

肺表面活性物质相关蛋白 C 真核表达载体的构建及体外表达

崔晓光 谭晶 李成儒 李文志

【摘要】 目的 克隆人肺表面活性物质相关蛋白 C(SP-C)基因,构建真核表达载体 pcDNA3.1(+)/SP-C,并检测其在体外的表达,为 SP-C 的批量生产提供可靠的方法。**方法** 提取肺癌手术患者病灶周围正常肺组织总 RNA,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术获得 SP-C cDNA 序列。用 NotI 和 XhoI 内切酶双酶切 SP-C cDNA 序列和质粒 pcDNA3.1(+),胶回收后体外连接。酶切和测序后,用脂质体包裹转染人乳腺癌细胞株 MCF-7,采用 RT-PCR 和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 SP-C 的表达。**结果** 能够正确克隆人 SP-C 基因并插入至质粒 pcDNA3.1(+);重组质粒体外转染 MCF-7 细胞后可以表达 SP-C 蛋白。**结论** 采用体外重组技术,成功构建了人 SP-C 真核表达载体 pcDNA3.1(+)/SP-C,并能在体外表达 SP-C,为下一步构建人 SP-C 乳腺特异表达载体,利用乳腺生物反应器大量生产 SP-C 奠定了基础。

【关键词】 肺表面活性物质相关蛋白 C; 真核表达载体; 克隆; 转染; MCF-7 细胞

Construction of eukaryote expression vector carrying human pulmonary surfactant-associated protein C and its expression in vitro CUI Xiao-guang, TAN Jing, LI Cheng-ru, LI Wen-zhi. Department of Anesthesiology, Second Hospital Affiliated to Harbin Medical University; Key Laboratory of Anesthesiology and Critical Care Medicine of Heilongjiang Province, Harbin 150086, Heilongjiang, China
Corresponding author: LI Wen-zhi, Email: wenzhili9@126.com

【Abstract】 Objective To clone human pulmonary surfactant-associated protein C (SP-C) and construct an eukaryote expression vector pcDNA3.1(+)/SP-C, and then to examine the SP-C expression in vitro, which may provide a reliable way of massive production of SP-C. **Methods** The total RNA of normal lung tissue neighboring lung cancer from patients undergoing operation was extracted, and SP-C cDNA was then obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Both SP-C cDNA sequence and plasmid pcDNA3.1(+) were digested with NotI and XhoI, then connected by T4 DNA ligase after recycling agarose. After identification by restriction analysis and DNA sequencing, the recombinant was transfected into human breast cancer MCF-7 cells by using lipofectin reagent, and then the expression of SP-C was examined by RT-PCR and Western blotting. **Results** Human SP-C cDNA could be correctly cloned into the plasmid pcDNA3.1(+), and SP-C protein may be expressed in MCF-7 cells after transfection. **Conclusion** By in vitro recombination, the eukaryote expression vector pcDNA3.1(+)/SP-C was successfully constructed and expressed SP-C in vitro, which rendered preparation for the construction of specific expression vector of human SP-C, and it laid the foundation of massive production of SP-C through mammary gland bioreactor.

【Key words】 Pulmonary surfactant-associated protein C; Eukaryote expression vector; Cloning; Transfection; MCF-7 cell

肺表面活性物质(PS)缺乏、功能障碍或灭活是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的重要发病机制之一^[1]。外源性 PS 补充疗法是治疗 ARDS 的有效措施^[2-3]。目前,外源性 PS 主要从牛和猪肺脏经萃取和透析方法提纯,但这样获得的 PS 缺乏肺表面活性物质相关蛋白(SP),主要是 SP-C,且与人种属差异大,产量有限,价格昂贵,故临床应用受限^[4]。随着转

基因动物技术的飞速进步,利用动物乳腺生物反应器得到 SP,然后与二棕榈酰卵磷脂组成有效的外源性 PS 已成为可能。本研究用分子克隆技术获得 SP-C 基因,并构建高效真核表达载体,为进一步构建 SP-C 乳腺特异表达载体,使用动物乳腺生物反应器生产 SP-C 奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料:正常人肺组织由哈尔滨医科大学附属第二医院胸外科提供;pcDNA3.1(+)质粒、人乳腺癌细胞株 MCF-7 和菌种 DH5 α 均由黑龙江省麻醉与危重病研究重点实验室保存;高保真 DNA 聚合酶 Primestart HS Taq 系列、T4 DNA 连接酶和

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.07.005

基金项目:哈尔滨医科大学重点科技项目(2D2006-07)

作者单位:150086 黑龙江,哈尔滨医科大学附属第二医院麻醉科,黑龙江省麻醉与危重病研究重点实验室

通信作者:李文志,Email:wenzhili9@126.com

NotI、XhoI(日本 Takara 公司);逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(美国 Promega 公司);总 RNA 提取试剂 TRIzol 和脂质体 Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司);琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒和质粒提取试剂盒(上海生物工程技术服务有限公司);RPMI1640 培养基(美国 Hyclone 公司);优级胎牛血清(杭州四季青公司);OPTI-MEM 培养基(美国 Gibco 公司);兔抗人 SP-C 单克隆抗体(单抗,英国 Abcam 公司);5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸/四唑氮盐(BCIP/NBT)底物显色试剂盒(美国 Sigma 公司)。

1.2 实验方法:本研究得到医院伦理委员会批准,获得患者或家属知情同意。

1.2.1 SP-C 基因引物设计与合成:按 GeneBank 中公布的人 SP-C mRNA 序列(NM_003018),用分子生物学软件 Primer Premier 5.0 设计引物。依据真核表达质粒 pcDNA3.1(+)的酶切位点图谱及 SP-C mRNA 序列酶切位点分析图谱,在引物上下游分别引入 NotI 酶切位点(GCGGCCGC)和 XhoI 酶切位点(CTCGAG)及保护性碱基。SP-C 上游引物:5'-TTAGCGGCCGCACCTGCAGCAAGATGGATGT-3';下游引物:5'-TTACTCGAGCGGAGGC GTCCTAGATGTAGT-3';扩增产物大小 594 bp。 β -肌动蛋白(β -actin)为内参照,上游引物:5'-CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT-3';下游引物:5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA-3';扩增产物大小 101 bp。引物由美国 Invitrogen 公司合成,并用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)方式纯化定量。

1.2.2 肺组织总 RNA 提取及 RT-PCR 纯化:取肺癌手术患者病灶周围正常肺组织,用 TRIzol 法提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的量及纯度。按 RT-PCR 试剂盒说明书步骤操作。SP-C 的 RT 反应条件:42 °C 60 min,95 °C 5 min,4 °C 5 min。PCR 反应条件:94 °C 变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 36 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。 β -actin PCR 反应条件:94 °C 变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s,共 25 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。产物纯化按琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒说明书进行。

1.2.3 pcDNA3.1(+)/SP-C 真核表达载体的构建:建立酶切反应体系:35 μ l 质粒 pcDNA3.1(+),35 μ l SP-C 胶纯化回收产物分别加入 NotI 2.5 μ l、XhoI 2.5 μ l、10×H 缓冲液 5 μ l 和 0.1%牛血清白

蛋白(BSA)5 μ l。反应体系为 50 μ l,37 °C 消化 12 h。向上述酶切产物加入 1/10 量的反应终止液以终止反应。琼脂糖凝胶分离目的条带,琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒回收目的条带。建立下列连接反应体系:SP-C 片段 16.5 μ l、线性化的质粒 pcDNA3.1(+) 5 μ l、10×T4 DNA 缓冲液 2.5 μ l 和 T4 DNA 连接酶 1 μ l。反应体系为 25 μ l,16 °C 连接 12 h。构建完成的 pcDNA3.1(+)/SP-C 真核表达载体转化至 DH5 α 菌株内,37 °C 孵箱培养 12 h。鉴定阳性菌落,抽提质粒进行双酶切鉴定和 SP-C 测序。

1.2.4 pcDNA3.1(+)/SP-C 的体外表达

1.2.4.1 pcDNA3.1(+)/SP-C 转染 MCF-7 细胞:按照脂质体 Lipofectamine™ 2000 操作说明书进行,分为 pcDNA3.1(+)/SP-C 转染组、空载体 pcDNA3.1(+)转染组和空白对照组。

