

人肺表面活性相关蛋白 A1 在酿酒酵母中表达、纯化及活性分析

兰和魁^{1*} 封志纯¹ 黄建生² 郑维扬³ 陈丽珊² 淳于利娟² 任大明²

¹(第一军医大学附属珠江医院儿科 广州 510282) ²(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

³(第一军医大学附属南方医院 广州 510515)

摘 要 将编码正常人肺表面活性物质相关蛋白 A1 基因的 cDNA 克隆至酿酒酵母的分泌表达载体 pVT102U/ α 中, 构建了重组质粒 pVT102U/ α -SP-A1 转化酵母宿主菌 S-78, 通过改变培养基的 pH 值水平, 经摇瓶培养, SDS-PAGE 结果显示, 培养上清中 SP-A1 表达量达 400mg/L 以上, 表达产物分子量为 62kD 和 32kD。分别以二聚体和单体形式出现。ELISA 和 Western blot 实验表明表达产物能被抗体特异性识别。生物学活性检测证实它具有调理肺巨噬细胞吞噬 *E. coli* 的功能。

关键词 肺表面活性物质相关蛋白 A1, 酿酒酵母, 表达

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0410-04

人肺表面活性物质相关蛋白 A(Surfactant protein A, SP-A)具有促进磷脂的转化, 维持肺表面活性物质(Pneumonyary surfactant, PS)的正常生理功能、稳定Ⅱ型细胞内外 PS 的水平、保持肺泡腔 PS 处于最佳功能状态, 调节局部免疫和炎症反应^[1-3], 调控其它相关基因的转录^[4]等多种重要的生理功能。目前临床使用的 SP-A 均为动物肺组织和人羊水的提取物, 制备较困难, 价格昂贵, 因此, 通过基因工程手段来制备 SP-A 具有重要的理论意义及潜在巨大的应用价值。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiac*)的使用有数百年的历史, 随着近年对其遗传学、分子生物学及其功能的研究深入, 人们现已成功地应用其表达了许多具有功能的蛋白质。本研究利用酿酒酵母表达系统, 以胞外分泌的方式表达了 SP-A1 蛋白, 并对这种表达蛋白质进行了免疫学和活性鉴定, 为研究肺表面活性物质(PS)和 SP-A 的功能打下基础。

1 材料和方法

1.1 载体、菌株、酶和主要试剂

酵母 S-78(Leu2⁻ura3⁻rep4⁻)表达质粒 pVT102U/ α 由方向东博士惠赠; 大肠杆菌 TG1 及载体 pUC118 由本实验室保存。EcoR I、Hind III、Sal I、Xba I 等限制酶, RNaseA, T4 DNA 连接酶购自 Boehringer Mannheim 和华美生物工程公司; DNA 测序由上海生

工公司完成; 蛋白质次低分子量为生化所东风试剂厂产品; T 载体购自 Gene 公司; Sephadex G-25 和 G-75、Sepharese 4B 为瑞典 Pharmacia 公司产品; 兔抗 SP-A 多克隆抗体由 Wright JA 教授惠赠; SP-A 标准蛋白质由本实验室提取。酵母培养基 Peptone、YNB (W/O)为 Difco 公司产品。

1.2 目的基因片段的扩增

采用 RT-PCR 方法由正常中国人肺Ⅱ型细胞克隆 *spa1* 基因。引物由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物: (+)5'-GCAGAATTCC ATGTGG CTGT GCCCTCTG-3', 引入 EcoR I 位点, 下游引物: (-)5'-GTAGTCTGACTCAGAACTCAC AGATGCTC-3', 引入 Sal I 位点。由重组 pUC118/*spa1* 中扩增目的基因, EcoR I / Sal I 酶切后纯化目的片段。

1.3 酵母重组表达载体的构建

目的载体的限制酶分析与片段的回收: 将表达载体经 Xba I / Sal I 酶切回收大片段, 经纯化试剂盒回收。将目的基因、载体大片段及接头 5'-CTA-GATAAAAGA-3' 和 3'-TATTTTCTTTAA-5' 于 16℃ 连接 12h, 转化 TG1, 涂含氨苄青霉素的 LB 平板, 挑取阳性菌落抽提转化子质粒 DNA, 经 Xba I / Sal I 双酶切鉴定, 筛选重组子。

