

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00408

## 胡子鲇脑型芳香化酶基因全长 cDNA 克隆及表达

孙晶<sup>1,2</sup>, 李广丽<sup>1,2</sup>, 朱春华<sup>1,2</sup>, 吴天利<sup>1,2</sup>, 邓思平<sup>1,2</sup>

1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 南海水产经济动物增殖养殖广东普通高校重点实验室, 广东海洋大学, 广东 湛江 524025

**摘要:** 采用 RT-PCR 和 RACE 法, 克隆了胡子鲇(*Clarias fuscus*)脑型芳香化酶基因 *Cyp19a1b*, 应用荧光实时定量 PCR 检测其在前脑、下丘脑、脑垂体、肝、精巢和卵巢 6 种组织, 以及性腺分化前后(出膜后 12~30 d)全鱼中的 mRNA 表达。结果表明, *Cyp19a1b* cDNA 全长 2 347 bp, 5'端非编码区 219 bp, 3'端[不包括 poly(A)]596 bp, 开放阅读框(ORF)1 503 bp, 编码 500 个氨基酸, 推测其编码蛋白质分子量为 56.388 kD。序列分析及分子系统进化树结果表明, 胡子鲇 *Cyp19a1b* 氨基酸序列与非洲鲇(*Clarias gariepinus*)*Cyp19a1b* 同源性最高, 达 95.6%; 与南方大口鲇(*Silurus meridionalis*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)及稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*) *Cyp19a1b* 同源性达 75%以上, 但与上述鱼类的性腺型芳香化酶基因(*Cyp19a1a*)同源性低于 62%, 表明其为脑型芳香化酶, 同源性分析结果与根据传统形态学和生化特征分类的结果相一致。荧光实时定量 PCR 结果显示, *Cyp19a1b* 在胡子鲇上述组织中均有表达, 其中下丘脑中表达量最高, 肝和精巢最低, 在脑部的表达存在明显的性别差异( $P < 0.05$ )。此外, 在胡子鲇性腺分化前(出膜后 12 d)*Cyp19a1b* 即开始表达, 但分化前后表达量无显著性差异( $P > 0.05$ )。结果暗示 *Cyp19a1b* 可能不是引起胡子鲇性腺分化的直接因素, 但其可能通过“下丘脑-垂体-性腺轴”对性腺分化过程产生间接影响。

**关键词:** 胡子鲇; P450 芳香化酶基因; RT-PCR; 性腺分化; 表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)03-0408-08

胡子鲇(*Clarias fuscus*)又称塘虱鱼, 属鲇形目(Siluriformes)、胡子鲇科(Clariidae)、胡子鲇属, 为热带及亚热带淡水鱼类, 广泛分布于东南亚及中国长江流域以南水体, 肉味鲜美, 营养丰富, 市场潜力巨大。在同等养殖条件下, 雄性胡子鲇的生长速度比雌性快<sup>[1]</sup>, 且售价高于同等规格的雌鱼。因此, 获得胡子鲇雄性苗种并进行单性化养殖, 可有效缩短养殖周期, 提高养殖产量, 而性别控制则是单性化养殖的关键。

芳香化酶(*Cyp19a*)属于细胞色素P450 家族, 可催化某些雄激素转化为雌激素, 是雌激素生物合成的关键酶和限速酶, 广泛存在于脊椎动物的

脑和性腺中<sup>[2]</sup>。研究表明, 芳香化酶可影响哺乳动物中枢神经系统的发育和功能, 调节神经内分泌和繁殖功能以及性行为<sup>[3]</sup>, 并参与非哺乳动物性腺分化的调控<sup>[4]</sup>。很多实验已证实芳香化酶可控制多种鱼类的性别分化和性别转化<sup>[5]</sup>。在大多数哺乳动物中, 芳香化酶由 *CYP19* 单基因编码, 但在鱼类却发现了两种不同基因编码的 *Cyp19a1*, 即脑型芳香化酶(*Cyp19a1b*)和性腺型芳香化酶(*Cyp19a1a*), 它们以明显不同的形式分别存在于脑和性腺中, 且鱼类脑中芳香化酶表达量是哺乳动物兔、鼠和人脑的 100~1 000 倍<sup>[3]</sup>。*Cyp19a1a* 主要参与雌激素生物合成和卵巢分化, 在性腺分

收稿日期: 2011-11-06; 修订日期: 2011-12-10.

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划重点项目(桂科合 1140009-4).

