

研究简报

DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2009.40782

阿部鲻鰕鯱 P450 1A1克隆与分析

程 章¹ 聂湘平¹ 王 芳² 李凯彬²

(1 暨南大学水生物研究中心, 广州 510632 2 中国水产科学院珠江水产研究所 广州 510380)

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF P450 1A1 IN MUGILOGOBius ABEI

CHENG Zhang¹, NIE Xiang Ping¹, WANG Fang² and LI Kai Bin²

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632
2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

关键词: 阿部鲻鰕鯱; P450 1A1 基因克隆; 序列分析

Key words: Mugilogobius abei; P450 1A1; Cloning; Sequence analysis

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)04-0782-07

细胞色素 P450 (Cytochrome P450 简称 CYP) 是生物体内广泛存在的一类重要的代谢酶, 它参与包括内源性物质和多种外源性物质(包括药物)在内的各类物质的代谢和转化。其中以 P450 酶系作为毒物毒性的生物学标志物(Biomarker)已广泛应用于毒理学研究中。细胞色素 P450 1A1 是一种微粒体加单氧酶, 催化多种异生物质(如 PAHs、PCBs 等)进行相反应的生物转化^[1]。对哺乳动物和鱼体内的细胞色素 P450 1A1 的研究结果都证实其是由异生物质键联芳烃受体(Ah receptor)诱导的, 且两者的性状和可诱导性都非常相似^[2]。这种响应机理是细胞色素 P450 1A1 成为有机污染的生物标志物的根据。所以细胞色素 P450 酶系的诱导已被提出作为评价环境污染状况的最灵敏的生物学指标之一。

阿部鲻鰕鯱 *Mugilogobius abei* 属鲈形目鰕鯱鱼科, 是我国常见的河口鱼类, 栖息于河口咸淡水交界水域及近海岸浅水滩涂处。阿部鲻鰕鯱是底栖穴居鱼类, 有领域感, 生活于沉积相间隙水环境, 是沉积相污染检测的理想生物。作为广布种, 日本中南部、韩国、我国东南部沿海到越南都有分布^[3]。*M. abei* 作为指示生物有较广的应用范围。本实验通过对阿部鲻鰕鯱的 P450 酶系(P450 1A1)蛋白的基因克隆, 为下一步研究 P450 1A1 对环境污染物的暴露诱导响应的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物为野外河口区采集的成年阿部鲻鰕鯱, 在实验室培养两周。实验时一次腹腔注射 β -萘黄酮

(β -NF), 注射剂量 $5\text{mg}/\text{kg}$ 鱼体重, 暴露一周后提取肝脏总 RNA。

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α , 由中国水产科学院珠江水产研究所提供。PGEM-T Easy Vector System 为 Promega 公司产品。

1.1.2 试剂盒与试剂 RT-PCR 试剂盒和普通凝胶纯化回收试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品; 限制性内切酶、RNA 抽提试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA 分子 Marker、琼脂糖等相关试剂购自华美生物工程公司、Promega 公司、宝生物工程(大连)有限公司等; β -NF 低溶点琼脂糖为 Sigma 公司产品; 其他试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物合成与合成 根据 GenBank 已登录的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、大西洋鳕 (*Salmo salar*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、底鳉 (*Fundulus heteroclitus*) 等鱼类 P450 1A1 序列, 设计合成下列引物: P_{C_1} : 5'-gIVATCTgtggVATgtCTTC 3'; P_{C_2} : 5'-GCCACTgRTTgATgAAGACRCAGggT 3'。引物用去离子双蒸水(ddH_2O)溶解至 $20\mu\text{mol/L}$ — 20°C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 肝脏总 RNA 的提取 按照 SV Total RNA Isolation System 方法提取阿部鲻鰕鯱肝脏总 RNA, 然后取 $3\mu\text{L}$ 总 RNA 样品用变性琼脂糖凝胶电泳溴化乙锭染色显示 28S rRNA 和 18S rRNA 检测 RNA 的完整性。

