

• 综 述 •

重组蛋白正确折叠与修饰的提高策略

李家冬, 王弘

华南农业大学 食品学院广东省食品质量与安全重点实验室 畜禽产品精准加工与安全控制技术国家地方
联合工程研究中心 (广东), 广东 广州 510642

李家冬, 王弘. 重组蛋白正确折叠与修饰的提高策略. 生物工程学报, 2017, 33(4): 591–600.

Li JD, Wang H. Strategies to improve the folding and modification of recombinant proteins: a review. Chin J Biotech, 2017, 33(4): 591–600.

摘 要: 随着分子生物学的研究和不断发展, 基因表达技术有了很大的进步。到目前为止, 人们已经研究出多种表达系统用以生产重组蛋白, 但没有一种表达系统能够完全满足当前需要, 各种活性肽和蛋白质类药物的需求逐年攀升, 不仅对表达量有要求, 更需要正确的翻译后折叠、修饰, 使表达蛋白和天然构象更加接近, 具有更高的活性和稳定性。结合目前的研究工作从表达系统与宿主、分泌表达、共表达、融合表达和培养条件等方面综述了其对重组蛋白正确折叠以及翻译后修饰的影响, 并提出可能改进的策略。

关键词: 重组蛋白, 表达系统, 折叠, 翻译后修饰

Strategies to improve the folding and modification of recombinant proteins: a review

Jiadong Li, and Hong Wang

National-Local Joint Engineering Research Center for Processing and Safety Control of Livestock and Poultry Products (Guangdong),
Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: Gene expression technology has made great progress with the continuous developments and researches of

Received: September 5, 2016; **Accepted:** December 27, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31271866), Province Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2014A030311043), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2014A050503059), Science and Technology Planning Project of Guangzhou (No. 2014J4100185).

Corresponding authors: Hong Wang. Tel: +86-20-85288279; Fax: +86-20-85280270; E-mail: gzwhongd@163.com

国家自然科学基金 (No. 31271866), 广东省自然科学基金 (No. 2014A030311043), 广东省科技计划项目 (No. 2014A050503059), 广州市科技计划项目 (No. 2014J4100185) 资助。

molecular biology. Though many systems to produce recombinant proteins have been studied, none of them is available so far to satisfy the needs completely. With the increasing demands of bioactive peptides and protein drugs, expression quantity and correct posttranslational folding and modifications are also needed under the circumstance which can make proteins more close to native conformation and higher activity and stability. Based on our previous work, we summarized the factors affecting the folding and modifications of recombinant proteins correctly from five aspects, including expression system and hosts, secretory expression, coexpression, fusion expression, and the culture conditions, as well as improvement strategies.

Keywords: recombinant proteins, expression systems, folding, posttranslational modification

在过去的研究中,科学家发现真核生物蛋白质组的复杂性远胜其基因组,蛋白质结构的多样性和翻译后修饰使蛋白质组的复杂性进一步增加。同一编码基因的蛋白质可能因为折叠后结构的不同而体现出不同的生物活性。同样,蛋白质翻译后不同化学基团的修饰也是影响其发挥正常生物学功能的重要原因^[1]。因此,在利用基因工程技术进行各种生物活性蛋白的获取、改造进程中,如何保证目的蛋白正确折叠结构,如何获得翻译后目标蛋白的有效修饰,一直是蛋白质工程领域持续研究的热点。本文将从表达系统及宿主的选择、表达方式以及表达条件等方面,分析其对外源蛋白正确折叠以及翻译后修饰的影响,并提出可能改进的策略。

1 表达系统及表达宿主的选择

目前,常用四大表达系统的表达特点已经

比较明确,因此,当针对外源蛋白的基本特点确定好表达系统后,表达宿主的选择就显得十分重要。常用宿主如表 1 所示。在采用不同的大肠杆菌进行青霉素酰胺酶表达时发现,以经过改造的 lon 和 ompT 蛋白酶缺陷菌 BL21(DE3) 替代普通宿主大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 11105,可溶性蛋白具有明显优势,其得到的产物活性是在 *E. coli* ATCC 11105 菌株中表达时的 10 倍^[2]。当然,表达载体和表达宿主的匹配也需要根据外源蛋白的特点进行试验筛选。比方说在避免包涵体的形成^[3-4]方面,Suryanarayana 等^[5]把构建的 3 种质粒 PA-pPROEXHTa、PA-pQE30 和 PA-pET32c 分别转入不同的宿主 *E. coli* DH5α、BL21-DE3、DE3-pLysS、M15 和 XL-1 blue,最终发现只有 PA-pQE30-XL-1 blue 中的重组蛋白以可溶形式存在,其他重组株均有包涵体产生。

