

网络出版时间:2012-03-16 11:45

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120316.1145.001.html

家蚕 GSK3 α 氨基酸序列分析及其 mRNA 转录水平研究

张 瑜¹, 李 京², 杜孟芳²

(1 河南内乡蚕业生产办公室, 河南 内乡 474350; 2 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002)

【摘 要】 **【目的】** 对家蚕(*Bombyx mori*)糖原合成酶激酶 3 α (GSK3 α)蛋白的氨基酸序列进行分析,并检测家蚕不同发育时期及蜕皮激素、饥饿处理下,GSK3 α 基因 mRNA 转录水平的变化。**【方法】** 以家蚕为供试材料,采用 RT-PCR 和荧光定量 PCR 方法,研究家蚕 GSK3 α 在不同发育期的表达和转录情况,及激素和饥饿处理对其转录的影响。**【结果】** 家蚕 GSK3 α 基因由 2 个外显子和 1 个内含子构成,其中内含子长度为 1 411 bp,预测家蚕 GSK3 α 蛋白质分子质量为 33.78 ku,等电点为 7.61。氨基酸系统进化树和序列多重联配分析结果表明,家蚕 GSK3 α 与所选几种昆虫 GSK3 α 的序列一致性较高(79%~91%)。家蚕 GSK3 α mRNA 在幼虫取食期转录水平较高,在蜕皮期转录水平较低。在注射后 6 h 内,蜕皮激素对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 的转录无诱导作用,但在注射 12~24 h 有较强的诱导作用,而且在注射 12 h 时诱导活性达到最高,之后逐渐降低。饥饿处理对家蚕 GSK3 α mRNA 的转录水平影响较小。**【结论】** 家蚕 GSK3 α 在昆虫的进化过程中是比较保守的,其表达受到蜕皮激素的调控,饥饿处理对其转录水平影响较小。

【关键词】 家蚕;糖原合成酶激酶;序列分析

【中图分类号】 S881.2⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)04-0025-06

Amino acid sequence analysis and study on mRNA transcription level of *Bombyx mori* glycogen synthase kinase 3 α

ZHANG Yu¹, LI Jing², DU Meng-fang²

(1 The Office of Sericulture, Neixiang, He'nan 474350, China;

2 College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

Abstract: **【Objective】** The amino acid sequence of *Bombyx mori* glycogen synthase kinase 3 α (BmGSK3 α) was analyzed in this study. The mRNA transcription level of BmGSK3 α was further studied in different developed stages and after molting hormone and starvation treatments. **【Method】** Temporal expression profiles of BmGSK3 α , effects of hormone and starvation treatment on BmGSK3 α transcript were investigated by using Real-time PCR methods. **【Result】** The sequence analysis of BmGSK3 α found that BmGSK3 α gene consists of 2 exons and one intron of 1 411 bp in size. The predicted molecular weight and pI of BmGSK3 α are 33.78 ku and 7.61 respectively. Amino acid sequence alignments indicated that BmGSK3 α shared high identity with other reported GSK proteins (from 79% to 91%). The expression level of BmGSK3 α increased in larva feeding stage and decreased in molting stage. BmGSK3 α transcript had no significant difference after 6 h treatment of 20E and increased after 12 h of 20E treatment then decreased grad-

* [收稿日期] 2011-10-09

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011B180021)

[作者简介] 张 瑜(1971—),男,河南内乡人,农艺师,主要从事农业技术推广研究。E-mail:anshiheng@sohu.com

[通信作者] 杜孟芳(1975—),女,河南鄢陵人,讲师,博士,主要从事昆虫生理生化和分子生物学研究。

E-mail:dumengfang@sohu.com

ually. Further starvation treatment found that starvation had limited influence on *BmGSK3 α* expression.

【Conclusion】 *BmGSK3 α* is conserved in evolution process of insects. The expression level of *BmGSK3 α* is regulated by 20E and starvation has limited influence on *BmGSK3 α* expression.

