

不同倍性鲫鲤性腺型芳香化酶 *cyp19a1a* 基因 cDNA 的克隆及表达

陶 敏, 刘少军*, 张卓慧, 陈 婕, 刘文彬, 刘 筠

(湖南师范大学生命科学学院,教育部蛋白质化学与发育生物学重点实验室,湖南 长沙 410081)

摘要: 为研究性腺型芳香化酶 P450aromA (*cyp19a1a* 基因编码)在不同倍性鲫鲤卵巢发育过程中的作用,实验采用同源克隆和 cDNA 末端快速扩增技术(RACE),获得了二倍体红鲫、三倍体湘云鲫和四倍体鲫鲤的 *cyp19a1a* 基因 cDNA 全长。结果显示,3 种鱼 *cyp19a1a* 基因均编码 517 个氨基酸残基,而且编码的蛋白都包含 P450aromA 特有的跨膜螺旋区、I-螺旋区、Ozol's 肽区、芳香化酶特异保守区以及血红素结合区。采用 RT-PCR 分析 *cyp19a1a* 基因 mRNA 在 3 种不同倍性鱼类组织中的表达情况,结果显示,*cyp19a1a* 基因主要在实验鱼的卵巢中表达,其次在精巢、脑、脾脏有少量表达。采用实时荧光定量 PCR 对 *cyp19a1a* 基因 mRNA 在不同倍性鱼卵巢中的表达进行分析,结果发现,*cyp19a1a* 基因在不同倍性鱼的非繁殖期卵巢的表达都高于繁殖期卵巢,并且在繁殖期和非繁殖期,*cyp19a1a* 基因在三倍体湘云鲫的表达量高于二倍体红鲫和四倍体鲫鲤。采用免疫组织化学方法对 CYP19A 蛋白在不同倍性鲫鲤卵巢中的定位进行分析,结果发现,CYP19A 蛋白主要定位在滤泡细胞、Ⅳ时相卵母细胞的放射膜上以及Ⅱ时相卵母细胞的卵浆中。研究表明,性腺型芳香化酶在不同倍性鲫鲤卵巢发育过程中的表达存在一定的差异性,三倍体鱼 *cyp19a1a* 基因 mRNA 水平表达异常,推测与其不育有关联性。

关键词: 不同倍性鲫鲤;性腺型芳香化酶;卵巢发育;mRNA 表达;组织定位

中图分类号: Q 786; S 965.1

文献标志码: A

P450 芳香化酶也称芳香化酶或雌性激素合成酶,是将雄激素转化为雌激素的关键限速酶^[1]。研究表明,雌激素在性别分化、卵巢滤泡发育以及维持雌性性征等方面起着重要作用,特别是雌激素中的雌二醇参与了许多关键的过程,包括生长、发育和繁殖等。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^[2]。迄今为止,学者们发现绝大部分脊椎动物只存在一个拷贝的芳香化酶基因,主要依靠启动子和非翻译外显子的选择性拼接从而在不同组织表达^[3]。但也有研究表明,在硬骨鱼类中,P450 芳香化酶是由两种不同的基因编码形成的,它们是性腺型芳香化酶 P450aromA (*cyp19a1a* 基因编

码)和脑型芳香化酶 P450aromB (*cyp19a1b* 基因编码)^[4-5]。前者主要在卵巢中表达,参与雌激素生物合成以及卵巢分化,在性腺分化中起主要作用;后者主要在脑中表达。而且,两种基因的排列顺序也不同,它们之间最多存在 60% 的相同区域,因此,被认为是染色体复制的结果^[6]。目前,已有 10 多种鱼类 *cyp19a1a* 基因被克隆,如鲤 (*Cyprinus carpio*)^[7]、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[8]、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)^[9]、赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)^[10]、条斑星鲈 (*Verasper moseri*) 等^[11]。此外,研究还表明,*cyp19a1a* 基因 mRNA 在卵黄早期发生过程中表达显著上升,但是在卵黄完全生成之后或者排卵

收稿日期:2014-06-27 修回日期:2014-07-17

资助项目:湖南省教育厅资助科研项目(14B115,13C523);湖南省自然科学基金项目(14JJ2148);国家自然科学基金重大国际合作项目(31210103918);湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心(20134486)

通信作者:刘少军,E-mail:lsj@hunnu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

后表达会显著下降^[12]。

以红鲫(*Carassius auratus* red var.)为母本,鲤(*Cyprinus carpio*)为父本,两者交配形成了杂交第一代鲫鲤 F_1 。在鲫鲤 F_1 发现部分可育后代,它们自交获得二倍体 F_2 ^[13],一些二倍体 F_2 能产生二倍体卵子和二倍体精子,它们受精后在 F_3 中形成了两性可育的异源四倍体鲫鲤,经过连续繁殖,形成了一个雌雄两性可育、遗传性状稳定的异源四倍体鲫鲤群体($F_3 - F_{23}$),这是世界上在鱼类乃至脊椎动物中人工培育的首例两性可育异源四倍体鱼类^[14-15]。该品系的建立不仅为形成一个染色体数目为200的新鱼种奠定了坚实基础,为探讨自然界鱼类多倍体的起源和进化提供了重要研究模型,而且为大规模生产不育三倍体鱼提供了大量四倍体鱼亲本。利用异源四倍体鲫鲤作为父本,以二倍体日本白鲫(*Carassius cuvieri*)作为母本,制备了具有多种优势的不育三倍体湘云鲫。四倍体、三倍体、二倍体鱼不但在遗传组成上存在明显差异,在表型上也存在明显差异。在生长速度方面,三倍体湘云鲫快于四倍体鲫鲤和二倍体红鲫,在繁殖特性上三倍体湘云鲫是不育的^[16]。三倍体鱼的不育性机制与其遗传(染色体)^[17]、内分泌(HPG轴)^[18]、生殖(性腺发育)^[19-20]等一系列异常性有密切联系。已有的研究也表明,多种生殖相关基因(如*Dmc1*, *Gnrh2*, *Gth*, *Gthr*等)^[21-22]在三倍体湘云鲫中表达异常,三倍体湘云鲫的*Piwi*和*piRNA*的表达也出现异常^[23]。

