

# 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类 *FUT2* 基因的 克隆与组织表达\*

姜 薇<sup>1,2</sup> 姚 琳<sup>2</sup> 江艳华<sup>2</sup> 李风铃<sup>2</sup>  
牟海津<sup>1</sup> 刘 慧<sup>2</sup> 翟毓秀<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003;

2. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 通过同源克隆的方法获得太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类 *FUT2* 基因的 cDNA 序列,分析其在牡蛎中的组织表达差异。研究表明,太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因 cDNA 全长为 1941 bp, 包含 180 bp 的 5'非翻译区、1086 bp 的编码 361 个氨基酸的开放阅读框及 675 bp 的 3'非翻译区。分子进化聚类分析结果显示,太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因与家鼠(*Mus musculus*)等哺乳动物的 *FUT2* 基因聚为 1 个分支。此外,类 *FUT2* 基因 mRNA 在太平洋牡蛎成贝的肝胰脏、闭壳肌、外套膜、唇瓣、鳃等 5 个组织中均有分布,其中在唇瓣中的表达量最低,在其余 4 个组织中的表达量差异不显著。本研究表明,牡蛎中类 A 型组织血型抗原 HBGA 很可能存在与人 A 型 HBGA 相似的合成途径,可为进一步探索牡蛎特异性富集诺如病毒 NoV 的分子机制奠定研究基础。

**关键词** 太平洋牡蛎; 类 *FUT2* 基因; 克隆; 组织表达

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)05-0070-06

诺如病毒(Norovirus, NoV)是引起人类非菌性急性肠胃炎的主要病原(Daniels *et al*, 2000),其感染引起的病例占病毒性肠胃炎的 90%(Chatterjee *et al*, 2004; Green, 1997)。NoV 可识别人类组织血型抗原(Histo-blood group antigens, HBGAs),并将其作为连接的配体或受体感染人类(Marionneau *et al*, 2002; Huang *et al*, 2003; Hutson *et al*, 2003)。在人类 HBGAs 合成过程中,*FUT2*(Fucosyltransferase 2,  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶)将岩藻糖基转移到 I 型链( $\beta$ -1,3-糖苷键连接的前体物质)半乳糖残基末端形成 H 抗原,随后 A 酶( $\alpha$ -1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶)将 GalNAc 转移到 H 抗原 Gal 残基末端,形成 A 型抗原(Shirato, 2012)。因此,*FUT2* 是 A 型 HBGA 合成的关键酶之一。

牡蛎(*Crassostrea gigas*)能够特异性富集 NoV,食

用被 NoV 污染且加热不彻底的牡蛎常引起 NoV 的感染(Tian *et al*, 2006; 柳淑芳等, 2009),为水产品质量及食用安全带来隐患。Le Guyader 等(2006)与 Tian 等(2006)发现牡蛎中存在类 A 型 HBGA,并确定类 A 型 HBGA 作为受体介导牡蛎肠胃细胞特异性吸附 NoV,为研究牡蛎特异性富集 NoV 的分子机理拓展了新的研究视野。根据牡蛎类 A 型 HBGA 与人类 HBGAs 结构的相似性,推测牡蛎中也存在类似于人类 *FUT2* 的酶以合成类 A 型 HBGA,但尚未见国内外有关该酶及相关基因的研究报道。

本研究通过 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆牡蛎类 *FUT2* 基因,分析其序列特征,并通过实时荧光定量 RT-PCR 的方法分析其组织表达特性,为深入开展牡蛎特异性富集诺如病毒的分子机理研究奠

\* 国家自然科学基金(31101883)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金计划项目(BS2010SW041)共同资助。

姜 薇, E-mail: jiangweiysfri@163.com

通讯作者: 翟毓秀, 研究员, E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-03-10, 收修改稿日期: 2014-04-23

