

大肠杆菌和酵母表达系统的研究进展

张云鹏, 温 彤, 姜 伟*

中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

摘 要: 20 世纪 70 年代以来, 分子生物学及基因组学迅猛发展, 其在生物及医学领域发挥着越来越重要的作用。在发酵工业中, 分子生物学技术广泛应用于菌种的遗传改造和基因工程菌株的构建, 以期提高发酵产物的产量并丰富发酵产物的类型。其中, 利用原核及真核表达系统进行外源基因的扩增、表达以生产蛋白疫苗、核酸疫苗和酶制剂等是近十年来发酵工业的新兴领域。本文从表达载体和宿主菌改造两方面综述近些年来大肠杆菌及酵母表达系统的新进展与新技术。

关键词: 大肠杆菌表达系统; 酵母表达系统; 表达载体; 宿主菌改造

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2014.06.02

The Research Progress of *Escherichia coli* Expression Systems and Yeast Expression Systems

ZHANG Yun-peng, WEN Tong, JIANG Wei*

State Key Laboratory for Agro-biotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: Since the 70s of 20th century, the rapid development of molecular biology and genomics have played increasingly important role in the field of biological and medical science. In fermentation industry, molecular biology techniques are widely used in construction of genetically engineered bacteria and strains improvement, in order to improve the yield of fermentation products and enrich fermentation product types. In the past decade, the use of prokaryotic and eukaryotic expression systems for exogenous gene amplification and expression to produce proteins vaccines, DNA vaccines and enzymic preparations, etc. is the emerging field of fermentation industry. In this paper, we reviewed the recent progress on *E. coli* expression systems and yeast expression systems from two aspects of vectors and host transformation.

Key words: *Escherichia coli* expression system; Yeast expression system; expression vectors; host bacteria transformation

在发酵工业中, 菌种无疑是影响产物产量和质量最重要的因素之一。早期研究中通常通过定向筛选自然突变的方法得到发酵菌种, 此种方法耗时长、效率低。随后出现的物理/化学诱变技术提高了菌种筛选的速度, 提高了筛选及生产效率。从 20 世纪 70 年代起, 随着分子生物学及基因组学的快速发展, 各种工程菌株遗传操作体系的完善, 已能十分方便地利用微生物进行多种蛋白质疫苗、核酸疫苗和酶制剂等的发酵生产。利用原核及真核表达系统和高度发展的自控发酵设备生产各种发酵产物是近十年来发酵工业最为活跃的

领域之一。本文从表达载体和宿主菌改造两方面综述了大肠杆菌和酵母工程菌株构建与改造的新进展与新技术。

1 大肠杆菌表达系统研究进展

1.1 大肠杆菌表达载体的构建与评价

以大肠杆菌为代表的原核生物由于易于培养、生长速度快等优势成为原核工程菌的代表菌株。大肠杆菌中应用最普遍的工程菌是大肠杆菌 BL21(DE3)。BL21 是 λ DE3 大肠杆菌溶源菌, 包

收稿日期: 2014-09-09; 接受日期: 2014-09-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170089)资助。

作者简介: 张云鹏, 博士研究生, 主要从事微生物遗传学研究。E-mail: zyp900421@hotmail.com。* 通信作者: 姜 伟, 副教授, 博士, 主要从事微生物遗传研究。E-mail: jiangwei1099@aliyun.com

含受控于 *lacUV5* 启动子的 T7 RNA 聚合酶表达基因,在有乳糖或 IPTG 存在的情况下表达 T7 RNA 聚合酶,可以快速大量地启动 T7 启动子下游基因的表达。在过去 20 年中广泛应用的表达载体主要有 pGEX 系列、pQE 系列与 pET 系列。目前 pET 系列仍然是普遍使用的一种高效表达载体。pET 表达系统的表达原理主要是应用 *LacI*/*P*_{T7lac} 启动子,使得目的基因在有诱导物的情况下大量表达。但是在这种外源蛋白大量表达的情况下,过量表达的目的蛋白很容易导致包涵体的形成。为了改变这种情况,英潍捷基公司 (Invitrogen Co.) 在 pET 表达载体基础上开发了 pET SUMO 表达系统。这个表达系统在目的蛋白前加入了 SUMO 元件以提高目的蛋白的溶解性。在目的蛋白的纯化过程中可利用 SUMO 蛋白酶将 SUMO 元件切下以得到原始蛋白。pET SUMO 载体图谱如图 1 所示^[1]。

