

猪 $IFN\alpha$ 基因在毕赤酵母中的高效分泌表达

黄海^{1,2}, 谢蓓^{1,2}, 于瑞嵩^{2,3}, 刘惠莉^{2,3}, 张德福^{2,3},
曹祥荣¹, 李震^{2,3}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097; 2. 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106;

3. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106)

摘要:巴斯德毕赤酵母载体质粒 pPICZ α A 含有强启动子 P_{AOX1} 和 α -MF 信号肽序列, 构建猪 $IFN\alpha$ 基因的重组质粒 pPICZ α A- $IFN\alpha$, 并转入 *E. coli* JM109 中, 得到转猪 $IFN\alpha$ 基因工程菌, 经酶切鉴定克隆到载体 pPICZ α A 上的外源基因即为猪 $IFN\alpha$ 基因。通过电击将经 *Sac* I 酶切后线性化的 pPICZ α A- $IFN\alpha$ 质粒转化到巴斯德毕赤酵母 KM71 中。SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定表达产物的结果表明, 分泌于胞外的猪 $IFN\alpha$ 蛋白分子量比猪 $IFN\alpha$ 理论值分子量稍大, 估计是糖基化的原因。表达的蛋白可发生正确的抗原-抗体反应, 表达量为 0.45 mg/mL。将蛋白表达上清经细胞毒性实验检测表达产物的抗病毒活性为 2.1×10^4 IU/mL。

关键词:猪 $IFN\alpha$; 巴斯德毕赤酵母; 基因重组; 分泌表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)02-0215-06

High Level Secretion Expression of Po $IFN\alpha$ in *Pichia pastoris*

HUANG Hai^{1,2}, XIE Pei^{1,2}, YU Rui-Song^{2,3}, LIU Hui-Li^{2,3}, ZHANG De-Fu^{2,3},
CAO Xiang-Rong¹, LI Zhen^{2,3}

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 2. Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China;

3. Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: The porcine alpha interferon gene was inserted into the *Pichia pastoris* expression vector of pPICZ α A which contains AOX I promoter and α -factor signal sequence. The recombinant plasmid was transformed into host cell *E. coli* JM109 and then was extracted for analysis of restriction enzymes. It was confirmed that heterogeneous gene spliced into vector pPICZ α A was $IFN\alpha$ gene. The recombinant plasmid of pPICZ α A- $IFN\alpha$ was linearized by *Sac* I and transformed into KM71 by electroporation. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that $IFN\alpha$ product was observed in the supernatant with a little larger molecular weight than that of natural $IFN\alpha$. The *rIFN* gene has the same antigenicity as natural one. The expressed *rIFN* accumulated up to about 0.45mg/mL. The cytokine activity of the supernatant was verified by WISH/VSV system, which was about 2.1×10^4 IU/mL.

Key words: Po $IFN\alpha$; *Pichia pastoris*; gene recombination; secretory expression

干扰素作为一种重要的细胞因子, 能够诱导一系列细胞内的蛋白表达, 继而发挥抗病毒、抗细胞增

殖和调节免疫应答等作用^[1]。尤其干扰素具有广泛的抗病毒效应, 使用干扰素防制家畜病毒性疾病克

收稿日期: 2004-05-08; 修回日期: 2004-09-15

基金项目: 上海市农业科学院中青年学术技术带头人培养基金资助 [Supported by the Academic Trains Funds of the Young and Middle-aged Technological Leader from Shanghai Academy of Agricultural Sciences]

作者简介: 黄海 (1979—), 男, 江苏徐州人, 硕士研究生, 研究方向: 细胞与分子生物学。Tel: 021-62200389; E-mail: oswald1115@163.com

通讯作者: 李震 (1963—), 男, 山东人, 博士, 研究员, 研究方向: 动物生物技术。Tel: 021-62200389; E-mail: zhenli60@public3.sta.net.cn

