

## 重组人载脂蛋白 A-I 在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的高表达

冯美卿<sup>1</sup> 蔡钦生<sup>1</sup> 宋大新<sup>2</sup> 钟江<sup>2</sup> 吴满平<sup>1</sup> 周珮<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(复旦大学药学院生物合成教研室, 上海 200032)

<sup>2</sup>(复旦大学生命科学院微生物教研室, 上海 200433)

**摘 要** 高密度脂蛋白 (High-density Lipoprotein, HDL) 是血浆中重要的脂蛋白, 其主要成分为载脂蛋白 A I (Apolipoprotein A I, ApoA I)。为了大量制备该蛋白, 首先尝试利用 *Pichia pastoris* 表达系统高效表达 ApoA I。通过 PCR 扩增获得天然含人载脂蛋白 ApoA I 的基因片段, 将其插入到 *P. pastoris* 分泌型载体 pPIC9K 上, *Bgl* II 酶切线性化后电转化 *P. pastoris* GS115, 将获得的 1000 多个转化子依次在含不同  $C_{418}$  浓度的 YPD 平板筛选高抗性转化子, 得到的 22 个高抗性转化子经甲醇诱导, SDS-PAGE 检测得到 6 株高表达菌。然后对其中的高表达菌株 AP16 的培养及诱导条件进行了优化, 结果显示: 接种后培养 24~28h, 转入诱导阶段, 培养基 pH 值在 7~7.5, 菌体密度  $OD_{600} = 80$  左右, 以 1% 甲醇诱导 96h 最有利于 ApoA I 的表达, 表达水平达 160mg/L。14L 发酵罐结果显示表达水平与摇瓶相当, 均高于其它表达系统, 为大批量制备奠定了基础。

**关键词** 重组人载脂蛋白 ApoA I, 毕赤酵母, 表达优化

**中图分类号** Q554 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0906-06

高密度脂蛋白 (HDL) 是血浆中重要的脂蛋白, 其主要成份是载脂蛋白 (Apolipoprotein A I——ApoA I)。吴满平<sup>[1]</sup> 等从肝及周围组织细胞的细胞膜上相继分离到高亲和力的 HDL 受体。通过 ApoA I 与肝细胞表面受体确认途径把外周组织过剩的胆固醇重新运回肝脏, 因此 HDL 在甘油三酯的运输、代谢及动脉粥样硬化等疾病的发生和控制中有重要作用, 目前其已成为脂类代谢研究的重点之一。另外根据 ApoA I 能特异识别肝细胞表面受体的特性, 使得 ApoA I 在靶向药物研究中有着良好的应用前景。

从人血清提取的 ApoA I 的蛋白分子量为 28.3kD, 由 243 个氨基酸组成, 无糖基化修饰<sup>[2]</sup>。目前 ApoA I 主要从人血清分离提取, 但由于人血液供应短缺和难以解决的血液污染问题, 很难实现靶向药物的产业化, 大大限制了其开发和应用。为进一步探索 ApoA I 的结构与功能及其在新药开发中的应用, 可利用基因工程技术获得利用常规方法难以获得的大分子蛋白质, 实现 ApoA I 的高效表达。

用于重组蛋白的表达系统有大肠杆菌系统、*Pichia pastoris* 甲醇酵母系统、昆虫表达系统等。近年来 *Pichia pastoris* 表达系统显示出了诸多优势, 已

有不少外源蛋白用 *Pichia pastoris* 甲醇酵母进行表达<sup>[3]</sup>。但天然 ApoA I 在 *P. pastoris* 中的表达尚未见报道。本文报道以昆虫表达系统的表达质粒 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得天然的 ApoA I 基因构建重组菌, 成功地在 *P. pastoris* GS115 宿主菌内表达并进行了优化。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 昆虫表达质粒 DNA

pFB-S-ApoA I<sup>[4]</sup> 作为 PCR 模板, 表达载体 pPIC9k, 宿主菌 GS115 为本实验室保存, 限制性内切酶 *Xho* I, *Eco*R I, *Bam*H I, *Sal* I 购自 GIBCO 公司。

