

山羊重组促卵泡素长效类似物基因在毕赤酵母中表达

杨欢利, 赵西彪, 宋晓娟, 丁家桐

扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009

摘要: 为了获得长效FSH制剂, 利用重叠PCR技术将山羊FSH的 α , β 亚单位, 通过hCG β 亚单位羧基末端延长肽(CTP)基因序列的连接, 构建成单链长效类似物基因 *FSH β -CTP- α* 。将其克隆至表达载体 pPIC9K, 重组载体线性化处理电转化至毕赤酵母 GS115 中, 经判型和 G418 筛选后获得高拷贝菌株 His⁺Mut⁺。经甲醇诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明: 重组 *FSH β -CTP- α* 的转化子可以正确有效地表达目的蛋白, 分子量约为 29 kD。放射免疫分析法 (RIA) 测定表达上清, 高拷贝转化子的平均表达量为 91.849 mIU/mL, 显著高于低拷贝转化子的平均 37.419 mIU/mL 的表达量, 为 FSH 的结构研究和长效 FSH 制剂的生产奠定了基础。

关键词: 山羊促卵泡素, 长效类似物基因, 毕赤酵母

Expression of Goat Follicle-stimulating Hormone Analogous Gene in *Pichia pastoris*

Huanli Yang, Xibiao Zhao, Xiaojuan Song, and Jiatong Ding

College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: In order to obtain the long-acting FSH preparation, the single strand long-acting analogous gene *FSH β -CTP- α* was successfully constructed by the C-terminal peptide(CTP) of carboxyl-terminal region of human chorionic gonadotropin with the goat *FSH α* -subunit and β -subunit genes, then it was inserted into pPIC9K vector. The recombinant plasmid pPIC9K *FSH β -CTP- α* was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The multi-copy inserts His⁺Mut⁺ were gained by the screening of phenotype and hyper-resistance to G418. After methanol induction, the supernatant was analysed by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western blot. The results show that the transformants of *FSH β -CTP- α* could express the objective protein successfully and the molecular weight is about 29 kD. The concentration of supernatant was detected by Radio-immunoassay and the average expression of multi-inserts is 91.849 mIU/mL and the low-inserts is 37.419 mIU/mL. The expression of multi-inserts is higher than the low-inserts significantly. This research lay the foundation for studying the structure of FSH and the production of long-acting FSH preparation.

Keywords: follicular-stimulating hormone, long-acting analogous gene, *Pichia pastoris*

促卵泡素(FSH)是动物脑垂体前叶嗜碱性促性腺激素细胞分泌的一种糖蛋白质类激素, 与促黄体素(LH)、促甲状腺素(TSH)、绒毛膜促性腺激素(CG)

构成了糖蛋白激素家族。糖蛋白激素是异二聚体分子, 由 α 亚单位和 β 亚单位通过非共价键连接构成。同一物种中, α 亚单位相同, β 亚单位是特异性的, 决

Received: June 26, 2007; Accepted: August 21, 2007

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province(No. BK2005050).

Corresponding author: Jiatong Ding. Tel: +86-514-7979309; Fax: +86-514-7979309; E-mail: jt ding@yzu.edu.cn

江苏省自然科学基金项目资助 (No. BK2005050)。

定着激素的特定的生理功能^[1]。FSH 在雄性动物,可刺激精细管的生长、睾丸间质细胞发育、精原细胞增殖,并在睾酮的协助下促进精子生成。在雌性动物,可刺激卵泡成熟排卵、诱导颗粒细胞合成芳香化酶、催化睾酮转变为雌二醇^[2,3]。FSH 可应用于动物的发情调控、超数排卵及不孕不育的治疗。此外,由于这些糖蛋白激素独特的结构特征,为研究复杂的二聚体糖蛋白的结构与功能的关系提供了一个重要的模型^[4]。

