

条斑星鲈 *CYP19a* 基因克隆及其在雄鱼生殖周期中的表达

金国雄¹, 温海深^{1*}, 柳学周², 何峰¹, 李吉方¹, 陈彩芳¹,
史宝¹, 张葭人¹, 陈晓燕¹, 史丹¹, 杨艳平¹

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 细胞色素 P450 芳香化酶 (P450arom) 作为 P450 细胞色素酶超家族中的一员, 是性类固醇生成途径中的末端酶, 能够将雄激素转化为雌激素。在大多数脊椎动物中, P450arom 由 *CYP19* 单基因编码。但是在鱼类中存在两种 P450 芳香化酶, 分为性腺型芳香化酶 (P450aromA) 和脑型芳香化酶 (P450aromB), 它们由不同的基因 (*CYP19a* 和 *CYP19b*) 编码, 分布在不同的组织。通过简并引物扩增及 RACE cDNA 扩增克隆, 在国内外首次获得全长为 2 167 bp 的条斑星鲈 *CYP19a* cDNA 序列, 并将推测的氨基酸序列与其它物种 P450arom 氨基酸序列进行多重比较, 发现存在跨膜螺旋区、I-螺旋区、Ozol 肽区、芳香化酶特异保守区以及血红素结合区。通过 RT-PCR 分析了 P450aromA mRNA 在条斑星鲈不同组织中的表达情况, 结果表明, *CYP19a* 基因主要在脑、卵巢和精巢中表达, 其次在肠、肝脏、肾脏也有少量表达。同时也分析了 P450aromA mRNA 在处于不同发育期的精巢中的表达情况, 发现在 II 期精巢中表达量最高, 在 V 期精巢中表达量最低。

关键词: 条斑星鲈; P450 芳香化酶; 克隆; mRNA 表达

中图分类号: Q 786; S 917

文献标识码: A

条斑星鲈 (*Verasper moseri*) 属鲈形目 (Pleuronectida)、鲈科 (Pleuronectinae)、星鲈属, 主要分布在日本茨城县以北到鄂霍茨克以南海域, 我国黄、渤海亦有分布, 但十分罕见。属于冷温性大型底栖鱼类, 生长速度是圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*) 的 1.3 ~ 1.5 倍。条斑星鲈肉质鲜嫩、营养丰富, 胶原蛋白含量较高, 在日本上市价格一般为牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的 4 ~ 5 倍, 为高档水产品, 深受消费者喜爱, 具有很高的经济价值, 是我国北方继大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 和牙鲆后, 海水工厂化养殖的重点培育对象之一。

细胞色素 P450 芳香化酶 (P450arom) 作为 P450 细胞色素酶超家族中的一员, 是性类固醇生成途径中的末端酶, 它在雄激素转化为雌激素的

过程中起芳香化作用^[1]。脊椎动物中, 雌激素在性别分化, 卵巢滤泡发育以及维持雌性性征上起重要作用, 特别是雌激素中的雌二醇作为性类固醇参与许多关键的过程, 包括生长、发育和繁殖等^[2]。因此, P450arom 的适量表达成为大多数脊椎动物性别分化和繁殖的关键^[3]。

在大多数脊椎动物中, P450arom 由 *CYP19* 单基因编码。但是在鱼类中存在两种 P450 芳香化酶, 分别为性腺型芳香化酶 (P450aromA) 和脑型芳香化酶 (P450aromB), 它们由不同的基因 (*CYP19a* 和 *CYP19b*) 编码, 分布在不同的组织中。如斑马鱼 (*Danio rerio*) *CYP19a* 和 *CYP19b*, 每个基因都能编码不同的酶且有不同的调控机制^[4]。根据序列和系统发生分析, 斑马鱼两种 P450arom 基因分别与已鉴定的金鱼 (*Carassius*

收稿日期: 2009-06-26

修回日期: 2009-10-27

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A414)

通讯作者: 温海深, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

auratus) CYP19a 和 CYP19b 属于直系同源基因^[5]。最近有研究表明,CYP19a 转录浓度在卵巢重复发育开始及卵泡卵黄积累早期呈上升趋势,当卵黄积累完成后又急剧下降^[6]。至今,已有多种鱼类 CYP19a 基因被分离和克隆,如斑马鱼、金鱼、平鲷 (*Rhabdosargus sarba*)、罗非鱼 (*Tilapia*)、赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis* Gunther) 等。目前国内有关 P450arom 的研究报道主要集中在人类及高等脊椎动物,有关鱼类的报道还较少。本实验克隆得到了条斑星鲷 CYP19a 基因 cDNA 全长,并对其序列进行比较和分析,同时应用半定量 RT-PCR 技术对 CYP19a 基因 mRNA 在条斑星鲷各组织及不同发育期精巢中的表达情况进行了分析,旨在为研究 CYP19a 基因在条斑星鲷特别是雄鱼繁殖生理中的功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验样本

实验用条斑星鲷均采自烟台百佳水产有限公司;每月定期采样,连续一年。于实验室回流水箱中暂养 3~4 d 后,解剖取出各组织。Bouin 氏液固定用于组织学观察的样品,液氮中速冻用于克隆及 mRNA 表达实验的样品,然后转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 精巢组织分期

将固定在 Bouin 氏液中的精巢组织取出,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。LEICA-RM2016 型切片机制片,厚度为 5 μm, H. E 染色,中性树胶封片,Nikon E200 型显微镜下观察及显微摄影。根据 H. E 染色结果,将所得精巢组织样本分为 5 个期(图 1)^[7], II 期精巢(精原细胞排列成束), III 期精巢(精小叶中出现小叶腔和初级精母细胞), IV 期精巢(精巢中出现精子细胞), V 期精巢(精小叶中充满成熟的精子), VI 期精巢(精子排出或退化吸收)。