1.4 DNA 序列分析

用 pVT102U/ α 的 α 因子启动子的上游 DNA-

收稿日期 2000-12-05, 修回日期 2001-04-26。

基金项目 国家自然科学基金(39670770) 广东省自然科学基金(950558) 和国家 863 计划项目资助。

* 联系作者。Tel 86-20-85143731; E-mail: hklan0@yahoo.com 或 lanhk@253.net

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

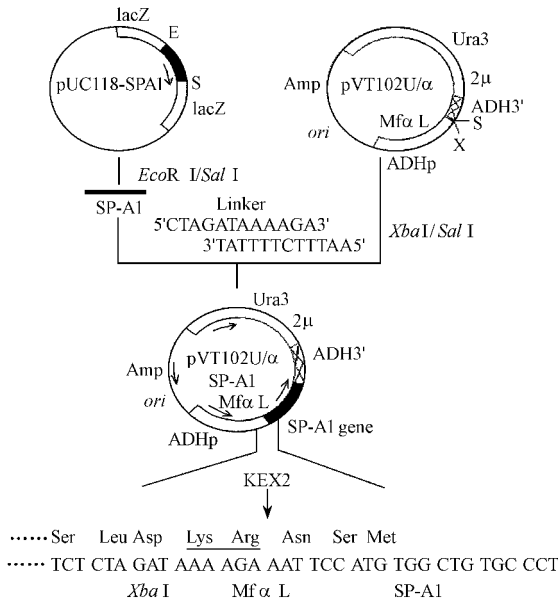


图 1 载体 pVT102U/α-SP-A1 构建及基因融合区内的部分核酸序列

Fig.1 Construction of plasmid pVT102U/α-SP-A1
Ura3. Ura gene ;Ap. β-lactamase gene ;
ADHp. ADH1 gene promotor ;ADH3'. The 3'-region
of ADH1 gene ;MfαL. α-mating factor loading peptide ;
ori. *E. coli* origin 2μ. Yeast origin

40bp 序列(5'-TAAATACTACTATTGCCAGC-3')和 *spa1* 基因 3'端引物扩增 pVT102U/α *spa1* 的 *spa1* 基因 纯化扩增产物 ,克隆于 T 载体用 Sp6 和 T7 双向测序。

1.5 酵母 S-78 感受态细胞的制备与转化

接种酵母 S-78 单菌落于 2mL 酵母丰富培养基 (YPD 酵母提取物 10g、蛋白胨 20g、葡萄糖 20g/L) 中 28℃ 振荡培养过夜。取 100μL 过夜培养液转入 50mL YPD 中 28℃ 振荡培养 12h(A_{600} 为 0.7 ~ 0.8)。1500g × 5min 4℃ 离心 ,收集细胞 ,用灭菌的预冷双蒸水洗涤 2 次。将沉淀细胞重悬于 20mL 的预冷 1mol/L 山梨醇中 ,同前离心后加入 1mL 预冷 1mol/L 山梨醇。取 1μL(约 1μg)质粒 DNA 加至 80μL 感受态细胞 ,移入 0.2cm 的电极杯中 ,置冰浴 5min ,采用电脉冲转化(1500V ,25μF ,200Ω) ,立即加入预冷 1mol/L 山梨醇 1mL ,取 200μL 涂布在酵母选择培养基(YSD 酵母氮碱 6.7g、葡萄糖 20g、肌醇 200mg、腺嘌呤 50mg/L)上置 28℃ 培养 2 ~ 3d 菌落出现。

1.6 重组子的筛选

将 YSD 平板出现的克隆培养 ,抽提质粒 ,做 PCR 鉴定和质粒转化大肠杆菌后 ,提取质粒进行酶切鉴定。

1.7 SP-A1 在 S-78 中的表达及产物纯化

挑选培养基上重组的 S-78 单菌落 ,接种于 2mL

选择培养基(YSD)中 ,30℃ 振荡培养过夜 ,然后取 500μL 过夜菌液接种于 200mL 酵母普通培养基 (YCD 酵母氮碱 6.7g、葡萄糖 20g、酪蛋白水解物 5g、肌醇 200mg、腺嘌呤 50mg/L) 或 YPD 培养基中 ,将 pH 值调至 6.5 ~ 6.7 ,于 30℃ 培养 48 ~ 72h。培养物上清旋转蒸发(冷冻干燥机 Sentry™ VirTis 公司)浓缩至 30mL 经 Sephadex G-25 column 层析柱分批脱盐 ,收集蛋白洗脱液(约 25mL) ,经 Mannose-sepharose 及 Sephadex G-75 column 层析 纯化目的蛋白。

