

研究简报

# FMDV 整联蛋白受体 $\beta_1$ 亚基的克隆及其配体黏附区多抗的制备

杜平<sup>1</sup>, 尚佑军<sup>1</sup>, 马军武<sup>1</sup>, 贺延玉<sup>3</sup>, 孙晓林<sup>2</sup>, 刘湘涛<sup>1</sup>

1 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, 兰州 730046

2 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070

3 甘肃农业大学研究测试中心, 兰州 730070

**摘要:** 采用 RT-PCR 技术从牛气管组织扩增出 2400 bp 的 $\beta_1$ 基因, 回收纯化连入 PGEM-T 载体, 测序。用 ExPasy 软件对 $\beta_1$ 基因的抗原性进行分析, 选取胞外区 334~861 bp 的配体结合区与 6×His 融合, 在大肠杆菌中大规模诱导表达, 并经 Ni<sup>2+</sup>亲和柱层析纯化。通过 SDS-PAGE 鉴定后, 应用纯化蛋白免疫新西兰家兔, 获得效价在 1:12 800 以上的多抗, Western blotting 鉴定表明此抗体可特异性的与表达的融合蛋白作用。

**关键词:** 口蹄疫病毒, 整联蛋白,  $\beta_1$ 亚基, 配体结合区, 多克隆抗体

## Cloning of Foot-and-Mouth Disease Virus Integrin Receptor $\beta_1$ Subunit and Antibody Production to Its Ligand-binding Domain

Ping Du<sup>1</sup>, Youjun Shang<sup>1</sup>, Junwu Ma<sup>1</sup>, Yanyu He<sup>2</sup>, Xiaolin Sun<sup>2</sup>, and Xiangtao Liu<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Animal Virology, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Lanzhou 730046, China

2 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

3 Instrumental Research & Analyse Center, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

**Abstract:** We produced  $\beta_1$  gene which is about 2400 bp by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from bovine trachea, reclaimed and purified, then cloned the amplified fragment to pGEM-T easy vector, confirmed by sequencing. The immuno-dominant epitope of  $\beta_1$  gene was chosen by computer analysis and then syncretized ligand-binding domain from 346 bp to 843 bp of cytoplasm with six histidine, expressed LBD protein massly in *E. coli* BL21 (DE3), and identified by SDS-PAGE. The fusion protein was purified with Ni-NTA affinity chromatography and immunized New Zealand rabbits preparing of its polyclonal antibody, the specific antibody titer was above 1:12 800 detected by indirect ELISA, the result of Western blot showed that this antibody could be recognized by LBD fusion protein.

**Keywords:** foot-and-mouth disease virus, integrin,  $\beta_1$  subunits, ligand-binding domain, polyclonal antibody

**Received:** October 9, 2007; **Accepted:** November 21, 2007

**Supported by:** the National key Technology R & D Program (No. 2006BAD06A03).

**Corresponding author:** Xiangtao Liu. E-mail: HNXiangtao@hotmail.com

国家科技支撑计划(No. 2006BAD06A03)。

多年来,人们一直认为细胞受体决定着病毒的组织嗜性和细胞趋向<sup>[1]</sup>。口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)各血清型病毒粒子表面的氨基酸序列包括细胞受体识别位点周围的区域则有所不同,但各型 FMDV 感染易感动物引起的特征性症状十分相似,如高热,口、鼻、舌头、四肢、乳头等部位囊层皮的水泡。因此,各型 FMDV 及其突变体通过细胞表面受体进入宿主细胞的机制可能相同<sup>[2]</sup>。

现已确定有两类受体与 FMDV 的感染有关,即硫酸乙酰肝素<sup>[3]</sup>(Heparan sulfate, HS)和整联蛋白(Integrin)<sup>[4,5]</sup>。HS 作为细胞受体只局限于一些毒株,且介导野毒株进入培养细胞时的作用还没得到证实,多项研究表明整联蛋白是病毒启动感染的受体<sup>[6,7]</sup>。整联蛋白是细胞表面的一种膜蛋白,由 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基以非共价形式结合而成的异二聚体,担负着细胞间及细胞与基质间的粘附、细胞内外信号转导等功能<sup>[8]</sup>。运用反向遗传学研究发现,缺失或敲除 RGD [arginine-glycine-aspartic acid, 精氨酸-甘氨酸-天(门)冬氨酸]三联体的 FMDV cDNA 的感染性会消失,不能与细胞结合并引起易感动物发病。证实 FMDV 借助病毒粒子表面的 RGD 三联体与整联蛋白结合侵入敏感细胞<sup>[2]</sup>。目前所确定的 FMDV 整联蛋白受体有 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_8$ <sup>[9]</sup>。

