

## 食蚊鱼 *CYP19a* 基因的克隆与序列分析

甘 为, 方展强\*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广东广州 510631)

**摘要:** 硬骨鱼类 *CYP19* 基因与生物的性别分化和激素调节相关, 因此可开发用来探究环境激素污染与基因表达的关系。本研究首次克隆和分析了食蚊鱼 *CYP19a* cDNA 的全系列, 为将 *CYP19* 基因作为监测环境激素生物标志物的研究提供了全面的实验数据。根据 *CYP19a* 基因 cDNA 保守区域设计引物, 扩增保守区域并测序。采用 RACE 法扩增食蚊鱼 *CYP19a* 基因 cDNA 序列全长, 对其蛋白序列进行同源性分析, 并将序列应用于 *CYP19a* mRNA 转录水平的 RT-PCR 法检测中。成功克隆食蚊鱼 *CYP19a* 基因全长, 获得 *CYP19a* 基因总长为 2020 bp, ORF 为 238~1791 bp, 共编码 518 个氨基酸, 对其编码的蛋白质进行有关信号肽、跨膜螺旋、亲水性/疏水性、一级结构、二级结构和三级结构分析, 与其他硬骨鱼类底鳉、青鳉、平鲷、鲫、鲤和斑马鱼的性腺 *CYP19a* 基因作同源性比较, 其基因相似度分别为 93%、84%、84%、71%、71% 和 66%。用 MEGA 6.0 软件对 19 个物种的 *CYP19a* 基因进行聚类分析, 食蚊鱼 *CYP19a* 基因与底鳉、青鳉同源性最高, 说明芳香化酶在进化上相对保守。确定从食蚊鱼性腺所克隆的 *CYP19a* 基因是芳香化酶基因, 证明食蚊鱼的芳香化酶是由 *CYP19a* 和 *CYP19b* 两种基因编码的。食蚊鱼卵巢芳香化酶具有 3 个高度保守的片段, 并具有催化活性。

**关键词:** 食蚊鱼; *CYP19a* 基因; cDNA 末端快速扩增法; 序列分析

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

在水生环境中, 多种环境激素被排放进水体中, 严重危害水环境中的鱼类。受环境污染影响的鱼类无论在基因表达还是形态方面都可能发生异常变化, 许多学者正努力研究如何利用这些生物学指标作为生物标志物监测受污染水体中的环境激素类物质。目前较为公认鱼类生物标志物有卵黄蛋白原(VTG)和 *VTG* mRNA 的表达参数等。然而, 对环境的检测不能凭借单一的标志物或者手段得出结论, 必须寻找更多的方法, 通过多种途径得出较为合理的结论。硬骨鱼类(Osteichthyes)的 *CYP19* 基因与生物的性别分化和激素调节相关, 因而成为近年来较热门的生物标志物。Greytak 等<sup>[1]</sup>, Kazeto 等<sup>[2]</sup> 和 Orrego 等<sup>[3]</sup> 的研究均表明, 受到环境污染或毒害

的生物体体内的 *CYP19* 基因表达都发生异常变化。已有文献报道, 雄性胖头鲮(*Pimephales promelas*)<sup>[4]</sup>、青鳉(*Oryzias laticeps*)<sup>[5]</sup> 和斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[6]</sup> 等小型硬骨鱼类的 *CYP19* 基因的表达被作为生物标志物用于监测环境污染。

食蚊鱼(*Gambusia affinis*) 隶属鲮形目(Cyprinodontiformes), 花鳉科(Poeciliidae), 食蚊鱼属(*Gambusia*), 是淡水生活的小型卵胎生鱼类<sup>[7]</sup>, 原产于中南美洲, 自1927年从菲律宾引入我国, 已成为遍及我国南方的淡水小型鱼类。食蚊鱼入侵性很强, 其体形小, 食性杂, 繁殖周期短, 容易捕捞, 并易于在实验室饲养, 因此被广泛用作指示生物。开展利用食蚊鱼目标基因的表达作为生物标志物监测水环境中类雌激素/雄激素物质污染

收稿日期: 2015-12-03 修回日期: 2016-05-28

资助项目: 广东高校城市水环境生态治理与修复工程技术研究中心建设项目(2012gezx A004)

通信作者: 方展强, E-mail: fangzhang@scnu.edu.cn

的研究, 有助于将食蚊鱼作为内分泌干扰效应研究的模式实验动物。有关食蚊鱼 *CYP19a* 基因片段及 *CYP19b* 基因全长已由本实验室克隆<sup>[8-9]</sup>, 在此基础上, 本研究根据 *CYP19a* 基因 cDNA 保守区域设计引物, 扩增保守区域并测序; 采用 RACE 法扩增食蚊鱼 *CYP19a* 基因 cDNA 序列全长, 对其蛋白序列进行同源性分析, 将序列应用于 *CYP19a* mRNA 转录水平的 RT-PCR 法检测中。其结果为将 *CYP19* 基因作为监测环境激素生物标志物的研究提供了全面的实验数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验鱼购自广州市花鸟鱼虫市场。购买后放入鱼缸进行饲养, 待其完全稳定(约 20 d)后进行实验。抽提 RNA 所用的 Trizol Reagent、反转录酶 M-MLV、RNA 酶、限制性内切酶、胶回收试剂盒、PCR 扩增试剂盒均购自 TaKaRa 公司; Taq 酶、克隆使用的载体 pMD19-T Vector Systems (T 载体) 购自上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.2 实验方法

**引物的设计与合成** 参照 NCBI 中已登录的青鳉、底鳉 (*Fundulus heteroclitus*)、斑马鱼、金鱼 (*Carassius auratus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 等 *CYP19a* 基因 cDNA 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列在同源保守区内设计引物, 引物序列见表 1。

**总 RNA 的提取** 取新鲜卵巢, 用 Trizol

Reagent 提取总 RNA。用变性琼脂糖凝胶电泳溴化乙锭染色显示 28 S 和 18 S 检测 RNA 的完整性。

**保守片段的克隆** 以食蚊鱼总 RNA 为模板, 反转录按 TaKaRa 反转录试剂盒的步骤操作。以引物 OF 和 OR 进行 PCR 扩增, 反应条件为 94 °C 预变性 3 min 后进入循环: 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 20 s, 共 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。用浓度 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 胶回收试剂盒回收。回收产物与 pMD19-T Vector 连接并转化大肠杆菌 DH5a 菌株, 经菌落 PCR、质粒酶切鉴定挑选出阳性克隆进行测序。测定结果通过 BLAST 软件搜索 NCBI 的核酸数据库, 进行同源性比较。

