

许氏平鲉(*Sebastes schlegeli*)*CYP19B* 基因 cDNA 克隆及在生殖周期中的表达分析*

杨艳平 温海深 史 丹 母伟杰 何 峰 李吉方

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 从许氏平鲉脑组织中克隆到细胞色素 P450 芳香化酶(P450aromB) (*CYP19B*)基因核心功能区 cDNA。结果表明, 许氏平鲉*CYP19B* 主要功能区片段编码 369 个氨基酸, 包括 I-螺旋区、Ozol's 肽区及部分芳香化酶特异性保守区。RT-PCR 分析表明, *CYP19B* 在雌鱼和雄鱼各组织中表达情况不同, 在雌鱼中表达较丰富, 但是两者都在性腺和脑中有表达, 且脑中的表达量高于性腺。生殖季节表达结果表明, *CYP19B* 在繁殖前期表达较为丰富, 退化期末见有表达。*CYP19B* 在精巢处于 期的许氏平鲉脑组织中表达最为丰富, 在精巢发育 期的脑组织表达量最低。上述研究结果说明, *CYP19B* 在雌性和雄性许氏平鲉繁殖周期中均发挥重要生理作用。

关键词 许氏平鲉, P450arom B 基因, 克隆, mRNA 表达

中图分类号 S965

细胞色素 P450 芳香化酶(P450arom)是类固醇合成途径中的末端酶, 整个芳香化反应过程中, 细胞色素 P450 芳香化酶起主导作用, 对调节整个性类固醇激素的平衡有重要意义(Yu *et al*, 2008)。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, 表达受不同调节因子影响, 在胚胎发育过程中有不同时空表达, 具有独特的功能(Piferrer *et al*, 2005)。至今, 已经在 10 余种鱼类中克隆了 *CYP19* 基因, 并对功能进行了初步研究(李广丽等, 2004)。但是, 关于许氏平鲉芳香化酶基因克隆与表达的研究尚未见报道。

许氏平鲉(*Sebastes schlegeli*)隶属于鲉形目(Scorpaeniformes)、鲉科(Scorpaenidae)、平鲉属(*Sebastes*), 原名黑鲷, 主要分布于西北太平洋近岸海域, 在我国主要分布于渤海、黄海和东海, 国外见于朝鲜东西两岸、日本北海道以南及鄂霍次克海南部水域(陈大刚

等, 1994)。该鱼营卵胎生繁殖, 目前我国人工增殖和网箱养殖的理想对象。其肉质鲜美, 在山东沿海有黑石斑的美誉, 在海外如日本、韩国的鲜活鱼市场上深受欢迎。随着近岸渔业资源的逐步匮乏, 其海捕产量已无法满足市场的需求, 在北方沿海进行许氏平鲉的人工增殖具有重要的经济效益和社会效益。本文以山东沿海网箱养殖的许氏平鲉为对象, 应用分子生物学方法, 克隆 *CYP19B* 基因, 采用半定量 RT-PCR 技术对 *CYP19B* 基因 mRNA 在许氏平鲉不同性腺发育期组织表达情况进行分析。研究结果, 在理论上丰富硬骨鱼类繁殖生理内容, 在实践上为建立许氏平鲉全人工繁殖和育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源与样品采集

2008 年 11 月—2009 年 9 月, 在山东沿海采集网箱养殖的许氏平鲉(*Sebastes schlegeli*), 每两个月采样一次, 共采集样本 142 尾。体长为 21.2—39.1cm, 体

* 山东省自然科学基金重点课题资助, Z2008D03 号。杨艳平, E-mail: yyhappygirl@126.com

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

收稿日期: 2011-09-12, 收修改稿日期: 2011-11-17

重 275.8—3760.4g。实验鱼在室内水族箱暂养 2—3d, 流水充氧, 满足人工光照和自然水温。实验前测量主要生物学指标并迅速解剖各组织, 液氮中速冻, 然后转移至 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。然后根据 H.E 染色结果对于性腺发育时期做出判断(表 1)。

