

## 利用大肠杆菌高效表达人载脂蛋白 AI 及其性质分析

# Over-expression in *Escherichia coli* and Characterization of Apolipoprotein AI

丁满生<sup>1,2\*</sup>, 马文峰<sup>1</sup>, 张梅芳<sup>2</sup>, 刘大涛<sup>3</sup>, 郭美锦<sup>1</sup>, 庄英萍<sup>1</sup>, 储 炬<sup>1</sup>, 张嗣良<sup>1</sup>, 龚邦强<sup>2</sup>  
DING Man-Sheng<sup>1,2\*</sup>, MA Wen-Feng<sup>1</sup>, ZHANG Mei-Fang<sup>2</sup>, LIU Da-Tao<sup>3</sup>, GUO Mei-Jin<sup>1</sup>, ZHUANG Ying-Ping<sup>1</sup>, CHU Ju<sup>1</sup>, ZHANG Si-Liang<sup>1</sup> and GONG Bang-Qiang<sup>2</sup>

1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2. 上海凯曼生物科技有限公司, 上海 200233

3. 上海信谊药业有限公司药研所生物制药研究室, 上海 200085

1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2. Shanghai Comman Pharma. Co. Ltd, Shanghai 200233, China

3. Biopharmaceutical Lab, Institute of Pharmaceutical research, Shanghai Sine Pharma. Co. Ltd, Shanghai 200085, China

**摘 要** 载脂蛋白 AI (apolipoprotein AI, apo AI) 是高密度脂蛋白 HDL 的主要组成成分, 流行病学研究表明 apo AI 的含量决定血浆中 HDL 的高低, 而 HDL 具有胆固醇逆向转运的功能, 起到降低冠心病发生概率的作用。通过大肠杆菌表达系统来生产 apo AI 的蛋白原 proapo AI, 蛋白的表达形式为包涵体, 通过疏水柱进行柱上复性。同时在 proapo AI 和 apo AI 之间设计一个酸水解位点, 通过将蛋白原 proapo AI 进行酸水解来得到成熟蛋白 apo AI。最终得到的成熟蛋白 apo AI 在结构分析和脂结合特性上都与天然的 apo AI 相似, 从而为该蛋白的工业生产上提供了一个良好的基础。

**关键词** 载脂蛋白 AI, 包涵体, 疏水柱, 复性

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0198-06

**Abstract** Apolipoprotein AI (apo AI), the major protein component of human high-density lipoprotein (HDL), is a single-chain polypeptide of 243 amino acids. Several epidemiological studies have shown that the plasma concentrations of HDL has the role of reverse cholesterol transport (RCT) and inversely correlated with the incidence of coronary artery disease. Because apo AI lacks post-translational modifications, it is convenient to express human apo AI in *Escherichia coli* expression system. However, there is a poor stability of the mRNA and the apo AI protein in *E. coli*, it is difficult to express mature apo AI in recombinant bacteria, moreover, even as a fusion protein, apo AI is still sensitive to degradation and can not be cleaved efficiently from the fusion tags. In contrast, proapolipoprotein AI (proapo AI, having an additional polypeptide containing the amino acids Arg-His-Phe-Trp-Gln-Gln at the amino-terminal of the mature protein) proved stable and undegraded in *Escherichia coli*, and therefore, in this research, an expression system of *E. coli* including a plasmid of  $P_{RPL}$  tandem promoter was adapted to produce proapo AI. Furthermore, site-directed mutagenesis of the proapo AI cDNA was performed to generate a Clu8Asp mutation in the amino-termi-

Received: September 7, 2004; Accepted: December 1, 2004.

This work was supported by Grants from National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA217021) and National Natural Science Foundation of China (Major Program) (No. 2002AA223451)

\* Corresponding author. Tel: 86-21-64851967 ~ 215; E-mail: dingmansheng@163.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2002AA217021)和国家自然科学基金重大科技专项(No. 2002AA223451)资助。

nal sequence of proapo AI which created an acid labile Asp-Pro peptide bond between amino acid 8 and 9, and permitted specific chemical cleavage to remove pro-peptide. After inducing with a shift of temperature, yields of recombinant proapo AI achieved about 40% of total cell protein and the recombinant proapo AI expressed proved as a form of inclusion body in cells, so protein need to renature. First of all, the protein was dissolved in buffer with denaturant, and renaturation was carried out on a hydrophobic interaction column (Phenyl Sepharose), ion-exchange chromatography and gel-filtration chromatography were then used to further purify the protein. The purified recombinant apo AI was detected by a set of tests including Western-blotting, Circular dichroism spectra and lipid-binding test, the results shown that recombinant apo AI has similar structural and lipid-binding properties identical to those of native plasma apo AI, which facilitates further research and application.

