

重组人载脂蛋白 AI 米兰突变体在大肠杆菌中的可溶性表达 Soluble Expression of Recombinant Human Apolipoprotein A-I-Milano in *Escherichia coli*

黎 明^{1,2}, 赵洪亮¹, 薛 冲¹, 张 伟¹, 张士猛¹, 刘志敏^{1*}

LI Ming^{1,2}, ZHAO Hong-Liang¹, XUE Chong¹, ZHANG Wei¹, ZHANG Shi-Meng¹ and LIU Zhi-Min^{1*}

1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2. 天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300222

1. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

2. Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China

摘 要 载脂蛋白 AI 米兰突变体 (apolipoprotein A-I-Milano, AIM) 是载脂蛋白 AI 的天然突变体, 具有比载脂蛋白 AI 更强的抗动脉粥样硬化的作用。将 AIM 基因 N-末端的氨基酸密码子优化后, 克隆至表达载体 pET22b, 重组质粒转化 BL21(DE3) 宿主菌, 用 IPTG 诱导表达。AIM 以可溶形式表达, 约占菌体总蛋白的 38%。表达产物经 Butyl Sepharose 4F 疏水层析和 Q Sepharose H.P. 阴离子交换层析后, 再用 Vivaspin20(30 000MW) 进行超滤, AIM 单体的纯度达 95% 以上。AIM 单体与脂结合活性表明, AIM 单体结合脂的速度比 apoA-I 慢, 但结合脂的量比 apoA-I 高。这项研究为 AIM 的结构和功能, 特别是临床应用研究奠定了基础。

关键词 载脂蛋白 AI 米兰突变体, 可溶性表达, 大肠杆菌

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0354-06

Abstract Apolipoprotein A-I-Milano (AIM), a natural variant, not only inhibits the initiation and progression of atherosclerosis, but also makes the preexisting atherosclerotic lesions regress. AIM gene, at which N-terminal codons were optimized, was subcloned into the expression vector of pET22b. Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3) and induced with IPTG. The expressed apolipoprotein A-I-Milano was soluble in *E. coli* and was about 38% of total cell lysate. Purified by Butyl Sepharose 4F hydrophobic chromatography and Q Sepharose H.P. anion exchange chromatography, followed by ultrafiltration with Vivaspin 20(30 000MW), AIM monomer was obtained in a purity of more than 95%. Activity assay of binding of AIM monomer to lipid indicates that association of AIM monomer with DMPC is slower than normal apoA-I but DMPC number associated by AIM monomer is more than by apoA-I. This results will be important for studying structure, function of AIM, specially clinical application.

Key words apolipoprotein A-I-Milano, soluble expression, *E. coli*

Received: November 3, 2004; Accepted: January 25, 2005.

This work was supported by Grants from National High Technology Program (No. 2002AA2Z345B) and the State "863" High Technology R&D Project of China (No. 2002AA217021).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948823; Fax: 86-10-66948876; E-mail: liming096@sina.com

国家重大科技专项资金资助项目 (No. 2002AA2Z345B) 和国家 "十五" 863 计划资金项目 (No. 2002AA217021)。

动脉粥样硬化斑块形成是动脉粥样硬化心血管病和动脉粥样硬化脑血管病的主要病因。美国和欧洲有 1/3 的人口患有动脉粥样硬化心脑血管疾病,我国也有近 1 亿人患有动脉粥样硬化心脑血管疾病,而且,心脑血管病发病率与死亡率近年也明显增加。该病是全世界发病率最高、预防和治疗花费最多的病种之一。该病现在还无良药可治,因而,抗动脉粥样硬化药 (atherosclerotic drugs) 的研究日益受到重视,世界各大制药公司都在全力开发治疗该病的药物,但现在尚是空白。

载脂蛋白 AI (apolipoprotein AI, ApoA-I) 是高密度脂蛋白的最主要结构成分,是卵磷脂胆固醇酰基转移酶的最主要激活剂。它可以与储积在动脉管壁细胞表面的胆固醇结合,将胆固醇逆向运送至肝脏,在肝脏进行分解代谢;它还可以抑制低密度脂蛋白的氧化以及抗炎反应,具有明显的抗动脉粥样硬化的生物学效应。近年来证明高密度脂蛋白、ApoA-I 浓度与冠状动脉疾病的发生呈负相关^[1];动物和临床试验还证明,ApoA-I 具有明显的治疗和预防动脉粥样硬化症的作用,因此,apoA-I 基因已经成为治疗和预防动脉粥样硬化症的靶基因^[2]。