**5'RACE 与 3'RACE 扩增** 将提取的总 RNA 进行反转录, 然后用引物 GSP-1 进行目的基因第一条链 cDNA 的合成。去除多余的 dNTP、引物等再用 TdT 酶在 cDNA 3' 端加 poly(A), 使用引物 GSP-2 和试剂盒自带的桥连引物 AAP 对已经加 poly(A) 尾的 cDNA 进行 PCR 第一轮扩增, PCR 反应体系总体积为 31.5 mL, 反应条件: 先 94 °C 变性 2 min 后进入循环, 每个循环包括 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环。最后一次循环结束时 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。为增加扩增效率及扩增的特异性, 将上述 PCR 液稀释 10 倍, 取 5 mL 作模板, 用引物 GSP-3 和试剂盒自带的桥连通用扩增引物 AUAP 进行巢式 PCR 第二轮扩增, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离、回收、克隆、送测序。

反转录获得 cDNA 第一链后, 用引物 3'598-1 和 UPM 以合成的 cDNA 为模板进行第一轮 PCR 扩增, PCR 反应体系总体积为 28 mL, 反应条件: 先 5 次循环 (94 °C 30 s, 72 °C 3 min); 然后 5 次循环 (94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min); 最后 25 次循环 (94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min), 4 °C 保存。将第一轮 PCR 扩增产物稀释 50 倍, 取 4 mL 作为模板, 用引物 3'598-2 和 UPM 进行第二轮 PCR 扩增, 反应条件与第一轮扩增相同, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离、回收、克隆、送测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CYP19a* 基因 cDNA 序列的克隆

提取食蚊鱼卵巢组织的总 RNA, 采用 1% 的

表 1 食蚊鱼 *CYP19a* 基因克隆引物

Tab. 1 *G. affinis CYP19a* gene primers

引物名称 primer	引物序列 sequence	描述 description
<i>CYP19a</i>	上游(OF): 5'-GGCACAGCMAGCAACTAYTA-3'	扩增性腺 保守区(约 1100 bp)
	下游(OR): 5'-CTGGGAVAGGTTGTTGGTCT-3'	
5'RACE	GSP1: 5'-TTTTCCACAGGGCTAC-3'	用于 5'RACE, 产物约 700 bp
	GSP2: 5'-GGCAGCTGAGCCCTGGTTTG-3'	
	GSP3: 5'-TAAGGACATGATTAAGTCCG-3'	
	试剂盒自带上游引物	
3'RACE	3'598-1: ACTTCACCATGCGGCGAGCCCTGTC	用于 3'RACE, 产物约 500 bp
	3'598-2: TCTCGCCGTTTCTCCAGCCGTTT	
	试剂盒自带下游引物	

琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。结果显示卵巢组织总RNA的18 S和28 S条带清晰明亮,在微量分光光度计中测定,260和280 nm的吸收值的比值为1.8~2.0,表明所提取的总RNA完整性良好,纯度较高,点样孔清晰,表明基本没有杂质,可作为保守片段PCR扩增的模板。

根据GenBank中已有物种的*CYP19a* cDNA序列比对,在保守度较高的区域设计*CYP19a*简并引物对,以提取的卵巢组织的总RNA逆转录后的产物为模板进行PCR扩增,产物电泳结果显示,在食蚊鱼的卵巢中扩增出一条约1100 bp的特异带,与引物设计的预期结果相一致。经上海生工测序结果显示,食蚊鱼*CYP19a*基因cDNA保守区域片段大小为1080 bp,将此克隆得到的基因片段与其他鱼的性腺*CYP19a*基因作同源性比较,发现其与底鳉,青鳉,罗非鱼(*Tilapia* sp.),鲫,斑马鱼,鲤基因内片段的相似性分别达到了91.2%、83.8%、83%、70.3%、70.2%、69.3%,说明克隆得到的基因即为食蚊鱼*CYP19a*基因。

**5'RACE *CYP19a*基因扩增结果** 根据已获得的*CYP19a*基因保守片段,设计基因特异性引物GSP1、GSP2、GSP3以及5'RACE试剂盒通用引物进行巢式PCR扩增。经电泳检测,扩增得到一条约700 bp的特异条带,其大小与预期结果相一致。经上海生工测序结果显示,食蚊鱼*CYP19a*基因cDNA 5'RACE片段大小为665 bp,该序列与底鳉的*CYP19a*序列的相似性达82%,与青鳉的*CYP19a*序列的相似性达79%,证明克隆所得的片段是5'RACE *CYP19a*基因。

根据已获得的*CYP19a*基因保守片段,设计基因特异性引物3'598-1,3'598-2以及3'RACE试剂盒通用引物进行巢式PCR扩增。经电泳检测扩增得到一条500 bp的特异条带,其大小与预期结果相一致。经上海生工测序结果显示,食蚊鱼*CYP19a*基因cDNA 3'RACE片段大小为485 bp,该序列与底鳉的*CYP19a*序列的相似性达86%,与青鳉的*CYP19a*序列的相似性达88%,证明克隆所得的片段是3'RACE *CYP19a*基因。

## 2.2 *CYP19a*基因序列及其编码蛋白质生物信息学分析

利用软件Sequencher 5.0将中间保守片段与5'端扩增片段、3'端扩增片段进行拼接。核酸序

列开放性阅读框在NCBI上ORF Finder工具中进行查找。用DNAMAN软件翻译开放性阅读框(ORF)并分析蛋白质一级结构分子量、氨基酸组成和预测等电点。运用Hopfield软件预测蛋白质二级结构。用Swiss model预测蛋白质的三级结构。信号肽的预测使用signalIP服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。利用ExPASy中的ProtScale工具对蛋白质的亲水性、疏水性进行预测;采用Hphob./Kyte & Doolittle算法预测氨基酸序列的疏水性/亲水性。蛋白的跨膜区域通过TMHMM和TMPred软件预测。蛋白序列的多重比对使用Clustal X软件。进化树由Clustal X和Mega 6.0分析构建完成(图1)。

***CYP19a*基因ORF 序列拼接结果** 得到cDNA序列全长2020 bp,ORF为238~1791 bp,共编码518个氨基酸,5'端有237 bp的非编码区,3'端有229 bp的非编码区。等电点pI为7.40,测算的蛋白质分子量约为58.5 ku。