服了传统抗病毒药物成本高、副作用大、疗效不佳等缺点。猪 *IFN α* 对猪存在多种病毒性疾病,如猪瘟、口蹄疫、蓝耳病等均可起一定的防治作用。研制开发高效生产干扰素的生物体系已经引起了国内外学者的广泛重视。甲醇营养型酵母表达系统具有高表达、高稳定、高分泌的特点,其宿主菌巴斯德毕赤酵母自身蛋白分泌量少,下游分离纯化操作易行,能大规模发酵生产,是一种适宜表达外源基因的真核表达系统。在本研究中,采用 PCR 定点突变方法获得突变成熟猪 *IFN α* 基因编码区,借助表达载体 pPICZ α A 使重组基因整合到毕赤酵母 KM71 染色体中,对 *IFN α* 重组蛋白在毕赤酵母中的高效分泌表达进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

含猪 *IFN α* 的 pGEX-*IFN* 质粒由本室保存,毕赤酵母菌株 KM71、表达载体 pPICZ α A、ZeocinTM 均购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 引物

上游引物 (5'-CACTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTGTGACCTGCCTCAGACCCA-3'),下游引物 (5'-TAGCGGCCGCTCCTTCTTCTGAGTCTGT-3'),由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.3 其他

T4 DNA 连接酶、所有限制酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Fragment Purification Kit 购自 TaKaRa 公司; anti-human *IFN*-alpha antigen affinity purified polyclonal antibody 购自 Cytolab 公司、anti-Rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate、BCIP-NBT colour substrate 均购自 Promega 公司; YNB、Biotin、Easy SelectTM *Pichia* Expression Kit 购自 Invitrogen 公司; BCA Protein Assay Kit 购自 PIERCE 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增

根据猪 *IFN α* 基因的核苷酸序列设计引物,上下游引物分别含有 *Xho* I、*Not* I 酶切位点,上游引物: 5'-CACTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTGTGACCTGCCTCAGACCCA-3',下游引物: 5'-TAGCGGCCGCTCCTTCTTCTGAGTCTGT-3'。其中下画线分别是 *Xho* I、*Not* I 酶切位点,斜体为目的蛋白

的 α -MF 信号肽序列由胞内分泌至胞外时 *Kex*2 和 *Ste*13 的酶切位点。此构建原因一:是当蛋白由胞内分泌至胞外信号肽经酶切后,在目的蛋白的 N 端不残留多余的氨基酸。原因二:在目的蛋白的 C 端加上 *His* TAG 以便以后的过柱纯化。黑体表示的氨基酸(Cys)通过 PCR 定点突变,同义突变为酵母偏爱密码子(TGC→TGT),以提高蛋白的表达量。

1.2.2 酵母表达载体的构建

将扩增的猪 *IFN α* 基因经 *Xho* I、*Not* I 酶切后插入 pPICZ α A 的相同的位点,经连接转化大肠杆菌 JM109,以含 Zeocin(25 μ g/mL)的低盐 LB 平板筛选转化子,提取质粒,限制酶切鉴定重组质粒。

1.2.3 电穿孔转化及高表达量转化子的筛选

按 Invitrogen *Pichia* 操作指南制备 *Pichia pastoris* KM71 感受态。取 80 μ L 感受态细胞与 10 μ L (5-10 μ g) *Sac* I 线性化的重组表达质粒混合,注入预冷的 0.2 cm 电转杯中,冰浴 5 min,于 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪 2 000 V,25 μ F,300 Ω ,4.86 ms 条件下电转化后,立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇,转移到小试管中 30 $^{\circ}$ C 静置 1~2 h,取 50、100、200 μ L 菌液涂布于 YPDS(Zeocin 100 μ g/mL)抗性选择平板上,28~30 $^{\circ}$ C 倒置培养 2~3 d,直至克隆长出。

1.2.4 重组酵母工程菌的诱导表达

将重组菌和空载体转化酵母菌 KM71/pPICZ α A 单克隆分别接种于 100 mL 的 BMGY 培养基中,28~30 $^{\circ}$ C,250~300 r/min 培养 18 h 左右,至菌体 OD_{600} 值为 2~6,1 500~3 000 g,室温离心 5 min 收集菌体。菌体沉淀用 20 mL BMMY 培养基重悬, OD_{600} 值为 1 左右,28~30 $^{\circ}$ C,250~300 r/min 培养 4~5 d,每隔 24 h 补加甲醇至终浓度为 1%,并在 0、24、48、60、72、84、96、108、120 h 分别取少量的培养上清和菌体,以确定表达的最佳时间。诱导培养结束后,培养液 12 000 r/min,5 min 分别收集上清和沉淀,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 表达产物的浓缩处理及 SDS-PAGE 分析

