

# 绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*) *CYP19a* 基因克隆与表达特征分析\*

张冬茜 温海深 钱焜 迟美丽 倪蒙 步艳 丁玉霞

(中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

**提要** 利用简并引物扩增及 RACE 全长克隆技术, 克隆得到绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*) *CYP19a* 基因 cDNA 全长序列。通过多序列比对, 发现具有芳香化酶特定保守序列, 包括一个 I-螺旋区, 一个 Ozol 肽区, 一个亚铁血红素结合区域以及一个芳香化酶特异性结合区域。通过 RT-PCR 技术检测了其在绿鳍马面鲈成鱼各组织表达的情况, 发现其 *CYP19a* 基因只在卵巢中有表达; 同时也分析了其在不同卵巢发育期的表达情况, 发现 *CYP19a* 在卵黄发生后期表达量达到最高值, 卵巢退化吸收期表达量达到最低值。

**关键词** 绿鳍马面鲈; P450 芳香化酶; 基因克隆; mRNA 表达  
**中图分类号** Q786, S917

绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*), 属鲈形目(Tetraodontiformes)、革鲈科(Aluteridae)、马面鲈属(*Navodon*) (孟宪菊等, 2009)。主要分布于太平洋西部, 国外常见于日本、朝鲜半岛沿海, 非洲东岸等。在我国主要分布于东海、南海、黄海、渤海和台湾沿海, 其中东海产量较大(李平伦等, 2003)。绿鳍马面鲈属于温水性底层鱼类, 肉质洁白坚实, 味道鲜而不腻, 营养丰富, 蛋白质含量高于带鱼, 鱼肉纤维较长, 可制成鱼绒或鱼糜制品, 还可深加工制成烤鱼片, 诸多产品畅销国外, 市场前景十分广阔(孟宪菊等, 2009)。

芳香化酶(P450arom)是细胞色素 P450 家族中的一员, 是类固醇代谢中的一种重要酶类, 可催化雄激素转化为雌激素(Simpson *et al*, 1994), 是雌激素生物合成过程中的关键酶和限速酶(Simpson *et al*, 2002)。已有研究表明, 芳香化酶可以影响哺乳动物的中枢神经系统的功能和发育, 调节繁殖功能以及神经内分泌(Lephart, 1996)。很多实验已证明芳香化酶可以参与鱼类性别分化以及性别转化(Nakamura *et al*, 1998)。

在大多数哺乳动物中, 芳香化酶由单基因编码, 但在鱼类中却发现两种不同基因编码的芳香化酶, 即性腺型芳香化酶(P450aroma)和脑型芳香化酶(P450aromb), 而且鱼类脑中芳香化酶的表达量远高于兔、鼠和人(Lephart, 1996)。大多数关于性腺型芳香化酶的研究证明, P450aroma 参与了雌激素的生物合成以及卵巢分化, 一些研究认为 P450aromb 决定中枢雌二醇生物合成, 参与性腺分化(Lephart, 1996)。至今, 一些鱼类的 *CYP19a* 基因已经被分离并且克隆得到, 如克氏海葵鱼(*Amphiprion clarkii*) (Yasuhisa *et al*, 2010)、大西洋黄鱼(*Micropogonias undulatus*) (Scott *et al*, 2006)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) (徐跑等, 2005)、条斑星鲈(*Verasper moseri*) (金国雄等, 2010)。本实验主要克隆得到了绿鳍马面鲈 *CYP19a* 的全长 cDNA 序列, 对其序列进行比较分析, 应用半定量 RT-PCR 技术对 *CYP19a* 基因 mRNA 在组织及不同发育期卵巢中的表达情况进行了分析, 旨在为研究绿鳍马面鲈 *CYP19a* 功能研究奠定基础, 也为建立人工繁殖提供科学依据。

\* 山东省科技攻关计划课题资助, 2009GG10005017 号。张冬茜, 硕士研究生, E-mail: zdqnell@163.com

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

收稿日期: 2012-03-12, 收修改稿日期: 2012-05-17

## 1 材料与方法

### 1.1 实验样品

实验用绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*)采自烟台百佳水产有限公司, 2010年11月—2011年9月, 每2个月采样1次, 每次采样人工养殖绿鳍马面鲈10尾, 解剖观察补充各性别至少到3尾, 共采样6次, 总计68尾, 体长为20.2—29.5cm, 体重195.5—650.3g, 其中雌鱼37尾。在实验室水族箱里暂养2—3d, 每次采样前将绿鳍马面鲈置于实验室水循环系统中暂养1d, 流水充氧, 满足人工光照、自然水温。解剖取出各组织。Bouin氏液固定部分性腺, 用于组织学观察。各组织样品迅速置于液氮中, 采样结束后放入-80℃超低温冰箱保存, 用以后续的总体RNA提取。计算性腺成熟系数(GSI) =  $[GW/(BW-VW)] \times 100$ , 肥满度(CF) =  $(BW/BL^3) \times 100$ , 肝重指数(HSI) =  $[LW/BW] \times 100$ 。

### 1.2 性腺组织学分期

将置于Bouin氏液中的卵巢进行常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 5 $\mu$ m切片, H.E染色, 中性树脂封片, 显微镜观察分期。

### 1.3 试剂及引物

引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, Smart<sup>TM</sup> Race cDNA Amplification kit试剂盒购自Clontech公司, RNA提取试剂RNAiso Reagent和基因表达所用Taq酶试剂盒为TakaRa公司产品, M-MLV购自Promega公司, 普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂

盒、pGM-T载体购自北京天根生化科技有限公司, 大肠杆菌DH5 $\alpha$ 和基因克隆所用HiFi Taq酶购自北京全式金生物技术有限公司。其它试剂均为国产分析纯。根据已知鱼类*CYP19a*保守序列, 利用CodeHop原理设计简并引物(Rose *et al.*, 1998), 简并引物AF1、AR1, 根据得出片段再设计特异性引物AF2、AR2, 用PRIMER PRIMER 5.0设计全长克隆特异性引物SP5、SP3, 18S表达引物SF1、SR1, *CYP19a*基因表达引物AF3、AR3(表1), 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

### 1.4 总RNA提取和cDNA合成

将-80℃超低温冰箱中保存的组织样品取出, 各取100mg, 用RNAiso Reagent抽提总RNA, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 用DNase 酶去除基因组DNA, 核酸测定仪(Biodropsis, BO-1000)测定浓度。使用M-MLV试剂盒, 按照说明书进行RNA反转录, 合成片段克隆及组织周期表达所需cDNA模版。提取新鲜性腺组织总RNA用以合成全长克隆模版, 使用Smart<sup>TM</sup> Race cDNA Amplification kit试剂盒, 按照说明书进行操作。

### 1.5 *CYP19a* 全长克隆

利用表1中的克隆引物, 以绿鳍马面鲈成鱼卵巢的cDNA为模板, 进行PCR反应, 扩增目的基因片段。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 切下目的条带, 使用TIANGEN胶回收试剂盒纯化PCR产物, 严格按照说明书进行操作。回收DNA使用T4连接

表1 绿鳍马面鲈*CYP19a*基因克隆和表达所用引物

Tab.1 Primers used for *N. septentrionalis* *CYP19a* gene cloning and mRNA expression analysis

引物名称	引物序列(5'—3')	扩增序列长度(bp)
片段克隆引物		
AF1	TGAGCTGCATCGGCATGTAYGARMG	526
AR1	TCCAGCACGCACTGCACNACRTTYTC	
AF2	TATGGATCTGATCTCTGCTTGTGA	1243
AR2	AGGCTGAAGTCGTTGGGTTTGAGG	
5' RACE引物		
SP5	GGAATCTCAGGTATGACAGCAGTGGG	577
3' RACE引物		
SP3	AGGGAACAAACATCATTCTGAACACCG	303
RT-PCR引物		
AF3	CTACTGTTCCACGCTTTGG	297
AR3	GAGCCTGTTGAGATGTC	
18S F	CCTGAGAAACGGCTACCACATC	119
18S R	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	

酶连接至 pGM-T 载体中,将重组质粒转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,使用蓝白斑筛选,挑选白色菌斑进行菌体 PCR,阳性克隆送至北京华大公司测序。根据已获得的片段,利用表 1 中 3'RACE 和 5'RACE 引物,按照 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒的方法,从绿鳍马面鲷成鱼性腺中扩增目的基因 3'RACE 和 5'RACE 序列,利用 DNAMAN 软件进行拼接,获得目的基因全长。

### 1.6 *CYP19a* 基因全长分析与系统进化树构建

使用 DNAMAN 对测序结果进行分析,将 mRNA 全长序列以及推断所得氨基酸序列进 Blast 同源搜索,并使用 Clustal X 将其与其它物种 P450arom 氨基酸序列进行多重序列比对,使用 MEGA 4.0 邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建系统进化树(Kumar *et al.*, 2004)。

### 1.7 *CYP19a* 基因组织特异性及在卵巢繁殖周期中的表达

**1.7.1 *CYP19a* 在各组织表达检测** 根据 mRNA 全长序列设计特异性引物(表 1),以 18S 作为内参基因,对脑、垂体、心、肝、脾、胃、肾、腮、肠、肌肉、卵巢、精巢的 cDNA 进行 PCR 扩增。18s 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 退火温度 61 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 反应 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。特异性表达引物反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 退火温度 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 反应 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取 5 $\mu$ L 的 PCR 产物进行检测,对电泳结果采用 Lane 1D 凝胶图像处理系统进行分析。

**1.7.2 *CYP19a* 在雌鱼生殖周期中的表达检测** 根据 H.E 染色结果,从每次采样样品中发育较为一致的雌鱼中挑选 3 个卵巢样品,提取 RNA 后进行反转录,用于 mRNA 表达检测。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 退火温度 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 反应 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取 5 $\mu$ L 的 PCR 产物进行检测分析。

### 1.8 数据分析

实验所得数据表示为平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD),采用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,并进行 Duncan's

多重比较,当  $P < 0.05$  时,认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 雌性绿鳍马面鲷性成熟系数(GSI)、肝重系数(HSI)、肥满度(CF)周年变化

随着卵巢发育周年变化的进行,卵巢成熟系数(GSI)以及肝重指数(HIS)也相应地发生变化。根据对全年数据的统计,雌性绿鳍马面鲷 GSI 最高峰出现在 5 月,为 5.61,其最低点在 11 月,为 2.15; 其 HIS 最高峰出现在 1 月,为 14.52,最低点在 9 月,为 8.94; 其肥满度全年变化不大,最高峰出现在 1 月和 3 月,均为 2.34,其最低点出现在 9 月,为 2.00(表 2)。

