

文章编号: 1004 - 7271(2008)04 - 0411 - 07

奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶基因的克隆、 序列分析和结构预测

唐永凯¹, 李建林¹, 陈文华², 俞菊华¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部水生动物遗传育种和
养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090)

摘要:采用 RT-PCR 和 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法分离出奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶 (P450aromA) 的全序列, 得到 1784 bp 的全长 cDNA, 包括 38 bp 5' 非翻译区, 1566 bp 阅读框以及含 Poly(A) 信号 (AATAAA) 的 167 bp 3' 非翻译区 [不包括 Poly(A)]。阅读框共编码 521 个氨基酸, 计算的蛋白质分子量为 59 ku。同源性分析显示, 奥利亚罗非鱼 P450aromA 的氨基酸序列与其它鱼性腺 P450arom 具有 70% 以上的同源性, 与其它鱼脑 P450arom 为 60% 左右同源, 但芳香化酶高保守区包括 I-螺旋区, 芳香化酶特异保守区 II 和血红素结合区 III 和其它鱼芳香化酶的同源性分别高达 83% ~ 96%, 78% ~ 86% 和 85 ~ 100%。系统发育分析表明奥利亚罗非鱼 P450aromA 与鱼类性腺 P450arom 属于同一分支的。生物信息学分析显示: 奥利亚罗非鱼 P450A 基因编码的蛋白无信号肽, 无跨膜区域, 为非分泌蛋白, 同时含有多个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, N-糖激化位点, N-肉豆蔻酰化位点, 蛋白激酶 C 磷酸化位点。

关键词:奥利亚罗非鱼; 快速扩增 cDNA 末端; P450 芳香化酶

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Cloning, sequence and function analysis of P450arom from *Oreochromis aurea* ovary

TANG Yong-kai¹, LI Jian-lin¹, CHEN Wen-hua², YU Ju-hua¹

(1. Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture,
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The cDNA encoding ovarian P450arom (P450aromA) was isolated using RT-PCR and RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) methods. The cDNA was 1784 bp long with 38 bp 5' UTR, 167 bp 3' UTR [excluding poly(A)] and 1566 bp open reading frame, which encoded 521 amino acids with a calculated molecular weight of 59 ku. Comparisons of the deduced amino acid sequence to that of the ovarian P450arom in other fishes revealed above 70% identity, higher than the 60% identity in brain P450arom. But the percent of similarity in the regions of high homology, including the I-helix, an aromatase-specific conserved region II, and the heme-binding region III, were 83% - 96%, 78% - 86% and 85% - 100% respectively.

收稿日期: 2007-12-11

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2006029); 基本科研业务费专项资金 (2007JBFC03)

作者简介: 唐永凯 (1978 -), 男, 湖北黄冈人, 助理研究员, 主要从事鱼类遗传育种方面的研究。E-mail: tangyk@ffrc.cn

通讯作者: 俞菊华, E-mail: yujh@ffrc.cn

Phylogenetic analysis of the P450arom gene family indicated that the *Oreochromis aureus* P450aromA was clustered with fish P450aromA. The bio-information analysis revealed that the predicted protein had no signal peptide and notable transmembrane region. It contained many casein kinase II phosphorylation sites, N-myristoylation sites, Protein kinase C phosphorylation sites, N-glycosylation sites.

Key words: *Oreochromis aurea*; RACE; P450arom

芳香化酶是细胞色素 P450 家族中的一员,催化某些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,广泛存在于大多数脊椎动物的脑和垂体中^[1]。研究表明,芳香化酶可以影响哺乳动物中枢神经系统的功能和发育,调节神经内分泌和繁殖功能以及性行为^[2],并参与非哺乳动物性腺分化的调控^[3],而且还影响多种鱼类的性别分化和性别决定^[4]。罗非鱼属于鲈形目、鲷鱼科,罗非鱼属。由于它食性杂,生长快,耐低氧,抗病力强,现已成为世界性的养殖鱼类。但罗非鱼在养殖过程中出现雌雄生长差异明显,雄鱼生长快,个体大,雌鱼则生长慢、个体小,这就常常导致出池规格相差悬殊,从而降低了鱼产品的产量和质量,因此生产中常采用单性养殖,这也引发了人们对罗非鱼性别决定的研究。本研究分离了奥利亚罗非鱼卵巢中芳香化酶基因,对其系列进行了比较和分析,为今后进一步研究该基因在奥利亚罗非鱼性别形成、投喂性激素后该基因的表达、以及芳香化酶抑制剂对该基因表达的影响奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