定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

实验用太平洋牡蛎于 2012 年 11 月在山东省威海乳山市海阳所镇杜家养殖场采集, 解剖后获得肝胰脏、鳃等组织, 迅速保存于液氮中。

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, 限制性内切酶等工具酶购自 Fermentas 公司, SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)、Advantage® 2 PCR Kit(Clontech)、PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自大连宝生物公司, 琼脂糖凝胶、DNA 回收试剂盒购自 TIANGEN 公司。

### 1.2 总 RNA 的提取和 SMART cDNA 的合成

取太平洋牡蛎的肝胰脏约 100 mg, 加液氮于研钵中充分研磨, 按照 Trizol 操作手册提取总 RNA。按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 操作手册制备 5' RACE-Ready cDNA 和 3' RACE-Ready cDNA。

### 1.3 中间片段的克隆

根据 NCBI 网站上公布的非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, NP001082705)、人(*Homo sapiens*, NP000502.4)、小鼠(*Mus musculus*, AAF45146.1)、野猪(*Sus scrofa*, CAA67932.1)、黄牛(*Bos taurus*, CAA67931.1)等  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶氨基酸序列信息, 利用 ClustalX 1.81 软件通过多重序列比对分析保守序列片段, 根据保守序列并结合牡蛎密码子偏爱性设计合成一对简并引物 FMF/FMR, 引物序列见表 1。以 FMF/FMR 为引物, RACE-Ready cDNA 的 100 倍稀释液为模板, 扩增太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的中间保守片段。PCR 扩增体系: 2.0 mmol/L dNTP 1.0  $\mu$ l, 10.0  $\mu$ mol/L

FMF/FMR 各 1.0  $\mu$ l, 25.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ l, 5 U/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ l, cDNA 模板 5.0  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 补足体系至 25.0  $\mu$ l。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 58–48 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 10 个循环, 每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳后, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对目的片段纯化, 纯化产物连接 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 经蓝白斑筛选及限制性内切酶鉴定后, 将阳性克隆送往上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.4 全长 cDNA 的克隆(RACE)

根据中间保守片段的序列, 设计基因特异性引物 FofrF 和 FofrR, 引物序列见表 1。

3'RACE: 以太平洋牡蛎肝胰脏 SMART cDNA 为模板, 以 FofrR/UPM 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

5'RACE: 以太平洋牡蛎肝胰脏 cDNA 为模板, 以 FofrF/UPM 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 66 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

所有 RACE PCR 产物经过纯化回收后分别克隆到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ 。经蓝白斑筛选、限制性内切酶鉴定后, 将阳性克隆送往上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.5 序列分析

测序结果拼接后, 将克隆所得基因用 DNAMAN 分析推测其相应的蛋白质序列, 在 NCBI 中搜索同源基因, 并进行序列同源性比对。用 ExPASy-Compute pI-Mw tool 在线预测蛋白质的等电点和分子量, 同时用 Phyre2(Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0)在线预测蛋白质二级结构, 用 TMHMM Server V. 2.0 在线分析跨膜区, 用 NetOGlyc 4.0 Server 在线分析糖基化位点等。从 NCBI 中下载其他生物的 *FUT1*、*FUT2* 及 *FUT3* 蛋白质序列, 利用 MEGA 5.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ), 将预测 *FUT2* 的表达蛋白序列与其进行系统进化分析, 设置 1000 次 bootstraps, 并采用 p-distance 模型, 构建进化树。

### 1.6 组织表达分析

以太平洋牡蛎成贝活体为实验对象, 选取 10 个大小接近的牡蛎为平行样品, 迅速解剖, 分别取肝胰脏、闭壳肌、外套膜、唇瓣和鳃等 5 个组织, 按照 Trizol 操作手册步骤对各组织样品进行总 RNA 提取,

