

doi: 10.7541/2013.104

剑尾鱼 P-糖蛋白基因全长 cDNA 克隆、分析及组织分布

王芳¹ 李凯彬¹ 聂湘平² 刘春¹ 劳海华¹ 王英英¹ 梁慧丽¹ 吴淑勤¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380; 2. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632)

摘要: P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)为 ABC 转运体超家族的主要成员, 分布于细胞膜, 依赖 ATP 供能, 可将细胞内的亲脂性毒物或药物逆浓度泵出胞外, 在机体解毒上具重要功能。研究采用 RT-PCR 和 RACE 法对剑尾鱼 *P-gp* 基因进行克隆并获得了全长 cDNA 序列 4301 bp, 该基因编码 1286 个氨基酸残基, 估算编码蛋白的分子质量为 141.64 kD。生物信息学分析表明, 剑尾鱼 *P-gp* 不含信号肽序列, 具 ATP 转运家族蛋白的典型结构域, 包括 2 个疏水性的跨膜区(Transmembrane domains, TMD) 和 2 个位于细胞浆内的核苷酸结合区(Nucleotide-binding domains, NBD), 为全转运子, 每个跨膜区都有 6 个跨膜 α 螺旋, 而每个 NBD 包含 1 个 ABC 转运体家族标记序列; 跨膜性质预测结果显示该蛋白属膜蛋白, 具 *P-gp* 的典型特征。序列同源性分析发现, 不同进化地位动物 *P-gp* 存在高度同源性, 显示 *P-gp* 在系统进化上高度保守。*P-gp* 在剑尾鱼肝脏、肾脏、脑等不同组织均有表达, 其中以肝脏的相对表达量最高, 是 *P-gp* 检测的代表组织。QRT-PCR 实验表明, 苯并(a)芘胁迫可明显诱导 *P-gp* mRNA 的表达。剑尾鱼 *P-gp* 的表达水平或可作为一个生物标记物指标, 应用于环境持久性有机污染物的监测研究中。

关键词: 剑尾鱼; P-糖蛋白; ABC 转运蛋白家族; 全长 cDNA 克隆; 组织分布; 苯并(a)芘; 生物标记物

中图分类号: Q958.8; X52 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)05-0817-07

P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)为ABC转运蛋白超家族(ATP-binding cassette transporter superfamily)的最主要成员, 具运输、调节、通道功能^[1]。P-gp 是一种膜转运糖蛋白, 与毒物的代谢密切相关, 该蛋白含ATP结合位点和疏水性结构域等结构, 通过其疏水位点与细胞内不溶于水的毒性物质结合, ATP水解供能, 将异生物逆浓度梯度泵出细胞外, 影响异生物在胞内的累积, 减少潜在的毒害威胁。目前人P-gp相关研究较为深入和系统, 其核心结构由2个疏水性的跨膜区和2个核苷酸结合区组成, 在机体解毒和药物代谢等过程中起重要作用^[2]。

以鱼类为代表的水生动物终生生活于水中, 在水环境生物监测上有较好的应用优势。污染物进入生物体, 必然引起机体防御反应, 启动相关蛋白的表达。Kurelec, *et al.*^[3]首次提出*P-gp*的表达有助于水生生物抵抗污染物的毒性作用, Cooper, *et al.*^[4]首次

报道了污染环境中底鳉(*Fundulus heteroclitus*)肝 *P-gp*水平升高, 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[5]、紫嵴冠鳊(*Anoplarchus purpureus*)^[6]、阿部鲮鳊虎(*Mugilogobius abei*)^[7]的研究也表明*P-gp*是一种监测外源异生物物质的有效生物标志物。*P-gp*和机体其他代谢酶系统共同组成完整的体内解毒和保护机制, 可作为生态毒理学指标应用于污染物的生物监测。

苯并(a)芘(Benzo[a]Payrene)是一种具有5个苯环结构的多环芳烃, 是PAHs的典型代表。水体中的B[a]P可通过鱼的鳃、皮肤及消化道进入鱼体内, 破坏鱼体内脏器官^[8], 对鱼类造成遗传、免疫和生殖等毒性^[9]。潘鲁青等^[10]研究表明 B[a]P 对栉孔扇贝鳃丝、消化盲囊芳香烃羟化酶(AHH)等生物标记物表现出明显的时间剂量效应性和胁迫稳定性。剑尾鱼体型小、繁殖周期短, 便于实验室饲养管理, 在持久性有机污染物^[11]、环境雌激素^[12]、重金属^[13]等水

收稿日期: 2012-06-27; 修订日期: 2013-05-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(40976072)资助

