

# 蛋白质错误折叠循环扩增及其在朊病毒蛋白检测中的应用研究进展

王海霞<sup>1</sup> 石国庆<sup>2</sup> 刘怡孝<sup>1</sup> 万鹏程<sup>2</sup> 管峰<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>中国计量学院生命科学院, 杭州 310018; <sup>2</sup>新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000;

<sup>3</sup>中国计量学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 植物环境生物学与检测技术研究所, 杭州 310018)

**摘要** 朊病毒蛋白(prion protein, PrP)是传染性海绵状脑病的病原体, 其检测是该病诊断的重要依据。该文从原理、方法、影响因素和检测应用方面对蛋白质错误折叠循环扩增(protein misfolding cyclic amplification, PMCA)这种朊病毒蛋白新型检测技术做了介绍, 旨在为朊病毒蛋白的检测和发病机制研究提供理论参考。

**关键词** 朊病毒蛋白(PrP); PrP<sup>C</sup>; PrP<sup>Sc</sup>; 蛋白质错误折叠循环扩增(PMCA); 检测

朊病毒蛋白(prion protein, PrP)是传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathy, TSE)的病原体, 该蛋白在哺乳动物体内均表达正常结构, 即细胞型朊病毒蛋白(cellular prion protein, PrP<sup>C</sup>), 当PrP<sup>C</sup>构象发生错误折叠( $\beta$ 折叠增多)时, 会形成病变朊病毒蛋白(scrapie prion protein, PrP<sup>Sc</sup>)<sup>[1-2]</sup>。PrP主要存在于中枢神经系统, 即脑组织中, 但也少量存在于肝脏、肾脏、胎盘及其他分泌物和排泄物(如皮肤分泌物、粪便、尿液、乳汁、鼻子分泌物和唾液等)<sup>[3]</sup>中, 甚至在动物活动的周边环境 and 土壤中也有PrP<sup>Sc</sup>的存在<sup>[4]</sup>, 而分泌物和排泄物和污染的环境则可能是间接接触传播的重要途径。

PrP是一类无免疫原性的蛋白分子, 传统的检测方法主要针对大脑组织的空泡化病变。最近几年, PrP浓缩技术与免疫组化和斑点杂交等检测技术的结合, 使得早期检测对更多来源的样品(如肝脏、小肠和新鲜乳及商品乳等)有了技术上的突破, 改变了之前普遍认为的乳液中不存在朊病毒蛋白及其制品安全可靠的观点<sup>[5]</sup>。但这些方法的应用仍不能满足早期检测和微量检测的需要, 而近期发展起来的高效蛋白质错误折叠循环扩增(protein misfolding cyclic amplification, PMCA)技术可以在体外扩增和检测PrP<sup>Sc</sup>, 弥补了原有技术的不足, 实现了快速和早期检测, 因此PMCA具有更高的应用价值。

为PrP<sup>Sc</sup>是该病的唯一病原, 即只有当PrP<sup>C</sup>存在时才会被传染而形成大量PrP<sup>Sc</sup>并积聚。基于上述理论, Saborio等<sup>[7]</sup>在2001年首次提出并报道了利用PMCA技术在体外产生大量PrP<sup>Sc</sup>。这个方法类似于通过PCR循环扩增DNA, 二者都以少量的模板作为“种子”获得大量的产物。将含有PrP<sup>Sc</sup>的脑匀浆物和含有大量PrP<sup>C</sup>的正常脑匀浆物按一定的比例混匀, 之后进行恒温孵育, 诱导PrP<sup>C</sup>转变成PrP<sup>Sc</sup>并生成聚集体, 再通过超声破碎仪将PrP<sup>Sc</sup>聚集体破碎成更多的感染单元作为新的“种子”, 继续诱导新的PrP<sup>Sc</sup>生成, 经过上述“孵育-超声破碎”多次循环后生成大量的PrP<sup>Sc</sup><sup>[8]</sup>, 这就是蛋白质错误折叠循环扩增技术(图1)。

PMCA不仅能快速扩增PrP<sup>Sc</sup>, 也为“唯蛋白假说”提供了强有力的证据: 只要宿主组织提取物能通过体外PMCA产生PrP<sup>Sc</sup>就可以认为感染了TSE<sup>[9]</sup>。因此PMCA可以用于疾病的诊断和样品的检测, 具有微量快速并能定量检测等许多优点。

