

人 β 干扰素与人血清白蛋白融合蛋白的表达及纯化

张琦, 雷捷勇, 丁月娣, 陈蕴, 屈琳, 陈淑娴, 金坚

江南大学医药学院 细胞与分子药理学实验室, 无锡 214122

摘要: 为开展人 β 干扰素-人血清白蛋白融合蛋白(IFN β -HAS)的临床前研究, 本研究采用免疫学方法对毕赤酵母转化子进行筛选, 得到高产菌株 8 株。在 5 L 发酵罐上对高产菌株进行诱导表达, 产量达 500 mg/L。发酵液经超滤浓缩、染料亲和层析、镍离子螯合亲和层析和 DEAE 离子交换层析纯化后, 融合蛋白纯度达到 96%。Western blotting 杂交表明融合蛋白具有人血清白蛋白和人 β 干扰素的抗原性, 细胞病变抑制法测定 IFN β -HSA 比活性为 1.96×10^7 IU/mg。建立了融合蛋白的生产工艺, 为 IFN β -HSA 的临床前研究奠定了基础。

关键词: β 干扰素, 融合蛋白, 毕赤酵母

Expression and purification of IFN β -HSA fusion protein in *Pichia pastoris*

Qi Zhang, Jianyong Lei, Yuedi Ding, Yun Chen, Lin Qu, Shuxian Chen, and Jian Jin

Department of Cellular and Molecular Pharmacology, School of Medicine and Pharmacology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In order to obtain enough fusion protein for developing preclinical studies of IFN β -HAS, we screened *Pichia pastoris* transformants expressing high-level protein by immunology method. The yield of IFN β -HSA was about 500 mg/L by fed-batch fermentation. The purity of IFN β -HSA reached 96% through the steps of ultrafiltration, Blue Sepharose FF, Ni²⁺-IMAC and DEAE Sepharose FF. Analysis of Western blotting showed that IFN β -HSA had the antigenicity of IFN β and HSA. The specific activity was about 1.96×10^7 IU/mg by standard survival activity test on WISH cells challenged with VSV virus. This study provided a method to produce IFN β -HSA.

Keywords: IFN β , fusion protein, *Pichia pastoris*

人 β 干扰素具有抗病毒、抗肿瘤、抗增殖和免疫调节作用。临床上, β 干扰素主要用于病毒性疾病、恶性肿瘤和自身免疫性疾病的治疗^[1]。1993 年美国 FDA 批准了 Chiron 公司生产的 IFN β -1b 上市销售, 其商品名为 Betaseron, 用于治疗多发性硬化症、神经系统疾病。日本批准了静脉注射的 IFN β 用于治疗

慢性乙型或丙型肝炎。但由于 β 干扰素单体的体内半衰期较短, 其体内静脉注射的药物半衰期只有 2~4 h, 限制了其应用。Cynthia 等利用白蛋白融合技术构建人 β 干扰素与人血清白蛋白的融合蛋白(IFN β -HSA)并在小鼠骨髓瘤细胞中得到表达, 经纯化后研究了其药代动力学性质。以 IFN β -HSA 对猕猴静脉注射

Received: August 24, 2009; **Accepted:** September 22, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China(863 Program)(No. 2006AA02Z153).

Corresponding author: Jian Jin. Tel: +86-510-85918219; E-mail: jinjian31@126.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA02Z153)资助。

或者皮下注射后都显示出良好的药物动力学性质。皮下注射的生物利用度为 87%, 血浆清除率降低了 140 倍, 半衰期由 8 h 提高到 40 h^[2]。以上资料表明 IFN β -HSA 具有很好的医疗应用前景。

本研究采用毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达 IFN β -HSA, 该表达系统不仅可以进行蛋白翻译后的折叠和糖基化, 还具有操作简便、性状稳定、表达背景蛋白少、生产工艺易于放大等优点^[3]。为了得到足够量的蛋白纯品以便开展 IFN β -HSA 的临床前研究, 本研究从高产菌株的筛选为起始, 进而研究了目的蛋白的发酵条件, 摸索出了一条纯化路线, 并进行了体外活性的初步检测, 为药物临床前研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、病毒和细胞株

