

α -L-岩藻糖苷酶基因在斑马鱼发育过程中的功能分析

王道, 刘文彬, 肖亚梅*

(湖南师范大学 生命科学学院, 教育部蛋白质化学和鱼类发育生物学重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: α -L-岩藻糖苷酶(*alpha*-L-fucosidase, FUCA1/2)是糖基水解酶家族的成员, 参与糖蛋白、糖脂等生物大分子的分解代谢反应。为了解 α -L-岩藻糖苷酶在动物发育中的功能, 检测了 *fuca1* 和 *fuca2* 在斑马鱼组织和胚胎发育中的特异表达模式。*fuca1* 和 *fuca2* 基因在斑马鱼成体中的表达存在组织差异, 在斑马鱼的精巢中表达量最高, 此外肝脏中也检测到 *fuca1* 和 *fuca2* 的高表达。在斑马鱼胚胎发育中, 在其整个胚胎发育时期均检测到了 *fuca1* 和 *fuca2* 的表达。构建了 *fuca1* 基因的反义表达载体, 显微注射到斑马鱼受精卵。统计结果显示反义载体注射导致斑马鱼胚胎高致死率。研究表明, *fuca1* 和 *fuca2* 基因在鱼类胚胎发育和成体的精巢、卵巢与肝脏发育中可能具有重要的作用。

关键词: 斑马鱼; FUCA1; FUCA2; 胚胎发育

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)04-0310-06

Functional Analysis of *Alpha*-L-fucosidase Gene During Development of *Danio rerio*

WANG Dao, LIU Wen-bin, XIAO Ya-mei*

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Fish Developmental Biology of National Education Ministry, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: *Alpha*-L-fucosidase-1 (FUCA1) and *alpha*-L-fucosidase-2 (FUCA2) are the members of the glycosyl hydrolase family and play important roles in the catabolism of glycoproteins, glycolipids and other bioactive macromolecules reaction. In order to further understand the function of *alpha*-L-fucosidase in animal development, the tissue-specific and temporal expression patterns were analyzed in zebrafish. The *fuca1* and *fuca2* were expressed in all 8 tissues examined, *fuca1* and *fuca2* were highly expressed in the testis and to a much less degree, in the liver of zebrafish. *fuca1* and *fuca2* were expressed at all developmental stages examined. A constructed *fuca1* antisense expression vector was microinjected into zebrafish embryos. The statistical results show a high mortality rate. Together, these results indicate that the *fuca1* and *fuca2* gene may play an important role in embryonic development of fish embryos and also function in adult tissues including testis, ovary and liver.

Key words: zebrafish; FUCA1; FUCA2; development of embryos

(*Life Science Research*, 2013, 17(4): 310~315)

α -L-岩藻糖苷酶是一种催化含岩藻糖基的糖蛋白、糖脂等生物活性大分子水解酶的溶酶体酸性水解酶^[1]。 α -L-岩藻糖苷酶广泛分布于人体和动

物的组织细胞、血液、体液和精液中^[2-5]。 α -L-岩藻糖苷酶主要负责水解岩藻多糖糖苷键的非还原末端的 L-岩藻糖残基, 释放出岩藻糖。岩藻糖基复

收稿日期: 2013-05-10; 修回日期: 2013-06-26

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB22305); 国家自然科学基金面上项目(31172399; 30871908; 30971658); 湖南师范大学青年优秀人才培养计划课题资助项目(ET31105)

作者简介: 王道(1984-), 男, 湖南长沙人, 博士研究生, 主要从事动物发育中的信号转导机制研究; * 通讯作者: 肖亚梅(1968-), 女, 湖南宜章人, 湖南师范大学生命科学学院教授, 主要从事动物发育和人类疾病中的信号转导机制研究, Tel: 0731-88872297, E-mail: yameix@126.com.

合物在免疫应答、信号转导、个体发育及人类疾病的发病机制中发挥着重要的调控作用^[6]。 α -L-岩藻糖苷酶已被研究证实是溶酶体贮积病、炎症、囊肿性纤维化、癌症的发展及配子在脊椎和无脊椎动物之间的相互作用的关键因子^[7]。 α -L-岩藻糖苷酶-1 (*alpha-L-fucosidase-1*, FUCA1) 是一个编码 466 个氨基酸的膜和精液相关的同工酶, 属于糖基水解酶 29 家族的一员。FUCA1 作为一种同型四聚体, 负责水解和减少在各种组织中的糖蛋白的部分碳水化合物。 α -L-岩藻糖苷酶-2 (*alpha-L-fucosidase-2*, FUCA2) 是一个编码 467 个氨基酸的分泌蛋白酶, 作为一种四聚体存在, 特异地存在于组织血浆中。FUCA2 也属于糖基水解酶 29 家族的成员, 主要负责催化水依赖的 α -L-岩藻糖苷酶转变为醇。本研究以模式动物斑马鱼 (*Danio rerio*) 为研究材料, 检测 *fuca1* 和 *fuca2* 基因在斑马鱼胚胎发育和成体不同组织中的表达, 以进一步探讨岩藻糖苷酶家族在动物个体发育中的功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验中用的斑马鱼购自武汉中国科学院水生生物研究所。养殖于循环水养殖系统, 通过人工调节光周期对斑马鱼进行催产, 采集斑马鱼受精卵, 置于培养皿中静水孵化, 获取不同发育时期的胚胎。

选取已达性成熟阶段的斑马鱼(雌雄各 6 尾)剪鳃放血后, 分别取其肝脏、精巢、卵巢、脑、肾脏、肌肉、心脏、鳍等 8 种组织。

上述所取不同时期胚胎及成体组织样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。

1.2 RT-PCR 检测 *fuca1* 和 *fuca2* 两基因的表达

选取已经达到性成熟的斑马鱼, 剪鳃放血后数分钟迅速摘取 8 种不同的组织: 精巢、卵巢、脑、肾脏、肌肉、心脏、肝脏和鳍。选取已经达到性成熟的斑马鱼, 进行光周期催产获取不同发育时期的胚胎材料: 两细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠期、神经胚、视原基、脑泡期、肌肉效应期、心跳期、眼色素期、体色素期和出膜期。利用 Omega 试剂盒提取上述组织或胚胎的总 RNA。根据已经报道的斑马鱼 *fuca1* 基因 (GenBank accession number: nm212740.1) 和 *fuca2* 基因 (GenBank accession number: nm001004115.1) 序列片段分别设计 RT-PCR 所用的引物 Z-1、Z-2 与 Z-3、Z-4 (表 1)。PCR

反应总体积 $10\text{ }\mu\text{L}$ (PCR Taqmix $2\times$ 溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$, 灭菌水 $3\text{ }\mu\text{L}$, 逆转录产物 cDNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$ 和正负特异引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$)。PCR 反应条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。以 β -actin 作为实验内参, 做 3 次以上有效重复。

1.3 斑马鱼 *fuca1* 反义表达载体的构建

1.3.1 斑马鱼 *fuca1* 基因编码区序列目的片段的获得

根据已经报道得到的 cDNA 编码区序列两端设计引物 (FUC+: $5'$ -TTGCGGCCGCATGCAGGT-GACTCGCAGTCAGATA- $3'$; FUC-: $5'$ -GACGCG-TCTATGCCACCCCTTCCATCTTG- $3'$), 分别引入 *Mlu* I 和 *Not* I 酶切位点, 并在酶切位点前加上相应的保护碱基。以斑马鱼性腺 cDNA 作为模板, PCR 将该基因扩增, PCR 反应条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ $1\text{ min } 30\text{ s}$, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切下目的条带, 生工试剂盒回收纯化, 得到目的片段的产物。

1.3.2 目的片段和载体的双酶切

将引入酶切位点的目的片段及载体 pCI-NEO 载体分别进行双酶切。双酶切反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$: DNA or pCI-NEO 载体 $7\text{ }\mu\text{L}$, *Not* I $0.7\text{ }\mu\text{L}$, *Mlu* I $1\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ H Buffer $2\text{ }\mu\text{L}$, 0.1% BSA $1\text{ }\mu\text{L}$, 0.1% Triton X-100 $1\text{ }\mu\text{L}$, 灭菌水 $7.3\text{ }\mu\text{L}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 12 h 后, 加入 $10\times$ Loading Buffer, 停止反应, 再经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 分离目的条带, 生工试剂盒回收纯化。

1.3.3 目的片段与 pCI-NEO 载体的连接、转化、筛选

用 Takara T4 连接酶做 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜连接反应: DNA $15\text{ }\mu\text{L}$, pCI-NEO 载体 $2\text{ }\mu\text{L}$, T4 DNA Ligase $1\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ T4 DNA Ligase Buffer $2.5\text{ }\mu\text{L}$, 灭菌水 $4.5\text{ }\mu\text{L}$ 。将连接好的产物转到 DH5 α 大肠杆菌, 然后涂板过夜。第二天, 用灭菌牙签从转化板上挑取单克隆 3~5 个, 在具有氨苄青霉素抗性的 1 mL 的 LB 液体培养基中搅匀, 振荡培养 6 h。然后分别取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 菌液与 30% 甘油以 1:1 的比例保种, 另外以菌液为模板, 用载体两端的通用引物 T3 和 T7, PCR 后跑琼脂糖胶进行初步检测确认。

1.3.4 质粒的测序及双酶切鉴定

将阳性单克隆菌液 $200\text{ }\mu\text{L}$ 按 1:1 加入 30%

甘油后交生工测序,并且将含重组质粒的菌液,用生工的试剂盒做质粒小量提取,进一步将质粒DNA用 *Mlu* I 和 *Not* I 进行双酶切,最后进行琼脂糖电泳鉴定。

1.4 斑马鱼 *fuca1* 基因反义表达载体的显微注射

吸取斑马鱼受精卵,放在盛有 Hoff 液的凹槽琼脂平板上,进行显微注射.每个卵注入量为 1 nL.实验时设置 3 组:实验组(注射构建的 *fuca1* 反义表达载体),空白组(仅注射空载体)和正常组(不注射).注射后的受精卵置于培养皿中培养.记录各组从注射完成后胚胎发育各个时期的时间、表型和死亡数量等。

表 1 PCR 所用引物及其碱基序列

Table 1 The primers of PCR	
Primer names	Primer sequences
Z-1	5'-TCGCTGTTTCTTTGCTGC-3'
Z-2	5'-TAGCATTGCCAAATCTCC-3'
Z-3	5'-GGTGGACATCTTTGCTTGGT-3'
Z-4	5'-GCAGGACACCGTTTCTACCA-3'
β -actin(+)	5'-CCGTGACCTGACTGACTACCTC-3'
β -actin(-)	5'-ATACCGCAAGATTCCATACCC-3'

2 结果

2.1 斑马鱼不同发育时期胚胎及成体不同组织 *fuca1* 在 mRNA 水平表达检测结果

检测了两细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠期、神经胚、视原基、脑泡期、肌肉效应期、心跳期、眼色素期、体色素期和出膜期共 12 个不同发育时期斑马鱼胚胎 *fuca1* 基因的表达(图 1)。我们在斑马鱼 12 个胚胎发育时期均检测到了 *fuca1* 基因的表达。

对斑马鱼肾脏、肌肉、心脏、鳍、肝脏、精巢、卵巢、脑 8 种不同组织 *fuca1* 基因 mRNA 检测结果显示,在 8 种组织中均检测到 *fuca1* 的表达,精巢中的表达量最高,卵巢中的表达要低于精巢,肝脏中的表达量仅次于精巢(图 2)。

2.2 斑马鱼不同发育时期胚胎及成体不同组织 *fuca2* 在 mRNA 水平表达检测结果

检测了两细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠期、神经胚、视原基、脑泡期、肌肉效应期、心跳期、眼色素期、体色素期和出膜期共 12 个不同发育时期斑马鱼胚胎 *fuca2* 基因的表达(图 3)。我们在斑马鱼 12 个胚胎发育时期均检测到了 *fuca2* 基因的表达。

对斑马鱼肌肉、卵巢、精巢、肾脏、心脏、肝脏、鳍、脑 8 种不同组织 *fuca2* 基因 mRNA 检测结果显示,在 8 种组织中均检测到 *fuca2* 的表达,而且

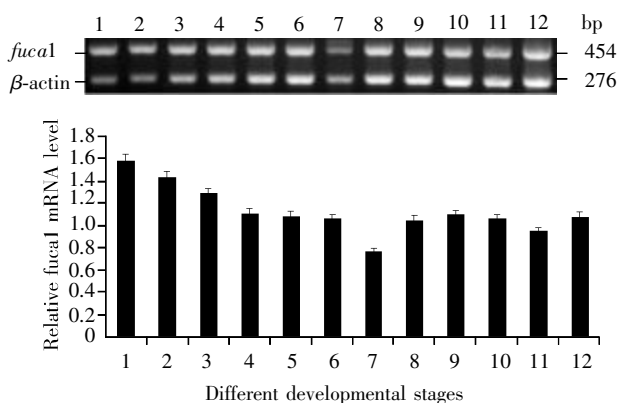


图 1 *fuca1* 基因在斑马鱼 12 个不同发育时期胚胎 mRNA 水平的表达

1: 两细胞期; 2: 多细胞期; 3: 囊胚期; 4: 原肠胚期; 5: 神经胚; 6: 视原基; 7: 脑泡期; 8: 肌肉效应期; 9: 心跳期; 10: 眼色素期; 11: 体色素期; 12: 出膜期。

Fig.1 The mRNA expression of *fuca1* in zebrafish different embryo

1: two cells stage; 2: multi-cells stage; 3: blastula; 4: gastrula; 5: neurula; 6: optic primordium; 7: brain vesicle; 8: muscle movement; 9: heart-beat; 10: eye pigmentation; 11: body pigmentation; 12: hatching larvae.

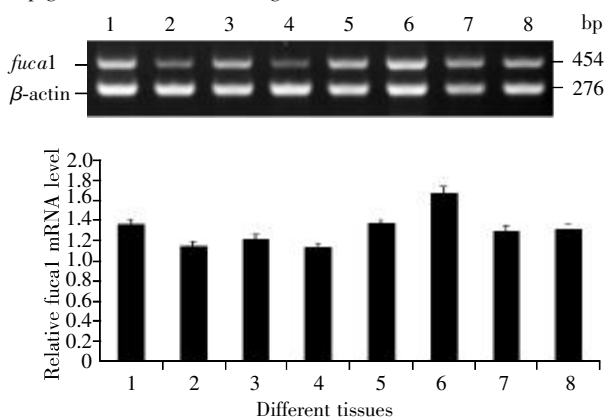


图 2 *fuca1* 基因在斑马鱼 8 种不同组织中 mRNA 水平的表达

1: 肾脏; 2: 肌肉; 3: 心脏; 4: 鳍; 5: 肝脏; 6: 精巢; 7: 卵巢; 8: 脑。

Fig.2 The mRNA expression of *fuca1* in zebrafish different tissues

1: kidney; 2: muscle; 3: heart; 4: fin; 5: liver; 6: testis; 7: ovary; 8: brain.

精巢中的表达量也是最高的,卵巢中的表达量也要低于精巢,肝脏中的表达量也仅次于精巢(图 4)。

2.3 斑马鱼 *fuca1* 基因反义表达载体构建结果

将 cDNA 编码区序列两端设计引物分别引入 *Mlu* I 和 *Not* I 酶切位点,用 PCR 对目的基因进行扩增,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,胶回收纯化.然后把回收产物和 pCI-NEO 载体在 37 °C 水浴锅中分别用 *Mlu* I 和 *Not* I 双酶切.双酶切后的目的基因产物连接到 pCI-NEO 载体上,转化到

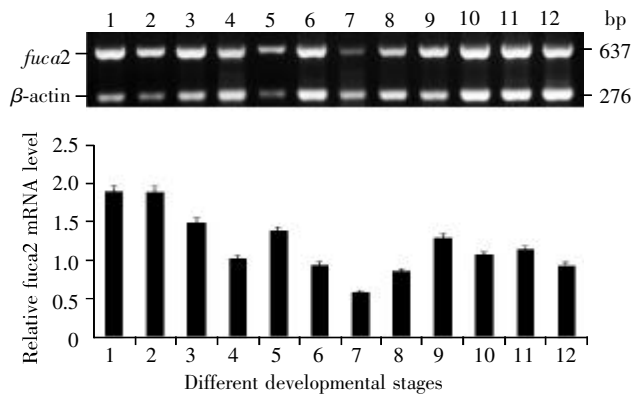


图 3 *fuca2* 基因在斑马鱼 12 个不同发育时期胚胎 mRNA 水平的表达

1: 两细胞期; 2: 多细胞期; 3: 囊胚期; 4: 原肠胚期; 5: 神经胚; 6: 视原基; 7: 脑泡期; 8: 肌肉效应期; 9: 心跳期; 10: 眼色素期; 11: 体色素期; 12: 出膜期。

Fig.3 The mRNA expression of *fuca2* in zebrafish different embryo

1: two cells stage; 2: multi-cells stage; 3: blastula; 4: gastrula; 5: neurula; 6: optic primordium; 7: brain vesicle; 8: muscle movement; 9: heart-beat; 10: eye pigmentation; 11: body pigmentation; 12: hatching larvae.

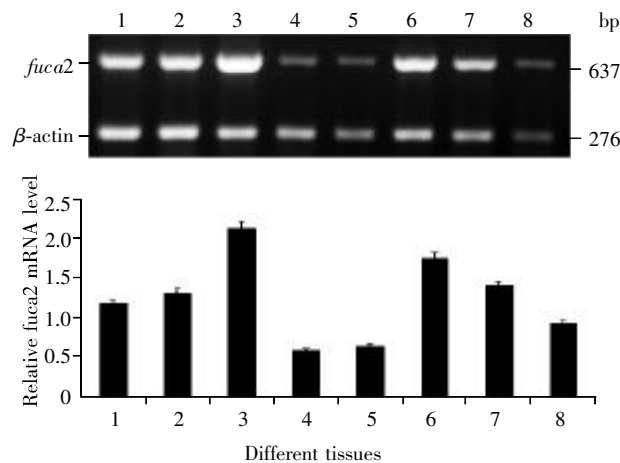


图 4 *fuca2* 基因在斑马鱼 8 种不同组织中 mRNA 水平的表达

1: 肌肉; 2: 卵巢; 3: 精巢; 4: 肾脏; 5: 心脏; 6: 肝脏; 7: 鳍; 8: 脑。

Fig.4 The mRNA expression of *fuca2* in zebrafish different tissues

1: muscle; 2: ovary; 3: testis; 4: kidney; 5: heart; 6: liver; 7: fin; 8: brain.

DH5 α , 蓝白斑筛选挑取菌落, 进行菌液 PCR 的初步鉴定. 提取的重组质粒做双酶切鉴定, 经过 *Mlu* I 和 *Not* I 双酶切后释放出一条 1 339 bp 左右条带, 提示扩增的目的片段已经成功地插入到 pCI-NEO 载体中(图 5).

2.4 显微注射斑马鱼 *fuca1* 基因反义表达载体结果

如图 6 所示, 本研究注射了 *fuca1* 基因的反

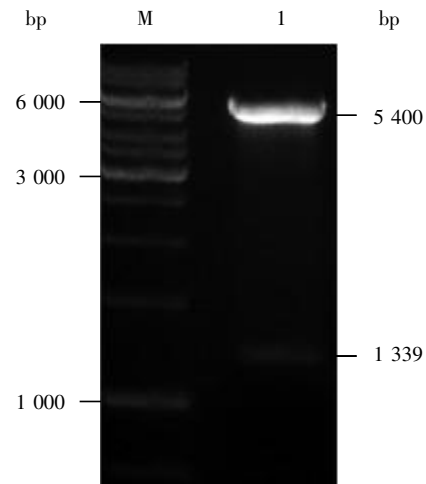


图 5 *fuca1*-pCI-NEO 的双酶切鉴定电泳结果

M: DNA 标记; 1: 重组质粒 *fuca1*-pCI-NEO.

Fig.5 Agarose electrophoresis of the recombinant *fuca1*-pCI-NEO with *Mlu* I and *Not* I

M: DNA Marker; 1: Recombinant plasmid *fuca1*-pCI-NEO.

义表达载体的胚胎由于混入了 GFP 质粒, 所以从囊胚期以后放在荧光倒置显微镜下用 450~490 nm 的蓝光激发, 观察是否出现绿色荧光, 如果出现绿色荧光, 则表明 *fuca1* 基因反义表达载体被成功注入胚胎。

本研究还在主要发育时期, 对胚胎进行了正常数目和死亡数目的统计, 并根据统计的数据形成图表 (图 7), 我们可以看出, 注射 *fuca1* 反义表达载体的实验组斑马鱼胚胎致死率是非常高的, 从囊胚期到神经胚期就出现大量死亡. 相对于正常组和空白注射组 98.4% 和 94.8% 的斑马鱼胚胎出膜存活率, *fuca1* 反义表达载体注射组胚胎出膜存活率仅为 1.1%.

