

# 肺表面活性物质相关蛋白C原核表达载体的构建、表达及纯化\*

王静, 杜江, 周细中, 刘茹, 沈蔚, 王斌

## Construction, expression and purification of a prokaryotic expression plasmid carrying pulmonary surfactant protein C

Wang Jing, Du Jiang, Zhou Xi-zhong, Liu Ru, Shen Wei, Wang Bin

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have suggested that gene defection leads to the structural change of pulmonary surfactant protein C (SP-C). Early detection of pulmonary surfactants is of great significance for prediction of occurrence of lung diseases.

**OBJECTIVE:** To clone human pulmonary SP-C, to construct a prokaryotic expression vector PET28a/SP-C, and to obtain purified SP-C.

**METHODS:** The total RNA of normal lung tissue was extracted, and SP-C cDNA was then obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction. The purified product of SP-C cDNA was then inserted into PMD-18T vector to obtain recombinant PMD-18T/SP-C. The recombinant plasmid PMD-18T/SP-C was cut by restriction enzymes *Bam* H I / *Hind* III and then purified to become SP-C cDNA with viscous ends, as was PET28a to become a linear plasmid fragment with the same viscous ends as SP-C cDNA. The SP-C cDNA was combined with the PET-28a that had been cut by the enzymes to construct the recombinant plasmid PET-28a/SP-C. The correct PET-28a/SP-C was transformed into BL21 to induce expression.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Two bands were detected at 5 000-7 500 bp and 250-1 000 bp after SP-C cDNA and its recombinant plasmid were identified after *Bam* H I and *Hind* III double digestion. The fragment length of the inserted gene was 597 bp, in consistence with the SP-C cDNA sequence announced by GeneBank. Western-blot analysis showed that the purified SP-C protein had a new band with the expected size at a relative molecular mass of about 27 000. These findings indicate that human SP-C cDNA can be correctly cloned into the PET-28a, with construction of the recombinant plasmid PET-28a/SP-C, and SP-C protein may be expressed in BL21.

Wang J, Du J, Zhou XZ, Liu R, Shen W, Wang B. Construction, expression and purification of a prokaryotic expression plasmid carrying pulmonary surfactant protein C. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(15): 2699-2703. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 研究表明肺表面活性物质蛋白基因缺陷导致肺表面活性物质蛋白的结构发生变化。早期检测肺表面活性物质的含量对于预测肺部疾病的发生意义重大。

**目的:** 克隆人肺表面活性物质相关蛋白 C(surfactant associated protein C, SP-C)基因, 构建原核表达载体 PET-28a/SP-C, 并纯化 SP-C 蛋白。

**方法:** 提取正常人肺组织总 RNA, RT-PCR 技术获得 SP-C cDNA 序列, 纯化后的 SP-C 基因插入至中间载体 PMD-18T, 得到重组质粒 PMD-18T-SP-C, 重组质粒经过 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切后纯化回收得到具有黏性末端的 SP-C cDNA, 将质粒 PET-28a 同样经过双酶切后纯化回收得到与 SP-C cDNA 具有相同黏性末端的质粒片段, 将具有黏性末端的 SP-C cDNA 与 PET-28a 定向连接后得到重组质粒 PET-28a/SP-C。然后将鉴定正确的 PET-28a/SP-C 重组质粒转入 BL21 中诱导表达。

**结果与结论:** 酶切鉴定及核苷酸序列测序证实扩增的 SP-C cDNA 及其重组质粒经过 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后, 在 5 000~7 500 bp 和 250~1 000 bp 处可检测到 2 条条带。核苷酸序列测序结果证实, 质粒中插入基因长 597 bp, 为一开放阅读框架, 与 GeneBank 中公布的人 SP-C cDNA 序列相符。Western-blot 检测结果显示, 纯化后的 SP-C 蛋白在相对分子质量约 27 000 处出现 1 条新生条带, 与预期的大小一致。结果证实, 实验成功克隆人 SP-C 基因并插入至质粒 PET-28a 中, 构建了 PET-28a/SP-C 重组质粒, 将其体外转化至 BL21 后可以表达 SP-C 蛋白。