***CYP19a*基因编码蛋白质信号肽** 由预测结果可知,信号肽酶切位点分值(C)、信号肽分值(S)和由C值和S值综合得出的剪切位点分值,用于更精确地确定信号肽酶切位点(Y)的最大值分别为0.202、0.523、0.289,均小于分界值0.45。同时,整条序列所有分值均较低,无明显较高的C值,无较大的S值、Y值。结果表明食蚊鱼*CYP19a*基因编码的蛋白质不含信号肽,故该蛋白为非分泌蛋白。

***CYP19a*基因编码蛋白质的跨膜区域** 用TMPred对跨膜区结构进行预测,发现两种可能的跨膜模式,一种跨膜模式显示该蛋白质存在4个跨膜区:第55至74位氨基酸,第329至348位氨基酸,肽链方向为从膜内跨越到膜外;第1至22位氨基酸,第78至99位氨基酸,肽链方向为从膜外跨越到膜内。另一种跨膜模式显示该蛋白存在3个跨膜区:第1至23位氨基酸,第329至348位氨基酸,肽链方向为从膜内跨越到膜外;第53至71位氨基酸,肽链方向为从膜外跨越到膜内。用TMHMM 2.0 Server预测结果显示,该蛋白质的跨膜螺旋数量(number of predicted TMHs)为0;1~517位氨基酸全部为膜外蛋白,无膜内蛋白,无跨膜结构。

***CYP19a*基因编码蛋白质的亲水性、疏水性** 结果显示正值区域的氨基酸分值多在0至0.5之间,而负值区域的氨基酸分值多在0至1之间,且

```

1      aggtgcttacttttctgtgtttccgtagagccggagtgccggttcttctctgtaaccg
61     cgggagcgtctttctatcgtagtgcttttctccccaggctcagttatatgtccccggag
121    ttcacgccaggcaagcggggagctgcgaatcgtgtcccagcggcggaacggcacggcta
181    cggctgactggttgggctcgaggagctacgttgacatcgttttgtaccctccgtcttATG
1
1      M
241    GATTTCGATCTCTTCTGTGGTGGGACCAAGTCCAATGTGGATATGGATGGTGCGGTGACA
21     D S I S S C G G T K S N V D M D G A V T
301    GACCTGGTGTCCATTTCCTTAAATGCCACAGCACACCTGTACCTGGCATCCCATAGCA
41     D L V S I S L N A T A H L S P G I P I A
361    ACAAGAACCCTCATTCTTCTCCTTTGTCTGCTGGTGGTGGCTGGAGTCACACGGAGAAA
61     T R T L I L L L C L L V V A W S H T E K
421    AACACGGTTCAGGCCCTTCGTTCTGCTGGGTTTTGGTCCACATTTGTCATATTTGAGA
81     N T V P G P S F C L G F G P H L S Y L R
481    TTCATCTGGACTGGGATTGGCACAGCCAGCAACTACTATAACAAGAAGTACGGAGACATT
101    F I W T G I G T A S N Y Y N K K Y G D I
541    GTCAGGGTTTGGATCAACGGAGAGGAGACCCTTATACTCAGCAGGGCCTCGGCAGTTAAT
121    V R V W I N G E E T L I L S R A S A V N
601    CATGTCCTAAGAATGAAAGTACACTTCCCGTTTTGGGAGCAAACCAGGGCTCAGCTGC
141    H V L K N G K Y T S R F G S K P G L S C
661    CTCGGCATGAATGAAAGGCATCATCTTCAACAACAACGTAGCCCTGTGGAAAAAGATA
161    L G M N E R G I I F N N N V A L W K K I
721    CGCACCTATTTGCCAAAGCCCTGACAGGTCCCAGTCTGCAGCAGACCGTGGAGGTTTGC
181    R T Y F A K A L T G P S L Q Q T V E V C
781    GTGTCCTCACGCAGACCCACCTGGACAACCTGGACAGCTTGGCTCACGTGGACGTCCTC
201    V S S T Q T H L D N L D S L A H V D V L
841    AGTTTGCTGCGCTGCACTGTGGTTGACATCTCCAACAGGCTCTTCTGGATGTCCCCTC
221    S L L R C T V V D I S N R L F L D V P L
901    AACGAGAAAGAGCTGCTGCTGAAGATTCACAGGTATTTGAAACGTGGCAGACGGTCTG
241    N E K E L L L K I H R Y F E T W Q T V L
961    ATCAAACCTGACATCTACTTCAAGTTTGGCTGGATTACCAAAGACACAAGACAGCAGCC
261    I K P D I Y F K F G W I H Q R H K T A A
1021   CGGGAGCTTCAGGATGCCATAGAAAACCTCGTTGAACAGAAGAGGAGAAAATGGAGCAG

```

(图1 Fig.1)

281 R E L Q D A I E N L V E Q K R R E M E Q  
 1081 GCAGATAAGCTGGACATCAACTTCACGGCAGACCTCATATTTGCACAAAACCACGGAGAG  
 301 A D K L D I N F T A D L I F A Q N H G E  
 1141 CTGTGGCTGAGAACGTCAGGCAATGCGTGTGGAGATGGTGATCGTGCTCCGGATACT  
 321 L S A E N V R Q C V L E M V I A A P D T  
 1201 TTGTCCATCAGCCTCTTCTTCATGCTGCTGCTCCTCAAACAAACCCCCACGTGGAGCTG  
 341 L S I S L F F M L L L L K Q T P H V E L  
 1261 CAGCTGCTGCAGGAGATAGACACCGTCATAGGCGACAGACAGATGCAGAACGGGGACCTT  
 361 Q L L Q E I D T V I G D R Q M Q N G D L  
 1321 CAGAAGCTGCAGGTGCTGGAGAGTTTCATCAACGAGTGCCTGCGCTTCCACCCGGTGGTG  
 381 Q K L Q V L E S F I N E C L R F H P V V  
 1381 GACTTCACCATGCGGCGAGCCCTGTCGGATGACGTCATCGACGGTTACCGGGTGCCAAAAG  
 401 D F T M R R A L S D D V I D G Y R V P K  
 1441 GGCACAAATATCATCCTGAACACGGGCCGCATGCACCGGACGGAGTTCTCCACAAGGCG  
 421 G T N I I L N T G R M H R T E F F H K A  
 1501 GACGAATTTAGTCTGGAGAACTTCCAGAAAAATACTCCTCGCCGTTTCTTCCAGCCGTTT  
 441 D E F S L E N F Q K N T P R R F F Q P F  
 1561 GGCTCGGGCCCTCGCGCTGCGTCGGCAAGCACATCGCCATGGTGATGATGAAATCCATC  
 461 G S G P R A C V G K H I A M V M M K S I  
 1621 CTGGGACTCTGCTCTCGCAGTACTCCGTCTGCCCCACGAGGGCCTGACCCTGGACTGC  
 481 L A T L L S Q Y S V C P H E G L T L D C  
 1681 CTCCCCAGACCAACAACCTTTCCAGCAGCCCGTGGAGCATCAGGAGGAGCCGAGCAG  
 501 L P Q T N N L S Q Q P V E H Q E E A E Q  
 1741 CTCAGCATGAGGTTCTTACCCGACAGAGAGGAAGCTGGCAGACGCCTTAGacggaccaa  
 521 L S M R F L P R Q R G S W Q T P \*  
 1801 caatgttcacataatgttgtgtgatacgccctccatcactacatctgtttaatgtetta  
 1861 tgattgtacaaagcactgctgtttcatttgacgagtcatatgttttgtgtttatacttat  
 1921 tttgttatgaactatgtactatgtaagtgtctatatgctaactttgaagtaaatgtaaat  
 1961 tattatgctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