载脂蛋白 AI 米兰突变体 (apolipoprotein A-I-Milano, AIM) 是第一个被发现的 ApoA-I 天然变体^[3],主要存在于意大利一个村庄的部分居民中。携带 AIM 的居民血浆中 HDL-胆固醇 (高密度脂蛋白: High-density lipoprotein, HDL) 的含量比正常人低,甘油三酯的含量比正常人高,尽管存在这些危险因素,这些居民却很少患冠状动脉疾病,而且长寿。研究表明,这是由于 AIM 具有独特的结构和功能特性: AIM 将 ApoA-I 第 173 位 Arg 突变成 Cys,在 HDL 上 70% Cys 形成链间二硫键,30% Cys 的巯基仍以游离状态存在。与 ApoA-I 相比较,AIM 的构象更稳定,在血浆中的半衰期延长;而且,链间二硫键使 AIM 形成了一个新的结构域,结合脂的能力大大增强;同时,AIM 游离的巯基具有抗脂类氧化的作用^[4],因此,AIM 比 ApoAI 的抗动脉粥样硬化的能力更强^[5]。

大量的动物和临床试验已证明,重组人 AIM 不仅能防止动脉粥样硬化的发生和发展,而且能逆转病变,且临床研究也未见明显的毒副作用。据源自美国 FDA 生物制品研究与开发公告,Esperion 公司研制的重组 AIM 以治疗和预防动脉粥样硬化症为适应症,已进入 III 期临床研究。因此,重组 AIM 有可能成为理想的治疗和预防动脉粥样硬化症的新药,具有广阔的临床应用前景。

AIM 的临床用量很大,临床剂量在克级水平,因此,AIM 用于临床治疗不可能从血液中提取,必须依赖基因工程技术进行重组生产。目前,国内还没有 AIM 表达和应用研究的相关报道。本项研究目的在于寻找一种有效表达 AIM 的方法,为其功能研究和应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及培养条件

大肠杆菌 BL21(DE3) 和 DH5 α 购自博大泰克公司;质粒 pET22b 由本室保存;重组质粒 pQE30-AIM 由本人构建;大肠杆菌用 LB 培养基培养。

1.2 工具酶和试剂

Pfx DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司,限制酶 *Nde* I 和 *Eco*R I 购自 TaKaRa 公司。T4 DNA 连接酶购自华美公司。AIM 基因由本室保存。DMPC 和从血浆中提取的人 ApoA-I 购自 Sigma 公司。Butyl Sepharose 4F, F. 16mm \times 100mm 为自装柱,其填料和 Q Sepharose High Performance 16/100 购自 Pharmacia 公司。Vivaspin20 (30 000MW) 购自博大泰克公司。

1.3 引物设计与合成

根据大肠杆菌的偏性密码子,再结合 pET22b 载体上核糖体结合位点附近的序列,用 DNA Star 软件将 AIM 基因片段的 N-末端的前 8 个氨基酸和其前肽氨基酸的密码子进行序列优化。用作序列优化的同义突变的引物为 M1 和 M2,

M1: 5'-CAAGACGAGCCACCGCAGAGTCCATGGGATCG AGTGAAGGACCTG-3,

M2: 5'-AGACATTTCTGGCAGCAAGACGAGCCACCGC AGAGT-3'。

再设计一对上下游引物将目的基因连接到 pET22b 载体上。上游引物 P1: 5'-TTT CATATG AGACATTTCTGGCAGCAAGA-3', 下游引物 P2: 5'-CC GAATTC CTATTACTGGGTGTTGAGCTTCTTAG-3'。其中上游引物引入 *Nde* I 酶切位点;下游引物引入了 *Eco*R I 酶切位点和两个终止密码子。

1.4 AIM 基因片段 N-末端氨基酸密码子序列优化

为了提高 AIM 在大肠杆菌中的表达量,我们将 AIM 基因片段的 N-末端的前 8 个氨基酸和其前肽氨基酸的密码子进行序列优化。优化通过用序列优化的同义突变的引物、进行两次 PCR 来完成的:第一次 PCR 的模板是测序正确、重组质粒 pDE30-AIM 中的 AIM 基因,引物是引物 M1 和 P2,第二次 PCR

