

文章编号:1000 - 0615(2005)05 - 0591 - 08

## 黄颡鱼脑 P-450 芳香化酶基因的克隆和组织表达

徐 跑<sup>1,2</sup>, 俞菊华<sup>2</sup>, 李建林<sup>2</sup>, 夏德全<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** P-450 芳香化酶(P450arom)是催化雄激素生物合成雌激素的关键酶。本文采用 RT-PCR 和 RACE 法,首次分离和克隆了黄颡鱼脑 P450 芳香化酶基因 HP450aromB, 并使用荧光实时定量 RT-PCR 对其组织表达进行了研究。结果表明 HP450aromB cDNA 全长 2080 bp(不包括 poly(A)), 5'端非翻译区有 25 bp, 3'端 555 bp(不包含 poly(A)), 阅读框(open reading frame, ORF)1500 bp, 编码 500 个氨基酸, 推测的蛋白质分子量为 56 kDa。同源性分析显示, HP450aromB 的氨基酸序列与其它鱼脑 P450arom 具有 70% 以上的同源性, 与其它鱼卵巢 P450arom 为 60% 左右同源, 与人胚盘和鸡卵巢 P450arom 则为 50% 左右同源; 但芳香化酶高保守区包括 I-螺旋区, 芳香化酶特异保守区 II 及血红素结合区 III 和其它鱼芳香化酶相比同源性分别为 83%~96%, 78%~86% 和 85%~100%。系统发育分析表明 HP450aromB 与鱼类脑 P450arom 属于同一分支的, 并且也显示了黄颡鱼和鲶鱼分类地位最近, 这和传统的分类一致。实时定量 RT-PCR 研究显示, HP450arom B 在前脑, 下丘脑, 垂体、卵巢、精巢均有表达, 在肝脏没表达, 表达量脑部高于性腺, 但雌雄鱼脑部 HP450arom B 的表达总量没显著差异。

**关键词:** 黄颡鱼; P450 芳香化酶; cDNA 末端快速扩增法; 系统发育; 组织表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A

## Molecular cloning of neural P450arom and its expression in *Pelteobagrus fulvidraco*

XU Pao<sup>1,2</sup>, YU Ju-hua<sup>2</sup>, LI Jian-lin<sup>2</sup>, XIA De-quan<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** The enzyme aromatase P-450(P450arom) catalyzes the conversion of androgen to oestrogen. A cDNA encoding P450arom was derived from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) brain, using RT-PCR and RACE. The cDNA was 2080 bp with 25 bp 5' UTR, 555 bp 3' UTR(excluding poly(A)) and 1500 bp ORF, which encodes 500 amino acids and has a predicted mol wt of 56 kDa. The yellow catfish brain-derived P450arom shares above 70% sequence identity with brain-derived aromatases of other fish species, but only about 60% with ovarian aromatases of other fishes, about 50% with human placenta and chicken ovarian aromatases. But the percentage of identity/similarity was higher in the regions of high homology, including the I-helix, an aromatase-specific conserved region II, and the heme-binding region III, their homology being 83% - 96%, 78% - 86% and 85% - 100% respectively. Phylogenetic analysis of the P450arom gene family indicated the yellow catfish brain-derived P450arom was clustered with other fishes brain-derived P450arom, and is the closest with channel catfish. This result is consistent with the result of traditional classification. The fluorescent real time quantity RT-PCR analysis revealed HP450arom B is expressed in fore-brain, hypothalamia, pituitary, ovary and testis, but is high in brain and low in gonad. There is no expression in liver. There is no significant difference between male fish and female fish brain.

**Key words:** *Pelteobagrus fulvidraco*; P450 aromatase; rapid amplification of cDNA ends (RACE); phylogenesis; expression in tissues

收稿日期: 2005-02-17

资助项目: 国家重点基础研究“973”规划项目(2004CB117401); 无锡市自然科学基金(CK03001)

作者简介: 徐 跑(1963-), 男, 江苏, 研究员, 博士研究生, 主要从事鱼类育种及生物技术研究。E-mail: Xup@ffrc.cn

通讯作者: 夏德全, E-mail: xiadq@ffrc.cn

雌激素对鸟类、爬行类以及更为低等的脊椎动物如鱼类等性别形成和性腺发育起着至关重要的作用,可以影响哺乳动物中枢神经系统的功能和发育,调节神经内分泌和繁殖功能以及性行为<sup>[1]</sup>。而脊椎动物体内雌激素(主要为雌二醇)是由芳香化酶复合体系催化 C19 雄激素生物合成 C18 雌激素,该复合体系包括依赖 NADPH 的 P450 还原酶和 P450 芳香化酶(P450arom, CYP19 基因产物),其中 P450arom 是催化这一反应的速度限制酶<sup>[2]</sup>。很多实验已证实芳香化酶可控制多种鱼类的性别分化和性别转化<sup>[3]</sup>,并且与人等大多数哺乳动物不同,越来越多的证据表明,在硬骨鱼类,芳香化酶 P450arom 至少由 2 种 CYP19 基因编码,即脑芳香化酶 P450aromB 和性腺芳香化酶 P450aromA,它们以明显不同的形式分别存在于脑和性腺中<sup>[4]</sup>,并且鱼类脑中的芳香化酶表达量较高,是哺乳动物兔、鼠、人相应部位的 100~1000 倍<sup>[5]</sup>。本研究分离了黄颡鱼脑 P450arom 基因,HP450aromB,对其序列进行了比较和分析,并应用实时定量 RT-PCR 研究了该基因在雌雄鱼脑、性腺、肝脏等的表达,为今后进一步研究该基因在黄颡鱼性别形成阶段、以及投喂性激素、芳香化酶抑制剂后该基因的表达提供基础依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**实验动物** 基因分离用雌性黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) 2 尾,体长 9.5 cm 左右,体重 90 g 左右,组织为前脑;实时定量 RT-PCR 用黄颡鱼雌雄各 3 尾,体长 5.7~7.5 cm,体重 66~76 g,性腺发育为 II 期,购自无锡中桥市场。

**试剂** 抽提 RNA 用 Trizol Reagent (Promega)、反转录酶 M-MLV、*RnaseH*、*TdT* 酶、胶回收试剂盒、*Taq* 酶,均购自 Takara;pUCm-T 载体购自上海生工生物工程技术有限公司;SYBR 荧光定量 RT-PCR 测定试剂盒购自 Takara。

**仪器** eppendorf Mastercycler personal PCR 仪,荧光定量 PCR 仪 Roche Lightcycler1.2。

**引物** 用于实验的所有引物如下,其碱基位置对应我们登录 GenBank 序列(GenBank accession number AY649789)。P1, P2, P3 是根据已知鱼类 P450arom 的保守序列,使用 CodeHop 原理<sup>[6]</sup>设计的;P4, P5 是根据 P1, P2 扩增的片段序