**关键词:** 肺表面活性物质相关蛋白 C; 原核表达载体; 克隆; 转化; 组织构建

**缩略语注释:** SP-C: surfactant associated protein C, 肺表面活性物质结合蛋白 C

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.009

王静, 杜江, 周细中, 刘茹, 沈蔚, 王斌. 肺表面活性物质相关蛋白 C 原核表达载体的构建、表达及纯化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2699-2703. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

肺表面活性物质结合蛋白 C(surfactant associated protein C, SP-C)是构成肺表面活性物质的小分子疏水性蛋白之一, 具有调节肺泡液-气界表面张力、维持肺表面活性膜的稳定

及参与肺器官局部防御体系等重要的生理功能<sup>[1-6]</sup>。除了 SP-C 结构变化和功能丧失与各种婴幼儿肺部疾病关系密切外<sup>[2-4]</sup>, SP-C 含量与肺发育程度和某些肺部疾病也有关, 所以早期检测肺表面活性物质的含量对于预测肺部疾病的发生意义重大。

实验通过基因工程的方法克隆 SP-C 基因,

Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Wang Jing★, Studying for master's degree, Physician, Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China wuanjunwj@163.com

Corresponding author: Wang Bin, Doctor, Master's supervisor, Chief physician, Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Received: 2012-01-01  
Accepted: 2012-03-07

南方医科大学珠江医院儿科, 广东省广州市 510282

王静★, 女, 1985 年生, 山西省文水县人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 医师。 wuanjunwj@163.com

通讯作者: 王斌, 博士, 硕士生导师, 主任医师, 南方医科大学珠江医院儿科, 广东省广州市 510282

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2012)15-02699-05

收稿日期: 2012-01-01  
修回日期: 2012-03-07  
(20111214009/WJ · W)

表达SP-C蛋白, 进而为SP-C单克隆抗体细胞株的建立和检测试剂盒的制备奠定基础。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察实验。

**时间及地点:** 于2010-05/2011-02在南方医科大学附属珠江医院儿科实验室完成。

**材料:**

**正常肺组织:** 由南方医科大学附属珠江医院胸外科提供。根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》，在实验前将实验方案和风险告知对方，并签署知情同意书<sup>[3]</sup>。

**主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
总 RNA 提取试剂 TRIzol 、限制性内切酶、T <sub>4</sub> DNA 连接酶及 PMD18-T 载体	美国 Invitrogen 公司
RT-PCR 试剂盒	TaKaRa 公司
Taq 酶, RNase A, SP-C 鼠抗人一抗及羊抗鼠二抗, 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸/四唑氮盐 (BCIP/NBT)	NEB 生物科技公司
底物显色试剂盒	盈信生物技术有限公司
蛋白酶 K	Boehringer Mannheim 公司
DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒	Omega 公司
HIS-tag 表达和纯化试剂盒 (QIAexpressionist™)	
PET28a 质粒, 大肠杆菌 BL21conodonplus [Rosseta],	Qiagen 公司

**方法:**

**肺组织总RNA提取:** 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。

**SP-C基因引物设计与合成与RT-PCR反应:** 按RT-PCR试剂盒说明书步骤操作。首先按GeneBank中公布的人SP-C mRNA序列(NM 003018.3), 用分子生物学软件Primer Premier 5.0设计引物。依据原核表达质粒PET28a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Bam H I 酶切位点(5' GGATCC 3')和Hind III酶切位点(5' AAGCTT 3')及保护性碱基。SP-C上游引物: 5' ATG GAT GTG GGC AGC AAA G 3'; 下游引物5' CCA CTG ACC CTG CTC ACC 3'; 扩增产物大小620 bp。引物由美国Invitrogen公司合成, 并用琼脂糖凝胶电泳方式纯化定量。

**SP-C的RT反应条件:** 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 42 °C 60 min, 95 °C 5 min, 4 °C 5 min。PCR反应条件: 反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s,

72 °C 120 s, 30个循环, 72 °C延伸7 min, 4 °C保存。产物纯化按琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒说明书。