**Key words** apolipoprotein AI, inclusion body, hydrophobic interaction chromatography, renaturation

人载脂蛋白 AI (apolipoprotein AI, apo AI) 是人高密度蛋白 (HDL) 中的蛋白组成部分, 是由 243 个氨基酸组成的单链蛋白。大量研究文献报道血液中的 apo AI 的含量的高低决定血液中 HDL 的浓度, 而 HDL 可以促进血液中的胆固醇的反向运输, 从而可以抑止冠心病和血管动脉粥样硬化的产生<sup>[1-4]</sup>。

利用大肠杆菌表达人重组 apo AI 已经被很多文献报道过, 因为 apo AI 缺少翻译后的修饰, 它的功能和活性主要是在于蛋白质的二级结构<sup>[5-9]</sup>。然而由于在大肠杆菌中进行表达 apo AI 基因, 其转录形成的 mRNA 和其合成的蛋白稳定性比较差<sup>[10]</sup>, 所以目前最新的研究文献都采用融合表达的形式来提高它的稳定性, 像蛋白 A、 $\beta$  半乳糖苷酶和 6 个组氨酸头等等<sup>[5, 8, 11]</sup>。但是采用融合表达形式往往要增加酶解的步骤除去亲和头, 并且使用这些水解酶往往造成对目的蛋白的非专一性水解。同时在上述报道中融合蛋白的表达量不超过细菌总蛋白的 20%, 表达量较低。

本文用带有  $\lambda$ -P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 双启动子的载体 pBV220 来高效表达成熟 apo AI 的蛋白原 proapolipoprotein AI (proapo AI)。proapo AI 与 apo AI 蛋白相比, 在蛋白 N 端多了 6 个氨基酸组成的肽片段 (Arg-His-Phe-Trp-Gln-Gln), 同时文献报道 proapo AI N 端的肽片段能大大增强蛋白质在大肠杆菌中的稳定性<sup>[12]</sup>。另外实验设计去掉一个谷氨酸 (Glu8), 在蛋白 N 端形成一个酸水解位点 (Asp7-Pro9), 便于去掉蛋白原前面的多肽, 得到成熟蛋白。另外使用 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动子, 外源蛋白在升温表达过程中容易形成包涵体, 包涵体对水解酶的降解作用往往不敏感。因此用这种表达系统可以增加 apo AI 在大肠杆菌中的稳定性使其大量积累。同时, 我们通过优化其发酵条件来提高其表达量, 并且在纯化过程中采用柱上复性的方法使其复性, 其结果表明最终得到的蛋白在蛋白结构和生物活性上都接近天然的人 apo AI。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

表达载体 pBV220 以及大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由上海凯曼生物科技有限公司保藏; PCR-Kit 购于 TaKaRa 公司, 限制酶、Taq 酶、T4 DNA 连接酶、T4 多聚核苷酸激酶及 DNA 分子量标准分别购自 TaKaRa 公司、Promega 公司和晶美公司; PCR 引物由上海生化细胞研究所合成; 标准分子量蛋白购自华美公司; 标准 apo AI 蛋白购自 Academy Bio-Medical 公司; 抗体包括 (一抗) 羊抗人 apo AI 抗体和二抗 (兔抗羊抗体), 购自 Chemicon international 公司; 纯化系统 (AKTA Explore) 为 Amersham Biosciences 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 表达载体 pBV-papoAI 的构建:** 首先从人源细胞 HepG2 中提取总 RNA, 应用 RT-PCR 技术制备出人 proapo AI 的基因的 cDNA 片段。其中设计两段引物: 上游引物 A (5' GAA TTC ATG CGT CAT TTC TGG CAA CAA GAC CCG CCG CAG AGC 3' *EcoR* I) 和下游引物 B (5' GGA TCC TTA TCA CTG GGT GTT GAG CTT CTT GGT 3' *Bam* H I)。A 片段 5' 端设计有 *EcoR* I 限制性酶识别序列, 并且去掉 Glu8 对应的核苷酸序列, 便于表达的蛋白内在 Asp7-Pro9 位置形成酸水解位点。B 引物 3' 端设计有 *Bam* H I 限制性酶识别序列。将人 proapo AI 的基因的 cDNA 片段首先亚克隆到 pGEM-T 载体上, 然后转化入 DH5 $\alpha$  宿主细胞, 培养后挑取菌落提取质粒进行限制酶酶切鉴定, 再将酶切鉴定正确的重组质粒进行 DNA 序列测定。然后将正确的 proapo AI 的 cDNA 片段以 *EcoR* I、*Bam* H I 限制酶分别从 pGEM-T 载体上切下, 再将表达载体 pBV220 用 *EcoR* I、*Bam* H I 限制酶消化后与 cDNA 片段进行连接, 构建重组表达质粒 pBV-papoAI。具体感受态细菌的制备、连接产物的转化、重组子的筛选以及酶切鉴定等操作都参照分子克隆

