

人骨形态发生蛋白 7(hBMP7)在毕赤酵母中的分泌表达

Expression and Secretion of Human Bone Morphogenetic Protein-7 in *Pichia pastoris*

陈 凌^{1,†}, 黄义德^{1,2}, 张彦定^{1,2,3*}

CHEN Ling^{1,†}, HUANG Yi-De^{1,2} and ZHANG Yan-Ding^{1,2,3*}

1. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350007

2. 福建省高校发育与神经生物学重点实验室, 福州 350007

3. 农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福州 350007

1. College of life science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2. State Key Laboratory of Developmental Biology and Neurobiology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

3. Key Laboratory of Sugarcane Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350007, China

摘 要 依据酵母密码子使用偏好性, 利用重叠延伸 PCR(OE-PCR)介导的定点突变方法, 对人骨形态发生蛋白-7(human Bone Morphogenetic Protein-7, hBMP7)成熟肽编码序列进行改造, 将毕赤酵母低频使用的精氨酸密码子 CGG 或 CGA 突变为高频使用的同义密码子 AGA, 明显提高了 hBMP7 成熟肽在毕赤酵母中的表达量。摇瓶培养表达量为 25.45mg/L, 是改造前序列的 4.6 倍; Tricine SDS-PAGE 及 Western-blotting 结果表明, hBMP7 成熟肽分子量为 18kD, 以单体形式存在, 具有良好的免疫原性, 利用梯度浓度 G418 筛选到一株高拷贝整合的转化子, 该转化子摇瓶表达量为 45.45mg/L, 约为单拷贝转化子的 2 倍。表达上清经阳离子交换介质 SP Sepharose® Fast Flow 纯化后, 目的蛋白纯度达到 90%。纯化后的样品与 I 型胶原混合冻干后埋植于小鼠股部肌袋内, 能异位诱导间充质细胞分化形成软骨细胞。

关键词 骨形态发生蛋白-7, 毕赤酵母, 密码子偏好性, 定点突变

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0907-07

Abstract The synonymous codons are used in a highly non-random manner in hosts of widely divergent species, which is termed “codon usage bias”. Several reports suggest that codon usage bias sometimes frustrate attempts to express high levels of exogenous genes. In this study, we attempted to express mature peptide of human bone morphogenetic protein-7(hBMP7), with optimized codons in *P. pastoris* expression system. Three low-usage ARG codons(CGG or CGA) of gene fragment coding the mature peptide of hBMP7 have been successfully converted into *P. pastoris*-preferred ARG codons(AGA) by overlap extension PCR-based multiple-site-directed mutagenesis for a high level expression of hBMP7 mature peptide. The present results showed that the production level(25.45mg/L) of codon-optimized *hbmp7* had a remarkably improvement of 4.6-fold relative to that(5.5mg/L) of non-codon-optimized *hbmp7*. Furthermore, a strain harboring multi-copy of codon-optimized *hbmp7* expression cassette was screened, and showed a increased level of expression with 2-fold more potent than the single-copy one. The

Received: July 3, 2006; Accepted: August 8, 2006.

This work was supported by grant from State Education Ministry, Scientific Research Fund of Fujian Provincial Education Department(No. JA01015), Development and Reform Commission of Fujian Province(No. 2004[686]) and Natural Science Foundation of Fujian Province(No. C0410008).

† Current address: the Department of Cell Biology and Genetics, Fujian Medical University.

* Corresponding author. Tel: 86-591-83465199; E-mail: ydzhang@fjnu.edu.cn

国家教育部资助项目, 福建省教育厅资助项目(No. JAO1015); 福建省发改委资助项目(No. 2004[686])和福建省自然科学基金(No. C0410008)资助。

recombinant hBMP7 mature peptide were produced as a 18kD monomer proteins , and were easily purified from culture supernatants by using ion-exchange chromatography. Functional assay demonstrated that rhBMP7 could induce ectopic cartilage formation , although its inductive ability was much less active than CHO cell-derived hBMP7.