图1 由食蚊鱼CYPI9a的cDNA序列推导出的氨基酸序列

阴影部分表示Poly(A)尾；下划线表示起始密码子ATG；\*表示终止密码子；小写字母表示5'UTR和3'UTR

**Fig. 1 Deduced amino acid sequence from CYPI9a cDNA sequence of *G. affinis***

The Poly A signal is shaded in gray; the start codon ATG is underlined; the stop codon indicated by an asterisk; the lower case indicated 5'UTR and 3'UTR

分值为负的氨基酸数量略多于分值为正的氨基酸。预测结果中正值越大表示越疏水, 负值越大表示越亲水。整体来看, 亲水性氨基酸分布多于疏水性氨基酸, 可认为CYP19a基因编码的蛋白质为亲水性蛋白质。

**CYP19a基因编码蛋白质的一级结构** 食蚊鱼CYP19a基因编码蛋白质各种理化性质分析结果显示, 该蛋白分子量约为58.5 ku, 等电点pI为7.40。序列含有20种必需氨基酸, 其中亮氨酸含量最高, 为12.38%, 含量最低的为半胱氨酸, 为1.97%。

**CYP19a基因编码蛋白质的二级结构**

CYP19a基因编码蛋白质的二级结构预测结果显示, CYP19a基因编码的氨基酸序列由48.35%的 $\alpha$ 螺旋(alpha helix)、42.75%的无规则卷曲(random coil)、8.90%的延伸链(extended strand)构成。

**CYP19a基因编码蛋白质三级结构** 食蚊鱼CYP19a基因编码蛋白质三级结构主要是由 $\alpha$ 螺旋、无规则卷曲、延伸链构成, 与二级结构预测结果相一致(图2)。

### 2.3 CYP19a基因序列同源性分析

使用ClustalW1.6软件对食蚊鱼、底鳉、青鳉、平鲷(*Rhabdosargus sarba*), 鲤、斑马鱼和鲫的CYP19a基因进行氨基酸序列对比(图3)以及相似性分析(表2)。结果显示, 在以上7个物种的CYP19a基因中, 有199个氨基酸是较为保守的, 相似性为38.20%, 其中, 食蚊鱼和底鳉的CYP19a基因的同源性最高, 为93%; 其次与青鳉、平鲷的同源性最高, 为84%; 食蚊鱼与斑马



图2 食蚊鱼CYP19a基因编码蛋白质三级结构预测

Fig. 2 The third structure prediction of coding protein from *G. affinis* CYP19a gene

鱼的相似性最低, 为66%。

### 2.4 CYP19a基因系统进化分析

为了更好地分析食蚊鱼体内CYP19a基因的结构特征, 进一步了解与其他高等脊椎动物之间的进化关系, 从Genbank中摘录了不同纲的代表物种(共19种)CYP19基因的氨基酸序列(表3), 使用DNAMAN、MEGE6.0和ClustalW1.6软件进行同源分析和聚类分析, 采用Neighbor-Joining法, 重复1000次, gap处理为缺失, 构建系统进化树(图4), 所标数据为在距离模式下, 用Bootstrap计算的各个分支支持度。从图中可以看出, 食蚊鱼的CYP19a基因与底鳉的同源性最高, 这与传统分类结果一致, 它们都属于鳉形目。鉴于之前的氨基酸同源性分析数据, 说明CYP19a基因在进化过程中相对保守, 在不同物种生长和发育过程中发挥十分重要的作用。

## 3 讨论

### 3.1 食蚊鱼CYP19a基因的存在形式

芳香化酶几乎存在于所有脊椎动物的脑和垂体中, 迄今已在除猪<sup>[10]</sup>以外的哺乳动物<sup>[11]</sup>、啮齿动物、爬行类<sup>[12]</sup>、两栖类<sup>[13]</sup>、鸟类<sup>[14]</sup>、软骨鱼类<sup>[15]</sup>体内克隆得到性腺芳香化酶基因的cDNA序列。硬骨鱼类中, 如金鱼及蟾鱼科(Batrachoididae)鱼类, 其脑和垂体中的P450arom表达水平比其他脊椎动物高出100倍<sup>[16]</sup>。

进一步的研究表明, 哺乳动物的P450arom是由CYP19基因家族中的一个基因表达的, 即哺乳动物CYP19基因只有一个拷贝, 但是在大多数硬骨鱼类[如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、金鱼、斑马鱼等]体内分离到了2种CYP19基因, 即性腺芳香化酶基因(CYP19a)与脑芳香化酶基因(CYP19b), 它们分别优先地在卵巢和脑组织中表达。2种基因分别在2个不同的组织中表达, 说明CYP19基因在进化过程中由于复制或基因某些部分分化与集中, 导致形成两个或多个拷贝, 并在不同组织中表达。然而, 并不是所有鱼类都是如此, Cheshenko等<sup>[17]</sup>在鳉的脑和卵巢中发现了单一拷贝的CYP19基因来编码P450arom, 这种现象的存在有可能是由于生物在进化过程中另一拷贝丢失所造成的。通常情况下, CYP19被认为与鱼类的性别分化过程密切相关, 这是因







<i>C. carpio</i>	GRMHRSEFFHKLNEFSLDNFQKNVPSRFFQPFSGPRSCVKGHIAMVMMKSLVTLLSRF	478
<i>D. rerio</i>	GRMHRSEFFSKPNQFSLDNFHKVPSRFFQPFSGPRSCVKGHIAMVMMKSLVALLSRF	477
<i>C. auratus</i>	GRMHRSEFFPKNEFSLDNFQKNVPSRFFQPFSGPRSCVKGHMAMVMMKSLVTLLSRF	478
	*:***:*** * ::* *:**, **, * *:*****;***;*:*****; :***;:	
<i>G. affinis</i>	SVCPHEGLTLDCLPQTNNLSQQPVEHQEEAE-QLSMRFLPRQRGSWQTP---	518
<i>F. heteroclitus</i>	SVCPHEGLTLDCLPQTNNLSQQPVEHHEEAQ-QLSMRFLPRQRGSWQTP---	518
<i>O. laticeps</i>	SVCPHEGLTLDCLPQTNNLSQQPVEHHQEAHLSMTFLPRQRGIWESPSPF	522
<i>R. sarba</i>	SVCTHEGLTLDCLPQTNNLSQQPVEHQEAESHLSMRFLPRQRGSWQTL---	520
<i>C. carpio</i>	SVCPVKGCTVDSIPQTNLDSQQPVE---EPS-SLSVQLILRRTL-----	520
<i>D. rerio</i>	SVCPMKACTVENIPQTNLDSQQPVE---EPS-SLSV-----	511
<i>C. auratus</i>	SVCPVKGCTVDSIPQTNLDSQQPVE---EPS-SLSVQLILRNAL-----	520
	***, ., *: : :***:***** *. , **:	

图 3 食蚊鱼 *CYP19a* 基因的氨基酸序列与底鲮、青鲮和斑马鱼等相关序列的同源性比较

*G. affinis*. 食蚊鱼; *F. heteroclitus*. 底鲮; *O. laticeps*. 青鲮; *R. sarba*. 平鲷; *C. carpio*. 鲤; *D. rerio*. 斑马鱼; *C. auratus*. 鲫; 序列中氨基酸一致的用“\*”表示, 相似的用“.”表示

Fig. 3 Alignments of deduced amino acid sequences of *CYP19a* from *G. affinis*, *F. heteroclitus*, *O. laticeps* and *D. rerio*

Identical and similar amino acids are marked by asterisks and dots, respectively

表 2 7种硬骨鱼类 *CYP19a* 基因的氨基酸序列相似性比较

Tab. 2 Comparison of 7 kinds of teleost *CYP19a* gene amino acid similarity

基因 gene	食蚊鱼 <i>G. affinis</i>	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	青鲮 <i>O. laticeps</i>	底鲮 <i>F. heteroclitus</i>	鲫 <i>C. auratus</i>	鲤 <i>C. carpio</i>	平鲷 <i>R. sarba</i>	%
食蚊鱼 <i>G. affinis</i>	100							
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	66	100						
青鲮 <i>O. laticeps</i>	71	88	100					
底鲮 <i>F. heteroclitus</i>	71	88	92	100				
鲫 <i>C. auratus</i>	93	68	67	67	100			
鲤 <i>C. carpio</i>	84	73	71	69	85	100		
平鲷 <i>R. sarba</i>	84	65	70	65	84	82	100	

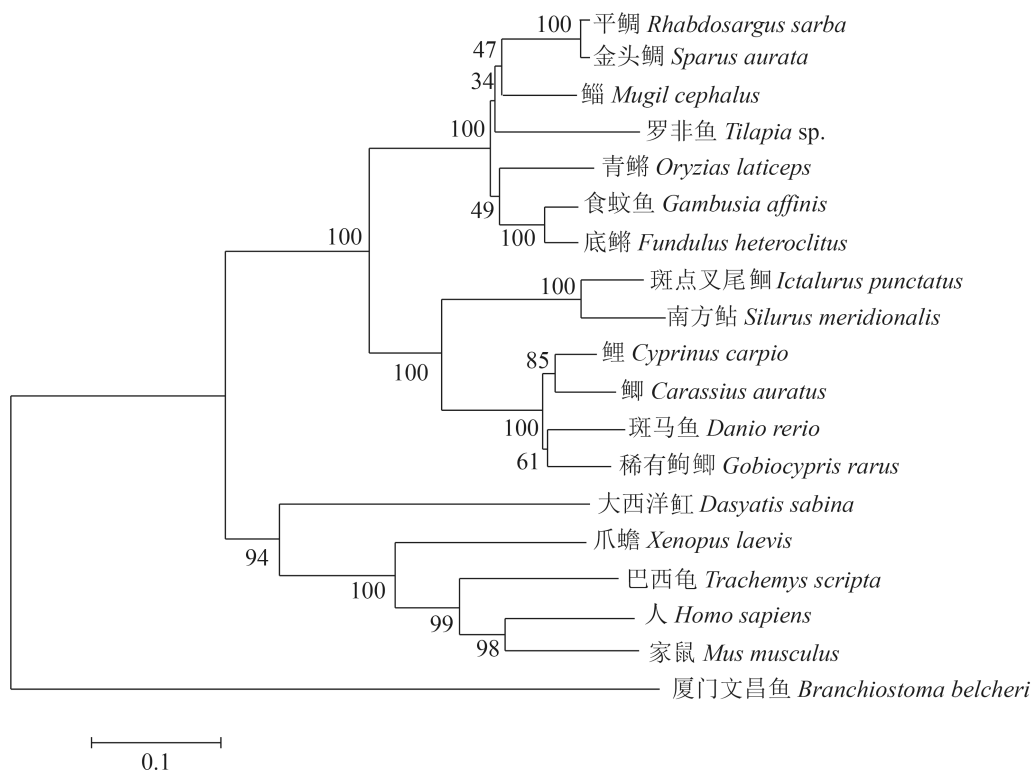
为芳香化酶在繁殖周期内具有表达活性, 并且芳香化酶的促进或抑制剂能够导致不正常的性别比率, 其中 *CYP19a* 基因主要参与雌激素物质合成和卵巢分化, 在性腺分化中起主要作用; *CYP19b* 是中枢雌二醇生物合成的决定物质, 主要参与中枢神经系统发育过程中脑的分化<sup>[18]</sup>和性行为的调节<sup>[19]</sup>。两种形式的芳香化酶都涉及性别分化和繁殖周期, 主要是参与硬骨鱼中枢神经

系统的发育以及性别分化, 有时还参与性别逆转。*CYP19* 表达活性的改变都会导致上述过程受到不同程度的干扰<sup>[20]</sup>。

本研究中, 从食蚊鱼的性腺中成功克隆出芳香化酶基因 *CYP19a*, 并对编码的氨基酸序列进行信号肽、跨膜螺旋、疏水性/亲水性以及蛋白质一级、二级、三级结构进行分析, 与其他脊椎动物 *CYP19a* 基因进行序列比对、氨基酸序

表 3 不同物种 *CYP19* 基因的氨基酸序列同源性分析

分类地位		中文名	学名	序列号	
classification status		Chinese name	science name	accession no.	
哺乳类 mammals	灵长目 Primatesa	人 <i>CYP19</i>	<i>Homo sapiens</i>	CAA68807	
	啮齿目 Rodentia	家鼠 <i>CYP19</i>	<i>Mus musculus</i>	D00659	
爬行类 reptiles	龟鳖目 Chelonia	巴西龟 <i>CYP19</i>	<i>Trachemys scripta</i>	AAG09376	
	两栖类 amphibians	蛙形目 Raniformes	爪蟾 <i>CYP19</i>	BAF48355	
软骨鱼类 cartilage fish	鳔形目 Myliobatiformes	大西洋魟 <i>CYP19</i>	<i>Dasyatis sabina</i>	AAF04617	
脊索类 chordate	头索动物亚门 Cephalochordata	厦门文昌鱼 <i>CYP19</i>	<i>Branchiostoma belcheri</i>	ABA47317	
	鲱形目 Cyprinodontiformes	青鳉 <i>CYP19a</i>	<i>Oryzias laticeps</i>	BAA11656	
		底鳉 <i>CYP19a</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	AAP47578	
		鲤 <i>CYP19a</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	ACB13197	
		鲫 <i>CYP19a</i>	<i>Carassius auratus</i>	AEX97168	
		斑马鱼 <i>CYP19a</i>	<i>Danio rerio</i>	AA163008	
		稀有鮎鲫 <i>CYP19a</i>	<i>Gobiocypris rarus</i>	ABC70869	
		平鲷 <i>CYP19a</i>	<i>Rhabdosargus sarba</i>	ABC70899	
		金头鲷 <i>CYP19a</i>	<i>Sparus aurata</i>	AAL27699	
		罗非鱼 <i>CYP19a</i>	<i>Tilapia sp.</i>	AA062625	
		鲃形目 Perciformes	斑点叉尾鲷 <i>CYP19a</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAB32613
		鲃形目 Siluriformes	南方鲃 <i>CYP19a</i>	<i>Silurus meridionalis</i>	AAP83133

图 4 根据 19 个物种的 *CYP19a* 氨基酸序列进行的进化树分析Fig. 4 Phylogenetic relationship of *CYP19a* with related proteins of other 19 species

<i>G. affinis</i>	TADLIFAQNHGELSAENVRQCVLEMVIAAPDTLSISLFFM <del>LLLKQTPHVELQLLQE</del> IDT	349
<i>F. heteroclitus</i>	TADLIFAQNHGELSAENVTQC <del>VLEMVIAAPDTLSISLFFM</del> LLLKQNP <del>HVELQLLQE</del> IDK	349
<i>O. laticeps</i>	TAELIFAQGHGELSAENVRQCVLEMVIAAPDTLSISLFFM <del>LLLKQNP</del> HVELQLLQEIDT	350
<i>R. sarba</i>	TAELIFAQNHGELSAENVRQCVLEMVIAAPDTLSISLFFM <del>LLLKQHPD</del> VELQLLQEIDT	350
<i>C. carpio</i>	TAELIFAQSHGELSTENVRQCVLEMVIAAPDTFSISLFFM <del>LLLKQNP</del> DVELKILQEINT	358
<i>D. rerio</i>	TAELIFAQSHGELSAENVRQCVLEMVIAAPDTLSISLFFM <del>LLLKQNP</del> DVELKILQEMDS	357
<i>C. auratus</i>	TAELIFAQSHGELSTENVRQCVLEMI <del>IAAPDTLSISLFFM</del> LLLKQNP <del>DVELKILQEM</del> NA	358
	***:*****, *****:*** *****:*****:*****:***** * .***:***: :	
	(a)	
<i>G. affinis</i>	VIGDRQM <del>QNGDLQKLQVLESF</del> INECLRFHPVVDFTMRRALSDDVIDGYRVPKGTNIILNT	409
<i>F. heteroclitus</i>	VIGDRELQNGDLQKLQVLESFINECLRFHPVVDFTMRRALSDDVIDGYRVPKGTNIILNT	409
<i>O. laticeps</i>	IVGDSQLQNGDLQKLQVLESFINECLRFHPVVDFTMRRALFDDI <del>IDGHRVQKGTNIILNT</del>	410
<i>R. sarba</i>	VIGERQLQNGDPQRLH <del>VLESF</del> INECLRFHPVVDFTMRRALSDDI <del>IDGYRVPKGTNIILNT</del>	410
<i>C. carpio</i>	VLAGRSLQSHLSRLHILESFINESLRFHPVVEFTMRRALDDDVIEGYKVKKGTNIILNV	418
<i>D. rerio</i>	VLAGRSLQSHLSK <del>LQILESF</del> INESLRFHPVVDFTMRRALDDDVIEGYNVKKG <del>TNIILNV</del>	417
<i>C. auratus</i>	VLAGRSLQSHLSG <del>FHILES</del> FINESLRFHPVVDFTMRRALDDDVIEGYKVKRGTNIILNV	418
	::. .:*. . . :::*****. *****:***** **:*:*. * :*****.	
	(b)	
<i>G. affinis</i>	<u>GRMHRTEFFHKADEF</u> SLENFQKNTPRRFQ <b>PF</b> GS <b>GP</b> RACV <b>GK</b> HIA <b>MVM</b> MKSILATLLS <b>QY</b>	469
<i>F. heteroclitus</i>	GRMHRTEFFHKADEFSL <b>EN</b> FQKNTPRRY <b>FQ</b> PF <b>GS</b> GP <b>RAC</b> V <b>GK</b> HIA <b>MVM</b> MKSILATLLS <b>QY</b>	469
<i>O. laticeps</i>	GRMHRTEFFHKA <b>NE</b> FSL <b>EN</b> FQKNTPRRY <b>FQ</b> PF <b>GS</b> GP <b>RAC</b> V <b>GR</b> HIA <b>MVM</b> MKSILV <b>TLL</b> S <b>QY</b>	470
<i>R. sarba</i>	G <b>HM</b> HRTEFF <b>KN</b> DE <b>FR</b> LE <b>NE</b> FK <b>NAP</b> RRY <b>FQ</b> PF <b>GS</b> GP <b>RAC</b> V <b>GK</b> HIA <b>MVM</b> MKSILV <b>TLL</b> S <b>QY</b>	470
<i>C. carpio</i>	GRMHRSEFFH <b>KL</b> NE <b>FL</b> DN <b>FQ</b> KN <b>VP</b> SR <b>FFQ</b> PF <b>GS</b> GP <b>RS</b> CV <b>GK</b> HIA <b>MVM</b> MKSILV <b>TLL</b> SR <b>F</b>	478
<i>D. rerio</i>	GRMHRSEFFSK <b>PN</b> Q <b>FL</b> DN <b>FH</b> KN <b>VP</b> SR <b>FFQ</b> PF <b>GS</b> GP <b>RS</b> CV <b>GK</b> HIA <b>MVM</b> MKSILV <b>ALL</b> SR <b>F</b>	477
<i>C. auratus</i>	GRMHRSEFF <b>PK</b> NE <b>FL</b> DN <b>FQ</b> KN <b>VP</b> SR <b>FFQ</b> PF <b>GS</b> GP <b>RS</b> CV <b>GK</b> H <b>MA</b> M <b>M</b> MKSILV <b>TLL</b> SR <b>F</b>	478
	*:***:*** * ::* *:* *. ** * *:*****:***:*****:*****. :***: :	
	(c)	