作者简介: 孙晶(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产经济动物发育生物学. E-mail: Janey07@163.com

通信作者: 邓思平(1974-), 博士, 讲师. E-mail: sipingdeng@gmail.com

化中起主要作用; *Cyp19a1b* 是中枢雌二醇生物合成的决定物, 主要参与中枢神经系统发育过程中脑的分化<sup>[3]</sup>和性行为的调节<sup>[6]</sup>。也有研究认为其参与性腺分化的调节<sup>[7]</sup>, 但作用机制尚不明确。

目前, 胡子鲇的研究主要集中在人工繁殖和苗种培育方面, 而对于胡子鲇性别相关基因的研究, 至今尚未见报道。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 法, 克隆了胡子鲇 *Cyp19a1b* 的 cDNA 全长, 并应用荧光实时定量 PCR 检测 *Cyp19a1b* 在胡子鲇前脑、下丘脑、脑垂体、肝、卵巢和精巢各组织, 以及性腺分化前后(出膜后 12~30 d) 全鱼中的 mRNA 表达, 旨在探讨 *Cyp19a1b* 基因表达与胡子鲇性腺分化的相互关系, 为后续胡子鲇单性苗种培育及单性化养殖奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

基因克隆和组织表达检测用胡子鲇成鱼购自湛江市霞山区步行街新街肉菜市场, 雌雄鱼各 3 尾, 体长(25.0±3.7) cm, 体质量(200.0±37.5) g, 均为性成熟个体; 性腺分化时期表达检测用胡子鲇仔鱼采自广西玉林牧源渔牧有限公司养殖基地, 于出膜后第 12 天[体长(0.90±0.05) cm]、18 天[体长(1.15±0.10) cm]、24 天[体长(1.64±0.15) cm]和 30 天[体长(2.15±0.12) cm]各取 3 尾, 液氮保存备用。

### 1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Invitrogen, M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega, SMARTer

RACE 试剂盒购自 Clontech, SYBR 荧光实时定量 PCR 测定试剂盒购自广州昊洋贸易有限公司。Taq<sup>TM</sup>、DL2000 DNA Marker、pMD19-T 载体均购自 Takara, 其余均为国产分析纯试剂, 购自上海生工生物工程技术有限公司。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由广东海洋大学水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保存。

### 1.3 方法

**1.3.1 引物设计** 实验用引物见表 1。根据 GenBank 中鱼类芳香化酶基因 *Cyp19a1b* 保守序列设计简并引物 P1 和 P2, 根据获得的 *Cyp19a1b* 基因保守区片段设计特异性引物 P3 和 P4, 以检测组织分布及性腺分化前后 *Cyp19a1b* 表达, GSP1 和 GSP2 是根据已知片段设计的特异性引物, 分别用来扩增 *Cyp19a1b* cDNA 的 5' 末端和 3' 末端。 $\beta$ -actinF 和  $\beta$ -actinR 作为内参引物扩增胡子鲇的  $\beta$ -actin 基因。所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.3.2 胡子鲇 *Cyp19a1b* 的克隆** 利用 SMARTer RACE 试剂盒克隆胡子鲇 *Cyp19a1b* cDNA。取雌性胡子鲇前脑, 抽提总 RNA, 实验流程参照 Invitrogen Trizol Reagent 说明书操作。取 2  $\mu$ g 总 RNA 按照 Promega 公司反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 以简并引物(P1 和 P2) 扩增胡子鲇 *Cyp19a1b* 部分编码区域, PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 反应条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 54 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 进

表 1 克隆胡子鲇 *Cyp19a1b* cDNA 序列及检测表达所用引物  
Tab.1 Primers used for cloning and expression of *Cyp19a1b* in *Clarias fuscus*

引物 primer	序列 sequence	碱基位置/nt position
P1	5'- TCCRGGBYTGCAGMRGAC-3'	627-644
P2	5'- TCHGGHGCYCGATCACCAT-3'	1 072-1091
P3	5'-ACGCTGTCCATCAGTCTGTCT-3'	90-111
P4	5'-CAGGATGGAAACGCAGAGATT-3'	247-267
GSP1	5'-GTCCATGAACTCGACAGAACATCCAAG-3'	53-80
GSP2	5'-CAGGACGAGATGGGGAAACTTGTGC-3'	293-317
$\beta$ -actinF	5'-ACCGCCGCCTCTTCCTC-3'	145-261
$\beta$ -actinR	5'-TTCCACAGGACTCCATACCCAG-3'	259-280

注: R=A+G, B=G+C+T, Y=C+T, M=A+C, H=A+C+T.

行切胶回收、载体连接、转化、PCR 阳性克隆及测序。3'末端和 5'末端序列的扩增按照 Clontech 公司 SMARTer RACE 试剂盒说明操作。

**1.3.3 序列分析与进化树的构建** 将所获得的 cDNA 序列应用 DNAMAN 进行拼接和推导氨基酸序列,用 CLUSTAL W 将其 cDNA 序列及推导的氨基酸序列与 GenBank 中已有鱼类的 *Cyp19a1* cDNA 序列及氨基酸序列进行同源性比较。利用 MAGE 4.0 邻位相联法 Neighbor-joining, 重复 1 000 次, gap 处理为缺失, 基于 *Cyp19a1* 氨基酸序列构建各物种系统进化树。

