

## Bm-TFF2 在毕赤酵母中的表达及鉴定

余果宇<sup>1,2,#</sup>, 张红芸<sup>3,#</sup>, 张 勇<sup>1</sup>, 江 萍<sup>1</sup>, 李文辉<sup>1</sup>, 张 云<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223; 2. 昆明医学院 生物化学教研室, 云南 昆明 650500;  
3. 昆明医学院第一附属医院 妇产科, 云南 昆明 650032)

**摘要:** Bm-TFF2, 一种从大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离得到的两栖类三叶因子, 具有比人三叶因子更强的生物学活性。该研究以 Bm-TFF2 的 cDNA 为模板, 利用 PCR 方法扩增 Bm-TFF2 基因, 然后插到含有 AOX1 启动子和  $\alpha$ -因子信号肽序列的表达载体 pPIC9K 中, 采用毕赤酵母表达系统进行分泌表达, 并用 G418 筛选高拷贝整合转化子。SDS-PAGE 和 Western blotting 都检测到 Bm-TFF2 被分泌性表达于酵母上清。在 1% 的甲醇诱导表达不同时间后, 重组蛋白在 72 h 的表达量最大, 可达 50 mg/L; 而不同浓度的饱和硫酸铵沉淀菌液上清时, 80% 的饱和硫酸铵沉淀量最大。这些结果表明, 重组质粒 Bm-TFF2-pPIC9K 成功构建并在真核细胞中高效表达, 这为进一步研究 Bm-TFF2 的生物学活性及其结构与功能关系奠定了基础。

**关键词:** Bm-TFF2; 毕赤酵母; 表达; 鉴定

中图分类号: Q966; Q516; Q786 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)06-0565-05

## Expression and identification of Bm-TFF2 in *Pichia pastoris*

YU Guo-Yu<sup>1,2,#</sup>, ZHANG Hong-Yun<sup>3,#</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, JIANG Ping<sup>1</sup>,  
LEE Wen-Hui<sup>1</sup>, ZHANG Yun<sup>1,\*</sup>

(1. Biotoxin Units, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. Biochemistry Section of Kunming Medical College, Kunming 650500, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

**Abstract:** Bm-TFF2, an amphibian trefoil factor, which is isolated from skin secretions of frog *Bombina maxima*, has much stronger biological activities than human TFFs. In the present study, Bm-TFF2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from its cDNA and cloned into *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K containing AOX1 promoter and  $\alpha$ -factor leader sequence. Multi-copies insertion transformants were screened on G418 plates. After the induction by 1% methanol for 72 hours, the expression of Bm-TFF2 came up to the best quantity which was about 50 mg in 1L medium, and 80% saturation ammonium sulfate was suitable to collect the Bm-TFF2 protein, as identified by SDS-PAGE and Western blotting assay. The results showed that the plasmid of Bm-TFF2-pPIC9K was constructed successfully and expressed abundantly in eukaryotic expression system, which lies basis for researching further the biological activities and the relationship of structure and functions of Bm-TFF2.

**Key words:** Bm-TFF2; *Pichia pastoris*; Expression; Identification

在哺乳动物中, 三叶型家族(trefoil factor family, TFFs)蛋白通过增强细胞迁移, 促进细胞增殖, 对抗细胞凋亡等过程参与黏膜的修复并维持其完整性(Baus-Loncar et al, 2005)。除此而外, TFFs 也涉及到肿瘤的发生或肿瘤的抑制(Lalani et al, 1999;

Siu et al, 2004), 但 TFFs 作用的生物学机制仍不清楚, 可能是 TFFs 的受体或识别位点还没有得到确切的证实(Emami et al, 2004; Sands & Podolsky, 1996)。人 TFF2, 又名解痉李多肽, 在胃肠道的伤口修复, 上皮再生和抗感染等过程中, 通过促进细胞

