

昆虫杆状病毒表达系统表达人载脂蛋白 A- I

朱媛娥 徐慧斌 赵志安 钟 江*

(复旦大学生命科学院 微生物学和微生物工程系, 上海 200433)

摘 要 载脂蛋白 apoA- I 是高密度脂蛋白中最主要的蛋白, 在胆固醇代谢及动脉粥样硬化等疾病的发生和控制中有重要作用。为了建立大量生产和制备该蛋白的方法, 昆虫杆状病毒表达系统被用来高效表达了两种形式的人 apoA- I。不带有信号肽序列的 proapoA- I 蛋白表达后主要在细胞内, 但在感染的晚期也有相当量的重组蛋白进入细胞培养液中。用蛇磷脂酶 A2 抑制因子 α 亚基信号肽序列引导表达的 apoA- I 蛋白在感染早期可以被分泌到培养液中。在此基础上, 通过 Phenyl Sepharose 疏水柱层析, 从感染细胞的培养液中初步分离纯化了成熟的 apoA- I 蛋白。这一结果为 apoA- I 的进一步研究和应用奠定了基础。

关键词 载脂蛋白, 高密度脂蛋白, 杆状病毒, 疏水层析

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0692-06

高密度脂蛋白(High-density lipoprotein, HDL)是血浆中的一类重要的脂蛋白, 它参与胆固醇逆向转运(Reverse cholesterol transport, RCT), 将肝外细胞和组织中多余的胆固醇转运至肝脏, 并加以转化和清除, 因而具有抗动脉粥样硬化作用^[1-4]。载脂蛋白 A- I(Apolipoprotein A- I, apoA- I)是 HDL 中最主要的载脂蛋白^[2,5], 它的缺失或减少会引起血浆 HDL 的降低, 导致冠心病发病率的增加^[6,7]。也有研究表明, apoA- I 蛋白还具有抗氧化、抗凝和抗炎作用, 以及调节细胞粘附分子的表达、介导细胞内信号传导等功能。它的这些功能对保护人体动脉管壁具有十分重要的意义^[8]。因此, apoA- I 已日益成为脂类代谢研究的焦点之一。此外研究发现肝脏细胞膜表面有 apoA- I 和 HDL 的高亲和性受体^[9,10], 因此游离 apoA- I 以及 HDL 具有肝脏靶向的特点, 这一重要的特点使得 apoA- I 在靶向药物研究中具有良好的应用前景。

在体内, apoA- I 主要由肝脏细胞和肠细胞合成^[2,11], 胞内新合成的 apoA- I 以 267 个氨基酸的前蛋白的形式存在, 前蛋白向细胞膜移动, 并被分泌到胞外, 在分泌过程中 N 端 18 个氨基酸的信号肽(pre 序列)被切除。分泌至血浆的 apoA- I 蛋白系原蛋白(proapoA- I), 它除了成熟蛋白的氨基酸序列外, N

端还带有 6 个氨基酸的 pro 序列。在血浆里, pro 序列被某种未知的金属蛋白酶切除, 最终形成含 243 个氨基酸的成熟 apoA- I^[2,8]。Louis *et al.*^[12]发现 pro 序列并非胞内加工所必须, 去除 pro 序列并不影响信号肽的正确切割, 但是会减缓 apoA- I 分泌的速率。也有研究提出虽然 proapoA- I 也具有构成 HDL 等功能, 但成熟 apoA- I 蛋白可以更好地促进胆固醇逆向转运过程中前 β -HDL 向 α -HDL 的转化^[8], 有助于 apoA- I 功能的发挥。

进一步探索 apoA- I 的结构与功能及其在新药开发中的应用, 需要建立基因工程高效表达生产 apoA- I 方法。本研究成功地利用昆虫杆状病毒表达系统, 在昆虫 Sf9 细胞中高效表达了 proapoA- I, 还将一种新的蛇磷脂酶 A2 抑制因子信号肽^[13]用于 apoA- I 成熟蛋白的直接分泌表达, 并且初步分离纯化了该蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

