

猪生长激素基因在巴斯德毕赤酵母中的高效分泌表达 及产物的 N-糖基化分析

欧阳菁^{*1} 杨林¹ 龙紫新¹ 王珣章¹ 邢珂¹ 魏平华²

¹(中山大学生物防治国家重点实验室、生物医药中心, 广州 510275)

²(广东省农业科学院, 广州 510650)

摘要 利用含有强启动子 P_{AOX1} 和 α -MF 信号肽序列的巴斯德毕赤酵母载体质粒 pPICZaA 构建出含 PST 基因的重组质粒 pPICZaA-pST。通过电击将经 *Sac* I 酶切后线性化的 pPICZaA-pST 质粒转化到巴斯德毕赤酵母 X-33 菌中, 并筛选 Mut⁺ 表型的重组菌。表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 结果表明, 分泌于胞外的 PST 蛋白分子量比天然 PST 分子量稍大, 而胞内的 PST 蛋白分子量与天然 PST 大小相同。将经 *Sac* I 酶切后线性化的 pPICZaA-pST 再次转化重组酵母细胞 X-33/pPICZaA-pST(Mut⁺), 所得表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示, PST 基因的表达水平明显提高, 且表达产生的蛋白均可发生正确的抗原-抗体结合反应, 表达量达 956mg/L。将发酵液上清进行 N-糖基化分析, 显示 rPST 无 N-糖基化加工修饰。

关键词 猪生长激素, 巴斯德毕赤酵母表达载体系统, 基因表达, N-糖基化分析

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0520-06

猪生长激素(Porcine somatotropin, PST)是由猪脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种单一肽链的蛋白质激素。它不仅能促进蛋白质的合成, 减少脂肪沉积, 还能增加矿物吸收与滞留, 是一种具有广泛生理功能的生长调节素。利用基因工程技术, 人们已通过大肠杆菌原核表达系统^[1~4]、鼠胚胎成纤维细胞^[5]、酵母细胞^[6]和杆状病毒表达载体系统^[7]将 PST 基因进行了表达。本文利用近年来研究发展最快的甲基营养型巴斯德酵母(*Pichia pastoris*)对 PST 基因进行了高效分泌表达研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:含猪生长激素(PST)基因的质粒 pX3-pST 由中山大学生物防治国家重点实验室保存;质粒 pPICZaA、大肠杆菌 TOP10F[']、巴斯德毕赤酵母 X-33、GS115/Albumn (Mut⁺)、GS115/pPICZaA/lacZ (Mut⁺)、ZeocinTM 均购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 引物:上游引物(5'-CCGGAATTCACG-CATGCCCTTGTG-3')下游引物(5'-GCTCTAGAAGCA-

CAGCTGCTCTCCACGAAG-3')由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.3 其它:T4DNA 连接酶、所有限制酶、丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、pGEM[®]-T Easy Vector System1 均购自 Promega 公司;RNase A、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为华美生物工程公司产品;兔抗猪生长激素抗体由广东省农科院兽医研究所提供;天然猪生长激素、酸洗玻璃珠、3, 3'-二氨基联苯氨盐酸盐、Endoglycosidase H 购自 Sigma 公司;硝酸纤维素膜购自 Schleicher&Schuell 公司;YNB、Biotin、Easy SelectTM *Pichia* Expression Kit 购自 Invitrogen 公司;QIA quick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司; Advantage[®]-HF PCR Kit 购自 CLONTECH 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增:参照试剂盒的说明。

1.2.2 酵母表达载体的构建:参照 Sambrook 的方法^[8]。

1.2.3 酵母的电击转化:参照 Easy SelectTM *Pichia* Expression Kit 的说明。

1.2.4 重组酵母 Mut 表型的筛选:参照 Easy Se-

收稿日期:2001-01-16, 修回日期:2001-04-09。

基金项目:广东省自然科学基金资助(963007)。

* 联系作者。Tel:86-20-84112504; Fax:86-20-84036551; E-mail:jauntyoy@hotmail.com

*lect*TM Pichia Expression Kit 的说明。

1.2.5 表达产物的检测:参照 Sambrook 的方法^[8]。

1.2.6 糖蛋白的 N-糖基化分析:在 30 μ L 发酵上清中加入 2 μ L Endoglycosidase H, 总反应体系为 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 作用 5 ~ 15h。

