

两种泥鳅芳香化酶基因的克隆与时空表达

杜启艳 南 平 燕帅国 常重杰

(河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007)

摘要: 鱼类的性别分化易受发育环境的影响。向性成熟的泥鳅和大鳞副泥鳅个体注射绒毛膜促性腺激素, 获得卵子和精子进行人工授精。把胚胎分别置于 20℃、25℃和 30℃条件下, 使其发育。经性腺检查发现随着温度的升高两种泥鳅中雄性个体所占的比例明显升高, 获得明显的偏雄比率群体。根据已知细胞色素 P450 芳香化酶 *CYP19b* 基因序列设计嵌套简并引物用巢式 PCR 扩增并克隆出了两种泥鳅的 *CYP19b* 的 DNA 片段。*MaCYP19b* 片段和 *Pd-CYP19b* 片段分别长 1337bp 和 1473bp。在此基础上用各自的特异引物克隆出两种泥鳅 *CYP19b* 的相应 cDNA 片段。通过基因组 DNA 和 cDNA 序列的比较证明两种泥鳅的 *CYP19b* 基因均包含三个内含子和四个外显子, 编码的蛋白质序列长 145 氨基酸残基。以 *GAPDH* 基因为对照, 分别对两种泥鳅成体组织和不同发育阶段的胚胎的 *CYP19b* 进行了半定量 RT-PCR 表达分析, 结果表明泥鳅 *CYP19b* 基因只在成体泥鳅卵巢、肾以及原肠胚和神经胚中表达。大鳞副泥鳅 *CYP19b* 基因在成体的脑、卵巢和肾以及神经胚和卵黄吸收期表达。这些结果为揭示细胞色素 P450 芳香化酶基因与环境性别决定机制的关系奠定了基础。

关键词: 泥鳅; 大鳞副泥鳅; 细胞色素 P450 芳香化酶; 性别分化

中图分类号: Q343 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)03-0276-08

在脊椎动物中, 胚胎发育的早期, 原始性腺是中性的, 具有分化为卵巢和精巢的双向潜能。一系列的环境因素诸如性激素处理、温度、pH、盐度和群体密度等都可以引起表型性别的改变^[1,2]。其中温度是研究最多的环境因素之一, 在鸟类、爬行类等动物中已经证实在性腺发育的某些时期温度可以影响性腺的分化途径^[3]。在这一过程中性腺内的类固醇激素起着关键的作用。细胞色素 P450 芳香化酶(Aromatase)是性腺性别分化中的关键酶, 其功能是催化雄激素转化为雌激素。因此芳香化酶基因(*CYP19*)从根本上控制着性腺性别分化的方向, 自然而然成为环境影响性别发育研究的焦点^[4-6]。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)是常见的鲤形目鳅科鱼类, 有一定的经济价值, 易取材、易饲养, 因此常常作为生物学和遗传学研究的实验材料。银染和 C 带研究证明大鳞副泥鳅为 ZZ/ZW 性别决定, 而泥鳅中未发现异形性染色体^[7]。为了比较分析近缘种在性

别分化和感受环境因素的差异, 作者考察了发育环境的温度对这两个物种胚胎性别分化的影响以及细胞色素 P450 芳香化酶 *CYP19* 基因的结构和时空表达特征。

1 材料与方法

1.1 材料 泥鳅、大鳞副泥鳅购于新乡市集贸市场。

1.2 发育温度对两种泥鳅性腺分化的影响 取健康性成熟个体作为亲本, 体长 12—18cm, 重 30—40g, 雌性 10 尾、雄性 20 尾, 分别注射鱼用绒毛膜促性腺激素(HCG): 800U/尾♀, 200U/尾♂。10—12h 后, 人工授精。把受精卵分别置于 20℃、25℃和 30℃下孵化, 用恒温培养箱控制温度。幼鱼体长大于 6cm 时活体解剖检测性腺确定性别。

1.3 基因组 DNA 的制备 断尾取血法提取基因组 DNA。具体步骤参照文献[8]进行。

1.4 *CYP19b* 基因的简并引物 PCR 和序列分析 根据从 Genbank 检索的硬骨鱼 *CYP19b* mRNA 全长、

收稿日期: 2004-11-02 修订日期: 2005-12-22

基金项目: 河南省高校杰出科研人才创新工程项目(No. 2001KYCX010); 河南省杰出青年科学基金(No. 0512001800); 河南省省级重点学科动物学资助

作者简介: 杜启艳(1964—), 女, 河南卫辉人, 硕士, 副教授, 从事动物遗传学研究

通讯作者: 常重杰(1965—), 男, 河南禹州人, 博士, 教授, E-mail: changzhongjie@tom.com

设计嵌套简并引物。PCR 反应体系 20 μ L: 包括 200 μ mol/L dNTP, 2.0mmol/L MgCl₂, 上游引物和下游引物 50pmol/L, TaqDNA 聚合酶 1U, 基因组 DNA 1 μ g。循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 40s, 58 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 共 35 个循环。循环结束后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10min。引物序列如下:

