

重组毕赤酵母高密度发酵表达 H5N1 禽流感病毒糖蛋白

杨坤宇, 何芳萍, 李少伟, 张佳鸿, 林庆山, 陈振钦, 李仲艺, 张军, 夏宁邵

厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005

摘要: 在 10 L 发酵罐中, 对高致病性禽流感病毒 H5N1 糖蛋白 HA1 在重组毕赤酵母中的表达发酵工艺进行了研究。通过分批补料培养方法探讨不同培养温度、诱导温度、补料方式、微量元素等因素对菌体的生长以及重组蛋白表达和活性的影响。结果表明, 菌种培养和诱导温度均为 25°C 时, 菌体的生长、分泌表达量和与广谱中和抗体的反应活性较好; 微量元素是影响重组 HA1 蛋白生物活性的重要因素; 通过优化高密度发酵工艺, H5N1 病毒糖蛋白 HA1 在发酵罐中的表达量比摇瓶培养提高 10.5 倍, 达到约 120 mg/L, 为大规模制备高致病性禽流感病毒的 HA1 蛋白奠定了基础。

关键词: 毕赤酵母, 高致病性禽流感病毒, H5N1, HA1, 发酵

Expression of H5N1 avian influenza virus haemagglutinin protein in *Pichia pastoris* by high-density cell fermentation

Kunyu Yang, Fangping He, Shaowei Li, Jiahong Zhang, Qingshan Lin, Zhenqin Chen, Zhongyi Li, Jun Zhang, and Ningshao Xia

National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, School of Life Sciences, Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: We produced high pathogenic avian influenza H5N1 haemagglutinin protein HA1 in recombinant *Pichia pastoris* in a 10 L fermentor, to establish a high-density cell fermentation method. We studied the effects of different factors such as culture temperature, induced temperature, methanol feeding methods, trace elements on the growth of *Pichia pastoris*, the yield and the biologic activity of recombinant HA1 protein. The culture temperature in pre-induced and induced stage were optimized at 25°C to adapt cell growth and recombinant protein expression, and induced temperature at 25°C also resulted in higher biologic activity of rHA1 than at 30°C. The binding activity of rHA1 against a wide-spectrum neutralizing antibody was susceptible to the presence of any trace elements, although trace elements would essentially benefit for the cell fermentation. As a conclusion, the expression level of rHA1 produced with optimized fermentation process reached 120 mg/L, which was 10.5 times higher than the one produced in regular shaking flask. The resultant high-density cell fermentation can likely produce rHA1 of H5N1 in large scale.

Keywords: *Pichia pastoris*, high pathogenic avian influenza, H5N1, HA1, fermentation

Received: December 25, 2008; **Accepted:** March 16, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 program) (No. 2006AA020905), National Natural Science Foundation of China (No. 30500092), Project in National Engineering Research Center (No. 2005DC105006), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-0500567), and Xiamen Science and Technology Development Program (No. 3502Z20073001).

Corresponding author: Shaowei Li. Tel: +86-592-2187880; Fax: +86-592-2181258; E-mail: shaowei@xmu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA020905), 国家自然科学基金(No. 30500092), 科技部工程中心建设项目(No. 2005DC105006), 教育部新世纪优秀人才培养计划(No. NCET-05-0567), 厦门市科技计划社会发展项目(No. 3502Z20073001)资助。

禽流感(Avian influenza, AI)是由甲型流感病毒引起的一种禽类感染的疾病综合症。1878年首次在意大利报道该病,随后该病在全世界范围内蔓延。1997年,香港首次报道了人感染高致病性禽流感病毒(High pathogenic avian influenza, HPAI)H5N1亚型事件,HPAI不仅给全世界的养禽业造成了打击,也严重危害到了人类的生命安全^[1,2]。禽流感病毒基因组由8个线状的单链负义RNA片段组成,至少编码11种病毒蛋白^[3]。血凝素蛋白(Hemagglutinin, HA)是病毒表面的主要糖蛋白,也是病毒最主要的表面抗原,可以诱生保护性抗体及细胞免疫,是当前疫苗的主要成分^[4]。HA蛋白包括HA1蛋白(47 kD)和HA2蛋白(29 kD)。HA1上含有HA最主要的5个抗原位点,HA1也是禽流感病毒和细胞表面特异性受体结合的主要位点^[5,6]。HA1的变异是导致禽流感病毒发生抗原漂移(Antigenic drift)和抗原转变(Antigenic shift)的主要原因^[7-9]。研究表明HA1上的某个氨基酸变异可以直接导致禽流感病毒由禽类向人类传播^[10,11]。因此,深入研究HA1的结构和生物学功能对预防、治疗禽流感十分重要。本研究中利用毕赤酵母分泌表达了有生物活性的重组HA1蛋白,建立稳定的高密度发酵工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