2 结果

2.1 PST 基因的 PCR 扩增与测序

以含 PST 基因的质粒 pX3-pST 为模板, 根据运行程序: 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 50 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 进行 PCR。电泳结果显示, PCR 产物大小约为 580bp(图略), 与预期大小一致。将 PCR 产物回收, 插入到 pGEM[®]-T-Easy 载体上, 进行全自动序列测定, 结果表明, 除插入子的第 183 位发生同义突变(G \rightarrow A)外, 其它碱基均与预期的相同。

2.2 含 PST 基因的重组质粒 pPICZ α A-pST 的构建

从 pGEM-T-Easy-pST 上用 *Eco*R I、*Xba*I 双酶切出含 PST 基因的片段, 并克隆到载体质粒 pPICZ α A 强启动子 P_{AOX1} 下游的 *Eco*R I + *Xba*I 酶切窗口中, 构建重组质粒 pPICZ α A-pST(图 1)。用 *Eco*R I、*Xba*I 双酶切 pPICZ α A-pST, 得到大小 2 个片段, 大片段约 3.6kb, 包含载体 pPICZ α A 的大部分序列; 小片段约 580bp, 为含 PST 基因的片段。由酶切鉴定结果可

知 pPICZ α A-pST 为所需的重组质粒(图 2)。

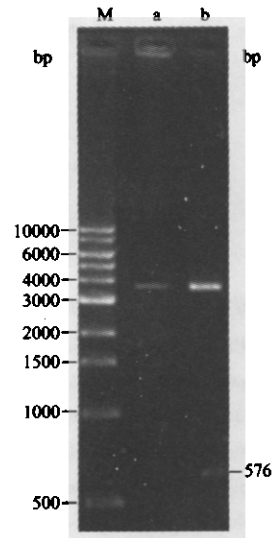


图 2 重组质粒 pPICZ α A-pST 的酶切鉴定

Fig.2 Characterization of pPICZ α A-pST by *Eco*R I / *Xba*I
M. 1kb DNA ladder; a. pPICZ α A digested by *Sac*I;
b. pPICZ α A-pST digested by *Eco*R I + *Xba*I

2.3 重组质粒 pPICZ α A-pST 的电击转化及筛选

将 5 ~ 10 μ g pPICZ α A-pST 回收纯化, 用 *Sac*I 酶切使之线性化后, 用高压脉冲电流转化宿主菌巴斯德毕赤酵母 X-33, 转化物涂布于含 100 μ g/mL ZeocinTM 的 YPDS 板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2 ~ 3d。将得到的 20 个 X-33/pPICZ α A-pST 转化子再转接到 500 μ g/mL ZeocinTM 的 YPDS 板上, 得到 16 个能正常生长的含多拷贝基因的重组菌。

2.4 转化子表型的筛选

用无菌牙签挑取 X-33/pPICZ α A-pST, 并分别点至 MM 板和 MD 板, 同时将 GS115/Albumin (Mut⁺) 和 GS115/pPICZ α /lacZ (Mut⁺) 先后点至 MMH 板和 MDH 板上(对照), 28 $^{\circ}$ C 培养 2 ~ 3d。结果有 14 个在 MM 和 MD 板上生长速度一致, 其表型为 Mut⁺; 有 2 个在 MM 上生长缓慢甚至不生长, 其表型为 Mut⁻(图略)。

