

DOI: 10.12131/20230060

文章编号: 2095-0780-(2023)06-0150-08

• 研究简报 •

牡蛎诺如病毒受体类 Lewis 抗原合成相关基因 *CgFUT5* 的克隆与表达鉴定

桂彬彬^{1,2}, 曲梦¹, 张蔚然^{1,3}, 李明玉^{1,4}, 江艳华¹, 姚琳¹, 王联珠¹

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所/农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 山东 青岛 266071

2. 大连工业大学 食品学院, 辽宁 大连 116034

3. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306

4. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

摘要: Lewis 抗原被认为是诺如病毒特异性结合受体, 作为诺如病毒传播载体, 牡蛎中也存在着类 Lewis 抗原, 但牡蛎合成这种碳水化合物的途径尚未阐明。为解析牡蛎中诺如病毒受体类 Lewis 抗原的合成路径, 利用 cDNA 末端快速扩增 (Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术克隆得到太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的 *CgFUT5* 基因全序列并进行生物信息学分析, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 分析其在 5 种组织中的表达情况。构建原核表达质粒转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 实现异源表达, 并通过免疫印迹法 (Western blot) 鉴定免疫原性。克隆得到了具有 1 173 bp 开放阅读区的 *CgFUT5* 基因 cDNA 序列, 系统发育树显示 *CgFUT5* 基因与多个物种具有合成 Lewis 抗原功能的岩藻糖基转移酶基因遗传学关系较近。重组 *CgFUT5* 蛋白可在大肠杆菌中过量表达, 且表达的重组 *CgFUT5* 蛋白与抗人 FUT5 抗体及抗 6×His 标签抗体均能特异性结合。研究发现 *CgFUT5* 基因在牡蛎鳃组织中大量表达, *CgFUT5* 蛋白与人 FUT5 蛋白具有相似的免疫原性, 推测牡蛎中存在着类 Lewis 抗原的合成通路, 并且调控牡蛎类 Lewis 抗原合成的基因还具有组织表达差异性。

关键词: 太平洋牡蛎; *CgFUT5* 基因; 克隆; 组织表达; 原核表达

中图分类号: TS 254.7

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Cloning, expression and identification of *CgFUT5* gene associated with Lewis antigen synthesis of Oyster norovirus receptors

GUI Binbin^{1,2}, QU Meng¹, ZHANG Weiran^{1,3}, LI Mingyu^{1,4}, JIANG Yanhua¹, YAO Lin¹, WANG Lianzhu¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China

2. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China

3. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

4. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: Lewis antigen is regarded as a specific binding receptor for norovirus, and Lewis-like antigen is also present in oysters as a vehicle for norovirus transmission, but the pathway for synthesis of this carbohydrate in oysters has not been elucidated.

收稿日期: 2023-03-25; 修回日期: 2023-06-29

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1600703); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31101883); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金 (2023TD76); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-49)

作者简介: 桂彬彬 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产品质量安全与标准化。E-mail: guibinbingo@163.com

通信作者: 姚琳 (1980—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为水产品质量安全与标准化。E-mail: yaolin@ysfri.ac.cn

王联珠 (1963—), 女, 研究员, 研究方向为水产品质量安全与标准化。E-mail: lianzhu_wang@aliyun.com

To clarify the pathway of norovirus receptor-like Lewis antigen synthesis in oysters, we cloned the *CgFUT5* gene from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) genome and analyzed the expression in five tissues. The full sequence of *CgFUT5* gene was obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) and bioinformatically analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). A prokaryotic expression plasmid was constructed to transform *Escherichia coli* for heterologous expression, and immunogenicity was identified by immunoblotting (Western blot). The cDNA sequence of *CgFUT5* gene with 1 173 bp open reading region was obtained by cloning, and phylogenetic tree shows that *CgFUT5* gene was genetically related to the rockweed glycosyltransferase gene that had the function of synthesizing Lewis antigen in several species. The recombinant CgFUT5 protein could be overexpressed in *E. coli*, and the expressed recombinant CgFUT5 protein specifically bound to both anti-human FUT5 antibody and anti-6×His tag antibody. To sum up, *CgFUT5* gene was successfully cloned and found to be abundantly expressed in oyster gill tissue, and CgFUT5 protein has similar immunogenicity to human FUT5 protein. It is hypothesized that a Lewis-like antigen synthesis pathway exists in oysters, and the genes regulating Lewis-like antigen synthesis in oysters also have differential tissue expression.

Keywords: *Crassostrea gigas*; *CgFUT5* gene; Clone; Tissue expression; Prokaryocyte expression

诺如病毒是人类所有年龄组急性肠胃炎散发和暴发的重要原因^[1-3], 具有高度传染性, 10~100 个病毒颗粒即可引发感染^[3]。在进入人体后, 诺如病毒会特异性地与肠道中的附着因子结合, 导致胃肠炎^[4]。组织血型抗原 (Histo-blood group antigens, HBGAs) 已被确定为多种诺如病毒毒株的附着因子^[5]。作为一种滤食性双壳软体动物, 在被病毒污染的水体中, 牡蛎体内的诺如病毒含量比环境中的高 100 倍, 病毒进入其体内难以被清除^[6-7], 因此牡蛎被认为是诺如病毒的重要传播媒介^[8]。多项研究指出, 诺如病毒在牡蛎中的富集是由于其能与牡蛎消化道中的碳水化合物特异性结合, 而这些碳水化合物具有类似于人类 HBGAs 的结构^[9-11]。因此, 有理由假设牡蛎中可能存在与人 HBGAs 相似的合成途径和关键基因。

