

## 口蹄疫病毒非结构蛋白 3A、3B 和 2C 基因的表达 及产物纯化与活性检测

付元芳<sup>1,2</sup>, 卢曾军<sup>1</sup>, 曹轶梅<sup>1</sup>, 郭建宏<sup>1</sup>, 张小丽<sup>2</sup>, 田美娜<sup>1</sup>, 刘在新<sup>1\*</sup>, 才学鹏<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室,  
农业部畜禽病毒学重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046)  
(<sup>2</sup> 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

**摘要:**【目的】口蹄疫病毒(FMDV)非结构蛋白(NSP)3A、3B和2C基因的表达及产物纯化与活性检测。【方法】利用原核表达系统表达了FMDV NSP 3A、3B和富含B细胞抗原位点序列的2C蛋白。利用高浓度尿素裂解包涵体,采用稀释法和氧化型、还原型谷胱甘肽系统相结合方法对2C蛋白进行复性。用金属螯合亲和层析的方法对表达的FMDV NSP 3A、3B和2C进行纯化。采用ELISA方法对比检测了3种纯化蛋白在检测羊血清NSP抗体的效果。【结果】检测得知3A和3B为可溶性表达蛋白,2C以包涵体形式表达。通过Western-blot分析,表明纯化后蛋白能与FMDV感染动物血清发生特异性反应。纯化的3A、3B和复性后的2C融合蛋白与3ABC抗原的检测结果显示具有很高的符合性。【结论】该研究为建立鉴别FMDV自然感染动物和灭活疫苗免疫动物的酶联免疫电转移印迹技术(EITB)提供了所需的材料。

**关键词:** 口蹄疫病毒; 非结构蛋白; 酶联免疫电转移印迹技术(EITB)

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)06-0790-06

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的偶蹄动物共患的一种热性、接触性传染病。该病在世界各地广泛流行,对动物及其产品的国际贸易带来严重的影响,因而世界各国都非常重视该病的预防和控制。发达国家主要通过捕杀感染动物及同居动物、可疑畜群来控制并消灭本病,而大多数发展中国家采取注射疫苗的方法控制该病的流行。在采取捕杀政策的国家如何检测隐性感染的动物;在注射疫苗国家,如何区分自然感染动物和注射疫苗动物是FMD防治研究中亟待解决的问题<sup>[1]</sup>。基于结构蛋白抗体的检测方法难以区分感染和免疫动物,近年来,国内外学者对FMDV非结构蛋白(NSP)2C、3A、3B、3AB、3D

和3ABC等进行了深入的研究。并建立了多种检测FMDV NSP抗体的ELISA方法<sup>[2-4]</sup>,期望能够找到一种区分感染动物和疫苗免疫动物的最佳鉴别诊断方法。

许多研究证实,3ABC或3AB抗体是目前公认的鉴别感染与免疫可信度最高的指标,可是在确定单个动物的感染与否时,仍存在不确定性。因此,目前的研究趋向于世界动物卫生组织(OIE)推荐使用的检测NSP 3ABC抗体的ELISA方法,同时配合检测多个NSP抗体的酶联免疫电转移印迹(EITB)方法<sup>[5]</sup>,可以提高检测的准确性。如先采用3ABC-ELISA做筛选性试验,如果样品为阳性或可疑结果,再用检测多个NSP抗体的EITB方法确定,检出的几率大,可信度较高。

基金项目: 国家支撑计划(2006BAD06A12); 国家“973项目”(2005CB523201)

\*通讯作者: Tel: +86-931-8342587; E-mail: liukey@public.lz.gs.cn

作者简介: 付元芳(1981-),女,藏族,甘肃天祝人,硕士研究生,主要从事病毒分子生物学研究。E-mail: wst258@163.com

收稿日期: 2007-12-13; 修回日期: 2008-02-19

本研究利用原核表达系统表达出了 FMDV NSP 3A、3B 和含 2C 蛋白主要 B 细胞抗原位点序列。通过 Western-blot 分析和 ELISA 方法检测其反应活性。为下一步建立检测多个 NSP 抗体的 EITB 方法提供了必要材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)pLys 株购自博大泰克公司产品,重组质粒 pET28a-3A、pET28a-3B 和 pET30a-2C 由本实验室构建并保存;3D 原核表达和纯化的重组蛋白由刘湘涛研究员惠赠。