本研究旨在克隆 $\beta_1$ 亚基的基因并制备其配体结合区(Ligand-binding domain, LBD)的多克隆抗体,为下一步阐明 $\alpha_v\beta_1$ 在口蹄疫病毒感染时的作用,研究各毒株对其利用率奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

牛气管组织采自青海屠宰场;克隆载体 PGEM-T、表达载体 pET-28a、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3)由本实验室保存;RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司;Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I 购自 TaKaRa 公司;低分子量标准蛋白购自上海公司;Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱、His-bind purification kit 购于 Novagen 公司;免疫用的新西兰家兔由本所动物场提供。

### 1.2 引物的设计及总 RNA 的提取

参照 GenBank 公布的牛源、猪源、人源 $\beta_1$ 亚基

的 AF468058、X07979、U27351 核苷酸序列号设计并合成两对克隆引物。B<sub>1</sub>引物的上游序列为:5'-CTGGATTGGACTGATCAGTTC-3';下游引物为:5'-CTCATACTTCGGATTAAC-3'。B<sub>2</sub>引物上游序列为:5'-GCAAATGCCAAATCATGTGGAG-3';下游引物为:5'-GTGTCCCATTGGCATTTC-3'。

取 30 mg 牛气管组织,加入 600  $\mu$ L Buffer RLT,均浆后按 QIAGEN RNeasy<sup>TM</sup> Mini Handbook 制备总 RNA。提取产物直接用于 RT-PCR,先用引物 B<sub>1</sub>,然后用引物 B<sub>2</sub>进行巢式扩增。PCR 产物经回收纯化后插入载体 PGEM-T 中,构建克隆载体 pGEM $\beta_1$ 。

### 1.3 LBD 表达载体的构建

对测序结果用 Expasy 软件进行抗原性分析,结合相关资料设计配体结合区表达引物。上游引物 LBD<sub>1</sub>: GTA GAATTC ACT CAA ATC CAG CCA CAG CAG,酶切位点为 *Eco*R I;下游引物 LBD<sub>2</sub>: CTA CTCGAG ATC TCC AGC GAA GTG AAA,酶切位点为 *Xho* I。以 pGEM $\beta_1$ 模板,扩增目的片段,回收纯化后经 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切,定向亚克隆至表达载体 pET-28a 中,得到重组质粒 pETLBD。

### 1.4 融合蛋白的诱导表达

将测序正确的 pETLBD 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),铺 kan<sup>+</sup>板,平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中过夜;挑一个单克隆于液体 LB (含 100 mg/L Kan) 中 37 $^{\circ}$ C 摇培约 12 h;以 1:100 的比例扩培菌体 37 $^{\circ}$ C 约 2~3 h,待 A<sub>600</sub>=0.6~0.8 h,加入 1 mmol/L IPTG(异丙基硫代- $\beta$ -D 半乳糖苷);在 37 $^{\circ}$ C 继续摇培 3 h、5 h、7 h、9 h 时分别收集菌液 1 mL,12 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 1 min,收集菌体;加入 100  $\mu$ L 上样缓冲液,沸水煮样 5 min,所得上清为诱导后的菌体全蛋白,同样方法制备诱导前的菌体全蛋白,进一步使用 SDS-PAGE 进行检测。

### 1.5 亲和纯化融合蛋白

SDS-PAGE 检测确定有诱导条带之后,进行大规模的蛋白诱导,收集诱导 9 h 的菌体。按 Novagen 的 His-bind Purification Kit 使用说明,利用 6 mol/L 尿素在变性条件下纯化包涵体蛋白。将上清转入加有 0.2 mL Ni<sup>2+</sup>-NTA 层析柱中。然后分别用 10 倍体积的结合缓冲液和 6 倍体积的冲洗缓冲液洗涤,用 1 mL 洗脱缓冲液洗脱重组蛋白。SDS-PAGE 电泳检测纯化的融合蛋白。洗脱缓冲液洗脱的融合蛋白用生物半透膜脱盐,利用紫外吸收法测定蛋白浓度和产量。