Lewis 抗原作为 HBGAs 的一种, 已经在微生物黏附和癌症转移等领域得到了深入研究^[12-16], Lewis 抗原在多种糖基转移酶依次催化下合成^[17], 根据不同岩藻糖基转移酶的底物特异性, 将岩藻糖从 GDP-岩藻糖转移至不同的前体寡糖上, 产生不同类型的 Lewis 抗原。在人类基因组中, *FUT5* 基因的转录产物是合成 Lewis 抗原的糖基转移酶之一, 属于 α -1,3/4-岩藻糖基转移酶 (α -1,3/4 fucosyl transferases, α -1,3/4 Fuc Ts)^[18], 同属于这一类糖基转移酶的还有 *FUT3*、*FUT4*、*FUT6*、*FUT7*、*FUT9*、*FUT10* 和 *FUT11*^[19-20]。*FUT5* 偏好于在二型前体的基础上合成 Le^x 和 sLe^x 抗原, 也有研究表明 *FUT5* 还参与合成 Le^a 、 Le^b 和 sLe^a 抗原^[21]。Lewis 抗原在诺如病毒结合过程中起重要作用, 这些经岩藻糖基化产生的碳水化合物可以和人 A/H 型 HBGAs 抗原在结合诺如病毒时产生竞争性抑制^[22], 在对牡蛎类 HBGAs 的研究中也有类似发现^[23]。

目前已经证实牡蛎中存在 Lewis 抗原, 种类包括 Le^a 、 Le^b 、 Le^x 和 Le^y 等^[24], 然而未见具体合成途径及关键基因的研究。本研究克隆了太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)

FUT5 基因, 通过荧光定量法检测了太平洋牡蛎各组织中 *FUT5* 基因的表达量, 探讨太平洋牡蛎 *FUT5* 基因的组织表达差异性, 旨在为牡蛎富集诺如病毒的分子机理研究提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

鲜活太平洋牡蛎 (体长 10~13 cm) 样本 (10 只) 采集自青岛市黄岛区某贝类养殖场。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 模板制备

取牡蛎消化腺组织, 在液氮中研磨, 根据试剂盒的操作说明, 用动物组织 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 中国) 制备牡蛎消化腺总 RNA。用 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。用 Nano Photometer Pearl 微分光光度计 (Implen, 德国) 测定 RNA 浓度。使用 SMATER RACE 5'/3' 试剂盒 (TaKaRa, 中国) 对总 RNA 进行逆转录合成 5'/3' cDNA 末端 (RACE), 使用 Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒 (艾科瑞生物工程有限公司, 中国) 对总 RNA 逆转录合成 1st Strand cDNA。

1.3 中间片段克隆

根据 NCBI 公布的人 (*Homo sapiens*, NC_000019.10)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*, NC_036898.1)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*, NC_030680.2)、狗 (*Canis lupus familiaris*, NC_051824.1) 等物种的 *FUT5* 基因序列, 使用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 选取相似度较高的氨基酸序列在 NCBI 网站上公布的太平洋牡蛎全基因组中搜索比对, 找到预测的太平洋牡蛎 *FUT5* (*CgFUT5*) 基因序列 (XM_020069167.2)。利用 Primer 5 软件设计中间片段扩增引物 FT5-1 和 RT5-1 (表 1), 以太平洋牡蛎消化腺总 RNA 反转录合成的 1st Strand cDNA 为模板, 扩增 *CgFUT5* 基因中间片段。PCR 反应体系 (50 μ L) 为: FT5-1、

RT5-1 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $1 \mu\text{L}$, PCR 预混液 $25 \mu\text{L}$, cDNA 模板 $3 \mu\text{L}$, RNase free water $20 \mu\text{L}$ 。反应条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, $48 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min。PCR 产物经 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳后, 使用凝胶成像仪对电泳条带进行观察, 选择合适条带进行切胶并送至测序公司测序。

表 1 实验中所用引物
Table 1 Primers used in this experiment

引物 Primer	序列 (5'—3') Sequence (5'—3')	用途 Function
FT5-1	CCAGAGCCAAAAACCTCACTC	中间片段 克隆
RT5-1	TCCCAGCGAAATCTACTTCC	
RRT5	GATTACGCCAAGCTTGTAATGACTGGA CAGCACACTGTTCTTG	RACE
FRT5	GATTACGCCAAGCTTACGCATCTCCTG AAGAATTGGCTAAGG	
Q-FT5-A	TCTGTATTCTGTAAGGCCGGAGTGG	荧光定量组 织表达分析
Q-RT5-A	AGTTTCGGGACAATGGGATTTCTCG	
F-actin	CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT	
R-actin	TGGGCACCTGAATCGCTCGTT	

1.4 基因全长克隆

根据中间片段克隆得到的序列, 使用 Primer 5 软件设计 RACE 克隆引物 FRT5/RRT5 (表 1)。以 SMATER RACE 5'/3' 试剂盒合成的 cDNA 做模板, 扩增 5'/3' 序列。反应体系为: RNase Free Water $15.5 \mu\text{L}$, $2\times\text{seqAmp Buffer}$ $25 \mu\text{L}$, SeqAmp DNA polymerase $1 \mu\text{L}$, 5'/3' RACE cDNA $2.5 \mu\text{L}$, $10\times\text{UPM}$ $5 \mu\text{L}$, RRT5/FRT5 $1 \mu\text{L}$ 。反应程序为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min。

将 RACE PCR 产物经 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收纯化后克隆到 pUC19 线性载体上。将重组载体转化到 TOP10 感受态细胞, 并进行蓝白斑筛选和 PCR 鉴定。选择结果良好的克隆送至测序公司测序。

