



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150225

## 镰孢霉疫苗表达系统的构建及优化

何希宏, 孙春杰, 张华菲, 付丽霞, 刘浩

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 镰孢霉 (*Fusarium venenatum*) 是一种具有高效表达和分泌蛋白质潜力的丝状真菌。本文探索以镰孢霉为表达宿主建立真菌蛋白表达系统。以含有 Hyg 抗性的 pFGL59 为出发质粒, 分别利用真菌宿主里常用的强启动子 PgpdA、PglA 和 Ptrypsin 构建整合型蛋白表达载体, 并通过表达猪流行性腹泻病毒的中和表位蛋白 COE, 检测该系统的表达效率。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对工程菌株的胞外蛋白进行分析检测, 结果显示在启动子 Ptrypsin 的驱动下, COE 蛋白在镰孢霉工程菌中高效表达并分泌到胞外, 而含有启动子 PgpdA 和 PglA 的工程菌胞外蛋白中未检测到 COE 蛋白。根据镰孢霉密码子偏好性对 *coe* 基因的密码子进行优化后, COE 蛋白在镰孢霉中的表达量得到显著提高。该疫苗表达系统的构建为疫苗蛋白在真菌宿主里的异源表达提供了新的方向。

**关键词:** 镰孢霉; 异源表达; COE 蛋白

中图分类号: S852.65<sup>+</sup>9.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2017)01-0025-06

## Construction and Optimization of Vaccine Expression System for *Fusarium venenatum*

HE Xihong, SUN Chunjie, ZHANG Huafei, FU Lixia, LIU Hao

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** *Fusarium venenatum* is a newly developed filamentous fungi with a strong protein expression ability. A vaccine expression system was constructed in *F. venenatum*. With pFGL59 Hyg resistance as the starting plasmid, strong promoters PgpdA, PglA and Ptrypsin were utilized to construct integrated protein expression vector. This expression system was verified and optimized through expressing the neutralizing epitope protein (COE) of porcine epidemic diarrhea virus. The extracellular protein of the engineered strain was analysed and detected with polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that COE was efficiently expressed and secreted into the extracellular under the control of promoter Ptrypsin. The COE protein was not detected in the engineered bacteria extracellular proteins with promoters PgpdA and PglA. The production of COE protein was obviously increased when *coe* codons were optimized according to the codon usage preference of *F. venenatum*. This vaccine expression system provided a new direction for the heterologous expression of vaccine protein in fungi host.

**Key words:** *Fusarium venenatum*; heterologous expression; COE protein

丝状真菌又称霉菌, 在发酵工业上曾被广泛地应用于有机酸(衣康酸、抗坏血酸等)、抗生素(青霉素、头孢菌素等)和酶制剂(脂肪酶、糖化酶等)的生产。近年来由于丝状真菌的蛋白表达后修饰系统接近高等真核生物而且表达基因工程蛋白时总量大、活

性高等特点而受到研究人员的关注<sup>[1-2]</sup>。同时, 由于丝状真菌的发酵成本较低且生长迅速, 也是其产业化应用的有利条件<sup>[3]</sup>。工业生产上常用于蛋白表达的菌株主要有曲霉属真菌, 包括黑曲霉 (*Aspergillus niger*)<sup>[4]</sup>和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)<sup>[5]</sup>等、瑞氏木霉

收稿日期: 2015-12-01; 修回日期: 2016-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31201282); 天津市科委国际科技合作项目(14RCGHSY00180)

作者简介: 何希宏(1982—), 女, 河北唐山人, 助理研究员; 通信作者: 刘浩, 教授, liuhao@tust.edu.cn

数字出版日期: 2016-12-01; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20161201.1109.010.html>