巴斯德毕赤酵母 GS115 购自 Invitrogen 公司。大肠杆菌 JM109、含有融合蛋白 IFN β -HSA cDNA 的质粒 pPIC9K-IFN β -HSA, 由本实验室构建并保存。滤泡性口炎病毒 VSV 和 WISH 细胞, 也均由本实验室保存。

1.2 工具酶及试剂

限制性内切酶 *Sal* I 购自 TaKaRa 公司; 酵母提取物和蛋白胨购自 Oxoid 公司; 酵母氮基购自上海生工; β 干扰素标准品购自 PEPROTECH 公司(单位 2×10^7 IU/mg 的冻干粉, 使用时以 PBS 溶液溶解稀释成母液待用); 融合蛋白冻干粉的溶解稀释法同标准品; 其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基

MD 固体培养基: 2% 葡萄糖, 1.34% 酵母氮基, 0.02% 生物素, 18.22% 山梨醇, 1.5% 琼脂; 一级种子培养基: 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 甘油; 二级种子培养基: 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 甘油, 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0), 1.34% 酵母氮基, 0.02% 生物素; 发酵培养基: 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 4% 甘油, 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0), 1.34% 酵母氮基, 0.02% 生物素; 流加培养基: 5% 酵母提取物, 10% 蛋白胨, 10% 甘油, 6.7% 酵母氮基, 0.1% 生物素; 防降解培养基(甲醇补料期间): 2.5% 酵母提取物, 5% 蛋白胨, 6.7% 酵母氮基, 0.1% 生物素。

1.4 免疫斑点法筛选高产菌株^[4]

将质粒 pPIC9K-IFN β -HSA 转化大肠杆菌 JM109, 提取质粒, 用限制性内切酶 *Sal* I 酶切质粒, 将 5 μ L 线性化的质粒和 40 μ L 毕赤酵母感受态细胞混合加入电极杯中, 在 1.5 kV、25 μ F、200 Ω 、时间常数 4.2 ms 的条件下电转化, 立即涂布在 MD 平板上, 待菌落长出, 将菌落影印在 0.45 μ m 滤膜上并菌面朝上转贴在贴有硝酸纤维膜的 BMMY 平板上诱导 2 d, 取出中间的硝酸纤维膜, 5% 脱脂奶粉溶液 4 $^{\circ}$ C 下封闭过夜。对目的蛋白用人白蛋白的多抗结合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。PBST 漂洗后再用二抗结合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBST 漂洗后 DAB 显色。挑选出染色较深的菌落进行摇瓶培养和诱导, 并对其摇瓶培养条件如甲醇诱导浓度、诱导浓缩比、诱导时间等因素进行初步优化, 确定摇瓶培养的最佳条件。

1.5 表达融合蛋白

利用 5 L 发酵罐进行巴斯德毕赤酵母的高密度发酵^[5]。先从保存菌种的 YPD 平板上挑取一单菌落接种于种子培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h, 按照 5% 的接种量接入到 2 L 起始培养基中, 初始发酵条件设定为 30 $^{\circ}$ C, 500 r/min, pH 6.0。以 30% 的磷酸和 2 mol/L 的氢氧化钾调节 pH。当初始培养基中的碳源甘油消耗完时, 溶氧上升超过 50%, 开始流加补料生长培养基, 流速为 2.5 mL/min, 共补料 600 mL。补料完成后, 溶氧上升, 此时菌浓 A_{600} 超过 200。转速设定为 800 r/min, 一次性补加 0.5% 发酵液体积的甲醇, 使得菌体的碳源由甘油过渡为甲醇。当溶氧再次反弹至 50% 以上时, 开启甲醇补料与溶氧水平反相关联, 即当溶氧大于 60% 时, 一次性流加 10 mL 的甲醇^[6], 诱导 132 h。SDS-PAGE 电泳检测诱导不同时间的表达情况, 并用双抗体夹心 ELISA 方法定量检测融合蛋白的表达量^[7]。

