

工业生物技术

共表达分子伴侣 PDI 和 Ero1 对灰盖鬼伞过氧化物酶在毕赤酵母中表达的影响

陈飞¹, 胡美荣², 江贤章¹, 陶勇², 黄建忠¹

1 福建师范大学生命科学院, 福建 福州 350108

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

陈飞, 胡美荣, 江贤章, 等. 共表达分子伴侣 PDI 和 Ero1 对灰盖鬼伞过氧化物酶在毕赤酵母中表达的影响. 生物工程学报, 2015, 31(12): 1682-1689.

Chen F, Hu MR, Jiang XZ, et al. Enhancement of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by co-expression chaperone PDI and Ero1. Chin J Biotech, 2015, 31(12): 1682-1689.

摘 要: 来源于灰盖鬼伞长度为 1 092 bp 的 CiP 目的基因与 AOX1 启动子一起整合进酵母染色体基因组中。重组蛋白 CiP 在酿酒酵母信号肽的引导下成功分泌到胞外, 质谱鉴定为目的蛋白, 成功在毕赤酵母中表达灰盖鬼伞过氧化物酶 (CiP)。将伴侣蛋白内质网氧化还原酶 1 (Ero1)、二硫键异构酶 (PDI) 分别单独及同时转入 CiP 酵母受体菌中, 研究它们对 CiP 在毕赤酵母中表达的影响。结果表明: 在摇瓶中, 相对于无分子伴侣的菌株, 单独整合 PDI 及同时整合 Ero1、PDI 菌株的 CiP 酶活分别提高了 2.43 和 2.62 倍, 活力达到 316 U/mL 和 340 U/mL。挑选同时整合 Ero1、PDI 伴侣蛋白的 CiP 菌株, 5 L 发酵罐进行高密度发酵, 酶活最高达到 3 379 U/mL, 比摇瓶提高约 10 倍。本实验结果较目前已报道的 1 200 U/mL 已是最高水平。

关键词: 毕赤酵母, 灰盖鬼伞过氧化物酶, 内质网氧化还原酶, 二硫键异构酶

Received: January 26, 2015; **Accepted:** July 13, 2015

Supported by: Key Technologies of Industrialization Project in Fujian Province (No. [2010]358).

Corresponding author: Jianzhong Huang. Tel: +86-591-22868212; E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

福建省产业化关键技术项目 (No. 闽财指[2010]358 号) 资助。

Enhancement of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by co-expression chaperone PDI and Ero1

Fei Chen¹, Meirong Hu², Xianzhang Jiang¹, Yong Tao², and Jianzhong Huang¹

¹ College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian, China

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The 1 095 bp gene encoding peroxidase from *Coprinus cinereus* was synthesized and integrated into the genome of *Pichia pastoris* with a highly inducible alcohol oxidase. The recombinant CiP (rCiP) fused with the α -mating factor per-pro leader sequence derived from *Saccharomyces cerevisiae* was secreted into the culture medium and identified as the target protein by mass spectrometry, confirming that a *C. cinereus* peroxidase (CiP) was successfully expressed in *P. pastoris*. The endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 (Ero1) and protein disulfide isomerase (PDI) were co-expressed with rCiP separately and simultaneously. Compared with the wild type, overexpression of PDI and Ero1-PDI increased CiP activity in 2.43 and 2.6 fold and their activity reached 316 U/mL and 340 U/mL respectively. The strains co-expressed with Ero1-PDI was used to high density fermentation, and their activity reached 3 379 U/mL, which was higher than previously reported of 1 200 U/mL.

