

黄鳍P-450芳香化酶基因的克隆及序列分析

俞菊华 吴婷婷 李建林 曹丽萍 夏德全

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,无锡 214081)

摘要:P-450 芳香化酶(P450arom)是催化雄激素生物合成雌激素的关键酶。本文采用 RT-PCR 和 RACE(Rapid amplification of cDNA ends)法,首次分离和克隆了雌雄同体鱼黄鳍卵巢中 P450 arom 基因。该基因 cDNA 全长 1802bp(不包括 poly(A)),5'端非翻译区有 49bp,3'端 202bp(不包含 poly(A)),阅读框(Open reading frame, ORF)1551bp,翻译成 517 个氨基酸,计算的蛋白质分子量 58.2kDa。同源性分析显示,黄鳍卵巢 P450arom 的氨基酸序列与其他鱼卵巢 P450arom 具有 63%—80% 同源性,与其他鱼脑 P450arom 为 58%—60% 同源,与人胚盘和鸡卵巢 P450arom 则为 50%—52% 同源;但在芳香化酶高保守区(包括 I-螺旋区,芳香化酶特异保守区和血红素结合区)的同源性高达 76%—92%。系统发育分析表明芳香化酶基因是单起源,黄鳍卵巢芳香化酶基因与鱗鱼卵巢的关系最近,与鱼类卵巢 P450arom 属于同一分支的,与鱼类脑及鸡和人的属于不同分支。

关键词: 黄鳍;P-450 芳香化酶;cDNA 末端快速扩增法;系统发育关系

中图分类号:Q173 文献标识码:A 文章编号:1000-3207(2005)05-0550-07

黄鳍(*Monopterus albus* Zuiew)属于硬骨鱼纲 Os-teichthyes,黄鳍亚科,是一种具有天然单向性逆转特性的动物。自幼体到第一次性成熟为雌体,产卵后变为雌雄间体并最终变为雄体^[1]。有关黄鳍性别形成、转化的分子机制目前还没见研究报道。现有的研究表明鸟类、爬行类以及更为低等的脊椎动物如鱼类等卵巢的发育中雌激素起着至关重要的作用。而体内雌激素(主要为雌二醇)是由芳香化酶复合体系催化 C₁₉ 雄激素生物合成 C₁₈ 雌激素,其中包括依赖 NADPH 的 P450 还原酶和 P450arom(CYP19 基因产物),P450 芳香化酶是催化这一反应的速度限制酶^[2]。本研究首次分离了黄鳍卵巢中 P450arom 基因,为今后进一步研究黄鳍性别形成、性别逆转阶段 CYP19 基因的表达规律,认识雌雄同体鱼性别形成、转化的分子机制,完善对鱼类性别决定机制的认识奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 黄鳍购自无锡中桥菜市场,取卵巢,前脑组织。

1.2 试剂 抽提 RNA 用 Trizol Reagent (Promega)、反转录酶 M-MLV, *RnaseH*, *TdT* 酶、胶回收试剂盒,均购自 Takara; *Taq* 酶购自 Promega, PUCm-T 载体购自上海生工生物工程技术有限公司

引物用于 PCR 反应的所有引物如下,其碱基位置根据登录 GenBank 序列(GenBank accession number AY583785)确定。P1, P2, P3 是根据已知鱼类 P450arom 的保守序列设计的;P4, P5 是根据 P1, P2 分离的片段设计的用于 3'RACE 的特异引物;P6, P7, P8 是根据 P2, P3 引物分离的片段设计的用于 5'RACE 的引物,所有引物均由 Takara 合成,其中 R = A + G, N = A + C + T + G。

P1 碱基 977-1001 5'-CAGTGTGTGGAGATGCTCATCG-3'
P2 碱基 1403-1429 5'-CTTCATCATCACCATGGCTATGTGCTT-3'
P3 碱基 356-381 5'-CGGGTGTGGATCAACGGNGARGARAC-3'
P4 碱基 1242-1262 5'-ACAGGGTACCGAAGGCCACAA-3'
P5 碱基 1283-1301 5'-CCGCATGCACCGGACAGACT-3'
P6 碱基 693-713 5'-TGACACGGTACACCAAGGAAGA-3'
P7 碱基 604-624 5'-AGGTTGCTAGGTGAGTCTGT-3'
P8 碱基 396-415 5'-ATGATGCACCGCTGATGACC-3'