1.6 融合蛋白的分离纯化

将发酵液在 10 000 r/min 下离心, 收集上清, 以截留分子量 10 kD 的膜超滤浓缩并进行脱盐处理。利用 AKTA 蛋白层析系统, 第一步选用 Blue Sepharose 亲和层析, 在 0.02 mol/L PB、0.1 mol/L NaCl、pH 7.2 条件下平衡柱子, 流速 5 mL/min, 上样后基线淋洗至平衡, 以 0.02 mol/L PB、2 mol/L NaCl、50% 乙二醇、pH 7.2 的条件进行洗脱。第二

步进行 Ni^{2+} 螯合层析^[8] 调节样品 pH 7.2, 先以 0.02 mol/L PB、0.15 mol/L NaCl、pH 7.2 的条件平衡, 流速 2 mL/min, 上样后淋洗至基线平衡, 用 0.02 mol/L PB、0.15 mol/L NaCl、0.05 mol/L 咪唑、pH 7.2 的条件分别以 20%、60% 的比例梯度洗脱。第三步进行离子交换层析, 平衡液为 0.02 mol/L PB、0.05 mol/L NaCl、pH 7.2, 流速 2 mL/min, 上样后淋洗基线平衡, 用 0.02 mol/L PB、0.5 mol/L NaCl、pH 7.2 的条件分别以 30% 和 60% 的比例梯度洗脱。SDS-PAGE 电泳检测主要纯化过程中的样品纯度, 双抗体夹心 ELISA 方法定量检测融合蛋白的表达量。

1.7 融合蛋白的 Western blotting 鉴定

将纯化后的样品进行适当的稀释, 200 V 电压下进行 SDS-PAGE 电泳 50 min, 100 V 电压下转膜 60 min 至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 4°C 下封闭过夜。第 2 天取出, 将脱脂奶粉去除, PBST 清洗 3 次, 分别加入鼠抗人血清白蛋白单抗和鼠抗人 β 干扰素单抗结合(抗体均以 1:100 稀释), 37°C 下孵育 2 h, 去除抗体, PBST 洗膜 3 次。再加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠二抗(1:100 稀释), 37°C 下孵育 2 h。去除二抗, 加 DAB 显色液显色。

1.8 细胞病变抑制法测定融合蛋白的活性

参照中华人民共和国药典(2005 年)第 3 部附录 XC 中干扰素的活性测定方法测定融合蛋白的活性。以含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基在 37°C、5% CO_2 的条件下培养 WISH 细胞, 传代 2 次。用完全培养基稀释成每 1 mL 含 $2.5 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$ 个细胞的细胞悬液, 接种于 96 孔细胞板中, 每孔 100 μL , 于同上的培养条件下培养 5 h。将配制的 IFN β 标准品和 IFN β -HSA 融合蛋白样品溶液移入接种 WISH 细胞的培养板中, 每孔加入 100 μL 。培养 18~24 h。弃去培养板中的上清, 加入保留的滤泡性口炎病毒(VSV, -70°C 保存), 用攻毒培养基(含 3% 小牛血清的 RPMI1640 培养基)稀释至 100 TCID₅₀, 每孔 500 μL 。同样条件下培养 24 h。然后进行染色和脱色。用酶标仪在 570 nm 处测定吸光值。以人 β 干扰素标准品为参照, 计算融合蛋白的效价。

2 结果

2.1 免疫学方法筛选高产菌株

电转化毕赤酵母感受态细胞后 3~5 d 的时间平板上长出约 150 个菌落。取出中间的硝酸纤维素薄膜, 蛋白印迹杂交显色, 结果见图 1。从平板上的菌落中挑选 8 株显色较深的菌株进行摇瓶培养, 经过对于摇瓶培养条件初步优化后, 在甲醇浓度 2%、诱导浓缩比 1/2、诱导时间 60 h 的时候其融合蛋白产量最高可达 200 mg/L, 表达情况见图 2。

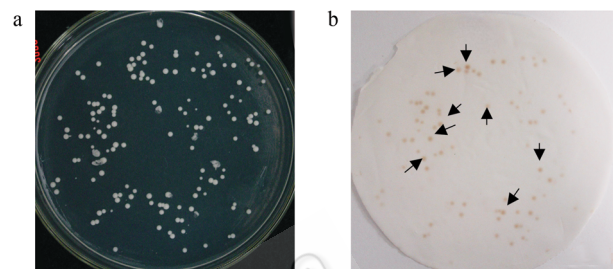


图 1 原位双膜法筛选效果

Fig. 1 Transformants screened with *in situ* two-layer membrane method. (a) Transformants on MD plate. (b) IFN β -HSA expressed from individual transformants.

