

[文章编号] 1007-7405(2015)02-0081-09

# 大黄鱼 *cyp19a/b* 基因的克隆与表达分析

陈 芸, 周 鹏, 张子平, 谢芳靖, 蔡明夷, 王艺磊

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 克隆得到了调节雌雄激素平衡的大黄鱼 *cyp19a/b* 基因, *cyp19a* 基因 cDNA 全长 1805 bp (NCBI 登录号: FJ800566), 其中开放阅读框 1557 bp, 编码 518 个氨基酸; *cyp19b* 基因 cDNA 全长 2268 bp (NCBI 登录号: FJ800567), 其中开放阅读框 1503 bp, 编码 500 个氨基酸. 荧光定量 PCR 分析显示 *cyp19a* 基因在性腺中有明显的表达, 且在卵巢中的表达量极显著且高于精巢; 在肌肉、脑、肝脏、肾脏、脾脏等组织器官中基本不表达. 而 *cyp19b* 基因在脑、脾脏和肝脏中有较高表达, 在性腺和其他器官中基本不表达.

[关键词] *cyp19a/b* 基因; 芳香化酶; 性腺; 表达差异

[中图分类号] Q 343.1+5

[文献标志码] A

## Cloning and Expression of *cyp19a/b* Gene in Large Yellow Croaker *Larimichthys crocea*

CHEN Yun, ZHOU Peng, ZHANG Zi-ping, XIE Fang-jing, CAI Ming-yi, WANG Yi-lei

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Gonad development is dependent on balance between estrogen and androgen, which is regulated by expression of the *cyp19* gene and its product aromatase cytochrome P450. Two *cyp19* genes named as *cyp19a* and *cyp19b* have been identified in fish. In this study, both the *cyp19a* and *cyp19b* have been cloned from *Larimichthys crocea*. The cDNA of *cyp19a* gene is 1805bp in length (NCBI: FJ800566), including the 1557bp open reading frame (ORF) which codes a polypeptide of 518 amino-acid. The cDNA of *cyp19b* gene is 2268bp in length (NCBI: FJ800567), including the 1503bp ORF which codes a polypeptide of 500 amino-acid. Real-time PCR results show that the expression level of *cyp19a* in ovary is significantly higher than in testis. And the expression level of *cyp19a* in gonad is higher than other tissues. The expression level of *cyp19b* gene in brain, spleen and liver is higher than in gonad, muscle, and kidney.

**Key words:** *cyp19a/b* gene; aromatase; gonad; gene expression

## 0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国重要的海水养殖鱼类之一, 在福建省的养殖规模和产量巨大. 但是目前大黄鱼每年的产量和质量不稳定, 主要是因为其抗病力较差、性成熟偏早等问题困扰养殖产业, 极大影响了种鱼的种质和成鱼的质量. 有研究表明, 大黄鱼体长生长速度随年龄增大而递减

[收稿日期] 2014-03-10

[修回日期] 2014-06-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31272653); 福建省自然科学基金资助项目 (2011J05082); 集美大学创新团队基金资助项目 (2010A001)

[作者简介] 陈芸 (1978—), 女, 讲师, 博士, 主要从事分子遗传学研究. 通讯作者: 王艺磊 (1963—), 女, 教授, 博士, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn.

并逐渐趋于零,性成熟过程中的体长生长速度显著降低<sup>[1]</sup>.而在人工养殖大黄鱼中,大黄鱼体重增长速度以 2 龄鱼生长最快,1 龄鱼一般 50~100 g,2 龄则可达 300~500 g.因此人工养殖大黄鱼以养殖 1~2 年为最佳养殖期<sup>[2]</sup>.而目前人工养殖大黄鱼的性成熟年龄也在 1~2 龄间,生长期与大黄鱼性成熟期的重叠在一定程度上可能会影响大黄鱼的体重增长.因此,研究大黄鱼性腺发育及性成熟的分子机制,有助于在生产实践中筛选出具有优良性状的大黄鱼.

芳香化酶 *P450* 在脊椎动物的性激素形成中有重要作用.雄激素和雌激素在体内相关酶的作用下可相互转化,两者的平衡直接影响动物性腺的正常发育.由 *cyp19* 基因编码的芳香化酶 *p450* 是雄激素转化生成雌激素的主要限速酶,是维持上述平衡的关键因子<sup>[3]</sup>.在大部分硬骨鱼类中存在两种芳香化酶,一种是由 *cyp19a* 基因编码的性腺型芳香化酶,该基因主要在卵子的类固醇生成鞘和颗粒细胞层表达;另一种是由 *cyp19b* 基因编码的脑型芳香化酶,该基因主要在脑中表达<sup>[3]</sup>.这两种酶都可以使雄激素睾酮转化成雌激素 17 $\beta$ -雌二醇,内源性导致性别逆转<sup>[3]</sup>,因此推测 *cyp19* 基因与鱼类的性别分化有关<sup>[3]</sup>.研究发现,在黄颡鱼中 *cyp19a* 基因主要在卵巢中表达<sup>[4]</sup>;在日本比目鱼中的研究表明芳香化酶的低水平表达是精巢发育所必需的<sup>[5-6]</sup>.用芳香化酶抑制剂可诱导鱼类发生性逆转,主要是因为该抑制剂抑制了 *cyp19* 基因的表达,破坏了雄激素向雌激素的转化,导致雌激素量减少<sup>[5-6]</sup>.目前,相关研究在大黄鱼中还未见报道.

