

EB病毒 gp125 蛋白的酵母表达及在鼻咽癌检测中的应用

胡 波¹, 张新玲², 周文营¹, 李 林^{1*}

(中山大学附属第三医院 1.检验科;2.超声科,广东 广州 510630)

摘要:【目的】采用毕赤酵母系统构建表达 EB 病毒 gp125 重组蛋白,并探讨其在鼻咽癌血清学诊断中的应用。【方法】以 EBV DNA 为模版,采用 PCR 法扩增 gp125 的编码基因 BALF4(2574 bp),与毕赤酵母表达载体 pPIC9 连接,转化酵母菌 GS115,甲醇诱导重组蛋白表达。重组蛋白经 SDS-PAGE、免疫印迹法鉴定后,包被聚丙烯板,制备 ELISA 试剂检测鼻咽癌患者和正常人群 gp125-IgA 抗体。【结果】在毕赤酵母菌中高效地表达了分泌型的 gp125 重组蛋白,相对分子质量为 110 000,免疫印迹证实目的蛋白有免疫原性,gp125 蛋白经纯化后作为包被抗原检测鼻咽癌患者和健康对照的敏感度和特异度分别为 78.0%和 92.0%。【结论】采用毕赤酵母系统高效分泌表达了 gp125 重组蛋白,初步评估了 gp125 蛋白在鼻咽癌血清筛选中的诊断价值。

关键词:鼻咽癌;gp125;毕赤酵母

中图分类号: R365

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)05-0780-06

Expression of gp125 Protein of Epstein-Barr Virus in *Pichia pastoris* and Application in Detection of Nasopharyngeal Carcinoma

HU Bo¹, ZHANG Xin-ling², ZHOU Wen-ying¹, LI Lin^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Ultrasound, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To analyze the application of recombinant gp125 proteins in serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). 【Methods】 DNA was extracted from the B95-8 cells was used as the templates in a polymerase chain reaction (PCR). gp125 gene (2574 bp) was generated and inserted into pPIC9 vector. The recombinant plasmids were transformed into GS115 yeast by electroporation. The yeast transformants induced by methanol expressed recombinant proteins. The recombinant proteins synthesized were coated to microplate for detection of EBV-IgA antibody in NPC patients by ELISA. 【Results】 We have successfully secretly expressed the recombinant gp125 protein in the *Pichia pastoris*. The molecular weight of product was approximately 110 000. The recombinant protein gp125 in the culture supernatant showed good immunoreactivity with IgA antibodies to EBV by Western blot. A novel ELISA was established using *Pichia pastoris*-expressed gp125 proteins. Serum samples were collected from patients with NPC and healthy controls and using this ELISA tested. The sensitivity and the specificity of gp125 tests in the NPC sera were 78.0% and 92.0%, separately. 【Conclusion】 The recombinant proteins gp125 were highly secretly expressed in *pichia pastoris*, the diagnostic value of the recombinant protein in screening for NPC patients was primary evaluated and the valuable pPIC9-gp125 yeast strain was obtained.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; gp125; *Pichia pastoris*

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(5): 780-785]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种上皮来源的恶性肿瘤,高发于中国南部地区。流行病学资料显示 EB 病毒 (Epstein-Barr virus,

EBV)是 NPC 的重要诱发因子,NPC 患者血清中的 EBV VCA 抗体水平普遍升高,其检测结果可用于 NPC 的临床诊断和/或流行病学调查^[1-2]。目前

收稿日期: 2014-01-06

基金项目: 广东省科技计划项目(2006B36001010); 教育部第 44 批留学回国人员科研启动基金[教外司留(2012)940]

作者简介: 胡波,博士,副教授,研究方向:肿瘤的分子生物学机制,E-mail: hubo96073@hotmail.com; * 通信作者: 李林,教授,E-mail: Lilin5786@263.net

