

# 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*) 类 $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶的密码子 优化与原核表达\*

姚 琳<sup>1</sup> 江艳华<sup>1</sup> 李风铃<sup>1</sup> 朱文嘉<sup>1</sup> 郭莹莹<sup>1</sup>  
姜 薇<sup>2</sup> 翟毓秀<sup>1</sup> 王联珠<sup>1①</sup>

(1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 农业部水产品质量安全风险实验室(青岛)  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 潍坊市产品质量检验所 潍坊 261061)

**摘要** 牡蛎消化组织内存在的类 A 型血型组织抗原是其特异性富集诺如病毒的主要原因, FUT2(Fucosyltransferase 2,  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶)是 A 型血型组织抗原合成的关键酶。本研究在前期克隆了太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类 FUT2 基因 cDNA 全长的基础上,根据大肠杆菌密码子偏爱性优化并合成了类 FUT2 基因,插入原核表达载体 pRSET A 构建 pRSET-mof,将其转化大肠杆菌 BL21,用异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导。经 SDS-PAGE 分析显示,在 37°C、IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L 的条件下,诱导 4 h 后出现大小约为 46 kDa 的特异性目的条带。利用 His 亲和层析柱纯化及超滤管浓缩目的蛋白,得到单一条带,说明纯化效果良好。Western blot 分析显示,目的蛋白与抗 6×His 标签单克隆抗体、抗人 FUT2 单克隆抗体均能发生特异性反应,表明优化后的太平洋牡蛎类 FUT2 基因在大肠杆菌系统中成功表达。本研究结果为今后研究太平洋牡蛎类 FUT2 基因的功能,进一步探索牡蛎特异性富集诺如病毒的分子机理奠定了基础。

**关键词** 太平洋牡蛎; 类 FUT2 基因; 密码子优化; 原核表达

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)01-0074-06

牡蛎是海洋养殖年产量最大的类群,2012 年我国牡蛎产量达 394 余万 t(农业部渔业局,2013),是我国重要的养殖经济贝类。牡蛎大多生活在近海海域或河流入海口,其生长环境因人类活动的影响而受到不同程度的污染,牡蛎在滤食海水中饵料的同时,也将水体中的食源性病毒-诺如病毒(Norovirus, NoV)特异性地富集于体内,污染牡蛎常引起食品安全事件(Langlet *et al*, 2015; Moore *et al*, 2015)。牡蛎特异性富集 NoV 的分子机理近几年成为国际上的研究热点,目前已确定其消化组织内存在一种类似于人 A 型组织血型抗原(A Like Histo-Blood Group Antigens, A Like

HBGAs)的物质,其作为受体介导了牡蛎特异性富集 NoV 的生物学过程(Le Guyader *et al*, 2006; Tian *et al*, 2006),这个发现是该领域的重要理论突破,揭示了牡蛎特异性富集 NoV 的分子机理。

在人 A 型 HBGAs 的合成过程中,FUT2(Fucosyltransferase 2,  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶,即 Se 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 *et al*, 2012),因此 Se 酶是人类 A 型 HBGA 合成的关键酶。本研究在前期

\* 国家自然科学基金(31101883)和科技部科技基础性工作专项(2013FY113300)共同资助。姚琳, E-mail: yaolin@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王联珠, 研究员, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-03-20, 收修改稿日期: 2015-04-27

首次成功克隆太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类 *FUT2* 基因 cDNA 全长的基础上, 根据大肠杆菌密码子偏爱性对基因进行了优化, 构建了类 *FUT2* 基因原核表达重组质粒, 并在大肠杆菌中进行表达与鉴定, 为进一步研究牡蛎类 *FUT2* 基因功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒与菌株

含有太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因完整编码框的质粒 pMD-OF2 由姜薇等(2014)构建(GenBank 登录号: KJ184342); 原核表达载体 pRSET-A 为 Invitrogen 公司产品; 大肠杆菌 Top10 和 BL21(DE3)感受态细胞为天根生化科技(北京)有限公司产品。