1.3 试剂

所用试剂有 RNAiso Reagent (TaKaRa 公司)、RNA 酶抑制剂 (TaKaRa 公司)、M-MLV 逆转录酶 (Promega 公司)、Taq 酶 (TaKaRa 公司)、DNase I (TaKaRa 公司)、dNTP (TIANGEN 公司)、DNA Marker I 和 DNA Marker II (TIANGEN 公司)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TIANGEN

公司)、pGM-T 载体相关试剂盒 (TIANGEN 公司) SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech 公司)、Advantage 2 PCR 试剂盒 (Clontech 公司)。

1.4 引物

根据已知鱼类 CYP19a 保守序列,利用 CodeHop 原理设计简并引物^[8],简并上游引物为 5'-TGAGCTGCATCGGCATGTAYGARMG-3',下游引物为 5'-TCCAGCACGCACTGCACNACRTTYTC-3'。根据克隆的 cDNA 片段,用 Primer premier 5.0 软件设计引物,用于 5'-RACE 的引物为 5'-CATTGACGGGCACATCCAGGAAGAGT-3', 3'-RACE 引物为 5'-CTCTTCCTGGATGTGCCCGTCAATG-3'。半定量 RT-PCR 上游引物为 5'-TGGATGTGCCCGTCAATG-3',下游引物为 5'-AGACAGCTCGCCGTGGTTC-3'。18S 内参上游引物为 5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATC-3',下游引物为 5'-CCAATTACAGGGCCTCGAAAG-3'。所有引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

1.5 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 -80 °C 保存的条斑星鲷组织:肠、鳃、心、脾、肾、幽门盲囊、头肾、精巢、肝、胃、脑、肌肉、卵巢各 100 mg,用 RNAiso Reagent 抽提总 RNA,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以 DNase I 酶去除基因组 DNA,紫外分光光度计 (Ultrospec-2100 Pro, Amersham) 测定 RNA 浓度。各组织 RNA 分别用 M-MLV 逆转录酶以 Oligo(dT)₁₈ 为引物合成 cDNA 第一链,反应体系及程序为 2 μg RNA 加 Oligo(dT)₁₈ 2 μL 补水至 13 μL,混匀后 70 °C,5 min,冰水浴 2 min,再向体系中加入缓冲液 5 μL、dNTP 5 μL、RNA 酶抑制剂 1 μL、M-MLV 逆转录酶 1 μL,混匀后 42 °C,60 min,最后 95 °C,5 min 灭活逆转录酶。合成的 cDNA 于 -40 °C 保存备用。

1.6 PCR

简并引物 PCR 扩增体系为 cDNA 1 μL、PCR 缓冲液 2.5 μL、dNTP 2 μL、引物各 0.5 μL、Taq 酶 0.2 μL,补无菌水至 25 μL。反应程序采用降落 PCR:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,以后每个循环退火温度降低 1 °C,直到退火温度降至 53 °C,共 10 个循环,再在 53 °C 退火温度下进行 25 个循环,72 °C 延伸 10 min。

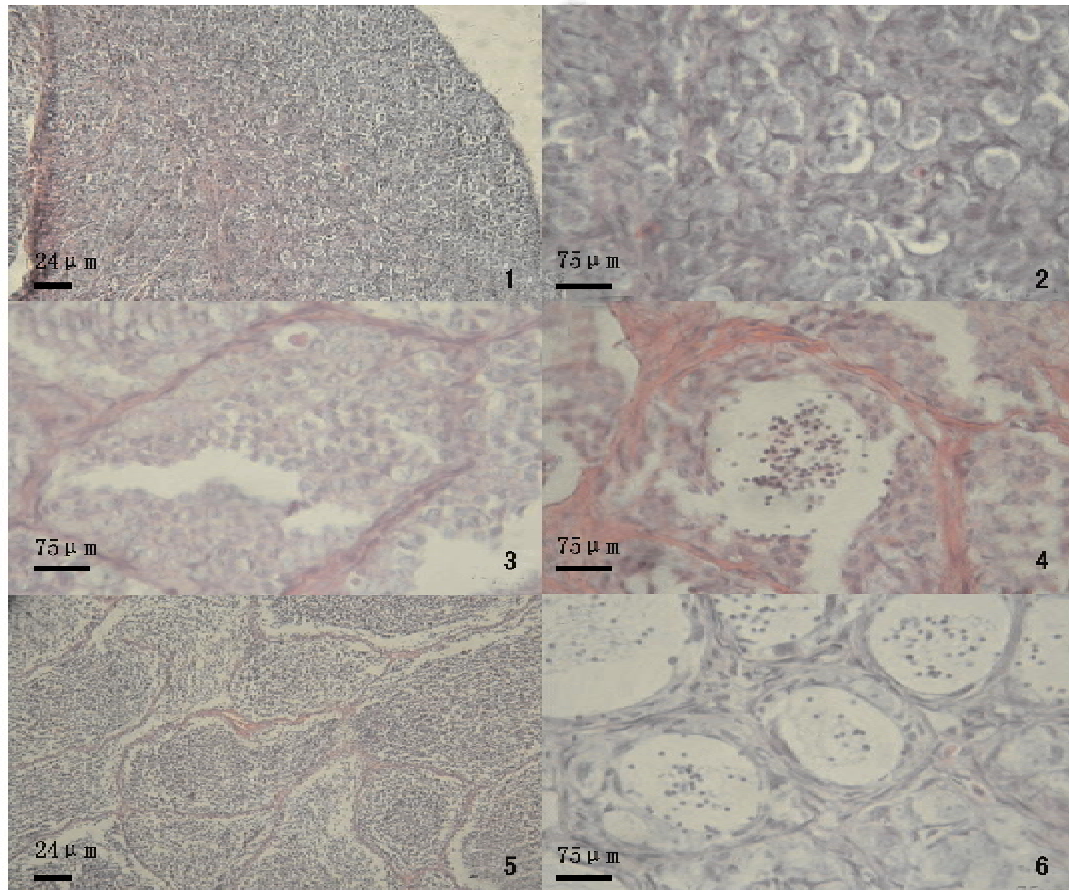


图1 条斑星鲽精巢组织学分期

1,2: II期精巢; 3: III期精巢; 4: IV期精巢; 5: V期精巢; 6: VI期精巢。

Fig.1 The histological stages of testes

1,2: stage II; 3: stage III; 4: stage IV; 5: stage V; 6: stage VI.

