

人对氧磷酶 1 在巴斯德毕赤酵母中的表达与纯化

于子桐, 廖一波, 叶燕锐

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 人对氧磷酶 1 (Human Paraoxonase 1, hPON1) 是人体血液中的一种非专一性酯酶, 可以水解多种有机磷化合物, 被认为是一种有机磷农药中毒的解毒剂。为了得到较纯的具有活性的 hPON1, 本文采用巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统, 对 hPON1 进行胞内表达。hPON1 基因经过密码子优化后克隆至 pPICZA 表达载体上, 构建得到 pPICZA-PON1 重组表达质粒, 经线性化后转化至巴斯德毕赤酵母 X33 菌株中, 筛选得到阳性重组菌株。将重组菌株进行摇瓶发酵 120 h, 酶活达 0.15 U/mL。收集发酵液并细胞裂解后, 用 Ni-NTA 整合亲和层析的方法进行纯化, 得到纯化的 hPON1, SDS-PAGE 结果显示表达产物的大小约 37 ku, 与预期的蛋白分子量相符。表达的重组 hPON1 的最适反应温度为 45 °C, 最适 pH 为 9.0。以上结果表明, 本研究成功地表达并得到较纯的有活性的 hPON1 蛋白。

关键词: 人对氧磷酶 1; 巴斯德毕赤酵母; 密码子优化; 胞内表达

文章编号: 1673-9078(2017)7-85-89

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.013

Expression and Purification of Human Paraoxonase 1 in *Pichia pastoris*

YU Zi-tong, LIAO Yi-bo, YE Yan-rui

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Human paraoxonase 1 (hPON1) is a non-specific esterase in human plasma that can hydrolyze various organophosphates, and is considered as an organophosphate pesticide scavenger. In order to obtain high-purity active hPON1, a *Pichia pastoris* expression system was used to conduct intracellular expression of hPON1. The hPON1 gene was codon-optimized and cloned into the pPICZA expression vector to obtain the recombinant plasmid pPICZA-PON1. The recombinant vector was linearized and transformed into *Pichia pastoris* X33, and positive transformants were verified by colony polymerase chain reaction (PCR). Batch fermentation of the recombinant strains was performed in shake flasks for 120 h, and the esterase activity of hPON1 was 0.15 U/mL. Cells were collected and lysed and the recombinant protein was purified by nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) affinity chromatography. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) results showed that the molecular mass of the recombinant hPON1 was approximately 37 ku, consistent with the expected value. The optimal reaction temperature and pH for the expression of recombinant hPON1 were 45 °C and 9.0, respectively. The above results demonstrated that active recombinant hPON1 was successfully expressed, and high purity and active hPON1 was obtained in this study.

Key words: human paraoxonase 1; *Pichia pastoris*; codon optimization; intracellular expression

对氧磷酶 1 (Paraoxonase 1, PON1) 是哺乳动物血液中存在的一种广谱的非专一性酯酶。人的 PON1 (hPON1) 由 355 个氨基酸残基组成, 不含糖的 PON1 相对分子量约为 37 ku^[1]。该酶可以水解不同类型的底物, 其水解活性大致分为三类: 有机磷酸酯、芳香羧酸酯和氨基甲酸酯^[2]。已有研究显示, hPON1 具有抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗糖尿病、抗菌和解救有机磷中毒等作用^[3-7], PON1 也被认为是这些疾病的新的生物标志物^[8]。hPON1 对有机磷中毒的解毒作

收稿日期: 2017-01-26

基金项目: 华南理工大学中央高校基本科研业务费 (2014ZM0056)

作者简介: 于子桐 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 医药生物学

通讯作者: 叶燕锐 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程、医

药生物学

用也得到了证实, 缺少 PON1 的哺乳动物比野生型动物更易中毒, 而给予纯化的 PON1 能缓解甚至解除有机磷中毒的作用, 因此有人提出可以用 PON1 作为有机磷农药中毒的解毒剂^[9-12]。已有研究证明, PON1 比现有的有机磷解毒剂有更好的解毒作用^[13]。