本研究拟克隆大黄鱼的 *cyp19a/b* 基因,并分析它们在大黄鱼不同组织中的表达,研究它们在大黄鱼性腺发育及成熟中可能具有的功能奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验大黄鱼体重 500 g 左右.取精巢、卵巢、肌肉、端脑、中脑、延脑、下丘脑、肝脏、肾脏、脾脏、前肾等组织,提取总 RNA 备用.

### 1.2 总 RNA 的抽提及基因全长的获取

各组织总 RNA 的提取根据本实验室改良的 RDP 方法<sup>[7-8]</sup>.根据已知的 *cyp19a/b* 基因的核苷酸序列,设计正反向引物,扩增获得 cDNA 片段,并克隆测序.然后根据获得的基因片段设计 3'和 5' RACE 所需特异引物 GSP1 和 GSP2,用 SMART-RACE 法扩增获得 3'和 5'端片段.所有获得的 cDNA 片段均与 pMD18-T 质粒连接后转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,并筛选阳性克隆测序.所有自行设计的引物(见表 1)合成及序列测序均由上海捷瑞生物工程有限公司完成.

### 1.3 目的基因的生物信息学分析

本文中核苷酸、氨基酸序列的同源性比对在 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 上进行;蛋白质分子量和等电点预测采用 pI/Mw tool;信号肽查找在 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 上进行;跨膜区查找采用 TMHMM-2.0;磷酸化位点查找采用 NetPhos2.0 Server;糖基化位点查找采用 NetNGlyc 1.0 Serve;氨基酸结构域分析采用 InterProScan;系统发育树构建采用 MEGA4.

### 1.4 荧光定量 PCR 分析目的基因在各器官的表达

根据拼接的 *cyp19a/b* 的全长 cDNA 序列,设计 *cyp19a*、*cyp19b*、 $\beta$ -actin 基因的荧光定量 PCR 引物(见表 1).以 cDNA 第一条链为模板, $\beta$ -actin 为内标基因,各基因特异性引物和 SYBR Green 进行定量 PCR 扩增.每个反应的体系如下:10  $\mu$ L SYBR Green Real time PCR Master Mix,0.5  $\mu$ L 正向、反向基因特异引物,1  $\mu$ L cDNA 第一条链及 8  $\mu$ L 无 RNase 水.反应条件为:95  $^{\circ}$ C 变性 10 min 后,进行如下 40 个循环:95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 退火 1 min.雌雄大黄鱼的每种器官各 4 个样品,每个样品进行 3 次重复.用 SPSS 15.0 统计软件对样本进行 one way ANOVA 方差分析,以  $P < 0.05$  为显著水平, $P < 0.01$  为极显著水平.

表 1 实验中所用的引物  
Tab. 1 Primers

基因 Genes	正向引物 Forward-primers	反向引物 Reverse-primers	用途 Purpose
<i>cyp19a</i>	5'-ATGGATCTGATCTCTGCTTGTGAAC-3'	5'-GCTGTCTTGTGCCTCTGGTGAAT-3'	扩增 cDNA cDNA amplified
<i>cyp19b</i>	5'-ATGCTGCCGCTGGAGACACTCAC-3'	5'-CCGCTTTCTTGTGCTTATCGTA-3'	
5' <i>cyp19a</i> -GSP1		5'-TGCTGCGATCACCATCT CCAAC-3'	5'-RACE
5' <i>cyp19a</i> -GSP2		5'-GGGCTGCTGTCTTGTGCCTCTG-3'	
5' <i>cyp19b</i> -GSP1		5'-TTGAGCGGCACCCCTGAGGAA-3'	
5' <i>cyp19b</i> -GSP2		5'-TGCCCGGAGGGGTCAGTCAT-3'	
3' <i>cyp19a</i> -GSP1	5'-GCACGAATATCATCCTGAACACCG-3'		3'-RACE
3' <i>cyp19a</i> -GSP2	5'-TCCTCGCCGTTACTTCCAGCCATT-3'		
3' <i>cyp19b</i> -GSP1	5'-GCGAAAAGCTCTGGAGGATGACA-3'		
3' <i>cyp19b</i> -GSP2	5'-AGTCGTTTCTTCCAGCCCTTCG-3'		
<i>cyp19a</i> -RQ	5'-CCGGACAGAGTTTTTCCACAA-3'	5'-GAACCGAATGGCTGGAAGTAAC-3'	荧光定量 Real time PCR
<i>cyp19b</i> -RQ	5'-CTGTCTTGAGTCAGAAAGGTGCT-3'	5'-TCAACCACGGGATGAAACC-3'	
β-actin-RQ	5'-CGCGACCTCACAGACTACCTC-3'	5'-TGTCACGCACGATTTCCTC-3'	

2 结果与分析

2.1 *cyp19a* 基因序列特征

*cyp19a* 基因 cDNA 序列全长 1805 bp (见图 1, NCBI 登录号: FJ800566), 其中 3'UTR (去除 polyA 部分) 长 229 bp, 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 长 1557 bp. *cyp19a* cDNA 可编码 518 个氨基酸, 预测其分子质量约为 58.7 ku, 等电点约为 6.68. 该序列在 T<sup>59</sup> - D<sup>60</sup> 有一个信号肽酶切位点, 在 V<sup>32</sup> - A<sup>55</sup> 和 S<sup>67</sup> - A<sup>90</sup> 位置分别具有一个由 23 个氨基酸组成的跨膜区. 磷酸化位点 (Phosphorylation sites) 分析显示有 9 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点, 3 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点和 3 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点; 糖基化位点 (N - x - S/T) 在 N<sup>145</sup> 区域. 进一步用 InterProScan 分析发现 *cyp19a* 有一个半胱氨酸铁-血红素配体特征区序列, 即 [FW]-[SGNH]-x-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD] (此序列位于 442 - 451 氨基酸之间, 为 FGSGPRSCVG), 该区是对芳香化酶活性起关键作用的保守区Ⅲ (血红素结合区). 此外, 对芳香化酶活性起关键作用的保守区 I (I - 螺旋区)、II (P450arom 特异保守区) 也被发现.