### 2.2 卵巢周年发育观察

卵巢组织切片观察,发现绿鳍马面鲷卵巢属于非同步发育,分期根据各时期切片视野中数量或者面积占优势的卵母细胞类型作为卵巢划分依据,将性腺分为 6 期(柳学周等, 2009)。2010 年 11 月所采卵巢含有大量初期卵母细胞,为 期早期(图 1a); 2011 年 1 月所采卵巢依然含有大量初级卵母细胞,为 期晚期(图 1b); 2011 年 3 月卵巢中的卵母细胞开始合成初级卵黄,为 期(图 1c); 2011 年 5 月所采集的卵巢样品中既有含有大量次级卵黄的卵母细胞的 期卵巢(图 1d)又有含有成熟卵黄的卵母细胞的 期卵巢(图 1e); 2011 年 7 月卵巢处于退化吸收期,可见大量排空的滤泡囊壁,为 期(图 1f); 2011 年 9 月处于重复发育 期,其卵巢发育与 2010 年 11 月基本一致。

### 2.3 *CYP19a* 基因的全长序列

克隆得到 *CYP19a*(GenBank 登录号: JQ965766)全长 cDNA 序列为 1746bp,其中 5'非编码区 49bp, 3'非编码区 173bp, 开放阅读框 1524bp, 编码 507 个氨基酸。推导的氨基酸序列 304—339 位为 I-螺旋区, 366—386 位为 Ozol 肽区, 424—433 位为芳香化酶特异性保守区, 444—470 位为亚铁血红素结合区(图 2)。

### 2.4 序列分析和系统进化分析

使用 DNA MAN 软件推断克隆得到的 *CYP19a* 全长(1746bp)的氨基酸序列,可知 5'-UTR 长 49bp,

表 2 雌性绿鳍马面鲷 GSI、HIS、CF 季节变化

Tab.2 GSI, HIS and CF in female *N. septentrionalis*

生物学指标	11 月	1 月	3 月	5 月	7 月	9 月
HSI(%)	11.45 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	14.52 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	14.29 $\pm$ 1.01 <sup>c</sup>	9.75 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	9.26 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	8.94 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>
GSI(%)	2.15 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	3.01 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	3.73 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	5.61 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	5.58 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	2.92 $\pm$ 0.58 <sup>ab</sup>
CF(10 <sup>-2</sup> )	2.23 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	2.34 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.34 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	2.42 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	2.23 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	2.00 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>

注: 数据均表示为平均数 $\pm$ 标准差,不同上标字母表示存在显著性差异( $P < 0.05$ , one-way ANOVA, followed by Duncan's)

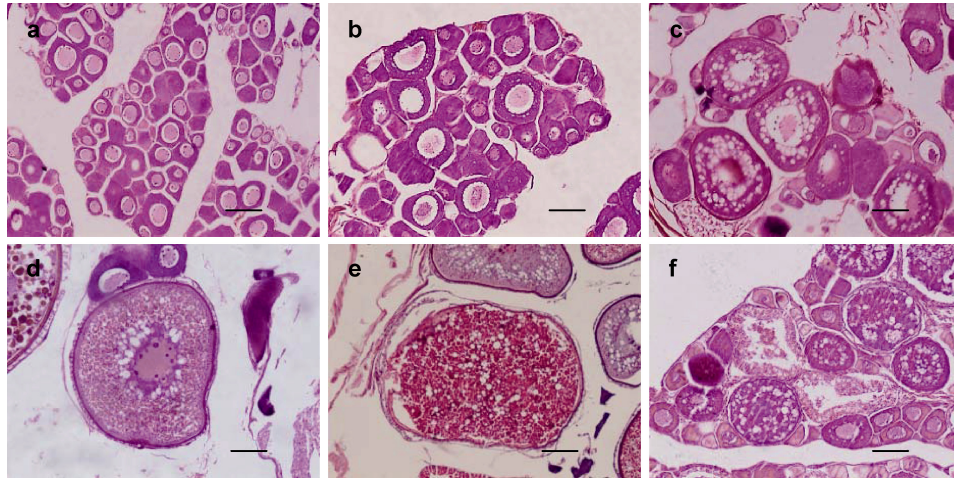


图 1 绿鳍马面鲈的卵巢组织学切片

Fig.1 Histological sections in the ovary of *N. septentrionalis*

a. 期早期, 比例尺=70 $\mu$ m; b. 期晚期, 比例尺=70 $\mu$ m; c. 期, 比例尺=70 $\mu$ m; d. 期, 比例尺=70 $\mu$ m; e. 期, 比例尺=70 $\mu$ m; f. 期, 排卵后滤泡细胞层, 比例尺=70 $\mu$ m

3'-UTR 长 173bp。50—1573bp 共 1524bp, 编码 507 个氨基酸。序列中包括一个 I-螺旋区, 一个 Ozol 肽区以及一个亚铁血红素结合区域, 同时具有芳香化酶特异性结合区域。使用 Clustal X 软件将绿鳍马面鲈 *CYP19a* 氨基酸序列与其它物种 *CYP19a* 氨基酸序列比对, 发现四个功能区域较为保守(图 3)。

用 Blast 比较蛋白质序列, 得到相似性较高的序列都是鱼类 *CYP19a* 序列, 可知绿鳍马面鲈 *CYP19a* 与尖吻鲈(*Latescal carifer*, AAV91179)、克氏海葵鱼(*Amphiprion clarkii*, BAI44466)、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*, AAR97601)、黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*, AAP23236)等相似度都为 78%, 与许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*, ACN39247)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*, CAC43178)、日本拟隆头鱼(*Pseudolabrus japonicus*, ABB96485)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*, ACO35041)等相似度为 77%。