### 1.2 工具酶与主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、预染及非预染蛋白质分子量 Marker 购自 Fermentas 公司, DNA 快速回收试剂盒、抗 6×His 标签单克隆抗体、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 抗人 *FUT2* 单克隆抗体购自 Abcam 公司, His Gravei Trap Ni 亲和层析柱购自美国 GE 公司, 超滤离心管(10 kDa)购自美国 Millipore 公司, IPTG、氨苄青霉素钠等试剂购自北京索莱宝科技有限公司, 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因稀有密码子分析及基因合成

利用 Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/coden>)对太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因进行稀有密码子分析。按照大肠杆菌密码子偏爱性对类 *FUT2* 基因进行优化, 由上海生工生物工程有限公司进行全基因合成并克隆到 pMD-18T 载体上, 命名为 pMD-mof。

### 1.4 引物设计与 PCR 扩增

根据太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的序列信息, 设计扩增完整开放阅读框的引物 FofPm/RofH, 上下游引物两端分别设计 *Pst* I 和 *Hind* III 的酶切位点, 引物序列: FofPm 5'-TTTCTGCAGATGGTGAAACGTA-TGTTTTTCATCTGG-3'; RofH 5'-TTTAAGCTTCATT-GGGATCCATTGAGGAAAATAATAATC-3'。类 *FUT2* 的扩增以质粒 pMD-mof 为模板, 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 52℃ 40 s, 72℃ 2.5 min, 30 个循环后 72℃ 延伸 7 min。通过 1.0%(W/V)的琼脂

糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

### 1.5 原核表达重组质粒的构建与鉴定

将上述 PCR 扩增产物经 DNA 凝胶回收试剂盒纯化后, 用 *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切, 再次回收纯化, 插入同样用 *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切的 pRSET-A 载体中, 将连接产物转化 Top10 感受态细胞, 挑取单菌落少量提取质粒并通过酶切及 PCR 鉴定, 将阳性克隆送至上海生工生物公司进行测序。

### 1.6 原核表达

将构建成功的重组质粒转化大肠杆菌感受态细胞 BL21, 挑取阳性重组细菌接种到 LB 培养液(含 50  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素), 37℃ 振荡过夜培养, 取菌液, 按 1:100 的比例再次接种至新鲜 LB 培养液中, 37℃ 振荡培养至  $OD_{600\text{ nm}}$  值约 0.4–0.6 时, 加入终浓度为 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 诱导表达。在加入 IPTG 后, 分别于 2、3、4、5、6 h 各收集菌液 1.5 ml, 经 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 80  $\mu$ l pH=7.4 的 PBS 重悬菌体沉淀物, 加入 20  $\mu$ l 的 5×Loading Buffer, 水浴煮沸 10 min 后立即置于冰上, 通过 SDS-PAGE 电泳分离, 考马斯亮蓝 R-250 染色检测表达情况, 同时设置转入 pRSET-A 空载体的 BL21 与 BL21 作为对照。

### 1.7 重组蛋白纯化

使用 His 标签镍离子亲和层析柱进行蛋白质纯化。先用 10 ml 结合缓冲液(20 mmol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH=7.4)平衡层析柱, 加入经超声波破碎的含目的蛋白的菌体裂解液 10 ml, 用 10 ml 结合缓冲液洗涤, 最后加 3 ml 洗脱缓冲液(20 mmol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH=7.4)洗脱, 收集洗脱液。取 4 ml 上述洗脱液, 加入 Amicon Ultra 的过滤装置内管中并套入外管, 14000 r/min 离心 20 min 后, 将内管倒置套在另一洁净离心管内, 3500 r/min 离心 10 min, 得到的样品即为纯化后的目的蛋白, 用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