将表达上清用三氯乙酸/胆酸钠(TCA/DOC)沉淀法来处理。将 50 μ L (1/4 体积)的 TCA/DOC 溶液加入 200 μ L 表达上清中,至 TCA 的终浓度为 20% (w/v),震荡混合,冰上孵育 30 min;微型离心机室温离心 15 min,去上清;加入 600 μ L (3 倍于原样品体积)的丙酮(室温),样品在室温下静置 10 min,使

TCA/DOC 溶于丙酮;微型离心机室温离心 15 min,去上清,冷冻抽干 2 min;加入 50 μ L 1 \times 样品缓冲液溶解沉淀,然后将样品 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,取 15 μ L 样品上样,做 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.6 表达产物的 Western Blot 鉴定

经 SDS-PAGE 检测有 *IFN α* 表达的上清液进行蛋白质印迹 (Western Blot) 鉴定。分别取 200 μ L 对照和阳性克隆培养的上清液,沉淀蛋白后,于 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳后的聚丙烯酰胺凝胶通过 Mini Trans-Blot 电转移系统 (Bio-Rad) 以 100 V, 2 h 的参数电转移至硝酸纤维素滤膜。电转完毕,将膜于室温下在去离子水中浸泡,然后置于一封闭的塑料袋中,加入封闭液 (5% 脱脂奶粉于 PBS 中),室温缓摇 1h;用 TBST 洗膜,加入含兔抗人 *IFN α* 多克隆抗体 (终浓度为 0.2 μ g/mL) 的新鲜 Dilution Buffer 中,室温缓摇,过夜;用 TBST 洗膜,加入含适量二抗 (羊抗兔 1 : 7 500) 的 Dilution Buffer,室温缓摇 6 h;用 TBST、TBS、AP Buffer 分别洗膜,NBT/BCIP 显色,待蛋白带的颜色达到要求 (约 10~30 min),以水漂洗,终止显色,拍照记录。

1.2.7 表达蛋白的纯化及 BCA 法蛋白浓度测定

在蛋白上清液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至终浓度为 50% 来沉淀蛋白,将沉淀悬浮于 1~2 倍沉淀物体积的 PBS 中。将此溶液置于透析袋中透析过夜,然后用 PEG20000 浓缩溶液,取样测浓度。取 25 mL BCA 试剂 A 与 0.5 mL BCA 试剂 B 充分混合。准备从 25 μ g/mL 到 2 000 μ g/mL 的系列稀释 BSA 标准蛋白,将 0.1 mL 系列稀释标准蛋白与样品分别加入标记试管,各加 2 mL BCA 混合试剂,混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。冷却至室温后于 562 nm 处测吸光度,由标准曲线计算样品浓度。

1.2.8 细胞病变抑制法检测表达蛋白的活性

采用 WISH 细胞/VSV 系统测定^[2]。

2 结 果

2.1 *PoIFN α* 基因的 PCR 扩增与测序

以 pGEX-*IFN* 为模板,根据运行程序:94 $^{\circ}$ C 1 min;55 $^{\circ}$ C 1 min;72 $^{\circ}$ C 1 min;扩增 25 个循环,最后延伸 10 min 进行 PCR。电泳结果显示,PCR 产物大小约为 530 bp,与预期大小一致。将 PCR 产物回收,插入到 pPICZ α A 载体上,由上海博亚公司测序。结果表明,除插入序列的第 9 位发生同义突变 (T \rightarrow

C),第 146 位发生错义突变 (GCA \rightarrow GTA) 外,其他碱基均与预期的相同。

2.2 含 *IFN α* 基因的重组质粒的构建及鉴定

将 PCR 产物用 *Xho* I、*Not* I 双酶切,克隆至载体质粒 pPICZ α A 强启动子 P_{AOX1} 下游的 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切窗口中,构建重组质粒 pPICZ α A-*IFN α* (图 1)。通过 *Xho* I、*Not* I 酶切 pPICZ α A-*IFN α* 来进行鉴定,得到大小两个片段,大片段约为 3.6 kb,包含载体 pPICZ α A 的大部分序列;小片段约为 528 bp,为含 *IFN α* 基因的片段。由酶切鉴定的结果可知 pPICZ α A-*IFN α* 为所需的重组质粒 (图 2)。

