

研究报告

D-氨基酸氧化酶与麦芽糖结合蛋白和透明颤菌血红蛋白的融合表达

于慧敏¹, 马现锋¹, 罗晖², 文程¹, 沈忠耀¹

1 清华大学化工系 生物化工研究所, 北京 100084

2 北京科技大学 生物科学与技术系, 北京 100083

摘要: D-氨基酸氧化酶(DAAO)是一种重要的工业酶。为了进一步提高 DAAO 在大肠杆菌中的可溶性和活性表达, 分别构建了麦芽糖结合蛋白(MBP)和透明颤菌血红蛋白与三角酵母 DAAO (*TvDAAO*) 的 N-端融合蛋白。其中, MBP 融合蛋白 MBP-*TvDAAO* 在组成型(JM105/pMKC-DAAO)和诱导型菌株(JM105/pMKL-DAAO)中表达时, 目标蛋白的可溶性表达量分别达到全细胞蛋白表达量的 28%以上和 17%左右, 比无 MBP 融合的对照菌株 BL21(DE3)/pET-DAAO 分别提高 3.7 和 1.8 倍; 但其酶活水平显著下降。VHb 融合蛋白 VHb-*TvDAAO* 在重组菌 BL21(DE3)/pET-VDAAO 中摇瓶诱导表达时, DAAO 酶活达到了 3.24 u/mL, 比对照菌株 BL21(DE3)/pET-DAAO 提高了约 90%。

关键词: D-氨基酸氧化酶, 大肠杆菌麦芽糖结合蛋白, 透明颤菌血红蛋白, 融合表达

Fusion Expression of D-amino Acid Oxidase from *Trignoposis variabilis* with Maltose Binding Protein and *Vitreoscilla Hemoglobin*

Huimin Yu¹, Xianfeng Ma¹, Hui Luo², Cheng Wen¹, and Zhongyao Shen¹

1 Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2 Department of Biological Biological Science and Technology, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

Abstract: D-amino acid oxidase (DAAO) is one of important industrial enzymes. To increase the solubility and activity of the *TvDAAO* from *Trignoposis variabilis* expressed in recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*), a maltose binding protein (MBP) and *Vitreoscilla hemoglobin* (VHb) was introduced to fuse with N-terminal of the *TvDAAO*, respectively. Fusion protein of MBP-*TvDAAO* was constitutively expressed in JM105/pMKC-DAAO and inductively expressed in JM105/pMKL-DAAO. With respect to the control strain of BL21 (DE3)/pET-DAAO without MBP fusion, the constitutive fusion expression obtained 28% of soluble protein with 3.7 folds of solubility improvement. As for the inductive fusion expression, corresponding results changed to 17% and 1.8 folds, respectively. However, the DAAO activity significantly decreased in the MBP-fusing expression. Fusion protein of VHb-*TvDAAO* was constructed and inductively expressed in BL21 (DE3)/pET-VDAAO. Its DAAO activity highly reached 3.24 u/mL in flask culture, about 90% increase in contrast to the control without VHb.

Keywords: D-amino acid oxidase (DAAO), maltose binding protein (MBP), *Vitreoscilla Hemoglobin* (VHb), fusion expression

Received: February 28, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

Supported by: the Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation, China (No. 200345).

Corresponding author: Huimin Yu. Tel: +86-10-62788568; E-mail: yuhm@tsinghua.edu.cn

全国优秀博士学位论文作者专项资金项目(No. 200345)资助。

D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO, EC1.4.3.3)是一种以黄素腺嘌呤(FAD)为辅酶的黄素蛋白,它对催化反应底物有高度的立体异构选择性和广谱性,被广泛用于D-氨基酸定性定量分析、生物传感器、L-氨基酸和 α -酮酸生产等。它在工业上的重要应用之一即为两步酶法生产7-氨基头孢烷酸(7-ACA)^[1-3]。DAAO广泛存在于哺乳动物的内脏、藻类、真菌和细菌中^[4]。其中,红酵母(*Rhodotorula gracilis*)和三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)的RgDAAO和TvDAAO在工业上的应用最为广泛,其cDNA序列同源性为26%^[5]。根据已经解析的RgDAAO三维结构,可以预测TvDAAO的结构模型^[1,6],从而为其高活性外源表达提供依据。研究人员对DAAO基因进行了一系列克隆、测序和重组表达研究^[7-9],以实现其高效表达和酶的有效生产。

