

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

吳郭魚肝臟細胞色素 P450 之純化及免疫分析方法之建立

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2313-B-041-007-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

計畫主持人：王明雄

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 18 日

中文摘要

過去農業上廣泛使用的農藥與殺蟲劑，及近年來因工業發展所產生的化學物質或環境污染物質，可能會干擾生物體之正常機能，進而影響生物體的正常機能。這些物質對生物而言，都屬於外來的物質，統稱為生體異物 (xenobiotics)。這些脂溶性的毒性物質可被生物體內之解毒酵素系統作用，包括細胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 的單氧酶系統 (monooxygenase)，而轉變成水溶性的代謝產物再排出體外，以減少對生物體的傷害。Cytochrome P450 為一可誘導的蛋白質 (induction protein)，會因環境污染物的誘導，而使其在生物體內的含量升高。魚類的 cytochrome P450 可被一些常見的污染物質如 polychlorinated biphenyls (PCBs)、polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)、dioxins、石油產品或農藥等所誘導產生。Cytochrome P450 的活性經誘導產生後，通常會維持一段時間，因此常用來作為環境毒物學或環境污染監控的指標。因此，cytochrome P450 似乎可以作為環境是否遭受污染的生物指標 (biomarker)。魚類的 cytochrome P450 1A (CYP1A)，目前已經評估用來發展作為監測水域環境受到生體異物污染的一種指標。本研究即在於建立吳郭魚 (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) 肝臟中的 cytochrome P450 的免疫分析方法，及快速且便利的測定 cytochrome P450 的含量，可作為環境毒物學及環境污染監控的指標測定之用。亦可以用來做為魚類對於生體異物代謝研究之指標。包括自吳郭魚肝臟中分離純化 cytochrome P450 並製作吳郭魚 cytochrome P450 之多株抗體，並建立吳郭魚 cytochrome P450 的免疫分析方法。經由本計劃的執行，已建立吳郭魚肝臟中的 cytochrome P450 的免疫分析方法，將繼續以此方法應用在環境污染、毒物學、藥理學及食品衛生方面的研究之上。

英文摘要

Large amounts of some man-made chemicals have been released into the environment. These chemicals include classical environmental pollutants, such as DDT and its metabolites, aromatic hydrocarbons, many of polychlorinated biphenyls (PCBs), alkylphenols and others. All these chemicals can have profound influences on physiology and survival, and hence destroy stable populations. These organic compounds were foreign to the organism. The term "xenobiotic" was coined to cover all compounds that are "foreign" to the organism under study. Xenobiotic metabolizing enzymes are involved in the biotransformation of lipophilic xenobiotics into more polar metabolites for excretion. Cytochrome P450 (CYP)-dependent monooxygenase are a family of xenobiotic metabolizing enzymes. In a number of field and laboratory studies, the response of this enzymes to widespread environment pollutants such as PCBs, polyaromatic hydrocarbons (PAH), dioxins, oil compounds, pesticides, and so on, has been demonstrated and validated. The induction of cytochrome P450 in fish has been evaluated as a sensitive, convenient, early warning signal of organic xenobiotics in the aquatic environment. The objective of this study is to development the immunoassay method to be a biomarker that in regarded as powerful and informative tool in ecotoxicology and environmental management. The study include ① purification of cytochrome P450 of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*), ② induction of polyclonal antibody and development immunoassay for cytochrome P450 of tilapia.

Key word: cytochrome P450, tilapia, immunoassay

一. 研究計畫之背景及目的。

隨著人類活動與農業、工業的發展，造成環境惡化，例如工廠經常排出大量廢水，因此造成環境存在許多工業產生的重金屬與有機物質等污染物；另外，又有農業過度使用殺蟲劑與農藥及家庭廢水的排放等污染。這些污染物由廢水排放進入河川及海洋中，並累積在沉積物中，隨著環境的變化，沉積物中的污染物再釋入水中，並經由生物的累積 (bioaccumulation)，影響整個生態體系 (1)。其中，直接受到衝擊的首先是水生資源，過去本省多處河口與沿岸常有遭受到污染的報導。其中魚類經由食物鏈，生物濃縮的步驟，使得污染物在魚體的濃度增加幾百倍甚至幾千倍，所以經由魚體測試毒性反應常是水污染的指標之一 (1)。

傳統上，以直接測定生物體內之生體異物或其代謝物的含量來了解生物體是否遭受污染。但由於一般生物遭受的生體異物污染量極低，基於靈敏度的限制，無法以一般傳統方法進行檢測，且生體異物在生物體內被快速轉化而排出，故以傳統方法檢測生體異物有其困難的地方。因此另一個檢測生體異物的方法即為以生體異物代謝酵素的活性作為指標，藉由生體異物誘發生物體中的生體異物酵素活性，來了解生物是否遭受到生體異物的污染。Cytochrome P450 即是一種可誘導的蛋白質 (induction protein)，會因環境污染物的誘導，而使其在生物體內的含量升高。魚類的 cytochrome P450 1A (CYP1A)，目前已經評估用來發展作為監測水域環境受到生體異物污染的一種指標 (25-29)。Cytochrome P450 的活性經誘導產生後，通常會維持一段時間，因此常用來作為環境毒物學或環境污染監控的指標。