1.2.2 CYP1A1 中间片段基因克隆 按照试剂盒 Takara

收稿日期: 2007-12-28 修订日期: 2009-02-17

基金项目: 国家自然基金(40471118)、科技部公益研究专项(2004DIB1Z-029)资助

作者简介: 程章(1983—), 男, 黑龙江牡丹江人; 在读硕士研究生; 研究方向为环境生物学

通讯作者: 聂湘平, E-mail: npxn@jnu.edu.cn

RNA LA PCR™ Kit(AMV) Ver 1.1方法, 以阿部鲻鰕鯱肝脏总 RNA为模板, 合成 cDNA第一链: 反应体系为 20 μ L其中含 RNase Free dH₂O 4.5 μ L, 10× RNA PCR Buffer 2 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 4 μ L, dNTP (10mmol/L each) 2 μ L, RNase Inhibitor (40U/ μ L) 0.5 μ L, Reverse Transcriptase (5U/ μ L) 1 μ L, Oligo dT-Adaptor Primer (20 μ mol/L) 1 μ L。阿部鲻鰕鯱肝脏总 RNA 5 μ L 反转录反应条件为: 46℃ 30min, 97℃ 5min, 5℃ 5min。PCR扩增以 cDNA第一链为模板, 用 P_c₁、P_c₂两个引物进行 PCR扩增: 50 μ L体系包含 dd H₂O 31.75 μ L, 10× LA PCR™ Buffer II (Mg²⁺ free) 4 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 3 μ L, TaKaRa LA Taq 0.25 μ L, 上游引物 P_c₁ 0.5 μ L, 下游引物 P_c₂ 0.5 μ L, 反转录液 10 μ L。PCR扩增反应条件: 94℃预变性 4min, 然后进行 30个循环反应, 其温度循环条件为: 94℃变性 30s, 54℃退火 30s, 72℃延伸 2min, 循环结束后 72℃再延伸 7min。PCR产物应用 1% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下将观察到的目的条带切下, 直接纯化; 应用 T4 DNA连接酶和 PGEM-T 将纯化好的 PCR产物连接进 PGEM-T 将重组质粒转化 E. coli 菌株 (DH5 α), 转化好的 DH5 α 菌株涂布于含有 X-gal/ IPTG 的 LB平板, 进行蓝白斑筛选。目的质粒经 PCR鉴定后进行测序。

1.2.3 3' RACE 根据已测出的 P450 1A1核心片段 cDNA序列设计并合成引物 P_c₅: 5' GGACAAGACAGATTTC-CTCGCT; P_c₆: 5' TGCGGCACTCGTCATTCC 3'; P_c₇: 5' CTCTCIGTCATIGTGATCATAGCGCC 3'。

3' RACE根据试剂盒的操作流程进行, 用 5 μ L总 RNA以 Oligo dT adaptor primer [5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG-TACGC(T)16 3'] 为引物, 用 AMV根据其使用说明进行 RT反应, 然后用 RT反应体系的 10% (v/v) 以 Adaptor primer (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC 3') 和 P_c₅为引物进行 PCR退火温度为 60℃, 其他 PCR反应条件同上。扩增液稀释 5倍, 取 2 μ L作为模板, Adaptor primer 和 P_c₅作为引物进行 PCR反应, 退火温度为 58℃, 其他同上。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离、回收、克隆和测序。

1.2.4 5' RACE 原理参照文献 [4], 用 5 μ L总 RNA以 P_c₅为引物, 用 AMV根据使用说明进行 RT反应, 然后加RNaseH分解 mRNA 用试剂盒回收 cDNA去除多余的 dNTP 引物等; 再用 T酶在 cDNA 3'端加 poly(A), 用试剂盒回收加了 poly(A)尾的 cDNA 以此为模板, 用 P_c₆及 Oligo dT adaptor primer (同 3') 为引物进行 PCR退火温度为 54℃, 反应体系组成、条件同 3'RACE, PCR扩增液用胶回收试剂盒回收, 再以此回收液为模板, 用 P_c₇及 AP为引物, 进行 PCR反应, 退火温度为 60℃, 反应体系组成及条件同上。产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离、回收、克隆和测序。

1.2.5 PCR产物的克隆和鉴定 在 T4 DNA连接酶的作用下, 将纯化的 DNA片段按 3:1物质的量比值与 PGEM-T vector进行连接反应。连接产物转化 E. coli DH5 α 感受态细胞, 在含有 100 μ g/mL的氯苄青霉素以及 IPTG和 X-Ga的 LB平板上筛选重组子, 筛选出的阳性克隆进行双酶切和 PCR鉴

定, 以确定质粒是否插入了目的片段。

1.2.6 序列测定及分析 序列 测定由上海申能博彩生物技术有限公司完成。所得序列拼接、校正后用 DNastar BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、ClustalW、PAUP4.0等软件分析。

1.2.7 克隆片段的生物信息学分析 以克隆并测序得到的基因编码的氨基酸序列作为原始数据, 选择生物学软件或网络服务器, 有针对性地进行分析。对该基因编码的蛋白质结构特点、理化性质等按照 <http://www.expasy.org> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> DNastar及 NCBI上提供的核酸、蛋白质在线分析工具进行。氨基酸组成分析利用 DNastar的 EDIF-SEQ工具, 信号肽预测利用 SignalP分析工具, 跨膜结构分析利用 TMpred 蛋白质的亲疏水性分析利用 DNastar的 Protein工具, 基序分析利用 PROSITE工具, 功能结构域分析利用 NCBI CD-Search service工具, 二级结构预测利用 SOPMA分析工具^[5-9]。

2 结果

2.1 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1基因的分离

应用 P_c₁和 P_c₂进行引物 PCR扩增, 电泳结果显示, 在约 650bp处有一明显的目的带, 与预期的 P450 1A1 cDNA核心片段大小相符 (图 1); T载体克隆成功以后, 挑选一个阳性克隆用 EcoRI 进行酶切检测, 确定插入片段大小正确, 将该重组 T载体质粒进行序列测定; 测序结果显示: 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1核心片段大小为 649 bp BLAST比对结果表明该序列与舌齿鲈 P450 1A相同性高达 88%, 是预期的 P450 1A1 cDNA序列; 根据所得序列设计合成引物 P_c₁、P_c₂和 P_c₃, 用肝脏总 RNA进行 3'RACE获得 1100 bp左右的 DNA条带, 经插入质粒, 酶切鉴定, 送测序, 结果得到 1185 bp的序列。按照 5'RACE实验程序, 结果获得 650 bp左右的特异条带, 克隆后酶切鉴定, 送测序, 序列为 636 bp。把上述序列拼接得到阿部鲻鰕鯱 P450 1A1全序列 (图 2), 该 cDNA总长 1943bp其中阅读框 1552 bp 编码 516个氨基酸, 估算的蛋白质分子量为 58.71 kDa 3'非翻译区 411 bp。

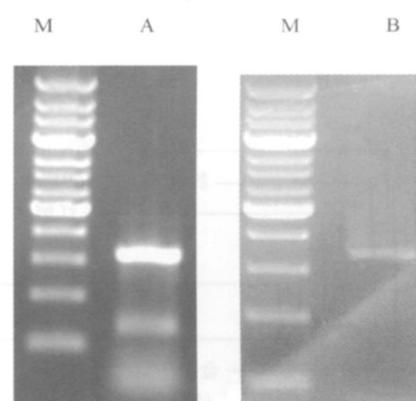


图 1 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1扩增结果
Fig. 1 Mugilgbobius abei P450 1A1 PCR product
A: RT-PCR; B: 5'端半巢式 PCR 扩增结果 Sm+nested PCR product; M: 200 bp DNA ladder marker

图 2 阿部鲻𫚥鳉 P450 1A1 cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequence of P450 1A 1 from the *Mugilogobius abei*

箭头表示 PCR 引物 Nucleotide sequence of primers for PCR are shown by arrows

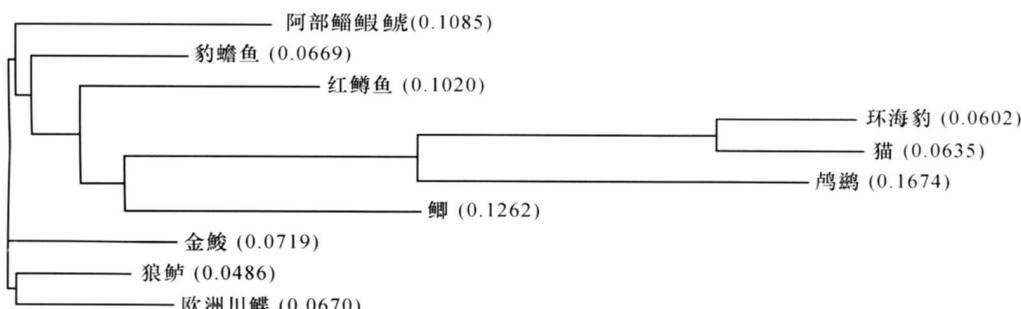


图 3 P450 1A1 蛋白质的系统进化树, 数字代表 Bootstrap 值

Fig. 3 Phylogenetic tree of P4501A1 protein.

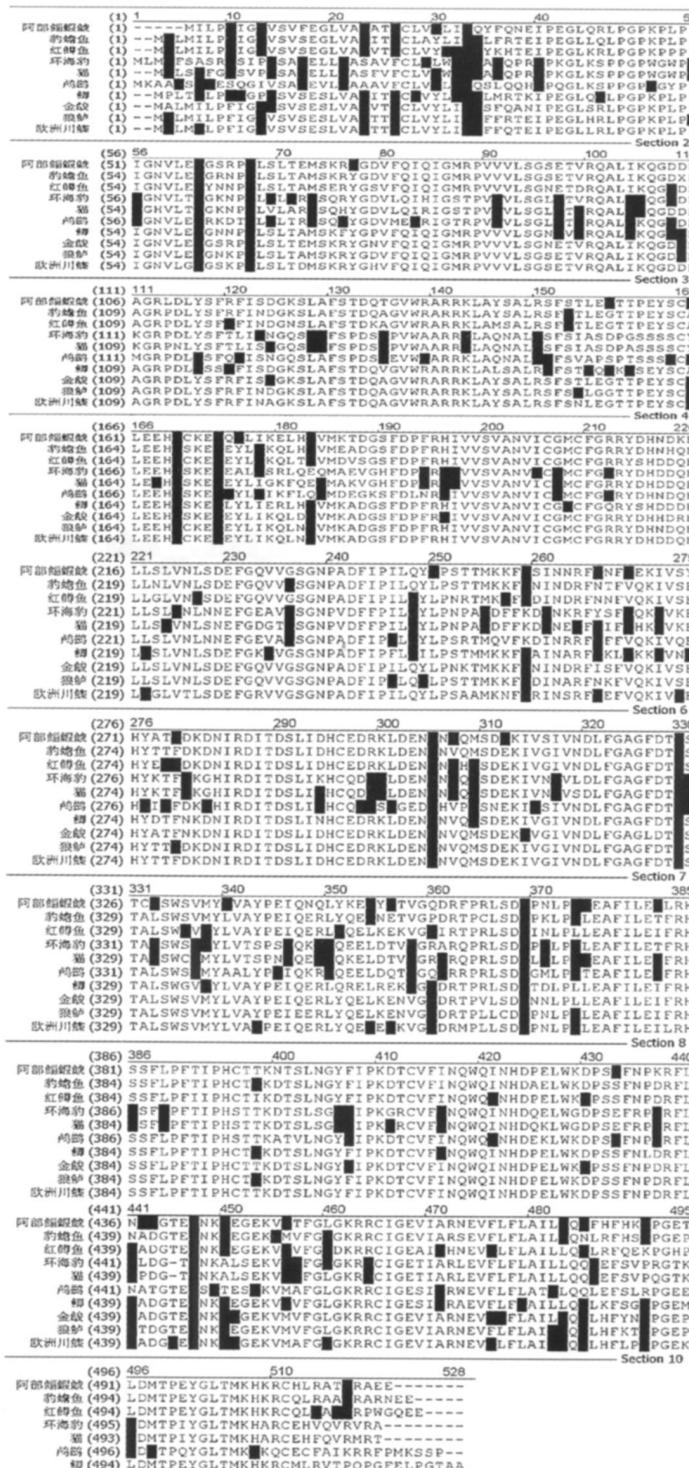


图 4 阿部鲻虾虎 P450 1A1 与其他动物的 P4501A1 氨基酸序列比较

“—”表示此位置缺失氨基酸。各种动物 P450 1A1 的 GenBank 登录号分别为：金鮣 gi|6225202 刺泥鰌 gi|6225201 豹蟾鱼 gi|3913314 狼
鲈 gi|5921905 鸽鹬 gi|93277049 家猫 gi|75070279 环海豹 gi|84468688 虹鳟 gi|19924296 鲫 gi|99029236
The GenBank accession numbers of the sequences used in the figure were as follow: *Liza aurata* gi|6225202 *linanda* gi|6225201 *Opsanus tau* gi|3913314 *Dicentrarchus labrax* gi|5921905 *Phalacrocorax carbo* gi|93277049 *Felis catus* gi|75070279 *Macaca mulatta* gi|55976408 *Canis lupus familiaris* gi|3913305 *Balaenoptera acutorostrata* gi|93204566 *Stenotomus chrysops* gi|3913316 *Oncorhynchus mykiss* gi|19924296 *Carassius auratus* gi|99029236

2.2 同源性比较

阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 基因的氨基酸序列经 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析, 发现与其他生物的阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 基因具有较高的同源性。利用 VectorNT 软件包将阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 基因 cDNA 序列推导的氨基酸序列与其他物种 P450 1A1 的氨基酸进行多序列比较, 并构建系统进化树(图 3 图 4)。BLAST 结果显示, 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 与刺泥蝶 P450 1A1 同源性最高, 达 91.6%; 与其他鱼类 P450 1A1 的同源性都较高, 大于 70%; 与人、鸟类和小鼠等哺乳类动物的 P450 1A1 同源性略低, 均为 60% 左右。

2.3 生物信息学分析

以 DNAstar 软件对阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 基因编码氨基

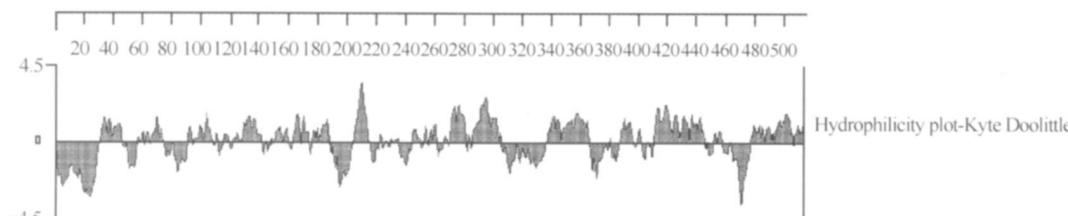


图 5 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 蛋白亲/疏水特性

Fig. 5 Hydrophilicity/hydrophobicity analysis of *Mugilogobius abei* P450 protein

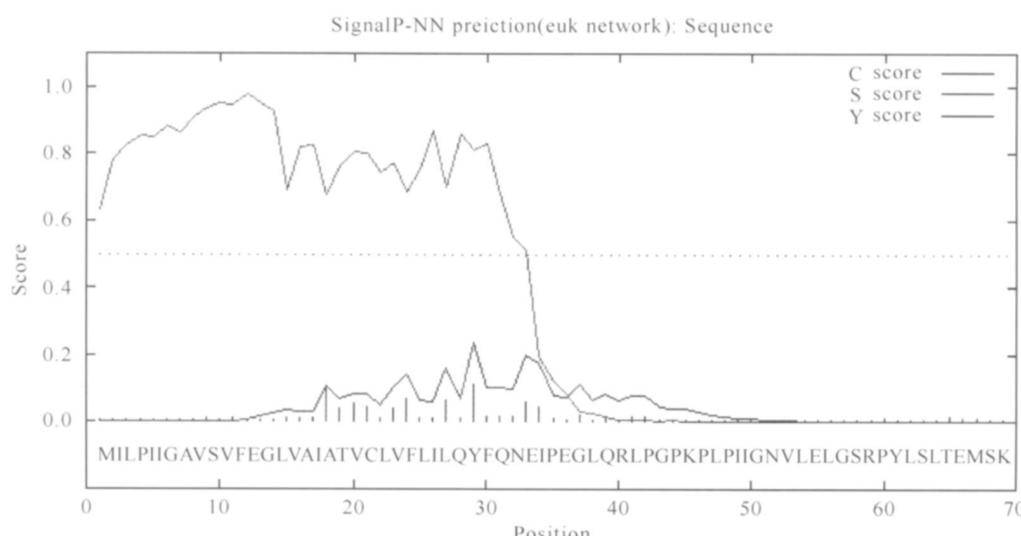


图 6 阿部鲻鰕鯱 P450 1A 信号肽预测

Fig. 6 Prediction of the Signal peptide of P450 1A

C score: 原始剪切位点的分值; S score: 信号肽的分值; Y score: 综合剪切点的分值

C score: Original cut score; S score: Signal score; Y score: General cut score

用 signalP 对阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 氨基酸序列进行信号肽分析可知(图 6), 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 在第 1—29 区间的氨基酸残基存在多个信号肽酶切位点, 得分为 0.824, 最可能的分割位点在 28—29(LIL-QY)。这说明该蛋白存在信号肽酶切位点, 有信号肽, 是一种分泌蛋白。从而可以推测阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 在细胞质中合成, 可以被转移到细胞质外作用于外源性物质。

经过 NCBI CD-Search service 和 ScanProsite 蛋白位点和

酸序列的基本特征进行分析, 结果显示其编码蛋白分子量为 58.71 kD, 等电点 (PI) 6.34, 氨基酸组成中带正电荷氨基酸 (K, R) 55 个, 占 10.66%, 带负电荷氨基酸 (D, E) 62 个, 占 12.02%, 整个蛋白带正电荷, 疏水性氨基酸 (A, I, L, F, W, V) 184 个, 占 35.66%, 极性氨基酸 (N, C, Q, S, T, Y) 133 个, 占 25.78%。

亲疏水性分析结果(图 5)显示: P450 1A1 蛋白在第 30—40, 55—80, 90—190, 200—220, 240—310, 340—370, 390—450 区域和 480—516 区域为亲水性区域, 余下的氨基酸为疏水性的。可见, 亲水性残基所占比例远远大于疏水性残基, 因此推测该蛋白是亲水性的。

序列模式分析表明, 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 编码蛋白可能含有一个半胱氨酸亚铁血红素配合基结合域, 位于第 456—465 个氨基酸残基, 由 FGLGKRRRCIG 组成, 半胱氨酸亚铁血红素配合基结合域使 P450 1A1 能与膜结合的蛋白, 使其能够结合在内质网和线粒体内膜上。

用 TMpred 对 P450 1A1 跨膜性质进行预测, 显示有四个跨膜区(图 7), 316—338 是很强的由内向外的跨膜转运区, 1—30, 188—206 和 464—484 为优先的由外向内跨膜转运

区。用 SOPMA 对 P450 1A1 蛋白二级结构预测结果(图 8)所示, α 螺旋 (Alpha helix 230 个 AA) 44.57%, 延伸主链 (Extended strand 56 个 AA) 10.85%, β 转角 (Beta turn 21 个

AA) 4.07%, 随机卷曲 (Randomcoil 209 个 AA) 40.50%, 可知阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 基因编码的蛋白主要以无规卷曲和 α 螺旋为主, 间或有 β 转角。