(*Trichoderma reesei*)<sup>[6]</sup> 和泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 等。这些菌株被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认定属于“一般认为安全 (Generally Recognized as Safe, GRAS)”的菌株<sup>[7-8]</sup>。因此, 在食品和药品安全性倍受关注的情况下, 丝状真菌成为了可用于生产异源重组蛋白的首选宿主。2001年 Moralejo 等<sup>[9]</sup>在泡盛曲霉中生产甜蛋白 (thaumatin) 时, 表达量为 150 mg/L。同年, Conesa 等<sup>[10]</sup>以黑曲霉糖化酶基因启动子在黑曲霉中表达海洋真菌氯化物过氧化酶 (*Caldariomyces fumago* Chloroperoxidase), 目的蛋白表达量为 500 mg/L。但是, 上述丝状真菌作为异源宿主在表达来自病毒的中和抗原表位蛋白时其表达量和分泌效率都比较低<sup>[11]</sup>, 且这些菌株会分泌产生大量胞外蛋白酶, 因此有必要寻找新的更适合表达疫苗蛋白的真菌表达宿主。

镰孢霉 (*Fusarium venenatum*) 是近年来发现的表达外源重组蛋白效率较高的丝状真菌, 早在 1984 年镰孢霉就经过安全检测评估而在食品工业上应用<sup>[12]</sup>, 用于生产可做成素肉食物的蛋白 Quorn<sup>TM</sup>。镰孢霉 ATCC20334 属于镰孢霉属的表达宿主, 在英国作为商品化的食物来源已有 30 多年<sup>[13]</sup>。此外, 由于该菌拥有低蛋白酶分泌背景、工艺简单和生产工艺成本低廉等特点, 使镰孢霉成为一个非常有潜力的异源蛋白表达宿主<sup>[14]</sup>。Royer 等<sup>[15]</sup>利用 Ptrypsin 启动子已成功表达了克隆自不同丝状真菌的脂肪酶、纤维素酶等, Farnworth 等<sup>[16]</sup>在镰孢霉中表达黑曲霉来源的糖化酶产量能达到 300 mg/L, 因此尝试进行镰孢霉中疫苗蛋白表达的研究。

猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 是一种能引起猪肠道传染性疾病的流感病毒<sup>[17]</sup>, 而病毒表面的中和表位蛋白 COE 能够激发机体的免疫反应<sup>[18]</sup>。本研究探索以镰孢霉为宿主构建 PEDV 的疫苗 (COE) 表达系统, 比较了 COE 蛋白在不同启动子作用下的表达差异, 并在 *coe* 基因上游引入了来源于黑曲霉异支链淀粉酶基因 (*ipuA*) 的信号肽 (IPU), 使疫苗蛋白高效的分泌到发酵液中, 从而省去繁琐的细胞破碎过程, 简化了产物分离纯化步骤。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养条件

镰孢霉 (*Fusarium venenatum*) ATCC20334 购自美国模式菌种保藏中心, 镰孢霉的野生型和转化子在

PDA 平板上 28 °C 光照培养用于产生孢子。大肠杆菌 JM 109 在 LB 液体或固体培养基中于 37 °C 培养, 转化筛选平板添加卡那霉素终质量浓度为 100 μg/mL。农杆菌 (*Agrobacterium*) AGL1 在 LB 液体或固体培养基中于 28 °C 培养。IM<sup>[19]</sup> 液体或固体培养基中添加乙酰丁香酮 (200 μmol/L) 和卡那霉素 (100 μg/mL), 用于农杆菌介导转化镰孢霉。PDA 培养基中添加潮霉素 B (20 μg/mL)、头孢噻肟钠 (200 μmol/L)、链霉素 (100 μg/mL) 和氨苄青霉素 (100 μg/mL), 用于筛选镰孢霉转化子; Vogel's 麦芽糊精液体培养基<sup>[20]</sup>用于镰孢霉的发酵。整合型表达载体 pFGL59<sup>[21]</sup>, 本实验室保存。

### 1.2 工具酶及主要试剂

实验所用限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶等, 大连宝生物公司; DNA 相对分子质量标准品, 北京 Trans Gen 公司; 质粒小量提取及 DNA 片段回收试剂盒, 北京 TIANGEN 公司; 琼脂糖, Sunbiotech 公司; 青霉素、乙酰丁香酮、头孢噻肟钠、链霉素、潮霉素 B, Sigma 公司; 其他均为分析纯试剂。

