

犬肺表面活性蛋白 A 的克隆及其在昆虫杆状病毒系统的表达

熊海凤, 吴汉文, 黄学婷, 李明, 周倩, 崔雅倩, 祁克宗, 刘红梅*

(兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽省动物性食品质量与生物安全工程实验室, 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 利用 RT-PCR 方法扩增犬肺表面活性蛋白 A (canine lung surfactant protein A, *cSP-A*) 基因, 将其连接至 pMD18-T 载体, 经测序正确后, 使用 DNAMAN 软件比对不同种属 SP-A 基因序列; 将 *cSP-A* 基因片段经双酶切后连接至 pFastbac1 载体得到 pFastbac1-*cSP-A*; 再将其转化至 DH10Bac 感受态细胞, 获得重组 Bacmid 质粒, 然后转染 sf9 细胞得到 P1 代重组杆状病毒 P1 rBv-*cSP-A*, P1 代病毒连续扩增 3 代后, 取 P4 rBv-*cSP-A* 感染 sf9 细胞表达 *cSP-A* 重组蛋白, 利用蛋白免疫印迹和间接免疫荧光试验鉴定表达产物。结果显示 *cSP-A* 基因大小为 699 bp; 不同种属间 SP-A 的 C 末端碳水化合物识别结构域的同源性为 49.1% ~95.5%; 经 Western Blot 和 IFA 鉴定, 重组 *cSP-A* 蛋白在细胞内表达未分泌到胞外, 分子量大小约为 31.84 kDa。

关键词: 犬; 肺表面活性蛋白 A; 克隆; 昆虫杆状病毒表达系统; 表达

中图分类号: S858.292.53

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)03-0449-05

Cloning of canine lung surfactant protein A and its expression in insect baculovirus system

XIONG Haifeng, WU Hanwen, HUANG Xueting, LI Ming, ZHOU Qian, CUI Yaqian, QI Kezong, LIU Hongmei
(Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, Anhui Province Engineering Laboratory for Animal Food Quality and Bio-safety, School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: RT-PCR was used to amplify canine lung surfactant protein A (canine lung surfactant protein A, *cSP-A*) gene, which was ligated into pMD18-T vector. DNAMAN software was used to compare *cSP-A* gene sequences from different species after sequencing correctly. *cSP-A* gene was digested by double enzymes and then cloned to pFastbac1 vector to prepare pFastbac1-*cSP-A*, which was further transformed into DH10Bac competent cells to obtain recombinant bacmid plasmid, and transfected into sf9 cells to generate P1 recombinant baculovirus rBv-*cSP-A* subsequently; P1 viral stock was propagated serially for three times. The recombinant protein was expressed in sf9 cells infected with P4 rBv-*cSP-A*, and the expressed product was identified by western Blot and indirect immunofluorescence test. The result showed that the length of *cSP-A* gene was about 699 bp. The homology of SP-A carbohydrate binding domain among different species was 49.1%-95.5%. Recombinant *cSP-A* protein was expressed in cells but not secreted out of cells, and its molecular weight was approximately 31.84 kDa by Western Blot and IFA.

Key words: canine; lung surfactant protein A; cloning; insect baculovirus expression system; expression

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2) 引发的 2019 年冠状病毒病 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 已蔓延至全世界, 升级为国际重大的公共卫生事件。在 COVID-19 疫情下, 人与动物的安全受到极大威胁。据报道, 目前已从猫、雪

貂、狗、水貂、金仓鼠、恒河猴、老虎和狮子等动物检测到 SARS-CoV-2 核酸阳性^[1-2]。对宠物犬来说, 虽然其对 SARS-CoV-2 的易感性较猫和雪貂低, 且有部分犬能产生中和抗体^[3], 但作为潜在病毒携带者对 SARS-CoV-2 的传播还存在不确定性^[4], 因此, 寻找有效防治犬感染 SARS-CoV-2 的相关制

