

韩志霞,马金玉,王雪云,等. 鸡源志贺菌 *IpaC* 基因表达载体的构建及其在毕赤酵母中的表达[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):39-42.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.009

# 鸡源志贺菌 *IpaC* 基因表达载体的构建 及其在毕赤酵母中的表达

韩志霞,马金玉,王雪云,蒋大伟,刘芳,许兰菊,李克宇

(河南农业大学牧医工程学院,河南郑州 450002)

**摘要:**为使 *IpaC* 基因表达产物保持天然的生物学活性,实现在酵母表达系统中高效表达,本研究在不改变 *IpaC* 蛋白氨基酸序列的情况下,根据酵母密码子偏爱性优化合成 *IpaC*#基因,分别构建真核表达载体 pGAPZ $\alpha$ A - *IpaC* 和 pGAPZ $\alpha$ A - *IpaC*#,然后将线性化重组质粒电转化至毕赤酵母 X-33 中,对阳性转化子用 SDS-PAGE 及 Western blot 检测其表达产物。结果表明,经 SDS-PAGE 及 Western blot 检测,仅在 pGAPZ $\alpha$ A - *IpaC*#/X-33 重组菌表达产物菌体沉淀中检测到大小为 70 ku 的目的蛋白,实现了鸡源志贺菌 *IpaC*# 基因在毕赤酵母中的胞内表达,从而验证毕赤酵母表达系统与外源基因序列的相关性,为进一步提高鸡源志贺菌 *IpaC* 基因在毕赤酵母中的高效表达提供科学依据,对研究该病的发病机制具有重要意义。

**关键词:**鸡源志贺菌;*IpaC* 基因;毕赤酵母;优化密码子;pGAPZ $\alpha$ A;真核表达

**中图分类号:**Q786;S852.61 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0039-04

志贺菌可以感染多种物种,不仅是人,志贺菌还可以引起猪、鼠、狐狸、兔、牛等多种动物痢疾,其中以幼年动物患病率最高,严重的会导致死亡<sup>[1]</sup>。在志贺菌侵袭肠道过程中,毒力大质粒上Ⅲ型分泌系统分泌的 *IpaC* 蛋白通过介导细胞骨架重排而使志贺菌趁机侵入肠上皮细胞,而且只有重组纯化的 *IpaC* 蛋白才能够在一定程度上恢复志贺菌的侵袭能力<sup>[2]</sup>。在分子水平上,*IpaC* 蛋白不同结构域具有不同生物学功能<sup>[3-5]</sup>。志贺菌对人的侵袭感染机制的研究比较深入。鸡源志贺菌拥有与人源菌株相同的 *IpaC* 蛋白分子<sup>[6-8]</sup>,但是至今尚不清楚鸡肠上皮细胞是否存在与人肠上皮细胞相似的 *IpaC* 蛋白受体分子。目前,鸡源志贺菌 *IpaC* 基因的克隆表达在原核表达系统表达技术已经比较成熟<sup>[9-11]</sup>,但目前国内外在毕赤酵母表达系统中的研究较少。因此,为使 *IpaC* 基因表达产物保持天然的生物学活性,为研究鸡肠上皮细胞上的 *IpaC* 蛋白受体分子提供研究基础,本研究通过根据酵母表达系统对密码子的偏爱性,对鸡源志贺菌 *IpaC* 基因进行优化合成,分别构建真核表达载体 pGAPZ $\alpha$ A - *IpaC* 和 pGAPZ $\alpha$ A - *IpaC*#,使 *IpaC* 和 *IpaC*#整合到酵母染色体中,从而验证毕赤酵母表达系统与外源基因序列的相关性,为进一步提高鸡源志贺菌 *IpaC* 基因在毕赤酵母中的高效表达提供科学依据,对研究该病的发病机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