Bac-To-Bac[®] 杆状病毒表达系统购自 Life Technologies Inc. Sf9 细胞由本实验室保存; Sf-900 II 无血清培养液购自 Invitrogen 公司。TNM-FH 昆虫细胞培养基粉剂购自 Sigma 公司。限制酶购自 Roche 公司;

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自北京鼎国公司,其他生化试剂均为国内外公司生产的分析纯或生化纯试剂。人血浆来源的 apoA-I 蛋白由复旦大学药学院吴满平、周佩教授提供。

1.2 方法

1.2.1 转移载体 pFB-proapoA-I 的构建: 利用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切从质粒 pBSK-proapoA-I 切下 proapoA-I 的 DNA 片段,克隆到载体 pFastBac1 的相应酶切位点中,得到转移载体 pFB-proapoA-I (图 1) 并经酶切检验和部分序列测序确认。

1.2.2 转移载体 pFB-S-*apoA-I* 的构建: 以 pFB-*apoA-I* 质粒 DNA 为模板,利用两次聚合酶链式反应 (PCR),将蛇磷脂酶 A2 抑制因子 α 亚基信号肽序列^[13]插入 apoA-I 序列的 5' 端,同时将 N 端 6 个氨基酸的 pro 序列缺失,得到了带有信号肽序列,可分泌表达成熟 apoA-I 的 pFB-S-*apoA-I*。所设计的引物有正向引物 1: 5' CTCCTTTTCGTTTTGGTAG CCAGAGGAAGCTGTGATGAACCCCCCAGAG;

正向引物 2: 5' CGCGGATCCATGAAATCCCTACAGATCATCTGTCTCCTTTTCGTTTTGGTAG;

反向引物: 5' CCGAATTCGTTTATTCTGAGCACC3' (其中黑体部分为信号肽序列)。第一次 PCR 使用正向引物 1 和反向引物,反应条件为:首先 95℃ 预变性 5 min,然后以 95℃ 变性 1 min,56℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1 min 的循环反复 35 次,最后 72℃ 保温 10 min。第二次 PCR 使用正向引物 2 和反向引物,反应条件与第一次 PCR 相似,但复性温度为 54℃。

PCR 产物经纯化,用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切后插入载体 pFastBac1 的相应位点,得到带信号肽序列、并缺失 pro 序列的 pFB-S-*apoA-I* (图 1)。质粒经酶切分析和插入基因的全序列测定验证正确。

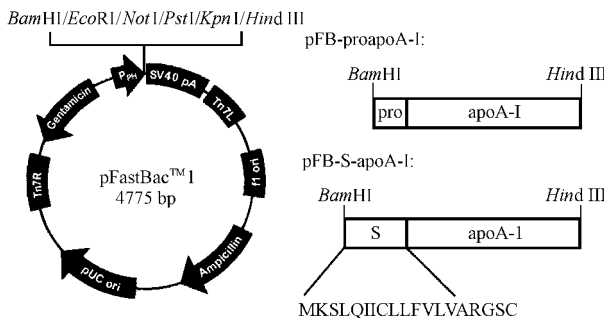


图 1 pFastBac1 质粒图谱及插入 apoA-I 基因片段图示

Fig. 1 The diagram of pFastBac1 and the inserted apoA-I gene fragments

1.2.3 重组杆状病毒的获得: 表达 apoA-I 的两株重组杆状病毒均用 Bac-to-Bac 系统构建,根据 Life

Technologies 公司提供的实验指导手册进行。将 pFB-proapoA-I 和 pFB-S-*apoA-I* 质粒 DNA 转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞,在含有合适的抗生素和 X-gal 的培养基上培养,选择白色的转化子,提取其中的重组 Bacmid DNA,用 PCR 验证转移载体上的 apoA-I 基因片段的确已转座到 Bacmid DNA 中(图片未显示)。重组 Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞,72h 后收获培养液上清,得到重组的杆状病毒作为原代病毒液,4℃ 保存备用。感染 Sf9 细胞扩增病毒。