3 讨论

对 GenBank 中已经发表的脊椎动物的 *fuca1* 和 *fuca2* 基因序列及其推导的氨基酸序列进行的同源性分析, 如下图所示 (图 8A、B), 分别是用 Mega 5.0 构建的 FUCA1 和 FUCA2 的系统发育树. 系统进化树表明, FUCA1 在黑猩猩和人类、爪蟾的相似性最高, 而与其他目的牛、犬的相似性则较低, 与小鼠、大鼠、鸡等动物的相似性更低, 与斑马鱼相距很远, 相似性最低. FUCA2 在斑马鱼、爪蟾、人和鸡的相似性最高, 而与小鼠、大鼠动物相似性则较低, 与家犬相距甚远相似性最低. 证明在系统发育进化中, 鱼类的 FUCA1 在脊椎动物中的同源性比 FUCA2 要低, FUCA1 和 FUCA2 保持着较低的保守性进化特征。

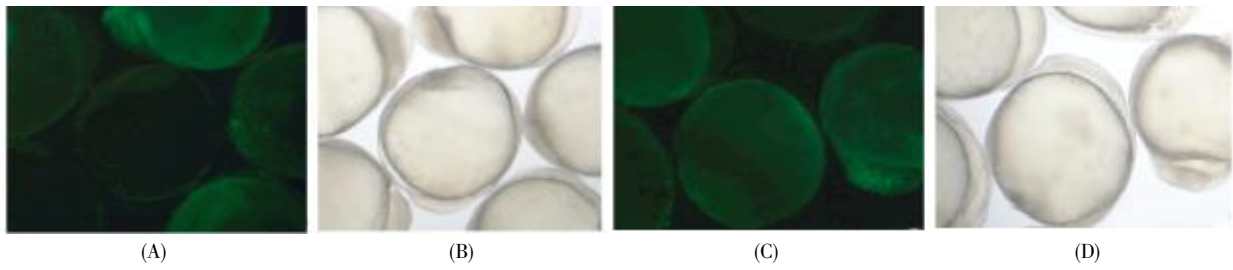


图6 显微注射的检测图

(A) 注射剂中所含的空载体(空白组)(绿色荧光); (B) 注射剂中所含的空载体(空白组)(普通光); (C) 注射剂中所含的 *fuca1* 反义表达载体(实验组)(绿色荧光); (D) 注射剂中所含的 *fuca1* 反义表达载体(实验组)(普通光).

Fig.6 Detection of injected embryos

(A) Injected containing the empty vector (Control) (Green fluorescent); (B) Injected containing the empty vector (Control) (Ordinary light); (C) Injected containing the *fuca1*-pCI-NEO (Treated) (Green fluorescent); (D) Injected containing the *fuca1*-pCI-NEO (Treated) (Ordinary light).

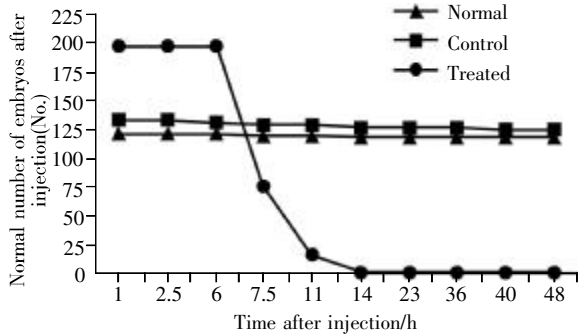


图7 正常胚胎数目变化

1 h: 两细胞期; 2.5 h: 多细胞期; 6 h: 囊胚期; 7.5 h: 原肠胚期; 11 h: 神经胚期; 14 h: 视原基; 23 h: 脑泡期; 36 h: 眼色素期; 40 h: 体色素期; 48 h: 出膜期.

Fig.7 The change in the number of normal embryos

1 h: two cells stage; 2.5 h: multi-cells stage; 6 h: blastula; 7.5 h: gastrula; 11 h: neurula; 14 h: optic primordium; 23 h: brain vesicle; 36 h: eye pigmentation; 40 h: body pigmentation; 48 h: hatching larvae.

Intra 等通过比较基因组分析发现新型 α -L-岩藻糖苷酶在蠕虫、昆虫、海胆、海鞘类动物、鱼、鸡类及两栖类、哺乳类动物和各种细菌产生了共39种 α -L-岩藻糖苷酶序列, 而且 FUCA1 和 FUCA2 这两种 α -L-岩藻糖苷酶是存在于所有脊椎动物的同源基因, 它们反映了不同的生物学功能^[7]. 鱼类的 *fuca1* 和 *fuca2* 基因研究很少, 在斑马鱼中, α -L-岩藻糖苷酶基因家族中 *fuca1* 和 *fuca2* 基因在组织内广泛的表达, 这一结果与已经报道在人类中的研究基本是一致的^[8]. 近年来研究发现, 在哺乳动物中由于溶酶体酶使得 α -L-岩藻糖苷酶降解, 造成岩藻糖物质在不同器官贮积, 会渐进地出现溶酶体贮积病, 导致运动功能障碍, 神经元丢失, 出生时无空泡化等致病的神经系统疾病, 最终导致死亡^[9, 10]. 在人类 *fuca1* 基因先天缺乏或者功能