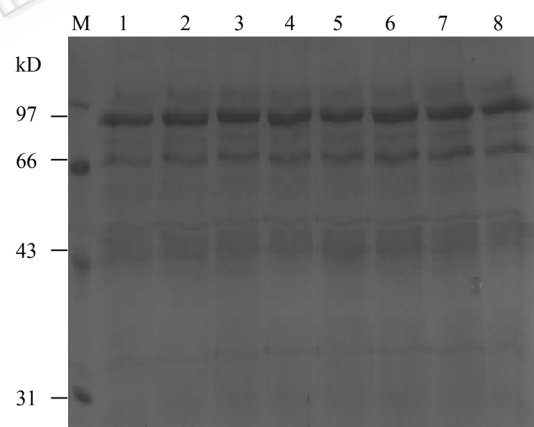


图 2 八株毕赤酵母诱导表达 IFN β -HSA 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of IFN β -HSA expressed in *Pichia pastoris*. M: protein marker; 1-8: SDS-PAGE analysis of shake flask supernatant of eight transformants screened with two-layer membrane method.

2.2 表达 IFN β -HSA 融合蛋白

上罐初始菌浓为 3.3, 在培养至 8 h 时, 菌浓开始迅速升高, 直到诱导前期菌浓 A_{600} 达到 180。采用脉冲式补料方式流加甲醇, 当诱导至 90 h 左右时,

融合蛋白浓度达到最高约为 500 mg/L。直到下罐, 最终菌浓 A_{600} 达到 350, 产量并无减少, 并且目的蛋白的降解并不严重, 这对后期的纯化是有利的。结果见图 3 和图 4。

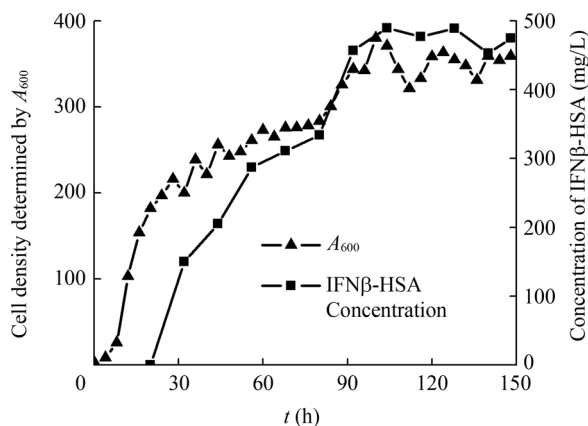


图 3 发酵过程中工程菌的生长曲线和融合蛋白的表达
Fig. 3 Cell growth curve and the expression of fusion protein.

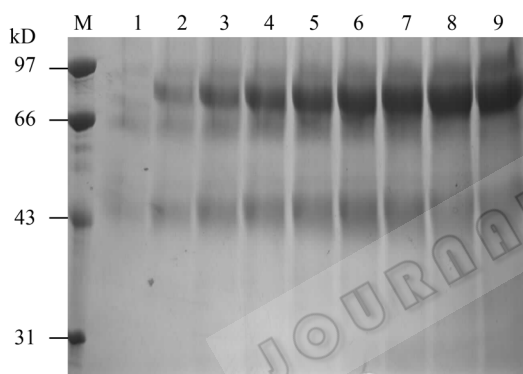


图 4 不同诱导时间下融合蛋白表达情况的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE for expression of fusion protein in different time. M: protein marker; 1: before induction; 2–9: 12, 24, 36,

48, 60, 72, 84, 96 h post induction.