收稿日期: 2010-08-17; 接受日期: 2010-11-10

基金项目: “973” 项目(2010CB529805); 国家基金委重点项目(30630014); 国家基金委面上项目(30570359); 中国科学院重要方向项目(KSCX2-YW-R-088)

\*通讯作者(Corresponding author), E-mail: zhangy@mail.kiz.ac.cn

#并列第一作者(Authors contributed equally to the work)

第一作者简介: 余果宇(1972—), 女, 博士, 研究方向: 肿瘤分子生物学; 张红芸(1970—), 女, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤的临床诊断

迁移和抑制细胞凋亡发挥作用(Farrell et al, 2002; Hanby et al, 1993), 并且 TFF2 表达的增加常常与肿瘤的进展和不良的预后相关(Dhar et al, 2003; Emami et al, 2004; Katoh, 2003)。从大蹼铃蟾皮肤分泌物中纯化得到的含两个三叶因子结构域的 Bm-TFF2, 是第一个被报道的具有整合素  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 依赖性血小板活化活性(Zhang et al, 2005)的三叶因子蛋白质。最近的研究又表明, 天然 Bm-TFF2 具有促进细胞迁移、细胞增殖以及抗凋亡的功能, 而这些可能与其促进伤口修复、组织再生功能紧密相关(Zhang et al)。所以, Bm-TFF2 潜在的生物学活性使其成为一种有用的分子工具来进一步研究 TFFs 家族蛋白结构与功能的关系。Bm-TFF2 分子中的 12 个半胱氨酸形成三对二硫键, 从而使体外表达 Bm-TFF2 成为一种挑战性工作。而甲醇利用型毕赤酵母能够以醇氧化酶启动子 AOX1 和  $\alpha$ -因子信号肽强烈诱导其下游的外源基因进行分泌性表达, 同时通过提高插入载体的拷贝数量或高密度发酵等方法进一步提高目的蛋白质的产量。因此, 本研究采用甲醇利用型毕赤酵母分泌性表达 Bm-TFF2, 并对甲醇诱导的最适时间以及饱和硫酸铵沉淀的最适浓度进行了评估, 从而为进一步研究 Bm-TFF2 的生物学活性、结构与功能的关系以及其可能的作用机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

酵母表达质粒 pPIC9K、毕赤酵母菌株 GS115、遗传霉素 G418、三梨醇(Sorbitol)、蛋白胨和毕赤酵母培养试剂盒等均购于美国 Invitrogen 公司。聚合酶、限制性内切酶、DNA 连接酶和碱性磷酸酶购自大连宝生物公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 目的片段的扩增及重组质粒的构建

Bm-TFF2 的 PCR 特异性引物由上海生物工程有限公司合成, 正向引物序列为 5'-gtc gaattc ggttttccaatctatgag-3', 包括 *EcoR* I 酶切位点(斜体)和 Bm-TFF2 N 端的 6 个氨基酸(黑体); 反向引物序列为 5'-tat gcggccgc tca ttcttg aggtttaagca-3', 包括 *Not* I 酶切位点(斜体)、终止子和 Bm-TFF2 C 端的 6 个氨基酸(黑体)。以 Bm-TFF2 的 cDNA 为模板, 按照 95℃ 预变性 4 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s 进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸

7 min 获得 PCR 产物。产物经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切以后连接到相同双酶切后的 pPIC9K 质粒中形成重组质粒 Bm-TFF2-pPIC9K。将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态并铺板于有氨苄和卡拉霉素抗性的 LB 平板。次日用 Bm-TFF2 的特异性引物对挑出的克隆行菌落 PCR 检测, 并测序选出的阳性克隆。抽提测序正确的克隆质粒并用 *Sac* I 线性化 Bm-TFF2-pPIC9K 质粒。碱性磷酸酶去磷酸端后用苯酚、氯仿和异丙醇抽提 DNA。