Key words: *Bombyx mori*; glycogen synthase kinase; sequence analysis

糖原合成酶激酶 3(Glycogen synthase kinase 3, GSK3) 又称细胞周期蛋白依赖性激酶 5(Cyclin-dependent kinase 5), 是一种重要的丝/苏氨酸磷酸激酶, 可使糖原合成酶磷酸化而抑制糖原合成, 是糖代谢的主要限速酶^[1]。近年来的大量研究发现, GSK3 除参与糖代谢外, 还广泛参与细胞内其他生理过程, 包括蛋白质的合成、细胞的增殖和分化等。GSK3 存在 GSK3 α 和 GSK3 β 2 种亚型, 目前对其的研究主要集中在 GSK3 β 上。GSK3 β 在体内的调节机制很复杂, 主要的调节方式包括磷酸化调节、蛋白复合体形成和亚细胞定位。可被 GSK3 β 磷酸化的蛋白有 40 多种, 包括酶、结构蛋白和转录因子等^[2]。GSK3 α 和 GSK3 β 有相似的结构和底物, 其编码基因的同源性为 85%, 催化结构域同源性高达 90% 以上, 分别定位于 19q13.2 和 3q13.3^[3-4]。GSK3 α 和 GSK3 β N 末端 Ser-21 的磷酸化受到蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB)、蛋白激酶 A (Protein kinase A, PKA) 和蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 途径的调控^[5], 磷酸化的 GSK3 α 失去活性^[6]。相反, GSK3 β Tyr-216 磷酸化后可引起其活性增强^[7]。

相对于 GSK3 β , GSK3 α 的研究较为滞后, 在昆虫中更是鲜有报道。更为重要的是, 在哺乳动物和昆虫中, 胰岛素是促进糖原合成的主要激素, 但最近的研究表明, 昆虫蜕皮激素也参与脂肪和糖的代谢^[8-9], 作为哺乳动物所没有的一种激素, 昆虫的蜕皮激素到底如何影响昆虫 GSK3 α 的表达, 到目前为止还未见相关报道。为此, 本试验以家蚕 (*Bombyx mori*) 为对象, 对其 GSK3 α 进行分析, 并采用 RT-PCR 和荧光定量 PCR 方法, 研究了 GSK3 α 基因 mRNA 在不同发育期的转录情况, 及激素和饥饿处理对其转录的影响, 以期为进一步深入研究该基因对脂肪体糖代谢的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试家蚕品种为“秋风”×“白玉”, 在室内以人工饲料饲养。总 RNA 抽提试剂 (RNAiso Reagent) 购自 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒 (RevertAid™

First Strand cDNA Synthesis Kit) 及荧光定量试剂盒 (SYBR Primer Script RT-PCR Kit) 购自大连宝生物公司, 蜕皮激素 (20-Hydroxyecdysone, 20E) 为 Sigma 公司产品。本研究使用的其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 家蚕 GSK3 α 基因及其编码蛋白的氨基酸序列分析

从家蚕基因组数据库 (<http://www.silkbdb.org/silksoft/blast2-simple.html>) 中得到 GSK3 α 的氨基酸序列, 利用蛋白质数据库 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 预测家蚕 GSK3 α 蛋白的等电点、分子质量及氨基酸组成等序列特征。同源搜索采用 NCBI 中的 BLAST 工具进行, 对所获得的同源序列采用 MAGE4.0 软件构建系统进化树, 并选用 ClustalW2 和 Genedoc 软件进行序列多重联配。

