

应用双质粒共表达体系提高融合蛋白 GGH 在毕赤酵母 GS115 中的表达量

王慧¹, 窦文芳¹, 张晓梅¹, 许泓瑜¹, 许正宏^{1,2}

¹ 江南大学 医药学院制药工程研究室, 无锡 214122

² 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: 为实现人胰高血糖素样肽-1-人血清白蛋白融合蛋白 ((GLP-1_{A2G})₂-HSA, 简称 GGH) 的规模化制备, 通过 pPICZαB 与 pPIC9K 双质粒共表达体系提高融合蛋白 GGH 在毕赤酵母中的表达量。首先运用 PCR 技术扩增出融合蛋白 GGH 的基因片段, 构建了表达质粒 pPICZαB-ggh, 并电转至经载体 pPIC9K-ggh 异位整合的 GGH 分泌型菌株——毕赤酵母 GS115/F₂; 然后采用免疫学方法并结合高浓度抗生素筛选获得高产菌 GS115/F₃, 在 30 °C, 3% 甲醇诱导 80 h 后 GGH 的表达量达到了 491 mg/L, 较 GS115/F₂ 提高了 49.7%, 通过荧光定量 PCR 发现 GGH 基因拷贝数在含有双质粒体系的 GS115/F₃ 中较出发菌株 GS115/F₂ 提高了 26.7%。Western blotting 杂交表明融合蛋白同时具有人血清白蛋白和人胰高血糖素样肽-1 的抗原性。

关键词: 融合蛋白 GGH, 双质粒, 毕赤酵母, 荧光定量 PCR, Western blotting

High-level expression of fusion protein GGH in *Pichia pastoris* GS115 by constructing a double plasmid co-expression system

Hui Wang¹, Wenfang Dou¹, Xiaomei Zhang¹, Hongyu Xu¹, and Zhenghong Xu^{1,2}

¹ Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In order to make a large-scale preparation of (GLP-1_{A2G})₂-HAS (GGH), the double-plasmid pPICZαB and pPIC9K co-expression system was introduced into *Pichia pastoris* GS115. Firstly, the GGH fusion gene was amplified by PCR to create the recombinant expression plasmid pPICZαB-ggh, which was transformed into *P. pastoris* GS115/F₂ that was integrated by another recombinant expression plasmid pPIC9K-ggh. The immunology method combined with high concentration

Received: September 17, 2010; **Accepted:** December 22, 2010

Supported by: National Key New Drug Creation of China (No. 2009ZX09102-221), National Natural Science Foundation of China (No. 31000016), Science and Technology Support Program of Jiangsu Province (No. BE2009629).

Corresponding author: Zhenghong Xu. Tel: +86-510-85918206; E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

国家重大新药创制专项 (No. 2009ZX09102-221), 国家自然科学基金 (No. 31000016), 江苏省科技支撑计划 (No. BE2009629) 资助。

antibiotic was used to screen recombinant strain *P. pastoris* GS115/F₃ capable of high-level expression of GGH protein. The GGH fusion protein expressed by GS115/F₃ increased 49.7% compared with the GS115/F₂ in the expression conditions of 3% methanol inducing 80 h at 30 °C. At the same time, the quantitative PCR results showed that GGH gene dose in GS115/F₃ increased 26.7% with respect to that of GS115/F₂. Furthermore, the Western blotting experiment indicated that the recombinant GGH possess the two antigenicities of GLP-1 and HSA.

Keywords: fusion protein GGH, double plasmid, *Pichia pastoris*, quantitative PCR, Western blotting