Cytochrome P450 可藉由比色法 (30)、酵素反應分析 (31)、免疫化學(21, 32-34) 方法及測定 mRNA (27) 來分析其含量。比色法及酵素反應分析法，最為常見且便利，但主要受到樣品的狀態所影響，在不適合的採集與貯存樣品的條件，或者樣品中存在誘導物質與生體異物的拮抗劑也都會明顯影響 cytochrome P450 活性的測定 (30-31)。而以魚類 cytochrome P450 的 cDNA 序列所設計的 mRNA 分析方法，也由於 mRNA 的測定易受到樣品狀態所影響，故不適合大量的樣品測定 (27)。而目前所發展 cytochrome P450 的測定方法中，以免疫化學方法之特異性最高，且不受 cytochrome P450 的活性所影響。其中，又以 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 為快速節省時間的方法，可同時分析大量的樣品，故較適合作為環境毒物學或環境污染監控的指標測定之用 (32-34)。

本計劃即以吳郭魚 (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) 作為研究的材料，並選擇以水源和水生生物群的主要污染物-五氯酚 (pentachlorophenol, PCP) 作為 cytochrome P450 的誘發劑，來進行溶出、分離及純化吳郭魚肝臟 cytochrome P450。同時亦製作吳郭魚肝臟 cytochrome P450 之抗體並建立免疫分析方法。可以提供環境污染調查分析或者魚類的生體異物代謝研究之用。

二. 研究方法

(1) 實驗用吳郭魚

實驗用吳郭魚苗由台南縣之養殖場購買，於實驗室之玻璃魚缸 (110×50×52 cm) 中蓄養至 150±50 g 大小後再進行實驗。

(2) 吳郭魚肝臟 cytochrome P450 之誘導

每 100 g 吳郭魚全重注射 0.625 mg PCP 來誘導吳郭魚肝臟中 cytochrome P450 的產生。以 aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 及 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 等 (31) 來監測 cytochrome P450 被誘導產生的量。

(3) 吳郭魚肝臟 microsomes fraction 之分劃

選擇最佳誘發的條件飼養吳郭魚，再解剖取其肝臟進行實驗。由於 cytochrome P450 主要存於分離的 microsomes 中，因此依照 Omura and Sato (35) 之方法進行 microsomes 的分劃。將肝臟組織以 1.15% KCl 漂洗兩次，去除血塊，再以 Potter-Elvehjem homogenizer 研磨，磨碎後之組織，在冷卻離心機中 2,000×g，10 min，可得上澄液及沈澱。再將上澄液以 100,000 ×g 離心 1 h，所得的沈澱即為 microsomes fraction。將以此 microsomes fraction 作為純化 cytochrome P450 的材料。

(4) 以介面活性劑抽出吳郭魚肝臟 cytochrome P450

由於 cytochrome P450 主要存在於內質網膜之上，經由分離後內質網膜是以 microsomes 的型態存在。因此在純化分離 cytochrome P450 之前，必須以介面活性劑（或稱清潔劑），將其自內質網膜上溶出。一般常用來溶出 cytochrome P450 的介面活性劑有 sodium cholate、Emulgen 及 Lubrol-PX 等 (36)。本研究以 sodium cholate 及 Triton X-100 溶出吳郭魚肝臟 microsomes fractions 中之 cytochrome P450，找出最適合的解離條件，再進一步進行純化分離。

(5) 以層析法分離吳郭魚肝臟 cytochrome P450

分離不同的蛋白質必須要考慮到不同蛋白質的特性，目前已有數種層析方法可應用在分離純化 cytochrome P450 (36-42)。本計劃將參考 Wang and Ueng (43) 的方法，嘗試以 Octylamino-Sepharose chromatography、diethylaminoethyl (DEAE) chromatography 及 CM-Sepharose、hydroxylapelite 等層析方法進行分離純化 cytochrome P450。

(6) 以 SDS-Polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) 分離與鑑定 ZnBP

以不同層析法分離而得之分離液，將以 SDS-PAGE 判斷其 bands，以鑑定分離出的 cytochrome P450 之純度。SDS-PAGE 擬參照 Bollag 等之方法 (44)。

(7) cytochrome P450 抗體之製備：

上述純化所得之 cytochrome P450，將作為抗原來製作多株抗體。為避免不必要的干擾影響抗體的誘發，將參考 Harlow and Lane (45) 之方法將 cytochrome P450 進行 SDS-PAGE 後，再挖起該蛋白質 band 的膠體進行 electroelution，再進一步進行凍濃縮以得到純度較高的 cytochrome P450 為抗原。參考 Harlow and Lane (45) 之方法進行 cytochrome P450 多株抗體 (polyclonal antibody) 的製作。以小白鼠做 (BALB/C) 為實驗動物。

