

异育银鲫 P450 家族 CYP3A136 基因的克隆与表达

朱磊^{1,2}, 胡晓^{1,2}, 房文红^{1*}, 胡琳琳¹,
李新苍¹, 李国烈^{1,2}, 写腊月¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所,农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室,上海 200090;

2. 四川农业大学动物医学院,四川 雅安 625014)

摘要: 根据5种硬骨鱼已知CYP3A序列保守区设计兼并引物,以异育银鲫cDNA为模板扩增得到CYP3A基因片段,根据得到片段序列设计特异引物并利用cDNA末端快速扩增技术(RACE)获得全长cDNA。得到异育银鲫CYP3A基因全长为1769 bp,开放阅读框为1545个核苷酸,编码514个氨基酸。其预测蛋白质分子量为58.624 ku,理论等电点为6.30。将异育银鲫CYP3A序列理论编码氨基酸序列提交细胞色素P450命名委员会(Cytochrome P450 Nomenclature Committee)并由其命名为CYP3A136。氨基酸序列分析显示,其与稀有鮟鮓、草鱼、鲮同源性较高,并且具有高度保守的血红素结合区域FXXGXXXCXG。异育银鲫CYP3A基因的半定量RT-PCR显示,在肝和肠组织中转录水平最高,在肾和鳃中次之,其余组织较低。

关键词: 异育银鲫; CYP3A136; 克隆; 组织分布

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

细胞色素P450(cytochrome P450,简称CYPs)是一类含有亚铁血红素的超家族单加氧酶,它参与许多外来物质(包括药物,环境化合物等)以及内源性内固醇和胆汁酸的生物转化^[1]。根据氨基酸序列的相似性,CYPs可以划分到不同的家族和亚家族^[2]。在人和哺乳动物中,CYP3A同工酶类占肝脏和小肠CYPs蛋白的最大比重,且具有丰富的多样性,在哺乳动物使用的药物中有超过50%的药物是CYP3A的底物或者抑制剂^[3]。这些酶参与了许多化学结构不同的化合物代谢,如毒素、杀虫剂、治疗药物、致癌物、饮食产品和激素等^[4]。与哺乳动物相比,鱼类中有关CYP3A的研究较少,主要有舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[5]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[6]、稀有鮟鮓(*Pimephales promelas*)^[7]、鲮(*Gobiocypris rarus*)^[8]等,国内仅见草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[9]。和哺乳动物一样,鱼类CYP3A同工酶具有多种亚型,主要存在于肝脏组织,在肠和鳃等其它组织中也有存在。

药酶的诱导或抑制是研究药物相互作用的基

础,分析CYP3A基因有助于揭示药物相互作用模式的分子机制。异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是我国重要的淡水养殖经济鱼类,在我国淡水水域广泛分布^[10],常用作环境污染评价。本研究使用同源序列法对异育银鲫CYP3A基因进行克隆,预测氨基酸序列、二级结构、功能区域、分析组织表达,旨在探明异育银鲫CYP3A基因分子背景,为后续设计定点突变实验,构建分子相互作用模型并进一步揭示其诱导和抑制等调控分子机制,以及蛋白分子和底物之间相互作用的关系等提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验试剂 3'-Full RACE Core Set Ver 2.0、RNAiso Plus、5'-Full RACE Kit、PrimeScript RT-PCR Kit、TaKaRa LA Taq[®] Hot Start Version、pMD-18T载体、DNase I及胶回收试剂盒均为大连宝生物公司产品,所用引物为上海生工生物有

收稿日期:2011-04-21 修回日期:2011-07-06

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2007M06)

通讯作者:房文红,E-mail:whfang06@yahoo.com.cn

限公司合成,其他试剂为国产分析纯。

实验动物 异育银鲫采自上海市青浦淡水鱼养殖场,体质量(160±10) g,暂于水循环、充氧玻璃水族箱,水温 25~27 °C,投食饲养 4 周后开始实验。

1.2 实验方法

CYP3A 基因片段的获得 从异育银鲫肝脏中提取总 RNA,并用 DNase I 除去基因组 DNA。紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,取 5 µg 总 RNA 合成 cDNA 第一链。

根据硬骨鱼类底鳃 (*Fundulus heteroclitus*) GenBank: AF105068. 2、日本青鳉 (*Oryzias latipes*) GenBank: AF105018. 1、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) GenBank: U96077. 1、鲮 GenBank: EU332794. 1、鲤 (*Cyprinus carpio*) GenBank: GU046696. 1 所公布完全编码区序列设计兼并引物 F-304、R-949 扩增 cDNA 并得到 CYP3A 中间片段。扩增条件为 94 °C 3 min(1 循环),94 °C 30 s,55 °C 30 s,70 °C 1 min(30 循环),72 °C 10 min(1 循环)。扩增片段在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳并回收,将回收片段克隆到 18T 载体并送交大连宝生物公司完成测序。

CYP3A 基因全长的获得 根据测序验证后 CYP3A 的部分片段,设计 RACE 3'引物 F-567 和 5'引物 R-312,按照 RACE 试剂盒说明分别进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增。反应条件:94 °C 3 min(1 循环),94 °C 30 s,60 °C 30 s,70 °C 2 min(30 循环),72 °C 10 min(1 循环)。PCR 产物分别克隆 18T 载体并由大连宝生物公司完成测序。拼接全序列后得到 CYP3A mRNA 完全编码序列,将预测的氨基酸序列提交细胞色素 P450 命名委员会 (Cytochrome P450 Nomenclature Committee)命名。实验过程中所用引物设计软件为 Primer premier 5.0,引物序列见表 1。

序列生物信息学分析 使用 NCBI 数据库中 Blast 程序对序列进行比对分析。使用 DNAMAN 6.0 软件和 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>)预测氨基酸序列、组成和蛋白质基本理化性质。信号肽和结构域分析采用 SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 Motif Scan(<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>)。使用 MEGA 4.1 软件构建系统发生树。用 predictprotein([\[predictprotein.org/\]\(http://www.predictprotein.org/\)\)初步预测蛋白结构。](http://www.</p>
</div>
<div data-bbox=)

表 1 异育银鲫 CYP3A 基因 RACE 和半定量 RT-PCR 相关引物列表

Tab. 1 Universal and specific primers used for RACE and semi-quantitative RT-PCR

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence
F-304	TCTTCACCAACMGMAGGAACT
R-949	CCGGCGAAGATGAAGATCATGG
F-567	ACCAGCACAGCCTTCAGCGTCCG
R-312	TGATGTTGGTCACAAAAGGGT
SQF	ATGGGCTCTGCTCATACTGTT
SQR	TCCTCCTCCAGTCGTCGTCTT
Beta-F	TGCCCTGGTCGTTGATAA
Beta-R	TGGCATAACAGGTCCTTACGAA

半定量检测 CYP3A mRNA 在异育银鲫组织分布 使用 RNAiso Plus 分别提取 3 尾异育银鲫肝、头肾、肾、前肠、中肠、后肠、脾、鳃和肌肉总 RNA,以 Oligo dT 和随机引物合成 cDNA 第一链。根据已获得的 CYP3A 全长序列设计引物 SQF 和 SQR,同时以异育银鲫 β -actin 基因序列(GenBank: AB039726)为内参设计引物 beta-F 和 beta-R,对各组织中 CYP3A 的表达进行半定量分析。扩增条件同为 94 °C 1 min(1 循环),94 °C 30 s,57 °C 30 s,70 °C 1 min(28 循环),72 °C 10 min(1 循环)。产物经 1.5% 琼脂糖电泳,通过 Quantity One 4.6 软件对条带进行分析,以 Gauss 痕迹量的 CYP1A/ β -actin 表示 DNA 的相对含量。

2 结果

2.1 异育银鲫 CYP3A136 基因的克隆和氨基酸序列分析

根据 5 种硬骨鱼类 CYP3A 同源性区域设计简并引物,获得了异育银鲫细胞色素 P450 3A 的部分片段,在此基础上进行 RACE-PCR 得到了 2 个长度分别为 653 bp 和 1 135 bp 大小的 5'和 3'端序列片段,由此拼接成长 1 769 bp 的全长 cDNA 序列(GenBank: GU998964),polyA 加尾信号 AATAAA(1 740~1 745 bp),5'端非编码区 30 bp,3'端非编码区 194 bp,开放阅读框 1 545 bp,编码 514 个氨基酸(图 1)。提交氨基酸序列到 P450 命名委员会并将该基因命名为 CYP3A136。预测其蛋白质分子量为 58.624 ku,理论等电点为 6.30。

```

1      GTTTTAGTCTGAGCGTCTGGAGCAGGAACCATGAGCTACGGTCTGTTCTTCTCTGCTGAAACATGGGCTCTGCTCATACTGTTTGTGAC
1      M S Y G L F F S A E T W A L L I L F V T
91     ACTTCTGTTTCATATATGGATCCTGGCCTCATGGTGTCTTCAAGAAGTTGGGGATCCCGGGCCCAACCTCTGCCGTTCTTCGGAACCAT
31     L L F I Y G S W P H G V F K K L G I P G P K P L P F F G T M
181    GCTGGAATATAGAAAGGGGTTTCACAACCTTCGATATGGAGTGTTCAGAAGAACGGACGAGTCTGGGGTATTTACGATGCGAGGCAGCC
61     L E Y R K G F H N F D M E C F K K N G R V W G I Y D A R Q P
271    TGTCTGTGCATCATGGACCTATCCATCATCAAAACCATCCTGGTTAAAGAATGCTACTCTCTTCCACCAACAGAAGAACTTCCGCTCT
91     V L C I M D L S I I K T I L V K E C Y S L F T N R R N F R L
361    GAACGGCCGCTGTACGATGCCGTGCCATCGTAGAAGACGACGACTGGAGGAGGATCCCGAGCGTCTCTGCCCTCCTTACCAGCGG
121    N G P L Y D A V S I V E D D D W R R I R S V L S P S F T S G
451    GAGGTTAAAGGAGATGTTCCGTATCATGAAGACTCACTCTCACACTCTGGTTGATAATCTGGGGAAAACAGCAACCGGAGGAGAAGCGGT
151    R L K E M F G I M K T H S H T L V D N L G K T A T R G E A V
541    GGAAATTAAGAGTTCTTCGGGGCTACGGTATGGATGTTGAGCAGCAGCGTTCAGCGTCGACATCGACTCCCTCAACAACCCCTAA
181    E I K E F F G A Y G M D V V T S T A F S V D I D S L N N P K
631    AGACCCTTTGTGACCAACATCAAGAAGATGCTGAAGTTGACTTCTGAAACCTGTGTTCTGATCAGCGCTGATTTCCCTTTCATCAC
211    D P F V T N I K K M L K F D F L N P V F L I S A V F P F I T
721    TCCTGTCTGGAGAAAATGGGTTTCGCCTTCTCCGACTTCTGTGACCGACTTCTTCTACGCTGCCTTGAAGAAGATCAAGTCTGAAAAG
241    P V L E K M G F A F F P T S V T D F F Y A A L K K I K S E R
811    AGTGTCCAGCGAGCAGAAGAAGAAGCGAGTGGACTTCTGACGCTGATGGTGGATTCTCAGACGGCTGGGGATCTGAGGAGCACACTGA
271    V S S E Q K K K R V D F L Q L M V D S Q T A G G S E E H T E
901    GAAAGTCTGAGCGACCACGAGATCCTCTCAGTCCATGATCTTCTATCTTCGGCGGTACGAGACCAGCAGCAGCAGCTGCTCCTTCTT
301    K G L S D H E I L S Q S M I F I F G G Y E T S S S T L S F F
991    CTTCTACAATCTGGCCACACCCCCGAGCCATGGAGAAGCTGCAGGGGAGATCGACCAGGCTTCTCTAGAGAGGATCCGGTGGACTA
331    F Y N L A T H P E A M E K L Q G E I D Q S F S R E D P V D Y
1081   TGAAGGCATCATGAACATGGAGTATCTGGACGACGGCTGAACGAGTCTCTGCGGCTTCCCATCGTTGCTCGACTGGAGCGCGTCTG
361    E G I M N M E Y L D A A L N E S L R L F P I V A R L E R V C
1171   TAAGAAAACGGTGGACATCAACGGCCTCCTGGTTCTAAAGACGTTGGTGGTATGATCCCGACCTTCGCCCTCCACAGAGACCCGGACTA
391    K K T V D I N G L L V P K D V V V M I P T F A L H R D P D Y
1261   CTGGAGCGAGCCGACAGCTTACAGCCGACAGGTTCTTAAAGACAACAGAGAGTGCATCGACCCCTACATGTTTCATGCCCTTCGGTCT
421    W S E P D S F R P Q R F S K D N R E S I D P Y M F M P F G L
1351   GGGCCCAGGAAGTGCATCGGGATGAGTTTCTCAGGTGAGCATCAAGTGGCCATCGTGGAGATCCTGCAGCGCTTCGAGCTCTCTGT
451    G P R N C I G M R F A Q V S I K L A I V E I L Q R F D V S V
1441   GTGTGAGCAGACTCAGTTCTCTGGAGCTCGACACCAGCGACTCCTGGCCCCAAGAGCCCATCAAACTCCAGTTCAAGCCTCGCAA
481    C E Q T Q V P L E L D T S G L L A P K S P I K L Q F K P R K
1531   ACCTTCCCTCTCAGAGGACATCTGTAACAACAACAACAGTCCGTAAGCAGCTCTCAGGCCGACGAGAAGCTTGCCTTCTTTCATCTT
511    P S L S E D I C N N N N T S *
1621   TTCAGACTGAGAGCTTGAAGTAACTTAGCTTCTGAGAGCACAGTTTCAAGTTCAGAGGTTTATTCTGATTGAGAGAACTAAACATGAGATC
1711   AGCCTTTAAAGATGTTCTGTGAAAATGAAATAAAATGTATGAAAAGTAAAAA

```

图1 异育银鲫 CYP3A136 开放阅读框及其编码的氨基酸序列

起始密码子用粗体标记,终止密码子用星号标出,信号肽用矩形框标出,血红素结合区用阴影标出。

Fig.1 Open reading frame and deduced amino acid sequence of CYP3A136 from crucian carp

Initiation codon is indicated in bold, terminator codon is indicated by asterisk, signal peptidase is boxed by black, heme-binding region are shadowed.

通过异育银鲫 CYP3A136 亚铁血红素结合区域和其他物种 CYP3A 基因的亚铁血红素结合区域进行对比,发现血红素结合区域 FXXGXXXCXG 在不同物种间具有高度保守性,除第 2 位氨基酸有物种间差异,其余氨基酸基本

相同(图 2)。

利用蛋白预测软件 predictprotein 以氨基酸序列对蛋白结构进行预测,结果显示在 10 - 27 和 216 - 233 氨基酸序列段存在高疏水区域,在 264 - 268 位氨基酸存在蛋白结合信号。

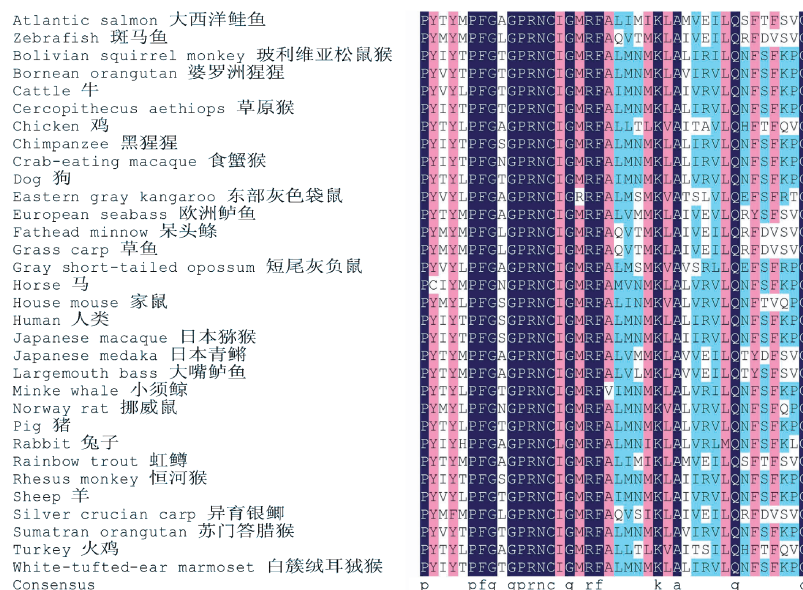


图 2 不同物种间 CYP3A 氨基酸亚铁血红素结合区域序列对比
(血红素结合区域高亮标出)

Fig. 2 CYP3A heme-binding region amino acids sequence alignment in different species (Heme-binding region is highlight)

2.2 CYP3A136 基因序列比对和系统进化分析

以异育银鲫 CYP3A136 开放阅读框序列通过 NCBI 网站 Blast X 同源对比发现:本实验所得异育银鲫 CYP3A136 基因与稀有鲟鲫 CYP3A (Genebank: ABV01347.1) 相似性为 83%,与草鱼 CYP3A (Genebank: ADO19749.1) 相似性为 82%,与鲮 CYP3A126 (ACA35026.1) 相似性为 80%。基于不同物种的 CYP3A 氨基酸序列构建系统发生树,进化树显示,异育银鲫与硬骨鱼类同属一支,哺乳动物,爬行动物、鸟类和脊索动物属于另外 4 支(图 3)。

2.3 异育银鲫 CYP3A136 基因的各组织活性

使用半定量 RT-PCR 方法对异育银鲫 CYP3A136 基因在各组织中的转录情况进行研究,结果显示,CYP3A136 转录活性最强的组织是肝和后肠,在前肠和中肠也有活性,在其他组织中转录保持较低水平(图 4)。

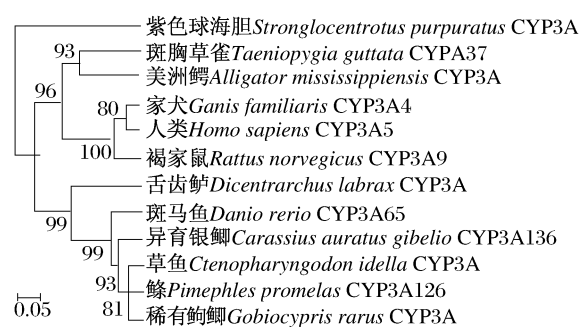


图 3 基于 CYP3A 氨基酸序列构建的几种生物
NJ 系统发生树(1 000 Bootstrap)

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed from the amino acid sequence by Neighbor-Joining(1 000 Bootstrap)

3 讨论

首个 P450 蛋白于 1958 年在大鼠肝微粒体中被发现^[11],后续从古细菌、植物到各类动物,细胞

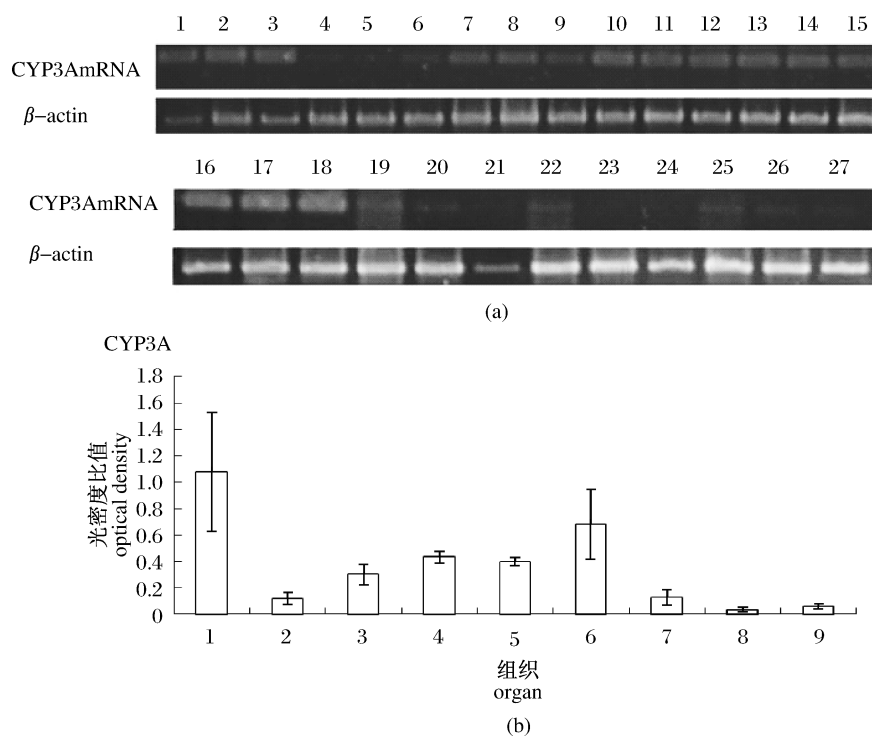


图4 半定量 RT-PCR 检测 CYP3A136 基因 mRNA 在异育银鲫的组织分布

(a) 1~3 号泳道为肝组织, 4~6 号泳道为头肾组织, 7~9 号泳道为肾组织, 10~12 号泳道为前肠, 13~15 号泳道为中肠, 16~18 号泳道为后肠, 19~21 号泳道为鳃组织, 22~24 号泳道为脾组织, 25~27 号泳道为肌肉组织。(b) 以 Gauss 痕迹量的 CYP3A/ β -actin 表示 DNA 相对含量, 异育银鲫各组织 CYP3A 分布柱状图($n=3$)。

1. 肝, 2. 头肾, 3. 肾, 4. 前肠, 5. 中肠, 6. 后肠, 7. 鳃, 8. 脾, 9. 肌肉。

Fig. 4 mRNA distributing in different organs detected by semi-quantitative RT-PCR

(a) Detect each organs repetitive group per every three lanes, according the number, organs are liver, head-kidney, kidney, former/middle/latter intestine, gill, spleen and muscle in turn. (b) semi-quantitative RT-PCR analysis of CYP3A mRNA distribution. The trace of the PCR products was analysed by using Gauss model and β -actin was used to normalize the data. Results are expressed as means \pm SD. (bar) ($n=3$).

1. liver, 2. head-kidney, 3. kidney, 4. former intestine, 5. middle intestine, 6. latter intestine, 7. gill, 8. spleen, 9. muscle.

色素 P450 超家族几乎在所有生物中被发现^[12]。1982 年, 细胞色素 P450 首次被克隆、测序^[13], 这标志着 P450 研究重点也慢慢由生物化学, 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来。截至 2009 年 8 月, 已发布 997 个家族, 2 519 个亚家族总计 11 294 个 P450 超家族基因。在众多 P450 酶系中, CYP3A 亚家族占主导地位, 广泛参与外源性脂质有机物及内源性类固醇激素类代谢^[14]。在遗传进化上, 脊椎动物 CYP3A 基因主要包括 4 个分支, 硬骨鱼类 (Teleost)、爬行类 (Diapsid)、鸟类 (Aves) 和哺乳动物 (Mammalian), 虽然 CYP3A 具有较大物种间差异, 但整个硬骨鱼类 CYP3A 有着较为保守的进化趋势。细胞色素 P450 参与催化的底物种类和反应类型具有广泛性和多样性, 各亚家族序列之间具有差异性, 但所有的

P450 都具有高度保守的血红素结合区域 (FXXGXXXCXG), 其中绝对保守的半胱氨酸与催化活性中心亚铁血红素中铁元素形成硫醇盐离子键, 从而成为铁的一个配体, 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^[12]。P450 与底物的结合能诱导酶发生构象上的改变并引起氧化还原配体的相互作用, 铁自旋态平衡, 氧化还原电位和氧的结合、活化以及插入底物等等^[15]。本研究表明, 在 CYP3A136 中血红素结合区序列为 FGLGPRNCIG, 其中 FG 组成一个转角 (turn), RNC 组成另一个转角, 在不同物种间存在差异的第三号氨基酸正好处于两个转角之间。这种关键结构域中间存在的非保守氨基酸可能通过周围氨基酸的位阻效应而屏蔽其对催化活性可能带来的负面影响。

通过对 CYP3A136 蛋白二级结构的预测所

发现的高疏水区域氨基酸序列段提示可能存在跨膜结构域,鉴于 10-17aa 区域是信号肽序列,故该蛋白可能为单次跨膜蛋白,此分析结果和 P450 超家族蛋白分布主要于内质网膜上的研究结果一致^[16]。有假说认为,由于存在疏水性的膜结合结构域,其 F-G 环和 β -折叠能通过和膜结合的方式提高底物进出酶的能力^[17]。脂质和 CYP450 的相互作用能增强磷脂横向扩散速率使底物接近膜结合的血色素部位^[18]。CYP3A136 第 30-215aa 构成内质网膜结构域,而 234-514 构成其膜外结构域,血红素结合结构域和酶活性中心也存在细胞胞质溶胶侧。CYP3A 作用底物绝大多数为脂溶性药物和通过转运蛋白进入细胞膜的药物分子这一现象从而可以得到解释^[19-20]。蛋白质相互作用分析表明,在 264-268 位序列(EQKKK)有一个强有力的蛋白相互结合信号,提示 CYP3A136 可能通过此位点与内质网膜蛋白相互结合从而将其锚定在质膜或细胞骨架上。

通过组织分布半定量结果表明,CYP3A136 在各个组织上均有表达,表明其基因可以通过组成型表达模式进行表达,而肝肠等组织较高的基因转录水平的差异则在胚胎时期就已经建立起来^[11]。

细胞色素 P450 作为一类异源物质代谢酶类,其家族成员在进化过程中不断增加,并在进化压力下获得更多不同的新功能,这些进化趋势主要体现在增加了单种酶类对多种底物的适应性^[21-24]。部分氨基酸位点的突变导致酶对底物识别的特异性降低从而识别更多底物,但是仍然有大量的 P450 酶具有非常精确的底物专一性,对此有学者认为进化负压的存在加强了对有用表型的选择^[25-26]。CYP3A 在人类基因组中一共发现 4 个亚型和两个假基因,很难想象如此少量的分子竟然参与几乎 60% 的药物代谢。P450 分子对底物的识别能力和关键氨基酸残基的理化结构有着重要关系,在兔 P450s 2C1 和 2C3 中第 113 和 365 号氨基酸残基决定了黄体酮水解酶活性的特异性^[27-28]。鼠 P450 2B1 依赖 114,206,363 和 487 号氨基酸残基改变底物特异性^[29]。在人类 P450 2C9 中第 359 位的亮氨酸残基突变为异亮氨酸残基会改变苯妥英水解酶的活性以及丙酮苄羟香豆素水解酶的活性^[30-31]。如此众多的例子同时表明,氨基酸的改变,对整个 P450 家系的进化和演变来说都是十分关键的。包括 P450 家族基因的命名,主要是依靠其序列差异

性进行划分的,同一家族的 P450 氨基酸同源性能达到 40% 以上,亚家族同源性则达到 55% 以上。本实验得到异育银鲫的 CYP3A136 的 cDNA 序列,为下一步对该基因实现定点突变以及用酶动力学方法研究其与底物和诱导剂抑制剂的结合提供了一个物质基础。

参考文献:

- [1] GUENGRICH F P. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes[J]. Journal of Biological Chemistry,1991,266(16):10019-10022.
- [2] NELSON D R. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2003,409(1):18-24.
- [3] LAMPEN A, CHRISTIANS U, GONSGHIO A K, et al. Metabolism of the macrolide immunosuppressant, tacrolimus, by the pig gut mucosa in the Ussing chamber[J]. British Journal of Pharmacology,1996,117(8):1730-1734.
- [4] NEBERT D W, GONZALEZ F J. P450 genes: structure, evolution, and regulation [J]. Annual Review of Biochemistry,1987,56:945-993.
- [5] VACCARO E. Cloning, tissue expression, and inducibility of CYP 3A79 from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology,2007,21(1):32-40.
- [6] TSENG H P. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005,205(3):247-258.
- [7] CHRISTEN V. Identification of a CYP3A form (CYP3A126) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and characterisation of putative CYP3A enzyme activity [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2010,396(2):585-595.
- [8] LIU Y. Molecular characterization of cytochrome P450 1A and 3A and the effects of perfluorooctanoic acid on their mRNA levels in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) gills [J]. Aquatic Toxicology, 2008,88(3):183-190.
- [9] II D. Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology,2008,147(1):17-29.

- [10] LABELLS F S, STEIN D, QUEEN G. Occupation of the cytochrome P450 substrate pocket by diverse compounds at general anesthesia concentrations [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1998, 358 (2): 177–185.
- [11] JENSEN S L, COHEN-BAZIRE G, NAKAYAMA T O, *et al.* The path of carotenoid synthesis in a photosynthetic bacterium [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1958, 29 (3): 477–498.
- [12] ANZENBACHER P, ANZENBACHEROVA E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58 (5–6): 737–747.
- [13] CHEN Y T, NEGISHI M. Expression and subcellular distribution of mouse cytochrome P1-450 mRNA as determined by molecular hybridization with cloned P1-450 DNA [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1982, 104 (2): 641–648.
- [14] DANIELSON P B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans [J]. *Current Drug Metabolism*, 2002, 37 (3): 561–597.
- [15] RAVICHANDRAN K G. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's [J]. *Science*, 1993, 261 (5122): 731–736.
- [16] OLSEN M J. Function-based isolation of novel enzymes from a large library [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18 (10): 1071–1074.
- [17] AMOLD G E, ORMSTEIN R L. Molecular dynamics study of time-correlated protein domain motions and molecular flexibility: cytochrome P450BM-3 [J]. *Biophysics Journal*, 1997, 73 (3): 1147–1159.
- [18] LEWIS D F V. *Cytochromes P450 structure, function and mechanism* [M]. London: Taylor & Francis, 1996: 79–88.
- [19] PROT J M, VIDEAU O, BROCHOT C, *et al.* A cocktail of metabolic probes demonstrates the relevance of primary human hepatocyte cultures in a microfluidic biochip for pharmaceutical drug screening [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 408 (1–2): 67–75.
- [20] EKINS S, STRESSER D M, Andrew Williams J. *In vitro* and pharmacophore insights into CYP3A enzymes [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003, 24 (4): 161–166.
- [16] TSENG H P. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 205 (3): 247–258.
- [21] MATSUMURA I, ELLINGTON A D. *In vitro* evolution of beta-glucuronidase into a beta-galactosidase proceeds through non-specific intermediates [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305 (2): 331–339.
- [22] ZACCOLO M, GHERARDI M. The effect of high-frequency random mutagenesis on *in vitro* protein evolution; a study on TEM-1 beta-lactamase [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285 (2): 775–783.
- [23] YANG J. Structure-based engineering of *E. coli* galactokinase as a first step toward *in vivo* glycorandomization [J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12 (6): 657–664.
- [24] VARADARAJAN N. Highly active and selective endopeptidases with programmed substrate specificities [J]. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4 (5): 290–294.
- [25] O' LOUGHLIN T L, GREENE D L, MATSUMURA I. Diversification and specialization of HIV protease function during *in vitro* evolution [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2006, 23 (4): 764–772.
- [26] KROBACH T, KEMPER B, JOHNSON E F. A hypervariable region of P450IIC5 confers progesterone 21-hydroxylase activity to P450IIC1 [J]. *Biochemistry*, 1991, 30 (25): 6097–6102.
- [27] HSU M H. A single amino acid substitution confers progesterone 6 beta-hydroxylase activity to rabbit cytochrome P450 2C3 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (10): 6939–6944.
- [28] KESZIE K M. Molecular basis for a functionally unique cytochrome P450IIB1 variant [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (33): 22515–22521.
- [29] VERONESE M E. Site-directed mutation studies of human liver cytochrome P-450 isoenzymes in the CYP2C subfamily [J]. *Biochemical Journal*, 1993, 289 (Pt 2): 533–538.
- [30] KAMINSKY L S. Correlation of human cytochrome P4502C substrate specificities with primary structure: warfarin as a probe [J]. *Molecular Pharmacology*, 1993, 43 (2): 234–239.
- [31] SZCZESNA-SKORUPA E, CHEN C D, KEMOER B. Cytochromes P450 2C1/2 and P450 2E1 are retained in the endoplasmic reticulum membrane by different mechanisms [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 374 (2): 128–136.

Cloning, sequencing and tissue expression of the cytochrome P450 3A136 in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)

ZHU Lei^{1,2}, HU Xiao^{1,2}, FANG Wen-hong^{1*}, HU Lin-lin¹,
LI Xin-cang¹, LI Guo-lie^{1,2}, XIE La-yue¹

(1. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. Animal Medical College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Cytochrome P450s (CYPs) are important xenobiotic metabolizing proteins. Their gene feature and protein function have been well understood in mammals, while their potent drug metabolic activity in freshwater fish aroused aquatic biologists' attention. Many DNA sequences of CYP3As have been discovered in teleosts such as killifish, rainbow trout and minnow. However, little has been referred to important freshwater economic fish in China. This study focused on CYP3A's cDNA sequence of crucian carp and predicted its protein structure and function preliminarily. In this study, degenerate primers for CYP3A of crucian carp were designed on the basis of conserved regions of known CYP3A sequences from five teleosts. Using crucian carp cDNA as a template, the partial fragments of crucian carp CYP3A cDNA were amplified. An antisense primer for 5'-RACE and a sense primer for 3'-RACE were designed to obtain the full-length CYP3A cDNA sequence by 5' and 3'-RACE. The full-length of CYP3A cDNA for crucian carp is 1 769 bp with open reading frame (ORF) of 1 545 bp encoding 514 amino acids. The calculated MW was of 58. 624 ku and a theoretical pI of 6. 30. The Cytochrome P450 Nomenclature Committee has named this cDNA CYP3A136. The deduced amino acid sequence of crucian carp's CYP3A136 showed high similarity with those of rare gudgeon, grass carp and fathead minnow. It contained the conserved heme-binding motif of cytochrome P450 monooxygenases (FXXGXXXCXG). Furthermore, we examined the gene expression levels of CYP3A136 in tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. The results demonstrated that the highest levels of CYP3A136 mRNA were seen in liver and intestine, followed by kidney and gill, and lower level were seen in other tissues.

Key words: crucian carp (*Carassius auratus gibelio*); CYP3A136; cloning; tissue expression

Corresponding author: FANG Wen-hong. E-mail: whfang06@yahoo.com.cn