表 1 常用表达宿主

Table 1 Frequently-used hosts for expression

Expression system	Hosts
Prokaryotic expression system	<i>E. coli</i> (BL21 series ^[9] , Rosetta 2 series, Origami 2 series), <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptomyces</i>
Yeast expression system	<i>Pichia pastoris</i> ^[10] , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Baculovirus expression vector system	High Five ^[11] , Sf9 ^[12] , Sf21 ^[13] , Tn-368, SFSWT-1, TN5B1-4, Ea4, Tn4h
Mammalian expression system	CHO ^[14] , 293 ^[15] , Myeloma cell ^[16] , COS, MDCK

另外,二硫键的形成是某些外源蛋白的正确折叠和活性所必需时^[6-8],能促进二硫键形成的宿主菌,也可提高活性蛋白的表达。K-12 衍生菌的 Origami 2 系列属于硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin reductase, trxB) 和谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, gor) 两条主要还原途径双突变菌株,可显著提高细胞质中二硫键形成几率,促进活性蛋白的可溶性表达。Nikolaivits 等^[17]在 BL21 和 Origami 2 中分别表达角质酶,发现在 Origami 2 细胞质中表达的产物热稳定性比 BL21 细胞中高 73%。同样地, Xu 等^[8]在表达南极拟酵母 *Pseudozyma antarctica* lipase B (Pal B) 时也发现在 Origami B(DE3) 中的重组脂肪酶活性是 BL21(DE3) 中的 3 倍,其原因可能就是由于 Origami 细胞质中的氧化环境更利于二硫键的形成,促进了表达产物正确折叠。与此同时,利用定向进化,通过分离分子伴侣或折叠因子的变异体,可以实现宿主细胞对外源重组蛋白的特异性折叠。该策略被用于分离大肠杆菌 GroEL 突变株,并证明其对绿色荧光蛋白的折叠效率提高了 8 倍^[18]。

不同的昆虫细胞完成蛋白糖基化的能力不同。Sf9 细胞一般只能产生高甘露糖或寡甘露糖型糖蛋白,High five 细胞则比 Sf9 细胞更为复杂,甚至能完成一些末端唾液酸化^[19-20]。TN5B1-4、Ea4 和 Tn4h 细胞能产生复杂的半乳糖型多糖^[21-22]。

另外,对昆虫细胞进行糖基化改造,将哺乳动物糖基转移酶基因插入野生杆状病毒载体中,使昆虫细胞能稳定表达哺乳动物糖基化修饰酶类,已成为新的提高昆虫表达系统糖蛋白表达能力的有效手段。Juliant 等^[23]将 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (GNT-I) 基因、GNT-II 基因

和 β -1,4-半乳糖转移酶基因 (β -1,4-GalT I) 添加至杆状病毒基因组中,成功得到了具有半乳糖基化的抗体。此外,也有研究者通过构建携带哺乳动物表达原件的重组病毒,使其能够在哺乳动物细胞中表达^[24]。

常用的几种用于表达重组蛋白的哺乳动物细胞株有 CHO 细胞、COS 细胞和 293 细胞等。不同的细胞对重组蛋白的修饰可能会稍有差别,如人 CHO 细胞在表达人白血病抑制因子时会出现 N 端氨基酸缺失,表达人组织因子旁路抑制剂时,会出现 C 端氨基酸的缺失,而这些情况在另外的一些细胞株中并未出现^[25-26]。