表 1 实验中所用引物序列  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Sequence(5'-3')
FMF	GGYTAYYTG CARAGNTGG
FMR	AACNGTRGTRTTCA
FofrR	GTGTACATTTTCCTGATTTTC
FofrF	TGGACATTGCCATCCTGAC
F-of-1	TTCTCTTTGTGGTTGGCTCAG
R-of-1	CAGTGTGGTTACAGTTGGTCAG
Fo-actin	CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT
Ro-actin	TGGGCACCTGAATCGCTCGTT

于-80℃冷冻保存备用。按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa)说明书进行 cDNA 的合成。

应用实时荧光定量 RT-PCR 的方法,根据太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因序列,以第一链 cDNA 为模板,设计目的基因引物 F-of-1 和 R-of-1,序列见表 1。以  $\beta$ -actin 基因为内参基因,合成上下游引物 Fo-actin 和 Ro-actin (张晨等, 2011),分析类 *FUT2* mRNA 在牡蛎 5 个组织中的表达分布。

按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa)说明书,配制实时荧光定量 RT-PCR 反应体系,在荧光定量 PCR 仪(LightCycler 2.0, Roche)上进行,反应程序为 95℃ 5 min,以 95℃ 5 s, 60℃ 20 s 为 1 个循环,40 个循环后,测定熔解曲线,结束反应。所有样品反应均重复 3 次。

实时荧光定量 RT-PCR 所得的数据应用 Delta-Delta Ct 方法进行相对定量分析(Livak *et al.*, 2001),设定太平洋牡蛎唇瓣中该基因的表达量为 1。对类 *FUT2* 基因的相对表达水平实验中所得实验数据用 SPSS

18.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  作为显著性差异、 $P < 0.01$  作为极显著差异标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 类 *FUT2* 基因克隆与序列分析