外侧: 上游引物: 5' GG (A/C) (A/T) C (A/C/G) GC (G/A/C) TG (C/T) AACTACT3'
下游引物: 5' (C/T) AG (C/T) AC (A/G) CACTG (C/T) CT (G/C) AC3'
内侧: 上游引物: 5' GCAT (T/C) G (T/C) (G/C/T) CG (G/A) GT (C/G/T) TGGAT3'
下游引物: 5' AT (T/G) AGAAC (C/T/A) G (T/C) (T/C) TGCCA (G/T) GT3'

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳、回收纯化后, 克隆入 pGEM-T 载体并转入 JM109 宿主菌中。挑选阳性克隆进行碱基序列测定。利用 Blast 软件包对克隆出的 *CYP19b* DNA 结构、碱基序列及其可能编码的氨基酸序列进行分析。

1.5 成体组织和胚胎发育不同时期 RNA 的提取
用 RNeasy Mini Kit RNA 提取试剂盒分别提取两种泥鳅成体的卵巢、脑、精巢、心、肝和肾等 6 种组织以及胚胎发育过程中的原肠胚、神经胚、尾芽期、孵出期和卵黄吸收期等 5 个时期的总 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。

1.6 *CYP19b* cDNA 的克隆 根据已获得的 *CYP19b* 基因的碱基序列, 设计特异引物。取成体卵巢 cDNA 为模板进行 RT-PCR。PCR 产物的克隆及测序分析同上。特异引物序列如下:

泥鳅 *CYP19b*: 上游引物: 5' GCATCGCGGGTCTGGAT 3'
下游引物: 5' ATGAGAACCGCTTGCCATGT3'

大鳞副泥鳅 *CYP19b*: 上游引物: 5' GCATCGCGCGGGTGTGGAT3'
下游引物: 5' ATGAGAACCGTTTGCCAGGT3'

1.7 成体组织和胚胎发育不同时期 *CYP19b* 基因的表达 利用 *CYP19b* 基因的特异引物, 对其进行成体组织和胚胎发育不同时期特异表达的半定量 RT-PCR 分析^[9]。每种组织取总 RNA 1 μ g 进行反转录反应。取 2 μ LcDNA 作为 RT-PCR 反应时的模板。参照基因为持家基因 *GAPDH*。

GAPDH 引物为: 上游引物: 5' GCCTCTTGCAAGACCAACTG3'
下游引物: 5' CGGAAGGCCATGCCTGTCAG3'

2 结果

2.1 发育温度对两种泥鳅性腺分化的影响

受精卵在实验控制条件下长至体长 6cm 以上(约 3 个月)时, 活体解剖检测性腺确定其性别。所得结果列入表 1。实验结果表明, 发育温度对两种泥鳅的性腺性别分化影响均显著。在 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 时, 泥鳅雄性个体所占比率分别为 58%、85% 和 86%; 而大鳞副泥鳅雄性个体所占比率分别为 53%、87% 和 87%。随着温度的升高雄性个体所占比例明显增加。图 1a 是大鳞副泥鳅初级卵母细胞时期卵巢的扫描电镜照片; 图 1b 为精子发生时期的精巢。

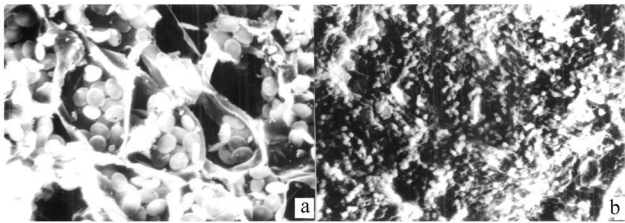


图 1 大鳞副泥鳅性腺的扫描电镜照片

Fig.1 The scanning electron microscopy photographs of gonads in *P. dabryanus*
a. 初级卵母细胞时期的卵巢 The ovary in primary oocytes stage; b. 精子发生时期的精巢 The testis in spermatogenesis stage

表 1 胚胎发育温度对泥鳅和大鳞副泥鳅性腺分化的影响

Tab. 1 The effect of temperature of embryogenesis on sex differentiation of gonad in *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus*

温度(℃) Temperature	胚胎数目 Embryo number	成活率(%) Survival rate		雌 性 Female		雄 性 Male		雄性比率(%) Male ratio	
		Ma	Pd	Ma	Pd	Ma	Pd	Ma	Pd
20	200	95	94	79	88	110	100	58	53
25	200	94	96	28	25	160	167	85	87
30	200	91	93	26	24	156	162	86	87

注: Ma. 泥鳅(*M. anguillicaudatus*); Pd. 大鳞副泥鳅(*P. dabryanus*)