1.2.4 Sf9 细胞的培养: Sf9 细胞的单层培养、悬浮培养以及无血清培养的方法参见文献[14]。为了防止小牛血清中带有的人 apoA-I 对实验结果可能的影响,与表达有关的试验,其细胞均在无血清培养液 Sf900 II 中生长。

1.2.5 重组蛋白表达检测: 以 5×10^5 cells/mL 的活细胞密度接种 25cm² 培养瓶,同时加入适量重组病毒液,使感染复数 (MOI) 约为 1pfu/cell,27℃ 培养,72h p.i. 时将贴壁细胞完全吹打下来,取 1 mL 细胞悬液,5000 r/min 离心 5 min,细胞沉淀中加入 100 μ L 2 \times SDS 样品缓冲液,SDS-PAGE (12%) 电泳分析和 Western blot 检测,具体方法参见文献[15]。第一抗体为兔抗人 apoA-I 抗体(购自 Calbiochem 公司);第二抗体为碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(购自 Sigma 公司),按生产厂商推荐的稀释比例使用。

1.2.6 悬浮培养的 Sf9 细胞中重组蛋白的表达分析: 在 125 mL 的三角瓶中接入 20mL 活细胞密度大约为 1×10^6 cells/mL 的 Sf9 细胞,在旋转摇床上以 27℃、150 r/min 摇动培养。隔天接种病毒,MOI 约为 5pfu/cell。48h p.i. 加入蛋白酶抑制剂 PMSF、Aprotinin、Leupeptin 至终浓度分别为 17 μ g/mL、1.0 μ g/mL、0.5 μ g/mL,以防止重组蛋白被蛋白酶降解。每隔 24 h 取样 1 mL。10000 r/min 离心 5 min,将上清和细胞沉淀分离。细胞沉淀中加入 100 μ L 2 \times SDS 样品缓冲液,取 200 μ L 培养液上清,加入等体积预冷的丙酮-无水乙醇 (1:1) 混合液,充分混合以沉淀蛋白,10000 r/min 离心 5min,去上清,待蛋白沉淀略干后,加入 100 μ L 2 \times SDS 样品缓冲液。同上用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。

1.2.7 分泌表达的重组 apoA-I 蛋白的纯化: 取 50mL 经病毒感染 72h 后的悬浮培养细胞的上清液,加入 1mol/L 盐酸调节 pH 至 6.6,加入硫酸铵至终浓度为 0.1 mol/L,然后上样至 Phenyl Sepharose (购自 Amersham) 层析柱,柱床直径为 1 cm,高 10 cm。分别用水、30% 丙二醇、70% 丙二醇分步洗脱^[11],收集

洗脱液,同上分析重组蛋白的存在。

2 结 果

2.1 重组病毒构建

具体步骤见 1.2.3。首先构建分别含有 proapoA-I 和 S-apoA-I 基因的转移载体 pFB-proapoA-I 和 pFB-S-apoA-I (图 1),其中后者在 apoA-I 成熟蛋白前带有一段蛇磷脂酶 A2 抑制因子 α 亚基信号肽序列^[13]:MKSLQIICLLFVLVARGSC,用于分泌表达成熟的 apoA-I。所构建的载体分别用限制性内切酶分析、DNA 序列分析等验证正确(结果未显示)。

用两种转移质粒分别转化大肠杆菌 DH10Bac,在转座酶的帮助下,质粒上的 apoA-I 表达框架被转座到 Bacmid 上。通过抗生素和 X-gal 筛选,分离得到两种重组 Bacmid。再用重组 Bacmid DNA 分别转染 Sf9 细胞,72h 后在倒置显微镜下观察,可见细胞具有明显的感染症状(未显示)。收获培养液上清,得到两种原代重组的杆状病毒,分别称为 vAc-proapoA-I 和 vAc-S-apoA-I。这两种重组病毒分别以苜蓿夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* Nucleopolyhedrosis Virus,AcMNPV)为骨架,借助多角体蛋白启动子表达 proapoA-I 和带异源信号肽的 S-apoA-I。

