

沼泽型水牛 *CYP19A1* 基因克隆、序列分析及组织表达研究

苏 节, 刘庆友, 朱 鹏, 沈开元, 石德顺*, 崔奎青*

(广西大学, 亚热带生物资源保护利用国家重点实验室, 南宁 530004)

摘 要: 旨在对沼泽型水牛 *CYP19A1* 基因进行克隆、生物信息学分析及对其在水牛组织的表达规律进行系统的探索。根据 GenBank 已公布的牛 *CYP19A1* 基因序列, 设计特异性引物应用 RT-PCR 方法扩增克隆获得目的基因片段; 应用生物信息学方法, 分析和预测了水牛 *CYP19A1* 的理化性质、蛋白质二级及三级结构; 应用 QRT-PCR 技术对 *CYP19A1* 在水牛组织的表达进行了差异分析。测序结果表明: 水牛 *CYP19A1* 基因的编码区全长 1 512 bp, 共编码 503 个氨基酸。多重序列比较分析显示水牛 *CYP19A1* 核苷酸序列与牛、绵羊、猪、人、马相应序列相似性分别为 99%、98%、91%、86% 和 84%, 结合系统进化树分析结果推测, *CYP19A1* 基因在不同物种以及进化的过程中具有高度保守性。定量分析结果显示: 水牛 *CYP19A1* 在水牛垂体、大脑、肝脏、骨骼、卵巢、肌肉和心脏组织具有不同程度的表达, 其中垂体和大脑表达量最高, 骨骼和卵巢次之, 肌肉表达最低。本研究成功地克隆了沼泽型水牛 *CYP19A1* 基因并研究了其在不同水牛组织中的表达规律, 为阐明其在水牛性腺中参与的激素合成转化规律等研究奠定了理论基础。

关键词: 水牛; *CYP19A1*; 克隆分析; 表达模式

中图分类号: S823.8⁺3.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)04-0514-08

Cloning and Sequence Analysis of Swamp Buffalo *CYP19A1* Gene and Determination of Its Expression Pattern in Different Tissues

SU Jie, LIU Qing-you, ZHU Peng, SHEN Kai-yuan, SHI De-shun*, CUI Kui-qing*

(State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources,

Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: In order to clone, sequence bioinformatic analysis and expression pattern determination of *CYP19A1* gene in swamp buffalo, a pair of special primers were designed according to released sequence of bovine *CYP19A1* in GenBank. The *CYP19A1* gene was amplified by RT-PCR, its gene sequence character and protein structure was systemically analysed by bioinformatics techniques. The expression patterns of buffalo *CYP19A1* in different tissues were also assayed with qRT-PCR. The results showed that the cloned 1 587 bp buffalo *CYP19A1* gene fragment including a 1 512 bp whole length CDS (coded 503 amino acids). The sequence multialigned results showed that buffalo *CYP19A1* gene shared 99%, 98%, 91%, 86% and 84% of similar nucleotide sequence with that of *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa* and *Homo sapiens*, respectively. In addition, the expression pattern analysis results showed that buffalo *CYP19A1* expressed in all the seven detected tissues, with the most abundant expression in brain and pituitary gland, followed by skeleton and ovary, the minimal expression in muscle was observed. The cloning and analysis of *CYP19A1* gene provided an important foundation for further study regulation mechanism of

收稿日期: 2012-09-21

基金项目: 国家转基因重大专项(2011ZX08007-003); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA100607); 国家自然科学基金项目(31160457)

作者简介: 苏 节(1987-), 男, 广西柳州人, 硕士生, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: 198964717@qq.com

* 通信作者: 石德顺, 研究员, 博导, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn; 崔奎青, 副教授, 硕导, E-mail: kqcui@126.com

CYP19A1 gene in buffalo in the future.

