

Development of SNP Markers for Norovirus Related FUT2 Gene in Oyster

Shouquan Yan¹, Lijun Song², Yulan Zhou³, Huasheng Jiang¹, Jiafeng Wang^{1*}

¹Stem Cell Research and Cellular Therapy Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong

²Reproductive Medicine Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong

³Clinical Medicine Research Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong

Email: *wangjiafeng_gz@163.com

Received: Jun. 25th, 2019; accepted: Jul. 9th, 2019; published: Jul. 16th, 2019

Abstract

Norovirus (NV) may cause acute gastroenteritis with highly contagious, an outbreak of NV infection involves a large number of people which can easily cause panic. However, the pathogenesis of NV infection is unclear by now. Epidemiological studies have found that oysters can specifically enrich NV and thus become the primary approach of food-borne infection of NV, while the mechanism of its biological enrichment process is also not clear. Studies have shown that human FUT2 polymorphism can affect NV recognition and infection. And experiments have discovered the similar NV recognition receptors in oysters. We found significant differences in NV enrichment between different oyster individuals, but it is not clear whether this difference is related to the polymorphism of FUT2 gene. This study intends to screen polymorphic sites of oyster FUT2 gene using high-throughput sequencing, and develop polymorphic markers of oyster FUT2 gene by high-resolution melting curve and fluorescence quantitative PCR. This study laid a foundation for exploring the mechanism of oyster enrichment NV. It also provides new insights into NV infection in humans and contributes to develop prevent and treat methods.

Keywords

Oyster, FUT2, SNP, Norovirus

牡蛎富集诺如病毒相关FUT2基因单核苷酸多态性标记开发

闫守泉¹, 宋丽君², 周玉兰³, 蒋华生¹, 王家丰^{1*}

¹广东医科大学附属医院, 干细胞研发与临床转化中心, 广东 湛江

*通讯作者。

²广东医科大学附属医院, 生殖医学中心, 广东 湛江

³广东医科大学附属医院, 临床研究中心, 广东 湛江

Email: wangjiafeng_gz@163.com

收稿日期: 2019年6月25日; 录用日期: 2019年7月9日; 发布日期: 2019年7月16日

摘要

诺如病毒(NV)可导致急性肠胃炎并具有高度的传染性, 一次爆发涉及人数众多, 极易引起恐慌。NV致病机理尚不明确, 流行病学研究发现牡蛎可特异性富集NV而成为食源感染NV最主要途径, 而其生物富集过程机理也不清楚。研究表明人体FUT2多态性会影响NV识别与感染, 实验表明牡蛎体内存在类似人体NV识别受体。我们研究发现不同牡蛎个体间NV富集存在显著差异, 该差异是否与FUT2多态性相关尚不清楚。本研究拟借助高通量测序等方法筛选牡蛎FUT2多态性位点, 然后利用高分辨率熔解曲线以及荧光定量PCR等技术开发、验证FUT2多态性标记。本研究为探索牡蛎富集NV过程机理奠定基础; 同时为进一步明确NV感染人体过程以及相关预防和治疗措施提供新思路。

关键词

牡蛎, FUT2基因, 单核苷酸多态性, 诺如病毒

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

食用海洋贝类尤其是牡蛎经常可引起具有高度传染性的急性肠胃炎, 表现为严重的腹泻、呕吐, 传染与传播速度极快。研究发现此类非细菌性急性肠胃炎是由诺如病毒(Norovirus, NV)感染引起的[1] [2] [3] [4], NV 又称诺瓦克样病毒(Norwalk-like viruses), 为单股正链 RNA 病毒, 属于杯状病毒科(Caliciviridae family)。NV 是一种重要的食源性病毒, 主要通过粪 - 口途径和人 - 人途径传播, 最常见感染途径是接触被污染的食物、水和病人[5]。贝类属于滤食性动物, 滤食的同时其消化道可以特异性富集随污水带来的NV, 导致其消化道病毒浓度高出生长环境的几十甚至上千倍[6]。美国 CDC (<http://www.cdc.gov/norovirus/>) 统计认为贝类是食源性 NV 摄入的主要来源。马丽萍等检测了我国黄、渤海区 7 个采集点 840 例不同贝类样本 NV 污染情况, 平均检出率为 13.33% (112/840), 其中牡蛎的检出率最高, 达到 19.35% (30/155) [7]。因此贝类特别是牡蛎(oyster)作为 NV 中间寄生体, 成为最常见的 NV 食源传播载体, 生吃或者食用没有彻底加热的牡蛎很容易引起 NV 感染[8] [9]。