胰高血糖素样多肽 1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是由肠道 L 细胞合成和分泌的一个由 30 个氨基酸组成的具有促进胰岛素分泌功能的多肽, 体内外研究显示 GLP-1 能增强葡萄糖依赖性的胰岛素分泌, 减少食物的摄取, 减慢胃的排空, 以及抑制胰高血糖素的分泌、刺激胰 β 细胞增殖, 促进胰岛再生, 又能抑制胰 β 细胞的凋亡, 是现有糖尿病药物无可比拟的^[1-4]。但是, 由于 GLP-1 在体内易被二肽酰基肽酶 IV (DPPIV) 降解和肾脏清除导致半衰期很短, 限制了其临床应用^[5]。为克服该缺点, 本实验室前期通过重叠 PCR 将两个 GLP-1 突变串联体分子与一个人血清白蛋白 HSA 分子融合 (*ggh*), 并实现了其在巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中的表达^[6]。

pPIC9K 和 pPICZαB 同属于巴斯德毕赤酵母分泌型表达载体, 可以通过同源重组的方式分别在毕赤酵母基因组 HIS4 位点与 AOX1 位点进行整合, 实现在同一宿主菌中的共表达, 从而提高目标蛋白在毕赤酵母中的基因剂量, 在一定范围内可以提高目标蛋白的表达量。Williams 等将 pPIC9K 和 pPICZαA 质粒同时整合到毕赤酵母 GS115 中, 建立双质粒共表达体系, 从而提高了明胶在毕赤酵母 GS115 中的表达量, 由原来的 54.4 mg/L 提高至 80.2 mg/L^[7]。

本实验室前期将 GGH 基因克隆到毕赤酵母分泌型表达质粒 pPIC9K, 构建了重组菌 GS115/F₂, 摇瓶培养 80 h 其目的蛋白表达量达到 328 mg/L^[8]。本研究通过构建 pPIC9K 和 pPICZαB 双质粒共表达体系, 进一步提高了融合蛋白 GGH 在毕赤酵母中的表达量, 为该药物分子的规模化制备奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌体和载体

大肠杆菌 *E. coli* JM109 由本实验室保存; 质粒 pPIC9K-*ggh*、pMD19-T-*gapdh* 和毕赤酵母表达菌株 GS115/F₂ 由本实验室构建并保存; pPICZαB 购自 Invitrogen 公司; pMD19-T Simple Vector 为 TaKaRa 公司产品。

1.1.2 主要试剂

各种限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 和蛋白 Marker 等购自 TaKaRa 公司, 质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒均购自上海捷瑞生物有限公司, 酵母氨基、Zeocin、HRP-DAB 底物显色液等均为上海生工产品, GLP-1 和 HSA 单克隆抗体等购自优宁维公司, 引物由上海捷瑞生物有限公司合成, 其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母表达载体 pPICZαB-*ggh* 的构建

设计合成分别带有 *Kpn* I 和 *Not* I 两种酶切位点的 GGH 引物, 引物 P1、P2 序列见表 1 (下划线所示为酶切位点)。以 pPIC9K-*ggh* 为模板, P1、P2 为引物, 扩增出 5'端和 3'端分别带有 *Kpn* I 和 *Not* I 两种酶切位点的 *ggh* 基因, 然后和 pMD19-T Simple Vector 相连转化至 *E. coli* JM109, 用含有 100 μg/mL Amp 的 LB 平板筛选阳性克隆验证, 并抽提质粒用 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切后连接至毕赤酵母表达载体 pPICZαB 中, 重组表达载体 pPICZαB-*ggh* 转化至 *E. coli* JM109, 用含有 25 μg/mL

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
P1	GTGCGGT <u>ACCG</u> GAGAAAAGACACGGT GAAGTACTT	1 937
P2	GATTGCGGCCGCTTATAAGCCTAAGG CAGCTT	
P3	CGAGGAGCAGGACTGACA	159
P4	TGGACCGCGCTGATGAAC	
P5	GGA CTGGAGAGGTGGTAGAAC	213
P6	AGCAGCCTTGATAACAGACTTG	
P7	AATGCGCTATTAGTTCGTAC	201
P8	TGTCACTTACTGGCGTTTTTC	

The underline showed site of enzyme digestion.