(第三版)<sup>[12]</sup>。

**1.2.2 重组蛋白的表达:**用质粒 pBV-papoAI 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 从转化平板上挑选单菌落, 接种于 3mL 的 LB 培养基中(含 100 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素), 在 30 $^{\circ}$ C 下摇床培养过夜。取过夜后的培养液按 2% 的比例接到装有 10mL 新鲜 LB 培养基的摇瓶中, 在 30 $^{\circ}$ C 下摇床培养。当菌体密度  $OD_{600}$  达到 0.5 左右将培养温度从 30 $^{\circ}$ C 迅速升高到 42 $^{\circ}$ C 进行诱导, 诱导培养 4h 后收集菌体, 用超声破碎后离心, 用 12% 的 SDS-PAGE 检测上清和沉淀, 确定蛋白是否是以包涵体形式表达。

**1.2.3 包涵体的洗涤和溶解:**将收集的菌体与配好的溶菌酶溶液(1mg/mL, 10mmol/L Tris buffer, pH 8.0)按 1:10 (W/V) 的比例混匀, 冰浴 0.5h, 然后通过超声进行破碎。破菌结束后, 12 000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 20min, 弃上清。用 0.5% Triton X-100 (V/V) 洗涤 3 次后, 将包涵体以 5:10 (W/V) 溶解于含 8 mmol/L Urea 缓冲液中。

**1.2.4 蛋白的复性和纯化:**包涵体的复性采用疏水柱 (HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose-HP) 进行柱上复性, 控制流速为 1mL/min, 洗脱后收集蛋白峰。进一步在离子交换柱 (DEAE Sepharose-FF-60/100) 纯化, 控制流速为 1mL/min, 将收集的蛋白溶液通过中空纤维素柱 (MidGee cross flow filter) 浓缩后经凝胶柱 (HiPrep-26/60-Sepharose-S-300-HR) 进行精制。将收集的蛋白峰用 45% 的甲酸 55 $^{\circ}$ C 反应 3 h, 酸水解去掉位于 proapo AI N 端的肽序列。最后将得到的蛋白溶液于  $\text{NH}_4\text{Ac}$  溶液中进行透析 48h 后, 冻干后于 -80 $^{\circ}$ C 保藏。

**1.2.5 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测:**SDS-PAGE 检测蛋白采用 12% 的分离胶, 具体操作见分子克隆(第三版)<sup>[12]</sup>。Western blotting 具体操作如下: 用 20mmol/L Tris 的缓冲液(含有 150mmol/L glycine 和 20% methanol, pH 8.0) 将 SDS-PAGE 分离胶转印到 PVDF 膜上, 膜用 TBST 缓冲液(10mmol/L Tris、150mmol/L NaCl 和 0.05% Tween-20, pH 8.0) 洗涤 3 遍。然后将膜放入杂交袋, 加入 1% 的牛血清白蛋白溶液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h, 再用 1% 的牛血清白蛋白溶液以 1:1000 稀释一抗后, 加入到杂交袋中, 37 $^{\circ}$ C 轻摇 1h 后取出膜, 用 PBST 洗涤 3 遍后放入另一杂交袋, 将二抗以 1:2000 稀释后加入, 于 37 $^{\circ}$ C 避光轻摇 1h 后, 取出用 PBST 洗涤 3 遍。配制含有 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的四氨基联苯胺(TMB)底物溶液, 将膜浸没在上述溶液中于暗处显色, 当出现肉眼可见的一条带

