenum*) 中, VHb 的引入也都改善了发酵过程中的供氧矛盾, 大幅度地提高了如酒精、头孢菌素 C 等产物的产量^[7,8]。在本课题组的研究中, 由于 VHb 在产聚 α -羟基丁酸酯 (PHB) 的重组大肠杆菌中的引入, 降低了重组细胞的临界氧浓度, 提高了发酵液的氧传递系数, 从而同时提高了重组细胞的发酵密度和 PHB 的表达量, 进而大大降低了 PHB 的发酵成本^[9]。

总之, 由于 VHb 在发酵过程中对于促进菌体生长、产物合成以及解决供氧矛盾等许多方面具有非常重要的作用, 因此其研究与应用必将成为发酵工业中的一项关键技术。与此相应, VHb 的分离纯化和检测分析方法研究也必将越来越受到人们的重视。

收稿日期: 2003-01-17

^{*} 国家自然科学基金重点项目 (29834103); 国家自然科学基金面上资助项目 (29876021)

^{**} 电子信箱: yuhm@mail.tsinghua.edu.cn

1 透明颤菌血红蛋白的分离纯化

VHb 发现初期,许多研究均侧重于它的分离和纯化。1974 年,Webster 和 Liu 建立了一套完整而有效的 VHb 分离方法^[10,11]。Tyree 等在 1978 年以及 Kita 等在 1984 年又进行了改进^[3,12]。总的来说,在约 25℃ 下培养两天后离心得到的透明颤菌菌体,于 -15℃ 保存后即可按照下述步骤进行透明颤菌血红蛋白的分离和纯化(大肠杆菌与其基本相同):

1.1 冻融提取

取冷冻细胞 100g 悬浮于 0.1mol/L pH7.5 磷酸盐中,加 2g 脱氧胆酸钠,终体积 200ml,悬浮物分至几个无污染的钢制大口杯中,冻融 4 次,冷冻采用甲基溶纤剂中的干冰,解冻采用微温水,以下步骤均应在低于 4℃ 进行,悬浮物在 35000 转离心 30min,并将上清小心移注。

1.2 硫酸鱼精蛋白步骤

将 17.5ml (50mg/ml) 的硫酸鱼精蛋白溶液加入粗提取物,悬浮物在 39000 转离心 2h,再将上清小心移注(可先取几份粗提取物试样进行滴定以确定硫酸鱼精蛋白的最佳加入量)。

1.3 硫酸铵沉淀

在上步收获的上清液上加硫酸铵(25.8g/100ml 上清),使其饱和度达 45%,静置几小时后 25000 转离心 30min,弃去沉淀,再加足量硫酸铵(12.3g/100ml 45% 上清),使其饱和度达 65%,再静置几小时或一夜后 25000 转离心 30min,弃去上清。

1.4 Sephadex G-100 层析步骤

65% 硫酸铵沉淀溶于 10~20ml 0.02mol/L pH7.5 磷酸盐中,若溶液浑浊则应透析除去过剩的盐并溶解全部的蛋白,将溶液注入 Sephadex G-100 层析柱(4.1×43.5cm,含约 33g 干重凝胶),流速约 30ml/h,收集 10ml 碎片,碎片分别在 280nm,400nm 有吸收峰,集中碎片并用硫酸铵(47.6g/100ml, 75%)浓缩,静置几小时后 25000 转离心 30min。

1.5 TEAE-纤维素层析步骤

浓缩的 G-100 洗提液溶于几毫升 0.015mol/L pH7.16 磷酸盐中,并相对于同样的缓冲溶液透析两天。用 TEAE-纤维素柱(1.1×50cm,含 10g(干重)TEAE-纤维素(0.55meq/g)按 Peterson 和 Sober 的方法进行淋洗,即先用 2mol/L NaCl 及 0.015mol/L pH7.16 磷酸盐溶液将柱子再生,以磷酸盐缓冲液

作为淋洗液,流量 40ml/h,收集 4~5ml 分部洗脱液,浓缩透析后在纤维素乙酸盐条带上加入 0.02mol/L pH7.15 磷酸盐缓冲液走电泳,再用苯胺黑染色以揭示分部洗脱液中余下的多种蛋白成分的存在。

对于被纯化的 VHb 来说,A400 与 A280(400nm 与 280nm 的吸光度)的比值是纯度的满意准数。上述各步分离纯化步骤所获得的 VHb 的纯度和收率可总结如表 1 所示。由表可见,经过五步提取,VHb 的纯化倍数为 75.8,而收率只有 8%。