2.3 融合蛋白的分离纯化

发酵上清液经 10 kD 分子截留量的膜超滤浓缩, 可去除无机盐分子及一些小分子代谢产物, 补水稀释除盐使最终电导控制在 15 mS/cm。样品经 Blue-Sepharose 层析分离, 得到 2 个组分 P1 和 P2(图 5), 电泳鉴定目的蛋白大部分存在于峰 P1。合并较纯的目的蛋白洗脱溶液。

合并的目的蛋白溶液中含有少部分的乙二醇, 电导值 44 mS/cm, 透析脱盐至电导值为 15 mS/cm, 经 Ni^{2+} 螯合亲和层析分离, 得到 P1 和 P2 两个组分,

电泳检测目的蛋白集中在峰 P2 里(图 6)。

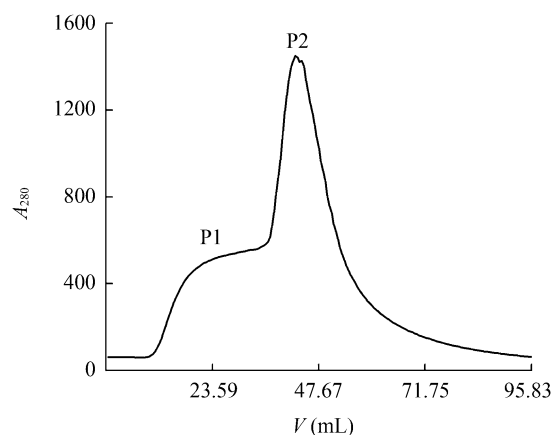


图 5 BlueSepharose FF 层析纯化 IFN β -HSA

Fig. 5 BlueSepharose FF chromatography of IFN β -HSA. P1: elute peak of IFN β -HSA; P2: elution peak of other protein.

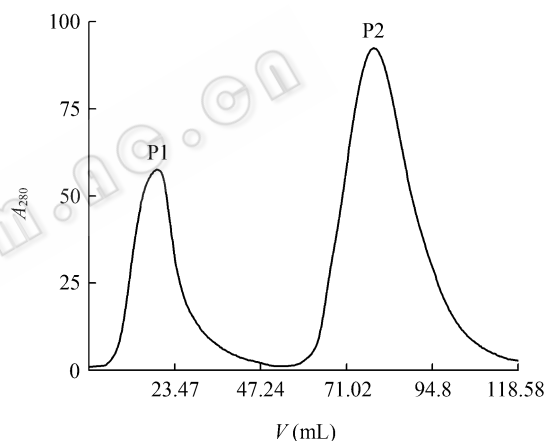


图 6 Ni^{2+} 亲和层析纯化 IFN β -HSA

Fig. 6 Ni^{2+} IMAC chromatography of IFN β -HSA. P1: elution peak of other protein; P2: elute peak of IFN β -HSA.

将收集得到纯度较高的目的蛋白溶液, 经透析脱盐处理使电导值降到 5 mS/cm, 经 DEAE 离子交换层析, 梯度洗脱出现 3 个峰 P1、P2 和 P3(图 7), 电泳检测目的蛋白集中在峰 P3 处, 且电泳条带为单一一条带。

纯化过程主要步骤的电泳分析见图 8。总回收率 17.3%, 见表 1。

2.4 融合蛋白的 Western blotting 鉴定

融合蛋白分别用人白蛋白单抗和人 β 干扰素单抗进行杂交显色后, 在 8.9 kD 处均有条带出现(图 9)。表明该融合蛋白保留了人白蛋白和人 β 干扰素的免疫原性, 确为所要的蛋白结构。

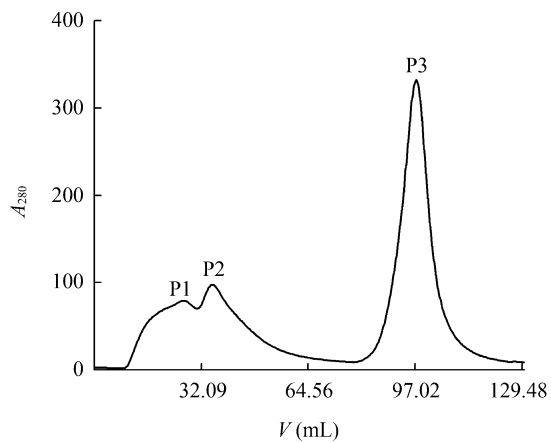


图7 DEAE Sepharose FF 层析纯化 IFNβ-HSA

Fig. 7 DEAE Sepharose FF chromatography of IFNβ-HSA. P1, P2: elute peak of other protein; P3: elution peak of IFNβ-HSA.