提取新鲜性腺组织总 RNA,用于 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第一链合成。合成的 cDNA 第一链分别用 Advantage 2 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增,各操作步骤、反应体系以及反应程序均按照 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒使用手册进行。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切下目的条带,回收纯化 PCR 产物(操作步骤严格按照 TIANGEN 胶回收试剂盒说明书)。回收 DNA 在 T4 连接酶作用下连接到 pGM-T 载体中,重组子转化至 DH5 α 感受态细胞,含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上 37 °C 培养过夜,挑取白色菌落划线培养,菌体 PCR 检测,阳性克隆送至北京华大公司测序。将测回序列拼接获得的 mRNA 全长序列及推断的氨基酸序列进行 Blast 同源搜索,用 Clustal X2 软件与其它物种 P450arom 氨基酸序列进行多重序列比对,系统

进化树构建使用 MEGA 4.0 软件中 Neighbor-joining 法(自展值为 1 000)^[9]。

1.7 *CYP19a* 基因 mRNA 各组织及雄鱼生殖周期中的表达检测

CYP19a 基因 mRNA 各组织表达检测 根据 mRNA 全长序列设计特异引物(通过上、下游引物所在位置计算出产物长度为 263 bp),以 18S rRNA 为内参照对鳃、心、脾、肾脏、幽门盲囊、头肾、精巢、肝脏、胃、脑、肌肉、卵巢 cDNA 进行 PCR 扩增。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

CYP19a 基因 mRNA 在雄鱼生殖周期中的表达检测 根据 H.E 染色结果,每一期均从发育较为一致的雄鱼中挑选出 3 个精巢组织样品,提取 RNA,反转录后用于 mRNA 表达检测。实验所得数据均表示为平均数 \pm 标准差 (mean \pm SD),采用 SPSS 13.0 统计软件中的 Duncan 氏法

进行数据处理和检验分析,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 条斑星鲷 *CYP19a* 基因 cDNA 全长克隆

取星鲷卵巢组织 RNA,通过 RT-PCR 方法,用简并引物扩增得到 1 条特异性条带,长度约为 520 bp(图 2),经测序后确定该产物长度为 526 bp。根据所得片段序列分别设计行 5'-RACE 及 3'-RACE 特异引物,经 RACE 反应后克隆测序,将 5'-RACE 和 3'-RACE 所得片段与简并引物扩增所得片段拼接得到 *CYP19a* 基因 mRNA 全长序列,其长度为 2 167 bp。该序列已提交至 GenBank(序列号为 FJ169904)。在 NCBI 上进行 Blastn 分析,结果出来的相似序列均为 *CYP19a* 基因,其中同源性较高的有庸鲷 (*Hippoglossus hippoglossus*)、褐牙鲆、漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、赤点石斑鱼、河鲈 (*Perca flavescens*),同源性分别为 96%、94%、93%、86%、86%、86%、83%。这说明所扩序列为 *CYP19a* 基因 cDNA 全长。

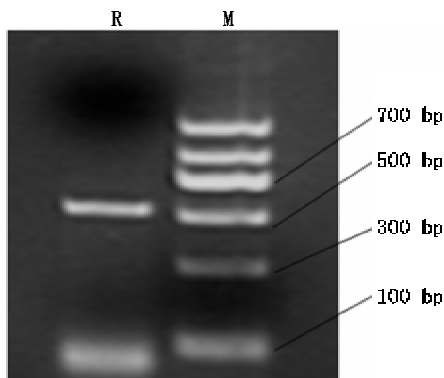


图 2 简并引物 PCR 扩增结果

R:简并引物 PCR 扩增结果,M:Marker II。

Fig.2 The result of PCR amplification used degenerate primers

R:The result of PCR amplification used degenerate primers,
M:Marker II.

2.2 序列分析

将克隆得到的 cDNA 序列(长 2 167 bp)用 DNAMAN 软件翻译成氨基酸序列(图 3),可知前 94 bp 为 5'-UTR 和后 504 bp 为 3'-UTR。95 ~ 1 663 bp 共编码 523 个氨基酸残基,29 ~ 32 位为

N-糖基化位点,34 ~ 57 位为跨膜螺旋区,305 ~ 336 位为 I-螺旋区,361 ~ 383 位为 Ozol 肽区,392 ~ 415 位为芳香化酶特异保守区,442 ~ 455 位为血红素结合区。

运用 Clusta X2 软件,将条斑星鲷 *CYP19a* 氨基酸序列与斑马鱼 *CYP19a*(序列号: NP_571229)/*CYP19b*(序列号: NP_571717)、半滑舌鲷 *CYP19a*(序列号: ABL74474)/*CYP19b*(序列号: ABM90641)、人类 *CYP19*(序列号: NP_112503)、文昌鱼 *CYP19*(序列号: ABA47317)、小家鼠 *CYP19*(序列号: NP_031836)、庸鲷 *CYP19a*(序列号: CAC36394)/*CYP19b*(序列号: AAY26901)、爪蟾 *CYP19*(序列号: BAE93232)氨基酸序列进行比对(图 4)。发现条斑星鲷 *CYP19a* 氨基酸序列与其它物种的 *CYP19* 氨基酸序列相比较为保守,特别是不同鱼类的 *CYP19a* 氨基酸序列保守性很强,且在 I-螺旋区、Ozol 肽区、芳香化酶特异保守区、血红素结合区最为保守。