2 分泌表达

大肠杆菌细胞质的还原性环境可能因为抑制蛋白二硫键的形成,进而对外源表达蛋白的正确折叠和活性造成不利影响^[6]。除了采用如前所述的改造宿主方式,为促进分泌型外源蛋白的可溶表达和正确折叠,可以尝试将被表达的蛋白质分泌到周质腔或胞外,以减少还原性环境造成的不利影响^[27]。当前体肽通过翻译后 Sec 途径进行运输时,信号识别粒子 (SRP) 依赖途径被证明有助于促进胞内易聚集前体肽的分泌,避免包涵体的形成^[28]。也有研究表明,细胞被膜上的 Dsb 蛋白酶家族可以促进蛋白的正确折叠^[7],从而提高外源蛋白的活性、稳定性和可溶性^[29]。许多因素,包括信号肽的类型、外源蛋白的大小及氨基酸组成等都会对蛋白转运造成影响。研究表明,大肠杆菌分泌蛋白主要是分泌至周质腔,这些蛋白的 N 端一般含有一段富含疏水氨基酸残基的信号肽,能帮助蛋白穿过细胞膜进入周质腔,信号肽被信号肽酶切除后,产生成熟的蛋白质^[30]。目前使用比较广

泛的有周质腔蛋白 pel B、外膜蛋白 omp A 和 omp F、枯草芽胞杆菌木聚糖酶等多种天然分泌蛋白的信号肽。Cui 等^[31]用放线菌信号肽 Kp-SP 促进地衣杆菌 α 淀粉酶的分泌表达,得到的 α 淀粉酶活性是未分泌表达的 10 倍。同样地, Mohajeri 等^[32]利用 pelB 使人内皮抑素直接分泌到 BL21(DE3) 周质腔中,得到的可溶蛋白含量占细胞总蛋白的 35%,避免了大量包涵体的产生。此外,不同的信号肽分泌能力不同,要根据目的蛋白的不同进行试验筛选。Zhao 等^[9]在 BL21(DE3) 中分别过表达由 TorA 和 PelB 引导的 GadB,发现 TorA 促 GadB 分泌表达的效果比 PelB 好,得到的 GadB 活性更高。

真核细胞的分泌途径是一个涉及多细胞器的复杂系统,参与前体肽的运输和翻译后修饰,因此,提高其分泌途径中的各个环节能在一定程度上促进其翻译后修饰,如 N 端信号肽能够引导前体肽到内质网,使其在内质网中进行修饰,而促进前体肽在内质网和高尔基体之间的转移对于成熟蛋白的形成具有很大的帮助^[33]。

毕赤酵母有两类信号肽可供选择:外源蛋白自身具有的信号肽和来源于酵母的信号肽。外源信号肽引导表达的重组蛋白容易降解,而且效率较低,因此通常选择酵母本身的分泌信号肽来指导外源蛋白的分泌,主要有蔗糖酶 (SUCZ)、酸性磷酸脂酶 (PHO1)、Killer 毒素和 α 因子 (MF α 1) 等^[34]。同样地,针对不同外源蛋白,不同信号肽其分泌能力不同。Zhang 等^[35]在毕赤酵母中分别用 α 因子和天然信号肽引导黑曲霉 QU10 的果糖基转移酶分泌表达,3 d 后发现 α 因子引导表达的产物活性是天然信号肽的 6 倍。

3 共表达

一般情况下,由于强启动子的调控,外源蛋白在大肠杆菌中的表达水平往往会比较高,而宿主自身的促折叠因子无法满足外源蛋白正确折叠的需要时,易形成包涵体。分子伴侣本身不是功能蛋白的组成部分,但是与外源蛋白共表达时能够阻止分子内和分子间不正确的相互作用,进而帮助蛋白质正确折叠,在一定程度上能克服包涵体的形成^[36]。

目前大肠杆菌表达系统中用于共表达以促进外源蛋白正确折叠并增加其可溶性的辅助蛋白主要有 Gro EL/ES、Dna K/Dna J/Grp E、硫氧还蛋白 (Thioredoxin)、折叠酶 (Foldase) 和引发因子 (Trigger factor) 等,应根据外源蛋白的特点选择不同的分子伴侣或折叠酶。例如在大肠杆菌中共表达 Gro EL/ES 能增加某些蛋白 (人乙醛脱氢酶 3A1^[37]、腈水合酶^[38]、人乳头瘤病毒衣壳蛋白 L1^[39]和磷酸合成酶^[40]等) 的可溶性,却对其他一些蛋白 (人酸性富含胱氨酸分泌型蛋白^[41]、噬菌体 P22 结构蛋白^[42]) 无增溶效果。同样地,Xu 等^[8]在大肠杆菌 BL21(DE3) 和 Origami B(DE3)中共表达 Pal B (Trigger factor, Gro EL/ES, Dna K/J-Grp E 和 Dsb A),发现只有共表达 Dsb A 时才能促进表达产物的活性。此外,当包涵体在周质腔中形成时,共表达周质腔蛋白酶可以提高周质腔对外源蛋白的加工能力,促进外源蛋白折叠,减少包涵体的形成^[27,43]。

