

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.01.006

mSDF-1 γ /GM-CSF 融合蛋白的制备及其对辐射小鼠造血损伤恢复的促进

徐斌¹, 居小萍^{2*}, 经纬¹, 陈樱²(第二军医大学第一附属医院 1. 普外科; 2. 放疗科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 利用毕赤酵母表达系统表达 mSDF-1 γ /GM-CSF 融合蛋白, 研究该融合蛋白对辐射小鼠的促进增殖作用和免疫增强作用。方法: 化学合成 mSDF-1 γ /GM-CSF 基因, 构建携带该基因的表达载体, 转化酵母后分泌表达重组融合蛋白, 离子交换柱纯化, SDS-PAGE 和 Western blotting 分析鉴定。⁶⁰Co γ 射线照射制备小鼠辐射模型, 以融合蛋白皮下注射进行治疗, 观察辐射小鼠骨髓造血细胞的增殖活性及免疫细胞的趋化活性。结果: 成功构建表达载体 pPIC9K-SDF1-rh-GM-CSF1, 转化毕赤酵母菌株 GS115 后表达融合蛋白 mSDF-1 γ /GM-CSF, 其相对分子质量为 32 000, 含量为 78 ng/ml。融合蛋白治疗后, 辐射小鼠骨髓单个核细胞增殖活性、GM-CFU 形成能力明显提高(均 $P < 0.01$)、骨髓细胞凋亡率非常明显地降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 小鼠外周血 CD3⁺CD4⁺T 细胞数显著高于辐射组和 GM-CSF 治疗组(均 $P < 0.05$)。结论: mSDF-1 γ /GM-CSF 融合蛋白具有促进造血和免疫细胞增殖的双重活性, 有望在抗肿瘤免疫和造血调控中开发成为有应用前景的新型细胞因子。

[关键词] 融合蛋白; SDF-1; GM-CSF; 辐射损伤; 造血; 肿瘤免疫

[中图分类号] R730.54; R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)01-024-05

Expression of mSDF-1 γ /GM-CSF fusion protein and its protective effect on radiotherapy-induced hematopoiesis damages

XU Bin¹, JU Xiao-ping^{2*}, JING Wei¹, CHEN Ying²(1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Radiotherapy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To express mSDF-1 γ /GM-CSF fusion protein in the *Pichia pastoris* expression system and investigate its *in vivo* promoting effects on hematopoiesis function and immune function. **Methods:** The mSDF-1 γ /GM-CSF fusion gene was chemically synthesized and was cloned into *pichia* expression vector; the vector was then transfected into *Pichia pastoris* expression system. Then the expressed products were detected by SDS-PAGE, Western blotting and purified by ion exchange columns. Rat irradiation model was established by ⁶⁰Co γ ray and were subcutaneously injected with the fusion protein. The hematopoietic and chemotactic activities of the fusion protein were investigated *in vivo*. **Results:** The expression vector pPIC9K-SDF1-L-GM-CSF was successfully constructed, and mSDF-1 γ /GM-CSF fusion protein was successfully expressed by *Pichia pastoris* strain GS115. The molecular weight of the protein was about 32000 D, with a concentration of 78 ng/ml. The numbers of bone marrow mononuclear cells and GM-CFU were significantly increased in rats after subcutaneous injection of the fusion protein ($P < 0.01$). The apoptotic rate of bone marrow cells was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the numbers of CD3⁺CD4⁺T lymphocytes in the peripheral blood were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The mSDF-1 γ /GM-CSF fusion protein can improve the hematopoietic function and immune function in irradiated rats, which might be a promising cytokine for regulating hematopoiesis and anti-tumor immune response.

[Key words] fusion protein; SDF-1; GM-CSF; irradiation damage; hematopoiesis; tumor immunity

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 24-28]

放射治疗是治疗多种恶性肿瘤的有效手段,但是电离辐射会使生物大分子以及细胞的结构和功能受到损伤,造血系统受到辐射后最容易诱发损伤。免疫系统的影响与造血系统的损伤密切相关,如何保护和尽快恢复辐射后患者的造血和免疫功能是放射治疗学需要解决的重要课题^[1-2]。目前常用于造血损伤修复的药物是 GM-CSF、G-CSF,但是其促进

造血增殖的作用维持时间短暂,停药后效果即消失。近年来趋化因子及其受体在造血调控中的作用日益

[基金项目] 上海市自然科学基金资助项目(No. 06ZR14114)。Supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 06ZR14114)

