

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240812007

引用格式: 张蔚然, 曲梦, 胡君霞, 等. 太平洋牡蛎不同温度处理下转录组分析与类 *B3GALT1* 基因的克隆及表达[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 81-90.

ZHANG WR, QU M, HU JX, et al. Transcriptome analysis of different temperature stress in *Crassostrea gigas* and cloning and expression of *B3GALT1*-like [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 81-90. (in Chinese with English abstract).

太平洋牡蛎不同温度处理下转录组分析与类 *B3GALT1* 基因的克隆及表达

张蔚然^{1,2}, 曲梦¹, 胡君霞^{1,3}, 江艳华¹, 郭莹莹¹, 朱文嘉¹,
李娜¹, 李凤铃¹, 姚琳^{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, 青岛 266071;
2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘要: **目的** 探究不同温度处理下太平洋牡蛎中诺如病毒结合受体合成通路上响应的基因, 筛选后进行克隆和表达规律的研究。**方法** 对牡蛎分别进行高温(25 °C)及低温(5 °C)处理, 取其鳃和消化腺两种组织, 提取RNA后进行转录组测序与分析。选取诺如病毒结合受体合成通路上规律性响应温度处理的基因作为目标, 对目标基因进行克隆、原核表达与免疫印迹鉴定。通过实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析该基因的组织表达和季节表达规律。**结果** 类 β 1,3 半乳糖转移酶 1 (*B3GALT1*) 基因(GenBank LOC117683256)在鳃组织低温组的多个取样点均出现显著上调。扩增得到该基因 1089 bp 的编码区(coding sequence, CDS)。在 25 °C、异丙基-D-硫代半乳糖苷(isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导 8 h 后, 出现大小约为 84.9 kDa 的蛋白条带, 该条带与抗 MBP 标签抗体、抗人 *B3GALT1* 抗体均能发生特异性结合。类 *B3GALT1* 基因在鳃组织中大量表达, 且低温时的表达量显著高于高温($P < 0.01$)。**结论** 太平洋牡蛎类 *B3GALT1* 基因的表达量受温度影响, 表达的蛋白与人类 β 1,3 半乳糖基转移酶具有相似的免疫原性; 类 *B3GALT1* 基因的组织表达和季节表达规律在一定程度上与诺如病毒爆发的季节性相符合。本研究为深入探索牡蛎季节性富集诺如病毒分子机制提供基础。

关键词: 太平洋牡蛎; 转录组; 诺如病毒; 类 *B3GALT1* 基因; 组织表达

Transcriptome analysis of different temperature stress in *Crassostrea gigas* and cloning and expression of *B3GALT1*-like

ZHANG Wei-Ran^{1,2}, QU Meng¹, HU Jun-Xia^{1,3}, JIANG Yan-Hua¹, GUO Ying-Ying¹,
ZHU Wen-Jia¹, LI Na¹, LI Feng-Ling¹, YAO Lin^{1*}

收稿日期: 2024-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101883, 32172292); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2023TD76); 现代农业产业技术体系专项(CARS-49)

第一作者: 张蔚然(1999—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: zwr9909@163.com

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

(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. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: Objective To explore the genes that respond to the synthesis pathway of norovirus binding receptors in *Crassostrea gigas* under different temperature stress, screen them, and study their cloning and expression patterns. **Methods** *Crassostrea gigas* were treated at high temperature (25 °C) and low temperature (5 °C), and two tissues of gills and digestive glands were extracted for RNA extracted for transcriptome sequencing and analysis. Selected genes on the synthesis pathway of norovirus binding receptors that responded to temperature treatment as targets, clone, express in prokaryotic cells, and identified by Western blotting. The tissue expression and seasonal expression pattern of the gene were analyzed by quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** The β 1,3 galactosyltransferase-like 1 (*B3GALT1*-like) gene (GenBank LOC117683256) was significantly upregulated in multiple sampling sites in the gill group. The 1089 bp coding sequence (CDS) region of the gene was amplified. After 8 h of induction of 25 °C, isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), a protein band of about 84.9 kDa appeared, which was specifically bound to both anti-MBP tag antibody and anti-human B3GALT1 antibody. *B3GALT1*-like genes was abundantly expressed in gill tissue and was significantly higher at low temperature than at high temperature ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression level of *B3GALT1* gene in *Crassostrea gigas* is affected by temperature, and the expressed protein has similar immunogenicity to human β 1,3 galactosyltransferase. The tissue expression and seasonal expression patterns of the *B3GALT1* gene are somewhat consistent with the seasonality of norovirus outbreaks. This study provides a foundation for further exploration of the molecular mechanism of seasonal enrichment of norovirus in *Crassostrea gigas*.

KEY WORDS: *Crassostrea gigas*; transcriptome; norovirus; *B3GALT1*-like gene; tissue expression

0 引言

诺如病毒是全球食源性疾病中主要涉及的病原体,具有极低的感染剂量和极强的传播能力^[1]。感染后会出现恶心、呕吐、腹泻和低烧等症状,常会引起急性胃肠炎散发病例和暴发疫情,是食品安全、公共卫生领域重点关注的病原^[2-3]。诺如病毒主要通过“粪-口”途径传播,除了被污染的水、果蔬外,牡蛎也被认为是诺如病毒食源性传播的重要载体之一^[4-6]。牡蛎属于滤食性动物,可以特异性富集水中的诺如病毒,在体内积累的病毒通常很难在净化过程中排出^[7-9]。

研究表明,诺如病毒识别组织血型抗原(histo-blood group antigens, HBGAs)并将其作为侵入人类肠道细胞的受体^[10-11]。在牡蛎的消化腺、鳃等组织中也发现有多种类HBGAs的表达,作为一种特定受体选择性地富集诺如病毒,这可能是诺如病毒生物积累的主要机制^[7,12]。

组织血型抗原是具有高度多态性的糖类抗原,主要包含A/B、Lewis和H抗原3大类决定簇,决定簇的形成通常是以二糖前体为核心,受控于不同的基因通过糖基转移酶有序地加成单糖而形成具有特定序列的多糖,通常以糖蛋白或者鞘糖脂(glycosphingolipids, GSLs)的形式存在^[13-14]。

研究人员对诺如病毒在牡蛎体内积累过程的影响因素展开过多方面的研究,包括温度、水污染等环境因素^[15],以及牡蛎在诺如病毒生物积累过程中类HBGAs分子表达和基因调控特征等^[16]。诺如病毒的爆发存在一定的季节性,常在冬春季出现感染高峰,而牡蛎中诺如病毒的检出率在冬季等气温较低的季节也明显高于其他季节^[17-18],且来自冷水水域(5 °C)的牡蛎的病毒载量明显高于来自温暖水域(大于10 °C)的牡蛎^[19]。有研究指出冬末春初诺如病毒与牡蛎鳃、外套膜和消化腺组织的结合能力及富集效率显著加强,而牡蛎中类HBGAs的含量存在一定的季节变化,在冬季的表达量将增加,提示研究人员温度对牡蛎中类HBGAs的表达可能有一定的影响^[20-21]。