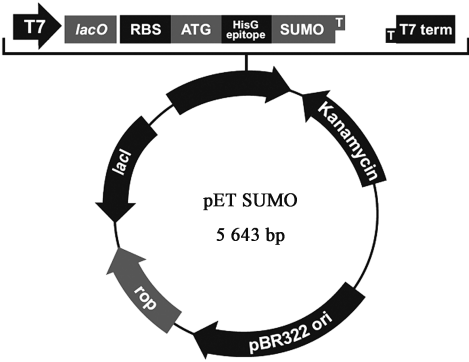


图 1 pET SUMO 质粒图谱^[1]

Fig.1 Map of pET SUMO^[1].

载体结构说明: T7, T7 RNA 聚合酶启动子; *lacO*, 乳糖操纵子抑制子结合位点; RBS, 核糖体结合位点; ATG, 翻译起始位点; HisG epitope, 组氨酸标签; SUMO, SUMO 促溶区段; T7 term, T7 RNA 聚合酶终止子; Kanamycin, 卡那霉素抗性基因; pBR322 ori, pBR322 质粒的复制起始位点; *rop*, 决定质粒在菌体内以低拷贝形式存在; *lacI*, 乳糖操纵子抑制子表达基因。

2013 年, Balzer 等^[2]通过构建一系列的表达载体评价了 5 个调节子/启动子组合 *XylS*/*P*_m (野生型)、*XylS*/*P*_m ML1-17 (*P*_m 突变体)、*LacI*/*P*_{T7lac}、*LacI*/*P*_{trc} 和 *AraC*/*P*_{BAD} 的转录效率和表达效率。他们发现: 在 5 个调节子/启动子组合中目的基因的表达效率与质粒的拷贝数有关; *LacI*/*P*_{T7lac} 的转录活性最高; 而 *LacI*/*P*_{T7lac} 和 *XylS*/*P*_m ML1-17 表达活性蛋白的能力高于其余 3 组启动子; 在 5 组

启动子中 *XylS*/*P*_m ML1-17 的应用最灵活, 因为其对于宿主菌的要求比较低; *AraC*/*P*_{BAD} 启动子在不受诱导物诱导的情况下表达量最低, 说明其下游基因的表达是受到严格调控的, 并且这个启动子具有最高效的 5'UTR。

1.2 大肠杆菌表达系统的优化

为了提高蛋白的表达量, 并使蛋白正确的折叠, 具有蛋白活性, 研究人员进行了一系列的尝试。Lopez 等^[3]通过突变 RNA 酶延长了 mRNA 的半衰期, 从而延长蛋白翻译的时间, 使得 MukB 蛋白的表达量提高了 2 倍; 利用某些分子伴侣蛋白可以帮助目的蛋白折叠的特性^[4], 将这些分子伴侣与目的蛋白共表达以促进蛋白的折叠; Bessette 等^[5]通过突变大肠杆菌中与氧化还原相关的蛋白使大肠杆菌胞质处于氧化状态, 促进了带有二硫键的蛋白的表达; Wacker 等^[6]通过将 pGL 操纵元导入大肠杆菌解决了大肠杆菌表达蛋白 N 端糖基化的问题; Johnson 等^[7]最近发现将目的蛋白与酵母中 NatB 蛋白以及其底物蛋白共表达可以解决大肠杆菌表达人与酵母中部分乙酰化蛋白的问题。

除了对外源载体以及分子伴侣进行研究外, 对于宿主菌的改造也是原核表达载体改造中的重要一环。对于宿主菌的改造主要是通过对宿主菌随机突变数据库进行筛选得到高效表达的菌株, 随后通过对高效表达的菌株进行基因组水平的分析, 找到突变基因, 分析其在宿主菌代谢调控中所起到的作用^[8], 通过从表型反推基因型的正向遗传学方法可以使我们对于某个基因在代谢过程中所起到的作用有更深刻的理解。目前, 比较好的筛选数据库主要是 Keio 数据库, 其中包含了大肠杆菌 K-12 的所有非致死突变^[9], 为大肠杆菌宿主菌改造提供了极大的便利。最近, Bowie 等^[10]通过碱基类似物 2-氨基嘌呤突变以及突变基因 *mutD5* 的应用对大肠杆菌 TOP10 进行了突变, 使得其对一系列真核和原核基因的表达量提高了 90 倍; Makino 等^[11]利用化学诱变的方法对大肠杆菌进行改造使得其表达 IgG 的能力提高了 5 倍。

