

农业生物技术

金针菇免疫调节蛋白基因 *fip-fve* 在毕赤酵母 GS115 中诱导型和组成型表达

林景卫^{1,2}, 贾佳², 钟鸣², 陈丽静², 李浩戈², 郭志富², 齐明芳¹, 刘立侠³, 李天来¹

1 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866

2 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866

3 东北师范大学生命科学学院, 吉林 长春 130024

林景卫, 贾佳, 钟鸣, 等. 金针菇免疫调节蛋白基因 *fip-fve* 在毕赤酵母 GS115 中诱导型和组成型表达. 生物工程学报, 2014, 30(3): 464-471.

Lin JW, Jia J, Zhong M, et al. Inducible and constitutive expression of *fip-fve* from *Flammulina velutipes* in *Pichia pastoris* GS115. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 464-471.

摘 要: 为获得稳定来源并且具有生物学活性的重组金针菇免疫调节蛋白 (Fip-fve), 将 *fip-fve* 基因转至毕赤酵母 GS115 中进行诱导型和组成型表达。用 PCR 方法从金针菇子实体基因组 DNA 中扩增 *fip-fve* 基因, 连接至 pPIC9 构建诱导型表达载体 pPIC9-FIP-fve, 从毕赤酵母基因组 DNA 中扩增三磷酸甘油醛脱氢酶启动子 (*pgap*), 替换 pPIC9-FIP-fve 上乙醇氧化酶启动子 (*paox1*) 构建组成型表达载体 pPIC9-PGAP-FIP-fve。将线性化的两种表达载体用 PEG 法转化毕赤酵母 GS115, 经组氨酸缺失培养基筛选和酵母菌落 PCR 鉴定后进行表达。结果表明, 重组 Fip-fve 在以甲醇 (1%, V/V) 为碳源进行诱导型表达 4 d 达到最高, 粗蛋白表达量为 158.2 mg/L, 在以葡萄糖 (10%) 和甘油 (1%, V/V) 为碳源进行组成型分别在表达第 4 天和第 5 天达到最高, 粗蛋白分别为 46.3 mg/L 和 29.5 mg/L。SDS-PAGE 及 Western blotting 证明重组 Fip-fve 已正确表达, 血细胞凝集活性检测初步证明重组 Fip-fve 具有良好生物学活性。

关键词: 金针菇, 免疫调节蛋白, 毕赤酵母, 组成型表达

Received: May 19, 2013; **Accepted:** August 20, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31000928).

Corresponding author: Tianlai Li. Tel: +86-24-88487004; E-mail: tianlaili@126.com

国家自然科学基金 (No. 31000928) 资助。

网络出版时间: 2013-9-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130913.0912.002.html>

Inducible and constitutive expression of *fip-fve* from *Flammulina velutipes* in *Pichia pastoris* GS115

Jingwei Lin^{1,2}, Jia Jia², Ming Zhong², Lijing Chen², Haoge Li², Zhifu Guo², Mingfang Qi¹, Lixia Liu³, and Tianlai Li¹

1 College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China

2 College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China

3 School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, Jilin, China

Abstract: We transformed the *fip-fve* gene into *Pichia pastoris* GS115 for inducible and constitutive expression to obtain feasible bioactive recombinant Fip-fve. The *fip-fve* gene was cloned from *Flammulina velutipes* fruiting body by PCR and ligated to pPIC9 to construct inducible expression vector pPIC9-FIP-fve, and promoter *pgap* was used to replace the *paox1* to construct constitutive expression vector pPIC9-PGAP-FIP-fve. These two vectors were used to transform *P. pastoris* by PEG method. The *fip-fve* was expressed after histamine-absence screening and yeast colony PCR. The inducible expression level reached 158.2 mg/L at the fourth day and the constitutive expression level was 46.3 mg/L and 29.5 mg/L using glucose and glycerol, respectively. The SDS-PAGE and Western blotting both proved the correctness of rFip-fve, and the hemagglutination test indicates the rFip-fve's bioactivity.