这些引物在黄鳍卵巢 P450arom 上的相对位置见图 1。

收稿日期:2004-06-30;修订日期:2005-05-20

基金项目:中国水产科学研究院科研基金项目(2003-2-3);国家重点基础研究规划项目“973”(2004CB117401)资助

作者简介:俞菊华(1966—),女,江苏,博士,副研究员;从事鱼类生物技术研究,E-mail 地址:yujh@ffrc.cn

通讯作者:夏德全,xiadq@ffrc.cn

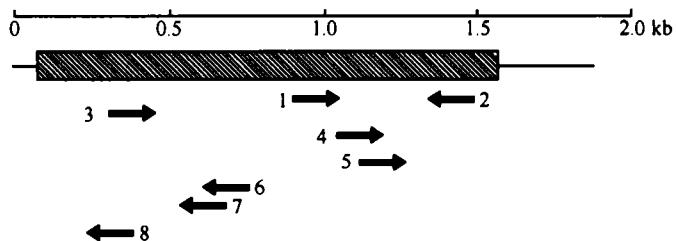


图 1 所用引物在黄鳝卵巢 P450arom 上的相对位置

Fig. 1 Relative positions of different primers in the P450arom ovarian sequence of rice field eel

1.3 总 RNA 的抽提 取新鲜卵巢及前脑,用 Trizol Reagent 抽提总 RNA。用变性琼脂糖凝胶电池溴化乙啶染色显示 28s 和 18s 检测 RNA 的完整性。

1.4 保守片段的分离 取 5μg 从卵巢和脑抽提的总 RNA 以 dT-AP [dT-AP, 5'-CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C(T)₁₆-3'] 为引物,用 M-MLV 根据使用说明进行 RT 反应,然后取 10% RT 液,使用引物 P1 和 P2 扩增 P450arom 450bp 左右的保守序列,PCR 反应体系总体积 25μL,其中含 5μL 10× 反应缓冲液,2μmol/L 氯化镁,200μmol/L dNTP,引物各 0.4μmol/L,2.5U Taq 酶。反应条件 94℃ 3min,然后 30 循环 94℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min,最后 72℃ 10min,4℃ 保存;PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶,使用胶回收试剂盒回收,用 T-载体克隆,送测序。同理,使用 P3 和 P2 分离得到 1100bp 左右的片段,退火温度使用 56℃,72℃ 延伸用 1min 30s。根据这些序列设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物,分离扩增 P450arom 的 3' 和 5' 端序列。

1.5 3'RACE 方法 用 5μg 总 RNA 以 dT-AP(同上)为引物,用 M-MLV 根据使用说明进行 RT 反应,然后用 10% RT 液,以 AP [AP, 5'-CTGATCTAGAG-GTACCGGATCC-3'] 和 P4 为引物进行 PCR,PCR 总体积 25μL,反应体系同上,反应条件:94℃ 3min,然后 28 循环 94℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min,最后 72℃ 10min,4℃ 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 2μL 作模板,用引物 AP 和 P5 进行再扩增,退火温度为 55℃,产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,送测序。

1.6 5'RACE 方法原理 参照文献^[3,4],用 5μg 总 RNA,以 P6 为引物,用 MMLV 根据使用说明进行 RT 反应,然后加 *RnaseH*,分解 mRNA,用 DNA 回收试剂盒(Takara)回收 cDNA,去除多余的 dNTP,引物等;再用 *TdT* 酶在 cDNA 3' 端加 poly(A),用试剂盒回收加了 poly(A) 尾的 cDNA,以此为模板,用 P7 及 dT-AP(同 3'RACE) 为引物,进行 PCR,反应体系组成同 3'

RACE,PCR 液稀释 10 倍,取 2μL 为模板,用 P8 及 AP,进行 PCR,反应体系组成同上,PCR 液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,送测序。

1.7 测序和序列分析 PCR 产物克隆到 pUCM-T 载体后,送上海开瑞生物芯片科技股份有限公司测序。序列分析用软件 DNATools5.1,P450arom 的氨基酸同源性比较使用 ClustalW1.6^[5] 分析,比对结果用 PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony version 4.0, b2)^[6] 计算系统发育关系,用 Neighbor-Joining 法,重复 1000 次,gap 处理为缺失。在距离模式下,用 Bootstrap 计算各个分支的支持度。