大肠杆菌表达外源蛋白的研究已经非常成熟, 为科学研究和发酵生产行为提供了极大的便利, 但是仍然有一部分与外源蛋白表达相关的调控通路未知, 需要进一步的探究。

2 酵母表达系统研究进展

酵母表达体系是目前工业生产中非常重要的一种真核表达体系,可以通过分泌途径将目的蛋白分泌出菌体外,提取程序简便,为工业生产提供了极大便利,并且在发酵生产安全性要求高的蛋白产品(如食品、药品等)方面具有不可比拟的优势。近些年来,药用蛋白在临床医学中的作用越来越大,据估计其市场价值可达到每年 700 亿~800 亿美元,并且以每年 7%~15% 的速度增长^[12,13]。尽管原核表达体系已经得到了长足的发展,并且也可进行一系列的糖基化或乙酰化的修饰,但其在药物蛋白表达领域仍然具有一定的局限性与缺陷。就目前而言,考虑到药用蛋白的安全性与某些蛋白的特殊性,部分表达宿主还优先选择真核生物,如酵母工程菌株。药用蛋白表达宿主酵母菌主要有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)以及耶罗维亚酵母

(*Yarrowia lipolytica*),其中以酿酒酵母的应用最为广泛。1996 年酿酒酵母基因组作为第一个真核基因组发布^[14],促进了酵母遗传学的研究,也为将酿酒酵母作为药用蛋白表达宿主打下了坚实的基础。

2.1 酵母表达载体

在酿酒酵母表达系统中,常用的表达质粒是 pYC2-E(见图 2A)^[15]。在这个表达载体中,目的蛋白的表达受到半乳糖激酶启动子的控制,当有半乳糖存在时,宿主菌表达半乳糖激酶以分解半乳糖获得能量,同时启动半乳糖激酶启动子下游基因的转录,达到外源蛋白表达的目的。在毕赤酵母表达系统中,英潍捷基公司提供的表达载体主要有诱导型表达载体和组成型表达载体两种。组成型表达载体 pGAPZ(见图 2B)^[16]以 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子为外源蛋白表达启动子,不需要诱导。而诱导型表达载体 pPICZ α (见图 2C)^[17]以醇氧化酶基因 *AOX1* 启动子启动外源基因的表达,只有在甲醇存在的情况下外源基因才能开始转录。

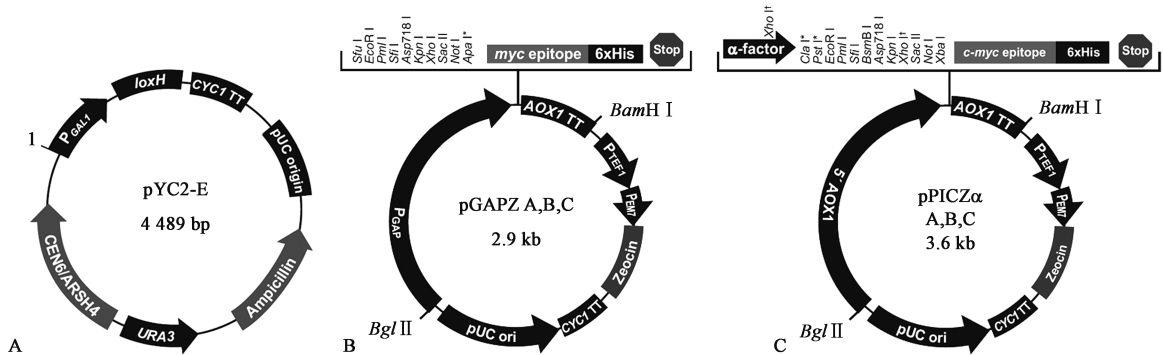


图 2 酿酒酵母表达质粒 pYC2-E,毕赤酵母组成型表达载体 pGAPZ 和诱导型表达载体 pPICZ α 质粒图谱^[15~17]

Fig.2 Map of yeast expression vector pYC2-E, pGAPZ and pPICZ α ^[15~17].