随着 FSH 在畜牧生产和人类医学临床上的广泛的应用,传统的从动物垂体和绝经期妇女尿中提取的 FSH,由于量少、纯度低、活性差,并常含有其它激素及潜在传染性病原,如牛海绵状脑炎、羊瘙痒病等^[5,6],已不能满足需求;而采用基因工程的方法可生产高纯度重组 FSH^[7-9]。然而,由于 FSH 的半衰期短平均只有 2~2.5 h,而同属于糖蛋白激素的人绒毛膜促性腺激素(hCG)的半衰期可长达 12~36 h^[10]。研究发现,这种差别在于 hCG β 亚单位存在羧基末端延长肽(CTP)结构,可以延长 hCG 在体内的半衰期^[11]。Fares 等^[12]人最早开展长效 FSH 类似物的研究。巴斯德毕赤酵母表达系统是被广泛应用的真核表达系统,具有较强的乙醇氧化酶启动子,可有效地控制外源蛋白的表达;其糖基化产生的寡糖类型与哺乳动物的相似,以及具有遗传稳定性强,可进行发酵培养到高细胞浓度等优点^[4]。

本研究将构建的山羊 FSH 长效类似物基因 *FSH β -CTP- α* 克隆到载体 pPIC9K 中构建成毕赤酵母重组表达载体,将重组载体线性化处理电转化至毕赤酵母 GS115 的基因组中,经表型鉴定及 G418 筛选后获得甲醇利用快型的高拷贝菌株 His⁺Mut⁺,经甲醇诱导表达后进行分子量和表达量的分析,为研究糖蛋白激素结构与功能的关系及重组 FSH 长效制剂的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株

质粒 pVITRO $FSH\beta$ -CTP- α 、大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存;毕赤酵母表达载体 pPIC9K、毕赤酵母菌株 GS115 由中国农业大学王建武博士惠赠。

1.1.2 酶及主要试剂

限制酶 *EcoR* I、*Not* I、*Sal* I,高保真聚合酶

*Pyrobest*TM DNA Polymerase, DNA Ligation Kit Ver 2.0, MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver 2.0, DL2 000, DL15 000, Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 购自 TaKaRa 公司。DNA 片段玻璃奶快速纯化回收试剂盒, YNB, G418 硫酸盐购自北京博大泰克生物

基因技术有限公司,一抗为兔抗-*FSH β* 及二抗为羊抗兔 IgG-HRP 购自武汉博士德生物工程公司产品,FSH 放免试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基:酵母抽提物 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L;酵母培养基 YPD、BMGY、BMMY、MD、MM 具体配方见参考文献[13]配制。

1.1.4 PCR 引物

根据毕赤酵母 pPIC9K 载体上多克隆位点处酶切位点的特点及 *FSH β -CTP- α* 的 cDNA 序列上信号肽基因序列的位置,设计用于扩增去信号肽的目的基因 *FSH β -CTP- α* 的引物 F1、F2 及用于毕赤酵母转化子鉴定的引物 5 AOX1、3 AOX1 由上海捷瑞生物工程公司合成,引物序列为:

F1 5' ATAGAATTCAGAAGCTGCGAGCTGACC3' (阴影部分为 *EcoR* I 酶切位点)

F2 5' TATGCGGCCGCTTAAGATTTGTGATAATAA3' (阴影部分为酶 *Not* I 酶切位点)

5 AOX1 5' -GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

3 AOX1 5' -GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

1.2 方法

1.2.1 山羊长效 FSH 类似物基因的构建

利用 PCR 重叠延伸法将 *FSH α* 、*FSH β* 基因及 hCG 末端延长肽(CTP)序列,连接组成山羊长效 FSH 类似物基因 *FSH β -CTP- α* ,具体构建过程见参考文献[14]。

1.2.2 毕赤酵母表达载体 pPIC9K $FSH\beta$ -CTP- α 的构建

以含有构建的目的基因的质粒 pVITRO $FSH\beta$ -CTP- α 为模板,用引物 F1、F2 进行 PCR,扩增出不含信号肽的目的基因。PCR 扩增的条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58.7 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;最后,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。将纯化后的 PCR 产物及载体用 *EcoR* I、*Not* I 进行双酶切,将双酶切后的载体及目的基因琼脂糖凝胶检测并进行切胶回收。用 Gene Tools 进行定量,然后将载体及目的基因用 DNA Ligation Kit Ver 2.0 16 $^{\circ}$ C 连接 30 min 后转化感受态细胞 DH5 α ,提取阳性转化的