表 1 许氏平鲉采样记录及性腺分期

Tab.1 *S. schlegeli* sample records and each stage of gonadal development

采样时间	精巢发育时期	雄鱼样本数	卵巢发育时期	雌鱼样本数
11 月	期	4	期	4
1 月	期	3	期	3
3 月	期	4	— 期	3
5 月	期	3	期	4
7 月	期	3	期	3
9 月	期	4	期	3

1.2 试剂

RNA 提取试剂 RNAiso Reagent、*Taq* 酶、DNaseI (RNasefree)、RNasin、RNA 酶抑制剂购自 TaKaRa 公司, M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; dNTP、DNA Marker、DNA Marker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PGM-T 载体相关试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; DH5 α 感受态细胞购自青岛群昌科贸有限公司。

1.3 引物

根据已知鱼类 CYP19B 保守序列, 根据 CodeHop 原理改进技术(陈彩芳等, 2009)设计用简并引物 BF1/BR1、BF2/BR2。BF1/BR1 用于许氏平鲉 CYP19B 基因片段的克隆, BF2/BR2 用于延长克隆得到的许氏平鲉 CYP19B 基因片段。根据两次 PCR 克隆的得到 CYP19B 基因片段用 primer premier5.0 软件设计 BF3、BR3 用于半定量 RT-PCR 450aromB 引物, 预计克隆片段长度 309bp。所有引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成(表 2)。主要生物信息数据库和分子应用软件为: NCBI、Codehop、BlockMaker、DNAMAN、Oligo6.0、Clustal X、MEGA 4。

1.4 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

选取许氏平鲉雌、雄鱼各组织约 100mg, 用 RNAiso Reagent 抽提总 RNA, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以 DNaseI 酶去除基因组 DNA, 紫外分光光度计测定 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, 于 -40℃ 保存备用。

表 2 许氏平鲉 CYP19B 基因克隆和表达所用的引物
Tab.2 Primers used for CYP19B gene cloning and mRNA expression analysis of *S. schlegeli*

引物名称	引物序列(5'—3')	扩增片段长度
BF1	CATCGGCACCGCCTGnaaytaytaya	673bp
BR1	TCCAGCACGCACCKnacrttyrtc	
BF2	CAGTGCGTGCTGGARATGGTGATYG	450bp
BR2	CTTCATCATCACCATGgnmatngnytt	
BF3	CCCATCCCTCCAATCAC	309bp
BR3	GCTCCGTAGCAAAGTCAAG	
18SF	CCTGAGAAACGGCTACCACATC	119bp
18SR	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	

1.5 PCR 产物克隆和序列分析

简并引物 PCR 扩增体系为: 从脑组织抽提的 cDNA 1 μ l、PCR 缓冲液 2.5 μ l、dNTP 2 μ l、引物各 BF1 及 BR 10.5 μ l、*Taq* 酶 0.2 μ l, 补无菌水至 25 μ l。反应程序: 94℃ 预变性 5min, 50 循环[94℃ 变性 35s, 退火温度(BF1/BR1: 63℃; BF2/BR2: 65℃) 35s, 72℃ 延伸 35s], 72℃ 延伸 10min。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳回收纯化目的条带, PGM-T 载体连接转化, 蓝白斑筛选阳性克隆产物测序。预计 CYP19B 基因片段到 1100bp。所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对和同源性比较。采用 Neighbour-Joining 法(1000runs)结合 Clustal X、MEGA4 软件, 进行多重比对、构建系统进化树。

1.6 CYP19B 基因 mRNA 的组织时空表达检测

采用本实验已经建立的表达方法(陈晓燕等, 2011), 用特异引物 BF3/BR3(产物长度 309bp), 以 18S rRNA 为内参照, 对雌、雄许氏平鲉性腺、肝、脾、肾、脑、肠、鳃、心、胃、脂肪、盲囊和头肾 12 种组织 cDNA 进行 PCR 扩增。各月份中选取发育同步的 3 条鱼, 进行性腺和脑的不同发育阶段表达分析。产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。最后选取经三次重复均表现为一致的结果。

1.7 统计分析

实验所得数据均表示为平均数 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE), 采用 SPSS 13.0 统计软件中的 Duncan's 法进行数据处理和检验分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 实验结果