用 Clustal X 软件将绿鳍马面鲈 *CYP19a* 氨基酸序列与文昌鱼、人、小鼠、非洲爪蟾、斑马鱼等 15 个物种的 *CYP19a* 序列进行比对, 硬骨鱼类汇为一个分支, 绿鳍马面鲈 *CYP19a* 与尖吻鲈、点带石斑鱼、红鳍东方鲷等硬骨鱼 *CYP19a* 的进化地位均较为接近(图 4)。

### 2.5 *CYP19a* 的组织表达模式

采用 RT-PCR 技术研究了 *CYP19a* 在性成熟绿鳍马面鲈各组织中的表达模式, 发现 *CYP19a* 只在卵巢检测到表达, 精巢以及脑等其它组织未检测到表达(图 5)。

### 2.6 *CYP19a* 在雌性绿鳍马面鲈繁殖周期中的表达模式

检测了绿鳍马面鲈卵巢的繁殖周期表达, *CYP19a* 基因的相对表达量(*CYP19a*/18S)最高值出现在 5 月, 为 1.73, 随后显著降低, 最低值出现在 7 月, 为 0.48, 随后逐渐升高, 直至 5 月达到最高值(表 3)。

## 3 讨论

克隆得到的 *CYP19a* 全长序列 1746bp, 其中编码区长 1524bp, 编码 507 个氨基酸, 具有明显的细胞色素 P450 基因家族的特征: I-螺旋区、Ozol 肽区、芳香化酶特异性保守区以及亚铁血红素结合区(Simpson *et al*, 1989; Zhang *et al*, 2004), 说明绿鳍马面鲈此基因的催化活性、结构及功能是保守的, 其推导所得氨基酸序列与尖吻鲈等其它硬骨鱼类同源性高达 78%, 表明本实验克隆所得到的序列为绿鳍马面鲈 *CYP19a* 序列。

在组织表达模式中, 只有在绿鳍马面鲈卵巢中检测到了 *CYP19a* 的表达, 精巢以及脑等其它组织都无法检测到 *CYP19a* 的表达, 证明该基因具有卵巢表达特异性, 这与已报道的硬骨鱼如黄颡鱼(徐跑等, 2005)、底鳉(Greytak *et al*, 2005)、南方鲷(Liu *et al*, 2007) *CYP19a* 的组织表达情况一致。已有研究表明, 芳香化酶不仅在卵巢中表达也在精巢中表达, 但卵巢中表达水平远远高于精巢, 如斑马鱼(Sherilyn *et al*, 2006)、半滑舌鳎(Deng *et al*, 2009)等。同时, 芳香化酶也可以在性腺以外的组织表达, 这可能与所研究

```

1  GCTTTCCCCCTGACGCAGAGCGCTGCTGGTTTCTAGCTCAGCAACCTTATGATCTGTGAT
1  M D L I
61  CTCTGCTGTGAGCTGGAGATGATTTCATCGGCTGGACGCGGTGGCTGGCTGTGACCT
21  S A C E L E M I S I G L D A V V A A D L
121  GGTTCCTGTCACCAAGGCGCTGGCGTGGCTGGCTGTGCTGCTGCTGATGGAG
41  V S V S T R A L A L V A C A L L L A W S
181  CCACACCAGACAGAGCAGCTCCAGGTCATCTTCTGTCTGGGTCTGGGCCACTGCT
61  H T R Q S S S V P G P S F C L G L G P L L
241  GTCATACCTGAGATTCCTCTGCACTGGTATCGGCACAGCTACTACTACAGCAAGAA
81  S Y L R F L C T F G I G T A T N Y Y S K K
301  GTATGGAGACATAGTCAGAGTCTGGGTTAATGGAGAGGAAACTACTACTCAGCAGGCC
101  Y G D I V R V W V N G E E T L I L S R P
361  ATCAGCTGTGCCACGCTACTGAAGAACGCAAACTACTGTTACGCTTTGGGAGCAAAA
121  S A V H H R L R K N A Y F D I S P G V Y S K T
421  GGGACTCGGCTGCATCGGCATGTACGAGAGGATCATATTTAACAACAATCGCTGA
141  G L G C I G M Y E R G I I F N N N F A E
481  GTGAAAAAGATACGCCTATTTTTCACAAAGCTGTGACGGCCCGGGCGGTGCAGCAG
161  W K K I R L R G T V F V D I S N Y R L F
541  GGTGCAGGTGTGCAGCTCTCCACGCGGCGCACCTGGACGGCTGGAGGCTGCAGGA
181  V Q V C S S S T Q A H L D G L E S L Q D
601  CGTGGACGCTCTCGGCTGCTGCGAGGACCGCTGGTGCATCTCAACAGGCTCTCTCT
201  V D V L G R L R G T V D I S N R L F L
661  GGGGTGGCGGTAACGAGAAGGAGCTGCTGCTGAAGATCCAGAAGTATTTGCACGCTG
221  G V A V N E K E L L L K I Q K Y F D T W
721  GCAGACGGTGTGATCAGCCGAGGTTTACTTCAAGCTGGACTGGATCCACCGGAAGCA
241  Q T V L I R L R K L D W I H R K H
781  CAAGGAGGCGGCGAGGAGCTGCAGGATGCCATCGAGAGCTGATAGAGCAGAAGAGGAG
261  K E A A Q E L Q D A I E S L I E Q K R R
841  AGATTTGAAGGAGCAGCAAACTGGACGCCATCACTTCACTGCTGAGTCTCATATTTGC
281  D L K E A D L K D A I N F T A E L I F A
901  GCAGAGTCATGGTGAAGTGTGCGGAGAATGTTGTCAGTGCCTGGAGATGGTGAT
301  Q S H G E L S A E N V V Q C V L E M V I
961  CGCGGCGCAGACAGCTGTCCATAGCCTCTTCTTCACTGCTGCTCTCAAGCAGAA
321  A A P D T L S I S L F F M L L L L K Q N
1021  TCCCAACGTGGAGCTGCAGCTGCTGGGAGATCGACGACGCTTGGGTGAGAAGCGCT
341  P N V E L Q L L R E I D D V V G E K P L
1081  ACAGAAGGGGACCTCAGAAGCTGCAGGCTGCTGGAGTCTTCAACAGCAGAGCTTGGC
361  Q K G D L Q K L Q V L E S F I N E S L R
1141  CTTCCACCCAGTGGTGGACTTCACCATGGCTCGAGCCCTGCTGAGGACATCATTTAGGG
381  F H P V V D F T M R R A L S E D I I E G
1201  TCACAGGTCGCCAAGGGCACAACATCATTTGAACACCGGGCAGATGCACCAGAATGA
401  H R V P K G T N I I L N T G H M H Q N E
1261  GTTCTTCTCAACCCACGACTTCAGGCTGGAGAATTTTCAGAAAAATGCTCTCGCCG
421  F F L K P N D F S L E N F Q K N A P R R
1321  TTTTTCCAGCGTTCGGATCGGGCCCGCGCTGCGTGGGAAGCAGCTTGCATGGT
441  F F Q P F G S G P R A C V G K H V A M V
1381  CATGATGAAATCCGCTCGGGGCGCTGCTCCTCCGTTACTCTGTTTGTCCCACTCGGG
461  M M K S V L G T L L S R Y S V C P H S G
1441  CTTGACGCTGGACTGCCTCCCACTGACCAACCTCAGCCAGCAGCTGTAGAACATCA
481  L T L D C L P L T N N L S Q Q P V E H Q
1501  GCAGAAGGCCCATCATCGGCTGAGCTTCTTACCAGCAGAGAGGAGCCGCGCAAC
501  Q E A H H L G M S F L P R Q R G S R Q T
1561  ACTCTGTACTAAATCTACTTGCCTGATCTCCCTGCTGGTGTACAAAGCTAACTT
521  L C Y
1621  TTATATATTGTGTATCCAATCTGACTCTGTTTAACTATGGTGGATTGTTTGAGAT
1681  GAACATATAAGCTGATAAATATAATTTATCTGCCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
1741  AAAAAA