Keywords: *Flammulina velutipes*, immunomodulation, *Pichia pastoris*, constitutive expression

金针菇免疫调节蛋白 (Fip-fve) 是上个世纪末从金针菇子实体中提纯的一种小分子功能蛋白质, 隶属于真菌免疫调节蛋白 (Fip) 家族^[1]。迄今为止, 多种真菌免疫调节蛋白已被发现, 包括灵芝、松杉灵芝、草菇、黑芝和紫芝等^[2-5], 该家族蛋白由 110 个左右氨基酸组成, 分子量为 12–13 kDa, 具有免疫调节和抗肿瘤活性。Fip-fve 由 114 个氨基酸组成, 分子量为 12.7 kDa, 与第一个已知的真菌免疫调节蛋白——LZ-8 具有 63% 的同源性^[2], 天然的 Fip-fve 为类似哑铃型的同源二聚体^[6-7], 在酸性和高低温条件下均能保持良好的生物学活性^[8]。Fip-fve 具有血细胞凝集活性, 可以在体外凝集 4 种类型的人血细胞。Fip-fve 还可以促进人外周血淋巴细胞增殖, 并且明显增加多种细胞因子分泌包括白介素 2 和干扰素 γ ^[9]。Fip-fve 具有良好的抗过敏活性, 有研究表明其可以完全抑制由牛血清蛋白 (BSA) 引起

的小鼠系统过敏反应^[1], 能够抑制嗜酸性粒细胞引起的过敏性鼻炎^[10], Fip-fve 还可以抑制卵清蛋白 (OVA) 引起的食物过敏反应^[11]和用来治疗羽刺皮癣螨 2 型抗原 (Dp-2) 引起的呼吸道炎症^[12]。此外, Fip-fve 还具有抗肿瘤活性^[13], Chang 等发现给患有肝癌的小鼠口服喂食 Fip-fve 可以延长患病小鼠的存活期^[14], 干扰素 γ 可能是起抗肿瘤活性的关键效应分子^[15-16]。

从天然金针菇子实体中提纯 Fip-fve 过程繁琐, 费时费力, 而且产率较低^[5], 因此越来越多的研究者尝试利用基因工程的手段在不同的表达宿主中重组表达 Fip-fve, 以期得到高效表达的重组蛋白。1997 年, Lin 等首先将 *fip-fve* 基因转化至大肠杆菌 TG1 中, 获得了谷胱甘肽-S 转移酶融合的重组真菌免疫调节蛋白, 表达水平分别 5 mg/L, 但是其生物学活性仅为天然 Fip-fve 的一半^[17]。之后, 他们又将该蛋白在昆虫表达系统—

—Sf21 细胞 (草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*) 中进行表达,重组 Fip-fve 具有类似天然蛋白的生物学活性,但是产量依然较低,为 6.25 mg/L (3.1 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ cells)^[18]。毕赤酵母表达系统是近些年来兴起的一种外源蛋白表达系统,由于其兼有原核和真核表达系统的优点,在基因工程领域中得到日益广泛的应用,考虑金针菇免疫调节蛋白的特点和其他表达系统的不足,本研究以毕赤酵母为宿主,进行 *fip-fve* 基因诱导型和组成型两种重组表达,探究其在两种模式下的重组表达效率并检测重组 Fip-fve 的生物学活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10 感受态细胞和 pGM-T 载体购自北京天根生化有限公司;毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和表达载体 pPIC9 为本实验室保存;金针菇 *Flammulina velutipes* 子实体购自当地市场。

1.1.2 酶和试剂

限制性内切酶, DNA 和蛋白质标准分子量为大连 TaKaRa 产品; *Taq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为北京天根生化有限公司产品; Sephadex G-100 为美国 GE 产品;人血红细胞由沈阳农业大学校医院志愿者提供;小鼠抗

