大肠杆菌表达系统和酵母表达系统的研究进展

祁浩, 刘新利* (齐鲁工业大学生物工程学院, 山东济南 250353)

摘要 由于 DNA 重组技术和蛋白组技术的发展与成熟, 外源基因表达技术备受关注。其在生物、食品、工业以及医学领域发挥着举足轻重的作用。以原核生物细胞及真核生物细胞作为表达系统, 进行目的基因序列的表达以生产蛋白疫苗、核酸疫苗和生物酶制剂等是近年来发酵工业的新型领域。原核和真核表达系统是近年来研究和应用最广泛和最成熟的外源基因表达系统。对近年来关于大肠杆菌表达系统和酵母表达系统的研究进展进行了综述。

关键词 大肠杆菌表达系统; 酵母表达系统; 表达载体; 外源基因; 宿主菌株

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)17-004-03

Research Progress of Expression Systems of *Escherichia coli* and Yeast

QI Hao, LIU Xin-li* (Qilu University of Technology, Jinan, Shandong 250353)

Abstract Due to the rapid development of recombinant DNA technology and proteomic technology, exogenous gene expression technology has received much attention. It plays increasingly important role in the field of biological, foodstuff, industry and medical science. In recent years, the use of prokaryotic and eukaryotic expression systems for exogenous gene amplification and expression to produce proteins vaccines, nucleic acid vaccine and enzyme preparations, etc. is the emerging fields of fermentation industry. Prokaryotic expression and eukaryotic expression systems were commonly used to express exogenous gene. The research progress of yeast and *E. coli* expression systems in recent years were reviewed.

Key words *E. coli* expression system; Yeast expression system; Expression vectors; Exogenous gene; Host bacteria

自 20 世纪七八十年代以来, 由于分子生物学和蛋白组学的迅猛发展, 各种外源基因表达的遗传操作技术日趋成熟^[1]。其中, 大肠杆菌等原核表达系统具有遗传背景研究清楚、操作简单、生长繁殖快、成本低、产量高、表达产物纯化过程简单、产物稳定性好、不易污染以及应用范围广等优点, 是最早进行研究的外源基因表达系统, 同时也得到了非常广泛的应用, 取得了巨大的科研价值和经济效益^[2-3]。

酵母菌是一类单细胞真核微生物, 尤其是对酿酒酵母的应用可以追溯到几千年以前。同时, 随着科学技术的不断发展, 酵母的生物学和遗传学背景也已经研究得十分清楚。由于酵母菌具有生长旺盛、生长周期短等特性, 近年来, 在外源基因表达方面得到了深入研究和广泛应用^[4-5]。利用酵母系统表达外源基因时, 既具有原核生物生长繁殖快、遗传操作简单等特点, 又具有真核生物对外源蛋白进行翻译后修饰加工的能力。表达外源基因常用的酵母种类有酿酒酵母和甲基营养型酵母^[6]。随着 DNA 技术的迅猛发展, 利用大肠杆菌和酵母表达系统表达蛋白疫苗、核酸疫苗和生物酶制剂等新型领域, 开始进入产业化阶段, 但随之带来一系列问题。笔者对大肠杆菌表达系统和酵母表达系统的研究进展进行了综述。

1 大肠杆菌表达系统

1.1 大肠杆菌表达载体 大肠杆菌作为原核生物, 因其具有培养条件简单、生长速度快、操作简单以及不易污染等特点而成为原核表达系统中占据优势的菌株。表达系统中最重要的元件是表达载体, 表达载体应当具有表达量高、稳定

性好、适用范围广等优点。表达载体主要包括启动子、表达阅读框、终止子、复制起点以及抗性筛选标记等重要元件^[7-8]。

近年来的研究表明, 在科研和工业上被广泛应用的大肠杆菌表达载体主要有 pGE 系列、pQE 系和 pET 系列, 其中目前被广泛应用的高效表达载体是 pET。此系统是在大肠杆菌中表达外源蛋白最高效、产量最高、成功率最高的表达载体。它最初是利用与启动子配套并且能高效转录特定基因的外源 RNA 聚合酶构建的 T7RNA 聚合酶/启动子系统, 可以从各种基因(包括原核细胞、真核细胞)生产大量的目的蛋白^[9]。