重组质粒, 利用 *EcoR* I、*Not* I 双酶切及质粒 PCR 鉴定, 将鉴定正确的重组质粒进行测序分析。

1.2.3 重组表达载体转化入毕赤酵母 *GS115* 中

将测序验证正确的重组表达载体 pPIC9KFSH β -CTP- α 用 *Sal* I 酶切线性化后, 用玻璃奶快速纯化回收试剂盒进行浓缩, 使其浓度达到 0.5~1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 然后电转化至感受态的毕赤酵母 *GS115* 细胞中, 电转化参数为电压 1500 V, 时间为 5 ms, 具体操作方法见 Electroporator 2510 中有关毕赤酵母电转化的操作说明, 电转化后 30 \times 培养 2~3 d 待菌落出现。

1.2.4 多拷贝转化子的筛选

将 MD 平板上的菌落分别转涂到不同浓度 G418 的 YPD 平板来筛选含有目的基因多拷贝插入的菌落, G418 的浓度梯度为 0.25 mg/mL、0.75 mg/mL、1.00 mg/mL、1.50 mg/mL、2.00 mg/mL、2.5 mg/mL、3.00 mg/mL, 具体操作参照 Invitrogen 公司 Multi-Cop *Pichia* Expression Kit 进行。

1.2.5 重组子的判型及 PCR 鉴定

将不同浓度 G418 筛选的菌落分别点到 MD 平板上, 30 \times 培养 2 d; 然后将 MD 平板上的菌落分别拷贝到 MM 和 MD 平板上, 30 \times 培养 2 d; 然后寻找在 MM 和 MD 平板上生长都正常的菌落, 即为甲醇利用快型, 菌落的表型为 His $^+$ Mut $^+$ 。将 His $^+$ Mut $^+$ 型菌落接种 YPD 中过夜培养后提取毕赤酵母基因组, 具体操作见[15]; 以酵母基因组为模板利用 5 AOX1 和 3 AOX1 引物进行 PCR 鉴定, PCR 扩增条件为: 94 \times 预变性 4 min; 94 \times 变性 1 min, 56.4 \times 退火 1 min, 72 \times 延伸 1 min, 30 个循环; 最后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。

1.2.6 阳性酵母转化子的诱导表达

分别挑选不同拷贝的 His $^+$ Mut $^+$ 菌落接种 25 mL 的 BMGY 于 250 mL 的摇瓶中, 30 \times 300 r/min 振荡培养到 OD_{600} 达 2~6, 室温 4500 r/min 离心 8 min 倾倒下清; 用 100 mL BMMY 重悬菌体于 1 L 的摇瓶中, 盖上两层灭菌纱布于 30 \times 300 r/min 诱导表达; 每 24 h 取 1 mL 表达培养基, 同时加入 100% 的甲醇至终浓度为 0.5%, 将取出的样品最大转速离心 5 min, 吸取上清-80 \times 保存待用。

1.2.7 表达产物的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 检测

将-80 \times 保存的表达上清于冰上解冻后用冷丙酮进行浓缩, 然后用超纯水溶解, 取上清液与 SDS 上

样液混合后 100 \times 煮沸 10 min, 然后进行 SDS-PAGE 分析, 浓缩胶为 5%、分离胶为 15%, 电泳结束后用考马斯亮蓝进行染色, 并与标准蛋白分子量比较。将剩余样品进行 Western blot 检测, 具体操作见分子杂交理论与技术[16]。

1.2.8 放射免疫检测上清中目的蛋白的表达量

将-80 \times 保存的表达上清于冰上解冻后, 分别加入 FSH 抗体和 I 125 -FSH, 室温放置 16~18 h 后加入分离剂, 4000 r/min 离心 25 min 立即吸取上清液测定放射性计数(CPM), 根据标准浓度的 CPM 值绘制标准曲线, 然后计算不同 CPM 值的表达上清中目的蛋白的表达量。

