

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.05.013

重组人血清淀粉样蛋白分离纯化及稳定性研究

唐 艳¹, 王伟颖², 刘永东², 陈文琼^{1△}

(1. 四川省乐山市人民医院, 四川 乐山 614000; 2. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190)

摘要:目的 建立人血清淀粉样蛋白1单体(HSAA1)的制备方法,并考察其活性及稳定性。方法 利用基因重组技术构建重组HSAA1大肠杆菌工程菌,变性条件下进行层析纯化,透析复性纯化后蛋白,采用酶联免疫吸附法检测复性后SAA1的生物活性,在不同温度及不同pH值的缓冲液中考察其储存稳定性。结果 SAA1在大肠杆菌E. coli中可溶性表达,纯化后蛋白纯度超过95%,透析复性后蛋白二级结构主要为 α 螺旋结构;SAA1质量浓度在0.01~2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度值呈线性关系;SAA1在中性及偏碱性条件下的稳定性高于酸性条件;在pH 8的缓冲液体系中添加25%甘油,室温存放90 d后,SAA1无明显降解。结论 采用原核表达体系,结合变性纯化及透析复性可获得高纯度的重组SAA1,可作为免疫检测的标准品和校准品,也可作为抗原制备相应单克隆抗体及多克隆抗体。

关键词:重组人血清淀粉样蛋白;分离纯化;复性;免疫活性;稳定性

中图分类号:R965;R977.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)05-0059-05

Separation, Purification and Stability of Recombinant Human Serum Amyloid-Like Protein

TANG Yan¹, WANG Weiying², LIU Yongdong², CHEN Wenqiong¹

(1. The People's Hospital of Leshan, Leshan, Sichuan, China 614000; 2. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China 100190)

Abstract: Objective To establish a preparation method of human serum amyloid-like A1 (HSAA1) protein and to investigate its activity and stability. **Methods** The gene recombination technology was used to construct recombinant HSAA1 engineered *Escherichia coli*, which was purified by chromatography in the denatured state and then refolded through dialysis. The biological activity of refolded SAA1 was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the storage stability was investigated in buffers at different temperatures and pH values. **Results** SAA1 was found to be expressed in a soluble way, and the purity of the purified SAA1 protein was more than 95%. The secondary structure of SAA1 refolded through dialysis was mainly α helix. The mass concentration of SAA1 was linear with the absorbance in the range of 0.01–2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. SAA1 was found to be more stable in neutral and alkaline condition than in acidic condition. SAA1 did not degrade significantly after 90 d of storage in pH 8 buffer system with 25% glycerol at room temperature. **Conclusion** Recombinant SAA1 with high-purity can be obtained by prokaryotic expression system, denaturing purification and dialysis renaturation. It can be used as the immunoassay standard and calibrator, and as an antigen for the preparation of corresponding monoclonal antibodies and polyclonal antibodies.

Key words: recombinant human amyloid-like protein; separation and purification; renaturation; immune activity; stability

血清淀粉样蛋白A(SAA)主要由肝细胞分泌,是血液循环中参与高密度脂蛋白(HDL)运输的一类载脂类蛋白^[1],在不同脊椎动物中编码SAA的基因具有高度同源性^[2]。编码人血清淀粉样蛋白(HSAA)的基因组有4种,分别为ssa1, ssa2, ssa3, ssa4。其中,ssa1和ssa2基因编码功能蛋白为SAA1和SAA2,ssa4基因编码重要的

结构蛋白为SSA4,而ssa3为不表达蛋白的假基因^[3]。成熟的人SAA1单体(HSSA1)由104个氨基酸组成,相对分子质量为12 000^[4],其二级结构由4个 α 螺旋和1个C端尾巴构成^[5]。除参与脂质代谢和运输外,SAA在细菌清除、炎症调节、肿瘤发生等生理过程中发挥着重要作用。作为机体内的一种重要调节素,SAA1不仅能结合

第一作者:唐艳,女,大学本科,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)366597050@qq.com。

[△]通信作者:陈文琼,女,大学本科,主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)chenwenqiong2018@163.com。

796-803.

[32] 纪 纲. 荷叶黄酮营养品配方的减重作用及其机制的实验研究[J]. 广州体育学院学报,2017,37(5):71-74.

[33] 张 明,陈 珍. 山楂黄酮提取物降血脂研究[J]. 安徽农业科学,2016,44(16):109-110.