宿主毕赤酵母菌株GS115购于Invitrogen公司。重组质粒pPIC9k-HA1和重组菌株GS115/pPIC9k-HA1由本实验室构建,具有His⁺和Mut⁺表型。

1.1.2 化学试剂

酵母膏、蛋白胨为英国Oxoid公司产品,生物素为美国BD公司产品,无机盐、甘油与葡萄糖为国产分析纯试剂,消泡剂“泡敌”为江苏淮阴赛欧消泡剂有限公司产品,HRP为Serotec公司产品,标准蛋白分子量marker为TaKaRa产品。

1.1.3 单抗

单抗1A6、13H8、13D4^[12]和酶标单抗3G4-HRP均由本实验室自己制备。

1.1.4 培养基

YPD活化培养基:葡萄糖20 g/L,蛋白胨20 g/L,酵母膏10 g/L。

BMGY种子培养基:YNB 13.4 g/L,甘油10 g/L,生物素0.4 mg/L,1 mol/L pH 6.0磷酸钾缓冲液100 mL/L。

BMMY诱导培养基:YNB 13.4 g/L,甲醇5 mL/L,生物素0.4 mg/L,1 mol/L pH 6.0磷酸钾缓冲液100 mL/L。

分批发酵培养基(FBS):85% H₃PO₄ 26.7 mL/L, CaSO₄ 0.93 g/L, K₂SO₄ 18.2 g/L, MgSO₄·7H₂O 14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, Glycerol 20.0 g/L, PTM1 4.35 mL/L,用30%氨水调至pH 5.4^[13]。

微量元素(PTM1):CuSO₄·5H₂O 6.0 g/L, MgSO₄·H₂O 3.0 g/L, H₃BO₃ 0.02 g/L, ZnCl₂ 20.0 g/L, Biotin 0.20 g/L, NaI 0.08 g/L, Na₂MoO₄ 0.2 g/L, CoCl₂ 0.5 g/L, FeSO₄·2H₂O 65 g/L, H₂SO₄ 5.0 mL/L。

补料生长培养基:50%(W/V)甘油(含12 mL/L PTM1)。

1.1.5 仪器

BIOSTAT-B 10 L自动发酵罐与微机连接,由MFCS/win 2.0软件控制发酵过程,为德国B.Braun Biotech公司产品;微量蛋白电泳仪为Bio-Rad公司产品;Eppendorf Biophotometer分光光度计,德国Eppendorf公司产品;Columbus Plus型自动洗板机和酶标仪,奥地利TECAN公司产品。

1.2 方法

1.2.1 种子菌的活化

将保存于-80℃的菌种在YPD平板上划线,30℃培养48 h,挑起典型单菌落接种于10 mL YPD液体培养基中,200 r/min培养16 h后按1%的接种量接种到装有150 mL BMGY的1 L三角瓶中,按实验需要的温度,200 r/min培养至OD₆₀₀为6左右。

1.2.2 摇瓶培养

将BMGY培养液3000 r/min常温中离心5 min,弃去上清,菌体用BMMY培养基重悬继续培养,每隔24 h补加1次甲醇至终浓度为0.5%。

1.2.3 补料高密度发酵培养

将BMGY培养液按10%接种量接入10 L BIOSTAT-B发酵罐中,以30%氨水或10%磷酸自动反馈控制发酵液的pH值,调节通气量和搅拌转速使溶氧维持在30%左右,根据需要夹套自动控制温度。发酵培养12 h后开始按一定流速补加甘油,直到OD₆₀₀达280左右,停止补料,待溶氧上升(即甘油耗尽),开始补加甲醇,诱导表达HA1蛋白。采用3种诱导方式:I:补入发酵液总体积0.5%的甲醇,