利用 Mega 4.0 软件(Neighbor-joining 法)对上述多重比较的序列进行聚类分析(图 4),结果所有硬骨鱼类形成一个分支,人、小家鼠和爪蟾形成一个分支,文昌鱼单独成一支。在硬骨鱼类分支中所有鱼的 *CYP19a* 又形成一支,其中与条斑星鲷 *CYP19a* 亲缘关系最近的为庸鲷 *CYP19a*,其次为半滑舌鲷 *CYP19a*,且都有很高的自展值。

2.3 *CYP19a* 基因在不同组织中的表达分析

用半定量 RT-PCR 检测方法,以反转录合成的第一链 cDNA 为模板,以 18S rRNA 为内参照,分析了条斑星鲷卵巢、肌肉、脑、胃、肝脏、精巢、头肾、幽门盲囊、肾脏、脾、心、鳃及肠中 *CYP19a* 基因的表达情况。先以 18S 引物的扩增结果来平衡不同组织的 cDNA 模板量,再通过特异引物所扩长为 263 bp 的产物来确定各组织相对表达量,特异引物的 PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,40 个循环,72 °C 延伸 10 min,最后选取经 3 次重复均表现为一致的结果。图 5 为 3 次重复结果中的代表图。从图上可看出 18S 基因片段在各组织中扩增良好,可排除 RNA 提取失败的假阴性结果。*CYP19a* 基因在条斑星鲷的卵巢、脑、肝脏、精巢、肾脏、肠中有表达,且卵巢、脑、和精巢中的表达量明显要高于其它组织,肠中的表达量次之,肝脏和

肾脏中的表达量很小,其余组织均无表达。

2.4 CYP19a 基因在精巢生殖周期的表达分析

每期精巢取 3 个样本,半定量 RT-PCR 检测,电泳结果采用 Tanon GIS 凝胶图象处理系统进行分析。将各期 CYP19a 基因 mRNA 的表达量和

18S rRNA 的表达量作为 CYP19a 基因 mRNA 相对表达量。结果条斑星鲈 CYP19a 在精巢生殖周期中的 II 期表达最为丰富,然后表达量逐渐降低, V 期时达到最低值,在精子排出或退化吸收后 (VI 期) CYP19a 表达量又有所回升(图 7)。

```

1  GGATGTTCAAGGAGTGCAGCTGCTTCTCATCATCGAAACGTCAAATACACACATCGGAGAACTCGTTCACGGCCGATCACAACATACCCATGGAAACAAGTCTGTTCGTGGCAC 120
1  M E Q S P V R G T 9
121  CCGTCCAGCCCCCAAGGCTCTGGGGCCGCACTGGGGACCTGGTCTCCAGTCCCAAAAGCCACCGCAGTGGGAACACCGGGCGTCTGGGTGCCACCAGGACCTTGATCTGCTCGT 240
10  A P A P Q G L G A A L G D L V S T S P N A T A V G T P G V S V A I R T L I L L V 49
N-glycosylation site Transmembrane helix region
241  GTGTGTGCTGCTGGTGCCTGGAGCCACAGACAGGAGAACCGTGCAGGTCCACCTTTCTGTCTGGGTCTGGGGCCACTTCTCTCATACGTGAGATTCAATGCGAGCGGTATAGGCAC 360
20  C V L L L V A F S H T D R R T V P G P P F C L G L G P L L S Y V R F M W T G I G T 89
361  AGCCAGCACTACTACAACAAGAATGAGAGCAATTGTCCAGACTCTGGATCGATGGACAGGACGACTCATCTCAGCAGGCCATCAGCCGTTTACCAGTGTGAAGATGGACATTA 480
90  A S N Y Y N K K Y G D I V R V W I D G E E T L I L S R A S A V Y H V L K N G H Y 129
481  CAGCTCCCGITTTGGGACAGGCGAGGACTGACCTGCATCGGCATGTAOCAGACAGCCATCATCTTCAACAACAACGCTGTCCCTTTGGAAAAGACAGCCACCACTTACCAGAGCTCT 600
130  T S R F G S R Q G L S C I C M Y E R G I I F N N N V S L W K K T R I H F T R A L 169
601  GACAGCTCCAGGTTTGGCAAGAAGACAGTGGAGTCTGGCTCTCCCTCCACACAGACTCACCTGGACGACCTGGACAGTTTGGCTCAGCTCGACGCTCTCAGTTTTCGGCTGCACCTGGT 720
170  T G P G L Q K I V E V C V S S T Q T H L D D L D S L A H V D V L S L L R G T V V 209
721  CGACATCCCAACAGACTCTCTCGATGTGCCCTCAATGACAAACAGCTCCTGCTGAAGATTCTCAAGTATTTTGACCCGTGCCAACTGCTTAATCAAAACAGACATGTACTCTAG 840