根据已知 *FUT2* 序列,分析其保守片段,根据保守片段设计简并引物 FMF/FMR,扩增得到 414 bp 的 cDNA 片段,利用 3' RACE 技术获得了 1002 bp 的片段,该片段包含终止密码子 TGA、两个加尾信号序列 AATAA 及 30 bp 的 poly(A)。利用 5' RACE 技术获得了 525 bp 的片段,该片段包含 3 个起始密码子 ATG。将 3' RACE 和 5' RACE 获得的片段拼接,获得太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因 cDNA 序列。通过 DNA Star 分析软件发现,该 cDNA 包含一个长度为 1086 bp 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF),编码 361 个氨基酸残基(图 1)。该序列已提交至 GenBank,序列号为 KJ184342。预测得知该蛋白分子量为 41.62 kDa,理论等电点为 9.52,属于碱性蛋白质。

```

1  catggggactcctggaacgacttaacaaattatatgttcgaattccctctacaataacttgactgacttgtcaaaatagcttttgccaaattcataagaatagatagacgttagatatgat
121 agagagggttaaaccagggcagatctctcttgcattttgtgcattagatgcatataaaaaATGGTGAAGAAATGTTTCATCTGGCTTTAGGATGCAAGACTTCTAAGGAAATTTACA
    M V K R M F S S G F R M Q D F L R K F T
241 CTGTGCTTTTGCCCTTGTTTTCATCCTTGGAGCTGGCTTCGTCTTGGTGAATCTTCTCCCTATCCCTCCTCACTTCTGGCAAAGTTTTTACAACCTTTTTAAAGCCACAACAACTTCT
    L C L C L V F I L G A G F V L V E F F S L S S F T S G K V F T T F L K P Q Q T S
361 GATAAAAAATATGCGGTAGAACAACAAAACTCACCTAATGAAGAAAGAAAAATATTCTAAGCTCATCACCCTTTGAAGCCTCCAACACACTACTGCTACTGTAATTTTGAAGGACGC
    D K K Y A V E Q K N S P N E E R K N I S K L I T T L K P P T H Y A T V N F E G R
481 CTTGAAATCAGCTGTTGAGTTTGCATCCCTGTATGGGATGCAAGCATAATAATTGATACCAGTTATACCTGCCAATTCGAATCTTCCGAGAATTTCAAATTTACTGTTGGTCCC
    L G N Q L F E F A S L Y G I A K H N N L I P V I P A N S I L R R I F K I T V G P
601 ACTAGGCCAGAGATCAAAATATACGAAAAGATACCACGAGAAAAAGGATGTGATTTGAACCACCATTGATGGCGTTGGGGGAATCCGAAAACGTTTGGATTAAGGTTATTTGCAGAGT
    T R P E I K Y T K R Y H E K K G C V F E P P L M A L G E S E N V W I K G Y L Q S
721 TGGAAATATATTCATCAGGCTGATTCAGAAATCAGGAAATGTACACTTTTCAAGACTCCATTTCTCAGAAAGCAAAATCAACATTCAGGCGATTATGCATCCAAGAAAAACAAATC
    W K Y I H Q A D S E I R K M Y T F Q D S I S Q K A K S T F Q A V I A S K K N K I
841 ACCAACAACAGCTTTACGTTGGAGATTCAGTCAAGAGGAGACATGAAAAACAATCTAAACTATGTAAGTACGGATACACCAGTCCGACATGAGTAACTCTCGAAAGCTATGAAC
    T T N T V Y V A V H V R R G D M K N N L N Y V K Y G Y T T A D M S Y L S K A M N
961 ACATTCGGAAAGACTTTAAAGATGTTCTTCTTGTGGTGGCTCAGATGACCTGAAGTGGTGAAGGAGAATGAAGGATGAGGACATTGATTTATCCCGGGGCAACAGTCCAGAA
    T F R K D F K D V L F V V G S D D L K W C K E N M K D E D I V F I P P G N S P E
1081 ATGGACATTGCCATCTGACCAACTGTAACCACACTGTTGTGACTGTGGGAGTTATGGCTGGTGGACCGCTTGGCTCATCAACGGTAAAACCTACTACTACAAAGTTTCCCCACACCC
    M D I A I L T N C N H T V V T V G S Y G W W T A W L I N G K T I Y Y K G F P T P