Keywords: *Pichia pastoris*, *Coprinus cinereus* peroxidase, endoplasmic reticulum oxidoreductase 1, protein disulfide isomerase

过氧化物酶是一系列能够氧化芳香胺类、酚类等化合物的氧化剂。大多数的过氧化物酶活性中心常含有伴随三价铁的原卟啉，且广泛存在于生物有机体中。过氧化物酶分为哺乳类和植物类两个超家族，根据序列比对，植物类超家族成员又被分为 3 种类型：一类是胞内过氧化物酶，如酵母细胞色素 C 过氧化物酶；二类和三类分别为真菌胞内过氧化物酶和植物胞内过氧化物酶。二类过氧化物酶是二聚体糖蛋白，含有 2 个钙离子和 4 个保守的二硫键，且二硫键形成的位置不同于三类酶^[1-2]。

过氧化物酶在临床检验和废水处理方面的作用已经引起工业化生产的注意^[3-5]。已经有来自于不同物种的过氧化物酶用于处理酚类聚合物^[6-9]。辣根过氧化物酶属于第三类过氧化物酶，由于其高效的催化活力和专一性电子供体而被

人们广泛熟知。然而，近些年被人们广泛关注的灰盖鬼伞过氧化物酶 (CiP) 是一种由担子菌类分泌的二类过氧化物酶，具有与辣根过氧化物酶 (HRP) 相似的功能^[10-11]。另外，CiP 由单一的酶组成，而 HRP 由至少 12 种不同催化活性的酶组成，且酶的比例随不同的生长周期进行改变。对于工业化大规模生产过氧化物酶来说，一个高效且经济的生产系统是迫切需要的。已知的酿酒酵母^[12]、米曲霉^[13]等已被工业化用来外源表达 CiP。2009 年 Kim 等在毕赤酵母中功能表达了 CiP，以 ABTS 为底物，其 K_m 和 V_m 分别为 22.4 $\mu\text{mol/L}$ 、1.82 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})$ ，在 5 L 发酵罐中表达活力达到 1 200 U/mL，蛋白浓度 1.7 g/L，是目前报道的最高水平^[14]。

毕赤酵母表达系统已经发展成为一个成熟的外源蛋白表达系统，工业上常用来大规模表

达外源蛋白。毕赤酵母表达系统具有以下优点：遗传改造方便，外源蛋白表达水平高，真核蛋白翻译后修饰，便于大规模发酵，分泌的重组蛋白易于纯化^[15-17]。毕赤酵母表达系统已经被成功地用来表达多种重组外源蛋白^[18-19]。二硫键异构酶 (PDI) 和内质网氧化还原酶 (Ero1) 广泛存在于真菌、植物、动物和人内质网中，能够帮助蛋白分泌。PDI 是内质网中含量最丰富的蛋白之一，可以催化 3 种反应：氧化 (催化蛋白形成新的二硫键)；还原 (除去二硫键)；异构化 (通过巯基-二硫键交换改变已存在的 Cys 配对)^[20]。在酵母内质网中大部分以氧化状态存在，意味着 PDI 主要显示氧化活性帮助蛋白形成正确的折叠结构而分泌到胞外。Ero1 在内质网中氧化还原态的 PDI 成氧化态，间接帮助蛋白分泌^[21]。缺失 Ero1 的细胞内质网不能氧化新合成的蛋白，而缺少 PDI 的细胞不能存活。Zhang 等^[22]在毕赤酵母中通过共表达 PDI 使葡萄糖苷酶比活提高 1.5 倍；Wu 等^[23]在毕赤酵母中通过共表达 PDI 和 Ero1 使人血清白蛋白和人生长激素的融合蛋白在 5 L 发酵罐上表达量提高到 3-4 g/L。

本实验中，我们首先在毕赤酵母中成功表达并分泌 CiP，然后通过整合分子伴侣蛋白 PDI 和 Ero1，进一步提高 CiP 的表达。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠克隆菌株 T1 购自全式金公司；酵母表达菌株 X33、穿梭质粒 pPIC9k、pPICZ α A 购自 Invitrogen 公司；目的基因 CiP 由南京金斯瑞合成。GenBank 登录号为 XM_001834316，去掉信号肽 (前 20 个氨基酸)。