### 1.3 镰孢霉遗传转化筛选标记的确定

将镰孢霉孢子接种至 PDA 固体培养基, 在光照条件下 28 °C 培养 4~5 d。用涂布器将 PDA 平板上的孢子洗下, 悬浮孢子后用无菌的 Miracloth 滤布过滤并计数。调整孢子悬液浓度为 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>, 取 200 μL 涂布于含有不同质量浓度 (0、5、10、15 μg/mL) 潮霉素 B 的 PDA 平板上, 28 °C 培养。分别于 2、3、4 d 后观察镰孢霉生长情况, 以确定潮霉素 B 对镰孢霉的最小抑制质量浓度。

### 1.4 质粒的构建及密码子优化

#### 1.4.1 引物的设计和合成

本实验所用启动子为 Pgpda、PglaA 和 Ptrypsin, 其中启动子 Pgpda 来源于构巢曲霉 (*A. nidulans*) 的三磷酸甘油醛脱氢酶编码基因, PglaA 来源于黑曲霉 (*A. niger*) 的糖化酶基因, Ptrypsin 来源于镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的胰蛋白酶基因; 终止子 Ttrpc 来源于 *A. nidulans* 的色氨酸操纵子中吡啶甘油磷酸合酶基因。实验所用引物见表 1。为使 COE 蛋白能够分泌到发酵液中, 在 *coe* 上游引物中引入信号肽基因 (IPU), 所有引物交由华大基因公司合成。

#### 1.4.2 PCR 扩增

PCR 反应体系: 10 × PCR buffer 2 μL, 模板 1~2 μg, dNTP 0.2 mmol/L, 上游引物和下游引物各 0.2 μmol/L, Taq 酶 2 U, 补无菌水至终体积为 20 μL。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 反应 35 个循环, 72 °C 后延伸 10 min. 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物大小.

表 1 引物  
Tab. 1 Primers

引物名称	引物序列 (5'-3')	酶切位点
PgpdA-F	CGGGGTACCGAGCTCTGTACAGTGACCGGTGACT	<i>Kpn</i> I
PgpdA-R	CGGGGTACCGAATTCTGTGATGTCTGCTCAAGCGGGTA	<i>Eco</i> R I, <i>Kpn</i> I
PglaA-F	CGGGGTACCGACCTTCCATGGAAGTGACCTG	<i>Kpn</i> I
PglaA-R	CGGGGTACCGCGCGCGGGCCAGATCTTGCTGAGGTGTAATGATGCTGG	<i>Bgl</i> II, <i>Apa</i> I, <i>Bss</i> H II, <i>Kpn</i> I
Ptrypsin-F	CGGGGTACCGAATTCTTACAAACATTCAA	<i>Kpn</i> I
Ptrypsin-R1	ATCTGTCTGGTACCGGTGAAGAGATAGATATCCA	<i>Kpn</i> I
Ptrypsin-R2	ATCTGTCTGGGCCCGGTGAAGAGATAGATATCCA	<i>Apa</i> I
trpc-F	TTGGCGCGCTCCACTAACGTTACTGAAATCATC	<i>Bss</i> H II
trpc-R	CCCAAGCTTTCGAGTGGAGATGTGGAGTGG	<i>Hind</i> III
coe-F	CGGGATCCATGCGCTCTACAGGATCTTCTTACCCCTTTCGCGGGCCTTCCAAGTGGCTCAAGCC ATGGTGAAGCTCAAGTTCCG	<i>Bam</i> H I
coe-R	CGGGATCCCAATGGTGATGGTGATGATGATAGTATACTTGGTACACAC	<i>Bam</i> H I
cocoe-F	ATGCGTCTACTGGCTACCT	—
cocoe-R	TTAGTGGTGGTGGTGGTGGT	—

注: 下划线处为酶切位点; 斜体处为信号肽 IPU 基因编码序列.