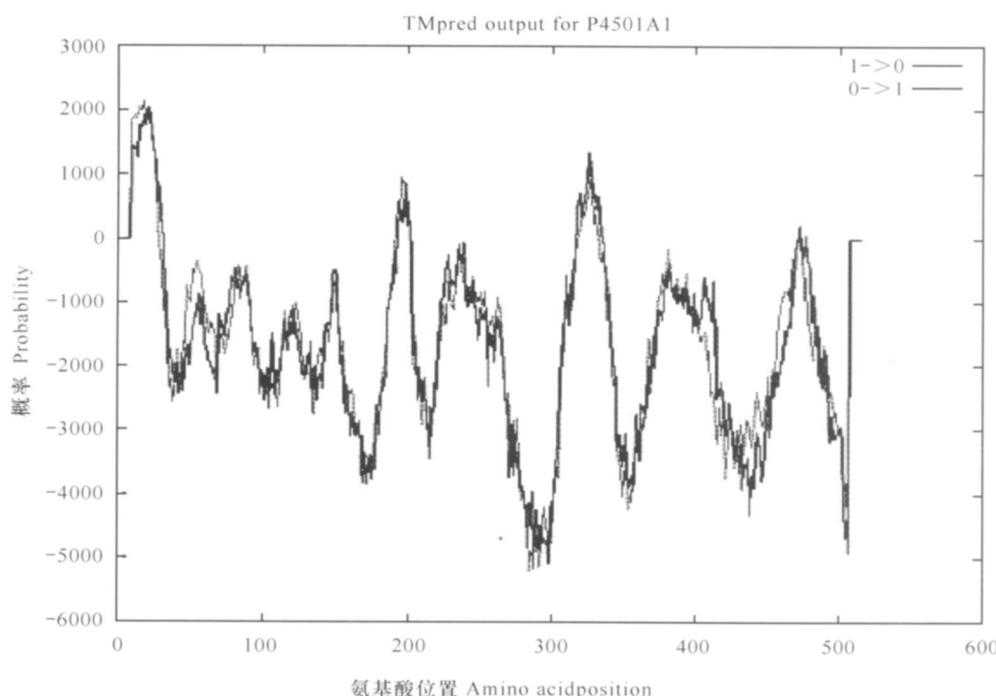


图 7 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 基因氨基酸跨膜区段的预测
Fig. 7 Prediction of the transmembrane amino acid segment of Mugil gobius abei

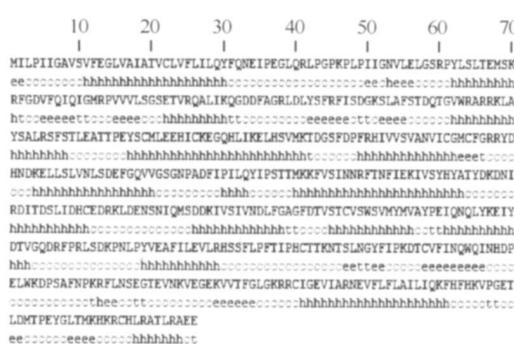


图 8 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 蛋白二级结构预测
Fig. 8 Prediction on secondary structure of P450 1A1

α 螺旋: 230 (44.57%); 延伸主链: 56 (10.85%); β 转角: 21 (4.07%); 随机卷曲: 209 (40.50%); 数字代表氨基酸的数量
Alpha helix (h): 230 (44.57%); Extended strand (e): 56 (10.85%); Beta turn (t): 21 (4.07%); Randomcoil 209 (40.50%); Numbers of amino acids are represented by number

3 讨 论

P450 1A1 基因在真菌、细菌、植物、脊椎动物以及鱼类上是高度保守的^[7]。本研究以 P450 1A1 为研究对象, 采用 RACE 法及嵌套 PCR 法, 首次对阿部鲻

进行分离与克隆, 获得了阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 基因的 cDNA 全序列, 并对该基因编码的氨基酸序列进行同源性和系统进化分析。所克隆序列包含亚铁血红素结合区、酶功能所需的精氨酸密码子等 CYP 1A 分子主要特征和功能域, 编码由 516 个氨基酸残基组成的蛋白质, 通常认为, 蛋白质的空间结构及其功能较核酸一级序列具有更大的保守性, 因此一般来讲, 如果蛋白质序列间的相似性大于 30%, 它们很可能是同源的^[8]。通过蛋白质同源性检索发现, 阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 与进化地位不同的其他各类动物的 P450 1A1 基因编码的氨基酸序列存在高度的同源性, 表明该基因在进化上是高度保守的, 保守位点的存在对于其功能的维持可能起着至关重要的作用。