后, 用去离子水漂洗终止反应, 拍照保存。

**1.2.6 Apo AI 含量的 ELISA 测定:**Apo AI 的测定通过 ELISA 方法进行<sup>[12]</sup>, 方法具体如下: 抗体首先用包被液按 1:500 稀释, 加于 96 孔板上, 每孔加入 50 $\mu$ L, 置于 37 $^{\circ}$ C 培育 2h, 然后用去离子水洗涤, 再加入 200 $\mu$ L/孔封闭液, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 30min, 用去离子水洗涤, 加入测定抗原 50 $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h, 用去离子水洗涤, 加入 1:500 稀释的酶标抗体(二抗), 每孔加 50 $\mu$ L, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 1h, 用去离子水洗涤, 加入底物显色液邻苯二胺试剂 100 $\mu$ L 到每孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 加显色终止液到每孔, 最后在波长 492nm 进行检测。

**1.2.7 圆二色光谱及氨基酸序列分析:**将纯化的重组 apo AI 蛋白用 20mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释到 0.2mg/mL, 于 0.1cm 径长的石英杯中扫描, 扫描范围为 190~250nm。圆二色仪型号为 JASCO J-715, 测定温度为 25 $^{\circ}$ C, 扫描速度 100nm/min, 响应度 0.5s, 分辨率 0.2nm, 狭缝宽度 1nm, 累计 8 次。

Apo AI 的 N 端氨基酸序列由中科院上海生化所测定。

**1.2.8 体外磷脂结合试验:**将 DMPC (Dimyristoylphosphatidylcholine, 二豆蔻酰卵磷脂)溶解于缓冲液(8.5% KBr, 0.01% azide, 1mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris, pH 7.4)中, 在 4 $^{\circ}$ C 下剧烈振荡, 放置 24h。取终浓度为 0.5mg/mL 的 DMPC 和 2.65mg/mL 标准 apo AI, 以 DMPC/apo AI = 5:1 (V/V) 的比例混合, 在 24 $^{\circ}$ C 每间隔 2min 于 325nm 读取一次 OD 值, 直至 1h, 然后以 log OD 相对时间作图。再取一定量的重组 apo AI 按上述比例加到 DMPC 液中, 同样操作。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的酶切及 PCR 鉴定

将 PCR 制备的基因片段首先亚克隆到 pGEM-T 载体上, 然后转化入 DH5 $\alpha$  宿主细胞, 培养后挑取单菌落提取质粒, 经过 *Eco*R I、*Bam*H I 双酶切后可得到大小为 0.75kb 的片段, 将酶切鉴定正确的重组质粒进行 DNA 序列测定, 测定的结果与设计符合。再将表达载体 pBV220 用 *Eco*R I、*Bam*H I 限制酶消化后与 apo AI 的 cDNA 片段进行连接, 构建重组表达质粒 pBV-papoAI(图 1)。

### 2.2 重组蛋白的表达

将构建好的工程菌 DH5 $\alpha$ /pBV-papo AI 通过摇床培养进行升温表达后, 通过超声进行破碎, 上清和沉淀分别走 12% SDS-PAGE 电泳(图 2)。结果表明

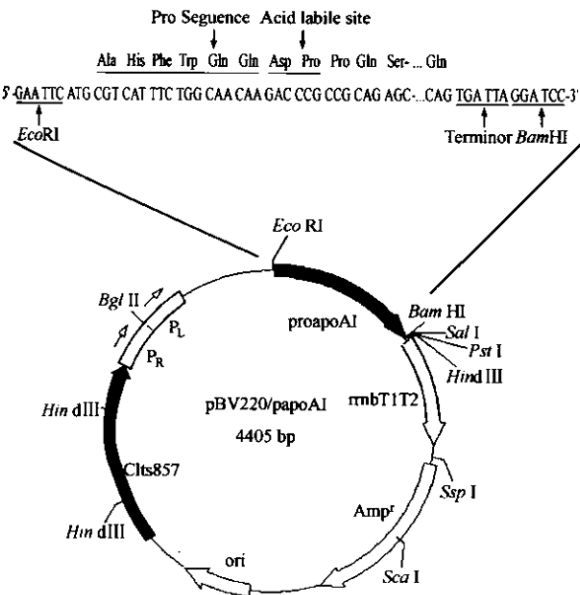


图 1 表达 proapo AI 的大肠杆菌载体 pBV-papo AI 的图谱  
Fig.1 The diagram of *E. coli* expression vector pBV-papo AI for recombinant proapo AI protein