目前对于温度影响牡蛎类HBGAs表达的分子机制鲜少见报道。本研究对太平洋牡蛎进行高温及低温处理并进行转录组测序分析,选择鞘糖脂生物合成-乳糖和新乳糖系列通路上规律性响应温度胁迫的差异表达基因作为目的基因进行原核表达,并进行免疫印迹鉴定;通过实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)对该基因进行组织表达与季节性表达分析。本研究旨在深入探索牡蛎季节性富集诺如病毒的分子机制,以期为预防和控制诺如病毒在牡蛎中的传播提供新的策略与方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用太平洋牡蛎采自青岛某养殖场。

动物组织总 RNA 提取试剂盒、大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10 和 BL21 (DE3)感受态细胞、增强型辣根过氧化物酶 - 二氨基联苯胺 (horseradish peroxidase-diaminobenzidine, HRP-DAB)底物显色试剂盒(北京天根生化科技有限公司); qRT-PCR 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect realtime)、qRT-PCR 试剂盒 TB Green® Premix Ex Taq™ II(北京宝日生物技术有限公司); pMAL-c5x 载体(武汉森灵生物科技有限公司); PCR 2×Accurate Taq Master Mix(预混液)、Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司); 12 cm 亲和层析柱空柱、Ni-NTA 6FF 琼脂糖纯化树脂、糊精树脂 6FF、引物(上海生工生物工程股份有限公司); 硝酸纤维素膜(北京兰杰柯科技有限公司); 异丙基-*D*-硫代半乳糖苷 (isopropyl-*D*-thiogalactoside, IPTG)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(北京索莱宝科技有限公司); 烟草蚀纹病毒蛋白酶(组氨酸标签)(上海碧云天生物技术有限公司); 兔抗 β 1,3-半乳糖基转移酶 1 多克隆抗体(苏州博奥龙科技有限公司); HRP 标记的羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)(重链和轻链)(美国 Proteintech 集团有限公司); Rabbit pAb 兔抗 MBP-tag 多克隆抗体[翌圣生物科技(上海)股份有限公司]。

1.2 仪器与设备

T1 型 PCR 仪(德国 Whatman Biomerra 公司); LightCycler 480II 实时荧光 PCR 仪(瑞士 Hoffmann-La Roche 有限公司); Nano Photometer Pearl 微量核酸蛋白测定仪(德国 Implen 公司); Y-ZY3 半干式转膜仪(北京君意东方电泳设备有限公司); ALQD59A300 实验室养殖水体温度控制系统(深圳市奥凌恒业有限公司); JY92-IIN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物及样品处理

选取规格相近且双壳完整健康无损伤的活牡蛎 120 只, 平均壳长(11.0±1.0) cm, 壳高(4.0±0.5) cm, 湿重(120.0±5.0) g。实验用牡蛎 4~8 °C 运输至实验室后, 清洗表面附着物, 用过滤后的海水冲洗干净, 在塑料养殖箱(1.0 m×0.7 m×0.4 m)中暂养 3 d, 期间水温保持在 15 °C, 每天换 1/2 海水, 持续充氧, 不投喂食物。

准备 3 个养殖箱, 对照组养殖箱加入 15 °C 的海水, 低温实验组、高温实验组养殖箱内加入海水后用温控系统使水温分别维持在 5 °C 和 25 °C, 温度选取参考水温年际变化^[22]。将结束暂养的 120 只牡蛎随机分配于 3 个养殖箱中,

每组 40 只。实验期间持续充氧, 每天换海水 1 次, 换水前将新水预热或预冷至各组所需温度, 每天投喂小球藻 1 次。

以实验开始时 0 h 取样作为对照, 鳃和消化腺组织样品的对照组编号分别为 GC 和 HC。参照刘慧等^[23]探究温度对长牡蛎类 HBGA_s 表达的影响时选取的取样时间, 分别在高温及低温组处理 6、12、24、48 h 时取样, 一共 18 组编号, 54 个样品, 具体分组方式见表 1。

表 1 转录组实验分组
Table 1 Group of the transcriptome experiments

编号	取样组织	处理方式	处理时间/h
GHA	鳃组织	高温处理	6
GHB			12
GHC			24
GHD			48
GLA			6
GLB			12
GLC	消化腺组织	低温处理	24
GLD			48
HHA			6
HHB			12
HHC			24
HHD			48
HLA	鳃组织	对照	6
HLB			12
HLC			24
HLD			48
GC			0
HC			消化腺组织

每组在取样时随机选取 2 只牡蛎, 用无菌镊子和手术刀解剖将鳃及消化腺组织取出。取 1~2 g 组织置于无菌无酶冻存管并迅速置于液氮中, 随后转移到 -80 °C 冰箱保存。将两只个体的同种组织取出后混匀合并为 1 个样品, 每个组均设置 3 个生物学重复, 即每组共选取 6 只牡蛎。

1.3.2 转录组文库的构建与测序

采用 TRIzol 试剂依照说明书提取样品总 RNA 后构建转录组, 文库质检合格后, 使用 Illumina 测序仪进行测序。采用 fastp 软件预处理原始数据后获取质量较高的待分析数据, 用于后续数据分析^[24]。

1.3.3 转录组分析

本研究共设计消化腺组织和鳃组织的 2 个实验组在 4 个取样时间和对照组相比的 HLA vs HC、GLA vs GC 等 16 个比较分组, 使用 HISAT2 软件将高质量序列数据(clean reads)与参考基因组(GCF_902806645.1_cgigas_uk_roslin_v1)进行比对^[25], 并进行基因表达量计算^[26]。利用 DESeq2 软件进行差异表达基因分析, 其中符合 q 值 < 0.05 且表达差异倍

数(foldchange, FC)>2 或 FC<0.5 阈值的基因被定义为差异表达基因^[27]。随后,基于超几何分布算法对差异表达基因进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,用于筛选显著性富集功能条目。委托上海欧易生物技术有限公司进行文库构建、转录组测序和分析。

1.3.4 转录组数据 qRT-PCR 验证

为了确保转录组实验的准确性及可重复性,分别在鳃组织和消化腺组织的高温及低温处理组中各随机挑选两个差异表达基因,包括 *DDX39B*、*ATP-dependent RNA helicase DEAH12* 等共 8 个基因,进行 qRT-PCR 验证,与对照 GC 组和 HC 组分别对比。将 qRT-PCR 与转录组测序数据中基因的相对表达量做比较分析。使用与转录组测序同批次的 RNA,参照反转录试剂盒说明书进行反转录,获得相应的 cDNA 作为模板,以太平洋牡蛎 β -actin (Genbank 编号: AF026063)为参考基因,合成引物 *F-actin* 和 *R-actin*^[28]。按照 TB Green[®]Premix Ex Taq TM II 试剂盒进行 qRT-PCR,反应体系如下:上下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L, cDNA 模板 2 μ L, DNase Free Water 6.4 μ L。反应程序为:预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,变性 95 $^{\circ}$ C 5 s,退火 60 $^{\circ}$ C 30 s,循环 40 次,融解 95 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 60 s,降