研究证明 NV 与人类组织血型抗原(histo-blood group antigens, HBGAs)识别并以之为受体引发感染, 目前已经有 8 种特异性的 NV-HBGAs 结合模式已经被描述[10] [11] [12] [13]。HBGAs 主要的效用部分是其糖链结构, 其最主要的合成酶是由岩藻糖基转移酶(FUT)基因编码的[14]。人体中主要有 3 种 FUT 基因, 2 种 α -1,2 岩藻糖基转移酶 FUT1 (H 基因)和 FUT2 (Se 基因)可作用于前体链合成 H 抗原(即 O 抗原)。FUT3 (Le 基因)则参与 Lewis 血型抗原合成, 作用于 I 型/II 型链合成 Lea/x, 或者修饰 H1/2 抗原产生 Leb/y。研究发现 FUT2 基因突变导致相应的酶失活后可以导致“非分泌型”个体, “非分泌型”个体对 NV 有天然的免疫性, 不会被 NV 识别感染[15]。不同地域人群发现多种不同突变导致的“非分泌型”, 例如在 129 密码子发生的 se385

突变导致相应酶仅表现微弱活性，在 143 密码子处发生的 se428 突变则直接导致无酶活性[16] [17]；此外还有 se302, se571 以及 se778 等突变均能影响酶活性[18] [19]。目前，在人类 FUT2 基因中已经有超过 21 个不同的 SNP 位点被报道[20]，说明 *FUT* 基因的遗传多态性与 NV 识别与结合有极为密切的关系。

Tain 等发现 NV 能够特异性结合到牡蛎消化系统，并利用 ELISA 实验证实作为 NV 寄生体的牡蛎中存在 A-HBGAs 类似受体，牡蛎正是通过 HBGAs 类似受体与 NV 识别并选择性富集[21] [22]。刘帅帅等人[23]利用 ELISA 检测到牡蛎中同时存在 A-HBGAs 和 H-HBGAs。上述事实表明牡蛎富集 NV 与其体内 HBGAs 类似受体密切相关。此外，相同海域的相同地点的不同牡蛎个体对 NV 的识别和富集能力也存在明显差异，不易染毒的牡蛎中是否也存在类似人体“非分泌型”机制目前尚不明确。也尚未有描述牡蛎 *FUT2* 基因突变的报道。

如今，牡蛎基因组测序图谱已经发布[24]，我们在牡蛎基因组找到 *FUT2* 基因序列信息。此外，利用前期高通量转录组测序数据与基因组比对，发现 *FUT2* 基因包含有多个多态性位点。目前也没有牡蛎 *FUT2* 基因多态性开发验证的研究报道。本研究拟通过牡蛎转录组与基因组同源比对方法开发 *FUT2* 基因的多态性位点，为将来进一步研究 NV 的识别机制奠定良好基础。

2. 实验材料与方法

2.1. 牡蛎样本获取与核酸提取

从青岛以及湛江多个沿海潮间带收取牡蛎样本共计 60 个个体。牡蛎刀开壳后收取闭壳肌与外套膜等组织，用于转录组测序的样本置于液氮保存；用于突变位点筛选验证的样本先置于 60%乙醇水溶液中保存，并在取样后每隔 1 天分别更换 70%、80%、90%乙醇水溶液直至更换为无水乙醇，然后更换两次无水乙醇直至样本已经充分脱水后常温储存。

Table 1. Oyster samples used in this study and usage allocation

表 1. 项目使用的牡蛎样本及用途分配

样本组	来源	样本量	取样部位	储存	用途
转录组样本	QD	20			
	QH	20	闭壳肌、外套膜	液氮	高通量转录组测序 以及 <i>FUT</i> 基因克隆测序
	DL	20			
养殖群体	QD	20	闭壳肌、外套膜	无水乙醇	突变位点筛选、验证