**1.1.2 血清:**阳性血清来自人工感染 FMDV 的牛、羊和猪,阴性血清来自健康牛、羊和猪,由国家口蹄疫参考实验室制备并保存。180 份羊血清样品采自 Asia I FMDV 疫区的临床健康羊,由本实验室采集并保存。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**Probond purification system kit 购自 Invitrogen 公司,HRP 标记酶标抗体购自 Sigma 公司;酶标仪为美国伯乐 Bio-rad 680 型酶标仪。

### 1.2 重组表达质粒的诱导表达

将重组质粒 pET28a-3A、pET28a-3B 和 pET30a-2C 分别转化大肠埃希氏菌 BL21(DE3)pLys,挑取阳性克隆接种于 2×YT(含 100 μg/mL 卡那霉素)培养基中,37℃ 培养过夜,第 2 d 以 1/100 的接种量接入新鲜的 2×YT 培养液(含 100 μg/mL 卡那霉素),培养至 OD 值约为 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,3000 r/min 振荡培养 5 h,最后离心收集菌体。用蛋白质加样缓冲液悬浮菌体,进行 SDS-PAGE 分析,同时以诱导前菌液作为对照。

### 1.3 表达产物的可溶性分析

离心收集表达菌体,用适当的 PBS(1 mol/L pH 7.4)洗涤 3 次,每次 4~12000×g 离心 15 min。将 200 mL 培养物的细菌沉淀用 8 mL PBS 溶液重悬起。加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL,冰浴 30 min。然后,进行冰浴超声处理,以悬液趋于透明,吸吹时无明显凝块为度。4~12000×g 离心 10 min,分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定<sup>[6]</sup>。

### 1.4 可溶性蛋白的回收和包涵体的裂解

在可溶性蛋白中加入 1% 的 TritonX-100 及 DTT 至终浓度为 1 mmol/L 后于-20℃ 保存,以备纯化。将包涵体用 0.1 倍体积的 IB 洗液(20 mmol/L pH 7.5 的 Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 10 mL/L Triton X-100)

连洗两次,每克包涵体加入 5 mL 含 20 mmol/L 咪唑(imidazole)的裂解-结合缓冲液(8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 mol/L Tris, pH 8.0),室温裂解 1 h,4℃ 离心 10 min,收集上清液,备用。

### 1.5 表达蛋白纯化前的复性

在包涵体溶解上清中立即加入终浓度为 1% 的 Triton X-100,加入 9 倍体积的复性缓冲液(0.8 mmol/L 氧化型谷胱甘肽 GSSH, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽 GSH, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris pH 8.5),用 0.01 mol/L PBS pH 7.4 透析 48 h,每 12 h 更换一次透析液。取出复性的包涵体蛋白液,经 PEG6000 进行浓缩,于-20℃ 保存以备纯化。

### 1.6 3A、3B 和 2C 融合蛋白的纯化

向 ProBond<sup>TM</sup> Purification System 提供的纯化柱中加入 2 mL Ni-NTA His Bind Resin,按其操作说明进行装柱。每个纯化柱中加入 8 mL 准备好的欲纯化物,室温振荡结合 30 min,用 8 mL 洗液(250 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 2.5 mol/L NaCl, 3 mol/L Imidazole pH 6.0)洗涤 4 次,洗脱非特异性结合在柱子上的蛋白质。然后用 8 mL 洗脱液(250 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 2.5 mol/L NaCl, 250 mmol/L Imidazole pH 6.0)洗脱吸附在柱子上的融合蛋白,SDS-PAGE 观察。

### 1.7 纯化后融合蛋白的活性检测分析

**1.7.1 Western blot 分析:**将纯化后的融合蛋白参照分子克隆实验指南<sup>[7]</sup>的方法进行 Western blot 检测。将 SDS-PAGE 蛋白带转移至硝酸纤维素膜,用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭,以牛抗 FMDV 血清为一抗,兔抗牛 IgG-HRP 为二抗,二氨基联苯胺(DAB)染色。电转移条件为 160 mA 电泳 2 h。