收稿日期: 2021-11-25

基金项目: 安徽农业大学研究生创新项目 (2021yjs-20) 和国家自然科学基金 (31872445) 共同资助。

作者简介: 熊海凤, 硕士研究生。E-mail: 1661545249@qq.com

* 通信作者: 刘红梅, 博士, 副教授。E-mail: liu2844707@sina.com

剂迫在眉睫。

哺乳动物呼吸系统主要分泌 4 种肺表面活性蛋白(lung surfactant protein, SP)即 SP-A, B, C, D, 其中 SP-A、SP-D 为亲水性糖蛋白, 以 SP-A 含量最高, 具有抗感染和免疫调节双重作用^[5]。有报道机体在某些疾病状态下 SP-A 和 SP-D 的水平降低, 如严重急性呼吸综合征, 可能会增加病原感染风险和导致疾病恶化^[6]。最近, 人源 SP-D 被多个文献证明可以结合高度糖基化的 SARS-CoV-2 刺突 (S) 蛋白^[7-8], SP-D 中和 SARS-CoV-2 的效应提示 SP-A 和 SP-D 可能在 COVID-19 中的潜在治疗前景。

目前, 关于犬 SP-A (canine lung surfactant protein A, cSP-A)的基因结构与功能的研究鲜有报道。本研究通过 RT-PCT 方法克隆 *cSP-A* 基因并测序, 分析其基因序列特征, 进而利用昆虫杆状病毒系统表达 *cSP-A* 蛋白, 为进一步鉴定 *cSP-A* 功能以及评估应用其蛋白防治 SARS-CoV-2 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及菌株

Sf9 细胞、pFastBac1 转移载体由上海兽医研究所陈鸿军研究员惠赠, DH10Bac、DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 主要试剂

质粒 DNA 小量提取试剂盒、小鼠抗 His 单克隆抗体购自上海生工生物技术有限公司, Bacmid DNA 提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司, FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京索莱宝生物技术有限公司, Trizol, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自上海雅酶生物科技有限公司。

1.3 引物的设计与合成

参照 GenBank 公布的 *cSP-A* 的基因序列 (GenBank: M11769.1), 设计相关引物见表 1, 引物由上海生工生物技术有限公司合成 (下划线部分为酶切位点, 斜体部分为引入的 6 \times His 序列)。

1.4 *cSP-A* 基因的克隆及序列分析

采用 Trizol 法提取犬肺脏组织 RNA, 随机引物反转录成 cDNA, 使用引物 P1/P2 进行 PCR 扩增。反应条件为: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 完全延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后胶回收纯化。纯化产物再连接至 pMD-18T 载体并转化至 JM109 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 挑取白色单菌落进行菌液 PCR 鉴定, 阳性质粒送上海生工生物技术有限公司测序, 鉴定正确的阳性质

粒命名为 pMD18T-*cSP-A*。使用 DNAMAN 软件将 *cSP-A* 序列与猪 (*sus scrofa*) SP-A、牛 (*bovine*) SP-A、小鼠 (*mouse*) SP-A、大鼠 (*rat*) SP-A、绵羊 (*ovine*) SP-A、人 (*human*) SP-A1、鸡 (*chicken*) SP-A、鹅 (*goose*) SP-A 的序列进行多重比对。

1.5 重组转移载体的构建

以阳性克隆 pMD18T-*cSP-A* 为模板, 使用引物 P3/P4 扩增 *cSP-A* 基因, 在 3'端引入的 6 \times His 序列, 5'端和 3'端分别引入 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点。反应条件为: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 57 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 完全延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后胶回收纯化。纯化产物再经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切后连接至 pFastBac1 转移载体, 连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 挑取白色单菌落进行菌液 PCR 鉴定, 阳性质粒送上海生工生物技术有限公司测序, 鉴定正确的阳性质粒命名为 pFastBac1-*cSP-A*。