### 1.8 表达产物的 Western blot 分析

收集重组细菌, 进行 SDS-PAGE 电泳, 将 PAGE 胶上的蛋白电转印至硝酸纤维素膜后, 用含 10%脱脂奶粉的 TBST 封闭过夜, TBST 洗涤 3 次, 与抗 6×His 标签单克隆抗体(用 TBST 1:2000 倍稀释)或抗人 *FUT2* 单克隆抗体(用 TBST 1:1000 倍稀释)作用 1 h, TBST 洗涤 3 次, 与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(用 TBST 1:1000 倍稀释)作用 40 min 后, TBST

洗涤5次,用HRP-DAB底物显色试剂盒显色观察。

## 2 结果

### 2.1 类 *FUT2* 基因的稀有密码子分析及优化

太平洋牡蛎野生型类 *FUT2* 基因中的稀有密码子分析结果显示,类 *FUT2* 基因中含有6种稀有密码子,共31个,比例为11.6%,比例较高(表1),其中,包含11个精氨酸密码子、9个甘氨酸密码子、4个亮氨酸密码子、4个脯氨酸密码子、2个异亮氨酸密码子

和1个苏氨酸密码子,并且存在1个二联体稀有密码子(亮氨酸-精氨酸)和1个三联体稀有密码子(精氨酸-精氨酸-甘氨酸)。针对上述稀有密码子,按照大肠杆菌密码子偏爱性重新优化合成了类 *FUT2* 基因,用大肠杆菌中使用频率高的CGU来表达精氨酸,用GGU表达甘氨酸,用AUU表达异亮氨酸,用CUG表达亮氨酸,用CCG表达脯氨酸,用ACC表达苏氨酸,将突变型 *FUT2* 基因命名为mof。测序结果表明,优化的基因不存在大肠杆菌稀有密码子,并且未改变氨基酸序列。

表1 太平洋牡蛎野生型类 *FUT2* 基因稀有密码子分析  
Tab.1 The analysis of rare codons of *FUT2* like gene in wild-type *C. gigas*

项目 Items	精氨酸 Arginine			甘氨酸 Glycine		亮氨酸 Leucine	脯氨酸 Proline	异亮氨酸 Isoleucine	苏氨酸 Threonine
	CGG	AGG	AGA	GGA	GGG	CUA	CCC	AUA	ACG
稀有密码子 Rare codon	CGG	AGG	AGA	GGA	GGG	CUA	CCC	AUA	ACG
出现次数 Occurrence number	1	4	6	6	3	4	4	2	1
优化密码子 Optimized codon	CGU			GGU		CUG	CCG	AUU	ACC

### 2.2 重组质粒 pRSET-mof 的构建与鉴定

以质粒 pMD-mof 为模板,使用引物 FofPm/RofH 对目的片段进行 PCR 扩增,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,可见大小约为 1.1 kb 的特异性条带,与目的基因的大小一致(图 1)。将纯化后的 PCR 产物经 *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切后,插入同样用 *Pst* I 和 *Hind* III

双酶切的 pRSET-A 载体中,转化大肠杆菌感受态细胞 Top10 后,小量提取质粒,酶切鉴定可见大小约为 2.9 kb 的载体条带与 1.1 kb 左右的插入片段,证实构建正确(图 2),测序结果表明 PCR 过程中没有误配,将该原核表达重组载体命名为 pRSET-mof。

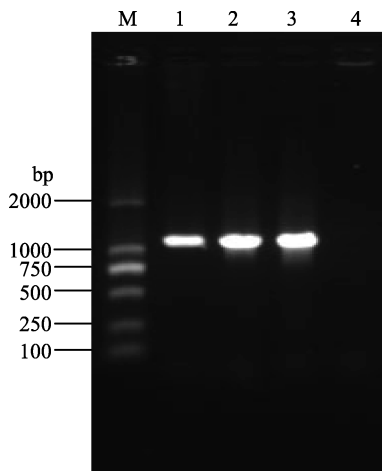


图1 优化后的类 *FUT2* 基因 PCR 扩增产物电泳  
Fig.1 Agarose gel analysis of codon-optimized *FUT2*-like gene PCR amplification product

