

奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶基因的克隆及其表达

唐永凯¹, 李建林¹, 陈文华², 俞菊华¹

(1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 上海海洋大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: 采用 RT-PCR 和快速扩增 cDNA 末端 (Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 法分离出奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 卵巢芳香化酶 (P450aromA) 的全序列, 得到 1 784 bp 的全长 cDNA, 包括 38 bp 5' 非翻译区, 1 566 bp 阅读框以及含 Poly(A) 信号 (AATAAA) 的 167 bp 3' 非翻译区 [不包括 Poly(A)]。阅读框共编码 521 个氨基酸, 推算的蛋白质分子量为 59 kD。同源分析显示, 奥利亚罗非鱼 P450aromA 的氨基酸序列与其他鱼类性腺芳香化酶 (P450arom) 具有 70% 以上的同源性, 与其他鱼类脑 P450arom 有 60% 左右同源性, 但其芳香化酶高保守区包括 I-螺旋区、芳香化酶特异保守区和血红素结合区分别与其他鱼类 P450arom 的同源性高达 83%~96%、78%~86% 和 85%~100%。系统发育分析表明, 奥利亚罗非鱼 P450aromA 属于鱼类性腺 P450arom, 分子系统进化树分析结果与根据传统的形态学和生化特征分类结果基本一致。生物信息学分析显示, 奥利亚罗非鱼 P450aromA 基因编码的蛋白无信号肽, 无跨膜区域, 为非分泌型蛋白。同时还含有多个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-糖基化位点、N-肉豆蔻酰化位点及蛋白激酶 C 磷酸化位点。使用 Taqman 探针法检测 P450aromA 在奥利亚罗非鱼成鱼各种组织中的表达。结果发现, P450aromA 只在卵巢中表达。同时比较了鱼苗、鱼种和成鱼卵巢中 P450aromA 的表达差异, 结果显示, 鱼苗中无 P450aromA 的表达, 成鱼中 P450aromA 的表达量是鱼种阶段的 30 倍。[中国水产科学, 2008, 15(5): 729-737]

关键词: 奥利亚罗非鱼; RACE; 芳香化酶; Taqman 探针

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0729-09

芳香化酶 (P450arom) 是细胞色素 P450 家族中的一员, 催化某些雄激素转化为雌激素, 是雌激素生物合成中的关键酶和限速酶, 广泛存在于大多数脊椎动物的脑和垂体中^[1]。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 2 种由不同基因编码的 P450arom, 即性腺型芳香化酶 (P450aromA) 和脑型芳香化酶 (P450aromB), 它们以明显不同的形式分别存在于性腺和脑中^[2-3]。研究表明, 芳香化酶可以影响哺乳动物中枢神经系统的功能和发育, 调节神经内分泌和繁殖功能以及性行为^[4], 并参与非哺乳动物性腺分化的调控^[5], 而且还影响多种鱼类的性别分化和性别决定^[6]。

罗非鱼属于鲷形目, 鲷科, 罗非鱼属。由于其食性杂, 生长快, 耐低氧, 抗病力强, 现已成为世界性的养殖鱼类。但在养殖过程中出现雌雄生长差异明显的现象。雄鱼生长快, 个体大; 雌鱼则生

长慢、个体小, 这就常常导致出池规格相差悬殊, 从而降低了鱼产品的产量和质量^[7]。因此, 开展罗非鱼性别决定机制研究以及探索罗非鱼全雄育种技术, 对于罗非鱼养殖产业的发展具有重要意义和应用价值。本研究分离了奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 卵巢中芳香化酶基因, 对其序列进行了比较和分析, 并应用实时定量 RT-PCR 研究了该基因在雌雄鱼不同组织中的表达以及不同发育期的表达量, 为今后进一步研究该基因在奥利亚罗非鱼性别形成中的作用, 以及研究投喂性激素和使用芳香化酶抑制剂对该基因表达的影响奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 奥利亚罗非鱼鱼苗 (体长 2.5 cm 左右), 鱼种 (体质量 12 g 左右), 成鱼 (体质量

收稿日期: 2007 12 17; 修订日期: 2008 03 22.

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2006029); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金项目 (2007JBFC03)。

作者简介: 唐永凯 (1978-), 男, 助理研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: tangyk@ffrc.cn

通讯作者: 俞菊华 (1966-), 女, 研究员. 主要从事遗传育种研究. E-mail: yujh@ffrc.cn

500 g 左右) 均取自本实验场。

1.1.2 试剂 Trizol Reagent 购自 Promega; AMV, RnaseH, TdT 酶, *Taq* 酶, 3' RACE 试剂盒, Premix Ex TaqTM (Perfect Real time), Taqman 探针购自 Takara; 胶回收试剂盒, pUCm-T 载体、连接酶购自上海生物工程有限公司; 大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.1.3 仪器 PCR 仪为 Eppendorf mastercycler personal. Real time PCR 仪为 BIO-RAD 的 MJ Mini 型。

1.1.4 引物 用于实验的所有引物见表 1。碱基位置以序列 5' 端第一个碱基为“1”计算。P1、P2 是根据已知鱼类 P450arom 的保守序列, 利用 CodeHop 原理^[6] 设计的引物; P3、P4 是根据 P1、P2 扩增出的片段, 使用软件 Primer 5.0 设计的用于