Zeocin 的 LB 平板筛选阳性克隆, 并进行 PCR 和双酶切鉴定。

1.2.2 重组表达质粒的线性化和电转化酵母细胞

取 5~10 μg 鉴定和测序正确的 pPICZ α B-ggh 重组表达质粒, 用 *Pme* I 单酶切使之线性化, 琼脂糖凝胶电泳回收 5.6 kb 片段, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。参考相关文献制备毕赤酵母 GS115/F₂ 感受态细胞^[9], 分别取 80 μL 和 5 μL 的线性化的重组表达质粒 pPICZ α B-ggh 混合, 用 Bio-Rad 电转仪于参数 1.5 kV、25 μF 、200 Ω 、时间常数 5 ms 进行电转化, 立即加入 1 mL 1 mol/L 冰浴山梨醇, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 2 h。取 200 μL 涂布于含有 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的 MD 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d 至出现转化子。

1.2.3 免疫斑点法筛选高表达菌株

将 0.45 μm 的醋酸纤维素薄膜平置于长有菌落的含有 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的 MD 平板上, 用涂布棒轻压使醋酸纤维素薄膜完全湿润并赶尽气泡, 使所有菌落转移到醋酸纤维素薄膜上, 并在 BMMY 平板上置同样大小的 0.22 μm 的硝酸纤维素薄膜, 赶出气泡, 将醋酸纤维素薄膜菌落面向上置于硝酸纤维素薄膜上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 80 h, 将上层醋酸纤维素薄膜转移至 MD 平板上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将下层硝酸纤维素薄膜取出, 5% 脱脂奶封闭 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 用 TBST (含有 0.05% 吐温-20 的 TBS) 洗膜 5 min, 重

复 3 次, 用兔抗人血清白蛋白多抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 用 TBST 洗膜 5 min, 重复 3 次, 再用二抗结合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 用 TBST 洗膜 5 min, 重复 3 次, 加入新鲜配置的 DAB 显色液, 染色 5 min 后用 TBST 清洗, 挑选出染色颜色较深的菌落进行摇瓶培养和诱导。

1.2.4 诱导表达及表达产物分析

挑取膜上颜色由深到浅的单菌落接种于 10 mL 的 YPD 培养基, 培养 24 h, 5% 接种量转接到装有 60 mL 含 3% 甘油的 BMGY 培养基的 500 mL 三角瓶中, 初始 OD_{600} 为 1, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 振荡培养过夜, 24 h 后离心收集菌体, 用 20 mL 含有 3% 甲醇的 BMMY 培养基重悬菌体后诱导表达, 每隔 24 小时补加甲醇至终浓度为 3%, 甲醇诱导 80 h 后 OD_{600} 约为 200, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 用微量白蛋白试剂盒测发酵上清液中的目的蛋白含量^[6], 发酵液离心后取上清等体积进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 重组毕赤酵母基因组的提取和 PCR 鉴定阳性克隆

提取高产菌 GS115/F₃ 和出发菌株 GS115/F₂ 的基因组 DNA, 加入 RNase A 消除 RNA 的干扰。以 pPICZ α B 质粒上的抗性基因, 即 Zeocin 基因为扩增目的片段设计引物 P3、P4, 序列见表 1, 对提取的酵母基因组 DNA 进行 PCR 扩增验证。

1.2.6 Q-PCR 鉴定高产菌的目的基因拷贝数

以三磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*gapdh*) 为内源参照基因。根据引物设计软件 Primer 5 设计基因 *gapdh* (P5、P6)、*ggh* (P7、P8) 片段引物 (表 1), 进行 PCR 扩增, 回收基因片段并与 pMD19-T 质粒相连, 建立单拷贝的重组质粒, 即 pMD19-T-*gapdh* 质粒和 pMD19-T-*ggh* 质粒, 转化到大肠杆菌 JM109 中, 验证并提取重组质粒, 通过梯度稀释, 从而建立了 *gapdh* 基因和 *ggh* 基因的循环数 (C_i 值) 与起始模板数的相关标准曲线。Q-PCR 的条件是: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$

延伸 30 s, 读板, 40 次循环; 72 °C 终延伸 5 min; 65 °C 到 94 °C 绘制熔解度曲线, 每 0.5 °C 读板 1 次, 1 次 1 s; 16 °C 保温至结束。Q-PCR 的体系是: 模板 0.5 μ L, 引物各 0.2 μ L, SYBR 12.5 μ L, ddH₂O 11.6 μ L。