#### 1.2.2 酵母菌 GS115 的转化

制备酵母感受态细胞 GS115, 取约 20  $\mu$ g 处理好的 Bm-TFF2-pPIC9K 质粒, 用 Bio-Rad GenPulser 电击仪, 在 1 500 V、20  $\mu$ F 和 200 A 的条件下将重组质粒电击转入 GS115(His<sup>-</sup>)感受态细胞中, 分别取等量涂于葡萄糖琼脂板 MD 平板上(13.4 g/L 酵母氮源碱基、0.2 g/L 生物素、20 g/L 葡萄糖、15 g/L 琼脂)和甲醇琼脂板 MM 平板上(13.4 g/L 酵母氮源碱基、0.2 g/L 生物素、20 g/L 葡萄糖、5 mL 甲醇和 15 g/L 琼脂), 30℃ 培养, 观察转化子的生长情况。

#### 1.2.3 筛选 G418 抗性转化子

培养 48 h 后, 挑出在两种平板上都生长良好的菌落转于一新的 MD 平板上, 并同时接种于每孔含 200  $\mu$ L YPD(10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖)的 96 孔板中, 对应编号, 30℃ 培养 48 h 后, 用 100  $\mu$ L 多道移液器上下吹打重新悬浮细胞, 各取 10  $\mu$ L 培养的酵母菌液按编号又转于一新的每孔含 190  $\mu$ L YPD 培养基的 96 孔板, 30℃ 培养 24 h 后, 重复上述操作一次, 最后按编号点样于不同浓度 G418(0、0.25、0.75、1.5、2.0 mg/mL)的 YPD 培养平板上, 30℃ 培养 48 h 并观察克隆的生长状况。选取那些在高浓度 G418 (2.0 mg/mL)的 YPD 培养平板上生长良好的克隆接种于 MD 琼脂平板, 并进一步用表达载体 pPIC9K 的通用引物  $\alpha$ -factor 和 3'-AOX, 以及 Bm-TFF2 的特异性引物行菌落 PCR 以确定阳性克隆。

#### 1.2.4 重组蛋白质的分泌性表达及鉴定

将上述方法筛选所得的阳性单克隆接种于 10 mL BMGY 培养基中(含 10 g/L 酵母提取物、20 g/L 蛋白胨、13.4 g/L 酵母氮源碱基、0.2 g/L 生物素、10 g/L 甘油、100 mmol/L 磷酸钾, pH 6.0), 待酵母菌生长到 OD<sub>600</sub>  $\approx$  5.0 后 3 000 g, 离心 5 min, 弃上清, 留细胞沉淀, 加入一定量的 BMMY(含 10 g/L 酵母提取物、20 g/L 蛋白胨、13.4 g/L 酵母氮源碱基、

0.2 g/L 生物素、20 g/L 甲醇、100 mmol/L 磷酸钾, pH 6.0)重悬细胞至  $OD_{600} \approx 1.0$ , 30℃, 180 r/min 持续摇 72 h, 在此之间不间断地补加一定量甲醇至终浓度 1.0%。取 1 mL 上清, 3000 g 离心 5 min, 用三氯乙酸(TCA)法沉淀浓缩蛋白, 取等量(20  $\mu$ L)蛋白行 SDS-PAGE(15%)并用考马斯亮蓝染色, 同时用 Bm-TFF2 的抗体行 Western blotting 检测。