Key words human bone morphogenetic- γ (hBMP7) , *Pichia pastoris* , codon usage bias , site-directed mutagenesis

骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Proteins , BMPs) ,是一类广谱性的蛋白质生长调节因子 ,在动物(包括人类)的生长发育过程中 ,对骨组织^[1]、脑^[2]、肾脏和眼^[3]、心脏^[4]及生殖系统^[5]等多种组织器官的决定与分化起重要作用。BMP7 也称为成骨蛋白-1(Osteogenic Protein-1 ,OP-1) ,其全长 cDNA 约为 1.3kb ,是一类磷酸化的二聚体糖蛋白分子^[6] ,重组表达的人 BMP7 能在异位诱导骨组织的发生^[7] ,并能促进骨缺损的修复^[8] ,此外 ,还发现 BMP7 在哺乳动物牙齿发育过程中起关键作用 ,并在口腔组织工程中具有很好的应用前景^[9]。

目前国内外重组 BMPs 的生产多见于哺乳动物细胞^[7,10,11]及昆虫细胞^[12,13] ,虽活性较高但产量少、成本高 ,而原核表达系统虽也能表达出具有活性的 BMPs 蛋白^[14-17] ,但该类系统缺乏必需的蛋白质翻译后修饰及折叠机制 ,进而可能影响真核来源的重组产物的生物学活性。毕赤酵母(*P. pastoris*)表达系统是目前已被广泛应用的外源蛋白表达系统 ,既有原核生物遗传学操作方法简便易行及易于放大培养的优点 ,更有真核生物翻译后加工修饰的特性。截至 2000 年 ,该系统已成功用于包括 45 种人类蛋白在内的 400 多种外源蛋白的表达^[18] ,通过 Pubmed 检索 ,目前用该系统实现成功表达的外源蛋白已超过 1800 种。

因此 ,本研究采用 *P. pastoris* 表达系统进行了 *hbmp7* 的重组表达研究。考虑到宿主的密码子使用偏好性(codon usage bias)^[19,20] ,本研究通过重叠延伸 PCR(Overlap extension PCR ,OE-PCR)将人 *hbm*p7 成熟肽编码序列中的 3 个酵母低频使用的精氨酸密码子改造为高频使用的同义密码子 ,显著提高了 *hbm*p7 成熟肽的表达水平。所得重组 BMP7 成熟肽仅以单体形式存在 ,具备良好的免疫原性 ,纯化后的样品能异位诱导间充质细胞分化形成软骨细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

含有 *hbm*p7 cDNA 全长序列的质粒 pBluescript II KS(+)-*hbm*p7 由本室构建 ;大肠杆菌 TOP10F'、*P. pastoris* 菌株 GS115 及表达质粒 pPIC9K、pAO815

均为 Invitrogen 公司产品 ;限制酶、Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品 ;核酸纯化试剂盒购自 Promega 公司 ;hBMP7 标准蛋白、鼠抗 hBMP7 抗体为 R&D 公司产品 ;蛋白胨、酵母浸提物、YNB、羊抗鼠 IgG-AP、Zymolyase、NC 膜、NBT/BCIP、蛋白质分子量标准等购自华美公司 ;层析介质 SP Sepharose® Fast Flow 购自 Amersham Biosciences 公司。其余试剂为国产分析纯。引物序列由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 *hbm*p7 成熟肽编码序列的改造策略 :利用 OE-PCR 对 *hbm*p7 成熟肽编码序列的三个位点实施定点改造。如图 1 所示 ,针对从 5'端到 3'端的三个待突变位点分别设计三对引物 :J&I、L&K 及 N&M ,每对引物的方向相反且 5'端序列部分互补 ,在互补区内包含了待引入的突变位点。此外 ,还设计一对外侧引物 A&B ,用于相关片段的扩增(各引物引发位置如图 1 所示 ,引物序列见表 1)。