1.6 重组杆粒的构建

取 5 μ L 重组转移质粒 pFastBac1-*cSP-A* 转化至 DH10Bac 感受态细胞, 涂布于含有卡那霉素 (50 μ g \cdot mL⁻¹)、庆大霉素 (10 μ g \cdot mL⁻¹)、四环素 (7 μ g \cdot mL⁻¹) 及含有 IPTG (40 μ g \cdot mL⁻¹) 和 X-gal (20%) 的 LB 平板并于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养, 经三轮蓝白斑筛选后分别挑取白色单菌落及蓝色单菌落 (野生型 Bacmid) 使用通用引物 M13 进行菌液 PCR 鉴定, 鉴定正确的阳性杆粒命名为 Bacmid-*cSP-A*, 野生型 Bacmid 杆粒命名为 Bacmid-N。

表 1 合成的引物序列

Table 1 Synthesized primer sequences

引物	引物序列 (5'-3')	目的
P1	ATGATCGAGAACAATACGA	从犬肺组织
P2	TCAAAACTCACAGATGGCC	扩增 <i>cSP-A</i>
P3	GGG <u>GATCC</u> ATGATCGAGAACAATACGA	构建重组
P4	CCCTCGAGTTAGT <u>ATGTTGGTGGTGGT</u> GAAATTCGCAGATGGTCA	转移载体
M13-F	CCCAGTCACGAGTTGTA ⁺ AAACG	鉴定重组
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGG	杆粒

1.7 重组杆状病毒的扩增及拯救

提前一天取生长状况良好且处于对数生长期的 sf9 细胞铺于六孔板, 待细胞生长汇合至 80%左右开始转染。使用脂质体转染法, 按试剂盒说明书将 Bacmid-*cSP-A*、Bacmid-N 转入 sf9 细胞, 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养。转染 24 h 后每天观察细胞病变, 待细胞变圆、胞核变大且大部分细胞开始脱落即可收取培养基上清, 即为 P1 代重组杆状病毒, 命名为 rBv-*cSP-A*, P1 代野生型杆状病毒命名为 rBv-N, 并

于 4 °C 避光保存。取 200 μL P1 代病毒液按照 OMEGA 病毒 DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA 进行 PCR 鉴定。鉴定无误后, 取适量 P1 代病毒感染 sf9 细胞, 待细胞出现明显病变后收集培养基上清, 此为 P2 代病毒, 按照此方法继续盲传至 P4 代病毒。

1.8 重组蛋白的鉴定

1.8.1 IFA 取 P4 代重组杆状病毒感染 72 h 后的 sf9 细胞进行 IFA 鉴定, 以野生型杆状病毒感染的 sf9 细胞作为阴性对照。吸弃培养基上清, 加入预冷的 4%多聚甲醛室温固定 10 min, PBST 洗涤; 加入 0.2% Trion×100 室温透化 10 min, PBST 洗涤; 加入含 2%BSA 的 PBST 37 °C 封闭 1h, PBST 洗涤; 加入 6×His tag 鼠源单克隆抗体作为一抗 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤; 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤, 于荧光倒置显微镜下进行观察。

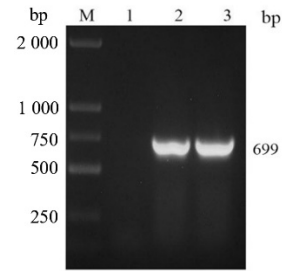
1.8.2 Western Blot 取 P4 代重组杆状病毒感染 72 h 后的 sf9 细胞进行 Western Blot 鉴定, 同时以野生型杆状病毒感染的 sf9 细胞作为阴性对照。细胞沉淀中加入 RIPA 裂解液于冰上裂解 10 min, 分别向细胞裂解上清、细胞裂解沉淀中加入 5×SDS PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水煮 10 min 后进行 Western Blot 鉴定, 以 6×His tag 鼠源单克隆抗体作为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗。

2 结果与分析

2.1 cSP-A 基因的克隆及序列比较

以犬肺组织 cDNA 为模板, P1/P2 为引物 PCR 扩增 cSP-A 基因。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析, 结果如图 1, 可见 699 bp 处单一的目的条带。目的基因经胶回收纯化后克隆至 pMD-18T 载体, 经酶切和测