(8) 測定 cytochrome P450 的 ELISA 方法的建立

參考 Maryland (46) 及 Hong *et al.* (47) 之方法建立 ELISA。並以 ELISA 測定血清中“cytochrome P450 抗體”的力價。

(9) Western blotting

參考 Copeland (48) 之方法進行 Western blotting，以確定 cytochrome P450 在 SDS-PAGE 上之位置及抗體是否具有專一性。

(10) 各種生化性質的測定

- a. Cytochrome P450 含量：利用 reduced cytochrome P450 與 CO 結合後，在 450 nm 下有最大的吸光的特性來測定其含量 (30)。
- b. Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 及 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD): 參考 Whyte *et al.* (31) 的方法來測定。
- c. 蛋白質測定：以 Lowry 法測定 (49)。

三 結果與討論

(1) 最佳誘發吳郭魚肝臟 cytochrome P450 條件的選擇。

如 Table 1 所示，以注射 PCP (0.625 mg/100g) 的方式，可明顯的誘導 cytochrome P450 的產生，同時其單加氧酶的活性如 Aryl hydrocarbon hydrolase、Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD)、Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 等均明顯的增高，但對 Aniline-4-hydroxylase 及 Aminopyrine-N-hydroxylase 並無多大的影響。

(2) 製備吳郭魚肝臟 microsomes fraction。

如 Figure 1。

(3) 以界面活性劑自 microsomes fraction 抽出 cytochrome P450，並選擇最適合的抽出條件。

如 Table 2 所示，以 sodium cholate 及 Triton X-100 可抽出 90.9% cytochrome P450。

(4) 以不同的層析法，嘗試分離、純化 cytochrome P450。

純化流程如 Figure 1 所示，以 Octylamino-Sepharose (Figure 2)、DEAE-Sepharose (Figure 3) 及 CM-Sepharose (Figure 4)、hydroxylaptite (Figure 5) 等層析方法進行分離純化 cytochrome P450。以 SDS-PAGE 分析各純化過程之蛋白質，如 Figure 6 所示，可在 45 kDa 附近得到單一的蛋白質色帶，將再進一步研究此蛋白質與其他 CYP 之差異性。吳郭魚肝臟 CYP 之純化「產量」及「倍數」如 Table 2 所示，以吳郭魚肝臟 microsomes 之蛋白質為起點，以 cytochrome P450 之含量為指標，吳郭魚肝臟之 ZnBP，其純化產量為~0.06%。其純化倍數為~79 倍。

(5) 以純化的 cytochrome P450 製備多株抗體。並以 ELISA 測定抗體力價。

本研究係以 Harlow and Land (1988) 之方法，以小白鼠製備 CYP 之多株抗體。小白鼠首次免疫 1 周後，血清中的抗體力價即明顯增加，經 3 次的加強免疫後，CYP 的抗體力價即可達到 1/6,400。在第四次加強免疫 (9 周後)，血清的抗體稀釋曲線如 Figure 7。與注射前的血清的抗體稀釋曲線比較，其 CYP 抗體的力價明顯的增加，經測定為 1/8,800。將小白鼠犧牲進行採血，製得 CYP 抗體。

(6) 進行 Western blotting，確定抗體是否具有專一性。

由於多株抗體的特異性較低，故以免疫轉印分析，以了解其對 CYP 是否有專一性的結

合。Figure 8 為以 CYP 抗體，對 CYP 所進行的免疫轉印分析。比較轉印前的銀染，及轉印後之 immunoblotting，由此可知該抗體主要的結合蛋白質為 45 kDa 左右的 CYP，得知該抗體對 CYP 具有專一性的結合。

四. 計劃成果自評

本計劃主要為建立吳郭魚肝臟中的 cytochrome P450 (CYP) 的免疫分析方法，目的在於快速且便利的測定 CYP 的含量，而作為環境毒物學及環境污染監控的指標測定之用。亦可以用來做為魚類對於生體異物代謝研究之指標。預期未來可以應用在環境污染、毒物學、藥理學及食品衛生方面的研究之上。為純化吳郭魚肝臟之 CYP，乃將 PCP 以肌肉注射的方式誘導吳郭魚產生 CYP。取得肝臟後均質，並以差異式離心法分離 microsome，再自此 microsome 溶出及分離 CYP。由 Octyl-Sepharose、DEAE-Sepharose、CM-Sepharose 及 Hydroxyapatite chromatography 等層析方法，已能成功地分離純化出此 CYP。由 SDS-PAGE 之分析，可知此 CYP 之分子量為 45 kDa 左右。同時由吳郭魚肝臟純化的 CYP，已能成功地製成 CYP 多株抗體，並以此抗體發展出來免疫分析方法，可以做為研究 CYP 的指標。