1.3 家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 的转录分析

以核糖体基因 (*rps49*) 为内参基因, 对 GSK3 α 基因 mRNA 的转录水平进行分析。

1.3.1 引物设计与合成 利用 Primer Premier 5.0 软件设计从家蚕基因组获得的 GSK3 α 基因和内参基因 *rps49* 的引物。家蚕 GSK3 α 基因的正向引物为: 5'-AAATCGGTGAAGGAACCTATG-3', 反向引物为: 5'-CCAATACATCGTAAAGTCG-3'; 内参 *rps49* 基因的正向引物为: 5'-CAGGCGGTTC AAGG GTCAATAC-3', 反向引物为: 5'-TGCTGGGCTCT TTCCACGA-3'。引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.3.2 不同发育时期家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 的转录情况 分别选取龄期为幼虫 4 龄 1~3 d、5 龄蜕皮期、5 龄 1~7 d、游走期、蛹期 1~2 d 的家蚕, 按照 RNAiso Reagent 说明书提取脂肪体总 RNA。每个时期共取 10 头家蚕的脂肪体, 提取的总 RNA 用 DNase I 处理, 消除残留的 DNA 污染。用紫外分光光度计 (Thermo, USA) 检测 RNA 的纯度及含量。参照反转录试剂盒说明书, 将提取的家蚕 RNA 反转录为第 1 链 cDNA, -20℃ 保存。以 cDNA 第 1 链为模板, 采用荧光定量 PCR 检测不同发育时期家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 的转录水平。PCR 反应体

系为:SYBR premix (2 $\times$) 12.5 μ L, 正向引物(5 μ mol/L)1 μ L,反向引物(5 μ mol/L)1 μ L,cDNA 模板 1 μ L,最后加双蒸水至 25 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s;95 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,68 $^{\circ}$ C 20 s,共 40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,95 $^{\circ}$ C 15 s,用于记录溶解曲线。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[10]计算。

1.3.3 蜕皮激素处理对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 转录水平的影响 给 5 龄 2 d 家蚕幼虫注射蜕皮激素(20E),剂量为 100 ng/头,以注射体积分数 0.5% 乙醇为对照,分别于注射后 6,12,24 和 48 h 取试验组及对照组幼虫脂肪体提取总 RNA,反转录与荧光定量 PCR 方法同 1.3.2。

1.3.4 饥饿处理对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 转录水平的影响 对 5 龄 2 d 的家蚕幼虫进行饥饿处

理,处理时间分别为 6,12,24 和 48 h,随后提取幼虫脂肪体进行总 RNA 提取,反转录与荧光定量 PCR 方法同 1.3.2。

1.3.5 统计方法 荧光定量 PCR 重复 3 次,相对转录水平利用 t 检验进行分析。

2 结果与分析

2.1 家蚕 GSK3 α 基因及其编码蛋白的氨基酸序列

对家蚕 GSK3 α 基因进行分析,结果表明,该基因 DNA 由 2 个外显子和 1 个内含子构成,其中内含子长度为 1 411 bp(图 1)。ExPASy 分析显示,该基因编码蛋白预测分子质量为 33.78 ku,等电点为 7.61,分子式为 C₁₅₂₄ H₂₄₀₅ N₄₁₁ O₄₃₂ S₁₂,酸性氨基酸(Asp+Glu)占 39%,碱性氨基酸(Arg+Lys)占 40%,蛋白质不稳定指数为 26.28%,属稳定蛋白。