奥利亚罗非鱼取自本实验场,组织为卵巢。

1.1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Promega; AMV、RNaseH、TdT 酶、Taq 酶、3'RACE 试剂盒购自 TakaRa; 胶回收试剂盒, pUCm-T 载体、连接酶购自上海生物工程有限公司,大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.1.3 仪器

PCR 仪为 Eppendorf Mastercycler Personal。

1.1.4 引物

用于实验的所有引物如下,其碱基位置对应我们登录 GenBank 序列 (GenBank accession number DQ279891)。P1, P2 是根据已知鱼类 P450arom 的保守序列,使用 CodeHop 原理^[5-6]设计的; P3, P4 是根据 P1, P2 分离的片段,使用软件 Primer5.0 设计的用于 3'RACE 的特异引物; P5, P6, P7 是根据 P1, P2 引物分离的片段,设计的用于 5'RACE 的引物。所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,其中 R = A + G, N = A + C + T + G。

P1 碱基 336-361 5'- CGGGTGTGGATCAACGGNGARGARAC -3';

P2 碱基 1383-1409 5'- CTTCATCATCACCATGGCTATGTGCTT -3';

P3 碱基 1072-1091 5'- TAG ACG CTG TTG TGG GTG AG - 3';

P4 碱基 1079-1098 5'- TGT TGT GGG TGA GAG ACA GC - 3';

P5 碱基 1098-1116 5'- TGG TGT CCG TGT TCT GTC G - 3';

P6 碱基 627-645 5'-GCG CAG CAA ATT GAG GAC - 3';

P7 碱基 566-585 5'- GTA TGG AGG AGA CGC AAA CA - 3';

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提

取奥利亚罗非鱼卵巢,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 28 s 和 18 s,检测 RNA 的完整性。

1.2.2 保守片段的分离

取 5 μg 从卵巢中抽提的总 RNA,以 OligodT-AP[5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)₁₆-3']为引物,根据 AMV 使用说明进行 RT-PCR 反应,然后用 10% RT 液,使用引物 P1 和 P2 扩增 P450aromA 1 000 bp 左右的保守序列。PCR 反应体系为 25 μL ,其中含 2.5 μL 10 \times PCR 反应缓冲液,2 $\mu\text{mol/L}$ 氯化镁,200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP,引物各 0.1 $\mu\text{mol/L}$,0.125U *Taq* 酶。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,然后 30 循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增液用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶,使用胶回收试剂盒回收,用 pUCm-T 载体克隆,送测序。根据这些序列设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物,扩增 P450arom 的 3'和 5'端序列。

1.2.3 3'RACE 方法

用 5 μg 总 RNA,以 oligodT-AP 为引物,根据 AMV 使用说明进行 RT 反应,然后用 RT 液的 10%,以 AP [5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3']和 3'RACE 特异引物 P3 进行 PCR,PCR 总体积 25 μL ,反应体系同上。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,然后 30 循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 作模板,用引物 AP 和 3'RACE 第 2 个特异引物 P4 进行再扩增,退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$,扩增液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,送测序。

1.2.4 5'RACE 方法

原理参照^[5-6],用 5 μg 总 RNA,以 P5 为引物,根据 AMV 使用说明进行 RT 反应,然后加 *RnaseH* 分解 mRNA,用 DNA 回收试剂盒回收 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 poly(A)尾的 cDNA。以此为模板,用 P6 及 oligodT-AP(同 3'RACE 引物)为引物,进行 PCR,反应体系组成同 3'RACE。PCR 液稀释 10 倍,取 2 μL 为模板,用 P7 及 AP 引物,进行 PCR,反应体系组成同上,PCR 液用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,送测序。

1.2.5 测序和序列分析

PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体后,送上海捷瑞生物工程有限公司测序。用 Dnastar, Clustalw, Mega 等软件分析奥利亚罗非鱼 P450aromA 序列,以及它与其它鱼类的系统发生。用 SignalP 和 PROSITE 在线工具预测蛋白质的结构。