其中,通过融合表达策略引入一些具有特异功能的蛋白或多肽,有可能改善表达宿主细胞的生长状况、提高目的蛋白的可溶性表达水平、改进目的蛋白的提取纯化方法以及从分子水平上提高酶的催化活性和稳定性等。常见的用于构建融合蛋白的特异性功能蛋白有大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(Maltose binding protein, MBP)^[10-13]和透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla hemoglobin*, VHb)^[14-18],等等。

本研究采用来自三角酵母的TvDAAO为对象,通过MBP与TvDAAO的融合表达,考察了MBP对提高TvDAAO的可溶性和活性的影响。通过VHb与TvDAAO的融合表达,考察了VHb的引入对重组细胞的生长和TvDAAO表达活性的影响。

1 材料与方法

1.1 工具酶和试剂

各种工具酶均购自TaKaRa(大连)公司;质粒提取、PCR产物纯化试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。基因扩增、酶切、连接、转化、质粒提取、琼脂糖凝胶电泳、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)等基因工程操作均按照常规方法进行^[19]。

1.2 菌株和质粒

克隆菌株*E. coli* TOP-10F'从Invitrogen公司购买;表达菌株*E. coli* BL21(DE3)从Promega公司

购买,*E. coli* JM105由本实验室保藏。DAAO基因是采用RT-PCR方法克隆自本实验室保藏的一株*Trigonopsis variabilis*^[20]。质粒pMKL-DAAO(Kan^r)是诱导型,pMKC-DAAO(Kan^r)是组成型。VHb在诱导型质粒pET-VDAAO中表达。使用到的各种质粒及其相关基因特性见表1。

表1 本研究中所用的质粒
Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant genotype	Source or reference
pET-28a	5.4 kb, T7 promoter, Kan ^r	Novagen
pET-DAAO	6.4 kb, T7 promoter, TvDAAO, Kan ^r	This group, [20]
pMAL-p2x	6.7 kb, Tac promoter, malE, Amp ^r	NEB
pMKL-DAAO	8.4 kb, Tac promoter, malE, TvDAAO, Kan ^r	This study
pMKC-Acy	6.3 kb, Tac promoter, malE, lac ^r , Kan ^r	This group, [12]
pMKC-DAAO	7.4 kb, Tac promoter, malE, TvDAAO, lac ^r , Kan ^r	This study
pBR322-vgb	5.8 kb, vgb, Amp ^r	[21]
pET-VDAAO	6.9 kb, T7 promoter, vgb, TvDAAO, Kan ^r	This study

1.3 引物

在质粒pMKL-DAAO的构建过程中,TvDAAO基因的扩增采用质粒pET-DAAO^[20]为模板,以P_{DAOI-1}/P_{DAOI-2}为引物。其中,P_{DAOI-1}: CGCGGATCCA TGGCTAAAATCGTT(下划线处为BamH I位点);P_{DAOI-2}: CCCAAGCTTCTAGTGGTGGTGGTG(下划线处为Hind III位点)。氨苄青霉素抗性基因(Amp^r)的去除采用质粒pMAL-p2x(NEB)为模板,以P_{pma1-1}/P_{pma1-2}为引物。其中,P_{pma1-1}: CATCCTCGAG ACCAAGTTTACTCATATA(下划线处为Xho I位点);P_{pma1-2}: TAGGTACCATGAGCGGATACATATTT(下划线处为Kpn I位点)。卡那霉素抗性基因(Kan^r)的扩增采用质粒pET-28a(+)为模板,以P_{Kan-1}/P_{Kan-2}为引物。P_{Kan-1}: TACGGTACCAAGCTGGGCTGTGTGCA(下划线处为Kpn I位点);P_{Kan-2}: TAGCACTCGAGA ACAACACTCAACCCTATC(下划线处为Xho I位点)。融合蛋白VHb-TvDAAO的构建采用overlap-PCR方法,分别使用引物P_{Vgbl-1}/P_{Vgbl-2}、P_{DAOII-1}/P_{DAOII-2}和P_{Vgbl-1}/P_{DAOIII-2}为引物。其中,P_{Vgbl-1}: CATGCCATGGGCATGTTAGACCAGCAAAC C(下划线处为Nco I位点);P_{Vgbl-2}: AACGATTTTAG CCATTTCAACCGCTTGAGC; P_{DAOII-1}: GCTCAA