Fip-fve 的多克隆抗体由天津天健生物制药有限公司制备;预染标准分子量蛋白质、PV 膜、羊抗小鼠 HRP-抗体和 ECL 荧光试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品;酵母转化试剂盒为美国 ZYMO 产品。

1.1.3 培养基

LB 培养基、YPD、BMM 和 MD 培养基参考毕赤酵母表达手册^[19]。毕赤酵母诱导型培养基改进为: YNB, 6.7 g/L, 酵母粉, 0.1 g/L, 蛋白胨, 0.2 g/L。组成型培养基改进为: YNB, 6.7 g/L, 酵母粉, 0.2 g/L, 蛋白胨, 0.4 g/L, 葡萄糖/甘油, 10%。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆

按照程度等的方法提取金针菇及酵母的基因组 DNA^[20]。根据已知的金针菇免疫调节蛋白基因序列和酵母三磷酸甘油醛脱氢酶启动子序列分别设计 *fip-fve* 及 *pgap* 的扩增引物 (表 1)。上述引物均由上海生工生物公司合成。*fip-fve* 的 PCR 程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min。*pgap* 的 PCR 程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 分别回收 330 bp (*fip-fve*) 和 500 bp (*pgap*) 左右的片段, 与 pGM-T 载体 (Amp⁺) 连接, 转化大肠

表 1 本研究所用相关引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Fip-fve-forward	GCAGAATTCATGTCCGCCACGTCGCTCACCTTC	32
Fip-fve-reverse	AGTGCGGCCGCTTACTTCTTCCACTCAGCGATGATG	36
PGAP-forward	AGGCGGAGCTCGATCCTTTTTTGTAGAAATGTC	33
PGAP-reverse	AGCGCCGGATCCTGTGTTTTGATAGTTGTTCAATTG	36

杆菌 TOP10 经过蓝白斑筛选和菌落 PCR 检测, 挑取阳性克隆送至上海生工生物公司测序。

1.2.2 载体构建

提取含有 *fip-fve* 的 pGM-T 质粒 DNA, 与毕赤酵母表达载体 pPIC9 (Amp⁺) 同时进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 琼脂糖电泳, 回收 *fip-fve* 和 pPIC9 片段, 连接, 转化, 经 Amp 抗性筛选和菌落 PCR 检测得到阳性克隆, 获得诱导型表达载体 pPIC9-FIP-fve。提取含有 PGAP 的 pGM-T 质粒 DNA, 与诱导型表达载体 pPIC9-FIP-fve (Amp⁺) 同时进行 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切, 琼脂糖电泳, 回收 pgap 和 pPIC9-FIP-fve 片段, 连接, 转化, 经 Amp 抗性筛选和菌落 PCR 检测得到阳性克隆, 获得组成型表达载体 pPIC9-PGAP-FIP-fve。

1.2.3 毕赤酵母转化与筛选

大量提取质粒 pPIC9-FIP-fve 和 pPIC9-PGAP-FIP-fve (5 μg), 用 *Sac* I 酶切, 回收目的片段。酵母感受态制备和转化参考酵母转化试剂盒进行操作, 将转化后的酵母菌液涂布于不含氨基酸的 MD 固体平板上, 30 °C 培养 2–3 d, 直至长出酵母转化子。将不同酵母转化子重新接种至新 MD 平板, 编号, 以 *fip-fve* 引物进行酵母菌落 PCR 检测。

1.2.4 重组 Fip-fve 表达与检测

挑取 PCR 阳性的酵母菌落进行重组表达, 转 pPIC9-FIP-fve 的进行诱导型重组表达, 先将酵母接种 YPD 液体培养 (200 mL/500 mL 三角摇瓶, 共 10 瓶), 30 °C、200 r/min 培养 16–18 h, 离心收集菌体, 再转入甲醇诱导液体培养基 BMM (200 mL/500 mL 三角摇瓶, 共 2 瓶) 中, 继续培养 5 d, 每隔 1 天补加 1% 甲醇, 同时取培养液离心收集上清。转 pPIC9-PGAP-FIP-fve 的酵母进行组成型表达, 将 PCR 阳性的酵母菌分别

