

皮蝇素 C 蛋白在毕赤酵母中的表达及纯化

Expression and Purification of Recombinant Hypodermin C in *Pichia pastoris*

高兴春, 徐梅倩, 何国声*

GAO Xing-Chun, XU Mei-Qian and HE Guo-Sheng*

中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200232

Shanghai Institute of Animal Parasitology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200232, China

摘 要 利用 PCR 技术从重组质粒 pGEM-T/HC 中扩增 HC cDNA 片段, 克隆到 pPIC9k 毕赤酵母表达载体中, 获得重组质粒 pPIC9k-HC, 重组质粒线性化后电激转化入毕赤酵母 GS115 菌株中, 重组子经 G418 筛选、PCR 鉴定得到含外源基因的重组子, 然后在含 0.5% 甲醇的培养基中诱导产生目的蛋白, 经 SDS-PAGE 检测发现表达蛋白质的相对分子量约为 28kD, 表达量约为 121 mg/L, 表达上清经超滤浓缩和阴离子交换层析初步纯化, 所得纯化产物经 Western-blot 表明具有与兔抗 HC 血清特异性结合的能力; 明胶电泳检测显示具有水解酶活性, 为今后进行大规模的牛皮蝇蛆病的调查提供了一种生产大量廉价抗原的方法。

关键词 HC, 毕赤酵母, 表达纯化

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0552-05

Abstract Hypodermin C (HC) cDNA was amplified from recombinant pGEM-T/HC, cloned in frame with the signal sequence in yeast vector pPIC9k. The plasmid was linearized and transformed into *Pichia pastoris* GS115 strain by electroporation method. Recombinant strain was screened by G418 resistant, and further confirmed by PCR. The recombinant strain which contains insert was induced in the medium containing 0.5% methanol. The supernatant was collected and then purified by anion exchange chromatography. SDS-PAGE indicated that the target protein is around 28kD. Western-blot showed it can react with rabbit-anti HC serum. Gelatin substrate SDS-PAGE displayed it had enzyme activity. Provided a method to produce enough antigens for carrying out extensive immunological analyses.

Key words Hypodermin C, *Pichia pastoris*, expression and purification

牛皮蝇蛆病是由皮蝇科皮蝇属的皮蝇幼虫引起的一种寄生虫病, 其感染严重影响菜牛出肉率、奶牛产奶量及牛皮的质量。此病在欧洲、北美、亚洲等地广泛流行^[1,2], 在我国甘肃、西藏、新疆、青海、内蒙古等五大牧区流行甚为严重^[3-5]。对此病的诊断有临床诊触和血清学的方法。以皮蝇一期幼虫的可溶性抗原做 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

是目前应用最广泛的方法, 具有简单、方便、特异性强、敏感性高等优点^[6-9]。但收集大量的一期幼虫十分困难, 用于诊断成本也过高, 所以人们很早就开始在寻找更好的抗原。

皮蝇素 (Hypodermin C, HC) 是皮蝇一期幼虫可溶性抗原的主要成分^[10-12], 是一种丝氨酸蛋白酶, 分子量为 25223D, 成熟的 HC 含有 230 个氨基酸, 比

Received: October 20, 2006; Accepted: December 18, 2006.

This work was supported by the grant from the Collection and Preservation of the Important Parasite of Poultry and Livestock (No. 2002DEB10050).

* Corresponding author: Tel: +86-21-54085785, E-mail: he-guosheng@yahoo.com.cn

畜禽重要寄生虫虫种资源的收集与保存项目(No. 2002DEB10050)资助。

其前体少了 30 个氨基酸,整个氨基酸序列和胰蛋白酶家族的丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列具有高度的相似性。牛皮蝇和纹皮蝇 HC 具有相同的抗原决定簇^[13],所以此特异性抗原可以诊断这两种蝇蛆病。Casais 等^[14]1998 年用大肠杆菌表达 HC 获得了成功,通过 ELISA 检测发现有很好的敏感性和特异性。研究人员^[15,16]专门对天然的 HC 和重组 HC 在皮蝇蛆病诊断中的应用进行了评估,发现在 ELISA 中使用重组 HC 的效果与天然 HC 的相同,都具有高度的敏感性和特异性,并且在大规模的疫病普查中使用重组 HC 可以降低成本,是今后诊断的首选抗原。