### 1.2.5 重组蛋白在不同时间的表达以及上清的硫酸铵沉淀

选择两个表达量相对高的克隆, 按上述方法进行 1%甲醇诱导表达。在酵母菌生长至 24、48、72 和 96 h 的各时间点分别取 1 mL 培养液, 3000 g 离心 5 min 并用 TCA 法沉淀浓缩上清, SDS-PAGE (15%) 和 Western blotting 检测等量蛋白以确定 Bm-TFF2 的最佳诱导时间。将选择出来的表达量高的克隆接种于有 200 mL BMGY 的 1 L 培养瓶, 30℃, 180 r/min 摇 16 h 至  $OD_{600} \approx 5.0$ , 3 000 g 离心 5 min 收集酵母菌, 用 BMMY 调 OD 至 1.0, 四层纱布封口, 同上条件发酵生长, 每 24 h 加甲醇至终浓度 1.0%, 72 h 后收集发酵液, 3 000 g 离心 5 min 得上清。将上清等量分为 7 份, 分别用 40%、50%、60%、70%、80%、90%和 100%的饱和硫酸铵于 4℃ 进行沉淀并取等量 (20  $\mu$ L)沉淀行 Western blotting 以检测最佳沉淀浓度。

## 2 结 果

### 2.1 PCR 扩增及重组表达质粒的构建

以 Bm-TFF2 的 cDNA 为模板, 通过 PCR 反应扩增出约 350 bp 的目的片段(图 1A)。克隆出的片段经过 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后与同样双酶切的穿梭

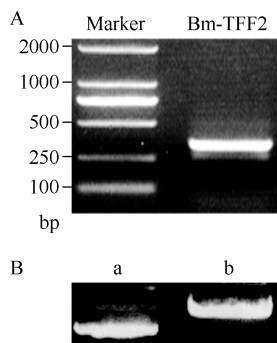


图 1 A: Bo-TFF2 基因的 PCR 产物; B: Bo-TFF2-pPIC9K 质粒(a)与线性化的 Bo-TFF2-pPIC9K 质粒(b)。

Fig. 1 A: The PCR product of Bo-TFF2 gene from amphibian cDNA; B: The plasmid of Bo-TFF2-pPIC9K(a) and the linearized plasmid of Bo-TFF2-pPIC9K(b).

载体 pPIC9K 连接, 并将连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态。挑取阳性克隆进行测序, 选择插入片段列与 GenBank (AY 789708)中 Bm-TFF2 的报道完全一致的克隆, 抽提其质粒, *Sac* I 线性化(图 1B), 去磷酸端后回收质粒 DNA。

### 2.2 G418 抗性转化子的筛选以及重组蛋白质的诱导表达和鉴定

处理后的 Bm-TFF2-pPIC9K 质粒经电击转入 GS115, 96 孔板传代, G418 筛选后, 最后在含 2.0 mg/mL G418 的 YPD 培养平板上挑出 8 个生长良好的克隆进行 PCR 检测。结果显示除第 3 号克隆外, 余者用通用引物(图 2A-a)和 Bm-TFF2 的特异性引物(图 2A-b)扩增后都在 530 bp 和 350 bp 的地方出现扩增条带, 说明除第 3 号克隆为假阳性外, 其它的为阳性克隆。采用上述方法, 以 1.0%的甲醇诱导表达 7 个阳性克隆, 发酵 72 h 后对菌体上清行 TCA 沉淀, 然后各取 20  $\mu$ L 行还原性 SDS-PAGE(15%), 结果显示每个克隆的发酵上清液中, 在相对分子质量为 13 k 的地方出现明显的蛋白条带(图 2B), 进一步用 Bm-TFF2 的抗体做 Western blotting 也在相同

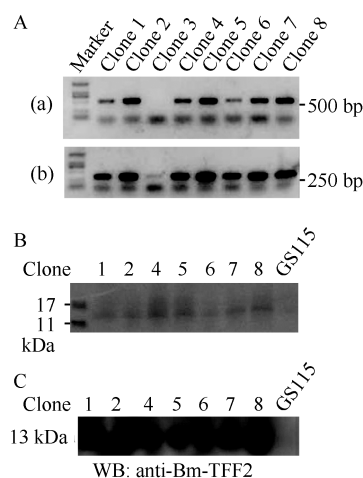


图 2 阳性重组子的鉴定

Fig. 2 The identified of positive recombinant clone

A: pPIC9K 的通用引物(a)和 Bm-TFF2(b)的特异引物检测 G418 筛选的 8 个克隆。

SDS-PAGE(B)和 Western blotting(C)分析阳性克隆重组蛋白的表达; 结果显示相对分子质量为 13 k 的蛋白条带被诱导性地分泌表达于酵母上清液中, 而宿主菌 GS115 却无目的蛋白表达。

