

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)CYP2 基因的 cDNA 克隆及表达分析*

冯艳艳^{1,2} 李 健² 张德宁^{1,2} 刘 萍² 葛倩倩² 吕建建² 高保全²

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 通过 RT-PCR 及 SmartTM Race 技术, 首次克隆了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)CYP2 基因 cDNA 全长序列。该基因 cDNA 全长 1662bp, 编码一个由 492 个氨基酸组成的多肽, 预测理论等电点为 6.348, 分子量大小为 56.68kD。氨基酸序列中含有 CYP 基因家族所特有的 K 螺旋保守序列(ExxR)和血红素结合区(FxxGxxxCxG)。经氨基酸序列比对及系统进化树分析发现, 与岸蟹(*Carcinus maenas*)的同源性最高, 达到 75%。实时荧光定量 PCR 结果表明, CYP2 基因在肝胰腺、鳃、肌肉、血淋巴、心脏和眼柄中均有分布, 在肝胰腺中表达量最高。肌肉注射磺胺嘧啶后, 三疣梭子蟹高、中、低三剂量组 CYP2 基因表达较对照组都有上调, 并具有时间差异性, 低剂量组表达量逐渐降低, 趋于对照组, 中剂量组和高剂量组表达量先升高后降低, 6h 后同一时间点, 均是高剂量组表达最高, 低剂量组最低。表明磺胺嘧啶可诱导三疣梭子蟹 CYP2 基因, CYP2 基因可能参与三疣梭子蟹的药物代谢反应。

关键词 三疣梭子蟹; CYP2; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR; 磺胺嘧啶

中图分类号 Q78 doi: 10.11693/hyhz20131100186

细胞色素 CYP450 (cytochrome CYP450, CYP450) 酶系是一类亚铁血红素蛋白的超家族酶系, 主要是参与多种内源物质(保幼激素及其类似物、蜕皮甾酮、脂肪酸和信息素等)和外源物质(药物、环境毒物等)(Danielson, 2002; Matthias *et al*, 2008; 刘晨晖等, 2010)的代谢。自 1958 年首个 CYP450 蛋白在大鼠肝微粒体中被发现以来(Jensen *et al*, 1958), CYP450 酶系的研究已经有五十多年的历史(Estabrook, 1996)。20 世纪 80 年代, 随着分子生物学技术的应用, Fujii-Kuriyama 等(1982)克隆和测序了老鼠肝 CYP450 基因(Chen *et al*, 1982), 这标志着 CYP450 研究由生物化学、生物物理学特征的鉴定及酶学功能的研究转变为基因表达的调控机制和结构与功能的对应关系上(朱磊等, 2011)。生物体 CYP450 酶系活性受到遗传、机体状态、营养、疾病等多种因素的影响, 尤其是许多

药物外源化合物可诱导或抑制 CYP450 酶的活性, 从而影响药物的代谢(夏伟, 2000)。目前, 国内外对水产品动物 CYP450 酶研究较少, 但随着对 CYP450 酶分子水平的认识和体外研究技术的进步, 可以通过研究外源物质对 CYP450 酶的诱导和抑制情况, 预测或评估水产动物体内可能发生的药物相互作用, 指导药物的安全联用(胡晓, 2010)。CYP450 酶系在药物代谢中起主要作用的有四个家族: CYPs1—4, 其中 CYP1、CYP2 和 CYP3 家族酶承担着人体三分之二药物的代谢(Guengerich, 2008; 樊慧蓉等, 2006), 而在甲壳动物中目前只发现了 CYP2 和 CYP4 家族基因。CYP2 家族是目前已知的 CYP450 同工酶中最大、最复杂的家族(周园等, 2002), 它是 CYP450 中的重要成分, 主要参与许多低分子有机化合物及药物在体内的代谢。有关海洋甲壳类 CYP2 基因的研究报道十分

*国家高技术研究发展计划(863 计划), 2012AA10A409 号; 山东省自主创新专项, 2013CX80202 号; 农业科技成果转化基金项目, 2013GB23260589 号。冯艳艳, 硕士研究生, E-mail: yarufeng@sina.cn

通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-11-23, 收修改稿日期: 2014-01-10

有限, 现只在佛罗里达龙虾 *Panulirus argus* (Boyle *et al.*, 1998)和岸蟹 *Carcinus maenas* (Rewitz *et al.*, 2003) 中有报道, 三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 尚未见报道。本实验主要克隆了三疣梭子蟹 CYP2 基因的 cDNA 全长序列, 并对序列进行比较分析; 利用 Real time RT-PCR 方法分析该基因的组织表达情况及其在外源药物(磺胺嘧啶)作用下表达量的变化, 以期为进一步了解甲壳类动物 CYP450 的功能和作用机制, 探讨 CYP450 与药物之间的相互作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 实验于 2012 年在山东省潍坊市昌邑海丰水产养殖有限责任公司进行。实验所用材料为三疣梭子蟹“黄选 1 号”80 日龄幼蟹, 体重 (32.66±6.27)g。健康个体暂养于半径 3m 的室内水泥养殖池中, 每池 80 只。水温 22—25°C, pH 7.8—8.4, 盐度 25—27, 持续充氧, 每天换水 1/3, 投喂蓝蛤。暂养一周。

实验试剂 Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; TaKaRa TaqTM、PMD18-T 载体、Top 10 感受态细胞、SMARTTM RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自日本 TaKaRa 公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 及 3'、5'RACE cDNA 的合成

取健康三疣梭子蟹个体的肝胰腺于液氮中研磨, Trizol 法提取总 RNA, 按照 Invitrogen 说明书进行; 并用紫外分光光度计与 1%凝胶电泳检测其质量与完整性。核酸蛋白测定仪(Thermo, NANO DROP-2000)测定 RNA 浓度。用 PrimerScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 产品去除基因组 DNA 后合成第一链 cDNA; 按照 SMARTTM RACE Amplification Kit 试剂盒的使用说明, 合成用于 3'和 5'RACE 扩增的 cDNA。反转录产物于-40°C 冰箱保存备用。

1.3 三疣梭子蟹 CYP2 基因 cDNA 中间片段的克隆

从美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中搜寻佛罗里达龙虾 *P. argus*、斑马鱼 *Danio rerio* 和虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 的 CYP2 基因, 利用 ClustalX 软件对以上序列进行同源性对比以确定其保守区域, 并设计兼并引物 CYP2-F1 和 CYP2-R1。以三疣梭子蟹肝胰腺 cDNA 为模板, 以 CYP2-F1 和 CYP2-R1 为引物, 扩增三疣梭子蟹 CYP2 基因中间片段。PCR 扩

增反应体系为 100μL, 扩增反应条件为: 94°C 5min 预变性, 94°C 30s 变性, 52°C 30s 退火, 72°C 1min 延伸, 30 个循环, 最后 72°C 10min 延伸, 4°C 保存。PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段大小。用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)回收目的片段并进行纯化, 纯化产物与 pMD18-T 载体(日本 TaKaRa 公司)连接, 并将重组质粒转化到大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞(日本 TaKaRa 公司)中, 涂平板、进行蓝白斑筛选, 阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后送上海生物工程有限公司测序。

1.4 CYP2 基因 3'和 5'末端扩增

中间片段经 NCBI 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)后, 可证实所得三疣梭子蟹 CYP2 基因部分序列与其他物种的 CYP2 基因同源。利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物: CYP2-RACE3'和 CYP2-RACE5'。两条引物用于 RACE 扩增 cDNA 全长序列, 3'-RACE 和 5'-RACE PCR 扩增使用 Advantage 2 PCR Kit 试剂盒(日本 TaKaRa 公司), PCR 产物的分离、纯化和测序等方法同中间片段克隆。引物序列见表 1。

表 1 三疣梭子蟹 CYP2 基因全长克隆及定量 RT-PCR 表达所用引物

引物	引物序列(5'—3')
CYP2-F1	CTKMGRGACYTKGGKATGGG
CYP2-R1	GAAGAGCTCCATCCTGGCCA
CYP2-RACE3'	GGAAGCGAGACCACCTCCAACACCT
CYP2-RACE5'	TTTGCCGTTCTCATCCAGCCAGCG
CYP2 荧光-F	GATGGAGGCAAAGAAAGATGAC
CYP2 荧光-R	GAAGGTGTTGGAGGTGGTCTC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC
β-actin-F	CGAAACCTCAACACTCCCG
β-actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC

1.5 CYP2 基因的生物信息学分析

使用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列去除和序列拼接, 使用 EditSeq 程序预测开放阅读框(ORF)、翻译氨基酸和蛋白质理化性质的预测。使用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLASTN 和 BLASTX 软件对 CYP2 基因进行同源性分析。使用 PredictProtein 服务器进行蛋白序列功能位点分析(PROSITE motif search)。使用 Signal P3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测蛋白信号肽。使用 ClustalX 软件对三疣梭子蟹

与其他物种的 CYP2 基因氨基酸序列进行多序列比对, 在此基础上采用 MEGA 4.0 软件, 以邻接法(Neighbor-joining)构建系统进化树。

1.6 三疣梭子蟹本体表达及肌注磺胺嘧啶对 CYP2 基因表达的影响

1.6.1 实验设计

给药方法: 根据《新编渔药手册》的推荐剂量和预实验结果, 把暂养了一周的三疣梭子蟹随机分为 4 组, 每组 50 个个体, 分别为对照组(0.7%生理盐, C)、磺胺嘧啶低剂量(15mg/kg, SD-L)、磺胺嘧啶中剂量(30mg/kg, SD-M)和磺胺嘧啶高剂量(60mg/kg, SD-H)。按照各处理组给药剂量, 通过三疣梭子蟹第四步足与体壁关节膜处肌肉注射给药(吴光红等, 2008), 注射前和注射后用酒精棉对注射部位进行消毒处理。各处理组每天注射一次, 连续 5 天。

取样方法: 于末次给药 24h 后 1、3、6、12、18、24、48、72h 取样, 每组取肝胰腺组织样品, 每个时间点随机取 3 只, 液氮保存。另取 3 只健康无注射药物的三疣梭子蟹的肝胰腺、鳃、肌肉、血淋巴、眼柄和心脏进行 RNA 提取, 以检测三疣梭子蟹 CYP2 基因在不同组织中的表达水平。

1.6.2 CYP2 基因 mRNA Real Time RT-PCR 定量检测

将各组反转录好的三疣梭子蟹肝胰腺的 cDNA 用 DEPC 水稀释 3 倍, 配制 10 μ L 体系反应液。分别加入 SYBR Premix Ex TaqTM II (2 \times) 5 μ L, PCR 正反引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, ROX Reference Dye II 0.2 μ L, cDNA 稀释模板 1 μ L, 灭菌水 3 μ L。三疣梭子蟹 CYP2 基因荧光定量引物: CYP2 荧光-F 和 CYP2 荧光-R(见表 1), 以三疣梭子蟹 β -actin 为内参基因(见表 1)。荧光定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30s, 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 40 个循环。不同时间点同一样品的目的基因和内参基因均在同一个 96 孔板上进行, 每个样品采取三个平行。实验仪器为 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR 荧光定量 PCR 仪, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析数据。

1.7 数据统计分析

实验结果用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析($P < 0.05$ 时表示差异显著, 用*表示; $P < 0.01$ 时表示差异极显著, 用**表示), 并进行 Duncan 氏多重比较(当 $P < 0.05$ 时差异显著)。

2 结果

2.1 CYP2 基因的全长 cDNA 序列分析

采用 RACE 方法扩增获得三疣梭子蟹 CYP2 基因

cDNA 全长为 1660bp(GenBank 登录号: KF781516), 包含 1479bp 的开放阅读框(ORF)、93bp 的 5'非编码区和 88bp 的 3'非编码区, 编码一个由 492 个氨基酸组成的多肽, 预测理论等电点 PI 为 6.348, 分子量大小为 56.68kD。有一个终止子, 并含有一个多腺苷酸信号 ATAAA 和一个 poly(A)尾巴。起始密码子 ATG 位于 94—96 位核苷酸。

用 SignalP 3.0 程序分析该基因的推导理论氨基酸发现 CYP2 的 1—21 氨基酸区域具有一个信号肽。利用 PredictProtein 服务器对三疣梭子蟹 CYP2 蛋白序列进行功能位点分析, 发现该蛋白序列具有多个功能位点(图 1), 包括: 1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点: 118—121; 5 个酪蛋白磷酸化位点: 83—86, 97—100, 280—283, 337—340, 488—491; 7 个 N-肉蔻酰基化位点: 24—29, 105—110, 129—134, 153—158, 297—302, 333—338, 383—388; 5 个蛋白激酶 K 磷酸化位点: 41—43, 121—123, 202—204, 282—284, 488—491; 1 个酰胺化位点: 430—433; 1 个 CYP450 家族特有的亚铁血红素结合区: 428—437。

蛋白质的磷酸化、酰基化和酰胺化都属于化学修饰, 通过对这些位点的鉴定有助于进一步研究蛋白质主要定位、可能的稳定性结构以及功能作用的发现等, 具有非常重要的生物学意义。

2.2 CYP2 基因多序列比对及系统进化树分析

使用 DNAMAN 软件对三疣梭子蟹 CYP2 氨基酸序列与其他物种的 CYP2 氨基酸序列进行同源比对分析, 结果如图 2。三疣梭子蟹 CYP2 基因与甲壳动物中的岸蟹 *C. maenas* 的同源性最高, 达到 75%, 与佛罗里达龙虾 *P. argus* 同源性为 39%, 与脊椎动物底鳉 *Fundulus heteroclitus*、黑点青鳉 *Oryzias melastigma*、红尾蝴蝶鱼 *Chaetodon xanthurus*、默氏蝴蝶鱼 *Chaetodon mertensii*、斑马鱼 *Danio rerio*、食蟹猴 *Macaca fascicularis*、褐家鼠 *Rattus norvegicus* 的同源性分别为 36%、35%、36%、35%、33%、35%、32%。利用 MEGA4.0 软件构建系统进化树并分析, 结果表明: 三疣梭子蟹 CYP2 基因与甲壳动物中的岸蟹 *C. maenas* 紧密聚为一支, 之后又与佛罗里达龙虾 *P. argus* 聚为一支(图 3)。

2.3 CYP2 基因在三疣梭子蟹各组织中的表达

利用 Real Time RT-PCR 检测三疣梭子蟹在组织中的 CYP2 基因转录表达量, 结果表明, CYP2 基因在肝胰腺、鳃、心脏、肌肉、眼柄和血淋巴中都有表达。以血淋巴中表达量为基准, 在肝胰腺中表达量最高

```

1 ACA TGG GGA GAC GCG TGG TAC TGT CTG CAG GGT TCG GCG GTG CTG GGA CAG TCA GCT TGA ATA CAA GAC AGG CAT CGG TGG CAA GCC GCT 90
91 GAG ATG TTG GTG GAG GTG TTT CTG TTC GCT GTG CTG GTG TTC CTG CTG TGG AAG ACC TTC AGT AAG CCT CCA GGA TTG CCT CCA GGC AAG 180
   M L V E V F L F A V L V F L L W K T F S K P P G L P P G K
181 TGG GGG CTT CCC CTG GTG GGC TAC ATC CCC TGG ACC AGC AAG AAC TTT GAG GAG CAG GTG ATG GAC CTC CAC CAG CAG TAT GGA AAC ATC 270
   W G L P L V G Y I P W T S K N F E Q V M D L H Q Q Y G N I
271 TTC TTA TGG AGG ATG GGG ACA CAG TTA ATG ATT TTT ATA AAC GAC TAC AAA CTG ATG AAA GAA GCT TTC TCC AGA GCC GAA TTT ATT CCC 360
   F L W R M G T Q L M I F I N D Y K L M K E A F S R A E F I P
361 AGA CCA GAT TGG GAT GTA CTG ACA TTA ATA GAT GAG CTT CCC CAC GGA ATC GTT TCA TCT AGC GGC ATT TTA TGG CAC AAC AAC CGC AGA 450
   R P D W D V L T L I D E A P H G I V S S S G I L W H N N R R
451 TTT ACG CTG CGG CAG CTG CGT GAC CTT GGC ATG GGC AAG TCC TCC CTG GTG GGG GCG GTG CAG CAG CAA TGC CTT AAG CTG CGC GAG ACA 540
   F T L R Q L R D L G M G K S S L V G A V Q Q Q C L K L R E T
541 CTC GCC AAG GGG GCT GGA ACA GGT GTA GTG ATT AAC CAT CAG CTT CAT CTG TCT GTG ATT AAT ATC ATC TGG TAC ATG GTG GCG AGC AGA 630
   L A K G A A G T A V V I N H Q L H L S V I N I I W Y M V A S R
631 CAG TTT GAT GCA GAA AAC AAA AGA TTA CAC GAG TTT GTA GAC CTT TTA TCA GAT CTA GTT ATA CTT TCC AAT CGA TGC GCC ATC AAG GAC 720
   Q F D A E N K R L H E F V D L L S D L V I L S N R L A I K D
721 TTC ATG CCG TGG ATG CAG AAT GTC ATG CCG GAT TTC CTC TTT AAA CGC CTC ATT AAA TAT CAT GAA ATG ATG GAC ATG AAG GAA AAG TTC 810
   F M P W M Q N V M P D F L F K R L I K Y H E M D M K E K F
811 TTG CAG TTC TTT AGG GAA GAG GTC GAG GAG CAC AAG GCC ACT TTG GAT CCA AAC CAC CCG CGG GAC CTC ATT GAT AGC TAC TTG CTG GAG 900
   L Q F F R E E V E E H K A T L D P N H P R D L I D S Y L L E
901 ATG GAG GCA AAG AAA GAT GAC CCG GAA ACA ACC TGC AGC GAG AGA GAT TTG ATG TTT CTA ATG TTT GAG ATG TTC AGT GCG GGA AGC GAG 990
   M E A K K D D P E T T C S E R D L M F L M F E M F S A G S E
991 ACC ACC TCC AAC ACC TTC ACG TGG GTG TGT TGC TAC CTG GCG GCA CAT CCG CAG GTT CAG CGC AAG TTG CAT GCT GAG ATT GAC GAA TGC 1080
   T T S N T F T W V C C Y L A A H P Q V Q R K L H A E I D E V
1081 CTT CCC AGT GGA GCT CTG CCC ACC TTG GCG GAG AAG TCT AGG ATG CCG TAC ACG GAG GCC GTG ATT CAC GAA GTG ATG AGA GCT TGT TCA 1170
   L P S G A L P T L A E K S R M P Y T E A V I H E V M R A C S
1171 CTG ATA AAC TTC GGA GTA CAG CAC ATG GCC GCC AGT GAC CCG CAG CTG GGG GTC ACC ATT CCA AAG GGA GCA GTC GTG AGC ACC ACC 1260
   L I N F G V Q H M A A S D T Q L G G Y T I P K G A V V S T T
1261 GTC ACG GCG ATC CAC TAT GAC AGT CGC TAC TGG GAT CCG CCC GAG GAG TTC AGR CCG GAG CGC TGG CTG GAT GAG AAC GGC AAA TTC TCC 1350
   V T A I H Y D S R Y W D S R Y W D R P E E F R P E R W L D E N G K F S
1351 ATG GTC AAG GAG GGA TTC CTG CCC TTC GGT GTG GGA AAG AGA GTT TGC GTT GGG GAA AGT CTG GCC AGG ATG GAG CTG TTC ATC CTC ACA 1440
   M V K E G F L P F G V G K R V C V E S L A R M E L F I L T
1441 ACC ATG GTC TTC CAA AGC TTC GCC ATC GCT CCT CCG CCT GGC AAA TCT GTC AAC TTG ACA CCT GAT TTG AGC GGT TTC TTC TTC CGT AAG 1530
   T M V F Q S F A I A P P P G K S V N L T P D L S G F F R K
1531 GCA ATG CCC AAT GAG TTC GTC TTC ACC GCC AGG GAA CAG TAA TGG TCG CTA TGG CAA TCA TCA GCC GTC CTG TAA AGT ATG TCA GCA ACA 1620
   A M P N E F V F T A R E Q *
1621 ACA AAT ATT CTC TCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A 1660

```

图 1 三疣梭子蟹 CYP2 基因 cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of CYP2

方框内的 ATG 为起始密码子, 终止密码子由*表示, 下划线为信号肽序列, 方框内是 K 螺旋保守区, 椭圆为血红素结合区保守序列 (FxxGxxxCxG)

($P < 0.01$), 其次是鳃 ($P < 0.01$), 在血淋巴中表达最少 (图 4)。

2.4 不同剂量及作用时间的磺胺嘧啶对 CYP2 基因在肝胰腺中表达变化量的影响

利用 Real Time RT-PCR 检测三疣梭子蟹在注射不同剂量的磺胺嘧啶在不同时间点肝胰腺中 CYP2 基因转录表达量的变化情况(图 5)。结果显示, 连续注射磺胺嘧啶 5d 后, 各实验组均有 CYP2 mRNA 的表达, 三个剂量组较对照组均出现不同程度的上调。其中, 低剂量组在给药后的 1、12、18 和 24h 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且表达量逐渐降低趋于对照组; 中剂量组和高剂量组在各取样点表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对于同一测定时间, 磺胺嘧啶低中高剂量组的 CYP2 基因的表达量 6h 后呈现高剂量组 > 中剂量组 > 低剂量组。

3 讨论

目前有关海洋无脊椎动物细胞色素 CYP450 的研究主要集中在基因克隆及功能分析方面, 但与脊

椎动物相比, 有关海洋甲壳类 CYP450 基因的研究报道十分有限(张喆等, 2011)。1996 年, James (1984)首次从甲壳动物佛罗里达龙虾 *P. argus* 中克隆出了 CYP2 家族的 CYP2L1 基因, 随后, Boyle 等(1998)在 *P. argus* 肝胰腺中又克隆出多条 CYP2L 基因, 预示海洋甲壳动物 CYP2 基因具有多态性。2003 年, 同样属于第二家族的 CYP330A1 序列在岸蟹 *C. maenas* 肝胰腺中被分离出来(Rewitz et al, 2003)。此外, 研究人员在岸蟹 *C. maenas*(Rewitz et al, 2003)、中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis*(张喆等, 2011)和利莫斯螯虾 *Orconectes limosus*(Dauphin-Villemant et al, 1999)等海洋甲壳动物中发现了 CYP4 基因, 并研究了其参与苯并芘、多氯联苯、多环芳烃等环境污染物和水产药物诺氟沙星等外源化合物和蜕皮激素等内源性物质的代谢(Snyder, 1998; 张喆等, 2011)。虽然 CYP450 包括很多家族, 各家族参与催化的底物种类和反应类型之间具有差异性, 但是在结构上仍然保留着一些共同的保守区域, 即 CYP 基因家族所特有的 K 螺旋保守序列(E_{xx}R)和血红素结合区

(FxxGxxxCxG) (冷欣夫等, 2001)。K 螺旋保守区可能是与 CYP450 的电子供体相作用, 血红素结合区中

绝对保守的半胱氨酸与催化活性中心亚铁血红素中的铁元素形成硫醇盐离子键, 从而成为铁的一个配

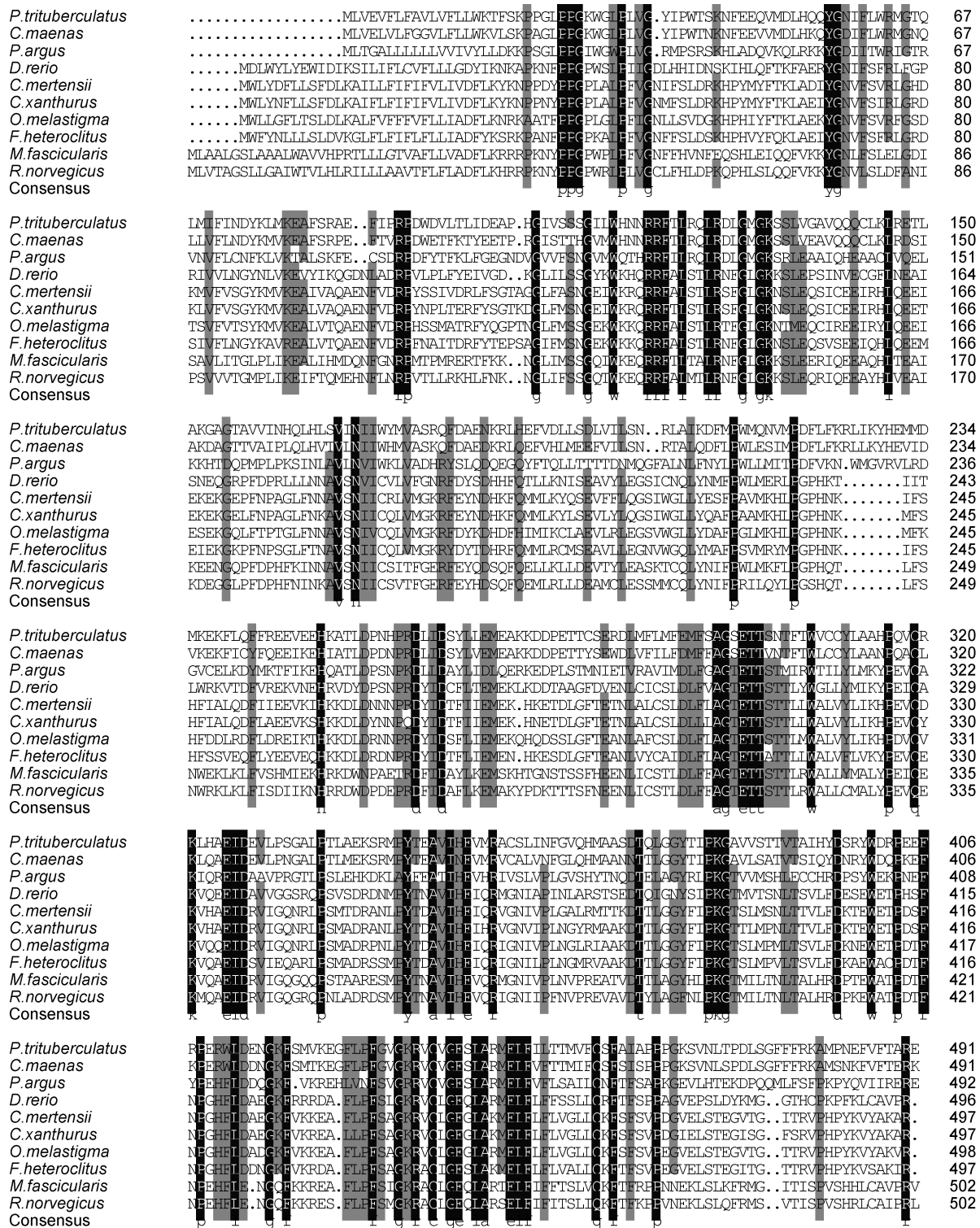


图 2 三疣梭子蟹 CYP2 氨基酸序列与其他动物 CYP2 的氨基酸序列比对
Fig.2 Multiple alignment of CYP2 amino acid sequence with other CYP2 animals
相同的氨基酸用暗色背景表示, 缺失的氨基酸用“-”表示

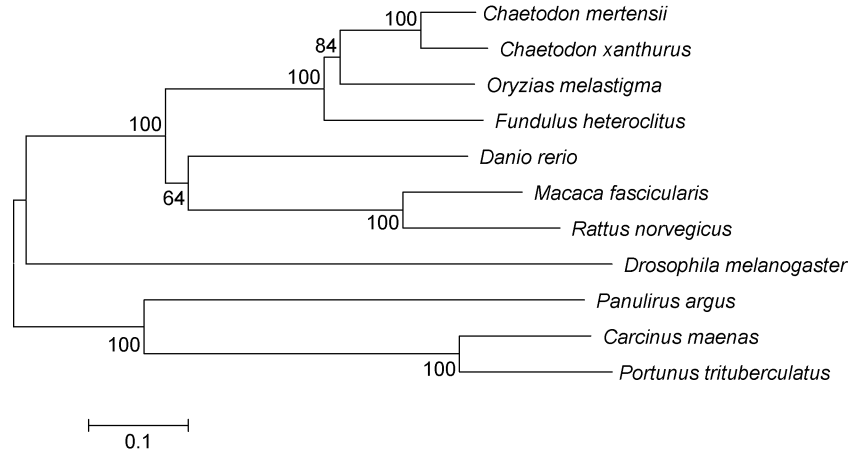


图3 不同物种的 CYP2 基因系统进化树

Fig.3 CYP2 phylogenetic tree of different species

默氏蝴蝶鱼: *Chaetodon mertensii*, ABO21082.1; 红尾蝴蝶鱼: *Chaetodon xanthurus*, ABO21094.1; 黑点青鳉: *Oryzias melastigma*, AGN04296.1; 底鳉: *Fundulus heteroclitus*, AAD54016.1; 食蟹猴: *Macaca fascicularis*, AAZ29440.1; 褐家鼠: *Rattus norvegicus*, NP786942.1; 斑马鱼: *Danio rerio*, NP001076504.1; 果蝇 *Drosophila melanogaster*, AAB69750.1; 岸蟹: *Carcinus maenas*, AC194903.1; 三疣梭子蟹: *Portunus trituberculatus*, KF781516; 佛罗里达龙虾: *Panulirus argus*, Q27712.1

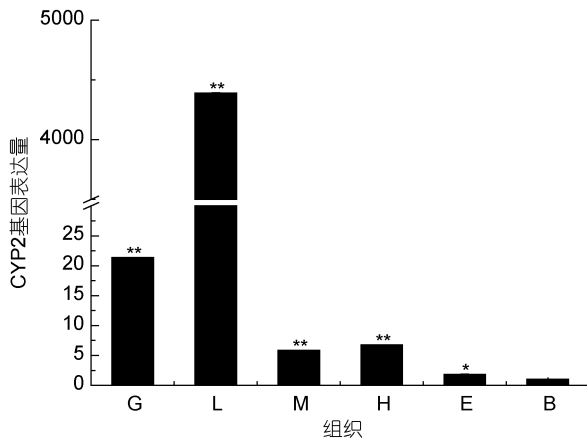


图4 三疣梭子蟹 CYP2 基因在组织中表达量

Fig.4 Distribution of CYP2 transcript in different tissues of *P. trituberculatus*

G: 鳃; L: 肝胰腺; M: 肌肉; H: 心脏; E: 眼柄; B: 血淋巴

体,这正是蛋白能够与氧结合的关键结构,同时也是作用于底物的酶活性中心(Aenzenbacher, 2001)。本研究首次克隆了三疣梭子蟹 CYP2 基因 cDNA 全序列,该基因的氨基酸序列含有 CYP450 蛋白保守区域,此区域包括血红素结合区(FxxGxxxCxG)、绝对保守的半胱氨酸(Cys)和位于 K 螺旋保守区中的序列(ExxR)。将三疣梭子蟹 CYP2 氨基酸序列与其他物种进行同源比对分析发现,三疣梭子蟹与岸蟹 *C. maenas* 同源率为 75%;进行系统进化分析发现三疣梭子蟹 CYP2 基因与甲壳动物的亲缘关系最近,与岸蟹 *C. maenas* 紧密分为一支,由此更证明了本实验克隆的 CYP2 基

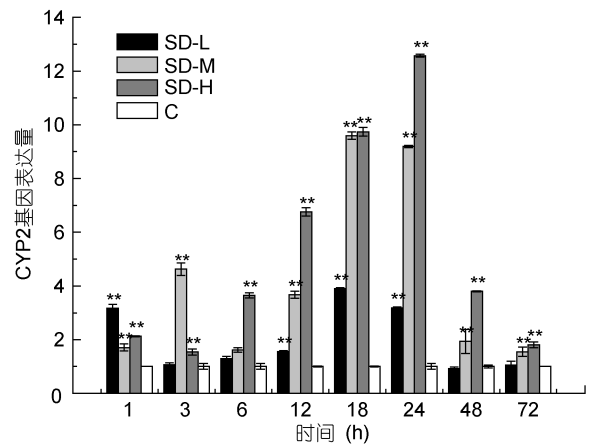


图5 不同浓度磺胺嘧啶对三疣梭子蟹肝胰腺 CYP2 基因表达的影响

Fig.5 Variation of CYP2 gene in *P. trituberculatus* hepatopancreas after sulfadiazine treatment at different time

SD-L: 磺胺嘧啶低剂量组(15mg/kg); SD-M: 磺胺嘧啶中剂量组(30mg/kg); SD-H: 磺胺嘧啶高剂量组(60mg/kg); C: 对照组

因为三疣梭子蟹 CYP2 基因。

通过 Real Time RT-PCR 方法对三疣梭子蟹 CYP2 本体表达进行研究发现: CYP2 基因在机体中分布广泛,在肝胰腺、鳃、肌肉、心脏、眼柄和血淋巴中均有表达。其表达强度最高为肝胰腺,其次是鳃,最后在肌肉、心脏、眼柄和血淋巴中表达量最少。之所以在肝胰腺中表达最多,是因为肝胰腺是对外来物质(包括药物或有毒物质)进行代谢反应的主要部位。Gonzalez(1993)在研究 CYP450 的生物学功能时发现,

虽然 CYP450 基因表达比较广泛,但其表达还是有选择性的,在哺乳动物中 CYP2A1 只在肝脏中表达,这与肝脏的解毒功能有关。Brown 研究证明鱼类的 CYP450 主要在脾、肝、心、头肾、肾、鳃中表达,其中在脾和肾中表达水平较高(Brown, 1998; 郭小泽, 2009)。Solé 等(2005)在对一系列海洋无脊椎动物 CYP450 的组织分布进行研究时发现, CYP450 在环节动物的肠中表达水平最高,在软体动物的消化腺中表达量最大,在甲壳动物的肝胰腺中表达最多,此研究结果与在岸蟹 *C. maenas* 中的研究类似(Dam *et al.*, 2008)。Matsuo 等(2008)利用荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法方法对银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*) CYP1A、CYP2K1、CYP2M1 和 CYP3A27 基因进行了研究,发现 CYP1A、CYP2M1 和 CYP3A27 在研究的所有组织中均有表达,且 CYP3A27 在各组织的表达量均最高,而 CYP2K1 只在肝脏和嗅觉器官中表达。

生物体在生活环境中会接触到许多外来物质,对外来物质的清除主要通过肝脏系统 CYP450 基因表达进行,这些基因的酶产物催化外来物质极性化,促使外来物质易于从体内排出(范岚等, 2009)。同时 CYP450 转录表达容易受到外来物质的影响,外来物质可以诱导或者抑制 CYP450 从而影响治疗效果或产生毒副作用。外来物质主要通过影响 CYP450 mRNA 的转录水平、CYP450 的翻译过程或者 CYP450 酶的活性等对 CYP450 产生影响。CYP2 是 CYP450 中一种重要的药物代谢酶,在甲壳动物中主要存在于肝胰腺,参与许多低分子有机化合物及药物在体内的代谢。在哺乳动物, CYP2 活性已被用于指示外源性化合物引起的肝脏疾病。2006 年,刘树民等(2006)发现黄药子可诱导大鼠肝脏中 CYP2E1 基因的表达,黄药子和当归配伍后 CYP2E1 基因的表达下降,说明黄药子和当归在 CYP2E1 基因的转录水平发挥作用。2007 年,陈大健等(2007a, b)研究发现氟苯尼考和乙醇对鲫鱼 CYP2E1 酶均具有抑制作用,说明氟苯尼考和乙醇在 CYP2E1 酶的活性上发挥作用。2003 年, Rewitz 等(2003)发现岸蟹 *C. maenas* 肝胰腺中 CYP330A1 (属于 CYP2 基因家族)的表达能够被聚丁二烯、苯并[a]芘诱导,说明聚丁二烯、苯并[a]芘在 CYP330A1 基因的转录水平发挥作用。本实验用不同浓度磺胺嘧啶刺激三疣梭子蟹 CYP2 基因的表达,发现磺胺嘧啶在 CYP2 mRNA 转录水平上有影响。各浓度磺胺嘧啶均可诱导肝胰腺中 CYP2 基因的表达,并

且给药剂量越大, CYP2 基因上调水平越高,且出现的峰值越晚,这说明三疣梭子蟹 CYP2 基因与磺胺嘧啶的代谢有关,并且给药浓度影响 CYP2 的表达程度,其原因可能是给药浓度越高,肝胰腺 CYP2 基因表达量越多且持续时间越长,代谢药物的能力就越强,以使机体尽快将药物代谢到正常水平。这是机体细胞的一种自我保护机制,通过这样的机制,细胞增强了对外源性物质解毒的能力。随着给药时间的推移 CYP2 mRNA 转录水平逐渐降低,其原因可能是随着给药时间的推进,药物在机体的浓度不断减少,药物代谢量也不断降低,导致 CYP2 基因的表达慢慢降低最终回到原来的水平。磺胺嘧啶可使 CYP2 mRNA 表达升高,说明其对 CYP2 有诱导作用,揭示了磺胺嘧啶与 CYP2 酶的底物药物合用时,很可能发生药物的相互作用,应适当调整用量,避免发生不良反应。

本文主要围绕三疣梭子蟹药物代谢酶 CYP2 基因克隆及磺胺嘧啶对其 mRNA 表达水平影响进行研究,为进一步充分了解 CYP450 家族的生理功能及生理、生化反应过程,还需要更深入的研究三疣梭子蟹 CYP2 基因表达的组织特异性、蛋白表达及酶活性的影响。对于三疣梭子蟹 CYP2 基因的克隆、序列分析以及其表达情况的研究,有利于进一步深入研究三疣梭子蟹 CYP2 基因在其生长发育和药物代谢中的作用,同时为深入研究其他物种的 CYP2 基因功能奠定了理论基础。

参 考 文 献

- 朱磊, 胡晓, 房文红等, 2011. 异育银鲫 P450 家族 CYP3A136 基因的克隆与表达. 水产学报, 35(10): 1450—1457
- 刘树民, 张琳, 李颖等, 2006. 黄药子与当归配伍对大鼠肝脏 CYP1A2、CYP2E1 基因 mRNA 表达的影响. 中药药理与临床, 22(3): 75—76
- 刘晨晖, 乐江, 2010. 细胞色素 P450 CYP2E1 酶构型特征及其表达调控机制的研究进展. 中国药理学与毒理学杂志, 24(2): 155—160
- 吴光红, 张静波, 孟勇等, 2008. 不同水温下恩诺沙星在中华绒螯蟹体内的药代动力学. 南京农业大学学报, 31(2): 105—110
- 冷欣夫, 邱星辉, 2001. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景. 北京: 科学出版社, 2
- 张喆, 李健, 王芸等, 2011. 中国对虾细胞色素 P450 基因 CYP4 原核表达条件优化. 海洋科学, 35(9): 49—55
- 陈大健, 王加才, 张萍等, 2007a. 氟苯尼考对鲫鱼 CYP2E1 活性影响的药代动力学评价. 中国兽医科学, 37(03): 269—273