二硫键外源蛋白正确折叠的限制因素之一就是二硫键的形成,而分子伴侣如 PDI 等能很好帮助二硫键的形成,从而防止蛋白聚合、减缓折叠速率等^[44-45]。如 Inan 等^[46]用毕赤酵母表达重组 Na-ASP1 蛋白 (含 20 个半胱氨酸) 时发

现, Na-ASP1 基因与 PDI 基因共表达时可减少不可溶 Na-ASP1 的形成, 且明显提高其分泌水平, 说明 Na-ASP1 在胞内的折叠过程和可溶表达得到提高^[47-48]。如果将几种促折叠蛋白分子同时共表达, 有可能获得比单独表达一种时更好的效果。Chen 等^[49]在毕赤酵母中将灰盖鬼伞过氧化酶与 Erol-PDI 共表达, 得到的产物活性比单一共表达 Erol 或 PDI 高很多倍。

在昆虫杆状病毒表达系统中仍然可以通过共表达提高外源蛋白的折叠修饰和可溶表达。细胞质分子伴侣 Hsp70 不仅能促进胞内前体肽的易位, 而且能够防止胞内非特异性的分子内疏水作用从而抑制前体肽的聚集, 使前体肽能够顺利进入内质网进行翻译后加工^[33]。内质网分子伴侣 BiP 是一种免疫球蛋白重链结合蛋白, 能帮助前体肽进入内质网进行修饰, 从而促进其可溶性和分泌水平^[50]。

哺乳动物内质网固有蛋白在蛋白的折叠和分泌进程中起到重要的作用, 许多研究证实, 提高细胞内翻译后修饰过程中相关蛋白的表达, 如 PDI、XBP-1、GRP78/BIP、ERp57、GRP94、CRT、CNX、GADD34、ATF4 和 CypB 等, 有助于提高外源蛋白的折叠修饰^[51-52]。当内质网中未折叠或者不正确折叠蛋白积累时, 会诱导 XBP-1 的生成, 从而促进内质网分子伴侣的产生, 提高内质网、高尔基体对蛋白的加工能力, 进而提高外源蛋白的折叠修饰和分泌表达水平^[16,53]。此外, Haredy 等^[14]发现在 CHO 细胞中过表达未折叠蛋白反应中的中心因子 ATF4 可以使 IgG 表达提高 2.4 倍, 就是由于 ATF4 的过表达使外源蛋白在胞内的折叠修饰得到增强, 造成其表达量的提高。

4 融合表达

亲和标签多用于重组蛋白的检测和纯化, 除此之外, 有研究发现, 当亲和标签以融合蛋白的形式与外源蛋白一起表达时, 能够发挥分子伴侣的作用, 促进外源蛋白折叠, 提高外源蛋白的可溶性和稳定性。常用的多聚组氨酸与外源蛋白融合后能给外源蛋白的分离纯化带来极大便利, 但组氨酸的数目与融合部位对融合蛋白的表达水平及其溶解性有显著影响^[54]。其他可供选择的融合蛋白还有谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、泛素蛋白、DsbA 和麦芽糖结合蛋白 (MBP) 等。

有研究表明, 胞内抗体的稳定性比亲和性更能影响其性能^[55], 由于胞内还原性环境不利于二硫键的形成, 导致 scFV 不稳定, 异源表达 scFV 时, 为了提高其稳定性, 很多研究者采用融合表达的方式。Bach 等^[56]在大肠杆菌中表达多种 scFV, 发现即使选用强启动子, 在 trxB-菌株中表达, scFV 的可溶表达水平依然很低, 主要以包涵体形式存在, 当在 scFV 的 C 端融合 MBP 时, MBP-scFVs 的可溶性和稳定性有了很大提高, 且具有活性。Shaki-Loewenstein 等在哺乳动物细胞内表达 scFV 时也得到相同的结论^[57]。Xu 等^[8]把 7 种 N 端标签 (GST, MBP, NusA, TRX, T7PK, Skp 和 DsbA) 和 PalB 融合表达时, 发现 MBP 和 T7PK 能显著提高 PalB 的可溶性, 而 DsbA 不仅能显著提高表达产物可溶性, 也提高了其活性。均说明了融合表达是一种促外源蛋白折叠的有效方法。