1.2.4.2 RT-PCR 检测 SP-C 的表达:转染 48 h 后收集各组培养的 MCF-7 细胞(约 5×10^6 个/ml),按 TRIzol 试剂盒说明书步骤提取总 RNA,并以其为模板扩增 SP-C cDNA 和 β -actin(内参照)。

1.2.4.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 SP-C 的表达:转染 72 h 后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,加入蛋白裂解液,离心取上清液,测蛋白浓度。取蛋白加入等体积蛋白上样缓冲液,煮沸、离心后取上清液,用十二烷基硫酸钠(SDS)-PAGE 分离蛋白,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,脱脂奶粉液封闭。TBST 缓冲液洗膜。加入兔抗人 SP-C 一抗(1:1 000)和 β -actin 一抗(1:200),4 °C 孵育。TBST 缓冲液洗膜后加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:500)和 β -actin 二抗(1:500)孵育,洗膜显色。

2 结果

2.1 肺组织总 RNA 鉴定(图 1):琼脂糖凝胶电泳检测可见 28 s 和 18 s 两条条带亮度清晰,5 s 条带较弱,未见 DNA 等大分子污染条带。紫外分光光度计分析, A_{260}/A_{280} 为 1.952 0。

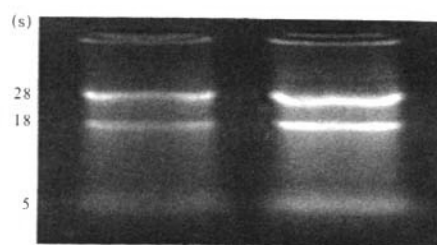
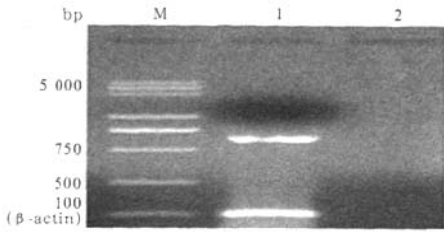


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测正常肺组织总 RNA

2.2 RT-PCR 扩增产物 SP-C 的鉴定(图 2):琼脂

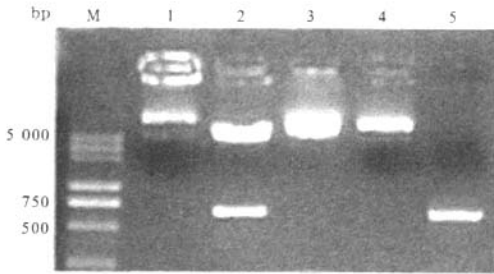
糖凝胶电泳检测所得目的条带在 500~750 bp, 符合 SP-C cDNA 阅读框架的大小。



SP-C:肺表面活性物质相关蛋白 C, M:Marker,
1:扩增产物 SP-C, 2:阴性对照, β-actin:β-肌动蛋白

图 2 人正常肺组织 SP-C 基因的逆转录-聚合酶链反应产物

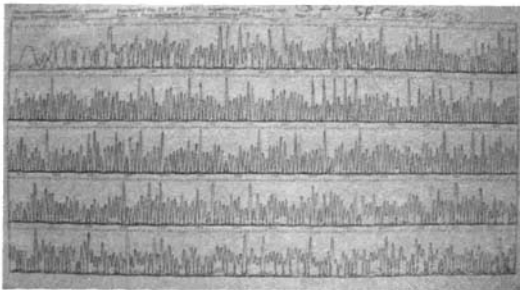
2.3 重组质粒酶切鉴定(图 3):菌落 PCR 筛选出阳性菌落,抽提质粒后进行 NotI 和 XhoI 双酶切,在 5 000 bp 和 500~750 bp 处得到两条条带,与质粒 pcDNA3.1(+)+5 428 bp 和 SP-C 594 bp 相符合。



SP-C:肺表面活性物质相关蛋白 C, M:Marker, 1:重组 pcDNA3.1(+)/SP-C, 2:重组 pcDNA3.1(+)/SP-C 双酶切, 3:重组 pcDNA3.1(+)/SP-C 单酶切(NotI), 4:质粒 pcDNA3.1(+), 5:重组 pcDNA3.1(+)/SP-C 菌落