表 1 VHb 的分离纯化

序号	VHb 纯化步骤	纯度(A ₄₀₀ /A ₂₈₀)	收率(%)
1	冻融提取	0.029	100
2	硫酸鱼精蛋白	0.045	80
3	硫酸铵两步沉淀	0.14	52
4	Sephadex G-100 层析	0.81	26
5	DEAE cellulose 层析	2.20	8

2 透明颤菌血红蛋白的检测与分析方法

对于得到的较高纯度的 VHb,可以用各种不同的方法对其进行定性与定量的测定,文献中提到的方法主要有紫外-可见光谱法、红外光谱法、SDS-PAGE 电泳法、³¹P 核磁共振法以及 Western Blotting 法等。

2.1 紫外-可见分子吸收光谱法^[10,12]

由于透明颤菌血红蛋白具有氧化态、还原态和氧合态等多种形态,且各种形态均具有特征的吸收频率,因此几种绝对光谱和差示分光光谱的分析方法就建立起来了。

Webster 和 Liu 最先通过光谱研究 VHb。文献认为 VHb 可以被过量连二亚硫酸盐还原,被铁(Ⅲ)氰化物和过硫酸铵氧化,VHb 的氧合态光谱在 576nm,543nm,414nm 有强峰,此状态是在富氧溶液中通过 NADH 的酶促反应引发的,而且此状态一旦形成,就十分稳定。当溶液处于贫氧状态时,还原态光谱出现,且当溶氧降至 14μmol/L 以下时,这种形态可用分光光度法检测。将 CO 鼓入氧合态溶液可使吸收峰转至 566nm,535nm,419nm,而这正是 VHb-CO 络合物的特征峰;氰化物能与 VHb 结合,从而抑制氧合态的形成;VHb-H₂O₂ 络合物的光谱则与氧合态非常类似。实际上他们做了大量光谱实验,不仅证明了 VHb 的存在,而且对于 VHb 在细胞中的生理功能作了较深入的探讨。

VHb 的 CO 差光谱检测方法特征性最强,应用最为广泛。该法可如下操作:在试样端和参比端分别注入 1ml VHb 粗提物的磷酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH7.5),然后在试样端加入 100 μ l 新制硫酸钠溶液或连二亚硫酸钠晶体,将 CO 鼓泡入试样端 3min,在分光光度计上从 370nm 到 650nm 扫描差光谱。当进行定量分析时,VHb 的含量主要是利用 CO 差光谱的本征消(吸)光系数来计算,它的涵义是浓度为 1mmol/L VHb 在 1cm 厚的比色池中产生的吸光度差值($A_{419\text{nm}} - A_{436\text{nm}}$)。文献[11]中给出了 $A_{419-436} = 274\text{m}(\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$,根据比色池厚度和差光谱图上吸收峰对应的吸光度值,即可初步确定 VHb 的浓度。

2.2 SDS-PAGE 电泳法^[14]

十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)是根据分子量的差异,从不均一的混合物中分离蛋白质的常用方法。电场中的蛋白质被聚丙烯酰胺凝胶基质过滤而分离;因蛋白质所带电荷不同而产生的阻力可由蛋白质与 SDS 的缔合作用而减至最低。因此该法可根据分子量的大小来识别 VHb。由于在电泳过程中 VHb 的两个亚基发生解离,因此最终可在分子量约 15000 处观察到明显的条带。

SDS-PAGE 电泳法检测 VHb 的具体步骤为:取培养液约 100 μ l,离心后弃去上清液,用 0.5ml 50mmol/L Tris(pH7.4)洗涤后加入 20 μ l 上样缓冲液将细胞裂解,经振荡、5min 沸水浴、超声处理并再次离心后,由十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测细胞蛋白,凝胶浓度为 15%,凝胶经考马斯亮蓝(R250)染色和脱色后即可指认 VHb。此外,配合激光扫描仪和专用软件可定量测定 VHb 含量。

2.3 红外光谱法^[15]

为了阐明氧气和羰基与 VHb 络合物的本质,应用红外光谱法对氧合态和羰(基)合态的 VHb 进行了研究,发现在 4 有 NADH、氧气及 NADH/VHb 还原酶存在时,除去特征的“氧合”可见光谱峰(λ_{max} 为 415nm,543nm,577nm)之外,在 1134 cm^{-1} 处还呈现一个 $^{16}\text{O}_2$ 红外峰,其半峰宽($\lambda_{1/2}$)为 17 cm^{-1} ,强度(B)为 10($\text{mmol/L})^{-1}\text{cm}^{-2}$;当可利用的氧气缺乏时,红外峰消失,而特征的“解氧合”可见光谱峰(λ_{max} 为 423nm,553nm)出现。氧合态 VHb 在红外区无论对于 $^{16}\text{O}_2$ 还是 $^{18}\text{O}_2$ 均只有一个峰,而氧合血