GCGGTTGAAATGGCTAAAATCGTT; P_{DAOII-2}: CCC CAAGCTTCTAAAGGTTTGGACGAGTAAG(下划线处为 *Hind* III 位点); P_{V_{gblI-1}}: TACGGTACCGCAT GTTAGACCAGCAAACC(下划线处为 *Kpn* I 位点); P_{DAOIII-2}: GGGAATTCCATATGCTAAAGGTTTGGACG(下划线处为 *Nde* I 位点)。

1.4 培养基和培养条件

重组菌株的培养使用 LB 液体培养基, 含卡那霉素 50 mg/L。在进行诱导型表达时, 以 1%接种量转接至 50 mL LB 培养基中(300 mL 摇瓶), 37°C, 200 r/min 摇床培养 2~2.5 h, 至 *OD*₆₀₀ 为 0.6~0.8; 加入 1 mmol/L 诱导剂异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG), 28°C 继续培养 20 h 左右。在进行组成型表达时, 以 1%接种量转接至 LB 培养基中(300 mL 摇瓶), 28°C 培养 20 h 左右。

1.5 DAAO 酶活测定

本研究中 *TvDAAO* 及融合蛋白 MBP-DAAO 和 Vhb-DAAO 的酶活测定采用比色法。取 5 mL 菌液 8000 r/min 离心 2 min, 以 5 mL 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH8.0)重悬沉淀; 在功率为 200 W、占空比 3/3 的条件下超声破碎 90 个循环; 13000 r/min 离心 2 min, 分别取上清液和沉淀, 4°C 保存用于测定酶活^[20]或进

行 SDS-PAGE 电泳^[19]。每分钟生成 1 μmol 丙酮酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位, 用 u 表示。

2 结果和讨论

2.1 MBP-*TvDAAO* 融合蛋白的构建

MBP 是一种细胞质内可溶性蛋白。很多研究表明外源蛋白与 MBP 在大肠杆菌中融合表达时有助于提高目的蛋白的可溶性表达水平^[10-12]。其原因可能是辅助蛋白 MBP 从核糖体上释放后能够迅速有效地正确折叠, 并促进下游目标蛋白肽段的正确折叠^[13]。因此, 本研究分别构建了 MBP-*TvDAAO* 融合蛋白的诱导型和组成型表达载体, 考察 MBP 基因(*malE*)与 *TvDAAO* 的融合表达, 对 *TvDAAO* 的可溶性和活性的影响。

诱导型表达载体以质粒 pMAL-p2x 为基础构建。由于 pMAL-p2x 含有 Amp^r 抗性基因, 其表达产物 β-内酰胺酶在降解氨苄青霉素的同时也能降解 DAAO 酶的催化产物, 因此需要将其去除替换成 Kan^r 抗性基因。插入扩增自质粒 pET-DAAO^[20] 的 *TvDAAO* 基因, 即获得 MBP-*TvDAAO* 的诱导型表达质粒 pMKL-DAAO, 如图 1 所示。

