

# VP4 基因鉴定非 EV71 非 CoxA16 手足口病病原体漏检的研究

木朝宇<sup>1</sup>, 庄晓亮<sup>1</sup>, 赵俊<sup>1</sup>, 陈敬贤<sup>1,2</sup>, 王明丽<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨肠道病毒 VP4 基因通用引物 PCR 诊断非肠道病毒 71 型 (EV71) 非柯萨奇病毒 A 组 16 型 (CoxA16) 手足口病 (HFMD) 病毒方案的准确性。方法 通过肠道病毒 VP4 基因通用引物 PCR 鉴定阜阳地区非 EV71 非 CoxA16 HFMD 病毒时, 显示两例病毒分离株为 Sabin-1 (命名为 Fy-01 和 Fy-02 株)。分别采用引物 EVP4/Q8 和 VP1 特异性引物对 Fy-01 和 Fy-02 分离株进行鉴定。结果 采用 VP4 基因 PCR 扩增产物测序证实, 两例病毒分离株为 Sabin-1, 而采用 EVP4/Q8 引物 PCR 扩增 Fy-01 分离株却存在异常的扩增条带, PCR 扩增产物测序结果为柯萨奇病毒 A 组 10 型 (CoxA10); 将 VP4 基因 PCR 产物制备成克隆载体挑选多个单克隆测序结果显示, Fy-01 分离株既存在 Sabin-1 VP4 基因, 又存在 CoxA10 VP4 基因, 证实为两种毒株混合感染。结论 临床诊断为非 EV71 非 CoxA16 HFMD 的病例, 如病原学诊断仅采用 VP4 基因 PCR 产物测序, 特别是针对多种肠道病毒混合感染引起的 HFMD, 其结果并不完全可靠。

**关键词** 手足口病; VP4 基因; Sabin-1; CoxA10

**中图分类号** R 373.25; R 725.125

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1198-05

近年来, 非肠道病毒 71 型 (human enterovirus 71, EV71) 非柯萨奇病毒 A 组 16 型 (coxsackievirus A16, CoxA16) 引起手足口病 (hand foot and mouth disease, HFMD) 暴发流行引起了人们的注意。2008 年新加坡的 HFMD 大爆发中, CoxA6 和 CoxA10 造成的患者占总患者人数的 35.3%<sup>[1]</sup>。2008 年芬兰 HFMD 爆发确定由 CoxA10 和 CoxA6 引起<sup>[2]</sup>。2010 年法国爆发 HFMD 患者中, CoxA10 比例为 39.9%, CoxA6 比例为 28%。2008 年西班牙爆发的脱甲病确认是由 CoxA10 引起的<sup>[3]</sup>。我国深圳市也报道过非 EV71 非 CoxA16 的人类肠道病毒 (human enterovirus, HEVs) 引起的 HFMD 的流行<sup>[4]</sup>。自我国山东

临沂市以及安徽阜阳市爆发由 EV71 引起的 HFMD 以来, 其病原学监测都集中在 EV71 和 CoxA16<sup>[4]</sup> 上。非 EV71 非 CoxA16 的其他引起 HFMD 病原体仅仅通过肠道病毒通用型引物进行检测。目前国内对非 EV71 非 CoxA16 的 HEVs 检测时, 常采用 VP4 基因进行型别鉴定<sup>[5-7]</sup>, 而该研究显示, 仅采用 VP4 基因 PCR 产物测序, 尤其是 HEVs 混合感染引起的 HFMD, 其结果并不完全可靠, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 病毒株来源** 两株 Sabin-1 疫苗分离株 Fy-01 和 Fy-02 由阜阳市疾控中心肠道病毒室提供, 由阜阳市疾控中心肠道病毒室对 2011~2012 年阜阳市第二人民医院收治入院的诊断为 HFMD 患儿咽拭子标本采用人横纹肌肉瘤细胞 (human rhabdomyosarcoma, RD) 和人喉癌上皮细胞 (human laryngeal carcinoma, Hep-2) 进行病毒分离的过程中, 发现两株 VP4 基因测序定型为 Sabin-1 的分离株命名为 Fy-01、Fy-02。步骤均参照 2009 年版的《手足口病预防控制指南》进行操作。