[作者简介] 徐斌(1965-),男,江苏省盐城市人,博士,副教授,主要从事恶性肿瘤的临床和基础研究。E-mail: xubin@smmu.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: jxphorse@yahoo.com.cn

引起人们的关注。在众多的趋化因子及其受体中,基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)对造血功能的调节显得最为突出^[3,4]。SDF-1可与多种造血生长因子协同,促进髓系、巨核系造血前体细胞的增殖与分化^[5,6]。本课题利用基因工程技术制备新型细胞因子 mSDF-1 γ /GM-CS 融合蛋白,初步研究了该融合蛋白在体内的促造血增殖作用和免疫增强作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和主要试剂

毕赤酵母表达质粒 pPIC9K、表达菌株 GS115 购自 Invitrogen 公司,质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,限制性内切酶购于 Takara 公司,T4 DNA 连接酶为 MBI 公司产品,SDF-1 单抗、鼠抗、兔抗鼠购自 Milipore 公司。实验动物为昆明种小鼠,雌性,体重 20~24 g,由第二军医大学实验动物中心提供,合格证号:SYXK(沪)2007-0003。

1.2 mSDF-1 γ /GM-CS 融合基因的合成与载体构建

融合基因委托 invitrogen 公司合成,在 mSDF-1 基因和 GM-CSF 基因之间加上连接肽(Gly4Ser)合成融合基因 mSDF-1-L-GM-CSF,全长为 834 bp。合成的融合基因的两侧分别带有 Xho I 和 EcoR I 酶切位点,对 pPIC9K 载体进行了改造,然后用 Xho I 和 EcoR I 双酶切处理,用 T4 DNA Ligase 连接载体和融合基因,构建 pPIC9K-SDF1-rhGM-CSF1 重组质粒。

1.3 pPIC9K-SDF1-GM-CSF1 亚克隆转化酵母菌株 GS115

采用质粒提取试剂盒大量抽提 pPIC9K 及 pPIC9K-SDF1-GM-CSF1 质粒 DNA,各取 10 g DNA 用 Sal I 酶切处理使质粒线性化,用电转法转化 GS115 感受态细胞。电转仪为 Bio-Rad 公司产品,电转条件:电压 1.5 kV,电容 25 μ F,电阻 200 Ω ,电击时间为 3.8~5 ms。将转化产物涂布于缺乏组氨酸的 RDB 营养缺陷平板,3~4 d 后可见重组克隆长出。

1.4 毕赤酵母表达菌株的筛选和条件优化

挑取 48 个长势较好的酵母转化菌落进行小规模发酵,用 Dot blotting 方法进行初步筛选;高拷贝重组子煮菌 PCR 验证;将上述筛选出有表达的酵母转化子菌株进行放大诱导表达实验。用 SDS-PAGE 和 Western blotting 法筛选高水平表达菌株,鉴定融合蛋白的表达。

1.5 mSDF-1 γ /GM-CS 融合蛋白的纯化

浓缩培养上清,取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀处理的上清离心 800 \times g 30 min,弃上清,以 50 mmol/Tris-HCl,1

mmol/L EDTA (pH 8.0) 缓冲液溶解沉淀。置入透析袋中,对 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液室温透析 4 h;阴离子层析:层析柱为 Hiprep 16/10 Source 30Q 柱,样品为透析后复溶沉淀,以 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液平衡,洗脱液 B 为 50 mmol/L Tris-HCl NaCl pH 8.0,洗脱方法为 0~40% B 30 min,40%~100% B 10 min,5 ml/min。纯化产品的 Western blotting 鉴定,采用 Lowery 法测定纯化产品的蛋白浓度。

1.6 辐照小鼠治疗实验

昆明种健康雌性小鼠,随机分为 4 组:A 为正常对照组,B 为辐射模型组,C 为 GM-CSF 治疗组,D 为 mSDF-1 γ /GM-CS 融合蛋白治疗组。每组 15 只小鼠。给一次性⁶⁰Co γ 射线照射,照射剂量为 6 Gy,吸收剂量率为 0.56 Gy/min。A 和 B 两组均予以皮下注射生理盐水 0.2 ml/每只,1 次/d 共 14 d;C 和 D 组皮下注射相应制剂 1 次/d,时间共 14 d,GM-CSF 注射剂量为 1 g/kg,mSDF-1 γ /GM-CS 注射剂量为 1 g/每 kg 小鼠。