1.2 外源基因结构 外源基因是整个表达过程最关键的因素, 因为它决定了通过表达系统是否得到目的产物。原核基因在大肠杆菌表达系统中可以直接进行表达, 而真核基因属于断裂基因, 其基因组 DNA 中的基因区别于原核基因, 是不连续的, 其中含有内含子序列, 转录出的前体 mRNA 不能被大肠杆菌进行剪切, 从而形成有功能的 mRNA, 不能完成正常的蛋白翻译功能, 因此无法在大肠杆菌表达系统中直接进行表达^[10]。大肠杆菌不能识别真核基因转录和翻译元件, 所以必须提供大肠杆菌识别的转录及翻译元件, 以保证真核基因的表达。例如, 真核基因的前导肽不能被大肠杆菌识别, 因此在设计真核基因时应去除前导肽序列, 必要时换以原核的信号肽序列。此外, 许多蛋白质都是以无活性的前体蛋白的形式表达, 必须通过翻译后的加工修饰才能成为真正有活性的功能蛋白, 因此在设计外源基因序列时应从活性蛋白质编码序列开始^[11]。

1.3 表达宿主 作为外源基因的表达宿主, 对其表达活性和表达量会产生很大的影响。每个宿主细胞都可以被看成一个微观的小型工厂, 按照细胞固有的程序完成一系列活动。菌株内源的蛋白酶过多, 可能会造成目的基因产物表达

基金项目 国家自然科学基金项目(31370110); “泰山学者”建设工程专项。

作者简介 祁浩(1990-), 男, 山东淄博人, 硕士研究生, 研究方向: 生物制药工程。* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物代谢活性物质研究。

收稿日期 2016-04-23

的不稳定性,所以理想的宿主菌株往往是蛋白酶缺陷型的菌株。其中,最经典的蛋白酶缺陷型菌株就是 BL21 系列菌株。BL21(DE3)是其中研究最成熟的菌株,添加了 T7 聚合酶基因,是为 T7 表达系统而设计的^[12-13]。

1.4 影响外源基因表达的关键因素 不同的目的基因具有不同的结构多样性,并且与大肠杆菌基因有明显的差异性,因此不同外源基因的表达效率往往存在很大的差异。载体(启动子)和宿主菌的选择、密码子的选用、mRNA 的稳定性、培养条件的控制和表达产物的后加工处理等因素都是影响大肠杆菌表达外源蛋白的关键因素。

表达载体是整个表达系统中最关键的元件。在大肠杆菌表达系统中有很多的载体可以表达外源基因,这些载体通常具有以下共同的特征:高拷贝数、产量高、应用范围广、表达产物易纯化以及在菌体内稳定性好。研究表明,大肠杆菌表达外源基因适用的载体包括融合表达载体、分泌型表达载体和共表达载体等^[14]。

1.4.1 融合表达载体。表达载体可以插入目的基因之外的辅助基因序列,并且与目的基因构成融合蛋白基因序列进行表达,可以提高外源蛋白的活性和产量,并且可以简化下游纯化的操作等。融合蛋白基因与外源基因结合,可以利用融合信号肽将融合蛋白分泌到细胞周质或胞外表达,有利于形成二硫键以及避免胞质蛋白酶的水解,同时有利于目的蛋白的分离和纯化^[15]。研究表明,成功的融合表达载体包括 GST(谷胱甘肽转移酶)系统、半乳糖苷酶系统、麦芽糖结合蛋白(MBP)系统、蛋白 A 系统、纯化标签融合系统等^[16]。