红蛋白和氧合肌红蛋白在红外区有好几个峰。这些红外光谱提供了氧气与 VHb 结合本性的第一个直接证据。细胞中氧气的振动频率应在相似的区域,VHb 与氧气的联结应该同氧合血红蛋白及氧合肌红蛋白相一致,然而红外谱图上的特异性的区别显示出它们在联结上的重大差异。同样 CO 与 VHb 结合时在 26 呈现 1964 cm^{-1} 的吸收峰,半峰宽为 9 cm^{-1} ,B 为 14($\text{mmol/L})^{-1}\text{cm}^{-2}$ 。CO 峰对于温度十分敏感,当温度由 26 降到 4 时,B 增至 21($\text{mmol/L})^{-1}\text{cm}^{-2}$,且此 C-O 键的伸缩振动频率比 CO 与血红素 A 联结时(1951 cm^{-1})高,这些特征红外参数也成为 VHb 的定性手段。

2.4 ^{31}P 核磁共振法^[16]

分别将野生菌(VHb $^-$)和染色体上有单拷贝的 *vgb* 基因的重组菌(VHb $^+$)经过摇瓶培养后以缓冲液重悬,以甲基二磷酸作为内标,在傅立叶变幻方式下,用 Bruker WM300 光度计扫描 NMR 信号。

限氧状况下 VHb $^+$ 和 VHb $^-$ 两种菌的 ^{31}P -NMR 谱图研究可用两个参数来表征:分别为以胞内和胞外无机磷酸盐的化学位移差表示的跨膜 pH 和由 NTP 峰面积及 ATP + ADP 峰面积表示的胞间 ATP 水平。从这两个参数来看,VHb $^+$ 分别为 VHb $^-$ 相应指标的 1.6~2 倍。此技术不仅能观测 VHb 的表达,而且为进一步探讨其生理功能,譬如 VHb 在菌体的物质及能量代谢过程中的作用,指明了方向。

2.5 Western Blotting 法^[17]

这种方法使研究者能用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨出与专一抗血清结合的专一性蛋白质。将聚丙烯酰胺凝胶上分辨出的蛋白质转移到与抗血清一起保温过的硝酸纤维素膜上。第一抗体专一地与待分离蛋白质的抗原决定簇结合,然后用第二抗体,如联结生物素的山羊抗 IgG 检测已结合上去的抗体。

1994 年, Kallio 等人用 Western Blotting 法对 VHb 进行了测定。基本步骤如下:将纯化的 VHb 对家兔进行免疫注射,4~6 周后加强注射,在其后的 7~10 日内采集抗血清并进行纯化,再将 VHb 从 15%的 SDS-PAGE 转移至纤维素滤膜上与抗血清一起温育,洗涤后再将滤膜与第二抗体(与辣根过氧化物酶偶联的抗免疫球蛋白抗体)一起温育,进一步洗涤后,通过放射自显影确定抗原-抗体-抗体复合物在纤维素滤膜上的位置。

3 VHb 检测方法的比较

VHb 不同检测方法各有其优缺点和适用范围。

SDS-PAGE 利用了凝胶的过滤(分子筛)作用和电泳淌度双重机理,加入的巯基乙醇将二硫键还原,SDS 使蛋白质的氢键和疏水键打开,并与其结合,使各种蛋白带上相同密度的负电荷,这样就可以消除电荷干扰,准确测定蛋白的分子量。此法以标准蛋白做标尺,可获得较高的分辨率,且操作方便、应用面广。它的不足是只能定出蛋白的分子量,若细胞中含有与 VHb 分子量相近的蛋白,则无法加以区别,所以电泳结果只能作为一个旁证。

除了可见光谱之外,红外光谱对于像 VHb-CO 这样的血红蛋白与配体结合的环境,也是一种有效的检测手段。红外光谱法是惟一一种能直接检测配位体的分析方法,这是它最突出的特点。在已知的几种血红蛋白羰基络合物中,红外测量参数对于 CO 伸缩振动带频率的变化引起的配体环境的改变是十分敏感的。同样,血红蛋白氧络合物用红外方法也可以测量。 1134cm^{-1} 的氧配体吸收峰和 1964cm^{-1} 的羰基配体吸收峰可证明 VHb 的存在。红外光谱法可进一步探讨配体与 VHb 结合的方式及络合物的结构,同时它也可给出不同种血红蛋白在红外谱图上的差异。它的缺点是成本较高,并且难以定量。