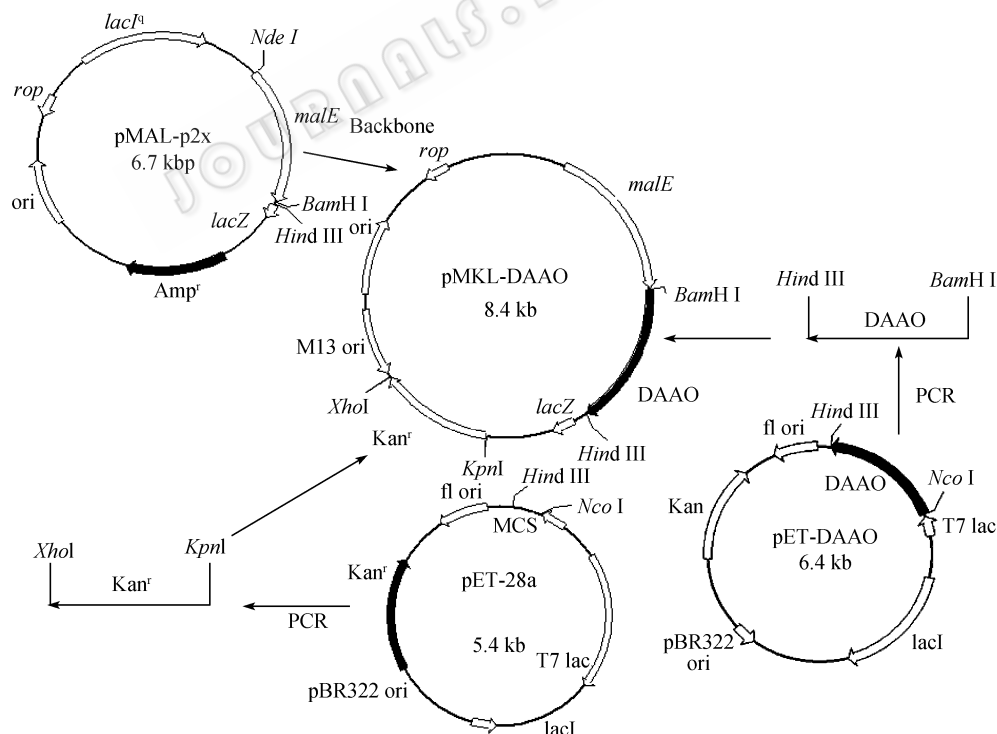


图 1 表达 MBP-*TvDAAO* 融合蛋白的诱导型质粒 pMKL-DAAO 的构建示意图
Fig. 1 Construction of the inducible plasmid of pMKL-DAAO expressing MBP-*TvDAAO*

组成型表达载体的构建以质粒 pMKC-Acy^[12]和 pMKL-DAAO 为基础。从质粒 pMKC-Acy 中酶切获得质粒骨架 pMKC, 插入从 pMKL-DAAO 中获得的融合蛋白基因 *malE-DAAO*, 即可获得 MBP-TvDAAO 的组成型表达质粒 pMKC-DAAO。

2.2 MBP 融合蛋白对 TvDAAO 的可溶性和表达活性的影响

将重组质粒 pMKL-DAAO 和 pMKC-DAAO 分别转化到优选的大肠杆菌 JM105 宿主, 得到表达 MBP-TvDAAO 融合蛋白的重组大肠杆菌 JM105/pMKL-DAAO 和 JM105/pMKC-DAAO。以优选的 TvDAAO 单表达重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET-DAAO 为对照, 对三株菌株分别进行培养和诱导型、组成型表达。20 h 后收集菌体, 取相同菌浓的菌体进行超声破碎, 离心收集上清液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 2。

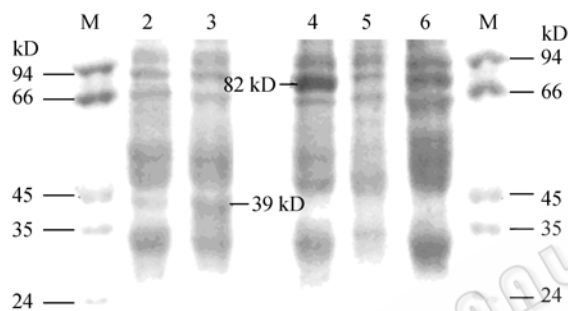


图 2 重组菌 28°C 培养表达的可溶目标蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of soluble target proteins expressed in recombinant strains at 28°C

M: protein marker; 2: control strain of BL21(DE3)/pET-DAAO, no induction; 3: control strain of BL21(DE3)/pET-DAAO, TvDAAO; 4: constitutive strain of JM105/pMKC-DAAO, MBP-TvDAAO; 5: inducible strain of JM105/pMKL-DAAO, no induction; 6: inducible strain of JM105/pMKL-DAAO, MBP-TvDAAO. Electrophoresis was performed as protocol^[19]. Photographing and quantification of the gel bands achieved by Image-Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) with Total Lab 1.0 software

TvDAAO 的分子量为 39 kD, 与分子量为 43 kD 的 MBP 融合后得到分子量为 82 kD 的融合蛋白。由图 2 可见, 蛋白条带大小与预期相符。对图 2 分析发现, 在 28°C 条件下表达时, 对照菌株(lane 3)中目的蛋白 TvDAAO 的可溶性表达量只占全细胞总蛋白表达量的 6%左右, 而组成型菌株 JM105/pMKC-DAAO (lane 4) 中融合蛋白 MBP-TvDAAO 的可溶性表达占全细胞蛋白表达量的 28%, 诱导型菌株 JM105/pMKL-DAAO (lane