2 结果

2.1 奥利亚罗非鱼 P450aromA 的分离

取奥利亚罗非鱼卵巢的 RNA,进行 RT-PCR,用引物 P1 和 P2 扩增得到 1000 bp 左右的条带(图 1-1),经克隆后测序,得到 1074 bp 片段,根据所得序列设计合成用于 3'RACE 引物 P3, P4。使用 RT 液用引物 P3, AP 扩增。然后,使用该 PCR 液稀释液作模板用引物 P4, AP 扩增,得到 800 bp 左右的条带(图 1-2),克隆后测序得到奥利亚罗非鱼 P450aromA 3'端序列。按照 5'RACE 实验程序,最后使用引物 P7, AP 扩增获得 500 bp 左右条带(图 1-3),克隆后测序后获得奥利亚罗非鱼卵巢 P450arom 5'端序列。

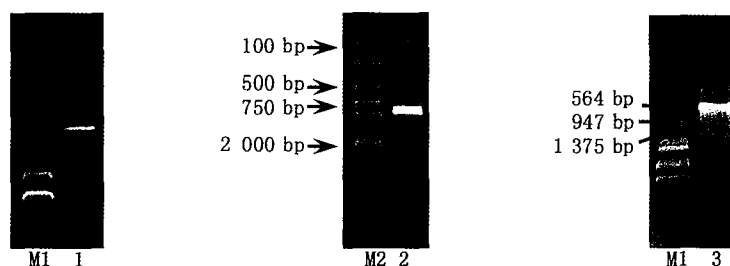


图 1 PCR 扩增产物图

Fig. 1 The result of PCR amplification

M1: λ DNA/EcoR I + Hind III marker; M2: DL2000

1: 引物 P1, P2 扩增条带; 2: 3'RACE 引物 P4, AP 扩增条带; 3: 5'RACE 引物 P7, AP 扩增条带

使用 DNASTar 软件把上述序列拼接得到奥利亚罗非鱼 P450aromA 全序列 (GenBank accession number: DQ279891), 该 cDNA 全长 1784 bp, 其中阅读框 1566 bp, 翻译 521 个氨基酸, 3' 非翻译区 167 bp [不包括 poly(A)], 5' 非翻译区 38 bp (图 2)。预测的蛋白质分子量为 59 ku, 理论等电点 (pI) 为 7.47, 含疏水氨基酸 191 个, 极性氨基酸 149 个, 酸性氨基酸 48 个, 碱性氨基酸 48 个。其编码氨基酸序列为:

```

1 CGA GTC TGT GCA GGC TGT TCT ACA TCA TCA CCC TTC TCA TGG ATC TGA TCT CTG CTT GTG      60
1                                                                                      M D L I S A C E      8
61 AAC AGG CGA TGA GTC CTG TAG GCT TAG ACG CCG TGG TGG CAG ATC TGT CTG TGA CCT CAA    120
9  Q A M S P V G L D A V V A D L S V T S N      28
121 ATG CCA TCC AAT CGC ATG GGA TAT CAA TGG CAA CCA GAA CGC TGA TAC TGC TCG TCT GTC     180
29  A I Q S H G I S M A T R T L I L L V C L      48
181 TGC TGT TGG TTG CCT GGA GTC ACA CGG ACA AGA AAA TTG TGC CAG GTC CTT CTT TCT GTT     240
49  L L V A W S H T D K K I V P G P S F C L      68
241 TGG GTT TGG GCC CAC TTC TGT CAT ATC TGA GAT TTA TCT GGA CTG GCA TAG GCA CAG CCA     300
69  G L G P L L S Y L R F I W T G I G T A S      88
301 GCA ACT ACT ACA ATA ACA AGT ATG GAG ACA TTG TTA GAG TCT GGA TCA ACG GAG AAG AAA     360
89  N Y Y N N K Y G D I V R V W I N G E E T     108
361 CGC TCA TAC TAA GCA GAT CTT CAG CAG TGC ACC ATG TGC TGA AGA ACG GAA ACT ATA CTT     420
109 L I L S R S S A V H H V L K N G N Y T S     128
421 CAC GTT TTG GGA GCA TCC AGG GAC TCA GCT GCC TCG GCA TGA ACG AGA GAG GCA TCA TAT     480
129 R F G S I Q G L S C L G M N E R G I I F     148
481 TCA ACA ACA ACG TAA CTC TGT GGA AAA AGA TAC GCA CCT ATT TTG CTA AAG CTC TGA CAG     540
149 N N N V T L W K K I R T Y F A K A L T G     168
541 GCC CAA ATT TGC AGC AGA CCG TGG ATG TTT GCG TCT CCT CCA TAC AGG CTC ACC TGG ACC     600
169 P N L Q Q T V D V C V S S I Q A H L D H     188
601 ACC TGG ACA GCC TGG GAC ACG TTG ATG TCC TCA ATT TGC TGC GCT GCA CCG TGC TGG ACA     660
189 L D S L G H V D V L N L L R C T V L D I     208
661 TCT CTA ACA GAC TCT TCC TGA ACG TAC CTC TCA ATG AGA AAG AGC TGA TGC TGA AGA TTC     720