然而将 hPON1 开发为候选的治疗药物, 还存在一些限制, 主要包括: 较难采用微生物系统表达重组 hPON1 以及野生型的 hPON1 对特定底物水解活性低和纯化后的酶稳定性差等^[15]。已有研究采用大肠杆菌体系表达 hPON1^[11], 大肠杆菌表达系统操作简单, 外源蛋白表达量较高, 但一般以包涵体的形式表达, 需要复性, 且蛋白质的折叠常常存在问题, 而巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达体系作为一种真核生物的表达系统, 相对于大肠杆菌有很多优点。巴斯德毕

赤酵母表达系统是 20 世纪 80 年代发展起来的一种高效的外源蛋白表达系统^[16], 是目前运用最为广泛的基因工程酵母表达系统, 能以甲醇作为唯一碳源的微生物。毕赤酵母表达系统既具有原核表达系统的易培养、繁殖快和表达量高等优点, 又具有真核表达系统的外源蛋白翻译后再加工修饰等特点。毕赤酵母表达系统质粒遗传稳定, 表达效率高, 可在胞内合成过氧化酶的微体, 稳定表达量, 适合高密度发酵^[17]。

本研究采用毕赤酵母系统表达具有生物活性的 hPON1, 对其进行纯化并分析其最适温度和最适 pH, 为进一步研究其应用提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

巴斯德毕赤酵母菌株 X33 (*P. pastoris* X33) 和大肠杆菌 DH5 α (*Escherichia coli* DH5 α) 为本实验室保存, pPICZA 质粒购自 Invitrogen 公司。

表 1 本文所用的引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列	用途
PON1-F	CATCGAATTCATGGCCAAGTTGATCGCCT	PON1 基因克隆
PON1-R	GTATGCGGCCGCGCAATTCACAATACAAGG	
5'AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	菌落 PCR 鉴定
3'AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC	

1.2 方法

1.2.1 基因优化与合成

采用金唯智公司的 OptimWiz 软件对 PON1 基因的密码子使用偏好性、GC 含量和 mRNA 二级结构进行优化。优化后基因的合成由金唯智公司完成。

1.2.2 重组质粒的构建与筛选鉴定

以质粒 pUC57-PON1 为模板, 用 5'AOX 和 3'AOX 通用引物为引物进行 PCR 反应扩增 PON1。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环; 第 30 个循环 72 °C 延伸 7 min, PCR 产物经 1% 凝胶电泳鉴定。

pPICZA 质粒和 PON1 的 PCR 产物分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切, 用 T4 DNA ligase 16 °C 过夜连接酶切产物, 然后用 CaCl_2 转化法转入 *E. coli* 感受态, 涂板于 LB (zeocin 终浓度为 25 mg/mL) 平板上, 过夜培养。挑取阳性转化子过夜培养后提取质粒, 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切鉴定, 酶切产物经 1% 凝胶电泳鉴定。将构建好的重组

1.1.2 试剂与培养基

hPON1, 广州复能基因有限公司; 酵母氮源 YNB (Yeast Nitrogen Base), Difco; 蛋白胨、酵母提取物, Oxoid; PMSF, Sigma; 其他试剂为市售国产分析纯。

LB 培养基: 每 100 mL 中含有 1 g 胰蛋白胨, 0.5 g 酵母抽提物, 1 g NaCl (低盐时为 0.5 g), 根据需要添加 zeocin 使终浓度为 25 mg/mL。培养基 YPD (根据需要加 zeocin 使终浓度为 100 mg/mL)、BMGY 和 BMMY 参考 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。

1.1.3 仪器

FluorCham M 凝胶成像分析系统, ProteinSimple; Milli-Q 纯水机, Millipore; 5810R 型高速冷冻离心机, Eppendorf; PB-10 pH 计, Sartorius; 蛋白纯化仪 AKTA purifier, GE Healthcare 公司; XS105 十万分之一天平, Mettler Toledo; Vortex-Genie2 涡旋振荡器, Scientific Industries; Enspire-2300 多功能酶标仪, PerkinElmer。

1.1.4 引物

本文所用的引物如表 1 所示。

质粒 pPICZA-PON1 经 *Sac* I 线性化后, 通过电转化方法转入 *P. pastoris* X33 感受态中。取转化产物涂布于 YPD (zeocin 终浓度为 100 mg/mL) 平板上, 30 °C 培养 48 h, 分别挑取平板上的 PON1 和 X33 单菌落, 用 5'AOX 和 3'AOX 通用引物作为引物, 进行菌落 PCR 鉴定, PCR 产物经 1% 凝胶电泳鉴定。