以 *gapdh* 为参照基因, 检测待测样品中的 *ggh* 基因表达水平的差异, 以原始菌株 GS115/F₂ 为校准样本, 以高产菌株 GS115/F₃ 为待测样本, 比较待测样本相对校准样本的表达差异。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对其分析。

1.2.7 Western blotting 鉴定融合蛋白的表达

将原始出发菌株 GS115/F₂ 和高产菌株 GS115/F₃ 的发酵液离心取上清, 200 V 电压下进行 SDS-PAGE 电泳, 100 V 电压下转膜 60 min 至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, TBST 洗膜 3 次, 分别加入鼠抗人血清白蛋白单抗和鼠抗人 GLP-1 单抗结合 (抗体均以 1 : 1 000 稀释), 37 °C 孵育 2 h, 去除抗体, TBST 洗膜 3 次。再加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠的二抗 (1 : 1 000 稀释), 37 °C 下孵育 2 h, 去除二抗, TBST 洗膜 3 次之后, 加 DAB 显色。

2 结果

2.1 表达载体 pPICZaB-*ggh* 的构建及鉴定

构建了含有 *ggh* 基因的毕赤酵母重组表达质粒 pPICZaB-*ggh*, 构建流程如图 1 所示, 然后对其进行 PCR 及 *Kpn* I / *Not* I 双酶切鉴定 (图略)。重组的 pPICZaB-*ggh* 经 PCR 及双酶切都可以得到大小为 2 000 bp 左右的 DNA 片段, 测序结果显示 DNA 序列无突变, 表明重组表达载体 pPICZaB-*ggh* 构建成功。

2.2 免疫学方法筛选高产菌株

将线性化的重组质粒 pPICZaB-*ggh* 电转化毕赤酵母 GS115/F₂ 感受态细胞, 30 °C 培养 2~3 d 后在每块平板的上层醋酸纤维素膜上长出约 100~1 000 个左右转化子。将上层醋酸纤维素薄膜转移至 MD 平板上, 4 °C 保存。取下层的硝酸纤维素薄膜进行免疫显色, 鉴定转化子的表达水平的高低, 结果见图 2。

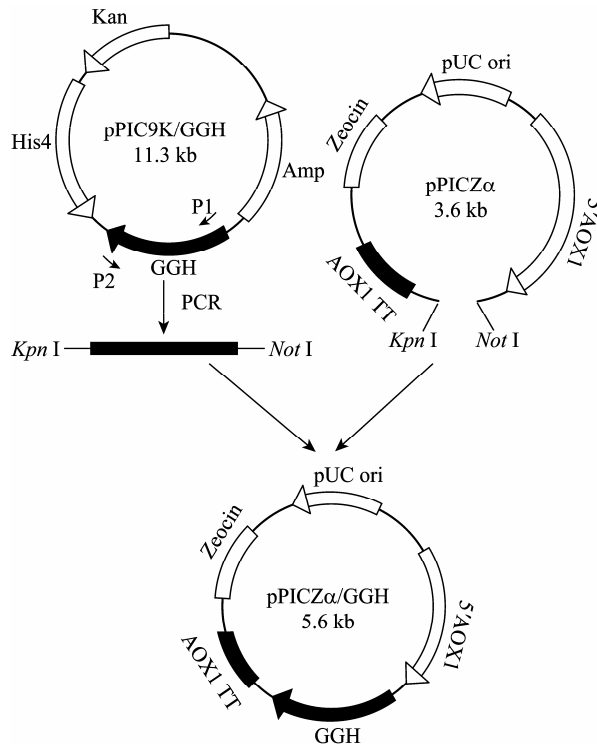


图 1 重组质粒 pPICZaB-*ggh* 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pPICZaB-*ggh*.