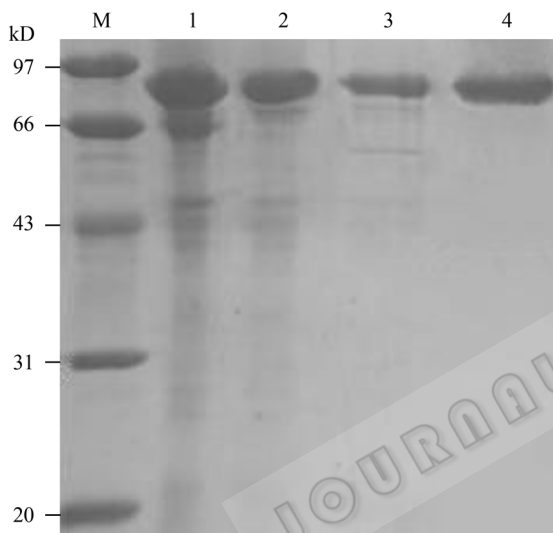


图8 IFNβ-HSA 纯化过程的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of IFNβ-HSA after each step purification. M: protein marker; 1: SDS-PAGE analysis of supernatant; 2-4: SDS-PAGE analysis purification of Blue-Sepharose FF, Cu²⁺ IMAC and DEAE Sepharose FF.

表1 融合蛋白 IFNβ-HSA 的纯化

Table 1 Summary of IFNβ-HSA purification protocol

Purification step	Total IFNβ-HSA (mg)	Purity (%)	Recovery (%)
Supernatant	245	—	100
Ultrafiltration	203	—	83
Blue Sepharose Fast Flow	102	77	42
Ni ²⁺ -IMAC	60	91	24
DEAE Sepharose Fast Flow	42	96	17

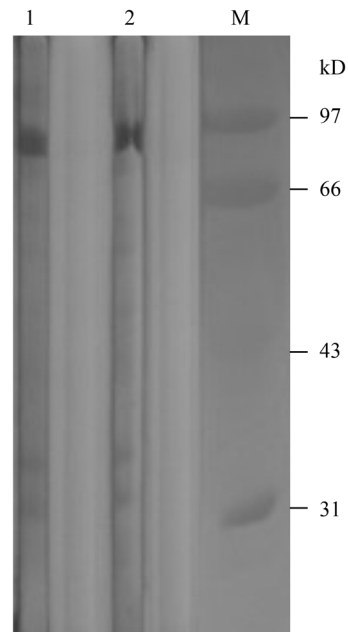


图9 IFNβ-HSA 的 Western blotting 鉴定

Fig. 9 Western blotting analysis of IFNβ-HSA. M: protein marker; 1: fusion protein hybridized with HSA monoclonal antibody; 2: fusion protein hybridized with IFNβ monoclonal antibody.

2.5 细胞病变抑制法测定融合蛋白的活性

不同稀释倍数下的 IFNβ 标准品和 IFNβ-HSA 样品对细胞病变的保护作用见图 10。图中以 $\log_4(x)$ 为横坐标(x 表示稀释倍数), 干扰素不同稀释倍数下作用的细胞 570 nm 处的吸光值作为纵坐标, 得出两条变化趋势极为相近的拟合曲线。

