

阿部鲮鰟鲃 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 MUGILOGOBIOUS ABEI

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

(1. Institute of the Hydrobiology Jinan University Guangzhou 510632

2. Pearl River Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences Guangzhou 510380)

关键词: 阿部鲮鰟鲃; 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 成为有机污染物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。

阿部鲮鰟鲃 *Mugilogobius abei* 属鲈形目鰟鲃鱼科, 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。阿部鲮鰟鲃属底栖穴居鱼类, 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。本实验通过对阿部鲮鰟鲃的 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鲮鰟鲃, 在实验室内培养两周。实验时一次腹腔注射 β -萘黄酮

(β -NF), 注射剂量 5 mg/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 低熔点琼脂糖为 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*)、大西洋鲑 (*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: P₁: 5'-GTATCTCTG-8VATGTCCTC 3'; P₂: 5'-CCACTGRTTGATGAAgACRCAGGTGT 3' 引物用去离子双蒸水 (ddH₂O) 溶解至 20 μ mol/L, -20 $^{\circ}$ 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 方法提取阿部鲮鰟鲃肝脏总 RNA, 然后取 3 μ 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: 国家自然科学基金 (40471118) 科技部公益研究专项 (2004D11Z029) 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: nxpnie@jnu.edu.cn

RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver 1.1 方法, 以阿部鳎鰽肝脏总 RNA 为模板, 合成 cDNA 第一链: 反应体系为 20 μL 其中含 RNase Free dH₂O 4.5 μL, 10× RNA PCR Buffer 2 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μL, dNTP (10 mmol/L each) 2 μL, RNase Inhibitor (40 U/μL) 0.5 μL, Reverse Transcriptase (5 U/μL) 1 μL, Oligo dT-Adaptor Primer (20 μmol/L) 1 μL, 阿部鳎鰽肝脏总 RNA 5 μL。反转录反应条件为: 46℃ 30 min, 97℃ 5 min, 5℃ 5 min。PCR 扩增以 cDNA 第一链为模板, 用 P₁、P₂ 两个引物进行 PCR 扩增: 50 μL 体系包含 dd H₂O 31.75 μL, 10× LA PCR™ Buffer II (Mg²⁺ free) 4 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μL, TaKaRa LA Taq 0.25 μL, 上游引物 P₁ 0.5 μL, 下游引物 P₂ 0.5 μL, 反转录液 10 μL。PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 然后进行 30 个循环反应, 其温度循环条件为: 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 循环结束后 72℃ 再延伸 7 min。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 (DH5α), 转化好的 DH5α 菌株涂布于含有 X-gal/PTG 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 P₁: 5' GGACAAGACAGATTTCCTCGCT₃'; P₂: 5' TGCGGCACTGTCATTC 3'; P₃: 5' CTCTCTGTCATGTGATCATAGCGCC 3'。

3' RACE 根据试剂盒的操作流程进行, 用 5 μL 总 RNA 以 Oligo dT adaptor primer [5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC (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 P₁ 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 μL 作为模板, Adaptor primer 和 P₂ 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 μL 总 RNA 以 P₁ 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 P₂ 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 P₃ 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 DH5α 感受态细胞, 在含有 100 μg/mL 的氨苄青霉素以及 IPTG 和 X-Gal 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 DNAsar 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.ch.embnet.org> DNAsar 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 DNAsar 的 EDIT-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 DNAsar 的 Pro-tein 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 SOBM 分析工具 [5]。

2 结果

2.1 阿部鳎鰽 P450 1A1 基因的分离

应用 P₁ 和 P₂ 进行引物 PCR 扩增, 电泳结果显示, 在约 650 bp 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: 阿部鳎鰽 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 同源性高达 88%, 是预期的 P450 1A1 cDNA 序列; 根据所得序列设计合成引物 P₁、P₂ 和 P₃, 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鳎鰽 P450 1A1 全序列 (图 2), 该 cDNA 总长 1943 bp, 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 kD, 3' 非翻译区 411 bp。

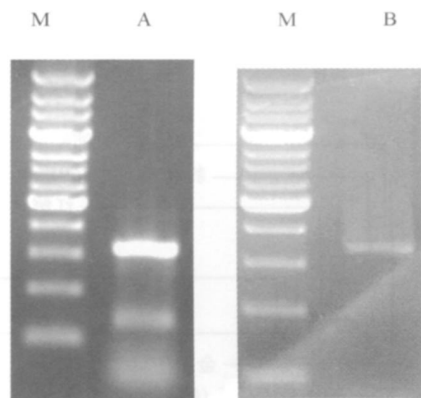


图 1 阿部鳎鰽 P450 1A1 扩增结果
Fig 1 Mugil gobius abs P450 1A1 PCR product
A RT-PCR B 5'端巢式 PCR 扩增结果 Smi nested PCR product M 200 bp DNA ladder Marker

M I L P I I G A V S V F E G L V A I A T V C L V F L I L Q Y F Q N E I .
1 ATG ATA CTA CCA ATC ATT GGA GGT GTG TCC GTC TTT GAG GGT CTT GTG GCC ATA GCA ACA GTG TCC TTG GTC TTT CTG ATC TTA CAA TAT TTT CAA AAT GAA ATT .
P E G L Q R L P G P K P L Y I I G N V L E L G S R P Y L S L I E M S K .
106 CCT GAG GGG CTT CAG COT TTG COT GGT CCC AAA CCA CTA CCA ATC ATT GGT AAT GTG TTG GAG CTG GGC AGC AAA COT TAC CTG AGC CTC ACT GAA ATG AGC AAG .
R F G D V F Q I Q I G M R P V V V L S C S E I V R Q A L I K Q C D D F .
211 CGC TTT GGA GAT GTC TTT CAG ATC CAG ATT GGG ATG CGC COT GTG GTT GTG CTG AGT GGC AGT GAG ACA GTT COT CAG GCA CTC ATC AAA CAA GGA GAT GAT TTT .
A G R L D L Y S F R F I S D G K S L A F S T D Q T G V U R A R R K L A .
316 GCT GAA AGA CTT GAT CTG TAT AGC TTT CGC TTC ATC AGC GAT GGC AAG ACT CTG GCC TTC AGC ACA GAG CAA ACC GGT GTG TGG CGA GCT COT AGA AAG CTG GGC .
Y S A L R S F S T L E A T T P E Y S C H L E E H I C K E G Q H L I K E .
421 TAG AGC GGC CTG GGC TCC TTG TCC ACC TTA GAG GGC ACA ACT CGG GAG TAT TCA TGC ATG TTG GAG GAG CAC ATC TGC AAA GAG GGA GAA GAT CTA ATC AAG GAG .
L H S V M K T D G S F D P F R H I V U S V A N V I C C H C F C R R Y D .
526 CTC GAC TCT GTT ATG AAG ACA GAT GGA AOT TTT GAT COT TTT CGC CAC AIT GTG GTT TCT GTA GCC AAT GTT ATC TGT GGG ATG TGT TTT GGT CGG CGC TAT GAT .
H N D K E L L S L V N L S D E F C Q U V C S C N P A D F I P I L Q Y I .
631 CAC AAT GAC AAA GAG CTG CTA AGC TTG GTG AAT CTC AGT GAT GAG TTT GGC GAG GTT GTT GGC AGT GGG AAT COT GGG GAC TTC ATA COT AIT CTT CAG TAT ATT .
P S T T M K K F V S I N N R F T N F I E K I V S Y H Y A T Y D R D N I .
736 CCA AGT ACA ACA ATG AAG AAG TTT GTG AGC ATC AAT AAC AGA TTC ACA AAT TTT AIT GAG AAG ATT GTC AGC TAT CAC TAT COT ACC TAT GAT AAG GAC AAC ATT .
R D I T D S L I D H C E D R K L D E N S N I Q M S D D K I U S I V N D .
841 CGG GAG ATC ACA GAC TCC CTC ATT GAT CAC TGT GAG GAT CGG AAA CTA GAT GAG AAC TCA AAC ATT CAG ATG TCT GAT GAC AAG ATA GTC AGC AIT GTC AAT GAC .
L F C A G F D I V S I C V S U S V M Y H V A Y P E I Q N Q L Y K E I Y .
946 CTG TTC GGA GCT GGT TTT GAT ACA GTC TCT ACC TGT GTG TCC TGG TCT GTC ATG TAC ATG GTT GCC TAT CCA GAA ATA CAA AAT CAA CTG TAT AAA GAA ATA TAT .
D T V G Q D R F P R L S D K P N L P Y V E A F I L E V L R H S S F L P .
1051 GAT ACA CTG GGA CAA GAC AGA TTT COT CGC TTG TCA GAT AAA COT AAT TTA CCC TAC GTT GAG GCT TTC ATT CTG GAG GTG TTG CGG CAC TGG TCA TTC CTT COT .
F T I P H C T I K N I S L N G Y F I P K D I C V F I N Q U Q I N H D P .
1156 TTC ACA ATC CCA CAC TGC ACC ACT AAA AAC ACA TCT CTT AAT GGC TAC TTT ATT CGG AAG GAC ACC TGC GTC TTC ATC AAC CAC TGG CAG ATA AAC CAC GAT CCA .
E L U K D P S A F N P K R F L N S E C T E V N K V E C E K V U T F G L .
1261 GAG CTC TGC AAA GAT COT TCT GCA TTT AAC CCA AAG COT TTC CTG AAC AGT GAA GGC ACA GAG CTC AAC AAG GTC GAG GGG GAG AAA GTC GTC ACT TTT GGT CTG .
G K R R C I G E V I A R N E V F L F L A I L I Q K F H F H K V P G E I .
1366 GGT AAA AGC CGC TGC AIT GGG GAG GTC AIT CCA AGA AAT GAA GTT TTT CTC TTC CTG GCA ATT CTC ATC CAG AAG TTT CAC TTC CAC AAG GTT COT GGT GAG ACA .
L D H T P E Y G L T M K H K R C H L R A T L R A E E .
1471 CTG GAC ATG ACT CCA GAA TAT GGG CTA ACA ATG AAA CAT AAA CGC TGC CAC GTT CGA GGC ACA TTA CCA GGA GAA GAG TAA AGC CAT TAT GTT TTT ACA GTG TAT .
1576 TTT AAA AAT GGT TGG ACT CTA GAT TGT ACT AAC ATC AGC TGG GCA ATC CAT ACC ACT CTA AAA TCT ATG CAT CCA CAG GTT TGG TTT GTG TAC TCT TCA GCT TAA .
1681 AGT GCA ACA GCA GAT ATA TTT GTT TGT TAT TCG ACA GGC AAA GCT TTT AAT AGC TAT TTG TAC AIT CAT TGG TCA TGG TAG GAT GAA GTA AIT TCA GTG TAT AAG .
1786 CAT ATA CAC AAG ATA AAT ATA COT TGA AGC TAT AIT TGT ATC CCA AAT GTG AIT GTC ATG TTT TTG TTT TTC TAT TTT TAT TAT AAG GAA TTA TTA TTT TTA GAC .
1891 TTT TGT ATA CTT TTA ATA AAA TTT TGA CAA TAC AAA AAA GAA AAA AAA AA .

图2 阿部鲮鰈鲢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

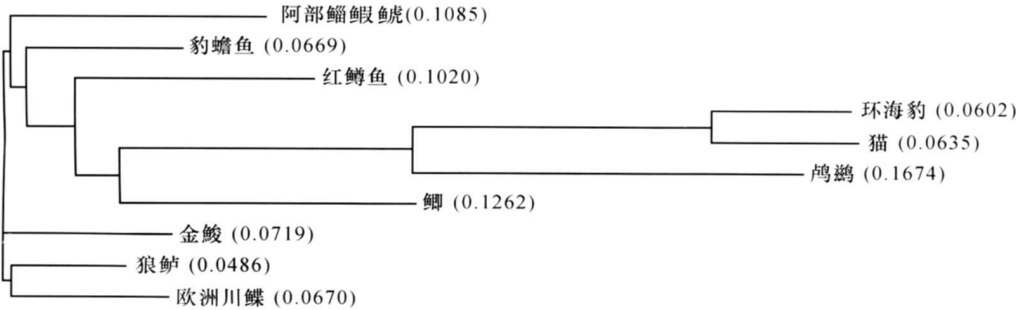


图3 P450 1A1 蛋白质的系统进化树,数字代表 Bootstrap 值
Fig. 3 Phylogenic tree of P4501A1 protein

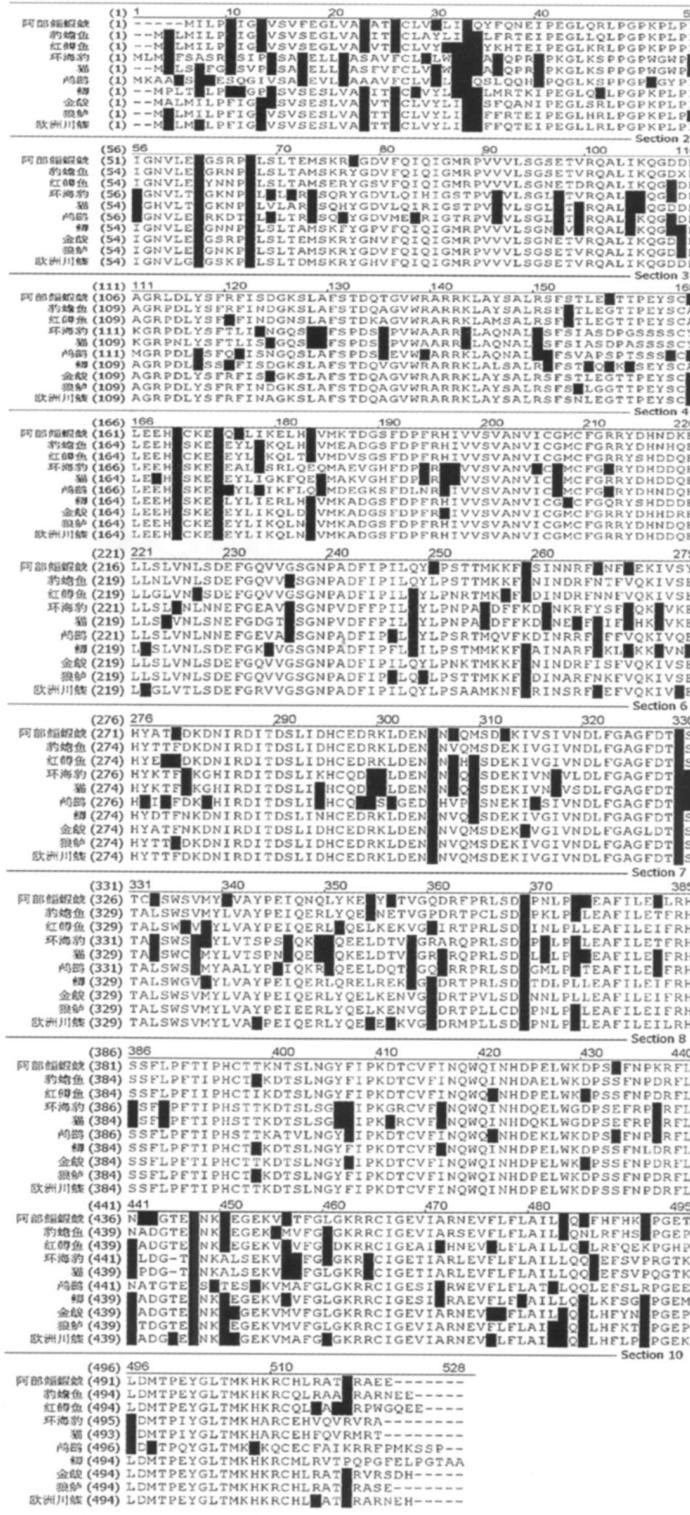


图 4 阿部鲯鲯 P450 1A1 与其他动物的 P450 1A1 氨基酸序列比较

Fig. 4 Alignment of P450 1A1 amino acid sequence

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

2 2 同源性比较

阿部鰮鰻 P450 1A1 基因的氨基酸序列经 BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 分析, 发现与其他生物体的阿部鰮鰻 P450 1A1 基因具有较高的同源性。利用 VectorNTI 软件包将阿部鰮鰻 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, 阿部鰮鰻 P450 1A1 与刺泥鰻 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 软件对阿部鰮鰻 P450 1A1 基因编码氨基

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。

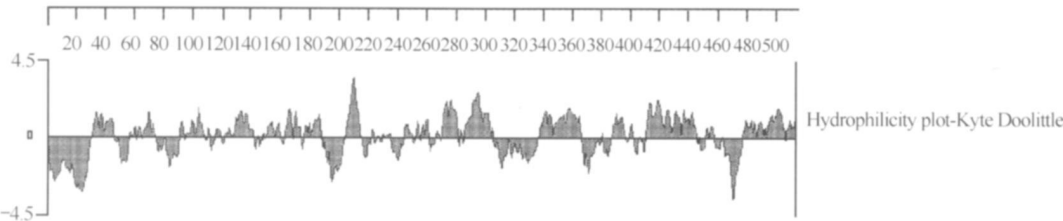


图 5 阿部鰮鰻 P450 1A1 蛋白亲/疏水特性
Fig. 5 Hydrophilicity/hydrophobicity analysis of *Mugilogobius abei* P450 protein

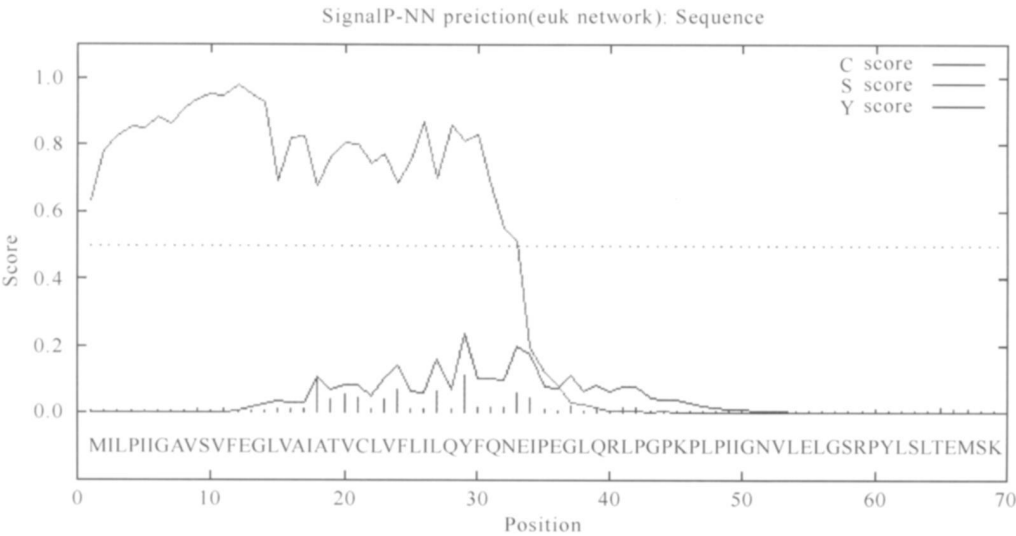


图 6 阿部鰮鰻 P450 1A 信号肽预测
Fig. 6 Prediction of the Signal peptide of P450 1A
C score: 原始剪切位点的分值; S score: 信号肽的分值; Y score: 综合剪切点的分值
C score: Original cut score; S score: Signal score; Y score: General cut score

用 signalP 对阿部鰮鰻 P450 1A1 氨基酸序列进行信号肽分析可知 (图 6), 阿部鰮鰻 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。从而可以推测阿部鰮鰻 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

序列模式分析表明, 阿部鰮鰻 P450 1A1 编码蛋白可能含 1 个半胱氨酸亚铁血素配合基结合域, 位于第 456—465 个氨基酸残基, 由 FGLGKRRICG 组成, 半胱氨酸亚铁血素配合基结合域使 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

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鲮鰟鲃更为可行。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,阿部鲮鰟鲃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,而阿部鲮鰟鲃 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] Goksöyr A, Forlin L. The cytochrome P450 system in fish aquatic toxicology and environmental monitoring[J]. Aquat Toxicol, 1992, 22: 287— 312

[2] Stegeman J J, 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 Academic of Fishery Sciences, Jinan University. The freshwater fishes of Guangdong Province[M]. Guangzhou: Guangdong Sci& Tech 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] Frohman 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 Nat Acad Sci USA, 1988, 85(23): 8998— 9002

[5] Cao J L, Yu J H, Li J L, et al. Cloning and sequence analysis of DMT gene in Oreochromis aurea[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 Y W, Hu W, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding G-RHII from rice field eel[J]. Acta Hydro Sinica, 2007, 46(1): 95— 99 [方平, 李英文, 胡伟, 等. 黄鳝 G-RHII 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 phytopharmac 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, M Duffie K, Hernandez B, et al. CYP1A1, GSTM1 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 S M, Woodin B R, Stegeman J J. Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (Aroplarchus purpurascens) exposed to environmental contaminants[J]. Aquat Toxicol, 2002, 60: 17— 32