图 3 聚合酶链反应进行 pcDNA3.1(+)/SP-C 酶切鉴定

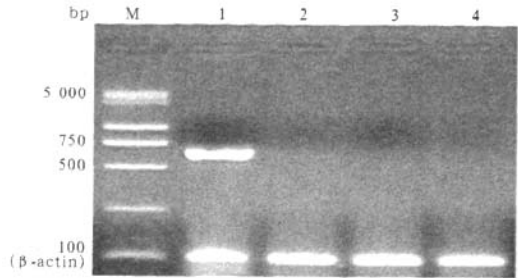
2.4 重组质粒的测序(图 4):将阳性克隆送至美国 Invitrogen 公司,采用双脱氧链末端终止法进行测序,测序结果用生物学软件进行比对。结果显示,重组质粒中插入基因长 594 bp,为一开放阅读框架,与 GeneBank 中公布的人 SP-C cDNA 序列完全相符,说明本实验已正确获得 SP-C 基因。



SP-C:肺表面活性物质相关蛋白 C

图 4 双脱氧链末端终止法对 SP-C 的部分测序结果

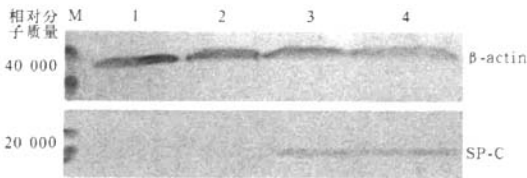
2.5 SP-C 在 MCF-7 细胞中的表达(图 5~6):转染 48 h 后,RT-PCR 结果显示,pcDNA3.1(+)/SP-C 转染的细胞在 500~750 bp 处出现特异性条带,而空载体 pcDNA3.1(+)+转染的和 MCF-7 细胞未见条带。



SP-C:肺表面活性物质相关蛋白 C, M:Marker, 1:转染 pcDNA3.1(+)/SP-C 的 MCF-7 细胞, 2, 3:MCF-7 细胞, 4:转染 pcDNA3.1(+)+的 MCF-7 细胞, β-actin:β-肌动蛋白

图 5 质粒转染 MCF-7 细胞的 SP-C 逆转录-聚合酶链反应鉴定

转染 72 h 后,Western blotting 结果显示,pcDNA3.1(+)/SP-C 转染的细胞出现 SP-C 特异条带(SP-C 相对分子质量约为 21 000),空载体 pcDNA3.1(+)+转染的和 MCF-7 细胞未见条带。



SP-C:肺表面活性物质相关蛋白 C, M:Marker, 1:转染 pcDNA3.1(+)+的 MCF-7 细胞, 2:MCF-7 细胞, 3, 4:转染 pcDNA3.1(+)/SP-C 的 MCF-7 细胞, β-actin:β-肌动蛋白

图 6 蛋白质免疫印迹法鉴定 SP-C 蛋白

3 讨论

PS 通过 SP 起到降低肺泡表面张力,增加肺顺应性,维持大小肺泡容积相对稳定,防止肺不张和肺水肿的作用^[5]。目前已知的 4 种 SP(A、B、C 和 D)中 SP-B 和 SP-C 是主要蛋白,其功能是促进磷脂分子扩散,使磷脂快速吸附于气液界面成为单分子层,增加单分子膜的稳定性,提高脂质复合物的表面活性^[6-9]。但是 SP-B 和 SP-C 为疏水性蛋白,大量提取并应用于临床存在许多困难。本研究中利用分子生物学技术首次构建 SP-C 真核表达载体,体外成功表达 SP-C。SP-C cDNA 相对分子质量很小,当插入基因碱基数目较少时有利于载体构建和表达。因此本实验中首先选用 SP-C 作为目的基因,为以后构