表 1 *hBmp7* 定点突变的相关引物

Table 1 Primers for site-directed mutagenesis of <i>hBmp7</i>	
Primer	Sequence
A	5'-TTATTCTGAAGGATCCAAACG-3'
B	5'-GGCATCTCTGACATCCTCTT-3'
I	5'-TTGGCCATTCTCAGGG-3'
J	5'-GCCCTGAGAATGGCC-3'
K	5'-AGCCCAGGTCTCTGAAG-3'
L	5'-CTTCAGAGACCTGGGCT-3'
M	5'-CAGGCTCTGACCACCAT-3'
N	5'-GGTGGTCAGAGCCTGTG-3'

利用 pyrobest 高保真酶由质粒 pBluescript II KS (+)-*hbm*p7 扩增得到 *hbm*p7 成熟肽编码序列 ,扩增引物分别为 7UP :5'-TCCACGGGGAGCAAACAG-3' ; 7DN :5'-CTA GTGGCAGCCACAGGC-3' ,并将扩增片段连接至酵母分泌型表达载体 pPIC9K 的 *Sna*b I 位点处 ,将重组质粒命名为 pPIC9K-*hbm*p7/ori。经测序确认无误后 ,以此重组质粒为模板 ,应用 OE-PCR 将 *hbm*p7 成熟肽编码序列中编码精氨酸的第 22 (CGG)、第 48 (CGA)及第 133 (CGA)位的酵母低频使用密码子突变为高频使用的同义密码子(AGA)。突变引入过程如图 1 所示 ,首先分别扩增片段 AI、JB、

的密码子为 CGG ;编码第 48 位、第 133 位精氨酸的密码子为 CGA ,这两种密码子在酵母高表达的基因中几乎不使用^[19] ,利用 OE-PCR 介导的定点突变对 *hbmp7* 成熟肽编码序列进行改造 ,将这两种密码子

突变为酵母高频使用的同义密码子 AGA^[20]。经序列分析证实了此基因已实现预期突变。图 2 显示突变过程中相关片段的扩增结果(图 2 ,A)及密码子优化前后的序列比对结果(图 2 ,B)。

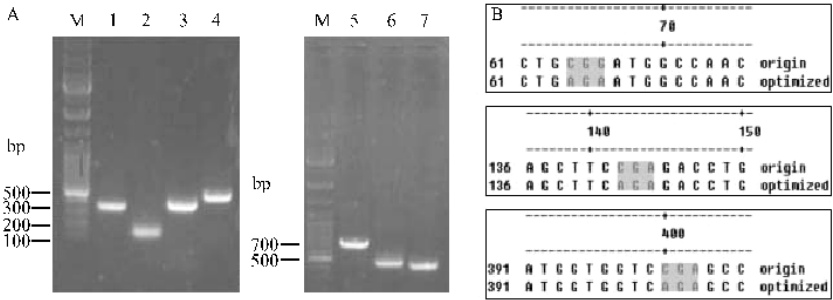


图 2 *hbmp7* 成熟肽编码序列中 3 个精氨酸密码子的定点突变

Fig. 2 The mutagenesis of coding sequence of mature peptide of hBMP7 for the three ARG codons

A :The relative DNA fragments in the mutagenesis by OE-PCR ; 1 ~ 7 :AK(363bp) ;NB(150bp) ;JH(405bp) ;JH(485bp) ;AM(696bp) ; AK(443bp) ; 7UPDN(420bp) ;M :DNA marker ; B :The three ARG codons in the original/optimized sequence.

2.2 宿主密码子使用偏好性对 *hbmp7* 成熟肽表达量的影响及重组产物的鉴定

含有单一拷贝的野生型和突变型 *hbmp7* 成熟肽编码序列的分泌型表达质粒 pAO815- α -*hbmp7*/ori 和 pAO815- α -*hbmp7*/mut 经 *Bgl* II 酶切后回收包含有 *hbmp7* 表达盒的大片段 ,然后分别电击转化酵母宿主菌 GS115。分别就序列优化前后选取两株转化子 G/pAO815-ori/1 和 G/pAO815-mut/1 ,用引物 5' AOX/3' AOX 进行 PCR 鉴定为阳性(结果未显示)。在相同条件下 ,对上述两株转化子及空载质粒转化子 G/pAO815 进行摇瓶表达 ,诱导表达第 3 天各取表达上清 20 μ L 进行 Tricine SDS-PAGE 电泳分析。结果表明 ,G/pAO815-ori/1 和 G/pAO815-mut/1 的表达上清中都出现一条 18kD 的特异性条带 ,而 G/pAO815 的表达上清