#### 1.2 培养基

YPD、BMGY、BMMY、MD 配方及相关操作见 Invitrogen 公司的 Multi-copy *Pichia* Expression Kit from Invitrogen 操作手册。

#### 1.3 主要发酵设备

摇床: 偏心矩 4.5dm。

发酵罐: 美国产 NBS F110 14L 全自动发酵系统, 配有 pH、溶氧、温度计、搅拌, 空气进气、补料自动控制系统等。

收稿日期: 2004-04-05, 修回日期: 2004-08-18。

基金项目: 上海市科委重点项目基金资助 (No. 024319204)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-21-54237431; Fax: 86-21-64225149; E-mail: hstkfq2222@sina.com

## 1.4 方法

有关 *P. pastoris* 的实验方法参照 Invitrogen *Pichia pastoris* Expression Kit 进行,发酵参照 *Pichia* Fermentation Guideline 进行。

**1.4.1 重组菌的构建:** PCR 引物: 正向引物 5' CTCGAG ATGGATGAACCCGCCAGAGCCC -3', 反向引物 5' GAATCC TTGAAGCTCAACACCCAGTGA-3'。模板: 昆虫表达系统的表达质粒 DNA; 通过 PCR 扩增获得天然 apoA I 基因片段, 由 TaKaRa 公司用定点突变法消除基因内的两个 *Xho* I 位点。apoA I 基因片段经 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切后插入分泌型表达载体 pPIC9, 得到重组质粒 pPIC9-apoA I。将重组质粒 pPIC9-apoA I 用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切后得到的片段(含 apoAI 基因)插入分泌型表达载体 pPIC9K, 得到表达质粒 pPIC9K-apoA I (见图 1)。

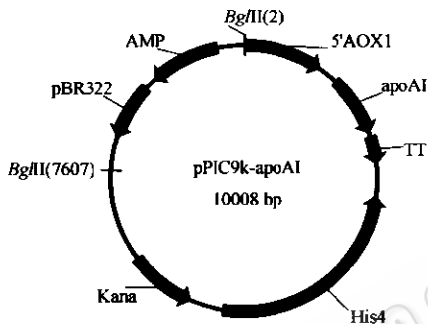


图 1 表达质粒的构建

Fig.1 Construction of expressed plasmid

将获得的表达质粒 pPIC9K-ApoA I 用 *Bgl* II 酶切后回收大片段, 在电转化仪上于 1.5kV, 25 $\mu$ F, 200 $\Omega$  条件下电转化 *P. pastoris* GS115 电感受态细胞, 涂于 MD 平板上于 30 $^{\circ}$ C 培养至有转化子长出。

**1.4.2  $G_{418}$  高抗性的转化子的筛选:** 用点种法鉴定酵母转化子的  $G_{418}$  抗性。依次用含  $G_{418}$  浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL 的 YDP 平板进行筛选。

**1.4.3 摇瓶培养:** 摇瓶培养分为两个阶段, 一是生长阶段, 此阶段以甘油为碳源只是菌体积累, 没有目的蛋白的表达。二是诱导阶段, 此阶段以甲醇为唯一碳源, 菌体增长缓慢, 目的蛋白在甲醇诱导下进行表达。培养过程: 从斜面挑取新鲜单菌落接入含 30 mL BMGY 的摇瓶, 摇床培养 24 h 作为种子液, 吸取 1.3 mL 接入含 40 mL BMGY 的 250 mL 摇瓶进入生长阶段, 摇床培养 24 h, 室温离心 (6 000r/min, 6min), 菌体用 15 mL BMMY 悬浮, 重新放入摇床培养进入诱导阶段。每 24 h 补甲醇 150  $\mu$ L (培养条件均为 30 $^{\circ}$ C、220 r/min)。

**1.4.4 菌龄对 ApoA I 表达的影响:** 种子液接入培养基后, 分别生长 16h、24h、28h、32h、40h、48h, 进入诱导阶段, 诱导 120h, 取样做 SDS-PAGE 检测 ApoA I 表达情况。

**1.4.5 诱导时间对 ApoA I 表达的影响:** 进入甲醇诱导阶段, 从 72 h 开始每隔 12 h 取样, 至 132 h 停止培养, SDS-PAGE 检测 ApoA I 表达情况。

**1.4.6 诱导起始 pH 对诱导的影响:** 配制诱导培养基 BMMY, 其自然 pH 为 6.2, 分别用稀磷酸和 KOH 溶液调 pH, 使 pH 值分别为 5.0、5.5、6.5、7.0、7.5、8.0 作为诱导培养基, 培养 96h, 取样做 SDS-PAGE 检测 ApoA I 表达情况。