本計劃已將預定之成果完成，完成比率 100%，目前正將此等結果撰寫成報告，向國外相關期刊投稿中。由於 95 年度國科會之計劃申請未獲通過，目前正以自費的方式進行進一步的研究，目前則是以本計劃所製備之 CYP 抗體進行生體異物相關的研究中。預期可得到吳郭魚對於生體異物代謝的調控機制等結果。

五 參考文獻

- (1) Peakall DB. 1994. Biomarkers, the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News*, 1: 55-60.
- (2) Iguchi T. 1998. Environmental endocrine disruptors. *Nippon Rinsho, Japanese Journal of Clinical Medicine*, 56:2953-2962.
- (3) Parkinson A. 1996. Biotransformation of xenobiotics, In: *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill Press, New York, 113-186.
- (4) Nebert DW, Gonzalez FJ. 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 945-993.
- (5) Caldwell J. 1980. Conjugation reactions. In: *Concepts in Drug Metabolism*. Marcel Dekker Press, New York, 221.
- (6) Lu AYH, Coon MJ. 1968. Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 243: 1331-1332.
- (7) Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. Cytochrome P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42.
- (8) Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig C., Falck JR, Farrell G, Kaminsky LS, Spivack SD, Boitier E, Beaune P. 1999. Human cytochromes P450. *Mol. Asp. Med.*, 20: 1-137.
- (9) Ryan DE, Levin W. 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol. Ther.*, 45: 153-239.
- (10) Gonzalez FJ. 1990. Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol. Ther.*, 45: 1-38.

- (11) Ioannides C, Parke DV. 1990 The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab. Rev.*, 22: 1-85.
- (12) Williams DE, Buhler DR. 1983. Purified form of cytochrome P-450 from rainbow trout with high activity toward conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin B1-2,3-epoxide. *Cancer Res.*, 43: 4752-4756.
- (13) Celander M, Ronis MJJ, Förlin L. 1989. Initial Characterization of a constitutive cytochrome P-450 isoenzyme in rainbow trout liver. *Mar. Environ. Res.*, 28, 9-13.
- (14) Celander M, Förlin L. 1991. Catalytic activity and immunochemical quantification of hepatic cytochrome P-450 in β -naphthoflavone and isosafrol treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, 9: 189-197.
- (15) Celander M, Förlin L. 1992. Quantification of cytochrome P4501A1 and catalytic activities in liver microsomes of isosafrol- and β -naphthoflavone-treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Environ. Res.*, 34: 123-126.
- (16) Celander M, Leaver MJ, George SG, Förlin L. 1993. Induction of cytochrome P450 1A1 and conjugating enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: a time course study. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106C: 343-349.
- (17) Celander M, Broman D, Förlin L, Näf C. 1995. Effects of petroleum hydrocarbons on the hepatic cytochrome P450 1A1 system in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.*, 39: 61-65.
- (18) Celander M, Förlin L. 1995. Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P450 1A1 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquat. Toxicol.*, 33: 141-153.
- (19) Celander M, Stegeman JJ, Förlin L. 1996. CYP1A1-, CYP2B- and CYP3A expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: CYP1A1-specific down-regulation after prolonged exposure to PCB. *Mar. Environ. Res.*, 42: 283-286.
- (20) Husoy AM, Myers MS, Goksoyr A. 1996. Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua L*) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36: 53-74.
- (21) Husoy AM, Myers MS, Willis ML, Collier TK, Celander M, Goksoyr A. 1994. Immunohistochemical localization of CYP1A and CYP3A-like isozymes in hepatic and extrahepatic tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua L*), a marine fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 129: 294-308.
- (22) Förlin L, Celander M. 1995. Studies of the Inducibility of P450 1A in Perch from the PCB-Contaminated Lake Järnsjön in Sweden. *Mar. Environ. Res.*, 39: 85-88.
- (23) Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. 2003. Cytochrome p450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere.*, 51:491-500.
- (24) Ueng YF, Ueng TH. 1995. Induction and purification of cytochrome P450 1A1 from 3-methylcholanthrene-treated tilapia, *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*. *Arch Biochem Biophys.*, 322:347-56.
- (25) Bucheli TD, Fent K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science & Technology*, 25: 201-268.
- (26) Nilsen BM, Berg K, Goksoyr A. 1998. Induction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. A biomarker for environmental pollution. *Methods Mol Biol.*, 107: 423-38.
- (27) Goksoyr A. 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl.*, 17: 80-95.
- (28) Monostory K, Jemnitz K, Vereczkey L. 1996. Xenobiotic metabolizing enzymes in fish: diversity, regulation and biomarkers for pollutant exposure. *Acta Physiol Hung.*, 84: 369-81.