- 陈大健, 杨海峰, 覃少华等, 2007b. 乙醇对鲫鱼 CYP2E1 活性的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 35(8): 269—273
- 范 岚, 谢海棠, 李 智等, 2009. 黄芩苷对 Chang Liver 细胞 CYP3A4、CYP2C9 和 CYP2C19 表达的影响. 中国现代医学杂志, 19(23): 3546—3550
- 周 园, 胡艳丽, 李丽燕等, 2002. 细胞色素 P450 酶的研究进展. 农垦医学, 24(3): 224—226
- 胡 晓, 2010. 喹诺酮类药物对异育银鲫 P450 酶系的影响及 3A 亚型克隆. 四川: 四川农业大学硕士学位论文, 1—16
- 夏 伟, 2000. 细胞色素 P450 的研究进展. 国外医学: 卫生学分册, 27(1): 41—45
- 郭小泽, 2009. 三角帆蚌细胞色素 P450 基因的克隆与表达. 湖南: 湖南农业大学硕士论文, 11—36
- 樊慧蓉, 和 凡, 刘昌孝, 2006. Cocktail 探针药物法用于评价细胞色素 P450 同工酶影响的研究进展. 中国药学杂志, 41(14): 1045—1048
- Anzenbacher P, Anzenbacherova E, 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. Cellularand Molecular Life Sciences CMLS, 58(5—6): 737—747
- Boyle S M, Greenberg R M, James M O, 1998. Isolation of CYP2L2 and two other cytochrome P450 sequences from a spiny lobster, *Panulirus argus*, hepatopancreas cDNA library. Marine Environmental Research, 46(1—5): 21—24
- Brown D J, Clark G C, Van Beneden R J, 1998. A new cytochrome P450 (CYP30) family identified in the clam *Mercenaria mercenaria*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 121(1): 351—360
- Chen Y T, Negishi M, 1982. Expression and subcellular distribution of mouse cytochrome P450 mRNA as determined by molecular hybridization with cloned P₁-450 DNA. Biochemical and Biophysical Research Communications, 104(2): 641—648
- Dam E, Rewitz K F, Styrisshave B *et al*, 2008. Cytochrome P450 expression is moult stage specific and regulated by ecdysteroids and xenobiotics in the crab *Carcinus maenas*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 377(4): 1135—1140
- Danielson P B, 2002. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. Current Drug Metabolism, 3(6): 561—597
- Dauphin-Villemant C, Bocking D, Tom M *et al*, 1999. Cloning of a novel cytochrome P450(CYP4C15) differentially expressed in the steroidogenic glands of an arthropod. Biochemical and Biophysical Research Communications, 264(2): 413—418
- Estabrook R W, 1996. The remarkable P450s: A historical overview of the versatile heme protein catalysts. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 10: 202—204
- Fujii-Kuriyama Y, Mizukami Y, Kawajiri K *et al*, 1982. Primary structure of a cytochrome P450: coding nucleotide sequence of phenobarbital inducible cytochrome P450 cDNA from rat liver. Proceeding of the National Academy of Science USA, 79(9): 2793—2797
- Gonzalez F J, 1993. Cytochrome P450 Evolution and Nomenclature. In: Sehenkman J B, Greim H eds. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, Berlin: 211—219
- Guengerich F P, 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. Chemical Research in Toxicology, 21(1): 70—83
- James M O, 1984. Catalytic properties of cytochrome P450 in hepatopancreas of the spiny lobster, *Panulirus argus*. Marine Environmental Research, 14: 1—11
- Jensen S L, Cohen-Bazire G, Nakayama T O *et al*, 1958. The path of carotenoid synthesis in aphotosynthetic bacterium. Biochimica et Biophysica Acta, 29(3): 477—498
- Matsuo A Y O, Gallagher E P, Trute M *et al*, 2008. Characterization of Phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Endocrinology, 147(1): 78—84
- Matthias D, Sabine E, Chimene A *et al*, 2008. Cloning, expression and characterization of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*. Applied Microbiology Biotechnology, 79: 931—940
- Rewitz K, Styrisshave B, Andersen O, 2003. CYP330A1 and CYP4C39 enzymes in the shore crab *Carcinus maenas*: sequence and expression regulation by ecdysteroids and xenobiotics. Biochemical and Biophysical Research Communications, 310(2): 252—260
- Snyder M J, 1998. Cytochrome P450 enzymes belonging to the CYP4 family from marine invertebrates. Biochemical and Biophysical Research Communications, 249(1): 187—190
- Solé M, Livingstone D R, 2005. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and 'NADPH-independent benzo [a] pyrene hydroxylase' activity in a wide range of marine invertebrate species. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 141(1): 20—31

CLONING AND EXPRESSION OF CYP2 GENE IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

FENG Yan-Yan^{1,2}, LI Jian², ZHANG De-Ning^{1,2}, LIU Ping², GE Qian-Qian²,
LV Jian-Jian², GAO Bao-Quan²

(1. Ocean University of Shanghai, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract The complete cDNA sequence of CYP2 gene in swimming crab *Portunus trituberculatus* was cloned first time in RT-PCR and SmartTM Race technology. The full-length cDNA of CYP2 was 1662bp encoding a 492 amino-acid polypeptide with the predicted molecular weight of 56.68kD and estimated isoelectric point of 6.38. The conserved K helix sequence (ExxR) and heme-binding motif (FxxGxxxCxG) of cytochrome CYP450 monooxygenases identified in CYP2 suggested that the CYP2 belonged to the cytochrome CYP450 subgroup. Comparison of amino acid sequences showed that the amino acid homology of CYP2 between *P. trituberculatus* and *Carcinus maenas* was >75%. Real time RT-PCR was used to assess the mRNA expression of CYP2 in organs or tissues and its expression level of CYP2 under different concentrations of sulfadiazine. The results show that CYP2 was widely expressed in all detected tissues, including hepatopancreas, gills, muscle, hemolymph, and eyestalk. The expression level of CYP2 was up-regulated distinctly in the hepatopancreas after intramuscular administration of sulfadiazine, gradually reduced with the time, and achieved the level of the control in 72h ($P<0.05$). Therefore, CYP2 could be induced by sulfadiazine and might be involved in the drug-metabolic response of *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; CYP2; gene cloning; expression; sulfadiazine