核磁共振波谱技术(NMR)的发展至今已有 50 年的历史,其中 ^{31}P 核磁共振谱(^{31}P -NMR)主要用于大肠杆菌生物能量学、腺苷三磷酸酶动力学以及宿主与质粒之间的相互作用的研究,用于 VHb 的检测是 1994 以后才开始的。应用这项技术可对含有 VHb 的大肠杆菌细胞在自然条件下和微氧调控条件下的质子转移及三磷酸腺苷(ATP)水平分别加以描述。通过胞间相对 ATP 浓度、胞内胞外 pH 差的测量,可比较含有 VHb 与不含 VHb 的大肠杆菌在呼吸效率上的差别。此法可深入研究 VHb 在细胞生长代谢过程中所起的作用,如只用于定性分析 VHb,则显得成本偏高。

Western Blotting 方法是一种特异性极强的方法,即用 VHb 抗体来检测 VHb 蛋白。此方法所需样品量少、准确性很高,但 VHb 的抗血清极难获得,要先找到适宜的免疫动物种系,然后经过制定免疫计划、注射免疫原、收集抗血清、抗体纯化等诸多步骤,不仅成本颇高,而且时间周期也很长。

与上述方法比较起来,紫外-可见光谱法具有特异性强、成本低廉、操作简单及可定量检测 VHb 等许多优点。凡是连接血红素的蛋白(无论是人血红蛋白,还是从 *Rhizodium celerit*、透明颤菌及重组大肠杆菌中分离出来的与豆血红蛋白基础序列相似的微生物血红蛋白)在光谱上都显示出一个特异的吸收区带,称为索里特带(Soret band)。对 VHb 的各种形态,不管是还原态还是氧合态,都有特征的强吸收峰,而将 CO 鼓泡入还原态菌液时,在 419nm、535nm、566nm 处的吸收峰完全可以证明 VHb 的存在;此外,紫外-可见光谱法所用的仪器为紫外-可见分光光度计,其设备价格要远远低于红外光谱仪及核磁共振仪器;所需试剂也只有连二亚硫酸钠、CO 气等,而电泳法至少需要十几种试剂;从操作上看,此法步骤较少,测量周期很短,且可根据实际情况不断地改进实验方法。而印记法仅免疫注射一步至少要花费 60 天的时间,电泳法测量时间虽然不长,但操作过程比较繁琐;再者,从定量分析来看,红外与核磁由于不是直接检测 VHb(分别测量配体和 ATP),所以难以定量;电泳法必须通过染色和激光扫描,以及专门的软件才能定量;印记法虽定量准确,但考虑它操作上的难度太高,定量不易实现;而紫外-可见光谱法与 VHb 纯化相结合,可求出 VHb 的摩尔消(吸)光系数,再由朗伯-比耳定量公式,即可得到 VHb 的含量。

此外,对于紫外-可见光谱法,许多 VHb 的相关信息可通过测量细胞粗提物的方法得到。Webster 和 Liu 甚至用含 VHb 的全部细胞悬浮物进行光谱的测量,其结果与高度纯化的 VHb 十分类似^[10,11]。在本课题组的研究中,为检测产聚-羟基丁酸酯(PHB)的重组大肠杆菌 VGI(pTU14)中表达的透明颤菌血红蛋白(VHb),建立了一种基于全细胞悬浮液的改进一氧化碳(CO)差光谱法,在优化光谱条件的基础上,不仅成功地消除了 PHB 颗粒对光谱分析的干扰,而且成功地对 VHb 的表达量进行了简便、快捷且准确的定量分析^[18]。为此,当在发酵工业中应用透明颤菌血红蛋白基因的克隆表达来提高氧利用能力时,由于只需对重组血红蛋白的表达和表达量进行定性或定量分析,因此直接应用重组大肠杆菌或其它重组菌的全细胞悬浮液进行改进的一氧化碳分析,是一种操作简便快速且精度较高的优选分析方法,也是透明颤菌血红蛋白检测方法研究的一个重要发展方向。

综上所述,由于透明颤菌血红蛋白(VHb)能够从分子水平上控制 *vgb* 基因克隆菌对氧气的利用能力,在限氧条件下促进细胞生长和产物合成,因此可以提高发酵过程中目的产物的产量和收率,实现高密度发酵。又由于 VHb 的应用不仅可以降低氧气及能量的消耗,还不需要附加的设备投资,因此可以大大降低发酵成本。可以说,VHb 的发现及研究进展为利用分子克隆技术解决微生物发酵过程中的氧气供求矛盾及实现高密度发酵培养提供了良好途径,因此 VHb 在微生物发酵工业中的应用必将越来越普遍,而其分离纯化与分析方法的研究也必将更为深入,更为精确与便捷。