M. DNA 分子量 DL2000; 1-3. 类 *FUT2* 扩增产物;  
4. 阴性对照

M. DNA marker DL2000; Lane 1-3. *FUT2*-like gene PCR product; Lane 4. Negative control

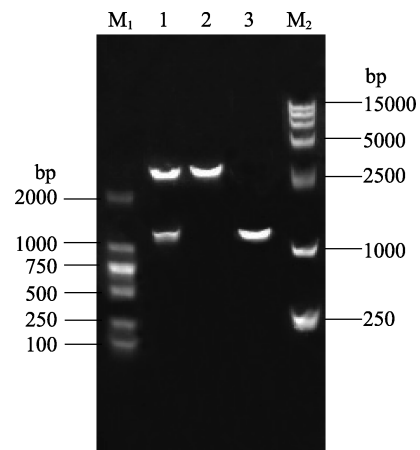


图2 重组质粒 pRSET-mof 的双酶切鉴定与 PCR 鉴定  
Fig.2 Digestion and PCR identification of the recombinant plasmid pRSET-mof

M<sub>1</sub>. DNA 分子量 DL2000; M<sub>2</sub>. DNA 分子量 DL15000;  
1. *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切 pRSET-mof; 2. *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切 pRSET A; 3. pRSET-mof 的 PCR 扩增  
M<sub>1</sub>. DNA marker DL2000; M<sub>2</sub>. DNA marker DL15000;  
Lane 1. pRSET-mof digested with *Pst* I and *Hind* III;  
Lane 2. pRSET-A digested with *Pst* I and *Hind* III;  
Lane 3. PCR identification of pRSET-mof

### 2.3 类 FUT2 重组蛋白的原核表达与纯化

重组质粒 pRSET-mof 转化大肠杆菌感受态细胞 BL21 后, 分别加入终浓度为 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 以确定最佳诱导浓度; 分别在诱导 2、3、4、5、6 h 后收集菌液, 经超声波破碎, 分离上清液和沉淀, 进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, 在 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L、诱导 4 h 的样本中, 出现大小约为 46 kDa 的蛋白条带, 大小与预计结果相符合, 两个对照组均未见目的条带。重组蛋白经 His Gravel Trap Ni 亲和层析柱纯化, SDS-PAGE 结果显示, 纯化产物仅有 1 条大小约为 46 kDa 的特异性条带, 未见其他大小的杂质蛋白条带(图 3), 表明获得较高纯度的重组类 FUT2 蛋白。

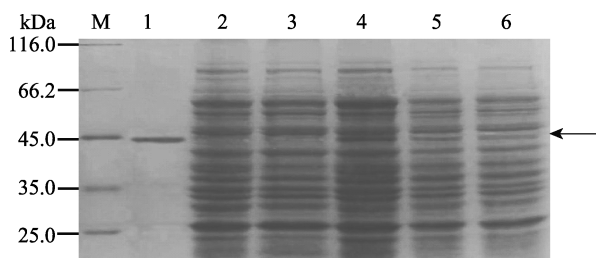


图 3 重组 FUT2 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达和亲和层析柱纯化

Fig.3 Expression and  $\text{Ni}^{2+}$  affinity column purification of the recombinant FUT2 protein

M. 蛋白质分子量; 1. 纯化后的重组 FUT2 蛋白; 2. pRSET A 空载菌体蛋白; 3. 大肠杆菌 BL21(DE3) 菌体蛋白; 4-6. 诱导后的重组 FUT2 蛋白, 箭头指向目的蛋白  
M. Protein relative molecular mass marker; Lane 1. Purified recombinant FUT2; Lane 2. Negative control of BL21( DE3) transformed by pRSET A; Lane 3. Negative control of BL21(DE3); Lane 4-6. Recombinant FUT2 protein induced by IPTG, arrow indicates the target protein