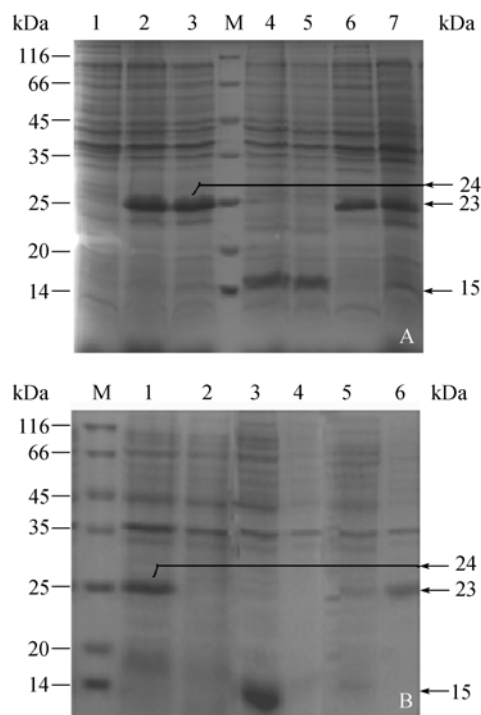
**1.7.2 ELISA 检测对比几种 NSP 的反应性:**经纯化的蛋白用 Bradford 法确定其蛋白含量,用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释纯化抗原,包被 96 孔酶标板,采用间接 ELISA 方阵滴定抗原最佳工作浓度。用最适抗原浓度包被酶标板,检测与已知的牛、羊和猪阳性和阴性血清的反应性。对比检测 180 份采自 Asia FMDV 疫区的临床健康羊血清,并将检测结果与 3ABC 试剂盒检测结果作对比分析。

## 2 结果

### 2.1 3A、3B 和 2C 融合蛋白在大肠杆菌 BL21 (DE3) pLys 中的表达

将诱导菌菌体收集进行 SDS-PAGE,结果与未诱

导的阴性对照相比有明显的融合蛋白表达带,分子质量约为 24、15 和 23 kDa,与理论值相符(图 1-A)。表达菌体的可溶性分析表明,融合蛋白 3A、3B 主要以可溶性蛋白形式存在,而 2C 主要以包涵体的形式存在于沉淀中(图 1-B)。



**图 1** 表达产物的 SDS-PAGE(A)和可溶性分析(B)  
Fig. 1 Analysis of expressed products by SDS-PAGE and the solubility of the products.  
Lane M is protein molecular weight Marker; Lane 1 in A shows recombinants before induced with IPTG; Lanes 2 and 3, 4 and 5, 6 and 7 in A show 3A, 3B and 2C recombinants induced with IPTG, respectively; Lanes 1, 3 and 5 in B show expressed products in supernatant from 3A, 3B and 2C recombinants, respectively; Lanes 2, 4 and 6 in B show expressed products in sediment from 3A, 3B and 2C recombinants, respectively.

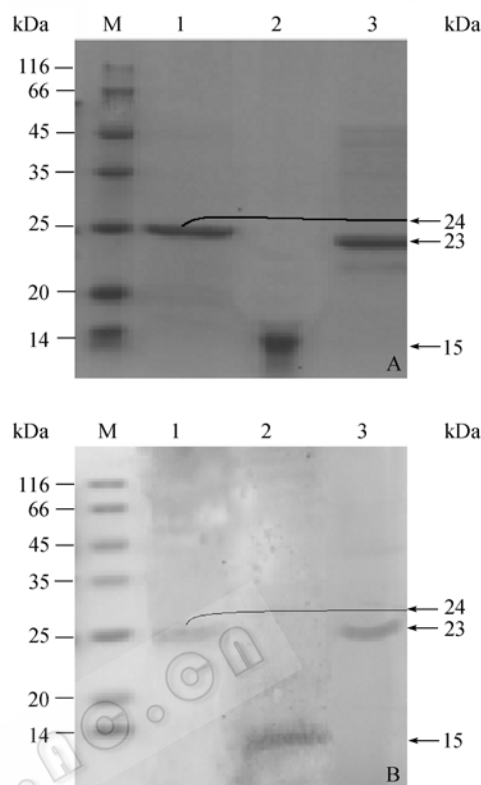
## 2.2 3A、3B 和 2C 融合蛋白的纯化

由于融合蛋白的 N 端带有一标记的 6 个组氨酸残基,组氨酸对 Ni-NTA 有很强的吸附能力,因而可以利用镍离子亲和层析的方法纯化融合蛋白。纯化蛋白经 SDS-PAGE 分析,均只有 1 条约 24、15 和 23 kDa 的蛋白带(图 2-A)。