2.5 PST 基因在巴斯德毕赤酵母中的表达及其表达产物的鉴定

分别挑取 1 个 X-33/pPICZ α A、6 个 X-33/pPICZ α A-pST (Mut⁺) 和 4 个 X-33/pPICZ α A-pST (Mut⁻) 的单菌落, 接种至 BMYG 培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ \approx 2.0 ~ 6.0。离心收菌, 并重悬于 BMMY 培养基中进行摇瓶培养。将培养液上清和细胞可溶蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示, X-33/pPICZ α A-pST (Mut⁺) 的培养液上清和细胞可溶蛋白样品均比 X-33/pPICZ α A 的多了一条约 22kD 的蛋白带(图 3), 而

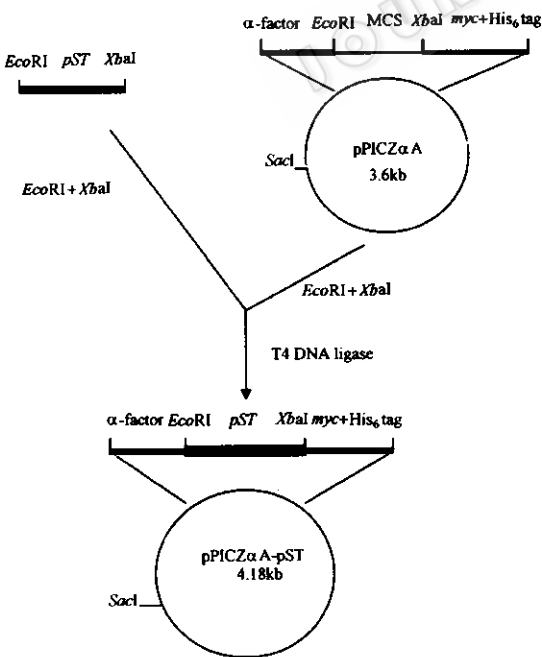


图 1 重组转移载体质粒 pPICZ α A-pST 的构建

Fig.1 Construction of recombinant transfer plasmid pPICZ α A-pST
 α -factor: α -factor signal sequence and priming site; MCS: multiple cloning site; myc + His₆ tag: myc epitope tag and 6 \times His tag

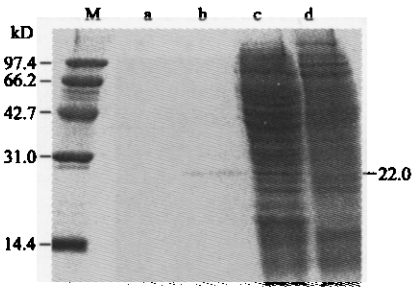


图3 表达产物 rPST 的 SDS-PAGE 检测

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expressed rPST
M. Mid-range protein molecular marker; a. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA; b. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA-pST/9; c. Soluble cellular proteins from cultured X-33/pPICZaA; d. Soluble cellular proteins from cultured X-33/pPICZaA-pST/9

X-33/pPICZaA-pST (Mut⁺) 的培养液上清和细胞可溶蛋白样品中 22kD 的蛋白带不清晰。这说明, PST 基因在 Mut⁺ 表型转化子中的表达水平远远高于在 Mut⁻ 表型转化子中。从 6 个 X-33/pPICZaA-pST (Mut⁺) 中挑出表达量最高的 9 号进行 Western blot 分析, 结果表明, 其培养液上清和细胞可溶蛋白中均有一条猪生长激素特异反应带, 且上清中的比天然 PST (分子量约为 22kD) 略大一点, 而 X-33/pPICZaA 中为阴性结果 (图 4), 这说明表达产物即为预期的 PST 蛋白。

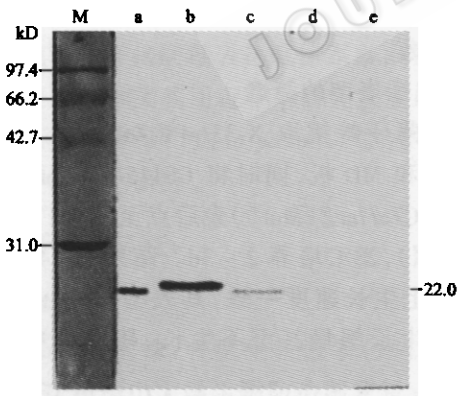


图4 表达产物 rPST 的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of expressed rPST