**1.3.4 胡子鲇 *Cyp19a1b* mRNA 在组织及性腺分化前后的表达** 胡子鲇性腺分化时间为出膜后第 16 天(本实验室结果, 待发表)。因此在出膜后第 12 天、18 天、24 天和 30 天, 分别抽提胡子鲇仔鱼全鱼总 RNA, 检测 *Cyp19a1b* mRNA 在胡子鲇性腺分化前后的相对表达量; 取雌、雄胡子鲇成鱼的前脑、下丘脑、脑垂体、肝、卵巢或精巢组织, 分别抽提总 RNA, 检测组织表达。取 2  $\mu$ g RNA 进行反转录, 合成 cDNA 第一链。取反转录产物 0.5  $\mu$ L, 荧光实时定量 PCR 检测 *Cyp19a1b* 的表达, 实验流程参照 BioRad 公司的 SYBR 荧光实时定量 PCR 测定试剂盒操作说明进行。

#### 1.4 数据处理

根据荧光实时定量 PCR 测得的  $C_t$  值, 运用  $2^{-C_t}$  法计算 *Cyp19a1b* 和  $\beta$ -actin 在胡子鲇上述组织和性腺分化前后的表达量, 以胡子鲇  $\beta$ -actin 基因为内参, 校正 *Cyp19a1b* 的相对表达量。实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件中的单因素方差分析 (ANOVA), 显著性水平为 0.05; 并采用 Duncan's 方法进行多重比较分析。所有结果均以平均值  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm SE$ ) 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 胡子鲇 *Cyp19a1b* 基因全长 cDNA 克隆

胡子鲇 *Cyp19a1b* cDNA 全长通过 3 个有重叠部分的 PCR 片段拼接而成。内部片段以雌性胡子鲇前脑中抽提的总 RNA 为模板, 使用根据 *Cyp19a1b* 高度保守序列设计的简并引物 P1 和 P2,

得到大小为 456 bp 的预期片段; 利用特异性引物 GSP1 和 GSP2, 进行 SMART-RACE-PCR, 分别获得 5'末端 796 bp 及 3'末端 1 500 bp 的预期条带, 拼接后得到胡子鲇 *Cyp19a1b* cDNA 全长 (GenBank 登录号 JN859189)。胡子鲇 *Cyp19a1b* cDNA 序列由 2 347 个核苷酸组成, 其开放阅读框 (ORF) 长度为 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸, 5'端非编码区 (5'-UTR) 有 219 bp, 3'-UTR [不包括 poly(A)] 有 596 bp (图 1), 推测其编码蛋白质分子量为 56.388 kD。