2.2 *CYP19b* 基因的克隆和序列分析

用所设计的简并引物进行巢式 PCR, 在两种泥鳅基因组 DNA 扩增中均获得了一条约 1350bp 的条带(图 2)。测序分析表明, 上述两条扩增带的长度分别为 1337bp 和 1473bp。根据所得基因组 DNA 序列设计特异引物, 以卵巢 cDNA 为模板进行 RT-PCR 分析, 均扩增出一条约 430bp 的带(图 3)。用 DNAMAN

软件分析所得基因组 DNA 和 cDNA 碱基序列表明所克隆的泥鳅 *CYP19b* DNA 片段长 1337bp, 含有 4 个外显子和 3 个内含子, 其中外显子 1、2、3、4 分别长 49bp、155bp、177bp 和 58bp; 内含子 1、2、3 分别为 92bp、670bp 和 136bp; 编码蛋白质长 145 氨基酸残基。所克隆的大鳞副泥鳅 *CYP19b* DNA 片段长 1473bp, 也由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 其中外显子 1、2、3、4 的长度分别为 49bp、155bp、177bp 和 58bp; 内含子 1、2、3 的长度分别为 92bp、799bp 和 143bp; 编码蛋白质长 145 氨基酸残基。内含子的位置在二个基因中相同, 但序列差异较大。所有的内含子拼接点均遵循 GT-AG 规律。所克隆两个 *CYP19b* 基因的 DNA 序列、内含子的位点和序列以及其编码的氨基酸序列如图 4 和图 5 所示。

2.3 两种泥鳅 *CYP19b* 基因的同源性和聚类分析

利用Genbank 的 blast 软件包进行源性检索发现所克隆的泥鳅和大鳞副泥鳅片段均与罗非鱼的 *CYP19b* 相似性最高, 分别为 73.1%和 74.5%, 因此所克隆的基因应当为两种泥鳅中各自的 *CYP19b*, 根据 *CYP19b* 基因命名规则, 把它们分别命名为: *Ma-CYP19b* 和 *PdCYP19b*。其他几种有代表性物种与这两个基因的相似性列入表 2。在这 9 个物种中, 有 54 个氨基酸是高度保守的, 相似性为 75.25%, 其中, 泥鳅和大鳞副泥鳅之间的相似性最高, 达 95.9%。泥鳅与人和蛙的相似性最低, 是 58.6%。大鳞副泥鳅与人的相似性最低, 为 57.9%。图 6 为低据氨基酸序列相似性, 应用 DNAMAN 软件构建的系统进化树。

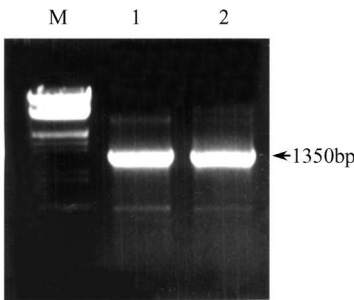


图 2 *CYP19b* 基因组 DNA 扩增

Fig. 2 The amplification results of genomic DNA of *CYP19b* M λ /EcoR I + Hind III; 1. *M. anguillicaudatus*; 2. *P. dabryanus*

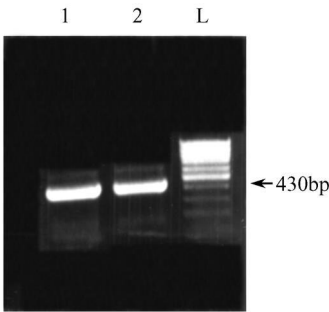


图 3 *CYP19b* cDNA 扩增

Fig. 3 The amplification results of cDNA of *CYP19b* L 100p DNA Ladder; 1. *M. anguillicaudatus*; 2. *P. dabryanus*