#### 1.4.3 蛋白表达载体的构建

在 pFGL 59 的 T-DNA 区依次连接 PgpdA/PglaA/Ptrypsin、*coe* 和终止子 Ttrpc, 构建整合型蛋白表达载体. 利用引物 PgpdA-F/PgpdA-R 从 *A. nidulans* 基因组上扩增启动子 PgpdA (884 bp), PgpdA 片段通过 *Kpn* I 单酶切连接到载体 pFGL 59 上构建载体 pFGL 59 :: PgpdA, 并验证 PgpdA 连接的方向性. 利用引物 trpc-F/trpc-R 从 *A. nidulans* 基因组上扩增终止子 Ttrpc (767 bp), Ttrpc 片段通过 *Bss*H II/*Hind* III 双酶切连接到载体 pFGL 59 :: PgpdA 上, 构建载体 pFGL59 :: PgpdA :: Ttrpc. 采用引物 coe-F/coe-R 扩增 *coe* (951 bp), *coe* 基因片段通过 *Bam*H I 单酶切连接, 获得表达载体 pFGL 59 :: PgpdA :: *coe* :: Ttrpc (pLH 98). 利用引物 PglaA-F/PglaA-R 从 *A. niger* 基因组上扩增启动子 PglaA (921 bp), 通过 *Kpn* I 单酶切替换表达载体 pLH98 的启动子 PgpdA, 并连接 *coe* 片段, 构建疫苗表达载体 pFGL 59 :: PglaA :: *coe* :: Ttrpc (pLH 99). 利用引物 Ptrypsin-F/Ptrypsin-R1 从 *F. oxysporum* 基因组上扩增启动子 Ptrypsin (1 206 bp), 同样的方法构建载体 pFGL 59 :: Ptrypsin :: *coe* :: Ttrpc (pLH 100).

#### 1.4.4 *coe* 密码子的优化

根据 <http://www.kazusa.or.jp/codon/> 网站公布的镰孢霉的密码子偏好性密码子表优化 *coe* 密码子, 将优化后的 *coe* 碱基序列送至上海捷瑞公司合成. 优化后的片段命名为 *cocoe*, 设计引物 (见表 1). 先通过

*Bss*H II/*Hind* III 双酶切连接终止子 Ttrpc 片段, 再利用引物 Ptrypsin-F/Ptrypsin-R2 扩增启动子 Ptrypsin, 通过 *Kpn* I/*Apa* I 双酶切连接启动子 Ptrypsin 片段. 合成的 *cocoe* 基因通过 *Apa* I 单酶切连接, 并验证 *cocoe* 基因连接的方向性, 构建疫苗表达载体 pFGL 59 :: Ptrypsin :: *cocoe* :: Ttrpc (pLH 106).

#### 1.5 镰孢霉转化子的筛选及验证

采用农杆菌转化的方法将构建好的表达载体导入镰孢霉<sup>[22]</sup>, 经潮霉素 B 筛选后, 平板上长出的转化子再经 PCR 进一步验证.

#### 1.6 镰孢霉转化子的 COE 蛋白表达水平分析

将镰孢霉和阳性转化子分别点接至 PDA 固体平板上, 28 °C 光照培养. 待孢子长好后, 收集孢子制成  $1 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> 的孢子悬液, 转接至 Vogel's 麦芽糊精液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 5 d. 用纱布初步收集发酵液, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用三氯乙酸法处理, 然后进行 SDS-PAGE 检测.

## 2 结果与讨论

### 2.1 镰孢霉遗传转化筛选标记的确定

在含有不同质量浓度潮霉素 B 的 PDA 固体培养基上培养镰孢霉, 观察菌体的生长情况, 实验结果如图 1 所示. 随着抗生素质量浓度的增高, 镰孢霉的生长逐渐减弱, 当其质量浓度达到 15 μg/mL 时, 检测不到镰孢霉的萌发. 这表明潮霉素 B 质量浓度为

15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时可完全抑制镰孢霉的生长,潮霉素 B 可

以作为镰孢霉转化子的筛选标记.