作者简介: 王芳(1980—), 女, 山东日照人; 硕士, 助理研究员; 主要研究方向为水生实验动物学。E-mail: fwang3612@126.com

通信作者: 吴淑勤(1956—), 女, 研究员; 主要从事水产动物病害研究。E-mail: wushuqin001@21cn.com

环境污染检测方面具有较好的敏感性,是毒理试验的理想实验动物。本实验以剑尾鱼为实验材料,采用 RT-PCR 和 RACE-PCR 法,获得了 *P-gp* 基因全长 cDNA 序列,并进行了生物信息学分析,在此基础上,用实时荧光定量 RT-PCR 法进行了 *P-gp* 基因的组织分布及污染物胁迫的时间效应关系的研究,这为 *P-gp* 作为生物标记物应用于环境持久性有机污染物提供基础。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 提取

剑尾鱼 4—5 月龄,为珠江水产研究所水生实验动物中心培育。参照 Bard, *et al.* 方法,剑尾鱼腹腔注射 $\beta\text{NF}^{[14]}$, 使终浓度达 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 鱼体重,3d 后按照 SV Total RNA Isolation System 方法提取剑尾鱼肝脏总 RNA, 然后取 $5 \mu\text{L}$ 总 RNA 样品用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 的质量和浓度,用于全长 cDNA 克隆。同时分别取 3 尾剑尾鱼的心、肝、脾、肾、脑、肌肉、鳃、眼睛,每个组织为 1 个样本, -80°C 保存,用于组织分布研究。

1.2 剑尾鱼 *P-gp* 基因全长 cDNA 扩增

根据已登录的斑马鱼(*Danio rerio*)、美洲黄盖鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)、川鲈(*Platichthys flesus*)、底鳉(*Fundulus heteroclitus*)等鱼类 *P-gp* mRNA 序列,在较保守区域设计合成兼并引物 SPGP1、SPGP2F 和 SPGP3R(表 1),用剑尾鱼肝脏总 RNA 为

模板,以 Oligo dT adaptor primer 为引物进行逆转录合成第一链 cDNA,用兼并引物 SPGP1 进行 PCR 扩增,PCR 扩增条件均为: 94°C 预变性 4min, 94°C 30s, 60°C 40s, 72°C 60s, 共 30 个循环,最后延伸 10min。根据已获得的剑尾鱼 *P-gp* 基因 cDNA 片段序列,设计特异性引物 SPGP2R 和 SPGP3F,引物溶解和保存方法同上。分别应用兼并引物 SPGP2F 和特异性 SFPGP2R、特异性引物 SPGP3F 和兼并引物 SPGP3R 进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为: 94°C 预变性 4min, 94°C 30s, 60°C 40s, 72°C 1.5min, 共 30 个循环,最后延伸 10min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

根据所获得 *P-gp* 基因片段序列,设计并合成 2 条 5' RACE PCR 特异性下游引物和 2 条 3' RACE PCR 特异性上游引物(表 1)。RACE-PCR 反应参照 Clontech 5' RACE 试剂盒的说明进行,用特异性引物 SFPGP 5RACE P1 和试剂盒内通用引物 UPM 进行第一次扩增,以 PCR 产物为模板,SFPGP 5RACE P1 和 UPM 为引物进行半巢式 PCR,完成后用 1% 琼脂糖 ($1\times\text{TAE}$) 凝胶电泳分离,回收目的片段,克隆、测序。

1.3 产物的克隆和序列测定

PCR 产物经 1% 的琼脂糖 ($1\times\text{TAE}$) 凝胶电泳分离,在紫外光下,切下目的凝胶条带, DNA 回收试剂盒回收。回收的 DNA 与 pGEM-T 载体连接,转化至大肠杆菌 DH5 α , 进行蓝白斑筛选。阳性克隆送上海生物工程技术有限公司测序。

表 1 剑尾鱼 *P-gp* 基因全长 cDNA 序列扩增引物
Tab. 1 Oligonucleotides used for cloning the *P-gp* gene of *Xiphophorus helleri*