不同融合蛋白的促折叠效果不同, Dälken 等^[58]发现未融合表达时, 毕赤酵母中人颗粒酶 B (GrB) 大部分滞留在胞内, 形成不正确的折

叠,当融合表达时,GrB能够有效分泌至胞外,形成正确的折叠,且MBP的促折叠效果比GST要强。同样地,Wang等^[59]在毕赤酵母中构建了4种蛋白融合MPHs:CHBD-MPH、GST-MPH、MBP-MPH和CBD-MPH,发现CHBD-MPH和GST-MPH表达产物的活性是未融合蛋白的13.6倍和11.9倍,而与CBD和MBP融合表达的MPH活性没有明显变化。

5 培养条件的影响

表达系统能够成功得到所需外源蛋白的最重要的条件之一就是合适的培养条件,这些条件主要包括培养基成分、温度、pH、诱导条件以及培养时间等。在培养基中添加CaCl₂和谷氨酸可以提高某些外源蛋白的活性^[60],此外,Chhetri等^[61]也发现在大肠杆菌培养基中加入3%乙醇再进行ITPG诱导表达时候,可以提高外源蛋白表达量和稳定性。

温度对大肠杆菌的生长代谢影响很大。不少研究认为,低温条件下蛋白质合成的速率降低,疏水作用降低,与温度相关的分子伴侣过量表达,多肽折叠的动力学改变,从而使具有正确折叠的蛋白含量增加^[62],同时,产生的前蛋白能够及时运输到周质腔或培养基中,以免聚集在内膜内侧,形成包涵体堵塞通道,阻碍蛋白的分泌^[63],但是温度过低则会影响细胞膜的流动性,不利于胞内蛋白的运输。大肠杆菌的最适生长温度为37℃,在该温度下,虽然细胞膜流动性和蛋白合成速率有所增加,但胞内前蛋白过多的堆积使包涵体形成增多,进一步影响细胞生理和蛋白运输^[64]。Ujii等^[65]在BL21(DE3)中表达南极假丝酵母*Candida antarctica* lipase B (CALB)时,发现在37℃和30℃下,CALB仅以包涵体

形式存在,当降低温度到20℃时,活性蛋白主要以可溶形式分泌至胞外。

杆状病毒表达系统中,培养基中血清的有无对重组蛋白的表达具有很大的影响。很多研究对在无血清和有血清条件下,病毒的生长和重组蛋白的表达进行了比较^[66-67],Joshi等^[19]报道,血清对于外源蛋白的复杂糖基化具有促进作用。

6 结语

目前,活性蛋白尤其是真核活性蛋白在哺乳动物表达系统里面成功率较高,表达的重组蛋白最接近天然构象,但是其不足也同样明显,如表达量低、成本高、周期长等。所以研究者一般首先希望能通过大肠杆菌表达系统进行表达,因为其成本低廉、培养操作简便等优势是显而易见的。由于酵母表达系统兼具两者部分优势,既有一定的翻译后修饰,同时也操作简便、成本低,所以作者认为可以优先尝试酵母表达系统。构建合适的表达载体——启动子、信号肽、共表达序列等都是需要考虑的因素,并可以同时采用多种策略以实现累加效应加强促分泌折叠作用,如同时添加多个共表达元件、分泌表达和共表达同时进行等,优化表达条件,进行表达。Su等^[68]发现,当木聚糖酶在大肠杆菌中单独异源表达时,即使存在信号肽pelB的引导,重组酶主要以包涵体形式存在,当其与角质酶共表达时,重组酶也是存在于胞内,且以包涵体形式存在,而当木聚糖酶与角质酶和信号肽pelB一起共表达时,在pelB和角质酶的双重作用下,重组酶主要分泌到胞外培养基中且具有活性。本课题组将改造后的Bmace与来源于酿酒酵母的锚固蛋白AGal融合后插入表

