

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00502

## 赤点石斑鱼卵型芳香化酶基因启动子调控绿色荧光蛋白在斑马鱼早期生殖腺中的表达

黄伟<sup>1,2</sup> 周莉<sup>1</sup> 刘静霞<sup>1</sup> 李志<sup>1</sup> 桂建芳<sup>1</sup>

(1. 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;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** P450 芳香化酶(P450arom)是生物体内合成雌激素的关键酶。为研究赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)卵型芳香化酶基因(*EaCyp19a1a*)启动子的调控作用, 构建了 *EaCyp19a1a* 启动子 9 个不同的 5'端缺失片段与绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)组成的表达载体, 分别命名为 p*EaCyp19a1a*-EGFP1-9。在 COS-7 细胞中的瞬时转染实验证明载体 p*EaCyp19a1a*-EGFP7 具有很强的转录活性。通过显微注射, 将线性化的 p*EaCyp19a1a*-EGFP7 载体注入斑马鱼单细胞期受精卵中, 定期在荧光显微镜下观察 GFP 的表达。结果发现 GFP 在胚胎期(受精后约 48h)开始表达, 主要发生在斑马鱼早期生殖腺细胞中, 具有明显的性腺特异性。这说明 *EaCyp19a1a* 的启动子序列中含有调控其性腺特异表达的顺势作用原件。研究为进一步探明芳香化酶在鱼类性别分化和性别转变过程中的作用奠定了基础。

**关键词:** 赤点石斑鱼; 卵型芳香化酶; 启动子; 绿色荧光蛋白; 斑马鱼

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0502-07

赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)是一种雌雄同体, 雌性先熟的海鱼类, 自然条件下雌性成熟年龄个别为 2 龄, 多数为 3 龄, 一般在六龄转变为雄性<sup>[1]</sup>。因此, 对其性腺分化发育及其性别转变的机制进行研究具有重大意义。近年来, 研究人员通过喂食、注射或体内埋植外源性激素(主要为 17 $\alpha$ -甲基睾丸酮)、芳香化酶抑制剂等成功诱导赤点石斑鱼发生性逆转, 证实其属于类固醇激素依赖型性别决定, 芳香化酶基因直接参与了该鱼类性别转变的调控<sup>[1-5]</sup>。

细胞色素 P450 芳香化酶(Aromatase)广泛存在于大多数脊椎动物的脑和垂体中, 它催化雄激素转化为雌激素, 是雌激素生物合成中的关键酶和限速酶。研究表明, 鱼类至少存在两种芳香化酶: P450aromA 和 P450aromB, 分别来自性腺和脑, 由不同的基因编码(*Cyp19a1a* 和 *Cyp19a1b*)。这两种芳

香化酶具有不同的底物活性和组织分布, 分别具有独特的调节方式<sup>[6,7]</sup>。Tchoudakova, *et al.*<sup>[8]</sup>曾报道金鱼的 *Cyp19a1b* 基因的启动子能指导绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因在斑马鱼的神组织表达。近期, Tong, *et al.*<sup>[9]</sup>建立的转基因斑马鱼品系发现 GFP 基因能在斑马鱼 *Cyp19a1b* 启动子的指导下特异表达于脑的胶质细胞中。虽然 *Cyp19a1a* 基因的启动子已在青鳉、金鱼、斑马鱼、罗非鱼、欧洲鲈鱼、鳊鱼、色鳊等多种硬骨鱼类中得到克隆<sup>[10-16]</sup>, 但是目前还没有其调控功能方面的报道。

近年来, 本实验室针对石斑鱼的特殊发育过程, 围绕“下丘脑-垂体-性腺”内分泌调控轴, 克隆和鉴定了 *TSH $\beta$* 、*GTH $\alpha$* 、*FSH $\beta$* 、*LH $\beta$* 、*Sox3*、*Dmrt1*、*Cyp19a1a/b*、*MBP* 和 *ApoC-I* 等一批调控鱼类生殖和性腺分化的重要基因<sup>[17-23]</sup>。Huang, *et al.*<sup>[24]</sup>对赤点

收稿日期: 2009-05-14; 修订日期: 2009-10-10

基金项目: 国家 973 计划(2004CB117401); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-N-020)资助

作者简介: 黄伟(1978—), 男, 汉族, 湖北枣阳人; 博士; 主要从事鱼类发育遗传学研究。E-mail: hwei@ihb.ac.cn

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn.

石斑鱼卵型芳香化酶基因(*EaCyp19a1a*)的研究表明, 该基因仅表达于卵巢滤泡细胞中, 其表达量随着赤点石斑鱼由雌到雄的性逆转过程逐渐下降至消失。同时, 对 *EaCyp19a1a* 启动子的分析表明, 该启动子拥有较强的转录活性区域, 其上 SF-1、CREB、Sox5 等特异的转录因子结合位点在硬骨鱼类中相当保守, 它们可能对 *Cyp19a1a* 基因的时空表达具有较强影响。因此, 进一步研究 *EaCyp19a1a* 启动子的调控功能具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、细胞与试剂、仪器

pEGFP-N1 质粒、COS-7 细胞株、DH5 $\alpha$  感受态细胞均由本实验室保存, 限制酶、T4 连接酶、DNA 聚合酶(TaKaRa 公司)、DNA 回收试剂盒(MBI 公司)、DMEM 培养基(GIBCO 公司)、脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000(Invitrogen 公司)、胎牛血清(杭州四季青)、分光光度计(DU-70 Spectrophotometer, 美国 Beckman 公司)。

### 1.2 实验动物

赤点石斑鱼取自武汉水产品市场。斑马鱼为 AB 品系, 本实验室养殖房养殖。

### 1.3 基因组 DNA 的提取、PCR 扩增

取赤点石斑鱼 1—2 条, 切其部分尾鳍组织约 300 mg 于裂解液[50 mmol/L Tris(pH 8.0)、100 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、1% SDS、10 mg/mL proteinase K]中消化过夜, 苯酚/氯仿法抽提纯化得到基因组 DNA, 溶于 TE 溶液中, -20℃保存。

根据本实验室已经扩增得到的 *EaCyp19a1a* 启动子序列(GenBank 登录号 EU239953), 设计引物(表 1)。上游引物为 F1-9, 均引入酶切位点 *Xho* ; 下游引物为 R, 引入酶切位点 *Kpn* 。以已提取的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 1 至 9 段启动子 5'端缺失片段。采用 1%琼脂糖凝胶进行电泳, DNA 回收试剂盒回收目标条带。

### 1.4 表达载体 p*EaCyp19a1a*-EGFP 的构建

用 T4 DNA 连接酶将回收的 *EaCyp19a1a* 启动子片段连接到 pMD18-T Vector, 进行克隆测序。测序反应由上海生工生物工程公司完成。pEGFP-N1 (4.7 kb)质粒经 *Ase* /*Nhe* 双酶切去掉其 CMV 启动子序列, 然后补平, 连接成载体 pEGFP-N1(4.1 kb)。pEGFP-N1(4.1 kb)和 T 载体上的 *EaCyp19a1a*

启动子序列再分别经 *Xho* /*Kpn* 双酶切, 经连接, 筛选阳性克隆, 提取质粒并进行酶切鉴定。

表 1 *EaCyp19a1a* 启动子克隆引物  
Tab. 1 Primers used for *EaCyp19a1a* promoter amplification

| 引物名称<br>Name | 引物序列 Sequences                          | 酶切位点<br>Restriction enzyme cutting site |
|--------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| F1           | 5'-GCCCTCGAGCTCCTCC<br>TCTGTTGTGGC-3'   | <i>Xho</i>                              |
| F2           | 5'-GCCCTCGAGTCTCTGTA<br>CGCTCAAGGG-3'   | <i>Xho</i>                              |
| F3           | 5'-GCCCTCGAGAACTTGC<br>TTCTCATCACC-3'   | <i>Xho</i>                              |
| F4           | 5'-GCCCTCGAGTTTCGAGC<br>TTTCCTTGTGTG-3' | <i>Xho</i>                              |
| F5           | 5'-GCCCTCGAGAGAGGA<br>GCTGCTACAGAACC-3' | <i>Xho</i>                              |
| F6           | 5'-GCCCTCGAGAAGCCG<br>TTTTCTAAGAAC-3'   | <i>Xho</i>                              |
| F7           | 5'-GCCCTCGAGTTGTGAA<br>TGATCTTGATC-3'   | <i>Xho</i>                              |
| F8           | 5'-GCCCTCGAGATGGAGT<br>CTGGTGGGTTTG-3'  | <i>Xho</i>                              |
| F9           | 5'-GCCCTCGAGGGTGAG<br>TGAATTCACAGAG-3'  | <i>Xho</i>                              |
| R            | 5'-GCCGGTACCGGAGTCA<br>TCGCCCCGTTCA-3'  | <i>Kpn</i>                              |

### 1.5 细胞转染及荧光显微镜观察

COS-7 细胞在 DMEM 培养液中贴壁生长, 每天传代。细胞培养于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。转染前 24h 传代, 将 COS-7 细胞重铺于 6 孔板中的洁净盖玻片上。待细胞融合率达 80%时, 将 5  $\mu$ g 重组质粒和 10  $\mu$ L Lipofectamine 2000 (Invitrogen)分别与 250  $\mu$ L 无血清培养基混匀, 室温静置孵育 5min。然后将两种混合培养液加入 6 孔板的单孔细胞中, 同时每孔另外加入 1500  $\mu$ L 无血清培养基, 混匀, 培养箱(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)中培养。5h 后终止反应, 换用新鲜的 DMEM 培养液继续培养。24h 后转染细胞可在荧光显微镜下镜检。先吸去培养基, 用 PBS 液轻轻洗涤细胞, 4%多聚甲醛室温固定, 终浓度为 2  $\mu$ g/mL 的 DAPI 液染色, 然后置于荧光显微镜下观察、拍照。

### 1.6 显微注射

用 *Bgl* 线性化 p*EaCyp19a1a*-EGFP 载体, 纯化后溶于双蒸水, 质量浓度为 50  $\mu$ g/ $\mu$ L。收集斑马鱼受精卵若干, 于 1-细胞期之前将线性化载体注射到受精卵动物极区域中, 每个受精卵大约注射 50 pg。注射后的鱼卵于含 1%的 1-phenyl 2-thiourea (PTU) 水中 26—28℃继续培养, 自然发育, 定期在荧光显微镜下观察荧光表达情况, 并照相。

## 2 结果

### 2.1 pEaCyp19a1a-EGFP 载体的构建

以赤点石斑鱼基因组 DNA 为模板, 利用引物 F1-9/R 经 PCR 扩增(引物位点见图 1A), 得到 9 条 DNA 片段(图 1B)。经回收纯化后克隆入 T-Vector, 选取阳性克隆进行测序鉴定。通过与已知启动子序列(EU239953)进行比对, 结果显示本研究得到的克隆序列与之完全一致, 表明已得到赤点石斑鱼 *EaCyp19a1a* 启动子 5'端缺失的系列片段。

用 *Ase* /*Nhe* 双酶切去掉 pEGFP-N1 上的 CMV 启动子部分(图 2A), 然后补平自连成不带启动子的载体 pEGFP-N1(4.1 kb)。利用 PCR 引物设计时引入的 *Xho* 和 *Kpn* 酶切位点, 将 *EaCyp19a1a*

启动子片段克隆入同样经过 *Xho* /*Kpn* 作用后的 pEGFP-N1(4.1 kb)载体上(图 2B)。*EaCyp19a1a* 启动子片段长度分别为 195 bp—2.0 kb, pEGFP-N1(4.1 kb)载体部分长度约为 4.15 kb。所构建的载体相应地分别命名为 pEaCyp19a1a-EGFP1-9。

### 2.2 pEaCyp19a1a-EGFP 转染 COS-7 细胞

为了验证已构建的 pEaCyp19a1a-EGFP1-9 启动子表达载体是否具有活性, 将这些载体分别瞬时转染至 COS-7 细胞, 荧光显微镜高倍镜下观察各孔荧光表达情况, 并随机计算每孔 3 个视野中表达荧光的细胞平均数及转染效率(表 2,  $P < 0.05$ ), 其中 7 种报告基因具有启动子转录活性。荧光显微镜下, 载体 pEaCyp19a1a-EGFP7(图 3A)和 pEaCyp19a1a-

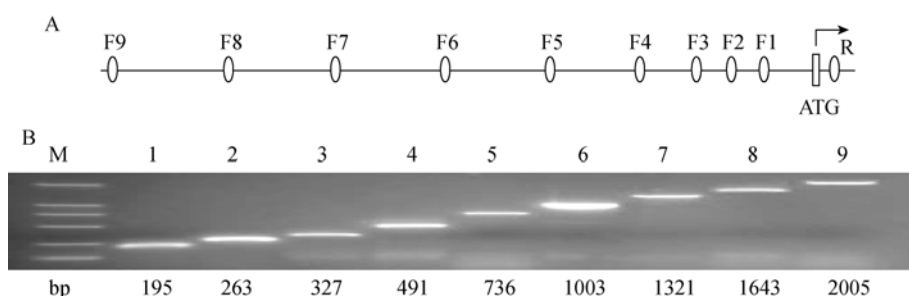


图 1 PCR 扩增赤点石斑鱼 *EaCyp19a1a* 启动子片段

Fig. 1 Amplification of *EaCyp19a1a* promoter segments by PCR

A. PCR 引物位点示意图; B. PCR 产物电泳图; F1-9. 9 条正向引物; R. 反向引物; M. DL 2000 DNA 分子量标准; 1—9. 不同的启动子片段; 195—2005. DNA 片段的大小

A. Schematic map of PCR primers on *EaCyp19a1a* promoter; B. Electrophoretogram of PCR products; F1-9. nine pieces of forward primers; R. reverse primer; M: DNA marker; 1—9. PCR products; 195—2005. sizes of PCR products

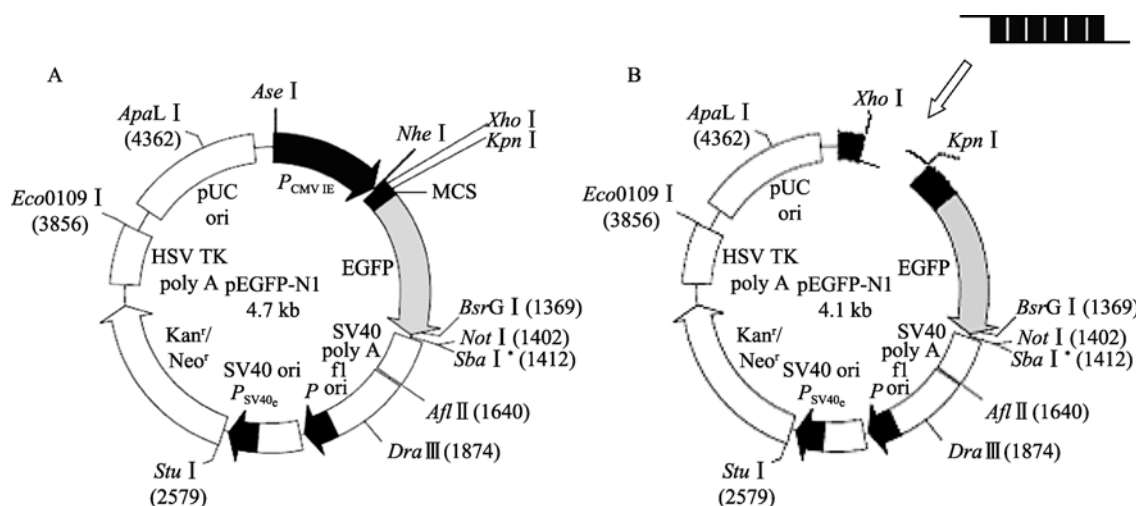


图 2 pEaCyp19a1a-EGFP 载体的构建

Fig. 2 Artificial construction of pEaCyp19a1a-EGFP vector

A. pEGFP-N1(4.7 kb)载体及酶切位点示意图; B. 载体 pEGFP-N1(4.1 kb)和 *EaCyp19a1a* 启动子片段均被 *Xho* /*Kpn* 双酶切, 并连接

A. Restriction map in pEGFP-N1 vector; B. the ligation sketch map of pEGFP-N1(4.1 kb) and *EaCyp19a1a* promoter segments, which were double digested with *Xho* and *Kpn*

EGFP6(图 3B)可见较多明亮荧光细胞,载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP1、4、5 荧光细胞数目略少(图 3C, D, E), *pEaCyp19a1a*-EGFP3、8 的荧光细胞数目则更少(图 3F, G), 载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP2、9 和阴性对照载体 *pEGFP-N1*(4.1 kb)未见明显荧光(图略)。转染效率比较可发现载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP7 明显较高, 这说明该载体具有较强的转录活性。

表 2 高倍镜下表达绿色荧光蛋白的细胞计数及所占该视野细胞的比例(×200)  
Tab. 2 Cells counting of positive GFP and transfection efficiency (Original magnification: ×200)

| 载体 Vector                 | 高倍镜视野表达 GFP 细胞数 Cells counting of positive GFP | 转染效率 Transfection efficiency (%) |
|---------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP1 | 96.51±18.45                                    | 20.6                             |
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP2 | 0                                              | 0                                |
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP3 | 22.37±4.19                                     | 4.7                              |
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP4 | 89.42±17.34                                    | 18.7                             |
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP5 | 101.68±21.94                                   | 21.5                             |
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP6 | 157.71±31.36                                   | 33.8                             |
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP7 | 163.85±32.71                                   | 34.1                             |
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP8 | 18.16±4.02                                     | 3.8                              |
| <i>pEaCyp19a1a</i> -EGFP9 | 0                                              | 0                                |

**2.3 *pEaCyp19a1a*-EGFP 在斑马鱼性腺的表达**  
选取转染实验中转染效率最高的载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP7 用做显微注射。在注射的 120 粒受精卵中, 54 粒在低囊胚期和原肠早期死亡, 66 尾仔鱼出膜, 注射存活率为 55%。在荧光显微镜下观察发现其中 4 尾有荧光表达。最早观察到绿色荧光时胚胎处于出苗前期(约受精后 48h), 荧光主要出现在早期生殖腺部位, 呈现几个亮点状(图 4A)。随着鱼苗的孵出与生长, 荧光强度有持续增加, 面积逐渐扩大的趋势。鱼苗孵出后 1—2d(即受精后 72—96h), 荧光沿着生殖脊方向逐渐展开(图 4B, C)。此外, 仔鱼出膜后可在背部和侧面肌肉观察到荧光, 零星呈现若干个低亮度的点带状斑纹, 这是非特异的。

3 讨 论

芳香化酶是雌激素生物合成过程最后一步的限速酶。在人类, 由于许多雌激素依赖性疾病(如子宫内膜癌、乳腺癌)的发生发展与芳香化酶有密切关系, 因此芳香化酶的表达和调控成为防治人类性别依赖

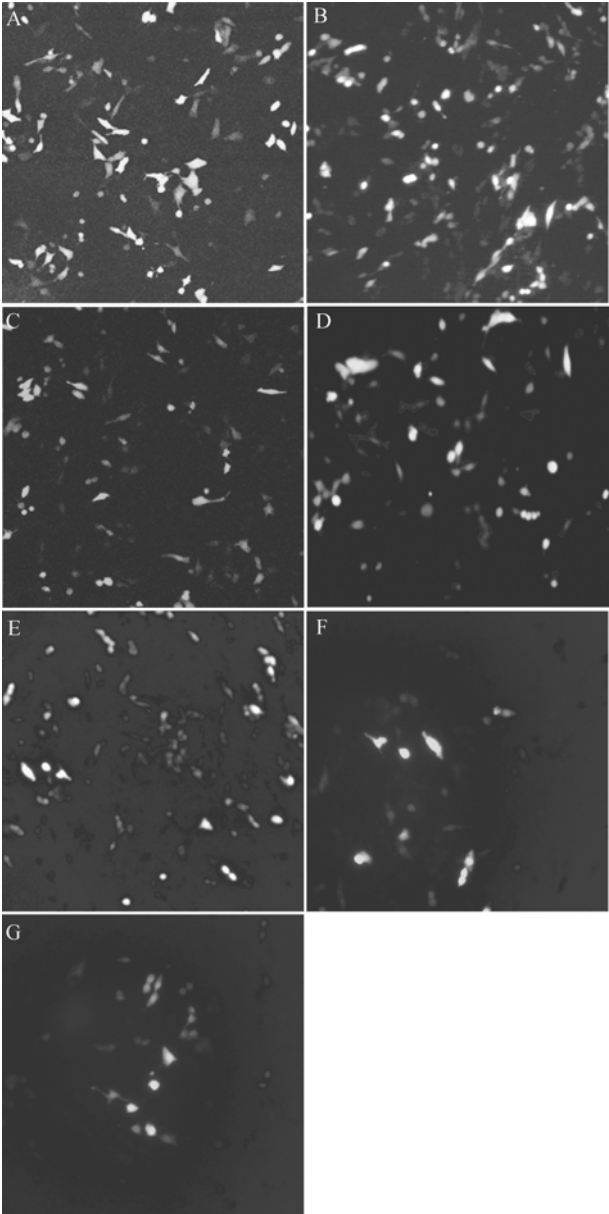


图 3 绿色荧光蛋白在 COS-7 细胞中的表达图像(×200)  
Fig. 3 Expression of GFP in transfected COS-7 cells (Original magnification: ×200)  
A. 载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP7 表达图像; B. 载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP6 表达图像; C. 载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP1 表达图像; D. 载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP4 表达图像; E. 载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP5 表达图像; F. 载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP3 表达图像; G. 载体 *pEaCyp19a1a*-EGFP8 表达图像  
A. Image of *pEaCyp19a1a*-EGFP7 vector; B. Image of *pEaCyp19a1a*-EGFP6 vector; C. Image of *pEaCyp19a1a*-EGFP1 vector; D. Image of *pEaCyp19a1a*-EGFP4 vector; E. Image of *pEaCyp19a1a*-EGFP5 vector; F. Image of *pEaCyp19a1a*-EGFP3 vector; G. Image of *pEaCyp19a1a*-EGFP8 vector

性疾病研究的热点。大量研究表明人芳香化酶基因的主要特点是其具有组织特异性表达, 即不同的组织利用不同的启动子, 如胎盘组织中主要是启动子

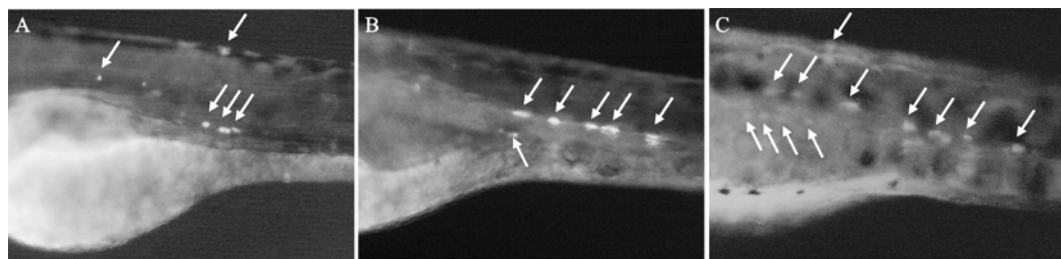


图4 *EaCyp19a1a* 启动子指导绿色荧光蛋白在斑马鱼中表达

Fig. 4 Expression of GFP in zebrafish embryos directed by *EaCyp19a1a* promoter

A. 胚胎期(约受精后 48 h); B. 出膜 1d 鱼苗(约受精后 72 h); C. 出膜 2d 鱼苗(约受精后 96h)。鱼体头部在左, 白色箭头为表达 GFP 的原始生殖细胞, 黑色箭头为非特异性表达 GFP 的细胞

A. The embryo (about 48 hpf); B. One day old larvae; C. Two days old larvae. Head is on the left, specific GFP-expressing cells were indicated by white arrows while ectopic expressing cells by black arrows

PI.1, 脂肪组织中主要是 PI.4, 卵巢组织中是 PII 等<sup>[25-27]</sup>。相比之下, 虽然芳香化酶基因的启动子在众多鱼类中得到了克隆, 但是启动子与其基因表达之间的关系研究较少, 仅见于 Tchoudakova, *et al.* 的报道。Tchoudakova, *et al.*<sup>[8]</sup>曾将金鱼的 *Cyp19a1a* 和 *Cyp19a1b* 的启动子分别注射到斑马鱼受精卵中, 但是只发现包含 *Cyp19a1b* 的载体在神经组织内表达, 而 *Cyp19a1a* 的载体未能发现荧光表达。近期, Huang, *et al.*<sup>[24]</sup>对赤点石斑鱼和其他鱼类 *Cyp19a1a* 启动子进行了分析, 发现这些启动子拥有一个共同的含有 SF-1、CREB 等转录因子结合位点的保守区域, 并推测这段保守区域对鱼类 *Cyp19a1a* 启动子调控卵巢特异表达具有决定性作用。因此, 本研究通过构建赤点石斑鱼 *EaCyp19a1a* 启动子的绿色荧光蛋白表达载体, 结合显微注射技术, 希望获得鱼类芳香化酶基因启动子调控组织特异性表达的更多证据。

通过本研究, 我们发现长度约 1.3 kb 的 *EaCyp19a1a* 启动子能够驱动绿色荧光蛋白在斑马鱼体内表达。所注射斑马鱼用含 PTU 的培养液去除斑马鱼色素和自发荧光后, 于受精后 48h 时在胚胎中可观察到绿色荧光表达于早期生殖腺部位, 并随着鱼苗的孵出与生长而发展。这在时间和空间上与斑马鱼内源性 *Cyp19a1a* 的早期表达一致, 说明 *EaCyp19a1a* 的启动子序列中含有调控其性腺特异表达的顺势作用原件, 并且可以跨物种行使其功能。

在本实验中, 绿色荧光蛋白只在部分受注射胚胎中表达, 而不在所有胚胎中表达, 这种现象在瞬时转基因斑马鱼中常常发生<sup>[28,29]</sup>。这是因为受注射胚胎中仅有少量细胞整合了完整的外源 DNA, 所以外源 DNA 在暂态表达时表达量不高。相比之下, 一

旦获得稳定的转基因种系, 则胚胎的每一个细胞都整合了外源 DNA, 因而在相应组织中外源 DNA 的表达量就会高很多。这有待于在 p*EaCyp19a1a*-EGFP 稳定的转基因斑马鱼种系中做进一步观察分析。

总之, 本研究为深入了解鱼类芳香化酶, 尤其是卵型芳香化酶的表达调控机制提供了有效地帮助, 有利于进一步探明芳香化酶在鱼类性别分化和性别转变过程中的重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Li G L, Liu X C, Lin H R. Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on sex reversal in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 145—150 [李广丽, 刘晓春, 林浩然. 17 $\alpha$ -甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响. 水产学报, 2006, 30(2): 145—150]
- [2] Hong W S, Zhang Q Y, Gong M J, *et al.* Masculinization of red grouper (*Epinephelus akaara*) induced by exogenous hormone [J] *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*. 1994, 13(4): 375—381 [洪万树, 张其永, 公茂军, 等. 外源激素诱导赤点石斑鱼雄性化. 台湾海峡, 1994, 13(4): 375—381]
- [3] Xia W, Zhou L, Gui J F. The linkage structure and phylogeny of DMRT gene family in the teleost fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(2): 254—263 [夏伟, 周莉, 桂建芳. 真骨鱼类 DMRT 基因家族的连锁结构及其系统发生. 水生生物学报, 2009, 33(2): 254—263]
- [4] Xing C G, Jin S, Yuan S P. Sex reversal of Grouper (*Epinephelus* sp.) [J]. *Fisheries Science*, 2006, 25(4): 214—216 [刑晨光, 金珊, 袁思平. 石斑鱼性逆转研究现状. 水产科学, 2006, 25(4): 214—216]
- [5] Li G L, Liu X C, Lin H R. Aromatase inhibitor letrozole induces sex inversion in the protogynous red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. *Acta Physiological Sinica*, 2005,

- 57(4): 473—479 [李广丽, 刘晓春, 林浩然. 芳香化酶抑制剂 letrozole 对赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)性逆转的作用. 生理学报, 2005, 57(4): 473—479]
- [6] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, *et al.* Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2009, doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.002
- [7] Piferrer F, Blazquez M. Aromatase distribution and regulation in fish [J]. *Fish Physiol. Biochem.*, 2005, **31**: 215—226
- [8] Tchoudakova A, Kishida M, Wood E, *et al.* Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish [J]. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2001, **78**: 427—439
- [9] Tong S K, Mouriec K, Kuo M W, *et al.* A *Cyp19a1b-GFP* (Aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells [J]. *Genesis*. 2009, **47**(2): 67—73
- [10] Tanaka M, Fukada S, Matsuyama M, *et al.* Structure and promoter analysis of the cytochrome P450 aromatase gene of the teleost fish, Medaka, *Oryzias latipes* [J]. *J. Biochem.*, 1995, **117**: 719—725
- [11] Kazeto Y, Ijiri S, Place A R, *et al.* The 5'-flanking regions of CYP19A1A1 and CYP19A1A2 in zebrafish [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **288**: 503—508
- [12] Yoshiura Y, Senthilkumaran B, Watanabe M, *et al.* Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction [J]. *Biol. Reprod.*, 2003, **68**: 1545—1553
- [13] 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**: 101—115
- [14] Galay-Burgos M, Gealy C, Navarro-Martín L, *et al.* Cloning of the promoter from the gonadal aromatase gene of the European sea bass and identification of single nucleotide polymorphisms [J]. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 2006, **145**: 47—53
- [15] Nocillado J N, Elizur A, Avitan A, *et al.* Cytochrome P450 aromatase in grey mullet: cDNA and promoter isolation; brain, pituitary and ovarian expression during puberty [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2006, **263**: 65—78
- [16] Tzchori I, Degani G, Hurvitz A, *et al.* Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2004, **138**: 271—280
- [17] Zhang Y, Zhang W, Zhang L, *et al.* Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression [J]. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2004, **92**: 39—50
- [18] Wang Y, Zhou L, Yao B, *et al.* Differential expression of thyroid-stimulating hormone beta subunit in gonads during sex reversal of orange-spotted and red-spotted grouper [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2004, **220**: 77—88
- [19] Li C J, Zhou L, Wang Y, *et al.* Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common  $\alpha$ , FSH $\beta$  and LH $\beta$  in groupers [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2005, **233**: 33—46
- [20] Yao B, Zhou L, Wang Y, *et al.* Differential expression and dynamic changes of SOX3 during gametogenesis and sex reversal in protogynous hermaphroditic fish [J]. *J. Exp. Zool. Part. A. Ecol. Genet. Physiol.*, 2007, **307**: 207—219
- [21] Xia W, Zhou L, Yao B, *et al.* Differential and spermatogenic cell-specific expression of DMRT1 during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007, **263**: 156—172
- [22] Zhou L, Li C J, Wang Y, *et al.* Identification and characterization of a MBP isoform specific to hypothalamus in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *J. Chem. Neuroanat.*, 2007, **34**: 47—59
- [23] Wang Y, Zhou L, Li Z, *et al.* Molecular cloning and expression characterization of ApoC-I in the orange-spotted grouper [J]. *Fish Physiol. Biochem.*, 2008, **34**: 339—348
- [24] Huang W, Zhou L, Li Z, *et al.* Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (*Cyp19a1a*) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2009, **307**: 224—236
- [25] Bulun S E, Sebastian S, Takayama K, *et al.* The human *Cyp19* (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters [J]. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2003, **86**: 219—224
- [26] Hinshelwood M M, Smith M E, Murry B A, *et al.* A 278 bp region just upstream of the human CYP19 (aromatase) gene mediates ovary-specific expression in transgenic mice [J]. *Endocrinology*, 2000, **141**: 2050—2053
- [27] Stocco C. Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation [J]. *Steroids*, 2008, **73**: 473—487
- [28] Meng A, Tang H, Ong B A, *et al.* Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2 [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**: 6267—6272
- [29] Long Q, Meng A, Wang H, *et al.* GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene [J]. *Development*, 1997, **124**: 4105—4111

## THE *EACYP19A1A* PROMOTER OF RED-SPOTTED GROUPER DIRECTS THE EXPRESSION OF GFP IN EARLY PRIMARY GONAD CELLS OF ZEBRAFISH

HUANG Wei<sup>1,2</sup>, ZHOU Li<sup>1</sup>, LIU Jing-Xia<sup>1</sup>, LI Zhi<sup>1</sup> and GUI Jian-Fang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

**Abstract:** Cytochrome P450 aromatase (P450arom) is the key enzyme responsible for estrogen biosynthesis in many species, and is believed to participate in the regulation of sexual differentiation of teleost fishes. However, the regulation mechanisms of aromatase genes remain unknown. In this study, we examined the role of *EaCyp19a1a* promoter in ovary specific expression of *EaCyp19a1a*. Firstly, nine 5'-deletion promoter region were obtained by PCR amplification using primers designed according to the accurate localizations of the special positive regulatory elements in the isolated 5'-flanking sequence, such as SOX5, CREB, SF-1, and so on. Then, these nine deletion mutants covering *EaCyp19a1a* promoter were constructed into the recombinant pEGFP-N1 (4.1 kb) vector, and examined their transcription activities. The construct of p*EaCyp19a1a*-EGFP7 vector was proved to possess the highest activity by transient transfection in COS-7 cells. Subsequently, the linearized p*EaCyp19a1a*-EGFP7 DNA was microinjected into fertilization eggs of zebrafish and the embryos were observed termly with fluorescent microscopy for the green fluorescent protein (GFP) expression. Specific green fluorescence was found to be restricted in the early primary gonad cells as early as zebrafish embryos at the hatching stage (about 48 hpf) and extend gradually along with the direction of germinal ridge development in larvae. These results indicated that some *cis*-acting elements were binding to *EaCyp19a1a* promoter and had the ability to regulate *EaCyp19a1a* gene expression specifically in the gonad. This research laid a foundation for further study on the role of aromatase in sex differentiation and sex inversion of fish.

**Key words:** Red-spotted grouper; Ovarian aromatase; Promoter; Green fluorescent protein; Zebrafish