1.8 SP-A 免疫原性检测

按分子克隆^[5]方法进行 ELISA 和 Western blot 检测 ,一抗为兔抗-SP-A 多克隆抗体。

1.9 表达产物初步活性测定

SP-A1 的调理作用 ,测定天然和重组 SP-A 的调理肺巨噬细胞对 *E. coli* 吞噬作用的剂量效应^[6~8]。

1.9.1 鼠巨噬细胞的分离 :肺巨噬细胞按文献 9 ~ 10 报道的方法由无特殊病原体的雄性大鼠中分离 ,重悬在 A 缓冲液[140mmol/L NaCl ,5mmol/L KCl , 2.5mmol/L Na_2PO_4 , 10mmol/L HEPES , 2mmol/L MgSO_4 ,6mmol/L 葡萄糖 ,2mmol/L CaCl_2 ,0.1% 明胶 (wt/vol) ,pH7.4] 终浓度为 10^7 细胞/mL。

1.9.2 SP-A 的准备 :天然猪 SP-A 和重组的 SP-A1 溶解于 5mmol/L HEPES ,pH7.4 ,分成若干份保存于 -70℃ 备用

1.9.3 细菌培养 :*E. coli* J5 分别培养于 LB 培养基中 37℃ 振荡培养过夜 ,常温下离心 3000g × 2min 收集细菌 ,用 A 缓冲液洗涤 3 次 ,离心 2500g × 10min ,A 缓冲液重悬 ,荧光分光光度计测定使其终浓度为 5×10^8 cfu/mL。

1.9.4 细菌杀伤实验 :在有或无 SP-A 和肺巨噬细胞存在时 ,实验其吞噬杀伤活性。采用细菌/巨噬细胞比为 1:1 ,保证细菌被有效地摄取 ,不同剂量 SP-A 加入至混合液中 ,终体积为 200μL ,轻度晃动 37℃ 孵化 30min ,加入预冷的 ddH₂O 中止吞噬和杀伤作用 ,用等体积的 LB 稀释后涂琼脂平板 37℃ 培养过夜 ,计数克隆。

2 结 果

SP-A1 基因的序列分析经 Sp6 和 T7 引物双向测序 ,证实所克隆的 *spa1* 基因读框及序列完全正确 ,*spa1* 基因已与 MfαL 正确融合。转化子的质粒经 PCR 和转化大肠杆菌鉴定发现为正确阳性克隆。

2.1 *spa1* 在酵母细胞中的分泌表达以及纯化

表达蛋白质经 Sephadex G-25 Mannose-sepharose

和 Sephadex G-75 层析得到两条带(62kD、32kD),表达量为 400mg/L。

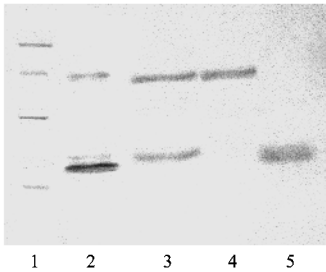


图 2 SP-A1 的 SDS-PAGE(12%)

Fig.2 SDS-PAGE(12%)analysis of the SP-A1 expressed in yeast S-78.

- 1. Molecular weight markers(97kD 66kD 43kD , 30kD 20kD ,14kD) 2. Natural SP-A (pig) ;
- 3. Sample finally purified on Sephadex G-25 column ;
- 4, 5. Sample purified on the Mannose-sepharose column and Sephadex G-75 column ;

2.2 免疫原性的测定

利用 ELISA 方法分别检测天然 SP-A 及基因表达产物的免疫原性 ,可见两反应曲线的特征相似 ,都是典型的 S 型曲线 ,表明 SP-A1 的抗原特性与天然 SP-A 的相同。

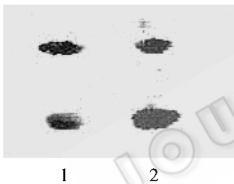


图 3 SP-A 免疫印迹分析

Fig.3 Western blot of SP-A

- 1. Recombinant SP-A1 ; 2. Natural SP-A(pig)