2 结果

2.1 FSH β -CTP- α 基因的 PCR 扩增

去掉信号肽序列后目的基因 FSH β -CTP- α 大小为 782 bp, PCR 扩增后 1.5% 电泳检测得到的条带与预期的大小相一致。

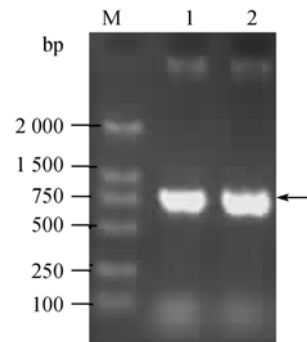


图 1 FSH β -CTP- α 的 PCR 扩增

Fig. 1 The product of FSH β -CTP- α by PCR
M: DNA marker DL2 000; 1~2: PCR products

2.2 重组表达载体 pPIC9KFSH β -CTP- α 的酶切鉴定

毕赤酵母表达载体 pPIC9K 大小为 9.3 kb, 目的基因大小为 782 bp, 重组表达载体用 *EcoR* I、*Not* I 双酶切后可出现两条带: 一条为 9.3 kb, 另一条为 775 bp; 电泳检测得到的条带与预期的大小相一致, 同时测序结果显示 FSH β -CTP- α 编码区没有发生突变。这些结果表明此重组载体可以用于下一步的转化表达。

2.3 多拷贝转化子的筛选

将经过 MD 平板初步筛选的菌落, 用含不同浓度

G418 的 YPD 平板来筛选多拷贝转化子, 最后在 4 mg/mL G418 的 YPD 平板上筛选到 6 个菌落定为高拷贝的转化菌落, 并以在 0.5 mg/mL G418 的 YPD 平板上筛选的菌落作为低拷贝的对照菌落。

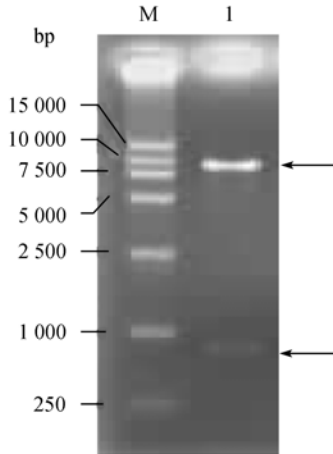


图 2 重组载体 pPIC9KFSHβ-CTP-α 的酶切鉴定
 Fig. 2 Identification of pPIC9KFSHβ-CTP-α digested by EcoR I and Not I
 M: DNA marker DL15 000

2.4 阳性重组子的 PCR 鉴定

以筛选的 His⁺Mut⁺型菌落基因组为模板, 用 5 AOX1 和 3 AOX1 引物进行 PCR 扩增鉴定, 电泳显示两条带: 一条为 2.2 kb, 另一条为 1267 bp; 其中 2.2 kb 为毕赤酵母野生型乙醇氧化酶基因(AOX1), 1267 bp 为目的基因 775 bp 加上载体上 AOX1 序列上 492 bp 大小的部分, 电泳结果与预期条带的大小一致。

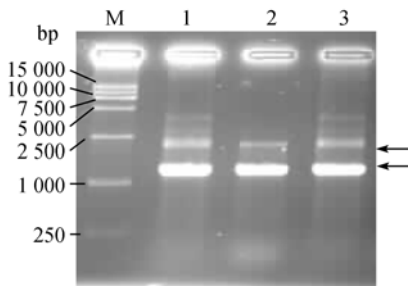


图 3 阳性重组子的 PCR 鉴定
 Fig. 3 Identification of positive recombinants by PCR
 M: DNA marker DL15 000; 1~3: the products of positive recombinants amplified by PCR

2.5 诱导表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

将浓缩的诱导表达产物进行 SDS-PAGE 电泳后用考马斯亮蓝染色, 与蛋白 Marker 比较后显示在

29 kD 处有明显的蛋白条带的出现, 电泳显示前 48 h 未见蛋白条带, 72 h 可见微弱的蛋白表达并随着表达时间的继续表达量逐渐的增加在 168 h 表达量接近最高以后缓慢降低。进一步的 Western blot 分析显示 29 kD 处蛋白为 FSHβ-CTP-α 基因表达的蛋白。