Key words: buffalo; CYP19A1; cloning and analysis; expression pattern

芳香化酶,又称“雌激素合成酶”,是一种在雌激素生物合成过程中的关键酶,它是细胞色素 P450 超家族中的一员,是 CYP19A1 基因编码的产物^[1]。芳香化酶在类固醇生成过程中参与了多种催化反应,特别是在雄激素经过芳香化,转变成雌激素过程中起着重要的作用^[2]。研究表明 CYP19A1 mRNA 的表达与卵泡发育有关,若 CYP19A1 的表达量降低或抑制芳香化酶活性都可能直接影响雄烯二酮和睾酮转化成雌酮和雌二醇^[3]。因此,CYP19A1 基因在动物生长、发育和生殖过程中具有重要的调控作用,特别在卵泡生长发育、成熟至排卵中性激素的合成转换过程中都发挥关键作用。

水牛属季节性发情动物,产后卵巢长时间不活动,卵泡闭锁率高,发情表征不明显,繁殖力普遍较低(各地调查的繁殖率 30%~60%)。广西本地水牛情期人工授精受胎率仅为 30%~40%,而本地黄牛人工授精受胎率为 70%~80%。中国沼泽型水牛产犊间隔 450 d 以上,长于印度河流型水牛的 375.5 d,妊娠期比河流型水牛长 7~14 d^[4]。沼泽型水牛繁殖力低不仅仅是中国一地的现象,越南、泰国、菲律宾等东南亚诸国的水牛亦是如此^[5]。而水牛繁殖性状影响的相关基因研究相关报道较少,因此亟待应用动物分子克隆和基因表达生物技术研究阐释影响水牛繁殖性状的重要功能基因,以期建立水牛的分子育种和基因改良技术,提高水牛的繁殖力。作为性激素合成转换的主要基因 CYP19A1 已

在人^[6]、小鼠^[7]、马^[8]和猪^[9]等动物中先后成功克隆,但是在水牛中仍未见报道。本研究拟克隆水牛 CYP19A1 基因序列并对其进行生物信息学分析及组织表达规律分析,为阐明其在水牛性腺中参与的激素合成转化规律等研究中提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用水牛选自广西南宁市鲁班路屠宰场,采集其新鲜的皮肤、肾脏、肉、大脑、肝脏和卵巢等 6 种组织(来自同一头 11 月龄雌性沼泽型水牛)。

1.2 主要试剂

质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司。Reverse Transcriptase(AMV)、La Taq 酶、限制性内切酶、Oligo d(T)₁₈ 和 pMD-18T Vector 均购自大连 TaKaRa 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;Fast Start Universal SYBR Green Master(ROX)购自于 Roche 公司;DH5 α 感受态细胞为本实验室自制。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 上已知的牛 CYP19A1 基因序列(登录号:NM_174305.1),利用 Oligo 6.0 软件分别设计了 1 对 CYP19A1 特异性引物、定量引物以及 β -actin 内参引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成,其序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers for experiment

目的基因 Target gene	引物(5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Fragment size
CYP19A1	F: GGACTTATCACAACCAGGACT	1 587
	R: CAGGGACTGACCAAACCTTCT	
CYP19A1 (QRT-PCR)	F: TTCCCAAAGCCTAATGAGT	122
	R: GTGACCAGGATGACCTTCA	
β actin	F: ACCGCAAATGCTTCTAGG	182
	R: ATCCAACCGACTGCTGTC	

1.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

Trizol 法提取水牛皮肤、肉、肾脏、大脑、肝脏和卵巢

等 6 种组织总 RNA。RNA 提取后,通过分光光度计及电泳检测其纯度和完整性,并置于 -80℃ 下保

存备用。按照 M-MLV 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行反转录反应, 反转录体系 20 μL : 2 μg total RNA, 1 μL DNase I, 1.3 μL DNase I Buffer, 1 μL ED-TA, 1 μL dNTP, 2 μL 随机引物, 4 μL 5 \times M-MLV buffer, 0.5 μL RNase Inhibitor, 0.3 μL M-MLV 逆转录酶, 5 μL RNase Free H₂O; 反应条件: 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 90 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

1.3.3 RT-PCR 反应 以反转录产物做模版进行 PCR 反应。反应体系 20 μL : 模版 1 μL , 上下游引物各 0.5 μL , 2 μL 10 \times LA Buffer, 1 μL 25 nmol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.3 μL LA *Taq*, 14.7 μL ddH₂O。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.4 PCR 产物的连接与测序 PCR 产物纯化回收后, 将目的片段与克隆载体 pMD-18T 连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 再将菌液涂布在含有氨苄青霉素 (Amp⁺) 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。通过挑取单克隆在含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基中培养, 然后 cracking 鉴定并用天根生物技术有限公司普通质粒小提试剂盒提取重组质粒, 将含有目的片段的重组质粒送上海生物工程有限公司进行测序。