温 50 $^{\circ}$ C 30 s。每个样本进行 3 次技术重复。相对表达量的数据结果使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算^[29],引物序列见表 2。

1.3.5 重点基因筛选及编码区序列克隆

对差异表达基因进行 KEGG 富集分析,重点筛选鞘糖脂生物合成-乳糖和新乳糖系列通路(KEGG 编号 crg00601)上的基因,对各个实验组与对照组相比,选择在此通路上呈现差异性表达并规律性响应温度处理的基因作为目的基因。

根据美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中太平洋牡蛎基因组(ID 29159)中目的基因的序列信息,做进一步的克隆验证,选取其中的编码区(coding sequence, CDS),利用 Primer 5.0 软件设计核心片段扩增引物 *B3GALTI-F/B3GALTI-R*。所用引物序列见表 2。

取活太平洋牡蛎的鳃组织约 50 mg,放入研钵加液氮充分研磨后提取总 RNA。使用以 Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒合成的第一链 cDNA 为模板,PCR 扩增相关片段。反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min;变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,退火 50 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;最终延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳后,使用凝胶成像仪观察,选择合适条带切胶并送上海生工生物工程股份有限公司测序。

表 2 实验中所用引物序列
Table 2 Primers sequence used in this experiment

基因 ID	引物名称	序列(5'-3')
LOC105319208	<i>q-F1</i>	CTGGTCGTCTGCTGGCTCTTG
	<i>q-R1</i>	CGCAAGGTGATCGTATGAATATGGC
LOC105325358	<i>q-F2</i>	GTATGTGTTCTTCTTGGCGAGACAG
	<i>q-R2</i>	GCTGCGACTTTCCTTGGTTGTG
LOC105321656	<i>q-F3</i>	GTCAATCTAAGTGGTGGCAGAAAC
	<i>q-R3</i>	ACGAGAGTCAACAGCAGATAGTGG
LOC105325575	<i>q-F4</i>	CCATAGACAGAGAACAGCCAGTGAG
	<i>q-R4</i>	GCGAAACCTCTCCAAAGCAACAG
LOC105318009	<i>q-F5</i>	TCGGTAACAGTGGACGGTGAC
	<i>q-R5</i>	GCAGGTGCGTATCCGAAGAATAG
LOC105318166	<i>q-F6</i>	GTTCCATTGTACGACTTCCAGAC
	<i>q-R6</i>	ACCTATGCTATGTGCCTCATCCAG
LOC117689189	<i>q-F7</i>	GGACAACAACAACCACCGTGAC
	<i>q-R7</i>	GAAGCACCACTTGAACCTGATG
LOC105326276	<i>q-F8</i>	TCAATCACAGAGACTTGGAGCAGAC
	<i>q-R8</i>	GCAGGGCGTAGTGGAGGATAGAAC
LOC117683256	<i>B3GALTI-F</i>	GTTAGTATTCTTGCTCAACTCTGGACTG
LOC117683256	<i>B3GALTI-R</i>	GAAGAATTGACCCATCACCTACCT
LOC117683256	<i>B3GALTI-q-F</i>	TTACCCTCTCGCCACTCAGTTCC
LOC117683256	<i>B3GALTI-q-R</i>	CCAGTACCGCACTGTGTTCCAC
AF026063	<i>F-actin</i>	CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT
	<i>R-actin</i>	TGGGCACCTGAATCGCTCGTT

1.3.6 生物信息学分析

使用 Snapgene 软件预测目的基因的开放阅读框、氨基酸序列, 并计算出分子量和等电点。用 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 在线分析蛋白质跨膜结构域, 用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线分析蛋白质二级结构, 用 SMART (http://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 和 phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/help.cgi?id=help/faq>) 在线分析蛋白质三级结构。

1.3.7 质粒构建与原核表达

使用在线密码子优化工具 (<https://www.genscript.com.cn/gensmart-free-gene-codon-optimization.html>), 对克隆得到的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。优化后的基因序列在氨基酸序列 5' 添加 6×His 标签序列及 TEV 酶切割位点, 基因合成后通过同源重组克隆至载体 pMAL-c5x 上, 基因合成及重组质粒构建委托金斯瑞生物科技有限公司完成。

将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选后挑取单菌落接种于含 50 μg/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基, 经 36 °C 摇床过夜培养后按 1:50 体积比转移至含有氨苄青霉素的 LB 培养基中扩大培养。至菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 再次放入摇床诱导 8 h。取 2 mL 诱导后的菌液离心并收集菌体。用 80 μL ddH₂O 重悬菌体后加入 20 μL 的 5×蛋白上样缓冲液混匀, 水浴煮沸 10 min, 12000 r/min 离心 2 min, 取上清, 即为总蛋白溶液。取 10 μL 加入丙烯酰胺浓度为 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中, 经 120 V 恒压电泳分离, 取胶块经考马斯亮蓝染液染色 1 h, 后使用脱色液充分脱色, 查看蛋白表达情况, 经鉴定选取阳性样品溶液, 置于 -20 °C 保存。

1.3.8 表达蛋白的免疫印迹分析

取阳性重组菌进行凝胶电泳(步骤同 1.3.7), 电泳完成后经转膜仪 25 V 恒压 30 min 后转移蛋白至硝酸纤维素薄膜, 而后转移至含有 1% BSA 的含吐温-20 三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris buffered saline with Tween-20, TBST)中封闭, 于 4 °C 冰箱孵育过夜。用 TBST 缓冲液洗涤薄膜 3 次, 加入目的基因对应的抗体(使用 TBST 缓冲液稀释 1000 倍), 同时在另一组加入兔抗麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)标签多克隆抗体(使用 TBST 缓冲液稀释 2000 倍)室温孵育 2 h, 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 3000 倍)室温孵育 1 h, 用 TBST 缓冲液洗涤薄膜 3 次。按照 HRP-DAB 底物显色试剂盒说明书配制显色液进行显色并观察。

1.3.9 蛋白纯化

选取成功诱导表达后的菌液 600 mL 离心收集菌体, 使

用裂解液[20 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), pH 7.4]重悬菌体并于冰上超声破碎菌体, 8000 r/min 离心 10 min 后, 分别收集上清与沉淀。将表达于上清的可溶性蛋白经 0.45 μm 的滤膜过滤, 载入预先用裂解液平衡好的 MBP 标签亲和层析柱, 孵育 10 min 后使流穿液缓慢排出树脂, 取第一次流穿液再次加入纯化柱中流出, 增加蛋白与填料的结合率。依次向纯化柱中加入 5 倍柱体积的低盐缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.2)与 10 倍柱体积的高盐缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.2)洗脱杂蛋白。用 10 倍填料体积的麦芽糖洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 麦芽糖, pH 7.4)洗脱后获得纯化后的重组蛋白, 用凝胶电泳检测纯化效果。