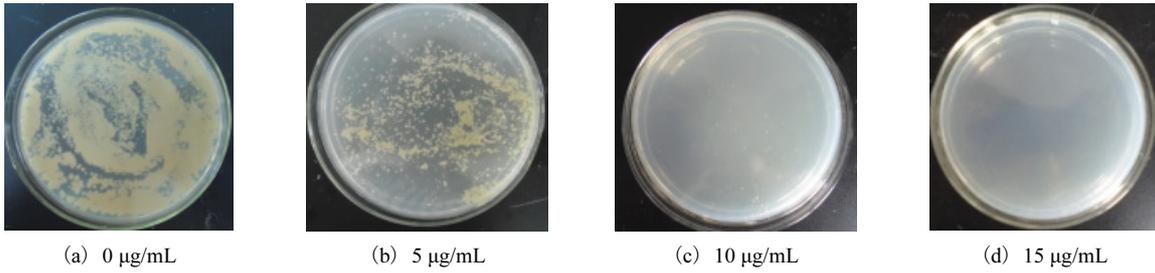
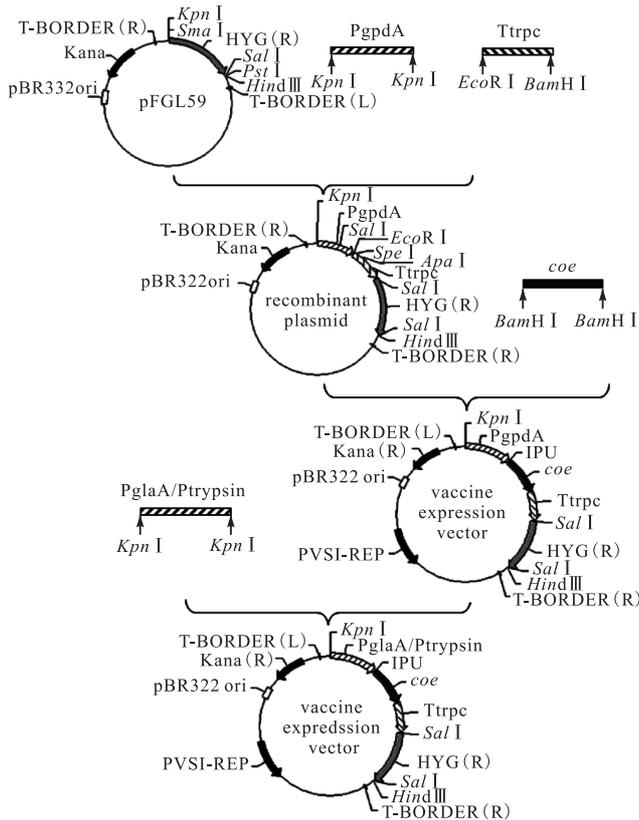


图 1 镰孢霉 ATCC20334 对潮霉素 B 的敏感性实验

Fig. 1 The sensitivity of *Fusarium venenatum* ATCC20334 to hygromycin B

2.2 蛋白表达载体的构建及转化

作为构建疫苗表达系统的第一步,以 pFGL59 为出发质粒构建了含有不同启动子的表达载体,尝试表达疫苗蛋白 COE. pFGL59 含有的 pBR322 复制起始位点,使其可以在大肠杆菌中稳定存在且具有高拷贝数,载体中含有的 T-DNA 区域可将外源基因导入受体基因组上. 疫苗表达载体的构建流程见图 2.



质粒 T-DNA 如下:PgpdA/PglA/Ptrypsin 分别表示来源于 *A. nidulans* 持家基因、*A. niger* 糖化酶基因和 *F. oxysporum* 胰蛋白酶基因的启动子; *coe/cocoe* 分别代表密码子优化前后的 PEDV 中和表位基因; Ttrpc 表示来源于 *A. nidulans* 色氨酸操纵子中吡啶甘油磷酸合酶基因的终止子; HYG(R) 编码潮霉素 B 抗性基因.

图 2 疫苗表达载体构建示意图

Fig. 2 Schema of the construction of vaccine expression vector

取 1  $\mu\text{L}$  重组质粒利用 0.2 cm 电转杯通过电击法 (2.5 kV) 导入农杆菌. 农杆菌与镰孢霉进行共培养, 在抗性平板上挑取转化子提取基因组, 并扩增 *coe/cocoe* 片段以验证转化子, 验证结果如图 3 所示, 证明 *coe/cocoe* 基因成功导入镰孢霉的基因组上.