建 SP-A、SP-B 和 SP-D 真核表达载体奠定了基础。

获得目的基因的方法有多种,其中之一是通过 RT-PCR 反应获得目的基因 cDNA 片段。采用这种方法不但可以获得较完整的连续编码序列,而且片段的碱基数目较少,容易在宿主细胞中表达^[10]。本研究中,人 SP-C 的 mRNA 序列已知,设计特异的上、下游引物,经 RT-PCR 后获得大量 cDNA 片段。设计时上游引物引入 NotI 酶切位点,下游引物引入 XhoI 酶切位点,当用 NotI 和 XhoI 分别双酶切 SP-C 和 pcDNA3.1(+)后产生两个不同的黏性末端,所以 SP-C 可定向插入至 pcDNA3.1(+)中。本研究中得到的 SP-C 碱基排列基本符合 Kozak 序列,有利于表达载体的构建,转录和翻译效率很高。

本研究中选用的质粒 pcDNA3.1(+)是目前常用的真核表达载体^[11-12]。pcDNA3.1(+)含有表达调控所需的许多元件,包括多克隆位点、真核表达启动子巨细胞病毒(CMV)、终止信号、牛生长激素的 polyA (BGHPolyA)、真核表达抗性标志新霉素抗性基因(neor)、原核复制子和原核选择性基因氨苄青霉素抗性基因(Amp^r),其中 CMV 是一种强效的启动子。此外,pcDNA3.1(+)还含有 T7 和 SP6 引物序列,便于插入的外源基因测序。

将真核表达载体 pcDNA3.1(+)/SP-C 导入培养的真核细胞内并且检测其瞬时表达情况,是验证载体构建正确性的简单而有效的方法^[13]。外源基因导入受体细胞的关键点是穿过细胞膜屏障和防止外源 DNA 降解。目前已有多种方法可将外源基因导入受体细胞,如物理方法(电穿孔法)、化学方法(脂质体介导法)和生物学方法(逆转录病毒载体法)。本实验中采用的 Lipofectamine™2000 阳离子型脂质体进行转染,具有稳定性好、操作简便、高效和易重复等优点。细胞对阳离子脂质体-DNA 复合物的摄取有胞饮转运和融合穿膜直接转运两种形式。脂质体被用作载体,将各种 DNA 转入细菌、真菌植物原生质和动物细胞,并可以在受体细胞内表达。随着脂质体技术的不断进步,其毒性作用也在逐渐降低。许多实验表明,脂质体本身对细胞或机体不会产生明显的毒副作用^[14],因此,本实验中使用 Lipofectamine™2000 阳离子型脂质体作为转染试剂是安全可靠的。

综上所述,按本研究的方法可成功构建 SP-C 的真核表达载体,并且在真核细胞内能高效表达 SP-C 蛋白。我们下一步即将开展的工作是将山羊 β-酪蛋白调控序列插入至 pcDNA3.1(+)/SP-C

中,构建乳腺特异表达载体,再通过动物乳腺生物反应器生产 SP-C,为临床治疗 ARDS 提供保障。

参考文献

- [1] Pfister RH, Soll RF, Wiswell T. Protein containing synthetic surfactant versus animal derived surfactant extract for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007; CD006069.
- [2] 孙瑜, 黄静霞, 王秋群, 等. 不同剂量猪肺表面活性物质对大鼠油酸型急性肺损伤疗效的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18: 470-473.
- [3] 纪树萍, 张秀玲, 马文旭, 等. 肺表面活性物质替代治疗早产儿肺透明膜病的研究. *中国危重病急救医学*, 2007, 19: 248.
- [4] Seger N, Soll R. Animal derived surfactant extract for treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009; CD007836.
- [5] Willson DF, Thomas NJ, Markovitz BP, et al. Effect of exogenous surfactant (calfactant) in pediatric acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2005, 293: 470-476.
- [6] Tong Q, Zheng L, Dodd-o J, et al. Hypoxia-induced mitogenic factor modulates surfactant protein B and C expression in mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34: 28-38.
- [7] Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*, 2002, 347: 2141-2148.
- [8] 张秋金, 李银平, 黎檀实. 肺泡上皮细胞功能特性与内毒素性急性肺损伤. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 382-384.
- [9] 孙瑜, 夏照帆. 肺表面活性物质治疗急性呼吸窘迫综合征的临床研究. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 379-381.
- [10] Sugiura T, Yamagishi K, Kimura T, et al. Cloning and homologous expression of novel lignin peroxidase genes in the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73: 1793-1798.
- [11] MacColl GS, Novo FJ, Marshall NJ, et al. Optimisation of growth hormone production by muscle cells using plasmid DNA. *J Endocrinol*, 2000, 165: 329-336.
- [12] Moshal KS, Zeldin DC, Sithu SD, et al. Cytochrome P450 (CYP)2J2 gene transfection attenuates MMP-9 via inhibition of NF-kappaB in hyperhomocysteinemia. *J Cell Physiol*, 2008, 215: 771-781.
- [13] Löser P, Hüser A, Hillgenberg M, et al. Advances in the development of non-human viral DNA-vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther*, 2002, 2: 161-171.
- [14] Montier T, Benvegnu T, Jaffrès PA, et al. Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example. *Curr Gene Ther*, 2008, 8: 296-312.