多年以来,脊椎动物的性腺发育机制一直是生物学领域的研究热点。关于硬骨类性腺发育相关基因*cyp19a1a*的研究在国内外已有大量报道,但是在多倍体鱼类研究中鲜有报道。不同倍性鲫鲤的形成成为研究多倍体物种中的*cyp19a1a*基因的功能与作用机制提供了很好的实验材料。本实验采用同源克隆和RACE等方法,获得了不同倍性鲫鲤的性腺型芳香化酶*cyp19a1a*基因cDNA全长,并且采用RT-PCR和实时荧光定量PCR对*cyp19a1a*基因mRNA在不同倍性鱼不同组织的表达进行比较分析,同时采用免疫组织化学方法开展了CYP19A蛋白在不同倍性鲫鲤卵巢中定位分析,旨在为进一步研究*cyp19a1a*基因在不同倍性鲫鲤性腺发育中的功能以及为三倍体鱼不育和四倍体鱼可育提供科学依据,同时为不同倍性鱼类的繁殖生理和繁殖技术提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼均同期(4月和10月)取自湖南师范大学教育部多倍体鱼繁殖及育种技术工程研究中心,为池养健康的二倍体红鲫($2n = 100$)、三倍体湘云鲫($3n = 150$)和异源四倍体鲫鲤($4n = 200$)。实验鱼麻醉后分离实验所需组织,经处理后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中备用。

1.2 RNA的分离和cDNA第一条链的获得

不同倍性的鱼随机各取6条,运用TRIzol试剂(Invitrogen TRIzol[®] Reagent)分别从性腺(卵巢或精巢)、脑、肾脏、肝脏、心脏、脾脏、鳃、肌肉中提取总RNA,将总RNA沉淀溶解于无核酸酶的水中,采用凝胶电泳检测其片段的完整性并用分光光度计测其浓度,以便后续的反转录。检测结果较好的总RNA立即进行反转录实验或于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

采用Fermentas(MBI)反转录试剂盒(RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit),合成cDNA第一条链。反转录后产物立即进行PCR扩增,或保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.3 cDNA编码区片段的克隆及末端分离

根据斑马鱼(*Danio rerio*, AF226620)、金鱼(*Carassius auratus*, AB009336)和鲤(EU375455)*cyp19a1a*基因中保守的氨基酸序列,使用软件Primer Premier 5.0设计兼并引物(表1)。利用该兼并引物通过PCR扩增获得了三种鱼的*cyp19a1a*基因cDNA编码区中间片段。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测到目的片段,继而将反应体系扩大,进行回收纯化。将回收的DNA片段克隆于pMD18-T载体。连接反应及细菌转化均按pMD18-T载体试剂盒(TaKaRa公司)说明书进行操作。通过菌液PCR及限制性酶切鉴定为阳性重组质粒克隆后,送上海生物工程公司测序。

3'末端的扩增 根据已克隆的*cyp19a1a*基因编码区部分cDNA序列合成特异3'-RACE正向引物3R1和3R2(表1)。首先以TaKaRa3'-Full RACE Core Set中的oligo dT-3sites Adaptor Primer为引物进行反转录反应,然后用另外两对引物进行套式PCR。第一次PCR用3' sites Adaptor Primer和3R1扩增;第二次PCR用3' sites Adaptor Primer和3R2扩增。

5'末端的扩增 使用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clonetech 公司)对不同倍性鱼 *cyp19a1a* 基因的 5'末端进行分离。根据已克隆的 *cyp19a1a* 部分 cDNA 序列设计了两个反向引物 5R1 和 5R2(表 1)。首先使用 SMART II™ A Oligonucleotide 和 5'-RACE CDS Primer A 引物(表 1), PowerScript™ Reverse Transcriptase

进行反转录反应。然后用另外两对引物进行套式 PCR。第一次 PCR 用 UPM 和 5R1 进行 PCR 扩增;第二次 PCR 用 NUP 和 5R2 扩增。
通过对 3'-RACE 和 5'-RACE 的产物进行回收、连接、转化、鉴定及测序,获得了这 3 种鱼 *cyp19a1a* 基因的全长 cDNA 序列。