1201 AATTCCTAGCTAGCAAAATGTTCAATGCTGAAGATATTATTTTCCCTCAATGGATCCCAATGTGATtttgattatctgcaatttaacctacaccaagaagtaacccaatccaatgt
    N S Q L A K L F N A E D Y Y F P Q W I P M *
1321 caaagcatttctttacaactttccatttactggtatttacaatttatatttctagatataacattttacgatcctttaatttgaatgtatttatatttgaagttatttcatttaata
1441 tattttgaactgatgaaacagaattacatatatctcctcaatttttattgtgattgtgaccaccagctatatgtaaaaattgttatgattttcaagaaatccattttctgtccattttcta
1561 cataccaattttcttttatttttgaaaaatctatttttttaaaatgaagattgaaatccctattttcttttcatatttacattgtgtttttacttaaatatcatgtatattcattg
1681 atacttttggttattgtaagcattttaccacaagcctgctaaatgtatattttgtgatacattacatgtacacactgctcaacagtgaagaattgaagaattctaatgtaagcaatga
1801 aataaatataagatcaccaattgcttggattgtaagtttgatcgtgaagaatcaaatatcggtacattattttaaattctgttttaatatatctatgtatagttgttcaaaagaatgttt
1921 tattttaagtttttaataataacaataaaaaagaaactcaaaacaaatataaattgctgtaaaaaactgtacaatatatttatgattttcatagcaattatataatattgtttttcac
2041 atgtctgtacacagttctctttaaataaaaatgtgacattcccccatatccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因及推定的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Crassostrea gigas* *FUT2*-like gene

起始密码子编码的甲硫氨酸用圆框标记,中止密码子用“\*”表示,加尾信号(AATAAA)用方框标记,poly(A)尾用下划线标记  
Met coded by ATG is circled. The stop codon is marked by an asterisk. The polyadenylation signal (AATAAA) is boxed, and the poly(A) signal sequence is underlined

经 DNAMAN 软件分析推测其相应的蛋白质序列, 并通过 Phyre2 在线分析蛋白质二级结构。预测结果表明, 其成熟蛋白的二级结构共包含 9 个  $\alpha$  螺旋、8 个  $\beta$  折叠和无规卷曲。

对 FUT 家族系统进化分析显示(图 2), 太平洋牡蛎类 *FUT2* 氨基酸序列与人、大猩猩、家鼠、牛 *Bos taurus*、猪等的 *FUT2* 序列相似性较高, 聚为一类; 最终与 *FUT1* 聚为一类, *FUT1* 与 *FUT2* 同时与 *FUT3* 聚为一类。

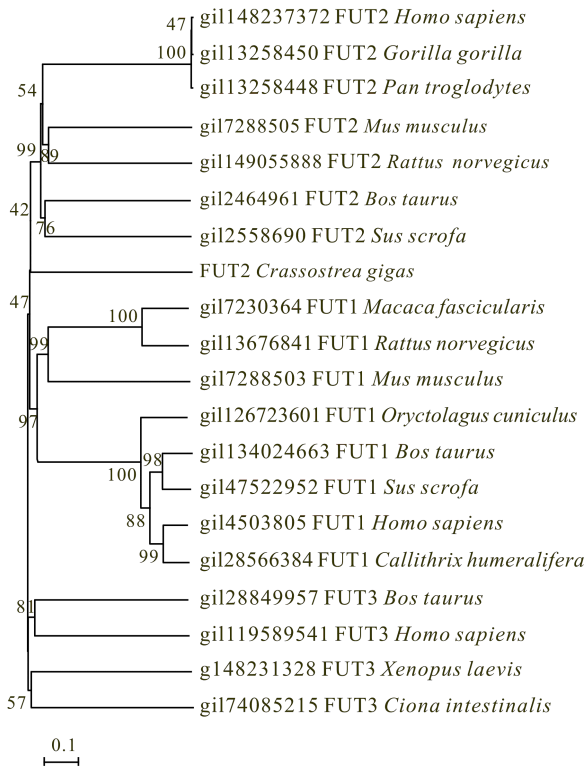


图 2 FUT 家族蛋白的系统进化分析  
Fig.2 Phylogenetic analysis of FUT family

用 TMHMM Server V. 2.0 对克隆所得目的片段的氨基酸序列的跨膜区在线分析(图 3), 发现牡蛎类 *FUT2* 分子的 361 个氨基酸可分为 3 部分:  $\text{NH}_2$  末端 18 个氨基酸残基为胞内结构, 之后 23 个氨基酸残基组成跨膜区, 随后的 320 个氨基酸残基为  $\text{COOH}$  末端部分, 为胞外结构。同时对糖基化位点进行分析, 结果发现, 在氨基酸序列的第 59、71、84、85、90、137、141、148 位存在 8 个糖基化位点。

### 2.2 组织表达分析

对提取的 RNA 用微量核酸蛋白测定仪测定, 判断其质量, 并调整 RNA 浓度在 1500–2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 测定结果显示  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  均在 1.8–2.1 之间, 表明所提

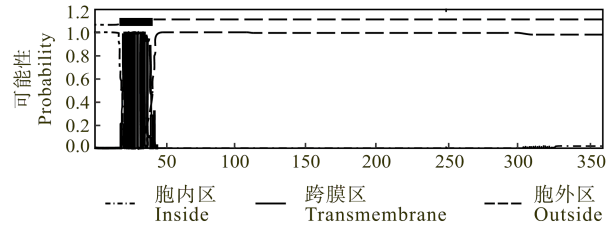


图 3 类 *FUT2* 蛋白序列跨膜区分析  
Fig.3 Transmembrane region analysis of *FUT2*-like protein

RNA 质量较好。

利用实时荧光定量 RT-PCR 对太平洋牡蛎类 *FUT2* mRNA 在不同组织的表达分布进行测定。测定过程中对目的片段作熔解曲线分析。类 *FUT2* 基因目的片段  $T_m$  值约为 82.5,  $\beta$ -actin 基因目的片段  $T_m$  值约为 84.5。由此可见, 该实验产生的扩增产物是目标产物, 特异性高。