**1.4.7 甲醇浓度的影响:** 使诱导培养基内甲醇浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%, 摇床培养, 每 24h 补甲醇使其终浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%, 诱导 96h, SDS-PAGE 检测 ApoA I 表达情况。

**1.4.8 菌体密度对 ApoA I 表达的影响:** 生长阶段结束时,  $OD_{600}$  约为 20 (约 80mg/mL), 取不同体积培养液离心, 菌体用相同体积的诱导培养基重悬, 使培养基  $OD_{600}$  分别为 20、40、60、80、100, 甲醇含量 1%, 进入诱导阶段, 每 24 h 补甲醇至终浓度 1%, 诱导 96 h, 取样检测 ApoA I 表达情况。

## 1.5 发酵罐培养

培养基: BMGY, 其中甘油 2%。

一级种子液: 挑取新鲜单菌落接入含 40 mL BMGY 摇瓶, 摇床培养 24 h。

二级种子液: 一级种子液以 5% 的接种量接入含 40 mL BMGY 的 250 mL 摇瓶, 摇床培养 12~13h, 作为发酵罐种子液。

发酵罐有效容积 14 L, 装入培养基 6 L, 加入适量泡敌, 115 $^{\circ}$ C 灭菌 25 min。

参数设置: 温度: 30 $^{\circ}$ C, pH 7.0, 溶氧 DO: 35%, 搅拌: 250~800r/min。

按发酵罐工作体积的 10% 接入二级种子液, 开始溶氧在 90% 左右。随着菌体迅速增长, 溶氧缓慢下降, 到 35% 左右搅拌-溶氧关联起作用, 随着菌体耗氧量的增加所需的搅拌速度也逐步增加, 到搅拌速度达到 800r/min, 关闭溶氧-搅拌关联系统, 当溶氧陡然升高至 90% 以上, 表明培养基内甘油耗尽, 开始补加 50% 甘油, 补料速度以维持溶氧在 35% 为宜。4h 后停止补料待甘油耗尽维持饥饿状态 1 h 左右, 开始补 100% 甲醇进入诱导阶段。

## 1.6 分析方法

菌体生长情况监测: 在菌体生长阶段, 隔一定时

间取样测菌体湿重。

**表达蛋白的检测:**通过 10% 或 12.5% 的 SDS-PAGE 检测。取诱导阶段发酵液 1 mL, 离心 (12,000 r/min, 5 min) 取上清 50  $\mu$ L, 加样品处理液 50  $\mu$ L, 100  $^{\circ}$ C 处理 5 min。用进样器吸取 15  $\mu$ L 或 30  $\mu$ L 上样, 电泳结束后用考马斯亮蓝染色。Western-blot 鉴定: 操作按 Western-blot 试剂盒要求。其中一抗为兔抗人 ApoA I 抗体, 二抗为 anti-rabbit 抗体。

**蛋白表达量计算:**上清液经分离、纯化、冷冻干燥, 根据发酵液体积计算蛋白表达量。

## 2 结果

### 2.1 $G_{418}$ 高抗性转化子筛选

用电转化法将表达质粒 pPIC9K-apoA I 转入 GS115 电感受态细胞后, 在 MD 平板上获得 1000 余个酵母转化子。将酵母转化子依次用含 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL  $G_{418}$  的 YDP 平板进行筛选, 最终在含  $G_{418}$  浓度为 4 mg/mL 的 YDP 平板上获得 22 个  $G_{418}$  高抗性转化子。