表 1 本研究所使用的引物
Tab.1 Primers used for this study

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence(from 5'-3')	用途 usage
<i>cyp19a1a</i> (+)	GGKACKGCCAGCAACTAC	克隆
<i>cyp19a1a</i> (-)	CAGCCCTTSACAGGACAC	克隆
3'sites Adaptor Primer	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	3'-RACE
3R1	AGTTTTATCAATGAGTCGCTCCG	3'-RACE
3R2	ACATCATACTGAATGTGGGTCGG	3'-RACE
SMART II™ A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	5'-RACE
5'-RACE CDS Primer A	(T)25V N(V = A/G/ C;N = A/ C/G/T)	5'-RACE
UPM Primer(Mix)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT(long) CTAATACGACTCACTATAGGGC(short)	5'-RACE
NUP Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'-RACE
5R1	TCCCAAAGCGTGAGGTGTAGAG	5'-RACE
5R2	ACCCGCACAATGTCTCCGTA	5'-RACE
<i>cyp19a1a</i> -S	CAGGAAGCATAAGAGAGACG	RT-PCR
<i>cyp19a1a</i> -A	CAACAGCAACATGAAGAACA	RT-PCR
<i>Rtcyp19a1a</i> -S	TTTGACACCTGGCAGACAGTATTA	Real-time PCR
<i>Rtcyp19a1a</i> -A	GCAACTCCTGAGCGTCTCTCTTAT	Real-time PCR
<i>β-actin</i> -S	TCTACAACGAGCTGCGTGTTG	内参基因
<i>β-actin</i> -A	CCTGTTGGCTTTGGGATTGA	内参基因

1.4 同源性分析

在 NCBI 的 GenBank 数据库中搜索脊椎动物 CYP19A 的氨基酸序列,选取其中 8 种代表性脊椎动物的 CYP19A 氨基酸序列:斑马鱼(AAK00643)、金鱼(AEX97168)、鲤(ACB13197)、大西洋鲑鱼(ADM15036)、日本青鳉(NP_001265808)、日本鳗鲡(AAS47028)、小家鼠(NP_031836)、人(NP_112503)。运用 DNASTAR 对“1.3”中获得 3 种鱼 *cyp19a1a* 基因的全长 cDNA 序列进行分析,分别找到其开放阅读框,推导出相应的氨基酸序列。采用 EBI 提供的 Clustalw 在线服务([http://www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

[Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/))对这 3 种鱼与搜索的其他 8 个物种进行序列比对分析并人工校正。然后通过 MEGA 4. 1^[24] 软件构件邻接系统进化树(Neighbour-Joining, NJ),同时采用 Bootstrap 重复检验 1 000 次该进化树的置信度。

1.5 *cyp19a1a* 基因在不同倍性鲫鲤的表达分析

采用 RT-PCR 分析 *cyp19a1a* 基因在不同倍性鱼的卵巢、精巢、脑、肾脏、肝脏、心脏、脾脏、鳃、肌肉等组织的表达情况。根据已测定的不同倍性鱼 *cyp19a1a* 编码区中完全相同的序列设计特异引物 *cyp19a1a*-S 和 *cyp19a1a*-A(表 1)进行 PCR 扩增,β-actin 基因作为内参基因(表 1)。

采用 Real-time PCR 的方法研究 *cyp19a1a* 基因(β -*actin* 基因作内参)在不同倍性鱼卵巢中的转录水平。根据测序获得不同倍性鱼编码区中完全相同序列,设计了荧光实时定量 PCR 特异引物 Rtcyp19a1a-S 和 Rtcyp19a1a-A(表 1)。PCR 反应及检测在 Prism7500 Sequence Detection System (ABI 公司)上进行,操作严格遵照仪器的操作程序。为保证 PCR 结果的准确性,对每一种样品的分析都重复了 4 次。反应条件为 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 40 个循环。参照 Livak 等^[25]提出的相对标准曲线法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 对相对定量的结果进行分析,得到不同倍性鱼的相对表达量图谱。采用 SPSS 13.0 软件的单因素方差分析检测各组间的显著性差异。当组间 $P < 0.05$ 时被判定为显著性差异。

1.6 免疫组织化学分析

取不同倍性鲫鱼卵巢,用 4% 多聚甲醛固定过夜,用 70% 酒精清洗 2 次,最后用 70% 酒精固定并放在 -20 °C 冰箱中备用。按照常规的实验方法对材料进行脱水、二甲苯透明等过程,用石蜡进行包埋,将包埋好的实验材料切片,厚度为 6 μ m。用 100% 二甲苯浸泡脱蜡,继而用酒精梯度复水,然后在 10 mmol/L 柠檬酸钠(pH 6.0)中煮沸 10 min 进行抗原修复,接着用 3% H_2O_2 进行内源性过氧化物酶活性的清除、5% 山羊血清封闭,一抗湿盒 4 °C 孵育过夜后,用 PBS 清洗 3 次,然后用酶标二抗进行杂交 1 h, PBS 清洗后滴加 HRP(过氧化氢酶)标记链霉亲和素,最后用 DAB(二氨基联苯胺)显色检测信号。用 Olympus 显微镜观察、彩色摄影。

2 结果

2.1 不同倍性鱼 *cyp19a1a* 基因 cDNA 全长序列的克隆及分析

对扩增获得的不同倍性鱼 *cyp19a1a* 基因编码区中间片段进行测序,用 Jellyfish 软件和 NCBI 网址的 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对测序结果进行同源性分析。BLAST 分析发现,该片段为斑马鱼、金鱼和鲤 *cyp19a1a* 基因的同源片段。分别对获得二倍体红鲫,三倍体湘云鲫,四倍体鲫鱼中 *cyp19a1a* 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 产物进行测序,与之前扩增部分编码区序

列拼接后可获得不同倍性鲫鱼 *cyp19a1a* 基因 cDNA 全长。其中二倍体红鲫 cDNA 全长 1 954 bp (GenBank 登录号: KC147009), 三倍体湘云鲫 cDNA 全长为 1 960 bp (GenBank 登录号: KC147010), 四倍体鲫鱼 cDNA 全长为 1 782 bp (GenBank 登录号: KC147011)。分离的这 3 种鱼 *cyp19a1a* 基因的开放阅读框都为 1 554 bp, 编码 517 个氨基酸残基。