序鉴定正确, 阳性质粒命名为 pMD18T- cSP-A。



M. DL2000 Marker; 泳道 1 为阴性对照; 泳道 2 和 3 为 PCR 扩增产物。

图 1 cSP-A 基因的 RT-PCR 扩增结果

Figure 1 RT-PCR amplification results of cSP-A gene

分析 cSP-A 肽链从 N-端至 C-端包含 4 个结构域: 10 个氨基酸残基组成的 N-末端区域; 富含羟脯氨酸, 由 24 个 Gly-Xaa-Yaa 重复序列组成的胶原区(collagen-like domain, CLR); 28 个氨基酸残基组成的颈部区域; 以及 C 末端碳水化合物识别结域(carbohydrate binding domain, CRD)。与人 SP-A1 相比, cSP-A 在 N 端结构域存在 1 个独有的 N-糖基化位点; 而在 C 端结构域, 两者均存在 1 个糖基化位点和 9 个钙离子结合位点, 而且位置也完全一致, 结果如图 2 所示。

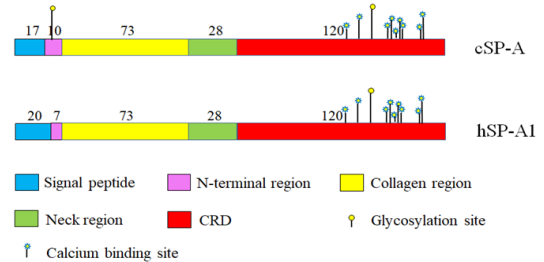


图 2 犬 SP-A 和人 SP-A1 肽链结构

Figure 2 Peptide structure of canine SP-A and human SP-A1

Bovine	NFDAIKELCARVGGHIAAPRSFEENEAIIVSIVKKYNTYAYLGLVEGPTAGDFYLLDGAPVNYTNWYPGEPRGRGKEKCVETITDQWWD
Chicken	NFSSALESCEETGGTLPMPNEEENKAIMGIVKQYNYAYLGIKESDTAGQFKYVNNQPLNYSWQQYEPNGKGTCKVEMTYDGNWWD
Dog	NFNDIQELCAGAGGQIAAPMSFEENEAVASIVKKYNTYAYLGLVESFDSGDFYLLDGAPVNYTNWYPGEPRGRGKEKCVEMTYDQWWD
Goose	IFSSALESCEKTGGTLPMPNKEENKAVMAIVEQYNSYAYLGIKESSETSGQFEYMGTPLNNTNWHQYEPNGKGTCKVEMHTNGNWD
Human	TFDAIQEACARAGGRIVPRNFEENEAIASIVKKYNTYAYVGLTEGSPGDFRYSDGTVPVNYTNWYRGEPRGRGKEKCVEMTYDQWWD
Mouse	NFDITIREMCTRAGGHIAAPRNFEENEAIASITKKYNTYYPYLVGIEGQTPGDFHYLLDGASVNYTNWYPGEPRGRGKEKCVEMTYDQWWD
Ovine	NFDAIKELCARAGGHIAPRSFEENEAITSIIVKHNTYAYLGLAEGPTAGDFYLLDGAPVNYTNWYPGEPRGRGKEKCVETIITDQWWD
Pig	AFDVIRELCARAGGRVIAAPRSFEENEAIASIAKKNYNYAYLGLVEGPTAGDFYLLDGTVPVNYTNWYPGEPRGRGKEKCVEMTYDQWWD
Rat	NFDITIKEMCTRAGGNVIAVPRNFEENEAIASIAKKNYNYAYLGLIEDQTPGDFHYLLDGASVNYTNWYPGEPRGRGKEKCVEMTYDQWWD
	2 1 1 2 2 1 1 1 1 1 1 1

1. 钙离子结合位点; 2. N-糖基化位点。

图 3 不同物种 SP-A CRD 区氨基酸序列比对图

Figure 3 Amino acid sequences alignment of SP-A CRD region in different species

使用 DNAMAN 软件将 cSP-A 与来自鸡、猪、鹅、人、小鼠、大鼠、绵羊及牛 SP-A 的 CRD 区氨基酸序列进行比较发现: CRD 序列全长为 120 aa, 不同种属间同源率为 49.1%~95.5%, 其中 cSP-A 与人 SP-A1 同源率为 75.5%; 不同物种间 CRD 区