1.2.3 人对氧磷酶 1 (rhPON1) 的摇瓶发酵与纯化

挑取阳性克隆接种于 BMGY 培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 16~20 h OD₆₀₀ 至 2~6, 8000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 再用 BMMY 培养基重悬细胞, 稀释 OD₆₀₀ 至 0.8~1.0, 28 °C、200 r/min 培养 5 d, 每隔 24 h 添加甲醇至 1% (V/V) 浓度, 从而诱导重组酯酶的表达, 并取 400 μL 发酵液 4 °C、8000 r/min 离心 5 min, 测定重组菌的生长曲线, 同时检测发酵液菌体的酶活力。同时以 X33 作为阴性对照进行同样操作。

发酵液于 4 °C、12000 r/min 离心 3 min, 经酸性玻璃珠裂解后, 利用蛋白纯化仪进行纯化。柱子采用 HisTrap FF Crude 1 mL, 上样量 5 mL, 流速 1 mL/min,

以 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液、0.5 mol/L 氯化钠、500 mmol/L 咪唑(pH 7.4)缓冲液作为洗脱液，每支收集管收集 0.5 mL，每管取 2 μL 样品于 280 nm 处测定吸光度，直至 OD_{280 nm} 回至基线后停止收集，根据 OD_{280 nm} 值将处于同一吸收峰的样品进行合并。

1.2.4 rhPON1 酶活力测定与蛋白分析

采用对硝基苯酚法测定脂肪酶活性，以 4-硝基苯丁酸酯 (pNPB) 作为底物，将其用 DMSO 溶解，终浓度为 100 mmol/L。总反应体系为 202 μL，先将 10 μL 酶液加入到 190 μL、100 mmol/L、pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中预热 3 min，再加入 2 μL、100 mmol/L 底物，在 pH 8.0 37 °C 条件下反应 7 min，以超纯水为空白，用酶标仪于 405 nm 测定其吸光度值，根据标准曲线计算酶活。水解酶活力单位 (1 U) 定义为：在上述条件下，每分钟水解底物 pNPB 所释放出 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。

重组转化子连续诱导培养 120 h，发酵上清液及菌体分别取 5 μL 上样，进行 4~20% SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝 R250 染色，脱色后检测目的蛋白条带，分析重组蛋白分子量。SDS-PAGE 电泳方法参考《分子克隆手册》。

1.2.5 rhPON1 最适温度与最适 pH 研究

为确定温度对酶活的影响，按照方法“1.2.4”，在 pH 8.0 条件下，测定不同温度下 (25、30、35、37、40、45、50 °C) 发酵菌体中 PON1 的酶活力。以超纯水为空白对照，每个样品平行操作三次，绘制温度-酶活力曲线。

为确定 pH 对酶活的影响，按照方法“1.2.4”，在 pH 4.0~10.0 (每隔 1.0 个 pH 单位为一个梯度) 的不同 pH 缓冲液范围内，在 37 °C 条件下，测定在不同 pH 条件下发酵菌体中 PON1 的酶活力。以超纯水为空白对照，每个样品平行操作三次，绘制 pH-酶活力曲线。

1.3 统计分析

每个试验点重复三次测定，采用 Excel 2013 和 GraphPad Prism 6 进行数据分析与处理。

2 结果与讨论

2.1 表达载体的构建

2.1.1 人对氧磷酶 1 (hPON1) 基因的优化

尝试将密码子优化前的 hPON1 在巴斯德毕赤酵母中进行表达，但未得到有活性的 hPON1 蛋白。推测由于 hPON1 是 人源蛋白，其密码子偏好性与本文采用的巴斯德毕赤酵母不同，因此针对巴斯德毕赤酵

母的密码子使用频率对 hPON1 进行了密码子优化(图 1)。优化前 hPON1 对巴斯德毕赤酵母的密码自适应指数 (Codon Adaptation Index, CAI) 为 0.76，优化后提高到 0.86。GC 含量从优化前的 43% 提高到 48%。优化前后的碱基一致性为 73.8%。