**T-A克隆:** 取3 μL经过胶回收纯化的目的基因, 按PMD18-T载体试剂盒说明书进行T载体克隆。反应体系: 将上一步所得的3'加A的SP-C cDNA 3 μL、PMD18-T载体1 μL, 去离子水1 μL及Solution 5 μL混合, 16 °C过夜连接。转化至感受态大肠杆菌DH5α中, 加入800 μL无抗生素的LB液体培养基中培养2 h, 取50 μL涂布平板后(加入X-Gal, IPTG, Amp), 37 °C过夜培养<sup>[6]</sup>。

**重组质粒提取与双酶切:** 用无菌牙签挑取上述培养板中的白色单菌落, 于50 μg/L Amp的LB液体培养基中培养6 h。取3 mL过夜培养的菌液, 离心8 000 r/min, 离心30 s, 弃上清, 收集菌体, 按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒, 送测序, 测序正确后命名为PMD-18T/SP-C, -20 °C保存备用。取50 μL重组质粒采用Bam H I 和Hind III双酶切使目的基因带有2个黏性末端, 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳观察酶切效果, 按照DNA快速回收试剂盒说明书步骤回收酶切后的目的片段。

**PET-28a/SP-C原核表达载体的构建:** 将表达质粒PET-28a进行同样双酶切并回收酶切产物、取1 μL酶切后的PET28a和3 μL酶切后的目的基因, 及适量T<sub>4</sub> DNA连接酶22 °C过夜连接。连接后的重组质粒转化至大肠杆菌BL21感受态菌中<sup>[7-8]</sup>, 加入800 μL无抗生素的LB液体培养基中培养2 h, 取50 μL涂板(含Kana)后, 37 °C过夜培养。用无菌牙签挑取单菌落于5 mL含50 μg/L Amp的LB液体培养基中培养6 h, 再行质粒提取与双酶切鉴定, 鉴定为阳性重组质粒送基因公司测序, 测序正确后命名为PET-28a/SP-C。

**SP-C的原核表达及检测:** PET-28a/SP-C转化BL21细胞: 分别将质粒PET28a与pET28a/SP-C转化E.coli M15 [pREP4]中, 37 °C培养过夜。培养次日以5%转接于LB培养基中, 37 °C培养2 h后, 取3 mL菌液, 测光吸收值A<sub>600 nm</sub>; 并收集菌体作为诱导表达前的对照, 其余菌液中加入IPTG至终浓度1 mmol/L, IPTG诱导1~5 h后, 分别收集菌体。表达产物用15%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 方法参照QIAexpressionist™操作说明进行。

**蛋白纯化及Western blot法检测SP-C蛋白的表达:** 诱导表达成功后将含有重组质粒PET28a/SP-C的表达菌株接种于200 mL的培养基LB中做大量表达, 所表达蛋白采用Ni-NTA Slurry (agrose) 方法进行纯化。分别将质粒PET28a与pET28a/SP-C转化E.coli M15 [pREP4]中, 37 °C培养过夜。次日以5%转接于LB培养基中, 37 °C培养2 h后, 取3 mL菌液, 测光吸收值A<sub>600 nm</sub>; 并收集菌体作为诱导表达前的对照, 其余菌液中加入异丙基硫代半乳糖苷至终浓度1 mmol/L, 诱导1~5 h后, 分别收集菌体。表达产物用15%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。诱导表达成功后将含有重组质粒PET28a/SP-C的表

