

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200433026

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

重组盘基网柄菌高密度发酵合成培养基
的优化研究

Studies on synthetic medium for high cell density
cultivation of recombinant *Dictyostelium discoideum*

国家自然科学基金(20306025)资助项目

王 颖

指导教师姓名: 卢 英 华 副 教 授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 0 7 年 5 月

论文答辩日期: 2 0 0 7 年 6 月

学位授予日期: 2 0 0 7 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2007年7月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
第一章 文献综述.....	1
1.1 盘基网柄菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> 介绍.....	1
1.1.1 盘基网柄菌的（无性）生命周期.....	1
1.1.2 盘基网柄菌的应用研究.....	2
1.2 盘基网柄菌表达系统.....	3
1.2.1 盘基网柄菌表达系统与各种通用表达系统的比较.....	3
1.2.2 重组盘基网柄菌表达异源蛋白质研究进展.....	6
1.2.3 重组盘基网柄菌表达人可溶性 Fas 配体.....	8
1.3 盘基网柄菌的培养研究进展.....	11
1.3.1 几种常用的盘基网柄菌培养基.....	11
1.3.2 限制细胞密度的自分泌因子.....	13
1.3.3 盘基网柄菌的高密度培养策略.....	14
1.4 本论文的研究内容及研究意义.....	17
第二章 材料与方法.....	19
2.1 重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 的构建.....	19
2.2 实验材料和试剂.....	20
2.3 实验仪器.....	21
2.4 培养基和缓冲溶液.....	22
2.4.1 无菌培养基.....	22
2.4.2 缓冲溶液.....	25
2.5 菌种保存.....	25
2.5.1 磷酸盐-琼脂平板.....	25
2.5.2 盘基网柄菌的孢子收集方法.....	25
2.6 孢子活化和细胞对 SIH 培养基的适应.....	25
2.7 盘基网柄菌的悬浮培养.....	26
2.8 分析方法.....	26
2.8.1 细胞密度的测定.....	26
2.8.2 葡萄糖浓度的测定.....	26
2.8.3 氨浓度的测定.....	28
2.8.4 氨基酸浓度的测定.....	29
2.8.5 表达产物 shFasL 浓度的测定.....	30

2.9 微生物的生长动力学.....	31
2.10 数据模拟.....	33
第三章 重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 对氨基酸的利用情况.....	37
3.1 氨基酸标准品的 HPLC 分析.....	38
3.1.1 混合氨基酸标准品的配制.....	38
3.1.2 流动相洗脱梯度的确定.....	39
3.1.3 混合氨基酸标准品的 HPLC 分析.....	42
3.1.4 标准曲线和精密度实验.....	44
3.2 SIH 培养基中氨基酸成分的 HPLC 检测分析.....	45
3.3 重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 对 SIH 培养基中氨基酸的利用情况.....	48
3.4 本章小结.....	49
第四章 培养基组成对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	50
4.1 重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 在标准 SIH 培养基中的生长.....	50
4.2 葡萄糖对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	51
4.3 半胱氨酸对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	53
4.4 SIH 培养基中无机盐组分对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	55
4.4.1 Mg^{2+} 浓度对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	56
4.4.2 Ca^{2+} 浓度对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	57
4.4.3 Fe^{3+} 浓度对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	59
4.5 SIH 培养基中维生素组分对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	60
4.5.1 生物素对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	60
4.5.2 维生素 B_{12} 对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	61
4.5.3 叶酸对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	62
4.5.4 硫辛酸对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	63
4.5.5 核黄素对重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 生长的影响.....	65
4.5.6 盐酸硫胺对重组盘基网柄菌生长的影响.....	66
4.6 本章小结.....	67
第五章 结论与展望.....	69
参考文献.....	72
附录.....	81
在读期间发表论文.....	90
致谢.....	91