1.7 治疗小鼠骨髓单核细胞的计数

辐射小鼠到治疗终点时颈椎脱臼处死小鼠,无菌条件下分离出股骨,剪开股骨两头,用含 1% 新生牛血清的 IMDM 培养液冲洗出骨髓细胞,制成骨髓单核细胞悬液,计数骨髓单核细胞数。

1.8 治疗小鼠骨髓 CFU 的计数

辐射小鼠在照后第 14 天被断头处死,取后肢股骨骨髓制成单细胞悬液,进行骨髓有核细胞计数之后,按照唐氏所述的成分比例,配成培养体系充分混匀后,以 1 ml/皿浇入 33 mm 直径的培养皿内,重复 3 皿。浇皿后室温静置片刻即置入 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度的培养箱内培养 10 d,在光镜下计数每皿 GM-CFU 产量。计数标准:由 ≥ 30 个细胞构成的一个细胞团视为一个细胞集落。

1.9 流式细胞术检测治疗小鼠骨髓细胞的凋亡

分离培养骨髓细胞方法如上,至合适细胞量后,固定细胞并用 PI 标记,上流式细胞仪检测。

1.10 治疗小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群检测

到达治疗终点后,取治疗小鼠尾静脉血 200 μ l,加入 CD4 - Cy 单抗 5 μ l,CD8-PE 单抗 5 μ l,CD3-FITC 单抗 5 μ l 混匀,室温下避光 20 min 进行单抗标记,加入 2 ml 溶血素后避光 8 min,PBS 洗涤 2 次,700 \times g 离心 2 min,即上机测定。流式细胞术检测 CD3⁺细胞、CD4⁺细胞、CD8⁺T 细胞比例。

1.11 统计学处理

应用 SPSS 统计软件进行统计学分析,计量资料

以用 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 *mSDF-1 γ /GM-CSF* 融合基因和载体的鉴定结果

融合基因和 pPIC9K 质粒用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示条带大小正确(图1)。

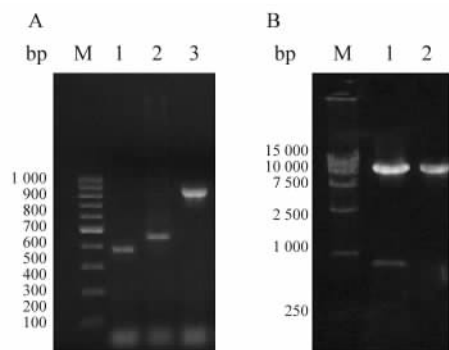


图1 融合基因 *mSDF-1 γ /GM-CSF*(A)和载体(B)的鉴定

Fig.1 Identification of fusion protein *mSDF-1 γ /GM-CSF* (A) and vector(B)

(A) M: Marker; 1: *mSDF-1*; 2: *mGM-CSF*; 3: *mSDF-1 γ /GM-CS*; (B) M: Marker; 1: *pPIC9K-mSDF-1 γ /GM-CS*; 2: *pPIC-9K*

2.2 表达质粒的鉴定结果

煮菌 PCR 鉴定结果表明,目的基因和载体经过双酶切后连接,并转入 top10 连接产物,选取的 14 个菌株 9 个含有目的基因,说明连接成功,挑取其中 4 个菌株进行测序,得到正确的 pPIC9K- *mSDF-1 γ -GM-CSF* 克隆(图2)。

2.3 融合蛋白的鉴定结果

取发酵液上清原液 10 μ l 上样,SDS-PAGE 蛋白电泳完成后,将蛋白转印至 PVDF 膜上,结合一抗(*mSDF-1* 单抗,鼠抗)和 HRP 标记的二抗(兔抗鼠),然后用 immobion western chemiluminescent hrp substrate 显色并显影到胶片上。Western blotting 分析结果显示在相对分子质量 32 000 处呈现目的蛋白,与 *mSDF-1 γ /GM-CS* 融合蛋白理论分子量相符。ELLSA 检测结果表明,培养上清中 GM-CSF 含量为 39 ng/ml,据 GM-CSF 与 *mSDF-1 γ /GM-CS* 融合蛋白的分子量比,计算融合蛋白的含量约为 78 ng/ml。

2.4 融合蛋白的纯化结果

分别取经浓缩、层析纯化的 *mSDF-1 γ /mGM-CSF* 融合蛋白产品行 Western blotting,分别采用抗小鼠 SDF 多克隆抗体和抗鼠 GM-CSF 多克隆抗体