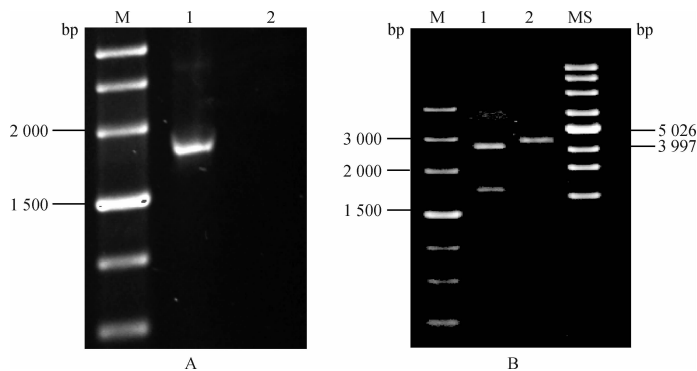
1.3.5 目的片段的测序及生物信息学分析 测定的结果用 BLAST 程序进行同源序列比对; 分子进化树构建用 MEGA 5.0 软件进行构建; 用 EX-PASY (<http://www.expasy.org>) 服务器分析水牛 CYP19A1 编码蛋白氨基酸组成、理论分子质量和等电点; 利用 SMART 程序 ([delberg.de\) 预测 CYP19A1 编码蛋白氨基酸序列可能存在的蛋白结构域; 利用 SignIP 程序 \(\[www.cbs.dtu.dk/services/SignalP\]\(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP\)\) 进行蛋白质 N-末端信号肽预测; 通过 Softberry 服务器分析了 CYP19A1 蛋白的亚细胞定位; 利用 DNASTar 中的 Protean 程序预测了 CYP19A1 蛋白质二级结构; 通过 I-TASSER 程序 \(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>\) 分析预测了 CYP19A1 蛋白质三级结构。](http://smart.embl-hei-</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.3.6 QRT-PCR 反应为 20 μL 体系, 1 μL RT-PCR 产物 10 μL 2 \times FastStart Universal SYBR Green Master (ROX), 0.6 μL PrimerF/R (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 8.4 μL RNase Free H₂O。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。试验对每个样品进行 4 次重复, 运用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 的方法计算目的基因的相对表达量。用内参 β actin 对其进行标准化, 将水牛肝脏组织作为对照, 其他为检测样品。

2 结果

2.1 水牛 CYP19A1 基因的克隆与鉴定

通过 Trizol 法纯化获得水牛组织的总 RNA, 电泳结果可以观察到清晰的 18S 和 28S 条带清晰 (图略), 说明获得了高质量的 RNA, 可用于下一步的反转录试验。应用设计的特异性扩增引物, 经 RT-PCR 扩增获得 1 587 bp 左右特异性条带 (图 1A)。将 PCR 产物连接克隆到 pMD-18T 载体, 选取阳性重组质粒采用 *Eco*R I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定, 经过电泳检测获得约 2 700 (pMD-18T) 和 1 587 bp 的条带 (图 1B), 结果与预期目的片段大小吻合。



A: M. DNA 相对分子质量标准 marker III; 1. 样品 RT-PCR 扩增产物; 2. 阴性对照。B: M. DNA 相对分子质量标准 marker III; 1. 克隆酶切产物; 2. 重组质粒; MS. Supercoil DNA ladder

A: M. Marker III; 1. RT-PCR product; 2. Negative control, B: M. Marker III; 1. Double-digestion products; 2. Recombinant plasmid; MS. Supercoil DNA ladder

图 1 水牛 CYP19A1 基因扩增与酶切鉴定

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product and digestion product of buffalo CYP19A1

2.2 水牛 CYP19A1 基因序列分析

对获得的阳性重组质粒进行测序分析,获得了 1 587 bp 序列片段包含全长的水牛 CYP19A1 基因 CDS 和部分 UTR 区序列。应用 NCBI 的 ORF

Finder 程序分析,水牛 CYP19A1 编码区为 1 512 bp,编码 503 个氨基酸(图 2)。经 Blast 软件相似性比对分析显示,水牛 CYP19A1 核酸序列与牛(NM_174305.1)、绵羊(NM_001123000.1)、猪(U37311.1)、