P450aromA 3' RACE 的特异引物; P5、P6、P7 是根据 P1、P2 引物扩增的片段设计的用于 P450aromA 5' RACE 的引物; P8、P9、P10 是 P450aromA 定量 PCR 的引物; P11、P12、P13 是根据莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) beta-actin 序列 (GenBank access. No.AB037865) 设计的用于奥利亚罗非鱼 beta-actin 定量 PCR 的引物。其中, P10、P13 是 taqman 探针, 探针的 5' 端用 FAM 标记, 3' 端用 BHQ1 标记。为了消除 RNA 中的 DNA 污染, 设计的引物中至少有 1 条引物跨越内含子。除 Taqman 探针由宝生物工程 (大连) 有限公司合成以外, 其他引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 其中, R=A+G, N=A+C+T+G。

表 1 实验中所用引物
Tab.1 Primers used in the experiment

引物 Primer	序列 Sequence	碱基位置 /bp Nucleotide position
兼并引物 Degenerate primers		
P1	5' - CGGGTGTGGATCAACGGNGARGARAC-3'	336-361
P2	5' - CTTCATCATCACCATGGCTATGTGCTT-3'	1 383 1 409
3' RACE-PCR		
P3	5' - TAG ACG CTG TTG TGG GTG AG -3'	1 383-1 409
P4	5' - TGT TGT GGG TGA GAG ACA GC -3'	1 079-1 098
5' RACE-PCR		
P5	5' - TGG TGT CCG TGT TCT GTC G -3'	1 098 1 116
P6	5' - GCG CAG CAA ATT GAG GAC -3'	627-645
P7	5' - GTA TGG AGG AGA CGC AAA CA -3'	566 585
Real time PCR for P450aromA		
P8	5' - ATGCGTCGAGCCCTGTCTGATGAC -3'	1 185-1 208
P9	5' - TGAAAGTAGCGCCGAGGAACATTGT -3'	1 348 1 324
P10	5' - GGCCGAATGCACCGACCGAGTTT -3'	1 260-1 283
Real time PCR for beta-actin		
P11	5' - GGAAATCGTGCGTGACATCAAAGA -3'	698 722
P12	5' - GGATTCCGCAGGATTCCATACCAA -3'	904 880
P13	5' - GCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCCT -3'	763 788

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提 取奥利亚罗非鱼成鱼卵巢, 用 Trizol Reagent 抽提总 RNA (用于分离 P450aromA); 用变性琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色显示 28S 和 18S RNA, 检测 RNA 的完整性。为了检测 P450aromA 在各组织中的表达, 取雌雄成鱼的脑、肝、肾、心脏、肌肉和性腺的 RNA 各 3 个样本。同时检测 P450aromA 在奥利亚罗非鱼不同发育期的表达; 取鱼苗、鱼种、成鱼的脑、性腺 (由于鱼苗

太小, 每 3 条鱼为 1 个样本) RNA 各 3 个样本。

1.2.2 保守片段的分离 取 5 μg 卵巢总 RNA, 以 OligodT-AP[5' -CTGATCTAGAGGTACCGGATC C(T)₁₆-3'] 为引物, 根据 AMV 试剂盒使用说明进行反转录 (RT) 反应, 然后用 RT 液总体积的 10%, 使用引物 P1 和 P2 扩增 P450aromA 1 000 bp 左右的保守序列。PCR 反应体系为 25 μL, 其中含 2.5 μL 10×PCR 反应缓冲液, 2 μmol/L 氯化镁, 200 μmol/L

dNTP, 引物各 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.125 U *Taq* 酶。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 然后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 次循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增液用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶, 使用胶回收试剂盒回收, 用 pUCm-T 载体克隆, 送测序。根据这些序列设计特异的 3' RACE 和 5' RACE 引物, 扩增 P450aromA 的 3' 和 5' 端序列。

1.2.3 3' RACE 用 5 μg 总 RNA, 以 oligodT-AP 为引物, 根据 AMV 使用说明进行 RT 反应, 然后用 RT 液总体积的 10%, 以 AP[5' - CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'] 和 3' RACE 特异引物 P3 进行 PCR, PCR 总体积 25 μL , 反应体系同 1.2.2。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 然后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 次循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。为增加扩增效率及扩增的特异性, 把上述 PCR 液稀释 10 倍, 取 2 μL 作模板, 用引物 AP 和 3' RACE 特异引物 P4 进行再扩增, 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$, 扩增液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 克隆, 送测序。

1.2.4 5' RACE 原理参照文献 [8], 用 5 μg 总 RNA, 以 P5 为引物, 根据 AMV 使用说明进行 RT 反应。然后加 *RnaseH* 分解 mRNA, 用 DNA 回收试剂盒回收 cDNA。再用 TdT 酶在 cDNA 3' 端加 Poly(A), 用试剂盒回收加 Poly(A) 尾的 cDNA。以此为模板, 用 P6 及 oligodT-AP 为引物, 进行 PCR, 反应体系组成同 1.2.2。PCR 液稀释 10 倍, 取 2 μL 为模板, 用 P7 及 AP 引物再扩增, 退火温度为 57 $^{\circ}\text{C}$, PCR 液用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 克隆, 送测序。

1.2.5 测序和序列分析 PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体后, 送上海捷瑞生物工程有限公司测序。用 Dnastar、Clustalw、Mega 软件分析奥利亚罗非鱼 P450aromA 序列, 以及与其他鱼类的系统发生关系。用 SignalP 和 PROSITE 在线工具预测蛋白质的结构。