```

图2 绿鳍马面鲈 *CYP19a* cDNA 序列和推导的氨基酸序列  
 Fig.2 cDNA and predicted amino-acid sequences of *N. septentrionalis CYP19a*

方框为起始密码子; 下划线为加尾信号; 灰色阴影为其保守序列: I-螺旋区, Ozol 肽区, 芳香化酶特异性保守区, 亚铁血红素结合区

的鱼种类以及性腺发育阶段相关(Lee *et al*, 2002; Kobayashi *et al*, 2004; 李广丽等, 2004)。

组织切片观察可知, 人工养殖的雌性绿鳍马面

鲈, 其生殖周期与野生绿鳍马面鲈生殖周期基本一致。2010 年 11 月, 雌鱼 GSI 位于全年最低点, 卵巢处于 期早期; 2011 年 1 月, GSI 值开始逐渐升高, 卵巢开始初步发育, 此时处于 期晚期, 同时其 *CYP19a* 表达量也开始逐渐升高。从 3 月开始, 性腺显著发育, 卵黄开始累积, GSI 显著高于 11 月, 此时大部分为 期卵巢, *CYP19a* 相对表达量也显著高于 1 月。5 月, 大部分卵母细胞的卵黄累积过程接近结束, 此时 GSI 值达到全年最高峰, 卵巢处于 期和 期, *CYP19a* 基因表达量同时也达到峰值。7 月, 卵母细胞成熟后卵巢排卵, 此时卵巢开始退化吸收, GSI 依旧维持在较高水平, 大部分变为 期卵巢, *CYP19a* 表达量显著降低至全年最低点。9 月卵巢处于重复发育 期, 卵巢完成退化吸收, GSI 显著降低, *CYP19a* 基因表达量开始逐渐回升。HIS 指数变化与 GSI 变化基本呈相反趋势, 从 9 月开始逐渐升高, 此时性腺发育程度较低, 肝脏开始合成营养物质储备能量; 到 11 月显著升高, 此时肝脏大量储存能量用以越冬; 1 月到达 HIS 最高值; 随后, 大量能量用以性腺发育, 5 月开始显著降低, 直至 9 月再次升高。CF 全年变化较小, 其最低值出现在 9 月, 此时繁殖季节结束, 鱼体能量被大量消耗, GSI、HIS 都处于较低水平, 随后开始储存能量, CF 值逐渐升高。这个结果与以前的普遍观点相一致, 说明了绿鳍马面鲈性腺发育, 性腺成熟系数, 肝重指数以及饱满度之间有着密切的关系, 呈现了明显季节性变化, 同时也显示了 *CYP19a* 表达量对卵巢周年发育有重要影响。