2.3 生物活性的初步测定

37℃ 孵化 30min ,观察在有或无肺巨噬细胞和 SP-A 存在时细菌成活率 ,肺巨噬细胞单独杀伤率为

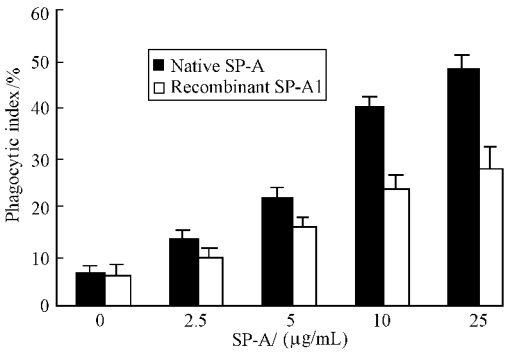


图 4 天然和重组 SP-A 调理吞噬活性

Fig.4 SP-A enhances association of *E. coli* J5 with alveolar macrophages

5.6% ± 2% ,当加入 SP-A 时杀伤效率明显增加 ,而单独 SP-A 对细胞无影响 ,在 S-78 中表达的 SP-A1 具有促进肺巨噬细胞吞噬病原体的功能。

3 讨 论

啤酒酵母是一种单细胞真核生物 ,与传统的大肠杆菌相比 ,它除了具有原核生物生长快 ,便于遗传操作和培养等优点外 ,在糖基化、二硫键形成以及蛋白质折叠等翻译后加工方面具有真核生物特点^[11~12] ,特别是酵母系统拥有一套与高等真核生物相似的分泌系统 ,表达的外源基因产物可以正确加工 ,经催化形成正确的二硫键后分泌到细胞外 ,并且不产生有毒产物 ,因而在表达外源蛋白尤其是真核生物蛋白等方面具有明显优越性。酵母的分泌表达比细胞内表达具有很多优点 :首先是酵母本身分泌的蛋白量很少 ,可使目的基因表达的蛋白的分离纯化工作大大简化 ;其次 ,由于酵母液泡中含有多种蛋白水解酶 ,当细胞裂解时 ,释放的蛋白酶会使表达的蛋白降解 ,而分泌表达可避免这一问题 ;另外 ,分泌表达还可避免产物在细胞内的积累 ,不致影响细胞的正常生长或引起产物降解。我们使用的 pVT102U/α 表达载体利用目前酵母最有效的分泌信号肽-α 交配因子(Mfα I)中的信号肽 ,经各种蛋白酶的后加工 ,分别去除信号肽、Mfα I 前导肽 ,表达出游离的 SP-A1。培养基中 pH 对蛋白酶裂解 SP-A1 的影响研究发现 ,与正常表达的 pH5.6 比较 ,较高 pH 明显降低 SP-A1 的水解 ,分别在 pH 为 5.6、6.5、7.2 和 7.5 时进行研究 ,表明在后两种情况时酿酒酵母很难生长 ,SDS-PAGE 未发现 SP-A1 条带 ,尽管 pH5.6 时细胞生长速率最大 ,但是 pH6.5 时 ,表达的 SP-A1 达最大浓度 ,推测通过调整培养基的 pH 可以减少胞外蛋白酶的作用 ,并尽量地维持蛋白质的生化特性(PI= 4.5 ~ 5.0)。

在还原和变性条件下 ,天然 SP-A 由于修饰不同可见 3 种形态 :26、32、38kD^[13] ,本研究中用 Western blotting 鉴定 ,32kD 和大约 62kD 的表达蛋白质的免疫反应条带与天然的 SP-A 单体和二聚体一致 ,可能二聚体为依赖二硫键的寡聚体。两种形态的蛋白质均与 Mannose-sepharose 亲和柱结合 ,表明蛋白质分子有类似凝集素的特征^[14~15]。本研究所表达的 SP-A1 能促进大肠杆菌 *E. coli* J5 的聚集 ,调理肺巨噬细胞的吞噬作用 ,与报道的 PAP 病人支气管灌洗液提取人 SP-A 单体的作用类似 ,非糖基化 SP-A(大肠杆菌表达重组 SP-A1 资料未显示)无调理活性 ,重组

蛋白质增加肺巨噬细胞对大肠杆菌 J5 吞噬消化 ,有剂量依赖性 ,且有平台 ,可能是通过受体介导的。推测酿酒酵母中重组蛋白质的糖基化与天然 SP-A 类似 ,但多个研究小组的研究表明酿酒酵母糖基化的糖链与哺乳动物细胞不同 ,天然 SP-A 以多聚体形式发挥作用 ,而重组蛋白质以单体或二聚体形式分泌 ,推断因此造成其生物活性低于天然 SP-A。有关重组 SP-A 的功能需作进一步研究。

REFERENCES(参考文献)