2.2 *cyp19b* 基因序列特征

*cyp19b* 基因 cDNA 序列全长 2268 bp (NCBI: FJ800567) (见图 2). 其中 3'UTR (去除 polyA 部分) 长 748 bp; ORF 长 1503 bp.

*cyp19b* cDNA 编码 500 个氨基酸, 预测其分子质量约为 56.7 ku, 等电点约为 7.12. 该序列在 S<sup>36</sup> - R<sup>37</sup> 有一个信号肽酶切位点. 在 Q<sup>10</sup> - F<sup>32</sup> 和 G<sup>45</sup> - G<sup>67</sup> 区域分别有一个由 22 个氨基酸组成的跨膜区. 磷酸化位点预测显示有 7 个丝氨酸磷酸化位点, 4 个苏氨酸磷酸化位点和 3 个酪氨酸磷酸化位点; 糖基化位点预测显示有两个位点分别是在 N<sup>9</sup> 和 N<sup>39</sup>. 与 *cyp19a* 类似, 与芳香化酶活性有关的保守区 I、II、III (位于 426 - 435 氨基酸之间, 为 FGCGPCSCVG) 均被发现.

2.3 *cyp19a* 同源性分析

本文选作同源性比对的 GenBank 上已注册的 *cyp19a* 氨基酸序列有:

- 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) AC035041.1、真鲷 (*Pagrus major*) BAB82524.1
- 点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) AAR97601.1、平鲷 (*Rhabdosargus sarba*) ABC70869.1
- 金头鲷 (*Sparus aurata*) AAL27699.1、细须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*) ABA26927.1
- 日本拟隆头鱼 (*Pseudolabrus japonicus*) ABB96485.1、鲷鱼 (*Mugil cephalus*) AAW72732.1

1 atg gatctg atctctgcttgtgaacgggcgatgaatcctgtacgttttgacgccatggtg 60  
1 M D L I S A C E R A M N P V R L D A M V 20  
61 acagaactggtctccatgcccccaatgccactgcagtgggatcaccgggcatctccatg 120  
21 T E L V S M P P N A (T) A V G S P G I S M 40  
121 gcaaccagaacctgatactgctcgtctgtctgctgctggttgccctggagccacacagac 180  
41 A T R T L I L L V C L L V A W (S) H T D 60  
181 aagaaactgtgaccaggctccttctgtctggtttgggcccgttttaacatatattg 240  
61 K K T V P G P S F C L G L G P L L T Y L 80  
241 ggattcatctggactggtataggcacagccagcatctactacaacaacaagtatggagac 300  
81 G F I W T G I G T A S I Y (Y) N N K (Y) G D 100  
301 attgtcagagctctggatcaatggagaagagaccctcactactcagcagggcacagctgtc 360  
101 I V R V W I N G E E T L I L S R A (S) A V 120  
361 caccagctactaaaaacggacattatacttcacgttttggaagcaaggaggacagc 420  
121 H H V L K N G H Y T S R F G (S) K E G L S 140  
421 tgccctcggtatgaatgagagtggcatcatatttaacaacaatttaactctgtgaaaaaag 480  
141 C L G M (N E S) G I I F N N N L T L W K K 160  
481 atacgcacctacttcaccaaaagctctgacgggtccaggcttgacgacagcatggaggtt 540  
161 I R T Y F T K A L T G P G L Q Q T M E V 180  
541 tgcgtcctccacgcagactcacctggaccacctggacagtttggatcatgtggacgtc 600  
181 C V S S T Q T H L D H L D S L D H V D V 200  
601 ctgagtttgcctgcgtgcaccgtcgtcgacatctccaacagactcttcttggacgtacct 660  
201 L S L L R C T V V D I S N R L F L D V P 220  
661 gtgagcgagaaagagctgctgctgaagattcagaagtattttgacacatggcagactgtg 720  
221 V (S) E K E L L L K I Q K Y F D T W Q T V 240  
721 ctgatcaaagcagacatttactcaagtttgcttgattcaccagagggcacaagacagca 780  
241 L I K P D I (Y) F K F A W I H Q R H K T A 260  
781 gcccaggagctgcaagatgccataaagagtctggttagagcagaagaggaaagatatggag 840  
261 A Q E L Q D A I K S L V E Q K R K D M E 280  
841 caggtcgataaactggacaacatcaacttcacagcagagctcatatttcgcacagaacat 900  
281 Q A D K L D N I N F T A E L I F A Q N H 300  
901 ggtgagctgtctgcagagaatgtgaggcagtggtgttggagvggttgatcgcacacca 960  
301 G E L (S) A E N V R Q C V L E M V I A A P 320  
961 gacactctgtccatcagcctcttctcatgttgctgctcctaagcagcatccaggtgtc 1020  
321 D T L S I S L F F M L L L L K Q H P G V 340  
1021 gagctgcagctgctggaggagatagacacagttgttagtgagagacagcttcagaacggg 1080  
341 E L Q L L E E I D (T) V V G E R Q L Q N G 360  
1081 gaccttcagaagttgcaggctcctggagagtttcatcaacgaatgcttgcgtttccacct 1140  
361 D L Q K L V L E S F I N E C L R F H P 380  
1141 gtggtggacttcaccatgcgtcgagccctgtctgatgacatcattgcaggctacagggtg 1200  
381 V V D F T M R R A L S D D I I D G Y R V 400  
1201 ccgaagggcacgaatatcatctctgaacaccggccacatgcaccggacagagttttccac 1260  
401 P K G T N I I L N T G H M H R T E F F H 420  
1261 aagcccaacgaattcagctctgaaaaacttgaaaaaatgctcctgcgcgttacttccag 1320  
421 K P N L E N F (S) L E N F E K N A P R R Y F Q 440  
1321 ccattcggttcaggccctcgtcctgtgttggttaagcacatcgccatgggtgatgaaaa 1380  
441 P F G S G P R S C V G K H I A M V M M K 460  
1381 tccatcctggttaacacttctctcccagtaactctgtttgccctcatatgggcttgacctg 1440  
461 S I L V T L L S Q Y S V C P H M G L T L 480  
1441 gactgcctcccacagaccaacaacctgtcccagcagcctgtagagcatcagcaagaggcc 1500  
481 D C L P Q T N N L S Q Q P V E H Q Q E A 500  
1501 gaacatctcagcatgagattcttaccagacagagaggcagctggcaaacacgctgagag 1560  
501 E H L (S) M R F L P R Q R G S W Q T R \* 518  
1561 agactctgagcctttattgttattattattattattattattgttgtgtgttttcttc 1620  
1621 atttatacagaatatatactattttgatctcacttacttaatttatattgttatatcactg 1680  
1681 tagaaagttaactttgatataattgtatgtattaaaaattgtatttttacctggaaccttat 1740  
1741 gaattgtaaaaatgtaaatttgggc *aataaa*gtaaattattgtgccaaaaaaaaaaaaaa 1800  
1801 aaaaa 1805