Optimized	ATGGCCAAGTTGATCGCCTTGACTTTGTGGGATGGGTTGGCCTTGTCCGTAACAC
Original	ATGGCGAAGCTGATTGGCTCACCTCTGGGGATGGGACTGGCACTTTCAGGAACAC
Optimized	CAGTCTCTTACCAGACCAGATTGAACGCTTTGCGTGGAGTTCAACACGTCGAGTTGCCA
Original	CAGTCTCTTACCAGACCAGCTTAATGCTCTCCGAGAGGTACAACCGTAGAACTTCT
Optimized	AACTGCAACCTTGTCAAGGGAATTGAGACCGTTCCGAGACTTGGAGATCTTGCCTAAC
Original	AACTGTAATTTAGTAAAGGAATCGAACTGGCTCTGAGACTTGGAGATCTGCCTAAT
Optimized	GGTTGGCCTTCATCTCCGCTCCGGTTTGAAGTACCCAGGTATTAAATCTTTCACCCAAAC
Original	GGACTGGCTTCATTAGCTCTGGATTAAGTATCTCGGAATAAGAGCTTCAACCCCAAC
Optimized	TCCCAGGAAAGATTTTGTGATGGATCTTAACGAGGAGGACCTACCGTTTGGAGTTG
Original	AGTCTGGAAAATCTTCTGATGGACTGAATGAAGAGATCCCAACAGTGTGGAAATG
Optimized	GGTATCACCGGTTCTAAGTTCGACGCTCTCCTTCAACCTCACGGTATCTCCACTTC
Original	GGGCTCAGTGGAAAGTAAATTTGATGATCTTCATTAAACCTCATGGGATTAGCAATTC

图 1 hPON1 基因的优化前和优化后序列比较

Fig.1 Alignment of pre- and post-optimization sequences of pPICZA-PON1

2.1.2 重组质粒 pPICZA-PON1 的构建与筛选鉴定

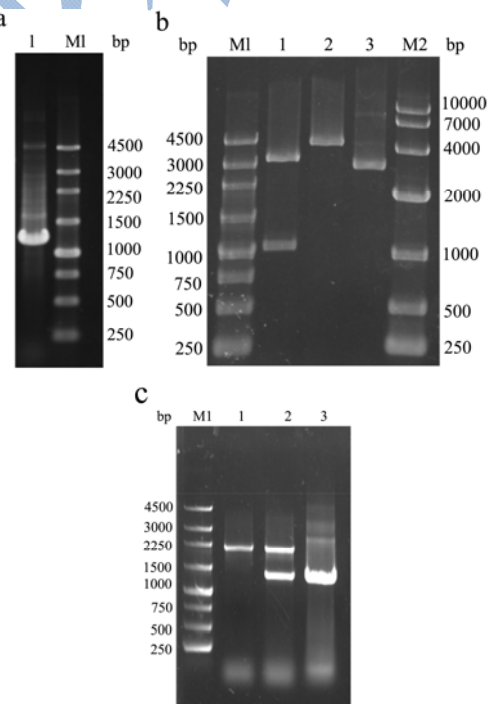


图 2 重组质粒 pPICZA-PON1 鉴定与菌落 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pPICZA-PON1

注：图 a 表示 PON1 PCR 产物；图 b 表示重组质粒 pPICZA-PON1 鉴定；图 c 表示菌落 PCR。图 a 中，1 表示 PON1 PCR 产物；M1 表示 Takara 250 bp ladder。图 b 中，M1 表示 Takara 250 bp ladder；1 表示 pPICZA-PON1, EcoR I+Not I 双酶切产物；2 表示 pPICZA-PON1, EcoR I 单酶切产物；3 表示 pPICZA-PON1；M2 表示 Takara DL 10000。图 c 中，M1 表示 Takara 250 bp ladder；1 表示 X33 菌落 PCR 产物；2 表示 PON1

菌落 PCR 产物; 3 表示重组质粒 pPICZA-PON1 PCR 产物。

按方法“1.2.2”, 扩增 PON1, 取 5 μ L PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, PON1 的 PCR 产物大小在 1000 bp~1500 bp 之间。结果表明: 在约 1300 bp 处有一条明显的扩增带 (图 2a), 与目的基因 PON1 片段大小 (1350 bp) 相符。