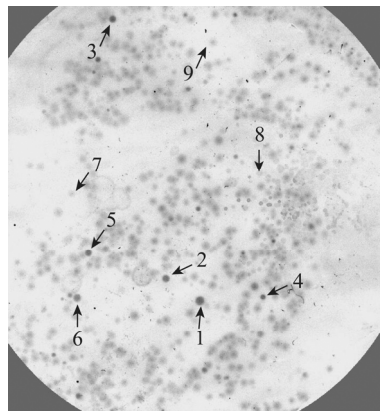


图 2 免疫学方法筛选结果

Fig. 2 Transformants screened with immunology method. Several intensely stained colonies are indicated with arrows.

每个染色点对应于上层醋酸纤维素薄膜上的相应菌落, 从图 2 可以看出不同菌落的显色强度有明显差异。挑取图 2 上箭头所指颜色由深到浅的顺序对应的单菌落进行摇瓶培养, 取发酵上清进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 3。从图 3 可以看出免疫显色深的

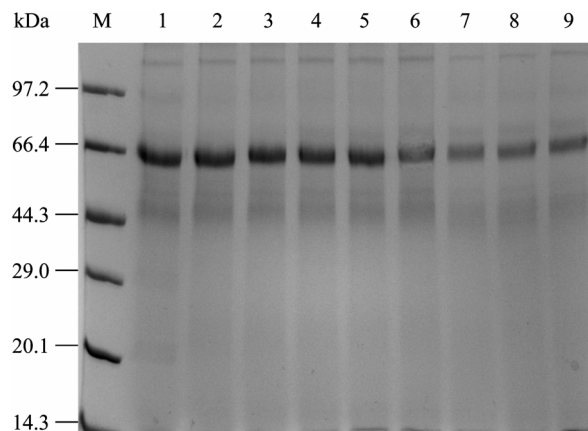


图3 SDS-PAGE 分析不同菌株诱导 72 h 表达的 GGH
Fig. 3 SDS-PAGE annlysis of GGH expressed in *Pichia pastoris*. M: protein marker; 1-9: SDS-PAGE analysis of shake flask supernatant of eight transformants screened with two-layer membrane method.

斑点对应的菌落的表达量明显高于免疫显色浅的斑点对应的菌落, 并利用此方法获得一株融合蛋白 GGH 高表达菌落 GS115/F₃。

考察了 GS115/F₃ 和 GS115/F₂ 在摇瓶中的发酵过程, 结果如图 4 所示, 生长 24 h 后用甲醇诱导, 两菌株在生长方面并没有明显的差异, 但是其外源蛋白的表达量却有显著的差异, OD_{600} 为 200 时 GS115/F₃ 和 GS115/F₂ 的表达量分别为 328 mg/L 和 491 mg/L, 单位 OD 的菌体融合蛋白的表达量提高了 49.7%。

2.3 Q-PCR 确定高产菌的基因拷贝数

为考察融合蛋白表达量的增加是否由基因拷贝数的增加引起的, 提取 pMD19-T-*pagdh* 质粒和 pMD19-T-*ggh* 质粒, 分别稀释 8 个梯度, 同时进行荧光定量 PCR, 反应结束后, 程序自动生成标准曲线和熔解度曲线, *gapdh* 标准曲线为: $y = -0.2925x + 2.14$, $r^2 = 0.999$, *ggh* 标准曲线为 $y = -0.3506x + 3.22$, $r^2 = 0.996$, 样品曲线落在标准曲线范围之内, 反应的熔解峰单一, 荧光定量 PCR 的引物特异性较高。应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析得到的高产菌 GS115/F₃ 和出发菌株 GS115/F₂ 相比, 基因剂量提高了 26.7%, 尿微量白蛋白试剂盒测试融合蛋白产量提高了 49.7%。

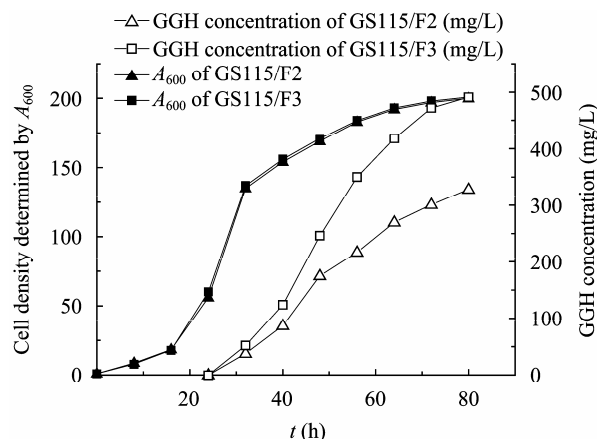


图4 GS115/F₂ 和 GS115/F₃ 的生长曲线和融合蛋白表达曲线

Fig. 4 Cell growth curve and fusion expression curve of GS115/F₂ and GS115/F₃.