## 2.3 纯化后融合蛋白的 Western blot 分析

纯化后的融合蛋白 3A、3B 和 2C,经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜上进行免疫学反应,结果显示,牛抗 FMDV 血清与纯化复性后的融合蛋白在约 24 kDa、15 kDa 和 23 kDa 处形成了特异的抗原抗

体反应带。证明纯化后的融合蛋白 3A、3B 和 2C 能与来自感染牛的 FMDV 阳性血清发生反应(见图 2-B)。



**图 2** 纯化后目的蛋白的 SDS-PAGE(A)和 Western blot 分析(B)

Fig. 2 Analysis of the purified recombinant proteins by SDS-PAGE and Western-blot. Lane M is protein molecular weight Marker; Lane 1 shows purified fusion proteins of 3A; Lane 2 shows purified fusion proteins of 3B; Lane 3 shows purified fusion proteins of 2C.

## 2.4 纯化后 3A、3B 和 2C 融合蛋白的 ELISA 检测

将纯化后的蛋白包被酶标板,采用与 3ABC 间接 ELISA 相同的反应程序进行检测<sup>[8]</sup>。结果显示,纯化的蛋白能够与 FMDV 感染动物血清发生特异性反应,而与健康动物血清不反应。并经方阵试验测得分别以 3A 10 ng、3B 118 ng 和 2C 46 ng 抗原为最佳包被量,表明纯化后的融合蛋白具有很好的反应活性(图 3)。用上述抗原工作浓度包被酶标板,进行间接 ELISA,检测 180 份田间羊血清,以已知的羊阳性和阴性血清为对照,并将检测结果与 3ABC 试剂盒和 3D 抗原检测结果做进一步对比分析,结果见表 1。检测得知,以 3A、3B 和 3ABC 为抗原的检测 results 和 3ABC 的检出结果最接近,2C 和 3D 的检测 results 与 3ABC 的符合率稍低,但也是重要的检测参考指标。