2.2 同源性分析和分子进化树的构建

应用 Clustal W 软件进行的同源性分析表明在所比较的 11 个物种中,不同倍性鲫鱼 CYP19A 氨基酸序列与其他物种的 CYP19A 氨基酸序列相比较为保守,特别是不同鲤科鱼类的 CYP19A 氨基酸序列保守性很强,且在 I-螺旋区、Ozol's 肽区、芳香化酶特异保守区、血红素结合区最为保守(图 1)。

基于以上获得的氨基酸序列,利用 Mega 4.1 构建了 NJ 系统进化树(图 2)。与相似性的分析相一致,这 6 种鲤科鱼类,即红鲫、三倍体湘云鲫、四倍体鲫鱼与金鱼、鲤、斑马鱼的 CYP19A 氨基酸序列聚类为一支,与其他硬骨鱼类的分化较远。整个鱼类作为一个大支聚类在一起,与此相对的是其他几个非鱼类的脊椎动物则聚类为一个支。该系统进化树与传统分类学的分类相吻合。

2.3 *cyp19a1a* 基因在不同倍性鲫鱼的表达分析

对三倍体湘云鲫的卵巢、精巢、脑、肾脏、肝脏、心脏、脾脏、鳃、肌肉 9 种组织的 *cyp19a1a* 基因进行 RT-PCR 扩增,结果显示 *cyp19a1a* 基因主要在三倍体鱼的卵巢中表达,其次在精巢、脑、脾脏有少量表达。同时,在以上所有组织中均有阳性对照 β -*actin* 基因的扩增带。*cyp19a1a* 基因在其他不同倍性鱼的上述 9 种组织中的表达情况与湘云鲫的表达情况基本一致。

采用实时荧光定量 PCR 对 *cyp19a1a* 基因 mRNA 在不同倍性鱼卵巢中的表达进行分析,结果显示, *cyp19a1a* 基因在不同倍性鱼的非繁殖期卵巢的表达都高于繁殖期卵巢,并且在繁殖期和非繁殖期, *cyp19a1a* 基因在三倍体湘云鲫的表达量都高于二倍体红鲫和异源四倍体鲫鱼(图 3)。溶解曲线(dissociation curve)显示,荧光实时定量 PCR 扩增时产物单一符合实验标准和要求。