### 2.4 类 FUT2 重组蛋白的 Western blot 鉴定

重组细菌经 SDS-PAGE 电泳后, 通过电转印将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 分别用抗 6×His 标签单抗、抗人 FUT2 单抗作为一抗, 进行 Western blot 分析。结果显示, 在约 46 kDa 处有明显的蛋白条带(图 4), 两个对照组均未见条带, 表明重组蛋白不仅能被抗 6×His 标签单抗识别, 也能与人 FUT2 单抗发生特异性反应, 说明太平洋牡蛎类 FUT2 重组蛋白成功获得表达。

## 3 讨论

NoV 是导致人类急性非细菌性腹泻的最主要病

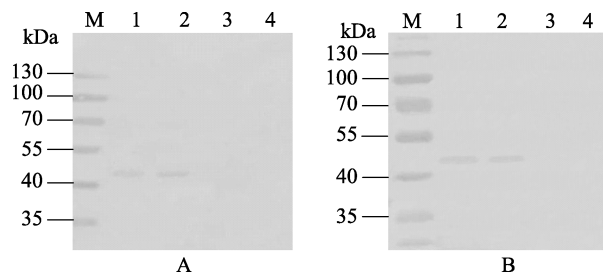


图 4 重组 FUT2 蛋白的 Western blot 分析  
Fig.4 Western blot analysis of the recombinant FUT2 protein

A: 以抗 6×His-Tag 单克隆抗体为一抗的 Western blot 结果。  
M. 蛋白质分子量; 1-2. 重组 FUT2 蛋白; 3. pRSET A 空载菌体对照; 4. 大肠杆菌 BL21(DE3)对照

B: 以抗人 FUT2 单克隆抗体为一抗的 Western blot 结果。  
M. 蛋白质分子量; 1-2. 重组 FUT2 蛋白; 3. pRSET A 空载菌体对照; 4. 大肠杆菌 BL21(DE3)对照

A: Western blot results using monoclonal antibody of 6×His-Tag as the first antibody. M. Protein relative molecular mass marker; Lane 1-2. Recombinant FUT2 protein; Lane 3. Negative control of BL21(DE3) transformed by pRSET A; Lane 4. Negative control of BL21(DE3)  
B: Western blot results using monoclonal antibody of human FUT2 as the first antibody. M. Protein relative molecular mass marker; Lane 1-2. Recombinant FUT2 protein; Lane 3. Negative control of BL21(DE3) transformed by pRSET A; Lane 4. Negative control of BL21(DE3)

原(Atmar *et al*, 2006), 已有多项研究表明, NoV 可识别别人 HBGAs, 即 NoV 将 HBGAs 作为连接的配体或受体感染人体(Hennessy *et al*, 2003; Rockx *et al*, 2005; Shirato, 2012), 而 FUT2 是人 HBGAs 合成的关键酶之一。生活在受污染水域的牡蛎, 作为 NoV 传播的重要载体, 具有特异性富集 NoV 的特性。现已证实牡蛎中存在类 A 型 HBGA(Le Guyader *et al*, 2006; Tian *et al*, 2006), 牡蛎是否也存在与人相似的 HBGAs 合成途径, 是否也利用类似 FUT2 的酶合成自身类 A 型 HBGAs, 这些问题的研究不仅有利于深入揭示牡蛎特异性富集诺如病毒的分子机理, 也有助于进一步解读牡蛎基因组信息。

本研究在前期获得太平洋牡蛎类 FUT2 基因 cDNA 全长的基础上, 开展原核表达研究, 最初使用野生型类 FUT2 基因进行原核表达, 但利用多种原核表达载体及菌株, 经过培养温度、IPTG 浓度、诱导时间等多种条件的优化后, 仍未见目的条带出现, 推测可能是野生型类 FUT2 基因中含有限制大肠杆菌表达的稀有密码子, 即大肠杆菌中 tRNA 的数量制约了某些外源基因的表达; 当外源基因的 mRNA 在大肠杆菌中翻译时, 由于 1 种或多种 tRNA 的稀有或缺少,