接入含有葡萄糖和甘油的组成型液体培养基 (200 mL/500 mL 三角摇瓶, 各 1 瓶), 30 °C、200 r/min 连续培养 6 d, 每隔 1 天取培养液离心收集上清。取 10 μL 上述培养液及野生型 GS115 培养液 (负对照) 上清与等体积二倍点样缓冲液混匀, 沸水煮 3 min, 标准分子量蛋白质取 5 μL, 然后进行 SDS-PAGE 检测, 其中浓缩胶为 5%, 分离胶为 12%。取不同培养天数的 10 μL 诱导型重组表达的培养液上清进行 Western blotting 检测, 其中一抗按 1:20 000 稀释, 二抗按 1:2 500 稀释, ECL 发光试剂盒中 A、B 液各取 1 mL 混匀, 均有涂布于所转 PV 膜上, 于暗室中进行 X-光片曝光 5–20 s。

1.2.5 重组 Fip-fve 血细胞凝集活性检测

取酵母发酵液, 6 000 r/min 离心 5 min 收集上清, 加硫酸铵至 95% 饱和, 12 000 r/min 离心 20 min, 取蛋白质沉淀, 重溶于 PBS (pH 7.2, 10 mmol/L), 透析, 超滤, 上样于 Sephadex G-100 (1.5 cm×60 cm) 进行柱层析, 得到初步纯化的重组 Fip-fve。取健康人血细胞 2 mL, 2 000 r/min 室温离心 5 min。收集血红细胞, 用 10 mmol/L PBS (pH 7.2) 反复洗涤并离心 3 次, 最终调整血细胞悬浮液为 1.5% (V/V)。血细胞凝集反应液由 25 μL 血细胞悬浮液, 25 μL 重组 Fip-fve (终浓度 2 μg/mL) 蛋白液和 50 μL 明胶 (0.2%) 混合, 加至 96 孔血凝板, 同时以植物凝集素 (PHA, 2 μg/mL) 和天然纯化的 Fip-fve 分别作为正对照, 以 PBS 作负对照, 置于 37 °C 培养箱培养。于 1.5 h 和 24 h 后肉眼和显微镜下观察血细胞凝集结果^[21]。

2 结果

2.1 表达载体的构建

从金针菇子实体基因组 DNA 中扩增 *fip-fve*

基因, 连接至 pGM-T 载体, 经测序验证正确后 (结果未显示), 再连接至 pPIC9 上构建出诱导型毕赤酵母表达载体 pPIC9-FIP-fve, 示意图见图 1, 并进行 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切电泳检测 (图 2)。然后以 *pgap* 启动子替换原载体上的 *paox1* 构建组成型毕赤酵母表达载体 pPIC9-PGAP-FIP-fve。

2.2 重组酵母转化子的获得与鉴定

将 *Sac* I 酶切后的线性表达载体 pPIC9-FIP-fve 和 pPIC9-PGAP-FIP-fve 转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 在不含氨基酸的 MD 培养基上进行筛选, 获得的重组酵母转化子以 *fip-fve* 引物进行菌落 PCR 检测 (图 3)。

2.3 重组 Fip-fve 的表达与检测

按着毕赤酵母表达手册方法^[14], 分别进行 *fip-fve* 的诱导型和组成型表达, 培养基上清用于 SDS-PAGE 检测 (图 4、5), 与负对照相比, 在