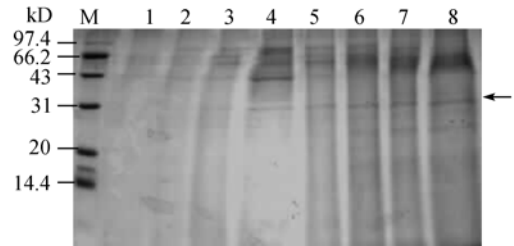


图 4 SDS-PAGE 分析 FSHβ-CTP-α 基因不同时间的表达
 Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression of FSHβ-CTP-α at different times
 M: low molecular weight standard protein marker; 1~8: the objective protein expressed at different times

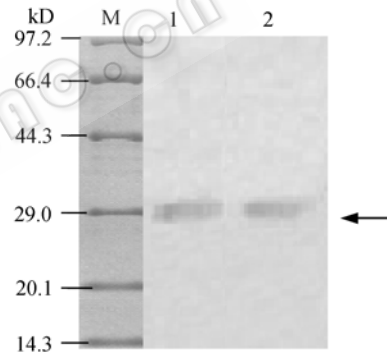


图 5 FSHβ-CTP-α 基因表达蛋白的 Western blot 分析
 Fig. 5 Western blot analysis of the protein expressed in Pichia pastoris
 M: protein marker; 1,2: identification of objective protein by Western blot

2.6 目的蛋白的放射免疫检测(RIA)

表达上清经放射免疫检测后, 结果用 SPSS11.0 统计软件分析显示, 如图 6。

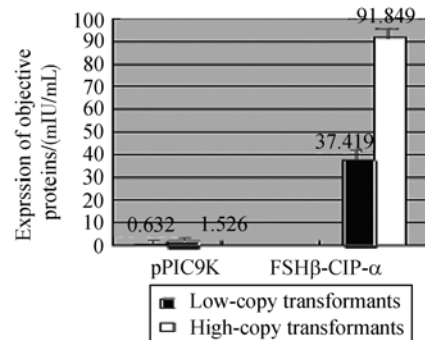


图 6 FSHβ-CTP-α 基因表达蛋白的放射免疫检测
 Fig. 6 Determination of objective protein by RIA

实验组表达量显著高于对照组, FSHβ-CTP-α 基

因的高拷贝转化子的表达量显著的高于低拷贝转化子, 其中放射免疫检测试剂盒的批内变异 $CV < 10\%$, 批间变异 $CV > 15\%$ 。

3 讨论

PCR 重叠延伸法是体外基因重组的一个非常有用的方法, 可使基因的重组过程不受限制性内切酶识别位点的限制, 同时可避免限制性内切酶法重建基因时发生阅读框架移码或密码子改变等问题^[17]。FSH 的 2 个非共价键相连的亚基往往由于一些原因而断裂成单链, 从而失去活性^[18]。Sugahara 等^[19]将 FSH 的 C 端序列与亚基的 N 端序列相融合形成单链 FSH 后可在 CHO 细胞中稳定的表达。CTP 结构由 29 个氨基酸组成含有 4 个 O-连糖链, Matzuk 等^[20]研究显示, CTP 结构可延长 hCG 在体内的半衰期, 但不参与受体结合和信号传导。本研究在利用 PCR 重叠延伸法构建单链 *FSH β -CTP- α* 基础上, 对其进行毕赤酵母表达研究, 结果显示 CTP 结构有利于 FSH 的分泌表达。