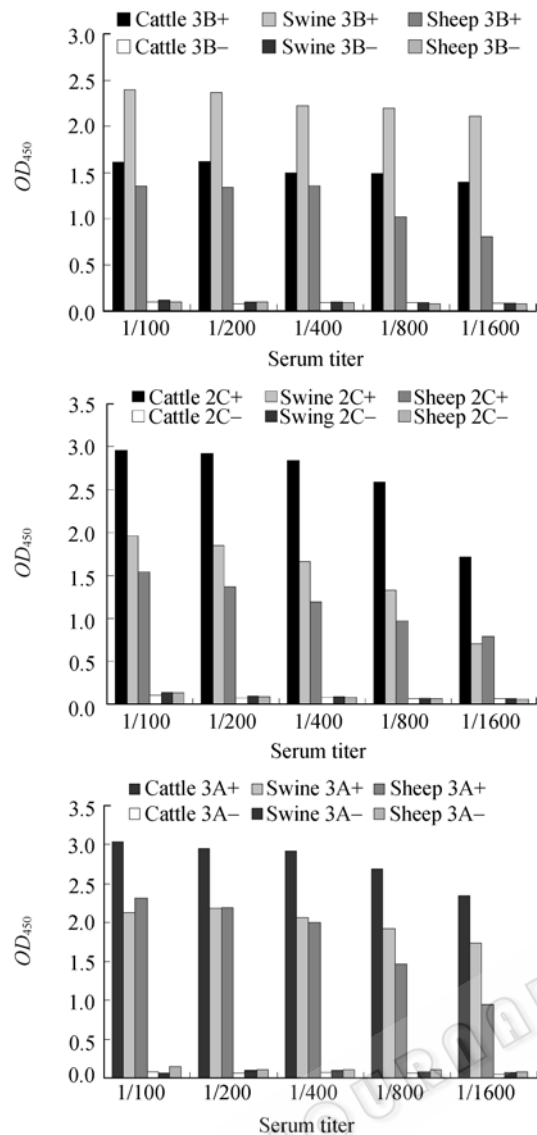


图 3 间接 ELISA 滴定纯化 3A、3B 和 2C 蛋白的抗原效价  
Fig. 3 Titration of reactivity of 3A, 3B and 2C protein by indirect ELISA. Pictures A, B and C show the reactivity of 3A, 3B and 2C protein with positive and negative sera derived from cattle, swine and sheep, respectively.

表 1 5 种抗原 ELISA 检测羊血清的结果比较  
Table 1 Comparison of the coincident rates of 5 NSPs used for detection of sheep sera

Antigen	Total sera number	Positive number	Negative number	Coincidence with 3ABC
3A	180	22	158	99.4%(179/180 )
3B	180	19	161	98.9%(178/180)
2C	180	20	160	96.1%(173/180)
3D	180	31	149	91.1%(164/180)
3ABC	180	21	159	/

3 讨论

原核表达系统是基因工程使用最多的蛋白表达

体系，将目标蛋白与一种特异性结构域形成融合蛋白，不仅可以避免目标基因产物被快速降解，还可使表达产物得到快速有效的纯化、回收。利用带 6 个组氨酸的载体表达带标签的融合蛋白是目前表达目的蛋白常用的手段，本研究所用表达载体 pET28a 和 pET30a 即在目的蛋白的氨基端带有组氨酸标签，表达产物能够通过 Ni-NTA 亲和层析柱得到快速纯化。

重组蛋白在大肠埃希氏菌中高水平表达时，目的蛋白以可溶或不可溶的形式表达。本试验结果表明，3A 和 3B 是可溶性表达，2C 以包涵体形式表达。可溶性蛋白易于纯化而且活性高，而聚集成无活性的包涵体蛋白聚积物，对重组蛋白的纯化和活性产生了影响。本研究采用稀释透析法和氧化型、还原型谷胱甘肽系统相结合的方法对表达的 2C 蛋白进行复性<sup>[9]</sup>，该方法简便实用，将含变性蛋白的溶液透析，变性剂通过膜被去除，里面的蛋白质开始复性。试验结果表明，本研究所采用的复性条件对 2C 融合蛋白有较好的复性效果。在用 Probond purification system 进行纯化时，我们对操作手册中所提供的方案进行了改进，采用咪唑梯度洗脱进行目的蛋白的纯化，纯化效果较好。因为重组蛋白在与 Ni-NTA 树脂结合的程中，会非特异性地结合一些其他的杂蛋白，使目标蛋白纯度降低，而低浓度咪唑能够有效的阻止非特异性结合，不仅得到高纯度的目的蛋白，也有利于 Ni-NTA His Bind 交换树脂的再生利用。

FMDV 灭活疫苗去除了大部分的 NSP 成分，免疫动物后也没有病毒增殖，因而也就没有 NSP 的表达和相应抗体的产生；而自然感染动物体内则有病毒的增殖，在病毒的装配过程中有 NSP 的表达，可刺激机体产生抗体，这就为建立检测 FMDV 感染动物与灭活疫苗免疫动物的方法提供了理论依据。目前许多实验室开展了检测 FMDV NSP 3A、3B、3D、2C 等抗体方法的研究，并比较了这些指标用于鉴别免疫动物和自然感染动物的效果。已有研究表明，2C 抗体虽然可以鉴别感染动物和免疫动物，但猪、牛血清中的 2C 抗体消退得要比 3ABC 快，却免疫牛中偶尔还可以检测到 2C 抗体。目前认为仅检测 3D 抗体不能区分感染动物与免疫动物，因为疫苗中含有少量的 3D 蛋白，经过多次免疫后，在免疫动物体内也能检测到 3D 抗体。近年来许多实验验证了 3AB、3ABC 抗体作为指标的可靠性，已有的 6 种商品化试剂盒中有 5 种是用于检测 3ABC 抗体<sup>[10]</sup>。Bergmann 等比较