proapo AI 表达量占细菌蛋白 40% 左右,基本上以包涵体的形式存在。

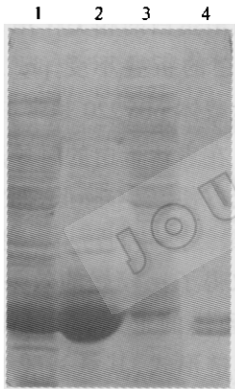


图 2 重组 proapo AI 在工程菌 DH5α/pBV-papo AI 中的表达  
Fig.2 The expression of recombinant proapo AI in *E. coli* DH5α/pBV-papo AI

1: cell after induction; 2: inclusion body; 3: supernatant; 4: plasma apo AI.

2.3 重组蛋白的纯化

包涵体在洗涤 3 遍之后,包涵体纯度达到 90% 左右。变性蛋白采用疏水柱层析技术进行柱上复性,变性液经过 Phenyl Sepharose-HP 复性洗脱,同时也起到纯化的作用。然后经过弱阴离子柱 DEAE Sepharose-FF 和凝胶柱 Sephacryl-S-300-HR 进一步精制。最后酸解去除 pro 肽序列。纯化后样品经银染鉴定(图 3)。从图中可以看到经银染后出现单一条带,纯化产品纯度达到电泳纯。各个纯化步骤的蛋

白含量和回收率见表 1,从表中可知整个纯化过程的蛋白的回收率为 51.7%。

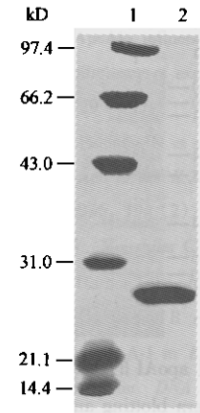


图 3 纯化 apo AI 的 SDS-PAGE 银染图  
Fig.3 SDS-PAGE of purified apo AI by silver staining  
1: marker; 2: purified apo AI.

表 1 proapo AI 复性纯化结果  
Table 1 Renaturation and purification summary of proapo AI

	Total protein/g	Protein concentration/(mg/mL)	Recovery/%
Denatured Protein	0.261	2.5	--
Phenyl Sepharose H.P.	0.179	0.8	68.6
DEAE Sepharose F.F.	0.155	1.5	86.6
Sephacryl-S-300-HR	0.135	1.1	87.1
Total recovery(%)			51.7

2.4 Western-blotting 检测、N 端测序及圆二色光谱分析

将纯化的样品通过 Western-blotting 检测,经显色后出现单一目的条带(图 4)。对经过复性纯化后的蛋白样品作 N 末端氨基酸序列测定,结果得到 N 末端的 15 个氨基酸序列为 D-P-P-Q-S-P-W-D-R-V-K-D-L-A-T,与实验设计吻合。进一步通过圆二色光谱进行检测,扫描结果(图 5)用蛋白质二级结构软件包(JWSSE)进行分析,结果可知重组 apo AI 和人血清 apo AI 的  $\alpha$  螺旋数比例分别为:48.7% 和 49.1%,可以判断上述变性重组 apo AI 的复性效果比较好,其空间结构与人血清蛋白相似。

2.5 体外脂结合实验

Apo AI 能够与脂类物质结合慢慢形成圆盘状或栅栏状的脂质体。在没有形成脂质体之前,apo AI 与脂类物质混合物在 325nm 下有最大吸收值;随着脂质体的慢慢形成,其吸光度慢慢下降;在完全形成脂质体后,在波长 325nm 下没有吸收值<sup>[2]</sup>。如图 6 所示,重组 apo AI 和标准 apo AI 分别与 DMPC 混合

后,其吸光度以类似的速率慢慢降低,在保温 24h 后,脂质体溶液变得澄清,这反映了两者之间具有类似的脂结合特性。

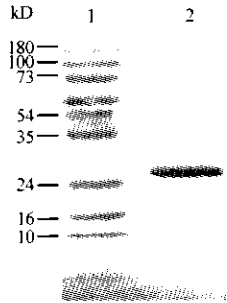


图 4 重组 apoAI 的 Western blotting 结果  
Fig.4 Western blotting analysis of recombinant apoAI refolded by Hitrap Phenyl HIC  
1: prestained protein marker; 2: recombinant apoAI.