1.2 主要试剂和仪器

Q5 DNA 聚合酶和限制性内切酶 *Bst*B I、*Eco*R I、*Not* I、*Mlu* I、*Sac* I、*Bam*H I 购自 NEB 公司；核酸 marker 购自奥赛博公司；蛋白 marker 和 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司；ABTS[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)]购自 Sigma 公司；博来霉素 (Zeocin)、G418 购自 Invitrogen 公司；其他试剂均为国产分析纯；质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自 Omega 公司；PCR 仪购自东胜创新生物科技有限公司；核酸电泳仪购自 Bio-Rad 公司；蛋白电泳仪购自君意公司；凝胶成像仪购自天能公司；引物由北京生工合成；DNA 测序由北京博尚公司完成。

1.3 方法

常规分子生物学操作参照《分子克隆手册》^[24]进行。

1.3.1 融合表达载体的构建

CiP 全基因合成序列，两端分别是 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点，双酶切纯化后与同样双酶切的 pPIC9k 载体连接，构建克隆载体 pPIC9k-CIP，转化大肠杆菌 *Escherichia coli* T1 感受态细胞，挑取单克隆进行 PCR 鉴定和酶切鉴定，基因测序正确后获得构建成功的融合表达载体。

根据伴侣蛋白 Ero1 和 PDI 基因序列设计寡核苷酸链，合成引物 (表 1)，通过 PCR 技术利用引物 P1 和 P2、P3 和 P4 分别以毕赤酵母的基因组为模板扩增出 Ero1 和 PDI 基因序列，两端均分别含有 *Bst*B I 和 *Not* I 酶切位点。双酶切纯化后将 Ero1 和 PDI 的成熟片段与分别同样双酶切的 pPICZ 载体连接，构建克隆载体 pPICZ-ERO1 和 pPICZ-PDI。转化 *E. coli* T1 感

表 1 分子伴侣基因 PCR 扩增引物列表

Table 1 PCR primers of molecular chaperone

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1	CTATTTTCGAAACGATGAGGATAGT AAGGAGCGTAGCTATC
P2	ATAAGAATGCGGCCGCTTACAA GTCTACTCTATATGTGGTATC
P3	CTATTTTCGAAACGATGCAATTCA ACTGGGATATTA AAACTG
P4	ATAAGAATGCGGCCGCTAAAGC TCGTCTGAGCGTCTGCCTC AGAGGCTGAAGCTTACGTAGAAT
P5	TCAGCAATGGCATTGAAGCCAGC CTCCTGAC
P6	CTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTA GAGCGGCCGCTAAAACCTGAAC

受态细胞, 挑取单克隆进行 PCR、酶切鉴定和基因测序, 获得正确的融合载体。将基因测序正确的重组质粒 pPICZ-PDI 利用引物 P5 和 P6 扩增出含有 AOX 启动子、PDI 基因以及终止子区域的目的片段, 与测序正确且 *Bam*H I 线性化的重组质粒 pPICZ-ERO1 进行同源重组, 采用 NOVO protein 同源重组方法, 构建克隆载体 pPICZ-ERO1-PDI。转化 *E. coli* T1 感受态细胞, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定、酶切鉴定、基因测序, 获得构建成功的载体。

1.3.2 阳性转化子的获得

将测序正确的重组质粒 pPIC9k-CIP 进行 *Sac* I 线性化后电转表达宿主毕赤酵母 *Pichia pastoris* X-33, 构建重组菌 X33/pPIC9k-CIP, 涂布在终浓度为 250 μ g/mL G418 的 YPD 平板上, 3 d 后获得阳性转化子。

将 3 个测序正确的重组质粒 pPICZ-ERO1、pPICZ-PDI、pPICZ-ERO1-PDI 进行 *Mlu* I 线性化后分别电转同一株含有 CiP 的表达宿主 *Pichia pastoris* X-33, 构建分别含有分子伴侣