收稿日期:2016-02-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:31272568)。

作者简介:韩志霞(1989—),女,河南商丘人,硕士研究生,主要从事兽医微生物学及免疫学研究。E-mail:zhixiahan2@126.com。

通信作者:许兰菊,硕士研究生,主要从事兽医微生物及免疫学研究。  
E-mail:xulanju11@126.com。

### 1.1 菌株及载体

原核重组载体 pET32a - *IpaC*/BL21 为河南农业大学牧医工程学院微生物学实验室构建保存;酵母真核载体 pGAPZ $\alpha$ A 由河南农业大学尹清强教授惠赠;宿主菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10 购自上海北诺生物技术有限公司;毕赤酵母菌株 X-33 为河南科技大学张春杰教授惠赠。

### 1.2 酶与试剂

rTaq DNA 聚合酶、DL2000、DL5000 均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;限制性内切酶 *Eco*R I、*Xba* I 均购自 Fermentas 公司(美国);T<sub>4</sub> 连接酶购自于 New England Biolabs(英国)公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒及质粒 DNA 小量提取试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 引物合成和重组质粒的测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。蛋白胨、酵母膏、Agar power 均购自 OXIOD 公司;琼脂糖凝胶购自 GENVIEW 公司;Zeocin<sup>TM</sup> 购自 invitrogen 公司;鼠源 6-His 单克隆抗体(Anti-His Tag Mouse Monoclonal Antibody),购自美国 Abbkine 试剂公司;羊抗小鼠 IgG-HRP,购自索莱宝公司;*IpaC* 蛋白免疫血清及鸡源志贺菌灭活疫苗免疫血清均由笔者实验室制备并保存。

### 1.3 *IpaC*#基因序列的合成

根据酵母密码子偏爱性,在不改变氨基酸序列的情况下,对 *IpaC* 基因原序列进行优化,由北京英茂盛业生物科技有限公司合成,并将基因序列克隆到 pUCE 载体上,命名为 pUCE - *IpaC*#。

### 1.4 引物设计与合成

根据鸡源志贺菌 *IpaC* 基因与 *IpaC*#基因全序列及毕赤酵母表达载体 pGAPZ $\alpha$ A 多克隆位点序列分别设计 1 对引物 P1、P2 和 P3、P4,上游引物加上 *Eco*R I、下游引物加上 *Xba* I 这 2 个酶切位点(斜体加粗为酶切位点),并根据载体

pGAPZ $\alpha$ A 序列设计检测引物 P5、P6,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,已经进行特异性检测。序列如下:P1,5′-CGGAATTCATGGAAATTCAAAACACAAAACCAACCCAGATTTTATATACAGATA-3′;P2,5′-GCTCTAGAGCAGCTCGAATGTTACCAGCAATCTGACTGGCTGTCGAGTTCTTTGAT-3′;P3,5′-CGGAATTCATGGAAATTCAGAACACCAAGCCTACACAAATCTTGACTACTGATA-3′;P4,5′-GCTCTAGAGCAGCTCTAATGTTTCCAGCAATTTGAGAGGCTGTAGAGTTTITAGAC-3′;P5( $\alpha$ -Factor sequencing primer),5′-TACTATTGCCAGCAATGCTGC-3′;P6(3′ AOX1 sequencing primer),5′-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3′。

### 1.5 重组载体构建

分别以 pET32a-IpaC 和 pUCE-IpaC#为模板进行 PCR 扩增,将扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并切下目的条带,用普通琼脂糖凝胶试剂盒回收目的片段。回收产物和质粒 pGAPZ $\alpha$ A 用 EcoR I 和 Xba I 限制性内切酶同时进行双酶切并经过琼脂糖凝胶电泳检测正确后,分别将 IpaC 和 IpaC#基因双酶切产物与载体 pGAPZ $\alpha$ A 双酶切产物在 T<sub>4</sub> 连接酶的作用下 16 ℃ 连接过夜。将连接产物转化至感受态大肠杆菌 TOP10,在含 Zeocin<sup>TM</sup> 抗性平板上进行筛选。挑取阳性单克隆,经菌液 PCR、质粒双酶切鉴定和序列分析。获得的重组质粒命名为 pGAPZ $\alpha$ A-IpaC、pGAPZ $\alpha$ A-IpaC#。