[34] 刘北林,董继生,倪小虎,等. 山楂黄酮提取及降血脂研究[J]. 食品科学,2007,28(5):324-327.

[35] 高 莹,肖 颖. 山楂及山楂黄酮提取物调节大鼠血脂的效果研究[J]. 中国食品卫生杂志,2002,14(3):14-16.

[36] 姚 园,崔丽贤,刘素稳,等. 山楂功能成分及加工研究进展[J]. 食品研究与开发,2017,38(15):211-215.

[37] 于 浩. 荷叶饮料主剂工艺及特性研究[D]. 天津:天津科技大学,2009.

(收稿日期:2021-05-12)

视黄醇抵抗细菌感染^[6],还能有效促进中性粒细胞和巨噬细胞对革兰阴性菌的提取和吞噬作用^[7]。此外,SAA1也是人体内的一种重要急性期蛋白,在急性炎症反应和免疫调节中发挥着重要作用^[8]。通常情况下,SAA1蛋白在血液内的质量浓度维持在1~3 μg/mL的较低水平,机体受到组织损伤、创伤、感染等炎性刺激后的24 h内,由肝细胞分泌进入血液的SAA1浓度会大幅提高至正常水平的1 000倍,炎症消除后,SAA1浓度又恢复到正常水平。近年来,SAA1常被用作人类炎症性疾病的重要临床指标^[9-10]。SAA在肿瘤的发生、转移和心脑血管疾病的形成中发挥着重要作用^[11],宫颈癌患者体内SAA1和SAA4蛋白含量大量增加^[12],接受表皮生长因子(EGF)受体酪氨酸激酶抑制剂治疗的非小细胞肺癌患者体内血浆的SAA1水平也明显升高^[13],血浆中SAA1升高也是心血管等疾病的重要致病因素^[14-16]。因此,SAA1也被用作肿瘤检测、心血管疾病等的生物标志物,预后及后续治疗效果的判定指标。SAA1蛋白在体内参与了多种疾病的发生与发展,但其发挥作用的机制尚未明确,在体外对于SAA1蛋白功能、检测手段及相关抗体的研究也存在大量问题亟待解决,故制备高纯度、高稳定性的SAA1蛋白尤为重要^[17-20]。本研究中采用大肠杆菌表达系统以可溶形式表达重组HSAA1,利用一步层析纯化,成功获得了纯度大于95%的SAA1蛋白,并初步考察其储存的稳定性,为SAA1用于免疫检测试剂盒、标准品及相关抗体的开发提供基础。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂、蛋白与菌株

仪器:Mili-Q型纯水仪器(密理博<中国>有限公司);BT124 S型分析天平(德国Sartorius公司,精度为0.01 g);Mini III型电泳仪(美国Bio-Rad公司);JY98型超声破碎仪(上海测博生物科技有限公司,功率为1 200 W,频率为19.5~20.5 kHz);UV755型紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);J-810型圆二色光谱仪(日本JASCO公司);ÄKTA Purifier 10型层析设备(美国GE Healthcare公司)。

试剂:苯甲基磺酰氟(PMSF,北京索莱宝科技有限公司,批号为20200612);其余试剂均为分析纯。

蛋白:蛋白质Marker(日本Takara Bio公司);HSAA1标准品(南京欧凯生物有限公司,纯度为99%);兔抗人SAA1多抗(金斯瑞生物科技有限公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(Proteintech Group Inc.)。

菌株:大肠杆菌E. coli BL21(DE3)菌株、大肠杆菌DH5α菌株PET28a质粒,购于中美泰和生物科技有限

公司。

1.2 菌种构建

采用全基因合成法合成SAA1氨基酸序列,选用限制性内切酶Xho I和EcoR I,将SAA1基因片段连接至pET28a质粒。将连接产物转入DH5α感受态细胞,涂布于Luria-Bertani(LB)固体培养基(100 μg/mL氨苄青霉素),37℃过夜培养,次日挑取单个圆润菌落,接种于LB培养液中继续培养12 h,取1 μL菌液作鉴定。将测序结果与美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站(<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>)中查到的相应序列进行比对,确定序列正确的重组质粒,转化至表达菌E. coli BL21(DE3)细胞,获得重组工程菌。