为第一抗体,检测纯化后的融合蛋白(图3),纯化后的蛋白浓度 890.5 μ g/ml。

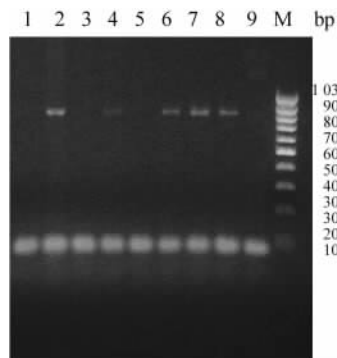


图2 pPIC9K-SDF1 γ /GM-CSF 质粒 PCR 的鉴定结果

Fig. 2 PCR amplification of pPIC9K-SDF1 γ /GM-CSF plasmid

1, 3, 5, 9: Negative clone; 2, 4, 6, 7, 8: Positive clone; M: Marker

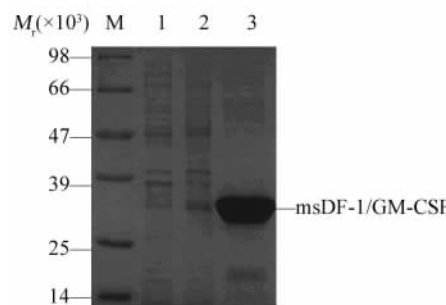


图3 纯化后融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein

M: Marker; 1: Before induction; 2: After induction; 3: After purification

2.5 *mSDF-1 γ /GM-CSF* 对辐射小鼠骨髓单个核细胞增殖的作用

实验小鼠存活情况, A 组为 15 只, B 组为 7 只, C 组为 10 只, D 组为 10 只。每组小鼠骨髓单个核细胞计数分别为: $(36.4 \pm 3.58) \times 10^5$ 、 $(3.9 \pm 0.79) \times 10^5$ 、 $(8.93 \pm 1.76) \times 10^5$ 、 $(9.97 \pm 1.55) \times 10^5$ 。骨髓单个核细胞数 *mSDF-1 γ /GM-CS* 组与 GM-CSF 组差异无统计学意义($P < 0.05$), 明显高于辐射模型组($P < 0.01$)。

2.6 *mSDF-1 γ /GM-CS* 对辐射小鼠 GM-CFU 形成的促进作用

小鼠照射后 14 d 骨髓 GM-CFU 数量为: A 组 (484.67 ± 12.34) /皿, B 组 (77.33 ± 14.01) /皿, C 组 (146.33 ± 24.13) /皿, D 组 (152 ± 29.14) /皿, 统

计学分析表明, mSDF-1 γ /GM-CSF 组的 GM-CFU 与 GM-CSF 组相似 ($P < 0.05$), 明显高于辐射模型组 ($P < 0.01$)。

2.7 mSDF-1 γ /GM-CSF 对辐射小鼠骨髓细胞凋亡的抑制作用

流式细胞分析显示辐射后骨髓凋亡细胞数量明显增加, A 组为 9.74%、B 组为 68.41%、C 组为 20.47%、D 组为 14.26%, mSDF-1 γ /GM-CSF 组凋亡率低于 GM-CSF 组和辐射模型组(图 4)。

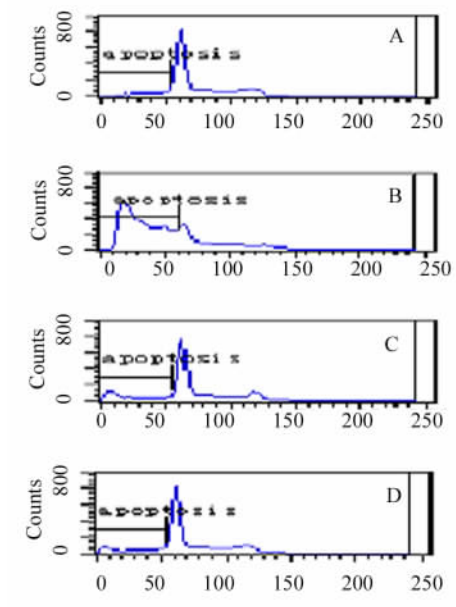


图 4 各组小鼠骨髓细胞凋亡率的比较

Fig. 4 Comparison of apoptosis rate of bone marrow cells in each group

A: Normal group; B: Irradiation group; C: GM-CSF treated group; D: mSDF-1 γ /GM-CSF treated group