1.2.6 Real time PCR 用 500 ng 总 RNA, 以 oligodT-AP 为引物, 根据 AMV 试剂盒使用说明进行 RT 反应, 反应总体积为 10 μL 。然后以此 RT 液为模板进行 Real time PCR。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 然后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 45 次循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。为检验反应的特异性, 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳。对取得的数据用动力学法 [9] 进行分析。

2 结果与分析

2.1 奥利亚罗非鱼 P450aromA 的分离

取奥利亚罗非鱼卵巢总 RNA, 进行 RT-PCR。用引物 P1 和 P2 扩增得到 1 000 bp 左右的条带, 见图 1 中条带 1, 经克隆后测序, 得到 1 074 bp 片段, 根据所得序列设计合成用于 3' RACE 的引物 P3、P4。使用 RT 液用引物 P3、AP 扩增。然后使用该 PCR 产物稀释液作模板用引物 P4、AP 扩增, 得到 800 bp 左右的条带同, 见图 1 中条带 2, 克隆后测序得到奥利亚罗非鱼 P450aromA 3' 端序列。按照 5' RACE 实验程序, 最后使用引物 P7、AP 扩增获得 500 bp 左右条带, 见图 1 中条带 3, 克隆后测序获得奥利亚罗非鱼 P450aromA 5' 端序列。

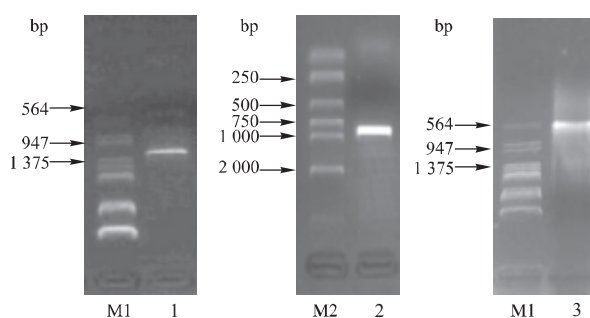


图 1 奥利亚罗非鱼 P450aromA 基因的 RT-PCR 扩增产物图

M1: λ DNA/*EcoR* I+*Hind* III marker; M2: DL2000 marker

1: 引物 P1, P2 扩增条带; 2: 3' RACE 引物 P4, AP 扩增条带; 3: 5' RACE 引物 P7, AP 扩增条带。

Fig.1 The result of RT-PCR amplification of P450aromA gene in *Oreochromis aureus*

1: Product of amplification with primer 1 and 2; 2: product of amplification with 3' RACE primer 4 and AP; 3: product of amplification with 5' RACE primer 7 and AP.

2.2 序列拼接与分析

使用 DNASTar 软件把上述序列拼接得到奥利亚罗非鱼 P450aromA 全序列 (GenBank access. No.DQ279891)。该 cDNA 全长 1 784 bp, 其中阅读框 1 566 bp, 翻译 521 个氨基酸, 3' 非翻译区

