

温度对泥鳅和大鳞副泥鳅性腺分化的影响和 CYP19a 基因的克隆与时空表达

南平, 杜启艳, 燕帅国, 常重杰
(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:向性成熟的泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)个体注射绒毛膜促性腺激素, 对所获得的卵子和精子进行人工授精。把胚胎分别置于 20℃、25℃ 和 30℃ 条件下, 使其发育。经性腺检查发现, 随着温度的升高两种泥鳅中雄性个体所占的比例明显升高, 获得明显的偏雄比率群体。根据已知细胞色素 P450 芳香化酶 CYP19a 基因序列设计嵌套简并引物用巢式 PCR 扩增并克隆出了两种泥鳅的 CYP19a 的 DNA 片段。泥鳅 CYP19a 片段和大鳞副泥鳅 CYP19a 片段分别长 941 bp 和 935 bp。在此基础上用各自的特异引物克隆出两种泥鳅 CYP19a 的相应 cDNA 片段。通过基因组 DNA 和 cDNA 序列的比较证明两种泥鳅的 CYP19a 基因均包含 2 个内含子和 3 个外显子, 编码的蛋白质序列长 84 氨基酸残基。以 GAPDH 基因为对照, 分别对 2 种泥鳅成体组织和不同发育阶段胚胎的 CYP19a 进行了半定量 RT-PCR 表达分析, 结果表明, 二者在成体组织中具有大致相似的表达模式, 在卵巢和脑组织中表达量较大, 在精巢和肝组织中微量表达, 在胚胎中二者的表达模式差异较大。

关键词:泥鳅; 大鳞副泥鳅; CYP19a; 性别分化

中图分类号:Q959.468 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0407-07

世界上现存鱼类多达 20 000 余种, 是脊椎动物中分布最广、种类最多的类群。在脊椎动物的系统进化中, 鱼类处于承前启后的关键地位^[1]。与高等脊椎动物相比, 其性别决定具有原始性和可塑性, 易受环境条件如温度等的影响。深入研究其性别决定机制, 对于水产养殖具有重要的实用价值。许多鱼类雌雄之间的经济性状如生长率等存在差异, 通过控制性别的方法对专门生产全雌或全雄鱼苗进行单性养殖可以提高经济效益。同时, 鱼类的性染色体分化处于萌芽状态, 在目前已进行过核型分析及带型考察的鱼类中, 仅有少数种类具有异形性染色体, 且类型多样。因此对于鱼类性别决定机制的研究还将有助于探讨脊椎动物中性别相关基因及染色体进化的机制^[2]。

在脊椎动物中, 胚胎发育的早期, 原始性腺是中性的, 具有分化为卵巢和精巢的双向潜能。在这一过程中, 性激素比率的变化起着关键作用^[3]。CYP19a 是细胞色素 P450 基因家族的一员, 编码芳香化酶 (aromatase, P450arom), 其功能是催化雄激素转化为雌激素, 被认为是性腺性别分化中的关

键酶, 控制着性激素的相对比率。该基因也被认为是感受环境因素进而影响胚胎发育性腺分化的关键基因^[4]。

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 是中国常见的鲤形目鳅科鱼类, 具有较近的亲缘关系, 曾被列为同一属。在之前的银染和 C 带研究时发现, 大鳞副泥鳅为 ZZ/ZW 性别决定, 而泥鳅中未发现异形性染色体^[5]。为比较分析近缘种在性别分化和感受环境因素的差异, 本研究侧重考察发育环境的温度对此二物种胚胎性别分化的影响以及 CYP19a 基因的结构和时空表达特征。

1 材料与方法

1.1 材料

泥鳅、大鳞副泥鳅购于新乡市集贸市场。

1.2 方法

1.2.1 发育环境的温度对性腺分化的影响 取健康性成熟个体雌性 10 尾、雄性 20 尾, 分别注射鱼用绒毛膜促性腺激素 (HCG): 800 U/尾 (♀)、

收稿日期: 2004-10-25; 修订日期: 2004-12-06。

基金项目: 河南省高校杰出科研人才创新工程项目 (2001KYCXD10); 河南省杰出青年科学基金资助 (05120001800)。

作者简介: 南平 (1979-), 女, 硕士生。E-mail: nanspring2002@163.com

通讯作者: 常重杰。E-mail: changzhongjie@tom.com

200 U/尾(♂), 10~12 h, 人工授精。把受精卵分别置于20℃、25℃和30℃下孵化, 用光照恒温培养箱控制温度, 以测定温度对泥鳅性腺分化的影响。幼鱼体长大于6 cm时活体解剖检测性腺确定性别。

1.2.2 基因组DNA的制备 断尾取血法提取基因组DNA。将实验鱼尾部擦干净, 断尾取血20~50 μL, 加入两倍体积的ACD(柠檬酸钠)抗凝, 10 000 r/min离心2 min, 去上清, 以适量STE重新悬浮血细胞, 离心去上清, 重复该步骤至上清液无红色。之后加入200 μL裂解液, 缓慢摇匀直至出现黏状物, 55℃温育2 h; 加蛋白酶K至终质量浓度100 μg/mL, 55℃消化过夜; 依次用酚·酚·氯仿·异戊醇混合物、氯仿·异戊醇混合物各抽提2次。加入1/10体积的3 mol/L NaAc和2倍体积的无水乙醇, 4℃放置20 min以充分沉淀DNA; 用枪头挑出DNA沉淀, 用70%冷乙醇洗涤之后置于4℃冰箱使之缓慢干燥。将DNA溶于适量的TE中, 4℃保存备用。

1.2.3 CYP19a基因的简并引物PCR和序列分析

根据从GenBank检索的硬骨鱼CYP19a mRNA全长设计嵌套简并引物。PCR反应体系20 μL: 包括200 μmol/L dNTP, 2.0 mmol/L MgCl₂, 上游引物和下游引物50 pmol/L, 10×缓冲液2 μL, Taq DNA聚合酶1 U, 基因组DNA 1 μg。循环参数为: 95℃ 5 min, 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 90 s, 共35个循环。循环结束后72℃充分延伸10 min。引物序列如下:

CYP19a的嵌套简并引物

外侧: 上游引物 G(G/C)T(G/A/C)(G/A)AC(A/G)
T(C/T)TC(C/T)AACAGAC

下游引物 C(T/C/G)CG(G/A/C)CGCATG(G/
C)TGAAGTC

内侧: 上游引物 AA(G/A)TA(T/C)TTT(G/C)
ACAC(G/A/T/C)TGGC

下游引物 CA(T/C)CTCCA(G/A)CAC(A/G)
(C/T)ACTG

PCR产物经琼脂糖凝胶电泳、回收纯化后, 克隆入pGEM-T载体并转化入JM109宿主菌中。挑选阳性克隆进行碱基序列测定。利用Blast软件包对克隆出的CYP19a DNA结构、碱基序列及其推测的氨基酸序列进行序列分析。

1.2.4 成体组织和胚胎发育不同时期RNA的提取 用RNeasy Mini Kit RNA提取试剂盒分别提取

2种泥鳅成体的卵巢、脑、精巢、心、肝和肾等6种组织的总RNA以及胚胎发育过程中的原肠胚、神经胚、尾芽期、孵出期和卵黄吸收期等5个时期的总RNA。琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量。

1.2.5 CYP19a cDNA的克隆 取成体卵巢总RNA 5 μL, 用RevertAid™FIRST Strand cDNA Synthesis Kit逆转录为cDNA。取1 μL cDNA作为RT-PCR的模板。根据已获得的CYP19a基因的碱基序列, 设计特异引物。反应参数为: 95℃ 5 min, 94℃ 40 s, 57℃ 40 s, 72℃ 60 s, 共35个循环, 循环结束后72℃充分延伸10 min。

特异引物序列为:

泥鳅CYP19a:

上游引物: AAGTATTTTGACACGTGGC

下游引物: CATCTCCAGCACGCACTG

大鳞副泥鳅CYP19a:

上游引物: AAGTATTTTGACACATGGC

下游引物: CATCTCCAGCACACACTG

1.2.6 成体组织和胚胎发育不同时期CYP19a基因的表达 参照文献[4]进行。

根据CYP19a基因cDNA序列, 各设计一对特异引物, 对CYP19a基因进行成体组织和胚胎发育不同时期特异表达的半定量RT-PCR分析。进行反转录反应时, 每种组织总RNA定量为1 μg。RT-PCR反应时取2 μL cDNA为模板。反应参数为: 95℃ 5 min, 94℃ 40 s, 57℃ (58℃) 40 s, 72℃ 60 s, 共30个循环, 循环结束后72℃充分延伸10 min, 电泳检测。

泥鳅和大鳞副泥鳅CYP19a的特异引物同上。

参照基因为持家基因GAPDH。

GAPDH引物为:

上游引物: GCCTCTTGCACGACCAACTG

下游引物: CGGAAGGCCATGCCTGTACG

2 结果与分析

2.1 温度对2种泥鳅性腺分化的影响

受精卵在实验控制条件下长至体长6 cm以上(约3个月)时, 活体解剖检测性腺确定其性别。结果表明, 发育温度对两种泥鳅的性腺性别分化影响均显著。在20℃、25℃和30℃时, 泥鳅雄性个体所占比率分别为58%、85%和86%; 而大鳞副泥鳅雄性个体所占比率分别为53%、87%和87%。随着温度的升高雄性个体所占比例明显增加。

2.2 CYP19a 基因的克隆和序列分析

用所设计的简并引物进行巢式 PCR, 在两种泥鳅基因组 DNA 中均扩增出一条约 900 bp 的条带 (图 1)。测序表明, 上述 2 条扩增带的长度分别为 941 bp 和 935 bp。根据所得基因组 DNA 序列设计特异引物, 以卵巢 cDNA 为模板进行 RT-PCR 分析, 在两种泥鳅中均扩增出一条约 250 bp 的带 (图 2)。

把所得的基因组 DNA 和 cDNA 碱基序列输入 GenBank 利用 Blast 软件包进行同源性检索。结果表明, 所克隆的泥鳅 CYP19a DNA 片段长 941 bp, 含有 3 个外显子和 2 个内含子, 其中外显子 1、2、3

分别长 89 bp、112 bp 和 51 bp, 内含子 1、2 分别为 216 bp 和 473 bp。所克隆的大鳞副泥鳅 CYP19a DNA 片段长 935 bp, 也由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 其中外显子 1、2、3 的长度分别为 89 bp、112 bp 和 51 bp, 而其内含子 1、2 的长度分别为 216 bp 和 467 bp。所有的内含子拼接点均遵循 GT-AG 规律。这两个 CYP19a 基因的 DNA 序列、内含子的位点和序列如图 3 和图 4 所示。其编码的氨基酸序列与斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 CYP19a 相似性最高, 达 88.10% (表 1), 因此分别命名为 MaCYP19a、PdCYP19a。其所编码的氨基酸序列长度均为 84 氨基酸残基。

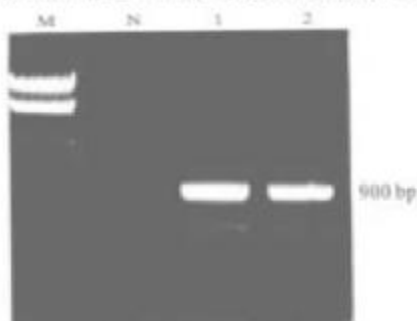


图 1 CYP19a 基因组 DNA 扩增结果

M: Marker 3; N: 空白对照; 1: 泥鳅; 2: 大鳞副泥鳅

Fig.1 CYP19a genomic DNA amplification fragment

M: Marker 3; N: Blank test; 1: *M. anguillicaudatus*; 2: *P. dabryanus*

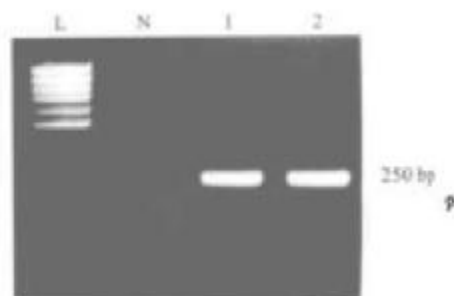


图 2 CYP19a cDNA 扩增结果

N: 空白对照; L: Ladder; 1: 泥鳅; 2: 大鳞副泥鳅

Fig.2 CYP19a cDNA amplification fragment

N: Blank test; L: Ladder; 1: *M. anguillicaudatus*; 2: *P. dabryanus*



图 3 泥鳅 CYP19a DNA 序列及其推测的氨基酸序列

□ 引物位点; ■ 内含子序列

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid (below the former) sequences of *M. anguillicaudatus* CYP19a gene

□ Primer sites; ■ Intron sequences

2.4 CYP19a 的时空特异性组织表达分析

以 GAPDH 为参照基因,用半定量 RT-PCR 方法研究了两种泥鳅中成体不同组织和胚胎发育过程中不同时期的特异性表达。结果表明,在泥鳅成体组织中 CYP19a 基因在卵巢中表达量最高,其次是脑和肾,在心、精巢中有微弱表达,而在肝中无表达(图 6);在大鳞副泥鳅成体组织中 CYP19a 基因具有类似的表达模式,即在卵巢中表达量最高,其次是

肾和脑,在肝中有微弱表达,而在心和精巢中无表达(图 7)。在胚胎发育的不同时期,两种泥鳅 CYP19a 基因的表达模式差异较大。泥鳅中 CYP19a 在原肠期表达量最高,其次是神经胚、尾芽期,在孵出期和卵黄吸收期无表达(图 8);在大鳞副泥鳅中 CYP19a 在卵黄吸收期表达量最高,其次是原肠期、神经胚,在尾芽期和孵出期无表达(图 9)。

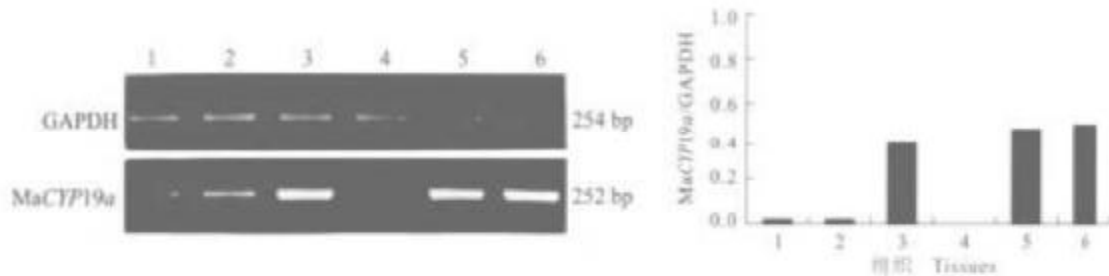


图 6 泥鳅 MaCYP19a 在成体组织中的表达

1:精巢; 2:心; 3:肾; 4:肝; 5:脑; 6:卵

Fig.6 Adult tissues expression of *M. anguillicaudatus* CYP19a

1:Sperm; 2:Heart; 3:Kidney; 4:Liver; 5:Brain; 6:Ovary

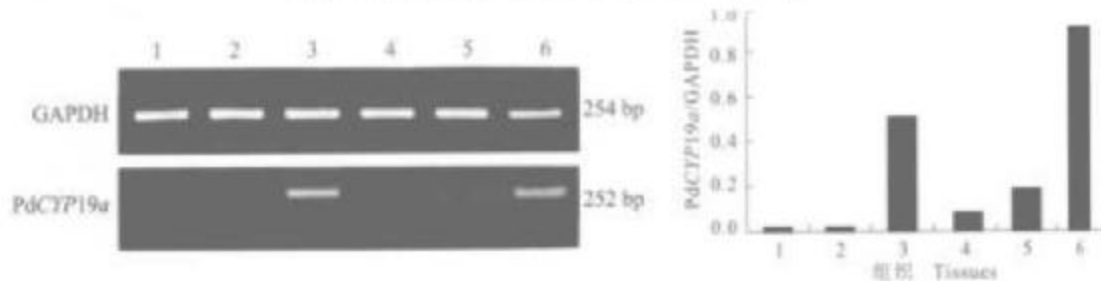


图 7 大鳞副泥鳅 PdCYP19a 在成体组织中的表达

1:精巢; 2:心; 3:肾; 4:肝; 5:脑; 6:卵

Fig.7 Adult tissues expression of *P. dabryanus* CYP19a

1:Sperm; 2:Heart; 3:Kidney; 4:Liver; 5:Brain; 6:Ovary

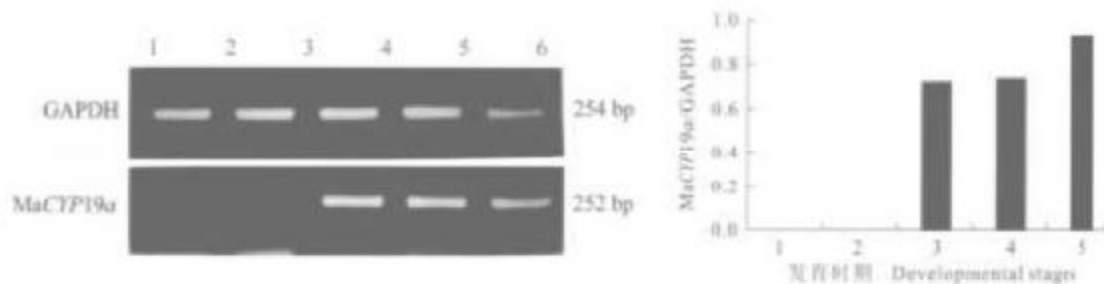


图 8 泥鳅 MaCYP19a 在胚胎中的表达

1:卵黄吸收期; 2:孵出期; 3:尾芽期; 4:神经胚; 5:原肠胚

Fig.8 Embryo expression of *M. anguillicaudatus* CYP19a

1:Yolk-sac absorption phase; 2:Hatched larva; 3:Tail bud formed; 4:Neurula; 5:Gastrulae

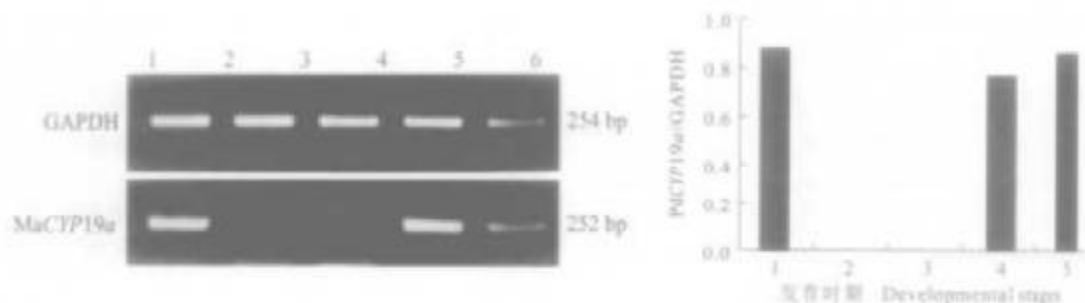


图9 大鳞副泥鳅 PdCYP19a 在胚胎中的表达
1:卵黄吸收期; 2:孵出期; 3:尾芽期; 4:神经胚; 5:原肠胚。

Fig.9 Embryo expression of *P. dabryanus* CYP19a

1:Yolk-sac absorption phase; 2:Hatched larva; 3:Tail bud formed; 4:Neurulae; 5:Gastrulae

3 讨论

鱼类的一个重要特征是性别决定机制的多样性,甚至在同一个属的不同种都存在不同的性别决定类型,可以为研究性别决定和分化的分子机制及进化规律提供丰富的素材。因此,关于鱼类性别决定和分化的研究日益受到人们的关注^[6-7]。

在泥鳅和大鳞副泥鳅性腺性别分化的早期,受温度的影响很大,高温(25~30℃)处理能得到明显的偏雌性群体,雄性比率达80%以上。而在20℃条件下发育形成性比接近1:1的种群。

众多资料表明,在雌雄异体鱼类中,性别决定通常情况下受遗传因素的控制,但非常容易受到环境因素诸如温度和外源性激素的影响而改变性腺发育的方向^[8]。有关鱼类中环境因素对性别决定和分化影响的现象已在包括野生种群和实验种群在内的39种硬骨鱼、33种丽鱼科鱼中发现^[9],最主要的因素是温度,其次是种群密度、盐度、pH、光周期等^[2]。鱼类中温度依赖型性别决定(Temperature-dependent-sex-determination, TSD)模型与爬行类中相似,可以划分为3种类型^[9]。第1种类型是高温下生成较多的雄性;低温则生成较多的雌性。大多数鱼类均属于此种类型。本研究的泥鳅和大鳞副泥鳅即属于此种类型。第2种类型则正好相反,如扁头鲩(*Ictalurus punctatus*)等较少的物种。第3种类型在高低温均诱导出单性雄性种群,中间温度生成性比为1:1种群,仅发现于日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)。

2种泥鳅中克隆的CYP19a分别长941 bp和935 bp,编码84个氨基酸残基的蛋白质。对该序列与其他物种的已知CYP19a氨基酸序列同源性聚

类分析可知,两种泥鳅的CYP19a相似性最高,达98.8%,且与斑马鱼CYP19a同源性最高(88.1%);与人CYP19同源性最低(50.0%)。这与彼此间的进化地位是相一致的。MaCYP19a在成体泥鳅的卵巢中表达量最高,脑和肾其次,心和精巢中有微弱的表达,而肝中无表达;PdCYP19a也在大鳞副泥鳅成体的卵巢中表达量最高,其次是脑和肾,在肝中有微弱表达,而在心和精巢中无表达。这种表达模式与Sox9基因极其相似,而后者已经被证明与性别决定和分化有着直接的关系。在胚胎发育过程中,MaCYP19a在泥鳅胚胎的原肠胚期表达量最高,其次是神经胚期和尾芽期,且三者中差异不大,但呈下降趋势,而孵出期和卵黄吸收期时无表达;PdCYP19a在卵黄吸收期表达量最高,其次是原肠胚、神经胚期,而在尾芽期和孵出期无表达。这表明:MaCYP19a基因可能在泥鳅胚胎的较早期表达,到后期(如孵出期、卵黄吸收期)已无表达;而PdCYP19a在整个胚胎时期则是表现为先下降,过一段时期又迅速上升的趋势,即在胚胎早期有表达,但呈下降趋势,在尾芽期和孵出期时无表达,到了卵黄吸收期时又出现高表达现象。CYP19a在两种泥鳅中的作用机制可能存在一定的差异。性激素比率假说是目前较流行的解释环境影响性别决定和分化机制的理论^[10]。该假说认为在性腺性别分化过程中,雄激素/雌激素比率的高低最终决定了性腺性别分化的方向。CYP19a基因编码的细胞色素P450芳香化酶(aromatase)催化睾酮转化为雌二醇,从而决定着这一比率^[11]。温度通过影响芳香化酶基因的表达或其调节基因的活性而最终影响性腺性别分化^[12-13]。因此,深入研究该基因的结构和表达

调控机理将有可能彻底揭示环境因素对性别决定和性腺分化影响的分子机制。

参考文献:

- [1] 余先觉,周 敏,李 康,等.中国淡水鱼类染色体[M].北京:科学出版社,1989:9.
- [2] Devlin R H, Yoshitaka Nagahama. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, 208: 191-364.
- [3] Baroiller J F, D'Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* (part C), 2001, 130: 399-409.
- [4] Helena D, Alexis F, YANN G, et al. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 59: 265-276.
- [5] 常重杰,余其兴. 大鳞副泥鳅 ZZ/ZW 型性别决定的细胞遗传学证据[J]. *遗传*, 1997, 19(3): 17-19.
- [6] Paul H, Montgomery S. Some like it hot: temperature-determined sex [J]. *Nature*, 1982, 296: 807-808.
- [7] Hurley M A, Matthiessen P, Pickering A D. A model for environmental sex reversal in fish [J]. *J Theor Biol*, 2004, 227(2): 159-165.
- [8] Nomura T, Arai K, Hayashi T, et al. Effect of temperature on sex ratios of normal and gynogenetic diploid loach [J]. *Fisheries Science*, 1998, 64(5): 753-758.
- [9] Fujioaka Y. Thermolabile sex determination in homoroid [J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, 59: 851-861.
- [10] Goto-Kaseto R, Kight K E, Zohar Y, et al. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 139(1): 72-84.
- [11] Tsai C L, Chang S L, Wang L H, et al. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain [J]. *J Neuroendocrinol*, 2003, 15(1): 97-102.
- [12] Eric S, Alexis F. Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 292: 494-505.
- [13] Helena D, Jean-francois B. Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 290: 574-585.
- [14] Tachori I, Degani G, Harvitz A, et al. Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 138(3): 271-280.

Effects of temperature on sex differentiation of gonads and the cloning and expression of CYP19a in two species of loaches

NAN Ping, DU Qi-yan, YAN Shuai-guo, CHANG Zhong-jie
(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 53007, China)

Abstract: Eggs and sperms were obtained by a single muscular injection of HCG in the adult of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus*. The zygotes were incubated separately at 20 °C, 25 °C and 30 °C. The results show that high temperature (25-30 °C) can promote male-biased sex ratio in both species of loach. And with the temperature rising, the male sex rate gets higher. A pair of nested degenerate consensus primers were designed based on the CYP19a mRNA complete cds of teleost fish. Using nest-PCR method, the part genomic sequences of CYP19a in two species of loach were amplified and cloned from genomic DNA. The DNA fragments of MaCYP19a and PdCYP19a were as long as 941 bp and 935 bp respectively. The gene-specific primers were designed based on the genomic DNA sequence. Then using RT-PCR method, the corresponding cDNA of CYP19a in both species were amplified and cloned from total RNA that was isolated from ovary tissue. By comparing their genomic DNA sequences and cDNA sequences, the cloned CYP19a of the two species all included 2 introns and 3 exons and encode 84 amino acids. With the reference gene of GAPDH, expression of these genes in adult tissues and at different embryo developing stages were studied separately with semi-quantitative RT-PCR. The results show that similar expression patterns have higher expression in ovary and brain, and slight expression in testis and liver exists in adult tissues of two species of loach. The expression patterns in embryo of both species are very different.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; CYP19a; sex-differentiation

Corresponding author: CHANG Zhong-jie. E-mail: Changzhongjie@tom.com