DOI: 10.12264/JFSC2024-0353

草鱼 cyp19a 基因的表达特征及其 RNA 干扰后性别相关基因的表达响应

肖小芳^{1,2},李胜杰²,刘青山¹,杜金星²,雷彩霞²,朱涛²,田静²,宋红梅²

1. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室,广东 广州 510380

摘要: 为探究 *cyp19a* 基因在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺发育过程中的表达模式及其 RNA 干扰靶基因沉默 后各性别相关基因的表达响应,本研究通过 RACE 技术克隆草鱼 *cyp19a* 基因全长 cDNA 序列,采用 qRT-PCR 技术 检测 *cyp19a* 基因在草鱼发育不同时期性腺组织和成鱼各组织中的表达模式,合成 *cyp19a*-dsRNA 并对雌鱼进行 RNA 干扰实验,对照组雌鱼注射等量生理盐水,检测性腺组织中性别相关基因的表达量和血清性类固醇激素含量。结果显示,草鱼 *cyp19a* 的 cDNA 序列全长为 2219 bp,其中开放阅读框长 1554 bp,5'非编码区(UTR)48 bp,3' UTR 617 bp,编码 517 个氨基酸。草鱼 *cyp19a* 基因在性腺中表达量最高,其次是肌肉、脑和心脏组织。不同发育 时期的性腺组织中,*cyp19a* 在卵巢中的表达水平均显著高于精巢(P<0.05),且在 48 月龄性成熟时期表达水平显著 上升,表明该基因在草鱼卵巢的发育和成熟过程中起关键作用。按 5 μg/g 注射 *cyp19a*-dsRNA 沉默干扰后 5 d, dsRNA 注射组 *cyp19a* 表达量与对照组相比显著降低(P<0.05), 靶基因沉默效率在 1 d 时为 59.72%,之后逐步上升。与对照组相比,dsRNA 注射组在 1~3 d 时 *fox12a* 和 *fox12b* 表达量显著上调(P<0.05),*dmrt1* 表达量下调(P>0.05), *amh* 表达量显著下调(P<0.05),并在干扰后 4~5 d 时 *fox12a*、*fox12b*、*dmrt1*和 *amh* 的表达量逐步恢复至接近对照组水平 (P>0.05);此外,注射组血清中雌二醇(E₂)含量显著下降(P<0.05),睾酮(T)含量显著上升,且可能通过负反馈调控*fox12a* 和 *fox12b* 表达水平显著上升,且可能通过负反馈调控*fox12a* 和 *fox12b* 表达,正向调控 *dmrt1*和 *amh* 表达量。研究结果表明,*cyp19a* 基因在草鱼卵巢发育过程中发挥关键作用。

草鱼属鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科 (Leuciscinae)、草鱼属(*Ctenopharyngodon*),全国各 地均有养殖,其年产量常居淡水养殖鱼类首位^[1]。 由于草鱼 4~5 龄性腺发育成熟,一定程度上限制 了其种质资源开发与利用的进度和效率^[2]。针对 20 月龄以上草鱼生长存在性别二态性,雌性生长 速度优于雄性^[3],深入解析草鱼性别基因在性腺 发育过程中的调控作用对开展单性育种工作以缩 短养殖周期具有重要意义。性别相关基因在硬骨 鱼类性别决定、性腺分化和发育过程中发挥关键

文章编号:1005-8737-(2025)04-0421-14

作用,如 dmrt1、amh、foxl2、cyp19a、sox3、sox9 等性别决定基因,对这类基因功能的研究有利于 开展鱼类单性育种等工作^[4]。其中,dmrt1和 amh 基因突变的雄性斑马鱼(Danio rerio)可发生性逆 转成为伪雌鱼^[5], foxl2 基因的转录水平在史氏鲟 (Acipenser schrenck)性腺组织中具有性别二态性 并在性别分化过程中发挥重要作用^[6],然而目前 围绕草鱼性别关键基因挖掘及相关功能研究相对 较少。本研究旨在探究性别决定基因在草鱼性腺 发育过程中的表达模式及其与各性别基因间的调

收稿日期: 2024-11-29; 修订日期: 2025-01-23.

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFD1200804);国家农业生物育种专项(2023ZD04065).

作者简介: 肖小芳(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: 2531935370@qq.com

通信作者: 宋红梅, 副研究员, 研究方向为水产生物技术与遗传育种. E-mail: shm1227@126.com

控作用,为开展草鱼单性育种技术研究提供支撑。

芳香化酶(Cytochrome P450 Aromatase, CYP19) 是细胞色素 P450 (Cytochrome P450)家族的成员 之一,是催化雄激素转变为雌激素的关键限速 酶^[7-8]。绝大部分哺乳动物中, P450 芳香化酶都是 由单一的 cyp19 基因编码而成, 而硬骨鱼 cvp19 基因至少存在 cyp19a 和 cyp19b 两种亚型, 分别编 码不同形式的芳香化酶异构体——性腺型芳香化 酶(P450aromA)和脑型芳香化酶(P450aromB)^[9]。 其中, cvp19a 作为内源性雌激素合成的关键基因, 该基因所编码的芳香化酶广泛参与调控鱼类卵巢 的分化和发育。张东云等^[10]通过分别投喂 30 mg/kg的17β-雌二醇和20 mg/kg的17β-雌二醇 混合 10 mg/kg 曲洛斯坦所获得的大口黑鲈 (Micropterus salmoides) 伪雌鱼性腺组织中 cvp19a1a基因表达水平相较雄鱼显著上调。Zhang 等^[11]研究发现 XX 型尼罗罗非鱼(Oreochromis niloticus)缺失 cyp19a1a 基因可导致鱼体雌激素水 平下降,性腺生殖细胞数量减少并发育为精巢。

舒畅等^[12]制备了牙鲆(Paralichthys olivaceus) Cvp19a 多克隆抗体并发现牙鲆性腺 cvp19a 基因 的蛋白水平与转录水平一致,具有性别二态性, 利用 Foxl2 和 Dmrt1 重组蛋白处理牙鲆性腺分化 期幼鱼可分别显著上调和下调 cyp19a 的转录水 平,表明 Foxl2 和 Dmrt1 蛋白可通过调控 cvp19a 的表达参与调控性腺的分化与发育。随着分子生 物学技术的发展, 鱼类 cyp19a 基因在性腺发育过 程中与各性别基因间的调控作用愈发明确, 如斑 马鱼^[13]、尼罗罗非鱼^[14]和大黄鱼(Larimichthys crocea)^[15]等。目前, 祁博等^[16]在草鱼不同月龄中 cvp19a1a的转录水平发现,在雌性草鱼3、6、48 月龄时 cyp19a1a 的转录水平均有不同程度的显 著上升, 表明 cyp19a1a 对草鱼卵巢的分化和发育 具有重要作用,但其在草鱼性腺发育过程中的表 达模式及其与各性别基因的调控作用尚未清晰。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是真核生物体内的一种天然免疫,是基于小 RNA (small RNA, sRNA)的基因表达调控方式。RNAi 现象在生物界普遍存在,可以在转录水平、转录后水平、翻译水平上对靶基因的表达实现特异性阻断和抑

制,是一种高效、稳定的抑制基因表达的技术手段,随着基于 RNAi 原理的基因沉默技术逐渐成熟,成为研究基因功能的有力工具^[17-18]。在刺参(*Apostichopus japonicus*)^[19]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[20]和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[21]等甲壳动物中均能通过注射或投喂 dsRNA 进行特异性抑制目的基因的表达。Song 等^[22]通过对鲤(*Cyprinus carpio*) *igf3* 基因长时间的 dsRNA 干扰中发现, *igf3* 基因沉默后能够显著影响促性腺激素和性固醇类激素的分泌,从而抑制性腺的发育。

本研究拟通过 RACE 技术克隆 *cyp19a* 基因的 全长 cDNA 序列,通过 qRT-PCR 技术探究 *cyp19a* 基因在草鱼性腺发育不同时期和成鱼各组织中的 表达模式,注射 dsRNA 干扰后性别相关基因的表 达和血清激素水平的测定,探讨 *cyp19a* 基因在草 鱼性腺发育和靶基因沉默后的调控作用,为进一 步探索 *cyp19a* 基因在草鱼性腺发育过程中对各 性别基因间的调控作用奠定基础,为开展草鱼单 性遗传育种研究提供支撑。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用鱼分别为 3、12、24、36 和 48 月龄草 鱼,由中国水产科学研究院珠江水产研究所三水 基地提供。根据年龄分别放入 5 个池塘网箱(2 m× 1 m×1.2 m)中暂养一周,暂养期间不间断充气增 氧,每天投喂两次饲料,饲料购于广东省佛山市 联大农牧科技有限公司。

1.2 组织样品采集

根据刘筠等^[23]草鱼性腺分期标准以及祁博 等^[16]对草鱼不同月龄性腺组织学观察结果,12、 24、36和48月龄草鱼精巢和卵巢分别处于发育 I、 II、III、IV期。选取48月龄草鱼成鱼雌雄各5尾, 禁食24h后,浸泡在含有100 mg/L的MS-222 (Sigma,美国)中麻醉,分别采集脑、眼、鳃、心 脏、脾脏、头肾、肝脏、中肠、肌肉、精巢和卵 巢组织。取12、24、36和48月龄草鱼雌雄各5 尾,禁食24h,麻醉后,采集性腺组织。取样后迅 速置于液氮中速冻后-80℃冰箱保存,用于后续 RNA的提取。所用草鱼均剪取尾鳍保存于无水乙 醇中,后续使用 Wang 等^[24]开发的草鱼雌雄特异性分子标记鉴定性别。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