中则没有该条带 ,JVP visionworkTMLS 半定量分析结果显示 G/pAO815-mut/1 表达上清中特异性蛋白含量为 25.45mg/L ,占上清总蛋白的 72.6% ;菌株 G/pAO815-ori/1 表达上清中特异性蛋白为 5.55mg/L ,占上清总蛋白 13.4%。序列优化前后特异性蛋白的表达量提高了 4.6 倍(图 3)。

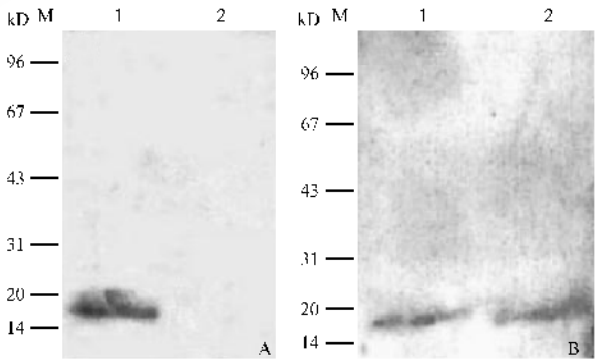


图 4 表达上清的 Western blotting 分析

Fig. 4 Western blotting analysis of culture supernatant

A :Western blotting analysis of culture supernatant ; 1 : culture supernatant of G/pAO815-mut/1 ; 2 :culture supernatant of G/pAO815 ; B :Western blotting analysis of culture supernatant from G/pAO815-mut/1 under reduced and non-reduced condition 1 :Reduced condition ; 2 :Non-Reduced condition .

取 G/pAO815-mut/1 表达上清 20 μ L 进行 Western-blotting ,结果显示 18kD 条带可被抗 hBMP7 抗体特异性识别(图 4 ,A) ,表明经密码子优化后所表达出的 rhBMP7 成熟肽仍具有良好的免疫原性。将两份 20 μ L 上清样品分别经还原型及非还原型处理后进行印迹分析 ,结果表明所得 rhBMP7 成熟肽又以分子量约 18kD 的单体形式存在 ,不具有天然

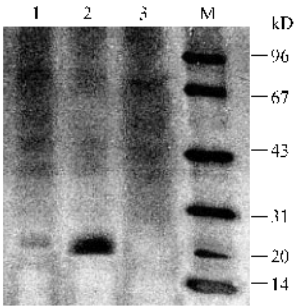


图 3 毕赤酵母密码子使用偏好性对 rhBMP7 成熟肽表达水平的影响

Fig. 3 The effect of favored codons of *Pichia pastoris* on the expression of the mature peptide of hBMP7

1 :culture supernatant of G/pAO815-ori/1 ; 2 :culture supernatant of G/pAO815-mut/1 ; 3 :culture supernatant of G/pAO815 ; M :standard protein molecular marker .