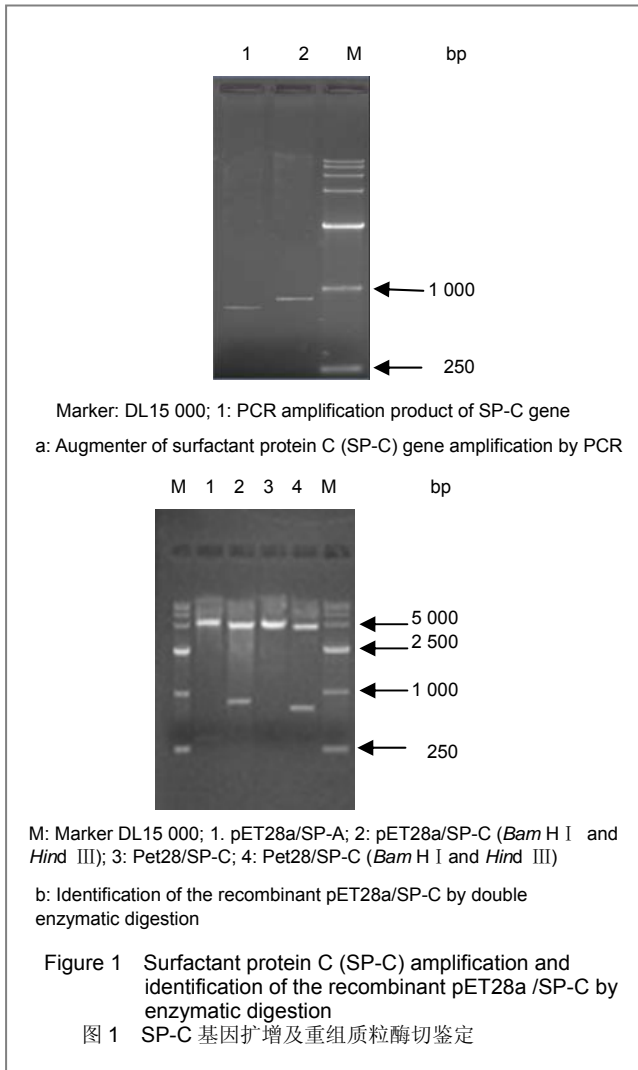
达菌株接种于200 mL LB中做大量表达, 表达蛋白用 Ni-NTA Slurry (agrose) 进行纯化。取含有目的蛋白的细菌裂解上清液(纯化前)和收集的峰值洗脱液(纯化后)行SDS-PAGE检测。

取纯化后的蛋白收集物10  $\mu$ L进行SDS-PAGE分析, 电泳后转印、加入鼠抗人SP-C一抗(1:500), 4  $^{\circ}$ C孵育。TBST缓冲液洗膜后加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠IgG (1:500), 洗膜显色。

**主要观察指标:** 聚合酶链反应扩增产物的鉴定结果, 重组表达载体的酶切鉴定结果及Western-blot鉴定结果。

## 2 结果

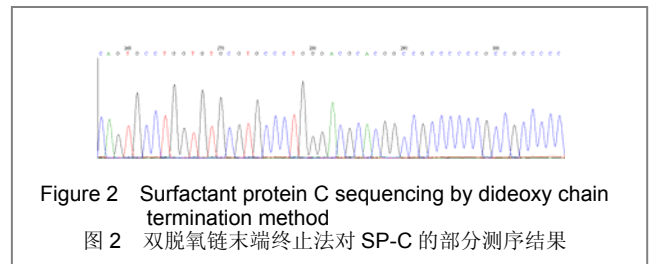
### 2.1 SP-C cDNA的PCR扩增及重组质粒的酶切鉴定结果 见图1。



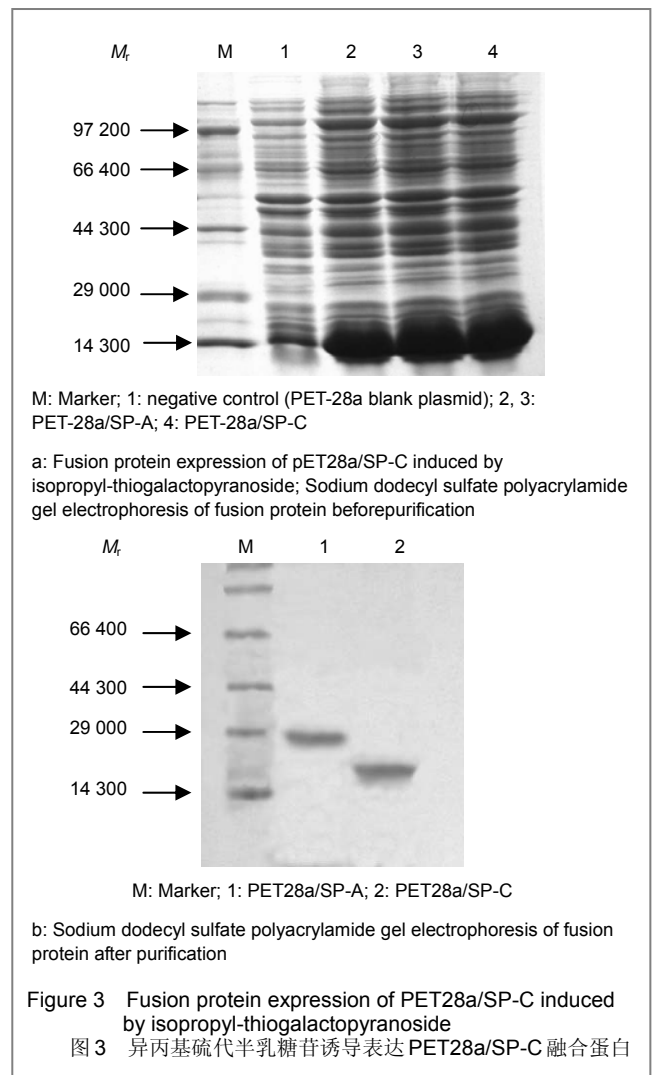
以总RNA经过反转录得到的cDNA为模板, 经正反链引物PCR后, 行2%琼脂糖凝胶电泳, SP-C cDNA可见扩增出约620 bp的条带。见图1a。先后将PMD-18T/SP-C和PET-28a用*Bam* H I和*Hind* III双酶