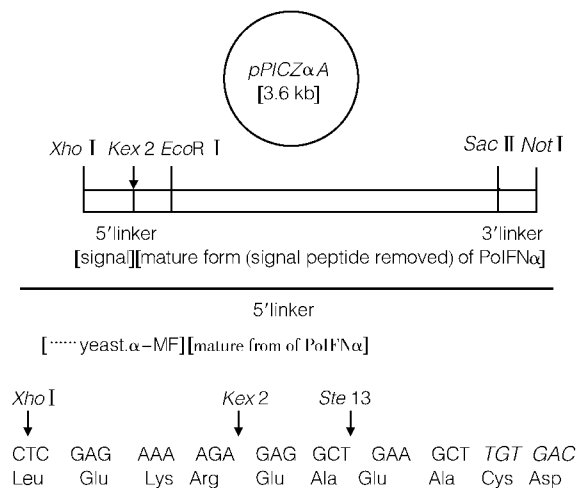


图 1 在毕赤酵母中通过使用质粒 pPICZ α A 的 α -MF 信号肽和 *Kex2*、*Ste13* 酶切位点来表达 *PoIFN α* 的策略

Fig.1 Strategy for expressing the porcine *IFN α* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the yeast α -MF and *Kex2*、*Ste13* cleavage site of plasmid pPICZ α A

The Glu-Ala repeats are retained in *PoIFN α* -pPICZ α A which the *PoIFN α* cDNA is cloned using *Xho* I and *Not* I. The stop codon is removed for using the C-terminal tag (polyhistidine tag).

2.3 重组质粒的转化及高产菌株的筛选

重组质粒 pPICZ α A-*IFN α* 经 *Sac* I 酶切线性化后,经 DNA Fragment Purification Kit 纯化浓缩后,于 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪上高压脉冲电流转化宿主菌巴斯德毕赤酵母 KM71,转化物涂布于含 100 μ g/mL ZeocinTM 的 YPDS 板上,28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d,直至克隆长出。

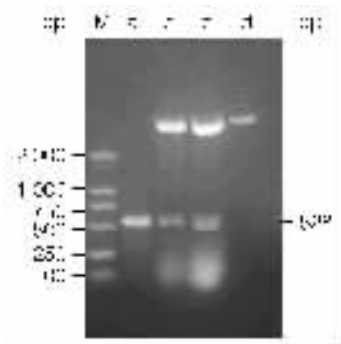


图2 重组质粒 pPICZ α A-IFN α 的酶切鉴定

M: 2 kb 分子量标准; a: PCR 产物; b,c: pPICZ α A-IFN α 经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切; d: pPICZ α A 经 *Sac* I 酶切。

Fig.2 Digestion of pPICZ α A-IFN α by *Xho* I / *Not* I

M: 2 kb DNA marker; a. PCR products; b,c: pPICZ α A-IFN α digested by *Xho* I + *Not* I ; d: pPICZ α A digested by *Sac* I .

将单克隆分别接种于 100 mL 的 BMGY 培养基中,至菌体 OD_{600} 值为 2~6,收集菌体。菌体沉淀用 20 mL BMMY 培养基重悬,然后在不同的时间段取上清液,三氯醋酸沉淀蛋白,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,筛选出有特异蛋白表达的高产菌株,经 Tanon 凝胶图象处理系统分析目的条带约为 26.8 kDa (图 3)。

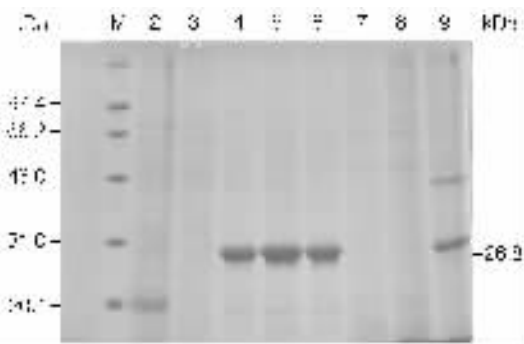


图3 高效表达 PoIFN α 酵母菌株的 SDS-PAGE 分析

M: 分子量标准; 1~9: 不同的时间所得的分泌重组蛋白(TCA/DOC 浓缩处理)。

Fig.3 Analysis of yeast clone with high yield of PoIFN α by SDS-PAGE

M: molecular maker; 1~9: different recombinant clones(concentrated by TCA/DOC) .