M. Mid-range protein molecular marker;

- a. Natural pST; b. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA-pST/9;
c. Soluble cellular proteins from cultured X-33/pPICZaA-pST/9;
d. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA;
e. Soluble cellular proteins from cultured X-33/pPICZaA

2.6 重组质粒 pPICZaA-pST 的再次电击转化及筛选

将经 Sac I 酶切后线性化的 pPICZaA-pST 再次电击转化到已整合有多个 PST 基因拷贝的 X-33/

pPICZaA-pST 中, 并将转化物涂布于含 1000 μ g/mL ZeocinTM 的 YPDS 板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2~3d。得到的转化子再用 2000 μ g/mL ZeocinTM 的 YPDS 板筛选。

2.7 PST 基因再次转化后的表达及其表达产物的鉴定

随机挑选再转化后的 6 个转化子进行表达, SDS-PAGE 检测结果表明 X-33/pPICZaA-pST/9-7 的表达水平最高。将 X-33/pPICZaA-pST/9 和 X-33/pPICZaA-pST/9-7 的培养液上清和细胞可溶蛋白进行 SDS-PAGE 检测, 比较发现, X-33/pPICZaA-pST/9-7 的表达水平比 X-33/pPICZaA-pST/9 的明显提高 (图 5), 且分泌的 rPST (重组猪生长激素) 与胞内 rPST 含量的比值也相应增大 (图 5、图 6)。进一步的 Western blot 分析表明, 培养液上清和细胞可溶蛋白中的 rPST 均可进行正确的抗原—抗体结合反应 (图 7)。

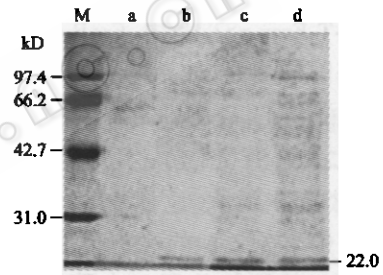


图5 再转化后培养液上清的 SDS-PAGE 检测

Fig.5 SDS-PAGE analysis of supernatants after retransformation

M. Mid-range protein molecular marker;

a. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA;

b~d. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA-pST/9, 9-1, 9-7

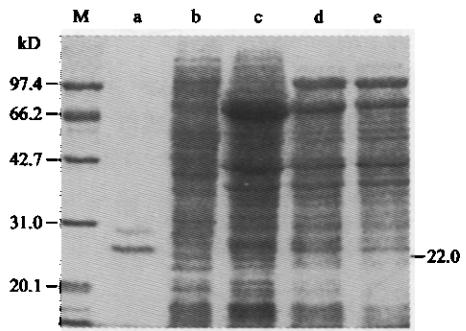


图6 再转化后胞内可溶蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig.6 SDS-PAGE analysis of soluble cellular proteins after retransformation

M. Mid-range protein molecular marker;

a. Soluble cellular proteins from cultured X-33/pPICZaA;

b~d. Soluble cellular proteins from cultured;

X-33/pPICZaA-pST/9, 9-1, 9-7

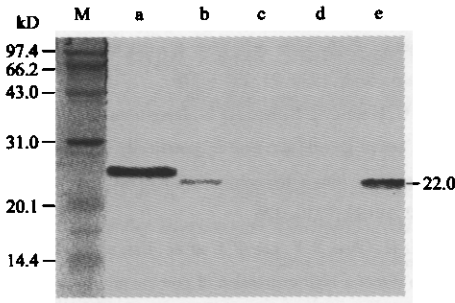


图 7 再转化后表达产物的 Western blot 分析

Fig.7 Western blot analysis of expressed products after retransformation

M. Mid-range protein molecular marker;

a. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA-pST/9-7;