### 1.6 重组质粒转化酵母宿主菌 X-33

大量提取质粒 pGAPZ $\alpha$ A-IpaC 和 pGAPZ $\alpha$ A-IpaC#,用限制性内切酶 Avr II 进行单酶切线性化,电泳后用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收,分别电转化至酵母菌 X-33 感受态细胞中,电转条件为:1.6 kV,25  $\mu$ F,400  $\Omega$ ,电击时间 4.3 ms。电击完毕后,马上将 1 mL 冰预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液加入菌体中,吹打混匀,转至 1.5 mL EP 管中,30 ℃ 静置培养 1~2 h。取 100  $\mu$ L 菌体悬液涂布于含有抗生素 Zeocin 浓度为 100  $\mu$ g/mL 的 YPD 固体培养基上,待菌液完全吸收后,将平板置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 1~3 d,直至单菌落出现,同时电转空质粒 pGAPZ $\alpha$ A 作对照。

### 1.7 高抗筛选

挑取在 Zeocin<sup>TM</sup> 浓度为 100  $\mu$ g/mL 平板上的单菌落,分别刺种在 Zeocin<sup>TM</sup> 浓度为 500、1 000、2 000  $\mu$ g/mL 的 YPD 平板上,置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 2~3 d,直至有单菌落出现。将高抗性阳性克隆接种于 Zeocin 浓度为 100  $\mu$ g/mL 的 YPD 平板上培养 2~3 d,直至有单菌落出现。将高抗阳性转化子按照酵母基因组 DNA 小量提取试剂盒说明书操作提取酵母基因组 DNA,利用检测引物 P5、P6 进行 PCR 扩增,并将 PCR 扩增产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.8 重组毕赤酵母表达产物检测

挑取鉴定正确的重组酵母单菌落接种于液体 YPD 培养基中,于 30 ℃、250 r/min 下振荡培养过夜。次日,取 0.2 mL 过夜培养物接种于 100 mL 液体 YPD 培养基中,于 30 ℃、250 r/min 下振荡培养。分别在 0、24、32、48、60、72、84、96、108、120、144 h 的各个时间点收集上清和细胞样品 10 mL,用于 SDS-PAGE 及 Western blot 分析,同时设立 pGAPZ $\alpha$ A/X-33 表达为对照组。将各个不同时间点收集的菌液在 4 ℃ 离

心机中,于 5 000 r/min 下离心 5 min,分别取菌体沉淀和上清。沉淀转移至无菌的 EP 管中。将收集的培养基上清用超滤法浓缩后进行 SDS 及 Western blot 检测。Western blot 分别用 His 单抗、IpaC 蛋白免疫血清及鸡源志贺菌灭活疫苗免疫血清进行特异性检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 合成的 IpaC#基因序列