1.3 诱导表达与鉴定

将保存的SAA1甘油菌按0.2%接种量接种于50 mL LB液体培养基中(100 μg/mL氨苄青霉素),37℃温度条件下活化过夜培养。将活化后的菌体按1%接种量接种于500 mL LB液体培养基中(100 μg/mL氨苄青霉素),37℃温度条件下扩大培养4 h,于600 nm波长处测定吸光度,吸光度达1.0后加入0.5 mmol/L异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),诱导表达,4 h后采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳技术确定目的蛋白是否表达。

1.4 菌体收集及破菌

用菌体质量10倍体积的破菌液(pH 8.0,20 mmol/L tris-HCl缓冲液)重悬菌体后,将菌体置冰浴中进行超声波破碎,破碎后离心(温度为4℃,转速为12 000 r/min)30 min,分别收集上清液和沉淀,采用SDS-PAGE凝胶电泳技术确定目的蛋白是否可溶性表达。

1.5 层析纯化

层析纯化前,先采用硫酸铵沉淀法对破菌后上清液进行预处理。取破菌后上清液,加入硫酸铵至1.5 mmol/L,于4℃放置30 min,离心(转速为12 000 r/min)30 min,离心后的沉淀用含有8 mmol/L胍的缓冲液重悬,离心(温度为4℃,转速为12 000 r/min)30 min;离心上清液用SP FF阳离子交换层析对重组SAA1进行纯化,缓冲液A为20 mmol/L HAc-NaAc(pH 4.0),缓冲液B为20 mmol/L HAc-NaAc+1 mol/L NaCl(pH 4.0)。纯化时先用缓冲液平衡层析柱,上样结束用缓冲液A进行淋洗,再用100%缓冲液B进样洗脱。收集目的蛋白洗脱峰,透析至20 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.5)中,并采用SDS-PAGE凝胶电泳技术确定纯化后的蛋白纯度。

1.6 蛋白结构表征

采用J-810型圆二色光谱仪分析透析后重组SAA1蛋白的二级结构,检测时蛋白浓度约为0.2 mg/mL,所用比色皿光径为1 mm,扫描波长范围为190~260 nm,

在室温下检测,以相应缓冲液为空白对照,检测样品时扣除空白对照,每个样品重复测定3次,取平均值。

1.7 免疫活性考察

采用酶联免疫吸附(ELISA)法进一步考察纯化并复性后的重组 HSAA1 的活性,并与 HSAA1 标准品进行对比。以购买的 HSAA1 标准品作为标准抗原,实验室纯化的重组 HSAA1 蛋白作为样品抗原,用抗原稀释缓冲液进行稀释,以每孔 0.001 ~ 0.250 μg 的量包被 96 孔板,每孔加入 100 μL 稀释后的抗原溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,倒掉包被液,用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤4次,拍干板子;每孔加入 120 μL 3% 牛血清蛋白,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,以封闭板子上未与抗原结合的位点,倒掉封闭液;用 PBST 洗涤4次,并拍干板子,每孔加入 100 μL 质量浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,倒掉一抗;用 PBST 洗涤4次,拍干板子,每孔加入 100 μL 以 1:1 000 稀释的二抗(以产品说明书为准),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,倒掉二抗;用 PBST 洗涤4次,拍干板子,每孔加入 100 μL 显色液,室温反应 10 min,每孔加入 50 μL 1 mol/L 硫酸溶液终止反应,室温反应 10 min,利用酶标仪于 450 nm 和 630 nm 波长处进行双波长比色。

1.8 稳定性考察

将复性后的 SAA1 分别置换至以下 5 种缓冲液体系中:20 mmol/L HAc - NaAc (pH 4.5), 20 mmol/L PB (pH 7.4), 20 mmol/L Tris - HCl 缓冲液 (pH 8.0), 含有 25% 甘油的 20 mmol/L Tris - HCl 缓冲液 (pH 8.0), 含有 50% 甘油的 20 mmol/L Tris - HCl 缓冲液 (pH 8.0)。将上述 5 种样品置 4 $^{\circ}\text{C}$ 和室温下,分别于 0, 10, 30, 90 d 取样,采用 16% Tricine - SDS - PAGE 凝胶电泳技术确定目的蛋白的降解情况,并考察其不同缓冲条件及温度下的稳定性。