P450 芳香化酶能催化雌激素转变为雄激素, 对鱼类性别分化具有重要作用。同时芳香化酶还能保证卵母细胞的卵黄生成及累积, 使得卵子发育正常进行。绿鳍马面鲈 *CYP19a* 基因的全年周期表达量有明显规律性, 从重复发育期开始, 随着 *CYP19a* 表达量的逐渐升高, 卵巢开始发育, 卵黄开始累积, 卵巢达到最终成熟阶段; 卵黄累积完成时, *CYP19a* 表达量达到最高值, 随着排卵完成, 其表达量骤然降低至全年最低水平。有研究表明, *CYP19a* 转录浓度在重复发育开始及卵泡卵黄累积早期呈上升趋势, 卵黄累积完成后又急剧下降(Chourasia *et al*, 2008), 由于采集间隔时间较长, 2 个月内卵巢经历 3 个时期的变化, 无法测定在卵母细胞最终成熟到排卵后 *CYP19a* 的精确变化, 不能确定 *CYP19a* 表达量降低是在产卵前或者产卵后, 但有研究显示, 大眼鲈(*Stizostedion vitreum*) (Barry *et al*, 1992)和金鱼(Pasmanik *et al*, 1988)在产卵

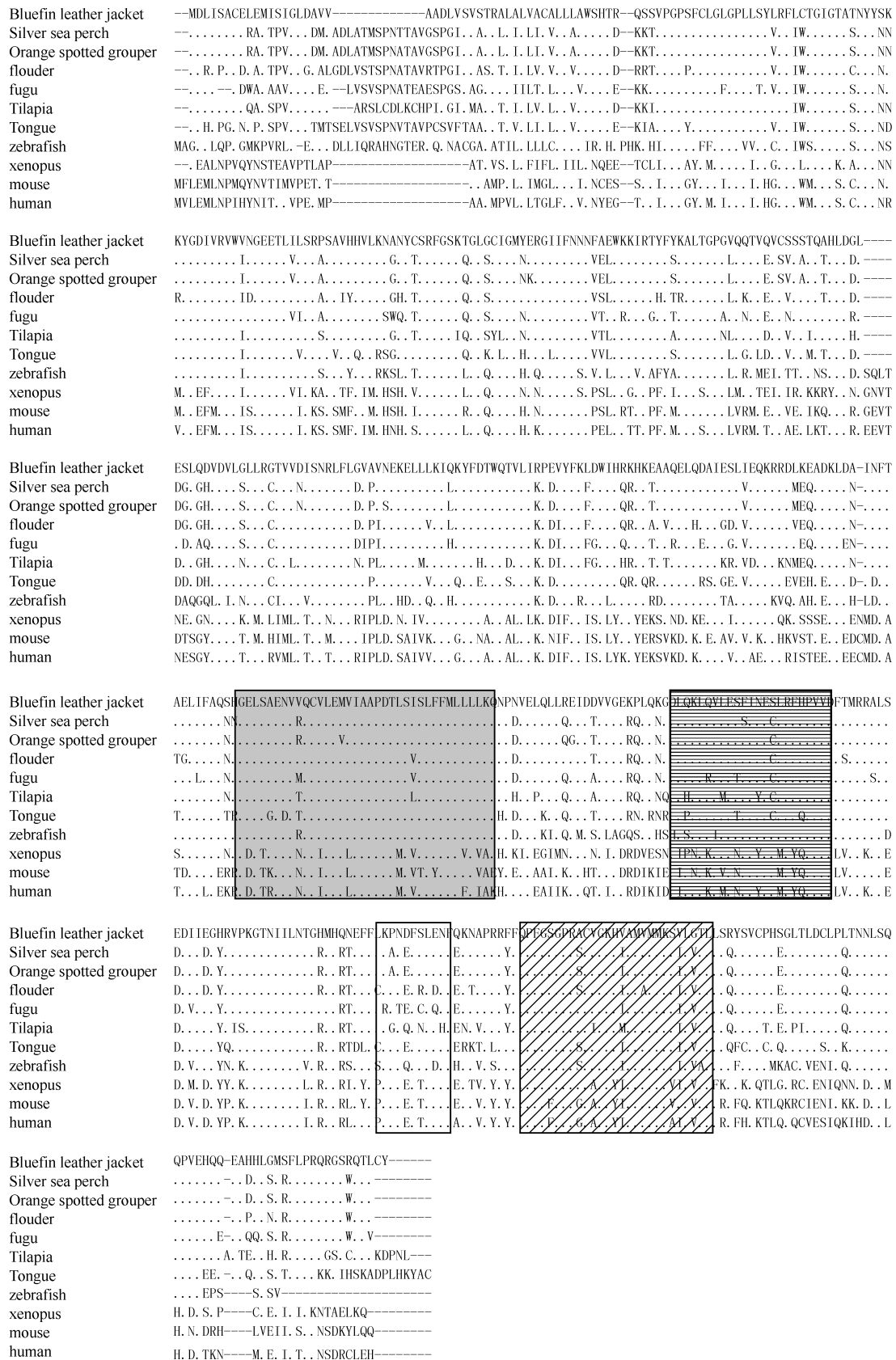


图 3 绿鳍马面鲈 *CYP19a* 与其它物种 *CYP19a* 氨基酸序列比对(Clustal X 1.81)