共有 41 个位置的氨基酸残基完全保守, 且在 C-端附近都含有一个 N-糖基化位点, 但鹅和鸡除外, 它们各自存在一个额外的 N-糖基化位点; 大多数物种 SP-A 与 Ca²⁺结合位点有关的残基在 CRD 序列中存在高度保守的 WND (Trp-Asn-Asp)基序, 但有 2 个

种属例外,其中犬为“WNN”,鸡为“WKD”,结果如图3。

2.2 重组转移载体的鉴定

以 pMD18T-*cSP-A* 为模板,使用引物 P3/P4 扩增 *cSP-A* 基因,结果如图3,可见 729 bp (含 *Bam*H I-*Xho* I 酶切位点及 6×His 标签) 处单一的目的条带。PCR 产物经胶回收纯化后连接至 pFastBac1 转移质粒, pFastBac1-*cSP-A* 经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定。结果如图4,可见约 4 775 bp 处的载体条带及 729 bp 的目的片段,同时测序结果与 *cSP-A* 基因序列完全一致,表明重组转移载体构建成功。

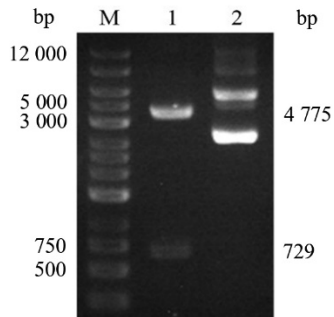


图4 重组转移载体 pFastbac1-*cSP-A* 的鉴定
Figure 4 Identification of the recombinant transfer vector pFastbac1-*cSP-A*

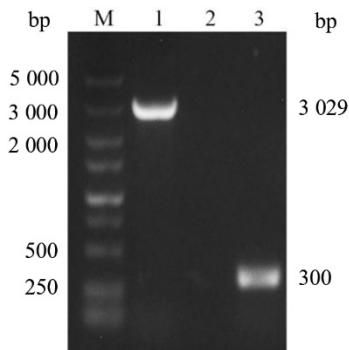


图5 *Bacmid-cSP-A* 重组杆粒的鉴定
Figure 5 Identification of *Bacmid-cSP-A* recombinant Bacmid

2.3 *Bacmid-cSP-A* 重组杆粒的鉴定

将构建成功的 pFastBac1-*cSP-A* 转化至 DH10Bac 感受态细胞,经过三轮蓝白斑筛选后分别挑取白色单菌落及蓝色单菌落,使用通用引物 M13 菌液 PCR 扩增。阳性重组杆粒扩增条带大小为 2 300 bp+目的基因片段大小,野生型杆粒为 300 bp。结果(图5)显示,阳性 *Bacmid-cSP-A* 可扩增出约 3 029 bp 条带且条带单一,野生型 *Bacmid-N* 扩增出

300 bp 条带,表明成功获得含 *cSP-A* 基因的重组杆粒且无野生型 *Bacmid* 污染。

2.4 重组蛋白的鉴定

2.4.1 IFA 鉴定 取 P4 代 rBv-*cSP-A* 病毒感染 72 h 后的 sf9 细胞进行 IFA 鉴定。结果(图6)显示, rBv-*cSP-A* 感染的 sf9 细胞发出明亮的绿色荧光,而野生型病毒感染的 sf9 细胞无可见的绿色荧光,表明重组 *cSP-A* 蛋白在 sf9 细胞中成功表达。

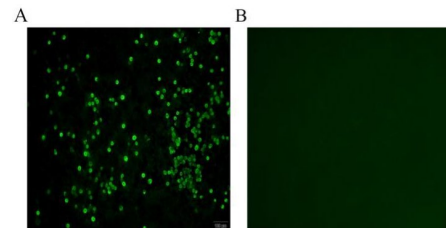


图6 重组杆状病毒 rBv-*cSP-A* 的 IFA 鉴定
Figure 6 IFA identification of recombinant baculovirus rBv-*cSP-A*