统计实验所得数据, 结果表明, 类 *FUT2* 基因在太平洋牡蛎的 5 个组织部位中均有表达, 其中唇瓣表达量最低(图 4)。经检验发现, 唇瓣中类 *FUT2* 的表达量与其余 4 个组织中的含量分别存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 但肝胰腺、闭壳肌、外套膜、鳃 4 个组织部位间表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

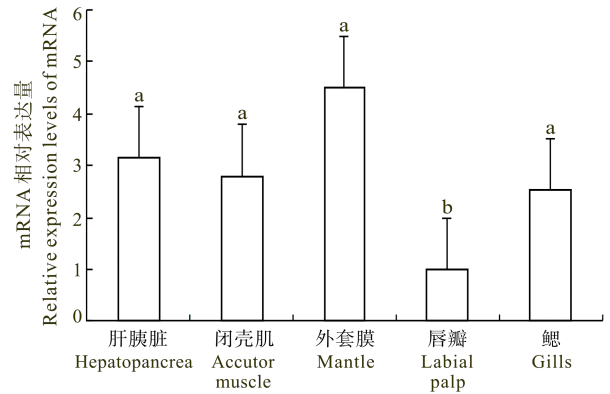


图 4 类 *FUT2* 基因在太平洋牡蛎 5 个组织中的表达量  
Fig.4 Relative expression of the *FUT2*-like gene in five different parts of *Crassostrea gigas*

具有不同字母的组之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )  
Different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

组织血型抗原 HBGA 系统由多个基因家族共同调控。ABH 系统是重要的 HBGA 系统之一, ABH 血型抗原是由 5 种前体糖链在 *FUT1*、*FUT2* 等多种糖基转移酶的系列催化下形成的。其中 *FUT2* 和 A 酶是 A 型血型组织抗原合成的两个关键酶。

Le Guyader 等(2006)通过免疫组织化学的方法证实牡蛎存在类 A 型 HBGA, 并且证明类 A 型 HBGA 与 NoV 粒子的结合方式和人类 A 型 HBGA 一致, 均是通过 N 端的  $\alpha$ -N-乙酰半乳糖胺残基完成的; Tian 等(2006)用不同 HBGAs 的单克隆抗体, 通过 ELISA、免疫组织化学结合三通道激光共聚焦显微镜分析的方法, 证实牡蛎胃肠道细胞存在类 A 型 HBGA, 并确定了牡蛎类 A 型 HBGA 可特异性结合 NoV。基于此, 推测牡蛎中类 A 型 HBGA 的合成存在类似的合成途径, 也存在类似人类 *FUT2* 的基因, 以实现类 A 型 HBGA 的合成。

经序列比对与系统进化分析发现, 本研究克隆得到的太平洋牡蛎类 *FUT2* cDNA 为岩藻糖基转移酶家族成员, 与 *FUT1*、*FUT2* 家族均具有一定相似性, 而人类 *FUT1* 和 *FUT2* 均位于 19 号染色体长臂 100 kb 的区域内, 且 *FUT1* 和 *FUT2* 分子的氨基酸序列具有高度同源性, 可能是进化过程中由于基因复制和易位而产生的新的基因座(Procter *et al.*, 1997)。对太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因进行系统进化分析, 发现其与多个哺乳动物 *FUT2* 聚为一类, 说明其跟 *FUT2* 亲缘性更高。进一步分析太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的开放阅读框发现, 其具有 3 个起始密码子, 其中第 1 个和第 3 个起始密码子距离 10 个氨基酸残基, 且二者均可编码长的阅读框, 这一特点与人类 *FUT2* 基因结构高度吻合, 而 *FUT1* 则不具有此性质(Rouquier *et al.*, 1995), 因此更进一步证实该基因属于 *FUT2* 家族。人类 *FUT2* 基因的这两个功能性起始密码子产生两条不同的多肽链, 具有相同的催化结构域, 且多肽链长度不同不会影响岩藻糖基转移酶的催化活性, 而太平洋牡蛎的类 *FUT2* 基因的多个起始密码子是否也具有相同的功能, 需要后续实验进一步研究。对所得序列进行跨膜分析发现, 牡蛎类 *FUT2* 分子的 361 个氨基酸可分为 3 部分:  $\text{NH}_2$  末端 18 个氨基酸残基为胞内结构, 之后 23 个氨基酸残基组成跨膜区, 同时对应二级结构为两段  $\alpha$  螺旋, 形成疏水片段; 随后的 320 个氨基酸残基为  $\text{COOH}$  末端部分, 为胞外结构。根据已知的人类 *FUT2* 结构特点, 推测该胞外结构位于高尔基体腔内, 很可能具有糖基转移的催化功能。对牡蛎类 *FUT2* 编码蛋白质序列进行糖基化位点分析, 发现其氨基酸序列的第 59、71、84、85、90、137、141、148 位存在 8 个糖基化位点, 这与人类岩藻糖基转移酶存在多个糖基化位点性质类似(Kelly *et al.*, 1995), 但这些糖基化位点在牡蛎岩藻糖基转移酶的催化功能中有何作用, 需要进一步研究。

众多研究表明, 牡蛎消化组织中 NoV 的检出率最高(Le Guyader *et al.*, 2006)。Le Guyader 等(2006)与

Tian 等(2006)均是在牡蛎消化组织中发现类 A 型 HBGA, 表明牡蛎的消化组织是 NoV 富集的主要部位, 也证实了牡蛎特异性富集 NoV 的理论。本研究发现在牡蛎的肝胰脏、闭壳肌、外套膜、唇瓣和鳃等 5 个组织中均可检测到类 *FUT2* 基因 mRNA 的存在, 其中在唇瓣中的表达量最低, 其余 4 个组织中的表达量无显著差异, 这一结果并非与“类 *FUT2* 在肝胰脏中表达量高”的预期一致, 推测可能的原因有如下两点: 一是与 NoV 富集量有最直接关系的类 A 型 HBGA 的含量高低可能由 A 酶的表达式来决定, 类 *FUT2* 作为合成类 A 型 HBGA 前体的关键酶, 与类 A 型 HBGA 的最终表达式、组织分布没有最直接的关系; 二是虽然类 *FUT2* 基因在上述 5 个组织部位均有表达, 但以肝胰脏为代表的消化组织具有消化道较长、上皮细胞比表面积较大的组织结构特性, 使得消化组织在类 A 型 HBGA 含量与其他组织相近的情况下能富集更多的 NoV。

本研究通过同源克隆的方法, 证实太平洋牡蛎中存在 NoV 受体合成关键基因——类 *FUT2* 基因, 并研究了其组织表达分布。该基因的发现为今后研究牡蛎类 *FUT2* 功能、探索牡蛎类 A 型 HBGA 合成途径、绘制牡蛎类 A 型 HBGA 合成过程中的调控信号通路奠定了研究基础, 也为今后从更深层面揭示牡蛎特异性富集 NoV 的分子机理、解读牡蛎基因组遗传信息、丰富牡蛎中 NoV 受体这一国际研究热点的理论体系提供前期研究基础。

## 参 考 文 献

- 柳淑芳, 李振, 周德庆. 青岛地区贝类产品中诺如病毒的感染和流行初探. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 61-66
- Chatterjee NK, Moore DW, Monroe SS, *et al.* Molecular epidemiology of outbreaks of viral gastroenteritis in New York State, 1998-1999. Clin Infect Dis, 2004, 38(Suppl 3): S303-S310
- Daniels NA, Bergmire-Sweet DA, Schwab KJ, *et al.* A food-borne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. J Infect Dis, 2000, 181(4): 1467-1470
- Green KY. The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis. Arch Virol Suppl, 1997, 13: 153-165
- Huang P, Farkas T, Marionneau S, *et al.* Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and Secretor Histo-blood group antigens: Identification of 4 distinct strain-specific patterns. J Infect Dis, 2003, 188(1): 19-31
- Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, *et al.* Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to H Histo-blood group antigens. J Virol, 2003, 77(1): 405-415

- Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, *et al.* Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2) fucosyltransferase gene (*FUT2*). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J Biol Chem*, 1995, 270(9): 4640–4649
- Le Guyader F, Loisy F, Atmar RL, *et al.* Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(6): 931–936
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Method*, 2001, 25(4): 402–408
- Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, *et al.* ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*, 2001, 83(7): 565–573
- Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, *et al.* Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterol*, 2002, 122(7): 1967–1977
- Procter J, Crawford J, Bunce M, *et al.* A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood group and secretor status and its potential for organ transplants. *Tissue Antigens*, 1997, 50(5): 475–483
- Rouquier S, Lowe JB, Kelly RJ, *et al.* Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments: Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus. *J Biol Chem*, 1995, 270(9): 4632–4639