2.4 表达产物的 Western blot 检测鉴定

将得到的高表达菌株接种培养,在不同的时间梯度取样。结果表明:在培养 72 h 以后, PoIFN α 的表达量达到最高,在随后的培养中,干扰素在培养基

中发生部分降解。将蛋白上清液与等体积上样缓冲液混合均匀,跑 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳做 Western blot。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 4。Western blot 分析显示,特异蛋白带约为 26.8 kDa 左右(图 5)。根据理论推算,比蛋白理论值分子量(22 kDa)大的 26.8 kDa 应为糖基化的 PoIFN α 。

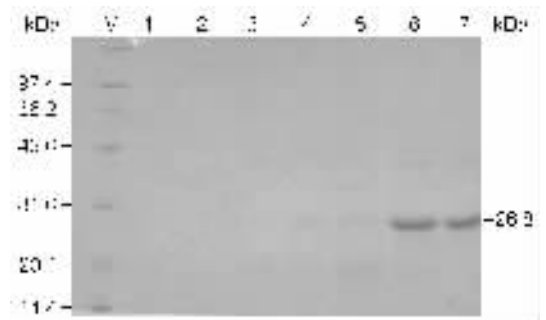


图4 分泌型表达菌株在不同发酵时间所得的蛋白上清的 SDS-PAGE 分析

M: 分子标准量; 1~7: pPICZ α A -PoIFN α /KM71 菌株所得分泌蛋白,未浓缩处理(0、24、48、60、72、84、96 h)。

Fig.4 Analysis of secretory proteins at different culture time by SDS-PAGE

M: Molecular marker; 1~7: different clones (not concentrated by TCA/DOC) .

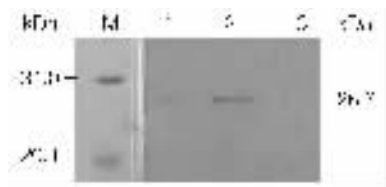


图5 分泌型表达菌株在不同发酵时间所得的蛋白上清的 Western blot 分析

M: 分子标准量; 1~2: pPICZ α A -PoIFN α /KM71 菌株所得分泌蛋白(84、96 h); 3: pPICZ α A/KM71 菌株所得分泌蛋白(84 h)。

Fig.5 Western blot of secretory proteins at different culture time

M: molecular marker; 1~2: expressed proteins at different sampling time of pPICZ α A -PoIFN α /KM71 (84、96 h); 3: expressed proteins of pPICZ α A/KM71 (84 h) .

2.5 表达蛋白的纯化及 BCA 法蛋白浓度测定

纯化蛋白溶液于 562 nm 处测吸光度值为 0.6317,由标准曲线计算样品浓度为 0.45 mg/mL。(图 6)。

2.6 细胞病变抑制法检测表达蛋白的活性

在 WISH/VSV 系统上,采用细胞病变抑制法,

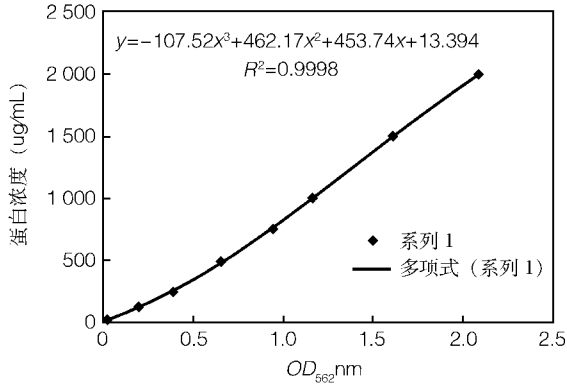


图 6 BSA 蛋白标准曲线

Fig.6 Standard curve of the BSA protein

用标准干扰素作对照,于 96 孔板上将两种干扰素均做倍比稀释,以结晶紫染色显示其抗病毒活性,用酶标仪测定 540 nm 的 A 值,确定其比活性为 2.1×10^4 IU/mL。