QD: 青岛, QH: 秦皇岛, DL: 大连。China: 三组合并。

利用组织基因组 DNA 提取试剂盒(Promega Corp., Wisconsin, USA)提取基因组 DNA。利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量，并利用 Nano Drop 2000 (Thermo 美国)检测 DNA 浓度和 OD260/OD280 值。

2.2. 牡蛎 *FUT2* 基因克隆测序及其突变位点筛选

1、转录组高通量转录组测序：每组 20 个样本混合，共形成三个转录组混合样本(分别来自 QD, DL 和 QHD, 表 1)，利用多地区的多个个体混合 RNA 进行转录组测序以增加获得更全面的基因突变类型的几率，尽量减少遗漏等位基因频率很小的位点。混合样本转录组测序采用短序列 Illumina 测序方式，物种鉴定以及高通量转录组测序具体步骤流程参考前期试验方法[25]。

2、多序列比对与 *FUT2* 突变位点发掘：将克隆测序获得牡蛎 *FUT2* 基因序列数据、高通量测序获得的序列数据以及 3 个牡蛎转录组序列数据与基因组参考序列一起进行多序列比对筛选 SNP，筛选标准简

单表述如下:

- 1) 每个位点的测序深度不小于 20;
- 2) 最小等位基因在高通量测序中至少有 4 个序列/reads 覆盖到;
- 3) 鉴于基因组测序深度超过 150×, 因此, 若在所有测序 DNA 序列以及转录本中只存在一个等位基因但该等位基因与基因组序列不同, 认定为候选突变位点。

2.3. 引物设计与筛选

按照以下原则筛选候选 SNP 位点进行引物设计:

- 1) 在序列保守区域选择候选 SNP 位点。
- 2) 候选位点周围不存在另外的突变, 有足够的侧翼序列设计引物。
- 3) 扩增片段长度介于 40~100 bp 之间, 每个扩增子中仅包含一个候选位点。
- 4) 引物熔解温度设置为 50°C~60°C。
- 5) 尽量避免引物在目标位置外有错配位点, 同时避免引物二聚体。

使用 Primer Premier 5 设计引物, 所有引物均交由生工(上海生工生物)合成。利用 PCR 反应试剂盒 (TaKaRa, 大连) 进行 PCR 扩增实验, PCR 热循环如下: 95°C 预热 10 分钟, 然后运行 40 个温度循环, 每个循环包括 94°C 持续 30 s, Tm 持续 30 s, 72°C 持续 30 s; 最后运行后延伸 72°C 持续 10 min。用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物质量, 选取电泳条带单一, 扩增效率高的引物对进行后续实验。

2.4. 扩增片段 HRM 分析

分型引物经 PCR 扩增后添加 LCgreen 和高、低温内标后在 LS96 仪器(Idaho, USA) 上运行 HRM。温度变化速率设定为 0.1°C/s, 收集产物熔解过程 50°C~95°C 之间的荧光信号, 通过分析溶解曲线获得候选突变位点的等位基因信息。

3. 实验结果

3.1. 核酸提取与评价

基因组 DNA 提取后琼脂糖凝胶电泳检测发现 DNA 条带大小符合预期, 仅有少量未完全降解的 RNA, 但完整性良好, 经过 RNA 降解处理后符合 SNP 分型要求。

3.2. 转录组测序结果

转录组测序共计产生 163.7 M 测序读长(reads), 与现有牡蛎基因组比对后发现有 127.4 M reads 能够比对到基因组, 比对比例达 77.8%。三个转录组测序数据分布均匀, 与基因组的对比率分别均高于 76%, 测序质量良好(见表 2)。

Table 2. Transcriptome sequencing and mapping to the oyster genome

表 2. 转录组测序与 MAP 到牡蛎基因组情况

转录组*	reads 数(M)	能比对到基因组的 reads 数(M)	Map 率(%)
QD	59.5	47.0	79.1
QH	53.9	41.9	77.7
DL	50.3	38.5	76.4
China	163.7	127.4	77.8