## 2 PMCA方法

### 2.1 基本方法

一般认为, PMCA过程中得到PrP的中间结构, 即蛋白酶抗性PrP(protease-resistant PrP, PrP<sup>res</sup>), 其在循环扩增后97%以上能形成PrP<sup>Sc</sup><sup>[7]</sup>。PMCA体系包括

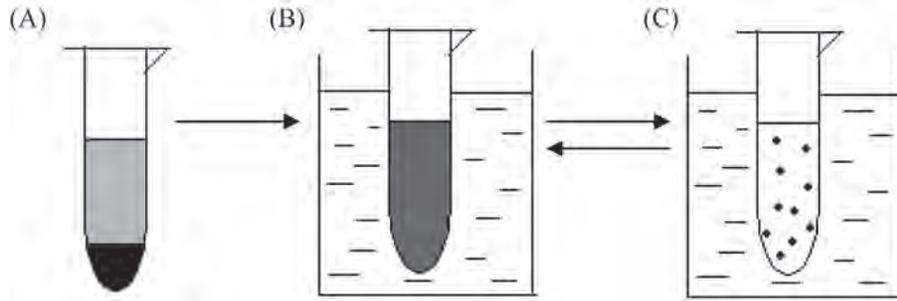
## 1 PMCA原理

Prusiner<sup>[6]</sup>发现并提出TSE的“唯蛋白假说”, 认

收稿日期: 2012-07-14 接受日期: 2012-08-20

国家高技术研究发展计划(863)(No.2008AA101011)和国家自然科学基金(No.C120103)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0571-86835772, E-mail: jlguanfeng@yahoo.com.cn



■: 正常脑匀浆物, ■: 异常脑匀浆物。A: 将少量异常脑匀浆物和过量正常脑匀浆物混匀; B: 37 °C恒温孵育30 min; C: 进行20 s超声破碎。B、C反复进行多个孵育-破碎循环。

■: normal brain homogenate, ■: infectious brain homogenate. A: a small amount of infectious brain homogenate and a large amount of normal brain homogenate are mixed together; B: incubate the mixture for 30 min at 37 °C; C: sonicate the product for 20 s. Repeat B and C for many incubation-sonication cycles.

图1 PMCA技术示意图

Fig.1 The sketch map of PMCA technology

作为“种子”的感染动物脑组织、大量正常的PrP<sup>C</sup>底物以及必需的细胞因子,利用“孵育-超声破碎”过程来实现PrP<sup>Sc</sup>“种子”对正常PrP<sup>C</sup>的结构转化。

将纯化的PrP<sup>C</sup>和PrP<sup>Sc</sup>混合,添加经过处理的器官组织匀浆物(如肝脏、肾脏、脑、心脏及肌肉等),在37 °C孵育并加以超声破碎,如此循环之后用蛋白酶K处理,处理后的样品用SDS-PAGE分离并转移到硝酸纤维素膜上,即可实现后续的蛋白质杂交检测<sup>[10]</sup>。

## 2.2 PMCA衍生技术

根据PMCA的基本方法,研究人员从优化反应条件和是否添加增速反应材料等方面进行了不断改进和创新,建立了几种比较高效的PMCA方法,如直接PMCA、连续PMCA(serial PMCA, sPMCA)、重组PrP-PMCA(rPrP-PMCA)、有特氟隆珠参与的导电性PMCA(PMCAb)以及定量PMCA(quantitative PMCA, qPMCA)等。

PMCA方法建立之初,直接在含有PrP<sup>Sc</sup>的脑匀浆物中加入正常动物脑匀浆物(稀释倍数可以为10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>等),37 °C恒温孵育后再进行一个短暂的(30 s、20 s)超声破碎,如此经过144个循环,最后用Western blot检测<sup>[10]</sup>。这一过程中PMCA的复制能力可达10<sup>5</sup>倍,但PrP<sup>C</sup>向PrP<sup>Sc</sup>转化的效率较低<sup>[11-12]</sup>。尽管如此,某些来源的样品(如肝脏、血液、尿液、唾液、粪便等)中PrP<sup>Sc</sup>的含量仍在检测限度以下,这就限制了PMCA技术的应用。而sPMCA大大弥补了直接PMCA的不足,把直接PMCA的产物作为“种子”加入正常仓鼠脑匀浆物进行新一轮96个或144个循环,每一轮的产物用正常脑匀浆物稀释10倍,再进