CONTENTS

Abstract	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Introduction of <i>Dictyostelium discoideum</i> (<i>D. discoideum</i>)	1
1.1.1 Asexual life cycle of <i>D. discoideum</i>	1
1.1.2 Application of <i>D. discoideum</i>	2
1.2 <i>D. discoideum</i> expression system.....	3
1.2.1 Comparison of <i>D. discoideum</i> and other expression systems.....	3
1.2.2 Progress of heterologous proteins expressed in <i>D. discoideum</i>	6
1.2.3 Soluble human Fas ligand expressed by <i>D. discoideum</i>	8
1.3 Studies on cultivation of <i>D. discoideum</i>	11
1.3.1 Several available media for <i>D. discoideum</i>	11
1.3.2 Autocrine growth inhibitors.....	13
1.3.3 Strategies for high cell density cultivation of <i>D. discoideum</i>	14
1.4 Contents and purpose of the thesis.....	17
Chapter 2 Materials and methods	19
2.1 Construction of recombinant <i>D. discoideum</i> AX3-pLu8.....	19
2.2 Materials and reagents.....	20
2.3 Equipments.....	21
2.4 Media and buffer.....	22
2.4.1 Axenic liquid media.....	22
2.4.2 Phosphate buffer.....	25
2.5 Storage of <i>D. discoideum</i>	25
2.5.1 Phosphate - agar plate.....	25
2.5.2 Collection of <i>D. discoideum</i> spores.....	25
2.6 Spore activation and adaption of <i>D. discoideum</i> in SIH medium.....	25
2.7 Cultivation of <i>D. discoideum</i> in suspension cultures.....	26
2.8 Analysis method.....	26
2.8.1 Cell accounting.....	26
2.8.2 Analysis of concentration of glucose	26
2.8.3 Analysis of ammonia.....	28
2.8.4 Analysis of amino acids.....	29
2.8.5 Analysis of soluble Fas ligand.....	30

2.9 Growth kinetics of microorganisms.....	31
2.10 Modeling of batch cultivation of <i>D. discoideum</i>	33
Chapter 3 Amino acid consumption during the cultivation of recombinant	
<i>D. discoideum</i> AX3-pLu8.....	37
3.1 Analysis of standard amino acids by HPLC.....	38
3.1.1 Preparation of amino acids standard mixture.....	38
3.1.2 Gradient elution program.....	39
3.1.3 Analysis of amino acids standard mixture by HPLC.....	42
3.1.4 Regression equations and precision analysis.....	44
3.2 Detection and analysis of amino acid in SIH medium.....	45
3.3 Amino acid consumption during the cultivation of recombinant <i>D.</i>	
<i>discoideum</i> AX3-pLu8 on SIH medium.....	48
3.4 Conclusion.....	49
Chapter 4 Influence of medium components on growth behavior of	
recombinant <i>D. discoideum</i> AX3-pLu8.....	50
4.1 Cultivation of AX3-pLu8 on standard SIH medium.....	50
4.2 Effect of glucose concentration on the growth of AX3-pLu8.....	51
4.3 Effect of cysteine concentration on growth of AX3-pLu8.....	53
4.4 Effect of metal ions on growth of AX3-pLu8.....	55
4.4.1 Effect of Mg ²⁺ concentration on growth of AX3-pLu8.....	56
4.4.2 Effect of Ca ²⁺ concentration on growth of AX3-pLu8.....	57
4.4.3 Effect of Fe ³⁺ concentration on growth of AX3-pLu8.....	59
4.5 Effect of vitamins in SIH medium on growth of AX3-pLu8.....	60
4.5.1 Effect of biotin concentration on growth of AX3-pLu8.....	60
4.5.2 Effect of VB ₁₂ concentration on growth of AX3-pLu8.....	61
4.5.3 Effect of folic acid concentration on growth of AX3-pLu8.....	62
4.5.4 Effect of lipoic acid concentration on growth of AX3-pLu8.....	63
4.5.5 Effect of riboflavin concentration on growth of AX3-pLu8.....	65
4.5.6 Effect of VB ₁ concentration on growth of AX3-pLu8.....	66
4.6 Conclusion.....	67
Conclusions and prospects.....	69
References.....	72
Appendix.....	81
Publications during graduate study.....	90
Acknowledgements.....	91

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 作为一个新兴的真核生物表达系统,用于表达需要翻译后修饰的药用蛋白具有广阔的应用前景,但其较慢的生长速度(代时为 8-12 h)以及较低的细胞密度($1-2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)严重限制了它成为通用表达系统的应用。为有效利用盘基网柄菌这一真核表达系统生产异源蛋白诸如人类可溶性 Fas 配体,有必要实现盘基网柄菌的高密度悬浮培养。

本文以可高通量表达人类可溶性 Fas 配体的重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 为研究对象,以全合成 SIH 培养基为研究起点,通过优化培养基组成的方法改善其培养,提高细胞生长速度及细胞浓度。