### 2.2 $G_{418}$ 高抗性转化子摇瓶表达 ApoA I

22 个  $G_{418}$  高抗性转化子经摇瓶发酵和甲醇诱导, 将其上清液用 SDS-PAGE 检测, 上样量 40  $\mu$ L, 结果 6 个转化子 (1、3、4、13、16、22) 的样品在 20 kD 和 31 kD 之间有明显的条带 (图 2), 其余重组菌株在该处条带较淡或没有。而 GS115 对照菌的发酵上清液在该处则无条带。选其中 16 号作为以后的实验菌, 菌编号为 AP16。

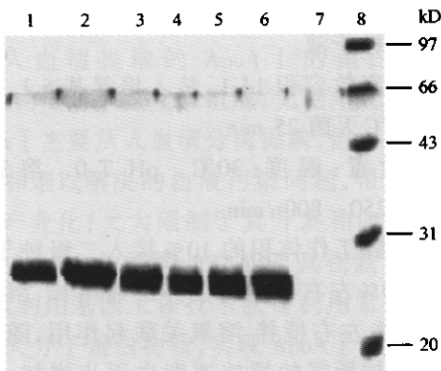


图 2 高表达菌株的筛选

Fig.2 Screening of high expression recombinant strains

1~7: 22, 16, 13, 4, 3, 1 and control strains;  
8: protein marker

### 2.3 Western blot 鉴定

SDS-PAGE 电泳经转膜反应、分别与一抗 (兔抗人 ApoA I 抗体)、二抗 (抗兔抗体) 反应、显色反应,

Western blot 鉴定结果见图 3, 表明重组菌表达的蛋白是人载脂 ApoA I 蛋白。

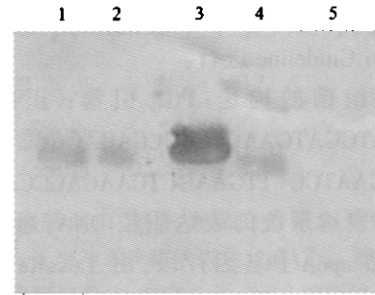


图 3 重组表达 ApoA I 的 Western-blot

Fig.3 Western-blot of recombinant ApoA I

1: flask sample; 2: fermentor sample;

3: human plasma sample; 5: control strain sample

### 2.4 菌龄对 ApoA I 表达的影响

接种后菌体随着时间延长而增加, 菌体的积累有利于表达产量的提高, 但生长时间的延长会导致菌体老化而不利目的产物表达, 从图 4 可见, 接种后生 28 h 进入诱导阶段, ApoA I 表达效果较好。

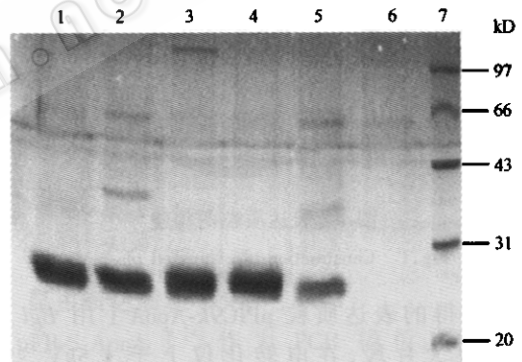


图 4 生长时间对 ApoA I 表达的影响

Fig.4 Effects of growth time on expression

1~6: growth time 16h, 24h, 28h, 32h, 40h, 48h; 7: protein marker

### 2.5 诱导起始 pH 对 ApoA I 表达的影响

*P. pastoris* 代谢过程中因消耗碳源产生有机酸而使 pH 降低, 而酸性环境不利于细胞的生长和外源基因的表达, 因而 pH 升高有利于中和菌体代谢过程中产生的酸而有利于生长和表达。由图 5 可见, 诱导培养基起始 pH 低于 6.5 和高于 7.5 均不利于 ApoA I 表达, 在本实验条件下 pH 为 7.0~7.5 时表达效果较好。

### 2.6 诱导时间对 ApoA I 表达的影响

目的蛋白的表达和分泌有一累积过程, 但同时菌体会产生水解蛋白酶破坏产物, 不同的目的蛋白、不同的表达系统、不同的表型达到最高表达量的时间不同。因此进入诱导阶段后要监测目的蛋白的表

达情况,由图5可见,AP16在72h已有相当量的目的蛋白表达,随着时间延长,表达量增加,84h、96h、120h表达量无明显差别,且表明*P. pastoris*所表达的ApoA I比较稳定。