导致了翻译延迟、成熟前翻译终止、翻译移码和氨基酸错配；特别是基因中含有成串或多个大肠杆菌稀有密码子，外源蛋白的表达量将非常低甚至不表达(Lavner *et al*, 2005)。经分析，牡蛎类 *FUT2* 基因 cDNA 序列中含有高达 11.6% 的稀有密码子，并且有两个连续稀有密码子串联的现象，这些稀有密码子及串联稀有密码子的存在，可能是导致目的基因在大肠杆菌中不表达的最主要原因。随后，利用密码子优化后的基因，实现了太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因在大肠杆菌中的表达，该结果也证实了前期的推测。

经过多次试验优化，类 *FUT2* 基因的表达量无明显提高，推测可能是其 mRNA 中存在不稳定序列或复杂结构，限制了目的基因的大量表达。一是今后可通过生物信息学预测 mRNA 的构象及其稳定性，在不影响蛋白质功能的前提下，将不稳定序列缺失，通过条件优化，将缺失突变体利用原核表达系统实现高表达；二是利用真核表达系统表达，真核表达系统与原核表达系统相比，具有不受稀有密码子限制的优点，表达蛋白的活性高，更适合真核生物基因的表达和功能研究。通过上述两种方式，突破类 *FUT2* 基因在原核生物中表达量低的问题，为今后太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的功能研究提供基础。

由于目前没有商业化的太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因表达产物的抗体，本研究使用两种抗体对大肠杆菌原核表达产物进行 Western blot 鉴定，一种是抗 6×His-Tag 单体，可准确标记 6×His-Tag 融合表达蛋白，结果显示，抗 6×His-Tag 单抗能与约 48 kDa 大小的特异性蛋白条带反应，证明了太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因在大肠杆菌中实现了表达。经过生物信息学软件分析，太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的翻译蛋白质序列与人 *FUT2* 的蛋白质序列有一定同源性，理论上推测抗人 *FUT2* 的单抗也可以识别太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的表达产物，因此，本研究又利用抗人 *FUT2* 的单抗(针对的抗原表位位于保守结构域内)作为一抗，对太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的原核表达产物进行 Western blot 鉴定，结果在硝酸纤维素膜上同样出现大小约为 48 kDa 的特异性条带，空白对照未见条带出现。该结果表明，太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的原核表达产物能与抗人 *FUT2* 单抗结合，从另一个角度证实了该基因在大肠杆菌中获得成功表达。此外，由于抗人 *FUT2* 单克隆抗体的高度特异性，能与太平洋牡蛎类 *FUT2* 基因的原核表达产物发生特异性反应，说明二者之间具有高度相似的免疫原性，甚至可以大胆推测，太平洋牡蛎类 *FUT2* 的结构域与人 *FUT2* 相似，具有相似的催化功能。该推测还需后续实验证实。

Kelly 的研究团队在首次克隆了人 *FUT2* 基因后，对不同人群的 *FUT2* 基因进行了大量分析后指出，该基因蛋白编码区内单碱基的突变(如 G428A、A385T、C571T、C628T、G849A、C658T)产生的无功能等位基因导致 *Se* 酶活性的丧失，而这些等位基因的分布具有一定的地域特异性、种族特异性，同时兼具个体差异性(Kelly *et al*, 1995; Rouquier *et al*, 1995)。研究表明，*Se* 酶活性缺失的人群更不易受到诺如病毒的感染(Marionneau *et al*, 2002; Harrington *et al*, 2004; Huang *et al*, 2005)。牡蛎作为全世界广泛分布的贝类，品种繁多，个体数量庞大，其中是否存在不具备 *Se* 酶活性的个体或地域性群体，从而使得其类 A 型 HBGAs 即诺如病毒受体不表达，继而缺失特异性富集诺如病毒的能力？如果这种推测被后续研究证实，那么随着牡蛎全基因组测序结果的不不断解析(Zhang *et al*, 2012)，结合贝类育种技术，培育不富集诺如病毒的、食用安全性更高的牡蛎新品种的研究思路将得到更为广泛的关注。