2.2 重组 apoA-I 表达的检测

用 vAc-proapoA-I 和 vAc-S-apoA-I 两种重组病毒分别感染单层培养的 Sf9 细胞,72h p.i.收获感染细胞,以 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测,结果如图 2 所示。proapoA-I 和成熟 apoA-I 在细胞内都有很高的表达(图 2A)。经测定,其分子量与血清中分离的人 apoA-I 蛋白一致,均为 28kD(图 3,4)。Western blot 显示该条带能与抗 apoA-I 的抗体反应(图 2B)表明基因得到正确的表达。

2.3 悬浮培养的 Sf9 细胞中重组蛋白的表达和分泌

摇动悬浮培养的 Sf9 细胞用重组病毒 vAc-proapoA-I 和 vAc-S-apoA-I 感染后,分别取 24 h、48 h、72 h、96 h 等时间点的样品,离心分成细胞沉淀和上清两部分,分别以 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。图 3 和图 4 分别显示了感染细胞胞内及培养液上清中重组蛋白表达量的时间动态。加样量分别相当于 100 μ L 培养物中的细胞,或 50 μ L 培养物中的培养液上清。

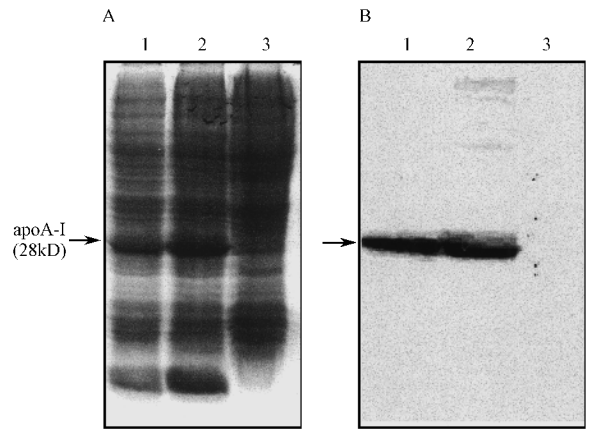


图 2 重组 apoA-I 蛋白在单层培养细胞内的表达
Fig.2 The expression of recombinant apoA-I in Sf9 monolayer culture

A. SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue ;B. Western blot with anti-apoA-I antibody. 1. vAc-S-apoA-I infected cells 2. vAc-proapoA-I infected cells 3. Uninfected cells. Arrows indicate apoA-I

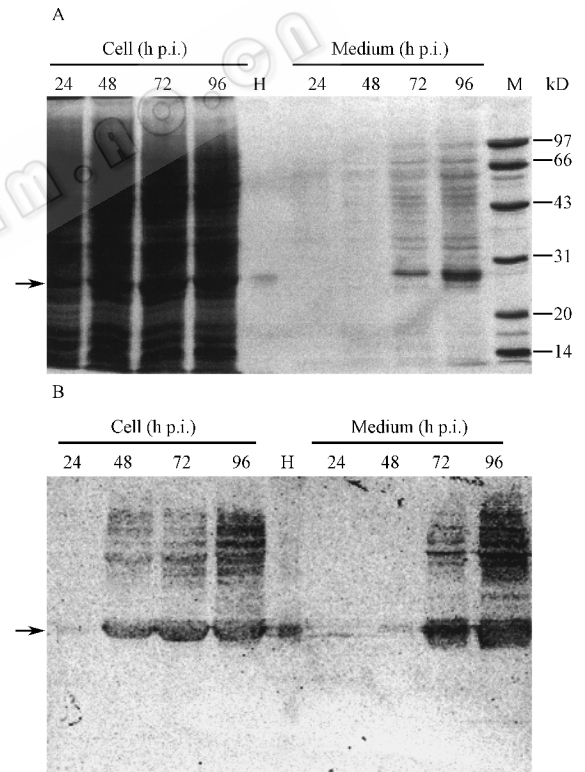


图 3 vAc-proapoA-I 感染细胞胞内及培养液中重组 apoA-I 的动态

Fig.3 The dynamics of intra- and extra-cellular recombinant apoA-I in Sf9 cells infected with vAc-proapoA-I
A. SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue ;B. Western blot with anti-apoA-I antibody ; H. apoA-I from human plasma ; M. Protein molecular weight standard ; Arrows indicate apoA-I