209 S N R L F L N V P L N E K E L M L K I Q     228
721 AAA AGT ATT TTC ACA CAT GGC AGG ATG TGC TTA TCA AAC CTG ACA TCT ACT TCA AGT TCG     780
229 K Y F H T W Q D V L I K P D I Y F K F G     248
781 GCT GGA TTC ACC ACA GGC ACA AGA CAG CAA CCC AGG AGT TAC AAG ATG CCA TTA AAC GTC     840
249 W I H H R H K T A T Q E L Q D A I K R L     268
841 TTG TAG ATC AAA AGA GGA AAA ATA TGG AGC AGG CAG ATA AGC TGG ACA ACA TCA ACT TCA     900
269 V D Q K R K N M E Q A D K L D N I N F T     288
901 CGG CAG AGC TCA TAT TTG CAC AAA ACC ACG GTG AGC TGT CTG CTG AGA ATG TGA CGC AGT     960
289 A E L I F A Q N H G E L S A E N V T Q C     308
961 GCG CGC TGG AGA TGG TGA TCG CAG CTC CGG ACA CTC TGT CCC TCA GTC TCT TCT TCA TGC     1020
309 A L I E M V I A A P D T L S L S L F F M L     328
1021 TTC TGC TCC TCA AAC AAA ACC CGT ACG TGG AGC CGC AGC TGC TAC AGG AGA TAG ACG CTG     1080
329 L L L K Q N P Y V E P Q L L Q E I D A V     348
1081 TTG TGG GTG AGA GAC AGC TTC AGA ACC AGG ATC TTC ACA AGC TGC AGG TGA TGG AGA GCT     1140
349 V G E R Q L Q N Q D L H K L Q V M E S F     368
1141 TCA TCT ACG AAT GCT TGC GCT TCC ACC CAG TGG TGG GCT TCA CCA TGC GTC GAG CCC TGT     1200
369 I Y E C L R F H P V V G F T M R R A L S     388
1201 CTG ATG ACA TCA TAG AAG GCT ACA GGA TCT CGA AGG GCA CAA ACA TCA TTC TGA ACA CAG     1260
389 IID D I I E G Y R I S K G T N I I L N T G     408
1261 GCC GAA TGC ACC GCA CCG AGT TTT TCC TCA AAG GCA ATC AAT TTA ATC TGG AAC ACT TTG     1320
409 R M H R T E F F L K G N Q F N L E H F E     428
1321 AAA ACA ATG TTC CTC GGC GCT ACT TTC AGC CGT TCG GTT CAG GCC CTC GCG CAT GCA TTG     1380
429 N N V P R R Y F Q IIIP F G S G P R A C I G     448
1381 GCA AGC ACA TGG CCA TGG TGA TGA TGA AAT CCA TTT TGG TGA CAC TGC TGT CTC AGT ACT     1440
449 K H M A M V M M K S I L V T L L S Q Y S     468

```

```

1441 CTG TTT GTA CTC ACG AGG GCC CGA TCC TGG ACT GCC TCC CAC AAA CCA ACA ACC TTT CCC 1500
469 V C T H E G P I L D C L P Q T N N L S Q 488
150 1AGC AGC CTG TAG AGC ACC AGC AGG CGG AGA CTG AAC ATC TCC ACA TGA GGT TCT TAC CCA 1560
489 Q P V E H Q Q A E T E H L H M R F L P R 508
1561 GGC AGG GAA GCA GCT GTC AAA CCC TCA AAG ACC CGA ACC TTT AGC TGT ACC TGT ACT TTT 1620
509 Q G S S C Q T L K D P N L *
1621 GTA TAC TTA ATT TGT ATA ATC TTA TAA CGA CAC ACC TAG CCT TTA TAT TTT GAT ATA CGC 1680
1681 AAA GAT TGT ATT TGT ACT CAA ACT GTA TGC ATG ATG TGA AAT GTA CAT TTA AAC CTG CTA 1740
1741 ACA CTG AAT TAA ATG TAA ATT ATT GTG TCA CAA AAA AAA AAA AA 1784

```

图2 奥利亚罗非鱼 P450aromA cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of the *Oreochromis aurea* P450aromA