- Shirato H. Norovirus recognition sites on histo-blood group antigens. *Front Microbiol*, 2012, 3: 177
- Tian P, Bates AH, Jensen HM, *et al.* Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 43(6): 645–651

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning and Expression of *FUT2*-like Gene in the Oyster (*Crassostrea gigas*)

JIANG Wei<sup>1,2</sup>, YAO Lin<sup>2</sup>, JIANG Yanhua<sup>2</sup>, LI Fengling<sup>2</sup>, MU Haijin<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>, ZHAI Yuxiu<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003;

2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** Norovirus (NoV) is the most common pathogen of acute viral gastroenteritis worldwide, which causes serious issues on public health and food safety. Histo-blood group antigens (HBGAs) have been recognized as receptors of NoV. It has been reported that type A-like HBGA presents in oyster gastrointestinal cells and induces specific accumulation of NoV in oysters. Alpha-1,2-fucosyltransferase (*FUT2*) is one of the key enzymes required in the HBGA synthesis. However, studies on *FUT2* in oysters and other aquatic animals have been lacking. In this study, we cloned the *FUT2*-like gene in oysters (*Crassostrea gigas*) using homologous gene sequence method, and also analyzed the expression of *FUT2*-like gene in five tissues, including hepatopancrea, adductor muscle, mantle, labial palp and gills. The *FUT2*-like cDNA has a full length of 1941 bp, including a 180-bp 5'-untranslated region (UTR), a 1086-bp open reading frame (ORF) that encodes a protein of 361 amino acids, and a 675-bp 3'-untranslated region (UTR). The molecular evolution analysis showed that the *FUT2*-like gene in oyster should be categorized into the same branch as *FUT2* genes in *Mus musculus* and other mammals. The expression pattern of *FUT2*-like gene was analyzed in 5 tissues mentioned above. The results showed that the mRNAs of this gene were expressed in all 5 tissues; the expression level in labial palp was significantly lower than that in the other 4 tissues. Our results indicated that A-like HBGA in oyster might have a similar biosynthesis pathway as Type A HBGA in human. Our study should provide insights into the molecular mechanism of the accumulation of NoV in oysters.

**Key words** *Crassostrea gigas*; *FUT2*-like gene; Clone; mRNA expression