## 1.6 多克隆抗体的制备

将透析定量后的 pETLBD 融合蛋白与弗氏完全佐剂等体积等量乳化, 采用背部皮下多点免疫新西兰家兔。4 只家兔分为两组, 每组两只, 一组每只注射 750  $\mu\text{g}$ , 另一组每只注射 375  $\mu\text{g}$ 。26 d 后, 以同样剂量的抗原与弗氏不完佐剂等体积等量乳化, 同样方法进行二免; 10 d 后, 用同样剂量的抗原加强三免。从首免算起, 分别在 13、26、36、46 d 耳缘静脉采血, 进行间接 ELISA 检测。三免 10 d 后颈总动脉取血, 37°C 孵箱放置 3 h, 4°C 冰箱过夜。吸取血清, 5000 r/min 离心 10 min。取上清加入 1/2 体积甘油-70°C 保存备用。

## 1.7 兔抗 pETLBD 多克隆抗体的 ELISA 检测和 Western blotting 鉴定

将纯化的 pETLBD 融合蛋白以 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  每孔 100  $\mu\text{L}$  包被 96 孔酶标板, 以免疫前的兔血清作为阴性对照, 羊抗兔 IgG-HRP 的稀释度为 1:15 000。以同样方法纯化的其他 His 融合蛋白作为交叉反应对照, 将已纯化的免疫血清做( $\times 100$ 、 $\times 200$ 、 $\times 400$ 、 $\times 800$ 、 $\times 1600$ 、 $\times 3200$ 、 $\times 6400$ 、 $\times 12 800$ )不同稀释后, 用间接 ELISA 法检测抗体效价。取 BL21 (DE3) 感受态菌和转化重组 pET-LBD 质粒的 BL21 (DE3) 在 IPTG 诱导前、诱导后的细菌, 以及纯化的 His-LBD 融合蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 以兔抗融合蛋白血清为一抗, Anti-rabbit IgG-HRP 为二抗进行 Western blot 测定抗体的特异性。

## 2 结果

### 2.1 $\beta_1$ 基因的扩增和克隆

1.0%的琼脂糖凝胶电泳显示 RT-PCR 产物呈弥散状态, 用另一对引物进行巢式扩增, 得到略大于 2000 bp 的清晰条带(图 1), 回收纯化后连接至载体 pGEM-T, PCR 鉴定与目的条带大小相符(图 2), 送大连宝生物工程有限公司测序。

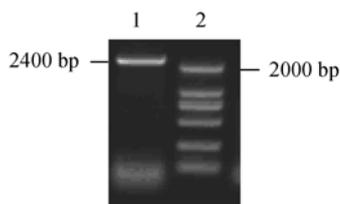


图 1 利用 B<sub>3</sub>/B<sub>4</sub> 引物 PCR 扩增  $\beta_1$  基因

Fig. 1 PCR products of  $\beta_1$  gene with B<sub>3</sub>/B<sub>4</sub> primer

1: PCR products of  $\beta_1$  gene with B<sub>3</sub>/B<sub>4</sub>; 2: marker DL-2000

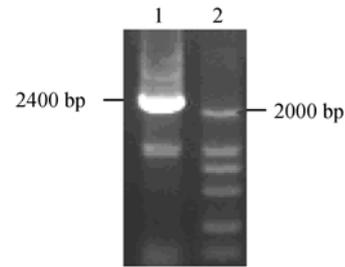


图 2 克隆质粒 pGEM $\beta_1$  的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of pEXT $\beta_1$  by PCR

1: PCR identification; 2: marker DL2000

### 2.2 $\beta_1$ 亚基的抗原性分析

软件分析 $\beta_1$  基因的抗原表位结果显示, 整个分子抗原性均较强, 存在多个抗原表位, 各参数分析结果如图 3。

### 2.3 表达载体 pETLBD 的构建

以克隆载体 pGEM $\beta_1$  为模板扩增目的片段, 产物经 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析, 与预期片段大小相符, 回收纯化后定向亚克隆至表达载体 pET-28a 中。挑取阳性的重组子经双酶切及序列测定表明与 pGEM $\beta_1$  上的序列相一致。