1.3.10 目的基因季节性表达与组织表达分析

(1) 季节表达规律分析

在 2023 年每个季节(3 月、6 月、9 月、12 月的上旬), 采集太平洋牡蛎样品, 取 3 只牡蛎的鳃组织, 在液氮中充分研磨, 并用试剂盒提取 RNA, 按照 1.3.4 的方法进行反转录与 qRT-PCR 检测, 以分析不同季节牡蛎鳃组织目的基因的表达规律, 所用引物序列见表 2。

(2) 组织表达规律分析

取 3 只牡蛎的外套膜、鳃、闭壳肌、唇瓣和消化腺组织, 在液氮中充分研磨并用试剂盒提取 RNA, 采取同 1.3.4 的方法进行反转录与 qRT-PCR 检测以分析 5 种组织中目的基因的相对表达水平。所用引物序列见表 2。

1.4 数据处理

所有的实验重复 3 次或以上, 结果以平均值±标准偏差表示, 使用 GraphPad Prism 8.0 进行显著性分析和绘图。

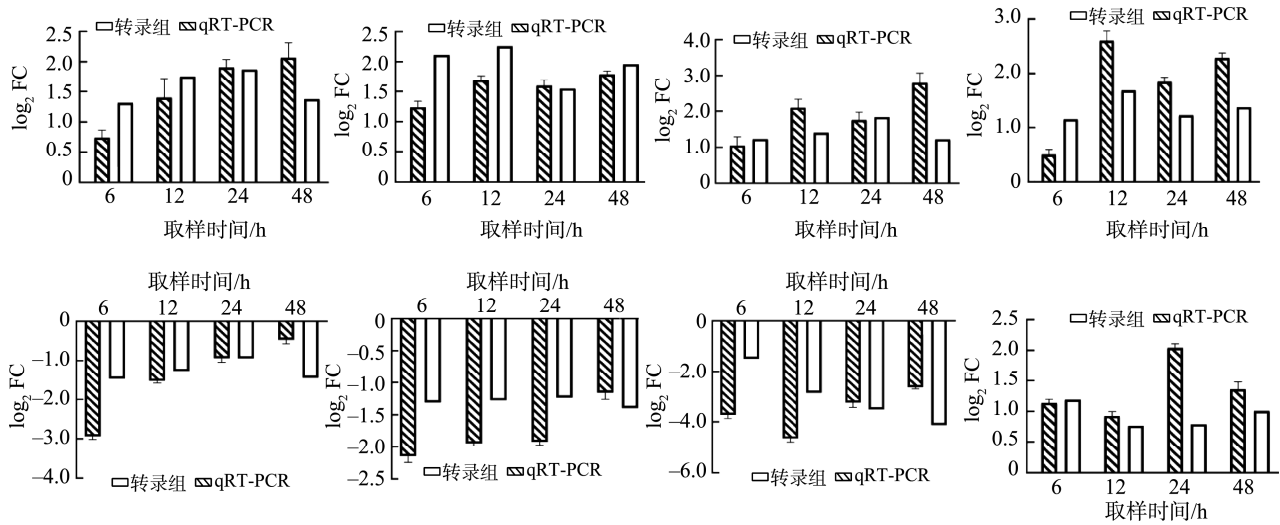
2 结果与分析

2.1 转录组测序

共完成 54 个样本的有参转录组测序, 获得 368.79 G 的待分析数据, 各样本的有效数据量分布在 6.06~7.08 G, Q30 碱基分布在 92.09%~93.88%, 平均 GC 含量为 42.29%。能定位到参考基因组上的 Clean reads 占比在 68.34%~75.57%。基于比对结果, 进行蛋白编码基因表达量分析。根据蛋白编码基因在不同样本中的表达量, 进行差异表达基因筛选。

2.2 qRT-PCR 验证

从图 1 可知, 随机选定的 8 个基因在 qRT-PCR 分析中的表达情况与转录组测序分析结果呈现出一致的上调或下调的表达趋势, 表明本次转录组数据和分析结果具有很高的准确性和可靠性。



注: A. LOC105319208; B. LOC105325358; C. LOC105321656; D. LOC105325575; E. LOC117689189; F. LOC105326276; G. LOC105318009; H. LOC105318166。

图 1 高低温处理下牡蛎转录组数据 qRT-PCR 验证

Fig.1 Validation of qRT-PCR of *Crassostrea gigas* transcriptome data under high and cold treatment

2.3 目的基因筛选

经过对转录组数据比较分析,初步筛选得到大量富集在 KEGG 中鞘糖脂生物合成-乳糖和新乳糖系列通路上的差异表达基因,见表 3,其中类 β 1,3-半乳糖转移酶

(*B3GALT1*)基因(GenBank: LOC117683256)的基因在鳃组织低温组的 12、24、48 h 3 个取样点均出现显著上调,满足 q 值 <0.05 且差异倍数大于 2,仅在 6 h 取样点时的差异倍数为 1.83,但满足 q 值 <0.05 ,故将其列为目的基因,命名为类 *B3GALT1*。

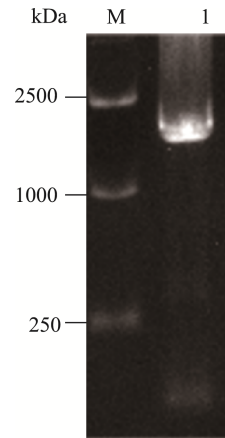
表 3 目的通路上显著性差异表达基因统计

Table 3 Statistics of significant and differentially expressed genes on the target pathways

基因 ID	差异倍数对数值 \log_2FC	上调或 下调	差异分组
	2.86	上调	GHA vs GC
LOC105327316	2.68	上调	GHB vs GC
	2.50	上调	GHC vs GC
LOC105327909	-1.72	下调	GHC vs GC
LOC117691395	2.63	上调	GHD vs GC
LOC105335091	-1.63	下调	GLA vs GC
	1.04	上调	GLB vs GC
LOC117683256	1.11	上调	GLC vs GC
	1.23	上调	GLD vs GC
LOC105324924	-1.50	下调	HHB vs HC
LOC105325959	-1.15	下调	HHB vs HC
	-23.22	下调	HHB vs HC
LOC105326727	-23.26	下调	HHD vs HC
LOC105336015	1.14	上调	HHB vs HC
LOC105342967	-7.45	下调	HHB vs HC

2.4 目的基因 CDS 克隆

克隆得到类 *B3GALT1* 共 1743 bp 长度的基因片段,见图 2,其中含 1089 bp 的完整 CDS 区,包含一个起始密码子(ATG)和一个终止密码子(TAA),编码 362 个氨基酸序列的开放阅读框。测序结果表明,该扩增片段序列与 GenBank ID 为 LOC117683256 基因序列 CDS 区一致。