采用 Tissue RNA Kit (OMEGA)试剂盒(广州 威佳生物科技有限公司,广州)提取草鱼各组织总 RNA,用 1%琼脂糖凝胶和 CytationTM ENO HTS 多功能酶标仪(Biotek Cytation 5,美国)检测总 RNA 纯度和浓度,样品 OD260/OD280 在 1.8~2.1 之间,依照 SMARTTM RACE cDNA Amplification 扩增试剂盒(TaKaRa,日本)说明书,合成 5'RACE 和 3'RACE cDNA。分别提取草鱼成鱼各组织、性 腺发育各时期、对照组和 dsRNA 处理组性腺组织 RNA, -80 ℃保存备用。利用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa,日本)合成并 稀释 cDNA 第一链,样品 cDNA 浓度为 200 ng/µL 左右, -20 ℃保存备用。

1.4 草鱼 cyp19a cDNA 的全长克隆和序列分析 根据转录组数据和已知鲤科鱼类的保守序

列,利用 Primer 5 软件设计特异性扩增引物 cvp19a-F 和 cvp19a-R (表 1), 以性腺 cDNA 第一 链为模板进行基因保守序列片段的扩增。20 uL 扩增体系为: DEPC水 6 µL, Premix Tag[™] 10 µL, 上下游引物各1 µL, cDNA 2 µL; 反应程序为: 94 °C 3 min, 35 个循环(94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产 物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后,送至生物工 程(上海)股份有限公司测序。通过测序结果设计 cvp19a 基因 5'race 和 3'race 巢式引物(表 1)。利 用 Smarter Race5'/3' Kit Components (TaKaRa, 日本)试剂盒进行 5'末端和 3'末端序列扩增, PCR 产物纯化连入 PBM 23 Vector 中, 再转化到 DH5α 感受态细胞中, 37 ℃过夜后进行菌落 PCR, 筛选出阳性单克隆进行测序, 通过软件 Vector NTI 分别将 cyp19a 的 5'端、3'端及其中 间核心序列拼接,从而获得草鱼完整的 cyp19a cDNA 序列。

表 1 本研究所用引物 Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage					
<i>сур19а-</i> F	CAAATGTGGCACTCTGGAA	核心片段扩增					
<i>cyp19a</i> -R	TCCGAACGGCTGAAAGA	intermediate sequence cloning					
R1	AGAGCCGTGATGGCGTCCTGTA	5' RACE 扩增					
R2	TGCTCCCAAAGCGTGAGGTGTA	5' RACE-PCR					
R3	TTGTAGTAGTTGCTGGCGGTCC						
F1	GAGTTACAGGACGCCATCACGG	3' RACE 扩增					
F2	AGTCCATTCTTGTGACGCTGT	3' RACE-PCR					
F3	CGCAAACCAACAACCTGTCGCA						
cyp19a-dsRNAF	TAATACGACTCACTATAGGGTATGGAGACATTGTGCGGGT	dsRNA 合成					
cyp19a-dsRNAR	Da-dsRNAR <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CGTGATGGCGTCCTGTAACT						
β -actinF	GATGATGAAATTGCCGCACTG	实时荧光定量					
β -actinR	ACCGACCATGACGCCCTGATGT	quantitative real-time PCR					
<i>cyp19a</i> -qF	GTAATGGCACTGAAGGGGCT						
<i>cyp19a</i> -qR	TGTAGTAGTTGCTGGCGGTCC						
dmrt1-qF	TACCAGCCCACACCGTACA						
dmrt1-qR	GCTCTCACACTCCAGCTTGTT						
amh-qF	AACAGGACAACAGCCCGAAA						
amh-qR	TGCACACTCTGAACTAGGCG						
foxl2a-qF	ACGAGACCGACGACAGACCAAC						
foxl2a-qR	GCCTGCGAAGAAAAATGTGAAATC						
foxl2b-qF	ACAACCCCTACAGCCGAATG						
foxl2b-qR	TACCCTGTTTACCTTGGACGAT						

注: 下划线部分为 T7 启动子序列.

Note: The underlined part is the T7 promoter sequence.

使用 ORF Finder (https://www.ncbi.nlm.nih. gov/orffinder/)预测 ORF 位置和氨基酸序列, ExPASy-ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) 分析蛋白质的理化性质, WoLF PSORT (https:// wolfpsort.hgc.ip/)进行亚细胞定位预测、SignalP-4.1 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/) 和 TMHMM-2.0 (https://services.healthtech. dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)分别进行蛋白质信 号肽和跨膜结构域预测, SOPMA (http://npsa-pbil. ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_ sopma.html)和 SWISS-MODEL(https://swissmodel. expasy.org/)分别预测蛋白质的二级结构和三级结 构, SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/)和 InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/)工具分别 分析氨基酸序列的保守结构域及其功能域位点, DNAMAN 软件进行氨基酸多重序列比对分析, MEGA 7.0 软件构建基于邻位相接法(NJ 法)的系 统进化树。

1.5 cyp19a-dsRNA 的合成

根据克隆得到的草鱼 cvp19a cDNA 序列,使 用在线软件 BLOCK-iT™ RNAi Designer (https:// rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/)获得草 鱼 cvp19a 基因沉默靶点所在的序列片段,利用 Primer 5 软件在包含 cyp19a 基因沉默靶点的序列 片段设计用于制备 cyp19a-dsRNA 的引物,并在 上下游引物 5′端添加 T7 启动子序列(表 1)。以性 腺cDNA第一链为模板,进行 cyp19a-dsRNA 模板 的扩增。50 µL扩增体系为: DEPC水 15 µL, Premix 25 μL, 上下游引物各 2.5 μL, cDNA 5 μL; 反应 程序为:98 ℃ 30 s, 35 个循环(98 ℃ 10 s, 63 ℃ 30 s, 72 ℃ 9 s), 72 ℃ 5 min, 4 ℃保存。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物目的片段大小。 PCR 产物经 Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒(Promega, 美国)纯化后, 根据 TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit 试剂 盒 (Thermo Scientific, 美国) 合成并纯化 cyp19a-dsRNA。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测纯化 后的 dsRNA, 酶标仪检测 dsRNA 浓度, -80 ℃冰 箱保存备用。

1.6 cyp19a-dsRNA 干扰实验样品采集

选取 300 尾 3 月龄体重为(9.97±0.96) g 健康 草鱼放入池塘网箱(1.8 m×0.9 m×1.2 m)暂养一周, 暂养期间不间断充气增氧,每天投喂两次饲料。 为筛选注射所需 cvp19a-dsRNA 最适浓度,设置 实验组和对照组,实验组分3组,采用腹腔注射 依次注射浓度为 1, 5, 10 µg/g 的 cyp19a-dsRNA, 对照组注射等量生理盐水,每组注射草鱼 30 尾, 注射后的实验鱼分组放入 4 个规格为 0.8 m× 0.6 m×0.6 m 的网箱中, 24 h 后, 每组随机挑选草 鱼 20 尾, 麻醉后, 采集性腺组织用于组织表达, 分析不同浓度 cvp19a-dsRNA 对雌鱼卵巢组织 cvp19a 表达量变化及其靶基因的沉默效率,筛选 最适浓度。后续实验组注射最适浓度的 cvp19adsRNA, 对照组注射等量的生理盐水, 每组注射 草鱼80尾,注射后的实验鱼分组放入2个规格为 0.8 m×0.6 m×0.6 m的网箱中。在实验的1d, 2d, 3 d, 4 d 和 5 d, 每组随机选取草鱼 10 尾, 麻醉后, 采集性腺和血液组织。性腺组织于 RNA 保存液 (聚合美生物科技有限公司, 北京)中暂存, 后转 移至-80 ℃冰箱保存,用于基因组织表达。血液组织 室温下静置 4~6 h 后, 4 ℃环境下, 4000 r/min 离心 20 min、收集上层血清于-80 ℃冰箱保存、用于 检测雌二醇(E₂)和睾酮(T)的含量。所用草鱼均剪 取尾鳍保存于无水乙醇中,用于性别鉴定。

1.7 实时荧光总量 PCR (qRT-PCR)

根据克隆得到的草鱼 *cyp19a* cDNA 序列,设 计用于实时荧光定量 PCR 的引物(表 1)。以草鱼 成鱼各组织、不同发育时期性腺组织以及 dsRNA 注射实验性腺组织 cDNA 为模板, *β*-actin 作为内 参基因^[25],每个样品设置 3 个重复。使用赛默飞 荧光定量仪(QuantStudioTM 6 Flex,美国)进行 qRT-PCR 检测。20 µL 反应体系为: DEPC 水 6 µL, Premix 10 µL,上下游引物各 1 µL, cDNA 2 µL; 反应程序为: 50 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 min, (95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环), 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s。

1.8 血清激素的测定

使用鱼雌二醇(E2)及睾酮(T) ELISA 试剂盒

(上海优选生物科技有限公司,上海)测定 cyp19a-dsRNA干扰实验雌、雄草鱼血清中 E₂及 T含量。在酶标仪 450 nm 波长下测定其吸光值 (OD),通过标准曲线计算各样品中的类固醇激 素含量。

1.9 数据分析

基因相对表达量以 2^{-ΔΔC_t} 计算, 各实验数据 用平均值±标准误(*x*±SE)表示, 用 SPSS 22.0 软件 进行统计分析, 在 One-way ANOVA 进行方差分 析的基础上采用 Duncan's 多重比较检验组间差异, 实验以 *P*<0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 cyp19a 基因全长 cDNA 序列分析

克隆得到草鱼 cyp19a cDNA 全长为 2219 bp (GenBank 登录号: PQ 476203), 其中 5'UTR 为 48 bp, 3'UTR 为 617 bp, ORF 为 1554 bp, 共编码 517 个氨基酸, 包含 20 种标准氨基酸, 其中亮氨酸最 多(14.7%)、丝氨酸(7.0%)次之、色氨酸(1.0%)最 少。通过在线软件 EXPASY 预测 CYP19a 蛋白分 子式为 C₂₆₁₀H₄₁₈₁N₇₁₃O₇₄₁S₂₅, 半衰期为 30 h, 等 电点 pI为 8.48,不稳定系数为 43.08,总体平均亲 水系数为 0.014。通过在线软件 WoLF PSORT 亚 细胞定位发现该蛋白在细胞质膜的概率为 22%, 在内质网的概率为10%。使用 SignalP-4.1 在线软 件分析蛋白信号肽发现该蛋白无信号肽。利用 TMHMM-2.0 预测跨膜螺旋数量显示该蛋白无跨 膜螺旋。使用 SWISS-MODEL 在线软件对草鱼 cvp19a 基因编码蛋白质三级结构的预测结果,发 现该蛋白质二级结构主要由 α-螺旋、延伸链和无 规则卷曲构成(图 1)。通过 SOPMA 在线软件对草 鱼 CYP19a 蛋白二级结构分显示 α-螺旋、延伸链 和无规卷曲所占的比例分别为 47.58%、9.86%和 42.55%。使用 SMART 和 InterPro 在线软件对蛋 白质保守结构域分析发现, 草鱼 cvp19a 编码的氨 基酸序列在 70~500 之间, 是 P450 蛋白保守结构 域,有4个低复杂度区位于氨基酸序列第46~55 位、第 68~80 位、第 185~200 位和第 330~341 位, 在 449~458 位氨基酸之间存在亚铁血红素结合区 (图 2 和图 3)。





1	TGGGAACT	TGGA	TGGAG	CATGG	GGA	GAC	TTG	AAGA	GA/	AA	ГСТ	GTT	CTT	ATG	GCA	GCT	GAA	CTG	сто	CAG	ССС
														M	A	A	Е	L	L	Q	Р
73	TGTGGAAT	GAAG	CCGGI	IGCGT	CTT	GGC	GAG	GCTG	GCGC	GTT(GAT	CTT	CTG	GTO	GAA	GGC	GCC	CGT.	AAT	GGC	ACT
	CGM	К	ΡV	/ R	L	G	Е	A	A	V	D	L	L	V	Е	G	A	R	Ν	G	Т
145	GAAGGGGC	TCAA	GACA/	ATGTG	TGT	GGA	GCCI	ACGG	CC/	CAG	CTA	CTG	CTG.	ATG	TTA	CTT	TGC	CTG	CTG	CTG	GCC
	EGA	Q	DN	N V	С	G	A	Т	A	Т	L	L	L	M	L	L	С	L	L	L	A
217	ATCAGACA	ACACO	CGGCC	CAGAG	AAA	TCT	CATO	GTGC	CGG	GT	CCT	TGT	TTC	TTO	CTG	GGT	CTG	GGT	CCT	CTT	СТС
	IRQ	Н	R I	Ρ	К	s	Н	v	Р	G	Р	С	F	F	L	G	L	G	Р	L	L
289	TCTTACTG	TCGG	TTCAT	ICTGG	TCT	GGG	ATCO	GGGA	CAC	CC!	AGC.	AAC	ТАС	TAC	AAC	AGC	AAG	TAT	GGA	GAC	ATT
	S Y C	R	F]	[\	S	G	Ι	G	Т	A	S	N	Y	Y	N	S	K	Y	G	D	Ι
361	GTGCGGGT	CTGG	ATCA/	ACGGT	GAG	GAA	ACTO	CTCA	TCC	TG	AGC.	AGG	TCT	TCT	GCT	GTG	TAT	CAT	GTG	TTG	AGG
	VRV	W	IN	N G	Е	Е	Т	L	Ι	L	S	R	S	S	A	V	Y	Н	V	L	R
433	AGATCTCT	GTAC	ACCTO	CACGC	TTT	GGG	AGC/	AAAC	CTAC	GTO	CTG	CAG	TGT	ATT	GGG	ATG	CAT	GAA	CAG	GGC	ATC
	RSL	Y	ΤS	S R	F	G	S	K	L	G	L	Q	С	Ι	G	M	Η	Е	Q	G	Ι
505	ATATTCAA	CTCA	AATGI	FGGTG	CTC	TGG	AAA	AAAA	TAC	GCI	ACC	TTT	TAT	GCT	AAA	GCT	CTA.	ACA	GGT	CCA	GGG
	IFN	S	N V	/ V	L	W	K	K	Ι	R	Т	F	Y	A	K	A	L	Т	G	Р	G
577	CTTCAGAG	AACT	TTGG/	AGATT	TGC	ACC	ACA	ГССА	CAA	CC	ACA	CAC	CTG	GAT	GAT	CTG	TCT	CAC	CTG.	ACG	GAT
	LQR	Т	LE	E I	С	Т	Т	S	Т	Т	Т	Н	L	D	D	L	S	Н	L	Т	D
649	GCTCGGGG	ACAG	GTGG/	ACATT	CTC	AAC	TTA	CTGC	GTT	GC	ATT	GTG	GTG	GAC	ATT	TCC	AAC.	AGA	CTG	TTT	СТА
	ARG	Q	V I) I	L	Ν	L	L	R	С	I	V	v	D	Ι	S	Ν	R	L	F	L
721	GGAGTTCC	TCTT	AATG/	AGTGT	GAT	CTG	CTT	CAGA	AGA	TT	CAG.	AAA	TAT	TTT	GAC	ACG	TGG	CAG.	ACA	GTA	TTA
	G V P	L	NE	ЕC	D	L	L	Q	K	I	Q	K	Y	F	D	Т	W	Q	Т	v	L
793	ATCAAACC	TGAT	GTGTA	ACTTC	AGA	CTG	GAC'	ГGGC	TAC	CAC	AAG.	AAG	CAC	AAG	AGA	GAA	GCT	CAG	GAG	TTA	CAG
	IKP	D	V Y	ίF	R	L	D	W	L	Н	K	K	H	K	R	Е	A	Q	Е	L	Q
865	GACGCCAT	CACG	GCTCI	FGATC	GAG	CAG	AAG/	AAAG	TTC	CAG	CTG.	ACA	CAT	GCA	GAA	AAA	СТС	GAC	CAG	СТС	AAC
	DAI	Т	ΑI	I	Е	Q	K	K	V	Q	L	Т	Н	A	Е	K	L	D	Q	L	N
937	TTCACAGC	AGAG	TTGAT	ГАТТС	GCT	CAG	AACO	CACG	GGG	GAG	CTG.	AGC	GCT	GAG.	AAC	GTC	AGG	CAG	TGT	GTG	TTG
	FТА	Е	LI	ΓF	А	Q	N	Н	G	Е	L	S	A	Е	N	v	R	Q	С	v	L
1009	GAGATGTT	GATA	GCGGG	CTCCA	GAT	ACT	CTC	ГСТА	TC/	GT	CTG	TTC	TTC.	ATG	TTG	CTG	TTA	CTC	AAA	CAG	AAT
	EML	I	A A	A P	D	Т	L	s	Ι	s	L	F	F	M	L	L	L	L	K	Q	N
1081	CCAGACGT	CGAG	FTGA/	AGATC	CTG	CAG	GAA/	ATGG	AA/	CTO	GTT	TTA	GCT	GGT	GGG	AGC	CTG	CAG	CAC	TCA	CAT
	PDV	Е	Lŀ	K I	L	Q	Е	М	Е	Т	v	L	A	G	G	s	L	Q	Н	s	Н
1153	CTGTCCAG	GTTA	AACAT	ITCTG	GAG	AGT	TTT/	АТСА	ACC	GAG	TCG	сто	CGG	TTO	CAC	CCG	GTC	GTG	GAC	TTC	ACC
	LSR	L	N I	ΓL	Е	s	F	I	N	Е	S	L	R	F	Н	Р	v	v	D	F	Т
225	ATGCGCCG	GGCC	CTGG/	ATGAT	GAT	GTC	ATC	GAGG	GCI	`AC/	AAA	GTG	AAG	AAA	GGA	ACA	AAC	ATC	ATA	тта	ААТ
	MRR	A	LI) D	D	v	T	Е	G	Y	K	V	K	K	G	Т	N	I	I	L	N
297	GTGGGTCG	AATG	CACCO	ATCT	GAT	TTC	TTC	- CCCA		CG	AAC	CAG	TTC	AGT	- CTT	GAC	AAC	- TTO	CAG	AAG.	AAC
<u> </u>	VGR	м	НБ	8 S	D	F	F	Р	К	р	N	۵	F	S	L	D	N	F	۵	К	N
369	GTGCCGAG	TCGT	гтстт	TCAG	000	TTC	GGA'	TCAG		CA	220	TCA	ТGT)	OTO	CCA	AAG	CAC	ATC	GCT	ATG	стс
1507	V P S	R	FF	7 0	Р	F	G	S	G	р	R	S	C	v	G	K	н	T	A .	м	v
1441	ATGATCAA	CTCC	1 1 ATTC7	N TCTC	1	TCTC'	TTC	гсто	UCT7	• тс	TCC	CTC	TGT	, ССТ	TTC	100		тст	10 10 10	л СТМ	
1441	MMV	s 100/	тт	V	т	T	T T	s	D D	F	s	v	с С	p	T	K		гот. С	T	V	F
1512		0011			1 CTC	TCC	L CAC(3 7.000	11 1000	1' 'TC4	0	, 1		TCC	L	n CTC	0 100	с стс	1	TC TC	LL ATC
1313	C T D	OUNAI	T N	IUMAU J N	10	100	ONG	ONGL	n n	v 100	5AG	GURG	D	r.00.	nuU c	10	nuu c	010 V	ONG	1010	л I С т
	<u>51</u> P	ų	1 1	N IN	L	3	Q	ų	ľ	٧	E	E	r	3	3	г	5	v	ų	L	T

图 2 草鱼 *cyp19a* 基因 CDS 区及其编码的氨基酸序列 红色的 ATG 为起始密码子. 黄色下划线表示保守结构域, 亚铁 血红素结合区以灰色背景显示.

Fig. 2 CDS region of *cyp19a* gene of *Ctenopharyngodon idellus* and its encoded amino acid sequence

The red ATG indicates the start codon. The conserved domain is underlined in yellow, and the heme-binding region is shown with a grey background.

	*	20	* 40	*	60	*	80	*	100	
Ctenopharyngodon idellus : Culter alburnus : Megalobrama amblycephalas : Carassius gibelio : Danio rerio : Cyprinus carpio : Chanos chanos : Homo sapiens : Mus musculus : Xenopus tropicalis :	MÄAELLQPCGMKP MAAELLQPCGMKP MAAELLQPCGMKP MARELLQPCGMKP MAGDLLQPCGMKP MAGELLQPCGMKP MACHLFSPCTHPDGC	VRLGEAAVDIIVE VRLGEAAVDIIVE VRLGEAAVDIIVE VRLGEAAVDIIVE VRLGEAVDIIIQ VRLSEAPIDIIMQ VRLNEAVTEIIP 	GAFNGAEGAQDN GARNGTEGAQDN GARNGTEGAQDN GARNSTDCAQDS RAHNGTERAQDN GARNSTDCAQDN TTHNHTEKASGS IHYN ITSTVPEA MQYNVT IMVPEA MQYNVT IMVPEA	VCGATATILIN VCGATATILIN VCGATATILIN VCGATATILIN VCGATATILI RGATATILI VGGATATILI VGGATATILI VGGATATILI VGATAMFVLI VTVSAMFILI AFATWSILIR	ILCIDIAIRQHF ILCIDIAIRHHF ILCIDIAIRHHF ILCIDIAIRHHF ILCIDIAIRHHF ILCIDIAIRHHF ILCIDIAIRHHF ILSINAMQK-F TGLFDIVWNY MGINLIWNO FFIJULWNO	RPEKSFVPGPC RPEKSFVPGPC RPEKSFMPGPC RTNKDFVPGPC RTNKDFVPGPC RPHKSFVPGPC RPHKSAMPGPS -EGTSSTPGPG -ESSSSTPGPG -EETCITGFA	FFLGLGPLLSY FFLGLGPLLSY FFLGLGPLLSY FFLGLGPLLSY FFLGLGPLLSY YCLGLGPVLSY YCLGLGPVLSY YCLGLGPLISH YCLGLGPLISH	CRFIWSGIGTAS CRFIWSGIGTAS CRFIWSGIGTAS CRFIWSGIGTAS CRFIWSGIGTAS CRFIWSGIGTAS CRFIWGIGSAC CRFIWGIGSAC CRFIWGIGSAC	NYYR SKYGDIV NYYR SKYGDIV NYYR SKYGDIV NYYR SKYGDIV NYYR SKYGDIV NYYR KYGDIV NYYR NKYGDIV NYYR RVYGEF NYYR KYGEF	: 105 : 105 : 105 : 105 : 105 : 105 : 105 : 105 : 105 : 85 : 85 : 85
	* 120	*	140	* 1	<u> </u>	* 100	· *	200	*	- 0.
Ctenopharyngodon idellus Culter alburnus Megalobrama amblycephala Carassius gibelio Danio rerio Cyprinus carpio Chanos chanos Homo sapiens Mus musculus Xenopus tropicalis	RVWINGEETLILSR RVWINGEETLILSR RVWINGEETLILSR RVWINGEETLILSR RVWINGEETLILSR RVWINGEETLILSR RVWINGEETLILSR RVWINGEETLISK RVWINGEETLISK RVWINGEETLISK	SAV HVLRSLUT SAV H	140 SRFGSKIGLOCI SRFGSKIGLOCI SRFGSKIGLOCI SRFGSKIGLOCI SRFGSKIGLOCI GRFGSKGGLOCI SRFGSKIGLOCI SRFGSKIGLOCI	GMHECGIIFN GMHECGIIFN GMHECGIIFN GMHECGIIFN GMHECGIIFN GMHECGIIFN GMGERGIIFN GMHENGIIFN GMHENGIIFN	NVVLWKKIRTE NVVLWKKIRTE NLELWKVRTE NVLWKKVRTE NVLWKKVRTE NVLWKKVRTE NIL/WKVRTE NELWKTRE NELWKTRE NELWKTIRE NELWKTIRE	MAKALTGPGLQ MAKALTGPGLQ MAKALTGPGLQ MAKALTGPGLQ MAKALTGPGLQ MAKALTGPGLQ MKALTGPGLQ MKALSGPGLQ MKALSGPGLQ MKALSGPGLQ	RTLEIGTTSTT RTLEIGTTSTT RTLEVGTTSTN RTLEVGTTSTN RTLEVGTTSTN RTLEVGITSTN RTLEIGASSTN HM TVGAESLK HM TVGAESLK QTEIGIRSKKI	I HEDISHETDA I HEDISHETDA I HEDISHETDA I HEDISHETDA SHEDISQETDA I HEDISHETDA O HERIQEETDA I HERIGEVTDT RYLENIGN <u>VTN</u> E	RGCVDIINLLR RGCVDIINLLR RGCVDIINLLR RGCVDIINLLR CGCUDIINLLR CGCVDIINLLR SGYVDVINLLR SGYVDVITLLR SGYVDVITLLR SGYVDVITLMR IGNVDVIKIMR	: 212 : 212 : 212 : 212 : 212 : 212 : 212 : 212 : 212 : 192 : 192 : 190
	220	* 240	*	260	*	280	* 30	* 00	320	
Ctenopharyngodon idellus : Culter alburnus : Megalobrama amblycephala: : Carassius gibelio : Danio rerio : Cyprinus carpio : Chanos chanos : Homo sapiens : Mus musculus : Xenopus tropicalis :	CIVVDDSNREFLEV CIVVDDSNREFLEV CIVVDDSNREFLEV CIVVDDSNREFLEV CIVVDDSNREFLEV CIVVDSNREFLEV CIVVDSNREFLEV RUNDDSNEFLEV RUNDSNEFLEV RUNDSNMEFLERI LIMLDSNNEFLERI	PLNECTLICKIQKY PLNECTLICKIQKY PLNECTLICKIQKY PLNECTLICKIHKY PLNETLICKIHKY PLNEDNICKIHKY PLNEQDMICKIHKY PLNEQDMICKIHKY PLDESAIVKKIQGY PLDESAIVKIQGY	FDTWQTVLIKPDV FDTWQTVLIKPDV FDTWQTVLIKPDV FDTWQTVLIKPDV FDTWQTVLIKPDV FDTWQTVLIKPDV FDTWQTVLIKPDT FDTWQTVLIKPD FNAWQALLIKPDI FNAWQALLIKPDI	YYFRLDWLHKK YYFRLDWLHKK YYFRLDWLHKK YYFRLDWLHRK YYFRLDWLHKK YYFRLDWLHKK YYFRLTWLCQR LFFKISWLYKK LFFKISWLYRK LFFKISWLYRK	HK: EAQELQ AI HK: EAQELQ AI HK: EAQELQ AI HK: DAQELQ AI HK: DAQELQ AI HK: DAQELQ AI HK: AQELQ AI HTSAAKBLQ YE: SVKDLK AI YE: SVKDLK EI YE: SANDLKE I	TALIECKKVC TALIECKKVC TALIECKVC TALIECKVC TALIECKVC QGLIVKCAM EVLIAEKRVC AVLVEKRR AVLVEKRRK	LTHAEKLOQ-LI LTHAEKLOQ-LI UHAEKLOQ-LI UHAEKLOQ-LI LAHAEKLOQ-LI LAHAEKLOQ-LI ISTERKIEECMI VSTAEKLEECMI LSSSEKLOEM	NETABLIE AQNH NETABLIE AQNH NETABLIE AQSH DETABLIE AQSH NETABLIE AQSH NETABLIE AQSH DEATBLIE AQSR DEATBLIE ABRR DEATBLIE ABRR DEASELIE AQNH	GELSAENVRQC GELSAENVRQC GELSAENVRQC GELSAENVRQC GELSAENVRQC GELSAENVRQC GELTAENVRQC GELTRENVNQC GELTRENVNQC GELTRENVNQC	: 318 : 318 : 318 : 318 : 318 : 318 : 318 : 318 : 299 : 299 : 297
	*	340	* 360	*	380	*	400	*	420	
Ctenopharyngodon idellus : Culter alburnus : Megalobrama amblycephala: : Carassius gibelio : Danio rerio : Cyprinus carpio : Chanos chanos : Homo sapiens : Mus musculus : Xenopus tropicalis :	VLEMLIAAPDTLSIS VLEMLIAAPDTLSIS VLEMVIAAPDTLSIS VLEMVIAAPDTLSIS VLEMVIAAPDTLSIS VLEMIIAAPDTLSVS ILEMLIAAPDTMSVS ILEMLIAAPDTMSVS	SLFFMLLLIKONPD SLFFMLLLIKONPD SLFFMLLLIKONPD SLFFMLLLIKONPD SLFFMLLLIKONPD SLFFMLLLIGONPD SLFFMLLIGONPD SLFFMLLINAFYPE SLFFMLVLJAGHEK	VELKILCEMETVI VELKILCEMETVI VELKILCEMETVI VELKILCEMETVI VELKILCEMETVI VELKILEMETVI VECRILEMETVI VECRILEMETVI VECRILEMETVI VECRIMEIDNV	AGGSICHSH AGGSICHSH AGRSICHSH AGRSICHSH AGRSICHSH VGRSICHSH VGRSICHSH ADRICNAD IGERDIKIDD GDRDIKIED IGDRUYESND	SRINILESFINE SRINILESFINE SRIHILESFINE SRIHILESFINE SRIFILESFINE ONICVLEKFINE ONICVLEKFINE ONICVLENFINE PNIKVLENFINE	ESLREH ESSREH ESSREH ESSREH ESSREH ESSREH ESSREH ESSREH ESSREH ESSREY EVVDE ESSREY EVVDE ESSREY EVVDE ESSREY EVVDE	TMRRALFDDVI TMRRALFDDVI TMRRALFDDVI TMRRALFDDVI TMRRALFDDVI TMRRALFDDVI TMRKALFDDVI VMRRALFDDVI VMRRALFDDVI VMRRALFDDVI	EGYRVKKGTNII EGYRVKKGTNII EGYRVKGTNII EGYRVKKGTNII EGYRVKKGTNII EGYRVSKGTNII EGYRVKKGTNII EGYRVKKGTNII EGYRVKKGTNII	LNVGRMHRSDF LNVGRMHRSDF LNVGRMHRSDF LNVGRMHRSDF LNVGRMHRSDF LNVGRMHRSDF LNVGRMHRLF LNIGRMHRLF LNIGRMHRLF LNIGRMHRLFY	: 425 : 426 : 406 : 406
	* 440	铁血红素结合[X Heme-bind	ing region * 48	0 *	500	*	520		
Ctenopharyngodon idellus : Culter alburnus : Megalobrama amblycephalaz : Carassius gibelio : Danio rerio : Cyprinus carpio : Chanos chanos : Homo sapiens : Mus musculus : Xenopus tropicalis :	F K PNQFSL NFQ F K PNQFSL NFQ F K PNQFSL NFQ F K PNQFSL NFKI F K PNQFSL NFQ F K PNQFSL NFQ F K PNQFSL NFET F K PNETLENFA F K PNEFTLENFA F K PNEFTLENFE T	VPSRFFQFFGSGP VPSRFFQFFGSGP VPSRFFQFFGSGP VPSRFFQFFGSGP VPSRFFQFFGSGP VPSRFFQFFGSGP VPSRFFQFFGFGP VPSRFFQFFGFGP VPSRYFQFFGFGGP	SOVER TAMVM SOVER TAMVM SOVER VAMVM SOVER TAMVM SOVER TAMVM SOVER TAMVM SOVER TAMVM SOVER TAMVM ACAGE TAMVM ACAGE TAMVM	KSILVTLLSR KSILVTLLSR KSILVTLLSR KSILVTLLSR KSILVALLSR KSILVTLLSR KTILVTLLGR KKILVTLLRR KKVLVTLLRR KKVLVTLLRR	FSVCFLKGCTVE FSVCFLKGCTVE FSVCFLKGCTVE FSVCFVKGCTVE FSVCFVKGCTVE FSVCFVKGCTVE FSVCFVKGCTVE FSVSPHFCCTVE FNVKTLQGQCVE FUVKTLQKRCTE YKVQTLGGRCTE	EST PQTNNLSQ 25T PQTNNLSQ 25T PQTNNLSQ 25T PQTNNLSQ 25T PQTNNLSQ 25T PQTNNLSQ 25T PQTNNLSQ 25T PQTNNLSQ 25T QKIHDLSL 25T QKIHDLSL 25T QKIHDLSL 25T QKINNDLSM	VEBPSSISV 22 VEBPSSISV 22 VEBPSSISV 22 VEBPSSISV 22 VEBPSSISV 22 VEBPSSISV 22 VEBPSSISV 24 VEBPSSISV 25 VEBPSSISV 25 VEBPSSISV 26 VEBPSSISV 26 VEBPSSISV 26 VEBPSSISV 27 VEBPSSISV 26 VEBPSSISV 27 VEPSSISV 27 VEP	21 TIRNTI 21 TIRNTI	: 51 : 51 : 51 : 51 : 51 AQHTGSS : 52 Q : 50 Q : 50	17 17 17 17 17 28 03 03 00

图 3 不同脊椎动物 cyp19a 编码氨基酸同源性分析

包含草鱼 PQ 476203, 翘嘴鲌 KAK9958479.1, 团头鲂 XP_048025102.1, 银鲫 XP_052438418.1, 斑马鱼 AAG12243.1, 鲤 ACB13197.1, 遮目鱼 XP_030648858.1, 人 NP_000094.2, 小鼠 NP_001335100.1, 热带爪蟾 BAE93232.1. 深色阴影区域表示具有相同氨基酸位点的物种的例子, 浅色阴影区域表示所列物种中有一半以上具有相同的氨基酸位点. 红色文本框表示亚铁血红素结合区域.

Fig. 3 Homology of cyp19a encoding amino acid sequence in different vertebrates

Including Ctenopharyngodon idellus PQ 476203, Culter alburnus KAK9958479.1, Megalobrama amblycephala XP_048025102.1, Carassius gibelio XP_052438418.1, Danio rerio AAG12243.1, Cyprinus carpio ACB13197.1, Chanos chanos XP_030648858.1, Homo sapiens NP_000094.2, Mus musculus NP_001335100.1, and Xenopus tropicalis BAE93232.1. Dark shaded areas indicate examples of species with the same amino acid sites; light shaded areas indicate that more than half of the listed species have the same amino acid sites. The red textbox indicates heme-binding region.

2.2 氨基酸序列同源比对及系统进化树构建

使用 Mega7.0 软件将草鱼 *cyp19a* 基因的氨基 酸序列分别与其他物种进行比对并通过邻位相接 法(NJ法)构建进化树。与其他物种 CYP19a 氨基 酸序列同源性比对显示(图 4), 草鱼 CYP19a 氨基 酸序列与硬骨鱼类具有同源性, 其中, 与翘嘴鲌 (*Culter alburnus*, KAK9958479.1)的同源性最高, 达 99.81%, 与其他鲤科鱼类同源性在 89.75%~ 96.32%之间。与其他鱼类的同源性相对较低, 如达 里湖高原鳅(*Triplophysa dalaica*, XP_056621982.1) (83.82%)和点鳍红眼脂鲤(*Colossoma macropomum*, XP_036420492.1)(83.82%)。与两栖类的同源性较 低,如非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, BAA90529.1) (57.23%)。与哺乳动物如人类(*Homo sapiens*, NP_000094.2)和小鼠(*Mus musculus*, NP_001335100.1) 的同源性分别为 55.63%和 56.07%。与鸟类动物 如红原鸡(*Gallus Gallus*, NP_001001761.3)的同源 性为 57.77%。与爬行动物的同源性最远, 如绿瘦 蛇(*Ahaetulla prasina*, XP_058011942.1)(53.67%)。 系统进化树可分为五个大支, 分别是鱼类、两栖 类、哺乳类、鸟类和爬行类,其中,硬骨鱼类 cyp19a 氨基酸序列聚为一支,草鱼 cyp19a 基因与 鲤科鱼类亲缘关系较近,与两栖类、哺乳类、鸟 类和爬行类同源性逐渐降低。系统发育树结果显 示,草鱼 cyp19a 的系统进化关系与传统物种进化 地位基本一致。



图 4 基于 GenBank 数据库 cyp19a 编码氨基酸序列构建草鱼与其他物种的邻位相接法(NJ法)系统发育树 谱系节点中的数字表示引导值(%). 底部的条形图表示序列中有 5%的氨基酸差异.

Fig. 4 Neighbor-joining algorithm phylogenetic tree of *Ctenopharyngodon idellus* and other species constructed based on the *cyp19a* encoded amino acid sequence from the GenBank database

Numbers in the phylogram nodes indicate the bootstrap value (%). The bar at the bottom indicates 5% amino acid divergence in the sequences.

2.3 cyp19a 在草鱼成鱼组织中的表达分布

通过 qRT-PCR 检测 48 月龄草鱼雌鱼和雄鱼 组织中 *cyp19a* 基因的表达情况,结果如图 5 所 示。*cyp19a* 在卵巢组织中表达水平最高且极显著 高于精巢(*P*<0.01);在脑、心脏、肌肉组织中均 有表达,其中雌鱼的脑和肌肉组织中的表达水 平显著高于雄鱼(*P*<0.05);在眼、肝脏、中肠等 组织微量表达。

2.4 cyp19a 在不同发育时期性腺中的表达

如图 6 所示, 在发育不同时期性腺, *cyp19a* 在 卵巢中的表达水平均显著高于精巢(*P*<0.05), 随 着性腺发育, 卵巢中 *cyp19a* 的表达水平呈上升趋 势, 48 月龄时表达水平达到最高且极显著高于精 巢(*P*<0.01)。精巢中 *cyp19a* 基因的表达一直处于 较低水平, 在 36 龄时表达量最高且极显著低于卵 巢(*P*<0.01)。







2.5 *cyp19a*-dsRNA 注射浓度的筛选和干扰后性别相关基因的表达

利用 Wang 等^[24]开发的草鱼雌雄特异性分子 标记鉴定草鱼性别后,以正常雌性草鱼卵巢组织 为对照组,分析不同浓度 *cyp19a*-dsRNA 注射组 雌鱼卵巢组织 *cyp19a* 的表达量变化,结果显示 (图 7),注射不同浓度 *cyp19a*-dsRNA 后 *cyp19a* 基 因的表达量均显著下降(*P*<0.05)。分别注射 1 μg/g、 5 μg/g 和 10 μg/g 浓度 *cyp19a*-dsRNA 后, *cyp19a* 的表达量无显著差异(*P*>0.05),两个浓度组的基 因沉默效率相似,且 5 μg/g 浓度下的基因沉默效 率最高, 以 5 μg/g 的 *cyp19a*-dsRNA 为最佳注射浓 度进行注射实验。



以正常雌雄草鱼性腺组织为对照组,注射组 卵巢组织在注射 cvp19a-dsRNA 后 5 天 qRT-PCR 结果显示(图 8), 与雌鱼相比, 干扰后 cyp19a 的 表达量均显著性降低(P<0.05), cyp19a基因的表达 水平在干扰后 5 天内呈先下降后上升的趋势, 注 射后 1 d 表达量最低, 沉默效率达 59.72%, 且显 著高于雄鱼(P<0.05)。cyp19a-dsRNA 干扰后, 注 射组 foxl2a 基因表达水平呈先上升后下降再缓慢 上升的趋势, 在 2 d 时表达量最高且显著高于雌 鱼和雄鱼(P<0.05),3 d时表达量最低显著低于雌 鱼且高于雄鱼(P<0.05), 后上升至与雌鱼无显著 差异(P>0.05)。注射组 foxl2b 基因表达水平呈先上 升后下降的趋势,在2d时表达量大幅上升,显著 高于雄鱼和雌鱼(P<0.05)、后表达水平下降至与 雌鱼无显著差异(P>0.05)。注射组 dmrt1 基因表达 水平在干扰后呈先下降后上升的趋势,3d时表达 量最低, 与雌鱼相比无显著差异(P>0.05), 且均 显著低于雄鱼(P<0.05)。注射组 amh 基因表达水 平呈先下降后升高的趋势,2d时表达量最低目显 著低于雌鱼和雄鱼(P<0.05),后上升与雌鱼无显 著差异(P>0.05)。



(4) 8 年 単任剤 *CyP19a*-dSRNA 后住脉组织性剂相关蒸闪的表达情况
 C-F: 对照组雌鱼; dsRNA-F: 注射组雌鱼; C-M: 对照组雄鱼. 不同字母表示差异显著(P<0.05).
 Fig. 8 Expression of sex-related genes in gonadal tissue after *cyp19a*-dsRNA injection in *Ctenopharyngodon idellus* C-F: control female, dsRNA-F: dsRNA female, C-M: control male. Different letters indicate significant differences (P<0.05).

2.6 cyp19a-dsRNA 干扰后血清激素含量

注射 *cyp19a*-dsRNA 后 5 天干扰的血清激素 结果显示(图 9),对照组雌鱼睾酮(T)含量均显著 低于雄鱼(P<0.05),与雌鱼相比,注射组血清中 T 含量呈先上升后下降的趋势,注射后 3 d 时含量最 高,显著高于雌鱼(P<0.05),且与雄鱼无显著差异 (P>0.05), 后下降至与雌鱼无显著差异(P>0.05)。对 照组雌鱼雌二醇(E₂)含量均显著高于雄鱼(P<0.05), 与雌鱼相比, 注射组血清中 E₂ 含量呈先下降后上 升的趋势, 在注射后前 3 天血清中 E₂ 含量与雄鱼 无显著差异(P>0.05), 且显著低于雌鱼(P<0.05), 在注射后 4 d 上升至与雌鱼无显著差异(P>0.05)。



图 9 草鱼注射 cyp19a-dsRNA 后睾酮(a)和雌二醇(b)的浓度

C-F: 对照组雌鱼; dsRNA-F: 注射组雌鱼; C-M:对照组雄鱼. *表示与对照组雌鱼有显著差异(P<0.05). Fig. 9 Concentrations of testosterone (a) and estradiol (b) after *cyp19a*-dsRNA injection in *Ctenopharyngodon idellus* C-F: control female, dsRNA-F: dsRNA female, C-M: control male. The * indicate significant differences (P<0.05) with control female group.

3 讨论

3.1 草鱼 cyp19a 基因序列特征分析

通过 RACE 技术克隆获得草鱼 cvp19a 基因 cDNA 全长,氨基酸序列比对发现草鱼 cyp19a 基 因属于性腺型芳香化酶基因, 与鲤科鱼类翘嘴 鲌、团头鲂等同类型且同源性较高,与传统依据 形态学分类结果一致。氨基酸组成分析显示、草 鱼 CYP19a 氨基酸序列中亮氨酸等碱性氨基酸的 占比较高,这类氨基酸产生的静电相互作用可增 强底物与蛋白功能域结合的稳定性, 保证芳香化 化反应顺利进行^[26]。α-螺旋作为最常见的二级结 构在蛋白质互作中发挥着关键作用^[27],草鱼 CYP19a 蛋白的 α-螺旋占比为 47.58%, 是构成功 能域的重要组成部分, 在催化雄激素转化为雌激 素的过程中起重要作用。通过信号肽预测和亚细 胞定位发现草鱼 CYP19a 蛋白有可能存在于内质 网上且不存在信号肽序列, 与芳香化反应大多发 生在内质网上的特性相吻合。此外、草鱼 CYP19a 蛋白保守结构包含血红素结合位点, 与斑马鱼^[28]、 翘嘴鳜 (Siniperca chuasti)^[29]、兰州鲇 (Silurus lanzhouensis)^[30]保守结构类似, 表明草鱼 CYP19a 蛋白与其他鱼类 P450 芳香化酶一样都具有血红 素分子活性中心,有利于芳香化反应的进行。

3.2 *cyp19a* 基因在草鱼不同组织和性腺发育时期的表达变化

硬鱼类中, cyp19a 基因的表达模式具有明显的性别二态性, 在雌性中高表达, 雄性中少量表达。本研究表明, cyp19a 基因在草鱼成鱼性腺、脑和肌肉组织中呈现明晰的性别二态性, 在卵巢中极显著高于精巢, 这与尼罗罗非鱼^[31]、暗纹东方鲀(Takifugu obscurus)^[32]和花鲈(Lateolabrax maculatus)^[33]等鱼类研究结果一致, cyp19a 基因的高表达可以促进雄激素转化成雌激素, 而雌激素在鱼类卵巢发育和维持中起重要作用。同时, 本实验中, cyp19a 在草鱼脑和肌肉组织中均呈现显著的性别二态性, 这与印度囊鳃鲇(Heteropneustes fossilis)^[34]、乌鳢(Channa argus)^[35]等在雌鱼脑中表达量高于雄鱼的结果一致。推测 cyp19a 基因可能不仅对草鱼卵巢的分化起到调控作用, 也可能

参与脑-垂体-性腺轴的调控。此外,本实验中草鱼 肌肉中 *cyp19a* 的表达量较高,仅次于性腺组织, 推测与肌肉的发育有关,但具体作用需进一步 研究。

cyp19a 基因的表达在硬骨鱼类繁殖期和非繁 殖期也表现出不同的雌雄差异,本研究中通过 *cyp19a* 基因在草鱼性腺不同发育阶段的表达结果 观察到 48 月龄草鱼卵巢中 *cyp19a* mRNA 的表达 水平最高,其次是 36 月龄,12 月龄表达量最低, 表明 *cyp19a* 基因在卵巢的发育和成熟过程中发 挥着重要作用。在鱼类早期卵黄发生的过程中, 卵巢 *cyp19a* 基因的表达量会显著上升,如斑马鱼^[36]。 齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)精巢成熟阶段 *cyp19a* 转录水平在精母细胞中显著表达,表明可 能与该时期精巢的发育以及精子的发生有关^[37]。 36 月龄草鱼精巢中 *cyp19a* mRNA 水平显著高于 其他时期,推测在草鱼精巢发育过程中 *cyp19a* 基 因的表达可能是对精巢的成熟发挥促进作用。

3.3 *cyp19a*-dsRNA 干扰下各性别基因在卵巢中的变化

芳香化酶作为雌激素合成的终末端酶, cvp19a 基因的激活还受多方基因的调控,为了探 索 cyp19a 基因在草鱼性腺发育过程中的分子调 控机制、挑选性别特异性基因 foxl2a、foxl2b、 dmrtl 和 amh 基因进行辅助验证。本研究通过 dsRNA 连续 5 天干扰草鱼 cvp19a 基因,达到一定 的敲降效果, 注射组 cyp19a 基因的表达显著下 调。foxl2 基因是雌性决定通路中的一个关键基因, 通过转录激活可介导类固醇生成基因,进而参与 卵巢发育^[38]。目前, foxl2 基因在鱼类中存在不同 的拷贝形式,即 foxl2a 和 foxl2b^[39]。金钱鱼 (Scatophagus argus)中, cyp19a 基因的激活依赖上 游基因 foxl2, foxl2 基因的高表达可使 cyp19a 基 因表达上调,促使雌激素的合成^[40]。本研究发现, 短时间内草鱼 cyp19a 基因的转录水平和 E2 的含 量显著下降后, foxl2a 和 foxl2b 基因的表达均显 著上调,形成负反馈调控。foxl2 基因的表达产物 可与 cyp19a 基因启动子结合从而转录合成芳香 化酶 mRNA, 本研究表明 foxl2a 和 foxl2b 基因的 表达上调,可能是为了激活上调草鱼 cvp19a 基因

的转录水平,以维持鱼体 E2 正常水平,从而确保 卵巢的正常分化和发育。dmrtl 基因是目前发现 的较保守的性别决定基因,参与雄性性腺的分化 和发育,其产生具有锌指结构的转录调控因子可 以与特异的 DNA 序列结合, 通过控制下游基因 的表达来调控性腺发育方向^[41]。有研究发现, 罗 非鱼中 dmrtl 基因可结合 cvp19a 基因启动子中 ACATATGT 回文序列, 下调 cyp19a 基因的表达^[42]。 本研究中, 短期的干扰沉默下, 卵巢中 dmrt1 基 因的表达无显著变化,有一定的降低,表明短时 间内为了调节鱼体 cvp19a 基因的表达恢复正常 水平, dmrtl 基因的转录得到一定的抑制, 但其中 的具体调控机制还需进一步的探索。amh 基因在 哺乳动物中可以调节生殖细胞的发育和分化,长 期以来参与雄性性腺分化,硬骨鱼类不存在缪勒 氏管, 但广泛存在 amh 和 amhr2 的同源基因, 且 与鱼类的牛殖能力和牛殖细胞增殖有关^[43]。 cyp19a 缺失的斑马鱼中, amh 基因与多个性别决 定基因的表达水平显著下调, 性腺分化和发育延 迟^[44]。本研究发现, cyp19a 基因短时间内沉默, 卵 巢中 amh 基因的表达水平显著降低, amh 基因的 表达水平和 T 的含量呈负反馈调节, 表明 cvp19a 基因转录水平与E2水平的下调所引发T水平的上 调,可能是抑制 amh 基因转录发生的原因。本研 究探讨了草鱼 cvp19a 基因在早期性腺发育中与 各性别决定基因及性类固醇之间的调控作用,但 其中更深层次的作用机制还有待进一步研究。

3.4 cyp19a-dsRNA 干扰下血清激素的变化

鱼类芳香化酶参与脑-垂体-性腺轴相关繁殖 活动,既能决定鱼类性别分化,又能影响性腺发 育。芳香化酶由 *cyp19* 基因编码,催化雄激素转 化为雌激素,而硬骨鱼类存在两种编码形式的芳 香化酶异构体,分别由 *cyp19a*和 *cyp19b* 基因编码, 目前还未从草鱼性腺中发现并克隆得到 *cyp19b* 基因。*cyp19a* 单突变和 *cyp19a*/cyp19b 双突变的 雌性斑马鱼在整个发育阶段均为雄性表型,且 E₂ 水平显著降低^[45]。本研究通过注射 dsRNA 5 天干 扰草鱼 *cyp19a* 基因,注射组 *cyp19a* 基因的表达显 著下调,与之对应的注射组 E₂ 水平显著下降,同 时注射组 T 水平显著上升,证实草鱼 *cyp19a* 基因 转录水平与 E₂ 水平呈正向调控,表明在 *cyp19a* 基因转录水平下调的情况下,T转化为 E₂的芳香 化反应可能被削弱,使得 T 含量的上升,E₂含量 降低。在注射 dsRNA 后 4~5 d *cyp19a* 基因的表 达还处于干扰状态,表达被沉默,而 E₂和 T 水平 均逐步恢复与对照组雌鱼无显著差异,表明单个 基因的干扰下,草鱼 E₂和 T 的合成短期内有较为 明显的变化,后恢复正常水平,可能引发了其他 的激素合成通路对其进行调控。

4 结论

本研究克隆得到草鱼 *cyp19a* 基因 cDNA 全 长序列及其在性腺发育过程中的表达模式,并利 用 dsRNA 技术对 *cyp19a* 基因进行沉默干扰,引 发 *fox12a、fox12b、dmrt1* 和 *amh* 基因表达水平及 性类固醇激素含量的动态变化,为深入研究 *cyp19a* 基因对草鱼性别分化、性腺发育和卵巢维 持过程中的作用奠定基础,为开发草鱼单性育种 技术提供支撑。

参考文献:

- [1] Administrative Department for Fisheries the Ministry for Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2024[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024: 24-25. [农业农村部渔业渔政管理 局,全国水产技术推广总站,中国水产学会. 2024 中国渔 业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2024: 24-25.]
- [2] Jiang P, Han L Q, Bai J J, et al. Estimation of genetic parameters and breeding values for growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(1): 18-25. [姜鹏, 韩林强, 白俊 杰,等. 草鱼生长性状的遗传参数和育种值估计[J]. 中国 水产科学, 2018, 25(1): 18-25.]
- [3] Fan J J, Bai J J, Han L Q, et al. Differences in body weight growth between female and male grass carp cultured in a pond[J]. Fisheries Science, 2019, 38(2): 231-235. [樊佳佳, 白俊杰, 韩林强, 等. 池塘养殖草鱼两性体质量生长差异 研究[J]. 水产科学, 2019, 38(2): 231-235.]
- [4] Li Y J, Wu L M, Li X J. A review on the genes related with sex determination and differentiation in teleosts[J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2017, 45(4): 72-78. [李永婧, 吴利敏, 李学军. 硬骨鱼类性别决 定与分化相关基因研究进展[J]. 河南师范大学学报(自然)

科学版), 2017, 45(4): 72-78.]

- [5] Lin Q H, Mei J, Li Z, et al. Distinct and cooperative roles of *amh* and *dmrt1* in self-renewal and differentiation of male germ cells in zebrafish[J]. Genetics, 2017, 207(3): 1007-1022.
- [6] Okada H, Hagihara S, Yamashita K, et al. Expression pattern of *foxl2* and *dmrt1* in gonad of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* in relation to sex differentiation[J]. Aquaculture, 2017, 479: 712-720.
- [7] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis[J]. Endocrine Reviews, 1994, 15(3): 342-355.
- [8] Ghosh D, Egbuta C, Kanyo J E, et al. Phosphorylation of human placental aromatase CYP19A1[J]. Biochemical Journal, 2019, 476(21): 3313-3331.
- [9] Song Z, Qiang J, Zhu H J, et al. Research progress of sex regulating gene *cyp19a* in fish[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2022(3): 25-29. [宋卓, 强 俊, 朱昊俊, 等. 鱼类性别调控基因 *cyp19a* 的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(3): 25-29.]
- [10] Zhang D Y, Song H M, Li S J, et al. Effects of 17β-estradiol and trilostane on the growth and gonadal development of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2024, 31(3): 266-277. [张东云, 宋红梅, 李胜杰, 等. 17β-雌二醇和曲洛斯坦对大口黑鲈 生长及性腺发育的影响[J]. 中国水产科学, 2024, 31(3): 266-277.]
- [11] Zhang X B, Min Q W, Li M R, et al. Mutation of *cyp19a1b* results in sterile males due to efferent duct obstruction in Nile tilapia[J]. Molecular Reproduction and Development, 2019, 86(9): 1224-1235.
- [12] Shu C, Wang L J, Zou C C, et al. Polyclonal antibody preparation and application of aromatase Cyp19a in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Marine Sciences, 2022, 46(11): 83-93. [舒畅, 王丽娟, 邹聪聪, 等. 牙鲆芳香化酶 Cyp19a 多克隆抗体制备及其应用[J]. 海洋科学, 2022, 46(11): 83-93.]
- [13] Bai J, Gong W D, Wang C L, et al. Dynamic methylation pattern of *cyp19a1a* core promoter during zebrafish ovarian folliculogenesis[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(3): 947-954.
- [14] Wang J, Wen C G, Zhao Y, et al. The prokaryotic expression and the protein purification of Nile tilapia *cyp19a1a* gene[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(4): 45-50. [王金, 文 春根,赵燕,等.尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) *cyp19a1a* 原核表达与蛋白纯化[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 45-50.]
- [15] Chen Y, Zhou P, Zhang Z P, et al. Cloning and expression of

cyp19a/b gene in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2015, 20(2): 81-89. [陈芸,周鹏,张子平,等. 大黄鱼 *cyp19a/b* 基因的克隆与表达分析[J]. 集美大学学报(自然 科学版), 2015, 20(2): 81-89.]

- [16] Qi B, Li S J, Du J X, et al. Gonadal histology and expression analysis of sex characteristic genes in grass carp at different ages[J]. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(1): 105-114.
 [祁博,李胜杰, 杜金星,等. 草鱼不同月龄性腺组织学观 察及性别特征基因 *cyp19a1a* 和 *amh* 的表达分析[J]. 渔业 科学进展, 2025, 46(1): 105-114.]
- [17] Reshi M L, Wu J L, Wang H V, et al. RNA interference technology used for the study of aquatic virus infections[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 14-23.
- [18] Shen D L, Li Y F. Pathways and mechanisms of RNA interference mediated by viral siRNA[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(4): 1237-1248. [申东亮,李用芳. 病毒 siRNA 介导的 RNA 干扰途径与机制[J]. 生物工程学 报, 2021, 37(4): 1237-1248.]
- [19] Liu B Z. Clone, expression and functional analysis of SoxE gene in sea cucumber and sea urchin[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023. [刘炳正. 刺参和海胆 SoxE 基因克 隆、表达及功能初探[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023.]
- [20] Sun D F, Yu H, Li Q. Examination of the roles of *Foxl2* and *Dmrt1* in sex differentiation and gonadal development of oysters by using RNA interference[J]. Aquaculture, 2022, 548: 737732.
- [21] Zhu Y K. Molecular cloning, expression patterns and function exploration of *FOXL2* in *Macrobrachium rosenbergii*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022. [祝远奎. 罗氏沼虾 *FOXL2* 基因的克隆、表达及功能 初探[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.]
- [22] Song F B, Wang L M, Yu Z Z, et al. Knockdown of *igf3* gene by RNA interference causes gonadal development inhibition of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Aquaculture Research, 2021, 52(7): 3006-3014.
- [23] Liu J, Liu S L, Shou X Z, et al. Studies on the gonadal development of grass carp[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 1962(4): 63-85, 87-96. [刘筠, 刘 素孋, 寿孝鐘, 等. 草魚性腺發育的研究[J]. 湖南师范大 学自然科学学报, 1962(4): 63-85, 87-96.]
- [24] Wang Y P, Lu Y, Zhang Y, et al. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation[J]. Nature Genetics, 2015, 47(6): 625-631.
- [25] Yao W L, Jiang P, Bai J J, et al. Analysis of differential expressed genes between male and female gonads of grass

carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on high throughput transcriptome group sequencing[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(9): 3901-3911. [姚汶励, 姜鹏, 白俊杰, 等. 基于高通量转录组测序的草鱼雌雄性腺差异表达基 因分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(9): 3901-3911.]

- [26] Katchalski-Katzir E, Shariv I, Eisenstein M, et al. Molecular surface recognition: Determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(6): 2195-2199.
- [27] Moon H, Lim H S. Synthesis and screening of smallmolecule α-helix mimetic libraries targeting protein-protein interactions[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2015, 24: 38-47.
- [28] 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.
- [29] Zou L J, Gong J, Ji L, et al. Cloning and expression analysis of *CYP19a* gene in mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Life Science Research, 2017, 21(4): 295-301. [邹立军, 龚婧, 吉 璐, 等. 翘嘴鳜性腺型芳香化酶基因 *CYP19a* 的克隆及表 达研究[J]. 生命科学研究, 2017, 21(4): 295-301.]
- [30] Li M M, Yu Z X, Zhang L P, et al. Cloning and localization of gonadal aromatase gene in *Silurus lanzhouensis*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(5): 654-667. [李 敏敏, 俞兆曦, 张利平, 等. 兰州鲇性腺型芳香化酶 *cyp19a1a* 基因克隆及表达定位分析[J]. 福建农业学报, 2022, 37(5): 654-667.]
- [31] Li M R. Preliminary studies on expression and function of Cyp19a1a and Cyp19a1b in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[D]. Chongqing: Southwest University, 2014. [李梦 茹. 尼罗罗非鱼两种芳香化酶(Cyp19a1a 和 Cyp19a1b)表 达与功能的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.]
- [32] Gao Y Y, Liu X F, Hu P, et al. Molecular cloning, sequence structure and expression analysis of gonadal aromatase gene in puffer *Takifugu obscures*[J]. Fisheries Science, 2020, 39(1): 30-39. [高莹莹, 刘新富, 胡鹏, 等. 暗纹东方鲀芳 香化酶基因的结构及表达分析[J]. 水产科学, 2020, 39(1): 30-39.]
- [33] Li B Y, Wen H S, Wang L Y, et al. Histology of gonadal differentiation and expression analysis of sex-related genes *cyp11b*, *cyp19a1a* in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 185-193. [李冰玉, 温海深, 王灵钰, 等. 花鲈性腺分化组

织学及性别相关基因 cyp11b 和 cyp19a1a 的表达分析[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 185-193.]

- [34] Chaube R, Rawat A, Joy K P. Molecular cloning and characterization of brain and ovarian cytochrome P450 aromatase genes in the catfish *Heteropneustes fossilis*: Sex, tissue and seasonal variation in, and effects of gonadotropin on gene expression[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 221: 120-133.
- [35] Huang S J, Wu Y X, Chen K C, et al. Gene expression and epigenetic modification of aromatase during sex reversal and gonadal development in blotched snakehead (*Channa maculata*)[J]. Fishes, 2023, 8(3): 129.
- [36] Tong S K, Chiang E F, Hsiao P H, et al. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 79(1-5): 299-303.
- [37] Yan T M, Cai Y P, He J Y, et al. Characterization and expression profiles of *cyp19a1a* in the schizothoracine fish *Schizothorax prenanti*[J]. Tissue and Cell, 2019, 58: 70-75.
- [38] Tucker E J. The genetics and biology of FOXL2[J]. Sexual Development, 2022, 16(2-3): 184-193.
- [39] Crespo B, Lan-Chow-Wing O, Rocha A, et al. *foxl2* and *foxl3* are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 194: 81-93.
- [40] Liu H F, Mu X J, Gui L, et al. Characterization and gonadal expression of *FOXL2* relative to *Cyp19a* genes in spotted scat *Scatophagus argus*[J]. Gene, 2015, 561(1): 6-14.
- [41] Dong J J, Li J, Hu J, et al. Comparative genomics studies on the *dmrt* gene family in fish[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 563947.
- [42] Wang D S, Zhou L Y, Kobayashi T, et al. Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia[J]. Endocrinology, 2010, 151(3): 1331-1340.
- [43] Yan Y, Zhu H J, Tao Y F, et al. Research progress on the effect of AMH gene on sex determination in fish[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2022(2): 26-31. [闫悦, 朱昊俊, 陶易凡, 等. AMH 基因对 鱼类性别决定影响的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(2): 26-31.]
- [44] Lau E S, Zhang Z W, Qin M M, et al. Knockout of zebrafish ovarian aromatase gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 leads to all-male offspring due to failed ovarian differentiation[J]. Scientific Reports, 2016, 6: Article No.37357.

[45] Yin Y K, Tang H P, Liu Y, et al. Targeted disruption of aromatase reveals dual functions of *cyp19a1a* during sex differentiation in zebrafish[J]. Endocrinology, 2017, 158(9): 3030-3041.

Expression characteristics of the *cyp19a* gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and expression responses of sex-related genes after RNA interference

XIAO Xiaofang^{1,2}, LI Shengjie², LIU Qingshan¹, DU Jinxing², LEI Caixia², ZHU Tao², TIAN Jing², SONG Hongmei²

1. School of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou, Huzhou 313000, China;

 Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou, Guangzhou 510380, China

Abstract: This study investigated the expression pattern of the cyp19a gene during gonad development in grass carp (Ctenopharyngodon idellus) and the expression responses of various sex-related genes after RNA interference-mediated silencing of the target gene. The full-length cDNA sequence of the cvp19a gene was cloned using RACE technology, and the expression patterns of the cyp19a gene in gonadal tissues at different developmental stages of grass carp as well as in various tissues of adult fish were detected using qRT-PCR technology. Synthetic cyp19a-dsRNA was injected ino female grass carp for RNA interference experiments, while an equal volume of physiological saline was injected into the control group. The expression levels of sex-related genes in gonadal tissues and serum sex steroid hormone concentrations were then detected. The results showed that the full-length cDNA sequence of cyp19a in grass carp is 2219 bp, encoding an open reading frame of 1554 bp, a 5' UTR of 48 bp, a 3' UTR of 617 bp, and 517 amino acids encoded. The expression level of the cyp19a gene was highest in the gonads, followed by muscle, brain, and heart tissues. In gonads at different developmental stages, the expression level of cyp19a in ovaries was significantly higher than that in testes (P < 0.05) and significantly increases during the sexually mature stage at 48 months old, indicating that this gene plays a crucial role in the development and maturation of ovaries in grass carp. Five days after injection of 5 µg/g of cyp19a-dsRNA for silencing interference, the expression level of cyp19a in the dsRNA-injected group was significantly reduced compared to that in the control female fish (P < 0.05). The silencing efficiency of the target gene was 59.72% at 1 day post-injection and gradually increased thereafter. Compared to the control female fish, the dsRNA-injected group showed significant upregulation of foxl2a and foxl2b expression levels (P < 0.05) and downregulation of amh expression levels (P < 0.05) at 1 to 3 days post-injection, while *dmrt1* expression levels were not significantly changed (P>0.05). By 4 to 5 days post-interference, the expression levels of foxl2a, foxl2b, dmrt1, and amh in the dsRNA-injected group gradually returned to levels close to those of the control female group (P > 0.05). Furthermore, the serum estradiol (E_2) levels in the injected group were significantly decreased (P < 0.05) compared to those in the control female fish, while testosterone (T) levels were significantly increased (P < 0.05). In conclusion, the expression level of the grass carp cyp19a gene, which belongs to the gonad aromatase gene, was highest in ovarian tissues, increased significantly during the sexual maturity stage, and may positively regulate fox l2a and fox l2b expression by negative feedback expression of dmrt l and amh. These results suggest that cyp19a plays a pivotal role in the development of ovaries and the nervous system in grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus; cyp19a*; dsRNA; gonadal development **Corresponding author:** SONG Hongmei. E-mail: shm1227@126.com.