167 bp [不包括 poly(A)], 5' 非翻译区 38 bp (图 2)。预测的蛋白质分子量为 59 kD, 理论等电点 (pI) 为 7.47, 含疏水氨基酸 191 个, 极性氨基酸 149 个, 酸性氨基酸 48 个, 碱性氨基酸 48 个。其编码氨基酸序列如图 2 所示。

```

1 CGA GTC TGT GCA GGC TGT TCT ACA TCA TCA CCC TTC TCATGG ATC TGA TCT CTG CTT GTG      60
1      M D L I S A C E      8
61 AAC AGG CGA TGA GTC CTG TAG GCT TAG ACG CCG TGG TGG CAG ATC TGT CTG TGA CCT CAA    120
9   Q A M S P V G L D A V V A D L S V T S N      28
121 ATG CCA TCC AAT CGC ATG GGA TAT CAA TGG CAA CCA GAA CGC TGA TAC TGC TCG TCT GTC     180
29  A I Q S H G I S M A T R T L I L L V C L      48
181 TGC TGT TGG TTG CCT GGA GTC ACA CGG ACA AGA AAA TTG TGC CAG GTC CTT CTT TCT GTT     240
49  L L V A W S H T D K K I V P G P S F C L      68
241 TGG GTT TGG GCC CAC TTC TGT CAT ATC TGA GAT TTA TCT GGA CTG GCA TAG GCA CAG CCA     300
69  G L G P L L S Y L R F I W T G I G T A S      88
301 GCA ACT ACT ACA ATA ACA AGT ATG GAG ACA TTG TTA GAG TCT GGA TCA ACG GAG AAG AAA     360
89  N Y Y N N K Y G D I V R V W I N G E E T      108
361 CGC TCA TAC TAA GCA GAT CTT CAG CAG TGC ACC ATG TGC TGA AGA ACG GAA ACT ATA CTT     420
109 L I L S R S S A V H H V L K N G N Y T S      128
421 CAC GTT TTG GGA GCA TCC AGG GAC TCA GCT GCC TCG GCA TGA ACG AGA GAG GCA TCA TAT     480
129 R F G S I Q G L S C L G M N E R G I I F      148
481 TCA ACA ACA ACG TAA CTC TGT GGA AAA AGA TAC GCA CCT ATT TTG CTA AAG CTC TGA CAG     540
149 N N N V T L W K K I R T Y F A K A L T G      168
541 GCC CAA ATT TGC AGC AGA CGG TGG ATG TTT GCG TCT CCT CCA TAC AGG CTC ACC TGG ACC     600
169 P N L Q Q T V D V C V S S I Q A H L D H      188
601 ACC TGG ACA GCC TGG GAC ACG TTG ATG TCC TCA ATT TGC TGC GCT GCA CCG TGC TGG ACA     660
189 L D S L G H V D V L N L L R C T V L D I      208
661 TCT CTA ACA GAC TCT TCC TGA ACG TAC CTC TCA ATG AGA AAG AGC TGA TGC TGA AGA TTC     720
209 S N R L F L N V P L N E K E L M L K I Q      228
721 AAA AGT ATT TTC ACA CAT GGC AGG ATG TGC TTA TCA AAC CTG ACA TCT ACT TCA AGT TCG     780
229 K Y F F H T W Q D V L I K P D I Y F K F G      248
781 GCT GGA TCT ACC ACA GGC ACA AGA CAG CAA CCC AGG AGT TAC AAG ATG CCA TTA AAC GTC     840
249 W I H H R H K T A T Q E L Q D A I K R L      268
841 TTG TAG ATC AAA AGA GGA AAA ATA TGG AGC AGG CAG ATA AGC TGG ACA ACA TCA ACT TCA     900
269 V D Q K R K N M E Q A D K L D N I N F T      288
901 CGG CAG AGC TCA TAT TTG CAC AAA ACC ACG GTG AGC TGT CTG CTG AGA ATG TGA CGC AGT     960
289 A E L I F A Q N H G E L S A E N V T Q C      308
961 GCG CGC TGG AGA TGG TGA TCG CAG CTC CGG ACA CTC TGT CCC TCA GTC TCT TCT TCA TGC     1020
309 A L E M V I A A P D T L S L S L F F M L      328
1021 TTC TGC TCC TCA AAC AAA ACC CGT ACG TGG AGC CGC AGC TGC TAC AGG AGA TAG ACG CTG     1080
329 L L L K Q N P Y V E P Q L L Q E I D A V      348
1081 TTG TGG GTG AGA GAC AGC TTC AGA ACC AGG ATC TTC ACA AGC TGC AGG TGA TGG AGA GCT     1140
349 V G E R Q L Q N Q D L H K L Q V M E S F      368
1141 TCA TCT ACG AAT GCT TGC GCT TCC ACC CAG TGG TGG GCT TCA CCA TGC GTC GAG CCC TGT     1200
369 I Y E C L R F H P V V G F T M R R A L S      388
1201 CTG ATG ACA TCA TAG AAG GCT ACA GGA TCT CGA AGG GCA CAA ACA TCA TTC TGA ACA CAG     1260
389 D D I I E G Y R I S K G T N I I L N T G      408
1261 GCC GAA TGC ACC GCA CCG AGT TTT TCC TCA AAG GCA ATC AAT TTA ATC TGG AAC ACT TTG     1320
409 R M H R T E F F L K G N L E H F E      428
1321 AAA ACA ATG TTC CTC GGC GCT ACT TTC AGC CGT TCG GTT CAG GCC CTC GCG CAT GCA TTG     1380
429 N N V P R R Y F Q P F G S G P R A C I G      448
1381 GCA AGC ACA TGG CCA TGG TGA TGA AAT CCA TTT TGG TGA CAC TGC TGT CTC AGT ACT     1440
449 K H M A M V M M K S I L V T L L S Q Y S      468
1441 CTG TTT GTA CTC ACG AGG GCC CGA TCC TGG ACT GCC TCC CAC AAA CCA ACA ACC TTT CCC     1500
469 V C T H E G P I L D C L P Q T N N L S Q      488
1501 AGC AGC CTG TAG AGC ACC AGC AGG CGG AGA CTG AAC ATC TCC ACA TGA GGT TCT TAC CCA     1560
489 Q P V E H Q Q A E T E H L H M R F L P R      508
1561 GGC AGG GAA GCA GCT GTC AAA CCC TCA AAG ACC CGA ACC TTT AGC TGT ACC TGT ACT TTT     1620
509 Q G S S C Q T L K D P N L *
1621 GTA TAC TTA ATT TGT ATA ATC TTA TAA CGA CAC ACC TAG CCT TTA TAT TTT GAT ATA CGC     1680
1681 AAA GAT TGT ATT TGT ACT CAA ACT GTA TGC ATG ATG TGA AAT GTA CAT TTA AAC CTG CTA     1740
1741 ACA CTG AAA TAA ATG TAA ATT ATT GTG TCA CAAAAAAAAAAAAA      1784

```

图 2 奥利亚罗非鱼 P450aromA cDNA 及推导的氨基酸序列

* 表示终止子, 3'端 Poly(A) 信号 (AATAAA) 用黑体表示。蛋白质序列中高度保守的片段用下划线指示, 依次为 I-螺旋区 (I), 芳香化酶特异保守区 (II) 和血红素结合区 (III)。

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of P450aromA in *Oreochromis aurus*

Stop code is marked with asterisk (*). The polyadenylation signals (AATAAA) in the 3' -untranslated regions are shown as bold letters. Regions of high homology are underlined and indicated by Roman numerals which are I-helix (I), aromatase-specific conserved region (II) and heme-binding region (III), respectively.