3A、3B、2C、3D 和 3ABC 作为诊断抗原,应用间接 ELISA 方法检测感染牛的敏感性和准确性,以 3A、3B 和 3ABC 为抗原的检测 results 和病毒分离与 EITB 的检出结果最接近,尤其以 3ABC 检出结果最好<sup>[11]</sup>。虽然世界上多个实验室建立了多种检测 FMDV NSP 抗体的 ELISA 方法,但至今没有形成统一的判定标准,而且不同方法的检测结果也有差异<sup>[12]</sup>,这就为进一步提高 NSP 抗体检测的可靠性提出了要求。通过检测多个 NSP 的抗体,来综合判断感染或免疫动物是目前研究的一个方向,OIE 口蹄疫诊断标准已经推荐了一种检测 5 种 NSP 抗体的 EITB 方法,有少于两种 NSP 的印迹信号弱于阴性对照血清,则该份血清所对应的动物就可判为已感染过 FMDV。通过流式分析和多色荧光信号来检测不同的 NSP 抗体也已有报道<sup>[13]</sup>。

本研究通过 Bradford 法确定纯化蛋白的含量,作为诊断抗原,应用间接 ELISA 方法滴定抗原效价,结果显示:3A、3B 和 2C 均具有很好的反应活性;3A 对牛和羊阳性血清的反应性强于猪阳性血清,3B 对猪阳性血清的反应信号更强。说明不同宿主对不同的 NSP 的抗体应答存在差异。为了进一步比较几种 NSP 检测羊血清的差异,以 3A、3B、2C、和 3D 作为诊断抗原,采用间接 ELISA 方法检测田间羊血清,并与已建立的 3ABC-ELISA 方法比较。结果表明,3A 比 3ABC 多检出一份阳性结果,3B 比 3ABC 漏检两份,由此看出,以 3A 和 3B 为抗原的检测 results 与 3ABC 的检出结果最接近。与 3ABC 的检测 results 比较,2C 漏检四份样品,多检出三份阳性。这样的结果有报道认为<sup>[11]</sup>,可能是由原核表达的 2C 蛋白结构的某些差异性导致的。3D 漏检三份,比 3ABC 多检出 13 份阳性,推测这可能是因为有些动物体经过免疫后,在体内产生了 3D 抗体。所以,基于单个非结构蛋白抗体检测的方法对不同宿主进行检测时,可能存在漏检和出现假阳性的问题。为了提高检测准确性,这就需要建立同时检测多个非结构蛋白抗体的方法,以提高 NSP 抗体检测方法的敏感性和对某些临界值血清的检出率。3ABC 抗体检测 ELISA 和多个 NSP 抗体检测 EITB 方法的联合应用能满足这一要求,这种情况尤其适用于口蹄疫长期散发地区的畜群净化检疫。本研究为建立检测多个 NSP 抗体的 EITB 方法奠定了基础。

#### 参 考 文 献

[1] 谢庆阁主编. 口蹄疫. 北京: 中国农业出版社, 2004.

- [2] Mackay DKJ, Forsyth MA, Davies PR, *et al.* Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, 1997, 16: 446–459.
- [3] Sorensen KJ, Madsen KA, Madsen EA, *et al.* Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol*, 1998, 143: 1–16.
- [4] Lubroth J, Brown F. Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated animals. *Res Vet Sci*, 1995, 59: 70–78.
- [5] Mackay DKJ. Proceedings of the final meeting of concerted action ct93 0909. Special Issue of the Veterinary quarterly, *Journal of Clinical Sciences and Epidemiology*, 1998, 20 (supplement 2): S2–S26.
- [6] Frederick MA. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆. 第三版. 北京: 科学技术出版社, 2002.
- [8] 曹轶梅, 卢曾军, 刘在新, 等. 用大肠杆菌表达 FMDV NSP 3ABC 鉴别感染与注苗动物 ELISA 方法的建立. 畜牧兽医学报 (*Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*), 2005, 36(4): 381–386.
- [9] 曹轶梅, 卢曾军, 刘在新, 等. 大肠埃希氏菌表达 FMDV 3AB 非结构蛋白的纯化复性与活性检测. 中国兽医科技(*Chinese journal of veterinary science and technology*), 2003, 23: 22–25.
- [10] Brocchi E, Bergmann IE, Dekker A, *et al.* Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 2006, 24(47-48): 6966–79.
- [11] Bergmann IE, Malirat EV, Neitzert E, *et al.* Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch Virol*, 2000, 145: 473–489.
- [12] Li Y, Ferris N, Hamblin P, *et al.* FAO phase XIX FMD Inter-laboratory Comparative Test Exercise on Serology. in: Report on discussions held in open session, 17-19 October 2006: 356–366.
- [13] Clavijo A, Hole K, Li M, *et al.* Simultaneous detection of antibodies to foot-and-mouth disease non-structural proteins 3ABC, 3D, 3A and 3B by a multiplexed Luminex assay to differentiate infected from vaccinated cattle. *Vaccine*, 2006, 24(10): 1693–704.