hBMP7 的二聚体结构(图 4 B)。

2.3 高拷贝转化子的筛选、表达和重组蛋白的纯化

一般而言,外源片段整合拷贝数越高,外源基因的表达量也越高^[25]。利用单酶切线性化载体转化酵母而后再用梯度浓度的 G418 进行筛选是获得高拷贝整合菌株的一个简便而有效的方法。因此,本研究将重组质粒 pPIC9K-hbmp7/mut 经 Sac I 线性化后电击转化宿主菌 GS115。线性化载体可发生多次的插入整合事件(single-crossover event),从而有可能获得含有多拷贝基因数目的转化子。电击所产生的转化子经 MD 平板初筛及梯度 YPD-G418 复筛后获得一株高拷贝菌株 G/hbmp7/B2,其 G418 耐受上限为 4.0mg/mL,用引物 5' AOX/3' AOX 进行 PCR 鉴定为阳性(结果未显示)。空载质粒 pPIC9K 经 Sac I 线性化后电击转化宿主菌 GS115,经 G418 筛选和 PCR 鉴定获得对照菌株 G/9K。将 G/hbmp7/B2 和 G/9K 进行摇瓶表达,每 24h 收集 G/hbmp7/B2 诱导表达上清各 20 μ L 进行 Tricine SDS-PAGE 电泳,结果表明:G/hbmp7/B2 的分泌上清在 18kD 处有一特异性条带。该条带出现于甲醇诱导后第 2 天,并于第 4 天达到最高表达量,经 UVP visionwork™ LS 半定量分析,第四天特异性条带占总蛋白的 76.2%,表达量为 45.45mg/L,约为单拷贝整合菌株表达量的 2 倍。该条带在第五天出现降解,表达量为 40.41mg/L(图 5 A)。使用阳离子交换树脂 SP Sepharose® Fast Flow 对表达上清中的目的蛋白进行纯化。上样后依次用含 100mmol/L、300mmol/L、500mmol/L 及 1mol/L NaCl 的 PBS(pH7.0)梯度洗脱,结果当以 300mmol/L NaCl 的 PBS 进行洗脱时特异性蛋白的含量最高,杂蛋白含量最少。洗脱液中 rhBMP7 的含量达到 90%(图 5 B)。

2.4 rhBMP7 成熟肽的生物学活性鉴定

将 1 μ g 纯化的 rhBMP7 成熟肽、1 μ g hBMP7 标准蛋白以及空载菌株 G/9K 表达上清分别与等量 I 型

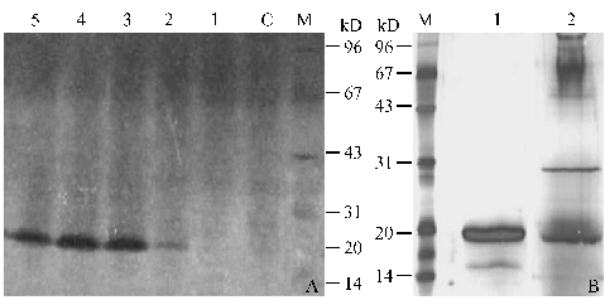


图 5 诱导表达各时间点 rhBMP7 成熟肽的表达情况
及产物的初步纯化

Fig. 5 Time course study of mature peptide of hBMP7
secreted from *Pichia pastoris* and partial purification
through ion-exchange chromatography

A 1~5: Culture supernatants of G/hBmp7/B2 from day 1 to day 5 after methanol induction; C: culture supernatants of G/9K as control; M: standard protein molecular marker; B 1: partial purified rhBMP7 through ion-exchange chromatography; 2: Culture supernatants of G/hBmp7/B2; M: standard protein molecular marker.

胶原混合冻干后植入小鼠肌袋^[7]。术后 7d,对各组小鼠植入区的局部组织进行切片,切片厚度 7 μ m,常规 HE 染色。显微镜下观察发现,阳性对照组肌肉组织中出现分化典型的软骨细胞,细胞体大而密集,核呈圆形或椭圆形,软骨组织外周为成纤维细胞和间充质细胞(图 6 A)。实验组植入区肌肉组织中出现了异位生成的软骨细胞,细胞体大而圆,但较稀疏(图 6 B)。阴性对照组中并未发现软骨细胞,植入物四周只有炎症细胞及散在的间充质细胞(图 6 C)。该结果表明,毕赤酵母表达的 rhBMP7 成熟肽能异位诱导间充质细胞分化为软骨细胞。但由于同源或异源二聚体是 BMPs 行使生物学活性的主要形式,因此,作为单体形式存在的 rhBMP7 成熟肽虽具有一定程度的生理活性,但其活性水平与二聚化的 hBMP7 标准蛋白相比还存在较大差距。