挑取 PON1 的单菌落接种于 LB (zeocin 终浓度为 25 mg/mL) 培养基中, 过夜培养后, 提取质粒, 将质粒分别进行 *EcoR* I 单酶切和 *EcoR* I+*Not* I 双酶切鉴定。结果表明: pPICZA-PON1 单酶切产物的大小在 4500 bp 左右 (图 2b), 双酶切产物的大小分别有 3000 bp~4500 bp 及 1000 bp~1500 bp 的条带, 与预期大小相符。

分别挑取 YPD (zeocin 终浓度为 100 mg/mL) 平板上的 PON1 和 X33 单菌落, 用 5'AOX 和 3'AOX 通用引物作为引物, 以 X33 作为阴性对照、重组质粒 pPICZA-PON1 作为阳性对照, 进行菌落 PCR 鉴定。结果表明: PON1 与阳性对照在约 1300 bp 处有一条明显的扩增带 (图 2c), 同 PON1 片段大小 (1350 bp) 相符, 而阴性对照 X33 未扩增出该条带, 确定重组质粒构建 (图 3) 成功。

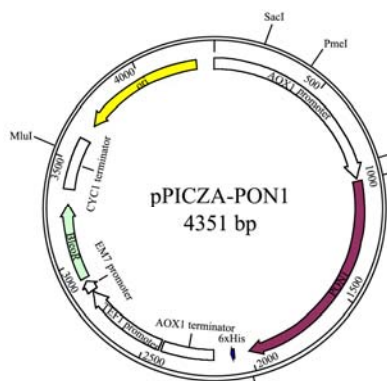


图 3 重组质粒 pPICZA-PON1

Fig.3 Recombinant plasmid pPICZA-PON1

2.2 rhPON1 的诱导表达与纯化

筛选获得的 rhPON1 和对照菌 X33 进行摇瓶培养, 添加终浓度 1% 的甲醇诱导。每隔 24 h 补加 1% 甲醇并取样, 检测 OD₆₀₀ 和酶活 (图 4a), 结果表明: rhPON1 的 OD 值在 96 h 达到最高值 30.98, 其酶活在 120 h 时达到 0.15 U/mL。与文献报道^[18]的大肠杆菌表达的包涵体复性结果进行了比较, 在表达量方面巴斯德毕赤酵母似乎没有优势, 未来可以通过构建多拷贝表达盒的菌株及发酵条件优化提高 hPON1 在巴斯德毕赤酵母中的表达量。分别取 5 μ L X33 发酵菌体 (96 h) 与 rhPON1 (24 h、48 h、72 h、96 h) 的发酵菌体裂

解液、120 h 的发酵菌体裂解液和上清液、120 h 纯化蛋白) 上样, 进行 4~20% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色, 脱色后, 利用 FluorCham M 凝胶成像系统进行分析 (图 4b)。结果显示, 菌体裂解液中的蛋白含量随着发酵时间而增加, 与对照菌株 X33 的菌体裂解液相比, 其胞内蛋白的条带相似, 无法判断 rhPON1 的条带。采用 Ni-NTA 螯合亲和层析对 120 h 的菌体裂解液进行纯化, 得到单一的蛋白条带, 其分子量大小在 30~40 ku 之间, 并接近 40 ku, 与预期的 37 ku 相符, 而发酵液的上清基本未测出酶活, 说明 rhPON1 在酵母细胞内表达, 没有分泌到胞外。Unver Y 等^[19]采用巴斯德毕赤酵母分泌表达 hPON1, 其表达产物大小为 59.1 ku, 大于 hPON1 理论大小, 推测是由于酵母过度糖基化造成。糖基化的存在, 易引起机体免疫反应, 在未来的应用方面面临的问题可能更多。