达载体 pPIC9K (具 α 因子信号肽), 在毕赤酵母 GS115 表面成功展示了 BmAChE, 表达产物具有良好活性^[69], 随后又把 Bmace 与二硫键异构酶共表达, 所得 BmAChE 的表达量和活性更高。

外源蛋白的表达是一个复杂的过程, 不同的外源蛋白, 其表达过程也不一样, 任何一个环节都可能会对活性蛋白的表达产生不良影响, 如何提高外源蛋白的翻译后修饰和折叠是研究者面临的一大难题, 目前没有一种表达方式是完全通用、适合所有外源蛋白表达、满足人们的所有需求。因此, 需要在研究过程中积累经验, 及时汲取相关领域最新进展, 找出关键因素, “对症下药”。

REFERENCES

- [1] Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(6): 391–403.
- [2] Ignatova Z, Mahsunah A, Georgieva M, et al. Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 1237–1245.
- [3] Chou CP, Lin WJ, Kuo BY, et al. Genetic strategies to enhance penicillin acylase production in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 27(10): 766–773.
- [4] Lin WJ, Kuo BY, Chou C. A biochemical engineering approach for enhancing production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Bioproc Biosyst Eng*, 2001, 24(4): 239–247.
- [5] Suryanarayana N, Vanlalhmuaaka, Mankere B, et al. Soluble expression and characterization of biologically active *Bacillus anthracis* protective antigen in *Escherichia coli*. *Mol Biol Int*, 2016, 2016: 4732791.
- [6] Besette PH, Åslund F, Beckwith J, et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(24): 13703–13708.
- [7] Kadokura H, Beckwith J. Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(8): 1231–1246.
- [8] Xu YL, Yasin A, Tang R, et al. Heterologous expression of lipase in *Escherichia coli* is limited by folding and disulfide bond formation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(1): 79–87.
- [9] Zhao AQ, Hu XQ, Li Y, et al. Extracellular expression of glutamate decarboxylase B in *Escherichia coli* to improve gamma-aminobutyric acid production. *AMB Express*, 2016, 6(1): 55.
- [10] Yang H, Li SH, Li FH, et al. Recombinant expression of a modified shrimp anti-lipopopolysaccharide factor gene in *Pichia pastoris* GS115 and its characteristic analysis. *Mar Drugs*, 2016, 14(8): 152.
- [11] Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol*, 2013, 4: 217.
- [12] Yazdani Y, Azari S, Kalhor HR. Expression of functional recombinant human tissue transglutaminase (TG2) using the bac-to-bac baculovirus expression system. *Adv Pharm Bull*, 2016, 6(1): 49–56.
- [13] Shi YL, Xiang JH, Zhou GZ, et al. The pacific white shrimp β -actin promoter: functional properties and the potential application for transduction system using recombinant baculovirus. *Mar Biotechnol*, 2016, 18(3): 349–358.
- [14] Haredy AM, Nishizawa A, Honda K, et al. Improved antibody production in Chinese hamster ovary cells by *ATF4* overexpression. *Cytotechnology*, 2013, 65(6): 993–1002.
- [15] Aydin H, Azimi FC, Cook JD, et al. A convenient and general expression platform for the production of secreted proteins from human cells. *J Vis Exp*, 2012, (65): 4041.
- [16] Ku SCY, Ng DTW, Yap MGS, et al. Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells. *Biotechnol Bioeng*,