切后行2%琼脂糖凝胶电泳分别回收SP-C片段及PET-28a线性片段, 然后将带有2个黏性末端的SP-C双链克隆至PET28a中, 连接产物转化*E.coli* M15 [pREP4]中, 后经过*Bam* H I和*Hind* III双酶切鉴定, 在5 000~7 500 bp和250~1 000 bp处得到2条条带, 与质粒PET28a(5 300 bp)和SP-C(597 bp)相符合, 见图1b。

**2.2 PET28a/SP-C的核苷酸序列测定结果** 将阳性质粒进行纯化, 送至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。分析证实质粒中插入基因长597 bp, 为一开放阅读框架, 与GeneBank中公布的人SP-C cDNA序列相符, 说明实验已正确获得SP-C基因并成功克隆至PET28a质粒内, 见图2。

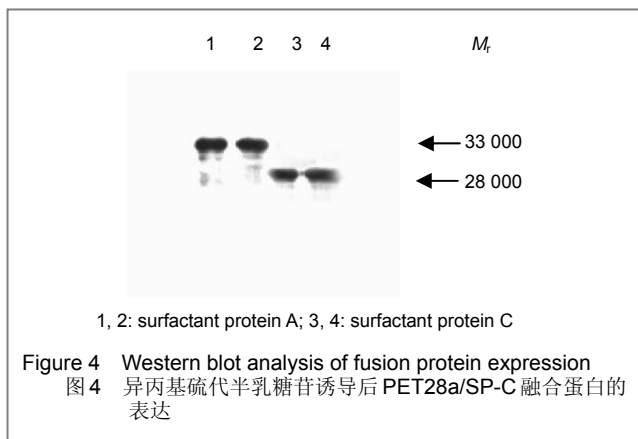


### 2.3 重组蛋白的表达与纯化结果 见图3a, b。



分别将质粒PET28a与pET28a/SP-C转化 *E.coli* M15 [pREP4]中, 37 °C培养过夜。次日以5%转接于LB培养基中, 37 °C培养2 h后, 取3 mL菌液, 测光吸收值  $A_{600\text{ nm}}$ ; 并收集菌体作为诱导表达前的对照, 其余菌液中加入IPTG至终浓度1 mmol/L, IPTG诱导1~5 h后, 分别收集菌体。表达产物用15%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。诱导表达成功后将含有重组质粒PET28a/SP-C的表达菌株接种于200 mL LB中做大量表达, 表达蛋白用Ni-NTA Slurry (agrose) 进行纯化。取含有目的蛋白的细菌裂解上清液(纯化前)和收集的峰值洗脱液(纯化后)行SDS-PAGE检测, 可见在纯化后的电泳图在相对分子质量约27 000处出现一条新生条带, 与预期的大小一致。

Western blot结果显示SP-C蛋白为为单一条带, 无降解条带, 说明在BL21中PET-28a/SP-C得到可溶性表达, 且目的蛋白在表达过程中无降解。见图4。