- (29) Goldfarb P, Livingstone D, Birmelin C. 1998. Biomonitoring in the aquatic environment: use of molecular biomarkers. *Biochem Soc Trans.*, 26: 690-694.
- (30) Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem.*, 239: 2370-2378.
- (31) Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol.*, 30: 347-570.
- (32) Scholz S, Behn I, Honeck H, Hauck C, Braunbeck T, Segner H. 1997. Development of a monoclonal antibody for ELISA of CYP1A in primary cultures of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* hepatocytes. *Biomarkers*, 2: 287-294.
- (33) Goksøyr A. 1991. A semi-quantitative cytochrome P4501A1 ELISA: a simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish. *Sci. Total Environ.*, 101: 255-262.
- (34) Moshe T, Myers CR, Michael R. 2002. Waterman Evaluating molar CYP1A level in fish hepatic microsomes by competitive ELISA using recombinant membrane-free CYP1A standard protein. *Aquatic Toxicology*, 59: 101-114.
- (35) Omura T, Sato R. 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 237: 1375-1376.
- (36) Roos PH. 1996. Chromatographic separation and behavior of microsomal cytochrome P450 and cytochrome b5. *J. Chromatogr. B* 684: 107-131.
- (37) Imai Y, Sato R. 1974. Gel-electrophoretically homogeneous preparation of cytochrome- p-450 from liver-microsomes of phenobarbital-pretreated rabbits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60: 8-14
- (38) Isa M, Cumps J, Fossoul C, Atassi G. 1992. A new method for the purification of cytochrome-P450 from human liver microsomes. *Biomed Chromatogr.*, 6: 248-250.
- (39) Kastner M, Neubert D. 1992. Purification of cytochromes P-450 derived from liver microsomes of untreated and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated marmoset monkeys. *J Chromatogr.*, 625: 55-66.
- (40) Miyatake A., Tsubaki M., Hori H., Ichikawa Y. 1994. Purification and comparative characterization of cytochrome P-450_{scc} (CYP XIA1) from sheep adrenocortical mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1215: 176-182.
- (41) Ryan DE, Levin W. 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol Ther.*, 45: 153-239
- (42) Sundin M, Warner M, Haaparanta T, Gustafsson J-Å. 1987. Isolation and catalytic activity of cytochrome P450 from the ventral prostate of control rats. *J Biol Chem.*, 262: 12293-12297.
- (43) Wang MH, Ueng TH. 1993. The resolution and reconstitution of monooxygenase system from hamster liver microsomes. *J. Chinese Biochem. Soc.*, 22: 37-45.
- (44) Bollag DM, Rozycki DM, Edelstein SJ. 1996. *Protein Methods*, 2nd ed., Wiley-Liss, Inc. Press, New York. 107-154, 301-351.
- (45) Harlow E, Lane D. 1988. *Antibodies A laboratory manual*, cold spring harbor laboratory Press, 553-612.
- (46) Maryland B. 2003. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. In: *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc. Press, New York. unit 2.1.
- (47) Hong TH, Chen ST, Tang TK, Wang SC, Chang T.H. 1989. The production of polyclonal and monoclonal antibodies in mice using novel immunization methods. *J. Immunology Methods*, 120: 151-157.
- (48) Copeland RA. 1993. Electrophoretic and chromatographic methods for assessing protein purity. In: *Methods for Protein Analysis*. Chapman and Hall Press. New York. 3: 261-288.
- (49) Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolbert NE. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 206-210.

Table 1. Effects of pentachlorophenol (PCP) on microsomal monooxygenase contents and activity in tilapia liver

	Control	PCP
Total weight (g)	124.12 ± 12.25	116.58 ± 17.96
Liver weight (g)	1.41 ± 0.15	1.71 ± 0.27 ^a
Liver weight/ Total weight (%)	1.13 ± 0.25	1.47 ± 0.10 ^a
Cytochrome P450 (nmol/mg protein)	0.10 ± 0.05	0.42 ± 0.21 ^a
NADPH-Cytochrome C reductase (nmol/min/mg protein)	4.61 ± 1.13	13.12 ± 0.84 ^a
Aryl hydrocarbon hydrolase (ΔI /mg protein)	14.43 ± 6.73	80.12 ± 15.63 ^a
Ethoxycoumarin-O-deethylase (pmol/min/mg protein)	9.26 ± 2.66	69.24 ± 25.95 ^a
Ethoxresorufin-O-deethylase (pmol/min/mg protein)	10.19 ± 5.39	75.35 ± 30.12 ^a
Aniline-4-hydroxylase (nmol/min/mg protein)	1.22 ± 0.50	1.52 ± 0.11
Aminopyrine-N-hydroxylase (nmol/min/mg protein)	12.35 ± 6.77	21.12 ± 3.65