行数轮循环,结果表明,在10<sup>10</sup>稀释倍数时仍能检测到PrP<sup>Sc</sup><sup>[11]</sup>。此反应体系中必须不断添加新鲜的正常脑匀浆物作为反应底物,保证了各种转化因子的有效性,提高了转化效率,也显著提高了PMCA的检测灵敏度。但随着PMCA扩增效率的增加,其特异性在第六轮开始下降,因此有研究者建议,sPMCA最好不要超过七轮<sup>[13-14]</sup>。后来,Atarashi<sup>[15]</sup>利用仓鼠重组过表达的PrP(rHaPrP)代替原来使用的PrP<sup>C</sup>,建立了rPrP-PMCA方法。这个过程能以指数方式增加rPrP<sup>Sc</sup>的产量,只需要两轮循环就能达到检测极限(5×10<sup>-17</sup> g或1 000个分子),大大提高了检测的灵敏度,但是rPrP-PMCA会抑制PrP<sup>Sc</sup>的扩增。为了消除rPrP-PMCA对PrP<sup>Sc</sup>扩增的抑制性,科研人员建立了PMCAb方法。一般来说,标准PMCA反应体系中PrP<sup>C</sup>向PrP<sup>Sc</sup>的转化率只有近10%,而加入珠子时(3个大的或者5个小的),转化率接近100%。聚四氟乙烯和乙缩醛等材料制成的珠子,能在48个循环的PMCA中使检测灵敏度提高2-3个数量级,可减少扩增轮数、提高特异性。PMCA的超声破碎过程不论是否添加珠子都能破碎聚集体,但用原子力显微镜(AFM)观察碎片发现,有珠子参与能使碎片更小,得到更多的颗粒<sup>[12]</sup>。因此,有珠子参与的超声破碎可以将PrP<sup>Sc</sup>破碎成更小的寡聚体,形成更多的新生感染单元来诱导产生更多的PrP<sup>Sc</sup>。添加特氟隆珠子也很可能有助于匀浆物在超声波中的分散,改善了扩增效率并减少了样品之间的逆变性<sup>[14]</sup>,从而提高了扩增效率。

最近,qPMCA技术的建立使得PrP<sup>Sc</sup>在定量检测方面取得了重要突破,类似于定量PCR原理,样品中

PrP<sup>Sc</sup>的量与达到检测所必需的PMCA的循环数有直接关系。将纯化的PrP<sup>Sc</sup>去糖基化,用蛋白质印记法得到PrP<sup>Sc</sup>的信号,再将所得信号与已知含量的重组朊病毒蛋白的信号作比较,从而得到其浓度;然后根据加入试管的PrP<sup>Sc</sup>的量和PMCA的循环数,通过标准曲线和测定未知样品所需的PMCA的循环数就可以估算样品中PrP<sup>Sc</sup>的原始含量<sup>[16]</sup>。该方法缩短了TSE的早期检测时间,提高了风险评估的可靠性,具有很高的应用价值。

### 3 PMCA的影响因素

PMCA通过一系列循环达到扩增PrP<sup>Sc</sup>的目的,其过程受到反应体系中多种因素的影响,如PrP<sup>Sc</sup>的破碎程度、脑组织匀浆物中总RNA、金属离子和一些细胞转化因子等。PrP<sup>Sc</sup>的生成过程中会形成聚集体,适度增加PMCA中超声破碎的功率能提高扩增效率,但当达到临界点时扩增效率便不再增加甚至会降低,破碎不彻底或破碎分子太小都会降低效率<sup>[17]</sup>。这一事实也说明了PrP<sup>Sc</sup>扩增中聚集体形成的“种子”大小有一个最小限度,破碎功率和时间都会影响扩增效率。