的模板是第一次 PCR 的产物,引物是引物 M2 和 P2,用 Pfx DNA 聚合酶反应体系和循环条件。

1.5 表达载体 pET22b-AIM 的构建和鉴定

以优化后的 AIM 基因为模板,用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,将扩增的 PCR 产物纯化后进行 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切反应,然后连接到经同样酶切的 pET22b 载体上,构建成 pET22b-AIM 重组质粒,此重组质粒不含 pET22b 载体上的 *PelB* 信号序列。将重组质粒转化 DH5 α 菌株后,把 DH5 α 涂布于含 amp^r (ampicillin resistance, amp^r) 的 LB 培养基平板,37 $^{\circ}$ C 培养 18h。再从转化平板上挑选 5 个转化子,接种于 3mL 含 amp^r 的 LB 培养基的试管,37 $^{\circ}$ C、120 r/min 摇菌培养约 6h 后,分别取其菌液,用菌液 PCR 筛选阳性克隆,将阳性克隆的质粒进行测序,测序结果用在线程序 BLAST 进行比较,序列、起始密码子和阅读框架全部正确,表达载体才构建成功。

1.6 重组蛋白 AIM 的表达

将测序正确的表达载体 pET22b-AIM 转化宿主菌株 BL21 (DE3)。挑单菌落制备种子液,按 1% 的比例接种于 20mL LB 培养基(含青霉素 60 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 约为 0.8,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 继续诱导 5h。收集发酵菌体,完全超声破碎后离心,分成上清和沉淀两部分,沉淀洗涤 2 次,分别进行 15% SDS-PAGE。

1.7 重组蛋白 AIM 的纯化

取 20g 湿菌体,用缓冲液 A (20mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH8.1) 洗涤 1 次,离心,弃上清,菌体再用 150mL 的缓冲液 A 重悬,超声 30min,离心后取上清,过滤后进行 Butyl Sepharose 4F.F 疏水层析。分别用 10 \times 缓冲液 A、缓冲液 B (80% 缓冲液 A + 20% 乙二醇)、缓冲液 C (60% 缓冲液 A + 40% 乙二醇) 和缓冲液 E (缓冲液 D: 20mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.1; 缓冲液 E: 40% 缓冲液 D + 60% 乙二醇) 洗脱至基线。收集各蛋白峰进行 SDS-PAGE 分析。

将含 AIM 的样品用 3 \times 体积的缓冲液 F (20mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH7.9) 稀释后,进行 Q Sepharose High Performance 16/100 离子交换层析。用缓冲液 G (20mmol/L Tris-HCl, 400mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH7.9) 进行线性梯度洗脱。洗脱缓冲液 G 的浓度梯度为 20 个柱体积内从 0% ~ 100%。收集各蛋白峰进行 SDS-PAGE 分析。

1.8 重组 AIM 的纯度分析

经 Q 柱纯化的样品,经 Vivaspin20 (30 000MW)

超滤管超滤后,进行非还原的 15% SDS-PAGE,然后通过凝胶扫描来检测样品的纯度。

1.9 重组 AIM 的 N-末端氨基酸残基分析

诱导表达的菌液样本进行 SDS-PAGE 还原电泳后,通过电转移的方法将蛋白转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜经染色和脱色后,送军事医学科学院仪器分析中心色谱室测序。

1.10 重组 AIM 的分子量测定

采用反相 HPLC 色谱对经部分纯化的 AIM 样品进行进一步纯化,纯化样品冻干后送军事医学科学院仪器分析中心质谱室进行质谱分析。纯化柱为 C8 反相 HPLC 柱, A 液为 H₂O + TFA, B 液为乙腈 + TFA, 流速为 0.5mL/min, 洗脱梯度为在 60 min 内 B 液浓度从 0% 到 100%。