**1.2 RT-PCR 扩增** 采用 Promega SV Total RNA Isolation System (购自普洛麦格公司) 抽提两株 Sabin-1 疫苗分离株 RNA (方法参考试剂盒说明书), 再用 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (购自赛默飞世尔科技公司) 逆转录成 cDNA (方法参考试剂盒说明书), -80℃ 保存备用。参考文献<sup>[6-8]</sup>的方法如下, 见表 1: 采用 OL68-1 / MD90/EVP4 引物 (肠道病毒 VP4 基因通用引物) 和 TaKaRa PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (购自宝生物公司), 分别对两株 Sabin-1 疫苗分离株进行巢式-PCR, 以 OL68-1 和 MD90 为引物进行第一轮 PCR 扩增, 扩增条件: 98℃ 10 s, 55℃ 30 s, 68℃ 30 s, 共 40 个循环; 再以 OL68-1 和 EVP4 引物, 进行第二轮 PCR 扩增, 扩增条件: 98℃ 10 s, 55℃ 30 s, 68℃ 30 s, 共 40 个循环<sup>[5]</sup>。采用 Q7/Q8 引物分别扩增两株 Sabin-1 疫苗分离株 VP1 基因, 扩增条件: 98℃ 10 s, 58℃ 30 s, 68℃ 1 min, 共 35 个循环<sup>[8]</sup>。肠道病毒 EVP4/Q8 组合引物扩增两株 Sabin-1 疫苗分离

2014-04-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30872253); 安徽省科技厅科技攻关项目 (编号: 8010302179)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup>哥伦比亚大学病理与细胞生物学系, 纽约 10032

作者简介: 木朝宇, 男, 硕士研究生;

王明丽, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1952987441@qq.com

株 VP4-VP1 基因 扩增条件:98 ℃ 10 s ,45 ℃ 30 s ,68 ℃ 4 min ,共 35 个循环。

表 1 RT-PCR 引物

引物名称	引物序列方向(5'→3')	产物大小 (bp)
OL68-1	GGTAA(C/T)TTCCACCACCA(A/T/G/C)CC	
MD90	CCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAAT	754
EVP4	CTACTTTGGGTCTCCGTGTT	657
Q7	GGTTTTGTGTCAGCGTGAATGA	
Q8	AAGAGGTCTCTATTCCACAT	1100

**1.3 PCR 产物分别直接测序和 TA 克隆测序** 分别将不同引物扩增的 PCR 产物送交上海英骏生物技术公司测序;以及将 PCR 产物经过胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司)纯化后,使用 TA 克隆试剂盒(购自上海英骏生物技术公司)转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞(本室自制)后,挑取不同的单克隆菌落送交上海英骏生物技术公司测序,测序均采用双向测序,测序结果均使用 DNASTAR 软件进行拼接。

**1.4 序列分析** 测序结果分别在 Genbank 数据库 BLAST 比对以确定病毒株型别,并使用 Mega 5.2 软件对序列进行分析。

## 2 结果

**2.1 病毒培养** 使用 RD 细胞以及 Hep-2 细胞分别接种 Fy-01 和 Fy-02 两株 Sabin-1 疫苗分离株,24 h 后观察 RD 细胞及 Hep-2 细胞均出现典型的肠道病毒特征性细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),主要表现为细胞肿胀圆缩,胞质内颗粒物质增加,病变细胞脱落等,见图 1。

**2.2 两株 Sabin-1 疫苗分离株肠道病毒 VP4 基因通用引物 RT-PCR 检测** 使用肠道病毒 VP4 基因通用引物对两株 Sabin-1 疫苗分离株进行 RT-PCR 扩增。结果显示 Fy-01 和 Fy-02 两株分离株均在 500~750 bp 间扩增出单一条带,见图 2。PCR 产物测序并在 GenBank 数据库进行 BLAST 比对,结果显示均为 Sabin-1 VP4 基因序列。

**2.3 通过肠道病毒 VP1 基因引物 PCR 检测两株 Sabin-1 疫苗分离株** 分别使用引物 Q7/Q8 对 Fy-01 和 Fy-02 两株 Sabin-1 疫苗分离株 VP1 基因全长进行扩增,目的片段长度 1.1 kbp。扩增结果显示 Fy-01 Sabin-1 疫苗分离株 VP1 基因扩增阴性, Fy-02 Sabin-1 疫苗分离株 VP1 基因在 1.1 kbp 处扩增出单一条带,见图 3。