b. Soluble cellular proteins of strain X-33/pPICZaA-pST/9-7;

c. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA;

d. Soluble cellular proteins from cultured X-33/pPICZaA; e. Natural PST

2.8 表达效率及表达量的测定

利用 SDS-PAGE 检测甲醇诱导时间对表达量的影响发现,诱导后 12h 有表达产物出现,随着时间的延长,表达量逐步增大。诱导后 72h 达到最大值(图 8),用日本岛津 CS 双波长薄层扫描仪扫描估测可知,rPST 约占上清中可溶蛋白的 47.8%。根据 Bradford 比色法测定得知,上清中可溶蛋白的总浓度为 2g/L,因此 rPST 的表达量约为 956mg/L。

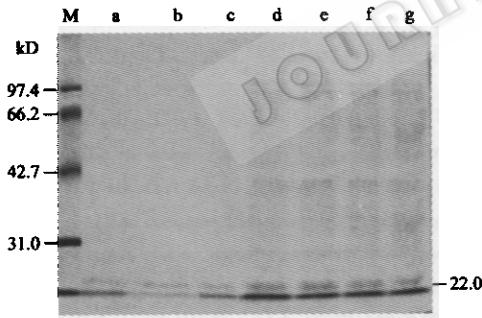


图 8 甲醇诱导 12~96h 培养上清的 SDS-PAGE 检测

Fig.8 SDS-PAGE analysis of supernatant from 12h to 96h after induction

M. Mid-range protein molecular marker;

a ~ g. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA-pST/9-7

from 12, 36, 48, 60, 72, 84, 96h

2.9 培养液上清中表达产物的 N-糖基化分析

将 X-33/pPICZaA-pST/9-7 72h 的培养液上清用 N-糖基化酶 Endoglycosidase H 37℃ 作用 5~15h, SDS-PAGE 检测显示,经 N-糖基化酶作用的目的蛋白分子量没有减小(图 9),说明 rPST 并未发生 N-糖基化。分子量比天然 PST 偏大,很可能是由于 O-糖基化作用的结果。

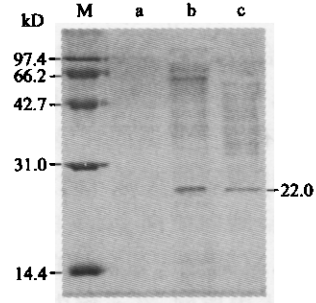


图 9 表达产物的 N-糖基化分析

Fig.9 Analysis of N-glycosylation of expressed products

M. Mid-range protein molecular marker;

a. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA

b. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA/9-7;

c. Supernatants from cultured X-33/pPICZaA/9-7

digested by Endoglycosidase H

3 讨论

本实验室曾将猪生长激素基因在杆状病毒载体系统中表达^[7],虽能保证真核蛋白的翻译后加工修饰,但表达产物仅占胞内可溶蛋白的 4.48%,产量不高,不利于产业化研究。本论文利用的巴斯德毕赤酵母表达体系是近年来发展最快的极具潜力的真核表达系统,已成功地应用于多种异源蛋白的商业化生产^[9-11]。本研究所采用的巴斯德毕赤酵母表达载体质粒 pPICZaA 含有甲醇诱导型启动子——乙醇氧化酶启动子 P_{AOX1} 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,这将更有利于重组猪生长激素蛋白的分离与纯化^[12]。大多数情况下,包含多拷贝基因的重组酵母菌株可生产出更高水平的蛋白质。获得多拷贝表达菌株有以下方法:(1)利用表达载体中含卡那霉素或 Zeocin™ 抗性基因的特点,不断提高 G418 或 Zeocin™ 在培养基中的浓度;(2)将含多重表达盒的拷贝插入到一个载体质粒中;(3)将目的基因的 DNA 片段在体外连接成串联体后再转化酵母菌^[13]。本研究利用电击法获得转化菌株,然后利用更高浓度的 Zeocin™ (500 μ g/mL) 进行筛选的结果证明,获得的转化菌株含多拷贝基因的几率比较高。在此基础上,本研究还应用了一种“再转化”的方法,使 rPST 基因的表达水平进一步得到了提高,且培养液上清与胞内可溶蛋白中目的蛋白含量的比值也相应增大,这说明有更大比例的 rPST 分泌至胞外。表