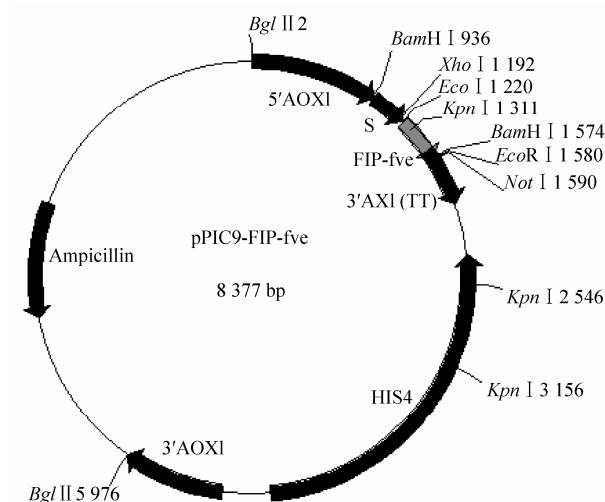


图 1 诱导型毕赤酵母表达载体 pPIC9-FIP-fve 的示意图

Fig. 1 Plasmid map of the inducible recombinant vector pPIC9-FIP-fve.

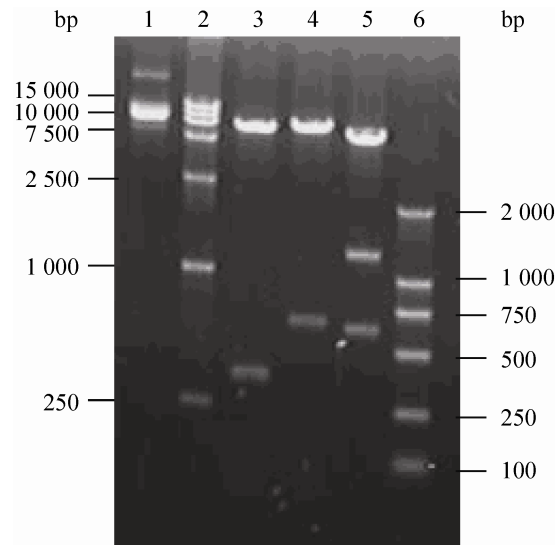


图 2 诱导型毕赤酵母重组表达载体 pPIC9-FIP-fve 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the inducible recombinant vector pPIC9-FIP-fve by enzyme digestion. 1: recombinant vector pPIC9-FIP-fve; 2: the DNA marker DL15 000 (bp); 3: pPIC9-FIP-fve digested with *EcoR* I; 4: pPIC9-FIP-fve digested with *Bam*H I; 5: pPIC9-FIP-fve digested with *Kpn* I; 6: DNA marker DL2 000 (bp).

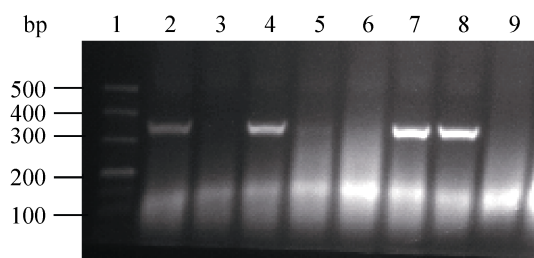


图 3 菌落 PCR 电泳检测重组毕赤酵母转化子

Fig. 3 Colony PCR and agarose electrophoresis of the recombinant *P. pastoris* transformants. 1: the DNA marker DL500 (bp); 2-9: different recombinant *P. pastoris* transformants.

14 kDa 和 17 kDa 处明显有蛋白质条带。重组 Fip-fve 的表达量用凝胶扫描和分析系统 (JYO4S-3C) 进行光密度吸收分析和目的重组

Fip-fve 含量的换算^[22], 在以甲醇为碳源的诱导型表达中第 4 天表达量最高, 为 158.2 mg/L, 在以葡萄糖和甘油为碳源进行组成型表达分别是在第 4 天和第 5 天达到最高, 分别为 46.3 mg/L 和 29.5 mg/L (结果未显示)。同时, 以诱导型的重组 Fip-fve 进行 Western blotting 检测, 结果如图 6 所示。