### 2.4 His-LBD 融合蛋白的表达及纯化

将测序正确的 pETLBD 质粒转入大肠杆菌 BL21 中诱导表达。结果显示, 菌体全蛋白中有明显 26 kD 的诱导条带, 而诱导前的菌体全蛋白没有, 证明目的蛋白得到表达(图 6)。菌体蛋白经 His-bind purification kit 亲和层析纯化后得到纯化的 His-LBD 融合蛋白, SDS-PAGE 结果表明, 纯化的融合蛋白分子量约为 24.96 kD(EditSeq 软件分析表明目的蛋白分子量大约为 19.84 kD, 融合标签的分子量约为 5.12 kD)(图 7), 纯度为 95%以上。紫外吸收法测得蛋白浓度为 5.0 mg/mL 左右, 产量为 30 mg/L 发酵物。

### 2.5 抗体效价检测

在首免 13、26、36、46 d 耳缘静脉采血, 用间接 ELISA 检测抗体效价, 三免疫后测得抗体效价为 1:12 800, 且无交叉反应。抗体变化情况如图 8 所示。

### 2.6 多克隆抗体的特异性鉴定

为能真实地反映纯化后的 His-LBD 抗体的质量, 笔者以纯化的 His-LBD 多克隆抗体为一抗, 羊抗兔 IgG-HRP 为二抗, 与原核表达的 His-LBD 蛋白进行 Western blot 分析。结果表明, 笔者制备的抗 His-LBD 多克隆抗体 1000 倍稀释液能识别原核表达的 His-LBD 蛋白片段, 具有较好的特异性(图 9)。

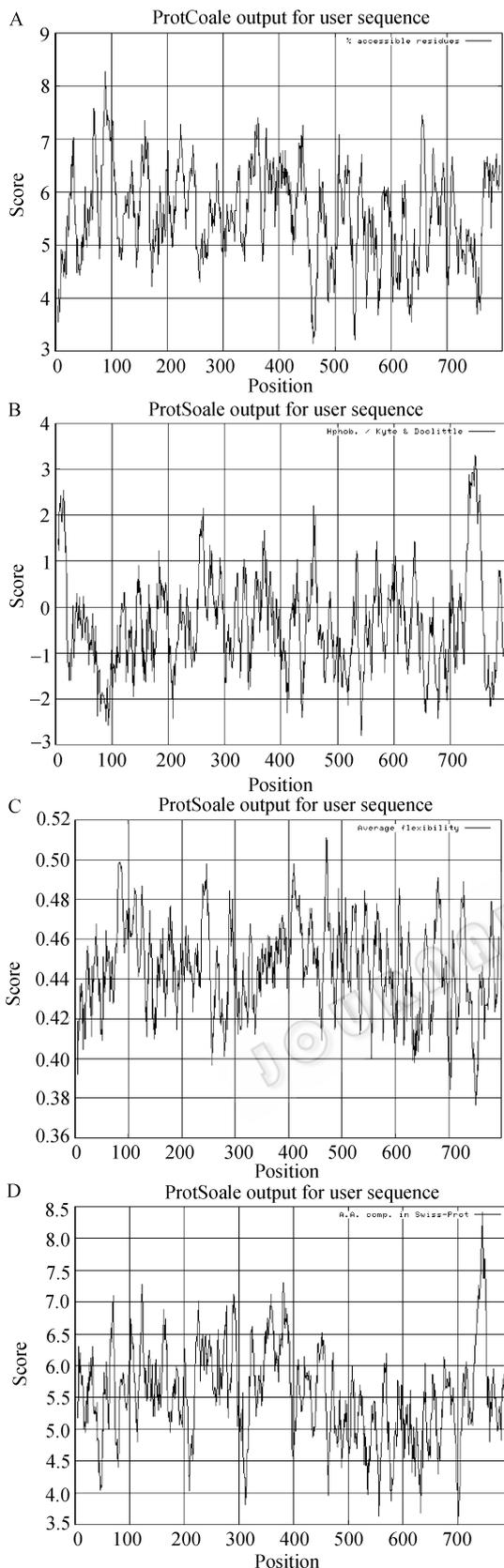


图 3  $\beta_1$  蛋白的可接近性(A)、亲水性(B)、柔性(C)、抗原性(D)分析

Fig. 3 The accessible(A), hydrophilic(B), flexible(C) and antigenic(D) evaluation of  $\beta_1$  protein