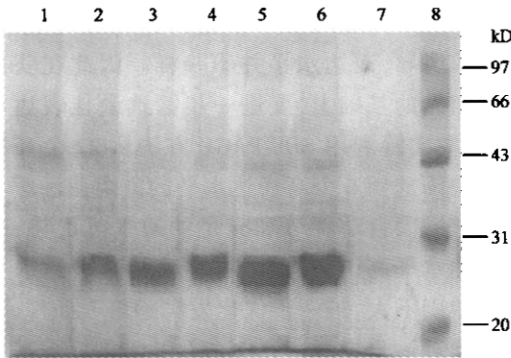


图5 诱导起始 pH 对 ApoA I 表达的影响

Fig.5 Effects of pH on ApoA I expression

1~7: pH of 5.0, 5.5, 6.2, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0; 8: protein marker

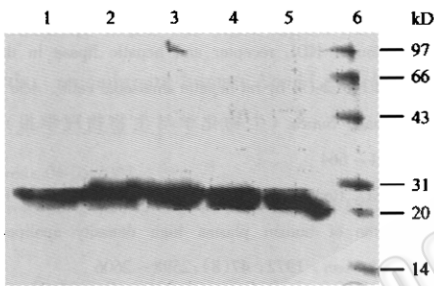


图6 诱导时间对 ApoA I 表达的影响

Fig.6 Effects of induction time on ApoA I expression

1~5: induction time of 72h, 84h, 96h, 120h, 132h, respectively;

6: protein marker

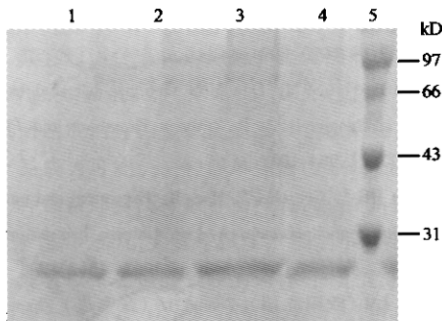


图7 甲醇浓度对 ApoA I 表达的影响

Fig.7 Effects of methanol concentration on expression

1~4: methanol concentration of 2.0%, 1.5%, 1.0%, 0.5%;

5: protein marker

### 2.7 不同甲醇浓度对 ApoA I 表达的影响

诱导阶段,甲醇既作为唯一的碳源又作为诱导剂,其含量直接影响对目的蛋白的表达。由图7可知甲醇含量偏低(低于0.5%)或过高(高于2%)均

对 ApoA I 的诱导表达不利,在本实验条件下甲醇含量 1% 最为适宜。

### 2.8 不同菌体密度对表达的影响

理论上,菌体密度高,目的蛋白表达量高,但供氧量需提高,结果从图8可见,菌体密度直接影响 ApoA I 表达量,OD<sub>600</sub> 低于 60, ApoA I 表达量低,菌体密度高于 80,表达量不仅下降,而且杂蛋白增加,OD<sub>600</sub> 为 60~80(菌重约为 240~300mg/mL)时最有利于 ApoA I 的表达。

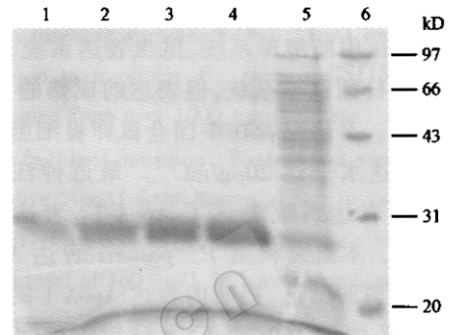


图8 菌体密度对 ApoA I 表达的影响

Fig.8 Effects of cell densities on ApoA I expression

1~5: cell densities (OD<sub>600</sub>) of 20, 40, 60, 80, 100, respectively;