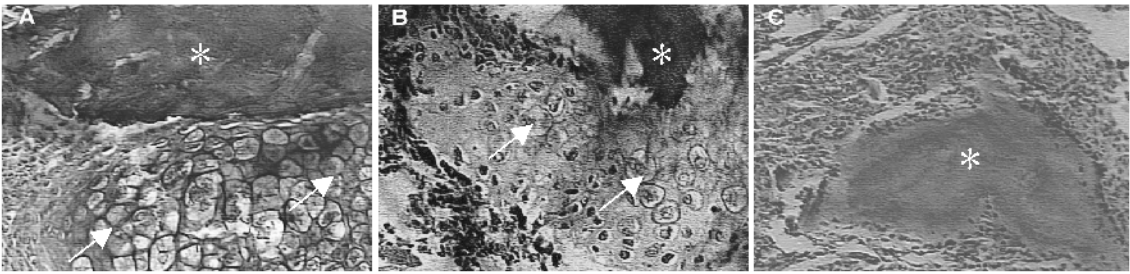


图 6 含 1 μ g rhBMP7 成熟肽的胶原冻干物植入小鼠肌袋的组织学检查

Fig. 6 Histological examination for mouse muscular pouches after implantation with collagen complex contain 1 μ g mature peptide of rhBMP7 (HE staining, $\times 200$; arrowhead: cartilage cells; *: collagen complex)

A: Formation of cartilage cells induced by 1 μ g rhBMP7 derived from CHO; B: Formation of cartilage cells induced by 1 μ g mature peptide of hBMP7 derived from *Pichia pastoris*; C: negative control, induced by cultures from G/9K.

3 讨论

在酵母大量表达的基因中,精氨酸密码子 AGA 的使用频率为 86.6%,而几乎不使用其同义密码子 CGA 和 CGG^[20],仅将植酸酶中编码 ARG 的密码子突变为高频使用的同义密码子 AGA,就能使植酸酶在 *P. pastoris* 中的表达量提高 37 倍之多^[26]。因此,考虑宿主密码子使用的偏好性是提高外源蛋白表达水平的一个有效途径。本研究利用 *P. pastoris* 对 ARG 密码子的显著偏好性,将 *hbmp7* 成熟肽编码序列中的 3 个酵母低频使用的 ARG 密码子突变为高频使用的同义密码子,改造后 rhBMP7 成熟肽的表达水平提高了约 4.6 倍。为了获得高拷贝转化子以实现高表达,本研究还利用梯度浓度 G418 筛选到一株高拷贝整合的转化子,该转化子摇瓶表达量为 45.45mg/L,约为单拷贝转化子的 2 倍。所得 rhBMP7 成熟肽能与鼠抗 hBMP7 抗体发生特异性识别,具备良好的免疫原性,但仅以 18kD 大小的单体存在。因 *P. pastoris* 表达系统具有分泌蛋白较少的优势,表达上清经阳离子交换树脂 SP Sepharose® Fast Flow 纯化后, rhBMP7 成熟肽的纯度可高达 90%。纯化后的样品与 I 型胶原混合冻干后埋植于小鼠股部肌袋内,能异位诱导间充质细胞分化形成软骨细胞,说明 *P. pastoris* 表达的 hBMP7 成熟肽单体具有一定程度的生物学活性。

天然 hBMP7 存在同源或异源二聚体形式,二聚化的 hBMP7 是行使生物学活性的主要形式,但是我们利用 *P. pastoris* 系统表达的 hBMP7 成熟肽分子仅以 18kD 单体形式存在,其生理活性与哺乳动物细胞表达的二聚化的 hBMP7 相比存在较大差距(图 6, A, B)。BMPs 家族蛋白在体内是以包含前肽(pro-regions)和成熟肽(mature region)的前体(precursor)形式合成。前肽分子将伴随成熟肽完成后续的加工折叠过程。待前体蛋白进入高尔基反面囊膜后,将被定位于此的特异性识别 RXXR 短肽序列的前体蛋白转化酶(pro-protein convertases, PCs)家族蛋白 furin 所剪切^[27],由此可认为,前肽在成熟肽的加工过程中可能有一定的作用。Gray 等^[28]的研究成果表明在 TGF- β 1 及活化素的成熟过程中,其前肽可作为分子内分子伴侣(Intramolecular chaperones, IMCs)帮助成熟肽正确折叠,形成正确的二硫键配对并以天然的二聚体形式释放至胞外。神经生长因子(NGF)的前肽与成熟肽在大肠杆菌中的融合表达能够实现 NGF 二硫键的正确配对并产生与天然分子具有相当