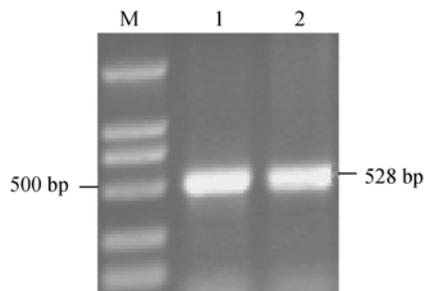


图 4 LBD 的 PCR 扩增  
Fig. 4 PCR products of LBD  
M: marker DL-2000; 1, 2: PCR products of LBD

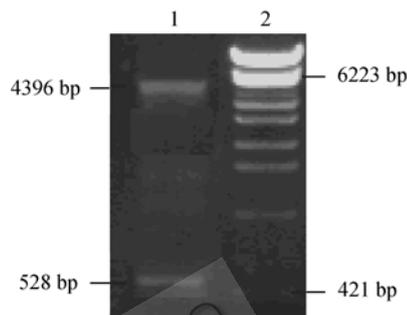


图 5 重组质粒 pETLBD 双酶切鉴定  
Fig. 5 Identification of recombinant pETLBD  
1: pETLBD digest with *EcoR* I and *Xho* I; 2:  $\lambda$ -EcoRI 14 I

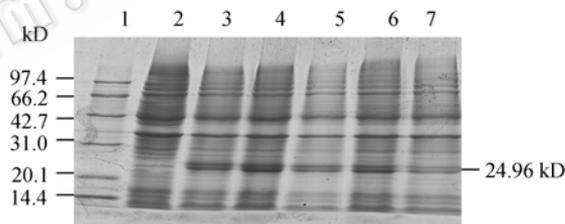


图 6 重组质粒在大肠杆菌不同诱导时间的 SDS-PAGE 结果

Fig. 6 Expression of the recombinant protein induced by IPTG at different time

1: protein marker; 2: non-induced bacteria with pETLBD(+); 3~7: the target recombinant proteins induced by 1.0 mmol/L of IPTG at 11, 9, 7, 5 and 3 h, respectively

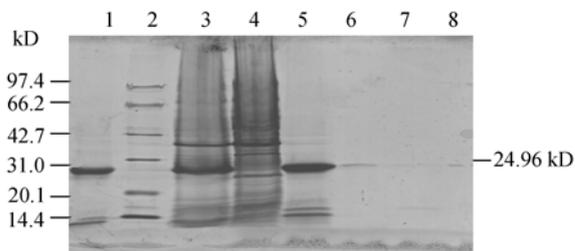


图 7 亲和层析纯化流程 LBD 蛋白 SDS-PAGE 图

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of LBD protein

1: Dialyze liquid of LBD protein; 2: molecular weight markers; 3: liquid of bagged-body; 4: non-induced *E. coli* liquid; 5: concentration liquid of Dialyzing LBD protein; 6: penetration liquid; 7: penetration liquid after washing buffer; 8: gather liquid after elution buffer

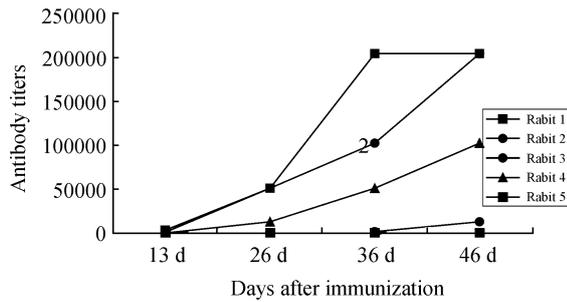


图8 免疫兔抗体效价变化曲线

Fig. 8 The changing antibody titers of sera of immunized Zealand rabbits

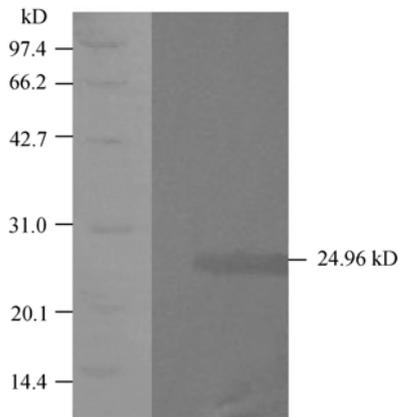


图9 LBD融合蛋白表达的Western blot检测

Fig. 9 Western blot analysis of recombinant LBD protein  
1: prestained protein marker; 2: Western blot of supernatant of LBD with Anti-His-LBD polyclonal antibody