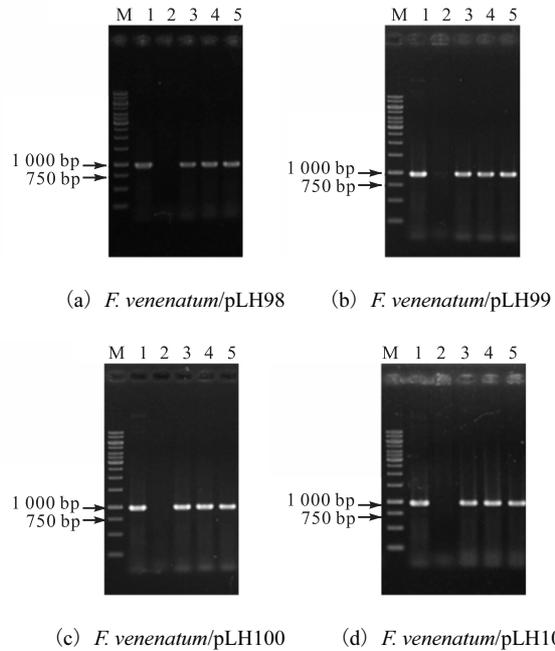


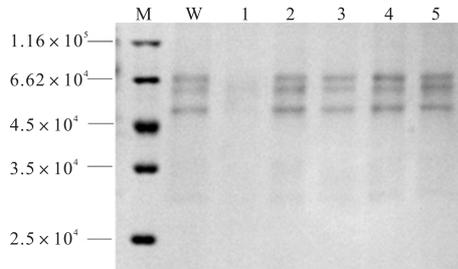
图 3 镰孢霉转化子的 PCR 验证图

Fig. 3 PCR analysis of the transformant

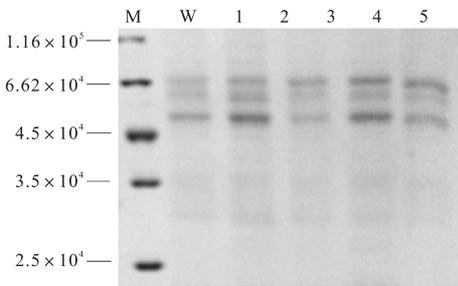
2.3 *coe* 优化前在镰孢霉中的异源表达

通过 SDS-PAGE 分析镰孢霉的转化子和野生型发酵液中的分泌蛋白. *F. venenatum/pLH98* 和 *F. venenatum/pLH99* 转化子发酵液中的蛋白条带与野生型相比没有明显差异, 如图 4(a) 和图 4(b) 所示, 表明通过 SDS-PAGE 未检测到 COE 蛋白. *F. venenatum/pLH100* 转化子发酵液中的蛋白条带与野生型相比, 在  $3.4 \times 10^4$  左右处有明显的蛋白条带,

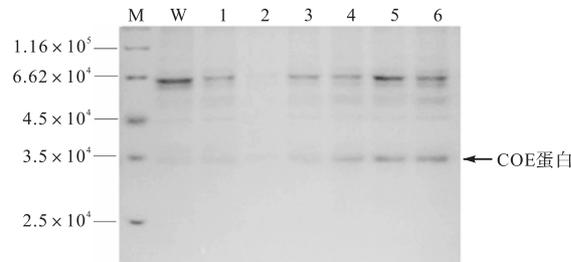
如图 4(c)所示,表明在 Ptrypsin 的作用下异源蛋白 COE 在宿主中高效表达,并且在信号肽 IPU 的引导下分泌到镰孢霉的发酵液中,与预期结果相符.但转化子与野生型相比,条带较弱,可见表达量较低,因此希望通过使用启动子 Ptrypsin 并优化 *coe* 基因密码子来提高其在镰孢霉中的表达量.