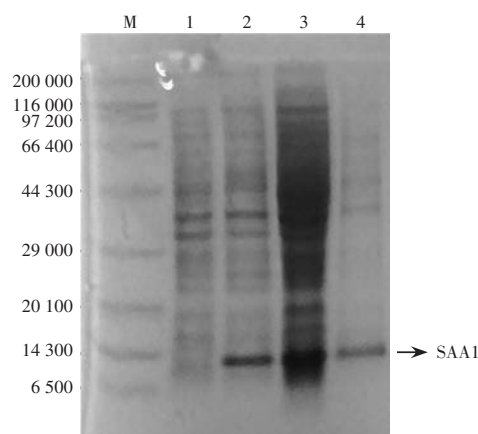
2 结果

2.1 重组 HSAA1 原核表达和鉴定

利用 LB 培养基进行摇瓶培养, IPTG 诱导表达重组 HSAA1, 诱导前后全菌、破菌上清液及沉淀的电泳结果见图 1。SAA1 理论相对分子质量为 12 000, 诱导后的全菌、破菌上清液和破菌沉淀均出现了相对分子量为 12 000 的条带, 但此条带并未在诱导前全菌中出现, 说明构建的重组大肠杆菌能有效表达 SAA1。比较破菌后离心的上清液和沉淀的电泳条带可发现, SAA1 主要存在于破菌后的上清液, 少量存在于破菌沉淀中, 说明重组 SAA1 主要为可溶性表达。

2.2 纯化及表征

首先,在破菌后离心上清液中加入终浓度为 1.5 mmol/L



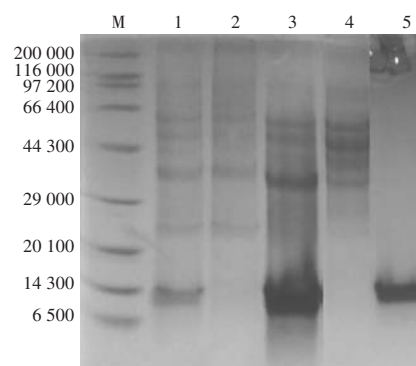
M. 蛋白 Marker 1. 诱导前全菌 2. 诱导后全菌
3. 诱导后破菌上清液 4. 诱导后破菌沉淀

图1 重组 HSAA1 诱导表达及破菌前后 SDS - PAGE 电泳图

M. Protein Marker 1. Whole cell before induction 2. Whole cell after induction 3. Supernatant for cell disruption after induction 4. Precipitation for cell disruption after induction

Fig.1 SDS - PAGE electrophoretogram before and after induced - expression of recombinant HSAA1 and cell disruption

的硫酸铵,对目标蛋白进行富集及初步纯化,电泳结果(见图2条带2)表明,目标蛋白在含有 1.5 mmol/L 硫酸铵溶液中全部沉淀。利用硫酸铵粗纯化,能去除一部分分子量较大的杂质,但效果不明显,仍需进行层析纯化。SAA 在体外未与 HDL 结合,具有形成三聚体、六聚体等低聚物的倾向^[17],多种结构共存不利于直接纯化。故本研究中采用 8 mmol/L 脲重悬硫酸铵沉淀产物,将目标蛋白完全变性为单体后,再进行层析纯化。SP FF 层析纯化结果见图3,杂蛋白主要存在于穿过峰中,利用 NaCl 阶跃洗脱,洗脱峰中重组 SAA1 的纯度在 95% 以上。

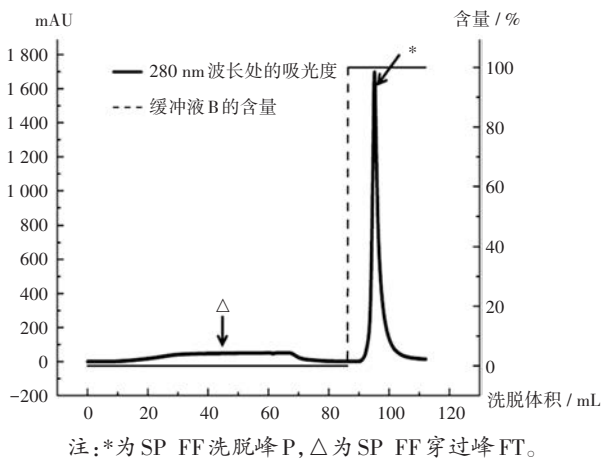


M. 蛋白 Marker 1. 破菌后上清液 2. 硫酸铵沉淀上清液
3. 8 mol/L 脲重悬硫酸铵沉淀 4. SP FF 穿过峰 FT 5. SP FF 洗脱峰 P

图2 SDS - PAGE 电泳图

M. Protein Marker 1. Supernatant for cell disruption 2. Supernatant after ammonium sulphate precipitation 3. Supernatant resuspended with 8 mol/L carbamide after ammonium sulfate precipitation 4. SP FF flowthrough peak F 5. SP FF elution peak P