摘录 GenBank 中已登录的一些鱼类的芳香化酶氨基酸序列: 斑马鱼脑 (AAK00642), 虹鳟脑 (CAC84574), 尼罗罗非鱼脑 (AAG18458), 青鳉脑 (AAP83449), 鲮脑 (AAP83132), 斜带石斑鱼脑 (AAR97602), 斜带石斑鱼性腺 (AAR97601), 斑马鱼性腺 (AAK00643), 虹鳟性腺 (1806325A), 尼罗罗非鱼性腺 (AAB16814), 奥利亚罗非鱼性腺 (DQ279891), 青鳉性腺 (Q92087), 鲮性腺 (AAP83133), 黑鲷性腺 (AAP23236)。使用 Clustalw 软件对以上各种鱼的 P450arom 的氨基酸序列进行比较分析发现, 奥利亚罗非鱼 P450aromA 的氨基酸序列与其他鱼性腺 P450arom 的氨基酸序列具有 70% 以上的同源性, 与其他鱼脑 P450arom 为 60% 左右同源; 但 P450arom 高保守区 (包括 I-

螺旋区、芳香化酶特异保守区和血红素结合区) 和其他鱼 P450arom 相比同源性分别高达 83%~96%、78%~86% 和 85%~100%。将上述鱼 P450arom 序列和鸡 (AAA48738)、鼠 (BAA00551) 的 P450arom 序列应用 Mega 软件, 采用 Neighbor-Joining 法, 重复 1000 次构建系统树 (图 3)。从系统树上可看出 P450arom 明显分为两大类, 一类为鱼类 P450arom, 另一类为和鱼类亲缘关系较远的鸡、鼠 P450arom。而鱼类 P450arom 又可分为脑 P450arom 和性腺 P450arom 两个不同分支, 本研究从奥利亚罗非鱼中分离出的芳香化酶属于性腺 P450arom 分支。分子系统进化树分析结果与根据传统的形态学和生化特征分类结果基本一致。

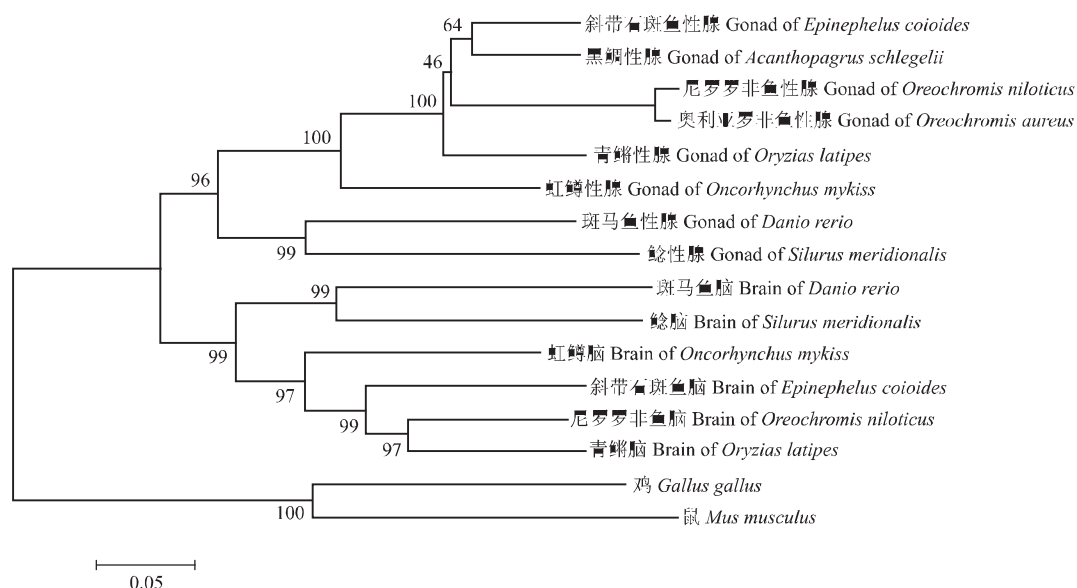


图 3 基于 NJ 法构建的奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶和其他物种的芳香化酶系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of P450aromA in *Oreochromis aureus* and P450arom in other organisms based on NJ method

2.3 蛋白功能预测

利用 SignalP 对奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶蛋白序列在线搜索, 寻找信号肽序列, 发现该蛋白不存在信号肽的概率极低, 不存在信号肽酶切位点, 是一种非分泌蛋白 (图 4-a)。跨膜性分析 (TMHMM) 显示, 奥利亚罗非鱼芳香化酶无明显跨膜区域 (图 4-b)。利用 PROSITE 在线工具分析该蛋白结构域, 发现其含有铁血红素和半胱氨酸结构域, 符合芳香化酶的结构特征。同时它还有潜在的 5 个酪蛋白

激酶 II 磷酸化位点 (5-8aa, 54-57aa, 204-207aa, 233-236aa, 515-518aa), 5 个 N-糖基激化位点 (125-128aa, 151-154aa, 286-289aa, 304-307aa, 485-488aa), 7 个 N-肉豆蔻酰化位点 (34-39aa, 83-88aa, 85-90aa, 124-129aa, 131-136aa, 145-150aa, 419-424aa) 和 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (56-58aa, 127-129aa, 209-211aa, 382-384aa, 407-409aa, 515-517aa)。