A. pYC2-E 载体结构说明: P_{GAL1}, 半乳糖激酶表达启动子; loxH, 同源交换区段; CYC1 TT, 酿酒酵母 *CYC1* 基因终止子; pUC origin, 质粒复制起始位点; Ampicillin, 氨苄青霉素抗性基因; URA3, 尿嘧啶缺失筛选标记; CEN6/ARSH4, 质粒拷贝数与分配决定区段。B. pGAPZ 质粒结构说明: P_{GAP}, 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子; AOX1 TT, 醇氧化酶基因终止子; P_{TEF1}, 酿酒酵母转录延伸因子 1 启动子; P_{EM7}, 一种合成的原核启动子; Zeocin, 博来霉素抗性基因; myc epitope, C 端 myc 抗原表位, 用于与 myc 抗体结合; 6xHis, C 端组氨酸标签, 用于 Ni 柱亲和和层析。C. pPICZ α 质粒结构说明: 5' AOX1, 醇氧化酶基因 *AOX1* 启动子; α -factor, 酿酒酵母 α 因子分泌信号肽。

2.2 目的基因表达框的改造

为了提高外源蛋白在酵母中表达量, 首先应对目的蛋白基因的启动子进行改造或替换。在酿酒酵母中常用的高效表达启动子主要是 *TEF1* 和 *GPD* (*TDH3*)。近些年来, 主要通过随机合成寡核苷酸技术^[18]和错配 PCR 技术^[19]对这些启动子进

行突变, 以期得到表达活性更高的启动子。在毕赤酵母中, 三磷酸甘油醛启动子 *GAP* 的转录活性也通过随机突变的方法得到了提高^[20]。

除了以上的组成型表达启动子外, 也有诱导表达启动子。在酿酒酵母中常用的诱导表达启动子主要是 *GALI* 和 *GAL10*。由于这两个启动子的

诱导物是半乳糖,半乳糖可以当做酵母的碳源而被消耗导致对基因表达的控制变得复杂,加之半乳糖价格较贵,阻碍了这两个启动子在工业生产中的应用。最近,McIsaac 等^[21]将 6 个 Zif268 结合位点与一个经过改造的 *GAL1* 启动子联合使用,使得 *GAL1* 在 Z_3 EV 转录因子存在时的表达更可控。在毕赤酵母中,最常用的诱导型启动子是 *AOX1* 启动子。由于 *AOX1* 启动子是甲醇诱导型启动子,在工业生产中使用甲醇存在安全隐患,所以现已通过对启动子进行改造以提高其转录效率并改变其甲醇诱导的特性^[22]。

在酵母表达体系中除了启动子因素外,密码子偏好性和质粒拷贝数也是影响外源蛋白表达的重要因素。通过对目的基因的密码子进行优化,使其更适应宿主的密码子偏好性,并通过改变 A/T, C/G 比例可以有效提高外源蛋白的表达效率。在质粒拷贝数方面,高拷贝的质粒有利于蛋白的大量表达,但是过量的蛋白表达会加重宿主负担,使得表达体系不稳定。通常情况下,将表达载体重组在宿主的基因组上有利于外源基因的稳定性。但是最近发现,在酵母中,很多时候质粒拷贝数并不与蛋白的表达量成正比^[23]。

2.3 宿主菌的改造

在酵母表达体系的研究过程中,宿主菌的改造同样也是研究的一个重要方向。

由于在酵母中表达的很多外源蛋白会分泌到细胞外,所以对酵母分泌途径的改造可以有效提高目的蛋白的产量。蛋白的表达和分泌主要包括转录、翻译、肽段转移、翻译后修饰、蛋白折叠、肽段切除、糖基化、包装和分泌等步骤^[24]。翻译后蛋白首先被转移到内质网中,在这个过程中,信号肽与前导肽起到关键作用。人工合成的缺少 N 端保守糖基化的 α -交配因子的前导肽与酿酒酵母本身的前导肽在引导胰岛素分泌的过程中具有类似的活性^[25]。在内质网中,蛋白的正确折叠是非常重要的,它决定蛋白进入分泌途径还是降解途径,肽段的错误折叠会加重内质网腔内的代谢负担,引起未折叠蛋白反应^[26,27]。过量表达内质网中蛋白质折叠因子和还原酶可以有效改善内质网环境,促进蛋白质的折叠,从而提高蛋白质的分泌量^[27~31]。在分泌途径的最后一步,蛋白质从内质网转移到高尔基体以及从高尔基体到细胞壁的囊泡运输过程中,两个关键蛋白 Sly1P 和 Sec1P

