

稀有鮡鲫脑芳香化酶 cDNA 片段的克隆与表达分析

曹梦西¹ 杨玉慧¹ 江文波¹ 王玉凤¹ 胡 炜² 赵浩斌¹

(1. 华中师范大学生命科学学院, 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 武汉 430079;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要:芳香化酶 (P450_{arom}) 是雌激素合成过程中的关键酶, 在性别分化中起重要作用。鱼类存在卵巢型和脑型两种芳香化酶, 分别由 *Cyp19a* 和 *Cyp19b* 编码。稀有鮡鲫作为我国特有的实验动物, 尚无其芳香化酶的有关资料, 其性别分化机制亦不清楚。本研究采用 RT-PCR 的方法以简并引物扩增了稀有鮡鲫脑型芳香化酶基因 *Cyp19b* 的部分序列, 其长度为 1070 bp, 编码 357 个氨基酸残基, 具有典型的芳香化酶结构域。RT-PCR 分析发现该基因主要在稀有鮡鲫的脑中表达, 在性腺、肠、肾中也有表达; 其在雌、雄脑中的表达差异不显著。在胚胎发育阶段, *Cyp19b* 的表达从囊胚期开始, 至神经胚期达到较高水平, 随后下降, 孵化期又有所增强, 孵化 10d 后维持在高水平。这些结果说明 *Cyp19b* 以脑中表达为主, 可能在稀有鮡鲫神经系统发育和脑的性别分化中有重要作用。

关键词:稀有鮡鲫; 芳香化酶; *Cyp19b*; 基因克隆; 表达模式

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)04-0748-08

在脊椎动物性别决定及分化通路的起始开关下游, 性激素作为主要效应子, 对早期性腺的分化起着关键作用^[1,2]。芳香化酶 (P450_{arom}) 属于细胞色素 P450 家族中的一员, 是性激素代谢中的关键酶, 它催化动物体内的雄激素 (主要为睾丸激素和雄烯二酮) 转化为雌激素, 其重要性不言而喻^[3-6]。除猪科动物外, 绝大多数哺乳动物以及鸟类中, P450_{arom} 只有一种, 由 *Cyp19* 单基因编码^[7]。鱼类芳香化酶有性腺型 (P450_{aromA}) 和脑型 (P450_{aromB}) 两种不同的形式; 其中 P450_{aromA} 由 *Cyp19a* 基因编码, 主要在卵巢中表达; P450_{aromB} 则由 *Cyp19b* 基因编码, 主要在中枢神经系统表达^[8-10]。一些研究结果已经证实 P450_{aromA} 参与了雌激素生物合成和卵巢分化的过程^[11-13]。P450_{aromB} 在鱼类脑中的活性是 P450_{arom} 在哺乳动物脑中的 100—1000 倍^[14], 一般认为其参与了神经系统的性别分化。然而, 大多数硬骨鱼的性腺中也有 P450_{aromB} 的表达, 可能它也参与了性腺分化的调节^[11]。

稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*) 是我国特有的一种小型鲤科鱼类, 由于其生活周期短, 易饲养, 性成熟快, 可终年产卵等多方面优势, 已经成为国内一种十

分有潜力的实验动物模型^[15,16]。关于稀有鮡鲫性别决定与分化方面的研究, 目前仅停留在形态学观察方面, 现已有一些性别决定和分化相关基因的报道, 如 *sox*、*dmrt1*、*wnt4* 等, 其结果也仅限在保守片段的克隆以及序列分析上^[17,18]。稀有鮡鲫性别决定与分化的机制仍不清楚。为了了解性激素在稀有鮡鲫性别分化过程中的作用, 我们采用 RT-PCR 的方法, 克隆了 *Cyp19b* 的部分序列, 并对其雌雄个体组织的表达模式以及胚胎发育各时期的表达情况做了初步的分析。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及取材 稀有鮡鲫取自中科院水生生物研究所, 暂养于本实验室。选取健康的性成熟个体, 解剖镜下取其眼、脑、鳃、心、肝、脾、肠、肾、鳔、卵巢、精巢和肌肉组织等液氮冻存备用。选取不同发育时期胚胎如合子期 (0—35 min)、多细胞期 (45 min—3.8h)、囊胚期 (4.5—7.2h)、原肠胚期 (8.25—10.8h)、神经胚期 (13.5—13.7h)、肌节出现期 (15h)、尾泡期 (22.7h)、肌肉效应期 (28.5h)、眼灰期 (52h) 等及出苗期 (75h)、出苗 5d、出苗 10d、出苗 15d、出苗 20d、出苗 25d、出苗 30d