2.8 mSDF-1 γ /GM-CSF 对外周血 T 细胞亚群增殖的变化

照射后 14 d mSDF-1 γ /GM-CSF 组 CD3⁺T 细胞为 (51.79 ± 2.52)%、CD4⁺T 细胞为 (48.55 ± 1.61)%、CD8⁺T 细胞为 (4.25 ± 0.74)%, GM-CSF 组 CD3⁺T 细胞为 (48.39 ± 1.31)%、CD4⁺T 细胞为 (38.57 ± 1.34)%、CD8⁺T 细胞为 (4.67 ± 0.38)%。结果表明 CD3⁺、CD4⁺T 在 mSDF-1 γ /GM-CSF 组高于 GM-CSF 组 ($P < 0.05$), CD8⁺T 细胞在两组之间比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

目前临床常应用 GM-CSF 治疗放射治疗后的造血损伤, GM-CSF 是一种能促进骨髓粒系、单核细胞

系、巨噬细胞系发育和成熟, 增加外周血成熟粒细胞、单核细胞功能的一种细胞因子, 主要应用于各种原因引起的白细胞减少症^[7]。我们应用 GM-CSF 治疗放疗患者的造血损伤过程中, 发现其治疗效果不十分满意, 作用维持时间短暂, 大部分患者停药后白细胞即下降, 再次应用疗效不佳。因此寻找新的可以修复造血损伤、同时尽快恢复患者免疫功能的药物十分必要。

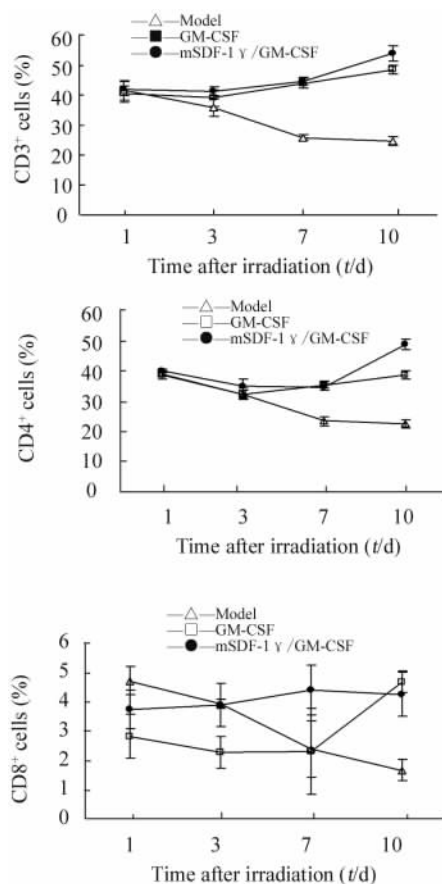


图 5 mSDF-1 γ /GM-CSF 治疗后小鼠 T 细胞亚群的变化

Fig. 5 Changes of T cell subsets in irradiated mice after mSDF-1 γ /GM-CSF treatment

SDF-1 属 CXC 型趋化因子, 同基因编码三种蛋白: SDF-1、SDF-1、SDF-1, SDF-1 对造血干/祖细胞具有刺激增殖、维持存活和抗凋亡作用, 对 T 细胞、前 B 细胞、树突状细胞等都能有效地起到趋化作用^[8-9]。SDF-1 可与多种造血生长因子协同, 促进髓系、巨核系造血前体细胞的增殖与分化^[10-12]。除了诱导 T 细胞趋化外, SDF-1 对 T 细胞也能发挥免疫调控作用, 包括促进增殖和细胞因子分泌, 抑制细胞凋亡等。SDF-1 浓度梯度对 T 细胞体外迁移有双向作用, 较低浓度的 SDF-1 能够产生趋化及抗肿瘤免疫反应。同时, SDF-1 不会诱导肿瘤细胞产生对放

化疗的抵抗作用^[13]。SDF-1 可与多种造血生长因子协同,促进髓系、巨核系造血前体细胞的增殖与分化。本课题采用利用基因工程技术制备具有双重生物学活性的 mSDF-1 γ /GM-CS 融合蛋白,以探讨其对辐射小鼠修复造血和免疫损伤的作用。

应用毕赤酵母进行重组蛋白质的生产已经成为一个颇受人们关注的热点。目前利用毕赤酵母已成功表达了多种有价值的蛋白,显示了其在基因工程疫苗开发中的潜力^[14-15]。我们选用了毕赤酵母表达系统进行了 mSDF-1 γ /GM-CS 融合蛋白的表达,这种新型细胞因子可能会发挥先“定向趋化和聚集”免疫、造血细胞至相关免疫微环境部位,然后再进行“激活和增强”这些免疫、造血细胞的功能,从而更有效的激发免疫反应、调控免疫应答。在毕赤酵母中表达外源蛋白的一大优势还在于:在一些信号肽的协助下,可实现外源蛋白的高水平分泌表达,一般目的蛋白可占有被分泌蛋白的 30% 以上,十分有利于目的蛋白的分离纯化。在本研究中,融合蛋白纯化后纯度达 90% 以上。