### 3 讨论

#### 3.1 整联蛋白的功能分析

现在对细胞受体的研究均是在培养细胞上,由于整联蛋白在细胞间充当的多种功能,使在本动物上对其进行研究不太可能。目前对各整联蛋白在介导口蹄疫病毒感染所起的作用还不太清楚,比较确切的是 $\alpha_v\beta_6$ ,已确定 $\alpha_v\beta_6$ 是口蹄疫病毒感染时最重要、最常用的受体,与病毒的初始吸附有关<sup>[10]</sup>;虽然一些毒株对 $\alpha_v\beta_3$ 也有较高的利用率,但 $\alpha_v\beta_3$ 与病毒的黏合能力太弱<sup>[11]</sup>,加之 $\alpha_v\beta_3$ 只分布于脉管系统<sup>[12]</sup>,确定 $\alpha_v\beta_3$ 与病毒的原初感染无关;各组织中 $\alpha_v\beta_1$ 的表达量相对于其它整联蛋白较低,特别是 $\alpha_v\beta_6$ <sup>[4]</sup>,感染FMDV后,其它整联蛋白的量都在增加, $\alpha_v\beta_1$ 的量却无明显变化<sup>[13]</sup>,但一些毒株对 $\alpha_v\beta_1$ 却具有很高的利用率,Duque等的研究发现O型毒株对 $\alpha_v\beta_1$ 的利用率要比 $\alpha_v\beta_3$ 的高<sup>[14]</sup>。因此 $\alpha_v\beta_1$ 在其表达量无太大变化时如何介导感染是多年来研究的热点和难点,

虽在人和动物上作了不少研究,但收获甚微。

$\beta_1$ 整联蛋白是整联蛋白中最大的家族,至少可与12种 $\alpha$ 亚基相结合,但作为口蹄疫病毒受体的只有 $\alpha_v\beta_1$ <sup>[4]</sup>。动物体内 $\alpha_v$ 亚基和 $\beta_1$ 亚基的表达量很高,但 $\alpha_v\beta_1$ 的合成量却很少,使直接从动物体内提取、纯化 $\alpha_v\beta_1$ 的抗原不大可能,目前还无相应的单抗<sup>[5]</sup>。Jackson<sup>[4]</sup>等在CHO细胞中研究 $\alpha_v\beta_1$ 时发现,口蹄疫病毒对CHO细胞的吸附可被抗 $\alpha_v$ 的单抗或含有RGD序列的多肽阻断,但不能被抗 $\alpha_v\beta_5$ 的单抗所阻断,表明 $\alpha_v\beta_1$ 与口蹄疫病毒的吸附主要是 $\alpha_v$ 亚基,但配体结合区是由 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基共同组成,因此 $\alpha_v$ 亚基所含的配体结合区并不完整。为了验证 $\beta_1$ 亚基配体结合区在 $\alpha_v\beta_1$ 与口蹄疫病毒结合时所起的作用,本研究诱导表达其配体结合区。

#### 3.2 $\beta_1$ 亚基配体结合区的确定

许多整联蛋白的配体是线性多肽,其中有7种与RGD三联体结合<sup>[9]</sup>。整联蛋白和其配体结合的区域为配体结合区,这些区域由 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基共同组成,且呈非连续性分布<sup>[15]</sup>。虽应用各种方法确定与配体黏附相关的位点,但目前并不清楚。多项研究表明,配体黏附位点主要分布在 $\alpha$ 亚基氨基端重复序列的 $\beta$ 折叠(存在七个这样的折叠)和 $\beta$ 亚基 von Willebrand factor A区中<sup>[16]</sup>。Stanley等<sup>[17]</sup>研究发现,gpIIIa的109~171aa区域使RGD三联体变为了化学上的交叉结合,而这个区域在所有 $\beta$ 亚基中都很保守(序列同源率为76%),表明这个区域可能在这种受体家族中起一定的作用。Bajt(1992)<sup>[18]</sup>、Puzon-McLaughlin(1996)等<sup>[19]</sup>相继确定 $\beta_1$ 的Asn224, Asp233, Asp267, Asp295对其与配体的结合起着关键的作用。Catherine等<sup>[15]</sup>(1998)发现,将 $\alpha_v\beta_1$ 的187-193区域用 $\alpha_v\beta_3$ 的相关区域代替后, $\alpha_v\beta_1$ 能与玻连蛋白、vWF和VN结合。

蛋白抗原表位预测要根据免疫原性与结构特性的关系,重点考虑蛋白亲水性、两亲性、分子运动性、表面可及性、序列多变性、肽链的末端,并以表面可及性、多变性、两亲性为重中之重。概括而言,好的抗原表位须具备高亲水性和柔韧性,并位于结构表面<sup>[15]</sup>。配体结合区是与病毒结合的区域,其须具有高度的亲水性且可变性较强才能达到与配体的高度结合。运用Expasy生物软件对 $\beta_1$ 蛋白的抗原指数、蛋白柔性、可及性及亲水性预测分析发现:

$\beta_1$  蛋白的 400~700aa 的抗原指数为全蛋白中最低; 300~400aa 虽抗原指数、可及性、亲水性较高, 但蛋白柔性较低; 0~100aa 中含有信号肽序列, 且亲水性为全蛋白中最低, 故这 3 个区段均不是理想的抗原表位。

鉴于以上资料及 Duque 等[14](将 346~843 bp 的区域定为配体结合区)的研究, 本研究将 $\beta_1$  基因的 334~861 bp 区域定为其配体结合区。

### 3.3 多克隆抗体效价及反应特异性分析

间接 ELISA 检测抗体效价发现, 以 750 ug 免疫的 1、2 号兔最终抗体效价都达到了 1:204800, 但 1 号兔二免、三免后无变化。3、4 号兔以 375 ug 免疫, 3 号兔的效价为 1:102400, 4 号为 1:12800。高剂量免疫的 1、2 号二免、三免后的 OD 值变化幅度不大; 低剂量免疫的两只, 其中一只的效价在 13 天时几乎为阴性, 26 天时只达到 1: 800; 4 号兔的效价在 36 天时与高剂量的 1 号、2 号兔 26 天时接近, 46 天时的效价与 1 号、2 号兔 36 天时接近。从以上可以看出, 抗原所诱导的免疫反应具有阈值, 当达到这一值时, 再加强免疫也无大的变化。根据 4 号兔抗体效价变化趋势可以预测, 再加强免疫其效价也会和 1、2 号接近, 因此, 在常规免疫时, 可根据具体试验的需要, 采取大量、少次、短时免疫和少量、多次、长时免疫的方法。虽然各梯度免疫的最终效价有所差异, 但均可说明本试验筛选的抗原具有较好的抗原性。3 号兔的抗体效价较低, 可能与个体差异有关, 因其重量、体形要比其它的稍大。对照阴性血清的抗体滴度与空白对照接近, 表明机体所表达的受体只限于局部组织。Western blot 检测表明, 所制备的抗 LBD 多克隆抗体具有较强的反应特异性, 能够与表达的重组蛋白发生特异性反应。ELISA 和 Western blot 分析表明本研究制备的抗 LBD 多克隆抗体可用于下一步在体外培养细胞上验证 $\beta_1$ 亚基 LBD 作用的研究。

本研究成功克隆了 $\beta_1$ 亚基的全基因组, 并在大肠杆菌中表达其配体结合区, 获得了相应的多抗, 为确定 $\beta_1$ 亚基配体结合区的作用, 研究 $\alpha_v\beta_1$ 的组织分布, 阐述口蹄疫各毒株对其利用率及在感染过程中的作用奠定了基础, 同时有望为口蹄疫的诊断提供新的诊断方法。

## REFERENCES

- [1] Schneider-Schaulies. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *Gen Virol*, 2000, **81**(6): 1413–1429.
- [2] Jackson T, Ellard FM, Abu-Ghazaleh R, *et al*. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 1996, **70**: 5282–5287.
- [3] Jackson T, Mould AP, Sheppard D, King A MQ. The integrin  $\alpha_v\beta_1$  is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2002, **76**: 935–941.
- [4] Jackson, T, Sheppard D, Denyer M, *et al*. The epithelial integrin  $\alpha_v\beta_6$  is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, **74**: 4949–4956.
- [5] Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Sevilla N, *et al*. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol*, 2000, **74**: 1641–1647.
- [6] Baranowski E, Sevilla N, Verdagner N, *et al*. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol*, 1998, **72**: 6362–6372.
- [7] Armulik A, Nilsson I, *et al*. Determination of the border between the transmembrane and cytoplasmic domains of human integrin subunits. *Biol Chem*, 1999, **274**: 37030–37034.
- [8] Jackson Terry, Clark Stuart, Berryman Stephen, *et al*. Integrin  $\alpha_v\beta_8$  functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the  $\beta$ -chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol*, 2004, **78**: 4533–4540.
- [9] Berryman Stephen, Clark Stuart, Paul Monaghan, *et al*. Early events in integrin  $\alpha_v\beta_6$  mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2005, **79**: 8519–8534.
- [10] Duque H, LaRocco M, William T, *et al*. Interactions of foot-and-mouth disease virus with soluble bovine  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_6$  integrins. *J Virol*, 2004, **78**: 9773–9781.
- [11] Monaghan P, Gold S, Simpson J, *et al*. The  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor for foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *Journal of General Virology*, 2005, **86**: 2769–2780.
- [12] Jackson, T, King AMQ, Stuart DI, Fry E. Structure and receptor binding. *Virus Res*, 2003, **91**: 33–46.
- [13] Duque H, Bax B. Foot-and-mouth disease virus receptors: comparison of bovine  $\alpha_v$  integrin utilization by type A and O viruses. *J Virol*, 2003, **72**: 2500–2511
- [14] Catherine F, Katherine C, Louise B, *et al*. Regulation the extracellular ligand binding activity of integrin. *Frontiers in Bioscience*, 1998, **3**: 684–700.
- [15] Takagi J, Kamata T, Meredith J, *et al*. Changing ligand specificities of alphavbeta1 and alphavbeta3 integrins by swapping a short diverse sequence of the beta subunit. *Biol Chem*, 1997, **272**: 19794–19800.
- [16] Tuckwell DS, Humphries MJ: A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factors A

domain. *FEBS Lett*, 1997, **400**: 297-303.

[17] Bajt M, Ginsberg M, Frelinger A, *et al*. A spontaneous mutation of integrin alphaIIb-beta3 (Platelet glycoprotein lib-IIIa) helps define a ligand binding site. *Biol Chem*, 1992, 3794.

[18] Puzon-McLaughlin W, Takada Y. Critical residues for

ligand binding in an I domain-like structure of the integrin beta1 subunit. *Biol Chem*, 1996, **271**: 20438-20443.

[19] Ferris NP, Abrescia NG, Stuart DI, *et al*. Utility of recombinant integrin alpha v beta6 as a capture reagent in immunoassays for the diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Virol Methods*. 2005, **127**(1): 69-79.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 盐水枝角类的生物学及海水培养利用

赵文 何志辉 殷守仁 著

978-7-03-020277-2 ¥60.00 2008年4月28日出版

本书是论述蒙古裸腹溞、西藏拟溞等盐水枝角类的生物学、生态学及海水培养利用技术的专著。首先概述了盐水枝角类的类群和生态分布，其次分别介绍了在海水中广泛应用的蒙古裸腹溞和正在驯化培养的西藏拟溞的生物学、生态学和培养利用技术，再次介绍了其他一些枝角类的海水盐度适应性及驯化培养的潜力。此外，还在不同章节中穿插总结评述了盐水枝角类研究的新思路和进一步应用前景。

本书可供水产学、生物学、生态学、环境科学等相关领域的研究人员、养殖业者和大专院校师生参考。



### 高黎贡山药用植物名录

钱子刚 李安华 主编

978-7-03-021346-4 ¥80.00 2008年4月20日出版

高黎贡山是中国生物多样性丰富的地区之一，具有动植物种属复杂、新老兼备、南北过渡、东西交汇的格局，素有“绿色宝库、物种基因库”等美称。其药用植物资源也异常丰富。编写人员历时两年多时间完成了野外调查工作和查阅、研究、整理文献工作，并编写了本书。本书共记载高黎贡山地区的药用植物 200 科、1298 种，其中蕨类植物 25 科、65 种；裸子植物 8 科、15 种；被子植物 167 科、1218 种。

适用于从事生物多样性保护研究和药学、中药学科研、教学工作，以及从事或有志于中药资源保护与开发利用研究的专业人士和学习者。



### MicroRNA 研究方法（导读版）

原著：John J. Rossi, Gregory J. Hannon 导读：屈良鹁

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 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>