- 2008, 99(1): 155–164.
- [17] Nikolaivits E, Kokkinou A, Karpusas M, et al. Microbial host selection and periplasmic folding in *Escherichia coli* affect the biochemical characteristics of a cutinase from fusarium oxysporum. *Protein Expr Purif*, 2016, 127: 1–7.
- [18] Wang JD, Herman C, Tipton KA, et al. Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S chaperonins. *Cell*, 2002, 111(7): 1027–1039.
- [19] Tatischev RA, Choi C, Phan SE, et al. Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension culture. *Biotechnol Progr*, 2001, 17(4): 676–684.
- [20] Wilde M, Klausberger M, Palmberger D, et al. *Tnao38*, high five and *sf 9*-evaluation of host-virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(4): 743–749.
- [21] Joshi L, Davis TR, Mattu TS, et al. Influence of baculovirus-host cell interactions on complex N-linked glycosylation of a recombinant human protein. *Biotechnol Progr*, 2000, 16(4): 650–656.
- [22] Joshi L, Shuler ML, Wood HA. Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells. *Biotechnol Progr*, 2001, 17(5): 822–827.
- [23] Juliant S, L  v  que M, C  rutti P, et al. Engineering the baculovirus genome to produce galactosylated antibodies in lepidopteran cells//Beck A, Ed. *Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals*. New York: Humana Press, 2013: 59–77.
- [24] Belzhelarskaia SN. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect and mammalian cells. *Mol Biol*, 2011, 45(1): 142–159.
- [25] Geisse S, Kocher HP. Protein expression in mammalian and insect cell systems. *Methods Enzymol*, 1999, 306: 19–42.
- [26] Hippenmeyer PJ, Pegg LE. Enhancing expression of recombinant proteins in mammalian cells using the herpesvirus VP16 transactivator. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6(5): 548–552.
- [27] Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(5): 625–635.
- [28] Georgiou G, Segatori L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(5): 538–545.
- [29] Jong WSP, Saur   A, L  irink J. Extracellular production of recombinant proteins using bacterial autotransporters. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21(5): 646–652.
- [30] Dong ZX, Zhang J, Lee BH, et al. Secretory expression and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus plantarum* in *Escherichia coli*. *J Mol Catal B: Enzym*, 2013, 93: 57–64.
- [31] Cui YB, Meng YW, Zhang J, et al. Efficient secretory expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* with a novel actinomycete signal peptide. *Protein Expr Purif*, 2017, 129: 69–74.
- [32] Mohajeri A, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Pourhassan-Moghaddam M, et al. Cloning and expression of recombinant human endostatin in periplasm of *Escherichia coli* expression system. *Adv Pharm Bull*, 2016, 6(2): 187–194.
- [33] Ail  r E, Betenbaugh MJ. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(2): 142–145.
- [34] Wang QH, Gao LL, Liang HC, et al. Research advances of the influence factors of high level expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(12): 1644–1649 (in Chinese).
- 王庆华, 高丽丽, 梁会超, 等. 影响毕赤酵母高效表达重组蛋白的主要因素及其研究进展. *药学报*, 2014, 49(12): 1644–1649.
- [35] Zhang GQ, Yang J, Shi JJ, et al. Molecular cloning and over-expression of a fructosyltransferase from *Aspergillus niger* QU10. *Chin J Biotechnol*, 2015, 31(4): 512–522 (in Chinese).
- [36] Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing

- biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem*, 2008, 307(1/2): 249–264.
- [37] Voulgaridou GP, Mantso T, Chlichlia K, et al. Efficient *E. coli* expression strategies for production of soluble human crystallin ALDH3A1. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e56582.
- [38] Pei XL, Wang QY, Meng LJ, et al. Chaperones-assisted soluble expression and maturation of recombinant co-type nitrile hydratase in *Escherichia coli* to avoid the need for a low induction temperature. *J Biotechnol*, 2015, 203: 9–16.
- [39] Pan D, Zha X, Yu XH, et al. Enhanced expression of soluble human papillomavirus L1 through coexpression of molecular chaperonin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2016, 120: 92–98.
- [40] Ma N, Wei LJ, Fan YX, et al. Heterologous expression and characterization of soluble recombinant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Actinosynnema pretiosum* ssp. *Auranticum* ATCC31565 through co-expression with chaperones in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2012, 82(2): 263–269.
- [41] Schneider EL, Thomas JG, Bassuk JA, et al. Manipulating the aggregation and oxidation of human sparc in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(6): 581–585.
- [42] Gordon CL, Sather SK, Casjens S, et al. Selective *in vivo* rescue by GroEL/ES of thermolabile folding intermediates to phage p22 structural proteins. *J Biol Chem*, 1994, 269(45): 27941–27951.
- [43] Lin YH, Fang WL, Lin WJ, et al. Improving production of penicillin acylase in *Escherichia coli* via efficient DegP-mediated processing of precursors in periplasm. *Proc Biochem*, 2001, 37(1): 23–30.
- [44] van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, et al. Intracellular sorting and transport of proteins. *Progr Biophys Mol Biol*, 2003, 83(1): 1–45.
- [45] Robinson AS, Hines V, Wittrup KD. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 1994, 12(4): 381–384.
- [46] Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J, et al. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(4): 771–778.
- [47] Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*, 1992, 355(6355): 33–45.
- [48] Helenius A, Marquardt T, Braakman I. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol*, 1992, 2(8): 227–231.
- [49] Chen F, Hu MR, Jiang XZ, et al. Enhancement of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by co-expression chaperone PDI and Ero1. *Chin J Biotech*, 2015, 31(12): 1682–1689 (in Chinese).
陈飞, 胡美荣, 江贤章, 等. 共表达分子伴侣 PDI 和 Ero1 对灰盖鬼伞过氧化物酶在毕赤酵母中表达的影响. *生物工程学报*, 2015, 31(12): 1682–1689.
- [50] Hsu TA, Betenbaugh MJ. Coexpression of molecular chaperone Bip improves immunoglobulin solubility and IgG secretion from *Trichoplusia ni* insect cells. *Biotechnol Progr*, 1997, 13(1): 96–104.
- [51] Cain K, Peters S, Hailu H, et al. A CHO cell line engineered to express XBP1 and ERO1- L_{α} has increased levels of transient protein expression. *Biotechnol Progr*, 2013, 29(3): 697–706.
- [52] Pybus LP, Dean G, West NR, et al. Model-directed engineering of "difficult-to-express" monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(2): 372–385.
- [53] Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(21): 7448–7459.
- [54] Mohanty AK, Wiener MC. Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position. *Protein Expr Purif*, 2004, 33(2): 311–325.
- [55] Wörn A, Auf der Maur A, Escher D, et al. Correlation between *in vitro* stability and *in vivo* performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 2795–2803.