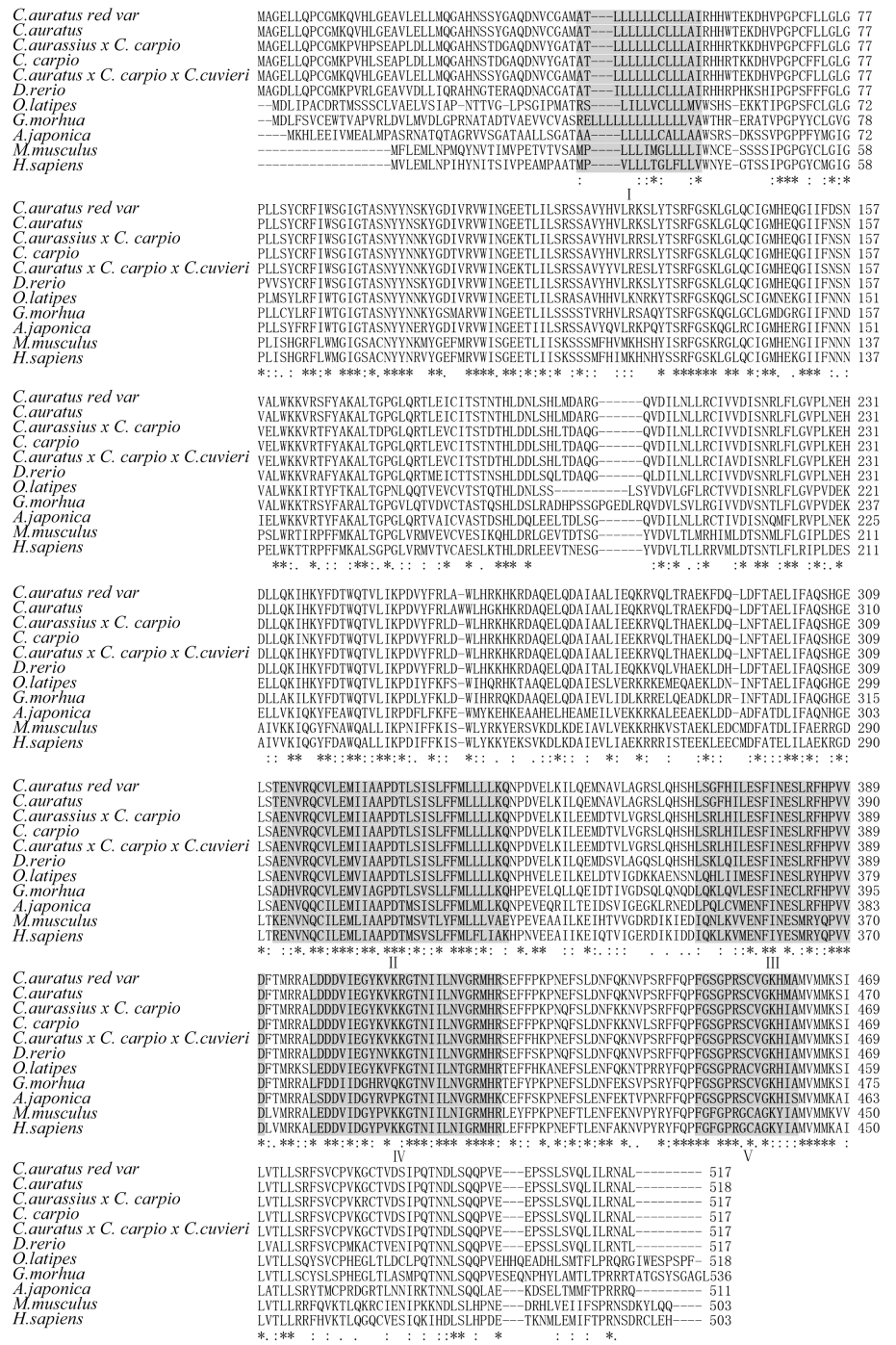


图 1 不同脊椎动物的 CYP19A 氨基酸的同源性分析

阴影区 I – V 依次表示:跨膜螺旋区、I-螺旋区、Ozol’s 肽区、芳香化酶特异保守区、血红素结合区。“*”表示保守的氨基酸残基,“:”表示保守替换的氨基酸残基,“.”表示相似性氨基酸

C. auratus red var. (红鲫;KC147009); *C. auratus* (金鱼;AEX97168); *C. carassius* × *C. carpio* (四倍体鲫鲤;KC147011); *C. carpio* (鲤;ACB13197); *C. auratus* × *C. carpio* × *C. cuvieri* (三倍体湘云鲫;KC147010); *D. rerio* (斑马鱼;AAK00643); *O. latipes* (日本青鲋;NP_001265808); *G. morhua* (大西洋鲑鱼;ADM15036); *A. japonica* (日本鳗鲡;AAS47028); *M. musculus* (小鼠;NP_031836); *H. sapiens* (人;NP_112503)

Fig. 1 Homology analysis of CYP19A protein in different vertebrates

Shadow regions I – V indicate successively: transmembrane helix region, I-helix region, Ozol’s peptide region, aromatase-specific conserved region and heme-binding region. * is used to indicate highly conserved amino acid residue; ; indicates conservative amino acid residue which was replaced, . represents similar amino acid

C. auratus red var. (KC147009); *C. auratus* (AEX97168); *C. carassius* × *C. carpio* (KC147011); *C. carpio* (ACB13197); *C. auratus* × *C. carpio* × *C. cuvieri* (KC147010); *D. rerio* (AAK00643); *O. latipes* (NP_001265808); *G. morhua* (ADM15036); *A. japonica* (AAS47028); *M. musculus* (NP_031836); *H. sapiens* (NP_112503)

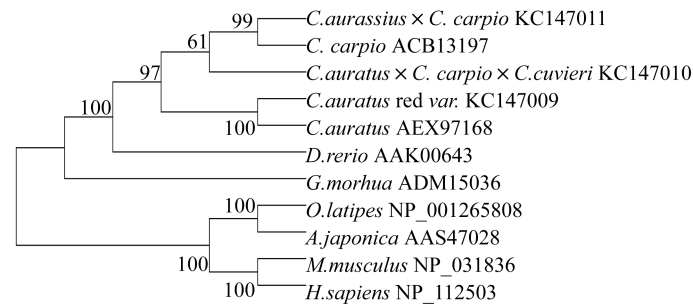


图2 基于不同脊椎动物的 CYP19A 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

节点上的数字表示 bootstrap 的置信度；编号代表 Genebank 序列号

Fig. 2 The phylogenetic tree generated by NJ method based on CYP19A in different species

Bootstrap values are indicated at nodes; the sequence number comes from Genebank

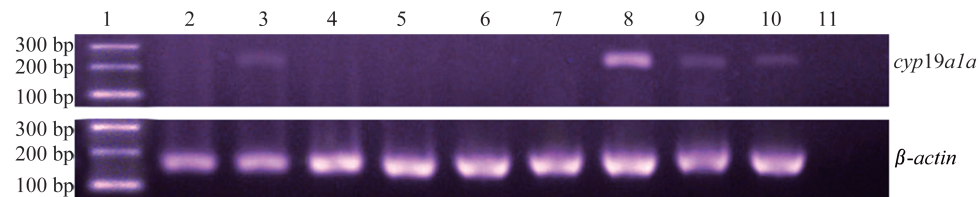


图3 *cyp19a1a* 在三倍体湘云鲫不同组织的表达图谱 (RT-PCR 结果)

1. 分子标记, 2. 心脏, 3. 脾脏, 4. 肝脏, 5. 肾脏, 6. 垂体, 7. 肌肉, 8. 卵巢, 9. 精巢, 10. 脑, 11. 阴性对照

Fig. 3 The tissue distribution of *cyp19a1a* mRNA in triploids by RT-PCR

1. Marker, 2. heart, 3. liver, 4. spleen, 5. kidney, 6. pituitary, 7. muscle, 8. ovary, 9. tests, 10. brain, 11. negative control

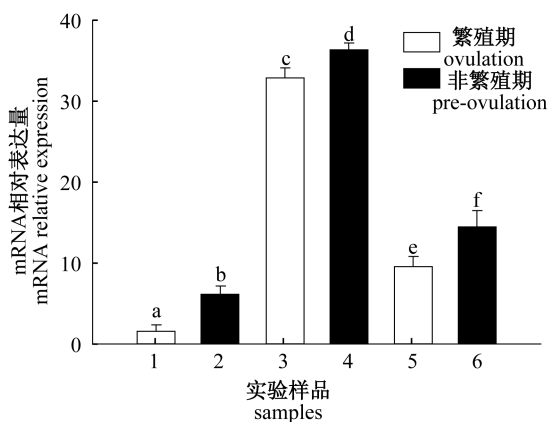


图4 *cyp19a1a* 在非繁殖期和繁殖期

不同倍性鱼卵巢中 Real-time PCR 结果

1, 2. 二倍体卵巢; 3, 4. 三倍体湘云鲫卵巢; 5, 6. 四倍体鲫卵巢。含有不同字母代表组间有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Expression profile of *cyp19a1a* in the ovaries of different ploidy fishes