1.5 序列分析

分析测序结果, 将中间片段及 5'、3' 序列拼接, 得到完整的 CgFUT5 基因序列。使用 Snapgene 软件预测氨基酸序列并计算出分子量和等电点; 运用 TMHMM 在线系统 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 分析蛋白质跨膜结构域; 利用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 在 MEGA 7.0 软件中采用邻接法进行序列比对, 构建系统发育树。

1.6 组织表达分析

取 3 只牡蛎的外套膜、鳃、闭壳肌、唇瓣和消化腺组织, 在液氮中研磨混合, 提取各组织总 RNA, 使用 RT-qPCR

反转录试剂盒 (TaKaRa, 中国) 制备荧光定量 cDNA 模板。根据 CgFUT5 基因序列合成引物 Q-FT5-A/Q-RT5-A (表 1), 以太平洋牡蛎 $\beta\text{-actin}$ 基因 (NCBI 网站登录号 AF026063) 为内参基因, 设计引物 F-actin/R-actin (表 1)^[25-26]。通过 RT-qPCR 检测牡蛎外套膜、鳃、闭壳肌、唇瓣和消化腺中的 CgFUT5 基因表达水平, 每个组织样品设置 3 个平行组, 反应体系为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s (收集荧光信号), 40 个循环。组织相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算^[27]。

1.7 原核表达

对前期克隆得到的 CgFUT5 基因序列依据大肠杆菌密码子偏好性进行稀有密码子优化, 使用金斯瑞密码子优化工具 (<https://www.genscript.com.cn/gensmart-free-gene-codon-optimization.html>) 在线进行。优化后的基因序列在氨基酸序列 C 端添加 $6\times\text{His}$ 标签序列, 克隆至 pET-28a(+) 质粒, 得到的重组质粒命名为 pET-CgFUT5。同时构建截断 N 端部分氨基酸序列并添加 $6\times\text{His}$ 标签序列, 克隆至 pET-28a(+) 质粒, 得到的重组质粒命名为 pET-His- Δ_{59} -CgFUT5。

将 pET-CgFUT5 与 pET-His- Δ_{59} -CgFUT5 质粒分别转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经卡那霉素筛选后挑取单菌落接种于含 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的液体 LB 培养基, 经 $36 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床过夜培养后按体积比 1 : 50 转移至含有卡那霉素的 TB 培养基中扩大培养。至菌液 OD_{600} 为 0.6 时, 加入终浓度为 $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 溶液, 设置培养温度为 $36 \text{ }^\circ\text{C}$, 培养时间为 6 h。取 1 mL 诱导后的菌液离心并收集菌体沉淀。加入 $80 \mu\text{L}$ 双蒸水 (ddH₂O) 重悬菌体沉淀后, 加入 $20 \mu\text{L}$ $5\times$ 蛋白上样缓冲液吹打混匀, 煮沸 10 min 以裂解细菌, $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 取 $10 \mu\text{L}$ 上清液加入聚丙烯酰胺体积分数为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶上样孔中, 同时加入蛋白标准 Marker、BL21 空菌阴性对照和 pET28a 空载阴性对照组菌液。在垂直电泳仪 (百晶生物有限公司, 中国) 中经 120 V 电压分离后, 取胶块置于室温摇床中用考马斯亮蓝染色液染色 1 h, 再经脱色液充分脱色至蛋白条带清晰可见。

1.8 免疫印迹分析

取 1 mL 成功表达 CgFUT5 蛋白的菌液, 离心收集菌体后按体积比 8 : 2 加入 ddH₂O 和蛋白上样缓冲液, 经煮沸离心后进行 SDS-PAGE 电泳, 同时加入蛋白 Marker 和 pET28a 空载阴性对照菌液。电泳完成后在 30 V 恒定电压下转移蛋白至硝酸纤维素薄膜, 置于预冷的 TBS 缓冲液中洗涤后, 转移至含有 1% (w) 牛血清白蛋白 (BSA) 的 TBST 缓冲液中, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜。用 TBST 缓冲液洗涤过夜孵育后的硝酸纤维素薄膜 3 次, 加入兔抗人

FUT5 单克隆抗体 (ABnova, 中国) (使用 TBST 缓冲液稀释 2 000 倍), 同时在另一组加入鼠抗 6×His 标签单抗体 (Abcam, 中国) (使用 TBST 缓冲液稀释 3 000 倍), 室温孵育 2 h。孵育结束后使用 TBST 缓冲液洗涤薄膜 3 次, 加入对应的二抗 (使用含 1% BSA 的 TBST 缓冲液稀释 3 000 倍) 室温孵育 1 h, 用 TBST 缓冲液洗涤薄膜 3 次。按照 HRP-DAB 底物显色试剂盒 (天根生化科技有限公司, 中国) 说明书配制显色液, 将显色液滴加于洗涤后的硝酸纤维素薄膜表面, 避光放置 5 min 显色。

2 结果

2.1 *CgFUT5* 基因全长序列

根据设计的中间片段引物 FT5-1/RT5-1, 扩增得到 932 bp 的 cDNA 片段; 利用 3'RACE 克隆扩增得到 322 bp 的片段, 利用 5'RACE 克隆扩增得到 417 bp 的片段; 将序列拼

接, 得到一个具有 1 173 bp 翻译区的完整 *CgFUT5* 基因序列, 包括一个起始密码子 (ATG) 和一个终止密码子 (TAA)、一个加尾信号 (AATAAA) 以及一段由 34 个腺嘌呤核苷酸组成的 poly(A) 结构 (图 1)。

2.2 *CgFUT5* 基因序列分析

对 *CgFUT5* 基因序列推导出的氨基酸序列进行分析, 序列由 396 个氨基酸组成, 经 ExPASy-Compute pI-Mw tool 在线预测显示该蛋白相对分子质量为 46.0 kD, 理论等电点为 9.65, 属于碱性蛋白质。利用 TMHMM 推算其跨膜结构域, 结果显示, *CgFUT5* 具有一个跨膜结构域, 由位于 7—24 的 18 个氨基酸组成 (图 2)。