EBV的血清学检测采用免疫荧光法、免疫酶法和ELISA等方法。免疫荧光法和免疫酶法因特异性差和阳性细胞计数受主观因素影响等缺点已逐渐被ELISA方法所取代,但目前通过基因工程表达的包被抗原在特异性和灵敏度两个指标上无法同时达到满意的效果,限制了ELISA方法的实际应用。为及时而准确地对NPC患者进行早期诊断和治疗,利用DNA重组技术寻找理想的基因工程EBV-VCA抗原用于制备诊断试剂是当前急需解决的问题^[3-4]。EBV VCA抗原是NPC的重要诊断抗原,由多种不同的蛋白成分组成。gp125是VCA的主要抗原多肽之一,由EB病毒基因组中BALF4基因编码,由于是一种糖蛋白,基因重组表达的该蛋白的分子质量为110 000,但一般仍称为gp125^[5]。本研究采用毕赤酵母系统表达了gp125重组蛋白,用于检测相应的gp125-IgA抗体,分析了gp125抗原在NPC血清学诊断中的敏感度和特异度,探讨该重组抗原在NPC诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

300份病理确诊为NPC患者的血清样本来自中山大学附属肿瘤医院,江苏省肿瘤医院。男性221例、女性79例,平均(45 ± 25)岁,均为首次发现,未经治疗。500份健康对照组标本来自中山大学附属第三医院健康体检者,男性372例、女性128例,平均(43 ± 22)岁(采集时间2003-2005年)。372份EB病毒PCR阴阳性血清(阳性75份,阴性297份,平均(42 ± 20)岁,采集时间2005年)分别来自南方医科大学南方医院及附属珠江医院,EB病毒PCR定量检测试剂盒购自中山大学达安基因有限公司,PCR仪分别为瑞士Roche公司LightCycler及美国BioRad MJ Option II型;单纯疱疹病毒抗体检测试剂盒检出的IgM、IgG阳性标本21份、巨细胞病毒IgM、IgG检测试剂盒检出的阳性标本27份均来自中山大学附属第三医院门诊患者,试剂购自美国ZENS SCIENTIFIC INC。

1.2 质粒载体与关键试剂

EB病毒转化的淋巴瘤细胞株B95-8细胞购自中山大学基础医学院,酵母表达载体pPIC9A和酵母菌GS115购于美国Invitrogen公司(按说明书

操作),大肠杆菌JM109用于所有质粒扩增,ZeocinTM用于毕赤酵母菌和大肠杆菌阳性克隆的筛选。病毒DNA抽提试剂盒购自上海生物工程公司。DNA回收及纯化试剂盒QIA quick Gel Extraction Kit(QIAGEN)购自基因公司。所有内切酶及T4DNA连接酶均购自New England Biolabs,蛋白胨及YNB购自Difco公司。EBV VCA-IgA抗体检测试剂盒购自北京贝尔生物工程有限公司。

1.3 重组质粒的构建及鉴定

EBV DNA的提取参照文献^[6],以EBV病毒DNA为模板扩增gp125抗原的编码基因BALF4(2574 bp),扩增引物由上海博亚公司合成,引物序列如下:F: 5'-G GAATTC ATG CTC GAG AAC AGG ACA GCC TAC TG -3'; R: 5'-CG GCGGCCGC TTA CTG CAG GGT GGC AAT GCC-3。F为上游引物,R为下游引物;画线部分为EcoR I和Not I酶切位点。扩增条件如下:98℃ 10S,55℃ 15S,72℃ 3 min;扩增40个循环。取PCR扩增产物10 μL在10 g/L的琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果。将PCR产物BALF4基因插入pPIC9载体构建重组酵母表达载体pPIC9-BALF4,双酶切电泳及DNA序列分析鉴定重组质粒,具体操作见相关公司手册。重组质粒pPIC9-BALF4经Sal I线性化,电穿孔法转导酵母菌GS115(mut+,His-),涂菌于MD平板上,300C培养3~10 d,PCR法筛选阳性重组子。mut+表型筛选使用MMH和MDH平板。