### 3 讨论

肺表面活性物质通过肺表面活性物质蛋白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<sup>[9]</sup>。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<sup>[10-13]</sup>。但是SP-C肺组织含量较少, 大量提取存在困难<sup>[14]</sup>。有研究在原核细胞pGEX 2T/ BL21(DE3)成功表达出完整的SPA1蛋白质, 鉴定表达产物具有良好的免疫原性<sup>[15]</sup>。实验利用分子生物学技术构建重组质粒, 表达肺表面活性物质蛋白C, Western blot实验证明该SP-C蛋白可与特异性抗体结合发生抗原抗体反应。

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<sup>[16]</sup>。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<sup>[17]</sup>。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。因此本实验中选用SP-C作为目的基因, 成功克隆至表达载体并成功表达, 为构建SP-A, SP-B和SP-D原核表达载体奠定了基础。

使用大肠杆菌表达系统时, 易发生菌体蛋白的污染。实验利用常用原核表达载体质粒PET-28a, 载体的N端携带His标签、凝血酶基因及T7启动子标签序列; 在C端具有His标签序列, 载体的克隆及表达区域由T7 RNA聚合酶启动子控制。pET-28a载体可在BL21(DE3), Rossta等表达菌株中高表达融合有His标签的蛋白, 通过His-Tag能与Ni<sup>2+</sup>发生螯合作用的原理对融合蛋白进行纯化, 简化了蛋白质下游纯化技术的步骤<sup>[18]</sup>, 并且避免了菌体蛋白的污染。

在可用的蛋白表达系统中, 大肠杆菌具有稳定的遗传学特点, 生产技术简便, 成本廉价, 是目前使用广泛的表达体系<sup>[19-20]</sup>。原核表达系统主要缺点是不能对表达的蛋白质进行翻译后修饰, 使用大肠杆菌表达的蛋白质不能有效地折叠产生复杂的高级结构。本次实验制备的SP-C蛋白作为抗原免疫动物, 通过免疫动物后检测血清抗体效价可达到单抗制备的标准。

实验成功构建SP-C的原核表达载体, 并且在原核细胞内能高效表达SP-C蛋白。下一步将制备SP-C单克隆抗体, 组装试剂盒, 为临床预测与SP-C蛋白表达异常所致的肺部疾病提供方法。

致谢: 感谢南方医科大学附属珠江医院胸外科的大力支持。

### 4 参考文献

- [1] Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med.* 2002;347(26):2141-2148.
- [2] Hartl D, Griese M. Interstitial lung disease in children-genetic background and associated phenotypes. *Respir Res.* 2005;6:32.
- [3] Noguee LM. Genetics of pediatric interstitial lung disease. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18(3):287-292.
- [4] van Moorsel CH, van Oosterhout MF, Barlo NP, et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(11):1419-1425.
- [5] Administrative Regulations on Medical Institution. State Council of the People's Republic of China. 1994-09-01.
- [6] Tian ZJ, Jiang XQ, Chen, Q et al. Cloning and expression of human interleukin-32 and studies on its bioactivity. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2011;27(12):1284-1287.
- [7] Wang XN, Xu B, Feng Z, et al. Cloning, expression and identification of Toll like receptor interacting protein gene of *Schistosoma japonicum*. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi.* 2011;23(4):406-411.
- [8] Haghi F, Peerayeh SN, Siadat SD, et al. Cloning, expression and purification of outer membrane protein PorA of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dev Ctries.* 2011;5(12):856-862.
- [9] 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(4):470-476.
- [10] Schürch D, Ospina OL, Cruz A, et al. Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films. *Biophys J.* 2010; 99(10):3290-3299.
- [11] 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(1):28-38.

[12] Zhang QJ, Li QP, Li TS, et al. Chinese Critical Care Medicine. 2005;(6):382-384.  
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[J].中国危重病急救医学,2005,(6):382-384.

[13] Huang GS, Zhang JL, Liao Y, et al. Zhonghua Fuyou Linchuang Yixue Zazhi. 2007;(5):272-274.  
黄国盛,张俊玲,廖燕.机械通气与肺表面活性物质治疗急性呼吸窘迫综合征的临床研究[J].中华妇幼临床医学杂志,2007,(5):272-274.