列,使用软件 Primer5.0 设计的用于脑芳香化酶基因 3 RACE 的特异引物;P6, P7, P8 是根据 P2, P3 引物扩增的片段序列,设计的用于脑芳香化酶基因 5 RACE 的引物。P9, P10 是 HP450aromB 实时定量 RT-PCR 引物;P11, P12 是根据鱼类  $\beta$ -actin 保守序列设计的实时定量 RT-PCR 分析所用的引物,其碱基位置对应黄颡  $\beta$ -actin (GenBank accession number AY647143),实时定量 PCR 引物使用 Roche Lightcycler 引物设计软件设计。所有引物均由 Takara 合成,其中

$$R = A + G, N = A + C + T + G$$

P1 碱基 905-930	5-CAGTGTGTGTGGAGATGGTGATCG -3 ;
P2 碱基 1361-1334	5-CTTCATCATCACCATGGCTATGTGCTT -3 ;
P3 碱基 272-298	5-CGGGTGTGGATCAACGNGARGARAC -3 ;
P4 碱基 1178-1200	5-CCAAAGGGACAAACATCATTCT -3 ;
P5 碱基 1279-1299	5-GTGCCGAGTCGCTTCTTCCA -3 ;
P6 碱基 821-801	5-TGGCATTGATGACTTTACGC -3 ;
P7 碱基 568-548	5-ATGACCTGAGGAGTC CGT GA -3 ;
P8 碱基 321-297	5-GCAGATGCCTTGCTTGAATGAGT -3 ;
P9 碱基 1092-1110	5-TAAAGGAGTCTCTGCGGT -3 ;
P10 碱基 1399-1383	5-GCTATGTGCTTCCCCA -3 ;
P11 碱基 678-692	5-ACTTCGAGCAGGAGAT -3 ;
P12 碱基 906-890	5-ACAGTGTGGCATAACAG -3

### 1.2 方法

**总 RNA 抽提** 取黄颡鱼前脑,用 Trizol Reagent 抽提总 RNA。用变性琼脂糖凝胶电泳溴化乙啶染色显示 28 s 和 18 s 检测 RNA 的完整性。

#### 黄颡鱼脑 P450arom 基因的分离

(1) RT-PCR 克隆保守片段:取 5  $\mu$ g 从脑抽提的总 RNA 以 dT-Ap [dT-AP, 5-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC (T)16-3] 为引物,根据 M-MLV 使用说明进行 RT 反应,然后用 10% RT 液,使用引物 P1 和 P2 扩增 P450arom B 450 bp 左右的保守序列,PCR 反应体系总体积 50  $\mu$ L,其中含 5  $\mu$ L 10  $\times$ 反应缓冲液,2  $\mu$ mol  $L^{-1}$ 氯化镁,200  $\mu$ mol  $L^{-1}$  dNTP,引物各 0.4  $\mu$ mol  $L^{-1}$ ,2.5 U *Taq* 酶。反应条件 94 2 min,然后 30 循环 94 30 s,58 30 s,72 1 min,最后 72 10 min,4 保存;PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶,使用胶回收试剂盒回收,用 T-载体克隆,送测序。同理,使用 P3 和 P2 扩增得到 1100 bp 左右的片段,退火温度使用 56,72 延伸用 1 min 30 s。根据这些序列设计特异的 3 RACE 和 5 RACE 引物,分离、扩增 P450arom 的 3 和 5 端序列。

(2) 3 RACE 克隆 3 端片段:用 5  $\mu$ g 总 RNA 以 dT-Ap [dT-AP, 5-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC

(T)16-3]为引物,根据 M-MLV 使用说明进行反转录反应,然后用 RT 液的 10%,以 AP[AP,5-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3]和 3 RACE 特异引物 P4 进行 PCR,PCR 总体积 50  $\mu$ L,反应体系同上,反应条件 94 2 min,28 循环,条件为 94 30 s,58 30 s,72 1 min,最后 72 10 min,4 保存;为增加扩增效率及扩增的特异性,把上述 PCR 液稀释 10 倍,取 2  $\mu$ L 作模板,用引物 AP 和 3 RACE 第 2 个特异引物 P5 进行再扩增,退火温度为 55,扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆后测序。

(3)5 RACE 克隆 5' 端片段:原理同文献[7,8],用 5  $\mu$ g 总 RNA,以 P6,根据 M-MLV 使用说明进行 RT 反应,然后加 RnaseH,分解 mRNA,用 DNA 回收试剂盒(Takara)回收 cDNA,去除多余的 dNTP,引物等;再用 TdT 酶在 cDNA3' 端加 poly(A),用试剂盒回收加 poly(A)尾的 cDNA,以此为模板,用 P7 及 dT-AP(同 3 RACE)为引物,进行 PCR,反应体系组成同 3 RACE,PCR 液稀释 10 倍,取 2  $\mu$ L 为模板,用 P8 及 AP,进行 PCR,反应体系组成同上,PCR 液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆后测序。

(4)测序和序列分析:PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体后,送上海开瑞生物芯片科技股份有限公司测序。序列分析用软件 DNATools 5.1,P450arom 的氨基酸同源性比较使用 ClustalW 1.6<sup>[9]</sup>分析,对比结果用 PAUP (phylogenetic analysis using parsimony version 4.0, b2)<sup>[10]</sup>计算系统发育关系,用 Neighbor-joining 法,重复 1000 次,gap 处理为缺失。

#### HP450arom B 在雌雄黄颡鱼组织的表达

取雌、雄黄颡鱼各 3 尾,分别抽提前脑、下丘脑、垂体、肝脏、卵巢或精巢总 RNA,以  $\beta$ -actin 为内标,采用实时定量 RT-PCR 测定 HP450aromB 的表达。取 1  $\mu$ g 用 M-MLV(H) (试剂盒)进行 RT 反应,体系同前,RT 液稀释 10 倍,取 2  $\mu$ L,分别用引物 9、10 和 11、12 用 Ex Taq HS (试剂盒), $Mg^{2+}$  5.0  $\mu$ mol  $L^{-1}$ ,引物浓度 0.2  $\mu$ mol  $L^{-1}$ ,20  $\mu$ L 反应体系,以预变性:95 10 s,1 循环;PCR 反应:95 5 s,60 20 s,50 循环,融解曲线分析:95 0 s 20  $s^{-1}$ ,65 15 s 20  $s^{-1}$ ,95 0 s 0.1  $s^{-1}$  使用 Roche LightCycler 1.2 进行实时定量 PCR,根据融解曲线判别扩增是否特异,并在反应结束电

泳检测,根据实时定量 PCR 测得  $C_t$  值,计算 HP450aromB 和  $\beta$ -actin 在各组织的表达量,用  $\beta$ -actin 表达量校正 HP450aromB 的相对表达量,最后以雄鱼端脑的比值为 1,确定该基因在各组织的表达高低。把三尾雌雄鱼端脑、下丘脑、垂体的 HP450arom mRNA/ $\beta$ -actin mRNA 分别相加,使用  $t$ -检验 ( $P < 0.05$ ),确定雌雄鱼间 HP450aromB 的表达差异是否显著。