发展了柱前衍生反相高效液相色谱检测氨基酸的方法。采用 2, 4-二硝基氯苯为衍生剂,衍生方法简便,可同时对 16 种氨基酸进行定性分离和定量检测反应生成的 DNP-氨基酸峰面积与氨基酸浓度具有良好的线性关系,线性相关系数在 0.992 ~ 0.999 之间。用该法分析重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 对 SIH 培养基中氨基酸的利用情况,发现对赖氨酸的利用最为彻底,发酵末期赖氨酸被完全消耗;对蛋氨酸、色氨酸、精氨酸、组氨酸的利用也比较充分,在发酵末期这四种氨基酸的含量都降到初始含量的 15% 以下;而对天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、缬氨酸的需求不大,末期含量仍接近或高于初始含量的 50%。

采用单次单因素法,分析 SIH 培养基中各组分对 AX3-pLu8 细胞生长的影响。葡萄糖为细胞生长的必需营养成分,最佳的初始葡萄糖浓度在 10 g L^{-1} 左右。 Mg^{2+} 对细胞生长有明显的促进作用,可显著提高最大细胞密度及缩短世代时间。最佳的 Mg^{2+} 浓度为 1.25 mmol L^{-1} , 这时最大细胞密度可达 $5.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 远高于在标准 SIH 培养基所能达到的培养水平 $3.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。 Ca^{2+} 不是盘基网柄菌细胞生长的必需金属离子,且 Ca^{2+} 浓度高于 3.75 mmol L^{-1} 时对细胞生长有抑制作用。少量 Fe^{3+} 的添加能显著提高细胞的生长速度,但对最大细胞密度影响不大;而高浓度的 Fe^{3+} 对细胞生长出现明显的抑制作用,细胞几乎不生长,较适添加量为 0.1 mmol L^{-1} 。维生素中,生物素、叶酸及核黄素是 AX3-pLu8 生长的必需维生素,当培养基中缺少这三种维生素中的任何一种时,细胞几乎不生长,较

适合的添加量为生物素 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ，叶酸 0.2 mg L^{-1} ，核黄素 2.5 mg L^{-1} 。VB₁₂ 和 VB₁ 均不是细胞生长所必需的维生素，且添加量对菌体生长影响不大。虽然 AX3-pLu8 在不添加硫辛酸时也能生长，但最大细胞密度仅能达到 $1.6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ，且硫辛酸的添加量对细胞密度的影响也较为明显，最佳硫辛酸浓度为 0.4 mg L^{-1} 。

关键词：盘基网柄菌；人类可溶性 Fas 配体；培养基；高效液相色谱；氨基酸。

Abstract

The social amoeba of slime mould *Dictyostelium discoideum* has emerged as an attractive eukaryotic system for the expression of recombinant proteins, especially for those pharmaceutical proteins whose conformation and bioactivity depend on post-translational modifications to offer the greatest degree of product fidelity. However, the application of this system is seriously affected by slow growth rates (doubling time of 8-12 h) as well as low maximal cell densities ($1-2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) in the presence of axenic (liquid) media. Therefore, scientific efforts should be expended on the techniques for cultivating *D. discoideum* cells on axenic medium.

In this work, a recombinant *D. discoideum* strain AX3-pLu8 expressing soluble form of human Fas ligand was studied. Since the medium composition has great effect on the cells growth behavior, standard synthetic SIH medium was optimized for a high cell density cultivation of *D. discoideum*.

To understand amino acid consumption during cultivation of recombinant *D. discoideum* AX3-pLu8 on SIH medium, a method for determination of amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with 2, 4-dinitrochlorobenzene (DCNB) derivatization was developed. 16 amino acids could be well separated in 55 min, and a good linear relationship between peak area and concentration of amino acid was established with the correlation coefficients in the range of 0.992- 0.999. Analysis of culture samples of *D. discoideum* on SIH medium indicated that lysine was completely consumed during cultivation. Methionine, tryptophan, arginine and histidine were also utilized considerably, while aspartic acid, glutamic acid, glycine, threonine, proline and valine did not show significant demand during the cell growth. This metabolic characteristic would supply reliable data to design a more reasonable synthetic medium for *D. discoideum*.