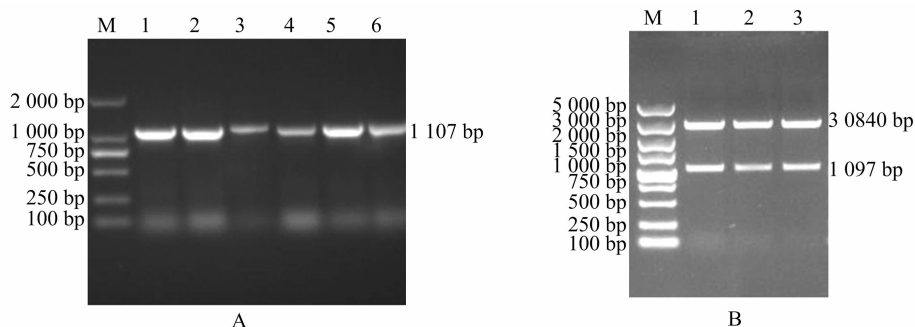
优化后的 IpaC#基因序列如下所示(斜体加粗为酶切位点):**GAATTC**ATGGAAATTCAGAACACCAAGCCTACACAAATCTTGACTACTGATATTTCTACTAAGCAAACCTCAATCTTCTTCTGAACTCAGAAATCTCAAAACTATCAGCAGATTGCTGCCCCACATCCCATTGAACGTTGGTAAAAATCCTGTTTGTACTACTACTTTGAACGACGATCAGTTGTTGAAGTTGTCTGAGCAAGTTCAGCACGATTCTGAGATTATCGCTAGATTGACTGATAAAAAGATGAGGACTTGTCTGAAATGTCTCATACCTTGACTCCAGAGAACACTTTGGACATCTCTTCTTTGTCTTCTAACGCTGTCTCTTTGATCATTTCTGTGCACTCTTGTGTTCTGCAATTGAGAACAGCTGAAACCAAGTTGGGATCTCAATTGTCTTTGATTGCATTTGACGCAACAAAGTCTGCCGCAGAAAAATTGTTAGACAGGGTTTGGCCGCTTGCTCTTCTTCTATCACTGGAGCTGTTACTCAGGTTGGTATTACAGGAATTGGTGCTAAGAAAACTCATTCTGGAATCTCTGACC AAAAGGGTGCTTTGAGAAAAAACTTGGCTACTGCACAATCTTTGGAGAAAGAGTTGGCCGGTTCTAAATTTGGGTTTGAACAAGCAAATCGATACAAACATCACTTCTCTCAAACCTAACTCTTCTACAAAATCTTGGGAAAGAACAAATTTGGCACCTGACAACATTTCTTTGTCTACAGAACATAAAACATCTTTGTCTTCTCCAGACATTCCTTTGCAGGATAAGATCGACACTCAGAGAAGAACTTACGAA TTGAATACATTGTCTGCCCAGCAAAAACAGAATATTGGTAGAGCTACCATGGAGACTTCTGCAGTTGCTGGTAATATCTCTACTTCTGGTGGTAGATACGCCTCTGCTTTGGAAGAGGAAGAACAGTTGATCTCTCAGGCATCTTCTAAGCAGGCTGAAGAGGCTTCTCAGGTCTCTAAGGAAGCATCTCAAGCTACTAACCAATTGATTCAAAAATGTTGAACATCATCGATTCTATTAAACAGTCTAAAAA CTCTACAGCCTCTCAAATTGCTGGAAACATTAGAGCTTT**TCTA GA**。

### 2.2 重组载体的鉴定结果

挑取转化后平板上的单菌落过夜培养,各取 1  $\mu$ L 作模板进行 PCR 扩增,结果显示,电泳出现 1 条约 1 107 bp 的特异性条带,与目的基因片段大小一致(图 1-A)。提取的质粒 pGAPZ $\alpha$ A-IpaC#和 pGAPZ $\alpha$ A-IpaC 经 EcoR I 和 Xba I 双酶切电泳出现 2 条带,其中 1 条条带为载体质粒,约 3 084 bp,另 1 条条带片段长约 1 097 bp,酶切结果与预期结果相一致(图 1-B)。对重组质粒测序结果分析,结果表明 IpaC 基因及 IpaC#基因均位于 pGAPZ $\alpha$ A 质粒  $\alpha$  因子信号肽序列下游,具有正确的阅读框。

### 2.3 高抗性阳性转化子的鉴定

以转化有线性化的重组质粒 pGAPZ $\alpha$ A-IpaC 和 pGAPZ $\alpha$ A-IpaC#的酵母基因组为模板,以  $\alpha$ -Factor sequencing primer 和 3′ AOX1 sequencing primer 为引物进行 PCR,若线性化的含目的基因的重组质粒与酵母成功重组则应扩增出



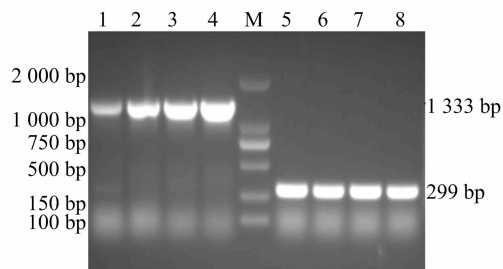
A: M—DL2000; 1~3—重组质粒 pGAPZαA-IpaC 菌落 PCR 产物; 4~6—重组质粒 pGAPZαA-IpaC# 菌落 PCR 产物;  
 B: M—marker V; 1~2—重组质粒 pGAPZαA-IpaC 双酶切鉴定结果; 3—重组质粒 pGAPZαA-IpaC# 双酶切鉴定结果