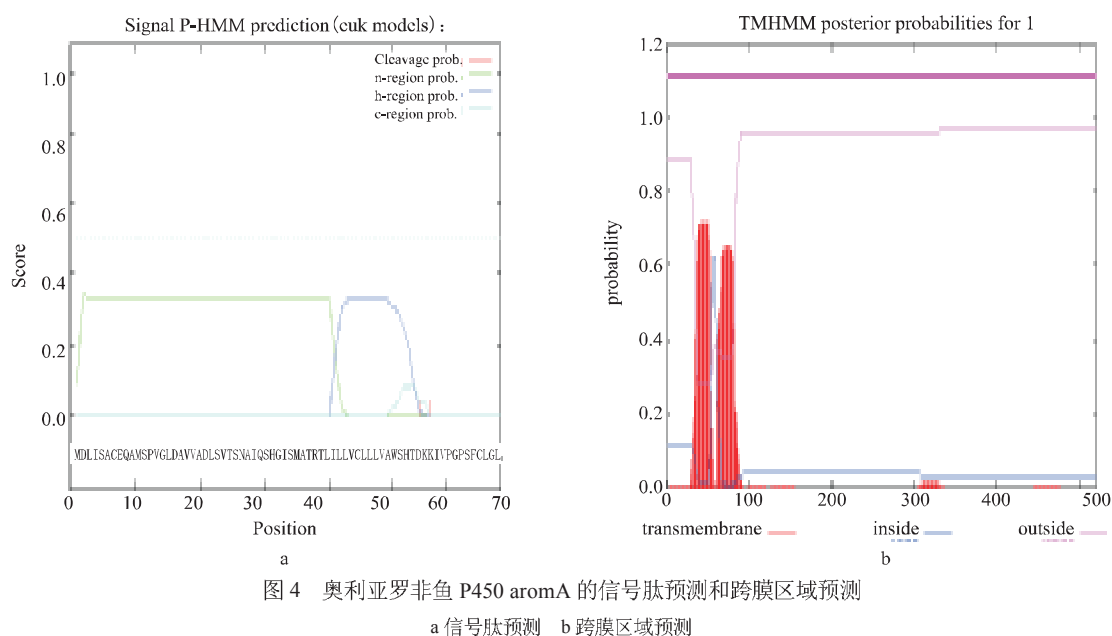


图4 奥利亚罗非鱼 P450aromA 的信号肽预测和跨膜区域预测
a: signal peptide prediction b: transmembrane region prediction

2.4 P450aromA的表达分析

取奥利亚罗非鱼雌雄成鱼的脑、肝、肾、心脏、肌肉、精巢和卵巢的RNA,反转录为cDNA后,以此cDNA液为模板进行Real time PCR。结果显示,只有雌鱼卵巢中有P450aromA的表达(图5)。扩增

产物电泳结果显示,只有雌鱼卵巢中有1条166 bp条带,而且无非特异性条带。同时beta-actin电泳结果显示,奥利亚罗非鱼各组织中均有1条206 bp的条带,无非特异性条带(未显示)。

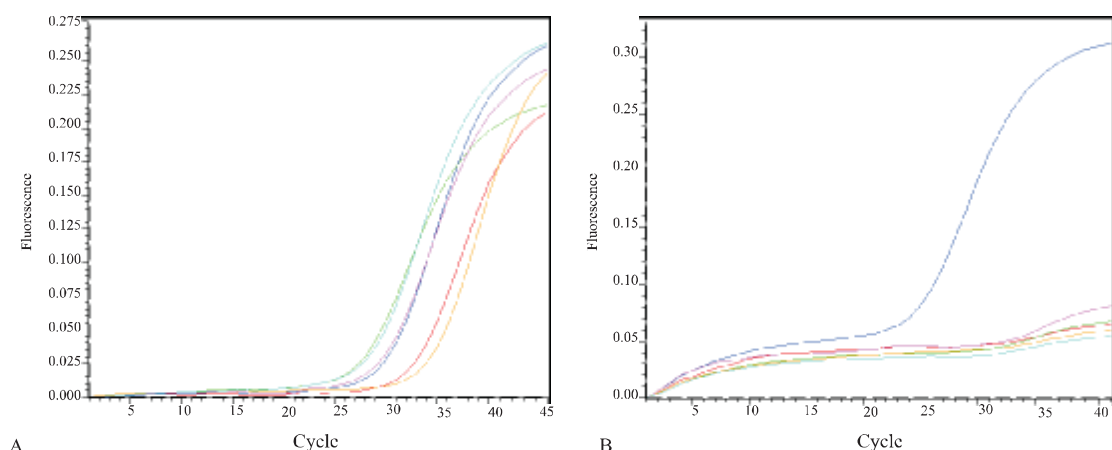


图5 奥利亚罗非鱼 Beta-actin(A) 和 P450aromA(B) 的扩增曲线图
Fig.5 Amplification curve of beta-actin (A) and P450aromA (B) in *Oreochromis aureus*

为了检测P450aromA在奥利亚罗非鱼脑和性腺中不同发育期的表达量,将鱼苗、鱼种、成鱼的脑和性腺RNA均反转录成cDNA。Real time PCR结

果显示,P450aromA在鱼苗的脑和性腺以及鱼种和成鱼的脑中不表达,只在鱼种和成鱼的卵巢中表达,成鱼P450aromA的表达量为鱼种的30倍(表2)。

表 2 奥利亚罗非鱼 P450aromA 在不同发育期卵巢中的相对表达量
Tab.2 Relative P450aromA expression in *Oreochromis aureus* at different development stage