Fig.2 SDS - PAGE electrophoretogram



注: * 为 SP FF 洗脱峰 P, Δ 为 SP FF 穿过峰 FT。

图3 SP FF层析色谱图(λ = 280 nm)

Note: * refers to SP FF elution peak P, and Δ refers to SP FF peak F.

Fig. 3 Chromatogram of SP FF(λ = 280 nm)

8 mmol / L 脲中的蛋白通常处于变性状态,且无活性,为恢复目标蛋白的二级结构和生物活性,采用截留相对分子质量 3 000 的透析袋在 4 ℃ 条件下对 SP FF 洗脱峰进行透析,以除去洗脱峰中的脲。目标蛋白分别在 HAc - NaAc (pH 4.5) 和 Tris - HCl (pH 8.0) 缓冲液中透析的圆二色光谱图 (见图 4)。可见,2 种缓冲溶液目标蛋白均于 208 nm 和 222 nm 波长处表现出 2 个负的特征肩峰,表明透析到 2 种缓冲液中的目标蛋白均形成了以 α 螺旋为主的二级结构,均能恢复其天然构象^[5]。

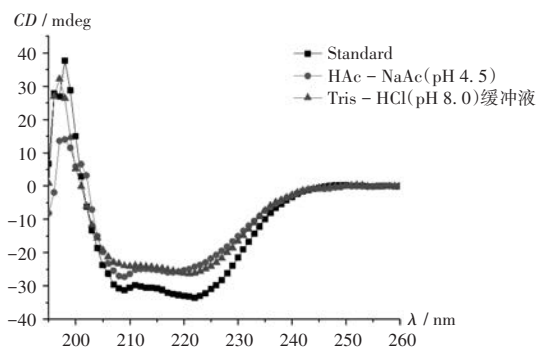


图4 透析复性SAA1的圆二色光谱图

Fig. 4 CD spectroscopy of dialysis refolded SAA1

2.3 免疫活性检测

630 nm 波长处的吸光度值主要用来扣除酶标板的本底吸附,450 nm 波长处的吸光度值才反映实际反应的光吸收值,故仅测定 450 nm 波长处的吸光度。抗原浓度和 450 nm 波长处的吸光度值间的相关性见图 5,结果表明,重组 HSAA1 的质量浓度在 0.01 ~ 2.50 μg / mL 范围内与吸光度值呈线性关系,与 HSAA1 标准品具有相似的线性趋势,且质量浓度为 0.01 μg / mL 时,重组 HSAA 蛋白仍具有与抗体的结合能力,所得 SAA1 具有良好的免疫活性和优异的反应灵敏度,可作为免疫学诊断试剂的标准品,以及用于诱发活体动物产生相应的抗体。

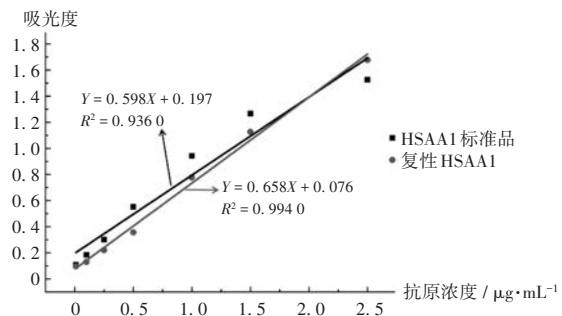


图5 重组 HSAA1 与 HSAA1 标准品免疫活性比较(λ = 450 nm)

Fig. 5 Comparison of immune activity between renatured HSAA1 and HSAA1 standard(λ = 450 nm)