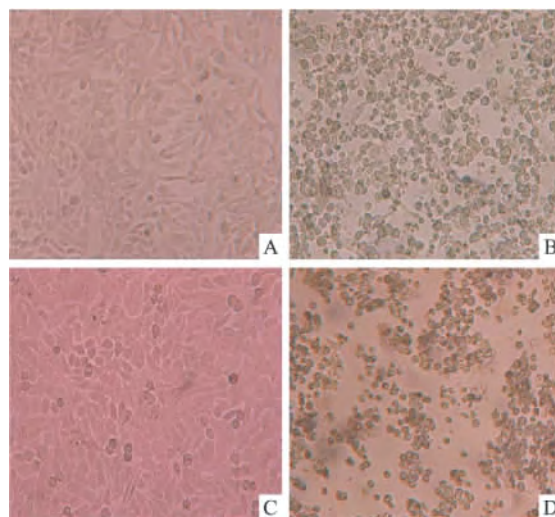


图 1 两株 Sabin-1 疫苗分离株病毒培养  $\times 100$

A: 正常 RD 细胞对照;B: 接种 Sabin-1 疫苗分离株后出现 CPE 的 RD 细胞;C: 正常 Hep-2 细胞对照;D: 接种 Sabin-1 疫苗分离株后出现 CPE 的 Hep-2 细胞

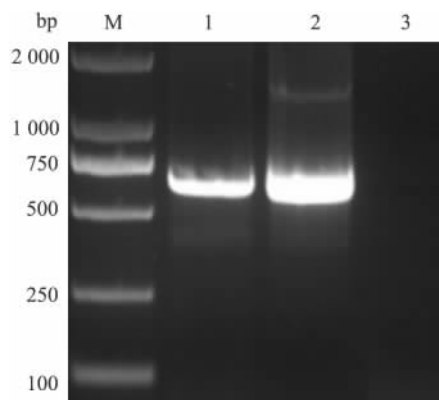


图 2 肠道病毒 VP4 基因通用引物 PCR 检测

M: Marker DL2000;1: Fy-01 Sabin-1 疫苗分离株肠道病毒 VP4 基因通用引物 PCR 检测;2: Fy-02 Sabin-1 疫苗分离株肠道病毒 VP4 基因通用引物 PCR 检测;3: PCR 阴性对照

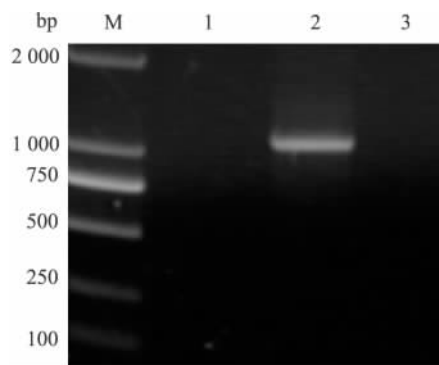


图 3 两株 Sabin-1 分离株 VP1 基因扩增

M: Marker DL2000;1: Fy-01 Sabin-1 疫苗分离株肠道病毒 VP1 基因 PCR 检测;2: Fy-02 Sabin-1 疫苗分离株肠道病毒 VP1 基因 PCR 检测;3: PCR 阴性对照

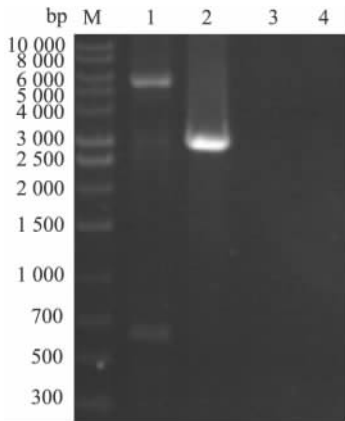


图4 两株 Sabin-1 分离株 VP4-VP1 基因扩增

M: Marker 10 000 bp;1:Fy-01 Sabin1 疫苗分离株 VP4-VP1 基因 PCR 检测;2:Fy-02 Sabin1 疫苗分离株 VP4-VP1 基因 PCR 检测;3: PCR 阴性对照;4:PCR 体系对照