1.4 重组蛋白gp125的诱导表达、鉴定和纯化

将重组酵母菌株接种于BMGY液体培养基中,30℃ 3.0×g约16~18 h,当600 nm吸光度(D)值=2~6时离心收获细胞,并重悬于BMMY液体培养基中,29℃ 3.0×g振荡培养,每24 h补充甲醇到终浓度为4 g/L诱导表达。在开始诱导表达后的24、48、72、96和120 h各时间点分别取样1 mL于1.5 mL离心管中离心,分离培养上清,用于检测各时间点总蛋白含量和目的蛋白效价,从而确定最佳的诱导表达时间。同时分别采用1、2、4、8、12和16 g/L的甲醇终浓度对重组蛋白进行诱导,测定重组蛋白的效价来确定最佳甲醇诱导浓度。离心收集含有重组gp125蛋白的上清进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳、薄层蛋白扫描定量分析;培养上清经SDS-PAGE电泳后转染PVDF膜,加EB阳性血清,然

后分别加入碱性磷酸酶标记的兔抗人 IgG 抗体,进行 Western blot 检测。用 ELISA 检测培养上清中重组 gp125 蛋白效价。细胞培养上清中的 gp125 重组蛋白经饱和硫酸铵盐析后,过 SephadexG-25 葡聚糖凝胶柱脱盐,更换为起始缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaCl, pH 7.0),用 DEAE-Sephrose Fast Flow 琼脂糖阴离子交换柱纯化,柱体积(16 mm×25 mm),在 FPLC 层析装置上流速 2 mL/min,走纸速度 10 mm/min。平衡液及样品缓冲液为(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0),不连续梯度洗脱,NaCl 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6 和 1 mol/L,SDS-PAGE 和 ELISA 检测蛋白活性和纯度,然后过分子筛,再次用 SDS-PAGE 和 ELISA 检测蛋白活性和纯度。

1.5 Gp125-IgA 抗体的检测

稀释纯化的 gp125 重组蛋白,100 ng/100 μ L 每孔分别包被聚丙烯反应板,PBS 封闭。HRP 标记的羊抗人 IgA Fab 段[Goat F(ab)2 Anti-Human IgA-HRP]作为探针,用 ELISA 间接法检测 NPC 患者和健康体检标本的血清 VCA-gp125-IgA 水平,四甲基联苯胺为底物,450nm 波长处测定 A 值。固相抗原及酶标记物的最佳工作浓度用方阵滴定确定。通过 ROC 曲线确定临界值(cut-off 值)。敏感度为 NPC 患者标本中的阳性检出率,特异度为健康对照组中的阴性检出率。相同标本同时用北京贝尔生物工程有限公司 EBV VCA-IgA 抗体检测试剂盒进行检测。

1.6 特异度考核

EB 病毒 PCR 检测阴阳性血清、单纯疱疹病毒 I 型、II 型 IgM、IgG 抗体阳性血清、巨细胞病毒 IgM、IgG 抗体阳性血清分别用上述 gp120 重组蛋白制备的 gp120-IgA 抗体检测试剂进行检测。

1.7 统计学分析

统计分析用 SPSS 12.0 软件。VCA IgA 检测的 A450 用 $\bar{x} \pm sD$ 表示。各组间计数资料的比较采用行×列表的卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 pPIC9-BALF4 载体构建和蛋白表达

以质粒 EBV 病毒 DNA 为模板扩增 gp125 编码基因 BALF4,PCR 产物经琼脂糖电泳鉴定,在

2574bp 处可见到清晰条带,与理论上 BALF4 基因的大小完全符合(图 1)。

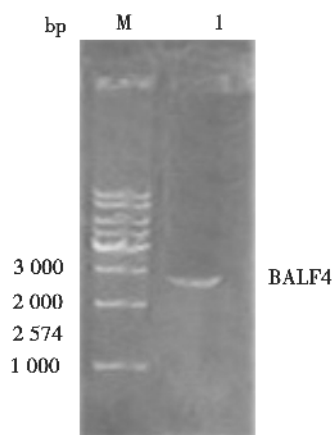


图 1 PCR 扩增 BALF4 基因

Fig.1 PCR products of BALF4 gene

M: DGL2000 DNA marker; 1: PCR product of BALF4(2574 bp)

将 BALF4 基因插入载体 pPIC9 的相应位点,得到重组质粒 pPIC9-BALF4,经序列分析及酶切鉴定表明,BALF4 基因序列正确,基因插入方向无误(图 2)。