体外PrP<sup>Sc</sup>的生成过程中必须有一些细胞因子的参与,这些细胞因子大多位于细胞膜脂筏结构中,但是到目前为止尚未完全阐明这些细胞因子的种类和具体作用。PrP<sup>C</sup>结构中磷脂酰肌醇(GPI)锚定位点是其固定于细胞膜的主要结构,该结构还在PrP<sup>Sc</sup>的转化中发挥重要作用,细菌的重组PrP(rPrP)因缺少此结构而不能作为PMCA的反应底物;在PMCA过程中用磷脂酶处理除去GPI锚定位点的PrP<sup>C</sup>很大程度上能减少甚至完全不能生成PrP<sup>Sc</sup><sup>[18]</sup>。因此,GPI锚定位点在PrP<sup>C</sup>向PrP<sup>Sc</sup>的转化过程中起着十分重要的作用。实验证明,纯化的PrP<sup>C</sup>和PrP<sup>Sc</sup>混合并不能发生转化,而加入哺乳动物脑组织后则会发生<sup>[19]</sup>。另外,小而高度结构化的RNA、脊椎动物的总RNA以及核苷酸聚合物如polyA和polydT等均能使PrP<sup>C</sup>向PrP<sup>Sc</sup>转化。这些细胞因子存在于多数哺乳动物的主要器官中,如大脑、脊髓、肝脏等,但低等生物(酵母、细菌和蝇类)不存在类似的转化因子<sup>[10]</sup>。此外,少量NADPH可以促进rPrP向PrP<sup>res</sup>的转化,与其结构相似的NAD和NADP,还有硫酸化多糖、RNA分子、DNA分子和分子伴侣等也有类似的功能。其中,聚合阴离子尤其是poly(A)RNA,能在PMCA体系中直

接诱导PrP<sup>C</sup>向PrP<sup>Sc</sup>转化<sup>[19]</sup>。而硫酸化多糖可能是通过促进或稳定PrP<sup>C</sup>和PrP<sup>Sc</sup>的相互作用来加速PrP<sup>Sc</sup>的形成<sup>[20]</sup>。

PrP<sup>C</sup>具有转运金属离子的作用,但PrP<sup>Sc</sup>对金属离子的作用尚不清楚。不过低剂量(50 mmol/L)和高剂量(500 mmol/L)的Mn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>都能促进PMCA反应,而Cu<sup>2+</sup>则不能,但Cu<sup>2+</sup>可以使失活的PrP<sup>Sc</sup>恢复其侵染性和蛋白酶K抗性<sup>[17]</sup>。

在PMCA反应体系中添加特氟龙珠、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、尼龙能促进扩增,此外,添加两性分子的苷类如0.05%的皂素也能将PMCA的灵敏度提高5~25倍。这些条件的优化使PMCA比转基因小鼠的生物检测法提高10<sup>5</sup>倍的灵敏度<sup>[21]</sup>,为TSE的检测提供了快速高效的方法。

### 4 PMCA的应用

PMCA技术为PrP的检测和病理学研究提供了高效的技术手段,并且利用PMCA技术复制出的跨界朊病毒蛋白可为有效治疗人类克雅氏病提供参考<sup>[22]</sup>。体外生成的PrP<sup>Sc</sup>在理化特性上与脑源性PrP<sup>Sc</sup>十分相似,且具有感染性<sup>[8]</sup>。因此,可利用该技术体外生成PrP<sup>Sc</sup>进行早期检测诊断或代替脑源性PrP<sup>Sc</sup>进行多种研究。