### 2.2 序列分析与进化树的构建

将所获得的胡子鲇 *Cyp19a1b* cDNA 序列与 GenBank 中已有鱼类 *Cyp19a1* cDNA 序列进行相似性检索比对, BLAST 结果表明, 胡子鲇 *Cyp19a1b* cDNA 序列与鱼类 *Cyp19a1b* cDNA 序列的同源性达 70% 以上, 与 *Cyp19a1a* 同源性低于 55%。氨基酸序列比对显示, 胡子鲇 *Cyp19a1b* 与非洲鲇 (*Clarias gariepinus*) *Cyp19a1b* 同源性最高, 为 95.6%, 与南方大口鲇 (*Silurus meridionalis*)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲫 (*Carassius auratus*)、稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*) 和赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) *Cyp19a1b* 同源性高于 75%, 而与上述 9 种鱼 *Cyp19a1a* 同源性低于 62%。摘录 GenBank 中非洲鲇 *Cyp19a1b* (GU220076.1)、非洲鲇 *Cyp19a1a* (GU220075.1)、南方大口鲇 *Cyp19a1b* (AY-325907.1)、南方大口鲇 *Cyp19a1a* (AY325908.1)、黄颡鱼 *Cyp19a1b* (AY649789.2)、黄颡鱼 *Cyp19a1a* (AY871802.1)、斑马鱼 *Cyp19a1b* (AF226619.1)、斑马鱼 *Cyp19a1a* (AF183906.1)、斑点叉尾鲷 *Cyp19a1b* (NM001 200163.1)、斑点叉尾鲷 *Cyp19a1a* (S75715.1)、鲤 *Cyp19a1b* (EU499382.1)、鲫 *Cyp19a1b* (AB009335.1)、稀有鮡鲫 *Cyp19a1b* (GU220393.1) 和赤点石斑鱼 *Cyp19a1a* (AY-547354.1) 的氨基酸序列构建氨基酸进化树, 结果显示, 所有鱼脑型 *Cyp19a1* (*cyp19a1b*) 聚为一支, 而性腺型 *Cyp19a1* (*Cyp19a1a*) 聚为另一个不同分支 (图 2)。胡子鲇 *Cyp19a1b* 与非洲鲇同处于 *Cyp19a1b* 一支, 两者属鲇形目、胡子鲇属中不同种,

```

1  acatgggtactaccaatgacattttaaatgaggagagcctgcaaccgcagtatctgcatcgccgcagcc 69
70  acagtatctgcaaaacttcagaggattctccagttccatctaacagaatgatgaaagcttttgaattcgt 138
139  ccctagaccttcgagcgcaggtgaaggagattaaggctttatcatttcggttggtttaagtgtatgttca 207
208  cccagtgtaaggATGGAGTCACAGAACCAGTCTGACGTCATGGCTGCAGTGGATGCTAGCGGATTTGA 276
1  M E S Q N T S D V M A A V D A S G F G 19
277  GTTATATCAGCATTACTGTTGCTTCTCTGCTGATTTCACTTACAGCCTGCAAGAGAGGGGACAAATCA 345
20  V I S A L L L L L L L I S L T A C K R G D K S 43
346  AACTTACCAGGTCATACTGGTTACTGGGCTTGGTCCCATTTAAGCTATGCTAGATTTTGTGGATG 414
44  N L P G P Y W L L G L G P I L S Y A R F L W M 67
415  GGTGTTGGTACAGCCAGCAATTATTATAATAAGAAATACGGTTGCATGACTCGAGTTGGATCCAGGGA 483
68  G V G T A S N Y Y N K K Y G C M T R V W I Q G 91
484  GAGGAGACTCATCTAAGCAAGTCATCTGCTGTGTATCATGCTCCTGAAGAGCAGTAATATATTGCT 552
92  E E T L I L S K S S A V Y H V L K S S N Y I A 115
553  AGATTTGCTAGCAGACGTGGACTGAGGTGTATCGGTATGGATGAACAAGGCATAATCTTTAACAGCAAC 621
116  R F A S R R G L R C I G M D E Q G I I F N S N 139
622  ATCCCCCTTGGAAAAAAGTACGCACATATTTGCTAAAGCTCTATCAGGACCTGGGCTGCAGAGGACA 690
140  I P L W K K L R T Y F A K A L S G P G L Q R T 163
691  GTGGGTGTGTGTGTCAGTGCCACCAATACACTTGGATGTTCTGTGCGAGTTTCATGGACTCCTCGGGC 759
164  V G V C V S A T N T H L D V L C E F M D S S G 187
760  CACGTGGATGCTCTGGATTTCTGCGCTGCGTGTGTGTCGATGCTCCAACAGACTTCTCTCCAAAT 828
188  H V D A L D F L R C V V V D V S N R L F L Q I 211
829  CCAATCAACGAGAAAGAGTTGCTAGTGAAGATCCACAAGTACTTTGACACTTGGCAAAGTGTCTCATC 897
212  P I N E K E L L V K I H K Y F D T W Q T V L I 235
898  CAGCCAGAATTTTTTCCGACTAGACTGGGTGTATAAAAAACATCAACAAGCAGCAAAGGACTACAG 966
236  Q P E F F F R L D W V Y K K H Q Q A A K E L Q 259
967  GACGAGATGGGAAAAGTGTGCAGCAGAAGCGAAAATCATCAATGCCGTGAAAAAAGTGGATGAACCG 1035
260  D E M G K L V Q Q K R K I I N A V E K L D E P 283
1036  GACTTCGCAACCGAGTTGATATTTGCCAGAATCATGGAGAAATGCAGAAGATGATGTGAGGCGAGTGC 1104
284  D F A T E L I F A Q N H G E M S E D D V R Q C 307
1105  GTGTTGGAGATGGTATAGCAGCACCAGCAGCAGTGTCCATCAGTCTGTTCTKCATGCTGGTCTGTG 1173
308  V L E M V I A A P D T L S I S L F X M L V L L 331
1174  AAGCAGAATCCGGCAGTGGAGCAGAGTACTGCAGGAGATGCACAGTGTCTAGGAGGACCGGAGATG 1242
332  K Q N P A V E Q S I L Q E M H S V L G G R E M 355
1243  GAATCAGCTGACCTGCAGAAGTTGTCAGTGTGAGAGTTTTATAAGGGAATCTCTGCGTTTCCATCCT 1311
356  E S A D L Q K L S V M E S F I R E S L R F H P 379
1312  GTGGTAGATTTTCATCATGAGCGGAGCACTAGAAGACGATTTTCATTGAAGGCTACAAGGTGGCCAAAGG 1380
380  V V D F I M R R A L E D D F I E G Y K V A K G 403
1381  ACAAAATCATTCTGAACATCGGACAGATGCACAAGAGCAGAGTTCTTCTCAAAGCCAACGAATTT 1449
404  T N I I L N I G Q M H K S T E F F S K A N E F 427
1450  AGTCTGGAGAAGTCTAGGGACAATGTGCCGAGTGGTTCTTCCAGCATTGGCTGTGGGCCACGGGCC 1518
428  S L E N F R D N V P S R F F Q P F G C G P R A 451
1519  TGTGTGGGGAAGCACATAGCTATGGTGTATGTAAGGCCATACTGGTGCAGGTTCTACTGCAGTACACA 1587
452  C V G K H I A M V M M K A I L V T V L L Q Y T 475
1588  GTGTGCCCTCAGCCGGCTGCACCGTCAACACCATCAGGCAAACCAACCTTTACAGCAGCCCGTGC 1656
476  V C P Q P G C T V N T I R Q T N N L S Q Q P V 499
1657  GAGGAGCACACACAGCCTGGCCATGAGGTTTCATACCAGCAAAGTGCAGCCCTGACAAGCAATAAgca 1725
500  E E D T H S L A M R F I P R K L S P D K Q * 521
1726  gcctaaggattgggatgacatcattcatatgcaacagcattaaatagttatgattatgttactactggt 1794
1795  aagaaaaattagtgcaaaatgtgatctgaaaatgaaaatgaaaaatgaaaaatgtacctaaggaaa 1863
1864  catatgattacacttagtaaatgaatataactgaatatacttctctgtgggaaccatattgttcca 1932
1933  aactaactcattttgtcactggtattattctgtttagaacattatggcataaattctcattttctcca 2001
2002  catgaatattggtttggttacagtacacagtaactaatgttctctacatacatacaaaataacaatt 2070
2071  tattactgaattctatatatttgaactcgttagtgaaaaaattcatgctatacaccactcacctgctgt 2139
2140  aggaaataacctcatgatgtttctatcatattgttcatcactcgtctgcatatattgtatagtgct 2208
2209  tgtgtttataaaatattttctttacagctataaaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacgtgctct 2277
2278  ttgataacaacactgctgtataaaagaaacagtaacaaatcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2346
2347  a

```

图 1 胡子鲇 *Cyp19a1b* 全长 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

下划线表示起始密码子 ATG; \*表示终止密码子 TAA; 黑色框表示加尾信号 AATAAA; 黑色阴影表示 poly(A)尾巴; 小写字母为 5'-UTR 和 3'-UTR.

Fig.1 cDNA sequence and predicted amino-acid sequences of *Cyp19a1b* in *Clarias fuscus*  
 The polyA signal is shaded in black. The initiation codon ATG is underlined. The termination codon is indicated by an asterisk.  
 Polyadenylation signal is in black border. The lowercases indicate 5' and 3' UTR.

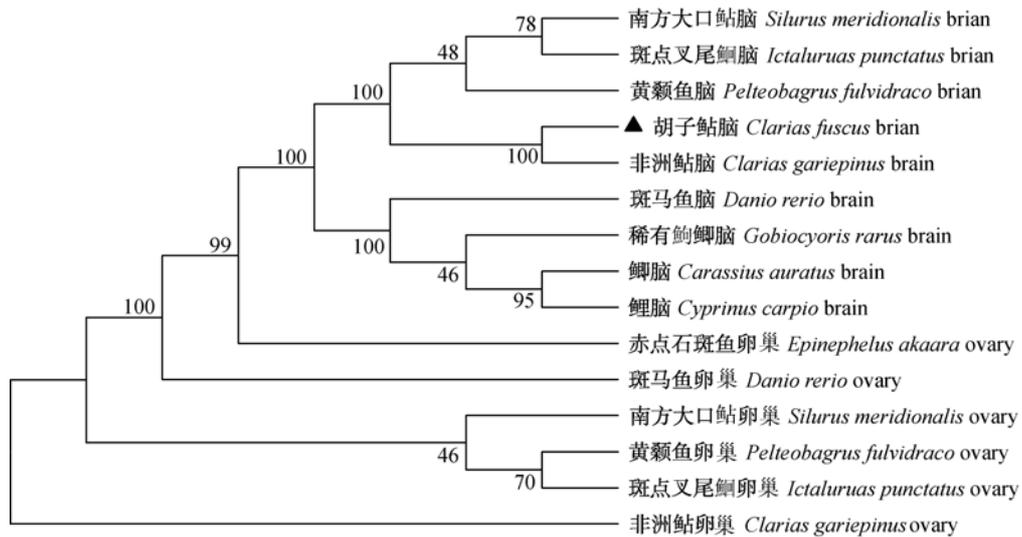


图 2 基于 NJ 法构建的胡子鲶 *Cyp19a1b* 和其他鱼类的 *Cyp19a1* 系统进化树  
 Fig.2 Phylogenetic tree of *Cyp19a1b* in *Clarias fuscus* and *Cyp19a1* in other fishes based on NJ method

而与斑马鱼、稀有鮡鲫、鲤和鲫处于不同级不同分支,表明胡子鲶与非洲鲶亲缘关系最近,与鲤形目中斑马鱼、稀有鮡鲫、鲤和鲫亲缘关系最远,这与传统的形态学和生化特征分类结果一致。

2.3 胡子鲶 *Cyp19a1b* 在组织及性腺分化前后的表达

荧光实时定量 PCR 结果显示, *Cyp19a1b* 在胡子鲶前脑、下丘脑、脑垂体、肝、精巢和卵巢组织中均有表达,脑部表达量较高, mRNA 相对表达量为  $0.010 \pm 0.001 \sim 0.084 \pm 0.010$ , 而肝和精巢有微弱表达。 *Cyp19a1b* 表达量在脑部存在明显的性别差异,雌鱼均显著高于雄鱼 ( $P < 0.05$ ),以雌鱼下丘脑表达量最高,为  $0.084 \pm 0.010$ 。卵巢中

*Cyp19a1b* 的表达量高于精巢 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

胡子鲶性腺分化前后 *Cyp19a1b* 的表达结果显示, *Cyp19a1b* 在性腺分化前即开始表达,第 12 天(性腺分化前)、18 天、24 天和 30 天的相对表达量依次为  $0.006 \pm 0.002$ 、 $0.004 \pm 0.002$ 、 $0.005 \pm 0.004$  和  $0.003 \pm 0.002$ ,分化前后各时间点间表达量无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

3 讨论

*Cyp19a1* cDNA 已在许多动物如鱼类<sup>[8-12]</sup>、鸟类<sup>[13]</sup>、啮齿动物<sup>[14]</sup>及哺乳动物<sup>[15]</sup>中被克隆。本研究克隆了雌性胡子鲶前脑中的 *Cyp19a1* 基因,氨

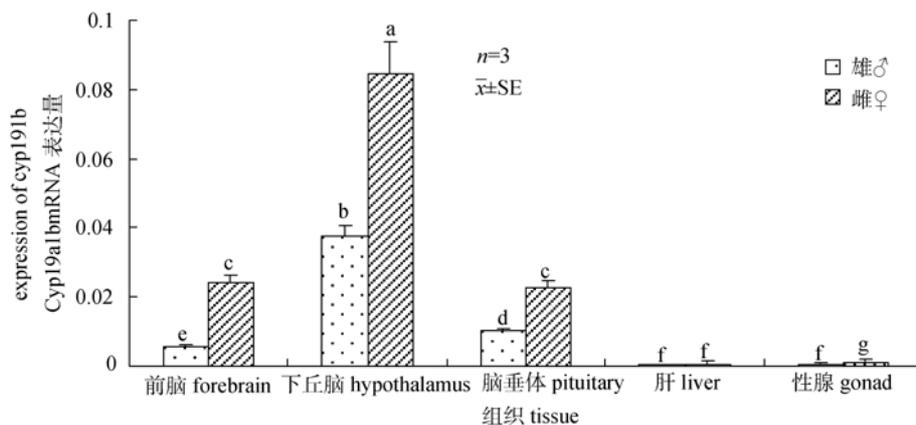


图 3 *Cyp19a1b* 在胡子鲶前脑、下丘脑、脑垂体、肝和性腺中的差异表达  
 不同字母表示组织间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig.3 Expression of *Cyp19a1b* in male and female *Clarias fuscus* forebrain, hypothalamus, pituitary, liver and gonad  
 Different letter indicates significant difference among tissues ( $P < 0.05$ ).

氨基酸序列同源性比对及系统进化树分析发现,所得到的胡子鲇 *Cyp19a1* 属于鱼类 *Cyp19a1b*, 与同属的非洲鲇 *Cyp19a1b* 同源性最高, 亲缘关系最近, 而与鲤形目中斑马鱼、稀有鮡鲫、鲤和鲫的亲缘关系最远, 这与传统的基于形态学和生化特征的分类结果一致。

荧光实时定量PCR结果发现, *Cyp19a1b* 基因在胡子鲇前脑、下丘脑、脑垂体、肝、精巢和卵巢组织中均有表达, 说明雌激素具有广泛的生理作用, 可参与中枢神经系统的发育和脑的性分化, 刺激肝合成卵黄蛋白原及调节性行为<sup>[16]</sup>。对黄颡鱼的研究结果表明, *Cyp19a1b* 除在肝中没有表达外, 在上述其他组织均有表达<sup>[16]</sup>, 这与本研究结果基本一致。本研究发现 *Cyp19a1b* 在胡子鲇雌鱼前脑、下丘脑和脑垂体的表达量均高于雄鱼, 此结果与赤点石斑鱼<sup>[17]</sup>研究结果一致, 这可能与芳香化酶可催化雄激素转化为雌激素的生理功能有关。本研究中 *Cyp19a1b* 的表达量在脑部明显高于性腺和肝, 且在下丘脑表达量最高, 表明 *Cyp19a1b* 表达具有一定的组织特异性, 主要在前脑、脑垂体及下丘脑等神经组织表达, 其表达量可能与神经生长有着密切关系, 这与黄颡鱼<sup>[17]</sup>、赤点石斑鱼<sup>[18]</sup>和半滑舌鳎<sup>[19]</sup>的研究结果类似。本研究还发现, *Cyp19a1b* 在胡子鲇肝、精巢和卵巢中有微弱的表达, 这可能与上述组织在雌激素代谢中的作用密切相关, 如芳香化酶催化雄激素生成的雌二醇可以影响很多生理活动, 如刺激肝合成卵黄蛋白原, 影响生殖细胞发育及性别决定<sup>[20]</sup>。但对金鱼、斑马鱼和雄性黄鳍 (*Monopterus albus*) 的研究表明, 金鱼 *Cyp19a1b* 只在脑中表达, 而卵巢中未检测到该基因的表达<sup>[10]</sup>; 斑马鱼 *Cyp19a1b* 只在脑和卵巢中表达, 但在卵巢中的表达量远低于脑中表达量<sup>[21]</sup>; 雄性黄鳍 *Cyp19a1b* 脑和精巢中表达量较高, 皮肤中表达量较低, 而在肝没有表达<sup>[22]</sup>。此外, 只有虹鳟<sup>[23]</sup>鳃、半滑舌鳎<sup>[19]</sup>皮肤和鳃中 *Cyp19a1b* 表达的报道。本研究结果与之不完全相同, 造成各研究结果不同可能与所研究鱼的种类、年龄及性腺所处不同发育时期有关。上述研究结果揭示, 在硬骨鱼类中, *Cyp19a1b* 基因主要在脑、下丘脑、