6: protein marker

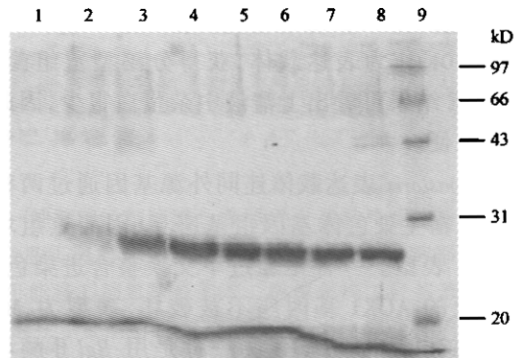


图9 发酵罐内诱导时间对 ApoA I 表达的影响

Fig.9 Effects of induction time on ApoA I expression in 14L fermentation

1~8: various induction time of 0, 36, 48, 60,

72, 84, 96, 108h, respectively; 9: protein marker

在优化的条件下培养重组菌 AP16,甲醇诱导,收集上清液,进行分离和纯化,结果摇瓶内表达量达 160μg/mL,目的蛋白占上清中总蛋白 75% 以上。

### 2.9 发酵罐培养

菌种接入后 12h 左右,开始补加 50% 甘油,4h 后停止补加(菌重约为 150mg/mL),1h 后开始补 100% 甲醇,进入诱导阶段,因重组菌的表型为 *Mut<sup>s</sup>*,甲醇消耗较慢,溶氧下降也非常缓慢,因此甲

醇的流速以保持溶氧呈下降趋势和 pH 缓缓降低的趋势为宜。于诱导阶段不同时间取样做 SDS-PAGE 分析。诱导时间对表达的影响见图 9, 由图 9 可见补加甲醇前, 无 ApoA I 表达, 甲醇诱导 36h 有 ApoA I 表达, 此后随着时间延长表达量增加, 60h 后增势不明显, 因此发酵罐培养诱导 60h 即可, 比摇瓶缩短 24 ~ 36h。上清液经纯化, 表达水平与摇瓶相当。

### 3 讨论

用于重组蛋白的表达系统有大肠杆菌系统、*Pichia pastoris* 甲醇酵母系统、昆虫表达系统, 应用较多的为大肠杆菌原核系统, 但表达的成熟的 ApoA I 易被降解<sup>[5]</sup>。有研究者在中国仓鼠卵巢细胞中表达 ApoA I, 表达水平达 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[6]</sup>。最近钟江等在昆虫杆状病毒表达系统表达了 ApoA I, 表达水平达 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[4]</sup>。本研究利用 *P. pastoris* 表达 ApoA I, 通过对重组菌的筛选、摇瓶内表达 ApoA I 的条件优化, 表达水平达到 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 发酵罐表达水平与摇瓶相当, 是目前国内外所见报道中表达水平最高的。

*P. pastoris* 中外源蛋白的表达有胞内和分泌两种形式, 因 *P. pastoris* 分泌很低水平的内源蛋白, 分泌表达的外源蛋白纯化非常方便。根据 ApoA I 蛋白本身特性, 本实验选用了 *P. pastoris* 的分泌型载体 pPIC9.0K 作为表达载体, 获得分泌型重组菌, 从 SDS-PAGE 结果可看出上清液中杂蛋白很少, 因此分离非常简便。

*P. pastoris* 表达载体连同外源基因通过两种方式整合至宿主染色体基因组基座上, 因而重组均有两种 *Mut* 表型。一种是通过单交换整合进染色体, 染色体上的 AOX1 基因座不被破坏, 表型为 *Mut*<sup>+</sup> (methanol utilization fast)。另一种是用 *Bgl* II 酶切质粒载体, 释放出包含 AOX1 末端序列的表达盒, 与宿主染色体上的 AOX1 基因发生一步置换反应, 宿主染色体上的 AOX1 被破坏, 得到的表达菌株为 AOX1 缺陷型, 即 *Mut*<sup>s</sup> (methanol utilization slow) 表型<sup>[7]</sup>。本实验的整合方式为第二种, 因此得到的转化子绝大多数为 *Mut*<sup>s</sup>。*Mut*<sup>s</sup> 表型消耗甲醇较慢, 对甲醇不敏感, 甲醇的用量直接影响菌体表达 ApoA I, 甲醇残留量高, 产生的甲醛杀死细胞, 因此实验过程中甲醇用量要严格控制, 以利于表达和后续的分离纯化。