2.4 采用肠道病毒 EVP4/Q8 组合引物 PCR 检测两株 Sabin-1 疫苗分离株 采用肠道病毒 EVP4/Q8 组合引物对 Fy-01 和 Fy-02 两株 Sabin-1 疫苗分离株的 VP4-VP1 基因进行扩增,扩增目的片段长度约 3 000 bp。Fy-01 Sabin-1 分离株 PCR 扩增后在 5 000 ~6 000 bp 处出现单一条带,Fy-02 Sabin-1 分离株 PCR 扩增后在 3 000 bp 处出现单一条带,分别将 PCR 产物测序,测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对发现 Fy-01 Sabin-1 疫苗分离株 PCR 扩增产物测序结果提示为 CoxA10 毒株,序列大小为

5 600 bp;Fy-02 Sabin-1 分离株 PCR 扩增产物测序结果提示为 Sabin-1。

2.5 PCR 产物 TA 克隆测序进一步验证 为了验证肠道病毒通用引物扩增 VP4 基因 PCR 产物直接测序可能存在漏检的现象,再次采用肠道病毒 VP4 基因 PCR 扩增产物 TA 克隆后随机挑取 7 个单克隆菌落送交测序公司进行测序,通过 Mega 5.2 软件对测序序列进行分析,7 个单克隆的测序结果显示 Fy-01 Sabin-1 疫苗分离株既存在 Sabin-1 VP4 基因又存在 CoxA10 VP4 基因序列,见图 5。结果分析表明采用肠道病毒 VP4 基因通用引物鉴定肠道病毒型别时,直接使用 PCR 扩增产物测序存在病原体漏检的可能,尤其针对肠道病毒混合感染的标本。

### 3 讨论

对已经鉴定为 Sabin-1 的 Fy-01 分离株的 VP4-VP1 基因进行扩增研究时发现,Fy-01 分离株为 Sabin-1 和 CoxA10 混合型。而使用 VP4 基因 PCR 产物的单克隆测序结果也显示通过 VP4 基因 PCR 产物测序鉴定为 Sabin-1 的 Fy-01 分离株属于 Sabin-1 和 CoxA10 混合型。这些研究表明:通过肠道病毒通用引物扩增 VP4 基因的 PCR 产物测序鉴定未知肠道病毒型别时,尤其是混合型感染的标本,其结果并不完全可靠。使用 Primer primer 5.0 软件进行引