注: M. 标准蛋白分子量; 1. 类 *B3GALT1* 基因扩增产物。

图 2 牡蛎类 *B3GALT1* 基因 CDS 区 PCR 产物

Fig.2 PCR product of *B3GALT1*-like gene CDS region of *Crassostrea gigas*

2.5 生物信息学分析

ExPASy-Compute pI-Mwtool 在线预测结果表明, 类 B3GALT1 蛋白相对分子质量为 42.8 kDa, 理论等电点为 8.89。用 TMHMM 推算其跨膜结构域, 结果如图 3, 表明类 B3GALT1 具有一个跨膜结构域, 由位于 20~42 的 23 个氨基酸组成。

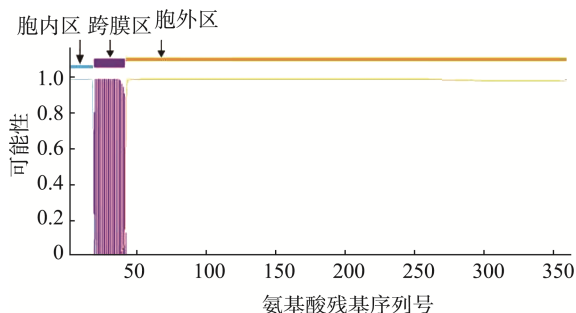
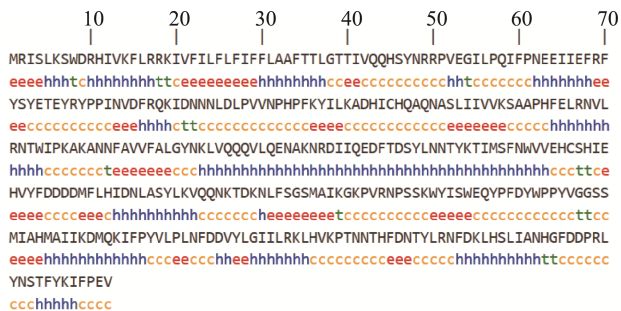


图 3 牡蛎类 B3GALT1 蛋白跨膜结构域预测
Fig.3 Transmembrane structure prediction of B3GALT1-like protein of *Crassostrea gigas*

利用 SOPMA 蛋白二级结构预测分析软件在线分析类 B3GALT1 二级结构, 结果如图 4, 表明类 B3GALT1 含有 131 个 α 螺旋, 14 个 β 折叠, 145 个无规则卷曲。



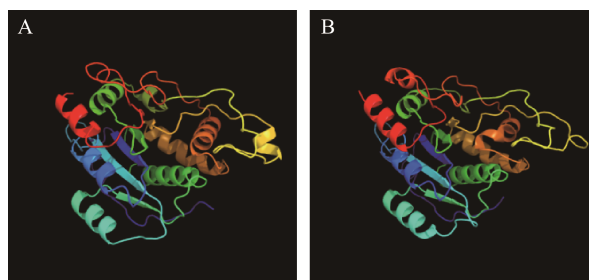
注: h. α -螺旋; t. β -折叠; c. 无规则卷曲; e. 延伸链。
图 4 牡蛎类 B3GALT1 二级结构预测
Fig.4 Secondary structure prediction of B3GALT1-like of *Crassostrea gigas*

通过 phyre 网站在线预测蛋白质三级结构, B3GALT1 蛋白的三级结构模型来源依据为 c7jhc, 包括 253 个氨基酸残基, 该模型置信度达 100% (图 5A)。具有 β 1,3-半乳糖基转移酶活性的人 B3 (I型前体合成酶) 的蛋白三级结构模型同为 c7jhc, 包括 264 个氨基酸残基, 置信度达 100%。结果表明, 二者具有相同的三级结构(图 5B)。

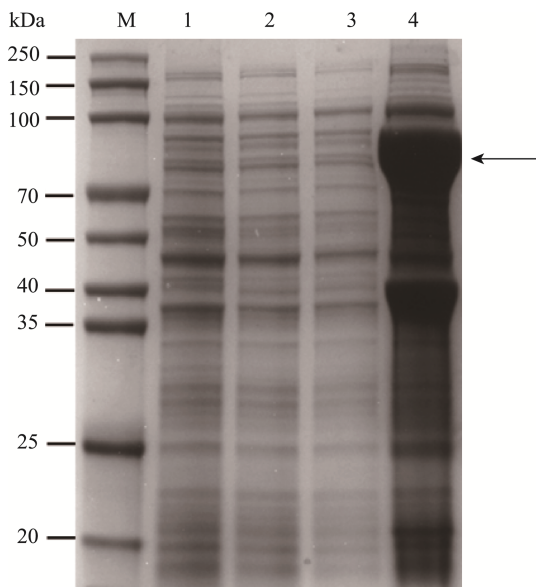
2.6 原核表达

将成功构建的重组质粒命名为 P-B3, 转化大肠杆菌 (BL21) 并诱导后, 使用凝胶电泳分析, 结果如图 6 所示, 在 25 $^{\circ}$ C, 0.2 mmol/L IPTG 终浓度诱导表达 8 h 的诱导条件下, 含 P-B3 质粒的重组大肠杆菌总蛋白在 84.9 kDa 大小处出

现了明显的目的条带, 大小与预测结果相符合, 空白对照组未出现相似条带, 表明类 B3GALT1 蛋白在大肠杆菌表达系统中成功表达。



注: A. 类 B3GALT1 三级结构预测; B. 人 B3GALT1 三级结构预测。
图 5 牡蛎类 B3GALT1 蛋白三级结构预测
Fig.5 Tertiary structure prediction of B3GALT1-like protein of *Crassostrea gigas*

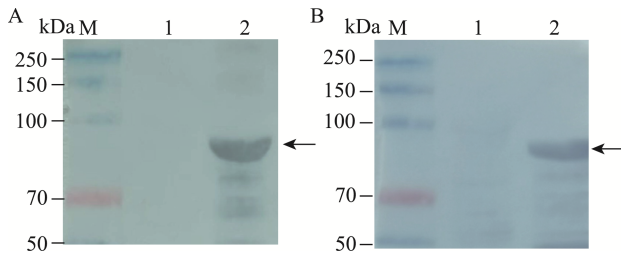


注: M. 标准蛋白分子量; 1. 大肠杆菌 BL21 (DE3) 总蛋白; 2. pMAL-c5x 空载菌体蛋白; 3. 未经诱导的 P-B3 转化大肠杆菌总蛋白; 4. 诱导后的 P-B3 转化大肠杆菌总蛋白; 箭头标记目的条带。

图 6 牡蛎类 B3GALT1 蛋白的原核表达
Fig.6 Prokaryotic expression of the B3GALT1-like protein of *Crassostrea gigas*