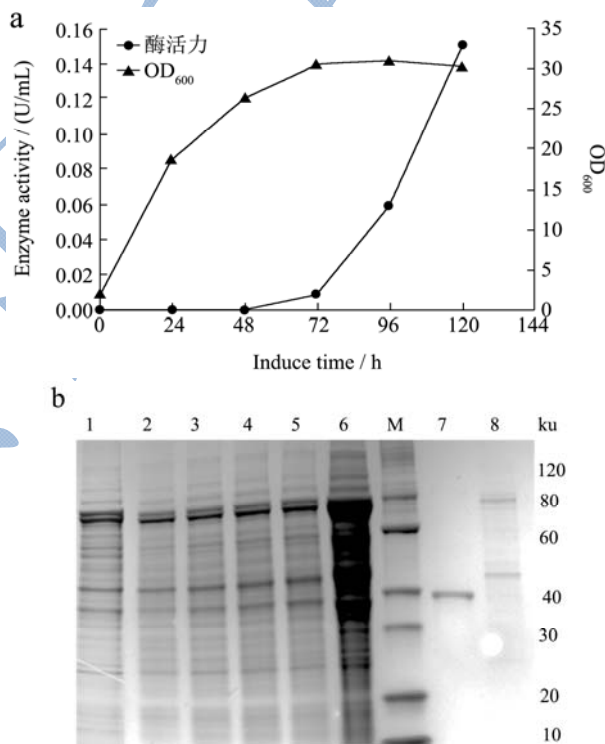


图 4 rhPON1 摇瓶发酵生长曲线、酶活力与 SDS-PAGE 分析
Fig.4 Batch growth curve during shake flask fermentation (OD₆₀₀) and enzyme activity of recombinant PON1 (a) and SDS-PAGE analysis (b)

注: 图 a 表示 rhPON1 摇瓶发酵生长曲线与酶活力; 图 b 表示发酵各取样点与纯化后的 rhPON1 的 SDS-PAGE 分析。1 表示 X33 发酵菌体; 2 表示 24 h 发酵菌体; 3 表示 48 h 发酵菌体; 4 表示 72 h 发酵菌体; 5 表示 96 h 发酵菌体; 6 表示 120 h 发酵菌体; M 表示 Protein Marker; 7 表示 120 h 已纯化; 8 表示 120 h 发酵上清液。

2.3 rhPON1 的最适 pH 和温度研究

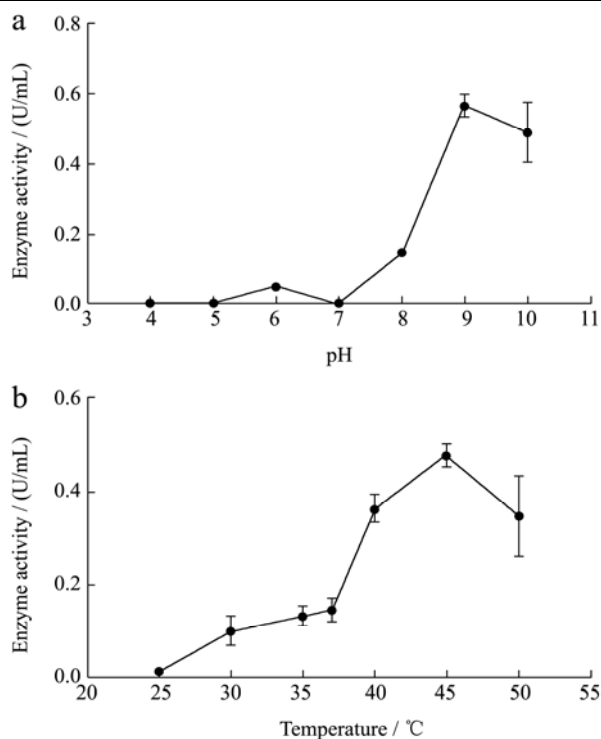


图5 pH与温度对rhPON1酶活力的影响

Fig.5 Effect of temperature and pH on the activity of rhPON1

注: a表示pH对酶活的影响; b表示温度对酶活的影响。

根据方法“1.2.5”,测定pH和温度对rhPON1活性的影响,结果表明:rhPON1在pH 9.0的条件下酶活最高(图5a),酶活力为0.57 U/mL。在pH 4.0~7.0酶活力较低(低于10%),在pH 6.0时,酶活力仅有0.05 U/mL;在pH 8.0时,酶活力为0.15 U/mL,并且在pH 9.0~10.0范围内,可以保持较高的酶活(高于80%)。rhPON1在45 °C的条件下酶活最高(图5b),酶活力为0.48 U/mL。在25 °C时酶活力仅有0.01 U/mL,而在30~37 °C时,可以保持较稳定的酶活力(20%~35%),并且在40~50 °C范围内,可以保持较高的酶活(高于70%)。