6)中融合蛋白 MBP-TvDAAO 的可溶性表达量为 17%。因此, 在 28°C 条件下表达时, 组成型和诱导型表达的 MBP-TvDAAO 融合蛋白的可溶性比单表达 TvDAAO 分别提高了 3.7 和 1.8 倍, 说明 MBP 的引入确实可以显著提高 TvDAAO 的可溶性表达水平。

进一步测量三株重组菌中目的蛋白的总酶活, 结果如表 2 所示。

对图 2 和表 2 进行对比分析发现, 虽然 JM105/pMKC-DAAO 和 JM105/pMKL-DAAO 中表达的 MBP-TvDAAO 融合蛋白的可溶性比单表达 TvDAAO 的 BL21(DE3)/pET-DAAO 显著提高, 但其总酶活反而显著下降。结合对 TvDAAO 三维结构的预测和催化机理分析^[1], 可以认为当分子量(43 kD)较大的 MBP 在 TvDAAO 的 N 端进行融合表达时, 应该正好处于 TvDAAO 催化活性中心的“开口”部位, 对底物和酶分子的接近造成一定的空间阻遏, 从而导致了其酶活的下降。

表 2 TvDAAO 和 MBP-TvDAAO 在重组菌中表达的总酶活
Table 2 Total activity of TvDAAO and MBP-TvDAAO in recombinant strains

Strains	Conditions	Activity (u/mL)
JM105/pMKL-DAAO	MBP-DAAO, inducible	0.76
JM105/pMKC-DAAO	MBP-DAAO, constitutive	1.08
BL21(DE3)/pET-DAAO	DAAO, inducible	1.62

2.3 VHb-DAAO 融合蛋白的构建

VHb 是透明颤菌在贫氧条件下合成的一种可溶性血红蛋白分子^[14], 它的一个重要生理功能是从分子水平上提高细胞对氧气的利用能力, 协助细胞在贫氧环境中生长^[15]。它还可以降低外源蛋白对细胞的毒性^[16]、提高目标蛋白重组表达的活性和稳定性^[17]以及增加目标产品在重组细胞内的产率^[18]。VHb 的开放阅读框有 441 bp (包括终止密码子), 编码 146 个氨基酸残基, 其分子量远远小于 MBP。因此, 理论上可以消除 MBP 在 TvDAAO 的 N 端融合所产生的空间位阻效应。

通过 Overlap-PCR 方法构建 VHb-TvDAAO 融合蛋白, 并插入质粒 pET-28a(+), 即获得 VHb-TvDAAO 诱导型表达的重组质粒 pET-VDAAO, 具体构建过程如图 3 所示。

2.4 VHb 的融合表达对重组菌生长和 DAAO 表达的影响

将重组质粒 pET-VDAAO 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)宿主, 得到表达 VHb-TvDAAO 融合蛋白的

重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-VDAAO。对该菌株和对照菌株 BL21(DE3)/pET-DAAO 进行平行培养和诱导表达, 考察其细胞生长和酶活表达特性, 结果如图 4 所示。

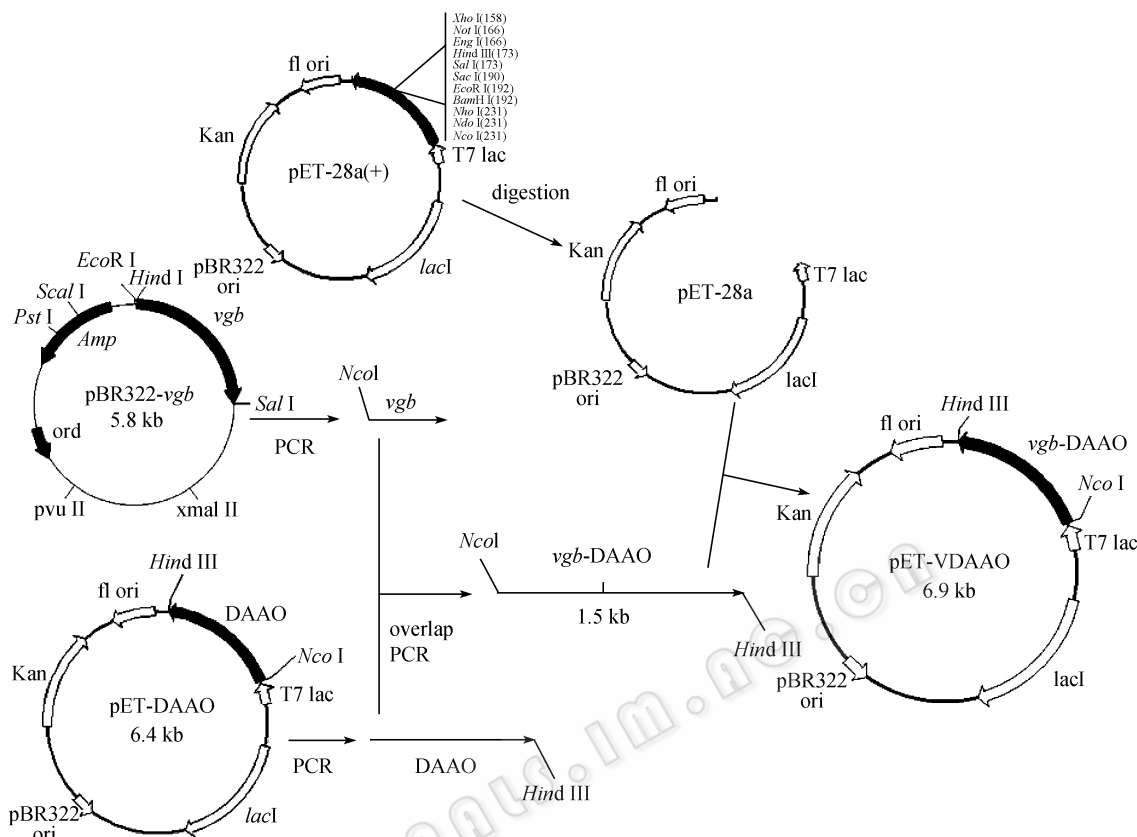


图 3 表达 VHb-TvDAAO 融合蛋白的诱导型质粒 pET-VDAAO 的构建示意图
Fig. 3 Construction of the inducible plasmid of pET-VDAAO expressing VHb-TvDAAO

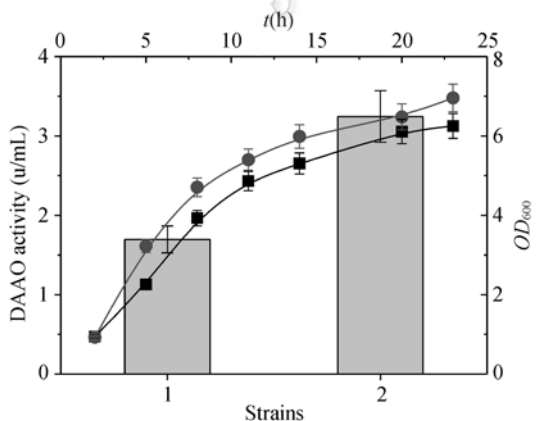


图 4 融合蛋白 VHb-TvDAAO 中 VHb 对细胞生长和 DAAO 酶活的影响

Fig. 4 Effect of VHb in fusion protein of VHb-TvDAAO to cell growth and DAAO activity

1: BL21 (DE3)/pET-DAAO without VHb; 2: BL21 (DE3)/pET-VDAAO with VHb; ●: cell growth of OD₆₀₀ of BL21 (DE3)/pET-VDAAO with VHb; ■: OD₆₀₀ of BL21(DE3)/pET-DAAO without VHb

由图可见, VHb 的引入可以促进重组细胞的生长。在实验条件下的摇瓶培养中, 携带 VHb 融合蛋白的重组菌的 OD₆₀₀ 相对于对照菌株提高了 12% 左右。酶活分析结果进一步表明, 重组菌 BL21(DE3) /pET-VDAAO 表达的 VHb-TvDAAO 融合蛋白的总酶活达到 3.24 u/mL, 比对照菌株提高了约 90%。

综上所述, 本研究分别成功构建了三角酵母 DAAO 与大肠杆菌麦芽糖结合蛋白 MBP 和透明颤菌血红蛋白 VHb 的融合蛋白。结果表明, MBP 与 TvDAAO 的融合表达可以提高 TvDAAO 的可溶性, 但却降低了活性。而 VHb 的引入不仅可以促进重组菌株的生长, 同时还可以显著提高 TvDAAO 的酶活。上述结果为 MBP 和 VHb 等功能蛋白与不同目标蛋白进行融合表达策略的普遍应用提供了依据。

致谢: 透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)由中国科学院上海生物工程研究中心杨胜利院士惠赠。

REFERENCES

- [1] Pollegioni L, Molla G, Sacchi S, *et al.* Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **78**: 1–16.
- [2] Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, *et al.* Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci*, 2007, **64**: 1373–1394.
- [3] Pilone MS. D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57**: 1732–1747.
- [4] Sun BB, Wang XL, Yang ZP. Recent rResearch progress of D-Amino acid oxidase. *Chem & Bioeng*, 2007, **24**(2): 8–11.
孙兵兵, 王筱兰, 杨志平. D-氨基酸氧化酶的研究进展. *化学与生物工程*. 2007, **24**(2): 8–11.
- [5] Pollegioni L, Molla G, Campaner S, *et al.* Cloning, sequencing and expression in *E. coli* of a D-amino acid oxidase cDNA from *Rhodotorula gracilis* active on cephalosporin C. *J Biotechnol*, 1997, **58** (2): 115–123.
- [6] Tishkov VI, Khoronenkova SV. D-Amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism, and practical application. *Biochem (Moscow)*, 2005, **70**: 40–54.
- [7] Lin LL, Chien HR, Wang WC, *et al.* Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase gene in *Escherichia coli* and characterization of its inactive mutants. *Enzyme Microb Technol*, 2000, **27**: 482–491.
- [8] Alonso J, Barredo JL, Diez B, *et al.* D-amino acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) ATCC 26217. *Microbiology*, 1998, **144**: 1095–1101.
- [9] Hwang TS, Fu HM, Lin LL, *et al.* High-level expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Escherichia coli* using lactose as inducer. *Biotechnol Lett*, 2000, **22**: 655–658.
- [10] Clement JM, Jehanno M, Popescu O, *et al.* Expression and biological activity of genetic fusions between *MalE*, the maltose binding protein from *Escherichia coli* and portions of CD4, the T-Cell receptor of the AIDS virus. *Protein Express Purific*, 1996, **8**: 319–331.
- [11] Spangfort MD, Ipsen H, Sparholt SH, *et al.* Characterization of purified recombinant Bet v1 with authentic N-Terminus, cloned in fusion with maltose-binding protein. *Protein Express Purific*, 1996, **8**: 365–373.
- [12] Zhou H, Yu HM, Luo H, *et al.* Inducible and constitutive expression of glutaryl-7- aminocephalosporanic acid acylase by fusion to maltose-binding protein. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **40**: 555–562.
- [13] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**(5): 411–421.
- [14] Yu HM, Shen ZY. Progress in research of *Vitreoscilla* hemoglobin and *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Acta Microbiol Sinica*, 1999, **39**(5), 478–482.
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*, 1999, **39**(5): 478–482.
- [15] Khosla C, Bailey JE. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1988, **214**: 158–161.
- [16] Chien LJ, Wu JM, Kuan IC, *et al.* Coexpression of *Vitreoscilla* hemoglobin reduces the toxic effect of expression of D-Amino acid oxidase in *E. coli*. *Biotechnol Prog*, 2004, **20**: 1359–1365.
- [17] Khang Y, Kim I, Hah Y, *et al.* Fusion protein of *Vitreoscilla* hemoglobin with D-amino acid oxidase enhances activity and stability of biocatalyst in the bioconversion process of cephalosporin C. *Biotech Bioeng*, 2003, **82**: 480–488.
- [18] Yu HM, Shi Y, Zang YP, *et al.* Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin biosynthesis in *Escherichia coli* on production of poly (β -hydroxybutyrate) and fermentative parameters. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **214**: 223–227.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [20] Luo H, Tong YZ, Li Q, *et al.* Cloning and expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase gene in *E. coli*. *Acta Microbiologica Sinica*. 2004, **44**(3): 336–339.
罗晖, 童忆舟, 李强, 于慧敏, 沈忠耀. 三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达. *微生物学报*, 2004, **44**(3): 336–339.
- [21] Wu Y, Yang SL. Construction and study of an integrated expression vector of *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) by double homologous recombination between plasmid and chromosome. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1996, **12**(3), 276–283.
吴奕, 杨胜利. 整合型 *vgb* 基因载体的构建和研究. *生物工程学报*, 1996, **12**(3), 276–283.