然后根据甲醇的消耗情况进行补加, 每次甲醇消耗完后, 溶氧(Dissolved oxygen, DO)剧烈上升时补加 50 mL 的甲醇, 并适当添加纯氧以维持 DO 在 30% 左右; II: 补入发酵液总体积 0.5% 的甲醇, 初始碳源消耗完后开始以 3 mL/(L·h) 速度流加甲醇, 3 h 后将流速提高到 6 mL/(L·h), 之后根据 DO 调节甲醇流加速度, 并添加纯氧以维持 DO 在 30% 左右; III: 以 3 mL/(L·h) 速度流加甲醇, 3 h 后将流速提高到 6 mL/(L·h), 之后根据溶氧调节甲醇流加速度, 添加纯氧以维持 DO 在 30% 左右。所有流加用的甲醇都含有 12 mL/L 的 PTM1。发酵过程中按一定时间间隔连续取样测菌体浓度和目的蛋白表达量, 直到发酵结束。由发酵罐控制系统软件自动记录发酵参数。

1.2.4 菌体浓度 OD_{600} 的测量

将菌液稀释到 OD_{600} 为 0.2~0.6 之间, 用 Eppendorf Biophotometer 分光光度计测定 600 nm 处的吸光值。

1.2.5 HA1 蛋白浓度检测

经纯化后的重组 HA1(rHA1)蛋白浓度用参考文献[14]报道的 BCA(Bicinchoninic acid)方法进行测定。

1.2.6 双抗体夹心法检测 rHA1 蛋白表达量

双抗体夹心法检测如文献[12]报道。单抗 1A6 和 13H8 按 1:1 混合包被于 96 孔聚苯乙烯微孔中 (100 ng/孔), 以已知浓度的高纯度 rHA1 蛋白进行梯度稀释制作标准曲线, 3G4-HRP 为酶标二抗。待测样品梯度稀释后进行检测, 根据标准曲线计算发酵液中的 rHA1 蛋白含量。

1.2.7 间接 ELISA 检测 rHA1 蛋白活性

间接法 ELISA 检测方法如文献[15]。高纯度的 rHA1 蛋白按 50 ng/孔包被于 96 孔聚苯乙烯微孔中, 广谱构象单抗 13D4 按一定梯度稀释作为一抗, GAM-HRP 为酶标二抗。样品吸光值($OD_{450/620}$)与临界指控吸光值($OD_{450/620}$)的比值 (Sample/Cut off, S/CO)作为检测 rHA1 活性的指标。

2 结果与分析

2.1 温度对 rHA1 表达的影响

2.1.1 温度对菌种状态的影响

为了考察温度对发酵种子状态的影响, 在摇瓶中用 BMGY 富集菌种时, 选用 22°C、25°C、30°C 三种不同的温度培养重组菌至 OD_{600} 为 6, 再将

BMGY 培养液按 10% 接种量接入 10 L BIOSTAT-B 发酵罐培养, 结果如表 1, 在 22°C、25°C 条件下培养的菌种发酵的最终菌体浓度、重组 HA1(rHA1)的表达量、单位分泌表达量和与广谱中和抗体的反应活性(S/CO 表示)相当, 均高于 30°C 条件, 提示用于 rHA1 发酵的菌种宜采用较低的培养温度, 这可能跟培养温度过高, 菌体易于衰老, 不利目的蛋白的表达^[16]有关。同时, 由于 22°C 培养菌种至 OD_{600} 为 6 约需 24 h, 而 25°C 只需 16~18 h, 因此, 选用 25°C 作为菌种的培养温度。

表 1 不同的培养温度对菌体生长和重组蛋白表达的影响
Table 1 Effects of different culture temperatures on cell density and expression level of rHA1

Induced temperature(°C)	Cell density (OD_{600})	Yield of rHA1(mg/L)	Relative secretion rate [mg/(L· OD_{600})]	S/CO
22	335	82	0.245	12
25	341	88	0.258	12.9
30	297	65	0.219	10.8

2.1.2 不同诱导温度对 rHA1 表达的影响

采用 22°C、25°C、30°C 三种温度对 rHA1 进行诱导表达, 结果如表 2 所示: 诱导温度的提高有利于菌体的生长, 当诱导温度为 22°C 时, 发酵最终菌体浓度 OD_{600} 为 292, 25°C、30°C 诱导温度下的 OD_{600} 分别增加到 342 和 348, 提示低的诱导温度减缓了酵母菌的生长; 诱导温度为 25°C 时虽然 OD_{600} 和单位 OD_{600} 分泌量不是最高, 但蛋白的胞外分泌量达到了较高的 98 mg/L, 说明高的诱导温度有利于提高生物量, 低的温度则有利于外源蛋白的分泌, 适当的温度则可获得较高的单位分泌表达量。同时, 对获得的目的蛋白进行针对广谱中和抗体的生物学活性分析结果表明, 22°C、25°C 诱导温度获得的 rHA1 蛋白具有较好的活性, 而诱导温度升至 30°C 时活性将比 25°C 下降 7 倍。综合分析这些结果, 25°C 为 rHA1 分泌发酵表达的最适诱导温度。