A: Identification of 8 clones selected by G418 through the universal primer of pPIC9K (a) and the specific primer of Bm-TFF2 (b). SDS-PAGE (B) and Western blotting (C) analyzed the expression of recombinant protein in positive clones. The results showed the 13 k protein band existed in supernatant solution of clones, but there was no protein band in GS115.

分子质量大小的位置出现明显的特异性显色条带(图 2C), 而没有 Bm-TFF2-pPIC9K 质粒转入的 GS115 宿主菌则无对应条带, 表明 Bm-TFF2 在酵母菌中被正确诱导表达。

### 2.3 重组蛋白在不同时间的表达以及上清的硫酸铵沉淀

用 1.0% 甲醇诱导两个表达量高的转化子(2 号和 8 号克隆), 分别在 24、48、72 和 96 h 的时间点取 1 mL 培养液离心, TCA 法沉淀, 各取 20  $\mu$ L 进行 Western blotting 检测, 结果显示两个转化子在各个时间点都有表达, 但蛋白在 72 h 的表达量最大(图 3A)。从 1L 培养基中可获得约 50 mg 的重组蛋白 Bm-TFF2。增大表达体积, 同样方法对 8 号克隆诱导表达 72 h, 并用不同浓度的饱和硫酸铵于 4 $^{\circ}$ C 沉淀上清和检测沉淀量。如图 3B 所示, 当饱和硫酸铵浓度为 80% 时, 所得蛋白条带颜色最深, 提示蛋白的沉淀量最大(图 3B)。

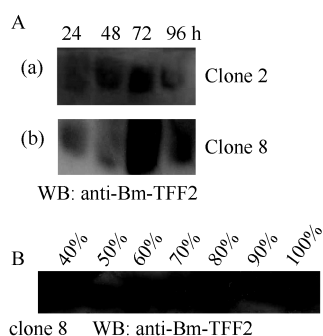


图 3 重组蛋白质在不同时间的表达以及上清的硫酸铵沉淀  
Fig. 3 The expression of recombinant protein in various times and ammonium sulfate precipitation of supernatant solution

A: 在 1.0% 甲醇诱导下, Western blotting 分析 2 号和 8 号克隆在 24、48、72 和 96 h 的 Bm-TFF2 的表达量; B: 相同条件下, 对 8 号克隆进行诱导表达, Western blotting 分析 40%~100% 的饱和硫酸铵沉淀蛋白上清所得的蛋白沉淀量。

A: Western blotting analysis the expression of Bm-TFF2 in 24, 48, 72, and 96 hours for 2 and 8 clones induced by 1.0% methanol; B: Western blotting analysis the precipitation of supernatant solution with 40%~100% saturated ammonium sulfate.

## 3 讨论

人三叶因子家族成员具有特征性的三叶草结构域, 即由 38 或 39 个氨基酸组成, 其中 1-5、2-4 和 3-6 位的半胱氨酸形成三对二硫键, 二硫键的正确生成是蛋白质形成活性构象, 发挥生物学功能的基础。大蹼铃蟾皮肤分泌物中至少存在两种不同形式的 TFFs, 其一是作为一种非晶状体的  $\beta$ -晶状体