2.1 cDNA 片段的克隆

利用引物 BF1/BR1 从许氏平鲉脑组织中扩增出与预期大小相符的片段长度约为 700bp, 经测序后确定该产物长度为 673bp。之后从脑组织中再次克隆

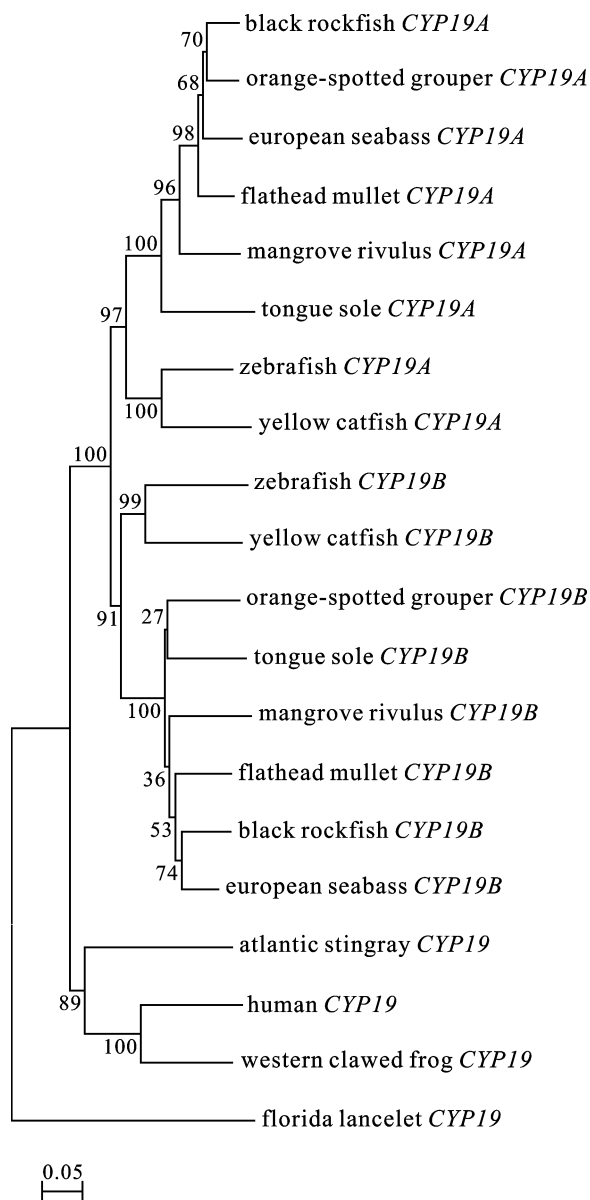


图2 用 MEGA4.0 中的 NJ 方法对许氏平鲷 *CYP19A*、*CYP19B* 与其它物种分子进化树聚类分析

Fig.2 Phylogenetic tree of the *CYP19A*, *CYP19B* from *S. schlegeli* and other vertebrates by NJ method of MEGA 4.0

注: 分支上的数字代表自展值

明显高于精巢和心脏的表达,而在其它组织中未见有表达(图 3B)。

2.4 *CYP19B* 基因在不同发育时期雌性许氏平鲷卵巢和脑组织中的表达

通过 RT-PCR 检测,发现许氏平鲷 *CYP19B* 的 mRNA 在脑组织中每个发育时期都可以检测到表达,然而在卵巢组织中只有 11—3 月(— 期)可以检测到表达,5—9 月(— 期)间没有见到脑型芳香化酶的表达($P<0.05$)。在 11—5 月(— 期)中,脑组织

中的 mRNA 表达量逐渐增加,5 月份(— 期)表达量最丰富,而后表达量迅速下降,7—9 月(— 期)表达量最低($P<0.05$)。而 11—3 月(— 期)之间,卵巢组织 mRNA 的表达量都均为逐渐上升($P<0.05$)。见图 4A。

2.5 *CYP19B* 基因在不同发育时期雄性许氏平鲷精巢和脑组织中的表达

许氏平鲷 *CYP19B* 在脑的发育各周期中都可以检测到表达,而精巢发育周期中只有 1—3 月(— 期)以及 11 月(— 期)能够检测到表达。在脑中,表达量随着周期发育而上升,5 月份(— 期)时表达量最丰富,达到峰值,随后表达量下降($P<0.05$)。精巢中,1—3 月(— 期)表达量最低,11 月(— 期)表达量最高,达到峰值($P<0.05$)。见图 4B。

3 讨论

在大多数哺乳动物中, P450arom 由 *CYP19* 单基因编码,但在鱼类中却发现了由两种不同基因编码的 P450arom,称为性腺型芳香化酶(*CYP19A*)和脑型芳香化酶(*CYP19B*)。*CYP19* 基因属于细胞色素 P450 基因家族,无论是鱼类 *CYP19A* 和 *CYP19B* 还是其它物种的 *CYP19*,其氨基酸序列具有明显的细胞色素 P450 基因家族的特征:跨膜区、I-螺旋区、Ozols 肽区、芳香化酶特异性保守区和亚铁血红素结合区(Zhang et al, 2004)。本文从许氏平鲷的脑组织中克隆到一个 1109bp cDNA 序列片段,经 Blastn 分析得出与此片段序列同源性较高的都是鱼类脑型芳香化酶,并且其氨基酸序列具有明显的细胞色素 P450 基因家族的特征: I-螺旋区、Ozols 肽区及部分芳香化酶特异性保守区。将此片段与许氏平鲷 *CYP19A* 基因片段比对发现其同源性仅有 65%,因此可以确定许氏平鲷也像大多数鱼类一样具有两种不同基因编码的 P450arom,而作者克隆的 cDNA 长片段是 *CYP19B* 基因的核心功能区。通过对许氏平鲷 P450aromB 氨基酸序列与其它鱼类 P450aromB 及人类、爪蟾 P450arom 氨基酸序列进行多重比较发现,有多氨基酸位点是保守的,对酶活性起着重要作用位点 I133、E302、P308、D309、T310、R435、C437 也完全一致(Kao et al, 1996)。说明许氏平鲷 *CYP19B* 与其它物种 *CYP19* 在催化活性、结构及功能上是保守的。

CYP19B 在雌性许氏平鲷中表达较为广泛,在卵巢、脾脏、脑、脂肪和头肾中均有明显表达,其中脑的表达量最高,在其它组织中未见表达。在雄鱼的精巢、脑和心脏中有表达,脑中表达量明显高于精巢和

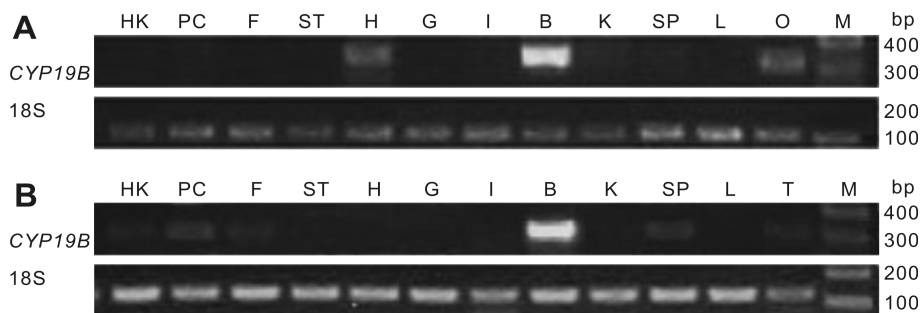


图3 *CYP19* 基因在雌性(A)、雄性(B)许氏平鲈各组织中的表达

Fig.3 The mRNA expression of *CYP19* gene in tissues of female (A) and male (B) *S. schlegelii*

O: 卵巢; T: 精巢; L: 肝脏; SP: 脾; K: 肾; B: 脑; I: 肠; G: 鳃; H: 心脏; ST: 胃;

F: 脂肪; HK: 头肾; PC: 盲囊; M: marker

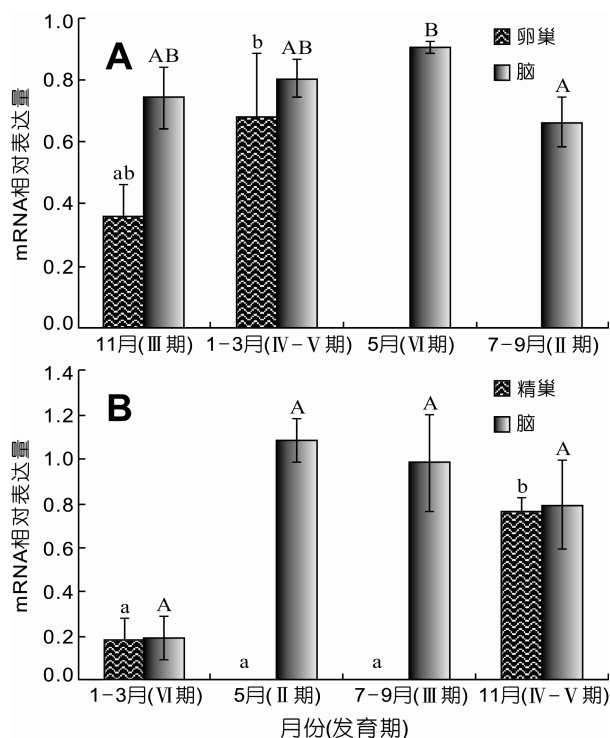


图4 *CYP19B* 基因在雌性许氏平鲈卵巢(A)、雌性许氏平鲈精巢(B)和脑中的相对表达量(*CYP19B*/18S)

Fig.4 Relative Expression Levels of *CYP19B* (*CYP19B*/18S) in ovary (female) (A), testis (male) (B) and brain of *S. schlegelii*

注: 数据均表示为平均值±标准误, 图中标有不同的字母表示存在显著性差异($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较)

心脏, 在其它组织中未见有表达。可见 P450aromB 在雌性和雄性许氏平鲈脑和性腺均有表达, 脑部 mRNA 在雌、雄鱼中的表达量明显高于性腺, 这个表达规律与金鱼、虹鳟以及半滑舌鳎的研究结果类似 (Callard *et al.*, 1997; 邓思平等, 2008); 也进一步证实, P450aromB 在脑、下丘脑、视网膜等神经组织中表达, 一方面参与中枢神经系统发育和性行为调节的推断 (Bjerselius *et al.*, 2001), 同时也可能与鱼类性腺

分化 (Trant *et al.*, 2001) 和繁殖活动密切相关 (Cavaco *et al.*, 2001)。这些说明雌激素在雌性和雄性鱼类生长、发育和繁殖中均发挥重要作用。也有部分鱼类, 如金鱼 P450aromB 只在脑中表达, 在卵巢中没有检测到 (Tchoudakova *et al.*, 1998), 可能与性腺发育期有关, 机制并不十分清楚。

许氏平鲈 P450aromB 在 11—3 月时卵巢均有表达, 此时卵巢处于 期和 期。在 3 月(期)

时卵巢表达量最高 ($P < 0.05$), 说明 P450aromB 对许氏平鲈卵巢发育发挥重要作用, 与脊椎动物和其它鱼类相似 (Robert *et al.*, 2002)。已有研究表明, 抑制芳香化酶 mRNA 表达或酶活性降低或抑制雌二醇, 是精巢分化所必需的 (Tzchoria *et al.*, 2004), 推测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 17α , 20β -二羟黄体酮, 进而影响到其性成熟和生殖行为相一致 (Vizziano *et al.*, 1996)。本研究证实雌性许氏平鲈的 *CYP19B* 在脑中表达模式与黑鲷及金鱼相似 (Pasmanik *et al.*, 1988), 在雌鱼脑中表达量明显高于雄鱼, 说明 E_2 主要作用于卵巢发育成熟。雌性许氏平鲈 *CYP19B* 在繁殖后期表达量显著高于非繁殖期, 与舌齿鲈和金鱼研究结果相似 (Gonzalez *et al.*, 2003), 循环血液中的类固醇激素在一定程度上受脑芳香化酶活性的调节 (Pasmanik *et al.*, 1988)。繁殖季节的雄性许氏平鲈脑组织中芳香化酶表达量最低, 再次证明雌二醇在精巢生殖周期中可能起负调节作用, 生理机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- 邓思平, 陈松林, 刘本伟等, 2008. 半滑舌鳎脑芳香化酶基因 cDNA 克隆及表达分析. 动物学研究, 29(1): 17—24
- 李广丽, 刘晓春, 张 勇等, 2004. 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. 动物学报, 50(5): 791—799
- 陈大刚, 叶振江, 段 钮等, 1994. 许氏平鲈繁殖群体的生物学及其苗种培育的初步研究. 海洋学报(中文版), 16(3): 94—101
- 陈晓燕, 温海深, 何 峰等, 2011. 半滑舌鳎促性腺激素受体在雄性生殖周期中的表达. 海洋与湖沼, 42(2): 201—206
- 陈彩芳, 温海深, 何 峰等, 2009. 程序化设计的简并引物克

- 隆半滑舌鲷 CYP17 基因. 中国海洋大学学报(自然科学版), 39(6): 1213—1218
- Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsen H *et al*, 2001. Male goldfish reproductive behavior and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -estradiol. *Aquat Toxicol*, 53: 139—152
- Callard G V, Tchoudakova A, 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *J Steroid Biochem & Mol Biol*, 61(3—6): 387—392
- Cavaco J E, Baal J, Dijk W *et al*, 2001. Steroid hormones stimulate gonadotrophs in juvenile male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod*, 64: 1358—1365
- Gonzalez A, Pifferrer F, 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain, distribution and changes in relation to and, sex and the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*, 132: 223—230
- John M T, Sonja G, Jared A *et al*, 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in Zebrafish fry (*Danio rerio*). *J Exp Zool*, 290: 475—483
- Kao Y C, Cam L L, Laughton C A *et al*, 1996. Binding characteristics of seven inhibitors of human aromatase: a site-directed mutagenesis study. *Cancer Res*, 56: 3451—3460
- Pasmanik M, Callard G V, 1988. Changes in brain aromatase and 5 α -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology*, 122: 1349—1356
- Piferrer F, Bla'zquez M, 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem*, 31: 215—226
- Robert H D, Yoshitaka N, 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191—364
- Tchoudakova A, Callard G V, 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology*, 139(4): 2179—2189
- Trant J M, Gavasso S, Ackers J *et al*, 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *Exp Zool*, 290: 475—483
- Tzchoria I, Gad Degani G, Hurvitz A *et al*, 2004. Cloning and developmental expression of the Cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*). *General and Comparative Endocrinology*, 138: 271—280
- Vizziano D, Fostier A, 1996. Effect of 17 beta-estradiol, testosterone and 11-ketotestosterone on 17, 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the rainbow trout testis. *Gen Comp Endocrinol*, 104: 179—188
- Yu J H, Tang Y K, Li J L, 2008. Cloning, Structure, and Expression Pattern of the P-450 aromatase gene in rice field eel (*Monopterus albus*). *Biochem Genet*, 46: 267—280
- Zhang Y, Zhang W M, Zhang L H *et al*, 2004. Two distinct cytochrome P450 aromatase in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 92: 39—50

CLONING AND THE EXPRESSION ANALYSIS OF CYP19A GENE cDNA DURING THE REPRODUCTIVE CYCLE OF SEBASTES SCHLEGELI

YANG Yan-Ping, WEN Hai-Shen, SHI Dan, MU Wei-Jie, HE Feng, LI Ji-Fang
(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Using nested RT-PCR technology, we cloned brain cytochrome P450 aromatase (P450aromB) gene (CYP19B) cDNA fragment of the major functional areas of black rockfish (*Sebastes schlegeli*). The mRNA expression was examined in the gonads of male and female black rockfish (*S. schlegeli*) at different stages of gonadal development. The cloned cDNA function sequence with an open reading frame of 1109 nucleotides encoded 495 predicted amino acid residues, cross-domain gene family characteristics of the three regions, including the I-helix, Ozol's peptide region, and some aromatic region. In addition, the sites of I133, E302, P308, D309, T310, R435, C437 which consistent with human aromatase gene play an important role on the activity. RT-PCR analysis showed that the CYP19B was expressed in gonads and brain of male and female, but it was more abundant in the brain than in the gonads. The results showed that periodic expression of CYP19B in the early reproductive gonads is more abundant, and there is no expression at stage . In the stage , the relative expression level of CYP19B in brain is the highest. In the stage , the relative expression level was the lowest. The study indicates that, CYP19B may play an important physiological role in both female and male black rockfish reproductive.

Key words *Sebastes schlegeli*, P450aromB, Clone, mRNA expression