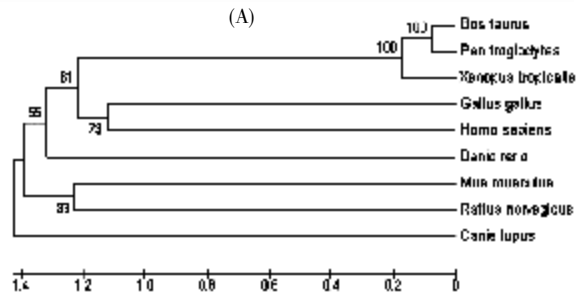
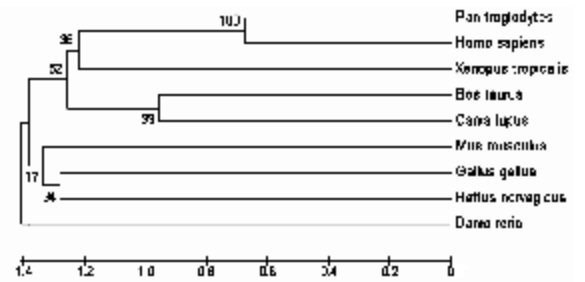


图8 9种脊椎动物 FUCA1 (A)和 FUCA2 (B)系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree of FUCA1 (A) and FUCA2 (B)

障碍会造成岩藻糖苷积累症, 可使得糖脂和糖蛋白从胎儿一出生就在组织中慢慢地大量积累, 造成岩藻糖苷蓄积症, 容易引起发育迟缓、神经系统疾病、内脏增大和癫痫等疾病^[11]. *fuca1* 和 *fuca2* 基因在斑马鱼胚胎发育早期从两细胞到神经胚有高表达, 在脑泡期都存在一定的下降, 胚胎发育后期的肌肉效应期又回升, 该结果表明与鱼类神经系统的发育成熟也是密切相关的. FUCA1 作为肝癌临床诊断的一种标志分子已经广泛被证实^[12-13], 本研究中 *fuca1* 基因在斑马鱼的肝脏组织中也表现出高度表达的特征.

特别令人们关注的是 FUCA1/2 在动物生殖发育中所发挥的重要作用. 研究人员发现 α -L-岩藻糖苷酶还可能参与了果蝇及其它动物性腺器官的受精调控^[14, 15], Pluta 等证实母牛宫颈部位的分泌

物与精子运输的生理调制机制是通过糖基化的蛋白变化来驱动的^[6]。 α -L-岩藻糖苷酶在精卵膜融合事件中可能与识别功能相关,它作为一种非水解性结合蛋白与 α -L-岩藻糖苷酶残基结合来调节精卵识别,参与精子穿入透明带调节^[17-21]。Leray G等研究也发现在小鼠成熟后岩藻糖苷酶的活性会急剧地上升,大量激活卵母细胞的生长^[22]。尽管岩藻糖转移酶和岩藻糖苷酶已经被发现在精子发生和精子成熟的过程中,但是其具体生物学调节机制依然未知。王道等对黄鳝 *fuca1* 基因的研究表明, *fuca1* 在黄鳝的雌性腺组织中存在着表达差异(待发表)。总之,相关研究结果提示岩藻糖苷酶基因可能是鱼类生殖发育的重要调控基因。

参考文献(References):

- [1] 单瑞芬, 吴茜茜, 蔡敬民. 岩藻多糖降解酶的研究进展[J]. 安徽农业科学 (SHAN Rui-fen, WU Qian-qian, CAI Jing-min. Research progress of fucoidan-degrading enzyme[J]. Journal of Anhui Agriculture), 2012, 40(19): 9996-9997.
- [2] JOHNSON S W, ALHADEFF J A. Mammalian *alpha*-L-fucosidases[J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, 1991, 99(3): 479-488.
- [3] TAKESHITA H, YASUDA T, NADANO D, *et al.* Genetically polymorphic *alpha*-L-fucosidase (FUCA1) isozymes detected in blood plasma[J]. Human Genetics, 1994, 94(3): 224-230.
- [4] CORDERO O J, MERINO A, BUGIA B, *et al.* Cell surface human *alpha*-L-fucosidase[J]. European Journal Biochemistry, 2001, 268(11): 3321-3331.
- [5] ALHADEFF J A, KHUNSOOK S, CHOOWONGKOMON K, *et al.* Characterization of human semen *alpha*-L-fucosidases[J]. Molecular Human Reproduction, 1999, 5(9): 809-815.
- [6] ALI S, JENKINS Y, KIRKLEY M, *et al.* Leukocyte extravasation: an immunoregulatory role for *alpha*-L-fucosidase[J]. Journal of Immunology, 2008, 181(4): 2407-2413.
- [7] INTRA J, PEROTTI M E, PAVESI G, *et al.* Comparative and phylogenetic analysis of *alpha*-L-fucosidase genes[J]. Gene, 2007, 392(1-2): 34-46.
- [8] WIEDERSCHAIN G Y, KOLIBABA L G, ROSENFELD E L. Human *alpha*-L-fucosidases[J]. Clinica Chimica Acta, 1973, 46(3): 305-310.
- [9] KONDAGARI G S, RAMANATHAN P, TAYLOR R. Canine fucosidosis: a neuroprogressive disorder[J]. Neurodegenerative Diseases, 2011, 8(4): 240-251.
- [10] VEERAMACHANENI D N, SMITH M O, ELLINWOOD N M. Deficiency of fucosidase result in acrosomal dysgenesis and impaired sperm maturation[J]. Journal of Andrology, 1998, 19(4): 444-449.
- [11] WIESE T J, DUNLAP J A, YOREK M A. L-Fucose is accumulated via a specific transport system in eukaryotic cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(36): 22705-22711.
- [12] FAWZY M M, AMIN S M, OMAR K M. *Alpha*-L-fucosidase as a tumour maker of hepatocellular carcinoma[J]. Arab Journal Gastroenterology, 2012, 13(1): 9-13.
- [13] ZHU J, JIANG F, NI H B, *et al.* Combined analysis of serum γ -glutamy I transferase isoenzyme II, α -L-fucosidase and α -fetoprotein detected using a commercial kit in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 5(1): 89-94.
- [14] INTRA J, PEROTTI M E, PASINI M E. Cloning sequence identification and expression profile analysis of α -L-fucosidase gene from the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*[J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57(4): 452-461.
- [15] INTRA J, CENNI F, PEROTTI M E. An *alpha*-L-fucosidase potentially involved in fertilization is present on *Drosophila* spermatozoa surface[J]. Molecular Reproduction and Development, 2006, 73(9): 1149-1158.
- [16] PLUTA K, IRWIN J A, DOLPHIN C, *et al.* Glycoproteins and glycosidases of the cervix during the periostrous period in cattle[J]. Journal of Animal Science, 2011, 89(12): 4032-4042.
- [17] HANCOCK L W, RAAB L S, ARONSON N N Jr. Synthesis and processing of rat sperm-associated *alpha*-L-fucosidase[J]. Biology of Reproduction, 1993, 48(6): 1228-1238.
- [18] AVILES M, ABASCAL L, CASTELLS M T, *et al.* Immunocytochemical localization and biochemical characterization of a novel plasma membrane-associated, neutral PH optimum *alpha*-L-fucosidase from rat testis and epididymal spermatozoa[J]. Biochemical Journal, 1996, 318(3): 821-831.
- [19] PHOPIN K, NIMLAMOO W, BARTLETT M J, *et al.* Distribution, crypticity, stability, and localization of α -L-fucosidase of mouse cauda epididymal sperm[J]. Molecular Reproduction and Development, 2012, 79(3): 208-217.
- [20] VENDITTI J J, SWANN J M, BEAN B S. Hamster sperm-associated *alpha*-L-fucosidase functions during fertilization[J]. Biology of Reproduction, 2010, 82(3): 572-579.
- [21] MATSUMOTO M, HIRATA J, HIROHASHI N, *et al.* Sperm-egg binding mediated by sperm *alpha*-L-fucosidase in the ascidian, *Halocynthia roretzi*[J]. Zoological Science, 2002, 19(1): 43-48.
- [22] LERAY G, SHACOORI V, PRODHOMME C, *et al.* *Alpha*-L-fucosidase in rat testis during sexual maturity[J]. Archives Andrology, 1988, 21(1): 23-28.