2.2 不同的甲醇流加策略对 HA1 表达的影响

重组菌株在发酵罐中先以甘油为碳源进行培养, 当达到一定菌体浓度后, 再以甲醇进行诱导。从图 1 可看出 3 种不同的甲醇流加方式获得的菌体浓度相近, 方式 II 的略低, 可见不同的甲醇补加方式对酵母菌生长的影响不明显。如图 2, 方式 I 进行补料, rHA1 的产量最低, 这可能是受甲醇浓度始终处于匮乏状态的影响, 甲醇仅能供重组菌继续生长, 不能

再高效诱导外源蛋白的表达^[17,18]; 方式 III 进行补料时, 由于诱导初期甲醇流加速度较慢, 重组菌株适应甲醇的时间比方式 II 推迟了 6~9 h 左右, 导致发酵周期延长, 增加了发酵成本; 流加方式 II 则较优, 其最高分泌表达量可达 103 mg/L, 较方式 I 和 III 分别提高了 59.2% 和 22.4%。发酵过程中, 当碳源由甘油转变为甲醇后, 其代谢途径会发生变化, 存在一个代谢流的重新分配过程^[19], 甲醇流加方式 II 有利于重组菌株在这个过渡期快速适应以甲醇为碳源, 不仅缩短了发酵周期, 还提高了目的蛋白的表达量, 因此, 采用方式 II 进行诱导。

表 2 不同的诱导温度对菌体生长与重组蛋白表达的影响
Table 2 Effects of different induced temperatures on cell density and expression level of rHA1

Induced temperature(°C)	Cell density (OD_{600})	Yield of rHA1(mg/L)	Relative secretion rate [mg/(L· OD_{600})]	S/CO
22	292	89	0.305	12.1
25	342	98	0.287	12.8
30	348	79	0.228	1.82

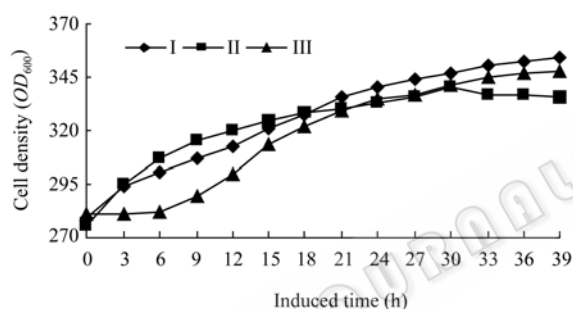


图 1 不同的甲醇流加策略对重组菌株生长的影响
Fig. 1 Effects of different methanol Fed-method on cell density.

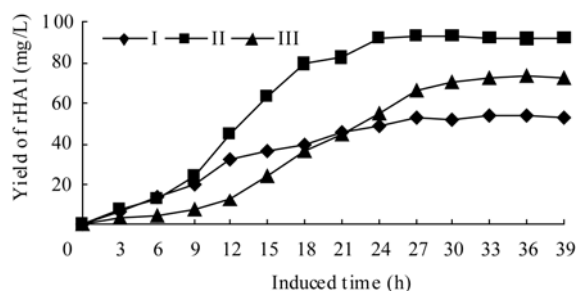


图 2 不同的甲醇流加策略对 rHA1 表达的影响
Fig. 2 Effects of different methanol Fed-method on expression level of rHA1.