GGACTTATCACACCAGGACTTTAAATTAATCTCCCTGAGATCAAGTAAACAAA

1 ATCCTTTGGAGTGTGAACCCAAGGCATTACAATGTCACCAGCATGGTGTCCGAAGTTGTGCCTATTGCTAGCATTGCAGTCTGCTG

1 M L L E V L N P R H Y N V T S M V S E V V P I A S I A V L L

91 CTCACATGGATTTCTCTCTGGTTGGAAATATGAGGACACATCTCAATACCAGGTCCCAGCTACTTCTGGGAATGGGCCCTCAT

31 L T G F L L L V W N Y E D T S S I P G P S Y F L G I G P L I

181 TCCCAGTGCAGTTCTCTGTGGATCGGCAGTGCCTGCAATTACTACAACAAGATGTATGGAGAATTCATGAGAGTCTGGGTATGT

61 S H C R F L W M G I G S A C N Y Y N K M Y G E F M R V W V C

271 GGAGAGAAACCCCTATTATTAGCAAGTCCCAAGTATGTTCATGTAATGAAGCACAGTCACTACATATCCCGATTTGGCAGTAAACTT

91 G E E T L I I S K S S S M F H V M K H S H Y I S R F G S K L

361 GGGTTCGAATTCATCGGCATGCACGAGAAAGGCATCATATTAACAATAATCCAGCACTCTGAAAGTTGTTCGACCTTCTTTACAAAA

121 G L Q F I G M H E K G I I F N N N P A L W K V V R P F F T K

451 GCTTTGTCCGCCCTTGGCTGGCATGTGACCATCTGTGCTGATFCCATCACCAGGCATCTGGACAGGCTGGAGAGGTCTGCAAT

151 A L S G P G L V R M V T I C A D S I T R H L D R L E E V C N

541 GACTTGGCTATGTGGACGTGTGACCTCATGCGGGCATCATGCTGGACACCTCTAACGTGCTCTCTCTGGGGATCCCTTGGATGAA

181 D L G Y V D V L T L M R R I M L D T S N V L F L G I P L D E

631 AGTCCATCTGGTTAAATCCAGGGGTATTTTGATGCATGGCAAGCTCTCTCTCAAAACAGACATCTCTTTAAGATTTCTTGGCTG

211 S A I V V K I Q G Y F D A W Q A L L L K P D I F F K I S W L

721 TGCAGAAAGTATGAAAGTCTGTCAAGGACTTGAAAGATGCCATGGAAATTCATAGAGAAAAAGACAGGATTCMAATGACAGAG

241 C R K Y E K S V K D L K D A M E I L I E E K R H R I S I A E

811 AAGCTGGAAAGACAGCATAGATTTCCGCACTGAGTTGATTTTTGCTGAGAAACGTTGGTGAACCTACAAGAGAGAATGTAAACCGATGATA

271 K L E D S I D F A T E L I F A E K R G E L T R E N V N Q C I

901 TTGGAAATGCTGATCCGAGCGCCAGACACATGCTGTGTTCTGTGTTCTCATGCTGTTTCTCATTTGCAAGCATCCCAGGTGAAGAG

301 L E M L I A A P D T M S V S V F F M L F L I A K H P Q V E E