2.4 Western blotting 鉴定融合蛋白的表达

为鉴定经双质粒体系改造的高表达菌株 GS115/F₃ 表达的融合蛋白 GGH 与出发菌株 GS115/F₂ 是否一致, 用人白蛋白一抗和人胰高血糖素样肽-1 一抗对其进行 Western blotting 鉴定, 如图 5 所示, 表达宿主经双质粒体系改造前后蛋白质的分子量均是 7.3 kDa, 表明宿主菌株的改造没有影响融合蛋白的特性, 融合蛋白 GGH 同时具有人白蛋白和人胰高血糖素样肽-1 的免疫原性。在 66.4 kDa 和 44.3 kDa 中间出现的一个阳性条带, 经测序是 GGH 的降解条带。

3 讨论

为了从大量重组菌中筛选得到高产菌, 本实验将免疫斑点法^[10]结合高浓度抗生素平板对其进行筛选, 抗生素平板上生长的菌落影印在醋酸纤维素薄膜上, 诱导分泌的蛋白透过醋酸纤维素膜结合在硝酸纤维素膜上。免疫斑点法选用免疫方法对酵母的分泌蛋白进行检测, 筛选高表达的转化子, 且每次可同时筛选几百个转化子, 免疫显色后各菌落的外泌蛋白量之间的对比明显、直观, 可以直接挑选染色较深的单菌落进行液体培养基诱导表达。这个方法简化了筛选高产菌株的工作量, 并且可靠性更高。

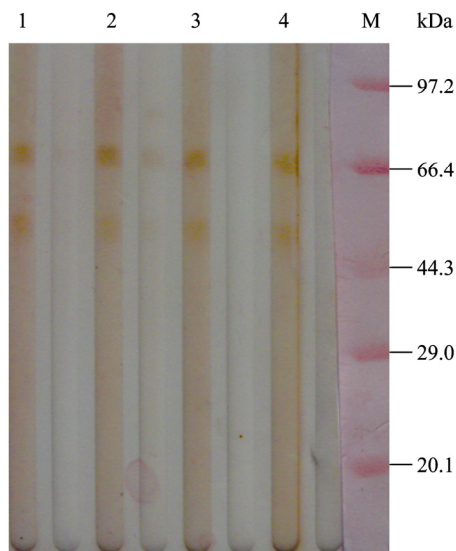


图5 (GLP-1_{A2G})₂-HAS 融合蛋白的 Western blotting 鉴定
 Fig. 5 Western blotting analysis of (GLP-1_{A2G})₂-HSA. M: protein marker; 1: fusion protein of GS115/F₃ hybridized with GLP-1 monoclonal antibody; 2: fusion protein of GS115/F₂ hybridized with GLP-1 monoclonal antibody; 3: fusion protein of GS115/F₃ hybridized with HSA monoclonal antibody; 4: fusion protein of GS115/F₂ hybridized with HSA monoclonal antibody.

因为高浓度的抗生素抗性在很多情况并不能真实反映表达量,某些拷贝在整合时目的基因可能丢失,仅剩下抗生素抗性,出现假阳性。结果表明,所筛选的高表达菌落与实际液体培养基诱导表达情况相符。免疫斑点法筛选的特点是必须应用已知蛋白的相应抗体进行筛选,因此,对于尚无抗体的新蛋白或者比较昂贵的抗体应用较难。