2.7 免疫印迹分析

使用兔抗 MBP 标签抗体(图 7A)和兔抗人 B3GALT1 蛋白抗体(图 7B)的免疫印迹分析结果显示, 在泳道 2 中(目的蛋白组)在约 84.9 kDa 处有明显的显色条带, 且空白对照无显色。这一结果证实重组质粒 P-B3 成功表达蛋白并被转移至硝酸纤维素薄膜上, 不仅能与通用型的 MBP 标签抗体结合, 且能被抗人 B3GALT1 抗体特异性识别, 表明表达蛋白具有与人 β 1,3-半乳糖基转移酶蛋白高度相似的免疫原性。



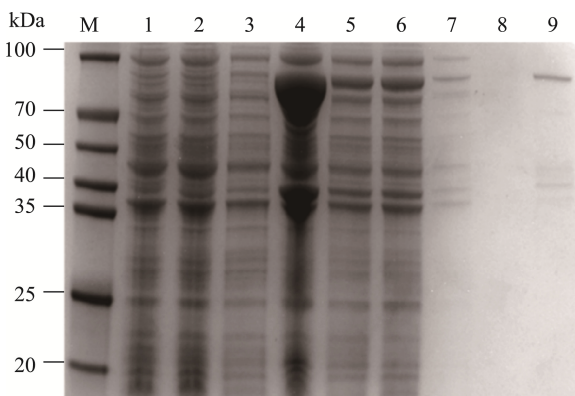
注: A. 以兔抗 MBP 标签抗体为一抗分析类 B3GALT1 表达蛋白;
B. 以兔抗人 B3GALT1 抗体为一抗分析类 B3GALT1 表达蛋白
M. 蛋白分子量标准; 1. pMAL-c5x 空载菌体蛋白对照;
2. 类 B3GALT1 蛋白; 箭头标记目的条带。

图 7 牡蛎类 B3GALT1 蛋白的免疫印迹分析

Fig.7 Western blot analysis of B3GALT1-like protein of *Crassostrea gigas*

2.8 蛋白纯化

重组大肠杆菌菌体样本及超声破碎后上清液样本经纯化后, 通过凝胶电泳分析, 都出现了与目的蛋白分子量大小相似的条带, 约为 84.9 kDa, 结果如图 8 所示。在低盐洗脱液组分中, 杂蛋白已经较少, 说明与填料结合的杂蛋白不多, 而高盐洗脱液中已几乎无杂蛋白。在麦芽糖洗脱液组分中, 存在与目的蛋白大小相似的条带, 说明目的蛋白被成功洗脱。



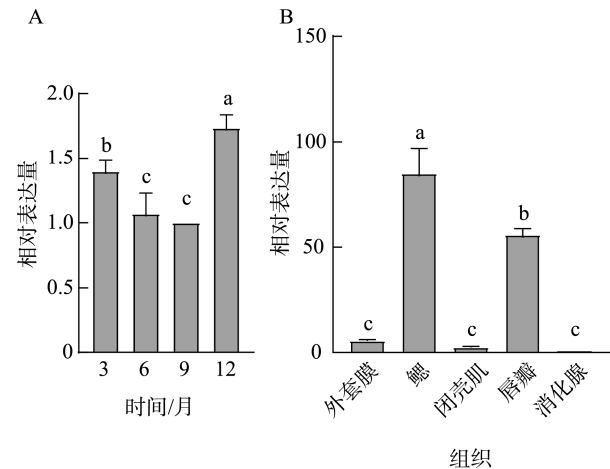
注: M. 标准蛋白质分子量; 1. 大肠杆菌 BL21(DE3)蛋白;
2. pMAL-c5x 空载菌体蛋白; 3. 未经诱导的含 P-B3 质粒大肠杆菌总蛋白; 4. 诱导后的含 P-B3 质粒大肠杆菌总蛋白; 5. 超声破碎后的菌体蛋白上清; 6. MBP 亲和层析柱初始流出液; 7. 低浓度盐溶液洗杂液; 8. 高浓度盐溶液洗脱液; 9. 麦芽糖洗脱液。

图 8 牡蛎类 B3GALT1 蛋白纯化凝胶电泳分析

Fig.8 Gel electrophoresis analysis of B3GALT1-like protein purification of *Crassostrea gigas*

2.9 基因组织表达与季节性表达规律

类 B3GALT1 基因的季节性表达检测结果如图 9A 所示, 表明该基因在 9 月份的表达量最低, 与 6 月和 9 月这种高温季节相比, 类 B3GALT1 在 3 月和 12 月这种低温季节相对表达量较高, 上述结果呈现出转录组数据基本一致的趋势。



注: A. 类 B3GALT1 基因在太平洋牡蛎组织中 4 个季度的相对表达量 ($P < 0.01$); B. 类 B3GALT1 基因在太平洋牡蛎 5 种组织中的相对表达量 ($P < 0.01$)。不同字母代表组间极显著性差异 ($P < 0.01$)。

图 9 牡蛎类 B3GALT1 基因的季节及组织表达分析

Fig.9 Quarterly and tissue expression analysis of B3GALT1-like gene of *Crassostrea gigas*

通过 qRT-PCR 分析了牡蛎 5 种组织中的类 B3GALT1 基因的表达量, 结果如图 9B 所示, 该基因在各组织中的表达量差异较大, 在消化腺中的表达量最低, 以消化腺中的表达量为基准, 在外套膜、鳃、闭壳肌和唇瓣中的表达量分别为 5.4、84.6、2.4 和 55.7 倍, 在鳃组织的表达量最高。

3 讨论与结论

诺如病毒导致的急性胃肠炎具有明显的冬春季爆发的季节性特征, 被一度称为“冬季呕吐病”^[30], 引起冬春季诺如病毒爆发的原因可能有很多, 低温利于病毒的存活和传播是其中的外部因素之一^[31]。相关研究显示在双壳贝类受到高温或低温影响时, 多种基因的表达都会出现上调或下调的变化^[32-34], 类似的变化是否会影响牡蛎富集诺如病毒的某个环节, 值得研究人员深入探索。

鞘糖脂生物合成-乳糖和新乳糖系列通路是诺如病毒特异性结合受体合成相关的重点通路, MA 等^[35]在对诺如病毒感染与太平洋牡蛎鞘糖脂生物合成途径的转录组学研究中也曾对此通路展开分析, 本研究将研究重点也放在该通路上。本研究的转录组测序结果显示, 该通路上有 12 个糖基转移酶相关基因出现了不同程度的差异表达, 且上、下调情况也有很大差异。有研究发现太平洋牡蛎不同组织中的类 HBGA 存在多态性和差异性^[23,36], 从本研究转录组测序结果推测, 该现象可能与不同组织在温度变化时发生显著差异表达的基因不同有关, 从而引发类 HBGA 的表达量和类别的不同。