Fig.3 Alignment of amino acid sequences of *N. septentrionalis CYP19a* and comparison to other species (Clustal X 1.81)  
深灰色方框为 I-螺旋区; 虚格线方框为 Ozol 肽区; 空白方框为芳香化酶特异性保守区; 斜线方框为亚铁血红素结合区



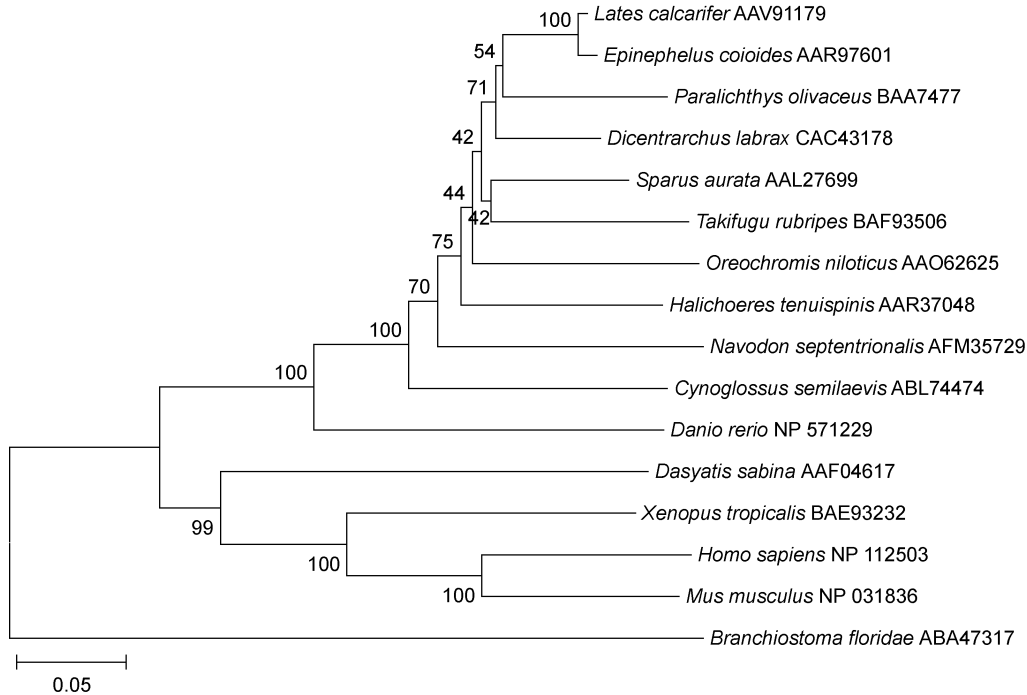


图 4 不同动物物种 *CYP19a* 氨基酸构建的系统进化树

Fig.4 A phylogenetic tree constructed for amino acid sequences of *CYP19a*

GenBank *CYP19a* 登陆号: 斑马鱼(NP571229), 半滑舌鲷(ABL74474), 人(NP112503), 文昌鱼(ABA47317), 小鼠(NP031836), 非洲爪蟾(BAE93232), 尖吻鲈(AAV91179), 红旗东方鲀(BAF93506), 金头鲷(AAL27699), 点带石斑鱼(AAR97601), 舌齿鲈(CAC43178), 牙鲆(BAA7477), 细棘海猪鱼(AAR37048), 罗非鱼(AAO62625), 大西洋鲑(AAF04617), 绿鳍马面鲀(JQ965766)

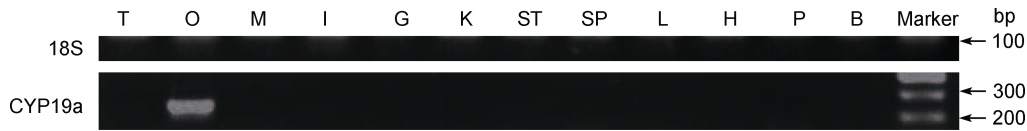


图 5 *CYP19a* 在绿鳍马面鲀的组织表达

Fig.5 Tissue distribution of *CYP19a* in *N. septentrionalis*

B. 脑; P. 垂体; H. 心; L. 肝; SP. 脾; ST. 胃; K. 肾; G. 腮; I. 肠; M. 肌肉; O. 卵巢; T. 精巢; Marker. DNA 分子量标准

表 3 *CYP19a* 在绿鳍马面鲀卵巢发育期相对表达量(*CYP19a*/18S)

Tab.3 Relative expression of *CYP19a* mRNA during ovary developmental stages of *N. septentrionalis*

月份	11月	1月	3月	5月	7月	9月
<i>CYP19a</i> /18S	0.95±0.05 <sup>bc</sup>	1.01±0.10 <sup>c</sup>	1.34±0.04 <sup>d</sup>	1.73±0.10 <sup>e</sup>	0.48±0.05 <sup>a</sup>	0.86±0.06 <sup>b</sup>

数据均表示为平均数 ± 标准差, 不同上标字母表示存在显著性差异( $P < 0.05$ , one-way ANOVA, followed by Duncan's)

前体内芳香化酶活性受到调节而降低。芳香化酶表达量决定着硬骨鱼卵巢成熟以及其重复发育(Guiguen *et al*, 2010), *CYP19a* 表达量对卵母细胞发育有重要作用, 这也在日本鳗鲡(Ijiri *et al*, 2003)的研究中得到了证明。

本研究克隆了绿鳍马面鲀的 *CYP19a* 全长, 显示了其组织表达的特异性, 同时研究了其在绿鳍马面鲀生殖周期中的表达, 为进一步揭示 *CYP19a* 对于绿鳍马面鲀性腺发育的作用研究奠定了基础, 为绿鳍马面鲀的人工繁殖提供了一定的理论基础。

### 参 考 文 献

- 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
- 李平伦, 李德军, 徐金波等, 2003. 绿鳍马面鲀海上网箱养殖技术要点. 齐鲁渔业, 20(10): 10—11
- 金国雄, 温海深, 柳学周等, 2010. 条斑星鲈 *CYP19a* 基因克隆及其在雄鱼生殖周期中的表达. 水产学报, 34(2): 194—203
- 孟宪菊, 张利民, 2009. 绿鳍马面鲀的生物学特性及人工养殖前景. 齐鲁渔业, 26(6): 47—48
- 柳学周, 徐永江, 刘乃真等, 2009. 半滑舌鲷卵巢发育的组织

- 学和形态数量特征研究. 渔业科学进展, 30(6): 25—35
- 徐 跑, 俞菊华, 唐永凯等, 2005. 黄颡鱼卵巢 P-450arom 基因的克隆及组织表达. 中国水产科学, 12(5): 541—548
- Barry T P, Procarione L S, Lapp A F *et al*, 1992. Induced final oocyte maturation and spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture*, 92: 21—25
- Chourasia T K, Joy K P, 2008. Ovarian P450 aromatase activity in the catfish *Heteropneustes fossilis*: Seasonal changes and effects of catechol estrogens. *General and Comparative Endocrinology*, 156: 537—543
- Deng S P, Chen S L, Xu J Y *et al*, 2009. Molecular cloning, characterization and expression analysis of gonadal P450 aromatase in the half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture*, 287: 211—218
- Greytak S R, Denise C D, Gloria V *et al*, 2005. Isolation and characterization of two cytochrome P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): Differential expression in fish from polluted and unpolluted environments. *Aquatic Toxicology*, 71: 371—389
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F *et al*, 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 352—366
- Ijiri S, Kazeto Y, Lokman P M *et al*, 2003. Characterization of a cDNA encoding P-450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*, 130: 193—203
- Kobayashi Y, Kobayashi T, Nakamura M *et al*, 2004. Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. *Zoological Science*, 21: 417—425
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150—163
- Lee Y H, Yueh W S, Du J L, 2002. Aromatase inhibitors block natural sex change and induce male function in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker: Possible mechanism of natural sex change. *Biology of Reproduction*, 66(6): 1749—1754
- Lephart E D, 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Research Reviews*, 22(1): 1—26
- Liu Z, Wu Fengrui, Jiao B *et al*, 2007. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *Journal of Endocrinology*, 194: 223—241
- Nakamura M, Kobayashi T, Chang X *et al*, 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281: 362—372
- Pasmanik M, Callard G V, 1988. Changes in brain aromatase and 5 $\alpha$ -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology*, 122: 1349—1356
- Rose T M, Schultz E R, Henikoff J G *et al*, 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research*, 26(7): 1628—1635
- Scott N B, Scott L A, 2006. Tissue- and sex-specific regulation of CYP19A1 expression in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 149: 205—216
- Sherilyn J, Sawyer, Kelly A *et al*, 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147: 108—117
- Simpson E R, Clyne C, Rubin G *et al*, 2002. Aromatase—a brief overview. *Annual Review of Physiology*, 64: 93—127
- Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D *et al*, 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, 15: 342—355
- Simpson E R, Merrill J C, Hollub A J *et al*, 1989. Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells. *Endocrine Reviews*, 10: 136—148
- Yasuhisa K, Ryo H, Saori M *et al*, 2010. Sex- and tissue-specific expression of P450 aromatase (cyp19a1a) in the yellowtail clown fish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 155: 237—244
- Zhang Y, Zhang W M, Zhang L H *et al*, 2004. Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92: 39—50



## THE GENE CLONING OF *CYP19a* AND ITS EXPRESSION CHARACTERIZATION ANALYSIS IN *NAVODON SEPTENTRIONALIS*

ZHANG Dong-Qian, WEN Hai-Shen, QIAN Kun, CHI Mei-Li,  
NI Meng, BU Yan, DING Yu-Xia  
(College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

**Abstract** Cytochrome P450s aromatizing enzyme is the key and rate-limiting enzyme to produce estradiol (E<sub>2</sub>). There are two different genes (*CYP19a* and *CYP19b*) encoding P450 aromatizing enzyme in teleost, and are both expressed in different tissues. The complete cDNA sequence of CYP19 in *Navodon septentrionalis* was obtained by the techniques of RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The result of multiple amino acids alignment show that there was an I-coiled coil region, an Ozol's peptide-binding region, a heme binding region, and a aromatizing enzyme specific binding region. The *CYP19a* mRNA expression in different tissues of the adult fish were analyzed by semi-quantitative PCR technique and the result suggest that it was expressed in ovary only. The result of *CYP19a* expression pattern in the ovary at different developmental stages show the highest expression before ovulation and lowest a after ovulation.

**Key words** *Navodon septentrionalis*; P450 aromatase; gene cloning; mRNA expression