图1 重组质粒菌落 PCR 和双酶切电泳图谱

长度为 1 333 bp 的片段,线性化的质粒 pGAPZαA 与酵母成功重组则应扩增出长度为 299 bp 的小片段,pGAPZαA-IpaC 为阳性对照。经 1% 琼脂糖凝胶检测,结果(图 2)与预期一致,PCR 产物经测序,线性化的重组质粒已经成功整合到酵母基因组中。

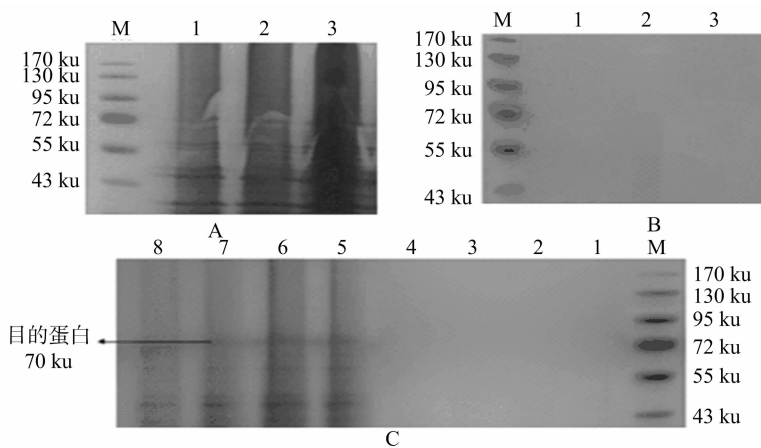
#### 2.4 重组酵母表达产物 SDS-PAGE 电泳结果

分别挑取 pGAPZαA-IpaC/X-33 和 pGAPZαA-IpaC#/X-33 阳性酵母菌培养表达,不同时间取的样品中上清和菌体沉淀进行 SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色,与空载体对照菌比较(图 3),各个时间点取得样品中,培养基上清中均没有条带,pGAPZαA-IpaC#/X-33 重组菌体沉淀中有微弱的目的蛋白条带。



M—DL2000; 1~2—pGAPZαA-IpaC 酵母基因组的 PCR; 3~4—pGAPZαA-IpaC# 酵母基因组的 PCR; 5~8—pGAPZαA 酵母基因组 PCR 结果

图2 重组酵母基因组的 PCR 结果



A: M—蛋白质marker; 1—pGAPZαA/X-33 全菌; 2~3—pGAPZαA-IpaC/X-33 72、96 h 全菌体;  
 B: M—蛋白质marker; 1—pGAPZαA/X-33 上清; 2~3—pGAPZαA-IpaC/X-33 在 72、96 h 表达上清;  
 C: M—蛋白质marker; 1—pGAPZαA/X-33 上清; 2~4—pGAPZαA-IpaC#/X-33 在 108、96、72 h 上清; 5~7—pGAPZαA-IpaC#/X-33 在 108、96、72 h 全菌体; 8—pGAPZαA/X-33 全菌体