3 讨论

Pichia pastoris 是近十年发展起来的真核表达系统^[3],更适合表达真核蛋白。迄今为止,该表达系统已成功应用于 200 多种异源蛋白的表达以及多种蛋白的商业化生产^[4~6],其中 Philip T. Liu 等曾在毕赤酵母中表达并纯化了人的干扰素 α -1^[7],证明该表达系统可以用来构建生产人干扰素。巴斯德毕赤酵母表达载体质粒 pPICZ α A 含有甲醇诱导型启动子-乙醇氧化酶启动子和 α -MF 信号肽序列。P_{AOX1} 可有效防止外源基因表达产物对酵母生长可能产生的细胞毒性。 α -MF 信号肽序列可在蛋白质分泌到胞外的过程中被有效切除。加之巴斯德毕赤酵母仅分泌很低水平的自身蛋白,这样将更有利于猪 *alpha* 干扰素蛋白的分离与纯化^[8]。另外,与啤酒酵母的过度糖基化相比其分泌蛋白糖基化较适中,蛋白糖基化位点为 Asn-X-Ser/Thr,与哺乳类细胞的糖基化位点相同。本研究选择毕赤酵母和整合型载体 pPICZ α A 构建 PoIFN α 蛋白高效分泌型表达系统,获得了外源基因整合到酵母染色体上的遗传性稳定的重组子,表达的目的蛋白 PoIFN α 为糖基化蛋白,由 SDS-PAGE 胶可以看出目的蛋白的表达量较高,且杂蛋白较少。Western blot 鉴定表达的蛋白可发生正确的抗原-抗体反应,但目的条带较浅。有可能是我们使用的一抗与目的蛋白的特异性不

高,导致它们之间的结合不牢靠,在洗膜过程中一抗被洗脱下来,从而导致后面的显色较弱,条带颜色较浅。

此前,葛丽等也曾在毕赤酵母系统中表达过 PoIFN α ,但表达量偏低。本实验中,我们通过重新选择表达宿主及对目的基因进行优化改造以期能提高蛋白表达量。在宿主上我们选择了 KM71 而非 GS115,是因为 GS115 菌株 (*his4*) 含有野生型 AOX 1 和 AOX 2 基因,利用甲醇的表型为 Mut⁺ (Methanol Utilization Plus)。而 KM71 菌株的 AOX1 基因大部分被删除和取代,它必须依赖表达很弱的 AOX2 基因,故利用甲醇表型为 Mut^s (Methanol Utilization Slow)。而据文献报道,对于分泌表达, Mut⁺ 和 Mut^s 都可使用。Mut^s 菌株虽然在诱导阶段生长缓慢,但有时外源蛋白的表达反而更高,更有利于蛋白的正确折叠与修饰(糖基化等)^[9]。如 PepT1 的表达在 Mut^s 菌株中较高^[10]。

Pichia pastoris 中 α -factor 信号序列的加工过程包括三个步骤,第一是在内质网由信号肽酶切去信号序列(pre sequence),第二步由内切酶 Kex2 在 Lys-Arg 位点剪切除去前导序列(pro leader sequence),第三步是有 Ste13 蛋白除去 Glu-Ala 重复子^[11]。Glu-Ala 重复子被认为对于信号肽的去除并非必需,而且 Ste13 对 Glu-Ala 重复子的切割效率不是 100%,常造成外源蛋白 N 端的不均匀性(heterogeneity)^[12]。但也有人认为,在构建时保留 Glu-Ala 重复子是明智的,因为它能够减少外源蛋白对 Kex2 一类蛋白酶切割的空间位阻作用^[13],因此本文在构建表达质粒时在上游引物中保留了 Glu-Ala 重复子以确保蛋白在分泌至胞外时,信号肽能被剪切完全。另外,在质粒 pPICZ α A 上,编码酵母 α -MF 信号肽切除位点的序列与 PoIFN α 蛋白基因之间多了 6 个碱基即 2 个氨基酸,当信号肽被切除后,多余的 2 个氨基酸将位于 PoIFN α 蛋白的 N 端,将影响目的蛋白的生物活性。因此我们通过 Xho I 和 Not I 位点构建的重组质粒通过将编码信号肽切除位点的序列直接与目的蛋白序列相连,从而保障在分泌至胞外的目的蛋白的 N 端不会有多余的氨基酸;同时通过此构建还在目的蛋白的尾端加上了 His TAG,有利于分泌蛋白的纯化。除此之外我们将成熟猪 IFN α 基因编码区的第一个氨基酸(Cys)进行 PCR 定点突变,同义突变为酵母偏爱密码子。这些