蛋白和三叶因子复合物的成份之一, 即含三个三叶因子结构域的 TFF, 具有内皮依赖性心肌衰竭以及对哺乳动物的强烈毒性(He et al, 2008; Liu et al, 2008); 其二是由两个三叶因子结构域构成 Bm-TFF2, 分子中有 12 个半胱氨酸, 两个重复从而形成一致性序 C-X9-C-X9-C-X4-C-C-X10-C。Bm-TFF2 除了有剂量依赖性的血小板激动活性外, 还是第一个被报道的具有促进细胞迁移和增殖、抑制细胞凋亡的两栖类三叶因子。基于 Bm-TFF2 具有较 hTFF2 高的活性, 加之两栖类动物三叶因子的表达迄今为止还是一个空白, 所以该研究的目的是构建一个良好的表达体系表达 Bm-TFF2。毕赤酵母表达系统是近年发展起来的一个高效表达体系, 在甲醇为碳源时候, 它利用强启动子—醇氧化酶 AOX1 高效启动外源基因分泌性表达, 并且可以控制外源基因的表达(Tschopp et al, 1987)。加之酵母本身分泌的蛋白量较少, 所以为下游的纯化提供了很大方便, 该系统也已应用于许多真核蛋白质的表达, 尤其在表达人 TFFs 家族蛋白时得到广泛应用(Sun et al, 2008; Wang et al, 2005)。毕赤酵母表达系统在表达外源蛋白时最大的特征是可以对重组蛋白质进行正确的折叠和翻译后修饰, 从而有利于活性蛋白的生成。所以该研究利用毕赤酵母表达系统表达 Bm-TFF2。如图 1 A 所示, 我们首先利用 PCR 技术, 以 Bm-TFF2 的 cDNA 为模板扩增得到相对分子质量约为 350 bp 的 Bm-TFF2 基因, 然后将它与表达载体 pPIC9K 连接并选出正确的重组子克隆, SacI 线性化克隆质粒使其与酵母染色体在多个同源位点上发生交换(图 1 B)。为防止载体的自连, 线性化后的质粒进一步去磷酸端。最后以电转的方式高效率转化 GS115 酵母宿主菌。在经过浓度渐增的 G418 筛选后, 如图 2 A 所示, 筛选出来的 8 个阳性重组子克隆经过 PCR 鉴定有 7 个(3 号克隆除外)检测到 Bm-TFF2 基因的整合。SDS-PAGE 检测 7 个阳性克隆中目的蛋白的诱导表达时, 结果也提示在 1% 的甲醇诱导了 72 h 后, 所有菌落上清中都出现相对分子质量为 13 k 的电泳条带。Western blotting 证实该电泳条带即为 Bm-TFF2 目的蛋白, 而无质粒转入的 GS115 宿主菌上清则无此分泌性蛋白(图 2A 和 2B)。在表达 Bm-TFF2 时, 我们还选择了不同的诱导时间、甲醇浓度和 pH 值对蛋白进行优化性表达。结果提示在诱导时间相等的条件下, 甲醇诱导浓度为 1.0% 以及环境 pH 为 6.0 时表达量最大(结果未显

示)。而在甲醇诱导浓度为 1.0% 和 pH 为 6.0 时, 诱导 72 h 的蛋白表达量较 24、48 和 96 h 为多(图 3A)。这与生长激素在毕赤酵母中的表达条件探讨相一致(Xu et al, 2008)。当利用最佳诱导条件并增加诱导体积表达 Bm-TFF2 时, 我们可以从 1 L 培养基中获得约 50 mg 的重组蛋白, 这与毕赤酵母表达 hTFF3 的表达量相似(Sun et al, 2008)。最后, 我们选择了不同浓度的饱和硫酸铵来沉淀上清, 结果提示当饱和硫酸铵的浓度为 80% 时, 其所得的蛋白量高于其它浓度硫酸铵的沉淀量(图 3B), 这为沉淀并纯化目的

蛋白提供了一定的实验基础。

总之, 该研究利用毕赤酵母表达体系在体外成功构建和表达了 Bm-TFF2, 并利用 pPIC9K 的 G418 抗性筛选出多拷贝重组子并证实了目的蛋白表达并分泌于酵母菌液上清, 进而对其最佳诱导时间以及饱和硫酸铵的最大沉淀浓度进行了一定的检测, 最后从 1L 菌液中获得约 50 mg 的目的蛋白。从而为体外高效表达 Bm-TFF2 并研究其结构与功能的关系以及作用机制的解释提供了可能。