3 结论

本文利用基因工程手段及毕赤酵母表达系统,在摇瓶条件下,成功表达出有活性的重组人对氧磷酶1(rhPON1)。在pH 8.0、45 °C条件下,以4-硝基苯丁酸酯为底物,利用对硝基苯酚法测酶活力为0.15 U/mL。rhPON1的最适pH为9.0,酶活力为0.57 U/mL;其最适温度为45 °C,酶活力为0.48 U/mL。

参考文献

[1] Furlong C E, Richter R J, Chapline C, et al. Purification of rabbit and human serum paraoxonase [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(42): 10133

[2] Billecke S, Draganov D, Counsell R, et al. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters [J]. *Drug Metabolism & Disposition*, 2000, 28(11): 1335-42

[3] Camps J, Pujol I, Ballester F, et al. Paraoxonases as potential antibiofilm agents: their relationship with quorum-sensing signals in Gram-negative bacteria [J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2011, 55(4): 1325

[4] Costa L G, Richter R J, Li W F, et al. Paraoxonase (PON1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity [J]. *Biomarkers*, 2003, 8(1): 1-12(12)

[5] Koren-Gluzer M, Aviram M, Meilin E, et al. The antioxidant HDL-associated paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development and stimulates β -cell insulin release [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(2): 510-8

[6] Shih D M, Gu L, Xia Y R, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis [J]. *Nature*, 1998, 394(6690): 284-7

[7] Boshtam M, Razavi A E, Pourfarzam M, et al. Serum paraoxonase 1 activity is associated with fatty acid composition of high density lipoprotein [J]. *Disease Markers*, 2013, 35(4): 273-280

[8] Zhou C, Cao J, Shang L, et al. Reduced paraoxonase 1 activity as a marker for severe coronary artery disease [J]. *Disease Markers*, 2013, 35(2): 97-103

[9] Costa L G, McDonald B E, Murphy S D, et al. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 1990, 103(1): 66-76

[10] Wang N N, Dai H, Yuan L, et al. Study of paraoxonase-1 function on tissue damage of dichlorvos [J]. *Toxicology Letters*, 2010, 196(2): 125-32

[11] Stevens R C, Suzuki S M, Cole T B, et al. Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(35): 12780-12784

[12] Valiyaveetil M, Alamneh Y, Rezk P, et al. Recombinant paraoxonase 1 protects against sarin and soman toxicity following microinstillation inhalation exposure in guinea pigs [J]. *Toxicology Letters*, 2011, 202(3): 203-208

[13] Gaidukov L, Bar D, Yacobson S, et al. *In vivo*, administration of BL-3050: highly stable engineered PON1-HDL complexes [J]. *BMC Clinical Pharmacology*, 2009, 9(1): 18

[14] Zhang L, Chen Y, Jin Y, et al. Genetic determinants of high

- on-treatment platelet reactivity in clopidogrel treated Chinese patients [J]. *Thrombosis Research*, 2013, 132(1): 81-87
- [15] Bajaj P, Tripathy R K, Aggarwal G, et al. Human paraoxonase 1 as a pharmacologic agent: limitations and perspectives [J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 854391-854391
- [16] Damasceno L M, Huang C J, Batt C A. Protein secretion in *Pichia pastoris*, and advances in protein production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 31-9
- [17] Cereghino G P L, Cereghino J L, Ilgen C, et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 329-332
- [18] Bajaj P, Tripathy R K, Aggarwal G, et al. Expression and purification of biologically active recombinant human paraoxonase 1 from inclusion bodies of *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression & Purification*, 2015, 115: 95
- [19] Unver Y, Kurbanoglu E B, Erdogan O. Expression, purification, and characterization of recombinant human paraoxonase 1 (rhPON1) in *Pichia pastoris* [J]. *Turkish Journal of Biology*, 2015, 39(4)