Table 2. Purification fold of CYP at different step of purification

Purification step	Total Protein (mg)	Total P450 (nmol)	Specific content (nmol/mg)	% yield of protein	Fold purification
1. Microsomes	139.2 ± 10.5	32.8 ± 1.2	0.24 ± 0.16	100.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
2. Solubilized Microsomes	104.3 ± 5.9	29.8 ± 0.9	0.28 ± 0.06	74.93 ± 3.31	1.17 ± 0.19
3. Octyl-Sepharose chromatography	66.9 ± 3.5	28.5 ± 0.7	0.43 ± 0.12	48.06 ± 4.52	1.79 ± 0.27
4. DEAE-Sepharose chromatography	31.0 ± 1.7	25.8 ± 0.9	0.83 ± 0.07	22.27 ± 2.45	3.45 ± 0.23
5. CM-Sepharose chromatography	10.9 ± 1.3	19.3 ± 1.1	1.77 ± 0.19	7.83 ± 1.62	7.38 ± 0.67
6. Hydroxyapatite chromatography	0.8 ± 0.1	15.2 ± 0.8	19.00 ± 0.76	0.06 ± 0.00	79.17 ± 2.92

1. Each value represents the mean±SD (n=3).

2. ^a Value significant different from the respect control value, P<0.05.

1. Each value represents the mean±SD (n=4).

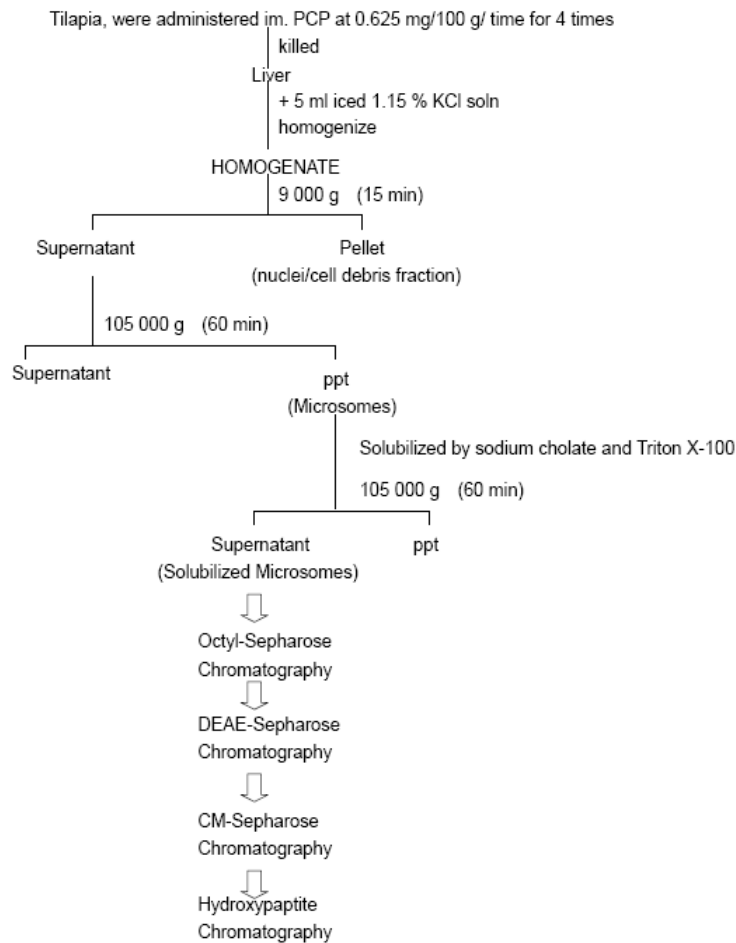


Figure 1. Purification procedure of the CYP from pentachlorophenol (PCP) treated tilapia.

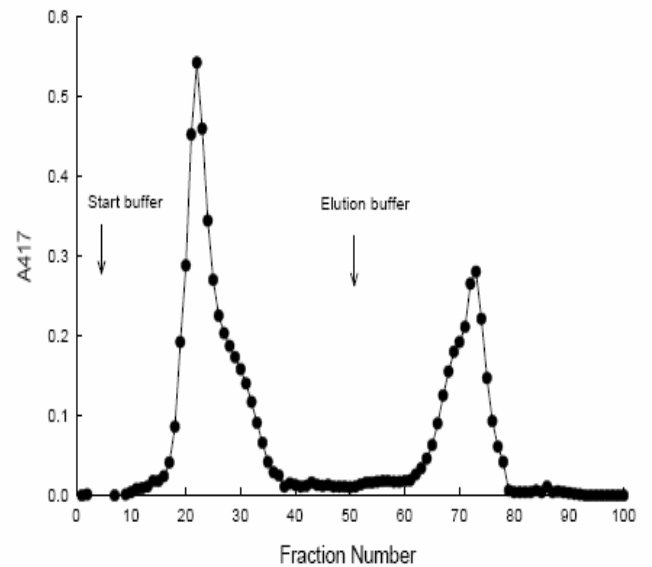


Figure 2. Purification of the CYP by Octyl-Sepharose chromatography.