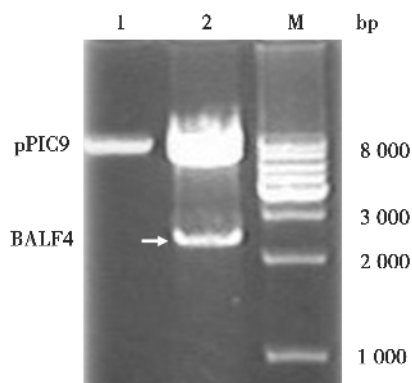


图 2 重组质粒 pPIC9-BALF4 的酶切分析

Fig.2 Double digestion of recombinant plasmid of pPIC9-BALF4

1: pPIC9A / EcoR I+Not I; 2: pPIC9-BALF4/ EcoR I+Not I; M: DGL2000 DNA marker

SDS-PAGE 显示,经甲醇诱导的携带 pPIC9-BALF4 的 GS115 酵母菌培养上清中出现一相对分子质量约为 110 000 的特异性条带,与预测的 gp125 蛋白的相对分子质量相符,表达水平约占总蛋白的 62%(图 3)。而转入 pPIC9 空载体的 GS115

酵母菌培养上清中无此条带出现,根据培养上清中总蛋白含量计算目的蛋白 gp125 浓度为 20 mg/L。

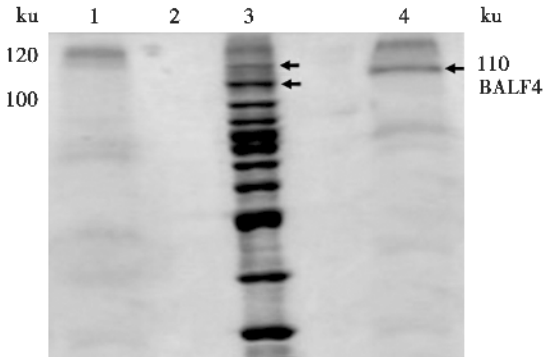


图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

1: The expressed pPIC9 /GS115 supernatants; 2: The expressed supernatants of non-transformed GS115; 3: Protein molecular weight Markers; 4: The expressed pPIC9-BALF4/GS115 supernatants

pPIC9-BALF4/GS115 重组菌株在甲醇诱导 72 h 分泌表达重组蛋白效价最高,第 96 h 后开始呈下降趋势。ELISA 检测效价为 1:204 800。在诱导 72 h 时,采用不同的甲醇终浓度 1 g/L、2 g/L、4 g/L、8 g/L、12 g/L、16 g/L 对重组酵母菌进行诱导表达。结果发现(图 4),重组酵母菌在 0.5%的甲醇浓度下表达目的蛋白的效价最高,1 g/L 和 16 g/L 的甲醇浓度下几乎不表达目的蛋白,在 4 g/L 和 8 g/L 的甲醇浓度下表达水平相似。

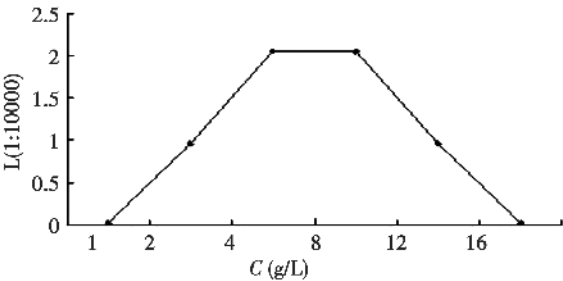


图 4 重组蛋白的最佳甲醇诱导浓度

Fig.4 Optimal methanol concentration

Recombinant yeast was induced with a final Methanol concentration of 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 8 g/L, 12 g/L, 16 g/L, respectively and collected supernatant at 72 h. L: Titre of recombinant protein in supernatant; C: A final methanol concentration