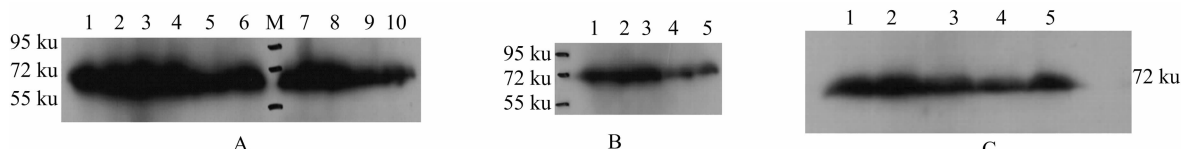
图3 SDS-PAGE 分析结果

#### 2.5 Western blot 的检测结果

将 24、32、48、60、72、84、96、108、120、144 h 取得的 pGAPZαA-IpaC#/X-33 菌体沉淀样品用带 His 单抗作 Western blot 检测,结果如图 4-A 所示,菌体沉淀中蛋白大小位置与预期一致,在 108 h 时表达量最高。将 84、96、108、120、144 h 取得的样品用 IpaC 蛋白免疫后血清抗体作 Western blot 检测,结果如图 4-B 所示,蛋白大小位置与预期一致。将 84、96、108、120、144 h 取得的样品用志贺菌全菌体疫苗免疫的血清抗体作 Western blot 检测,结果如图 4-C 所示,蛋白大小位置与预期一致。

#### 3 结论与讨论

真核表达系统克服了原核表达系统持续表达可能会对宿主细胞产生毒害作用,过量表达可能导致非生理反应,目的蛋白常以包涵体形式表达,导致产物纯化困难的缺点,而真核表达系统能诱导基因的高效表达,可达  $10^5$  倍,为其他系统所不及,可以严格调控基因表达,人为地调控基因表达量。因此,利用真核表达系统来表达目的蛋白越来越受到重视。目前,基因工程研究中常用的真核表达系统有酵母表达系统、昆虫细胞表达系统和哺乳动物细胞表达系统。



A: 1~10—144、120、108、96、84、72、60、48、24 h 的重组菌体蛋白与 His 标签抗体反应结果;

B: 1~5—144、120、108、96、84 h 的重组菌体蛋白与 IpaC 蛋白免疫抗体血清反应结果;

C: 144、120、108、96、84 h 的重组菌体蛋白与全菌疫苗免疫抗体血清反应结果

图4 IpaC 蛋白的 Western blot 分析结果

毕赤酵母表达系统可使外源对蛋白进行加工修饰,使得表达的外源蛋白具有类似天然蛋白质的构象<sup>[12]</sup>。而本研究选择的真核表达载体 pGAPZαA 以 GAP 为启动子,在表达过程中不须要添加甲醇,操作更为简单,其含有 α 信号因子,利用该信号因子可将目的蛋白分泌到培养基中获得纯度较高的蛋白<sup>[13-14]</sup>。

影响外源基因在毕赤酵母中表达量的因素很多,其中外源基因自身的特点是影响表达量的重要因素,包括密码子使用情况、GC 含量等。国内外很多研究通过将外源基因的密码子进行优化,使外源基因的密码子使用频率符合毕赤酵母的密码子偏好性的要求,取得很好的效果<sup>[15-18]</sup>。本研究通过对 IpaC 基因的分析发现,该基因中含有毕赤酵母的稀有密码子,基于这种情况,本研究根据毕赤酵母的密码子偏好性,对鸡源志贺氏菌来源的 IpaC 基因进行优化改造,在不改变其氨基酸序列的基础上,选择毕赤酵母偏爱型的密码子,并调整基因的 GC 含量,使其更加符合毕赤酵母的要求。优化后的 IpaC#基因与原始 IpaC 基因序列相比,共改变了 269 个碱基,涉及 207 个氨基酸,GC 含量由原来的 38.83% 变为 40.02%,而在毕赤酵母中 GC 含量一般为 40%~42%,优化合成的目的基因 GC 含量与毕赤酵母相符。

本研究分别构建了真核表达载体 pGAPZαA - IpaC 和 pGAPZαA - IpaC#,重组菌的表达产物经 SDS - PAGE 及 Western blot 检测,在 pGAPZαA - IpaC 重组菌体沉淀和表达上清中均没有检测到目的蛋白,而在 pGAPZαA - IpaC#重组菌体沉淀中检测到目的蛋白大小约为 70 ku,这进一步验证了毕赤酵母真核表达系统与外源基因本身有关<sup>[19-20]</sup>。而在 pGAPZαA - IpaC#重组菌表达培养基上清中并未检测到目的蛋白,有可能是因为 IpaC 蛋白本身具有膜结合区,在分泌过程中与酵母细胞发生结合,也有可能是 α 信号肽与 IpaC 基因在一定程度上不匹配,为后期进一步研究 IpaC 蛋白在毕赤酵母中的高效表达奠定基础。在后续试验中,更换信号肽序列或者优化信号肽序列密码子可能使 IpaC 蛋白高效分泌表达。