(收稿日期: 2009-12-12)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①广东天普药业: 天普洛安 (封二)
- ②珠海健帆: 血液灌流器 (插页)
- ③天津生化制药: 琥珀氢可 (插页)
- ④廊坊爱尔: 炭肾 (插页)
- ⑤德尔格: Smart Care™智能化自动脱机系统 (插页)
- ⑥恩华药业: 力月西 (插页)
- ⑦第一制药: 克倍宁 (封三)
- ⑧天津红日药业: 血必净注射液 (封底)

作者: 崔晓光, 谭晶, 李成儒, 李文志, CUI Xiao-guang, TAN Jing, LI Cheng-ru, LI Wen-zhi
作者单位: 哈尔滨医科大学附属第二医院麻醉科, 黑龙江省麻醉与危重病学研究重点实验室, 黑龙江, 150086
刊名: 中国危重病急救医学 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE
年, 卷(期): 2010, 22(7)
被引用次数: 0次

参考文献(14条)

1. 纪树萍;张秀玲;马文旭 肺表面活性物质替代治疗早产儿肺透明膜病的研究[期刊论文]-中国危重病急救医学 2007(4)
2. 孙瑜;夏照帆 肺表面活性物质治疗急性呼吸窘迫综合征的临床研究[期刊论文]-中国危重病急救医学 2008(6)
3. 张秋金;李银平;黎檀实 肺泡上皮细胞功能特性与内毒素性急性肺损伤[期刊论文]-中国危重病急救医学 2005(6)
4. Whitsett JA;Weaver TE Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease 2002
5. Tong Q;Zheng L;Dodd-o J Hypoxia-induced mitogenic factor modulates surfactant protein B and C expression in mouse lung 2006
6. Willson DF;Thomas NJ;Markovitz BP Effect of exogenous surfactant (calfactant) in pediatric acute lung injury:a randomized controlled trial 2005
7. Seger N;Soll R Animal derived surfactant extract for treatment of respiratory distress syndrome 2009
8. 孙瑜;黄静霞;王轶群 不同剂量猪肺表面活性物质对大鼠油酸型急性肺损伤疗效的影响[期刊论文]-中国危重病急救医学 2006(8)
9. Moshal KS;Zeldin DC;Sithu SD Cytochrome P450(CYP)2J2 gene transfection attenuates MMP-9 via inhibition of NF-kappabeta in hyperhomocysteinemia 2008
10. Pfister RH;Soll RF;Wiswell T Protein containing synthetic surfactant versus animal derived surfactant extract for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome 2007
11. MacColl GS;Novo FJ;Marshall NJ Optimisation of growth hormone production by muscle cells using plasmid DNA 2000
12. Sugiura T;Yamagishi K;Kimura T Cloning and homologous expression of novel lignin peroxidase genes in the white-rot fungus phanerochaete sordida YK-624 2009
13. Montier T;Benvegna T;Jaffrès PA Progress in cationic lipid-mediated gene transfection:a series of bio-inspired lipids as an example 2008
14. Lser P;Hüser A;Hillgenberg M Advances in the development of non-human viral DNA-vectors for gene delivery 2002

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyxx201007003.aspx

授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: a9415323-9106-44af-98ad-9ede0170a5fe

下载时间: 2011年5月9日