引物 Primer		序列 Sequence (5'-3')	位置 Position
SFPGP 5RACE	P1	GCCTTTGGTGAAACCGATGATGA	647—669
	P2	CCACCTTGTCACCAATGCCCTCT	585—607
SFPGP 1	F	TCTGYCTGGATGHGAGAGTGAGAC	1711—1736
	R	CAAYRAGATCCTGTCTCWCATGG	2426—2450
SFPGP 2	F	ATCATGCAACAGGVAHGGCT	499—519
	R	CCAGTCGAACCTTATCCAGTGC	1750—1771
SFPGP 3	F	GCTATCGGAGTTGTTTGCT	2323—2341
	R	AGTGGATRITTCAGCYGTTG	3345—3364
SFPGP 3RACE	P1	AACAAAGAGCCTGAGATCGACA	3079—3100
	P2	TGAGCAGGGAGACAAGCGACA	3108—3128
QSFPGP	F	CACGGCTTCACCTTCTCCTT	
	R	ACTCCCTCCACATCCATCCTT	
Q β -actin	F	TGCTATGTTGCACTGGACTTTGAG	
	R	CCTCTCGTTTCCGATGGTGATGAC	

1.4 序列拼接及生物信息学分析

利用 Vector NTI Suite 10.0 软件包对获得的剑尾鱼 *P-gp* 基因各片段进行拼接, 利用 ORF Finder 确定其完整编码序列并显示其编码的氨基酸序列。利用蛋白分析专家系统服务器 ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>)所提供的蛋白质在线分析工具, 如 ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)预测氨基酸序列的分子量、等电点、稳定性指数等理化性质; InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>)和 MotifScan (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif-scan>)预测氨基酸序列中的基序和功能域; 使用 ClustalW1.8 软件, 将剑尾鱼 *P-gp* 推断的氨基酸序列与 GenBank 中登录的其他动物 *P-gp* 进行多序列比对, 采用 MEGA4.0 软件包进行构建系统树。

1.5 *P-gp* 在剑尾鱼不同组织器官中的分布

按照 QIAGEN RNeasy Mini Kit 试剂盒分别提取 1.1 中保存的每尾剑尾鱼 8 种组织总 RNA, 每份 RNA 作为 1 个样本, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 用核酸蛋白测定仪测定 RNA 样品的浓度和纯度。采用 SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 进行反转录合成 cDNA 模板。

荧光定量 PCR 在 ABI 7500 (Applied Biosystems) 实时荧光定量 PCR 仪进行, 目的基因的定量 PCR 引物序列(表 1)。反应体系为 20 μ L: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 \times) 10 μ L, ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ L, 20 μ mol/L 的上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 1 μ L, 加双蒸水补足反应总体积为 20 μ L。反应条件为: 95 预变性 30s; 然后 95 5s, 60 34s, 扩增 40 个循环, 60 延伸时采集荧光信号, 反应结束后对扩增产物进行溶解曲线分析, 以确保特异性扩增。样本和内参分别设 3 个重复, 以 β -actin 作为内参基因校正实验误差。采用相对 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行 *P-gp* mRNA 在剑尾鱼各组织器官中的表达分析。结果用 Excel 软件进行计算和单因素方差分析, 实验数据用平均值表示。

1.6 苯并(a)芘对剑尾鱼肝脏 *P-gp* 表达的影响

实验分对照组和处理组, 每组 20 尾, 处理组暴露于 20 μ g/L 的苯并(a)芘水体中, 对照组养殖水体中加入同样浓度的 DMSO 溶剂, 暴露时间为 11d, 每隔 1 天更换全部暴露液。实验期间正常投喂。分别在 1、3、5、7、9、11d 取 3 尾鱼肝脏冷冻于 -80 冰箱中, 暴露完毕提取肝脏总 RNA 并进行相关分析。RNA 提取、荧光定量 RT-PCR 及分析方法见 1.5。

2 结果

2.1 剑尾鱼 *P-gp* 基因 cDNA 扩增结果、蛋白序列组成及理化特性预测

用 RT-PCR 方法扩增到剑尾鱼 *P-gp* 基因中间片段, 通过 RACE PCR 的方法获得其 3' 和 5' 端片段, 经测序后将 3' 和 5' 端序列及中间片段序列用 vector 9.0 进行拼接, 获得剑尾鱼 *P-gp* 基因全长 cDNA 序列, GenBank 登录号为 HQ829295。该序列全长 4301 bp, 采用 NCBI 的 ORF Finder 软件分析表明, 其开放阅读框(Open reading frame, ORF)为 3861 bp, 编码 1286 个氨基酸组成的多肽, 起始密码子位于 25 bp 处, 终止密码子位于 3883 bp 处, 以碱基 TGA 终止, 序列包含 13 个碱基的 poly(A)尾巴和 416 bp 的 3'UTR 序列。