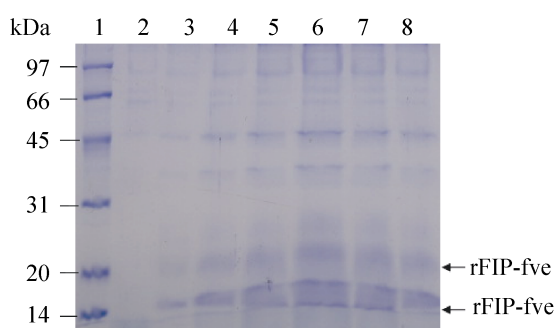


图 4 以葡萄糖为碳源的组成型重组 Fip-fve 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the constitutive rFip-fve using glucose. 1: the protein marker (kDa); 2: the sample of the wild-type *P. pastoris* GS115 as the negative control; 3-8: the samples of the constitutive culture at different day (1-6 d).

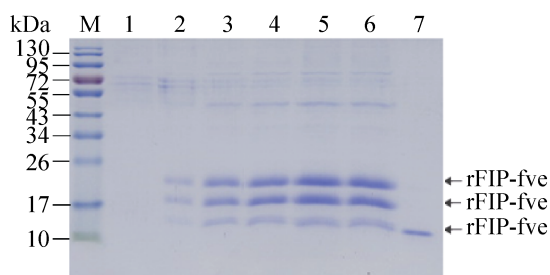


图 5 以甲醇为碳源的诱导型重组 Fip-fve 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the inducible rFip-fve using methanol. M: the protein marker (kDa); 1: the sample of the wild-type *P. pastoris* GS115 as the negative control; 2-6: the samples of the inducible culture at different day (1-5 d); 7: the native Fip-fve as the positive control.

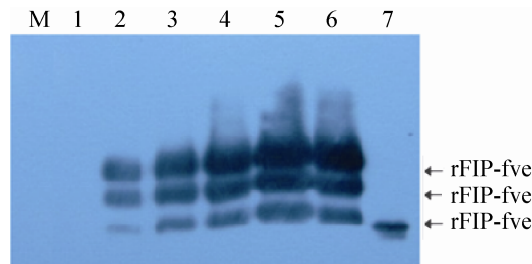


图 6 以甲醇为碳源的诱导型重组 Fip-fve 的 Western blotting 检测

Fig. 6 Western blotting analysis of the inducible rFip-fve using methanol. M: the protein marker (kDa); 1: the sample of the wild-type *P. pastoris* GS115 as the negative control; 2-6: the samples of the inducible culture at different day (1-5 d); 7: the native Fip-fve as the positive control.

2.4 重组 Fip-fve 血细胞凝集活性的检测

重组 Fip-fve 经过硫酸铵沉淀和 Sephadex-G-100 凝胶柱层析纯化后, 最后获得 29 mg 纯化重组 Fip-fve, 并进行人血细胞凝集试验初步检测其生物学活性。结果表明, 重组 Fip-fve 在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 就可以明显凝集人血细胞 (表 2), 说明重组 Fip-fve 具有良好的血细胞凝集活性。

表 2 重组 Fip-fve 血细胞凝集活性检测

Table 2 Hemagglutination test of rFip-fve

Concentration	32	16	8	4	2	1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
rFip-fve	++	++	+	+	+	-
nFip-fve	++	++	+	+	+	-
PHA	++	++	++	+	+	+
PBS	-	-	-	-	-	-

3 讨论

从天然的金针菇子实体或者菌丝体中提取 Fip-fve 产量比较低, 费时费力, 同时也增大了成本。运用现代生物技术尤其是基因工程手段进行重组 Fip-fve 的生产将有效克服上述不足。Ko 等曾在大肠杆菌中成功表达 *fip-fve*, 但是产