尝试用毕赤酵母表达系统表达重组 HC 目的在于利用该系统产量高、生产成本低等优点生产大量 HC 用于免疫诊断。毕赤酵母表达系统是兼有真核表达系统翻译后修饰功能及原核表达系统方便、简单和价廉等优点于一身的理想表达系统^[17]。我们将该系统应用于表达皮蝇素 C 蛋白取得了成功,为今后牛皮蝇蛆病的诊断提供了一种成本低、产量高的重组抗原生产方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒:*Pichia* 酵母 GS115、*Pichia* 酵母表达质粒 pPIC9k,由上海交通大学张大兵教授提供,大肠杆菌 DH5 α 由本室保存,pMD18-T 质粒购自 TaKaRa,含有 HC 基因的 pGEM-T 质粒由法国农科院馈赠。

1.1.2 工具酶与试剂:所用限制酶 *Not* I, *Eco*R I, *Sal* I 及 *Taq* DNA 聚合酶均为大连宝生物工程公司产品。酵母提取物、蛋白胨购自上海生物工程公司。兔抗 HC 的阳性血清以及以及做为阳性的重组 HC 均由法国农科院馈赠。羊抗兔 IgG-HRP 为华美生物工程公司产品,低分子蛋白 Marker 由上海农科院生物技术中心提供,其余都为国产分析纯试剂。层析用的 AKTK purifer 系统和 Mono Q HR5/5 为 Amersham Bioscience 公司产品,Stirrel 超滤器,10000D 的滤膜为 Milipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 本试验所用 PCR 引物由赛百盛公司合成(根据已报道的 HC 序列^[18],设计一对含 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点的引物(酶切位点由-标出):

hp1 :GCAGAATTCATAATCAATGGATACGAAG

hp2 :GCAAGCGCCGCTTAAAATATTATACCAG

1.2.2 表达质粒 pPIC9k-HC 的构建:以法国农科院

提供的 pGEM-T/HC 质粒为模板,分别利用正向和反向引物 hp1/hp2 进行 PCR 扩增(94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 45s,50 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 1min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min)。PCR 产物胶回收后连接到 pMD18-T 载体上,然后用 *Not* I / *Eco*R I 切下 HC 基因,克隆到用同样酶切处理的表达载体 pPIC9k 上构建 pPIC9k-HC 表达载体,对构建的表达载体进行双酶切和 PCR 鉴定,最后进行测序。

1.2.3 毕赤酵母的转化与鉴定:将重组质粒 pPIC9k-HC 以 *Sal* I 进行酶切,线性化后的重组质粒在 2.0kv 200k Ω 25 μ F 条件下电击转化入制备好的酵母感受态细胞 GS115 中,转化产物涂布于 MD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2~5d 后长出菌落。取一块 96 孔细胞培养板,每孔加入 200 μ L YPD 培养基,用无菌牙签将生长在 MD 平板上的 *His*⁺ 转化株逐一接种到每一孔中,置于 30 $^{\circ}$ C 静置培养 2d,取一新 96 孔细胞培养板,每孔加入 190 μ L YPD 培养基,在第一轮的 96 孔板中各取 10 μ L 菌液,加入第二块 96 孔细胞培养板的相应孔中,置于 30 $^{\circ}$ C 静置培养 1d,按以上步骤将菌液接入第三块细胞培养板中,30 $^{\circ}$ C 静置培养过夜后,将第三块细胞培养板各孔的菌液悬起,各取 10 μ L 分别滴加于含 1mg/mL G418 的 YPD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养,观测生长情况,对长出的 *Mut*⁺ 型重组子进行 PCR 鉴定,以确定用来诱导表达的含 pPIC9k-HC 质粒的 GS115 转化株。

1.2.4 重组酵母的诱导表达:将重组子放入以甘油为碳源的 BMGY 培养基中,30 $^{\circ}$ C 250r/min 振荡培养,到 *OD*₆₀₀ 值为 2~6 时,4000r/min 离心 5min 收集细胞沉淀,用含 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基重悬菌体,30 $^{\circ}$ C 250r/min 振荡培养以诱导表达,每 24h 添加甲醇至浓度为 0.5%,60h 后收集上清。