#### 参考文献:

- [1] 许兰菊,王川庆,胡政政,等. 鸡志贺氏菌在我国的发现及其病原特性研究[J]. 中国预防兽医学报,2004,26(4):281-286.
- [2] Terry C M, Picking W L, Birket S E, et al. The C-terminus of IpaC is required for effector activities related to *Shigella* invasion of host cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2008, 45(4):282-289.
- [3] Shaikh N, Terajima J, Watanabe H. IpaC of *Shigella* binds to the C-terminal domain of β-catenin[J]. Microbial Pathogenesis, 2003, 35(3):107-117.
- [4] Bärzu S, Benjelloun - Touimi Z, Phalipon A, et al. Functional analy-

- sis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis [J]. Infection and immunity, 1997, 65(5):1599-1605.
- [5] Kim S, Kim J, Seo G. Iron oxide nanoparticle - impregnated powder - activated carbon (IpaC) for NOM removal in MF membrane water treatment system[J]. Desalination and Water Treatment, 2013, 51(31/32/33):6392-6400.
- [6] 刘红英. 人志贺菌对雏鸡的致病性及人、鸡志贺菌某些重要基因的比较研究[D]. 郑州:河南农业大学,2008.
- [7] 杨霞,陈陆,许兰菊,等. 鸡源鲍氏志贺菌 hn03 株的分子鉴定与演化分析[J]. 畜牧兽医学报,2009,40(3):402-408.
- [8] 杨霞. 利用分子遗传标记技术对鸡鲍氏志贺菌的鉴定和菌株起源研究[D]. 郑州:河南农业大学,2007.
- [9] 苗根萍,蒋大伟,许兰菊,等. 鸡源志贺菌 IpaC 基因的克隆及原核表达[J]. 中国兽医学报,2013,33(9):1352-1357.
- [10] 陈志宝,宋博翠. 弗氏志贺菌侵袭性基因 IpaC 诱饵质粒的构建及其自激活作用[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(6):590-593.
- [11] 孙素霞,王红,王勇,等. 福氏志贺氏菌毒力基因 IpaC 在大肠杆菌中表达的初步研究[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,19(6):29-31.
- [12] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12):5301-5317.
- [13] Borgheresi R A M B, Palma M S, Ducancel F, et al. Expression and processing of recombinant sarafotoxins precursor in *Pichia pastoris* [J]. Toxicon, 2001, 39(8):1211-1218.
- [14] Li J W, Liu Y, Li K, et al. Cloning of a fusion gene containing hGM - CSF gene and gene encoding L protein of HBV and expression in *Pichia pastoris* [J]. Hepato - Gastroenterology, 2009, 57(99/100):578-582.
- [15] Scorer C A, Buckholz R G, Clare J J, et al. The intracellular production and secretion of HIV - 1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Gene, 1993, 136(1/2):111-119.
- [16] 姚斌,张春义,王建华. 高效表达具有生物活性植酸酶的毕赤酵母[J]. 中国科学 C 辑, 1998, 28(3):237-243.
- [17] 陈惠,赵海霞,王红宁,等. 植酸酶基因中稀有密码子的改造提高其在毕赤酵母中的表达量[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(2):171-175.
- [18] Chang S W, Shieh C J, Lee G C, et al. Multiple mutagenesis of the *Candida rugosa* LIPI gene and optimum production of recombinant LIPI expressed in *Pichia pastoris* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(2):215-224.
- [19] 陈熙,陈毓,齐小雨,等. 人溶菌酶定点突变基因在毕赤酵母中的表达及活性分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(6):1396-1401.
- [20] 董亚青,朱文斗,王琳琳,等. 鸡 α - 干扰素在毕赤酵母中的表达及其表达条件优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11):275-277.