外源基因的拷贝数是影响其表达量的重要因素, 同源重组会产生多拷贝的整合, 一般来讲整合的

拷贝数愈多表达量愈高<sup>[8]</sup>。本实验用含  $G_{418}$  的 YPD 平板筛选到 apoA I 基因多拷贝串联的转化子。但有时单拷贝和多拷贝对表达并没有影响, 或同样的拷贝数表达水平并不一致, 本实验通过  $G_{418}$  从 1000 多个转化子中筛选到 22 个  $G_{418}$  高抗性转化子, 将它们用甲醇诱导, 表达水平并不一样。因此在获得高抗性重组菌的基础上, 要进一步筛选最佳表达水平的菌株, 本实验利用 SDS-PAGE 方法从 22 个高抗性转化子中筛选到 6 个高表达水平的重组菌。

发酵罐因自动调节和充足的通气等优势, 一般情况表达水平高于摇瓶, 但本实验摇瓶表达水平与发酵罐差别不大, 进一步优化发酵罐培养条件, 表达水平有望进一步提高, 为 ApoA I 工业化打下基础是我们今后的目标。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Wei Q (魏强), Wu MP (吴满平), Chen PW (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, 6 (28):661 - 664
- [2] Samuel EL, Ronald H, Richard IS. The influence of lipid on the conformation of human plasma high density apolipoprotein. *J Biological Chem*, 1972, 47(8):2598 - 2606
- [3] Li HZ (李洪钊), Li LZ (李亮助), Sun QM (孙强明). Strategies for Optimizing *Pichia pastoris* expression system. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2003, 43(2):288 - 293
- [4] Zhu YE (朱耀娥), Xu HB (徐慧斌), Zhao ZA (赵志安). Expression of human apolipoprotein A-I in baculovirus-insect Cell system. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, 19(6):692 - 697
- [5] Ryan RO, Forte TM, Oda MN. Optimize bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expression and Purification*, 2003, 27(1):98 - 103
- [6] 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
- [7] Ouyang LM (欧阳立明), Zhang HZ (张惠展) Zhang SL(张嗣良). Advances in the study of *Pichia pastoris* as a heterologous gene expression system. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2000, 27(2):151 - 154
- [8] Peng Y (彭毅), Yang XC (杨希才), Kang LY (康良仪). Factors affecting expression of heterologous protein in methylotrophic yeast. *Biotechnology Information* (生物技术通讯), 2000, 4:33 - 36

## Expression of Human Recombinant ApoA I in *Pichia pastoris*

FENG Mei-Qing<sup>1</sup> CAI Qin-Sheng<sup>1</sup> SONG Da-Xin<sup>2</sup> ZHONG Jiang<sup>2</sup> WU Man-Ping<sup>1</sup> ZHOU Pei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

<sup>2</sup>(School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** Apolipoprotein AI is an important apolipoprotein in human plasma that has a wide range of physiology and pharmaceutical functions. To obtain large quantity of the protein for research and application, *Pichia pastoris* expression system was first used for high-level expression of recombinant ApoA-I. The cDNA fragment encoding human ApoAI was inserted into expression vector pPIC9K and the resulted plasmid was linearized and used to transform *P. pastoris* GS115 for secretory expression. Twenty-two transformants with high resistance to G<sub>418</sub> were selected from over 1000 transformants. Among the six transformants expressed, recombinant ApoAI was secreted at high level after methanol induction. Western blot analysis indicated that the recombinant ApoAI from *P. pastoris* was similar to those of native ApoAI from human serum in antigenicity and molecular weight. After growth in BMGY for 28 h, recombinant strain AP16, with cell density of 80 at A<sub>600</sub>, was induced for 96h with 1% methanol in BMMY (pH 7.0 ~ 7.5) to achieve an expression level of 160 mg/L in both 250 mL shake flask and 14L fermentation, which was much higher than that of other expression systems.

**Key words** recombinant human ApoAI, *Pichia pastoris*, expression

Received: 04-05-2004

\* Corresponding author. Tel: 86-21-54237431; Fax: 86-21-64225149; E-mail: pzhou@shmu.edu.cn; hstkfq2222@sina.com