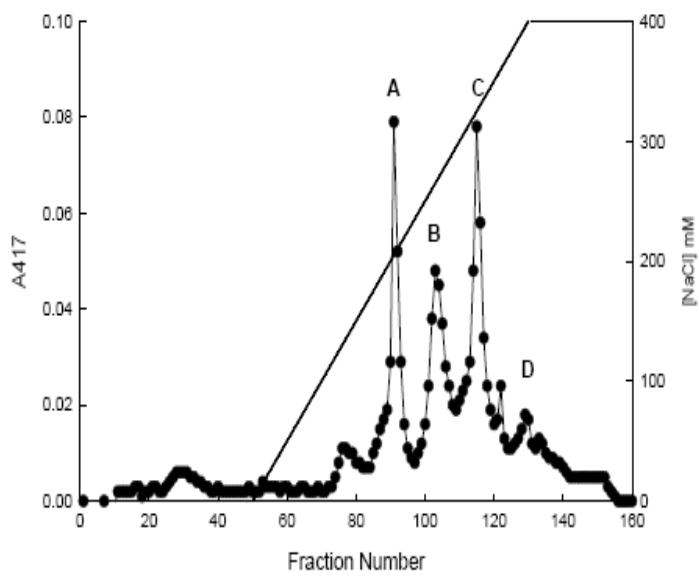


Figure 3. Purification of the CYP by DEAE-Sepharose chromatography.

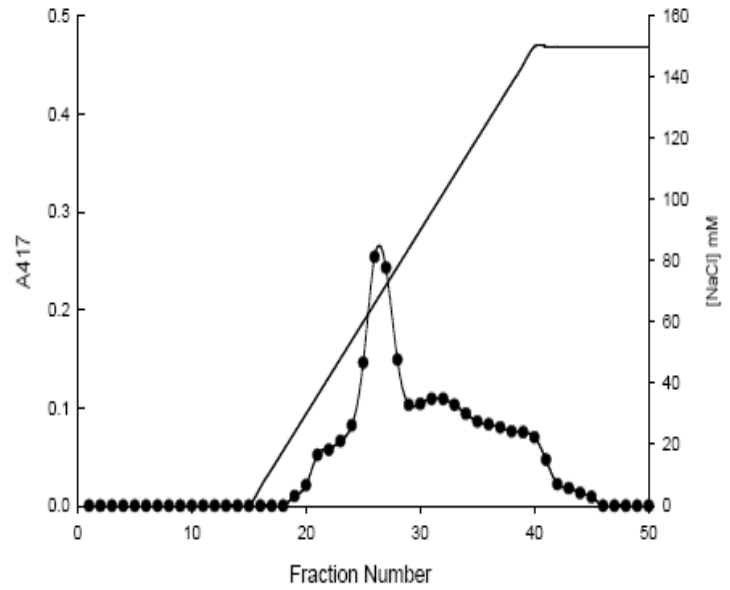


Figure 4. Purification of the CYP by CM-Sepharose chromatography.

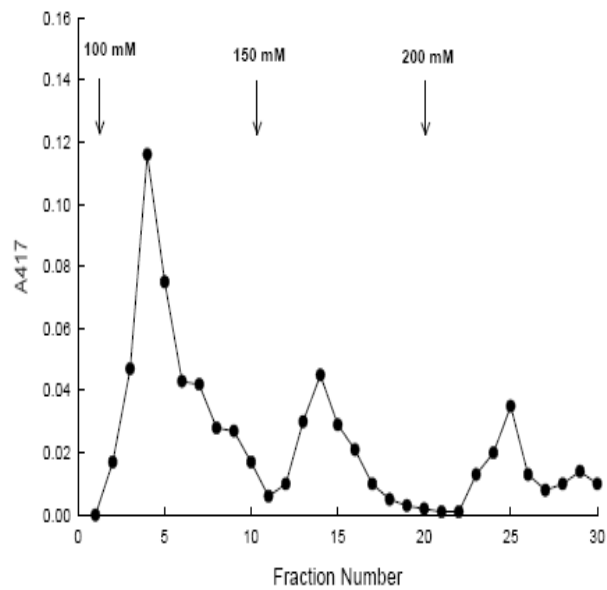


Figure 5. Purification of the CYP by Hydroxyapatite chromatography.