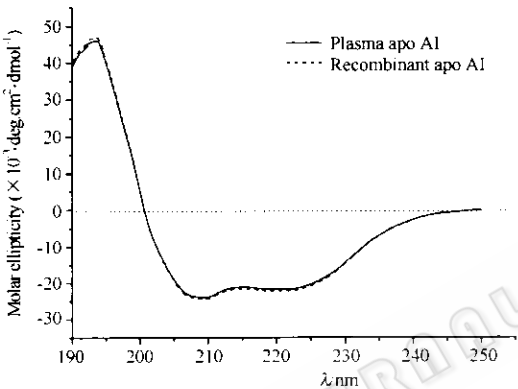


图.5 重组 apo AI 蛋白的光谱分析  
Fig.5 Circular dichroism spectra of free native and recombinant apoAI

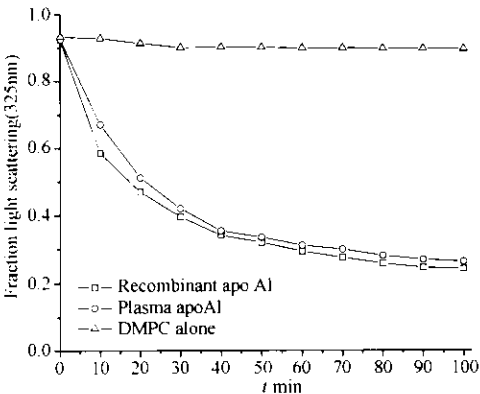


图 6 重组 apoAI 的脂结合动力学过程  
Fig. 6 Interaction of plasma apoAI and recombinant apoAI with DMPC liposomes

3 讨 论

目前用来表达 apo AI 基本上都是采用大肠杆菌

及酵母系统,然而研究证明人 apo AI 在大肠杆菌细胞内的半衰期小于 10 min<sup>[13]</sup>,有些表达产物只是 N 端的部分片段,这种现象主要归结为 mRNA 的不稳定和翻译上的不完全。通过 Northern blot 分析, mRNA 的稳定性直接与重组 apoAI 表达的有效性相关联,apoAI 基因 5' 端的轻微改变将明显影响其表达<sup>[10]</sup>。而采用蛋白融合表达的形式来制备 apoAI,表达量不高且在去除亲和头的过程中容易导致非专一性的酶切,目的蛋白的降解现象严重,蛋白的回收率低。也有采用真核的中国仓鼠卵巢细胞表达系统<sup>[14]</sup>和昆虫杆状病毒表达系统<sup>[15]</sup>来表达 apo AI,但细胞分泌蛋白到胞外的效果不是很理想,往往胞内还存在一部分蛋白。而且表达产物中都出现 26 kD 这条带,这条带用相应的免疫印迹的方法不能检测到<sup>[15]</sup>,这种现象在国内朱媛娥的报道中也出现过<sup>[16]</sup>。

本文采用大肠杆菌表达系统来表达 apoAI 的蛋白原形式 proapo AI。proapo AI 证明比 apo AI 更稳定,其原因可能是 proapo AI 的 pro 结构能有效的指引蛋白进入周质<sup>[17]</sup>,同时 proapo AI 在胞内的稳定在于蛋白与其它细菌蛋白的相关作用,而不仅仅是 pro 片段的本身,蛋白的折叠不受 pro 片段的影响<sup>[18]</sup>。同时采用的表达载体 pBV220 是带 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 双启动子的温控型的载体。在表达蛋白的时候采用升温诱导的方式操作上比较方便,成本降低,而且可以减少化学诱导中 IPTG 对最终产品的污染。将 pBV220 用于表达其他蛋白也取得了比较好的效果,而且其表达产物基本都是包涵体的形式,蛋白需要复性。由于 apo AI 蛋白是单链形式,其氨基酸组成中没有 Cys,且蛋白的生物活性主要取决于它的二级结构,这在一定程度上决定了其复性程度的方便。研究中采用疏水柱进行柱上复性的方法,这种复性方法相对于传统的稀释复性和采用凝胶柱复性的方法而言都有其优越性。稀释复性的时间比较长,蛋白被很大程度稀释,进一步纯化需要浓缩。利用凝胶柱复性相对比较方便,但是凝胶柱的处理量比较低,且在变性剂逐渐被稀释的过程中容易引起蛋白在柱上析出,因此过程不容易控制。而采用疏水柱复性基本可克服上述缺点,疏水柱的处理量大,复性时间短,且洗脱时具有疏水纯化的功能,减少了纯化的步骤。