991 GCAATAATGAGGGAAATCCAGACTGTTGTTGGTGAAGAGACATAAGGATGATGATATGCAAAAGCTAAAAGTGGTGGAAAACCTTATT

331 A I M R E I Q T V V G E R D I R I D D M Q K L K V V E N F I

1 081 AATGAGAGCATCGGTACCAGCCCTTTGTGACCTGGTCATGCCCAAAGCCTTAGAGGATGACGTATCGATGCTACCCCGTAAAAAG

361 N E S M R Y Q P V V D L V M R K A L E D D V I D G Y P V K K

1 171 GGGACTACAATATCTGTAATCTTGGAGAATGCATAGACTCGAGTTTTTCCAAAGCCTAATGAGTTTACTCTTGGAAAACCTTTGCCAAG

391 G T N I I L N L G R M H R L E F F P K P N E F T L E N F A K

1 261 AATGTTCTTACAGGTACTTTCAGCCATTGGCTTTGGCCCCCGGCTGTGCGGAAAGTACATCGCCATGGTGATGAAGATCATT

421 N V P Y R Y F Q P F G F G P R A C A G K Y I A M V M M K V I

1 351 CTGGTCAACCTTCTGAGACGCTTCCAGGTGCAGACTTTCAGAATCGGTGGTTGAGAAGATGCAGAAGAAAAATGACTTATCTTGTGAT

451 L V T L L R R F H V Q T L Q D R C V E K M Q K K N D L S L H

1 441 CCAGATGAGACCAGCAGCGGCTAGAAATGATTTTCAACCCAAAGAAATTCAGACAAGTGCCTCGAGTGTAAAGAAGTTGGTCAAGTCC

481 P D E T S D R L E M I F T P R N S D K C L E C *

图 2 水牛 CYP19A1 基因序列及预测编码的氨基酸序列
Fig. 2 Buffalo CYP19A1 nucleotide and amino acid sequences

人(BC107785.1)和马(NM_001081805.1)相应序列相似性分别为 99%、98%、91%、86% 和 84%，表明 CYP19A1 基因在不同哺乳动物中具有较高的进化保守性。

2.3 水牛 CYP19A1 基因系统进化树构建

选择水牛 CYP19A1 氨基酸序列与牛(NM_001075748.1)、猪(NM_001244660.1)、马(XM_001497809.3)、大熊猫(XM_002918419.1)、犬(XM_859339.2)、家兔(XM_002711616.1)、黑猩猩(XM_511035.3)、人(NM_006565.3)、中国仓鼠(XM_

003508553.1)、小鼠(NM_181322.3)、大鼠(NM_031824.1)、鸡(NM_205332.4)和非洲爪蟾(NM_00108641.1)的序列,进行了多重序列比较(图 3),结果显示 CYP19A1 基因在不同物种中具有较高的保守性。应用 MEGA5.0 软件,用 NJ 法构建系统进化树(图 4),结果显示哺乳动物聚成一支,两栖类非洲爪蟾和鸟类的鸡在进化树的外围,进化树的形态与分类学保持了较高的一致性。在哺乳动物中,反刍类水牛与牛聚为一支,与猪的遗传距离相对较近。



图 3 不同物种间 CYP19A1 氨基酸的多重序列比对

Fig. 3 Multiple alignment and analysis of deduced amino acid sequences of CYP19A1

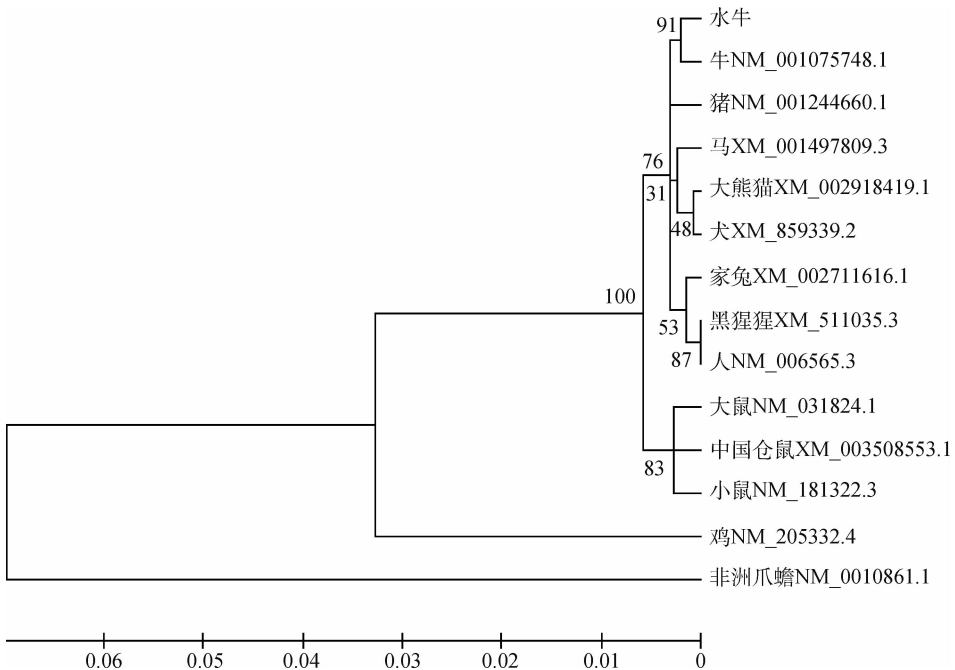


图 4 水牛 CYP19A1 蛋白质进化树分析(NJ 法)