采用 ProtParam 软件预测剑尾鱼 *P-gp* 的基本理化性质, 发现该蛋白分子式 $C_{6356}H_{10100}N_{1690}O_{1867}S_{49}$, 分子量约为 141.64 kD, 理论等电点 pI 为 7.06。酸性氨基酸 (DE) 139 个, 占 10.81%; 碱性氨基酸 (RK) 138 个, 占 10.73%, 该蛋白整体带负电荷, 疏水性氨基酸 (AILFWV) 444 个, 占 39.27%, 极性氨基酸 (NCQSTY) 313 个, 占 24.34%。在酵母和大肠杆菌中体内表达的半衰期分别大于 20h 和 10h, 在溶液中的不稳定系数 (Instability index) 为 34.76, 低于阈值 40, 提示该蛋白在溶液中性质稳定。脂溶系数为 94.37, 亲水指数 (GRAVY) 为 0.005。

2.2 剑尾鱼 *P-gp* 信号肽、功能域与基序分析

利用 SignalP 4.0 程序对剑尾鱼 *P-gp* 多肽序列中的信号肽进行分析, 结果显示剑尾鱼 *P-gp* 蛋白中不含信号肽, 不属于分泌蛋白。保守结构功能域分析结果该蛋白具有 *P-gp* 的基本结构特征, 包括 4 个核心区域, 即 2 个疏水性的跨膜区 (transmembrane domains, TMD) 和 2 个核苷酸结合区 (nucleotide-binding domains, NBD)。核苷酸结合区包含了 Walker A (亦称 P 环)、Walker B、ABC 转运体家族标记序列 (ABC transporters family signature)、ATP 结合位点、D 环、H 环和 Q 环等保守序列, 属于 ABC 转运蛋白超家族成员。

利用 PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>) 软件分析显示, 该蛋白可能存在 12 个 N_糖基化位点, 3 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白磷酸化位点, 15 个蛋白酶 C 磷酸化位点, 16 个酪蛋白激酶 II (CKII) 磷酸化位点, 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点, 19 个 N-肉豆蔻酰化位点, 2 个 ATP/GTP 结合位点基序 A 和 2 个 ABC 转运家族位点标记。

2.3 剑尾鱼 P-gp 跨膜区分析

用TMpred工具对P-gp跨膜性质进行预测,结果显示可能存在由内向外和由外向内的2种跨膜螺旋,采用可信度高的跨膜模型结果(表2),其中有12个跨膜螺旋,显示P-gp基因是典型的跨膜结构。SOPMA(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html)预测结果显示 α 螺旋701(54.51%),延伸主链194(15.09%), β 转角66(5.13%),随机卷曲325(25.27%)。可知剑尾鱼P-gp基因编码的蛋白主要为 α 螺旋和无规则卷曲,间或有 β 转角。

表 2 剑尾鱼 P-gp 预测跨膜区位置

Tab. 2 The sites of *Xiphophorus helleri* P-glycoprotein transmembrane domain

编号 Number	起始 From	结束 To	长度 Length	分值 Score	方向 Orientation
1	55	79	(25)	1923	i-o
2	120	137	(18)	2010	o-i
3	197	216	(20)	2108	i-o
4	218	236	(19)	2005	o-i
5	296	320	(25)	2482	i-o
6	332	349	(18)	2500	o-i
7	417	444	(28)	595	i-o
8	715	739	(25)	1714	o-i
9	760	778	(19)	2819	i-o
10	863	880	(18)	1964	o-i
11	945	963	(19)	1651	i-o
12	979	995	(17)	1637	o-i

注: 分值>500为可信

Note: Only scores above 500 are considered significant

2.4 不同生物 P-gp/ABCB1/MDR1 进化关系的分析

将剑尾鱼 P-gp 的序列在 GenBank 数据库中 BLAST 同源搜索,根据生物进化阶元选择 13 个代表性物种,包括犬(*Canis familiaris*)、猫(*Felis catus*)、食蟹猴(*Macaca fascicularis*)、人(*Homo sapiens*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、中国仓鼠(*Cricetulus griseus*)、虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、川鲮(*Platichthys flesus*)、美洲黄盖鲮(*Pseudopleuronectes americanus*)、底鲮(*Fundulus heterolitus*)、光若花鲮(*Poeciliopsis lucida*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)等的 P-gp/ABCB1/MDR 序列,结果发现剑尾鱼 P-gp 序列与所对比生物 P-gp 一致性为 60.3%—

95%。依此绘制的分子进化树(图 1)可以看出,剑尾鱼与光若鲮的进化距离最近,与川鲮、斑马鱼、虹鳉汇为一支,这与不同进化阶元的物种间的进化距离与种系演化进程相符,也可以说明从分子水平上绘制系统进化树基本上代表了它们在经典分类上的地位。