Ero1、PDI、Ero1-PDI 的 CiP 菌株 X33/pPICZ-ERO1、X33/pPICZ-PDI、X33/pPICZ-ERO1-PDI, 涂布在终浓度 250 μ g/mL G418 和 50 μ g/mL 博来霉素的 YPD 双抗平板上, 3 d 后获得阳性转化子。

1.3.3 重组蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 检测

将重组菌株 X33/pPIC9k-CIP 和分别整合分子伴侣 Ero1、PDI、Ero1-PDI 的 X33/pPIC9k-CIP 菌株进行 YPD (1%酵母膏, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖, 1.5%琼脂粉) 平板划线培养, 挑取单菌落接种于 3 mL YPCS (1%酵母浸出物, 2%蛋白胨, 0.5%酪蛋白水解物, 0.5%山梨醇) 试管种子培养基中, 24 h 后 1%接种量转接到 250 mL 装液量 50 mL 的 YPCS 摇瓶中, 24 h 后加 1% (V/V) 甲醇和终浓度为 50 μ mol/L 的血红素, 48 h 和 72 h 后均各加 1% (V/V) 甲醇诱导, 96 h 收菌, 8 000 r/min 离心 5 min 收集上清, 上清进行 SDS-PAGE 检测。

1.3.4 CiP 酶活测定

用 ABTS 和双氧水进行酶活测定^[14]: 取 1 μ L 稀释的上清酶液至 0.3 mL ABTS-H₂O₂ (2 mmol/L ABTS, 2.9 mmol/L H₂O₂, pH 4.4) 中, 利用 UV1800 测定 420 nm (被氧化的 ABTS 摩尔消光系数为 3.6×10^4 L/(mol·cm)) 下 1 min 内活度值的变化 ΔG , 温度控制在 25 $^{\circ}$ C, 酶活 (U/mL) = $\Delta G \times 0.3 \times$ 稀释倍数 / 0.036。

1.3.5 5 L 发酵罐放大表达 CiP

将同时含有分子伴侣 Ero1 和 PDI 的 X33/pPIC9k-CIP 菌株按 3%接种量接种到 3 mL YPD 的一级试管种子液中, 30 $^{\circ}$ C, 250 r/min, 12 h 后 3%接种量转接到 500 mL 装液量 100 mL BMGY (1%酵母浸出物, 2%蛋白胨, 1.34%

YNB, 400 $\mu\text{g/L}$ 生物素, 1%甘油, 100 mmol/L pH 6.0 的磷酸钾缓冲液) 二级种子液摇瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min, 12 h 后 OD_{600} 到 10, 10% 的接种量接种到 5 L 的发酵罐中, 发酵罐初始装 1.8 L BSM 培养基, 每升 BSM 含: 26.7 mL 85% H_3PO_4 , 0.93 g CaSO_4 , 18.2 g K_2SO_4 , 14.9 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.13 g KOH, 40 g 甘油和 4.35 mL PTM1 (过滤除菌); 每升 PTM1 含 6.0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g NaI, 3.0 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g H_3BO_3 , 0.5 g CoCl_2 , 20.0 g ZnCl_2 , 65.0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g 生物素, 5 mL H_2SO_4 。初始发酵控制温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 用浓氨水 (28%) 控制 pH 为 5.0, 通过调节搅拌转速和通气量控制罐上溶氧在 20% 以上。等 BSM 中甘油耗尽溶氧上升后, 以 18.15 mL/(h·L) 的速率流加含有 1.2% (V/V) PTM1 的 50% (W/V) 甘油, 待 OD_{600} 到 150–200 时停止流加甘油, 饥饿培养 30 min–2 h, 以 6 g/(h·L) 的速率流加含有 1.2% (V/V) PTM1 的 100% 甲醇, 调节搅拌转速和通气量控制溶解氧在 20% 以上。

2 结果

2.1 重组蛋白表达载体的构建和表达

将重组质粒 pPIC9k-CiP 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切鉴定, 得到 1 000 bp 的目的条带, 与预期结果一致 (图 1)。DNA 测序结果证明融合目的片段序列正确。重组菌 X33/pPIC9k-CiP 进行甲醇诱导表达, 胞外上清进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明在约 40 kDa 处有一条明显的条带, 发酵罐放大培养时, 50 kDa 和 60 kDa 处也均有条带 (图 2)。

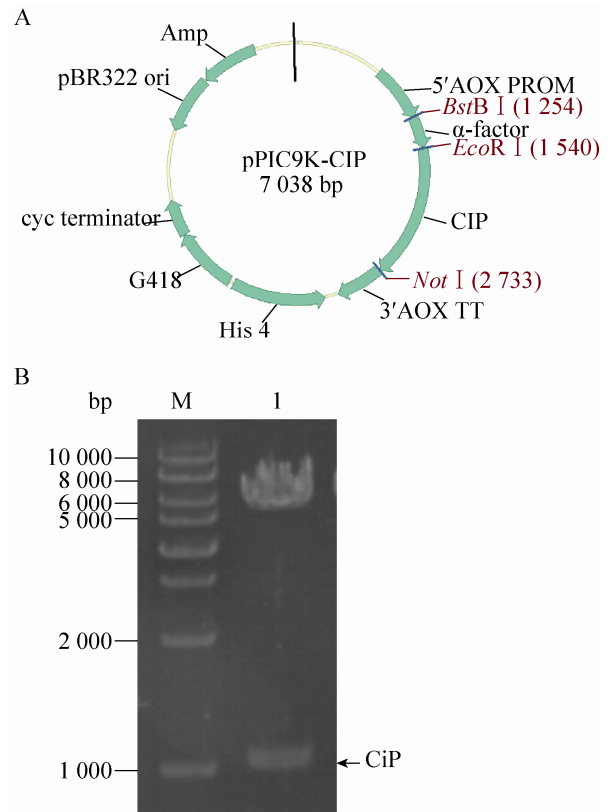


图1 pPIC9k-CiP质粒图示 (A) 及酶切电泳鉴定 (B)
Fig. 1 Schematic map of the recombinant plasmid pPIC9k-CiP (A) and restriction analysis of the recombinant plasmid pPIC9k-CiP (B). M: DNA marker; 1: pPIC9k-CiP digested with *Eco*R I / *Not* I.

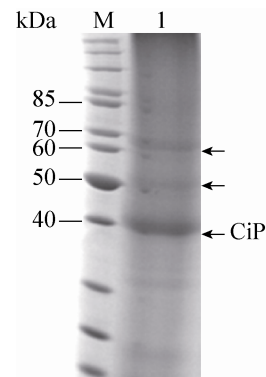


图2 重组蛋白 CiP 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein CiP. M: protein marker; 1: broth supernatant.

2.2 重组蛋白 CiP 的鉴定

将图 2 中的 3 条片段采用中国科学院微生物研究所的 LC-MALDI 串联飞行时间质谱仪进行鉴定, LC-MS 的数据表明, 40、50 和 60 kDa 处蛋白和 XM_001834316 编码的蛋白的同源性分别为 41%、40%和 14%, 因此断定 40、50 kDa 处蛋白一定为 CiP, 因为具有较高的同源性; 60 kDa 处蛋白尚需进一步的验证。50 kDa 处蛋白推测主要是因为糖基化所致, 根据糖基化软件分析 (CBS Prediction Servers), 推测 162-165 位为糖基化位点 NSSQ。

2.3 摇瓶水平检测分子伴侣对 CiP 表达影响

将 X33/pPIC9k-CIP 菌株作为空白菌株, 与分别整合分子伴侣 Ero1、PDI、Ero1-PDI 的 X33/pPIC9k-CIP 菌株按照上述条件进行摇瓶发酵。空白菌株酶活 130 U/mL, 整合 Ero1 的 CiP 菌株酶活为 90 U/mL, 整合 PDI 的 CiP 菌株酶活为 316 U/mL, 同时整合 Ero1、PDI 的 CiP 菌株酶活达到 340 U/mL (图 3)。由图 4 可知, 整合 Ero1 菌株蛋白表达较空白少, 整合 PDI、Ero1-PDI 菌株蛋白表达均较空白多。

2.4 5 L 发酵罐表达 CiP

将空白菌株 X33/pPIC9k-CIP 和整合伴侣蛋

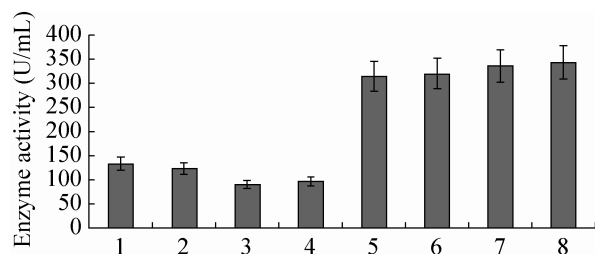


图 3 共表达分子伴侣对 CiP 酶活的影响

Fig. 3 Analysis of the CiP activity by co-expression chaperone after shake-flask induction for 96 h. 1-2: ck; 3-4: ck+Ero1; 5-6: ck+PDI; 7-8: ck+Ero1-PDI.

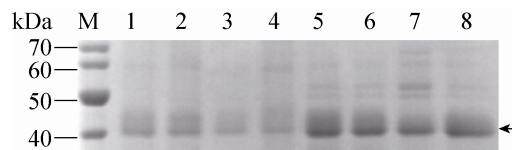


图 4 SDS-PAGE 分析分子伴侣对 CiP 表达的影响
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the molecular chaperone effect to recombinant protein CiP after shake-flask induction for 96 h. M: protein marker; 1-2: ck; 3-4: ck+Ero1; 5-6: ck+PDI; 7-8: ck+Ero1-PDI.

白 Ero1-PDI 的 X33/pPIC9k-CIP 菌株按上述条件进行 5 L 发酵罐放大培养。发酵液上清进行 SDS-PAGE 分析 (图 5), 整合分子伴侣的菌株蛋白表达明显好于空白菌株, 酶活和比活也均有较大提高, 空白菌株发酵结束酶活 867 U/mL, 蛋白浓度 2.1 g/L, 比酶活 413 U/mg。整合伴侣蛋白 CiP 菌株发酵结束酶活达到 3 379 U/mL, 蛋白浓度 4.4 g/L, 比活 768 U/mg (图 6)。

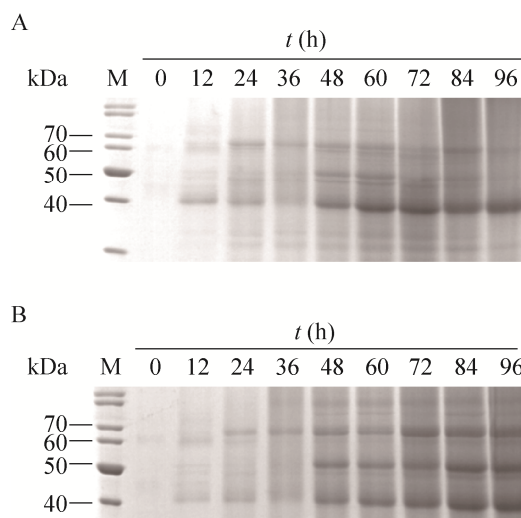


图 5 SDS-PAGE 分析 5 L 发酵罐空白菌株 (A) 和添加 Ero1-PDI 菌株 CiP 表达情况 (B)

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the fermentation of *P. pastoris* X33/pPIC9k-CIP (A) and *P. pastoris* X33/pPIC9k-CIP/pPICZ-ERO1-PDI (B) in a 5 L bioreactor after induction for 96 h. M: protein marker.

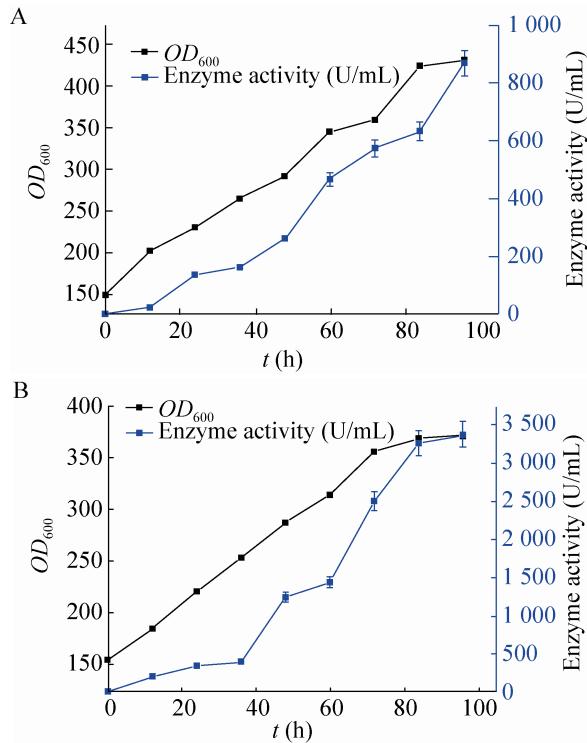


图 6 CiP 空白对照菌株 (A) 及添加 Ero1-PDI 菌株 (B) 在 5 L 发酵罐中诱导 96 h 的生长情况和酶活分析
Fig. 6 Analysis of the cell growth and enzyme activity of *P. pastoris* X33/pPIC9k-CIP (A) and *P. pastoris* X33/pPIC9k-CIP/pPICZ-ERO1-PDI (B) in a 5 L bioreactor after induction for 96 h.

3 讨论

毕赤酵母表达系统已经是一种成熟的外源蛋白表达系统, 由于外源蛋白翻译速度快来不及修饰导致很多蛋白留在胞内。本文通过整合伴侣蛋白希望能够提高目的蛋白的表达: Ero1 和 CiP 共表达时, Ero1 对 CiP 形成二硫键以及正确折叠没有帮助, 因此不能够提高 CiP 的表达水平, 当 Ero1 和 CiP 同时表达时 Ero1 会占用一定的营养源, 从而降低了 CiP 的表达水平。CiP 的三级结构中含有 4 个二硫键, PDI 直接有助于二硫键的形成, 因此有助于其表达。当

Ero1、PDI 以及 CiP 共表达时, PDI 在帮助 CiP 形成二硫键时, 本身被还原, Ero1 可以将 PDI 氧化, 使其重新恢复功能, 从而促进 CiP 的表达, 因此单独共表达 PDI 及同时共表达 Ero1 和 PDI 时有利于 CiP 的表达。本实验单独整合 PDI 和 Ero1-PDI 使目的蛋白酶活分别提高 2.43 和 2.62 倍, 说明 PDI 成功帮助 CiP 进行正确的折叠分泌提高蛋白表达, 另外, 同时整合两个分子伴侣 Ero1-PDI 的菌株表现出最高的酶活。5 L 发酵罐放大实验整合 Ero1-PDI 菌株酶活与表达量均有明显提高, 比活 768 U/mg 比空白 527 U/mg 提高 1.46 倍, 酶活 3 379 U/mL 已是目前查阅国内外文献中最高酶活。

本文通过整合分子伴侣促进蛋白正确折叠从而提高蛋白表达为以后蛋白纯化及酶学性质的研究奠定了良好的基础, 对促进其他外源蛋白在毕赤酵母中的正确折叠和表达提供了新的思路和借鉴。

REFERENCES

- [1] Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol*, 1992, 2(3): 388–392.
- [2] Conesa A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J Biotechnol*, 2002, 93(2): 143–158.
- [3] Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. Effect of reaction conditions on phenol removal by polymerization and precipitation using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(4/5): 295–300.
- [4] Kim SJ, Joo JC, Kim HS, et al. Development of the radical-stable *Coprinus cinereus* peroxidase by blocking the radical attack. *J Biotechnol*, 2014, 189: 78–85.
- [5] Kauffmann C, Petersen BR, Bjerrum MJ. Enzymatic

- removal of phenols from aqueous solutions by *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. *J Biotechnol*, 1999, 73(1): 71–74.
- [6] Morawski B, Lin ZL, Cirino P, et al. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Eng Des Sel*, 2000, 13(5): 377–384.
- [7] Kim YH, Won K, Won JM, et al. Synthesis of polycardanol from renewable source using a fungal peroxidase *Coprinus cinereus*. *J Mol Catal B Enzymatic*, 2005, 34(1/6): 33–38.
- [8] Park SY, Kim YH, Won K, et al. Enzymatic synthesis and curing of polycardol from renewable resources. *J Mol Catal B Enzymatic*, 2009, 57(1/4): 312–316.
- [9] Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1504(2/3): 196–219.
- [10] Cohen YV, Dosoretz CG. Fate of horseradish peroxidase during oxidation of monobrominated phenols. *J Chen Technol Biotechnol*, 2009, 84(10): 1559–1566.
- [11] Kim SJ, Lee JA, Joo JC, et al. The development of a thermostable *Coprinus cinereus* peroxidase through in silico design. *Biotechnol Prog*, 2010, 26(4): 1038–1046.
- [12] Sawai HH, Ashikari T, Tanaka Y, et al. Cloning, sequencing, and heterologous expression of a gene coding for *Arthromyces ramosus* peroxidase. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59(7): 1221–1228.
- [13] Petersen JFW, Tams JW, Vind J, et al. Crystallization and X-ray diffraction analysis of recombinant *Coprinus cinereus* peroxidase. *J Mol Biol*, 1993, 232(3): 1221–1228.
- [14] Kim SJ, Lee JA, Won K, et al. Functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 2009, 44(7): 731–735.
- [15] Spadiut O, Rossetti L, Dietzsch C, et al. Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy. *Protein Expres Purif*, 2012, 86(2): 89–97.
- [16] Kopera E, Dwornyk A, Kosson P, et al. Expressin, purification and characterization of glycosylated influenza H5N1 hemagglutinin produced in *Pichia pastoris*. *Acta Biochim Pol*, 2014, 61(3): 597–602.
- [17] Fan K, Jiang J, Wang Z, et al. Expression and purification of soluble porcine cystatin 11 in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 174(5): 1959–1968.
- [18] Zarei N, Vaziri B, Shokrgozar MA, et al. High efficient expression of a functional humanized single-chain variable fragment(scFv) antibody against CD22 in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(24): 10023–10039.
- [19] Wu Q, Li B, Wu F, et al. High level expression, efficient purification, and bioactivity of recombinant human metallothionein 3(rhMT3) from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expres Purif*, 2014, 101: 121–126.
- [20] Onda Y, Kobori Y. Differential activity of rice protein disulfide isomerase family members for disulfide bond formation and reduction. *Febs Open Bio*, 2014, 4: 730–734.
- [21] Qiang L, Wang H, Farmer SR. Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1- α . *Mol Cell Biol*, 2007, 27(13): 4698–4707.
- [22] Zhang JH, Wu D, Chen J, et al. Enhancing functional expression of β -glucosidase in *Pichia pastoris* by co-expressing protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioproc E*, 2011, 16(6): 1196–1200.
- [23] Wu M, Liu W, Yang GH et al. Engineering of a *Pichia pastoris* expression system for high-Level secretion of HSA/GH fusion protein. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(5): 2400–2411.
- [24] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

(本文责编 陈宏宇)