2.3 微量元素 PTM1 对 rHA1 表达的影响

以上述的流加方式 II 进行甲醇诱导, 甲醇中加入不同浓度的 PTM1 分别是 0 mL/L、6 mL/L、

12 mL/L 和 18 mL/L。如表 3, 发酵的最终菌体浓度和 rHA1 的分泌表达量与 PTM1 含量呈正相关, 但当 PTM1 浓度超过 12 mL/L 时, 最终菌体浓度和 rHA1 的分泌量反而下降, 说明合适的 PTM1 含量有利于菌体的生长和重组蛋白的分泌。rHA1 与构象型广谱中和单抗的反应性与 PTM1 的浓度呈负相关; 当 PTM1 浓度超过 12 mL/L 时 rHA1 几乎丧失了与构象型的单抗相结合的活性。

表 3 不同的 PTM1 浓度对重组蛋白表达量和生物活性的影响

Table 3 Effects of different PTM1 concentrations on expression level and biologic activity of rHA1

PTM1 concentration (mL/L)	Cell density (OD_{600})	Yield of rHA1 (mg/L)	Relative secretion rate [mg/(L· OD_{600})]	S/CO
0	339.2	118	0.348	13.4
6	351.23	126	0.359	5.3
12	368.54	132	0.358	0.6
18	354.3	125	0.352	0.3

将纯化后的 rHA1 蛋白(30 mg/L)与不同浓度的 PTM1 在室温中反应 15 min, 再进行活性检测, 结果发现 rHA1 与构象型广谱中和单抗的反应性与 PTM1 的浓度呈负相关(数据未显示)。说明 PTM1 中含有可影响 rHA1 的构象活性的某些成分, 因此, 在甲醇诱导时不加入 PTM1。

2.4 时间与 rHA1 诱导表达的关系

在培养和诱导温度为 25°C 条件下, 以甘油为碳源培养菌种至 OD_{600} 为 280, 历时约 33 h; 以补料方式 II 进行诱导, 诱导甲醇中不含 PTM1, 每隔 3 h 取样测量菌体浓度和 rHA1 的表达量, 历时 36 h。如图 3 所示, 培养 18 h 后菌体生长进入对数期; 33 h 进行甲醇诱导后 rHA1 即开始表达, 菌体生长减缓; 54 h

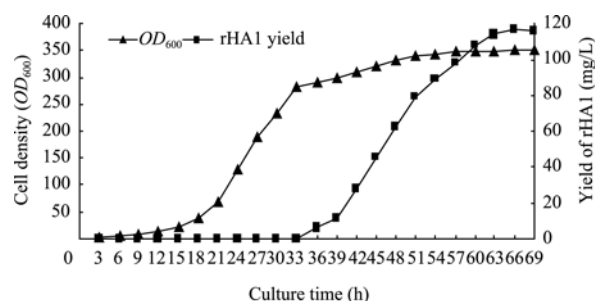


图 3 诱导时间与菌体浓度和 rHA1 表达量的关系
Fig. 3 Cell density and expression level of rHA1 at different stages after induced in fed-batch culture.

后菌体生长进入稳定期, OD_{600} 维持在 340 左右; 66 h 时(即诱导后 33 h)rHA1 的分泌表达量到达高峰值 120 mg/L; 69 h 菌体浓度维持不变, 而表达量略有下降, 提示菌体分泌目的蛋白能力下降, 部分菌体开始老化。因此, 在优化发酵条件下, 培养 33 h, 诱导 33 h 是合适的发酵时间。

2.5 分批补料发酵与摇瓶培养的比较

利用正交实验获得摇瓶诱导表达 rHA1 的最佳条件(数据未显示)。比较发酵和摇瓶表达 rHA1 的差别(表 4), 发酵最终菌体浓度约是摇瓶培养的 6.6 倍, 而发酵中 rHA1 的表达量却是摇瓶表达的 10 倍左右, 且目的蛋白的活性相当, 说明发酵液单位 OD_{600} 的产出率比摇瓶高, 将发酵和摇瓶表达 2 种方法获得的培养上清液平行进行纯化, Endo-H 酶去除 N-糖链后进行 SDS-PAGE 分析, 结果(图 4)显示去糖基的 rHA1 的纯度>90%, 分子量约为 30 kD, 发酵表达的蛋白量明显大于摇瓶表达。结果表明, 工艺优化后的发酵培养比摇瓶培养更适合重组菌株诱导表达目的蛋白。

表 4 rHA1 在摇瓶和发酵罐中培养表达的差别
Table 4 Difference of rHA1 produced between in the shaking flask and fermentor

Process	Cell density (OD_{600})	Yield of rHA1 (mg/L)	Relative secretion rate [mg/(L· OD_{600})]	S/CO
Shaking flask	52	11.5	0.221	12.4
Fermentor	345	120.8	0.350	13.2