2.2 重组 gp125 蛋白的鉴定和纯化

western blot 显示在相对分子质量为 110 000 处出现一条特异性带,与预测的 gp125 重组蛋白

的相对分子质量相符(图 5)。

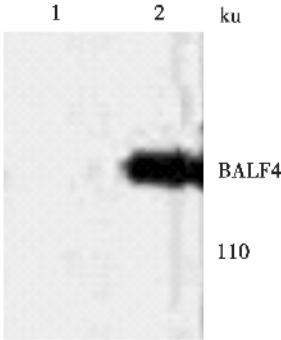


图 5 重组蛋白的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of recombinant protein

1: The pPIC9 /GS115 expressed supernatants; 2: The pPIC9-gp125/GS115 expressed supernatants

SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色可见经盐析、离子交换和分子筛纯化后的重组 gp125 蛋白带,相对分子质量为 110 000,纯度在 90%以上(图 6)。

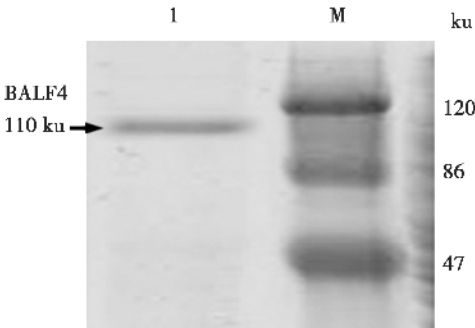


图 6 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein

1: The purified recombinant pPIC9-gp125 protein; M: Protein molecular weight Markers

2.3 gp125-IgA 抗体的检测

用纯化后的 gp125 蛋白作为包被抗原分别对鼻咽癌患者及健康体检标本进行检测(通过 ROC 曲线确定其 cut-off 值),用 gp125 作为包被抗原,在 NPC 患者中的阳性率(78.0%)显著高于北京贝尔公司 EBV VCA-IgA 抗体检测试剂盒检测相同组别的 NPC 患者的阳性率(64%; $\chi^2=20.11$, $P < 0.01$),差异有统计学意义。两组不同试剂在健康对照组中的阳性率分别为 8.0%和 10%,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.16$, $P > 0.05$,表 1)。

表 1 gp120-IgA 和 EBV VCA-IgA 试剂盒(贝尔)检测 NPC 患者和健康人群结果比较
Table 1 Comparison of results of VCA-IgA in NPC patients and healthy controls by using gp120-IgA and EBV VCA-IgA kit (beier)

Group	NPC(<i>n</i> = 300)		Healthy controls(<i>n</i> = 500)		
	A450	Positive rate	A450	Positive rate	cut-off
Gp120-IgA	0.575 ± 0.265	78%(234/300)	0.120 ± 0.118	8%(40/500)	0.356
VCA-IgA(beier)	0.545 ± 0.312	64.0%(192/300)	0.148 ± 0.106	10%(50/500)	0.305
χ ²		20.11		1.16	
<i>P</i>		<0.01		>0.05	

2.4 特异性考核

PCR 阴阳性血清 gp125-IgA 检测结果:在 297 份 EBV PCR 阴性标本中,gp125 重组蛋白制备的检测试剂未出现阳性结果;在 75 份 EBV PCR 阳性标本中,有 19 份 gp125-IgA 检测阳性,阳性结果均出现在 EBV PCR 阳性的标本中,gp125-IgA 抗体检测相对于核酸检测的特异性为 100%;单纯疱疹病毒 I 型、II 型 IgM、IgG 抗体阳性血清 21 份中,EB 病毒 gp125-IgA 检测未出现阳性;巨细胞病毒 IgM、IgG 抗体阳性血清 27 份中,EB 病毒 gp125-IgA 检测未出现阳性。

3 讨 论

EBV 是英国病毒学家 Epstein-Barr 等人于 1964 年从 Burkitt's 淋巴瘤细胞系中分离到的病毒,广泛存在于全世界,人类感染后成为终生潜伏性感染,在一定条件下活化,并可转化淋巴细胞。广泛的证据证明 EBV 与 NPC 密切相关,NPC 患者血清中具有针对多种 EB 病毒抗原的抗体,其中包括潜伏期和溶解期表达的抗原,例如 EA,EBNA1, VCA 和 DNA 酶等^[7-9],且针对这些抗原的特异性抗体效价的升高常发生在临床发现肿瘤之前^[8],因此在 NPC 高发区人群进行该类抗体普查对于 NPC 的早期发现和治疗有着重要的意义。