设计得到了测序结果的印证(其载体的够建策略见图 1)。

本研究结果表明, $PoIFN\alpha$ 蛋白能顺利高效地分泌到培养基中, 这为今后的发酵、动物实验以及表达其他的细胞因子等工作打下了一定的基础, 但仍有许多方面需要进行摸索优化, 对 *Pichia pastoris* 表达系统的认识还需进行进一步的探讨。

参考文献(References):

- [1] SUN Wei-Min, WANG Hui-Qin. Research approach of cell factor. Beijing: The Publication of People's Health, 1999. 540~541.
孙卫民, 王惠琴. 细胞因子研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 540~541.
- [2] Pestka S, Langer J A, Zoon K C, Samuel C E. Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem*, 1987, 56: 727~777.
- [3] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(1): 45~66.
- [4] Romanos M A, Scorer C A, Clare, J J. Foreign gene expression in the yeast: a review. *Yeast*, 1992, 8: 423~488.
- [5] Sreekrishna, K. Strategies for optimizing protein expression and secretion in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: Baltz R H, Hegeman G D, Skatrud P L (ed.), *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics*, American Society of Microbiology, Washington, D C, 1993, 119~126.
- [6] Sreekrishna, K, Kropp, K. *Pichia pastoris*. In: Wolf, K I (ed.), *Non Conventional Yeast in Biotechnology*, Berlin: Springer, 1996,

203~252.

- [7] Philip T. Liu, Tuan V. Ta, Lorelie H. Villarete. High-yield expression and purification of human interferon α -1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2001, 22: 381~387.
- [8] Barr K A, Hopkins S A, Sreekrishna K. Protocol for efficient secretion of HAS developed from *Pichia pastoris*. *PharmEng*, 1992, 12: 48~51.
- [9] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J, Higgins D R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, 16: 23~52.
- [10] Frank D, Stephan T, Hannelore D. Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter pep T1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Comm*, 1997, 232~656.
- [11] Brake A J, Merryweather J P, Coit D G, Heberlein U A, Masiarz F R, Mullenbach G T, Urdea M S, Valenzuela P, Barr P J. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 4642~4646.
- [12] Briand L, Perez V, Huet J C, Danty E, Masson C, Pernollet J C. Optimization of the production of a honeybee Odorant-Binding protein by *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 1999, 15: 362~369.
- [13] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E, Blankenship D T, Tsay J T, Smith P L, Wierschke J D, Subramaniam A, Birkenberger L A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, 190: 55~62.

《遗传》一篇论文获中国科协期刊优秀学术论文奖

为激励广大科技人员不断创新, 发表高水平的学术论文, 进一步提高办刊质量, 加速我国科技期刊国际化, 促进我国科学技术水平的不断提高, 从 2003 年起, 中国科协每年举办一届优秀论文评选活动。第二届中国科协优秀论文评选活动于 2004 年 3 月开始, 12 月结束。本届参加评选的优秀论文由中国科协所属全国性学会、协会、研究会主办的学术期刊编辑部推荐, 先由 3 名同行专家个人推荐, 再由刊物的主办学会组织专家初审后推荐, 经中国科协期刊优秀学术论文专家评审委员会评选, 报中国科协学术交流工作委员会审定, 对 99 篇中国科协期刊优秀学术论文予以表彰, 以资鼓励。

2005 年 1 月, 中国遗传学会和《遗传》编辑部分别收到中国科学技术协会颁发的“第二届中国科协期刊优秀学术论文奖”获奖证书, 《遗传》2000 年第 4 期发表的“红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 DNA 的 RFLP 分析”(作者: 李小明、郑用璉、张方东、朱英国)一文获中国科协期刊优秀学术论文表彰。

(李绍武)