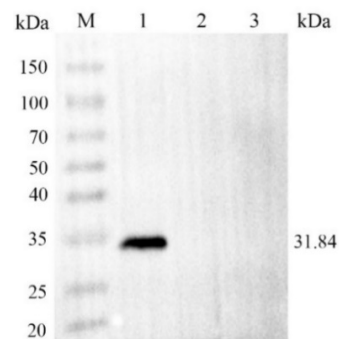


图7 *cSP-A* 基因表达产物的 Western Blot 鉴定
Figure 7 Western Blot identification of *cSP-A* gene expression product

2.4.2 Western Blot 鉴定 取 P4 代 rBv-*cSP-A* 病毒感染 72 h 后的 sf9 细胞破碎上清和沉淀进行 Western Blot 鉴定。结果(图7)显示, rBv-*cSP-A* 感染的 sf9 细胞破碎沉淀样品在约 31.84 kDa 处有单一的特异性条带,而野生型病毒感染的 sf9 细胞样品无条带,表明重组 *cSP-A* 蛋白表达在 sf9 细胞的沉淀中,没有分泌到胞外。

3 讨论

SP-A 和 SP-D 主要通过抗病原微生物感染以及免疫调节的双重功能来发挥肺部的先天免疫作用^[5]。文献报道 SP-A 和 SP-D 可以中和多种病毒,包括甲型流感病毒、呼吸道合胞病毒、人类免疫缺陷病毒等^[9-12],近两年由于受新冠疫情的影响,SP-A 和 SP-D

因其抗病毒作用再次成为人们关注的重点^[5]。据报道感染 SARS-CoV-2 的重症患者血清 SP-A 和 SP-D 含量升高^[13], 在体外人源重组 SP-D 可以与冠状病毒表面的 S 蛋白结合, 是抑制 SARS-CoV-2 感染的潜在治疗制剂^[7-8], 但犬源 SP-A 是否可以抗 SARS-CoV-2 感染还是未知。

分析 cSP-A 基因序列, 发现 cSP-A 与人 SP-A1 在肽链结构、N-糖基化修饰、钙离子结合位点等方面都高度相似, 但有 3 处有趣的差异。首先, cSP-A 的 N-末端区域存在一个独有的 N-糖基化位点, cSP-A 的 N-糖基化修饰是否有助于其识别微生物糖基, 进而增强其抗病原的功能还需要试验加以验证。其次, 位于 CLR 的一个离散的扭结肽序列, 在人中为 PCPP^[14], 啮齿类动物为 MGLP^[15], 而犬为 PGHP。该扭结肽具有构象灵活性, 有助于更高阶 SP-A 低聚物的形成以及 CRD 结构域在空间上的分离^[15-17], 这一序列在不同物种间的差异可能是基因进化的结果。最后, 大多数物种 (包括人) 在 CRD 区存在特征性基序—WND (Trp-Asn-Asp), 而犬为 WNN (Trp-Asn-Asn), 虽然天冬氨酸残基 (Asp) 和天冬酰胺残基 (Asn) 都是脂肪族氨基酸, 但单个氨基酸的改变有何意义还值得进一步研究。

天然 SP-A 在体内主要以十八聚体形式存在, 由 6 个三聚体亚基组成, 形成花束状结构^[18], SP-A 与细胞外配体的结合依赖于颈区-CRD 三聚体和 SP-A 十八聚体的高亲和性多价结合^[19], 因此, 如何使表达的重组蛋白形成多聚体结构对于其后续的功能研究显得尤为重要。由于昆虫杆状病毒表达系统具有外源蛋白表达量高, 同时兼具糖基化及磷酸化修饰且表达的外源蛋白接近其天然结构等多种优点, 故本试验采用杆状病毒表达系统表达重组 cSP-A 蛋白, 但试验结果表明尽管重组 cSP-A 蛋白取得了较高水平的表达, 但主要为细胞内表达, 未能分泌到胞外, 进而影响了后续的功能验证。