1.11 重组 AIM 单体的活性测定

将 10mg DMPC 溶解在 1mL 氯仿里,用氮气吹干后,在真空中干燥 2h。加入 3.2mL 的 STB, 充分振荡后,在 4 $^{\circ}$ C 超声破碎 30min。取三个 Eppendorf 管,每管加入 800 μ L 超声破碎后的 DMPC 脂质体,然后分别加入 200 μ L STB, 200 μ L 含 1mg ApoA-I (从血浆中提取的标准品) 的 STB 和 200 μ L 含 1mg AIM 的 STB, 使 DMPC/AIM 的质量比为 2.5 比 1。前两管分别是空白对照和标准对照。迅速振荡混匀,室温下测定 325nm 的光吸收值 A_{325} 。每 2min 测定一次,测 60min。重复 3 次,观察 A_{325} 值的变化。

2 结果

2.1 AIM 基因 N-末端氨基酸密码子优化

经过两次 PCR 后, AIM 基因 N-末端氨基酸密码子优化前后的序列如下:

突变前: CGG CAT TTC TGG CAG CAA GAT GAA CCC
CCC CAG AGC CCC TGG GAT

突变后: AGA CAT TTC TGG CAG CAA GAC GAG CCA
CCG CAG AGT CCT TGG GAT

氨基酸: R H F R Q Q D E P P Q S P W D

其中前 6 个氨基酸 RHFRQQ 是 AIM 的前肽, DEPPQSPW 才是成熟的 AIM 蛋白的前 8 个氨基酸,划有横线的部分为已作同义突变的氨基酸密码子。

2.2 表达载体 pET22b-AIM 的构建和鉴定

将经过 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切的 AIM 基因片段与 pET22b 载体片段连接起来,转化 DH5 α ,挑 5 个单菌落作菌液 PCR 鉴定,筛选出含重组质粒 pET22b-AIM 阳性克隆如图 1,其中 1、4、5 号菌为阳性克隆。将 1 号菌的重组质粒进行测序,测序结果用 BLAST

比较表明:克隆到 pET22b 载体的 AIM 基因片段序列正确,起始密码子和翻译框架与预先设计相一致。表明表达载体 pET22b-AIM 构建成功。

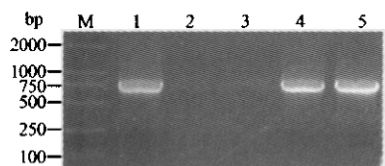


图1 PCR 鉴定重组质粒 pET22b-AIM

Fig.1 PCR amplification analysis of recombinant plasmid pET22b-AIM

M: DNA molecular weight marker; 1,4,5: results of PCR amplification of pET22b-AIM; 2,3: negative results.

2.3 大肠杆菌工程菌的诱导表达

重组质粒 pET22b-AIM 以 BL21(DE3) 为宿主菌进行表达试验,用 IPTG 诱导 5h 后,离心沉淀菌体,SDS-PAGE 电泳鉴定表明,在 29kD 处有一特异性的目的蛋白表达条带,与分子量理论值相符,空载质粒诱导菌无此条带,表明有目的蛋白表达。菌体经超声破碎,离心,沉淀镜检全部为细胞碎片,SDS-PAGE 检测,结果如图 2,目的蛋白全部以可溶形式存在。凝胶扫描显示,目的蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 38%。

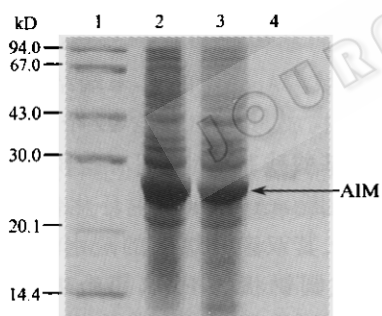


图2 pET22b-AIM/BL21(DE3)表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of pET22b-AIM/BL21(DE3) expression products

1: molecular weight standards; 2: total cell lysate of BL21(DE3) expressing AIM; 3: supernatant fraction from total cell lysate of BL21(DE3) expressing AIM; 4: pellet fraction from total cell lysate of BL21(DE3) expressing AIM.