(a) 转化子 *F. venenatum*/pLH98 的发酵液分析



(b) 转化子 *F. venenatum*/pLH99 发酵液分析



(c) 转化子 *F. venenatum*/pLH100 的验证图发酵液分析

M. 蛋白相对分子质量标准; W. 镰孢霉野生型的发酵液; 1—6. 含有 *coe* 基因的镰孢霉转化子发酵液

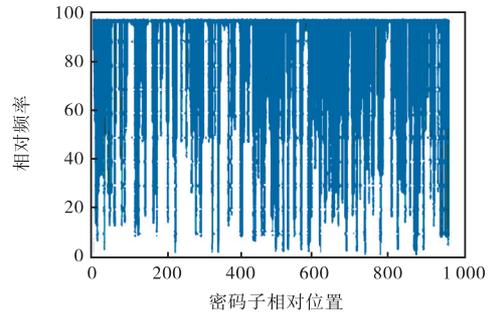
图 4 COE 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of COE protein

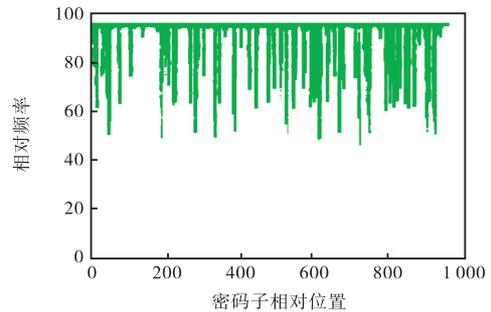
## 2.4 *coe* 基因密码子的优化

密码子偏好性是外源蛋白在真菌中表达的重要因素.如果外源基因与表达宿主的密码子使用偏好性差别较大,宿主细胞内与其相匹配的 tRNA 浓度就会比较低,会使蛋白翻译延伸过程中断的概率大大增加.对 *coe* 基因优化结果如图 5 所示,优化后密码子的适应指数(CAI)由原先的 0.44 提升至 0.92,优化 *coe* 基因的 GC 含量和稀有密码子以延长 mRNA 的表达,打破影响核糖体结合和 mRNA 稳定性的

Stem-loop 结构.



(a) 镰孢霉中自然的 *coe* 序列 (CAI = 0.44)



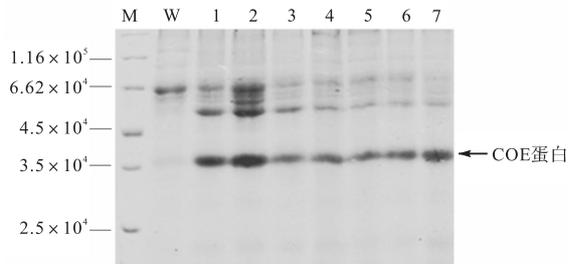
(b) 镰孢霉中优化后的 *coe* 序列 (CAI = 0.92)

图 5 用于镰孢霉表达的 *coe* 基因的常用密码子优化

Fig. 5 Codon usage optimization of *coe* gene for the expression of *Fusarium venenatum*

## 2.5 *coe* 优化后在镰孢霉中的异源表达

根据镰孢霉的密码子偏好性优化 *coe* 基因序列,采用启动子 Ptrypsin 构建表达载体 pLH106.转化子 *F. venenatum*/pLH106 进行 SDS-PAGE,在  $3.4 \times 10^4$  左右处转化子有明显蛋白条带,且蛋白量明显高于 *coe* 密码子未优化时,而  $6.62 \times 10^4$  非特异性的蛋白条带亮度差别不大(图 6),可见在启动子 Ptrypsin 的驱动下,基因序列优化有利于 COE 蛋白在镰孢霉里的表达.结果表明,将 *coe* 按照镰孢霉的密码子偏好性进行优化后,提高了其在宿主菌里表达水平.