达的 rPST 水平达到 956mg/L, 具有产业化潜力。

在蛋白质的合成过程中, 当分泌蛋白质的 N 端新生肽刚一出现, 信号识别体 (Signal recognition particle, SRP) 即与带有新生肽链的核糖体结合, 使肽链延伸作用暂时终止或延伸速度大大减慢, 一旦 SRP-核糖体复合体结合到内质网上, 蛋白质合成的延伸作用又重新开始, 直到完成蛋白质的合成。分泌蛋白质经移位后进入内质网, 在小腔内进行肽链折叠、N 端信号肽的切除及初步糖基化作用。然后产生转运小泡, 进入高尔基复合体。高尔基复合体对糖蛋白上的寡聚糖核作进一步的修饰与调整, 并进行分拣, 直至将糖基化的蛋白质送往分泌粒^[14]。本研究所采用的酵母系统, 其 N-糖基化和 O-糖基化作用都是从内质网开始的, 然后在高尔基体中作进一步的加工修饰; 而哺乳动物细胞的 O-糖基化最先定位在高尔基体^[15]。所以, 胞内的 rPST 由于缺乏糖基化加工修饰或糖基化程度很低, 尽管在 N 端融合了信号肽的 89 个氨基酸, 但与天然的已进行糖基化修饰的成熟猪生长激素差不多大。又因为巴斯德毕赤酵母中糖蛋白的糖基化程度虽比酿酒酵母中低得多, 但仍比哺乳动物细胞中的要大一些^[16], 所以分泌至血清中的 rPST 的分子量比天然 PST 大。

巴斯德毕赤酵母在分泌加工的过程中将 N-和 O-糖添加到糖蛋白上, 通常 N-糖的早期加工比较保守^[16]。巴斯德毕赤酵母中仅有极少百分比的糖蛋白发生 O-糖基化^[15]。从 rPST 的 N-糖基化分析可知, rPST 分泌过程中, 几乎未发生 N-糖基化, 这与其一级结构分析的结果一致: PST 基因中未发现常见的 Asn-X-Ser/Thr N-糖基化位点, 但存在多个 O-糖基化的可能序列, 这就说明 rPST 进行的可能是 O-糖基化修饰, 而几乎不存在 N-糖基化加工。O-糖基化对于蛋白质形成正确的二、三、四级结构至关重要^[17], 且对于保证激素类信号分子的生物学活性也起到不可缺少的作用^[18]。因此进一步研究 rPST 的 O-糖基化作用将是件十分有意义的工作。

REFERENCES (参考文献)