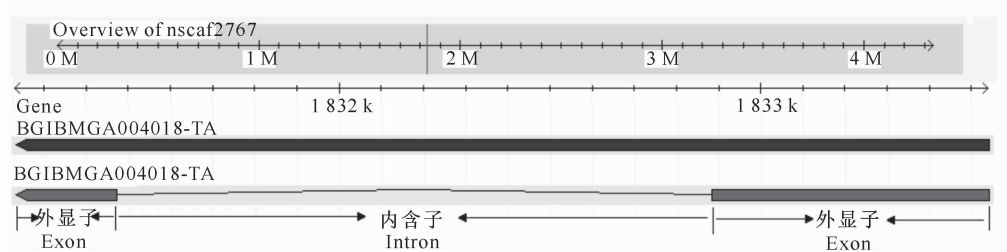


图 1 家蚕 GSK3 α 基因的定位
Fig. 1 Localization of *B. mori* GSK3 α

2.2 家蚕 GSK3 α 氨基酸序列的系统进化树与多重联配

图 2 结果表明,印度跳蚁首先与丽蝇蛹集金小蜂聚在一起,后与意蜂聚在一起;埃及伊蚊先与热带家蚊聚在一起,后与黑腹果蝇聚在一起;所选的几种昆虫中仅家蚕为鳞翅目昆虫,家蚕虽与赤拟谷盗首先聚集且序列一致性较高,但进化距离较远。图 3 结果显示,家蚕 GSK3 α 氨基酸序列(GenBank 登录号:GQ250576.1)与赤拟谷盗(GenBank 登录号:EFA06801.1)的一致性最高,达 91%,与印度跳蚁

(GenBank 登录号:EFN80780.1)、意蜂(GenBank 登录号:NP_001161897.1)、丽蝇蛹集金小蜂(GenBank 登录号:NP_001161184.1)、埃及伊蚊(GenBank 登录号:XP_001659377.1)、热带家蚊(GenBank 登录号:XP_001841735.1)和豌豆蚜(GenBank 登录号:NP_001161896.1)的一致性均在 80% 以上,与果蝇 GSK3 α (GenBank 登录号:NP_477080.1)的一致性也达到 79%。以上结果均与形态分类结果相符。

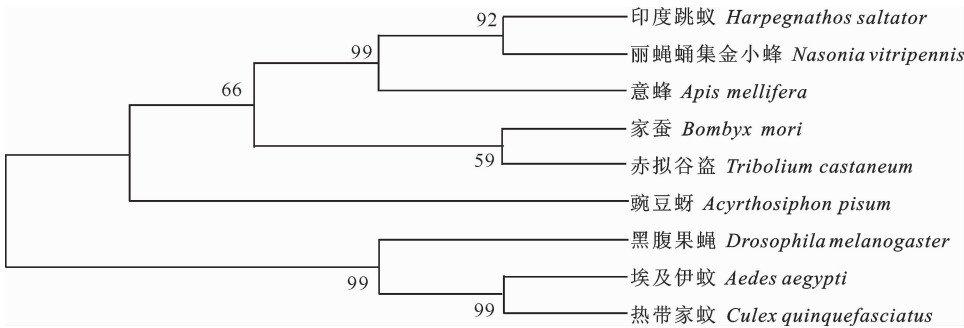


图 2 家蚕 GSK3 α 氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of *B. mori* GSK3 α and other reported insects