参考文献

- [1] Pringsheim E G. The *Vitreoscillaceae*: A family of colourless, gliding, filamentous organisms. *J Gen Microbiol* [J], 1951, 5: 124 ~ 149
- [2] 于慧敏,沈忠耀. 透明颤菌血红蛋白及其基因的研究进展. *微生物学报* [J], 1999, 39(5): 478 ~ 482
- [3] Tyree B, Webster D A. Electron-accepting properties of cytochrome o purified from *Vitreoscilla*. *J Biol Chem* [J], 1978, 253(21): 7635 ~ 7637
- [4] Webster D A, Orii Y. Oxygenated cytochrome o — An active intermediate observed in whole cells of *Vitreoscilla*. *J Biol Chem* [J], 1977, 252(6): 1834 ~ 1836
- [5] Dikshit KL, Webster D A. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene* [J], 1988, 70: 377 ~ 386
- [6] Khosla C, Bailey J E. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* [J], 1988, 214: 158 ~ 161
- [7] 郭宏秋,杨胜利. 透明颤菌血红蛋白在发酵工业中的应用概述. *微生物学通报* [J], 1996, 23(4): 227 ~ 230
- [8] Khosravi M, Webster D A, Stark B C. Presence of the Bacterial hemoglobin gene improves α -amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Plasmid* [J], 1990, 24: 193
- [9] Yu H M, Shi Y, Zhang Y P, et al. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin biosynthesis in *Escherichia coli* on production of poly (α -hydroxybutyrate) and fermentative parameters. *FEMS Microbiol Lett* [J], 2002, 214 (2): 223 ~ 227
- [10] Webster D A, Liu Ch Y. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide cytochrome o reductase associated with cytochrome o purified from *Vitreoscilla*. *J Biol Chem* [J], 1974, 249(13): 4257 ~ 4260
- [11] Liu Ch Y, Webster D A. Spectral characteristics and interconversions of the reduced, oxidized, and oxygenated forms of purified cytochrome o. *J Biol Chem* [J], 1974, 249(13): 4261 ~ 4266
- [12] Kita K, Konichi K, Anraku Y. Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. Purification and properties of cytochrome b_{558} -d complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electron carrying systems. *J Biol Chem* [J], 1984, 259(5): 3379 ~ 3381
- [13] Joshi M, Mande S, Dikshit K L. Hemoglobin biosynthesis in *Vitreoscilla stercoraria* DW: cloning, expression, and characterization of a new homolog of a bacterial globin gene. *Appl and environment microbiol* [J], 1998, 6: 2220 ~ 2228
- [14] 吴奕,杨胜利. 透明颤菌血红蛋白的表达及对基因工程菌的影响. *生物工程学报* [J], 1996, 12(2): 177 ~ 182
- [15] Choc M G, Webster D A, Caughey W S. Oxygenated Intermediate and carbonyl species of cytochrome o (*Vitreoscilla*) Characterization by infrared spectroscopy. *J Biol Chem* [J], 1982, 257(2): 865
- [16] Kallio P T, Kim D J, Tsai P A, et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur J Biochem* [J], 1994, 219: 201 ~ 208
- [17] Khosla C, Bailey J E. Evidence for partial export of *Vitreoscilla* hemoglobin into the periplasmic space in *Escherichia coli* Implications for protein function. *J Mol Biol* [J], 1989, 210: 79 ~ 89
- [18] 于慧敏,史悦,沈忠耀,杨胜利. CO 差光谱法分析重组大肠杆菌中的透明颤菌血红蛋白. *清华大学学报* [J], 2002, 42(5): 615 ~ 618

Progress of Purification and Detection of *Vitreoscilla* Hemoglobin

Yu Huimin Shi Yue Shen Zhongyao

(Department of Chemical Engineering Tsinghua University Beijing 100084)

Abstract *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) is the only well characterized prokaryotic oxygen-binding protein that allows bacterium to grow aerobically even under poor oxygen conditions. Thus, it has very promising application prospect during industrial fermentation of aerobic microbes to conquer the oxygen limitation. The processes of separation and purification of VHb were discussed. The methods of qualitative detection and quantitative analysis of VHb were focused. Advantages, disadvantages and applicability of different methods were compared. It's the development and research direction to quantitatively analyze VHb expressed in recombinant strains in fermentation by the method of modified carbon monoxide (CO) difference spectrum, in which the whole cells containing non-separated and non-purified VHb are directly used as the objects.

Key words *Vitreoscilla* hemoglobin Purification Qualitative detection and quantitative analysis