* 表示终止子,3'端 Poly(A)信号(AATAAA)用斜体表示。蛋白质序列中高度保守的片段用下划线指示,并用罗马字表示,其中 I-螺旋区(I),芳香化酶特异的保守区(II),血红素结合区(III)。

摘录 GenBank 中已登录的一些鱼类的芳香化酶氨基酸系列:斑马鱼/B(AAK00642),金鱼/B(AAB39408),虹鳟/B(CAC84574),尼罗罗非鱼/B(AAG18458),鲈/B(AAM95455),青鳉/B(AAP83449),鲢/B(AAP83132),斜带石斑鱼/B(AAR97602),斜带石斑鱼/A(AAR97601),斑马鱼/A(AAK00643),金鱼/A(AAC14013),虹鳟/A(1806325A),尼罗罗非鱼/A(AAB16814),奥利亚罗非鱼/A(DQ279891),鲈/A(CAC43178),青鳉/A(Q92087),鲢/A(AAP83133),黑鲷/A(AAP23236)。使用 Clustalw 软件对以上各种鱼的 P450arom 的氨基酸系列进行比较分析,发现奥利亚罗非鱼 P450aromA 的氨基酸序列与其它鱼性腺 P450arom 的氨基酸序列具有 70% 以上的同源性,与其它鱼脑 P450arom 为 60% 左右同源,但芳香化酶高保守区(包括 I-螺旋区,芳香化酶特异保守区 II 和血红素结合区 III)和其它鱼芳香化酶相比同源性分别高达 83%~96%, 78%~86% 和 85%~100%。根据同源性构建的系统树(图3)表明奥利亚罗非鱼卵巢 P450arom 与其它鱼类性腺 P450arom 属于同一分支。

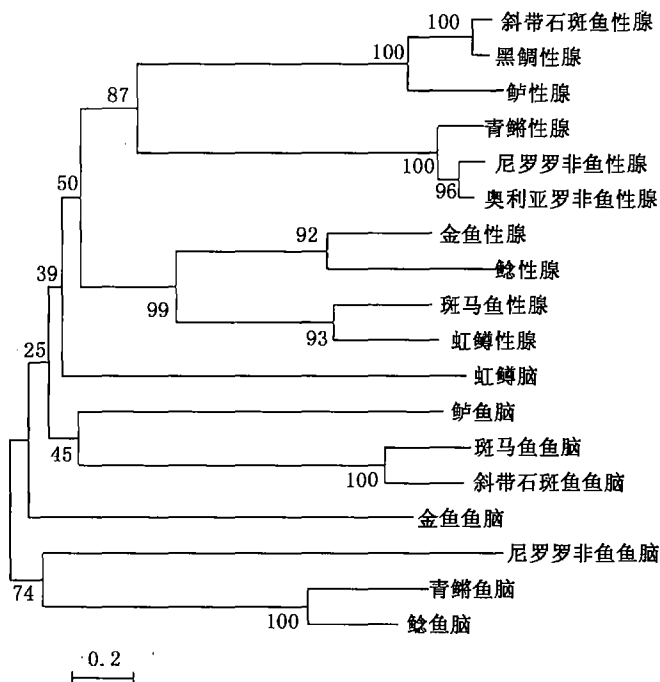


图3 鱼类性腺芳香化酶(P450aromA)和脑芳香化酶(P450aromB)进化树

Fig. 3 Phlogenetic analysis of fish P450arom proteins

2.2 蛋白功能预测

利用 SignalP 对奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶蛋白序列在线搜索,寻找信号肽序列,发现该蛋白存在信号肽的概率极低,不存在信号肽酶切位点,是一种非分泌蛋白。跨膜性分析显示(TMhMM),奥利亚罗非鱼芳香化酶无明显跨膜区域。利用 PROSITE 在线工具分析该蛋白结构域,发现其含有铁血红素和半胱氨酸结构域,符合芳香化酶的结构特征。同时它还有潜在的 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(5-8aa,54-57aa,204-207aa,233-236aa,515-518aa),5 个 N-糖激化位点(125-128aa,151-154aa,286-289aa,304-307aa,485-488aa),7 个 N-肉豆蔻酰化位点(34-39aa,83-88aa,85-90aa,124-129aa,131-136aa,145-150aa,419-424aa),6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(56-58aa,127-129aa,209-211,382-384,407-409aa,515-517aa)。