说明：小写字母—cDNA 序列用；\*—终止密码；大写字母—氨基酸序列；斜体加粗—polyA 加尾信号；圆圈—磷酸化位点（S：丝氨酸磷酸化位点；T：苏氨酸磷酸化位点；Y：缬氨酸磷酸化位点）；下划线—高度保守的片段；方框—糖基化位点。

Notes: lowercase—cDNA; \*—termination codon; uppercase—amino acid; italic overstriking type—polyA signal; round—sites of phosphorylation (S:serine phosphorylation; T:Threonine phosphorylation; Y:Valine phosphorylation); underline—highly conserved sequence; square frame—sites of glycosylation.

图 1 *cyp19a* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig.1 Nucleic acid and amino acid sequences of *cyp19a* gene

```
1 atgtctgccgctggagacactcaccaaccaaacgggtggttaacactgtgactgaagtcacc 60
1 M L P L E T L T N Q T V V N T V T E V T 20
61 gtccttctgtcttactactgtctgtctgtcttccaccactggagccgaacaaacggt 120
21 V L L L L L L L L L L L F T T W S R T N R 40
121 tcaaataataccaggtccttcttctgtgggcaggactcggtccgacacctcacatacaccaga 180
41 S N I P G P S F W A G L G P I L T Y T R 60
181 ttcattgtgactgggacggcgaacggcatgtaactactataacaacaataatggcagcata 240
61 F I W T G T I G T A C N Y Y N N Y G S I 80
241 gtccgggtttggattaatggtgaagagaccatcattctgagcaggctctcagcagtgat 300
81 V R V W I N G E E T I I L S R S S A V Y 100
301 catgttctgaggagtgacctctacacagccagatttgggagtaaacagggttggagtgt 360
101 H V L R L L L Y T A R F G S K A G G L E C 120
361 attgggatggaagggagggtattattttcaacagtgtatgtccacctctggaaaaaagca 420
121 I G M E G R G I I F N S D V P L W K K A 140
421 aggcagtatttttccaaagctctgacaggccccgggtctccagaggactgtgggaatctgt 480
141 R T Y F S K A L T T G P G L Q R T V G I C 160
481 gtgagctccacagccaaacacctggactgcctgcaggagatgactgacccctccgggcat 540
161 V S S T A K H L D C L Q E M T D P S G H 180
541 gtggactcgtcaattctgtgagagccatagtggtggacatttccaaagcgttttctc 600
181 V D L S N L L R A I V V D I S N R L K I C 200
601 aggggtgccgctcaatgaaaaggacttctgtgatgaaaatccaaagctactttgagacctgg 660
201 R V P L N E K D L L M K I Q S Y F E T W 220
661 caaacagttttaataaagcctgatataatttcaagattggatggctgtacgataagcac 720
221 Q T V L I K P D I F F K I G W L K H 240
721 aagaaagcggccaggagctgcaagacgtgatggagagccttcttgaaattaaagaaag 780
241 K K A A Q E L Q D V M E S L L E I K R K 260
781 attataaatgagctctgagaagttggatgatgattttgactttgcaacagagctcatattt 840
261 I I N E S E K L D D D F D F A T E L I F 280
841 gctcagaatgtcggcgagctttcagcagataacgtcaggcagtgctgctggagatggtg 900
281 A Q N V G E L S A D N V R Q C V L E M V 300
901 attgcagcgtgacacactttccatcagcctcttcttcatgctgatgctgtgaaacaa 960
301 I A A P D T L S I S L F F M L M L K Q 320
961 aaccagacgtagagatgaggatagtgaggagatggacgctgtcttgagtcagaaaggt 1020
321 N P D V E M R I V E E M D A V L S Q K G 340
1021 gctgaaaacatcaattatcaaagcctgaaagtgtctggagagttttatcaatgagcttatg 1080
341 A E N I N Y Q S L K V L E S F I N E S M 360
1081 aggtttcatcccggtggttgatttcacaatgcgaaaagctctggaggatgacatcatcgaa 1140
361 R F H P V V D F T M R K A L E D D I I E 380
1141 ggcactaaaattacaaaagggaccaacatcattctcaacattgggtctcatgataaatca 1200
381 G T K I T K G T N I I L N I G L M H K Q 400
1201 gaatttttcccaaaacccaaagagttcagcctgagcaactttcacaaaacagttcccagt 1260
401 E F F P K P K E F S L S N F H K T V P S 420
1261 cgtttcttcagccctcggtgtgtggcctcgttctcgtggtggaaaacacatcgccatg 1320
421 R F F Q P R G C G P R S C V G K H I A M 440
1321 gtgatgatgaaggccatccttgcactctgttctcgttatactgtgtgccctgcgcaa 1380
441 V M M K A I L V T L L S R Y T V C P R Q 460
1381 ggctgcaccctcaacagcactcaggcagaccaacaacctgtcgcagcagcccggtggaggac 1440
461 G C T L N S I R Q T N N L S Q C Q P V E D 480
1441 gagcacagcctggccatgcgctttatccctcggacgacacaacctccacacaatctggac 1500
481 E H S L A M R F I P R T T Q P P H N L D 500
1501 tgagacattcagtgcaatcctaagtattgaacatggtgaagaatgtagctgatgaatagg 1560
*
1561 atctaataatccccctactaaaattatacaaatgtgacccatgacctctggtattctgggt 1620
1621 tttcatagtgtatttctgagctgtcttcaaagagcaacaatacatattgtgatgttcgag 1680
1681 cggatgttttctacttttgacatcactgacctctggcgaaatactttgaaagtggag 1740
1741 cagttggcaggatgatttactgacccatagaaaagcaatatggaaacccagggcagatacac 1800
1801 actacaacttgagaggtcacaaaattatttttagaaataataacatggtgccaacttgt 1860
1861 taaaacctggactgagacaaagagctccagttacatgtttaatactgttgatattttac 1920
1921 acacagtactgtttctttagggattattgtgttaaactattcagtggttatcagtcata 1980
1981 ggtaaaggaagttagtttagacataaacgtcatgttaaatttcagcacacacgggaaat 2040
2041 gtgaaatgttggtatgctgtataatccaattctaategcatatatattaaatctctagaaa 2100
2101 aaaaaagggttatgttaaggtaaaaatagtttagttttaagggtctcggtgaaagaaaatg 2160
2161 acgacacaggcattaaatcaaatgttactaatatttttggtgtgttgctcaaagtaaat 2220
2221 ctcatccaataaataaatgtgatgttttttaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2268
```