发育期 Development stage	样本编号 Serial number of sample	相对初始模板量 Relatively initial amount of gene template	平均值 Average	相对表达量 Relative amount of gene transcription
鱼种 Juvenile	1	0.0012	0.00094	1
	2	0.00084		
	3	0.00077		
成鱼 Adult fish	1	0.036	0.028	30
	2	0.022		
	3	0.025		

3 讨论

芳香化酶由 *CYP19* 基因编码, 几乎存在于所有脊椎动物的脑和性腺中。目前在许多脊椎动物中已克隆出该基因, 如哺乳动物^[10]、鸟类^[11]、啮齿动物^[12]、鱼类^[13]等。在硬骨鱼类中, 芳香化酶至少由 2 种 *CYP19* 基因编码, 即性腺芳香化酶 (P450aromA) 和脑芳香化酶 (P450aromB), 并且鱼类脑中的表达量较高, 是哺乳动物兔、鼠、人等相应部位表达量的 100~1 000 倍^[14]。本研究从奥利亚罗非鱼卵巢中分离到了 1 784 bp 的 P450arom cDNA, 共编码 521 个氨基酸。同源性分析显示它与其他鱼的性腺 P450arom 同源性较高, 与其他鱼类脑型 P450arom 同源性较低, 所以它属于鱼类性腺芳香化酶, 同时也说明芳香化酶在进化中具有较高的保守性。聚类分析显示, 鱼类性腺芳香化酶和脑芳香化酶属于两个不同的类, 系统进化树分析结果与根据传统的形态学和生化特征分类结果也基本一致。奥利亚罗非鱼 P450aromA 具有 P450arom 共有的保守区域 I-螺旋区、芳香化酶特异保守区和血红素结合区。蛋白结构预测出它也含有铁血黄素和半胱氨酸结构域, 这表明奥利亚罗非鱼 P450aromA 可能与其他生物的 P450arom 功能相类似。

在真核生物中, 作为 1 种膜结合蛋白, 细胞色素 P450 分布在细胞的内质网膜和线粒体内膜上, 二者的膜蛋白合成定位机制截然不同。定位于内膜系统上的细胞色素 P450 依赖于内质网上的蛋白质翻译偶联易位系统 (Translation-coupled translocation system), 通过 N 端信号肽、信号识别颗粒 (Signal recognition particle, SRP) 及内质网膜上的停泊蛋白-信号识别颗粒受体之间的作用, 将合成该蛋白的核糖体连接到内质网膜上, 进行共翻

译转运。而定位于线粒体内膜上的细胞色素 P450 则在细胞质中完成翻译, 然后通过线粒体膜上的蛋白质移位酶进入线粒体, 这一过程需要分子伴侣 Hsp70 (Heat shock protein 70) 的协助^[15]。决定细胞色素 P450 的定位在线粒体上还是内膜系统中, 主要依赖于 N 端信号序列。通过信号肽识别以及氨基酸结构分析, 奥利亚罗非鱼 P450aromA 蛋白以亲水性区域为主, 无信号肽识别序列, 为非分泌型蛋白, 可将其定位于线粒体内膜上。对潜在的修饰位点分析发现, 该蛋白含有多个糖基化位点、N 肉豆蔻酰化位点和蛋白激酶 C 磷酸化位点, 这些位点可能是 P450arom 蛋白完成其生理功能的重要组成部分。

实时定量 PCR (Real time PCR) 是检测基因表达最灵敏的方法, 特别是低丰度的基因, 在微生物检测、食品检测、病原体检测、药物疗效考核、转基因研究以及基因表达研究等方面有重要的应用价值^[16]。而 Taqman 探针增加了探针的识别步骤, 比 Sybergreen 的特异性更高。本研究使用 Taqman 探针法研究了 P450aromA 在奥利亚罗非鱼雌雄鱼各组织的表达, 结果发现, 除了在雌鱼卵巢中检测到 P450aromA 的表达外, 其他组织均不表达。而在鱼苗、鱼种和成鱼 3 个不同发育阶段, 只在鱼种和成鱼的卵巢中检测到 P450aromA 的表达, 成鱼的表达量是鱼种的 30 倍, 这表明 P450aromA 具有卵巢表达特异性, 而且其表达量随着发育阶段的递增有增加的趋势。前人对其他鱼类性腺 P450arom 在各组织的表达研究取得了不同结果。Tchoudakova 等^[17]使用 RT-PCR 在金鱼脑中检测到 P450aromA 的微弱表达, 李广丽等^[18]通过半定量 RT-PCR 检测到 P450aromA 在赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 的垂体、性腺中均有表达, 而 Kishida 等^[19]通过 Northern 杂交则未发

现 P450aromA 在斑马鱼 (*Danio rerio*) 脑中表达, Adriana 等^[20]通过原位杂交发现 P450aromA 在斑马鱼鱼苗的脑和性腺中不表达,只在鱼种和成鱼的卵巢中表达,而且成鱼中的表达量高于鱼种中的表达量,但抗缪勒氏管激素 (Anti-Müllerian hormone, AMH) 的表达量反而下降,这与本研究奥利亚罗鱼 P450aromA、AMH 的结果一致 (未发表)。造成各研究结果不同的原因可能与所研究鱼种类、发育状态以及检测方法的灵敏度和特异性有关。

参考文献:

- [1] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis [J]. *Endocrinol Rev*, 1994, 15: 342-254.
- [2] 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]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 79: 305-314.
- [3] Dalla Valle L, Ramina A, Vianello S, et al. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002, 82: 19-32.
- [4] Lephart E D. A review of brain aromatase cytochrome P450 [J]. *Brain Res Rev*, 1996, 22: 1-26.
- [5] Pifferrer 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]. *J Exp Zool*, 1994, 270: 255-262.
- [6] Nakamara M, Kobayashi T, Chang X, et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish [J]. *J Exp Zool*, 1998, 281: 362-372.
- [7] 李家乐, 李思晨, 李思发, 等. 不同组合尼罗罗非鱼 (♀) × 奥利亚尼罗罗非鱼 (♂) 养殖性能差异研究 [J]. *上海水产大学学报*, 1997, 6 (2): 96-101.
- [8] 俞菊华, 吴婷婷, 杨弘, 等. RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定 [J]. *水产学报*, 2003, 27 (6): 533-539.
- [9] Liu W H, Saint D A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294: 347-353.
- [10] Bulun S E, Sebastian S, Takayama K, et al. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 86: 219-224.
- [11] Halm S, Kwon J Y, Rand-Weaver M, et al. Cloning and gene expression of P450 17alpha-hydroxylase, 17,20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 130 (3): 256-266.
- [12] Serdar E B, Siby S, Kazuto T, et al. Cloning and characterization of the rat cytochrome P450 4F5 (CYP4F5) gene [J]. *Gene*, 2002, 297: 179-187.
- [13] Leea Y M, Williamsb T D, Junga S O, et al. cDNA cloning and expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* [J]. *Mar Pollut Bull*, 2005, 51: 769-775.
- [14] 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: 740-750.
- [15] Robin M A, Sauvage I, Grandperret T, et al. Ethanol increases mitochondrial cytochrome P450 2E1 in mouse liver and rat hepatocytes [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579 (30): 6 895-6 902.
- [16] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Gen Res*, 1996, 6 (10): 986-994.
- [17] Tchoudakova A, Callard G V. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary [J]. *Endocrinology*, 1998, 139: 2 179-2 189.
- [18] 李广丽, 刘晓春, 张勇, 等. 赤点石斑鱼两种芳香化酶 cDNA 的克隆及其表达的组织特异性 [J]. *动物学报*, 2004, 50 (5): 791-799.
- [19] Kishida M, Callard G V. Distinct cytochrome P450 aromatase informs in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development [J]. *Endocrinology*, 2001, 142: 740-750.
- [20] Adriana R M, Yan Y L, Ruth A B, et al. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (AMH) relative to sox9a, sox9b, and cyp191a, during gonad development [J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5: 655-667.

Cloning and expression of P450arom from *Oreochromis aureus* ovary

TANG Yong-kai¹, LI Jian-lin¹, CHEN Wen-hua², YU Ju-hua¹

(1. Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Cytochrome P450 aromatase is an enzyme complex responsible for synthesis of estrogens by aromatization of androgens. In majority of tetrapods examined so far, aromatase is the product of *CYP19* gene. However, in teleosts there are two isoforms of aromatase gene, which encode two structurally different proteins, P450aromA and P450aromB, with similar catalytic activities. Studies show that aromatase can control sex differentiation and sex transformation in many kinds of fishes. Tilapia are now one of the most widely cultured fish in the world. This study investigated cloning and tissue expression of aromatase gene in blue tilapia (*Oreochromis aureus*) aiming to further study the function of P450arom during sex formation and to provide basic data for artificial sex control of tilapia.

The cDNA encoding ovarian P450arom (P450aromA) was isolated from ovary of *O. aureus* using RT-PCR and RACE (Rapid amplification of cDNA ends) methods. The cDNA is 1 784 bp long with 38 bp 5' UTR, 167 bp 3' UTR [excluding poly (A)] and 1 566 bp open reading frame (ORF), which encode 521 amino acids with a calculated molecular weight of 59 kD. For phylogenetic analysis the deduced amino acid sequence of *O. aureus* P450aromA, together with P450arom sequence reported for other vertebrate species, were aligned by ClustalW. The results show that the *O. aureus* ovarian P450arom shares above 70% identity with ovarian P450arom of other fishes, and higher than 60% identity with brain P450arom of other fishes. But the percentage of similarity in the regions of high homology, including the I-helix, aromatase-specific conserved region, and heme-binding region, are 83%–96%, 78%–86% and 85%–100% respectively. Phylogenetic analysis of the P450arom gene family indicate that *O. aureus* P450aromA is clustered with fish P450aromA, which is consistent with conventional classification system. The bio-information analysis through SignalP and PROSITE web database online reveals that the predicted protein has no signal peptide and notable transmembrane region. It contains many casein kinase II phosphorylation sites, N-myristoylation sites, protein kinase C phosphorylation sites, N-glycosylation sites. These sites may be essential for P450arom catalytic function. Taqman probe method was used to detect the P450aromA expression in different tissues including brain, liver, kidney, muscle, testis and ovary in adult fish. The results show that P450aromA is only expressed in adult fish ovary. Comparing the P450aromA expression level in ovary of larval, juvenile and adult fish, we can conclude that P450aromA is only expressed in juvenile and adult fish, and the amount of gene transcripts is 30 times in adult fish than in juvenile.

[Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (5): 729–737]

Key words: *Oreochromis aureus*; RACE; P450arom; taqman probe

Corresponding author: YU Ju-hua. E-mail: yujh@ffrc.cn