## 参考文献:

- Baus-Loncar M, Kayademir T, Takaishi S, Wang T, 2005. Trefoil factor family 2 deficiency and immune response [J]. *Cell Mol Life Sci*, **62**(24): 2947-2955.
- Dhar DK, Wang TC, Maruyama R, Udagawa J, Kubota H, Fuji T, Tachibana M, Ono T, Otani H, Nagasue N, 2003. Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer [J]. *Lab Invest*, **83**(9): 1343-1352.
- Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C, 2004. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression [J]. *Peptides*, **25**(5): 885-898.
- Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, Wang TC, 2002. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury [J]. *J Clin Invest*, **109**(2): 193-204.
- Hanby AM, Poulsom R, Singh S, Elia G, Jeffery RE, Wright NA, 1993. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach [J]. *Gastroenterology*, **105**(4): 1110-1116.
- He YY, Liu SB, Lee WH, Zhang Y, 2008. Melanoma cell growth inhibition by  $\beta\gamma$ CAT, which is a novel non-lens  $\beta\gamma$ -crystallin and trefoil factor complex from frog *Bombina maxima* skin [J]. *Toxicon*, **52**(2): 341-347.
- Katoh M, 2003. Trefoil factors and human gastric cancer (review) [J]. *Int J Mol Med*, **12**(1): 3-9.
- Lalani EN, Williams R, Jayaram Y, Gilbert C, Chaudhary KS, Siu LS, Koumariou A, Playford R, Stamp GW, 1999. Trefoil factor-2, human spasmolytic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells [J]. *Lab Invest*, **79**(5): 537-546.
- Liu SB, He YY, Zhang Y, Lee WH, Qian JQ, Lai R, Jin Y, 2008. A novel non-lens  $\beta\gamma$ -crystallin and trefoil factor complex from amphibian skin and its functional implications [J]. *PLoS One*, **3**(3): e1770.
- Sands BE, Podolsky DK, 1996. The trefoil peptide family [J]. *Annu Rev Physiol*, **58**: 253-273.
- Siu LS, Romanska H, Abel PD, Baus-Loncar M, Kayademir T, Stamp GW, Lalani el N, 2004. TFF2 (trefoil factor family factor2) inhibits apoptosis in breast and colorectal cancer cell lines [J]. *Peptides*, **25**(5): 855-863.
- Sun Y, Peng X, Zhang Y, Lv S, Wu W, Wang S, 2008. Stability and biological activity of human intestinal trefoil factor produced by *Pichia pastoris* [J]. *Protein Pept Lett*, **15**(3): 255-259.
- Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR, 1987. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris* [J]. *Nucleic Acids Res*, **15**(9): 3859-3876.
- Wang H, Tong Y, Fang M, Ru B, 2005. High-level expression of human TFF3 in *Escherichia coli* [J]. *Peptides*, **26**(7): 1213-1218.
- Xu Q, Wu X, Hou R, Liao M, Il KH, Shou J, Bian H, Han N, Pan J, Zhang Z, Zhu M, 2008. High-level secretory expression, purification and characterization of Ailuropoda melanoleuca growth hormone in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, **60**(2): 182-187.
- Zhang J, Zhang Y, Wan SG, Wei SS, Lee WH, 2005. Bm-TFF2, a trefoil factor protein with platelet activation activity from frog *Bombina maxima* skin secretions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**(4): 1027-1033.
- Zhang Y, Yu G, Xiang Y, Wu J, Jiang P, Lee W, Bm-TFF2, a toad trefoil factor, promotes cell migration, survival and wound healing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **398**(3): 559-564.