国内外针对 apo AI 在治疗急性动脉粥样硬化上已经开展了很多研究,本实验研究结果为下一步的药理药效和临床研究打下了一个良好的基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhao Y, Sparks DL, Marcel YL. Effect of the apolipoprotein A-I and surface lipid composition of reconstituted discoidal HDL on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. *Biochemistry*, 1996, **35** (51): 16510 - 16518
- [2] Gillotte KL, Davidson WS, Lund-Katz S *et al.* Apolipoprotein A-I structural modification and the functionality of reconstituted high density lipoprotein particles in cellular cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**: 23792 - 23798
- [3] Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Engler JA *et al.* Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1531** (1 - 2): 4 - 46
- [4] Sviridov D, Fidge N, Beaumier-Gallon G *et al.* Apolipoprotein A-I stimulates the transport of intracellular cholesterol to cell-surface cholesterol-rich domains (caveolae). *The Biochemical Journal*, 2001, **358** (Pt 1): 79 - 86
- [5] Monaco L, Bond HM, Howell KE *et al.* A recombinant apoA-I-protein A hybrid reproduces the binding parameters of HDL to its receptor. *The EMBO Journal*, 1987, **6**: 3253 - 3260
- [6] Moguilevsky N, Varsalona F, Guillaume JP *et al.* Production of authentic human proapolipoprotein A-I in *Escherichia coli*: strategies for the removal of the amino-terminal methionine. *Journal of Biotechnology*, 1993, **27** (2): 159 - 172
- [7] Bergeron J, Frank PG, Emmanuel F *et al.* Characterization of human apolipoprotein A-I expressed in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, **1344** (2): 139 - 152
- [8] Panagotopoulos SE, Witting SR, Horace EM *et al.* Bacterial expression and characterization of mature apolipoprotein A-I. *Protein Expression and Purification*, 2002, **25** (2): 353 - 361
- [9] Ryan RO, Forte TM, Oda MN. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expression and Purification*, 2003, **27** (1): 98 - 103
- [10] Isacchi A, Sarmientos P, Lorenzetti R *et al.* Mature apolipoprotein AI and its precursor proApoAI: influence of the sequence at the 5' end of the gene on the efficiency of expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 1989, **81** (1): 129 - 137
- [11] Lorenzetti R, Sidoli A, Palomba R *et al.* Expression of the human apolipoprotein AI gene fused to the *E. coli* gene for beta-galactosidase. *FEBS Letters*, 1986, **194** (2): 343 - 346
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [13] Moguilevsky N, Roobol C, Loriau R *et al.* Production of human recombinant proapolipoprotein A-I in *Escherichia coli*: purification and biochemical characterization. *DNA*, 1989, **8**(6): 429 - 436
- [14] Schmidt HH-J, Genschel J, Haas R. Expression and purification of recombinant apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expression and Purification*, 1997, **10**(2): 226 - 236
- [15] Schmidt HH, Haas RE, Remaley A *et al.* *In vivo* kinetics as a sensitive method for testing physiologically intact human recombinant apolipoprotein A-I: comparison of three different expression systems. *Clinica Chimica Acta* 1997, **268** (1): 41 - 60
- [16] Zhu YE (朱媛娥), Xu HB (徐慧斌), Zhao ZA (赵志安) *et al.* Expression of human apolipoprotein A-I in baculovirus-insert cell system. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19**(3): 692 - 697
- [17] Rosenwasser TA, Hogquist KA, Nothwehr SF *et al.* Compartmentalization of mammalian proteins produced in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, **265** (22): 13066 - 13073
- [18] McGuire KA, Davidson WS, Jonas A. High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I. *Journal of Lipid Research*, 1996, **37**: 1519 - 1528