在任何表达系统中外源蛋白的表达水平受多种因素的影响。毕赤酵母中宿主表型、基因剂量、外源基因特性、外源蛋白的理化性质和发酵条件的优化控制等都是影响蛋白质表达水平的重要因素。有报道在毕赤酵母中增加目的基因的拷贝数可以提高外源蛋白的表达量^[11],人血清白蛋白的分泌量和基因剂量呈正相关在菌株克鲁维氏酵母 *Kluyveromyces* 中早已被验证^[12]。一般提高基因剂量的方法大部分都是通过体外构建多拷贝的目的基因串联以同源重组的方式整合到酵母基因组中,然后通过高浓度的抗生素来筛选高表达的转化子; Marx 等将质粒整合

到毕赤酵母核糖体 DNA 位点上,利用结合核糖体 DNA 有效转录的特点,将血清白蛋白 HSA 基因在毕赤酵母中的转录效率提高了 40%^[13]。本研究证明了两次电转携带有同种目的基因的不同分泌型表达质粒,通过高浓度的抗生素结合免疫法筛选,不仅可以提高目的基因的拷贝数,并且在一定范围内提高了外源蛋白的表达量。这种双质粒共表达体系不仅可以提高单一蛋白在宿主中的表达量,还可以实现两种不同的蛋白在同一宿主中的共表达。

本实验通过建立双质粒共表达体系提高融合蛋白 GGH 在毕赤酵母中的表达,然后通过高浓度的抗生素抗性结合免疫斑点法进行高通量的筛选,获得的高产菌 GS115/F₃ 融合蛋白的表达量将近提高了一半,和出发菌株 GS115/F₂ 相比表达的蛋白质结构一致。影响外源蛋白在毕赤酵母中的表达因素还很多,它不仅受外源基因特性的影响,也受到宿主菌、Mut 表型、酶切和糖基化及培养条件的影响,所以应从影响毕赤酵母蛋白表达的多种因素着手提高融合蛋白 GGH 的表达量,实现规模化制备。

REFERENCES

- [1] Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, et al. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 1987, 2(8571): 1300-1304.
- [2] Vahl TP, Paty BW, Fuller BD, et al. Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(4): 1772-1779.
- [3] Turton MD, O'Shea D, Gunn I, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 1996, 379(4): 69-72.
- [4] Ahrén B, Winzell MS, Wierup N, et al. Hughes, DPP-4 inhibition improves glucose tolerance and increases insulin and GLP-1 responses to gastric glucose in association with normalized islet topography in mice with beta-cell-specific overexpression of human islet amyloid polypeptide. *Regul Pept*, 2007, 143(1/3): 97-103.
- [5] Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of

glucagon-like peptide-1 by human plasma *in vitro* yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite *in vivo*. *Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80(3): 952-957.

[6] Dou WF, Lei JY, Zhang LF, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagon-like peptide-1 mutants in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2008, 61(1): 45-49.

[7] Williams KE, Jiang J, Ju J, et al. Novel strategies for increased copy number and expression of recombinant human gelatin in *Pichia pastoris* with two antibiotic markers. *Enzyme Microbial Technol*, 2008, 43(1): 31-34.

[8] Yang T. High-level expression and purification of recombinant protein GGH in *Pichia pastoris*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.
杨涛. 重组蛋白 GGH 在毕赤酵母中的高效表达及纯化 [D]. 无锡: 江南大学, 2009.

[9] Lin-cereghino J, Wong WW, Xiong S, et al. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques*, 2005, 38(1): 44-48.

[10] Mcgrew JT, leiske D, Dell B, et al. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: used of a rapid method to detect high-level expressing teansformants. *Gene*, 1997, 187(2): 193-200.

[11] Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, et al. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J Boitechnol*, 2001, 88(1): 21-35.

[12] Cox H, Mead D, Sudbery P, et al. Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the PMA1 promoter. *Yeast*, 2000, 16(13): 1191-1203.

[13] Marx H, Mecklenbräuker A, Gasser B, et al. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(8): 1260-1270.



本 期 广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	生物谷网站	内 页
宝生物工程 (大连) 有限公司	封 二	艾本德 (上海) 国际贸易有限公司	内 页
北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司	扉 一	镇江东方生物工程公司	内 页
安琪酵母股份有限公司	内 页		