活性的二聚化分子^[29]。因此, BMPs 的前肽对成熟肽可能也具有促使成熟肽形成天然构型的作用,但最近 Hillger 等^[30]的研究却表明 BMP2 的前肽并不能促进 BMP2 成熟肽的正确折叠和二硫键的氧化配对。

此外,较高度的糖基化修饰可能阻止成熟肽的自主折叠, *P. pastoris* 表达的 *Dermatophgoides pteronyssinus*(Der p)因高度的糖基化修饰而不能正确折叠,当经过脱糖基处理后,具有天然构型的重组产物的比例和产物的活性水平均有显著提高^[31]。因此,利用遗传学方法对酵母分泌蛋白糖基化方式进行人源化改造(humanized)的意义不仅在于使重组蛋白减少抗原性以适应于人类疾病的治疗^[32],而且也可通过降低重组蛋白的糖基化程度来避免酵母的过度糖基化对蛋白构型及活性水平的负面影响。

尽管 *P. pastoris* 表达系统产生的重组 hBMP7 成熟肽缺乏天然蛋白所具有的二聚体结构,但该单体蛋白仍具有良好的免疫原性。同时,利用小鼠股部肌袋包埋实验证实了所得 rhBMP7 成熟肽具有诱导肌肉间充质细胞转化为软骨细胞的生理活性。目前我们尚处于重组表达摇瓶表达阶段,表达量平均在 30~50mg/L 之间。在下一步的工作中,一方面,将着手研究 hBMP7 前肽分子在 *P. pastoris* 胞内环境中对成熟肽折叠的可能作用,以期在酵母分泌蛋白中得到二聚化的 rhBMP7 成熟肽分子;另一方面,将依据 *P. pastoris* 的密码子偏爱性,对 hBMP7 基因进行全面优化改造,同时改善表达条件,使用对温度、pH、溶氧等因素控制准确的发酵罐进行较大规模的发酵培养,以期得到更高的表达量。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Urist MR, Sato K, Brownell AG *et al.* Human bone morphogenetic protein(hBMP). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1983, **173**: 194-199
- [2] Furuta Y, Piston DW, Hogan BL. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development*, 1997, **124**: 2203-2212
- [3] Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & Development*, 1995, **9**: 2795-2807
- [4] Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion cardiac development. *Development*, 1996, **122**: 2977-2982
- [5] Shimasaki S, Moore R K, Otsuka F *et al.* The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*,