2.4 稳定性考察

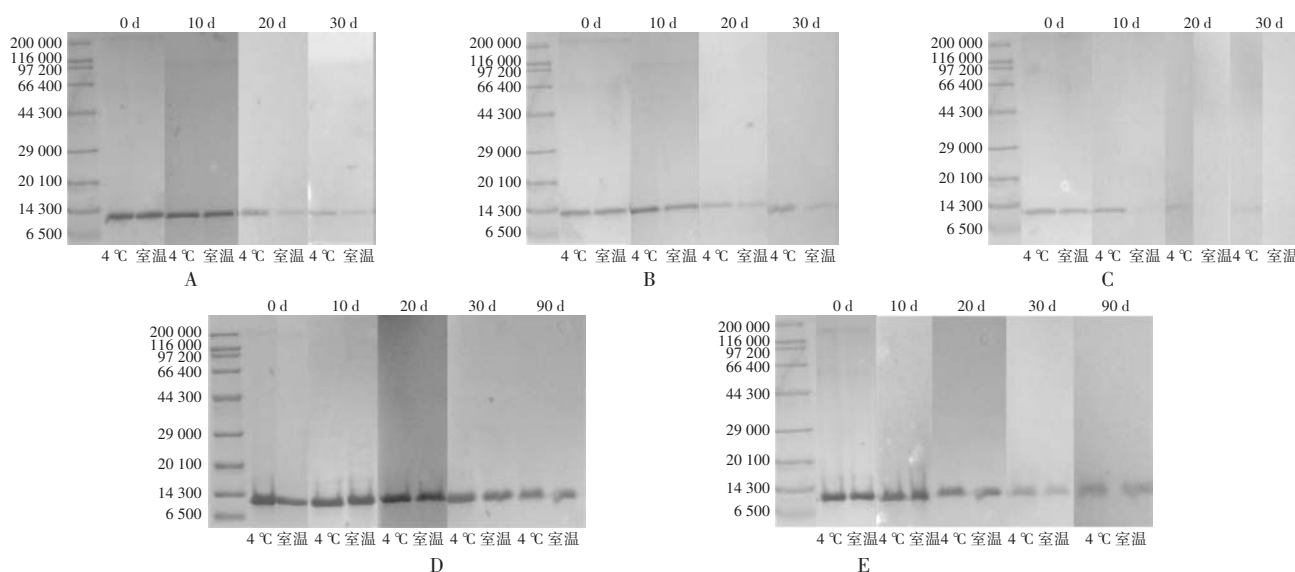
由图 6 可知,pH 值对 SAA1 的储存稳定性有较大影响。在不同 pH 值的缓冲液中,SAA1 在 4 ℃ 的稳定性高于室温,室温存放 10 d 后,SAA1 在 pH 8.0 和 pH 7.4 的缓冲液中无明显降解,但在 pH 4.5 的缓冲液中完全降解,表明 SAA1 在中性及偏碱性条件下的稳定性高于酸性条件;室温存放 30 d 后,SAA1 在 pH 8.0 和 pH 7.4 的缓冲液中也发生明显降解,但 4 ℃ 存放能延缓降解速率。在 pH 8.0 的缓冲液体系中添加甘油能提高 SAA1 的稳定性,添加 25% 甘油 4 ℃ 和室温放置 90 d 后均无明显降解,表明甘油可作为蛋白稳定剂保护重组 SAA1 蛋白不被降解,且 25% 甘油作为稳定剂的效果强于 50% 甘油。

3 讨论

本研究中成功构建了重组 HSAA1 大肠杆菌工程菌,SAA1 主要为可溶性表达;在含脲的缓冲体系中,利用层析纯化能获得 95% 以上纯度的 SAA1;透析复性后 SAA1 的二级结构主要为 α 螺旋结构,表明 8 mmol / L 脲处理的 SAA1 能恢复其天然结构;重组 SAA1 蛋白在质量浓度为 0.01 μg / mL 时仍有较高的抗体结合能力和免疫活性。相较于 pH 4.5 的酸性条件,中性和弱碱性条件更有利于维持 SAA1 的稳定性,加入 25% 甘油有利于重组蛋白在 4 ℃ 和室温条件下长期储存。25% 甘油是维持重组 HSAA1 活性的优良稳定剂。本研究结果为 SAA1 用于免疫检测、标准品制备、临床检测等奠定了良好基础。

参考文献

- [1] MALLEE, DE BEER FC. Human serum amyloid A (SAA) protein: A prominent acute - phase reactant for clinical practice [J]. Eur J Clin Invest, 1996, 26(6): 427 - 435.
- [2] UHLAR CM, WHITEHEAD AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute - phase reactant [J]. Eur J Biochem, 1999, 265(2): 501 - 523.
- [3] O'BRIEN KD, CHAIT A. Serum amyloid A: The "other" inflammatory protein [J]. Current Atherosclerosis Reports, 2006, 8(1): 62 - 68.
- [4] DE BUCK M, GOUWY M, WANG JM, et al. Structure and