[1] Floros J ,Phelps D S ,Kourembanas S *et al* . Primary translation products ,biosynthesis , and tissue specificity of the major surfactant protein in rat. *J Biol Chem* ,1986 **261**(2) 828 ~ 831

[2] LeVine A M ,Bruno M D ,Huelsman K M *et al* . Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* , 1997 **158**(9) 4336 ~ 4340

[3] Kremlev S G ,Phelps D S . Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production. *Am J Physiol* , 1994 **267**(6 Pt 1) 1712 ~ 719

[4] Korutla L ,Strayer D S . SP-A as a cytokine :surfactant protein-A-regulated transcription of surfactant proteins and other genes. *J Cell Physiol* ,1999 **178**(3) 379 ~ 386

[5] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* . 2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989

[6] Van Iwaarden J F ,Pikaar J C ,Storm J *et al* . Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Bio-*

chem J ,1994 **303**(Pt 2) 307 ~ 411

[7] Manz-Keinke H ,Plattner H ,Schlepper-Schafer J . Lung surfactant protein A (SP-A) enhances serum-independent phagocytosis of bacteria by alveolar macrophages. *Eur J Cell Biol* ,1992 **57**(1) 95 ~ 100

[8] Pikaar J C ,Voorhout W F ,Van Gold LMG *et al* . Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages. *J Infect Dis* ,1995 **171**(2) 481 ~ 489

[9] van Iwaarden J F ,Van Strijp JA ,Visser H *et al* . Binding of surfactant protein A (SP-A) to herpes simplex virus type 1-infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A. *J Biol Chem* ,1992 **267**(35) 25039 ~ 25043

[10] van Iwaarden F ,Welmers B ,Verhoef J *et al* . Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* . 1990 **1**(1) 91 ~ 98

[11] Bussey H . Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. *Yeast* ,1988 **4**(1) :17 ~ 26

[12] Romanos M A ,Scorer C A ,Clare J J . Foreign gene expression in yeast :a review. *Yeast* ,1992 **8**(6) 423 ~ 488

[13] Haagsman H P ,Hawgood S ,Sargeant T *et al* . The major lung surfactant protein SP 28 ~ 36 is a calcium-dependent carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* ,1987 **262**(29) :13877 ~ 13880

[14] Strong P ,Kishore U ,Morgan C *et al* . A novel method of purifying lung surfactant proteins A and D from the lung lavage of alveolar proteinosis patients and from pooled amniotic fluid. *J Immunol Methods* , 1998 **220**(1 ~ 2) :139 ~ 149

[15] Day AJ . The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. *Biochem Soc Trans* ,1994 **22**(1) 83 ~ 88

Expression and Characterization of Human Pulmonary Surfactant-associated Protein A1 in *Saccharomyces cerevisiae*

LAN He-Kui^{1*} FENG Zhi-Chun¹ HUANG Jian-Sheng² ZHENG Wei-Yang³ CHEN Li-Shan²
CHUNYU Li-Juan² REN Da-Ming²

¹(Pediatrics of Zhujiang Hospital ,First Military Medical University ,Guangzhou 510282 , China)

²(Institute of Genetics ,Fudan University ,Shanghai 200433 ,China)

³(Nanfang Hospital ,First Military Medical University ,Guangzhou 510515 ,China)

Abstract The cDNA encoding pulmonary surfactant-associated protein A1 (SP-A1) derived from healthy adult 's lung was cloned into the pVT102U/α ,expression vector of *Saccharomyces cerevisiae* which contains the yeast α-factor signal sequence leading to the secretion of expressed protein and then transformed into *Saccharomyces cerevisiae* S-78(leu2 ,ura3 ,rep4) by electroporation .After 2 ~ 3 days culture in adequate pH ,the expressed SP-A1 accumulated up to 400mg/L in supernatant .The pure proteins were obtained by Sephadex G-25 ,G-75 ,Sephadex 4B .The expressed recombinant products 62kD and 32kD reacted to specific antibody using ELISA and Western blot .The SP-A1 protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae* was efficient in enhancing the phagocytosis of *E . coli* J5 by alveolar macrophages .

Key words SP-A1 , *Saccharomyces cerevisiae* , expression

Received : December 5 2000

This work was supported by grant from the National Natural Sciences Foundation of China(39670770) , and Natural Sciences Foundation of Guangdong(950558)

* Corresponding author . Tel 86-20-85143731 ; E-mail :lanhk@263 .net or hklanc@journals .im .ac .cn