1, 2. ovary of red crucian carp; 3, 4. ovary of triploid fish; 5, 6. ovary of tetraploid fish. Different letters indicate significant differences between expression level ($P < 0.05$)

2.4 CYP19A 蛋白在不同倍性鲫鲤的卵巢定位分析

二倍体红鲫的卵巢中充满大量Ⅳ时相卵母细胞及少量Ⅱ时相卵母细胞, 免疫组化的结果显示, 在二倍体红鲫中 CYP19A 主要在滤泡细胞中表达, 另外在Ⅱ时相卵细胞的胞浆和较成熟的卵细胞放射膜周边也有表达 (图 5-a 箭头所示)。

三倍体湘云鲫成熟季节的卵巢中主要由体积较小呈囊状排列的卵原细胞及少量Ⅱ、Ⅲ时相卵母细胞组成。免疫组化的结果显示, CYP19A 蛋白在卵原细胞中大面积表达和Ⅱ时相卵细胞的胞浆中表达 (图 5-b 箭头所示)。

异源四倍体鲫鲤的卵巢与二倍体红鲫相似, 卵巢中可见大量Ⅳ时相卵母细胞及一些Ⅱ时相卵母细胞, CYP19A 主要在滤泡细胞和Ⅱ时相卵细胞的胞浆及较成熟的卵细胞放射膜周边表达 (图 5-c 箭头所示)。

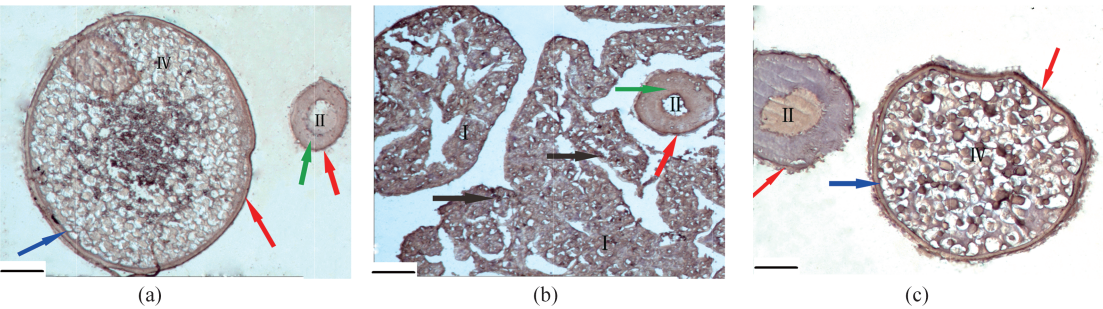


图 5 CYP19A 蛋白在不同倍性鲫鲤的卵巢定位

(a) 二倍体红鲫卵巢,CYP19A 蛋白主要定位在滤泡细胞(红色箭头),IV 时相卵母细胞的放射膜(蓝色箭头),II 时相的卵浆(绿色箭头);(b) 三倍体湘云鲫卵巢,CYP19A 蛋白在卵原细胞中大面积表达(黑色箭头)和定位在滤泡细胞(红色箭头)、II 时相卵母细胞的胞浆中(绿色箭头);(c) 四倍体鲫鲤卵巢,CYP19A 蛋白主要定位在滤泡细胞(红色箭头),IV 时相卵母细胞的放射膜(蓝色箭头)。标尺为 200 μm

Fig. 5 Distribution of CYP19A in the ovaries of different ploidy fishes

(a) ovaries of red crucian carp,CYP19A are expressed in follicle cells(red arrow),zona radiata(blue arrow) in IV oocytes, and stage II (green arrow); (b) ovaries of triploid fish,CYP19A are abundantly expressed in oogonium(black arrow),zona radiata(blue arrow) in IV oocytes, and stage II (green arrow); (c) ovaries of tetraploid fish,CYP19A are expressed in follicle cells(red arrow), and zona radiata (blue arrow) in IV oocytes. Scale bar:200 μm

3 讨论

已有的研究表明,三倍体湘云鲫的性腺具有三种类型:精巢型、卵巢型和脂肪型,这些结构都不能产生正常配子^[19-20]。鱼类的性腺发育与配子成熟主要受到下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)为核心的神经和内分泌系统调控,下丘脑分泌促性腺激素释放激素(GnRH: gonadotrophin releasing hormone),激发脑垂体分泌促性腺激素(GTH:gonadotropic hormone)与性腺表面特异的促性腺激素受体(GTHR: gonadotropin receptor)结合,促使性腺分泌性类固醇激素,从而使性腺发育成熟^[16]。已有的研究表明,HPG 轴相关基因(如 *Gnrh2*,*Gth*,*Gthr* 等)^[22]在三倍体湘云鲫中表达失常。雌激素在鱼类卵黄生成、生殖细胞发育、性逆转等过程中起关键作用^[26],而 P450 芳香化酶主要作用是将雄激素转化为雌激素^[1-2],因此,P450 芳香化酶在鱼类卵巢发育中起着较为重要的作用。