3 讨论

芳香化酶由 CYP19 编码,几乎存在于所有脊椎动物的脑和性腺中。目前在许多脊椎动物中已克隆出该基因,如哺乳动物^[7],鸟类^[8],啮齿动物^[9],鱼类^[10-12]等。在硬骨鱼类中,芳香化酶至少由 2 种 CYP19 基因编码,即性腺芳香化酶(P450aromA)和脑芳香化酶(450aromB),它们以明显不同的形式分别存在于脑和性腺中^[13],并且鱼类脑中的表达量较高,是哺乳动物兔、鼠、人等相应部位的 100~1000 倍^[14]。本文从奥利亚罗非鱼卵巢中分离到了 1784 bp 的 P450arom cDNA,共编码 521 个氨基酸。通过同源性及系统发育分析可知,它具有芳香化酶共有的保守区域 I-螺旋区,芳香化酶特异保守区 II 和血红素结合区 III,蛋白结构预测出它也含有铁血红素和半胱氨酸结构域,所以它属于鱼类性腺芳香化酶,同时也说明了芳香化酶在进化中具有较高的保守性。

在真核生物中,作为一种膜结合蛋白,P450 分布在细胞的内质网膜和线粒体内膜上,二者上的膜蛋白的合成定位机制截然不同。定位于内膜系统上的细胞色素 P450 依赖于内质网上的蛋白质翻译偶联易位系统(translation-coupled translocation system),通过 N 端信号肽、信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)及内质网膜上的停泊蛋白-信号识别颗粒受体之间的作用,将合成该蛋白的核糖体连接到内质网膜上,进行共翻译转运。而定位于线粒体内膜上的 P450 则在细胞质中完成翻译,然后通过线粒体膜上的蛋白质移位酶进入线粒体,这一过程需要分子伴侣 Hsp70 (heat shock protein 70) 的协助^[15]。决定细胞色素 P450 的定位于线粒体上还是内膜系统中,主要依赖于 N 端信号序列。通过信号肽识别以及氨基酸结构分析,奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶蛋白以亲水性区域为主,无信号肽识别序列,为非分泌型蛋白,可将其定位于线粒体内膜上。对潜在的修饰位点分析,发现该蛋白含有多个糖激化位点、N 肉豆蔻酰化位点和蛋白激酶 C 磷酸化位点,这些位点可能是芳香化酶蛋白完成其生理功能的重要组成部分。随着生物信息学的飞速发展,其预测可信度得到了很大的提高,这给我们课题的开展和研究的深入提供了很好的指导意义和宝贵的参考价值。

参考文献:

- [1] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, *et al.* Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis[J]. *Endocr Rev*, 1994, 15:342-254.
- [2] Lephart E D. A review of brain aromatase cytochrome P450[J]. *Brain Res Reviews*, 1996, 22:1-26.
- [3] Pifferrer F, Zanuy S, Carrillo M, *et al.* Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal functional males[J]. *J Exp Zool*, 1994, 270:255-262.
- [4] Nakamura M, Kobayashi T, Chang X, *et al.* Gonadal sex differentiation in teleost fish[J]. *J Exp Zool*, 1998, 281:362-372.
- [5] 陈受宜,朱立煌(译). PCR 聚合酶链式反应[M]. 北京:科学出版社,1994:25-35.
- [6] 俞菊华,吴婷婷,杨弘,等. RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定[J]. *水产学报*, 2003, 27(6):533-539.
- [7] 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.
- [8] Halm S, Kwon J Y, Rand-Weaver M, *et al.* Cloning and gene expression of P450 17alpha-hydroxylase, 17,20-lyase cDNA in the gonads

- and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 130(3):256–266.
- [9] Serdar E B, Siby S, Kazuto T, *et al.* Cloning and characterization of the rat cytochrome P450 4F5 (CYP4F5) gene [J]. *Gene*, 2002, 297:179–187.
- [10] Leea Y M, Williamsb T D, Junga S O, *et al.* cDNA cloning and expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*[J]. *Mar Pollut Bull*, 2005, 51:769–775.
- [11] Adriana R M, Yan Y L, Ruth A B, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a, during gonad development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5:655–667.
- [12] 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.
- [13] Callard G V, Tchoudakova A V, Kishida M, *et al.* Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish[J]. *J Ster Biochem & Mol Bio*, 2001, 79:305–314.
- [14] 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.
- [15] Robin M A, Sauvage I, Grandperret T, *et al.* Ethanol increases mitochondrial cytochrome P450 2E1 in mouse liver and rat hepatocytes [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(30):6895–6902.