EB 病毒壳抗原(VCA)是 NPC 的重要诊断抗原,其主要抗原多肽 gp125 有极强的免疫原性^[5],是诊断 EBV 既往感染及新近感染的最有价值的抗原。大量研究证实,EBV VCA IgA 类抗体升高是 NPC 患者的特征之一,且 VCA IgA 抗体先于肿瘤出现,为 NPC 的早期诊断提供了重要的血清学依据。本研究尝试着从 B95-8 细胞中扩增出 gp125 的编码基因在酵母中表达,希望能得到一个针对

NPC 患者 VCA 特异性抗体的良好抗原。

毕赤酵母是一种高效的外源蛋白表达系统,具有生长快,纯化方便,可高水平分泌外源蛋白,利于大规模工业化生产等特点。作为真核表达系统,毕赤酵母还可进行类似哺乳动物细胞的蛋白翻译后修饰,如信号肽加工,蛋白折叠,二硫键形成和糖基化修饰,磷酸化修饰等^[10-11],因此大部分利用酵母菌表达的重组蛋白具有同天然蛋白相似的生物学功能^[12-13]。此外,人类感染毕赤酵母的机率极低^[14],故该系统来源的菌体蛋白质与人源标本极少有交叉反应,用于制备诊断试剂,结果具有较高的特异性。本研究在毕赤酵母中成功地高效表达了分泌型的 gp125 重组蛋白,表达产物的相对分子质量为 110 000,Western blot 证实该带有免疫反应性,重组蛋白纯化后其纯度达 90%以上。ELISA 检测结果显示 gp125 重组蛋白与 NPC 患者血清间具有良好的免疫反应性;gp125 目的蛋白的表达水平为 62%,表达量为 20 mg/L,可以满足大规模生物制品生产的需要。

Gp125 是 VCA 复合物中的主要成份,在机体免疫反应中是主要的免疫原,分布于细胞核和细胞浆内^[6],本研究表达了 gp125 蛋白,作为包被抗原对 NPC 患者和健康人标本进行检测,其灵敏度(78.0%)显著高于北京贝尔公司 EBV VCA-IgA 抗体检测试剂盒(64%)(χ²=20.11,*P*<0.01),差异有统计学意义,提示本研究在酵母中表达的 gp125 蛋白作为包被抗原在检测 NPC 病人的灵敏度方面优于北京贝尔生物工程有限公司 EBV VCA-IgA 抗体检测试剂盒。两组不同试剂的特异度分别为 92.0%和 90%,差异无统计学意义。本实验室曾经在毕赤酵母中表达了 BALF4(S)(aa287-623)^[6],其中 VCA-BALF4(S)的灵敏度(76.3%)和 VCA-BALF4 的灵敏度(78%)比较接近,但特异性前者

(96%)明显好于后者(92%),提示 BALF4 全长片段中可能含有引起非特异性反应的抗原决定簇,去掉该类抗原决定簇,可能会提高 NPC 病人的检测特异性。VCA-gp125 IgA 对于 NPC 的早期诊断有效,本研究使用酵母表达的 gp125 重组蛋白对 NPC 病人进行检测,其阳性率为 78.0%,仍有 20%左右的 NPC 患者无法用 VCA-gp125 IgA 抗体检测出,目前尚未发现任何单个的血清学标志物可以用来诊断所有的 NPC 患者,可能对于 VCA 基因重组抗原来说,需要将其与其它不同抗原进行联合检测,才能提高 NPC 早期诊断的灵敏度和特异性。具体需与哪种抗原片段进行联合检测,还有待于进一步探讨。本实验用 EB 病毒 PCR 阴阳性血清、同属疱疹病毒科的单纯疱疹病毒抗体阳性标本、巨细胞病毒抗体阳性标本对 gp125 蛋白作为检测抗原的特异性进行考核,阳性结果均出现在 EB 病毒 PCR 阳性血清中,在 EBV PCR 阴性标本、单纯疱疹病毒抗体阳性标本、巨细胞病毒抗体阳性标本中均未出现阳性,证明 gp125 用于 EBV IgA 抗体检测时,具有较高的特异性。

本研究利用毕赤酵母系统高效分泌表达了 gp125 重组蛋白,并用于检测 NPC 和健康对照组血清中 gp125-IgA 抗体,对该重组抗原在 NPC 血清学诊断中的价值进行了初步评估,获得了在 NPC 筛选中有一定应用价值的 pPIC9-BALF4 生产酵母工程菌株,表明重组 gp125 蛋白可以有效地用于 NPC 患者相关抗体的检测。

参考文献:

- [1] Chang C, Middeldorp J, Yu KJ, et al. Characterization of ELISA detection of broad-spectrum anti-Epstein-Barr virus antibodies associated with nasopharyngeal carcinoma[J]. J Med Virol, 2013, 85(3): 524-529.
- [2] Fachiroh J, Schouten T, Hariyanto B, et al. Molecular diversity of Epstein-Barr virus IgG and IgA antibody responses in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of Indonesian, Chinese, and European subjects[J]. J Infect Dis, 2004, 190(1): 53-62.
- [3] Cai YL, Li J, Lu AY, et al. Diagnostic significance of combined detection of epstein-barr virus antibodies, VCA/IgA, EA/IgA, Rta/IgG and EBNA1/IgA for nasopharyngeal carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(5): 2001-2006.
- [4] Romdhoni AC, Wiqoyah N, Kentjono WA. Early detection of nasopharyngeal carcinoma using IgA anti-EBNA1 + VCA-p18 serology assay[J]. Ear Nose Throat J, 2014, 93(3): 112-115.
- [5] Pearson G. ELISA tests and monoclonal antibodies for EBV[J]. J Virol Methods, 1988, 21(9): 97-104.
- [6] 胡波, 李朝霞, 盛平, 等. EB 病毒 VCA 基因片段在毕赤酵母中的表达及临床应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(4): 365-370.
Hu B, Li ZX, Sheng P, et al. Expression of VCA genes of Epstein-Barr virus in Pichia pastoris and Clinical Application [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2010, 30(4): 365-370. (in Chinese)
- [7] Cheng W, Chan K, Chen H, et al. Assessing the risk of nasopharyngeal carcinoma on the basis of EBV Antibody spectrum[J]. Int J Cancer, 2002, 97(9): 489-492.
- [8] Karray H, Ayadi W, Fki L, et al. Comparison of three different serological techniques for primary diagnosis and monitoring of nasopharyngeal carcinoma in two age groups from Tunisia[J]. J Med Virol, 2005, 75(9): 593-602.
- [9] Nystad T, Myrmet H. Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis [J]. J Clin Virol, 2007, 38(9): 292-297.
- [10] Subathra M, Santhakumar P, Satyam Naidu S, et al. Expression of avian influenza virus (H5N1) hemagglutinin and matrix protein 1 in pichia pastoris and evaluation of their immunogenicity in mice [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(7): 3635-3645.
- [11] Han M, Wang X, Ding H, et al. The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by Pichiapastoris[J]. Enzyme Microb Technol, 2014, 54(8): 32-37.
- [12] Li H, Hui X, Yang S, et al. High level expression, efficient purification and bioactivity assay of recombinant human platelet-derived growth factor AA dimer (PDGF-AA) from methylotrophic yeast Pichia pastoris [J]. Protein Expr Purif, 2013, 91(2): 221-227.
- [13] Marbach J, Zentis P, Ellinger P, et al. Expression and characterisation of fully posttranslationally modified cellular prion protein in Pichia pastoris [J]. Biol Chem, 2013, 394(11): 1475-1483.
- [14] 刘德美, 安玉亮, 苏芬. 奥默毕赤酵母菌引起脓血尿 1 例报道[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(1): 31-33.
Liu DM, An YL, Su F. One case report of purulent hematuria caused by Pichia ohmeri [J]. Chin J Lab Med, 2002, 25(1): 31-33. (in Chinese)

(编辑 王晓鹰)