- [1] SU T Z (苏悌之), Oxender D L, RI-Geweley M E *et al.* cDNA recombinant of porcine growth hormone and expression in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理学报), 1990, 22(2): 111 ~ 120
- [2] YU X P (余旭平), QI S Z (齐顺章). High level temperature inducible expression of porcine growth hormone in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1991, 7(4): 307 ~ 311
- [3] O' Mahony, D J, Wang, H Y, McConnell, D J *et al.* The effect of phage T7 lysozyme on the production of biologically active porcine somatotropin in *Escherichia coli* from a gene transcribed by T7 RNA polymerase. *Gene*, 1990, 91: 275 ~ 279
- [4] Chen, H C, Hwang, C F, Mou, D G. Long-term expression of the biologically active growth hormone in genetically modified fibroblasts after implantation into a hypophysectomized rat. *Enzyme Microb Technol*, 1992, 14(4): 321 ~ 326
- [5] Hwang, L H, Chen B F, Lee P L *et al.* Use of helper-free retroviral vector to direct a high expression of porcine growth hormone in mouse fibroblast cells. *Biotechnol Appl Biochem*, 1992, 16(2): 171 ~ 181
- [6] Jung J, Lee M *et al.* Method for the production of porcine growth hormone using a synthetic gene in yeast cells. United States Patent 5, 541, 086, 1996
- [7] OUYANG J (欧阳菁), WEI P H (魏平华), YANG L (杨林) *et al.* Expression of porcine growth hormone gene in baculovirus vector system. *Chinese virology* (中国病毒学), 2000, 15(3): 285 ~ 290
- [8] Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] Romanos M A, Scorer C A, Clare, J J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, 8: 423 ~ 488
- [10] 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, pp. 119 ~ 126
- [11] Sreekrishna K, Kropp, K. *Pichia pastoris*. In: Wolf, K I (ed.), *Non-Conventional Yeasts in Biotechnology*. Berlin: Springer, 1996, pp. 203 ~ 252
- [12] Barr K A, Hopkins S A, Sreekrishna K. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm Eng*, 1992, 12: 48 ~ 51
- [13] Thill C P, Savis G R, Stillman G R *et al.* Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. In: Healtot H, Davies J, Florent J *et al.* (ed), *Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms*, Strasbourg, France, societe Franaise de Microbiologie, Paris, 1990, pp. 477 ~ 490
- [14] SHEN T (沈同), WANG J Y (王镜岩), ZHAO B T (赵邦悌) *et al.* Biosynthesis of protein. In: SHEN T (沈同), WANG J Y (王镜岩) (ed), *Biochemistry* (生物化学), 2nd ed, Beijing: Higher Education Press, 1995, pp. 411 ~ 414
- [15] Philippe van den S, Pauline, M R, Raymond, A D *et al.* Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 33(3): 151 ~ 208
- [16] Gemmill T R, Trimble R B. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1426(2): 227 ~ 237
- [17] Otvos L Jr, Krivulka G R, Urge L *et al.* Comparison of the effects of amino acid substitutions and beta-N- vs. alpha-O-glycosylation on the T-cell stimulatory activity and conformation of an epitope on the rabies virus glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1267: 55 ~ 64
- [18] George, A J T. Surface-bound cytokines—a possible effector mechanism in bacterial immunity? *Immunol. Today*, 1994, 15: 88 ~ 89

High Level Secretion Expression of Porcine Somatotropin Gene in *Pichia pastoris* and N-Glycosylation Analysis of Products

OUYANG Jing¹ YANG Lin¹ LONG Qing-Xin¹ WANG Xun-Zhang¹ XING Ke¹ WEI Ping-Hua²

¹ (State Key Laboratory for Biological Control, Biopharmaceutical Center, Zhongshan University Guangzhou 510275, China)

² (Guangdong Academy of Agricultural Sciences Guangzhou 510650, China)

Abstract The porcine somatotropin gene was inserted into the *Pichia pastoris* expression vector of pPICZαA which contains AOX I promoter and α-factor signal sequence. The recombinant plasmid of pPICZαA-pST was linearized by Sac I and transformed into X-33 by electroporation. The multi-copy insert transformants were selected and cultivated in flasks. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that PST gene products were observed in the supernatants with a little larger molecular weight size than the natural PST's, however, the molecular weight size of the PST gene products in the soluble cellular proteins were identical to the natural PST's. Retransformation of the linearized pPICZα-pST showed the expression level was improved greatly and rPST has the same antigenicity as natural one. The expressed rPST accumulated up to about 956mg/L. The N-glycosylation analysis showed rPST had no N-glycosylation.

Key words porcine somatotropin, *Pichia pastoris* expression vector system, gene expression, N-glycosylation

Received: January 16, 2001

This work was supported by Grant from Guangdong Nature Science Fund(963007).

* Corresponding author. Tel: 86-20-84112504; Fax: 86-20-84036551; E-mail: jauntyoy@hotmail.com