今后的研究中, 一方面通过添加 Gp64 信号肽促进 cSP-A 蛋白的分泌表达, 另一方面尝试在 N 端加入柔性肽序列从而将两个 cSP-A 基因进行串联表达, 促进多聚体的形成, 以期得到具有高亲和力的重组 cSP-A 蛋白。

参考文献:

[1] KUMAR A, PANDEY S N, PAREEK V, et al. Predicting susceptibility for SARS-CoV-2 infection in domestic and wildlife animals using ACE2 protein sequence homology[J]. *Zoo Biol*, 2021, 40(1): 79-85.
[2] MCALOOSE D, LAVERACK M, WANG L, et al. From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 infection in tigers

and lions at the Bronx Zoo[J]. *mBio*, 2020, 11(5): e02220.
[3] PATTERSON E I, ELIA G, GRASSI A, et al. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy[J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 6231.
[4] SHARUN K, TIWARI R, NATESAN S, et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, associated zoonotic concerns, and importance of the One Health approach during the ongoing COVID-19 pandemic[J]. *Vet Q*, 2021, 41(1): 50-60.
[5] WATSON A, MADSEN J, CLARK H W. SP-A and SP-D: dual functioning immune molecules with antiviral and immunomodulatory properties[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 622598.
[6] MATERA M G, ROGLIANI P, CALZETTA L, et al. Pharmacological management of COVID-19 patients with ARDS (CARDS): a narrative review[J]. *Respir Med*, 2020, 171: 106114.
[7] ARROYO R, GRANT S N, COLOMBO M, et al. Full-length recombinant hSP-D binds and inhibits SARS-CoV-2 [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1114.
[8] HSIEH M H, BEIRAG N, MURUGAIAH V, et al. Human surfactant protein D binds spike protein and Acts as an entry inhibitor of SARS-CoV-2 pseudotyped viral particles[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 641360.
[9] WATSON A, KRONQVIST N, SPALLUTO C M, et al. Novel expression of a functional trimeric fragment of human SP-A with efficacy in neutralisation of RSV[J]. *Immunobiology*, 2017, 222(2): 111-118.
[10] VAN IWAARDEN J F, VAN STRIIP J A, 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]. *J Biol Chem*, 1992, 267(35): 25039-25043.
[11] HARTSHORN K L, WEBBY R, WHITE M R, et al. Role of viral hemagglutinin glycosylation in anti-influenza activities of recombinant surfactant protein D[J]. *Respir Res*, 2008, 9: 65.
[12] HARTSHORN K L, WHITE M R, TECLE T, et al. Viral aggregating and opsonizing activity in collectin trimers[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(1): L79-L88.
[13] GHATI A, DAM P, TASDEMIR D, et al. Exogenous pulmonary surfactant: a review focused on adjunctive therapy for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 including SP-A and SP-D as added clinical marker[J]. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2021, 51: 101413.
[14] FLOROS J, WANG G, MIKEROV A N. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2: impact on function[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009, 19(2): 125-137.
[15] UEMURA T, SANO H, KATOH T, et al. Surfactant protein A without the interruption of Gly-X-Y repeats loses a kink of oligomeric structure and exhibits impaired phospholipid liposome aggregation ability[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(48): 14543-14551.
[16] VOSS T, SCHÄFER K P, NIELSEN P F, et al. Primary structure differences of human surfactant-associated proteins isolated from normal and proteinosis lung[J]. *Biochim et Biophys Acta*, 1992, 1138(4): 261-267.
[17] RIDSDALE R A, PALANIYAR N, HOLTERMAN C E, et al. Cation-mediated conformational variants of surfactant protein A[J]. *Biochim et Biophys Acta BBA-Mol Basis Dis*, 1999, 1453(1): 23-34.
[18] PALANIYAR N, IKEGAMI M, KORFHAGEN T, et al. Domains of surfactant protein A that affect protein oligomerization, lipid structure and surface tension[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2001, 129(1): 109-127.
[19] NALIAN A, UMSTEAD T M, YANG C H, et al. Structural and functional determinants of rodent and human surfactant protein A: a synthesis of binding and computational data[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2613.