从 NCBI 网站下载多个物种岩藻糖基转移酶蛋白质序列, 构建 *CgFUT5* 基因进化树, 结果显示, *CgFUT5* 基因与秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) *FUT5* (NC_003280.10) 等具有合成 Lewis 抗原功能的基因聚为一类 (图 3)。

```

1      tgcgatcacctttatcatcaacccgcatggtttaaacatggctgcaacctggaccttgatgaattagccacaatggagttacgcggaagggaataactagtaactcccaaggagata
121    taacaacaacgtataatgatgatccatgtagcttactgactcttctcagttaccagggtcggagtagtaacaaggacaactgatagttgttcttctgactctggaaggATGAGGAAGA
                                     M R R
241    ATACAGTGGCAGTATGTTGCTCCTGTGCTGGGGTATGCTGTCAATACATCTTCTAGGAATCAAGTGTGAATAATTTCCACCAAAAGACTCAACAATAAGGATAGGCATAAAAGATCG
I Q W Q Y V V L V L G V C L S I H L L G N Q V L N N F H Q R L N N K D R H K R S
361    CCAGAGCCAAAACCTCACTCATCAAAAACAAGAACAGTGTGCTGTCAGTATTACAATCAAGAGATACTTAAGTCTGCAAATACAATCTAATCCACCAAAAACATCGGTATATTA
P E P K T S L I Q N K N S V V S S H Y N Q E I L N S A N Y K S N S T K N I G I L
481    TTTTACAATAAGCCATCTTGGATGCTTTCGAGTCAACAGTATTGATTCAACAAGATGTCCTCAATTTAAAACAATAATGCACAATATATACCAATAACAAGAATTACGAAAAATCAAAG
F Y N K P S W M S F E S T V I D S T R C P N L K Q K C T I Y T N N K N Y E K S K
601    GTAGTTATTTCTATGGGAAAACTCCTTCAAAGTCCCAGAGAAAAAAGTGGCGAGTTTGGACGTTCTTTTCGATTGAATCTCCTTTCTGTATTCTGTAAAGCCGGAGTGGAAA
V V I F Y G E K L P S K V P E K K N G Q V W T F F S I E S P F L Y S V R P E W K
721    GATAAATTTTCATGACAATGACATATAGACGAGACTGACTTACCTATTTTACGGAAAAATTGAGAAGCGAGAAATCCATTGTCGCCGAAACTACTCTGAAGTGTACAAAAAGAAA
D K F S W T M T Y R R D S D F T Y F Y G K I Q K R E I P L S R N Y S E V Y K R K
841    AACAGACCGTATCATGGGCTGAAGCAATTGAACTCGTTTTCAAACGTGAGGAATACGTTAAGAACTCCAGAAAGTACATAAGTGTGGATGTATGGTAAATGTGGAAAACTTAAA
N K T V S W A V S N C N S F S K R E E Y V K K L Q K Y I S V D V Y G K C G K L K
961    TGTGGACAGCGGTCGCGGGGTAACCGACTGTCACAAAAGTTCCGCGGAAGAATACAAATCTACCTAGCAGTCAAAACTCAATATGCAAAAGACTACTACTACAGAGAACTATTAAT
C G Q R S A G V T D C H K K F A E E Y K F Y L A V E N S I C K D Y T T E K L F N
1081  TTCTTCTTTACGATCTCCATGATTCCTATCATCAATGACCTAAAATGCCCGTGAATACATAACAAACGGAACGATCATTAAATATACTAGACTACGCATCTCCTGAAGAATGGCT
F F F Y D L P M I P I I N G P K N A R E Y I P N G T Y I N I L D Y A S P E E L A
1201  AAGGATCTAGAAAAGTGGATCAACGAACTCTTATCCGAGTATTTAAAGGAGAAGGACAAATATACAGGAAGTAGATTTCGCTGGGAAATAGTTTATGTCCAATGTGTTCTAGA
K D L E R I G S N E T L Y S E Y L K E K D K Y T G S R F R W E L V L C P M C S R
1321  CTTACAGGAAAATCTTAAACCGTAGCAAAATATACCAGATATTAATCTTGGATTGGGAATGATACTTGATCAAGCCATAAgtctgtagtatgtttaaagttaaatgtagtcttaa
L Q E N S L T S S K I I P D I N S W I W N D T C I K P *
1441  tgtggagAATAAAgttaaatctgAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 太平洋牡蛎 *FUT5* 基因全长及氨基酸序列

Fig. 1 Full length and amino acid sequence of *FUT5* gene in *C. gigas*