Fig. 4 Phylogenetic tree of the deduced amino acid of CYP19A1

2.4 水牛 CYP19A1 蛋白特性的生物信息分析

通过 EXPASY 服务器分析 CYP19A1 基因的

氨基酸组成,其中亮氨酸含量最高(11%),其次是缬氨酸(8%),色氨酸含量最低(1%)。CYP19A1 蛋白

理论分子质量为 58.06 ku,等电点为 6.87,为弱酸性蛋白。应用 SignalP 程序对 CYP19A1 蛋白 N-末端信号肽进行预测,结果显示,水牛 CYP19A1 蛋白 N-末端不存在信号肽。通过 Softberry 服务器分析预测了水牛 CYP19A1 蛋白的亚细胞定位情况,结果表明,水牛 CYP19A1 蛋白位于质膜。进一步用 SMART 程序(<http://smart.embl-heidelberg.de>)预测了 CYP19A1 基因的蛋白结构域,结果显示水牛 CYP19A1 具有 1 个转膜结构域和 1 个芳香酶特有的结构域 Pfam p450(图 5)。



图 5 水牛 CYP19A1 蛋白质结构域示意图

Fig. 5 The protein domain of buffalo CYP19A1

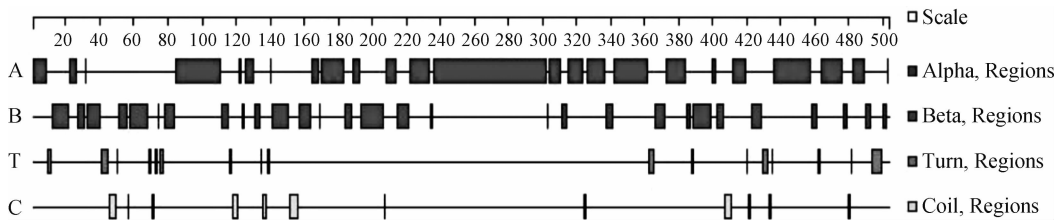
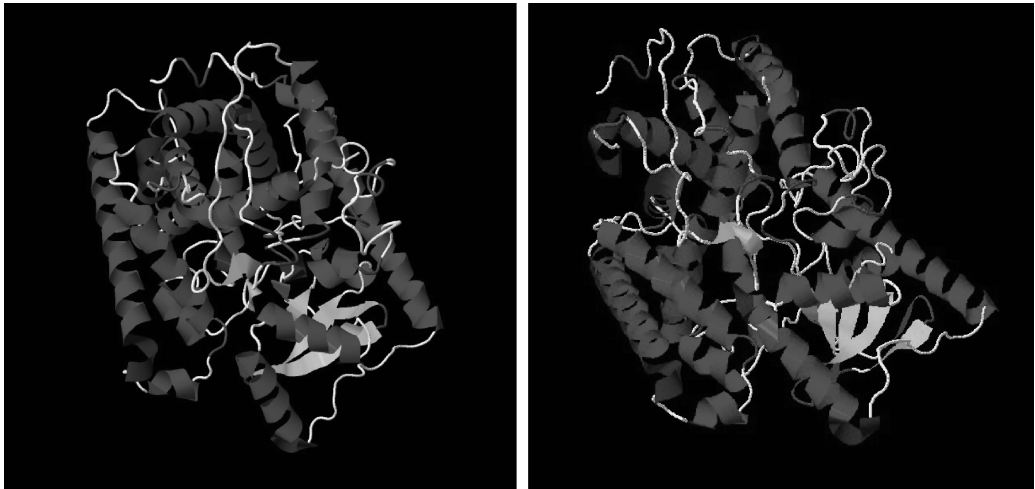


图 6 水牛 CYP19A1 蛋白质二级结构图

Fig. 6 The secondary structure of buffalo CYP19A1 protein



左侧为水牛;右侧为人类

The left side is buffalo; For human right

图 7 水牛 CYP19A1 蛋白质三级结构图

Fig. 7 The tertiary structure of buffalo CYP19A1 protein

随后又对水牛 CYP19A1 蛋白二级结构和高级结构进行了预测分析。用 DNASTar 中 Protean 程序进行蛋白质的二级结构分析,结果表明,水牛 CYP19A1 蛋白二级结构包含 24 个 α -螺旋,30 个 β -折叠,17 个 T-转角,12 个无规则卷曲(图 6)。利用 I-TASSER 程序模拟了水牛和人 CYP19A1 蛋白质高级结构,水牛 CYP19A1 蛋白高级结构与 PBD 蛋白高级结构数据库中的人的 CYP19A1 蛋白结构相似性很高(图 7)。