图 5 食蚊鱼性腺芳香化酶的高度保守区

序列中高度保守的片段用下划线指示；(a)I-螺旋区，(b)芳香化酶特异的保守区，(c)血红素结合区。对酶催化活性起重要作用的位点用粗体字表示

Fig. 5 High homology regions of P450 aromatase in ovary of *G. affinis*

Regions of high homology are underlined; (a)I-helix, (b)an aromatase-specific conserved region, (c) heme-binding region. Amino acids known to be essential for catalytic functions are marked by bolds

列同源性以及系统进化树分析，可确定所克隆的基因全长是性腺芳香化酶基因，而且CYP19b基因全长已由本实验室赖静萍<sup>[9]</sup>克隆获得，表明食蚊鱼的芳香化酶是由CYP19a和CYP19b两种基因编码。基于氨基酸的序列进化树分析显示，食蚊鱼与哺乳动物、爬行动物、两栖动物、软体动物以及文昌鱼的亲缘关系最远，而与其他硬骨鱼类有较高的同源性，尤其与同属鳞形目的底鳞、青鳞，相似性分别为93%、84%。另外将食蚊鱼的CYP19a基因和CYP19b基因编码的氨基酸序列进行对比，发现其相似性高达66%。张杨等<sup>[21]</sup>发现CYP19具有相同的祖先基因，而硬骨鱼

由于基因组的特异复制，产生了两个包含芳香化酶基因的旁系同源基因框，经过亚功能化和长期的选择压力，分别形成了硬骨鱼类中的卵巢芳香化酶基因和脑芳香化酶基因。这也解释了食蚊鱼CYP19的两个基因具有高度相似性的原因<sup>[9]</sup>。

### 3.2 芳香化酶保守区特点

在食蚊鱼的性腺芳香化酶中发现了芳香化酶的3个高度保守片段，如图5中下划线所示，依次表示I-螺旋区(类固醇物质结合有关)、芳香化酶特异保守区以及血红素结合区，此结果与徐跑等<sup>[22]</sup>对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)脑和卵

巢芳香化酶的研究结果相似, 只是编码的氨基酸序列有少许不同。Graham-Lorence等<sup>[23]</sup>使用点突变方法通过研究人P450arom酶催化活性发现7个酶催化活性位点, 分别为I130、E298、P304、D305、T306、R431和C433, 经过对比分析发现, 食蚊鱼CYP19a基因在这些位点所编码的氨基酸与人、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[24]</sup>、胡鲇(*Clarias fuscus*)<sup>[25]</sup>的一致(图5), 进一步证明了这些位点对该酶催化活性的重要性, 同时也间接证明了食蚊鱼性腺芳香化酶具有催化活性。

综上, 食蚊鱼卵巢芳香化酶具有3个高度保守的片段, 并具有催化活性。芳香化酶在不同鱼类体内的存在形式不同的原因: 一是可能由于不同物种在进化时基因复制出现偏差, 而且鱼类不同于其他脊椎动物, 生活环境多样导致不同组织的芳香化酶基因由同一个基因编码; 二是在鱼类体内均存在两种形式的CYP19基因, 二者在不同组织中均有表达, 只是表达程度不同或其中一种基因类型在该组织中占主导地位, 从而只检测到一种CYP19基因形式的表达<sup>[26]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Greytak S R, Champlin D, Callard G V. Isolation and characterization of two cytochrome P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): differential expression in fish from polluted and unpolluted environments[J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 71(4): 371-389.
- [2] Kazeto Y, Place A R, Trant J M. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles[J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 69(1): 25-34.
- [3] Orrego R, McMaster M, Van Der Kraak G, et al. Effects of pulp and paper mill effluent extractives on aromatase CYP19a gene expression and sex steroid levels in juvenile triploid rainbow trout[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 97(4): 353-360.
- [4] Halm S, Pounds N, Maddix S, et al. Exposure to exogenous 17 $\beta$ -oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 60(3-4): 285-299.
- [5] Contractor R G, Foran C M, Li S F, et al. Evidence of gender- and tissue-specific promoter methylation and the potential for ethinylestradiol-induced changes in japanese medaka (*Oryzias latipes*) estrogen receptor and aromatase genes[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 2004, 67(1): 1-22.
- [6] Kishida M, McLellan M, Miranda J A, et al. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2-3): 261-268.
- [7] 潘炯华, 苏炳之, 郑文彪. 食蚊鱼(*Gambusia affinis*)的生物学特性及其灭蚊利用的展望[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 1980, (1): 118-138.  
Pan J H, Su B Z, Zheng W B. Biological characteristics of *Gambusia affinis* and the prospects for its use for mosquito control[J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 1980, (1): 118-138(in Chinese).
- [8] 闫月明. 多氯联苯(PCB 1248)暴露对食蚊鱼CYP19a mRNA表达的影响及毒性效应研究[D]. 广州: 华南师范大学, 2013.  
Yan Y M. Effects of PCBs (PCB 1248) exposure on the expression of gonadal cytochrome P450 aromatase (CYP19a) gene and the toxic effect in mosquitofish (*Gambusia affinis*)[D]. Guangzhou: South China Normal University, 2013(in Chinese).
- [9] 赖静萍. 食蚊鱼CYP19b基因的克隆及环境激素对其表达的影响[D]. 广州: 华南师范大学, 2014.  
Lai J P. Cloning of CYP19b gene and effects of environmental hormones on CYP19b of mosquitofish (*Gambusia affinis*)[D]. Guangzhou: South China Normal University, 2014(in Chinese).
- [10] Choi I, Troyer D L, Cornwell D L, et al. Closely related genes encode developmental and tissue isoforms of porcine cytochrome P450 aromatase[J]. *DNA and Cell Biology*, 1997, 16(6): 769-777.
- [11] Simpson E R, Michael M D, Agarwal V R, et al. Cytochromes P45011: expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage[J]. *The FASEB Journal*, 1997, 11(1): 29-36.
- [12] Gabriel W N, Blumberg B, Sutton S, et al. Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 290(5): 439-448.
- [13] Miyashita K, Shimizu N, Osanai S, et al. Sequence

- analysis and expression of the P450 aromatase and estrogen receptor genes in the *Xenopus* ovary[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 75(2-3): 101-107.
- [14] McPhaul M J, Noble J F, Simpson E R, *et al.* The expression of a functional cDNA encoding the chicken cytochrome P-450arom (aromatase) that catalyzes the formation of estrogen from androgen[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(5): 16358-16363.
- [15] Kazeto Y, Trant J M. Molecular biology of channel catfish brain cytochrome P450 aromatase (CYP19A2): cloning, preovulatory induction of gene expression, hormonal gene regulation and analysis of promoter region[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 35(3): 571-583.
- [16] Callard G V, Tchoudakova A V, Kishida M, *et al.* Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 79(1-5): 305-314.
- [17] Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, *et al.* Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 155(1): 31-62.
- [18] Lephart E D. A review of brain aromatase cytochrome P450[J]. Brain Research Reviews, 1996, 22(1): 1-26.
- [19] Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsén H, *et al.* Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 $\beta$ -estradiol[J]. Aquatic Toxicology, 2001, 53(2): 139-152.
- [20] 王晶晶. 稀有鮡鲫CYP19a1基因的克隆及内分泌干扰物对其表达的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.  
Wang J J. Cloning of *CYP19a1* genes and effects of endocrine disrupting chemicals on *CYP19A1* of rare minnow[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2010(in Chinese).
- [21] 张杨,张利红,张为民. 硬骨鱼类芳香化酶基因起源、进化和表达调控[EB/OL]. 中国科技论文在线, 2010-12-29[http://WWW.paper.edu.cn/releaseoaoer/content/201012-1251].
- Zhang Y, Zhang L H, Zhang W M. CYP19 Genes in Teleosts: Origin, Evolution, and Expression Regulation[EB/OL]. Chinese science and Technology Papers Online, 2010-12-29[http://WWW.paper.edu.cn/releaseoaoer/content/201012-1251](in Chinese).
- [22] 徐跑, 俞菊华, 李建林, 等. 黄颡鱼脑P-450芳香化酶基因的克隆和组织表达[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 591-598.  
Xu P, Yu J H, Li J L, *et al.* Molecular cloning of neural P450arom and its expression in *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(5): 591-598(in Chinese).
- [23] Graham-Lorence S, Peterson J A, Amarnah B, *et al.* A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450[J]. Protein Science, 1995, 4(6): 1065-1080.
- [24] 邓思平, 陈松林, 刘本伟, 等. 半滑舌鳎脑芳香化酶基因cDNA克隆及表达分析[J]. 动物学研究, 2008, 29(1): 17-24.  
Deng S P, Chen S L, Liu B W, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of brain P450arom in Half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis* Gunther[J]. Zoological Research, 2008, 29(1): 17-24(in Chinese).
- [25] 孙晶, 李广丽, 朱春华, 等. 胡子鲇脑型芳香化酶基因全长cDNA克隆及表达[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 408-415.  
Sun J, Li G L, Zhu C H, *et al.* Molecular cloning and expression of *CYP19a1b* cDNA in *Clarias fuscus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(3): 408-415(in Chinese).
- [26] 崔俊莉. 两种泥鳅中CYP19基因的克隆及表达分析[D]. 新乡: 河南师范大学, 2011.  
Cui J L. Molecular cloning of *CYP19* gene and their expression of adult and embryo in two species of loaches[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2011(in Chinese).

## Molecular cloning and analysis of *CYP19a* gene in mosquitofish (*Gambusia affinis*)

GAN Wei, FANG Zhanqiang\*

(Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** Biological sex differentiation and hormonal regulation are related with the expression of *CYP19* gene in teleost, and so it can be used to explore the relationship between environmental hormone pollution and gene expression. The *Gambusia affinis CYP19a* cDNA of full sequence was cloned and analyzed for the first time. This would provide comprehensive experimental data for the study of the *CYP19* gene as a biomarker for monitoring environmental hormones. Primers were designed according to the conserved region of *CYP19a* cDNA, and the conserved region was amplified and sequenced. RACE method was used to amplify the *G. affinis CYP19a* cDNA of full sequence and its protein sequence homology analysis, and the RT-PCR method was used to detect the transcription level of *CYP19a* mRNA in the sequence. The full length cDNA sequence of *G. affinis CYP19a* type was cloned. This sequence contains 2020 bp nucleotides and codes 518 amino acids with an open reading frame (ORF) from 238 bp to 1791 bp. We made an analysis of the signal peptide, transmembrane helices, hydrophilic/hydrophobic, primary structure, secondary structure and tertiary structure. When making the homology comparison with *CYP19a* gene in gonads of other teleost, the gene fragment similarity of mosquitofish were 93%, 84%, 84%, 71%, 71% and 66% with *Fundulus heteroclitus*, *Oryzias laticeps*, *Rhabdosargus sarba*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Danio rerio* respectively. This showed that the cloned gene was *G. affinis CYP19a* gene. Phylogenetic analysis of the *CYP19* gene by using MEGA4.0 indicates that *CYP19a* gene is highly conserved when clustered with other 19 species ovary-derived P450arom gene. We identified the *CYP19a* cDNA of full sequence is gonadal aromatase gene, and the proof of *G. affinis* aromatase is by two genes of *CYP19a* and *CYP19b* encoding. *G. affinis CYP19a* has 3 highly conserved fragments, and has catalytic activity.

**Key words:** *Gambusia affinis*; *CYP19a*; rapid amplification of cDNA ends; sequence analysis

**Corresponding author:** FANG Zhanqiang. E-mail: fangzhq@scnu.edu.cn

**Funding projects:** Guangdong Technology Research Center for Ecological Management and Remediation of Urban Water System (2012gczxA004)