2.5 P-gp 基因在剑尾鱼不同组织分布的实时荧光定量检测

以 QSFPGP 为引物,剑尾鱼心、肝、脾、肾、脑、肌肉、鳃、眼睛 8 个样本 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因,应用荧光定量 RT-PCR 方法研究剑尾鱼 P-gp mRNA 的组织器官表达特征(图 2)。结果表明剑尾鱼 P-gp mRNA 在 8 种组织中均有表达,在肝、脑的表达量显著高于其他几个组织,其次是肾和眼睛,脾中 P-gp mRNA 表达量最低。方差分析结果表明,肝与脑 P-gp mRNA 表达量之间差异显著($P<0.05$),肝和脑与其他 6 个组织部位之间存在着极显著差异($P<0.001$),而肌肉和鳃($P=0.053$)、肾和眼睛($P=0.102$) P-gp mRNA 表达量无显著差异。剑尾鱼各组织 P-gp mRNA 表达量依次为肝>脑>肾>眼睛>肌肉>鳃>心>脾。

2.6 苯并(a)芘对剑尾鱼肝脏 P-gp 表达的影响

以 QSFPGP 为引物,B[a]P 诱导 1、3、5、7、9、11d 后剑尾鱼肝脏样本 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因,利用荧光定量 RT-PCR 方法研究剑尾鱼肝脏

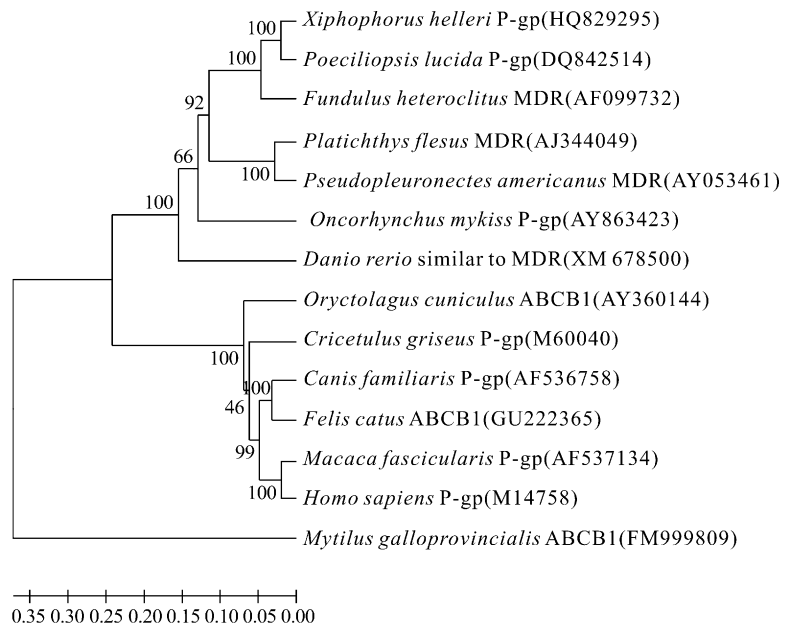


图 1 P-gp 蛋白质的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of P-gp

中 *P-gp* 变化规律(图 3), 剑尾鱼肝中 *P-gp* mRNA 相对表达量在 B[a]P 诱导后第 3 天达到一个小高峰, 第 5 天达到最高峰, 第 9 天开始维持较低的表达量。

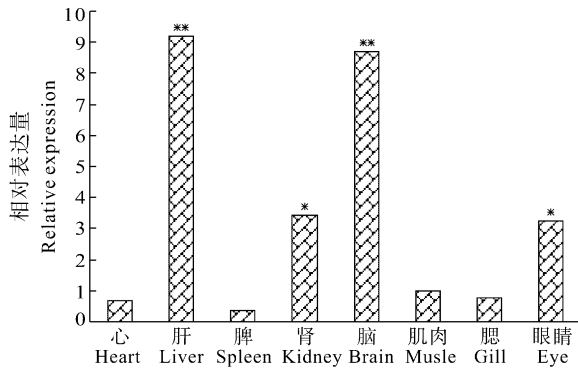


图 2 剑尾鱼 *P-gp* 在各组织中的表达情况

Fig. 2 The expression of *Xiphophorus helleri*'s *P-gp* in different tissues
 $n=3$ /组; *表示与心、脾、肌肉和鳃 4 个组织表达量比有显著差异; **表示与其他 6 各组织表达量比有极显著差异($P<0.05$, $P<0.01$)
 $n=3$ /each; * $P<0.05$ vs. liver, spleen, muscle and gill; ** $P<0.01$ vs. other 6 group

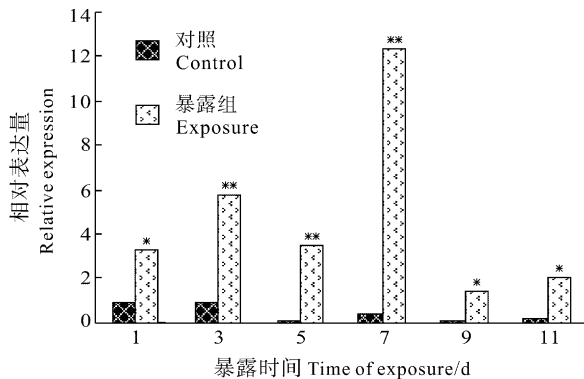


图 3 *P-gp* 在剑尾鱼肝脏中的相对表达分析

Fig. 3 Analysis of *Xiphophorus helleri*'s *P-gp* mRNA relative expression in liver
 $n=3$ /组/时间点; “*、**”表示与相应对照组比有显著或极显著差异($P<0.05$, $P<0.01$)
 $n=3$ /each/each time point; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control group at the same time

3 讨论

ABC 转运蛋白是一类 ATP 依赖型转运蛋白超家族, 成员间具相似的结构, 在生物体内发挥着极其重要的生理功能, 广泛分布于细菌到人类各种生物体中。已知哺乳动物 ABC 转运蛋白有 49 种, 分为 7 个亚家族, 命名为 ABCA 到 ABCG (http://www.nutrigenet.com/humanabc.htm), 其中 ABCB1、ABCG2 等亚家族蛋白参与生物体的多药耐药(Multixeno-

biotic resistance)。ABCB 亚家族基因只存在于脊椎动物基因组中, 包括 4 种完整转运体和 7 种半转运体, *P-gp* 为 ABCB1, 是第一个被发现的人类 ABC 蛋白。生物信息学分析发现, 本研究克隆获得的基因编码 1286 个氨基酸残基组成蛋白质, 大小与哺乳动物以及其他鱼类 MDR/*P-gp*/ABCB1 相似, 且具有 MDR/*P-gp*/ABCB1 的主要特征和功能域, 包括疏水性跨膜区(TMD)、核苷酸结合区(NBD)、ATP 结合位点等。依据编码的氨基酸序列进行同源性和系统进化分析, 结果显示该基因与鳉形目其他鱼类有较高的同源性, 构建的进化树与传统的分类关系相吻合, 因而, 我们克隆的为剑尾鱼 *P-gp* 基因。*P-gp* 具特别的空间结构和生理功能, 比较也发现该基因在不同物种的进化上较为保守, 这可能与其独特的转运功能有关。

ABC 转运蛋白依据结构不同可分为全转运子和半转运子^[2], 全转运子由 2 个 TMD 和 2 个 NBD 组成, 含有 2 个 ATP 结合位点; 而半转运子则由 1 个 TMD 和 1 个 NBD 构成, 只有 1 个 ATP 结合位点。剑尾鱼 *P-gp* 具有 2 个 TMD 和 2 个 NBD, 从 N 末端到 C 末端呈 TMD-NBD-TMD-NBD 的排列, 是典型的 ABCB 亚家族全转运子。跨膜区作为膜通道有利于药物转运, 而 NBD 是 ATP 的结合位点, *P-gp* 具膜转运糖蛋白的典型特征, 通过 ATP 供能, 行使其运输、通道等相关功能^[15]。

组织分布的研究表明, *P-gp* 在剑尾鱼肝脏、脑、肾脏等 8 个不同组织均有表达, 其中以肝组织的相对表达量最高, Tutundjian, *et al.*^[16]用半定量 RT-PCR 检测大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)各个器官中 *Mxr* 基因表达情况发现, *Mxr* 在所有检测的 8 种组织中均有表达, 但具有明显的组织特异性。肝脏是机体最主要的解毒器官, 也是异生物体内代谢的重要场所, 其高表达有助于机体的解毒过程, 减少损害。因而, 肝脏可作为 *P-gp* 检测的代表组织, 对生物体所处的污染状态和潜在危险进行监测。剑尾鱼脑组织 *P-gp* 的相对表达量也明显高于肝脏之外的其他器官, 大菱鲂 *Mxr* 基因^[16]研究也发现在脑组织具有最高表达量, 这可能与血脑屏障有关。血脑屏障能选择性地阻止某些物质由血液进入脑, *P-gp* 分布于脑毛细血管内皮细胞上, 是血脑屏障上一种重要的转运蛋白, 能有效阻止包括药物在内的多种异生物进入中枢神经系统。通过构建基因缺失鼠, 已证实了 *P-gp* 在血脑屏障中对利福平等多种药物的转运作用^[17]。