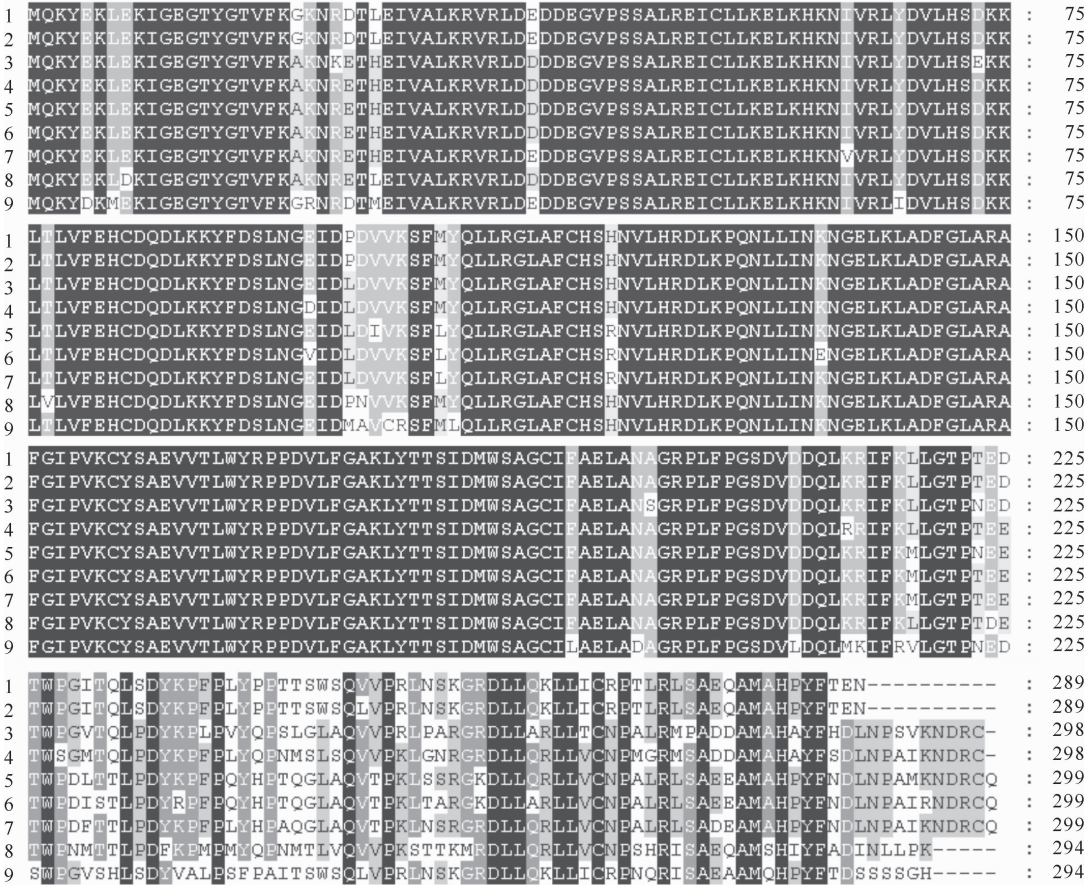


图 3 家蚕 GSK3 α 与其他昆虫已知 GSK3 α 氨基酸序列的多重联配分析

黑色阴影表示一致性 100%，灰色表示一致性 80%，白色表示一致性小于 80%

1. 埃及伊蚊; 2. 热带家蚊; 3. 家蚕; 4. 赤拟谷盗; 5. 印度跳蚁; 6. 丽蝇蝇集金小蜂; 7. 意蜂; 8. 豌豆蚜; 9. 黑腹果蝇

Fig. 3 Multiple alignments of amino acid sequence of *B. mori* GSK3 α and other insects

100% identity are in black box, 80% identity in grey box and identity below 80% in white box;

1. *Aedes aegypti*; 2. *Culex quinquefasciatus*; 3. *Bombyx mori*; 4. *Tribolium castaneum*; 5. *Harpegnathos saltator*;
6. *Nasonia vitripennis*; 7. *Apis mellifera*; 8. *Acyrtosiphon pisum*; 9. *Drosophila melanogaster*

2.3 不同发育期家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 转录水平
的变异

GSK3 α mRNA 的转录水平相对较高, 在 5 龄蜕皮期转录水平较低, 在游走期最低, 在蛹期转录水平又明显上升。

图 4 表明, 在 4 龄和 5 龄家蚕幼虫取食期, 其

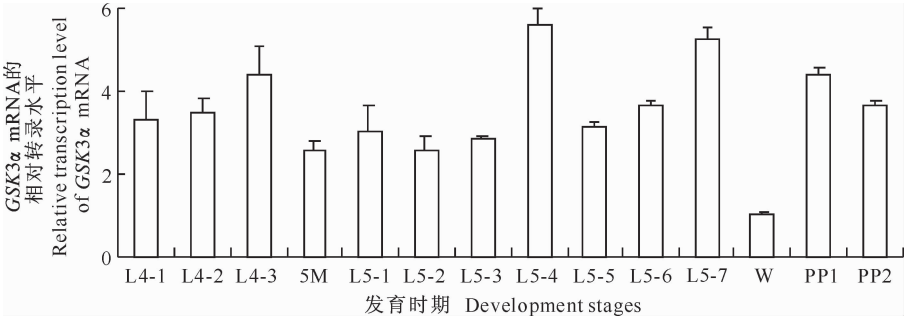


图 4 不同发育期家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 的转录水平

L4-1—L4-3. 分别为 4 龄 1, 2, 3 d; 5M. 5 龄蜕皮期; L5-1—L5-7. 分别为 5 龄 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d;