210  D I S N R L F L D V P V N E K E L L V K I L K Y F D A W Q T V L I K P D M Y F R 249
841  GTTCTACTGGATCCACCAGAGGACAAAGCCGAGTCAAGGAGCTGCATGATGCCATGGGGACCTGGTGGAGCAGAAAGAGAGAGACGTGGAGCAGGGGATAAAGTGGACAAACATCAA 960
250  F Y W I H Q R H K A A V K E L H D A I G D L V E Q K R R D V E Q A D K L D N I S 289
961  CTTACCACAGCCGCTCATATTTGCACAGAACCCAGCGAGCTGTCTCCGAGAACCTGCTGACAGTCCGCTGGAGATGGTGTATCCGGGCGCCACACTCTGTCCTCCAGCTCTTCTT 1080
290  F T T G L I F A Q N H G E L S A E N V V Q C V L E M V I A A P D T L S V S L F F 329
I-helix region
1081  CATGCTGCTGCTGCTCAGCAGATCCAGATGTGGAGCTGCAGCTGCTGGAGAGATTGACACTGTAGTGGGTGAGAGGCAGCTGCAGAACGGGACCTGCAGAGCTGCAGCTGCTGGA 1200
330  M L L L L K Q N P D V E L Q L L R E I D T V V C R Q L Q N G D L Q K L Q Y L E 369
1201  GAGCTTCATCAACAGCTGCTCTCCCTCCACCTCTGCTGCACTTCACCATGCCCGAGCCCTGTCOCATGACCTCATGAGCCCTACAGGCTACCAAGGGCCAGCAATCATCAAA 1320
370  S F I N E C L R F H P V V D F T M R R A L S D D V I E G Y R V P K G T N I I I N 409
Ozoi' s peptide region Aromatase-specific conserved region
1321  CAGGGGCTGATGCACCGCAGAGAGTTTTCTGCAAACTTGAAGAATTCAGCTTGAGCAACTTTGAGAAAATGCTCCTCGAGCTTACTTTCAGCGGTTGGTTCAGGCGCTGCTCTG 1440
410  T G R M H R T E F F C K P D E T R L S N F E K N A P R R Y F Q P F G S G P R S C 449
Heme binding region
1441  CGTTGGCAACACATCCCATGCTGATGATCAAAATCCATCCTGTCACATGCTCTCCGACTACTCGTGTGCCCCCAAGGGCCCTGACCCCTGCAGCTGCCAGCTTACGCTCTCATGCACAT 1560
450  Y C K H I A M V M I K S I L V T L L S Q Y S V C P H K G L T L D C L P Q T N N L 489
1561  GTCCAGCAGCCCTGCGAGCATCAGCCCCAGGCCACAGCTCAGCATCAGATTCTTACCCAGACAGAGGAACTGCGCAAACTCCAGACTCCGAGCTTACGCTCTCATGCACAT 1680
490  S Q Q P V E H Q P E A P Q L S M R F L P R Q R G S W Q T L P D S D L * 523
1681  TCCAGATATACTCTACATATATATGATCTACACCCGCTGATCTAGCTGCTTTTATCTGACTCTATAAACCCTAAGCTTTTATAAATTAATACCTGTTAAACTGTATGTTACTCGAA 1800
1801  CTAACATCGATAATGCAAAAACCTTACATTAATACCTGATTAATCTAATATTTCCCAATATACCTAATCTTTCTAATTTTTTATACATACACTAGATAATCAGATCTAAT 1920
1921  AATTCCGCGATTTCCCACTAGCAAACTGACACGTTTAAAAAATCACCACACCCAACAGACCCATATAGGTATGTTTTCTAATTTTTTATACATACACTACATAATCAGATCTAAT 1920
2041  GGAATACATTAATGTAAGTCCITTTGTCGAGTTTAACTCCGATGCTTACATTTGTTGTTGAAAGTTTCTATATGAAATAAAGTCTCTTTTCAATCAAAAATAAAAAA 2160
2161  AAAAAA 2167