2.5 水牛不同组织中 CYP19A1 基因表达分析

以 β -actin 为内参基因,应用 QRT-PCR 技术对

水牛 CYP19A1 基因在大脑、卵巢、肝脏、心脏、骨骼、肌肉和垂体组织中的表达情况进行了研究,结果

表明水牛 *CYP19A1* 在水牛垂体、大脑、肝脏、骨骼、卵巢、肌肉及心脏具有不同程度的表达,其中垂体表达量最高(相对表达量 14.72),骨骼(6.67)、大脑(5.94)和卵巢(4.32)次之,肌肉(0.36)表达最低(图 8)。

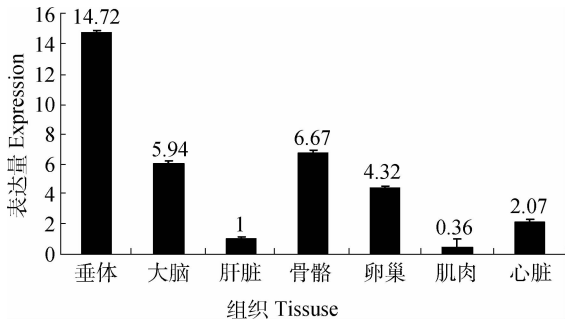


图 8 *CYP19A1* mRNA 在水牛不同组织中的表达情况
Fig. 8 The expression of buffalo *CYP19A1* mRNA in different tissues

3 讨论

CYP19A1 基因属于细胞色素 P450 超家族基因中的一员,编码芳香化酶蛋白 P450。芳香化酶蛋白 P450 是细胞色素酶的一种,由血红蛋白和黄体蛋白组成,是催化雄激素转化为雌激素的限速酶和关键酶,它可以使雄激素的 A 环芳香化,脱去 19 位上的碳原子,并将羰基转化为羟基,把雄烯二酮、睾酮分别转化为雌酮和雌二醇^[10]。本研究首次克隆得到了沼泽型水牛 *CYP19A1* 基因 cDNA 共 1 587 bp,其中编码序列 1 512 bp,理论编码 503 个氨基酸。运用多重比对和构建进化树分析后可知 *CYP19A1* 在不同哺乳动物中具有较高的保守性;通过生物信息学的方法对 *CYP19A1* 蛋白的二级结构和高级结构进行分析预测,结果表明水牛 *CYP19A1* 蛋白具有一个穿膜结构和芳香化酶特有的结构域,并且三级结构与 PDB 数据库中现有的人的 *CYP19A1* 蛋白结构相似。

芳香化酶存在于多个组织中,如性腺^[11]、大脑^[12]、垂体^[13]、脂肪组织^[14]、胎盘^[15]、骨骼^[16]及子宫内膜^[17]。芳香化酶之所以存在于多种组织中,是因为 *CYP19A1* 基因具有多达 10 个组织特异性启动子,均位于 *CYP19A1* 基因外显子 II,翻译起始部位上游的特定区域。尽管各部位芳香化酶启动子上游的调节基因不同,但编码开放阅读框架的序列总是一定的,所以无论剪切的方式如何,所表达的蛋白都是一样的。水牛是我国南方重要的肉、乳和役兼

用畜种资源^[18-19],而水牛繁殖性状影响的相关基因研究相关报道较少,本研究应用 QRT-PCR 技术检测了 *CYP19A1* 基因在水牛不同组织中的 mRNA 的表达情况,结果显示 *CYP19A1* 在不同组织间的表达存在较大的差异。其中垂体表达量最高,骨骼、大脑和卵巢次之,肌肉表达最低。由于是在 *CYP19A1* 的编码区设计的定量引物,而该基因具有大脑、骨骼、性腺特异性启动子,因此 *CYP19A1* 在大脑、骨骼、卵巢中特异性表达,这与前人的研究相吻合^[20-21]。本研究克隆了水牛 *CYP19A1* 基因及分析了其组织表达规律,为研究 *CYP19A1* 在水牛卵泡发生、生殖调控和类固醇代谢等方面的作用提供了一定理论基础。