W. 游走期; PP1, PP2. 分别为蛹期第 1 天和第 2 天

Fig. 4 Expression level of *B. mori* GSK3 α mRNA in different developmental stages

L4-1—L4-3. 1, 2, 3 d larve of 4th instar; 5M. Molting; L5-1—L5-7. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d larve of 5th instar;

W. Wandering larvae; PP1, PP2. 1 d and 2 d pupa

2.4 蜕皮激素诱导对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 转录水平的影响

图 5 结果表明,在注射蜕皮激素后 6 h 内,其对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 的转录无诱导作用,但在注射 12~24 h 有较强的诱导作用,注射蜕皮激素家蚕的 GSK3 α mRNA 转录水平极显著高于对照组,并且

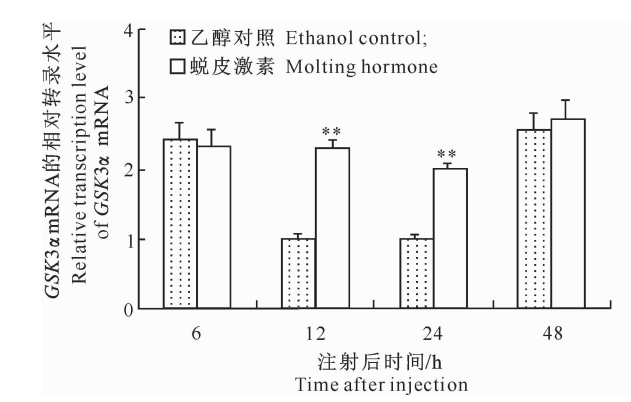


图 5 蜕皮激素对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 转录水平的影响
* *. 与对照组差异极显著($P<0.01$)

Fig. 5 Effect of molting hormone on transcription level of *B. mori* GSK3 α mRNA
Compared with control, * * means extremely significant difference ($P<0.01$)

3 讨 论

作为一种多功能的丝/苏氨酸类激酶,GSK3 在真核生物中普遍存在,其能使多种内源性底物(包括代谢途径中的蛋白、细胞结构蛋白和转录因子等)磷酸化,如能使糖原合成酶磷酸化,从而抑制其活性,达到抑制糖原合成的作用。除此之外,GSK3 α 能磷酸化多种转录因子,如 c-Jun、CAAT/增强子结合蛋白等,从而降低它们与 DNA 的结合活性,调节相关基因的转录及表达。在人类某些疾病,如 2 型糖尿病、阿尔茨海默病和其他神经退行性疾病的发生发展中,GSK3 的活性会异常升高,是胰岛素信号通路中的一个重要的调节因子^[11]。昆虫中 GSK3 α 相对比较保守,在本研究中,家蚕与其他昆虫 GSK3 α 氨基酸序列的一致性较高,即使与果蝇的 GSK3 α 也高达 79%。这种保守性也揭示了 GSK3 α 基因在进化过程中的保守性。

GSK3 α 的时序表达结果说明,家蚕幼虫在取食期 GSK3 α mRNA 表达量相对较高,在蜕皮期表达量较低,在幼虫游走期表达量最低。GSK3 α 的表达模式与家蚕蜕皮激素滴度有着相似的变化规律,说明家蚕 GSK3 α 与昆虫的蜕皮有关,可能也受到蜕皮激素的直接或者间接调控。进一步用蜕皮激素直接

在注射 12 h 时诱导活性达到最高,之后逐渐降低。

2.5 饥饿处理对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 转录水平的影响

由图 6 可以看出,饥饿处理对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 的转录水平影响较小,12 h 内家蚕 GSK3 α mRNA 的转录水平有所下降,但随后又上升。

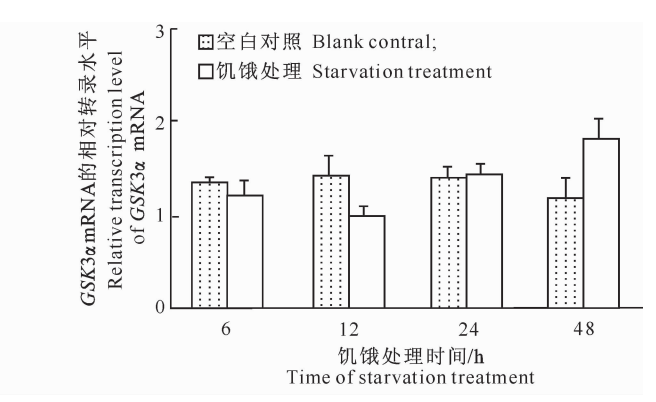


图 6 饥饿处理对家蚕 GSK3 α 基因 mRNA 转录水平的影响

Fig. 6 Effect of starvation on transcription level of *B. mori* GSK3 α mRNA

处理家蚕的试验也证实了这一结论。昆虫在蜕皮过程中,其脂肪体代谢也与蜕皮激素有关。在果蝇蜕皮期,特别是从幼虫到蛹的变态过程中,一些与脂肪代谢相关基因的表达依赖于蜕皮激素受体 ECR 的表达模式^[12],说明脂肪代谢过程也受到蜕皮激素的调控,即使这种调控并非直接的调控。有研究表明,蜕皮激素通过 2 种不同途径调控昆虫脂肪体的能量代谢,一种是通过一系列转录因子的表达阻遏糖酵解;另一种是通过缓慢减少食物消耗而诱发饥饿,进而增加脂肪消耗^[8-9]。这些发现与本试验结果相符,即家蚕 GSK3 α 的表达受到了蜕皮激素的调控。昆虫蜕皮前在高浓度的 GSK3 α 作用下,糖原合成酶磷酸化而失去活性,糖原合成减少,使虫进入不食、少动、能量消耗减少的蜕皮阶段。

最近的研究结果表明,蜕皮激素与其受体结合后诱导相应转录因子表达,这些转录因子通过多种信号途径,激活凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 的表达,进而启动半胱氨酸蛋白酶 caspase 途径,引起细胞凋亡^[13-14]。Spokoini 等^[14]指出,GSK3 α 在调节哺乳动物糖皮质激素诱导细胞凋亡的过程中发挥着重要作用。由此推测 GSK3 α 可能参与昆虫的细胞凋亡过程。本试验中蜕皮激素也诱导 GSK3 α 转录水平的表达,是否家蚕的 GSK3 α 也像哺乳动物中的一样可能

参与细胞的凋亡过程,还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Embi N, Rylatt D B, Cohen P, et al. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle [J]. *Eur J Biochem*, 1980, 107: 519-527.
 - [2] Woodgett J R, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5) [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1984, 788: 339-347.
 - [3] Woodgett J R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A [J]. *EMBO*, 1990, 9: 2431-2438.
 - [4] Shaw P C, Davies A F, Lau K F, et al. Isolation and chromosomal mapping of human glycogen synthase kinase-3 α and -3 β encoding genes [J]. *Genome*, 1998, 41: 720-727.
 - [5] Bragado M J, Aparicio I M, Gil M C, et al. Protein kinases A and C and phosphatidylinositol 3 kinase regulate glycogen synthase kinase-3A serine 21 phosphorylation in boar spermatozoa [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109: 65-73.
 - [6] Doble B W, Woodgett J R. GSK3: Tricks of the trade for a multi-tasking kinase [J]. *J Cell Science*, 2003, 116: 1175-1186.
 - [7] Clel A, Frame S, Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event [J]. *Biochem J*, 2004, 377: 249-255.
 - [8] Wang S, Liu S, Liu H, et al. 20-hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation [J]. *J Molecular Cell Biology*, 2010(2): 128-138.
 - [9] Tian L, Guo E, Wang S, et al. Developmental regulation of glycolysis by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in fat body tissues of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *J Molecular Cell Biology*, 2010, 2(5): 255-263.
 - [10] 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: 402-408.
 - [11] Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery [J]. *Biochem J*, 2001, 359: 1-16.
 - [12] Beckstead R B, Lam G, Thummel C S. The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila metamorphosis* [J]. *Genome Biol*, 2005, 6(12): R99.
 - [13] 李庆容, 邓小娟, 杨婉莹, 等. 果蝇蜕皮激素诱导程序性细胞死亡的遗传调控因子 [J]. *昆虫学报*, 2006, 49(1): 118-125.
Li Q R, Deng X J, Yang W Y, et al. Genetic regulators involved in ecdysone-induced programmed cell death in *Drosophila* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2006, 49(1): 118-125. (in Chinese)
 - [14] Spokoini R, Kfir-Erenfeld S, Yefenof E, et al. Glycogen synthase kinase-3 plays a central role in mediating glucocorticoid-induced apoptosis [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(6): 1136-1150.
-
- (上接第 24 页)
- [2] Campos S S, Alvarez M, Culebras J M, et al. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit hemorrhagic viral disease [J]. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2004, 144(4): 215-222.
 - [3] Forrester N L, Abubakr M I, Turner S L, et al. Phylogenetic analysis of Rabbit haemorrhagic disease virus strains from the Arabian Peninsula: Did RHDV emerges imultaneously in Europe and Asia? [J]. *Virol*, 2006, 344(2): 277-282.
 - [4] Forrester N L, Moss S R, Turner S L. Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: Possible impact on evolution and epidemiology [J]. *Virol*, 2008, 376(2): 390-396.
 - [5] Ruvoën-clouet N, Ganiere J P, Andr'e-Fontaine G, et al. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family [J]. *Virol*, 2000, 74(24): 11950-11954.
 - [6] 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.
 - [7] Hitoshi S, Kusunoki S, Kanazawa I, et al. Molecular cloning and expression of two types of rabbit β -galactoside α 1,2 fucosyltransferase [J]. *Biochimie*, 1995, 270(5): 8844-8850.
 - [8] Hitoshi S, Kusunoki S, Kanazawa I, et al. Molecular cloning and expression of a third type of rabbit GDP-L-fucose, β -D-galactoside 2- α -L-fucosyltransferase [J]. *Biochimie*, 1996, 271(28): 16975-16981.
 - [9] 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.
 - [10] Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N, Kindberg E, et al. Mendelian resistance to human norovirus infections [J]. *Semin Immunol*, 2006, 18(6): 375-386.
 - [11] Patrice, Nathalie Ruvoën-Clouet, Béatrice Le Moullac-Vaidye, et al. Association between expression of the H histo-blood group antigen, α 1,2 fucosyltransferases polymorphism of wild rabbits and sensitivity to rabbit hemorrhagic disease virus [J]. *Glycobiology*, 2009, 19(1): 21-28.
 - [12] Oriol R, Candelier J J, Mollicone R. Molecular genetics of H [J]. *Vox Sang*, 2000, 78(2): 105-108.
 - [13] Lindesmith L, Moe C L, Marionneau S, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 548-553.
 - [14] Hutson A M, Airaud F, Le Pendu J, et al. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera [J]. *Med Virol*, 2005, 77(1): 116-120.
 - [15] Thorven M, Grahn A, Hedlund K O, et al. A homozygous nonsense mutation (428G>A) in the human FUT2 gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections [J]. *Virol*, 2005, 79(24): 15351-15355.
 - [16] Kindberg E, Akerlind B, Johnsen C, et al. Host genetic resistance to symptomatic norovirus (GGII, 4) infections in Denmark [J]. *Clin Microbiol*, 2007, 45(8): 2720-2722.