## 2 结果

### 2.1 黄颡鱼脑 P450arom 的分离

取黄颡鱼脑组织的 RNA,进行 RT-PCR,用引物 1 和 2 均扩增到 450bp 左右的 DNA(图 1-I)。

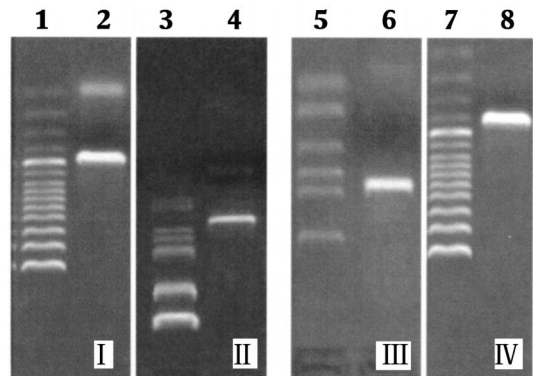


图 1 PCR 扩增

Fig. 1 The result of PCR amplification

1,7. GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus ; 3. DNA/EcoR I + Hind III marker ; 5. DL2000; 2. 引物 1,2 扩增条带; 4. 引物 3,2 扩增条带; 6. 3 RACE 引物 5,AP 扩增条带; 8. 5 RACE 引物 8,AP 扩增条带

I,IV. GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus , II. DNA/EcoR I + Hind III marker, III. DL2000, 2. product of amplification with primer 1 and 2, 4. product of amplification with primer 3 and 2, 6. product of amplification with 3 RACE primer 5 and AP, 8. product of amplification with 5 RACE primer 8 and AP

经克隆后测序,得到 453 bp 片段,根据所得序列设计合成用于脑 3 RACE 引物 P4,P5。使用脑 RNA RT 液用引物 P2,P3 扩增得到 1100 bp 左右 DNA 条带(图 1-II),克隆测序为 1073 bp。根据这一片段设计 5 RACE 引物 P6,P7,P8。使用脑 RNA RT 液用引物 P4,AP 扩增,条件同上,然后,使用该 PCR 液稀释液作模板用引物 P5,AP 扩增,得到 850 bp 的条带(图 1-III),克隆后测序获黄颡

鱼脑 P450arom 3 端序列。按照 5 RACE 实验程序,最后使用引物 P8,AP 扩增获得 400 bp 左右 DNA 条带(图 1-IV),克隆测序后获得 HP450arom B 5 端 321 bp。把上述序列拼接得到黄颡鱼脑 P450arom 全序列 (GenBank accession number:

AY649789),该 cDNA 总长 2080 bp,其中阅读框 1500 bp,翻译 500 个氨基酸,测算的蛋白质分子量为 56 kDa,3 非翻译区 555bp (不包括 poly(A)),5 非翻译区 25 bp(图 2)。