收稿日期: 2008-10-23; 修订日期: 2009-04-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30671609); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金 (2009FB18) 资助

作者简介: 曹梦西 (1984—), 女, 汉族, 山西大同人; 硕士研究生; 研究方向为发育生物学。E-mail: cmxlan@126.com

通讯作者: 赵浩斌, Tel: 027-67867704; E-mail: zhaohb@mail.ccnu.edu.cn

鱼苗液氮冻存储备用。

1.2 总 RNA 提取 采用 Invitrogen 公司 Trizol 试剂并依其使用说明,提取稀有鮕鲫各组织及不同发育时期胚胎总 RNA, - 80 保存备用。

1.3 脑芳香化酶基因保守片段的克隆 取 1μg 脑总 RNA,以 Oligo dT (TOYOBO)为引物,使用逆转录酶 ReverTra Ace (TOYOBO),按照使用说明书进行反转录获得 cDNA 的第一链,合成的 cDNA 于 - 20 保存。以此 cDNA 为模板,使用简并引物 aromBF: WCSGCRTGCAACTACTATAA, aromBR: GGCTGGAARWAACGWCKVGG^[20]进行 PCR 扩增。PCR 的反应体系 25μL,其中 2mmol/L dNTP 2.5μL, 10mmol/L 引物各 0.5μL, ExTaq (TaKaRa) 0.5U。PCR 反应条件: 94 3min 预变性; 35 个循环包括

94 1min, 42 30s, 72 1min; 72 延伸 10min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,回收后连接到载体 pMD19-T (TaKaRa),转化感受态细胞,蓝白斑筛选后,经 PCR 检测阳性克隆。随机挑选 3 个阳性克隆进行测序,测序由南京金思特生物科技有限公司完成。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.4 序列分析 所得序列在 NCBI 上进行同源性检索。使用 DNA star 推导出其氨基酸序列,在 NCBI 的保守结构域库中寻找其保守结构域 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。选取一些动物包括小鼠、爪蟾和鱼类的 P450arom 氨基酸序列,用 ClustaW (<http://www.ebi.ac.uk/Clustalw/>)进行序列比较分析。使用 MEGA4 软件以相邻结合 (NJ)方法构建系统进化树。

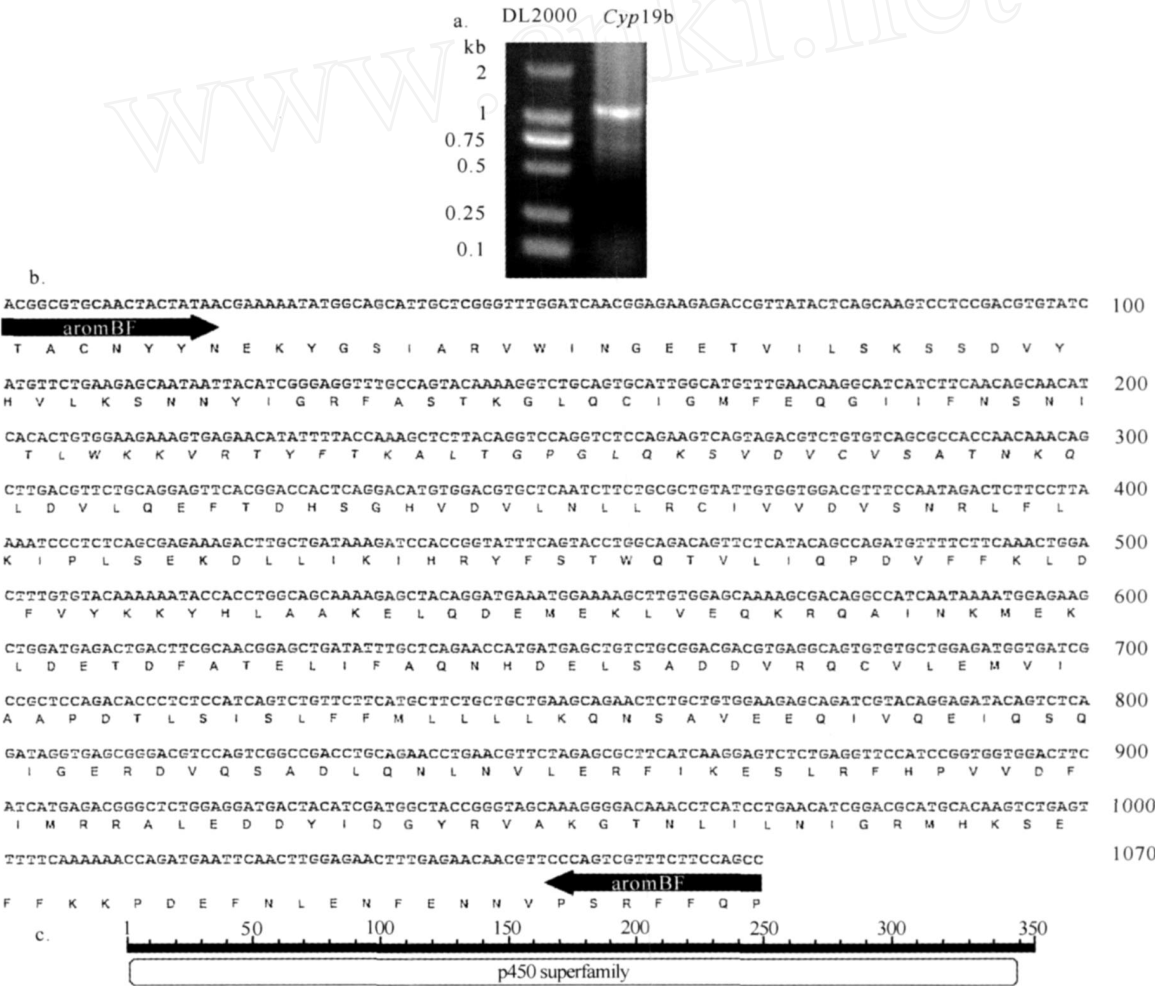


图 1 稀有鮕鲫脑芳香化酶

Fig. 1 P450aromB of *Gobiocypris rarus*

a. 稀有鮕鲫脑芳香化酶 cDNA 片段的 RT-PCR 结果; b. 稀有鮕鲫脑芳香化酶片段的序列,其上为 cDNA 序列,其下为氨基酸序列,数字代表碱基数,箭头所示为引物位置; c. 蛋白质保守结构域的分析结果

a. The amplification results of cDNA fragment of *Cyp19b*; b. deduced amino acid sequences of *Gobiocypris rarus* P450aromB. The top line is cDNA sequence, the nether line shows the amino acid sequences, numbers marks the nucleotide bases, the arrows shows the primer sites; c. Analysis results of the conserved domains of the protein

[illegible]

图 2 稀有鲃鲫 Cyp19b 片段编码的氨基酸序列与其他物种芳香化酶序列的多重比对

Fig. 2 Multialignment of aromatases of different animals

氨基酸一致的用 * 表示;相似的用 . 表示;方框标示保守结构区

Identical and similar amino acids are marked by asterisks and dots, respectively. The three conserved regions are framed and marked with I—III.

1.5 组织及胚胎表达的检测 取稀有鮟鲫各组织、不同发育时期胚胎及幼鱼的总 RNA 1 μg, 使用逆转录酶 ReverTra Ace 反转录成为 cDNA。cDNA 稀释两倍后, 取 0.5 μL 作为模板, 采用特异引物, 进行 PCR 检测其在各组织及胚胎的表达。反应

体系同前,所用引物为 GSP_{atom}BF: CGGGA GGTTT-
GCCA GTACA 和 GSP_{atom}BR: GATGAA GTCCAC-
CACCGGA T。PCR 程序为 94 预变性 3 min; 35 循
环 94 1 min, 55 30 s, 72 1 min; 最后 72
5 min。同时以 β -actin (引物为 β -actinF: TCCGG-

TATGTGCAAGGCCGG; β -actinR: CCACA TCTGCTG-GAAGGTGG)作为内参物,进行 PCR,程序为 94 预变性 3min; 25 循环 94 1min, 60 30s, 72 1min;最后 72 5min。1%琼脂糖凝胶电泳后观察拍照。

2 结果

2.1 Cyp19b cDNA 片段的克隆及序列分析

使用简并引物 aomBF/aomBR 进行稀有鮡鲫脑组织的 RT-PCR 扩增,得到大小约 1kb 的 cDNA 片段(图 1a)。经测序,该片段长度为 1070bp,编码 357 个氨基酸残基(图 1b)。在 NCBI 上进行保守结构域分析,显示我们得到的 Cyp19b 所编码的氨基酸序列属于 P450 超家族(图 1c)。与其他芳香化酶相似,该片段包含 3 个保守区,分别是底物结合环(I, substrate-binding loop)、远端螺旋区 -I(II, Distal helix I)、类固醇结合区(, the steroid-binding domain)等(图 2)。

把稀有鮡鲫芳香化酶片段的氨基酸序列与鲫(*Carassius auratus*, P450aomB, BAA23757)、鲤(*Cyprinus carpio*, P450aomB, ACB13198)、斑马鱼(*Danio rerio*, P450aomB, AAG12245)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*, P450aomB, AAL14612)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*, P450aomB, AAS58447)、青鳉(*Oryzias latipes*, P450aomB, AAP83449)、小鼠(*Mus musculus*, P450aom, NP_031836)、爪蟾(*Xenopus laevis*, P450aom, NP_001079122)的氨基酸序列进行多重比对,发现芳香化酶有很强的保守性(图 2)。所获稀有鮡鲫芳香化酶片段与小鼠和爪蟾芳香化酶相似性最低,均为 57%;与赤点石斑鱼、青鳉和斑点叉尾鮰脑型芳香化酶相似度分别为 67%, 69%和 75%;与斑马鱼、鲫和鲤脑型芳香化酶的相似度极高,分别为 91%、92%和 93%。

我们还结合斑马鱼 P450aomA (AA I63004)、鲤 P450aomA (ACB13197)、鲫 P450aomA (AAC4013)、赤点石斑鱼 P450aomA (AAS58448)、斑点叉尾鮰 P450aomA (AAB32613)、青鳉 P450aomA (BAA11656),构建了芳香化酶的系统发育树(图 3)。在系统发育树中,鱼类芳香化酶与爪蟾和小鼠芳香化酶分为两枝,鱼类芳香化酶又分为 A 和 B 两个类群,可见我们克隆的稀有鮡鲫芳香化酶片段属于 B 类,为脑型芳香化酶。无论 A 类还是 B 类,聚类与分类的亲缘关系相似,鲤科鱼类芳香化酶聚为一枝,其近缘为

斑点叉尾鮰,再次为青鳉和赤点石斑鱼。稀有鮡鲫脑型芳香化酶与鲤、鲫和斑马鱼脑型芳香化酶亲缘关系最近,聚于一簇。

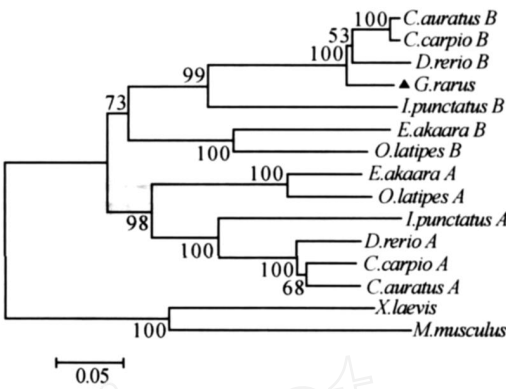


图 3 P450aom 的分子进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of P450aom s

种名缩写与图 2 相同, A 表示性腺型芳香化酶, B 表示脑型芳香化酶;分支数字代表置信度

The abbreviations are the same as in Fig. 2. A indicates ovarian P450aom, and B indicates brain P450aom. The numbers indicate the hits supporting the branching pattern from 1,000 bootstraps

2.2 稀有鮡鲫 Cyp19b 的组织表达模式

通过 RT-PCR 检测,在雌、雄鱼的脑、鳃、肠、肾、性腺中扩增出一条 750bp 的特异条带,其中在脑中的扩增条带最亮,肾脏次之,性腺和鳃中较弱;雄性眼中也有微弱表达(图 4a)。结果说明 Cyp19b 以脑中表达为主,且雌性脑中的表达量稍高于雄性脑中的表达。为了验证 Cyp19b 在雌雄脑中表达的差异,另选取性成熟雌雄个体各 5 尾,进行 RT-PCR,并采用 GeneTool 凝胶成像分析系统对电泳条带进行半定量分析(图 4b, c)。虽然雄性脑中脑型芳香化酶基因的表达量略高于雌性脑中的表达量,但经显著性检验, Cyp19b 在雌、雄性脑中的表达差异不显著。

2.3 Cyp19b 在胚胎发育各阶段的表达

RT-PCR 方法检测了稀有鮡鲫 Cyp19b 在不同发育时期胚胎及幼鱼中的表达,其结果(图 5)。早期胚胎如合子和多细胞期末有特异条带出现;从囊胚期开始检测到表达信号,至神经胚期出现一个较高水平的表达,之后从尾芽期到出苗 5d 其表达维持在相对较低水平,其中出苗期表达量较高。出苗 10d 后其表达水平进一步提高,至出苗 30d 处于稳定的高表达。然而在肌节出现期没有检测到预期条带(图 5)。

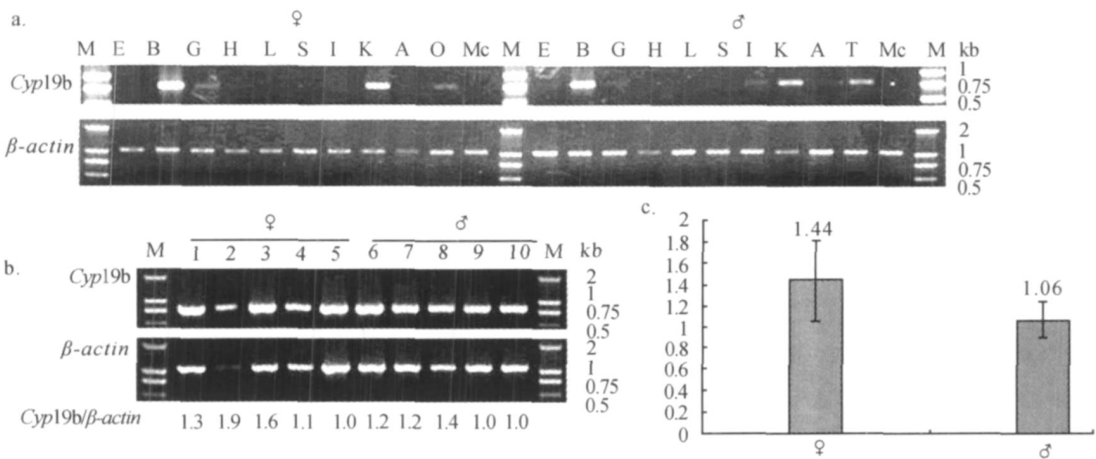


图 4 稀有鮡鲫 *Cyp19b* 的组织表达

Fig. 4 The expression of *Cyp19b* in various tissues of female (♀) and male (♂) of *Gobiocypris rarus*

a. 稀有鮡鲫 *Cyp19b* 的组织表达的 RT-PCR 结果; b. 稀有鮡鲫 *Cyp19b* 在不同雌雄个体脑中的表达检测结果; c. 雌雄各 6 尾稀有鮡鲫 *Cyp19b* 脑中表达的统计结果

a. results of RT-PCR analysis of *Cyp19b* in various tissues of *Gobiocypris rarus*; b. results of RT-PCR analysis of *Cyp19b* in brain of female (♀) and male (♂); c. statistical results of semi-quantitative RT-PCR for *Cyp19b* in the brains of female and male adult fish

M: DL2000 marker; E: 眼 (eye); B: 脑 (brain); G: 鳃 (gill); H: 心 (heart); L: 肝 (liver); S: 脾 (spleen); I: 肠 (intestine); K: 肾 (kidney); A: 鳔 (air bladder); O: 卵巢 (ovary); T: 精巢 (testis); Mc: 肌 (muscle)

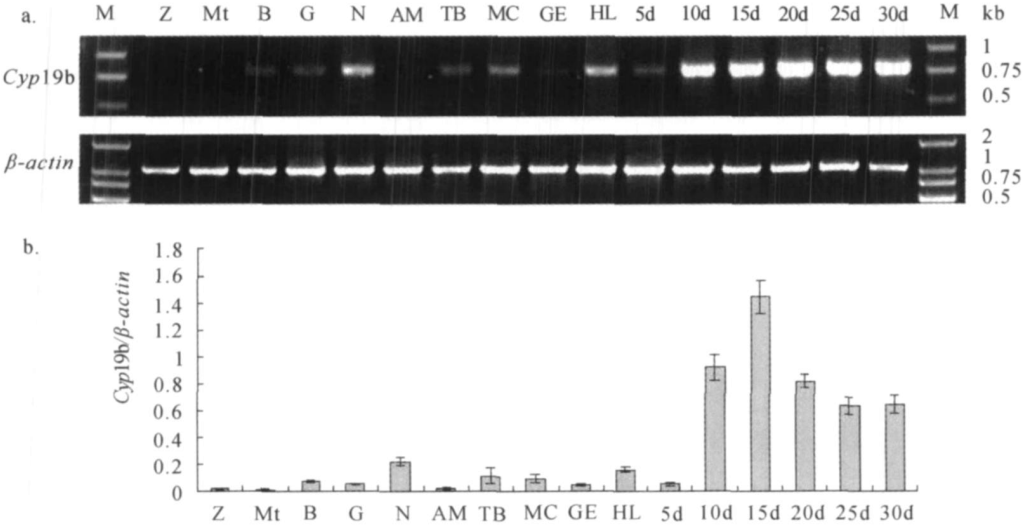


图 5 稀有鮡鲫 *Cyp19b* 在胚胎不同发育阶段的表达

Fig. 5 The expression of *Cyp19b* in the embryos and fries of *Gobiocypris rarus*

a. 胚胎发育不同时期 *Cyp19b* 表达的 RT-PCR 检测结果; b. 不同发育时期 *Cyp19b* 表达的半定量分析, 三次重复的统计结果

a. RT-PCR results of *Cyp19b* during embryonic development; b. triplicate semi-quantitative results of the expression of *Cyp19b* during embryonic development

M: DL2000 marker; Z: 合子 (zygote); Mt: 多细胞期 (multicellular stage); B: 囊胚期 (blastula); G: 原肠胚期 (gastrula); N: 神经胚期 (neurula); AM: 肌节出现期 (appearance of myomere); TB: 尾泡期 (tail bud); MC: 肌肉效应期 (muscular contraction); GE: 眼灰期 (greyish eyes); HL: 出苗期 (hatching); 5d: 出苗 5d (5d after hatching); 10d: 出苗 10d (10d after hatching); 15d: 出苗 15d (15d after hatching); 20d: 出苗 20d (20d after hatching); 25d: 出苗 25d (25d after hatching); 30d: 出苗 30d (30d after hatching)

3 讨 论

芳香化酶在进化过程中保守。本研究获稀有鮡鲫芳香化酶基因 *Cyp19b* cDNA 的部分片段, 经与其他脊椎动物芳香化酶氨基酸序列的同源性及分子

进化分析, 确定为脑型芳香化酶, 与亲缘关系较远的小鼠和爪蟾芳香化酶相似性为 57%, 而与亲缘关系最近的鲤科鱼类脑型芳香化酶的相似性达 91%—93%。在系统进化中, 鱼类可能发生了染色体的重复, 因而, 鱼类的大多数基因都有相似的两个不同拷

贝^[21]。芳香化酶基因的分子进化分析也证实了这点,鱼类脑型和性腺型芳香化酶为同一起源基因的两个分支,而小鼠和爪蟾芳香化酶仅有一个。芳香化酶的基因重复可能也使不同拷贝进化出了不同的功能,各负其责。如脑型芳香化酶主要在脑中表达,而性腺型芳香化酶主要在性腺表达。

在青鳉、金鱼、斑马鱼等硬骨鱼中,Cyp19b主要在脑、垂体等神经组织中表达。虽然Cyp19b在性腺中也有表达,但表达量比在脑中要低^[9, 12, 13, 15]。我们对稀有鮡鲫Cyp19b的表达分析也发现,其主要在脑中表达,且脑中表达量显著高于其他组织,与在其他鱼类中的研究结果一致。这说明Cyp19b的表达有一定组织特异性,它直接参与脑内雌激素的合成,进而影响脑的发育与性别分化。在中枢神经系统发育过程中,脑局部形成的雌激素可以影响、改变神经系统结构,使其在构造上出现两性分化,进而调节神经内分泌功能以及性行为^[14]。另外,在性腺中也检测到Cyp19b低水平表达,说明其在性腺的分化及发育中可能也起一定作用,可能与维持体内雌激素的平衡相关。

除了在脑和性腺中检测到Cyp19b外,稀有鮡鲫的鳃、肾、肠中也检测到Cyp19b的表达。尼罗罗非鱼的脑型芳香化酶Cyp19b的表达可以在脑、心、鳃、肌肉、血液、肾、肠、脾和精巢等多种组织检测到^[19],Makoto, et al. 在大西洋庸鲽 (*Hippoglossus hippoglossus*) 中发现Cyp19b可以在肾、肠、鳃、肝等组织中的表达^[22],杜启艳等在泥鳅中也检测到其在肾中表达^[23]。在文昌鱼中亦发现芳香化酶及雌激素受体在消化道的表达^[24]。这些结果说明雌激素具有广泛的生理作用,在肾中的表达可能与鱼类肾脏的类固醇合成相关,也可能与多个系统如消化系统、鳃呼吸的功能调节相关。

Cyp19b在不同发育时期的胚胎及幼鱼中的表达情况,在不同鱼类存在差异。斑马鱼Cyp19b在受精卵表达水平较高,之后其表达开始急剧下降,到多细胞期降至最低;在囊胚期前后呈现上升趋势,随后下降,至尾泡期处于最低水平;尾泡期之后到出苗期其表达量直线上升,而出苗后其表达水平又逐渐下降^[25]。在青鳉,从受精卵至4—6体节期都没有Cyp19b的表达,直到出苗前才检测到其较高水平表达,至出苗5d后表达量有所下降^[13]。从稀有鮡鲫不同胚胎发育时期的表达情况可以看到,囊胚期后Cyp19b开始表达,至神经胚期达较高水平,随后逐渐降低。出苗后又有较强表达,经短暂下降后,其表

达水平维持在稳定的高水平(出苗10d至出苗30d)。结果表明稀有鮡鲫Cyp19b不是母源因子,其表达与鱼类的神经系统分化与发育时期相一致。因为在个体发育过程中,较早发育和分化的是脑神经系统,神经胚期就是中枢神经发育的重要时期。值得一提的是,出苗后幼鱼Cyp19b的表达处于高水平,可能就是在这一时期鱼类脑中开始分泌雌激素和促性腺激素,通过脑-垂体-性腺轴对未分化的性腺产生影响,进而影响脑和性腺的性别分化。因此,有必要对Cyp19b进行进一步研究,以阐明鱼类脑及性腺性别决定和分化的机制。

参考文献:

- [1] Endo D, Kanaho Y I, Park M K. Expression of sex steroid hormone-related genes in the embryo of the leopard gecko [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, **155**: 70—78
- [2] Nakamura M, Kobayashi T, Chang X T, et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish [J]. *Exp Zoolog*, 1998, **281**: 362—372
- [3] Chardard D, Desvages G, Pieau C, et al. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (*Urodele Amphibia*) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1995, **99** (1): 100—107
- [4] Desvages G, Pieau C. Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992, **41**: 851—853
- [5] 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** (3): 342—355
- [6] Dong W, Wang L, Thomson C, et al. Benzo (a) pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus* [J]. *Aquatic Toxicol*, 2008, **88** (4): 289—300
- [7] Corbin C J, Hughes A L, Heffelfinger J R, et al. Evolution of sulfamyl aromataes: ancestral duplication with conservation of tissue-specific expression in the collared peccary (*Pecari tayassu*) [J]. *Mol Evol*, 2007, **65** (4): 403—412
- [8] Simpson E R, Clyne C, et al. Aromatase—a brief overview [J]. *Annu Rev Physiol*, 2002, **64**: 93—127
- [9] 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
- [10] Valle L D, Ramina A, Vianello S, et al. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002, **82** (1): 19—32
- [11] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, **208**: 191—364

- [12] Trant JM, Gavasso S, Ackers J, *et al* Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*) [J]. *J Exp Zool*, 2001, **290** (5): 475—483
- [13] Patil J G, Gunasekera R M. Tissue and sexually dimorphic expression of ovarian and brain aromatase mRNA in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Implications for their preferential roles in ovarian and neural differentiation and development [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, **158** (1): 131—137
- [14] Lephart E D. A review of brain aromatase cytochrome P450 [J]. *Brain Res Rev*, 1996, **22** (1): 1—26
- [15] Wang J W. Reproductive biology of *Gobiocypris Rarus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, **16** (2): 165—174 [王剑伟. 稀有鮡鲫繁殖生物学. 水生生物学报, 1992, **16** (2): 165—174]
- [16] Wang J W, Cao W X. *Gobiocypris rarus* and fish as laboratory animals [A]. In: Transactions of the Chinese Ichthyological Society, Vol 6 [C]. Beijing: Science Press 1997, 144—152 [王剑伟, 曹文宣. 稀有鮡鲫与鱼类实验动物. 鱼类学论文集 (第六辑). 北京: 科学出版社. 1997, 144—152]
- [17] Zhang X Y, Zhao G, Liu J D, *et al* Clone and sequence analysis of sox genes in Rare Gudgeon (*Gobiocypris rarus*) [J]. *J Wuhan Univ (Nat Sci Ed)*, 2006, **52** (2): 213—219 [张小艳, 赵刚, 刘江东, 等. 稀有鮡鲫 (Rare gudgeon) Sox基因的克隆及序列分析. 武汉大学学报 (理学版), 2006, **52** (2): 213—219]
- [18] Zhang X Y, Sun L W, Zha J M, *et al* Clone and sequence analysis of thirteen members of *Dm rt* genes in Rare Minnow [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, **2** (1): 88—93 [张小艳, 孙立伟, 查金苗, 等. 稀有鮡鲫 *Dm rt* 基因家族 13 个成员的克隆与序列分析. 生态毒理学报, 2007, **2** (1): 88—93]
- [19] Chang X, Kobayashi T, Senthilkumaran B, *et al* Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, **141** (2): 101—115
- [20] Li G L, Liu X C, Zhang Y, *et al* Cloning and expression of two cytochrome P450 aromatase genes in red-spotted grouper *Epinephelus akaara* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, **50** (5): 791—799 [李广丽, 刘晓春, 张勇, 等. 赤点石斑鱼两种芳香化酶 cDNA 的克隆及其表达的组织特异性. 动物学报, 2004, **50** (5): 791—799]
- [21] Chiang E F, Yan Y L, Guiguen Y, *et al* Two Cyp19 (P450 Aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, **18** (4): 542—550
- [22] Matsuoka M P, van Nes S, Andersen Ø, *et al* Real-time PCR analysis of ovary and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2006, **144** (1): 128—135
- [23] Du Q Y, Nan P, Yan S G, *et al* Molecular cloning and developmental expression of aromatases gene in two species of loaches [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (3): 276—283 [杜启艳, 南平, 燕帅国, 等. 两种泥鳅芳香化酶基因的克隆与时空表达. 水生生物学报, 2006, **30** (3): 276—283]
- [24] Fang Y Q, Weng Y Z, Ye R Z, *et al* Immunolocalization of aromatase, estrogen and estrogen receptor α and β in the epithelium of digestive tract and enteric neurons of amphioxus (*B ranchiostoma belcheri*) [J]. *Progress in Natural Science*, 2005, **15** (2): 157—161
- [25] Sawyer S J, Gerstner K A, Callard G V. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, **147** (2): 108—117

CLOWING AND EXPRESSONAL ANALYSIS OF Cyp19b GENE FRAGMENT IN Gobiocypris rarus

CAO Meng-Xi¹, YANG Yu-Hui¹, JIANG Wen-Bo¹, WANG Yu-Feng¹, HU Wei² and ZHAO Hao-Bin¹

(1. Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: P450 aromatase (P450arom), an enzyme catalyzing the synthesis of estrogens, is thought to play a key role in sex differentiation of neural and reproductive development in vertebrates. Most of the mammals have only one aromatase, but many teleost fish, including the zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*) have two isoforms of aromatase encoded by two distinct genes, *Cyp19a* expressed predominantly in the ovary and *Cyp19b* in the brain. *Gobiocypris rarus* is an emerging model fish in China because of its small size, transparent embryonic biology, spawning round the year, easy breeding, short generation and sensitivity in toxicology. However, the mechanisms of sex determination and differentiation are still unclear in this fish. Aromatase as the important factor in the differentiation of sex is also unavailable, so that the exact roles of aromatase gene in neural or ovarian development in this fish are unclear. To understand the mechanisms of sex differentiation and the role of aromatase in this process, we cloned the partial sequences of *Cyp19b* cDNA of *Gobiocypris rarus* by reverse transcription-polymerase chain reaction with degenerate primers dependant on the conservative sequences of the gene in other vertebrates, and we also examined its expression pattern in the tissues of adult fish and the developmental process of embryos in this fish by gene specific primers. The partial sequence of *Cyp19b* of *Gobiocypris rarus* we cloned consisted of 1070 base pairs which encoded 357 amino acids. Structural analysis of the deduced amino acid sequence indicated that it contained three specific domains of aromatases, substrate-binding loop, distal helix I and the steroid-binding domain. Multiple alignment and phylogenetic analysis showed that this protein of *Gobiocypris rarus* shared 57%—93% identities with P450arom proteins of other species and it was most similar to P450aromBs of *Danio rerio*, *Carrassius auratus* and *Cyprinus carpio* in 91%, 92% and 93%, respectively. This result indicated that the gene we got was *Cyp19b* of *Gobiocypris rarus*. The tissue expression pattern analysis by RT-PCR with specific primers showed that *Cyp19b* was predominantly expressed in the brain in both sexes, and the expression in the brain of female was slightly higher in female but not obviously stronger than that in the male in statistics. It was also expressed in eye, gill, kidney, intestine of both sexes, but not detectable expressions in other tissue like heart, liver, spleen, air bladder, and muscle. Ontogenic analysis by RT-PCR with specific primers showed that no expression was detected in the zygote, and the onset of expression of *Cyp19b* was from blastula, then the expression reached a higher level in neurula, after that it declined. The expression of *Cyp19b* burst again in 5d after hatching and it kept in a very high level till 30d after hatching. These results indicate that *Cyp19b* is expressed predominantly in the brain of adult fish, and it is also expressed highly in the stage of neurula. *Cyp19b* may play important roles in the development of central neural system and the sexual differentiation of the brain. The beginning of the expression from blastula suggest that *Cyp19b* is not a maternal factor for the embryos of *Gobiocypris rarus*.

Key words: *Gobiocypris rarus*; P450 aromatase; *Cyp19b*; Gene cloning; Expression pattern