Starting with the standard synthetic SIH medium, the influence of different medium components on the growth behavior of recombinant *D. discoideum* AX3-pLu8 was investigated. It was necessary to add glucose in SIH medium, and the variation of the initial glucose concentration had a great influence on the growth behavior of *D. discoideum*. Maximal cell densities were obtained when about 10 g L⁻¹ of glucose was added. Adding Mg²⁺ significantly improved the cell growth. At MgCl₂ concentration of 1.25 mmol L⁻¹, maximal cell density of 5.5×10⁷ ml⁻¹ was achieved, which was much higher than that could usually be expected for cultivations on standard SIH medium. Ca²⁺ was unnecessary to cell growth, and even showed an inhibition on maximal cell density when its concentration was higher than 3.75 mmol L⁻¹. Lower concentrations of Fe³⁺ showed no significant effect on maximal cell density and permitted cell growth with a higher growth rate, but higher Fe³⁺ concentration showed an obvious inhibition on cell growth. Growth ceased after one to two doublings in the presence of ferric chloride for concentrations in excess of 0.3 mmol L⁻¹. The best concentration of Fe³⁺ was close to 0.1 mmol L⁻¹. The requirement for vitamins showed that cell growth could hardly keep in a medium lacking biotin, folic acid or riboflavin, but the higher concentration of biotin or folic acid showed a subtle negative effect on cell growth. Optimal growth could be obtained when about 10 μg L⁻¹ biotin, 0.2 mg L⁻¹ folic acid and 2.5 mg L⁻¹ riboflavin were added. AX3-pLu8 did not show any requirement for VB₁₂ and VB₁, and the concentration of them had little influence on cell growth. Cells inoculated into SIH medium lacking lipid acid grew with normal growth rate, but the maximal cell density dropped drastically to 1.6×10⁷ mL⁻¹. The best concentration of lipid acid was 0.4 mg L⁻¹.

Keywords: *Dictyostelium discoideum*; human Fas Ligand; medium; HPLC; amino acid.

第一章 文献综述

基因技术的进步使利用重组蛋白开发和生产药物及疫苗以治疗各种疾病如癌症、肿瘤、高血压和艾滋病成为可能^[1]。应用基因工程技术构建重组细胞并通过重组细胞培养生产目标产物已成为现代生物技术中最活跃的研究方向之一，广泛应用于生产异源蛋白质及代谢工程等领域。随着可靠的基因转化技术的建立，在悬浮培养中单细胞生长的盘基网柄菌阿米巴变形虫被认为是发展前景十分广阔的重组药用蛋白真核表达系统，尤其适合于表达需要翻译后修饰的复杂糖蛋白^[2]。

1.1 盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 介绍

盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)属于真菌界的粘菌亚界的聚粘霉纲(*Acrasiomycetes*)^[3]。盘基网柄菌属 *D. discoideum* 由 Raper 1935 年于 North Carolina 发现^[4]，在土壤中在土壤中它以腐败有机物质如树叶上的细菌为食。

1.1.1 盘基网柄菌的（无性）生命周期

盘基网柄菌单细胞营养生长(vegetative growth phase)和多细胞发育阶段(development phase) 的两个不同的阶段的(无性)生命周期。在单细胞阶段细胞生长并通过简单的细胞分裂而增殖，在随后的多细胞阶段则发生形态形成和分化。在单细胞阶段的单核变形细胞被原动物学家称为阿米巴变形虫(amoebae)，通过吞噬(phagocytose)细菌或在无菌培养基中通过胞饮作用(pinocytosis)摄取营养^[5-7]，以单个个体的方式进行生长和分裂。处于对数生长期的盘基网柄菌细胞直径约为 10 μm ，它没有细胞壁，可通过伪足在固体表面移动。当营养物质耗尽时，这些阿米巴变形虫就会自动聚集在一起，进入一个分化的、多细胞阶段的无性发育周期(图 1.1)。在发育周期中，100 到 10^5 个阿米巴变形虫聚集在一起形成一个多细胞的塔状物。在这个过程中环腺苷酸 cAMP 作为信息物质起着十分重要的作用。cAMP 的脉冲波趋化性地调节阿米巴的聚集^[8]。通过进一步的分化，细胞聚集体形成肉眼可见的长为 1-2 mm，直径为 0.1 mm 的假合胞体(Pseudoplasmodia，也称 Slug)^[9]。这个假合胞体可定向移动。在外部条件刺激下(如光、pH、湿度、温度)，假合胞体趋向于基质表面，并在基质表面移动。这个