[14] Li QP. First Military Medical University. Southern Medical University. 2004.  
李秋平.人肺SP-A的提取、纯化及抗人SP-A mAb制备和初步应用研究[D].广州市:第一军医大学:南方医科大学,2004.

[15] Lan HK, Feng ZC, Huang JS, et al. Zhonghua Erke Zazhi. 2001;(4):38-41.  
兰和魁,封志纯,黄建生,等.人肺表面活性物质相关蛋白A1基因在大肠杆菌中的表达及产物的分离纯化[J].中华儿科杂志, 2001,(4):38-41.

[16] Chen W, Zhang J, Zhang J, et al. Expression of the PreS1 peptide of hepatitis B virus and preparation of its polyclonal antibody. Hybridoma (Larchmt). 2011;30(6):525-530.

[17] 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.

[18] Seltam A, Grueger D, Blasczyk R, et al. Easy identification of antibodies to high-prevalence Scianna antigens and detection of admixed alloantibodies using soluble recombinant Scianna protein. Transfusion. 2009;49(10):2090-2096.

[19] Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol. 2005;115:113-128.

[20] Thouvenin G, Abou Taam R, Flamein F, et al. Characteristics of disorders associated with genetic mutations of surfactant protein C. Arch Dis Child. 2010;95(6):449-454.

来自本文课题的更多信息——

**作者贡献:** 通讯作者负责实验设计, 实验实施、评估为全部作者, 均受过正规培训。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验标本提供者完全知情同意, 在充分了解实验前提下签署“知情同意书”。

**文章概要:**

**文章要点:** 本文通过克隆人肺表面活性物质相关蛋白 C(SP-C)基因, 构建原核表达载体 PET-28a/SP-C, 并得到纯化的 SP-C 蛋白。

**关键信息:** 结果证实, 采用体外重组技术, 成功构建了人 SP-C 原核表达载体 PET-28a/SP-C, 并能在体外表达 SP-C。实验为 SP-C 单克隆抗体细胞株的建立及肺部疾病检测试剂盒的研制奠定基础。

**研究的创新和不足之处:** 肺组织中含有肺表面活性物质蛋白, 但该蛋白的含量较低, 人工制备困难, 本文利用基因工程的方法构建重组质粒, 表达 SP-C 蛋白, 从而解决了蛋白来源的困难。

《中国组织工程研究》杂志 2012 年各专题组稿重点

干细胞培养与移植      骨损伤修复的组织构建      生物材料选择及应用      数字化组织工程技术      软组织移植存活和免疫

干细胞研究 骨髓来源干细胞 外周血来源干细胞 脂肪来源干细胞 脐带脐血干细胞 肿瘤来源干细胞 胚胎来源干细胞 干细胞培养与分化 干细胞移植 干细胞因子及调控因子 干细胞转基因表达 干细胞与中医药 干细胞基础实验 干细胞临床应用	组织构建研究 骨及软骨组织构建 口腔组织构建 皮肤组织构建 肌肉肌腱组织构建 心肺组织构建 血管组织构建 神经组织构建 泌尿系统组织构建 组织构建实验造模 组织构建细胞学实验 组织构建与生物活性因子 组织构建与生物力学 组织构建与中医药 组织构建基础实验 组织构建临床应用	生物材料研究 组织工程骨材料 组织工程软骨材料 组织工程血管材料 组织工程神经材料 组织工程口腔材料 纳米生物材料 膜生物材料 细胞外基质材料 抗菌抗病毒材料 组织工程复合支架材料 材料生物相容性 生物材料与药物控释 材料力学及表面改性 生物材料模型构建 生物材料基础实验 生物材料临床应用	数字化骨科及骨科 植入物研究 人工假体 骨科植入物 硬组织植入物 植入物与生物力学 数字化骨科 数字化图像与影像 数字化医学 植入物实验造模 植入物基础实验 植入物临床应用	器官组织细胞移植研究 肝移植 肾移植 心肺移植 组织细胞移植 移植与免疫 移植与影像技术 移植伦理与心理 移植与人工器官 器官移植与中医药 器官移植动物模型 器官移植基础实验 器官移植临床应用
--	---	---	---	--