2 结果

2.1 黄鳝 P450arom 的分离

分别取黄鳝卵巢和脑组织的 RNA,进行 RT-PCR,用引物 1 和 2 均扩增到 450bp 左右的 DNA,经克隆后测序,得到 453bp 片段,比较两序列,发现完全一致。根据所得序列设计合成引物 4,5,使用卵巢和脑总 RNA 进行 3'RACE,均获 600bp 左右条带,测序结果表明脑和卵巢得到的序列也一致,为 586bp,由于引物 1 和 2 是根据芳香化酶 I-螺旋区和血红素结合区设计的,可以扩增出鱼类脑和卵巢中 P450arom 的保守序列(用该对引物分离到了黄颡鱼脑和卵巢 P-450arom,并得到除了芳香化酶保守序列较一致外,其他有较大差异)。为此,初步认为黄鳝卵巢与脑中 P450arom 是由同一个基因编码的。使用卵巢 RNART 液用引物 2,3 扩增得到 1100bp 左右 DNA 条带,克隆测序为 1073bp。根据这一片段设计 5'RACE 引物 6,7,8,按照 5'RACE 实验程序,结果获得 500bp 左右 DNA 条带:克隆后测序结果为 421bp。把上述序列拼接得到黄鳝卵巢 P450arom 全序列(GenBank accession number AY583785),该 cDNA 总长为 1802bp,其中阅读框 1551bp,翻译 517 个氨基酸,测算的蛋白质分子量为 58.3kDa,3' 非翻译区 202bp(不包括 poly(A)),5' 非翻译区 49bp(图 2)。

2.2 序列分析

2.2.1 同源性比较 使用 ClustalW1.6 分析了黄鳍卵巢 P450arom 氨基酸序列与鲱鱼卵^[7]、虹鳟卵^[8]、金鱼卵^[9]、斑马鱼卵^[10]、鲶鱼卵^[11]、金鱼脑^[9]、斑马鱼脑^[10]、鲶鱼脑^[11]、鸡 卵巢^[12]、人胎盘^[13]等 P450arom 氨基酸序列的同源性,结果表明,黄鳍卵巢 P450arom 的氨基酸序列与鲱鱼卵巢同源性达 80%、与虹鳟卵 76% 同源、与金鱼卵 64% 同源、与斑马鱼卵 63% 同源、与鲶鱼卵 63% 同源、与鲶鱼脑 60% 同源、与金鱼脑 59% 同源、与斑马鱼脑 58% 同源、与鸡 52% 同源、与人 51% 同源。相对氨基酸序列,P450arom 的碱基序列同源性较低为 41%—71%,由于虹鳟、人 P450arom 的 cDNA 序列没有,为此在分析表格中缺,见表 1。但对芳香化酶活性起关键作用的保守区包括 I(I-螺旋区)、II(P450arom 特异保守区)、III(血红素结合区)的同源性高达 73%—92%、70%—87%、71%—100% (表 2)。使用点突变方法研究人 P-450arom 酶催化活性发现位点 I133, E302, P308, D309, T310, R435, C437 对酶活性起着重要作用^[14], 对比分析发现黄鳍 P-450arom 在这些位点的氨基酸与人的一致。进一步的结构分析显示,糖基化位点(N-X-S/T)在 N29,与其他鱼类卵巢 P-450arom 相似^[9,10]。蛋白激酶 C 磷酸化(PKC)相关的位点(S/T-X-R/K)在 59,130,385,410,503,其中 59,410 位为黄鳍和鲱鱼特有,503 位为黄鳍和虹鳟特有,130,385 位是大部分动物 P450arom 都具有的,黄鳍与人一样缺少 219 处 PKC 位点,黄鳍为 FNR,人为 SNT,而大部分动物为 SNR。这些分析结果表明 P450arom 在进化过程中,与酶活性或作用相关的位点较保守,本实验分离得到的黄鳍 P450arom 具有该酶的基本特征。