糖蛋白激素 FSH 有 2 个糖基化的亚基构成, 每个亚基有两个糖基化位点, α 亚基上位于 52/78 处, β 亚基位于 7/24 处。糖链的组成直接影响激素的生物学活性, 采用化学或酶解的方法去除糖链, FSH 的生物活性将降低至消失。分泌表达可使蛋白形成正确的构象、翻译、加工(糖基化), 外源蛋白的分泌表达需要在信号肽的引导下, 经内质网-高尔基体-囊泡-体外。目前 α -交配因子的前导肽序列使用最为广泛, Mitali samaddar^[9]等在对牛的 *FSH β* 亚基进行毕赤酵母表达时分别使用了 *FSH β* 信号肽和 α -交配因子的前导肽序列, 并进行了比较, 发现当同源 *FSH β* 信号肽替代为 α -交配因子的前导肽后, *FSH β* 的表达量获得了显著的提高, 表达量从 230 ng/mL 提高到 4 μ g/mL。本研究设计了去除信号肽的引物, PCR 扩增获得了去信号肽的目的基因, 利用载体上的 α -交配因子的前导肽获得了较高的表达。

一般情况下, 目的基因整合到酵母染色体上的拷贝数(即基因剂量)越高, 其表达水平也越高, 多拷贝整合有利于充分发挥其表达潜力。Clare 等^[21]在利用毕赤酵母表达破伤风毒素片段时发现, 重组蛋白的表达量与外源基因片段表达单元整合到酵母染色体上的拷贝数直接相关, 表达单元的拷贝数越多酵

母分泌重组蛋白的量越高。最近的研究显示, 在 1~8 整合拷贝数范围内, 乙肝表面抗原(HbsAg)表达量随基因剂量的增加而成比例升高^[22]。但也有少数例外, 即拷贝数增加对表达产生负效应^[23], 这可能由于高拷贝影响外源 mRNA 的翻译效率或蛋白通过内质网时不能正确的折叠。本研究用不同 G418 浓度的 YPD 培养基来筛选高拷贝转化子, 在 4 mg/mL G418 的平板上筛选到 6 个高拷贝菌落, 诱导表达显示高拷贝菌落比低拷贝菌落表达量显著的高, 为了进一步确定拷贝数与表达量之间量上的对应关系, 有必要用 Southern blot 来确定。

糖类是促性腺激素分子结构的重要组成部分, 约占促性腺分子量的 20%~30%^[24], 而 FSH 分子中大约含有 16%的碳水化合物包括己糖、己糖胺、岩藻糖和唾液酸等^[25]。本研究表达的目的蛋白分子量约为 29 kD, *FSH β -CTP- α* 基因表达蛋白的预测分子量为 25.96 kD, 加上 FSH 糖基化的分子量与预期的结果相符合而没有过度的糖基化, 保证了目的蛋白的生物活性及较小的抗原性。

本研究首次在毕赤酵母中成功的表达了山羊促卵泡素长效类似物, 为研究其结构与功能的关系及为复杂的二聚体糖蛋白的研究提供一个重要的模型; 同时为利用毕赤酵母大量生产重组长效 FSH, 以便在畜牧生产及生殖临床上的应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Biochemical and functional aspects of gonadotropin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive Biomedicine Online*, 2000, 1(2): 48-62.
- [2] Zhang ZC. *The Reproduction of Livestock* (3rd ed). Peking: Publishing Company of Chinese Agriculture, 2000, 41. 张忠诚. 家畜繁殖学(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000, 41.
- [3] Rose MP, Gaines Das RE, Balen AA. Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocrine Reviews*, 2000, 21(1): 5-22.
- [4] Rupali Gadkari, Rahul Deshpande, Rajan R. Dighe. Hyperexpression and purification of biologically active human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression & Purification*, 2003, 32: 175-184.
- [5] Lasmezias CI, Deslys JP, Demainay R, et al. BSE transmission to macaques. *Nature*, 1996, 381: 743-744.
- [6] Zhou JM. Prion diseases and the "protein only" hypothesis.