## Purification and reactivity of Foot-and-Mouth Disease Virus non-structural protein 3A, 3B and 2C expressed in *E. coli*

Yuanfang Fu<sup>1,2</sup>, Zengjun Lu<sup>1</sup>, Yimei Cao<sup>1</sup>, Jianhong Guo<sup>1</sup>, Xiaoli Zhang<sup>2</sup>,  
Meina Tian<sup>1</sup>, Zaixin Liu<sup>1\*</sup>, Xuepeng Cai<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology,  
National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute  
of Chinese Academy of Agriculture Science, Lanzhou 730046, China)

(<sup>2</sup>Veterinary College of Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** [Objective] To purify and to detect reactivity of non-structural proteins 3A, 3B and 2C expressed in the *Escherichia coli*. [Methods] FMDV NSP 3A, 3B and 2C containing the major B-cell antigenic sites were expressed in *E. coli*. We got renatured 2C protein by lysing of isolated inclusion body using high concentration of urea, and then diluted in a buffer system containing oxidized/reduced glutathione. Purified 3A, 3B and 2C were obtained by Ni-NTA His Bind Resin affinity chromatography. The reactivity of three NSPs with sera of different origin was measured using an indirect ELISA and Western-blot. The reactivity of three proteins was compared with 3ABC and 3D by detecting sera of clinically healthy sheep that were collected from epidemic region of Asia I FMD. [Results] Proteins 3A and 3B were solubly expressed in bacteria, and 2C was expressed to form inclusion body. All three products could react specifically with sera from FMDV infected animal by western-blot and ELISA. The high coincident rates were observed between 3A, 3B, 2C and 3ABC. [Conclusion] The results would provide useful materials for establishment of immunoelectro-transfer blot (EITB) diagnostic method, which could be used for differentiation of the FMDV infected animals from the vaccinated animals.

**Keywords:** Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV); non-structural protein (NSP); immunoelectro-transfer blot (EITB)

Supported by the National Key Technologies R&D Program(2006BAD06A12) and the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(2005CB523201)

\*Corresponding author. Tel: +86-931-8342587; E-mail: liukey@public.lz.gs.cn

Received: 13 December 2007/ Revised: 19 February 2008

### 科学出版社生命科学新书推介 (2008-04)

MicroRNA 研究方法 (导读版)

原著: John J. Rossi, Gregory J. Hannon

导读: 屈良鹄

978-7-03-021477-5 ¥ 88.00 2008 年 4 月 出版

MicroRNA 在动植物的生长、发育、分化、生殖等生理过程中发挥着重要的作用, 本书是最新的关于 microRNA 研究的方法学专著。两位主编 John J. Rossi 博士和 Gregory J. Hannon 博士, 分别来自美国加州生物科学研究所 & 贝克曼研究所和美国冷泉港实验室, 他们都是 RNA 干扰领域的知名专家。参与编写的 34 位作者分别来自不同国家的 13 个研究小组, 在 microRNA 研究的各个领域取得过突破性成果。本书的 13 个章节分别介绍了这 13 个研究小组所做的部分工作及取得的成果, 并以他们的研究为主线, 系统地汇集了其他研究小组的重要研究成果和主要研究方法。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文字 联系电话: 010-64031535 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目