的过量表达同样可以有效促进蛋白的分泌^[32]。

在酵母菌中,存在大量的蛋白酶表达,这些蛋白酶有些定位于蛋白分泌途径或作用于蛋白分泌途径^[33],导致外源蛋白表达后的折叠、糖基化等过程中可能会被错误剪切,直接导致蛋白表达量下降或活性下降。所以对酵母宿主菌中的蛋白酶系进行突变,可以有效减弱这一反应,从而提高外源蛋白表达的产量和质量。Cho 等^[34]通过对酿酒酵母中的天冬氨酸蛋白酶 YPS1、YPS2、YPS3、YPS6 和 YPS7 进行多点突变,使得在酿酒酵母中的甲状旁腺激素蛋白表达量有所上升。通过在其他酵母菌株中突变这些天冬氨酸蛋白酶,发现这些定位在细胞表面的天冬氨酸蛋白酶是外源蛋白被错误剪切的主要原因^[35,36]。

近些年来,对酵母菌株的改造已不仅仅限于单个基因的缺失或过量表达,而是对一系列基因的共同改造,以提高外源蛋白的表达量和活性。

3 展望

近代以来,随着细菌纯培养技术的发展,代谢控制技术的建立,尤其是分子生物学的快速发展,发酵产业进入了高速发展的阶段,创造出了巨大的经济价值,在食品、医药和保健等领域做出了巨大的贡献。

利用分子生物学手段,科学工作者构建了一系列的真核和原核表达体系。在大肠杆菌表达体系中采用技术主要包括启动子改造、共表达分子伴侣蛋白和筛选宿主菌株突变体库等;而在酵母菌表达体系中主要应用了随机突变与人工构建启动子、外源蛋白基因密码子优化、宿主菌代谢通路的改造与缺失等技术。尽管通过分子生物学手段构建了一系列的高效表达载体和适合的宿主菌,但是在各宿主菌中仍然存在一些没有研究透彻的调控通路,结合微生物代谢组等高通量技术,寻找代谢通路中的关键蛋白,对这些特定蛋白的过量表达与失活进行研究,有望进一步提高外源蛋白的表达量及活性。

参考文献

- [1] Invitrogen. Champion™ pET SUMO protein expression system for high-level expression and enhanced solubility of recombinant proteins in *E. coli* and cleavage of native protein [EB/OL]. <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pet->