过程称为迁移阶段(migration phase)。迁移阶段后是形成顶点阶段(culmination phase)。在此阶段假合胞体分化成一个子实体(fruiting body)。子实体由高度液泡化的、死亡的茎细胞和有发芽能力的孢子细胞组成。不同细胞类型的分化由特定的细胞类型基因诱导。不同的形态发生因子,如由茎前体(prestalk)特定基因诱导表达的分化诱导因子DIF(differentiation inducing factor)、cAMP、腺苷(adenosine)和氨(ammonium)均起着作用^[10-12]。孢子包裹在一个由半纤维素、纤维素和蛋白质组成的壳中,可保藏很长时间。在适宜的环境条件下,孢子可释放出来,发芽生成单个的阿米巴,从而开始新的生命周期^[13]。

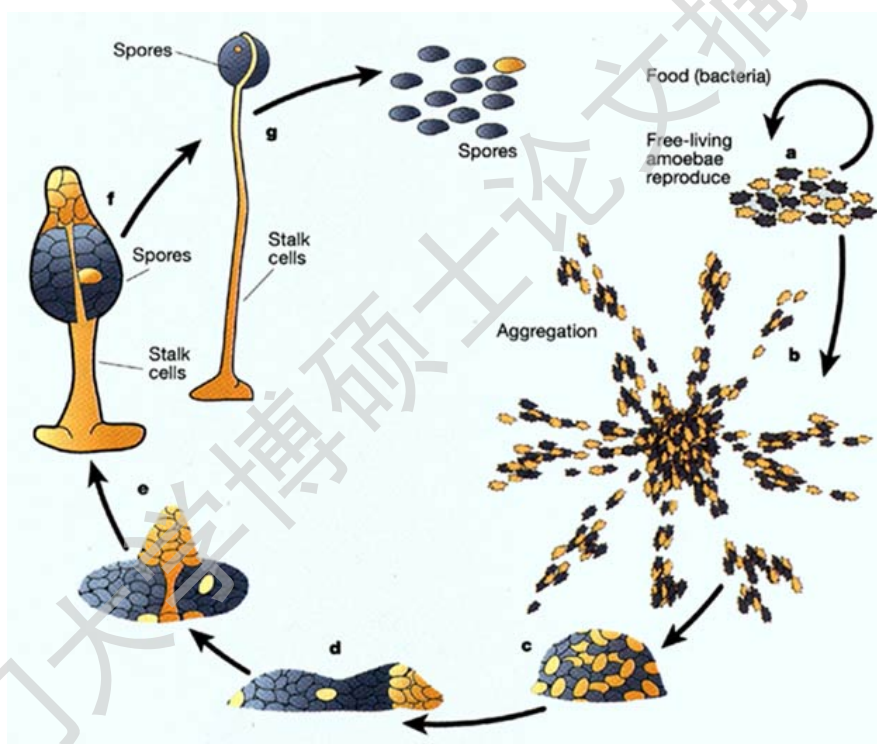


图 1.1 盘基网柄菌的无性生命周期^[图片来源于网络]

Fig 1.1 The (asexual) life cycle of *D. discoideum*

1.1.2 盘基网柄菌的应用研究

由于盘基网柄菌“阿米巴”变形虫能在两种形态之间进行切换:一种是孤立的单细胞生物,另一种是能表现出高等真核生物典型的细胞分异和协作的多细胞形式,也由于它容易在实验室中培养、已筛选出突变株,以及转化技术、

分离和鉴定不同细胞类型技术、生化和分子生物学技术的具备，盘基网柄菌“阿米巴”已成为了解细胞通信和分异方式的一种关键模型生物。目前，盘基网柄菌完整基因组测序工作已全部完成，盘基网柄菌有 7 个染色体，每个染色体的 DNA 数量只比细菌 *E. coli* 稍多一些^[14]，对基因组和蛋白组所做的分析表明其基因组的特点包括有大量基因参与生成和输出小分子。此外，该生物起源于真核生物演化的根部，这意味着可通过其基因组来研究关于真核生物起源和分化的问题，如细胞的信息传导、趋化性(chemotaxis)、细胞粘附、细胞分裂、细胞聚集、细胞变异、细胞骨架(cytoskeleton)、胞质分裂(cytokinesis)、形态发生(morphogenesis) 等^[15, 16]。2000 年，盘基网柄菌与酿酒酵母 *S. cerevisiae* 一起，被 NIH 选为标准微生物模型系统 (<http://www.nih.gov/science/models/d-discoideum/>)。盘基网柄菌特别的(无性)生命周期使它同时具有类似酵母和类似哺乳动物细胞的特征，这两个特征使它具有了作为外源蛋白表达宿主的潜力。盘基网柄菌的生命周期还与分化期间多种蛋白的调控表达有关。这种调控机制可有助于调控重组蛋白的表达^[17]。