- [56] Bach H, Mazor Y, Shaky S, et al. *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J Mol Biol*, 2001, 312(1): 79–93.
- [57] Shaki-Loewenstein S, Zfania R, Hyland S, et al. A universal strategy for stable intracellular antibodies. *J Immunol Methods*, 2005, 303(1/2): 19–39.
- [58] Dälken B, Jabulowsky RA, Oberoi P, et al. Maltose-binding protein enhances secretion of recombinant human granzyme B accompanied by *in vivo* processing of a precursor MBP fusion protein. *PLoS ONE*, 2010, 5(12): e14404.
- [59] Wang P, Huang L, Jiang H, et al. Enhanced secretion of a methyl parathion hydrolase in *Pichia pastoris* using a combinational strategy. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 123.
- [60] Liu H, Zhang WB, Liu D, et al. High expression of agarase Aga D in *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Sin*, 2015, 55(9): 1171–1176 (in Chinese).
刘欢, 张伟宾, 刘丹, 等. 琼胶酶 Aga D 在大肠杆菌中的高效表达. *微生物学报*, 2015, 55(9): 1171–1176.
- [61] Chhetri G, Kalita P, Tripathi T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, 2015, 2: 385–391.
- [62] Schumann W. Function and regulation of temperature-inducible bacterial proteins on the cellular metabolism//Schügerl K, Kretzmer G, Henzler HJ, et al, Eds. *Influence of Stress on Cell Growth and Product Formation*. Berlin Heidelberg: Springer, 2000: 1–33.
- [63] Li ZF, Su LQ, Wang L, et al. Novel insight into the secretory expression of recombinant enzymes in *Escherichia coli*. *Proc Biochem*, 2014, 49(4): 599–603.
- [64] Cheng J, Wu D, Chen S, et al. High-level extracellular production of α -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *J Agric Food Chem*, 2011, 59(8): 3797–3802.
- [65] Ujiiie A, Nakano H, Iwasaki Y. Extracellular production of *Pseudozyma (Candida) antarctica* lipase B with genuine primary sequence in recombinant *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2016, 121(3): 303–309.
- [66] Morais VA, Serpa J, Palma AS, et al. Expression and characterization of recombinant human α -3/4-fucosyltransferase III from *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) cells using the baculovirus expression system. *Biochem J*, 2001, 353(3): 719–725.
- [67] Taticek RA, Shuler ML. Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 54(2): 142–152.
- [68] Su LQ, Xu CH, Woodard RW, et al. A novel strategy for enhancing extracellular secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(15): 6705–6713.
- [69] Dong JX, Xie X, He YS, et al. Surface display and bioactivity of *Bombyx mori* acetylcholinesterase on *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e70451.

(本文责编 陈宏宇)