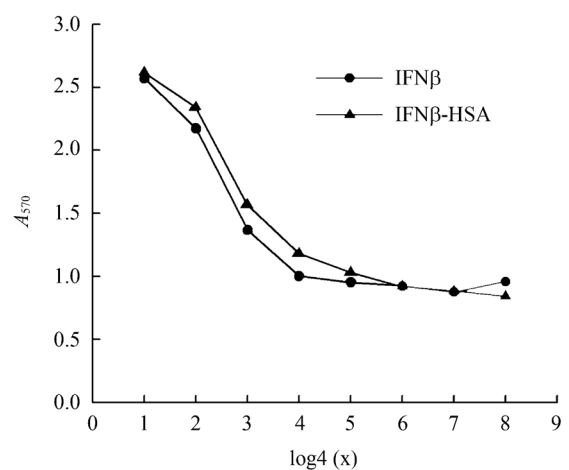


图10 IFNβ标准品和 IFNβ-HSA 对细胞的保护效应

Fig. 10 Protection effect of IFNβ standard and IFNβ-HSA on WISH cell.

取标准品在 ED₅₀ 时吸光值附近的 4 个点做线性拟合，得到拟合方程 $y=-0.5514x+3.1514(R^2=0.9769)$ ；样品吸光值的线性拟合同标准品，得到拟合方程 $y=-0.5088x+3.2025(R^2=0.9685)$ (图 11)。

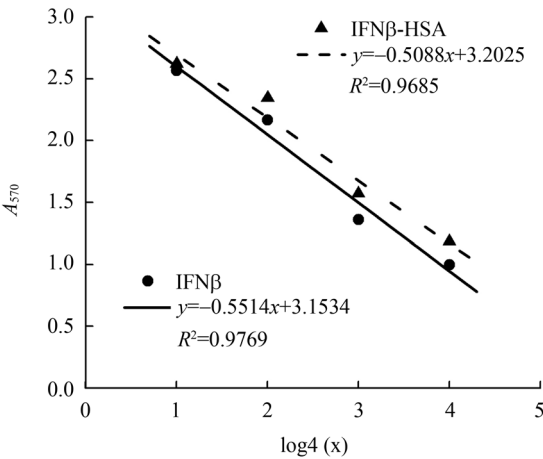


图 11 IFNβ标准品和 IFNβ-HSA 活性相关的直线段
Fig. 11 Line segment of relevance of protection effect of IFNβ standard and IFNβ-HSA on WISH cell.

结合 IFNβ标准品和 IFNβ-HSA 样品的线性拟合方程得到的数据，计算供试品的生物学活性，见表 2。

表 2 融合蛋白样品的活性分析
Table 2 Activity assay of IFNβ-HSA

Item	IFNβ	IFNβ-HSA
ED ₅₀	1.763	1.763
k	0.5514	0.5088
b	3.1534	3.2025
Titer (IU/mg)	2.0×10 ⁷	—
D	100	64
E	32.9727	50.5066

供试品生物学活性 (IU/mL)= $P_{\text{Standard}} \times D_{\text{Sample}} \times E_{\text{Sample}} / D_{\text{Standard}} \times E_{\text{Standard}}$ ；式中 P_r ：为标准品生物学活性，单位为 IU/mL； D_{Sample} ：为供试品预稀释倍数； E_{Sample} ：为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数； D_{Standard} ：为标准品预稀释倍数； E_{Standard} ：为标准品半效稀释倍数。计算得干扰素融合蛋白的活性为 1.96×10^7 IU/mg。

3 讨论

筛选高产菌株在应用毕赤酵母表达外源蛋白的

研究中是重要的一环。传统上多用摇瓶培养并诱导的方法，以期获得高产菌株。此法工作量大，工序复杂。近年来越来越多的研究者通过在质粒上插入 Kana 抗性基因，筛选能够抗高浓度 G418 的转化子的方法来获得目的基因的多拷贝菌株。但实际工作中发现 G418 抗性的高低与目的蛋白的表达量并非呈现一种正比关系^[9]，而且有时拷贝中的目的基因在重组时丢失，只剩下抗性基因，出现假阳性转化子。本研究应用免疫学方法检测表达产物来筛选高表达转化子，具有直观、简便、高通量特点。根据染色深浅直接辨别表达量高低从而挑选菌落进行摇瓶培养和诱导表达。此法简化了筛选高产菌株的工作量，根据表型筛选的可靠性也更高。而对于那些无相应抗体或抗体价格昂贵的蛋白，本法也存在应用上的局限性。