1.2 盘基网柄菌表达系统

1.2.1 盘基网柄菌表达系统与各种通用表达系统的比较

目前，对治疗及其他用途的蛋白质和酶的快速增长的需求只能通过重组蛋白的异源合成满足^[18]。因此，应用基因工程技术构建重组细胞并令其超量合成其它生物体内含量极微但却具有较高经济价值的生化物质是现代生物技术研究的重点之一。

原核和真核表达系统是生产重组蛋白的通用表达系统。目前最常用的表达系统有原核的细菌（主要是大肠杆菌）、真核的酵母、昆虫及动物细胞系。细菌具有两个显著的优点：操作简易和能在廉价培养基中迅速生长，使之适于用作表达多种蛋白的理想工具，但其在表达真核基因方面存在不少严重缺点。细菌表达系统，如 *E. coli* 不拥有各种翻译后修饰加工功能（posttranslational modifications），如氮和氧联结的糖基化（glycosylation）、磷酸化（phosphorylation）和酰基化（acylation）。然而这些修饰功能对很多蛋白质的生物活性、功能、结构、溶解性、稳定性、半衰期、蛋白酶的抗性以及相容性起着决定性的作用^[17, 19]。

^{20]}。此外，由于细菌本身分泌能力很弱，虽然有些重组蛋白质可分泌到细胞周质中，但是排放到培养基中通常是不可能的。在利用细菌表达大量异源蛋白质时通常以不溶的凝聚物形式，即所谓的包涵体 (inclusion bodies) 存在于细胞内，只能通过菌体破碎（溶解）、离心收集以及清洗三大步骤分离包涵体，然后溶解在高浓度的变性剂中，再通过小心的复性步骤重新获得活性异源蛋白，这就增加了操作难度，尤其在重组异源蛋白的大规模生产过程中，这个缺陷更为明显。通过溶解分离细胞质中的蛋白质往往会释放出核酸、热源及内毒素、脂多糖等杂质，这些都必须在产品中去除^[19]。另外，与细胞外相比，细胞内蛋白酶种类多和浓度较高，原核生物表达的异源蛋白的活性和收率可能会被蛋白酶的活性影响，不适合用于表达糖蛋白^[21, 22]。

酵母菌是一个表达外源蛋白的常用低等真核系统。作为食用微生物，酵母菌不含有特异性的病毒，不产生毒素，属于安全型基因工程受体系统。酵母菌的基因表达调控机理比较清楚，遗传操作相对较为简单，能将外源基因表达产物分泌至培养基中，并且可在廉价的培养基中快速生长（世代时间 90 min）。这个低等真核系统虽然可对目标蛋白进行糖基化，但是氮和氧连接的寡糖结构与动物细胞中的有明显的区别^[23]。超糖基化现象（即在核心寡糖上悬挂甘露多聚糖长链）在酵母中十分普遍，从而阻碍了蛋白质的正确折叠和蛋白质的活性^[23]。这使得利用这个表达系统生产药用蛋白没有吸引力^[20]。

被杆状病毒(baculovirus)传染的昆虫细胞，如 *Spodoptera* (SF9 或 SF21) 的一些特征使其成为生产重组蛋白的一个普遍使用的真核细胞表达系统^[24, 25]。作为真核生物它拥有许多高等真核生物中存在的蛋白质修饰、加工和传输系统。病毒可在昆虫细胞中大量繁殖，因此可相对容易地表达大量的重组蛋白，并且重组蛋白可表达在细胞的适当位置，如膜蛋白结合于膜上，核酸蛋白固定于细胞核上，分泌型蛋白分泌到培养基中。此外，病毒基因组相当大（130 kb），因此可方便地导入大的外源 DNA 片断。但是这种基于杆状病毒载体的表达系统也有一些缺点。比如一些翻译后修饰，如富含精氨酸和赖氨酸系列的内蛋白剪切效率极低。这个表达系统的糖基化能力通常只适用于生产含高甘露糖单元的糖蛋白，也就是说，它不适合于用来生产含岩藻糖(fucose)、半乳糖(galactose)以及

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库