M. 蛋白相对分子质量标准; W. 镰孢霉野生型的发酵液; 1—7. 含有 *coe* 基因的镰孢霉转化子发酵液

图 6 COE 蛋白的 SDS-PAGE 分析图

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of COE protein

### 3 结 论

本研究建立了以镰孢霉为表达宿主的疫苗表达系统:在含有潮霉素抗性的 pFGL59 质粒 T-DNA 区域依次连入启动子 PgpdA/PglaA/Ptrypsin、*coe* 基因和终止子 Ttrpc, 构建疫苗表达载体并获得含有该载体的镰孢霉工程菌株. 为使 COE 蛋白能够分泌到发酵液中, 在 *coe* 基因 5'端引入黑曲霉异支链淀粉酶基因(*ipuA*)的信号肽基因(IPU). 镰孢霉菌株在 Vogel's 麦芽糊精液体培养基中 28 ℃、200 r/min 发酵 5 d, 通过 SDS-PAGE 检测镰孢霉菌株发酵液, 发现 COE 蛋白在启动子 Ptrypsin 作用下的成功表达, 并且根据镰孢霉密码子偏好性优化 *coe* 碱基序列后, 该蛋白在镰孢霉中的表达量显著提高. 这为 PEDV 口服疫苗的研制提供了新的思路, 为疫苗蛋白在丝状真菌宿主里的规模化生产奠定了基础.

致谢:感谢国家高技术研究发展计划(863 计划)(2012AA020403)对本研究的资助.

#### 参考文献:

- [ 1 ] Gouka R J, Punt P J, van den Hondel C. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: Progress, limitations and prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(1): 1-11.
- [ 2 ] 刘德辉, 黄毓茂, 徐惠. 丝状真菌异源蛋白高效表达的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(2): 221-224.
- [ 3 ] Punt P J, van Biezen N, Conesa A, et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production[J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(5): 200-206.
- [ 4 ] Buxton F P, Gwynne D I, Davies R W. Heterologous protein secretion by *Aspergillus niger* growing in submerged culture as dispersed or aggregated mycelia[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44: 157-160.
- [ 5 ] Tsuchiya K, Gomi K, Kitamoto K, et al. Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 40(2/3): 327-332.
- [ 6 ] Durand H, Clanet M, Tiraby G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1988, 10(6): 341-346.
- [ 7 ] Nevalainen H, Valentino S J, Peter L B. Heterologous protein expression in filamentous fungi[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(9): 468-474.
- [ 8 ] Nevalainen H, Suominen P, Taimisto K. On the safety of *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Biotechnology, 1994, 37(3): 193-200.
- [ 9 ] Moralejo F J, Watson A J, Jeenes D J, et al. A defined level of protein disulfide isomerase expression is required for optimal secretion of thaumatin by *Aspergillus awamori* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2001, 266(2): 246-253.
- [ 10 ] Conesa A, van de Velde F, van Rantwijk F, et al. Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(21): 17635-17640.
- [ 11 ] David L, Jay D. K. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27: 53-75.
- [ 12 ] Griep M I, Mets T F, Massart D L. Effects of flavour amplification of Quorn and yoghurt on food preference and consumption in relation to age, BMI and odour perception[J]. British Journal of Nutrition, 2000, 83(2): 105-113.
- [ 13 ] Wiebe M. Myco-protein from *Fusarium venenatum*: A well-established product for human consumption[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(4): 421-427.
- [ 14 ] Blinkovsky A M, Byun T, Brown K M, et al. Purification, characterization, and heterologous expression in *Fusarium venenatum* of a novel serine carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3298-3303.
- [ 15 ] Royer J C, Moyer D L, Reiwitich S G, et al. *Fusarium graminearum* A3/5 as a novel host for heterologous protein production[J]. Nature Biotechnology, 1995, 13(12): 1479-1483.
- [ 16 ] Farnworth N E, Robson G D, Trinci A P J, et al. Trypsin-like protease (TLP) production in *Fusarium oxysporum* and *Fusarium venenatum* and use of the TLP promoter for recombinant protein (glucoamylase) production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33: 85-91.
- [ 17 ] 孙东波, 郎洪武, 时洪艳, 等. PEDV S 蛋白 B 细胞抗原表位的筛选和鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(9): 971-977.

(下转第 42 页)