参考文献:

- [1] GHOSH D, GRISWOLD J, ERMAN M, et al. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase[J]. *Nature*, 2009, 457: 219-223.
- [2] BALTHAZART J, BALL G F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase) [J]. *Trend Neurosci*, 1998, 21: 243-249.
- [3] ECHTERNKAMP S, AAD P, EBORN D, et al. Increased abundance of aromatase and follicle stimulating hormone receptor mRNA and decreased insulin-like growth factor-2 receptor mRNA in small ovarian follicles of cattle selected for twin births[J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(7): 2193-2200.
- [4] 李忠权. 水牛繁殖季节及情期适时输精的研究[J]. *广西畜牧兽医*, 2007, 23(3): 116-117.
- [5] 章纯熙. 水牛产业资源的利用和开发[J]. *中国食物与营养*, 2006, 3: 19-21.
- [6] SHOZU M, AKASOFU K, HARADA T, et al. A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, 72: 560-566.
- [7] SCOTT N J A, CAMERON V, RAUDSEPP S, et al. Generation and characterization of a mouse model of the metabolic syndrome: apolipoprotein E and aromatase double knockout mice[J]. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*, 2012, 302: E576-E584.
- [8] CHOI I, SIMMEN R, SIMMEN F. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatase complementary deoxyribonucleic acid from periimplantation porcine and equine blastocysts identifies multiple novel 5'-untranslated exons expressed in embryos, endometri-

- um, and placenta[J]. *Endocrinology*, 1996, 137: 1457-1467.
- [9] KO Y, CHOI I, GREEN M L, et al. Transient expression of the cytochrome P450 aromatase gene in elongating porcine blastocysts is correlated with uterine insulin-like growth factor levels during periimplantation development[J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 37: 1-11.
- [10] HONG Y, CHEN S. Aromatase, estrone sulfatase, and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Structure-function studies and inhibitor development[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 340: 120-126.
- [11] NORBERT W, WASIMA A, RICHARD I. Differentiation-specific action of orphan nuclear receptor NR5A1 (SF-1): transcriptional regulation in luteinizing bovine theca cells[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4: 64.
- [12] AZCOITIA I, YAGUE J G, GARCIA-SEGURA L M. Estradiol synthesis within the human brain[J]. *Neuroscience*, 2011, 191: 139-147.
- [13] CARRETERO J, BLANCO E, RUBIO M, et al. Gonadal steroids regulate aromatase P450 expression in the rat pituitary[J]. *Eur J Anat*, 2011, 15: 98-106.
- [14] BADER M I, REITMAYER C, ARNDT C, et al. Age dependency of estrogen responsiveness in the uterus and adipose tissue of aromatase-knockout (ArKO) mice[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011, 128(1-2): 29-37.
- [15] HAURI-HOHL A, MEYER-BÖNI M, LANG-MURITANO M, et al. Aromatase deficiency owing to a functional variant in the placenta promoter and a novel missense mutation in the CYP19A1 gene[J]. *Clin Endocrinol*, 2011, 75: 39-43.
- [16] GENNARI L, MERLOTTI D, NUTI R. Aromatase activity and bone loss[J]. *Adv Clin Chem*, 2011, 54: 129-164.
- [17] MAIA J R H, HADDAD C, CASOY J. Correlation between aromatase expression in the eutopic endometrium of symptomatic patients and the presence of endometriosis[J]. *Int J Women's Health*, 2012, 4: 61.
- [18] 卢永芳, 蔡治华, 李 强, 等. 江淮水牛线粒体 D-loop 区和 *Cytb* 基因遗传多态性及系统发育分析[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(5): 701-707.
- [19] 刘 伟, 苗永旺, 李大林, 等. 利用微卫星 DNA 标记分析槟榔江水牛群体遗传特征[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(11): 1543-1549.
- [20] NAKAGAWA T, IWABUCHI J. Brain-specific promoter/exon I, f of the *cyp19a1* (aromatase) gene in *Xenopus laevis* [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 132(3-5): 247-255.
- [21] ZHAO H, INNES J, BROOKS D C. A novel promoter controls *Cyp19a1* gene expression in mouse adipose tissue[J]. *Reprod Biol Endocr*, 2009, 7: 37.

(编辑 程金华)