- [6] Ozkaynak E , Rueger DC , Drier EA *et al.* OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J* , 1990 , **9** (7) : 2085 – 2093
- [7] Sampath TK , Maliakal JC , Hauschka PV *et al.* Recombinant human osteogenic protein-1 induce new bone formation *in vivo* with a special activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro* . *J Biol Chem* , 1992 , **267** (28) : 20352 – 20362
- [8] Cook SD , Baffes GC , Wolfe MW *et al.* The effect of rOP-1 on healing of large segmental bone defects. *Bone Joint Surg Am* , 1994 , **76** (6) : 827
- [9] Nakashima M , Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotechnology* , 2003 , **21** (9) : 1025 – 1032
- [10] Israel DI , Nove J , Kerns KM , Kaufman RJ *et al.* Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo* . *Growth Factor* , 1996 , **13** : 291 – 300
- [11] Wang EA , Rosen V , D'Alessandro JS *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci* , 1990 , **87** : 2220 – 2224
- [12] Zhu BF(朱帮福) , Lu ZF(卢兹凡) , Chen SM(陈苏民) *et al.* Expression of hBMP3 in baculovirus expression system and purification and bone-inducing assay of hBMP3. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报) , 2002 , **18** (1) : 70 – 74
- [13] Hazama M , Aono A , Ueno N *et al.* Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 1995 , **209** (3) : 859 – 866
- [14] Xiong SH(熊绍虎) , Yu LC(余磊) , Tan HY(谭海燕) *et al.* Expression and purification of recombinant bone morphogenetic-2 in *E. coli* . *J First Mil Med Univ*(第一军医大学学报) , 2002 , **22** (5) : 413 – 416
- [15] Yang JH(阳菊华) , Zhao L(赵丽) , Yang S(杨爽) *et al.* Expression of recombinant human BMP-6 in *Escherichia coli* and its purification and bioassay *in vitro* . *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2003 , **19** (5) : 556 – 560
- [16] Wang XH(王欣璐) , Liu M(刘淼) , Li H(李华) *et al.* High-level expression of the mature region of human bone morphogenetic protein-4 in *Escherichia coli* and the measurement of activity. *Chin J Exp Surg*(中华实验外科杂志) , 2001 , **18** (2) : 133 – 135
- [17] Zhu BF(朱帮福) , Pu Q(蒲勤) , Chen NC(陈南春) *et al.* Expression , purification and bone-inducing activity of recombinant human bone morphogenetic-3 mature peptide. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) , 1999 , **15** (3) : 288 – 292
- [18] Cereghino GPL , Cereghino JL , Iigen C *et al.* Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* . *Current Opinion in Biotechnology* , 2002 , **13** : 329 – 332
- [19] Zhang SP , Zubay G , Goldman E. Low-usage codons in *Escherichia coli* , yeast , fruit fly and primates. *Gene* , 1991 , **105** (1) : 61 – 72
- [20] Sharp PM , Tuohy TMF , Mosurski KR. Codon usage in yeast : cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expression genes. *Nucleic Acids Res* , 1986 , **14** (13) : 5125 – 5142
- [21] Ana V , Dipti AC , Sathyamangalam S *et al.* Effect of Copy Number on the Expression of Hepatitis B antigen in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris* . *Prot Expr Purif* , 2001 , **21** : 71 – 80
- [22] Cereghino JL , Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylophilic yeast *Pichia pastoris* . *FEM Microbiology Reviews* , 2000 , **24** : 45 – 66
- [23] Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences : intimation of translational control. *J Cell Biol* , 1991 , **115** : 887 – 903
- [24] Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrata *in vitro* . *J Cell Sci* , 1980 , **41** (1) : 159 – 175
- [25] Clare JJ , Romanos MA , Rayment FB *et al.* Production of mouse epidermal growth factor in yeast : high level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* , 1991 , **105** : 205 – 212
- [26] Yao H(姚斌) , Zhang CY(张春义) , Wang JH(王建华) *et al.* Highly expression of biologically active phytase in *Pichia pastoris* . *Sci China , Series C*(中国科学 , C 辑) , 1998 , **28** (3) : 237 – 243
- [27] Molloy SS , Bresnahan PA , Leppla SH *et al.* Human furin is a calcium dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* , 1992 , **267** : 16396 – 16402
- [28] Gray AM , Mason AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor- β 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* , 1990 , **247** : 1328 – 1331
- [29] Rattenholl A , Lilie H , Grossmann A *et al.* The pro sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur J Biochem* , 2001 , **268** : 3296 – 3303
- [30] Hillger F , Herr G , Rudolph R *et al.* Biophysical comparison of BMP2 , proBMP2 , and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *J Biol Chem* , 2005 , **280** (15) : 14974 – 14980
- [31] Oort EV , Heer PG , Leeuwen AV *et al.* Maturation of *Pichia pastoris*-derived recombinant pro-Der P 1 induced by deglycosylation and by natural cysteine protease Der P 1 from house dust mite. *Eur J Biochem* , 2002 , **269** : 671 – 679
- [32] Choi BK , Bobrowicz P , Davidson RC *et al.* Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris* . *Proc Natl Acad Sci* , 2003 , **100** (9) : 5022 – 5027