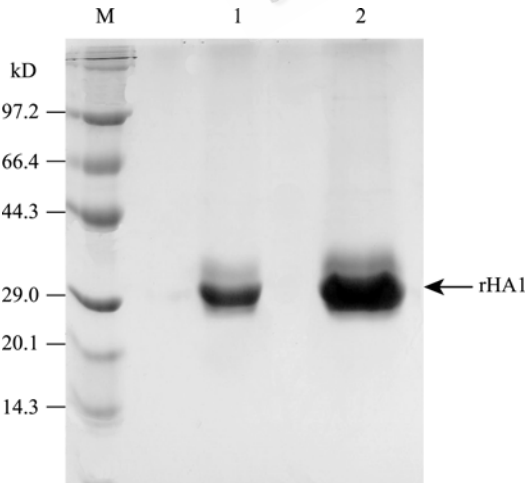


图 4 摇瓶表达与发酵表达的比较

Fig. 4 Comparison of expression level of rHA1 produced in shake flask and in fermentor. M: protein molecular weight marker; 1: purified HA1 protein produced by shake flask (20 μ L); 2: purified HA1 protein produced by fermentor (10 μ L).

3 讨论

重组毕赤酵母基因工程的重要应用之一是利用高密度发酵分泌表达获得重组外源蛋白。酵母工程菌的分泌发酵不仅要求尽量提高菌体的密度和外源蛋白的绝对分泌量, 而且由于外源蛋白直接分泌到培养基中, 因此, 更为重要的是通过优化培养基的组分将对外源蛋白生物活性的影响降到最低。本研究优化了高密度分泌发酵的条件, 以 OD_{600} 测量菌体浓度、线性单抗标准曲线法检测绝对分泌量和广谱中和单抗反应性衡量蛋白的活性等多方面地研究 rHA1 的有效表达量, 说明了胞内表达和胞外分泌表达的发酵工艺的关键差异。其中, 诱导剂甲醇是诱导过程所必需的, 研究结果表明, 在甲醇诱导浓度优化(8 L 发酵液中含有不超过 2 L 的甲醇)过程中甲醇对 rHA1 的活性没有显著的影响; 虽然诱导剂中加入微量元素 PTM1 有利于重组菌株的生长和 rHA1 的分泌, 但极大程度地降低了 rHA1 与中和广谱中和单抗的反应性。作者正尝试在菌体培养期和诱导初期加入少量的 PTM1, 在 rHA1 大量分泌时通过培养基交换、稀释或金属螯合等方式, 以期在维持 rHA1 的活性情况下进一步提高菌体浓度和分泌量。

温度控制是高密度发酵高效分泌表达外源蛋白的重要因素。目前, 关于发酵前菌种培养温度对后期发酵影响的研究鲜有报道, 本研究结果表明不同的菌种培养温度对发酵的最终生物量和表达量有较大的影响, 这可能与培养温度对菌种的生理状态影响有关, 温度高, 酶促反应速率加快, 生长代谢加快, 菌体也易于衰老, 不利后期的诱导表达。一般认为毕赤酵母的最优培养条件是 28°C~30°C, 本研究发现较低的诱导温度(22°C)减缓菌体的生长, 最终生物量偏低, 导致目的蛋白得率下降; 而提高诱导温度(30°C)将导致 rHA1 生物活性的下降, 原因可能是表达速度加快不利于外源蛋白的折叠和有效地向胞外分泌, 比较胞内 rHA1 的表达情况可分析影响 rHA1 分泌效率的因素, 但纯化胞内 rHA 存在一定的难度, 研究正在进行中。

甲醇流加策略的优化是高密度发酵领域的研究热点之一, 本研究采用 3 种不同的补料方式进行诱导, 结果显示诱导初期一次性补加发酵液总体积 0.5% 的甲醇可诱使菌体迅速适应碳源的变化, 有利于缩短发酵周期。甲醇既是碳源又是能源, 诱导期的

菌体生长与外源蛋白诱导表达过程竞相消耗能量, 过低的甲醇浓度可能导致诱导表达的能量不足而降低表达量, 过高的甲醇浓度又将抑制菌体的生长, 甚至导致死亡, 因此诱导过程中保持一定的甲醇浓度对菌体的生长和 rHA1 的表达有重要的意义^[13,16,20]。