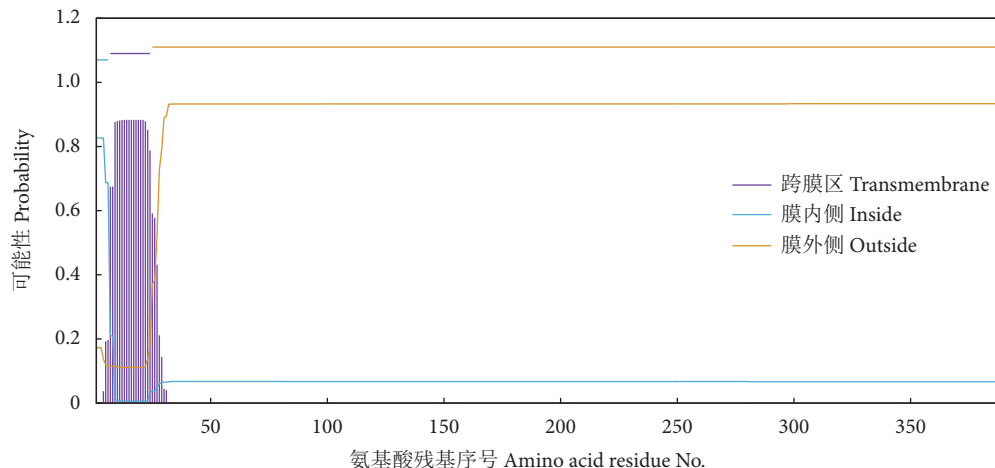


图2 *CgFUT5* 蛋白跨膜结构分析

Fig. 2 Transmembrane structure analysis of *CgFUT5* protein

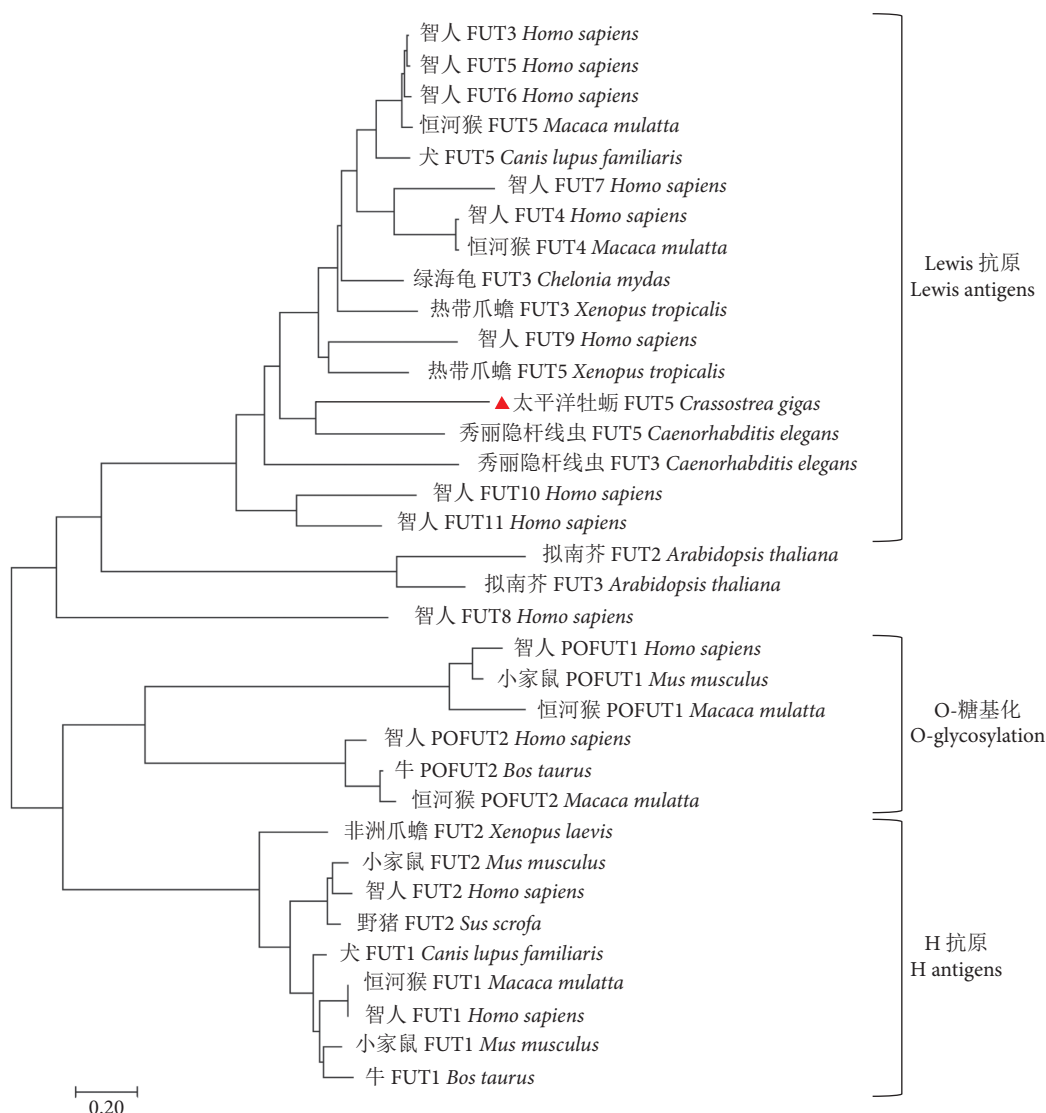


图3 FUTs 家族系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of FUTs family

2.3 *CgFUT5* 基因在太平洋牡蛎中的组织分布

通过 RT-qPCR 分析了牡蛎 5 种组织中的 *CgFUT5* 基因表达量, 结果表明, *CgFUT5* 基因在各组织中的表达量差异较大, 以闭壳肌中的表达量为基准, 在鳃、外套膜和唇瓣中的表达量分别为 44、7 和 3 倍, 而消化腺中的表达量则很低 (图 4)。

2.4 *CgFUT5* 重组蛋白的原核表达

使用 SDS-PAGE 电泳分析经 IPTG 诱导后的大肠杆菌总蛋白, 结果显示, 转化 pET-*CgFUT5* 质粒的重组大肠杆菌总蛋白在 46 kD 标准分子量大小处出现了蛋白条带, 且阴性对照中无此条带, 表明 *CgFUT5* 蛋白在大肠杆菌表达系统中成功表达; 而转化 pET-His- Δ_{59} -*CgFUT5* 质粒的大肠杆菌总蛋白在 40 kD 标准分子量处出现了蛋白条带, 表明截断部分 N 端氨基酸序列的 *CgFUT5* 蛋白也在大肠杆菌中成功表达, 且表达量明显高于未截断序列质粒的蛋白 (图 5)。

2.5 *CgFUT5* 重组蛋白免疫印迹分析

使用鼠抗 6 \times His 标签单克隆抗体 (图 6) 和兔抗人 FUT5 蛋白多克隆抗体 (图 7) 的免疫印迹分析结果显示, 在泳道 2 中 (目的蛋白组) 有一个约为 46.0 kD 的条带, 而泳道 1 中 (pET28a 空载对照组) 没有出现类似大小的条带。这一结果证实转化后的 *CgFUT5* 蛋白成功表达并被转移至硝酸纤维素薄膜, 且重组 *CgFUT5* 蛋白具有与人 FUT5 蛋白相似的免疫原性。

3 讨论

诸如病毒与牡蛎 HBGAs 的相互作用及结合机制是目前研究的热点^[9,11], 关于牡蛎组织血型抗原的合成方式和来源的研究尚处于起步阶段。通过类比人类 HBGAs 的合成途径, 可以假设牡蛎通过与人类相似的途径合成类 HBGAs, 因此逐一克隆牡蛎中的关键糖基转移酶基因是验

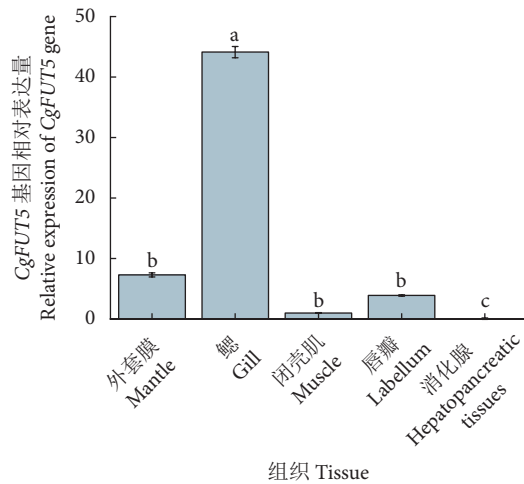


图4 *CgFUT5* 基因在太平洋牡蛎 5 种组织中的相对表达量

注: 不同字母代表组间极显著性差异 ($P < 0.01$)。

Fig. 4 Relative expression of *CgFUT5* gene in five tissues of *C. gigas*

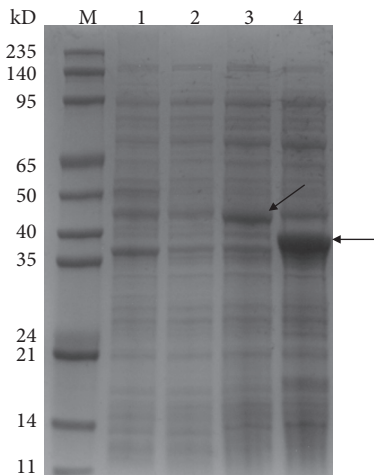
Note: Different letters represent extremely significant differences among the groups ($P < 0.01$).

证上述假设的必要手段。

在前期的研究中笔者团队已克隆了 2 个太平洋牡蛎类 HBGAs 合成相关的糖基转移酶基因^[25,28], 其中牡蛎类 *FUT10* 基因与 *CgFUT5* 基因所预测的功能类似, 但是二者在牡蛎中的组织分布规律却差异明显, 类 *FUT10* 基因在消化腺组织中高表达而 *CgFUT5* 基因则几乎不表达, 在鳃中类 *FUT10* 基因的表达量最低而 *CgFUT5* 基因却有极高的表达量。目前在人体中已经发现 13 种岩藻糖基转移酶, 其中 *FUT3*、*FUT4*、*FUT5*、*FUT6*、*FUT7*、*FUT9*、*FUT10* 和 *FUT11* 均属于 α -1,3/4-岩藻糖基转移酶, 均具有合成 Lewis 血型的功能^[29-30], 部分岩藻糖基转移酶具有相同的底物特异性, 但未见关于岩藻糖基转移酶的组织特异

性报道, 在其他哺乳动物中也未见报道。Kiem 等^[31] 在秀丽隐杆线虫 α -1,3-岩藻糖基转移酶的研究中发现存在多种相同功能的岩藻糖基转移酶基因, 其中的 *CEFT-1* (*Caenorhabditis elegans* fucosyl transferases 1) 基因也只在特定的组织或细胞内表达, 推测这种表达模式或许是秀丽隐杆线虫存在多种具有相似功能的岩藻糖基转移酶基因的原因。鉴于牡蛎与秀丽隐杆线虫同属于无脊椎动物, 笔者推测太平洋牡蛎中同样具有多种功能相似且底物特异性不同的岩藻糖基转移酶基因, 还进化出了复杂的组织特异性表达模式。有研究表明, 不同基因型的诺如病毒在牡蛎中的富集具有组织特异性, 如 GI 型主要分布于牡蛎消化腺, GII 型主要分布于鳃和外套膜, 而 GIII 型均匀分布于牡蛎各组织中^[32]。虽然诺如病毒感染在我国未大规模暴发, 但诺如病毒的区域性感染案例屡见不鲜, 其中 GII 型诺如病毒是引发我国诺如病毒感染的优势毒株^[33-36]。牡蛎消化腺组织是目前研究诺如病毒特异性富集的主要靶点, 但鳃作为牡蛎的滤食器官是牡蛎接触诺如病毒的第一道屏障, 同样具有富集 GII 型诺如病毒的特点。据此, 提出了牡蛎 *CgFUT5* 基因在鳃中特异性表达并产生 Lewis 抗原可能与牡蛎鳃组织特异性富集 GII 型诺如病毒有关的假设。挖掘牡蛎类 HBGAs 合成路径中的糖基转移酶基因, 进一步了解牡蛎类 HBGAs 的合成机理, 将能验证这一假设, 从而为食源性诺如病毒疫情防控提供新的解决方案。

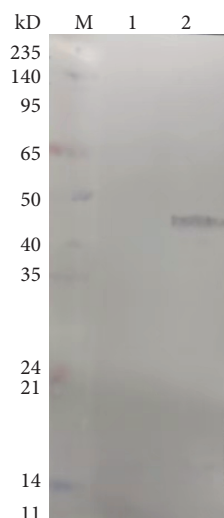