```

图 3 根据条斑星鲈 cDNA 序列推断所得氨基酸序列
Fig. 3 The deduced amino acid sequence based on cDNA sequence of barfin flounder

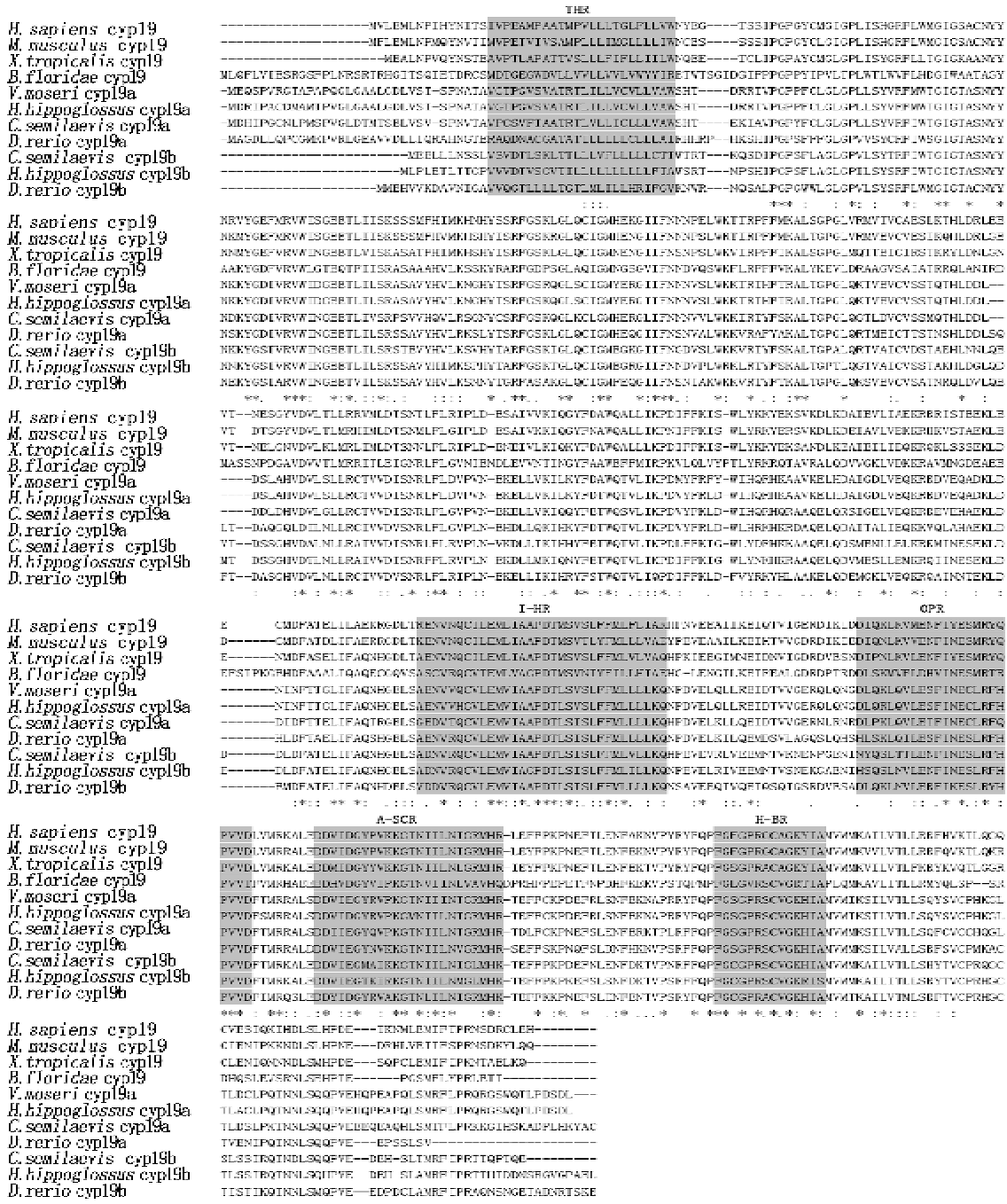


图4 条斑星鲷 *CYP19a* 氨基酸与其它物种 *CYP19* 氨基酸序列的比较

人: *H. sapiens*, 小鼠: *M. musculus*, 爪蟾: *X. tropicalis*, 文昌鱼: *B. floridae*, 半滑舌鳎: *C. semilaevis*, 庸鲷: *H. hippoglossus*, 斑马鱼: *D. rerio*, 条斑星鲷: *V. moseri*。

I-HR: I-螺旋区; 相同的氨基酸, 高度保守的氨基酸, 比较保守的氨基酸, 分别以 (*), (:), (-) 表示。

Fig. 4 Alignment amino acid of *Verasper moseri* *CYP19a* with other species

I-HR: I-helix region. The identical, highly conserved, and less conserved amino acid residues were indicated by (*), (:), (-), respectively.

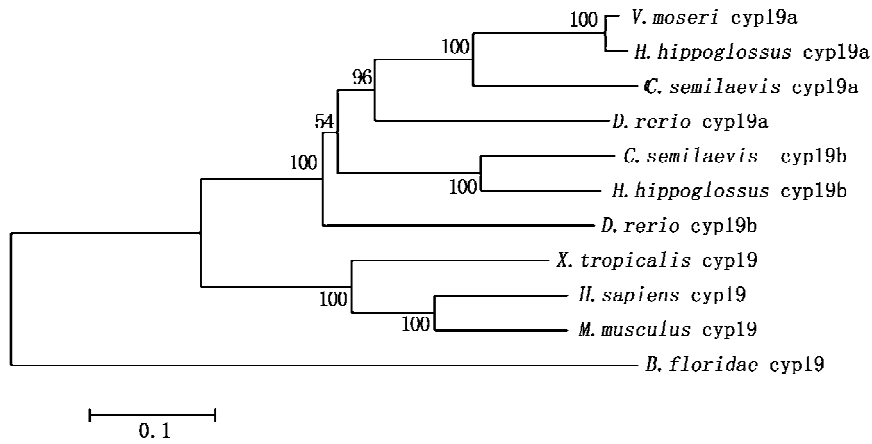


图5 基于 MEGA 4.0 中的 NJ 方法的条斑星鲷 *CYP19a* 与其它物种分子进化树聚类分析分支上的数字代表自展值。

Fig.5 Phylogenetic tree of the *CYP19a* from *Verasper moseri* and other vertebrates in MEGA 4.0

Program based on genetic distance by using NJ method

The number in the branch is the bootstrap value.

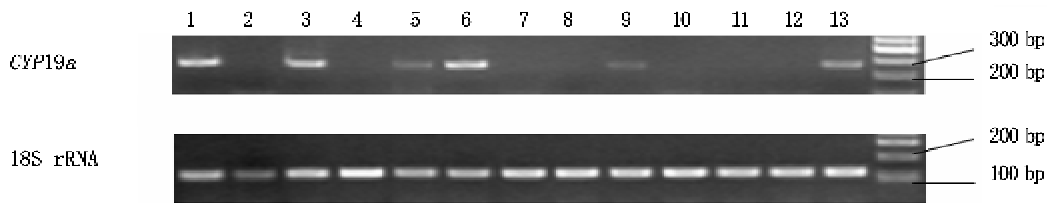


图6 *CYP19a* 基因在条斑星鲷各组织中的表达

1:卵巢;2:肌肉;3:脑;4:胃;5:肝脏;6:精巢;7:头肾;8:幽门盲囊;9:肾脏;10:脾;11:心;12:鳃;13:肠。

Fig.6 The mRNA expression of *CYP19a* gene in tissues of *Verasper moseri*

1: ovary;2: muscle;3: brain;4: stomach;5: liver;6: testis;7: head kidney;8: pyloric caecum; 9: kidney;10: spleen;11: heart;12: gill;13: intestine.