溶氧 DO 是反映发酵液中菌体生长状况的一个重要指标^[21], 有研究认为仅仅利用 DO 反馈控制甲醇的流加速率不能有效控制发酵液中的甲醇浓度^[20], 在本研究中, 对多批发酵数据进行统计可得出 DO 与甲醇浓度的对应关系(结果未发表), 利用 DO 变化规律可较好地反馈控制甲醇的用量, 重组菌株生长状态和 rHA1 的有效表达量均可得到良好的控制和重复, 这可能与外源蛋白对重组菌的影响有关, 同时 DO 的反馈调控甲醇诱导浓度有利于发酵工艺的自动化控制和工艺放大, 从而为 rHA1 的大规模表达纯化及其在相关领域的应用奠定坚实的基础。

REFERENCES

- [1] Guan Y, Poon LL, Cheung CY, *et al.* H5N1 influenza: A protean pandemic threat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(21): 8156–8161.
- [2] Subbarao K, Klimov A, Katz J, *et al.* Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, **279**(5349): 393–396.
- [3] Chanturiya AN, Basanez G, Schubert U, *et al.* PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes. *J Virol*, 2004, **78**(12): 6304–6312.
- [4] Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*, 2003, **362**(9397): 1733–1745.
- [5] Lee CW, Senne DA, Suarez DL. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J Virol*, 2004, **78**(15): 8372–8381.
- [6] Knossow M, Daniels RS, Douglas AR, *et al.* Three-dimensional structure of an antigenic mutant of the influenza virus haemagglutinin. *Nature*, 1984, **311**(5987): 678–680.
- [7] Castrucci MR, Campitelli L, Ruggieri A, *et al.* Antigenic and sequence analysis of H3 influenza virus haemagglutinins from pigs in Italy. *J Gen Virol*, 1994, **75** (Pt 2): 371–379.
- [8] Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses. *Virology*, 1989, **169**(2): 283–292.
- [9] Webster RG. Wet markets--a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? *Lancet*, 2004, **363**(9404): 234–236.
- [10] Ito T, Suzuki Y, Takada A, *et al.* Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J Virol*, 1997, **71**(4): 3357–3362.
- [11] Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, *et al.* Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol*, 2000, **74**(24): 11825–11831.
- [12] Chen YX, Luo HF, Ge SX, *et al.* Development and characterization of MAbs against haemagglutinin of highly pathogenic H5 Avian influenza virus. *Chin J Virol*, 2006, **21**(6): 422–427.
陈毅歆, 罗海峰, 葛胜祥, 等. 高致病性 H5 亚型禽流感流行性感冒病毒血凝素单克隆抗体的制备与初步应用. *病毒学报*, 2006, **21**(6): 422–427.
- [13] Wang Y, Hua ZZ, Liu LM, *et al.* High-level production of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2003, **24**(4): 635–639.
王芸, 华兆哲, 刘立明, 等. 重组毕赤酵母高密度发酵生产碱性果胶酶的策略. *生物工程学报*, 2003, **24**(4): 635–639.
- [14] Liu RS, He ZQ, Li SW, *et al.* Hepatitis E virus capsid protein production by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(3): 450–455.
刘如石, 何志强, 李少伟, 等. 重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白工程菌的高密度培养. *生物工程学报*, 2004, **20**(3): 450–455.
- [15] Guo QS, Ge SX, Xiong JH, *et al.* The molecular differences between genotype 1 and genotype 4 of HEV in their neutralization region. *Chin J Virol*, 2007, **23**(6): 454–458.
郭清顺, 葛胜祥, 熊君辉, 等. 戊型肝炎病毒基因 1 型和基因 4 型中和表位区域分子差异研究. *病毒学报*, 2007, **23**(6): 454–458.
- [16] Li HM, Wang HN, Xu QK. Advance of *Pichia pastoris* on high-density fermentation. *Lett Biotechnol*, 1999, **17**(1): 29–48.
李洪森, 王红宁, 许钦坤. 毕赤酵母高密度发酵研究进展. *生物技术通讯*, 2005, **16**(2): 210–12.
- [17] Lee J, Lee SY, Park S, *et al.* Control of fed-batch fermentations. *Biotechnol Adv*, 1999, **17**(1): 29–48.
- [18] Ohashi R, Mochizuki E, Suzuki T. A mini-scale mass production and separation system for secretory heterologous proteins by perfusion culture of recombinant *Pichia pastoris* using a shaken ceramic membrane flask. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**(5): 655–660.
- [19] Zhang SL, Chu J. A Multi-scale Optimization of Microbial Processes. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 75–78.
张嗣良, 储炬. 多尺度微生物过程优化. 北京: 化学工业出版社, 2003: 75–78.
- [20] 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, 范位民, 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.