- sumo_man.pdf, 2010-6-18.
- [2] Balzer S, Kucharova V, Megerle J, *et al.*. A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*[J]. Microb. Cell Fact., 2013, 12:26.
 - [3] Lopez P J, Marchand I, Joyce S A, *et al.*. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*[J]. Mol. Microbiol., 1999, 33:188-199.
 - [4] Houry W A. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm[J]. Curr. Protein Pept. Sci., 2001, 2(3):227-244.
 - [5] Besette P H, Aslund F, Beckwith J, *et al.*. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96:13703-13708.
 - [6] Wacker M, Linton D, Hitchen P G, *et al.*. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*[J]. Science, 2002, 298:1790-1793.
 - [7] Johnson M, Coulton A T, Geeves M A, *et al.*. Targeted amino-terminal acetylation of recombinant proteins in *E. coli*[J]. PLoS ONE, 2010, 5:e15801.
 - [8] Makino T, Skretas G, Georgiou G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria[J]. Microb. Cell Fact., 2011, 10:32.
 - [9] Baba T, Ara T, Hasegawa M, *et al.*. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. Mol. Syst. Biol., 2006, 2:2006.0008.
 - [10] Massey-Gendel E, Zhao A, Boulting G, *et al.*. Genetic selection system for improving recombinant membrane protein expression in *E. coli*[J]. Protein Sci., 2009, 18:372-383.
 - [11] Makino T, Skretas G, Kang T H, *et al.*. Comprehensive engineering of *Escherichia coli* for enhanced expression of IgG antibodies[J]. Metab. Eng., 2011, 13(2):241-251.
 - [12] Goodman M. Market watch: Sales of biologics to show robust growth through to 2013[J]. Nat. Rev. Drug. Discov., 2009, 8(11):837.
 - [13] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010 [J]. Nat. Biotechnol., 2010, 28:917-924.
 - [14] Goffeau A, Barrell B G, Bussey H, *et al.*. Life with 6000 genes[J]. Science, 1996, 274(5287):546,563-567.
 - [15] Invitrogen. pYES2.1-E and pYC2-EEchoTM-adapted expression vectors; For cloning of the gene of interest using the EchoTM cloning system and expression in *Saccharomyces cerevisiae*[EB/OL]. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pyes2_1e_pyc2e_man.pdf, 2010-12-29.
 - [16] Invitrogen. pGAPZ A, B, and C/pGAPZα A, B, and C; *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins [EB/OL]. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pgapz_man.pdf, 2010-06-28.
 - [17] Invitrogen. pPICZαA, B, and C; *Pichia* expression vectors for selection on ZeocinTM and purification of secreted, recombinant proteins [EB/OL]. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf, 2010-07-07.
 - [18] Jeppsson M, Johansson B, Jensen P R, *et al.*. The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. Yeast, 2003, 20:1263-1272.
 - [19] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, *et al.*. Tuning genetic control through promoter engineering[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102(36):12678-12683.
 - [20] Qin X, Qian J, Yao G, *et al.*. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2011, 77:3600-3608.
 - [21] McIsaac R S, Gibney P A, Chandran S S, *et al.*. Synthetic biology tools for programming gene expression without nutritional perturbations in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Nucleic Acids Res., 2014, 42:e48.
 - [22] Vogl T, Glieder A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production [J]. N. Biotechnol., 2013, 30(4):385-404.
 - [23] Aw R, Polizzi K M. Can too many copies spoil the broth[J]? Microb. Cell Fact., 2013, 12:128.
 - [24] Hou J, Tyo K E, Liu Z, *et al.*. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Res., 2012, 12:491-510.
 - [25] Kjeldsen T, Hach M, Balschmidt P, *et al.*. Prepro-leaders lacking N-linked glycosylation for secretory expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Protein Expr. Purif., 1998, 14:309-316.
 - [26] Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals[J]. Curr. Opin. Cell Biol., 2001, 13:349-355.
 - [27] Payne T, Finnis C, Evans L R, *et al.*. Modulation of chaperone gene expression in mutagenized *Saccharomyces cerevisiae* strains developed for recombinant human albumin production results in increased production of multiple heterologous proteins [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2008, 74:7759-7766.
 - [28] Gasser B, Sauer M, Maurer M, *et al.*. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73:6499-6507.
 - [29] Lodi T, Neglia B, Donnini C. Secretion of human serum albumin by *Kluyveromyces lactis* overexpressing KIPDI1 and KIERO1 [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71:4359-4363.
 - [30] Smith J D, Tang B C, Robinson A S. Protein disulfide isomerase, but not binding protein, overexpression enhances secretion of a non-disulfide-bonded protein in yeast [J]. Biotechnol. Bioeng., 2004, 85:340-350.
 - [31] Zhang W, Zhao H L, Xue C, *et al.*. Enhanced secretion of heterologous proteins in *Pichia pastoris* following overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* chaperone proteins[J]. Biotechnol. Prog., 2006, 22:1090-1095.
 - [32] Hou J, Tyo K, Liu Z, *et al.*. Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metab. Eng., 2012, 14(2):120-127.
 - [33] Kim H, Yoo S J, Kang H A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins [J]. FEMS Yeast Res., 2014, doi: 10.1111/1567-1364.12195.
 - [34] Cho E Y, Cheon S A, Kim H, *et al.*. Multiple-yapsin-deficient mutant strains for high-level production of intact recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J. Biotechnol., 2010, 149(1-2):1-7.
 - [35] Sohn S B, Graf A B, Kim T Y, *et al.*. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for *in silico* analysis of heterologous protein production [J]. Biotechnol. J., 2010, 5(7):705-715.
 - [36] Wu M, Shen Q, Yang Y, *et al.*. Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in *Pichia pastoris* GS115 [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2013, 40:589-599.