表达量的高低往往成为重组蛋白药物能否顺利实现工业化生产的重要因素。本研究在初步研究了目的蛋白的摇瓶培养和诱导条件之后，又对罐上发酵的条件(甲醇浓度，防降解培养基)进行了摸索，使表达量达到 500 mg/L 的水平，较之过去用 KM71 表达的 80 mg/L 的表达量有了很大的提高^[10]，为以后的工业化生产奠定了基础。

纯化工作在生化药物的研究过程中也是所占比重大很大的方面。本研究提供的纯化路线步骤少、操作方便、工艺稳定。首先发酵液色素的去除以及粗产物的提纯都可以通过 Blue Sepharose FF 一步完成，之后的 Ni²⁺螯合亲和层析和 DEAE 离子交换层析不仅去除了杂蛋白还在不同程度上去除了内毒素及其他杂质。不过在纯化得率上还有待进一步提高。生物活性检测结果表明该融合蛋白不仅保留了其原有的生物学活性，且生物活性值(1.96×10^7 IU/mg)与市售标准品的活性值(2×10^7 IU/mg)相当，这对于其药效学评价是有利的。然而要将其开发成为新一代的长效药物，还需在其毒理学性质及药代动力学性质方面做更多工作，以完备其临床前研究的数据资料。

REFERENCES

[1] Li NL, Ma AL, Yu QW, *et al.* Expression of human beta-IFN using yeast *Pichia pastoris* fermentation strategy

- optimization. *China Biotechnol*, 2004, **24**(1): 57–61.
- 李宁丽, 马安伦, 余奇温, 等. 酵母菌表达倍菲隆发酵工艺研究. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(1): 57–61.
- [2] Cynthia S, Bernardetta N, David WL, *et al*. An IFN- β -Albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates. *J Int Cyt Res*, 2003, **23**: 25–36.
- [3] Li ZL, Zhang FC. Progress of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol Bull*, 2006, **6**: 9–13.
- 李志龙, 张富春. 巴斯德毕赤酵母表达系统研究进展. *生物技术通报*, 2006, **6**: 9–13.
- [4] McGrew JT, Dan L, Brad D, *et al*. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. *Gene*, 1997, **187**: 193–200.
- [5] Berend T, Lisa S, Richard HJ, *et al*. Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Nature Protocols*, 2006, **1**(2): 1007–1021.
- [6] Zhou XS, Fan WM, Zhang YX. Effects of different methanol feeding strategy on Hirudin production in high-density fermentation by recombinant *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2002, **18**(3): 348–351.
- 周祥山, 范卫民, 张元兴. 不同甲醇流加策略对重组毕赤酵母高密度发酵生产水蛭素的影响. *生物工程学报*, 2002, **18**(3): 348–351.
- [7] Zhang LC, Zhang LF, Lei JY, *et al*. Development and application of double antibodies sandwich ELISA method for quantitative detection of IFN β -HSA. *Biotechnol Bull*, 2009, **1**: 121–125.
- 张立操, 张莲芬, 雷健勇, 等. 双抗体夹心 ELISA 定量检测 IFN β -HSA 融合蛋白方法的建立. *生物技术通报*, 2009, **1**: 121–125.
- [8] Sun XD, Li HQ, Sui HY, *et al*. Study on protein separation using immobilized metal ion affinity chromatography. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(4): 495–499.
- 孙旭东, 李红旗, 隋洪艳, 等. 金属螯合亲和层析分离蛋白质的研究. *生物工程学报*, 2000, **16**(4): 495–499.
- [9] Mehmet I, Dinesh A, Jayanta S, *et al*. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**(4): 771–778.
- [10] Lei JY, Zhang LF, Yang JL, *et al*. Secretory expression of the fusion protein IFN β -HSA in *Pichia pastoris*. *China Biotechnol*, 2006, **26**(7): 13–18.
- 雷健勇, 张莲芬, 杨健良, 等. 人 β 干扰素-血清白蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的分泌表达. *中国生物工程杂志*, 2006, **26**(7): 13–18.