1	TCATCGCTTGAACCGTTCAATTAGGCAAGTTGCTTCAGTCGCTTCCC	ATG GAT CTG ATC	61
1		M D L I	4
62	CCT GCT TGT GAA CGG GCA GTA GTT CCT GTT GGT TTG GAT GCA GCA GCG GCA GAC CTG GAC		121
5	P A C E R A V V P V G L D A A A D L D		24
122	TCT GTG TCC TCA AAT GCC ACT GCA GTG GGA TCA CGG GGC ATC TCA GTG GCA ACC AGA AGC		181
25	S V S S N A T A V G S A G I S V A T R A		44
182	TTG ATG CTG CTC GTC TGC CTG CTG GTC ACC TGG AAC CAC ACA GAG AAG AAG CAT GTA		241
45	L M L L V C L L L V T W N H T E K K H V		64
242	CCA GGT CCT TCT TTC TGT CTG GGC TTG GGG CCA CTT TTG TCA TAT GTG AGA TTC ATC TGG		301
65	P G P S F C L G L G P L L S Y V R F I W		84
302	ACT GGC ATA GCC ACA GCC AGC AAC TAC TAC AAC AAC AAG TAT GGA GAT ATT GTT AGA GTT		361
85	T G I G T A S N Y Y N N K Y G D I V R V		104
362	TGG ATC AAT GGA GAG GAG ACA CTC ATA CTC AGC AGG TCA TCA CGG GTG CAT CAT GTC CTG		421
105	W I N G E E T L I L S R S S A V H H V L		124
422	AAG AAT GGA CAT TAC ACT TCA CGT TTT GGG AGC AAG CAG GGA CTC AGC TGC GTT GGC ATG		481
125	K N G H Y T S R F G S K Q G L S C V G M		144
482	AAC GAG AGA GGC ATT ATA TTT AAC AAC AAC GTC CCT CTG TCG AAA AAG ATA CGC ATG TTT		541
145	N E R G I I F N N N V A L W K K I R M F		164
542	TTC ATC AAA GCC CTC ACA GGT CCG GGG TTG CAG CAG ACA GTG GAG GTT TGT GTC TCC TCC		601
165	F I K A L T G P G L Q Q T V E V C V S S		184
602	ACA CAG ACT CAC CTA GAC AAC CTG GAC AAT TTG GGT CAT GTC GAT GTC CTC AGT TTG CTG		661
185	T Q T H L D N L D N L G H V D V L S L L		204
662	CCC TGC ACC GTG ATA GAC ATC TTC AAC AGA AGA CTC TTC CTT GGT GTC CCT GTC AAT GAG AAA		721
205	R C T V I I D I F N R L F L G V P V N E K		224
722	GAA CTG CTG CTG AAA ATT CAC AAG TAT TTT GAA ACA TCG CAG TGT GTG CTG CTT AAA CCG		781
225	E L L L K I H K Y F E T W Q C V L L K P		244
782	GAC ATC TAC TTC AAG TTT GGG TGG ATT TAC AAG AGG CAC AAA GCA GCT GCC CGG GGG CTG		841
245	D I Y F K F G W I Y K R H K A A A R G L		264
842	CAA AAT GCT ATC GAG AGC CTT GCA GAA CAG AAG AGG AGA GAT ATG GAG CAG GCT GAT AAA		901
265	Q N A I E S L V E Q K R R D M E Q A D K		284
902	CTG GAC AAC ATC AAC TTC ACT GCA GAA CTT ATA TTT GCA CAG AAC CAC CGC GAG CTG TCT		961
285	L D N I N F T A E L I F A Q N H G E L S		304
962	GCT GAG AAT GTG AGC CAG TGT GTG TTG GAG ATG CTG ATC GCA GCG CCG GAC ACC CTG TCC		1021
305	A E N V T Q C V L E M V I A A P D T L S		324
	I		
1022	ATC AGC CTC TTC TTC ATG CTG GTG CTC CTC AAA CAG AAT CCA GAT GTG GAG CTG CAG TTG		1081
325	I S L F F M L V L L K Q N P D V E L Q L		344
1082	CTA CAG GAA ATT GAT ACT GTT GTG GGT GAG AGA CAG CTT CAG AAC GAA GAC CTT CCG AAG		1141
345	L Q E I D T V V G E R Q L Q N E D L P K		364
1142	CTG CAG GTG CTG GAG AGC TTC ATC AAT GAA TGC TTG CGT TTC CAC CCC GTG GTG GAC TTC		1201