岩藻糖基转移酶广泛存在于多种动植物及细菌中, 种类丰富且应用价值大, 但目前成功表征的真核生物来源的岩藻糖基转移酶只有较少的一部分。真核岩藻糖基转移酶属于 II 型跨膜蛋白, 它们具有共同的结构域特征, 即具有一个跨膜结构域, 其侧翼是一个短的氨基端结构域和一个大的羧基端催化结构域^[37], 这种特殊结构制约着岩藻糖基



M. 标准蛋白分子量; 1. BL21 (DE3) 菌体蛋白;
2. 转化 pET28a(+) 空载质粒菌体蛋白;
3. 转化 pET-CgFUT5 质粒菌体蛋白;
4. 转化 pET-His-Δ59-CgFUT5 质粒菌体蛋白;
箭头示目的条带。
M. Molecular weight of standard protein;
1. BL21 (DE3) bacterial protein;
2. Transformed pET28a(+) no-load plasmid body protein;
3. Transformed pET-CgFUT5 plasmid body protein;
4. Transformed pET-His-Δ59-CgFUT5 plasmid body protein;
arrows represent the destination strips.

图5 *CgFUT5* 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

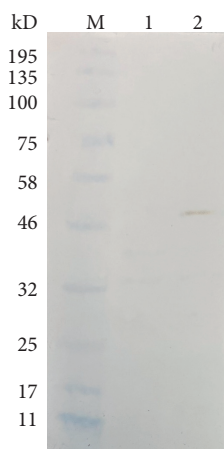
Fig. 5 Analysis of recombinant protein *CgFUT5* by SDS-PAGE electrophoresis



M. 标准蛋白分子量; 1. pET28a 空载菌体蛋白;
2. CgFUT5 质粒表达蛋白。
M. Molecular weight of standard protein; 1. pET28a
empty cell protein; 2. CgFUT5 plasmid expression protein.

图6 以鼠抗 6×His 标签单克隆抗体为一抗分析
CgFUT5 表达蛋白

Fig. 6 Expression of CgFUT5 protein analyzed by mouse
anti-6×His labelled monoclonal antibody as primary antibody



M. 标准蛋白分子量; 1. pET28a 空载菌体蛋白;
2. CgFUT5 质粒表达蛋白。
M. Molecular weight of standard protein; 1. pET28a
empty cell protein; 2. CgFUT5 plasmid expression protein.

图7 以兔抗人 FUT5 单克隆抗体为一抗分析
CgFUT5 表达蛋白

Fig. 7 Expression protein of CgFUT5 analyzed by rabbit anti-
human FUT5 monoclonal antibody as primary antibody

转移酶的异源表达与酶活表征。已有研究表明, 跨膜结构域对糖基转移酶蛋白在原核或真核系统中的表达有直接影响, 如可影响蛋白的可溶性、分泌性及表达量等^[38-40]。母乳低聚糖的体外合成中所使用的糖基转移酶通常来自于细菌, 这是因为细菌岩藻糖基转移酶不具有跨膜结构域, 更容易进行大规模制备^[41]。本文构建了截断跨膜域结构的 CgFUT5 基因原核表达质粒, 证明截断后的质粒在大肠杆菌

中实现了更高的表达量, 不仅为 CgFUT5 蛋白的提纯及功能验证奠定了基础, 也可为牡蛎 HBGAs 合成路径中的其他糖基转移酶基因的克隆表达研究提供参考。

4 结论

本研究主要对太平洋牡蛎 *FUT5* 基因进行了克隆, 通过对 CgFUT5 重组蛋白进行免疫印迹分析, 证实其具有与人 *FUT5* 蛋白相似的免疫原性, 表明牡蛎中类 HBGAs 的合成与人 HBGAs 的合成路径具有相似之处, 为进一步解析牡蛎特异性富集诺如病毒机理研究提供了新的证据。

参考文献:

- [1] FISCHER W C, PERIN J, ARYEE M J, et al. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review[J]. BMC Public Health, 2012, 12: 220.
- [2] NORDGREN J, SVENSSON L. Genetic susceptibility to human norovirus infection: an update[J]. Viruses, 2019, 11(3): 226.
- [3] TEUNIS P F M, MOE C L, LIU P, et al. Norwalk virus: how infectious is it?[J]. J Med Virol, 2008, 80(8): 1468-1476.
- [4] TAN M, JIANG X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle[J]. Trends Microbiol, 2005, 13(6): 285-293.
- [5] ATMAR R L, RAMANI S, ESTES M K. Human noroviruses: recent advances in a 50-year history[J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31(5): 422-432.
- [6] HUNT K, DORÉ B, KEAVENEY S, et al. A quantitative exposure assessment model for norovirus in oysters harvested from a classified production area[J]. Microb Risk Anal, 2023, 23: 100247.
- [7] RAZAFIMAHEFA R M, LUDWIG-BEGALL L F, THIRY E. Cockles and mussels, alive, alive, oh: the role of bivalve molluscs as transmission vehicles for human norovirus infections[J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 67(S2): 9-25.
- [8] CAMPOS C J, LEES D N. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(12): 3552-3561.
- [9] le GUYADER F, LOISY F, ATMAR R L, et al. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(6): 931-936.
- [10] HUANG P W, 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]. J Infect Dis, 2003, 188(1): 19-31.
- [11] TIAN P, BATES A H, JENSEN H M, et al. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells[J]. Lett Appl Microbiol, 2006, 43(6): 645-651.
- [12] SAIKIA K, SAHARIA N, SINGH C S, et al. Association of histo-blood group antigens and predisposition to gastrointestinal diseases[J]. J Med Virol, 2022, 94(11): 5149-5162.

- [13] SZLASA W, WILK K, KNECHT-GURWIN K, et al. Prognostic and therapeutic role of CD15 and CD15s in cancer[J]. *Cancers*, 2022, 14(9): 2203.
- [14] AZIZ F, KHAN I, SHUKLA S, et al. Partners in crime: the Lewis Y antigen and fucosyltransferase IV in *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 232: 107994.
- [15] PEÑA-GIL N, SANTISO-BELLÓN C, GOZALBO-ROVIRA R, et al. The role of host glycobiology and gut microbiota in rotavirus and norovirus infection, an update[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13473.
- [16] HARRINGTON P R, VINJE J, MOE C L, et al. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions[J]. *J Virol*, 2004, 78(6): 3035-3045.
- [17] ORIOL R. ABO, Hh, Lewis, and secretion[M]//CARTRON J, ROUGER P. Molecular basis of human blood group antigens. Boston: Springer US, 1995: 37-73.
- [18] COSTACHE M, CAILLEAU A, FERNANDEZ-MATEOS P, et al. Advances in molecular genetics of α -2- and α -3/4-fucosyltransferases[J]. *Transfus Clin Biol*, 1997, 4(4): 367-382.
- [19] KEELEY T S, YANG S Y, LAU E. The diverse contributions of fucose linkages in cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(9): 1241.
- [20] 孙玥, 王晓非. 岩藻糖基转移酶的研究进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25(1): 28-33.
- [21] HOLGERSSON J, LÖFLING J. Glycosyltransferases involved in type 1 chain and Lewis antigen biosynthesis exhibit glycan and core chain specificity[J]. *Glycobiology*, 2006, 16(7): 584-593.
- [22] DERYA S M, SPIEGEL H, HANISCH F G, et al. Biotechnologically produced fucosylated oligosaccharides inhibit the binding of human noroviruses to their natural receptors[J]. *J Biotechnol*, 2020, 318: 31-38.
- [23] ESHAGHI G M, TAN M T H, LI D. Influence of fucosidase-producing bifidobacteria on the HBGA antigenicity of oyster digestive tissue and the associated norovirus binding[J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 340: 109058.
- [24] MA L P, SU L J, LIU H, et al. Norovirus contamination and the glycosphingolipid biosynthesis pathway in Pacific oyster: a transcriptomics study[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 66: 26-34.
- [25] 姜薇. 太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的克隆与时空表达 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 39-57.
- [26] 李春勇. 敌百虫诱导近江牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) *HSC70* 基因表达的定量研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2007: 23-38.
- [27] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [28] 教杨, 姚琳, 曲梦, 等. 牡蛎诺如病毒受体合成基因类 *FUT10* 的克隆与组织表达 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(1): 120-127.
- [29] TU Z, LIN Y N, LIN C H. Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(10): 4459-4475.
- [30] de VRIES T, KNEGTEL R M, HOLMES E H, et al. Fucosyltransferases: structure/function studies[J]. *Glycobiology*, 2001, 11(10): 119R-128R.
- [31] NGUYEN K, van DIE I, GRUNDAHL K M, et al. Molecular cloning and characterization of the *Caenorhabditis elegans* α 1, 3-fucosyltransferase family[J]. *Glycobiology*, 2007, 17(6): 586-599.
- [32] le GUYADER F S, ATMAR R L, Le PENDU J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play[J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(1): 103-110.
- [33] 吴佳颖. 2011年-2021年诺如病毒在中国5岁以下急性胃肠炎儿童中的流行: 系统评价和荟萃分析 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022: 1-18.
- [34] 郎中凯, 甘雨露, 颜朝阳, 等. 2015—2021年重庆市万州区诺如病毒感染疫情流行特征分析 [J]. *中国初级卫生保健*, 2022, 36(11): 91-94.
- [35] 魏开心, 石安琪, 曹懋, 等. 宁夏地区2019-2020年诺如病毒所致感染性腹泻流行特征和病原学分析 [J]. *病毒学报*, 2023, 39(1): 96-104.
- [36] 赵金华, 龙江, 李得恩, 等. 青海省西宁市某幼儿园一起诺如病毒暴发疫情调查及分子流行特征分析 [J]. *医学动物防制*, 2023, 39(2): 116-119.
- [37] PAULSON J C, COLLEY K J. Glycosyltransferases: Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(30): 17615-17618.
- [38] de VRIES T, STORM J, ROTTEVEEL F, et al. Production of soluble human α 3-fucosyltransferase (FucT VII) by membrane targeting and *in vivo* proteolysis[J]. *Glycobiology*, 2001, 11(9): 711-717.
- [39] EL-BATTARI A, PROROK M, ANGATA K, et al. Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation[J]. *Glycobiology*, 2003, 13(12): 941-953.
- [40] CICERON F, ROCHA J, KOUSAR S, et al. Expression, purification and biochemical characterization of AtFUT1, a xyloglucan-specific fucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochimie*, 2016, 128/129: 183-192.
- [41] PETSCHACHER B, NIDETZKY B. Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems[J]. *J Biotechnol*, 2016, 235: 61-83.