量较低,只有 5 mg/L,并且重组的 Fip-fve 仅具有天然蛋白生物学活性的一半^[17]。Wu 等又将 *fip-fve* 在昆虫细胞中进行表达,获得具有良好生物学活性的重组蛋白,但是产量依旧较低,仅有 6.25 mg/L^[18]。Zhang 等将该基因引入组氨酸标签在大肠杆菌中也进行了融合表达与纯化,表达效率为 22%^[23]。而毕赤酵母具有原核细胞和核真核细胞的特点,成为功能蛋白质和药用蛋白质重组表达的理想宿主。

毕赤酵母表达有两种形式,一个是应用乙醇氧化酶启动子 (*paox1*) 的诱导型表达,该表达模式以甲醇为唯一碳源进行外源基因的诱导表达,其最大特点是表达量高,但是该模式需要更换碳源,同时在表达过程中需要使用甲醇具有一定的危害性和毒性。另外一种应用三磷酸甘油醛脱氢酶 (*pgap*) 的组成型表达,该表达模式不需要更换碳源,可以是甘油、葡萄糖、油酸等,表达方式较简单、安全^[19]。但是不同的目的蛋白用哪种表达方式效率更高还需要实际进行验证。吕等在毕赤酵母中同时进行了 SAM 合成酶 (SAMS) 的重组表达,结果组成型 SAMS 表达量比诱导型高 16.3%^[24]。本文分别构建了诱导型和组成型表达载体,进行了 *fip-fve* 在毕赤酵母 GS115 中两种模式的表达,结果表明两种模式下均能有效重组表达,而诱导型表达产量 (158.2 mg/L) 是组成型表达产量 (46.3 mg/L) 的 3.4 倍。其原因可能是 *paox1* 的超强启动子功能,有报道称该启动子是目前已知的最强启动子^[25],另外,诱导型表达过程中更换培养基,进行了酵母菌的富集。此外,在两种模式下表达的重组 Fip-fve 均有多条目的蛋白带的产生,可能是由于毕赤酵母进行了蛋白质翻译后的加工和修饰,尤其是糖基化修饰的缘故^[26]。

经过初步纯化的重组 Fip-fve 表现出良好血细胞凝集活性,在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时就能明显凝集人红细胞;这与天然 Fip-fve 一致,说明从毕赤酵母 GS115 获得的重组 Fip-fve 具有良好的血细胞凝集活性和初步的生物学活性,可以进行下一步的研究和开发。另外,我们还需要调整和优化表达体系和条件,以期获得更高产量的重组目的蛋白。

REFERENCES

- [1] Ko JL, Hsu CI, Lin RH, et al. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-*fve* isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur J Biochem*, 1995, 228: 244–249.
- [2] Lin WH, Huang CH, Hsu CI, et al. Dimerization of the N-terminal amphipathic α -helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-*gts*) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 1997, 272: 20044–20048.
- [3] Hsu HC, Hsu CI, Lin RH, et al. Fip-*vvo*, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochem J*, 1997, 332: 557–565.
- [4] Li QZ, Wang XF, Chen YY, et al. Cytokines expression induced by *Ganoderma sinense* fungal immunomodulatory protein (FIP-*gsi*) in mouse spleen cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162: 1403–1413.
- [5] Lin JW, Sun F, Zhang R, et al. Research on fungal immunomodulatory proteins. *Chin J Immunol*, 2005, 6: 477–450 (in Chinese). 林景卫, 孙非, 张韧, 等. 真菌免疫调节蛋白的研究进展. *中国免疫学杂志*, 2005, 6: 477–450.
- [6] Paaventhan P, Jeremiah SJ, See VS, et al. A 1.7 Å structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family. *J Mol Biol*, 2003, 332: 461–470.
- [7] Seow SV, Kuo IC, Paaventhan P, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the fungal immunomodulatory protein Fve from the golden needle mushroom (*Flammulina velutipes*). *Acta*