2.4 重组 AIM 的纯化和纯度分析

表达 AIM 的菌体经超声破碎、离心、过滤处理后,先用 Butyl 柱进行疏水柱层析第一步纯化,分别用 10× A 液、含 20%、40%、60% 乙二醇的相应缓冲液洗脱。然后将 60% 乙二醇的洗脱液稀释 3×,再上 Q 柱进行阴离子交换柱层析第二步纯化,用含 0.4mol/L NaCl 的缓冲液 G 进行连续梯度洗脱,缓冲

液 G 洗脱的浓度梯度为 20 个柱体积内从 0~100%,洗脱 AIM 所需的 NaCl 浓度约 0.3mol/L。AIM 经 Butyl 柱和 Q 柱纯化后的纯化结果见图 3。从图 3 可知,Q 柱纯化后的 AIM 重组蛋白中约含 30% 左右的 AIM 二聚体。将 Q 柱纯化后的 AIM 单双体混合物用 Vivaspin20(30 000MW)超滤膜超滤后,在进行非还原的 15% SDS-PAGE(图略),通过凝胶扫描表明,AIM 单体的纯度达 95% 左右。

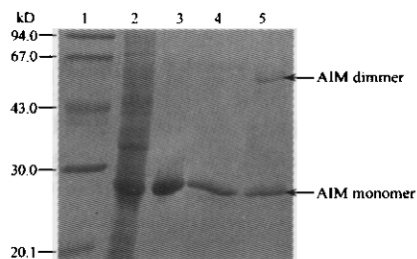


图3 AIM 经 Butyl 柱和 Q 柱纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of AIM purified by Butyl Sepharose 4F.F. and Q Sepharose H.P.

1: Molecular weight standards; 2: Samples before purified; 3: AIM purified by Butyl Sepharose 4F.F.; 4: AIM purified by Q Sepharose H.P. (reduced); 5: AIM purified by Q Sepharose H.P. (unreduced).

2.5 重组 AIM 的 N-末端氨基酸残基分析

重组蛋白 AIM 的 N-末端测序结果表明,N-末端的 6 个氨基酸为 Met-Arg-His-Phe-Trp-Gln,除 Met 外,其余氨基酸是 AIM 的 N-末端的前 5 个氨基酸,与理论序列一致。

2.6 重组 AIM 的分子量测定

初步纯化的 AIM 产物经反相 HPLC 色谱再次纯化后,用质谱测定 AIM 的分子量。测定的 AIM 单体和二聚体的分子量分别为 29031D 和 58045D,与理论值 29037D 和 58074D 非常接近,在误差允许的范围之内,说明 AIM 单体和二聚体都未发生降解,重组 AIM 的前肽的确有防止 AIM 降解的作用。

2.7 重组 AIM 单体的活性鉴定

载脂蛋白 ApoA-I 的活性可通过测定 ApoA-I 与脂质 DMPC 的结合能力来测定。当 ApoA-I 与脂质 DMPC 结合后,将脂质分子 DMPC 有机地排列起来,即两个 ApoA-I 分子像带子缠绕着圆饼状的脂双层, A_{325nm} 的吸光值会下降。AIM 单体与 DMPC 的结合情况如图 4。

从图 4 可知,不加载脂蛋白的空白对照 A_{325nm} 的吸光值仅有极少量的下降,对照人血浆 ApoA-I 的 A_{325nm} 的吸光值下降速度快,迅速达到平衡,AIM 单

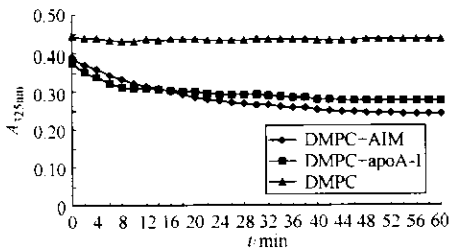


图4 载脂蛋白与DMPC的结合曲线

Fig. 4 Association kinetics of apolipoproteins with DMPC

体的 $A_{325\text{nm}}$ 的吸光值下降速度比 ApoA-I 慢, 但 $A_{325\text{nm}}$ 的吸光值下降的幅度比 ApoA-I 大。说明 AIM 单体结合脂的速度比 ApoA-I 慢, 但结合脂的量比 ApoA-I 多。这表明表达纯化的 AIM 单体具有脂结合活性。

3 讨论

我们已经构建了表达 AIM 的 pQE30-AIM/JM109 工程菌, AIM 在该工程菌中获得了高表达^[6], AIM 约占菌体总蛋白的 40%。但是表达的 AIM 只有一部分是可溶的, 还有一部分以包涵体形式存在。包涵体复性本身是一个十分复杂的问题, 同时还必须对可溶部分和包涵体部分分别进行纯化, 这给大规模生产带来不便和困难, 因此, AIM 的可溶性表达是我们希望解决的问题。我们构建了 pET22b-AIM 表达载体, AIM 在 pET22b-AIM/BL21 (DE3) 工程菌中获得了可溶性表达, 其产量约占菌体总蛋白的 38%。但是我们还不清楚为什么 AIM 在不同工程菌中的表达形式不一样。

已有报道^[7]指出, 在大肠杆菌表达体系里, ApoA-I 的前肽影响蛋白质的稳定性和表达。在大肠杆菌里, ApoA-I 的前肽序列可使 ProapoA-I 折叠形成的结构比成熟的 ApoA-I 折叠形成的结构更加稳定, 能有效地防止目的蛋白的降解; 另一方面, 前肽的碱基序列可增加转录和翻译的效率, 提高目的蛋白的表达量。小肠和肝脏合成 ApoA-I 后, 其前肽也是在血液中被一种钙依赖的蛋白酶水解掉才变成成熟的 ApoA-I 的。因此, 表达带有前肽的 ProapoA-I, 不影响它的正常功能。McGuire 等^[8]表达带有前肽的 ProapoA-I, 表达水平达 6mg/L, 且重组 ProapoA-I 在体内能有效地转变成成熟的 ApoA-I, 促进 RCT, 提高 HDL 的水平。Antonella 等^[7]研究指出, 成熟 AIM 的 N-末端前 8 个氨基酸密码子对 AIM 在大肠杆菌中的表达有很大的影响。首先, 它影响 mRNA 的稳定性, 将这 8 个氨基酸密码子进行统一突变后, mRNA 的稳定性明显提高, 其次, 它影响 mRNA 5' 末端的结构, 因此也影响了翻译。Bergeron 等^[9]将 ApoA-I 的

前 8 个氨基酸的密码子进行同义突变, 表达水平提高到 10mg/L。由于 AIM 基因与 apoA-I 基因的差别仅仅在第 545 位碱基由 T 变成 C, 所以在大肠杆菌里表达 AIM 时, 我们既表达了其前肽, 也对 AIM 的 N-末端前 8 个氨基酸密码子作了优化, 结果 AIM 获得了高表达, 在摇瓶内的表达量约 100mg/L, 表达量明显提高了。分子量测定结果表明, 即使进行 15h 的长时间诱导, AIM 也没有发生降解。活性测定结果表明, AIM 的前肽也不影响 AIM 的脂结合活性。说明密码子的优化和表达带前肽的 AIM 是切实可行的。

DMPC 和载脂蛋白的反应是一个广泛使用的模型系统, 用来研究载脂蛋白与脂类结合活性的研究。ApoA-I 和 AIM 单体和双体都可以与 DMPC 结合形成稳定的复合物, 使 DMPC 脂质体的浊度下降。结合的动力学特征可通过 325nm 的吸光值 A_{325} 的下降来表示。下降的速度越快, 表示 DMPC 和载脂蛋白结合的速度越快; 下降的幅度越大, 表示 DMPC 和载脂蛋白结合的量越高。从 DMPC 与载脂蛋白反应的动力学曲线看, AIM 单体与 DMPC 结合的速度比对照 ApoA-I 慢, 但结合 DMPC 的数量比 ApoA-I 大, 这与许多试验结果是一致的^[10]。这可从结构上进行解释。ApoA-I 具有二个蛋白质结构域, 即一个球形的 N-末端 (1-43) 结构域和一个与脂结合的 C-末端 (44-243) 结构域。ApoA-I 的 C-末端结构域由 10 个双亲的 α -螺旋构成, 其中 8 个含 22 个氨基酸残基, 2 个含 11 个氨基酸残基, 螺旋间有盐桥维持, 螺旋之间被脯氨酸隔断。ApoA-I 发生环化像带子一样缠绕着脂质分子, 其双亲 α -螺旋的疏水面扭曲着与脂质结合后形成圆饼状的 HDL, 每个 HDL 含有 2 个 ApoA-I 分子, 它们平行围绕着脂质分子^[11, 12]。ApoA-I 的 Arg¹⁷³ 位于双亲 α -螺旋的疏水面和亲水面的交界面上, 并和 Glu¹⁶⁹ 形成盐桥。当 Arg¹⁷³ 被 Cys¹⁷³ 代替后, 这个盐桥断裂, 损失一部分双亲 α -螺旋, 露出更多的疏水面, 因而可结合更多的脂质^[13]。当两个 AIM 单体的 Cys 间形成二硫键变成 AIM 二聚体时, 两个 AIM 单体之间形成一个新的结合脂质的结构域, 所以结合脂质的量更大, 结合脂质的速度更快, 结合也更稳定, 因此, AIM 二聚体与脂质结合的能力比 ApoA-I 和 AIM 单体都强, 在血浆中的半衰期比 ApoA-I 和 AIM 单体长^[5]。在正常体内, 仍有 30% 的 AIM 单体存在, AIM 二聚体可能是在与脂类物质结合时被氧化形成的, 其游离的巯基可以保护脂类物质不被氧化^[4]。说明 AIM 单体也是在体内发挥其生理作用的必要形式。

由于大肠杆菌缺乏内质网这个二硫键形成的场所,从热力学和动力学上看,在细胞质中一般是不利于二硫键形成的。首先,细胞质中的氧化还原电势很低,不能提供形成稳定的二硫键的驱动力;其次,在正常的生理条件下,没有一种酶能催化巯基的氧化,因此,表达的 AIM 应该全部是单体形式。而我们表达的 AIM 蛋白主要以单体的形式存在,但也存在 30% 左右的二聚体,现在还不清楚 AIM 二聚体是在宿主细胞内形成的还是在细胞外被氧化形成的。然而,不论是 AIM 单体还是 AIM 二聚体,AIM 的高效可溶性表达,都为 AIM 的结构、功能和临床应用研究奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Sedlis SP, Schechtman KB, Ludbrook PA *et al.* Plasma apoproteins and the severity of coronary artery disease. *Circulation*, 1986, **73**: 978 - 984
- [2] Fruchart JC, Duriez P. High density lipoproteins and coronary heart disease. Future prospects in gene therapy. *Biochimie*, 1998, **80**: 167 - 172
- [3] Gualandri V, Franceschini G, Sirtori CR *et al.* A-I_{Milano} apoprotein. Identification of the complete kindred and evidence of a dominant genetic transmission. *Am J Hum Genet*, 1985, **37**: 1083 - 1097
- [4] Bielicki JK, Oda MN. Apolipoprotein A-I_{Milano} and apolipoprotein A-I_{Paris} exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, 2002, **41**(6): 2089 - 2096
- [5] Shah PK, Yano J, Reyes O *et al.* High-dose Recombinant apolipoprotein A-I Milano mobilizes tissue cholesterol rapidly reduces lipid and macrophage content in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2001, **103**: 3047 - 3050
- [6] Li M (黎明), Zhao HL (赵洪亮), Liu ZM (刘志敏) *et al.* High-level expression of recombination human apolipoprotein A-I milano in *E. coli*. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 2003, **14**(3): 194 - 196
- [7] Nicole M, CorNelis R, Rosette L *et al.* Production of human recombinant proapolipoprotein A-I in *Escherichia coli*: purification and biochemical characterization. *DNA*, 1989, **8**(6): 429 - 436
- [8] McGuire KA, Davidson WS, Jonas A. High yield overexpression and characterization of human recombinant human proapolipoprotein A-I. *J lipid Res*, 1996, **37**(7): 1519 - 1528
- [9] Bergeron J, Frank PG, Emmanuel F *et al.* Characterization of human apolipoprotein A-I expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **134**(4): 139 - 152
- [10] Sirtori C, Franceschini G, Holmgren E *et al.* Dimer of molecular variant of apolipoprotein and processes for the production thereof. US5876968
- [11] Segrest JP, Harvey SC, Zannis V. Detailed molecular model of apolipoprotein A-I on the surface of high-density lipoproteins and its functional implications. *TCM*, 2000, **10**(6): 246 - 252
- [12] Panagotopoulos SE, Horace EM, Maiorano JN *et al.* Apolipoprotein A-I adopts a belt-like orientation in reconstituted high density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(46): 42695 - 42970
- [13] Calabresi L, Vecchio G, Longhi R *et al.* Molecular characterization of native and recombinant apolipoprotein A-I-Milano dimer. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(51): 32168 - 32174