鱼类 P450 1A1 已作为有效的 POP 污染生物标志物应用于环境监测中。研究表明, 哺乳类和鱼类 P450 1A1 酶活性对环境污染物的暴露有较敏感的响应, 但酶活性容易受到各种因素的影响, 而抗原性受蛋白变性的影响较小, 相比较而言, 蛋白定量检测方法在应用上有更好的稳定性, 且操作简单, 成本也相对较低。但是蛋白定量检测方法的建立需要特异性抗体, 而目前针对鱼类 P450 1A 的特异性抗体只有虹鳟、鲤鱼等几种, 由于不同鱼类 P450 1A 有所差异, 制备阿部鲻鰕鯱 P450 1A1 的特异性抗体对于阿部鲻鰕鯱的环境应用意义重大^[9]。阿部鲻 体型小, 直接从组织中分离提纯

P450 1A1蛋白较为困难。通过原核表达目标蛋白,再制备特异性抗体对于阿部鲻𫚥鱂更为可行。P450 1A1基因的获得是蛋白定量检测方法建立的重要上游工作。与其他已采用的鱼类材料相比,阿部鲻𫚥鱂在应用上有其特点和优点:它是我国常见的河口鱼类,栖息于河口咸淡水交界水域及近海岸浅水滩涂处。其栖息环境与人类生活环境密切相关,受人类活动扰动较大,对多种污染物有较强的敏感性,而阿部鲻𫚥鱂 P450 1A1基因的获得,为下游利用 P450 1A1在不同水平上的响应检测提供了基础。

参考文献:

- [1] Goksoy A, Forján L. The cytochrome P450 system in fish aquatic toxicology and environmental monitoring [J]. Aquat Toxicol, 1992, **23**: 287—312
- [2] Stegeman JJ, Lech J J. Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure [J]. Environ Health Perspect, 1991, **90**: 101—109
- [3] Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Jinan University. The freshwater fishes of Guangdong Province [M]. Guangzhou: Guangdong Sci & Techno Press, 1991: 456—457 [中国水产科学研究院珠江水产研究所,暨南大学,等编. 广东淡水鱼类志. 广州: 广东科技出版社, 1991: 456—457]
- [4] Froehman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full length cDNA from rare transcripts amplification using a single gene specific oligonucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, **85**(23): 8998—9002
- [5] Cao JL, Yu JH, Li JL, et al. Cloning and sequence analysis of DMT gene in *Oreochromis aureus* [J]. China J Fisheries, 2007, **14**(1): 23—31 [曹谨玲, 俞菊华, 李建林, 等. 奥利亚罗非鱼 DMT基因克隆与序列分析. 中国水产科学, 2007, **14**(1): 23—31]
- [6] Fang P, Li YW, Hu W, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding GFRH-II from rice field eel [J]. Acta Hydro Sinica, 2007, **46**(1): 95—99 [方平, 李英文, 胡炜, 等. 黄鳍 GFRH-II 的 cDNA 克隆与序列分析. 水生生物学报, 2007, **46**(1): 95—99]
- [7] Wu X. The biodiversity and phylogeny of cytochrome P450 [J]. World Pest, 2000, **22**(1): 17—22 [吴霞. 细胞色素 P450的生物多样性和植物保护. 世界农药, 2000, **22**(1): 17—22]
- [8] Goodman M T, McDuffie K, Hernandez B, et al. CYP1A1, GSIM1 and GSTT1 polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population [J]. Gynecol Oncol, 2001, **81**(2): 263—269
- [9] Bard SM, Woodin B R, Stegeman JJ. Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpurescens*) exposed to environmental contaminants [J]. Aquat Toxicol, 2002, **60**: 17—32