1.2.5 表达产物的生物特性鉴定:用 SDS-PAGE 进行表达产物分子量的确定,Western-blot 鉴定其抗原性,将收集的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后,100V 1h 转移至硝酸纤维素膜(NC)上,1% 明胶中封闭 1.5h, PBST 洗涤 3 次,每次 5min;与 1:500 兔抗 HC 血清作用 1h, PBST 洗涤 3 次;再与羊抗兔 IgG-HRP 1:2000 室温作用 1h, PBST 洗涤 3 次后,置于底物溶液中显色。明胶电泳进行酶活性检测:除在分离胶中含 0.1% 明胶外其他与 SDS-PAGE 胶相同,样品不经变性处理。电泳后用 2.5% TritonX-100 溶液 4 $^{\circ}$ C 洗涤,在 0.1mmol/L Tris-HCl pH7.5,1mmol/L CaCl₂ 溶液中 37 $^{\circ}$ C 温浴 60min,考马斯亮蓝染色。

1.2.6 表达产物的纯化:参照徐梅倩^[19]等方法将表

达上清用 Stirreel 超滤器浓缩至 1/5 体积,于 25mmol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液中透析,每 2h 换液 1 次,透析过夜。再通过 0.22 μ m 滤膜过滤。利用 AKTA purifier 系统和 Mono Q HR 5/5 阴离子交换柱(购自 Amersham Biosciences 公司)进行分离纯化。用含 2 M NaCl, 25mmol/L Tris-HCl pH8.0 的溶液进行梯度洗脱,流速 1mL/min,进样量 2mL,280nm UV 检测,收集含目的蛋白的洗脱液,进行 SDS-PAGE 分析和酶活性分析。测量纯化蛋白在 280nm 和 260nm 处的吸光值,根据以下公式计算蛋白浓度,并换算成蛋白原液浓度。蛋白浓度(mg/mL) = $OD_{280} \times 1.45 - OD_{260} \times 0.74$

1.2.7 毕赤酵母表达蛋白与 S2 细胞表达蛋白反应原性比较

取毕赤酵母表达蛋白与 S2 细胞表达蛋白各 0.5 μ g、1.0 μ g、2.0 μ g 上样,进行 Western-blot 检测,方法与 1.2.5 中相同。

2 结果

2.1 表达质粒 pPIC9k-HC 的构建与鉴定

成功构建融合蛋白表达载体 pPIC9k-HC。经鉴定插入序列与报道 HC 序列一致,插入方向正确,未发生移码突变。

2.2 毕赤酵母的转化与鉴定

挑取的在 1mg/mL G418 的 YPD 平板上长出的 *Mut*⁺ 型重组子都是阳性重组子。

2.3 重组酵母的诱导表达及生物特性鉴定

按 1.2.4 的方法选取在 1mg/mL G418 的 YPD 平板上生长的转化子在摇瓶内进行甲醇诱导表达,SDS-PAGE 分析表达上清。结果如图 1 所示,重组转化子 GS115 pPIC9k-HC 的甲醇诱导表达上清在 28kD 附近出现一条新增的条带,与预期的蛋白大小相符,而空载体 pPIC9k 的转化子的分泌上清在相应位置没有条带,表明目的蛋白获得了分泌表达。Western 结果如图 1 所示,显示该蛋白能与兔抗 HC 抗体特异性结合,且分子量为 28kD。由于 HC 蛋白是一种丝氨酸水解酶,具有水解明胶的作用,在明胶电泳中目的蛋白所在的区域水解明胶呈白色,其他区域因明胶本身就是一种蛋白而被染为蓝色。结果显示表达蛋白具有水解明胶的酶活性(如图 2 所示)。

2.4 表达产物的纯化

表达上清经超滤后,用阴离子交换柱进行纯化,梯度洗脱采取 7% B 液洗脱杂蛋白,17% B 液洗脱目

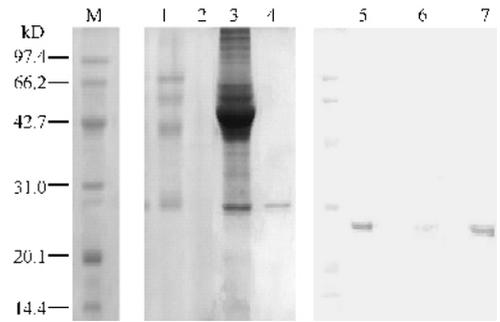


图 1 HC 的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

Fig. 1 Analysis of SDS-PAGE and Western-blot of HC

M: protein molecular weight marker; 1, 7: protein from recombinant HC gene strains 2, 6: protein from control strain 3: positive HC 4, 5: purified HC.

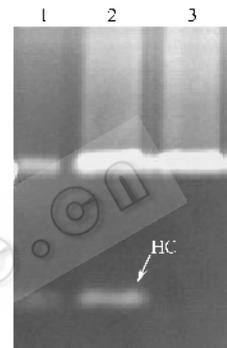


图 2 明胶电泳图

Fig. 2 Gelatin SDS-PAGE

1: purified HC 2: protein from recombinant HC gene strain 3: protein from control strain.

的蛋白。纯化的目的蛋白在 SDS-PAGE 上呈现一条带(图 1),经 ImageMaster VDS 软件(Amersham)进行凝胶光密度扫描分析发现纯度在 70% 以上,经 Western 检测发现具有良好的抗原性(图 1),水解明胶试验显示具有水解酶活性(图 2)

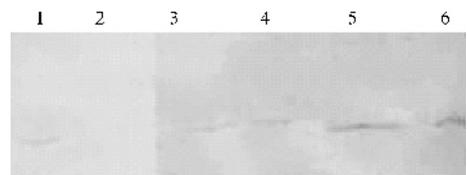


图 3 不同重组蛋白反应原性比较

Fig. 3 Compare of the reactivity of different rHC

1, 3, 5: rHC from *Pichia pastoris* 0.5 μ g, 1.0 μ g, 2.0 μ g respectively 2, 4, 6: rHC from S2 0.5 μ g, 1.0 μ g, 2.0 μ g respectively.

2.5 毕赤酵母表达蛋白与 S2 细胞表达蛋白反应原性比较

Western-blot 结果如图 3 所示,在 0.5 μ g 时,只有毕赤酵母表达的重组蛋白出现特异条带,而 S2 细胞表达的重组蛋白没有条带,在 1.0 μ g 和 2.0 μ g 时两种重组蛋白都出现特异条带,而毕赤酵母表达的蛋白的条带在相同质量时比 S2 细胞表达的重组蛋白亮,说明在毕赤酵母中表达的 rHC 的反应原性要

高于在 S2 细胞中表达的。

3 讨论

国外的研究者有利用大肠杆菌表达系统进行 rHC 表达的报道^[14],是与 GST 融合表达的,表达产物经纯化和切除 GST 后具有良好的抗原性,虽然也具有水解酶活性,但是由于已测出的 HC 三维结构^[20]显示其具有的 3 对二硫键对形成正确的空间结构至关重要,但目前用大肠杆菌表达的 HC 都是以包涵体形式存在,在复性过程中难以形成正确的构象,所以大肠杆菌表达系统并不是理想的可以得到正确折叠和有活性的 HC 的系统,并且产量偏低,为 3.5 mg/L。此后用果蝇 S2 细胞进行了表达,采用加 His 标签和不加标签两种方式进行研究,发现抗原性与天然的相同但是产量分别为 6mg/L 和 10mg/L (内部资料)。用以上系统表达 HC 都存在纯化困难、回收率低或表达量低、成本高等问题,尤其是大肠杆菌表达的 HC,其中可能含有一些大肠杆菌的菌体蛋白,在检测时引起假阳性。而毕赤酵母表达系统是目前被认为最有前景的商业蛋白质生产工具之一,具有表达水平高,外源蛋白基因遗传稳定,具有糖基化、酰基化、蛋白磷酸化等翻译后修饰加工功能,使生产的蛋白具有天然的高级结构及生物学活性,并且毕赤酵母糖基化水平低,发酵工艺成熟,易放大,产物易纯化,所用发酵培养基十分廉价,一般碳源为甘油或葡萄糖及甲醇,其余为无机盐,成本远低于昆虫和哺乳动物表达系统^[17,21]。并且动物一般不会被感染酵母菌,血清中没有抗酵母蛋白的抗体,即使蛋白的纯度不是很高,也不会引起假阳性。因此本文尝试用该系统进行 HC 的表达研究并取得了成功,为今后皮蝇蛆病诊断所用抗原提供了一种新的途径。

本研究使用的是毕赤酵母 GS115 菌株和 pPIC9k 质粒,pPIC9k 质粒所带 Kanamycin 抗性基因在酵母中表现为抗 G418 的抗性,利用这一点可以用来筛选多拷贝的菌株。本文是经 3 块 96 孔细胞培养板连续培养,目的是使细胞具有相同的密度,然后逐一滴加到含 G418 的 YPD 平板上筛选的,结果在 G418 浓度为 1 mg/mL 的平板上长出几个菌落,浓度再高的平板上没有长出菌落,用 PCR 方法对长出的菌落进行验证,然后进行表达,挑表达量最高的菌株进行保种和后续试验,得到的产量大约为 121 mg/L。产量比用大肠杆菌和果蝇系统表达的产量要高,是目前世界上生产重组 HC 的所有方法中产量最高

的。但是与用毕赤酵母表达的 HA(与 HC 同家族的一种皮蝇素 A)相比产量还是不高^[22],可能筛选的工作量不够,筛选到的克隆中外源基因的拷贝数不高。由于毕赤酵母有很多表达载体,今后如果要提高 HC 的表达产量除了提高抗性筛选浓度,获得含更高拷贝外源基因的转化子外,还可以考虑更换表达载体。此外,也可以对表达条件进行优化和进行发酵研究,在发酵罐中,菌体密度更高,产量也会提高。

已知 HC 蛋白不存在 N-糖基化的位点,但有可能存在 O-糖基化的位点^[18],因为序列中存在大量的 Ser 和 Thr 残基,糖基化对其抗原性有无影响目前尚不清楚,但是从大肠杆菌中获得 rHC、从 S2 细胞和毕赤酵母中获得的 HC 都具有和天然 HC 相同的抗原性,说明糖基化对其抗原性不是必要的,因为在大肠杆菌表达菌株中不存在糖基化的酶,而 S2 细胞和毕赤酵母的糖基化方式不是完全相同的^[21],目前可以肯定的是糖基化对其酶活性没有影响^[14],对抗原性的影响有待进一步研究,但是其他的蛋白质修饰对生物活性有无影响也有待于进一步研究。

本实验室拥有法国农科院馈赠的由 S2 细胞表达的 rHC 及自己用毕赤酵母表达的 HC,由于是用作诊断,所以只做了二者反应原性的比较,结果发现,由毕赤酵母表达的 HC 的反应原性要高于用 S2 细胞表达的 HC,用于诊断要优于后者。由于 HC 只由寄生在牛体内的一期幼虫产生,要获得就必须将牛屠宰,所以难以获得天然的 HC。即使获得的重组 HC 反应原性要低于天然的,但由于本系统成本低廉、可以廉价获得大量 HC,所以并不会影响在实际中的应用的。

本研究所得的重组 HC 经超滤、透析和阴离子交换层析后得到初步纯化,纯度大约为 70% 左右,Western 试验表明具有很好的抗原性,水解明胶试验表明虽然有水解活性,但水解条带比未纯化前还浅;而从 Western 图中可以看出纯化后蛋白的浓度要比未纯化的大,这说明纯化后重组 HC 的水解活性减弱,这与用 S2 细胞表达 HC 蛋白纯化后的结果相同,原因有可能是在纯化过程中,耗时太长(4℃ 透析过夜的),使 HC 发生变性,酶活丧失,具体原因还有待进一步研究。不过就诊断来说,只要重组蛋白具有抗原性,对今后皮蝇蛆病诊断研究是不会产生影响的。以重组的 HC 为抗原做成试剂盒,可以使牛皮蝇蛆病的诊断更加方便和规范,若能做成试纸条,只需要一滴血或乳汁就可以诊断,那会更加方