#1	GTT TAG CAI TGG GGA TGT TTT TAT CAG GAC ATC CTT GAT GGG CTC GGT GAA CTT GGA AGG GTC TTG AGA GAA GTC CTG
#3	GTT TAG CAI TGG GGA TGT TTT TAT CAG GAC ATC CTT GAT GGG CTC GGT GAA CTT GGA AGG GTC TTG AGA GAA GTC CTG
#4	GTT TAG CAI TGG GGA TGT TTT TAT CAG GAC ATC CTT GAT GGG CTC GGT GAA CTT GGA AGG GTC TTG AGA GAA GTC CTG
#5	GTT TAG CAI TGG GGA TGT TTT TAT CAG GAC ATC CTT GAT GGG CTC GGT GAA CTT GGA AGG GTC TTG AGA GAA GTC CTG
#6	GTT TAG CAI TGG GGA TGT TTT TAT CAG GAC ATC CTT GAT GGG CTC GGT GAA CTT GGA AGG GTC TTG AGA GAA GTC CTG
#7	GTT TAG CAI TGG GGA TGT TTT TAT CAG GAC ATC CTT GAT GGG CTC GGT GAA CTT GGA AGG GTC TTG AGA GAA GTC CTG
#Sabin1	GTT TAG CAI TGG GGA TGT TTT TAT CAG GAC ATC CTT GAT GGG CTC GGT GAA CTT GGA AGG GTC TTG AGA GAA GTC CTG
#2	GTT CAA AGG GGC TGA TAG TTC TCT AAT AGA ATC TAA CAC CCG TTG TGT GAA TTT CTT TGG ATC TTG TGT GAA GTC TTG
#CA10	GTT CAA AGG AGC TGA TAG TTC TCT AAT AGA ATC TAA CAC CCG TTG TGT GAA TTT CTT TGG ATC TTG TGT GAA ATC TTG
#1	TTT CGA AGC CGC GTT ACT AGC TGA ATC TCT ATA ATA ATT AAT GGT GGT GTA ATT AAT GGT AGA ACC ACC ATA CGC TCT
#3	TTT CGA AGC CGC GTT ACT AGC TGA ATC TCT ATA ATA ATT AAT GGT GGT GTA ATT AAT GGT AGA ACC ACC ATA CGC TCT
#4	TTT CGA AGC CGC GTT ACT AGC TGA ATC TCT ATA ATA ATT AAT GGT GGT GTA ATT AAT GGT AGA ACC ACC ATA CGC TCT
#5	TTT CGA AGC CGC GTT ACT AGC TGA ATC TCT ATA ATA ATT AAT GGT GGT GTA ATT AAT GGT AGA ACC ACC ATA CGC TCT
#6	TTT CGA AGC CGC GTT ACT AGC TGA ATC TCT ATA ATA ATT AAT GGT GGT GTA ATT AAT GGT AGA ACC ACC ATA CGC TCT
#7	TTT CGA AGC CGC GTT ACT AGC TGA ATC TCT ATA ATA ATT AAT GGT GGT GTA ATT AAT GGT AGA ACC ACC ATA CGC TCT
#Sabin1	TTT CGA AGC CGC GTT ACT AGC TGA ATC TCT ATA ATA ATT AAT GGT GGT GTA ATT AAT GGT AGA ACC ACC ATA CGC TCT
#2	CCG GGT AGC TGA CGC GGC GTA AGA ATC TTT ATA ATA GTT GAT GTT AGT AAA GTT TAT TGT TGA TCC TCC AGT GGC TAC
#CA10	CCG GGT AGC TGA CGC GGC GTA AGA ATC CTT ATA ATA GTT GAT GTT AGT GAA GTT TAT TGT AGA TCC TCC AGT GGC TAC
#1	ATT TGA GTT TTC ATG TGC GCC CAC TTT CTG TGA TGA AAC CTG AGC ACC CAT
#3	ATT TGA GTT TTC ATG TGC GCC CAC TTT CTG TGA TGA AAC CTG AGC ACC CAT
#4	ATT TGA GTT TTC ATG TGC GCC CAC TTT CTG TGA TGA AAC CTG AGC ACC CAT
#5	ATT TGA GTT TTC ATG TGC GCC CAC TTT CTG TGA TGA AAC CTG AGC ACC CAT
#6	ATT TGA GTT TTC ATG TGC GCC CAC TTT CTG TGA TGA AAC CTG AGC ACC CAT
#7	ATT TGA GTT TTC ATG TGC GCC CAC TTT CTG TGA TGA AAC CTG AGC ACC CAT
#Sabin1	ATT TGA GTT TTC ATG TGC GCC CAC TTT CTG TGA TGA AAC CTG AGC ACC CAT
#2	GTT GCC AGI CTC ATG ACT ACC GGA TTT TTG CGT CGA GAC TTG AGC TCC CAT
#CA10	GTT ACC AGI CTC ATG ACT GCC GGA TTT TTG CGT CGA GAC TTG AGC TCC CAT

图5 Fy-01 Sabin-1 疫苗分离株 VP4 基因 PCR 扩增产物 TA 克隆测序与 Sabin1 标准序列、CoxA10 Kowalik 原型株序列比对结果

物 EVP4/Q8 与 GenBank 上注册的 CoxA10 山东株全基因序列 (GenBank 注册号 HQ728262.1) 进行序列比对显示,下游引物 Q8 引物 3' 端 6 个碱基和 CoxA10 的基因组 6 125 ~ 6 130 bp 处完全匹配,在退火温度为 45 °C 时,Q8 引物 3' 端 6 个碱基与 CoxA10 cDNA 模板结合,再加上肠道病毒通用引物 EVP4,可以扩增出的目的条带与测序序列大小完全吻合。因此在使用引物 EVP4/Q8 扩增混合 CoxA10 的 Fy-01 Sabin-1 疫苗分离株时,PCR 产物电泳结果在 5 000 ~ 6 000 bp 间出现条带。由于本实验室从未从事过 CoxA10 病毒株的研究,再加上本研究中设置有体系对照和阴性对照系统,可以确定 Fy-01 分离株为 Sabin-1 和 CoxA10 混合型,实验过程中不存在环境和操作中 CoxA10 阳性模板污染。

HFMD 病毒范围比较广泛,在国内,临床上一般只针对主要的病原体如 EV71、CoxA16 等进行特异性的检测,其他的 HFMD 病原体统一使用通用引物进行检测甚至不再继续确定型别,这样一来就会造成非 EV71 非 CoxA16 的其他 HFMD 病原体监测资料的空缺。临床上不可能针对全部 HFMD 病原体都使用特异性的引物进行检测,工作量大,再加上肠道病毒的 RNA 尤其容易发生变异,因此采用通用引物对肠道病毒进行检测鉴定仍然是一种比较好的办法。肠道病毒通用引物由于检测范围广而导致检测特异性低,且通用引物多含有稀有碱基,PCR 产物多需进行挑取单克隆进行测序鉴定,因此无法广泛应用于临床快速诊断。与之相比,Ishiko et al<sup>[5]</sup>通过肠道病毒 VP4 基因鉴定型别的方法简单快速而被广泛应用于临床检验和科研。Perera et al<sup>[9]</sup>通过实验比较 VP1、VP2、VP4 基因鉴定肠道病毒型别的优劣时,证明人类肠道病毒 B 组和人类肠道病毒 C 组型别鉴定时,仅 VP2 和 VP1 基因的鉴定是 100% 一致的;人类肠道病毒 A 组型别鉴定时 VP1、VP2、VP4 三者均具有 100% 一致性,提示在 HFMD 暴发时,采用 VP4 基因确定人类肠道病毒 A 组型别更省时省力。但是却可能在检测肠道病毒混合型感染引起的 HFMD 时发生漏检现象。上世纪 60 年代,我国开始推广接种糖丸,尤其未成年儿童基本上都口服过 3 次糖丸。然而,5 岁以下的儿童也是感染 HFMD 的主要群体,因此脊髓灰质炎病毒疫苗株 (oral poliovirus vaccine, OPV) 分离株对通用引物扩增非 EV71

非 CoxA16 HFMD 病原学鉴定的干扰是不容忽视的。此外,通过采集 HFMD 粪便和咽拭子标本进行病毒分离时,尤其是混合感染的患者经常会出现病毒分离的“副产物”如 OPV 分离株,这样一来就增加了 HFMD 病原学监测的难度。因此,单纯的使用 VP4 基因的 PCR 产物测序对非 EV71 非 CoxA16 的 HFMD 病原体进行鉴定是不准确的,尤其是混合型感染的标本。在这里,建议采用肠道病毒 VP4 基因通用引物扩增的 PCR 产物直接测序结果为非 HFMD 病原体时 (如 OPV 分离株),则可以考虑对 VP4 基因 PCR 产物进行挑取单克隆的方法进行测序,以进一步明确引起 HFMD 病原。

### 参考文献

- [1] Wu Y, Yeo A, Phoon M C, et al. The largest outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore in 2008: The role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains [J]. *Infect Dis* 2010, 14(12): e1076-81.
- [2] Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland [J]. *Clin Virol* 2010, 48(1): 49-54.
- [3] Davia J L, Bel P H, Ninet V Z, et al. Onychomadesis outbreak in Valencia, Spain associated with hand, foot, and mouth disease caused by enteroviruses [J]. *Pediatr Dermatol* 2011, 28(1): 1-5.
- [4] He Y Q, Chen L, Xu W B, et al. Emergence, circulation and spatiotemporal phylogenetic analysis of Coxsackievirus A6 and Coxsackievirus A10 associated hand, foot and mouth disease infections from 2008 to 2012 in Shenzhen, China [J]. *Clin Microbiol* 2013, 51(11): 3560-6.
- [5] Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, et al. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence [J]. *J Infect Dis* 2002, 185(6): 744-54.
- [6] 赵蕾, 陈敬贤, 王明丽. 阜阳市手足口病柯萨奇病毒 A10 型 VP4 区基因特征分析 [J]. *中华疾病控制杂志* 2013, 17(6): 480-3.
- [7] 王永全, 吉彦莉, 曲梅. 北京地区与手足口病相关的非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒的分子特征分析 [J]. *国际病毒学杂志*, 2011, 18(3): 469-71.
- [8] Boot H J, Schepp R M, van Nunen F J, et al. Rapid RT-PCR amplification of full-length poliovirus genomes allows rapid discrimination between wild-type and recombinant vaccine-derived polioviruses [J]. *J Virol Methods* 2004, 116(1): 35-43.
- [9] Perera D, Shimizu H, Yoshida H, et al. A comparison of the VP1, VP2, and VP4 regions for molecular typing of human enteroviruses [J]. *J Med Virol* 2010, 82(4): 649-57.

# 人类胞内氯离子通道蛋白 3 在原核细胞及真核细胞内的表达

李春雨, 潘林鑫, 刘晓颖, 范礼斌

**摘要** 目的 研究人类胞内氯离子通道蛋白 3 (CLIC3) 在真核细胞中的定位和表达, 及其 GST 融合蛋白在原核细胞中的表达。方法 以含人 CLIC3 的全长 cDNA 序列的质粒为模板, PCR 扩增 CLIC3 片段, 构建真核表达载体 pcDNA3.1-CLIC3-FLAG, 检测其定位及表达; 构建原核表达载体 pGEX-5X-3-CLIC3, 转化到大肠杆菌 BL21 菌株, IPTG 诱导融合蛋白 GST-CLIC3 表达。结果 细胞免疫荧光结果表明 CLIC3 在 COS7 细胞质和细胞核中均有分布; Western blot 结果显示 CLIC3 在 HEK-293T 细胞中能表达; 考马斯亮蓝染色结果表明融合蛋白 GST-CLIC3 在 BL21 菌株中能表达。结论 人类的 CLIC3 蛋白在 COS7、HEK-293T 及大肠杆菌 BL21 菌株均能有效表达, 为进一步了解 CLIC3 的功能奠定了一定的基础。

**关键词** CLIC3; 细胞定位; 蛋白表达

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1202-04

胞内氯离子通道 (chloride intracellular channels, CLIC) 蛋白家族是一个相对较新的离子通道蛋白类家族, 其在主要结构上 (三级结构的跨膜区) 不同于其他通道<sup>[1]</sup>。在脊椎动物中目前已知 CLIC 蛋白家族有 6 个成员, 分别是 CLIC1~6, 并且 CLIC 蛋白具有高度保守性<sup>[2]</sup>。在无脊椎动物中有 3 个成员。CLIC 家族成员和谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 超家族成员共同分享结构同源<sup>[2-3]</sup>。CLIC 蛋白区别于其他离子通道蛋白的一个独特特点是它们拥有以两种不同形式存在的能力: 一种是可溶球状形式, 另一种是完整的膜蛋白<sup>[4]</sup>。

人类 CLIC3 基因定位于 9q34.3, 由 236 个氨基酸组成, 其编码蛋白大小为 26.6 ku。CLIC3 分布于多种组织, 如胎盘、肺、心脏、肾、胰腺, 少量存在于骨骼肌中<sup>[5]</sup>。目前研究<sup>[6]</sup>已经证实了 CLIC3 的可溶性结构, 但大量的生化分析和细胞定位研究还尚无定论。该研究通过构建 CLIC3 的真核表达载体, 通过质粒转染、免疫荧光、免疫印记等方法研究外源性

2014-05-05 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点科研项目 (编号: KJ2010A187); 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81201368); 安徽省自然科学基金 (编号: 11040606M170、11040606M164); 安徽医科大学博士基金 (编号: XJ201009)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学系, 合肥 230032

作者简介: 李春雨, 女, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: xyz2848@sohu.com;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

## Research on undetection of non-EV71 and non-CoxA16 related HFMD pathogens identified by using VP4 gene

Mu Chaoyu Zhuang Xiaoliang Zhao Jun et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the accuracy of PCR for detection of non-EV71 and non-CoxA16 by using universal primers with VP4 gene of HEV. **Methods** When identified by VP4 gene of EV71 and CoxA16 unrelated HFMD, two isolates of Sabin-1 were found (such as Fy-01 and Fy-02). They were identified by co-primers such as EVP4/Q8 and specific primers of VP1 gene. **Results** Fy-01 isolates were appeared with an unusual fragment and identified as CoxA10 after being sequenced and the selected independent clones were sequenced and blasted in GenBank. It proved that both Sabin-1 and CoxA10 existed. **Conclusion** Clinical diagnosis of EV71 and CoxA16 unrelated HFMD, when identifying the type of HFMD pathogen only by using the amplification product of VP4 gene after being sequenced directly is not enough, especially HFMD with mixed infections caused by enterovirus.

**Key words** HFMD; VP4 gene; Sabin-1; CoxA10