*QD: 青岛, QH: 秦皇岛, DL: 大连。China: 三组合并。

3.3. FUT2 基因序列确定

以现有牡蛎基因组序列信息作为参考,利用转录组数据比对到基因组 FUT2 基因序列并通过多序列片段比对分析筛选 SNP 位点。序列比对共发现有 14 条序列符合 FUT2 基因同源比对,这些序列存在相互交叉重叠,分别对应 1~7 条转录本。其中有两条序列(LOC105330520, LOC105332210)对应最多的转录本,分别有 7 条和 5 条转录本,且不同转录本间的序列同源性最好。为了保证开发的 SNP 标记有良好的保守型,我们利用这两条长度最长,包含转录本最多的两条序列(LOC105330520, LOC105332210)作为参考来开发 SNP 标记。

3.4. SNP 标记开发

按照前述原则在筛选出 8 个位点,其中包括 LOC105330520 序列上 2 个位点,LOC105332210 序列上 6 个位点,8 个位点均分布在两条序列的后半段序列保守区。大多数位点突变类型为 R 类型(A/G),共有 5 个 R 突变位点,另外有两个 S 类型(C/G)突变一个 Y 类型(T/C)突变(表 3)。针对性设计高分辨率熔解曲线(HRM)引物,初步引物筛选发现均符合 HRM 要求。以 20 个养殖群体样本为模板,所有引物经过 PCR 扩增反应后运行 HRM,有 5 个位点能够获得稳定溶解曲线分型结果(图 1)。

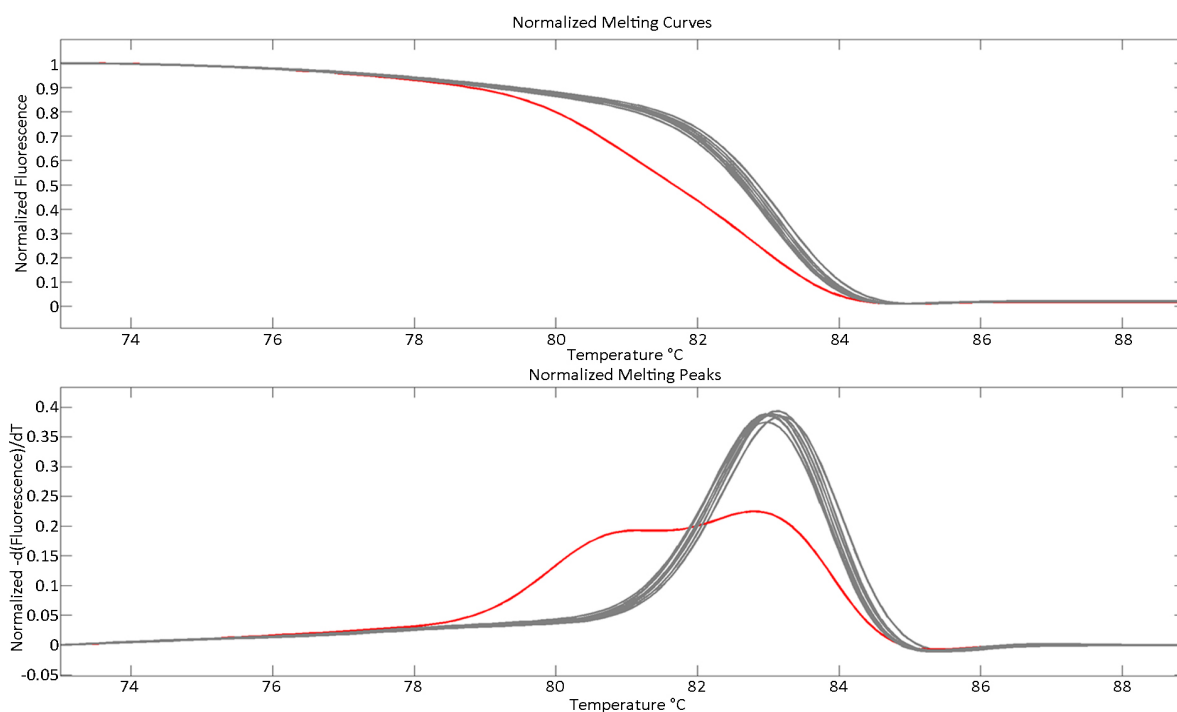


Figure 1. HRM melting curves

图 1. HRM 溶解曲线图

Table 3. Primer information for SNPs developed in oyster FUT2 gene

表 3. FUT2 基因 SNP 位点开发引物信息

转录本	引物序列	类型	位置
LOC105330520	5' CTCCTCCCAGTTCCTCATCG 3'	R	736
	5' GTTCTCGGACCTCGTCTTCC 3'		
	5' AAACCGAGGAGAACAGATTG 3'	S	616
	5' TGAGGAACTGGGAGGAGATA 3'		