为了进一步探讨 P450aromA(*cyp19a1a* 基因编码)在不同倍性鲫鲤卵巢发育过程中的作用,本实验首次获得了二倍体红鲫、三倍体湘云鲫和四倍体鲫鲤的 *cyp19a1a* 基因 cDNA 全序列。通过同源性分析,发现这 3 种不同倍性鱼 *cyp19a1a* 基因编码的氨基酸序列相似性高达 91%,并且,基于不同物种 CYP19A 氨基酸序列构建的 NJ 系

统进化树表明,CYP19A 蛋白在鲤科鱼类中具有高度保守性。根据氨基酸序列的高度保守性和推导蛋白具有的 CYP19A 蛋白特殊的结构域,可以确定实验获得的正是不同倍性鲫鲤的 *cyp19a1a* 基因。同时,三倍体湘云鲫和四倍体鲫鲤的 *cyp19a1a* 基因并不与其原始亲本完全一致,因此,推测染色体配对时的重组交换可能导致三倍体和四倍体鱼 *cyp19a1a* 基因与原始亲本的差异,但有待进一步深入分析。

本实验结果显示,*cyp19a1a* 基因 mRNA 在不同倍性鲫鲤的表达具有组织特异性,在卵巢中的表达最高,在大脑、精巢和脾脏中有微弱表达,该结果与 *cyp19a1a* 基因在斑马鱼和鲤中表达模式相一致^[5,7],进一步表明,该基因在不同倍性鱼中的功能与其他鱼类的 *cyp19a1a* 基因的功能相一致,都是与芳香化酶的生理功能相关,促进卵巢的发育和性腺分化。

刘少军等^[20]研究认为,在繁殖季节,三倍体湘云鲫卵巢中有很多体积较小成囊状排列的卵原细胞和少量初级卵母细胞,卵母细胞主要停留在 I、II 时相,少量进入第 III、IV 时相;而红鲫和四倍体鲫鲤的卵母细胞主要以 I、II、IV 时相卵母细胞存在;在非繁殖季节,三倍体湘云鲫主要以 I 时相卵母细胞存在,而红鲫和四倍体鲫鲤的卵巢以 I、II 时相卵母细胞存在。Piferrer 等^[12]则认为,*cyp19a1a* 基因 mRNA 在卵黄早期发生过程中表

达显著上升,但是在卵黄完全生成之后或者排卵后表达会显著下降。本研究结果发现,*cyp19a1a* 基因在非繁殖季节二倍体红鲫和四倍体鲫鲤鱼巢表达会比成熟期的卵巢表达高,而 *cyp19a1a* 基因在繁殖期和非繁殖季节三倍体鱼卵巢的表达差异不大,并且在各个时期三倍体鱼 *cyp19a1a* 基因在不同组织的表达都是最高的。结合以前的性腺切片观察^[20],表明 *cyp19a1a* 基因在二倍体红鲫和四倍体鲫鲤鱼巢中的表达模式和其他鱼类一致,在成熟期趋向于下降;三倍体鱼则由于其卵巢不能正常发育,而使 *cyp19a1a* 基因在其卵巢的表达模式上与其他鱼类存在一定的差异性。此外,免疫组化结果显示,CYP19A 蛋白在二倍体红鲫和四倍体鲫鲤鱼巢中的组织定位情况与三倍体湘云鲫卵巢中的定位情况具有一定的差别,这可能也导致了三倍体湘云鲫卵巢中的 *cyp19a1a* 基因表达量明显高于其他两种鱼。同时,性腺型芳香化酶在不同倍性鲫鲤鱼巢发育过程中的表达存在一定的差异性,三倍体鱼 *cyp19a1a* 基因 mRNA 水平表达异常,推测与其不育有关联性。

参考文献:

- [1] Ahmed S. Review of the molecular modelling studies of the cytochrome P-450 estrogen synthetase enzyme, aromatase [J]. Drug Design and Discovery, 1998, 15 (4) : 239 – 252.
- [2] Simpson E R, Clyne C, Rubin G, *et al.* Aromatase-a brief overview [J]. Annual Review of Physiology, 2002, 64 (1) : 93 – 127.
- [3] Harada N, Utsumi T, Takagi Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternate use of multiple exons 1 and promoter, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1993, 90 (23) : 11312 – 11316.
- [4] Tchoudakova A, Callard G V. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary [J]. Endocrinology, 1998, 139 (4) : 2179 – 2189.
- [5] Trant J M, Gavassa S, Ackers J, *et al.* Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes in zebrafish fry [J]. Journal of Experimental Zoology, 2001, 290 (5) : 475 – 483.
- [6] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, *et al.* Aromatase cytochrome P450 the enzyme responsible for estrogen biosynthesis [J]. Endocrine Reviews, 1994, 15 (3) : 342 – 353.
- [7] Barney M, Patil J G, Gunasekera R M, *et al.* Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): Sexual dimorphism and onset of ontogenic expression [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 156 (3) : 499 – 508.
- [8] Chang X T, Kobayashi T, Kajiura H, *et al.* Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 1997, 18 (1) : 57 – 66.
- [9] Ijiri S, Kazeto Y, Lokman P M, *et al.* Characterization of a cDNA encoding P-450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development [J]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 130 (2) : 193 – 203.
- [10] Zhang Y, Zhang W, Zhang L, *et al.* Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression [J]. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 92 : 39 – 50.
- [11] Jin G X, Wen H S, Liu X Z, *et al.* Cloning of CYP19a gene and expression analysis during the reproductive cycle in males of *Veras permoseri* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34 (2) : 194 – 203. [金国雄, 温海深, 柳学周, 等. 条斑星鲷 CYP19a 基因克隆及其在雄鱼生殖周期中的表达. 水产学报, 2010, 34 (2) : 194 – 203.]
- [12] Piferrer F, Blazquez M. Aromatase distribution and regulation in fish [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2005, 31 : 215 – 226.
- [13] Liu Y, Zhou G J. Cytological study on gonadal development of F₁ hybrids produced by crossing *Carassius auratus* (♀) with *Cyprinus carpio* (♂) [J]. Acta Hydrobiological Sinica, 1986, 10 (2) : 101 – 107. [刘筠, 周工健. 红鲫 (♀) × 湘江野鲤 (♂) 杂交一代生殖腺的细胞学研究. 水生生物学报, 1986, 10 (2) : 101 – 107.]
- [14] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, *et al.* The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. Aquaculture, 2001, 192 (2 – 4) : 171 – 186.