- Prog Bichem Biophys*, 2004, **31**(2): 95–105.
- 周筠梅. Prion 疾病和 “proteinonly” 假说. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(2): 95–105.
- [7] Kobayashi M, Morita T, Ikeguchi K, *et al.* *In vivo* biological activity of recombinant goldfish gonadotropins produced by baculovirus in silk worm larvae. *Aquaculture*, 2006, **256**: 433–442.
- [8] Kumar TR, Schuff KG, Nusser KD, *et al.* Gonadotroph-specific expression of the human follicle stimulating hormone β gene in transgenic mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, **247**: 103–115.
- [9] Samaddar M, Catterall JF, Dighe RR. Expression of biologically active β subunit of bovine follicle-stimulating hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression & Purification*, 1997, **10**: 345–355.
- [10] Wang YF. *Reproductive Medicine*. Peking: Publishing Company of People's sanitation, 1991, 86.
- 王一飞. *生殖医学*. 北京: 人民卫生出版社, 1991, 86.
- [11] Vicenta GC, Irving B. Novel recombinant gonadotropins. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2001, **12**(2): 72.
- [12] Nickle GM, Becker MD, Nicholas S, *et al.* First live birth after ovarian stimulation using a chimeric long-acting human recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) agonist (recFSH-CTP) for *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 2003, **79**(3): 621–623.
- [13] Invitrogen. Multi-copy *Pichia* Expression Kit, Version D, 57–61.
- [14] Sun XP, Yan ZJ, Yang HL, *et al.* Construction and expression of goat follicle-stimulating hormone analogous gene. *Acta Veterinaria Zootechnica Sinica*, 2006, **37**(12): 1250–1253.
- 孙雪萍, 严正杰, 杨欢利, 等. 山羊 FSH 类似物基因构建及其表达. *畜牧兽医学报*, 2006, **37**(12): 1250–1253.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] Wang TH, Feng ZT, Jean Philippe Merlio. *Theory and Technology of Molecular Hybridize*. Peking: Publishing Company of Science, 2005, 167–178.
- 王廷华, 冯忠堂. *分子杂交理论与技术*. 北京: 科学出版社, 2005, 167–178.
- [17] Zhang M, Si LS. Recombinant PCR—the technology of rapid recombine gene *in vitro*. *Journal of Xi'an Medical University*, 2001, **22**(3): 270–275.
- 张梅, 司履生. 重组 PCR——一种快速体外基因重组技术. *西安医科大学学报*, 2001, **22**(3): 270–275.
- [18] Samaddar M, Babu PS, Catterall JF. Identification of an attenuating region in the bovine follicle-stimulating hormone beta subunit mRNA that decrease its expression in *E. coli*. *Gene*, 1999, **228**(1-2): 253–260.
- [19] Sugahara T, Grootenhuys PD, Sato A, *et al.* Expression of biologically active genes encoding the common alpha subunit and either the CG beta of FSH beta subunit: role of linkersequence. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, **125**(1-2): 71–77.
- [20] Matzuk MM, Boime I. The role of the asparagines-linked oligosaccharides of the alpha subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotrophin. *Cell Biol*, 1988, **106**: 1044–1059.
- [21] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, *et al.* High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* containing multiple tandem integrations of gene. *Biotechnology (NY)*, 1991, **9**: 445.
- [22] Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, *et al.* Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression & Purification*, 2001, **21**: 71–80.
- [23] Li HZ, Li LZ, Sun QM, *et al.* Strategies for optimizing *Pichia pastoris* expression system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, **43**(2).
- 李洪钊, 李亮助, 孙强明, 等. 巴斯德毕赤酵母表达系统优化策略. *微生物学报*, 2003, **43**(2): 288–292.
- [24] Muyan M, Boine I. The carboxyl-terminal region is a determinant for the intracellular behavior of the chorionic gonadotropin subunit effects on the processing of the Asn-linked oligosaccharides. *Mol Endocrinol*, 1998, **12**: 766.
- [25] Dong W. *Reproductive Hormone of Livestock*. Peking: Publishing Company of Agriculture, 1983, 137–168.
- 董伟. *家畜生殖激素*. 北京: 农业出版社, 1983, 137–168.



本期广告索引

企业	版位	企业	版位
GE Healthcare 公司	封底	杭州博日科技有限公司	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	生物谷网站	内页
富士胶片(中国)投资有限公司	封三/内页	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	赛默飞世尔科技有限公司	内页
伯乐生命医学产品(上海)有限公司	内页	国药励展	内页