便,为牛皮蝇蛆的防治提供更有效的检测手段,为控制国内的牛皮蝇蛆病作出贡献。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Papadopoulos E, Himonas C, Boulard C. The prevalence of bovine hypodermosis in Greece. *Parasitologia*, 1997, **39**(4): 431 – 433.
- [2] Frangipane di Regalbono A, Capelli G, Otranto D, et al. Assessment of cattle grub (*Hypoderma* spp.) prevalence in northeastern Italy: an immunoepidemiological survey on bulk milk samples using ELISA. *Vet Parasitol*, 2003, **111**(4): 343 – 350.
- [3] Guo YH (郭媛华), Chi GM (迟光明), Bao HM (包海眉), et al. Brief introduction of epidemic and prevention of hypodermosis in bovine in inner Mongolia. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology* (中国兽医寄生虫病), 2002, **10**(2): 1 – 4.
- [4] Cao SG (曹仕光). The investigation on the harm degree of *Hypoderma bovis* on the cattle in different height above sea level. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology* (中国兽医寄生虫病), 2004, **12**(4): 16 – 17.
- [5] Zhang JI (张军良). Brief introduction of epidemic of hypodermosis in bovine in maqin. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences* (青海畜牧兽医杂志), 2004, **34**(5): 17.
- [6] Webster K A, Giles M, Dawson C. A competitive ELISA for the serodiagnosis of hypodermosis. *Vet Parasitol*, 1997, **68**(1 – 2): 155 – 164.
- [7] Boulard C, Villejoubert C, Moire N, et al. Sero-surveillance of hypodermosis in a herd under therapeutic control. Effect of a low level of infestation. *Vet Parasitol*, 1996, **66**(1 – 2): 109 – 117.
- [8] Boulard C, Villejoubert C. Use of pooled serum or milk samples for the epidemiological surveillance of bovine hypodermosis. *Vet Parasitol*, 1991, **39**(1 – 2): 171 – 183.
- [9] Otranto D, Testini G, Sottili R, et al. Screening of commercial milk samples using ELISA for immuno-epidemiological evidence of infection by the cattle grub (*Diptera: Oestridae*). *Vet Parasitol*, 2001, **99**(3): 241 – 248.
- [10] Boulard C. Preliminary study of crude collagenase extracted from the 1st stage larva of *Hypoderma lineatum* (de Villers). *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 1970, **270**(10): 1349 – 1351.
- [11] Lecroisey A, Boulard C, Keil B. Chemical and characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Eur J Biochem*, 1979, **101**(2): 385 – 393.
- [12] Pruett JH, Temeyer KB, Burkett BK. Antigenicity and immunogenicity of *Hypoderma lineatum* soluble proteins in the bovine host. *Vet Parasitol*, 1988, **29**(1): 53 – 63.
- [13] Boulard C, Villejoubert C, Moire N. Cross-reactive, stage-specific antigens in the *Oestridae* family. *Vet Res*, 1996, **27**(4 – 5): 535 – 544.
- [14] Casais R, Martin Alonso JM, Boga JA, et al. *Hypoderma lineatum*: expression of enzymatically active hypodermin C in *Escherichia coli* and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. *Exp Parasitol*, 1998, **90**(1): 14 – 19.
- [15] Panadero R, Lopez C, Carballo D, et al. Assessment of a recombinant antigen versus natural hypodermin C for the serodiagnosis of hypodermosis in cattle. *Parasitol Res*, 2000, **86**(1): 67 – 68.
- [16] Boldbaatar D, Xuan X, Kimbita E, et al. Detection of antibodies to *Hypoderma lineatum* in cattle by Western blotting with recombinant hypodermin C antigen. *Vet Parasitol*, 2001, **99**(2): 147 – 154.
- [17] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, **16**(1): 23 – 52.
- [18] Moire N, Bigot Y, Periquet G, et al. Sequencing and gene expression of hypodermins A, B, C in larval stages of *Hypoderma lineatum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1994, **66**(2): 233 – 240.
- [19] Sun Y (孙怡), Gu YX (顾越星), Xu MQ (徐梅倩), et al. Separation and purification of hypodermin A on monolithicanion exchange columns. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology* (中国兽医寄生虫病), 2003, **11**(1): 1 – 3.
- [20] Broutin I, Arnoux B, Riche C, et al. 1.8 A structure of *Hypoderma lineatum* collagenase: a member of the serine proteinase family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1996, **52**(Pt 2): 380 – 392.
- [21] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)*, 1993, **11**(8): 905 – 910.
- [22] Xu MQ (徐梅倩), Gao XC (高兴春), Sun Y (孙怡), et al. Hypodermin A expressed in *Pichia pastoris* system. *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报), 2006, **26**(3): 296 – 299.