β 1,3-半乳糖转移酶 1 (B3GALT1) 在鞘糖脂生物合成途径中占据上游的关键位置, 可将 UDP-半乳糖转化为半乳糖, 而后与 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 以 1,3 糖苷键连

接, 催化 I 型前体的合成, 参与糖脂和糖蛋白的碳水化合物部分的生物合成。本研究通过对其跨膜结构域的预测, 得出该基因包含跨膜结构域, 这与之前人类 $\beta 1,3$ -半乳糖转移酶基因编码一种 II 型跨膜蛋白质结构域的研究相符合^[37]。类 *B3GALT1* 基因(Genebank ID 为 LOC117683256), 在牡蛎鳃组织中的表达呈现上调趋势, 这一发现与牡蛎组织血型抗原的量、牡蛎与诺如病毒的富集效率以及牡蛎中诺如病毒的检出率均存在明显的季节性高峰的现象相符合。推测类 *B3GALT1* 基因的上调会引起下游相关血型组织抗原表达量的增加, 这也能从分子水平上解释了其他研究人员发现的低温诱使牡蛎内脏团中类 A 型 HBGA 的表达量显著增加的现象^[23]。组织血型抗原的表达量的增加会使得牡蛎对诺如病毒的富集量增加, 这可能是诺如病毒爆发呈现一定季节性的重要内在原因之一。

在前期的研究中本研究团队已克隆了多个太平洋牡蛎类 HBGA 合成相关的糖基转移酶基因如类 *FUT2* 基因^[28]、Lewis 抗原合成酶类 *FUT10* 基因^[38]、类 *FUT1* 基因^[39]、*CgFUT5* 基因^[40], 且进行了相关的功能验证, 逐步证明了牡蛎体内可能存在与人血型抗原相似合成路径。本研究对类 *B3GALT1* 基因进行克隆及相关生信分析, 发现该基因的表达蛋白与人 *B3GALT1* 蛋白具有非常相似的三级结构, 免疫印迹结果显示抗人 $\beta 1,3$ -半乳糖基转移酶 1 的抗体与该重组蛋白确实能实现特异性结合, 不仅说明牡蛎中类 *B3GALT1* 与人 $\beta 1,3$ -半乳糖基转移酶 1 之间存在相似的免疫原性, 也从一个角度证实了两者之间的高级结构具有相似性。

有研究表明, 融合 MBP 标签可增加蛋白的可溶性, pMAL-c5x 载体含有 MBP 融合标签、tac 启动子, 都可在一定程度上促进蛋白的可溶性表达^[41], 因此本研究选择了带有 MBP 标签的 pMAL-c5x 载体。在类 *B3GALT1* 原核表达的实验中, 起初其表达量并不高, 考虑到跨膜结构域对糖基转移酶蛋白在原核表达系统中的可溶性及表达量有直接影响^[42-43], 且本团队在前期研究中发现缺失跨膜域的 *cgFUT5* 在大肠杆菌中实现了更高的表达量^[40], 在本研究中也缺失了跨膜域并获得了预期的实验结果。

在季度表达分析中, 类 *B3GALT1* 基因在 3 月和 12 月这两个低温时间的相对表达量较高, 而在 6 月和 9 月这两个高温时间的相对表达量较低。这一发现与转录组数据所呈现的趋势基本一致, 进一步支持类 *B3GALT1* 基因表达受温度影响的假设。结合秋冬季诺如病毒在牡蛎中的检出率呈现高峰的现象^[18,44], 以及 HBGA 在低温季节表达量增高的趋势^[23], 可推测类 *B3GALT1* 基因的表达与诺如病毒的富集之间很可能存在某种联系。由于类 *B3GALT1* 是催化 HBGA 合成的关键酶之一, 其在低温季节的高表达很可能导致牡蛎类 HBGA 表达量的增加, 进而促进了牡蛎对诺如病毒的富集, 加快了诺如病毒的食源性传播。

本研究结果显示, 类 *B3GALT1* 基因在所检测的 5 种组织中均有表达, 且表达量在不同组织间存在显著差异。

有研究发现牡蛎消化腺和鳃组织中的类 HBGA 同样呈现一定的多态性和差异性^[36], 且不同基因型的诺如病毒在牡蛎不同组织中的富集率也不同^[7], 这可能与本研究发现的类 *B3GALT1* 在不同组织的基因表达量的差异有关。

本研究以温度作为牡蛎中诺如病毒特异性结合受体合成通路上关键基因的关键影响因素, 为研究牡蛎类 HBGA 合成酶功能及探索合成路径提供了基础, 也为解析牡蛎结合诺如病毒分子机制与控制诺如病毒的食源性传播提供了新的研究思路和理论依据。