## 参 考 文 献

- 姜薇, 姚琳, 江艳华, 等. 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类 *FUT2* 基因的克隆与组织表达. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 70-75
- 中国渔业统计年鉴. 农业部渔业局编制. 北京: 中国农业出版社, 2013
- Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006, 35(2): 275-290
- Harrington PR, Vinjé J, Moe CL, *et al*. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol*, 2004, 78(6): 3035-3045
- Hennessy EP, Green AD, Connor MP, *et al*. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis*, 2003, 188(1): 176-177
- Huang P, Farkas T, Zhong W, *et al*. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol*, 2005, 79(11): 6714-6722
- 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
- Langlet J, Kaas L, Greening G. Binding-based RT-qPCR assay to assess binding patterns of noroviruses to shellfish. *Food Environ Virol*, 2015, DOI: 10.1007/s12560-015-9180-x
- Lavner Y, Kotlar D. Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. *Gene*, 2005, 345(1): 127-138
- 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
- Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, *et al.* Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*, 2002, 122(7): 1967–1977
- Moore MD, Goulter RM, Jaykus LA. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2015, 6: 411–433
- Rockx BH, Vennema H, Hoebe CJ, *et al.* Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis*, 2005, 191(5): 749–754
- 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, 177(3): 1–3
- Tian P, Bates AH, Jensen HM, *et al.* Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Let Appl Microbiol*, 2006, 43(6): 645–651
- Zhang G, Fang X, Guo X, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 2012, 490(7418): 49–54

(编辑 冯小花)

## Codon Optimization and Prokaryotic Expression of Fucosyltransferase 2 Like Protein from the Oyster (*Crassostrea gigas*)

YAO Lin<sup>1</sup>, JIANG Yanhua<sup>1</sup>, LI Fengling<sup>1</sup>, ZHU Wenjia<sup>1</sup>, GUO Yingying<sup>1</sup>,  
JIANG Wei<sup>2</sup>, ZHAI Yuxiu<sup>1</sup>, WANG Lianzhu<sup>1</sup>①

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Products Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Qingdao), Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;  
2. Weifang Product Quality Inspection Institute, Weifang 261061)

**Abstract** Norovirus is the most common cause of acute gastroenteritis and is responsible for substantial morbidity and mortality worldwide. The oyster is considered to be one of the major vehicles for foodborne disease caused by Norovirus. The A-like histo-blood group antigens (HBGA) in oyster digestive tissues is a major reason for Norovirus specific bioaccumulation in oyster, and  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase (FUT2) is one of the key enzymes required in the mammal HBGA synthesis. Based on our previously cloned the full-length cDNA of FUT2-like gene in oysters (*Crassostrea gigas*) (GenBank ID: KJ184342), we re-designed and artificially synthesized the open reading frame of FUT2-like gene by adopting the codons preferentially used in *Escherichia coli* without any change of the amino acid sequences. The synthesized FUT2-like mutant gene was inserted into the pRSET A to construct prokaryotic expression plasmid pRSET-mof. The recombinant plasmid was identified by enzyme digestion and sequencing, and then expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells through isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG) induction. SDS-PAGE analysis showed that inducing the BL21 (DE3) cells at 37°C in 0.8 mmol/L of IPTG for 4 hours were the optimal conditions for expression of the recombinant fusion protein. The molecular mass of the expressed protein product was about 46 kDa, which was consistent with the prediction. The recombinant protein was purified and concentrated by Ni-chelating affinity chromatography and the ultrafiltration. SDS-PAGE analysis showed a single band (about 46 kDa), which means a good purification result. Western blot analysis showed that the recombinant fusion protein could be specifically combined with mouse anti-His-Tag Mab and mouse anti-human FUT2 Mab. So the expressed protein was confirmed to be the aimed protein. These findings would provide a basis for further studies on the function of FUT2-Like gene of oyster and the probable molecular mechanism of accumulation of NoV by oysters.

**Key words** *Crassostrea gigas*; FUT2 like gene; Codon optimization; Prokaryocyte expression

① Corresponding author: WANG Lianzhu, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn