

与朊毒体相关的鱼类朊蛋白研究概况

兰邹然^{①②} 王志亮^{②*} 张学成^①

(^①中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003; ^②农业部动物检疫所国家外来动物疫病诊断中心 青岛 266032)

摘要: 疯牛病 (mad cow disease) 即牛传染性海绵状脑病 (bovine transmissible spongiform encephalopathy, BSE) 的俗称, 是一种慢性消耗性、致死性、中枢神经系统退行性疾病。疯牛病被认为与朊毒体 (Prion) 有关, 朊毒体是由正常朊蛋白 (Prion protein 或者 PrP^C) 发生构象改变后形成的异常蛋白 (PrP^{Sc})。疯牛病的发生引起了世界各国政府和科学界的高度重视, PrP 的起源及其功能研究已成为研究热点。鱼类 PrP 相关蛋白的研究正在展开中, 由于鱼类 PrP 相关蛋白与朊蛋白的结构相似, 鱼类感染 TSE 类似病存在理论上的风险。本文全面地综述了疯牛病的概况、朊毒体的特性、朊毒体与哺乳动物朊蛋白、鱼类 PrP 相关蛋白 (PrP1、PrP2 和 PrP3) 及鱼类其他 PrP 相关蛋白的研究情况, 为国内水生动物 PrP 相关蛋白研究提供参考。

关键词: 鱼类; 朊毒体; 细胞朊蛋白; 痒病朊蛋白; 朊蛋白 1; 朊蛋白 2; 朊蛋白 3

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 0250-3263(2006)04-115-07

Prion and Fish Prion Proteins: Current Research Status

LAN Zou-Ran^{①②} WANG Zhi-Liang^② ZHANG Xue-Cheng^①

(^①Life Sciences and Technology College, Ocean University of China, Qingdao 266003;

^②National Diagnostic Center for Exotic Animal Disease, National Animal Quarantine Institute, MOA, Qingdao 266032, China)

Abstract: Mad cow disease, or bovine spongiform encephalopathy (BSE), is a chronic, transmissible, fatal neurodegenerative disorder disease in cattle. Prion is regarded to cause this disease, and it appears to be an isoform of an normal host-encoded prion protein (PrP^C). Governments and scientists all over the world have been concerning about the epidemic of BSE, and therefore, the functions and evolutionary origin of PrPs have received much attention. Given the common structural features of fish PrP and mammalian PrPs, a theoretical risk exists for the occurrence of a prion disease in fish. This review briefly introduces the characteristics of prion, the relationship between prion and prion protein, PrP-related proteins in fishes (PrP1, PrP2 and PrP3) and the other proteins related to PrP in fishes.

Key words: Fish; Prion; PrP^C; PrP^{Sc}; PrP1; PrP2; PrP3

1986年疯牛病 (mad cow disease) 在英国首先发现并报道, 此后英国的疯牛病引起全球轰动, 本病由于其高度的致死性和难以治愈, 不仅造成养牛业的巨大损失, 而且可传染给人类, 一时间又成为一恐怖的代名词, 所以引起人类的高度重视, 科学界已把疯牛病及其相关课题作为焦点开展广泛研究。

疯牛病的传播途径一直受到世人的关注, 从本病的起源来看, 确切的证据显示本病很可能源于羊痒病, 后来的研究表明, 含有疯牛病病原

——朊毒体 (Prion) 的肉骨粉反过来又会导致羊疯牛病的发生, 而人类食用含疯牛病病原的牛肉制品可能引起人类新型克-雅氏病^[1]。因此, 动物源性食品在本病的传播中起着重要的作用。

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30270981), 国家科技攻关计划课题 (No. 2004BA519A53) 资助;

* 通讯作者, E-mail: zlwang111@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 兰邹然, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 分子遗传学, E-mail: lanzrjn@163.com.

收稿日期 2006-02-08, 修回日期 2006-04-26

随着肉骨粉(meat and bone meal, MBM)的推广应用,肉骨粉被广泛用作动物性饲料蛋白添加剂,同时也被作为蛋白源性饲料而用于鱼类养殖中。虽然本病的传播存在种间障碍,而且到目前为止,并没有证据显示本病可以传染给水生动物,但是由于朊毒体的高度抗逆性,使病原可以在自然界中长期生存而不被降解^[1],而且,鱼类的 PrP 相关蛋白在结构上与哺乳动物朊蛋白极为相似。因此,朊毒体突破种间屏障传播给鱼类的可能性是否存在?病原是否通过食物链蓄积?含有病原的动物性饲料饲喂经济鱼类后是否能在鱼的体内蓄积?病原是否通过食用这些鱼类进一步传染给人类?这些依然都是令人困惑的大问题。基于这些问题,科学家们已开始对鱼类疯牛病病原相关蛋白展开研究^[2-4]。

1 疯牛病概况

疯牛病是在英国出现的一种新病,1996年确诊,1997年 Wells 等正式报道^[5]。本病是一种慢性消耗性、致死性、中枢神经系统退行性疾病,病牛行为和运动异常、感觉和反应过敏,最后因慢性消耗衰竭而死亡。BSE 与疯牛病相关的传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathy, TSE),包括人的库鲁氏病(Kuru)、克-雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、格斯特曼-斯特斯勒-史茵克综合症(Gerstman-Straussler-Scheinker's syndrom, GSS)和致死性家族性失眠症(fatal familial insomnia, FFI)等,以及动物的绵羊痒病(Scrapie)、黑尾鹿及麋鹿的慢性消耗性疾病(chronic wasting disease, CWD)等等^[6,7]。

本病病原为一种全新的、不由基因控制的、具有蛋白酶抗性的蛋白粒子,被 Prusiner 定义为“Prion”^[8],Prion 的译法一直未得到统一,出现过朊病毒、朊毒体、普里昂、蛋白侵染子、蛋白感染子、感染性蛋白、朊粒等译名,其中朊病毒的译法较为常见,但是比较容易引起误解,因而本文使用“朊毒体”这一概念。

1987年4月,英国开始从不同的流行病学角度对可能导致 BSE 或影响其发生的因素进

行了调查。结果表明,BSE 发病牛均给饲喂了商业化的、可能含有痒病病原的肉骨粉复合饲料。BSE 传染主要传播途径是消化道,疯牛病母牛所产的犊牛能感染疯牛病。研究表明,初生后犊牛 3 d 内感染率较高^[9]。但是,本病不会通过牛群之间的接触而发生水平传播。本病的潜伏期为 2.5~6.0 年或更长。另外,本病与牛的性别、品种和遗传因素无明显的相关性^[10]。

本病的初步诊断可以参考临床症状和流行病学资料,但需要实验室诊断确诊。方法包括脑组织病理学检查、PrP^{Sc} 检测(细胞免疫化学检查、免疫印迹、组织印迹、ELISA 等)及 Prn^P 基因分析等等^[11]。

2 朊毒体(Prion)的特性

TSE 的病原学探讨花费了科学界大量的精力,对于 TSE 病原的争论长期存在,由于没有成功分离到病原,也没有检测到与感染有关的免疫反应,所以对于 TSE 病原的本质,目前还没有在科学界形成统一的定论。历史上曾经出现过病毒、类病毒(virino)、杀虫剂和自身免疫反应等假说,但这些假说都难以从理论上阐明 TSE 的病原特性。目前得到科学界广泛认可的是 Prusiner 提出了朊毒体作为感染性病原的假说,随着对 TSE 研究的深入,越来越多的科研证据使这一假说正在得到越来越广泛的支持。

与常规病原比较,朊毒体的理化特性非常独特,朊毒体在土壤中可存活 3 年,可以抵抗高温、高压、紫外线、离子辐射(如 γ -射线)、超声波、强酸(pH 2.1)、强碱(pH 10.5),对福尔马林、乙醇、戊二醛、超声波、非离子型去污剂、蛋白酶等能使普通病原灭活的理化因子具有较强的抵抗力^[12-14]。134~138℃ 高压蒸汽 18 min,只能使大部分灭活病原,360℃ 干热条件下,朊毒体可存活 1 h;在福尔马林固定的病牛脑组织中可以长期存活。十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素、苯酚等蛋白质变性剂能使之灭活,含 2% 有效氯的次氯酸钠 1 h 或 90% 的石炭酸 24 h 处理可使之灭活。含 2% 有效氯的次氯酸钠及 2 mol/L 的氢氧化钠,20℃ 1 h 以上用于表面消

毒。只有焚烧才是朊毒体最可靠的杀灭办法。

PrP^{Sc}具有潜在的神经毒性,其中 PrP106~126 称为神经肽,单独这一段小肽也能使在体外培养的神经细胞发生凋亡。而大量 PrP^{Sc}在 CNS,尤其是在脑内的积累可抑制 Cu²⁺与超氧化物歧化酶(SOD)或其他酶的结合,从而使神经细胞的抗氧化能力下降;PrP^{Sc}还可抑制星形细胞摄入能诱导其增殖的 Glu;此外,细胞内的 PrP^{Sc}还可能抑制 Tau 调节的微管蛋白的聚合,导致 L-型钙通道发生改变,进而使细胞骨架失去稳定性。上述这些原因以及其他尚不明了的原因最终都可使神经细胞发生凋亡并产生空泡状结构,形成空泡变性,进而使各种信号传导发生紊乱^[15]。

另外,朊毒体的致病特征与常规病原差异很大^[16-18]。主要表现为:感染后潜伏期长、宿主不产生免疫应答、没有发现炎症反应、慢性进行性病理变化(有淀粉样斑块、神经胶质增生等)、患病动物不能康复、难以治愈,最终以死亡告终。细胞培养不产生细胞病变,感染细胞内未发现包涵体。免疫抑制剂、免疫增强剂、干扰素、胸腺切除、脾切除等等不能改变本病的潜伏期和病程。

3 朊毒体与哺乳动物朊蛋白

朊毒体的本质是哺乳动物宿主细胞蛋白 PrP^C(cellular form of prion protein)发生构象改变的异构体,即 PrP^{Sc}(scrapie-isoform prion protein),也被称为 PrP^{res}(protease resistant protein),也就是说 PrP^C是朊毒体形成所必需的物质基础。朊蛋白是哺乳动物一种糖蛋白,主要分布在神经元和胶质细胞表面,由染色体基因组编码,在人类基因组中编码 PrP 的基因(prion protein gene, PRNP)位于人 20 号染色体的短臂上,而小鼠则位于 2 号染色体的同源区域^[19,20],牛、羊位于 13 号染色体的同源区域^[21]。PRNP 基因表达的正常产物称为 PrP^C,长度为 250 个氨基酸左右,分子量为 33~35 ku。PrP^C骨架为 4 个 α -螺旋结构连接在一起,占 42%,而 β -折叠仅占 3%。PrP^C为对蛋白酶敏感的可溶性蛋白,因而也被称为

PrP^{sen}(protease sensitive protein)。PrP^{Sc}主要存在于细胞内,PrP^{Sc}和 PrP^C具有相同的蛋白质一级结构,即一致的氨基酸线性顺序,但是它们具有明显不同的空间构象,PrP^{Sc} α -螺旋占 30%,而 β -折叠高达 43%,这种高度折叠结构使其溶解度降低,对蛋白酶具有坚强的抵抗力^[22]。PrP^C通过 GPI 锚定于细胞膜外,其正常功能目前还没有确切的定论,可能与 GABA 系统、内钙调节、小脑运动以及昼夜节律有关,也可能具有抗氧化功能,还可能具有神经信号传导和金属离子转动的作用^[23-26]。

朊毒体存在不同的种和株,株的特异性是由 PrP^{Sc}的四级结构,即由其构象和糖基化类型决定。痒病朊毒体已被鉴定有 20 多个株,而 BSE 因子可能只有 1 个株。研究发现,一种动物的朊毒体第一次进入不同的宿主体内产生感染,往往比使同类宿主感染的时间长(即潜伏期长),即朊毒体的感染存在种间屏障,而朊毒体的株型是影响种间屏障的重要因素之一^[27]。

4 鱼类 PrP 相关蛋白的研究概况

朊毒体给经济鱼类带来的风险如何尚未得知,但是,由于动物源性饲料曾被作为蛋白添加用于经济鱼类的饲养,这种未知的风险时刻困扰着人类。因此,已经开展了对于一些鱼类 PrP 相关蛋白的研究,到目前为止,已经进行了太平洋三文鱼、红鳍东方鲀、黑青斑河豚、斑马鱼、鲤鱼、棘鱼和红鲱鱼等^[2,28-32] PrP 相关蛋白的研究,并获得了一些相关信息。在斑马鱼的研究中,科研人员发现了 3 种人类朊蛋白的相关蛋白 PrP1(原称为 PrP-461/stPrP-1)、PrP2(原称为 stPrP-2)和 PrP3(原称为 PrP-like/PrPL-P),PrP1 和 PrP2 属于长的 PrP 蛋白,而 PrP3 属于短的 PrP 蛋白。通过斑马鱼发育过程中的 mRNA 体内杂交研究发现,PrP1 局限分布于中枢神经底层的前部和神经中枢;PrP2 则分布于脑、眼、肾、侧线神经丘(lateral line neuromasts)、肝、心脏、胸鳍和后肠(posterior intestine)^[30];而对 PrP3,从红鳍东方鲀和太平洋三文鱼的研究中发现,这种蛋白主要在视网膜、皮肤和脑中分

布^[29] ,Maddison 等在研究红鳍鱼 PrP 及单克隆抗体时发现,红鳍鱼的 PrP 大小为 64 ku,主要可以在脑、脑脊液和视神经中检测到^[31];这与 PrP^C 在动物体内的分布相近。在鱼的其他 PrP 相关蛋白研究中,科研人员还发现了 Shadoo 蛋白。在这些鱼的 PrP 相关蛋白中,PrP1 和 PrP2 在结构上比 PrP3 和 Shadoo 蛋白更为相似。

4.1 鱼类 PrP1 的分子特征 斑马鱼 PrP1 的长度为 606 个氨基酸,它具有 PrP 蛋白家族的结构特点,序列中包含一个信号肽序列(1~23 号氨基酸),一长段的重复序列(48~332 位氨基酸之间),一个疏水中央区,两个半胱氨酸残基形成的分子内二硫桥(463 和 554 位氨基酸),两个糖基化位点(367 和 445 位氨基酸)还有一个疏水的羧基端跨膜区(592~606 位氨基酸之间)。值得注意的是序列中具有 GPI-锚定位点,但是无论斑马鱼还是红鳍东方鲀,疏水性尾巴均缺少剪切位点。红鳍东方鲀的 PrP1 长度为 461 氨基酸,比斑马鱼的短,只有一个糖基化位点,其他结构方面与斑马鱼的 PrP1 相似(图 1)。

4.2 鱼类 PrP2 的分子特征 斑马鱼 PrP2 的

长度为 567 个氨基酸,序列的结构与 PrP1 一样具有 PrP 蛋白家族的结构特征,包括一个信号肽序列(1~19 位氨基酸),一长段富含 Gly-Tyr-Pro 的重复序列(74~246 位氨基酸之间),一个疏水中央区(299~315 位氨基酸之间),两个半胱氨酸残基形成的分子内二硫桥(399 和 509 位氨基酸),两个糖基化位点(438 和 443 位氨基酸)还有一个疏水的羧基端跨膜区(549~567 位氨基酸之间)并有一个潜在的剪切位点(537 位氨基酸),GPI-锚定位点(538 位氨基酸)及疏水性尾巴。红鳍东方鲀的 PrP2 长度为 435 个氨基酸,比斑马鱼的 PrP2 短。除了多一个疏水区 and 少一个糖基化位点以外,其他结构与斑马鱼相似(图 1)。

4.3 鱼类 PrP3 的分子特征 斑马鱼的 PrP3 长度为 188 个氨基酸,而红鳍东方鲀的 PrP3 长度为 180 个氨基酸,与其他 PrP 家族蛋白比较,PrP3 在结构上缺乏信号肽和疏水区之间的重复序列,二硫桥及一个或两个糖基化位点;而在疏水区后面多了一段 2~4 个氨基酸(GY,GGY 和 GGGY)重复序列(图 1)。

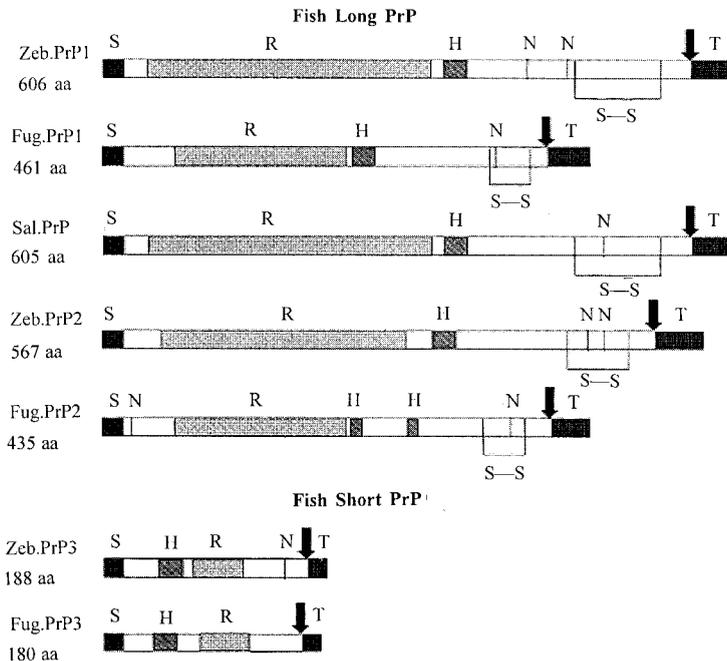


图 1 鱼类 PrP 相关蛋白:长 PrP(PrP1 and PrP2)和短 PrP(PrP3)的结构示意图 [引自Cotto, 2005]

Zeb: 斑马鱼, Sal: 三文鱼, Fug: 红鳍东方鲀, 序列结构中各特征组件的相对大小均在结构图中以不同方框和字母表示。

S: 信号肽序列; R: 重复序列; H: 疏水区; S-S: 二硫桥; N: 糖基化位点; 箭头: GPI-锚定位点; T: 疏水性尾巴。

5 鱼类其他 PrP 相关蛋白的研究

Shadoo 蛋白(简称为 Sho 蛋白),由 *SPRN* 基因编码,人类和其他动物(如小鼠和大鼠)中也存在这种蛋白。鱼类中,红鳍东方鲀、黑青斑河豚、斑马鱼等均发现了本蛋白,在鱼的基因组里发现了两拷贝的这种蛋白编码基因^[28]。Sho 蛋白从鱼到人类均比较保守(图 2),它在结构上缺乏二硫桥,并且只有一个糖基化位点,Sho 蛋白的结构与 PrPC 有些相似^[3]。而另一个与 PrP 相关的蛋白 Dopple,在鱼类目前还没有找到相似的蛋白^[30]。

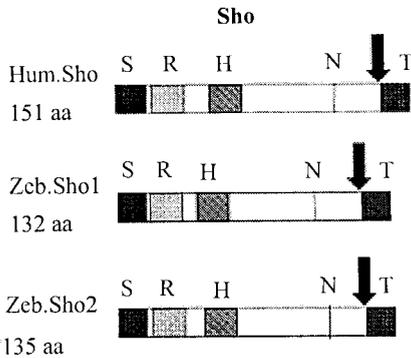


图 2 脊椎动物 Shadoo (Sho) 蛋白结构图^[引自Cotto, 2005]

Hum: 人类; Zeb: 斑马鱼。序列结构中各特征组件的相对大小均在结构图中以不同方框和字母表示; S: 信号肽序列;

R: 重复序列; H: 疏水区; N: 糖基化位点;

箭头: GPI-锚定位点; T: 疏水性尾巴。

6 哺乳动物 PrP 和鱼类 PrP 相关蛋白的比较

乳动物 PrP 和鱼类 PrP 相关蛋白均为细胞表面蛋白,它们可能在与细胞外基质相互作用中扮演重要角色或者可能作为分子信号的受体^[33]。这类蛋白中的二硫桥有助于维持蛋白质构象稳定,鱼类和哺乳动物 PrP 中均有 GPI-锚定位点,这进一步证明 PrP 存在于细胞外,并锚定于细胞膜上^[34]。另外,PrP 蛋白结构中的糖基化位点可以保护细胞外蛋白,使之能抵抗蛋白酶的消化,并且能避免非特异性的蛋白间相互作用。斑马鱼 PrP2 二级结构的羧基端区

域(氨基酸残基 313 ~ 530 之间)和人 PrP^C 具有一样的 2 个 β 折叠和 3 个长的 α 螺旋结构的顺序结构^[35]。蛋白疏水簇分析(hydrophobic cluster analysis)^[36]表明,斑马鱼的 PrP2 与人 PrP^C 具有几个相似的保守疏水簇。在 PrP2 的氨基酸相似于人 PrP^C 的区域,有一个脊椎动物 PrP 家族共有的保守基序。斑马鱼 PrP2 和人 PrP^C 二级结构的羧基端 α 螺旋区域有 33% 的氨基酸同源性,而在这个区域,斑马鱼 PrP1 与人 PrP^C 的有 25% 的同源性;斑马鱼 PrP1 和 PrP2 则有 62% 的同源性;斑马鱼和红鳍东方鲀的 PrP1 之间具有 66% 的同源性;斑马鱼 PrP1 和红鳍东方鲀 PrP2 之间有 57% 的同源性。PrP1 和 PrP2 的以上保守基序及其在序列中相似的氨基酸位置表明 PrP1 和 PrP2 可能都是 PrP 家族的成员^[30]。

虽然还没有证据表明鱼类可以感染 TSE,并且 TSE 的传染存在种间障碍,但是,由于已获知的鱼类 PrP 相关蛋白在结构上与哺乳动物朊蛋白极为相似,科学家们在这方面的研究和认识还不够充分,因而,鱼类感染 TSE 的风险存在理论上的可能性。

7 小结

疯牛病不仅是一种危害极其严重的人畜共患疾病,而且也是“经济病”和“政治病”。疯牛病的暴发和流行,给该病流行国的养牛业带来沉重的打击,对人类健康也构成了巨大威胁,并严重影响经济和对外贸易。此外,疯牛病的病原——朊毒体,是一种崭新的、极为特殊的病原体,其组成成分、结构、感染、增殖方式以及生物学特性与常规病原完全不同,由于其形成基础是动物细胞膜外的组成蛋白 PrP^C,因而 PrP^C 及朊毒体研究正在深入开展,这不仅对疯牛病及相关 TSE 的防治工作具有重要的推动作用,而且对整个生物学界重新认识病原的本质,探索新的可能危害人类健康的潜在病原也有特殊的启迪意义。

鱼类 PrP 相关蛋白 PrP1、PrP2、PrP3 及其他 PrP 相关蛋白的发现,以及他们在发育过程中的不同表达模式表明,在脊椎动物的进化过程

中 PrP 的功能有可能增加或者丢失,这对于研究 PrP 蛋白的进化,探讨 PrP 蛋白的进化模式具有一定参考意义。但是要确切的解释 PrP 从鱼类到四足动物是如何进化? PrP 的真实功能到底是怎样的?仍然非常遥远的。科学工作者需要投入更多的时间和精力,并在以下几个方面多做工作,以求新的突破:对更多鱼类的 PrP 相关蛋白进行研究,以获得更多鱼类 PrP 相关蛋白的信息,为详细解释 PrP 蛋白的进化奠定基础;根据已获得的蛋白信息进行鱼类 PrP 相关蛋白结构和功能研究;鱼类 PrP 相关蛋白功能与哺乳动物朊蛋白的功能相关性;鱼类 PrP 相关蛋白转变成 Prion 类似蛋白的可能性及机制;建立鱼类 PrP 蛋白研究模型的可能性;鱼类中是否具有类似 TSE 的疾病;Prion 进入鱼类体内的动力学变化;鱼类在正常条件下或攻毒情况下是否可以感染 Prion。当然,还有更多开拓性的工作需要在研究中不断的发现、总结和深入。

参 考 文 献

- [1] Prusiner S B. Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 1997, **278**(5 336): 245 ~ 251.
- [2] Oidtmann B, Simon D, Holtkamp N, *et al.* Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. *FEBS Lett*, 2003, **538**(1-3): 96 ~ 100.
- [3] Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, *et al.* Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene*, 2003, **314**: 89 ~ 102.
- [4] Rivera-Milla E, Stuermer C A, Malaga-Trillo E. An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA. *Trends Genet*, 2003, **19**(2): 72 ~ 75.
- [5] Wells G A, Scott A C, Johnson C T, *et al.* novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 1987, **121**(18): 419 ~ 420.
- [6] Hunter N, Goldman W, Smith G, *et al.* The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol*, 1994, **137**(1-2): 171 ~ 177.
- [7] Prusiner S B. Prions and neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*, 1987, **317**(25): 1 571 ~ 1 581.
- [8] Prusiner S B. Prions. *Sci Am*, 1984, **251**(4): 50 ~ 59.
- [9] Wilesmith J W, Ryan J B, Hueston W D. Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bone meal inclusion in proprietary concentrates. *Res Vet Sci*, 1992, **52**(3): 325 ~ 331.
- [10] Fatzer R, Ehrensperger F, Heim D, *et al.* 182 offspring of cows with bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Switzerland. 2. Epidemiology and pathological findings. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 1998, **140**(6): 250 ~ 254.
- [11] Kretzschmar H A. Diagnosis of prion diseases. *Clin Lab Med*, 2003, **23**(1): 109 ~ 128. viii.
- [12] Taylor D M. Inactivation of SE agents. *Br Med Bull*, 1993, **49**(4): 810 ~ 821.
- [13] Collee J G, Bradley R. BSE: a decade on-Part I. *Lancet*, 1997, **349**(9 052): 636 ~ 641.
- [14] Taylor J P, Hardy J, Fischbeck K H. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 2002, **296**(5 575): 1 991 ~ 1 995.
- [15] 郑东霞, 宋厚辉, 王志亮. 牛海绵状脑病病原学研究进展. *中国预防兽医学报*, 2002, **24**(1): 72 ~ 74.
- [16] DeArmond S J. Overview of the transmissible spongiform encephalopathies: prion protein disorders. *Br Med Bull*, 1993, **49**(4): 725 ~ 737.
- [17] Prusiner S B. Molecular biology of prion diseases. *Science*, 1991, **252**(5012): 1 515 ~ 1 522.
- [18] Prusiner S B. Biology and genetics of prion diseases. *Annu Rev Microbiol*, 1994, **48**: 655 ~ 686.
- [19] Robakis N K, Devine-Gage E A, Jenkins E C, *et al.* Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, **140**(2): 758 ~ 765.
- [20] Sparkes R S, Simon M, Cohn V H, *et al.* Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(19): 7 358 ~ 7 362.
- [21] Iannuzzi L, Palomba R, Di Meo G P, *et al.* Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (*PRNP*) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, **81**(3-4): 202 ~ 204.
- [22] Aguzzi A, Weissmann C. Prion research: the next frontiers. *Nature*, 1997, **389**(6 653): 795 ~ 798.
- [23] Mouillet-Richard S, Emonval M, Chebassier C, *et al.* Signal transduction through prion protein. *Science*, 2000, **289**(5 486): 1 925 ~ 1 928.
- [24] Jobling M F, Huang X, Stewart L R, *et al.* Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126. *Biochemistry*, 2001, **40**(27): 8 073 ~ 8 084.

- [25] Jackson G S , Murray I , Hosszu L L , *et al* . Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 **98**(15) : 8 531 ~ 8 535 .
- [26] Aguzzi A , Hardt W D . Dangerous liaisons between a microbe and the prion protein. *J Exp Med* 2003 **198**(1) : 1 ~ 4 .
- [27] Prusiner S B . Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1998 **95**(23) : 13 363 ~ 13 383 .
- [28] Premzl M , Gready J E , Jermiin L S , *et al* . Evolution of vertebrate genes related to prion and Shadoo proteins-clues from comparative genomic analysis. *Mol Biol Evol* ,2004 **21**(12) : 2 210 ~ 2 231 .
- [29] Suzuki T , Kurokawa T , Hashimoto H , *et al* . cDNA sequence and tissue expression of *Fugu rubripes* prion protein-like : a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 **294**(4) : 912 ~ 917 .
- [30] Cotto E , Andre M , Forgeue J , *et al* . Molecular characterization , phylogenetic relationships , and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Febs J* , 2005 **272**(2) : 500 ~ 513 .
- [31] Maddison B C , Patel S , James R F , *et al* . Generation and characterisation of monoclonal antibodies to Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) prion protein. *J Immunol Methods* , 2005 **306**(1-2) : 202 ~ 210 .
- [32] Rivera-Milla E , Oidtmann B , Panagiotidis C H , *et al* . Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. *FASEB J* 2006 **20**(2) : 317 ~ 319 .
- [33] Pan T , Wong B S , Liu T , *et al* . Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem J* ,2002 **368**(Pt 1) : 81 ~ 90 .
- [34] Liu T , Li R , Pan T , *et al* . Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem* 2002 **277**(49) : 47 671 ~ 47 678 .
- [35] Calzolari L , Zahn R . Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. *J Biol Chem* 2003 **278**(37) : 35 592 ~ 35 596 .
- [36] Callebaut I , Labesse G , Durand P , *et al* . Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA) : current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci* , 1997 **53**(8) : 621 ~ 645 .