A. 20 mmol / L Tris - HCl(pH 8.0)缓冲液 B. 20 mmol / L PB(pH 7.4) C. 20 mmol / L HAc - NaAc(pH 4.5)
D. 20 mmol / L Tris - HCl(pH 8.0)缓冲液 + 25% 甘油 E. 20 mmol / L Tris - HCl(pH 8.0)缓冲液 + 50% 甘油

图6 SAA1稳定性考察结果

A. 20 mmol / L Tris - HCl buffer solution(pH 8.0) B. 20 mmol / L PB(pH 7.4) C. 20 mmol / L HAc - NaAc(pH 4.5) D. 20 mmol / L Tris - HCl buffer solution(pH 8.0) + 25% glycerol E. 20 mmol / L Tris - HCl buffer solution(pH 8.0) + 50% glycerol

Fig.6 Results of the stability testing of SAA1

Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration - Dependent Functions During Host Insults[J]. Current Medicinal Chemistry, 2016, 23(17):1725 - 1755.

- [5] LU JH, YU YD, ZHU I, et al. Structural mechanism of serum amyloid A - mediated inflammatory amyloidosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(14):5189 - 5194.
- [6] DEREBE MG, ZLATKOV CM, GATTU S, et al. Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection [J]. Elife, 2014, 3:e03206.
- [7] SHAH C, HARI - DASS R, RAYNES JG. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram - negative bacteria [J]. Blood, 2006, 108(5):1751 - 1757.
- [8] MALLE E, SODIN - SEMRLS, KOVACEVIC A. Serum amyloid A: An acute - phase protein involved in tumour pathogenesis [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(1):9 - 26.
- [9] 周齐洋, 张小燕, 朱婷婷, 等. 人血清淀粉样蛋白 A 的重组表达及免疫学检测标准品的初步研究 [J]. 药物生物技术, 2018, 25(1):21 - 25.
- [10] 宋英林, 赵玉环, 褚春旭, 等. 人血清淀粉样蛋白 A1 原核表达及胶体金检测方法的建立 [J]. 长春理工大学学报(自然科学版), 2016, 39(6):134 - 137.
- [11] LIU CB. Serum amyloid A protein in clinical cancer diagnosis [J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(2):117 - 121.
- [12] DIAMANDIS EP. Identification of serum amyloid A protein as a potentially useful biomarker for nasopharyngeal carcinoma [J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(15):5293.
- [13] REN Y, WANG H, LU D, et al. Expression of serum amyloid A

in uterine cervical cancer [J]. Diagn Pathol, 2014, 9:16.

- [14] MILAN E, LAZZARI C, ANAND S, et al. SAA1 is over - expressed in plasma of non small cell lung cancer patients with poor outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine - kinase inhibitors [J]. J Proteomics, 2012, 76:91 - 101.
- [15] RÖCKEN C, SHAKESPEARE A. Pathology, diagnosis and pathogenesis of AA amyloidosis [J]. Virchows Arch, 2002, 440(2):111 - 122.
- [16] LIEPNIEKS JJ, KLUVE - BECKERMAN B, BENSON MD. Characterization of amyloid A protein in human secondary amyloidosis; the predominant deposition of serum amyloid A1 [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1270(1):81 - 86.
- [17] LACHMANN HJ, GOODMAN HJ, GILBERTSON JA, et al. Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis [J]. N Engl J Med, 2007, 356(23):2361 - 2371.
- [18] WANG LM, COLÓN W. Urea - induced denaturation of apolipoprotein serum amyloid A reveals marginal stability of hexamer [J]. Protein Sci, 2005, 14(7):1811 - 1817.
- [19] 郝雪微, 马 翠, 吴静红, 等. 人血清淀粉样蛋白 SAA1 蛋白的原核重组表达 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(25):4829 - 4833.
- [20] 徐世东, 刘 飞, 阙云超, 等. 人血清淀粉样蛋白 A 的原核表达及抑菌研究 [J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2019, 32(2):196 - 200.

(收稿日期:2021 - 04 - 01;修回日期:2021 - 08 - 09)