- [15] Babiak I, Dobosz S, Goryczko K, *et al.* Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa; the effect of processing and biological factors [J]. *Theriogenology*, 2002, 57(4): 1229 – 1249.
- [16] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes [J]. *Science China Series C: Life Sciences*, 2010, 53(4): 416 – 425.
- [17] Zhang C, He X X, Liu S J, *et al.* Chromosome pairing in meiosis I in allotetraploid hybrids and allotriploid Crucian Carp [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(1): 89 – 94.
- [18] Long Y, Liu S J, Huang W, *et al.* Comparative studies on histological and ultra-structure of the pituitary of different ploidy level fishes [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2006, 49(5): 446 – 453.
- [19] Liu S J, Sun Y D, Li S F, *et al.* Analysis of gonadosomatic indexes of the triploid crucian carp [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(2): 111 – 114. [刘少军, 孙远东, 黎双飞, 等. 三倍体湘云鲫性腺指数分析. *水产学报*, 2002, 26(2): 111 – 114.]
- [20] Liu S J, Hu F, Zhou G J, *et al.* Gonadal structure of triploid crucian carp produced by crossing allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* red var. (♀) × *Cyprinus carpio* L. (♂) with *Carassius auratus cuvieri* [J]. *Acta Hydrobiological Sinica*, 2002, 24(4): 301 – 306. [刘少军, 胡芳, 周工建, 等. 三倍体湘云鲫繁殖季节的性腺结构观察. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 301 – 306.]
- [21] Tao M, Liu S J, Long Y, *et al.* The cloning of *Dmc1* cDNAs and a comparative study of its expression in different ploidy cyprinid fishes [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, 51(1): 38 – 46.
- [22] Long Y, Tao M, Liu S J, *et al.* Differential expression of *Gnrh2*, *Gthβ* and *Gthr* genes in sterile triploids and fertile tetraploids [J]. *Cell and Tissue Research*, 2009, 338(1): 151 – 159.
- [23] Zhou Y, Zhong H, Liu S J, *et al.* Elevated expression of Piwi and piRNAs in ovaries of triploid crucian carp [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 383(1–2): 1 – 9.
- [24] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596 – 1599.
- [25] Livark K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [26] Hiramatsu G, Matsubara T, Weber G, *et al.* Vitellogenesis in aquatic animals [J]. *Fisheries Sciences*, 2002, 68(suppl. I): 694 – 699.

Molecular cloning and comparative expression patterns of *cyp19a1a* of gene in different ploidy cyprinid fishes

TAO Min, LIU Shaojun*, ZHANG Zhuohui, CHEN Jie, LIU Wenbin, LIU Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Education Ministry of China,
College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: In order to study the role of the gonad-specific aromatase (P450aromA) encoded by *cyp19a1a* gene in ovary development of different ploidy cyprinid fishes, molecular cloning and comparative expression patterns of *cyp19a1a* of gene in different ploidy cyprinid fishes were carried out. By PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE), the full length cDNAs of *cyp19a1a* in diploid red crucian carp (*Carassius auratus* red var.), triploid crucian carp and allotetraploid hybrids were obtained. Our data showed that all the cDNAs of *cyp19a1a* gene in the three different ploidy fishes encode 517 amino acids, which contains transmembrane helix region, I-helix region, Ozol's peptide region, aromatase-specific conserved region and heme-binding region. By RT-PCR using specific primers against the same sequences of coding regions in different ploidy cyprinid fishes, a comparative study of the expression pattern of *cyp19a1a* was carried out. This result showed that *cyp19a1a* was preferentially expressed in ovaries of these three fishes, but also was present at much lower levels in testes, brains and spleens. The expression pattern of *cyp19a1a* in ovaries of different ploidy fishes from the pre-ovulation and the ovulation was also studied by Real-time PCR, and the results showed that the expression of this gene was greatly different among the three different ploidy fishes. In the ovulation and pre-ovulation, the expression of *cyp19a1a* mRNA in ovary of triploids was the highest among these three fishes. By immunohistochemistry, the CYP19A peptide locations in the ovary of the different ploidy fishes were studied, which indicated that CYP19A was found in follicle cells, outside layer of zona radiate of IV oocytes, and ooplasm of stage II oocytes. These researches showed that there are different expressions of the gonad-specific aromatase during the ovary development in different ploidy cyprinid fishes. In addition, the abnormal expression of *cyp19a1a* mRNA in triploids might be associated with sterility.

Key words: different ploidy cyprinid fishes; P450aromA; ovary development; mRNA expression; immunohistochemistry

Corresponding author: LIU Shaojun. E-mail: lsj@hunnu.edu.cn