1	GAGT	GAA	TCT	TCA	CAA	AGT	GTC	AGG	ATG	GGG	TTA	CAG	ACC	ATG	TCT	GAA	GTC	ATG	GCT	GCA	61
1									M	G	L	Q	T	M	S	E	V	M	A	A	12
62	GTG	GAG	GGT	AAC	ATA	TTA	AAA	GTG	ATA	TCA	GCA	TTA	CTG	TTG	CTT	GTA	CTG	CTG	ATT	TCA	121
13	V	E	G	N	I	L	K	V	I	S	A	L	L	L	L	V	L	L	I	S	32
122	CTT	ACA	GCA	TAC	AAC	AGA	GGA	AAC	AAA	TCT	ACC	TTA	CCA	GGT	CCC	TAC	TGG	TTA	CTG	GGT	181
33	L	T	A	Y	N	R	G	N	K	S	T	L	P	G	P	Y	W	L	L	G	52
182	CTT	GGC	CCC	ATT	CTG	AGC	TAT	TCT	AGG	TTT	TTG	TGG	ATG	GGT	ATC	GGA	ACC	GCC	AGC	AAT	241
53	L	G	P	I	L	S	Y	S	R	F	L	W	M	G	I	G	T	A	S	N	72
242	TAC	TAC	AAC	AAT	AAA	TAT	GGG	TGT	ATG	ACT	CGG	GTT	TGG	ATC	CAG	GGA	GAG	GAG	ACA	CTC	301
73	Y	Y	N	N	K	Y	G	C	M	T	R	V	W	I	Q	G	E	E	T	L	92
302	ATT	CTA	AGC	AAG	GCA	TCT	GCT	GTG	TAC	CAT	GTT	CTG	AAG	AGT	AGT	AAA	TAC	ATT	GCC	AGA	361
93	I	L	S	K	A	S	A	V	Y	H	V	L	K	S	S	K	Y	I	A	R	112
362	TTT	GCT	AGT	AGT	CAT	GGA	CTG	AGG	TGC	ATC	GGT	ATG	GAT	GAA	CAA	GGC	CTT	ATC	TTT	AAC	421
113	F	A	S	S	H	G	L	R	C	I	G	M	D	E	Q	G	L	I	F	N	132
422	AGC	AAC	ATC	CCG	CTT	TGG	AAA	AAA	CTA	CGC	ACT	TAT	TTT	GCC	AAA	GCC	CTG	TCA	GGC	CCT	481
133	S	N	I	P	L	W	K	K	L	R	T	Y	F	A	K	A	L	S	G	P	152
482	GGT	CTG	CAG	AAG	GCA	GTG	GGT	GTG	TGT	TTT	AGT	GCC	ACC	AAC	AAG	CAC	TTG	GAT	GTC	CTG	541
153	G	L	Q	K	A	V	G	V	C	V	S	A	T	N	K	H	L	D	V	L	172
542	TGT	GAT	TTC	ACG	GAC	TCC	TCA	GGT	CAT	GTG	GAT	GTT	CTG	AAC	TTC	CTG	CGC	TGT	GTA	GTG	601
173	C	D	F	T	D	S	S	G	H	V	D	V	L	N	F	L	R	C	V	V	192
602	GTC	GAC	ATC	TCC	AAC	AGA	CTC	TTC	CTC	CAA	GTT	CCT	ATC	AAC	GAG	AAA	GAT	TTG	CTA	CTG	661
193	V	D	I	S	N	R	L	F	L	Q	V	P	I	N	E	K	D	L	L	L	212
662	AAG	ATC	CAT	AAA	TAC	TTT	GAC	ACT	TGG	CAA	AAA	GTG	CTC	ATC	CAG	CCA	GAC	ATT	TTT	TTC	721
213	K	I	H	K	Y	F	D	T	W	Q	K	V	L	I	Q	P	D	I	F	F	232
722	CGC	ATA	GAC	TGG	GTG	TAT	AAA	AAA	CAT	CAA	CAA	GCA	GCA	AAG	GAG	CTG	CAG	GAG	GAG	ATG	781
233	R	I	D	W	V	Y	K	K	H	Q	Q	A	A	K	E	L	Q	E	E	M	252
782	GGG	AGA	CTT	GTG	GAG	CAG	AAG	CGT	AAA	GTC	ATC	AAT	GCC	AGT	GAA	AAA	CTG	GAT	GAG	ACT	841
253	G	R	L	V	E	Q	K	R	K	V	I	N	A	S	E	K	L	D	E	T	272
842	GAC	TTT	GCA	ACC	GAG	CTG	ATA	TTT	GCT	CAG	AAT	CAT	GGA	GAG	ATG	TCA	GAA	GAT	GAC	GTG	901
273	D	F	A	T	E	L	I	F	A	Q	N	H	G	E	M	S	E	D	D	V	292
902	AGG	CAG	TGT	GTG	TTG	GAG	ATG	GTA	ATA	CGC	GCA	CCG	GAC	ACT	CTG	TCC	GTG	AGT	CTG	TTC	961
293	R	Q	C	V	L	E	M	V	I	A	A	P	D	T	L	S	V	S	L	F	312
962	TTC	ATG	CTG	GTG	CTG	TTG	AAG	CAG	GAG	CCA	GCA	GTG	GAG	CAG	CAT	ATA	CTG	CAG	GAG	ATG	1021
313	F	M	L	V	L	L	K	Q	E	P	A	V	E	Q	H	I	L	Q	E	M	332
1022	CAC	GAA	GTC	CTA	GGT	ATA	CGG	GAG	ATG	GAG	CCG	GAC	CTA	CAG	AAG	TTG	TCA	GTG	ATG	1081	
333	H	E	V	L	G	I	R	E	M	E	P	A	D	L	Q	K	L	S	V	M	352
1082	GAG	AGT	TTT	ATA	AAG	GAG	TCT	CTG	CGG	TTC	CAT	CCT	GTG	GTG	GAC	TTC	ATC	ATG	AGG	AGA	1141
353	E	S	F	I	K	E	S	L	R	F	H	P	V	V	D	F	I	M	R	R	372
1142	GCG	CTA	GAA	GAC	GAC	ATT	GAA	GGC	TAC	AGA	GTG	GCC	AAA	GGG	ACA	AAC	ATC	ATT	CTG	1201	
373	A	L	E	D	H	I	E	G	Y	R	V	A	K	G	T	N	I	I	L	392	
1202	AAC	ATA	GGG	CAG	ATG	CAC	AAG	AGC	ACT	GAG	TTC	TTT	CAG	AAA	GCC	ACT	GAA	TTC	ACT	TTG	1261
393	N	I	G	Q	M	H	K	S	T	E	F	F	Q	K	A	T	E	F	T	L	412
1262	GAA	AAC	TTT	GAT	AAC	AAT	GTG	CCG	AGT	CGC	TTC	TTC	CAG	CCG	TTC	GGC	TGT	GGG	CCA	CGT	1321
413	E	N	F	D	N	N	V	P	S	R	F	F	Q	P	F	G	C	G	P	R	432
1322	GCC	TGT	GTG	GGG	AAG	CAC	ATA	GCT	ATG	GTG	ATG	ATG	AAA	GCC	ATA	CTG	GTG	ACG	GTT	CTA	1381
433	A	C	V	G	K	H	I	A	M	V	M	M	K	A	I	L	V	T	V	L	452
1382	TCA	CAT	TAT	ACA	GTG	TGT	CCT	CAG	CCC	GGC	TGC	ACC	GTC	AGC	ACC	ATC	AGA	CAA	ACC	AAC	1441
453	S	H	Y	T	V	C	P	Q	P	G	C	T	V	S	T	I	R	Q	T	N	472
1442	ATC	CTT	TCA	CAG	CAG	CCC	ATA	GAG	GAG	GAA	ACA	CAA	AGC	CTG	CTC	ATG	AGG	TTC	ATA	CCA	1501
473	I	L	S	Q	Q	P	I	E	E	E	T	Q	S	L	L	M	R	F	I	P	492
1502	CGT	AAC	CTG	AAC	CCA	GAC	AAA	CAA	TAA	GCA	GCC	TCC	GGA	CTG	CAT	GAC	ATC	TTT	CAA	ATG	1561
493	R	N	L	N	P	D	K	Q	*												500
1562	CAG	CAG	GGG	CTG	AAA	TAA	TTA	TGA	TTA	CAC	AGC	AGC	CTT	AAT	TCA	GTC	TGA	CTA	AAT	GTG	1621
1622	TCT	CAA	CAA	TTT	GTA	GAT	CAA	CAG	AAA	TGG	AAA	ATT	AGA	AAA	CTA	AAC	AAT	TAA	TGT	GAC	1681
1682	ATG	ATT	ATC	ACT	CAG	TAG	CTT	GAA	ACA	AGA	ACA	TAA	TTA	ATT	GAA	CTA	AAT	CAA	ATA	TTT	1741
1742	AAT	TTC	TGT	TGG	AAA	CAC	ATT	TGC	GTT	AAA	CAC	TTT	CCA	ATT	TTC	TCG	TAG	TTT	TCA	AAC	1801
1802	ATT	TTA	GAA	CAT	AAA	AAT	TCA	GGT	TTC	TTA	ATT	TGT	AAA	GTG	AAG	TTA	CAA	ATT	ACT	GCA	1861
1862	TGC	TTG	CTC	CTA	GTG	TTT	CTT	TTT	AAT	GCA	ACA	CAA	ATA	TAA	ACT	CTT	TCA	GAT	TAT	TAC	1921
1922	TAA	ATA	AGT	AGA	TCT	GGA	ACT	TAT	TAG	AGA	AGT	TAT	TCA	CAA	CAT	AAA	CAT	GTT	TTT	TTG	1981
1982	CGT	ACC	ACA	TTT	CAC	CTG	TAC	TCA	TGT	GTG	TTT	TCA	CTA	ATA	ATC	CTC	CAC	TCT	TCA	ACA	2041
2042	GTT	ATT	TTA	AAA	AAT	AAT	AAA	AAC	ATA	ACA	CAT	TTG	CAT								2080

图 2 黄颡鱼脑 P450arom 全长 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of yellow *Pelteobagrus fulvidraco* brain-derived P450arom cDNA. The 1500 bp ORF encodes a protein of 500 amino acids in length

2.2 序列分析

同源性比较 使用 ClustalW 1.6 分析黄颡鱼脑 P450arom 氨基酸序列与鳊鱼 (*Ictalurus punctatus*) 脑<sup>[11]</sup>, 金鱼 (*Carassius auratus*) 脑<sup>[12]</sup>, 斑马鱼 (*Danio rerio*) 脑<sup>[5]</sup>, 鳊鱼卵<sup>[11]</sup>, 黄鳝 (*Monopterus albus*) 卵, 金鱼卵<sup>[12]</sup>, 斑马鱼卵<sup>[5]</sup>, 鸡卵巢<sup>[13]</sup>, 人胎盘<sup>[14]</sup> 等 P450arom 氨基酸序列的同源性, 结果表明, 黄颡鱼脑 P450arom 的氨基酸序列与鳊鱼脑同源性最高, 为 85 %, 金鱼脑 71 %, 斑马鱼脑 70 %, 鳊鱼卵 60 %, 黄鳝卵 60 %, 金鱼卵 59 %, 斑马鱼卵 59 %, 鸡卵巢 49 %, 人胎盘 51 %。