参考文献

- [1] CAUL EO. Viral gastroenteritis: Small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part II. The epidemiological perspective [J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1996, 49(12): 959-964.
- [2] ATMAR RL, RAMANI S, ESTES MK. Human noroviruses: Recent advances in a 50-year history [J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2018, 31(5): 422-432.
- [3] European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union one health 2022 zoonoses report [J]. *EFSA Journal*, 2023, 21(12): e8442.
- [4] 崔健, 杨莉莉, 邓婷婷, 等. 果蔬食品中诺如病毒污染状况及检测研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(12): 3884-3892.
CUI J, YANG LL, DENG TT, et al. Research progress on norovirus contamination status and detection technology in fruit and vegetable foods from a non-traditional perspective [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(12): 3884-3892.
- [5] FERLAND TM, COLLARD ÈM, BEAULIEU GV, et al. Evaluation of a new automated viral RNA extraction platform for hepatitis A virus and human norovirus in testing of berries, lettuce, and oysters [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 416: 110664.
- [6] PANDISCIA A, FALCÓ I, TERIO V, et al. Survival modelling of infectious human norovirus and surrogates for high-pressure inactivation in strawberry puree [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2024, 94: 103702
- [7] MAO M, ZHANG Z, ZHAO X, et al. Spatial distribution and enrichment dynamics of foodborne norovirus in oyster tissues [J]. *Foods*, 2023, 13(1): 128.
- [8] TIAN P, ENGELBREKTSON AL, XI J, et al. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: A possible mechanism of bioaccumulation [J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(9): 2140-2147.
- [9] RAZAFIMAHEFA RM, LUDWIG-BEGALL LF, THIRY E. Cockles and mussels, alive, alive, oh-The role of bivalve molluscs as transmission vehicles for human norovirus infections [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(S2): 9-25.
- [10] SINGH BK, LEUTHOLD MM, HANSMAN GS. Structural constraints on human norovirus binding to histo-blood group antigens [J]. *Mosphere*, 2016, 1(2): e00049-16
- [11] SAIKIA K, SAHARIA N, SINGH CS, et al. Association of histo-blood group antigens and predisposition to gastrointestinal diseases [J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 94(11): 5149-5162.
- [12] TIAN P, ENGELBREKTSON AL, MANDRELL RE. Seasonal tracking of histo-blood group antigen expression and norovirus binding in oyster gastrointestinal cells [J]. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(8): 1696-1700.
- [13] 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 [J]. *Biochimie*, 2001, 83(7): 565–573.
- [14] RIMKUTE I, THORSTEINSSON K, HENRICSSON M, *et al.* Histo-blood group antigens of glycosphingolipids predict susceptibility of human intestinal enteroids to norovirus infection [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(47): 15974–15987.
- [15] SUN YQ, LIANG MA, ZHAO F, *et al.* Research progress on biological accumulation, detection and inactivation technologies of norovirus in oysters [J]. *Foods*, 2023, 12(21): 3891
- [16] YANG M, TONG L, WANG S, *et al.* Gut microbiota and transcriptomics reveal the effect of human norovirus bioaccumulation on oysters (*Crassostrea gigas*) [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e0016122.
- [17] 周德庆, 苏来金, 赵峰, 等. 诺如病毒在贝类中的富集特性与机制研究进展[J]. *病毒学报*, 2015, 31(3): 313–317.
ZHOU DQ, SU LJ, ZHAO F, *et al.* Research progress in norovirus bioaccumulation in shellfish [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2015, 31(3): 313–317.
- [18] SMITH FM, MAQSOOD R, SULLINS AR, *et al.* Seasonality of respiratory, enteric, and urinary viruses revealed by wastewater genomic surveillance [J]. *Mosphere*, 2024, 9(5): e0010524.
- [19] CAMPOS CJA, KERSHAW S, MORGAN OC, *et al.* Risk factors for norovirus contamination of shellfish water catchments in England and Wales [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 241(16): 318–324.
- [20] LE-GUYADER FS, LOISY F, ATMAR RL, *et al.* Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(6): 931–936.
- [21] MAALOUF H, ZAKHOUR M, LE PENDU J, *et al.* Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(16): 5621–5630.
- [22] 苑克磊, 侯查伟, 丁一, 等. 我国黄海浒苔绿潮暴发海域环境因子季节性变化及年际变化分析[J]. *广西科学院学报*, 2018, 34(3): 204–209.
FAN KL, HOU CW, DING Y, *et al.* Analysis of the seasonal and inter-annual changes of environmental factors in *Enteromorpha prolifera* green tide outbreak in the Yellow Sea [J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2018, 34(3): 204–209.
- [23] 刘慧, 马丽萍, 赵峰, 等. 长牡蛎类 HBGAs 的提取与组织分布以及温度和盐度对其表达的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(2): 236–243.
LIU H, MA LP, ZHAO F, *et al.* Extraction, tissue distribution and influence of temperature and salinity on HBGAs-like molecules in oyster [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(2): 236–243.
- [24] CHEN SF, ZHOU YQ, CHEN YR, *et al.* FASTP: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): 884–890.
- [25] KIM D, LANDMEAD B, SALZBERG SL, HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357–U121.
- [26] ROBERTS A, TRAPNELL C, DONAGHEY J, *et al.* Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias [J]. *Genome Biology*, 2011, 12(3): R22.
- [27] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- [28] 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[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 70–75.
JIANG W, YAO L, JIANG YH, *et al.* Molecular cloning and expression of *FUT2*-like gene in the oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 70–75.
- [29] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. 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.
- [30] THONGPRACHUM A, KHAMRIN P, MANEEKARN N, *et al.* Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: Prevalence, seasonality, and outbreak [J]. *Journal of Medical Virology*, 2016, 88(4): 551–570.
- [31] 翟梦滢, 汤巧雨, 李永红, 等. 气候要素对我国诺如病毒急性胃肠炎感染暴发的影响分析[J]. *环境卫生学杂志*, 2023, 13(3): 154–161.
ZHAI MY, TANG QY, LI YH, *et al.* Influence of climatic factors on the outbreaks of acute gastroenteritis caused by norovirus in China [J]. *Journal of Environmental Hygiene*, 2023, 13(3): 154–161.
- [32] FAN Z, MAO J, WANG Y, *et al.* Transcriptomic WGCNA analyses reveal endoplasmic reticulum response of *Patinopecten yessoensis* under acute heat stress [J]. *Aquaculture*, 2024, 589: 740938.
- [33] ZHANG X, ZHU H, YUAN J, *et al.* Diversity of heat shock proteins in response to various stressors in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2024, 584: 740647.
- [34] ACQUAFREDDA M, GUO X, MUNROE D. Transcriptomic response of the atlantic surfclam (*Spisula solidissima*) to acute heat stress [J]. *Marine Biotechnology*, 2024, 26(1): 149–168.
- [35] MA LP, SU LJ, LIU H, *et al.* Norovirus contamination and the glycosphingolipid biosynthesis pathway in Pacific oyster: A transcriptomics study [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 26–34.
- [36] 苏来金. 诺如病毒在贝类中的分布及与牡蛎类组织血型抗原结合机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
SU LJ. Distribution of norovirus in shellfish and the binding mechanism to HBGA-like molecules in oysters [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [37] 杨丽娟, 陈艳华. β 1,3-半乳糖基转移酶家族研究进展[J]. *中国现代医药杂志*, 2016, 18(8): 101–105.
YANG LJ, CHEN YH. Research progress on the β 1,3-galactosyltransferase family [J]. *Modern Medicine Journal of China*, 2016, 18(8): 101–105.
- [38] 教杨, 姚琳, 曲梦, 等. 牡蛎诺如病毒受体体合基因类 *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.
JIAO Y, YAO L, QU M, *et al.* Molecular cloning and expression of *FUT10*-like gene for norovirus receptor synthesis in *Crassostrea gigas* [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(1): 120–127.
- [39] GUI B, YAO L, QU M, *et al.* Cloning, expression, and functional characterization of *FUT1*, a key gene for histo-blood group antigens synthesis in *Crassostrea gigas* [J]. *CURR Issues Mol Biol*, 2023, 45(5): 4200–4213.
- [40] 桂彬彬, 曲梦, 张蔚然, 等. 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[J]. *南方水产科学*, 2023, 19(6): 150–157.
GUI BB, QU M, ZHANG WR, *et al.* Cloning, expression and identification of *CgFUT5* gene associated with Lewis antigen synthesis of oyster norovirus receptors [J]. *South China Fisheries Science*, 2023, 19(6): 150–157.
- [41] 史成颖, 李正国, 徐乾, 等. 茶树谷氨酰胺合成酶同源基因的克隆及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2017, 37(1): 40–47.
SHI CY, LI ZG, XU Q, *et al.* Clone and expression of gs homologue of tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, 37(1): 40–47.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 寇晓霞, 吴爱武, 范宏英. 广东省市售牡蛎中诺如病毒污染调查[J]. *现代预防医学*, 2018(24): 4439–4442.
KOU XX, WU AIW, FAN HY. Survey on Norovirus contamination in commercial oysters in Guangdong Province [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2018(24): 4439–4442.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)