1.4.2 分泌型表达载体。外源蛋白在大肠杆菌细胞内容易被宿主体内的蛋白酶降解,同时为了外源蛋白质能够分泌到宿主体外进行正确折叠修饰和便于提纯,所以被表达的外源蛋白需要分泌到宿主体外,因此分泌型载体是实现此步骤的关键因素,表达分泌蛋白防止宿主菌对外源蛋白的降解,同时减轻宿主细胞代谢负荷及对产物进行胞外正确折叠修饰,使其具有真正的生物学活性^[17]。分泌型载体具有以下优点:一些在胞内被蛋白酶降解的蛋白质在细胞周质中很稳定;一些在胞内无活性的蛋白质分泌后便具有活性,分泌可能使蛋白能够正确折叠;产生的蛋白质没有氨基酸末端甲硫氨酸,因为切割位点在信号肽与编码序列之间,甲硫氨酸会影响许多蛋白质的活性^[18-19]。

1.4.3 共表达载体。绝大多数真核基因表达的产物若要表现出相应的生物活性都必须以多聚复合体的形式组合,因此构建共表达载体来表达这类外源基因是表达产物有无活性的最关键一步,同时新生蛋白质在后期的折叠和分泌过程中共表达策略也起到至关重要的作用。有研究人员构建了可与 pET 载体共表达的载体 pOKD,用于表达异源二聚体外源基因,这种载体可以与大多数大肠杆菌表达载体共存于细胞中^[20]。Marco 等^[21]设计了共同表达分子伴侣的 3 载体系统,其中 2 种载体分别携带不同的分子伴侣,另外 1 种载体携带目的基因,分子伴侣与目的基因被分别独立诱导。例如,从嗜冷菌中分离的一类分子伴侣 Cpn60 和 Cpn10 共同表达后

可以使大肠杆菌在 4 °C 低温下生长,这样的环境有利于蛋白的正确折叠,有利于提高表达产物的活性和产量^[22]。

研究表明,大肠杆菌表达外源基因的技术越来越成熟,为今后的科学研究和大规模工业生产提供了极大的可能性和经济价值,但是目前仍然有关键问题需要解决,因为还有一部分与外源蛋白表达相关的调控通路未知,有些与大肠杆菌代谢途径对外源基因表达影响的因素没有解决。

2 酵母表达系统

酵母是低等的单细胞真核生物,遗传背景清楚,既具有原核生物细胞生长迅速、容易培养、遗传操作简单等特点^[23],又具有真核生物表达外源蛋白时对蛋白质的翻译后加工和修饰等功能。因此相对于大肠杆菌等原核表达系统,酵母表达出的蛋白是结构更加复杂、具有生物学活性且酵母表达系统比其他真核表达系统遗传背景清楚、遗传操作简便、生长周期短,成本低。因此,酵母表达系统在表达外源蛋白方面有着明显的优势^[24-25]。

目前工业生产中最重要的外源蛋白表达系统是酵母表达系统,通过表达分泌途径可以将目的蛋白分泌到细胞外,提取纯化过程技术成熟简便,为其大规模工业生产奠定了基础,并且在发酵生产中安全性较高。酵母表达系统既具有遗传操作简单和生长周期快等特点,又具有真核细胞的翻译后修饰加工的优势,在工业生产中可以大规模生产,因此具有极大的经济价值^[26]。酵母表达系统最常用的宿主菌株有酿酒酵母、毕赤酵母和裂殖酵母。

经过多年的研究,大肠杆菌等原核生物表达系统得到了长足的发展,由于其安全性较差,因此在生物医药领域仍然具有很大的局限性。考虑到医药蛋白的安全性与其蛋白的特殊性,真核生物表达系统具有明显的优势^[27-28],如酵母表达菌株。以酵母表达系统来表达医药蛋白的宿主菌主要有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*),其中以酿酒酵母的应用最为广泛^[29]。

2.1 酵母系统表达载体 酵母细胞体内本身不带有质粒,外源基因若要进入酵母体内,只能利用整合型穿梭质粒作为载体携带外源基因先在大肠杆菌中复制扩增,然后导入酵母细胞中,再携带外源基因的表达载体与酵母细胞染色体基因组整合,进而表达外源基因^[30]。在毕赤酵母表达系统中主要应用 2 种载体,分别为诱导型表达载体和组成型表达载体。组成型表达载体以磷酸甘油醛脱氢酶启动子为外源蛋白表达启动子,不需要诱导,而诱导型表达载体以醇氧化酶基因启动子启动外源基因的表达,外源基因只能在甲醇的诱导下才能进行转录。在酿酒酵母表达系统中,常用的表达质粒是在这个表达载体中,目的蛋白的表达受到半乳糖激酶启动子的控制,宿主菌表达半乳糖激酶用来分解半乳糖获得能量,获取能量的同时启动半乳糖激酶启动子下游基因的转录,外源基因因此得到表达^[31-32]。

载体转化到酵母宿主中的方式包括原生质体转化法、电

转化法、聚乙二醇法和氯化锂转化法。转化效率较高的是原生质体转化法和氯化锂法,原生质体转化法易形成高拷贝数,但是操作步骤十分繁琐,操作过程中极易受到污染。电转化法操作简便,转化效率高且不易污染,目前已被广泛应用^[33]。

2.2 目的基因表达框的改造 提高目的蛋白在酵母表达系统中的表达量,目的基因启动子的改造或替换是非常关键的一步。在酿酒酵母表达系统中最常用的高效表达启动子主要是 *TEF1* 和 *TDH3*。近年来研究表明,主要通过随机合成寡核苷酸技术和易错 PCR 技术对启动子进行突变,来达到符合研究的启动子。同时,在毕赤酵母中通过随机突变,三磷酸甘油醛 *GAP* 启动子的活性同样得到了提高^[34]。

诱导型启动子是另一种重要的酵母表达外源基因的启动子。*GAL1* 和 *GAL10* 是 2 种最常用的酵母诱导型启动子。但是,这 2 个启动子的诱导物都是半乳糖,半乳糖作为碳源被酵母消耗,从而导致对基因表达的控制变得复杂,加之半乳糖的价格较高,因此在大规模工业生产中未得到广泛应用^[35]。*AOX1* 是毕赤酵母中最常用的诱导型启动子。*AOX1* 启动子以甲醇为诱导物,因此在工业生产中安全性得不到保障。研究表明通过对启动子进行改造,可以提高其转录效率并且可以替换甲醇作为诱导物^[36]。

在酵母表达系统中,除了启动子因素外,影响外源蛋白表达的重要因素还包括密码子偏好性和质粒拷贝数。可以对外源基因的密码子进行优化,使其更加适合宿主菌的密码子的偏好性,并通过改变 4 种碱基的比例可以有效提高外源蛋白的表达效率,提高产量。同时,高拷贝的质粒有利于蛋白表达量的提高,但是蛋白表达过量会加重宿主菌的代谢负担,造成表达系统的稳定性下降。通常情况下,将表达载体重组在宿主的基因组上,有利于外源基因的稳定性^[37]。

2.3 宿主菌的改造 对酵母宿主的改造是另一种重要的途径。很多外源蛋白在酵母中能进行高效表达,但是它们需要分泌到细胞外才有意义。因此,若要提高目的蛋白的产量,可以通过改造酵母的分泌途径来实现。外源蛋白的表达和分泌过程主要包括转录、翻译、翻译后修饰加工、蛋白折叠、糖基化、包装、和分泌等步骤^[38]。蛋白经翻译后首先会被转移到细胞质基质中的内质网中,此过程中起到最关键作用的是信号肽与前导肽。由人工合成的 α -交配因子的前导肽与酵母本身的前导肽在引导胰岛素分泌的过程中具有类似的活性。在内质网中,最重要的就是蛋白的准确折叠,蛋白进入分泌途径还是降解途径由此来决定,若肽段错误折叠会加重内质网腔内的代谢负担,引起未折叠蛋白反应^[39]。过量表达内质网中蛋白质折叠因子和还原酶,可以有效改善内质网环境,促进蛋白质的折叠,从而提高蛋白质的分泌量。分泌过程的最后一步是目的蛋白从内质网运输到高尔基体,然后再次运输到细胞壁的囊泡中,2 个关键蛋白 *Sly1P*、*Sec1P* 的过量表达可以有效促进目的蛋白的分泌^[40]。因此,对酵母宿主菌的改造不会只是局限于单个基因的缺失或过量表达,而是对一系列关键基因的共同改造,以此来提高目的蛋