说明:小写字母—cDNA 序列用;\*—终止密码;大写字母—氨基酸序列;斜体加粗—polyA 加尾信号;圆圈—磷酸化位点(S:丝氨酸磷酸化位点;T:苏氨酸磷酸化位点;Y:缬氨酸磷酸化位点);下划线—高度保守的片段;方框—糖基化位点。

Notes: lowercase—cDNA; \*—termination codon; uppercase—amino acid; italic overstriking type—polyA signal; round—sites of phosphorylation (S:serine phosphorylation; T:Threonine phosphorylation; Y:Valine phosphorylation); underline—highly conserved sequence; square frame—sites of glycosylation.

图2 *cyp19b* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig.2 Nucleic acid and amino acid sequences of *cyp19b* gene

花溪鲮 (*Kryptolebias marmoratus*) ABC68614. 1、鳕鱼 (*Gadus morhua*) ADM15036. 1  
青鲮 (*Oryzias latipes*) Q92087. 1、绿鳍马面鲈 (*Thamnaconus septentrionalis*) AFM35729. 1  
虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 1806325A、细棘海猪鱼 (*Halichoeres tenuispinis*) AAR37048. 1  
斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*) Q92111. 1、南方鲇 (*Silurus meridionalis*) AAP83133. 1  
泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) BAJ19136. 1、金鱼 (*Carassius auratus*) AAC14013. 1  
鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) ACB13197. 1、斑马鱼 (*Danio rerio*) AAK00643. 1  
稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*) ADB29065. 1、蟾蜍 (*Xenopus laevis*) NP\_001079122. 1  
鸡 (*Gallus gallus*) NP\_001001761. 1、大鼠 (*Rattus norvegicus*) NP\_058781. 2  
人 (*Homo sapiens*) P11511. 3.

结果表明, 大黄鱼 *cyp19a* 的氨基酸序列与其他鱼类的氨基酸序列同源性较高. 其与细须石首鱼的同源性为 96%; 与点带石斑鱼的同源性为 95%; 与真鲷、斑马鱼、金鱼的同源性分别是 94%、80% 和 80%; 与非洲爪蟾和人类的同源性分别是 74% 和 49%.

2.4 *cyp19b* 基因同源性分析

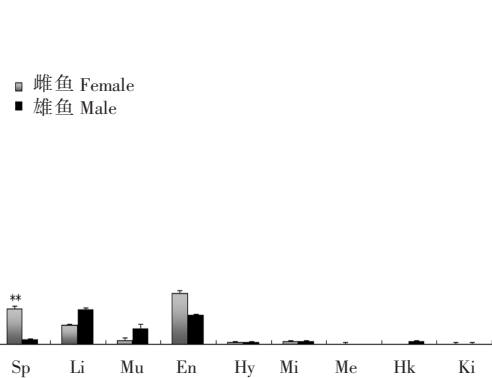
同源性比对选用 GenBank 上已注册的 *cyp19b* 的氨基酸序列有:

大黄鱼 ACO35042. 1、平鲷 ABC70868. 1、日本拟隆头鱼 ABB96486. 1、鲤鱼 ACB13198. 1  
细棘海猪鱼 AAR37047. 1、大西洋庸鲽 (*Hippoglossus hippoglossus*) Q4VC53  
三星攀鲈 (*Trichogaster trichopterus*) ABR66863. 1、鲮鱼 AAW72730. 1、金鱼 AAB39408. 1  
银汉鱼 (*Odontesthes bonariensis*) AAQ88434. 2、青鲮 AAP83449. 1、稀有鮡鲫 ADB44882. 1  
底鲮 (*Fundulus heteroclitus*) AAS76199. 1、花溪鲮 ABC68613. 1、斑马鱼 AAV41033. 1  
虹鳟鱼 *cyp19b* - I CAC84574. 1、虹鳟鱼 *cyp19b* - II CAC84575. 1、南方鲇 AAP83132. 1  
鸡 AAA48738. 1、家鼠 (*Mus musculus*) BAA00551. 1、人: P11511. 3.

结果表明, 大黄鱼 *cyp19b* 氨基酸序列与平鲷同源性最高, 为 86%; 与大西洋庸鲽、鲮鱼、斑马鱼、金鱼的同源性分别是 85%、81%、65% 和 65%; 与家鼠、人的同源性分别只有 51%、17%.

2.5 *cyp19a/b* 基因在大黄鱼各器官中的表达

大黄鱼 *cyp19a/b* 基因在各器官的表达情况见图 3、图 4.

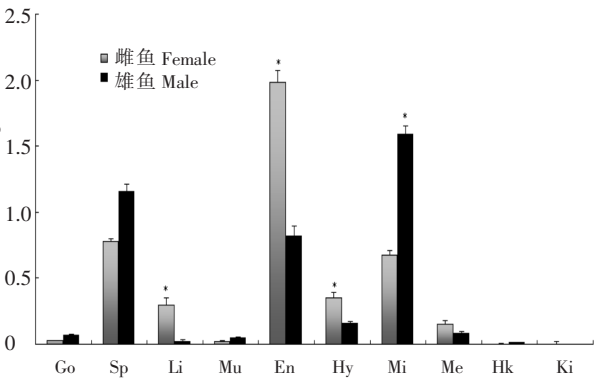


说明: Go—性腺; Sp—脾; Li—肝; Mu—肌肉; En—端脑; Hy—下丘脑; Mi—中脑; Me—延脑; Hk—头肾; Ki—肾;  
\*\* 表示雌雄同一器官存在极显著差异,  $P < 0.01$ .

Notes: Go—Gonad; Sp—Spleen; Li—Liver; Mu—Muscle; En—Endbrain; Hy—Hypothalamus; Mi—Midbrain; Me—Medulla; Hk—Head-kidney; Ki—Kidney; \*\*—extremely significant differences,  $P < 0.01$ .

图 3 *cyp19a* 在雌雄各器官的表达情况

Fig.3 Quantity PCR analysis of the *cyp19a* gene expression from different tissues



说明: Go—性腺; Sp—脾; Li—肝; Mu—肌肉; En—端脑; Hy—下丘脑; Mi—中脑; Me—延脑; Hk—头肾; Ki—肾;  
\* 表示雌雄同一器官存在显著差异,  $P < 0.05$ .

Notes: Go—Gonad; Sp—Spleen; Li—Liver; Mu—Muscle; En—Endbrain; Hy—Hypothalamus; Mi—Midbrain; Me—Medulla; Hk—Head-kidney; Ki—Kidney; \*—significant differences,  $P < 0.05$ .

图 4 *cyp19b* 在雌雄各器官的表达情况

Fig.4 Quantity PCR analysis of the *cyp19b* gene expression from different tissues

经统计学分析, *cyp19a* 在卵巢中表达量最高, 显著高于精巢. 该基因在雌雄肝脏、肌肉、端脑, 以及雌性脾脏中表达量比较低, 而在其他各器官基本不表达. 大黄鱼 *cyp19b* 在中脑、端脑、下丘脑、脾脏和肝脏中有较高表达量, 在性腺和其他器官中基本不表达.

2.6 *cyp19a/b* 基因系统发育分析

采用 MEGA4.0 软件, 以邻位相连法构建系统进化树 (见图 5).

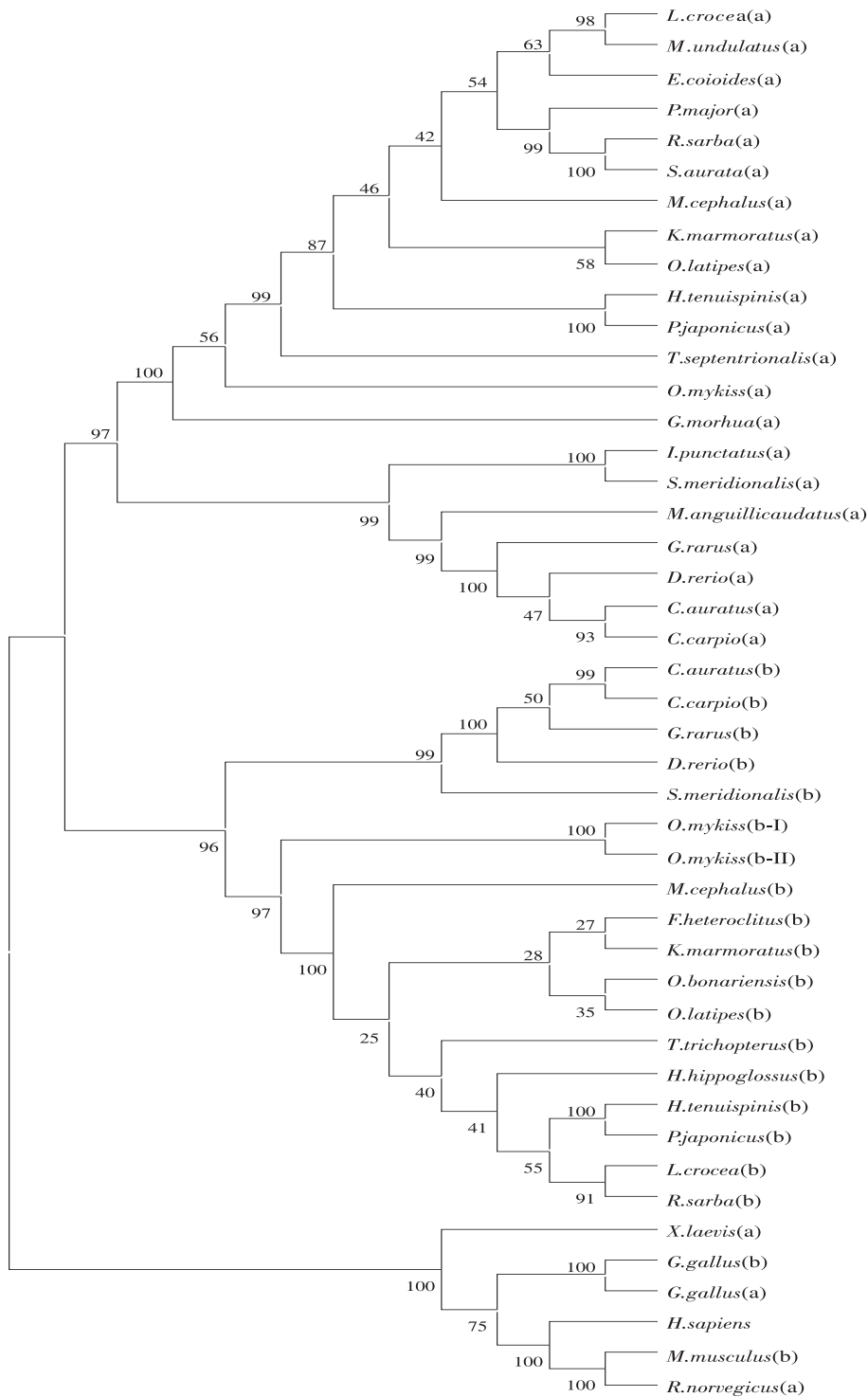


图 5 基于 NJ 法构建的 *cyp19a/b* 蛋白质序列系统进化树  
Fig.5 Phylogenetic analysis of protein sequences of *cyp19a/b*



该进化树根据 GenBank 上已注册的 *cyp19a* 和 *cyp19b* 的氨基酸全长序列构建。多序列比对等参数采用默认设置值。从结果可以看出,整个系统发育树分成3大支,鱼类 *cyp19a*、*cyp19b* 各聚成一支,而两栖类、鸟类和哺乳类的 *cyp19a/b* 共聚成一支。以鱼类 *cyp19a* 分析,大黄鱼与同为石首鱼科的细须石首鱼关系最近,且与鲈形目其他鱼类(细须石首鱼、点带石斑鱼、鲷类)一起聚成小支;而鲤形目(金鱼、斑马鱼、稀有鮕鲫、鲤鱼、泥鳅)、鲈形目(斑点叉尾鲷)、鲇形目(南方鲇)鱼类聚成一小支,且与大黄鱼关系较远。以鱼类 *cyp19b* 分析,大黄鱼与平鲷关系最近,且与鲈形目其他鱼类(平鲷、日本拟隆头鱼、细棘海猪鱼)聚成一小支;而鲤形目(金鱼、斑马鱼、稀有鮕鲫、鲤鱼)、鲇形目(南方鲇)鱼类聚成一小支,且与大黄鱼关系较远。

### 3 讨论

在哺乳动物中只有一种芳香化酶,该酶通过中枢神经系统调节作用,影响动物的神经内分泌、繁殖及性行为<sup>[9-10]</sup>,并参与调控哺乳动物性腺的分化<sup>[11]</sup>。在硬骨鱼类中,目前发现金鱼由一个 *cyp19* 基因编码脑芳香化酶;而斑马鱼由两个基因 *cyp19* (*cyp19a/b*) 编码芳香化酶<sup>[12]</sup>;虹鳟中则发现有两种类型的 P450aromB,可能由一个或两个 *cyp19* 基因编码<sup>[13]</sup>。部分鱼类中 *cyp19a* 基因在卵子发生期间的卵黄卵泡中有表达,这与鱼类卵巢发育期间对雌激素的需求相一致;而在脑部,雄激素芳香化变成雌激素是调节生理和行为的一个基本步骤,此时 *cyp19b* 基因的正常表达至关重要<sup>[14-15]</sup>。

Chiang<sup>[16]</sup> 研究认为斑马鱼 *cyp19a* 基因在卵黄发生期间主要在滤泡中表达,其功能可能是参与卵巢中卵泡形成过程的卵黄发生, *cyp19b* 主要在丘脑下部、端脑、嗅球中表达,对神经系统的功能、性行为、性别决定产生影响。本研究中大黄鱼 *cyp19a* 基因主要在性腺中表达,在脑部基本没有表达(见图2); *cyp19b* 主要在脑部(中脑、端脑、下丘脑)、脾脏、肝脏表达,在性腺中基本没有表达(见图3),这与斑马鱼、金鱼的研究结果相似<sup>[16-17]</sup>。对虹鳟<sup>[14]</sup>、石斑鱼<sup>[18]</sup>的研究表明 *cyp19b* 主要在脑和垂体中表达,有明显的雌、雄差异; *cyp19a* 主要在性腺和垂体表达,且性腺表达量远高于垂体,无雌雄差异。另外不同鱼类的 *cyp19a/b* 在脾脏、肾脏、肝脏、腮中有时也有表达,但可能研究鱼的种类、年龄、所处发育状态及研究方法不同,表达模式各有不同<sup>[11,14,18-19]</sup>。但一致的是 *cyp19a* 和 *cyp19b* 在性腺和脑的表达存在明显的组织特异性<sup>[20]</sup>。斑马鱼中有两种芳香化酶氨基酸具有60%的同源性,编码它们的两个基因是直系同源基因,由同一祖先基因复制而产生<sup>[16]</sup>。根据复制—退化—互补模型<sup>[21]</sup>,如果基因被相互退化的基本的组织特异性调控因子所调节,两个复制的基因的功能都会被保留下来。因此,脑型的 *cyp19b* 不能补偿卵巢型 *cyp19a* 的功能,雌性如果缺乏卵巢型 *cyp19a* 就会不育,这在人类和小鼠中已经被证实<sup>[22-23]</sup>。本研究中大黄鱼两种芳香化酶的氨基酸同源性达63%,进一步同源比较发现,大黄鱼芳香化酶氨基酸序列与鲈形目鱼类相似性高达85%以上,与鲤形目、鲈形目相似性高达65%以上(见图4)。这表明大黄鱼两种芳香化酶基因在进化上保守性较高,但在功能上却又各自独立,不可互相替代。 *cyp19a* 和 *cyp19b* 表达模式的不同表明它们具有不同的生理功能,也说明在进化过程中这两个基因在两种不同组织中的重要性。

### [参考文献]

- [1] 徐开达,刘子藩. 东海区大黄鱼渔业资源及资源衰退原因分析[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 392-396.
- [2] 张彩兰,刘家富,李雅璐,等. 福建省大黄鱼养殖现状分析与对策[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(1): 77-83.
- [3] VON HOFSTEN J, OLSSON P E. Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2005, 3(1): 63-73.
- [4] 徐跑,俞菊华,唐永凯,等. 黄颡鱼卵巢 P450arom 基因的克隆及器官表达[J]. 中国水产科学, 2005, 12(5): 541-548.
- [5] KITANO T, TAKAMUNE K, KOBAYASHI T, et al. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex reversed



- males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 1999, 23(2): 167-176.
- [6] KITANO T, TAKAMUNE K, NAGAHAMA Y, et al. Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$  methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Molecular Reproduction and Development, 2000, 56(1): 1-5.
- [7] CHOMCZYNSKI P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples [J]. Biotechniques, 1993, 15(3): 532-537.
- [8] ZHANG Z P, SHEN B L, WANG Y L, et al. Differential expression of proliferating cell nuclear antigen in the developing ovary and testis of penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. DNA and Cell Biology, 2010, 29(4): 163-170.
- [9] 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): 342-355.
- [10] LEPHART E D. A review of brain aromatase cytochrome P450 [J]. Brain Research Reviews, 1996, 22(1): 1-26.
- [11] PIFERRER F, ZANUY S, CARRILLO M, et al. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males [J]. Journal of experimental zoology, 1994, 270(3): 255-262.
- [12] 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]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 79(1/5): 305-314.
- [13] VALLE L D, RAMINA A, VIANELLO S, et al. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 82(1): 19-32.
- [14] TANAKA M, TELECKY T M, FUKADA S, et al. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 $\beta$  in the ovary [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 1992, 8(1): 53-61.
- [15] TANAKA M, FUKADA S, MATSUYAMA M, et al. Structure and promoter analysis of the cytochrome P450 aromatase gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*) [J]. The Journal of Biochemistry, 1995, 117(4): 719-725.
- [16] CHIANG E F, YAN Y L, GUIGUEN Y, et al. Two *cyp19* (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain [J]. Molecular Biology and Evolution, 2001, 18(4): 542-550.
- [17] GELINAS D, PITOC G A, CALLARD G V. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA; mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1998, 138(1/2): 81-93.
- [18] 李广丽, 刘晓春, 张勇, 等. 赤点石斑鱼两种芳香化酶 cDNA 的克隆及其表达的器官特异性 [J]. 动物学报, 2004, 50(5): 791-799.
- [19] 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(2): 740-750.
- [20] 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.
- [21] FORCE A, LYNCH M, PICKETT F B, et al. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations [J]. Genetics, 1999, 151(4): 1531-1545.
- [22] SHOZU M, AKASOFU K, HARADA T, et al. A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1991, 72(3): 560-566.
- [23] FISHER C R, GRAVES K H, PARLOW A F, et al. Characterization of mice deficient in aromatase (arko) because of targeted disruption of the *cyp19* gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 1998, 95(2): 6965-6970.