重组病毒 vAc-proapoA-I 感染细胞后(图 3),细胞内在 24 h 开始有少量重组 apoA-I 出现,48 h、72 h 和 96 h 表达量逐步上升。在培养液上清中,72 h 时可见有相当水平的重组 apoA-I 出现,96h 时重组

apoA- I 的量明显上升。Western blot 也验证了这些结果(图 3B)。

重组病毒 vAc-S-apoA- I 感染细胞后(图 4),细胞内同样在 24h p. i. 即能观察到重组 apoA- I, 随后表达持续上升, 72h 时细胞内的重组蛋白达到高峰, 96h 时胞内重组蛋白的量有所降低。与 vAc-proapoA- I 明显不同的是, vAc-S-apoA- I 感染细胞后, Western blot 在 24h 即可以检测到细胞培养液中有少量的重组 apoA- I 出现, 48h 时考马斯亮蓝染色的凝胶中也可以看到明显的重组 apoA- I 条带, 比 vAc-proapoA- I 感染的细胞中的情形至少提前 24h。这一结果表明蛇磷脂酶 A2 抑制因子 α 亚基信号肽在昆虫细胞中得到了识别和加工处理。

值得注意的是, Western blot 显示感染的细胞内有含量相当的两条带可以与抗体反应, 分子量分别约为 28 kD 和 26 kD, 但考马斯亮蓝染色却显示相应位置只有一条 28 kD 的主带(图 4)。

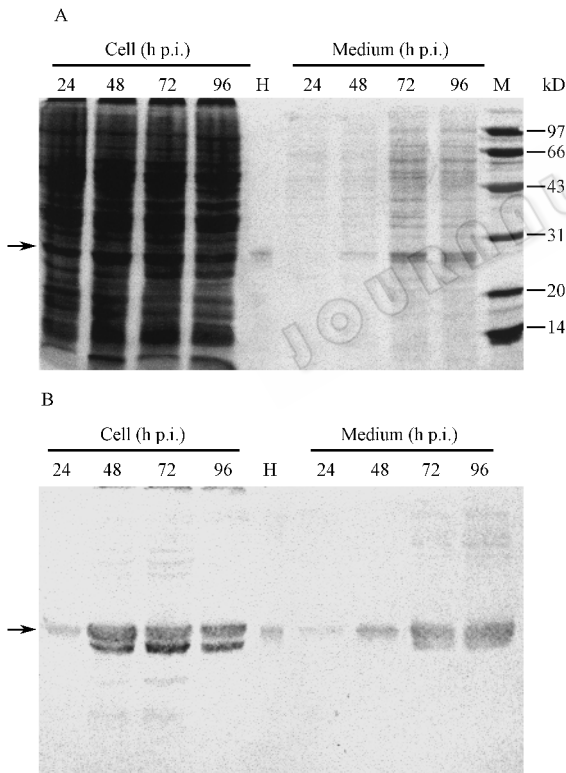


图 4 vAc-S-apoA- I 感染细胞胞内及培养液中重组 apoA- I 的动态

Fig.4 The dynamics of intra- and extra-cellular recombinant apoA- I in Sf9 cells infected with vAc-S-apoA- I

A. SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue; B. Western blot with anti-apoA- I antibody; H. apoA- I from human plasma; M. Protein molecular weight standard; Arrows indicate apoA- I

2.4 目的蛋白的分离纯化

含有 apoA- I 的感染细胞培养液上清直接用疏水层析进行一步法浓缩、分离和纯化。培养液上清经调节 pH 和盐浓度后, 上样到 Phenyl Sepharose 柱, 并用 H₂O、30% 和 70% 丙二醇分步洗脱。SDS-PAGE 和 Western blot 分析可以看出, 该方法取得了较好的初步分离纯化效果(图 5)。

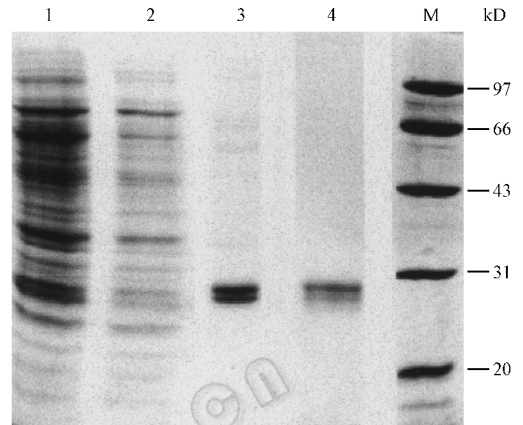


图 5 分泌表达的重组人 apoA- I 蛋白的分离纯化

Fig.5 Preliminary purification of secreted recombinant apoA-I

1. Original sample; 2. Flow-through; 3. Elution with 30% propylene glycol; 4. Human plasma apoA- I; M. Molecular weight standard

3 讨论

迄今为止, 已有许多重组表达人 apoA- I 蛋白的报道^[2,5,16], 最常见的是应用大肠杆菌原核表达系统。但是在大肠杆菌中, apoA- I 的 mRNA 极其不稳定, 表达的成熟蛋白亦易被降解, 一般以融合蛋白的形式表达, 难以获得成熟 apoA- I^[12]。也有研究者选用在中国仓鼠卵巢细胞中表达重组人 apoA- I, 表达量可达 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[16]。昆虫杆状病毒表达系统具有多种优点, 如表达水平高, 能对重组蛋白进行一系列转译后加工修饰等。

本文采用 Bac-To-Bac 系统构建了表达人 apoA- I 的两个重组杆状病毒, 一是表达去除了天然信号肽(pre)序列, 但保留 pro 序列, 另一个用一种异源的信号肽——蛇磷脂酶 A2 抑制因子 α 亚基信号肽引导表达成熟 apoA- I。两种重组病毒感染 Sf9 细胞后, 在多角体蛋白强启动子的作用下 apoA- I 基因均得到了高效的表达, 接近 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

比较两种病毒表达重组 apoA- I 的情况发现, 带有异源信号肽的重组病毒感染后, 很快(24h p. i. 图 4)可以在细胞培养液中检测到明显的重组蛋白, 而不带有信号肽的重组病毒感染后, 在感染晚期(72h

p.i., 图 3) 时才在细胞培养液中检测到明显的重组蛋白。这一结果提示蛇磷脂酶 A2 抑制因子信号肽能被昆虫细胞识别, 指导蛋白质的加工、分泌。但细胞内仍然存留相当数量的重组蛋白, 表明分泌效率尚不够高。不带有信号肽的 apoA- I 感染晚期在细胞培养液中发现大量的重组蛋白(图 3、4), 其中的机理还有待探讨, 可能是由于 apoA- I 随脂质流动一齐被排放到胞外。虽然不排除少量被感染细胞破裂造成胞内蛋白外泄, 但可能并不是主要的原因。重组病毒不形成多角体, 对细胞结构完整性的影响较小, 在感染后 3~4d 未观察到明显的细胞破裂。同时, 感染晚期培养液中蛋白总量的增加, 明显低于重组 apoA- I 量的增加, 也表明培养液中 apoA- I 水平提高有一定的特异性。目前正在构建表达其它一系列形式的 apoA- I 的重组杆状病毒, 比较分析它们的表达和分泌, 及表达产物末端氨基酸序列, 从而进一步了解该蛋白在昆虫细胞中的表达规律。

有报道指出, apoA- I 蛋白具有多个两亲性的 α 螺旋结构, 且蛋白很容易发生降解^[16]。而且在分泌过程中, 重组蛋白可与脂质结合, 形成各种形式的脂蛋白分子。这给该蛋白表达和分离纯化带来了一些困难。Western blot 检测时, 在 28 kD 的主要表达产物条带下面还有一条分子量较小(约 26 kD)的条带(图 4B、5), 推测可能是由于蛋白被部分降解的结果, 人血浆来源的 apoA- I 有时可以观察到同样的降解现象。另外, 有时虽然 Western blot 显示两条带, 考马斯亮蓝染色却只能看见一条带(图 4)。这其中的原因还不清楚。我们在进行人血浆 apoA- I 蛋白实验时也常遇到类似的情况, 提示以不同形态存在的 apoA- I 可能在电泳和考马斯亮蓝染色结果中有些不同。类似的结果在文献中也有报道^[17]。

我们用 Phenyl Sepharose 疏水柱层析纯化蛋白, 比较了多种洗脱方法, 发现用 30% 丙二醇和 70% 丙二醇的分步洗脱效果和效率最佳, 但回收率还有待进一步提高。设想将分泌表达在上清中的 apoA- I 在分离纯化之前先脱脂, 再通过疏水柱层析, 有可能优化纯化效果和效率, 这有待于进一步试验。

HDL 和 apoA- I 蛋白在抗动脉粥样硬化等心血管疾病中的作用早已得到确认^[1-4], apoA- I 的结构和功能, 及其在周围细胞和肝脏细胞表面受体的研究也日趋深入^[1, 9-11], 借助基因工程的方法得到大量纯化的具有生物活性的 apoA- I 蛋白将有助于上述的各项研究和应用工作。本研究成功进行了 apoA- I 的表达, 初步分离了分泌的蛋白。分泌表达

方便了提取, 表达产物是成熟蛋白, 或是在血浆中可自动加工成熟的原蛋白, 为深入该蛋白的研究和实际应用奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] WEI Q (魏强), WU M P (吴满平), CHEN P F (陈佩芳) *et al.* Cooperation of HDL receptor and hepatic lipase in the selective uptake of HDL₂-CE by rat hepatic sinusoidal cells. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 1996, **28**(28): 661-664
- [2] Pyle L E, Barton P, Fujiwara Y *et al.* Secretion of biologically active human proapolipoprotein A- I in a baculovirus-insect cell system: protection from degradation by protease inhibitors. *Journal of Lipid Research*, 1995, **36**: 2355-2361
- [3] WU X W (吴新伟), FU M D (傅明德). The molecular mechanism of reverse transport of HDL. *Progress in Physiological Science* (生理科学进展), 1998, **29**(4): 361-363
- [4] Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2000, **161**(2): 245-254
- [5] Ryan R O, Forte T M, Oda M N. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A- I. *Protein Expression and Purification*, 2003, **27**(1): 98-103
- [6] CHEN P F (陈佩芳), LI J J (李剑军), WU M P (吴满平). Cholesterol efflux from macrophages mediated by high-density lipoprotein-3. *Chinese Journal of Arteriosclerosis* (中国动脉硬化杂志), 2000, **8**(2): 111-114
- [7] LIANG L B (梁利波), LI J (黎健). apoA- I plays a protective role in the development of atherosclerosis. *Chinese Journal of Arteriosclerosis* (中国动脉硬化杂志), 1998, **6**(4): 353-356
- [8] Sviridov D, Pyle L E, Jauhiainen M *et al.* Deletion of the propeptide of apolipoprotein A- I reduces protein expression but stimulates effective conversion of pre β -high density lipoprotein to α -high density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 2000, **41**(11): 1872-1882
- [9] Martinez L O, Jacquet S, Esteve J-P *et al.* Ectopic β -chain of ATP synthase is apolipoprotein A- I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 2003, **421**(6918): 75-79
- [10] Acton S, Rigotti A, Landschulz K T *et al.* Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 1996, **271**(5248): 518-520
- [11] Sorci-Thomas M G, Thomas M J. The effects of altered apolipoprotein A- I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovascular Medicine*, 2002, **12**(3): 121-128
- [12] Pyle L E, Fidge N H, Barton P A *et al.* Production of mature human apolipoprotein A- I in a baculovirus-insect cell system: propeptide is not essential for intracellular processing but may assist rapid secretion. *Analytical Biochemistry*, 1997, **253**(2): 253-258
- [13] Choo A B H, Dunn R D, Broady K W *et al.* Soluble expression of a functional recombinant cytolytic immunotoxin in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 2002, **24**(3): 338-347

ture (体外培养的原理与技术), Beijing Science Press, 2001

- [15] Ausubel F M , Brent R , Kingston R E *et al.* Short protocols in molecular biology (精编分子生物学实验指南). Beijing : Science Press ,1998
- [16] Schmidt H H-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

- [17] Schmidt H H-J , Haas R E , 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

Expression of Human Apolipoprotein A- I in Baculovirus-insect Cell System

ZHU Yuan-E XU Hui-Bin ZHAO Zhi-An ZHONG Jiang*

(Department of Microbiology and Microbial Engineering , School of Life Sciences , Fudan University , Shanghai 200433 , China)

Abstract Apolipoprotein A- I is the major apolipoprotein in high-density lipoprotein known to have a wide range of physiological functions , the best-studied one of which is in regulating cholesterol metabolism and preventing arteriosclerosis. Human blood has been the only source of this protein. To facilitate further research and application , it is essential to produce it through genetic engineering. In the current research , the baculovirus-insect cell system was used to overexpress human apolipoprotein A- I . Two recombinant baculoviruses were constructed. The first one expressed a pro form of apoA- I lacking native signal peptide. The recombinant protein was found to remain mainly inside cells in the early phase of infection , while being largely excreted to the medium late in infection. The second one used a heterologous signal peptide , snake phospholipase A2 inhibitor α subunit signal peptide , to lead the secretion of mature apoA- I . In contrast to the first virus , recombinant apoA- I was found in the culture medium at the early phase of virus infection. The mature apoA- I was purified from culture medium using Phenyl Sepharose hydrophobic interaction chromatography (HIC) and eluted with water and Propylene. This work shows that snake phospholipase A2 inhibitor α subunit signal peptide can be used to secret human apoA- I in insect cells , but the efficiency of its secretion is limited when the expression level is high.

Key words apolipoprotein , high-density lipoprotein , baculovirus , hydrophobic interaction chromatography

Received : 05-20-2003

This work was sponsored by Grant from Fudan University Med-X Program.

* Corresponding author. Tel 86-21-55664332 ; Fax : 86-21-65650149 ; E-mail : jzhong@fudan.edu.cn

安捷伦科技参展第十届北京分析测试学术报告会及展览会

在第十届北京分析测试学术报告会及展览会上 ,安捷伦科技展示了各种全球领先的分析仪器。安捷伦推出的最新仪器和解决方案将为石油化工、环境保护、医药卫生、日用消费品及食品等行业提供分析与全方位解决方案 ,特别是要帮助中国的环保分析、食品安全和药物分析研发与国际标准接轨。

安捷伦展示的仪器主要有第一款由中国团队自主开发制造、为中国客户量身定做的产品 6820 气相色谱仪 ,世界最前沿的 5973 Inert MSD 气质联用系统和 LC/MSD TOF 飞行时间质谱等等 ,可以为石油化工、环境保护、医药卫生、日用消费品及食品等行业提供分析与全方位解决方案。安捷伦的分析仪器被广泛应用于关系到人民生活质量的多个领域 ,包括蔬菜水果中农药残留的分析 ,水产品、畜禽产品以及其它农产品中的药物残留的测定 ,可为中国食品出口构筑与国际标准接轨的平台 ,破除绿色壁垒对出口的障碍。

在过去几年中 ,中国的化学分析市场一直保持两位数的年增长率。加入 WTO 则更推动了如安全食品、环境保护和石化等市场的快速发展。目前 ,中国是安捷伦生命科学和化学分析事业部全球第三大市场 ,也是增长最快的市场。安捷伦科技一直致力于通过投资、技术转让、人才培养以及多方合作等多种形式推动这一市场的长期发展。

要了解更多安捷伦科技的信息 ,请访问 : www.agilent.com。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>