本研究进行了辐射小鼠体内实验,研究 mSDF-1 γ /GM-CS 对辐射所致造血和免疫损伤的修复作用。由于骨髓有核细胞量的多少,可以大致反映骨髓的增殖程度,与外周血白细胞计数的呈正相关。因此,在本研究中我们首先观察了骨髓有核细胞数量的变化,发现 mSDF-1 γ /GM-CS 融合蛋白能够使受照射小鼠骨髓有核细胞数量明显地增加,其增加的幅度与对照药物 GM-CSF 相似,说明 mSDF-1 γ /GM-CS 确有保护骨髓有核细胞、减轻放射损伤程度的作用。同时实验结果显示,mSDF-1 γ /GM-CS 治疗组骨髓 GM-CFU 数量高于辐射组,骨髓细胞凋亡数减少。辐射可以明显加速诱导细胞凋亡的发生,辐射导致造血细胞凋亡是引起辐射损伤的一个重要方面,我们推测 mSDF-1 γ /GM-CS 具有保护造血干细胞或刺激造血干细胞内造血祖细胞分化的作用的同时还具有抗骨髓细胞凋亡的作用。T 细胞亚群检测显示 mSDF-1 γ /GM-CS 可以通过促进 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞的增殖修复辐射后的免疫损伤。

总之,本研究构建具有双重生物学活性的新型细胞因子 mSDF-1 γ /GM-CS 融合蛋白,初步研究了其对辐射小鼠损伤的修复作用,提示 mSDF-1 γ /GM-CS 具有保护造血干祖细胞,促进免疫功能恢复的作用,我们还将进一步研究其作用的分子机制,为临床放疗所致造血和免疫损伤提供新的方法和实验数据。

[参 考 文 献]

- [1] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response[J]. *Nature*, 2007, 449(7146): 819-926.
- [2] Herodin F, Drouet M. Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches[J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(10): 1071-1080.
- [3] Mendez-Ferrer S, Frenette PS. Hematopoietic stem cell trafficking: regulated adhesion and attraction to bone marrow microenvironment[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1116: 392-413.
- [4] Broxmeyer HE. Chemokines in hematopoiesis[J]. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15(1): 49-58.
- [5] Mueller SN, Hosiawa-Meagher KA, Konieczny BT, *et al.* Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses[J]. *Science*, 2007, 317(5838): 670-674.
- [6] Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology[J]. *Science*, 2007, 317(5838): 627-629.
- [7] Katsumoto TR, Duda J, Kim A, *et al.* Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and accessory cells modulate radioprotection by purified hematopoietic cells[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(6): 853-858.
- [8] Posevitz-Fejfar A, Smida M, Kliche S, *et al.* A displaced PAG enhances proximal signal and SDF-1-induced T cell migration[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(1): 250-259.
- [9] Guo Y, Hangoc G, Bian H, *et al.* SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(9): 1324-1332.
- [10] Geeraerts T, Deiva K, Mšika I, *et al.* Effects SDF-1 alpha and gp 120IIIb on apoptotic pathways in SK-N-SH neuroblastoma cells [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 339(1-2): 115-120.
- [11] Poznansky MC, Olszak IT, Foxall R, *et al.* Active movement of T cells away from a chemokine[J]. *Nat Med*, 2000, 6(5): 543-548.
- [12] Shi M, Hao S, Su L, *et al.* Vaccine of engineered tumor cells secreting stromal cell-derived factor-1 induces T-cell dependent anti-tumor responses[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, 20(4): 401-409.
- [13] Jankowski K, Kucia M, Wysoczynski M, *et al.* Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7926-7935.
- [14] Ruiz-Ferrer V, Govtia E, Martinez-Gareia B, *et al.* Expression of functionally active helper component protein of Tobacco etch potyvirus in the yeast *Pichia pastoris*[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85 (Pt1): 241-249.
- [15] Morawski B, Lin Z, Cirino P, *et al.* Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*[J]. *Protein Eng*, 2000, 13(5): 377-384.

[收稿日期] 2008 - 10 - 24

[修回日期] 2008 - 12 - 10

[本文编辑] 王莹