

## 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(P450<sub>arom</sub>)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<sub>arom</sub> 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 P450<sub>arom</sub> 的氨基酸序列与其他鱼卵巢 P450<sub>arom</sub> 具有 63%—80% 同源性,与其他鱼脑 P450<sub>arom</sub> 为 58%—60% 同源,与人胚盘和鸡卵巢 P450<sub>arom</sub> 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鲮鱼卵巢的关系最近,与鱼类卵巢 P450<sub>arom</sub> 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 Osteichthyes,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<sup>[1]</sup>。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 C<sub>19</sub>雄激素生物合成 C<sub>18</sub>雌激素,其中包括依赖 NADPH 的 P450 还原酶和 P450<sub>arom</sub>(CYP19 基因产物),P450 芳香化酶是催化这一反应的速度限制酶<sup>[2]</sup>。本研究首次分离了黄鳍卵巢中 P450<sub>arom</sub> 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 P450<sub>arom</sub> 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'-CAGTGTGTGTGGAGATGCTGATCG-3'

P2 碱基 1403-1429 5'-CTTCATCATCACCATGGCTATGTGCTT-3'

P3 碱基 356-381 5'-CGGGTGTGGATCAACGGNGARGARAC-3'

P4 碱基 1242-1262 5'-ACAGGGTACCGAAGGGCACAA-3'

P5 碱基 1283-1301 5'-CGCATGCACCGGACAGAGT-3'

P6 碱基 693-713 5'-TGACAGGTACACCAAGGAAGA-3'

P7 碱基 604-624 5'-AGTTGTCTAGGTGAGTCTGT-3'

P8 碱基 396-415 5'-ATGATGCACCGCTGATGACC-3'

这些引物在黄鳍卵巢 P450<sub>arom</sub> 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

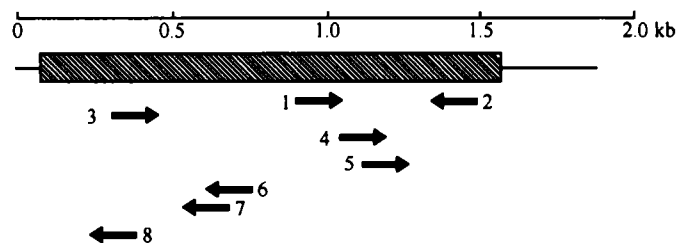


图 1 所用引物在黄鳍卵巢 P450arom 上的相对位置

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泳溴化乙啶染色显示 28s 和 18s 检测 RNA 的完整性。

**1.4 保守片段的分离** 取 5 $\mu$ g 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)<sub>16</sub>-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 25 $\mu$ L,其中含 5 $\mu$ L 10 $\times$  反应缓冲液,2 $\mu$ mol/L 氯化镁,200 $\mu$ mol/L dNTP,引物各 0.4 $\mu$ mol/L,2.5U Taq 酶。反应条件 94 $^{\circ}$ C 3min,然后 30 循环 94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,最后 72 $^{\circ}$ C 10min,4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C 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 5 $\mu$ g 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 25 $\mu$ L,反应体系同上,反应条件:94 $^{\circ}$ C 3min,然后 28 循环 94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,最后 72 $^{\circ}$ C 10min,4 $^{\circ}$ C 保存;为增加扩增效率及扩增的特异性,把上述 PCR 液稀释 10 倍,取 2 $\mu$ L 作模板,用引物 AP 和 P5 进行再扩增,退火温度为 55 $^{\circ}$ C,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<sup>[3,4]</sup>,用 5 $\mu$ g 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 2 $\mu$ L 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<sup>[5]</sup>分析,比对结果用 PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony version 4.0, b2)<sup>[6]</sup>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 黄鳍 P450arom 的分离

分别取黄鳍卵巢和脑组织的 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,初步认为黄鳍卵巢与脑中 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鳍卵巢 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<sup>[7]</sup>, 虹鳟卵<sup>[8]</sup>, 金鱼卵<sup>[9]</sup>, 斑马鱼卵<sup>[10]</sup>, 鲈鱼卵<sup>[11]</sup>, 金鱼脑<sup>[9]</sup>, 斑马鱼脑<sup>[10]</sup>, 鲈鱼脑<sup>[11]</sup>, 鸡卵巢<sup>[12]</sup>, 人胎盘<sup>[13]</sup> 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、与鲈鱼卵 63% 同源、与鲈鱼脑 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<sup>[14]</sup>, 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<sup>[9,10]</sup>。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	TCATCGCTTGAACCGTTCAATTAGGCAAGTTGCTTTCAGTCTGCTTCCC																			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	A	D	L	D	24			
122	TCT	GTG	TCC	TCA	AAT	GCC	ACT	GCA	GTG	GGA	TCA	GCG	GGC	ATC	TCA	GTG	GCA	ACC	AGA	GCC	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	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	GGC	ACA	GCC	AGC	AAC	TAC	TAC	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	GCG	GTG	CAT	CAT	GTA	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	GTA	GCT	CTG	TGG	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	GTG	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	CGC	TGC	ACC	GTG	ATA	GAC	ATC	TTC	AAC	AGA	CTC	TTC	CTT	GGT	GTA	CCT	GTC	AAT	GAG	AAA	721			
205	R	C	T	V	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	TGG	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	GTA	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	GGC	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	ACG	CAG	TGT	GTG	TTG	GAG	ATG	GTG	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 GGC 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  
II  
1262 AAT ATC ATT CTC AAC ACT GGC CGC 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 E G S 444  
1382 GGC CCT CGA TCT TGC GTT GGC AAG CAC ATT GCC ATG GTG 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  
III  
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 AGC 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 TAA TTA TAT TTT GGT ATT AAA ACT GTA TTT TTG AGT TGT 1741  
1742 ACT ATT ATG CAT TAA TAG ACA TGC TAA TAC TAA AGT AAA TAT AAA TTA TTT CGC CAG TGT 1801  
1802 T 1802

图2 黄鳍卵巢 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),对酶活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 黄鳍卵巢 P450arom 氨基酸序列与鲮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

黄鳍卵	鲮鱼卵	金鱼卵	虹鳟卵	鲮鱼卵	斑马鱼脑	金鱼脑	鲮鱼脑	斑马鱼脑	鸡	人
Rice field eel (ov)	Medaka (ov)	Goldfish (ov)	Trout (ov)	Catfish (ov)	Zebrafish (ov)	Goldfish (br)	Catfish (br)	Zebrafish (br)	Chicken (ov)	Human (ov)
黄鳍卵	80	64	76	63	63	59	60	58	52	51
鲮鱼卵	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
鲮鱼卵	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
鲮鱼脑	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(%).包括鲮鱼卵巢(Q92087)、虹鳟卵巢(1806325A)、金鱼卵巢(AAC14013)、斑马鱼卵巢(AAK00643)、鲮鱼卵巢(Q92111)、金鱼脑(AAB39408)、斑马鱼脑(AAK00642)、鲮鱼脑(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 (AAL 14612), 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	鲮鱼卵	金鱼卵	虹鳟卵	鲶鱼卵	斑马鱼卵	金鱼脑	鲶鱼脑	斑马鱼脑	鸡	人
Rice field eel (ov)	Medaka (ov)	Goldfish (ov)	Trout (ov)	Catfish (ov)	Zebrafish (ov)	Goldfish (br)	Catfish (br)	Zebrafish (br)	Chicken (ov)	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的之外,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 与鲮鱼的关系最近,并同属于鱼类卵巢 P450arom 那一大分支。

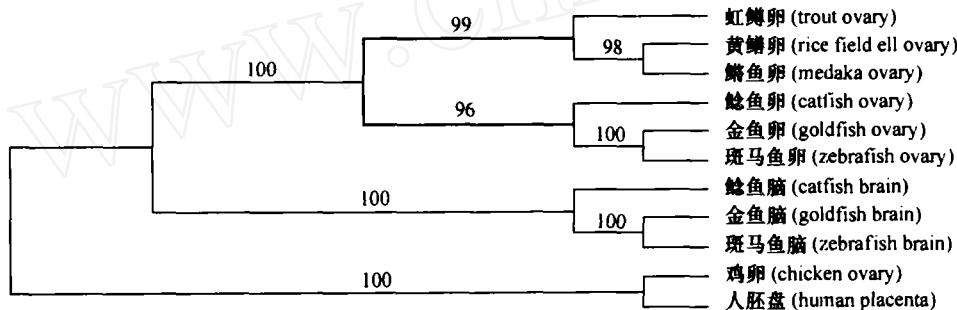


图 3 P450 芳香化酶蛋白质系统树用 PAUP4.0b2 软件 Njbootstrap 方法构建。

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<sup>[2]</sup>,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<sup>[16,17]</sup>,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<sup>[8-10]</sup>,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,如现有研究证明鲮鱼脑和卵巢 P450arom 是由同一个基因编码的<sup>[15]</sup>,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。

分析黄鳍和鲮鱼两者的基因组量发现它们都比较小<sup>[18,19]</sup>,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 $\beta$  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, Amameh 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 Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a 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 C<sub>19</sub> androgens into C<sub>18</sub> 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* Zuiew, P-450 aromatase, RACE, Phylogenetic relatedness