#### 4.1 PrP<sup>Sc</sup>的检测

在英国疯牛病爆发之后,研究人员建立并逐步改进了TSE的检测方法,从利用大脑和中枢神经系统等的免疫组化检测到血液甚至尿液检测都获得了极大进展,但是这些检测技术都需要一定量的PrP<sup>Sc</sup>。而在潜伏期或者患病个体的外周组织和体液及分泌物(如肝脏、脾脏、肾脏、肠、血液、奶、脑脊液等)中的PrP<sup>Sc</sup>含量通常很低,常规技术如免疫组化及ELISA等往往不能检出,这给动物性食品安全带来一定的潜在风险。TSE的潜伏期很长,早期症状不明显,感染动物的分泌物中的侵染性PrP<sup>Sc</sup>是该病传播的重要潜在途径,利用PMCA检测奶、粪便、尿液、唾液等样品中的PrP<sup>Sc</sup>可以实现对该病的早期检测<sup>[4,18,23-24]</sup>。正常脑匀浆物经过PMCA不会产生PrP<sup>res</sup>,而连续PMCA可以将样品中的微量PrP<sup>Sc</sup>扩增到可以检出的水平,以前者为对照可以避免假阳性的出现进一步提高早期检测的准确性。对患病晚期鹿的口腔液、泌尿生殖系统和肠胃组织进行分析,结果显示,在这些组织中存在PrP<sup>Sc</sup>,其中唾液腺、膀胱和小

肠中含量较高<sup>[25]</sup>。用sPMCA能在潜伏期动物的乳液、粪便和唾液以及发病期动物的乳液、粪便、尿液和唾液中检测到PrP<sup>Sc</sup><sup>[4]</sup>。近来,利用sPMCA在患病羊的精液中也检测到侵染性PrP<sup>Sc</sup>的存在<sup>[26]</sup>,为证明该病的垂直传播提供了证据。

一项对痒病传染性的研究表明,患病羊污染的羊舍16年后仍具有传染性,据此推测环境中的PrP<sup>Sc</sup>可能会保持几十年的活性<sup>[27]</sup>。并且对土壤中PrP的研究表明,附着在土壤颗粒以及石英微粒、蒙脱石和高岭石等载体表面PrP的侵染性都得到了提高,这可能是由于与这些颗粒相连后使得其构象或聚集状态发生改变而更适合其传播<sup>[28]</sup>。因此,PMCA还可以对物品及环境中的微量PrP<sup>Sc</sup>进行监测,从而更好地控制TSE的传播。

#### 4.2 PrP<sup>Sc</sup>的定量分析

目前,可通过qPMCA方法来估算脑、神经系统、脾脏、肝脏、血液和尿液等组织和器官中PrP<sup>Sc</sup>的浓度<sup>[16]</sup>。用连续qPMCA对鹿感染性脑匀浆组织PrP<sup>Sc</sup>的检测限度可达 $6.7 \times 10^{13}$ 稀释度,而利用生物化学标记方法则为 $10^7$ 稀释度<sup>[21]</sup>,且这种检测方法适用于所有菌株和物种的PrP<sup>Sc</sup><sup>[16]</sup>。利用qPMCA测定发病期仓鼠的脾脏、血沉棕黄层、血浆和尿液中PrP<sup>Sc</sup>的含量分别为脑中的 $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-10}$ 和 $10^{-11}$ 倍<sup>[16]</sup>。定量检测技术的建立在疾病诊断、治疗效果评估、药物筛选和环境监测方面具有重要作用,检测最低限度达到仅相当于一个侵染性PrP<sup>Sc</sup>分子<sup>[14]</sup>。另外,利用PMCA技术在一些羊场20 cm<sup>2</sup>的容器污染物表面检测到含有 $2.4 \times 10^{-15}$  g PrP<sup>Sc</sup><sup>[29]</sup>。因此,PMCA不仅能对生物体还可以对环境污染程度进行定量分析,评估环境的安全性。此外,由于PrP<sup>Sc</sup>对理化灭活等有很高的抗性,可以通过监测PrP<sup>Sc</sup>的含量变化筛选适于细菌、真菌和病毒的新型广谱消毒剂<sup>[30]</sup>。

#### 4.3 致病机制及传播的研究

依据朊病毒蛋白模板假说,PrP<sup>Sc</sup>模板能诱导PrP<sup>C</sup>精确地复制其折叠形式。但PMCAb的研究中发现,与PrP<sup>Sc</sup>相似的纤维状PrP并不能复制侵染性蛋白,而与PrP<sup>Sc</sup>折叠形式不同的另一种形式却能诱导侵染性蛋白的产生,又在PrP<sup>Sc</sup>稳定结构形成前观察到PrP<sup>res</sup>的存在,这说明PrP<sup>C</sup>错误折叠的第一产物是PrP<sup>res</sup><sup>[31]</sup>。因此可以证明,可能存在与模板假说不同的另一种TSE的传播机制。

利用sPMCA进行检测可能接触过痒病因子羊

的口腔分泌物和乳液,结果显示,大部分样品存在PrP<sup>Sc</sup>,这表明痒病感染早期的亚临床状态(至屠宰前或者死亡前均无临床症状者)在动物和人中可能普遍存在<sup>[32-33]</sup>。同时,由于羊相互舔舐的生活习性以及乳液在动物和人食物链中的重要性,唾液和乳液PrP<sup>Sc</sup>在TSE的水平传播中可能是一种重要途径<sup>[32-34]</sup>。临床早期患病妊娠母羊的羊膜和胎儿大脑、脾脏、盲肠和咽后淋巴结都能检测到PrP<sup>res</sup><sup>[35]</sup>,这表明TSE在胚胎期是可以感染的。这些发现改变了以往认为TSE主要通过水平传播(牛羊源性食物)和散发性的观点,垂直传播的可能或许是彻底消灭该病的关键控制点。

## 5 结论与展望

PMCA为哺乳动物PrP<sup>Sc</sup>的检测提供了重要手段和方法,方便样品采集的同时大大提高了TSE的早期检测和灵敏度。该技术能对动物内脏组织、口腔液、粪便以及污染物进行检测,扩大了应用范围,提高了环境监测和控制疾病传播的能力。而定量PMCA可以估算感染的程度以及各种灭菌方法的效果<sup>[36]</sup>,在生物实验室安全和环境监测中具有良好的应用前景。另一方面,PMCA的效率受到底物成分的影响,因此为研究PrP<sup>Sc</sup>生成过程中参与的细胞因子以及结构转换机制提供了技术手段。脑组织匀浆粗提物比纯化重组PrP有着更高的PrP<sup>Sc</sup>转化率,推测还有其他未知宿主因子的参与,这些因素可能会影响到潜伏期甚至临床表现。

近来,科研人员用PMCA检测发现某些苔藓植物提取物能够降解PrP<sup>Sc</sup>至原来的1%以下,甚至到免疫斑点杂交检测限度以下的水平<sup>[37]</sup>,这无疑为TSE的治疗带来了希望。同时可以利用qPMCA技术在多种组织和体液中监测临床期PrP<sup>Sc</sup>的动态变化,从而判断药物的治疗效果,为药物设计、筛选和药效评价提供技术手段。总之,随着PrP检测技术的发展和对其分子结构的深入研究,相信不久的将来人们对该病的病理机制、诊断和治疗都将获得重大突破。

## 参考文献 (References)

- 1 林东海,文 祎. 朊病毒蛋白prion的研究进展. 中国科学: 化学 [Lin Donghai, Wen Yi. Progresses on prion proteins. Scientia Sinica (Chimica)] 2011; 41(4): 683-98.
- 2 毕 昊,陆华新,王先广,卢艳军,刘志国. 利用PMCA技术实验不同剂量MCT联合DTT对PrP(sc)转化的抑制效应. 中国生

- 物化学与分子生物学报(Bi Hao, Lu Huaxin, Wang Xiangang, Lu Yanjun, Liu Zhiguo. The inhibitory effect of MCT in different concentration with DTT on amplification of PrP<sup>Sc</sup> by PMCA *in vitro*. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology) 2011; 27(9): 879-84.
- 3 Maddison BC, Rees HC, Baker CA, Taema M, Bellworthy SJ, Thorne L, *et al*. Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J Infect Dis* 2010; 201(11): 1672-6.
- 4 Gough KC, Maddison BC. Prion transmission: Prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* 2010; 4(4): 275-82.
- 5 管峰, 石国庆, 赵进, 杨利国. 乳及乳制品中朊蛋白及其安全性研究进展. *动物营养学报*(Guan Feng, Shi Guoqing, Zhao Jin, Yang Ligu. Prion proteins and their safety in milk and milk products. *Chinese Journal of Animal Nutrition*) 2010; 22(5): 1177-80.
- 6 Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13363-83.
- 7 Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001; 411(6839): 810-3.
- 8 周瑞敏, 田婵, 董小平. 蛋白质错误折叠循环扩增技术及其应用. *医学分子生物学杂志*(Zhou Ruimin, Tian Chan, Dong Xiaoping. Protein misfolding cyclic amplification and its application. *Journal of Medical Molecular Biology*) 2008; 5(6): 550-3.
- 9 Zou WQ, Gambetti P. From microbes to prions: the final proof of the prion hypothesis. *Cell* 2005; 121(2): 155-7.
- 10 Abid K, Morales R, Soto C. Cellular factors implicated in prion replication. *FEBS Lett* 2010; 584(11): 2409-14.
- 11 石崧, 董辰方, 张宝云, 石琦, 王桂荣, 王新, 等. 一种基于连续PMCA的PrP<sup>Sc</sup>体外扩增方法的建立. *病毒学报*(Shi Song, Dong Chenfang, Zhang Baoyun, Shi Qi, Wang Guirong, Wang Xin, *et al*. Establishment of PrP<sup>Sc</sup> conversion based on serial PMCA *in vitro*. *Chinese Journal of Virology*) 2008; 24(4): 282-6.
- 12 Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Ostapchenko VG, Savtchenko R, Alexeeva I, Rohwer RG, *et al*. Highly efficient protein misfolding cyclic amplification. *PLoS Pathog* 2011; 7(2): e1001277.
- 13 Pulford B, Spraker TR, Wyckoff AC, Meyerett C, Bender H, Ferguson A, *et al*. Detection of PrPCWD in feces from naturally exposed Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) using protein misfolding cyclic amplification. *J Wildl Dis* 2012; 48(2): 425-34.
- 14 Barria MA, Gonzalez-Romero D, Soto C. Cyclic amplification of prion protein misfolding. *Methods Mol Biol* 2012; 849: 199-212.
- 15 Atarashi R. Recent advances in cell-free PrP<sup>Sc</sup> amplification technique. *Protein Pept Lett* 2009; 16(3): 256-9.
- 16 Chen B, Morales R, Barria MA, Soto C. Estimating prion concentration in fluids and tissues by quantitative PMCA. *Nat Methods* 2010; 7(7): 519-20.
- 17 Sarafoff NI, Bieschke J, Giese A, Weber P, Bertsch U, Kretschmar HA. Automated PrPres amplification using indirect sonication. *J Biochem Biophys Methods* 2005; 63(3): 213-21.
- 18 Kim JI, Surewicz K, Gambetti P, Surewicz WK. The role of glycosphosphatidylinositol anchor in the amplification of the scrapie isoform of prion protein *in vitro*. *FEBS Lett* 2009; 583(22): 3671-5.
- 19 Shi S, Dong CF, Tian C, Zhou RM, Xu K, Zhang BY, *et al*. The propagation of hamster-adapted scrapie PrP<sup>Sc</sup> can be enhanced by reduced pyridine nucleotide *in vitro*. *FEBS J* 2009; 276(6): 1536-45.
- 20 Murayama Y, Yoshioka M, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, *et al*. Sulfated dextrans enhance *in vitro* amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(Sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(Sc). *PLoS One* 2010; 5(10): e13152.
- 21 Johnson CJ, Aiken JM, McKenzie D, Samuel MD, Pederson JA. Highly efficient amplification of chronic wasting disease agent by protein misfolding cyclic amplification with beads (PMCAb). *PLoS One* 2012; 7(4): e35383.
- 22 李建疆, 李泽鸿, 万家余, 高宏伟. 22L毒株朊蛋白错误折叠循环扩增方法的建立. *中国畜牧兽医*(Li Jianjiang, Li Zehong, Wan Jiayu, Gao Hongwei. Establishment of protein misfolding cyclic amplification for 22L PrP<sup>Sc</sup>. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*) 2010; 37(2): 71-4.
- 23 Gonzalez-Romero D, Barria MA, Leon P, Morales R, Soto C. Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett* 2008; 582(21): 3161-6.
- 24 Maddison BC, Baker CA, Rees HC, Terry LA, Thorne L, Bellworthy SJ, *et al*. Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep. *J Virol* 2009; 83(16): 8293-6.
- 25 Haley NJ, Mathiason CK, Carver S, Zabel M, Telling GC, Hoover EA. Detection of chronic wasting disease prions in salivary, urinary, and intestinal tissues of deer: Potential mechanisms of prion shedding and transmission. *J Virol* 2011; 85(13): 6309-18.
- 26 Rubenstein R, Bulgin MS, Chang B, Sorensen-Melson S, Petersen RB, LaFauci G. PrP(Sc) detection and infectivity in semen from scrapie-infected sheep. *J Gen Virol* 2012; 93(Pt 6): 1375-83.
- 27 Rodriguez CM, Bennett JP, Johnson CJ. Lichens: Unexpected anti-prion agents? *Prion* 2012; 6(1): 11-6.
- 28 Smith CB, Booth CJ, Pedersen JA. Fate of prions in soil: A review. *J Environ Qual* 2011; 40(2): 449-61.
- 29 Maddison BC, Baker CA, Terry LA, Bellworthy SJ, Thorne L, Rees HC, *et al*. Environmental sources of scrapie prions. *J Virol* 2010; 84(21): 11560-2.
- 30 Pritzkow S, Wagenführ K, Daus ML, Boerner S, Lemmer K, Thomzig A, *et al*. Quantitative detection and biological propagation of scrapie seeding activity *in vitro* facilitate use of prions as model pathogens for disinfection. *PLoS One* 2011; 6(5): e20384.
- 31 Makarava N, Kovacs GG, Savtchenko R, Alexeeva I, Ostapchenko VG, Budka H, *et al*. A new mechanism for transmissible prion diseases. *J Neurosci* 2012; 32(21): 7345-55.
- 32 Gough KC, Baker CA, Rees HC, Terry LA, Spiropoulos J, Thorne L, *et al*. The oral secretion of infectious scrapie prions occurs in preclinical sheep with a range of PRNP genotypes. *J Virol* 2012; 86(1): 566-71.
- 33 Gough KC, Baker CA, Taema M, Maddison BC. *In vitro* amplification of prions from milk in the detection of subclinical infections. *Prion* 2009; 3(4): 236-9.
- 34 Da Costa Dias B, Weiss SF. A kiss of a prion: New implications for oral transmissibility. *J Infect Dis* 2010; 201(11): 1615-6.
- 35 Garza MC, Fernandez-Borges N, Bolea R, Bodiola JJ, Castilla J,

- Monleon E. Detection of PrPres in genetically susceptible fetuses from sheep with natural scrapie. *PLoS One* 2011; 6(12): e27525.
- 36 Murayama Y, Yoshioka M, Horii H, Takata M, Yokoyama T, Sudo T, *et al.* Protein misfolding cyclic amplification as a rapid test for assessment of prion inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(2): 758-62.
- 37 Johnson CJ, Bennett JP, Biro SM, Duque-Velasquez JC, Rodriguez CM, Bessen RA, *et al.* Degradation of the disease-associated prion protein by a serine protease from lichens. *PLoS One* 2011; 6(5): e19836.

## Progress on Protein Misfolding Cyclic Amplification and Its Applications in the Detection of Prion Protein

Wang Haixia<sup>1</sup>, Shi Guoqing<sup>2</sup>, Liu Yixiao<sup>1</sup>, Wan Pengcheng<sup>2</sup>, Guan Feng<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; <sup>2</sup>The Key Sheep Breeding and Reproduction Biotechnology Laboratory of Xinjiang Production and Construction Group, Shihezi 832000, China; <sup>3</sup>China Jiliang University, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, Institute of Plant Environmental Biology and Measurement Technology, Hangzhou 310018, China)

**Abstract** Prion protein (PrP) is the pathogen of transmissible spongiform encephalopathy (TSE), and its detection is the important diagnosis basis of the disease. In this paper, a new technology named protein misfolding cyclic amplification was reviewed, including the technical principles, methods, influence factors and applications in the prion diseases detection. The aim is to provide theoretical references for the detection of prion protein and the mechanism of the disease.

**Key words** prion protein; PrP<sup>C</sup>; PrP<sup>Sc</sup>; PMCA; detection

---

Received: July 14, 2012 Accepted: August 20, 2012

This work was supported by the National High-tech Research and Development Program of China (863) (No.2008AA101011) and the National Natural Science Foundation of China (No.C120103)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86835772, E-mail: jlguanfeng@yahoo.com.cn