鱼类关于P-gp的研究起步较晚,相关基础较为薄弱,目前还没有获得针对鱼类P-gp的抗体。国外关于鱼类P-gp蛋白的检测研究选用的多为哺乳动物的相应抗体,其中应用最多的是鼠单克隆抗体C219^[18,19]、C494^[18],采用western blot、ELISA等方法开展研究。由于鱼类和哺乳类P-gp蛋白质序列的差异,影响了其特异性,Sauerborn, *et al.* ^[20]发现P-gp在5种鲤科鱼类肝脏中都有表达,但是哺乳动物单克隆抗体C219不能识别鱼类P-gp,我们也尝试应用鼠抗人P-gp单克隆抗体进行鱼类的相关研究,发现其检测灵敏性不好,在定性与定量上的应用都有局限。为了更好地将剑尾鱼应用于环境研究,针对其P-gp建立特异性强的检测方法对于深入系统的研究是必要的。P-gp基因序列的获得,不仅可表达目标蛋白,制备高效价的特异性抗体用于蛋白定量检测,而且为分子水平的检测方法的建立提供了基础;同时也为鱼类P-gp作用机制的研究奠定了基础。

近年来鱼类 ABC 转运蛋白的研究不断增多,GenBank 上已登录的 P-gp 基因全序列的鱼类有川鲮和光若花鲮,其他转运蛋白的相关工作也已开展,如底鳃 ABCB1、ABCC2、ABCG2 和 ABCB11 等亚家族转运蛋白的研究^[21],虹鳟也有 3 种 ABC 转运蛋白的报道^[22]。剑尾鱼 ABC 转运蛋白的数量、分类、结构功能以及相互之间的关系还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Tu C H, Yang D Z. Molecular structure and function of P-glycoprotein [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, **25**(1): 7—11 [涂春华, 杨冬梓. P-糖蛋白结构及作用机制. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, **25**(1): 7—11]
- [2] Jones P M, George A M. Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC transporters what goes around comes around [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, **267**: 5298—5305
- [3] Kurelec B, Pivcevic B. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 1991, **19**(4): 291—302
- [4] Cooper P S, Volgelbein W K, Van Veld P A. Altered expression of the xenobiotic transporter P-glycoprotein in liver and liver tumours of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated environment [J]. *Biomarkers*, 1999, **4**(1): 48—58
- [5] Doi A M, Holmes E, Kleinow K M. P-glycoprotein in the catfish intestine: inducibility by xenobiotics and functional properties [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, **55**(3—4): 157—170
- [6] Bard S M, Woodin B R, Stegeman J J. Expression of P-glycoprotein and cytochrome p450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to environmental contaminants [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, **60**(1—2): 17—32
- [7] Cheng Z, Nie X P, Wang F, *et al.* Cloning and sequential analysis of P-gp in *Mugilogobius abei* [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2009, **9**(1): 4—8 [程章, 聂湘平, 王芳, 等. 阿部鳊鰕虎 P-gp 蛋白编码区基因克隆与分析. 安全与环境学报, 2009, **9**(1): 4—8]
- [8] Weng Z H, Wang X H, Wang S H, *et al.* Histopathological changes of liver, spleen and small intestines in *Sparus macrocephalus* exposed to Benzo(a)pyrene [J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2008, **13**(4): 309—314 [翁朝红, 王新红, 王淑红等. 苯并(a)芘暴露引起黑鲷肝、脾、肠组织病理变化. 集美大学学报(自然科学版), 2008, **13**(4): 309—314]
- [9] Reynaud S, Deschaux P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **77**(2): 229—238
- [10] Pan L Q, Liu N, Wang J. Study of biomarkers selection of the Scallop *Chlamys farreri* exposed to B[a]P [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(2): 299—306 [潘鲁青, 刘娜, 王静. 栉孔扇贝在 B[a]P 胁迫下生物标志物筛选的研究. 水生生物学报, 2012, **36**(2): 299—306]
- [11] Fan C P, Wang Q, Liu X Y, *et al.* Toxicity and effect of tetrabromodiphenyl ether upon the antioxidant defense system of swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, **31**(3): 642—648 [范灿鹏, 王奇, 刘昕宇, 等. 四溴联苯醚对剑尾鱼毒性及其抗氧化系统的影响. 环境科学学报, 2011, **31**(3): 642—648]
- [12] Li J Y, Li K B, Liu C, *et al.* Vitellogenin in *Xiphophorus helleri*: distribution and expression under 17 β -estradiol exposure [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, **16**(5): 705—711 [李建寅, 李凯彬, 刘春, 等. 卵黄蛋白原在剑尾鱼体内不同组织的分布及雌激素作用对其表达的影响. 中国水产科学, 2009, **16**(5): 705—711]
- [13] Fang Z Q, Wang C F, Wei H R. Effects of Mercury and Selenium on Na⁺/K⁺-ATPase Activity in *Xiphophorus helleri* Heckel [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, **12**(2): 220—223 [方展强, 王春风, 卫焕荣. 汞和硒对剑尾鱼 Na⁺/K⁺-ATPase 活性的影响. 应用与环境生物学报, 2006, **12**(2): 220—223]
- [14] Bard S M, Woodin B R, Stegeman J J. Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to environmental contaminants [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, **60**(1—2): 17—32
- [15] Jones P M, George A M. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**(6): 682—699
- [16] Tutundjian R, Cachot J, Leboulenger F, *et al.* Genetic and immunological characterization of a multixenobiotic