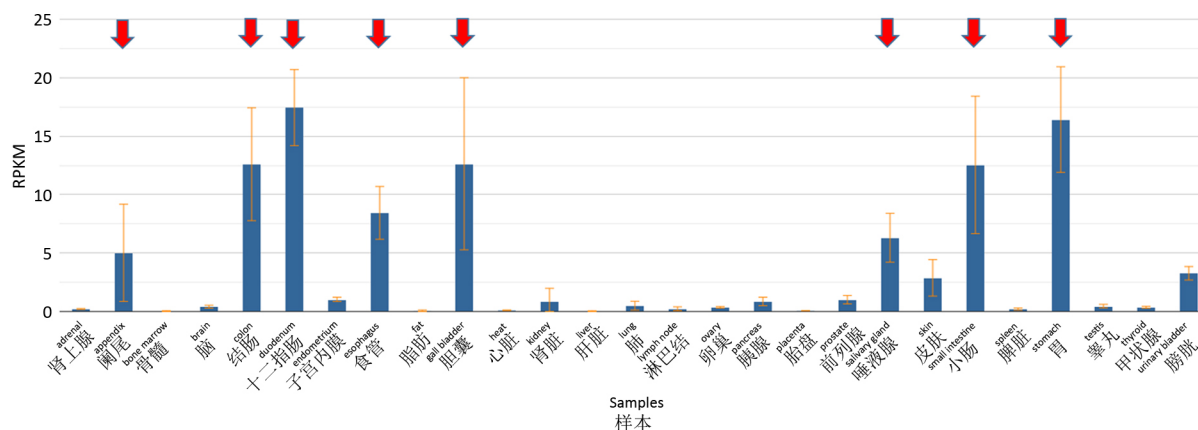
Continued

LOC105332210		
5' GAAATTC	AAGGACGCTTAG 3'	R 654
5' AGGAACACG	TACTCCATCAT 3'	
5' TGGAGTACG	TGTTCTCTAT 3'	
5' ACGGGATACA	AAATGTTTCAT 3'	R 688
5' TGGGGACTTT	TCTTACGATGA 3'	
5' AATCTCACG	TTTTGTTGG 3'	S 865
5' GGATGGATG	GCGCAAGG 3'	
5' CCGGGATAGA	AAAAATCATCAGTA 3'	R 1379
5' TACTCGACAG	GAAATTCACC 3'	
5' GAAAGCAAAG	CTATGTCCTC 3'	Y 1285
5' ATTTTCAGAC	CTCAATCCGA 3'	
5' TTATTCATTG	GAATCCATC 3'	R 1432

注：粗体字表示能够获得稳定 HRM 分型结果的引物对。

4. 讨论与结论

目前为止，由于缺乏成熟的细胞培养系统和动物模型，对 NV 的复制、组装、免疫特性等方面的研究进展缓慢，NV 感染人类引发疾病的具体机制仍然尚未明确，目前尚无疫苗或相关特效药物，主要以预防为主。人类 FUT2 基因表达具有显著的组织特异性，研究表明在目前已知的人体组织中与消化系统相关的组织中 FUT2 基因表达量显著高于其他组织(图 2)；而牡蛎可特异性富集 NV，因此食用牡蛎成为人类感染 NV 重要的风险因素。作为研究 NV 感染的重要部分，从传播途径入手，研究遗传因素对 NV 在贝类寄生体内识别和生物富集过程的影响，有望利用遗传学手段开发能减少或阻断 NV 通过贝类传播的有效方法，也为 NV 感染的预防和治疗提供新思路。



RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads): 代表每百万 reads 中来自于某基因每千碱基长度的 reads 数,用来衡量表达量。

Figure 2. Diagram of human FUT2 gene expression in different tissues in vivo (from NCBI)

图 2. 人 FUT2 基因在体内各组织样本中的表达量示意图(来源于 NCBI)

牡蛎 FUT2 基因相关序列偏多较多，与人类 FUT2 基因同源性较差。之前有学者通过克隆获得太平洋牡蛎(*C. gigas*)FUT2 基因并提交 NCBI 数据库[26]，在牡蛎基因组公布以后发现之前获得的牡蛎 FUT2

基因序列同牡蛎基因组 FUT3 序列同源性高达 98%，而与牡蛎 FUT2 的同源性仅为 36%，之前克隆的 FUT2 基因实际上应该是牡蛎 FUT3 基因。此外，目前尚无研究描述牡蛎 FUT 基因多态性相关报道。

牡蛎基因组个体间单核苷酸多态性差异往往表现的异常高，个体间差异达到 2.3% [24]。我们比对分析后发现两种最主要的 FUT2 序列，两条序列在不同个体间分别都具有严格的保守性。我们推测可能 FUT2 基因在牡蛎中发生基因扩张现象，执行更加细致的生物学功能，这也从侧面反映 FUT2 基因在牡蛎识别 NV 中可能发挥重要作用。

总之，我们在 FUT2 保守区开发 5 个 FUT2 基因转录区 SNP 标记位点。我们开发的标记均在转录区内，可能会直接影响 FUT2 基因编码蛋白的功能，也可能影响其基因的转录过程，从而影响牡蛎对 NV 的识别和富集作用，为进一步研究 NV 在生物体内的作用机制奠定良好基础。对进一步研究 NV 感染人体机理以及相应疫苗和药物的开发均有重要意义。

基金项目

本研究受到以下基金项目资助：国家自然科学基金(81600445)；广东省医学科学技术研究基金(A2016522)；广东医科大学科研基金(M2017009)；广东医科大学附属医院博士基金(BJ201512)。

参考文献

- [1] Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S.H., Lee, D. and Vinjé, J. (2014) Genotypic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 147-155. <https://doi.org/10.1128/JCM.02680-13>
- [2] Jung, S., Hwang, B.M., Jung, H.J., et al. (2017) Emergence of Norovirus GII.17-Associated Outbreak and Sporadic Cases in Korea from 2014 to 2015. *Osong Public Health & Research Perspectives*, **8**, 86. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.1.12>
- [3] Niendorf, S., Jacobsen, S., Faber, M., et al. (2017) Steep Rise in Norovirus Cases and Emergence of a New Recombinant Strain GII.P16-GII.2, Germany, Winter 2016. *Eurosurveillance*, **22**, 26. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30447>
- [4] Kwok, K., Niendorf, S., Lee, N., et al. (2017) Increased Detection of Emergent Recombinant Norovirus GII.P16-GII.2 Strains in Young Adults, Hong Kong, China, 2016-2017. *Emerging Infectious Diseases*, **23**, 1852-1855. <https://doi.org/10.3201/eid2311.170561>
- [5] Kittigul, L., Thamjaroen, A., Chiawchan, S., et al. (2016) Prevalence and Molecular Genotyping of Noroviruses in Market Oysters, Mussels, and Cockles in Bangkok, Thailand. *Food & Environmental Virology*, **8**, 133-140. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9228-6>
- [6] Lees, D. (2000) Viruses and Bivalve Shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, **59**, 81-116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00248-8)
- [7] Ma, L.P., Zhao, F., Yao, L., Li, X.G., Zhou, D.Q. and Zhang, R.L. (2013) The Presence of Genogroup II Norovirus in Retail Shellfish from Seven Coastal Cities in China. *Food and Environmental Virology*, **5**, 81-86. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9102-8>
- [8] 苏来金. 贝类中诺如病毒几种检测方法的研究[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [9] Alfano-Sobsey, E., Sweat, D., Hall, A., Breedlove, F., Rodriguez, R., Greene, S., Ledford, S.L., et al. (2012) Norovirus Outbreak Associated with Undercooked Oysters and Secondary Household Transmission. *Epidemiology and Infection*, **140**, 276-282. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000665>
- [10] Huang, P., Farkas, T., Marionneau, S., Zhong, W., Ruvoën-Clouet, N., Morrow, A.L., Jiang, X., et al. (2003) Noroviruses Bind to Human ABO, Lewis, and Secretor Histo-Blood Group Antigens: Identification of 4 Distinct Strain-Specific Patterns. *Journal of Infectious Diseases*, **188**, 19-31. <https://doi.org/10.1086/375742>
- [11] Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A.L. and Jiang, X. (2005) 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. *Journal of Virology*, **79**, 6714-6722. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005>
- [12] Harrington, P.R., Lindesmith, L., Yount, B., Moe, C.L. and Baric, R.S. (2002) Binding of Norwalk Virus-Like Particles to ABH Histo-Blood Group Antigens Is Blocked by Antisera from Infected Human Volunteers or Experimentally

- Vaccinated Mice. *Journal of Virology*, **76**, 12335-12343. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12335-12343.2002>
- [13] Harrington, P.R., Vinjé, J., Moe, C.L. and Baric, R.S. (2004) Norovirus Capture with Histo-Blood Group Antigens Reveals Novel Virus-Ligand Interactions. *Journal of Virology*, **78**, 3035-3045. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.6.3035-3045.2004>
- [14] Tan, M. and Jiang, X. (2005) Norovirus and Its Histo-Blood Group Antigen Receptors: An Answer to a Historical Puzzle. *Trends in Microbiology*, **13**, 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.004>
- [15] Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Baric, R., *et al.* (2003) Human Susceptibility and Resistance to Norwalk Virus Infection. *Nature Medicine*, **9**, 548-553. <https://doi.org/10.1038/nm860>
- [16] Thorven, M., Grahn, A., Hedlund, K.O., *et al.* (2005) A Homozygous Nonsense Mutation (428G->A) in the Human Secretor (FUT2) Gene Provides Resistance to Symptomatic Norovirus (GGII) Infections. *Journal of Virology*, **79**, 15351-15355. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15351-15355.2005>
- [17] Carlsson, B., Kindberg, E., Buesa, J., *et al.* (2009) The G428A Nonsense Mutation in FUT2 Provides Strong But Not Absolute Protection against Symptomatic GII.4 Norovirus Infection. *PLoS ONE*, **4**, e5593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005593>
- [18] Ferrer-Admetlla, A., Sikora, M., Laayouni, H., Esteve, A., Roubinet, F., Blancher, A., Casals, F., *et al.* (2009) A Natural History of FUT2 Polymorphism in Humans. *Molecular Biology and Evolution*, **26**, 1993-2003. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp108>
- [19] Currier, R.L., Payne, D.C., Staat, M.A., *et al.* (2015) Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. *Clinical Infectious Diseases*, **60**, 1631-1638. <https://doi.org/10.1093/cid/civ165>
- [20] Koda, Y., Tachida, H., Pang, H., Liu, Y., Soejima, M., Ghaderi, A.A., Kimura, H., *et al.* (2001) Contrasting Patterns of Polymorphisms at the ABO-Secretor Gene (FUT2) and Plasma α (1, 3) Fucosyltransferase Gene (FUT6) in Human Populations. *Genetics*, **158**, 747-756.
- [21] Tian, P., Bates, A.H., Jensen, H.M. and Mandrell, R.E. (2006) Norovirus Binds to Blood Group A-Like Antigens in Oyster Gastrointestinal Cells. *Letters in Applied Microbiology*, **43**, 645-651. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02010.x>
- [22] Tian, P., Engelbrektson, A.L., Jiang, X., Zhong, W. and Mandrell, R.E. (2007) Norovirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens on Gastrointestinal Cells of Clams, Mussels, and Oysters: A Possible Mechanism of Bioaccumulation. *Journal of Food Protection*, **70**, 2140-2147. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2140>
- [23] 刘帅帅, 姚琳, 马丽萍, 周德庆, 赵峰. 贝类中3种组织血型抗原 elisa 检测方法的建立与分型[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 211-216.
- [24] Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., *et al.* (2012) The Oyster Genome Reveals Stress Adaptation and Complexity of Shell Formation. *Nature*, **490**, 49-54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>
- [25] Wang, J., Qi, H., Li, L., Que, H., Wang, D. and Zhang, G. (2015) Discovery and Validation of Genic Single Nucleotide Polymorphisms in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Resources*, **15**, 123-135. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12278>
- [26] 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(5): 70-75.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询; 或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8976, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjbm@hanspub.org