白的表达量。

3 展望

经过近些年的不断研究,现代分子生物学和 DNA 技术已经得到了很大发展,发酵技术也日益成熟,微生物发酵产业进入了飞速发展阶段,由此开创了分子生物学和发酵领域巨大的科研和经济价值,在食品医药和保健品等领域都创造了巨大的价值。利用这些越来越成熟的科学技术,科学工作者构建了一系列的真核表达体系以及原核表达体系,构建了一系列高效的表达载体以及与其搭配的宿主菌,但是在各宿主菌中仍然存在一些问题。

参考文献

- [1] 戒晶晶,刁振宇,周国华. 大肠杆菌表达系统的研究进展[J]. 药物生物技术,2005,12(6):416-420.
- [2] LEE P S,LEE K H. *Escherichia coli* a model system that benefits from and contributes to the evolution proteomics [J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 84(7):801-814.
- [3] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版),2008,9(5):33-37.
- [4] 董清华,沈元月. 酵母表达系统研究进展与展望[J]. 北京农学院学报,2008,23(4):41-42.
- [5] VALENZUELA P,MEDINA R. Synthesis and assemble of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast [J]. Nature,1982,298:347-350.
- [6] GELLISSEN G,JANOWICZ Z A,MERKELBACH A. Heterologous gene expression in *Hansenula polymorpha*:Efficient secretion of glucoamylase [J]. Biotechnology,1991,9(3):291-295.
- [7] 许崇利,杨梅,许崇波. 大肠杆菌表达系统的影响因素[J]. 中国动物检疫,2010,27(8):49-51.
- [8] NU C P,NU C K. Recombinant protein production in *Escherichia coli* [J]. Postepy Biochem,2006,52(4):448-456.
- [9] DONG X,TANG B,LI J,et al. Expression and purification of intact and functional soybean (*Glycine max*) seed ferritin complex in *Escherichia coli* [J]. Microbiol Biotechnol,2008,18(2):299-307.
- [10] JONASSON P,LIL JEKVIST S,NYGRÉN P A,et al. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant protein sin *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and applied biochemistry,2002,35(2):91-105.
- [11] WILSON C J,ZHAN H,SWINT-KRUSE L,et al. The lactose repress orsystem:Paradigms for regulation,allosteric behavior and protein folding [J]. Cell Mol Life Sci,2007,64(1):3-16.
- [12] BOWERS L M,LAPOINT K,ANTHONY L,et al. Bacterial expression system with tightly regulated gene expression and plasmid copy number [J]. Gene,2004,340(1):11-18.
- [13] MASIP L,PAN J L,HALDAR S,et al. An Engineered Pathway for the Formation of Protein Disulfide Bonds [J]. Science,2004,303:1185.
- [14] ARRAU J,LAURITE C,PETERSEN G E,et al. Current strategies for use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins [J]. Protein Expr Purif,2006,48(1):1-13.
- [15] CHOI J H,LEE S Y. Secretary and extracellular production of recombinant protein s using *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004,64(5):625.
- [16] LAMLA T,ERDMANN V A. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins [J]. Protein Expr Purif,2004,33(1):39.
- [17] GEORGIU G,SEGATORI L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria:Status report and future prospects [J]. Curr Opin Biotechnol, 2005,16(5):538-545.
- [18] GEORGIU G,SEGATORI L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria:Status report and future prospects [J]. Curr Opin Biotechnol, 2005,16(5):538-545.
- [19] MORGULHAO F J M,MONTEIRO G A,LARSSON G,et al. Evaluation of inducible promoters on the secretion of a ZZ-proinsulin fusion protein [J]. Biotechnol Appl Biochem,2003,38:87-93.
- [20] DZIVENU O K,PARK H H,WU H. General co expression vectors for the over expression of heterodimeric protein complees in *Escherichia coli* [J]. Protein Expr Purif,2004,38(1):1.

有机质含量、改善土壤理化性状、增加土壤保水能力、提高水分利用率为目的,绿肥种植,增施有机肥,可施太阳岛腐熟饼肥 450 kg/hm²、大豆(豆饼)300 kg/hm²。

2.3 采取降氮增密措施 结合品种需肥特性和植烟地块土质状况,纯氮量严格控制在 75 kg/hm² 以内,氮、磷、钾比例为 1.0:(0.7~1.0):3.0。合理移栽密度,严格落实行距、株距移栽标准,以行距 115~120 cm、株距 45 cm、密度 18 450~19 200 株/hm² 为宜。

2.4 合理施肥方法 孙敬权等^[6]报道,在皖北地区,采用一次性单行条施全部氮肥易导致烟株在旺长前地上部分生长过旺、下部叶前后半片厚度差异明显,肥料淋溶损失大、肥效降低,烟田明显无后劲,同时在干旱气候条件下移栽根系有受肥料灼伤的风险。采用单株定量侧穴施肥、基施和追施相结合,因肥料局部集中且烤烟生长前期降水不足导致烟株早期生长缓慢,肥效明显向后延迟。采用基施和追施相结合,基肥为单株定量环穴施肥,与剪叶育苗技术、“旱地培土”技术相配套可很好地克服前两者的缺点,且可提高烟叶品质和肥料的利用率。在生产上,应特别注意施肥方法的掌握,避免水对肥料的负面效应。在移栽前 10~15 d 施用基肥,注意减少基肥比例,增加追肥次数,实施动态精量施肥,以充分发挥肥料效益,减少养分的流失。具体方法:根据烟田前茬作物、施肥种类、施肥量及产量、土壤质地、品种需肥特性、目标产量和土壤养分化验结果,判断土壤肥力的高、中、低,确定地块施肥总氮量;在确定地块施肥总氮量的基础上,最终减少 20% 总氮肥用量;施肥方式为基肥+滴灌追肥,总氮量的 40% 作为基肥在移栽前 10~15 d 施入(含全部有机肥),进行穴施或 2、3 条划施,深 15~20 cm;其余 40% 在移栽后以滴灌形式追施水溶性肥料(N:P:K=15:15:30),即在栽后 25~28 d 追施氮肥用量的 20%,栽后 40 d 追施氮肥用量的 20%。

2.5 进行井窖移栽 在地膜覆盖栽培的基础上,利用制作的 6 cm 直径打孔器进行打孔,深度 18~20 cm,边浇水边放入烟苗,在烟苗芯叶长出井窖 2 cm 左右时进行封填,营造烟苗生长的适宜温度与湿度环境,促进烟苗早生快发,减轻病虫害危害;同时增加移栽深度,可利于不定根生长,增强烟株抗倒伏能力,解决风刮造成的烟苗损伤及倒伏。

2.6 适时、适量滴灌 由于水肥的协同作用有一定的范围,当灌水量过大时,二者不仅不会产生互作,反而会产生负效应,过量灌水会引起肥料的淋失和烟叶产量、质量的下降。所以,应按照不同生育时期烟叶对水分的需求特点及时补充水分亏缺,以水调肥,促进烟叶生长。

3 小结

针对近几年烟区烤烟移栽期干旱少雨、大田生长期间歇性干旱严重,引起烟株早期氮素利用低、中后期氮素供应过量,影响烟叶正常成熟采收和收购管理的实际情况,发展水肥一体化,优化烟田水分管理,合理调控烟田水肥供应,实现水肥资源同步高效利用,可达到既节水又增产的双重目标,能确保烟叶生长发育良好、落黄成熟正常,提高烟叶品质,增加种烟收入,为烤烟可持续发展打下坚实的基础。

参考文献

- [1] 李才华. 新田烤烟生产关键施肥技术研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2011.
- [2] 刘毅, 申昌优, 肖先仪, 等. 水肥耦合对旱地烟生长、产量、品质及肥料利用率的影响[J]. 江西农业学报, 2012(6): 100-102.
- [3] 杨军. 膜下滴灌对不同施肥烤烟生长及品质的影响[D]. 长沙:湖南农业大学, 2010.
- [4] 石俊雄. 基追肥比例和施肥方法对烤烟产质量的影响[J]. 贵州农业科学, 2002(S1): 19-22.
- [5] 谢云波, 冯文强, 曾祥忠. 烤烟的养分需求规律及施肥技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010(21): 1115-1119.
- [6] 孙敬权, 唐经祥, 薛明德. 皖北烟区烤烟施肥技术改进研究[J]. 安徽农业技术师范学院学报, 1998(2): 13-15.
- [7] OGATA K, NISHIKAWA H, OHSUGI M. A yeast capable of utilizing ethanol[J]. Agric Biol Chem, 1969, 33: 1519-1520.
- [8] KLEI I J, HARDER W, VEENHUIS M. Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeast[J]. Yeast, 1991, 7(3): 195-209.
- [9] QIN X, QIAN J, YAO G, et al. GAP promoter library for finetuning of gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77: 3600-3608.
- [10] MCISAAC R S, GIBNEY P A, CHANDRAN S S, et al. Synthetic biology tools for programming gene expression without nutritional perturbations in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42: 48.
- [11] VOGL T, GLIEDER A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production [J]. New Biotechnol, 2013, 30(4): 385-404.
- [12] AW R, POLIZZI K M. Can too many copies spoil the broth [J]. Microb Cell Fact, 2013, 12: 128.
- [13] HOU J, TYO K E, LIU Z, et al. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Yeast Res, 2012, 12: 491-510.
- [14] PATIL C, WALTER P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: The unfolded protein response in yeast and mammals [J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13: 349-355.
- [15] HOU J, TYO K, LIU Z, et al. Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metab Eng, 2012, 14(2): 120-127.
- [16] MARCO A, MARCO V D. Bacteria cotransformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning [J]. Biotechnol, 2004, 109(1): 45.
- [17] DEUERLING E, SCHULZE SPECHING A, TOMOYASU T, et al. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins [J]. Nature, 1999, 400: 693.
- [18] VALENZUELA P, MEDINA R. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast [J]. Nature, 1982, 298: 347-350.
- [19] 马银鹏, 王玉文, 党阿丽, 等. 毕赤酵母表达系统研究进展[J]. 黑龙江科学, 2013(9): 27-31.
- [20] 董清华, 沈元月. 酵母表达系统研究进展与展望[J]. 北京农学院学报, 2008, 23(2): 72-75.
- [21] 唐香山, 张学文. 酿酒酵母表达系统[J]. 生命科学研究, 2004(2): 106-107.
- [22] BUSSINEAR C M, SHUSTER J A. Genetic stability for protein expression systems in yeast [J]. Dev Bio Stand, 1994, 83: 13-19.
- [23] 张云鹏, 温彤, 姜伟. 大肠杆菌和酵母表达系统的研究进展[J]. 生物技术进展, 2014, 6(4): 389-393.
- [24] COFFEY A, BARRELL B C, BUSSEY H, et al. Life with 6000 genes [J]. Science, 1996, 274(5287): 563-567.
- [25] 王卓华, 叶凯, 徐洪, 等. 庚型肝炎病毒 E2 区 cDNA 在毕赤酵母中的表达及抗原性鉴定[J]. 生物工程学报, 2002, 18(2): 187-191.
- [26] CREGG J M, CEREGINO J L, SHI J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Molecular biotechnology, 2000, 16: 23-52.

(上接第 6 页)