- resistance system in the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2002, **132**(2): 463—471
- [17] Berezowski V, Landry C, Dehouck M P, *et al.* Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier [J]. *Brain Research*, 2004, **1018**(1): 1—9
- [18] Kleinow K M, Doi A M, Smith A A. Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal [J]. *Marine Environmental Research*, 2000, **50**(1—5): 313—317
- [19] Hemmer M J, Courtney L A, Ortego L S. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies [J]. *Journal Experimental Zoology*, 1995, **272**(1): 69—77
- [20] Klobucar R S, Zaja R, Franjević D, *et al.* Presence of ecotoxicologically relevant Pgp and MRP transcripts and proteins in Cyprinid fish [J]. *Arhiv Za Higijenu Radai Toksikologiju*, 2010, **61**(2): 175—182
- [21] Paetzold S C, Ross N W, Richards R C. Up-regulation of hepatic ABCC2, ABCG2, CYP1A1 and GST in multixenobiotic-resistant killifish (*Fundulus heteroclitus*) from the Sydney Tar Ponds, Nova Scotia, Canada [J]. *Marine Environmental Research*, 2009, **68**(1): 37—47
- [22] Zaja R, Munić V, Klobucar R S, *et al.* Cloning and molecular characterization of apical efflux transporters (ABCB1, ABCB11 and ABCC2) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, **90**(4): 322—332

P-GLYCOPROTEIN OF SWORDTAIL FISH *XIPHOPHORUS HELLERI*: cDNA CLONING, BIOINFORMATIC AND TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION ANALYSIS

WANG Fang¹, LI Kai-Bin¹, NIE Xiang-Ping², LIU Chun¹, LAO Hai-Hua¹, WANG Ying-Ying¹,
LIANG Hui-Li¹ and WU Shu-Qin¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: P-glycoprotein is one of the major members of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily which prevented in plasma membrane, utilizes the energy of ATP hydrolysis to transport various substrates across cellular membranes, functions as an export pump that decreases intracellular concentrations of xenobiotic agents. In our experiment, RT-PCR and RACE-PCR were used for *P-gp* gene cloning in swordtail fish *Xiphophorus helleri*. The full-length of P-gp cDNA for swordtail fish was 4301 bp with open reading frame (ORF) of 3861 bp encoding a polypeptide of 1286 amino acids. The calculated MW was of 141.64 kD and a theoretical pI of 7.06. Bioinformatics analysis indicated that the deduced amino acid sequence contained striking features of the P-gp including four core regions, two transmembrane domains (TMD) and two nucleotide-binding domains (NBD) but no signal peptide. Each TMD had six transmembrane helices while NBD contained the highly conserved motif Walker A, Walker B, ABC transporters family signature, D-loop, H-loop, Q-loop and Signature C (L-S-G-G-Q). The deduced amino acid sequence aligned with those of *P-gp* genes from different species also displayed high degree of sequential homology as was shown by the phylogenetic tree. The gene of P-gp was expressed in all examined organs in swordtail fish and had a significantly high expression in liver, so it will be major organ for P-gp examination. Our results also showed that the hepatic P-gp expression of swordtail fish can be significantly upregulated with the exposure of benzo (a) pyrene. Therefore, the reaction of P-gp in the fish to the exposure of various xenobiotics can thus be used as a potential biomarker for monitoring environmental pollution.

Key words: *Xiphophorus helleri*; P-glycoprotein; ATP-binding cassette family; Full-length cDNA clone; Tissue distribution; Benzo[a]Pyrene; Biomarker