但芳香化酶高保守区包括 I-螺旋区, 芳香化酶特异保守区 II 和血红素结合区 III 和其它鱼芳香化酶相比同源性分别高达 83 % ~ 96 %, 78 % ~ 86 % 和 85 % ~ 100 % (图 3)。使用点突变方法研究人 P450arom 酶催化活性发现位点 I130, E298, P304, D305, T306, R431, C433 对酶活性起着重要作用<sup>[15]</sup>, 对比分析发现黄颡鱼脑 P450arom 基因在这些位点的氨基酸与人的一致 (图 3), 这进一步证明了这些位点对该酶催化活性的重要性, 同时也预示了黄颡鱼脑 P450arom 具有催化活性。

```

黄颡鱼脑 YCbrain -----MGLQTMSEVMAAVEGNILKVISALLLVLLISLTAY 36
鳊鱼脑 CCbrain -----MELQNVSDVMAVMEGRGLCVISALLFLLLSLTAY 36
金鱼脑 GFbrain -----MEEVLKGTVNFAAAVQVTLMLALTGTLILLHRIIFTA 38
斑马鱼脑 ZFbrain -----MMEHVVKDAVNIGAVVQGTLLLLTGLMLILLHRIIFGVK 39
金鱼卵 GFovary MAGELLQPCG--MKQVHLGEAVLELLMQGAHNSYGAQDNVCGAMATLLLLLCLLAIR 58
斑马鱼卵 ZFovary MAGDLLQPCG--MKPVRLGEAVVDLLIQRAHNGTERAQDNACGATATILLLLLLCLLAIR 58
鳊鱼卵 CCovary MAAHVFPMCERTRKPVHFSETVMEI LLREARNGTDPREYENPRG-ITLLLLLCLVLLLTWV 59
黄鳝卵 REovary --MDLI PACERAVVPVGLDAAAADLDSVSSNATAVGSAG--ISVATRALMLLVCLLLVTW 56
鸡卵巢 Chovary -----MI PETLNPLNY-FTSLV PDLMPVATVPI I I LICFLFLIW 38
人胎盘 Huovary -----MVLEMLNPIHYNITSIVPEAMPAATMPVLLLTGLFLLVW 39
                                     :::
  
```

```

黄颡鱼脑 YCbrain N-RGNKSTLPGPYWLLGLGPILSYSRFLWMGIGTASNYYNKYGCMTRVWIOGEEETLILS 95
鳊鱼脑 CCbrain N-RRNKSTLPGPYWLLGLGPILSYSRFLWTGIGTASNYYNKYGCMTRVWISGEETLILS 95
金鱼脑 GFbrain N-WRNQSGVPGPGWLLGLGPILSYSRFLWMGIGSACNYYNEKYGIARVWISGEEETLILS 97
斑马鱼脑 ZFbrain N-WRNQSA L PGPGWLLGLGPVLSYSRFLWMGIGTACNYYNEKYGSIARVWINGEETVILS 98
金鱼卵 GFovary HHWTEKDHVPGPCFLLGLGPLLSYCRFIWSGIGTASNYYNSKYGDI VRVWINGEETLILS 118
斑马鱼卵 ZFovary HHRPHKSHIPGPSFFFGLGPVVSYCRFIWSGIGTASNYYNSKYGDI VRVWINGEETLILS 118
鳊鱼卵 CCovary NRHEKKCSIPGPSFCLGLGPLMSYCRFIWMGIGTASNYYNEKYGDMVRVWISGEEETLVLS 119
黄鳝卵 REovary N-HTEKKHVPGPSFCLGLGPLLSYVRFIWTGIGTASNYYNKYGDI VRVWINGEETLILS 115
鸡卵巢 Chovary N-HEETSSIPGPGYCMGIGPLISHGRFLWMGVGNACNYYNKTYGEFVRVWISGEEETIIS 97
人胎盘 Huovary N-HEGTSSIPGPGYCMGIGPLISHGRFLWMGIGSACNYYNRVYGEFMRVWISGEEETIIS 98
                                     :
                                     :*** : :*:***: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
  
```

```

黄颡鱼脑 YCbrain KASAVYHVLKSSKYIARFASSHGLRCIGMDEQGLIFNSNIPLWKKLRITYFAKALSGPGL 155
鳊鱼脑 CCbrain KGSVAVYHVLKSSNYVARFASRSGLRICIGMDEQGLIFNSNIPLWKKLRITYFAKALTGPGLQ 155
金鱼脑 GFbrain KSSAVYHVLKSNNTYGRFASKKGLQCIGMFEQGIIFNSNMALWKKVRYFTKALTGPGLQ 157
斑马鱼脑 ZFbrain KSSAVYHVLKSNNTYGRFASAKGLQCIGMFEQGIIFNSNIAKWKVRYFTKALTGPGLQ 158
金鱼卵 GFovary RSSAVYHVLKSLYTSRFGSKLGLQCIGMHEQGIIFNSNVALWKKVRSFYAKALTGPGLQ 178
斑马鱼卵 ZFovary RSSAVYHVLKSLYTSRFGSKLGLQCIGMHEQGIIFNSNVALWKKVRAFYAKALTGPGLQ 178
鳊鱼卵 CCovary RPSAVYHVLKHSQYTSRFGSKLGLQCIGMHEQGIIFNSNVTLWRKVRITYFAKALTGPGLQ 179
黄鳝卵 REovary RSSAVHVLKNGHYTSRFGSKQGLSCVMNERGIIIFNNNVALWKKIRMFPIKALTGPGLQ 175
鸡卵巢 Chovary KSSSVFHVMTKHWNYVSRFGSKLGLQCIGMYENGIIFNNNPAHWKEIRPFFTKALSGPGLV 157
人胎盘 Huovary KSSSMFHIMKHNHYSSRFGSKLGLQCIGMHEKGIIFNNNPELWKTTRPFPMKALSGPGLV 158
                                     :*::*::*::*
                                     * .*** * ***:*** * .*:*** * * : ** * : : ***:***
  
```

```

黄颡鱼脑 YCbrain QKAVGVCSVATNKHLVDLDFDSSGHVDVNLFLRCVVDISNRLFLQVPINEKDLLLLKIH 215
鳊鱼脑 CCbrain RTVGVCVHATNKHLVDLCEFMDSSGHVDALNFLRCIVVDVSNRFLRIPINEKDLLVKIH 215
金鱼脑 GFbrain KSVDCVSAATNKQLNVLQEFTHDSGHVDVNLNLLRCIVVDVSNRFLRIPINEKDLLLLKIH 217
斑马鱼脑 ZFbrain KSVEVCVSAATNRQLDVLQEFTHDASGHVDVNLNLLRCIVVDVSNRFLRIPINEKELLIKIH 218
金鱼卵 GFovary RTLEICITSTNTHLDNLSHLMDARGQVDILNLLRCIVVDISNRLFLGVPLNEHDLLQKIH 238
斑马鱼卵 ZFovary RTMEICTTSTNTHLDDLSQLTDAQGLDILNLLRCIVVDVSNRFLGVPLNEHDLLQKIH 238
鳊鱼卵 CCovary RTLEICTSTNTHLDGLSRLTDAQGHVDVNLNLLRCIVVDISNRLFLDVPLEQNLLFKIH 239
黄鳝卵 REovary QTVEVCVSTQTHLDNL---DNLGHVDVLSLLRCTVIDIFNRLFLGVPLNEKELLIKIH 231
鸡卵巢 Chovary RMIAICVESTIVHLDKLEEVTVTEGVNVLNLMRRIMLDTSNKFLGVPLDESAIVLKIQ 217
人胎盘 Huovary RMVTVCAESLKTHLDRLEEVTVNESGYVDVLTLLRRVMLDTSNTLFLRIPLESAIVVKIQ 218
                                     : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
  
```



(续图 3)

黄颡鱼脑	YCbrain	KYFDTWQKVLIQPDIFFRID-WVYKHKQQA	AKELQEEMGR	LVEQKRKVINASEKLDE-TD	273	
鲮鱼脑	CCbrain	KYFDTWQTVLIQPDIFFFHLA-WMYKHHQA	AKELQEEMGR	LVEEKRKAINGMEKLGE-TD	273	
金鱼脑	GFbrain	RYFSTWQAVLIQPDVFFRLN-FVYKHYHLA	AKELQDEMG	KLVEQKRQAINNMEKLDE-TD	275	
斑马鱼脑	ZFbrain	RYFSTWQTVLIQPDIFFFKLD-FVYRKYHLA	AKELQDEMG	KLVEQKRQAINNTEKLDE-MD	276	
金鱼卵	GFovary	KYFDTWQTVLIKPDVYFRLAWLHRKHKRDA	QELQDAIAALIE	BQKRVQLTRAEKFDQ-LD	297	
斑马鱼卵	Zfovary	KYFDTWQTVLIKPDVYFRLD-WLHKKHKRDA	QELQDAITALIE	BQKVVQLVHAEKLDH-LD	296	
鲮鱼卵	CCovary	RYFETWQTVLIKPDFYFRLK-WLHDKHRNA	AQELHDAIEDLIE	BQKRTLQQA	EKLDN-LN	297
黄鳍卵	REovary	KYFETWQCVLLKPDIFYFKFG-WIYKRHKA	ARGLQNAIESL	VEQKRRDMEQADKLDN-IN	289	
鸡卵巢	Chovary	NYFDAWQALLKPDIFFFKIS-WLCKKYEEA	AKDLKGAMEILI	BQKRQKLS	TVEKLDHMD	276
人胎盘	Huovary	GYFDAWQALLIKPDIFFFKIS-WLYKKYE	KSVDLKDIAE	VLIAEKRRR	ISTEBKLEECMD	277

I

黄颡鱼脑	YCbrain	FATELIFAQNHGEMSEDDVROC	VLEMVIAAPD	TLVSLSLFFMLVLLKQKPAVEQHILQEMH	333
鲮鱼脑	CCbrain	FATELIFAQDHGEMSEDDVROC	VLEMVIAAPD	TLVSLSLFFMLVLLKQKPEVEQCILQEMR	333
金鱼脑	GFbrain	FATELIFAQNHDELSVDDVROC	VLEMVIAAPD	TLVSLSLFFMLLLLKQNSVVEEQIVQEQ	335
斑马鱼脑	ZFbrain	FATELIFAQNHDELSVDDVROC	VLEMVIAAPD	TLVSLSLFFMLLLLKQNSAVVEEQIVQEQ	336
金鱼卵	GFovary	FTAELIFAQSHGELSTENVRQC	VLEMVIAAPD	TLVSLSLFFMLLLLKQNPDELKILQEMN	357
斑马鱼卵	Zfovary	FTAELIFAQSHGELSAENVRQC	VLEMVIAAPD	TLVSLSLFFMLLLLKQNPDELKILQEMD	356
鲮鱼卵	CCovary	FTEELIFAQSHGELTAENVRQC	VLEMVIAAPD	TLVSLSLFFMLLLLKQNAEVERRILTEIH	357
黄鳍卵	REovary	FYLAGQVLLKPDIFYFKFG-WIYKRHKA	ARGLQNAIESL	VEQKRRDMEQADKLDN-IN	349
鸡卵巢	Chovary	FASQLIFAQNRGDLTAENVNQC	VLEMMIAAPD	TLVSLSLFFMLVLLKQNPDELQQLQEQID	349
人胎盘	Huovary	FATELILAEKRGDLTRENVNQC	ILEMLIAAPD	TMSVLSLFFMLFLIAKHPNVEEAIKEIQ	337

II

黄颡鱼脑	YCbrain	EVLGIREMEPADLQKLSVMESFI	KESLRFHPV	VDFIMRRAL	EDDHI	EGYR	VAKGTNI	IILN	393	
鲮鱼脑	CCbrain	NVLGGREVEPAELQKLTVMESFI	KESLRFHPV	VDFIMRRAL	DDDFI	EGYR	VAKGTNI	IILN	393	
金鱼脑	GFbrain	SQIGERDVESADLQKLNVLERFI	KESLRFHPV	VDFIMRRAL	EDDE	FI	EGYR	VAKGTNLI	LN	395
斑马鱼脑	ZFbrain	SQIGSRDVESADLQKLNVLERFI	KESLRYHPV	VDFIMRQ	SLEDDY	IDGYR	VAKGTNLI	LN	396	
金鱼卵	GFovary	AVLAGRSLQSHLSLQIFLESF	INESLRFHPV	VDFIMRRAL	DDDDVI	EGYK	VKRGTNI	IILN	417	
斑马鱼卵	Zfovary	SVLAGQSLQSHLSLQIFLESF	INESLRFHPV	VDFIMRRAL	DDDDVI	EGYK	VKRGTNI	IILN	416	
鲮鱼卵	CCovary	TVLGDTELQSHLSLQHLVLECF	INEALRHPV	VDFSYRRAL	DDDDVI	EGFRV	PRGTNI	IILN	417	
黄鳍卵	REovary	TVVGDREQLQNEDELQKLVLESF	INECLRFHPV	VDFIMRQ	ALTD	DI	IDGYR	VPKGTNI	IILN	409
鸡卵巢	Chovary	TVVGDREQLQSDMPNLKIVENFI	YESMRYQ	PVVDLIMR	KALQ	DDVID	GYPV	KKGTNI	IILN	396
人胎盘	Huovary	TVIGERDIKIDDIQKLVKVMENFI	YESMRYQ	PVVDLVMR	KAL	EDDVID	GYPV	KKGTNI	IILN	397

III

黄颡鱼脑	YCbrain	IGQMHKSTEFFQKATEFTLENS	DNVPSRFFQ	PF	CG	P	AC	VG	KH	I	A	M	V	M	K	A	I	L	V	T	V	L	S	453				
鲮鱼脑	CCbrain	IGRLHKSAEFFPKANEFSLNF	FENVPSRFFQ	PF	CG	P	AC	VG	KH	I	A	M	V	M	K	A	I	L	V	T	V	L	S	453				
金鱼脑	GFbrain	IGRMHK-SEFFQKPNFENLNF	FENTVPSRYFQ	PF	CG	P	AC	VG	KH	I	A	M	V	M	K	A	I	L	V	T	L	S	454					
斑马鱼脑	ZFbrain	IGRMHK-TEFFPKPNEFSLNF	FENTVPSRYFQ	PF	CG	P	AC	VG	KH	I	A	M	V	M	K	A	I	L	V	T	L	S	455					
金鱼卵	GFovary	VGRMHR-SEFFPKPNEFSLDN	FQKNVPSRFFQ	PF	GS	G	P	R	S	C	V	G	K	H	M	A	M	V	M	K	S	I	L	V	T	L	S	476
斑马鱼卵	Zfovary	VGRMHR-SEFFSKPNQFSLDN	FQKNVPSRFFQ	PF	GS	G	P	R	S	C	V	G	K	H	I	A	M	V	M	K	S	I	L	V	T	L	S	475
鲮鱼卵	CCovary	VGRMHR-SEFYPKPADFSLDN	FQKNVPSRFFQ	PF	GS	G	P	R	S	C	V	G	K	H	I	A	M	V	M	K	S	I	L	V	T	L	S	476
黄鳍卵	REovary	TGRMHR-TEFFLKPNEFNLNF	EKNAPRRYFQ	PF	GS	G	P	R	S	C	V	G	K	H	I	A	M	V	M	K	S	I	L	V	T	L	S	468
鸡卵巢	Chovary	IGRMHR-LEFFPKPNEFSLNF	EKNVPSRYFQ	PF	GF	G	P	R	S	C	V	G	K	F	I	A	M	V	M	K	A	I	L	V	T	L	S	455
人胎盘	Huovary	IGRMHR-LEFFPKPNEFTLEN	FAKNVPRYFQ	PF	GF	G	P	R	S	C	V	G	K	F	I	A	M	V	M	K	A	I	L	V	T	L	S	456

黄颡鱼脑	YCbrain	HYTVCPQPGCTVSTIRQTNIL	SQOPIE-EETQ	SLLMR	FIPRNL	NPDKQ	-----	500			
鲮鱼脑	CCbrain	QYTVCPQPGCTVSTIRQTNIL	SQOPIE-EDTQ	SLAMR	FIPRKR	SPDKQ	-----	500			
金鱼脑	GFbrain	RFTVCPRHGCTVSTIKQTNIL	SQMPVE-EDPD	SLAMR	FIPRAQ	NICG	PHLGEKTEE	510			
斑马鱼脑	ZFbrain	RFTVCPRHGCTVSTIKQTNIL	SQMPVE-EDPD	CLAMR	FIPRAQ	NSNGE	TADNR	SKE	511		
金鱼卵	GFovary	RFSVCPVKGCTVDSIPQTNIL	SQMPVE--EPSS	LSVQL	LILR	NL	-----	518			
斑马鱼卵	Zfovary	RFSVCPMKACTVENIPQTNIL	SQMPVE--EPSS	LSVQL	LILR	NL	-----	517			
鲮鱼卵	CCovary	RFSVCPPEESCTVENIAHTN	DL	SQMPVE--DKHT	LSVRF	IPRNT	HSTRNRKA	-----	524		
黄鳍卵	REovary	QYSVCPHKGLTMDCLPQTNIL	SQMPVE--RQPL	LEMV	FTQEA	QTRIR	TKVDQH	-----	517		
鸡卵巢	Chovary	RCRVQTMKGRGLNNIQKNN	DL	SMHP	IE--RQPL	LEMV	FTQEA	QTRIR	TKVDQH	-----	507
人胎盘	Huovary	RPHVKTLLQGCVESIQKI	HDL	SLHP	DE--TKN	LEMI	FTPRN	SDR	CLEH	-----	503

图 3 黄颡鱼脑 P450arom 氨基酸序列与鲮鱼等其它脊椎动物 P450arom 氨基酸序列的比较

Fig. 3 Alignment of yellow catfish brain-derived P450arom amino acid sequence those of other species

其中包括鲮鱼脑(AAL14612), 金鱼脑(AAB39408), 斑马鱼脑(AA K00642), 金鱼卵(AAC14013), 斑马鱼卵(AA K00643), 鲮鱼卵(Q92111), 黄鳍卵(A Y583785), 鸡卵巢(A31916), 人胎盘(Q4Hu19)。序列中高度保守的片段用下划线指示, 并用罗马字表示, 其中 I-螺旋区(I), 芳香化酶特异的保守区(II), 血红素结合区(III)。氨基酸一致的用 \* 表示, 相似的用 . 表示, 对酶催化活性起重要作用的位点用黑体字表示

channel catfish brain-derived P450arom (AAL14612), goldfish brain-derived P450arom (AAB39408), zebrafish brain-derived P450arom (AA K00642), goldfish ovary (AAC14013), zebrafish ovary (AA K00643), channel catfish ovarian P450arom (Q92111), rice field eel ovarian P450arom (A Y583785), chicken ovarian P450arom (A31916), and human placenta (Q4Hu19). Regions of high homology are underlined and indicated by Roman numerals: I-helix (I), an aromatase-specific conserved region (II), and heme-binding region (III). Identical and similar amino acids are marked by asterisks and dots, respectively. Amino acids known to be essential for catalytic functions are marked by bolds



系统发育分析 使用上述比对结果,用 PAUP 软件计算系统发育关系,在总共 539 个位点中,185 个位点由于处于变化较大的区域而被排除在系统发育关系之外,采用 Neighbor-Joining 法,重复 1000 次,gap 处理为缺失,构建了系统发

育树(图 4)。从系统树可见 HP450aromB 属于鱼类脑 P450arom 一支,并与鲶鱼脑 P450arom 亲缘关系最近,这传统分类结果一致,它们均属于鲶形目。

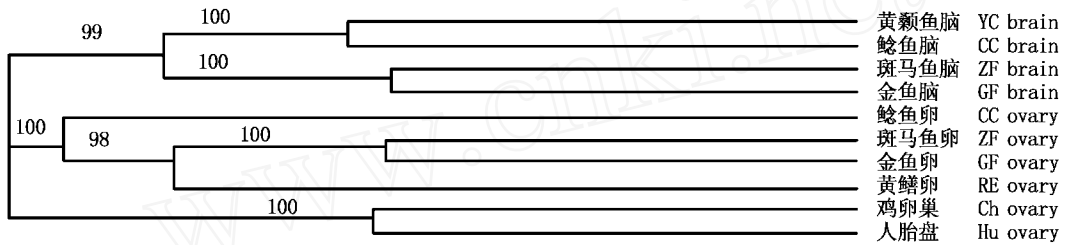


图 4 根据黄颡鱼脑 P450 氨基酸序列用 Nj bootstrap 构建的系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of yellow catfish brain-derived P450arom proteins  
分支上的数字代表 bootstrap 值

The consensus tree was constructed by neighbor-joining bootstrap using PAUP4b10. The number is the bootstrap value

### 2.3 HP450aromB 在部分组织的表达

实时定量 RT-PCR 结果显示,在黄颡鱼前脑、下丘脑、垂体、卵巢、精巢均有 HP450aromB 的表达(图 5 和图 6)。以  $\beta$ -actin 为内标,测定 HP450aromB 在上述组织的相对表达量,结果发现,以雄鱼端脑 HP450aromB mRNA/ $\beta$ -actin mRNA 为  $1 \pm 0.12$ ,雄鱼下丘脑则为  $1.74 \pm 0.10$ ,雄脑垂体  $1.16 \pm 0.09$ ,雌下丘脑  $1.88 \pm 0.14$ ,雌脑垂体  $1.67 \pm 0.14$ ,雌端脑  $0.44 \pm 0.02$ ,卵巢  $0.23 \pm 0.03$ ,精巢  $0.02 \pm 0.002$ ,即雌下丘脑 > 雄鱼下丘脑 > 雌脑垂体 > 雄脑垂体 > 雄端脑 > 雌端脑 > 卵巢 > 精巢(图 7)。对 3 尾雌、雄鱼 HP450aromB 在脑部相对表达量的总和进行 *t* 检验,结果没显著差异 ( $P < 0.05$ )。

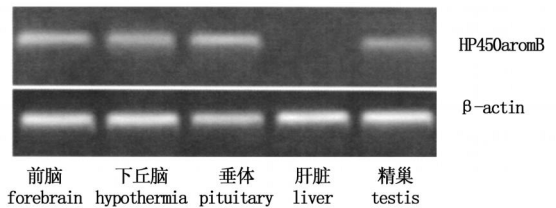


图 6 雄黄颡鱼部分组织中 HP450aromB 的表达

Fig. 6 Expression of HP450aromB in male yellow catfish tissues

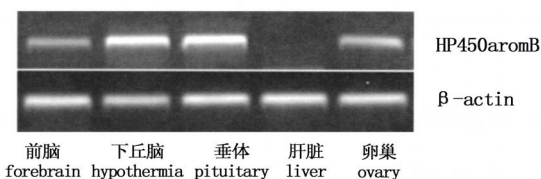


图 5 雌黄颡鱼部分组织中 HP450aromB 的表达

Fig. 5 Expression of HP450aromB in female yellow catfish tissues

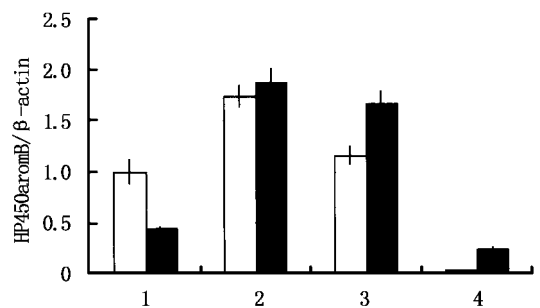


图 7 HP450aromB 在黄颡鱼雄、雌脑和性腺的相对表达量

Fig. 7 Expression level of HP450aromB in male and female yellow catfish brain and gonad  
纵坐标为 HP450aromB/ $\beta$ -actin mRNA 表达量比值,1:端脑,2:下丘脑,3:垂体,4:性腺空白柱表示雄鱼,黑色柱表示雌鱼。图中数值表示为 3 尾鱼的平均值和标准差

Y-axis is mRNA expression ratio of HP450arom and  $\beta$ -actin, 1: forebrain, 2: hypothalamia, 3: pituitary, 4: gonad, Blank column is male fish, black column is female fish. Data shown are expressed as mean  $\pm$  S. E. M of three fish

### 3 讨论

本文从黄颡鱼脑中分离到了 HP450aromB, 通过同源性及系统发育分析可知, 它属于鱼类脑一支 P450arom, 具有芳香化酶共有的保守区域 I-螺旋区, 芳香化酶特异保守区 II 和血红素结合区 III, 对酶催化作用起重要作用的位点 I130, E298, P304, D305, T306, R431, C433 与其它芳香化酶一致, 系统发育揭示了与鲶鱼脑 P450arom 遗传距离最近, 和传统分类一致, 它们同属于鲶形目。

本文使用灵敏度高的荧光实时定量 RT-PCR 研究了 HP450aromB 在雌雄鱼部分组织的表达, 结果发现除了在肝脏中没有检测到 HP450aromB 的表达外, 在前脑、下丘脑、垂体、卵巢和精巢均有表达, 分布比较广泛, 这可能与雌激素具有广泛的生理作用有关。结果还表明该基因的表达量在脑部明显比性腺高, 提示了脑 P450arom 的表达具有一定的组织特异性, 其调控及作用可能与性腺 P450arom 不同。

至今为止的研究表明, 大部分鱼类具有两个不同的芳香化酶基因分别编码脑和性腺芳香化酶<sup>[4,5,12]</sup>, 对脑芳香化酶基因在各组织的表达, 在部分鱼使用不同方法进行了研究, 但结果不尽相同。如使用 RT-PCR 对金鱼脑 P450arom 在各组织中的表达研究表明该基因只在脑中表达, 在卵巢中没有检测到脑中 P450arom 的表达<sup>[12]</sup>。使用 Northern 杂交对斑马鱼脑 P450arom 表达研究发现除了在脑中表达外在卵巢中也有弱表达, 但在肝脏没表达<sup>[5]</sup>, 半定量 RT-PCR 研究赤点石斑鱼脑 P450arom 表达时发现该基因在性腺、肝脏均有低表达<sup>[16]</sup>。造成各研究结果不同可能与所研究鱼种类、年龄以及所处发育状态有关。脑 P450arom 的表达量与神经生长有着密切关系<sup>[17-19]</sup>。本研究黄颡鱼雄鱼比雌鱼生长快, 因此, 雄鱼脑 P450arom 的表达量应该比雌鱼多, 但相对雄鱼雌鱼发育可能需要更多雌激素, 这两因素可能是导致 HP450aromB 在雌雄鱼脑部的表达量无明显差异的原因。但有关 HP450aromB 对性腺发育和神经发育等其它生理功能的贡献还需要进行更深入的研究。如分析其在性腺表达的细胞定位, 以及在性腺不同发育阶段表达量的变化等。

#### 参考文献:

- [1] Lephart E D. A review of brain aromatase cytochrome P450 [J]. Brain Res Reviews, 1996, 22 : 1 - 26.
- [2] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis [J]. Endocr Rev, 1994, 15 : 342 - 254.
- [3] Nakamura M, Kobayashi T, Chang X, et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish [J]. J Exp Zool, 1998, 281 : 362 - 372.
- [4] 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]. J Ster Biochem & Mol Bio, 2001, 79 : 305 - 314.
- [5] Kishida M, Callard G V. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development [J]. Endocrinology 2001, 142 : 740 - 750.
- [6] Rose T M, Schultz E R, Henikoff J G, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly-related sequences [J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(7) : 1628 - 1635. <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>.
- [7] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85 : 8998 - 9002.
- [8] 俞菊华, 夏德全, 杨弘, 等. RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定 [J]. 水产学报, 2003, 6 : 533 - 539.
- [9] Thompson J D, Higgins D G, Gibson J F. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22 : 4673 - 4680.
- [10] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods. Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1998.
- [11] Trant J M. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450 [J]. Gen Comp Endocrinol, 1994, 95 : 155 - 168.
- [12] Tchoudakova A, Callard G V. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary [J]. Endocrinology, 1998, 139 : 2179 - 2189.
- [13] 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]. J Biol Chem, 1988, 263 : 16358 - 16363.
- [14] Corbin C J, Graham-Lorence S, McPhaul M. Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in non steroidogenic cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85 : 8948 - 8952.
- [15] Graham-Lorence S, Amameh B, White R E, et al. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450 [J]. Protein Sci, 1995, 4 : 1065 - 1080.
- [16] 李广丽, 刘晓春, 张勇, 等. 赤点石斑鱼两种芳香化酶 cDNA 的克隆及其表达的组织特异性 [J]. 动物学报 2004, 50(5) : 791 - 799.
- [17] Menuet A, Koumondouros G, Steriote A, et al. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha [J]. J Comp Neurol, 462 : 180 - 193.
- [18] Blazquez M, Pifferrer F. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Mol and Cell Endocrinol, 2004, 219 : 83 - 94.
- [19] González A, Pifferrer F. Aromatase activity in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle [J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 132 : 223 - 230.