- Crystallog Sect, 2003, 59(9): 1487–1489.
- [8] Tong MH, Chien PJ, Chang HH, et al. High processing tolerances of immunomodulatory proteins Enoki and Reishi mushroom. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(9): 3160–3166.
- [9] Wang PH, Hsu CI, Tang YL, et al. Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-gamma production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 2721–2725.
- [10] Hsieh CW, Lan JL, Meng Q, et al. Eosinophil apoptosis induced by fungal immunomodulatory peptide-fve via reducing IL-5alpha receptor. *J Formos Med Assoc*, 2007, 106(1): 36–43.
- [11] Hsieh KY, Hsu CI, Lin JY, et al. Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33: 1595–1602.
- [12] Liu YH, Kao MC, Lai YL, et al. Efficacy of local nasal immunotherapy for Dp2-induced airway inflammation in mice: using Dp2 peptide and fungal immunomodulatory peptide. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112: 301–310.
- [13] Ding Y, Seow SV, Huang CH, et al. Coadministration of the fungal immunomodulatory protein FIP-fve and a tumour-associated antigen enhanced antitumour immunity. *Immunology*, 2009, 128: 881–894.
- [14] Chang HH, Hsieh KY, Yeh CH, et al. Oral administration of an enoki mushroom protein FVE activates innate and adaptive immunity and induces anti-tumor activity against murine hepatocellular carcinoma. *Int immunopharmacol*, 2010, 10: 239–246.
- [15] Chang HH, Sheu F. Anti-tumor mechanisms of orally administered a fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* in mice. *Nutr Immunol*, 2006, 20: A1057.
- [16] Liu YF, Chang SH, Sun HL, et al. IFN-r induction on carbohydrate binding module of fungal immunomodulatory protein in human peripheral mononuclear cells. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 4914–4922.
- [17] Ko JL, Lin SJ, Hsu CI, et al. Molecular cloning and expression of a fungal immunomodulatory protein, FIP-fve, from *Flammulina velutipes*. *J Formos Med Assoc*, 1997, 96: 517–524.
- [18] Wu CM, Wu TY, Kao SS, et al. Expression and purification of a recombinant Fip-fve from *Flammulina velutipes* in baculovirus-infected insect cells. *J Appl Microbiol*, 2008, 104: 1354–1362.
- [19] Invitrogen. Pichia expression kit, a manual of methods for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Version M, USA, 1997: 55–58.
- [20] Cheng D, Huang XY, Li BJ. A method for preparation of high quality DNA from medical fungi and construction of a genomic library. *Mycosystema*, 2002, 21(1): 137–139 (in Chinese). 程度, 黄翔宇, 李保健. 药用真菌高质量总 DNA 的制备及基因组文库的构建. *菌物系统*, 2002, 21(1): 137–139.
- [21] Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, et al. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Lingzhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *J Biol Chem*, 1989, 264: 472–478.
- [22] Lin JW, Hao LX, Xu GX, et al. Molecular cloning and recombinant expression of a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25: 383–390.
- [23] Zhang JC, Kong XH, Zhang PQ, et al. Cloning and expression of FIP-fve in *E. coli*. *J Jilin Agri Univ*, 2007, 29(5): 495–498 (in Chinese). 张介驰, 孔祥辉, 张丕齐, 等. 金针菇免疫调节蛋白基因克隆及其表达. *吉林农业大学学报*, 2009, 29(5): 495–498.
- [24] Lü ZY, Qian JC, Chu J, et al. Combined use of AOX1 and GAP promoter to express SAM synthetase and enhance S-adenosylmethionine accumulation in *Pichia pastoris*. *Ind Microbiol*, 2008, 38(4): 24–30 (in Chinese). 吕中原, 钱江潮, 储焜, 等. 同时利用 AOX1 和 GAP 启动子表达 SAM 合成酶促进重组毕赤酵母中 S-腺苷甲硫氨酸积累. *工业微生物*, 2008, 38(4): 24–30.
- [25] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology*, 1991, 9(5): 455–460.
- [26] Bastiaan-Net S, Chanput W, Hertz A, et al. Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). *Int Immunopharmacol*, 2013, 2013, 15(1): 167–175.

(本文责编 郝丽芳)