视网膜等神经组织中表达, 其调控及作用可能与 *Cyp19a1a* 不同, 可能主要参与中枢神经系统的发育过程, 进而调节神经内分泌和其他行为。

为了研究 *Cyp19a1b* 在性腺分化中的作用, 对 *Cyp19a1b* 在胡子鲇性腺分化前后的表达进行了检测。胡子鲇性腺分化时间为出膜后 16 d, 研究发现, 胡子鲇出膜后 12 d 即有 *Cyp19a1b* 的表达, 但分化前后表达量并无显著性差异。 *Cyp19a1b* 在性腺分化时期的表达已在部分鱼类进行了研究, 对舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 和斑马鱼的研究表明, *Cyp19a1b* 参与了它们的性腺分化<sup>[24]</sup>。斜带石斑鱼<sup>[25]</sup>性腺分化时间为出膜后第 120 天左右, 但 *Cyp19a1b* 在出膜后第 90 天即开始表达, 且前脑表达量在第 110 ~ 120 天最高, 下丘脑表达量在 90 ~ 130 天逐渐升高, 表明 *Cyp19a1b* 在斜带石斑鱼性腺分化时期可能参与了脑的分化。尼罗罗非鱼<sup>[26]</sup>性分化时间为出膜后 15 d, 且出膜后第 1 天脑中即有 *Cyp19a1b* 表达, 出膜后第 15 天性腺中 *Cyp19a1b* 开始表达; 而 *Cyp19a1a* 主要在卵巢中表达, 且在卵黄形成阶段表达水平显著增加, 说明 *Cyp19a1a* 对尼罗罗非鱼的性腺分化起决定性作用, 而 *Cyp19a1b* 可能主要参与雌激素介导的神经雌激素的合成。莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)<sup>[27]</sup>在孵化后第 2 天 *Cyp19a1b* 即开始表达, 在第 2 ~ 15 天表达量显著升高, 推测 *Cyp19a1b* 可能主要影响莫桑比克罗非鱼的神经内分泌活动, 并非直接对其性腺分化起作用。莫桑比克罗非鱼性腺发育早期 *Cyp19a1b* 的高表达进一步说明了 *Cyp19a1b* 在硬骨鱼类的神经内分泌作用<sup>[24]</sup>。本研究结果与前人的研究结果不完全相同, 显示 *Cyp19a1b* 可能不是引起胡子鲇性腺分化的直接因素, 但可能通过“下丘脑—垂体—性腺轴”间接影响性腺分化。

综上所述, *Cyp19a1b* 表达具有明显的雌、雄差异和组织特异性; *Cyp19a1b* 可能不是引起胡子鲇性腺分化的直接因素。

#### 参考文献:

- [1] Conner D O, Kynard B E. Environmental sex determination:

- interaction of temperature and genotype in a fish [J]. *Science*, 1981, 213 (4507): 577–579.
- [2] 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 (3): 342–355.
- [3] Lephart E D. A review of brain aromatase cytochrome P450 [J]. *Brain Res Rev*, 1996, 22(1):1–26.
- [4] 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]. *Exp Zool*, 1994, 270 (3): 255–262.
- [5] Nakamura M, Kobayashi T, Chang X, et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish [J]. *Exp Zool*, 1998, 281 (5): 362–372.
- [6] Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsen H, et al. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17  $\beta$ -estradiol [J]. *Aquat Toxicol*, 2001, 53 (2): 139–152.
- [7] Trant J M, Gavasso S, Ackers J, et al. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes(CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry(*Danio rerio*) [J]. *Exp Zool*, 2001, 290 (5): 475–483.
- [8] Tanaka M, Telecky T M, Fukada S, et al. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 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]. *Mol Endocrinol*, 1992, 8 (1): 53–61.
- [9] 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 olivaceous* [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 23 (2): 167–176.
- [10] 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.
- [11] Valle L D, Lunardi L, Colombo L, et al. European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. cytochrome P450arom: cDNA encoding, expression and genomic organization [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002, 80 (1): 25–34.
- [12] Ijiri S, Kazeto Y, Lokman P M, et al. Characterization of a cDNA encoding P450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 130 (2): 193–203.
- [13] Silveirin B, Ballien M, Foidart A, et al. Distribution of aromatase activity in the brain and peripheral tissues of passerine and nonpasserine avian species [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 117 (1): 34–53.
- [14] Lephart E D, Simpson E R, Mcphaul M J. Brain aromatase cytochrome P450 messenger RNA levels and enzyme activity during prenatal and development in the rat [J]. *Neuroendocrinol*, 1992, 16 (4): 187–192.
- [15] Chen S, Marc J B, Robert S. Human aromatase: cDNA cloning, southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15 [J]. *DNA*, 1988, 7 (1): 27–38.
- [16] Patil J G, Gunasekera R M. Tissue and sexually dimorphic expression of ovarian and brain aromatase mRNA in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Implications for their preferential roles in ovarian and neural differentiation and development [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 158 (1): 131–137.
- [17] 徐跑, 俞菊华, 李建林, 等. 黄颡鱼脑 P-450 芳香化酶基因的克隆和组织表达[J]. *水产学报*, 2005, 29 (5): 592–598.
- [18] 李广丽, 刘晓春, 林浩然, 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] 邓思平, 陈松林, 刘本伟, 等. 半滑舌鳎脑芳香化酶基因 cDNA 克隆及表达分析[J]. *动物学研究*, 2008, 29 (1): 17–24.
- [20] Callard G V. Autocrine and paracrine role of steroids during spermatogenesis: studies in *Squalus acanthias* and *Necturus maculosus* [J]. *Exp Zool*, 1992, 261 (2): 132–142.
- [21] 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.
- [22] 李伟, 刘功银, 罗春桃. 黄鳍脑芳香化酶基因cDNA的克隆及组织表达特异性分析 [J]. *水产科学*, 2009, 28 (8): 458–461.
- [23] Dalla V 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.
- [24] Trant J M, Gavasso S, Ackers J, et al. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes(CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry(*Danio rerio*) [J]. *Exp Zool*, 2001,

- 290 (5): 475–483.
- [25] Ganesan N, Tsai Y J, Chen C Y, et al. Developmental expression of genes involved in neural estrogen biosynthesis and signaling in the brain of the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* during gonadal sex differentiation [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011, 127(3–5): 155–166.
- [26] Chang X T, Kobayashi T, Senthilkumaran B, et al. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 141 (2): 101–115.
- [27] Esterhuysen M M, Helbing C C, van Wyk J H. Temporal expression of two cytochrome P450 aromatase isoforms during development in *Oreochromis mossambicus*, in association with histological development[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2008, 3 (4): 297–306.

## Molecular cloning and expression of *Cyp19a1b* cDNA in *Clarias fuscus*

SUN Jing<sup>1,2</sup>, LI Guangli<sup>1,2</sup>, ZHU Chunhua<sup>1,2</sup>, WU Tianli<sup>1,2</sup>, DENG Siping<sup>1,2</sup>

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China

**Abstract:** A cDNA encoding *Cyp19a1b* was derived from *Clarius fuscus* using RT-PCR and RACE. The cDNA was 2 347 bp with a 219 bp 5'UTR, a 596 bp 3'UTR (excluding poly (A)), and a 1 503 bp ORF, which encoded 500 amino acids and had a predicted mol wt of 56.388 kD. Sequence and phylogenetic analyses indicated that the *C. fuscus* *Cyp19a1b* shared 95.6% sequence identity with *clarias gariepinus* and >75% identity with *Silurus meridionalis*, *Pelteobagrus fulvidraco*, *Danio rerio*, *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Gobio-cypris rarus*, and *Epinephelus akaara*. In contrast, there was low sequence identity (<62%) with *Cyp19a1a* for these species. Therefore, the gene was classified into the *Cyp19a1b* subfamily. This is consistent with the classification based on traditional morphology and biochemistry. *Cyp19a1b* mRNA was expressed primarily in the fore-brain, hypothalamus, and pituitary, and to a lesser extent in the liver, testis and ovary. We observed differences in the level of expression in brain between males and females ( $P<0.05$ ). *Cyp19a1b* was expressed prior to sex differentiation in *C. fuscus*, but there was no difference in the level of expression between prior and post to sex differentiation (12–30 d after hatching). Our results suggest that *Cyp19a1b* is not directly involved in mediating sex differentiation in *C. fuscus*, but may play an indirect role by acting on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

**Key words:** *Clarias fuscus*; *Cyp19a1*; RT-PCR; sex differentiation; mRNA expression

**Corresponding author:** DENG Siping. E-mail: sipingdeng@gmail.com