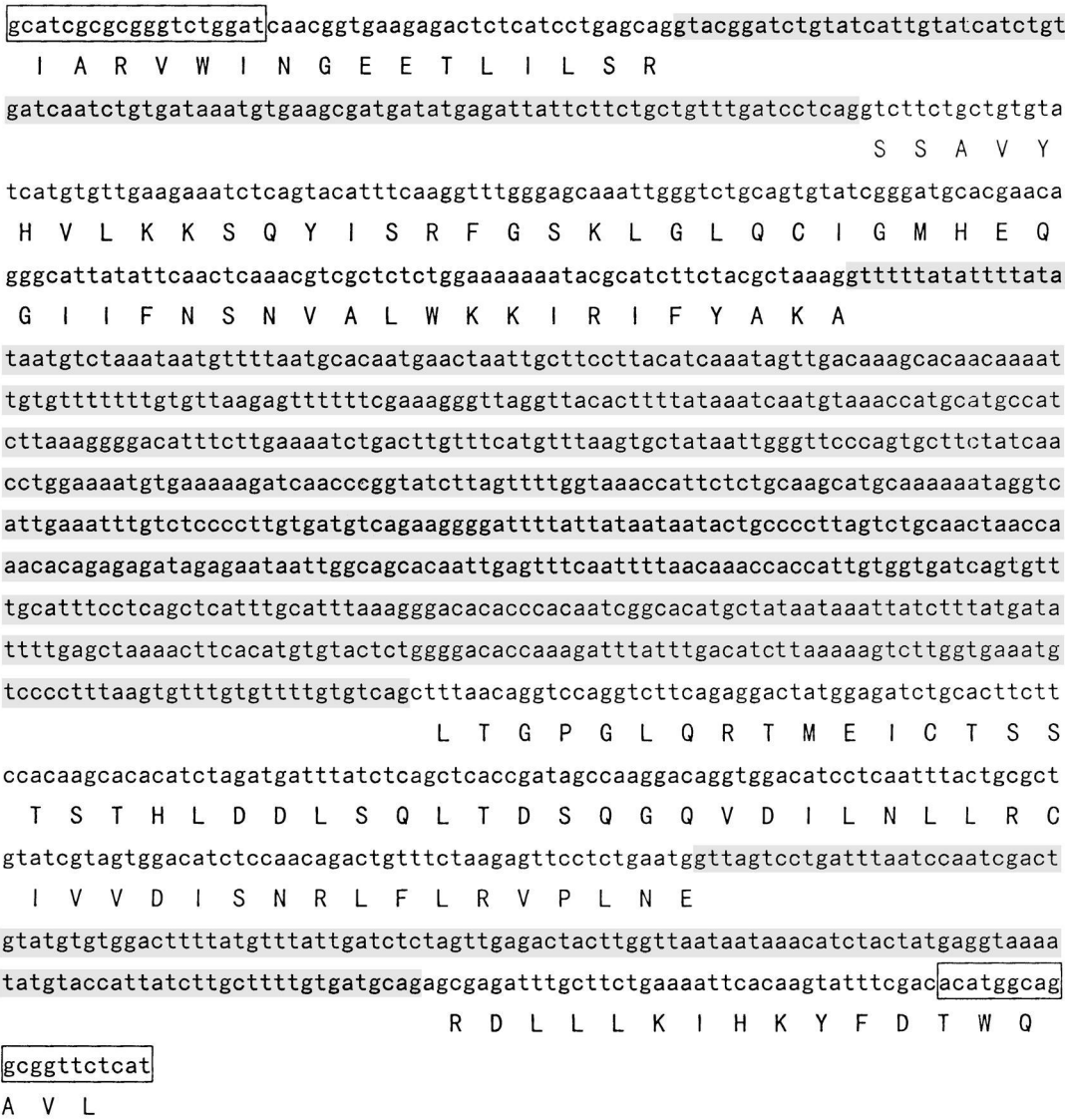


图 4 泥鳅 *CYP19b* DNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *M. anguillicaudatus CYP19b* gene

*** 引物位点 primer sites; ** 内含子序列 intron sequences

表 2 9 个物种的 *CYP19* 基因的氨基酸相似性

Tab. 2 Comparability of deduced amino acid sequences of <i>CYP19</i> gene from 9 species									
gene	<i>HsCYP19</i>	<i>GgCYP19</i>	<i>TsCYP19</i>	<i>RrCYP19</i>	<i>DrCYP19b</i>	<i>PdCYP19b</i>	<i>MaCYP19b</i>	<i>OmCYP19b</i>	<i>OnCYP19b</i>
<i>HsCYP19</i>	100%								
<i>GgCYP19</i>	76. 6%	100%							
<i>TsCYP19</i>	75. 9%	83. 4%	100%						
<i>RrCYP19</i>	63. 4%	68. 3%	66. 9%	100%					
<i>DrCYP19b</i>	55. 2%	55. 9%	52. 4%	53. 1%	100%				
<i>PdCYP19b</i>	57. 9%	60. 0%	59. 3%	59. 3%	72. 4%	100%			
<i>MaCYP19b</i>	58. 6%	60. 7%	60. 0%	58. 6%	70. 3%	95. 9%	100%		
<i>OmCYP19b</i>	57. 2%	58. 6%	55. 2%	56. 6%	77. 2%	73. 1%	71. 7%	100%	
<i>OnCYP19b</i>	55. 9%	58. 6%	55. 2%	53. 8%	71. 7%	74. 5%	73. 1%	80. 0%	100%

注: Hs: 人(*Homo sapiens*); Gg: 鸡(*Gallus gallus*); Ts: 龟(*Trachemys scripta*); Rr: 蛙(*Rana rugosa*); Dr: 斑马鱼(*Danio rerio*); Pd: 大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*); Ma: 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*); Om: 虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*); On: 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)

gcacgcgcgggtttggatcaacggtgaagagactctcatcctgagcaggtacggatctggatcatcgtattatctgt
I A R V W I N G E E T L I L S R
gatcaatctgtgataaatgtgaagcgatgatatgagattattcttctgctgtttgaacctcaggtcttctgctgtgta
S S A V Y
tcattgtttgaagagatctcagtacatctcaagggtttgggagtaaattgggtctgcagtgatcgggatgcataaaca
H V L K R S Q Y I S R F G S K L G L Q C I G M H E Q
gggcattatattcaactcaaacgtcgctctctggaaaaaatacgcaccttctacgctaaaggtttttatattttatg
G I I F N S N V A L W K K I R T F Y A K A
ctgtcctaatactgtaatgttttaatgcacaatgaactttgatcattacaatttaattgcttccttacaacaaaaagt
tgacgaagcacaacaacattgtgtttttatatttaatatatattgtgttttaagtgttttatgtgctaaagttttt
tcgaaagggttaggttacacatatataaatcaatgtaagacatatatgccatcttaaaggggacttatcatgaaaatc
tgacgactttcaggtttaagtgtctataattgggtcaccagtgcttctatcaacctagaaaatgtgaaagagatcaacc
tagtaacttagttttggtaaaccttctctcaagcatttaaaaaatagctcattgaaatttgtctcccccttgatgat
gtcagaaggggtctaatataataataactaccccttaactctgaaactatccaaacacacagagagagagagagagag
gtcagaaggggtctaatataataataactaccccttaactctgaaactatccaaacacacagagagagagagagagac
gtcagaaggggtctaatataataataactaccccttaactctgaaactatccaaacacacagagagagagagagagac
acacctacaaagtgtcaattttatcatgctataataaattatctatatgatattttgagctaaaacttcacatatgta
ctttggggacaccaacgattcatttgacatctttattaagtcgtgtaaaatgccccattaagtgtttgtgtgtttgt
cagctttaacaggtccaggtcttcagaggactttggagatctgcacttcttccacaagcacacatctagatgatttat
L T G P G L Q R T L E I C T S S T S T H L D D L S
ctcagttcaccgataaccagggacaggtggacatcctcaatttactgcgctgtatcgtagtagacatctccaacagac
Q F T D N Q G Q V D I L N L L R C I V V D I S N R L
tgtttctaagagttcctctgaatggtttagtcctgatttaaccaatctatgcgtggctcagactttaaaatgacttt
F L R V P L N E
tatgtttattgttcttttagttgtgaatatggttaataataaacatctattacggggtaaaattgacattatcttgctg
ttgtgatgcagagcgagatttgcttctgaaaattcacaagtatctcgacacatggcaaacggttctcat
R D L L L K I H K Y F D T W Q T V L

图 5 大鳞副泥鳅 *CYP19b* DNA 序列及其编码的氨基酸序列
Fig. 5 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *P. dabryanus CYP19b* gene
*** 引物位点 primer sites; ** 内含子序列 intron sequences

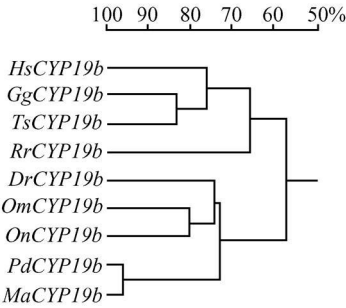


图 6 根据 9 个物种的 *CYP19* 基因的氨基酸序列构建的系统进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree based on *CYP19* deduced amino acids in 9 species
注: 表注同表 2 Annotation is the same as tab. 2

2.4 *CYP19b* 的时空特异性组织表达分析

以 *GAPDH* 为参照基因, 用半定量 RT-PCR 方法研究了两种泥鳅中成体不同组织和胚胎发育过程中不同时期的特异性表达。实验结果表明, 泥鳅 *CYP19b* 基因只在成体泥鳅卵巢和肾中有表达, 且前者表达量较高; 在胚胎发育的各个时期中, 该基因在原肠胚中表达量最高、其次是神经胚; 在尾芽期及其以后的孵出期和卵黄吸收期中均无表达。大鳞副泥鳅 *CYP19b* 基因在成体的脑中表达量最高, 其次是卵巢、肾, 在心 and 精巢中无表达; 在胚胎发育的不同时期, 该基因在神经胚和卵黄吸收期时有表达。

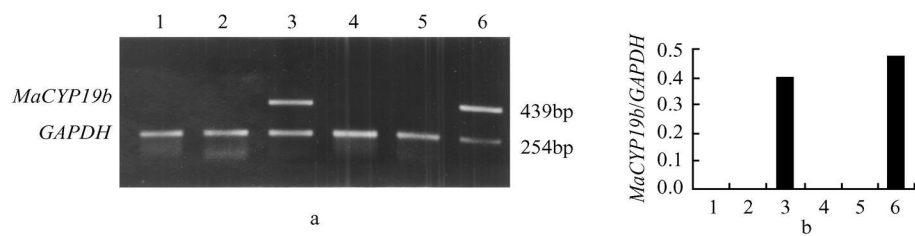


图 7 泥鳅 *CYP19b* 在成体组织中的表达

Fig. 7 The expression patterns of *CYP19b* in adult *M. anguillicaudatus*

a. *MaCYP19b* 和对照基因 *GAPDH* 的 RT-PCR 检测; b. 二者在成体组织中的表达量比值

a. RT-PCR of *MaCYP19b* and control *GAPDH*; b. the expression ratio of *MaCYP19b* and control *GAPDH* in several organs of adult *M. anguillicaudatus*

1. 精巢 testis; 2. 心 heart; 3. 肾 kidney; 4. 肝 liver; 5. 脑 brain; 6. 卵 ovary

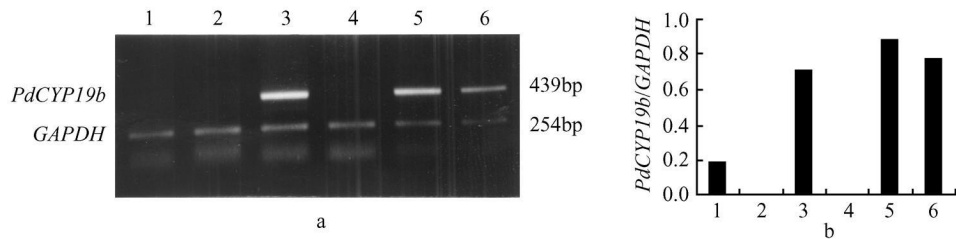


图 8 大鳞副泥鳅 *CYP19b* 在成体组织中的表达

Fig. 8 The expression patterns of *CYP19b* in adult *P. dabryanus*

a. *PdCYP19b* 和对照基因 *GAPDH* 的 RT-PCR 检测; b. 二者在成体组织中的表达量比值

a. RT-PCR of *PdCYP19b* and control *GAPDH*; b. the expression ratio of *PdCYP19b* and control *GAPDH* in several organs of adult *P. dabryanus*

1. 精巢 testis; 2. 心 heart; 3. 肾 kidney; 4. 肝 liver; 5. 脑 brain; 6. 卵 ovary

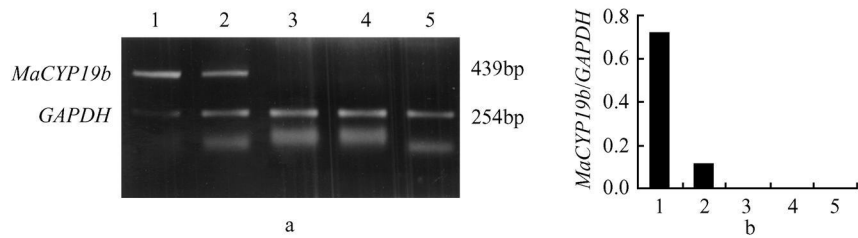


图 9 泥鳅 *CYP19b* 在胚胎不同时期的表达

Fig. 9 The expression of *CYP19b* in different stages of *M. anguillicaudatus* embryo

a. *MaCYP19b* 和对照基因 *GAPDH* 的 RT-PCR 检测; b. 二者在胚胎不同时期中的表达量比值

a. RT-PCR of *MaCYP19b* and control *GAPDH*; b. the expression ratio of *MaCYP19b* and control *GAPDH* in different stages of *M. anguillicaudatus* embryo

1. 原肠胚 gastrulae; 2. 神经胚 neurulae; 3. 尾芽期 tail bud formed; 4. 孵出期 hatched larva; 5. 卵黄吸收期 yolk-sac absorption phase

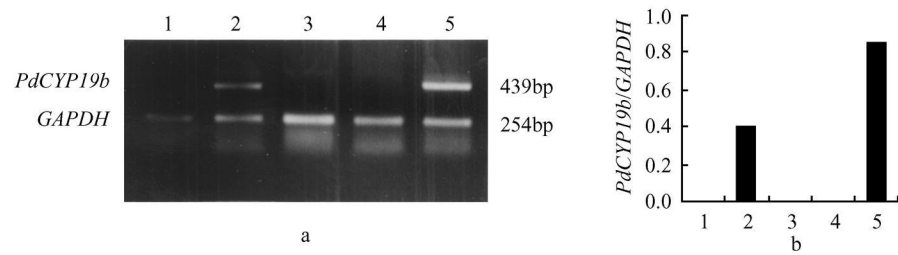


图 10 大鳞副泥鳅 *CYP19b* 在胚胎不同时期的表达

Fig. 10 The expression of *CYP19b* in different stages of *P. dabryanus* embryo

a. *PdCYP19b* 和对照基因 *GAPDH* 的 RT-PCR 检测; b. 二者在胚胎不同时期中的表达量比值

a. RT-PCR of *PdCYP19b* and control *GAPDH*; b. the expression ratio of *PdCYP19b* and control *GAPDH* in different stages of *P. dabryanus* embryo

1. 原肠胚 gastrulae; 2. 神经胚 neurulae; 3. 尾芽期 tail bud formed; 4. 孵出期 hatched larva; 5. 卵黄吸收期 yolk-sac absorption phase

3 讨论

两种泥鳅中,胚胎在较高温度(25—30℃)下发育均能得到明显的偏雄性群体,在20℃时则能形成性比接近1:1的种群。这说明温度对二者的性腺分化具有明显的影响。

在大多数鱼类中,性腺性别分化受环境因素和遗传型因素的共同作用。有时环境因素对鱼类性别分化具有决定性影响,即环境性别决定(Environmental Sex Determination, ESD)现象,此时后代的性别表型已经偏离了本身基因型的决定^[10]。近年来,ESD现象在鱼类中的报道日渐增多^[11-13]。在众多的ESD研究中,除了性激素外最主要的是有关温度对性别决定影响(Temperature-dependent sex determination, TSD)的研究,其次是种群密度、盐度、pH值、光周期等影响的研究^[2,3]。ESD在鱼类中的分布比以前预想的要广泛得多,现已在39种硬骨鱼、33种鲷鱼科鱼中发现了明显的ESD效应^[4]。但是环境因素只是影响性腺性别分化途径的选择,而并不改变其遗传组成。

在泥鳅和大鳞副泥鳅中,二者的 *CYP19b* 相似性很高,达95.9%,这与二者具有密切的进化关系是分不开的。成体组织中泥鳅 *CYP19b* 基因在卵巢中表达量最高,其次是肾;在大鳞副泥鳅中 *CYP19b* 在成体脑中表达量最高,其次是卵巢、肾,精巢中有微弱表达。在胚胎发育过程中,泥鳅 *CYP19b* 在原肠胚和神经胚表达;而大鳞副泥鳅 *CYP19b* 在神经胚和卵黄吸收期表达。鱼类的性别决定和分化的重要特征是多样性。在同一个属的不同种之间可能具有不同的性别决定类型。如鲈形目鲷鱼科的 *Oreochromis niloticus* 为XY型,而 *Oreochromis aureus* 则是ZW型^[14]。甚至同一物种的不同群体间性染色体类型也有差别^[15]。泥鳅与大鳞副泥鳅具有较近的亲缘关系,但二者在性染色体分化上具有很大差别,后者为ZW型,而前者则无性染色体分化^[7]。因此,作者推测两个物种间性别决定类型存在有一定的差异,正是这种差异引起它们的 *CYP19b* 基因的差异表达。

环境因子对性腺分化的影响的分子机制还未明了,目前比较流行的主要有三种假说,即H-Y抗原假说,性激素比率假说和下丘脑控制假说。现有的研究资料比较支持性激素比率假说和下丘脑控制假说^[16]。这两种假说认为鱼类性腺分化途径选择的原初信号来自于下丘脑或者与性激素形成有关的酶

的活性高低,雄激素/雌激素比值的高低最终决定了性腺分化的方向。芳香化酶具有催化睾酮转化为雌二醇的功能,从而成为这两种假说的关键点,即其低转化率生成雄性个体,高转化率生成雌性个体^[17]。芳香化酶基因(*CYP19*)及其上调或下调基因(如:*SOX9*、*AMH*、*DAX*、*WT*、*SF1*等)的表达情况则根本上控制着性腺性别分化的方向。温度可能通过影响芳香化酶基因或其调节基因的表达从而影响芳香化酶活性,因而最终影响了性腺性别分化^[18]。因此对 *CYP19* 基因进行详尽的研究有可能为揭示鱼类的性别决定和分化机制提供重要的实验依据。

参考文献:

- [1] Liu T M, Wu Q J, Ye Y Z. Studies on the artificial induced gynogenesis and the artificial sex reversal in loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2004, **28**(4): 445—447 刘同明, 吴清江, 叶玉珍. 人工诱导泥鳅雌核发育及人工转性的研究. 水生生物学报, 2004, **28**(4): 445—447
- [2] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, **208**(3-4): 191—364
- [3] Pauksts G L, Janzen F J. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design [J]. *The Quarterly review of biology*, 1991, **66**(2): 149—171
- [4] Dalla Valle L, Toffoli V, Vianello S, et al. Genomic organization of the *CYP19b* genes in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, **94**(1-3): 49—55
- [5] Choi J Y, Park J G, Jeong H B, et al. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatases in the protogynous wrasse *Halichoeres tenuispinus* [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2005, **141**(1): 49—59
- [6] Deng R P, Han Y L, Zhou X P, et al. A study on the differences of cytochrome P450 aromatase in female, male and imposex samples of *rhais clavigeras* [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2005, **29**(1): 110—112 邓瑞鹏, 韩雅莉, 周小鹏, 等. 雌雄及性畸变疣荔枝螺P450芳香化酶差异的研究. 水生生物学报, 2005, **29**(1): 110—112
- [7] Chang Z J, Yu Q X. The cytogenetical evidences of ZZ/ZW sex determination in *Paramisgurnus dabryanus* [J]. *Hereditas*, 1997, **19**(3): 17—19 常重杰, 余其兴. 大鳞副泥鳅 ZZ/ZW 型性别决定的细胞遗传学证据. 遗传, 1997, **19**(3): 17—19
- [8] Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A laboratory manual [M]. Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, 2001
- [9] 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**(3): 271—280
- [10] Hurley M A, Matthiessen P, Pickering A D. A model for environmental sex reversal in fish [J]. *J. Theor. Biol.*, 2004, **227**(2): 159—165
- [11] Tomoko N, Katsutoshi A, Taiga H, et al. Effect of temperature on sex ratios of normal and gynogenetic diploid loach [J]. *Fisheries Sci.*

- 1998, **64**(5): 753—758
- [12] Saillant E, Fostier A. Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. *J. Exp. Zool.*, 2002 **292**(5): 494—505
- [13] Tsai C L, Chang S L, Wang L H, *et al.* Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain[J]. *J. Neuroendocrinol.* 2003 **15**(1): 97—102
- [14] Carrasco L A P, Penman D J, Bromage N. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY, and YY genotypes[J]. *Aquaculture*. 1999, **173**(1-4), 207—218
- [15] Campos-Ramos R, Harvey S G, Masabanda J S, *et al.* Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis[J]. *Genetica*. 2001, **111**(1-3): 143—153
- [16] Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, *et al.* Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish[J]. *Gen Comp Endocrinol.* 2005 **142**(1-2): 60—66
- [17] Menuet A, Pellegrini E, Brion F, *et al.* Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene[J]. *J Comp Neurol.* 2005, **485**(4): 304—320
- [18] Chang X, Kobayashi T, Senthilkumar 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

MOLECULAR CLONING AND DEVELOPMENTAL EXPRESSION OF AROMATASES GENE IN TWO SPECIES OF LOACHES

DU Qi-Yan, NAN Ping, YAN Shuai-Guo and CHANG Zhong-Jie

(College of life sciences, Henan Normal University, Xinxing 453007)

Abstract: Fishes serve as a key link on the view of the vertebrate systematic evolution. Its sex determination is primitive and plastically compared with the other advanced vertebrates. Sexual differentiation of gonad is sensitive to environmental factors during a critical period of embryogenesis in some fish. The cytochrome P450 aromatase, which converts androgens to estrogens, is a key enzyme in sex differentiation of gonad. Therefore, the cytochrome P450 aromatase (*CYP19*) genes control the pathway of gonadal sex differentiation radically. *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* are common Cypriniformes fishes in China. They have a very close relationship and were classified to the same genus by some taxonomists. Heteromorphic sex chromosomes have been found only in *P. dabryanus*. To detect the effect of temperature to sex differentiation, Molecular cloning and developmental expression of aromatases gene in two species of loaches were studied. The zygotes of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* were incubated separately at 20 °C, 25 °C and 30 °C, until that the sex could be distinguished. The results show that high temperature (25—30 °C) can promote male-biased sex ration in both species loach. And with the temperature rising, the male sex rate gets higher. A pair of nested degenerate consensus primers was designed basing on the sequence of cytochrome P450 aromatase gene (*CYP19b*). Using nest-PCR method, the part genomic sequences of *CYP19b* in two species loach were amplified and cloned from genomic DNA. The DNA fragments of *MaCYP19b* and *PdCYP19b* are 1337bp and 1473bp respectively. The gene-specific primers were designed based on the genomic DNA sequence. Then using RT-PCR method, the corresponding cDNA of *CYP19b* in both species loach were amplified and cloned from total RNA that was isolated from ovary tissue. By comparing their genomic DNA sequence and cDNA sequence, we know that the cloned *CYP19b* of two species loach all include 3 introns and 4 exons and encode 145 amino acids. With the control gene of *GAPDH*, the expression patterns of the two genes were studied in adult tissues and different stages of embryo of two species loach separately with semi-quantitative RT-PCR. The results showed that *M. anguillicaudatus CYP19b* gene expressed only in ovary and kidney of adult tissues and gastrulae and neurula of embryo. The *P. dabryanus CYP19b* expressed in brain, ovary and kidney of adult tissues and neurula and yolk-sac absorption phase of embryo. Those results lay the foundations of clarifying the relation between cytochrome P450 aromatase gene and the mechanism of ESD to a certain extent.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; Cytochrome P450 aromatase; Sex differentiation