365	L	Q	V	L	E	S	F	I	N	E	C	L	R	F	H	P	V	V	D	F	384
1202	ACC	ATG	CGT	CAA	GCC	CTG	ACC	GAT	GAT	ATC	ATA	GAT	GCG	TAC	AGG	GTA	CCG	AAG	GGC	ACA	1261
385	T	M	R	Q	A	L	T	D	D	I	I	D	G	Y	R	V	P	K	G	T	404
1262	AAT	ATC	ATT	CTC	AAC	ACT	GGC	CCC	ATG	CAC	CGG	ACA	GAG	TTT	TTC	CTC	AAG	CCG	AAC	GAA	1321
405	N	I	I	L	N	T	G	R	M	H	R	T	E	F	F	L	K	P	N	E	424
1322	TTC	AAC	CTG	GAA	AAC	TTT	GAA	AAA	aat	GCC	CCT	CGC	CGT	TAC	TTC	CAG	CCA	TTC	GGT	TCA	1381
425	F	N	L	E	N	F	E	K	N	A	P	R	R	Y	F	Q	P	F	G	S	444
1382	GGC	CCT	CGA	TCT	TGC	GTT	GGC	AAG	CAC	ATT	GCC	ATG	GTC	ATG	ATG	AAA	TCC	ATC	CTG	GTG	1441
445	G	P	R	S	C	V	G	K	H	I	A	M	V	M	M	K	S	I	L	V	464
1442	ACT	CTG	CTC	TCC	CAG	TAC	TCA	GTT	TGC	CCT	CAT	AAG	GGC	TTG	ACC	ATG	GAC	TGC	CTC	CCA	1501
465	T	L	L	S	Q	Y	S	V	C	P	H	K	G	L	T	M	D	C	L	P	484
1502	CAG	ACC	AAC	AAC	CTC	TCC	CAG	CAG	CCT	GTA	GAG	CAT	CAG	CAG	GAA	GCC	AAT	CTG	AGC	ATG	1561
485	Q	T	N	N	L	S	Q	Q	P	V	E	H	Q	Q	E	A	N	L	S	M	504
1562	AGA	TTC	TTA	CCT	AGA	CAC	AGC	GGT	ACC	TGT	CAA	ACA	CTC	TGA	GCT	GCT	GAC	CTT	TAG	TTG	1621
505	R	F	L	P	R	H	S	G	S	C	Q	T	L	*							517
1622	TAC	CTT	TAC	GTT	TAT	ACA	AAG	TAT	ATA	CAT	TAG	TGT	GAT	CTC	CTT	TAC	TTC	ATT	ATT	TAT	1681
1682	CTC	ATA	ACT	GTA	CAA	AGT	TA	GT	TTA	TAT	TTT	GGT	ATT	AAA	ACT	GTA	TTT	TTG	AGT	TGT	1741
1742	ACT	ATT	ATG	CAT	TA	TA	AG	CA	TGC	TA	TA	AGT	AAA	TAT	AAA	TTA	TTT	CGC	CAG	TCT	1801
1802	T																				1802

图2 黄鳝卵巢 P450arom 全长 cDNA 序列及翻译的氨基酸序列阅读框 1551 bp 编码 517 个氨基酸。序列中高度保守的片段用下划线指示,为 I -螺旋区(I),芳香化酶特异的保守区(II),血红素结合区(III),对酶起重要作用的位点用粗体字表示,糖基化和蛋白激酶位点用方框表示。

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of rice field eel P450arom cDNA derived from ovary. The 1551-bp ORF encodes a protein of 517 amino acids in length. Regions of high homology are underlined and indicated by Roman numerals: I -helix(I), an aromatase-specific conserved region(II), and heme-binding region (III). Amino acids known to be essential for catalytic functions are in boldface type. The N-glycosylation site and protein kinase C phosphorylation (PKC) sites are boxed.

表1 黄鳝卵巢 P450arom 氨基酸序列与鱗鱼卵及其他脊椎动物的 P450arom 氨基酸序列的比较(%)

Tab.1 Alignment of rice field eel ovary-derived P450arom amino acid sequence with sequences of other vertebrates

黄鳝卵 Rice field eel (ov)	鱗鱼卵 Medaka (ov)	金鱼卵 Goldfish (ov)	虹鳟卵 Trout (ov)	鲶鱼卵 Catfish (ov)	斑马鱼脑 Zebrafish (ov)	金鱼脑 Goldfish (br)	鲶鱼脑 Catfish (br)	斑马鱼脑 Zebrafish (br)	鸡 Chicken (ov)	人 Human (ov)	
黄鳝卵		80	64	76	63	63	59	60	58	52	51
鱗鱼卵	71		63	74	64	63	57	60	57	50	61
金鱼卵	53	54		68	71	88	60	60	58	50	50
虹鳟卵	—	—	—		65	67	60	60	59	51	50
鲶鱼卵	59	59	69	—		71	59	60	57	50	52
斑马鱼卵	61	63	86	—	71		59	60	58	51	49
金鱼脑	50	48	48	—	52	57		72	88	52	53
鲶鱼脑	51	49	48	—	55	59	41		70	49	50
斑马鱼脑	51	48	52	—	54	57	47	41		52	52
鸡	51	48	49	—	49	53	50	50	51		71
人	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注:表中右上方为氨基酸序列的同源性(%),左下方为碱基序列的同源性(%).包括鱗鱼卵巢(Q92087)、虹鳟卵巢(1806325A)、金鱼卵巢(AAC14013)、斑马鱼卵巢(AAK00643)、鲶鱼卵巢(Q92111)、金鱼脑(AAB39408)、斑马鱼脑(AAK00642)、鲶鱼脑(AAL14612)、鸡卵巢(A31916)、人胎盘(Q4Hu19)。

Notes: The data in right up side are similarity percentages of amino acids of P450arom, and in left down are ones of nucleotide of P450arom. Rice field eel ovary-derived P450arom is compared with forms derived from medaka ovary (Q92087), trout ovary (1806325A), goldfish ovary (AAC14013), zebrafish ovary (AAK00643), catfish ovary (Q92111), goldfish brain (AAB39408), zebrafish brain (AAK00642), catfish brain (AAL14612), chicken ovary (A31916), and human placenta (Q4Hu19).

表2 黄鳍卵 P450arom 与其他脊椎动物 P450arom 保守区 I, II, III 之间的氨基酸序列同源性(%)

Tab. 2 The percent of identity/similarity between rice field eel and other vertebrates P450arom conserved regions I, II, III

黄鳍卵 Rice field eel (ov)	鳉鱼卵 Medaka (ov)	金鱼卵 Goldfish (ov)	虹鳟卵 Trout (ov)	鲶鱼卵 Catfish (ov)	斑马鱼卵 Zebrafish (ov)	金鱼脑 Goldfish (br)	鲶鱼脑 Catfish (br)	斑马鱼脑 Zebrafish (br)	鸡 Chicken (ov)	人 Human (ov)
I	93	90	93	90	93	86	90	86	73	73
II	87	70	83	75	75	79	75	79	79	79
III	85	92	100	100	100	85	85	85	78	71

2.2.2 系统发育分析 为了比较黄鳍卵巢 P450arom 与其他鱼类及脊椎动物 P450arom 的系统发育关系, 使用上述比对结果, 用 PAUP 软件计算系统发育关系, 在总共 539 个位点中, 185 个位点由于处于变化较大的区域而被排除在系统发育关系之外, 采用 Neighbor-Joining 法, 重复 1000 次, gap 处理为缺失, 构建了系统发育树

(图 3), 上标数据为在距离模式下, 用 Bootstrap 计算的各个分支支持度。从系统树可见 P450arom 是单起源, 但在基因进化中由于复制或在基因某些部分分化与集中, 导致形成两个或多个拷贝, 并在不同组织中表达。从图上可见黄鳍卵 P450arom 与鳉鱼的关系最近, 并同属于鱼类卵巢 P450arom 那一大分支。

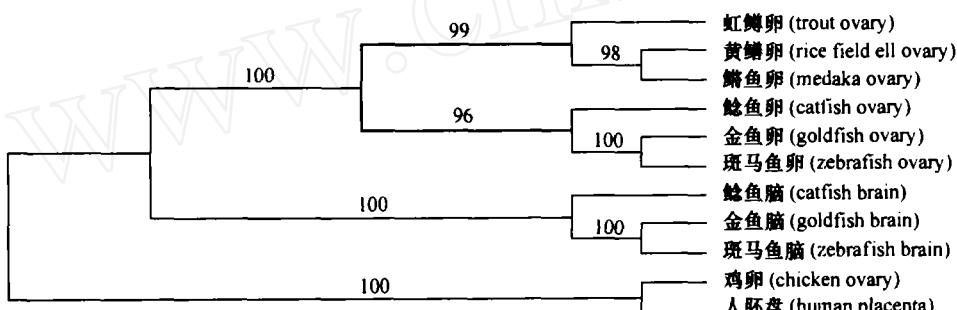


图3 P450 芳香化酶蛋白质系统树用 PAUP4.0b2 软件 Njbootstrap 方法构建。
分支上的数字代表 bootstrap 值

Fig. 3 Phylogenetic tree of P450arom proteins. The consensus tree was constructed by neighbor-joining bootstrap using PAUP4.0b2. The number is the bootstrap value.

3 讨论

至今研究结果表明在人 P450arom 是由 CYP19 基因家族中的一个基因表达的^[2], 但在猪等动物已发现不同组织, 不同发育阶段表达的 P450arom 是由 CYP19 基因家族中的不同基因编码的^[16,17], 在虹鳟、金鱼、斑马鱼等鱼中也分离到了分别在神经系统和性腺组织表达的由不同基因编码的 P450arom^[8-10], 本实验室在对黄颡鱼的研究中也发现脑和卵巢中的 P450arom 是不一样的(未发表)。但由于鱼类种类繁多, 生活环境, 进化程度又不完全一致, 因此, 上述情况也有例外, 如现有研究证明鳉鱼脑和卵巢 P450arom 是由同一个基因编码的^[15], 本研究发现在黄鳍脑中用引物 P1, P2 克隆到的序列及 3'RACE 序列与黄鳍卵巢中完全一致, 这很可能说明黄鳍脑和卵巢 P450arom 是由同一个基因编码的。至少黄鳍卵巢中 P450arom 在脑中也有一定的表达。

分析黄鳍和鳉鱼两者的基因组量发现它们都比较小^[18,19], 因此, 很可能在进化过程中缺少大部分鱼类都有的基因复制或四倍化过程, 导致 P450arom 没有发生复制等现象, 从而在脑和卵巢表达的 P450arom 是由同一个基因编码的。但要确定黄鳍脑和卵巢是由同一个基因编码的还需要作进一步的 Northern 杂交等研究。

参考文献:

- [1] Tao Y X, Lin H R. Studies on the natural sex reversal of paddyfield eel, *Monopterus albus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, 15: 274—278[陶亚雄, 林浩然. 黄鳍自然性反转的研究[J]. 水生生物学报, 1991, 15:274—278]
- [2] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis[J]. *Endocr. Rev.*, 1994, 15:342—353
- [3] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligo-nucleotide primer [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A.*, 1988, **85**:8998—9002
- [4] Yu J H, Xia D Q, Yang H, et al. Isolation and sequence somatostatin cDNA of *Megalobrama pellegrini* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, **6**:533—539 [俞菊华, 夏德全, 杨弘, 等 RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定. *水产学报* 2003, 6:533—539]
- [5] Thompson J D, Higgins D G, Gibson J F. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**:4673—4680
- [6] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods [R]. Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1998
- [7] Fukada S, Tanaka M, Matsuyama M, et al. Isolation, characterization, and expression of cDNA encoding the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, 1996, **45**:285—290
- [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 β in the ovary [J]. *J. Mol. Endocrinol.*, 1992, **8**:53—62
- [9] Tchoudakova A, Callard G V. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary [J]. *Endocrinology*, 1998, **139**:2179—2189
- [10] 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
- [11] Trant J M. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450 [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1994, **95**:155—168
- [12] McPhaul M J, Noble J F, Simpson E R, et al. The expression of a functional cDNA encoding the chicken cytochrome P-450arom (aromatase) that catalyzes the formation of estrogen from androgen [J]. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**:16358—16363
- [13] Corbin C J, Graham-Lorence S, McPhaul M, et al. Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in non steroidogenic cells [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, **85**:8948—8952
- [14] Graham-Lorence S, Arameh B, White R E, et al. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450 [J]. *Protein Sci.*, 1995, **4**:1065—1080
- [15] Tanaka M, Fukada S, Matsuyama M, et al. Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *J. Biochem.*, 1995, **117**:719—725
- [16] Corbin C J, Trant J M, Walters K W, et al. Changes in testosterone metabolism associated with the evolution of placental and gonadal isozymes of porcine aromatase cytochrome P450 [J]. *Endocrinology*, 1999, **140**:5202—5210
- [17] Choi I, Collante W R, Simmen R C, et al. A developmental switch in expression from blastocyst to endometrial/placental-type cytochrome P450 aromatase genes in the pig and horse [J]. *Biol. Reprod.*, 1997, **56**:688—696
- [18] Zhou R, Liu L, Guo Y, et al. Similar gene structure of two Sox9 genes and their expression patterns during gonadal differentiation in teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, 2003, **66**(3):211—217
- [19] Ishikawa Y. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics [J]. *Bioessays*, 2000, **22**(5):487—495

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE cDNA ENCODING P-450 AROMATASE FROM RICE FIELD EEL

YU Ju-Hua, WU Ting-Ting, LI Jian-Lin, CAO Li-Ping and XIA De-Quan

(Freshwater Fisheries Research Center Chinese Academy of Fishery Sciences WuXi 214081)

Abstract: In both males and females, estrogen programs and coordinates developmental, physiological, and behavioral responses essential for reproduction. The *cyp19* gene encodes P450arom, a heme-binding protein of the enzyme complex responsible for the conversion of C₁₉ androgens into C₁₈ estrogens. This enzyme complex comprising the flavoprotein NADPH-dependent cytochrome P450 reductase and P450 arom. Studies show that aromatase may influence the function and development of Central Nervous System of the mammals, readjust nervous internal secretion, reproduction function and sexual behavior, and participate the readjustment of sexual gland differentiation of non-mammals. Many experiments have proven aromatase can control the sex differentiation and sex transformation of many kinds of fishes. Rice field eel (*Monopterus albus*) is a kind of protogynous hermaphrodite. The studies of molecular mechanism of the rice field eel sex determination are not available. This study isolates P450arom gene from ovary of rice field eel. It intends to further study the function of P450arom during sex formation and sex reversal as well as the expression levels of the genes after the application of hormone and aromatase inhibitor in the future, aiming to provide basic materials for artificial sex control of rice field eel.

A cDNA encoding P450arom was derived from the rice field eel ovary using RT-PCR and RACE. The cDNA was 1802bp with 49bp 5'UTR, 202bp 3'UTR(excluding poly(A)) and 1551bp ORF, which encodes 517 amino acids and has a predicted mol wt of 58.2K. Based on mutational analysis and molecular modeling amino acids known to be essential for catalytic functions in the human P450arom(I133, E302, P308, D309, T310, R435, C437) were identical in rice field eel P450arom. Consistent with the glycosylation site described at the N terminus of human aromatase, a consensus N-glycosylation site (N-X-S/T) was identified in the amino terminal region of rice field eel at N29, which is similar to goldfish ovarian P450arom (N30). Further analysis indicated that the rice field eel P450arom has protein kinase C (PKC)-dependent sites at 59, 130, 385, 410, and 503 (S/T-X-R/K). For phylogenetic analysis the deduced amino acid sequence of rice field eel, together with P450arom sequences reported for other vertebrate species, were aligned by ClustalW, version 1.6. The results revealed the rice field eel ovarian P450arom shares 63%—80% sequence identity with ovarian aromatases of other fish species, but only 58%—60% with brain-derived aromatases of other fishes, 50%—52% with human being placenta and chicken ovarian aromatases. But the percent of identity/similarity was higher (70%—100%) in the regions of high homology, including the I-helix, an aromatase-specific conserved region, and the heme-binding region. The aligned sequences were used to construct phylogenetic trees by distance (Neighbor-Joining algorithm) and maximum parsimony criteria PAUP (Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0). Phylogenetic analysis of the P450arom gene family indicated that P-450 aromatase gene has a single origin. The rice field ovarian P450arom was clustered with medaka ovarian P450arom, and all fish ovarian aromatase were clustered together, and is independent with fish neural P450arom and chicken human P450arom.

Key words: *Monopterus albus* Zuiwei, P-450 aromatase, RACE, Phylogenetic relatedness