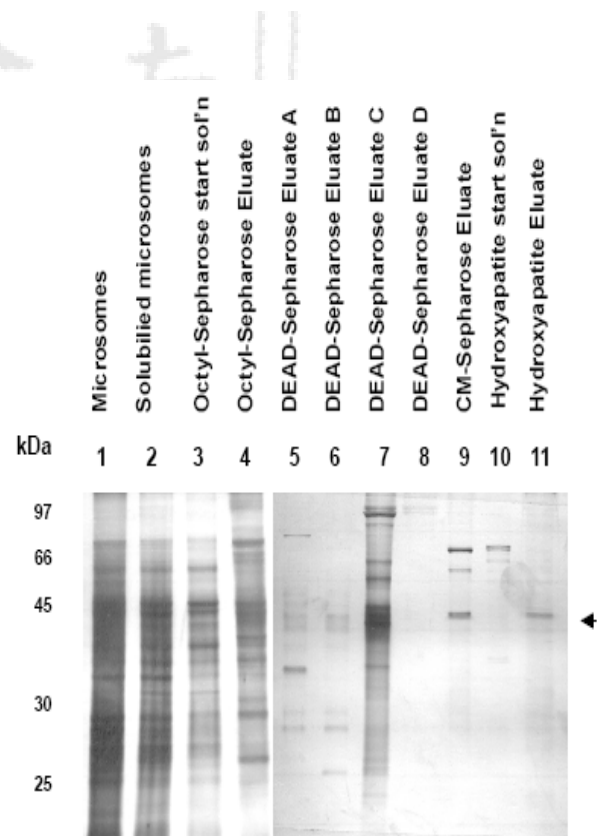


Figure 6. SDS-PAGE of fractions eluted from Octyl-Sepharose, DEAE-Sepharose, CM-Sepharose and hydroxyapatite chromatography. Markers of known molecular weight are also shown. Arrowheads show the position of the CYP.

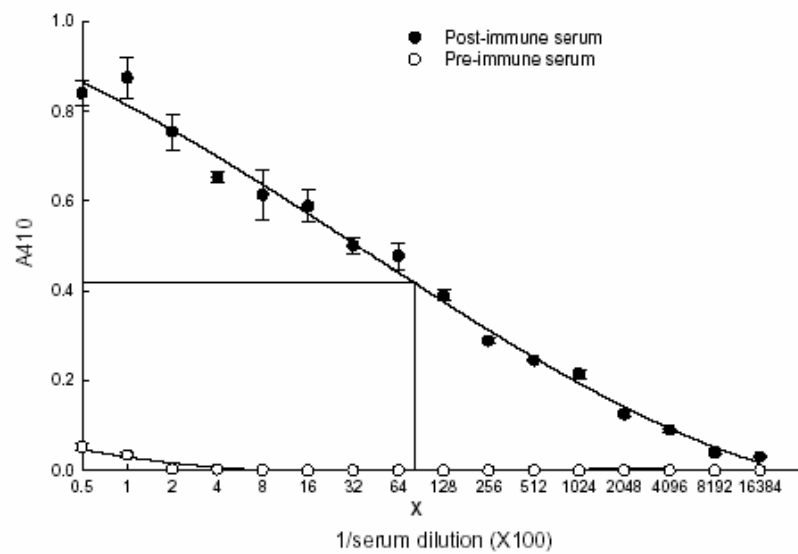


Figure 7. Antibody dilution curve. Polyclonal antibodies raised against CYP in a mouse reacted with CYP in ELISA. The reactivity of preimmune serum with CYP is shown for reference. X= dilution corresponding to antibody titer. The titer was estimated to be 1 in 8,800.

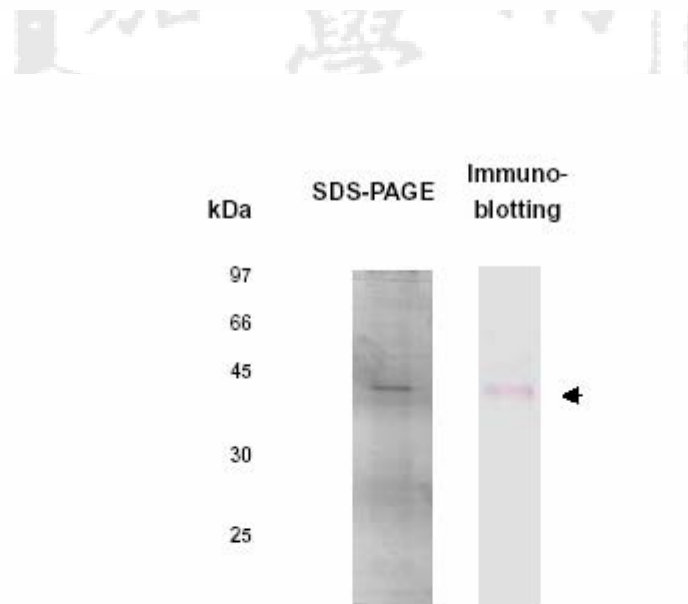


Figure 8. Polyclonal antibodies raised against CYP in a mouse reacted with CYP in immunoblotting. The PAGE of the purified CYP was stained with silver stain (left) and immunoblotting (right). Markers (M) of known molecular weight are also shown. Arrowhead denote the position of the CYP.