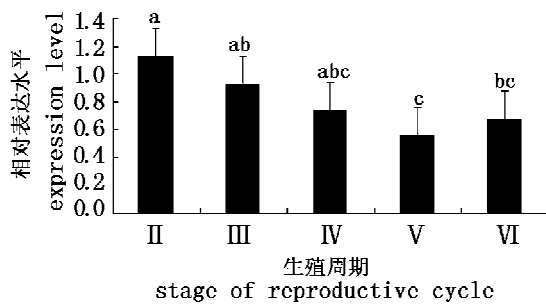


图7 条斑星鲷 *CYP19a* 基因在精巢生殖周期中的相对表达量 (*CYP19a*/18S)

Fig.7 Relative expression level of *CYP19a*(*CYP19a*/18S) in testes

3 讨论

作为一个与鱼类性别分化、发育及繁殖密切相关的基因,目前,在多种鱼类中都开展了芳香化

酶基因的研究^[10]。我们克隆得到的 cDNA 全长序列,经 Blastn 分析,得到相似性高的序列均为鱼类 *CYP19a* 基因。其中同源性最高的为庸鲷 *CYP19a* 基因,因此可以确定克隆得到的就是 *CYP19a* 基因。

无论是鱼类 *CYP19a* 和 *CYP19b* 还是其它物种的 *CYP19*,都存在相对保守区域即跨膜区、I-螺旋区、Ozol 肽区、芳香化酶特异的保守区和血红素结合区^[11]。将条斑星鲷 *CYP19a* 氨基酸序列与其它鱼类 *CYP19a*/*CYP19b* 及人类、小家鼠、爪蟾 *CYP19* 氨基酸序列进行多重比较发现有多氨基酸位点是保守的,且本实验得到的氨基酸序列也具有以上特征,这说明条斑星鲷 *CYP19a* 同其它物种 *CYP19* 在催化活性上很可能也是保守的。

雌激素的生成过程是由一个包含微粒体细胞色素 P450 芳香化酶和黄素蛋白 NADPH-细胞色

素 P450 还原酶的复合酶所催化^[12]。而雌激素在鱼类卵黄生成^[13]、生殖细胞发育^[14]、性逆转^[15]等过程中起关键作用,这充分说明了芳香化酶的生理重要性。在亚细胞水平,芳香化酶分布于类固醇生成细胞的滑面内质网膜上^[4]。mRNA 的组织表达不仅取决于鱼的种类,还取决于鱼的性别、年龄甚至是所处分期^[16]。P450aromA 和 P450aromB 主要表达组织都是脑、性腺,同时在其它组织如脑垂体、脾、头肾、肾脏、肝脏等都至少有一种或两种芳香化酶 mRNA 表达^[4]。条斑星鲮 P450aromA mRNA 也主要是在脑以及性腺(精巢和卵巢)中表达,其余组织只有肝脏、肾脏、肠中有少量表达,这一结果与星鲮亲缘关系很近的庸鲮 P450aromA mRNA 表达情况相似^[17]。

P450 芳香化酶由 *CYP19* 基因编码,而 *CYP19* 基因的调控直接影响到雄激素向雌激素的转化效率^[4]。在脊椎动物中 *CYP19* 基因高度保守,例如人类、小鼠、大鼠、牛、珍珠鸟和鸡等鸟类、爬行动物、斑马鱼和青鳉(*Oryzias latipes*)等鱼类^[1]。哺乳动物 P450arom 在许多组织都有表达,包括性腺、皮肤、脂肪组织、胎盘以及脑等^[18]。*CYP19* 基因转录受多个组织特异性启动区调控,其中性腺和脑的组织特异性启动子在人类、牛甚至鸟类中都很保守,由此推断控制 *CYP19* 在性腺和脑中表达的调控元件在不同物种间是高度保守的^[11]。目前,对人、羊、兔等高等动物的 *CYP19* 组织特异性表达转录起始位点都进行了研究^[19]。人类 *CYP19* 基因包含 10 个外显子,不同组织的 *CYP19* 转录产物的第一外显子也不同,在其第一外显子上游都具有组织特异性的启动子。尽管 *CYP19* 转录产物在 5'非编码区有所不同,但是由于第一外显子并不编码氨基酸,所以不同组织的 P450arom 蛋白有着相同的氨基酸序列^[20]。

作为在睾酮转化为雌二醇过程中起芳香化作用的酶,P450arom 也与雄鱼的生殖、发育功能相关^[21]。我们分析了 *CYP19a* 在精巢生殖周期中的表达情况,结果条斑星鲮 *CYP19a* 在 II 期表达最为丰富,这可能是因为 II 期的鱼正处在生长发育期,此时雌二醇能促进生长激素释放^[22],从而促进鱼体生长发育。在 III、IV、V 期表达量逐渐降低,V 期时达到最低值,VI 期时 *CYP19a* 表达量又有所回升,说明雌二醇在精巢生殖周期中可能起负调节作用,这与雌二醇能够抑制虹鳟离体精巢

产生 17 α , 20 β -二羟黄体酮,进而影响到其性成熟和生殖行为相一致^[23]。

在硬骨鱼类中,P450arom 主要在中枢神经系统和性腺表达。卵巢颗粒细胞中存在 P450arom,而颗粒细胞恰好能将雄激素转化为 17 β -雌二醇。抑制芳香化酶基因表达或是芳香化酶活性能够导致基因型雌鱼发育成表型雄鱼^[24],这些都表明芳香化酶在鱼类性腺分化和发育过程中具有重要生理学意义。

本实验首次克隆了条斑星鲮 *CYP19a* 基因,进行了组织及在精巢生殖周期中的表达分析,为进一步揭示雌激素在雄鱼繁殖生理中的作用机制奠定基础,同时也为查明 *CYP19a* 基因在鱼类生殖调控中的作用提供科学依据。

参考文献:

- [1] Trant J M, Gavasso S, Ackers J, et al. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*CYP19a* and *CYP19b*) in zebrafish fry (*Danio rerio*) [J]. *J Exp Zool*, 2001, 290(5): 475-483.
- [2] Yu J H, Tang Y K, Li J L. Cloning, structure, and expression pattern of the P450 Aromatase gene in rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. *Biochem Genet*, 2008, 46(5-6): 267-280.
- [3] Harada N, Honda S I, Hatano O. Aromatase inhibitors and enzyme stability [J]. *Endocr Relat Cancer*, 1999, 6(2): 211-218.
- [4] Piferrer F, Blazquez M. Aromatase distribution and regulation in fish [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2005, 31(2-3): 215-226.
- [5] Mitsuyo K, Gloria V C. 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(2): 740-750.
- [6] Chourasia T K, Joy K P. Ovarian P450 aromatase activity in the catfish *Heteropneustes fossilis*: Seasonal changes and effects of catecholestrogens [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 156(3): 537-543.
- [7] 刘筠. 养殖鱼类繁殖生理学 [M]. 北京: 农业出版社, 1993: 29-30.
- [8] 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 Res*, 1998, 26(7): 1628-1635.

- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5(2): 150–163.
- [10] Choi J Y, Park J G, Jeong H B, *et al.* Molecular cloning of cytochrome P450 aromatases in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis* [J]. *Comp Biochem Physiol Pt B*, 2005, 141(1): 49–59.
- [11] Zhang Y, Zhang W M, Zhang L H, *et al.* Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 92(1–2): 39–50.
- [12] Strobl P H, Moncaut N P, Gabriela C, *et al.* Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 143(1): 21–32.
- [13] Hiramatsu G, Matsubara T, Weber G, *et al.* Vitellogenesis in aquatic animals [J]. *Fisheries Sciences*, 2002, 68: 694–699.
- [14] Billard R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes [J]. *Aquaculture*, 1992, 100: 263–298.
- [15] Kroon F J, Munday P L, Westcott D A, *et al.* Aromatase pathway mediates sex change in each direction [J]. *Proc Roy Soc B-Biol Sci*, 2005, 272(1570): 1399–1405.
- [16] Blazquez M, Piferrer 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 Cell Endocrinol*, 2004, 219(1–2): 83–94.
- [17] van Nes S, Moe M, Andersen O. Molecular characterization and expression of two cyp19 (P450 aromatase) genes in embryos, larvae and adults of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 72(4): 437–449.
- [18] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G O, *et al.* Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis [J]. *Endocr Rev*, 1994, 15(3): 342–355.
- [19] Tong S K, Chung B C. Analysis of zebrafish cyp19 promoters [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 86(3–5): 381–386.
- [20] Chiang E F L, Yan Y L, Guiguen Y, *et al.* Two cyp19 (P450 Aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(4): 542–550.
- [21] Cevlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, 208(3–4): 191–364.
- [22] 温海深. 水产动物生理学 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2009: 309–310.
- [23] Vizziano D, Le Gac F, Fostier A. Effect of 17 beta-estradiol, testosterone, and 11-ketotestosterone on 17,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the rainbow trout testis [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1996, 104(2): 179–188.
- [24] Halm S, Rand-Weaver M, Sumpter J P, *et al.* Cloning and molecular characterization of an ovarian-derived (brain-like) P450 aromatase cDNA and development of a competitive RT-PCR assay to quantify its expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2001, 24(1): 49–62.

Cloning of *CYP19a* gene and expression analysis during the reproductive cycle in males of *Verasper moseri*

JIN Guo-xiong¹, WEN Hai-shen^{1*}, LIU Xue-zhou², HE Feng¹, LI Ji-fang¹, CHEN Cai-fang¹,
SHI Bao¹, ZHANG Jia-ren¹, CHEN Xiao-yan¹, SHI Dan¹, YANG Yan-ping¹

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Estrogens are key players in sexual differentiation and development and their production is essential for normal sexual development in both females and males. Cytochrome P450 aromatase is the terminal enzyme in steroidogenic pathway that converts androgens into estrogens. In most of vertebrates, P450arom is the product of the *CYP19* gene, which exists as a single copy per haploid genome. In contrast, there are two isoforms of aromatase in teleosts, which are encoded by two different genes, *CYP19a* and *CYP19b*, as well as have different distribution. This work describes the molecular cloning of the cDNA encoding the barfin flounder (*Verasper moseri*) gonad cytochrome P450 aromatase (*CYP19a*) by means of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), degenerate primers PCR amplification and 5'- and 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) analyses. We cloned the complete cDNA sequence of *CYP19a* gene and the length is 2 167 bp, encoding a protein of 523 amino acids. Via Blastn, the *CYP19a* cDNA displayed high identity with Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). Alignment analysis using barfin flounder *CYP19a* gene deduced amino acid sequence and amino acid sequences of other species showed that there were transmembrane helix region, I-helix region, Ozol's peptide region, aromatase-specific conserved region and heme-binding region in the deduced amino acid sequence. Phylogenetic analysis suggested the occurrence of a gene duplication for cytochrome P450 aromatase in the teleost lineage after its divergence from the tetrapods. Furthermore, the higher identity between barfin flounder P450aromA and P450aromAs of other teleosts suggested that they have the same origin. A semiquantitative PCR was developed to measure mRNA expression levels of *CYP19a* gene of barfin flounder. Expression analysis in different tissues demonstrated that P450aromA transcripts were highly abundant in brain, ovary and testis, less abundant in intestine, liver and kidney, showing that not only gonads can produce steroids but also other tissues have steroidogenic capability. And we analyzed the relative mRNA expression level of *CYP19a* in testes at different stages of reproductive cycle, there were the highest level at stage II and the lowest level at stage V. These changes in expression profiles may imply differences in the functionality of the enzyme between different stages, suggesting an important role for P450aromA in barfin flounder testes development.

Key words: *Verasper moseri*; cytochrome P450 aromatase; clone; mRNA expression

Corresponding author: WEN Hai-shen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn